

引用:何金秀,陈乙菲,魏毅,于若男,姜德.大黄䗪虫丸对宫颈癌细胞自噬与凋亡的作用及机制研究[J].中医药导报,2025,31(4):14-20.

大黄䗪虫丸对宫颈癌细胞自噬与凋亡的作用及机制研究^{*}

何金秀,陈乙菲,魏毅,于若男,姜德
(新疆医科大学中医学院,新疆 乌鲁木齐 830000)

[摘要] 目的:探讨大黄䗪虫丸(DHZCW)对宫颈癌细胞自噬与凋亡的作用及机制。方法:通过网络药理学方法预测大黄䗪虫丸治疗宫颈癌的作用靶点和信号通路,并进行细胞实验验证,将Hela细胞按不同实验目的设空白对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组及顺铂组,使用CCK-8法、划痕实验、JC-1染色、流式细胞术、透射电镜观察、蛋白免疫印迹法等检测方法检测大黄䗪虫丸对宫颈癌细胞自噬与凋亡的作用及其机制。结果:(1)网络药理:大黄䗪虫丸-宫颈癌核心作用靶点90个,核心10个靶点;(2)细胞实验:与空白对照组比较,低、中、高剂量组抑制了Hela细胞的增殖活性和细胞迁移能力,能够诱导线粒体膜电位下降和促进细胞凋亡;与空白对照组比较,随着大黄䗪虫丸剂量的增加,线粒体形态显著改变,由正常的线粒体到大量肿胀,线粒体嵴减少,直至出现线粒体膜破裂和消失、线粒体空泡化和凋亡小体;与空白对照组比较,低、高剂量组Beclin1和Bcl-2蛋白表达水平下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$),Bax蛋白表达水平升高($P<0.01$),同时低、中、高剂量组Bax/Bcl-2比值水平均高于空白对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与空白对照组比较,低、中、高剂量组LC3B-II/I蛋白表达水平均升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与空白对照组比较,高剂量组cleaved Caspase-3蛋白水平升高($P<0.01$)。结论:大黄䗪虫丸可以抑制Hela细胞自噬而促进凋亡,作用效果呈剂量效应关系。

[关键词] 宫颈癌;Hela细胞;大黄䗪虫丸;细胞自噬;细胞凋亡

[中图分类号] R285.5;R737.33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2025)04-0014-07

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.04.003

The Effect of Dahuang Zhechong Wan on Autophagy and Apoptosis of Cervical Cancer Cells

HE Jinxiu, CHEN Yifei, WEI Yi, YU Ruonan, JIANG De

(School of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang 830000, China)

[Abstract] Objective: To investigate the mechanism of Dahuang Zhechong Wan (DHZCW) in inducing autophagy and apoptosis in cervical cancer cells. Methods: Network pharmacology was used to predict the targets and signaling pathways of DHZCW in the treatment of cervical cancer, and they were validated through cellular experiments. Hela cells were divided into blank control group, low dose group, medium dose group, high dose group and cisplatin group according to different experimental purposes. CCK-8 assay, scratch test, JC-1 staining, flow cytometry, transmission electron microscopy, and protein immunoblotting were applied to detect the effect and mechanism of DHZCW on autophagy and apoptosis of cervical cancer cells. Results: (1)Network pharmacology: DHZCW had 90 core targets in cervical cancer, with 10 core targets. (2)Cellular experiments: Compared with the blank control group, low, medium, and high dose groups inhibited the proliferation and viability of Hela cells and impaired cell migration. They could induce a decrease in mitochondrial membrane potential and promote cell apoptosis. With the increase in the dose of DHZCW, there was a significant change in the morphology of mitochondria, from normal mitochondria to large swollen ones with fewer cristae, until the appearance of broken mitochondrial membrane, vacuolization, and apoptotic bodies. Compared with the blank control group, the expression levels of Beclin1 and Bcl-2 proteins decreased in low and high dose groups ($P<0.05$ or $P<0.01$), while the expression level of Bax protein increased ($P<0.01$). At the same time, low, medium and high dose groups showed higher Bax/Bcl-2 ratio than blank control group ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared

*基金项目:省部共建中亚高发病成因与防治国家重点实验室开放课题(SKL-HIDCA-2021-ZY1);国家中医药管理局全国名中医周铭心传承工作室建设项目(国中医药办人教函[2018]119号);新疆维吾尔自治区重大科技专项项目(2022A03019)

通信作者:姜德,男,教授,主任医师,研究方向为西北燥证与相关性疾病防治研究

with the blank control group, the expression levels of LC3B-II/I protein increased in low, medium and high dose groups ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with the blank control group, the levels of cleaved Caspase-3 protein increased in high dose group ($P<0.01$). Conclusion: DHZCW can inhibit autophagy in Hela cells and promote apoptosis, with a dose-dependent effect.

[Keywords] cervical cancer; Hela cells; Dahuang Zhechong Wan; autophagy; apoptosis

宫颈癌(cervical cancer, CC)是女性常见恶性肿瘤^[1],其99.7%病例源自高危型人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)持续感染^[2]。宫颈癌治疗常用手术、放疗、化疗,疗效显著,然复发与转移仍为主要致死原因^[3]。肿瘤细胞的活性变化及其侵袭转移能力是影响治疗预后的关键因素。调控细胞活性、抑制其恶性行为,能够有效杀灭肿瘤细胞,从而改善治疗效果^[4]。肿瘤细胞的自噬与凋亡均属于程序性细胞死亡,而肿瘤细胞可能通过线粒体自噬逃避凋亡,导致治疗困难和耐药^[5]。研究^[6-7]表明,许多中药在调节细胞自噬、诱导细胞凋亡、抑制细胞增殖和降低宫颈癌耐药性方面等具有显著优势。

