

NF- κ B 信号通路介导槲木皂甙抗宫颈癌作用及机制研究*

段海霞,李东红[△],暴蕾,李欢,高红敏
(陕西省西安市第四医院妇产科 710004)

[摘要] **目的** 探讨槲木皂甙对人宫颈癌细胞 HeLa 细胞增殖和迁移的抑制作用,揭示核因子- κ B(NF- κ B)在槲木皂甙抑癌过程中的分子机制。**方法** 以体外培养的人宫颈癌细胞 HeLa 系为研究对象,实验分为对照组、槲木皂甙(200 μ g/mL)处理组(观察组),48 h 后观察两组 HeLa 细胞增殖能力的改变。运用 Western blot 检测 NF- κ B 的表达及酵母自噬基因 Atg5/Vps30 的同源基因(Beclin 1)、自噬微管相关蛋白轻链 3B(LC3B)的改变。**结果** 槲木皂甙能够显著抑制 HeLa 细胞的增殖;槲木皂甙能够抑制 NF- κ B 信号通路及促进自噬相关蛋白 Beclin 1、Atg 5、LC3B 的表达。**结论** 槲木皂甙能够抑制 NF- κ B 信号通路,进而诱导自噬的发生影响宫颈癌细胞 HeLa 的增殖和迁移。

[关键词] 宫颈肿瘤;槲木皂甙;自噬;NF- κ B

[中图分类号] R737.33

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)07-0889-03

Research on anti-cervical cancer effect of araloside mediated by NF-kappa B signaling pathway and its mechanism*

Duan Haixia, Li Donghong[△], Bao Lei, Li Huan, Gao Hongmin

(Department of Obstetrics and Gynecology, Xi'an Municipal Fourth People's Hospital, Xi'an, Shaanxi 710004, China)

[Abstract] **Objective** To explore the inhibition role of araloside on cervical cancer HeLa cell proliferation and migration to reveal the molecular mechanism of NF- κ B in HeLa cell in the process of tumor suppression. **Methods** The in vitro cultured cervical cancer HeLa cell line served as the research object. The experiment was divided into the control group and araloside(200 μ g/mL) treatment group(observation group). The change of proliferation and migration ability after 48 h were observed in the two groups. Western blot was used to detect the expression of NF- κ B molecule and change of autophagy involved protein Beclin 1 and LC3B. **Results** Araloside could significantly inhibit the proliferation and migration of HeLa cells and the NF- κ B signaling pathway, and promoted the expression of autophagy related molecule Beclin 1, Atg 5 and LC3B. **Conclusion** Araloside could inhibit the NF- κ B signaling pathways, thus induces autophagy occurrence and influences the proliferation and migration of cervical cancer HeLa cells.

[Key words] uterine cervical neoplasms; araloside; autophagy; NF-kappa B

宫颈癌(cervical cancer)是女性常见的恶性肿瘤,并具有较高的发病率和病死率^[1]。其发病机制尚未明确,可能与高危型人乳头瘤病毒(high risk-human papillomavirus, HR-HPV)的持续感染相关^[2]。针对宫颈癌的治疗以手术结合放疗、化疗为主,但目前针对宫颈癌的治疗仍存在一定的局限性。因此,尽早找寻能够抑制宫颈癌发展的药物是当今相关领域的研究重点。

自噬是细胞程序性死亡的一种,也被称为二型程序性死亡,当细胞受到例如饥饿、病毒感染、外源性刺激、细胞内异常蛋白蓄积时就会诱导自噬的发生^[3-4]。正常水平的自噬是维持细胞稳定的一种生理过程,然而过度的自噬则会引起细胞的死亡。核因子- κ B(NF- κ B)信号通路是抗肿瘤研究中较为重点的一条信号通路,作为一种核转录调控因子,广泛地参与免疫应答、生长分化、细胞增殖等生命活动^[5-6]。槲木皂甙是我国重要的中药药材之一,具有保肝护肝、降血糖降血脂、抗氧化抗病毒等功能。有研究表明,槲木皂甙具有一定的抗肿瘤作用,本课题前期结果也证实槲木皂甙能够诱导 HeLa 细胞凋亡发生^[7]。因此,研究槲木皂甙对宫颈癌的抑制作用具有一定的理论基础。另外研究、开发槲木皂甙的抗宫颈癌作用,将会为宫颈癌的生物学治疗提供更多理论基础和分子靶点。

