

[文章编号] 1000-2200(2009)06-0468-03

· 基础医学 ·

## 黄芩素对人子宫颈癌 HeLa 细胞生长的抑制作用

童旭辉<sup>1,2</sup>, 董淑英<sup>1</sup>, 陶亮<sup>2</sup>

**[摘要]**目的:探讨黄芩素对人子宫颈癌 HeLa 细胞生长的抑制作用及可能机制。方法:采用磺酰罗丹明 B(SRB)法检测黄芩素对 HeLa 细胞生长的抑制作用;Hoechst 33258 荧光染色法观察黄芩素对 HeLa 细胞凋亡的诱导作用;比色法测定黄芩素对 HeLa 细胞内 caspase-3 活性的影响。结果:不同浓度黄芩素作用 24、36、48 h 后均可抑制 HeLa 细胞生长( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ );黄芩素作用 24 h 后,HeLa 细胞凋亡率增加( $P < 0.01$ ),细胞内 caspase-3 活性增强( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ )。结论:黄芩素能抑制 HeLa 细胞生长,其机制可能与诱导细胞凋亡及增强 caspase-3 活性有关。

**[关键词]** 子宫颈肿瘤;HeLa 细胞;黄芩素;细胞凋亡;caspase-3

**[中国图书资料分类法分类号]** R 737.33;R 329.24 **[文献标识码]** A

### Inhibitory effect of baicalein on human cervix cancer HeLa cells

TONG Xu-hui<sup>1,2</sup>, DONG Shu-ying<sup>1</sup>, TAO Liang<sup>2</sup>

(1. Department of Pharmacology, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030;

2. Department of Pharmacology, Zhongshan Medical School, Sun Yat-Sen University, Guangzhou Guangdong 510080, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the role of baicalein in inhibiting the HeLa cells of human cervix cancer and the possible mechanism. **Methods:** Sulforhodamine B (SRB) assay was used to determine the inhibitory effect of baicalein on HeLa cell growth; cellular apoptosis was detected by Hoechst 33258 fluorescent staining; caspase-3 activity was assayed by colorimetric method. **Results:** After treated with different concentration of baicalein for 24, 36, 48 hour, HeLa cell growth were significantly inhibited ( $P < 0.05$  to  $P < 0.01$ ); the apoptosis rate of HeLa cells ( $P < 0.01$ ) and the activity of caspase-3 ( $P < 0.05$  to  $P < 0.01$ ) were increased when HeLa cells were treated with baicalein for 24 hours. **Conclusions:** Baicalein can inhibit the growth of HeLa cells, and the inhibitory effect probably results from the increased cell apoptosis and caspase-3 activity.

**[Key words]** cervix neoplasms; HeLa cells; baicalein; apoptosis; caspase-3

黄芩是唇形科植物黄芩的干燥根,具有抗菌、抗病毒、抗炎、抗过敏、抗氧化(清除自由基)及抗肿瘤作用<sup>[1-3]</sup>。黄芩中主要的黄酮类成分为黄芩素、黄芩苷、汉黄芩素和汉黄芩苷。已有文献报道黄芩中黄芩素可抑制膀胱癌、前列腺癌、肝癌细胞生长<sup>[4-7]</sup>,并且在非细胞毒剂量时可逆转卵巢癌细胞株对阿霉素的耐药性<sup>[8]</sup>。但其对子宫颈癌细胞生长的影响至今未见报道,本研究旨在探讨黄芩素对人子宫颈癌 HeLa 细胞生长的抑制作用及其与诱导细胞凋亡之间的关系和可能的机制。

### 1 材料与方 法

1.1 材料 (1)细胞系:人子宫颈癌 HeLa 细胞购自 ATCC,由本实验室传代保存。(2)主要试剂:黄芩素购自中国药品生物制品检定所(HPLC  $\geq 98\%$ ,批号:200402),磺酰罗丹明 B(sulforhodamine B, SRB)、Hoechst 33258、三氯醋酸(TCA)、二甲基亚砜(DMSO)购自 Sigma-Aldrich 公司,caspase-3 活性检

测试剂盒购自 Chemicon 公司,细胞培养所用的 DMEM 干粉、新生小牛血清、胰酶、青-链双抗均购自 Gibco 公司。

#### 1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 HeLa 细胞在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 湿温环境下培养于含 10% 新生小牛血清的 DMEM 培养基中。

