

## 毛钩藤碱对人宫颈癌 Ca Ski 细胞增殖、凋亡、转移及侵袭的影响

李亚威, 谢磊, 王娜\*

(河北医科大学第一医院, 石家庄 050000)

**[摘要]** 目的:探讨毛钩藤碱对人宫颈癌 Ca Ski 细胞增殖、凋亡、转移、侵袭的影响及机制。方法:细胞活性与增殖检测(CCK-8)法检测细胞增殖活性, Hoechst 33258 染色及流式细胞术检测细胞凋亡, 实时荧光定量聚合酶链式反应检测 B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax), p53 mRNA 表达, 划痕实验检测细胞转移能力, Transwell 小室实验检测细胞侵袭能力, 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测纤连蛋白(FN), 基质金属蛋白酶-2(MMP-2)及基质金属蛋白酶-9(MMP-9)含量, 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测蛋白表达。结果:与空白组比较, 毛钩藤碱可以呈剂量及时间依赖性的抑制 Ca Ski 细胞的增殖; 8.0, 16.0, 32.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  毛钩藤碱组细胞凋亡率, Bax, p53 mRNA 表达增加( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), Bcl-2 mRNA 及磷酸化 Src(p-Src), 磷酸化信号转导和转录活化因子 3(p-STAT3)蛋白表达降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。与空白组比较, 1.0, 2.0, 4.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  毛钩藤碱组细胞迁移率, 穿膜细胞数, FN, MMP-2, MMP-9 含量及缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ ), 波形蛋白(Vimentin), N-钙黏蛋白(N-cadherin)表达降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), E-钙黏蛋白(E-cadherin)表达增加( $P<0.01$ )。结论:毛钩藤碱可以抑制人宫颈癌 Ca Ski 细胞的增殖、转移及侵袭, 并能诱导凋亡, 作用机制与调控 Src/STAT3 及 HIF-1 $\alpha$ /上皮间充质转化(EMT)信号通路有关。

**[关键词]** 毛钩藤碱; 宫颈癌; 增殖; 凋亡; 转移; 侵袭

**[中图分类号]** R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)04-0109-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220323

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211125.1552.005.html>

**[网络出版日期]** 2021-11-26 7:15

### Effect of Hirsutine on Proliferation, Apoptosis, Metastasis, and Invasion of Human Cervical Cancer Ca Ski Cells

LI Ya-wei, XIE Lei, WANG Na\*

(The First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of hirsutine on proliferation, apoptosis, metastasis, and invasion of human cervical cancer Ca Ski cells and its action mechanism. **Method:** The cell proliferation was determined by cell counting kit-8 (CCK-8) assay and the cell apoptosis by Hoechst 33258 staining and flow cytometry. The mRNA expression levels of B cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), and p53 were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction. The scratch test was conducted to detect the cell mobility, followed by the detection of cell invasion ability using a Transwell chamber. The contents of fibronectin (FN), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), and their protein expression levels were assayed by Western blot. **Result:** Compared with the control group, hirsutine inhibited the proliferation of Ca Ski cells in a dose- and time-dependent manner. The apoptosis rates and Bax and

**[收稿日期]** 20211009(001)

**[基金项目]** 河北省医学科学研究课题项目(20210081)

**[第一作者]** 李亚威, 硕士, 副主任技师, 从事妇科肿瘤临床检验与诊断学研究, E-mail: lywydy@163.com

**[通信作者]** \* 王娜, 硕士, 主治医师, 从事妇科肿瘤的诊断及治疗研究, E-mail: wangna5421@126.com

p53 mRNA expression levels in the 8.0, 16.0, 32.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  hirsutine groups rose ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), while the Bcl-2 mRNA expression and phosphorylated Src (p-Src) and phosphorylated signal transducer and activator of transcription factor 3 (STAT3) protein expression declined ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Compared with the control group, the 1.0, 2.0, 4.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  hirsutine groups exhibited lowered cell mobility, number of transmembrane cells, FN, MMP-2 and MMP-9 contents, and hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), Vimentin, and N-cadherin protein expression ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), but elevated E-cadherin protein expression ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** Hirsutine inhibits the proliferation, metastasis, and invasion of human cervical cancer Ca Ski cells and induces their apoptosis, which may be related to its regulation of Src/STAT3 and HIF-1 $\alpha$ /epithelial mesenchymal transformation (EMT) signaling pathways.

