

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.13.008

新合成黄腐酚类似物联合顺铂对宫颈癌细胞化疗增敏作用的研究*

王 慧¹ 朱婕曼¹ 刘树英¹ 亢延飞² 陈江平^{1Δ}

(1 河北北方学院附属第一医院妇产科 河北 张家口 075000; 2 河北北方学院 河北 张家口 075000)

摘要 目的:探讨新合成黄腐酚类似物联合顺铂对宫颈癌 Hela 细胞化疗敏感性的影响及其机制。**方法:**以不同浓度(5、7.5、15、20 $\mu\text{mol/L}$)黄腐酚类似物处理宫颈癌 Hela 细胞和正常 MRC-5 细胞 48 h 后, MTT 实验检测细胞增殖活力并计算出黄腐酚类似物对 2 种细胞的半数抑制浓度(IC_{50}); 采用 MTT 实验进一步观察 IC_{50} 最低的黄腐酚类似物联合顺铂对 Hela 和 MRC-5 细胞增殖活力的影响, 采用流式细胞仪检测 Hela 细胞周期和凋亡情况, Western blot 法检测 Hela 细胞中凋亡相关蛋白表达变化。**结果:**黄腐酚类似物 a8、a13、b11 和 b12 对宫颈癌 Hela 细胞增殖均有一定的抑制作用, 且 a13 的 IC_{50} 值最小; 另外, 这 4 种浓度的黄腐酚类似物对正常 MRC-5 细胞有轻微的抑制作用, 且 a13 的 IC_{50} 值最大。与对照组比较, 顺铂组、a13 组、顺铂+a13 组中正常 MRC-5 细胞存活率差异均无统计学意义($P<0.05$), 但顺铂组、a13 组和顺铂+a13 组中宫颈癌 Hela 细胞存活率、G2/M 期细胞百分比和 B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl-2)蛋白表达水平均明显降低, 而 G0/G1 期细胞百分比、细胞凋亡率和细胞中细胞色素 C(Cyt-c)、Bcl-2 关联 X 蛋白(Bax)、活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(Cleaved Caspase-3)、活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 9(Cleaved Caspase-9)蛋白表达水平均明显升高, 且顺铂+a13 组中上述指标变化幅度明显大于顺铂组、a13 组($P<0.05$)。**结论:**黄腐酚类似物与顺铂联合可协同抑制宫颈癌 Hela 细胞增殖, 表现良好的化疗增敏效果, 其作用机制可能与阻滞细胞周期进程和调控凋亡相关蛋白表达促进细胞凋亡有关。

关键词:新合成黄腐酚类似物; 宫颈癌; 顺铂; 细胞凋亡; 化疗敏感性

中图分类号: R-33; R737.33 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2022)13-2441-06

Study on Chemosensitization of Newly Synthesized Xanthohumol Analogues Combined with Cisplatin on Cervical Cancer Cells*

WANG Hui¹, ZHU Jie-man¹, LIU Shu-ying¹, KANG Yan-fei², CHEN Jiang-ping^{1Δ}

(1 Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei, 075000, China;

2 Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei, 075000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of newly synthesized xanthohumol analogues combined with cisplatin on the chemosensitivity of cervical cancer Hela cells and its mechanism. **Methods:** Cervical cancer Hela cells and normal MRC-5 cells were treated with xanthohumol analogs at different concentrations (5, 7.5, 15, 20 $\mu\text{mol/L}$) for 48 h. The MTT assay was used to detect the cell proliferation activity and calculate the half inhibitory concentration (IC_{50}) of xanthohumol analogues on two kinds of cells. MTT assay was used to further observe the effect of xanthohumol analogue with the lowest IC_{50} combined with cisplatin on the proliferation of Hela and MRC-5 cells. Hela cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry. The expression of apoptosis related proteins in Hela cells was detected by Western blot. **Results:** Xanthohumol analogues a8, a13, b11 and b12 had certain inhibitory effects on the proliferation of cervical cancer Hela cells, and the IC_{50} value of a13 was the lowest. In addition, the four xanthohumol analogues had a slight inhibitory effect on normal MRC-5 cells, and the IC_{50} value of A13 was the largest. Compared with the control group, there were no significant differences in the survival rate of normal MRC-5 cells in cisplatin group, a13 group and cisplatin combined with a13 group ($P<0.05$), but the survival rate of cervical cancer Hela cells, the percentage of G2/M phase cells and the expression level of Bcl-2 protein in cisplatin group, a13 group and cisplatin combined with a13 group were significantly reduced, while the percentage of G0/G1 phase cells, the cell apoptosis rate and cytochrome c (Cyt-c), B lymphoma-2 (Bcl-2) associated X protein (Bax), activated caspase-3 (Cleaved Caspase-3) and activated caspase-9 (Cleaved Caspase-9) protein expression levels increased significantly, and the change range of the above indexes in cisplatin combined with a13 group was significantly greater than that in cisplatin group and a13 group ($P<0.05$). **Conclusion:** The combination of xanthohumol analogue and cisplatin can synergistically inhibit the proliferation of cervical cancer Hela cells and show a good chemosensitization effect. Its mechanism may be related to blocking the process of cell cycle, regulating the expression of apoptosis related proteins and promoting apoptosis.

