

• 论 著 •

姜黄素诱导细胞自噬对人乳头瘤病毒复制的抑制研究^{*}

范世珍, 陈旭娜, 于波海, 莫 莉

(深圳市福田区中医院检验科, 广东深圳 518034)

摘 要:目的 研究姜黄素诱导细胞产生自噬对人乳头瘤病毒(HPV)复制的影响。方法 用姜黄素处理人宫颈癌细胞 SiHa 12 h, 荧光酶标仪观察自噬小体形成, 免疫印迹试验检测 SiHa 细胞自噬标志蛋白 LC3-II / LC3-I 的表达水平; 实时定量聚合酶链反应和免疫印迹试验分别检测 HPV E6 基因 mRNA 表达和蛋白水平。加入自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-MA), 实时定量聚合酶链反应和免疫印迹试验分别检测自噬抑制后 HPV E6 基因表达情况。结果 姜黄素诱导后, 与对照组相比, SiHa 细胞中自噬小体的荧光强度明显增高, LC3-II / LC3-I 比值明显上升($P<0.05$); 细胞诱导自噬后 HPV E6 mRNA 和蛋白水平明显降低, 而加入自噬抑制剂 3-MA 后, HPV E6 mRNA 和蛋白水平均明显增高。结论 姜黄素可能通过诱导细胞自噬抑制 HPV 的复制。

关键词:姜黄素; 自噬; 人乳头瘤病毒; 复制

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.11.046

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)11-1584-03

Inhibit effect of Curcumin on human papilloma virus replication by inducing cell autophagy^{*}

Fan Shizhen, Chen Xuna, Yu Bohai, Mo Li

(Department of Clinical Laboratory, Traditional Chinese Medical Hospital of Futian, Shengzhen, Guangdong 518034, China)

Abstract:Objective To explore the effect of autophagy induced by Curcumin on human papilloma virus (HPV) replication. **Methods** Human cervical cancer cell SiHa were treated with Curcumin to induce autophagy. Fluorescence microscope was used to observe the autophagosome. Western blotting was performed to analyze the expression level of autophagy marker protein LC3-II / LC3-I. Real time-polymerase chain reaction(PCR) and Western blotting were used to detect HPV E6 mRNA and protein expression level. After adding the autophagy inhibitor 3-methyl adenine (3-MA), real time-PCR and Western blotting was employed to detect the expression level of HPV E6. **Results** The fluorescence intensity of SiHa cells treated by Curcumin was significant increased, while the ratio of LC3-II and LC3-I was also significantly increased ($P<0.05$). The expression of HPV E6 mRNA and protein were decreased significantly after induction of autophagy, while increased significantly after adding autophagy inhibitor 3-MA. **Conclusion** Curcumin might inhibit HPV replication by inducing cell autophagy.

Key words:Curcumin; autophagy; human papilloma virus; replication

宫颈癌是全球女性常见的恶性肿瘤,其发病率居女性恶性肿瘤的第三位。流行病学资料显示,全世界每年约 53 万宫颈癌新发病例,约 27 万女性死于宫颈癌,国内每年新发病例占世界新发病例的 14.2%。尽管现在有人乳头瘤病毒(HPV)的预防性疫苗,但其不可能完成全面预防宫颈癌的任务,也不具备治疗功能,更无法通过疫苗控制宫颈癌和癌前病变^[1-3]。自噬是细胞利用溶酶体途径对胞质蛋白和细胞器进行降解的一种再循环系统,细胞可以通过自噬过程来达到细胞内各种成分的平衡稳态,从而使细胞保持最佳的活性状态^[4]。此外,在感染病毒的细胞中,病毒体和病毒蛋白、核酸均可通过自噬过程被自噬体包裹并降解。因此自噬也是机体防御病原体入侵的一道重要防线^[5]。姜黄素是从姜科姜黄属植物中提取的一种多酚类物质。相关研究证明姜黄素具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、清除自由基、抗微生物等多方面药理作用^[6-7]。也有研究显示姜黄素能通过泛素系统、细胞骨架、凋亡与自噬程序抑制登革热病毒对细胞的感染^[8]。有研究证实,姜黄素能明显抑制宫颈癌细胞系中 HPV E6/E7 转录水平,并抑制细胞增殖^[9]。但姜黄素能否诱导宫颈癌细胞自噬目前尚不明确。本研究利用姜黄素处理宫颈癌细胞系 SiHa,观察其是否能诱导自噬小体的形成、自噬标志蛋白 p62 和 LC3-II 的表达水平,以及 HPV

