

# NF- $\kappa$ B 抑制物对顺铂诱导宫颈癌 SiHa 细胞凋亡的影响\*

谢灵遐<sup>1</sup>, 胡丽娜<sup>2</sup>, 陈恒禧<sup>1</sup>, 彭雪<sup>1</sup>, 李金科<sup>1</sup>△

1. 四川大学华西第二医院 妇产科(成都 610041); 2. 重庆医科大学附属第二医院 妇产科(重庆 400010)

**【摘要】** 目的 了解核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)抑制物[阿司匹林、舒林酸、姜黄和二巯氨基甲酸酞吡咯烷(PDTC)]对顺铂诱导的 SiHa 细胞凋亡的影响。方法 体外培养宫颈癌 SiHa 细胞株,用前述 4 种 NF- $\kappa$ B 抑制物预处理细胞后,加入顺铂继续培养 24 h,Western blot 检测 NF- $\kappa$ B P65 的激活情况;MTT 检测细胞的相对存活率;采用原位缺口末端标记法(TUNEL)比较 4 种药物联合顺铂和单用顺铂处理 24 h 细胞的凋亡;采用 PI 染色-流式细胞术检测细胞凋亡和细胞周期的改变。结果 NF- $\kappa$ B 抑制物预处理后,再加入顺铂刺激,Western blot 结果显示可抑制顺铂诱导的 P65 表达( $P < 0.05$ );MTT 结果显示 NF- $\kappa$ B 抑制物能增加不同浓度顺铂对 SiHa 细胞的化疗毒性( $P < 0.05$ );NF- $\kappa$ B 抑制物预处理后加入顺铂,TUNEL 和流式细胞术检测细胞凋亡率均增加( $P < 0.05$ );顺铂能使 S 期细胞数增加(22.7% vs. 31.2%,  $P < 0.05$ ),而 NF- $\kappa$ B 抑制物预处理细胞则能抑制 S 期细胞的数量。结论 NF- $\kappa$ B 抑制物能增加 SiHa 细胞对顺铂化疗的敏感性,其机制可能是通过抑制小剂量顺铂对 SiHa 细胞 NF- $\kappa$ B 的激活,同时抑制小剂量顺铂对细胞 DNA 合成的诱导作用,进而增加顺铂诱导的细胞凋亡而达到的。

**【关键词】** 核转录因子- $\kappa$ B 宫颈癌 顺铂 细胞凋亡 化疗

**Effects of NF- $\kappa$ B Inhibitor on Cisplatin-induced Apoptosis in Cervical Cancer** XIE Ling-xia<sup>1</sup>, HU Li-na<sup>2</sup>, CHEN Heng-xi<sup>1</sup>, PENG Xue<sup>1</sup>, LI Jin-ke<sup>1</sup>△. 1. Department of Gynecology and Obstetrics, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Gynecology and Obstetrics, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

△ Corresponding author, E-mail: Leon-ljk@263.net

**【Abstract】** **Objective** To observe whether cisplatin-induced apoptosis were increased when SiHa cells were preincubated with nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) inhibitors [aspirin, sulindac, curcumin or pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC)]. **Methods** SiHa cells were preincubated 2 hours with aspirin, sulindac, curcumin and PDTC respectively, then a further incubation were done with cisplatin, and Western blot analysis were applied to detect P65 level of nuclear extraction. MTT assay was done to detect relative cell viability. TUNEL was applied to detect apoptosis rates. Flow cytometryies with PI staining were also used to detect apoptosis as well as cell cycle. **Results** When SiHa cells were pretreated with aspirin, sulindac, curcumin or PDTC, Western blot showed that the expression of P65 was inhibited upon cisplatin stimulus ( $P < 0.05$ ). MTT assay demonstrated that a preincubation with NF- $\kappa$ B inhibitor could significantly increase cisplatin-induced chemosensitivity ( $P < 0.05$ ). When cells pretreated with aspirin, sulindac, curcumin, or PDTC, TUNEL and flow cytometries assay showed that the apoptotic rates were all increased after 24 hours cisplatin stimulus ( $P < 0.05$ ). Results of flow cytometries were also showed that a pretreatment with aspirin, sulindac, curcumin, or PDTC could significantly increase cisplatin-induced apoptosis. **Conclusion** Aspirin, sulindac, curcumin and PDTC could all inhibit cisplatin induced NF- $\kappa$ B activation, which could increase cisplatin-induced chemosensitivity by augments of apoptosis.

