

柚皮素通过 AMPK 通路介导的自噬对顺铂耐药宫颈癌细胞 (HeLa/DDP) 顺铂耐药性的影响

贾艳利¹, 李军芳², 梁高峰²

1. 孟州市人民医院 妇产科, 河南 焦作 454750

2. 河南科技大学第一附属医院 临床药学部, 河南 洛阳 471000

摘要: 目的 探究柚皮素对顺铂耐药宫颈癌细胞 (HeLa/DDP) 顺铂耐药性的影响, 并探究其分子机制。方法 体外培养人 HeLa/DDP 细胞、HeLa 细胞, CCK-8 法检测不同质量浓度顺铂对 HeLa/DDP、HeLa 细胞增殖的影响及不同质量浓度柚皮素对 HeLa/DDP 细胞增殖的影响。设置对照组、顺铂组 (2 mg/L 顺铂)、顺铂+柚皮素组 (2 mg/L 顺铂+60 mg/L 柚皮素) 和顺铂+柚皮素+AMPK 通路抑制剂组 (2 mg/L 顺铂+60 mg/L 柚皮素+50 μ mol/L Compound C); CCK-8 法检测各组 HeLa/DDP 细胞增殖情况; 流式细胞仪检测各组 HeLa/DDP 细胞凋亡情况; 蛋白免疫印迹 (Western blotting) 法检测各组 HeLa/DDP 细胞中腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK)、p-AMPK、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、Beclin1、微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3) I、LC3 II 蛋白表达情况。结果 顺铂对 HeLa/DDP 细胞、HeLa 细胞的半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别在 4~8、1~2 mg/L, 柚皮素对 HeLa/DDP 细胞的 IC_{50} 在 30~60 mg/L。与对照组相比, 顺铂组 HeLa/DDP 细胞增殖抑制率、凋亡率及细胞中 p-AMPK/AMPK、Bax、Beclin1、LC3 II 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$), LC3 I 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$); 与顺铂组相比, 顺铂+柚皮素组 HeLa/DDP 细胞增殖抑制率、凋亡率及细胞中 p-AMPK/AMPK、Bax、Beclin1、LC3 II 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$), LC3 I 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$); 与柚皮素组相比, AMPK 通路抑制剂组 HeLa/DDP 细胞增殖抑制率、凋亡率及细胞中 p-AMPK/AMPK、Bax、Beclin1、LC3 II 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$), LC3 I 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$)。结论 柚皮素可能通过激活 AMPK 通路介导的自噬反应, 与顺铂联用发挥对 HeLa/DDP 细胞增殖抑制作用及凋亡促进作用。

关键词: 柚皮素; 腺苷酸活化蛋白激酶通路; 自噬; 宫颈癌; HeLa/DDP 细胞; 顺铂耐药性

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2021)05-0878-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.05.004

Effect of naringenin on cisplatin resistance of cervical cancer HeLa/DDP cells via AMPK pathway mediated autophagy

JIA Yan-li¹, LI Jun-fang², LIANG Gao-feng²

1. Department of Obstetrics and Gynecology, Mengzhou People's Hospital, Jiaozuo 454750, China

2. Department of Clinical Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of naringenin on cisplatin resistance of cervical cancer HeLa/DDP cells and its molecular mechanism. **Methods** HeLa/DDP cells and HeLa cells were cultured *in vitro*, CCK-8 method was used to detect the effects of different concentrations of cisplatin on the proliferation of HeLa/DDP and HeLa cells, and the effects of naringenin on the proliferation of HeLa/DDP cells. HeLa/DDP cells were divided into control group, cisplatin group (2 mg/L cisplatin), cisplatin + naringenin group (2 mg/L cisplatin + 60 mg/L naringenin) and cisplatin + naringenin + AMPK pathway inhibitor group (2 mg/L cisplatin + 60 mg/L naringenin + 50 μ mol/L Compound C). The proliferation of HeLa/DDP cells was detected by CCK-8 method, the apoptosis of HeLa/DDP cells was detected by flow cytometry. Western blotting (WB) method was used to detect the expression of adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK), p-AMPK, Bcl-2 associated X protein (Bax), Beclin1, microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) I and LC3 II protein in HeLa/DDP cells. **Results** The IC_{50} value of cisplatin to

