DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2018.02.002

醋酸棉酚诱导三株宫颈癌细胞 DNA 双链断裂研究

何人可， 汤小玲， 冉晨曦， 钟建斌， 马 影， 聂 聪， 赵 晋， 郭 忠*

（西北民族大学 医学院，甘肃 兰州 730030）

摘要：本文作者研究醋酸棉酚（gossypol acetic acid，GAA）对 3 株宫颈癌细胞 Hela、Siha、C-33A 的 DNA 双链断裂（double-strand break，DSB）机制。MTT 法检测 GAA 对 3 株宫颈癌细胞的体外增殖的影响；单细胞凝胶电泳实验检测 GAA 对 3 株宫颈癌细胞造成的 DNA 双链断裂；免疫组织化学法检测 GAA 诱导 3 株宫颈癌细胞产生的磷酸化组蛋白 γH2AX 焦点。GAA（0~160 μmol/L）以时间和浓度依赖方式抑制 3 株宫颈癌细胞的生长。2.5~40 μmol/L 的 GAA 作用 24 h，或 20 μmol/L 的 GAA 作用 3~48 h，CASP 软件分析显示，彗星细胞的头部 DNA 百分含量减少，尾长、彗星长度、尾部 DNA 百分含量、尾矩和 Olive 尾矩增加；而免疫组织化学染色结果显示，γH2AX 阳性细胞率呈浓度、时间依赖性增加。3 株细胞对 GAA 的敏感性呈现一定差异性。GAA 抗肿瘤的作用机制为诱导细胞 DSB，其中 GAA 诱导 C-33A 的 DSB 作用最强，Siha 次之，Hela 最弱。

关键词：醋酸棉酚；宫颈癌；DNA 双链损伤；γH2AX

中图分类号：R737　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1673—1689(2018)02—0120—11

Research of Gossypol Acetic Acid Inducing DNA Double-Strand Breaks in Three Cervical Cancer Cell Lines

HE Renke， *TANG Xiaoling*， *RAN Chenxi*， *ZHONG Jianbin*，
MA Ying， *NIE Cong*， *ZHAO Jin*， *GUO Zhong**

（Medical College of Northwest Minzu University，Northwest Minzu University，Lanzhou 730030，China）

Abstract：To explore the anti-tumor effect of three cervical cancer cell lines Hela，Siha and C-33A induced by gossypol acetic acid （GAA） respectively and the mechanism. The inhibitory effect of GAA on the growth of three cervical cancer cell lines was detected by MTT assay.The DNA damage of three cervical cancer cell lines caused by GAA was detected by single cell gel electrophoresis. The expression of phosphorylated histone protein （γH2AX） in three cervical cancer cell lines produced by GAA was detected by immunohistochemistry. Results：GAA （0~160 μmol/L） inhibited the growth of three cervical cancer cell lines in a dose-time dependence. The inhibition rate increased with the increase of concentration and time. 2.5~40 μmol/L of the GAA for 24 h，or 20 μmol/L GAA

收稿日期：2015-12-12

基金项目：国家自然科学基金项目（81560508，81260442，31560254）；西北民族大学 2014 年国家级大学生创新创业训练计划项目（201410742057）；西北民族大学 2015 年本科生科研创新项目（URIP15237）；西北民族大学 2016 年国家级大学生创新创业训练计划项目（201610742002）。

* **通信作者**：郭　忠（1968—），男，甘肃兰州人，医学硕士，教授，硕士研究生导师，主要从事肿瘤药理学研究。E-mail：251610780@qq.com

引用本文：何人可，汤小玲，冉晨曦，等. 醋酸棉酚诱导三株宫颈癌细胞 DNA 双链断裂研究[J]. 食品与生物技术学报，2018，37(2)：120-130.

role 3~48 h, The result of single cell gel electrophoresis display that cell comet head DNA percentage was reduced, but tail length, comet length, tail DNA percentage, tail moment and olive tail moment was increased; and immunohistochemistry results showed that, the γH2AX positive rate increased in a concentration-time dependence. The mechanism of antitumor by GAA is to inhibit the proliferation of three cervical cancer cell lines, induce DNA double strand breaks, and lead to cell death. And the sensitivity of C-33A was the highest, the Hela was the second, and Siha was the most insensitive.

Keywords: gossypol acetate, cervical cancer, DNA damage, γH2AX

棉酚(gossypol)是一种天然黄色多酚羟基双萘醛类化合物，主要存在于锦葵科植物棉花的根、茎和种子中。目前棉酚制剂主要有 3 种：醋酸棉酚、精制棉酚及甲酸棉酚[1]。棉酚最初作为男性避孕药广泛运用于临床。而近年来研究表明，醋酸棉酚(gossypol acetic acid, GAA)具有很显著的抗肿瘤活性，对多种肿瘤细胞系如宫颈癌、结肠癌、淋巴癌等产生抑制肿瘤细胞增殖并引起 DNA 损伤。抗肿瘤药物可以引起 DNA 损伤，其中，DNA 双链断裂(double strand break, DSB)是最严重的，常常导致染色体畸变和细胞死亡[2]。本课题组的前期研究成果也证实了醋酸棉酚能够诱导人粘液表皮样癌 MEC-1 细胞 DNA 双链断裂[8]。

宫颈癌是女性常见的恶性肿瘤，据 2012 年报道，全球女性有宫颈癌 52.8 万病例，26.6 万例死亡。尤其是发展中国家，宫颈癌发病率呈上升和年轻化趋势，占全球宫颈癌发病的 80%，严重威胁着广大育龄妇女的健康和生命。人乳头瘤病毒(HPV)是宫颈上皮内瘤变(CIN)和宫颈癌的病原体，是最常见的性传播全球病毒感染[3-4]。

本研究中根据细胞种类和感染 HPV(人乳头瘤病毒)16 和 HPV18 的情况，分为宫颈腺癌 Hela ($HPV16^-/HPV18^+$)、宫颈鳞癌 Siha ($HPV16^+/HPV18^-$) 和 C-33A ($HPV16^-/HPV18^-$)[5]。本实验将不同浓度的 GAA 作用于这 3 株宫颈癌细胞，初步探讨其杀伤肿瘤细胞的 DNA 双链损伤机制，为 GAA 临床用于化学治疗宫颈癌提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