**【Key words】** NF- $\kappa$ B Cervical cancer Cisplatin Apoptosis Chemotherapy

核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)是一组与细胞凋亡、生长增殖、炎症反应等密切相关的转录因子。研究显示<sup>[1]</sup>,NF- $\kappa$ B 的异常激活参与了子宫颈癌的发生机制。同时,研究发现,NF- $\kappa$ B 的异常激活可能与某些肿瘤对化、放疗不敏感的机制相关,包括头颈部肿瘤<sup>[2]</sup>、胰腺癌<sup>[3]</sup>、黑色素瘤<sup>[4]</sup>、乳腺癌<sup>[5]</sup>等。而作为

一种常用的化疗药物,顺铂的确能刺激某些细胞(包括正常细胞)的 NF- $\kappa$ B 激活<sup>[6]</sup>。因此,我们假设 NF- $\kappa$ B 的异常激活可能与宫颈癌细胞对化疗敏感性有关,如果使用药物抑制化疗药物诱导的 NF- $\kappa$ B 激活,可能增加宫颈癌细胞对化疗的敏感性。为此,本研究利用已证实<sup>[7-9]</sup>为 NF- $\kappa$ B 的抑制性药物,包括阿司匹林、姜黄、舒林酸和二巯氨基甲酸酞吡咯烷(PDTC),联合顺铂对宫颈癌细胞株 SiHa 细胞进行体外化疗,观察 SiHa 细胞对化疗敏感性的改变。

\* 中央高校基本科研业务费科研基地引导专项子课题基金  
(No. 2010SCU3003)资助

△ 通讯作者, E-mail: Leon-ljk@263.net

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

阿司匹林、姜黄、舒林酸(美国 Cayman chemical), PDTC(美国 Sigma 公司)。兔抗人多克隆抗体 NF- $\kappa$ B P65、Actin-pan(美国 Abzoom 公司, 工作浓度 1:750); 羊抗兔 IgG(美国 Santa Cruz 公司, 工作浓度 1:5000); MTT、顺铂、PI 染液(美国 Sigma 公司)。SiHa 细胞为 HPV16 阳性的人宫颈癌鳞癌细胞株, 由四川大学华西第二医院医学实验中心提供。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养及分组处理** 细胞培养于 RPMI1640 培养基 + 10% 小牛血清, 添加 100 U/mL 双抗, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养, 每 2~3 d 更换培养基。

分组处理: 实验分为对照组(SiHa 细胞未加药处理), 顺铂组(小、中、大剂量即 5、10、20  $\mu$ g/mL 作用 1 h 或 24 h)以及 NF- $\kappa$ B 抑制物预处理 2 h(终浓度分别为阿司匹林 1 mmol/L、姜黄 50  $\mu$ mol/L、舒林酸 0.5 mmol/L 和 PDTC 20  $\mu$ mol/L)再加顺铂化疗组。

**1.2.2 Western blot 检测 NF- $\kappa$ B 的激活** 按上述 1.2.1 分组处理, 其中顺铂为 5  $\mu$ g/mL 处理 1 h, 药物处理完毕后终止培养, 收集细胞进行核蛋白提取和定量。根据蛋白定量结果, 每泳道以 30  $\mu$ g 上样, SDS-PAGE 凝胶电泳, 以  $\beta$ -actin 作为内参照, 电泳后将凝胶中的蛋白转移到 PVDF 膜上, 最后经 ECL 显色, 以 P65 与  $\beta$ -actin 的光密度(OD)值的比值为相对表达量。

**1.2.3 MTT 检测细胞增殖情况** 细胞按 1.2.1 分组, 其中顺铂为: 5、10 和 20  $\mu$ g/mL, 作用 24 h。每组设置 4 个复孔。药物作用 24 h 后, 每孔加入 20  $\mu$ L 浓度为 5 mg/mL 的 MTT, 轻振培养板, 置培养箱中继续培养 4 h, 终止培养, 弃去上清液, 加入等量二甲基亚砜(DMSO), 室温震荡 10 min, 使其彻底溶解, 于酶标仪 490 nm 波长处测其吸光度(A)值, 以未加细胞的空白培养基调零, 计算细胞相对存活率。细胞相对存活率(%) = (A<sub>490</sub> 药物组/A<sub>490</sub> 对照组) × 100%。

**1.2.4 原位缺口末端标记法(TUNEL)检测细胞凋亡** 细胞 4 × 10<sup>4</sup>/孔接种于含血盖片的 12 孔板, 待细胞处于对数生长期, 更换培养基, 按 1.2.1 分组处理(顺铂 5  $\mu$ g/mL)24 h 后。预处理好的血盖片,

PBS 漂洗后, 分别滴加 50  $\mu$ L TdT 酶反应液, 50  $\mu$ L Streptavidin-HRP 工作液, DAB 工作液显色。以细胞核染成棕黄色或棕褐色者为阳性细胞。计算细胞凋亡率: 细胞凋亡率(%) = 5 个视野下的阳性细胞数/细胞总数 × 100%, 取其平均值。

