

花旗松素通过 PI3K/AKT/mTOR 通路对 宫颈癌 SiHa 细胞自噬、凋亡和衰老的影响^{*}

陈海燕, 曾雪莉

(湖北省随州市曾都医院妇产科, 随州 441300)

摘要: [目的] 观察花旗松素(Taxifolin)对宫颈癌 SiHa 细胞自噬、凋亡和衰老的影响。[方法] 采用 0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ Taxifolin 处理宫颈癌 SiHa 细胞。CCK-8 法检测细胞增殖倍数; 蛋白免疫印迹检测 Beclin1、p62、LC3II/LC3I 蛋白表达水平; 免疫荧光检测 LC3+ 含量; 流式细胞仪检测细胞凋亡; 流式分选检测线粒体膜电位; 蛋白免疫印迹检测 Bcl-2、Bax、Caspase-3、cleaved Caspase-3、Caspase-9、cleaved Caspase-9、磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)、p-PI3K、蛋白激酶 B (AKT)、p-AKT、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、p-mTOR 蛋白表达水平, 加入 AKT 激活剂 SC79 进行验证。[结果] 与 Taxifolin 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比较, Taxifolin 10、20 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞增殖倍数显著降低($P<0.05$), p62 蛋白水平显著降低($P<0.05$), Beclin1、LC3II/LC3I 蛋白水平显著升高($P<0.05$), LC3+ 含量显著升高($P<0.05$), 凋亡率显著升高($P<0.05$), 线粒体膜电位显著升高($P<0.05$), Bcl-2/Bax 比值显著降低($P<0.05$), cleaved Caspase-3/Caspase-3、cleaved Caspase-9/Caspase-9 比值升高($P<0.05$), p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 比值显著降低($P<0.05$)。加入 PI3K/AKT 信号通路激活剂 SC79 可逆转花旗松素对 SiHa 细胞凋亡、自噬及 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白表达的影响。[结论] Taxifolin 通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路的活化诱导宫颈癌 SiHa 细胞自噬、凋亡和衰老。

关键词: 宫颈癌; 花旗松素; 自噬; 凋亡

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1673-9043(2022)06-0789-08

宫颈癌(cervical cancer)在子宫颈表面的组织中发展,是影响全世界女性的最常见的癌症之一,每年有大量的女性因此而死亡^[1]。发生子宫颈癌的主要危险因素是人乳头瘤病毒(HPV)的持续感染,且其感染通常是无症状和短暂的^[2]。筛选和治疗方法的进步显著改善了临床结局,然而由于对标准疗法化疗的耐药性发展,晚期宫颈癌的治疗仍然是一个挑战^[3]。因此探寻治疗宫颈癌的有效方式是迫切的。抗肿瘤中药由于高抗癌效力和低毒性,已在临床上得到广泛应用,传统中药与健康生活方式的

结合通常可以完全缓解轻度和中度疾病。花旗松素(Taxifolin)又名二氢槲皮素、紫叶杉素,是提取自水红花子、土茯苓等植物中的一种生物类黄酮准维生素 P,具有抗肿瘤、抗病毒、抗菌、消炎等多种药理活性^[4]。已有研究表明花旗松素具有良好的体外抑制人宫颈癌 Hela 细胞增殖作用^[5]。目前还没有关于花旗松素对宫颈癌 SiHa 细胞影响的研究,本文旨在研究花旗松素对宫颈癌 SiHa 细胞自噬、凋亡和衰老的影响,以为宫颈癌的临床治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药物与主要试剂 花旗松素(批号:111816-201102,纯度 $\geq 98.9\%$,中国食品药品检定研究院);达尔伯克改良伊格培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)培养基、胎牛血清、胰蛋白酶和青-链霉素(货号分别为:12100-046、10082-147、10082-147、15140-122,均购于美国 Gibco 公司);MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(批号:G020-

^{*} 基金项目:湖北省自然科学基金项目(2016CFB528)。

作者简介: 陈海燕(1980-),女,主治医师,主要研究方向为妇科肿瘤。

通讯作者: 曾雪莉, E-mail: zengxueliqq@163.com。

引用格式: 陈海燕, 曾雪莉. 花旗松素通过 PI3K/AKT/mTOR 通路对宫颈癌 SiHa 细胞自噬、凋亡和衰老的影响[J]. 天津中医药大学学报, 2022, 41(6): 789-796.

1-1,南京建成生物工程研究所);CCK-8试剂盒、聚氨基丙烯酸正丁酯(bicinchoninic acid,BCA)蛋白浓度测定试剂盒和 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(批号分别为:C0037、P0012S、C1062S,上海碧云天生物技术研究);兔抗单克隆抗体 Beclin1、p62、LC3II/LC3I、Bcl-2、Bax、Caspase-3、cleaved caspase-3、Caspase-9、cleaved Caspase-9、磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)、p-PI3K、蛋白激酶 B(AKT)、p-AKT、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、p-mTOR(货号分别为:ab62557、ab56416、ab128025、ab196495、ab53154、ab13847、ab2302、ab52298、ab2324、ab191606、ab182651、ab106693、ab192623、ab2732、ab84400,英国 Abcam 公司)。

1.2 细胞及细胞培养 人宫颈癌鳞状癌 SiHa 细胞株(购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库),细胞培养于 10%胎牛血清和 1%青-链霉素的高糖 DMEM 培养基中,并放置在 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中。培养基每 2~3 d 更换 1 次,当需要收集细胞时,用 0.25%胰蛋白酶消化。实验用细胞为对数生长期细胞。

