

红三叶异黄酮对人宫颈癌 HeLa 细胞的抑制作用

赵振营¹, 法洪文^{2*}, 刘国琦¹

1. 天津市人民医院 药学部, 天津 300121

2. 天津市南开医院 妇产科, 天津 300193

摘要: **目的** 探讨红三叶异黄酮对人宫颈癌 HeLa 细胞的抑制作用及其作用机制。**方法** 以 MTT 法检测红三叶异黄酮 20、40、80 $\mu\text{g/mL}$ 分别在 24、48、72 h 对人宫颈癌 HeLa 细胞增殖作用的影响, 并在倒置显微镜下观察 HeLa 细胞形态学改变。流式细胞仪检测红三叶异黄酮 20、40、80 $\mu\text{g/mL}$ 对 HeLa 细胞凋亡的影响。实时荧光定量 PCR 仪检测红三叶异黄酮 20、40、80 $\mu\text{g/mL}$ 对 HeLa 细胞凋亡中调节基因 Bax、Bcl-2 表达水平的影响。**结果** 红三叶异黄酮对人宫颈癌 HeLa 细胞的增殖抑制作用, 表现为时间、浓度的相关性。红三叶异黄酮对 HeLa 细胞的形态学改变, 表现为随药物浓度增加细胞固缩变小, 并出现凋亡小体。流式细胞仪检测分析显示红三叶异黄酮能引起 HeLa 细胞凋亡, 并随药物浓度的增加而明显, 当红三叶异黄酮达到一定有效浓度时, 诱导其细胞凋亡。通过调节 Bax mRNA 与 Bcl-2 mRNA 的表达, 促进抑制 HeLa 细胞增殖, 能使 Bax 表达上升、Bcl-2 表达下降, 且呈剂量相关性。**结论** 红三叶异黄酮对人宫颈癌 HeLa 细胞的增殖具有抑制作用, 并呈一定的剂量和时间相关性, 提示通过调节 Bax mRNA 与 Bcl-2 mRNA 的表达, 促进抑制 HeLa 细胞增殖。

关键词: 红三叶异黄酮; 人宫颈癌 HeLa 细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡; Bax; Bcl-2

中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2019)12-3518-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.12.004

Inhibition of red clover isoflavones on human cervical cancer HeLa cells

ZHAO Zhen-ying¹, FA Hong-wen², LIU Guo-qi¹

1. Department of Pharmacy, Tianjin Union Medical Center, Tianjin 300121, China

2. Department of Obstetrics and Gynecology, Nankai Hospital, Tianjin 300193, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects and mechanism of red clover isoflavones on inhibition of human cervical cancer HeLa cells. **Methods** The MTT assay was used to detect the effects of red clover isoflavones with concentrations of 20, 40, and 80 $\mu\text{g/mL}$, respectively, on the proliferation of human cervical cancer HeLa cells at 24, 48, and 72 h, respectively. The morphological changes of HeLa cells were observed under inverted microscope. Flow cytometry was used to detect the apoptotic rate of red clover isoflavones with concentrations of 20, 40, and 80 $\mu\text{g/mL}$, respectively on HeLa cells. Real-time PCR instrument was used to detect red clover isoflavones with concentrations of 20, 40, and 80 $\mu\text{g/mL}$ on HeLa cells apoptosis modulating genes Bax and Bcl-2 expression levels. **Results** Red clover isoflavones inhibited the proliferation of human cervical cancer HeLa cells in a time and concentration dependent manner. The morphological changes of HeLa cells in red clover isoflavones showed that with the increase of drug concentration, cell shrinkage decreased and apoptotic globules appeared. Flow cytometry analysis showed that red clover isoflavones could induce apoptosis of HeLa cells, which was obvious with the increase of drug concentration. When it reached a certain effective concentration, it could induce apoptosis of HeLa cells. By regulating the expression of mRNA Bax and mRNA Bcl-2 to promote the inhibition of HeLa cell proliferation, Bax expression was increased, while Bcl-2 expression was decreased, and was dose dependent. **Conclusion** Red clover isoflavones has the inhibition of human cervical cancer HeLa cells in a dose and time dependent manner, indicating that red clover isoflavones promote the inhibition of HeLa cell proliferation by regulating the expression of mRNA Bax and mRNA Bcl-2.

