

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.03.020

张璐敏, 吕学维, 邵邻相, 等. 野艾蒿挥发油对 HeLa 癌细胞形态与结构的影响[J]. 广西植物, 2014, 34(3):393—397

Zhang LM, Lü XW, Shao LX, et al. Effects of essential oil from *Artemisia lavandulaefolia* on morphology and structure of HeLa cells *in vitro*[J].*Guihaia*, 2014, 34(3):393—397

# 野艾蒿挥发油对 HeLa 癌细胞形态与结构的影响

张璐敏, 吕学维, 邵邻相, 麻艳芳, 成文召, 高海涛

(浙江师范大学 化学与生命科学学院, 浙江 金华 321004)

**摘要:** 采用 MTT 法检测细胞活力, 用倒置显微镜、荧光显微镜和扫描电子显微镜观察细胞形态与结构的变化, 用激光共聚焦显微镜观察细胞微管的分布, 从而研究了野艾蒿挥发油对 HeLa 人宫颈癌细胞形态与结构的影响。结果表明: (1) 野艾蒿挥发油对 HeLa 癌细胞的增殖有明显的抑制作用, 呈剂量和时间依赖性。(2) 野艾蒿挥发油处理 HeLa 癌细胞 24 h 后, 100、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  实验组细胞体积缩小, 核染色质凝集、微绒毛消失、细胞表面有泡状突起, 微管解聚, 呈现典型的凋亡特征; 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  实验组细胞膜破裂、胞浆内含物外泄, 呈明显的坏死特征。(3) 野艾蒿挥发油具有抑制 HeLa 癌细胞增殖的作用, 低、中浓度的野艾蒿挥发油诱导细胞凋亡, 而高浓度的野艾蒿挥发油引起细胞坏死。

**关键词:** 野艾蒿; 挥发油; 细胞形态; 细胞结构; HeLa 癌细胞

中图分类号: Q942.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2014)03-0393-05

## Effects of essential oil from *Artemisia lavandulaefolia* on morphology and structure of HeLa cells *in vitro*

ZHANG Lu-Min, LÜ Xue-Wei, SHAO Lin-Xiang, MA Yan-Fang,  
CHENG Wen-Zhao, GAO Hai-Tao

(College of Chemistry and Life Science, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China)

**Abstract:** The effects of essential oil from *Artemisia lavandulaefolia* on morphology and structure of HeLa cells were investigated. Cell viability was assayed using MTT method. The differences of cell morphology and structure were observed by inverted microscopy, fluorescence and scanning electron microscope. Furthermore, the distribution of microtubules was observed by confocal microscopy. The results showed that essential oil from *Artemisia lavandulaefolia* could inhibit the proliferation of HeLa cells in dose- and time-dependent manner. Treated with essential oil of *Artemisia lavandulaefolia* for 24 h, cells in 100 and 200  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  experiment groups exhibited the typical morphology changes of undergoing apoptosis, such as cell shrinkage, nucleus chromatin condensed, microvilli disappear, bubbly uplift and the microtubules depolymerized. However, the cells in the 400  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  group showed the necrotic morphology changes including cytomembrane rupture and cytoplasm spillover. Essential oil from *Artemisia lavandulaefolia* could inhibit the proliferation of HeLa cells *in vitro*. And low and middle concentrations of essential oil from *Artemisia lavandulaefolia* could induce apoptosis, whereas high concentration of the compounds resulted in necrosis in HeLa cells.