* 基金项目: 河北省医学科学研究重点课题计划青年科技项目(20180815)

作者简介: 王慧(1984-), 女, 硕士, 主治医师, 从事妇科肿瘤方向的研究, E-mail: wanghui54830652@163.com

Δ 通讯作者: 陈江平(1968-), 女, 本科, 主任医师, 从事妇科肿瘤方向的研究, E-mail: 54830652@qq.com

(收稿日期: 2022-01-28 接受日期: 2022-02-23)

Key words: Newly synthesized xanthohumol analogues; Cervical cancer; Cisplatin; Cell apoptosis; Chemosensitivity

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R737.33 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)13-2441-06

前言

宫颈癌是一种发病率和死亡率均较高的女性生殖系统恶性肿瘤,据统计全球每年的新增和死亡人数分别高达 53 万、31 万^[1]。尽管临床上采用的手术、放疗和化疗等技术已取得了很大进步,但中晚期患者 5 年内的生存率并不理想^[2-4],而化疗耐药是影响患者预后、导致患者术后复发转移的重要因素,也是制约临床治疗的核心问题^[5]。黄腐酚是一种从啤酒花中分离出来的异戊二烯基类黄酮,具有抗肥胖、降血糖和抗高脂血症等活性,且在食管鳞状细胞癌、肺癌和胶质母细胞瘤等中表现出良好的抗肿瘤活性^[6-8]。本研究前期以黄腐酚作为先导化合物,通过对其结构修饰及改造合成了黄腐酚类似物,并发现新合成的黄腐酚类似物可通过抑制卵巢癌细胞增殖降低癌细胞对顺铂的耐药性,其具体机制为下调 FZD6 并抑制 Wnt/ β -连环蛋白而抑制癌细胞增殖、侵袭和转移的信号^[9],但其在宫颈癌中是否也存在类似的化疗增敏作用并不清楚。本研究通过体外实验观察,新合成的黄腐酚类似物与顺铂联合应用对宫颈癌 Hela 细胞的干预效果,为其应用于宫颈癌治疗改善化疗耐药提供新线索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 人宫颈癌细胞系 Hela 和人胚肺成纤维细胞系 MRC-5 购于中国科学院生化细胞所。

1.1.2 药品与试剂 黄腐酚购于上海韵泰信息科技有限公司,顺铂购于美国 Sigma 公司,胎牛血清(FBS)购于美国 Thermo 公司,青霉素-链霉素和 DMEM 培养基购于美国 Gibco 公司,四甲基偶氮唑蓝(MTT)试剂盒购于日本同仁化学研究所,细胞周期检测试剂盒购于南京建成生物工程研究所,Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司,细胞色素 C(Cyt-C)、B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl-2)、Bcl-2 关联 X 蛋白(Bax)、活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(Cleaved Caspase-3)、活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 9(Cleaved Caspase-9)和 GAPDH 抗体购于美国 Abcam 公司。

1.1.3 仪器 BB5060U 型 CO₂ 培养箱为德国 Heraeus 公司产品, Multiskan Ascent 型酶标仪为芬兰 Labsystems 公司产品, EPICS-XL 流式细胞仪为美国 Beckman 公司产品, Gel Doc EZ 凝胶成像分析系统为美国 Bio-Rad 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 采用含 1%青霉素-链霉素和 10%FBS 的 DMEM 培养基在饱和湿度、5% CO₂、37℃ 恒温培养箱内常规培养 Hela 细胞和 MRC-5 细胞,每 2d 更换一次新鲜培养基,待细胞几乎铺满培养瓶底时,加入 0.25%胰蛋白酶消化,并按照 1:3 比例传代。取长势良好的第 3~5 代对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 试剂配制 采用二甲基亚砜(DMSO)溶解黄腐酚类似物制成终浓度为 5、7.5、15 和 20 μ mol/L 工作液,避光保存于

