

联合应用盐酸小檗碱和紫杉醇对宫颈癌 HeLa 增殖的抑制作用及耐药性测试

刘慧琪 姜敏 郭茹 姜粤 夏靓
(长沙医学院 湖南长沙 410219)

摘要: 目的: 探讨盐酸小檗碱联合紫杉醇对宫颈癌 HeLa 增殖的抑制作用及耐药性测试。方法: 采用 MTT 法测定盐酸小檗碱和紫杉醇对 HeLa 紫杉醇 s 细胞株的抑制作用以及 HeLa 紫杉醇 s 细胞株耐药性。结果: 紫杉醇组、BBR 组、联合用药组均有抑制作用, 且联合处理组的抑制作用最强, 由此说明紫杉醇和 BBR 对 HeLa 紫杉醇 s 细胞株具有明显的抑制作用。联合组的抑制率与单纯用药组的相应抑制率相比, 具有明显的统计学意义 ($P < 0.05$); 联合组的半数致死量是 $97.52 \mu\text{g/ml}$ 耐药指数为 2.34。对紫杉醇和 BBR 产生明显耐药性, 耐药指数分别为 78.15 和 9.25。结论: 盐酸小檗碱和紫杉醇对 HeLa 紫杉醇 s 细胞株的增殖具有抑制作用。联合用药后耐药性降低, 其具体机制暂未明确。

关键词: 盐酸小檗碱; 紫杉醇; 宫颈癌; 耐药性

宫颈癌(human cervical cancer cells)的发生率在所有妇女生殖器官恶性肿瘤中排名仅次于乳腺癌,它也是一种严格危及妇女一生健康的病症。紫杉醇是目前临床上常用的肿瘤化疗药物,它能够诱导微管蛋白稳定聚合和抑制微管解聚,抑制癌细胞的分裂和增殖。小檗碱(BBC)也叫做黄连素,是采集自毛茛科植物黄连,黄柏等树根中的一类天然生物碱,属异喹啉类药物,动物实验结果表明小檗碱不仅具有解热止痛,降低胆固醇,降血压,还对抗心律失常,降低胆固醇水平,改善胰岛素抵抗以及抑制雄激素的功效,而近年来的科学研究也证实了小檗碱还具有抗肿瘤功能。两药联合应用对宫颈癌细胞增殖的抑制作用鲜有报道。因此本项目探究联合应用盐酸小檗碱和紫杉醇药物对宫颈癌细胞增殖抑制作用及耐药性测试,为之后临床治疗宫颈癌提供新方向和新思路。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

人宫颈癌 HeLa 细胞; BBR;紫杉醇; 紫杉醇的培养液; 10000U/L 青霉素和 0.1g/L 链霉素的 DMEM 培养基; 噻唑蓝(MTT); 标准胎牛血清。

1.2 实验方法

1.2.1 大剂量冲击法诱导紫杉醇耐药

人宫颈癌 HeLa 细胞加入含 10%胎牛血清、10000U/L 青霉素和 0.1g/L 链霉素的 DMEM 培养基培养, 在 37°C 、饱和湿度及 5% CO_2 条件下进行培养, 隔天观察细胞生长情况, 细胞生长到 80%~90% 后进行传代。传代细胞长至对数生长期时, 将培养液换为含有 10mmol/L 紫杉醇的培养液, 细胞在 37°C 、饱和湿度及 5% CO_2 培养 24h, 弃去含有紫杉醇的培养液, 更换新鲜正常 DMEM 继续培养, 当细胞密度达到 80% 时进行细胞传代, 传代后继续用 10mmol/L 紫杉醇按上述方法冲击诱导培养, 最终获得能在 10mmol/L 紫杉醇中稳定传代的紫杉醇耐药 HeLa, 该细胞株命名为 HeLa 紫杉醇 s 细胞株。将细胞维持在 10mmol/L 浓度进行培养以保持其耐药性。

