

疣毒净诱导 H8 细胞凋亡作用机制

潘舒裕¹, 陈小凤², 肖静^{2*}

(1. 广州中医药大学第二临床医学院, 广州 510006; 2. 广东省中医院大学城医院, 广州 510006)

[摘要] **目的:**观察疣毒净制剂对人宫颈永生细胞 H8 细胞增殖和凋亡的影响,探讨其可能的作用机制。**方法:**以转染 HPV16 基因后稳定传代的人宫颈永生细胞株 H8 细胞为研究对象;经 1,2,3,4,5 g·L⁻¹疣毒净干预 H8 细胞 24,48,72 h,同时设立空白组,四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测细胞增殖抑制作用;荧光显微镜下观察 1,2,3,4,5 g·L⁻¹疣毒净干预 24 h 后,经 Hoechst 33342 染色的细胞凋亡情况;流式细胞仪检测 1,2,3,4,5 g·L⁻¹疣毒净干预 24 h 后,经 AnnexinV/碘化丙啶(PI)双染后细胞早期凋亡率;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 1,2,3,4,5 g·L⁻¹疣毒净干预 24 h 后 H8 细胞半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3),聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶(PARP)蛋白表达情况。**结果:**与空白组比较,2,3,4,5 g·L⁻¹疣毒净对 H8 细胞的生长抑制呈明显的浓度-时间依赖效应($P < 0.05$);经 Hoechst 33342 染色后,荧光显微镜下可见 1,2,3,4,5 g·L⁻¹疣毒净给药后细胞均出现明显的核染色质浓缩,3,4,5 g·L⁻¹疣毒净干预下圆形亮蓝色凋亡小体逐渐增多;流式细胞仪检测到 1,2,3 g·L⁻¹疣毒净干预 24 h 后细胞的早期凋亡率分别为(23.73 ± 5.72)%, (63.9 ± 3.59)%, (71.53 ± 1.59)%,与空白组(6.53 ± 0.85)%比较早期凋亡率显著升高($P < 0.01$);与空白组比较,疣毒净组凋亡执行蛋白 Caspase-3 及其底物 PARP 蛋白均明显下调($P < 0.05$),呈浓度下调趋势,二者下调的趋势一致。**结论:**疣毒净能明显抑制宫颈永生细胞 H8 细胞增殖,诱导早期凋亡,可能是通过激活 Caspase-3-PARP 途径来执行的。

[关键词] 疣毒净制剂;宫颈永生细胞 H8 细胞;凋亡;半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3;聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)09-0134-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017090134

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170215.0951.032.html>

[网络出版时间] 2017-02-15 9:51

Mechanism of Youdujing in Inducing Apoptosis of H8 Cells

PAN Shu-yu¹, CHEN Xiao-feng², XIAO Jing^{2*}

(1. *The Second Clinical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;*

2. *University-town Hospital, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)*

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Youdujing preparation on the proliferation and apoptosis of cervical immortalized cells (H8 cells) and explore the possible mechanism. **Method:** H8 cells, which were transfected with HPV-16 gene and passed stably, were chosen to be the object of the study. Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay was used to detect the proliferation inhibition of H8 cells after being treated with 1, 2, 3, 4, 5 g·L⁻¹ Youdujing for 24, 48, 72 hours. Meanwhile, the blank was set up for parallel control. MTT was used to detect the inhibitory effect on cell proliferation. Apoptotic changes of cells that were intervened by 1, 2, 3, 4, 5 g·L⁻¹ Youdujing for 24 h and stained by Hoechst 33342 were observed by fluorescence microscope. Flow cytometry was used to detect the early-stage apoptotic rate of H8 cells after being double stained with Annexin V/propidium iodide (PI). Expressions of Caspase-3 protein and Poly ADP-ribose

[收稿日期] 20170103(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473716)

