

# 大叶茜草素对宫颈癌细胞增殖、粘附及糖酵解水平的分子机制研究

赵博<sup>1\*</sup> 王应<sup>1</sup> 王献红<sup>2</sup>

1. 郑州市中医院 河南郑州 450000

2. 郑州澍青医学高等专科学校 河南郑州 450064

**摘要:** 目的: 探究大叶茜草素对人宫颈癌细胞增殖、粘附、糖酵解水平及磷脂酰肌醇-3 激酶/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶 (PI3K/AKT) 的调控作用。方法: 体外培养人宫颈癌 HeLa 细胞, 激活剂组 (50  $\mu\text{mol/L}$  大叶茜草素 +10  $\mu\text{mol/LPI3K/AKT}$  通路激活剂 SC-79) 和抑制剂组 (50  $\mu\text{mol/L}$  大叶茜草素 + 2  $\mu\text{mol/L PI3K/AKT}$  通路抑制剂 LY294002), 干预 24 h。采用 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷 (EdU) 法、细胞粘附实验、乳酸、葡萄糖检测试剂盒、蛋白免疫印迹 (WB) 法进行分析。结果: 实验组和阳性药物组细胞增殖率、粘附数、乳酸含量、葡萄糖消耗水平、己糖激酶 2 (HK2)、乳酸脱氢酶 A (LDHA)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH)、p-PI3K、p-AKT ( $P<0.05$ )。结论: 大叶茜草素作用机制可能与抑制 PI3K/AKT 通路转导有关。

**关键词:** 宫颈癌; 大叶茜草素; 增殖

宫颈癌是严重威胁女性健康的生殖系统癌症之一<sup>[1]</sup>, 其发病率在所有恶性肿瘤中居第 14 位, 在女性癌症中高居第 4 位。目前针对宫颈癌有手术、放疗等多种手段进行干预, 但是其 5 年生存率较低问题依然严峻<sup>[2]</sup>, 因此找寻能有效治疗宫颈癌的新药物对患者而言意义重大。近年来, 中草药因其在肿瘤治疗中低毒、效果佳等特点受到国内外学者的关注。中医认为宫颈癌属带下、崩漏、癥瘕等范畴, 乃肝脾肾亏虚, 湿热邪毒所致, 所以治疗上主要以补虚祛邪、清热利湿、化瘀解毒等方法<sup>[3]</sup>。茜草作为传统中药材, 具有活血 化瘀、疏通经络的功效<sup>[4]</sup>。大叶茜草素是中药茜草的主要活性成分, 属于蒽醌类化合物, 有抗炎、抗病毒、抗肿瘤等生物活性<sup>[5]</sup>, 有研究表明, 大叶茜草素对肺癌<sup>[6]</sup>、口腔癌<sup>[7]</sup>、宫颈癌<sup>[8]</sup>等细胞都具有较强的抑制作用。磷脂酰肌醇-3 激酶/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶 (PI3K/AKT) 信号通路是一条与癌症发生、发展相关的经典通路, 参与调控多种癌细胞生长和分化<sup>[9]</sup>, 有文献指出, 调低 PI3K/AKT 信号通路可抑制宫颈癌<sup>[10]</sup>细胞的恶性生物学进程, 为治疗提供体外实验数据支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 药品与试剂

大叶茜草素、5-氟尿嘧啶 (美国 Sigma 公司, 纯度  $\geq 98\%$ ), 人重组纤维连接蛋白 (rFN) (上海碧云天生物技术有限公司), PI3K、AKT、p-PI3K、p-AKT 和  $\beta$ -actin) 一抗、辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG (二抗) (美国 Santa Cruz 公司)。

#### 1.2 仪器 BPN-50CH 型细胞培养箱 (上海)

## 2 实验方法

### 2.1 细胞培养

GB 对 OE19 细胞活力的影响干预 24 h 后, 与 Con 组相比, L/M/H 组与 CP 组细胞活力降低 ( $P<0.05$ )

#### 2.2 分组处理及给药

人食管癌 OE19 培养将食管癌细胞 OE19 在 RPMI-1640in D1)、M2 型丙酮酸激酶 (PKM2)、JAK2、磷酸化 (p-) JAK2、STAT3、p-STAT3。OE19 细胞用于实验, 培养于 37 $^{\circ}\text{C}$  5% CO<sub>2</sub> 培养箱中。1.2.2 分组及给药 GB 最适作用浓度筛选: 分为对照其中对照组细胞不做干预, 实验组采用

