

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.23.013

白藜芦醇通过降低 galectin-3 的表达抑制宫颈癌 SiHa 细胞的增殖并促进其凋亡 *

王 恒 李亚玲 代维栋 王 萍 李江鹏

(西安市第四医院妇产科 陕西 西安 710004)

摘要 目的: 探讨白藜芦醇对人宫颈癌 SiHa 细胞增殖和凋亡的影响及 galectin-3 在其中的作用。**方法:** 以体外培养的人宫颈癌 SiHa 细胞为研究对象, 实验分为对照组、白藜芦醇处理组及[白藜芦醇+galectin-3(5、10、20 $\mu\text{g/mL}$)]共 5 组, 分别给予生理盐水、300 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇及[300 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇+Galectin-3 (5、10、20 $\mu\text{g/mL}$)]处理。48 小时后, 分别收集各组细胞, 采用 MTT 法检测细胞的增殖情况, Caspase-3 活性试剂盒测定细胞的凋亡情况, Western Blot 技术测定细胞内 galectin-3 的蛋白表达水平。**结果:** 300 $\mu\text{mol/L}$ 的白藜芦醇明显抑制 SiHa 细胞的增殖, 并显著增加其凋亡水平, 同时减少了细胞内 galectin-3 的蛋白表达。在白藜芦醇处理的同时, 给予 5、10 及 20 $\mu\text{g/mL}$ 的 Galectin-3, 随着 Galectin-3 蛋白浓度的增加, SiHa 细胞的增殖抑制率逐渐降低, 凋亡水平也逐渐下降, 但是 VEGF-R3 受体的磷酸化水平却逐渐升高。**结论:** 白藜芦醇通过降低 galectin-3 的表达抑制宫颈癌 SiHa 细胞的增殖并促进其凋亡。

关键词: 白藜芦醇; 宫颈癌; 半乳糖凝集素 -3; 增殖; 凋亡

中图分类号: R711.74 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)23-4451-04

Resveratrol Inhibits the Proliferation and Promotes the Apoptosis of SiHa Cells by Reducing Galectin-3 Expression*

WANG Heng, LI Ya-ling, DAI Wei-dong, WANG Ping, LI Jiang-peng

(Department of Obstetrics and Gynecology, The Affiliated Guangren Hospital of Xi'an Jiaotong University College of Medicine, Xi'an, Shaanxi, 710004, China)

ABSTRACT Objective: To observe the effect of resveratrol on the proliferation and apoptosis of SiHa cells, and explore the related role of galectin. **Methods:** Human cervical cancer cell line SiHa was cultured in vitro, the experiment was divided into 5 groups as follows: control group, resveratrol and [resveratrol+galectin-3 (5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ and 20 $\mu\text{g/mL}$)]. They were given normal saline, resveratrol and [resveratrol+galectin (5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ and 20 $\mu\text{g/mL}$)], respectively. 48 hours later, the cells were collected. Cell proliferation was detected by MTT, cell apoptosis was determined by Caspase-3 activity assay kit, the galectin-3 expression was evaluated by Western Blot. **Results:** Resveratrol (300 $\mu\text{mol/L}$) obviously inhibited the proliferation of SiHa cells, significantly increased the apoptosis level, and markedly reduced galectin-3 expression. SiHa cells were given different concentrations of galectin-3 (5, 10, 20 $\mu\text{g/mL}$) along with resveratrol (300 $\mu\text{mol/L}$). With the increase of galectin-3 concentration, the proliferation of SiHa cells gradually increased and the apoptosis level of SiHa cells gradually reduced, however, the phosphorylation level of VEGF-R3 gradually increased. **Conclusion:** Resveratrol could inhibit the proliferation and promote the apoptosis of SiHa cells via reducing the galectin-3 expression.