收稿日期: 2020-09-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81741147)

作者简介: 贾艳利 (1975—), 女, 本科, 副主任医师, 主要从事妇科肿瘤研究。E-mail: lj1213456@163.com

HeLa/DDP cells and HeLa cells were 4—8 mg/L and 1—2 mg/L, respectively. IC₅₀ value of naringenin to HeLa/DDP cells was in the range of 30—60 mg/L. Compared with those in the control group, the proliferation inhibition rate, apoptosis rate and the protein expression levels of p-AMPK/AMPK, Bax, Beclin1 and LC3 II in HeLa/DDP cells were significantly higher in cisplatin group ($P < 0.05$), and the expression level of LC3 I protein was significantly lower ($P < 0.05$). Compared with those in cisplatin group, the proliferation inhibition rate and apoptosis rate of HeLa/DDP cells and the expression levels of p-AMPK/AMPK, Bax, Beclin1 and LC3 II protein in cisplatin + naringenin group were significantly higher, and the expression level of LC3 I protein was significantly lower ($P < 0.05$). Compared with those in cisplatin + naringenin group, the proliferation inhibition rate and apoptosis rate of HeLa/DDP cells and the protein expression levels of p-AMPK/AMPK, Bax, Beclin1 and LC3 II were significantly lower in cisplatin + naringenin + AMPK pathway inhibitor group, the expression level of LC3 I protein was significantly higher ($P < 0.05$). **Conclusion** Naringenin can inhibit proliferation and promote apoptosis of HeLa/DDP cells by activating autophagy mediated by AMPK pathway.

Key words: naringenin; adenosine monophosphate activated protein kinase pathway; autophagy; cervical cancer; HeLa/DDP cells; cisplatin resistance

宫颈癌是妇科常见的生殖系统恶性肿瘤,主要发生于 35~60 岁女性群体中,但近年来其发病率呈年轻化 and 上升趋势,严重威胁育龄妇女的生命健康^[1]。化疗是中晚期宫颈癌患者术后辅助治疗的重要手段,但临床治疗中宫颈癌细胞对化疗药物产生抵抗及耐受,使得疗效达不到预期的效果,是导致宫颈癌治疗失败的主要原因之一^[2]。因此,开发能够逆转宫颈癌耐药细胞耐药性的药物并研究其机制具有重要价值。柚皮素是水果、蔬菜中常见的二氢黄酮类活性成分,对肺癌、前列腺癌等多种肿瘤具有杀伤作用^[3-4]。有研究报道,柚皮素能够通过 ROS/JNK/Bcl2 通路抑制宫颈癌 HeLa 细胞增殖和迁移^[5],但对顺铂耐药宫颈癌细胞 (HeLa/DDP) 的影响尚不清楚。细胞自噬是一种不同于细胞凋亡的程序性死亡,在肿瘤耐药中发挥重要作用^[6]。研究发现,增强 HeLa 细胞自噬活性可增加 HeLa 细胞对顺铂化疗的敏感性^[7]。腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK) 通路是细胞中调节能量代谢的重要通路之一,能调节细胞自噬^[8]。近年来研究发现,柚皮素能够通过激活 AMPK 通路诱导急性白血病 HL-60 细胞自噬和细胞凋亡^[9]。本研究探讨柚皮素通过 AMPK 通路介导的自噬对 HeLa/DDP 细胞增殖及凋亡的影响,为化疗的辅助用药提供参考。

1 材料

人 HeLa/DDP 细胞 (货号: XY-XB-1948) 购自美国 ATCC 细胞库; 人 HeLa 细胞 (货号: YBCC100769) 购自美国 Scien Cell 公司; 顺铂、柚皮素 (货号: abs810466、abs42022979) 购自爱必信 (上海) 生物科技有限公司; 胎牛血清 (货号: FBS500-S) 购自澳大利亚 Aus Gene X 公司; RPMI

