

本文引用:张花,潘莹,何全中.蓝萼甲素对宫颈癌 C33A 细胞增殖和凋亡的影响及机制[J].新乡医学院学报, 2023,40(2):107-112. DOI:10.7683/xyxyxb.2023.02.002.

### 【基础研究】

# 蓝萼甲素对宫颈癌 C33A 细胞增殖和凋亡的影响及机制

张 花，潘 莹，何全中

(新乡医学院第三附属医院妇产科,河南 新乡 453003)

**摘要:** **目的** 探讨蓝莓素素(GLA)对宫颈癌 C33A 细胞增殖、凋亡的影响及其机制。**方法** 将对数生长期宫颈癌 C33A 细胞随机分为阴性对照组、5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、40  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组,阴性对照组细胞不加任何药物干预,5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、40  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组细胞分别加入终浓度为 5、10、20、40  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 进行干预。分别于培养 24、48、72 h 时,采用 3,3'-[1-(苯氨酰基)-3,4-四氮唑]-二(4-甲氧基-6-硝基)苯磺酸钠法检测 5 组细胞的增殖抑制率;于培养 48 h 时,采用流式细胞术检测阴性对照组、5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组细胞凋亡率,Western blot 法检测阴性对照组、5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组细胞中磷酸化 B 淋巴细胞瘤-2 基因相关启动子(p-BAD)和 10 号染色体缺失与张力蛋白同源磷酸酶(PTEN)蛋白相对表达量。**结果** 培养 24、48、72 h 时,5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、40  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组细胞增殖抑制率显著高于阴性对照组,10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、40  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组细胞增殖抑制率显著高于 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组,20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、40  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组细胞增殖抑制率显著高于 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组,40  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组细胞增殖抑制率显著高于 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组( $P < 0.05$ )。不同浓度 GLA 组细胞培养 48、72 h 时的增殖抑制率显著高于培养 24 h 时,培养 72 h 时的增殖抑制率显著高于培养 48 h 时( $P < 0.05$ )。5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组细胞凋亡率显著高于阴性对照组,10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组细胞凋亡率显著高于 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组,20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组细胞凋亡率显著高于 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组( $P < 0.05$ )。5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组细胞中 p-BAD 蛋白相对表达量显著低于阴性对照组,PTEN 蛋白相对表达量显著高于阴性对照组( $P < 0.05$ );10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组细胞中 p-BAD 蛋白相对表达量显著低于 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组,PTEN 蛋白相对表达量显著高于 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组( $P < 0.05$ );20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组细胞中 p-BAD 蛋白相对表达量显著低于 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组,PTEN 蛋白相对表达量显著高于 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组( $P < 0.05$ )。**结论** GLA 可通过上调 PTEN 蛋白、降低 p-BAD 的表达,抑制 C33A 细胞增殖,促进 C33A 细胞凋亡,且呈剂量依赖性。

**关键词:** 蓝萼甲素;宫颈癌;细胞凋亡;B 淋巴细胞瘤-2 基因相关启动子;10 号染色体缺失与张力蛋白同源磷酸酶

中图分类号: R737.33 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2023)02-0107-06

## Effect and mechanism of Glaucocalyxin A on proliferation and apoptosis of cervical cancer C33A cells

ZHANG Hua, PAN Ying, HE Quanzhong

( Department of Obstetrics and Gynecology ,the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University ,Xinxiang 453003 ,Henan Province ,China )

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of Glaucoalaxin A (GLA) on proliferation and apoptosis of cervical cancer C33A cells and its mechanism. **Methods** The cervical cancer C33A cells in logarithmic growth phase were randomly divided into negative control group, 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group, 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group, 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group and 40  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group. The cells in the negative control group were treated without any drug; the cells in the 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group, 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group, 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group and 40  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group were treated with the final concentration of 5, 10, 20, 40  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA, respectively. At 24, 48, 72 h of culture, the inhibitory rate of cell proliferation in the 5 groups were detected by Sodium3,3'-[1-(phenylamino)carbonyl-3,4-tetrazolium-bis(4-methoxy-6-nitro)] benzenesulfonic acid assay; at 48 h of culture, the apoptosis rate of cells in the negative control group, 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group, 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group and 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group were detected by flow cytometry; the expressions of phosphorylated Bcl-xl/Bcl-2 associated death promoter (p-BAD) and phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome 10 (PTEN) in cells in the negative control group, 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group, 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group and 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group were