**1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡和周期变化** SiHa 细胞 3 × 10<sup>5</sup>/孔接种 6 孔板, 待细胞处于对数生长期, 更换培养基, 按 1.2.1 分组处理(顺铂 5  $\mu$ g/mL), 培养 24 h 后, 终止培养。收集细胞后, 经 PI 染液染色, 流式细胞仪检测; PI 用氩离子激发荧光, 激光光波波长为 488 nm, 发射光波波长大于 630 nm, 产生红色荧光分析前散射光对侧散射光的散点图。采用计算机分析凋亡峰曲线下面积和各个细胞周期百分比取其平均值。

### 1.3 统计学方法

数据以均数( $n=4$ )表示。对连续变量的均数比较采用成组设计的  $t$  检验, 对计数资料的比较采用卡方检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 阿司匹林、姜黄、舒林酸和 PDTC 对顺铂诱导的 SiHa 细胞 NF- $\kappa$ B 激活的影响

见图 1。与对照组比较, 5  $\mu$ g/mL 顺铂刺激 1 h 后 SiHa 细胞表达 P65 增加, 表明顺铂能刺激 SiHa 细胞 NF- $\kappa$ B 的核转运; 而 4 种药物预处理后, SiHa 细胞 P65 较单独顺铂刺激的 P65 表达明显减弱 ( $P < 0.05$ ), 表明阿司匹林、姜黄、舒林酸和 PDTC 能抑制顺铂对 SiHa 细胞的 NF- $\kappa$ B 的激活。

### 2.2 MTT 检测 NF- $\kappa$ B 抑制物联合顺铂对 SiHa 细胞生长的影响

见图 2。其中, 姜黄、阿司匹林、舒林酸和 PDTC

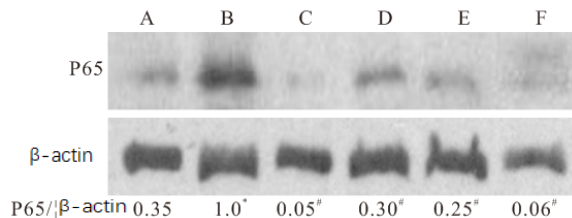


图 1 阿司匹林、姜黄、舒林酸和 PDTC 对顺铂诱导的 SiHa 细胞 NF- $\kappa$ B 激活的影响

Fig 1 Cisplatin induced NF- $\kappa$ B activation of SiHa cell pretreated with aspirin, curcumin, sulindac or PDTC

A, B, C, D, E, F: Control, cisplatin, curcumin + cisplatin, aspirin + cisplatin, sulindac + cisplatin, PDTC + cisplatin. \*  $P < 0.05$ , vs. control group; #  $P < 0.05$ , vs. cisplatin group

单独作用于 SiHa 细胞,24 h 细胞相对存活率分别为:89.9%、110.3%、108.5%和 96.7%,这一结果说明,4 种药物在此浓度下对 SiHa 细胞没有细胞毒性或者仅具有微弱的细胞毒性。而 4 种药物预处理 SiHa 细胞 2 h 后加入顺铂,能分别增加各种浓度的顺铂对 SiHa 细胞的抑制力。其中,姜黄能分别使 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  顺铂浓度下细胞相对存活率从 98.8%减少为 64.1%,使 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  顺铂浓度下细胞相对存活率从 81.3%减少为 56.3%,使 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  顺铂浓度下细胞相对存活率从 60.0%减少为 43.1%,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。说明,姜黄能够显著增加顺铂对 SiHa 细胞的生长抑制能力。

其余几种药物也或多或少的能增加顺铂的细胞毒性。以 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  顺铂组为例,10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  顺铂作用下,SiHa 细胞存活率为 81.3%,仅具有较弱的细胞毒性,但是阿司匹林、舒林酸和 PDTC 预处理后,再加入 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  顺铂 SiHa 细胞存活率则分别为 64.5%、68.1%和 72.4%,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。说明姜黄、阿司匹林、舒林酸和 PDTC 等 NF- $\kappa\text{B}$  抑制物在自身没有细胞毒性或微弱细胞毒性的浓度下,能增

加 SiHa 细胞对顺铂的化疗敏感性。

### 2.3 TUNEL 检测 NF- $\kappa\text{B}$ 抑制物对顺铂诱导 SiHa 细胞凋亡的影响

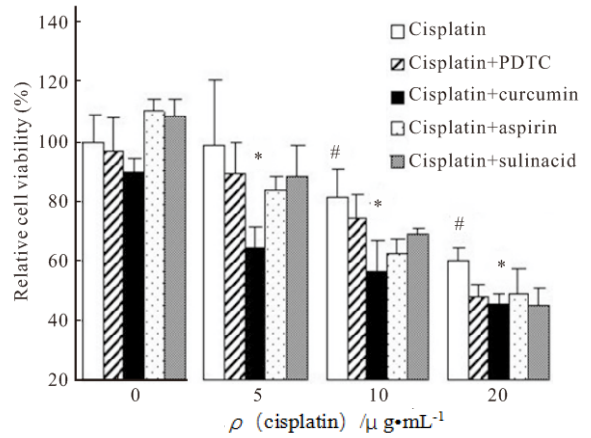


图 2 MTT 检测 NF- $\kappa\text{B}$  抑制物对顺铂化疗的增敏效果

Fig 2 MTT assay detecting relative cell viability to determine the effect of NF- $\kappa\text{B}$  inhibitor on cisplatin-induced chemosensitivity

