

利巴韦林对人肺腺癌细胞 A549、人乳腺癌细胞 Hela 迁移和凋亡的影响研究

郑来双^{1*}, 李 帅², 马玉莲¹(1.河南省医药采购服务中心, 郑州 450003; 2.河南省肿瘤医院, 郑州 450008)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)33-3103-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.33.10

摘要 目的:研究利巴韦林对人肺腺癌细胞 A549、人乳腺癌细胞 Hela 迁移和凋亡的影响。方法:以 A549、Hela 细胞为模型细胞,分别分为对照组和利巴韦林低、中、高剂量(20、40、80 $\mu\text{mol/ml}$)组,作用 24 h 后检测各组细胞的存活率、迁移能力、凋亡情况、酸性膜泡积累情况、自噬标志蛋白 LC3(以 LC3- II/LC3- I 为指标)的表达情况。结果:与对照组比较,利巴韦林能降低 A549、Hela 细胞的存活率(中、高剂量组差异均有统计学意义, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)和迁移能力,增加 A549、Hela 细胞的凋亡率(低、中、高剂量组差异均有统计学意义, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)、酸性膜泡积累数量与剂量呈反相关,LC3- II/LC3- I 比值(中、高剂量组差异均有统计学意义, $P < 0.01$),作用与剂量呈正相关。结论:利巴韦林可能通过诱导细胞自噬降低 A549、Hela 细胞的迁移并诱导其凋亡。

关键词 利巴韦林;人肺腺癌细胞 A549;人乳腺癌细胞 Hela;迁移;凋亡

Effects of Ribavirin on the Migration and Apoptosis of Human Lung Adenocarcinoma A549 Cells and Human Breast Cancer Hela Cells

ZHENG Lai-shuang¹, LI Shuai², MA Yu-lian¹(1.Henan Medicine Procurement Service Center, Zhengzhou 450003, China; 2.Henan Cancer Hospital, Zhengzhou 450008, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of ribavirin on the migration and apoptosis of human lung adenocarcinoma A549 cells and breast cancer Hela cells. METHODS: A549 cells and Hela cells were taken as model cells and divided into control group, ribavirin low-dose, medium-dose and high-dose groups (20, 40, 80 $\mu\text{mol/ml}$). The survival rate, migration ability, cell apoptosis, the accumulation of acid membranous vesicles, the expression of cell autophagy marker LC3 (LC3- II/LC3- I) were determined 24 h later. RESULTS: Compared with control group, ribavirin could decrease the survival rate (there was statistical significance of medium-dose and high-dose groups, $P < 0.05$ or $P < 0.01$) and migration ability of 549 cells and Hela cells; also could increase the apoptosis rate of them (there was statistical significance of low-dose, medium-dose and high-dose groups, $P < 0.05$ or $P < 0.01$), the number of acid membranous vesicles and LC3- II/LC3- I (there was statistical significance of medium-dose and high-dose, $P < 0.01$); the effects were positively associated with dosage. CONCLUSIONS: Ribavirin can reduce the migration and induce apoptosis of A549 and Hela cells by inducing cell autophagy.

KEYWORDS Ribavirin; Human lung adenocarcinoma A549 cells; Human breast cancer Hela cells; Migration; Apoptosis

参数与 TP5 本身可能有所差别,但这并不影响对微球体内释药动力学的比较研究与评价。

本文研究取得的结果不仅突破了 TP5 长效微球体内分析的限制,对于其他有类似代谢特点的蛋白多肽类药物的新型制剂药动学研究,同样也具有参考价值和借鉴意义。

参考文献

- [1] Audhya TK, Goldstein G. Thymopentin: stability considerations and potency by various routes of administration [J]. *Surv Immunol Res*, 1985, 4(Suppl 1):17.
- [2] Tischio JP, Patrick JE, Weintraub HS, et al. Short in vitro half-life of thymopentin 32-36 pentapeptide in human plasma[J]. *Int J Pept Protein Res*, 1979, 14(5):479.
- [3] 张宏.胸腺五肽脂质体的研究[D].天津:天津大学,2007:20-21.
- [4] He W, Jiang X, Zhang ZR. Preparation and evaluation of poly-butylcyanoacrylate nanoparticles for oral delivery of thymopentin[J]. *J Pharm Sci*, 2008, 97(6):2 250.

