

# 红花多糖对人宫颈癌 Hela 细胞增殖和 VEGF 表达的影响

杨婧<sup>1</sup>, 戚基萍<sup>2</sup>, 王锐<sup>1</sup>, 孙阳<sup>1</sup>, 王蔚<sup>1</sup>, 谢国梁<sup>1</sup>, 王亚贤<sup>1\*</sup>

(1. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040; 2. 哈尔滨医科大学 附属第一医院, 哈尔滨 150001)

**[摘要]** 目的:通过研究红花多糖对人宫颈癌 Hela 细胞增殖和血管内皮生长因子(VEGF)表达情况的影响,探讨红花多糖抗宫颈癌作用的分子机制。方法:体外培养人宫颈癌 Hela 细胞,加入含不同质量浓度(0.02,0.04,0.08,0.16,0.32,0.64 和 1.28 g·L<sup>-1</sup>)红花多糖的培养液,培养 48 h,用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测红花多糖对 Hela 细胞增殖的影响;以不同质量浓度(0.16,0.32,0.64 g·L<sup>-1</sup>)的红花多糖处理 Hela 细胞 48 h,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测细胞上清液中 VEGF 的表达,实时定量荧光聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测 VEGF mRNA 的表达,免疫印迹法(Western blot)检测 VEGF 蛋白表达的变化。结果:与空白组比较,(0.16,0.32,0.64 g·L<sup>-1</sup>)的红花多糖作用于宫颈癌 Hela 细胞 48 h 后能显著抑制细胞的体外增殖,呈现剂量依赖性( $P < 0.05$ )。红花多糖能明显下调 Hela 细胞 VEGF mRNA 和蛋白的表达( $P < 0.05$ )。结论:红花多糖可通过抑制 VEGF 的表达抑制宫颈癌 Hela 细胞的增殖,发挥抗肿瘤作用。

**[关键词]** 红花多糖; 人宫颈癌细胞; 血管内皮生长因子

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)08-0111-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016080111

## Effect of Safflower Polysaccharide on Proliferation and VEGF Expression of Human Cervical Cancer Hela Cells

YANG Jing<sup>1</sup>, QI Ji-ping<sup>2</sup>, WANG Rui<sup>1</sup>, SUN Yang<sup>1</sup>, WANG Wei<sup>1</sup>, XIE Guo-liang<sup>1</sup>, WANG Ya-xian<sup>1\*</sup>

(1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

2. The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of safflower polysaccharide on proliferation and vascular endothelial growth factor (VEGF) expressions of human cervical cancer Hela cells, and discuss its molecular mechanism against cervical cancer. **Method:** Human cervical cancer Hela cells were cultured *in vitro* with different concentrations of safflower polysaccharide (0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32, 0.64, 1.28 g·L<sup>-1</sup>) for 48 hours. Their effect on Hela cells proliferation was assessed by 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide (MTT) assay. Hela cells were treated with different concentrations of safflower polysaccharide (0.16, 0.32, 0.64 g·L<sup>-1</sup>) for 48 hours, and then enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the VEGF expression in cells supernatant; reverse Real-time PCR was used to detect VEGF mRNA expressions and Western blot method was used to detect VEGF protein expressions. **Result:** Compared with the blank group, safflower polysaccharide (0.16, 0.32, 0.64 g·L<sup>-1</sup>) could significantly inhibit the proliferation of Hela cells after 48 h treatment in a dose-dependent manner ( $P < 0.05$ ). Safflower polysaccharide could significant down-regulate mRNA expressions and protein expressions of VEGF of Hela cells, with significantly statistical differences ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Safflower polysaccharide can inhibit proliferation of cervical cancer Hela cells and have its antitumor effect by inhibiting the expressions of VEGF.