中医学对宫颈癌的认识主要见于“癥瘕”“石瘕”等论述中,主要病机为气滞、血瘀、痰湿、毒邪等蕴结胞宫,日久酿为癌毒,致冲任失调,带脉失约,内生癌肿,发为此病^[8]。大黄䗪虫丸(DHZCW)是张仲景抗癌三方瑰宝之一,具化瘀生新、缓中补虚之效,为中医药抗癌领域之经典。其中大黄攻瘀凉血,黄芩助除瘀热;桃仁、干漆及虫类药等活血通络,攻逐瘀血;杏仁降气、润燥;生地黄、芍药养血滋阴;甘草调和诸药,补虚和中。DHZCW虽具有治疗妇科相关疾病的临床实践^[9-10],但对宫颈癌内容甚少。为进一步研究DHZCW治疗宫颈癌的价值,本研究进行网络药理学及体外细胞实验探究DHZCW对宫颈癌的作用及机制。

1 材料

1.1 细胞 人宫颈癌Hela细胞系来自于新疆医科大学实验室。

1.2 药物、试剂和仪器

1.2.1 药物 DHZCW中成药购自北京同仁堂(国药准字号:Z11020002),剥去DHZCW丸衣,药材置于干净的玻璃烧杯中,加入10倍蒸馏水充分浸泡30 min,超声溶解,0.45 μ m滤膜过滤,用旋转蒸发仪提纯,用烘干机烘干、磨粉,回收至无菌冻存管并称量,置于-80 $^{\circ}$ C冰箱中保存。

1.2.2 主要试剂 DMEM培养基(美国Gibco公司,批号:31600034);BI胎牛血清(以色列生物科技公司,批号:04-001);胰酶(美国cytiva公司,批号:SSH30042.01);青霉素-链霉素双抗(美国cytiva公司,批号:V30010);JC-1线粒体膜电位检测试剂盒(北京索莱宝公司,批号:M8650);兔源性LC3B抗体(英国Abcam公司,批号:ab192890);Beclin1抗体(英国Abcam公司,ab207612);活性半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cleaved Caspase-3)抗体(英国Abcam公司,批号:ab214430);兔源性Bcl-2抗体(江苏亲科生物,批号:AF6139,AF7022);电镜固定液(武汉赛维尔生物,批号:G1102)。

1.2.3 主要仪器 Tanon 4600系列全自动化学发光/荧光图像分析系统(上海天能科技有限公司);PowerPacTM基础电泳仪(美国Bio-Rad公司);DxFLEX流式细胞仪(美国Beckman

Coulter公司);倒置荧光显微镜(德国徕卡,DMi8)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 DHZCW与宫颈癌相关靶点 通过中医药系统药理学平台(TCMSP)、BATMAN-TCM数据库和文献检索查询12味中药(熟大黄、桃仁、苦杏仁、黄芩、地黄、白芍、甘草、土鳖虫、水蛭、虻虫、蛴螬和干漆)的有效化学成分,TCMSP根据药代力学参数($OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$)进行活性成分筛选并获得与化合物作用的靶蛋白,进而得到所有药靶基因。整合GeneCards、TTD、DisGenet及OMIM等数据库资源,筛选并确认宫颈癌的潜在基因靶点。利用Venny 2.1.0在线工具,分析DHZCW的靶标与宫颈癌相关靶点的共同交集。将结果导入String平台,构建详尽的蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络图。使用Cytoscape软件的CytoNCA插件对PPI网络进行网络拓扑学分析,筛选核心靶点。使用Metascape网站进行KEGG和GO富集分析,最后使用Cytoscape构建信号通路-作用靶点网络关系图。

2.1.2 分子对接 将主要药物活性成分及筛选出的核心靶点进行分子对接,分别从PubChem数据(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)、PDB(<http://www.rcsb.org>)数据库获取活性成分、靶蛋白3D结构,使用AutoDock软件进行分子对接,PyMOL软件进行数据可视化处理。

2.2 细胞实验

2.2.1 细胞培养及分组 用DMEM完全培养基培养Hela细胞,在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂条件下细胞培养箱常规培养,待细胞生长状态良好且融合至80%左右,用胰蛋白酶消化细胞,传代后进行后续实验。细胞分组设置:空白对照组,低剂量组(1/4 IC₅₀ mg/mL),中剂量组(1/2 IC₅₀ mg/mL),高剂量组(IC₅₀ mg/mL),顺铂组(2 μ g/mL^[11])。

2.2.2 细胞增殖能力检测 取对数生长期细胞,调整细胞密度为 5×10^3 个/mL,以每孔100 μ L接种于96孔板,培养24 h后,弃去培养基,分为空白对照组、DHZCW给药组。分别加入不同剂量的DHZCW(0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、4.0、8.0 mg/mL),每组设置6个复孔,培养24 h后,每孔100 μ L加入含10% CCK8完全培养液,避光孵育1~4 h,于酶标仪450 nm处测定各孔吸光度(A),并计算半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC₅₀)及细胞活力。细胞活力=对照组A值-实验组A值/对照组A值×100%。

2.2.3 细胞划痕实验 将各组细胞接种于24孔板中,待细胞铺满培养皿后用10 μ L移液枪头沿中线在每孔垂直划痕,洗去不贴壁的细胞,更换新鲜5%血清培养基。按实验分组给药处理后,将细胞放入37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱,继续培养24 h后显微镜下观察细胞迁移情况,计算划痕愈合率。使用Image J软件测量划痕面积,计算细胞迁移率。细胞迁移率=(1-24 h划痕面积/0 h划痕面积)×100%。