1.3 MTT 检测细胞增殖 将宫颈癌 SiHa 细胞接种于 96 孔板(100 μL/孔)孵育 24 h 后,用不同浓度(0、0.1、0.5、1、2.5、5、10、20、40、80、120、150、200 μmol/L)花旗松素处理细胞,置于 37℃,含 5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h,每孔加入 MTT 溶液 50 μL,孵育 4 h,吸出上清液,每孔加 150 μL DMSO,用平板摇床摇匀,用酶标仪在 570 nm 处检测各浓度 OD 值。实验重复 3 次,取平均值并计算药物半数抑制浓度 IC₅₀ 值,选择 20 μmol/L Taxifolin 为最高浓度,倍数递减确定给药浓度梯度为:20、10、5 μmol/L 进行后续实验。

1.4 CCK-8 法检测细胞增殖倍数 取对数生长期宫颈癌 SiHa 细胞,胰蛋白酶消化制成细胞悬液,以每孔 4×10³ 个细胞接种于 96 孔板,每孔 100 μL,培养 24 h,加入 Taxifolin(0、5、10、20 μmol/L)处理 24、48、72 h,于每个检测时间点(0、24、48、72 h)分别加入稀释到 10%的 CCK-8 溶液 10 μL,置于 37℃,含 5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 4 h,用酶标仪在 450 nm 处检测吸光值,计算细胞增殖倍数。

1.5 Western blot 检测 Beclin1、p62、LC3II/LC3I、PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR 及凋亡相关蛋白表达水平 取对数生长期宫颈癌 SiHa 细

胞接种至 6 孔板,置于 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中,加入 Taxifolin(0、5、10、20 μmol/L)处理 24 h,处理后将细胞用磷酸盐缓冲溶液(PBS)将清洗 3 次,再加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液进行总蛋白提取,BCA 试剂盒测定蛋白质含量;提取等量蛋白质样品,100℃变性 5 min。然后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳分离并转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,5%的牛血清白蛋白(BSA)室温封闭 2 h 后加入相应的一抗,4℃过夜孵育,次日,清洗后再加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1 h,清洗。最后加入发光液后,于凝胶成像仪进行曝光拍照,并用 ImageJ 软件统计灰度值计算相对表达量。GAPDH 作为上样量参照,至少重复 3 个独立的实验。

1.6 免疫荧光检测 LC3+ 含量 将经 Taxifolin(0、5、10、20 μmol/L)处理 24 h 后的宫颈癌 SiHa 细胞接种于细胞爬片上,用 PBS 浸洗 3 次,每次 3 min;用多聚甲醛固定 15 min,用 PBS 浸洗 3 次,每次 3 min。0.5% Triton X-100 室温通透 20 min,PBS 浸洗 3 次,每次 3 min,吸水纸吸干 PBS,在玻片上滴加正常山羊血清,室温封闭 30 min,吸掉封闭液,加入一抗,孵育过夜,PBS 浸洗,避光加入荧光二抗,孵育 1 h,PBS 浸洗,滴加 DAPI 避光孵育 5 min,用含荧光淬灭剂的封片液封片,于荧光显微镜下观察采集图像。

1.7 流式检测细胞凋亡 宫颈癌 SiHa 细胞经 Taxifolin(0、5、10、20 μmol/L)处理 24 h,胰酶消化收集各组悬浮细胞到 10 mL 的离心管中,每样本细胞数为 3×10⁶/mL,1 000 r/min 离心 5 min,弃去培养液,用孵育缓冲液洗涤 1 次,1 000 r/min 离心 5 min,用 100 μL 的标记溶液重悬细胞,室温下避光孵育 15 min,1 000 r/min 离心 5 min 沉淀细胞孵育缓冲液洗 1 次,加入荧光(SA-FLOUS)溶液 4℃下孵育 20 min,避光并不时振动,流式细胞仪分析:流式细胞仪激发光波长用 488 nm,用一波长为 515 nm 的通带滤器检测 FITC 荧光,另一波长大于 560 nm 的滤器检测 PI。

1.8 JC-1 法检测线粒体膜电位 将宫颈癌 SiHa 细胞接种于 6 孔板中,加入 Taxifolin(0、5、10、20 μmol/L)处理 24 h 后用 PBS 清洗 3 次,孵育 24 h,加入 JC-1 (5 μg/mL)室温避光反应 30 min。用流式分选仪检测,记录红色和绿色荧光强度。

1.9 加入 AKT 激活剂 SC79 对 SiHa 细胞的影响 选择 20 $\mu\text{mol/L}$ 剂量花旗松素处理细胞,将细胞随机分为 4 组:Control 组、Taxifolin 20 $\mu\text{mol/L}$ 组、SC79 组和 Taxifolin 20 $\mu\text{mol/L}$ +SC79 组。Control 组不做处理,Taxifolin 20 $\mu\text{mol/L}$ 组用 20 $\mu\text{mol/L}$ 花旗松素处理 24 h,SC79 组用 AKT 激活剂 SC79 处理 24 h,Taxifolin 20 $\mu\text{mol/L}$ +SC79 组用 20 $\mu\text{mol/L}$ 花旗松素和 AKT 激活剂 SC79 联合处理 24 h。检测各组细胞凋亡、自噬及相关蛋白表达。

