

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.15.005

萝卜硫素对宫颈癌 HeLa 细胞凋亡及放射敏感性的影响

张亚芳,赵晓红,王德珠,张华凤,王小花

(海南省妇女儿童医学中心妇产科,海南 海口 570206)

摘要:目的 探讨萝卜硫素对宫颈癌 HeLa 细胞凋亡及放射敏感性的影响。方法 体外培养宫颈癌 HeLa 细胞,采用四氮唑比色(MTT)法确定萝卜硫素和放射线对 HeLa 细胞的干预剂量;采用克隆形成实验观察萝卜硫素对 HeLa 细胞的放射增敏作用;将 HeLa 细胞分为对照组、联合组、萝卜硫素组和放射组,检测细胞凋亡和细胞周期变化,同时检测 HeLa 细胞中细胞外信号调节激酶(ERK1/2)、磷酸化 ERK1/2(p-ERK1/2)、Akt、磷酸化 Akt(p-Akt)、半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)蛋白表达。结果 随着萝卜硫素浓度和放射线剂量的增加,HeLa 细胞抑制率增加,萝卜硫素对 HeLa 细胞的半数抑制浓度(IC_{50})为 $(76.28 \pm 9.27) \mu\text{mol/L}$,故选 $80 \mu\text{mol/L}$ 作为干预浓度;放射线对 HeLa 细胞的 IC_{50} 为 $(2.13 \pm 0.27) \text{Gy}$,故选 2Gy 作为半干预剂量;随着放射剂量的增加,放射组和联合组细胞存活率均降低,联合组各放射剂量的细胞存活率均低于放射组($P < 0.05$),萝卜硫素能提高 HeLa 细胞放射敏感性,SERD₀ 和 SERD_q 分别为 1.517 和 2.024。各组 HeLa 细胞 G₀/G₁ 期细胞比例变化不显著($P > 0.05$);与对照组比较,其余各组 HeLa 细胞凋亡率、G₂/M 期细胞比例、ERK1/2、p-ERK1/2、Akt、p-Akt、Caspase-3 蛋白表达增加,S 期细胞比例降低,联合组作用最强,放射组次之,萝卜硫素组最弱($P < 0.05$)。结论 萝卜硫素可通过 G₂/M 期阻滞诱导 HeLa 细胞凋亡,并通过激活 ERK 和 Akt,增强 HeLa 细胞的放射敏感性。

关键词:萝卜硫素;宫颈癌;细胞凋亡;放射敏感性

中图分类号:R965;R979.1

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)15-0022-05

Effect of Sulforaphane on Apoptosis and Radiosensitivity of HeLa Cells of Cervical Cancer

ZHANG Yafang, ZHAO Xiaohong, WANG Dezhu, ZHANG Huafeng, WANG Xiaohua

(Department of Gynecology and Obstetrics, Hainan Women and Children Medical Center, Haikou, Hainan, China 570206)

Abstract: Objective To investigate the effect of sulforaphane on apoptosis and radiosensitivity of HeLa cells of cervical cancer. **Methods** HeLa cells were cultured *in vitro*. The inhibitory dose of sulforaphane and radiation on HeLa cells was determined by methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) method. The radiosensitization effect of sulforaphane on HeLa cells was observed by clonogenesis experiment. HeLa cells were divided into the control group, combined group, sulforaphane group and radiation group. Cell apoptosis and cell cycle changes were detected. The expression of extracellular signal regulated kinase 1/2(ERK1/2), p-ERK1/2, AKT, p-Akt and Caspase-3 protein in HeLa cells were detected. **Results** With the increase of sulforaphane concentration and radiation dose, the inhibition rate of HeLa cell increased. The half inhibitory concentration(IC_{50}) of sulforaphane on HeLa cells was $(76.28 \pm 9.27) \mu\text{mol/L}$, so $80 \mu\text{mol/L}$ was selected as the intervention concentration. The half inhibitory concentration(IC_{50}) of HeLa cells by radiation was $(2.13 \pm 0.27) \text{Gy}$, so 2Gy was chosen as the semi-intervention dose. With the increase of radiation dose, the cell survival rate of radiation group and combined group was significantly decreased, and the survival rate of HeLa cells in the combined group was lower than that in the radiation group($P < 0.05$). Sulforaphane could improve the radiosensitivity of HeLa cells, and SERD₀ and SERD_q were 1.517 and 2.024 respectively. The proportion of G₀/G₁ phase in HeLa cells did not significantly changed in each group($P > 0.05$). Compared with the control group, the apoptosis rate, G₂/M cell proportion, ERK1/2, p-ERK1/2, Akt, p-Akt and Caspase-3 protein expression in HeLa cell of other groups were significantly increased, the proportion of cells in S phase decreased, and the combined group had the strongest effect, followed by radiation group, and the effect of sulforaphane group was the weakest($P < 0.05$). **Conclusion** Sulforaphane can induce HeLa cells apoptosis through G₂/M phase arrest, and enhance the radiosensitivity of HeLa cells through the activation of ERK and Akt.

