

甘草酸通过线粒体膜去极化诱导 HPV18 阳性的人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡的作用研究

姚锐, 郑胡忠, 吴丽群, 蔡平生^{*}(温州市中西医结合医院, 浙江 温州 325000)

摘要: 目的 分析甘草酸对人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)18 阳性的人宫颈癌 HeLa 细胞的抗增殖和促凋亡特性及其可能的作用方式, 探讨甘草酸在预防 HPV 感染的作用和治疗宫颈癌的潜力。方法 MTT 法检测甘草酸在 caspase-8, caspase-9, caspase-3 抑制剂存在的情况下对 HeLa 细胞增殖的抑制作用, 相差显微镜观察细胞形态学, 4',6-二脒基-2-苯基吲哚染色检测细胞核凝集和 Hoechst 33342 染色检测核形态, Annexin V-FITC/PI 法分析细胞凋亡, 采用 caspase-8, caspase-9 和 caspase-3 比色试剂盒测定宫颈癌细胞中 caspase 的活性, 通过 Mito Tracker Red CMX Ros 染色评估线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)。结果 与对照组相比, 甘草酸可显著降低 HeLa 细胞活力, 并伴随着核浓缩和 DNA 碎片的增加, 呈剂量依赖性。甘草酸可通过线粒体去极化诱导宫颈癌 HeLa 细胞凋亡, 并诱导 caspase-8, caspase-9 和 caspase-3 活化。结论 甘草酸对宫颈癌细胞的抗增殖和促凋亡特性可能是通过诱导线粒体膜电位的破坏, 激活细胞内和细胞外途径的 caspases 活性, 甘草酸可作为预防和控制宫颈癌的一种辅助手段。

关键词: 宫颈癌; 人乳头瘤病毒; 甘草酸; HeLa 细胞; 细胞凋亡

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2020)22-2727-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.22.007

引用本文: 姚锐, 郑胡忠, 吴丽群, 等. 甘草酸通过线粒体膜去极化诱导 HPV18 阳性的人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡的作用研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(22): 2727-2733.

Study on Effect of Glycyrrhizin on Apoptosis of HPV18+ Human Cervical Carcinoma HeLa Cells Induced by Mitochondrial Membrane Depolarization

YAO Rui, ZHENG Huzhong, WU Liqun, CAI Pingsheng^{*}(Wenzhou Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Wenzhou 325000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To analyze the anti-proliferative and apoptotic properties of glycyrrhizin on human papilloma virus(HPV)18-positive HeLa cells in cervical cancer and its possible mode of action, and to explore the potential of glycyrrhizin in the prevention of HPV infection and treatment of cervical cancer. **METHODS** MTT assay was used to detect the inhibitory effect of glycyrrhizin on HeLa cell proliferation and the inhibition of caspase-8, caspase-9 and caspase-3 inhibitors. Cell morphology was observed by phase contrast microscopy. Nuclear condensation was detected by 4',6-diamidino-2-phenylindole staining and nuclear morphology was detected by Hoechst 33342 staining. Apoptosis was analyzed by Annexin V-FITC/PI method. The activity of caspase in cervical cancer cells was determined by caspase-8, caspase-9 and caspase-3 colorimetric kits, and the mitochondrial membrane potential($\Delta\Psi_m$) was evaluated by Mito Tracker Red CMX Ros staining. **RESULTS** Compared with control group, exposure to glycyrrhizin significantly reduced HeLa cell viability, accompanied by nuclear condensation and increased DNA fragmentation, in a dose-dependent manner. Glycyrrhizin could induce apoptosis by mitochondrial depolarization and could induce caspase-8, caspase-9 and caspase-3 activation in cervical cancer HeLa cells. **CONCLUSION** The anti-proliferative and apoptotic properties of glycyrrhizin on cervical cancer cells may be through the induction of disruption of mitochondrial membrane potential and activation of caspases activity in intracellular and extracellular pathways. Glycyrrhizin can be used as an adjunct prevent and manage cervical cancer.

KEYWORDS: cervical cancer; human papilloma virus; glycyrrhizin; HeLa cells; apoptosis

子宫颈癌是世界范围内女性第四大常见癌症^[1], 人乳头状瘤病毒(human papilloma virus, HPV; 主要为 16 型和 18 型)感染是宫颈癌发生的主要危险因素, >90%的子宫颈肿瘤含有高危 HPV DNA^[2]。据报道, 2015 年全球大约估计有 270 000 名女性死于宫颈癌^[3], 而将近 85%的宫颈癌死亡发生在不

发达或发展中国家^[4]。尽管近年来在宫颈癌诊断和治疗方面取得了进展, 但晚期宫颈癌患者的 5 年生存率仍然<40%^[5]。大量流行病学报告表明, 植物源化合物具有潜在的抗肿瘤作用, 其中许多通过调节肿瘤细胞中发生的各种细胞和分子事件而表现出抗肿瘤特性^[6]。甘草酸是一种三萜糖苷, 是