的表达与复制情况,探讨姜黄素诱导细胞自噬后对 HPV 的影响,为抗 HPV 治疗及姜黄素的应用提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 试剂 姜黄素、3-甲基腺嘌呤(3-MA)和荧光染料购自 Sigma-Aldrich(上海)贸易有限公司,抗 β -actin 抗体购自 Abcam(上海)贸易有限公司,抗 Beclin1, LC3-II 和抗 HPV16 E6 抗体购自上海起福生物有限公司。兔抗羊 IgG 购自北京中山生物技术公司。细胞培养胎牛血清购自南京森贝伽生物科技有限公司。RNA 提取试剂盒购自广州健仑生物科技有限公司,逆转录试剂盒购自大连宝生物公司,罗氏实时定量聚合酶链反应(PCR)试剂。其余分析纯试剂均购自上海生物工程有限公司。

1.2 细胞来源及培养 人宫颈癌细胞系 SiHa 购自中科院上海细胞库,用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素和链霉素的 DMEM 培养基,于 37℃,5% CO₂ 浓度下培养。每 2~3 天换液传代,当细胞生长至 80% 视野密度时,加入不同浓度的姜黄素以用于下一步研究。

1.3 自噬荧光小体检测 自噬荧光小体检测采用 Biederbick 等^[10]介绍的荧光染料染色方法进行。SiHa 处理完毕后加入 0.05 mmol/L 荧光染料于 37℃ 温育 60 min 后,磷酸盐(PBS)

^{*} 基金项目:深圳市 2015 年科技研发资金基础研究资助项目(20150316171501)。 作者简介:范世珍,女,副主任技师,主要从事临床检验研究。

缓冲液冲洗 2 次,4%多聚甲醛固定,用荧光酶标仪测定其荧光强度。

1.4 免疫印迹试验 姜黄素作用于 SiHa 细胞 12 h 后,用预冷 PBS 漂洗 2 次,随后加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液充分裂解细胞,4℃ 12 000 r/min 离心 10 min。细胞总蛋白提取试剂盒根据厂家说明书进行。将获取的蛋白经 10%~12%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳、转膜,放入 5%脱脂奶粉中封闭 1 h;洗涤后,加入抗 Beclin1,LC3-II 和 LC3-I 抗体,4℃ 孵育过夜;多次洗涤后,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠二抗孵育膜 1 h。增强化学发光(ECL)法发光、显影。

1.5 实时定量 PCR 法 细胞处理完毕后,根据试剂盒操作步骤提取细胞总 RNA,并取 3 μg 的 RNA 进行逆转录,将获得的 cDNA 进行实时定量 PCR。本文所用引物如下:HPV16 E6 上游引物 5'-GAA TGT GTG TAC TGC AAG CA-3',下游引物 5'-CAC AGT GGC TTT TGA CAG TT-3';GAPDH 上游引物 5'-AGT GGG GTG ATG CTG GTG CTG-3',下游引物:5'-CGC CTG CTT CAC CAC CTT CTT-3',在 LightCycler96 定量 PCR 仪(罗氏)上按以下程序扩增:50℃ 2 min,95℃ 10 min,95℃ 15 s,58℃ 1 min,共 40 个循环。PCR 结束后计算各处理组中 HIF-1α 蛋白的相对表达量,计算公式: $2^{-\Delta\Delta C_t}$, $\Delta\Delta C_t = \text{实验组}(C_{t\text{HIF-1}\alpha} - C_{t\text{GAPDH}}) - \text{对照组}(C_{t\text{HIF-1}\alpha} - C_{t\text{GAPDH}})$ 。

1.6 统计学处理 采用 GraphPad Prizm 软件进行数据处理及统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并采用单因素方差分析进行比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 姜黄素对 SiHa 细胞自噬的影响 SiHa 细胞经 5、10、20、30 μmol/L 姜黄素处理后,自噬小体的荧光强度逐渐增强,分别为 0.825 ± 0.16 、 1.385 ± 0.12 、 1.758 ± 0.07 、 2.280 ± 0.155 ,与对照组(0 μmol/L)的荧光强度 0.635 ± 0.08 相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。