**Key words:** *Artemisia lavandulaefolia*; essential oil; cell morphology; cell structure; HeLa cells

收稿日期: 2013-08-15 修回日期: 2013-10-23

基金项目: 浙江省科技厅项目(2008C22023)

作者简介: 张璐敏(1987-), 女, 山西长治人, 硕士研究生, 研究方向为细胞生物学, (E-mail)zhanglumin208@163.com。

\*通讯作者: 邵邻相, 教授, 研究方向为细胞生物学, (E-mail)shaolinxiang@zjnu.cn。

近年来,植物挥发油成分及其生物活性的研究已经成为热点(宁德生等,2013;刘磊等,2012)。野艾蒿(*Artemisia lavandulaefolia*),为菊科蒿属多年生草本植物,有艾叶、野艾之称,是传统的药用植物。野艾蒿具有祛湿、散寒、温经、止血等作用。在临床上可用于胆囊炎、肝硬化、口腔炎、发热、支气管炎等疾病的治疗。野艾蒿植物中含有多种对人体有益的氨基酸、维生素、微量元素等营养物质(王登奎等,2006),其挥发油中也含有多种化学成分(王晓琴等,2011),包括烯烴类、黄酮类、桉油素类等化合物,具有抑菌(Cha *et al.*,2005)、杀虫、抗氧化、增强机体免疫力(王登奎等,2006)、抗肿瘤等作用。野艾蒿挥发油可以诱导人口腔上皮癌细胞凋亡,其主要成分为1,8-桉叶素(Cha *et al.*,2010)。但有关野艾蒿挥发油对 HeLa 癌细胞影响的研究尚未见有报道。本实验主要研究了野艾蒿挥发油对体外培养的 HeLa 癌细胞增殖及细胞形态与结构的影响,为野艾蒿的开发利用提供实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 野艾蒿挥发油的制备

将新鲜野艾蒿叶粉碎,参考麻艳芳等(2010)的方法,用水蒸气蒸馏法提取挥发油,无水硫酸钠脱水,4℃避光保存。精确称取100 mg挥发油,加10 μL吐温-80溶解,涡旋混匀,PBS配至1 mL,过滤灭菌,临用前用培养基稀释至所需浓度。

### 1.2 主要试剂和仪器

胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);胰蛋白酶、DMEM培养基(Gibco公司);MTT、吐温-80、DMSO、戊二醛、TritonX-100、BSA、Anti- $\alpha$ -Tubulin(Sigma公司);Alexa Fluor<sup>®</sup>488 驴抗鼠二抗、防荧光淬灭剂(Invitrogen公司)。3111型CO<sub>2</sub>细胞培养箱、1500型全自动酶联免疫检测仪(美国Thermo公司);Eclipse E600型荧光显微镜(日本Nikon公司);KYKY-1000B型扫描电子显微镜(中国中科院科学仪器厂);TCS SP5激光共聚焦扫描显微镜(德国Leica公司)。

### 1.3 细胞培养与药物处理

细胞接种在含10%胎牛血清的DMEM培养基(100 μg/mL的青霉素和链霉素),37℃、5%CO<sub>2</sub>的饱和湿度条件下培养。取对数生长期细胞以1×10<sup>4</sup>个/孔接种于96孔板中,培养12 h后加入挥发

油,终浓度为31.25、62.5、125、250、500、1 000 μg/mL,设置0.01%吐温-80阴性对照组;细胞以5×10<sup>5</sup>个/孔接种于有盖玻片的6孔板中,培养12 h后加入挥发油,终浓度为100、200、400 μg/mL,设置0.01%吐温-80阴性对照组,400 μg/mL的5-氟尿嘧啶(5-FU)阳性对照组。作用24 h后进行各项指标检测。

### 1.4 MTT 检测细胞活力

野艾蒿挥发油作用细胞6、12、24 h后,每孔加入20 μL MTT(5 mg/mL)溶液,每组5个重复孔,37℃孵育4 h后,弃去培养基,加入150 μL DMSO溶液,避光振荡15 min,全自动酶联免疫检测仪570 nm波长下测定吸光度(A)值。计算各组细胞存活率。细胞存活率(%)=A 实验组/A 对照组×100%。