1640 培养液 (货号: GMS12052.4.1) 购自美国 GENMED 公司; CCK-8 试剂 (货号: CK-04) 购自日本同仁化学研究所; AMPK 通路抑制剂 Compound C (货号: 171260-10MG) 购自美国 Merck-millipore 公司; AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (货号: S0185) 购自哈尔滨新海基因检测有限公司; p-AMPK 抗体、AMPK 抗体、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 抗体、Beclin1 抗体、微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) 抗体、GAPDH 抗体 (货号: ab133448、ab207442、ab263897、ab92389、ab62721、ab181602) 购自 Abcam 公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 (货号: 0295G-HRP) 购自美国 santa 公司; 培养箱 (型号: TY10GI2-2) 购自美国 Shellab 公司; 酶标仪 (型号: MODEL550) 购自美国 Bio-Rad 公司; 流式细胞仪 (型号: Guauasoft 6L) 购自美国 Millipor 公司。

2 方法

2.1 细胞培养

将 HeLa/DDP、HeLa 细胞置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中,用 RPMI 1640 培养基 (含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素) 培养,每隔 1~2 天换液 1 次,细胞密度达到 85% 后传代培养,取对数生长期细胞用于后续实验。

2.2 CCK-8 法检测顺铂对 HeLa/DDP、HeLa 细胞增殖的影响

将 HeLa/DDP、HeLa 细胞以 1×10^5 个/mL、100 μ L/孔接种于 96 孔培养板,加入不同终浓度 (0、0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00 mg/L) 的顺铂,培养 48 h,每孔加入 20 μ L CCK-8 试剂,避光继续培养 4 h,使用酶标仪在波长 450 nm 处测定各孔吸光度 (A) 值,

以 0 mg/L 顺铂处理细胞为对照孔, 计算增殖抑制率。

$$\text{增殖抑制率} = (A_{\text{对照孔}} - A_{\text{实验孔}}) / A_{\text{对照孔}}$$

2.3 CCK-8 法检测柚皮素联合顺铂对 HeLa/DDP 细胞增殖的影响

将 HeLa/DDP 细胞以 1×10^5 个/mL、100 μ L/孔接种于 96 孔培养板, 加入 2.00 mg/L 顺铂及不同终浓度 (0、15、30、60、120、240 mg/L) 的柚皮素, 培养 48 h, 每孔加入 20 μ L CCK-8 试剂, 避光继续培养 4 h, 使用酶标仪在波长 450 nm 处测定各孔 A 值, 以 0 mg/L 柚皮素处理细胞为对照孔, 计算增殖抑制率。

2.4 CCK-8 法检测柚皮素联合顺铂及 AMPK 通路抑制剂对 HeLa/DDP 细胞增殖的影响

将 HeLa/DDP 细胞以 1×10^5 个/mL、100 μ L/孔接种于 96 孔培养板, 分为对照组、顺铂组 (2 mg/L 顺铂)、顺铂+柚皮素组 (2 mg/L 顺铂+60 mg/L 柚皮素)、顺铂+柚皮素+AMPK 通路抑制剂组 (2 mg/L 顺铂+60 mg/L 柚皮素+50 μ mol/L Compound C), 培养 48 h, 每孔加入 20 μ L CCK-8 试剂, 避光继续培养 4 h, 使用酶标仪在波长 450 nm 处测定各孔 A 值, 计算增殖抑制率。

2.5 流式细胞仪检测柚皮素联合 AMPK 通路抑制剂对 HeLa/DDP 细胞凋亡的影响

将 HeLa/DDP 细胞按照“2.4”项中分组处理, 培养 48 h, 弃培养液, PBS 洗涤, 胰酶消化后收集细胞, 用 $1 \times$ binding buffer 调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL, 加入 5 μ L Annexin V-FITC、10 μ L PI 混匀, 室温下避光孵育 15 min, 使用流式细胞仪检测其凋亡率。

2.6 蛋白免疫印迹 (Western blotting) 法检测各组 HeLa/DDP 细胞中 AMPK 通路及凋亡、自噬相关蛋白表达

将 HeLa/DDP 细胞按照“2.4”项中分组处理, 培养 48 h, 收集细胞, 使用 RIPA 细胞裂解液提取细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 取等量蛋白进行电泳、转膜, 5%脱脂奶粉封闭 2 h, 加入一抗 (p-AMPK 抗体、AMPK 抗体、Bax 抗体、Beclin1 抗体、LC3 抗体、GAPDH 抗体, $1:500$ 稀释), 4°C 孵育过夜, TBST 洗膜, 加入羊抗兔二抗 (辣根过氧化物酶标记, $1:1000$ 稀释), 室温孵育 1 h, TBST 洗膜, 化学发光法显色, 成像拍照, 分析条带灰度值。

