

## 派特灵对HeLa细胞增殖迁移能力及PI3K/Akt 信号转导通路的影响

刘运华, 赵宗江\*, 张新雪, 杨涛, 张萌萌, 吴英杰, 高坤, 郑鹏飞  
(北京中医药大学, 北京 100029)

**[摘要]** 目的:探索派特灵对HeLa细胞增殖迁移侵袭能力及磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路相关蛋白的影响。方法:①将HeLa细胞分为空白组,派特灵组(3.906,2.604,1.953,1.563,1.302,1.116,0.977 g·L<sup>-1</sup>),加药干预24 h,镜下观察细胞形态变化,并采用噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞活力,计算派特灵对HeLa细胞的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。②将HeLa细胞分为空白组,顺铂组(0.01 g·L<sup>-1</sup>),派特灵高、中、低质量浓度组(2.974,1.487,0.991 g·L<sup>-1</sup>),采用细胞增殖与毒性检测(CCK-8)法检测派特灵对HeLa细胞增殖能力的影响,使用划痕实验检测细胞的迁移情况,采用侵袭实验(Transwell)检测细胞侵袭能力的变化。③增设抑制剂LY294002组(0.006 g·L<sup>-1</sup>),采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测派特灵对PI3K, Akt, 重组人B细胞淋巴瘤因子-x1(Bcl-x1), B细胞淋巴瘤/白血病相关d蛋白(Bad)表达的影响。结果:①与空白组比较,镜下观察显示,用药组细胞数目减少,细胞形态不完整;MTT比色法显示,派特灵对HeLa细胞增殖有显著抑制作用(P<0.01),计算得出派特灵对HeLa细胞的IC<sub>50</sub>为2.974 g·L<sup>-1</sup>。②CCK-8法显示,与空白组比较,培养24, 36, 48 h,所有用药组均对HeLa细胞增殖有抑制作用(P<0.01);与顺铂组比较,各时间点派特灵中、低质量浓度组对HeLa细胞增殖抑制作用减弱(P<0.01);划痕实验显示,与空白组比较,各加药组均能抑制HeLa细胞的迁移能力(P<0.01),派特灵高质量浓度组细胞迁移率低于顺铂组(P<0.05);Transwell实验显示,与空白组比较,各加药组HeLa细胞穿膜数减少(P<0.01),与顺铂组比较,派特灵中、低质量浓度组细胞穿膜数升高(P<0.01)。③Western blot显示,与空白组比较,派特灵高、中、低剂量及LY294002组的PI3K, Bcl-x1, Akt表达量下降(P<0.05, P<0.01), Bad表达量增高(P<0.01);与派特灵高质量浓度组比较,派特灵低质量浓度组的PI3K, Akt, Bcl-x1蛋白表达升高(P<0.01), Bad表达降低(P<0.01)。结论:派特灵能抑制HeLa细胞增殖迁移侵袭能力,符合一定量效和时效关系,可能与其影响PI3K/Akt信号通路相关蛋白表达有关。

**[关键词]** HeLa细胞; 派特灵; 半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>); 侵袭; 转移; 磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)

**[中图分类号]** R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)17-0056-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20201626

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200629.0948.002.html>

**[网络出版日期]** 2020-6-29 13:36

### Effect of Paiteling on HeLa Cell Proliferation and Metastasis Ability and PI3K/Akt Signal Transduction Pathway

LIU Yun-hua, ZHAO Zong-jiang\*, ZHANG Xin-xue, YANG Tao, ZHANG Meng-meng, WU Ying-jie,  
GAO Kun, ZHENG Peng-fei  
(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of Paiteling on the proliferation, metastasis and invasion of HeLa cells and relevant proteins of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway. **Method:** ① HeLa cells were divided into blank group and Paiteling concentration gradient groups (3.906,