作者简介: 姚锐, 女, 副主任医师 Tel: (0577)88917052 E-mail: 41380466@qq.com *通信作者: 蔡平生, 女, 主任医师 Tel: (0577)88910524 E-mail: cpshosanna@aliyun.com

甘草的主要活性化合物,已被证明具有抗氧化、抗炎和抗病毒作用^[7]。研究表明,甘草酸对不同的人类肿瘤细胞具有有效的体外细胞毒性^[8-9]。然而,甘草酸对人子宫颈癌细胞的抗增殖和抗肿瘤作用尚未阐明。因此,本研究旨在探讨甘草酸在人宫颈癌细胞中的细胞毒性作用及其可能的作用机制。

1 仪器与试剂

iMark 型全自动酶标分析仪(美国 Bio-Rad 公司);CK2 型倒置显微镜、IX70-S8F2 型倒置相差显微镜均来自日本 Olympus 公司;ECLIPSE Ti-S 型荧光倒置显微镜(日本 Nikon 公司);FAC-SCalibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司)。

甘草粉末(浙江三溪堂中药有限公司,批号:130201;纯度>95%);顺铂(批号:061205)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil,5-FU;批号:F21689)、Hoechst 33342 (批号:HY-15559)、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI,批号:17510)、Rhodamine123(批号:R302)、碘化丙啶(propidium iodide, PI,批号:25535-16-4)、caspase-3, caspase-8, caspase-9 抑制剂(Z-DEV-FMK, Z-IETD-FMK, Z-LEHD-FMK,批号分别为 GC12287, GC12407, GC16990)和 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(2',7'-dichlorodi-hydrofluorescein diacetate, DCFH-DA,批号:S24489)均购自 Sigma。最小必需培养基(minimum essential medium, MEM)、胎牛血清(批号:110213)、3-(4,5-二甲基噻唑-2-酰基)-2,5-二苯四唑溴化铵[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT](批号:HY-15924)等化学试剂均购自 Gibco 公司;FITC Annexin V 细胞凋亡检测试剂盒(美国 BD 生物科学公司,批号:556507);caspase-3(批号:K106-25)、caspase-8(批号:K113-400)和 caspase-9(批号:K119-400)活性检测试剂盒购自美国 BioVision 公司。

2 方法

2.1 甘草酸的提取

将甘草粉末置于圆底烧瓶中,加入适量乙醇溶解(甘草粉末与乙醇溶剂的料液比为 1:10),配制成浓度为 1 mmol·L⁻¹ 的储存液,使用时稀释至需要的浓度(20, 40, 80, 160 和 320 μmol·L⁻¹)。

2.2 细胞培养

HPV18 阳性的人宫颈癌 HeLa 细胞系购自中国科学院细胞库,在 MEM 培养基中培养,置于一

定湿度,37℃和含 5%二氧化碳的环境中培养。

2.3 MTT 法测定细胞活力

HeLa 细胞以接种密度为每孔 5×10³ 个细胞接种于 96 孔板,37℃培养 24 h,甘草酸(20, 40, 80, 160 和 320 μmol·L⁻¹) 分别处理 24 h 和 48 h^[10-12],每孔加入 10 μL 5 mg·mL⁻¹ MTT 染料,37℃下孵化 4 h。紫色沉淀(甲臜)加入 100 μL 二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)轻微震荡溶解。待完全溶解后,用酶标仪在 490 nm 处测量每孔的吸光度,计算细胞存活率(%). IC₅₀ 值由 Origin 6.0 Professional 计算。

2.4 台盼蓝法测定细胞死亡

细胞以接种密度为 7.0×10⁴·mL⁻¹ 接种于 12 孔板过夜,不同浓度的甘草酸(20, 40, 80, 160 和 320 μmol·L⁻¹)再处理 24 h 和 48 h。孵育结束后,收集悬浮细胞和贴壁细胞,1 500 r·min⁻¹ 离心 5 min,重悬于 10 μL 0.4%台盼蓝溶液中,在倒置显微镜下使用血细胞计数器进行计数。结果以各组 3 次独立试验的死亡细胞百分比表示。

2.5 相差显微镜形态学分析

细胞以每孔 5×10³ 个细胞的密度接种于 96 孔板过夜,加入含不同浓度的甘草酸(20, 40, 80, 160 和 320 μmol·L⁻¹)的新鲜培养基处理 24 h,在倒置相差显微镜下观察细胞形态。

2.6 核冷凝的 DAPI 染色检测

HeLa 细胞以 5×10³·mL⁻¹ 接种到 6 孔板,37℃下孵育 24 h,不同浓度的甘草酸(20, 40, 80, 160 和 320 μmol·L⁻¹)处理 24 h。冷 PBS 洗涤后,细胞固定于冰甲醇 10 min,用透明缓冲液(3% 多聚甲醛和 0.25% Triton x-100)透明并用 DAPI 染色。染色后在荧光倒置显微镜下拍摄。