DOI:10.7683/xxxyxyxb.2023.02.002

收稿日期:2021-12-03

作者简介:张 花(1987-),女,河南新乡人,博士,主治医师,研究方向:宫颈癌防治及盆底重建。

detected by Western blot. **Results** At 24,48,72 h of culture, the inhibitory rate of cell proliferation in the 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group, 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group, 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group and 40  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group was significantly higher than that in the negative control group ( $P < 0.05$ ); the inhibition rate of cell proliferation in the 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group, 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group and 40  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group was significantly higher than that in the 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group ( $P < 0.05$ ); the inhibitory rate of cell proliferation in the 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group and 40  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group was significantly higher than that in the 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group ( $P < 0.05$ ); the inhibitory rate of cell proliferation in the 40  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group was significantly higher than that in the 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group ( $P < 0.05$ ). The inhibition rate of cell proliferation at 48 h and 72 h of culture was significantly higher than that at 24 h of culture, and the inhibition rate of cell proliferation at 72 h of culture was significantly higher than that at 48 h of culture in different concentrations of GLA groups ( $P < 0.05$ ). The apoptosis rate of cells in the 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group, 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group and 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group was significantly higher than that in the negative control group ( $P < 0.05$ ); the apoptosis rate of cells in the 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group and 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group was significantly higher than that in the 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group ( $P < 0.05$ ); the apoptosis rate of cells in the 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group was significantly higher than that in the 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group ( $P < 0.05$ ). The relative expression level of p-BAD protein in the 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group, 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group and 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group was significantly lower than that in the negative control group, the relative expression level of PTEN protein was significantly higher than that in the negative control group ( $P < 0.05$ ); the relative expression level of p-BAD protein in the 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group and 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group was significantly lower than that in the 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group, the relative expression level of PTEN protein was significantly higher than that in the 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group ( $P < 0.05$ ); the relative expression level of p-BAD protein in the 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group was significantly lower than that in the 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group, the relative expression level of PTEN protein was significantly higher than that in the 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** GLA can inhibit the proliferation and promote the apoptosis of C33A cells by up-regulating the expression of PTEN protein and reducing the expression of p-BAD protein, and this is in a dose-dependent manner.

**Key words:** Glaucocalyxin A; cervical cancer; cell apoptosis; Bcl-xl/Bcl-2 associated death promoter; phosphatase and tensin ho-molog deleted from chromosome 10

宫颈癌是在世界范围内仅次于乳腺癌和结直肠癌的第三大女性恶性肿瘤,其发病率高,每年约 56.9 万例新发病例,且其发病呈年轻化趋势<sup>[1]</sup>。宫颈癌与持续人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)感染密切相关,其中 HPV-16 型感染者占 50%,HPV-18 型占 10%<sup>[2]</sup>;但并不是所有感染了 HPV 的患者都进展为宫颈癌<sup>[3]</sup>。目前,有关 HPV 阳性宫颈癌细胞的研究比较多,但是关于 HPV 阴性宫颈癌的预防和治疗目前国内外研究较少,因此,HPV 阴性宫颈癌的防治逐渐被研究者关注。

近年来,随着中药提取工艺的提高,中药在抗宫颈癌方面取得了一定的成绩<sup>[4-5]</sup>。蓝萼甲素(Glaucocalyxin A, GLA)和蓝萼乙素(Glaucocalyxin B, GLB)是从药用植物蓝萼香茶菜中分离鉴定的 2 种二萜化合物<sup>[6]</sup>。有研究显示,GLB 对肺腺癌 AGZY 细胞、HL-60 白血病细胞等多种肿瘤细胞的生长具有抑制作用<sup>[6]</sup>。本课题组前期的细胞及动物实验证实,GLB 对宫颈癌 SiHa 及 HeLa 细胞的生长均有明显抑制作用<sup>[7-9]</sup>。因 GLA 与 GLB 活性结构的相似性,故 GLA 在抗肿瘤方面也有一定的作用<sup>[10]</sup>。本课题组前期研究证实,GLA 对宫颈癌 HeLa 及 SiHa 细胞均有明显抑制作用,其机制可能与上调 p53 和 Bax 的表达有关<sup>[11]</sup>。

肿瘤细胞凋亡是由多种因素参与的过程,B 淋巴细胞瘤-2 基因相关启动子(Bcl-xl/Bcl-2 associated death promoter,BAD)基因是 Bcl-2 家族成员之一,近年来 BAD 蛋白在细胞凋亡过程中的调控作用成为许多学者的研究热点。10 号染色体缺失与张力蛋白同源磷酸酶(phosphatase and tensin ho-molog deleted from chromosome 10,PTEN)基因缺失或失活可激活下游 3-磷酸肌醇激酶(phosphatidylinositol 3-hydroxykinase,PI3K),进而通过 PI3K/蛋白激酶 B(protein kinase B,Akt)/BAD 通路,抑制细胞凋亡。本研究旨在通过观察 GLA 对 HPV 阴性宫颈癌 C33A 细胞中 p-BAD 和 PTEN 的影响,探讨 GLA 对宫颈癌 C33A 细胞增殖和凋亡的影响及其可能机制,以期为 GLA 在临床 HPV 阴性宫颈癌治疗中的应用提供依据。

