

# Notch 信号通路介导白头翁皂苷 B4 抗子宫颈癌作用及机制研究\*

任楠楠<sup>1</sup>, 段海霞<sup>2</sup>, 张建彬<sup>3△</sup>

(1. 陕西省西安市第四医院检验科 710004; 2. 西北妇女儿童医院生殖妇科, 西安 710039; 3. 空军军医大学军事预防医学系劳动卫生与环境卫生学教研室, 西安 710032)

**[摘要]** **目的** 探讨白头翁皂苷 B4 对人宫颈癌 HeLa 细胞增殖和迁移的抑制作用, 揭示 Notch 信号通路在白头翁皂苷抑癌过程中的分子机制。**方法** 以体外培养的人宫颈癌 HeLa 细胞为研究对象, 实验分为对照组、白头翁皂苷处理组(20 mg/mL)、Jagged1 处理组、Jagged1+白头翁皂苷 B4 处理组(20 mg/mL), 48 h 后观察白头翁皂苷处理组与对照组 HeLa 细胞增殖能力的改变。运用 Western blot 检测 Notch 信号通路相关分子的表达以及自噬相关蛋白 Atg5 和 Beclin1 的改变。**结果** 与对照组相比, 白头翁皂苷 B4 能够显著抑制 HeLa 细胞的增殖( $P < 0.05$ ); 白头翁皂苷 B4 能够抑制 Notch 信号通路以及促进自噬相关分子 Beclin1 和 Atg5 的表达( $P < 0.05$ ); 运用 Jagged1 诱导 Notch 信号通路活化后白头翁皂苷 B4 对 HeLa 细胞的增殖抑制作用。**结论** 白头翁皂苷能够抑制 Notch 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; 白头翁皂苷; 自噬; Notch 信号通路

**[中图分类号]** R737.33

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2020)05-0705-04

## Study on Notch signaling pathway for mediating anti-cervical cancer effect of anemoside B4 and its mechanism

REN Nannan<sup>1</sup>, DUAN Haixia<sup>2</sup>, ZHANG Jianbin<sup>3△</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Xi'an Municipal Fourth Hospital, Xi'an, Shaanxi 710004, China; 2. Department of Reproductive Gynecology, Northwest Women and Children's Hospital, Xi'an, Shaanxi 710039, China; 3. Teaching and Researching Section of Labor and Environmental Hygiene, Faculty of Military Preventive Medicine, Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the inhibition role of araloside B4 on the proliferation and migration of human cervical cancer HeLa cells for revealing the molecular mechanism of Notch signal pathway in the inhibiting cancer process of araloside B4. **Methods** The in vitro cultured human cervical cancer HeLa cells served as the study objects. The experiment was divided into the negative control group, anemoside B4 treatment group (20 mg/mL), Jagged1 treatment group and Jagged1+anemoside B4 treatment group (20 mg/mL). The changes of proliferation and migration ability after 48 h in the araloside treatment group and control group were observed. The Western blot was used to detect the expression of Notch signal pathway related molecular expression and level of autophagy related protein Beclin 1 and Atg5. **Results** Compared with the control group, anemoside B4 could significantly inhibit the proliferation of HeLa cells ( $P < 0.05$ ). Anemoside B4 could inhibit Notch signaling pathway and promote the expression of autophagy related molecule Beclin 1 and Atg 5 ( $P < 0.05$ ). Jagged1 was used to induce the inhibitory effect of Anemoside B4 on HeLa cells after activation of Notch signaling pathway. **Conclusion** Araloside can inhibit the Notch signal pathway, thus induce the autophagy occurrence for influencing the proliferation and migration of cervical cancer HeLa cells.

**[Key words]** uterine cervical neoplasms; anemoside; autophagy; Notch signal pathway

子宫颈癌(cervical cancer)是威胁女性健康的重要疾病之一<sup>[1]</sup>。然而,目前该病的发病机制尚未阐明,大量的研究证据表明该病的发生与高危型人乳头瘤病毒感染关系密切<sup>[2]</sup>。目前,临床上针对子宫颈癌的治疗主要以手术治疗、放疗及化疗为主。自噬被称为细胞Ⅱ型程序性死亡,当细胞受到内在或外在的刺激时,如饥饿、病毒感染、蛋白堆积等则会引起自噬发生<sup>[3-4]</sup>。在一般条件下,自噬是保障细胞存活的生理过程,然而过度自噬发生则会诱导细胞死亡,对细胞产生毒性作用。在肿瘤细胞中自噬常常发挥更为重要的作用。Notch 信号通路是肿瘤研究的重要通路,Notch 信号通路相关分子是核转录相关的调控因子。研究表明,Notch 信号通路相关分子参与细胞的免疫、应激、生长、分化及细胞增殖等生命活动<sup>[5-8]</sup>。白头翁皂苷 B4 是一类中药提取物分子,之前的研究表明,白头翁皂苷 B4 具有抗肿瘤、降糖降脂、抗氧化应激等功能。最近的研究指出,白头翁皂苷 B4 还具有抑制肿瘤发生的作用。本课题组前期结果同样证实白头翁皂苷 B4 能够引起 HeLa 细胞增殖活性降低<sup>[9]</sup>。本课题组认为继续深入地研究白头翁皂苷 B4 抑制子宫颈癌的作用机制具有一定的基础和意义,而将白头翁皂苷 B4 开发成抗子宫颈癌的药物具有较好的临床前景。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