2.7 统计学分析

采用 SPSS 24.0 软件分析数据。实验数据用

$\bar{x} \pm s$ 表示, 两组比较行 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较行 SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 顺铂对 HeLa/DDP、HeLa 细胞增殖的影响

与对照组 (0 mg/L 顺铂) 相比, 0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00 mg/L 顺铂处理下的 HeLa/DDP 细胞、HeLa 细胞增殖抑制率均显著升高。见表 1。顺铂对 HeLa/DDP 细胞的半数抑制浓度 (IC_{50}) 在 4~8 mg/L, 对 HeLa 细胞的 IC_{50} 在 1~2 mg/L。后续实验选择 2 mg/L 顺铂进行进一步研究。

表 1 顺铂对 HeLa/DDP、HeLa 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of cisplatin on proliferation of HeLa/DDP and HeLa cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	$\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	增殖抑制率/%	
		HeLa/DDP 细胞	HeLa 细胞
对照	0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
顺铂	0.25	$8.16 \pm 1.14^*$	$9.85 \pm 1.28^*$
	0.50	$19.33 \pm 2.27^*$	$22.79 \pm 1.85^*$
	1.00	$32.65 \pm 2.83^*$	$38.44 \pm 2.64^*$
	2.00	$40.53 \pm 2.56^*$	$53.91 \pm 2.27^*$
	4.00	$48.62 \pm 2.78^*$	$61.17 \pm 2.89^*$
	8.00	$56.97 \pm 3.04^*$	$68.23 \pm 3.06^*$

与对照组比较: $*P < 0.05$

$*P < 0.05$ vs control group

3.2 柚皮素对 HeLa/DDP 细胞增殖的影响

与对照组 (0 mg/L 柚皮素) 相比, 15、30、60、120、240 mg/L 柚皮素处理下的 HeLa/DDP 细胞增殖抑制率均显著升高。柚皮素对 HeLa/DDP 细胞的 IC_{50} 在 30~60 mg/L。结果见表 2。后续实验选择 60 mg/L 柚皮素质量浓度进行进一步研究。

表 2 柚皮素对 HeLa/DDP 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of naringenin on proliferation of HeLa/DDP cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	$\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	增殖抑制率/%
对照	0	0.00 ± 0.00
柚皮素	15	$17.16 \pm 2.27^*$
	30	$36.59 \pm 2.58^*$
	60	$55.08 \pm 4.43^*$
	120	$67.34 \pm 3.59^*$
	240	$73.97 \pm 3.72^*$

与对照组比较: $*P < 0.05$

$*P < 0.05$ vs control group

3.3 柚皮素联合顺铂及 AMPK 通路抑制剂对 HeLa/DDP 细胞增殖的影响

与对照组相比, 顺铂组 HeLa/DDP 细胞增殖抑制率显著升高 ($P < 0.05$); 与顺铂组相比, 顺铂+柚皮素组 HeLa/DDP 细胞增殖抑制率显著升高 ($P < 0.05$); 与顺铂+柚皮素组相比, 顺铂+柚皮素+AMPK 通路抑制剂组 HeLa/DDP 细胞增殖抑制率显著降低 ($P < 0.05$), 结果见表 3。

3.4 柚皮素联合顺铂及 AMPK 通路抑制剂对 HeLa/DDP 细胞凋亡的影响

与对照组相比, 顺铂组 HeLa/DDP 细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$); 与顺铂组相比, 顺铂+柚皮素组 HeLa/DDP 细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$); 与顺铂+柚皮素组相比, 顺铂+柚皮素+AMPK 通

路抑制剂组 HeLa/DDP 细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$), 见图 1 和表 4。

