

· 药理 ·

紫草素对宫颈癌 Hela 细胞增殖、侵袭和迁移的影响

郝臻凤^{1,2}, 刘静², 张瑜¹, 李瑶瑶¹, 孔桂美¹, 卜平¹, 钱静^{1*}

(1. 扬州大学医学院中西医结合临床医学系, 江苏扬州 225009;

2. 扬州大学附属泰兴市人民医院, 江苏泰兴 225400)

[摘要] 目的:研究紫草素(shikonin)对人宫颈癌 Hela 细胞增殖、侵袭和迁移能力的影响,并对其机制进行初步探讨。方法:体外培养 Hela 细胞,分为对照组和紫草素组(浓度分别为 4,8,16,32,64 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),采用 MTT 法检测紫草素对 Hela 细胞增殖的抑制作用;紫草素处理 Hela 细胞 24 h 后,采用流式细胞术观察细胞凋亡率的变化;Transwell 小室法检测细胞侵袭和迁移力的变化;Western blotting 法分析黏着斑激酶(FAK)蛋白表达及 FAK 磷酸化水平的变化;实时荧光定量 PCR 技术检测 FAK mRNA 表达的情况。结果:紫草素对 Hela 细胞的增殖具有抑制作用,且具有浓度和时间依赖性;细胞凋亡率随着紫草素浓度的增加而逐步增高,其中 32,64 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的紫草素可明显抑制细胞增殖并诱导其凋亡($P < 0.001$)。4,8,16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的紫草素作用于 Hela 细胞后,能够显著降低 Hela 细胞的穿膜细胞数($P < 0.05$)。紫草素能够呈浓度依赖性的下调 Hela 细胞中 FAK 蛋白和 mRNA 的表达,使 FAK 磷酸化水平降低。结论:紫草素可显著抑制 Hela 细胞的增殖、侵袭和迁移能力,其机制可能与抑制 FAK 磷酸化水平有关。

[关键词] 紫草素;增殖;侵袭;迁移;黏着斑激酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)06-0091-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015060091

Effects of Shikonin on Proliferation, Invasion and Migration in Cervical Cancer Hela Cells

HAO Zhen-feng^{1,2}, LIU Jing², ZHANG Yu¹, LI Yao-yao¹, KONG Gui-mei¹, BU Ping¹, QIAN Jing^{1*}

(1. Medical College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. Taixing People's Hospital Affiliated to Yangzhou University, Taixing 225400, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of shikonin on proliferation, invasion and migration of human cervical cancer Hela cells and to explore the possible mechanism. **Method:** The human cervical cancer Hela cells were cultivated and divided into control group and shikonin group (the concentration was respectively 4, 8, 16, 32, 64 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). The effect of shikonin on cell viability, apoptosis, invasion and migration of cells cultivated after 24 h were studied by MTT assay, flow cytometric and Transwell assay, respectively. When cells were cultivated after 24 h, the expression of focal adhesion kinase (FAK) protein, the level of phosphorylated FAK, and mRNA were assessed by Western blot and quantitative real-time PCR analysis. **Result:** Shikonin inhibited proliferation and induced apoptosis of Hela cells in a dose-dependent manner. When treated with low-toxic doses of shikonin (4, 8, 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), the cell invasion and migration were markedly suppressed. Furthermore, shikonin significantly down-regulated the expression of FAK and the level of phosphorylated FAK. In addition, shikonin could increase the expression of FAK mRNA. **Conclusion:** Shikonin inhibits proliferation and invasion of cervical cancer Hela cells by inhibiting phosphorylation of FAK.

[Key words] shikonin; proliferative; invasion; migration; focal adhesion kinase

紫草素(shikonin)是从紫草科植物紫草的根中提取出的一种有效成分,其化学结构为萘醌类化合

[收稿日期] 20140813 (004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81272537);江苏省中医药局项目(LZ13206)

[第一作者] 郝臻凤,博士,主治医师,从事中西医结合临床妇产科学研究, Tel:18852714249, E-mail:zhao1113@163.com

[通讯作者] *钱静,教授,主任中医师,博士生导师,从事中西医结合临床妇产科学研究, Tel:13004333643, E-mail:yzqj2000@163.com