**[Key words]** safflower polysacchande; human cervical cancer cells; vascular endothelial growth factor

**[收稿日期]** 20150811(017)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81473359);黑龙江中医药大学优秀青年教师支持计划项目(051246)

**[第一作者]** 杨婧,博士,副教授,从事中医药抗肿瘤的研究,Tel:0451-82195940,E-mail:yangjingdx@sina.com

**[通讯作者]** \*王亚贤,教授,博士生导师,从事中医药现代化多学科免疫学研究,Tel:0451-82193649,E-mail:wangyxmail@yahoo.com.cn

Folkman<sup>[1]</sup>提出了“肿瘤血管生成”理论,认为实质肿瘤的增长与血管的新生有着密切的关系。肿瘤细胞代谢产生的化学信号可激活处于休眠状态的血管内皮细胞,从而促进肿瘤血管生成,新生的血管为肿瘤的生长提供了丰富的氧气和营养物质,并能带走代谢产物。因而,抗肿瘤血管生成疗法已经成为目前治疗肿瘤的研究方向之一。宫颈癌是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤<sup>[2]</sup>,且宫颈癌的生长与新生血管的形成有着密切的关系<sup>[3]</sup>。

红花是一味传统的活血化瘀中药,具有活血通经,散瘀止痛的功能。本课题组前期研究发现,红花中提取的有效成分红花多糖具有免疫调节功能,对胃癌<sup>[4]</sup>、肝癌<sup>[5]</sup>、乳腺癌<sup>[6]</sup>均有抑制作用,且能抑制鸡胚绒毛尿囊膜的血管生成<sup>[7]</sup>。但不同部位的肿瘤对同一种药物的敏感性不同,红花多糖对宫颈癌细胞是否同样具有抗肿瘤作用还不清楚。为此,本研究探讨红花多糖对宫颈癌细胞株体外作用的分子机制。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 人宫颈癌 Hela 细胞株购自上海瑞齐生物科技有限公司,加入高糖 DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司,批号 NZA1070),于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。

**1.2 药品** 红花购于哈尔滨世一堂中药饮片有限责任公司(批号 20120812),经黑龙江中医药大学药剂教研室王锐副教授鉴定符合 2010 年版《中国药典》规定。采用超微粉碎联合超声波辅助提取红花中的多糖,提取物进一步纯化得到精制红花多糖<sup>[8]</sup>。

**1.3 试剂与仪器** 四甲基偶氮唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司,批号 M2128),内皮生长因子(VEGF)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(美国 R&D 公司,批号 DVE00),Trizol 提取试剂盒(美国 Invitrogen 公司,批号 15596-026),内参(GAPDH)抗体(美国 Bioworld 公司,批号 MB001),VEGF 抗体(美国 Abcam 公司,批号 ab46154)。Heracell 150i 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo 公司),CKX41 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司),IQ5 型实时荧光定量 PCR 仪,PowerPac™ HC 蛋白电泳及转膜系统(美国 Bio-Rad 公司),Multimager 型多功能凝胶图像成像仪(美国 Alpha Innotech 公司)。

## 2 方法

**2.1 MTT 测定 Hela 细胞增殖** 取对数生长期的 Hela 细胞 5 × 10<sup>3</sup> 个/孔接种在 96 孔板中,每孔体积

100 μL。置入 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 孵箱孵育,至 Hela 细胞单层铺满孔底时弃掉原培养液。分别加入质量浓度为 0.02,0.04,0.08,0.16,0.32,0.64,1.28 g·L<sup>-1</sup> 的红花多糖,以 0 g·L<sup>-1</sup> 红花多糖组作为空白组,每个剂量设 3 个复孔。孵育 48 h,分别在每孔加入 5 g·L<sup>-1</sup> 的 MTT 溶液 10 μL,继续孵育 4 h。吸弃孔内培养上清液,每孔加入二甲基亚砷 150 μL,避光振荡摇匀 10 min,使结晶物充分融解完全显色。在酶联免疫检测仪上测定 490 nm 波长处吸光度 A。按下列公式计算肿瘤细胞增殖抑制率(IR)。