**[收稿日期]** 20200211(007)

**[基金项目]** 派特灵合作开发项目(2180071720049)

**[第一作者]** 刘运华,在读硕士,从事中医药防治再生障碍性贫血的研究, E-mail:2398895370@qq.com

**[通信作者]** \* 赵宗江,教授,博士生导师,从事中医药防治慢性肾脏病与再生障碍性贫血机制的研究, Tel:010-64286926, E-mail: zongjiangz@sina.com

2.604, 1.953, 1.563, 1.302, 1.116, 0.977  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). After drug intervention for 24 h, the cell morphological changes were observed under microscope. The cell viability was measured by thiazole blue (MTT) colorimetry, and the half inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) of Paiteling on HeLa cells was calculated. ② HeLa cells were divided into blank group, cisplatin group ( $0.01 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), Paiteling high-dose group ( $2.974 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), Paiteling medium-dose group ( $1.487 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and Paiteling low-dose group ( $0.991 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Cell proliferation and toxicity test (CCK-8) method was used to detect the effect of Paiteling on the proliferation ability of HeLa cells, scratch test was used to detect cell migration, and invasion test (Transwell) was used to detect changes in cell invasion ability. ③ Inhibitor LY294002 group ( $0.006 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) was added. Western blot (WB) was used to detect the expressions of Paiteling on PI3K, Akt, recombinant human B-cell lymphoma factor-x1 (Bcl-x1), and B-cell lymphoma/leukemia associated D protein (Bad). **Result:** ① Compared with the blank group, microscopic observation showed that the number of cells in the treatment group was significantly reduced, and the cell morphology was incomplete. MTT experiments showed that Paiteling has a significantly inhibitory effect on HeLa cell proliferation ( $P<0.01$ ). The  $\text{IC}_{50}$  of Paiteling on HeLa cells was calculated as  $2.974 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . ② The CCK-8 experiment showed that compared with the blank group, all the drug-treated groups had an inhibitory effect on HeLa cell proliferation at 24, 36, 48 h ( $P<0.01$ ), compared with the cisplatin group, middle and low-dose Paiteling groups showed a reduced inhibitory effect on HeLa cell proliferation at each time point ( $P<0.01$ ). The scratch test showed that, compared with the blank group, each drug-added group could inhibit the migration ability of HeLa cells ( $P<0.01$ ), and the cell migration rate of the high-dose Paiteling group was lower than that of the cisplatin group ( $P<0.05$ ). Transwell experiments showed that compared with the blank group, the number of membranes permeated by HeLa cells in each drug-treated group was decreased ( $P<0.01$ ), and the number of membranes permeated in the middle and low-dose Paiteling groups was increased compared with the cisplatin group ( $P<0.01$ ). ③ Western blot showed that compared with the blank group, the expression levels of PI3K, Bcl-x1, and Akt in the high, medium, and low-dose Paiteling groups and the LY294002 group decreased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), while the expression of Bad increased ( $P<0.01$ ). Compared with the high-dose Paiteling group, the PI3K, Akt, and Bcl-x1 protein expressions were increased in the low-dose Paiteling group ( $P<0.01$ ), whereas Bad expression was decreased ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** Paiteling can inhibit HeLa cell proliferation, metastasis and invasion ability in a dose-dependent and time-dependent manner, which may be related to its effect on the expressions of PI3K/Akt signaling pathway-related proteins.

[Key words] HeLa cells; paiteling; half inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ); invasion; metastasis; phosphatidylinositol 3 kinase / protein kinase B (PI3K / Akt)

宫颈癌是妇女最常见的恶性肿瘤,据统计全球每年新增的宫颈癌发病人数约为50万例,而我国占了其1/3左右,严重威胁着女性的健康,是唯一被世界卫生组织建议在全世界范围内进行筛查的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。宫颈癌与人乳头瘤病毒(HPV)感染的关系明确,HPV是现如今发现的最小的无包膜双链DNA病毒,属于乳头瘤病毒科亚种,迄今为止已经发现的HPV亚型有180余种,自然人群约50%存在HPV感染,性活跃人群HPV感染率达80%。以HPV致病力及致癌危险性大小为依据,临床上将其分为低危型和高危型两大类,低危型包括HPV-11, HPV-6, HPV-43, HPV-39等,其可以导致皮肤和生殖器官的增生性疣类病变和子宫颈上皮内瘤病变;高危型

HPV包括HPV-56, HPV-33, HPV-18, HPV-16等,主要引起皮肤及生殖器癌和宫颈内癌变<sup>[2-3]</sup>。派特灵是基于大量中医经典古籍研制的中药复方,临床上主要用防治于尖锐湿疣和宫颈疣瘤病变,是一种能够防治HPV感染的中药制剂,已列入国家中医药管理局中国中医药科技开发交流中心中医药科技成果推广项目[(京)卫消证字(2011)第0220号],具有操作简便、副作用少、治愈率高、复发率低等优点,在临床上无论是单独应用还是联合应用都有显著的治疗效果<sup>[4]</sup>,但是其具体机制还未见相关文献报道,实验表明,磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号转导通路和肿瘤疾病密切相关,在抑制细胞凋亡过程中有着重要作用<sup>[5]</sup>,因此,本实验深入细

胞分子水平研究派特灵对HeLa细胞增殖迁移侵袭能力及PI3K/Akt信号通路的影响。

## 1 材料

**1.1 细胞** HeLa细胞株(北京协和细胞资源中心,批号2019032710103),传至第15代。

**1.2 药物与试剂** 派特灵(北京派特博恩生物技术开发有限公司,批号20190323005);顺铂(源叶生物公司,批号H15A9Z67897);抑制剂LY294002(AbMole公司,批号M1925-03);DMEM高糖培养基(Invitrogen公司,批号2004655);0.25%胰蛋白酶EDTA(Cellgro公司,批号06519005);胎牛血清,RIPA组织细胞裂解液(Biodes公司,批号分别为18060501,DE5012);4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)(Vetec公司,批号WXBC5224V);二甲基亚砜(DMSO),噻唑蓝(MTT)(Amresco公司,批号分别为0457C072,298-93-1);Transwell小室,matrigel胶(北京拜尔迪生物技术有限公司,批号分别为3467,354934);结晶紫(Solarbio公司,批号C9470);BCA法蛋白定量试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司,批号2019A2HP1511);青-链霉素混合液(Caisson公司,批号03181010);0.4%台盼蓝染色液(Absin公司,批号SG07);ECL超敏发光液(德国MerckMillipore公司,批号EL1010010);细胞增殖检测试剂盒(CCK-8,Dojindo Laboratories公司,批号LJ614); $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin),Akt,B细胞淋巴瘤因子-x1(Bcl-x1)(Cell Signaling Technology公司,批号分别为4691S/15,4691S/20,4691S/20);PI3K(Novus公司,批号HMC812);B细胞淋巴瘤/白血病相关d蛋白(Bad),二抗辣根酶标记山羊抗兔免疫球蛋白(Abcam公司,批号分别为GR27982-39,ab6721)。

