

蟾蜍灵对宫颈癌细胞的增殖抑制作用及其机制研究

刘 霏¹, 李浩然¹, 程 玺¹, 李梦娇¹, 王子良², 杨 莉³

1. 复旦大学附属肿瘤医院妇科, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032;
2. 复旦大学附属肿瘤医院肿瘤研究所, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032;
3. 浙江省肿瘤医院妇科, 浙江 杭州 310002

[摘要] 背景与目的: 宫颈癌仍然是妇科肿瘤致死病因的第二位, 部分原因为化疗耐药。蟾蜍灵是传统中药蟾酥的成分之一, 目前在国内广泛应用于肿瘤的治疗中。该研究旨在探讨蟾蜍灵对宫颈癌细胞ME180和C33A的增殖抑制作用及相关机制。方法: 采用CCK8(cell counting kit-8)法检测蟾蜍灵对宫颈癌细胞增殖的抑制作用, 采用葡萄糖检测分析试剂盒(glucose assay kit)进行细胞内糖代谢检测分析, 采用实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测细胞内葡萄糖转运蛋白1(glucose transporter 1, GLUT1)和己糖激酶2(hexokinase 2, HK2)的mRNA的表达水平, 采用蛋白[质]印迹法(Western blot)检测原癌基因C-MYC和缺氧诱导因子1 α (Hif-1 α)表达的变化。结果: CCK8法结果显示, 蟾蜍灵能明显抑制宫颈癌细胞ME180和C33A细胞增殖($P=0.027$, $P=0.018$)。糖代谢检测结果显示, 蟾蜍灵处理组葡萄糖代谢水平显著降低($P=0.034$, $P=0.036$)。qRT-PCR检测结果显示, 蟾蜍灵处理组糖代谢相关指标GLUT1($P=0.019$, $P=0.016$)和HK2($P=0.039$, $P=0.041$)的表达水平明显下调。Western blot检测结果显示, 蟾蜍灵处理后宫颈癌细胞内C-MYC和Hif-1 α 蛋白表达水平显著下调。结论: 蟾蜍灵可以通过降低宫颈癌细胞ME180和C33A糖代谢水平, 从而抑制细胞增殖。

[关键词] 蟾蜍灵; 宫颈癌; 细胞增殖; 葡萄糖代谢

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2015.10.004

中图分类号: R737.33 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2015)10-0780-05

Research on the cytostatic effect of bufalin on cervical carcinoma cells and the related mechanism
LIU Fei¹, LI Haoran¹, CHENG Xi¹, LI Mengjiao¹, WANG Ziliang², YANG Li³ (1. Department of Gynecological Oncology, Fudan University Shanghai Cancer Center, Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2. Department of Cancer Institute, Fudan University Shanghai Cancer Center, Shanghai 200032, China; 3. Department of Gynecological Oncology, Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310002, Zhejiang, China)

Correspondence to: CHENG Xi E-mail: cheng_xi1@hotmail.com

[Abstract] **Background and purpose:** Cervical cancer remains the second leading cause of death in gynecologic malignancies partially because of resistance to chemotherapy. Bufalin, a component of the traditional Chinese medicine Chansu, has been widely used in cancer treatment in China. This study aimed to investigate the effects of bufalin on inhibiting the proliferation of ME180 and C33A and explore its possible mechanism. **Methods:** The cytostatic effects of bufalin on ME180 and C33A cells were evaluated by CCK8 assay (cell counting kit-8). Glucose levels in ME180 and C33A cells were measured using glucose assay kit. Then the alterations of GLUT1 (glucose transporter 1) and HK2 (hexokinase 2) gene expression were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The expressions of proto-oncogene C-MYC and HIF1 α (hypoxia-inducible factor 1 α) were determined by Western blot. **Results:** According to the results of CCK-8, bufalin can significantly inhibit the proliferation of carcinoma cells ME180 and C33A ($P=0.027$, $P=0.018$). Test on glycometabolism indicated that glucose uptake in cells treated with bufalin decreased ($P=0.034$, $P=0.036$). Results from real-time PCR showed that

the expression of glycometabolism related indicators GLUT1 ($P=0.019$) and HK2 ($P=0.016$) levels were significantly down-regulated in bufalin treated group. Western blot showed that the expression of C-MYC and HIF1 α in cells with bufalin treatment was down-regulated markedly. **Conclusion:** Bufalin can inhibit the proliferation of the cervical carcinoma cells ME180 and C33A through inhibition of their glucose metabolism.

