

车叶草苷调节FOXO3-FOXM1信号轴对宫颈癌细胞 上皮-间质转化和化疗耐药性的影响

林艳云^{1*} 刘浩哲² 李慧颖¹

(¹石家庄平安医院肿瘤科, 石家庄 050000; ²石家庄平安医院妇产科, 石家庄 050000)

摘要 该文探究车叶草苷调节FOXO3-FOXM1信号轴对宫颈癌细胞上皮-间质转化和化疗耐药性的影响。将宫颈癌细胞(HeLa)分为对照(HeLa)组、耐药对照(HeLa/DDP)组、低浓度车叶草苷组、高浓度车叶草苷组、高浓度车叶草苷+si-NC组、高浓度车叶草苷+si-FOXO3组。利用CCK-8法检测细胞增殖、流式细胞术检测细胞凋亡、裸鼠移植瘤实验观察肿瘤形成、qRT-PCR检测FOXO3、FOXMI mRNA表达水平, Western blot检测上皮-间质转化相关蛋白及FOXO3、FOXMI蛋白表达情况。结果显示, 耐药对照组与对照细胞的增殖和凋亡能力无显著差异($P>0.05$); 与耐药对照组相比, 低浓度车叶草苷组、高浓度车叶草苷组HeLa/DDP细胞FOXO3、E-cadherin表达水平及凋亡率升高, FOXMI、N-cadherin、Vimentin表达水平及增殖能力降低, 裸鼠移植瘤质量降低、体积减小($P<0.05$), 高浓度车叶草苷组效果优于低浓度车叶草苷组($P<0.05$); 与高浓度车叶草苷+si-NC组相比, 高浓度车叶草苷+si-FOXO3组HeLa/DDP细胞FOXO3、E-cadherin表达水平及凋亡率降低, FOXMI、N-cadherin、Vimentin表达水平及增殖能力升高, 裸鼠移植瘤质量增加、体积增大($P<0.05$)。车叶草苷可能通过提高FOXO3表达水平, 进而降低FOXMI表达水平, 从而抑制宫颈癌HeLa细胞上皮-间质转化和化疗耐药性。

关键词 车叶草苷; FOXO3-FOXMI; 宫颈癌; 上皮-间质转化; 耐药性

The Impacts of Asperuloside on Epithelial-Mesenchymal Transition and Chemotherapy Resistance of Cervical Cancer Cells by Regulating the FOXO3-FOXMI Signaling Axis

LIN Yanyun^{1*}, LIU Haozhe², LI Huiying¹

(¹Department of Oncology, Shijiazhuang Ping'an Hospital, Shijiazhuang 050000, China;

²Department of Obstetrics and Gynecology, Shijiazhuang Ping'an Hospital, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract This study was to investigate the impacts of asperuloside on EMT (epithelial-mesenchymal transition) and chemotherapy resistance of cervical cancer cells by regulating the FOXO3-FOXMI signaling axis. Cervical cancer cells (HeLa) were separated into control (HeLa) group, drug-resistant control (HeLa/DDP) group, low concentration asperuloside group, high concentration asperuloside group, high concentration asperuloside+si-NC group, and high concentration asperuloside+si-FOXO3 group. Cell proliferation was detected using CCK-8 assay; apoptosis was detected using flow cytometry; tumor formation was observed in nude mouse transplant experiments, and FOXO3 and FOXMI mRNA expression were detected using qRT-PCR. Western blot was used to detect the expression of epithelial-mesenchymal transition related proteins N-cadherin, E-cadherin, Vimentin, and FOXO3 and FOXMI proteins. There

收稿日期: 2024-12-11 接受日期: 2025-01-17

*通信作者。Tel: 18633835231, E-mail: esf234@126.com

Received: December 11, 2024 Accepted: January 17, 2025

*Corresponding author. Tel: +86-18633835231, E-mail: esf234@126.com

was no obvious difference in the proliferation and apoptosis abilities of cells between the drug-resistant control group and the control group ($P>0.05$). Compared with the drug-resistant control group, the expression of FOXO3 and E-cadherin, and the apoptosis rate in HeLa/DDP cells in the low concentration and high concentration asperuloside groups were increased, while the expression of FOXM1, N-cadherin, and Vimentin, and proliferation ability were decreased, the mass and volume of transplanted tumors in nude mice were reduced ($P<0.05$), the effect of high concentration asperuloside group was superior to the low concentration asperuloside group ($P<0.05$). Compared with the high concentration asperuloside+si-NC group, the expression of FOXO3 and E-cadherin, and the apoptosis rate in HeLa/DDP cells in the high concentration asperuloside+si-FOXO3 group were reduced, the expression of FOXM1, N-cadherin, Vimentin, and proliferation ability were increased, and the mass and volume of transplanted tumors in nude mice were increased ($P<0.05$). Asperuloside may inhibit epithelial-mesenchymal transition and chemotherapy resistance in cervical cancer HeLa cells by increasing FOXO3 expression and decreasing FOXM1 expression.