1 材料与方

1.1 材料 HeLa 细胞由西安交通大学医学院实验医学中心提供;槲木皂甙由西京医院药剂科提供;RPMI-1640 培养基购自 Invitrogen 公司;肌动蛋白(Actin)、酵母自噬基因 Atg5/

Vps30 的同源基因(Beclin 1)、自噬微管相关蛋白轻链 3B(LC3B)和 NF- κ B 抗体购自 Abcam 公司;四甲基偶氮唑盐(MTT)购自 Amresco 公司;二甲基亚砜(DMSO)购自天津巴斯夫化工有限公司。

1.2 方法

1.2.1 HeLa 细胞培养 常规条件培养 HeLa 细胞,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度条件。

1.2.2 HeLa 细胞生长抑制及迁移的检测 实验分为对照组、槲木皂甙(200 μ g/mL)处理组(观察组)。48 h 后加入新配置的 5 mg/mL 的 MTT 20 μ L,继续放入孵箱 4 h,弃去上清液后每孔加入 150 μ L 的 DMSO,震荡混匀。运用 490 nm 的酶标仪检测吸光度。

1.2.3 Western blot 检测信号通路及自噬相关蛋白 收取蛋白样品,运用蛋白定量检测的方法测定蛋白水平。50 μ g 蛋白加入上样缓冲液后进行凝胶电泳,再电转聚偏二氟乙烯(PVDF)膜。孵育一抗和二抗,用化学发光法显色,曝光、显影、定影。以 Actin 作为内参照。条带用薄层扫描仪扫描,再运用软件分析各条带灰度值,计算各蛋白(Beclin 1、LC3B、NF- κ B)的相对水平。

1.2.4 激活 NF- κ B 信号通路对抑制自噬的发生及促进 HeLa 细胞增殖的影响 运用 NF- κ B 受体的激动因子(receptor activator of NF-kappa B ligand, RANKL)干预后(RANKL 组),与槲木皂甙共同处理(联合组),并观察各组细胞 NF- κ B 信号通

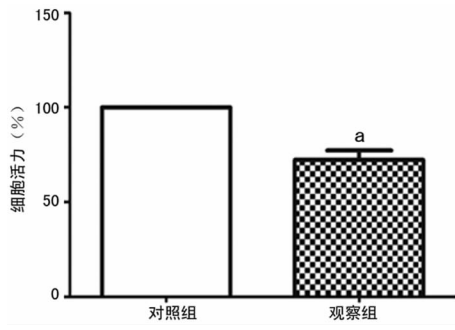
路激活的情况。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计分析软件处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

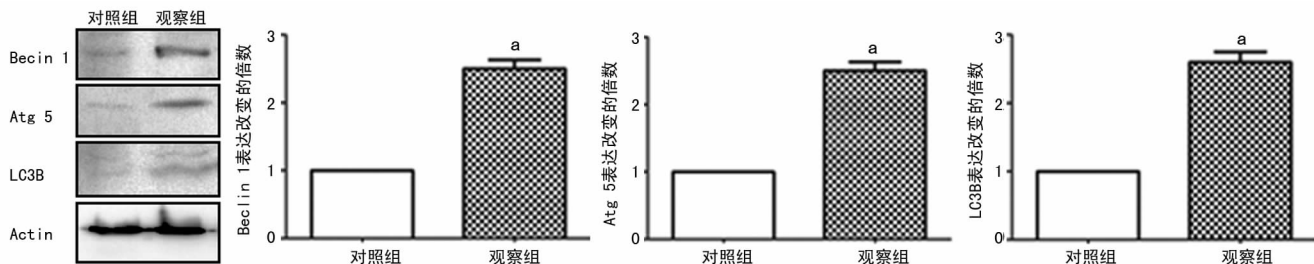
2.1 两组 HeLa 细胞增殖活力比较 MTT 细胞增殖实验发现, 观察组与对照组比较, 细胞增殖活力显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1。