[**Key words**] Bufalin; Cervical neoplasm; Cellular proliferation; Glucose metabolism

2008年全球有28.7万例患者死于宫颈癌, 据估计, 2030年死于宫颈癌的患者将升至41万^[1]。临床上复发或远处转移的宫颈癌患者, 难以进行再次手术或放疗, 常规的治疗方法为化疗, 而化疗耐药和化疗药物不良反应不能耐受仍然是比较严峻的问题^[2]。因此, 寻找新的治疗药物迫在眉睫。不同于正常细胞, 肿瘤细胞主要通过有氧糖酵解获得能量^[3-4]。糖酵解途径(glycolytic pathway)能够快速产生ATP, 有效地为细胞增殖、侵袭转移提供能量^[5]。Hanahan等^[3]认为, 这种特殊的糖代谢方式能够使肿瘤细胞与正常细胞在竞争能量时占据优势地位。近年来, 不少研究表明抑制肿瘤细胞糖代谢, 不仅能导致肿瘤细胞能量耗竭, 而且阻碍其合成快速增殖所需的物质, 最终达到抑制肿瘤细胞增殖的目的^[6]。Knouzy等^[7]研究发现, 异环磷酸胺的代谢产物氯乙醛可以体外抑制乳腺癌细胞MCF-7的糖代谢, 进而抑制其增殖。蟾蜍灵是传统中药蟾酥的主要活性成分之一, 具有良好的抗肿瘤作用^[8-10], 并且, 相对于传统的化疗药物, 蟾蜍灵的不良反较小^[11]。目前研究发现, 蟾蜍灵对肿瘤具有抑制细胞Na⁺-K⁺-ATP酶、阻滞细胞周期、促进细胞凋亡、诱导细胞分化等功能, 而这些功能与细胞的代谢密切相关, 而蟾蜍灵对肿瘤细胞糖代谢的影响鲜见报道。因此本研究从代谢的角度, 应用蟾蜍灵作用于宫颈癌细胞ME180和C33A, 分析蟾蜍灵对宫颈癌细胞糖代谢的影响, 探讨蟾蜍灵抑制宫颈癌细胞增殖的可能机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

人宫颈癌细胞系ME180和C33A购自美国ATCC(American type culture collection)公司。

高糖DMEM培养基、0.25% Trypsin-EDTA、1×PBS购自美国Hyclone公司。胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国Gibco公司。蟾蜍灵购自美国Sigma-Aldrich公司。CCK8(cell counting kit-8)购自日本Dojindo Molecular Technologies公司。葡萄糖检测分析试剂盒(glucose assay kit)购自美国Biovision公司。内参引物GAPDH及引物GLUT1、HK2由上海生物工程技术有限公司合成, 引物序列见表1。Real-time PCR所用试剂均购自日本TaKaRa公司。蛋白[质]印迹法(Western blot)所用抗体均购自中国Protein Tech生物公司。

表1 目的基因的引物序列

Target gene	Primers sequence
GAPDH	F:5'-GGCCTCCAAGGAGTAAGACC-3'
	R:5'-CAAGGGGTCTACATGGCAAC-3'
GLUT1	F:5'-CTTGTGGCCTTCTTTGAAGT-3'
	R:5'-CCACACAGTTGCTCCACAT-3'
HK2	F:5'-GTTGTCCGTAACATTCTCATCGA-3'
	R:5'-CTGTCTTGAGCCGCTCTGAGAT-3'

1.2 细胞培养

各种细胞均按照ATCC提供的标准方案进行培养, 具体为用含有10% FBS, 1%青-链霉素的DMEM培养基进行培养, 各细胞均在37℃、CO₂体积分数为5%的培养箱中培养, 应用0.25%胰蛋白酶消化传代。实验所用细胞均为处于对数生长期细胞。

