

黄芪注射液对宫颈永生生化上皮细胞生长的作用

张立¹, 李能莲¹, 舍雅莉¹, 王雅莉¹, 骆亚莉¹, 张秋菊¹, 胡树名¹, 吕玲^{2*}

(1. 甘肃中医学院, 兰州 730000; 2. 甘肃省妇幼保健院, 兰州 730050)

[摘要] **目的:**观察黄芪注射液对人宫颈永生生化上皮细胞(H8细胞)的生长抑制作用,分析其细胞周期调控机制。**方法:**采用MTT法检测黄芪注射液对H8细胞生长的作用,光学显微镜观察药物作用后细胞形态,利用流式细胞仪(FCM)分析黄芪注射液作用后H8细胞的周期。免疫荧光分析的第一抗体为细胞周期蛋白(cyclin)D1,B1,细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)1,4和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(CDKI)p21蛋白,第二抗体采用荧光素标记,应用FCM检测黄芪注射液作用后H8细胞荧光强度。**结果:**黄芪注射液对H8细胞的生长有抑制作用,其中20 g·L⁻¹作用最明显。黄芪注射液处理组可见细胞生长稀疏、死亡或凋亡,细胞固缩成深染圆形小体。黄芪注射液作用于H8细胞时,S,G2期细胞减少,使细胞阻滞于G1期。H8细胞cyclinD1蛋白表达降低极显著;cyclinB1,CDK4蛋白,p21蛋白表达略降低,无统计学意义;CDK1蛋白表达显著降低。**结论:**黄芪注射液有可能作为一种细胞周期调控剂来预防或辅助治疗宫颈癌前病变。

[关键词] 黄芪注射液; 宫颈永生生化; 细胞周期; 蛋白表达; 细胞形态

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)04-0158-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015040158

Effect of Huangqi Injections on Growth of Human Immortalized Cervical Epithelial Cells ZHANG Li¹,

LI Neng-lian¹, SHE Ya-li¹, WANG Ya-li¹, LUO Ya-li¹, ZHANG Qiu-ju¹, HU Shu-ming¹, LYU Ling^{2*}

(1. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Gansu Maternity and Child Health Care Hospital, Lanzhou 730050, China)

[Abstract] **Objective:** To observe growth inhibition of Huangqi injections on human immortalized cervical epithelial cells (H8 cells) and make research on cell cycle regulation mechanism. **Method:** Effect of Huangqi injections on H8 cells was detected by MTT, form of cells after being injected was observed on optical microscope, cells cycle of H8 was analyzed by flow cytometry (FCM). First antibodies of immunofluorescence assay were cyclins D1 and B1, cyclin-dependent kinases (CDK) 1 and 4, cyclin-dependent kinase inhibitor (p21), second antibody was fluorescein labeled, fluorescence degree of H8 cells after being injected Huangqi injections was determined by FCM. **Result:** There was inhibiting effect on growth of H8 cells after being injected, function was the most obvious of 20 g·L⁻¹. Some of the Huangqi injections treatment group appeared to be sparse in cell growth, death or apoptosis, cells stained pyknosis hyperchromatic circular corpuscle. When Huangqi injections on H8 cells, S and G2 phase cells decreased, cell blocked in G1 period. Expression of cyclin D1 protein in H8 cells significantly decreased; expression of cyclin B1, CDK4 and P21 were slightly reduced, but without statistical significance; expression of CDK1 protein reduced significantly. **Conclusion:** Huangqi injections can be regarded as a cell cycle regulation agent for prevention or adjuvant therapy of cervical cancer.