2.2 姜黄素对 Beclin 1 蛋白表达的影响 免疫印迹试验结果显示,与对照组相比,姜黄素作用 12 h 后自噬相关蛋白 Beclin 1 的表达明显增高。见图 2。

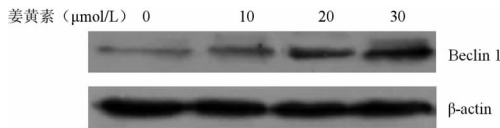


图 2 姜黄素对 SiHa 细胞 Beclin 1 蛋白表达的影响

2.3 姜黄素对 LC3-II 表达的影响 免疫印迹试验结果显示,姜黄素作用于 SiHa 细胞 12 h 后,LC3-II 蛋白表达增强,LC3-II/LC3-I 比值增加。

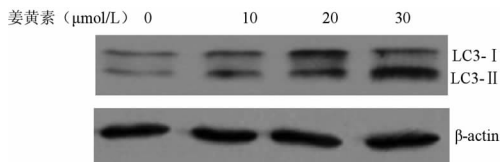


图 3 不同浓度姜黄素对 SiHa 细胞 LC3-II/LC3-I 表达的影响

2.4 姜黄素对 HPV E6 基因 mRNA 表达的影响 荧光定量 PCR 结果显示,阴性对照组中 HPV 16 E6 基因 mRNA 的相对表达量为 0.264 ± 0.02 。经 5、10、20、30 μmol/L 姜黄素处理

后,HPV 16 E6 基因 mRNA 水平随姜黄素浓度的增高而逐渐降低,分别为 0.21 ± 0.015 、 0.16 ± 0.012 、 0.12 ± 0.007 、 0.07 ± 0.008 ($P < 0.05$)。而同时给予自噬抑制剂 3-MA 处理后,HPV 16 E6 基因 mRNA 水平增高至 0.21 ± 0.012 ($P < 0.05$)。见图 4(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。

2.5 姜黄素对 HPV E6 蛋白表达的影响 免疫印迹试验结果与实时荧光定量 PCR 结果类似。不同浓度姜黄素可明显下调 HPV E6 蛋白的表达,而 3-MA 可逆转姜黄素的这种效应。见图 5。

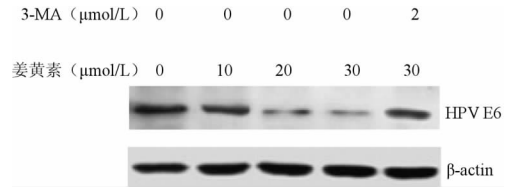


图 5 姜黄素对 HPV E6 蛋白表达的影响

3 讨 论

HPV 感染是导致宫颈癌最重要的病因,HPV 是双链 DNA 病毒,病毒 DNA 以整合形式存在于宿主细胞中,主要通过癌蛋白 E6、E7 发挥致癌作用^[10]。尽管关于 HPV 感染导致宫颈癌的研究已经取得巨大进展,尤其预防性 HPV 疫苗的问世使宫颈癌的一级预防成为可能,但预防效果并不尽如人意,故继续深入研究 HPV 致癌机制,探索预防、治疗 HPV 感染的新策略一直为国内外学者所关注^[11]。

研究表明,自噬在病毒和细菌感染时被激活,大量的病毒感染可以诱发完全或部分的自噬,但因感染病毒的差异,所导致的结果也不尽相同,或有利于病毒的清除,或被病毒本身所利用而利于病毒的复制。如 Beclin 1 过表达可保护小鼠免受 Sindbis 病毒感染引起的脑炎^[12],而 1 型单纯疱疹病毒(HSV-1)编码的神经毒性蛋白 ICP34.5 和 Beclin 1 结合后,抑制了自噬功能,从而可以导致小鼠的致命性脑炎^[13-14]。但关于自噬在 HPV 感染中的作用却未见报道。