1.3 CCK8细胞增殖实验

采用0.025、0.05、0.1和0.2 μmol/L的蟾蜍灵处理宫颈癌细胞ME180和C33A 48 h后检测其增殖抑制情况, 结果发现, 低于0.1 μmol/L的蟾蜍灵对宫颈癌细胞抑制作用不明显, 而高于0.1 μmol/L的蟾蜍灵对宫颈癌细胞毒性过大, 均

不利于后续实验检测。因此选用0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的蟾蜍灵进行后续实验。0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的蟾蜍灵处理宫颈癌细胞ME180和C33A 48 h后,计数稀释至 10^4 个/mL,接种于96孔板中,每孔加入100 μL 细胞悬液即1 000个活细胞,同时接种相同数量未处理的宫颈癌细胞作为对照组。设3个复孔,并设置空白对照。置于培养箱中培养,每隔24 h在450 nm测定吸光度(D)值。以上实验重复3次。绘制细胞增殖曲线。

1.4 葡萄糖代谢检测

采用特制葡萄糖代谢检测专用96孔板,每孔70 μL 培养基,每孔种细胞数 3×10^4 个,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 体积分数为5%的细胞培养箱过夜,按照glucose assay kit说明书检测葡萄糖含量,计算分析细胞的糖摄取水平。

1.5 实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测

反应液配制按照日本TaKaRa公司SYBR Premix Ex TaqTM II说明书进行操作(GAPDH作为内参)。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,40个循环。数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法,所有qRT-PCR实验重复3次,每次设置3个复孔。

1.6 Western blot检测

同时收集0.1 $\mu\text{mol/L}$ 蟾蜍灵处理48 h以及对对照组细胞沉淀,加入裂解液及蛋白酶抑制剂裂

解细胞,抽提蛋白定量3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 后上样于SDS-PAGE中电泳,电泳结束后将蛋白恒压湿转至0.2 μm PVDF膜上,8%的脱脂牛奶封闭1h,一抗4 $^{\circ}\text{C}$ 温育过夜,TBST洗膜3次,加入二抗室温温育2 h,TBST洗膜3次后化学发光法进行目的蛋白条带显色。

1.7 统计学处理

所有实验均重复3次以上。采用SPSS 19.0统计软件进行统计学分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。计量资料的比较采用方差分析和 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 蟾蜍灵对宫颈癌细胞增殖的影响

CCK8检测结果显示,蟾蜍灵处理组宫颈癌细胞ME180和C33A的增殖明显受到抑制,差异有统计学意义(图1, $P < 0.05$)。以上结果表明,0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的蟾蜍灵能够明显抑制宫颈癌细胞ME180和C33A的增殖。

2.2 蟾蜍灵对宫颈癌细胞糖代谢水平的影响

检测蟾蜍灵处理前后宫颈癌细胞ME180和C33A葡萄糖摄取的情况。结果显示,与对照组相比,处理组的宫颈癌细胞葡萄糖摄取水平明显降低,差异具有统计学意义(图2, $P < 0.05$)。上述结果表明,蟾蜍灵可能通过降低宫颈癌细胞ME180和C33A的糖代谢水平,从而抑制宫颈癌细胞的增殖。为进一步研究蟾蜍灵调节宫

