

槲子苷抑制PI3K/AKT/mTOR通路对宫颈癌细胞增殖、侵袭、自噬的影响

田甜¹ 李刚² 张峰¹ 徐淑娜¹ 李伟华^{1*}

(¹济南市人民医院, 药剂科, 济南 271100; ²济南市人民医院, 科教科, 济南 271100)

摘要 该文旨在探究槲子苷(GEN)抑制磷酸肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶标(mTOR)通路对宫颈癌细胞增殖、侵袭、自噬的影响。将HeLa细胞分别用不同浓度(0、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$) GEN处理或用100 $\mu\text{mol/L}$ GEN和10 $\mu\text{mol/L}$ 740Y-P共同处理, MTT和集落形成实验检测GEN对HeLa细胞增殖的影响; Transwell小室和细胞划痕实验检测GEN对HeLa细胞侵袭和迁移的影响; 流式细胞术检测GEN对HeLa细胞凋亡的影响; 吖啶橙(AO)染色以测定自噬过程中出现的酸性囊泡细胞器(AVO)数量; LC3免疫荧光检测HeLa细胞自噬情况; qRT-PCR检测HeLa细胞 *PI3K*、*PTEN*、*AKT*、*TSC2*和*mTOR* mRNA表达水平; 蛋白质免疫印迹检测HeLa细胞自噬和PI3K/AKT/mTOR信号通路相关蛋白的表达水平。与GEN-0组比较, 不同浓度GEN组HeLa细胞存活率降低, 集落形成数、侵袭数减少, 迁移率, *PI3K*、*AKT*和*mTOR* mRNA表达水平及p-*PI3K*/*PI3K*、p-*AKT*/*AKT*和p-*mTOR*/*mTOR*水平均下降($P<0.05$), 细胞凋亡率、AVO数量、LC3荧光强度、*PTEN* mRNA表达水平、*TSC2* mRNA表达水平、Beclin-1蛋白表达水平、LC3II/I蛋白表达水平上升($P<0.05$); 与GEN-100组比较, GEN-100+740Y-P组HeLa细胞存活率增加, 集落形成数、细胞侵袭数增多, 迁移率、*PI3K*、*AKT*和*mTOR* mRNA表达水平及p-*PI3K*/*PI3K*、p-*AKT*/*AKT*和p-*mTOR*/*mTOR*水平上升($P<0.05$), 细胞凋亡率、AVO数量、LC3荧光强度、*PTEN* mRNA表达水平、*TSC2* mRNA表达水平、Beclin-1蛋白表达水平、LC3II/I蛋白表达水平下降($P<0.05$)。GEN通过抑制PI3K/AKT/mTOR通路抑制宫颈癌细胞增殖和侵袭, 促进细胞自噬。

关键词 槲子苷; 宫颈癌细胞; 磷酸肌醇3-激酶; 哺乳动物雷帕霉素靶标; 自噬

Effects of Geniposide on the Proliferation, Invasion, and Autophagy of Cervical Cancer Cells by Inhibiting the PI3K/AKT/mTOR Pathway

TIAN Tian¹, LI Gang², ZHANG Feng¹, XU Shuna¹, LI Weihua^{1*}

(¹Department of Pharmacy, Jinan People's Hospital, Jinan 271100, China;

²Department of Science and Education, Jinan People's Hospital, Jinan 271100, China)

Abstract This study aims to investigate the effects of GEN (geniposide) on the proliferation, invasion, and autophagy of cervical cancer cells by inhibiting the PI3K (phosphoinositol 3-kinase)/AKT (protein kinase B)/mTOR (mammalian target of rapamycin) pathway. HeLa cells were treated with different concentrations (0, 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$) of GEN or with a combination of 100 $\mu\text{mol/L}$ GEN and 10 $\mu\text{mol/L}$ 740Y-P. MTT and colony formation assays were used to detect the effect of GEN on HeLa cell proliferation.

收稿日期: 2024-11-12

接受日期: 2024-12-30

济南市科技创新发展计划(批准号: 202134050)资助的课题

*通信作者。Tel: 13127269969, E-mail: 361161637@qq.com

Received: November 12, 2024

Accepted: December 30, 2024

This work was supported by the Jinan Science and Technology Innovation Development Plan (Grant No.202134050)

*Corresponding author. Tel: +86-13127269969, E-mail: 361161637@qq.com

Transwell chamber and cell scratch assay were used to detect the effects of GEN on HeLa cell invasion and migration. Flow cytometry was used to detect the effect of GEN on apoptosis of HeLa cells. AO (acridine orange) staining was used to determine the number of AVOs (acidic vesicle organelles) presenting during autophagy. Autophagy of HeLa cells was detected by LC3 immunofluorescence. The mRNA expression levels of *PI3K*, *PTEN*, *AKT*, *TSC2* and *mTOR* in HeLa cells were detected by qRT-PCR. Western blot was used to detect the expression levels of autophagy and PI3K/AKT/mTOR signaling pathway related proteins in HeLa cells. Compared with the GEN-0 group, the survival rate, colony formation number, cell invasion number, migration rate, *PI3K*, *AKT* and *mTOR* mRNA expression, p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT, and p-mTOR/mTOR levels of HeLa cells in different concentrations of GEN groups decreased ($P<0.05$), and the apoptosis rate, AVO quantity, LC3 positive rate, *PTEN* and *TSC2* mRNA expression, Beclin-1 and LC3II/I protein expression increased ($P<0.05$). Compared with the GEN-100 group, the survival rate and colony formation number, cell invasion number, migration rate, *PI3K*, *AKT* and *mTOR* mRNA expression, p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT, and p-mTOR/mTOR levels of HeLa cells in the GEN-100+740Y-P group increased ($P<0.05$), and the apoptosis rate, AVO quantity, LC3 positive rate, *PTEN* and *TSC2* mRNA expression, Beclin-1 and LC3II/I protein expression decreased ($P<0.05$). GEN inhibits the PI3K/AKT/mTOR pathway to suppress the proliferation and invasion of cervical cancer cells and promote autophagy.