**1.3 仪器** HCB-1300V型垂直层流洁净工作台(青岛Haier公司);TH4-200型倒置显微镜(日本Olympus公司);SSW-420-2S型电热恒温水槽(上海博迅实业公司);LT-CPS型立式压力蒸汽灭菌器(上海LERD Tech公司);SpectraMax M4型多功能酶标仪(上海美谷分子仪器有限公司);G:B0X型凝胶成像系统(美国Syngene公司);LD4-2型低速离心机(北京医用离心机厂);B5060EK型CO<sub>2</sub>恒温培养箱(美国Thermo公司);153B型转膜仪,552B型电泳仪(美国Bio-Rad公司)。

## 2 方法

**2.1 药液处理** 将派特灵原液分装于1.5 mL离心管里,每管1 mL,4 °C,12 000 r·min<sup>-1</sup>离心30 min,以除去杂质沉淀,收集上清于15 mL离心管内,用

0.22  $\mu$ m 滤器过滤除菌,储存于4 °C,用时按比例稀释。

**2.2 细胞传代培养** 从培养箱取出HeLa细胞培养瓶,镜下观察细胞生长至80%左右,移弃旧培养基,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗残余培养基,之后加入0.25%胰蛋白酶1 mL,消化2 min,迅速移入超净台加入含10% FBS的DMEM培养基1 mL终止消化,用移液管轻轻吹打,冲下残余的贴壁细胞,吸入15 mL离心管,1 000 r·min<sup>-1</sup>离心2 min,弃上清,加含10% FBS DMEM培养基,移入培养瓶中,放于恒温CO<sub>2</sub>培养箱中培养。

**2.3 细胞形态学观察** 不同剂量药物给药干预培养24 h,于倒置显微镜下观察HeLa细胞的生长状况,并进行拍照记录图像数据,分析其形态变化和生长情况。

**2.4 分组** 分为空白组,顺铂组(0.01 g·L<sup>-1</sup>)<sup>[6]</sup>,派特灵高质量浓度组[半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)],派特灵中质量浓度组(1/2 IC<sub>50</sub>),派特灵低质量浓度组(1/3 IC<sub>50</sub>)。

**2.5 MTT比色法检测派特灵对HeLa细胞IC<sub>50</sub>** 根据文献[7]和预实验结果将派特灵原液分别稀释为7个不同浓度(1/256,1/384,1/512,1/640,1/768,1/896,1/1 024),对应药物质量浓度分别为3.906,2.604,1.953,1.563,1.302,1.116,0.977 g·L<sup>-1</sup>,同时设不加药空白组,并且分别设置对应的调零孔。待瓶中细胞贴壁达80%左右时,0.25%的胰酶消化1 min,用含10% FBS的DMEM终止消化,在离心管中吹打混匀后,用血球计数板计数,于96孔培养板内每孔加入5% FBS DMEM培养基200  $\mu$ L,依据预实验,HeLa细胞种植密度为5 000个,并设平行复孔,置孵箱孵育24 h取出于超净台内,倾斜培养板,将一次性注射器针头深入孔中吸出培养液,在孔中添加无血清DMEM 200  $\mu$ L,同步24 h到G<sub>0</sub>期,再次移去培养基后添加各组对应的含药培养基,分别继续培养24 h,吸弃培养基,加入5 g·L<sup>-1</sup> MTT溶液20  $\mu$ L及无血清DMEM培养基180  $\mu$ L,继续培养3 h,移弃培养基,倒扣在滤纸上吸干残余培养基,避光加入二甲基亚砜(DMSO)200  $\mu$ L,于37 °C恒温摇床上晃匀10 min,用自动酶标仪检测各组细胞吸光度A(波长490 nm)<sup>[8]</sup>。各组排除差异较大数据后,取A平均值,计算生长抑制率,生长抑制率=1 - (A<sub>派特灵组</sub> - A<sub>药液调零</sub>)/(A<sub>空白组</sub> - A<sub>空白调零</sub>),实验重复3次,用SPSS 23.0软件分析计算出IC<sub>50</sub>。

**2.6 CCK-8检测细胞增殖情况** 收集对数生长期

的HeLa细胞,以每孔 $5 \times 10^3$ 个/孔的密度接种于96孔培养板,无血清DMEM同步24 h,按照以上实验分组分别加入含药培养基,每个浓度设6个复孔,在加药干预12,24,36,48 h对应时间点分别吸弃培养基,加入无血清DMEM培养基100  $\mu$ L和CCK-8溶液10  $\mu$ L,37  $^{\circ}$ C培养箱培养1.5 h,在多功能酶标仪450 nm波长处测定每个复孔 $A^{[9]}$ 。