Key words: red clover isoflavones; human cervical cancer HeLa cells; cell proliferation; cell apoptosis; Bax; Bcl-2

收稿日期: 2019-08-08

基金项目: 天津市“131”创新型人才培养工程(2016)

作者简介: 赵振营, 女, 副主任药师, 研究方向为医院药学、药理学、中药现代化。E-mail: clinpharmtj@163.com

*通信作者 法洪文, 女, 硕士。E-mail: 1170452112@qq.com

宫颈癌是发病率仅次于乳腺癌的威胁全球女性健康的第2大恶性肿瘤,约占女性恶性肿瘤发病率的13%,并且呈现年轻化趋势。全世界每年约52万例女性患者罹患宫颈癌,约26万例女性患者死于宫颈癌,其中85%在发展中国家,据统计显示中国仅2012年新增宫颈癌病例就达6.2万,死亡达2.9万例,这给我国女性健康带来了严重的威胁^[1-3]。国内外大样本流行病学调查公认高危型人乳头瘤病毒(HR-HPV)的持续性感染是导致宫颈癌前病变和宫颈癌发生的高危因素。大部分HR-HPV感染的妇女可通过自身免疫能力的增强将其清除,但仍有5%~10%的感染妇女无法清除HR-HPV,从而导致持续性HR-HPV感染,导致宫颈癌的发生^[4-5]。目前,最新版2018年的美国国家综合癌症网络(NCCN)指南针对各种类型和各项期别的治疗仍采取手术和放疗为主、化疗为辅的综合治疗原则。

近年来国内外的研究均证实红三叶异黄酮能抑制乳腺癌细胞的增殖并诱导细胞凋亡^[6],本实验以人宫颈癌HeLa细胞株为研究对象,通过MTT法、流式细胞仪检测、实时荧光定量PCR法检测凋亡调节基因Bax、Bcl-2的表达等,观察红三叶异黄酮作用于宫颈癌HeLa细胞后,细胞形态的改变、数量的变化,计算红三叶异黄酮对HeLa细胞抑制率、细胞凋亡指数、细胞凋亡率等指标,来探讨红三叶异黄酮对宫颈癌HeLa细胞的增殖抑制作用和诱导HeLa细胞凋亡作用,为今后红三叶异黄酮辅助治疗宫颈癌提供新方法的实验依据。

1 材料

1.1 实验材料

红三叶异黄酮购买自西安小草植物科技有限责任公司,批号XC20131009,质量分数为98%。

1.2 实验试剂

RPMI-1640培养基(美国Gibco公司);乙二胺四乙酸(EDTA,美国Sigma-Aldrich公司);胰蛋白酶(美国Invitrogen公司);胎牛血清(FBS,美国Gibco公司);二甲基亚砜(DMSO)、四甲基偶氮唑蓝(MTT)试剂盒、四甲基异硫氰酸罗丹明(TRITC)染色试剂盒均购自美国Sigma公司;双染色流式法细胞凋亡检测试剂盒(ALEXA FLUOR 488 ANNEXIN V/DEAD)、Trizol试剂、Oligo(dT)18溶液、10mM dNTP溶液、RNase Inhibitor(RNase抑制剂)、M-MLV逆转录酶均购自美国Invitrogen公司;SYBR Green PCR Master Mix(瑞士Roche

公司)。

1.3 主要实验器材

CO₂培养箱;酶标仪;倒置显微镜;荧光显微镜;离心沉淀机;流式细胞仪;实时荧光定量PCR仪;紫外分光光度计;超低温冰箱;电子天平;超净工作台;电热恒温水槽;超低温高速冷冻离心机;10、20、100 μL微量加样器;6、24、96孔细胞培养板;25、75 cm²培养瓶。