[第一作者] 潘舒裕,硕士,从事中西医结合治疗妇科肿瘤研究,E-mail:13560178524@163.com

[通讯作者] *肖静,博士,主任医师,从事中西医结合治疗妇科肿瘤科研工作,E-mail:xiaojingson_2004@126.com

polymerase (PARP) protein in H8 cells, which were treated with 1, 2, 3, 4, 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Youdujing for 24 h, were tested by Western blot method. **Result:** The growth of H8 cells intervened by 1, 2, 3, 4, 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Youdujing was significantly inhibited in concentration-dependent and time-dependent manners ($P < 0.05$), compared with blank group. According to Hoechst 33342 staining, nuclear chromatin condensations were observed after being intervened by 1, 2, 3, 4, 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Youdujing for 24 h, and round, bright blue apoptotic bodies increased after being treated with 3, 4, 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Youdujing. The early-stage apoptotic rates of cells treated with 1, 2, 3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Youdujing were $(23.73 \pm 5.72)\%$, $(63.9 \pm 3.59)\%$, $(71.53 \pm 1.59)\%$, respectively, according to flow cytometry, which were significantly higher than that of control group $(6.53 \pm 0.85)\%$ ($P < 0.01$). Caspase-3 and PARP proteins were consistently down-regulated in H8 cells ($P < 0.05$). **Conclusion:** Youdujing preparation can inhibit H8 cell growth and induce early-stage apoptosis in H8 cells, which may be implemented by activating Caspase-3-PARP.

[Key words] Youdujing preparation; cervical immortalized cells; apoptosis; Caspase-3; Poly ADP-ribose polymerase (PARP)

宫颈癌是全球女性常见恶性肿瘤之一,其中约90%发生在发展中国家^[1]。在我国,宫颈癌每年新发病例约在11万以上,且每年约有2~3万女性死于宫颈癌^[2]。高危型人乳头瘤状病毒(high risk human papillomavirus, HR-HPV)持续性感染,病毒基因整合至宿主基因中,持续表达致癌蛋白E6, E7, 宫颈细胞脱离正常的细胞周期调控进入永生化状态,是宫颈癌发生的主要原因,预防和治疗 HPV 感染是宫颈癌防治的关键^[3]。目前宫颈癌的一级预防主要为预防性疫苗的接种,已经批准上市的有二价疫苗(针对 HPV16 和 18 基因型),四价疫苗(针对 HPV 6, 11, 16 和 18 基因型)和九价疫苗(包括 HPV6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 和 58 基因型),国内近期批准上市的是 16, 18 型二价疫苗,但尚未推行,治疗性疫苗处于研制当中^[4]。对于早期 HPV 感染,临床上可采用光动力^[5], 冷冻^[6], 超声聚焦^[7], 干扰素^[8]等治疗方法。疣毒净制剂是广东省中医院的院内制剂,临床应用已有 20 余年^[9], 早期应用于低危型 HPV 感染引起的尖锐湿疣治疗, 研究表明疣毒净能清除体外 HPV 病毒, 降低 HPV 拷贝数, 使局部病损组织超微结构逐渐恢复正常^[10]。在针对宫颈 HR-HPV 感染患者的临床研究上已证实疣毒净在清除 HR-HPV 上确有疗效, 能下调人端粒酶逆转录酶 mRNA 表达, 降低端粒酶活性, 逆转高危型 HPV 感染(疣毒净组和生理盐水组观察 3 个月后 HR-HPV 转阴率分别为 96.6% 和 70%)^[11], 降低病理级别^[12]。但其发挥作用的机制需要进一步研究及阐述。本研究以转染 HPV16 型基因的人宫颈永生化细胞 H8 细胞为研究对象, 观察疣毒净对人宫颈永生化细胞的增殖抑制和诱导凋亡的作用, 探讨其可能作用的分子学机制。