### 1.5 倒置显微镜观察细胞形态

野艾蒿挥发油作用 HeLa 癌细胞24 h后,倒置显微镜观察,拍照。

### 1.6 Hoechst33342/PI 荧光染色观察细胞核形态

取细胞爬片,滴加等体积的Hoechst 33342染液(5 μg/mL)和PI(5 μg/mL)混合液10 μL进行染色,荧光显微镜下观察,拍照。

### 1.7 扫描电镜观察细胞表面超微结构

采用麻艳芳等(2010)的实验方法进行细胞爬片的处理,扫描电子显微镜观察拍照。

### 1.8 透射电镜观察细胞内部超微结构

细胞用2.5%戊二醛、1%锇酸依次固定,常规脱水、包埋切片,透射电镜观察拍照。

### 1.9 激光共聚焦显微镜观察微管纤维的结构与分布

取细胞爬片,PBS清洗后3.7%甲醛4℃固定过夜;PBS清洗,0.1% TritonX-100透膜15 min;PBS清洗;5% BSA室温封闭30 min; $\alpha$ -Tubulin鼠多克隆抗体(1:1 000)4℃孵育过夜;PBS清洗;Alexa Fluor<sup>®</sup>488 驴抗鼠 IgG(1:1 000)避光室温孵育30 min;再次PBS清洗,加入防荧光淬灭液,4℃晾干,指甲油封片;激光共聚焦显微镜观察,拍照。

### 1.10 统计分析

运用SPSS 18.0软件进行单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异性显著, $P < 0.01$ 为差异性极显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 野艾蒿挥发油对 HeLa 细胞活力的影响

MTT结果显示,31.25 μg/mL野艾蒿挥发油

处理 HeLa 细胞 6、12 h 后,细胞存活率分别为 96.37%、92.63%,抑制作用不明显;相反,野艾蒿挥发油处理 24 h 后,细胞存活率为 104.85%,促进细胞的生长;62.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的野艾蒿挥发油作用 HeLa 细胞 6、12、24 h 后,存活率分别为 93.40%、83.17%、81.91%,呈时间依赖性;125、250、500、1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  野艾蒿挥发油处理 HeLa 细胞 6、12、24 h 后,细胞存活率明显变小,差异极显著性( $P < 0.01$ )。图 1 结果表明,随着浓度的增加,野艾蒿挥发油对细胞的生长抑制逐渐增强。低浓度时对 HeLa 细胞无明显抑制作用,中、高浓度时抑制 HeLa 癌细胞增殖,呈剂量和时间依赖性。

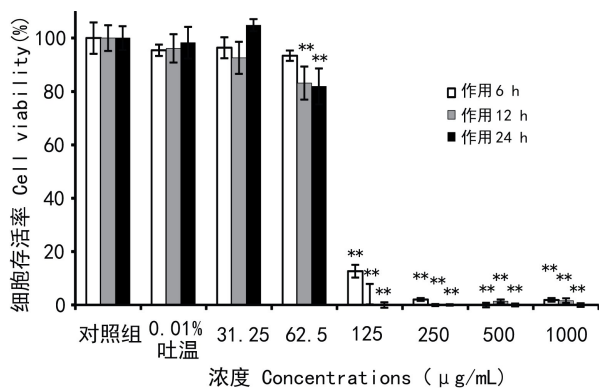


图 1 野艾蒿挥发油对 HeLa 细胞增殖的影响  
Fig. 1 Effects of essential oil from *Artemisia lavandulaefolia* on HeLa cell proliferation

## 2.2 野艾蒿挥发油对 HeLa 癌细胞形态的影响

对照组与阴性对照组(图 2: A、B)细胞大而饱满,多呈梭形,表面光滑,生长旺盛。阳性对照组(图 2: C)细胞皱缩,呈不规则状,表面粗糙,贴壁性差,有凋亡小体产生。100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  野艾蒿挥发油处理后(图 2: D),细胞体积缩小,数量减少,聚集成团,出现凋亡小体,呈现典型细胞凋亡特征;200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  野艾蒿挥发油处理后(图 2: E),细胞干瘪,失去立体感,细胞碎片和漂浮细胞增多;400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的野艾蒿挥发油处理后(图 2: F),细胞膜破损,胞浆外溢,出现许多颗粒状物质,表明细胞已经坏死。