1.4 细胞

人宫颈癌HeLa细胞株由天津市环湖医院细胞生物实验室提供。

2 方法

2.1 MTT法检测红三叶异黄酮对人宫颈癌HeLa细胞增殖的抑制作用

对照组仅加入与实验组等浓度DMSO的完全培养基作用于HeLa细胞,设6个复孔。红三叶异黄酮组通过预实验将红三叶异黄酮最终浓度设定为红三叶异黄酮低、中、高剂量(20、40、80 μg/mL)组,每组设6个复孔,共3个浓度组。

将生长至对数期的HeLa细胞,用含10% FBS的RPMI-1640培养液配成单个细胞悬液,以每孔 1×10^4 个/mL的细胞接种于96孔板中,每孔体积0.1 mL。待细胞单层铺满96孔板底,吸去上清,分别加入不同浓度的红三叶异黄酮20、40、80 μg/mL各100 μL,对照组仅加入与实验组等浓度DMSO的完全培养基,每组6个复孔。在5% CO₂, 37 °C培养箱中常规培养,分别于24、48、72 h后终止培养,并于倒置显微镜下观察细胞形态变化。每孔加入MTT溶液15 μL(5 mg/mL),37 °C,继续孵育4 h,常温离心1 000 r/min,5 min,小心吸弃孔内培养上清液,每孔加入150 μL DMSO,震荡摇匀10 min,使结晶物充分溶解。置于酶标仪上,在波长595 nm下比色,测定各孔吸光度(A)值,记录结果。A值大小与活细胞数量呈正相关,即A值越高,说明活细胞数量越多。每个实验浓度设6平行复孔,实验重复3次。计算红三叶异黄酮对HeLa细胞生长抑制率。以红三叶异黄酮浓度为横坐标,抑制率为纵坐标,绘制曲线图。

$$\text{抑制率} = 1 - A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.2 流式细胞仪检测HeLa细胞凋亡率

将HeLa细胞用不含EDTA的胰蛋白酶消化1~3 min,调整细胞浓度使其达到 5×10^5 个/mL,1 000 r/min,4 °C离心10 min,弃上清;用2 mL冰冷的PBS液

冲洗细胞,轻轻震荡使细胞悬浮;再次离心用 PBS 洗过的细胞,1 000 r/min,5 min,弃去上清后,用 100 μ L 1 $\times$ binding buffer 重悬细胞至 1×10^5 个/mL,并分成 4 管:双阴、FITC 单阳、PE 单阳、双阳;每 100 μ L 细胞悬液中加入 5 μ L AnnexinV+1 μ L 100 μ g/mL PI 工作液;轻轻混匀,室温避光处放置 15 min;各试管中分别加入 1 $\times$ binding buffer 缓冲液 400 μ L,轻柔混匀,冰浴孵育 10 min;尽快上流式机器,激发波长 488 nm。用 CellQuest 软件进行分析,计算细胞凋亡率,并以 FITC 为横坐标,PE 为纵坐标,绘制二维散点图;结果判读左下象限(Q4):正常细胞群,Annexin-V(-),PI(-);右下象限(Q3):早期凋亡细胞群,Annexin-V(+),PI(-);右上象限(Q2):晚期凋亡细胞或死亡细胞群,Annexin-V(+),PI(+);左上象限(Q1):机械损伤或坏死细胞群,Annexin-V(-),PI(+).