1 材料

1.1 细胞株 人宫颈永生化细胞 H8 细胞由中国医学科学院基础医学研究所生物物理室提供。

1.2 药物 疣毒净主要药物有板兰根 15 g, 大青叶 15 g, 苦参 15 g, 紫草 25 g 等, 购自广东省中医院中药房, 饮片由广东省中医药科学院研究员袁小红和刘博鉴定为正品。取全量中药材, 加水 1 000 mL 于祝尔康煎药壶中浸泡 30 min, 定时煎煮 90 min, 双层纱布滤渣。煎煮 2 次后取得药液, 用旋转蒸发仪以 45 $^{\circ}\text{C}$, 60 $^{\circ}$ 旋转蒸发后得到浓缩药液, -80 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻过夜, 第 2 天置于冷冻干燥机干燥, 取得冻干粉样品。冻干粉含生药为 6.38 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

1.3 试剂 RPMI 1640 培养基, 胎牛血清, 含 EDTA 胰酶(Gibco 公司, 批号分别为 8116019, 42F2362K, 25200072); 磷酸盐缓冲液(PBS, Hyclone 公司, 批号 212871); 噻唑蓝(MTT, MP 公司, 批号 M5178); Annexin V/碘化丙啶(PI) apoptosis kit(杭州联科生物有限公司, 批号 6300103); ImmobilonTM Western Chemiluminescent HRP Substrate(Millipore 公司, 批号 1530902); 10 \times RIPA, 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)(8G10) Rabbit mAb, Anti-rabbit IgG HRP-linked Antibody, Poly(ADP-ribose) polymerase(PARP) Rabbit mAb HRP-linked Antibody β -actin(13ES) Rabbit mAb(CST 公司, 批号分别为 9806S, 9665, 7074, 9542, 4970); BCA Protein Assay Kit(Thermo 公司, 批号 190983)。

1.4 仪器 VICTOR X5 型酶标仪(美国 Perkinelmer 公司); DMI 3000 型倒置生物显微镜(德国 Leica 公司); FC500 型流式细胞分析系统(美国 Beckman 公司); Mini-PROTEAN Tetra 电泳槽, Mini Trans-Blot[®] 转印槽, PowerPacTM 基础电泳仪电源, Universal Hood II 型

化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 将人宫颈永生化细胞 H8 细胞接种于 RPMI 1640 完全培养基(含有 10% 胎牛血清,青霉素和链霉素各 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$), $5\% \text{ CO}_2$ $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 饱和湿度条件下培养。细胞传代时, PBS 冲洗 2 遍, 加入 0.25% 含 EDTA 的胰酶消化, 完全培养基终止消化后收集细胞, 重悬, 按 $1:3 \sim 1:5$ 传代。

2.2 药物配备 取疣毒净冻干粉 2 g , 加 PBS 40 mL , $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 水溶 30 min , $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 涡旋 3 次, 每次 10 min , $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min , 取上清, 以 $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ 滤器过滤, 混匀, 得到药物终质量浓度为 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

2.3 MTT 法检测药物对细胞生长的抑制作用 将对数生长期 H8 细胞调整密度为 4×10^5 个/mL, 接种于 96 孔板中, 每孔细胞悬液 $200 \text{ }\mu\text{L}$, 培养 24 h 后分别弃原培养基, 空白组不加药物, 疣毒净组加入疣毒净, 终质量浓度为 $1, 2, 3, 4, 5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 每组设 6 个复孔, 继续培养 $24, 48, 72 \text{ h}$ 后, 弃掉培养基, 加入 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT $20 \text{ }\mu\text{L}$, 孵育 4 h , 小心吸出上清, 加入二甲基亚砜(DMSO) $150 \text{ }\mu\text{L}$ 轻微振荡 10 min 后终止反应, 使用酶标仪在 570 nm 波长下检测各孔吸光度 A 。计算细胞存活率。实验重复 3 次。

$$\text{细胞生长存活率} = A_{\text{药物组}} / A_{\text{空白组}} \times 100\%$$

2.4 荧光显微镜下细胞形态观察 取对数生长期 H8 细胞, 调整密度为 1.5×10^5 个/mL, 接种于 12 孔板中, 接种 24 h 后, 空白组不加入药物, 疣毒净组每孔加入 $1, 2, 3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 疣毒净, 继续培养 24 h , 加入 Hoechst 33342 $500 \text{ }\mu\text{L}$ 染色, 于荧光显微镜下观察其细胞核染情况。实验重复 3 次。

