DOI: 10.11844/cjcb.2026.11.0003
中国细胞生物学学报 Chinese Journal of Cell Biology 2026, 48(11): 2521–2533 CSTR: 32200.14.cjcb.2026.11.0003

· 研究论文 ·

桑黄多糖对宫颈癌HeLa细胞的抑制作用及初步机制研究

许嫣腾　刘舟琴　厉莹玮　陆红*
(浙江中医药大学药学院, 杭州 311402)

摘要　该文观察桑黄多糖(*Phellinus igniarius* polysaccharide, PIP)对宫颈癌HeLa细胞的增殖、凋亡、自噬、迁移、侵袭作用并探讨其可能的分子机制。采用MTT法设置(0~800) μg/mL梯度浓度PIP处理HeLa细胞24、48、72 h, 检测细胞活力, 根据细胞增殖抑制率确定低、中、高实验给药浓度(50、100、200 μg/mL)。实验分组还包括雷帕霉素(rapamycin)(500 nmol/L)+PIP(100 μg/mL)组、3-MA(5 mmol/L)+PIP(100 μg/mL)组、CQ(20 μmol/L)+PIP(100 μg/mL)组及Z-VAD-FMK(20 μmol/L)+PIP(100 μg/mL)组。采用MTT法检测细胞活力; 克隆形成实验检测细胞克隆形成能力; 流式细胞术检测细胞周期变化; DAPI染色观察细胞的形态变化; 划痕实验与Transwell实验检测细胞迁移与侵袭能力; JC-1、DCFH-DA及MDC染色分别检测线粒体膜电位、ROS水平及自噬荧光水平; Western blot检测相关蛋白表达水平。与对照组比较, PIP组细胞克隆形成、迁移、侵袭能力显著降低(P<0.05); S期比例上升, CDK2、Cyclin A2表达水平下降(P<0.05); ROS水平升高, 线粒体膜电位降低, Bax、cleaved caspase-3、细胞色素C表达上调, Bcl-2、caspase-9、caspase-3表达下调(P<0.05); Beclin-1、LC3-II/I表达水平升高, p62表达水平降低(P<0.05); p-PI3K、p-Akt、p-mTOR表达水平降低, ULK1表达水平升高(P<0.05); E-cadherin表达水平升高, MMP2、MMP9表达水平降低(P<0.05)。与PIP组比较, rapamycin可降低凋亡率, 3-MA、CQ可提高凋亡率(P<0.05); Z-VAD-FMK可逆转PIP诱导的凋亡相关蛋白变化(P<0.05)。PIP可抑制宫颈癌HeLa细胞增殖、迁移、侵袭, 并将细胞周期阻滞于S期, 通过ROS介导的线粒体通路诱导caspase依赖性凋亡, 同时可能激活保护性自噬拮抗凋亡, 联用自噬抑制剂可产生协同效应。

关键词　桑黄多糖; 宫颈癌; HeLa细胞; 凋亡; 自噬

Inhibitory Effect of *Phellinus igniarius* Polysaccharides on Cervical Cancer HeLa Cells and Preliminary Mechanitic Study

XU Yanteng, LIU Zhouqin, LI Yingwei, LU Hong*
(*College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311402, China*)

Abstract　This study investigates the effects of PIP (*Phellinus igniarius* polysaccharide) on the proliferation, apoptosis, autophagy, migration and invasion of cervical cancer HeLa cells, and explores its potential molecular mechanisms. HeLa cells were treated with gradient concentrations (0-800) μg/mL of PIP for 24, 48, and 72 h. Cell viability was assessed using the MTT assay. Based on the cell proliferation inhibition rate, low, medium, and high

收稿日期: 2026-07-02　接受日期: 2026-09-24
*通信作者。Tel: 13157129893, E-mail: luhong@zcmu.edu.cn
Received: July 2, 2026　Accepted: September 24, 2026
*Corresponding author. Tel: +86-13157129893, E-mail: luhong@zcmu.edu.cn

experimental doses (50, 100, 200 μg/mL) were determined. Additional treatment groups included rapamycin (500 nmol/L)+PIP (100 μg/mL), 3-MA (5 mmol/L)+PIP (100 μg/mL), CQ (20 μmol/L)+PIP (100 μg/mL), and Z-VAD-FMK (20 μmol/L)+PIP (100 μg/mL). Cell viability, colony formation, cell cycle, and morphological changes were evaluated by MTT, colony formation assay, flow cytometry, and DAPI staining, respectively. Migration and invasion were assessed using scratch and Transwell assays. Mitochondrial membrane potential, ROS levels, and autophagic fluorescence were measured by JC-1, DCFH-DA, and MDC staining. Western blot was employed to detect the expression of relevant proteins. Compared with the control group, PIP treatment significantly reduced cell colony formation, migration, and invasion (P<0.05). The proportion of cells in the S phase increased, and the expression of CDK2 and Cyclin A2 decreased (P<0.05). ROS levels increased, mitochondrial membrane potential decreased, and expression levels of Bax, cleaved caspase-3, and cytochrome C were upregulated, while Bcl-2, caspase-9, and caspase-3 expression levels were downregulated (P<0.05). Beclin-1 and LC3-II/I expression levels increased, and p62 expression decreased (P<0.05). The expression levels of p-PI3K, p-Akt, and p-mTOR decreased, while ULK1 expression increased (P<0.05). The expression level of E-cadherin increased, and MMP2 and MMP9 expression decreased (P<0.05). Compared with the PIP group, rapamycin decreased the apoptosis rate, while 3-MA and CQ increased the apoptosis rate (P<0.05). Z-VAD-FMK reversed the changes in apoptosis-related proteins induced by PIP (P<0.05). PIP inhibits proliferation, migration, and invasion of cervical cancer HeLa cells and arrests the cell cycle at the S phase. It induces caspase-dependent apoptosis via a ROS-mediated mitochondrial pathway and may simultaneously activate protective autophagy that antagonizes apoptosis. Co-treatment with autophagy inhibitors can yield synergistic effects.

Keywords *Phellinus igniarius* polysaccharide; cervical cancer; HeLa cells; apoptosis; autophagy

宫颈癌(cervical cancer, CC)是全球女性高发恶性肿瘤，每年新增病例超60万例，死亡人数逾34万例，分别占女性癌症新增病例和死亡病例的6.5%与7.7%[1]。尽管人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)疫苗普及和宫颈筛查技术提升使整体发病率呈下降趋势，但年轻患者比例近年显著上升[2]。目前临床治疗手段(如手术、放疗、化疗)面临复发率高、毒副作用显著等局限，从传统中医药开发低毒高效的抗宫颈癌新型药物具有迫切的临床需求[3]。

桑黄(*Phellinus igniarius*)是一种传统药用真菌，主要含有多糖、黄酮等活性成分，具有显著的抗炎、抗氧化和抗肿瘤等药理活性[4-6]。《神农本草经》记载桑黄具有治疗“癥瘕积聚”的功效，其中“癥瘕”即指现代医学中的妇科肿瘤[7]。现代研究进一步表明，桑黄提取物对乳腺癌、卵巢癌等妇科肿瘤细胞的增殖具有显著的抑制作用[8-9]。在宫颈癌领域，已有研究证实桑黄菌丝体提取物可通过诱导G_0/G_1期细胞周期阻滞和激活线粒体凋亡途径抑制HeLa细胞生长[10]，其多糖成分则表现出良好的免疫调节活性[11]。然而，桑黄多糖(*Phellinus igniarius* polysaccharide, PIP)在宫颈癌中的作用机制仍不明确。

细胞凋亡与自噬是调控肿瘤细胞命运的关键程序性细胞过程，二者交互作用密切影响肿瘤进展[12]。细胞凋亡与自噬均属于程序性死亡形式，可清除冗余或受损成分。但与凋亡必然致死不同，自噬具有双重作用：既可在应激状态下帮助肿瘤细胞存活，也可通过关键信号通路发挥抑癌效应。已有研究证明，人参皂苷Rg3可通过抑制自噬流促进凋亡；喜树碱则通过ROS调节AMPK/mTOR/ULK1轴诱发保护性自噬[13-14]。上述研究表明，凋亡与自噬的交互调控直接影响肿瘤细胞命运，是天然产物抗肿瘤的重要共同机制。