-20℃ 下备用。

1.2.3 实验分组 以不同浓度(5、7.5、15、20 μ mol/L)黄腐酚类似物处理 Hela 细胞 48 h 作为实验组,以正常培养不做处理的 Hela 细胞作为对照,另外以正常 MRC-5 细胞作为参照;将 Hela 细胞分为对照组(正常培养不做处理)、顺铂组(以 5 μ g/mL 顺铂处理 48 h^[9])、黄腐酚类似物组(以 5 μ mol/L IC₅₀ 值最低的黄腐酚类似物处理 48 h)和顺铂+黄腐酚类似物组(以 5 μ g/mL 顺铂和 5 μ mol/L IC₅₀ 值最低的黄腐酚类似物联合处理 48 h);其中,每次处理设置 3 个复孔。

1.2.4 MTT 法检测细胞增殖 将对数生长期的细胞以每孔 200 μ L(浓度为 1×10^5 个/mL)接种至 96 孔板上,常规培养贴壁后,给予药物处理,处理 48 h 后,每孔加入 1 g/L MTT 溶液 50 μ L,孵育 4 h 后,弃上清液,加入 DMSO 溶液 150 μ L,待蓝紫色结晶充分溶解后,采用酶标仪检测细胞在 490 nm 处的光密度(OD)值,并根据公式计算细胞增殖活力和增殖抑制率。其中,细胞活力(%)=(实验组 OD 值/对照组 OD 值) $\times$ 100%,抑制率(%)=(1-实验组 OD 值/对照组 OD 值) $\times$ 100%;采用 GraphPad Prism 6.0 软件计算药物对细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)。实验重复 3 次取平均值。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡 收集两份处理 48 h 后的顺铂组、黄腐酚类似物组、顺铂+黄腐酚类似物组和对照组 Hela 细胞,一份用于细胞周期检测,一份用于细胞凋亡检测。(1)细胞周期:磷酸缓冲液(PBS)洗涤细胞后,加入预冷的 75%乙醇溶液固定过夜;1000 r/min 离心 5 min,弃上清液,以 PBS 洗涤 2 次;加入水解酶 Rnase 100 μ L,在 37℃ 下水解 1 h 后,加入 400 μ L PI 染液避光染色 30 min 后,上流式细胞仪检测细胞周期分布情况。(2)细胞凋亡:以 PBS 洗涤收集到的细胞后,加入结合缓冲液 400 μ L 制备浓度为 10^6 个/mL 的细胞悬液,先后加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI 溶液,混匀后避光孵育 15 min,补加 200 μ L 结合缓冲液后,上流式细胞仪检测细胞凋亡情况。实验重复 3 次。

1.2.6 Western blot 检测 Cyt-C、Bax、Bcl-2、Cleaved Caspase-3 和 Cleaved Caspase-9 蛋白表达水平 向待测的 Hela 细胞中加入裂解液抽提细胞总蛋白后,采用 BCA 法测定蛋白浓度;将变性后的蛋白样品行电泳分离后,转至聚偏氟乙烯膜上;经 5%脱脂奶粉封闭 1 h 后,加入以 1:1000 比例稀释的相应一抗,置于 4℃ 下反应过夜后,再以 1:2000 比例稀释的二抗室温孵育 1 h。化学发光剂显影曝光后,以 GAPDH 为内参,采用凝胶成像分析系统分析。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析,计量资料以 K-S 法进行正态性检验,对于符合正态性分布的计量资料以“均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)”表示,以单因素方差分析进行多组间比较,组间进一步两两比较则采用 LSD-t 检验,检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 黄腐酚类似物对宫颈癌 Hela 和正常 MRC-5 细胞增殖的

影响

通过 MTT 实验筛选出对 Hela 细胞增殖影响较大的 4 种黄腐酚类似物(a8、a13、b11 和 b12)作对比分析,结果显示:黄腐酚类似物 a8、a13、b11 和 b12 对宫颈癌 Hela 细胞增殖均有

一定的抑制作用,且 a13 的 IC_{50} 值最小;另外,就正常 MRC-5 细胞而言,4 种黄腐酚类似物对其有轻微的抑制作用,且 a13 的 IC_{50} 值最大,见表 1 和表 2。故后续选取作用效果最佳的黄腐酚类似物 a13 进行实验。

表 1 不同浓度黄腐酚类似物 a8、a13、b11 和 b12 作用下宫颈癌 Hela 细胞的增殖抑制率(%, $\bar{x} \pm s$)Table 1 The proliferation inhibition rate of cervical cancer Hela cells under the action of different concentrations of xanthohumol analogues a8, a13, b11 and b12(%, $\bar{x} \pm s$)