2.5 Annexin V FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率 取对数生长期 H8 细胞调整密度为 1.5×10^5 个/mL, 接种于 6 孔板中, 接种 24 h 后, 每孔加入 $1, 2, 3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 疣毒净, 空白组不加药物, 培养 24 h 后吸出培养液, PBS 洗涤细胞 1 次, 用不含 EDTA 胰酶常规消化 1 min , 收集细胞, 加入 Annexin V-FITC $5 \text{ }\mu\text{L}$ 和 PI $10 \text{ }\mu\text{L}$ 。涡旋混匀, 室温避光孵育 5 min , 使用流式细胞分析系统检测细胞凋亡率。实验重复 3 次。

2.6 蛋白免疫印迹法检测相关蛋白表达 蛋白样品收集与制备, 对数生长期细胞以 1.5×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后每孔加入 $1, 2, 3, 4, 5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 疣毒净, 空白组不加药物, 继续培养 24 h 后收集细胞。PBS 清洗 2 遍, 每孔加入含有蛋白酶抑

制剂的裂解液($1 \times \text{RIPA}$) $40 \text{ }\mu\text{L}$, 细胞刮刮取蛋白样品, 每 10 min 振荡 1 次, 30 min 后 $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min , 取上清。BCA 测定蛋白浓度, 蛋白变性, 置于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存。SDS-PAGE 电泳及蛋白电转移, 制备 SDS-PAGE 凝胶, 蛋白上样, 浓缩胶 70 V 恒压至过分离胶后, 转 120 V 继续电泳直至胶底。电泳结束后取出凝胶, 由负极至正极按“海绵垫-滤纸-凝胶-PVDF 膜-滤纸-海绵垫”顺序组装电转装置, 300 mA 横流转膜 120 min 。封闭与抗体孵育, 将 PVDF 膜置于 5% 脱脂奶粉中封闭 1 h , 加入相对应一抗($1:1\,000$)后, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜。第 2 天 TBST 缓冲液室温下快速摇动洗膜 4 次, 每次 8 min , 加入相应二抗孵育 1 h , TBST 缓冲液室温下快速摇动洗膜 3 次, 每次 15 min 。曝光, 采用 Bio-Rad 凝胶成像系统曝光。实验重复 3 次。

2.7 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据统计, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。计量资料比较采用单因素方差分析, 计数资料比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 疣毒净对 H8 细胞的增殖抑制作用 疣毒净干预 H8 细胞后, 随着给药浓度和给药时间的增加, 与空白组比较, 从 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 疣毒净干预 $24, 48, 72 \text{ h}$ 开始细胞活力显著下降($P < 0.01$), 细胞生长抑制率显著增加($P < 0.01$), 呈明显的浓度时间-依赖效应。见表 1。给药 $24, 48, 72 \text{ h}$ 时药物的半数抑制浓度(IC_{50})分别为 $2.95, 3.03, 2.93 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.2 疣毒净对 H8 细胞形态的影响 H8 细胞经 $1, 2, 3, 4, 5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 疣毒净处理后, 从 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 疣毒净开始, 光学显微镜下观察细胞边缘变钝, 出现很多皱缩和细小碎片, 细胞质内出现空泡。经 Hoechst 33342 染色后, 荧光显微镜下可见给药后细胞核亮蓝色荧光较空白组明显增多, $3, 4, 5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度干预下圆形亮蓝色凋亡小体逐渐增多。见图 1。

