

# 丙戊酸钠联合全反式维甲酸促进子宫颈癌细胞衰老的发生

尤青叶<sup>1</sup>, 冯定庆<sup>2</sup>, 凌 斌<sup>1,3</sup>, 张红丽<sup>1</sup>, 李 兵<sup>1</sup>, 伍娇娇<sup>1</sup>, 赵婷婷<sup>1</sup>

**摘要** 目的 研究丙戊酸钠(VPA)联合全反式维甲酸(ATRA)诱导子宫颈癌细胞衰老作用,并探讨其分子机制。方法

实验分为对照组、VPA组、ATRA组、VPA+ATRA组,采用3 mmol/L VPA、1 μmol/L ATRA单独或联合作用于人子宫颈癌HeLa及SiHa细胞,对照组仅加溶媒;采用CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous法检测细胞增殖;β-半乳糖苷酶化学染色法检测细胞衰老;Q-PCR和Western blot法分别检测衰老相关基因P16、P63、hTERT的mRNA和蛋白表达变化。结果 VPA对HeLa及SiHa细胞均有生长抑制作用,与ATRA联合抑制效果明显优于单独用药( $P < 0.05$ );β-半乳糖苷酶染色显示,VPA+ATRA组衰老细胞比例显著增加,与对照组及VPA组、ATRA组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );Q-PCR和Western blot法结果显示,VPA单独和联合ATRA可上调P16、P63的表达,降低hTERT的表达,且联合用药优于单独用药及对照组( $P < 0.05$ )。结论 VPA联合ATRA可抑制子宫颈癌细胞增殖,上调P16和P63的表达,下调hTERT的表达,可能是其诱导细胞衰老的分子机制。

**关键词** 子宫颈癌;丙戊酸;维甲酸;细胞衰老

中图分类号 R 737.33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)02-0135-05

近年来子宫颈癌的发病率有明显上升和年轻化趋势,发病率以每年2%~3%的速度增长<sup>[1]</sup>。早期

子宫颈癌患者可采用手术治疗,而晚期患者主要以铂类化疗为主,但毒副作用大,患者易对其产生耐药性,患者生存率大大降低<sup>[2-3]</sup>。丙戊酸钠(valproate acid,VPA)是一种传统的抗癫痫药物,同时也是一种组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase,HDAC)抑制剂,高效、安全、低毒、可口服的特点使其极具临床前景。全反式维甲酸(all-trans retinoic acid,ATRA)是维生素A的生物活性代谢产物,与其受体结合,具有促进上皮细胞分化成熟的作用,已作为一种诱导分化剂用于临床肿瘤的治疗。研究<sup>[4-5]</sup>证实VPA联合ATRA可使子宫颈癌细胞发生细胞周期阻滞,并诱导细胞分化,但细胞凋亡增加不明显。该研究进一步分析VPA联合ATRA的抗子宫颈癌作用,观察其对细胞衰老的影响并探讨其可能的分子机制,为寻求新的子宫颈癌治疗方法提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂** VPA购自杭州赛诺菲安万特民生制药有限公司,用PBS稀释成600 mmol/L的储存液,-20℃保存;ATRA购自美国Sigma公司,用DMSO稀释成833 mmol/L的储存液,-20℃保存;CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous购自美国Promega公司;TRIzol购自美国Invitrogen公司;PCR试剂盒购自日本TaKaRa公司;引物由上海生工生物工程有限公司合成;P16、P63、hTERT抗体购自英国Abcam公司;相应蛋白的辣根酶标记二抗均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;DMEM培养基购自美国GIBCO公司;新生小牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;ECL-增强化学发光检测试剂购自瑞士罗氏公司;BIORAD化

2014-11-03 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81372777、81372779、81072127)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院<sup>1</sup> 妇产科、<sup>2</sup> 分子医学重点实验室,合肥 230001

<sup>3</sup> 卫生部中日友好医院妇产科,北京 100086

作者简介:尤青叶,女,硕士研究生;