50  $\mu\text{mol/L}$  大叶茜草素干预 HeLa 细胞，阳性药物组采用 20  $\mu\text{g/mL}$  5-氟尿嘧啶<sup>[11]</sup> 进行干预，抑制剂组是 50  $\mu\text{mol/L}$  大叶茜草素和 2  $\mu\text{mol/L}$  LLY294002<sup>[12]</sup> 共同干预，激活剂组是 50  $\mu\text{mol/L}$  大叶茜草素和 10  $\mu\text{mol/L}$  SC-79 同时干预。

### 2.3 测定指标

#### 2.3.1 EdU 法测定人宫颈癌 HeLa 细胞增殖率

参照 EdU 试剂盒进行操作检测细胞增殖率，荧光显微镜拍照记录后用 ImageJ 1.8 软件分析染色细胞数，细胞增殖率 (%)。取各组干预 24 h 的细胞，EdU 染色，去除细胞培养液，加入 4% 多聚甲醛 0.5 mL，15 min 后 0.5 mL 3% BSA 洗涤，0.5 mL 0.3% TritonX-100 去除 BSA，室温放置 10 min，洗涤 3 次；每孔加 200  $\mu\text{L}$  Click 反应液，室温避光孵育 30 min，之后洗涤 3 次去除 Click 反应液；加入 Hoechst 染液，孵育 10 min，用 3% BSA 洗涤 3 次去除 Hoechst；装片，随机选取 3 个视野，显微镜下拍照，用 Image-J 软件处理图片，分析并计算细胞增殖率。细胞增殖率 (%) = EdU 阳性染色细胞数 (红色) / 总细胞数 (蓝色)  $\times$  100%。

#### 2.3.2 细胞粘附实验测定人宫颈癌 HeLa 细胞的粘附能力

细胞分组与给药方法同 2.2，用无血清培养液稀释 rFN，取 rFN 胶 20  $\mu\text{g/mL}$  铺于 96 孔板，风干后用 PBS 洗涤 3 次，每次 20 min。取各组干预 24 h 细胞，制成浓度为  $1 \times 10^4$  个/mL 的单细胞悬液，取 100  $\mu\text{L}$ ，加入到铺胶的 96 孔板中，设 3 个复孔，置于 37 $^{\circ}\text{C}$  培养 1 h，取出 96 孔板，洗涤 3 次，4% 多聚甲醛固定 10 min，结晶紫染色 15 min 后洗涤 3 次，于 50 倍显微镜下观察黏附细胞数。GB 对 OE19 细胞活力的影响干预 24 h 后，与 Con 组相比，L/M/H 组与 CP 组细胞活力降低 ( $P < 0.05$ )。

## 3 结果

### 3.1 大叶茜草素干预，见图 1。

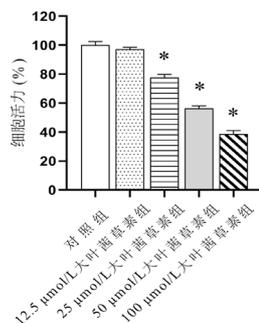


图 1 CCK-8 法测定不同浓度大叶茜草素对 HeLa 细胞活力的影响  
注：与对照组相比，\* $P < 0.05$ 。

### 3.2 各组 HeLa 细胞的增殖率比较

(1) determined by CCK-8 method Compared with the control group 结果显示，Fig 2 Influence of kaempferol on HeLa celladh 与对照组相比见图 2-A 与图 2-B。

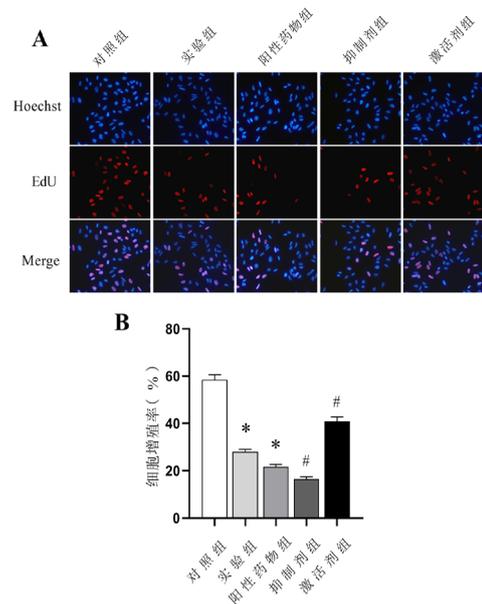


图 2 EdU 法测定大叶茜草素对 HeLa 细胞增殖率的影响

注：图 2-A 代表细胞增殖图 ( $\times 20$ )，图 2-B 代表细胞增殖率比较；与对照组相比，\* $P < 0.05$ ；与实验组相比，# $P < 0.05$ 。