2.2.4 细胞凋亡检测 采用流式细胞术检测。将对数生长期的Hela细胞接种于6孔板中,每孔含 5×10^5 个细胞,每组设3个复孔。按实验分组给药处理后,培养24 h,收集细胞。以预冷磷酸盐缓冲液洗涤后重悬细胞,采用细胞凋亡检测试剂盒中的Annexin V-FITC标记,避光、室温孵育15 min,以PI染色后上机检测细胞凋亡率。

2.2.5 线粒体膜电位检测 采用JC-1染色和荧光倒置显微镜观察并检测。将对数生长期的Hela细胞接种于24孔板中,每孔含 5×10^5 个细胞,每组设3个复孔。培养24 h,按实验分组给药处理后采用JC-1线粒体膜电位检测试剂盒检测细胞中红绿荧光并拍照,用Image J软件分析荧光强度。以红/绿荧光强度的比值表示细胞去极化程度,比值越高说明膜电位高。

2.2.6 细胞自噬与凋亡病理观察 采用透射电镜观察。将对数生长期的Hela细胞接种于6孔板细胞培养皿中,每孔含 5×10^6 个细胞,每组设3个复孔。按实验分组给药处理后,培养24 h,其培养基加入2.5%的戊二醛固定液固定细胞,观察细胞线粒体形态、自噬和凋亡的情况,并拍照。

2.2.7 细胞中自噬与凋亡相关蛋白表达水平检测 采用Western blotting法检测。将对数生长期的Hela细胞接种于6孔板中,每孔含 5×10^6 个细胞,每组设3个复孔。按实验分组给药处理后,培养24 h,提取细胞总蛋白并以BCA法测定蛋白浓度后,取适量蛋白样本进行SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳)。电泳结束后依次转膜,封闭,加入LC3B、Bcl-2、cleaved Caspase-3和Beclin1(稀释度均为1:2 000),Bax和 β -actin(稀释度均为1:5 000)4 ℃摇床孵育过夜;加入辣根过氧化物酶标记的二抗(稀释度为1:5 000),室温摇床孵育1 h;洗膜后曝光,在化学发光成像系统中成像、扫描。采用Image J软件对目标条带进行灰度值量化分析, β -actin作为内参标准,以评估目的蛋白的相对表达水平。

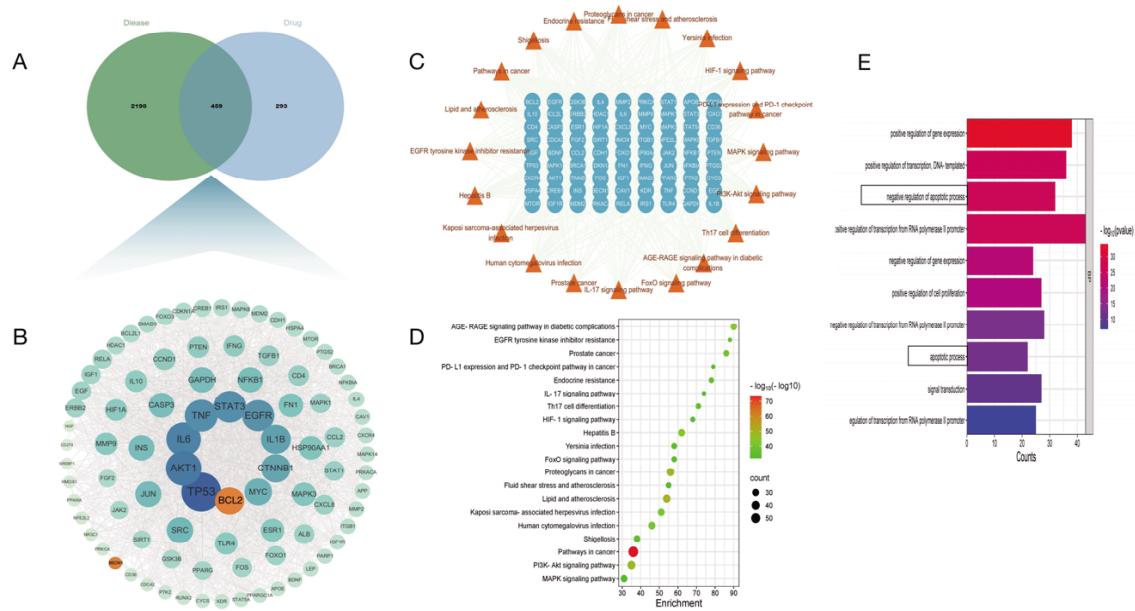
2.3 统计学方法 采用Image J与GraphPad Prism 10软件处理数据、进行图表绘制。计量资料以“均数±标准差”($\bar{x}\pm s$)表示,符合正态分布者,多组比较使用单因素或多因素方差分析,两组比较采用LSD法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结 果