1.10 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。正态分布计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 降低宫颈癌 SiHa 细胞活力 与 Taxifolin 0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时相比较,Taxifolin 40、80、120、150、200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度细胞活力显著降低($P<0.05$)。结果见图 1。

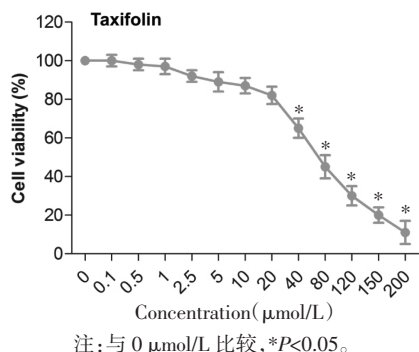


图 1 Taxifolin 不同浓度处理宫颈癌 SiHa 细胞 24 h 细胞活力的变化

2.2 抑制宫颈癌 SiHa 细胞增殖 与 Taxifolin 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比较,Taxifolin 10、20 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞增殖倍数显著降低($P<0.05$)。结果见图 2。

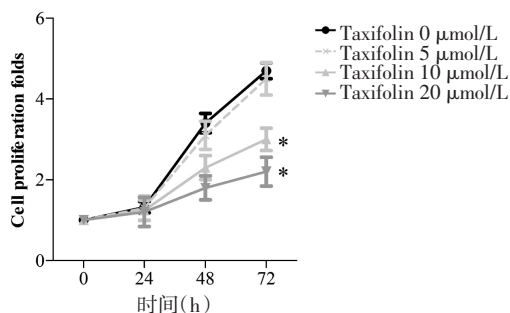
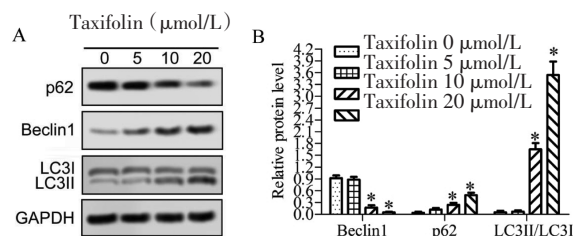


图 2 各组宫颈癌 SiHa 细胞增殖倍数的比较

2.3 诱导宫颈癌 SiHa 细胞自噬 与 Taxifolin

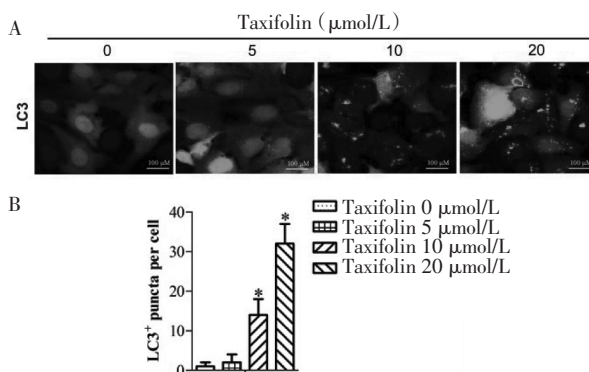
0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比较,Taxifolin 10、20 $\mu\text{mol/L}$ 组 p62 蛋白水平显著降低($P<0.05$),Beclin1、LC3II/LC3I 蛋白水平显著升高($P<0.05$)。结果见图 3。



注:A.WB 实验检测各组细胞 Beclin1、p62、LC3II、LC3I 蛋白表达; B.半定量分析各组细胞 Beclin1、p62、LC3II、LC3I 蛋白表达水平;与 Taxifolin 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较,* $P<0.05$ 。

图 3 各组宫颈癌 SiHa 细胞自噬蛋白 Beclin1、p62、LC3II、LC3I 的比较

2.4 升高宫颈癌 SiHa 细胞 LC3+含量 与 Taxifolin 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比较,Taxifolin 10、20 $\mu\text{mol/L}$ 组 LC3+含量显著升高($P<0.05$)。结果见图 4。



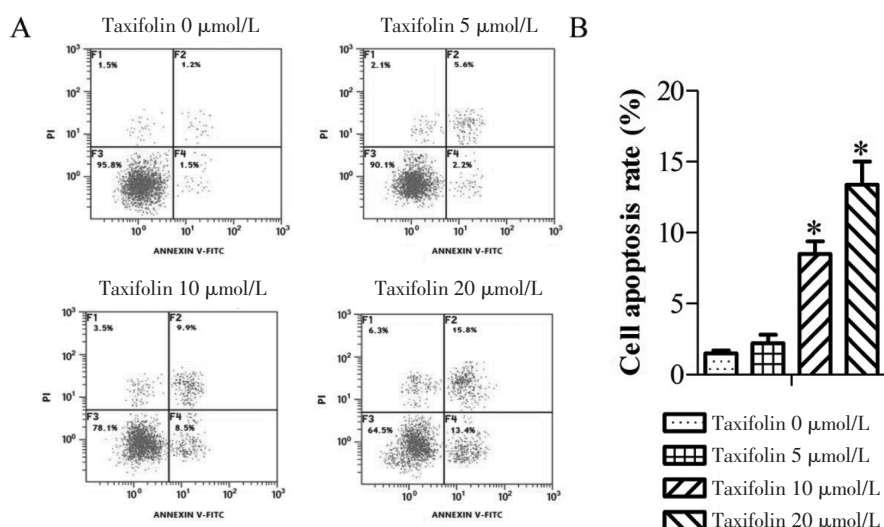
注:A.免疫荧光检测各组细胞 LC3+含量;B.半定量分析 LC3+含量。与 Taxifolin 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较,* $P<0.05$ 。