Key words: sulforaphane; cervical cancer; apoptosis; radiosensitivity

放射治疗(简称放疗)是治疗中晚期宫颈癌的主要手段,可实现宫颈癌的局部控制。但在宫颈癌的治疗中,耐放射治疗越来越受到重视,因其是放疗临床失败的原因之一^[1]。但这种肿瘤耐辐射的分子机制尚不完全清楚。肿瘤细胞在细胞周期的 G₂/M 期对放射最敏感,在 S 期对放射最耐受^[2]。放疗可激活丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKT),这些通路调节细胞的增殖和凋亡,抑制这些途

径可增强细胞的放射敏感性^[3]。流行病学研究表明,经常食用水果和蔬菜对癌症的发展具有抑制作用^[4]。萝卜硫素广泛存在于西兰花、卷心菜、花椰菜、甘蓝、萝卜、芥菜等十字花科植物中,在体外可抑制包括人结肠癌、白血病和前列腺癌细胞在内的几种癌细胞系的增殖,并增加其凋亡^[5]。萝卜硫素还可诱导 G₂/M 期细胞周期停滞,降低 S 期细胞的百分比,抑制体外癌细胞的组蛋白去乙酰化酶(HDAC)活性,并在体内延迟前列腺癌

(PC-3)异种移植瘤的生长^[6]。此外,萝卜硫素和其他药物联用可进一步抑制细胞生长,从而使药物和放疗剂量降低到比单用时更安全的水平,以确保更低的癌症发生率和不良反应等级^[7]。本研究中观察了萝卜硫素对HeLa细胞凋亡及体外放射的增敏作用,为宫颈癌的临床治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与细胞

仪器:MK3型酶标仪(南京德铁实验设备有限公司);Clinae 23EX型直线加速器(美国Varian公司);Ti-s型倒置显微镜(日本Olympus公司);BD垂直电泳仪,BD/FACSCanto II流式细胞仪,均购自美国BD公司;E-Gel Imager型凝胶成像仪(美国UVP公司)。

试剂:萝卜硫素(纯度大于99%,上海研生生化试剂有限公司);RPMI-1640培养基和胎牛血清(美国HyClone公司);胰酶和青链霉素溶液(美国Corning公司);四氮唑(MTT,美国Amresco公司);细胞凋亡检测试剂盒和细胞周期检测试剂盒(美国BD公司);细胞蛋白抽提试剂盒(碧云天生物技术研究);细胞外信号调节激酶(ERK1/2),磷酸化ERK1/2(p-ERK1/2),Akt,磷酸化Akt(p-Akt),半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3), β -actin抗体,均购自美国Santa Cruz公司;辣根过氧化物酶HRP标记亲和纯化山羊抗小鼠IgG二抗(武汉艾美捷科技有限公司)。

细胞:宫颈癌HeLa细胞(中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库)。

1.2 细胞培养

用含胎牛血清(10%)的RPMI-1640培养液在37℃、5%CO₂条件下培养HeLa细胞,隔日换液,选择对数生长期细胞进行试验。

1.3 MTT法检测萝卜硫素和放射线的生长抑制作用

将HeLa细胞以 5×10^3 个/孔接种于96孔板中(每孔200 μ L),用不同浓度萝卜硫素(0,10,20,40,80,160,320 μ mol/L)或不同剂量放射线(0,1,2,4,6,8 Gy)干预24 h后加入MTT(每孔50 μ L),继续培养4 h,离心,弃上清液,加入二甲亚砜(DMSO),每孔200 μ L,振荡,用酶标仪在450 nm波长处测定吸光度值(OD值),计算细胞抑制率。细胞抑制率 = $\frac{OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{处理组}}}{OD_{\text{对照组}}} \times 100\%$ 。

1.4 克隆形成试验观察萝卜硫素的放射增敏作用

将HeLa细胞分为放射组和联合组。取对数生长期的HeLa细胞以 10^3 个/孔接种于6孔板中(每孔3 mL),待细胞贴壁后,联合组加入含有半数抑制浓度(IC₅₀)的萝卜硫素,放射组不加萝卜硫素,同时用不同剂量放射线(0,1,2,4,6,8 Gy)照射24 h后更换培养液,正常培