3.1 DHZCW治疗宫颈癌的网络药理学分析

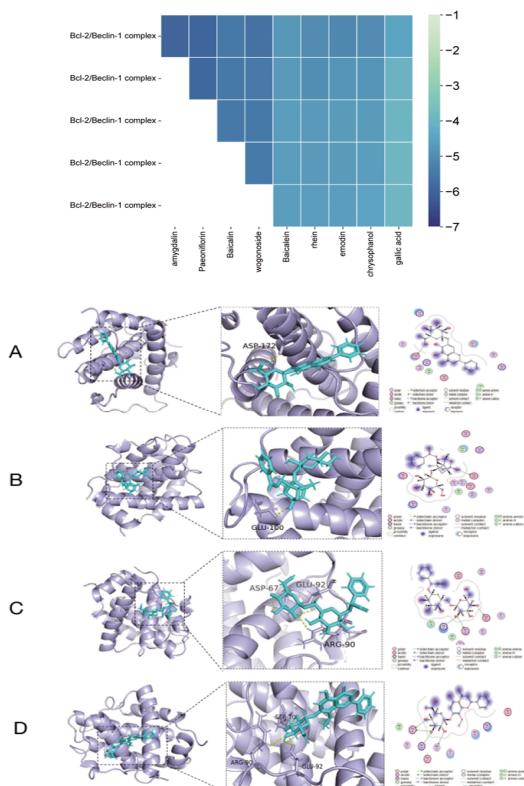
3.1.1 DHZCW与宫颈癌相关靶点 DHZCW所含12种中药,与宫颈癌相关的有效成分有230种,通过取交叉点,获得459个DHZCW治疗宫颈癌的靶标(图1A)。对这些交叉靶点进行拓扑分析,并筛选出核心作用靶点90个(图1B),按度值排序,显示前10个核心靶点,分别是TP53、Akt1、IL-6、TNF、STAT3、EGFR、IL-1 β 、CTNNB1、MYC、Bcl-2。进一步进行KEGG和GO富集分析,KEGG富集分析显示癌症、PI3K-Akt、丝裂原活化蛋白激酶信号通路(MAPKs)、EGFR酪氨酸激酶抑制剂抵抗(EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance)、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染(Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection)、低氧诱导因子-1信号通路(HIF-1)等途径是治疗的关键途径(图1C、1D)。GO分析确定凋亡过程是治疗宫颈癌的关键生物过程(图1E)。以上网络药理学分析表明,DHZCW可能通过调节多通路途径控制凋亡过程来干预宫颈癌的发生发展。

3.1.2 分子对接 将DHZCW主要活性成分与Bcl-2/Beclin1复合物进行分子对接,对接结果显示,baicalin(黄芩苷)、paeoniflorin(芍药苷)、amygdalin(苦杏仁苷)、wogonoside(汉黄芩苷)、rhein(大黄酸)、emodin(大黄素)和chrysophanol(大黄酚)的结合能均 <-5.0 kJ/mol,结合能见图8。通常认为配体和受体结合能数值越低,其对接能力越好,评估结合性良好一般以结合能 <-5.0 kJ/mol(约为-1.2 kcal/mol)为标准。最后选择结合能选取结合最好的4组进行对接模式分析作图。(见图2)



注:A.DHZCW的相关靶点与宫颈癌相关靶点之间的交叉靶点;B.交叉点目标之间的PPI网络;C.核心作用靶点与KEGG富集信号通路;D.KEGG富集分析气泡图;E.GO分析DHZCW治疗宫颈癌的十大生物学过程。

图1 DHZCW治疗宫颈癌相关靶点及通路途径

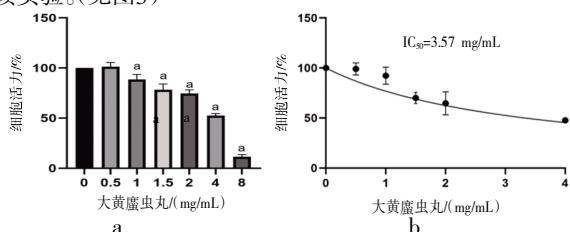


注:A.baicalin;B.paeoniflorin;C.amygdalin;D.wogonoside。

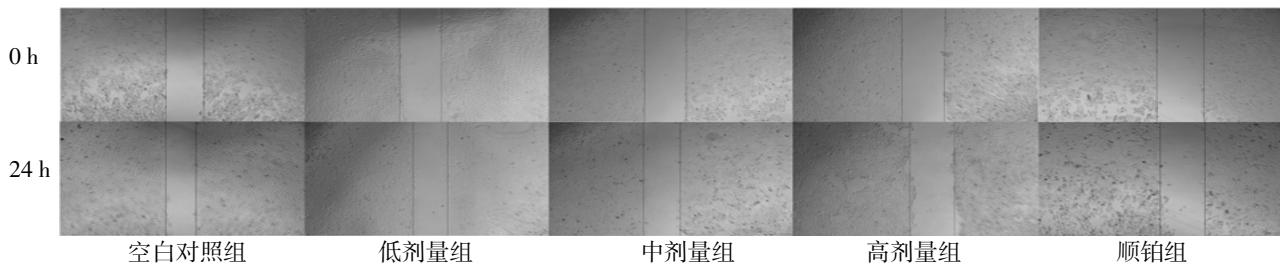
图2 分子对接及结合能色阶图

3.2 细胞实验

3.2.1 DHZCW对Hela细胞增殖的影响 通过CCK-8验证DHZCW对Hela细胞增殖的影响,不同浓度(0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、4.0、8.0 mg/mL)的DHZCW处理细胞24 h后,细胞活力分别为100.00%、99.00%、92.33%、70.00%、64.67%、47.67%、3.33%,表明DHZCW对Hela细胞增殖的抑制具有剂量依赖性。其IC₅₀为357 mg/mL。基于以上结果,选择DHZCW 1/4 IC₅₀(1.0 mg/mL)、1/2 IC₅₀(2.0 mg/mL)、IC₅₀(4.0 mg/mL)作为低、中、高剂量组用于后续实验。(见图3)

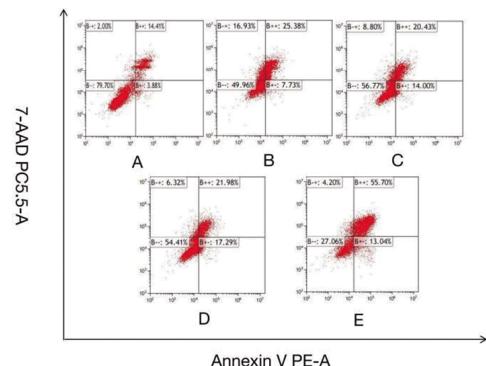


注:a.DHZCW对Hela细胞增殖能力影响;b.DHZCW对Hela细胞IC₅₀的影响;与空白对照组比较,^aP<0.01。

图2 DHZCW对Hela细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)图4 各组Hela细胞0 h、24 h划痕愈合情况 ($\times 4$)