**2.7 划痕实验检测细胞迁移能力** HeLa细胞贴壁80%时,将其消化离心重悬后台盼蓝染色计数,根据96孔板种植的细胞密度,按底面积换算成6孔板种植的密度为 $1.5 \times 10^5$ 个细胞/孔,待细胞贴壁形成单层细胞后,用1 mL的枪头垂直六孔板背面横线划直线,PBS清洗3次,按照以上实验分组处理,分别加入相应的含药DMEM培养基2 mL,分别在培养0,12,24 h,用显微镜放大100倍拍照,于相同位置取5个视野拍照,采用Image J分析软件测量划痕面积变化 $^{[10]}$ ,细胞迁移率=(0 h划痕面积-观察时间点划痕面积)/0 h划痕面积 $\times 100\%$ ,实验重复3次。

**2.8 Transwell实验检测细胞侵袭能力** 将对数生长期的HeLa细胞消化离心计数后,用无血清培养基重悬细胞,每个Transwell上室种植 $4 \times 10^4$ 个细胞 $^{[11]}$ ,并且加入各组相应的刺激药物,下室为含10% FBS的DMEM培养基,在5%  $CO_2$ 的恒温细胞培养箱中进行培养;实验前用无血清DMEM稀释matrigel至100  $mg \cdot L^{-1}$ ,于Transwell上室加入凝胶50  $\mu$ L后风干,临用时用无血清PBS清洗数遍;24 h

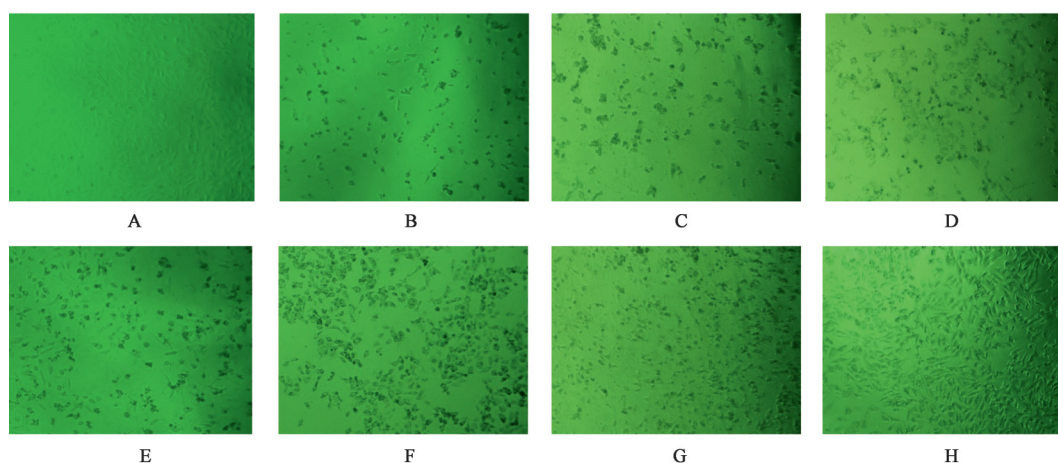
后用无菌棉签轻轻擦去上室细胞,甲醇固定小室膜下的细胞15 min,PBS清洗3次后自然晾干,0.1%结晶紫染色20 min,PBS清洗后于倒置显微镜放大200倍观察拍照,每膜取5个不同视野平均值,实验重复3次。

**2.9 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测PI3K, Akt, Bad, Bcl-xl蛋白表达** 增设PI3K/Akt通路抑制剂LY294002组 $^{[12]}$ ,质量浓度0.006  $g \cdot L^{-1}$ 。各组分别加药干预细胞24 h,使用RIPA提取细胞总蛋白,并用BCA法测蛋白浓度,每孔取蛋白40  $\mu$ g,浓缩胶80 V电泳40 min,分离胶120 V电泳2 h,电转100 V电泳1.5 h,加入一抗 $\beta$ -actin, PI3K, Akt, Bcl-xl(1:1 000);Bad(1:2 000),牛奶封闭1.5 h,4  $^{\circ}$ C杂过夜,加入二抗(1:2 000),TBST洗膜10 min,重复3次,加入ECL发光液后曝光,采用Image J软件分析条带灰度值,实验重复3次。

**2.10 统计学分析** 采用SPSS 23.0统计软件对实验数据进行ANOVA单因素方差分析,组内两两比较采用LSD法,计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 派特灵对HeLa细胞形态的影响** 培养24 h,空白组HeLa细胞呈扁平不规则多角形,形态饱满;与空白组比较,随着派特灵浓度的增加,派特灵各质量浓度组细胞数目逐渐减少,细胞固缩,排列紊乱。见图1。



A. 空白组;B-H.派特灵(3.906,2.604,1.953,1.563,1.302,1.116,0.977  $g \cdot L^{-1}$ )组

图1 派特灵对HeLa细胞病理形态的影响(倒置显微镜, $\times 100$ )

Fig. 1 Effect of Paiteling on pathological morphology of HeLa cells(inverted microscope, $\times 100$ )

**3.2 派特灵对HeLa细胞的 $IC_{50}$**  与空白组比较,派特灵各组对HeLa细胞有显著抑制作用( $P < 0.01$ ),最大抑制率为70.55%,最小抑制率为7.55%,随着给

药质量浓度增加(0.98~3.91  $g \cdot L^{-1}$ ),抑制率逐渐升高;计算得出派特灵对HeLa细胞的 $IC_{50}$ 为2.974  $g \cdot L^{-1}$ 。后续采用派特灵高质量浓度组( $IC_{50}$ ),