Keywords asperuloside; FOXO3-FOXM1; cervical cancer; epithelial-mesenchymal transition; drug resistance

宫颈癌是全球女性第四大常见癌症,也是导致女性死亡的主要原因^[1]。随着HPV疫苗的广泛应用和有效的癌症筛查,宫颈癌的发病率下降,早期可及时进行手术治疗^[2]。尽管如此,宫颈癌仍然具有较高的侵袭性和死亡率,病理发展机制仍不清楚^[3]。叉头盒O3(forkhead box O3, FOXO3)是叉头盒蛋白的O类亚家族成员,与其他FOXO蛋白相比,FOXO3在控制癌症发展和化疗药物敏感性方面发挥突出作用^[4-5]。已经鉴定出大量FOXO3下游靶基因,它们参与控制细胞命运的重要生物过程。FOXM1是FOXO3下游靶标最关键的靶标之一,也是一种癌基因,其表达被FOXO3抑制^[6]。FOXO3和FOXM1位于PI3K-Akt、Ras-ERK、JNK/p38MAPK信号的下游,在抗癌药物的作用机制中有作用^[7]。癌症治疗会产生耐药性,是当前临床癌症治疗面临的主要挑战,而耐药性的产生机制与FOXO3和FOXM1失调有关^[8]。车叶草苷具有良好的抗癌活性,对人乳腺癌、白血病和口腔癌细胞均有细胞毒性,可作为一种潜在的抗癌化合物^[9]。有研究表明,车叶草苷能够抑制宫颈癌细胞增殖,并通过内质网应激-线粒体途径促进宫颈癌细胞凋亡^[10]。基于以上背景,本研究旨在评估车叶草苷对宫颈癌细胞上皮-间质转化和化疗耐药性的影响,并验证FOXO3-FOXM1是否参与这一过程,为进一步了解宫颈癌的潜在治疗靶点和开发宫颈癌的治疗药物提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人宫颈癌细胞: HeLa细胞系购自中国科学院典

型培养物收藏中心细胞库,细胞在含有10%胎牛血清的杜氏改良Eagle培养基中培养。雌性Balb/c-nude裸鼠(小鼠)购自江苏艾菱菲生物科技有限公司,生产许可证号: SCXK(苏)2023-0020。

1.2 主要试剂

顺铂(DDP)购自上海源叶生物科技有限公司; 车叶草苷(货号: TTL064)购自上海融禾医药科技发展有限公司; 引物、si-NC和si-FOXO3质粒均由上海吉玛制药技术有限公司合成; CCK-8试剂盒(货号: 40203ES60)、Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(货号: 40302ES20)、细胞RNA提取试剂盒(货号: 19231ES)、PVDF膜、高质量第一链cDNA合成预混液(货号: 11141ES)、One Step RT-qPCR SYBR Green Kit(货号: 11143ES)购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司; BCA蛋白定量试剂盒(货号: AP12L025)、细胞裂解液(货号: AP01L076)、ECL化学发光液(货号: AP34L044)、特级胎牛血清(货号: AC03L155)、SDS-PAGE(货号: AP15L106)、细胞转染试剂(货号: AC04L071)购自和元李记(上海)生物技术有限公司; FOXO3兔单克隆抗体(货号: ab314007)、FOXM1兔单克隆抗体(货号: ab207298)、神经型钙黏附素(N-cadherin)兔单克隆抗体(货号: ab76011)、上皮型钙黏附素(E-cadherin)兔单克隆抗体(货号: ab227639)、波形蛋白(Vimentin)兔单克隆抗体(货号: ab6721)、羊抗兔二抗(货号: ab150077)购自英国Abcam公司。

1.3 细胞化疗耐药处理

DDP纯度大于98%,使用超纯水配制至合适浓度。HeLa细胞接受浓度逐渐增加的DDP诱导,以建立耐DDP细胞系,处于指数生长期的HeLa细胞最

初在含有0.1 $\mu\text{g/mL}$ DDP的培养基中培养。14天后, DDP浓度逐渐增加至0.3 $\mu\text{g/mL}$, 再培养2周。随后, DDP浓度逐渐升高至1.2 $\mu\text{g/mL}$, 直至细胞稳定生长并反复传代。约10个月后, 成功生成DDP抗性细胞系, 并在含有DDP的培养基中维持以保留其抗性。

HeLa及HeLa/DDP细胞培养至指数生长期, 分别接受0、10、20、40、60、80 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的DDP处理, 3天后, CCK-8法检测细胞活性, 计算细胞存活率及 IC_{50} ^[11]。挑选最适顺铂浓度, 培养耐DDP的HeLa细胞(DDP/HeLa), 用0.25%胰蛋白酶-EDTA消化液在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育2 min进行消化处理。在显微镜下观察, 待细胞变圆, 开始脱离培养瓶壁时, 添加含血清的培养基终止消化。消化后的细胞在4 $^{\circ}\text{C}$ 下以300 $\times g$ 的速度离心5 min, 小心吸弃上清液, 用含有10%胎牛血清的杜氏改良Eagle培养基重悬, 按 1×10^5 个/孔的密度接种于6孔板中, 于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养, 待细胞生长至合适状态后, 用于后续实验。

1.4 细胞分组

将成功建立的DDP/HeLa细胞株分为: 耐药对照(DDP/HeLa)组(DDP/HeLa control group)、低浓度车叶草苷组(L-asperuloside group)、高浓度车叶草苷组(H-asperuloside group)、高浓度车叶草苷+si-NC组(H-asperuloside+si-NC group)、高浓度车叶草苷+si-FOXO3组(H-asperuloside+si-FOXO3 group)。另取正常非耐药HeLa细胞作为对照组(control group), 对照组不做处理, 耐药对照(DDP/HeLa)组使用合适的顺铂浓度维持其耐药性, 低浓度车叶草苷组、高浓度车叶草苷组分别以500 $\mu\text{g/mL}$ 、1 000 $\mu\text{g/mL}$ 车叶草苷处理^[10]。高浓度车叶草苷+si-NC组、高浓度车叶草苷+si-FOXO3组以1 000 $\mu\text{g/mL}$ 车叶草苷处理前, 分别转染si-NC和si-FOXO3质粒。各组细胞处理48 h后进行后续实验。si-FOXO3序列为: GGC AGA AUG UCU UAC AGA AUG, si-NC序列为: TTC TCC GAA CGT GTC ACG TTT

1.5 CCK-8法检测细胞增殖情况

各组细胞经胰酶37 $^{\circ}\text{C}$ 消化90 s后接种于96孔板, 每孔 2×10^4 个细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h, 每孔加入10 μL CCK-8溶液, 用酶标仪检测波长在450 nm处的吸光度(D)值。细胞存活率($\%$)= $[(D_{\text{未处理组}} - D_{\text{空白组}}) / (D_{\text{实验组}} - D_{\text{空白组}})] \times 100\%$ 。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡情况