养14 d,隔天换液。将细胞用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,用甲醇固定,并用Giemsa溶液染色。由2名研究人员独立在显微镜下手动计数至少包含50个细胞的菌落数。计算细胞克隆形成率(PE)和存活分数(SF), $PE = \frac{\text{菌落形成数}}{\text{接种数}} \times 100\%$, $SF = \frac{PE_{\text{测试组}}}{PE_{\text{对照组}}} \times 100\%$ 。应用GraphPad Prism软件5.01,按照 $SF = 1 - (1 - e^{-D/D_0})N$ 公式生成剂量-生存曲线,并计算放射生物学参数,包括平均致死剂量(D₀)、准致死剂量阈值剂量(D_q),临床实践中每日剂量2 Gy(SF2),外推数(N),D₀时放射增敏比(SER D₀) = $D_{0\text{ 对照组}} / D_{0\text{ 实验组}}$;D_q时放射增敏比(SER D_q) = $D_{q\text{ 对照组}} / D_{q\text{ 实验组}}$ ^[8]。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡和细胞周期

将HeLa细胞分为对照组、联合组、萝卜硫素组和放射组。对照组不进行处理,联合组用含有IC₅₀的萝卜硫素和半数抑制剂量的放射线进行处理,萝卜硫素组用含有IC₅₀的萝卜硫素处理,放射组用半数抑制剂量的放射线进行处理。将HeLa细胞以 5×10^4 个/孔接种于6孔板内(每孔3 mL),待细胞贴壁后,按上述分组分别处理HeLa细胞24 h,弃培养基,消化后转移至离心管内,离心,弃上清液,根据试剂盒说明书,用流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞周期。

1.6 蛋白质印迹(WB)法检测蛋白表达

以 5×10^4 个/孔接种于6孔板内(每孔3 mL),待细胞融合加入,按1.5项下方法分组,分别处理HeLa细胞24 h,收获细胞,根据细胞量加入细胞蛋白抽提液,进行电泳,每孔上样量为20 μ g,将印迹转移到聚偏氟乙烯膜上,然后用5%脱脂牛奶在室温下封膜1 h,将膜与相应抗体进行孵育,4℃过夜,用TBST缓冲液对膜进行2次冲洗,将二抗(1:5 000)在室温下孵育30 min。用ECL法显色,采集图像进行分析。

1.7 统计学处理

采用SPSS 19.0统计学软件分析。试验结果采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,分析前进行正态检验,用单因素方差分析进行判断,组间两两比较用SNK-q检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 萝卜硫素对HeLa细胞抑制作用的影响

随着萝卜硫素浓度的增加,HeLa细胞抑制率增加,与0 μ mol/L比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。萝卜硫素对HeLa细胞的IC₅₀为(76.28 $\pm$ 9.27) μ mol/L,故选80 μ mol/L作为干预浓度。详见图1。

2.2 放射线对HeLa细胞抑制作用的影响

随着放射线剂量的增加,HeLa细胞抑制率增加,与0 Gy比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。放射线对HeLa细胞的半数抑菌剂量为(2.13 $\pm$ 0.27) Gy,故选2 Gy