细胞总凋亡率=Q3+Q2

2.3 实时荧光定量 PCR 法检测凋亡调节基因 Bax、Bcl-2 的表达

2.3.1 总 RNA 的提取和纯化 提取总 RNA:将不同浓度的红三叶异黄酮作用 48 h 后的培养液舍弃,用冷的 PBS 冲洗 HeLa 细胞两遍,吸净残存的液体后,向每个样品中加 1 毫升 TRIzol,使其充分覆盖整个细胞,冰浴 5 min;在离心管中每 1 mL TRIzol 起始量加 200 μ L 氯仿,手甩充分混匀,冰浴中静置分层 15 min。预冷离心机 15 min;将离心管在 4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min,离心 15 min。离心后混合液体分为 3 层:下层为红色酚氯仿相,中间层以及上层无色水相,而 RNA 只存在于上层无色的水相中;用移液器小心吸出上层水相,移入另一离心管中,加入等体积的异丙醇,手甩充分混匀,冰浴 10 min;4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min,离心 10 min。此时在试管底部及侧壁上可见絮状沉淀块,即 RNA 沉淀;小心移出上清;在 RNA 沉淀中加入 1 mL 75%乙醇,混匀后,4 $^{\circ}$ C,7 500 r/min,离心 10 min;重复用 75%乙醇洗涤 RNA 沉淀 1 次,去除杂质;去上清,37 $^{\circ}$ C 温箱 10~15 min 晾干 RNA 沉淀,加入 50 μ L RNase-free 的水,55~65 $^{\circ}$ C 水浴 10 min,充分溶解。

2.3.2 定量和检测总 RNA 紫外定量和检测 RNA 纯度:用 DEPC 水溶解 RNA,紫外分光光度计检测 RNA 在 260、280 nm 处的吸光度,计算产量。根据样品在 260、280 nm 处的吸光值,按 $1A=40 \mu$ g/mL 公式计算 RNA 的纯度,即 RNA 溶液的 A_{260}/A_{280} 比

值范围在 1.8~2.0,表明提取的 RNA 纯度较高。甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性:配制 1.2%的电泳胶:10 $\times$ MOPS Gel Buffer 3 mL、Agrose 0.36 g、RNase-Free Water 27 mL 加热溶解 Agrose,稍微冷却,加入 37%甲醛 5.4 mL,摇匀后倒胶,待胶冷凝后,置于电泳槽中,浸于 1 $\times$ MOPS Gel Buffer 中平衡 10 min,待用。样品变性:5 $\times$ MOPS Buffer 2 μ L、RNA 样品 4.5 μ L、甲醛 3.5 μ L、甲酰胺 10 μ L,四者 65 $^{\circ}$ C 水浴变性 15 min,立即冰浴冷却。加入 5 $\times$ Loading Buffer 2 μ L、EB 1 μ L。电泳:将处理好的 RNA 样品,稍微离心,60 V 恒压电泳 20 min。在凝胶成像仪上观察结果,并用数码相机拍照记录。

2.3.3 逆转录合成 Cdna 0.2 mL EP 管中加入总 RNA 4 μ g、Olig(dT)18 2 μ L、10 mmol/L dNTP 2 μ L,补 DEPC 处理的水至终体积 25 μ L;65 $^{\circ}$ C 5 min 后立即冰浴 5 min;加入:5 $\times$ Reaction buffer 8 μ L、DTT 4 μ L、RNase 抑制剂 1 μ L (40 μ g/ μ L)、M-MLV 2 μ L (200 μ g/ μ L);37 $^{\circ}$ C 孵育 50 min;70 $^{\circ}$ C,15 min 破坏酶活性终止反应,-20 $^{\circ}$ C 保存;

2.3.4 实时定量 PCR 扩增检测表达水平 引物设计:引物设计采用 Gene Runner 软件设计,经 Blast 检索无同源性,所有引物由北京 Invitrogen 生物技术公司合成。 β -actin 基因扩增产物为 146 bp,其引物序列为:上游引物 5'-ATCAGCAAGCAGGAG TATG-3',下游引物 5'-AATAAAGCCATGCCAATC-3';Bax 基因扩增产物为 172 bp,其引物序列为:上游引物 5'-TCTGACGGCAACTTCA ACTG-3',下游引物 5'-AACCACCCTGGTCTTGG AT-3';Bcl-2 基因扩增产物为 178 bp,其引物序列为:上游引物 5'-TGTTGTTCAAACGGGATTCA-3',下游引物 5'-GAGCAAGTGCAGCCACAATA-3'。

