

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2021.01.001
文章编号: 1005-8982 (2021) 01-0001-07

妇科肿瘤专题·论著

冬凌草甲素对人宫颈癌HeLa细胞线粒体 凋亡途径的影响*

张亚男, 张子暘, 刘海英, 王书惠

(牡丹江医学院附属红旗医院, 黑龙江 牡丹江 157011)

摘要: **目的** 观察冬凌草甲素对人宫颈癌HeLa细胞凋亡的影响, 并探讨其诱导HeLa细胞线粒体凋亡的机制。**方法** 体外培养HeLa细胞, 分别以0 $\mu\text{mol/L}$ (设为空白对照组)、5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、25 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ 冬凌草甲素处理12 h、24 h、36 h、48 h, CCK-8法检测HeLa细胞活力, 计算 IC_{50} 。以0 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、25 $\mu\text{mol/L}$ 冬凌草甲素处理HeLa细胞24 h, 采用Annexin V/PI双染法和TUNEL染色分别检测HeLa细胞凋亡; JC-1染色检测线粒体膜电位($\Delta\psi\text{m}$)改变; Western blotting检测细胞色素c (Cyt c)、B细胞淋巴瘤-2因子(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)的表达; 比色法检测半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3)、半胱氨酸蛋白酶-9 (Caspase-9)活性。**结果** 冬凌草甲素抑制HeLa细胞细胞活力呈剂量-时间依赖效应($P < 0.05$), 其12 h、24 h、36 h、48 h的 IC_{50} 分别为95.63 $\mu\text{mol/L}$ 、32.24 $\mu\text{mol/L}$ 、19.58 $\mu\text{mol/L}$ 和4.13 $\mu\text{mol/L}$; 与空白对照组比较, 5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、25 $\mu\text{mol/L}$ 冬凌草甲素组HeLa细胞凋亡率和凋亡指数升高($P < 0.05$); 与空白对照组比较, 5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、25 $\mu\text{mol/L}$ 冬凌草甲素组HeLa细胞 $\Delta\psi\text{m}$ 降低($P < 0.05$); 与空白对照组比较, 5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、25 $\mu\text{mol/L}$ 冬凌草甲素组HeLa细胞Cyt c、Bax表达升高($P < 0.05$), Bcl-2、Bcl-2/Bax比值降低($P < 0.05$); 与空白对照组比较, 5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、25 $\mu\text{mol/L}$ 冬凌草甲素组HeLa细胞Caspase-3、Caspase-9活性升高($P < 0.05$)。**结论** 冬凌草甲素可诱导HeLa细胞凋亡, 其机制可能是通过线粒体凋亡途径实现。

关键词: 宫颈肿瘤; 冬凌草甲素; HeLa细胞; 凋亡; 线粒体凋亡途径

中图分类号: R737.33; R285.5

文献标识码: A

Effects of oridonin on mitochondrial apoptotic pathway of human cervical carcinoma Hela cells*

Ya-nan Zhang, Zi-yang Zhang, Hai-ying Liu, Shu-hui Wang
(The Affiliated Hongqi Hospital of Mudanjiang Medical University, Mudanjiang,
Heilongjiang 157011, China)

Abstract: Objective To investigate effects of oridonin on apoptosis of human cervical carcinoma Hela cells with the purpose of analyzing the mitochondrial mechanisms of apoptosis. **Methods** The Hela cells were cultured in vitro and the viability of the cells was measured with cell counting kit-8 (CCK-8) at 12-, 24-, 36- and 48-hour oridonin treatment at different doses (0, 5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$) and the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) were measured. The Hela cells were treated with different doses of oridonin (0, 5, 10, 25 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h. The apoptosis of the cells was determined with Annexin V/PI double staining and TUNEL staining. The mitochondrial membrane potential (ψm) was observed by JC-1 staining. The expression of cytochrome c (Cyt c), human B cell lymphoma

收稿日期: 2020-06-10

* 基金项目: 黑龙江省中医药科研项目 (No: ZHY11-W32)