1 材料与方法

**1.1 细胞和主要试剂** 宫颈癌 C33A 细胞由新乡医学院病理学教研室提供,GLA 由新乡医学院药理学教研室提供<sup>[6]</sup>,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium,DMEM)购自美国 Invitrogen 公司,二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO)购自美

国Sigma公司,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)购自北京中杉金桥公司,放射免疫沉淀法(radio immunoprecipitation assay,RIPA)裂解缓冲液、苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluorid,PMSF)、聚氰基丙烯酸正丁酯(bicinchoninic acid,BCA)蛋白定量试剂盒、人膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(annexin V-fluorescein isothiocyanate,Annexin V-FITC)细胞凋亡检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,抗PTEN单克隆抗体购自美国ProSci公司,抗p-BAD体购自美国SAB公司,3,3'-[1-(苯氨酰基)-3,4-四氮唑]-二(4-甲氧基-6-硝基)苯磺酸钠[Sodium3,3'-[1-(phenylamino) carbonyl-3,4-tetrazolium-bis(4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid,XTT]检测试剂盒购自美国Biotium公司。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养和GLA溶液配制** 将宫颈癌C33A细胞接种于含体积分数10% FBS的DMEM中,置于37℃、含体积分数5% CO<sub>2</sub>的培养箱中进行培养;然后,用胰蛋白酶消化,每2~3 d传代1次,待细胞密度达80%~90%,取对数生长期细胞用于后续实验。称取3.32 mg GLA,加入200 μL DMSO和PBS混合液(各100 μL),配制成50 mmol·L<sup>-1</sup>储存液,使用时再用细胞培养液按1:100稀释成500 μmol·L<sup>-1</sup>工作液,分别使用细胞培养液按1:100、1:50、1:25、1:12.5比例将工作液进一步稀释,获得终浓度5、10、20、40 μmol·L<sup>-1</sup> GLA。

**1.2.2 XTT法检测细胞增殖能力** 取对数生长期C33A细胞,按每孔10 000个细胞接种于96孔板中,随机分为阴性对照组、5 μmol·L<sup>-1</sup> GLA组、10 μmol·L<sup>-1</sup> GLA组、20 μmol·L<sup>-1</sup> GLA组、40 μmol·L<sup>-1</sup> GLA组,阴性对照组细胞不加任何药物干预,5 μmol·L<sup>-1</sup> GLA组、10 μmol·L<sup>-1</sup> GLA组、20 μmol·L<sup>-1</sup> GLA组、40 μmol·L<sup>-1</sup> GLA组细胞分别加入终浓度为5、10、20、40 μmol·L<sup>-1</sup> GLA进行干预,每个浓度设定5个复孔;同时设置空白对照组(调零孔),该组不加细胞和药物;将各组细胞置于37℃、含体积分数5% CO<sub>2</sub>培养箱继续培养;分别于接种后4、24、48、72 h后每孔加入25 μL XTT混合液(含25 μL XTT和5 mL PMS),继续培养4 h,轻微震荡一下孔板后,用酶标仪测定各孔在492 nm处吸光度值,计算细胞增殖抑制率,细胞增殖抑制率(%)=[1-(实验组吸光度值/空白对照组吸光度值)]×100%。

**1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡情况** 取对数生长期C33A细胞,调整细胞密度为1×10<sup>5</sup> L<sup>-1</sup>,接种

于培养瓶,随机分为阴性对照组、5 μmol·L<sup>-1</sup> GLA组、10 μmol·L<sup>-1</sup> GLA组、20 μmol·L<sup>-1</sup> GLA组,阴性对照组细胞不加任何药物干预,5 μmol·L<sup>-1</sup> GLA组、10 μmol·L<sup>-1</sup> GLA组、20 μmol·L<sup>-1</sup> GLA组细胞分别加入终浓度为5、10、20 μmol·L<sup>-1</sup> GLA进行干预;将各组细胞置于37℃、含体积分数5% CO<sub>2</sub>培养箱继续培养;培养48 h后,收集细胞,使用PBS重悬细胞并计数;取重悬的(5~10)×10<sup>4</sup>细胞,1 000 r·min<sup>-1</sup>离心5 min,弃上清,依次进行Annexin V-FITC和碘化丙啶标记,用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。实验重复3次,取均值。