宫颈癌细胞系 Hela、Siha、C-33A，购自中国科学院上海生科院细胞资源中心。GAA，陕西宏达植物化工有限公司产品；DMEM，美国 Gibco 公司产品；胎牛血清，兰州民海生物工程有限公司产品；MTT，美国 Sigma 公司产品；二甲基亚砜(DMSO)，天津市德恩化学试剂有限公司产品；DAPI，美国 Molecular probes 公司产品；PI，美国 lsbio 公司产品；鼠抗γH2AX 单克隆抗体，美国 Upstate Technology 公司产品；FITC 标记山羊抗小鼠 IgG，北京中山金桥生物技术有限公司产品，其余试剂均为国产分析纯。Olympus AX70 荧光显微镜，日本 Olympus 公司产品；酶联免疫分析仪，美国 Bio-Rad 公司产品；DYY-6C 型电泳仪，北京市六一仪器厂制造。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及药物配制 Hela、Siha、C-33A 细胞在体积分数 5% CO_2、37 ℃的孵育箱中贴壁培养。培养基为含有体积分数 10%灭活胎牛血清、抗生素(100 μg/L 青霉素和 100 μg/L 链霉素)的 DMEM。每 3~4 天传代一次，取对数生长期细胞用于实验。观察终浓度为 2.5、5、10、20、40、80、160 μmo1/L 的 GAA 对宫颈癌细胞 Hela、Siha、C-33A 的作用。以未加药物组(control)作为对照。

1.2.2 MTT 细胞活性测定 细胞培养同 1.2.1 方法，调整细胞浓度为 2×10^8 个/L，接种至 6 孔板中，每孔 2 mL，置 37 ℃孵箱孵育。培养 24 h 后，吸弃上清液，加入含 GAA(20 μmol/L)的新培养基，37 ℃、体积分数 5% CO_2 继续培养，在不同时间点取出。在倒置显微镜下观察细胞形态。

取对数生长期的 Hela、Siha、C-33A 细胞，将细胞制成单细胞悬液后，调节细胞浓度至 7×10^7 个/L，按每孔 100 μL 接种到 96 孔板，每组设 6 个复孔。间隔 8~12 h 后，吸弃培养液，用含 2.5~160 μmol/L GAA 的新培养液处理细胞，同时设立空白对照和 DMSO 溶剂对照，37 ℃、体积分数 5% CO_2 继续培养 24、48 h 和 72 h 后，每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 μL，37 ℃继续孵育 4 h，终止培养。小心吸弃孔

内培养上清液，每孔加入 150 μL DMSO，振荡 10 min,使结晶物充分溶解。酶标仪上测定各孔 490 nm 的吸光度值(A_{490})。本实验重复 3 次。按下式计算出

细胞生长抑制率(%)=(1−M_1/M_0)×100%　　(1)

式(1)中,M_0 为对照组吸光值平均值;M_1 为实验组吸光值平均值。

以 Excel Forcast 函数计算半数抑制浓度(IC_{50}值)。

1.2.3　中性单细胞凝胶电泳实验　收集不同浓度 GAA 处理 24 h 以及用 20 μmo1/LGAA 处理不同时间的 Hela、Siha、C-33A 细胞进行中性单细胞凝胶电泳。

细胞计数:制成单细胞悬液,调整细胞浓度为 4×10^7 个/L。

制片：将 50 μL 1 g/dL 的低熔点琼脂糖凝胶(Agarose type Ⅶ)均匀铺开于毛玻片上，室温下放置备用。将 400 μL 的细胞和 1.2 mL 1 g/dL 低熔点琼脂糖凝胶 40 ℃下预热，混匀后迅速铺到第一层凝胶上(约 1.4 mL),冰上固化 3 min。

裂解:将载玻片浸没于新配制的预冷裂解液中(含 0.4~0.5 mg/mL 蛋白酶 K，使用前加入),4 ℃裂解 l h,小心移入 37 ℃孵箱孵育 18~20 h。

解旋:TBE 漂洗载玻片 3 次,每次 30 min。将载玻片静置于电泳槽中 30 min。注意液面高于载玻片 2 mm,避光。

电泳：调整缓冲液液面高度，使电压为 16~18 V,电流约 7 mA,电泳 25 min。

染色：体积分数 1% H_2O_2 固定玻片 10 min,双蒸水充分洗涤。PI(终质量浓度为 5 μg/mL)染色 30 min，置于密闭湿盒中,4 ℃保存。(在 24 h 内观察,以防止荧光淬灭)

观察:在荧光显微镜(10×40 倍)紫外光(UV)的激发下,DNA 图像呈橘红色。每个载玻片拍摄至少 50 个细胞,每个药物剂量 3 张片子。本实验重复 3 次。图片用 CASP 软件分析。计算尾长(Tail length)、头部 DNA 百分含量(Head DNA%),尾部 DNA 百分含量(Tail DNA)、尾矩(TM)和 Olive 尾矩(OTM)等指标。TM 定义为：迁移的平均距离与彗尾部 DNA 的分数的乘积。OTM 计算方法:尾部光密度重心与头光密度重心之间的距离×尾部 DNA 百分含量[6]。

1.2.4　免疫荧光染色

1）细胞培养及处理:Hela、Siha、C-33A 细胞培养同 1.2.1 方法,调整细胞浓度为 2×10^8 个/L,各取 35 mm×10 mm 培养皿 6 个，取 100 μL 细胞悬液接种至已放有盖玻片上的（盖玻片硫酸浸泡过夜,清洁后用体积分数 95%乙醇浸泡后过火,预先放入培养皿中),置 37 ℃孵箱孵育 2 h。每个皿加入 DMEM 培养基 2 mL，培养 24 h 后，吸去上清液，加入含 GAA(20 μmol/L)的新培养基,继续培养。37 ℃、体积分数 5% CO_2 继续培养，在不同时间点取出。另外，用不同浓度 GAA 处理 Hela、Siha、C-33A 细胞 24 h 后取出。

2)免疫荧光染色检测 γH2AX 焦点:免疫荧光检测参照 Macphail 等[7]的方法,并稍作改动[8]。被处理的细胞到达时间点后,预冷的 TBS 洗涤 2 次;

固定:4 g/dL 多聚甲醛固定 20 min;TBS 洗涤,5 min×3 次;

破膜：体积分数 0.2% Triton-X 100 破膜,15 min;TBS 洗涤,5 min×3 次;

封闭:TTN 浸泡 10 min;PBS 洗涤,5 min×3 次;

孵一抗:TTN 稀释鼠 γH2AX 单克隆一抗,体积比为 1:500，孵育过夜,TBS 洗涤,1 min×2 次;TTN 洗涤 1 min;

孵二抗:TTN 稀释山羊抗鼠 FITC-IgG，体积比为 1:200,孵育 1 h,TBS 洗涤,5 min×3 次,避光;

染核:DAPI 终质量浓度为 0.05 μg/mL,5 min,TBS 洗涤,5 min×3 次,注意避光;

封片：水性封片液封片,Olympus IX51 荧光显微镜下观察;

γH2AX 焦点定量按 Daniel 等的方法[9],用Image Pro Plus 软件进行,γH2AX 焦点定量计数,γH2AX 焦点>5 为阳性细胞。每张片子至少统计 800 个细胞。

数据统计：数据进行 Fish student t 检验。t 检验,p<0.05,差异具有显著性。

1.2.5　统计分析方法　实验数据用 mean±SEM 表示,采用 SPSS 19.0 分析数据,单因素方差分析检验多组平均数之间的差别,P<0.05 时认为差别具有统计学意义。