[通信作者] 王书惠, E-mail: bcf55555@163.com; Tel: 0453-6602056

factor-2 (Bcl-2) and human Bcl-2-related X protein (Bax) were detected by Western blotting. The activity of cysteinyl aspartate specific proteinase-3 (Caspase-3) and cysteinyl aspartate specific proteinase-9 (Caspase-9) were detected by colorimetric method. Results Oridonin inhibited the viability of cells in a dose- and time-dependent manner ($P < 0.05$), with IC_{50} of 95.63, 32.24, 19.58 and 4.13 $\mu\text{mol/L}$ after 12, 24, 36 and 48 hours, respectively. Compared with those in the blank control group, increased apoptotic rate and apoptotic index ($P < 0.05$) were observed in the HeLa cells treated with 5, 10 and 25 $\mu\text{mol/L}$ oridonin. Compared with those in the blank control group, decreased ψm ($P < 0.05$) were observed in the HeLa cells treated with 5, 10 and 25 $\mu\text{mol/L}$ oridonin. Compared with those in the blank control group, increased expressions of Cyt c, decreased expressions of Bcl-2, increased expressions of Bax and decreased expressions of Bcl-2/Bax ($P < 0.05$) were observed in the HeLa cells treated with 5, 10 and 25 $\mu\text{mol/L}$ oridonin. Compared with those in the blank control group, increased activity of Caspase-3 and Caspase-9 ($P < 0.05$) were observed in the HeLa cells treated with 5, 10 and 25 $\mu\text{mol/L}$ oridonin. Conclusion Oridonin can induce apoptosis of the HeLa cells, and the possible mechanisms may be related to the mitochondrial apoptotic pathway.

Keywords: uterine cervical neoplasms; oridonin; heLa cells; apoptosis; mitochondrial apoptotic pathway

宫颈癌是最常见的危害妇女健康及生命的主要恶性肿瘤之一，因极高的病死率而备受国内外研究者的关注。据国际癌症研究中心统计，2013年全球宫颈癌新发病例约48.5万，死亡病例约23.6万，其中发展中国家约占85%^[1]。有研究数据表明，我国宫颈癌发病率为12.96/10万，病死率为3.28/10万，且发病率和病死率均随年龄的增长而增加^[2]。宫颈癌的主要病因可能与人乳头瘤病毒感染有关，其他如机体免疫功能低下、吸烟与被动吸烟、口服避孕药、人工流产次数过多、性伴侣过多、丈夫包皮过长、早婚、结婚次数过多、多产及初产年龄过早均可成为诱发宫颈癌危险因素^[3-5]。近年来，中药以其有效低毒的优势作为治疗肿瘤的替代疗法日益得到人们的重视。冬凌草甲素是冬凌草的主要有效成分，为二萜类化合物。除冬凌草外，同属植物蓝萼香茶菜、毛叶香茶菜等亦可分离出冬凌草甲素。现代药理研究表明，冬凌草甲素具有较强的抗肿瘤活性^[6]，可以治疗胰腺癌^[7]、卵巢癌^[8]、食管癌^[9]、肝癌^[10]、肺癌^[11]、乳腺癌^[12]、前列腺癌^[13]、直肠癌等^[14]。研究表明，冬凌草甲素亦可诱导人宫颈癌HeLa细胞凋亡^[15]。但是冬凌草甲素诱导HeLa细胞凋亡的机制研究较少。本研究采用体外培养HeLa细胞，探讨线粒体凋亡途径在冬凌草甲素诱导HeLa细胞中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

冬凌草甲素（中国科学院昆明植物研究所），

二甲基亚砜（DMSO，终浓度 $\leq 0.01\%$ ）（上海浩然生物技术有限公司），RPMI 1640培养基（美国Gibco公司），胎牛血清（FBS）和胰蛋白酶（北京元亨圣马生物技术研究所），CCK-8试剂盒（美国Abbkine公司），TUNEL检测试剂盒和Annexin V-FITC/PI试剂盒（南京凯基生物有限公司），碘化丙锭（PI）（美国Axygen公司），JC-1检测试剂盒（上海容创生物技术有限公司），兔抗人细胞色素c（Cyt c）抗体、兔抗人B细胞淋巴瘤-2因子（Bcl-2）抗体和兔抗人Bcl-2相关X蛋白（Bax）抗体（美国Cell Signal公司），半胱氨酸蛋白酶-3（Caspase-3）和半胱氨酸蛋白酶-9（Caspase-9）活性测定试剂盒（北京纽朴生物技术有限公司）。Model 311型二氧化碳培养箱（美国Thermo Scientific公司），FC-500流式细胞仪（美国Beckman公司），BX43荧光显微镜（日本Olympus公司），Bio-Tek ELX800型多功能酶标仪（美国BIO-RAD公司），Tanon 5200 Multi图像分析系统（上海天能科技公司）。