**1.2.4 Western blot法检测细胞中PTEN和磷酸化BAD(phosphorylated BAD,p-BAD)蛋白相对表达量** 取对数生长期C33A细胞,调整细胞密度为1×10<sup>5</sup> L<sup>-1</sup>,接种于培养瓶,随机分为阴性对照组、5 μmol·L<sup>-1</sup> GLA组、10 μmol·L<sup>-1</sup> GLA组、20 μmol·L<sup>-1</sup> GLA组,阴性对照组细胞不加任何药物干预,5 μmol·L<sup>-1</sup> GLA组、10 μmol·L<sup>-1</sup> GLA组、20 μmol·L<sup>-1</sup> GLA组细胞分别加入终浓度为5、10、20 μmol·L<sup>-1</sup> GLA进行干预,将各组细胞置于37℃、含体积分数5% CO<sub>2</sub>培养箱继续培养;培养48 h后,收集各组细胞,用预冷的PBS重悬,1 500 r·min<sup>-1</sup>离心5 min,重复1次,弃上清;再加入少量PBS重悬后,3 000 r·min<sup>-1</sup>离心5 min,弃上清;然后,加入1 mL细胞裂解液(1 mL RIPA细胞裂解液和5 μL PMSF),冰上静置30 min;再应用超声细胞粉碎机将细胞置于冰上超声(超声时间1 s,间隔5 s,共5次),4℃下12 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min,取上清;按照每4 μL蛋白样品加入1 μL蛋白上样缓冲液的比例混合蛋白样品和蛋白上样缓冲液,100℃加热3 min;采用BCA法测定蛋白样品浓度;配制十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶,将准备好的样品和彩色预染蛋白质分子质量标准分别加入各个上样孔中进行电泳,采用半干转膜仪进行转膜1.5 h;然后,用质量分数50 g·L<sup>-1</sup>脱脂奶粉封闭1 h;再分别加入兔抗人PTEN一抗(滴度1:1 000)、鼠抗人p-BAD一抗(滴度1:500)、鼠抗人Tubulin一抗(滴度1:1 000)孵育,并滴加相应二抗辣根过氧化物酶标记山羊抗兔抗体(滴度1:5 000)和辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠抗体(滴度1:5 000)孵育;使用BeyoECL Plus发光试剂盒在暗室压片曝光,应用Quantity-one软件分析目的条带灰度值,计算p-BAD和PTEN的相对表达量,目的蛋白相对表达量以目的蛋白的灰度值与内参蛋白的灰度值比值表示。实验重复3次,取均值。

**1.3 统计学处理** 应用SPSS 13.0软件进行统计

学分析,计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多组间均数比较采用方差分析,两两比较采用独立样本  $t$  检验,检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 5 组细胞增殖能力比较 结果见表 1。培养 24、48、72 h 时,5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、40  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组细胞增殖抑制率显著高于阴性对照组,10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

表 1 5 组细胞增殖抑制率比较

Tab.1 Comparison of inhibitory rate of cells proliferation among the five groups ( $\bar{x} \pm s$ )

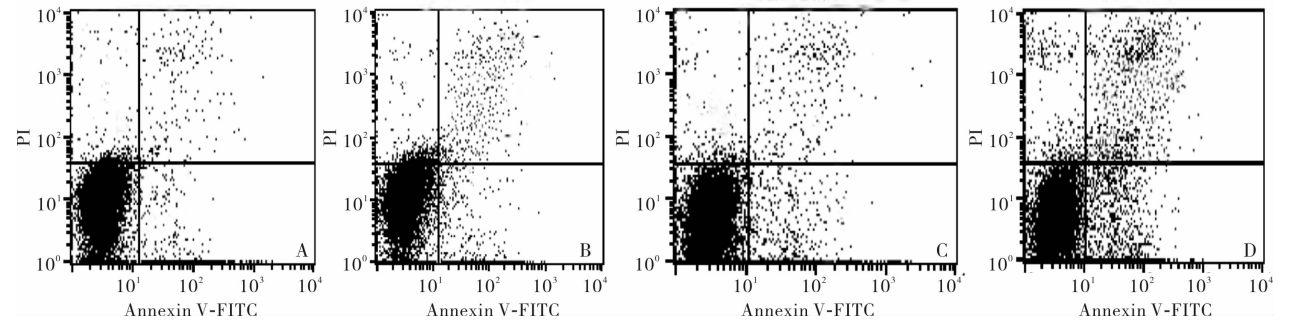
组别	<i>n</i>	细胞增殖抑制率/%			<i>F</i>	<i>P</i>
		培养 24 h	培养 48 h	培养 72 h		
阴性对照组	5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	—	—
5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GLA 组	5	3.00 ± 0.71 <sup>a</sup>	5.03 ± 0.71 <sup>ab</sup>	6.80 ± 0.84 <sup>ab</sup>	132.302	0.001
10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GLA 组	5	6.02 ± 1.00 <sup>ac</sup>	12.60 ± 0.55 <sup>abc</sup>	13.82 ± 0.84 <sup>abcde</sup>	31.879	0.000
20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GLA 组	5	9.60 ± 0.55 <sup>ace</sup>	13.81 ± 0.84 <sup>abce</sup>	15.61 ± 1.14 <sup>abcde</sup>	61.833	0.002
40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GLA 组	5	14.63 ± 1.34 <sup>acef</sup>	19.80 ± 1.30 <sup>abcef</sup>	21.80 ± 0.45 <sup>abcdef</sup>	56.004	0.000
<i>F</i>		138.444	231.000	165.268		
<i>P</i>		0.000	0.000	0.000		