2 实验结果

2.1　GAA 对 C-33A、Siha、Hela 细胞增殖的影响

通过体外 GAA 药敏试验对肿瘤细胞进行加药培养，然后观察细胞形态的变化并用 MTT 法检测 GAA 对 3 种细胞的增殖抑制作用,并用抑制率(%)

和 IC_{50} 来表示。IC_{50} 是衡量细胞化疗敏感性的指标之一。它是指细胞存活率为 50%时的药物浓度，IC_{50} 越大，化疗敏感性越低。2.5~160 μmol/L 的浓度范围内 GAA 对 Hela、Siha、C-33A 细胞的生长呈明显的抑制作用，呈时间-浓度依赖性。GAA 对 Hela、Siha、C-33A 细胞作用 24 h 的 IC_{50} 分别为 60.64、48.37、43.27 μmol/L，48 h 的 IC_{50} 分别为 49.59、39.61、37.25 μmol/L，72 h 的 IC_{50} 分别为 43.29、37.40、32.68 μmol/L。实验结果发现，GAA 能够明显抑制 3 种细胞的生长，IC_{50} 大小为 C-33A<Siha<Hela，故敏感性为 C-33A 比 Siha 强，Hela 最弱（表 1，表 2，表 3，图 1）。

表 1　GAA 对 C-33A 细胞增殖的抑制作用

Table 1　Inhibitory effect of GAA on the growth of C-33A cells

GAA/(μmol/L)	24 h		48 h		72 h	
	OD	抑制率/%	OD	抑制率/%	OD	抑制率/%
0(con)	0.583±0.165	0	0.752±0.123	0	1.172±0.006	0
2.5	0.481±0.086	12.77±9.27	0.615±0.046	17.00±7.46	0.903±0.057*	22.95±4.44
5	0.437±0.062	21.74±11.64	0.543±0.005	25.92±11.45	0.793±0.099*	32.36±8.08
10	0.406±0.051	26.95±11.88	0.466±0.029	35.64±14.34	0.636±0.128*	45.81±10.81
20	0.293±0.024	46.58±10.93	0.249±0.025*	65.41±8.97	0.341±0.066**	70.89±5.44
40	0.107±0.007*	80.59±4.03	0.130±0.004*	82.23±3.37	0.172±0.018***	84.37±0.41
80	0.081±0.021*	86.03±0.38	0.069±0.002*	90.53±1.82	0.072±0.002***	93.89±0.17
160	0.074±0.024*	87.52±0.53	0.062±0.004*	91.49±1.98	0.065±0.001***	94.47±0.06

注：均数±标准误，n=6。与正常对照组相比，*：P<0.05，**：P<0.01，***：P<0.001。同一行的数值根据 LSD 多重比较，后面跟着不同的上标字母则表示具有显著性差异（P<0.05）。

表 2　GAA 对 Siha 细胞增殖的抑制作用

Table 2　Inhibitory effect of GAA on the growth of Siha cells

GAA/(μmol/L)	24 h		48 h		72 h	
	OD	抑制率/%	OD	抑制率/%	OD	抑制率/%
0(con)	0.627±0.133	0	0.731±0.035	0	1.058±0.077	0
2.5	0.524±0.093*	16.20±2.13	0.592±0.009**	18.97±1.83	0.796±0.013**	24.63±2.99
5	0.509±0.009*	18.59±2.08	0.555±0.012**	24.01±1.35	0.749±0.112**	29.40±3.86
10	0.466±0.050*	24.82±5.69	0.504±0.013**	30.96±3.62	0.619±0.071***	41.58±1.74
20	0.397±0.105**	37.03±2.37	0.338±0.025***	53.76±0.91	0.211±0.018***	80.11±0.16
40	0.161±0.016**	74.01±2.15	0.074±0.005***	89.80±0.85	0.100±0.020***	90.63±0.88
80	0.078±0.022**	87.61±0.57	0.065±0.005***	91.05±0.17	0.083±0.018***	92.16±0.79
160	0.072±0.019**	88.52±0.42	0.062±0.004***	91.52±0.13	0.067±0.015***	93.69±0.70

注：均数±标准误，n=6。与正常对照组相比，*：P<0.05，**：P<0.01，***：P<0.001。同一行的数值根据 LSD 多重比较，后面跟着不同的上标字母则表示具有显著性差异（P<0.05）。

表 3　GAA 对 Hela 细胞增殖的抑制作用

Table 3　Inhibitory effect of GAA on the growth of Hela cells

GAA/(μmol/L)	24 h		48 h		72 h	
	OD	抑制率/%	OD	抑制率/%	OD	抑制率/%
0(con)	0.419±0.108	0	0.542±0.008	0	0.743±0.001	0
2.5	0.402±0.110**	4.15±1.12	0.495±0.018**	8.60±1.47	0.658±0.008***	11.51±0.86
5	0.386±0.104**	8.02±0.75	0.475±0.018**	12.39±1.42	0.634±0.001**	14.69±0.04
10	0.365±0.103**	13.17±1.45	0.434±0.030***	19.98±3.16	0.555±0.020**	25.30±1.98
20	0.331±0.090**	21.17±0.77	0.357±0.034**	34.11±3.76	0.381±0.053**	48.80±5.11
40	0.157±0.046**	62.78±0.96	0.118±0.013***	78.32±1.54	0.085±0.019***	88.61±1.78
80	0.078±0.027**	81.58±1.18	0.057±0.000***	89.48±0.10	0.062±0.008***	91.72±0.75
160	0.056±0.025**	87.07±1.82	0.043±0.002***	92.16±0.20	0.045±0.006***	93.99±0.64

注：均数±标准误，n=6。与正常对照组相比，*：P<0.05，**：P<0.01，***：P<0.001。同一行的数值根据 LSD 多重比较，后面跟着不同的上标字母则表示具有显著性差异（P<0.05）。

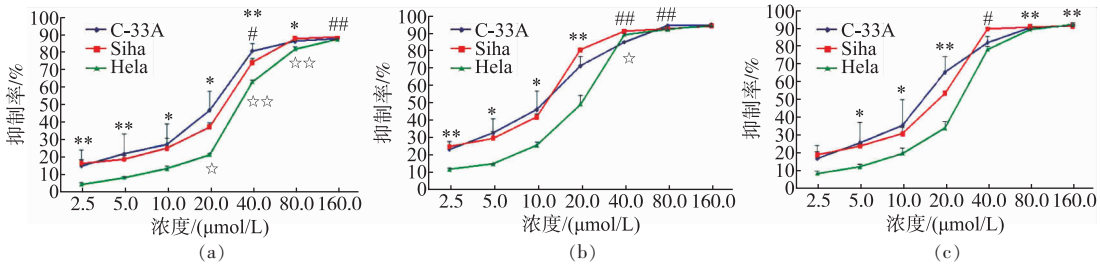


图 1　GAA 对 C-33A、Siha、Hela 细胞增殖抑制作用的差异性比较

Fig. 1　Difference comparison of inhibitory proliferation effect of GAA on C-33A、Siha and Hela cells