将2 mL细胞悬液(含 2×10^5 个细胞)接种于6孔板

中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育48 h并清洗后重悬。然后用5 μL FITC和10 μL PI染色细胞, 并在室温下避光孵育15 min。在FACS Calibur流式细胞仪上分析样品, 计算细胞凋亡率。

1.7 裸鼠移植瘤实验

准备雌性Balb/c-nude裸鼠54只(6~8周龄, 平均体质量: 18~20 g)。用胰蛋白酶处理各组细胞后, 在10% PBS中制备细胞悬液(1×10^7 个/mL)。然后用碘伏和75%酒精常规消毒裸鼠背侧皮肤, 并注射0.2 mL各组细胞悬液。对照组注射正常HeLa细胞悬液, 其余各组注射DDP/HeLa细胞并腹腔注射适量DDP验证其耐药性, 其中高浓度车叶草苷+si-NC组、高浓度车叶草苷+si-FOXO3组注射的DDP/HeLa细胞分别转染si-NC、si-FOXO3, 注射后用镊子将针孔夹紧, 防止细胞悬液漏出^[12]。低浓度车叶草苷组、高浓度车叶草苷组裸鼠在前期预实验的基础上分别灌胃25 mg/kg、50 mg/kg车叶草苷, 每天1次, 14天后, 将肿瘤组织取出, 测量质量。游标卡尺测量后通过体积(V)=(长径 $\times$ 短径 2)/2进行计算。该研究经石家庄平安医院动物伦理委员会审批通过(2024-25)。

1.8 qRT-PCR检测FOXO3、FOXM1 mRNA表达情况

使用1 mL TRIzol试剂提取各组细胞总RNA, 通过分光光度法(Nano Drop 2000)分析A260/A280值。然后将总RNA逆转录为cDNA, 反应总体积为20 μL 。引物序列如下, FOXO3引物序列为5'-CGG ACA AAC GGC TCA CTC T-3'(正向)和5'-GGA CCC GCA TGA ATC GAC TAT-3'(反向), FOXM1引物序列为5'-GGA AGC AAA GGA GAA AAC CC-3'(正向)和5'-ATA GCA AGC GAG TCC GCA TT-3'(反向), GAPDH引物序列为5'-CAG CCC TTC CTG ACA AGC TA-3'(正向)和5'-GTG GCC TCA TCC AAC ACA AG-3'(反向)。根据制造商的说明, 使用One Step RT-qPCR SYBR Green Kit进行qRT-PCR以检测FOXO3、FOXM1 mRNA表达, 选择GAPDH作为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法量化相对mRNA水平。

1.9 Western blot检测N-cadherin、E-cadherin、Vimentin、FOXO3、FOXM1蛋白表达情况

各组DDP/HeLa细胞用RIPA裂解缓冲液处理后, 通过SDS-PAGE分离蛋白质。冲洗后, 立即将蛋白质转移到PVDF膜上。将膜在5%脱脂奶粉中室温封闭2 h, 与FOXO3(1:1 000)、FOXM1(1:1 000)、N-

cadherin(1:5 000)、E-cadherin(1:25)、Vimentin(1:100)一抗4℃孵育过夜。将膜清洗3次,然后与二抗(1:5 000)37℃孵育2 h。将膜使用ECL处理后,通过化学发光成像仪捕获图像。

1.10 统计分析

Graphpad Prism 7.0软件分析数据,数据表示为平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)。单因素方差分析进行多组间比较,进一步两组间的比较采用SNK-*q*检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HeLa和HeLa/DDP细胞对DDP的耐药性

10、20、40、60、80 μg/mL DDP处理后的HeLa细胞存活率低于未处理(0 μg/mL)组($P<0.05$),20、40、60、80 μg/mL DDP处理后HeLa/DDP细胞存活率低于

未处理(0 μg/mL)组($P<0.05$),且同一浓度下HeLa细胞的存活率低于HeLa/DDP细胞;HeLa/DDP细胞的IC₅₀为86.12 μg/mL,高于HeLa细胞,见表1。

2.2 各组细胞增殖能力比较

和耐药对照组比较,低、高浓度车叶草苷组HeLa/DDP细胞的 D_{450} 值降低($P<0.05$);和低浓度车叶草苷组比较,高浓度车叶草苷组HeLa/DDP细胞的 D_{450} 值降低($P<0.05$);与高浓度车叶草苷组、高浓度车叶草苷+si-NC组相比,高浓度车叶草苷+si-FOXO3组HeLa/DDP细胞的 D_{450} 值升高($P<0.05$),见表2。

2.3 各组细胞凋亡比较

耐药对照组与对照组细胞的凋亡率无明显差异($P>0.05$);和耐药对照组比较,低、高浓度车叶草苷组凋亡率升高($P<0.05$);和低浓度车叶草苷组比

表1 不同浓度DDP对HeLa和HeLa/DDP细胞存活率的影响

Table 1 Effects of different concentrations of DDP on the viability of HeLa and HeLa/DDP cells

浓度/μg·mL ⁻¹ Concentration /μg·mL ⁻¹	细胞存活率/% Cell viability /%	
	HeLa	HeLa/DDP
0	94.26±3.78	96.26±3.28
10	65.38±7.84*	94.16±4.15
20	51.65±5.37*#	86.14±7.28*#
40	37.13±4.45*#	77.36±7.16*#
60	22.15±2.37*#	65.08±7.27*#
80	10.06±1.18*#	46.16±5.49*#
IC ₅₀ /μg·mL ⁻¹	20.37	86.12

* $P<0.05$, 与0 μg/mL比较; # $P<0.05$, 与10 μg/mL比较。n=9。

* $P<0.05$ compared with 0 μg/mL; # $P<0.05$ compared with 10 μg/mL. n=9.