HeLa 细胞(空军军医大学西京医院妇产科提供);白头翁皂苷 B4(美国 Sigma 公司);噻唑蓝(MTT)、RPMI1640 培养基(美国 Sigma 公司);Actin、Beclin1、Atg5 和 Notch1 抗体(英国 Abcam 公司);二甲亚砜(DMSO,美国 Gibco 公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 HeLa 细胞培养及 MTT 检测

HeLa 细胞常规 37 °C、5%的 CO<sub>2</sub>、饱和湿度孵箱培养。细胞分为 4 组:空白对照组、白头翁皂苷 B4 处理组(20 mg/mL)、Jagged1 处理组、Jagged1+白头翁皂苷 B4 处理组(20 mg/mL)。细胞接种在 96 孔板中,待细胞完全贴壁处于良好状态下每孔加入 20 μL 浓度是 5 mg/mL 的 MTT 溶液,继续放入细胞培养箱孵育 4 h,用移液器分别吸弃各孔中的上清液,每孔加入 150 μL DMSO,运用酶标仪检测各孔的吸光度值,计算细胞活力。

#### 1.2.2 Western blot 检测信号通路及自噬相关蛋白

将 4 组处理的 HeLa 细胞分别运用蛋白提取试剂盒提取蛋白样品,运用紫外分光光度计进行蛋白浓度定量,蛋白浓度配平后放入-80 °C 冰箱保存。进行凝胶电泳(恒流条件 80 V,120 min),电转(恒压条件 250

mA,90 min)。进行一抗(Beclin1、Atg5、Notch1、Actin)孵育 4 °C 过夜、二抗室温孵育 2 h,用 ECL 发光法显色。各组以 Actin 蛋白作为内参。

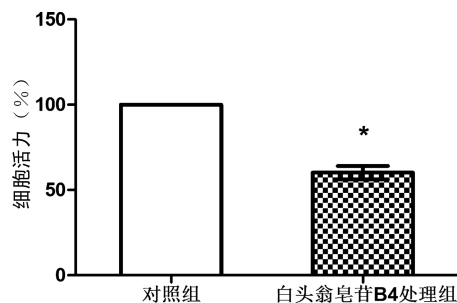
### 1.3 统计学处理

数据采用 SPSS 22.0 统计学软件进行分析处理,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,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 白头翁皂苷 B4 对 HeLa 细胞增殖的抑制作用

运用 MTT 细胞增殖实验发现,白头翁皂苷 B4 处理 48 h 后与对照组相比,细胞活力显著降低( $P < 0.05$ ),见图 1。



\*:  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

图 1 MTT 检测白头翁皂苷 B4 对 HeLa 细胞增殖活力的影响

### 2.2 白头翁皂苷 B4 对 HeLa 细胞自噬的促进作用

运用 Western blot 检测了白头翁皂苷 B4 处理后自噬相关蛋白 Atg5 和 Beclin1 表达水平,结果提示,白头翁皂苷 B4 处理组自噬相关蛋白 Atg5 和 Beclin1 表达水平显著升高( $P < 0.05$ ),白头翁皂苷 B4 能促进自噬的发生(图 2)。

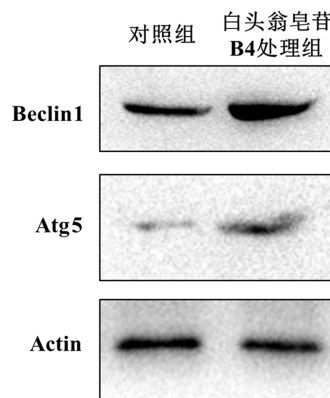


图 2 Western blot 检测白头翁皂苷 B4 处理后自噬相关蛋白的表达

### 2.3 白头翁皂苷 B4 对 Notch 信号通路的抑制作用

运用 Western blot 检测了 Notch 信号通路中 Notch1 蛋白的表达水平,提示白头翁皂苷 B4 处理组较对照组相比,Notch1 蛋白处于低表达状态(图 3)。