派特灵中质量浓度组(1/2 IC<sub>50</sub>),派特灵低质量浓度组(1/3 IC<sub>50</sub>)。见表1。

表1 派特灵对HeLa细胞抑制率的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 1 Effect of paiteling on HeLa cell inhibition rate( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	抑制率/%
空白	-	0
派特灵	0.977	7.552±0.678 <sup>1)</sup>
	1.116	9.688±1.088 <sup>1)</sup>
	1.302	13.959±1.345 <sup>1)</sup>
	1.563	18.734±3.172 <sup>1)</sup>
	1.953	28.050±3.586 <sup>1)</sup>
	2.604	41.544±1.785 <sup>1)</sup>
	3.906	70.554±1.734 <sup>1)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>P<0.01。

**3.3 派特灵对HeLa细胞增殖的影响** 与空白组比较,培养12 h,顺铂组、派特灵高、中质量浓度组均对HeLa细胞有显著抑制作用(P<0.01),培养24, 36, 48 h,顺铂组、派特灵各组均对HeLa细胞增殖有抑制作用(P<0.01);与顺铂组比较,各时间点派特灵

中、低质量浓度组对HeLa细胞增殖抑制作用减弱(P<0.01);与派特灵高质量浓度组比较,各时间点派特灵中、低质量浓度组均对HeLa细胞增殖抑制作用减弱(P<0.01),除培养24 h外,顺铂组与派特灵高质量浓度组比较差异无统计学意义;表明派特灵能够抑制HeLa细胞的增殖,并呈一定的剂量依赖性。见表2。

**3.4 派特灵对HeLa细胞迁移能力的影响** 与空白组比较,顺铂组、派特灵各组细胞迁移率均降低(P<0.01);与顺铂组比较,派特灵高质量浓度组细胞迁移率降低(P<0.05),派特灵低质量浓度组迁移率升高(P<0.01);与派特灵高质量浓度组比较,派特灵低质量浓度组迁移率升高(P<0.01)。培养24 h,与空白组比较,顺铂组、派特灵各组细胞迁移率降低(P<0.01);与顺铂组比较,派特灵低质量浓度组细胞迁移率升高(P<0.01),派特灵高质量浓度组细胞迁移率降低(P<0.05);与派特灵高质量浓度组比较,派特灵低质量浓度组迁移率升高(P<0.01);表明派特灵能抑制HeLa细胞迁移。见表3,图2。

表2 派特灵对HeLa细胞增殖抑制的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 2 Effect of Paiteling on inhibition of HeLa cells proliferation( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	12 h	24 h	36 h	48 h
空白	-	0.675±0.018	0.713±0.035	0.845±0.028	1.021±0.041
顺铂	0.010	0.468±0.024 <sup>1)</sup>	0.327±0.023 <sup>1)</sup>	0.293±0.022 <sup>1)</sup>	0.226±0.020 <sup>1)</sup>
派特灵	2.974	0.471±0.038 <sup>1)</sup>	0.401±0.042 <sup>1,2)</sup>	0.320±0.033 <sup>1)</sup>	0.245±0.019 <sup>1)</sup>
	1.487	0.619±0.040 <sup>1,2,3)</sup>	0.480±0.048 <sup>1,2,3)</sup>	0.393±0.018 <sup>1,2,3)</sup>	0.354±0.026 <sup>1,2,3)</sup>
	0.991	0.649±0.047 <sup>2,3)</sup>	0.513±0.029 <sup>1,2,3)</sup>	0.470±0.039 <sup>1,2,3)</sup>	0.453±0.034 <sup>1,2,3)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>P<0.01;与顺铂组比较<sup>2)</sup>P<0.01;与派特灵高质量浓度组比较<sup>3)</sup>P<0.01(表4同)。

表3 派特灵对HeLa细胞迁移能力的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of paiteling on metastasis ability of HeLa cells ( $\bar{x}\pm s, n=3$ ) %

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	12 h	24 h
空白	-	45.045±2.795	57.065±5.677
顺铂	0.010	-7.209±4.870 <sup>1)</sup>	-9.235±2.181 <sup>1)</sup>
派特灵	2.974	-24.623±6.936 <sup>1,2)</sup>	-30.953±8.154 <sup>1,2)</sup>
	1.487	-5.098±4.089 <sup>1)</sup>	-6.244±2.797 <sup>1)</sup>
	0.991	18.073±3.573 <sup>1,3,4)</sup>	19.821±6.299 <sup>1,3,4)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>P<0.01;与顺铂组比较<sup>2)</sup>P<0.05,<sup>3)</sup>P<0.01;与派特灵高质量浓度组比较<sup>4)</sup>P<0.01。