表2 各组细胞 D_{450} 值比较

Table 2 Comparison of D_{450} values of cells in each group

分组 Groups	D_{450} 值 D_{450} values
Control	1.68±0.18
DDP/HeLa control	1.67±0.17
L-asperuloside	1.45±0.15*#
H-asperuloside	1.19±0.12*#&
H-asperuloside+si-NC	1.21±0.13*#&
H-asperuloside+si-FOXO3	1.48±0.15@△
<i>F</i>	17.843
<i>P</i>	<0.001

* $P<0.05$, 与对照组比较; # $P<0.05$, 与耐药对照组比较; & $P<0.05$, 与低浓度车叶草苷组比较; @ $P<0.05$, 与高浓度车叶草苷组比较; △ $P<0.05$, 与高浓度车叶草苷+si-NC组比较。n=9。

* $P<0.05$ compared with the control group; # $P<0.05$ compared with the DDP/HeLa control group; & $P<0.05$ compared with the L-asperuloside group; @ $P<0.05$ compared with the H-asperuloside group; △ $P<0.05$ compared with the high concentration of H-asperuloside+si-NC group. n=9.

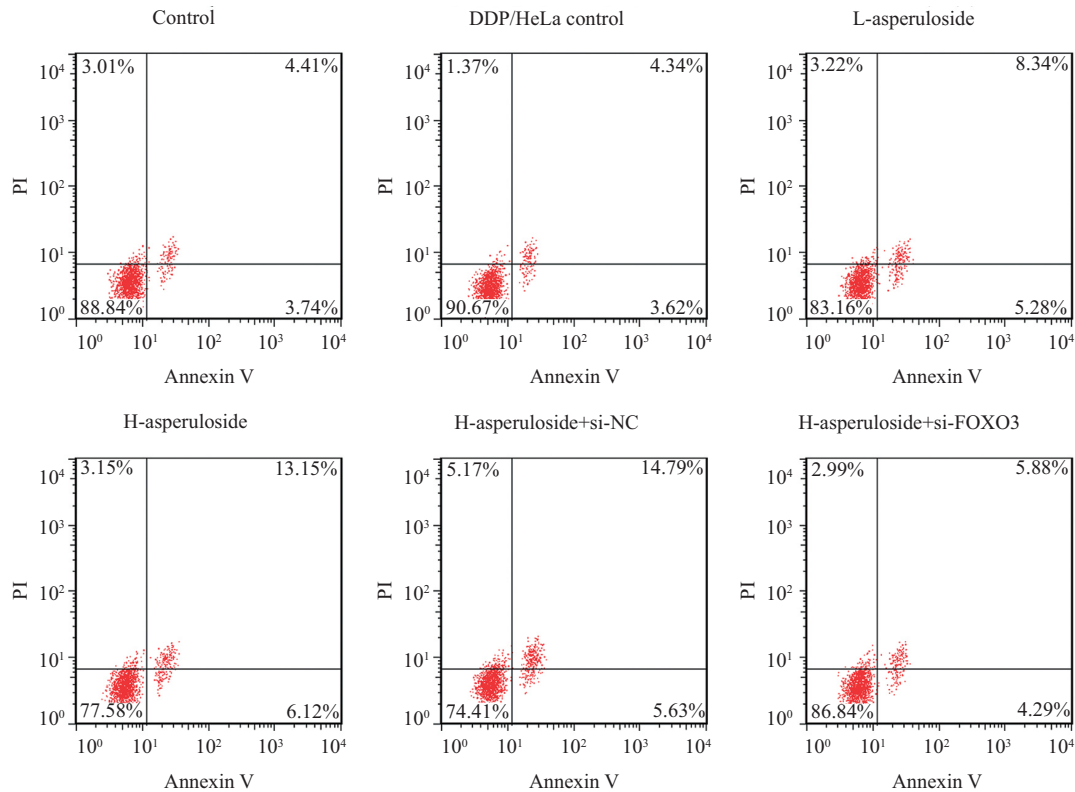


图1 各组细胞凋亡的流式分析图

Fig.1 Flow cytometry analysis of cell apoptosis in each group

表3 各组细胞凋亡率比较

Table 3 Comparison of cell apoptosis rate in each group

分组 Groups	凋亡率/% Apoptosis rate /%
Control	8.16±0.83
DDP/HeLa control	7.86±0.81
L-asperuloside	13.73±1.45* [#]
H-asperuloside	19.79±2.13* [#] &
H-asperuloside+si-NC	20.21±2.17* [#] &
H-asperuloside+si-FOXO3	10.25±1.08@ [△]
<i>F</i>	121.064
<i>P</i>	<0.001

* $P<0.05$, 与对照组比较; [#] $P<0.05$, 与耐药对照组比较; & $P<0.05$, 与低浓度车叶草苷组比较; @ $P<0.05$, 与高浓度车叶草苷组比较; [△] $P<0.05$, 与高浓度车叶草苷+si-NC组比较。 $n=9$ 。

* $P<0.05$ compared with the control group; [#] $P<0.05$ compared with the DDP/HeLa control group; & $P<0.05$ compared with the L-asperuloside group; @ $P<0.05$ compared with the H-asperuloside group; [△] $P<0.05$ compared with the high concentration of H-asperuloside+si-NC group. $n=9$.