\*  $P < 0.05$ , vs. the same drug among different cisplatin concentration groups; #  $P < 0.05$ , vs. different drugs in same cisplatin concentration

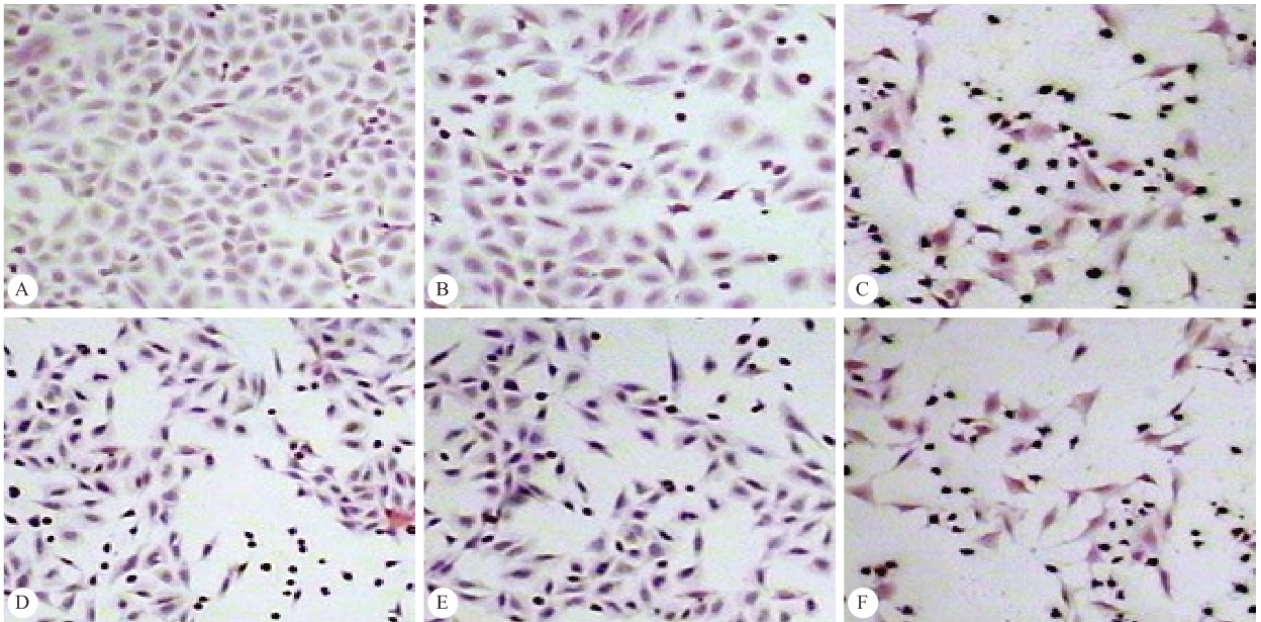


图 3 TUNEL 检测细胞 4 种药物联合顺铂诱导的凋亡。 $\times 200$

Fig 3 TUNEL to detect the 4 drugs combined with cisplatin induced cell apoptosis rates.  $\times 200$

The experiment method was described as before. The non-apoptotic cell showing long fusiform with pink or light purple nucleus and rich cytoplasm, while the apoptotic cell showing condensed dark brown nucleus with no cytoplasm. A,B,C,D,E,F: Same as Fig 1

见图 3。正常 SiHa 细胞见极少量凋亡细胞,凋亡率为 3.5%,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  顺铂处理 24 h 后细胞凋亡率增加为 8.2%,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。而姜黄、阿司匹林、舒林酸和 PDTC 预处理 2 h 后,顺铂对细胞凋亡率增加,分别达到了 35.6%、22.3%、

25.1%和 31.4%,与单用顺铂比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。表明,4 种药物通过增加顺铂诱导的细胞凋亡,从而提高 SiHa 细胞对化疗的敏感性。

### 2.4 流式细胞术检测 NF- $\kappa\text{B}$ 抑制物联合顺铂对

## SiHa 细胞凋亡和细胞周期的影响

见附表。正常 SiHa 细胞凋亡率为 11.8% (自身存在少量细胞凋亡外, 实验本身的消化、吹打离心等均可能造成部分细胞 DNA 损伤而表现凋亡)。5  $\mu$ g/mL 顺铂作用 24 h 后细胞凋亡率增加为 16.9%, 说明小剂量顺铂能增加 SiHa 细胞凋亡, 但其作用微弱; 而阿司匹林、舒林酸、姜黄和 PDTC 预处理后再用顺铂化疗, 细胞凋亡率分别增加为 24.7%、31.7%、33.8% 和 34.7%, 与单用顺铂相比差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