Xanthohumol analogues	5 μ mol/L	7.5 μ mol/L	15 μ mol/L	20 μ mol/L	IC_{50}/μ mol/L
a8	11.21 $\pm$ 1.24	26.08 $\pm$ 3.54	38.97 $\pm$ 3.52	50.90 $\pm$ 4.21	20.13 $\pm$ 2.07
a13	30.27 $\pm$ 2.09 ^a	45.11 $\pm$ 3.61 ^a	68.64 $\pm$ 4.90 ^a	89.41 $\pm$ 5.14 ^a	8.24 $\pm$ 0.27 ^a
b11	10.65 $\pm$ 0.77 ^{ab}	21.58 $\pm$ 1.79 ^{ab}	39.46 $\pm$ 2.27 ^{ab}	58.75 $\pm$ 3.83 ^{ab}	17.51 $\pm$ 0.82 ^{ab}
b12	16.88 $\pm$ 1.61 ^{abc}	30.89 $\pm$ 3.01 ^{abc}	47.26 $\pm$ 4.44 ^{abc}	64.85 $\pm$ 4.74 ^{abc}	14.41 $\pm$ 0.97 ^{abc}
F	329.610	98.980	113.537	122.527	158.045
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Note: compared with a8, ^a $P < 0.05$. Compared with a13, ^b $P < 0.05$. Compared with b11, ^c $P < 0.05$.

表 2 不同浓度黄腐酚类似物 a8、a13、b11 和 b12 作用下正常 MRC-5 细胞的增殖抑制率(%, $\bar{x} \pm s$)Table 2 The proliferation inhibition rate of normal MRC-5 cells under the action of different concentrations of xanthohumol analogues a8, a13, b11 and b12(%, $\bar{x} \pm s$)

Xanthohumol analogues	5 μ mol/L	7.5 μ mol/L	15 μ mol/L	20 μ mol/L	IC_{50}/μ mol/L
a8	1.20 $\pm$ 0.41	3.75 $\pm$ 0.52	6.44 $\pm$ 0.98	10.32 $\pm$ 2.17	120.46 $\pm$ 49.42
a13	1.94 $\pm$ 0.74 ^a	3.24 $\pm$ 1.09 ^a	5.63 $\pm$ 1.31 ^a	8.74 $\pm$ 0.91 ^a	176.67 $\pm$ 49.30 ^a
b11	1.03 $\pm$ 0.59 ^{ab}	2.36 $\pm$ 0.78 ^{ab}	5.22 $\pm$ 1.25 ^{ab}	8.04 $\pm$ 0.84 ^{ab}	114.38 $\pm$ 20.07 ^{ab}
b12	2.41 $\pm$ 0.77 ^{abc}	4.71 $\pm$ 0.60 ^{abc}	7.05 $\pm$ 1.83 ^{abc}	12.44 $\pm$ 1.87 ^{abc}	119.21 $\pm$ 46.44 ^{abc}
F	9.043	14.304	3.183	14.086	4.199
P	0.000	0.000	0.037	0.000	0.013

Note: compared with a8, ^a $P < 0.05$. Compared with a13, ^b $P < 0.05$. Compared with b11, ^c $P < 0.05$.

2.2 黄腐酚类似物 a13 联合顺铂对宫颈癌 Hela 细胞和正常 MRC-5 细胞增殖的影响

MTT 实验检测结果显示,与对照组比较,顺铂组、a13 组和顺铂 +a13 组中宫颈癌 Hela 细胞存活率均明显降低,且顺铂 +a13 组明显低于顺铂组或 a13 组($P < 0.05$);然而,顺铂组、a13

组、顺铂 +a13 组中正常 MRC-5 细胞存活率与对照组比较,差异均无统计学意义($P < 0.05$),且顺铂组、a13 组与顺铂 +a13 组比较,MRC-5 细胞存活率差异也均无统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

表 3 各组宫颈癌 Hela 细胞和正常 MRC-5 细胞增殖活力的比较(%, $\bar{x} \pm s$)Table 3 Comparison of proliferation activity of cervical cancer Hela cells and normal MRC-5 cells in each group(%, $\bar{x} \pm s$)

Groups	Hela	MRC-5
Control	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00
Cisplatin	59.74 $\pm$ 3.46 ^a	95.13 $\pm$ 6.92
a13	68.92 $\pm$ 4.47 ^a	96.02 $\pm$ 5.82
Cisplatin combined with a13	45.34 $\pm$ 3.52 ^{abc}	97.28 $\pm$ 5.14
F	434.491	1.796
P	0.000	0.234

Note: compared with control group, ^a $P < 0.05$. Compared with cisplatin group, ^b $P < 0.05$. Compared with a13 group, ^c $P < 0.05$.