物,具有抗炎、抗肿瘤等作用^[1]。研究报道紫草素可以抑制多种肿瘤细胞的增殖、侵袭和迁移能力,但其具体作用机制还不完全清楚^[2]。黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)是 1992 年 Schaller 等发现的一种新的酪氨酸蛋白激酶,它是整合素介导的信号转导途径的中心分子,其在细胞的增殖、凋亡、侵袭、迁移中发挥着重要的作用^[3]。本文选用人宫颈癌 Hela 细胞为研究对象,拟研究紫草素对宫颈癌 Hela 细胞增殖、侵袭和迁移的抑制作用,并探讨其机制是否与抑制 FAK 的磷酸化有关。

1 材料

1.1 药品 紫草素(shikonin,美国 Calbiochem),使用时用二甲基亚砜(DMSO)溶解,并使 DMSO 的最终质量浓度 $<0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光保存。

1.2 细胞株和试剂 人宫颈癌 Hela 细胞(购自中国科学院上海细胞库)。DMEM 细胞培养基(Hyclone 公司,批号 NZE1147),胎牛血清(Hyclone 公司,批号 NXA0544),胰蛋白酶(Sigma 公司,批号 2242B80),MTT 粉剂(Sigma 公司,批号 1313B12),Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(南京凯基公司,批号 20131121),Transwell 小室(Corning 公司,批号 20130204),FAK, p-FAK, β -actin 克隆抗体(Cell Signaling 公司)。TRIzol 试剂(Invitrogen 公司,批号 14105),RT-PCR 试剂盒(日本 Takara 公司,批号 AK401),FAK, GAPDH 引物(上海生工生物技术公司合成)。

1.3 仪器 Synergy 型全自动酶标板分析仪(美国, Bio-Tek 公司),Mini Protean[®] Tetra System 型蛋白电泳槽,Power Pac Basic 型电转移装置, Molecular Imager ChemiDoc XRS + Image Lab 2.0 型成像系统(美国,均为 Bio-Rad 公司),FACS Calibur 型流式细胞测定仪(美国, Becton-Dickinson 公司),801 型正置荧光显微镜(日本, Nikon 公司),ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪(美国, Applied Biosystems 公司)。

2 方法

2.1 检测细胞活力 取对数生长期 Hela 细胞,制成 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 的细胞悬液,每孔 $200 \mu\text{L}$ 接种于 96 孔板,次日加入含不同浓度(4, 8, 16, 32, 64 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)紫草素的培养液,每组设 5 个平行孔, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱培养 24, 48, 72 h 后,按常规方法进行 MTT 反应,酶标仪检测波长 490 nm 的吸光度(A_{490}),计算抑制率。

$$\text{抑制率} = (1 - \text{药物组 } A_{490} / \text{对照组 } A_{490}) \times 100\%$$

2.2 检测细胞凋亡 Hela 细胞经不同浓度(4, 8, 16, 32, 64 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的紫草素处理 24 h 后,按照试

剂盒说明,胰酶消化收集 1×10^6 个细胞, PBS 清洗后弃去上清,再用 $100 \mu\text{L}$ 结合缓冲液重悬,每管加入 $4 \mu\text{L}$ Annexin V-FITC, $5 \mu\text{L}$ PI 染液,避光孵育 15 min 后流式细胞仪检测。按下式计算凋亡率。

$$\text{凋亡率} = \text{凋亡细胞数} / \text{总细胞数} \times 100\%$$

2.3 检测细胞侵袭和迁移力 Transwell 小室底部膜用 Matrigel 稀释液包被、水化。用无血清培养液将细胞密度调整到 5×10^5 个/mL,加 $200 \mu\text{L}$ 到 Transwell 上室,加 $500 \mu\text{L}$ 含 20% 胎牛血清的培养液到下室。分别按紫草素终浓度为 4, 8, 16 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 加入样品处理细胞,每种浓度设 5 个复孔,细胞继续培养 12 h,取出 Transwell 小室用 PBS 洗 2 遍,用棉签擦去上室表面细胞,甲醇固定 15 min, 0.1% 结晶紫室温下染色 30 min,在高倍镜下计数小室膜下面侵袭的细胞数,计数中间和四周 5 个视野,取平均值。迁移实验不铺 Matrigel,其余步骤同侵袭实验。