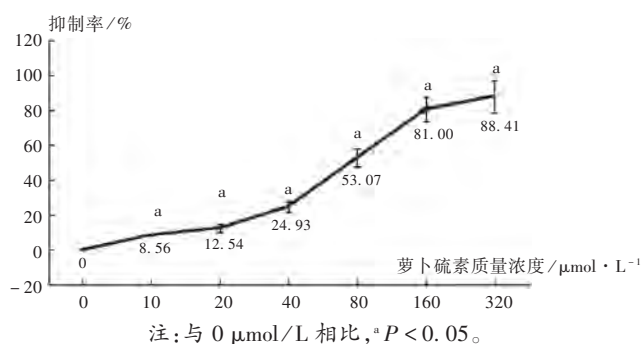


图1 萝卜硫素对HeLa细胞抑制作用的影响

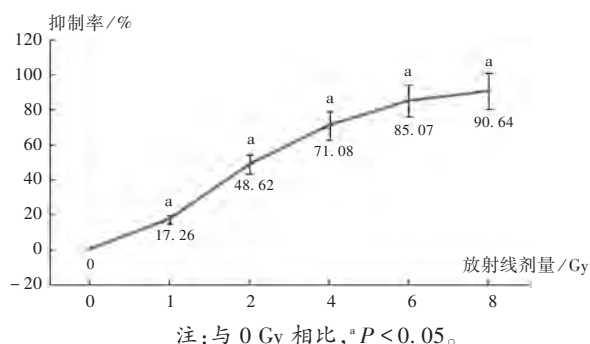


图2 放射线对HeLa细胞抑制作用的影响

作为半干预剂量 ($P < 0.05$)。详见图2。

2.3 萝卜硫素对HeLa细胞放射敏感性的影响

随着放射剂量的增加,放射组和联合组细胞存活率均降低,且联合组各放射剂量的细胞存活率均低于放射组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。萝卜硫素能提高HeLa细胞的放射敏感性, $SER D_0$ 和 $SER D_q$ 分别为1.517和2.024。详见表1和图3。

表1 剂量-生存曲线的放射生物学参数

组别	D_0	D_q	N	SF	$SER D_0$	$SER D_q$
放射组	1.758	2.177	3.542	0.529	-	-
联合组	1.157	0.984	2.348	0.324	1.517	2.024

注: - 为无数据。

2.4 萝卜硫素对HeLa细胞凋亡和细胞周期的影响

各组HeLa细胞 G_0/G_1 期细胞比例变化不显著,差异无统计学意义 ($P > 0.05$);与对照组比较,其余各组HeLa细胞凋亡和 G_2/M 期细胞比例增加,S期细胞比例

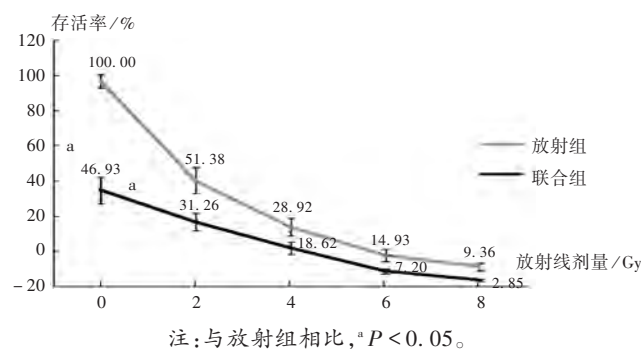


图3 萝卜硫素对HeLa细胞放射敏感性的影响

降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与萝卜硫素组和放射组比较,联合组HeLa细胞凋亡和 G_2/M 期细胞比例增加,S期细胞比例降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),详见表2和图4、图5。

表2 萝卜硫素对HeLa细胞凋亡和细胞周期的影响 ($\bar{X} \pm s, \%$)

组别	细胞凋亡率	G_0/G_1	S	G_2/M
对照组	1.95 ± 0.13	62.51 ± 4.28	25.95 ± 2.06	11.54 ± 2.17
萝卜硫素组	3.12 ± 0.18^a	60.07 ± 4.58	22.29 ± 3.17^a	18.64 ± 0.25^a
放射组	4.35 ± 0.46^{ab}	60.38 ± 7.59	20.14 ± 5.36^{ab}	19.48 ± 3.54^{ab}
联合组	6.35 ± 0.37^{abc}	62.48 ± 6.73	14.50 ± 4.83^{abc}	23.02 ± 4.92^{abc}

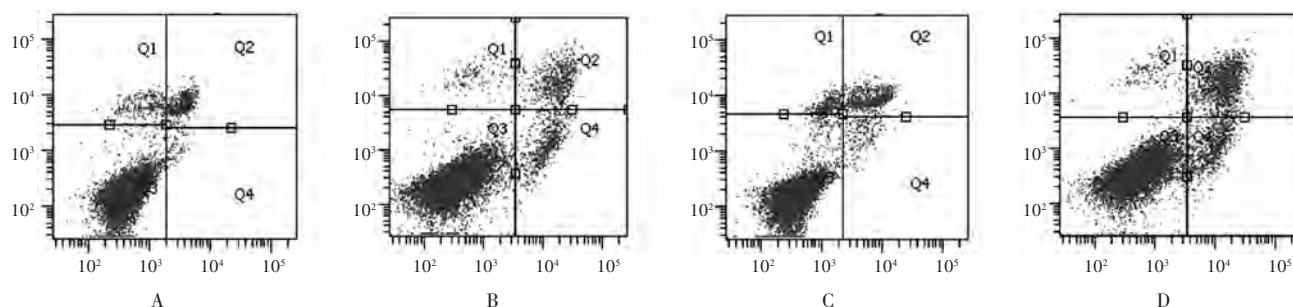
注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与萝卜硫素组比较,^b $P < 0.05$;与放射组比较,^c $P < 0.05$ 。