2.3 黄腐酚类似物 a13 联合顺铂对宫颈癌 Hela 细胞周期的影响

流式细胞仪进一步检测 Hela 细胞周期结果显示, 与对照组比较, 顺铂组、a13 组和顺铂 +a13 组中 Hela 细胞在 G0/G1 期所占百分比明显升高, G2/M 期细胞百分比明显降低 ($P<0.05$), 且顺铂 +a13 组中上述指标变化幅度明显大于顺铂组、a13 组 ($P<0.05$)。见表 4。

表 4 各组细胞在不同时相所占百分比的比较(%, $\bar{x} \pm s$)
Table 4 Comparison of percentage of cells in different phases in each group(%, $\bar{x} \pm s$)

Groups	G0/G1	S	G2/M
Control	21.58 $\pm$ 2.41	33.08 $\pm$ 3.34	45.32 $\pm$ 3.32
Cisplatin	38.30 $\pm$ 3.13 ^a	37.93 $\pm$ 2.47 ^a	23.75 $\pm$ 2.09 ^a
a13	33.92 $\pm$ 2.45 ^a	38.26 $\pm$ 3.20 ^a	27.87 $\pm$ 3.11 ^a
Cisplatin combined with a13	43.15 $\pm$ 4.27 ^{abc}	39.38 $\pm$ 2.88 ^{ac}	17.29 $\pm$ 2.01 ^{abc}
F	77.183	7.838	177.931
P	0.000	0.000	0.000

Note: compared with control group, ^a $P<0.05$. Compared with cisplatin group, ^b $P<0.05$. Compared with a13 group, ^c $P<0.05$.

2.4 黄腐酚类似物 a13 联合顺铂对宫颈癌 Hela 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测 Hela 细胞凋亡结果显示, 顺铂组、a13 组

和顺铂 +a13 组中 Hela 细胞凋亡率均明显高于对照组, 且顺铂 +a13 组高于顺铂组、a13 组 ($P<0.05$)。见图 1、表 5。

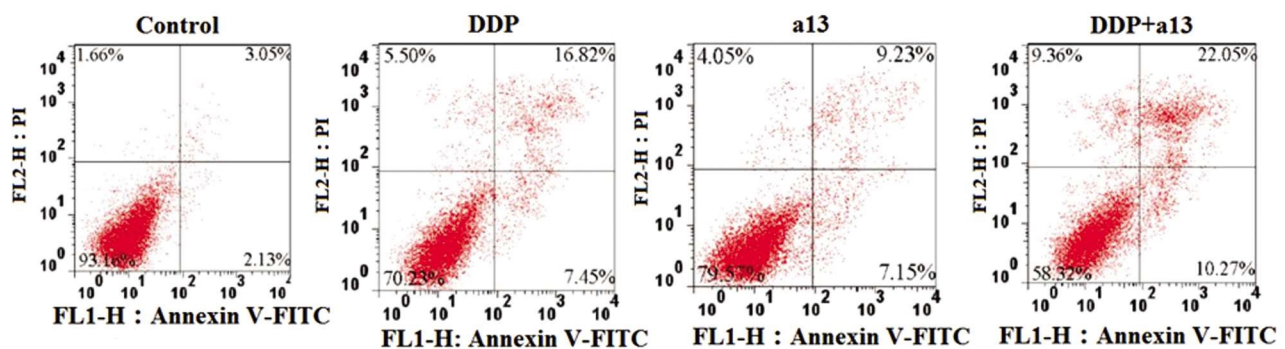


图 1 流式细胞仪检测黄腐酚类似物 a13 联合顺铂对宫颈癌 Hela 细胞凋亡的影响

Fig.1 Effect of xanthohumol analogue a13 combined with cisplatin on apoptosis of cervical cancer Hela cells detected by flow cytometry

表 5 各组细胞凋亡率的比较(%, $\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of apoptosis rate of cell in each group(%, $\bar{x} \pm s$)

Groups	Apoptosis rate
Control	5.18 $\pm$ 1.27
Cisplatin	24.27 $\pm$ 2.88 ^a
a13	16.38 $\pm$ 1.91 ^a
Cisplatin combined with a13	32.32 $\pm$ 3.31 ^{abc}
F	196.755
P	0.000

Note: compared with control group, ^a $P<0.05$. Compared with cisplatin group, ^b $P<0.05$. Compared with a13 group, ^c $P<0.05$.