表 3 各组 HeLa/DDP 细胞增殖抑制率比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Comparison of proliferation inhibition rate of HeLa/DDP cells in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	增殖抑制率/%
对照	0.00 ± 0.00
顺铂 (2 mg·L ⁻¹)	38.65 ± 4.85*
顺铂 (2 mg·L ⁻¹) + 柚皮素 (60 mg·L ⁻¹)	64.82 ± 5.87 [#]
顺铂 (2 mg·L ⁻¹) + 柚皮素 (60 mg·L ⁻¹) + AMPK 通路抑制剂 (50 μmol·L ⁻¹)	43.24 ± 5.11 [▲]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与顺铂组比较: [#] $P < 0.05$; 与顺铂+柚皮素组比较: [▲] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs cisplatin group; [▲] $P < 0.05$ vs cisplatin + naringenin group

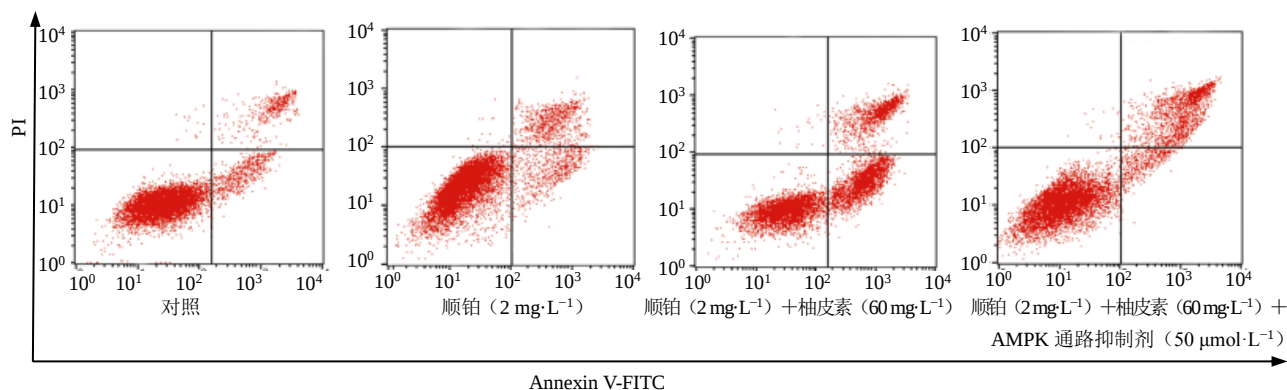


图 1 各组 HeLa/DDP 细胞凋亡情况

Fig. 1 Apoptosis of HeLa/DDP cells in each group

表 4 各组 HeLa/DDP 细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Comparison of apoptosis rate of HeLa/DDP cells in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	凋亡率/%
对照	8.74 ± 1.22
顺铂 (2 mg·L ⁻¹)	19.63 ± 1.86*
顺铂 (2 mg·L ⁻¹) + 柚皮素 (60 mg·L ⁻¹)	34.86 ± 1.78 [#]
顺铂 (2 mg·L ⁻¹) + 柚皮素 (60 mg·L ⁻¹) + AMPK 通路抑制剂 (50 μmol·L ⁻¹)	22.45 ± 1.72 [▲]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与顺铂组比较: [#] $P < 0.05$; 与顺铂+柚皮素组比较: [▲] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs cisplatin group; [▲] $P < 0.05$ vs cisplatin + naringenin group

3.5 各组 HeLa/DDP 细胞中 AMPK 通路相关蛋白表达情况

与对照组相比, 顺铂组 HeLa/DDP 细胞中

p-AMPK/AMPK 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 与顺铂组相比, 顺铂+柚皮素组 HeLa/DDP 细胞中 p-AMPK/AMPK 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 与顺铂+柚皮素组相比, 顺铂+柚皮素+AMPK 通路抑制剂组 HeLa/DDP 细胞中 p-AMPK/AMPK 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 见图 2 和表 5。