1.2.2 试剂配制 使用 DMSO 溶解黄芩素粉,配制成 50、100、200 mmol/L 的贮存液,使用时按 1:1 000 比例加入培养液中,终浓度为 50、100、200  $\mu\text{mol/L}$ 。对照组加入等量的 DMSO。

1.2.3 SRB 法检测细胞生长<sup>[9]</sup> 取指数生长期细胞以  $5 \times 10^4/\text{ml}$  接种于 96 孔板,每组设 5 个复孔。24 h 后加入不同浓度黄芩素;药物作用 24、36、48 h 后使用 10% TCA 4 °C 固定细胞 1 h;弃掉固定液,用超纯水洗 5 遍,每次 1 min,甩干后空气干燥;每孔加入 0.4% SRB 染色蛋白 30 min;用 1% 醋酸洗去游离染料,甩干后空气干燥;10 mmol/L Tris 溶解染料;使用酶标仪在 564 nm 波长处测定 OD 值,测时减去空白 OD 值。

1.2.4 Hoechst 33258 荧光染色法检测细胞凋亡 取对数生长期细胞以  $5 \times 10^4/\text{ml}$  接种于 12 孔板,

[收稿日期] 2009-02-25

[作者单位] 1. 蚌埠医学院 药理学教研室,安徽 蚌埠 233030;2. 中山大学中山医学院 药理学教研室,广东 广州 510080

[作者简介] 童旭辉(1977-),男,硕士,讲师。

24 h 后加入不同浓度黄芩素, 药物处理 24 h 后弃培养基, 4% 多聚甲醛 4 ℃ 固定 10 min, PBS 洗 2 次, 加 1 ml Hoechst 33258 染色液 (10 μg/ml) 避光染色 10 min。荧光显微镜下紫外光激发观察细胞核的改变。随机视野下在 100 个细胞中计数凋亡细胞数, 计算凋亡率。

**1.2.5 比色法检测 caspase-3 活性** caspase-3 活性检测试剂盒是基于 caspase-3 可以催化底物 Ac-IETD-pNA (acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp p-nitroanilide) 产生黄色的 pNA (p-nitroaniline), 从而可以通过测定吸光度来检测 caspase-3 的活性。pNA 在 405 nm 附近有强吸收。取对数生长期细胞以  $5 \times 10^4$ /ml 接种于 6 孔板, 24 h 后加入不同浓度黄芩素, 药物处理 24 h 后, 胰酶消化细胞, 计数; 将细胞密度调至  $2 \times 10^6$ /ml, 1 500 r/min 离心 10 min; 使用 100 μl 预冷的 1 × 细胞裂解液重悬细胞沉淀, 冰浴裂解 10 min; 4 ℃ 10 000 × g 离心 10 min; 把上清转移到冰浴预冷的离心管中, 置于冰上; 按试剂盒说明进行操作, 使用酶标仪在 405 nm 测定 caspase-3 的酶活性, OD<sub>405</sub> 即为样品中 caspase-3 催化产生的 pNA 产生的吸光度, 其值大小反映 caspase-3 活性强弱。

**1.3 统计学方法** 采用方差分析和 *q* 检验。

## 2 结果

**2.1 黄芩素抑制 HeLa 细胞生长** 不同浓度黄芩素均可抑制 HeLa 细胞生长, 并且随着黄芩素药物浓度提高, 其对 HeLa 细胞生长的抑制作用越明显,

表现为 OD 值变小。这种生长抑制作用在给药后 24、36 和 48 h 均出现。各时间点黄芩素组 OD 值与对照组比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ ) (见表 1)。

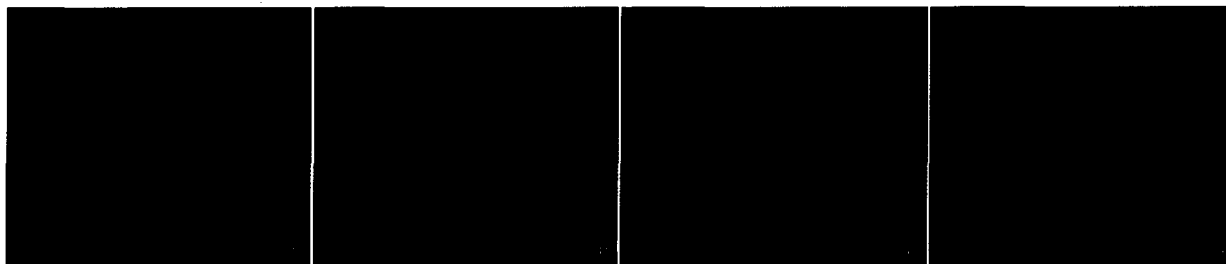
表 1 黄芩素对 HeLa 细胞生长的影响比较 ( $n_i = 5; \bar{x} \pm s$ )