本研究以宫颈癌HeLa细胞为研究对象，探究PIP在宫颈癌HeLa细胞周期、迁移、侵袭、凋亡和自噬等方面的影响，初步阐明PIP抑制宫颈癌HeLa增殖的作用及可能的作用机制，为抗宫颈癌新型药物的研究开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 *实验细胞* 人宫颈癌HeLa细胞购自中国科学院上海细胞库，出库时附带该批次细胞的支原体

阴性检测报告和人源短串联重复序列(short tandem repeat, STR)基因型鉴定报告。细胞培养于DMEM完全培养基(含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 U/mL链霉素), 并置于37 ℃、5% CO_2恒温培养箱内进行培养。

1.1.2 试剂和仪器 桑黄子实体药材购自淳安千岛湖桑都食用菌专业合作社; 噻唑蓝[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT](货号: T1320)和DAPI染色液(货号: D9542-1MG)购自Sigma公司; 活性氧检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒、结晶紫染色液、Annexin V-FITC凋亡试剂盒、细胞周期与凋亡检测试剂盒、乳酸脱氢酶活力试剂盒、细胞自噬染色检测试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒(货号: S0033-1、C2006、C0121、C1063、C1052、E1020、C3018S、P0012)购自上海碧云天生物技术有限公司; ECL发光检测液(货号: 190-5070)、3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 自噬早期抑制剂, 货号: HY-19312)和氯喹(chloroquine, CQ, 自噬溶酶体降解阻断剂, 货号: HY-17589A)、雷帕霉素(rapamycin, 自噬诱导剂, 货号: HY-10219)、泛caspase抑制剂(Z-VAD-FMK, 货号: HY-16658B)购自MCE公司; 羊抗兔IgG-HRP二抗(货号: BA1057, 稀释比例为1:5 000)购自武汉博士德生物科技有限公司; 羊抗鼠IgG-HRP二抗(货号: Ab6789, 稀释比例为1:5 000)购自Abcam公司; β-actin(货号: 4970T)、Bax(货号: 5023S) 、Bcl-2(货号: 4223S)、cleaved caspase-3(货号: 9664S)、caspase-3(货号: 9665)、细胞色素C(cytochrome C)(货号: 4280)、p62(货号: 5114)、LC3A/B(货号: 12471)、Beclin-1(货号: 3495)均购自CST公司(在一抗中, 除Akt一抗为鼠源单克隆抗体外, 其余一抗均为兔源多克隆抗体; 总蛋白抗体稀释比例为1:1 000, 磷酸化抗体稀释比例为1:800); caspase-9(货号: YM3077)购自ImmunoWay公司; CDK2、Cyclin A2(货号: ET1602-6、ET1612-26)购自华安生物科技有限公司; E-cadherin、PI3K、p-Akt、mTOR、p-mTOR、ULK1(货号: WL01482、WL03380、WLP001a、WL02477、WL03694、WL03067)购自万类生物科技有限公司; MMP2、MMP9(货号: Ab-02639、Ab-02682)购自臻优品生物科技有限公司; p-PI3K(货号: AF3242)购自Affinity公司; Akt(货号: sc-5298)购自Santa Cruz公司; 胎牛血清(货号: 1806042)购自杭州四季青生物科技有限公司; 胰蛋白酶溶液(货号: C20250EP)购自Gibco公司。所有一抗均与相应种属来源的羊抗兔或羊抗鼠二抗匹配使用。

1.1.3 药物制备 PIP制备: 预处理后的桑黄子实体粉末按固液比1:10加入蒸馏水, 在95 ℃下回流提取3次, 每次8 h。提取液经5 000 r/min、4 ℃离心10 min后, 收集上清液, 通过减压蒸发浓缩后, 加入4倍体积的95%乙醇, 于4 ℃静置过夜进行沉淀。采用Sevag法[15]去除分离出的大部分蛋白质, 随后使用截留分子量8 000~12 000 Da的透析袋(货号: MD44-14, Viskase公司)对蒸馏水透析48 h, 最后冻干得到部分纯化的桑黄粗多糖提取物(命名为PIP)。经苯酚–浓硫酸法测得总多糖含量为61.7%。鉴于PIP为部分纯化的粗多糖提取物, 样品中可能混杂少量蛋白质、多酚等残留成分, 其抗肿瘤效应是否完全由多糖成分单独介导仍需进一步研究。

1.2 方法

1.2.1 细胞分组及处理 采用MTT法设置0、25、50、100、200、400 、600、800 μg/mL梯度浓度PIP, 分别干预HeLa细胞24、48、72 h, 检测细胞存活率。依据增殖抑制效应筛选出低浓度50 μg/mL、中浓度100 μg/mL、高浓度200 μg/mL, 作为后期实验浓度。此外, PIP最佳处理浓度是100 μg/mL和处理时间为48 h。

将HeLa细胞分为对照组, 低、中、高浓度(50 μg/mL、100 μg/mL、200 μg/mL PIP)组。3-MA在PIP处理前1 h干预: 对照组、3-MA(5 mmol/L)组、PIP(100 μg/mL)组、3-MA(5 mmol/L)+PIP(100 μg/mL)组; CQ在PIP处理前1 h干预: 对照组、CQ(20 μmol/L)组、PIP(100 μg/mL)组、CQ(20 μmol/L)+PIP(100 μg/mL)组; 雷帕霉素在PIP处理前30 min干预: 对照组、雷帕霉素(500 nmol/L)组、PIP(100 μg/mL)组、雷帕霉素(500 nmol/L)+PIP(100 μg/mL)组。Z-VAD-FMK在PIP处理前2 h干预: 对照组、Z-VAD-FMK(20 μmol/L)组、PIP组(100 μg/mL)、Z-VAD-FMK(20 μmol/L)+PIP(100 μg/mL)组。除特殊说明外, 药物处理总时长为48 h。

1.2.2 MTT法检测细胞存活率 MTT法测定细胞活力, 将细胞以1×10^4/孔的速度接种到96孔板, 加入浓度为12.5、25、50、100、200、400、600、800 μg/mL的PIP, 每个浓度6个复孔, 分别作用24 h、48 h、72 h。终止前4 h加入MTT, 37 ℃、5% CO_2继续孵育4 h后加DMSO溶解结晶。用酶标仪(Synergy

H1, Bio-Tek公司)检测各孔490 nm波长处的吸光度($D_{490\ nm}$)值, 并计算各个时间浓度的细胞存活率。$RC(\%)=[(D_{给药组}-D_{调零组})/(D_{正常对照组}-D_{调零组})]\times100\%$。其中, RC: 细胞存活率。

1.2.3 LDH释放率的测定 将HeLa细胞(1×10^5/mL)接种于6孔板, 分别用50、100、200 μg/mL的PIP培养48 h。按试剂盒说明书绘制标准曲线。接着, 先收集各孔培养上清作为胞外LDH检测样本, 再消化裂解细胞(37 ℃、30 min), 5 000 r/min、4 ℃离心10 min收集上清液作为胞内LDH检测样本。按步骤吸取试剂和样品至96孔板, 用酶标仪(440 nm)测定。本实验设置不含细胞的空白培养基孔作为本底对照。计算细胞LDH释放率公式如下。$RR_{LDH}=[E_{培养基}/(E_{培养基}+E_{裂解液})]\times100\%$。其中, RR_{LDH}: LDH释放率; $E_{培养基}$: 细胞培养基中的LDH酶活力单位; $E_{裂解液}$: 细胞裂解液中的LDH酶活力单位。

1.2.4 克隆形成实验 各组分别接种HeLa细胞(300/皿)。细胞黏附后, 分别加入不同浓度的PIP(50、100、200 μg/mL)处理24 h后, 更换为不含药物的完全培养基继续培养至第14天, 每3 d完全更换一次培养基。室温条件下, 用4%多聚甲醛固定15 min, 5%结晶紫染色30 min。晾干后, 在相机下拍照并计数。

1.2.5 划痕愈合实验 HeLa细胞(5×10^5/mL)接种于6孔板, 贴壁后用200 μL枪头划线。PBS洗涤后加入不同浓度PIP(50、100、200 μg/mL)无血清培养基。显微镜下记录0、24、48 h划痕宽度。ImageJ分析愈合率。