[Key words] Huangqi injections; cervical immortalized; cell cycle; expression of protein; cell morphology

黄芪临床应用十分广泛,中医常将其用于治疗 各类癌症患者^[1-2],能提高患者免疫力^[3-4]、抑制肿

[收稿日期] 20140524(004)

[基金项目] 甘肃省中医药管理局课题(GZK-2013-56)

[第一作者] 张立,硕士,讲师,从事肿瘤病理研究,Tel:13919982461,E-mail:xuanli-711@163.com

[通讯作者] *吕玲,硕士,副主任医师,从事妇科肿瘤研究,Tel:13919010949,E-mail:gslvling@126.com

瘤细胞增殖、促进肿瘤细胞凋亡及抑制肿瘤新生血管形成及生长等^[5]。宫颈癌由高危型人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)引起^[6],发生过程包括癌前病变、早期浸润癌、浸润癌,整个过程约 10 年,HPV 达到细胞转化的永生化即相当于癌前病变。宫颈癌前病变即宫颈不典型增生,H8 细胞是 HPV16 永生化的宫颈鳞状上皮细胞株,即相当于临床的癌前阶段,可作为宫颈癌前病变的体外实验模型。本实验观察黄芪注射液对 H8 细胞生长的作用,探讨其对细胞周期调控的机制,为分析黄芪治疗宫颈癌前病变的可行性提供参考。

1 材料

M5 型自动酶标仪(美国分子仪器公司)。细胞周期蛋白(cyclin)B1,D1,细胞周期蛋白激酶(CDK)1,4,细胞周期蛋白激酶抑制因子 p21,山羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG)工作液均购自北京中杉生物技术有限公司;人永生化宫颈鳞状上皮细胞系 H8(中国医学科学院基础医学研究所),黄芪注射液[石家庄神威药业有限公司,批号 Z13020999,规格 10 mL/支(相

当于原药材 20 g)]。

2 方法与结果

2.1 细胞培养 将 H8 细胞置于含 2% 胎牛血清的达尔伯克必需基本培养基(dulbecco's modified eagle medium,DMEM)中,37℃,5% CO₂ 恒温箱内培养。

2.2 药物作用后细胞增殖能力的测定 采用噻唑蓝比色法(MTT)。根据文献[7]选择黄芪注射液作用终质量浓度分别为 200,20,2 g·L⁻¹,空白组采用等量生理盐水,共分 4 组,每组设 6 个平行孔。取 10⁵ 个/mL 的 H8 细胞悬液,2 个 96 孔板,以每孔 195 μL 接种,培养 24 h 后给药 5 μL。培养 2 d 后,每孔加入 5 g·L⁻¹ MTT 20 μL,继续培养 4 h,吸出培养液,加入二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO) 150 μL,轻微振荡溶解结晶,于 570 nm 处测定吸光度(A)。药物浓度均为 MTT 检测中筛选出的最佳有效作用剂量,见表 1。结果表明黄芪注射液对 H8 细胞的生长具有抑制作用,其中 20 g·L⁻¹ 作用最明显,故后续试验均采用此质量浓度。

表 1 黄芪注射液对 H8 细胞的生长抑制作用

Table 1 Inhibiting effect of Huangqi injections on H8 cells

组别	剂量 /g·L ⁻¹	A					
		1	2	3	4	5	6
空白	-	0.567 ± 0.031	0.467 ± 0.021	0.500 ± 0.017	0.567 ± 0.035	0.533 ± 0.021	0.500 ± 0.021
黄芪注射液	200	0.367 ± 0.032 ¹⁾	0.333 ± 0.015 ¹⁾	0.343 ± 0.021 ¹⁾	0.300 ± 0.027 ¹⁾	0.312 ± 0.020 ¹⁾	0.380 ± 0.021 ¹⁾
	20	0.170 ± 0.010 ²⁾	0.167 ± 0.015 ²⁾	0.160 ± 0.010 ²⁾	0.153 ± 0.012 ²⁾	0.187 ± 0.015 ²⁾	0.200 ± 0.015 ²⁾
	2	0.270 ± 0.027 ¹⁾	0.233 ± 0.015 ¹⁾	0.210 ± 0.010 ¹⁾	0.233 ± 0.006 ¹⁾	0.300 ± 0.027 ¹⁾	0.221 ± 0.026 ¹⁾

