

• 论 著 •

上调人 1 型大麻素受体表达诱导人宫颈癌细胞凋亡的实验研究

张 萌¹, 龙 明², 郑慧峰¹, 杨 缙^{1△}, 李 晶²

(1. 重庆市人民医院重症医学科 400014; 2. 重庆三峡医药高等专科学校 404120)

摘要:目的 通过构建基因真核表达载体,探讨人 1 型大麻素受体(hCB1R)对人宫颈癌 HeLa 细胞体外凋亡的作用及机制。方法 构建 GV230-hCB1R 质粒,经双酶切、测序鉴定后,转染 HeLa 细胞,免疫印迹(Western blot)法及免疫荧光细胞化学染色(ECL)联合激光扫描共聚焦显微镜技术检测 hCB1R 表达及细胞定位;流式细胞术检测细胞凋亡,Western blot 法及实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 hCB1R、Bcl-2、Bax、Bad 的表达。结果 hCB1R 转染 HeLa 细胞后表达相对分子质量为 40 000 的 hCB1R 蛋白,细胞膜和细胞质中均有 hCB1R 表达;过表达的 hCB1R,可上调 Bax、Bad 的表达,抑制 Bcl-2 的表达,流式细胞术检测结果显示 HeLa 细胞株呈现凋亡,hCB1R 对宫颈癌 HeLa 细胞株的生长表现出明显的抑制作用,促进宫颈癌 HeLa 细胞凋亡。结论 上调 HeLa 细胞 hCB1R 表达可增强 Bax、Bad 表达,抑制 Bcl-2 表达,诱导细胞凋亡。

关键词:人 1 型大麻素受体; HEK293 细胞; 宫颈癌细胞; 细胞凋亡

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.15.021 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2016)15-2128-04

Experimental study on up-regulating expression of hCB1R for inducing apoptosis of HeLa cells

ZHANG Meng¹, LONG Ming², ZHENG Hui Feng¹, YANG Jin^{1△}, LI Jing²

(1. Department of Intensive Care Unit, People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400014, China;

2. Three Gorges of Chongqing Medical College, Chongqing 404120, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect and mechanism of human type 1 cannabinoid receptor (hCB1R) on the apoptosis of cervical cancer HeLa cell by constructing the gene eukaryotic expression vector. **Methods** The GV230-hCB1R plasmid was constructed and identified by the double enzyme digestion and DNA sequencing. Then it was transfected into HeLa cells. The expression and cellular localization(ECL) of hCB1R was detected by Western blot and immunofluorescence cellular chemical staining combined with laser scanning confocal microscope; the apoptosis rate was tested by flow cytometry; the mRNA and protein expression of hCB1R, Bcl-2, Bax and Bad was examined by real-time fluorescent quantitative PCR(qRT-PCR). **Results** After transfection into HeLa cells, hCB1R protein with the relative molecular mass of 40 000 was expressed in both cytoplasm and cellular membrane of cells. The over expression of hCB1R could up-regulate the apoptosis of Bax and Bad, and inhibited the Bcl-2 expression. The flow cytometry results displayed that HeLa cell line showed apoptosis, hCBIR had obvious inhibiting effect on the growth of cervical cancer HeLa cell line and promoted apoptosis. **Conclusion** Up-regulating expression of hCB1R in HeLa cells could enhance the expression of Bax and Bad inhibit the expression of Bcl-2, thus inducing the cellular apoptosis.

Key words: human type 1 cannabinoid receptor; HEK293 cell; cervical cancer cell; apoptosis

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤,占女性生殖系统恶性肿瘤的半数以上,其病死率居女性恶性肿瘤的首位^[1-2]。近年来随着人乳头状瘤病毒(HPV)感染率的上升,宫颈癌的发病率呈上升趋势,且好发年龄趋于年轻化,成为严重危害妇女健康的主要疾病之一^[3]。目前治疗的常用方法为放、化疗或手术治疗,但是已有报道,这些治疗方法会出现预后不佳,肿瘤复发等问题,且这些问题仍是临床上不能解决的问题^[4-5]。为寻求更多更好的方法来治疗该病并降低治疗成本,国内外学者正在研究各种靶向治疗的方法^[6]。大麻素受体有 2 种类型:大麻素受体 1(CB1R)和大麻素受体 2(CB2R)。有研究表明,大麻素对癌细胞具有生长抑制作用^[7],但是,能否通过大麻受体抑制宫颈癌细胞的生长还未能得到充分证实。本研究通过构建 hCB1R 真核表达载体,确定其在 HeLa 细胞内的表达,研究 hCB1R 对宫颈癌细胞凋亡作用及其作用机制,为大麻系统在肿瘤治疗中的应用奠定一定的实验基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料 人脑组织 cDNA、HEK293 细胞、宫颈癌 HeLa 细胞、GV230 质粒由本实验室保存;总 RNA 提取试剂盒、