1.2.6 Transwell实验 (1) 迁移实验: 将对数期HeLa细胞制成2.5×10^5/mL单细胞悬液, 分别加入200 μL含不同浓度PIP(50、100、200 μg/mL)无血清培养基的细胞悬液至Transwell上室, 下室加600 μL含10% FBS完全培养基, 37 ℃、5% CO_2培养24 h, PBS洗涤, 室温4%多聚甲醛固定30 min; PBS洗涤, 结晶紫染色20 min; PBS洗涤, 擦拭上室细胞, 显微镜下观察拍照; 依据前期MTT细胞活力检测结果校正穿膜细胞数, 以排除药物细胞毒性对穿膜细胞计数结果的干扰。

(2) 侵袭实验: 基质胶与预冷无血清培养基按照1:8稀释, 60 μL加入上室, 37 ℃孵育3 h, 接种细胞, 其余操作同迁移实验; 依据前文MTT检测结果校正各组细胞活力。

1.2.7 DAPI染色检测细胞核形态 采用DAPI试剂盒观察HeLa细胞凋亡。DAPI染色采用1 mg/mL原液, PBS洗涤细胞3次, 荧光显微镜观察细胞核形态。

1.2.8 PI单染检测细胞周期 将HeLa细胞以5×10^5/孔密度铺入6孔板, 静置12 h后更换培养基, 加入不同浓度的PIP(50、100、200 μg/mL)继续培养24 h。之后, 37 ℃胰酶消化细胞1 min, PBS洗涤, 4 ℃、300 ×g离心5 min收集细胞, 弃上清, 用预冷的70%乙醇于4 ℃固定过夜。第2天, 4 ℃、300 ×g离心5 min去除固定液, 用PBS重悬细胞, 加入PI染色液, 37 ℃避光孵育30 min。最后, 过滤并用流式细胞仪检测红色荧光。

1.2.9 细胞内ROS水平的测定 将HeLa细胞(1×10^5/mL)接种于6孔板, 分别用50、100、200 μg/mL的PIP培养48 h。处理后, 弃去旧培养基, 用预冷的PBS清洗细胞, 37 ℃胰酶消化1 min后, 于4 ℃、300×g离心5 min弃上清。用无血清培养基稀释的DCFH-DA染色液(10 μmol/L)重悬细胞, 37 ℃避光孵育30 min, 其间混匀。孵育后, 4 ℃、300 ×g离心5 min, 弃上清, 用无血清培养基洗涤细胞2次, 去除未进入细胞的探针。最后, 用PBS重悬细胞, 过滤至流式管中, 进行流式检测。

1.2.10 JC-1染色法检测细胞线粒体膜电位 将HeLa细胞(1×10^5/mL)接种于6孔板中, 用浓度为50、100、200 μg/mL的PIP培养48 h。培养结束后, 吸弃旧培养基, 按试剂盒说明书加入完全培养基和JC-1染色工作液, 37 ℃避光孵育20 min。孵育结束后, 吸弃上清液。用JC-1染色缓冲液洗涤细胞2次, 将6孔板置于倒置荧光显微镜下观察, 并拍照记录细胞的荧光情况。为评估线粒体膜电位的变化, 本研究采用了JC-1染料。该染料在高膜电位下于线粒体内形成红色荧光聚集体, 而在低膜电位下则以绿色荧光单体形式存在于细胞质中。

1.2.11 Annexin V-FITC/PI双染法检测细胞凋亡率 将悬浮细胞在4 ℃下300 ×g离心5 min, 收集细胞, 用预冷的PBS洗涤细胞2次, 加入195 μL Annexin V-FITC结合液重悬细胞。加入5 μL Annexin V-FITC染色液和10 μL的PI染液, 轻轻混匀, 室温避光孵育20 min, 加入400 μL结合缓冲液, 混匀。1 h内用流式细胞仪分析细胞凋亡情况。

1.2.12 MDC法检测细胞自噬荧光 将HeLa细胞接种于24孔板并培养过夜, 然后根据分组进行给药。48 h后, 更换培养液, 使用MDC染色液进行染色, 室

温避光孵育30 min。孵育后清洗细胞, 用荧光显微镜观察绿色荧光。MDC是一种常用的自噬体标记探针, 能够特异性结合自噬体膜上的酸性磷脂。虽然其特异性并非绝对, 但结合LC3-II/I值及p62表达水平的变化, 可有效验证自噬的发生。

1.2.13 Western blot检测细胞凋亡及自噬相关蛋白表达情况 各组HeLa细胞经48 h药物处理后, 加入细胞裂解液, 提取总蛋白, BCA法测定蛋白浓度。取蛋白样品, 95 ℃煮沸变性5 min, 进行12% SDS-PAGE, 每孔上样40 μL(各组等量总蛋白), 电泳分离后, 湿法转印至PVDF膜, 室温5%脱脂奶粉封闭1 h, 1× TBST洗涤3次, 每次10 min。剪裁目的条带, 4 ℃孵育一抗过夜(所有抗体稀释度1:1 000), 1× TBST洗涤3次, 每次10 min。二抗(抗体稀释度1:10 000)室温孵育2 h, 1× TBST洗涤3次, 每次10 min, 滴加ECL发光液, 采用全自动凝胶成像分析仪拍照, ImageJ软件分析各组条带的积分吸光度值(integrated absorbance, IA), 以β-actin表达量进行内参校正。

1.2.14 统计方法 使用GraphPad Prism 9.5软件(GraphPad Software公司)进行统计学分析及制图, 所有实验均独立重复3次(n=3, 生物学重复), 计量资料以$\bar{x}\pm s$表示, 两组比较采用独立样本t检验; 多组比较方差齐时采用单因素方差分析+Tukey多重比较; 方差不齐时则采用Tamhane's T2法, P<0.05表示具有显著性差异; P<0.01表示具有极显著性差异。

2 结果

2.1 PIP对HeLa细胞增殖的影响

采用梯度浓度(0~800 μg/mL)的桑黄多糖(PIP)分别处理HeLa细胞24、48、72 h后, MTT法检测结果如图1A所示: PIP对HeLa细胞的增殖抑制效应呈现显著的时间–剂量依赖关系(P<0.01)。结合细胞活性及实验有效性, 筛选50、100、200 μg/mL作为后续实验剂量。

不同浓度PIP处理HeLa细胞48 h后, 细胞培养液中LDH活性显著升高(P<0.05, P<0.01), 表明PIP诱导细胞膜损伤(图1B)。与对照组相比, PIP组细胞克隆形成率随PIP浓度升高而降低(P<0.01, 图1C)。流式细胞术和Western blot结果显示, 与对照组相比, PIP实验组S期细胞比例显著增加, HeLa细胞内CDK2和Cyclin A2的蛋白表达水平显著降低(P<0.05, P<0.01), 提示细胞周期被PIP阻滞于S期(图1D和图1E)。

2.2 PIP对HeLa细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响

与对照组相比, PIP组划痕愈合率显著降低, Transwell穿膜侵袭细胞数显著减少, 且呈剂量依赖性(P<0.05, 图2A~图2D); Western blot检测显示, 与对照组比较, PIP各组MMP2、MMP9蛋白表达水平显著降低, E-cadherin蛋白表达水平显著升高(P<0.05, 图2E)。

2.3 PIP诱导HeLa细胞氧化应激与线粒体功能障碍

与对照组相比, PIP组表现出剂量依赖性损伤特征, 具体表现为: 细胞密度显著下降、贴壁能力减弱、细胞皱缩及轮廓模糊, 并伴有明显碎片数目增多。DAPI染色结果显示, 处理组细胞核形态发生改变, 荧光染色呈浓聚、致密的块状或碎片状结构, 且核碎裂程度随PIP浓度升高而加重(图3A)。

