

过量表达*Peroxiredoxin V*抑制苦木提取物诱导的 宫颈癌SiHa细胞凋亡

肖婉秋[#] 张惠娜[#] 任晨曦 郭晓宇 李楠 丛杰 冯耀元 孙虎男^{*}

(黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院, 大庆 163319)

摘要 近年来, 宫颈癌(cervical cancer)的中药治疗方法因其低毒高效的特点备受广大研究者的关注。Prx V(*Peroxiredoxin V*)是Prxs(*Peroxiredoxins*)蛋白家族中的重要成员, 在调控氧化应激诱导的癌细胞增殖、迁移、集落形成、凋亡等过程中发挥着重要的作用。该研究集中探究了Prx V在苦木提取物(*Picrasma quassioides* extract, PQE)诱导人宫颈癌细胞(SiHa细胞)凋亡过程中的调控作用, 通过构建Mock和Prx V过表达的SiHa细胞系, 利用PQE进行处理, 采用MTT assay实验、划痕实验、集落形成实验、荧光显微照相技术和蛋白质免疫印迹法对其进行细胞活力、增殖能力、细胞迁移能力、群落形成能力、线粒体损伤、细胞凋亡有关蛋白质的表达及细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平变化等检测。研究结果显示, PQE通过下调细胞内Prx V蛋白的表达, 从而有效促进细胞内ROS的蓄积, 诱导SiHa细胞凋亡。另外, 过量表达Prx V有效抑制了PQE引起的细胞内ROS的蓄积, 进而有效降低了PQE介导的SiHa细胞凋亡及凋亡相关蛋白的表达水平。该研究初步揭示了Prx V在PQE诱导的宫颈癌SiHa细胞凋亡过程中的保护作用, 为宫颈癌的临床中药治疗策略和Prx V的新功能研究提供了理论依据。

关键词 过氧化物还原酶V; 苦木提取物; 宫颈癌细胞; 活性氧; 细胞凋亡

Overexpression of the *Peroxiredoxin V* Inhibits the *Picrasma quassioides* Extract Induced Apoptosis in SiHa Cervical Cancer Cells

XIAO Wanqiu[#], ZHANG Huina[#], REN Chenxi, GUO Xiaoyu, LI Nan, CONG Jie, FENG Yaoyuan, SUN Hunan^{*}

(College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract In recent years, traditional Chinese medicine treatments for cervical cancer have received more attentions due to their low toxicity and high efficiency. Prx V (*Peroxiredoxin V*), a major member of the Prxs (*Peroxiredoxins*) protein family, plays an important role in regulating the oxidative stress-induced cancer cell proliferation, migration, colony formation and apoptosis. The present study focused on the regulatory role of Prx V on PQE (*Picrasma quassioides* extract) induced apoptosis of human cervical cancer cells (SiHa cells), by constructing Mock and Prx V overexpressed SiHa cell lines. The cell viability, proliferation, migration, community formation, mitochondrial damage, apoptosis, intracellular ROS (reactive oxygen species) and apoptosis related protein expressions were investigated by MTT assay, scrape assay, colony formation assay, fluorescence micrography and West-

收稿日期: 2022-10-17 接受日期: 2022-12-30

2022年大学生创新创业训练计划(批准号: 202210223020)资助的课题

[#]共同第一作者

^{*}通讯作者。Tel: 18745968262, E-mail: sunmkbb@qq.com

Received: October 17, 2022 Accepted: December 30, 2022

This work was supported by the Training Programs of Innovation and Entrepreneurship for Undergraduates of University (Grant No.202210223020)

[#]These authors contributed equally to this work

^{*}Corresponding author. Tel: +86-18745968262, E-mail: sunmkbb@qq.com

ern blot. The results showed that PQE effectively increased intracellular ROS accumulation and induced apoptosis of SiHa cells by down-regulating the Prx V protein expression. In addition, overexpression of Prx V significantly reduced the PQE mediated intracellular ROS accumulations and apoptosis as well as the apoptosis-related proteins expression. These findings revealed that *Prx V* plays a protective role in PQE-induced apoptosis of cervical cancer SiHa cells, which provides a theoretical basis for exploring the clinical treatment strategy and the function of *Prx V* in cervical cancer.

Keywords Peroxiredoxin V; *Picrasma quassioides* extract; cervical cancer; ROS; cell apoptosis

宫颈癌(cervical cancer)是一种常见的妇科疾病,在女性恶性肿瘤中发病风险和死亡风险极高。我国女性每年因宫颈癌而死亡的患者大约有3.7万人^[1-2],我国是全世界宫颈癌患病率排名位居前列的国家,在新疆、内蒙、山西、陕西等地宫颈癌的死亡率居高^[3]。苦木[*Picrasma quassioides* (D.Don) Benn, PQ]作为一种传统中药,具有清热、祛湿、解毒、消肿的功效,其中生物碱类作为主要活性成分,其抗菌、抗炎、抗肿瘤等生物活性的特性已受到广泛的关注^[4-6]。SHINSAKU等^[7]研究发现,苦木具有良好的抗癌疗效,苦木中的化合物苦木素昔A、黄苦木素B及苦木素昔B对P388人白血病细胞具有抑制作用;CHEN等^[8]研究表明,苦木中的 β -咔巴琳生物碱对烟草花叶病毒有一定的抑制作用,并且当这些生物碱与苦木内脂等药物进行联合应用时出现的抑制效果更加显著。刘岩等^[9]证明了苦木提取物能有效抑制HepG2细胞的生长,并且对肝癌细胞凋亡有显著的促进作用。然而, β -咔巴琳在抗肿瘤应用上的前景及其抗癌疗效机制研究还没有得到证实,尤其是 β -咔巴琳如何影响肿瘤细胞内氧化应激反应致使癌细胞死亡等方面尚不清楚。活性氧(reactive oxygen species, ROS)作为细胞内的信号分子,在调控细胞增殖、分化、凋亡以及代谢、迁移等过程中发挥重要的作用。另外,从众多传统医药提取物的抗炎、抗癌研究中发现了ROS参与化学预防和抗肿瘤等过程中的作用^[10]。我们的前期研究发现,苦木提取物(PQ extract, PQE)可以通过增加细胞和线粒体内ROS水平来诱导细胞凋亡,对人宫颈癌SiHa细胞发挥抗癌作用^[11],但是Prx V在苦木提取物诱导的宫颈癌细胞调往过程中的调控作用尚不清楚。