2.7 Hoechst 33342 染色测定细胞核形态

Hoechst 33342 染色进一步检测 HeLa 细胞凋亡相关的形态学改变。简而言之,HeLa 细胞以 5×10⁴·mL⁻¹ 接种到 6 孔板,37℃下孵育 24 h,不同浓度的甘草酸(20, 40, 80, 160 和 320 μmol·L⁻¹)处理 24 h, PBS 洗涤,加入 Hoechst 33342(5 μg·mL⁻¹)染料,避光,37℃下孵育 10 min,用荧光倒置显微镜观察荧光核形态。

2.8 Annexin V-FITC/PI 法分析细胞凋亡

HeLa 细胞被接种于 60 mm 培养皿并用不同浓度的甘草酸(20, 40, 80, 160 和 320 μmol·L⁻¹)处理 24 h,冷 PBS 洗涤 2 次,重悬于 1×缓冲液使细

胞浓度为 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 。100 μL 细胞悬液(1×10^5 个细胞)转移到 5 mL 培养试管,参照 Annexin V FITC 细胞凋亡检测试剂盒说明分析细胞凋亡,用流式细胞仪分析染色细胞。

2.9 caspase-8, caspase-9 和 caspase-3 活性的测定

根据 caspase-8, caspase-9 和 caspase-3 比色试剂盒步骤操作,最后用酶标仪于 405 nm 处测定吸光度,以此来表示宫颈癌细胞中 caspase-8, caspase-9 和 caspase-3 的活性。

2.10 caspase-8, caspase-9, caspase-3 抑制剂作用分析

为了证实甘草酸的细胞毒性与 caspase 活化的关系,HeLa 细胞用 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Z-DEVD-FMK (caspase-3 抑制剂),Z-IETD-FMK(caspase-8 抑制剂)和 Z-LEHD-FMK(caspase-9 抑制剂)预处理 2 h,不同浓度(20, 40, 80, 160 和 $320 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)甘草酸处理 24 h。细胞存活率采用“2.3”项下 MTT 测定法测定。

2.11 通过 Mito Tracker Red CMX Ros 染色评估线粒体膜电位($\Delta\Psi\text{m}$)

采用 Mito Tracker Red CMX Ros 染色,分析甘草酸处理的 HeLa 细胞的线粒体膜电位。HeLa 细胞每孔 2×10^5 细胞接种于 12 孔板,黏附过夜,与不同浓度(20, 40, 80, 160 和 $320 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)甘草酸孵育 12 h。洗涤细胞并用 3.5%多聚甲醛在 37°C 条件下固定 15 min,然后在 0.05% Triton x-100 中透明。避光条件下,用 Mito Tracker Red ($25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)对细胞染色 30 min,用荧光倒置显微镜拍照。

2.12 统计分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析和 Dunnett's 多重比较进行统计学分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 甘草酸抑制子宫颈癌 HeLa 细胞增殖

与对照组相比,甘草酸作用后细胞活力显著减少(图 1A),且抑制 HeLa 细胞增殖的作用呈浓度和时间依赖方式。在 24 h 和 48 h, IC_{50} 分别为 $121.84 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $38.53 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。不同浓度的甘草酸(20, 40, 80, 160 和 $320 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)处理 24 h 后,HeLa 细胞存活率显著降低,分别为 88.43%, 67.46%, 54.48%, 47.40%和 24.63%(图 1A),呈浓度依赖关系;处理 48 h 后,宫颈癌细胞的存活率进一步下降,分别约为 86.87%, 45.85%, 19.09%, 8.77%和 7.22%(图 1A)。因此,HeLa 细胞在不同浓度的甘草酸中展现出细胞活力明显下降。

此外,通过台盼蓝试验也证实了甘草酸对宫颈癌细胞的毒性作用。不同浓度的甘草酸(20, 40, 80, 160 和 $320 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)处理宫颈癌细胞 24 和 48 h 后大量细胞死亡。与对照组相比,处理 24 h 时细胞死亡率分别为 13.56%, 28.12%, 40.05%, 53.37%和 70.93%(图 1B);处理 48 h, HeLa 细胞的死亡率进一步增加,分别为 17.84%, 48.25%, 74.26%, 83.47%和 88.53%(图 1B)。

3.2 甘草酸诱导宫颈癌细胞发生形态学改变

用相差显微镜对甘草酸处理的 HeLa 细胞进行形态学分析。甘草酸处理 24 和 48 h 后,观察到的 HeLa 细胞形态学变化呈剂量和时间依赖性。不同浓度的甘草酸下,HeLa 细胞显示出体积缩小和核凝结形态。部分细胞肿胀,细胞膜裂解,细胞器解体,提示甘草酸诱导 HeLa 细胞毒性(图 1C~D)。随着甘草酸浓度的增加,宫颈癌细胞的这些形态变化更为明显。相比之下,对照细胞则表现出良好的舒展形态。