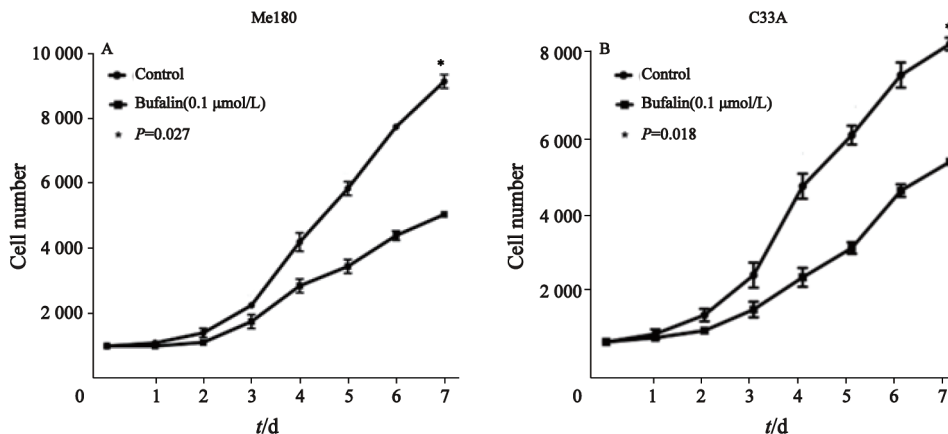


图1 蟾蜍灵可抑制宫颈癌细胞ME180(A)和C33A(B)增殖

Fig. 1 Bufalin can inhibit the proliferation of cervical carcinoma cells ME180(A) and C33A(B)

颈癌细胞糖代谢的机制, 采用qRT-PCR法对葡萄糖转运体GLUT1和己糖激酶HK2进行检测。结果显示, 与对照组相比, 蟾蜍灵处理组的GLUT1和HK2表达水平明显下调, 差异具有统计学意义(图3, $P < 0.05$)。

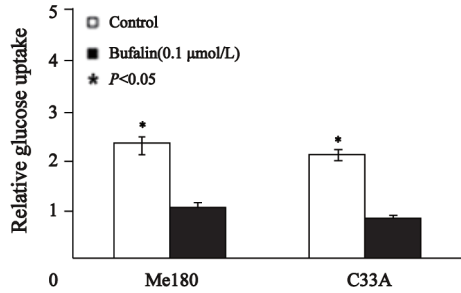
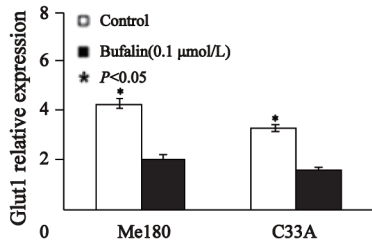


图2 蟾蜍灵可降低宫颈癌细胞葡萄糖摄取水平

Fig. 2 Bufalin can decrease glucose uptake in cervical carcinoma cells



2.3 C-MYC和HIF1α可能是蟾蜍灵潜在的作用靶点

采用Western blot检测对照组和蟾蜍灵处理组细胞的C-MYC和HIF1α蛋白表达水平, 结果表明, 与对照组相比, 蟾蜍灵处理组细胞内C-MYC和HIF1α蛋白表达水平明显降低(图4)。

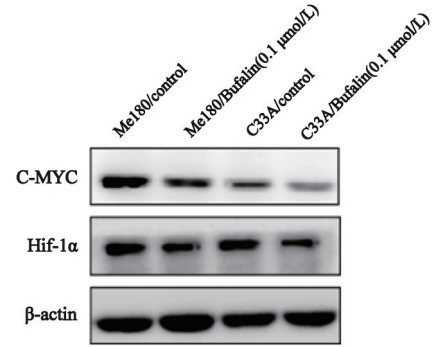


图3 糖代谢相关基因GLUT1和HK2的表达

Fig. 3 Expression of glucose metabolism-related genes GLUT1 and HK2

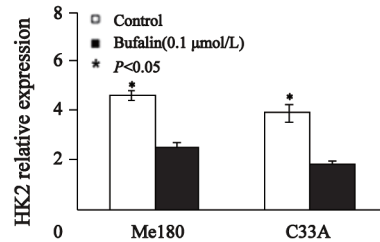


图4 蟾蜍灵可抑制C-MYC和HIF1α蛋白表达

Fig. 4 Expression of C - MYC and HIF1α was down-regulated with bufalin treatment

3 讨论

蟾蜍灵对肿瘤细胞的增殖抑制作用在肝癌、肺癌、乳腺癌、胃癌、卵巢癌及白血病等多种肿瘤中均有报道, 主要通过阻滞细胞周期^[15-16]、干扰或激活MRPKs家族主要通路^[17]、下调TS蛋白、降低拓扑异构酶II水平及活性等机制抑制肿瘤细胞增殖^[18]。本研究中首次发现蟾蜍灵可以通过抑制宫颈癌细胞糖代谢从而抑制细胞增殖。

