

论著·基础研究

保妇康栓对宫颈癌细胞 SiHa 体外增殖和凋亡的影响^{*}

李倩珺¹, 胡艺琳², 梁 琰³, 王 婷³, 吴晓宾³, 晁 艳^{3△}

(1. 广州医科大学附属第一医院, 广东广州 510120; 2. 深圳市妇幼保健院, 广东深圳 518028;
3. 广州中医药大学第二附属医院, 广东广州 510120。)

摘要:目的 研究中药保妇康栓含药血清在细胞水平对宫颈癌 SiHa 细胞体外增殖及凋亡的影响, 探讨保妇康栓抑制宫颈癌 SiHa 细胞生长可能的作用机制。方法 中药保妇康栓含药血清培养液作用于 SiHa 细胞 24、48、72 h, 并设立阴性及阳性(西药含药血清)对照组, 采用 CCK8 及流式细胞分析技术进行细胞增殖、细胞周期及细胞凋亡检测。结果 保妇康栓对宫颈癌 SiHa 细胞增殖具有抑制作用, 24 h 抑制作用最强。与阴性对照组比较, 保妇康栓组 SiHa 细胞中 G₀/G₁ 期细胞显著增多, S 期细胞显著减少, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 保妇康栓的作用可能是通过阻断细胞从 G₀/G₁ 期向 S 期分化, 从而抑制宫颈癌 SiHa 细胞增殖并诱导凋亡来抑制肿瘤生长。

关键词: 莪术; 冰片; 宫颈肿瘤; 细胞增殖; 细胞周期; 细胞凋亡

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2019.01.005

中图分类号: R711.74; R446.11

文章编号: 1673-4130(2019)01-0016-03

文献标识码: A

Effect of Baofukang Suppository on proliferation and apoptosis in human cervical cancer cell SiHa^{*}

LI Qianjun¹, HU Yilin², LIANG Yan³, WANG Ting³, WU Xiaobin³, CHAO Yan^{3△}

(1. The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510120, China;
2. Shenzhen Maternity and Child Healthcare Hospital, Shenzhen, Guangdong 518028, China; 3. The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of serum with Baofukang Suppository on proliferation and apoptosis of human cervical cancer cell SiHa at cellular level and to explore the possible mechanism of serum with Baofukang Suppository inhibiting the growth of SiHa. **Methods** Serum with Baofukang Suppository was applied to SiHa cells for 24 h, 48 h and 72 h, and negative and serum with western medicine was set as control. By CCK8 and flow cytometry to study the effect of serum with Baofukang Suppository on proliferation, apoptosis and cell cycle of human cervical cancer cell SiHa. **Results** Serum with Baofukang Suppository suppressed the proliferation of cervical cancer cell SiHa, 24 h had the strongest inhibitory effect. The results of flow cytometry showed that cells in G₀/G₁ phase increased and S phase decreased in Baofukang Suppository group, which was significantly different from that in the negative control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Baofukang Suppository may inhibit tumor growth by inhibiting the proliferation of cervical cancer cell SiHa and blocking the cell differentiation from G₀/G₁ phase to S phase and inducing apoptosis.

Key words: curcuma zedoaria; borneolum syntheticum; uterine cervical neoplasms; cell proliferation; cell cycle; apoptosis

宫颈癌是女性生殖器官肿瘤中最常见的肿瘤之一, 高危型人乳头瘤病毒(HPV)感染是目前认为导致宫颈癌最主要的因素^[1-2]。当今宫颈癌的治疗手段包括手术、放、化疗等, 但这些措施均存在一定的弊端,

如出现机体免疫功能下降, 反生并发症, 甚至死亡等^[3]。近年来, 中医药在抗病毒及抗肿瘤方面的作用日益引起关注, 但其发挥作用的机制尚不明^[4-5]。纯中药栓剂保妇康栓由莪术油和冰片 2 味中药组成,

^{*} 基金项目: 广东省中医药局课题(2017KT1156, 20171096)。

作者简介: 李倩珺, 女, 主管技师, 主要从事临床检验、细胞学形态和真菌耐药方面的研究。 △ 通信作者, E-mail: chaoyanqy@163.com。

本文引用格式: 李倩珺, 胡艺琳, 梁琰, 等. 保妇康栓对宫颈癌细胞 SiHa 体外增殖和凋亡的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(1): 16-18.

可活血化瘀、清热解毒、去腐生肌,常用于治疗宫颈 HPV 感染。保妇康栓可改善局部免疫微环境并消除 HPV 感染,降低了高危型 HPV 感染患者向宫颈进展的危险性^[6-7]。因此,本研究通过制备保妇康栓含药血清并作用于 HPV16 阳性人宫颈鳞癌细胞系 SiHa 细胞,观察细胞体外增殖及凋亡情况,旨在为临床应用中药预防并治疗 HPV 感染提供重要的实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂 细胞培养基购自美国 GIBCO 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,二甲基亚砷购自上海华舜产品,青霉素和链霉素购自华北制药厂,胰酶及乙二胺四乙酸购自 SERVA 公司及赛多利斯公司,CCK-8 试剂盒购自碧云天生物技术研究,核糖核酸酶和聚酰亚胺购自 Sigma 公司。