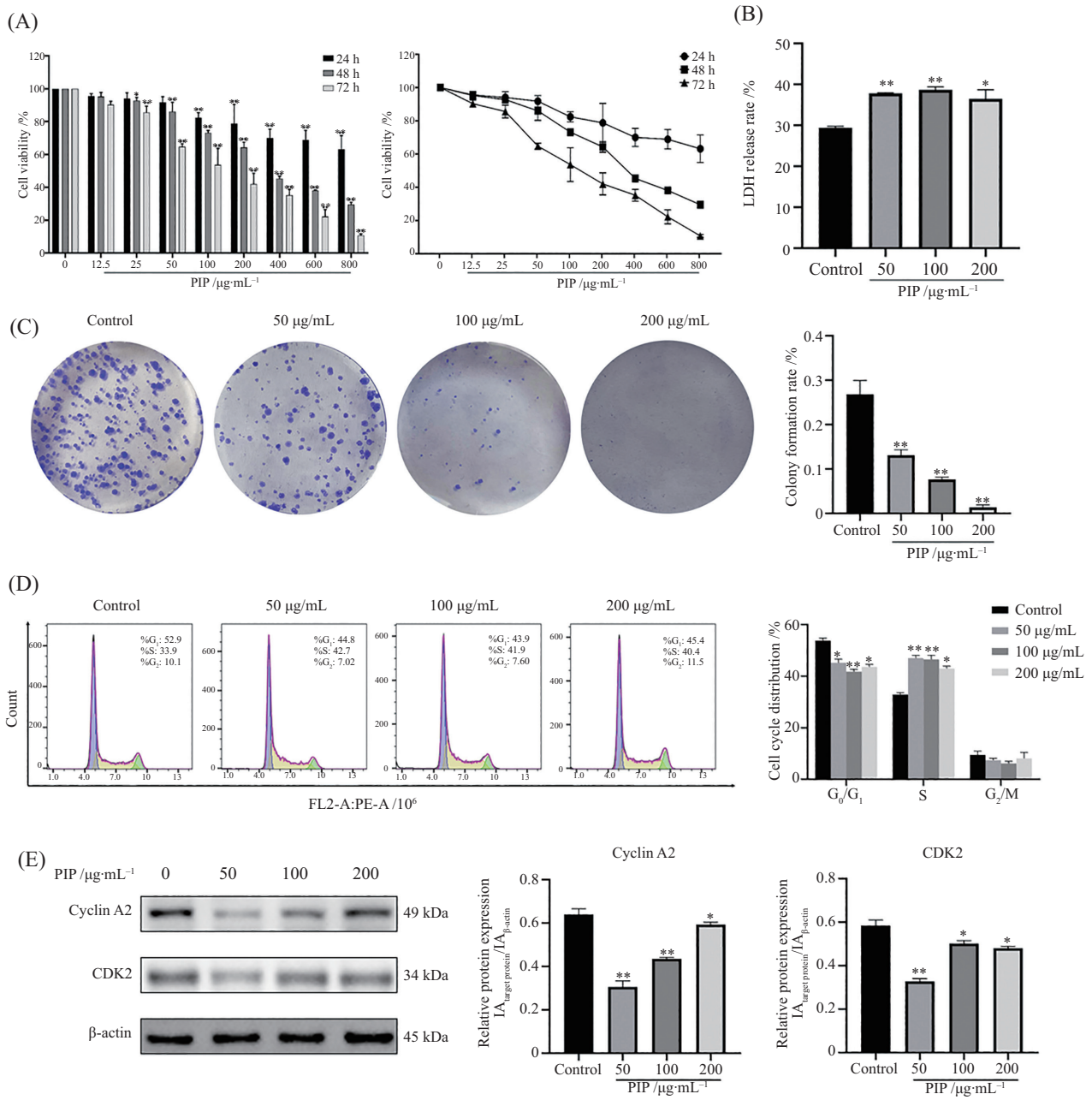
利用DCFH-DA荧光探针对ROS水平进行评估, 发现经100~200 μg/mL PIP处理24 h后, 细胞内绿色荧光强度显著增强(图3B)。线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)检测如图3C所示: PIP处理导致JC-1荧光由红转绿, 提示线粒体膜电位去极化。

2.4 Annexin V-PI流式凋亡率与凋亡相关蛋白表达

Annexin V-PI双染实验结果表明: 50~200 μg/mL PIP处理显著增加HeLa细胞凋亡率[对照组(2.1%±0.3%) *vs* 处理组(18.5%~34.2%), P<0.05/P<0.01], 且呈浓度依赖性(图4A)。PIP处理组中的促凋亡蛋白Bax、细胞色素C及cleaved caspase-3的表达水平均显著上调(P<0.01), 而抗凋亡蛋白Bcl-2、caspase-9和caspase-3的表达水平则显著下调(P<0.01)(图4C)。这些结果表明, PIP可能通过激活线粒体途径诱导HeLa细胞凋亡。为深入探究PIP激活的线粒体途径是否依赖caspase, 我们使用泛caspase抑制Z-VAD-FMK(20 μmol/L)对细胞进行预处理。结果显示, PIP诱导的细胞凋亡被显著抑制(P<0.01), 相关凋亡蛋白的表达亦恢复正常(图4B和图4D), 表明PIP通过激活caspase依赖性通路诱导细胞死亡。

2.5 PIP对HeLa细胞自噬表型的影响

MDC染色显示, HeLa细胞MDC标记的自噬泡平均荧光强度(以对照组为1, 计算相对值)随PIP处理浓度升高上调(P<0.05, 图5A); 与对照组相比, 3-MA单独处理荧光无显著差异, 100 μg/mL PIP荧光信号显著增强(P<0.01, 图5B), PIP+3-MA组荧光程度较



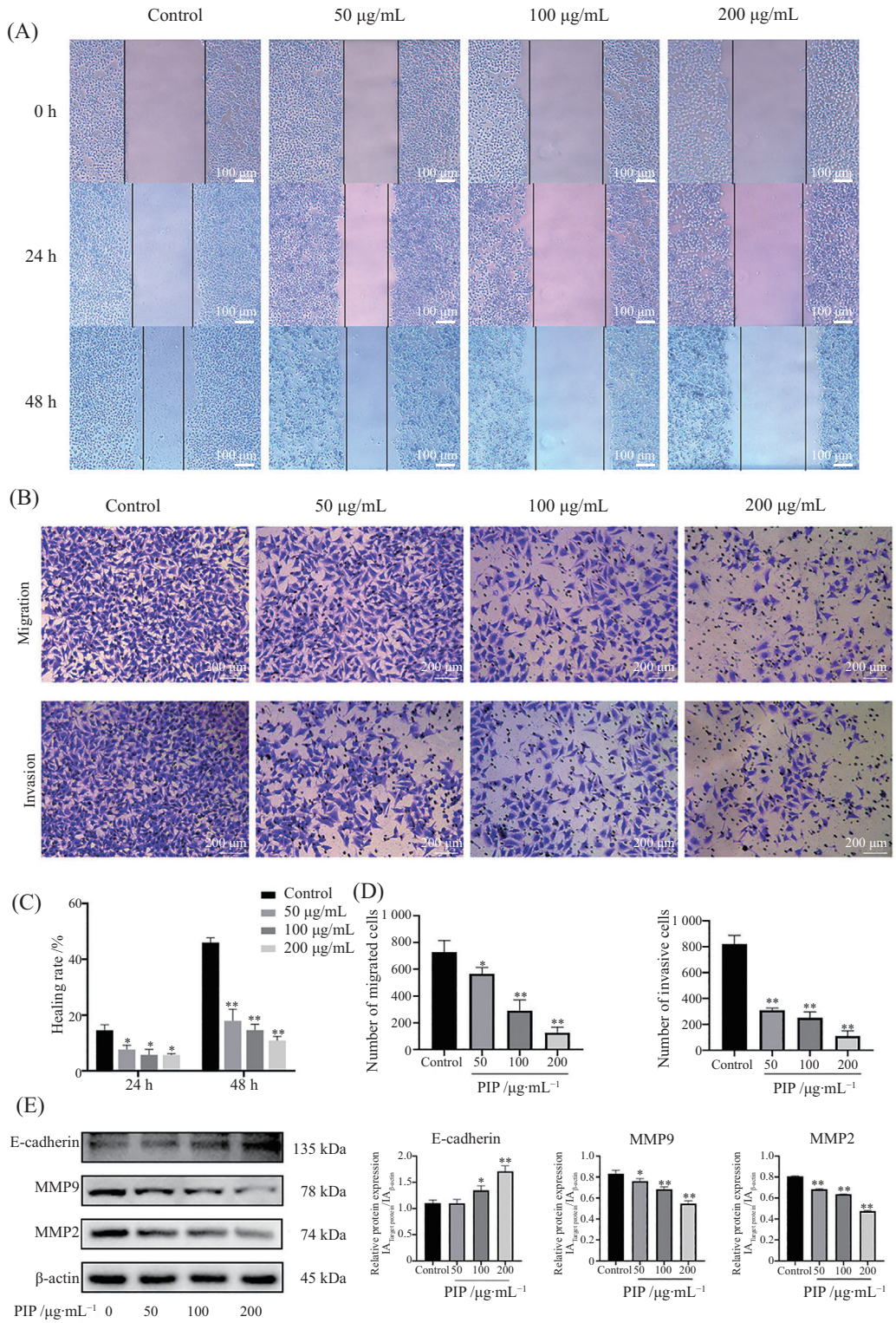
A: MTT法检测不同浓度PIP处理24、48和72 h后HeLa细胞的存活率变化; B: PIP对HeLa细胞乳酸脱氢酶(LDH)释放率的影响; C: PIP对HeLa细胞集落形成能力的抑制作用; D: PIP处理24 h对HeLa细胞周期分布的影响; E: Western blot检测PIP处理后HeLa细胞周期相关蛋白的表达水平。$\bar{x}\pm s$, n=3, *P<0.05, **P<0.01, 与对照组比较。