Keywords geniposide; cervical cancer cells; phosphoinositol 3-kinase; mammalian target of rapamycin; autophagy

宫颈癌是女性中第四大常见癌症, 每年造成近8%的女性死亡, 目前, 发达国家宫颈癌死亡率正在下降; 然而, 由于药物和检测方面的限制, 许多发展中国家的宫颈癌死亡率仍然很高^[1]。此外, 用于治疗宫颈癌的药物会产生各种副作用, 比如致使正常细胞产生不可逆的功能丧失和畸形^[2]。自噬是一种分解和回收老化蛋白质和受损细胞器的过程, 可平衡能量来源, 利于细胞生存, 但该过程也能够对癌细胞发挥保护作用, 进而促进癌症进展^[3]。磷酸肌醇3-激酶(phosphoinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶标(mammalian target of rapamycin, mTOR)通路作为调节自噬的关键通路之一, 参与包括各种肿瘤在内的一系列病理性疾病的发生和进展^[4]。多项研究表明, PI3K/AKT/mTOR信号通路在宫颈癌发展中发挥重要作用, 该通路调控人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)阳性宫颈癌细胞中的病毒/宿主细胞串扰, 在宫颈癌中经常失调, 可能是宫颈癌的潜在治疗靶点^[5-6]。天然产物被认为是发现新药的宝藏, 对医学具有重要价值。越来越多证据表明, 天然产物可以通过调控PI3K/AKT/mTOR介导的自噬, 从而抑制肿瘤生长。梔子苷(geniposide, GEN), 又称京尼平苷, 是从梔子科植物梔子中分离得到的活性成分, 是一种水溶性环烯醚萜葡萄糖苷^[7]。在传统

医学中, GEN被认为具有抗炎、抗血管生成、抗氧化的作用, 用于治疗各种炎症相关疾病, 包括癌症^[8]。既往研究表明, GEN能够诱导宫颈癌细胞凋亡^[9], 抑制人口腔鳞状癌细胞增殖和迁移^[10]; 其也通过调控GLP-1R/PI3K/AKT/mTOR通路激活自噬, 改善糖皮质激素诱导的成骨细胞凋亡^[11]。基于此, 本研究旨在探究GEN对宫颈癌细胞增殖、侵袭和自噬影响, 以及该过程与PI3K/AKT/mTOR通路的关系。

1 材料与方法

1.1 试剂

人宫颈癌细胞(HeLa细胞)(目录号: TCHu187)购于中国科学院上海细胞库; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(货号: A5256701)和DMEM培养基(货号: 11965092)购于美国ThermoFisher Scientific公司; 链霉素/青霉素(货号: P1400)购于北京索莱宝生物科技有限公司; GEN(货号: G889653)购于上海麦克林生化科技股份有限公司; PI3K激活剂(货号: 740Y-P)(目录号: HY-P0175)购于美国MedChemExpress公司; 噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)(货号: C7062)购于北京博奥森生物技术有限公司; 4%多聚甲醛(货号: BL539A)购于安徽白鲨生物科技有限公司; 结晶紫染料(货号: 60505ES25)购于翌圣生物科技(上海)

股份有限公司; Transwell小室(货号: 3407)购于美国Corning公司; 细胞凋亡检测试剂盒(货号: E-CK-A211)购于武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; 吖啶橙(acridine orange, AO)染色试剂盒(货号: C2017S)购于上海碧云天生物技术有限公司; p-PI3K(货号: AP0427)、PI3K(货号: A22730)、p-AKT(货号: AP0637)、AKT(货号: A17909)、p-mTOR(货号: AP0978)、mTOR(货号: A2445)、Beclin-1(货号: A21191)、LC3(货号: A12319)和 β -actin(货号: AC026)一抗及二抗购于爱博泰克生物科技有限公司。

1.2 细胞培养

将HeLa细胞在补充有10% FBS和1%链霉素/青霉素的DMEM中培养, 并维持培养箱环境在37 °C和5% CO₂。当细胞在培养瓶中达到85%融合度时, 对细胞进行传代培养。将生长至对数期的细胞分别用不同浓度(0、25、50、100 μ mol/L) GEN处理, 并分为GEN-0组、GEN-25组、GEN-50组、GEN-100组。另取HeLa细胞用100 μ mol/L GEN和10 μ mol/L 740Y-P共同处理, 作为GEN-100+740Y-P组。

1.3 MTT测定

将细胞按照1.2的方法处理24 h, 去除培养基, 加入MTT溶液(40 μ L/孔), 37 °C孵育2 h。最后, 除去MTT溶液, 加入100 μ L DMSO以溶解甲臞晶体, 并使用酶标仪测量490 nm波长处的吸光度(*D*)值。根据公式计算存活率, 存活率(%)=[(实验组*D*值-空白组*D*值)/(对照组*D*值-空白组*D*值)] $\times$ 100%。

1.4 集落形成

将细胞传代6次后, 向六孔板每个孔加入1 000个细胞, 根据1.2的分组处理14天, 每3天更换一次培养基。培养结束后, 弃去培养基, 每孔加入4%多聚甲醛(2 mL)室温固定30 min, 弃去固定液, 每孔加入2 mL结晶紫染料(0.1%)室温染色15 min, 清洗至液体无色, 观察并计数。

1.5 Transwell小室

使用无血清培养基制备Matrigel凝胶, 并将其添加至Transwell的上室。将200 μ L使用无血清培养基制备的细胞悬液(5×10^4 个/mL)接种于上室, 下室填充600 μ L含有10% FBS的DMEM培养基。在37 °C和5% CO₂培养箱中孵育48 h, 吸干上室培养基, 用棉签轻轻擦拭Matrigel和上室内的细胞。使用4%多聚甲醛(600 μ L)室温固定小室细胞20 min, 再用结晶紫染料(0.1%)于室温进行染色, 染色时间设置为10 min, 洗

涤后观察并计数。

1.6 细胞划痕实验

将HeLa细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种于六孔板中, 待细胞密度达到95%时, 使用200 μ L移液器吸头在细胞单层的底面上划痕, 拍摄图像, 记录划痕宽度(*W*₀)。然后按1.2分组进行处理, 并在37 °C下继续孵育24 h, 再次拍摄划痕处图像, 记录划痕宽度(*W*₂₄)。细胞迁移率(%)=(1-*W*₂₄/*W*₀) $\times$ 100%。

1.7 流式细胞术

将细胞按照1.2分组处理24 h后, 收集细胞, 用预冷的磷酸盐缓冲液重悬洗涤3次。室温下1 000 r/min离心5 min后, 将细胞悬浮于结合缓冲液(1×10^4 个/mL)中, 在20 °C下用FITC标记的膜联蛋白V和PI染色15 min, 注意避光, 随后使用流式细胞仪进行分析。

1.8 AO染色

HeLa细胞处理24 h后, 弃去药物培养基, 磷酸盐缓冲液轻轻洗涤, 加入AO染色液, 置于37 °C、5% CO₂培养箱中培养8 min。然后吸除染色液, 洗涤后加入适量缓冲液完全覆盖细胞, 使用荧光显微镜观察。