细胞周期分析发现, 5  $\mu$ g/mL 顺铂作用于细胞 24 h 后, S 期细胞增加, G<sub>2</sub>/M 期细胞减少, 但是, 加入 NF- $\kappa$ B 抑制物后, S 期细胞下降, DNA 合成受到抑制, 说明, NF- $\kappa$ B 抑制物可能通过抑制小剂量顺铂诱导的 SiHa 细胞 DNA 合成, 来抑制 SiHa 细胞的增殖, 从而增加顺铂的化疗效果。

附表 流式细胞术分析 NF- $\kappa$ B 抑制物联合顺铂对 SiHa 细胞凋亡和细胞周期的影响

Table Enclosed table flow cytometry to detect the function of NF- $\kappa$ B inhibitor combined with cisplatin on apoptosis as well as cell cycle

| Group              | Apoptosis rate (%) | Cell cycle (%)                 |       |                   |
|--------------------|--------------------|--------------------------------|-------|-------------------|
|                    |                    | G <sub>1</sub> /G <sub>0</sub> | S     | G <sub>2</sub> /M |
| Control            | 11.8               | 58.4                           | 22.7  | 18.9              |
| Cisplatin          | 16.9               | 61.2                           | 31.2  | 7.6               |
| Aspirin+cisplatin  | 24.7*              | 62.0                           | 18.4* | 19.6*             |
| Sulindac+cisplatin | 31.7*              | 61.2                           | 11.3* | 27.6*             |
| Curcumin+cisplatin | 33.8*              | 56.6                           | 28.9  | 14.5*             |
| PDTC+cisplatin     | 34.7*              | 61.2                           | 27.6  | 11.3              |

\*  $P < 0.05$ , vs. cisplatin group

## 3 讨论

### 3.1 顺铂诱导细胞凋亡的机制

顺铂是常用的化疗药物, 与大多数化疗药物类似, 顺铂的化疗机制主要为诱导肿瘤细胞凋亡。我们的研究发现, 无论是采用 TUNEL 方法或者流式细胞术检测细胞凋亡, 顺铂均能提高 SiHa 细胞的凋亡率, 这一结果证实了顺铂通过诱导肿瘤细胞凋亡而发挥其化疗效果。但顺铂诱导细胞凋亡的具体机制尚不完全清楚。Melendez-Zajgla 等<sup>[10]</sup> 采用免疫荧光和电镜技术发现, 与其他化疗药物类似, 顺铂也是通过损害线粒体的稳定性来诱导 HeLa 细胞凋亡。Park 等<sup>[11]</sup> 的研究也证实了这一观点, 而且, 他们进一步阐述了顺铂诱导细胞凋亡的可能机制: 首先激活的 Bax 诱导线粒体渗透性改变, 然后释放细胞色素 C 氧化酶, 激活 caspase-9, 最后进入细胞凋亡执行过程。

除了线粒体依赖的 caspase 凋亡途径, 细胞凋亡还存在非线粒体依赖的凋亡机制或者凋亡调节机制, 转录因子 NF- $\kappa$ B 即是其中之一。Kim 等<sup>[12]</sup> 研究发现, 顺铂对肝癌细胞的凋亡机制不仅涉及到线粒体依赖的 caspase 机制, 还涉及非线粒体的凋亡机制, 比如通过抑制 NF- $\kappa$ B 激活, 及降低其下游抗凋亡基因表达如 X-连锁凋亡抑制蛋白 (XIAP)、TNF 受体相关因子 (TRAF2) 等, 促进肿瘤细胞凋亡。但 Azuma 等<sup>[13]</sup> 研究发现, 顺铂诱导口腔鳞癌细胞的凋亡机制不涉及 NF- $\kappa$ B 通路, 主要还是依赖线粒体的 caspase 通路。这一结论可能由于细胞系的不同而不一致, 因此, 有关 NF- $\kappa$ B 与顺铂诱导细胞凋亡的机制尚需进一步研究。

### 3.2 NF- $\kappa$ B 抑制物增强了顺铂对宫颈癌细胞的凋亡诱导作用

细胞凋亡异常是恶性肿瘤的基本特征之一。肿瘤细胞通过激活一些抗凋亡的蛋白或信号通路来躲避凋亡, 包括 Bcl-2、NF- $\kappa$ B、Akt 等, 其中, NF- $\kappa$ B 通路的激活可能是某些炎症相关的肿瘤发病的重要机制。化疗药物虽然可以诱导细胞凋亡而达到治疗目的, 但是, 在某些肿瘤细胞, 小剂量的化疗药物可以激活这些抗凋亡的信号通路或蛋白, 从而减弱其诱导凋亡的细胞毒性<sup>[14]</sup>。如前所述, 我们的研究发现宫颈鳞癌细胞 SiHa 对小剂量顺铂并不敏感, 其原因可能是小剂量顺铂可以诱导 SiHa 细胞 NF- $\kappa$ B 通路的激活而削弱了顺铂的凋亡作用。我们先后使用了阿司匹林、舒林酸、姜黄和 PDTC 这 4 种 NF- $\kappa$ B 抑制药物, 发现抑制 NF- $\kappa$ B 的激活能增加顺铂诱导的细胞凋亡作用。