凌 斌,男,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:lingbin.ling@gmail.com

**Results** The results showed that the recombinant lentiviral vector GV248-GFP-Puro-shSIGIRR was successfully constructed. qRT-PCR and Western blot confirmed that SIGIRR was knockdown in HKC cells. Moreover, the results also showed that compared with the control cells, the phosphorylated NF-κB (p65) and the mRNA levels of MCP-1 and RANTES were significantly increased in HKC/shSIGIRR cells by being stimulated with IL-1β. **Conclusion** The results suggest that SIGIRR acts as a “brake” of inflammatory reaction in Toll-like receptor/IL-1 receptor (TLR/IL-1R) pathway in HKC cells. The study may provide a potential new target for the treatment of Lupus nephritis.

**Key words** lupus nephritis; human renal tubular epithelial cells; SIGRR; lentiviral vector; NF-κB; chemokine

学发光仪购自美国 BIO-RAD 公司。

**1.2 细胞培养及分组** 人子宫颈癌细胞株 HeLa 与 SiHa 购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。细胞培养于含有 10% 小牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素的 DMEM 培养基中,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱孵育 48 h 换液 1 次,取对数生长期细胞进行实验。实验分为对照组、VPA 组、ATRA 组、VPA + ATRA 组。各组药物终浓度为 VPA 3 mmol/L、ATRA 1 μmol/L。观察 48 h。

**1.3 CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous 法检测细胞增殖** 取对数生长期的 HeLa 及 SiHa 细胞经胰酶消化制成细胞悬液,以 1 500 个/孔的密度接种于 96 孔板,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h 后,各用药组分别加入相应的药物,对照组仅加溶媒,每组设 3 个复孔。分别于 24、48、72、96 h 加 CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous 工作液,1 h 后酶标仪 490 nm 波长处检测各孔吸光度(optical density, OD) 值。生长抑制率(%) = (用药组 OD 值 - 对照组 OD 值) / 对照组 OD 值 × 100%。实验重复 3 次。

**1.4 β-半乳糖苷酶染色法检测细胞衰老** 取对数生长期细胞,制成单细胞混悬液,以 1 × 10<sup>6</sup> 个/ml 的密度接种于 6 孔板,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h 后,各用药组分别加入相应的药物,对照组用溶媒处理。孵育 48 h 后吸除培养液,PBS 洗涤 2 次,加入 1 ml β-半乳糖苷酶染色固定液,室温固定 15 min 后吸除固定液,PBS 洗涤 3 次,加入 1 ml 染色工作液,37 °C 孵育过夜,第 2 天取出用 PBS 洗涤,再加 1 次 PBS 保留,显微镜下观察并拍照。衰老指数(%) = (阳性细胞数 / 总细胞数) × 100%。

**1.5 Q-PCR 法检测 P16、P63、hTERT mRNA 的表达** 收集细胞加入 TRIzol 提取总 RNA,按照 Prime-Script<sup>®</sup> RT 操作说明配制逆转录反应体系,逆转录合成 cDNA。P16、P63、hTERT 引物序列及扩增产物大小见表 1(PCR 引物序列检测的 P63 为 TAP63 亚型)。按照 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> 试剂盒说明设置反应体系及参数,进行荧光定量 PCR 的检测,按照 2<sup>-ΔCt</sup> 即 2<sup>-(目的基因Ct - 管家基因Ct)</sup> 计算各基因的相对表达量。实验重复 3 次,结果取平均值。

**1.6 Western blot 法检测子宫颈癌细胞株中 P16、P63、hTERT 的表达** 收集细胞加入 RIPA 裂解细胞,提取总蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度。分别配制 6% 和 8% 的 SDS-PAGE 电泳凝胶,恒压电泳分离;半干法恒压 15 V 转膜 30 min;4 °C 摇床上封闭