**[Keywords]** hirsutine; cervical cancer; proliferation; apoptosis; metastasis; invasion

宫颈癌为全球发病率及死亡率均高居第4顺位的妇科恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。近年来,由于宫颈癌疫苗的接种及筛查技术的普及,使其发病率及死亡率下降了50%,但在许多欠发达地区,宫颈癌仍严重威胁女性身体健康<sup>[2]</sup>。手术切除是早期宫颈癌患者的主要治疗手段,而对于晚期、转移性或复发宫颈癌患者,则需辅以放疗及化疗等措施<sup>[3]</sup>。由于患者在化疗时常出现耐药性及严重的不良反应,因而寻求安全有效的宫颈癌治疗药物对于改善患者预后、减少转移及复发、提高生存率尤为必要<sup>[4-5]</sup>。毛钩藤碱是从传统中药茜草科藤本植物钩藤中分离得到的生物碱类单体活性物质,具有心脏保护、抗感染和降血压等作用<sup>[6]</sup>。毛钩藤碱对结肠癌 SW480 细胞<sup>[7]</sup>,肝癌 SMMC-7721 细胞<sup>[8]</sup>,乳腺癌 MDA-MB-231 细胞<sup>[9]</sup>的增殖均有抑制作用,然而对人宫颈癌 Ca Ski 细胞增殖、凋亡、转移及侵袭的影响目前为止均未见报道。因此,本研究以人宫颈癌 Ca Ski 细胞为研究对象,在明确毛钩藤碱具有抑制 Ca Ski 细胞增殖作用的基础上,进一步探讨其对凋亡、转移、侵袭的影响及潜在机制,以期为宫颈癌的临床治疗提供依据。

## 1 材料

**1.1 药物及试剂** 毛钩藤碱(纯度>98%,成都植标化纯生物技术公司,批号 20191024);胎牛血清及 RPMI 1640 培养基(美国 HyClone 公司,批号分别为 SH30396.03, SH30809.01);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(武汉博士德生物公司,批号 AR1160);膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)凋亡试剂盒(美国 BD 公司,批号 556547);Hoechst 33258 染色试剂盒(北京百奥莱博科技公司,批号 YT118);TRIzol 试剂及 RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术公司,批号分别为 R0016, P0013C);逆转录试剂盒(日本 Takara 公司,批号 RR037A);实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-

time PCR)试剂盒(山东安普未来生物公司,批号 WLE8202KIT);Matrigel 基质胶及 Transwell 小室(美国 Corning 公司,批号分别为 354234, 354480);结晶紫染液(北京索莱宝科技有限公司,批号 C8470);纤连蛋白(FN),基质金属蛋白酶-2(MMP-2),基质金属蛋白酶-9(MMP-9)酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20200216, 20200408, 20200327);Src,磷酸化 Src(p-Src),信号转导和转录活化因子 3(STAT3),磷酸化 STAT3(p-STAT3),缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ ),波形蛋白(Vimentin),N-钙黏蛋白(N-cadherin),E-钙黏蛋白(E-cadherin)多克隆抗体(美国 Abcam 公司,批号分别为 ab109381, ab185617, ab68153, ab30647, ab51608, ab92547, ab18203, ab40772);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体及辣根酶标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 二抗(北京中杉金桥生物公司,批号分别为 201205, 201124)。

**1.2 仪器** HF240 型细胞培养箱(上海力申科学仪器公司);TE-2000-u 型荧光倒置显微镜(日本 Nikon 公司);VARIOSKANLUX 型酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司);FACSCalibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司);2720 型 Real-time PCR 扩增仪(美国 ABI 公司);LF-Mini4 型蛋白电泳仪及 LF-ZY02 型转印仪(北京龙方科技公司)。

**1.3 细胞** 人宫颈癌 Ca Ski 细胞,购于中科院上海细胞所。细胞解冻复苏后接种于 RPMI 1640 培养基(10%胎牛血清),在饱和湿度,37  $^{\circ}\text{C}$ ,5% $\text{CO}_2$  条件下常规传代培养,当培养至对数生长期时用于实验。

## 2 方法

**2.1 CCK-8 法检测细胞增殖** 取对数生长期的人宫颈癌 Ca Ski 细胞,接种于 96 孔板中,每孔 6 000 个细胞,培养 24 h 使细胞完全贴壁。弃掉培养基,

加入含毛钩藤碱浓度为0, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 32.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的完全培养基<sup>[10]</sup>, 其中0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 毛钩藤碱组为空白组。在细胞培养箱中继续培养24, 48, 72 h, 吸取CCK-8溶液10  $\mu\text{L}$ 加入各孔中, 继续培养2 h, 用酶标仪在450 nm测吸光度 $A$ 。增殖抑制率 $= (A_{\text{空白组}} - A_{\text{加药组}}) / (A_{\text{空白组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

**2.2** Hoechst 33258染色检测细胞凋亡 收集经0, 8.0, 16.0, 32.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 毛钩藤碱处理48 h的人宫颈癌Ca Ski细胞, 将细胞密度调整为 $5 \times 10^5$ 个/mL, 与Hoechst 33258染液混匀后, 避光环境下室温孵育10 min, 经磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗后, 荧光倒置显微镜下拍照, 检测细胞凋亡情况。

**2.3** 流式细胞术检测细胞凋亡 收集经0, 8.0, 16.0, 32.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 毛钩藤碱处理48 h的人宫颈癌Ca Ski细胞, 经PBS漂洗后, 避光环境下先后加入Annexin V-FITC和PI试剂各5  $\mu\text{L}$ , 轻轻混匀后, 继续避光环境下室温孵育10 min, 再加入结合缓冲液400  $\mu\text{L}$ , 用流式细胞仪检测细胞凋亡情况(1 h内)。