图 4 各组宫颈癌 SiHa 细胞 LC3+含量的比较

2.5 促进宫颈癌 SiHa 细胞凋亡 与 Taxifolin 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比较,Taxifolin 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞凋亡率显著升高($P<0.05$)。结果见图 5。

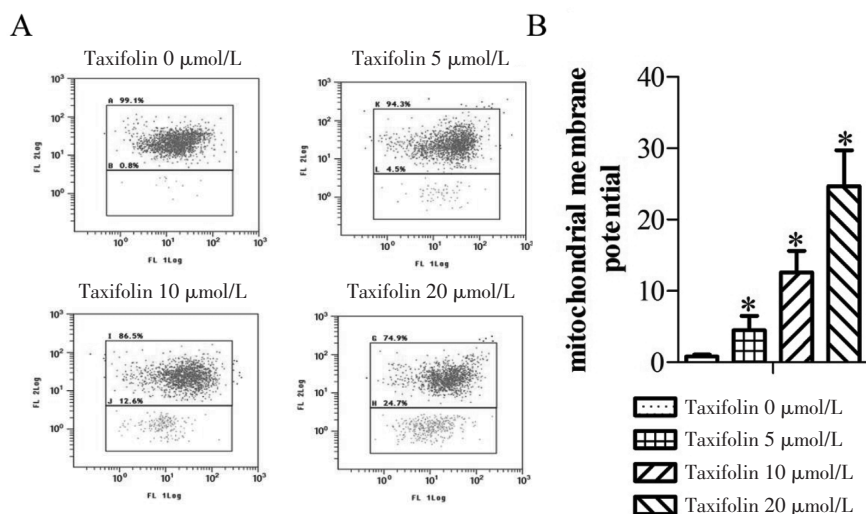
2.6 升高宫颈癌 SiHa 细胞线粒体膜电位 与 Taxifolin 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比较,Taxifolin 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 组线粒体膜电位显著升高($P<0.05$)。结果见图 6。

2.7 降低宫颈癌 SiHa 细胞 Bcl-2/Bax 比值,升高 cleaved Caspase-3/Caspase-3、cleaved Caspase-9/Caspase-9 比值 与 Taxifolin 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比较,Taxifolin 10、20 $\mu\text{mol/L}$ 组 Bcl-2/Bax 比值显著降低($P<0.05$),cleaved Caspase-3/Caspase-3、cleaved Caspase-9/Caspase-9 比值升高($P<0.05$)。结果见图 7。



注:A.流式细胞仪检测各组细胞细胞凋亡率;B.半定量分析各组细胞细胞凋亡率。与 Taxifolin 0 μmol/L 组比较, * $P<0.05$

图5 各组宫颈癌 SiHa 细胞细胞凋亡率的比较



注:A.流式检测各组细胞线粒体膜电位;B.半定量分析各组细胞线粒体膜电位。与 Taxifolin 0 μmol/L 组比较, * $P<0.05$ 。

图6 各组宫颈癌 SiHa 细胞线粒体膜电位的比较

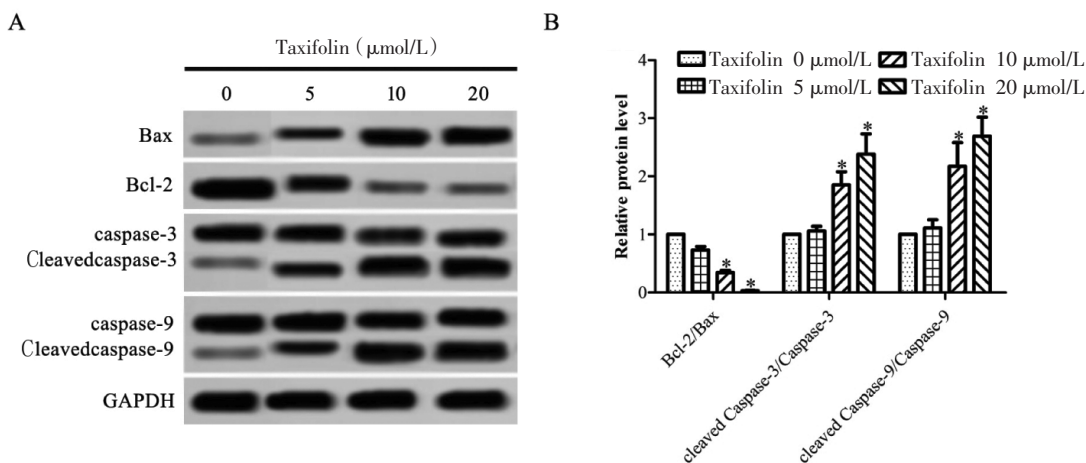
2.8 降低宫颈癌 SiHa 细胞 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 比值 与 Taxifolin 0 μmol/L 组相比较, Taxifolin 10、20 μmol/L 组 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 比值显著降低($P<0.05$)。结果见图 8。