2.4 检测 FAK 蛋白表达和磷酸化水平 将 2×10^5 个 Hela 细胞种植于 6 孔板中,待细胞贴壁后加入不同浓度(4, 8, 16, 32, 64 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的紫草素处理 24 h 后,弃去培养液,加入蛋白裂解液 $200 \mu\text{L}$ 收集蛋白样本,用 BCA 法测定蛋白浓度。取 $20 \mu\text{g}$ 蛋白样品进行聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳,电泳后电转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h 后加入一抗于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜,用 TBST 缓冲液洗涤 3 次,接着加入二抗于室温孵育 2 h,再用 TBST 缓冲液洗涤 3 次,然后加入化学发光剂进行检测, Molecular Imager ChemiDoc XRS + Imaging System 成像系统中采集图像。

2.5 检测 FAK mRNA 的表达 分别用不同浓度(4, 8, 16, 32, 64 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的紫草素处理 Hela 细胞 24 h 后,收集细胞,用 TRIzol 提取总 RNA 并进行 cDNA 合成。采用荧光实时定量 PCR 检测 FAK mRNA 水平并进行数据分析。FAK,上游引物为 5'-AGTAAAATCCAGCCAGCCCC-3',下游引物为 5'-GACATACTGCTGGGCCAGTT-3'; GAPDH,上游引物为 5'-AAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC-3',下游引物为 5'-GGGTCATTGATGGCAACAATA-3'。反应条件为: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 34 s, $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 s, 35 个循环后, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 7 min。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析待测样品中各基因的相对表达程度。

2.6 统计学处理 所有实验均重复 3 次以上,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 19.0 统计软件分析,单因素两均数的比较采用 t 检验,多均数的比较采用方

差分析 (ANOVA), $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

3 结果

3.1 对 HeLa 细胞增殖的影响 对照组 HeLa 细胞体外生长活跃, 经不同浓度 (4, 8, 16, 32, 64 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的紫草素处理后, 细胞生长呈现不同程度的抑制作用, 并且呈一定的浓度及时间依赖性 (表 1)。计算紫草素对 HeLa 细胞在 24, 48, 72 h 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 34.86, 32.84, 31.32 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表 1 紫草素对 HeLa 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Table 1 Effect of cell viability in HeLa cells treated with shikonin ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞增殖/A		
		24 h	48 h	72 h
对照	-	1.23 \pm 0.02	1.21 \pm 0.03	1.19 \pm 0.02
紫草素	4	1.16 \pm 0.03	1.12 \pm 0.02	1.08 \pm 0.02 ¹⁾
	8	1.07 \pm 0.02 ¹⁾	1.02 \pm 0.03 ¹⁾	0.99 \pm 0.03 ¹⁾
	16	0.99 \pm 0.02 ¹⁾	0.95 \pm 0.01 ²⁾	0.91 \pm 0.02 ²⁾
	32	0.67 \pm 0.02 ²⁾	0.64 \pm 0.02 ²⁾	0.62 \pm 0.03 ²⁾
	64	0.38 \pm 0.01 ³⁾	0.36 \pm 0.02 ³⁾	0.34 \pm 0.02 ³⁾

注: 与对照组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$ (表 2~4 同)。

3.2 对 HeLa 细胞凋亡的影响 紫草素作用于 HeLa 细胞 24 h 后, 细胞早期凋亡率逐渐上升, 细胞坏死或晚期凋亡率也逐渐上升, 其中 32, 64 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的紫草素可明显提高细胞凋亡率及坏死率 ($P < 0.001$), 见表 2。结合 MTT 的实验结果, 为排除药物的细胞毒作用对细胞侵袭和迁移能力的影响, 后续侵袭迁移实验选用的紫草素浓度依次为 4, 8, 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表 2 紫草素对 HeLa 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 2 Effect of cell apoptosis in HeLa cells treated with shikonin ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞凋亡/%	
		Q2	Q4
对照	-	3.07 \pm 0.66	1.44 \pm 0.38
紫草素	4	3.14 \pm 0.55	2.18 \pm 0.34 ¹⁾
	8	5.34 \pm 0.69 ²⁾	3.05 \pm 0.56 ²⁾
	16	6.46 \pm 1.31 ²⁾	4.12 \pm 0.48 ²⁾
	32	21.56 \pm 1.21 ³⁾	19.62 \pm 1.08 ³⁾
	64	30.29 \pm 0.98 ³⁾	29.89 \pm 0.98 ³⁾

