

# 基于 PI3K/AKT 信号通路探索柚皮素对宫颈癌 HeLa 细胞抑制作用的机制

李浩颖<sup>1</sup> 黄靖旋<sup>1</sup> 王琳<sup>(通讯作者)</sup>

(长沙医学院 临床学院 湖南长沙 410219)

**摘要:**目的: 该研究旨在通过检测细胞增殖活力、侵袭能力、迁移能力、蛋白表达等以探索柚皮素对宫颈癌 HeLa 细胞抑制作用的机制。方法: 在不同浓度梯度柚皮素作用下, 通过 Transwell 实验等法检测细胞侵袭能力, 其后通过流式细胞术进行检测并分析细胞凋亡率, 最后用蛋白印迹法检测 PI3K、AKT 等相关蛋白的表达。结果: 不同浓度柚皮素处理下的 HeLa 细胞, 经过上述方法以及统计学分析表明柚皮素在 PI3K/AKT 通路上可能起到抗宫颈癌的作用。结论: 本研究结果揭示了柚皮素通过 PI3K/AKT 通路对宫颈癌具有治疗作用, 为进一步的临床药物研究提供了理论基础。

**关键词:** 柚皮素; 宫颈癌; PI3K/AKT

宫颈癌是全球女性癌症相关死亡的几大重要原因之一, 在贫穷国家中, 宫颈癌的发病率仅次于肺癌<sup>[1]</sup>。据相关统计, 在 2020 年, 因宫颈癌患者死亡的女性约 40 万多人, 其发病率和死亡率有逐年不断上升的趋势。其中 HPV 感染是宫颈癌的主要原因, 当今世界上的 HPV 疫苗只用于预防 HPV 的感染, 在根源上并不能对宫颈癌的患者产生确切的治疗效果。且外, 常用的宫颈癌的主要治疗方法有化疗、放疗和手术治疗<sup>[2]</sup>。对于尚未恶化的早期患者, 通过手术治疗, 其 5 年生存率可以达到 100%, 虽然治疗效果佳, 但具有创伤性。随着生活方式的增加, 宫颈癌的发病年龄趋于提前, 因为年轻患者保持生育能力的意愿较强烈, 对于此类患者, 手术治疗并非首选<sup>[3]</sup>。而放疗、化疗因其效果的局限性和其副作用而常被诟病, 因此, 当迫切需要一种新型安全、费用低廉的抗宫颈癌药物及其科学高效的治疗方法, 以提高宫颈癌患者的 5 年生存率和生活质量。黄酮类化合物普遍存在于水果、蔬菜和一些中草药当中<sup>[4]</sup>。除了发挥着生理功能外, 也可在体内发挥多种生物活性, 其中包括抗氧化、抗炎、抗肥胖、抗病毒和抗癌活性。其中柚皮素主要存在于柑橘类水果中。且已经有相关文献, 证明柚皮素在不同浓度下对多种癌症细胞的单层培养中具有细胞毒作用, 如白血病、胰腺、乳腺、胃<sup>[5]</sup>。

## 1 实验与方法

### 1.1 实验及主要材料

宫颈癌 HeLa 细胞由长沙医学院院士工作站实验室保存并提供。柚皮素购自 Aladdin。DMEM 培养液 (美国 Gibco 公司); 0.25% -EDTA 胰蛋白酶、青链霉素 (北京索莱宝科技有限公司); 胎牛血清 (苏州依科赛生物科技股份有限公司, 批号 11H158); CCK-8 试剂盒。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养及药物处理

将 HeLa 细胞放置于 DMEM 培养基中培养, 并后续加入胰蛋白酶消化传代, 方便后续实验。培养条件为标准条件 (5% CO<sub>2</sub>, 37°C, 95% 湿度)。柚皮素溶解于 DMSO 中制备成 50mM 的储备溶液。细胞分别以 0 $\mu$ M、50 $\mu$ M、100 $\mu$ M 和 200 $\mu$ M 的柚皮素浓度进行处理。

#### 1.2.2 细胞侵袭能力检测

Transwell 实验: 配置基质胶稀释并稀释基质胶后, 在每一个小室中加入稀释基质胶, 放于 37°C 条件下中 1.5 h; 根据分组在每一个小室中加入细胞, 上室加入细胞悬液, 下室加入 DMEM。将 24 孔板放置于 37°C 恒温细胞培养箱继续孵育 24 h; 4% 的多聚甲醛溶液固定 30 min, 结晶。

#### 1.2.3 细胞凋亡能力检测

流式细胞术检测各组 HeLa 细胞凋亡取各组 HeLa 细胞接种在 96 孔板中, 37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下培养过夜, 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 用 PBS 缓冲液洗涤后, 离心收集细胞, 然后按照试剂盒说明书进行操作, 用流式细胞仪检测细胞凋亡情况

#### 1.2.4 Western blot

Western blot 法: 取上述培养的宫颈癌 HeLa 细胞, 离心后裂解, 再加入缓冲液, 测定蛋白浓度后提取总蛋白, 并转移到 PVDF 膜上, 封闭 2 h 后加入 MMP9、PI3K、AKT、CASP3 抗体 (稀释比例 1:500), 常规孵育。加入二抗后上机检测, 内参蛋白为 GADPH, 分析蛋白质表达水平。