2.2 两组细胞自噬相关蛋白表达水平比较 运用 Western blot 检测了两组细胞自噬相关蛋白 Beclin 1、Atg 5、LC3B 的表达, 结果发现, 观察组能够显著促进自噬相关蛋白的水平, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2。



^a: $P < 0.05$, 与对照组比较。

图 1 两组 HeLa 细胞增殖活力比较

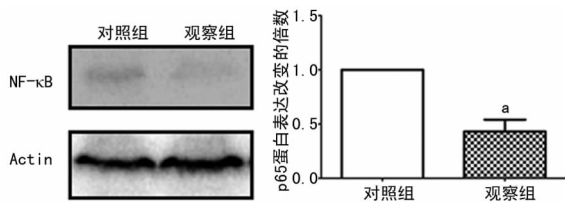


^a: $P < 0.05$, 与对照组比较。

图 2 两组自噬相关蛋白表达水平比较

2.3 两组细胞 NF- κ B 信号中 p65 蛋白表达比较 运用 Western blot 检测了 NF- κ B 信号通路中 p65 蛋白的表达水平, 结果显示观察组 NF- κ B 信号通路处于抑制状态, 与对照组比较, 观察组 p65 蛋白受到抑制, 见图 3。

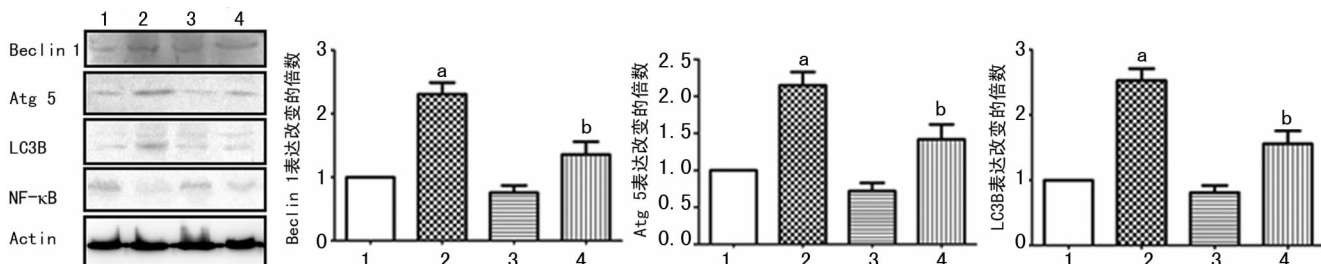
细胞增殖活力降低得到了逆转, 见图 5。



^a: $P < 0.05$, 与对照组比较。

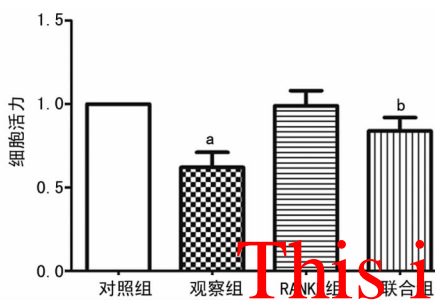
图 3 两组细胞 NF- κ B 信号中 p65 蛋白表达比较

2.4 各组细胞自噬相关蛋白的表达比较 采用 Western blot 检测自噬相关蛋白的表达, 激活 NF- κ B 信号通路能够抑制自噬的发生及促进 HeLa 细胞的增殖, 运用 RANKL 干预后, 能够引起 NF- κ B 信号通路激活, 结果发现, 槲木皂苷诱导的, HeLa 细胞自噬性死亡降低, 促进自噬相关蛋白 Beclin1、Atg5、LC3B 的表达(图 4); 自噬相关蛋白表达受到抑制, 槲木皂苷引起的