基于 3 株细胞 IC_{50} 的数值,确定最佳药物干预浓度为 20 μmol/L。选取 20 μmol/L GAA 处理后不同时间,观察细胞形态变化的时间依赖性。随着药物作用时间延长，越来越多的细胞皱缩、变圆、脱落。至 48 h,细胞体积变小,大面积脱落,见图 2。

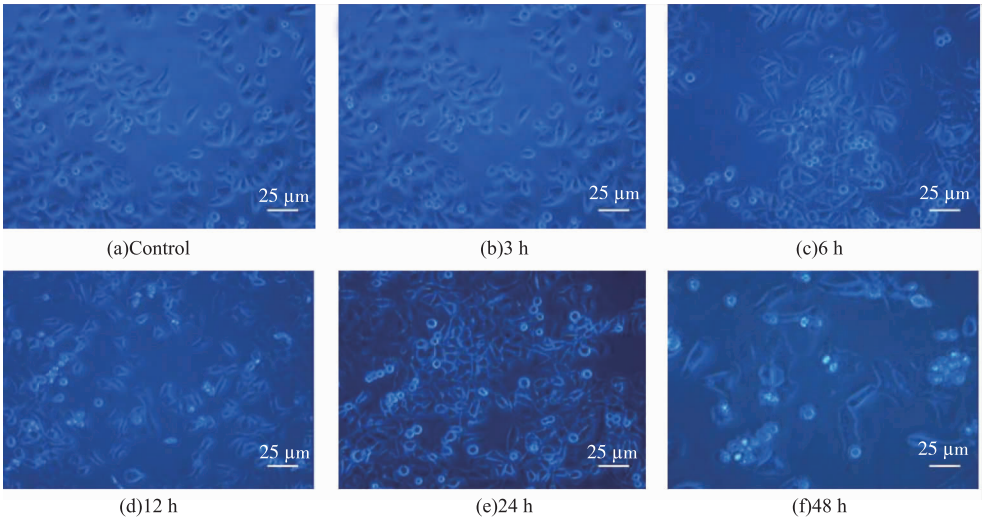


图 2　20 μmol/L GAA 作用 Hela 细胞不同时间点形态学变化

Fig. 2　Effect of 20 μmol/L GAA on cellular morphology of Hela cells at different time

2.2　中性单细胞凝胶电泳检测 DSB

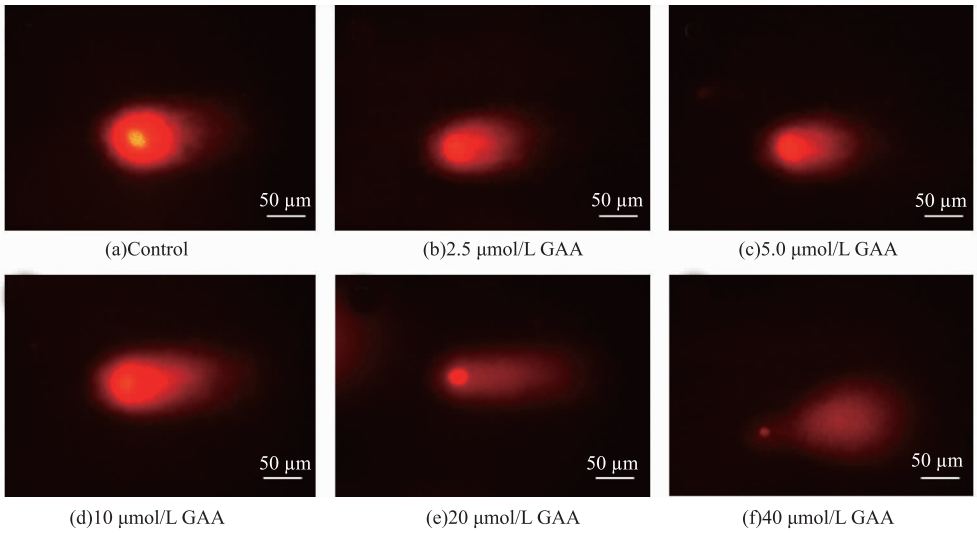
随着 GAA 浓度的增加（作用 24 h),Hela 细胞头部 DNA 百分含量（Head DNA%）降低，而尾长(Tail length)逐渐变长。2.5~40 μmol/L 的 GAA 作用细胞24 h，或 20 μmol/LGAA 分别作用 0~48 h，Hela、Siha、C-33A 彗星细胞的头部 DNA 百分含量(Head DNA%)减少,尾长(Tail length)、彗星长度(LComet)、尾部 DNA 百分含量(Tail DNA%)、尾矩(TM)和 Olive 尾矩(OTM)增加,说明 GAA 对细胞 DNA 双链损伤程度呈浓度时间-依赖性（图 3,表 4—表 9)。其中,GAA 对 C-33A 产生的 DSB 损伤最为严重,Siha 次之,Hela 最弱,但均明显(图 4)。

2.3　GAA 诱导 Hela、Siha、C-33A 细胞 γH2AX焦点的形成

观察免疫组织化学法结果,20 μmol/L 的 GAA 作用 3 h,细胞内即出现大量的绿色荧光焦点,且随着时间延长,焦点数越多,亮度也增强,48 h 时达峰值(图 5)。0~40 μmol/L 的 GAA 诱导 Hela、Siha、C-33A 内 H2AX 发生磷酸化,形成焦点,且呈剂量-效应关系(P<0.05)。我们发现,在同一浓度、同一时间下,C-33A 产生的焦点最多,而 Hela 是最少的(图 6—图 8,P<0.05)。

3　讨　论

宫颈癌是唯一病因明确、可以早期进行预防的癌症,但宫颈癌迄今仍是严重威胁妇女健康的常见恶性肿瘤之一,全球范围内其发病率居恶性肿瘤的发病率第三位,仅次于大肠癌和乳腺癌,其死亡率位居恶性肿瘤死亡率的第四位，仅次于大肠癌、肺癌和乳腺癌[9]。我国宫颈癌导致的患者死亡率从 25



(a)Control (b)2.5 μmol/L GAA (c)5.0 μmol/L GAA

(d)10 μmol/L GAA (e)20 μmol/L GAA (f)40 μmol/L GAA

图 3　GAA 处理 Hela 细胞 24 h 的中性彗星图像

Fig. 3　Representative images from the neutral comet assay showing the effects of different concentrations of GAA on Hela cells at 24 h