**2.4** Real-time PCR检测B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2), Bcl-2相关X蛋白(Bax), p53 mRNA表达 收集经0, 8.0, 16.0, 32.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 毛钩藤碱处理48 h的人宫颈癌Ca Ski细胞, 用TRIzol试剂提取总RNA, 并逆转录为cDNA。逆转录反应条件为25  $^{\circ}\text{C}$ , 10 min, 42  $^{\circ}\text{C}$ , 50 min, 65  $^{\circ}\text{C}$ , 15 min后终止反应。根据试剂盒说明书中的步骤进行操作, 总反应体系为20  $\mu\text{L}$ , 反应条件为95  $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min, 95  $^{\circ}\text{C}$ 变性10 s, 60  $^{\circ}\text{C}$ 退火10 s, 72  $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s, 共35个循环。通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因mRNA表达, GAPDH为内参基因, 所用引物由上海吉玛生物公司合成, 序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因	引物	长度/bp
GAPDH	5'-TGGACCTGACCTGCCGT-3'	136
	5'-TGGAGGAGTGGGTGTCGC-3'	
Bcl-2	5'-ATTGTGGCCTTCTTTGAGTTCG-3'	152
	5'-CCTACCCAGCCTCCGTTATCC-3'	
Bax	5'-CCAGGATGCGTCCACCAAGAA-3'	104
	5'-CCGTGTCCACGTCAGCAATCA-3'	
p53	5'-CCAGGGAGCACTAAGCGAGCA-3'	154
	5'-CTCGAGTCAGTCTGAGT CAGGC-3'	

**2.5** 划痕实验检测细胞转移能力 人宫颈癌Ca Ski细胞接种于6孔板, 接种细胞数为 $5 \times 10^5$ 个/孔, 待细胞汇集度达80%左右时, 用200  $\mu\text{L}$ 无菌移液器

枪头划线, PBS轻轻冲洗去除脱落细胞。分别加入含0, 1.0, 2.0, 4.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 毛钩藤碱的完全培养基, 分别于培养0, 48 h后用显微镜拍照, 通过采用Image J软件测量细胞迁移距离。细胞迁移率 $= (0 \text{ h 划痕面积} - 48 \text{ h 划痕面积}) / 0 \text{ h 划痕面积} \times 100\%$ 。

**2.6** Transwell小室实验检测细胞侵袭能力 用RPMI 1640培养基稀释Matrigel胶, 比例为8:1, 然后加入Transwell小室的上室, 在37  $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中孵育0.5 h, 弃掉多余培养基。取对数生长期的人宫颈癌Ca Ski细胞, 调整细胞密度为 $1 \times 10^6$ 个/mL, 用移液器吸取200  $\mu\text{L}$ 加入到上室中; 下室加入含0, 1.0, 2.0, 4.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 毛钩藤碱的完全培养基, 继续培养48 h。经多聚甲醛固定及结晶紫染色后, 用显微镜拍照, 计穿膜细胞数。

**2.7** ELISA检测细胞FN, MMP-2及MMP-9含量 将人宫颈癌Ca Ski细胞接种于6孔板中, 接种细胞数为 $5 \times 10^5$ 个/孔, 待细胞汇集度达80%左右时, 弃去培养基; 加入含0, 1.0, 2.0, 4.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 毛钩藤碱的完全培养基, 继续培养48 h, 收集细胞。按照ELISA测定试剂盒的操作步骤, 分别检测FN, MMP-2, MMP-9含量。

**2.8** 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测蛋白表达 收集经不同浓度毛钩藤碱处理48 h的人宫颈癌Ca Ski细胞, 加入适量RIPA裂解液, 在冰水浴中放置30 min, 4  $^{\circ}\text{C}$ , 12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min(离心半径6 cm), 取上清液。二喹啉甲酸法定量后, 取适宜体积, 按1:5比例加入上样缓冲液, 100  $^{\circ}\text{C}$ 沸水浴变性10 min。采用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离目的蛋白, 一抗(1:1 000)反应过夜, 二抗(1:5 000)反应1 h, 化学发光法显色, 拍照后Image J软件定量分析。

**2.9** 统计学处理 所有实验均重复5次, 通过Graph Pad Prism 6软件进行统计学处理, 计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 单因素方差分析和 $t$ 检验用于数据分析,  $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1** 毛钩藤碱对人宫颈癌Ca Ski细胞增殖的影响 与空白组比较, 1.0, 2.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 毛钩藤碱作用Ca Ski细胞24, 48, 72 h, 4.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 毛钩藤碱作用Ca Ski细胞24, 48 h, 8.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 毛钩藤碱作用Ca Ski细胞24 h后, 细胞增殖抑制率差异均无统计学意义; 其余各组的细胞增殖抑制率明显升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 见表2。在后续实验中, 选用8.0, 16.0, 32.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 毛钩藤碱开展研究; 为排除毛钩藤碱的细胞损伤作用对Ca Ski细胞转移和侵袭的影