1.2 细胞培养

人宫颈癌HeLa细胞（美国ATCC）接种于含10%热灭活FBS、2%谷氨酰胺、100 u/ml青霉素和100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素的RPMI 1640培养液中，在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%二氧化碳培养箱中培养。每48 h更换新鲜培养液，待细胞融合度达80%时，用0.25%胰蛋白酶消化传代。

1.3 方法

1.3.1 CCK-8检测HeLa细胞活力 检测方法参照CCK-8试剂盒操作说明书进行。将处于对数生

长期的HeLa细胞按 4×10^6 个/ml接种于96孔培养板,100 μ l/孔,设6个复孔,培养箱中培养。待细胞贴壁后向各培养孔中加不同浓度的冬凌草甲素100 μ l,浓度分别为5 μ mol/L、10 μ mol/L、25 μ mol/L、50 μ mol/L、100 μ mol/L。空白对照孔加入等体积不含冬凌草甲素的RPMI 1640培养液。分别培养12 h、24 h、36 h、48 h后终止培养。向各培养孔中加入10 μ l CCK-8,继续培养4 h。于酶标仪450 nm波长处测定光密度(OD)值,计算细胞活力,并应用Bliss法计算 IC_{50} 值。

1.3.2 Annexin V-FITC/PI双染法检测HeLa细胞凋亡 参照Annexin V-FITC/PI试剂盒操作说明书进行操作。待HeLa细胞贴壁后向各培养孔中加入5 μ mol/L、10 μ mol/L、25 μ mol/L冬凌草甲素,空白对照孔加入等体积不含冬凌草甲素的RPMI 1640培养液,培养24 h。胰蛋白酶消化,1 200 r/min离心5 min,收集细胞,PBS洗涤2次,250 μ l结合缓冲液重悬细胞,各培养孔依次加入Annexin V-FITC和PI液各5 μ l混匀,室温避光反应15 min。采用流式细胞仪检测细胞凋亡,计算凋亡率。

1.3.3 TUNEL染色检测HeLa细胞凋亡 参照TUNEL试剂盒操作说明书进行检测。分组及给药同1.3.2。弃培养基,PBS洗涤2次,4%多聚甲醛固定后,PBS洗涤3次,各培养孔加入50 μ l TUNEL反应液,避光37 $^{\circ}$ C培养1 h,PBS洗涤3次,Hoechst 33258染料37 $^{\circ}$ C避光染色10 min,中性树胶封片,BX43荧光显微镜观察细胞核形态,计算凋亡指数。

1.3.4 JC-1染色检测HeLa细胞 $\Delta\psi_m$ 参照JC-1试剂盒操作说明书进行检测。吸取500 μ l RPMI 1640培养液,加入1 μ l JC-1,涡旋混匀,37 $^{\circ}$ C孵育,配成JC-1工作液。分组及给药同1.3.2。弃去培养基,PBS洗涤2次,各培养孔加入1 ml JC-1,培养20 min。弃去培养基,PBS洗涤2次,各培养孔加入RPMI 1640培养液。采用荧光显微镜观察绿色和红色荧光。如 $\Delta\psi_m$ 较低,JC-1为单体,不能聚集在线粒体基质中,则发出绿色荧光;如 $\Delta\psi_m$ 较高,JC-1以聚合物形式聚集在线粒体基质中,则发出红色荧光。计算绿色/红色荧光,以绿色/红色荧光代表 $\Delta\psi_m$;绿色/红色荧光升高表示 $\Delta\psi_m$ 下降;绿色/红色荧光降低表示 $\Delta\psi_m$ 升高。

1.3.5 Western blotting检测HeLa细胞Cyt c、Bcl-2和Bax的表达 分组及给药同1.3.2。1 200 r/min离心5 min,收集细胞,充分裂解后提取总蛋白,用BCA法测定蛋白相对表达量。以10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺预制凝胶,各培养孔加入50 μ g蛋白样品进行电泳。常规转膜后5%脱脂奶粉封闭2 h。分别与I抗兔抗人Cyt c多克隆抗体(1:500)、兔抗人Bcl-2多克隆抗体(1:500)和兔抗人Bax多克隆抗体(1:500)4 $^{\circ}$ C孵育过夜,PBST洗脱10 min/次,共3次,洗膜后加辣根过氧化物酶标记山羊抗兔II抗孵育2 h,TBST洗脱,5 min/次,共3次,加入电化学发光试剂显影,Tanon 5200 Multi图像分析系统进行图像采集,以GAPDH作为内参。