表 4　GAA 诱导 C–33A 细胞 DNA 断裂的浓度效应（24 h）

Table 4　GAA induces DSB in C–33A cells in a dose–dependent manner（24 h）

	GAA/(μmol/L)	尾长/μm	彗星长度/μm	头部 DNA/%	尾部 DNA/%	尾矩（TM）	尾矩（OTM）
C–33A	0	74.75±20.54	205.00±48.345	85.56±22.21	21.13±5.91	18.55±6.08	18.19±5.53
	2.5	76.70±15.98	213.74±40.37**	83.69±25.91***	24.78±6.37**	21.36±5.69***	21.85±5.43***
	5	78.98±18.94*	217.52±35.03**	80.69±24.52**	25.60±6.16**	22.14±8.52***	23.48±6.41***
	10	81.78±25.59*	223.02±21.58**	79.65±39.09**	31.51±7.86**	25.79±5.69**	29.31±8.44***
	20	93.24±27.59**	227.72±47.23**	76.37±17.74**	41.92±16.17***	38.10±12.17***	38.50±8.67***
	40	120.18±32.95**	238.10±43.48**	72.44±23.52**	49.92±13.84***	51.41±15.02***	50.64±11.49***

注：均数±标准误，n=6。与正常对照组相比，*：P<0.05，**：P<0.01，***：P<0.001。

表 5　GAA 诱导 Siha 细胞 DNA 断裂的浓度效应（24 h）

Table 5　GAA induced Siha cells DSB in a dose–dependent manner（24 h）

	GAA/(μmol/L)	尾长/μm	彗星长度/μm	头部 DNA/%	尾部 DNA/%	尾矩（TM）	尾矩（OTM）
Siha	0	66.80±17.21	195.03±49.53	84.24±22.13	18.43±5.41	14.44±8.14	14.66±9.57
	2.5	69.20± 24.05	197.62±51.48**	83.65±30.85**	20.27±5.62**	16.53±6.23***	16.17±5.88***
	5	71.90±23.12**	202.92±42.08**	81.83±24.31**	23.31±8.45**	18.52±5.79***	18.44±8.61***
	10	77.68±18.21**	207.82±43.08**	75.48±25.55**	27.37±5.52**	21.76±8.99***	20.71±9.08***
	20	83.23±36.36**	215.26±24.90*	70.64±21.62**	30.15±9.14**	25.42±8.30***	23.72±8.95***
	40	92.97±30.39***	226.54±47.37***	62.09±24.05***	35.33±10.19***	36.36±12.28***	30.33±8.70***

注：均数±标准误，n=6。与正常对照组相比，*：P<0.05，**：P<0.01，***：P<0.001。

表 6　GAA 诱导 Hela 细胞 DNA 断裂的浓度效应(24 h)

Table 6　GAA induced Hela cells DSB in a dose-dependent manner(24 h)

	GAA/(μmol/L)	尾长/μm	彗星长度/μm	头部 DNA/%	尾部 DNA/%	尾矩(TM)	尾矩(OTM)
Hela	0	72.45±16.53	204.02±29.67	86.80±17.22	18.46±7.41	17.68±4.35	16.35±10.93
	2.5	73.58±18.34	208.38±16.18	84.33±53.94*	23.28±9.14*	20.90±6.97**	18.90±6.85**
	5	75.86±25.22*	211.76±49.93**	83.16±35.64**	26.72±20.91**	21.86±8.19**	21.64±5.62**
	10	79.74±20.95**	217.51±34.18**	80.74±20.09**	30.43±9.06***	23.36±5.97**	25.73±5.48***
	20	86.52±39.43**	225.42±46.41**	75.24±23.92**	35.63±17.01***	28.42±6.04***	35.21±9.67***
	40	113.38±27.84***	236.81±30.62***	69.53±27.55***	41.18±13.19***	45.08±12.07***	42.42±8.86***

注:均数±标准误,n=6。与正常对照组相比,*:P<0.05,**:P<0.01,***:P<0.001。

表 7　GAA 诱导 C-33A 细胞 DNA 断裂的时间效应(20 μmol/L)

Table 7　GAA induced C-33A cells DSB in a time-dependent manner(20 μmol/L)

	GAA/(μmol/L)	尾长/μm	彗星长度/μm	头部 DNA/%	尾部 DNA/%	尾矩(TM)	尾矩(OTM)
C-33A	0	73.99±30.73	204.74±40.47	85.61±13.47	20.81±8.08	16.87±5.95	17.66±5.63
	3	69.01±17.35	210.28±19.84	84.01±23.12	23.35±9.60*	20.10±7.44*	19.27±8.67*
	6	74.17±29.23	212.74±24.82*	82.64±11.59*	27.17±6.14**	22.69±10.39**	22.41±12.83**
	12	83.50±21.10*	220.29±39.54*	79.68±22.39*	35.75±17.32**	27.76±8.87**	28.45±8.16***
	24	93.30±19.84*	225.59±36.39*	78.06±19.82*	41.99±11.27**	38.16±12.83***	35.75±13.82***
	48	118.13±24.82*	238.74±22.82*	64.70±33.72*	53.83±13.71***	47.00±9.92***	40.20±14.16***

注:均数±标准误,n=6。与正常对照组相比,*:P<0.05,**:P<0.01,***:P<0.001。

表 8　GAA 诱导 Siha 细胞 DNA 断裂的时间效应(20 μmol/L)

Table 8　GAA induced Siha cells DSB in a time-dependent manner(20 μmol/L)

	GAA/(μmol/L)	尾长/μm	彗星长度/μm	头部 DNA/%	尾部 DNA/%	尾矩(TM)	尾矩(OTM)
Siha	0	66.44±35.15	194.47±43.37	89.23±23.79	12.86±9.64	14.81±7.23	14.45±8.97
	3	72.95±26.18*	198.39±50.79*	85.75±19.62*	16.86±10.67*	17.11±5.74*	16.46±9.96**
	6	75.32±31.79*	203.28±28.68*	83.63±23.09*	18.83±5.97*	18.87±6.63*	18.86±8.97***
	12	81.09±26.51*	211.31±35.57**	80.35±16.21**	26.24±6.72**	21.59±13.16**	23.15±9.28***
	24	83.48±47.13**	217.94±29.43**	75.16±22.16**	30.25±11.18**	26.18±10.75***	23.32±13.96***
	48	112.46±22.71**	233.78±48.41**	65.76±13.46**	43.70±6.34**	33.18±9.96**	35.85±12.59***

注:均数±标准误,n=6。与正常对照组相比,*:P<0.05,**:P<0.01,***:P<0.001。

表 9　GAA 诱导 Hela 细胞 DNA 断裂的时间效应(20 μmol/L)

Table 9　GAA induced Hela cells DSB in a time-dependent manner(20 μmol/L)