分组	OD <sub>564</sub>		
	24 h	36 h	48 h
对照组	0.949 3 ± 0.039 2	1.112 3 ± 0.043 2	1.289 4 ± 0.081 5
50 μmol/L 黄芩素	0.850 0 ± 0.046 7*	0.998 0 ± 0.023 1**	1.095 6 ± 0.056 4**
100 μmol/L 黄芩素	0.812 3 ± 0.051 4**	0.974 5 ± 0.051 9**	0.990 8 ± 0.096 5**
200 μmol/L 黄芩素	0.784 3 ± 0.079 0**	0.954 6 ± 0.051 8**	0.966 5 ± 0.097 8**
<i>F</i>	8.25	12.81	15.05
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01
<i>MS</i> <sub>组内</sub>	0.003	0.002	0.007

*q* 检验: 与对照组比较 \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

**2.2 黄芩素诱导 HeLa 细胞凋亡** Hoechst 33258 荧光染色照片显示, 对照组 HeLa 细胞核为蓝色均匀淡染。而不同浓度黄芩素作用 HeLa 细胞 24 h 后, 细胞表现为典型的凋亡形态学改变, 即细胞体积缩小, 胞核呈致密浓染或呈碎块状 (见图 1)。不同浓度黄芩素组凋亡率与对照组均明显增高 ( $P < 0.01$ ) (见表 2)。

**2.3 黄芩素增强 HeLa 细胞 caspase-3 活性** caspase-3 在肿瘤细胞凋亡中起重要作用。不同浓度黄芩素作用 HeLa 细胞 24 h 后, 细胞内 caspase-3 活性均较对照组增强 ( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ ) (见表 3)。



A: 对照组; B: 50 μmol/L 黄芩素; C: 100 μmol/L 黄芩素; D: 200 μmol/L 黄芩素

图 1 黄芩素作用 24 h 后 HeLa 细胞核变化 (荧光染色 ×200)

表 2 不同浓度黄芩素作用 HeLa 细胞 24 h 后的凋亡率比较 ( $n_i = 5; \bar{x} \pm s$ )

分组	凋亡率 (%)	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>MS</i> <sub>组内</sub>
对照组	2.94 ± 0.82			
50 μmol/L 黄芩素	8.93 ± 2.43**	16.38	<0.01	6.245
100 μmol/L 黄芩素	9.22 ± 2.01**			
200 μmol/L 黄芩素	13.98 ± 3.79**			

*q* 检验: 与对照组比较 \*\*  $P < 0.01$

## 3 讨论

宫颈癌是全球妇女恶性肿瘤中仅次于乳腺癌的第二个最常见的恶性肿瘤, 目前临床以手术切除、放疗、化疗相结合等综合疗法为主。但化疗药物普遍有严重的不良反应。黄芩素属于黄酮类物质, 本实验首先采用 SRB 法这一目前常用的细胞毒性检测方法, 观察黄芩素对 HeLa 细胞生长的影响。结果显示, 不同浓度黄芩素作用 24、36、48 h 后均可抑

表3 不同浓度黄芩素作用24 h后HeLa细胞内caspase-3活性比较( $n_i=5; \bar{x} \pm s$ )

分组	OD <sub>405</sub>	F	P	MS <sub>组内</sub>
对照组	0.052 1 ± 0.018 9			
50 μmol/L 黄芩素	0.114 5 ± 0.034 4 *	6.92	<0.01	0.001
100 μmol/L 黄芩素	0.131 5 ± 0.048 1 **			
200 μmol/L 黄芩素	0.146 8 ± 0.033 8 **			

q 检验:与对照组比较 \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

制 HeLa 细胞的生长( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ ),并且这种抑制作用随着黄芩素浓度增高而增强。以上结果表明,50 ~ 200 μmol/L 黄芩素可以抑制子宫颈癌 HeLa 细胞生长。