Key words: Resveratrol; Cervical cancer; galectin-3; Proliferation; Apoptosis

Chinese Library Classification: R711.74 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)23-4451-04

前言

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一, 其发病近年来呈现年轻化趋势, 且发病率逐年上升, 严重危害女性的生命健康。因此, 宫颈癌的防治已受到学术界的广泛关注^[1]。白藜芦醇是一种具有芪类结构、非黄酮类植物性多酚, 其在葡萄及虎杖等植物中的含量较丰富。实验表明, 白藜芦醇具有多种生物学功效, 其抗肿瘤作用正日益受到关注^[2-3]。最近的研究发现, 白藜芦醇对宫颈癌具有明显的抑制作用^[4], 但其相关作用机制尚不明确。半

乳糖凝集素 -3(galectin-3)属于半乳糖凝集素家族成员, 可以通过糖识别域与细胞内糖蛋白、细胞表面分子和细胞外基质蛋白相互作用, 参与细胞增殖和凋亡等一系列生理病理过程^[5]。Balasubramanian 等研究发现^[6], galectin-3 能够促进宫颈癌的发生和发展。那么, 白藜芦醇对宫颈癌的作用是否与 galectin-3 有关呢? 本研究以体外培养的人宫颈癌 SiHa 细胞株为研究对象, 观察了白藜芦醇对其增殖和凋亡的影响及其与 galectin-3 表达的关系, 旨在深入探讨白藜芦醇抗宫颈癌的作用及机制。

1 材料和方法

* 基金项目: 陕西省科学技术研究发展计划项目(2013K12-03-22)

作者简介: 王恒(1976-), 男, 主治医师, 主要研究方向: 宫颈癌的基础与临床研究;

电话: 13259766118, E-mail: wangheng99099@126.com

(收稿日期: 2014-03-22 接受日期: 2014-04-25)

1.1 材料

人宫颈癌 SiHa 细胞由西安交通大学医学院实验医学中心提供;白藜芦醇(Sigma);RPMI 121640 培养基(Invitrogen);MTT (Amresco);DMSO (天津巴斯夫化工有限公司);Annexin V 荧光试剂盒(晶美生物技术有限公司);Caspase-3 分光光度法检测试剂盒(南京生物科技发展有限公司);Galectin-3 抗体(Santa Cruz, CA); β -actin (Abcam);Galectin-3 蛋白 (Sigma) P-VEGF-R3/VEGF-R3 抗体 (Cell Applications, Inc., Wiltshire, UK)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将人宫颈癌 SiHa 细胞培养在含有 100 mL/L 胎牛血清,10 万 U/L 青霉素、链霉素的 RPMI 1640 培养液中,于 37℃、50 mL/L CO₂ 条件下保持饱和湿度培养。实验分为对照组、白藜芦醇及白藜芦醇 +Galectin-3 (5 μ g/mL、10 μ g/mL 及 20 μ g/mL)共 5 组。细胞贴壁后,对照组加入生理盐水,实验组加入白藜芦醇及 Galectin-3,使白藜芦醇的终浓度 300 μ mol/L,Galectin-3 的终浓度为 5、10 及 20 μ g/mL。培养板在孵箱培养 48 小时。

1.2.2 MTT 法检测 SiHa 细胞的增殖情况 取处于对数生长期的 SiHa 细胞,调整细胞密度为 $(6\sim 8)\times 10^7$ /L,接种于 96 孔板中(100 μ L/孔)。同时设置空白对照组和调零孔,每个剂量设 3 个平行孔。每孔加入新鲜配置的 MTT 20 μ L(浓度为 5 g/L),继续培养 4 小时,弃去上清液,加入 DMSO 150 μ L,在平板摇床上摇 10 分钟(60/分钟)后,用酶联仪于 490 nm 处测出各孔 A 值。细胞抑制率 $=[1-(\text{实验组 A 值}/\text{对照组 A 值})]\times 100\%$ 。实验重复 3 次。

1.2.3 Caspase-3 活性检测 分别收集各组细胞,PBS 洗细胞两次,加入 50 μ L 冰冷裂解液(Lysis Buffer),冰上裂解 20 分钟,4℃,10000 r/min 离心 1 分钟,回收上清液。BCA 法测定蛋白浓度。取含 200 μ g 蛋白的细胞裂解上清液,加入 50 μ L 的 2 $\times$ 反应缓冲液(Reaction Buffer),5 μ L Caspase-3 底物(Substrate),于 37℃ 避光孵育 4 小时;用酶标仪在 405 nm 处测出各孔 A 值,然后根据标准曲线计算各组的 Caspase-3 活性。