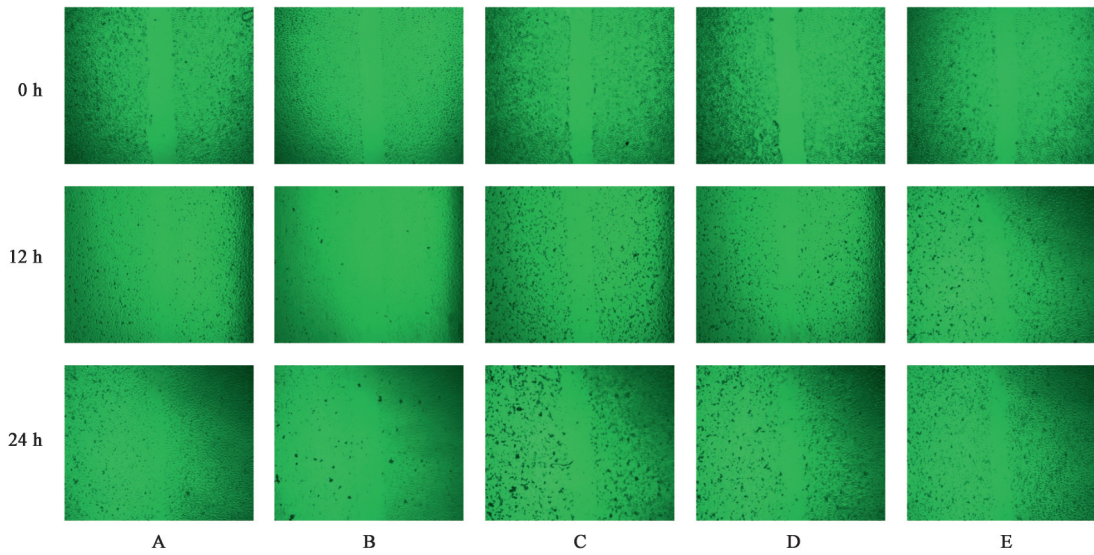
**3.5 派特灵对HeLa细胞侵袭能力的影响** 与空白组比较,顺铂组、派特灵各组平均穿膜细胞数降低(P<0.01);与顺铂组比较,派特灵中、低质量浓度组

穿膜细胞数增多(P<0.01);与派特灵高质量浓度组比较,派特灵中、低质量浓度组穿膜细胞数增多(P<0.01);顺铂组与派特灵高质量浓度组比较差异无统计学意义。派特灵能够抑制HeLa细胞的侵袭,并呈剂量依赖性。见表4,图3。

表4 派特灵对HeLa细胞侵袭能力的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of paiteling on invasion ability of HeLa cells( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	穿膜细胞数/个
空白	-	85.333±6.658
顺铂	0.010	24.333±3.215 <sup>1)</sup>
派特灵	2.974	22.333±1.528 <sup>1)</sup>
	1.487	44.000±2.000 <sup>1,2,3)</sup>
	0.991	64.667±3.512 <sup>1,2,3)</sup>



A. 空白组; B. 顺铂组; C~E. 派特灵高、中、低质量浓度组(图3同)

图2 派特灵对HeLa细胞迁移能力的影响(倒置显微镜, ×100)

Fig. 2 Effect of paiteling on metastasis ability of HeLa cells(inverted microscope, ×100)

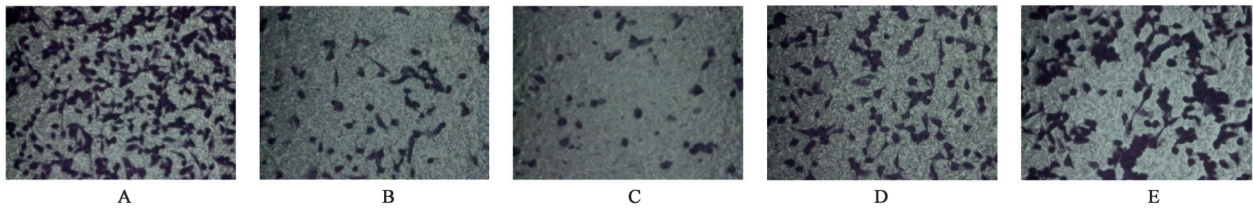


图3 派特灵对HeLa细胞侵袭能力的影响(倒置显微镜, ×200)

Fig. 3 Effect of paiteling on invasion ability of HeLa cells(inverted microscope, ×200)

**3.6 派特灵对HeLa细胞PI3K, Akt, Bad, Bcl-x1蛋白表达的影响** 与空白组比较, 派特灵高、中、低质量浓度组及LY294002组的PI3K, Bcl-x1, Akt表达量明显下降( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), Bad表达量显著增高( $P<0.01$ ); 顺铂组 Bcl-x1, Akt表达明显下降( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), Bad表达显著升高( $P<0.05$ )。与LY294002组比较, 派特灵高、中质量浓度组PI3K表达量显著下降( $P<0.01$ ), Bad表达量明显升高( $P<$

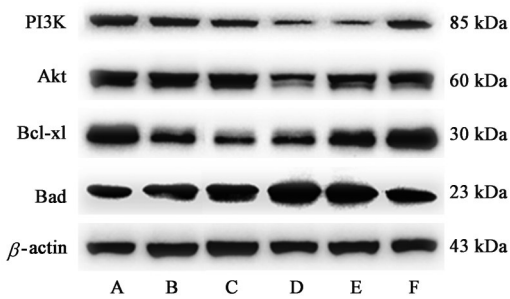
$0.05$ ,  $P<0.01$ ), 派特灵高质量浓度组Akt显著下降( $P<0.01$ ); 派特灵中、低质量浓度组的Bcl-x1表达量显著升高( $P<0.01$ ), 顺铂组PI3K, Bcl-x1表达明显升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), Bad表达明显下降( $P<0.05$ )。与派特灵高质量浓度组比较, 派特灵中、低质量浓度组的Akt, Bcl-x1蛋白表达显著升高( $P<0.01$ ); 派特灵低质量浓度组PI3K显著升高( $P<0.01$ ), Bad表达显著降低( $P<0.01$ )。见表5, 图4。