Prxs是细胞内的抗氧化酶,具有清除肿瘤细胞内ROS的功能^[12]。有研究表明Prxs家族蛋白对信号转导以及肿瘤细胞的增殖、迁移、凋亡等过程

均发挥着重要作用^[13]。Prx V是Prxs家族中的第五位成员,被称为非典型2-Cys过氧化物还原酶,主要存在于细胞质、线粒体和过氧化物酶体等细胞器中,具有清除细胞内ROS、活性氮(reactive nitrogen oxygen, RNS)的功能,也具有保护细胞免受氧化损伤,从而起到抑制细胞凋亡的作用^[14]。有研究报道,Prx III在氧化应激介导的宫颈癌细胞凋亡过程中发挥重大的作用^[15],提示了Prxs在宫颈癌细胞凋亡过程中潜在的调控作用。我们的前期有研究表明,在氧化应激的诱导下Prx V蛋白表达水平在HepG2肝癌细胞、SW480结肠癌细胞、AGS胃腺癌细胞中均有相应的变化,且在肝癌细胞中,过量表达Prx V能够抑制细胞凋亡;在胃癌细胞中,过量表达Prx V能够促进细胞增殖;在结肠癌细胞中,过量表达Prx V能够促进细胞的侵袭和迁移;在异种移植小鼠模型中,过量表达Prx V能加快细胞的生长^[16-19]。这些研究结果充分显示,过量表达Prx V能够有效调控氧化应激介导下的癌细胞增值、凋亡、迁移等特性。

本研究利用Prx V(实验组)和Mock(对照组)SiHa人宫颈癌细胞系,研究Prx V在苦木提取物诱导宫颈癌SiHa细胞凋亡的调控作用及其机制,为阐明Prx V在氧化应激诱导的宫颈癌细胞凋亡过程中的作用提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

提取制备:将50 g的苦木在500 mL乙醇中溶解,然后在37 °C条件下,以200 r/min的转速摇晃提取5 h;回收滤液,再用500 mL乙醇过滤残渣;提取液的回收和过滤过程重复3次,接着在55 °C的旋转蒸发器上浓缩12 h。浓缩液标记为苦木提取物,在4 °C的冰箱中保存,待进一步使用;SiHa宫颈癌细胞系来源于黑龙江八一农垦大学生命科技学院干细胞及再生生物学研究实验室。

1.2 试剂及仪器

DMEM高糖培养基、Hoechst、MitoSOX试剂盒购自美国Invitrogen公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国Hyclone公司; α -tubulin、 β -actin、Bax、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-7、Caspase-9、Prx V单克隆抗体购自美国Santa Cruz公司; AnnexinV-FITC、二氢乙锭(dihydroethidium, DHE)、JC-1试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 细胞培养皿均购自NEST公司; 流式细胞仪、蛋白质免疫印迹系统购自美国Amersham Bioscience公司。

1.3 细胞培养

将SiHa宫颈癌细胞培养于含有10%胎牛血清(FBS)、1%青霉素/链霉素(1% P/S)的DMEM培养液中, 再将其置于37 °C、5% CO₂的培养箱中培养。

1.4 细胞活性检测

将SiHa细胞以每孔 4×10^3 个细胞接种于96孔板中, 苦木提取物处理24 h, 取药物浓度为40、60、80 $\mu\text{g/mL}$ 处理细胞, 每孔加入10 μL MTT, 在37 °C培养箱中孵育2 h。随后, 弃上清液, 用二甲基亚砜(DMSO)溶解蓝紫色结晶甲臜, 利用酶标仪检测波长为490 nm处的吸光度值。

1.5 细胞凋亡检测

1.5.1 流式细胞仪检测 苦木提取物处理24 h后, 将对照组与处理组(苦木提取物浓度分别为40、60、80 $\mu\text{g/mL}$)的细胞悬于结合缓冲液(binding buffer)中, 加荧光标记的Annexin-V-FITC和PI, 在室温(25 °C)条件下孵育15 min。随即用流式细胞仪分析统计结果。

1.5.2 荧光显微镜法 SiHa细胞经苦木提取物处理24 h后, 将对照组和处理组细胞弃去上清液后, 用磷酸盐缓冲液(1 \times PBS, 0.01 mol/L)冲洗2~3次, 分别添加binding buffer, 再添加荧光标记的Annexin-V-FITC和PI, 于荧光显微镜下观察。

1.6 活性氧(ROS)水平检测

将细胞以每孔 2×10^5 个细胞接种至6孔板内, 收集苦木提取物处理24 h的细胞, 弃上清液后, 用1 \times PBS(0.01 mol/L)冲洗2~3次, 加入5 mol/L的DHE在37 °C培养箱中孵育30 min。弃去上清液, 用1 \times PBS洗1~2次, 利用流式细胞仪分析。

1.7 细胞迁移、集落形成能力检测

划痕实验: SiHa细胞以每孔 1×10^6 个细胞接种于12孔板内, 在细胞单层上进行线性划痕; 用1 \times PBS洗涤细胞3次, 再加入苦木提取物(40 $\mu\text{g/mL}$); 然后利用

荧光显微镜(EVOS[®]x1核心细胞培养显微镜)分别在0、48 h固定位置拍摄。

集落形成实验: SiHa细胞以每孔 1×10^3 个细胞接种于6孔板内, 用苦木提取物(40 $\mu\text{g/mL}$)处理后, 在培养箱中保存10天; 然后用PBS洗涤细胞, 3.7%甲醛在室温(25 °C)条件下固定10 min, 弃去溶液, PBS洗涤细胞, 甲醇处理20 min, 弃去溶液, PBS洗涤细胞, 0.05%结晶紫染色30 min; 弃去溶液, 孔板用PBS溶液洗涤3次, 晾干后扫描成像。

1.8 蛋白质免疫印迹法分析

细胞蛋白在裂解缓冲液中裂解, 在12%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶上分离, 浓度为15 $\mu\text{g/mL}$, 然后将其转移到硝化纤维素膜上(Millipore, Bedford, MA, USA)。一抗cleavage-Caspase-3、cleavage-Caspase-7、cleavage-Caspase-9、Bax、Bcl-2、 α -tubulin、 β -actin和Prx V(稀释比例均为1:1 000)于4 °C的摇床孵育过夜, 分别用含有150 mmol/L氯化钠(Tris缓冲液, TBS)和0.2% Tween 20的Tris-HCl(10 mmol/L, pH7.5)洗涤膜5次, 随后与辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG或抗小鼠IgG(均来自Sigma-Aldrich)在室温下孵育1 h。通过TBS洗涤去除多余的抗体后, 根据制造商的说明, 使用化学发光检测系统(Amersham, 伯克郡, 英国)检测特异性结合。

1.9 Prx V基因过量表达型SiHa细胞系构建

将Prx V过表达序列进行慢病毒构建并根据SiHa细胞的慢病毒滴度进行转染。将SiHa细胞以 1×10^5 细胞/孔接种至48孔板中反应24 h。将porly Brene以1:7的比例混匀放入4 °C冰箱备用。向培养液中加入慢病毒与促进液的混合液感染SiHa细胞72 h后加入培养液(10% FBS, 1% P/S), 转入35 mm培养皿, 待细胞生长至90%后, 用10 g/mL G418筛选细胞, 待细胞稳定生长后利用蛋白质免疫印迹法鉴定有Prx V-his蛋白表达, 则证明转染成功。