阿司匹林和舒林酸均是非甾体类抗炎药 (NASID), 临床上被广泛使用, 主要药理作用包括镇痛、退热、抗风湿等。除了这些之外, 流行病学研究还发现, 长期服用阿司匹林能降低一些炎症相关的肿瘤的发生率, 比如结肠癌、胃癌、前列腺癌等; 而服用舒林酸也能降低结肠癌发生率<sup>[15]</sup>。阿司匹林或舒林酸的这种抗肿瘤的具体原因不清楚, 除了抑制环氧酶 (COX) 和前列腺素合成外, NF- $\kappa$ B 通路可能也是其作用靶点。研究显示, 阿司匹林和舒林酸均能抑制肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 诱导的 NF- $\kappa$ B 激活, 其作用环节在 NF- $\kappa$ B 抑制蛋白 (I $\kappa$ B) 激酶 (IKK) 水平, 通过抑制 I $\kappa$ B 激酶  $\beta$  (IKK $\beta$ ) 激活, 继而阻止 I $\kappa$ B 降解和 NF- $\kappa$ B 的核转移与转录。

姜黄素是从姜科植物姜黄 *Curcuma longa* L. 的根茎中提取的药物。长期以来姜黄素被认为具有

抗炎和抗菌的作用。研究发现,姜黄具有抗癌功能,比如姜黄素能显著降低亚硝基诱导的大鼠口腔鳞癌发生率;I 期临床实验发现每天使用 8000 mg 的姜黄对人体没有毒副反应,却能预防某些癌前病变,比如预防子宫颈上皮非典型增生(CIN)、口腔白斑、表皮鲍温病、肠上皮化生等进展为癌症。还有研究发现,姜黄能显著改善某些癌症患者的临床症状<sup>[16]</sup>。可见,姜黄具有潜在的抗癌功能。姜黄抗癌的机制不清楚,研究发现<sup>[17]</sup>,姜黄素能抑制细胞因子诱导的 NF- $\kappa$ B 激活,其作用环节在 IKK 水平。因此,抑制 NF- $\kappa$ B 的激活可能是姜黄素重要的抗癌机制之一。

PDTC 是一种抗氧化剂,目前没有应用于临床。研究发现,PDTC 无论在体内、体外均能抑制脂多糖(LPS)诱导的 NF- $\kappa$ B 激活,而且相对 NASID,PDTC 对 NF- $\kappa$ B 的抑制更具有选择性<sup>[18]</sup>。

本研究发现,小剂量顺铂刺激 SiHa 细胞 1 h 能使 NF- $\kappa$ B P65 核表达增加;而使用阿司匹林(1 mmol/L)、舒林酸(0.5 mmol/L)、姜黄(50  $\mu$ mol/L)和 PDTC(20  $\mu$ mol/L)分别预处理细胞 2 h 后,顺铂能使 SiHa 细胞 NF- $\kappa$ B 的核表达减少,由此表明:这些药物能分别抑制顺铂对 SiHa 细胞 NF- $\kappa$ B 激活。

我们的研究还发现,尽管 SiHa 细胞对小剂量顺铂(5  $\mu$ g/mL)并不敏感,进一步采用 TUNEL 和流式细胞术发现,小剂量顺铂诱导的 SiHa 细胞凋亡能力微弱。但是如果用上述 NF- $\kappa$ B 抑制物分别预处理细胞后,顺铂的化疗效果显著增加,表现为细胞存活率降低,同时,顺铂诱导的细胞凋亡能力增加。我们推测其主要是由于顺铂能诱导 NF- $\kappa$ B 激活而部分抵消了顺铂诱导凋亡的能力,而使用药物预处理细胞则可以抑制 NF- $\kappa$ B 激活,从而使细胞对顺铂诱导的凋亡敏感性增加。Venkatraman 等<sup>[19]</sup>的研究结果证实了我们的结论,即:顺铂诱导 SiHa 细胞 NF- $\kappa$ B 激活与 SiHa 细胞的耐药性有关,而对 NF- $\kappa$ B 通路的抑制则能增加顺铂对 SiHa 细胞的凋亡能力和化疗效果。

我们采用流式细胞分析细胞周期发现,小剂量顺铂能增加 SiHa 细胞 S 期(DNA 合成期)细胞数,表明小剂量顺铂可能增加 DNA 合成能力继而使细胞增殖力增加,这可能与 SiHa 细胞对化疗抵抗有关;而 NF- $\kappa$ B 抑制物,尤其是阿司匹林和舒林酸,能明显抑制这种顺铂诱导的 DNA 合成,从而抑制肿瘤细胞增殖能力,这可能是阿司匹林和舒林酸增加顺铂化疗敏感性的另一种机制。

