

黄芪甲苷调控 JAK2/STAT3 信号通路增强宫颈癌 HeLa 细胞对紫杉醇的化疗敏感性*

何瑞荣 胡润凯 韩伟超 邵颖颖 李灿涛 丁少波

南方医科大学附属东莞市人民医院 广东 东莞 523059

摘要:目的:研究黄芪甲苷对宫颈癌 HeLa 细胞紫杉醇化疗敏感性的增强作用及其机制。方法:实验选用宫颈癌 HeLa 细胞,采用不同浓度紫杉醇和黄芪甲苷处理后,MTT 实验检测细胞存活率;流式细胞仪检测细胞周期变化及细胞凋亡情况;Hoechst 33342 染色观察细胞核形态变化;细胞划痕实验检测细胞迁移率;Western Blot 检测 Janus 激酶 2 (janus kinase 2, JAK2) /信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 信号通路相关蛋白表达水平。结果:与对照组比较,当黄芪甲苷浓度 $\geq 40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 及紫杉醇的浓度 $\geq 40 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,HeLa 细胞存活率明显降低($P < 0.05$)。与对照组比较,紫杉醇组细胞存活率、细胞周期、细胞凋亡、细胞迁移率及相关蛋白表达水平无明显变化($P > 0.05$);与紫杉醇组比较,紫杉醇+黄芪甲苷中、高剂量组细胞存活率、S 期及 G2/M 期细胞占比、细胞迁移率和 p-STAT3、p-JAK2、B 细胞淋巴瘤基因-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$);G0/G1 期细胞占比、早期凋亡细胞比例及 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax)、细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1)、细胞周期蛋白依赖性激酶 4 (cyclin dependent kinase 4, CDK4) 蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$)。激光共聚焦显微镜观察发现:对照组细胞核形态均一,而紫杉醇+黄芪甲苷中、高剂量组细胞出现明显凋亡特征,如细胞变形、核皱缩、染色质凝缩等。结论:黄芪甲苷可以增强宫颈癌 HeLa 细胞对紫杉醇的化疗敏感性,其机制可能与调控 JAK2/STAT3 信号通路相关。
关键词:宫颈癌;紫杉醇;黄芪甲苷;JAK2/STAT3 信号通路;化疗敏感性

DOI: 10.16368/j.issn.1674-8999.2022.12.472

中图分类号:R285.5 文献标志码:A 文章编号:1674-8999(2022)12-2649-08

Astragaloside IV Enhancing Chemosensitivity of Cervical Cancer HeLa Cells to Paclitaxel by Regulating JAK2/STAT3 Signaling Pathway

HE Ruirong, HU Runkai, HAN Weichao, SHAO Yingying, LI Cantao, DING Shaobo

Dongguan People's Hospital Affiliated to Southern Medical University, Dongguan Guangdong China 523059

Abstract: Objective: To study the enhancement effect and mechanism of astragaloside IV on the chemosensitivity of cervical cancer HeLa cells to paclitaxel. Methods: Cervical cancer HeLa cells were selected in the experiment and treated with different concentrations of paclitaxel and astragaloside IV, and the cell viability was detected by MTT assay. Flow cytometry was used to detect cell cycle changes and apoptosis. Hoechst 33342 staining was used to observe the changes in nuclear morphology. Cell scratch experiments were used to detect cell migration rate. Western Blot was used to detect the expression levels of proteins related to the Janus kinase 2 (JAK2) /signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling pathway. Results: Compared with the control group, when the concentration of astragaloside IV $\geq 40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and the concentration of paclitaxel $\geq 40 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, the survival rate of HeLa cells was significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the control group, the cell survival rate, cell cycle, cell apoptosis, cell migration rate and the expression levels of related proteins in the paclitaxel group had no significant changes.

* 基金项目:广东省中医药局“十三五”中医重点特色专科建设项目(粤中医函(2019)472号);东莞市社会发展科技重点项目(20211800905242)

($P > 0.05$)。Compared with the paclitaxel group ,the paclitaxel + astragaloside IV medium and high dose groups showed cell survival rate S phase and G2/M phase cell proportions ,cell migration rate and p-STAT3 ,p-JAK2 ,B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) protein expression level was significantly decreased ($P < 0.01$)。The proportion of cells in G0/G1 phase ,the proportion of early apoptotic cells ,Bcl-2 associated X protein (Bax) ,Cyclin D1 ,cyclin dependent kinase 4 (CDK4) protein expression level was significantly increased ($P < 0.05$)。Laser confocal microscope observation showed that the nucleus of the control group was uniformly stained ,while the cells in the paclitaxel + astragaloside IV medium and high dose groups had obvious apoptosis characteristics ,such as cell deformation ,nuclear shrinkage and chromatin condensation. Conclusion: Astragaloside IV can enhance the chemosensitivity of cervical cancer HeLa cells to paclitaxel and the mechanism may be related to the regulation of the JAK2/STAT3 signaling pathway.

Key words: cervical cancer; paclitaxel; astragaloside IV; JAK2/STAT3 signaling pathway; chemosensitivity

尽管通过疫苗、早期筛查等使宫颈癌的治疗取得了一定的进展,但其仍是全球女性的严重负担^[1]。超过50%的宫颈癌Ⅲ期、Ⅳ期患者对治疗产生耐受力,从而使疾病复发或转移^[2]。紫杉醇是一种通过抑制微管形成直接杀死肿瘤的抗癌药物,其静脉注射剂广泛用于临床治疗卵巢癌和宫颈癌^[3-4]。然而,紫杉醇的原发性和获得性耐药及严重的不良反应(如骨髓抑制和肝肾功能损害)明显降低了紫杉醇的实际疗效^[5]。因此,增加宫颈癌细胞对紫杉醇的敏感性并降低不良反应对提高紫杉醇的治疗效果至关重要。