PCR 反应:使用 Roche 公司的实时荧光定量 PCR 试剂盒:20 μ L 反应体系如下:2 $\times$ SYBR GREEN MIX 10 μ L、上下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L、cDNA 1 μ L,补 ddH₂O 至 20 μ L;反应条件:95 $^{\circ}$ C 变性 5 min,95 $^{\circ}$ C 20 s,60 $^{\circ}$ C 20 s,72 $^{\circ}$ C 20 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min,共 50 个循环。

2.4 统计学分析

所有的数据均运用 SPSS 19.0 统计学软件进行处理分析,所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,单样本分析采用组间 t 检验;多样本均数间比较采用单因素方差分析;多样本均数组间两两比较,采用 SNK-q 检验。

3 结果

3.1 MTT 法检测红三叶异黄酮对 HeLa 细胞增殖的抑制作用

3.1.1 红三叶异黄酮对 HeLa 细胞形态学的影响 对照组细胞形态正常, 细胞数量最多, 且大小一致, 具有丰满的包浆形态, 折光性也较好, 细胞培养 72 h 于倒置显微镜下可见细胞爬满整个培养瓶壁, 细胞形态在镜下表现为多边形或不规则状, 也称“铺路石”状, 细胞间紧密相连。红三叶异黄酮低剂量组

细胞数量减少, 且密度降低, 部分细胞形态变小, 其他变化不明显。红三叶异黄酮中剂量组细胞密度明显减少, 细胞形态固缩变小, 贴壁附着力降低, 并可见细胞碎片。红三叶异黄酮高剂量组细胞变化更加明显, 细胞缺乏附着力, 呈现出不规则的长梭形, 出现细胞核碎裂, 细胞明显皱缩, 可见凋亡小体。实验结果表明 72 h 下红三叶异黄酮各组作用的细胞随着药物浓度的增加, 细胞数量随之减少, 以高剂量组表现最明显, 可见凋亡小体。见图 1。

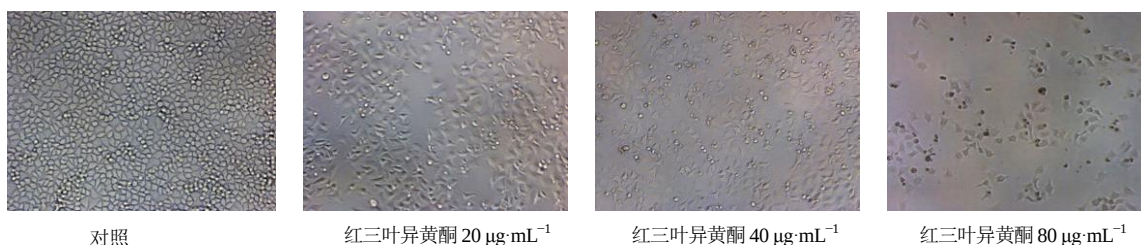


图 1 红三叶异黄酮对 HeLa 细胞形态学的影响 (×400)

Fig. 1 Effects of red clover isoflavones on cell morphology of HeLa cells (×400)

3.1.2 红三叶异黄酮对 HeLa 细胞增殖的影响 在 24 h 时, 与对照组相比, 红三叶异黄酮 20、40、80 µg/mL 组的 A 值显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 证明红三叶异黄酮作用 24 h 对 HeLa 细胞的增殖有抑制作用, 但此时段药物对细胞抑制情况与药物浓度之间关系不明显。在 48、72 h 时, 与对照组相比, 红三叶异黄酮低、中、高剂量组的 A 值显著降低 ($P < 0.01$), 且红三叶异黄酮 20、40、80 µg/mL 组的组间比较差

异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 证明红三叶异黄酮作用 48、72 h 对 HeLa 细胞的增殖有明显抑制作用, 并随着药物浓度增加而随之增加。在浓度一定前提下, 红三叶异黄酮组在 24 h 与 48 h、24 h 与 72 h、48 h 与 72 h 比较差异无统计学意义, 证明红三叶异黄酮对 HeLa 细胞的增殖抑制作用与药物作用时间之间的关系不明显。红三叶异黄酮对 HeLa 细胞增殖的影响见表 1。