黄芩素抑制肿瘤细胞生长的机制目前尚不明确<sup>[10]</sup>。在其他细胞株中黄芩素的作用机制可能与影响花生四烯酸系统代谢途径,抑制细胞增殖,使细胞周期阻滞,诱导肿瘤细胞凋亡,抗肿瘤新生血管生成等有关。细胞凋亡即细胞的程序化死亡是生物界中普遍存在的,在生物进化过程中形成的以实现对细胞数目精密调节的重要手段,具有重要的生物学意义。细胞凋亡的异常是肿瘤发生的重要机制。细胞凋亡具有独特的生物化学过程和细胞形态学变化,它的主要机制是:死亡信号经过传导和整合,最后激活核酸内切酶,引起核 DNA 非随机降解形成 180 ~ 200 个碱基对的寡核小体片段。实验中采用“Hoechst 33258 荧光染色法”观察黄芩素对 HeLa 细胞凋亡的影响,结果显示,黄芩素作用于 HeLa 细胞 24 h 后可明显增高细胞凋亡率,并且细胞凋亡随着黄芩素浓度增高而增多。这提示诱导细胞凋亡可能是黄芩素抑制细胞生长的原因之一。

细胞凋亡主要包括死亡受体途径和线粒体途径<sup>[11]</sup>,它们通过一系列分子和生化途径活化 caspases,并诱导许多细胞核和细胞质内相关底物降解,而 caspase-3 则是最常见的细胞凋亡通路的最后“执行者”<sup>[12]</sup>。实验中采用比色法测定细胞内 caspase-3 的活性,结果显示,伴随着细胞凋亡率增高的同时,细胞内 caspase-3 的活性也明显增强,这提示黄芩素诱导 HeLa 细胞凋亡与 caspase-3 激活有关,而这与 Pidgeon 等<sup>[13]</sup>的结果是一致的。

黄芩素对子宫颈癌 HeLa 细胞体外生长增殖作用的发现及其机制的初步探讨,扩展黄芩素的药理作用,且为临床采用中药治疗子宫颈癌提供理论基础及更广阔的研究思路。

#### [参 考 文 献]

- [1] 宋琳莉,孟庆刚.黄芩的药理作用研究进展[J].中华中医药学刊,2008,26(8):1676-1678.
- [2] 汤立建,赵良才,李庆林,等.黄芩黄酮类成分抗肿瘤作用及机制研究进展[J].中国中药杂志,2007,32(1):21-26.
- [3] Gao Z, Huang K, Yang X, et al. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. *Bichim Biophys Acta*, 1999, 1472 (3):643-650.
- [4] Ikemoto S, Sugimura K, Yoshida N, et al. Antitumor effects of *Scutellariae* radix and its components baicalein, baicalin and wogonin on bladder cancer cell lines [J]. *Urology*, 2000, 55(6):951-955.
- [5] Micoicovic R, McCabe NP, Keck RW, et al. *In vivo* and *in vitro* effect of baicalein on human prostate cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2005, 26(1):241-246.
- [6] Chang WH, Chen CH, Lu FJ. Different effects of baicalein, baicalin and wogonin on mitochondrial function, glutathione content and cell cycle progression in human hepatoma cell lines [J]. *Planta Med*, 2002, 68(2):128-132.
- [7] Chen CH, Huang LL, Huang CC, et al. Baicalein, a novel apoptotic agent for hepatoma cell lines; a potential medicine for hepatoma [J]. *Nutr Cancer*, 2000, 38(2):287-295.
- [8] 黎丹戎,张 玮,唐东平,等.黄芩素对卵巢癌耐药细胞株 A2780/ADM 逆转作用实验研究 [J]. *肿瘤*, 2004, 24 (2):111-113.
- [9] Skehan P, Storeng R, Scudiero D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1990, 82(13):1107-1112.
- [10] Li-Weber M. New therapeutic aspects of flavones; the anticancer properties of *Scutellaria* and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin [J]. *Cancer Treat Rev*, 2009, 35(1):57-68.
- [11] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis [J]. *Nature*, 2000, 407(6805):770-776.
- [12] Salvesen GS, Dixit VM. Caspase: intracellular signaling by proteolysis [J]. *Cell*, 1997, 91(4):443-446.
- [13] Pidgeon GP, Kandouz M, Meram A, et al. Mechanisms controlling cell cycle arrest and induction of apoptosis after 12-lipoxygenase inhibition in prostate cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(9):2721-2727.