注:与对照组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与培养 24 h 比较<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组比较<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与培养 48 h 比较<sup>d</sup> $P < 0.05$ ;与 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组比较<sup>e</sup> $P < 0.05$ ;与 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组比较<sup>f</sup> $P < 0.05$ 。

2.2 阴性对照组、5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组细胞凋亡率比较 结果见图 1。阴性对照组、5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组细胞凋亡率分别为 (10.38 ± 0.63)%、(13.59 ± 0.39)%、(15.99 ± 0.72)%、(21.52 ± 0.52)%。4 组间细胞凋亡率比较差异有统计学意义 ( $F = 197.892, P <$

GLA 组、20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、40  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组细胞增殖抑制率显著高于 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组, 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、40  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组细胞增殖抑制率显著高于 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组, 40  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组细胞增殖抑制率显著高于 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。不同浓度 GLA 组培养 48、72 h 时细胞增殖抑制率显著高于培养 24 h 时,培养 72 h 时细胞增殖抑制率显著高于培养 48 h,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

0.05); 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组细胞凋亡率显著高于阴性对照组,10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组细胞凋亡率显著高于 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组, 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组细胞凋亡率显著高于 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。



A: 阴性对照组; B: 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组; C: 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组; D: 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组。

图 1 阴性对照组、5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组细胞凋亡情况

Fig.1 Apoptosis of cells in the negative control group, 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group, 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group and 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA group

2.3 阴性对照组、5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组细胞中 PTEN 和 p-BAD 蛋白相对表达量比较 结果见图 2 和表 2。5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组细胞中 p-BAD 蛋白相对表达量显著低于阴性对照组, 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组细胞中 p-BAD 蛋白相对表达量显著低于 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组, 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组细胞中 p-BAD 蛋白相对表达量显著低于

10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组细胞中 PTEN 蛋白相对表达量显著高于阴性对照组, 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组细胞中 PTEN 蛋白相对表达量显著高于 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组, 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组细胞中 PTEN 蛋白相对表达量显著高于 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

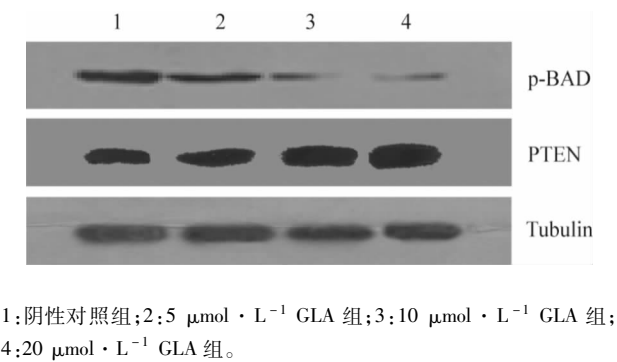


图2 阴性对照组、5 μmol · L<sup>-1</sup> GLA 组、10 μmol · L<sup>-1</sup> GLA 组、20 μmol · L<sup>-1</sup> GLA 组细胞中 p-BAD 和 PTEN 蛋白的表达

Fig.2 Expression of p-BAD and PTEN protein in the negative control group,5 μmol · L<sup>-1</sup> GLA group,10 μmol · L<sup>-1</sup> GLA group and 20 μmol · L<sup>-1</sup> GLA group

表2 阴性对照组、5 μmol · L<sup>-1</sup> GLA 组、10 μmol · L<sup>-1</sup> GLA 组、20 μmol · L<sup>-1</sup> GLA 组细胞中 p-BAD 和 PTEN 蛋白相对表达量比较