黄芪为豆科植物蒙古黄芪或膜荚黄芪的干燥根,具有补气升阳、固表止汗、利水消肿、生津养血、行滞通痹、托毒排脓、敛疮生肌的功效,用于治疗多种疾病。黄芪甲苷(astragaloside IV)是从天然黄芪中提取得到的小分子皂苷,具有多种生物活性,如抗炎、抗氧化、保护肝脏、抗肿瘤等^[6-7]。研究表明,黄芪甲苷能提高癌细胞对一线化疗药物的敏感性^[8-9],但具体的机制仍不明确,且黄芪甲苷能否增强宫颈癌 HeLa 细胞对紫杉醇的敏感性及其具体分子机制尚未报道。本研究旨在探讨黄芪甲苷与紫杉醇联合治疗宫颈癌可能产生的协同或拮抗作用及其机制,为传统中药应用于增强或逆转临床化疗药物敏感性提供理论基础。

1 材料

1.1 细胞系 宫颈癌 HeLa 细胞从中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库获得,目录号: TCHu187。

1.2 药物与试剂 黄芪甲苷粉末(成都瑞芬思生物科技有限公司,纯度 $\geq 98\%$,批号:170768);紫杉醇对照品(中国食品药品检定研究院,纯度 $\geq 99.8\%$,批号:100382-201904)。Hoechst 33342、噻唑蓝(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)(上海碧云天生物技术有限公司,货号:

C1011、ST316);胰蛋白酶、DMEM(高糖型)培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(美国 Gibco 公司,货号:250200-056、C11995500BT、Z7186FBS-5);4%多聚甲醛(百灵威试剂公司,货号:20220512);碘化丙啶(propidium iodide, PI)、磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)(北京索莱宝科技有限公司,货号:C0080、P1020-500);二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO,德国 Sigma-Aldrich 公司,货号:D2650);Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司,批号:20190314);信号转导和转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)抗体、p-STAT3 抗体、Janus 激酶2(janus kinase 2, JAK2)抗体、p-JAK2 抗体、细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)抗体、细胞周期蛋白依赖性激酶4(cyclin dependent kinase 4, CDK4)抗体、B 细胞淋巴瘤基因-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)抗体、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)抗体(英国 Abcam 公司,货号:ab68153、ab76315、ab76315、ab32101、ab16663、ab108357、ab32503、ab32124)。

1.3 仪器 CO₂ 细胞培养箱(美国 FORMA 公司,型号:3111);高速冷冻离心机(德国艾本德公司,型号:Centrifuge 5424,离心半径:8.5 cm);光学显微镜(日本 Olympus 公司,型号:BH-2);电子天平(美国梅特勒-托利多仪器公司,型号:AL204);荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司,型号:ABI);多功能酶标仪(美谷分子仪器有限公司,型号:Spec-traMax ID);激光共聚焦显微镜(德国 Wetzlar Leica 公司,型号:TCS SP8);流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司,型号:Canto™ II);Western Blot 相关仪器及其配件(美国 BIO-RAD 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 当细胞培养瓶中细胞生长到约

80%时,弃掉旧培养基,PBS清洗1次,加入1 mL 0.25%的胰蛋白酶,放入培养箱中消化2 min,快速转移至超净台,加入1 mL含10%胎牛血清的DMEM培养基终止消化后,轻轻吹打残余的贴壁细胞。将细胞悬液转移到10 mL离心管中,1 000 r·min⁻¹离心2 min,弃上清后加含10% FBS的DMEM培养基,混匀后将1/4的细胞悬液移入培养瓶中,置于恒温、5% CO₂培养箱中进行传代培养。

2.2 MTT 实验 当细胞生长至对数期时,用0.25%胰蛋白酶消化成单细胞悬液,调整细胞密度后,接种到96孔板中,每孔160 μL(约4.5×10³个细胞),分别设置为对照组,不同浓度(5 mg·L⁻¹、10 mg·L⁻¹、20 mg·L⁻¹、40 mg·L⁻¹、80 mg·L⁻¹、100 mg·L⁻¹、200 mg·L⁻¹)黄芪甲苷组及不同浓度(5 μmol·L⁻¹、10 μmol·L⁻¹、20 μmol·L⁻¹、40 μmol·L⁻¹、80 μmol·L⁻¹、100 μmol·L⁻¹、200 μmol·L⁻¹)紫杉醇组,每组设置9个复孔。培养24 h后,每孔加入40 μL相应药物,正常组加40 μL完全培养液,继续培养44 h后,每孔加入20 μL MTT,孵育4 h,弃去上清液,加入150 μL DM-SO溶解结晶物,振荡30 s,采用多功能酶标仪测定570 nm处吸光度值(optical density, OD)值。

2.3 细胞周期分析 当HeLa细胞生长至对数期时,用0.25%胰蛋白酶消化,每孔接种2 mL细胞混悬液(约含2.5×10⁵个细胞)到6孔板中,设置对照组、紫杉醇组(20 μmol·L⁻¹)及紫杉醇(20 μmol·L⁻¹) + 黄芪甲苷低(20 mg·L⁻¹)、中(40 mg·L⁻¹)、高(80 mg·L⁻¹)剂量组,每组设置3个复孔。当细胞培养24 h后,加入相应药物孵育24 h。收集全部细胞于离心管,PBS清洗2次后加入100 μL PBS重悬细胞,然后加入2 mL 4℃预冷70%乙醇。将细胞置于-20℃冰箱中,过夜固定,2 000 r·min⁻¹离心5 min,PBS清洗2次,除去残余乙醇,然后用500 μL含有100 mg·L⁻¹ DNase-free RNase的PI(50 mg·L⁻¹)染液重悬细胞,收集于流式管中,用流式细胞仪进行检测,每个样品取1.0×10⁴个细胞进行细胞周期分析。数据用ModFit LT 3.2软件分析。

2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡 当HeLa细胞生长至对数期时,用0.25%胰蛋白酶消化,每孔接种2 mL细胞混悬液(约含2.5×10⁵个细胞)到6孔板中,分组同2.3项所述,每组设置3个复孔。当细胞培养24 h后,加入相应药物孵育24 h。弃去培养基,PBS清洗,胰酶消化后,收集细胞。PBS洗涤2次,先后加入500 μL Binging Buffer、5 μL Annexin

V-FITC、5 μL PI,室温染色10 min,PBS清洗2次后采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况,数据用FlowJo 7.8软件处理分析。