2.9 加入 AKT 激活剂后花旗松素对 SiHa 细胞的影响 与 Control 组相比较, Taxifolin 20 μmol/L 组 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 比值和 P62 蛋白水平显著降低 ($P<0.05$), 细胞凋亡率和 Beclin1、LC3II/LC3I 蛋白水平显著升高 ($P<0.05$)。SC79 组 Taxifolin 20 μmol/L 组 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 比值和 P62 蛋白水平显著升高($P<0.05$), 细胞凋亡率和 Beclin1、LC3II/LC3I

蛋白水平显著降低 ($P<0.05$); 与 SC79 组相比较, Taxifolin 20 μM +SC79 组 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 比值和 P62 蛋白水平显著降低($P<0.05$), 细胞凋亡率和 Beclin1、LC3II/LC3I 蛋白水平显著升高($P<0.05$)。结果见图 9。

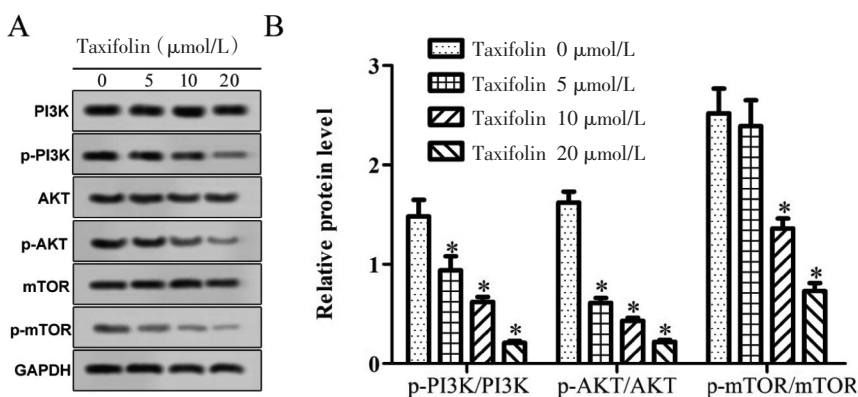
3 讨论

宫颈癌是全世界女性中最常被诊断出的癌症, 仅次于乳腺癌, 结肠直肠癌和肺癌^[6]。在许多不发达国家, 宫颈癌患者的 5 年生存率不到 40%^[7]。由于宫颈癌的强大增殖, 侵袭和转移能力, 晚期宫颈癌患者的预后仍然很差。由于化学疗法的治疗是有限且昂贵的, 因此探寻治疗宫颈癌的药物是迫切的。花旗松素是维生素 P 族中的一种有机化合物, 是一种



注:与 Taxifolin 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, * $P < 0.05$ 。

图7 各组宫颈癌 SiHa 细胞 Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-9 表达水平的比较



注:A. WB 检测各组细胞 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR 蛋白表达;B.半定量分析各组细胞 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR 蛋白表达水平。与 Taxifolin 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, * $P < 0.05$ 。

图8 各组宫颈癌 SiHa 细胞 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR 蛋白表达水平的比较

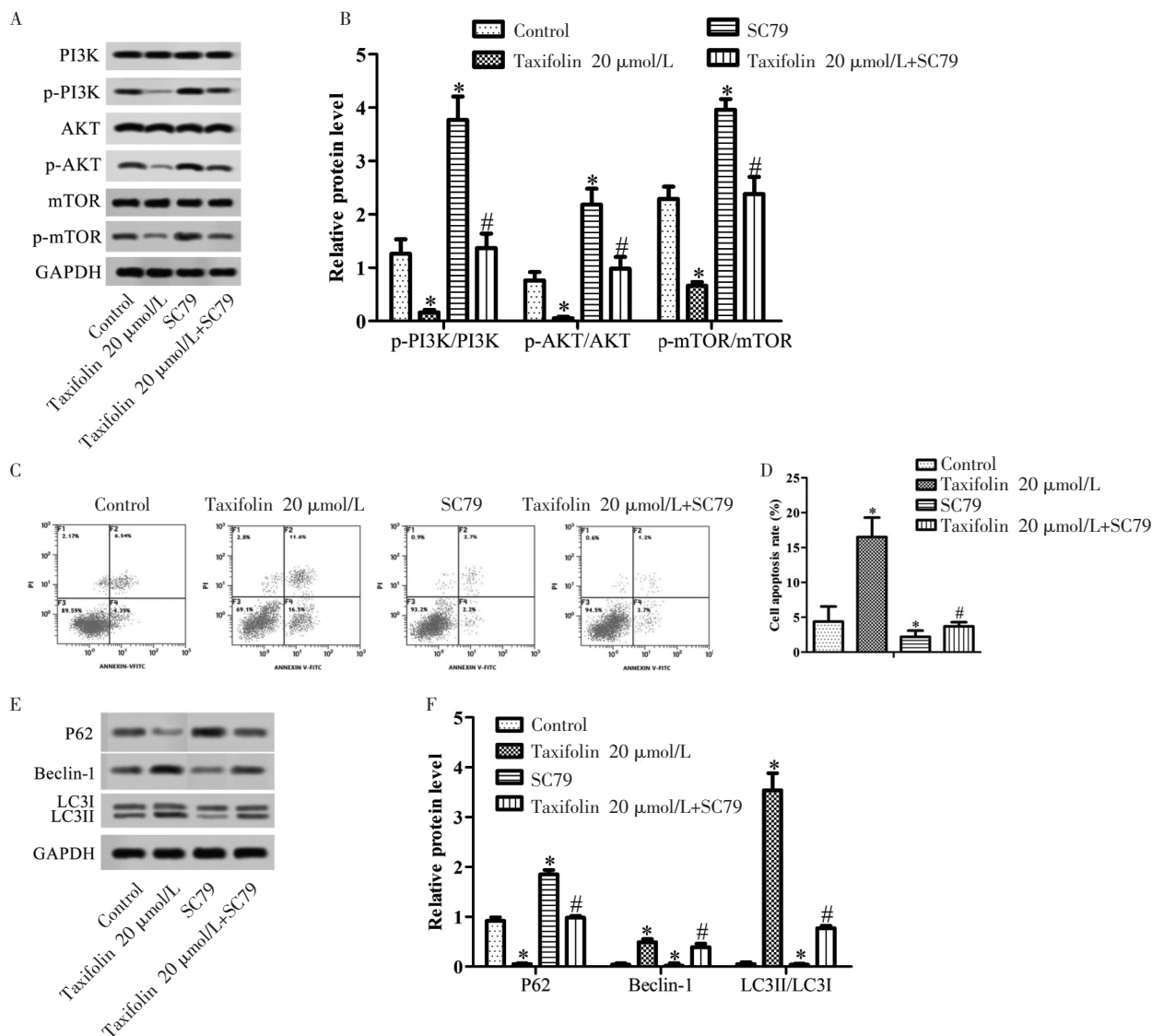
植物黄酮类化合物,大量研究表明花旗松素对多种肿瘤具有抑制作用。本研究发现,花旗松素具有抑制宫颈癌 SiHa 细胞活力的作用。