表 1 红三叶异黄酮对 HeLa 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 Effect of red clover isoflavones on HeLa cell proliferation ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(µg·mL ⁻¹)	24 h		48 h		72 h	
		A	抑制率/%	A	抑制率/%	A	抑制率/%
对照	—	0.74 ± 0.05	0	0.84 ± 0.04	0	0.97 ± 0.03	0
红三叶异黄酮	20	0.65 ± 0.03*	12.34	0.68 ± 0.06**	19.64	0.72 ± 0.09**	24.97
	40	0.62 ± 0.04**	15.95	0.57 ± 0.03**	32.10	0.53 ± 0.03**	45.19
	80	0.58 ± 0.11**	21.82	0.47 ± 0.05**	44.67	0.37 ± 0.05**	62.11

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

3.2 流式细胞仪检测红三叶异黄酮对 HeLa 细胞凋亡的作用

与对照组比较, 红三叶异黄酮 20、40、80 µg/mL 组的早期、中晚期和总细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.01$), 并在一定的作用时间内, 随着药物浓度的增

加, 细胞凋亡现象随之亦增加, 以红三叶异黄酮高剂量组凋亡现象最明显。见表 2、图 2。

3.3 实时荧光定量 PCR 法检测红三叶异黄酮对 HeLa 细胞内 Bax 和 Bcl-2 表达的影响

3.3.1 RNA 结果 紫外分光光度计检测的 RNA 的

表 2 红三叶异黄酮对 HeLa 细胞凋亡的作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 2 Effects of red clover isoflavones on apoptosis of HeLa cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	早期凋亡率/%	中晚期凋亡率/%	总凋亡率/%
对照	—	7.78 ± 0.78	1.65 ± 0.43	9.43 ± 1.22
红三叶异黄酮	20	$13.37 \pm 1.08^{**}$	$6.25 \pm 1.43^{**}$	$19.62 \pm 0.53^{**}$
	40	$15.16 \pm 0.83^{**}$	$9.26 \pm 0.81^{**}$	$24.42 \pm 0.97^{**}$
	80	$25.12 \pm 0.89^{**}$	$4.11 \pm 0.32^{**}$	$29.23 \pm 1.02^{**}$

与对照组比较: $^{**}P < 0.01$

$^{**}P < 0.01$ vs control group

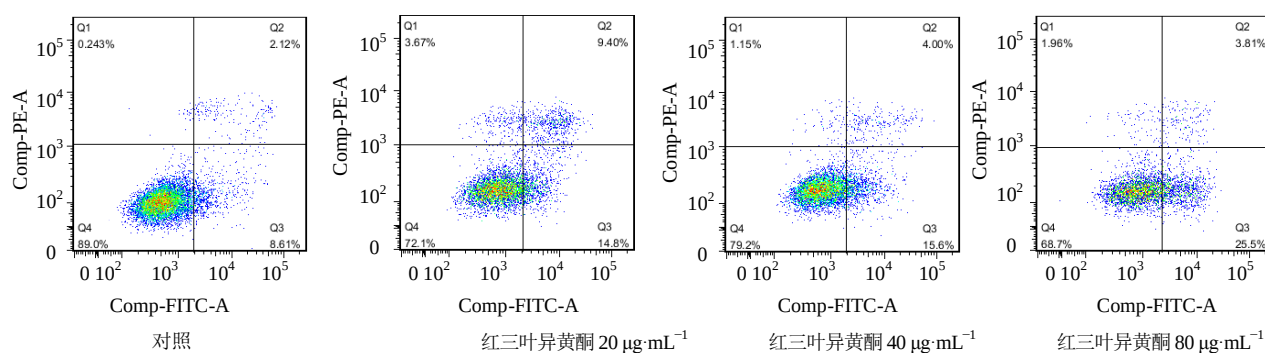


图 2 红三叶异黄酮对 HeLa 细胞凋亡的作用

Fig. 2 Effects of red clover isoflavones on apoptosis of HeLa cells

产量均大于 $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$; 纯度: A_{260}/A_{280} 为 $1.8 \sim 2.0$, 说明所提取的总 RNA 产量和纯度较高, 符合实验要求。甲醛变性凝胶检测 RNA 的完整性, $28 \text{ s}/18 \text{ s}$ 约为 $2:1$, 表明所提取的总 RNA 是完整的。