2.5 Hoechst 33342 染色观察细胞形态变化 当HeLa细胞生长至对数期时,用0.25%胰蛋白酶消化,每孔接种2 mL细胞混悬液(约含1.0×10⁵个细胞)于共聚焦培养皿中,分组同2.3项所述,每组设置3个复孔。孵育24 h后,加入不同浓度的紫杉醇及黄芪甲苷+紫杉醇混合液继续孵育24 h。弃去培养基,PBS洗涤2次,4%多聚甲醛室温固定10 min后,PBS洗涤2次,Hoechst 33342(5 mg·L⁻¹)常温染色10 min后,PBS清洗2次,置于共聚焦显微镜下观察细胞核形态。

2.6 细胞划痕实验检测细胞迁移 当HeLa细胞生长至对数期时,用0.25%胰蛋白酶消化,每孔接种2 mL细胞混悬液(约含2.5×10⁵个细胞)到6孔板中,细胞分组同2.3项所述,每组设置3个复孔。细胞汇合度为95%左右,用10 μL移液枪的枪头垂直地在板底部画出裂痕,PBS洗涤3次,加入不含血清的DMEM培养基,在活细胞成像仪下拍照,并记录0 h的划痕宽度S₁。加入不同浓度的紫杉醇及黄芪甲苷+紫杉醇混合液后放入37℃、5% CO₂培养箱中孵育24 h,再次放置在活细胞成像仪下拍照并记录24 h时划痕宽度S₂,计算细胞迁移率。

$$\text{细胞迁移率} = (S_1 - S_2) / S_1 \times 100\%$$

2.7 蛋白免疫印迹法(Western Blot)检测 JAK2/STAT3 信号通路相关蛋白表达水平 当HeLa细胞生长至对数期时,用0.25%胰蛋白酶消化,每孔接种2 mL细胞混悬液(约含2.5×10⁵个细胞)到6孔板中,细胞分组同2.3项所述,每组设置3个复孔。培养24 h后,各组分别加对应药物孵育24 h,使用RAPI细胞裂解液(含1 mmol·L⁻¹ PMSF)提取细胞总蛋白,用BCA法测定蛋白含量。配制一定浓度的SDS-PAGE凝胶,根据所检测目标蛋白的分子量上样。电压调至80 V电泳30 min后,调整电压至120 V,继续电泳70 min。恒定电流200 mA转膜90 min。用过滤好的5%脱脂奶粉封闭1.5 h。加入一抗(β-actin、STAT3、p-STAT3、JAK2、p-JAK2、Bcl-2、Bax、Cyclin D1、CDK4,稀释比例为1:4 000)震荡混匀,4℃过夜,TBST洗膜3次,每次10 min。加入相应二抗(稀释比例为1:2 000),室温震荡1 h,加入ECL发光液后放置在化学发光系统中曝光,采用Image J软件分析条带灰度值。

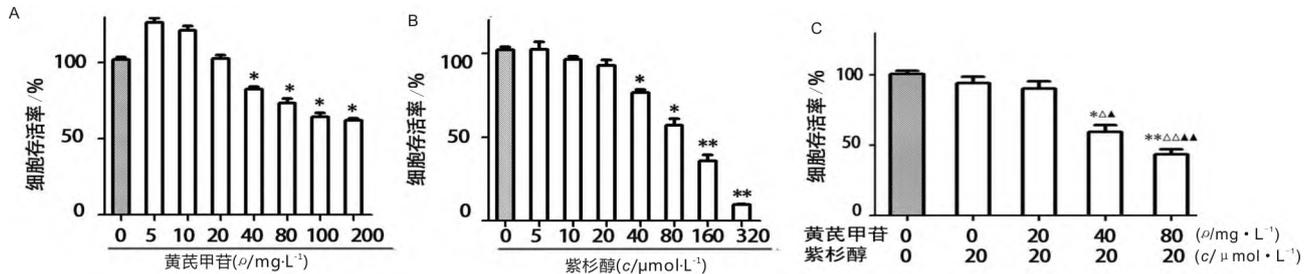
2.8 统计学方法 采用SPSS 22.0软件分析进行统计学处理,实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,

多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 黄芪甲苷增强 HeLa 细胞对紫杉醇的化疗敏感性 与对照组相比,当黄芪甲苷浓度 $\geq 40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 及

紫杉醇浓度 $\geq 40 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,HeLa 细胞存活率明显降低 ($P < 0.05$)。与对照组、紫杉醇组和紫杉醇+黄芪甲苷低 ($20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 剂量组比较,紫杉醇+黄芪甲苷中 ($40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、高 ($80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 剂量组细胞存活率均明显降低 ($P < 0.05$)。见图1。



注: A: 黄芪甲苷对细胞存活率的影响; B: 紫杉醇对细胞存活率的影响; C: 黄芪甲苷+紫杉醇对细胞存活率的影响。与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与紫杉醇组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与紫杉醇+黄芪甲苷低剂量组比较, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$

图1 不同处理组细胞存活率比较

3.2 黄芪甲苷增强紫杉醇诱导 HeLa 细胞周期阻滞 与对照组比较,紫杉醇组细胞周期无明显变化 ($P > 0.05$); 与紫杉醇组比较,紫杉醇+黄芪甲苷中、高剂量组 S 期及 G2/M 期细胞占比显著降低

($P < 0.05$), G0/G1 期细胞占比显著升高 ($P < 0.05$) 表明黄芪甲苷可促进紫杉醇诱导 HeLa 细胞周期阻滞,并将细胞阻滞在 G0/G1 期。见图2,表1。