1.10 统计学分析

数据以三个独立实验的平均值 \pm 标准差表示。本实验使用SPSS 19.0软件分析实验数据, 并采用双向方差分析来确定治疗组间的显著性差异($P < 0.05$)。

2 结果

2.1 苦木提取物对SiHa细胞活性、凋亡及ROS水平的影响

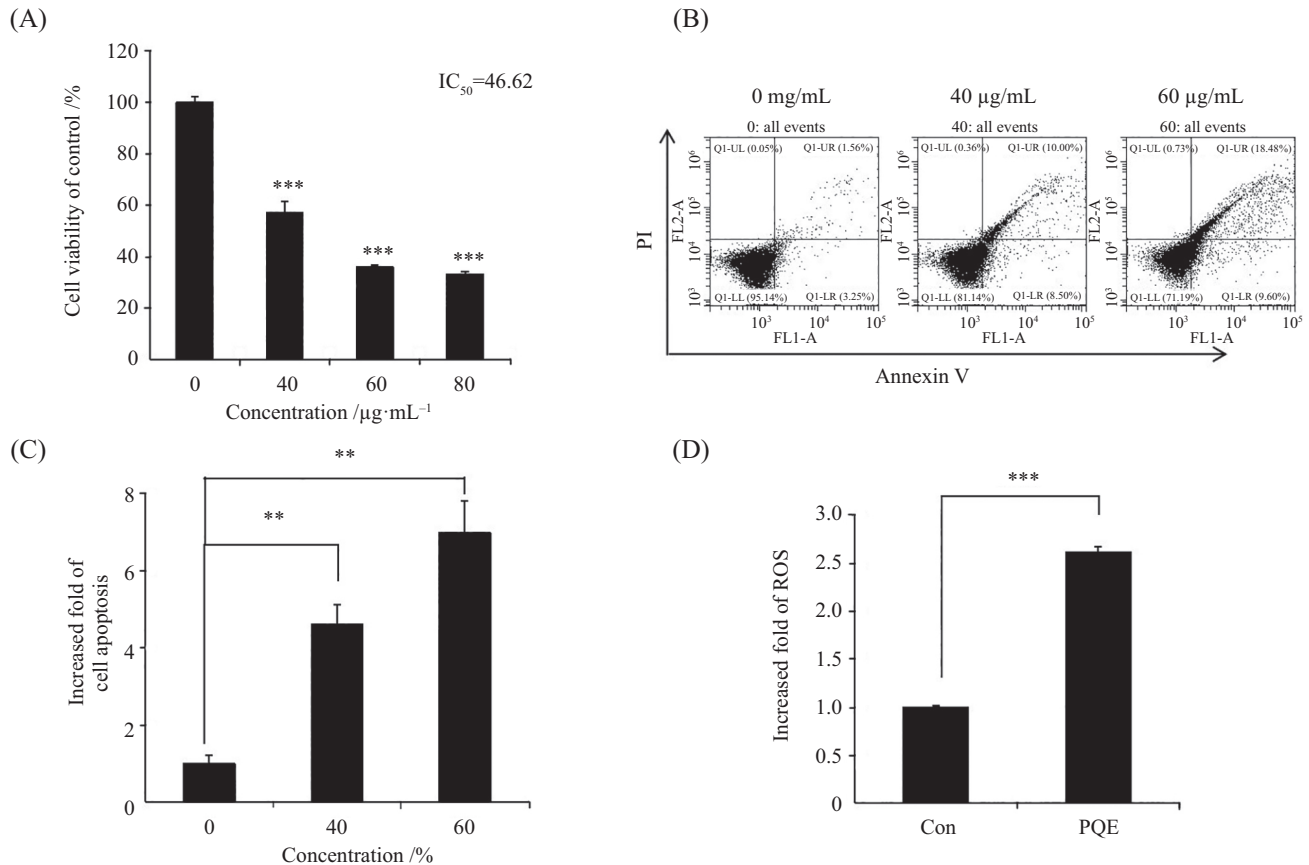
为了检测苦木提取物对SiHa人宫颈癌细胞活力

的影响,我们利用不同浓度(0、40、60、80 $\mu\text{g/mL}$)的苦木提取物处理SiHa细胞24 h,利用MTT assay检测细胞活力。结果显示,当苦木提取物处理细胞的浓度不断增加时, SiHa细胞存活率不断地下降(图1A)。为了验证苦木提取物是否通过诱导细胞凋亡引起SiHa细胞存活率降低,我们以0、40、60、80 $\mu\text{g/mL}$ 的药物浓度梯度处理细胞24 h,利用流式细胞术检测了细胞凋亡情况。结果显示,随着药物浓度的不断升高, Annexin V-FITC和PI标记的荧光强度显著增加,细胞凋亡水平增加(图1B和图1C)。为了验证苦木提取物是否会提高细胞内的活性氧水平,我们利用流式细胞仪进行检测,结果显示,40 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的苦木提取物处理24 h后的SiHa细胞ROS水平明显高于Con组

(图1D)。

2.2 苦木提取物对SiHa细胞Prx V表达水平的影响及Prx V过表达细胞系构建

为了验证Prx V在苦木提取物诱导SiHa细胞凋亡过程中的作用,检测了细胞内Prx V蛋白表达含量,结果显示随着苦木提取物处理时间的增加, Prx V蛋白表达水平明显降低(图2A)。为进一步验证细胞内ROS水平的升高能降低Prx V蛋白表达水平,加入NAC预处理30 min,再用40 $\mu\text{g/mL}$ 的苦木提取物处理24 h后,结果显示,与对照组相比,处理组细胞内的Prx V蛋白表达水平下降,但是加入NAC后, Prx V蛋白表达水平显著上升(图2B),证明了Prx V在苦木提取物诱导SiHa细胞凋亡过程中具有调控作用。



A: MTT检测法检测苦木提取物不同浓度(0、40、60、80 $\mu\text{g/mL}$)处理SiHa细胞24 h后的存活率; B: 流式细胞术检测不同浓度(0、40、60 $\mu\text{g/mL}$)的苦木提取物处理24 h后的SiHa细胞凋亡情况; C: 流式细胞仪定量分析细胞凋亡情况; D: 流式细胞术检测苦木提取物组与Con组细胞内ROS水平。*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ 。

A: MTT assay was used to detect the survival rate of SiHa cells treated with different concentrations of PQE (0, 40, 60, 80 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h; B: the apoptosis of SiHa cells was detected by flow cytometry after treated with PQE at different concentrations (0, 40, 60 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h; C: cell apoptosis was quantitatively analyzed by flow cytometry; D: intracellular ROS level was detected by flow cytometry in the drug treatment group compared with the Con group. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ 。