1.3.6 Caspase-3和Caspase-9活性检测 参照Caspase-3和Caspase-9活性测定试剂盒操作说明书进行检测。分组及给药同1.3.2,细胞裂解同1.3.5。吸取50 μ l细胞裂解上清液,加入50 μ l 2 \times 反应缓冲液,分别加入5 μ l Caspase-3和Caspase-9底物,37 $^{\circ}$ C避光孵育4 h。于酶标仪405 nm波长处测定OD值,计算Caspase-3和Caspase-9活性。

1.4 统计学方法

数据分析采用SPSS 21.0统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用单因素方差分析或重复测量设计的方差分析,进一步两两比较用LSD-*t*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 冬凌草甲素对HeLa细胞活力的影响

各实验组与空白对照组12 h、24 h、36 h、48 h的HeLa细胞活力比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点HeLa细胞活力有差异($F = 31.457$, $P = 0.000$);②各组HeLa细胞活力有差异($F = 273.936$, $P = 0.000$),随着冬凌草甲素浓度增加,HeLa细胞活力降低;③各组HeLa细胞活力变化趋势有差异($F = 27.837$, $P = 0.000$)(见表1)。冬凌草甲素处理12 h、24 h、36 h、48 h的 IC_{50} 为95.63 μ mol/L、32.24 μ mol/L、19.58 μ mol/L和4.13 μ mol/L。因24 h $IC_{50} > 25$ μ mol/L,故以 ≤ 25 μ mol/L(即5 μ mol/L、10 μ mol/L、20 μ mol/L)为冬凌草甲素处理浓度,处理24 h用于后续实验。

表 1 各组不同时间点 HeLa 细胞活力的比较 ($n=6, \%, \bar{x} \pm s$)

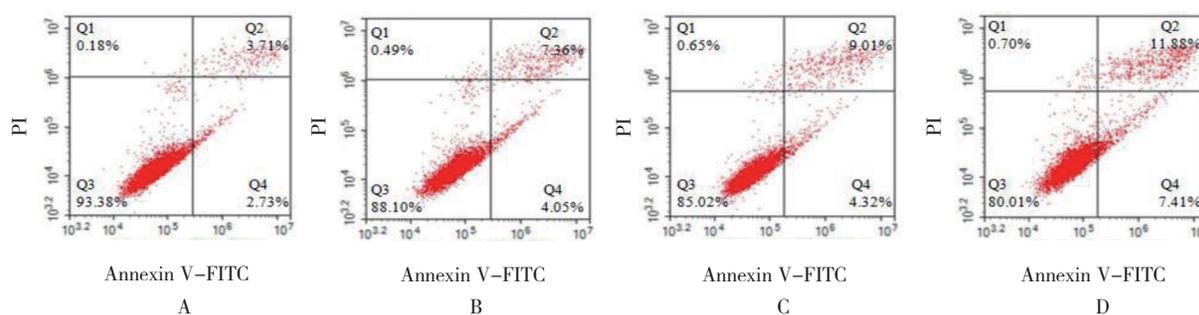
组别	12 h	24 h	36 h	48 h
空白对照组	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
5 μmol/L 冬凌草甲素组	95.67 ± 21.89	75.46 ± 15.17 [†]	61.01 ± 13.37 [†]	49.08 ± 9.86 [†]
10 μmol/L 冬凌草甲素组	79.26 ± 16.50	59.37 ± 12.90 [†]	52.01 ± 10.70 [†]	37.12 ± 6.36 [†]
25 μmol/L 冬凌草甲素组	65.54 ± 13.85 [†]	52.20 ± 10.84 [†]	46.37 ± 9.18 [†]	29.63 ± 4.91 [†]
50 μmol/L 冬凌草甲素组	58.21 ± 12.55 [†]	38.72 ± 6.98 [†]	29.34 ± 4.86 [†]	28.05 ± 4.76 [†]
100 μmol/L 冬凌草甲素组	50.87 ± 11.12 [†]	27.10 ± 4.21 [†]	26.27 ± 3.72 [†]	24.22 ± 3.22 [†]