## 2.3 野艾蒿挥发油对 HeLa 癌细胞核变化的影响

对照组与阴性对照组(图 3: A、B)细胞核呈均一的弱蓝色荧光,细胞形态规则,多呈圆形或椭圆形。阳性对照组(图 3: C)细胞核固缩,染色质凝集成颗粒状分布于细胞核边缘,染色呈强蓝色荧光。100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  野艾蒿挥发油处理后(图 3: D),细胞核

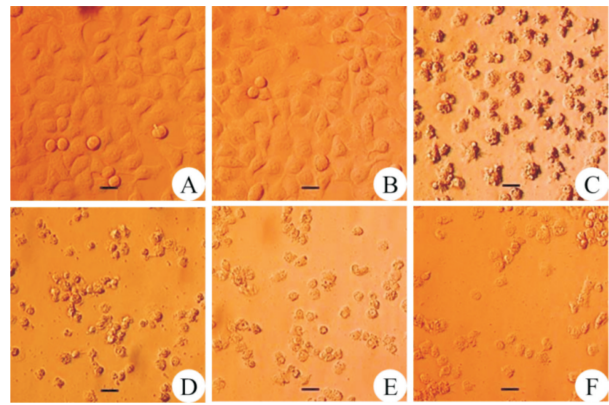


图 2 野艾蒿挥发油对细胞形态的影响 A. 对照组; B. 吐温-80; C. 5-氟尿嘧啶 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; D-F. 野艾蒿挥发油 100,200,400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。下同。

Fig. 2 Influences of essential oil from *Artemisia lavandulaefolia* on cell morphology (Bar=25  $\mu\text{m}$ ,  $\times 200$ )  
A. Control; B. Tween-80; C. 5-Fu 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; D-F. Essential oil from *Artemisia lavandulaefolia* 100,200,400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The same below.

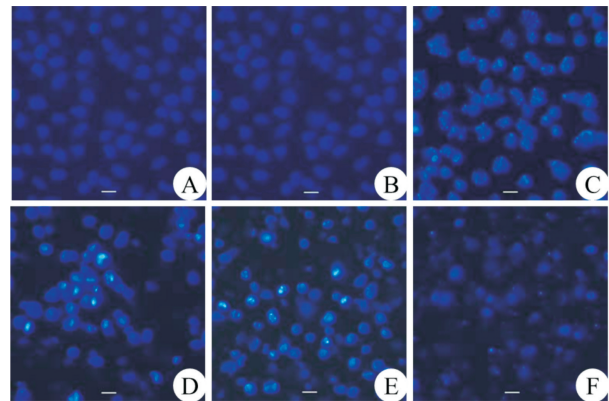


图 3 野艾蒿挥发油对细胞核的影响

Fig. 3 Influences of essential oil from *Artemisia lavandulaefolia* on cell nucleus (Bar=25  $\mu\text{m}$ ,  $\times 250$ )

体积缩小,形态变得不规则,核染色质凝集团块状呈亮蓝色荧光表现为细胞凋亡的形态学特征。200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  野艾蒿挥发油处理后(图 3: E),细胞碎片增多,大部分细胞核染色质为颗粒状呈亮蓝色,少部分细胞核被染为弱红色。400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的野艾蒿挥发油作用后(图 3: F),出现大量细胞核碎片和颗粒状物质,多数细胞核完整性破坏,说明细胞已经坏死。

## 2.4 野艾蒿挥发油对 HeLa 癌细胞表面超微结构的影响

对照组和阴性对照组(图 4: A、B)细胞伸展性好,呈长梭形,贴壁牢固,细胞表面有丰富的微绒毛。阳性对照组(图 4: C)细胞体积缩小,呈圆形,细胞表面出现球形的凋亡小体,微绒毛消失,100  $\mu\text{g}/\text{mL}$

与 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  野艾蒿挥发油处理后(图 4:D,E),细胞皱缩,失去立体感,形态不规则,表面微绒毛消失,细胞膜损伤,凋亡小体从细胞表面脱落,表现为典型的凋亡特征。400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  野艾蒿挥发油处理后(图 4:F),细胞向内凹陷皱缩,细胞膜破裂,胞浆外泄,呈细胞坏死特征。