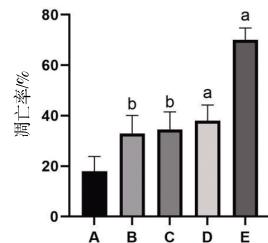
3.2.2 DHZCW对Hela细胞迁移能力的影响 与空白对照组比较,随着DHZCW剂量增加,缺口处肿瘤细胞覆盖面积减少。24 h后的细胞平均愈合率分别为:空白对照组(22.74±1.86)%、低剂量组(18.44±6.28)%、中剂量组(13.89±1.64)%、高剂量组(9.17±0.64)%和顺铂组(5.63±0.30)%。细胞划痕愈合率明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$),提示DHZCW能够抑制Hela细胞的迁移。(见图4)

3.2.3 DHZCW对Hela细胞凋亡的影响 流式细胞术检测显示,DHZCW干预后的细胞凋亡率显著升高,空白对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组和顺铂组的细胞凋亡率均值分别为(17.98±5.83)%、(32.97±7.14)%、(34.55±6.94)%、(37.99±6.22)%和(70.08±4.71)%。低、中、高剂量组和高剂量组细胞凋亡率均高于空白对照组($P<0.05$),以上结果表明,DHZCW能够诱导Hela细胞凋亡。(见图5~6)



注:A.空白对照组;B.低剂量组;C.中剂量组;D.高剂量组;E.顺铂组。

图5 各组Hela细胞凋亡流式图

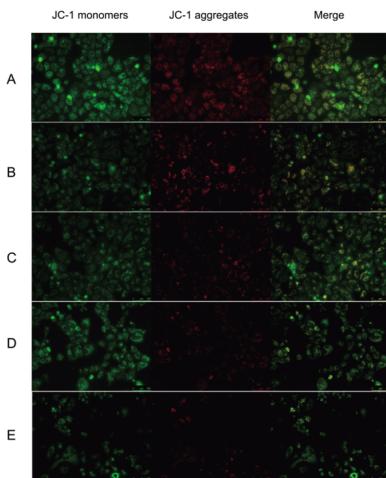


注:A.空白对照组;B.低剂量组;C.中剂量组;D.高剂量组;E.顺铂组。与空白对照组比较,^aP<0.01,^bP<0.05。

图6 各组Hela细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

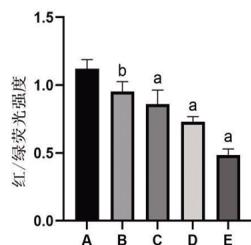
3.2.4 DHZCW对Hela细胞线粒体膜电位的影响 细胞线粒体膜电位(Mitochondrial membrane potential, $\Delta\phi_m$)结果显示,对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组、顺铂组细胞中红绿荧光强度比值依次为(1.12±0.07)、(0.95±0.07)、(0.86±0.10)、

(0.73±0.04)、(0.49±0.04)；与对照组比较，低中高剂量组细胞红绿荧光强度比值逐渐降低，反映 $\Delta\phi_m$ 随剂量增加而递减，差异有统计学意义($P<0.05$)。(见图7~8)



注：A.空白对照组；B.低剂量组；C.中剂量组；D.高剂量组；E.顺铂组。

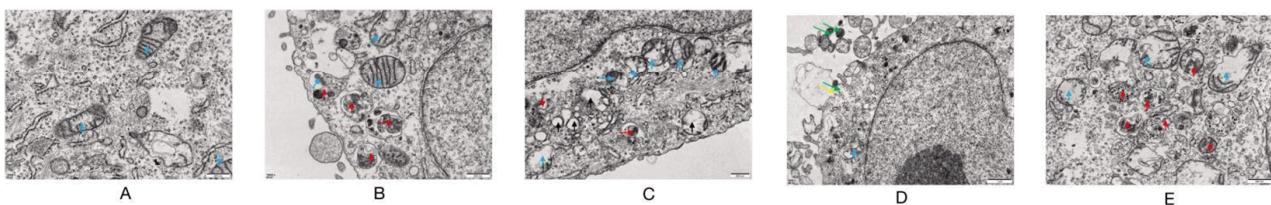
图7 各组HeLa细胞线粒体膜电位荧光图



注：A.空白对照组；B.低剂量组；C.中剂量组；D.高剂量组；E.顺铂组。与空白对照组比较，^a $P<0.01$ ，^b $P<0.05$ 。

图8 各组HeLa细胞红绿荧光强度值比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.2.5 DHZCW对HeLa细胞线粒体形态及自噬和凋亡的影



注：A.空白对照组；B.低剂量组；C.中剂量组；D.高剂量组；E.顺铂组。蓝色箭头：线粒体；红色箭头：溶酶体；黑色箭头：线粒体空泡化；绿色箭头：凋亡小体。

图9 各组HeLa细胞线粒体形态及自噬和凋亡的透射电镜显微图 ($\times 10000$)