RNA 逆转录试剂盒购自 Promega 公司;T 载体连接试剂盒、T4 DNA 连接酶、DH5α 感受态细菌胶回收试剂盒、实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)试剂盒购自 Takara 公司;Xho I 和 Kpn I 酶购自 NEB 公司;质粒提取试剂盒购自 Qiagen 公司;Lipofectamine™2000 购自 Invitrogen 公司;兔源 CB1R 抗体、兔源 Bcl-2 抗体、兔源 Bax 抗体、兔源 Bad 抗体购自 Abgent 公司;兔源 GAPDH 抗体购自 Bioword 公司;HRP 标记的山羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥公司;红色荧光标记的山羊抗兔 IgG 购自 Abbkine 公司;4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)及防荧光淬灭剂购自碧云天公司;流式细胞仪购自 Coulter 公司;GeneGnome5 化学发光成像仪购自 Syngene 公司;iQ5 型 qRT-PCR 仪购自 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 hCB1R 引物设计与合成 根据 GenbankNM_016083.4 基因序列,采用 Primer premier 5.0 软件设计引物。在上游引物的 5'加入 Xho I 酶切位点,下游引物 5'加入 Kpn I 酶切位点,引物由上海 Invitrogen Life Technologies 公司合成。hCB1R、Bcl-2、Bax、Bad 以及 GAPDH 的上下游引物序列见表 1。

表 1 ZRT-PCR 相关引物

基因型	上游引物(5'~3')	下游引物(3'~5')
hCB1R	GACCATAGCCATTGTGTGATCG	GGTTTCATCAATGTGTGGGA
Bcl-2	ATGTGTGTGGAGAGCGTCAACC	GCATCCCAGCCTCCGTTATC
Bax	GCTGTTGGGCTGGATCCAAG	TCAGCCCATCTTCTTCCAGA
Bad	CCAGTGAGCAGGAAGACTC	GGTAGGAGCTGTGGCGACT
GAPDH	GCCTCAAGATCATCAGCAATGC	CATGGACTGTGGTCATGAGTCTCT

1.2.2 hCB1R PCR 扩增及产物纯化 以人 cDNA 为基因模板,PCR 扩增 hCB1R 编码序列(CDS)区片段。PCR 反应条件:50 μL 体系;94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 2 min,循环 30 次;72 ℃延伸 10 min。PCR 产物用 120 g/L 琼脂糖凝胶电泳,按凝胶回收试剂盒说明回收纯化目的片段。

1.2.3 hCB1R 真核表达载体构建及鉴定 用 Xho I 和 Kpn I 酶对 hCB1R PCR 纯化产物和真核载体质粒 GV230 进行酶切,酶切产物回收纯化。按 T4 DNA 连接酶试剂盒说明连接,连接产物转 DH5α 感受态细胞,接种于含卡那霉素的 LB 培养基板培养,筛选阳性克隆,再接种于含卡那霉素的 LB 液体培养基,菌液按质粒提取试剂盒说明提取质粒,质粒用 Xho I 和 Kpn I 进行酶切,并送上海 Invitrogen 公司测序。

1.2.4 hCB1R 在 HeLa 细胞中表达和定位的检测 接种 HeLa 细胞到含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基的 35 mm 培养皿中,37 ℃,50 mL/L CO₂ 培养过夜,细胞的汇合度在 50%~70%后,设 hCB1R 组和空质粒组,按 Lipofectamine™ 2000 转染说明书分别转染 GV230-hCB1R 和 GV230,48 h 后收获细胞,超声裂解,获取蛋白。蛋白样品 100 ℃变性 10 min,5 μL 蛋白样本上样,100 g/L 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转膜,含 5 g/L 脱脂牛奶的 TBST 封闭 2.0 h,兔抗 CB1 抗体(1:500)4 ℃孵育过夜,辣根过氧化物(HRP)标记的山羊抗兔 IgG 室温孵育 2.0 h,化学发光法(ECL)显影。转染质粒 HeLa 细胞 48.0 h 后,吸去上清,加 1 mL 冰甲醇固定 20 min;30 mL/L H₂O₂ 室温 20 min;50 mL/L 胎牛血清封闭 1.5 h;兔抗 CB1R 抗体(1:100)4 ℃孵育过夜,红色荧光标记的山羊抗兔 IgG(1:50)37 ℃孵育 2.0 h,DAPI 染色 5 min,防荧光淬灭剂封片,激光共聚焦扫描检测荧光。