$$IR = (1 - A_{\text{加药组}} / A_{\text{空白组}}) \times 100\%$$

**2.2 ELISA 测定细胞上清液中 VEGF 表达** 取对数生长期的 Hela 细胞 1 × 10<sup>4</sup> 个/孔接种在 96 孔板中,每孔体积 100 μL。置入 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 孵箱孵育,至 Hela 细胞单层铺满孔底时弃掉原培养液。加入质量浓度为 0.16,0.32,0.64 g·L<sup>-1</sup> 的红花多糖,以 0 g·L<sup>-1</sup> 红花多糖组作为空白组,每个剂量设 3 个复孔。孵育至 48 h,1 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,收集上清。按血管内皮生长因子 ELISA 试剂盒使用说明书,分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。在 96 孔板上样品孔加上清液 100 μL,37 °C 孵育 2.5 h。弃液体,甩干,加洗涤液,静置。除空白孔外每孔加酶标试剂 100 μL,37 °C 孵育 1 h 后洗涤。每孔加显色剂 100 μL,终止液 50 μL,空白孔调零,在酶联免疫检测仪上测定 450 nm 波长处 A。计算 VEGF 浓度。

**2.3 实时定量荧光聚合酶链式反应(Real-time PCR)测定细胞 VEGF mRNA 表达**

**2.3.1 引物合成** 通过 Genbank 数据库,查找 VEGF mRNA 和 GAPDH mRNA 全基因序列,应用 Primer Premier 2.0 软件进行引物设计,由上海艾博思生物科技有限公司合成。所有引物通过同源性比较,均为特异引物。设计的引物序列和 PCR 产物长度见表 1。

表 1 待测基因及内参基因 PCR 引物序列信息

Table 1 PCR Primers sequence of the targeted and reference genes

引物	序列(5'-3')	长度/bp
GAPDH	上游 CATGAGAAGTATGACAACAGCCT	113
	下游 AGTCCTTCCACGATACCAAAGT	
VEGF	上游 GGCAGAAATCATGCACGAAGTGGTG	72
	下游 GGGTCTCGATTGGATGGCAGTAG	

**2.3.2 RNA 提取** Trizol 一步法提取 0.16,0.32,0.64 g·L<sup>-1</sup> 的红花多糖作用 48 h 后红花多糖组和空白组的细胞总 RNA,琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质

量,分光光度计测定 RNA 浓度。

**2.3.3 Real-time PCR 反应** 取 2  $\mu\text{L}$  总 RNA 逆转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板,加入设计好的 VEGF, GAPDH 的引物等。于实时荧光定量 PCR 仪上反应,PCR 循环条件:95  $^{\circ}\text{C}$  3 min,95  $^{\circ}\text{C}$  30 s,62  $^{\circ}\text{C}$  40 s,40 个循环,收集荧光信号。

**2.3.4 数据分析** 使用 Sequence Detection software version 1.2.3 软件记录分析各检测样本的  $C_t$  值,应用相对定量法 ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) 进行定量分析,通过比较  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  值的变化,分析各组 VEGF mRNA 的表达情况。

**2.4 免疫印迹法 (Western blot) 测定细胞 VEGF 蛋白表达** 取作用 48 h 的各组细胞,用预冷的磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤细胞 3 次,胰酶消化,1 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心去上清,加入细胞裂解液,离心 30 min,收集上清液用 Bradford 法测定样品中总蛋白质的浓度。各组样本蛋白经 10% SDS-PAGE 电泳后,将蛋白转到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上,用封闭液封闭 1~2 h,加入封闭液稀释的一抗 (1:100) 杂交过夜;洗膜,加入封闭液稀释的二抗 (1:100 000) 室温孵育 1 h,洗膜,显影,定影。进行荧光扫描成像,利用凝胶图象处理系统进行分析。

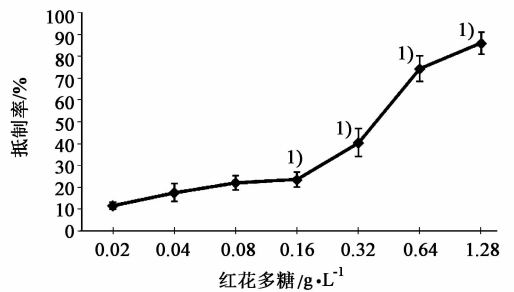
**2.5 统计学分析** 采用 SPSS 19.0 统计软件包进行方差分析,计量结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,各组间比较采用单因素方差分析,多重比较采用 Dunnett 法进行检验,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对 HeLa 细胞增殖的影响** 红花多糖作用 48 h 后,与空白组比较,随着红花多糖剂量的增加,HeLa 细胞的增殖抑制率逐渐增加 ( $P < 0.05$ ),见图 1。在 24, 48, 72 h 红花多糖抑制 HeLa 细胞增殖 50% 的药物浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 分别为 0.574, 0.269, 0.159  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在后续研究中红花多糖作用的最高浓度为 0.64  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**3.2 对 HeLa 细胞上清液中 VEGF 蛋白表达的影响** 与空白组比较,0.16, 0.32, 0.64  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的红花多糖作用 48 h 后,VEGF 蛋白含量下降,分别减少 26.4%, 39.2%, 53.4%, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