较, 高浓度车叶草苷组凋亡率升高($P<0.05$); 与高浓度车叶草苷组、高浓度车叶草苷+si-NC组相比, 高浓度车叶草苷+si-FOXO3组HeLa/DDP细胞的凋亡率降低($P<0.05$), 见图1与表3。

2.4 各组细胞裸鼠移植瘤体积和质量比较

耐药对照组与对照组裸鼠移植瘤的体积和质量无显著差异($P>0.05$); 和耐药对照组比较, 低、高

浓度车叶草苷组裸鼠移植瘤的体积减小、质量降低($P<0.05$); 和低浓度车叶草苷组比较, 高浓度车叶草苷组裸鼠移植瘤体积减小、质量降低($P<0.05$); 与高浓度车叶草苷组、高浓度车叶草苷+si-NC组相比, 高浓度车叶草苷+si-FOXO3组HeLa/DDP细胞裸鼠移植瘤体积增大和质量升高($P<0.05$), 见图2与表4。

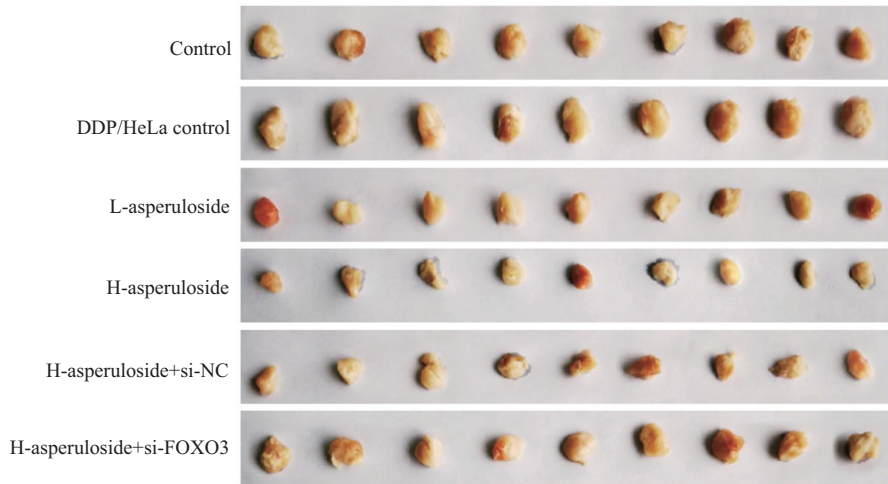


图2 各组细胞裸鼠移植瘤外观

Fig.2 Appearance of nude mouse transplanted tumors in each group

表4 各组细胞裸鼠移植瘤体积和质量比较

Table 4 Comparison of volume and mass of nude mouse transplanted tumors in each group

分组 Groups	体积/cm ³ Volume /cm ³	质量/g Mass /g
Control	1.26±0.14	1.15±0.12
DDP/HeLa control	1.41±0.15	1.27±0.13
L-asperuloside	1.05±0.12 ^{*#}	0.96±0.10 ^{*#}
H-asperuloside	0.68±0.07 ^{*#&}	0.63±0.07 ^{*#&}
H-asperuloside+si-NC	0.70±0.08 ^{*#&}	0.65±0.07 ^{*#&}
H-asperuloside+si-FOXO3	1.09±0.11 ^{@△}	1.02±0.11 ^{@△}
<i>F</i>	58.485	58.056
<i>P</i>	<0.001	<0.001

**P*<0.05, 与对照组比较; #*P*<0.05, 与耐药对照组比较; &*P*<0.05, 与低浓度车叶草苷组比较; @*P*<0.05, 与高浓度车叶草苷组比较; △*P*<0.05, 与高浓度车叶草苷+si-NC组比较。 *n*=9。

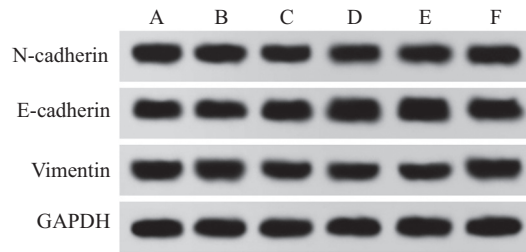
**P*<0.05 compared with the control group; #*P*<0.05 compared with the DDP/HeLa control group; &*P*<0.05 compared with the L-asperuloside group; @*P*<0.05 compared with the H-asperuloside group; △*P*<0.05 compared with the high concentration of H-asperuloside+si-NC group. *n*=9.

2.5 N-cadherin、E-cadherin、Vimentin表达水平比较

对照组、耐药对照组之间细胞上皮-间质转化相关蛋白表达无明显差异 (*P*>0.05); 与耐药对照组相比, 低浓度车叶草苷组、高浓度车叶草苷组 HeLa/DDP 细胞中 E-cadherin 表达水平升高, N-cadherin、Vimentin 表达水平下降 (*P*<0.05); 和低浓度车叶草苷组比较, 高浓度车叶草苷组 E-cadherin 表达水平升高, N-cadherin、Vimentin 表达水平下降 (*P*<0.05); 与高浓度车叶草苷组、高浓度车叶草苷+si-NC 组相比, 高浓度车叶草苷+si-FOXO3 组 E-cadherin 表达水平下降, N-cadherin、Vimentin 表达水平升高 (*P*<0.05), 见图3和表5。

2.6 各组细胞中FOXO3、FOXMI mRNA表达比较

与对照组(HeLa细胞)相比, 耐药对照组 HeLa/DDP 细胞中 FOXO3 mRNA 表达水平降低、FOXMI mRNA 表达水平提高 (*P*<0.05); 和耐药对照组比较, 低、高浓度车叶草苷组 FOXO3 mRNA 表达水平升高、FOXMI mRNA 表达水平降低 (*P*<0.05); 和低浓度车叶草苷组比较, 高浓度车叶草苷组 HeLa/DDP 细胞 FOXO3 mRNA 表达水平升高、FOXMI mRNA 表达水平降低 (*P*<0.05); 与高浓度车叶草苷组、高浓度车叶草苷+si-NC 组相比, 高浓度车叶草苷+si-FOXO3 组 HeLa/DDP 细胞 FOXO3 mRNA 表达水平降低、FOXMI mRNA 表达水平升高 (*P*<0.05), 见表6。



A: 对照组; B: 耐药对照组; C: 低浓度车叶草苷组; D: 高浓度车叶草苷组; E: 高浓度车叶草苷+si-NC组; F: 高浓度车叶草苷+si-FOXO3组。

A: control group; B: DDP/HeLa control group; C: L-asperuloside group; D: H-asperuloside group; E: H-asperuloside+si-NC group; F: H-asperuloside+si-FOXO3 group.