响,选用1.0,2.0,4.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 毛钩藤碱开展研究。

表2 毛钩藤碱对人宫颈癌Ca Ski细胞增殖抑制率的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 2 Effect of hirsutine on proliferation inhibition rate of human cervical cancer Ca Ski cells ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	增殖抑制率/%		
		24 h	48 h	72 h
毛钩藤碱	1.0	1.31±0.24	3.27±0.51	4.20±0.85
	2.0	2.34±0.32	5.54±0.67	6.06±1.03
	4.0	3.45±0.58	8.89±1.52	16.34±1.48 <sup>2)</sup>
	8.0	7.80±0.89	15.05±2.16 <sup>2)</sup>	34.21±5.24 <sup>2)</sup>
	16.0	12.26±1.27 <sup>1)</sup>	31.78±4.77 <sup>2)</sup>	48.39±4.72 <sup>2)</sup>
	32.0	21.65±2.02 <sup>2)</sup>	48.71±5.82 <sup>2)</sup>	65.82±8.10 <sup>2)</sup>

注:空白组增殖抑制率为0;与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ (表3~8同)。

3.2 毛钩藤碱对人宫颈癌Ca Ski细胞凋亡的影响  
与空白组比较,8.0,16.0,32.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 毛钩藤碱组的细胞凋亡率均显著增加( $P<0.01$ ),见图1,表3。与空白组比较,8.0,16.0,32.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 毛钩藤碱组Bcl-2 mRNA表达显著降低( $P<0.01$ ),Bax, p53 mRNA表达明显增加( $P<0.05, P<0.01$ ),见表4。

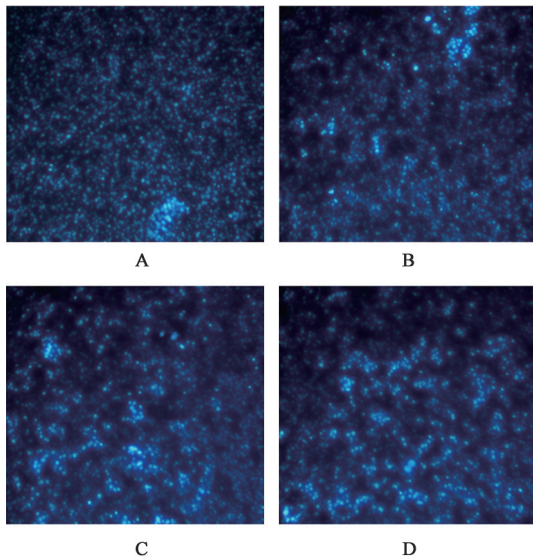


图1 毛钩藤碱对人宫颈癌Ca Ski细胞凋亡的影响 (Hoechst 33258,  $\times 200$ )

Fig. 1 Effect of hirsutine on apoptosis of human cervical cancer Ca Ski cells (Hoechst 33258,  $\times 200$ )

3.3 毛钩藤碱对人宫颈癌Ca Ski细胞Src, p-Src, STAT3, p-STAT3蛋白表达的影响  
与空白组比较,8.0,16.0,32.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 毛钩藤碱组p-Src, p-STAT3蛋白表达均降低( $P<0.05, P<0.01$ )。见图2,表5。

表3 毛钩藤碱对人宫颈癌Ca Ski细胞凋亡率的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 3 Effect of hirsutine on apoptosis rate of human cervical cancer Ca Ski cells ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	凋亡率/%	
		Hoechst 33258 染色	流式细胞术
空白		4.11±0.37	2.69±0.46
毛钩藤碱	8.0	17.03±2.49 <sup>2)</sup>	13.49±1.36 <sup>2)</sup>
	16.0	32.72±3.88 <sup>2)</sup>	28.30±3.76 <sup>2)</sup>
	32.0	51.15±6.42 <sup>2)</sup>	43.53±5.18 <sup>2)</sup>

表4 毛钩藤碱对人宫颈癌Ca Ski细胞Bcl-2, Bax及p53 mRNA表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 4 Effect of hirsutine on Bcl-2, Bax and p53 mRNA expressions of human cervical cancer Ca Ski cells ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Bcl-2	Bax	p53
空白		1.05±0.12	0.34±0.04	0.62±0.08
毛钩藤碱	8.0	0.73±0.08 <sup>2)</sup>	0.51±0.06 <sup>2)</sup>	0.71±0.07 <sup>1)</sup>
	16.0	0.57±0.06 <sup>2)</sup>	0.58±0.05 <sup>2)</sup>	0.85±0.10 <sup>2)</sup>
	32.0	0.42±0.05 <sup>2)</sup>	0.64±0.08 <sup>2)</sup>	0.96±0.11 <sup>2)</sup>

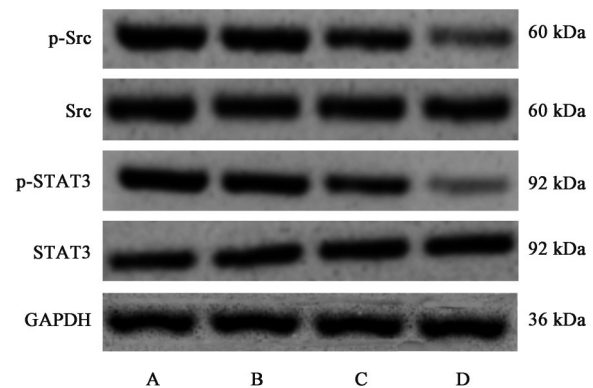


图2 各组细胞Src, p-Src, STAT3, p-STAT3蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of Src, p-Src, STAT3 and p-STAT3 protein expressions in each group