3.3 甘草酸诱导 HeLa 细胞核凝结

不同浓度甘草酸处理 24 h, HeLa 细胞出现显著的核改变,如箭头所示,甘草酸诱导核凝结呈剂量依赖的方式,而对照组细胞表现出正常细胞形态,见图 2A。Hoechst 33342 染色也可观察到经甘草酸处理的 HeLa 细胞的凋亡情况,其结果与此相似,细胞核呈浓缩和碎片状,而对照组的 HeLa 细胞显示弥漫性染色的完整细胞核,见图 2B。

3.4 甘草酸诱导宫颈癌 HeLa 细胞凋亡

甘草酸处理后显著减少了活细胞数量和增加了凋亡细胞数量,这种作用呈剂量依赖性增加直至 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,在 20, 40, $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下,凋亡细胞数量分别为 5.12%, 8.05%和 14.58%。而当浓度增加到 $160 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,死亡细胞数量大幅增加,观察到约 7.93%的坏死细胞并伴随 12.43%的细胞凋亡。当用 $320 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘草酸处理,死亡细胞的数量进一步增加到 18.99%,伴随 7.32%的细胞凋亡,见图 3。

3.5 甘草酸诱导宫颈癌 HeLa 细胞半胱天冬酶(caspase-8, caspase-9 和 caspase-3)活化

不同浓度的甘草酸处理 HeLa 细胞 24 h 后观察到诱导产生的 caspase 活性显著增加。与对照组相比,40, 80, 160 和 $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 caspase-3, caspase-8, caspase-9 活性均显著增加($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$),具有明显的剂量依赖性。结果见图 4A。

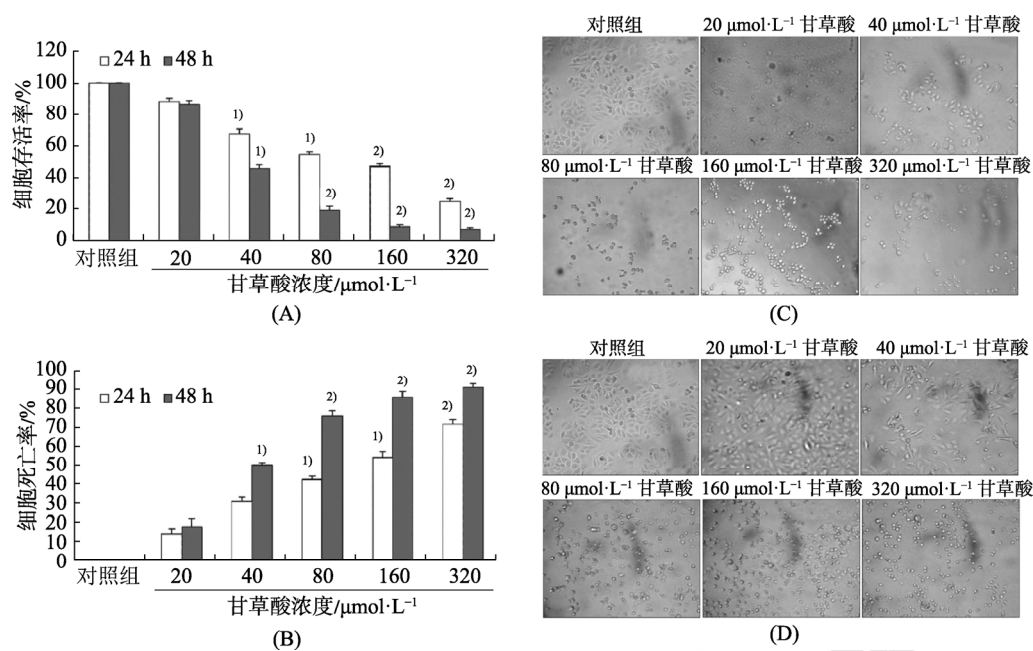


图1 甘草酸抗宫颈癌 HeLa 细胞增殖的体外活性

A-细胞存活率; B-细胞死亡率; C-对照组和不同浓度甘草酸组处理 24 h 的 HeLa 细胞相差显微照片; D-对照组和不同浓度甘草酸组处理 48 h 的相差显微照片。与对照组比, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 1 In vitro activity of glycyrrhizin against cervical cancer HeLa cells

A-cell viability percentage; B-cell death percentage; C-phase contrast photomicrograph of HeLa cells in control group and varying concentrations of glycyrrhizin treatment group for 24 h; D-phase contrast photomicrograph of HeLa cells in control group and varying concentrations of glycyrrhizin treatment group for 48 h. Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.001$.