#### 1.2.5 统计学分析

统计学处理: 用 SPSS 22.0 分析数据, 对于多组间比较使用单因素方差分析, 对于两组间比较进行 q 检验, 设定 P<0.05 有统计学意义。

## 2 结果

Transwell 侵袭实验显示, 与对照组相比, 预先孵育 24 小时后,

柚皮素浓度逐渐增加的处理组中侵袭细胞数量显著减少。这些证据表明,柚皮素可能抑制宫颈癌细胞的迁移和侵袭能力。为了评估柚皮素对宫颈癌的影响,我们评估了其对于Hela细胞形态和存活能力的影响。在不同柚皮素浓度下孵育24小时后,我们在显微镜下记录了Hela细胞的形态。我们的数据显示,柚皮素引发了细胞的形态变化,包括收缩、圆化和凋亡。它还降低了Hela细胞的存活能力。在流式细胞仪实验中,在0 $\mu$ M、50 $\mu$ M、100 $\mu$ M和200 $\mu$ M的柚皮素处理下的Hela细胞凋亡率比较相比,在柚皮素浓度0 $\mu$ M、50 $\mu$ M、100 $\mu$ M和200 $\mu$ M组下,Hela细胞凋亡率显著升高( $P < 0.05$ )。上述实验结果都表明着,柚皮素可能在某些方面上抑制宫颈癌Hela细胞的增殖、侵袭和迁移。为了进一步具体研究柚皮素在宫颈癌进展中的分子机制,我们根据先前生信分析下KEGG富集分析和分子对接的结果,对暴露于不同柚皮素浓度下的Hela细胞中的MMP9、AKT和CASP3蛋白表达水平进行了研究。结果显示,柚皮素降低了MMP9、PI3K蛋白的表达水平,同时增强了CASP3的表达水平。这些实验结果也都表明,柚皮素极有可能通过抑制PI3K/AKT通路发挥抗宫颈癌作用。

### 3 讨论

柚皮素是一是在各类中草药和水果都有广泛存在的黄酮类化合物,且被认为是最重要的黄酮类化合物之一,其成分主要分布在水果蔬菜如柠檬、橘子、马铃薯、佛手柑等<sup>[6]</sup>,从20世纪中国外学者的初步研究到迄今为止,柚皮素已被发现有抗癌、抗氧化、抗炎等大量药理作用,其中在柚皮素的抗肿瘤作用是近年来的研究热点,已经有相当的研究表明,柚皮素在乳腺癌、胃癌、肝癌中有着较为优异的抗癌成效<sup>[7]</sup>。在当今宫颈癌的治疗中,一直都缺少着治疗效果佳、副作用少的药物。PI3K/AKT信号通路发挥着至关重要的调控作用且是近年来研究的热点<sup>[8]</sup>,有“抗细胞凋亡途径”之称,其在多种肿瘤细胞的增殖、分化、侵袭等过程中发挥重要作用<sup>[9]</sup>,已有文献证明,宫颈癌中PI3K/Akt信号通路存在异常表达,可控制宫颈癌的发生发展,可为临床提供新的治疗靶点。在本文实验结果中,随着药物浓度的增加,细胞形态开始呈现凋亡特征,凋亡细胞数增加,细胞凋亡率也逐渐升高,通过抑制PI3K/AKT信号通路通路和降低了MMP9蛋白表达水平。

### 4 结论

综上所述,柚皮素可通过抑制PI3K/AKT信号通路从而发挥抗宫颈癌细胞的作用,阐述了一种柚皮素治疗宫颈癌的新机制,为后续的新型安全、费用低廉的抗宫颈癌药物及其科学高效的治疗方法的研发打下了坚实的临床基础。

#### 参考文献:

- [1]孙桂霞,张冬丽,曹芹雪, et al. 茯苓酸调节NF- $\kappa$ B途径诱导宫颈癌细胞凋亡和细胞周期停滞[J]. 中药材, 2023, (12): 3109-13.
  - [2]李丹,卢艳. 肿瘤相关巨噬细胞在宫颈癌中的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志: 1-14.
  - [3]QING L, JING L, DAN Z, et al. EIF3D promoted cervical carcinoma through Warburg effect by interacting with GRP78[J]. Journal of Obstetrics and Gynaecology, 2023, 43(1).
  - [4]李坤,王文英. 柚皮素基于TGF- $\beta$ 2介导对白内障晶状体病理性上皮间质转化的作用研究[J]. 中国中医眼科杂志, 2023, 33(12): 1101-8.
  - [5]王丹,彭莉,周燕红. 柚皮素抗肿瘤作用的研究进展[J]. 中草药, 2021, 52(10): 3151-6.
  - [6]夏莎莎,王启明,饶哲楠, et al. 柚皮素及其纳米递送体系研究进展[J]. 食品与发酵工业: 1-11.
  - [7]吴静洁,梅应兵,姚雪婷, et al. 基于网络药理学及分子对接研究柚皮素抗胃癌机制[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2021, 29(02): 124-31.
  - [8]刘琴,吴丹,胡华, et al. PI3K/Akt信号通路与女性相关恶性肿瘤关系的研究进展[J]. 中南医学科学杂志, 2021, 49(06): 738-40.
  - [9]王琼,杨振宇. 土贝母苷甲通过PI3K/AKT信号通路诱导宫颈癌Hela细胞凋亡的机制[J]. 中国妇幼保健, 2022, 37(22): 4269-72.
- 项目基金: 湖南省大学生创新创业训练计划项目: 湘教通(2022)174号-4587; 长沙医学院大学生创新创业训练计划项目: 长医教(2022)41号-037;
- 第一作者: 李浩颖(2000-),男,本科生,临床医学专业  
并列第一作者: 黄靖旋(2003-),女,本科生,临床医学专业  
通讯作者: 王琳(1986-),女,硕士研究生,讲师,研究方向: 生物化学与分子生物学