1.2.4 Western Blot 检测 Galectin-3 及 P-VEGF-R3/VEGF-R3 蛋白表达 收集各组细胞,经裂解液裂解。以 BCA 法测定蛋白浓度,然后 50 μ g 蛋白与加样缓冲液混合,经凝胶电泳分离,再电转移到 PVDF 膜上。孵育一抗和二抗,用 ECL 发光法显色,曝光、显影、定影。以 β -actin 作为内参照。条带用薄层扫描仪扫描,再运用软件分析各条带灰度值,计算 Galectin-3 及 P-VEGF-R3/VEGF-R3 蛋白相对含量。

1.3 统计学分析

本实验所有数据用均数 $\pm$ 标准差表示,采用 SPSS16 软件分析,组间两两比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 白藜芦醇对 SiHa 细胞增殖和凋亡的影响

以人宫颈癌 SiHa 细胞作为研究对象,观察白藜芦醇对其细胞增殖和凋亡的影响。此前研究发现,200~600 μ mol/L 范围内的白藜芦醇呈浓度依赖方式影响 SiHa 细胞的生存^[21]。因此,

本研究选取该区间中的一个适宜的浓度,即 300 μ mol/L 的白藜芦醇,观察其孵育 48 小时对 SiHa 细胞增殖和凋亡的影响。结果显示,白藜芦醇能够明显抑制 SiHa 细胞的增殖 $[(29.42\pm 0.42)\% \text{ vs. } (2.03\pm 0.42)\%, P<0.01]$;同时,也能够显著地增加 SiHa 细胞的凋亡 $[(0.29\pm 0.02) \text{ nmol/h/mg protein vs. } (0.09\pm 0.02) \text{ nmol/h/mg protein}, P<0.01]$ (图 1)。这些结果提示白藜芦醇可显著抑制 SiHa 细胞的增殖,并促进其发生凋亡。

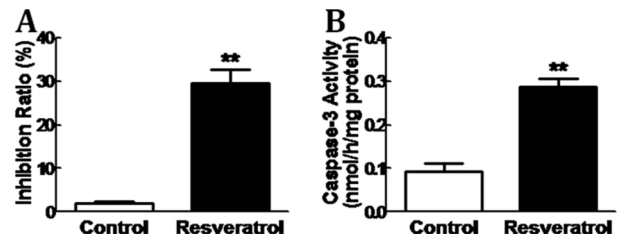


图 2 白藜芦醇对 SiHa 细胞内 galectin-3 表达的影响

注:(A) Western Blot 法检测 Galectin 及 β -actin 蛋白表达的条带;(B)

Galectin 表达的统计分析结果。** $P<0.01$ 与对照组比较。

Fig.2 Effect of resveratrol on the galectin-3 expression in SiHa cells

Note: (A) The representative Western blots images showed the expression of Galectin-3 using β -actin as loading control. (B) Intensities of Galectin-3 relative to β -actin. ** $P<0.01$ vs. Control group.

2.2 白藜芦醇对 SiHa 细胞内 galectin-3 表达的影响

Galectin-3 通过糖识别域与细胞内糖蛋白、细胞表面分子和细胞外基质蛋白相互作用,从而参与细胞增殖和凋亡等过程。有研究表明 galectin-3 能够促进宫颈癌的病理进程。那么, SiHa 细胞内 galectin-3 是否受到白藜芦醇的影响呢?因此,本研究通过 Western Blot 技术检测了白藜芦醇对 SiHa 细胞内 galectin-3 蛋白表达的影响。结果显示,300 μ mol/L 白藜芦醇孵育 48 小时后能够明显降低 SiHa 细胞内 galectin-3 蛋白的表达 $[(0.99\pm 0.06) \text{ vs. } (0.56\pm 0.04), P<0.01]$ (图 2)。这些结果提示 galectin-3 可能与白藜芦醇对 SiHa 细胞增殖和凋亡的影响有关。