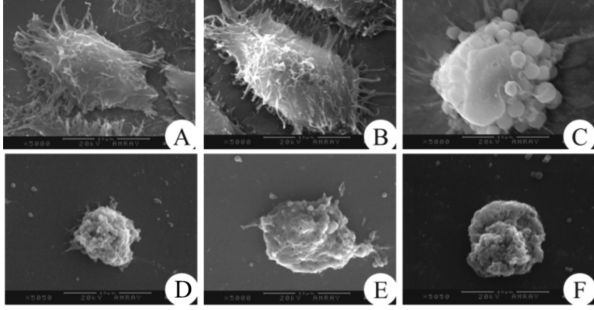


图 4 野艾蒿挥发油对细胞表面超微结构的影响

Fig. 4 Influences of essential oil from *Artemisia lavandulaefolia* on cell surface ultrastructure (Bar=10  $\mu\text{m}$ )

## 2.5 野艾蒿挥发油对 HeLa 癌细胞内部超微结构的影响

对照组与阴性对照组(图 5:A,B)细胞膜及核膜完整,核染色质分布均匀,核仁清晰可见。阳性对照组(图 5:C)细胞形态变得不规则,细胞核固缩,染色质凝集,出现凋亡小体。100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  野艾蒿挥发油处理后(图 5:D)细胞膜及核膜完整,染色质呈斑块状分布于细胞核膜内侧。200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  野艾蒿挥发油处理后(图 5:E)细胞轮廓模糊,核染色质断裂成碎片状,核膜破坏,出现膜泡。400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  野艾蒿挥发油处理后(图 5:F)细胞肿胀变形,空泡化,细胞膜和核膜裂解,内容物外泄,表明细胞已经坏死。

## 2.6 野艾蒿挥发油对 HeLa 癌细胞微管分布的影响

对照组和阴性对照组(图 6:A,a,B,b)细胞形态规则,微管发达密集,细丝状,呈网状结构均匀分布于细胞核周围。200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  野艾蒿挥发油处理 HeLa 癌细胞后(图 6:C,c),细胞皱缩,细胞形态变得不规则,微管解聚,微管数量减少,部分微管凝集成团块状,使细胞骨架功能改变。

## 4 讨论与结论

植物挥发油均可诱导肿瘤细胞凋亡。Sharama *et al.*(2010)和 Maeda *et al.*(2012)分别发现罗勒挥发油和大叶钓樟挥发油可引起体外结肠癌细胞、人类白血病 HL-60 细胞凋亡,其挥发油主要成分分别

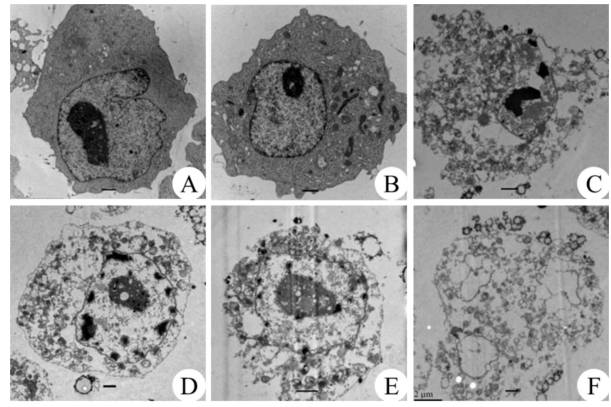


图 5 野艾蒿挥发油对细胞内部超微结构的影响

Fig. 5 Effects of essential oil from *Artemisia lavandulaefolia* on cell inside ultrastructure (Bar=1  $\mu\text{m}$ )