3.3 疣毒净对 H8 细胞早期及晚期凋亡率的影响 经 Annexin V-FITC 及 PI 双染后, 与空白组比较, $1, 2, 3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 疣毒净组 H8 细胞的早期凋亡率显著上升($P < 0.01$), 晚期凋亡率无明显变化。见表 2。

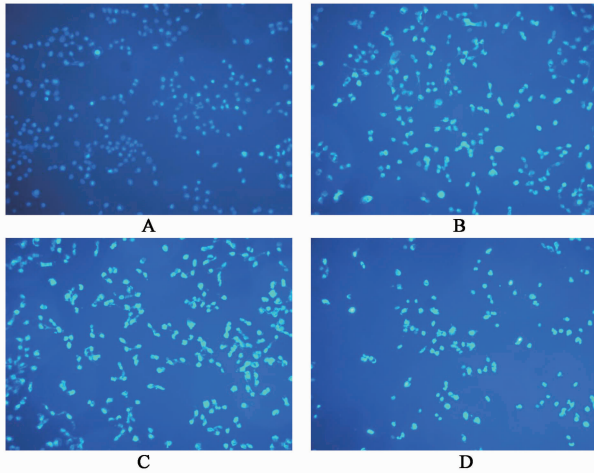
3.4 疣毒净对细胞 Caspase-3, PARP 蛋白表达的影响 与空白组比较, $3, 4, 5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 疣毒净作用于 H8 细胞 24 h 后, Caspase-3 蛋白表达量明显下调($P < 0.05$)。 $1, 2, 3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 疣毒净组 PARP 蛋白表达总体呈下调趋势, $4, 5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 疣毒净组细胞 PARP 蛋白

表 1 疣毒净对 H8 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of Youdujing on cell survival rate of H8 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h	48 h	72 h
空白	-	100	100	100
疣毒净	1	94 ± 2.30	95 ± 8.41	86 ± 2.16
	2	91 ± 3.15 ¹⁾	88 ± 9.29 ¹⁾	93 ± 7.25
	3	52 ± 4.35 ²⁾	56 ± 2.97 ²⁾	45 ± 7.91 ²⁾
	4	21 ± 0.16 ²⁾	21 ± 3.85 ²⁾	16 ± 3.36 ²⁾
	5	19 ± 1.69 ²⁾	16 ± 2.50 ²⁾	15 ± 2.57 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2, 3 同)



A. 空白组; B~D. 疣毒净(1, 3, 5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)组

图 1 疣毒净对宫颈永生细胞株 H8 细胞凋亡形态改变 (Hoechst 33342, $\times 200$)

Fig. 1 Morphological apoptotic changes of Youdujing in human cervical immortalized cell line H8 cells (Hoechst 33342, $\times 200$)

表 2 疣毒净对 H8 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

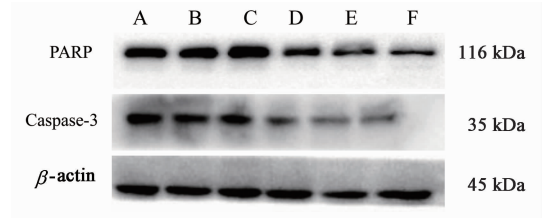
Table 2 Effect of Youdujing on apoptosis in H8 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	早期凋亡	晚期凋亡
空白	-	6.53 ± 0.85	2.50 ± 0.36
疣毒净	1	23.73 ± 5.72 ²⁾	2.06 ± 0.95
	2	63.90 ± 3.59 ²⁾	2.43 ± 0.15
	3	71.53 ± 1.59 ²⁾	2.76 ± 0.60

表达明显降低 ($P < 0.05$)。见图 2, 表 3。

4 讨论

宫颈癌的发生发展是一个连续性的病理变化过程,在临床上表现为 HPV 亚临床感染,宫颈上皮内瘤变 (I, II, III 级),原位癌,浸润癌逐步进展^[13]。2008 年的诺贝尔奖揭示了 HPV,尤其是高危型 HPV 的持续感染是发生宫颈癌的主要风险因素,病毒的 E6 与 E7 两种癌蛋白可干扰细胞周期、凋亡和染色体的稳定性,最终导致细胞的永生化和逐步发展