图1 苦木提取物对SiHa细胞ROS水平及细胞凋亡的影响

Fig.1 Effects of PQE on cellular ROS level and apoptosis in SiHa cells

为了探究*Prx V*是如何调控苦木提取物诱导SiHa细胞凋亡的, 我们采用慢病毒技术对SiHa细胞进行转染, 将*Prx V*基因过量表达和空白载体的SiHa细胞系构建后分别命名为*Prx V*和Mock两个组。蛋白免疫印迹法鉴定结果表明, SiHa细胞内*Prx V*过量表达组已带有转入的his标签, 说明细胞构建成功(图2C)。

2.3 过表达*Prx V*减弱苦木提取物对SiHa细胞活力、迁移及集落形成能力的影响

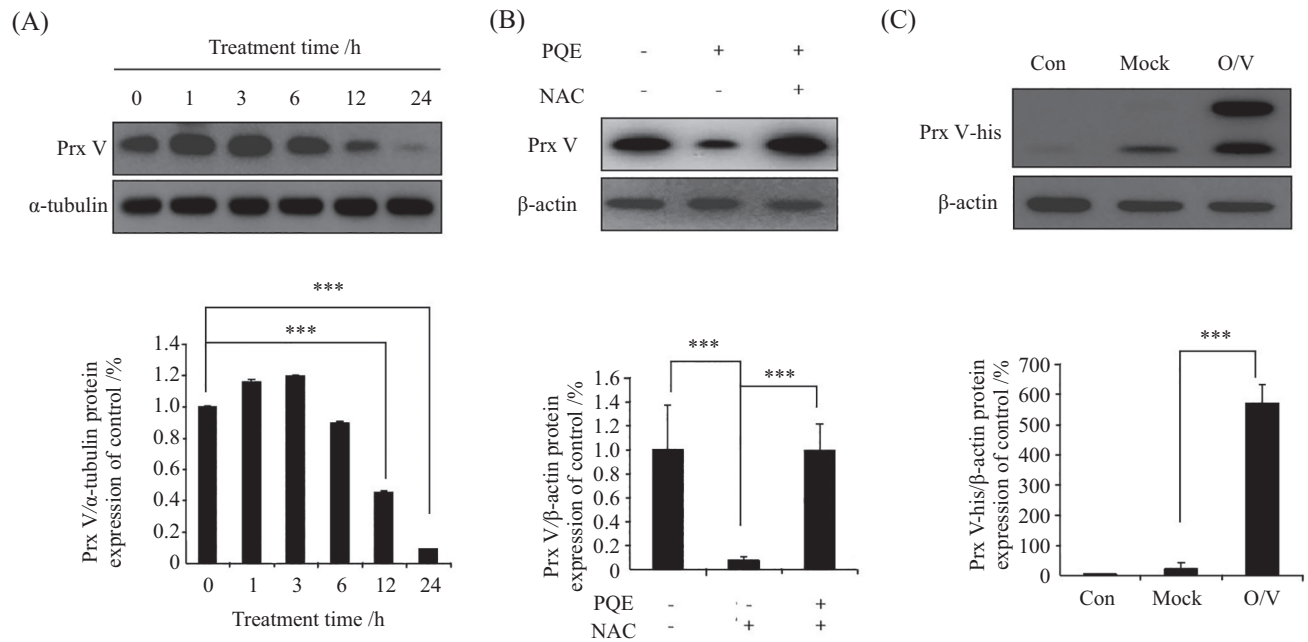
利用不同浓度(0、40、60、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的苦木提取物处理SiHa细胞24 h, 利用MTT assay检测细胞存活率。结果表明, *Prx V*过表达组SiHa细胞的存活率明显高于Mock组(图3A)。

为了检测*Prx V*过量表达对SiHa细胞迁移能力和群落形成能力的影响, 我们利用0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的苦木提取物处理Mock组和*Prx V*组SiHa细胞48 h, 通过划痕实验和群落形成实验分别检测*Prx V*基因的过量表达对细胞迁移能力和群落形成能力的影响; 结果显示, *Prx V*组SiHa细胞迁移速率快于Mock组;

同时SiHa细胞群落形成的能力*Prx V*组高于Mock组(图3B~图3D)。

2.4 过表达*Prx V*抑制苦木提取物对SiHa细胞内ROS及线粒体损伤的影响

为了探究*Prx V*的过量表达对苦木提取物诱导的SiHa细胞内ROS水平的影响, 利用ROS标记试剂DHE进行标记, 荧光显微镜照相结果显示, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的苦木提取物处理后*Prx V*组细胞内ROS水平低于Mock组(图4A)。接着, 为了检测*Prx V*的过量表达对苦木提取物诱导的SiHa细胞线粒体内ROS水平的影响, 利用线粒体ROS标记试剂Mito SOX进行标记, 荧光显微镜照相结果表明, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的苦木提取物处理24 h后*Prx V*组细胞内ROS水平低于Mock组(图4B)。接下来为了检测*Prx V*基因过量表达对苦木提取物诱导的SiHa细胞线粒体损伤的影响, 利用线粒体膜电位标记试剂JC-1进行标记, 荧光显微镜照相结果显示, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的苦木提取物处理24 h后*Prx V*组细胞内线粒体膜电位水平高于Mock组(图4C)。最后为了检测*Prx V*基因过量表达对苦木提取物诱导的