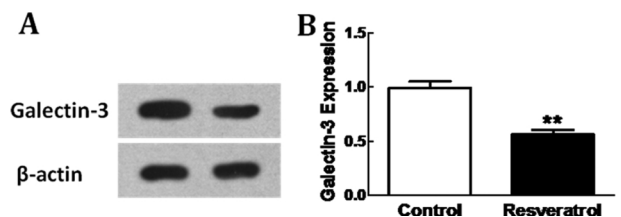


图 1 白藜芦醇对 SiHa 细胞增殖和凋亡的影响

注:(A) MTT 法检测 300 μ mol/L 白藜芦醇对 SiHa 细胞增殖的影响;

(B) Caspase-3 活性检测试剂盒测定 300 μ mol/L 白藜芦醇对 SiHa 细胞凋亡的影响。** $P<0.01$ 与对照组比较。

Fig.1 Effect of resveratrol on the proliferation and apoptosis of SiHa cells

Note: (A) The inhibitory effect of resveratrol (300 μ mol/L) on the proliferation of SiHa cells determined by MTT method; (B) The effect of resveratrol on the apoptosis of SiHa cells tested by Caspase-3 activity assay kit. ** $P<0.01$ vs. Control group.

2.3 Galectin-3 对白藜芦醇促进 SiHa 细胞增殖和抑制其凋亡作用的影响

为进一步探讨 galectin-3 对白藜芦醇促进 SiHa 细胞增殖和抑制其凋亡作用的影响,我们在给予 300 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇的同时采用不同浓度的 (5, 10, 20 $\mu\text{g/mL}$)galectin-3 处理 SiHa 细胞,48 小时后观察各组 SiHa 细胞的增殖和凋亡情况。Liu 等前期的研究发现,降低 galectin-3 表达可以抑制 SiHa 细胞的活性,而给予外源性 galectin-3 蛋白则能够通过增加 VEGF-R3 的磷酸化而增强 SiHa 细胞的活性^[2],而 VEGF-R3 受体在宫颈癌的发生发展中非常重要^[23]。我们的研究结果显示随着

Galectin-3 蛋白作用浓度的增加,SiHa 细胞的增殖抑制率逐渐降低,同时其凋亡水平也逐渐下降,相反 VEGF-R3 的磷酸化水平却逐渐升高(图 3)。这些结果与以往的研究报道是一致的,表明白藜芦醇可通过抑制 Galectin-3 的表达抑制宫颈癌 SiHa 细胞的增殖并促进其凋亡。很显然,外源性 galectin-3 弥补了白藜芦醇对 SiHa 细胞中 galectin-3 表达的限制,并激活其下游而发挥了效应,所以 galectin-3 是白藜芦醇抗宫颈癌 SiHa 细胞效应中重要的作用靶点。

