

伊维菌素对宫颈癌Hela细胞增殖和凋亡的影响

金亚玲¹, 王祥珍^{1*}, 刘厚聪², 孟 军³ (1. 广东省深圳市南山区妇幼保健院妇产科, 广东深圳 518067; 2. 华中科技大学协和深圳医院中心实验室, 广东深圳 518000; 3. 华中科技大学协和深圳医院妇产科, 广东深圳 518000)

摘要:目的 探讨伊维菌素对人宫颈癌Hela细胞增殖和凋亡的影响。方法 0.1、1、3 $\mu\text{mol/L}$ 伊维菌素处理Hela细胞, MTT、Edu法检测细胞活性, 流式细胞术检测细胞凋亡, 蛋白印迹检测p-JNK、JNK、NF- κB p65、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9表达。结果 伊维菌素呈浓度依赖性抑制Hela细胞增殖、诱导凋亡($P<0.01$), 上调p-JNK、Caspase-3、Caspase-9表达, 下调NF- κB p65、Bcl-2表达。结论 伊维菌素可能通过上调JNK信号通路诱导Hela细胞凋亡, 下调NF- κB 信号通路抑制Hela细胞增殖。

关键词: 伊维菌素; Hela细胞; 增殖; 凋亡

中图分类号: R 739

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2020)04-0391-04

Effect of ivermectin on proliferation and apoptosis of cervical cancer Hela cells

JIN Ya-ling¹, WANG Xiang-zhen^{1*}, LIU Hou-cong², MENG Jun³ (1. Department of Gynecology and Obstetrics, Nanshan Maternal and Child Health Hospital, Shenzhen 518067, China; 2. Central Laboratory; 3. Department of Gynecology and Obstetrics; Shenzhen Union Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Shenzhen 518067, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of ivermectin on proliferation and apoptosis of cervical cancer Hela cells. Methods After treated with 0.1, 1, 3 $\mu\text{mol/L}$ ivermectin, viability, apoptosis, and expression of p-JNK, JNK, NF- κB p65, Bcl-2, Caspase-3 and Caspase-9 in Hela cells were determined by MTT, Edu, flow cytometry, Western blot, respectively. Results Ivermectin inhibited proliferation, induced apoptosis ($P<0.01$), up-regulated expression of p-JNK, Caspase-3 and Caspase-9, and down-regulated expression of NF- κB p65 and Bcl-2 in Hela cells in a dose-dependent manner. Conclusion Ivermectin could induce apoptosis via up-regulation of JNK pathway and inhibit proliferation through down-regulation of NF- κB signaling in Hela cells.

Key words: ivermectin; Hela cells; proliferation; apoptosis

宫颈癌是最为常见的妇科恶性肿瘤, 发病率不断上升, 且发病年龄日趋年轻化, 目前以手术治疗为主, 但术后5年生存率仍较低。寻找高效且不良反应少的化疗药物是当前的热门研究领域。伊维菌素是源于阿维菌素家族的一种半合成的大环内酯类药物^[1], 是一种新型的广谱、高效、低毒的抗寄生虫药^[2], 对各种细菌、病毒和肿瘤也具有免疫调节的作用^[3]。研究报道, 伊维菌素有修复炎症损伤^[4]、抵抗脂多糖(LPS)刺激肝脏巨噬细胞活力的功能^[5], 并

且能抑制胃癌中Yes相关蛋白1的表达发挥抗肿瘤作用^[6]。JNK信号转导通路属于MAPK通路, 它在细胞周期、增殖、凋亡和细胞应激等多种生理和病理过程中均起到重要作用^[7]。NF- κB p65信号通路可以对有害刺激做出反应, 激发下游信号传导, 参与免疫反应的早期和炎症反应各阶段。NF- κB 激活可以促进肝细胞、肿瘤细胞等增殖, 调节细胞生长^[8-9]。本研究探讨了伊维菌素对人宫颈癌Hela细胞的体外增殖和凋亡作用, 现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 细胞与试剂

人宫颈癌Hela细胞株购自美国ATCC上海分公司; 伊维菌素购于西安康乐动物药业有限公司; DMEM培养基、胎牛血清、胰蛋白酶购自美国Invitrogen公司; 二甲基亚砜(DMSO)、MTT试剂购自美

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金项目
(No.C2017034)