**3.3 对 HeLa 细胞 VEGF mRNA 表达的影响** 不同质量浓度 (0.16, 0.32, 0.64  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 的红花多糖作用于 HeLa 细胞 48 h 后,VEGF mRNA 表达下调。与空白组比较,0.16, 0.32, 0.64  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  红花多糖组 VEGF mRNA 表达明显降低 ( $P < 0.05$ )。见表 3。



与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$

图 1 红花多糖对宫颈癌 HeLa 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig.1 Effect of safflower polysaccharide on proliferation of cervical cancer HeLa cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

表 2 红花多糖作用 48 h 后细胞上清液中 VEGF 蛋白含量比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Comparison of VEGF levels in the cells supernatant after 48 hours treatment with safflower polysaccharide ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	VEGF/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$
空白	-	583.4 $\pm$ 47.1
红花多糖	0.16	429.3 $\pm$ 39.5 <sup>1)</sup>
	0.32	354.7 $\pm$ 36.2 <sup>1)</sup>
	0.64	271.9 $\pm$ 18.3 <sup>1)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$  (表 3 同)。

表 3 红花多糖对 HeLa 细胞 VEGF mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

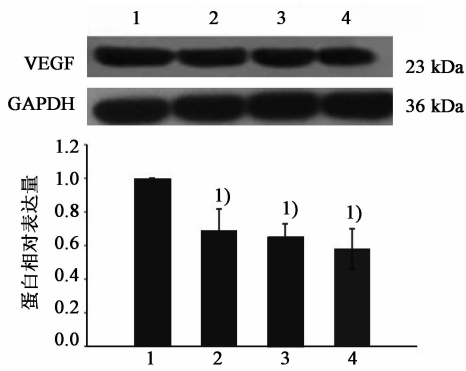
Table 3 Effect of safflower polysaccharide on VEGF mRNA expression of HeLa cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	GAPDH	VEGF
空白	-	17.06 $\pm$ 0.13	27.67 $\pm$ 0.07
红花多糖	0.16	18.89 $\pm$ 0.12	29.96 $\pm$ 0.20 <sup>1)</sup>
	0.32	19.37 $\pm$ 0.15	30.49 $\pm$ 0.06 <sup>1)</sup>
	0.64	14.41 $\pm$ 0.17	25.82 $\pm$ 0.21 <sup>1)</sup>

**3.4 对 HeLa 细胞 VEGF 蛋白表达的影响** 与空白组比较,0.16, 0.32, 0.64  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  红花多糖作用于 HeLa 细胞 48 h 后,VEGF 蛋白表达明显下降 ( $P < 0.05$ )。0.16, 0.32 和 0.64  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的红花多糖组 VEGF 蛋白的表达分别是 69%, 65% 和 58%。见图 2。

### 4 讨论

肿瘤细胞分泌的 VEGF 以旁分泌的形式与血管内皮细胞上的受体结合,刺激血管内皮细胞增殖,导致大量结构、功能异常的新生血管产生,加快肿瘤的发生和发展<sup>[9]</sup>。临床数据表明<sup>[10]</sup>,VEGF 在宫颈癌癌变过程中的阳性表达率呈现上升趋势,并且与宫



1. 空白组;2~4. 红花多糖(0.16,0.32,0.64 g·L<sup>-1</sup>)组。与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$

图 2 红花多糖对宫颈癌 HeLa 细胞 VEGF 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 2 Effect of safflower polysaccharide on VEGF protein expression of cervical cancer HeLa cells( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