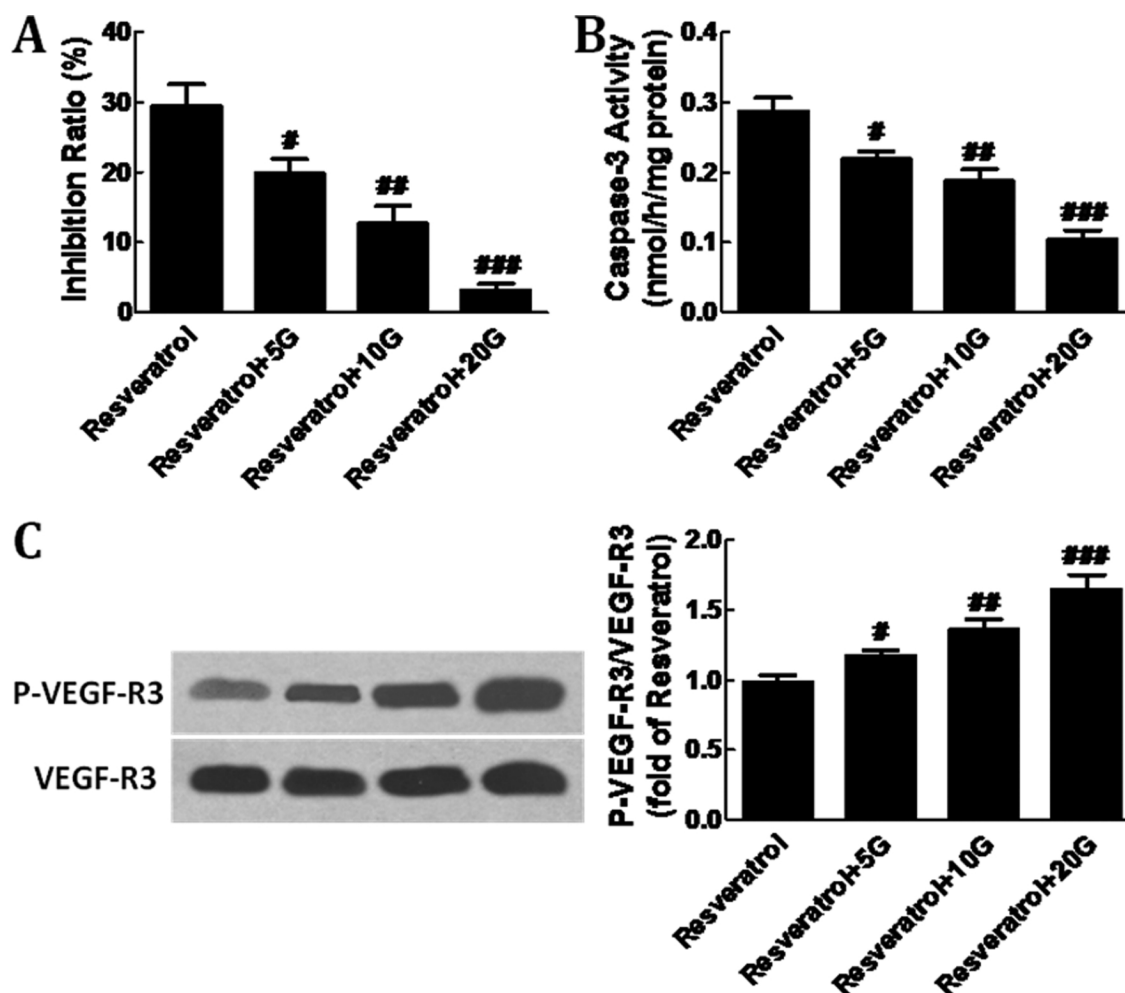


图 3 Galectin-3 对白藜芦醇促进 SiHa 细胞增殖和抑制其凋亡作用的影响

注:(A)MTT 法检测 5、10 及 20 $\mu\text{g/mL}$ 外源性 Galectin-3 对 300 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇处理的 SiHa 细胞增殖的影响;(B)Caspase-3 活性检测试剂盒测定 5、10 及 20 $\mu\text{g/mL}$ 外源性 Galectin-3 对 300 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇处理的 SiHa 细胞凋亡的影响;

(C) Western Blot 法检测 P-VEGF-R3/VEGF-R3 蛋白表达的条带及其统计分析结果。[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$,^{###} $P<0.0001$ 与白藜芦醇处理组比较。

Fig.3 Effect of galectin-3 on the resveratrol mediated promotion of proliferation and inhibition of apoptosis in SiHa cell

Note: (A)The effect of Galectin-3(5, 10 and 20 $\mu\text{g/mL}$) on the proliferation of SiHa cells treated by resveratrol (300 $\mu\text{mol/L}$) determined by MTT method;

(B) The effect of Galectin-3 (5, 10 and 20 $\mu\text{g/mL}$) on the apoptosis of SiHa cells treated by resveratrol (300 $\mu\text{mol/L}$) using Caspase-3 activity assay kit;

(C) The representative Western blots images showed the expression of P-VEGF-R3/VEGF-R3, and the intensities of P-VEGF-R3 relative to VEGF-R3.