1: 对照组; 2: 观察组; 3: RANKL 组; 4: 联合组; ^a: $P < 0.05$, 与对照组比较, ^b: $P < 0.05$, 与观察组比较。

图 4 Western blot 检测各组细胞自噬相关蛋白的表达



^a: $P < 0.05$, 与对照组比较, ^b: $P < 0.05$, 与观察组比较。

图 5 各组 HeLa 细胞的增殖活力比较

3 讨 论

宫颈癌是女性常见的恶性肿瘤, 并具有较高的发病率和病死率, 每年约有 20 万妇女死于此病^[7]。我国宫颈癌的发病率较高, 其中西北地区该病的死亡率最高。其发病机制尚未明确, 可能与 HR-HPV 的持续感染相关。宫颈癌的迁移与侵袭是该病治愈较难的主要原因, 一些邻近器官均会受到癌细胞的侵蚀。目前针对宫颈癌的治疗主要以手术结合放、化疗为主。但均未有很好疗效, 因此寻找治疗宫颈癌的新药具有重要的意义。

槲木皂苷是我国重要的中药药材之一, 具有保肝护肝、降

血糖降血脂、抗氧化抗病毒等功能^[8]。另有研究表明楸木皂苷具有一定的抗肿瘤作用,本课题前期结果也证实楸木皂苷能够诱导 HeLa 细胞凋亡发生^[7]。因此,研究楸木皂苷对宫颈癌的抑制作用具有一定的理论基础。另外研究、开发楸木皂苷的抗宫颈癌作用,将会为宫颈癌的生物学治疗提供更多理论基础和分子靶点。

近年来研究发现,自噬作为程序性死亡的一种,在肿瘤细胞存活的命运中发挥着重要的作用,诸多抗肿瘤药物的作用机制均与自噬的发生相关^[3]。当肿瘤细胞自噬过度发生后,能够促进肿瘤细胞的死亡^[9]。本研究发现,楸木皂苷处理后能够显著促进自噬水平的升高。这种自噬水平的增高可能与楸木皂苷抑制 HeLa 细胞的增殖和迁移相关。之前的研究表明,调控自噬发生的机制中,主要以 mTOR 信号通路为主。NF- κ B 信号通路与肿瘤的增殖和迁移关系密切^[10-14]。RANKL 是 NF- κ B 信号通路的激动剂。在前期的研究结果中也发现,楸木皂苷能够抑制 Akt/NF- κ B 信号通路的活性。NF- κ B 信号通路与自噬水平的增强存在一定的关联性。本研究运用 NF- κ B 信号通路的激动剂后,观察 HeLa 细胞自噬相关蛋白的改变,结果发现,当 NF- κ B 信号通路被抑制后,自噬相关蛋白 Beclin 1、LC3B 水平降低。以上结果提示,NF- κ B 信号通路参与了楸木皂苷诱导的 HeLa 细胞自噬性死亡。

综上所述,楸木皂苷对 HeLa 细胞的抑制作用可能与促进其自噬的发生有关,并且自噬的发生受到了 NF- κ B 信号通路的调控。楸木皂苷很可能会成为一种临床上治疗宫颈癌的有效药物。

参考文献

- [1] Basu S, Mahajan A. Psoas muscle metastasis from cervical carcinoma: Correlation and comparison of diagnostic features on FDG-PET/CT and diffusion-weighted MRI[J]. *World J Radiol*, 2014, 6(4): 125-129.
- [2] Chen J, Giridhary KV, Zhang LY, et al. A protein kinase C/protein kinase D pathway protects LNCaP prostate cancer cells from phorbol ester-induced apoptosis by promoting ERK1/2 and NF-kappa B activities[J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(8): 1198-1206.
- [3] Liu J, Fan L, Wang H, et al. Autophagy, a double-edged sword in anti-angiogenesis therapy[J]. *Med Oncol*, 2016,

33(1): 721-729.