A. 空白组; B~F. 疣毒净(1, 2, 3, 4, 5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)组

图 2 H8 细胞中 Caspase-3 和 PARP 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of Caspase-3 and PARP protein in H8 cells

表 3 疣毒净对 H8 细胞中 Caspase-3 和 PARP 蛋白相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Relative expressions of Caspase-3 and PARP protein in H8 cells after treatment with Youdujing ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	Caspase-3/ β -actin	PARP/ β -actin
空白	-	1	1
疣毒净	1	0.97 ± 0.11	0.99 ± 0.09
	2	0.91 ± 0.18	0.92 ± 0.07
	3	0.69 ± 0.14 ¹⁾	0.79 ± 0.08
	4	0.63 ± 0.09 ¹⁾	0.72 ± 0.11 ¹⁾
	5	0.53 ± 0.04 ¹⁾	0.65 ± 0.07 ¹⁾

为宫颈癌^[3]。宫颈永生细胞株 H8 细胞是转染 HPV16 基因后稳定传代的细胞系,不具有恶性肿瘤细胞的侵袭习性,但在某些致癌物质诱导下可发生癌变^[14],符合临床 HPV 亚临床感染及宫颈上皮内瘤变宫颈细胞的病理状态,可作为研究宫颈癌前病变理想的细胞模型。

在宫颈癌的发生机制中,HPV 持续性感染宿主细胞,把病毒基因整合进宿主基因中,持续表达致癌蛋白 E6, E7。E6 蛋白促使抑癌蛋白 p53 降解, E7 蛋白则与视网膜母细胞瘤抑制基因 Rb 结合,促使转录因子 E2F 与桥粒斑蛋白 (DP1) 蛋白形成异二聚体,活化 S 期基因的转录,导致细胞周期调控失控发生永生化和细胞恶性转化,逃脱凋亡^[3]。细胞凋亡是由基因调控的细胞自主有序性死亡,药物诱导

细胞凋亡发生可以清除机体多余的衰老、损伤及突变的细胞,维持体内细胞群的自身稳定^[15]。

光学显微镜下可从细胞形态上观察出细胞凋亡征象,表现为细胞分离固缩,染色体聚集,细胞表面产生泡状或芽泡状突起,逐渐出现圆形的凋亡小体^[16]。Annexin V-FITC/PI 双染法是检测早期凋亡较理想方法。磷脂酰丝氨酸从膜内翻转,暴露于细胞表面,是较早出现的凋亡特征。标记了荧光染料 FITC 的 Annexin V 可与胞膜外磷脂酰丝氨酸特异性结合,通过流式细胞仪检测细胞早期凋亡^[17]。本研究发现,疣毒净干预后 H8 细胞,光学显微镜观察出现细胞分离固缩,细胞质内空泡,可见凋亡小体等凋亡的形态学改变,Hoechst 33342 染色药物干预后细胞核亮蓝色荧光较空白组明显,Annexin V-FITC/PI 双染后流式细胞仪检测细胞早期凋亡率明显高于空白组,说明疣毒净能诱导 H8 细胞早期凋亡的发生,抑制细胞无限增殖。

细胞凋亡的发生主要通过 2 条途径,一条是外部途径,主要是细胞外信号刺激,特定的死亡配体 (TNF, FasL) 与受体结合,激活 Caspase 酶诱导细胞凋亡;另一条是内部途径,主要是内部凋亡刺激因子作用(癌基因的活化,DNA 损伤,细胞缺氧,细胞生长因子缺失等),使细胞内色素 C 由线粒体内部释放到细胞质,Caspase 酶激活导致细胞凋亡。其中,Caspase-3 是内外 2 条途径共同的执行蛋白,在凋亡通路调节中处于关键地位^[18]。PARP 又被称为“死亡底物”,能被 Caspase-3 裂解剪切,是早期凋亡的标志^[19]。本研究中疣毒净能下调 H8 细胞中 Caspase-3 及 PARP 蛋白表达,提示疣毒净能使 H8 细胞 Caspase-3 蛋白激活,切割下游底物 PARP,诱导早期凋亡发生。