- [5] Gao J, Ding X, Chu C, et al. Dry powder inhalations containing thymopentin and its immunomodulating effects in Wistar rats[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2009, 36(4/5):572.
- [6] Li YZ, Sun X, Gong T, et al. Inhalable microparticles as carriers for pulmonary delivery of thymopentin-loaded solid lipid nanoparticles[J]. *Pharm Res*, 2010, 27(9):1 977.
- [7] Wang J, Lu WL, Liang GW, et al. Pharmacokinetics, toxicity of nasal cilia and immunomodulating effects in Sprague-Dawley rats following intranasal delivery of thymopentin with or without absorption enhancers[J]. *Peptides*, 2006, 27(4):826.
- [8] 谢兰桂.胸腺五肽长效制剂的制备与评价[D].上海:复旦大学,2007:9-14.
- [9] Woo BH, Kostanski JW, Gebrekidan S, et al. Preparation, characterization and in vivo evaluation of 120-day poly(D, L-lactide) leuprolide microspheres[J]. *J Control Release*, 2001, 75(3):307.
- [10] 陈君,庞杰,张春彦,等.胸腺五肽配合治疗慢性阻塞性肺 38 例疗效观察[J].*中国民族民间医药杂志*, 2009, 2(1):95.

(收稿日期:2014-04-11 修回日期:2014-04-28)

* 主管药师。研究方向:临床药学。电话:0371-65960617。E-mail:2478793515@qq.com

近年来肿瘤的发病率逐年升高并成为导致患者死亡的主要原因之一。有研究显示,肿瘤的发生、发展,与细胞凋亡和增殖之间的失衡、细胞迁移具有极为密切的关系^[1]。与此同时,细胞自噬参与了细胞凋亡、增殖、迁移等调控^[2],靶向自噬研究肿瘤的治疗已成为当今热点^[3]。利巴韦林是一种广谱抗病毒合成药,通过抑制肌苷单磷酸脱氢酶,使鸟嘌呤核苷酸不能合成,从而阻止病毒核酸的合成^[4]。已有文献报道,利巴韦林具有抗肿瘤作用,且其衍生物具有降低人肺腺癌细胞A549、人乳腺癌细胞Hela存活率的作用^[5],但是利巴韦林对A549、Hela细胞的作用机制则少见报道。本文旨在初步探究利巴韦林对A549、Hela细胞凋亡和迁移的影响。

1 材料

1.1 仪器

荧光显微镜(日本Nikon公司);Thermo3131型CO₂培养箱、Thermo3001型多功能酶标仪(美国Thermo公司);TGL16M型离心机(湖南凯达公司);MIC0266型倒置显微镜(德国Zeiss公司);FACS Aria III型流式细胞仪(美国BD公司)。

1.2 药品与试剂

利巴韦林原料药(批号:R9644-10,纯度:98%)、二甲基亚砜(DMSO)、磺酰罗丹明B(SRB)、Hoechst 33258和吖啶橙(美国Sigma公司);RIPA裂解液(碧云天生物技术研究所);微管相关蛋白轻链3(LC3)抗体(美国Cell Signaling Technology公司);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体和辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(美国Santa Cruz公司);增强化学发光(ECL)试剂盒(加拿大Fermentas公司);聚偏二氟乙烯(PVDF)膜和超敏化学发光底物(美国Millipore公司);1640完全培养基和达尔伯克必需基本培养基(DMEM高糖培养基)(美国Invitrogen公司);胎牛血清(美国Hyclone公司)。

1.3 细胞

A549细胞、Hela细胞(中国科学院上海细胞库)。

2 方法

2.1 细胞培养

A549细胞在1640完全培养基中常规培养,Hela细胞在DMEM高糖培养基中常规培养,培养基中均含有10%胎牛血清,培养条件均为饱和湿度下37℃和5%CO₂。

2.2 分组与给药

将A549、Hela细胞分别分为4组,即对照组和利巴韦林低、中、高剂量(20、40、80 μmol/ml)组,每组4个复孔。对照组细胞中加入含有2%的DMSO培养液;利巴韦林低、中、高剂量组细胞中分别加入含有质量浓度为20、40、80 μmol/ml的利巴韦林培养液,其中利巴韦林各剂量组即为实验组。