表5 派特灵对HeLa细胞PI3K, Akt, Bcl-x1, Bad蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

Table 5 Effect of paiteling on PI3K, Akt, Bcl-x1, and Bad protein expression in HeLa cells( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

组别	质量浓度/ $g\cdot L^{-1}$	PI3K/ $\beta$ -actin	Akt/ $\beta$ -actin	Bcl-x1/ $\beta$ -actin	Bad/ $\beta$ -actin
空白	-	0.869±0.033	1.550±0.055	1.533±0.059	0.819±0.031
LY294002	0.006	0.696±0.087 <sup>2)</sup>	1.327±0.166 <sup>1)</sup>	0.763±0.095 <sup>2)</sup>	1.334±0.167 <sup>2)</sup>
顺铂	0.010	0.818±0.065 <sup>3)</sup>	1.317±0.104 <sup>1)</sup>	1.056±0.084 <sup>2,4)</sup>	1.097±0.087 <sup>1,3)</sup>
派特灵	2.974	0.469±0.058 <sup>2,4,5)</sup>	0.872±0.109 <sup>2,4,5)</sup>	0.921±0.115 <sup>2)</sup>	1.719±0.216 <sup>2,4,5)</sup>
	1.487	0.572±0.061 <sup>2,4)</sup>	1.146±0.079 <sup>2,6)</sup>	1.272±0.088 <sup>2,4,6)</sup>	1.592±0.110 <sup>2,3)</sup>
	0.991	0.721±0.072 <sup>2,6)</sup>	1.167±0.117 <sup>2,6)</sup>	1.719±0.173 <sup>1,4,6)</sup>	1.246±0.125 <sup>2,6)</sup>

注: 与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; 与LY294002比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ , <sup>4)</sup> $P<0.01$ ; 与顺铂组比较<sup>5)</sup> $P<0.01$ ; 与派特灵高质量浓度组比较<sup>6)</sup> $P<0.01$ 。



A. 空白组; B. 顺铂组; C. LY294002组; D-F. 派特灵高、中、低质量浓度组

图4 派特灵对HeLa细胞PI3K, Akt, Bcl-x1, Bad蛋白表达的影响  
Fig. 4 Effect of paiteling on PI3K, Akt, Bcl-x1 and Bad protein expression in HeLa cells

#### 4 讨论

宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤,对女性群体的身体健康有着严重的威胁,全球每年死于宫颈癌的女性达20多万人,发病率在女性群体中位居第2位<sup>[13]</sup>。目前,临床上治疗宫颈癌主要采用手术放疗和化疗综合治疗的方法,顺铂是一种经典的抗肿瘤药物,其机制主要是与DNA形成化合物,阻碍DNA的转录和翻译,导致细胞凋亡,但化疗药物在抑制肿瘤细胞增殖的同时,对正常细胞也有很大的杀伤作用,而且由于耐药性还会使化疗药物的临床应用及疗效大大减低。

宫颈癌属于中医“癥瘕”“五色带下”“崩漏”等范畴,情志失遂、饮食不节或邪毒内侵等因素导致肝、脾、肾等脏腑功能紊乱,冲任受损,瘀血、湿毒之邪瘀结于小腹、胞宫而成癥瘕<sup>[14]</sup>。派特灵是中国科学院研制的中药复方制剂,具有清热解毒、活血化瘀、祛腐生新的功效,临床主要用来防止HPV感染导致的疣瘤病变,其主要成分为苦参、蛇床子、金银花、大青叶、白花蛇舌草、鸦胆子。苦参能够清热燥湿、利尿、杀虫,阻断HPV的核酸合成和蛋白质的表达,起到抑制病毒繁殖的作用,此外还可以提高人体免疫细胞对抗原的灵敏性;蛇床子能祛风、止痒、解毒杀虫,药理研究表明其可以抑菌消炎,善治湿疹疥癣寒湿带下,对于妇人阴痒、滴虫性阴道炎有很好的疗效;金银花能疏散风热、止痢抗菌,还能消肿解毒、清解血毒,能提高机体对病原微生物的免疫力;大青叶可凉血消斑、清解热毒,现代研究表明其可以抗炎、抗肿瘤、抗病毒,还能提高机体的免疫力;白花蛇舌草可以消肿散结、利湿通淋、可以抑制瘤组织增殖扩散;鸦胆子可止痢截虐、腐蚀赘疣、清热解毒,研究表明其能促进肿瘤细胞的凋亡;数药经过加工提纯,祛除有害物质,保留有效成分,既能

抑制感染细胞的扩散又同时可清除潜在感染的HPV。尚维群等<sup>[15]</sup>把病理学诊断为宫颈上皮内瘤变的患者进行分组对比治疗,在干扰素栓配合派特灵治疗宫颈上皮内瘤变3个疗程后,经液基薄层细胞检测(TCT),发现治疗组转阴率明显优于对照组。