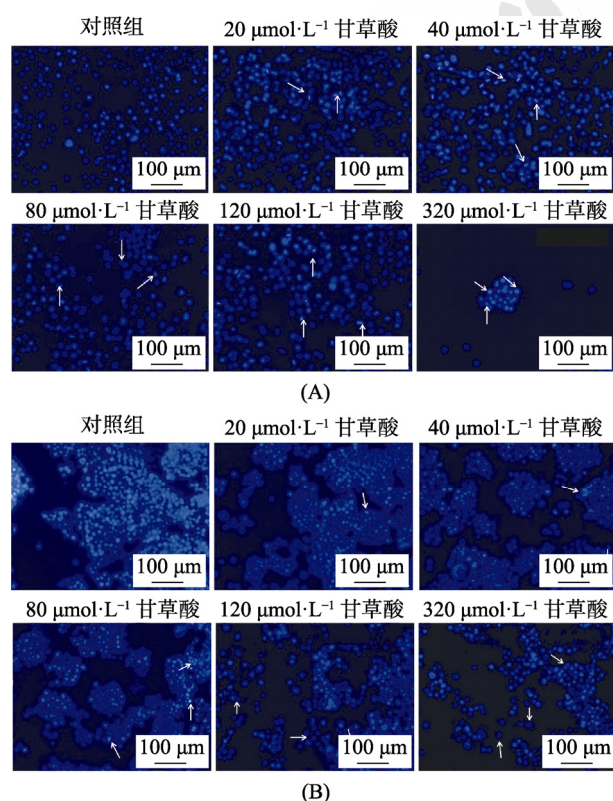


图2 台盼蓝试验结果

A-核形态学 DAPI 染色; B- Hoechst-33342 核染色。

Fig. 2 Trypan blue test result

A-nuclear morphology of DAPI stained; B-Hoechst-33342 nuclei stained.

3.6 caspase 抑制剂对甘草酸诱导细胞凋亡的抑制作用

采用 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Z-DEVD-FMK (caspase-3 抑制剂), Z-IETD-FMK(caspase-8 抑制剂) 和 ZLEHD-FMK(caspase-9 抑制剂) 分别对 HeLa 细胞预处理 2 h 后, 在不同浓度的甘草酸中处理 24 h。结果显示, caspase 抑制剂预处理后显著减少了甘草酸在宫颈癌细胞的细胞毒性, 见图 4B~D。

3.7 甘草酸破坏 HeLa 细胞线粒体膜电位

采用不同浓度甘草酸处理 HeLa 细胞后, 通过 Mitotracker Red CMXRos 染色观察线粒体膜电位 ($\Delta\Psi\text{m}$) 的破坏。发现细胞中的荧光强度减少, 随着甘草酸浓度的增加, $\Delta\Psi\text{m}$ 相应地减少。结果见图 5。

4 讨论

甘草酸是一种甘草衍生化合物, 以其广泛的生物活性而闻名, 如抗炎、抗氧化、抗病毒以及抗肿瘤等^[7]。研究表明甘草酸浓度 $<12 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 对正常的细胞没有毒性作用, 表明它是一种安全无毒的植物产物^[13-14]。同时, 最近研究显示 18β -甘草次酸(甘草的活性植物化学成分)可以诱导宫颈癌 SiHa 细胞凋亡^[15]。但甘草酸对宫颈癌