A: MTT assay showing the viability of HeLa cells following treatment with PIP at various concentrations for 24, 48, and 72 h; B: effect of PIP on the release rate of LDH (lactate dehydrogenase) from HeLa cells; C: inhibitory effect of PIP on the colony-forming ability of HeLa cells; D: effect of PIP on HeLa cell cycle distribution after 24 h; E: Western blot analysis of cell cycle-related protein expression levels in PIP-treated HeLa cells. $\bar{x}\pm s$, n=3, *P<0.05, **P<0.01 compared with control group.

图1　PIP抑制HeLa细胞的增殖能力

Fig.1　PIP inhibits the proliferation of HeLa cells

PIP组明显降低(P<0.01, 图5B)。Western blot结果表明, PIP上调Beclin-1、LC3-II/I的表达, 下调p62的表达(P<0.05, 图5C)。由于自噬通量需抑制剂干预验证, 本研究采用3-MA(5 mmol/L)、CQ(20 μmol/L)开展实验[16-18]。单独给药: 3-MA可导致p62水平升高、Beclin-1与LC3-II/I的表达水平降低, 抑制自噬体生成; CQ可导致LC3-II、p62的表达水平升高, 阻断自噬体–溶酶体融合。PIP在一定程度上可抑制CQ引起的LC3-II与p62的累积(P<0.05, 图5D和图5E), 提示PIP能够促进自噬下游的溶酶体降解过程。这表

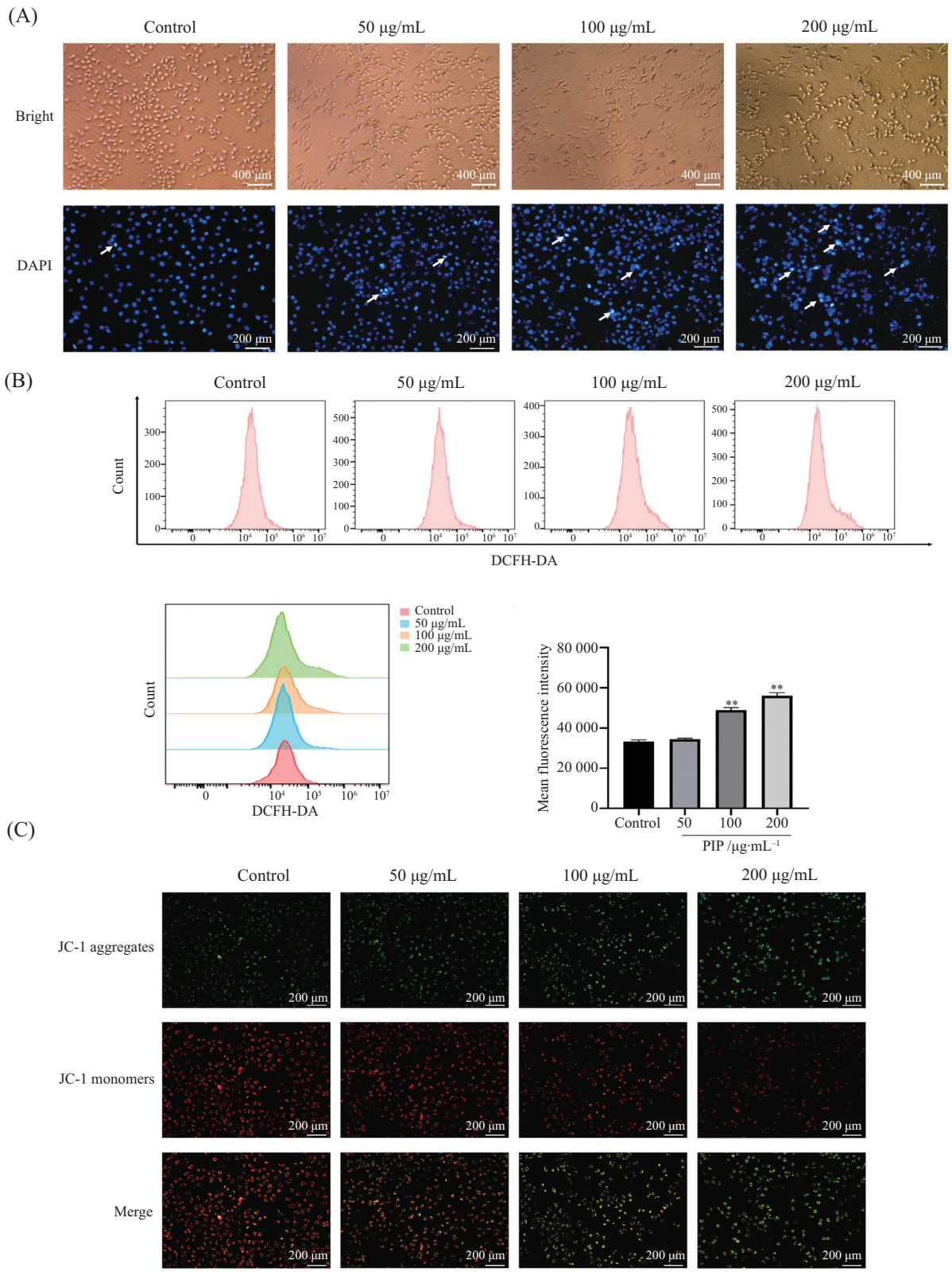


A: 采用显微镜观察PIP处理0、24和48 h后划痕区域的愈合情况; B: PIP对HeLa细胞迁移及侵袭行为的影响结果; C: 划痕实验的统计学分析结果; D: Transwell实验的统计学分析结果; E: 经PIP处理后HeLa细胞迁移与侵袭相关蛋白的免疫印迹检测结果。$\bar{x}\pm s$, n=3, *P<0.05, **P<0.01, 与对照组比较。

A: microscopic observation of scratch-wound healing in PIP-treated cultures at 0, 24, and 48 h; B: quantitative results demonstrating the effect of PIP on HeLa cell migration and invasion; C: statistical analysis results of the scratch assay; D: statistical analysis results of the Transwell assay; E: Western blot analysis of proteins associated with migration and invasion in HeLa cells following PIP treatment. $\bar{x}\pm s$, n=3, *P<0.05, **P<0.01 compared with control group.