[#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$, ^{###} $P<0.0001$ vs. Resveratrol.

3 讨论

宫颈癌是目前女性生殖系统常见的恶性肿瘤^[7,8],发生于子宫阴道部和宫颈管,发生率仅次于乳腺癌,居全球妇科肿瘤中的第二位,但宫颈癌是发展中国家排行榜首的妇科肿瘤^[9]。全世界每年约有 50 万新发宫颈癌病例, 占所有癌症新发病例的

5%,其中 80%来自发展中国家^[10]。宫颈癌多采用放疗、手术或综合治疗等方法^[11],但预后不佳,手术治疗后易发生转移复发。因此,深入研究宫颈癌的发生发展机制,寻找其有效的治疗药物,均具有深远的意义。

白藜芦醇是一种天然活性化合物, 能够降低血小板聚集, 预防、治疗动脉粥样硬化^[12,13]。大量的研究表明白藜芦醇具有抗

肿瘤活性^[14],但其作用机制尚未明确。本研究以 SiHa 细胞为研究对象,给予 300 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇处理 48 小时,结果显示 SiHa 细胞的增殖抑制,凋亡增加,这与以往的报道是一致的^[15-17],表明白藜芦醇抗宫颈癌的作用,但其机制尚需要进一步研究。

Galectin-3 属于半乳糖凝集素家族成员,可以通过糖识别域与细胞内糖蛋白、细胞表面分子和细胞外基质蛋白相互作用,参与细胞增殖和凋亡等一系列生理病理过程^[18]。Balasubramanian 等发现^[6]galectin-3 能够促进宫颈癌的发生发展,可能是宫颈癌发生和发展的关键调控因子^[19,20],其表达水平可能决定着宫颈癌的病变程度。本研究通过 Western blot 技术发现白藜芦醇处理在促进 SiHa 细胞凋亡和抑制其增殖的同时,明显降低了 SiHa 细胞内 galectin-3 的蛋白表达。进一步的实验中,我们在给予白藜芦醇的同时采用不同浓度的 galectin-3 处理 SiHa 细胞,旨在观察补充外源性 galectin-3 能否逆转一定量白藜芦醇对 SiHa 细胞增殖和凋亡的影响,以此判断二者之间是否存在因果关联。结果显示随着 galectin-3 蛋白作用浓度的增加, SiHa 细胞的增殖抑制率逐渐降低,同时其凋亡水平也逐渐下降,表明外源性的 galectin-3 能够以剂量依赖性的方式地逆转白藜芦醇对 SiHa 细胞增殖和凋亡的影响。由此可见,白藜芦醇可通过抑制 Galectin-3 的表达抑制宫颈癌 SiHa 细胞的增殖并促进其凋亡。Liu 等学者研究发现,外源性 galectin-3 能够剂量依赖性地激活 VEGF-R3 受体而发挥生物学效应。我们的实验也发现,外源性 galectin-3 蛋白能够激活 VEGF-R3 受体,并消除白藜芦醇的抗癌作用,所以 galectin-3 是白藜芦醇抗宫颈癌 SiHa 细胞效应中重要的作用靶点。本研究的结果为揭示白藜芦醇抗宫颈癌的作用提供了理论基础,但白藜芦醇具体通过何种机制调节 SiHa 细胞中 Galectin-3 的表达还有待我们进一步的研究。

参考文献(References)