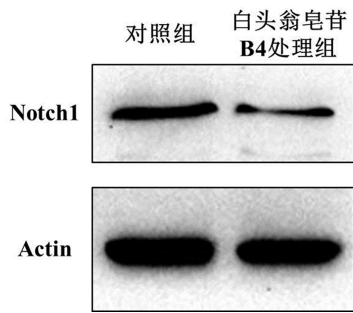


图 3 Western blot 检测白头翁皂苷 B4 处理后 Notch 的改变

2.4 激活 Notch 信号通路能够降低自噬的发生, 进而促进 HeLa 细胞增殖

运用 Notch 受体的激动因子(Jagged1)干预后, 能够引起 Notch 信号通路激活, 与白头翁皂苷 B4 共同处理后发现, 白头翁皂苷 B4 处理组的 HeLa 细胞自噬相关蛋白表达降低(图 4), 自噬发生可能受到抑制, 同时, Jagged1+白头翁皂苷 B4 处理组, 细胞活力与单纯白头翁皂苷 B4 处理组增加(图 5)。

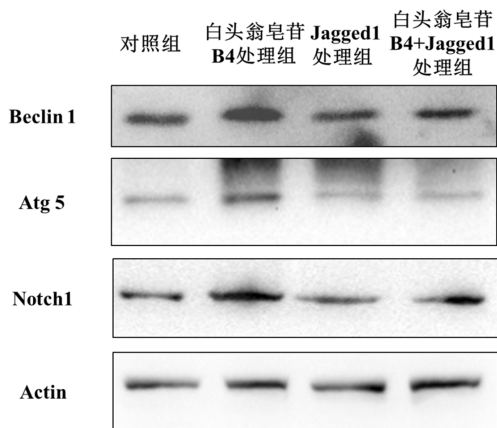
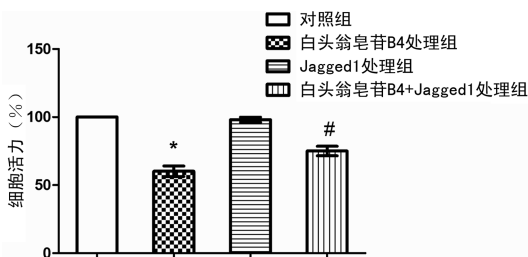


图 4 Western blot 检测自噬相关蛋白的表达



\*:  $P < 0.05$ , 与对照组相比; #:  $P < 0.05$ , 与白头翁皂苷 B4 处理组相比。

图 5 MTT 检测白头翁皂苷 B4 以及 Jagged1 处理对 HeLa 细胞增殖活力的影响

3 讨 论

自噬被称为细胞 II 型程序性死亡, 在一般条件下, 自噬是保障细胞存活的生理过程, 然而过度自噬发生则会诱导细胞死亡, 对细胞产生毒性作用。当肿瘤细胞自噬过度发生后, 能够促进肿瘤细胞的死亡<sup>[10-11]</sup>。本研究发现, 白头翁皂苷 B4 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白头翁皂苷 B4 抑制 HeLa 细胞的增殖和迁移相关。判断自噬表达水平的标志是自噬相关分子表达的升高, Beclin1 和 Atg5 是自噬相关蛋白, 这两种蛋白常常用来检测自噬水平。本研究运用 Western blot 检测了 HeLa 细胞中自噬相关蛋白的表达, 结果发现, HeLa 细胞经过白头翁皂苷 B4 的处理自噬水平过度发生, 这种自噬细胞过度发生则引起了 HeLa 细胞的损伤。这说明白头翁皂苷 B4 对 HeLa 细胞具有抑制效应, 并且可能是通过增加细胞自噬这一途径实现的。其他的研究结果证实白头翁皂苷能够促进 HeLa 细胞的凋亡发生, 本研究证实白头翁皂苷 B4 还能够促进细胞自噬来发挥抑制 HeLa 细胞的效应。Notch 信号通路相关分子是核转录相关的调控因子, 研究表明, Notch 信号通路相关分子参与细胞的免疫、应激、生长、分化及细胞增殖等<sup>[12-15]</sup>。本研究检测了白头翁皂苷 B4 处理后 Notch 信号通路的改变, 结果提示白头翁皂苷能够影响 Notch 信号通路, 抑制 Notch1 分子的表达。本研究通过干预细胞中 Notch 信号分子, 检测白头翁皂苷 B4 是否通过 Notch 信号通路调控自噬进而影响 HeLa 细胞的增殖。结果发现, 当 Notch 信号通路被活化后, 自噬相关蛋白 Beclin1 和 Atg5 水平降低, 提示 Notch 信号通路与自噬之间存在着调控关系。

综上所述, 白头翁皂苷 B4 对 HeLa 细胞具有抑制增殖的效果, 并且这种抑制效果可能与通过激活 Notch 信号通路调控 HeLa 细胞的自噬发生有关。随着研究的深入, 白头翁皂苷 B4 将有望成为临床上治疗子宫颈癌的有效药物。

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, GIRIDHAR K V, ZHANG L, 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. Autophagy, a double-edged sword in anti-angiogenesis therapy[J]. Med Oncol, 2016, 33(1): 10.