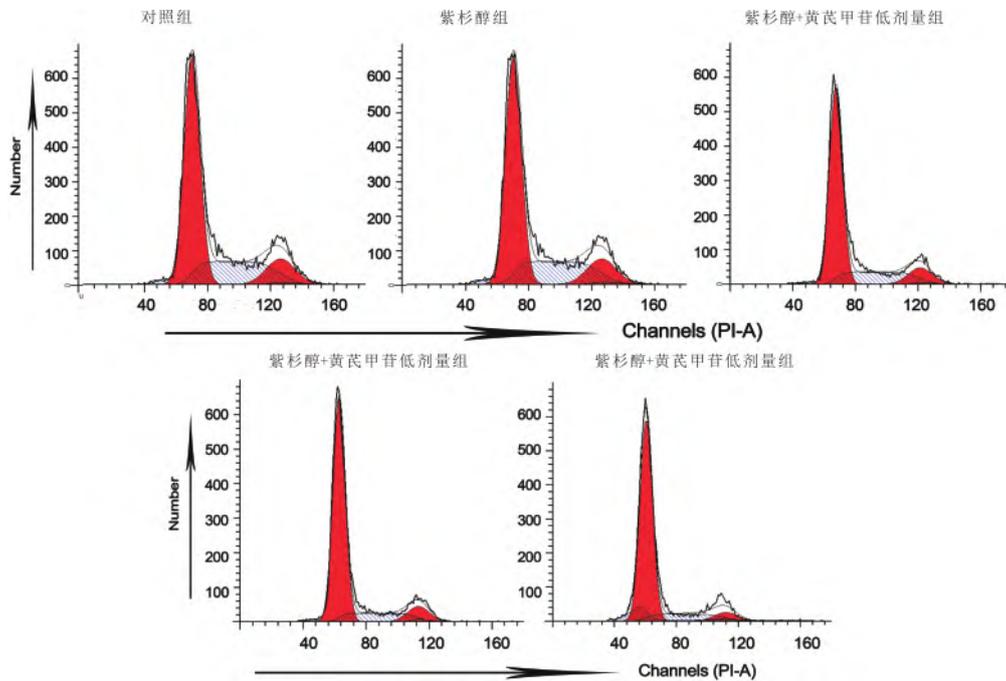


图2 黄芪甲苷与紫杉醇联合应用对细胞周期的影响

表1 黄芪甲苷与紫杉醇联合应用对细胞周期的影响

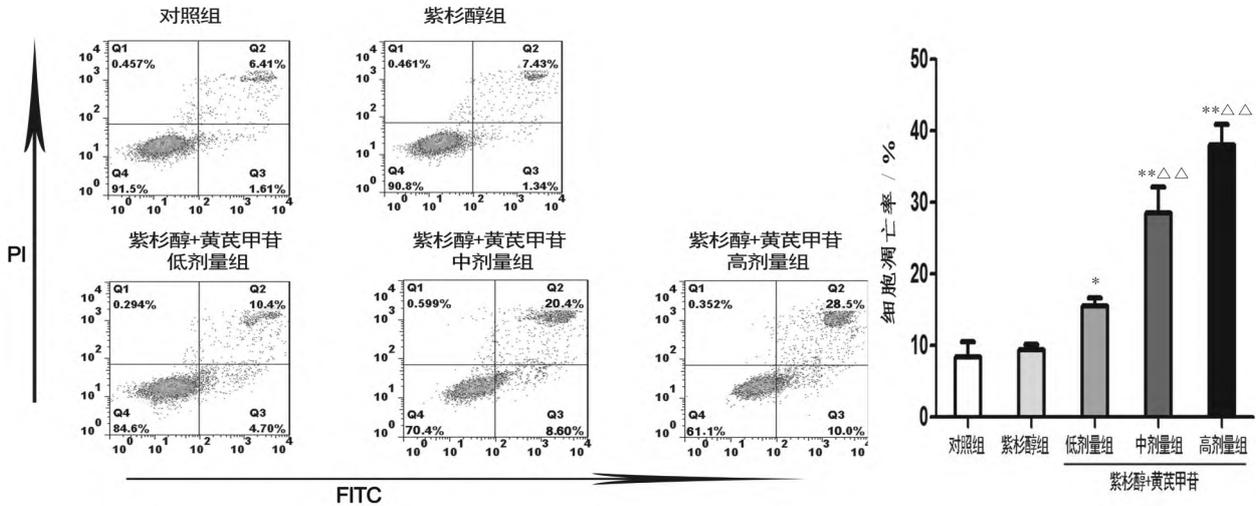
组别	n	G0/G1/%	S/%	G2/M/%
对照组	3	60.89 ± 2.25	26.82 ± 1.12	12.30 ± 2.10
紫杉醇组	3	58.39 ± 1.90	27.90 ± 2.18	13.71 ± 1.26
紫杉醇+黄芪甲苷低剂量组	3	65.73 ± 3.08	24.05 ± 2.27	11.21 ± 2.35
紫杉醇+黄芪甲苷中剂量组	3	75.67 ± 4.07 Δ	15.06 ± 1.19 Δ	9.28 ± 1.05 Δ
紫杉醇+黄芪甲苷高剂量组	3	82.21 ± 3.93 $\Delta\Delta$	12.49 ± 0.98 $\Delta\Delta$	5.29 ± 0.73 $\Delta\Delta$

注: 与紫杉醇组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

3.3 黄芪甲苷增强紫杉醇诱导 HeLa 细胞凋亡
与对照组比较,紫杉醇组细胞凋亡水平无明显变化 ($P > 0.05$)。与紫杉醇组比较,紫杉醇 + 黄芪甲苷中、高剂量组早期凋亡细胞逐渐增多 ($P < 0.05$)。通过激光共聚焦显微镜可以看到,对照组细胞核形态均一,而紫杉醇 + 黄芪甲苷中、高剂量组细胞出现凋亡特征,如细胞变形、细胞核皱缩、染色质凝缩等。