为了研究姜黄素是否通过自噬途径影响 HPV 复制与表达,本研究将姜黄素于稳定表达 HPV E6 蛋白的 SiHa 细胞株孵育,通过检测自噬荧光小体和自噬标志蛋白来评价自噬的发生。本研究采用的荧光染料被细胞摄入后,可选择性地与自噬体结合,因此测量荧光强度可以显示自噬体的形成及自噬体的数量。结果证实,SiHa 细胞经不同浓度姜黄素处理后,自噬小体的荧光强度逐渐增强,这表明姜黄素能诱导自噬小体的形成。为了进一步证实 SiHa 细胞自噬的发生,对 LC3 进行了检测。LC3 是使用最广的自噬标志物,定位于自噬泡上。自噬形成时,LC3-I(胞浆型 LC3)会酶解掉一小段多肽,转变为 LC3-II(膜型结合型 LC3)^[15]。LC3-II/I 比值的大小可估计自噬水平的高低。结果发现,姜黄素可明显上调 LC3-II/I 的比值。同时,姜黄素也可明显抑制 HPV 16 E6 基因 mRNA 和蛋白的水平。为了证明是自噬引起而非其他原因造成 HPV 表达增加,加入了自噬抑制剂 3-MA 做比较,发现自噬被抑制后 HPV E6 mRNA 和蛋白都表达增高,表明姜黄素通过细胞自噬影响 HPV 的复制和表达。

综上所述,姜黄素能促使宫颈癌 SiHa 细胞自噬,从而达到清除胞内病原体的效应。这将有助于进一步明确姜黄素的药理机制,从而为控制 HPV 持续性感染提供新的理论基础。

参考文献

[1] Shanehsazzadeh M, Sharifi-Rad J, Behbahani M, (下转第 1588 页)

道较少。序列试验往往出现灵敏度、阴性预测值降低,特异度和阳性预测值升高的情况;而平行试验常出现灵敏度、阴性预测值升高,特异度和阳性预测值降低的情况。就灵敏度而言,PCT 及 PCT/CRP 平行试验都具有较高的灵敏度,因此从经济、快速、节约的角度出发,PCT 单独检测基本可以满足临床检出细菌感染性肺炎病例的需要。但是 PCT/CRP 序列试验在 4 项指标中具有更好的特异度,说明序列试验具有最高的排除细菌感染性肺炎的能力。此外,PCT 和 PCT/CRP 序列试验都具有较好的阳性预测值和阴性预测值,同时能较为全面地反映诊断指标的约登指数和诊断准确度指数,也优于 CRP 单独检测和 PCT/CRP 平行试验。因此,PCT 和 PCT/CRP 序列试验的联合使用可提高早期儿童细菌感染性肺炎的诊断准确度。目前国内此类报道较少,因此本研究下一步还需要采用多中心、扩大样本量等方法来进一步验证该结论。

本研究还发现,尽管细菌感染性肺炎组 WBC 计数和 ESR 水平与非细菌感染性肺炎组比较差异有统计学意义($P<0.05$),但相关分析提示两者与 PCT 和 CRP 浓度均无显著相关,表明单独使用 WBC 计数和 ESR 并不是判断肺炎感染病原体的适当指标。

综上所述,PCT 单独检测和 PCT/CRP 序列试验的联合使用可能是较理想的儿童细菌感染性肺炎早期诊断手段,具有很好的临床推广价值。

参考文献

[1] 吴修宇,邓梦,黎杨杨,等.降钙素原在感染性疾病中的临床意义

(上接第 1585 页)

et al. Analysis of human papillomavirus and herpes simplex virus genus-2 from patients with cervical cancer in isfahan,iran[J]. Mater Sociomed,2014,26(4):234-236.

[2] Anaya-Ruiz M, Vincent AK, Perez-Santos M. Cervical Cancer trends in Mexico:incidence,mortality and research output[J]. Asian Pac J Cancer Prev,2014,15(20):8689-8692.

[3] Krishnappa P, Mohamad IB, Lin YJ, et al. Expression of P16 in high-risk human papillomavirus related lesions of the uterine cervix in a government hospital, Malaysia[J]. Diagn Pathol,2014,9(1):202.

[4] Klionsky DJ, Schulman BA. Dynamic regulation of macroautophagy by distinctive ubiquitin-like proteins[J]. Nat Struct Mol Biol, 2014,21(4):336-345.