1.2 药物 保妇康栓主要成分为莪术油及冰片制成的溶液购自海南碧凯药业有限公司。重组人干扰素 α-2b 水针剂购自安徽安科生物工程股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 选用细胞系为 HPV16 阳性人宫颈鳞癌细胞系 SiHa,培养条件为于胎牛血清 10%、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μg/mL,DMEM 培养基,5%CO₂、温度 37℃及饱和湿度。

1.3.2 含药血清的提取 选取雌性 SD 大鼠 60 只,平均体质量(200±30)g,随机分为中药组(保妇康栓组)、阳性对照组(干扰素组)和阴性对照组。每组每天灌胃给药 1 次,连续 7 d,阳性对照组肌肉注射给药 5 d。给药剂量为人临床给药等效剂量的 10 倍(200 g 体质量大鼠给药剂量=60 kg 体质量人给药剂量×0.018×100)。中药在末次给药后 1 h,西药在肌肉注射后 40 min,腹主动脉采血,血样于 37℃水浴 30 min,3 000 r/min 离心 10 min,吸取血清后灭活(56℃水浴 30 min)并除菌(0.22 μm 微孔滤膜过滤),分装于 1 mL 无菌 EP 管备用。

1.3.3 CCK-8 比色法观察药物对 SiHa 细胞的生长抑制作用 取数生长期细胞,胰酶消化离心后进行细胞计数(1×10⁴ 个/mL),接种于 96 孔培养板(每孔 100 μL),37℃培养箱培养。细胞贴壁后加入 8%含药血清培养基(设 6 个平等对照孔),使终体积为 200 μL,置培养箱培养 24、48、72 h 后加入 20 μL CCK-8 试剂,混匀,酶标仪测定每孔吸光度(OD 值)。

1.3.4 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡 每孔 2 mL 细胞悬液(2×10⁵ 个/孔)加入 6 孔板中;置 37℃培养箱 24 h 后加入 8%含药血清培养基(100 μL/孔),同时设阴性对照组;培养箱 37℃培养 72 h,消化并收集细胞。固定(-20℃无水乙醇)制备好的单细胞悬液,加入 100 μL RNaseA,37℃30 min;再加入

400 μL 碘化丙啶 PI 染色 30 min,采用流式细胞仪检测。每个样本获取 10 000 个细胞,采用 ModFitLT 3.0 软件分析结果。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件对数据进行分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用配对 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CCK8 检测细胞增殖 中药物组和阳性对照组 SiHa 细胞增殖均有不同程度的抑制,阴性对照组细胞生长活跃,中药物组和阳性对照组与阴性对照组比较,差异均有统计学意义(*P* < 0.05),且在 24 h 对其增殖的影响最为明显。见表 1。

表 1 各组宫颈鳞 SiHa 细胞增殖比较($\bar{x} \pm s$, OD 值)				
组别	<i>n</i>	24 h	48 h	72 h
阴性对照组	5	0.710±0.070	0.778±0.122	0.894±0.080
中药组	5	0.535±0.200*	0.353±0.070*	0.529±0.140*
阳性对照组	5	0.495±0.080*	0.303±0.160*	0.450±0.020*

注:与阴性对照组比较,**P* < 0.05

2.2 流式细胞仪检测细胞周期变化 与阴性对照组比较,中药物组和阳性对照组 SiHa 细胞中 G₀/G₁ 期细胞显著增多,S 期细胞显著减少,差异均有统计学意义(*P* < 0.05)。见表 2。

表 2 各组 SiHa 细胞周期比较(%)				
组别	<i>n</i>	G ₀ /G ₁	G ₂ /M	S
阴性对照组	3	46.05	14.10	39.85
中药组	3	56.34*	18.26	25.40*
阳性对照组	3	80.71*	11.91	7.38*

注:与阴性对照组比较,**P* < 0.05

2.3 流式细胞仪检测凋亡变化 中药物组和阳性对照组 SiHa 细胞凋亡率显著高于阴性对照组,差异均有统计学意义(*P* < 0.05)。

表 3 各组 SiHa 细胞凋亡率比较		
组别	<i>n</i>	凋亡率(%)
阴性对照组	3	10.21
中药组	3	49.34*
阳性对照组	3	60.82*

注:与阴性对照组比较,**P* < 0.05

3 讨论

宫颈癌是女性发生比例较高的恶性肿瘤之一,其在发展中国家的发病率较高。宫颈癌发生过程通常为正常宫颈上皮发展为上皮内瘤变最后进展为宫颈癌,其中高危型 HPV 持续感染是促进瘤变发生的主要因素。