综上所述,疣毒净制剂能抑制宫颈永生细胞 H8 细胞增殖,诱导细胞发生早期凋亡,可能是通过激活 Caspase-3-PARP 途径发挥作用。

[参考文献]

[1] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.

[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] Zur H H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application [J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(5): 342-350.

[4] 姜昊, 王建东, 闫震. HPV 疫苗研究进展 [J]. 中国临

床医生杂志, 2016, 44(11): 13-16.

[5] 姚红霞, 王玲, 吴红, 等. 光动力学及激光治疗子宫颈持续性 HPV 感染的疗效比较 [J]. 同济大学学报: 医学版, 2012, 33(1): 63-66.

[6] 石莹, 张秀兴, 郭芝亮. 冷冻治疗术对宫颈 CIN I 和 HPV 感染的疗效观察 [J]. 吉林医学, 2014, 35(33): 7331-7333.

[7] 任玉香, 吴凤英, 蔡惠芬, 等. 聚焦超声和激光加电凝治疗 HPV 高危亚型感染的 CIN I 疗效比较 [J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(4): 350-353.

[8] 李爱禄, 贺锦曦, 饶靖红, 等. 重组人干扰素 $\alpha 2b$ 阴道泡腾胶囊治疗宫颈 HPV 感染 64 例临床分析 [J]. 实用妇产科杂志, 2010, 26(5): 395-396.

[9] 禩国维, 范瑞强, 陈永锋, 等. 疣毒净治疗尖锐湿疣的多中心临床研究 [J]. 广州中医药大学学报, 1998, 15(4): 251-254.

[10] 江光明, 禩国维, 范瑞强. 疣毒净系列制剂对复发性尖锐湿疣局部 HPV 清除作用及超微结构观察 [J]. 岭南皮肤性病科杂志, 2003, 10(2): 77-79.

[11] 肖静, 吴佳, 于斌, 等. 疣毒净制剂治疗宫颈 HR-HPV 感染患者的疗效观察 [J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(9): 1212-1215.

[12] 肖静, 黄健玲, 蔡林儿. 疣毒净治疗 HR-HPV 感染宫颈病变的研究 [J]. 广东医学, 2011, 32(15): 2036-2039.

[13] Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer [J]. Clin Sci: Lond, 2006, 110(5): 525-541.

[14] 刘朝奇, 韩广州, 李昆, 等. 人巨细胞病毒协同人乳头瘤病毒 16 型诱导宫颈上皮细胞癌变的研究 [J]. 中华病理学杂志, 1999, 28(1): 24-27.

[15] Thompson C B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease [J]. Science, 1995, 267(5203): 1456-1462.

[16] 潘素娜, 王育红, 冯利兴, 等. 蟾毒灵诱导人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡的蛋白组学研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(13): 1998-2004.

[17] 张伟, 梁智辉. Annexin V-FITC/PI 双标记与 Hoechst33342/PI 双标记流式细胞术检测细胞凋亡的比较 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2014, 30(11): 1209-1212.

[18] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death [J]. Toxicol Pathol, 2007, 35(4): 495-516.

[19] Simbulan-Rosenthal C M, Rosenthal D S, Iyer S, et al. Transient poly (ADP-ribosyl) ation of nuclear proteins and role of poly (ADP-ribose) polymerase in the early stages of apoptosis [J]. J Biol Chem, 1998, 273(22): 13703-13712.

[责任编辑 张丰丰]