1.9 LC3免疫荧光检测

用100%甲醇室温固定HeLa细胞5 min, 用0.1%聚乙二醇辛基苯基醚透化细胞5 min, 然后用10%正常山羊血清在0.1% PBS-Tween中室温封闭细胞1 h。将细胞与1 μ g/mL LC3抗体(1:250)在4 °C下孵育过夜, 然后与2 μ g/mL山羊抗兔IgG二抗(1:500)室温孵育1 h。用DAPI标记细胞核, 荧光显微镜下拍摄。

1.10 qRT-PCR

用Trizol试剂从各组细胞中提取总RNA, 再用逆转录试剂盒合成cDNA; 采用SYBR Green qRT-PCR Mix进行qRT-PCR检测。PCR扩增体系: 95 °C高温孵育5 min使cDNA预变性; 变性(95 °C、20 s)、退火(55 °C、20 s)和延伸(72 °C、20 s), 循环40次。以 β -actin为内参, 使用2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算PI3K、PTEN、AKT、TSC2和mTOR mRNA相对表达量, 引物序列如下: PI3K(F 5'-CTG ACT GAC GCG ATT GCC TA-3', R 5'-GTG GTC AGG ACA TCG GGT TT-3'); PTEN(F 5'-CAC CGA GGA GAA GTA CCA CG-3', R 5'-TGG GTT CTC CAC CAC CCT TA-3'); AKT(F 5'-AGT GTG GAA GAA CCA CTC CG-3', R 5'-TGG CTT GAT CGT AGG GGA CT-3'); TSC2(F 5'-AGC CTG ACC TTG CAG TGC ACC-3', R 5'-TGC TCC AGC ACT CAG CGT CAC-3'); mTOR(F 5'-ATG CTT TTG AAC AGC TGC AC-3', R 5'-TGG TCC CAG

AGG ACC CTC AG-3'); β -actin(F 5'-GGT TGT TGA CAA CGG ATC CGG T-3', R 5'-GAG CCT CAT CAC CAA CGT AGC TG-3')。

1.11 蛋白质免疫印迹

收集各组处理 24 h 后的细胞, 4 °C 下用细胞裂解缓冲液(细胞浓度为 1.25×10^2 个/ μ L)裂解 20 min。4 °C、12 000 r/min 离心 10 min 后取上清液, 即为细胞总蛋白, 通过 Bradford 法测定总蛋白浓度, 使用 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白质, 然后将其转移到硝酸纤维素膜上。用 5% 脱脂奶粉或 5% 牛血清白蛋白在 20 °C 下封闭膜 2 h, 然后用一抗如 p-PI3K(1:500)、PI3K(1:500)、p-AKT(1:500)、AKT(1:500)、p-mTOR(1:1 000)、mTOR(1:1 000)、Beclin-1(1:2 000)、LC3(1:1 000)和 β -actin(1:1 000)处理,

在 4 °C 下过夜。随后, 在 20 °C 下用二抗(1:5 000, 山羊抗兔 IgG 或抗小鼠 IgG)处理膜 90 min。最后, 使用增强化学发光(ECL)检测试剂测定蛋白质的表达水平, 并通过 ImageJ 进行定量, 其中 β -actin 为参照蛋白。

1.12 统计分析

每个实验重复 6 次, 数据分析使用的是 SPSS 25.0 软件, 所有实验结果均以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较使用 LSD-*t* 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GEN 抑制 HeLa 细胞增殖和集落形成

利用 MTT 和集落形成实验观察 GEN 对 HeLa 细胞增殖的影响, 结果如图 1 和表 1 所示。与 GEN-0 组

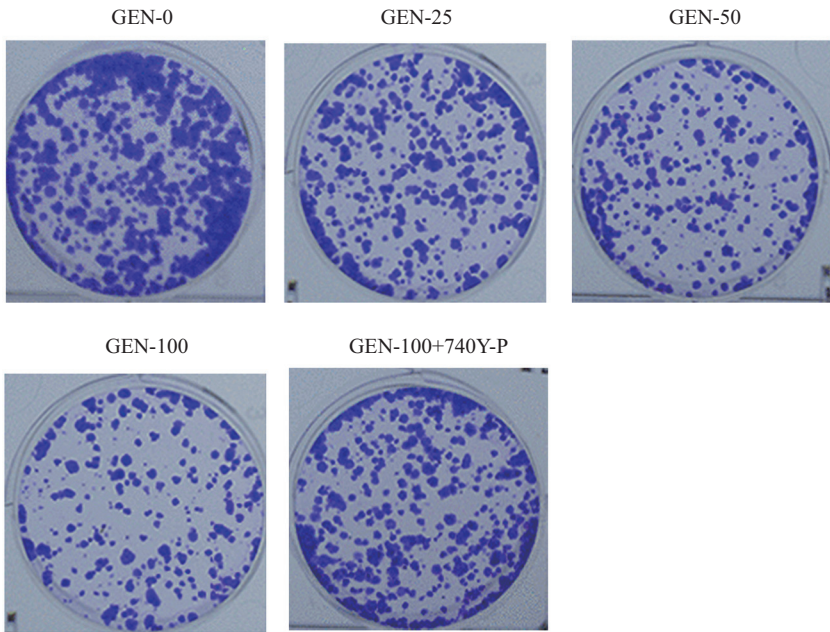


图1 HeLa细胞集落形成图
Fig.1 HeLa cell colony formation diagram

表1 HeLa细胞存活率和集落形成数量
Table 1 HeLa cell survival rate and number of colonies formed

组别 Groups	细胞存活率/% Cell survival rate /%	集落形成数 Number of colonies formed
GEN-0	100.00 $\pm$ 0.00	197.50 $\pm$ 13.82
GEN-25	75.09 $\pm$ 5.48*	162.00 $\pm$ 10.44*
GEN-50	64.60 $\pm$ 4.87* ^{&}	133.00 $\pm$ 8.15* ^{&}
GEN-100	43.21 $\pm$ 3.33* ^{&} [@]	105.50 $\pm$ 6.74* ^{&} [@]
GEN-100+740Y-P	84.98 $\pm$ 6.55 [#]	178.00 $\pm$ 5.72 [#]

$\bar{x} \pm s$, $n=6$; * $P < 0.05$, 与 GEN-0 组比; [&] $P < 0.05$, 与 GEN-25 组比; [@] $P < 0.05$, 与 GEN-50 组比; [#] $P < 0.05$, 与 GEN-100 组比。
 $\bar{x} \pm s$, $n=6$; * $P < 0.05$ compared with GEN-0 group; [&] $P < 0.05$ compared with GEN-25 group; [@] $P < 0.05$ compared with GEN-50 group; [#] $P < 0.05$ compared with GEN-100 group.