	GAA/(μmol/L)	尾长/μm	彗星长度/μm	头部 DNA/%	尾部 DNA/%	尾矩(TM)	尾矩(OTM)
Hela	0	72.01±17.82	204.50±28.70	88.22±21.43	16.86±5.72	17.96±6.18	14.41±9.17
	3	74.20±24.51	210.93±37.30*	85.12±34.16*	19.54±6.45*	20.25±5.99**	18.88±5.92***
	6	76.87±19.07*	213.26±41.28*	82.79±24.19**	21.11±9.785**	22.51±9.18**	20.76±10.16***
	12	84.36±23.31**	220.55±65.48**	78.75±17.75**	26.83±6.132**	26.09±5.830**	24.78±13.62***
	24	85.72±40.39**	225.39±24.31**	74.46±20.01**	33.55±7.83**	28.86±8.41**	35.50±7.78***
	48	118.39±34.51**	239.11±26.15**	65.30±17.66**	43.00±12.21***	45.96±12.66***	45.19±11.21***

注:均数±标准误,n=6。与正常对照组相比,*:P<0.05,**:P<0.01,***:P<0.001。

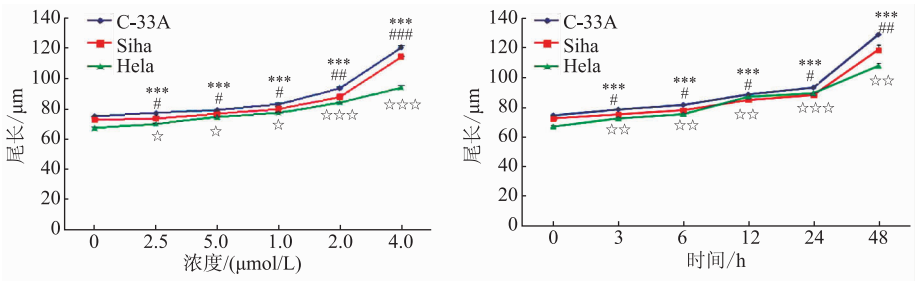
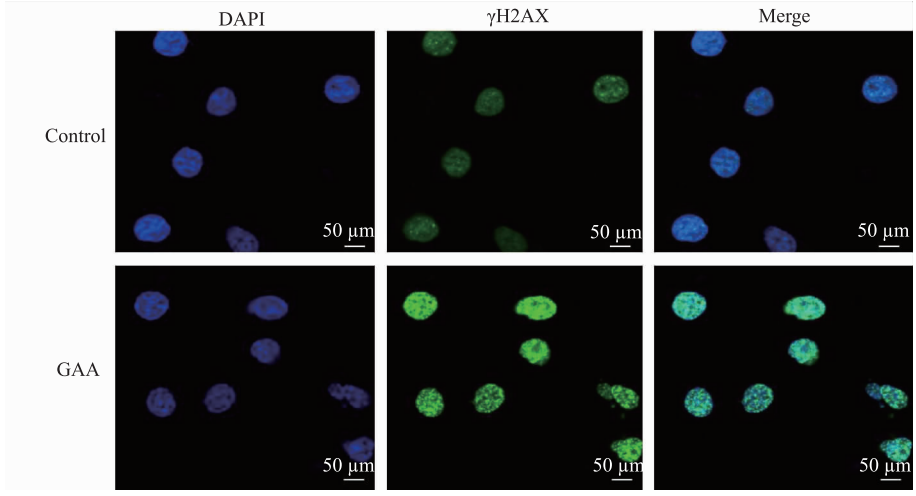


图 4　GAA 诱导 C−33A、Siha、Hela 细胞 DNA 断裂的浓度、时间效应的差异性比较（以 Tail length 为例）

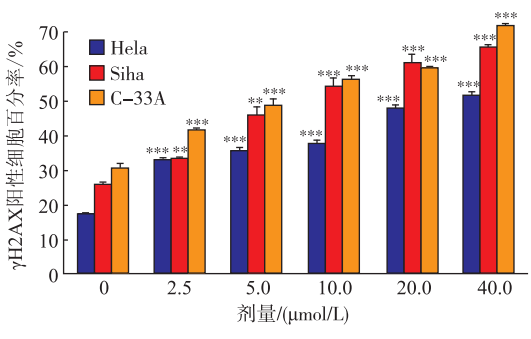
Fig. 4　DNA damage difference comparison of dose and time effect of GAA on C−33A、Siha and Hela cells （Taking Tail length as an example）



注：蓝色信号代表细胞核，绿色信号代表 γH2AX，叠加之后的图像如上图所示

图 5　20 μmol/L GAA 处理不同时间诱导 Hela 细胞 γH2AX 焦点形成

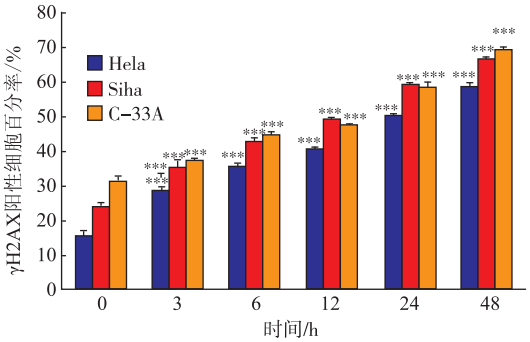
Fig. 5　Immunofluorescence staining of γH2AX foci in Hela cells treated with 20 μmol/L GAA for different time



注：Mean±SEM，n=5，*：P<0.05，**：P<0.01 vs control

图 6　GAA 诱导 Hela、Siha、C−33A 细胞生成 γH2AX 的浓度效应（24 h）

Fig. 6　GAA induces γH2AX foci in Hela、Siha、C−33A cells in a dose−dependent manner



注：Mean±SEM，n=5，*：P<0.05，**：P<0.01 vs control(0 h)

图 7　GAA（20 μmol/L）诱导 Hela、Siha、C−33A 细胞生成 γH2AX 的时间效应

Fig. 7　GAA （20 μmol/L）induces γH2AX foci in Hela、Siha、C−33A cells in a time−dependent manner

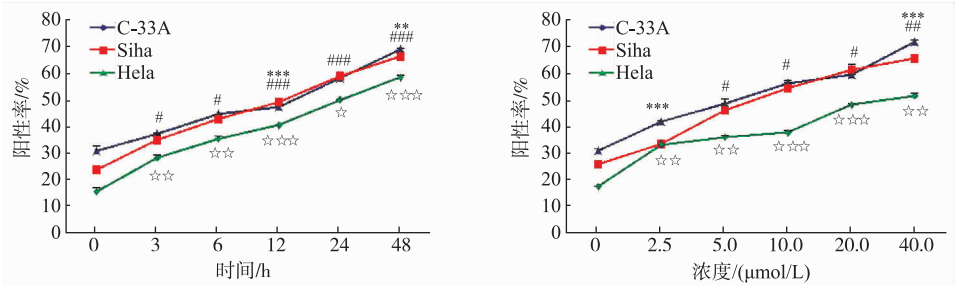


图 8　GAA 诱导 Hela、Siha、C-33A 细胞 γH2AX焦点的形成差异性比较

Fig. 8　Difference comparison of foci formation of GAA on C-33A、Siha and Hela cells