1.2.5 hCB1R 及凋亡相关因子蛋白表达的检测 hCB1R 组与空白组,分别以抗兔源 CB1R(1:500)、兔源 Bcl-2(1:1 000)、兔源 Bax(1:1 000)、兔源 Bad(1:1 000)的一抗 4 ℃孵育过夜,HRP 标记的山羊抗兔 IgG(1:1 000),室温孵育 2 h,ECL 法显影。

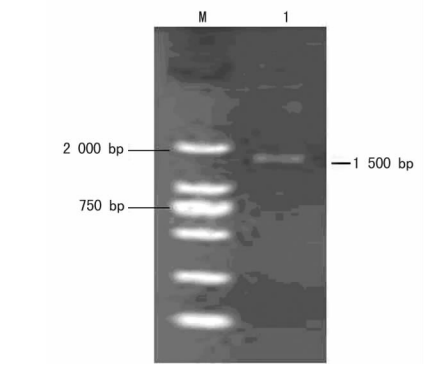
1.2.6 hCB1R 及凋亡相关因子的 mRNA 表达的检测 收集 CB1R 组与空白组细胞,按 RNA 提取试剂盒,RNA 逆转录试剂盒说明书操作得到 cDNA,按 qRT-PCR 试剂盒说明操作,25 μL 反应体系,PCR 反应条件:95 ℃,10 min;94 ℃,20 s,60 ℃,30 s,72 ℃,30 s,40 个循环。实验数据采用 2^{-ΔΔCt} 分析,ΔΔCt=(Ct_{目的基因}-Ct_{内参})实验组-(Ct_{目的基因}-Ct_{内参})空白组,相对定量(RQ),以 RQ_{实验组}=2^{-ΔΔCt},RQ_{对照组}=1 计算。

1.3 统计学处理 数据采用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析,计量资料采用 *t* 检验,以 *P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PCR 扩增 hCB1R PCR 产物电泳,在 1 500 bp 处出现目

的条带,与预期结果一致。见图 1。



注:M,DL5000 DNA marker;1,hCB1R。

图 1 hCB1R PCR 产物电泳图

2.2 酶切及测序鉴定重组质粒 构建质粒 GV230-hCB1R,见图 2。用 Xho I 和 Kpn I 酶切 GV230 载体质粒和 GV230-hCB1R 重组质粒,获得 1 500 bp 片段。酶切结果与预期结果一致。见图 3。

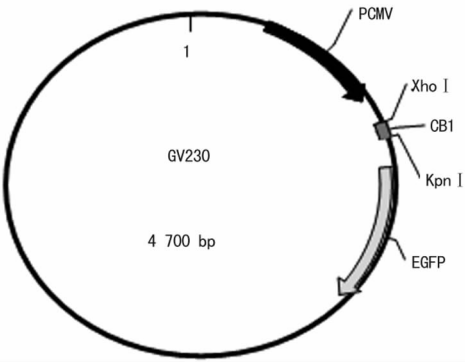
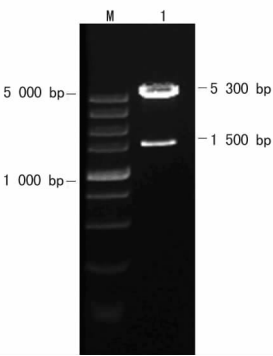