注：†与空白对照组比较， $P < 0.05$ 。

2.2 冬凌草甲素对 HeLa 细胞凋亡的影响

2.2.1 各组 HeLa 细胞凋亡率比较 各组 HeLa 细胞凋亡率比较，经方差分析，差异有统计学意义 ($F =$

14.018, $P = 0.002$)；与空白对照组比较，5 μmol/L、10 μmol/L、25 μmol/L 冬凌草甲素组 HeLa 细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$)。见图 1 和表 2。



A: 空白对照组; B: 5 μmol/L 冬凌草甲素组; C: 10 μmol/L 冬凌草甲素组; D: 25 μmol/L 冬凌草甲素组。

图 1 冬凌草甲素诱导 HeLa 细胞凋亡的流式细胞图

2.2.2 TUNEL 染色结果 各组 HeLa 细胞凋亡指数比较，经方差分析，差异有统计学意义 ($F = 16.061$, $P = 0.000$)；与空白对照组比较，5 μmol/L、10 μmol/L、25 μmol/L 冬凌草甲素组 HeLa 细胞凋亡指数升高 ($P < 0.05$)。见表 2 和图 2。

2.3 冬凌草甲素对 HeLa 细胞 $\Delta\psi_m$ 的影响

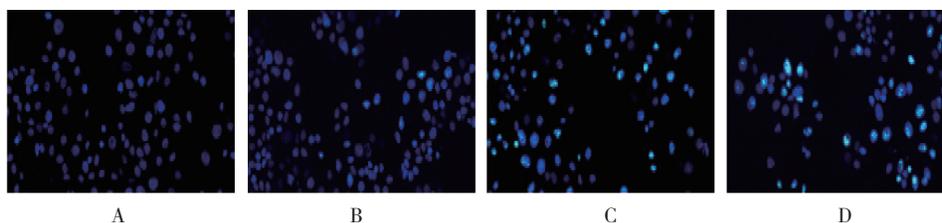
各组 HeLa 细胞绿色/红色荧光比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；与空白对照组比较，5 μmol/L、10 μmol/L、25 μmol/L 冬凌草甲素组 HeLa 细胞绿色/红色荧光升高 ($P < 0.05$)。提示冬凌草甲素可降低 HeLa 细胞 $\Delta\psi_m$ 。见表 3 和图 3。

表 2 各组 HeLa 细胞凋亡率和凋亡指数比较

($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	凋亡率/%	凋亡指数
空白对照组	6.50 ± 0.69	2.98 ± 0.31
5 μmol/L 冬凌草甲素组	11.49 ± 1.25 [†]	8.57 ± 0.88 [†]
10 μmol/L 冬凌草甲素组	13.41 ± 1.47 [†]	29.51 ± 3.26 [†]
25 μmol/L 冬凌草甲素组	19.53 ± 2.02 [†]	32.91 ± 3.63 [†]
F 值	14.018	16.061
P 值	0.002	0.000

注：†与空白对照组比较， $P < 0.05$ 。



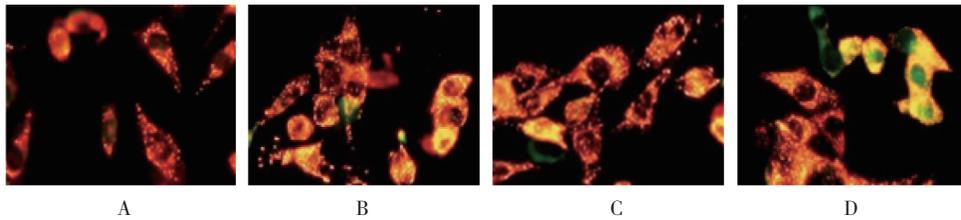
A: 空白对照组; B: 5 μmol/L 冬凌草甲素组; C: 10 μmol/L 冬凌草甲素组; D: 25 μmol/L 冬凌草甲素组。

图 2 冬凌草甲素诱导 HeLa 细胞凋亡 (TUNEL 染色 × 200)

表 3 各组 HeLa 细胞 $\Delta\psi_m$ 的比较
($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	绿色/红色荧光
空白对照组	1.00 ± 0.00
5 μmol/L 冬凌草甲素组	1.91 ± 0.19 [†]
10 μmol/L 冬凌草甲素组	2.07 ± 0.23 [†]
25 μmol/L 冬凌草甲素组	3.89 ± 0.41 [†]
F 值	4.577
P 值	0.047