综上所述,宫颈癌属于对化疗相对敏感的药物,尽管加大化疗剂量或者联合化疗能增加对癌细胞的杀伤力,但是其副作用更加明显,患者往往不能耐受。本研究表明,NF- $\kappa$ B 抑制性药物(阿司匹林、舒林酸、姜黄和 PDTC)在自身无细胞毒性或微弱细胞毒性的剂量下,可以显著增加顺铂对宫颈癌细胞的生长抑制和诱导凋亡,因此,这为宫颈癌的临床化疗提供了一个新的思路,即:采用无毒性的 NF- $\kappa$ B 抑制物联合小剂量化疗药物治疗宫颈癌患者,可能取得良好的化疗效果而不增加化疗药物的毒副反应。这有待于在今后的工作中进一步研究和探讨。

### 参 考 文 献

- 1 Li J, Jia H, Xie L, *et al.* Association of constitutive nuclear factor-kappaB activation with aggressive aspects and poor prognosis in cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 2009; 19(8):1421-1426.
- 2 Lee TK, Poon RT, Wo JY, *et al.* Lupeol suppresses cisplatin-induced nuclear factor-kappaB activation in head and neck squamous cell carcinoma and inhibits local invasion and nodal metastasis in an orthotopic nude mouse model. *Cancer Res*, 2007; 67(18):8800-8809.
- 3 Młynarczyk-Biaty I, Roeckmann H, Kuckelkorn U, *et al.* Combined effect of proteasome and calpain inhibition on cisplatin-resistant human melanoma cells. *Cancer Res*, 2006; 66(15):7598-7605.
- 4 Banerjee S, Zhang Y, Wang Z, *et al.* *In vitro* and *in vivo* molecular evidence of genistein action in augmenting the efficacy of cisplatin in pancreatic cancer. *Int J Cancer*, 2007; 120(4):906-917.
- 5 Weldon CB, Burrow ME, Rolfe KW, *et al.* NF-kappa B-mediated chemoresistance in breast cancer cells. *Surgery*, 2001; 130(2):143-150.
- 6 Mohammad RM, Banerjee S, Li Y, *et al.* Cisplatin-induced antitumor activity is potentiated by the soy isoflavone genistein in BxPC-3 pancreatic tumor xenografts. *Cancer*, 2006; 106(6):1260-1268.
- 7 Kutuk O, Basaga H. Aspirin inhibits TNF alpha- and IL-1-induced NF-kappaB activation and sensitizes HeLa cells to apoptosis. *Cytokine*, 2004; 25(5):229-237.
- 8 Takada Y, Bhardwaj A, Potdar P, *et al.* Nonsteroidal anti-inflammatory agents differ in their ability to suppress NF-kappaB activation, inhibition of expression of cyclooxygenase-2 and cyclin D1, and abrogation of tumor cell proliferation. *Oncogene*, 2004; 23(57):9247-9258.
- 9 Li YQ, Zhang ZX, Xu YJ, *et al.* N-Acetyl-L-cysteine and pyrrolidine dithiocarbamate inhibited nuclear factor-kappaB activation in alveolar macrophages by different mechanisms. *Acta Pharmacol Sin*, 2006; 27(3):339-346.
- 10 Melendez-Zajgla J, Cruz E, Maldonado V, *et al.* Mitochondrial

- changes during the apoptotic process of HeLa cells exposed to cisplatin. *Biochem Mol Biol Int*,1999;47(5):765-771.
- 11 Park MS, De Leon M, Devarajan P. Cisplatin induces apoptosis in LLC-PK1 cells via activation of mitochondrial pathways. *J Am Soc Nephrol*,2002;13(4):858-865.
  - 12 Kim JS, Lee JM, Chwae YJ, *et al.* Cisplatin-induced apoptosis in Hep3B cells: mitochondria-dependent and -independent pathways. *Biochem Pharmacol*,2004;67(8):1459-1468.
  - 13 Azuma M, Tamatani T, Ashida Y, *et al.* Cisplatin induces apoptosis in oral squamous carcinoma cells by the mitochondria-mediated but not the NF-kappaB-suppressed pathway. *Oral Oncol*,2003;39(3):282-289.
  - 14 Wang P, Song JH, Song DK, *et al.* Role of death receptor and mitochondrial pathways in conventional chemotherapy drug induction of apoptosis. *Cell Signal*,2006;18(9):1528-1535.
  - 15 Jacobs EJ, Rodriguez C, Mondul AM. A large cohort study of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and prostate cancer incidence. *J Natl Cancer Inst*, 2005; 97(13):

975-980.