比较,不同浓度GEN组细胞存活率和集落形成数下降($P<0.05$);与GEN-100组比较,GEN-100+740Y-P组细胞存活率和集落形成数上升($P<0.05$)。

2.2 GEN抑制HeLa细胞侵袭和迁移

利用Transwell小室和细胞划痕实验检测GEN对HeLa细胞侵袭和迁移的影响,结果如图2和表2所示。与GEN-0组比较,不同浓度GEN组细胞侵袭数和迁移率下降($P<0.05$);与GEN-100组比较,GEN-100+740Y-P组细胞侵袭数和迁移率上升($P<0.05$)。

2.3 GEN促进HeLa细胞凋亡和自噬

用流式细胞术和AO染色分别测定GEN对HeLa细胞凋亡和自噬过程中出现的酸性囊泡细胞器(AVO)数量的影响,结果如图3、图4和表3所示。与GEN-0组比较,不同浓度GEN组细胞凋亡率和AVO数量升高($P<0.05$);与GEN-100组比较,GEN-100+740Y-P

组细胞凋亡率和AVO数量降低($P<0.05$)。

2.4 GEN增加HeLa细胞LC3荧光强度

用LC3免疫荧光检测GEN对HeLa自噬的影响,结果如图5(单个HeLa细胞)和表4所示。与GEN-0组比较,不同浓度GEN组细胞LC3荧光强度升高($P<0.05$);与GEN-100组比较,GEN-100+740Y-P组细胞LC3荧光强度降低($P<0.05$)。

2.5 GEN调节PI3K、PTEN、AKT、TSC2和mTOR mRNA表达

通过qRT-PCR分析PI3K/AKT/mTOR通路相关基因表达情况,结果如表5所示。与GEN-0组比较,不同浓度GEN组细胞PTEN和TSC2 mRNA表达水平升高($P<0.05$),PI3K、AKT和mTOR mRNA表达水平降低($P<0.05$);与GEN-100组比较,GEN-100+740Y-P组细胞PTEN和TSC2 mRNA表达水平降

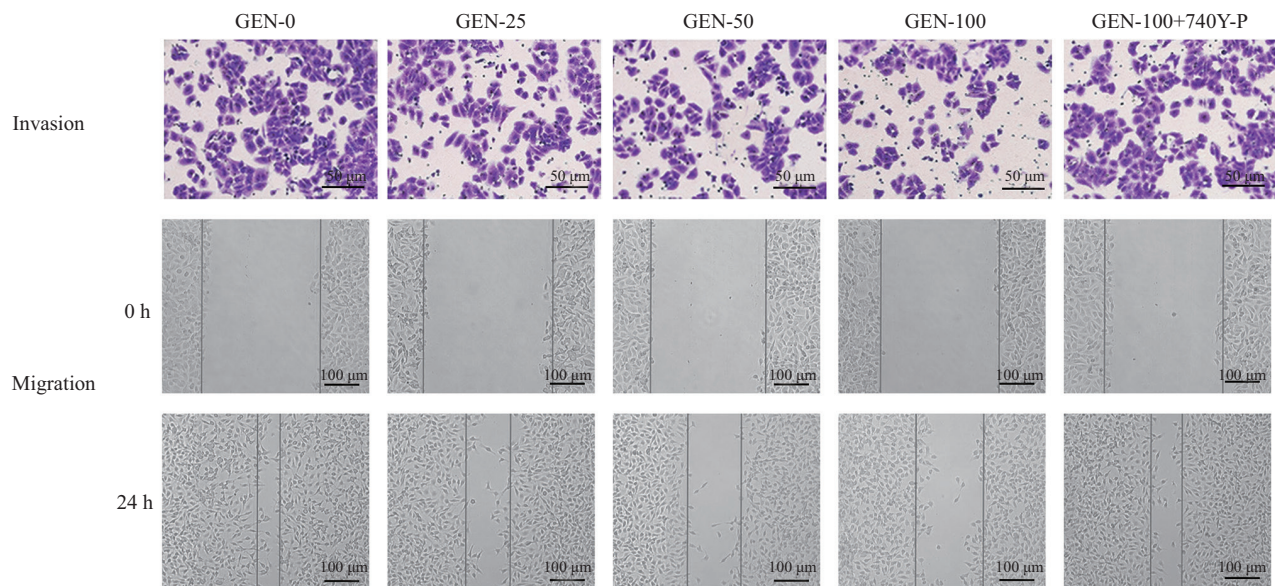


图2 HeLa细胞侵袭和迁移图

Fig.2 Invasion and migration of HeLa cells

表2 HeLa细胞侵袭数量和迁移率

Table 2 Invasion number and mobility of HeLa cells

组别 Groups	细胞侵袭数 Number of cells invaded	细胞迁移率/% Cell mobility /%
GEN-0	142.00±12.74	82.26±9.53
GEN-25	119.00±10.25*	65.84±7.26*
GEN-50	101.50±8.62* ^{&}	56.35±6.81*
GEN-100	77.00±6.57* ^{&@}	42.88±5.72* ^{&@}
GEN-100+740Y-P	133.50±9.49 [#]	76.53±7.35 [#]

$\bar{x} \pm s$, $n=6$; * $P<0.05$, 与GEN-0组比; [&] $P<0.05$, 与GEN-25组比; [@] $P<0.05$, 与GEN-50组比; [#] $P<0.05$, 与GEN-100组比。

$\bar{x} \pm s$, $n=6$; * $P<0.05$ compared with GEN-0 group; [&] $P<0.05$ compared with GEN-25 group; [@] $P<0.05$ compared with GEN-50 group; [#] $P<0.05$ compared with GEN-100 group.