肿瘤细胞中异常高表达的C-MYC和HIF1α在糖酵解中起到至关重要的作用^[19]。目前研究发现, C-MYC和HIF1α是主要的促进糖酵解的转录因子^[12-14]。C-MYC能够通过上调GLUT1

等葡萄糖转运体的表达, 促进肿瘤细胞主动摄取葡萄糖^[20]。Liu等^[21]研究发现, 应用GLUT1的抑制剂WZB117在体内外均可以明显抑制肺癌和乳腺癌细胞增殖。既往一些临床前期研究表明, 抑制HIF1α活性对肿瘤的生长抑制有显著效果^[22]。HIF1α可调控一系列靶基因如葡萄糖转运因子GLUT1、GLUT3, 糖酵解酶LDHA、HK等的转录, 与肿瘤糖代谢及增殖密切相关^[23]。C-MYC和HIF1α两者可协同激活HK2, 而HK2可通过磷酸化将细胞内的葡萄糖转化为葡萄糖-6-磷酸, 后者不是葡萄糖转运体的底物, 因而使葡萄糖在肿瘤细胞内的保留增加, 进而促进Warburg效应^[20, 24]。

在本研究中, CCK8法结果显示, 蟾蜍灵能够明显抑制宫颈癌细胞ME180和C33A增殖; 糖

代谢检测发现, 经蟾蜍灵处理后, 宫颈癌细胞的葡萄糖摄取水平明显降低; 而qRT-PCR结果显示, 分别与细胞主动摄取葡萄糖以及增加葡萄糖保留直接相关的GLUT1和HK2表达水平, 蟾蜍灵处理组明显低于对照组; Western blot结果表明, 蟾蜍灵能够降低细胞内糖酵解的主要转录因子C-MYC和HIF1 α 的表达水平, 进而影响下游与糖酵解相关的葡萄糖转运蛋白以及关键酶的表达或激活。糖酵解的抑制使得细胞快速增殖所需的能量不足和物质合成受阻, 最终达到抑制宫颈癌细胞增殖的目的。

综上所述, 本研究发现蟾蜍灵能够抑制宫颈癌细胞ME180和C33A增殖, 其机制可能是通过下调转录因子C-MYC和HIF1 α 的表达, 降低葡萄糖转运体GLUT1表达和己糖激酶HK2的激活, 进而降低了细胞的糖酵解水平, 最终达到抑制其增殖的目的, 蟾蜍灵是否在体内研究中也具有类似的作用, 还需进一步研究探索。