- 16 Cheng AL, Hsu CH, Lin JK, *et al.* Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res*,2001;21(4B):2895-2900.
- 17 Cohen AN, Veena MS, Srivatsan ES, *et al.* Suppression of interleukin 6 and 8 production in head and neck cancer cells with curcumin via inhibition of IKappa beta kinase. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*,2009;135(2):190-197.
- 18 Zhai JX, Zhang ZX, Feng YJ, *et al.* PDTTC attenuate LPS-induced kidney injury in sytemic lupus erythe matosus-prone MRL/lpr mice. *Mol Bio Rep*,2012;39(6):6763-6771.
- 19 Venkatraman M, Anto RJ, Nair A, *et al.* Biological and chemical inhibitors of NF-kappaB sensitize SiHa cells to cisplatin-induced apoptosis. *Mol Carcinog*,2005;44(1):51-59.

(2012-07-30 收稿,2012-10-21 修回)

编辑 沈进

(上接第 30 页)

DNA 的 CpG 岛密集区紧密结合从而直接干扰 DNMT,强烈地使超甲基化的 CpG 岛去甲基化,以使沉默的抑癌基因重新复活,发挥作用不需渗入 DNA、破坏 DNA 结构<sup>[10-12]</sup>。

综上所述, DNMT 抑制剂有望成为新的 HCC 内科化疗药品。非核苷类 DNMT 抑制剂普鲁卡因相比核苷类 DNMT 抑制剂 5-aza-dc 对 HepG<sub>2</sub> *Wif-1* 基因启动区脱甲基化作用更强,而且化学性质更加稳定,可口服给药。因其不整合入 DNA,故出现细胞毒性作用更小,该类物质可能具有更广阔的临床应用前景。但是 Wnt 通路的失调也可能导致胚胎的夭折、发育畸形并且增加成体癌症发生的可能。所以应严格控制运用药物的适用范围,掌握药物毒反应剂量与副反应剂量<sup>[13]</sup>,这将成为后续实验的研究重点。

### 参 考 文 献

- 1 Yuan F, Zhou W, Zou C, *et al.* Expression of Oct4 in HCC and modulation to wnt/ $\beta$ -catenin and TGF- $\beta$  signal pathways. *Mol Cell Biochem*,2010;343(1-2):155-62.
- 2 Lee BB, Lee EJ, Jung EH, *et al.* Aberrant methylation of APC, MGMT, RASSF2A, and *Wif-1* genes in plasma as a biomarker for early detection of colorectal cancer. *Clin Cancer Res*,2009;15(19):6185-6191.
- 3 高曰文,朱耀明,王艳林等.盐酸普鲁卡因对人结肠癌 HT-29 细胞 *Syk* 基因甲基化及表达的影响. *生物技术通报*,2010;12:173-177.
- 4 Gao Z, Xu Z, Hung MS, *et al.* Procaine and procainamide inhibit the Wnt canonical pathway by promoter demethylation

of *WIF-1* in lung cancer cells. *Oncol Rep*,2009;22(6):1479-1484.

- 5 Shitani M, Sasaki S, Akutsu N, *et al.* Genome-wide analysis of DNA methylation identifies novel cancer-related genes in hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol*, 2012; 33(5):1307-1317.
- 6 Huang L, Li MX, Wang L, *et al.* Prognostic value of Wnt inhibitory factor-1 expression in hepatocellular carcinoma that is independent of gene methylation. *Tumour Biol*,2011;32(1):233-240.
- 7 Deng Y, Yu B, Cheng Q, *et al.* Epigenetic silencing of *WIF-1* in hepatocellular carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol*,2010;136(8):1161-1167.
- 8 李洪利,张伟栋,李文通等.5-氮杂脱氧胞苷对肝癌细胞 HepG<sub>2</sub> 中抑癌基因 FHIT 表达的影响. *癌症*,2009;28(9):967-971.
- 9 Glait-Santar C, Benayahu D. SVEP1 promoter regulation by methylation of CpG sites. *Gene*,2011;490(1-2):6-14.
- 10 Tada M, Imazeki F, Fukai K, *et al.* Procaine inhibits the proliferation and DNA methylation in human hepatoma cells. *Hepatol Int*,2007;1(3):355-364.
- 11 Montes de Oca A, Madueno JA, Martinez-Moreno JM, *et al.* High-phosphate-induced calcification is related to SM22 $\alpha$  promoter methylation in vascular smooth muscle cells. *J Bone Miner Res*,2010;25(9):1996-2005.
- 12 Tada M, Imazeki F, Fukai K, *et al.* Procaine inhibits the proliferation and DNA methylation in human hepatoma cells. *Hepatol Int*,2007;1(3):355-364.
- 13 张 魄,王志禄,石守兰等.家族聚集性高血压 Wnt 信号通路基因表达的研究. *中国危重病急救医学*,2011;23(6):349-351.

(2012-05-14 收稿,2012-09-19 修回)

编辑 吕熙