颈癌的临床分期呈正相关,提示 VEGF 与宫颈癌的生长、浸润和侵袭密切相关。董巍樵<sup>[11]</sup>发现黄荆子分级分离提取物 EVn-50 能下调人宫颈癌裸鼠皮下移植瘤 VEGF 和增殖细胞核抗原(PCNA)蛋白表达,通过抑制新生血管形成和肿瘤细胞的增殖发挥抑制人宫颈癌裸鼠移植瘤生长作用。

近年来关于多糖抗肿瘤的研究逐渐增多。多糖通过抑制肿瘤细胞增殖,诱导肿瘤细胞凋亡及抑制细胞周期等。靳祎等<sup>[12]</sup>发现刺五加多糖对宫颈癌 HeLa 细胞有较强的抑制作用,能诱导其凋亡。王恩军等<sup>[13]</sup>发现山茱萸多糖能够通过促进凋亡相关蛋白(Bax)的表达诱导 HeLa 细胞凋亡。

本实验采用红花多糖(0.16,0.32,0.64 g·L<sup>-1</sup>)处理 HeLa 细胞,发现红花多糖能够抑制宫颈癌 HeLa 细胞的增殖,可能与抑制 HeLa 细胞 VEGF 的表达有关。结果显示,不同浓度红花多糖作用于宫颈癌 HeLa 细胞 48 h 后能抑制细胞的体外增殖并呈现剂量依赖性。红花多糖可以降低 HeLa 细胞培养上清液中 VEGF 蛋白含量,并且随着红花多糖浓度的增加,HeLa 细胞 VEGF mRNA 和蛋白的表达均呈现下调的趋势。结果提示,红花多糖通过抑制 VEGF 的表达阻断肿瘤新生血管的形成,抑制宫颈癌 HeLa 细胞的增殖,发挥抗肿瘤作用。但是由于中药成分复杂,作用靶点多,因此在后续的实验中会进一步探讨相关信号通路参与红花多糖抗宫颈癌作用的过程。

### [参考文献]

- [1] Folkman J. Angiogenesis and tumor growth[J]. N Engl J Med,1995,333(26):1757-1763.
- [2] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics[J]. C A Cancer J Clin,2011,(2):69-90.
- [3] 苏莉鸣,蒋秋燕. 肿瘤新生血管及其与宫颈癌关系的研究进展[J]. 中国现代药物应用,2007,1(10):68-70.
- [4] 马新博,周振座,宫汝飞,等. 红花多糖对人胃癌 SGC-7901 细胞抑制作用的初步研究[J]. 广西医学,2012,34(11):1444-1446.
- [5] 孙阳,杨婧,张琪琪,等. 红花多糖对肝癌细胞增殖阻滞的机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(13):156-159.
- [6] 陶冀. 红花多糖抑制人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖及其转移能力的影响[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2012.
- [7] 梁颖,王亚贤. 红花多糖对鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的影响[C]. 规范治疗与科学评价——第五届国际中医、中西医结合肿瘤学术交流大会暨第十四届全国中西医结合肿瘤学术大会论文集,2014.
- [8] 杨婧,张帅,王冬梅,等. 超微粉碎联合超声法提取红花中多糖工艺研究[J]. 哈尔滨商业大学学报:自然科学版,2014,30(3):354-356.
- [9] Hsueh C, Lin J D, Wu I C, et al. Vascular endothelial growth factors and angiopoietins in presentations and prognosis of papillary thyroid carcinoma [J]. J Surg Oncol,2011,103(5):395-399.
- [10] 王立岩,许晓艳,盛敏佳,等. HIF-1 $\alpha$  及 VEGF 在宫颈癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中国实验诊断学,2009,13(12):1749-1752.
- [11] 董巍樵. 黄荆子乙酸乙酯提取物对人宫颈癌裸鼠移植瘤生长及 PCNA 和 VEGF 表达的影响[D]. 衡阳:南华大学,2008.
- [12] 靳祎,刘超,范林林,等. 刺五加多糖对人宫颈癌 HeLa 细胞体外增殖和凋亡作用的实验研究[J]. 中成药,2014,36(1):162-164.
- [13] 王恩军,靳祎,王哲,等. 山茱萸多糖诱导宫颈癌细胞凋亡及 Bax 蛋白表达的变化[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(10):260-262.

[责任编辑 张丰丰]