抗癌药活性的主要机制之一是抑制癌细胞的生长。Li 等^[8]研究发现花旗松素通过抑制乳房癌细胞增殖对乳房癌具有治疗作用。Manigandan 等^[9]研究发现通过干预肿瘤细胞增殖和分化过程中的 Wnt/ β -catenin 通路,发现花旗松素可以对结肠癌起到抑癌的作用。本文与上述结果研究一致,结果表明花旗松素具有抑制宫颈癌 SiHa 增殖作用。

自噬抑制某些癌细胞的生长^[10]。自噬是一种主要的细胞内降解过程,参与维持机体的内环境稳态,近年来研究发现自噬功能异常与宫颈癌的发生发展以及治疗耐受等密切相关^[11]。Beclin1 是酵母 Atg6 基因在人类基因中的同源体,上调 Beclin1 的表达可诱导自噬的形成^[12]。自噬标记蛋白 p62 是多

泛素化结合蛋白,自噬发生缺陷可以上调 p62 的表达。LC3 由可溶形式 LC3I 和脂化形式(称为 LC3 II)组成。LC3 II 的存在与自噬直接相关,因为 LC II 是在自噬小体形成中募集的,细胞应激触发 LC3 I 缀合到磷脂酰乙醇胺以构成 lipidated LC3 II,这是自噬体的一个组件,是自噬的标记物^[13],LC3 II/LC3 I 的比例反应了自噬水平情况。本研究发现,花旗松素具有下调宫颈癌 SiHa 细胞 Beclin1 蛋白表达水平,上调 p62、LC3 II/LC3 I 蛋白表达水平的作用。提示花旗松素可诱导宫颈癌 SiHa 细胞自噬。

细胞凋亡是细胞的程序性死亡,凋亡维持细胞的存活及死亡平衡,细胞凋亡缺陷可引起癌症自身免疫,而细胞凋亡增强则可引起退行性疾病^[14]。线粒体在哺乳动物细胞凋亡的内在途径中具有重要作用。在各种类型的癌症中,凋亡抑制剂被高度表达,而凋亡启动子大多被灭活,导致一定程度的耐药



注: A. Western blot 检测各组细胞 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR 蛋白表达; B. 半定量分析各组细胞 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR 蛋白表达水平; C. 流式细胞仪检测各组细胞细胞凋亡率; D. 半定量分析各组细胞凋亡率; E. Western blot 实验检测各组细胞 Beclin1、p62、LC3II、LC3I 蛋白表达; F. 半定量分析各组细胞 Beclin1、p62、LC3II、LC3I 蛋白表达水平; 与 Control 组比较, * $P<0.05$; 与 SC79 组比较, # $P<0.05$ 。

图9 加入 AKT 激活剂后花旗松素对 SiHa 细胞的影响

性。因此,通过调控在癌细胞中的细胞凋亡的正常响应的再活化是希望的治疗方法^[15]。Zhou 等^[16]研究发现花旗红素通过诱导凋亡,细胞周期停滞和抑制 PI3K/AKT/mTOR 途径来抑制瘢痕细胞癌的生长。符小玲等^[17]研究发现花旗松素可以时间和浓度依赖性的方式抑制体外培养的人非小细胞肺癌细胞增殖并促进其凋亡。本文与上述结果研究一致,结果表明花旗红素具有促进宫颈癌 SiHa 细胞凋亡的作用。

线粒体膜电位是由存在于线粒体内膜的质子

泵将基质内的质子泵入外室所形成的横跨线粒体内膜的线粒体膜电位,其为维持线粒体进行氧化磷酸化、产生三磷酸腺苷、保持线粒体功能的基础^[18]。Xiao 等^[19]研究发现花旗松素通过抑制线粒体膜电位下降,减轻 ROS 从而保护 H9C2 细胞的氧化应激损伤。本研究发现,花旗红素具有升高宫颈癌 SiHa 细胞线粒体膜电位的作用。