收稿日期: 2020-04-27; 修订日期: 2020-06-15

作者简介: 金亚玲(1979-), 女, 硕士, 主治医师

通信作者: 王祥珍(1968-), 女, 博士, 主任医师,

E-mail: 1093456531@qq.com

国Sigma公司; RIPA 细胞组织裂解液和蛋白酶抑制剂购自中国Takara公司; 碘化丙啶(PI)、Annexin V-FITC/PI染色试剂盒购自南京建成生物技术公司; 兔抗人P-JNK、Bcl-2、Caspase3、NF- κ B p65、 β -actin和鼠抗人Caspase9单克隆抗体购自美国Abcam公司; 超敏ECL和BCA试剂盒购自日本WAKO公司; 分析纯酒精等购自上海生物工程公司。

1.2 仪器

CO₂培养箱购自美国Shellab公司; 流式细胞仪(COMLTER EPICS XL 型)和冷冻离心机购自美国Beckman公司; 光学倒置、荧光显微镜Olympus AX70 和全自动凝胶成像分析仪购自日本; 酶标仪Bio-tek购自美国。

1.3 Edu法测定细胞的增殖

Edu法采用碧云天Edu检测试剂盒, 对数期生长的Hela细胞用20 μ mol/L Edu培养基培养细胞2 h, 经固定、破膜等处理后, 加入Edu检测反应液, 0.1% DAPI染细胞核, 荧光显微镜下观察并计算Edu阳性率。

1.4 MTT法测定细胞的活性

取对数生长期的Hela细胞均匀接种于96孔板中, 调整细胞密度为 1×10^4 /孔, 每孔培养基100 μ L, 置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂孵箱内培养24 h, 用不含FBS的DMEM培养基饥饿2 h后给药。吸去培养基, 药物组每孔加入不同浓度的伊维菌素(0.1、1、3 μ mol/L)的培养基100 μ L, 设6个复孔。对照组每孔加入100 μ L不含药物的DMEM培养基, 培养24 h后, 加入5 g/L MTT 20 μ L, 继续培养4 h后弃上清, 加入DMSO 150 μ L显色, 振荡5~10 min, 待结晶物充分溶解后用酶标仪测定570 nm波长处的吸光度。吸光度越高说明活细胞数量越多, 即抑制增值率越低。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡率

采用Annexin V-FITC及PI双标流式细胞仪检测细胞凋亡, 将对数生长期的细胞分为实验组和对照组, 均匀接种在六孔板中(1×10^5 个/孔)。当细胞长至70%时, 在实验组中分别加入终浓度为0.1、1、3 μ mol/L伊维菌素作用24 h, 对照组加入等体积的培养基作用24 h, 胰酶消化2 000 r/min离心5 min, 收集细胞, PBS漂洗, 离心弃掉上清。用195 μ L Annexin V结合液重悬细胞, 加3 μ L Annex in-V-FITC和2 μ L 碘化丙啶轻轻混匀后室温避光静置孵育15 min, 加入190 μ L PBS缓冲液后马上进行流式细胞仪检测, 计算早期凋亡率和总凋亡率。

1.6 Western blot检测细胞凋亡相关蛋白的表达

将对数生长期的Hela细胞均匀接种在6孔板中(1×10^4 /孔), 培养24 h后, 每孔加入不同浓度(0.1、1、3 μ mol/L)的伊维菌素, 培养48 h后弃掉上清液, PDB冲洗后, 加入100 μ L 细胞裂解液, 冰上裂解细胞后提取细胞总蛋白, 用Bradford 法测定蛋白质浓度。取50 μ g蛋白与buffer混合后, 高温煮沸5 min, 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并转移至硝酸纤维素膜上, 5%脱脂乳室温摇床封闭1 h, TBST漂洗后, 分别与p-JNK、JNK、Bcl-2抗体(稀释比例为1:2 000)、NF- κ B p65 抗体(稀释比例为1:200)、 β -actin 抗体(稀释比例为1:4 000)、Caspase-3和Caspase-9抗体(稀释比例为1:2 000)等一抗在4 $^{\circ}$ C摇床孵育过夜。次日, TBST漂洗3次, 每次5 min, 加入HRP 标记山羊抗兔IgG和HRP 标记山羊抗鼠IgG(稀释比例为1:2 000), 室温孵育1 h, TBST漂洗3次, 每次5 min, 用ECL化学发光试剂显色后使用化学发光型凝胶成像系统照相, 内参对照选取 β -actin。