图2 PIP抑制HeLa细胞迁移与侵袭能力

Fig.2 PIP inhibits the migratory and invasive capacities of HeLa cells

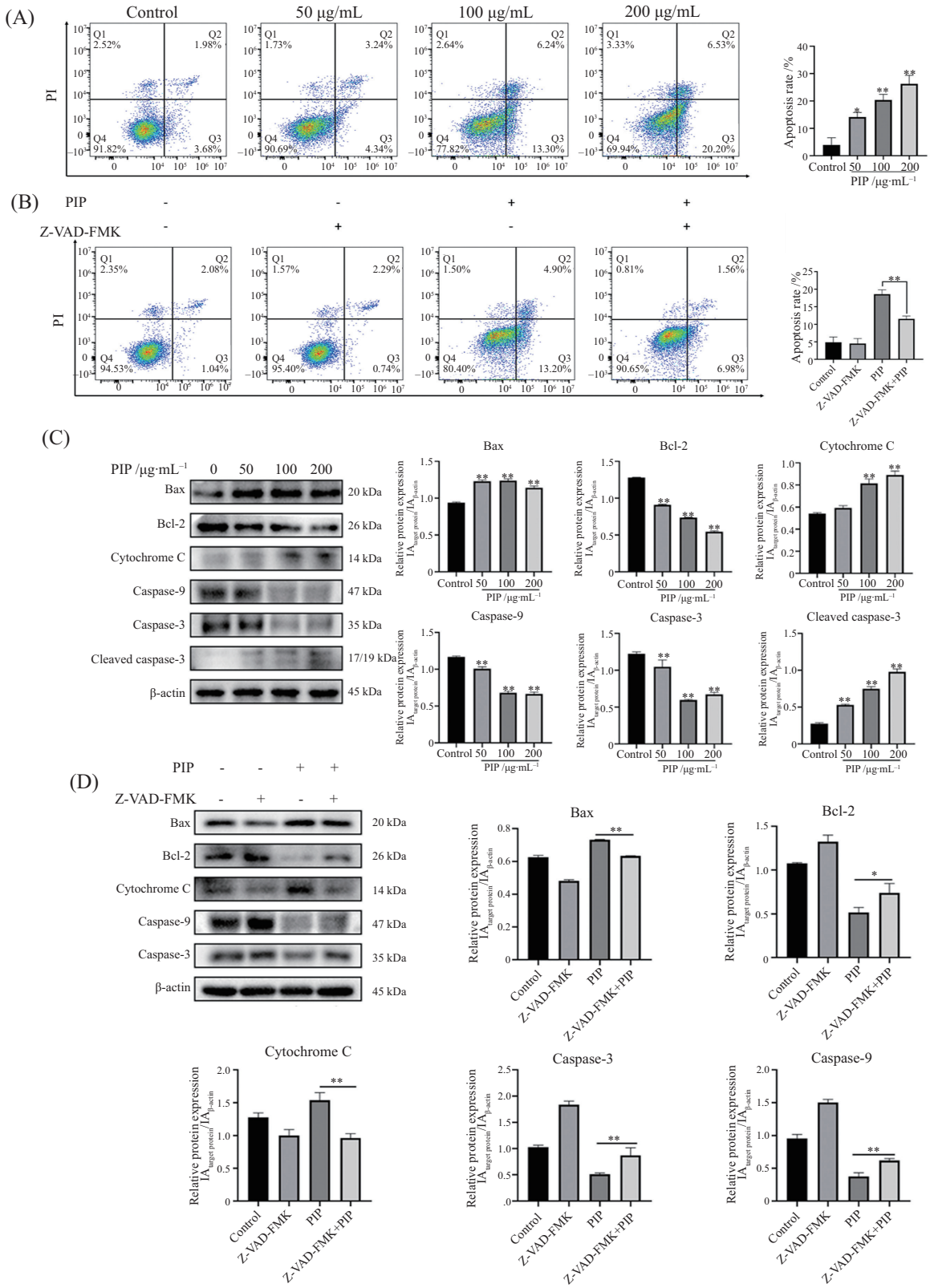


A: 在光镜下及DAPI核染色观察PIP处理后HeLa细胞的形态学改变; B: 通过DCFH-DA荧光的流式细胞术分析评估活性氧生成; C: JC-1染色评估PIP对HeLa细胞线粒体膜电位的影响。$\bar{x}\pm s$, n=3, $^{**}P$<0.01, 与对照组比较。

A: morphological changes in HeLa cells following PIP treatment observed under light microscopy and DAPI nuclear staining; B: analysis of ROS (reactive oxygen species) generation assessed by flow cytometry using DCFH-DA fluorescence; C: effect of PIP on the mitochondrial membrane potential in HeLa cells evaluated by JC-1 staining. $\bar{x}\pm s$, n=3, $^{**}P$<0.01 compared with control group.

图3 PIP诱导HeLa细胞氧化应激与线粒体膜电位变化

Fig.3 PIP induces oxidative stress and changes in mitochondrial membrane potential in HeLa cells

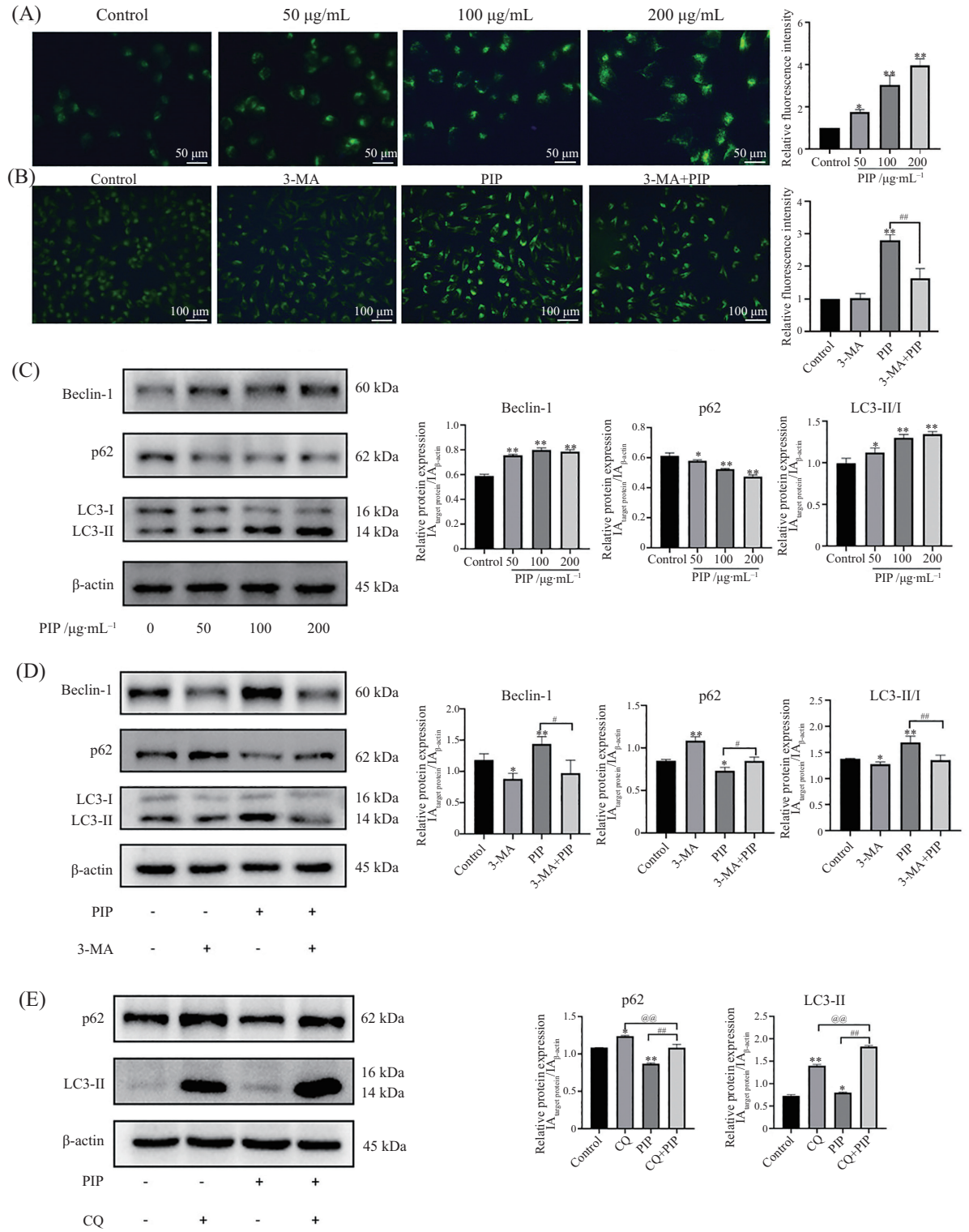


A: PIP对HeLa细胞凋亡率的作用; B: PIP对经Z-VAD-FMK处理的HeLa细胞凋亡率的影响; C: PIP对HeLa细胞中凋亡相关蛋白表达的作用; D: Z-VAD-FMK对PIP诱导的HeLa细胞凋亡相关蛋白表达的作用。$\bar{x}\pm s$, n=3, *P<0.05, **P<0.01, 与对照组比较。

A: effect of PIP on HeLa cell apoptosis rate; B: effect of PIP on apoptosis rate in HeLa cells treated with Z-VAD-FMK; C: effect of PIP on the expression of apoptosis-related proteins in HeLa cells; D: effect of Z-VAD-FMK on the expression of PIP-induced apoptosis-related proteins in HeLa cells. $\bar{x}\pm s$, n=3, *P<0.05, **P<0.01 compared with control group.