1.2.2 MTT 法测定盐酸小檗碱和紫杉醇对 HeLa 紫杉醇 s 细胞株生长的抑制作用

用取对数生长期的 HeLa 紫杉醇 s 细胞株,并调节细胞含量为 $4 \times 10^5/\text{mL}$,然后注射于 96 孔培养板上,设为对照组、紫杉醇组、BBR 组、联合药物组(紫杉醇+BBR)。药物处理均为(22.5mg/L 浓度梯度)共四组,每组设 4 孔,并各自加入了 $25 \mu\text{L}$ 的细胞悬液。盐酸小檗碱和紫杉醇的原液含量均为 6g/L,试验含量则采用 1g/L。药物处理组的最终含量按照盐酸小檗碱和紫杉醇血峰的含量作为参考,其血峰浓度均为 4.5mg/L,并检测细胞毒作用水平。在细胞贴壁 24h 后,药物处理组分各别加入了 $4.5 \mu\text{L}$ 体积的紫杉醇+BBR 溶液,然后加培养液至 200mL。将 96 孔培养板放置 37°C ,5% CO_2 ,在恒温箱中依次培养 24、48、72、96h 后,加入 MTT 溶液 $20 \mu\text{L}$,再继续培养 4h,弃上清液,加入 DMSO150 μL 所溶的紫色晶体,振荡 15min,待晶体溶化后放入酶标仪,测出 490nm 的 OD 值,并按照下列方法控制率=(1-试验组 OD 值/实验组 OD 值)来推算控制率。

1.2.3 HeLa 紫杉醇 s 细胞株耐药性的考察

把在对数生长期的 HeLa 紫杉醇 s 细胞株按 $6 \times 10^3 \text{cells}/\text{孔}$ 的密度注射在 96 孔板中,每孔含 $100 \mu\text{L}$ DMEM,经搅拌均匀后,在常规条件下培养 24h,使细胞贴壁。同时弃去每孔上清水,经各组培养 48h 后,在每孔上添加 $10 \mu\text{L}$ LCCK-8 及 $90 \mu\text{L}$ 不含胎牛新鲜血清的培养液。 37°C 培养 1h。用酶标仪测定在 450nm 处的细胞吸光度为 A。求半数抑制浓度 IC50 值和耐药指标(resistance index, RI)。RI 的等级 1-5 为低度耐药;5-15 为中度耐药;15 之上则为重度耐药。

1.3 统计学分析

采用 SPSS23.0 统计软件进行数据分析。

2 结果

2.1 三组对 HeLa 紫杉醇 s 细胞株增殖的抑制作用

结果表明: 紫杉醇组、BBR 组、联合用药组均有抑制作用, 且联合处理组的抑制作用最强, 由此说明紫杉醇和 BBR 对 HeLa 紫杉醇 s 细胞株具有明显的抑制作用。联合组的抑制率与单纯用药组的相应抑制率相比, 具有明显的统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 三组对 HeLa 紫杉醇 s 细胞株增殖的抑制作用比较

| 组别 | 抑制率 (%) |
|----|---------|
|----|---------|

| | 24h | 48h | 72h | 96h |
|-------|-------|-------|-----------------|------------|
| 对照组 | - | - | - | - |
| 紫杉醇组 | | | 54.1458.19 | 60.0139.24 |
| BBR 组 | 67.21 | 69.46 | 64.65 | 50.64 |
| 联合组 | | | 75.4881.3280.74 | 33.09 |

2.2 HeLa 紫杉醇 s 细胞株耐药性情况

结果表明：联合组的半数致死量是 97.52 μ g/ml 耐药指数为

2.34。对

紫杉醇和 BBR 产生明显耐药性,耐药指数分别为 87.15 和 9.25。

表 1 三组对 HeLa 细胞耐药性比较

| 组别 | HeLa 半数致死量 (μ g/ml) | 耐药指数 |
|-------|---------------------------|------|
| 对照组 | - | - |
| 紫杉醇组 | 6.7887.15 | |
| BBR 组 | 4.93 | 9.25 |
| 联合组 | 97.52 | 2.34 |

3 讨论

宫颈癌为中国女性第二大最常见恶性肿瘤,发病率大概为 3%~5%,仅次于乳腺癌。在全球范围内,一年大概有 50 万人次的宫颈癌新发患者。但是宫颈癌具体的发病率是根据地区,年龄,个人生活方式而不同的。90%以上的宫颈癌都伴有高危型 HPV 感染,危险的性生活是 HPV 感染最大的协同因素。近年来宫颈癌的病变趋向于年轻化,并影响妇女身体健康。由于癌细胞转移和侵入,极易导致人体的多器官功能衰竭和心血管破裂,以至出现失血性休克,死亡率极高。所以研究相关内容迫在眉睫。由于宫颈癌的产生发展机制复杂,牵扯到对人体中多种物质和基因的影响[1-2]。在肿瘤进展历程中,癌细胞经过外泌体内皮细胞、间质细胞和免疫细胞作用,促使肿瘤发展[3]。目前癌症发生机制有很多,例如影响 N-乙酰转移酶(N-acetyltransferase,NAT)的功能抑制癌细胞的生理功能;阻滞癌细菌的细胞循环,并控制癌症细胞的脱氧核糖核苷酸(Deoxyribonucleotide acid,DNA)及蛋白的合成,使含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase)级联反应激活,从而抑制癌增殖,并导致癌细胞坏死。还比如诱导微管蛋白稳定聚合和抑制微管解聚,抑制癌细胞的分裂和增殖。