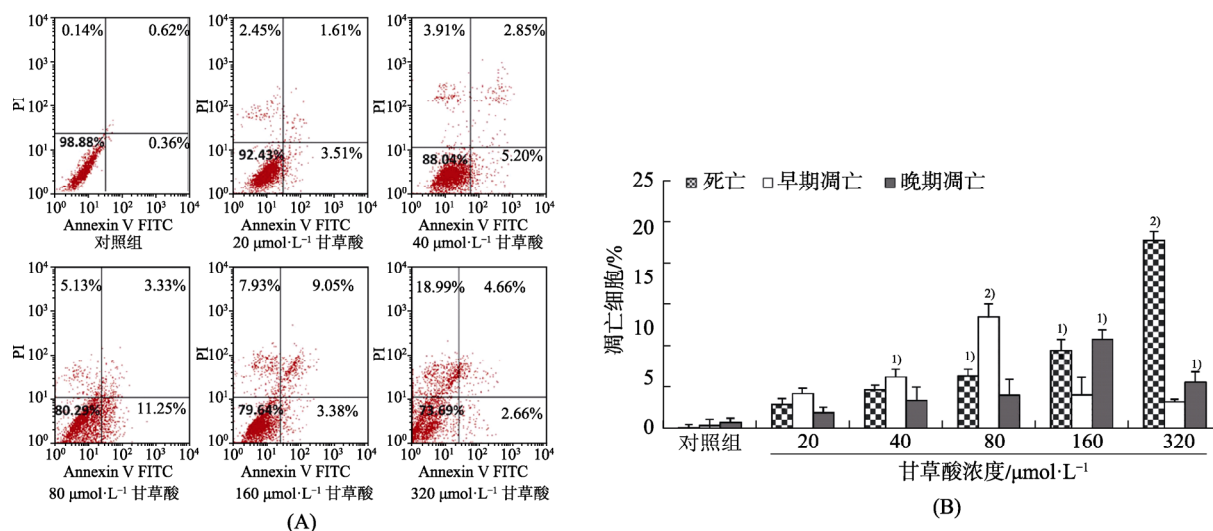


图3 甘草酸诱导宫颈癌 HeLa 细胞凋亡

A—不同浓度的甘草酸处理 HeLa 细胞 24 h 的 Annexin V-FITC/PI 染色百分比, 直方图右下象限为早期凋亡细胞, 右上象限为晚期凋亡细胞; B—Annexin V-FITC/PI 法观察到的细胞凋亡百分比。与对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 3 Glycyrrhizin induced apoptosis of cervical cancer HeLa cells

A—percentage of apoptosis in Annexin V-FITC/PI-stained HeLa cells treated with varying concentrations of glycyrrhizin for 24 h. The lower right quadrant of the histograms indicates the early apoptotic cells, and the upper right quadrant indicates the late apoptotic cells; B—percentage of apoptosis observed by Annexin V-FITC/PI. Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.001$.

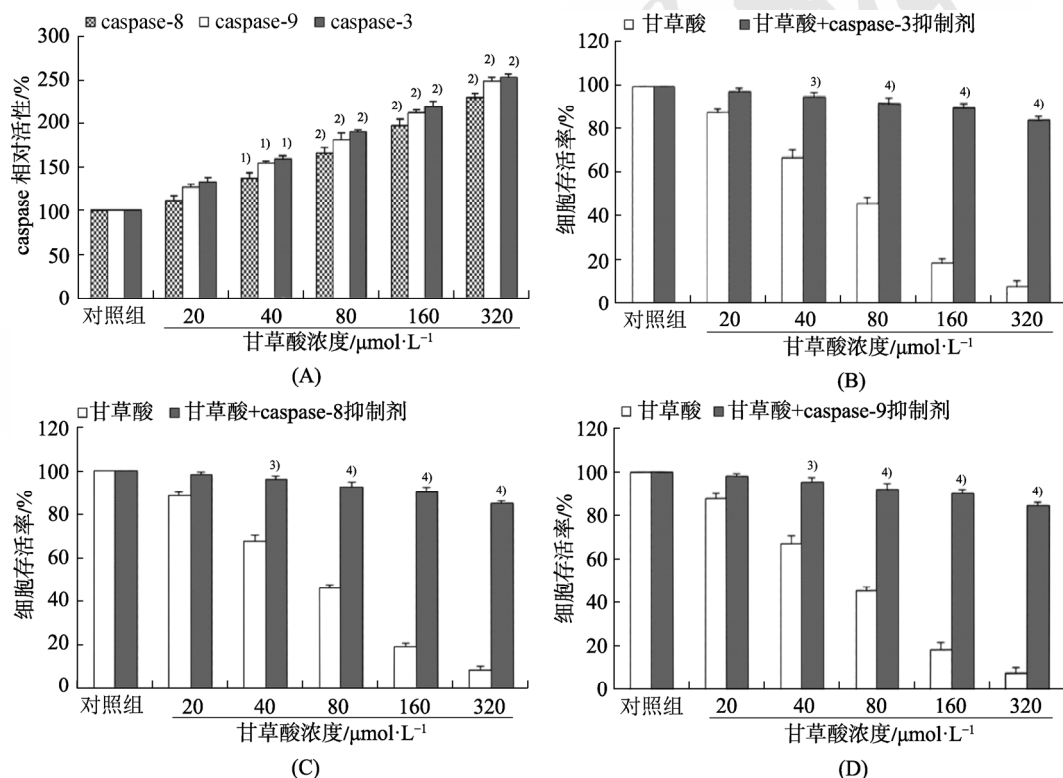


图4 甘草酸处理的 HeLa 细胞中 caspase 的活性

A—不同浓度的甘草酸处理 HeLa 细胞 24 h 后 caspase-3, caspase-8 和 caspase-9 活性百分比; B—caspase-3 抑制剂(Z-DEVD-FMK)预处理后, 不同浓度的甘草酸处理 24 h 的 HeLa 细胞存活率百分比; C—caspase-8 抑制剂(Z-IETD-FMK)预处理后, 不同浓度的甘草酸处理 24 h 的 HeLa 细胞存活率百分比; D—caspase-9 抑制剂(Z-LEHD-FMK)预处理后, 不同浓度的甘草酸处理 24 h 的 HeLa 细胞存活率百分比。与对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.001$; 与对应浓度的甘草酸组相比, ³⁾ $P<0.01$, ⁴⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 4 Activation of caspase in glycyrrhizin treated HeLa cells