PI3K/Akt是一个经典的信号转导通路,PI3K是由p85与p110两个亚基组成的异源二聚体,活化的PI3K能够激活Akt,使Akt磷酸化产生p-Akt,p-Akt对凋亡蛋白家族Bcl-x1,Bad及Bax等细胞因子有一定的调节作用,起到抗凋亡、保证细胞生存的作用<sup>[16]</sup>。PI3K/Akt特异性抑制剂LY294002能够高度选择性抑制PI3K的活性,从而阻断依赖于PI3K的Akt磷酸化和激酶活性,进而消除活化的Akt对凋亡蛋白Bad的抑制作用。

本研究发现派特灵能破坏HeLa细胞的正常形态,引起细胞皱缩变形;CCK-8实验表明,派特灵能够抑制HeLa细胞的增殖,且符合一定的量效和时效关系;Transwell实验和细胞划痕实验表明,派特灵能抑制HeLa细胞侵袭转移能力,并呈一定的浓度剂量依赖性;Western blot表明,派特灵能够下调PI3K,Akt,Bcl-x1蛋白表达,上调Bad蛋白表达,说明派特灵可能通过抑制PI3K/Akt信号转导通路相关抗凋亡蛋白的表达,提高凋亡相关蛋白表达,从而抑制HeLa细胞增殖迁移和侵袭,起到抗肿瘤作用。本实验研究阐释了派特灵抗宫颈癌的机制,具有良好的临床应用价值,其多靶点作用机制有待进一步实验验证。

#### [参考文献]

- [1] 杜文静,邓云丹,代强,等.腹腔镜下根治性子宫切除术治疗宫颈癌的Meta分析[J].中国循证医学杂志,2014,14(8):934-941.
- [2] 项先旺,江彤,陈传俊.人乳头瘤病毒-16E5蛋白的功能及E5蛋白与E6、E7蛋白的相互作用[J].中国临床保健杂志,2015,18(5):555-558.
- [3] CASTLE P E, STOLER M H, WRIGHT T C, et al. Performance of carcinogenic human papillomavirus (HPV) testing and HPV16 or HPV18 genotyping for cervical cancer screening of women aged 25 years and older: a subanalysis of the ATHENA study[J].Lancet Oncol,2011,12(9):880-890.
- [4] 吴凯新,林利红.派特灵在复发性持续性HPV感染患者中的应用效果及对宫颈局部免疫的影响观察[J].中国医学创新,2016,13(31):42-45.
- [5] DONG P, HAO F, DAI S, et al. Combination therapy

- Eve and Pac to induce apoptosis in cervical cancer cells by targeting PI3K/Akt/mTOR pathways [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2018, 38(1):83-88.
- [ 6 ] 岳晓雪,苗劲蔚,路攀.miR21对宫颈癌HeLa细胞及顺铂耐药HeLa/DDP细胞顺铂敏感性的影响[J].*中国医药导报*,2017,14(36):25-28.
- [ 7 ] 万喆,侯晴,李若瑜,等.采用微量液基稀释法对伊可尔~抗菌剂体外抗真菌活性探索性研究[J].*中国真菌学杂志*,2018,13(6):354-356.
- [ 8 ] 潘舒裕,陈小凤,肖静.疣毒净诱导H8细胞凋亡作用机制[J].*中国实验方剂学杂志*,2017,23(9):134-138.
- [ 9 ] WEI L, CUI L X, ZHAO X B, et al. miR-186 down-regulate EGFR expression and affect on proliferation and invasion of cervical cancer [J]. *Obstet Gynecol*, 2018, 30(8):155-158.
- [10] 董然,朱晓雷.MicroRNA-183抑制结肠癌肿瘤细胞的增殖、侵袭及迁移[J].*现代肿瘤医学*,2019,27(13):2267-2271.
- [11] 李雪茹,孙晖,查何,等.S100A9对宫颈癌HeLa细胞的增殖和迁移的影响及其机制探讨[J].*中国细胞生物学学报*,2015,37(12):1632-1638.
- [12] LEE, C M, FUHRMAN C B, PLANELLES V, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition by LY294002 radiosensitizes human cervical cancer cell lines [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(1):250-256.
- [13] 黄莎莎,郝登再,张岩,等.高危型HPV DNA整合导致宫颈癌的作用机制和临床检测进展[J].*遗传*, 2017, 39(9):775-783.
- [14] 乌左祥,王旭,吴冶.紫杉醇配合卡铂在老年宫颈癌患者中的应用评价[J].*世界中医药*, 2019, 14(3):656-660.
- [15] 尚维群,李坤.干扰素栓配合派特灵治疗宫颈上皮内瘤变I、II级临床疗效观察[J].*中国社区医师*, 2014, 30(5):94-95.
- [16] SONG J Q, XU T, YAN C, et al. Activation of Akt/GSK-3 $\beta$  signaling pathway is involved in intermedin 1-53 protection against myocardial apoptosis induced by ischemia/reperfusion [J]. *Apoptosis*, 2009, 14(11):1299-1307.

[责任编辑 张丰丰]