Tab.2 Comparison of relative expressions of p-BAD and PTEN protein in cells among the negative control group, 5 μmol · L <sup>-1</sup> GLA group, 10 μmol · L <sup>-1</sup> GLA group, 20 μmol · L <sup>-1</sup> GLA group			
(x̄ ± s)			
组别	n	p-BAD 蛋白	PTEN 蛋白
阴性对照组	3	0.76 ± 0.95	0.40 ± 0.05
5 μmol · L <sup>-1</sup> GLA 组	3	0.59 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.62 ± 0.01 <sup>a</sup>
10 μmol · L <sup>-1</sup> GLA 组	3	0.41 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.73 ± 0.04 <sup>ab</sup>
20 μmol · L <sup>-1</sup> GLA 组	3	0.29 ± 0.01 <sup>abc</sup>	0.91 ± 0.04 <sup>abc</sup>
F		48.460	94.941
P		0.000	0.000

注:与对照组比较<sup>a</sup>P < 0.05;与 5 μmol · L<sup>-1</sup> GLA 组比较<sup>b</sup>P < 0.05;与 10 μmol · L<sup>-1</sup> GLA 组比较<sup>c</sup>P < 0.05。

3 讨论

宫颈癌的发病率高,占妇科恶性肿瘤的第2位,是大多数发展中国家女性癌症死亡的主要原因<sup>[1]</sup>。HPV 持续感染与宫颈癌发生发展密切相关<sup>[2]</sup>。目前,临床上宫颈癌的治疗方法主要以手术、放射治疗、化学治疗为主。随着研究深入,已发现多种与宫颈癌发生相关的因素,如肿瘤微环境、免疫因素等,有关宫颈癌治疗的研究也更加多元化,包括基因干扰、免疫调节、中药治疗等。随着中药提取工艺的提高,中医药的研究逐渐趋向于采用分子生物学手段对其药理作用机制给予新的解释,传统中药在抗肿瘤方面的研究得到进一步细化。GLA 和 GLB 是从蓝萼香茶菜中提取的2种二萜化合物,具有15-氧-16 贝壳杉烯骨架,均有较好的抗肿瘤作用。有研究证实,GLB 可通过细胞周期阻滞及直接诱导细胞死亡的方式增加胃癌细胞对化学治疗药物敏感性<sup>[12]</sup>。吴元肇等<sup>[13]</sup>研究证实,GLB 可抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移及侵袭。本课题组前期通过细胞及动物模型实验证实,GLB 以剂量依赖的方式抑制宫颈癌

HeLa 和 SiHa 细胞株的增殖,增加 HeLa 和 SiHa 细胞凋亡,诱导 HeLa 和 SiHa 细胞自噬;其机制可能是通过调控磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 3-激酶/Akt 信号通路、JNK 和 p38 丝裂原活化蛋白激酶信号通路等实现<sup>[7-9]</sup>。关于 GLA 在抗肿瘤方面的研究也证实, GLA 对肺癌、乳腺癌、骨肉瘤、舌鳞状细胞癌等肿瘤细胞均有抑制作用<sup>[10-11,14-15]</sup>。但目前的研究多针对 Caski 细胞、HeLa 细胞、SiHa 等 HPV 阳性宫颈癌细胞,有关 HPV 阴性宫颈癌细胞的研究相对较少。

本研究以 HPV 阴性宫颈癌 C33A 细胞为研究对象,采用细胞体外培养的方法观察 GLA 对 C33A 细胞增殖的影响,结果显示,5 μmol · L<sup>-1</sup> GLA 组、10 μmol · L<sup>-1</sup> GLA 组、20 μmol · L<sup>-1</sup> GLA 组、40 μmol · L<sup>-1</sup> GLA 组细胞增殖抑制率显著高于阴性对照组,10 μmol · L<sup>-1</sup> GLA 组、20 μmol · L<sup>-1</sup> GLA 组、40 μmol · L<sup>-1</sup> GLA 组细胞增殖抑制率高于 5 μmol · L<sup>-1</sup> GLA 组,20 μmol · L<sup>-1</sup> GLA 组、40 μmol · L<sup>-1</sup> GLA 组细胞增殖抑制率高于 10 μmol · L<sup>-1</sup> GLA 组,40 μmol · L<sup>-1</sup> GLA 组细胞增殖抑制率高于 20 μmol · L<sup>-1</sup> GLA 组,说明不同浓度 GLA 对宫颈癌 C33A 细胞增殖有显著抑制作用,且呈浓度依赖性。本研究结果显示,5 μmol · L<sup>-1</sup> GLA 组、10 μmol · L<sup>-1</sup> GLA 组、20 μmol · L<sup>-1</sup> GLA 组细胞凋亡率显著高于阴性对照组,10 μmol · L<sup>-1</sup> GLA 组、20 μmol · L<sup>-1</sup> GLA 组细胞凋亡率显著高于 5 μmol · L<sup>-1</sup> GLA 组,20 μmol · L<sup>-1</sup> GLA 组细胞凋亡率显著高于 10 μmol · L<sup>-1</sup> GLA 组,说明 GLA 可促 C33A 细胞凋亡,且呈剂量依赖性。本研究结果与 GLA 在肝癌 SMMC-7721 细胞<sup>[14]</sup>、骨肉瘤细胞<sup>[15]</sup>、宫颈癌 HeLa 细胞等<sup>[10]</sup>方面的研究结果一致。