岁开始呈持续上升趋势,在 85 岁达到顶峰。性生活混乱、早孕、多育、人口流动性增大,使妇女罹患宫颈癌的危险性随之增大[10]。

无论是外源性的物理因素（电离辐射、紫外线)、化学因素(化疗药物),还是内源性的代谢产物,都能引起 DNA 双链断裂损伤,且这些损伤均能引起组蛋白 H2AX 发生磷酸化。当轻微损伤时,细胞的细胞周期检查点发生停滞,DNA 会对损伤进行有效的修复;当损伤过度时,则会激发细胞启动凋亡程序,造成细胞凋亡。而其中,DNA 断裂是损伤最严重的一种[11]。

本研究中采用 3 株同源细胞株:Hela、Siha、C-33A 为研究对象，用 MTT (Methyl Thiazolyl Tetrazolium)比色法和单细胞凝胶电泳(SCGE)分别对 3 株宫颈癌细胞的化疗敏感性与 DNA 损伤进行评估，并将 SCGE 与以 γH2AX 为指标的免疫组织化学染色的结果进行比较，探讨将 γH2AX 做为一个潜在的分子靶点，增加肿瘤细胞对化疗的敏感性,提高化疗治癌疗效的可能性。

我们知道,棉酚作为一种多酚类化合物,体外实验证实其具有抑制肿瘤细胞增殖及诱导细胞凋亡的作用[11]。它可以通过多种方式和分子靶向对肿瘤细胞进行抑制增殖和(或) 诱导凋亡,包括通过直接损伤线粒体抑制细胞能量代谢,调低细胞周期调节蛋白 Rb 和 cyclinD1 蛋白的表达，抑制蛋白激酶 C 活性,调节多元耐药基因的表达等[12]。本研究通过 MTT 法检测表明，在 2.5~160 μmol/L 浓度范围内,GAA 对宫颈癌细胞的生长具有明显的抑制作用,在对 C-33A,Siha,Hela 3 株细胞的作用中,对 HPV(-)的 C33A 细胞的生长抑制作用最为明显。在 HPV(+)的 2 种细胞中，对 Siha 的抑制作用较 Hela 细胞明显，这可能与 GAA 对宫颈鳞癌的抑制作用强于宫颈腺癌有关。

检测 DNA 损伤的方法有很多,比如荧光原位杂交、彗星试验、高效毛细管电泳、序列凝胶电泳等[7]。但为了更准确地通过 DNA 损伤程度来反应肿瘤内在敏感性,选取 2 个或多个生物标志物联合测定是明智的[13]。本研究借助中性彗星电泳和免疫细胞化学法同时检测 DSB。γH2AX 焦点与 DSB 的数量关系呈一一对应关系,γH2AX 抗体荧光染色是检测 DSB 存在的金标准[14]。H2AX 磷酸化形成 γH2AX 其实是一种保护机制，其主要功能是维持 DNA 损伤修复应答分子持续地聚集在损伤位点周围,从而间接修复 DNA 损伤[15]。所以,γH2AX 可作为一个非常敏感的指标来评价各种原因所致的 DNA 损伤程度。相比于传统的 DSBs 的检测方法,细胞免疫化学法不仅能够判断 DNA 双链的断裂，还可以直观计数 γH2AX 的表达和斑点数,操作简便,而且灵敏度高,是可行、可靠、经济的检测 DSBs 的方法[16]。SCGE 结果表明,GAA 造成 Hela、Siha、C-33A 各细胞 DNA 双链断裂具有时间和浓度效应(P<0.05)。本实验采用的 Tail length (μm)、Comet length (μm)、Head DNA (%)、Tail DNA (%)、Tail moment(TM)、Olive tail moment(OTM)等多项指标,能够对 DNA 的损伤情况有较为全面的观察。实验结果与 MTT 实验相符,3 株细胞对化学药物的敏感性越强,所需干预浓度越低,而产生的 DNA 损伤效果越强。SCGE 方法发现 3 株细胞在药物处理 48 h(20 μmol/L)或浓度 40 μmol/L(24 h)后 DNA 断裂最明显,差异有统计学意义。同时,我们引入 γH2AX 这个分子靶点进行 DSB 分析。免疫组织化学法结果与 SAGE 一致,即 GAA 有效地诱导了 3 株细胞 DNA 双链断裂，在同一浓度、同一时间下,C-33A 产生的焦点最多,而 Hela 是最少的。另外我们知道,E6、E7 是存在于高

危型 HPV16/18 病毒 DNA 上的决定性基因片段,2 个经典肿瘤抑制蛋白 E6 和 E7 通过与宿主细胞蛋白相互作用参与处理基因组稳定,细胞黏附,细胞增殖、凋亡,细胞周期,DNA 修复,代谢,翻译和转录信号[17]。当 GAA 造成细胞 DSBs 时,可能破坏或删除了 E6 和 E7 基因且阻遏了 E1 和 E2 区域,导致其表达丧失,导致 E6 和 E7 表达水平增加[18-19],导致细胞周期、有丝分裂异常。另外,有研究将 HPV16 E6 抗核酶导入宫颈癌细胞可显著降低细胞的端粒酶活性,从而提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,说明抑制 HPV DNA 的表达,可提高肿瘤的化疗敏感性[20]。同理,GAA 可以通过抑制端粒酶活性和损伤 DNA,提高两种 HPV 阳性细胞 Siha 和 Hela 的化疗敏感性,故二者在相同浓度或相同时间作用下,产生的 γH2AX 比 HPV 阴性的 C-33A 更少。而宫颈鳞癌对 GAA 的敏感性强于宫颈腺癌,故 Siha γH2AX 阳性率高于 Hela。

在药物损伤 DNA 后,若不能及时修复,DNA 转录、复制无法进行,细胞从而走向凋亡。DNA 断裂修复分为以 ATM 重组为主的同源性重组和以 DNA-PK(Ku70/Ku80 异二聚体、DNA-PKcs)为主的非同源重组(NHEJ)2 条途径[21]。其中,NHEJ 修复是人类最主要的途径,低浓度 GAA 具有抑制 DNA 双链断裂的修复和具有增强化疗敏感性的作用。有报道 GAA 诱导的 MEC-1 细胞 DNA 双链断裂机制,有可能与 NHEJ 修复途径中的 DNA-PKcs 有关,其过程大概是 Ku70 与 Ku80 形成异二聚体,再附于受损的 DNA 末端,共同激活 DNA-PKcs,最后完成修复[22]。

4 结 语

综上所述,近年来,棉酚作为一种抗肿瘤药物受到越来越多的关注,棉酚的抗肿瘤研究展现了其药用价值和临床应用的可能性,它引起的 Hela、Siha、C-33A 细胞 DNA 的断裂为它成为有效的抗癌药物提供了重要的理论依据。然而,引起双链断裂的机制并不是完全清楚。目前,有研究表明 PI3K 家族,包括 DNA-PK,ATM 和 ATR 参与了 H2AX 磷酸化的形成[23]。另外有研究表明,使用 PI3K 抑制剂渥曼青霉素作用细胞,再用 IR 处理后,γH2AX 焦点形成急剧减少,提示 H2AX 的磷酸化是 PI3K 家族成员催化的[24]。随着对棉酚的 DSB 机制的不断研究和完善,为临床应用治疗肿瘤打下坚实的基础。

参考文献:

[1] GUO Zhong,ZHAO Jin,MA Jianxiu. Progress in phamacological action of gossypol[J]. **Basic & Clinial Medicine**,2010,30(1):93-96.(in Chinese)

[2] TANAKA T,HALICKA H D,HUANG X,et al. Constitutive histone H2AX phosphorylation and ATM activation,the reporters of DNA damage by endogenous oxidants[J]. **Cell Cycle**,2006,5(17):1940-1945.