图 2 GV230-hCB1R 质粒示意图

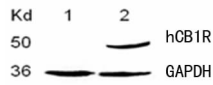


注:M,DL5000 DNA maker;1,GV230-hCB1R 质粒。采用 Xho I/Kpn I 双酶切。

图 3 GV230-hCB1R 酶切图

2.3 Western blot 法检测 hCB1R 表达 Western blot 法检测目的蛋白表达,hCB1R 蛋白条带位于相对分子质量 50×10³

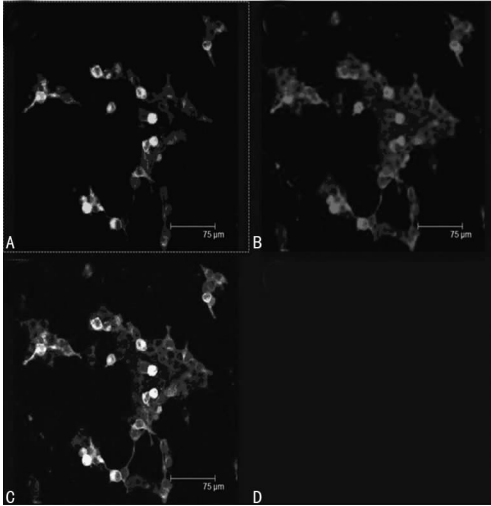
处,与预期结果一致。见图 4。



注:1,空白组;2,hCB1R 组。

图 4 hCB1R Western blot 法检测结果

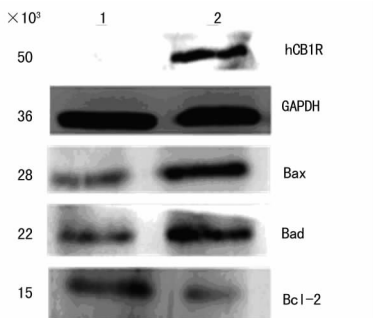
2.4 免疫荧光细胞化学染色联合激光扫描共聚焦显微镜技术检测 hCB1R 在 HeLa 定位表达 在 549 nm 段,激光扫描共聚焦显微镜检测 hCB1R 表达,橙黄色为表达物,hCB1R 表达于细胞膜和细胞质上,与预期结果一致。见图 5。



注:A,绿色荧光;B,红色荧光;C,复合荧光;D,空白。

图 5 hCB1R 在 HEK293 细胞的定位(×200)

2.5 Western blot 法检测 hCB1R、Bcl-2、Bax、Bad 的蛋白表达 Western blot 显示 hCB1R 组和空质粒组中凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、Bad 均有表达。hCB1R 组中的 Bax、Bad 蛋白表达高于空质粒组,但 Bcl-2 蛋白表达低于空质粒组,且差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 6。



注:1,空质粒组;2,hCB1R 组。

图 6 Western blot 法检测 hCB1R、Bcl-2、Bax、Bad 蛋白表达结果

2.6 荧光定量 PCR 检测 Bcl-2、Bax、Bad 的 mRNA 表达 荧光定量 PCR 检测结果显示 hCB1R 组和空质粒组相比较,hCB1R 组中的 Bax、Bad mRNA 表达高于空质粒组,但 Bcl-2 mRNA 表达低于空质粒组,且差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨 论

CB1R 分布于脑部、生殖系统等;CB2R 存在免疫系统中,两者均为 7 次跨膜 G 蛋白受体,有 68% 同源性。大麻素(cannabinoids)是大麻植物中的有效成分,大麻素具有止痛、镇静、抗痉挛、抗呕吐等多种药理作用,并具有明显抗肿瘤活性,对皮

肤癌、乳腺癌、神经胶质瘤等有抗肿瘤的作用^[7]。内源性(如 2-AG 和 anandamide)、天然的(如四氢大麻酚,THC)及合成的(如氨基吡啶大麻生物 WIN55,212-2,WIN)3 种。现有研究发现,大麻素类化合物通过刺激增加组织中大麻素受体下调基质金属蛋白酶 1 的表达,选择性抑制肿瘤细胞恶性增殖,对乳腺癌、前列腺癌和胰腺癌等具有明显的抑制作用^[8-9]。

此外,国内外临床前实验发现,CB1R 减轻患者疼痛及恶心、提高心情以及刺激食欲生物效应外,它还具有预防癌症发生的功能。CB1R 在人类直肠癌中扮演着抑癌基因的角色,通过甲基化基因启动子消弱直肠 CB1R 受体表达加快肿瘤细胞增长,反之,激活 CB1R 受体调节 cAMP 依赖性 PKA 信号通路,下调抗凋亡因子的存活率,则诱导肿瘤凋亡^[10]。研究表明 CB1R/2R 在肝癌细胞内高表达,体内外试验均证实 Δ^9 -THC 对肝癌细胞 HepG2 /BEL-7402 具有抑制作用^[11-12]。在小鼠模型中,内源性大麻素 AEA 可减少结肠异常隐窝灶的形成,CB1R 和 CB2R 两种受体在结肠癌 CaCo-2 细胞中都有表达,CB1R 的表达量远远高于 CB2R。AEA 可通过 CB1R 受体及脂筏介导抑制结肠癌 CaCo-2 细胞 p-AKT 蛋白和 caspase-3 等信号分子的表达^[13],抑制增殖并促进其凋亡,CB1R 受体抑制剂 SRI41716A 能部分拮抗该抑制效应^[14-15]。