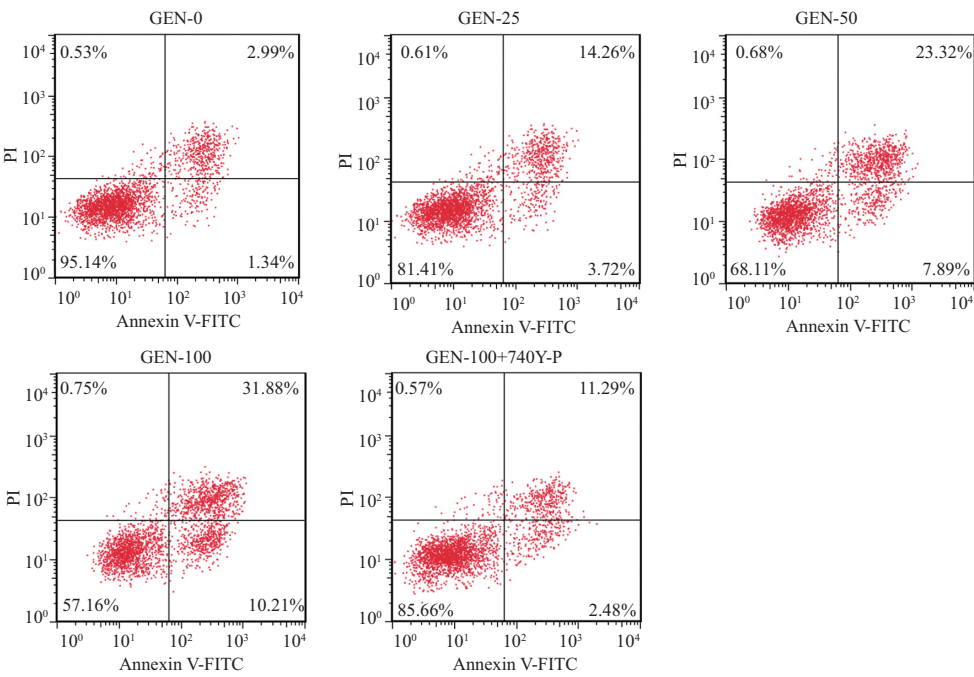


图3 HeLa细胞流式图

Fig.3 HeLa cell flow diagram

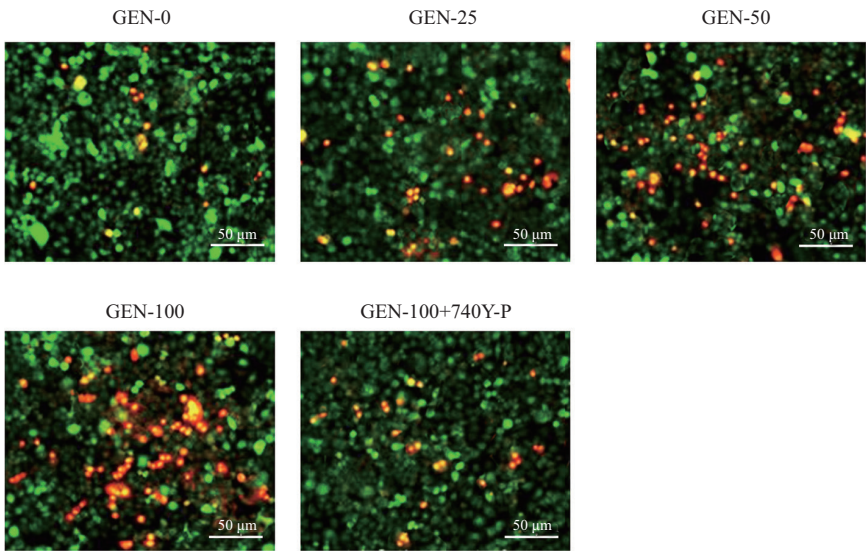


图4 HeLa细胞吖啶橙染色图

Fig.4 Acridine orange staining of HeLa cells

表3 HeLa细胞凋亡率和AVO数量

Table 3 Apoptosis rate and AVO number of HeLa cells

组别 Groups	细胞凋亡率/% Apoptosis rate /%	AVO数量 AVO number
GEN-0	4.33±0.67	13.50±2.17
GEN-25	17.98±2.05*	28.00±3.09*
GEN-50	31.21±3.97* ^{&}	34.50±3.82* ^{&}
GEN-100	42.09±4.38* ^{&} [@]	59.00±6.08* ^{&} [@]
GEN-100+740Y-P	13.77±1.64 [#]	22.00±2.25 [#]

$\bar{x} \pm s$, $n=6$; * $P<0.05$, 与GEN-0组比; [&] $P<0.05$, 与GEN-25组比; [@] $P<0.05$, 与GEN-50组比; [#] $P<0.05$, 与GEN-100组比。

$\bar{x} \pm s$, $n=6$; * $P<0.05$ compared with GEN-0 group; [&] $P<0.05$ compared with GEN-25 group; [@] $P<0.05$ compared with GEN-50 group; [#] $P<0.05$ compared with GEN-100 group.