A—activity percentage of caspase-3, caspase-8 and caspase-9 in HeLa cells treated with varying concentrations of glycyrrhizin for 24 h; B—after pre-treated with caspase-3 inhibitor(Z-DEVD-FMK), percentage of survival rate of HeLa cells treated with varying concentrations of glycyrrhizic acid for 24 h; C—after pre-treated with caspase-8 inhibitor(Z-IETD-FMK), percentage of survival rate of HeLa cells treated with varying concentrations of glycyrrhizic acid for 24 h; D—after pre-treated with caspase-9 inhibitor(Z-LEHD-FMK), percentage of survival rate of HeLa cells treated with varying concentrations of glycyrrhizic acid for 24 h. Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.001$; compared with the corresponding concentration of glycyrrhizin group, ³⁾ $P<0.01$, ⁴⁾ $P<0.001$.

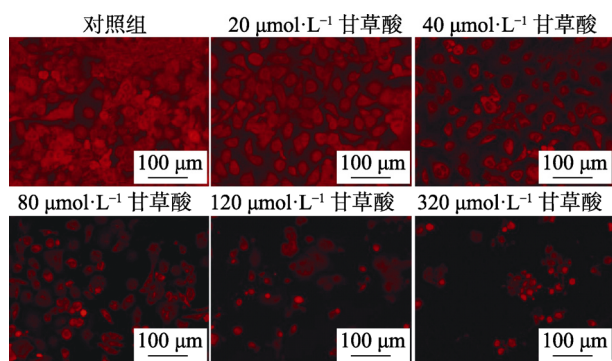


图5 甘草酸处理 HeLa 细胞的线粒体去极化
Fig. 5 Mitochondrial depolarization in glycyrrhizin treated HeLa cells

细胞的细胞毒性作用尚未阐明。因此,本研究旨在验证甘草酸或许可作为宫颈癌的一种抗增殖和抗肿瘤药物。

本研究系统地描述了甘草酸对宫颈癌 HeLa 细胞系的影响。细胞活力测定显示, HeLa 细胞暴露于甘草酸中,宫颈癌细胞的活力显著降低,且呈时间和剂量依赖性。进一步的形态学分析表明,甘草酸处理后细胞的形态发生了显著变化,细胞收缩,脱离表面,形成簇状,提示甘草酸在宫颈癌细胞系中具有明显的细胞毒性作用。之前的研究结果显示,甘草酸对不同的肿瘤细胞也有类似的作用^[14]。

细胞内细胞核碎裂,浓缩是细胞凋亡诱导^[16]的标志。DAPI 和 Hoechst 33342 染色显示,甘草酸通过细胞凋亡导致细胞死亡。此外,通过 FITC-Annexin V/PI 检测细胞早期和晚期凋亡变化,探讨早期凋亡标志物磷脂酰丝氨酸在细胞表面的表象,进一步表征甘草酸的细胞毒性。因此,观察到 Annexin V 阳性细胞呈剂量依赖性增加,提示甘草酸诱导 HeLa 细胞凋亡。

caspase-8 和 caspase-9 分别通过催化 caspase-3^[17]的活化,促进程序细胞死亡,以响应线粒体相关信号事件和细胞表面受体的死亡诱导信号。caspase-3 是凋亡的关键执行者之一,可以介导大量细胞蛋白降解。甘草酸处理 HeLa 细胞 caspase-8, caspase-9, caspase-3 的活性呈剂量依赖性提示甘草酸通过细胞表面受体和线粒体介导途径诱导细胞凋亡。此外,甘草酸诱导的宫颈癌细胞毒性被 caspase-8, caspase-9, caspase-3 抑制剂(分别是 Z-IETD-FMK, Z-LEHD-FMK 和 Z-DEVD-FMK)显著降低,表明 caspase-3 活化在甘草酸诱导的细胞凋亡过程中起关键作用。这一结果也与之前报

道的甘草次酸研究结果^[15]一致。然而, caspase 抑制剂的预处理并没有完全降低宫颈癌细胞的存活率,这表明甘草酸处理的 HeLa 细胞中通过另一种 caspase 非依赖途径发挥促凋亡作用。因此,甘草酸很可能通过 caspase 依赖和非依赖途径诱导 HeLa 细胞凋亡。然而,在目前的研究中, caspase 非依赖途径的作用还有待评估。

研究已证实线粒体膜电位的损失($\Delta\Psi_m$)是凋亡过程的一个早期事件^[18]。线粒体跨膜电位的破坏导致细胞色素 C 释放到细胞质中,激活 caspase-3,导致细胞活力丧失^[19]。甘草酸处理的宫颈癌细胞线粒体膜电位呈剂量依赖性降低,提示甘草酸诱导细胞早期凋亡。因此,结果表明,甘草酸可能通过破坏线粒体膜电位导致 HeLa 细胞程序性死亡,从而激活 caspase-3。