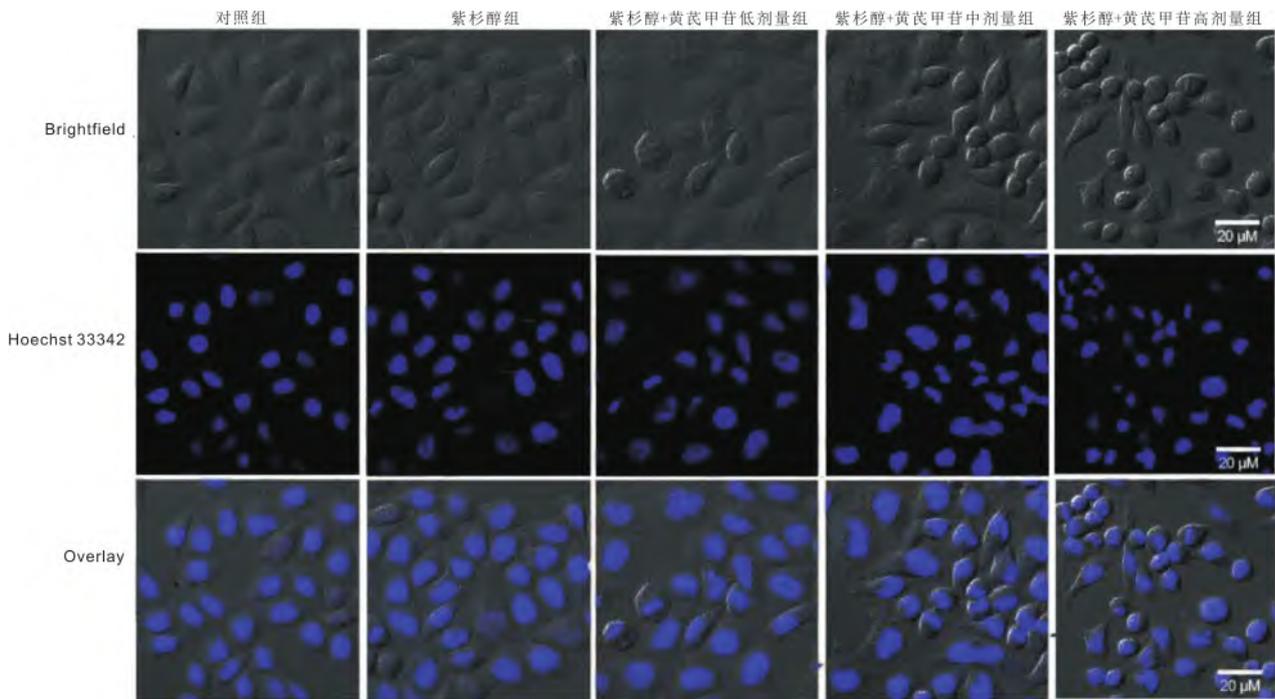
见图3图4。

3.4 黄芪甲苷增强紫杉醇对 HeLa 细胞迁移的抑制作用
细胞划痕实验结果显示,与对照组比较,紫杉醇组细胞迁移率无明显变化 ($P > 0.05$)。与紫杉醇组比较,紫杉醇 + 黄芪甲苷中、高剂量组细胞迁移率显著降低 ($P < 0.01$),表明黄芪甲苷增强紫杉醇对 HeLa 细胞迁移的抑制作用,见图5。



注: A: 细胞凋亡检测流式图; B: 细胞凋亡水平比较; 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与紫杉醇组比较, △△ $P < 0.01$

图3 黄芪甲苷对紫杉醇诱导细胞凋亡的影响

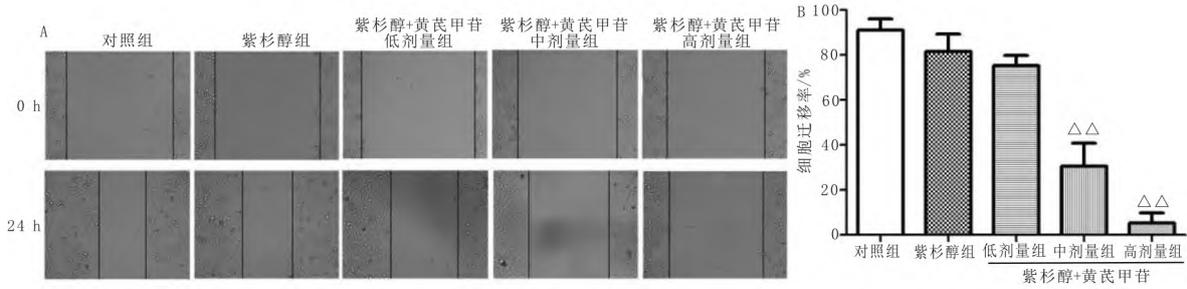


注: Brightfield: 白光背景图; Hoechst33342: 荧光背景图; overlay: 空白背景与荧光背景重叠图

图4 Hoechst 33342 染色观察黄芪甲苷与紫杉醇联合应用对细胞凋亡的影响

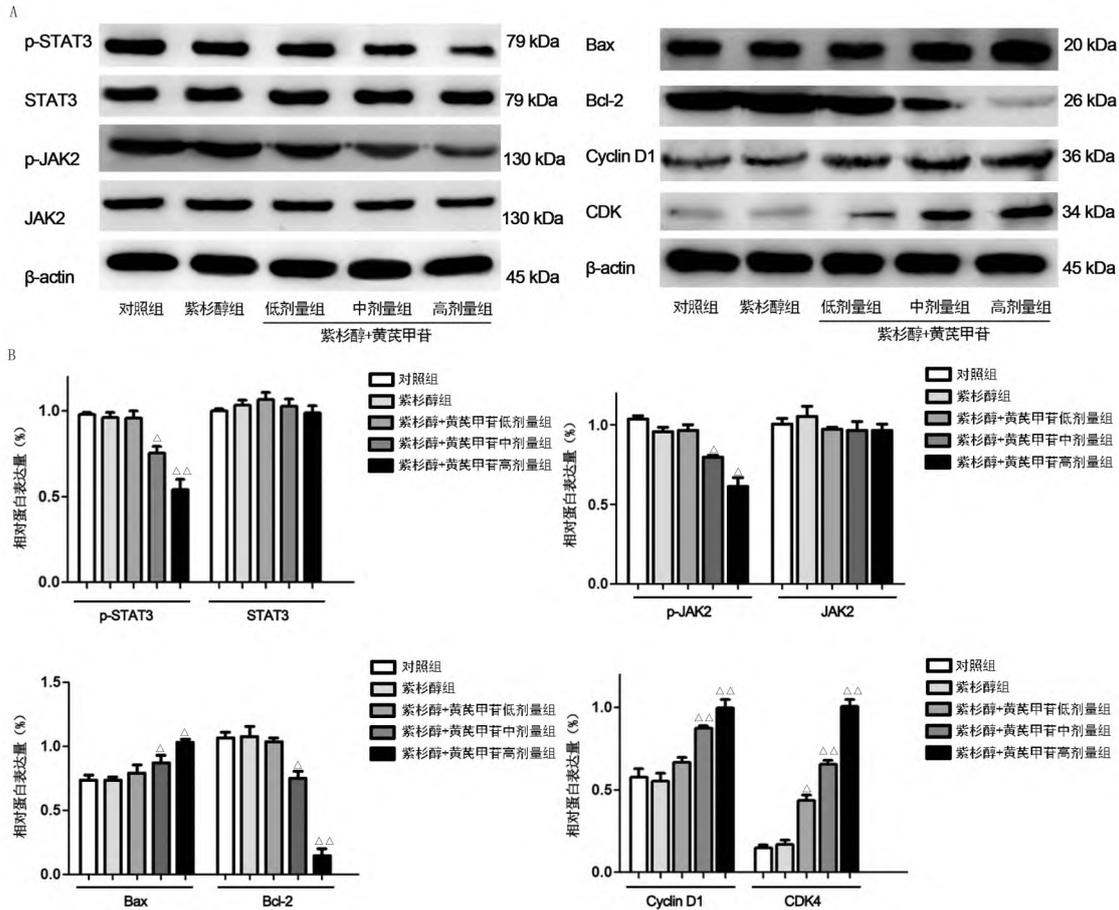
3.5 黄芪甲苷与紫杉醇联用对 HeLa 细胞 JAK2/STAT3 信号通路相关蛋白表达水平的影响
与对照组比较,紫杉醇组相关蛋白表达水平无明显变化 ($P > 0.05$)。与紫杉醇组比较,紫杉醇 + 黄芪甲苷