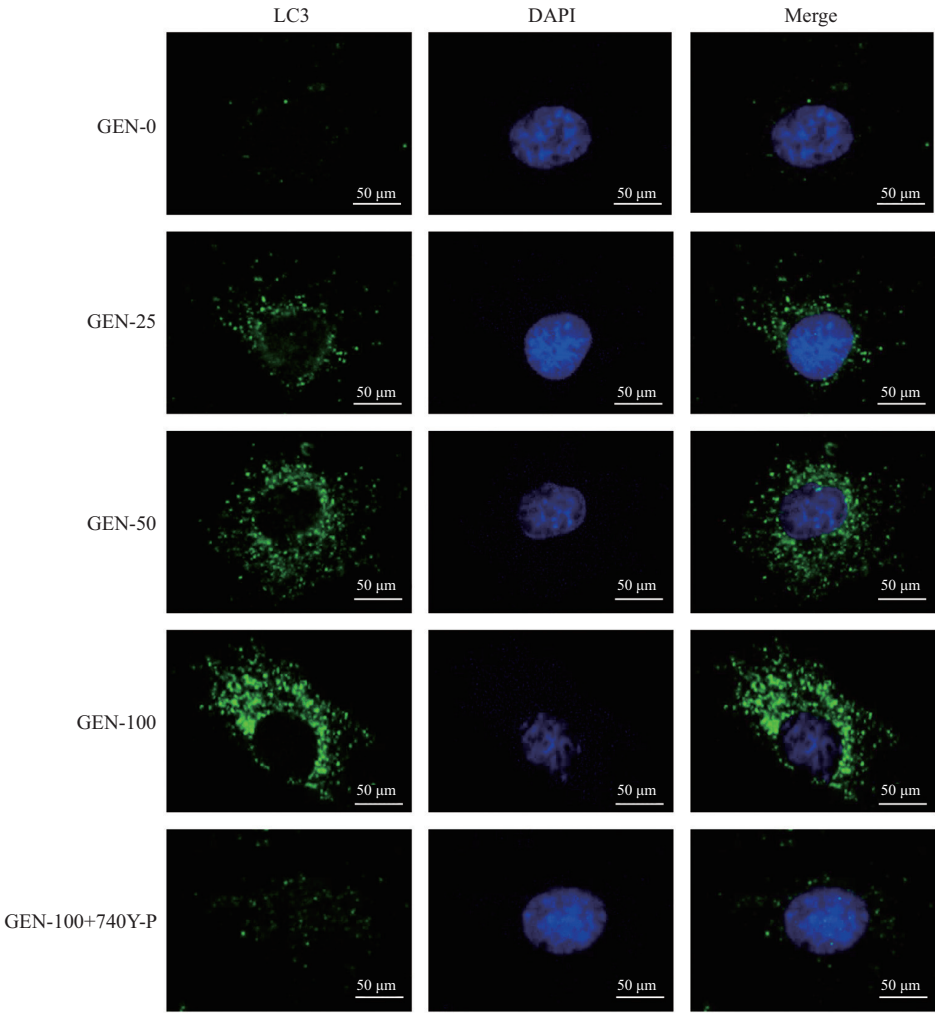


图5 HeLa细胞LC3免疫荧光图

Fig.5 LC3 immunofluorescence of HeLa cells

表4 HeLa细胞LC3荧光强度
Table 4 LC3 fluorescence intensity of HeLa cells

组别 Groups	LC3荧光强度 LC3 fluorescence intensity
GEN-0	5.49±0.73
GEN-25	27.26±23.15*
GEN-50	46.58±5.34* ^{&}
GEN-100	65.24±6.82* ^{&@}
GEN-100+740Y-P	8.22±0.13 [#]

$\bar{x} \pm s$, $n=6$; * $P<0.05$, 与GEN-0组比; [&] $P<0.05$, 与GEN-25组比; [@] $P<0.05$, 与GEN-50组比; [#] $P<0.05$, 与GEN-100组比。
 $\bar{x} \pm s$, $n=6$; * $P<0.05$ compared with GEN-0 group; [&] $P<0.05$ compared with GEN-25 group; [@] $P<0.05$ compared with GEN-50 group; [#] $P<0.05$ compared with GEN-100 group.

低 ($P<0.05$), *PI3K*、*AKT*和*mTOR* mRNA表达水平升高($P<0.05$)。

2.6 GEN调节自噬和PI3K/AKT/mTOR信号通路相关蛋白表达

利用蛋白质免疫印迹分析HeLa细胞自噬和PI3K/AKT/mTOR信号通路相关蛋白的表达水平,

结果如图6和表6所示。与GEN-0组比较, 不同浓度GEN组细胞Beclin-1和LC3II/I蛋白上调 ($P<0.05$), p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT和p-mTOR/mTOR水平下降 ($P<0.05$); 与GEN-100组比较, GEN-100+740Y-P组细胞Beclin-1和LC3II/I蛋白下调 ($P<0.05$), p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT和p-mTOR/mTOR水平上升($P<0.05$)。

表5 HeLa细胞PI3K、PTEN、AKT、TSC2和mTOR mRNA表达情况
Table 5 mRNA expression of PI3K, PTEN, AKT, TSC2 and mTOR in HeLa cells

组别 Groups	PI3K	PTEN	AKT	TSC2	mTOR
GEN-0	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
GEN-25	0.78±0.08*	1.30±0.13*	0.77±0.08*	1.22±0.12*	0.75±0.09*
GEN-50	0.58±0.06* ^{&}	1.59±0.16* ^{&}	0.56±0.06* ^{&}	1.43±0.14* ^{&}	0.51±0.05* ^{&}
GEN-100	0.39±0.04* ^{&@}	1.86±0.19* ^{&@}	0.33±0.03* ^{&@}	1.64±0.17* ^{&@}	0.28±0.03* ^{&@}
GEN-100+740Y-P	0.95±0.09 [#]	1.07±0.11 [#]	0.95±0.09 [#]	1.11±0.10 [#]	0.92±0.09 [#]

$\bar{x}\pm s$, $n=6$; * $P<0.05$, 与GEN-0组比; [&] $P<0.05$, 与GEN-25组比; [@] $P<0.05$, 与GEN-50组比; [#] $P<0.05$, 与GEN-100组比。
 $\bar{x}\pm s$, $n=6$; * $P<0.05$ compared with GEN-0 group; [&] $P<0.05$ compared with GEN-25 group; [@] $P<0.05$ compared with GEN-50 group; [#] $P<0.05$ compared with GEN-100 group.

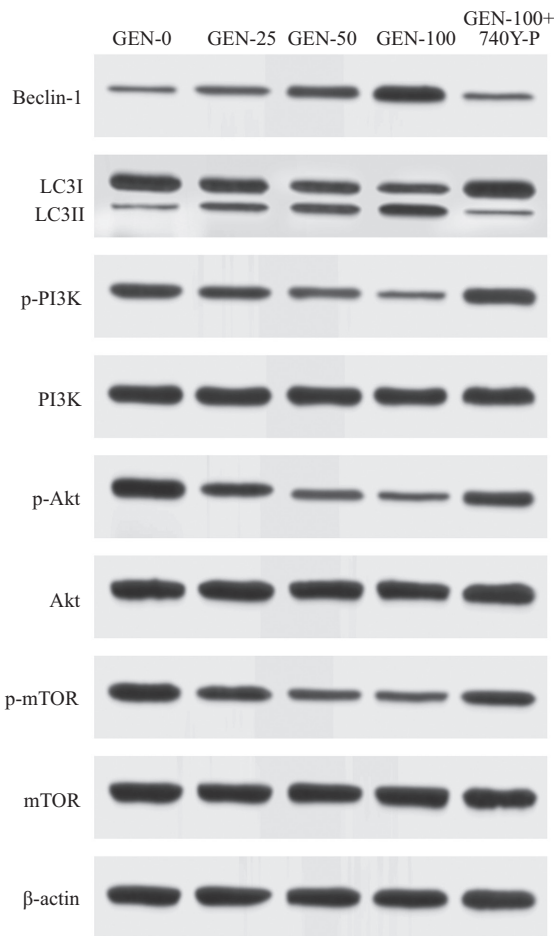


图6 HeLa细胞Beclin-1、LC3II/I和PI3K/AKT/mTOR通路蛋白条带
Fig.6 Beclin-1, LC3II/I and PI3K/AKT/mTOR pathway protein bands in HeLa cells

3 讨论

癌症是世界范围内的一个主要公共卫生问题, 尽管放疗和化疗等各种癌症治疗策略取得了进展, 但癌症仍然是导致死亡的主要原因。目前, 高危HPV的持续感染被认为是宫颈鳞状上皮内病变和宫颈癌发生和发展的关键因素^[12]。随着宫颈癌筛查和疫苗接种的开展, 宫颈癌的发病率有所下降, 但其死