- [4] Zhang JB, Cao R, Cai TJ, et al. The role of autophagy dysregulation in Manganese-Induced dopaminergic neurodegeneration[J]. *Neurotox Res*, 2013, 24(4): 478-490.
- [5] Gilmore TD. The Rel/NF-kappa B/I kappa B signal transduction pathway and cancer[J]. *Cancer Treat Res*, 2003, 115(115): 241-265.
- [6] Tapia MA, González-Navarrete I, Dalmasas A, et al. Inhibition of the canonical IKK/NF kappa B pathway sensitizes human cancer cells to doxorubicin[J]. *Cell Cycle*, 2007, 6(18): 2284-2292.
- [7] Lee EB, Kim OJ, Kang SS, et al. Araloside a, an antiulcer constituent from the root bark of *aralia elata* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(3): 523-526.
- [8] Kaur S, Sharma N, Krishn SR, et al. MUC4-mediated regulation of acute phase protein lipocalin 2 through HER2/AKT/NF- κ B signaling in pancreatic cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(3): 688-700.
- [9] Shao LN, Zhu BS, Xing CG, et al. Effects of autophagy regulation of tumor-associated macrophages on radiosensitivity of colorectal cancer cells[J]. *Mol Med Rep*, 2016(13): 2661-2670.
- [10] Guo L, Yu H, Gu W, et al. Autophagy negatively regulates transmissible gastroenteritis virus replication[J]. *Sci Rep*, 2016, 6(23864): 1-14.
- [11] Dong X, Levine B. Autophagy and viruses: adversaries or allies? [J]. *Innate Immun*, 2013, 5(5): 480-493.
- [12] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease[J]. *Cell*, 2008, 132(1): 27-42.
- [13] Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation[J]. *Nature*, 2011, 469(7330): 323-335.
- [14] Zhang Y, Li Z, Ge X, et al. Autophagy promotes the replication of encephalomyocarditis virus in host cells[J]. *Autophagy*, 2011, 7(6): 613-628.

(收稿日期: 2016-08-20 修回日期: 2016-11-03)

(上接第 888 页)

- 成分提取、药理作用及临床应用研究进展[J]. *中国医药导报*, 2014, 11(31): 159-166.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2000 年版[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 70.
 - [9] 李婷, 徐文珊, 李西文, 等. 中药桔梗的现代药理研究进展[J]. *中药药理与临床*, 2013, 29(2): 205-208.
 - [10] 王强, 李盛钰, 杨帆, 等. 玉竹中性多糖的分离纯化及单糖组成分析[J]. *食品科学*, 2010, 31(15): 100-102.
 - [11] 刘洋洋, 刘春生, 曾斌芳, 等. 甘草种质资源研究进展[J]. *中草药*, 2013, 44(24): 3593-3598.
 - [12] Damevska K, Gocev G, Nikolovska S. Eosinophilic ulcer of the oral mucosa: report of a case with multiple synchronous lesions[J]. *Am J Dermatopathol*, 2014, 36(7): 594-596.
 - [13] Song H, Lim H, Das SK, et al. Dysregulation of EGF

family of growth factors and COX-2 in the uterus during the preattachment and attachment reactions of the blastocyst with the luminal epithelium correlates with implantation failure in LIF-Deficient mice[J]. *Mol Endocrinol*, 2000, 14(8): 1147-1161.

- [14] 王汉明, 朱晓密, 赵雅君. 口疮 1 号方治疗大鼠口腔溃疡的实验研究[J]. *口腔医学研究*, 2014, 30(7): 627-629.
- [15] Arkhipov A, Shan Y, Das R, et al. Architecture and membrane interactions of the EGF receptor[J]. *Cell*, 2013, 152(3): 557-569.
- [16] Tomas A, Futter CE, Eden ER. EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer[J]. *Trends Cell Biol*, 2014, 24(1): 26-34.

(收稿日期: 2016-08-22 修回日期: 2016-11-05)