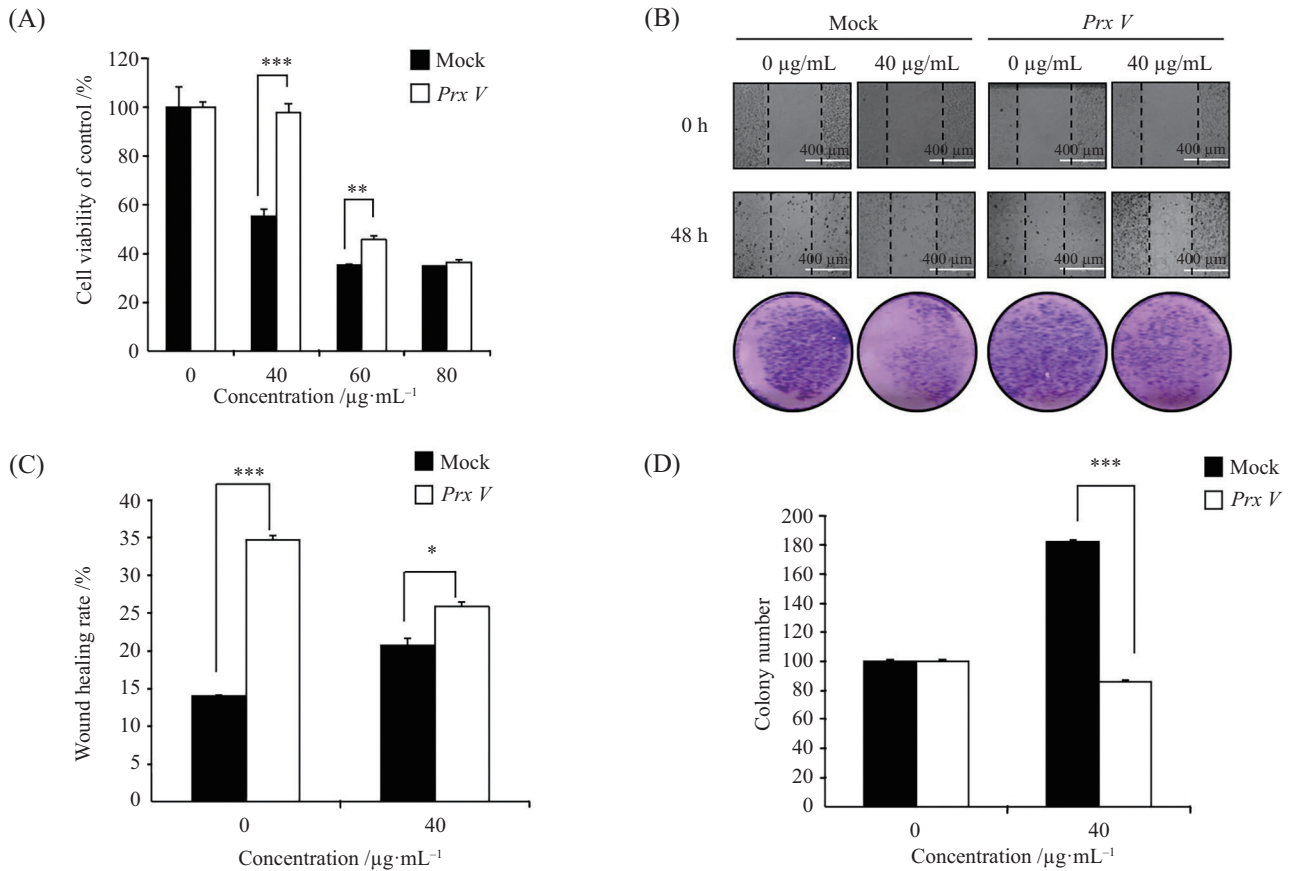


A: 不同时间(0、1、3、6、12、24 h)下利用40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 苦木提取物处理SiHa细胞后, 蛋白免疫印迹法检测*Prx V*蛋白质水平; B: 利用NAC预处理SiHa细胞, 蛋白免疫印迹法检测苦木提取物组内*Prx V*蛋白质水平; C: 利用蛋白免疫印迹法检测*Prx V*过表达组与Mock组的SiHa细胞系的构建; *** $P < 0.001$ 。

A: SiHa cells were treated with 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ construct of *Prx V* at different time (0, 1, 3, 6, 12, 24 h), and the protein level of *Prx V* was detected by Western blot; B: SiHa cells were pretreated with NAC, and *Prx V* protein level in drug treatment group was detected by western blot; C: Western blot was used to detect the construction of SiHa cell lines of *Prx V* overexpression group and Mock group; *** $P < 0.001$.

图2 苦木提取物对SiHa细胞*Prx V*表达水平的影响及*Prx V*过表达细胞系构建

Fig.2 Effects of PQE on *Prx V* gene expression and construct of *Prx V* over-expression cell line in SiHa cell



A: 利用MTT法检测不同浓度(0、40、60、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的苦木提取物对*Prx V*过表达组与Mock组SiHa细胞活力的影响; B: 利用划痕实验和群落形成实验检测苦木提取物浓度0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理的*Prx V*过表达组与Mock组SiHa细胞系的细胞迁移能力和群落形成能力; C: 迁移能力定量分析; D: 群落形成能力的定量分析。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A: MTT assay was used to detect the effects of different concentrations of PQE (0, 40, 60, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on the viability of *Prx V* overexpressed SiHa cells and Mock SiHa cells; B: the cell migration and community formation of *Prx V* overexpression group and Mock SiHa cell lines treated with PQE concentration of 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were detected by scratch experiment and community formation experiment; C: quantitative analysis of migration capacity; D: quantitative analysis of community formation capacity. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图3 过表达*Prx V*减弱苦木提取物对SiHa细胞活力、迁移及集落形成能力的影响

Fig.3 Effects of overexpression of *Prx V* on the viability, migration and colony formation of SiHa cells was attenuated by PQE

SiHa细胞存活率的影响, 利用活细胞荧光染料钙黄绿素进行标记, 荧光显微镜照相结果显示, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的苦木提取物处理24 h后的*Prx V*组细胞存活率高于Mock组(图4D)。