### 3.3 各组 HeLa 细胞的粘附能力比较

各组细胞增殖率比较 A:EdU 增殖图片 ( $\times 20$ )，比例尺长度为 100  $\mu\text{m}$ ；B: 细胞增殖率。见图 3-A 与图 3-B。

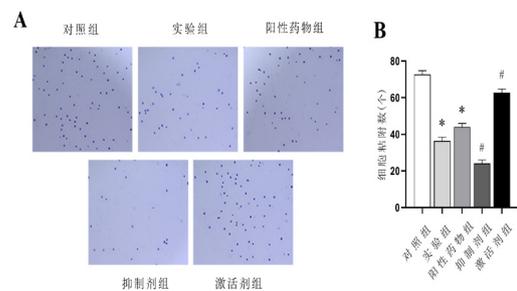


图 3 细胞黏附实验测定大叶茜草素对 HeLa 细胞黏附的影响

注：图 3-A 代表细胞黏附图 ( $\times 5$ )，图 3-B 代表细胞黏附数；与对照组相比，\* $P < 0.05$ ；与实验组相比，# $P < 0.05$ 。

3.4 各组 HeLa 细胞中糖酵解相关蛋白表达水平比较葡萄糖消耗水平

图 4-B 是乳酸含量；与对照组相比，\* $P < 0.05$ ；与实验组相比，# $P < 0.05$ ；5 各组细胞中糖酵解水平的影响注：图 4-A 代表 WB 图片；图 4-B 代表蛋白相对表达量；与对照组相比，\* $P < 0.05$ ；与实验组相比，# $P < 0.05$ 。见图 4-A 与图 4-B。

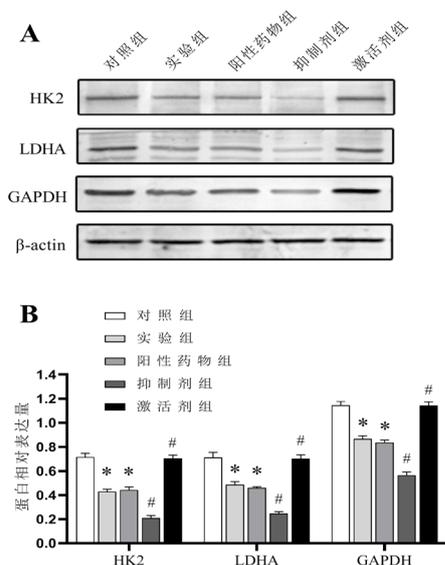


图 4 各组 HeLa 细胞中糖酵解相关蛋白表达水平的影响

注：图 4-A 代表 WB 图片；图 4-B 代表蛋白相对表达量；与对照组相比，\* $P < 0.05$ ；与实验组相比，# $P < 0.05$ 。

讨论：目前，随着人乳头瘤病毒疫苗的普及推广、宫颈癌诊断、筛查等措施的实行，宫颈癌在全国范围内发病率已经大大降低。但对于已经患宫颈癌的患者而言，因目前治疗手段存在弊端，放疗化疗易复发、副作用极大，致使死亡率仍居高不下。因此开发安全有效的药物迫在眉睫。近年来中药及其提取物因其具有低毒、高效等优势受到了国内外学者的关注。中医认为宫颈癌患者多表现为脏腑气血失调、气滞、血瘀、痰湿、毒邪侵袭、日久积结不解，其治疗方法多以补益肝肾、健脾扶正法佐以祛邪。大叶茜草素是提取于中药茜草的一种蒽醌类化合物。众多文献报道其具有抗肿瘤细胞活性。Zhang 等研究认为大叶茜草素对众多癌症模型具有细胞毒性，抑制癌细胞活力，诱导其凋亡与自噬，在各种癌症模型中均显示出临床前的抗癌效果。王喆研究认为大叶茜草素在体内裸鼠移植瘤实验和体外细胞实验中均能抑制