表 1 RT-PCR 引物序列

基因	引物序列	扩增长度(bp)
P16	F: 5'-TGAGAAACCTCGGAAACTTAG-3' R: 5'-AAAAGCCAGAAGCGGTGT-3'	236
P63	F: 5'-ATTCTCCTCCCTTCTCATCTC-3' R: 5'-AATCGCACAGCATCAATAACAC-3'	105
hTERT	F: 5'-CGTTTGGTGGATGATTTCTTGT-3' R: 5'-GCGGTGAAGGTGAGACTG-3'	105
GAPDH	F: 5'-GGACCTGACCTGCCCTCTAG-3' R: 5'-TAGCCAGGATGCCCTTGAG-3'	99

过夜。加入一抗 P16(1 : 1 000)、P63(1 : 500)、hTERT(1 : 1 000) 和内参照 GAPDH 抗体(1 : 2 000) 4 °C 孵育过夜;分别加入相应的二抗(1 : 1 000),室温孵育 2 h,ECL-增强化学发光检测试剂显色,BIORAD 化学发光仪进行检测。

**1.7 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 *t* 检验。

## 2 结果

**2.1 VPA 联合 ATRA 抑制子宫颈癌细胞增殖** CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous 法检测结果显示 VPA 和 ATRA 对 HeLa、SiHa 细胞均有增殖抑制作用,两药联合则具有协同/相加的作用,与 VPA 组、ATRA 组及对照组比较差异均有统计学意义(*P* < 0.05),见图 1。

**2.2 VPA 联合 ATRA 促进 HeLa、SiHa 细胞衰老** β-半乳糖苷酶染色结果显示,对照组 HeLa 细胞 β-半乳糖苷酶阳性率为 (5.3 ± 1.61)%, SiHa 细胞为 (3.6 ± 1.56)%; VPA + ATRA 组衰老指数显著增加,其中 HeLa 细胞为 (27.5 ± 4.46)%, SiHa 细胞为 (35.33 ± 4.55)%,与其他各组比较差异均有统计学意义(*F* = 106.7, *P* < 0.05)。提示 VPA 联合 ATRA 能够显著促进子宫颈癌细胞的衰老,见图 2。

**2.3 衰老相关基因 mRNA 的表达变化** Q-PCR 法检测结果显示 HeLa、SiHa 细胞经药物处理 48 h 后,与对照组比较,VPA 可上调 P16、P63 的 mRNA 表达水平(*F* = 39.51, *P* < 0.05);与对照组比较,VPA + ATRA 组 SiHa 细胞中 P16 的表达水平上调(*P* < 0.05),HeLa 细胞中 P16、P63 表达水平和 SiHa 细胞中 P63 表达水平显著上调(*P* < 0.01);VPA + ATRA 组与 VPA 组、ATRA 组比较,差异有统计学意义(*P* < 0.01),但 SiHa 细胞中 P16 表达水平 VPA + ATRA 组与 VPA 组、ATRA 组比较差异无统计学意义。与