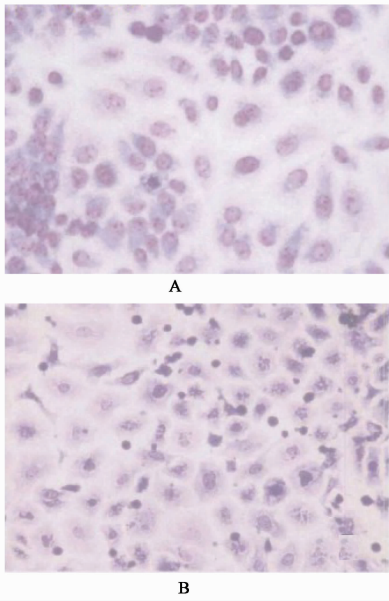
注:与空白组比较¹⁾P < 0.05,²⁾P < 0.01。

2.3 姬姆萨(Giemas)染色观察细胞形态 加黄芪注射液至 6 孔培养板中,每孔放置一片盖玻片,形成附有细胞的盖片。培养 3 d 后用三氯乙酸固定,每孔加预冷的 50% 三氯乙酸液 600 μL,轻轻地加入培养液表面,使死亡或凋亡的细胞被原位固定,静置 5 min 后将平板移至 4℃ 放置 1 h。取出盖玻片用水洗 3 遍,PBS 缓冲液冲洗 2 遍,甩干。用 Giemas 染色液染色 15 min,加水冲去多余染料,空气干燥,二甲苯透明,树脂胶封固。光学显微镜观察细胞形态、照像,胞核染成紫红色或蓝紫色,胞浆染成粉红色。空白组加等量生理盐水,见图 1,2。结果黄芪注射液处理组可见细胞生长稀疏、死亡或凋亡,细胞固缩成深染圆形小体。

2.4 流式细胞仪(FCM)检测细胞周期 按 1 × 10⁹ 个/L 将对数生长期细胞接种于 100 mL 培养瓶中,

加黄芪注射液培养 3 d 后收集细胞,制备单细胞悬液,每份标本测定 1 × 10⁴ 个细胞,检测细胞周期中不同时相的细胞数。空白组加等量生理盐水。结果发现黄芪注射液作用于 H8 细胞时,S,G2 期细胞减少,使细胞阻滞于 G1 期(P < 0.01)。

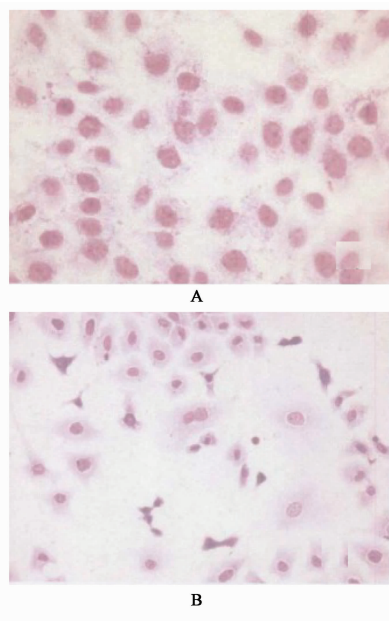
2.5 FCM 分析蛋白表达 加黄芪注射液培养 3 d 后收集细胞,采用蛋白间接免疫荧光标记法,细胞数 1 × 10⁶ 个/mL,第一抗体为 cyclin D1,B1 和 CDK1,CDK4,p21,1:100 稀释。异硫氰酸荧光素标记的二抗,山羊抗兔 IgG,1:100 稀释。每份标本测定 5 000 个细胞。空白组加等量生理盐水。结果与空白组相比,H8 细胞 cyclin D1 蛋白表达极明显降低(P < 0.01);cyclinB1 表达略降低,但无统计学意义;CDK1 蛋白表达显著降低(P < 0.05);CDK4 蛋白表达降低,但差异无显著性;p21 蛋白表达降低,但差