注: †与空白对照组比较, $P < 0.05$ 。



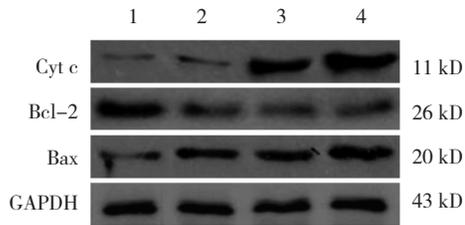
A: 空白对照组; B: 5 μmol/L 冬凌草甲素组; C: 10 μmol/L 冬凌草甲素组; D: 25 μmol/L 冬凌草甲素组。

图 3 冬凌草甲素对 HeLa 细胞 $\Delta\psi_m$ 的影响 (JC-1 染色 × 400)

表 4 各组 HeLa 细胞 Cyt c、Bcl-2、Bax、Bcl-2/Bax 相对表达量比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	Cyt c	Bcl-2	Bax	Bcl-2/Bax
空白对照组	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
5 μmol/L 冬凌草甲素组	1.942 ± 0.301 [†]	0.617 ± 0.082 [†]	1.723 ± 0.231 [†]	0.343 ± 0.041 [†]
10 μmol/L 冬凌草甲素组	6.792 ± 0.805 [†]	0.536 ± 0.074 [†]	1.865 ± 0.292 [†]	0.281 ± 0.030 [†]
25 μmol/L 冬凌草甲素组	11.818 ± 2.193 [†]	0.443 ± 0.061 [†]	3.076 ± 0.453 [†]	0.142 ± 0.021 [†]
F 值	23.628	4.041	6.367	9.076
P 值	0.001	0.039	0.032	0.015

注: †与空白对照组比较, $P < 0.05$ 。



1: 空白对照组; 2: 5 μmol/L 冬凌草甲素组; 3: 10 μmol/L 冬凌草甲素组; 4: 25 μmol/L 冬凌草甲素组。

图 4 冬凌草甲素对 HeLa 细胞 Cyt c、Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响

2.5 冬凌草甲素对 HeLa 细胞 Caspase-3、Caspase-9 活性的影响

各组 HeLa 细胞 Caspase-3、Caspase-9 活性比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与空白对照组

2.4 冬凌草甲素对 HeLa 细胞凋亡相关因子 Cyt c、Bcl-2、Bax 表达的影响

各组 HeLa 细胞 Cyt c、Bcl-2、Bax 相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与空白对照组比较, 5 μmol/L、10 μmol/L、25 μmol/L 冬凌草甲素组 HeLa 细胞 Cyt c、Bax 表达升高 ($P < 0.05$), Bcl-2、Bcl-2/Bax 降低 ($P < 0.05$)。见表 4 和图 4。

比较, 5 μmol/L、10 μmol/L、25 μmol/L 冬凌草甲素组 Caspase-3、Caspase-9 活性升高 ($P < 0.05$)。见表 5。

表 5 各组 HeLa 细胞 Caspase-3、Caspase-9 活性比较
($n=6, \%, \bar{x} \pm s$)

组别	Caspase-3 活性	Caspase-9 活性
空白对照组	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
5 μmol/L 冬凌草甲素组	164.16 ± 17.52 [†]	209.80 ± 22.78 [†]
10 μmol/L 冬凌草甲素组	184.93 ± 20.04 [†]	233.12 ± 25.57 [†]
25 μmol/L 冬凌草甲素组	221.19 ± 23.72 [†]	320.17 ± 35.14 [†]
F 值	4.918	10.535
P 值	0.023	0.001

注: †与空白对照组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

细胞凋亡在维持体内细胞或组织平衡中发挥着关键作用, 凋亡缺陷是肿瘤发病的重要病因学基础^[16-17]。本研究结果显示, 冬凌草甲素具有明显的诱导 HeLa 细胞凋亡的作用。另外, 本研究结果亦显示, 冬凌草甲素呈剂量-时间依赖效应抑制 HeLa 细胞活力。以上结果与以往研究结果相类似^[15, 18]。