细胞衰老是指细胞脱离细胞周期并不可逆地丧失增殖能力后进入的一种相对稳定的状态,是正常细胞的必然归宿。而越来越多的研究发现,肿瘤

细胞往往具有衰老障碍而表现出无限增殖的能力。在多种衰老细胞中,某些抑癌基因的过表达会引起细胞进入衰老程序,细胞绕过衰老途径是其永生化及癌变进展的必要条件。本研究发现,花旗红素具有降低宫颈癌 SiHa 细胞 Bcl-2/Bax mRNA 水平,升高 Caspase-3、Caspase-9 水平的作用。提示花旗红素可抑制宫颈癌 SiHa 细胞衰老。

磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(PI3K/Akt/mTOR)信号传导通路是哺乳动物细胞内重要的信号传导通路之一,它通过影响其下游多种效应分子的活化状态,发挥抑制细胞凋亡、促进增殖的作用。Zhou 等^[16]研究发现花旗松素通过诱导凋亡,细胞周期停滞和抑制 PI3K/AKT/mTOR 途径来抑制瘢痕细胞癌的生长。本研究发现,花旗松素具有降低宫颈癌 SiHa 细胞 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 比值的作用,且加入 PI3K/AKT 信号通路激活剂 SC79 可逆转花旗松素对 SiHa 细胞凋亡、自噬及 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白表达的影响。提示花旗松素通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路的活化调控宫颈癌 SiHa 细胞的生物学行为。

综上所述,花旗松素对宫颈癌 SiHa 细胞具有抑制增殖、衰老,促进凋亡、自噬,升高线粒体膜电位的作用,这可能是通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路的活化实现的,提示花旗松素可用于临床治疗宫颈癌的潜力,为临床治疗提供实验依据。但花旗松素难溶于水,导致生物利用率低,限制了其在医药和临床上的使用,下一步计划研究提高花旗松素的生物利用率。

参考文献:

- [1] 王品,李勤.阴道微生态与宫颈人乳头瘤病毒感染相关研究[J].临床误诊误治,2019,32(5):108-113.
WANG P,LI Q. The relationship between vaginal microecology and cervical human papillomavirus infection [J]. Clinical Misdiagnosis & Mistherapy, 2019, 32(5):108-113.
- [2] 蒋杰,毕玉晰,李志茹,等.人乳头瘤病毒 E6/E7 在宫颈癌中的研究进展[J].临床误诊误治,2018,31(11):101-105.
JIANG J,BI Y X,LI Z R,et al. Research progress of human papillomavirus E6/E7 in cervical cancer[J]. Clinical Misdiagnosis & Mistherapy, 2018, 31(11):101-105.
- [3] 赵肖丽,周伟慢,王华,等.伊立替康联合顺铂同步放化疗治疗晚期宫颈癌的临床价值及毒副反应分析[J].解放军医药杂志,2019,31(8):30-33.

- ZHAO X L,ZHOU W M,WANG H,et al. Clinical value and toxic and side effects of irinotecan combined with cisplatin by concurrent chemoradiotherapy in treatment of patients with advanced cervical cancer[J]. Medical & Pharmaceutical Journal of Chinese PLA, 2019, 31(8):30-33.
- [4] 杨松霖,杜姣姣,赵丽娟,等.花旗松素的研究进展及展望[J].化工管理,2018,(22):54-55,59.
YANG S L,DU J J,ZHAO L J,et al. Research progress and prospect of taxifolin[J]. Chemical Enterprise Management, 2018,(22):54-55,59.
 - [5] 翟延君,程飞,王添敏,等.花旗松素对人宫颈癌 Hela 细胞的体外抗肿瘤活性及其机理研究[J].中成药,2011,33(12):2052-2055.
ZHAI Y J,CHENG F,WANG T M,et al. *In vitro* anticancer activity of taxifolin on human cervical cancer Hela cells and its mechanism[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2011, 33(12):2052-2055.
 - [6] 李永红,李玉嫦,柯妍,等.斑蝥酸钠调控 PI3K/Akt/mTOR 通路对宫颈癌细胞自噬的研究[J].医学分子生物学杂志,2019,16(4):321-327.
LI Y H,LI Y C,KE Y,et al. Effect of sodium cantharidate on autophagy of cervical cancer cells by regulating PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. Journal of Medical Molecular Biology, 2019, 16(4):321-327.
 - [7] 彭荫伟. 小分子 Survivin 抑制剂 YM155 对人子宫颈癌 SiHa 和 ME-180 细胞增殖、凋亡的影响及机制研究[J]. 医学分子生物学杂志,2018,15(5):320-326.
PENG Y W. Effects of survivin inhibitor YM155 on proliferation and apoptosis of SiHa and ME-180 cervical cancer cells and the mechanism involved [J]. Journal of Medical Molecular Biology, 2018, 15(5):320-326.
 - [8] LI J,HU L,ZHOU T,et al. Taxifolin inhibits breast cancer cells proliferation,migration and invasion by promoting mesenchymal to epithelial transition *via* β -catenin signaling[J]. Life Sciences, 2019, 232(12):116617.
 - [9] MANIGANDAN K,MANIMARAN D,JAYARAJ R L,et al. Taxifolin curbs NF- κ B-mediated Wnt/ β -catenin signaling *via* up-regulating Nrf2 pathway in experimental colon carcinogenesis[J]. Biochimie, 2015, 119(7):103-112.
 - [10] 孙英甲,乐利明,荔志云.异甘草素抗胶质瘤作用机制的研究进展[J].解放军医药杂志,2020,32(1):110-113.
SUN Y J,YUE L M,LI Z Y. Research progress of the anti-glioma mechanism of isoglycyrrhizin[J]. Medical & Pharmaceutical Journal of Chinese PLA, 2020, 32(1):110-113.
 - [11] 何白云,王艳林,黄利鸣.细胞自噬与宫颈癌关系的研究进展[J].现代妇产科进展,2018,27(2):149-152.
HE B Y,WANG Y L,HUANG L M. Research progress on