总之,研究结果表明甘草酸表现出对宫颈癌细胞的抗增殖和凋亡特性可能是通过诱导线粒体膜电位的破坏,激活细胞内和细胞外途径的 caspases 活性。基于此,甘草酸通过诱导宫颈癌 HeLa 细胞凋亡,在体外证实了其优良的细胞毒性潜能,并显示了其抗肿瘤作用。因此,甘草酸可以作为未来宫颈癌预防和治疗研究的潜在药物。

REFERENCES

- [1] SMALL W, BACON M A, BAJAJ A, et al. Cervical cancer: A global health crisis [J]. Cancer, 2017, 123(13): 2404-2412.
- [2] WANG H Y, LEE D, PARK S, et al. Diagnostic performance of HPV E6/E7 mRNA and HPV DNA assays for the detection and screening of oncogenic human papillomavirus infection among woman with cervical lesions in China [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(17): 7633-7640.
- [3] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2016 [J]. CA: A Cancer J Clin, 2016, 66(1): 7-30.
- [4] ROY L, BOBBS A, SATTler R, et al. CD133 promotes adhesion to the ovarian cancer metastatic niche [J]. Cancer Growth Metastasis, 2018, 11: Doi: 10.1177/1179064418767882.
- [5] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2018 [J]. CA: A Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30.
- [6] AUNG T, QU Z P, KORTSCHAK R, et al. Understanding the effectiveness of natural compound mixtures in cancer through their molecular mode of action [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(3): 656. Doi: 10.3390/ijms18030656.
- [7] RUI Y, BOCHUAN Y, YONGSHENG M, et al. HMGR, SQS, β -AS, and cytochrome P450 monooxygenase genes in *Glycyrrhiza uralensis* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药: 英文版), 2015, 7(4): 290-295.
- [8] WANG Y H, LAN W Y, CHEN T. Antiviral effects of glycyrrhizic acid on human Cytomegalovirus AD169 strain *in vitro* [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2016, 38(10): 2121-2127.

- [9] CAI Y, ZHAO B X, LIANG Q Y, et al. The selective effect of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid on topoisomerase II α and apoptosis in combination with etoposide on triple negative breast cancer MDA-MB-231 cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017(809): 87-97.
- [10] GAO Y C, CHEN J, CAI Y. Effects of glycyrrhizin on the growth of human breast cancer cells of MDA-MB-231 [J]. *Chin J Clin Pharmacol*(中国临床药理学杂志), 2016, 32(13): 1210-1213.
- [11] 杨道科. 甘草甜素对胃癌细胞株 SGC-7901 凋亡影响的体外研究[J]. *中国现代药物应用*, 2008, 2(11): 32-33.
- [12] WANG X F, ZHAO Q. Effects and mechanisms of glycyrrhizin on human prostate cancer PC₃ cells growth [J]. *Int J Pathol Clin Med*(临床与病理杂志), 2018, 38(11): 2308-2313.
- [13] THIRUGNANAM S, XU L P, RAMASWAMY K, et al. Glycyrrhizin induces apoptosis in prostate cancer cell lines DU-145 and LNCaP [J]. *Oncol Rep*, 2008, 20(6): 1387-1392.
- [14] HIBASAMI H, IWASE H, YOSHIOKA K, et al. Glycyrrhizin induces apoptosis in human stomach cancer KATO III and human promyelotic leukemia HL-60 cells [J]. *Int J Mol Med*, 2005, 16(2): 233-236.
- [15] LEE C S, KIM Y J, LEE M S, et al. 18 β -Glycyrrhetic acid induces apoptotic cell death in SiHa cells and exhibits a synergistic effect against antibiotic anti-cancer drug toxicity [J]. *Life Sci*, 2008, 83(13/14): 481-489.
- [16] SARASTE A. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2000, 45(3): 528-537.
- [17] HUANG W W, YANG J S, LIN M W, et al. Cucurbitacin E induces G(2)/M phase arrest through STAT3/p53/p21 signaling and provokes apoptosis via fas/CD95 and mitochondria-dependent pathways in human bladder cancer T24 cells [J]. *Evid-Based Complementary Altern Med*, 2012, 2012: 952762. Doi: 10.1155/2012/952762.
- [18] ZHAO M, MYDLARZ W K, ZHOU S Y, et al. Head and neck cancer cell lines are resistant to mitochondrial-depolarization-induced apoptosis [J]. *ORL*, 2008, 70(4): 257-263.
- [19] FLEURY C, MIGNOTTE B, VAYSSIÈRE J L. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling [J]. *Biochimie*, 2002, 84(2): 131-141.

收稿日期: 2019-07-26
(本文责编: 李艳芳)