BAD 基因是 Bcl-2 家族成员之一,生理状态下 BAD 蛋白存在磷酸化和非磷酸化2种状态。BAD 蛋白存在 Bcl-2 家族成员 BH3 同源结构域,在凋亡刺激信号作用下非磷酸化的 BAD 蛋白可与 Bcl-2、Bcl-xl 形成异源二聚体,特异性替换 Bcl-2/Bax、Bcl-xl/Bax 的 Bax,进而促进细胞凋亡<sup>[16]</sup>。当生长因子作用于细胞时,BAD 在 Akt 等信号通路的作用下使多个丝氨酸残基磷酸化,p-BAD 与 14-3-3 蛋白结合成复合物并稳定存在于细胞质中,从而发挥抗凋亡效应<sup>[17]</sup>。近年来,BAD 蛋白在凋亡过程中的调控作用成为许多学者的研究热点。有研究结果显示,过表达 p-BAD 蛋白的星形胶质瘤患者的生存率明显下降<sup>[18]</sup>。BANSAL 等<sup>[19]</sup>研究报道,通过 RNA 干扰技术抑制卵巢癌细胞 CDK1 的表达,使 p-BAD 水平降低,可提高卵巢癌细胞对铂类化学治疗药物的敏感性,且增加细胞凋亡。有研究报道,在多种肿瘤细胞中 BAD 蛋白的磷酸化状态受 Akt 信号通路的调控,PTEN 基因缺失或失活可激活下游 PI3K,进而通过 PI3K/Akt/BAD 通路抑制细胞凋亡<sup>[20-21]</sup>。LI

等<sup>[22]</sup>研究报道,苦参碱可通过诱导乳腺癌细胞中 PTEN 表达上调,通过 Akt 途径使 BAD 蛋白脱磷酸化,导致 BAD 蛋白积聚,从而诱导细胞凋亡。本研究结果显示,5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组细胞中 p-BAD 蛋白相对表达量低于阴性对照组,PTEN 蛋白相对表达量高于阴性对照组;10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组、20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组细胞中 p-BAD 蛋白相对表达量低于 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组,PTEN 蛋白相对表达量高于 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组;20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组细胞中 p-BAD 蛋白相对表达量低于 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组,PTEN 蛋白相对表达量高于 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GLA 组;说明 GLA 诱导宫颈癌 C33A 细胞凋亡的机制可能是通过上调 PTEN 蛋白的表达,激活 PI3K/Akt 等信号转导,使 BAD 蛋白脱磷酸化,降低 p-BAD 蛋白表达,从而诱导细胞凋亡。

综上所述,GLA 可抑制 HPV 阴性宫颈癌细胞 C33A 的增殖,促进 HPV 阴性宫颈癌细胞 C33A 的凋亡,且呈剂量依赖性,其机制可能是通过上调 PTEN 蛋白的表达,激活 PI3K/Akt 等信号转导,使 BAD 蛋白脱磷酸化,导致 BAD 蛋白积聚,从而诱导细胞凋亡。本研究为中药 GLA 治疗 HPV 阴性宫颈癌提供了强有力的依据,但其确切机制还需进一步验证;另外,与其他药物或生物疗法的配伍应用的疗效、在宫颈癌动物模型上的应用等还需要进一步探讨。

参考文献:

[1] ARBYN M, WEIDERPASS E, BRUNI L, et al. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis[J]. *Lancet Glob Health*, 2020, 8(2): e191-e203.

[2] MASSAD L S. Replacing the pap test with screening based on human papillomavirus assays[J]. *JAMA*, 2018, 320(1): 35-37.

[3] KISSELJOV F, SAKHAROVA O, KONDRATJEVA T. Cellular and molecular biological aspects of cervical intraepithelial neoplasia [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2008, 271: 35-95.

[4] 苏敏, 龚小见, 周欣. 中药有效成分抗宫颈癌作用机制的研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(4): 675-684.

SU M, GONG X J, ZHOU X. Research progress in mechanism of traditional Chinese medicine active ingredients against cervical cancer[J]. *China J Chin Mater Med*, 2019, 44(4): 675-684.