1.7 统计学处理

数据采用SPSS 20.0统计学软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验; 计数资料以例(%)表示, 采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 伊维菌素对Hela细胞增殖的抑制作用

伊维菌素对Hela细胞的增殖有明显抑制作用, 吸光度和Edu阳性率随着伊维菌素浓度的增加而降低($P < 0.01$), 即其抑制增殖的作用随着伊维菌素浓度的增加而增强。见图1和表1。

2.2 伊维菌素对Hela细胞凋亡的诱导作用

伊维菌素作用Hela细胞24 h后, Hela细胞出现明显的早期凋亡现象, 且随着药物浓度的增加, Hela细胞的早期凋亡率和总凋亡率均明显提高($P < 0.01$), 见表2。

2.3 伊维菌素对Hela细胞凋亡相关蛋白表达的影响

伊维菌素作用Hela细胞24 h后, 磷酸化的JNK、Caspase-3和Caspase-9酶原的表达增强, 而NF- κ B p65和Bcl-2的表达则减弱, 并呈浓度依赖性, 见图2。

3 讨论

宫颈癌作为威胁妇女生命的第二大恶性肿瘤, 与肿瘤细胞的恶性增殖和凋亡减少有关, 一般采取手术和放化疗治疗。但宫颈癌晚期易转移, 手术难以全切, 术后易复发。近年研究发现, 伊维菌素在哮喘、癫痫、白血病、癌症等多种疾病的治疗中具

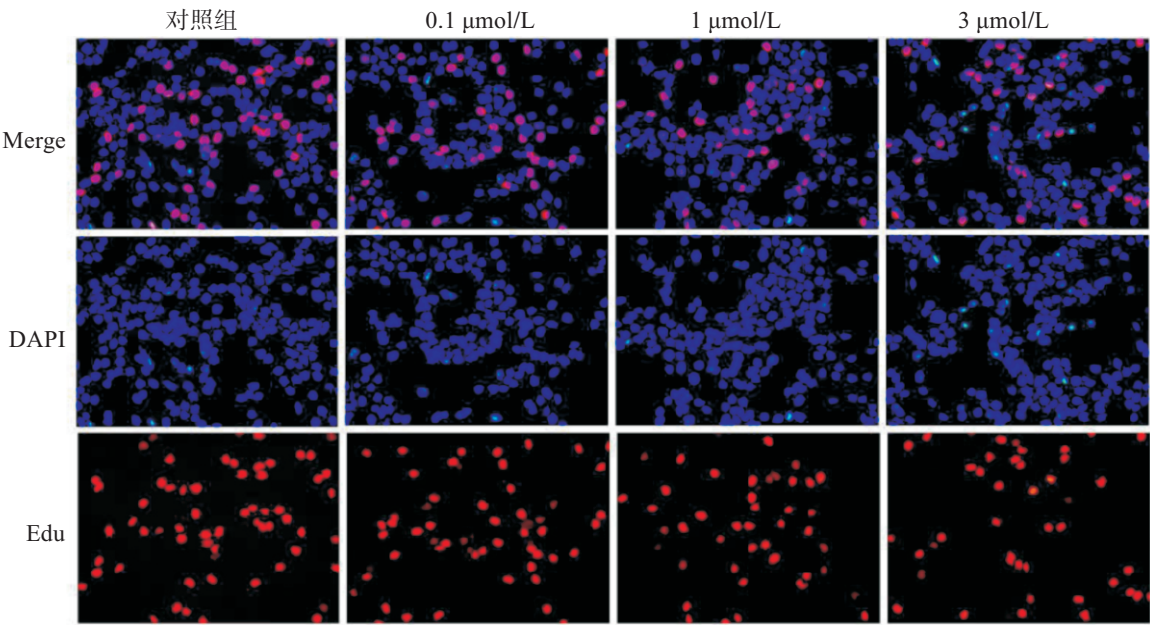


图1 不同浓度伊维菌素处理后Edu染色图

表1 伊维菌素对Hela细胞增殖的抑制作用

$\bar{x} \pm s, n=6$		
组别	吸光度	Edu阳性率/%
对照组	0.121 ± 0.009	38.63 ± 2.18
伊维菌素0.1 μmol/L	0.087 ± 0.008 ^a	32.49 ± 1.97 ^a
伊维菌素1 μmol/L	0.075 ± 0.005 ^{ab}	27.71 ± 2.54 ^{ab}
伊维菌素3 μmol/L	0.062 ± 0.005 ^{abc}	15.94 ± 2.67 ^{abc}