激活大多数信号通路,如 p38MAPK、PI3K、ERK 调节凋亡级联 Bcl-2/Bcl-xL 或 Bad 蛋白影响细胞凋亡,而调节细胞凋亡主要通过两条途径:一是细胞表面的死亡受体 Fas 介导的细胞凋亡;二是线粒体信号系统如 Bcl-2 家族^[16]。Bcl-2 家族是研究最为深入和广泛的凋亡调节基因,一般分为抗凋亡基因和促凋亡基因。其中抗凋亡基因中包括 Bcl-2、Mcl 等,促凋亡基因包括 Bax、Bad 等。Bcl-2 基因产物抑制细胞色素 C 的释放,从而发挥抗凋亡效能^[17-18]。

对于宫颈癌的治疗药物及其作用机制的研究开发一直是宫颈癌研究的热点。本试验首先构建了 hCB1R 真核表达载体,转染 HeLa 细胞并检测 hCB1R 在细胞中表达。检测转染后 HeLa 细胞中 Bax、Bad、Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达变化,结果显示 hCB1R 组中促凋亡因子 Bad、Bax 在 mRNA 和蛋白水平的表达量高于空白组,而抗凋亡因子 Bcl-2 的表达量低于空白组,表明 hCB1R 通过上调 Bax、Bad 的表达,同时下调 Bcl-2 的表达促进 HeLa 细胞的凋亡。试验表明,hCB1R 能诱导细胞凋亡是通过激活不同的信号通路,调节与细胞凋亡相关蛋白的表达。

本研究成功构建了 GV230-hCB1R 质粒,为进一步研究 hCB1R 的生物活性提供了载体基础;hCB1R 通过调节 Bcl-2 家族相关因子诱导宫颈癌细胞 HeLa 凋亡,为肿瘤的基因治疗及机制研究提供了实验基础。大麻素系统在宫颈癌的发生、发展中起重要作用,其介导细胞增殖和凋亡方面均起着重要作用,有望成为治疗宫颈癌的新靶点^[19-20]。

参考文献

- [1] 蒋静,邓青. 宫颈癌的筛查方法及其评价[J]. 中国妇幼保健,2008,23(20):2900-2902.
- [2] Armaroli P, Villain P, Suonio E, et al. European code against Cancer, 4th edition: Cancer screening[J]. Cancer Epidemiol,2015,39(Suppl 1):S139-152.
- [3] Hernández DM, Apresa-García T, Patlán-Pérez RM, et al.