中、高剂量组 p-STAT3、p-JAK2、Bcl-2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), Bax、Cyclin D1、CDK4 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), STAT3、JAK2 蛋白表达水平无明显变化 ($P > 0.05$)。见图6。



注: A: 细胞迁移对比图; B: 细胞迁移率比较; 与紫杉醇组比较, $\Delta \Delta P < 0.01$

图5 黄芪甲苷对紫杉醇抑制 HeLa 细胞迁移的影响



注: A: JAK2/STAT3 信号通路相关蛋白条带图; B: JAK2/STAT3 信号通路相关蛋白表达水平比较; 与紫杉醇组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta \Delta P < 0.01$

图6 黄芪甲苷与紫杉醇联合应用对相关蛋白表达的影响

4 讨论

宫颈癌是影响全球女性最严重的疾病之一^[10]。目前,对于宫颈癌的治疗手段有放疗、化疗、手术、中医治疗等,其中化疗是众多治疗方案的基石^[11]。紫杉醇是从紫杉树皮中提取出来的一种广谱抗癌药物,其作用机制是抑制癌细胞有丝分裂的过程^[12]。与目前临床上其他有效的化疗药物相似,紫杉醇不仅会引起严重的不良反应,而且会产生越来越低的化疗敏感性,这也是宫颈癌治疗的最大挑战之一。

黄芪甲苷是中药黄芪的有效成分^[13],在增强癌细胞对各种一线化疗药物敏感性方面具有很大的潜力。研究表明,黄芪甲苷可通过抑制 MRP2 蛋白在肿瘤细胞中的表达增强顺铂对肝癌细胞的化疗敏感性,提高其抗肿瘤作用^[14],还可通过抑制 AKT/NF- κ B 信号传导增强前列腺癌治疗中卡铂的敏感性,从而改善卡铂产生的耐药情况^[15]。通过抑制潜在的癌症治疗靶点 B7-H3 增强非小细胞肺癌对顺铂的化疗敏感性^[16]。

众所周知,细胞的增殖、周期变化、凋亡、迁移均

与肿瘤的发生发展息息相关^[17]。肿瘤细胞周期的不可控制是其无限增殖的原因之一,细胞周期调节点G1、G2及S期成为众多新型抗肿瘤药物的目标靶点^[18]。因此,在这项研究工作中,我们首先考察黄芪甲苷以及紫杉醇对HeLa细胞存活率的影响,选取其中3个成倍数浓度的黄芪甲苷与1个浓度的紫杉醇(紫杉醇在该浓度下无明显细胞抑制作用)联合处理细胞,结果发现,与对照组、紫杉醇组相比,紫杉醇+黄芪甲苷中、高剂量组细胞存活率明显降低。细胞周期及细胞凋亡实验表明,紫杉醇+黄芪甲苷中、高剂量组能够将HeLa细胞阻滞在G0/G1期,并明显促进细胞凋亡,表明黄芪甲苷能够增强HeLa细胞对紫杉醇的抗肿瘤敏感性。有报道表明,黄芪甲苷可导致HeLa细胞在G0/G1期的比例增加,G2/M期的比例减少,具有增强宫颈癌细胞株放射敏感性的作用^[19]。也有研究发现,单用黄芪甲苷对细胞周期分布的影响极小,但与紫杉醇联合具有协同作用,能够将MCF-7和MDA-MB-231细胞阻断在G2/M期^[20]。综合本研究结果表明,黄芪甲苷对紫杉醇在宫颈癌HeLa细胞中的增敏作用可能归因于细胞周期阻滞和促进凋亡。另外,本研究发现紫杉醇+黄芪甲苷中、高剂量组的细胞迁移能力显著下降,这也提示黄芪甲苷可以显著降低HeLa细胞对紫杉醇的抵抗性。