注: Q2 为晚期凋亡细胞或坏死细胞, Q4 为早期凋亡细胞。

3.3 对 HeLa 细胞侵袭和迁移力的影响 HeLa 细胞经不同浓度 (4, 8, 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的紫草素处理 24 h 后, 透膜细胞数目较对照组明显减少, 并呈浓度依赖性 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 紫草素对 HeLa 细胞侵袭力和迁移力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effects of cell invasion and metastasis in HeLa cells treated with shikonin ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	侵袭透膜细胞数	迁移透膜细胞数
		/个	/个
对照	-	65.8 \pm 6.06	68.9 \pm 6.93
紫草素	4	51.6 \pm 6.31 ¹⁾	48.8 \pm 6.21 ²⁾
	8	37.4 \pm 4.69 ²⁾	34.8 \pm 4.12 ³⁾
	16	20.4 \pm 3.31 ³⁾	22.8 \pm 3.76 ³⁾

3.4 对 FAK 蛋白表达以及 FAK 磷酸化水平的影响 HeLa 细胞经过不同浓度 (4, 8, 16, 32, 64 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的紫草素处理 24 h 后, Western blotting 法分析目的蛋白的表达。紫草素能明显下调 FAK 蛋白的表达, 明显降低 FAK 酪氨酸磷酸化水平, 大幅降低 FAK 酪氨酸磷酸化程度 (p-FAK/FAK)。见图 1。

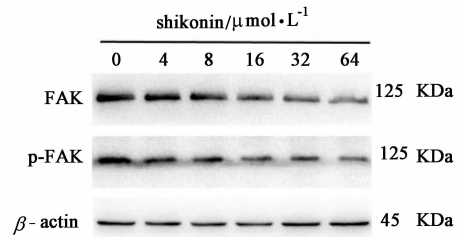


图 1 紫草素对 HeLa 细胞 FAK 蛋白表达以及 FAK 磷酸化水平的影响

Fig. 1 Effect of protein expression of FAK and p-FAK in HeLa cells treated with shikonin

3.5 对 HeLa 细胞 FAK mRNA 表达水平的影响 实时荧光定量 PCR 结果显示 FAK 和 GAPDH 基因的溶解曲线均为单峰, 说明为单片段扩增特异性较好。根据 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析 FAK 基因的相对表达量, 结果发现不同浓度 (4, 8, 16, 32, 64 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的紫草素作用 HeLa 细胞 24 h 后, FAK mRNA 的表达水平平均下降。与对照组比较, 各浓度的紫草素对 FAK mRNA 表达分别下调 12%, 20%, 28%, 39%, 55%。见表 4。

4 讨论

宫颈癌是妇女常见的恶性肿瘤之一, 严重威胁女性的生命和健康。目前临床上治疗宫颈癌主要采用手术、放疗和化疗综合治疗的方法, 并取得了一定的效果。但化疗药物在抑制肿瘤细胞增殖的同时, 对正常细胞也有很大的杀伤作用, 严重影响其临床应用及疗效, 因此从传统中药中寻求毒性较低的治疗药物已成为研究的热点^[4]。近年来国内外研究表明, 从中药紫草中提取的萘醌类化合物紫草素具

表 4 紫草素对 HeLa 细胞 FAK mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of the mRNA expression of FAK in HeLa cells treated with shikonin ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	GAPDH	FAK	ΔC_t	$\Delta\Delta C_t$	$2^{-\Delta\Delta C_t}$
对照	0	21.12 ± 0.20	28.04 ± 0.17	6.92 ± 0.19	0.00 ± 0.31	1.00(0.81 - 1.24)
紫草素	4	21.17 ± 0.15	28.26 ± 0.24	7.09 ± 0.12	0.17 ± 0.29	0.88(0.73-1.09) ^[1]
	8	21.51 ± 0.20	28.74 ± 0.21	7.23 ± 0.15	0.31 ± 0.32	0.80(0.65-1.01) ^[2]
	16	21.84 ± 0.22	29.22 ± 0.19	7.38 ± 0.19	0.46 ± 0.31	0.72(0.59-0.90) ^[2]
	32	21.52 ± 0.24	29.13 ± 0.23	7.61 ± 0.18	0.69 ± 0.35	0.61(0.49-0.79) ^[3]
	64	21.89 ± 0.17	29.96 ± 0.26	8.07 ± 0.17	1.15 ± 0.52	0.45(0.31-0.65) ^[3]