图3 N-cadherin、Vimentin、E-cadherin蛋白表达条带

Fig.3 Protein expression bands of N-cadherin, Vimentin, E-cadherin

表5 各组细胞上皮间-质转化蛋白表达比较

Table 5 Comparison of epithelial-mesenchymal transition protein expression in each group of cells

分组 Groups	N-cadherin	E-cadherin	Vimentin
Control	1.05±0.11	1.03±0.12	1.06±0.11
DDP/HeLa control	1.09±0.12	0.96±0.11	1.11±0.13
L-asperuloside	0.88±0.09 [#]	1.22±0.13 [#]	0.86±0.09 [#]
H-asperuloside	0.74±0.09 ^{#&}	1.39±0.14 ^{#&}	0.72±0.08 ^{#&}
H-asperuloside+si-NC	0.73±0.08 ^{#&}	1.41±0.15 ^{#&}	0.71±0.09 ^{#&}
H-asperuloside+si-FOXO3	0.92±0.12 ^{@△}	1.12±0.12 ^{@△}	0.91±0.11 ^{@△}
<i>F</i>	19.369	18.668	23.694
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

**P*<0.05, 与对照组比较; [#]*P*<0.05, 与耐药对照组比较; [&]*P*<0.05, 与低浓度车叶草苷组比较; [@]*P*<0.05, 与高浓度车叶草苷组比较; [△]*P*<0.05, 与高浓度车叶草苷+si-NC组比较。n=9。

**P*<0.05 compared with the control group; [#]*P*<0.05 compared with the DDP/HeLa control group; [&]*P*<0.05 compared with the L-asperuloside group; [@]*P*<0.05 compared with the H-asperuloside group; [△]*P*<0.05 compared with the high concentration of H-asperuloside+si-NC group. n=9.

表6 各组细胞中FOXO3、FOXMI mRNA表达比较

Table 6 Comparison of FOXO3 and FOXMI mRNA expression in cells of each group

分组 Groups	FOXO3	FOXMI
Control	1.08±0.12	1.03±0.06
DDP/HeLa control	0.53±0.06 [*]	2.11±0.22 [*]
L-asperuloside	0.67±0.08 [#]	1.76±0.18 [#]
H-asperuloside	0.88±0.09 ^{#&}	1.37±0.14 ^{#&}
H-asperuloside+si-NC	0.86±0.09 ^{#&}	1.39±0.14 ^{#&}
H-asperuloside+si-FOXO3	0.51±0.06 ^{&△}	1.98±0.21 ^{&△}
<i>F</i>	61.123	54.852
<i>P</i>	<0.001	<0.001

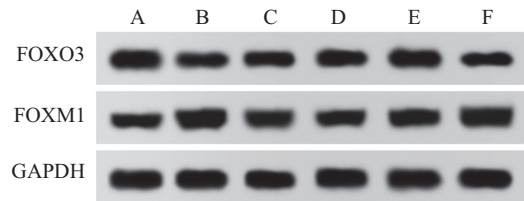
**P*<0.05, 与对照组比较; [#]*P*<0.05, 与耐药对照组比较; [&]*P*<0.05, 与低浓度车叶草苷组比较; [@]*P*<0.05, 与高浓度车叶草苷组比较; [△]*P*<0.05, 与高浓度车叶草苷+si-NC组比较。n=9。

**P*<0.05 compared with the control group; [#]*P*<0.05 compared with the DDP/HeLa control group; [&]*P*<0.05 compared with the L-asperuloside group; [@]*P*<0.05 compared with the H-asperuloside group; [△]*P*<0.05 compared with the high concentration of H-asperuloside+si-NC group. n=9.

2.7 各组细胞中FOXO3、FOXMI蛋白表达水平比较

和对照组(HeLa细胞)相比, 耐药对照组HeLa/DDP

细胞中FOXO3表达水平下降, FOXMI表达水平升高(*P*<0.05); 和耐药对照组比较, 低、高浓度车叶草苷组FOXO3表达水平升高, FOXMI表达水平下



A: 对照组; B: 耐药对照组; C: 低浓度车叶草苷组; D: 高浓度车叶草苷组; E: 高浓度车叶草苷+si-NC组; F: 高浓度车叶草苷+si-FOXO3组。
A: control group; B: DDP/HeLa control group; C: L-asperuloside group; D: H-asperuloside group; E: H-asperuloside+si-NC group; F: H-asperuloside+si-FOXO3 group.

图4 Western blot检测FOXO3、FOXM1蛋白表达情况
Fig.4 Western blot detection protein expression of FOXO3, FOXM1

表7 各组细胞FOXO3、FOXM1蛋白表达比较
Table 7 Comparison of FOXO3 and FOXM1 protein expression in each group of cells

分组 Groups	FOXO3	FOXM1
Control	1.06±0.11	0.45±0.06
DDP/HeLa control	0.54±0.06*	1.04±0.11*
L-asperuloside	0.66±0.07 [#]	0.78±0.08 [#]
H-asperuloside	0.86±0.09 ^{#&}	0.58±0.06 ^{#&}
H-asperuloside+si-NC	0.87±0.09 ^{#&}	0.59±0.06 ^{#&}
H-asperuloside+si-FOXO3	0.52±0.06 ^{&△}	0.95±0.10 ^{&△}
<i>F</i>	60.866	73.507
<i>P</i>	<0.001	<0.001

**P*<0.05, 与对照组比较; [#]*P*<0.05, 与耐药对照组比较; [#]*P*<0.05, 与低浓度车叶草苷组比较; [&]*P*<0.05, 与高浓度车叶草苷组比较; [△]*P*<0.05, 与高浓度车叶草苷+si-NC组比较。 *n*=9。
**P*<0.05 compared with the control group; [#]*P*<0.05 compared with the DDP/HeLa control group; [#]*P*<0.05 compared with the L-asperuloside group; [&]*P*<0.05 compared with the H-asperuloside group; [△]*P*<0.05 compared with the high concentration of H-asperuloside+si-NC group. *n*=9.