研究发现,JAK的激活可以使STAT3磷酸化并形成二聚体,进而影响下游CyclinD1、Bcl-2、VEGF、MMP-9等肿瘤相关蛋白的表达^[21-23]。STAT3被视为“原癌基因”,它的异常激活调控肿瘤细胞的恶性增殖、凋亡、迁移及免疫逃逸过程,在宫颈癌、结肠癌、卵巢癌、头颈部肿瘤等多种恶性肿瘤中发挥至关重要的作用^[24-26]。文献报道,隐丹参酮不仅可以通过抑制Try705位点的STAT3磷酸化而发挥抗肿瘤作用,而且可以增强舌鳞癌细胞对紫杉醇的化疗敏感性,具有成为克服紫杉醇耐药的一种治疗新策略的潜力^[27]。黄进等证明红景天苷能够促进C33A细胞凋亡,抑制其增殖及侵袭,相关机制可能与JAK2/STAT3信号通路被抑制有关^[28]。本研究结果表明,紫杉醇联合黄芪甲苷中、高剂量可以降低p-STAT3、p-JAK2的蛋白表达水平,同时引起下游经典凋亡蛋白Bcl-2水平的降低以及Bax水平的升高,导致HeLa细胞发生凋亡。除此之外,Cyclin家族是调控细胞周期的关键分子之一,它作用于细胞周期的不同阶段可以引起细胞分裂、增殖或加速细胞周期进程^[29]。在Cyclin家族中,CyclinD1在周期G1/S的转换点中发挥重要作用,其通过与CDK4结合为复合物,释放转录因子E2F,阻断细胞从G0/G1期进入S期,从而抑制细胞分裂增

殖^[30]。本实验结果显示,紫杉醇联合黄芪甲苷中、高剂量可显著上调CyclinD1、CDK4蛋白表达水平,与前面的流式细胞术的细胞周期结果是一致的。

综上所述,黄芪甲苷可增强紫杉醇对HeLa细胞的周期阻滞,诱导细胞凋亡,抑制细胞迁移,从而提高宫颈癌HeLa细胞对紫杉醇的化疗敏感性,其作用机制可能与调控JAK2/STAT3信号通路密切相关。

参考文献:

- [1]刘运华,赵宗江,张新雪,等.派特灵对HeLa细胞增殖迁移能力及PI3K/Akt信号转导通路的影响[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(17):56-63.
LIU Y H,ZHAO Z J,ZHANG X X,et al. Effect of paiteling on HeLa cell proliferation and metastasis ability and PI3K/Akt signal transduction pathway [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae,2020,26(17):56-63.
- [2]PENG J X,ZHAO J,ZHAO Y M,et al. HeLa cell-derived paclitaxel-loaded microparticles efficiently inhibit the growth of cervical carcinoma [J]. Int J Nanomedicine,2020,15:6409-6420.
- [3]DELLA CORTE L,BARRA F,FORESTE V,et al. Advances in paclitaxel combinations for treating cervical cancer [J]. Expert Opin Pharmacother,2020,21(6):663-677.
- [4]DHANASEKARAN S. Augmented cytotoxic effects of paclitaxel by curcumin induced overexpression of folate receptor- α for enhanced targeted drug delivery in HeLa cells [J]. Phytomedicine,2019,56:279-285.
- [5]ABOREHAB N M,OSAMA N. Effect of Gallic acid in potentiating chemotherapeutic effect of Paclitaxel in HeLa cervical cancer cells [J]. Cancer Cell Int,2019,19:154.
- [6]ZHANG J Q,WU C X,GAO L,et al. Astragaloside IV derived from Astragalus membranaceus: a research review on the pharmacological effects [J]. Adv Pharmacol,2020,87:89-112.
- [7]李文,旷雨,孟立峰,等.黄芪甲苷对宫颈癌Hela细胞增殖、迁移侵袭作用机制研究[J].中药药理与临床,2018,34(3):39-42,192.
LI W,KUANG Y,MENG L F,et al. Research on effects of astragaloside IV on hela cells of cervical cancer about its proliferation,migration and invasion [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med,2018,34(3):39-42,192.
- [8]YE Q,SU L,CHEN D G,et al. Astragaloside IV induced miR-134 expression reduces EMT and increases chemotherapeutic sensitivity by suppressing CREB1 signaling in colorectal cancer cell line SW-480 [J]. Cell Physiol Biochem,2017,43(4):1617-1626.
- [9]XIE T,LI Y,LI S L,et al. Astragaloside IV enhances cisplatin chemosensitivity in human colorectal cancer via regulating NOTCH3 [J]. Oncol Res,2016,24(6):447-453.
- [10]马君义,赵亚丽,屈丹妮,等.盐酸高乌甲素通过pRb通路介导人宫颈癌Hela细胞周期阻滞[J].中国现代应用药学,2020,37(14):1674-1680.
MA J Y,ZHAO Y L,QU D N,et al. Lappaconitine hydrochloride mediates the cell cycle arrest of human cervical cancer hela cell through p Rb pathway [J]. Chin J Mod Appl Pharm,2020,37(14):1674-1680.
- [11]李明秀,许振,石洪堂,等.靶向治疗、免疫治疗及其联合疗法在