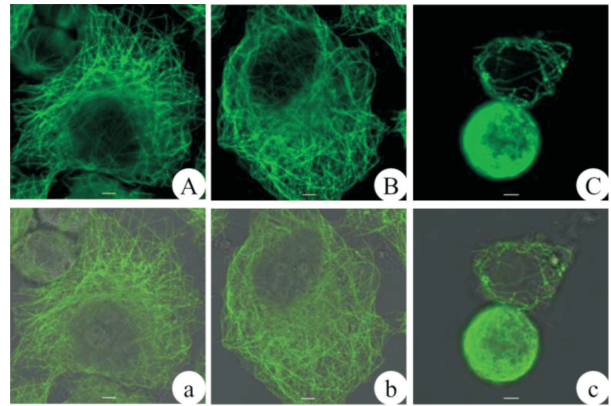


图 6 野艾蒿挥发油对细胞微管分布的影响

Fig. 6 Influences of essential oil from *Artemisia lavandulaefolia* on cell microtubule (Bar=3  $\mu\text{m}$ )

为百里香酚、芳樟醇。Cha *et al.*(2009)的研究发现万年蒿挥发油可以通过 MAPK 途径引起口腔表皮样癌细胞凋亡。本实验采用气相-质谱联用法(GC-MS)对野艾蒿挥发油的成分进行研究,结果显示:野艾蒿挥发油含有 65 种化合物,其主要成分为氧化石竹烯(20.48%)、桉叶-7[11]-烯-4-醇(15.84%)和  $\beta$ -石竹烯(15.09%)。MTT 结果显示,随着药物浓度的增加和处理时间的延长,野艾蒿挥发油对 HeLa 癌细胞的抑制作用呈剂量和时间依赖性,其中 31.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  野艾蒿挥发油处理 HeLa 细胞 24 h 后,细胞存活率为 104.85%,促进细胞的生长,说明随着作用时间的继续延长,极低浓度野艾蒿挥发油对 HeLa 癌细胞没有抑制作用,甚至会促进 HeLa 细胞的增殖。高浓度野艾蒿挥发油处理 HeLa 癌细胞后,细胞存活率明显变小,说明高浓度野艾蒿挥发油对

HeLa 癌细胞有显著的抑制作用,以上结果与 Kathirvel *et al.*(2012)研究的罗勒挥发油抑制 HeLa 细胞增殖的结果一致,但其挥发油的主要成分为肉桂酸甲酯(70.1%)、芳樟醇(17.5%)、 $\beta$ -榄香烯(2.6%)和樟脑(1.52%)。

细胞死亡主要包括细胞凋亡与坏死,形态学特征上两者有明显的区别。目前形态学检测仍是确定细胞凋亡与坏死的最可靠的方法。细胞凋亡形态学上最典型的特征是细胞核固缩,染色质断裂凝集,出现凋亡小体等程序性死亡特征。细胞坏死时细胞膜崩解,细胞质出现空泡,细胞内含物大量外泄。

野艾蒿挥发油处理 HeLa 癌细胞 24 h 后,低、中剂量组(100、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )倒置显微镜下观察到细胞体积减小,形态变得不规则,出现凋亡小体;Hoechst33342/PI 染色结果显示细胞核固缩,染色质断裂凝集于细胞膜边缘,呈亮蓝色斑块状,细胞碎片增多,表明细胞处于早期凋亡或晚期凋亡。而高剂量组(400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )细胞膜损伤,内容物外泄,颗粒状物质增多;荧光显微镜下观察到细胞核完整性破坏,大量颗粒状物质出现,表明细胞已坏死,与 Sharma *et al.*(2010)中报道的细胞凋亡特征一致。电子显微镜观察结果显示,低、中剂量组(100、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )细胞表面微绒毛和伪足消失,出现膜泡,形成凋亡小体,呈凋亡现象。高剂量(400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )细胞膜破裂,细胞表面出现许多孔洞,细胞内容物外溢,以上形态特征与麻艳芳等(2010)所描绘的细胞凋亡特征相类似。激光共聚焦显微镜观察结果显示,200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 野艾蒿挥发油处理 HeLa 癌细胞 24 h 后,微管解聚,丝状网络结构遭到破坏,细胞形态变得不规则,与曹波等(2008)中对细胞凋亡时微管的描述一致,说明野艾蒿挥发油可以破坏细胞的微管结构。