图4 PIP对宫颈癌HeLa细胞凋亡率及凋亡相关蛋白的影响

Fig.4 Effect of PIP on apoptosis rate and apoptosis-related proteins in cervical cancer HeLa cells

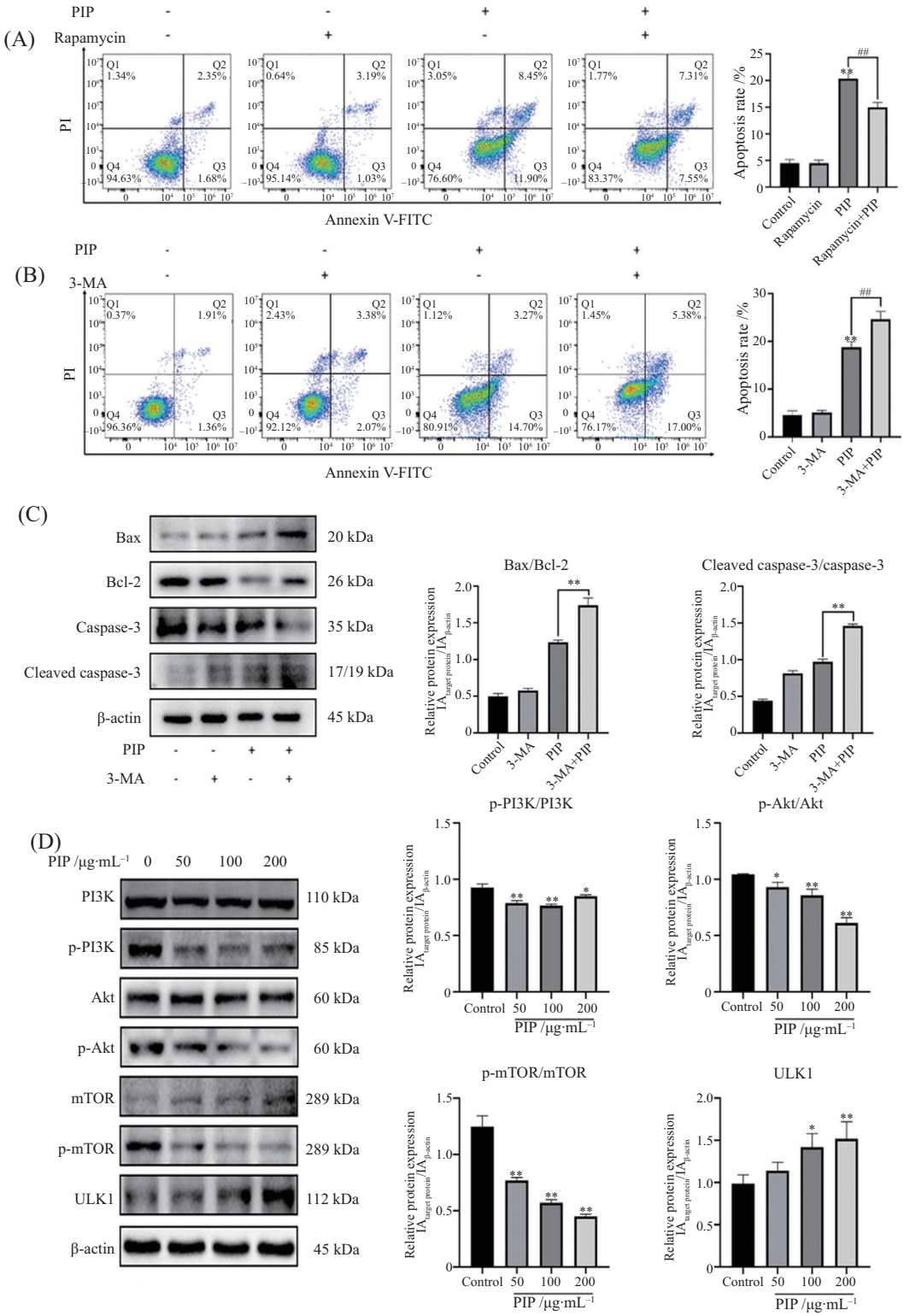


A: PIP对HeLa细胞自噬荧光强度的影响; B: 3-MA对HeLa细胞自噬荧光强度的影响; C: PIP对HeLa细胞自噬相关蛋白表达的Western blot结果的影响; D: 3-MA联合PIP对HeLa细胞自噬相关蛋白表达的Western blot结果的影响; E: CQ联合PIP对HeLa细胞自噬相关蛋白表达的Western blot结果的影响。$\bar{x}\pm s$, n=3, *P<0.05, **P<0.01, 与对照组比较; $^{\#}P$<0.05, $^{\#\#}P$<0.01; $^{@@}P$<0.01。

A: effect of PIP on autophagic fluorescence intensity in HeLa cells; B: effect of 3-MA on autophagic fluorescence intensity in HeLa cells; C: Western blot analysis showing PIP's effect on the expression of autophagy-related proteins in HeLa cells; D: Western blot analysis showing the effect of 3-MA combined with PIP on the expression of autophagy-related proteins in HeLa cells; E: Western blot analysis showing the effect of CQ combined with PIP on the expression of autophagy-related proteins in HeLa cells. $\bar{x}\pm s$, n=3, *P<0.05, **P<0.01 compared with control group; $^{\#}P$<0.05, $^{\#\#}P$<0.01; $^{@@}P$<0.01.

图5 PIP诱导HeLa细胞自噬表型变化

Fig.5 Phenotypic changes of autophagy induced by PIP in HeLa cells



A: 雷帕霉素对PIP诱导HeLa细胞凋亡率的影响; B: 3-MA对PIP诱导HeLa细胞凋亡率的影响; C: 3-MA处理下PIP诱导HeLa细胞凋亡相关蛋白表达的Western blot检测; D: PIP对HeLa细胞PI3K/Akt/mTOR通路蛋白表达影响的Western blot检测。$\bar{x}\pm s$, n=3, *P<0.05, **P<0.01, 与对照组比较; $^{\#\#}P$<0.01。

A: impact of rapamycin pretreatment on the apoptotic rate induced by PIP in HeLa cells; B: impact of 3-MA pretreatment on the apoptotic rate induced by PIP in HeLa cells; C: Western blot analysis of apoptosis-associated proteins in HeLa cells treated with PIP in the presence of 3-MA; D: Western blot analysis of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway proteins in HeLa cells treated with PIP alone. $\bar{x}\pm s$, n=3, *P<0.05, **P<0.01 compared with control group; $^{\#\#}P$<0.01.

图6 PIP诱导的自噬对HeLa细胞凋亡的影响及相关蛋白表达变化

Fig.6 Effects of PIP-induced autophagy on apoptosis and changes of related protein expression in HeLa cells

明, PIP可诱导HeLa细胞发生自噬。

2.6 PIP诱导的自噬对HeLa细胞凋亡的影响及相关蛋白观察

流式凋亡结果显示, 雷帕霉素联合PIP处理HeLa细胞, 可显著逆转PIP诱导的细胞凋亡(P<0.01, 图6A); 单独3-MA或雷帕霉素处理不影响基础凋亡率, PIP可显著升高凋亡水平, 而PIP+3-MA组凋亡率较PIP单药进一步上升(P<0.01, 图6B)。Western blot结果证实, 3-MA联合PIP给药可上调Bax、cleaved caspase-3表达(P<0.01, 图6C)。3-MA作为自噬早期抑制剂可阻断PIP诱导的保护性自噬, 进而发挥协同促凋亡作用, 提示PIP诱导的自噬对HeLa细胞可能具有保护作用, 抑制自噬会协同促进凋亡效应。

为初步探寻该自噬潜在的分子关联, 进一步检测PI3K/Akt/mTOR通路相关蛋白表达。结果显示, 梯度PIP剂量依赖性下调p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR值, 上调下游ULK1蛋白表达(P<0.05、P<0.01, 图6D); 且细胞ROS水平与通路磷酸化程度呈负相关, 与ULK1、自噬水平呈正相关, 提示PIP诱导的自噬可能与其抑制PI3K/Akt/mTOR通路活化有关。