- Epidemiological overview of uterine cervical Cancer[J]. Rev Med Inst Mex Seguro Soc, 2015, 53(12): 154-161.
- [4] 朴金霞, 徐娜, 浦建文. 多西紫杉醇联合顺铂治疗宫颈癌放疗后复发的临床研究[J]. 中国妇幼保健, 2007, 22(33): 4682-4683.
- [5] 沈李伟, 翟爱民, 杜利力, 等. 同步放化疗治疗中晚期宫颈癌的临床疗效观察[J]. 中国医药导刊, 2010, 12(11): 1877.
- [6] Proto MC, Gazerro P, Di Croce L, et al. Interaction of endocannabinoid system and steroid hormones in the control of colon Cancer cell growth[J]. J Cell Physiol, 2012, 227(1): 250-258.
- [7] Wang D, Wang H, Ning W, et al. Loss of cannabinoid receptor 1 accelerates intestinal tumor growth[J]. Cancer Res, 2008, 68(15): 6468-6476.
- [8] Jung HW, Park I, Ghil S. Cannabinoid receptor activation inhibits cell cycle progression by modulating 14-3-3 β [J]. Cell Mol Biol Lett, 2014, 19(3): 347-360.
- [9] Greenhough A, Patsos HA, Williams AC, et al. The cannabinoid delta (9)-tetrahydrocannabinol inhibits RAS-MAPK and PI3K-AKT survival signalling and induces BAD-mediated apoptosis in colorectal Cancer cells[J]. Int J Cancer, 2007, 121(10): 2172-2180.
- [10] Ramer R, Hinz B. Inhibition of Cancer cell invasion by cannabinoids via increased expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1[J]. J Natl Cancer Inst, 2008, 100(1): 59-69.
- [11] Pucci M, Pasquariello N, Battista N, et al. Endocannabinoids stimulate human melanogenesis via type-1 cannabinoid receptor[J]. J Biol Chem, 2012, 287(19): 15466-15478.
- [12] Fonseca BM, Correia-da-Silva G, Teixeira NA. The endocannabinoid anandamide induces apoptosis of rat decid-
- ual cells through a mechanism involving ceramide synthesis and p38 MAPK activation[J]. Apoptosis, 2013, 18(12): 1526-1535.
- [13] Rimmerman N, Ben-Hail D, Porat Z, et al. Direct modulation of the outer mitochondrial membrane Channel, voltage-dependent anion Channel 1 (VDAC1) by cannabidiol: a novel mechanism for cannabinoid-induced cell death[J]. Cell Death Dis, 2013, 4(12): e949.
- [14] Brown I, Cascio MG, Rotondo D, et al. Cannabinoids and omega-3/6 endocannabinoids as cell death and anticancer modulators[J]. Prog Lipid Res, 2013, 52(1): 80-109.
- [15] Gustafsson AB, Gottlieb RA. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 292(1): C45-51.
- [16] Hartman ML, Czyz M. Anti-apoptotic proteins on guard of melanoma cell survival[J]. Cancer Lett, 2013, 331(1): 24-34.
- [17] Waibel M, Solomon VS, Knight DA, et al. Combined targeting of JAK2 and Bcl-2/Bcl-xL to cure mutant JAK2-driven malignancies and overcome acquired resistance to JAK2 inhibitors[J]. Cell Rep, 2013, 5(4): 1047-1059.
- [18] Geiger S, Nickl K, Schneider EH, et al. Establishment of recombinant cannabinoid receptor assays and characterization of several natural and synthetic ligands[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2010, 382(2): 177-191.
- [19] 吴敏, 任瑞宝. 大麻素类化合物抗肿瘤研究新进展[J]. 肿瘤, 2013, 33(5): 478-482.
- [20] Cridge BJ, Rosengren RJ. Critical appraisal of the potential use of cannabinoids in Cancer management[J]. Cancer Manag Res, 2013, 5(5): 301-313.

(收稿日期: 2016-02-18 修回日期: 2016-04-21)

(上接第 2127 页)

- 评价[J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(31): 3505-3506.
- [2] 侯健. 发性骨髓瘤诊断的思考[J]. 临床血液学杂志, 2009, 22(1): 1-2.
- [3] 史小安. 206 例多发性骨髓瘤 M 蛋白分型及意义[J]. 中国实验诊断学, 2012, 16(3): 494-495.
- [4] Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, et al. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. [J]. Blood, 2005, 106(1): 296-303.
- [5] Jakob C, Egerer K, Liebis P, et al. Circulating proteasome levels are an Independent prognostic factor for survival in multiple myeloma[J]. Blood, 2007, 109(5): 2100-2105.
- [6] 张之南, 沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2007.
- [7] 侯健, 孔宪涛, 刘焱, 等. 337 例蛋白血症的血清免疫学特征[J]. 中华医学检验杂志, 1997, 20(2): 35-37.
- [8] Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple Myeloma[J]. Blood, 2008, 111(6): 2962-2972.
- [9] 叶文娟. 多发性骨髓瘤的实验室诊断及分型[J]. 临床和实验医学杂志, 2008, 7(12): 61-62.
- [10] 杨志钊, 杨山虹, 郭子文, 等. 本周氏蛋白电泳在 M 蛋白检测中价值的探讨[J]. 中国热带医学, 2006, 6(12): 2180-2181.
- [11] 杨璐, 徐俊荣, 顾兵. 免疫固定电泳技术对多发性骨髓瘤的分型诊断及预后判断价值[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(16): 1975-1976.
- [12] 苏畅, 罗绍凯, 许丽梅, 等. 轻链型多发性骨髓瘤 23 例临床分析[J]. 中国全科医学, 2004, 7(18): 1308-1309.

(收稿日期: 2016-02-14 修回日期: 2016-04-25)