A. 空白组; B. 处理组

图 1 黄芪注射液处理 H8 细胞染色形态变化(×400)

Fig. 1 Staining morphological changes of H8 cells after being injected Huangqi injections(×400)



A. 空白组; B. 处理组

图 2 黄芪注射液处理 H8 细胞形态变化(×400)

Fig. 2 Morphological changes of H8 cells after treatment of Huangqi injections(×400)

异均无显著性。

3 讨论

徐经安等^[7]研究发现高浓度黄芪注射液对宫颈癌 Hela 细胞具有促凋亡作用,可协同顺铂增强对 Hela 细胞的促凋亡作用。王晓莉等^[8]研究发现

黄芪对 Hela 细胞有明显抑制生长和促凋亡作用,且呈时间、剂量依赖性。胡雅君等^[9]研究认为黄芪注射液可使宫颈癌患者 TH1/TH2 平衡向 TH1 偏移而发挥抗肿瘤作用。欧幸甘^[10]研究发现黄芪多糖防治宫颈癌化疗所致的骨髓抑制疗效显著,可调节患者的免疫功能,值得临床推广。宫颈癌前病变是诊治的最关键阶段,及时治疗可有效地扼制其癌变,但对于宫颈癌前病变国内外尚缺乏有效的化学预防和干预手段。本文研究表明黄芪注射液对 H8 细胞的生长具有抑制作用,使 H8 细胞阻滞于 G1 期。说明黄芪注射液对 G1 期的某些关键事件产生了影响。深入研究发现黄芪注射液的作用环节主要在 G1 期细胞周期蛋白 cyclinD1,使 H8 细胞的 cyclinD1 蛋白表达下降,同时使 CDK1 蛋白下降,提示黄芪注射液有可能作为一种细胞周调控剂来预防或辅助治疗宫颈癌前病变。

[参考文献]

- [1] 吴疆. 参附注射液联合黄芪注射液对恶性肿瘤化疗毒副作用的影响[J]. 山东医药, 2009, 49(8): 89-91.
- [2] 柏长青, 遆新宇, 刘关键, 等. 党参、黄芪提取物注射液对减轻肺癌患者化疗毒副反应和生存质量影响的研究[J]. 中国康复医学志, 2006, 21(8): 707-709.
- [3] 赵美蓉, 周洁. 黄芪多糖对恶性肿瘤化疗后骨髓抑制的影响[J]. 天津中医药, 2007, 24(2): 114-116.
- [4] 丁宁, 杨宇飞, 许云, 等. 健脾活血解毒法拆方含药血清对人大肠癌细胞 HCT-116 细胞的增殖抑制作用及其机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(11): 272-275.
- [5] 朱世杰, 于莉莉, 贾立群. 参芪扶正注射液对荷瘤动物生存期影响的免疫机制研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2009, 16(4): 264-267.
- [6] 王小艳, 税平, 梁楠楠. 宫颈癌治疗方法的进展[J]. 华北煤炭医学院学报, 2010, 12(2): 183-185.
- [7] 徐经安, 胡平. 黄芪注射液联合顺铂对 HeLa 细胞生长的影响[J]. 新乡医学院学报, 2013, 30(3): 172-175.
- [8] 王晓莉, 苏志红, 李妍芹, 等. 黄芪对体外培养人宫颈癌 Hela 细胞的抑制作用[J]. 西北国防医学杂志, 2010, 31(4): 270-272.
- [9] 胡雅君, 李力, 龚世雄, 等. 黄芪对宫颈癌患者 TH1/TH2 细胞功能调节作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(11): 1157-1159.
- [10] 欧幸甘. 黄芪多糖预防及治疗宫颈癌化疗所致骨髓抑制的疗效观察[J]. 吉林医学, 2012, 33(13): 2774-2776.

[责任编辑 刘德文]