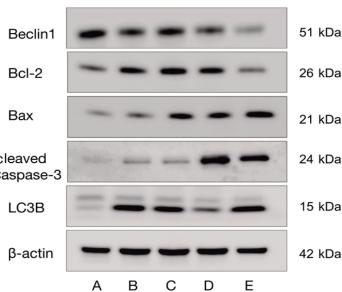
表1 各组HeLa细胞中Beclin1、Bcl-2、Bax、LC3B、cleaved Caspase-3蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Beclin1/β-actin	Bcl-2/β-actin	Bax/β-actin	Bax/Bcl-2	LC3B-II/I	cleaved Caspase-3/β-actin
空白对照组	3	1.00±0.04	0.98±0.03	0.48±0.01	0.49±0.02	0.19±0.03	0.07±0.02
低剂量组	3	0.65±0.06 ^b	0.81±0.10 ^a	0.58±0.09 ^b	0.71±0.11 ^a	1.06±0.09 ^b	0.15±0.09
中剂量组	3	0.87±0.05	0.97±0.02	0.78±0.07 ^b	0.80±0.08 ^a	1.20±0.17 ^b	0.21±0.12
高剂量组	3	0.66±0.02 ^b	0.75±0.03 ^b	0.77±0.07 ^b	1.04±0.13 ^b	0.97±0.19 ^a	0.87±0.06 ^b
顺铂组	3	0.72±0.13 ^b	0.72±0.14 ^b	1.11±0.10 ^b	1.57±0.17 ^b	1.77±0.54 ^b	0.55±0.18 ^b
F		14.055	10.427	81.232	47.653	13.230	47.221
P		0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000

注：与空白对照组比较，^a $P<0.05$ ，^b $P<0.01$ 。

响 与空白对照组比较，低剂量组少量线粒体肿胀，嵴结构模糊、断裂或减少，大量自噬溶酶体，且图中可见溶酶体吞噬线粒体；中剂量组线粒体大部分明显肿胀、变圆，膜内基质溶解，嵴减少，有的线粒体膜破裂，出现线粒体空泡，少量自噬溶酶体；高剂量组细胞损伤严重，存在凋亡征象，细胞内有空泡化，见凋亡小体，细胞膜破裂，核固缩、崩解，线粒体消失；顺铂组细胞大量线粒体肿胀，嵴结构模糊或减少，胞质内还可见大量自噬溶酶体。(见图9)

3.2.6 DHZCW对HeLa细胞中Beclin1、Bcl-2、Bax、LC3B、cleaved Caspase-3蛋白表达的影响 与空白对照组比较，低、高剂量组Beclin1和Bcl-2蛋白表达水平下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，Bax蛋白表达水平均升高($P<0.01$)，同时低、中、高剂量组Bax/Bcl-2比值均高于空白对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与空白对照组比较，低、中、高剂量组LC3B-II/I蛋白表达水平均升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与空白对照组比较，高剂量组cleaved Caspase-3蛋白水平升高($P<0.01$)。(见表1、图10)



注：A.空白对照组；B.低剂量组；C.中剂量组；D.高剂量组；E.顺铂组。

图10 HeLa细胞中Beclin1、Bcl-2、Bax、cleaved Caspase-3、LC3B蛋白表达Western blotting图

4 讨 论

DHZCW广泛应用于治疗肝癌、胃癌、胰腺癌、宫颈癌、子

宫肌瘤等,可显著提高患者生活质量,减缓肿瘤的发展^[1]。黄芩素、黄芩苷、芍药苷、苦杏仁苷、大黄酚和甘草苷等成分为DHZCW的主要成分($r>0.99$)^[12]。其中黄芩素可以抑制喉癌细胞侵袭和诱导凋亡^[13],通过调节p38 MAPK途径诱导HeLa细胞凋亡^[14]。黄芩苷可通过下调Bcl-2,上调Bax蛋白水平诱导人肝癌HepG-2细胞和人宫颈癌HeLa凋亡^[15-16]。芍药苷能够通过抑制Bcl-2蛋白表达,上调Beclin1蛋白的表达抑制结肠癌SW480细胞增殖、侵袭和迁移^[17]。此外,芍药苷还可以通过抑制Hedgehog/GII通路抑制细胞外信号调节激酶(ERK)和基质金属蛋白酶(MMPs)的表达,提高Bax/Bcl-2比值,促进细胞色素C释放^[18]。苦杏仁苷可诱导促自噬基因Beclin1和LC3,抑制mTOR和Bcl-2抗凋亡基因^[19]等。因此DHZCW抗肿瘤机制主要涉及诱导细胞周期停滞、细胞凋亡和自噬,以及抑制肿瘤细胞增殖、阻碍血管生成和转移、增强免疫力和逆转多药耐药性^[20]。网络药理结果显示,前10个核心靶点分别为TP53、Akt1、IL-6、TNF、STAT3、EGFR、IL-1 β 、CTNNB1、MYC、Bcl-2;GO分析确定凋亡过程是治疗宫颈癌的关键生物过程。笔者将DHZCW中核心活性成分与关键靶点进行了分子对接,结果证实了各成分与Bcl-2/Beclin1复合体间稳定对接。由此笔者推测DHZCW可能通过介导Bcl-2与Beclin1之间的相互作用,促进Bcl-2与Beclin1结合形成Bcl-2/Beclin1复合物,进而调控细胞的自噬与凋亡过程,展现出其作为潜在治疗靶点的复杂而重要的生物学功能。