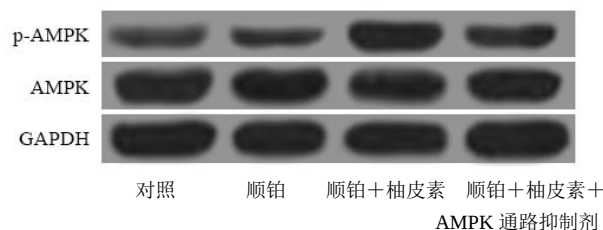


图 2 Western blotting 检测各组 HeLa/DDP 细胞中 p-AMPK、AMPK 蛋白表达情况

Fig. 2 Expression of p-AMPK and AMPK protein in HeLa/DDP cells detected by Western blotting

表 5 各组 HeLa/DDP 细胞中 p-AMPK、AMPK 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Comparison of p-AMPK and AMPK protein expression levels in HeLa/DDP cells of each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	p-AMPK/AMPK
对照	0.25 ± 0.04
顺铂 (2 mg·L ⁻¹)	0.36 ± 0.06*
顺铂 (2 mg·L ⁻¹) + 柚皮素 (60 mg·L ⁻¹)	0.92 ± 0.09#
顺铂 (2 mg·L ⁻¹) + 柚皮素 (60 mg·L ⁻¹) + AMPK 通路抑制剂 (50 μmol·L ⁻¹)	0.47 ± 0.06 [▲]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与顺铂组比较: # $P < 0.05$; 与顺铂+柚皮素组比较: [▲] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs cisplatin group; [▲] $P < 0.05$ vs cisplatin + naringenin group

3.6 各组 HeLa/DDP 细胞中凋亡、自噬相关蛋白表达情况

与对照组相比, 顺铂组 HeLa/DDP 细胞中 Bax、Beclin1、LC3 II 蛋白表达水平显著升高, LC3 I 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 与顺铂组相比,

顺铂+柚皮素组 HeLa/DDP 细胞中 Bax、Beclin1、LC3 II 蛋白表达水平显著升高, LC3 I 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 与顺铂+柚皮素组相比, 顺铂+柚皮素+AMPK 通路抑制剂组 HeLa/DDP 细胞中 Bax、Beclin1、LC3 II 蛋白表达水平显著降低, LC3 I 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 见图 3 和表 6。

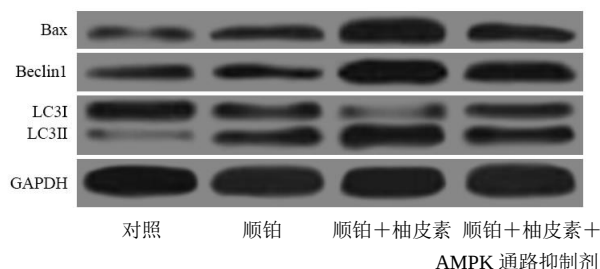


图 3 Western blotting 检测各组 HeLa/DDP 细胞中 Bax、Beclin1、LC3 I、LC3 II 蛋白表达

Fig. 3 Expression of Bax, Beclin1, LC3 I, and LC3 II protein in HeLa/DDP cells detected by Western blotting

表 6 各组 HeLa/DDP 细胞中 Bax、Beclin1、LC3 I、LC3 II 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 6 Comparison of Bax, Beclin1, LC3 I and LC3 II protein expression in HeLa/DDP cells of each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	Bax/GAPDH	Beclin1/GAPDH	LC3 I /GAPDH	LC3 II /GAPDH
对照	0.35 ± 0.05	0.38 ± 0.03	0.77 ± 0.06	0.14 ± 0.03
顺铂 (2 mg·L ⁻¹)	0.48 ± 0.05*	0.49 ± 0.03*	0.51 ± 0.06*	0.53 ± 0.05*
顺铂 (2 mg·L ⁻¹) + 柚皮素 (60 mg·L ⁻¹)	0.87 ± 0.07#	0.89 ± 0.10#	0.19 ± 0.02#	0.82 ± 0.05#
顺铂 (2 mg·L ⁻¹) + 柚皮素 (60 mg·L ⁻¹) + AMPK 通路抑制剂 (50 μmol·L ⁻¹)	0.56 ± 0.05 [▲]	0.64 ± 0.06 [▲]	0.39 ± 0.03 [▲]	0.57 ± 0.06 [▲]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与顺铂组比较: # $P < 0.05$; 与顺铂+柚皮素组比较: [▲] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs cisplatin group; [▲] $P < 0.05$ vs cisplatin + naringenin group

