

红景天对宫颈癌 HeLa 细胞增殖的抑制作用

★ 马宁 苑春莉 (广东省深圳市福田区人民医院 深圳 518033)

★ 盛辉 (吉林大学第一医院 长春 130021)

★ 王仁术 (吉林省通化市中医院 通化 134001)

摘要:目的:研究红景天(Rhodiola)对体外培养宫颈癌 HeLa 细胞的直接抑制作用及可能机制。方法:通过液体培养法、克隆形成法、³H-TdR 掺入法与 MTT 比色法分别检测给药后肿瘤细胞的增殖情况、克隆形成率、DNA 合成抑制率及生存率来探讨红景天的抑瘤效应。结果:与红景天共育 24 小时的细胞伸展不良,胞体回缩,贴附型细胞不贴壁,胞质粗糙,有大量颗粒状物堆积,而且药物浓度越大,形态学改变越明显。给药组肿瘤细胞增殖缓慢甚至停滞,出现细胞脱落、胞浆内颗粒状物堆积等形态学改变,克隆形成数明显少于对照组,cpm 和 A 值明显降低,即 ³H-TdR 掺入率减少,生存率下降。结论:红景天对体外培养宫颈癌 HeLa 细胞具有直接杀伤作用。

关键词:红景天;药理;DNA 合成;宫颈癌

中图分类号:R 285.5 **文献标识码:**A

红景天有效成分是从红景天根中提取的,目前已分离出 40 多种成分,主要有效成分为红景天苷^[1]。研究表明红景天具有抗缺氧^[2]、抗氧化^[3]、抗寒冷、抗疲劳、抗微波辐射、抗毒、双向调节作用^[4]及增强脑干网状系统的兴奋性及抗肿瘤等作用。本实验证实了红景天对体外培养宫颈癌细胞增殖的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 红景天(3 年生)由吉林大学基础医学院药物化学研究室分离提纯。人宫颈癌细胞系 HeLa 由吉林省肿瘤医院毒理研究室惠赠,为贴附型细胞。噻唑蓝(MTT, Sigma),十二烷基磺酸钠(SDS)和二甲基亚砷(DMSO,国产分析纯)购自北京华美生物工程公司。³H-TdR 购自北京原子能研究所,放射强度为 1 mCi。

1.2 红景天对宫颈癌细胞增殖抑制实验 生长良好的贴附型宫颈癌 HeLa 细胞用 0.25%胰蛋白酶消化后调成 1×10^5 个/mL 细胞悬液,取 0.2 mL 细胞悬液分别加入含有 0.5、1.0 和 2.0 mg/mL 红景天、20%胎牛血清(FCS)及 RPMI-1640 液的 24 孔细胞培养板中,每孔总量为 2 mL,接种细胞约 200 个,试验设 3 复孔,并设对照孔。37℃、5%CO₂ 饱和湿度下培养,第 5 天计数克隆数目,以大于或等于 20 个的细胞群为 1 个克隆。

1.3 动态检测红景天对肿瘤细胞增殖的影响 取 0.2 mL 1×10^5 /mL 的宫颈癌细胞悬液加入 24 孔细胞培养板,依次加入 RPMI-1640、10% FCS 及 3 种浓度红景天,每种浓度设 3 个复孔,并设对照孔,孵育,分别于给药后第 1~4 天每日分别取 1 孔台盼蓝染色计数。

1.4 红景天对肿瘤细胞 DNA 合成抑制作用 取 0.1 mL 密度为 1×10^5 /mL 宫颈癌细胞悬液,加入 96 孔细胞培养板,依次加入 RPMI-1640、10% FCS 及 3 种浓度红景天,每种浓度设 3 个复孔,并设对照孔,孵育 70 小时后,每孔分别加入 0.4 μCi ³H-TdR,继续孵育 2 小时,收集细胞于纤维滤膜上,洗涤,晾干。置于含有 3 mL 闪烁液的液闪瓶中,LKB-1211 型液体闪烁计数器测量每分钟脉冲次数(cpm)。按下式计算:

掺入抑制率(%) = $\frac{\text{对照组(cpm)} - \text{实验组(cpm)}}{\text{对照组(cpm)}} \times 100\%$

1.5 红景天对肿瘤细胞的杀伤作用 步骤同 4,孵育 68 小时后,每孔分别加入 50 μl 5 mg/mL MTT,继续孵育 4 小时,加入酸化 SDS 100 μl,孵育过夜(> 20 小时),以 SDS 作空白调零,全自动酶标仪 570nm 处测 A 值,计算生存率:

生存率(%) = $\frac{\text{实验组(cpm)}}{\text{对照组(cpm)}} \times 100\%$

2 结果

2.1 红景天对宫颈癌细胞增殖的影响 见表1。

表1 宫颈癌细胞克隆形成数目

	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	集落形成数目
对照组		93.83 ± 7.03
红景天组	0.5	$14.67 \pm 0.71^*$
	1.0	$8.67 \pm 1.34^*$
	2.0	$1.33 \pm 0.58^*$