[5] Zhang L, Sung JJ, Yu J, et al. Xenophagy in helicobacter pylori- and Epstein-Barr virus-induced gastric cancer[J]. J Pathol,2014, 233(2):103-112.

[6] Monroy A, Lithgow GJ, Alavez S. Curcumin and neurodegenerative diseases[J]. Biofactors,2013,39(1):122-132.

[7] Vera-Ramirez V, Perez-Lopez P, Varela-Lopez A, et al. Curcumin and liver disease[J]. Biofactors,2013,39(1):88-100.

[8] Tilghman SL, Rhodes LV, Bratton MR, et al. Phytoalexins, miRNAs and breast cancer:a review of phytochemical-mediated miRNA regulation in breast cancer[J]. J Health Care Poor Under-served,2013,24(1):36-46.

[9] Singh AK, Misra K. Human papilloma virus 16 E6 protein as a target for curcuminoids, curcumin conjugates and congeners for chemoprevention of oral and cervical cancers[J]. Interdiscip Sci,

[J]. 检验医学与临床,2014,11(1):75-77.

[2] 祁从辉,孟祥翠,李进. C-反应蛋白测定在感染性疾病中的价值[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(12):1373-1374.

[3] 呼新建. 降钙素原的研究进展[J]. 医学综述,2010,16(12):1795-1797.

[4] 朱星成. PCT,hs-CRP,SAA 在感染性疾病中的临床应用[D]. 昆明:昆明医科大学,2013.

[5] 屈文烈,王镇山,顾俊明. 血清降钙素原 C 反应蛋白内毒素的测定对社区获得性肺炎的诊断价值[J]. 中国实用内科杂志:临床版, 2006,26(11):832-833.

[6] 杨吉华,魏祥松,廖兵. 血清降钙素原、超敏 C 反应蛋白和白细胞介素 6 鉴别新生儿感染性肺炎的意义[J]. 重庆医学,2007,36(12):1194-1195.

[7] 熊大迁,张朝明,余修中,等. 降钙素原 C-反应蛋白及病原体检测对下呼吸道感染的诊断价值[J]. 检验医学与临床,2012,9(14): 1694-1696.

[8] 唐雪芳,仆林明,宋端怡. 联合检测血清降钙素原和 C-反应蛋白在婴幼儿重症肺炎早期诊断中的价值[J]. 医学信息,2011,12(23): 214-215.

[9] 徐向勇,李正峰. 降钙素原与 C 反应蛋白在新生儿感染性肺炎中的诊断价值[J]. 中华医院感染学杂志,2013,23(10):2515-2517.

[10] 严晓华,郭向阳,焦富勇. 儿童支气管肺炎 70 例降钙素原、C 反应蛋白、白细胞检测及应用价值[J]. 陕西医学杂志,2014,43(1): 119-120.

(收稿日期:2015-02-12)

2013,5(2):112-118.

[10] Biederbick A, Kern HF, Elsasser HP. Monodansylcadaverine. (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles[J]. Eur J Cell Biol,1995,66(1):3-14.

[11] Gradissimo Oliveira A, Delgado C, Verdasca N, et al. Prognostic value of human papillomavirus types 16 and 18 DNA physical status in cervical intraepithelial neoplasia[J]. Clin Microbiol Infect, 2013,19(10):447-450.

[12] Martinez-Outschoorn U, Sotgia F, Lisanti MP. Tumor microenvironment and metabolic synergy in breast cancers:critical importance of mitochondrial fuels and function[J]. Semin Oncol,2014, 41(2):195-216.

[13] Orvedahl A, Alexander D, Tallóczy Z, et al. HSV-1 ICP34. 5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein [J]. Cell Host Microbe,2007,1(1):23-35.

[14] Leib DA, Alexander DE, Cox D, et al. Interaction of ICP34. 5 with Beclin 1 modulates herpes simplex virus type 1 pathogenesis through control of CD4+ T-cell responses[J]. J Virol,2009,83(23):12164-12171.

[15] Mehta P, Henault J, Kolbeck R, et al. Noncanonical autophagy: one small step for LC3, one giant leap for immunity[J]. Curr Opin Immunol,2014,26(3):69-75.

(收稿日期:2015-05-05)