2.5 *Prx V*的过表达抑制了苦木提取物诱导的SiHa人宫颈癌的细胞凋亡

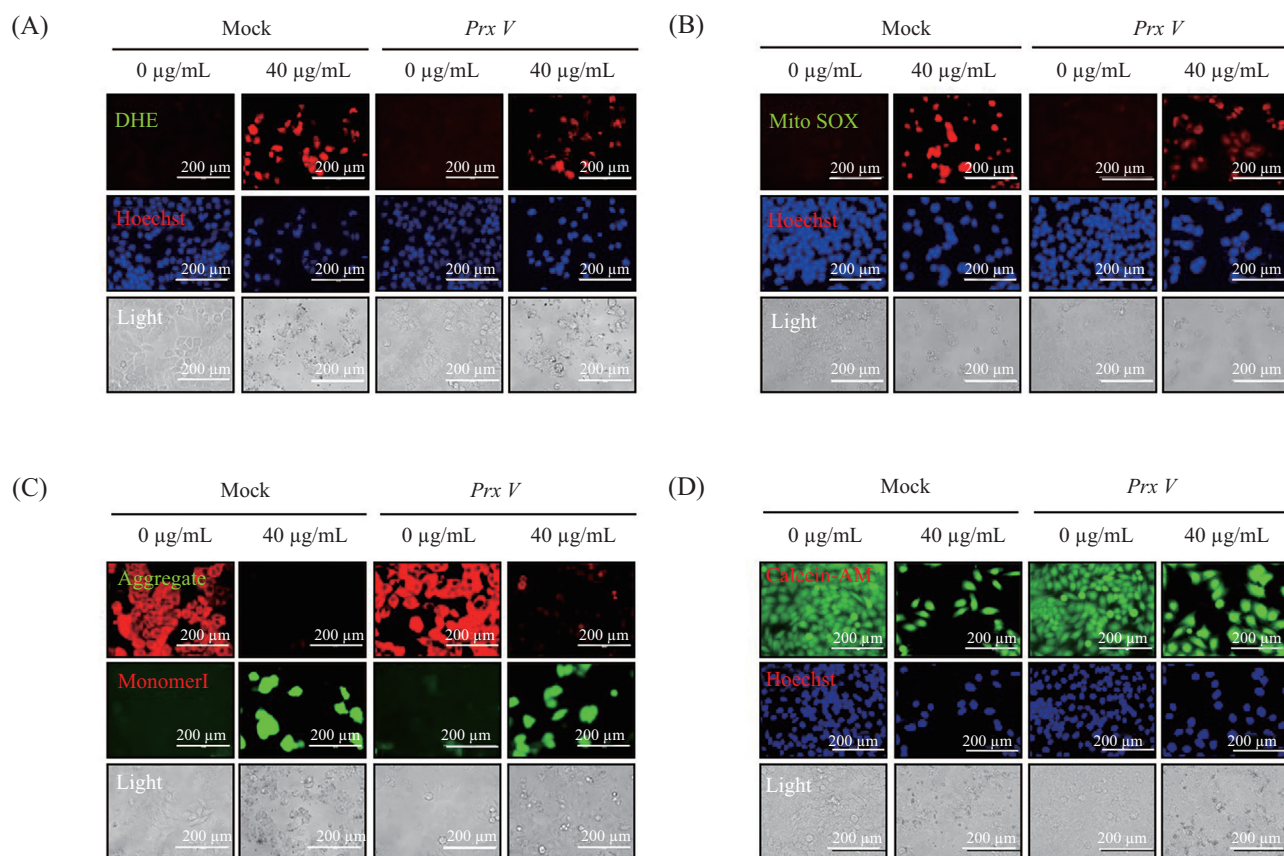
为了探究*Prx V*过表达对苦木提取物诱导的SiHa细胞凋亡相关蛋白表达水平的影响, 我们利用40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的苦木提取物分别处理Mock组和*Prx V*组SiHa细胞, 再利用蛋白免疫印迹法检测40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的苦木提取物处理的Mock组及*Prx V*组细胞内凋亡相关蛋白质水平的变化。结果显示苦木提取物处理后*Prx V*组细胞中C-Caspase-3、C-Caspase-7和C-Caspase-9、Bax蛋白表达量明显低于Mock组, Bcl-2蛋白表达量

明显高于Mock组(图5A~图5F)。

3 讨论

癌症是一个复杂的过程, 涉及一系列增殖信号, 包括逃避生长抑制、抵抗细胞死亡、不受控制的增殖以及癌细胞的侵袭和转移。新的抗肿瘤药物, 包括天然植物药物及其衍生物的开发一直是人们关注的焦点^[21-22]。事实上, 草药已被测试为多种癌症, 包括白血病、卵巢癌、睾丸癌、肺癌、肝癌、食道癌、胃癌、结肠癌和直肠癌^[23-24]在内的潜在治疗方式。在本研究中, 我们报道了苦木提取物在SiHa宫颈癌细胞中具有抗癌特性, 当其在正常细胞中时, 具有低细胞毒性, 促进细胞凋亡并抑制癌细胞迁移和增殖。

ROS作为第二信使, 在细胞生存、增殖、迁移



A: 利用DHE和Hoechst染色检测*Prx V*的过量表达对苦木提取物诱导的SiHa细胞内ROS水平的影响; B: 利用Mito SOX和Hoechst染色检测*Prx V*的过量表达对苦木提取物诱导的SiHa细胞线粒体内ROS水平的影响; C: 利用JC-1染色检测*Prx V*的过量表达对苦木提取物诱导的SiHa细胞线粒体损伤的影响; D: 利用钙黄绿素染色检测*Prx V*的过量表达对苦木提取物诱导的SiHa细胞活力的影响。

A: DHE and Hoechst staining were used to detect the effect of overexpression of *Prx V* on ROS levels in PQE-induced SiHa cells; B: Mito SOX and Hoechst staining were used to detect the effect of overexpression of *Prx V* on mitochondrial ROS levels in PQE-induced SiHa cells; C: JC-1 staining was used to detect the effect of overexpression of *Prx V* on PQE-induced mitochondrial damage in SiHa cells; D: the effect of overexpression of *Prx V* on the viability of PQE-induced SiHa cells was detected by calcein staining.

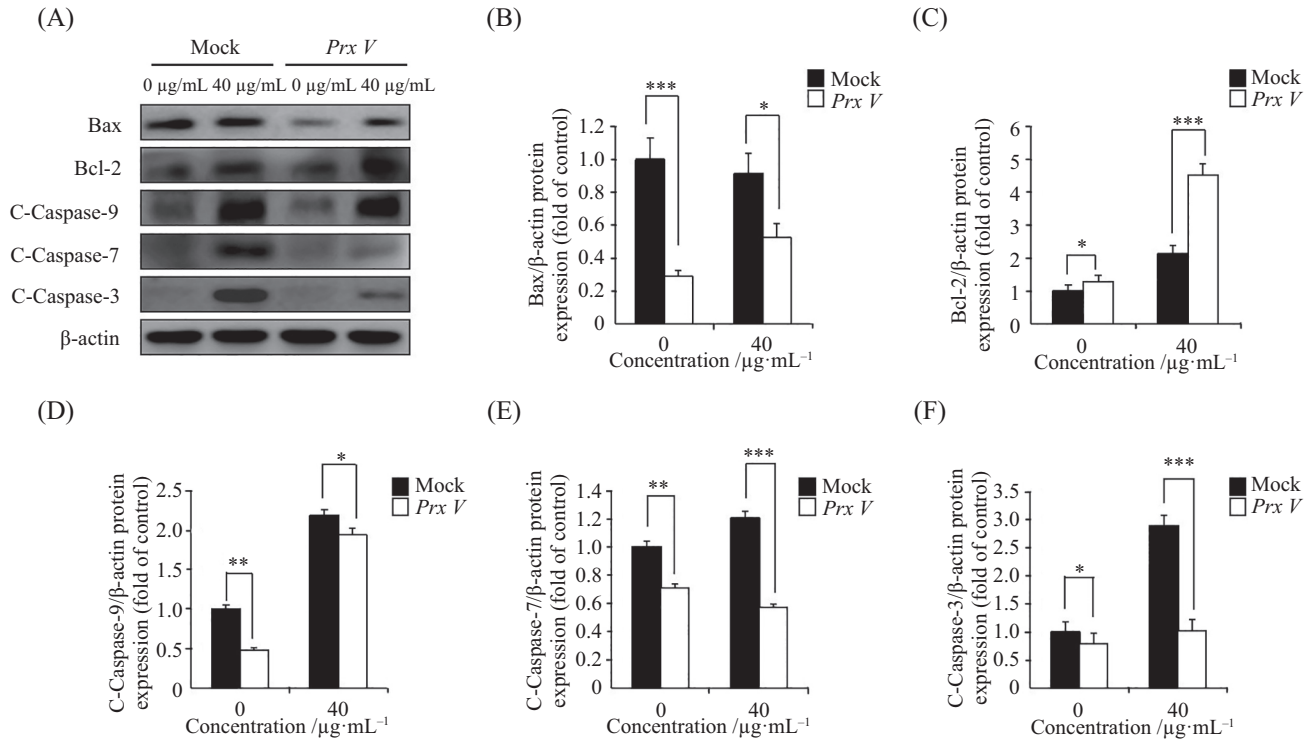
图4 过表达*Prx V*抑制苦木提取物对SiHa细胞内ROS及线粒体损伤的影响