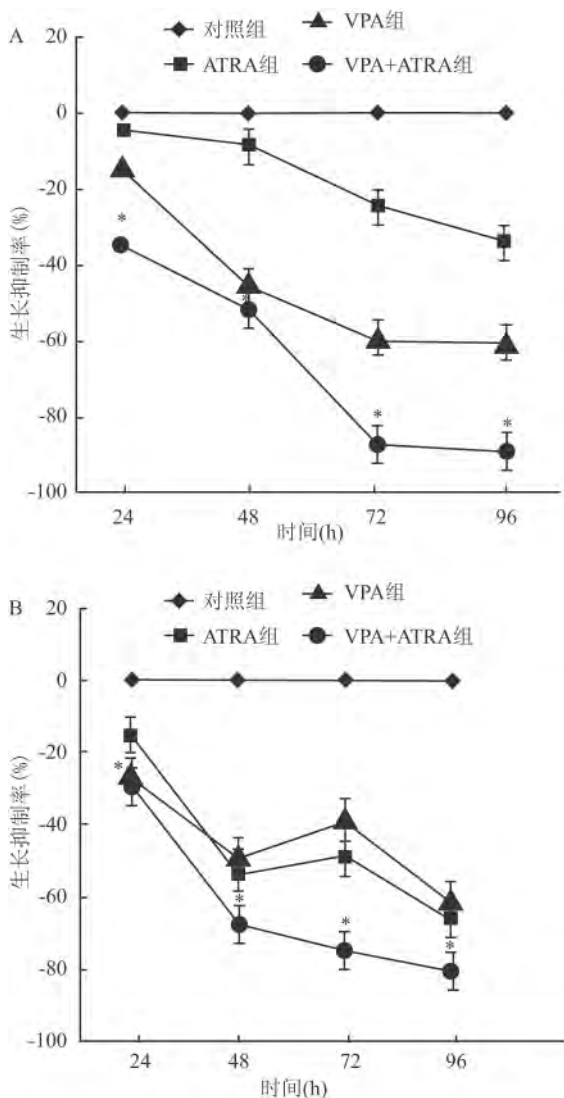


图1 VPA联合ATRA对HeLa、SiHa细胞增殖的影响  
A: HeLa细胞; B: SiHa细胞; 与其余3组比较: \*  $P < 0.05$

对照组比较, HeLa、SiHa细胞中VPA组和VPA + ATRA组均能降低hTERT mRNA表达水平 ( $P < 0.05$ ); VPA + ATRA组强于VPA组、ATRA组 ( $P < 0.01$ )。见图3。

2.4 P16、P63及hTERT的蛋白表达水平变化与各基因mRNA表达变化一致, HeLa、SiHa细胞经VPA单独和联合ATRA处理后, P16、P63的蛋白表达水平明显升高, 而hTERT的蛋白表达水平显著降低, VPA + ATRA组与对照组及VPA组、ATRA组比较差异均有统计学意义 ( $F = 40.56, P < 0.05$ )。见图4。

### 3 讨论

在多种肿瘤中存在的结构或表达异常、组蛋白乙酰化水平异常, 从而导致了特定抑癌基因的表达抑制。研究<sup>[6]</sup>显示HDAC抑制剂能够与HDAC特异性结合并抑制其活性, 促进组蛋白的乙酰化修饰, 上调相关抑癌基因的表达, 在多种肿瘤中显示了抗肿瘤作用。HDAC抑制剂可能通过多种途径起到抗肿瘤作用, 包括调控多种细胞凋亡途径及凋亡相关蛋白的表达及其稳定性, 诱导肿瘤细胞生长停滞、分化或细胞凋亡<sup>[7]</sup>, 也可能抑制肿瘤血管的生成, 影响肿瘤细胞的侵袭和转移<sup>[8]</sup>。除了内在的抗肿瘤活性, HDAC抑制剂还可增加对传统的细胞毒性药物和肿瘤细胞放射的敏感性。研究<sup>[4-5]</sup>表明, VPA是一种HDAC抑制剂, 联合ATRA可通过诱导细胞分化而发挥抗宫颈癌作用。本研究显示VPA与ATRA联合用药可促进宫颈癌细胞衰老。