3.3.2 PCR 结果 与对照组比较, 红三叶异黄酮 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 组 Bax mRNA 的表达无明显上调, Bcl-2 mRNA 的表达呈明显下调 ($P < 0.05$), Bax mRNA/Bcl-2 mRNA 呈明显上调 ($P < 0.01$); 红三叶异黄酮 $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ 组 Bax mRNA、Bax mRNA/Bcl-2

mRNA 的表达呈明显上调 ($P < 0.05$ 、 0.01), Bcl-2 mRNA 的表达则呈明显下调 ($P < 0.01$); 红三叶异黄酮 $80 \mu\text{g}/\text{mL}$ 未检测到 Bax mRNA 表达上调与 Bcl-2 mRNA 的表达下调, 可能是红三叶异黄酮在 $80 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 导致较多细胞死亡, 内参基因降解相对过快, 而引起 Bcl-2 mRNA 的高表达。结果表明当红三叶异黄酮在一定有效浓度时, 通过调节 Bcl-2 家族的 Bax mRNA 与 Bcl-2 mRNA 的表达促进抑制 HeLa 细胞增殖, 并诱导细胞凋亡, 见表 3。

表 3 红三叶异黄酮对 HeLa 细胞内 Bax 和 Bcl-2 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 3 Effects of red clover isoflavones on Bax and Bcl-2 gene expression in HeLa cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Bax mRNA	Bcl-2 mRNA	Bax mRNA/Bcl-2 mRNA
对照	—	1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.06	1.01 ± 0.09
红三叶异黄酮	20	1.16 ± 0.12	$0.54 \pm 0.35^*$	$2.10 \pm 0.36^{**}$
	40	$1.42 \pm 0.09^{**}$	$0.71 \pm 0.43^{**}$	$1.87 \pm 0.24^*$
	80	1.18 ± 0.38	1.21 ± 0.11	0.92 ± 0.05

与对照组比较: $^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$

$^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs control group

4 讨论

近年越来越多的研究表明, 中医单味药及有效成分通过多途径、多环节、多靶点对恶性肿瘤具有

抑制作用, 且副作用小, 其中不少报道了对宫颈癌的治疗研究, 为中医中药辅助治疗宫颈癌提供一种新的可能^[7-8]。

红三叶异黄酮中含有的黄酮类物质, 结构近似于人体内源雌激素, 能够以低亲和度结合雌激素受体(ER)、孕激素受体及雄激素受体而发挥作用, 众多研究表明适量的异黄酮类化合物能够促进动物的生长, 具有抗肿瘤、抗氧化、防止前列腺增生, 改善女性更年期综合症、提高机体免疫功能、防治骨质疏松、调节人体激素平衡以及抗氧化和清除自由基等的作用^[9-10], 越来越受到人们的广泛关注和普遍重视。报道表明红三叶异黄酮可抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖并诱导其凋亡, 具有抗肿瘤的作用, 其抑制作用随药物质量浓度提高和作用时间延长而更加明显, 其机制与诱导癌细胞凋亡、阻滞细胞周期进程有关^[7]。

目前普遍用来衡量药物抗肿瘤有效性的主要指标是抑瘤率。关于抗肿瘤中草药有效性的标准是抑瘤率>30%^[8]。本实验发现红三叶异黄酮各组作用的 HeLa 细胞随着药物浓度的增加, 细胞数量减少, 以高剂量组作用最明显, 可见大量细胞碎片及凋亡小体。在 MTT 作用下, 不同浓度的红三叶异黄酮抑瘤率在一段时间范围内随药物剂量的增加而增加, 同一浓度红三叶异黄酮对 HeLa 细胞增殖抑制作用在某一剂量时随药物作用时间的延长而增加明显, 可见, 红三叶异黄酮对 HeLa 细胞增殖抑制作用表现为对剂量与时间的相关性。