Fig.4 Effects of PQE inhibition by overexpression of *Prx V* on ROS and mitochondrial damage in SiHa cells

和凋亡中发挥关键作用^[25]。众所周知,线粒体不仅是细胞内ROS产生的主要来源,而且被认为是ROS损伤的主要靶点^[26-27]。在病理条件下,线粒体中过量的ROS形成会减少能量合成,如ATP形式,并加速额外ROS的产生^[28],ROS的积累会损坏线粒体膜,并可能导致细胞中线粒体依赖性凋亡^[29-30]。

在这项研究中,我们的实验数据显示苦木提取物处理显著促进了SiHa宫颈癌细胞的细胞内和线粒体ROS产生,以及ATP合成,同时线粒体膜电位降低。Caspase和Bcl-2家族成员参与促进线粒体依赖性细胞凋亡^[31-32]。在我们的研究中,我们发现苦木提取物治疗显著上调了SiHa宫颈癌细胞中的促凋亡蛋白,如裂解Caspase-9、裂解Caspase-3和Bax的表达水平,同时下调了抗凋亡蛋白Bcl-2的表达。此

外,ROS抑制显著减少苦木提取物处理的SiHa宫颈癌细胞中的凋亡及其迁移、增殖和线粒体通透性。PRDX家族在抗氧化过程中起着核心作用;它在许多哺乳动物中充当ROS浓度的调节器,以响应各种细胞内信号转导途径,调节细胞的各种生理病理活动^[33]。*Prx V*基因过表达显著降低了苦木提取物的诱导宫颈癌细胞凋亡的效果。所有这些发现强烈表明,ROS是苦木提取物刺激SiHa宫颈癌细胞正常功能的关键点。*Prx V*基因也可以作为未来宫颈癌治疗的突破点。中草药虽然可以避免引起药物抵抗,但因为其成分繁多,作用机制复杂,苦木提取物虽然有良好的抗癌效果,但仍然是一种混合物,其抗癌效果可能是由一种或者多种共同作用的。在未来的研究中,我们计划将苦木提取物进一步分离纯化,从而



A: 利用蛋白免疫印迹法检测凋亡相关蛋白表达水平变化; B-F: 蛋白质表达水平的定量分析。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A: determination of apoptosis-related protein levels by Western blot; B-F: quantitative analysis of protein expression level. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图5 *PrxV*的过表达抑制了苦木提取物诱导的SiHa人宫颈癌的细胞凋亡

Fig.5 Overexpression of *PrxV* inhibited cell apoptosis induced by PQE in SiHa human cervical cancer cells

找到其主要的活性成分。

综上所述,苦木提取物通过抑制细胞内Prx V的表达,使细胞内ROS水平增高,引起SiHa细胞发生凋亡,过量表达细胞内*Prx V*基因有效降低了ROS水平,抑制了凋亡水平。该研究为宫颈癌的临床治疗研究提供了一种靶向性治疗药物,同时初步说明了Prx V对苦木提取物诱导宫颈癌SiHa细胞凋亡的调控作用研究具有重要意义,为今后的宫颈癌治疗提供理论基础。

参考文献 (References)

- [1] 胡尚英, 郑荣寿, 赵方辉, 等. 1989至2008年中国女性子宫颈癌发病和死亡趋势分析[J]. 中国医学科学院学报(HU S Y, ZHENG R S, ZHAO F H, et al. Analysis on the incidence and death trend of cervical cancer in Chinese women from 1989 to 2008 [J]. Journal of the Chinese Academy of Medical Sciences), 2014, 36(2): 7.
- [2] 周琦, 吴小华, 刘继红, 等. 宫颈癌诊断与治疗指南(第四版)[J]. 中国实用妇科与产科杂志(ZHOU Q, WU X H, LIU J H, et al. Guidelines for diagnosis and treatment of cervical cancer, Fourth Edition [J]. Chinese Journal of Practical Gynecology and Obstetrics), 2018, 34(6): 613-22.
- [3] 孟庆普. 我国宫颈癌发病率世界第二[J]. 山东中医药大学学报(MENG Q P. The incidence rate of cervical cancer in China is the

second in the world [J]. Journal of Shandong University of Traditional Chinese Medicine), 2014(3): 46.

- [4] 李晓凤, 方媛, 蒋瑶, 等. 苦木科植物化学成分及生物活性研究进展[J]. 中国药师(LI X F, FANG Y, JIANG Y. Research progress on chemical constituents and biological activities of araliaceae plants [J]. China Pharm), 2015(5): 844-7.
- [5] 王琦, 周玲仙, 罗晓东. 苦木科植物化学成分及生物活性研究进展[J]. 国际中医中药杂志(WANG Q, ZHOU L X, LUO X D. Research progress on chemical constituents and biological activities of araliaceae plants [J]. International Journal of Traditional Chinese Medicine), 2004, 26(5): 277-80,86.
- [6] 赵文娜, 张新新, 谢人明, 等. 苦木化学成分和药理作用研究进展[J]. 中药材(ZHAO W N, ZHANG X X, XIE R M, et al. Research progress on chemical constituents and biological activities of araliaceae plants [J]. Chinese Herbal Medicine), 2011, 34(7): 1149-52.
- [7] SHINSAKU N, MICHIHARU S, MASAYOSHI O, et al. Effects of four chemicals isolated from *Picrasma quassioides* and *Petasites japonicus* on P-388 lymphocytic leukemia cells *in vitro* [J]. Senshokutai, 1986, 38: 1179-88.
- [8] CHEN J, YAN X H, DONG J H, et al. Tobacco mosaic virus (TMV) inhibitors from *Picrasma quassioides* Benn [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(15): 6590-5.
- [9] 刘岩, 张虹, 戴玮, 等. 苦木对HepG-2细胞增殖抑制作用及机制的研究[J]. 中药材(LIU Y, ZHANG H, DAI W, et al. Inhibitory effect of bitter wood on HepG-2 cell proliferation and its mechanism [J]. Chinese Herbal Medicine), 2010, 33(7): 1143-6.