【参 考 文 献】

- [1] MOUNTZIOS G, SOULTATI A, PECTASIDES D, et al. Developments in the systemic treatment of metastatic cervical cancer [J] . *Cancer Treat Rev*, 2013, 39(5): 430-443.
- [2] WANG S J, ZHENG C J, PENG C, et al. Plants and cervical cancer: an overview [J] . *Expert Opin Investig Drugs*, 2013, 22(9): 1133-1156.
- [3] HANAHAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation [J] . *Cell*, 2011, 144(5): 646-674.
- [4] HAN J, ZHANG L, GUO H, et al. Glucose promotes cell proliferation, glucose uptake and invasion in endometrial cancer cells via AMPK/mTOR/S6 and MAPK signaling [J] . *Gynecol Oncol*, 2015, 138(3): 668-675.
- [5] KROEMER G, POUYSSEGUR J. Tumor cell metabolism: cancer's achilles' heel [J] . *Cancer Cell*, 2008, 13(6): 472-482.
- [6] CHEN Z, LU W, GARCIA-PRIETO C, et al. The Warburg effect and its cancer therapeutic implications [J] . *J Bioenerg Biomembr*, 2007, 39(3): 267-274.
- [7] KNOUZY B, DUBOURG L, BAVEREL G, et al. Ifosfamide metabolite chloroacetaldehyde inhibits cell proliferation and glucose metabolism without decreasing cellular ATP content in human breast cancer cells MCF-7 [J] . *J App Toxicol*, 2010, 30(3): 204-211.
- [8] WU S, HSIAO Y, CHEN J, et al. Bufalin alters gene expressions associated DNA damage, cell cycle, and apoptosis in human lung cancer NCI-H460 cells *in vitro* [J] . *Molecules*, 2014, 19(5): 6047-6057.
- [9] WANG D, BI Z. Bufalin inhibited the growth of human osteosarcoma MG-63 cells via down-regulation of Bcl-2/Bax and triggering of the mitochondrial pathway [J] . *Tumor Biology*, 2014, 35(5): 4885-4890.
- [10] TIAN X, YIN H, ZHANG S, et al. Bufalin loaded biotinylated chitosan nanoparticles: An efficient drug delivery system for targeted chemotherapy against breast carcinoma [J] . *Eur J Pharm Biopharm*, 2014, 87(3): 445-453.
- [11] TAKAI N, UEDA T, NISHIDA M, et al. Bufalin induces growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human endometrial and ovarian cancer cells [J] . *Int J Mol Med*, 2008, 21(5): 637-643.
- [12] DANG C V, LE A, GAO P. MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities [J] . *Clin Cancer Res*, 2009, 15(21): 6479-6483.
- [13] FINLEY L W, CARRACEDO A, LEE J, et al. SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1alpha destabilization [J] . *Cancer Cell*, 2011, 19(3): 416-428.
- [14] DANG C V. MYC on the path to cancer [J] . *Cell*, 2012, 149(1): 22-35.
- [15] 孟晓燕, 方凡夫, 顾 伟. 蟾毒灵对人肝癌多药耐药BEL-7402/5-FU细胞增殖活性的影响 [J] . *山东医药*, 2009, 49(5): 37-39.
- [16] 顾 伟, 韩克起, 苏永华, 等. 蟾毒灵对人肝癌BEL-7402细胞增殖的影响 [J] . *中西医结合肝病杂志*, 2006, 16(1): 16-17.
- [17] 杨 蕾, 闫 红, 董国凤, 等. MAPK信号通路对蟾蜍灵抑制Jurkat细胞增殖及诱导其凋亡的影响 [J] . *实用药物与临床*, 2014, 17(9): 1092-1095.
- [18] 宋长城, 吕 祥. 蟾毒灵抗肿瘤作用及其分子机制研究进展 [J] . *现代肿瘤医学*, 2010, 18(9): 1863-1866.
- [19] ZHANG H, GAO P, FUKUDA R, et al. HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity [J] . *Cancer Cell*, 2007, 11(5): 407-420.
- [20] YOON S O, JEON T J, PARK J S, et al. Analysis of the roles of glucose transporter 1 and hexokinase 2 in the metabolism of glucose by extrahepatic bile duct cancer cells [J] . *Clin Nucl Med*, 2015, 40(3): e178-e182.
- [21] LIU Y, CAO Y, ZHANG W, et al. A small-molecule inhibitor of glucose transporter 1 downregulates glycolysis, induces cell-cycle arrest, and inhibits cancer cell growth *in vitro* and *in vivo* [J] . *Mol Cancer Ther*, 2012, 11(8): 1672-1682.
- [22] GORDAN J D, THOMPSON C B, SIMON M C. HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation [J] . *Cancer Cell*, 2007, 12(2): 108-113.
- [23] MARIN-HERNANDEZ A, GALLARDO-PEREZ J C, RALPH S J, et al. HIF-1alpha modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms [J] . *Mini Rev Med Chem*, 2009, 9(9): 1084-1101.
- [24] ZHANG T B, ZHAO Y, TONG Z X, et al. Inhibition of glucose-transporter 1 (GLUT-1) expression reversed Warburg effect in gastric cancer cell MKN45 [J] . *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(2): 2423-2428.

(收稿日期: 2015-03-25 修回日期: 2015-05-19)