细胞凋亡是细胞的一种自杀性行为, 根据细胞形态学变化可将细胞凋亡分为3个阶段: 凋亡开始时, 细胞表面的特化结构消失; 形成凋亡小体; 凋亡小体形成后, 被巨噬细胞吞噬消化^[9-10]。因此, 寻求增加诱导肿瘤细胞凋亡的药物, 是有效治疗恶性肿瘤的一种重要方法。本实验通过体外实验研究表明, 不同浓度的红三叶异黄酮对细胞凋亡的作用提高, 并在一定作用的时间内, 随着药物浓度的增加, 细胞凋亡现象随之亦增加, 以红三叶异黄酮低剂量组凋亡现象最明显。这些研究与发现都有利于进一步开展红三叶异黄酮作为临床治疗宫颈癌的辅助药物治疗的深入研究。

目前研究认为细胞凋亡过程是多组基因调控的结果, 其中 Bcl-2、Bax 等基因与之密切相关^[11]。Bcl-2 基因主要定位于线粒体外膜, 可以抑制细胞凋亡的发生。Bax 蛋白主要位于细胞浆中, 主要发挥

的是促凋亡作用, 细胞是否凋亡取决于 Bcl2/Bax 值, 其值高, 抑制细胞凋亡, 反之, 则促进细胞凋亡^[12]。目前尚无进一步的临床研究, 但这一对基因的发现可为肿瘤基因治疗和靶点治疗提供新思路。

综上所述, 红三叶异黄酮对人宫颈癌 HeLa 细胞的增殖具有抑制作用, 并呈一定的剂量和时间相关性, 提示通过调节 Bax mRNA 与 Bcl-2 mRNA 的表达, 促进抑制 HeLa 细胞增殖。

参考文献

- [1] 周 晖, 卢淮武, 彭永排, 等. 《2015 年 NCCN 宫颈癌临床实践指南》解读 [J]. 实用妇产科杂志, 2015, 31(3): 185-191.
- [2] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. *Int J Cancer*, 2015, 135(5): E359-86.
- [3] Shrestha A D, Neupane D, Vedsted P, et al. Cervical cancer prevalence, incidence and mortality in low and middle income countries: a systematic review [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2018, 19(2): 319-324.
- [4] 张雪芳, 何 鑫, 黄文阳, 等. 中国女性宫颈高危型 HPV 感染与阴道微生态关系的 Meta 分析 [J]. 首都医科大学学报, 2018, 39(6): 841-848.
- [5] Lee J E, Lee S, Lee H, et al. Association of the vaginal microbiota with human papillomavirus infection in a Korean twin cohort [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e63514.
- [6] 孟祥虎, 刘 博, 尹春萍, 等. mfn2 基因在猫爪草皂苷、红三叶异黄酮治疗乳腺癌中的作用机制研究 [J]. 中国医师, 2011, 14(9): 1143-1146.
- [7] 尹春萍, 樊龙昌, 何俊文, 等. 红三叶异黄酮总异黄酮对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 中草药, 2007, 38(2): 232-234.
- [8] 廖子君, 南克俊, 韩 君. 现代肿瘤药物治疗学 [M]. 西安: 世界图书出版西安公司, 2002: 8.
- [9] 李 娜, 高俊岩, 刘 敏. 细胞凋亡和肿瘤的关系研究进展 [J]. 当代医学, 2009, 15(16): 13-14.
- [10] 朱秀敏. 细胞凋亡的形态特征与分子机制概述 [J]. 生物学教学, 2011, 36(11): 6-9.
- [11] Wei A, Xin X, Wang Y, et al. Signal regulation involved in sulfur dioxide-induced guard cell apoptosis in *Hemerocallis fulva* [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2013, 98: 41-45.
- [12] 李小琦, 原继荣. Bcl-2/Bax 在宫颈癌诊断中的研究进展 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2010, 18(8): 7-8.