- [10] GUPTA S C, HEVIAEVIA D, PATCHVA S, et al. Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 16(11): 1295-322.
- [11] GONG Y X, LIU Y, JIN Y H, et al. *Picrasma quassioides* extract elevates the cervical cancer cell apoptosis through ROS-mitochondrial axis activated p38 MAPK signaling pathway [J]. *In Vivo*, 2020, 34(4): 1823-33.
- [12] 李兴太, 张春英, 仲伟利, 等. 活性氧的生成与健康疾病关系研究进展[J]. *食品科学*(LI X T, ZHANG C Y, ZHONG W L, et al. Research progress on the relationship between the production of reactive oxygen species and health and disease [J]. *Food science*), 2016, 37(13): 257-70.
- [13] 曾伟, 肖涛, 蔡安烈, 等. Peroxioredoxins在肿瘤中的研究进展[J]. *中国医药导报*(ZENG W, XIAO T, CAI A L, et al. Research progress of peroxiredoxins in tumor [J]. *China Medical Herald*), 2017, 14(25): 38-41.
- [14] 段婷, 姚兵. 过氧化物还原酶蛋白家族与疾病[J]. *医学研究生学报*(DUAN T, YAO B. Peroxide reductase protein family and diseases [J]. *Journal of Medical Postgraduates*), 2015(1): 98-101.
- [15] LI L, ZHANG Y G, CHEN C L, et al. Anti-apoptotic role of peroxiredoxin III in cervical cancer cells [J]. *FEBS Open Bio*, 2012, doi: 10.1016/j.fob.2012.12.002.
- [16] 刘悦, 焦冰洋, 于楠楠, 等. β -拉帕醌通过下调过氧化物酶V诱导SW480结肠癌细胞凋亡[J]. *中国细胞生物学学报*(LIU Y, JIAO B Y, YU N N, et al. β -Rapadione induces apoptosis of SW480 colon cancer cells by down-regulation of peroxidase V [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2016, 38(12): 1487-93.
- [17] 孙虎男, 焦冰洋, 王闯, 等. TBB诱导AGS细胞发生凋亡过程中对PrxV表达量的影响[J]. *黑龙江八一农垦大学学报*(SUN H N, JIAO B Y, WANG C, et al. Effect of TBB on the expression of PrxV in AGS cells during apoptosis [J]. *Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural Reclamation University*), 2018(4): 86-90.
- [18] 宫伊希, 谢丹萍, 王闯, 等. 过氧化物酶V在顺铂诱导HepG2肝癌细胞凋亡过程中的调控作用[J]. *中国细胞生物学学报*(GONY Y X, XIE D P, WANG C, et al. Role of Peroxidase V in cisplatin induced apoptosis of HepG2 hepatoma cells [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2019, 41(1): 95-102.
- [19] 焦冰洋, 王闯, 刘悦, 等. 大黄素通过下调Prx V蛋白水平诱导AGS胃癌细胞凋亡[J]. *黑龙江八一农垦大学学报*(JIAO B Y, WANG C, LIU Y, et al. Emodin induces apoptosis of AGS gastric cancer cells by down regulating the level of Prx V protein [J]. *Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural Reclamation University*), 2018, 30(1): 24-8.
- [20] LIN C H, PENG S F, CHUEH F S, et al. The ethanol crude extraction of *Cyperus rotundus* regulates apoptosis-associated gene expression in HeLa human cervical carcinoma cells *in vitro* [J]. *Anticancer Res*, 2019, 39(7): 3697-709.
- [21] SIMONE B, WEIDLE U H, WALTER K. The role of MAPK pathways in the action of chemotherapeutic drugs [J]. *Carcinogenesis*, 2002, 23(11): 1831-8.
- [22] HADI S M, ASAD S F, SINGH S, et al. A putative mechanism for anticancer and apoptosis inducing properties of plantderived polyphenolic compounds [J]. *IUBMB Life*, 2000, 50(3): 167-71.
- [23] HSIAO Y H, LIN C W, WANG P H, et al. The potential of chinese herbal medicines in the treatment of cervical cancer [J]. *Integrative Cancer Therapies*, 2019, doi: 10.1177/1534735419861693.
- [24] HU L L, CHEN D S, WANG Y Y, et al. *Smilax china* L. rhizome extract inhibits nuclear factor- κ b and induces apoptosis in ovarian cancer cells [J]. *Chin J Integr Med*, 2015, 21(12): 907-15.
- [25] LJLAB C, HUI Y. DFSG, a novel herbal cocktail with anti-asthma activity, suppressed MUC5AC in A549 cells and alleviated allergic airway hypersensitivity and inflammatory cell infiltration in a chronic asthma mouse model [J]. *Biomed Pharmacoth*, 2020, 121: 109584.
- [26] LIOCHEV S I. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 60(10): 1-4.
- [27] OTT M, GOGVADGE V, ORRENIUS S, et al. Mitochondria, oxidative stress and cell death [J]. *Apoptosis*, 2007, 12(5): 913.
- [28] 郭倩, 王蓓. 低氧诱导线粒体自噬的机制及其在相关疾病中的研究进展[J]. *国际呼吸杂志*(GUO Q, WANG B. The mechanism of hypoxia induced mitochondrial autophagy and its research progress in related diseases [J]. *International Journal of Respiratory Sciences*), 2018, 38(8): 5.
- [29] 鲁银. 阿散酸诱导NRK细胞凋亡的线粒体caspase-9依赖性途径研究[D]. 长沙: 湖南农业大学(LU Y. Mitochondrial caspase-9 dependent pathway of ARSENIC ACID induced NRK cell apoptosis [D]. Changsha: Hunan Agricultural University), 2012.
- [30] 梁盟. 联合NRF2沉默及自噬抑制增强蛋白酶体抑制剂诱导的胰腺癌细胞ROS依赖的线粒体凋亡[D]. 武汉: 华中科技大学(LIANG M. Combination of NRF2 silencing and autophagy inhibition enhances ROS dependent mitochondrial apoptosis in pancreatic cancer cells induced by proteasome inhibitors [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology), 2015.
- [31] SUN L Y, YANG B L, ZHANG A, et al. HPV16 E6 gene mutation promotes the proliferation of cervical cancer cells by regulating the expression of BDNF/TrkB [J]. *Chin J Integr Med*, 2021, 27(4): 246-50.
- [32] KIM H J, PARK C, HAN M H, et al. Baicalein induces caspase-dependent apoptosis associated with the generation of ROS and the activation of AMPK in human lung carcinoma A549 cells [J]. *Drug Dev Res*, 2016, 77(2): 73-86.
- [33] GOO S. Overview on peroxiredoxin [J]. *Mol Cell*, 2016, 39(1): 1-5.