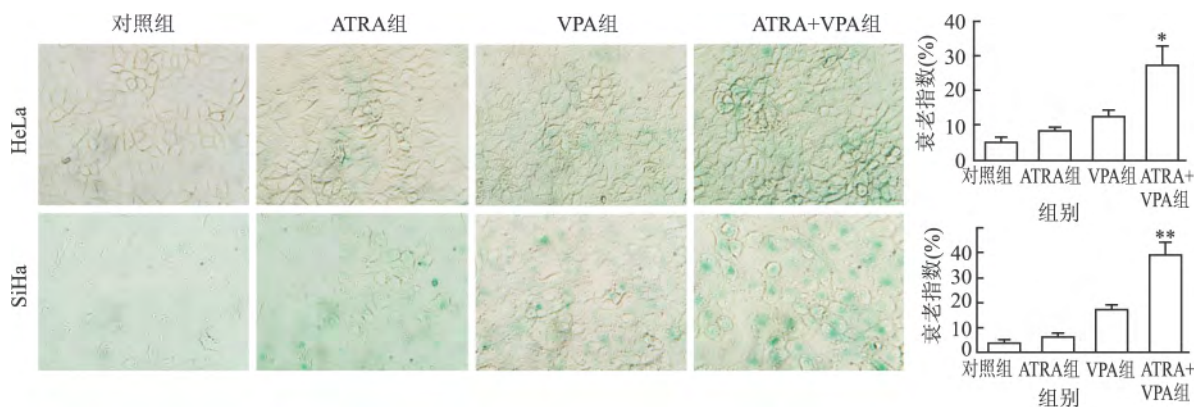


图2 VPA联合ATRA处理HeLa、SiHa细胞48h的β-半乳糖苷酶染色结果 SP × 400  
与相应细胞对照组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

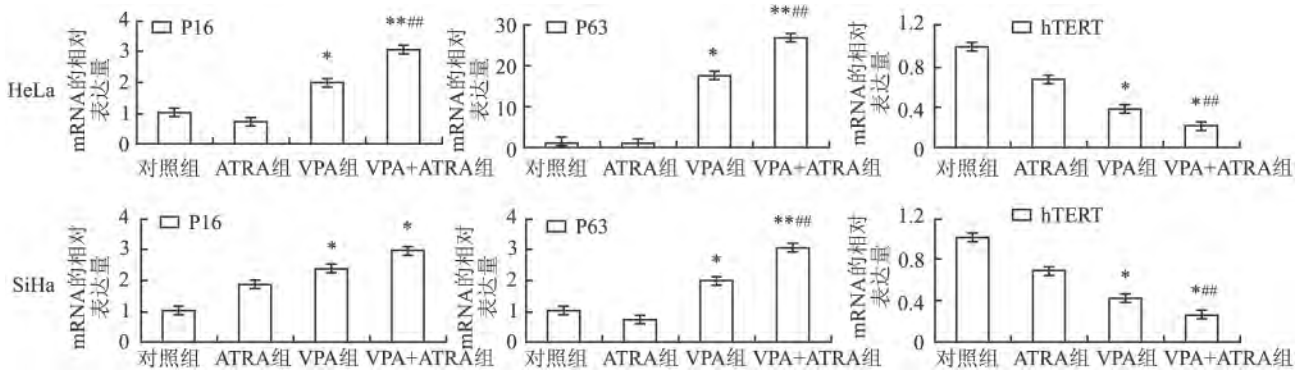


图3 VPA联合ATRA作用HeLa、SiHa细胞后P16、P63和hTERT mRNA的表达变化  
与相应细胞对照组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与相应细胞ATRA、VPA组比较: #  $P < 0.01$