2.5 黄腐酚类似物 a13 联合顺铂对宫颈癌 Hela 细胞中凋亡相关蛋白表达水平的影响

Western blot 检测 Hela 细胞中凋亡相关蛋白的表达情况, 结果显示, 与对照组比较, 顺铂组、a13 组和顺铂 +a13 组 Hela 细胞中 Cyt-C、Bax、Cleaved Caspase-3 和 Cleaved Caspase-9 蛋白表达水平均明显升高, 且顺铂 +a13 组高于顺铂组、a13 组 ($P<0.05$); 另外, 顺铂组、a13 组和顺铂 +a13 组 Hela 细胞中

Bcl-2 蛋白表达水平明显低于对照组 ($P<0.05$), 顺铂 +a13 组明显低于顺铂组、a13 组。见图 2、表 6。

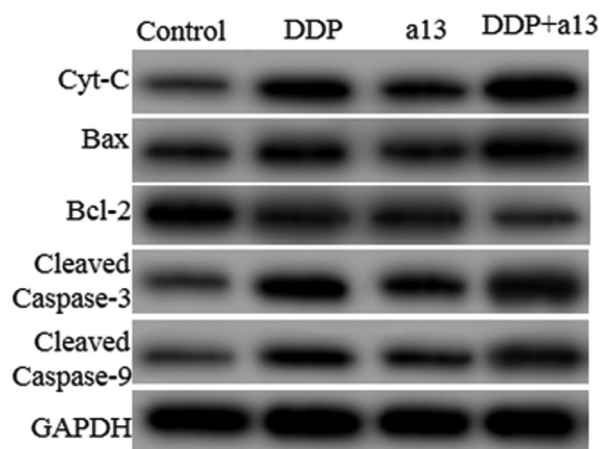


图 2 Western blot 检测黄腐酚类似物 a13 联合顺铂对宫颈癌 Hela 细胞中凋亡相关蛋白表达水平的影响

Fig.2 Western blot analysis of the effects of canthohumol analogue a13 combined with cisplatin on the expression levels of apoptosis-related proteins in cervical cancer Hela cells

表 6 各组细胞中 Cyt-C、Bax、Bcl-2、Cleaved Caspase-3 和 Cleaved Caspase-9 蛋白表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)Table 6 Comparison of protein expression levels of Cyt-C, Bax, Bcl-2, cleaved caspase-3 and cleaved caspase-9 in cells of each group($\bar{x} \pm s$)

Groups	Cyt-C	Bax	Bcl-2	Cleaved Caspase-3	Cleaved Caspase-9
Control	0.18± 0.02	0.26± 0.03	0.58± 0.04	0.15± 0.02	0.13± 0.02
Cisplatin	0.68± 0.04	0.57± 0.03 ^a	0.35± 0.03 ^a	0.66± 0.04 ^a	0.43± 0.03 ^a
a13	0.43± 0.03 ^a	0.40± 0.02 ^a	0.42± 0.03 ^a	0.45± 0.03 ^a	0.28± 0.03 ^a
Cisplatin combined with a13	0.92± 0.06 ^{abc}	0.81± 0.05 ^{abc}	0.24± 0.03 ^{abc}	0.85± 0.03 ^{abc}	0.58± 0.03 ^{abc}
F	563.215	429.447	169.884	852.868	435.484
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Note: compared with control group, ^a $P < 0.05$. Compared with cisplatin group, ^b $P < 0.05$. Compared with a13 group, ^c $P < 0.05$.

3 讨论

宫颈癌是全世界女性癌症相关死亡的第四大原因,化疗药物顺铂是一种小型铂基化合物,被认为是局部晚期宫颈癌或复发癌的标准疗法,但其应用受到与顺铂相关的不耐受性和严重不良反应的限制^[10-12]。因此,寻找和开发能够协同顺铂抑制宫颈癌细胞生长的药物对改善宫颈癌治疗现状具有重要意义。植物化学制剂是一种很有前途的协同化合物,具有潜在的抗癌作用^[13-15],故从天然植物中提取有效成分可能是研发新药和补充化疗治疗方案的重要途径。

黄腐酚是一种在酒花葎草花序中发现的重要的戊烯基类黄酮,具有广泛的化学预防和抗癌作用^[16,17]。有研究指出,黄腐酚可通过下调 HK2 和糖酵解对结直肠癌发挥抗肿瘤作用,还可增强顺铂对肺癌细胞生长的抑制作用^[18,19]。因黄腐酚的提取过程较为复杂,本研究前期以黄腐酚作为先导化合物,通过对其结构修饰及改造以得到生物活性更高的药物分子,进而便于设计合成具有抗肿瘤潜力的试剂。本研究结果显示,新合成的黄腐酚类似物 a8、a13、b11 和 b12 对宫颈癌 Hela 细胞增殖均有一定的抑制作用,其中 a13 的 IC₅₀ 值最小;另外, a13 与顺铂联合后 Hela 细胞存活率明显低于顺铂单独处理组,且 a13 对正常 MRC-5 细胞无明显毒性作用。结果表明,黄腐酚类似物 a13 可抑制宫颈癌 Hela 细胞增殖,并具有良好的顺铂增敏效果。