HeLa 细胞增殖，并且体内实验中对裸鼠体重没有产生显著影响，提示大叶茜草素对宫颈癌细胞具有抑制作用。

PI3K/AKT 通路受多种信号蛋白的调节，在许多癌症类型中被过度激活，并广泛调节癌细胞增殖、凋亡、生长等细胞进程。PI3K/AKT 被激活时，PI3K、AKT 会发生磷酸化，并募集大量的炎症因子，致使组织损伤直至癌变。所以阻断 PI3K/AKT 是有效地治疗癌症手段。有研究报道，阻滞 PI3K/AKT 通路可抑制宫颈癌细胞的发生、发展。Chen 等研究认为二甲双胍可通过抑制人宫颈癌细胞中的 PI3K/AKT 信号通路诱导细胞凋亡并抑制其迁移。Xiao 等研究发现当阻滞 PI3K/AKT 通路激活时，宫颈癌细胞的增殖、侵袭、迁移、上皮-间质转化均受到抑制。为了进一步验证 PI3K/AKT 通路与宫颈癌的关联；激活剂 SC-79 的作用与抑制剂 LY294002 相反。提示大叶茜草素依赖于对 PI3K/AKT 信号通路活性的下调作用。

综上所述，大叶茜草素可抑制人宫颈癌 HeLa 细胞的增殖、粘附及糖酵解，这与阻滞 PI3K/AKT 通路的信号转导相关。

#### 参考文献：

- [1]Liu Y, Li L, Li Y. Research progress on tumor-associated macrophages and inflammation in cervical cancer[J]. Biomed Res Int, 2020, 20(2): 68-76.
- [2]Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [3]胡鑫洁, 陈梅, 李楠, 等. 宫颈癌中医分期辨治研究进展 [J]. 中医药导报, 2021, 27(3): 155-158+163.
- [4]龚婷, 张敏, 王海珠, 等. 大叶茜草精油挥发性物质抑菌及抗氧化活性研究 [J]. 西南师范大学学报 (自然科学版), 2019,44(6): 54-59.
- [5]Zhe W, Ming L, Mi C, et al. Mollugin has an anti-cancer therapeutic effect by inhibiting TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation[J]. INT J MOL SCI, 2017, 18(8): 1619-1631.
- [6]International BR. Retracted: Involvement of Nrf2-mediated upregulation of heme oxygenase-1 in mollugin-induced growth inhibition and apoptosis in human oral cancer cells[J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 1915927.

[7]Wang Z, Li MY, Mi C, et al. Mollugin has an anti-cancer therapeutic effect by inhibiting TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(8): 1619.

[8]Bahrami A, Hasanzadeh M, Hassanian SM, et al. The potential value of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway for assessing prognosis in cervical cancer and as a target for therapy[J]. J Cell Biochem, 2017, 118(2): 4163-4169.

[9]Lee CY, Hsin MC, Chen PN, et al. Arctiin inhibits cervical cancer cell migration and invasion through suppression of s100a4 expression via PI3K/AKT pathway[J]. Pharmaceutics, 2022, 14(2): 365.

[10]杨美清, 田建辉. 中医药防治宫颈癌的研究进展 [J]. 中医药导报, 2019, 25(21): 87-89.

[11]CJiang N, DaiQ, SuX, et al. Role of PI3K/AKT pathway in cancer: the framework of malignant behavior[J]. Mol Biol Rep, 2020, 47(6): 4587-4629.

[12]Chen YH, Yang SF, Yang CK, et al. Metformin induces apoptosis and inhibits migration by activating the AMPK/p53 axis and suppressing PI3K/AKT signaling in human cervical cancer cells[J]. Mol Med Rep, 2021, 23(1):88.

**作者简介:**

赵博(1970年11月2日),男,汉族,河南省郑州市人,本科,单位:郑州市中医院,职位:主管中药师,研究方向:中药前处理与制剂

**基金项目:**

2024年河南省中医药科学研究专项课题 编号: 2023ZY3099

**课题名称:**

大叶茜草素对宫颈癌细胞增殖、粘附及糖酵解水平的分子机制研究 课题负责人: 赵博

申请单位: 郑州市中医院 经费(万): 立项不资助