- 宫颈癌治疗中的研究进展[J]. 现代妇产科进展 2020, 29(9): 710-712, 715.
- LI M X, XU Z, SHI H T, et al. Research progress of targeted therapy, immunotherapy and their combination in the treatment of cervical cancer[J]. Prog Obstet Gynecol 2020, 29(9): 710-712, 715.
- [12] 熊亮斌, 唐红菊, 宋新巍, 等. 紫杉醇类抗肿瘤原料药生产的研究进展[J]. 中草药 2020, 51(15): 4042-4049.
- XIONG L B, TANG H J, SONG X W, et al. Recent advances in synthesis of paclitaxel antitumor pharmaceutical raw materials[J]. Chin Tradit Herb Drugs 2020, 51(15): 4042-4049.
- [13] 蒋微, 蒋式骊, 刘平. 黄芪甲苷的药理作用研究进展[J]. 中华中医药学刊 2019, 37(9): 2121-2124.
- JIANG W, JIANG S L, LIU P. Research progress on pharmacologic effects of astragaloside IV[J]. Chin Arch Tradit Chin Med 2019, 37(9): 2121-2124.
- [14] QU X Y, GAO H, ZHAI J H, et al. Astragaloside IV enhances cisplatin chemosensitivity in hepatocellular carcinoma by suppressing MRP2[J]. Eur J Pharm Sci 2020, 148: 105325.
- [15] HE Y, ZHANG Q M, CHEN H, et al. Astragaloside IV enhanced carboplatin sensitivity in prostate cancer by suppressing AKT/NF- κ B signaling pathway[J]. Biochem Cell Biol 2021, 99(2): 214-222.
- [16] HE C S, LIU Y C, XU Z P, et al. Astragaloside IV enhances cisplatin chemosensitivity in non-small cell lung cancer cells through inhibition of B7-H3[J]. Cell Physiol Biochem 2016, 40(5): 1221-1229.
- [17] 杨明翰, 骆骄阳, 乔美玲, 等. 多伞阿魏体外抗胃癌活性筛选、细胞凋亡及周期阻滞机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(10): 112-122.
- YANG M H, LUO J Y, QIAO M L, et al. Mechanism of uygur medicine root of *Ferula ferulaeoides* in resisting gastric cancer activity and inducing cell apoptosis and cell cycle arrest in vitro[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae 2018, 24(10): 112-122.
- [18] WIMAN K G, ZHIVOTOVSKY B. Understanding cell cycle and cell death regulation provides novel weapons against human diseases[J]. J Intern Med 2017, 281(5): 483-495.
- [19] 李潇, 周艳艳, 宋晓婕, 等. 黄芪甲苷对宫颈癌细胞株放射敏感性的影响及相关机制[J]. 中国中医基础医学杂志, 2018, 24(11): 1540-1543.
- LI X, ZHOU Y Y, SONG X J, et al. Effects of astragaloside IV on radiosensitivity of cervical cancer cell lines and related mechanisms[J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med 2018, 24(11): 1540-1543.
- [20] ZHENG Y F, DAI Y, LIU W P, et al. Astragaloside IV enhances taxol chemosensitivity of breast cancer via caveolin-1-targeting oxidant damage[J]. J Cell Physiol 2019, 234(4): 4277-4290.
- [21] 肖美芳, 陆喆, 陈柳英, 等. 木犀草素通过调控 JAK2/STAT3 信号通路对 HeLa 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中成药, 2020, 42(6): 1620-1623.
- XIAO M F, LU Z, CHEN L Y, et al. Effects of luteolin on HeLa cell proliferation and apoptosis by regulating JAK2/STAT3 signal pathway[J]. Chin Tradit Pat Med 2020, 42(6): 1620-1623.
- [22] 纪佳, 陈岩岩. 黄芩汤对溃疡性结肠炎大鼠 IL-6、JAK-STAT3 信号通路及 HMGB-1 表达的影响[J]. 中医学报, 2018, 33(7): 1297-1301.
- JI J, CHEN Y Y. Effect of Huangqin Decoction on IL-6, JAK-STAT3 signal pathway and HMGB-1 expression in rats with ulcerative colitis[J]. Acta Chin Med 2018, 33(7): 1297-1301.
- [23] 张慧, 原晨, 卢华锋, 等. 小柴胡汤对抑郁症大鼠 JAK2/STAT3 通路及小胶质细胞活化的影响[J]. 中国药师, 2021, 24(4): 617-624.
- ZHANG H, YUAN C, LU H F, et al. Effects of Xiaochaihu Decoction on JAK2/STAT3 pathway and microglia activation in depression rats[J]. China Pharm 2021, 24(4): 617-624.
- [24] 管玲男, 刘哲, 王欢, 等. JAK/STAT3 信号通路及其抑制剂在肿瘤治疗领域的研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2018, 53(23): 1973-1977.
- GUAN L N, LIU Z, WANG H, et al. JAK/STAT3 signaling pathway and its inhibitors in tumor therapy[J]. Chin Pharm J 2018, 53(23): 1973-1977.
- [25] 夏雷达. 基于 EGFR-STAT3 通路探讨桂枝茯苓丸对人乳腺癌 MCF-7 细胞周期阻滞的影响[D]. 郑州: 河南中医药大学, 2017.
- XIA L D. Influence of inducing cycle arrest of Gui Zhi Fu Ling pill to human breast cancer MCF-7 cells based on EGFR-STAT3 paths[D]. Zhengzhou: Henan University of Chinese Medicine 2017.
- [26] 王慧玲, 赵维楠, 罗瑞, 等. 基于 JAK-STAT 通路研究槲皮素对宫颈癌 C-33A 细胞的影响[J]. 中医学报, 2021, 36(7): 1525-1529.
- WANG H L, ZHAO W N, LUO R, et al. Study on the effect of quercetin on human cervical cancer C-33A cells based on JAK-STAT pathway[J]. Acta Chin Med 2021, 36(7): 1525-1529.
- [27] 王颖. 隐丹参酮通过抑制 JAK/STAT3 信号通路提高舌鳞状细胞癌对紫杉醇化疗敏感性的实验研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2018.
- WANG Y. Cryptotanshinone sensitizes antitumor effect of paclitaxel on tongue squamous cell carcinoma growth by inhibiting the JAK/STAT3 signaling pathway[D]. Nanchang: Nanchang University, 2018.
- [28] 黄进, 刘福蓉, 温婷, 等. 红景天苷通过 JAK2/STAT3 通路影响宫颈癌 C33A 细胞的增殖、侵袭和凋亡[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志 2020, 27(5): 522-527.
- HUANG J, LIU F R, WEN T, et al. Salidroside affects proliferation, invasion and apoptosis of cervical squamous cell carcinoma C33A cells through JAK2/STAT3 pathway[J]. Chin J Cancer Biotherapy, 2020, 27(5): 522-527.
- [29] 郑楠, 徐扬. 细胞周期蛋白依赖性激酶 2 的功能及其抑制剂的研究[J]. 中国细胞生物学学报 2021, 43(4): 815-827.
- ZHENG N, XU Y. Studies on protein function of cyclin-dependent kinase 2 and its inhibitors[J]. Chin J Cell Biol 2021, 43(4): 815-827.
- [30] 王雪振, 牟悦, 郝倩, 等. 桦木酸抗肿瘤作用及机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志 2021, 27(21): 223-231.
- WANG X Z, MU Y, HAO Q, et al. Anti-tumor effect and mechanism of betulinic acid: a review[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae 2021, 27(21): 223-231.

收稿日期: 2022-07-08

作者简介: 何瑞荣 (1974-), 女, 广东惠州人, 大学本科, 副主任药师, 从事中药单体及金属药物抗肿瘤研究。

通信作者: 丁少波 (1969-), 女, 江西景德镇人, 主任药师, 从事药学与中药学研究。E-mail: 943098759@qq.com

编辑: 孙亚萍