野艾蒿挥发油具有抑制体外培养的 HeLa 癌细胞增殖的作用,低、中浓度的野艾蒿挥发油诱导细胞凋亡,高浓度的野艾蒿挥发油引起细胞坏死。

### 参考文献:

Cao B(曹波),Lei ZY(雷志勇),Chen H(陈虹),*et al.* 2008. YB-

13, a novel synthetic microtubule in inhibitor, induces apoptosis of HeLa cells and its mechanism(新的微管抑制剂 YB-13 诱导 HeLa 细胞凋亡及其机制)[J]. *Chin Pharm Bull* (中国药理学通报), **24**(1):123-127

Cha JD, Jeong MR, Choi HJ, *et al.* 2005. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia lavandulaefolia*[J]. *Planta Med*, **71**:575-577

Cha JD, Jeong MR, Kim HY, *et al.* 2009. MAPK activation is necessary to the apoptotic death of KB cells induced by the essential oil isolated from *Artemisia iwayomogi*[J]. *J Ethnopharm*, **123**(2):308-314

Cha JD, Kim YH and Kim JY. 2010. Essential oil and 1,8-Cineole from *Artemisia lavandulaefolia* induces apoptosis in KB cells via mitochondrial stress and caspase activation[J]. *Food Sci Biotechnol*, **19**(1):185-191

Kathirvel P, Ravi S. 2012. Chemical composition of the essential oil from basil(*Ocimum basilicum* Linn.) and its *in vitro* cytotoxicity against HeLa and HEP-2 human cancer cell lines and NIH 3T3 mouse embryonic fibroblasts[J]. *Nat Prod Res*, **26**(12):1112-1118

Liu L(刘磊), Qin HZ(秦华珍), Wang XQ(王晓倩), *et al.* 2012. Analysis of essential oil from 10 species of drugs of *Alpinia of ficinarum* by GC/MS(10 味山姜属药物挥发油成分的气相-质谱联用分析)[J]. *Guihaia* (广西植物), **32**(4):561-566

Maeda H, Yamazaki M, Katagata Y. 2012. Kuromoji(*Lindera umbellata*) essential oil-induced apoptosis and differentiation in human leukemia HL-60 cells[J]. *Exp Ther Med*, **3**:49-52

MA YF(麻艳芳), Shao LX(邵邻相), Zhang JP(张均平), *et al.* 2010. Effects of fingered citron essential oil on proliferation of MDA-MB-435 cells *in vitro*(佛手挥发油对 MDA\_MB\_435 人乳腺癌细胞体外增殖的影响)[J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), **45**(22):1737-1742

Ning DS(宁德生), Jiang LH(蒋丽华), LÜ SH(吕仕洪), *et al.* 2013. GC-MS analysis of volatile constituents from leaves of *Croton euryphyllus* and *C. lachnocarpus*(石山巴豆与毛果巴豆叶中挥发油成分分析)[J]. *Guihaia* (广西植物), **33**(3):364-367

Sharma M, Agrawal SK, Sharma PR, *et al.* 2010. Cytotoxic and apoptotic activity of essential oil from *Ocimum viride* towards COLO 205 cells[J]. *Food Chem Toxicol*, **48**(1):336-344

Wang DK(王登奎), Wu G(吴刚), Cheng XH(程向晖), *et al.* 2006. The contents of amino acids, vitamins, trace elements of *Artemisia lavandulaefolia*(野艾蒿中氨基酸、维生素、微量元素的含量分析)[J]. *Chin Trad Pat Med* (中成药), **28**(11):1658-1660

Wang XQ(王晓琴), Zhou CJ(周成江), Zhang N(张娜), *et al.* 2011. Studies on the chemical constituents of *Artemisia lavandulaefolia*(野艾蒿化学成分研究)[J]. *J Chin Med Mat* (中药材), **34**(2):234-236