与对照组比较: ^a $P < 0.01$; 与伊维菌素0.1 μmol/L组比较:

^b $P < 0.01$; 与伊维菌素1 μmol/L组比较: ^c $P < 0.01$

表2 伊维菌素对Hela细胞凋亡的作用

$\bar{x} \pm s, n=6$		
组别	早期凋亡率/%	总凋亡率/%
对照组	1.06 ± 0.48	1.13 ± 0.19
伊维菌素0.1 μmol/L	6.45 ± 0.83 ^a	7.16 ± 0.97 ^a
伊维菌素1 μmol/L	13.80 ± 1.09 ^{ab}	17.44 ± 1.00 ^{ab}
伊维菌素3 μmol/L	29.20 ± 1.74 ^{abc}	35.31 ± 1.34 ^{abc}

与对照组比较: ^a $P < 0.01$; 与伊维菌素0.1 μmol/L组比较:

^b $P < 0.01$; 与伊维菌素1 μmol/L组比较: ^c $P < 0.01$

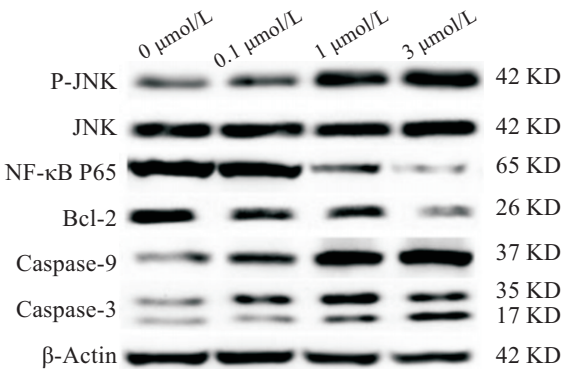


图2 伊维菌素对Hela细胞凋亡相关蛋白表达的影响

有重要的作用^[10-11]。伊维菌素能够阻断乳腺癌细胞的Akt/mTOR信号通路,诱导抑制细胞生长的自噬,有效阻断肿瘤的成长^[12]。同时伊维菌素还可以通过诱导线粒体功能障碍和氧化应激选择性诱导慢性粒细胞白血病细胞发生凋亡^[13]。c-Jun氨基末端激酶JNK属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, JNK家族作为促分裂原活化蛋白激酶MAPK超家族的重要成员,能够介导多种细胞刺激诱导凋亡。JNK 信号通路主要通过磷酸化激活Bax等促凋亡因子,抑制Bcl-2、Bcl-xl等抗凋亡因子^[14],从而激活线粒体依赖的细胞凋亡通路^[15]。NF-κB p65普遍存在于细胞胞质中,当相关刺激因素(如射线、细胞炎性因子、应激等)激活其生物活性后, NF-κB p65蛋白将进入细胞核内发挥其增殖调节的作用,调控多种下游基因的表达,介导如增殖、凋亡、血管形成、肿瘤转移等生物学过程,在多种疾病中扮演着重要的角色^[16-19]。本实验结果发现伊维菌素对Hela细胞的生长起抑制作用,且呈浓度依赖性,药物浓度越高,细胞存活率越低。Annexin V-FITC/PI 双染法及流式细胞术结果显示伊维菌素作用Hela细胞24 h后, Hela 细胞出现明显的早期凋亡现象,且随着药物浓度的增加, Hela 细胞的早期凋亡率和总凋亡率均明显提高($P < 0.01$),可见伊维菌素诱导宫颈癌Hela 细胞的凋亡效果较为明显。Western blot结果显示促进细胞凋亡作用的Caspase-3、Caspase 9酶原和磷酸化的JNK蛋白表达随着伊维菌素浓度的增加逐渐增加,而抑制凋亡作用的Bcl-2和促进增殖的NF-κB p65蛋白表达则随着伊维菌素浓度的增加而逐渐减少。研究结果说明,

伊维菌素或可通过激活JNK介导的线粒体依赖性信号转导通路诱导Hela细胞凋亡, 以及通过下调NF- κ B p65信号通路抑制Hela细胞增殖。

参考文献:

- [1] REZAADEH T, DALALI N, SEHATI N. Investigation of adsorption performance of graphene oxide/polyaniline reinforced hollow fiber membrane for preconcentration of ivermectin in some environmental samples[J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2018, 204(18): 409-415.
- [2] KAMGA G, DISSAK-DELON F N, NANA-DJEUNGA H C, et al. Audit of the community-directed treatment with ivermectin (CDTI) for onchocerciasis and factors associated with adherence in three regions of Cameroon[J]. *Parasit Vectors*, 2018, 11(1): 356-375.
- [3] BEERES D T, RAVENSBERGEN S J, HEIDEMA A, et al. Efficacy of ivermectin mass-drug administration to control scabies in asylum seekers in the Netherlands: A retrospective cohort study between January 2014-March 2016[J]. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2018, 12(5): e6401-e6411.
- [4] SANCHEZRUIZ W L, NUZUM D S, KOUZI S A. Oral ivermectin for the treatment of head lice infestation[J]. *Am J Health Syst Pharm*, 2018, 75(13): 937-943.
- [5] 张雪梅, 邓旭明. 伊维菌素对内毒血症小鼠生存率和细胞因子分泌的影响[J]. *中国兽医科学*, 2012, 42(1): 69-73.
- [6] NAMBARA S, MASUDA T, NISHIO M, et al. Antitumor effects of the antiparasitic agent ivermectin via inhibition of yes-associated protein 1 expression in gastric cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(64): 107666-107677.
- [7] AUNG H H, LAME M W, GOHIL K, et al. Induction of ATF3 gene network by triglyceride-rich lipoprotein lipolysis products increases vascular apoptosis and inflammation[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(9): 2088-2096.
- [8] LI A, WANG Q, HE G, et al. DEP domain containing 1 suppresses apoptosis via inhibition of A20 expression, which activates the nuclear factor κ B signaling pathway in HepG2 cells[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(1): 949-955.
- [9] WU C, YANG Y, CHEN M, et al. Autocleavage of the paracaspase MALT1 at Arg-781 attenuates NF- κ B signaling and regulates the growth of activated B-cell like diffuse large B-cell lymphoma cells[J]. *PLOS ONE*, 2018, 13(6): e199779.
- [10] CANTON C, CANTON L, DOMÍNGUEZ M P, et al. Field trial assessment of ivermectin pharmacokinetics and efficacy against susceptible and resistant nematode populations in cattle[J]. *Vet Parasitol*, 2018, 256(3): 43-49.
- [11] JUAREZ M, SCHCOLNIK-CABRERA A, DUE AS-GONZALEZ A. The multitargeted drug ivermectin: from an antiparasitic agent to a repositioned cancer drug[J]. *Am J Cancer Res*, 2018, 8(2): 317-331.
- [12] DOU Q H, CHEN H Y, WANG K, et al. Ivermectin induces cytostatic autophagy by blocking the PAK1/Akt axis in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2016, 15(76): 4457-4469.
- [13] WANG J, XU Y, WAN H, et al. Antibiotic ivermectin selectively induces apoptosis in chronic myeloid leukemia through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative stress[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 497(1): 241-247.
- [14] BHARDWAJ M, PAUL S, JAKHAR R, et al. Vitexin confers HSF-1 mediated autophagic cell death by activating JNK and ApoL1 in colorectal carcinoma cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(68): 112426-112441.
- [15] SUNG Y, PARK S, PARK S J, et al. Jazf1 promotes prostate cancer progression by activating JNK/Slug[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(1): 755-765.
- [16] PIRES B, BINATO R, FERREIRA G, et al. NF-kappa B regulates redox status in breast cancer subtypes[J]. *Genes*, 2018, 9(7): 320-322.
- [17] 王晓伟, 黄璵, 陈伟. TLR4/NF- κ B通路对非酒精性脂肪肝的作用机制[J]. *中华全科医学*, 2014(3): 384-385.
- [18] SWEET D T, CHEN Z, GIVENS C S, et al. Endothelial Shc regulates arteriogenesis through dual control of arterial specification and inflammation via the notch and nuclear factor-kappa-light-chain-enhancer of activated B-cell pathways[J]. *Circ Res*, 2013, 113(1): 32-39.
- [19] ZHU M, LI Y, ZHOU Z. Antibiotic ivermectin preferentially targets renal cancer through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative damage[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 492(3): 373-378.