4 讨论

宫颈癌是妇科常见恶性肿瘤, 发病率、死亡率在全部恶性肿瘤中的排名均位居前列。统计数据显示, 全球每年新发宫颈癌例数约 56.9 万例, 死亡例数约 31.1 万例, 其中 84.3% 的病例发生于资源贫乏的国家^[10-11]。由于宫颈癌患者早期症状不明显, 大部分患者确诊时疾病已进展至中晚期, 而中晚期宫颈癌通常采用以化疗为主的综合性治疗手段^[12]。顺铂是宫颈癌化疗的一线基础药物, 然而, 肿瘤细胞对其产生的耐药性常导致化疗达不到预期效果, 最终导致化疗失败。本研究中, 0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00 mg/L 顺铂处理下的 HeLa/DDP 细胞、HeLa 细胞增殖抑制率较对照组均显著升高, 顺铂对 HeLa/DDP、HeLa 细胞的 IC₅₀ 分别处于 4~

8、1~2 mg/L, 这表明顺铂对 HeLa/DDP 细胞、HeLa 细胞的增殖均具有抑制作用, 同时验证了 HeLa/DDP 细胞的顺铂耐药性。为提高化疗成功率, 探索新药物逆转 HeLa/DDP 细胞对顺铂的耐药性势在必行。

近年来, 从植物中提取的许多天然产物被报道对各种人类疾病具有预防和改善作用。柚皮素是一类黄酮类化合物, 广泛存在于芸香科、蔷薇科、柑橘属的植物中, 具有较强的降血糖、抗氧化、抗炎、清除自由基等作用^[13-14]。Zhao 等^[15]研究发现, 柚皮素能够通过炎症和凋亡细胞信号通路抑制乳腺癌细胞迁移。Parashar 等^[16]研究表明, 柚皮素可以增强吉非替尼在尿烷诱发的大鼠肺癌中的抗癌作用。本研究结果显示, 15、30、60、120、240 mg/L

柚皮素处理下的 HeLa/DDP 细胞增殖抑制率较对照组均显著升高,提示柚皮素在宫颈癌耐药细胞中亦具有抗癌作用。顺铂组 HeLa/DDP 细胞增殖抑制率、凋亡率及细胞中 Bax 蛋白表达水平较对照组显著升高,顺铂+柚皮素组 HeLa/DDP 细胞增殖抑制率、凋亡率及细胞中 Bax 蛋白表达水平较顺铂组显著升高,提示柚皮素可以增强顺铂对 HeLa/DDP 细胞的增殖抑制、凋亡促进作用,但涉及到的相关机制还需进一步研究。

细胞自噬是在真核细胞内广泛存在的依赖于溶酶体的降解途径,通过降解细胞内废用蛋白、细胞器等内容物以维持细胞稳态。自噬与肿瘤化疗耐药的产生关系密切,有研究表明,膀胱癌细胞通过自噬在化疗中促进自身存活,是化疗耐药产生的原因^[17]。陈璐等^[18]研究表明,增强自噬水平可增强宫颈癌 C-33A 细胞对顺铂的敏感性。Beclin-1 是自噬相关基因,在自噬发生中参与自噬体的形成^[19]。而 LC3 是常见的自噬标志性物质,在自噬发生中由 LC3 I 会转化为 LC3 II^[18]。AMPK 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,通过磷酸化调节下游信号分子发挥生物学活性,如抑制炎症反应、氧化应激反应等^[20]。有研究报道,AMPK 通路激活与自噬调节有关^[21]。本研究结果显示,顺铂可提高 HeLa/DDP 细胞中 p-AMPK/AMPK、Beclin1、LC3 II 蛋白表达水平,降低 LC3 I 蛋白表达水平,而使用柚皮素可在此基础上进一步提高 HeLa/DDP 细胞中 p-AMPK/AMPK、Beclin1、LC3 II 蛋白表达水平,降低 LC3 I 蛋白表达水平,提示柚皮素可在顺铂基础上进一步激活 AMPK 通路,并增强自噬反应。而使用 Compound C 抑制 AMPK 通路激活后,HeLa/DDP 细胞中 p-AMPK/AMPK 蛋白表达水平显著降低,同时细胞增殖抑制率、凋亡率及细胞中 Bax、Beclin1、LC3 II 蛋白表达水平显著降低,LC3 I 蛋白表达水平显著升高,进一步提示柚皮素可能通过激活 AMPK 通路,进而增强自噬,抑制细胞增殖并促进细胞凋亡,发挥逆转 HeLa/DDP 细胞顺铂耐药性的作用。