降 (*P*<0.05); 和低浓度车叶草苷组比较, 高浓度车叶草苷组 HeLa/DDP 细胞中 FOXO3 蛋白表达水平升高, FOXM1 蛋白表达水平降低 (*P*<0.05); 高浓度车叶草苷组和高浓度车叶草苷 + si-NC 组 FOXO3、FOXM1 表达水平无明显差异 (*P*>0.05); 和高浓度车叶草苷 + si-NC 组比较, 高浓度车叶草苷 + si-FOXO3 组 FOXO3 表达水平下降, FOXM1 表达水平升高 (*P*<0.05), 见图4和表7。

3 讨论

宫颈癌是妇科健康的主要问题, 高危 HPV 持续感染仍然是宫颈癌的主要危险因素^[13]。宫颈疣和宫颈癌由 HPV 感染引起, HPV 持续感染可从宫颈疣发展为良性宫颈发育不良和宫颈上皮内瘤变, 进而发展为浸润性宫颈癌^[14]。紫杉醇、顺铂、卡铂或上述药物联合使用是宫颈癌的一线治疗方案。但在实际临床治疗中, 肿瘤细胞常常产生耐药性, 治疗效果并不理想^[15]。

车叶草苷是从白花蛇舌草中分离和鉴定的 171 种化合物之一, 具有多种生物活性, 如抗炎和抗肿瘤, 例如, 其可以通过抑制 CDK2 和 E2F1 表达, 抑制肝癌细胞生长, 降低 5-氟尿嘧啶耐药性^[16]。在结直肠癌中, 车叶草苷抑制细胞上皮-间质转化, 减轻结肠炎症状、减少肿瘤数量、减小肿瘤大小^[17]。本研究通过 CCK-8 和流式细胞术测量数据显示, 车叶草苷可以显著抑制 HeLa/DDP 细胞增殖并诱导其凋亡, 且高浓度组效果优于低浓度组; 裸鼠移植瘤实验显示, 车叶草苷可降低 HeLa/DDP 细胞裸鼠移植瘤质量和体积; 车叶草苷可提高 HeLa/DDP 细胞 FOXO3、E-cadherin 蛋白表达水平, 抑制 FOXM1、N-cadherin、Vimentin 蛋白表达; 本研究得出车叶草苷同样抑制 HeLa 细胞的上皮-间质转化, 与前人研究中车叶草苷抑制结直肠癌细胞上皮-间质转化的结果相符^[17]; 结合前人研究表明, 车叶草苷对宫颈癌具有抗癌效果, 可能作为宫颈癌的潜在治疗药物^[10]。

多种细胞内外增殖信号通路会汇聚到 FOXO3

上, FOXO3主要受到PI3K-Akt/PKB和Ras-Raf-MEK-ERK信号通路的负向调节,以响应各种外部刺激和生长因子^[18]。FOXO3上游的PI3K-Akt和Ras-ERK通路激活会通过级联反应磷酸化FOXO3,从而为细胞核中的伴侣蛋白14-3-3提供结合位点,进而调节FOXO3转录活性和细胞质易位^[19]。FOXO3失活在人类肿瘤中经常被发现,已被证明与HPV感染和癌前病变有关^[20]。在HeLa细胞中,白藜芦醇可以促进FOXO3核易位,上调FOXO3及Bcl-2相互作用细胞死亡介质(Bcl-2 interacting mediator of cell death, BIM)的表达,抑制ERK活性,导致FOXO3活化,显著抑制HeLa细胞增殖并诱导其凋亡^[21]。本研究结果同样也显示FOXO3影响HeLa细胞的增殖和凋亡。

FOXO3是FOXO3下游靶基因,FOXO3不仅在转录上使FOXO3失活,还竞争相同的靶基因拮抗FOXO3^[22]。研究表明,FOXO3异位过表达可以加速体内模型中肿瘤发生发展,FOXO3激活导致FOXO3抑制^[23]。FOXO3过表达已被证明会在乳腺癌细胞中产生顺铂耐药性^[24]。因此,本研究检测了FOXO3和FOXO3的mRNA和蛋白表达,发现与对照组相比,耐药对照组HeLa/DDP细胞FOXO3表达水平降低、FOXO3表达水平提高;车叶草苷可提高HeLa/DDP细胞中FOXO3表达水平、降低FOXO3表达水平。抑制FOXO3表达后,HeLa/DDP细胞FOXO3表达水平提高,提示FOXO3对FOXO3的负调控作用;细胞增殖能力增强,凋亡能力降低,裸鼠移植瘤质量增加、体积增大,上皮-间质转化能力提高,与前人研究^[24]结果一致,提示车叶草苷可能通过FOXO3-FOXO3信号轴降低宫颈癌细胞上皮-间质转化能力和化疗耐药性。

综上所述,车叶草苷可能通过促进FOXO3表达、抑制FOXO3表达,进而影响宫颈癌细胞的上皮-间质转化能力和化疗耐药性。本研究为车叶草苷作为宫颈癌治疗的潜在药物提供了依据,并验证了FOXO3-FOXO3信号轴在宫颈癌化疗耐药性中的作用,车叶草苷可能能够作为宫颈癌化疗过程中的辅助药物。

参考文献 (References)

[1] SHI F, PANG X X, LI G J, et al. Genetic association study of intron variants in the forkhead box protein P3 gene in Chinese patients diagnosed with cervical cancer [J]. J Cell Mol Med, 2022, 26(9): 2658-72.