紫杉醇(Paclitaxel),是一种从红豆杉属树皮中提炼的自然次生新陈代谢物质,又名红豆杉醇,它是 FDA 审批的首个纯天然抗癌药物[4]。它的功能有增强免疫力系统、高效防治神经退行性疾病、控制肉毒神经毒素功能[5]。紫杉醇及其新型药物用作抗肿瘤药品后,在卵巢癌、乳腺癌和宫颈癌领域的防治作用也受到了普遍重视[6]。

小檗碱又称黄连素,由黄连和黄柏等药液中萃取得到,为一种常用的异喹啉类生物碱,有抗病原微生物的作用。另有科学研究结果表明[7]:p-Akt 在子宫内膜癌细胞中的表现程度明显提高,且与癌细胞的生长与转化成正相关联系。PI3k/Akt 浓度减低,则有助于减少对癌细菌的转移与入侵作用。既往的观察证实了[8]:宫颈癌 HeLa 细菌中 PI3K 和 Akt 蛋白表达程度升高,证明 PI3K 和 Akt 是参与宫颈癌发生

发展的信号物质,低、中和高剂量浓度盐酸小檗碱组细菌中 PI3K、Akt 和 P-Akt 蛋白表达程度明显降低,表示 Akt 磷酸化可用作 p3k 活性测定指标,可以反应 PI3k 信息通道的活力,盐酸小檗碱可以利用下调 PI3k/Akt 信息通道控制宫颈癌细胞生长[9]。该中药良好的抗菌机制,并且小檗碱具有增加宫颈癌细胞的放射敏感性,可以完美的和紫杉醇药物相互配合。

本文通过 MTT 法研究紫杉醇和 BBR 对 HeLa 细胞增殖的作用,结果显示紫杉醇和 BBR 对 HeLa 宫颈癌细胞的增殖产生显著的抑制作用,且结合使用的抑制效果显著高于单一使用的控制作用,但二者是否存在相应的量效机制,尚有待进一步探讨。另外,在耐药细胞诱导的前期,细菌更对药物敏感,加药培养后致死的细菌也更多,但在联合使用后耐药性明显减弱,其具体机理仍有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] LUCIDO C T, WYNJA E, MADEO M, et al. Innervation of cervical carcinomas mediated by cancer-derived exosomes. *Gynecol* 2019, 154 (1) : 228-235.
 - [2] BHAT A, SHARMA A, BHARTI A. Hedgehog signaling components are exported in exosomes of cervical cancer cell lines [J]. *Nanomedicine* , 2018, 13(17): 2127-2138.
 - [3]王留军,曾韬,王越.肿瘤外泌体在微环境细胞间通讯中的作用及其作为肿瘤标志物的研究进展[J]. *当代化工研究*, 2019,37(5):338-341.
 - [4]王俊松.天然药物紫杉醇的研究进展[J]. *当代化工研究*, 2018,(1):168-169. [5]Meng ZY,Lv QX,Lu J,et al.Prodrug strategies for paclitaxel[J].*Int J Mol Sci*,2016,17(5):796-818.
 - [6]徐晚成.抗癌药物紫杉醇的作用机理及机制[J]. *滨州医学院学报*, 2017,40(4):294-297.
 - [7]HUOX,SUNHZ,LIUQ,et al.Clinical and expressionsignificance of AKT1 by co-expression network analysis in endometrial cancer [J].*Front Oncol*,2019,9:1147.
 - [8]黄姗姗,刘慧萍,张钰玉,等.卵巢颗粒细胞自噬与 PI3K/AKT/FOXO3a 信号通路的相关性[J].*湖南中医药大学学报*,2019,39(06): 775-780.
 - [9]张文倩. NF90 通过 PI3K/Akt 信号通路调节宫颈癌血管生成的研究[D].*重庆医科大学*,2018.
- 项目基金：长沙医学院大学生创新创业训练计划项目：长医教[2022]41 号—147
- 第一作者：刘慧琪（2001.06-），女，汉族，湖南邵东，本科在读，口腔医学专业
- 通讯作者：夏靓（1997.01-），女，汉，湖南常德，本科，助教，研究方向：妇科教学