肿瘤细胞的自噬与凋亡均属于程序性细胞死亡。正常情况下,细胞内自噬和凋亡水平处于平衡状态^[21],一般自噬过程先于细胞凋亡启动,当应激超过一个临界持续时间或一个强度阈值时,凋亡程序被激活。部分观点认为自噬是凋亡的引导机制,自噬受到抑制时,对凋亡的发生有着促进作用^[22]。本研究中透射电镜结果显示,随着DHZCW剂量的增加,细胞内出现较多线粒体肿胀及嵴减少断裂,自噬溶酶体增加;中、高剂量作用下可见粒体膜破裂、凋亡现象出现和凋亡小体增加,这提示随着DHZCW剂量增加细胞内生物过程是由自噬到凋亡。随着DHZCW剂量的增加,细胞内的生物过程经历了从早期自噬应激(旨在保护细胞免受损伤)向晚期细胞凋亡的转变。 $\Delta\phi_m$ 降低标志细胞凋亡级联反应开始,其崩溃预示凋亡程序不可逆启动。在本研究中,利用荧光倒置显微镜观测到的现象揭示,不同浓度梯度的DHZCW(低、中、高剂量)均能触发 $\Delta\phi_m$ 的显著降低,且此效应随剂量递增而加剧,尤以高剂量组为甚。进一步通过流式细胞技术验证,高剂量DHZCW展现出更为显著的促细胞凋亡活性。据此推测,DHZCW诱导的细胞凋亡机制与其介导的 $\Delta\phi_m$ 下降紧密关联,表明DHZCW可经线粒体途径有效促进细胞凋亡过程。

在细胞自噬和凋亡的错综复杂的关系中,Bcl-2/Beclin1复合体作为调控枢纽^[23],调控细胞命运,引导其选择自噬途径或触发凋亡机制。自噬信号Beclin1与线粒体凋亡信号Bax/Bcl-2之间存在交叉^[24]。Beclin1的BH3域与Bcl-2结合,构成Bcl-2/Beclin1复合体。此复合体抑制Bax与Bcl-2的结合,进而提升Bax/Bcl-2比值。Bax高表达时,会促进caspase对Beclin1的剪切,降低Beclin1水平,进一步降低自噬通量^[25-26]。(见图9)

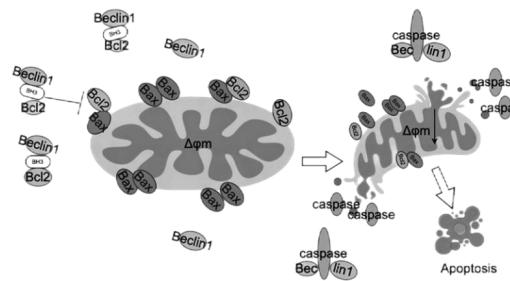


图9 Beclin1与Bcl-2结合机制图

因此,Bcl-2/Beclin1复合体在调控细胞自噬与凋亡的转归中起着关键作用。Western blotting检测结果显示,DHZCW各剂量组LC3B-II/I蛋白表达水平总体呈上调趋势,但在高剂量组出现下调;同时,Beclin1和Bcl-2的蛋白表达水平呈下调趋势,而Bax蛋白表达显著上调,导致Bax/Bcl-2蛋白表达比值升高。此外,cleaved Caspase-3的蛋白表达在高剂量组显著上调,这些结果与先前的研究一致。综合以上发现,研究结果表明,随着DHZCW剂量的增加,细胞自噬受到抑制,而线粒体损伤促凋亡蛋白释放,cleaved Caspase-3活化。DHZCW能促进细胞凋亡,从而达到抑制肿瘤细胞的作用。

综上所述,DHZCW可抑制HeLa细胞的增殖活性和细胞迁移能力,可能作用机制内促进Bcl-2和Beclin1形成Bcl-2/Beclin1复合物从而调控细胞自噬与凋亡。作用效果呈剂量效应关系。

参考文献

- [1] MARTH C, LANDONI F, MAHNER S, et al. Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up[J]. Ann Oncol, 2017, 28(suppl4): iv72-iv83.
- [2] BURMEISTER C A, KHAN S F, SCH?FER G, et al. Cervical cancer therapies: Current challenges and future perspectives[J]. Tumour Virus Res, 2022, 13:200238.
- [3] DUAN Y Q, YANG L, WANG W X, et al. A comprehensive bibliometric analysis (2000–2022) on the mapping of knowledge regarding immunotherapeutic treatments for advanced, recurrent, or metastatic cervical cancer [J]. Front Pharmacol, 2024, 15:1351363.
- [4] 于盼盼,杨萍,孙倩玉,等.宫颈癌组织GSTO1的表达与宫颈癌预后的相关性分析及其N-糖基化对宫颈癌恶性生物学行为的影响[J].安徽医科大学学报,2023,58(12):2002-2010.
- [5] TANGY C, WANG L M, QIN J J, et al. Targeting mitophagy to promote apoptosis is a potential therapeutic strategy for cancer[J]. Autophagy, 2023, 19(3):1031-1033.
- [6] TAO T, ZHANG P, ZENG Z, et al. Advances in autophagy modulation of natural products in cervical cancer[J]. J Ethnopharmacol, 2023, 314:116575.
- [7] 胡越,王林枫,李玥,等.软坚散结中药抗肿瘤作用机制研究进展[J/OL].中国实验方剂学杂志:1-18[2024-06-25]. <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20241128>.

[8] 陈怡,李道成.子宫颈癌患者的中医中药治疗[J].中国实用妇科与产科杂志,2024,40(1):45-49.

[9] 王子承,王海波,王颖,等.“虚劳干血”理论指导下复元活血汤合大黄蛰虫丸对乳腺癌癌因性疲乏的干预效果研究[J/OL].中华中医药学刊,2024:1-8.(2024-05-07).https://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20240506.1139.010.html.

[10] 彭皇青,边庆华,陈荣荣.桂枝茯苓丸联合大黄蛰虫丸治疗卵巢囊肿的临床疗效[J].检验医学与临床,2023,20(3):383-386.

[11] TIAN Y Y, MA B B, YU S Y, et al. Clinical antitumor application and pharmacological mechanisms of Dahuang Zhechong Pill[J]. Chin Herb Med, 2023, 15(2): 169-180.