保妇康栓的主要成分为冰片和莪术。莪术为姜科姜黄属植物蓬莪术、广西莪术和温郁金的干燥根茎,性温味辛苦,具有较好的抗肿瘤、抗炎、抗病原体、抗早孕、抗纤维组织增生和保肝等多种作用。其活性成分为挥发油,包括 β -榄香烯、莪术酮、莪术醇和吉玛酮等,能直接抑制、破坏肿瘤细胞和灭活病原体,还可增强机体自身免疫功能,从而促进机体对肿瘤和病毒的免疫反应^[8-13]。冰片亦可消炎止痛并促进药物吸收。保妇康栓单独或联合用药已成为宫颈持续性高危型 HPV 感染的主要治疗手段之一,将保妇康栓置于患者宫颈内部,莪术油可活血化瘀、清热解毒,提升局部免疫力,增加巨噬细胞吞噬能力,去腐生肌,消灭 HPV 及多种致病菌,促进鳞状上皮细胞生长,修复炎症损伤,促进康复^[6-7]。

肿瘤的发生、发展与细胞增殖和凋亡异常密切相关,因此,临床治疗肿瘤重要的策略之一就是诱导、促进肿瘤细胞凋亡。因此,本研究选择 HPV16 阳性人宫颈鳞癌细胞系 SiHa 细胞作为研究对象,通过 CCK8 实验发现,保妇康栓含药血清能抑制 SiHa 细胞增殖;流式细胞分析结果显示,保妇康栓含药血清作用后可引起 SiHa 细胞中 G₀/G₁ 期细胞显著增多, S 期细胞显著减少,周期阻断于 S 期,即细胞的 DNA 合成期,以致细胞不能进入下一个周期,细胞增殖减少,凋亡增加。以往有研究表明,莪术油的主要成分姜黄素和榄香烯对肿瘤细胞周期具有抑制作用^[10,14-15]。说明保妇康栓含药血清能抑制 SiHa 细胞增殖的作用机制可能是由于药物诱导了细胞的凋亡程序。

4 结 论

中药保妇康栓对宫颈癌的预防和治疗作用机制可能是通过调控肿瘤细胞周期,从而抑制肿瘤细胞增殖并促进细胞凋亡来实现的。然而中药保妇康栓体外抑制 SiHa 细胞增殖的效果弱于西药干扰素,这也是临床单独应用保妇康栓可使症状缓解但无法彻底治愈的原因之一,因此,临床常采用联合用药,效果更显著。

参考文献

[1] ADERSSON S, RYLANDER E, LARSSON B, et al. The

role of human papillomavirus in cervical adenocarcinoma carcinogenesis[J]. Eur J Cancer, 2001, 37(2): 246-250.

[2] 张秀梅, 张国楠. 宫颈癌年轻化高危因素研究进展[J]. 肿瘤预防与治疗, 2011, 24(4): 201-204.

[3] 王绍光. 妇科恶性肿瘤动脉化疗的种类、途径和方式[J]. 实用妇产科杂志, 2006, 22(8): 453-455.

[4] FERREIRA A S, LOPES A J. Chinese medicine pattern differentiation and its implications for clinical practice[J]. Chin J Integr Med, 2011, 17(11): 818-823.

[5] 孔赛, 韩凤娟, 张志刚, 等. 中药抗宫颈癌 HPV 感染的研究进展[J]. 世界中西医结合杂志, 2014, 9(3): 319-322.

[6] 李艳华, 许彩芹, 李颖敏. 保妇康栓在宫颈人乳头瘤状病毒感染患者中的应用[J]. 陕西中医, 2017, 38(10): 1332-1333.

[7] 施赛欧, 陈倩, 宋艳萍. 保妇康栓治疗宫颈 HPV 感染临床分析[J]. 中国性科学, 2016, 25(6): 52-55.

[8] 孙静. 莪术抗癌活性成分的研究进展[J]. 中国现代药物应用, 2008, 2(19): 118.

[9] 谢恬, 李铨璐, 王淑玲, 等. 榄香烯脂质体系列靶向抗癌天然药物基础研究进展[J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(4): 507-512.

[10] 王宏虹, 刘华钢, 刘丽敏, 等. β -榄香烯抗肿瘤作用机制研究概况[J]. 药物评价研究, 2009, 32(2): 140-143.

[11] 叶寿山, 盛晓蓉, 王萍, 等. 莪术油软胶囊抗病毒作用的研究[J]. 中药药理与临床, 2005, 21(3): 20-23.

[12] 赵艺, 杨汝刚, 罗岷, 等. 莪术油的药理作用及临床应用研究进展[J]. 实用中医内科杂志, 2006, 20(2): 125-126.

[13] HOUR T C, CHEN J, HUANG C Y, et al. Curcumin enhances cytotoxicity of chemotherapeutic agents in prostate cancer cells by inducing p21(WAF1/CIP1) and C/EBP-beta expressions and suppressing NF-kappaB activation [J]. Prostate, 2002, 51(3): 211-218.

[14] PARK C, KIM G Y, KIM G D, et al. Induction of G2/M arrest and inhibition of cyclooxygenase-2 activity by curcumin in human bladder cancer T24 cells [J]. Oncol Rep, 2006, 15(5): 1225-1231.

[15] HOLY J M. Curcumin disrupts mitotic spindle structure and induces micronucleation in MCF-7 breast cancer cells [J]. Mutat Res, 2002, 518(1): 71-84.

(收稿日期: 2018-08-02 修回日期: 2018-10-08)