细胞周期进程减慢和诱导细胞凋亡是顺铂发挥抗肿瘤作用的重要机制^[20-22]。有研究指出,黄腐酚可通过调控细胞周期蛋白和 Bcl-2、Cyt-C 和 Bax 诱导食管鳞状细胞癌周期阻滞于 G0/G1 期并诱导细胞凋亡^[23],黄腐酚可促进顺铂诱导的肺癌细胞凋亡^[24]。本研究结果发现,与顺铂单独处理相比,新合成的黄腐酚类似物 a13 和顺铂联合干预后宫颈癌 Hela 细胞在 G0/G1 期所占百分比升高, G2/M 期细胞百分比明显降低。结果表明,新合成的黄腐酚类似物 a13 和顺铂可协同诱导 Hela 细胞周期阻滞于 G0/G1 期。另外,顺铂+a13 组中 Cyt-C、Bax、Cleaved Caspase-3 和 Cleaved Caspase-9 蛋白表达水平均高于顺铂组,而 Bcl-2 蛋白表达水平低于顺铂组。其中, Bax 和 Bcl-2 是 Bcl-2 家族成员, Bax 为促凋亡蛋白,可与自身形成同源二聚体促进细胞凋亡,还可通过促进线粒体中 Cyt-C 释放,激活参与细胞凋亡起始的 Cleaved Caspase-9,进一步激活凋亡执行因子 Cleaved Caspase-3 诱导细胞凋亡^[25-27]。Bcl-2 为抗凋亡蛋白,可

与 Bax 形成异源二聚体抑制细胞凋亡^[28-30]。这表明,黄腐酚类似物 a13 联合顺铂可通过共同调控线粒体凋亡通路协同诱导 Hela 细胞凋亡。

综上所述,黄腐酚类似物与顺铂联合可协同抑制宫颈癌 Hela 细胞增殖,表现良好的化疗增敏效果,其作用机制可能与阻滞细胞周期进程和调控凋亡相关蛋白表达促进细胞凋亡有关。本研究仅从细胞水平初步阐述了黄腐酚类似物对宫颈癌细胞的顺铂增敏作用,后续研究仍需进行体内动物实验,以进一步验证黄腐酚类似物抑制宫颈癌细胞增殖及顺铂增敏的效果,为黄腐酚类似物未来用于宫颈癌的临床治疗提供一定数据支持。

参考文献(References)

- [1] Pimple SA, Mishra GA. Global strategies for cervical cancer prevention and screening[J]. Minerva Ginecol, 2019, 71(4): 313-320
- [2] Feng CH, Mell LK, Sharabi AB, et al. Immunotherapy With Radiotherapy and Chemoradiotherapy for Cervical Cancer [J]. Semin Radiat Oncol, 2020, 30(4): 273-280
- [3] Gadducci A, Cosio S. Neoadjuvant Chemotherapy in Locally Advanced Cervical Cancer: Review of the Literature and Perspectives of Clinical Research[J]. Anticancer Res, 2020, 40(9): 4819-4828
- [4] Nakamura F, Seino M, Suzuki Y, et al. Successful management of cutaneous lymphangitis carcinomatosa arising from cervical cancer with paclitaxel-cisplatin and bevacizumab combination therapy: a case report and review of the literature [J]. J Med Case Rep, 2019, 13(1): 328
- [5] Chi R, Watt P, Wei W, et al. Inhibition of Kpnβ1 mediated nuclear import enhances cisplatin chemosensitivity in cervical cancer [J]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 106-106
- [6] Saito K, Matsuo Y, Imafuji H, et al. Xanthohumol inhibits angiogenesis by suppressing nuclear factor-κB activation in pancreatic cancer[J]. Cancer Sci, 2018, 109(1): 132-140
- [7] Gao F, Li M, Zhou L, et al. Xanthohumol targets the ERK1/2/Fra1 signaling axis to reduce cyclin D1 expression and inhibit non small cell lung cancer[J]. Oncol Rep, 2020, 44(4): 1365-1374
- [8] Yuan J, Peng G, Xiao G, et al. Xanthohumol suppresses glioblastoma via modulation of Hexokinase 2 -mediated glycolysis [J]. J Cancer, 2020, 11(14): 4047-4058
- [9] Wang T, Li W, Ye B, et al. FTO-stabilized lncRNA HOXC13-AS epigenetically upregulated FZD6 and activated Wnt/β-catenin signaling