有较好的抗肿瘤活性。它主要通过细胞毒作用、诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞的侵袭和迁移、抑制肿瘤血管生成等多种机制发挥抗肿瘤作用^[5-8]。有研究发现紫草素能够抑制人宫颈癌 HeLa 细胞的增殖,并诱导其凋亡^[9],但对细胞侵袭和迁移的影响未见报道。本实验结果显示,紫草素能呈浓度和时间依赖性的抑制宫颈癌 HeLa 细胞的增殖;且随着药物浓度的增加,细胞早期和晚期凋亡率均逐渐上升,说明紫草素可明显抑制 HeLa 细胞的增殖,并诱导其凋亡。研究还发现紫草素能呈浓度依赖性的减少透膜细胞数目,提示紫草素能够抑制 HeLa 细胞的侵袭和迁移能力。本实验在前期研究的基础上,进一步证实了紫草素的抗宫颈癌的作用,为开发毒性较低的抗癌新药奠定基础。

FAK 在卵巢癌等多种恶性肿瘤中均呈高表达,且 FAK 的表达和 FAK 磷酸化水平的升高可以促进肿瘤细胞增殖、改变其黏附、侵袭和迁移能力^[10]。因此,笔者推测 FAK 可能是肿瘤细胞侵袭、转移潜能的一个共同通路,可作为肿瘤侵袭转移的早期标志物之一。本研究发现紫草素处理 HeLa 细胞 24 h 后,可明显下调 FAK 蛋白和 mRNA 的表达,抑制 FAK 磷酸化水平。因此,我们认为下调肿瘤细胞内 FAK 基因的表达,抑制其磷酸化水平可能是紫草素抑制 HeLa 细胞的增殖,诱导细胞凋亡,抑制其侵袭转移能力的机制之一。

本研究结果提示紫草素可以通过抑制 FAK 磷酸化来抑制宫颈癌 HeLa 细胞的增殖、侵袭和迁移,从而发挥其抗肿瘤的作用。紫草素是直接作用于 FAK,还是通过调节其上游激酶和/或信号分子而间接发挥作用仍不清楚。紫草素除通过调节 FAK 外,是否还调节其他信号通路尚需更深入的研究。

[参考文献]

[1] Mao X, Yu C R, Li W H, et al. Induction of apoptosis by shikonin through a ROS/JNK-mediated process in

Bcr/Abl-positive chronic myelogenous leukemia (CML) cells [J]. Cell Res, 2008, 18 (8):879-888.
 [2] Andújar I, Ríos J L, Giner R M, et al. Pharmacological properties of shikonin-a review of literature since 2002 [J]. Planta Med, 2013, 79 (18):1685-1697.
 [3] Lipfert L, Haimovich B, Schaller M D, et al. Integrin-dependent phosphorylation and activation of the protein tyrosine kinase pp125FAK in platelets [J]. J Cell Biol, 1992, 119 (4):905-912.
 [4] Kim M S, Bak Y, Park Y S, et al. Wogonin induces apoptosis by suppressing E6 and E7 expressions and activating intrinsic signaling pathways in HPV-16 cervical cancer cells [J]. Cell Biol Toxicol, 2013, 29 (4):259-272.
 [5] 冉芳, 蒋江涛, 赵虹, 等. 紫草素通过氧化胁迫诱导 K562 细胞凋亡 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19 (13):221-225.
 [6] Chen Y, Zheng L, Liu J, et al. Shikonin inhibits prostate cancer cells metastasis by reducing matrix metallo-proteinase-2/9 expression via AKT/mTOR and ROS/ERK1/2 pathways [J]. Int Immunopharmacol, 2014, 21 (2):447-455.
 [7] Jang S Y, Lee J K, Jang E H, et al. Shikonin blocks migration and invasion of human breast cancer cells through inhibition of matrix metalloproteinase-9 activation [J]. Oncol Rep, 2014, 31 (6):2827-2833.
 [8] Lee H J, Lee H J, Magesh V, et al. Shikonin, acetylshikonin, and isobutyrylshikonin inhibit VEGF-induced angiogenesis and suppress tumor growth in lewis lung carcinoma-bearing mice [J]. Yakugaku Zasshi, 2008, 128 (11):1681-1688.
 [9] Wu Z, Wu L J, Tashiro S, et al. Phosphorylated extracellular signal-regulated kinase up-regulated p53 expression in shikonin-induced HeLa cell apoptosis [J]. Chin Med J, 2005, 118 (8):671-677.
 [10] Sulzmaier F J, Jean C, Schlaepfer D D. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications [J]. Nat Rev Cancer, 2014, 14(9):598-610.

[责任编辑 聂淑琴]