亡率仍然很高, 因此寻找治疗宫颈癌的新机制、新靶点和新方法非常重要。自噬是一种自我更新过程, 可应对各种形式的细胞应激, 包括感染、缺氧、饥饿和内质网应激。细胞器和细胞内蛋白质被细胞捕获并运送到溶酶体进行降解。自噬降解产物从溶酶体输出到细胞质进行再循环^[13], 这种分解代谢过程在各种生理和病理过程中发挥着重要作用。有研究

表6 HeLa细胞Beclin-1、LC3II/I和PI3K/AKT/mTOR通路相关蛋白表达水平比较
Table 6 Comparative analysis of the expression levels of Beclin-1, LC3II/I and PI3K/AKT/mTOR pathway-related proteins in HeLa cells

组别 Groups	Beclin-1/ β -actin	LC3II/I	p-PI3K/PI3K	p-AKT/AKT	p-mTOR/mTOR
GEN-0	0.18 $\pm$ 0.03	0.13 $\pm$ 0.03	0.99 $\pm$ 0.11	0.95 $\pm$ 0.09	0.93 $\pm$ 0.10
GEN-25	0.42 $\pm$ 0.05*	0.44 $\pm$ 0.05*	0.85 $\pm$ 0.09*	0.82 $\pm$ 0.08*	0.80 $\pm$ 0.08*
GEN-50	0.65 $\pm$ 0.07* ^{&}	0.75 $\pm$ 0.08* ^{&}	0.67 $\pm$ 0.07* ^{&}	0.70 $\pm$ 0.06*	0.59 $\pm$ 0.06* ^{&}
GEN-100	0.97 $\pm$ 0.08* ^{&@}	0.93 $\pm$ 0.07* ^{&@}	0.38 $\pm$ 0.04* ^{&@}	0.41 $\pm$ 0.04* ^{&@}	0.43 $\pm$ 0.05* ^{&@}
GEN-100+740Y-P	0.25 $\pm$ 0.03 [#]	0.20 $\pm$ 0.03 [#]	0.91 $\pm$ 0.10 [#]	0.88 $\pm$ 0.09 [#]	0.85 $\pm$ 0.08 [#]

$\bar{x}\pm s$, $n=6$; * $P<0.05$, 与GEN-0组比; [&] $P<0.05$, 与GEN-25组比; [@] $P<0.05$, 与GEN-50组比; [#] $P<0.05$, 与GEN-100组比。

$\bar{x}\pm s$, $n=6$; * $P<0.05$ compared with GEN-0 group; [&] $P<0.05$ compared with GEN-25 group; [@] $P<0.05$ compared with GEN-50 group; [#] $P<0.05$ compared with GEN-100 group.

证实,细胞自噬和自噬相关蛋白的异常表达与宫颈癌的发生密切相关,HPV感染也会影响自噬活性^[14]。最近的研究表明,天然产物在预防和治疗癌症方面具有独特的优势,例如酯类、糖苷、类黄酮、酚类和生物碱等,均在药物开发中发挥着至关重要的作用,目前已有多种天然产物被证明可以通过调节自噬发挥抗癌作用^[15-16]。GEN是一种环烯醚萜葡萄糖苷类化合物,与研究较多的其他天然产物(如姜黄素和白藜芦醇)相比,其溶解性较好,易溶于水^[17]。据报道,GEN可诱导多种癌细胞凋亡,抑制肝细胞癌转移^[18],有研究表示GEN通过调节多种生物过程发挥对结肠癌的抗复发和转移作用^[19]。在本研究中,实验结果表明,不同浓度GEN处理的HeLa细胞自噬形成物AVO数量和LC3(自噬标志物)阳性率高于未处理的细胞,增殖和集落形成能力、侵袭和迁移能力均低于未处理的细胞。由此可知,GEN能够增强细胞自噬,抑制HeLa细胞增殖和侵袭,说明GEN具有抗宫颈癌的潜力。

早期研究证明,PI3K信号与各种人类疾病(包括癌症和增殖性疾病)有关,更重要的是,PI3K/AKT/mTOR信号通路可以调节癌细胞的细胞凋亡和自噬^[20]。该通路参与各种肿瘤的生长过程,细胞存活因子可以通过激活细胞膜上的AKT抑制细胞凋亡,AKT磷酸化致使凋亡机制丧失功能^[21]。在该通路中,AKT最重要的上游调控因子是PI3K,PI3K可以磷酸化磷脂酰肌醇4,5-二磷酸(phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP2),并将PIP2转化为磷脂酰肌醇3,4,5-三磷酸(PIP3),是AKT活化所必需的。失活的AKT可以通过其PH结构域与PIP3和磷酸肌苷依赖性激酶1(phosphoinosine dependent kinase 1, PDK1)

紧密结合而被募集到细胞膜上,从而立即磷酸化AKT(Tyr308),激活AKT^[22]。AKT通过触发雷帕霉素敏感的mTOR复合物1(mTOR complex 1, mTORC1)信号通路成为PI3K的主要效应子,雷帕霉素不敏感的mTOR复合物2(mTORC2)可以在关键靶位点磷酸化AKT^[23]。PI3K通过抑制促凋亡蛋白和激活抗凋亡蛋白来促进细胞存活和磷酸化mTOR, mTOR是PI3K信号通路的核心,由于mTOR抑制自噬,PI3K通路失活会诱导癌细胞自噬。临床数据显示,宫颈癌患者组织提取物中PI3K、AKT和mTOR蛋白水平较高,阻断PI3K/AKT/mTOR通路可抑制宫颈癌的进展^[24]。在PI3K/AKT/mTOR通路中,AKT的两侧有两个肿瘤抑制因子,分别是PTEN和TSC2,PTEN位于AKT上游,TSC2位于AKT下游和mTOR上游^[25]。自噬在包括许多肿瘤在内的多种疾病中失调,其可能成为一种有前途的治疗策略,Beclin-1是一种中心蛋白,其聚集辅因子形成BECN1-PIK3C3-PIK3R4复合物,从而触发自噬蛋白级联反应^[26]。PI3K/AKT/mTOR通路抑制剂在临床妇科癌症中广泛应用,效果显著^[27]。

在本研究中发现,GEN能够上调HeLa细胞PTEN和TSC2 mRNA表达,提高自噬标志物LC3II/I和Beclin-1蛋白的表达水平,提升细胞凋亡率;同时能够抑制PI3K、AKT和mTOR mRNA表达及降低p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT和p-mTOR/mTOR水平。为了深入探究GEN对PI3K/AKT/mTOR信号通路的调控,本研究使用PI3K激活剂740Y-P进行回补实验,结果发现740Y-P逆转了GEN对HeLa细胞生长和PI3K/AKT/mTOR信号通路的抑制作用。这表明GEN可能通过阻断PI3K/AKT/mTOR通路激活细胞自噬,抑制HeLa细胞增殖和侵袭。