肿瘤细胞的生长速度一般难以控制, 这可能与细胞的增殖能力较强和凋亡能力的减弱有关。细胞凋亡途径根据启动过程包括线粒体凋亡途径、死亡受体凋亡途径及内质网凋亡途径, 特别是线粒体凋亡途径在介导细胞凋亡中承担重要角色^[19]。线粒体是凋亡信号转导途径中起关键调节作用的细胞器, 在凋亡过程中具有重要的调控作用, 而线粒体损伤造成 $\Delta\psi_m$ 下降是细胞启动凋亡的一个特征性标志, 为细胞凋亡级联反应过程中最早发生的事件之一^[20-21]。本研究结果显示, 冬凌草甲素可显著降低 HeLa 细胞 $\Delta\psi_m$ 。以上结果初步提示, 冬凌草甲素诱导 HeLa 细胞凋亡的机制可能与线粒体凋亡途径有关。

Cyt c 是位于线粒体中的一种水溶性小分子物质, 具有调节能量代谢和调节细胞凋亡的功能, 为线粒体凋亡途径的关键调控蛋白之一^[22]。Caspase 蛋白家族是细胞凋亡中发挥关键作用的一组半胱氨酸蛋白酶, 一旦被凋亡触发因素激活, 就能降解细胞内蛋白而引起细胞凋亡^[23]。Caspase-3 活化是诱导细胞凋亡的关键核心步骤, Caspase-3 活化离不开其上游因子 Caspase-8 或 Caspase-9 的激活^[24]。Cyt c 无法穿过线粒体外膜, 因此细胞质中无法检测到。如果 $\Delta\psi_m$ 降低, 线粒体膜通透性则会增强, Cyt c 可穿过外膜释放到胞质中, 催化 Caspase-9 前体形成有活性的 Caspase-9, 进而激活执行细胞凋亡的 Caspase-3 的活性导致细胞凋亡。Bcl-2 是公认的细胞凋亡调控靶点, 大多定位于线粒体外膜上, 可以通过与 Bax 拮抗, 抑制 Bax 游离的数量。降低 Bcl-2 蛋白表达, 会促使 Bax 转位到线粒体膜, 进而增强线粒体通透性, 释放 Cyt c, 激活 Caspase-3 的级联反应, 从而促进细胞凋亡^[25-26]。Bcl-2/Bax 比值决定 Caspase-3 的激活程度, 比值越低, 激活程度越高。本研究结果显示, 冬凌草甲素可显著升高 HeLa 细胞 Cyt c 和 Bax 表达,

降低 Bcl-2、Bcl-2/Bax。本研究结果亦显示, 冬凌草甲素可显著升高 HeLa 细胞 Caspase-3 和 Caspase-9 活性。综上所述, 冬凌草甲素诱导 HeLa 细胞凋亡的机制可能与线粒体凋亡途径激活有关。

参 考 文 献 :

- [1] FITZMAURICE C, DICKER D, PAIN A, et al. The global burden of cancer 2013[J]. JAMA Oncol, 2015, 51(4): 505.
- [2] 应倩, 夏庆民, 郑荣寿, 等. 中国 2009 年宫颈癌发病与死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2013, 22(8): 612-616.
- [3] YE F, WANG H Z, LIU J, et al. Association of SMUG1 SNPs in intron region and linkage disequilibrium with occurrence of cervical carcinoma and HPV infection in Chinese population[J]. J Cancer, 2019, 10(1): 238-248.
- [4] 苏敏, 龚小见, 周欣. 中药有效成分抗宫颈癌作用机制的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(4): 675-684.
- [5] 周权, 黄民主, 黄霜, 等. 中国已婚妇女宫颈癌发病影响因素 Meta 分析[J]. 中国癌症杂志, 2011, 21(2): 125-129.
- [6] VASATURO M, COTUGNOR, FIENGO L, et al. The anti-tumor diterpene oridonin is a direct inhibitor of Nucleolin in cancer cells[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 16735.
- [7] LIERMANN J, NAUMANN P, FORTUNATO F, et al. Phytotherapeutics oridonin and ponocidin show additive effects combined with irradiation in pancreatic cancer in vitro[J]. Radiol Oncol, 2017, 51(4): 407-414.
- [8] XIA R, CHEN S X, QIN Q, et al. Oridonin suppresses proliferation of human ovarian cancer cells via blockage of mTOR signaling[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2016, 17(2): 667-671.
- [9] SHI M, LU X J, ZHANG J, et al. Oridonin, a novel lysine acetyltransferases inhibitor, inhibits proliferation and induces apoptosis in gastric cancer cells through p53- and caspase-3-mediated mechanisms[J]. Oncotarget, 2016, 7(16): 22623-22631.
- [10] ZHANG H P, LI G Q, GUO W Z, et al. Oridonin synergistically enhances JQ1-triggered apoptosis in hepatocellular cancer cells through mitochondrial pathway[J]. Oncotarget, 2017, 8(63): 106833-106843.
- [11] LI S, SHI D, ZHANG L Y, et al. Oridonin enhances the radiosensitivity of lung cancer cells by upregulating Bax and downregulating Bcl-2[J]. Exp Ther Med, 2018, 16(6): 4859-4864.
- [12] LI C Y, WANG Q, SHEN S, et al. Oridonin inhibits VEGF-A-associated angiogenesis and epithelial-mesenchymal transition of breast cancer in vitro and in vivo[J]. Oncol Lett, 2018, 16(2): 2289-2298.
- [13] LU J L, CHEN X, QU S, et al. Oridonin induces G₂/M cell cycle arrest and apoptosis via the PI3K/Akt signaling pathway in hormone-independent prostate cancer cells[J]. Oncol Lett, 2017, 13(4): 2838-2846.
- [14] YAO Z, XIE F H, LI M, et al. Oridonin induces autophagy via inhibition of glucose metabolism in p53-mutated colorectal cancer cells[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(2): e2633.