表5 毛钩藤碱对人宫颈癌Ca Ski细胞Src, p-Src, STAT3, p-STAT3蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 5 Effect of hirsutine on Src, p-Src, STAT3 and p-STAT3 protein expressions of human cervical cancer Ca Ski cells ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Src /GAPDH	p-Src /Src	STAT3 /GAPDH	p-STAT3 /STAT3
空白		1.21±0.14	0.95±0.10	1.05±0.09	1.60±0.28
毛钩藤碱	8.0	1.18±0.12	0.83±0.08 <sup>1)</sup>	0.97±0.12	1.24±0.15 <sup>2)</sup>
	16.0	1.27±0.15	0.61±0.08 <sup>2)</sup>	1.02±0.10	0.72±0.06 <sup>2)</sup>
	32.0	1.25±0.11	0.38±0.04 <sup>2)</sup>	1.06±0.13	0.29±0.03 <sup>2)</sup>

**3.4 毛钩藤碱对人宫颈癌 Ca Ski 细胞转移及侵袭能力的影响** 与空白组比较, 1.0, 2.0, 4.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  毛钩藤碱组细胞迁移率均明显降低 ( $P<0.05, P<0.01$ ), 提示毛钩藤碱可以抑制 Ca Ski 细胞的转移。与空白组比较, 各浓度组的穿膜细胞数均显著降低 ( $P<0.01$ ), 提示毛钩藤碱可以抑制 Ca Ski 细胞的侵袭。见表 6, 图 3, 4。

表 6 毛钩藤碱对人宫颈癌 Ca Ski 细胞转移及侵袭能力的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 6 Effect of hirsutine on metastasis and invasion of human cervical cancer Ca Ski cells ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞迁移率/%	穿膜细胞数/个
空白		75.60 $\pm$ 8.22	103.29 $\pm$ 12.71
毛钩藤碱	1.0	67.18 $\pm$ 8.14 <sup>1)</sup>	71.08 $\pm$ 9.11 <sup>2)</sup>
	2.0	48.35 $\pm$ 5.16 <sup>2)</sup>	54.95 $\pm$ 6.34 <sup>2)</sup>
	4.0	39.24 $\pm$ 4.57 <sup>2)</sup>	32.32 $\pm$ 3.65 <sup>2)</sup>

**3.5 毛钩藤碱对人宫颈癌 Ca Ski 细胞 FN, MMP-2 及 MMP-9 含量的影响** 与空白组比较, 1.0, 2.0, 4.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  毛钩藤碱组 FN, MMP-2 及 MMP-9 含

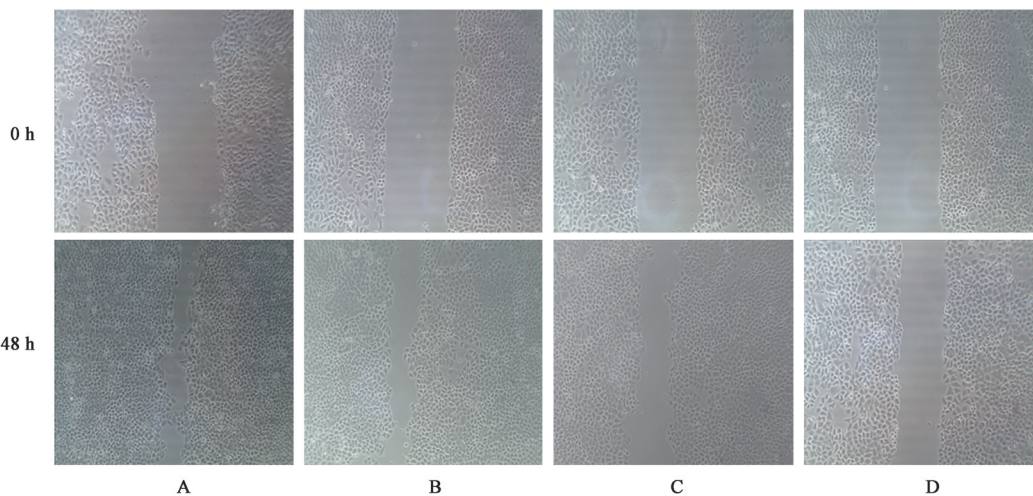
量均明显降低, 差异有统计学意义 ( $P<0.05, P<0.01$ )。见表 7。