[5] HSIAO Y H, LIN C W, WANG P H, et al. The potential of Chinese Herbal medicines in the treatment of cervical cancer [J]. *Integr Cancer Ther*, 2019, 18: 1534735419861693.

[6] LIANG H J, ZHANG Y X, HAI G F, et al. Isolation, structural elucidation, and cytotoxicity of three new ent-kaurane diterpenoids from *Isodon japonica* var. *glaucocalyx* [J]. *Planta Med*, 2012, 78(6): 589-596.

[7] 刘莹莹, 潘莹, 申芳芳, 等. 蓝萼乙素对宫颈癌细胞迁移与侵袭影响作用机制[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2019, 26(4): 212-220.

LIU Y Y, PAN Y, SHEN F F, et al. Effect and mechanism of glaucocalyxin B on invasion and migration of cervical cancer cells[J]. *Chin J Cancer Prevent Treatment*, 2019, 26(4): 212-220.

[8] 千文君, 潘莹, 白洁宇, 等. 蓝萼乙素对两种宫颈癌细胞裸鼠移植

瘤的抑制作用及其机制[J]. *海南医学*, 2017, 28(14): 2237-2242.

QIAN W J, PAN Y, BAI J Y, et al. Inhibitory effect of GLB on two kinds of cervical cancer cell lines transplanted tumor in nude mice and its mechanism[J]. *Hainan Med J*, 2017, 28(14): 2237-2242.

[9] PAN Y, BAI J, SHEN F, et al. Glaucocalyxin B induces apoptosis and autophagy in human cervical cancer cells[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(2): 1751-1755.

[10] HUANG X L, CHEN J L, LI X L, et al. Synthesis and *in vitro* anticancer activities of biotinylated derivatives of glaucocalyxin A and oridonin[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2021, 23(7): 703-711.

[11] 李晓敏, 潘莹, 尹宝靓, 等. 蓝萼甲素对人工宫颈癌裸鼠移植瘤的作用机制研究[J]. *中国妇幼保健*, 2015, 30(35): 6353-6356.

LI X M, PAN Y, YIN B J, et al. The mechanism of effect of glaucocalyxin A on transplanted tumor of human cervical carcinoma in nude mice[J]. *Matern Child Health Care China*, 2015, 30(35): 6353-6356.

[12] UR RAHMAN M S, ZHANG L, WU L, et al. Sensitization of gastric cancer cells to alkylating agents by glaucocalyxin B via cell cycle arrest and enhanced cell death[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2017, 11: 2431-2441.

[13] 吴元肇, 金早. 蓝萼乙素对三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖、迁移及侵袭的影响[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2020, 26(4): 589-594.

WU Y Z, JIN Z. Effects of Glaucocalyxin B on cell proliferation, migration and invasion of triple-negative breast cancer cells[J]. *Chin J Surg Integr Tradit Western Med*, 2020, 26(4): 589-594.

[14] TANG L, JIN X, HU X, et al. Glaucocalyxin A inhibits the growth of liver cancer Focus and SMMC-7721 cells [J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(2): 1173-1178.

[15] ZHU J, SUN Y, LU Y, et al. Glaucocalyxin A exerts anticancer effect on osteosarcoma by inhibiting GLII nuclear translocation via regulating PI3K/Akt pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(6): 708.

[16] DU C, FANG M, LI Y, et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition[J]. *Cell*, 2006, 102(1): 33-42.

[17] DATTA S R, DUDEK H, TAO X, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery [J]. *Cell*, 1997, 91(2): 231-241.

[18] CARTRON P F, LOUSSOUARN D, CAMPONE M, et al. Prognostic impact of the expression/phosphorylation of the BH3-only proteins of the BCL-2 family in glioblastoma multiform [J]. *Cell Death Dis*, 2012, 3(8): e421.

[19] BANSAL N, MARCHION D C, BICAKU E, et al. BCL2 antagonist of cell death kinases, phosphatases, and ovarian cancer sensitivity to cisplatin[J]. *J Gynecol Oncol*, 2012, 23(1): 35-42.

[20] LIU H Y, ZHANG Y Y, ZHU B L, et al. miR-21 regulates the proliferation and apoptosis of ovarian cancer cells through PTEN/PI3K/AKT [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(10): 4149-4155.

[21] AMINI-FARSANI Z, SANGTARASH M H, SHAMSARA M, et al. MiR-221/222 promote chemoresistance to cisplatin in ovarian cancer cells by targeting PTEN/PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Cytotechnology*, 2018, 70(1): 203-213.

[22] LI L Q, LI X L, WANG L, et al. Matrine inhibits breast cancer growth via miR-21/PTEN/Akt pathway in MCF-7 cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2012, 30(3): 631-641.

( 本文编辑:周二强 )