- [15] ZHANG Y H, WU Y L, TASHIRO S, et al. Reactive oxygen species contribute to oridonin-induced apoptosis and autophagy in human cervical carcinoma HeLa cells[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, 32(10): 1266-1275.
- [16] 黄果, 王佑权, 刘国文, 等. 姜黄素诱导胃癌细胞SGC-7901凋亡机制[J]. *中国公共卫生*, 2017, 33(7):1082-1085.
- [17] 郑婷婷, 焦丽静, 阙祖俊, 等. 中药诱导肿瘤凋亡相关机制研究进展[J]. *上海中医药杂志*, 2016, 50(10): 103-109.
- [18] 崔侨, 田代真一, 小野寺敏, 等. 冬凌草甲素通过诱导人宫颈癌HeLa细胞自噬下调凋亡的机制[J]. *药学报*, 2007, 42(1): 35-39.
- [19] 朱玲玲, 赵捷平, 窦勤玲, 等. 线粒体凋亡途径在槲皮素诱导U937细胞凋亡中的作用研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2018, 34(10): 1466-1471.
- [20] 姚成才, 涂远荣, 姜杰, 等. 榄香烯乳诱导线粒体凋亡途径逆转肺癌A549/DDP细胞株耐药[J]. *现代肿瘤医学*, 2014, 22(6): 1276-1281.
- [21] 齐一鸣, 黄俊琪. 2型登革病毒通过线粒体途径诱导EA.hy926细胞凋亡[J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(3): 385-389.
- [22] MOHAN V, AGARWAL R, SINGH R P. A novel alkaloid, evodi-amine causes nuclear localization of cytochrome-c and induces apoptosis independent of p53 in human lung cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 477(4): 1065-1071.
- [23] 邵庆瑞, 零伟德, 李健哲. 胡黄连苦苷II通过下调microRNA-1表达抑制H₂O₂诱导的心肌细胞凋亡[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(8): 77-82.
- [24] 陈子涵, 蒋继宏, 鞠秀云, 等. 蒲公英根水提物诱导MDA-MB-231细胞凋亡及其作用机制研究[J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(3): 353-358.
- [25] BALACHANDRAN C, EMI N, ARUN Y, et al. In vitro antiproliferative activity of 2, 3-dihydroxy-9, 10-anthraquinone induced apoptosis against COLO320 cells through cytochrome c release caspase mediated pathway with PI3K/AKT and COX-2 inhibition[J]. *Chem Biol Interact*, 2016, 249: 23-35.
- [26] 崔连莺, 王博, 张晓伟, 等. 胰腺癌细胞外泌体通过激活线粒体凋亡途径促进β细胞凋亡[J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(12): 2172-2178.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 张亚男, 张子喏, 刘海英, 等. 冬凌草甲素对人宫颈癌HeLa细胞线粒体凋亡途径的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2021, 31(1): 1-7.

Cite this article as: ZHANG Y N, ZHANG Z Y, LIU H Y, et al. Effects of oridonin on mitochondrial apoptotic pathway of human cervical carcinoma HeLa cells[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2021, 31(1):1-7.