表 7 毛钩藤碱对人宫颈癌 Ca Ski 细胞 FN, MMP-2 及 MMP-9 含量的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 7 Effect of hirsutine on FN, MMP-2 and MMP-9 contents of human cervical cancer Ca Ski cells ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	FN	MMP-2	MMP-9
空白		70.39 $\pm$ 8.65	115.48 $\pm$ 15.23	54.81 $\pm$ 6.49
毛钩藤碱	1.0	62.76 $\pm$ 7.11 <sup>1)</sup>	88.74 $\pm$ 10.18 <sup>2)</sup>	47.56 $\pm$ 5.83 <sup>1)</sup>
	2.0	58.22 $\pm$ 5.47 <sup>2)</sup>	79.32 $\pm$ 8.51 <sup>2)</sup>	43.69 $\pm$ 4.32 <sup>2)</sup>
	4.0	47.80 $\pm$ 6.15 <sup>2)</sup>	71.93 $\pm$ 9.72 <sup>2)</sup>	36.73 $\pm$ 5.61 <sup>2)</sup>

**3.6 毛钩藤碱对人宫颈癌 Ca Ski 细胞 HIF-1 $\alpha$ , Vimentin, N-cadherin 及 E-cadherin 蛋白表达的影响** 与空白组比较, 1.0, 2.0, 4.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  毛钩藤碱组 HIF-1 $\alpha$ , Vimentin 和 N-cadherin 蛋白表达明显降低, 差异有统计学意义 ( $P<0.05, P<0.01$ ), E-cadherin 蛋白表达明显上调, 差异有统计学意义 ( $P<0.05, P<0.01$ )。见表 8, 图 5。



A. 空白组; B~D. 1.0, 2.0, 4.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  毛钩藤碱组 (图 4, 5 同)

图 3 毛钩藤碱对人宫颈癌 Ca Ski 细胞转移能力的影响 (倒置显微镜,  $\times 40$ )

Fig. 3 Effect of hirsutine on metastasis of human cervical cancer Ca Ski cells (inverted microscope,  $\times 40$ )

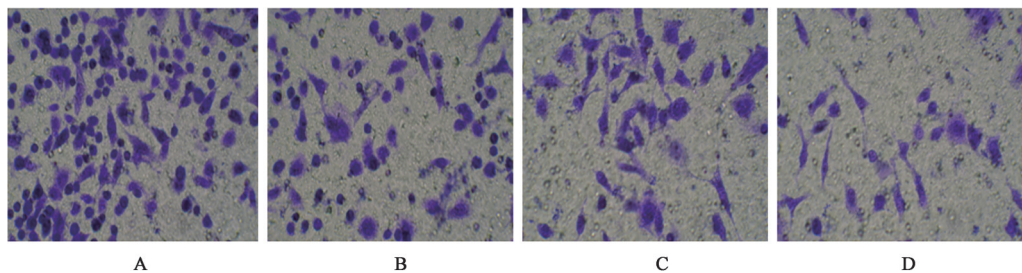


图 4 毛钩藤碱对人宫颈癌 Ca Ski 细胞转移及侵袭能力的影响 (结晶紫,  $\times 200$ )

Fig. 4 Effect of hirsutine on metastasis and invasion of human cervical cancer Ca Ski cells (crystal violet,  $\times 200$ )

表8 毛钩藤碱对人宫颈癌 Ca Ski 细胞 HIF-1 $\alpha$ , Vimentin, N-cadherin 及 E-cadherin 蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 8 Effect of hirsutine on HIF-1 $\alpha$ , Vimentin, N-cadherin, E-cadherin expressions of human cervical cancer Ca Ski cells ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	HIF-1 $\alpha$ /GAPDH	Vimentin/GAPDH	N-cadherin/GAPDH	E-cadherin/GAPDH
空白		0.82 $\pm$ 0.11	1.21 $\pm$ 0.16	0.95 $\pm$ 0.12	0.30 $\pm$ 0.04
毛钩藤碱	1.0	0.44 $\pm$ 0.06 <sup>2)</sup>	1.06 $\pm$ 0.09 <sup>1)</sup>	0.74 $\pm$ 0.09 <sup>2)</sup>	0.38 $\pm$ 0.04 <sup>2)</sup>
	2.0	0.31 $\pm$ 0.04 <sup>2)</sup>	0.49 $\pm$ 0.06 <sup>2)</sup>	0.66 $\pm$ 0.08 <sup>2)</sup>	0.52 $\pm$ 0.06 <sup>2)</sup>
	4.0	0.18 $\pm$ 0.03 <sup>2)</sup>	0.21 $\pm$ 0.02 <sup>2)</sup>	0.25 $\pm$ 0.03 <sup>2)</sup>	0.87 $\pm$ 0.10 <sup>2)</sup>

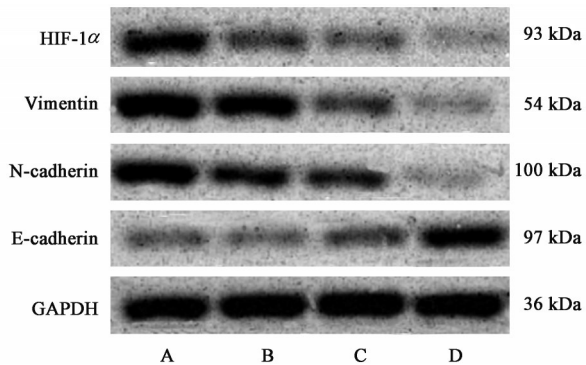


图5 各组细胞 HIF-1 $\alpha$ , Vimentin, N-cadherin 及 E-cadherin 蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of HIF-1 $\alpha$ , Vimentin, N-cadherin and E-cadherin protein expression in each group