3 讨论

抑制肿瘤细胞异常增殖是天然抗肿瘤药物的核心评价指标。MTT、克隆形成及LDH释放实验结果表明, PIP可呈浓度及时间依赖性降低HeLa细胞活力、抑制细胞克隆增殖、诱导肿瘤细胞损伤, 证实其具备显著的体外抗宫颈癌活性。细胞周期紊乱是肿瘤无限增殖的核心机制, CDK2与Cyclin A2是调控S期DNA复制的关键功能蛋白[17-19]。流式细胞术与蛋白检测结果表明, PIP可显著下调CDK2、Cyclin A2表达, 减少G_0/G_1、G_2/M期细胞比例, 并将HeLa细胞阻滞于S期, 抑制宫颈癌细胞异常增殖。

EMT异常激活与基质金属蛋白酶过度表达是介导宫颈癌侵袭转移的核心机制。E-cadherin下调及MMP2、MMP9异常升高可破坏细胞黏附稳态、降解细胞外基质, 促进肿瘤浸润与转移[20-21]。划痕及Transwell实验证实, PIP可显著抑制HeLa细胞的迁移与侵袭; Western blot结果进一步证实, PIP可剂量依赖性上调E-cadherin表达并下调MMP2及MMP9水平, 通过逆转EMT进程显著阻断宫颈癌的侵袭转移。

线粒体caspase依赖性凋亡是PIP清除宫颈癌细胞的关键机制[22-23]。本研究发现PIP可通过显著升高HeLa细胞ROS水平、降低线粒体膜电位, 诱发线粒体氧化应激损伤, 进而下调Bcl-2表达、上调Bax表达, 促进细胞色素C释放, 激活cleaved caspase-3凋亡通路, 显著提升细胞凋亡率。泛caspase抑制剂Z-VAD-FMK可有效逆转PIP介导的凋亡表型及相关蛋白变化, 明确PIP通过经典caspase依赖性线粒体通路诱导HeLa细胞凋亡。

本研究通过MDC染色及蛋白标志物检测发现, PIP可上调Beclin-1、LC3-II/I表达, 下调自噬底物p62表达; 3-MA、CQ双抑制剂干预结果提示, PIP可同时促进自噬小体形成与自噬溶酶体降解。进一步的药物实验表明, 自噬激活剂雷帕霉素可削弱PIP的促凋亡作用, 自噬抑制剂3-MA可协同增强PIP的凋亡诱导效应, 提示PIP诱导的自噬可能具有保护作用。

PI3K/Akt/mTOR通路在宫颈癌中异常活化, 参与调节细胞的生长、增殖、凋亡、自噬等[24-25]。本研究表明, PIP可抑制PI3K、Akt、mTOR蛋白的磷酸化, 上调下游ULK1蛋白表达, 提示该通路活化水平的改变可能与PIP诱导的潜在保护性自噬以及促凋亡效应存在关联。

综上所述, PIP能够显著抑制宫颈癌HeLa细胞增殖、迁移与侵袭, 介导细胞S期阻滞, 并经ROS介导诱导线粒体功能障碍, 触发caspase依赖性线粒体凋亡; 同时可能诱导保护性自噬拮抗凋亡, 联用自噬抑制剂可发挥协同作用。蛋白检测结果显示PIP可下调PI3K/Akt/mTOR通路磷酸化水平, 提示上述效应可能与该通路活化受抑制存在关联。

参考文献 (References)

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2021, 71(3): 209-249.

[2] Johnson C A, James D, Marzan A, et al. Cervical cancer: an overview of pathophysiology and management [J]. Seminars in Oncology Nursing, 2019, 35(2): 166-174.

[3] Tewari K S. Cervical cancer [J]. The New England Journal of Medicine, 2025, 392(1): 56-71.

[4] Chen C, Liu X, Qi S S, et al. Hepatoprotective effect of Phellinus linteus mycelia polysaccharide (PL-N1) against acetaminophen-induced liver injury in mouse [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 154: 1276-1284.

[5] Liu T T, Zhao M, Zhang Y M, et al. Polysaccharides from Phellinus linteus attenuate type 2 diabetes mellitus in rats via modulation of gut microbiota and bile acid metabolism [J]. International

Journal of Biological Macromolecules, 2024, 262(Pt 1): 130062.

[6] Yan J K, Pei J J, Ma H L, et al. Advances in antitumor polysaccharides from phellinus sensu lato: production, isolation, structure, antitumor activity, and mechanisms [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2017, 57(6): 1256-1269.

[7] 栾英杰, 侯万升. 神农本草经合注[M]. 北京: 人民军医出版社, 2010.

[8] Lee W Y, Hsu K F, Chiang T A, et al. *Phellinus linteus* extract induces autophagy and synergizes with 5-fluorouracil to inhibit breast cancer cell growth [J]. Nutrition and Cancer, 2015, 67(2): 275-284.

[9] Zhao L Z H. Inhibitory effects of Phellinus igniarius crude polysaccharides on the proliferation and metastasis-related abilities of tumor cells [J]. Journal of East China Normal University, 2008(2): 78-84.

[10] Tang S J, Shao C X, Yang Y, et al. The antitumor effect of mycelia extract of themedicinal macrofungus *Inonotus hispidus* on HeLa cells via the mitochondrial-mediated pathway [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2023, 311: 116407.

[11] Liu M M, Zeng P, Li X T, et al. Antitumor and immunomodulation activities of polysaccharide from *Phellinus baumii* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 91: 1199-1205.

[12] Dong X N, Yang Y T, Zou Z J, et al. Sorting nexin 5 mediates virus-induced autophagy and immunity [J]. Nature, 2021, 589(7842): 456-461.

[13] Bian S, Zhao Y, Li F Y, et al. 20(*S*)-ginsenoside rg3 promotes hela cell apoptosis by regulating autophagy [J]. Molecules, 2019, 24(20): 3655.

[14] Heng Y Q, Liang Y P, Zhang J Q, et al. Camptothecin inhibits neddylation to activate the protective autophagy through NF-κB/AMPK/mTOR/ULK1 axis in humanesophageal cancer cells [J]. Frontiers in Oncology, 2021, 11: 671180.

[15] Staub A M. Removal of proteins. Sevag method [M]//Methods in Carbohydrate Chemistry, New York: Academic Press, 1965: 5-6.

[16] He P Y, Hou Y H, Yang Y, et al. The anticancer effect of extract of medicinal mushroom *Sanghuangprous vaninii* against human cervical cancer cell via endoplasmic reticulum stress-mitochondrial apoptotic pathway [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2021, 279: 114345.

[17] Blanchard J M. Cyclin A2 transcriptional regulation: modulation of cell cycle control at the G_1/S transition by peripheral cues [J]. Biochemical Pharmacology, 2000, 60(8): 1179-1184.

[18] Otto T. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy [J]. Nature Reviews Cancer, 2017, 17(2): 93-115.

[19] Tadesse S, Anshabo A T, Portman N, et al. Targeting CDK2 in cancer: challenges and opportunities for therapy [J]. Drug Discovery Today, 2020, 25(2): 406-413.

[20] Pastushenko I, Blanpain C. EMT transition states during tumor progression and metastasis [J]. Trends in Cell Biology, 2019, 29(3): 212-226.

[21] Song J. Targeting epithelial-mesenchymal transition pathway in hepatocellular carcinoma [J]. Clinical and Molecular Hepatology, 2020, 26(4): 484-486.

[22] Poornima P, Quency R S, Padma V V. Neferine induces reactive oxygen species mediated intrinsic pathway of apoptosis in HepG2 cells [J]. Food Chemistry, 2013, 136(2): 659-667.

[23] Wang S T, Xing Y, Wang R P, et al. Jianpi Huayu Decoction suppresses cellular senescence in colorectal cancer via p53-p21-Rb pathway: network pharmacology and *in vivo* validation [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2024, 319(Pt 3): 117347.

[24] Peng Y, Wang Y Y, Zhou C, et al. PI3K/Akt/mTOR pathway and its role in cancer therapeutics: are we making headway? [J]. Frontiers in Oncology, 2022, DOI: 10.3389/fonc.2022.819128.

[25] Li X, Zhao J, Yan T C, et al. Cyanidin-3-*O*-glucoside and cisplatin inhibit proliferation and downregulate the PI3K/AKT/mTOR pathway in cervical cancer cells [J]. Journal of Food Science, 2021, 86(6): 2700-2712.