注:与对照组相比, * $P < 0.01$ 。

从表1可知红景天明显抑制了宫颈癌细胞的克隆形成($P < 0.01$),形成克隆的数目随药物浓度增加而减少。

2.2 肿瘤细胞的动态生长情况 红景天对宫颈癌细胞的生长均具有抑制作用,孵育6小时镜下可见给药组细胞增殖缓慢,贴附型细胞伸展不良,胞体回缩,胞质极度粗糙,内有大量颗粒状物堆积,48小时后大部分细胞脱落死亡,崩溃融解,增殖停滞;而对照组细胞伸展良好,胞质均匀透明,核大、核仁清晰。台盼蓝染色,给药组着色细胞占细胞总数的20%以上,而对照组小于5%。

2.3 红景天对DNA合成的抑制作用 见表2。实验组cpm明显低于对照组($P < 0.01$),与药物浓度呈反比,标志DNA合成明显受抑制。

表2 红景天对宫颈癌细胞的 $^3\text{H}-\text{TdR}$ 掺入抑制率的影响

红景天剂量/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	抑制率(%)
0.5	23.34
1.0	54.82
2.0	75.91

2.4 红景天对肿瘤细胞生存率的影响 见表3。A值与细胞存活数之间存在线性关系,实验组A明显低于对照组($P < 0.01$),且随药物浓度的增加而降低。

表3 红景天对宫颈癌细胞生存率的影响

红景天剂量/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	生存率(%)
0.5	62.58
1.0	32.68
2.0	15.25

3 讨论

红景天是继人参、刺五加后出现的又一种适应原样药物,用途广、低毒、副作用小,已从中分离出40多种化学成分,有研究表明红景天中的没食子酸、东莨菪素、谷留醇、杨梅黄素等具有不同程度抗肿瘤作用^[1,5]。本研究发现红景天对体外培养宫颈癌细胞具有直接杀伤作用。在不影响正常人骨髓单

个核细胞在rhG-GSF刺激下增殖能力的条件下,2.0mg/mL组抑制作用最强,且这种抑制作用存在剂量效果依赖性,随着红景天药物浓度的升高,抑制作用增强。

我们观察到与红景天共育24小时的细胞伸展不良,胞体回缩,贴附型细胞不贴壁,胞质粗糙,有大量颗粒状物堆积,而且药物浓度越大,形态学改变越明显。大量研究表明只有当细胞代谢不良时方出现细胞轮廓增强、反差增大,在胞质内出现颗粒、空泡及脂滴等,电镜下可见细胞大的暗色颗粒为变形的线粒体^[6]。MTT比色法进一步证实了红景天可干扰细胞代谢,正常活细胞线粒体内活性脱氢酶可将MTT还原为紫色的甲潜(formazan),且细胞的存活数与其产生的甲潜的OD值之间存在线性关系。给药组肿瘤细胞生长受抑,OD值明显低于对照组。贴附是贴壁细胞生长增殖的条件之一,通常细胞表面有由细胞分泌的糖蛋白膜,即细胞外衣,它对细胞运动尤其是贴附支持物生长有重要作用。细胞外衣的性质与细胞物质交换、酸碱失衡及膜电位等有一定的关系^[6]。改变细胞外衣的性质可抑制其贴附,使细胞由支持物上脱落下来。红景天可能通过干扰细胞代谢、改变细胞外衣的性质抑制肿瘤细胞增殖。TdR是DNA合成的必需物质,增殖过程中的细胞可摄取营养液中的TdR以合成DNA,红景天可使TdR掺入量明显减少。由此推测抑制S期肿瘤细胞DNA的合成是其抗癌机制之一。通过对红景天的药物化学及进一步实验研究关于红景天是否具有抑制RNA、蛋白质的合成以及刺激宿主免疫功能,从而间接抑制宫颈癌细胞生长的作用。红景天可能为宫颈癌的防治提供一种新型、高效、低毒、抗癌谱广的抗癌有效制剂。

参考文献

- [1]李伟,黄勤尼.红景天属植物的研究及应用[J].首都师范大学学报,2003,24(1):55~59
- [2]王家明,闫继平,王盛虔.红景天的药理作用研究[J].中医学报,2003,31(4):57~59
- [3]姜文华,孟晓婷,郝利铭,等.红景天素抗老化和抗痴呆效应的实验研究[J].白求恩医科大学学报,2001,27(2):127~129
- [4]王秀清.红景天素抗肿瘤作用的研究[J].吉林中医药,1992(3):40
- [5]陈秋丽,邓伟国,王毅.红景天皂苷对雌性大鼠蛋白质和脂质代谢的影响[J].吉林大学学报,2003,29(4):411~414
- [6]郭征.组织培养及分子生物学技术[M].北京:北京出版社,1995.16

(收稿日期:2006-03-31)