[2] BAEDYANANDA F, CHAIWONGKOT A, VARADARAJAN

S, et al. HPV16 E1 dysregulated cellular genes involved in cell proliferation and host DNA damage: a possible role in cervical carcinogenesis [J]. PLoS One, 2021, 16(12): e0260841.

[3] GAN Q, MAO L, SHI R, et al. Prognostic value and immune infiltration of HPV-related genes in the immune microenvironment of cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma [J]. Cancers, 2023, 15(5): 1419.

[4] BERNARDO V S, TORRES F F, DA SILVA D G H. FoxO3 and oxidative stress: a multifaceted role in cellular adaptation [J]. J Mol Med, 2023, 101(1/2): 83-99.

[5] LIN Z, NIU Y, WAN A, et al. RNA m⁶A methylation regulates sorafenib resistance in liver cancer through FOXO3-mediated autophagy [J]. EMBO J, 2020, 39(12): e103181.

[6] CUI W, XIE N, LAM E W, et al. High expression of cytoplasmic FOXO3 protein associated with poor prognosis of rectal cancer patients: a study from Swedish clinical trial of preoperative radiotherapy to big database analysis [J]. Heliyon, 2023, 9(5): e15342.

[7] LI J, DAI S, CHEN X, et al. Mechanism of forkhead transcription factors binding to a novel palindromic DNA site [J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(6): 3573-83.

[8] GHOSH S, SINGH R, VANWINKLE Z M, et al. Microbial metabolite restricts 5-fluorouracil-resistant colonic tumor progression by sensitizing drug transporters via regulation of FOXO3-FOXO3 axis [J]. Theranostics, 2022, 12(12): 5574-95.

[9] CHAN Y, NG S W, XIN TAN J Z, et al. Emerging therapeutic potential of the iridoid molecule, asperuloside: a snapshot of its underlying molecular mechanisms [J]. Chem Biol Interact, 2020, 315(1): 108911.

[10] QI ZM, WANG X, LIU X, et al. Asperuloside promotes apoptosis of cervical cancer cells through endoplasmic reticulum stress-mitochondrial pathway [J]. Chin J Integr Med, 2024, 30(1): 34-41.

[11] 张玉清, 邢惠海, 刘立秋, 等. miR-196b调控PI3K/Akt通路对宫颈癌细胞顺铂耐药的影响研究 [J]. 中国免疫学杂志 (ZHANG Y Q, XING H H, LIU L Q, et al. Study on the effect of miR-196b regulating PI3K/Akt pathway on cisplatin resistance of cervical cancer cells [J]. China Journal of Immunology), 2021, 37(23): 2865-70.

[12] 季雪颖, 陆晓媛, 经莉. 贝伐珠单抗联合阿司匹林对宫颈癌裸鼠移植瘤生长的影响及机制 [J]. 中国临床药理学杂志 (JI X Y, LU X Y, JING L. Bevacizumab combined with aspirin on the growth of human cervical cancer transplanted tumor in nude mice and its mechanism [J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology), 2022, 38(12): 1373-77.

[13] HUANG H, HAN Q, ZHENG H, et al. MAP4K4 mediates the SOX6-induced autophagy and reduces the chemosensitivity of cervical cancer [J]. Cell Death Dis, 2021, 13(1): 13.

[14] LIN X, WANG F, CHEN J, et al. N⁶-methyladenosine modification of CENPK mRNA by ZC3H13 promotes cervical cancer stemness and chemoresistance [J]. Mil Med Res, 2022, 9(1): 19.

[15] 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.

[16] LI L, QIU H. Asperulosidic acid restrains hepatocellular carcinoma development and enhances chemosensitivity through

- inactivating the MEKK1/NF- κ B pathway [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2024, 196(1): 1-17.
- [17] LU Y, GUAN T, XU S, CHEN Y E, et al. Asperuloside inhibited epithelial-mesenchymal transition in colitis associated cancer via activation of vitamin D receptor [J]. *Phytomedicine*, 2022, 101(1): 154070.
- [18] MENG X, PENG L, WEI X, et al. FOXO3 is a potential biomarker and therapeutic target for premature ovarian insufficiency [J]. *Mol Med Rep*, 2023, 27(2): 34.
- [19] CAO G, LIN M, GU W, et al. The rules and regulatory mechanisms of FOXO3 on inflammation, metabolism, cell death and aging in hosts [J]. *Life Sci*, 2023, 328(1): 121877.
- [20] MA X, ZHANG Q, DU J, et al. Integrated analysis of ceRNA regulatory network associated with tumor stage in cervical cancer [J]. *Front Genet*, 2021, 12(1): 618753.
- [21] LIU Z, LI Y, SHE G, et al. Resveratrol induces cervical cancer HeLa cell apoptosis through the activation and nuclear translocation promotion of FOXO3a [J]. *Pharmazie*, 2020, 75(6): 250-54.
- [22] SOLBERG N T, MELHEIM M, STRAND M F, et al. MEK inhibition induces canonical WNT signaling through YAP in KRAS mutated HCT-15 cells, and a cancer preventive FOXO3/FOXM1 ratio in combination with TNKS inhibition [J]. *Cancers*, 2019, 11(2): 164.
- [23] LI H, TANG X, SUN Z, et al. Integrating bioinformatics and experimental models to investigate the mechanism of the chelidone-induced mitotic catastrophe via the AKT/FOXO3/FOXM1 axis in breast cancer cells [J]. *Biomol Biomed*, 2024, 24(3): 560-74.
- [24] TANG Q, XU A, YANG Y, et al. FOXM1 contributes to chemotherapy sensitivity in cervical cancer by regulating TTK [J]. *Discov Med*, 2023, 35(176): 208-20.