2.3 SRB法检测细胞的存活率

将A549、Hela细胞分别种植到96孔板中,细胞密度为每孔 3×10^4 个,分组与给药同“2.2”项,以细胞培养液(不含细胞)为空白对照;加药处理24 h后,弃去旧培养液,每孔加入100 μl 10%的三氯乙酸(TCA),4℃下固定1 h;去离子水轻轻冲洗5次,室温下自然晾干;每孔加入50 μl 0.4%的SRB,室温染色5 min(平板震荡);弃染液,1%的乙酸洗5次,风干;每孔加100 μl 10 mmol/L三羟甲基氨基甲烷(Tris)液,在平板震荡器上震荡5 min。以空白对照调零,用酶标仪于540 nm波长下检测各组细胞的光密度(OD)值。按公式计算细胞存活率,细胞存活率=(实验组OD值/对照组OD值)×100%,对照组存活率设置

为100%。

2.4 划痕试验检测细胞的迁移能力

将A549、Hela细胞分别种植到24孔板中,细胞密度为每孔 3×10^5 个,行划痕试验,即用20 μl枪头在每个孔中划互相垂直的2条直线,枪头要垂直,不能倾斜。用PBS洗细胞3次,冲洗掉划下的细胞,分组与给药同“2.2”项,作用24 h后用倒置显微镜拍照,观察各组细胞的迁移能力。

2.5 Hoechst 33258染色检测细胞的凋亡情况

将A549、Hela细胞分别种植到24孔板中,细胞密度为每孔 3×10^5 个,分组与给药同“2.2”项,作用24 h后用Hoechst 33258对各组细胞进行活细胞染色;即弃细胞培养液,用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗细胞1次,每孔加入Hoechst 33258染液0.5 ml (10 μg/ml),包上铝箔放入CO₂培养箱中孵育15 min;弃染液,再用PBS冲洗细胞2次。在荧光显微镜下观察、拍照,紫外光激发,发射光为蓝色,以Hoechst 33258染色显示细胞核片段化的细胞为凋亡细胞^[6],计算凋亡率(凋亡率=凋亡细胞/细胞总数)。

2.6 吖啶橙染色检测细胞中酸性膜泡积累情况

将A549、Hela细胞分别种植到24孔板中,细胞密度为每孔 3×10^5 个,分组与给药同“2.2”项,作用24 h后吸弃各孔中培养液,PBS冲洗细胞2次,每孔中加入3滴吖啶橙染液(0.1 mg/ml),染色1 min;再用PBS洗细胞2次;吸干PBS,再加入2滴新PBS(保持孔底湿润),用倒置荧光显微镜观察,用蓝色荧光激发,绿色为细胞核,红色即为酸性膜泡,拍照记录。吖啶橙染色显示的酸性膜泡积累情况是检测细胞自噬水平的重要指标积累数量减少,自噬水平增加^[7]。

2.7 蛋白质印迹(Western blot)法检测细胞中LC3的蛋白水平

将A549、Hela细胞分别种植到10 cm培养皿中,分组与给药同“2.2”项,作用24 h后,利用RIPA裂解液收集全蛋白,20 μl上样量进行电泳,按常规转膜;封闭后加LC3抗体(1:2 000),4℃过夜,PBS漂洗3次加HRP标记的二抗(1:5 000),室温1 h,ECL显色,拍照。以GAPDH抗体为参照,以膜型LC3(LC3-II)与胞浆型LC3(LC3-I)的比值为指标评价LC3蛋白水平,该比值与自噬水平呈正相关^[8]。

2.8 统计学方法

所有数据均采用SPSS Statistics Base 20软件进行处理,至少取3次独立试验的结果,进行One-way ANOVA检验、*t*检验。结果以平均值±标准差的形式表示,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞存活率

与对照组比较,利巴韦林中、高剂量组A549、Hela细胞的存活率均降低,差异具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),利巴韦林低剂量组A549、Hela细胞的存活率降低,但差异无统计学意义,由此表明此作用具有浓度依赖性,结果见图1。

3.2 细胞迁移能力

与对照组比较,利巴韦林低、中、高剂量组A549、Hela细胞的迁移能力均降低,且具有浓度依赖性,结果见图2。

3.3 细胞凋亡情况

与对照组比较,利巴韦林低、中、高剂量组A549、Hela细胞的凋亡率均明显增加,差异具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),由此表明此作用具有浓度依赖性,结果见图3。