2.5 萝卜硫素对HeLa细胞中ERK1/2, p-ERK1/2, Akt, p-Akt, Caspase-3蛋白表达的影响

与对照组比较,其余各组HeLa细胞中ERK1/2, p-ERK1/2, Akt, p-Akt, Caspase-3蛋白表达增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与萝卜硫素组和放射组比较,联合组HeLa细胞中ERK1/2, p-ERK1/2, Akt, p-Akt, Caspase-3蛋白表达增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。详见表3。

3 讨论

萝卜硫素最早于1992年在花椰菜芽中被发现,是一种著名的抗癌化学预防剂,可抑制骨肉瘤细胞和其他恶性肿瘤的生长,其肿瘤抑制作用已在临床试验中被评估,包括前列腺癌患者的II期试验^[9]。虽然萝卜硫素的



A. 对照组 B. 萝卜硫素组 C. 放射组 D. 联合组

图4 萝卜硫素对HeLa细胞凋亡的影响

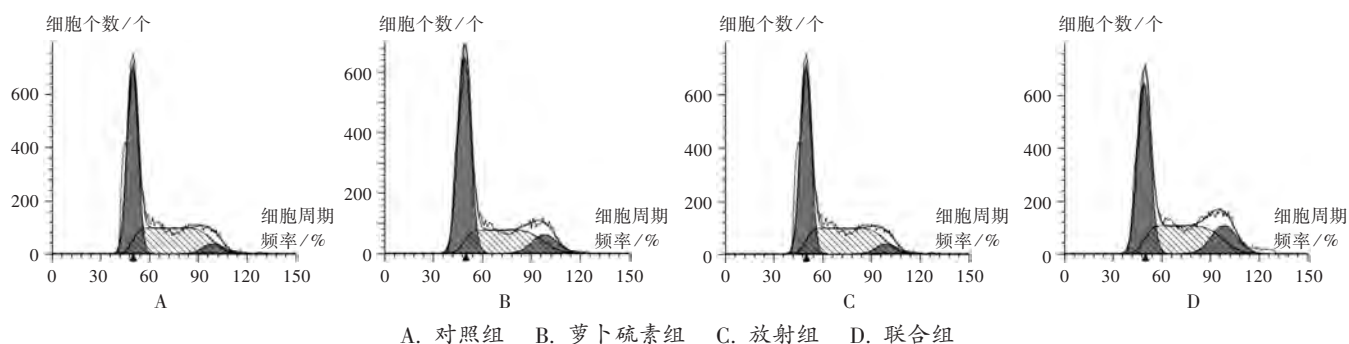


图5 萝卜硫素对 HeLa 细胞周期的影响

表3 萝卜硫素对 HeLa 细胞中 ERK1/2, p-ERK1/2, Akt, p-Akt, Caspase-3 蛋白表达的影响 ($\bar{X} \pm s$)

组别	ERK1/2	p-ERK1/2	Akt	p-Akt	Caspase-3
对照组	0.32 ± 0.04	0.28 ± 0.04	0.75 ± 0.09	0.22 ± 0.03	0.43 ± 0.04
萝卜硫素组	0.76 ± 0.08 ^a	0.62 ± 0.05 ^a	0.81 ± 0.10 ^a	0.28 ± 0.02 ^a	0.52 ± 0.04 ^a
放射组	0.91 ± 0.05 ^{ab}	0.73 ± 0.07 ^{ab}	1.06 ± 0.37 ^{ab}	0.36 ± 0.03 ^{ab}	0.68 ± 0.05 ^{ab}
联合组	1.38 ± 0.27 ^{abc}	1.17 ± 0.20 ^{abc}	1.54 ± 0.43 ^{abc}	0.58 ± 0.09 ^{abc}	0.82 ± 0.09 ^{abc}

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与萝卜硫素组比较,^b $P < 0.05$;与放射组比较,^c $P < 0.05$ 。

抗癌作用已在众多研究中被报道,但其增强癌细胞放射敏感性的作用至今未被研究。同时,相比于其他化学治疗(简称化疗)药物的高毒性和多种不良反应,大鼠口服有效剂量的萝卜硫素后,其最大血药浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$,但人类口服富含萝卜硫素的西兰花芽后,最大血药浓度仅为 2 $\mu\text{mol/L}$ ^[10]。本研究结果显示,萝卜硫素对体外培养的 HeLa 细胞增殖有抑制作用,且呈浓度依赖性。在克隆形成试验中,与未加萝卜硫素处理的细胞相比,萝卜硫素处理细胞的放射敏感性呈剂量依赖性增加,表明萝卜硫素可增强 HeLa 细胞的放射敏感性。