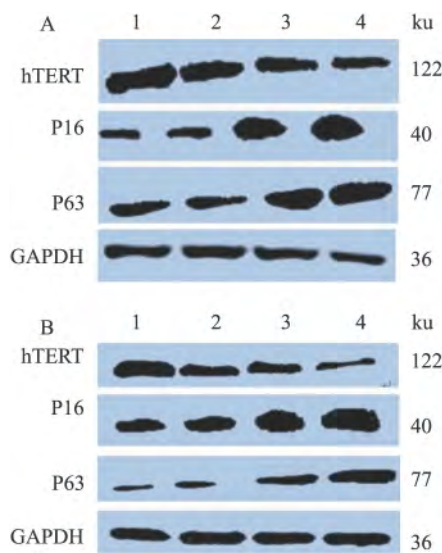


图4 VPA联合ATRA作用HeLa、SiHa细胞后P16、P63、hTERT蛋白的表达变化

A: HeLa细胞; B: SiHa细胞; 1: 对照组; 2: ATRA组; 3: VPA组; 4: ATRA + VPA组

既往研究<sup>[9]</sup>显示,VPA联合ATRA可调控多种基因表达,包括多种抑癌基因。本研究显示两药联合上调P16和P63的表达。P16是目前已经明确的一种重要的抑癌基因,其主要通过p16-cyclinD/CDK-RB途径对细胞周期进行调控。研究<sup>[10]</sup>显示细胞发生衰老时,P16表达明显升高,当年轻的细胞中导入P16基因细胞可出现衰老表型,提示P16是细胞寿命的关键调控基因之一。Duan et al<sup>[11]</sup>以P16正反义载体分别转染年轻的人成纤维细胞,发现P16过表达抑制了RB磷酸化而引起细胞早衰而其反义载体转染可以延缓细胞衰老。说明P16的积累不是衰老的结果而是衰老的诱因。P63是近几年来新发现的P53蛋白家族成员,其在上皮细胞发

育基因中两个不同的启动子,将其翻译产物分为两种亚型,即反式激活域完整的TAP63和反式激活域N端截短的 $\Delta$ NP63。TAP63转录激活(TA)结构域与P53的TA结构域具有同源性,可以激活P53的下游基因,具有与P53相似的抑制肿瘤细胞生长,诱导细胞周期停滞和细胞凋亡的作用。Truong et al<sup>[12]</sup>认为TAP63具有促进肿瘤细胞衰老的作用。目前研究<sup>[13]</sup>表明,HDAC抑制剂所诱导的细胞衰老部分是由P63介导的,这可能与不同细胞系特性和不同类型HDAC抑制剂作用的差别有关。

肿瘤细胞发生衰老是由很多因素参与在内的。hTERT是人类端粒酶蛋白的催化亚单位,其表达水平与细胞衰老密切相关。本研究显示VPA联合ATRA诱导衰老的宫颈癌细胞中hTERT表达水平显著降低。hTERT能激活端粒酶,端粒酶是细胞中负责端粒延长的一种酶,其能延长缩短的端粒,当端粒酶合成端粒难以弥补缩短的端粒时,端粒将进行性缩短,从而诱导体内细胞衰老。有研究<sup>[14]</sup>提示hTERT在肿瘤细胞、干细胞等永生化细胞中的表达水平很高,防止细胞因端粒缩短而发生细胞衰老、凋亡。由此可见,端粒、端粒酶在细胞衰老和肿瘤的发生中具有重要的作用,有可能成为肿瘤诊断的重要指标,同时,也可能成为肿瘤治疗的新靶点。

参考文献

[1] 莫小亮,罗殿中. 2012年美国宫颈癌筛查新指南解读[J]. 肿瘤防治研究 2014, 41(2): 188-92.  
[2] Klopp A H, Eifel P J. Chemoradiotherapy for cervical cancer in 2010 [J]. Curr Oncol Rep 2011, 13(1): 77-85.  
[3] Tewari K S, Monk B J. Recent achievements and future developments in advanced and recurrent cervical cancer: trials of the Gynecologic Oncology Group [J]. Semin Oncol 2009, 36(2): 170-80.