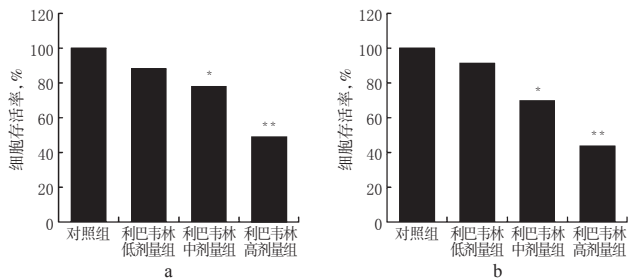


图1 各组细胞的存活率比较

a. A549 细胞; b. HeLa 细胞

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Fig 1 Comparison of survival rate of cells in each group

a. A549 cells; b. HeLa cells

vs. control group: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

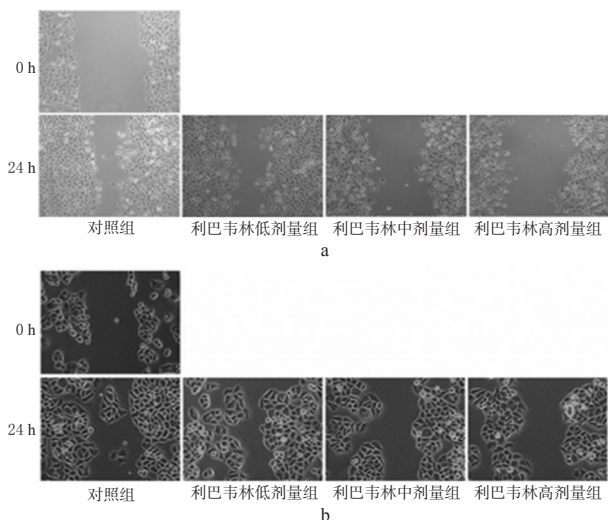


图2 各组细胞迁移的显微镜图

a. A549 细胞; b. HeLa 细胞

Fig 2 Microgram of cell migration in each group

a. A549 cells; b. HeLa cells

3.4 细胞中酸性膜泡积累情况

与对照组比较,利巴韦林低、中、高剂量组 A549、HeLa 细胞中酸性膜泡积累数据均明显减少,提示自噬水平增加,且具有浓度依赖性,结果见图 4。

3.5 LC3 蛋白表达情况

与对照组比较,利巴韦林低、中、高剂量组 A549 和利巴韦林中、高剂量组 HeLa 细胞的 LC3- II/LC3- I 比值均增加,差异具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);利巴韦林低剂量组 HeLa 细胞的 LC3- II/LC3- I 比值也增加,但差异无统计学意义,由此表明此作用具有浓度依赖性,结果见图 5。

4 讨论

研究显示,自噬是广泛存在于真核细胞中的基本生命现象,是细胞自我更新、自我修复的过程,是程序性细胞死亡的一种形式,所以自噬在决定细胞增殖或凋亡方面发挥着不可估量的价值^[9]。已有研究表明,自噬在肿瘤细胞的生理调控方面占据着重要地位,在肿瘤发展的各个阶段发挥着复杂的作用,甚至关系到肿瘤细胞的存亡^[10];至今,诸多临床与实验室数据均验证了自噬与肿瘤间具有一定关联性^[11-12]。