[12] 刘丽,王建成,韩庆霞,等.UPLC-MS/MS测定大黄蛰虫丸中的9种成分[J].食品与药品,2023,25(5):426-431.

[13] 王剑,孙永东,周兴玮,等.黄芩素经由miR-125b-5p/IRF4轴进而促进喉癌细胞死亡并抑制其侵袭的机制研究[J].中国临床药理学与治疗学,2023,28(11):1209-1218.

[14] LUO Y H, ZHANG L, WANG M Y, et al. Anti-cancer effects of baicalein on cervical carcinoma cells through down-regulation of the ERK/p38/MAPK pathway[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2021, 35(3): 945-952.

[15] 谢燕华,康超,缑娇,等.黄芩苷诱导人肝癌HepG-2细胞凋亡及对Bcl-2和Bax蛋白表达的影响[J].陕西中医药大学学报,2023,46(5):78-82.

[16] 熊梦雨.黄芩苷通过HPVE6/E7调控Wnt3a/β-catenin通路影响宫颈癌HeLa细胞的研究[D].十堰:湖北医药学院,2023.

[17] 司晓丽,韩玉梅,王家敏,等.芍药苷对结肠癌SW480细胞增殖、侵袭、迁移的影响[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2019,28(2):127-133.

[18] 张璐,林鹏,杨玉,等.芍药苷抗肿瘤作用机制的研究进展[J].癌变·畸变·突变,2024,36(2):164-167.

[19] EL-SEWEDYT, SALAMA A F, MOHAMED A E, et al. Hepatocellular carcinoma cells: Activity of amygdalin and sorafenib in targeting AMPK/mTOR and BCL-2 for anti-angiogenesis and apoptosis cell death[J]. BMC Complement Med Ther, 2023, 23(1): 329.

[20] FOLKERTS H, HILGENDORF S, VELLENGA E, et al. The multifaceted role of autophagy in cancer and the microenvironment[J]. Med Res Rev, 2019, 39(2): 517-560.

[21] 徐明瑶,谢胜,黎丽群,等.自噬-凋亡平衡调控在结直肠癌中的作用及中药干预研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2023,29(23):207-217.

[22] MARIÑO G, NISO-SANTANO M, BAEHRECKE E H, et al. Self-consumption: The interplay of autophagy and apoptosis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(2): 81-94.

[23] MARQUEZ R T, XU L. Bcl-2: Beclin 1 complex: Multiple mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch[J]. Am J Cancer Res, 2012, 2(2): 214-221.

[24] ADAMS J M, CORY S. Bcl-2-regulated apoptosis: Mechanism and therapeutic potential [J]. Curr Opin Immunol, 2007, 19(5): 488-496.

[25] LUO S, RUBINSZTEIN D C. Apoptosis blocks beclin 1-dependent autophagosome synthesis: An effect rescued by bcl-xL[J]. Cell Death Differ, 2010, 17(2): 268-277.

[26] ZHU Y S, ZHAO L X, LIU L, et al. Beclin 1 cleavage by caspase-3 inactivates autophagy and promotes apoptosis[J]. Protein Cell, 2010, 1(5): 468-477.

(收稿日期:2024-10-14 编辑:罗英姣)

(上接第13页)外肿瘤微环境下的LECs增殖、迁移和侵袭的影响[J].航空航天医学杂志,2024,35(8):972-976.

[17] 赵慧咏,魏昇,杨茗皓,等.肿瘤相关巨噬细胞及其分泌的CXCL1对肝癌细胞系Huh7生物学行为的影响[J].安徽医科大学学报,2023,58(3):398-404.

[18] 李荣荣,瞿申红,张少杰,等.miR-155/GATA3/CD4+T细胞通路对变应性鼻炎发病机制的调控[J].中国免疫学杂志,2024,40(3):629-635.

[19] VESELY M D, KERSHAW M H, SCHREIBER R D, et al. Natural innate and adaptive immunity to cancer[J]. Annu Rev Immunol, 2011, 29: 235-271.

[20] LAHIRI A, MAJI A, POTDAR P D, et al. Lung cancer immunotherapy: Progress, pitfalls, and promises[J]. Mol Cancer, 2023, 22(1): 40.

[21] 向莉,王爱荣,江高峰.肿瘤免疫循环调节研究进展[J].肿瘤药学,2021,11(4):420-425.

[22] 燕羽婷,李昕蓉,李岩,等.补益药红芪免疫调节作用机制研究进展[J].中草药,2024,55(16):5656-5668.

[23] 陈静,吴涛,刘雪松.肿瘤免疫:免疫系统与肿瘤细胞的持

续战斗[J].科学(上海),2023,75(5):12-16.

[24] PARDOLL D. Does the immune system see tumors as foreign or self? [J]. Annu Rev Immunol, 2003, 21: 807-839.

[25] 陈耀华,豆亚伟,周理乾,等.黄芪多糖基于PI3K/Akt通路对食管癌大鼠抑瘤作用及免疫功能的影响[J].现代生物医学进展,2023,23(16):3032-3036.

[26] PADINHARAYIL H, ALAPPAT R R, JOY L M, et al. Advances in the lung cancer immunotherapy approaches[J]. Vaccines, 2022, 10(11): 1963.

[27] 王雅楠,归明彬,屈莲平,等.黄芪多糖抑制结肠癌肿瘤微环境IDO1的表达增加瘤内CD8+T细胞浸润[J].中国中药杂志,2023,48(17):4722-4730.

[28] LI K, LI S, WANG D, et al. Extraction, characterization, antitumor and immunological activities of hemicellulose polysaccharide from astragalus radix herb residue [J]. Molecules, 2019, 24(20): 3644

(收稿日期:2024-07-18 编辑:蒋凯彪)