综上所述, GEN抑制宫颈癌细胞增殖和侵袭, 促进细胞凋亡和自噬的作用机制可能是抑制PI3K/AKT/mTOR通路信号转导。然而本研究仍有不足, 后续将深入研究GEN对其他宫颈癌或非宫颈癌细胞的普适性以及GEN在体内的最佳使用剂量和作用时间, 为栀子苷未来应用于临床治疗宫颈癌奠定基础。

作者贡献

田甜负责实验设计及论文写作; 李刚、张峰负责实验实施; 徐淑娜负责数据采集和统计分析; 李伟华负责收集文献及修改论文。

参考文献 (References)

- [1] CASTLE P E. Looking back, moving forward: challenges and opportunities for global cervical cancer prevention and control [J]. *Viruses*, 2024, 16(9): 1357.
- [2] MENG M, GUO Y, CHEN Y, et al. Cancer/testis-45A1 promotes cervical cancer cell tumorigenesis and drug resistance by activating oncogenic SRC and downstream signaling pathways [J]. *Cell Oncol*, 2024, 47(2): 657-76.
- [3] KLIONSKY D J, PETRONI G, AMARAVADI R K, et al. Autophagy in major human diseases [J]. *EMBO J*, 2021, 40(19): e108863.
- [4] DAI W, YANG H, XU B, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) alleviate excessive autophagy of ovarian granular cells through VEGFA/PI3K/AKT/mTOR pathway in premature ovarian failure rat model [J]. *J Ovarian Res*, 2023, 16(1): 198.
- [5] BOSSLER F, HOPPE-SEYLER K, HOPPE-SEYLER F. PI3K/AKT/mTOR signaling regulates the virus/host cell crosstalk in HPV-positive cervical cancer cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(9): 2188.
- [6] BAHRAMI A, HASANZADEH M, HASSANIAN S M, et al. The potential value of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway for assessing prognosis in cervical cancer and as a target for therapy [J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(12): 4163-9.
- [7] LIU L, WU Q, CHEN Y, et al. Updated pharmacological effects, molecular mechanisms, and therapeutic potential of natural product geniposide [J]. *Molecules*, 2022, 27(10): 3319.
- [8] ZHANG C, WANG N, TAN H Y, et al. Direct inhibition of the TLR4/MyD88 pathway by geniposide suppresses HIF-1 α -independent VEGF expression and angiogenesis in hepatocellular carcinoma [J]. *Br J Pharmacol*, 2020, 177(14): 3240-57.
- [9] BAI G, CHEN B, XIAO X, et al. Geniposide inhibits cell proliferation and migration in human oral squamous carcinoma cells via AMPK and JNK signaling pathways [J]. *Exp Ther Med*, 2022, 24(6): 706.
- [10] CAO H, FENG Q, XU W, et al. Genipin induced apoptosis associated with activation of the c-Jun NH2-terminal kinase and p53 protein in HeLa cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(8): 1343-8.
- [11] HUANG J, YE Y, XIAO Y, et al. Geniposide ameliorates glucocorticoid-induced osteoblast apoptosis by activating autophagy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 155(1): 113829.
- [12] GIANNONE G, GIULIANO A R, BANDINI M, et al. HPV vaccination and HPV-related malignancies: impact, strategies and optimizations toward global immunization coverage [J]. *Cancer Treat Rev*, 2022, 111(1): 102467.
- [13] SHU F, XIAO H, LI Q N, et al. Epigenetic and post-translational modifications in autophagy: biological functions and therapeutic targets [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 32.
- [14] ARANDA-RIVERA A K, CRUZ-GREGORIO A, BRIONES-HERRERA A, et al. Regulation of autophagy by high- and low-risk human papillomaviruses [J]. *Rev Med Virol*, 2021, 31(2): e2169.
- [15] CHAN W J, ADIWIDJAJA J, MCLACHLAN A J, et al. Interactions between natural products and cancer treatments: underlying mechanisms and clinical importance [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2023, 91(2): 103-19.
- [16] GARG P, GARG R, HORNE D, et al. Prognostic significance of natural products against multidrug tumor resistance [J]. *Cancer Lett*, 2023, 557(1): 216079.
- [17] HABTEMARIAM S, LENTINI G. Plant-derived anticancer agents: lessons from the pharmacology of geniposide and its aglycone, genipin [J]. *Biomedicines*, 2018, 6(2): 39.
- [18] WANG N, ZHU M, TSAO S W, et al. Up-regulation of TIMP-1 by genipin inhibits MMP-2 activities and suppresses the metastatic potential of human hepatocellular carcinoma [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e46318.
- [19] WU Y, LUO J, XU B. Network pharmacology and bioinformatics study of geniposide regulating oxidative stress in colorectal cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(20): 15222.
- [20] PENG Y, WANG Y, ZHOU C, et al. PI3K/AKT/mTOR pathway and its role in cancer therapeutics: are we making headway [J]? *Front Oncol*, 2022, 12(1): 819128.
- [21] LI Q, LI Z, LUO T, et al. Targeting the PI3K/AKT/mTOR and RAF/MEK/ERK pathways for cancer therapy [J]. *Mol Biomed*, 2022, 3(1): 47.
- [22] BANG J, JUN M, LEE S, et al. Targeting EGFR/PI3K/AKT/mTOR signaling in hepatocellular carcinoma [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(8): 2130.
- [23] KARAMI FATH M, EBRAHIMI M, NOURBAKHSH E, et al. PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in cancer stem cells [J]. *Pathol Res Pract*, 2022, 237(1): 154010.
- [24] ZHANG W, ZHOU Q, WEI Y, et al. The exosome-mediated PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in cervical cancer [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(7): 2474-84.
- [25] WAN L, WANG Y, LI J, et al. Inhibition of the AKT/mTOR pathway negatively regulates PTEN expression via miRNAs [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2022, 54(11): 1637-47.
- [26] HU F, SONG D, YAN Y, et al. IL-6 regulates autophagy and chemotherapy resistance by promoting BECN1 phosphorylation [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 3651.
- [27] BROEGE A, ROSSETTI S, SEN A, et al. Functional assessments of gynecologic cancer models highlight differences between single-node inhibitors of the PI3K/AKT/mTOR pathway and a pan-PI3K/mTOR inhibitor, gedatolisib [J]. *Cancers*, 2024, 16(20): 3520.