- to drive cervical cancer proliferation, invasion, and EMT[J]. J BUON, 2021, 26(4): 1279-1291
- [10] 白海燕, 刘宇, 李小琴, 等. 单纯放疗与顺铂联合氟尿嘧啶同步放化疗治疗中晚期宫颈癌患者的临床效果比较[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(35): 6917-6920
- [11] 毛万丽, 李杰慧, 冉立. 宫颈癌顺铂耐药研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2021, 29(16): 2927-2932
- [12] 叶鑫鑫, 王亚军. P-糖蛋白与宫颈癌顺铂化疗耐药关系及相关机制的研究进展[J]. 海南医学, 2021, 32(10): 1305-1309
- [13] Buttar HS, Tuli HS, Aggarwal V, et al. Xanthohumol: A Metabolite with Promising Anti-Neoplastic Potential[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2021, 22(3): 418-432
- [14] Girisa S, Saikia Q, Bordoloi D, et al. Xanthohumol from Hop: Hope for cancer prevention and treatment [J]. IUBMB Life, 2021, 73(8): 1016-1044
- [15] Harish V, Haque E, Śmiech M, et al. Xanthohumol for Human Malignancies: Chemistry, Pharmacokinetics and Molecular Targets [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(9): 4478
- [16] 李晨龙, 李海宁, 郭红云, 等. 黄腐酚诱导非小细胞肺癌细胞凋亡的初步研究[J]. 解放军药学报, 2017, 33(2): 109-112, 179
- [17] Tuli HS, Aggarwal V, Parashar G, et al. Xanthohumol: A Metabolite with Promising Anti-Neoplastic Potential[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2022, 22(3): 418-432
- [18] Liu W, Li W, Liu H, et al. Xanthohumol inhibits colorectal cancer cells via downregulation of Hexokinases II-mediated glycolysis[J]. Int J Biol Sci, 2019, 15(11): 2497-2508
- [19] Long B, Parks E, Pacurari P, et al. Cytotoxic Effects of Xanthohumol and Its Combination with Cisplatin on Human Metastatic Lung Cancer H1299 Cells[J]. J Adv Med Res, 2019, 1(1): 1-15
- [20] Lv M, Zhuang X, Zhang Q, et al. Acetyl-11-keto- β -boswellic acid enhances the cisplatin sensitivity of non-small cell lung cancer cells through cell cycle arrest, apoptosis induction, and autophagy suppression via p21-dependent signaling pathway [J]. Cell Biol Toxicol, 2021, 37(2): 209-228
- [21] Hu X, Ma J, Vikash V, et al. Thymoquinone Augments Cisplatin-Induced Apoptosis on Esophageal Carcinoma Through Mitigating the Activation of JAK2/STAT3 Pathway [J]. Dig Dis Sci, 2018, 63(1): 126-134
- [22] Chen X, Zou H, Li H, et al. Weekly Versus Triweekly Cisplatin-Based Chemotherapy Concurrent With Radiotherapy in the Treatment of Cervical Cancer: A Meta-Analysis [J]. Int J Gynecol Cancer, 2017, 27(2): 344-349
- [23] Yin S, Song M, Zhao R, et al. Xanthohumol Inhibits the Growth of Keratin 18-Overexpressed Esophageal Squamous Cell Carcinoma in vitro and in vivo[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8(1): 366-366
- [24] Li CL, Zhang YD, Guo HY, et al. Effect of xanthohumol on cisplatin induced apoptosis of lung cancer cell line H1650 [J]. Chin J Cancer Prevent Treatment, 2017, 24(14): 960-965
- [25] Liu Z, Ding Y, Ye N, et al. Direct Activation of Bax Protein for Cancer Therapy[J]. Med Res Rev, 2016, 36(2): 313-341
- [26] Hafezi S, Rahmani M. Targeting BCL-2 in Cancer: Advances, Challenges, and Perspectives[J]. Cancers (Basel), 2021, 13(6): 1292
- [27] Feng Y, Chen X, Zheng Y, et al. Prognostic value and susceptibility of BAX rs4645878 polymorphism in cancer: A systematic review and meta-analysis[J]. Medicine (Baltimore), 2018, 97(29): e11591
- [28] 严浩, 蒋蕾, 刘力. 人乳头瘤病毒 16/18、Bcl-2 和 Survivin 在宫颈癌组织中的表达[J]. 新乡医学院学报, 2014, 31(11): 943-946
- [29] 魏璇, 杜雪, 李咏梅, 等. VEGF-C 诱导宫颈癌 Hela 细胞 Bcl-2、cyclin D1 的表达[J]. 实用预防医学, 2014, 21(2): 135-139
- [30] Wang Q, Zhang L, Yuan X, et al. The Relationship between the Bcl-2/Bax Proteins and the Mitochondria-Mediated Apoptosis Pathway in the Differentiation of Adipose-Derived Stromal Cells into Neurons[J]. Plos One, 2016, 11(10): e0163327-e0163327