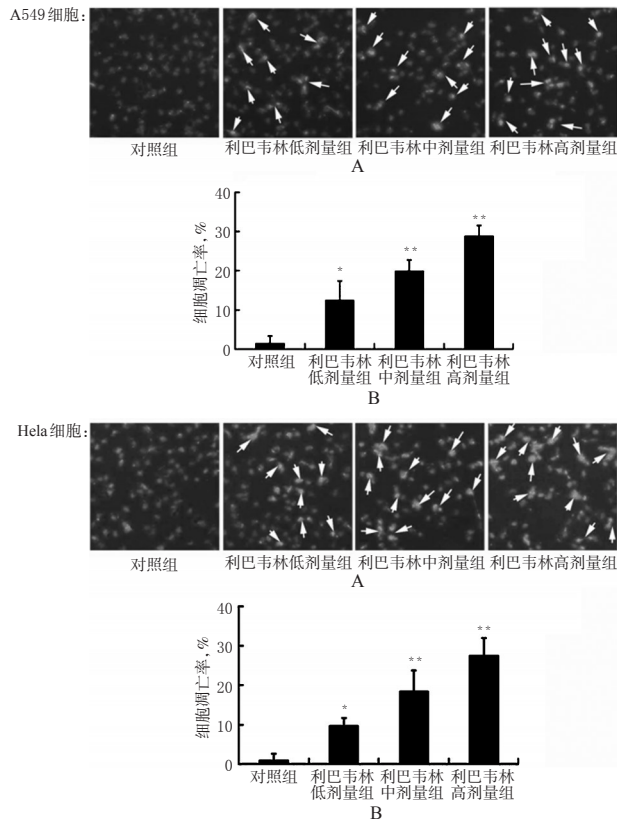


图3 各组细胞凋亡率比较

A. 显微镜图; B. 柱状图

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Fig 3 Comparison of cell apoptosis rate in each group

A. microgram; B. histogram

vs. control group: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

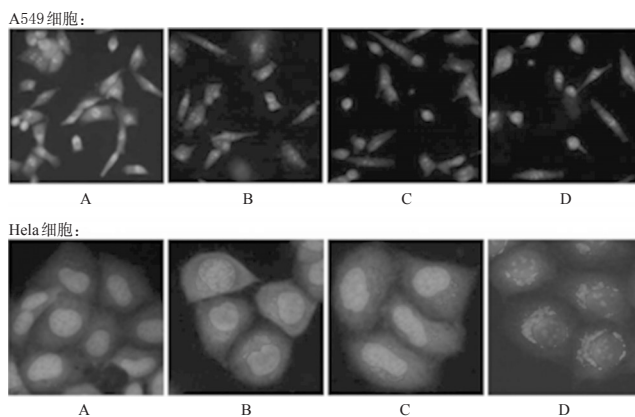


图4 各组细胞中酸性膜泡积累的显微镜图

A. 对照组; B. 利巴韦林低剂量组; C. 利巴韦林中剂量组; D. 利巴韦林高剂量组

Fig 4 Microgram of acid membranous vesicles in each group cells

A. control group; B. ribavirin low-dose group; C. ribavirin medium-dose group; D. ribavirin high-dose group

近年来,由于受环境变化、人们生活习惯改变等因素影响,恶性肿瘤成为严重威胁人类健康的疾病之一,然而人们对于肿瘤细胞自噬的分子机制仍然了解甚少,因此也不同程度的

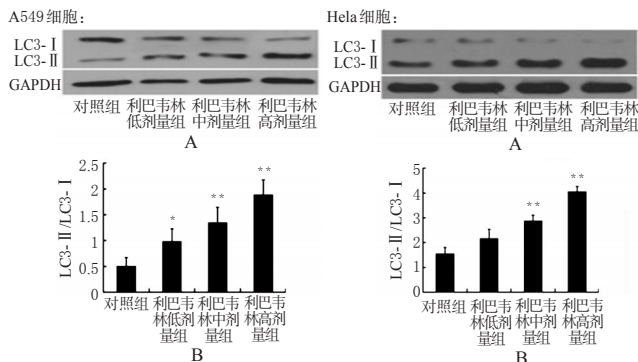


图5 各组细胞中LC3-II、LC3-I蛋白表达情况比较

A.电泳图;B.柱状图

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Fig 5 Comparison of the protein expression of LC3-II and LC3-I in each group cells

A. electrophoretogram; B. histogram

vs. control group: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

地影响了抗肿瘤药的研究与开发进展。目前,随着对肿瘤发生机制以及相关药物的深入研究,结果显示该类药可直接(或间接)启动自噬造成细胞死亡或是通过溶酶体酶活化释放凋亡因子诱导细胞凋亡、乃至发生细胞坏死等。此过程中,肿瘤细胞对抗肿瘤药的反应表现出自噬活性过强、甚至自噬性细胞死亡等^[13]。因此,笔者认为应积极筛选具备自噬调控功能的药物,从而以其为工具,探索阐明自噬机制,同时在此基础上还可为肿瘤治疗提供理论依据和方法支持^[14]。