- [4] Feng D ,Cao Z ,Li C , et al. Combination of valproic acid and ATRA restores RAR $\beta$ 2 expression and induces differentiation in cervical cancer through the PI3K/Akt pathway [J]. *Curr Mol Med* , 2012 ,12( 3) : 342 – 54.
- [5] Feng D ,Wu J ,Tian Y , et al. Targeting of histone deacetylases to reactivate tumour suppressor genes and its therapeutic potential in a human cervical cancer xenograft model [J]. *PLoS One* 2013 8 ( 11) : e80657.
- [6] Tassara M ,Döhner K ,Brossart P , et al. Valproic acid in combination with all-*trans* retinoic acid and intensive therapy for acute myeloid leukemia in older patients [J]. *Blood* ,2014 ,123( 26) : 4027 – 36.
- [7] Gan C P ,Hamid S ,Hor S Y , et al. Valproic acid: growth inhibition of head and neck cancer by induction of terminal differentiation and senescence [J]. *Head Neck* 2012 34( 3) :344 – 53.
- [8] Sakajiri S ,Kumagai T ,Kawamata N , et al. Histone deacetylase inhibitors profoundly decrease proliferation of human lymphoid cancer cell lines [J]. *Exp Hematol* 2005 33( 1) :53 – 61.
- [9] Trus M R ,Yang L ,Suarez Saiz F , et al. The histone deacetylase inhibitor valproic acid alters sensitivity towards all *trans* retinoic acid in acute myeloblastic leukemia cells [ J]. *Leukemia* ,2005 , 19( 7) : 1161 – 8.
- [10] Min E Y ,Kim I H ,Lee J , et al. The effects of fucodan on senescence are controlled by the p16INK4a-pRb and p14Arf-p53 pathways in hepatocellular carcinoma and hepatic cell lines [J] . *Int J Oncol* 2014 45( 1) : 47 – 56.
- [11] Duan J ,Zhang Z ,Tong T. Senescence delay of human diploid fibroblast induced by anti-sense p16INK4a expression [J]. *J Biol Chem* 2001 276( 51) :48325 – 31.
- [12] Truong A B ,Khavari P A. Control of keratinocyte proliferation and differentiation by P63 [J]. *Cell Cycle* 2007 6( 3) :295 – 9.
- [13] 曹振平 ,冯定庆 ,徐嵘嵘. 丙戊酸钠联合全反式维甲酸对 HeLa 细胞的杀伤机制研究[J]. *肿瘤* 2010 30( 10) : 827 – 32.
- [14] 李 敏 ,周 颖 ,凌 斌. 端粒及端粒酶活性的调控机制[J]. *医学分子生物学杂志* 2010 7( 2) : 176 – 9.

## Studies on promoting cellular senescence by VPA combined with ATRA in cervical cancer cells

You Qingye<sup>1</sup> ,Feng Dingqing<sup>2</sup> ,Ling Bin<sup>1 3</sup> , et al

(<sup>1</sup>Dept of Obstetrics and Gynecology ,<sup>2</sup>Key Laboratory of Molecular Medicine ,  
The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University Hefei 230001;

<sup>3</sup>Dept of Obstetrics and Gynecology of China-Japan Friendship Hospital Beijing 100086)

**Abstract Objective** To study valproate acid( VPA) combined with all-*trans* retinoic acid( ATRA) induced cervical cancer cells senescence ,and explore its mechanism. **Methods** The experiment is divided into the control group ,the VPA group ,ATRA and VPA + ATRA groups. HeLa and SiHa cells were treated with combined use of 3 mmol/L VPA ,1  $\mu$ mol/L ATRA or respectively. The control group was treated with vehicle only. Using CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous cell proliferation assay to detect the inhibitory rate of proliferation. Apply  $\beta$ -galactosidase staining method to observe the senescence. The mRNA expressions of P16 ,P63 and hTERT were detected using Q-PCR and its protein expressions were determined using Western blot. **Results** The proliferation of HeLa and SiHa cells were significantly inhibited by VPA. The effect of VPA combined with ATRA was stronger than individual treatment (  $P < 0.05$  ).  $\beta$ -galactosidase staining showed that  $\beta$ -galactosidase staining rate was up-regulated after VPA combined with ATRA in cervical cancer HeLa and SiHa cells ,the difference was significant compared with control group and individual group (  $P < 0.05$  ). Q-PCR and Western blot showed that VPA enhanced the mRNA and protein expression of P16 ,P63 and reduced the expression of hTERT. The efficacy was more powerful in combination therapy group (  $P < 0.05$  ). **Conclusion** VPA combined with ATRA can inhibit the growth of cervical cancer cell lines. The effect of inducing cervical cancer cells senescence may be related with up-regulation of P16 ,P63 and down-regulation of hTERT.

**Key words** cervical cancer; valproic acid; tretinoin; cell senescence