细胞周期阻滞和凋亡被认为是萝卜硫素最重要的作用机制^[11]。研究表明,在细胞周期中, G_2/M 期对放射最敏感^[12]。因此,诱导细胞周期阻滞在 G_2/M 期的药物在体内外都表现出了很强的放射敏感性。萝卜硫素在人骨肉瘤 U2OS 细胞中诱导 G_2/M 阻滞和凋亡^[13],在人骨肉瘤 MG63 细胞中诱导生长阻滞,并以 p53 独立的方式上调 p21WAF1/CIP1 蛋白的表达^[14]。本研究中流式细胞术结果显示,萝卜硫素或(和)萝卜硫素联合放射可抑制 G_2/M 期细胞周期进展,诱导 HeLa 细胞凋亡。但萝卜硫素和放射的确切协同作用机制目前尚不清楚。据报道,激活 ERK1/2 和 Akt 激酶可使 G_2/M 期停止,增加细胞对放射诱导的细胞死亡敏感。但辐射抵抗可能是由于放射抑制 ERK1/2 和 Akt,导致肿瘤细胞动态快速适应,以维持生长和生存能力^[15-16]。因此,ERK1/2 和 Akt 的激活可能增强肿瘤的放射敏感性。萝卜硫素通过引起 G_2/M 期阻滞来抑制 LM8 细胞的生长,表现为促进细胞

Akt 和 ERK1/2 的磷酸化,通过 Caspase-3 的裂解和激活,调节细胞凋亡和细胞增殖^[17]。在胰腺癌细胞中,萝卜硫素通过抑制 PI3K/Akt 和 MEK/ERK 通路诱导细胞凋亡^[18]。本研究结果显示,萝卜硫素增强了放射诱导的 ERK1/2 和 Akt 磷酸化,表明萝卜硫素可增强 HeLa 细胞的放射敏感性。

综上所述,萝卜硫素通过 G_2/M 期阻滞诱导 HeLa 细胞凋亡,并通过 ERK 和 Akt 的激活,增强了 HeLa 细胞的放射敏感性。萝卜硫素联合放射可能有助于增强萝卜硫素的抗肿瘤作用,提示萝卜硫素可能是一种有效的放射增敏剂。

参考文献:

- [1] 龙霞,吴逢波,徐珽,等. 奈达铂联合紫杉醇治疗中晚期宫颈癌的疗效及安全性系统评价[J]. 中国药业,2015,24(7):17-22.
- [2] KHORRAMIZADEH M, SABERI A, TAHMASEBI-BIRGANI M, et al. Impact of Prolonged Fraction Delivery Time Modelling Stereotactic Body Radiation Therapy with High Dose Hypofractionation on the Killing of Cultured ACHN Renal Cell Carcinoma Cell Line[J]. J Biomed Phys Eng, 2017, 7(3):205-216.
- [3] YU CC, HUNG SK, LIN HY, et al. Targeting the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway as an effectively radiosensitizing strategy for treating human oral squamous cell carcinoma in vitro and in vivo[J]. Oncotarget, 2017, 8(40):68641-68653.
- [4] 郭甜甜,刘聪敏,高肇好,等. 蔬菜水果中植物化学物质防治肺癌作用及机制研究现状[J]. 中国肺癌杂志,2017,20(12):841-846.
- [5] BESSLER H, DJALDETTI M. Broccoli and human health: immunomodulatory effect of sulforaphane in a model of colon cancer[J]. Int J Food Sci Nutr, 2018, 69(1):946-953.
- [6] ARCIDIACONO P, RAGONESE F, STABILE A, et al. Antitumor activity and expression profiles of genes induced by sulforaphane in human melanoma cells[J]. Eur J Nutr, 2017, 57(36):2547-2569.
- [7] FISHER ML, CIAVATTONE N, GRUN D, et al. Sulforaphane reduces YAP/ $\Delta\text{Np}63\alpha$ signaling to reduce cancer stem cell survival and tumor formation[J]. Oncotarget, 2017, 8(43):73407-73418.
- [8] LUO J, YUAN Y, CHANG P, et al. Combination of aloe-emodin with radiation enhances radiation effects and improves differen-