由此,笔者选取人工合成的广谱抗病毒药——利巴韦林,该药属于鸟苷酸生物合成抑制剂,通过细胞内磷酸化,其产物类似肌苷和鸟苷,在进入机体后能抑制肌苷酸-5-磷酸脱氢酶,进而阻断肌苷酸转变为鸟苷酸,可有效抑制病毒体核酸的合成和多种DNA及RNA病毒的复制,因此是治疗病毒性感染疾病的首选药物^[15]。利巴韦林因其作用确切、价格较低,临床常广泛用于婴、幼儿及成人的流行性气管炎、肠炎以及干扰素合并用于各型肝炎的治疗^[16-18];但是其在肿瘤治疗方面的作用还知之甚少。通过本次观察与研究不同浓度利巴韦林对A549、Hela细胞的影响,发现利巴韦林可以有效降低A549、Hela细胞的存活率和迁移能力,此外还可诱导其发生凋亡,并提高A549、Hela细胞自噬水平。由此,笔者认为利巴韦林可能通过诱导A549、Hela细胞自噬,引起细胞凋亡,进而减低其存活率和迁移能力。然而,利巴韦林调控A549、Hela细胞自噬的具体机制仍需进一步深入研究。

综上所述,本研究初步探讨了利巴韦林在抗癌治疗中的潜在价值,为利巴韦林的临床应用以及肿瘤细胞自噬的分子机制研究提供了一个新的切入点,值得临床进一步研究。

参考文献

[1] Burke AJ, Sullivan FJ, Giles FJ, *et al.* The yin and yang of nitric oxide in cancer progression[J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(3):503.
 [2] Doria A, Gatto M, Punzi L. Autophagy in human health and disease[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(19):1 845.
 [3] Jain MV, Paczulla AM, Klonisch T, *et al.* Interconnecti-

ons between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development[J]. *J Cell Mol Med*, 2013, 17(1):12.

[4] 靖百谦,周文,王凤山.利巴韦林临床应用进展[J]. *齐鲁药事*, 2006, 25(7):417.
 [5] Liu WY, Li HY, Zhao BX, *et al.* Synthesis of novel ribavirin hydrazone derivatives and anti-proliferative activity against A549 lung cancer cells[J]. *Carbohydrate Research*, 2009, 344(11):1 270.
 [6] Liu X, Zhao J, Xu J, *et al.* Protective effects of a benzoxazine derivative against oxidized LDL-induced apoptosis and the increases of integrin beta4, ROS, NF-kappaB and P53 in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19(10):2 896.
 [7] Ding XL, Zhang HY, Qi L, *et al.* Synthesis of novel pyrazole carboxamide derivatives and discovery of modulators for apoptosis or autophagy in A549 lung cancer cells [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19(18):5 325.
 [8] Shen S, Kepp O, Kroemer G. The end of autophagic cell death? [J]. *Autophagy*, 2012, 8(1):1.
 [9] Chen P, Cescon M, Bonaldo P. Autophagy-mediated regulation of macrophages and its applications for cancer[J]. *Autophagy*, 2014, 10(2):192.
 [10] Shpilka T, Weidberg H, Pietrokovski S, *et al.* Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family[J]. *Genome Biol*, 2011, 12(7):226.
 [11] Hippert MM, O'toole PS, Thorburn A. Autophagy in cancer: good, bad, or both?[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(19): 9 349.
 [12] Toth S, Nagy K, Palfia Z, *et al.* Cellular autophagic capacity changes during azaserine-induced tumour progression in the rat pancreas.Up-regulation in all premalignant stages and down-regulation with loss of cycloheximide sensitivity of segregation along with malignan transformation [J]. *Cell Tissue Res*, 2002, 309(3):409.
 [13] 张慧,黄家明,刘煜桐,等.三氧化二砷通过自噬作用抑制A549肺癌细胞的生长[J]. *广州医药*, 2013, 44(5):4.
 [14] Li LC, Liu GD, Zhang XJ, *et al.* Autophagy, a novel target for chemotherapeutic intervention of thyroid cancer [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2013, 12(4):33.
 [15] 刘丽欣,王岳.利巴韦林临床研究进展[J]. *现代中西医结合杂志*, 2008, 17(35):5 542.
 [16] 谭安琦.利巴韦林雾化吸入与静脉滴注治疗毛细支气管炎的疗效观察[J]. *中外妇儿健康*, 2011, 19(5):84.
 [17] 杨美华,房伶,纪平,等.利巴韦林治疗婴幼儿轮状病毒肠炎疗效观察[J]. *中国现代应用药学*, 1996(3):45.
 [18] 申慧丽,李青岭,郭进军.干扰素 $\alpha 2b$ 联合利巴韦林治疗慢性乙肝疗效观察[J]. *长治医学院学报*, 2001, 15(2):95.
 (收稿日期:2014-05-06 修回日期:2014-07-23)