[3] SATTERWHITE C L,TORRONE E,MEITES E,et al. Sexually transmitted infections among US women and men:prevalence and incidence estimates 2008[J]. **Sex Transm Dis**,2013,40(3):187-193.

[4] Dennyl,Cytological screening for cervical cancer prevention[J]. **Brest Pract Res Clin Obstest Gynecol**,2012,26(2):189-196.

[5] ZHANG Z,KNOBLOCH T J,SEAMON L G,et al. A black raspberry extract inhibits proliferation and regulates apoptosis in cervical cancer cells[J]. **Gynecol Oncol**,2011,123(2):401-406.

[6] LIU Xiuling,WANG Li,JIANG Chunhua,et al. Effects of thiamine and riboflavin on H_2O_2-induced DNA oxidative damage[J]. **Shanghai Jiaotong Univ(Med Sci)**,2009,29(9):1049-1052.(in Chinese)

[7] MACPHAIL S H,BANATH J P,YU Y,et al. Cell cycle-dependent expression of phosphorylated histone H2AX:reduced expression in unirradiated but not X-irradiated G1-phase cells[J]. **Radiat Res**,2003,159(6):759-767.

[8] GUO Zhong,ZHAO Jin,XUE Tongmin,et al. Gossypol acetic acid induces DNA double-strand breaks in human mucoepidermoid carcinoma cell MEC-1[J]. **Acta Physiologica Sinica**,2011,63(2):164-170.(in Chinese)

[9] DENNY L. Cervical cancer prevention:new opportunities for primary andsecondary prevention in the 21st century[J]. **Int J Gynecol Obstet**,2012,119(Suppl 1):80-84.

[10] QIAO Youlin,ZHAO Yuqian. Epidemiology and prevention of cervical cancer[J]. **Chinese Journal of Obstetrics & Gynecology and Pediatrics(Electronic Edition)**,2015,11(2):141-147.(in Chinese)

[11] GONG Ping,WANG Yuli,JIANG Ling,et al. Study on the effect of gossypol combined with radiotherapy in inducing apoptosis of human cervical carcinoma HeLa cells[J]. **Tumor**,2009,29(9):838-841.(in Chinese)

[12] WANG Yuli. Research progress in gossypol for anti-cancer[J]. **China Cancer**,2008,17(7):576-579.(in Chinese)

[13] ZHANG Yipei,CAO Jia,WANG Yan,et al. Radiosensitivity evalution of human tumor cell lines by single cell gel electroresis[J]. **Chin J Radiol Health**,2011,20(3):259-261.(in Chinese)

[14] ROTHKAMM K,LOBRICH M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low X-ray doses[J]. **Proc Natl Acad Sci USA**,2003,100(9):5057-5062.

[15] CELESTE A,FERNANDEZ C O,KRUHLAK M J,et al. Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks[J]. **Nat Cell Biol**,2003,5(7):675-679.

[16] SEDELNIKOVA O A,BONNER W M. Gamma H2AX in cancer cells:a potential biomarker for cancer diagnostics,prediction and recurrence[J]. **Cell Cycle**,2006,5(24):2909-2913.

[17] NARISAWA S M,KIYONO T. Basic mechanisms of high-risk human papil-lomavirus-induced carcinogenesis:roles of E6 and E7 proteins[J]. **Cancer Sci**,2007,98(10):1505-1511.

[18] FERNANDEZ A F,ESTELLER M. Viral epigenomes in human tumorigenesis[J]. **Oncogene**,2010,29(10):1405-1420.

[19] MOODY C A,LAIMINS L A. Human papillomavirus oncoproteins:pathwaysto transformation[J]. **Nat Rev Cancer**,2010,10(8):550-560.

[20] WANG Fang. Clinical analysis of the short-term effect of neoadjuvant chemotherapy on cervical carcinoma with different types of HPV[J]. **Journal of Frontiers of Medicine**,2013(13):43-44.(in Chinese)

[21] PAWELCZAK K S,ANDREWS B J,TURCHI J J. Differential activation of DNA-PK based on DNA strand orientation and sequence bias[J]. **Nucleic Acids Res**,2005,33(1):152-161.

[22] COLLIS S J,DEWEESE T L,JEGGO P A,et al. The life and death of DNA-PK[J]. **Oncogene**,2005,24(6):949-961.

[23] Zhong Guo,Jin Zhao,Lei Song,et al. Induction of H2AX phosphorylation in tumor cells by gossypol acetic acid is mediated by phosphatidylinositol-3-kinase(PI3K) family[J]. **Cancer Cell International**,2014,14:141.

[24] PAULL T T,ROGAKOU EP,YAMAZAKI V,et al. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage[J]. **Curr Biol**,2000,10(15):886-895.

会　议　消　息

会议名称(中文):分子模拟与蛋白互作研习班

所属学科:生物物理学、生物化学及分子生物学,细胞生物学

开始日期:2018-03-30　　结束日期:2018-04-01

所在城市:北京市　海淀区　　具体地点:北京市计算中心三层会议室

主办单位:中国生物工程学会计算生物学与生物信息学专委会　　承办单位:北京市计算中心

联系人:员老师　　联系电话:010-59341773

E-MAIL:bcc-sxpx@bcc.ac.cn

会议网站:http://bioc.bcc.ac.cn/bcc/China/shengwuxinxipeixun/2017-11-07/327.html

会议背景介绍:蛋白质组学是研究生命科学现象与科学规律的重要途径,在各个研究领域都有广泛应用。有许多蛋白质相关的数据库资源及生物信息学分析工具,在研究蛋白质的鉴定、结构分析与模拟、蛋白与核酸相互作用、与蛋白-蛋白相互作用、分子对接,乃至分子相互作用网络等各个层面为科学研究提供助力。为进一步推进相关研究发展,助力广大科研工作者提高蛋白质组学相关数据分析及生物信息学技能,北京市计算中心生物计算事业部推出"蛋白质组学及分子模拟"研习班。