- [1] Croswell J, Costello A. Screening for cervical cancer [J]. Am Fam Physician, 2012, 86 (6): 563-564
- [2] Zlotogorski A, Dayan A, Dayan D, et al. Nutraceuticals as new treatment approaches for oral cancer: II. Green tea extracts and resveratrol[J]. Oral Oncol, 2013, 49 (6): 502-506
- [3] Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, et al. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies[J]. Anticancer Res, 2004, 24 (5A): 2783-2840
- [4] Kim YS, Sull JW, Sung HJ. Suppressing effect of resveratrol on the migration and invasion of human metastatic lung and cervical cancer cells[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39 (9): 8709-8716
- [5] Funasaka T, Raz A, Nangia-Makker P. Nuclear transport of galectin-3 and its therapeutic implications [J]. Semin Cancer Biol, 2014, [Epub ahead of print]
- [6] Balasubramanian K, Vasudevamurthy R, Venkateshaiah SU, et al. Galectin-3 in urine of cancer patients: stage and tissue specificity[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2009, 135 (3): 355-363
- [7] Schiffman M, Solomon D. Clinical practice. Cervical-cancer screening with human papillomavirus and cytologic cotesting[J]. N Engl J Med, 2013, 369 (24): 2324-2331
- [8] Nogami Y, Iida M, Banno K, et al. Application of FDG-PET in cervical cancer and endometrial cancer: utility and future prospects [J]. Anticancer Res, 2014, 34 (2): 585-592
- [9] Snijders PJ, Steenbergen RD, Heideman DA, et al. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications [J]. J Pathol, 2006, 208 (2): 152-164
- [10] Valdespino VM, Valdespino VE. Cervical cancer screening: state of the art[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2006, 18 (1): 35-40
- [11] Menczer J. Patient-tailored conservative surgical treatment of invasive uterine cervical squamous cell carcinoma. A review [J]. Minerva Ginecol, 2013, 65 (4): 407-415
- [12] Chao W, Xuexin Z, Jun S, et al. Effects of resveratrol on cell growth and prolactin synthesis in GH3 cells[J]. Exp Ther Med, 2014, 7(4):923-928
- [13] Xie HC, Han HP, Chen Z, et al. A study on the effect of resveratrol on lipid metabolism in hyperlipidemic mice[J]. Afr J Tradit Complement Altern Med, 2014, 11 (1): 209-212
- [14] Zoberi I, Bradbury CM, Curry HA, et al. Radiosensitizing and anti-proliferative effects of resveratrol in two human cervical tumor cell lines[J]. Cancer Lett, 2002, 175 (2):165-173
- [15] Matic I, Zizak Z, Simonovic M, et al. Cytotoxic effect of wine polyphenolic extracts and resveratrol against human carcinoma cells and normal peripheral blood mononuclear cells[J]. J Med Food, 2010, 13 (4):851-862
- [16] Hsu KF, Wu CL, Huang SC, et al. Cathepsin L mediates resveratrol-induced autophagy and apoptotic cell death in cervical cancer cells[J]. Autophagy, 2009, 5(4): 451-460
- [17] Kramer MP, Wesierska-Gadek J. Monitoring of long-term effects of resveratrol on cell cycle progression of human HeLa cells after administration of a single dose[J]. Ann N Y Acad Sci, 2009, 1171:257-263
- [18] Song L, Tang JW, Owusu L, et al. Galectin-3 in cancer[J]. Clin Chim Acta, 2014, 431C: 185-191
- [19] Miranda FA, Hassumi MK, Guimaraes MC, et al. Galectin-3 overexpression in invasive laryngeal carcinoma, assessed by computer-assisted analysis[J]. J Histochem Cytochem, 2009, 57 (7): 665-673
- [20] Lee JW, Song SY, Choi JJ, et al. Decreased galectin-3 expression during the progression of cervical neoplasia [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2006, 132(4): 241-247
- [21] 申新, 于良, 张靖, 等. 白藜芦醇对人宫颈癌 SiHa 细胞增殖与凋亡作用的影响[J]. 第四军医大学学报, 2009, 30 (2): 145-148
Shen Xin, Yu Liang, Zhang Jing, et al. Effect of Resveratrol on proliferation and apoptosis of human cervical cancer cell line SiHa [J]. J Fourth Mil Med Univ, 2009, 30 (2): 145-148
- [22] Liu J, Cheng Y, He M, et al. Vascular endothelial growth factor C enhances cervical cancer cell invasiveness via upregulation of galectin-3 protein[J]. Gynecol Endocrinol, 2014 [Epub ahead of print]
- [23] Van Trappen PO, Steele D, Lowe DG, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D, and their receptor VEGFR-3, during different stages of cervical carcinogenesis [J]. J Pathol, 2003, 201(4): 544-554