- [4] ZHANG J, CAO R, CAI T, et al. The role of autophagy dysregulation in manganese-induced dopaminergic neurodegeneration [J]. *Neurotox Res*, 2013, 24(4): 478-490.
- [5] HABETS R A, de BOCK C E, SERNEELS L, et al. Safe targeting of T cell acute lymphoblastic leukemia by pathology-specific NOTCH inhibition [J]. *Sci Transl Med*, 2019, 11(494): e6246.
- [6] HABETS R A, de BOCK C E, SERNEELS L, et al. Notch and mTOR signaling pathways promote human gastric cancer cell proliferation [J]. *Neoplasia*, 2019, 21(7): 702-712.
- [7] YOU M S, WANG W P, WANG J Y, et al. Sun1 mediates interkinetic nuclear migration and Notch signaling in the neurogenesis of zebrafish [J]. *Stem Cells Dev*, 2019(29): 63.
- [8] WEI W, LI Z P, BIAN Z X, et al. Astragalus polysaccharide RAP induces macrophage phenotype polarization to M1 via the notch signaling pathway [J]. *Molecules*, 2019, 24(10): 2016-2020.
- [9] CHEKNEVA E E, GORUGANTHU M U, UZHACHENKO R V, et al. Correction to: Determinant roles of dendritic cell-expressed Notch Delta-like and Jagged ligands on anti-tumor T-cell immunity [J]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7(1): 124-129.
- [10] MA L, WANG Y, HUI Y, et al. WNT/NOTCH pathway is essential for the maintenance and expansion of human MGE progenitors [J]. *Stem Cell Reports*, 2019, 12(5): 934-949.
- [11] HIEMSTRA P S. Macrophage function in chronic obstructive pulmonary disease: the many faces of notch signalling [J]. *EBio Medicine*, 2019(43): 22-23.
- [12] WISZNIAK S, SCHWARZ Q. Notch signalling defines dorsal root ganglia neuroglial fate choice during early neural crest cell migration [J]. *BMC Neurosci*, 2019, 20(1): 21.
- [13] GUO L, YU H, GU W, et al. Autophagy negatively regulates transmissible gastroenteritis virus replication [J]. *Sci Rep*, 2016(6): 23864.
- [14] ROMERO M, ZORZANO A. Role of autophagy in the regulation of adipose tissue biology [J]. *Cell Cycle*, 2019, 18(13): 1435-1445.
- [15] RUSSELL K L, GORGULHO C M, ALLEN A, et al. Inhibiting autophagy in renal cell cancer and the associated tumor endothelium [J]. *Cancer J*, 2019, 25(3): 165-177.

(收稿日期: 2019-05-31 修回日期: 2019-11-12)

(上接第 704 页)

- G, et al. Chronic active B-cell-receptor signaling in diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Nature*, 2010, 463(7277): 88-92.
- [11] JIANG Y, HATZI K, SHAKNOVICH R. Mechanisms of epigenetic deregulation in lymphoid neoplasms [J]. *Blood*, 2013, 121(21): 4271-4279.
- [12] LOO S K, HAMID S S, MUSA M. DNMT1 is associated with cell cycle and DNA replication gene sets in diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214(1): 134-143.
- [13] JUNG J K, ARORA P, PAGANO J S, et al. Expression of DNA methyltransferase 1 is activated by hepatitis B virus X protein via a regulatory circuit involving the p16INK4a-cyclin D1-CDK 4/6-pRb-E2F1 pathway [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(12): 5771-5778.
- [14] HE D, ZHANG Y W, ZHANG N N, et al. Aberrant gene promoter methylation of p16, FHIT, CRBP1, WWOX, and DLC-1 in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas [J]. *Med Oncol*, 2015, 32(4): 92.
- [15] HUANG J, WANG Y, GUO Y, et al. Down-regulated microRNA-152 induces aberrant DNA methylation in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma by targeting DNA methyltransferase 1 [J]. *Hepatology*, 2010, 52(1): 60-70.
- [16] JIANG Y, HATZI K, SHAKNOVICH R, et al. Mechanisms of epigenetic deregulation in lymphoid neoplasms [J]. *Blood*, 2013(21): 4271-4279.

(收稿日期: 2019-08-10 修回日期: 2019-12-03)