#### 4 讨论

癌症是威胁人类生命健康的主要疾病,手术及放、化疗是现代临床治疗癌症的主要方法,但其治疗代价高、不良反应大,效果难以令人满意<sup>[11]</sup>。中药由于疗效确切及较低的毒副作用,在治疗癌症方面的重要性日益突显<sup>[12]</sup>。

肿瘤细胞凋亡是主动性、程序化的细胞死亡过程,凋亡进程受到阻碍是肿瘤细胞增殖失控的重要原因<sup>[13]</sup>。多种基因参与肿瘤细胞凋亡的调控过程,其中抗凋亡基因 Bcl-2,促凋亡基因 Bax 是调节细胞凋亡的一组关键基因;而 p53 作为抑癌基因,主要发挥稳定基因组、诱导细胞凋亡及负相调控细胞增殖等作用<sup>[14]</sup>。Src 是由原癌基因 c-Src 编码的一个相对分子质量为 60 kDa 的蛋白质,广泛存在于组织细胞中,与细胞的生长、发育和分化等密切联系,同时也参与肿瘤进展及转移<sup>[15]</sup>。肿瘤组织中 Src 磷酸化水平上调,是肿瘤细胞抗凋亡的关键分子<sup>[16]</sup>。STAT3 是 Src 靶向调节的下游蛋白,宫颈癌组织 p-STAT3 水平与宫颈癌恶性程度呈正相关,抑制 STAT3 活化,是诱导凋亡并发挥抗肿瘤作用的重要机制<sup>[17]</sup>。

转移和侵袭为宫颈癌复发、进展等不良预后的重要因素,涉及到靶组织、机体和肿瘤细胞的相互影响以及相关基因的信号传导和调节,是一个多基因、多步骤、复杂的调控过程<sup>[18]</sup>。因此,抑制宫颈癌

的转移和侵袭是研究的热点之一。FN 与肿瘤细胞基层侵袭,淋巴转移及血管侵袭密切相关;同时, FN 也可以通过诱导基质金属蛋白酶的表达,促进肿瘤细胞的侵袭和转移<sup>[19]</sup>。MMP-2 及 MMP-9 是肿瘤细胞转移、侵袭的重要证据,在肿瘤的转移、侵袭过程中扮演重要角色<sup>[20]</sup>。细胞微环境的改变如低氧等可促使肿瘤细胞增殖、转移和侵袭的发生,有研究表明, HIF-1 $\alpha$  作为缺氧微环境中的重要调节因子,在肿瘤中高表达,且 HIF-1 $\alpha$  的表达量与肿瘤的转移及浸润程度都密切相关<sup>[21]</sup>。通过癌症标本和动物肿瘤模型检测均已证实,上皮间充质转化(EMT)进程在肿瘤的转移及侵袭过程中具有重要意义<sup>[22]</sup>。在 EMT 进程中,肿瘤细胞间质样标志物 Vimentin, N-cadherin 表达升高,而上皮样标志物 E-cadherin 表达降低,进而导致肿瘤细胞间质属性增加,进而降低细胞之间黏附能力,引起转移及侵袭<sup>[23]</sup>。

本研究结果显示,毛钩藤碱可以呈剂量依赖性及时时间依赖性的抑制人宫颈癌 Ca Ski 细胞的增殖,表明毛钩藤碱具有体外抗宫颈癌作用。分别采用 Hoechst 33258 染色及流式细胞术观察,发现毛钩藤碱可以有效诱导 Ca Ski 细胞凋亡;同时,毛钩藤碱可以降低人宫颈癌 Ca Ski 细胞 Bcl-2 mRNA 表达及 p-Src, p-STAT3 蛋白表达,增加 Bax, p53 mRNA 表达,进一步表明下调 Src/STAT3 信号通路活化水平,进而发挥诱导凋亡作用是毛钩藤碱抑制 Ca Ski 细胞增殖作用的潜在机制。采用细胞划痕实验检测, Transwell 小室实验发现毛钩藤碱可以降低 Ca Ski 细胞迁移率及穿膜细胞数, ELISA 实验证实毛钩藤碱也能够降低 FN, MMP-2 及 MMP-9 含量,表明毛钩藤碱具有抑制 Ca Ski 细胞转移和侵袭的作用。此外,实验发现,经毛钩藤碱处理后, HIF-1 $\alpha$ , Vimentin 和 N-cadherin 蛋白表达降低,而 E-cadherin 蛋白表达上调,提示毛钩藤碱具有调控 HIF-1 $\alpha$ /EMT 信号通路的作用,而该作用是其发挥抑制 Ca Ski 细胞转移和侵袭的潜在机制。