- the relationship between autophagy and cervical cancer[J]. Progress in Obstetrics and Gynecology, 2018, 27(2): 149–152.
- [12] TSAI J H, HSU L S, HUANG H C, et al. 1-(2-hydroxy-5-methylphenyl)-3-phenyl-1,3-propanedione induces G1 cell cycle arrest and autophagy in HeLa cervical cancer cells[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(8): 1274.
- [13] MIRACCO C, CEVENINI G, FRANCHI A, et al. Beclin 1 and LC3 autophagic gene expression in cutaneous melanocytic lesions[J]. Human Pathology, 2010, 41(4): 503–512.
- [14] HASSAN M, WATARI H, ABUALMAATY A, et al. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer[J]. BioMed Research International, 2014, 2014(3): 150845.
- [15] KAUFMANN S H, VAUX D L. Alterations in the apoptotic machinery and their potential role in anticancer drug resistance[J]. Oncogene, 2003, 22(47): 7414–7430.
- [16] ZHOU W, GUO Z. Taxifolin inhibits the scar cell carcinoma growth by inducing apoptosis, cell cycle arrest and suppression of PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. Journal of B. U. ON.: Official Journal of the Balkan Union of Oncology, 2019, 24(2): 853–858.
- [17] 符小玲, 赵兴丹, 张倩, 等. 花旗松素对人非小细胞肺癌细胞 A549 的作用及其机制的研究[J]. 肿瘤药学, 2018, 8(4): 519–523, 527.
- FU X L, ZHAO X D, ZHANG Q, et al. Effects of taxifolin on human non-small cell lung cancer A549 cells and its mechanism[J]. Anti-Tumor Pharmacy, 2018, 8(4): 519–523, 527.
- [18] KROEMER G. Mitochondrial control of apoptosis: An introduction[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003, 304(3): 433–435.
- [19] 叶艳琼, 王晓莉, 蔡骞, 等. 花旗松素对过氧化氢诱导 H9C2 细胞焦亡的保护作用[J]. 中南大学学报(医学版), 2017, 42(12): 1367–1374.
- YE Y Q, WANG X L, CAI Q, et al. Protective effect of taxifolin on H₂O₂-induced H9C2 cell pyroptosis[J]. Journal of Central South University (Medical Science), 2017, 42(12): 1367–1374.

(收稿日期: 2022-08-20)

Effects of taxifolin on autophagy, apoptosis and senescence of SiHa cells in cervical cancer through PI3K/AKT/mTOR pathway

CHEN Haiyan, ZENG Xueli

(Department of Gynecology and Obstetrics, Zengdu Hospital, Suizhou 441300, China)

Abstract: [Objective] To observe the effects of taxifolin on autophagy, apoptosis and senescence of SiHa cells in cervical cancer. [Methods] SiHa cells of cervical cancer were treated with 0, 5, 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$ Taxifolin. Cell proliferation multiple was measured by CCK-8 method. Beclin1, p62 and LC3II/LC3I were detected by western blot. LC3+ was detected by immunofluorescence assay. Flow cytometry was used to detect apoptosis. Mitochondrial membrane potential was detected by flow sorting. Protein expression levels of Bcl-2, Bax, Caspase-3, cleaved Caspase-3, Caspase-9, cleaved Caspase-9, PI3K, p-PI3K, AKT, p-AKT, mTOR and p-mTOR were detected by protein western blot, AKT activator SC79 was added for verification. [Results] Compared with taxifolin 0 $\mu\text{mol/L}$ group, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$ taxifolin group cell proliferation ratio decreased significantly ($P < 0.05$), p62 protein levels decreased significantly ($P < 0.05$), Beclin1, LC3II/LC3I protein were significantly increased ($P < 0.05$), LC3+ content increased significantly ($P < 0.05$), the apoptosis rate increased significantly ($P < 0.05$), significantly increased mitochondrial membrane potential ($P < 0.05$), the Bcl-2/Bax ratio decreased significantly ($P < 0.05$), The ratio of cleaved Caspase-3/Caspase-3 and cleaved Caspase-9/Caspase-9 was increased ($P < 0.05$), and the ratio of p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT, and p-mTOR/mTOR were significantly decreased ($P < 0.05$). The addition of SC79, a PI3K/Akt signaling pathway activator, could reverse the effects of taxifolin on apoptosis, autophagy and PI3K/AKT signaling pathway related protein expression in SiHa cells. [Conclusion] Taxifolin induces autophagy, apoptosis and senescence of SiHa cells in cervical cancer by inhibiting the activation of PI3K/AKT/mTOR pathway.

Keywords: cervical cancer; taxifolin; autophagy; apoptosis