综上所述,本研究发现毛钩藤碱可以抑制人宫颈癌

Ca Ski细胞的增殖,其机制是通过下调 Src/STAT3 信号通路,进而诱导凋亡而实现;同时,毛钩藤碱也可以抑制 Ca Ski细胞的转移和侵袭,该作用与调控 HIF-1 $\alpha$ /EMT 信号通路有关。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] OLTHOF E P, VAN DER A A M A, ADAM J A, et al. The role of lymph nodes in cervical cancer: incidence and identification of lymph node metastases—a literature review [J]. *Int J Clin Oncol*, 2021, 26(9): 1600-1610.
- [2] ARBYN M, SIMON M, PEETERS E, et al. 2020 list of human papillomavirus assays suitable for primary cervical cancer screening [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2021, 27(8): 1083-1095.
- [3] 佐志刚, 汤继英, 蔡晓军. 华蟾素胶囊联合紫杉醇、顺铂治疗中晚期宫颈癌的临床观察 [J]. *中国药房*, 2017, 28(24): 3350-3353.
- [4] 杨婧, 戚基萍, 王锐, 等. 红花多糖对人宫颈癌 HeLa 细胞增殖和 VEGF 表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(8): 111-114.
- [5] 张蕾, 黄华明, 周杰, 等. 原花青素对宫颈癌 HeLa 细胞上皮间质转化的抑制作用 [J]. *中成药*, 2021, 43(7): 1733-1740.
- [6] WANG M, GUO J, WANG Z, et al. Simultaneous separation and determination of hirsutine and hirsuteine by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic capillary chromatography [J]. *Phytochem Anal*, 2020, 31(1): 112-118.
- [7] 韩晓丽, 席作武, 王凯, 等. 毛钩藤碱调控 IL-6/STAT3 信号通路抑制结肠癌细胞增殖、迁移及诱导细胞凋亡的体外实验 [J]. *中国老年学杂志*, 2020, 40(18): 3955-3959.
- [8] 王伟, 陈伟达. 毛钩藤碱诱导肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡作用机制探讨 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2018, 25(11): 761-766.
- [9] 黄器伟, 翟娜娜, 黄涛, 等. 毛钩藤碱通过线粒体途径诱导乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡 [J]. *生理学报*, 2018, 70(1): 40-46.
- [10] 翟娜娜, 黄器伟, 陈奎生. 毛钩藤碱对缺氧乳腺癌 MCF-7 细胞迁移和侵袭能力的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(11): 2009-2014.
- [11] MOUSAVI A, MODARRES G M, AKHAVAN S, et al. The outcome of locally advanced cervical cancer in patients treated with neoadjuvant chemotherapy followed by radical hysterectomy and primary surgery [J]. *Iran J Med Sci*, 2021, 46(5): 355-363.
- [12] YANG J, LI J, SUN M, et al. Studies of traditional Chinese medicine monomer on HeLa cell of cervical cancer [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2014, 27(4): 1063-1068.
- [13] ZHU C, ZHANG C, CUI X, et al. Trichosanthin inhibits cervical cancer by regulating oxidative stress-induced apoptosis [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 2779-2790.
- [14] 刘滢, 黄宙. 竹节参水提物对宫颈癌 HeLa 细胞凋亡的影响 [J]. *中成药*, 2021, 43(1): 224-227.
- [15] 郭世明, 吴志君, 何亚标, 等. 青娥方对去卵巢大鼠骨组织 Src/p130Cas/CRK 信号通路的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(9): 4347-4351.
- [16] 何晨晨, 唐波, 董慧, 等. Src 在胃癌腹腔转移多细胞团簇抗失巢凋亡中的作用 [J]. *第三军医大学学报*, 2017, 39(22): 2157-2162.
- [17] 陈加祥, 徐林林, 吴圣娇, 等. c-SRC 基因敲减降低宫颈癌 HeLa 细胞活性及磷酸化的信号转导与转录激活子-3 蛋白表达 [J]. *生理学报*, 2011, 63(3): 198-204.
- [18] WANG X, SUN H, ZHU S. Long non-coding RNA PTAR inhibits apoptosis but promotes proliferation, invasion and migration of cervical cancer cells by binding miR-101 [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 4536-4545.
- [19] 杨蕾, 杨玲竹. 瘦素、纤连蛋白、基质金属蛋白酶-9 对人绒毛细胞滋养细胞侵袭性的影响 [J]. *山东医药*, 2009, 49(15): 1-2.
- [20] LIAO C L, CHU Y L, LIN H Y, et al. Bisdemethoxycurcumin suppresses migration and invasion of human cervical cancer HeLa cells via inhibition of NF- $\kappa$ B, MMP-2 and -9 pathways [J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(7): 3989-3997.
- [21] 原娜, 王磊, 席强, 等. 宫颈癌患者外周血淋巴细胞的表达及其与乏氧诱导因子-1 $\alpha$ 的关系 [J]. *肿瘤学杂志*, 2020, 26(3): 185-189.
- [22] CARNEIRO I, QUINTELA-VIEIRA F, LOBO J, et al. Expression of EMT-related genes CAMK2N1 and WNT5A is increased in locally invasive and metastatic prostate cancer [J]. *J Cancer*, 2019, 10(24): 5915-5925.
- [23] LIANG W, LIU J, WU H, et al. Artemisinin induced reversal of EMT affects the molecular biological activity of ovarian cancer SKOV3 cell lines [J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(3): 3407-3414.

[责任编辑 张丰丰]