本研究结果表明柚皮素与顺铂联用可增强对 HeLa/DDP 细胞的增殖抑制作用,可能是通过激活 AMPK 通路介导的自噬反应发挥作用的。但具体是两药合用增效还是柚皮素增强顺铂的敏感性还需要进一步实验验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Haraga J, Nakamura K, Omichi C, *et al.* Pretreatment prognostic nutritional index is a significant predictor of prognosis in patients with cervical cancer treated with concurrent chemoradiotherapy [J]. *Mol Clin Oncol*, 2016, 5(5): 567-574.
- [2] Zhu H, Luo H, Zhang W, *et al.* Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2016, 10(1): 1885-1895.
- [3] Parashar P, Rathor M, Dwivedi M, *et al.* Hyaluronic acid decorated naringenin nanoparticles: appraisal of chemopreventive and curative potential for lung cancer [J]. *Pharmaceutics*, 2018, 10(1): 33-56.
- [4] Han K Y, Chen PN, Hong M C, *et al.* Naringenin attenuated prostate cancer invasion via reversal of epithelial-to-mesenchymal transition and inhibited upa activity [J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(12): 6753-6758.
- [5] 赖银璇, 王明蕊, 杨海丽, 等. 柚皮素通过 ROS/JNK/Bcl2 通路抑制宫颈癌 HeLa 细胞增殖和迁移 [J]. *中药药理与临床*, 2018, 34(1): 40-43.
- [6] Fu X T, Song K, Zhou J, *et al.* Tumor-associated macrophages modulate resistance to oxaliplatin via inducing autophagy in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19(1): 71-82.
- [7] 翟秋丽, 胡向丹, 肖静, 等. 黄芪多糖可能通过调控细胞自噬提高宫颈癌 HeLa 细胞对顺铂的敏感性 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(4): 805-812.
- [8] Jang E J, Kim S C, Lee J H, *et al.* Fucoxanthin, the constituent of *Laminaria japonica*, triggers AMPK-mediated cytoprotection and autophagy in hepatocytes under oxidative stress [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2018, 18(1): 97-108.
- [9] 梁健锋, 金明慧, 孔令佳, 等. 柚皮素激活 AMPK 诱导急性白血病 HL-60 细胞内质网应激型自噬和细胞凋亡 [J]. *医学分子生物学杂志*, 2019, 16(2): 136-141.
- [10] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [11] Wang Y, Zhang X, Miao F, *et al.* Clinical significance of leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor-1 expression in human cervical cancer [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(6): 3699-3705.
- [12] 张彦, 张梅, 王琳. 疏利达嗪通过抑制 Wnt/ β -catenin 通路逆转宫颈癌 HeLa/DDP 细胞对顺铂的耐药性 [J]. *中国妇幼保健*, 2019, 34(3): 666-670.
- [13] Xue N, Wu X, Wu L, *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effect of Naringenin in different

- nociceptive and inflammatory mice models [J]. *Life Sci*, 2019, 217(1):148-154.
- [14] 杨文青, 马 晶, 余华荣. 柚皮素改善阿尔茨海默病模型大鼠的认知能力及其机制研究 [J]. *中草药*, 2013, 44(6): 715-720.
- [15] Zhao Z, Jin G, Ge Y, *et al*. Naringenin inhibits migration of breast cancer cells via inflammatory and apoptosis cell signaling pathways [J]. *Inflammopharmacology*, 2019, 27(5): 1021-1036.
- [16] Parashar P, Tripathi C B, Arya M, *et al*. Biotinylated naringenin intensified anticancer effect of gefitinib in urethane-induced lung cancer in rats: favourable modulation of apoptotic regulators and serum metabolomics [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(3): S598-S610.
- [17] 张建育, 高瑞林, 李毅宁, 等. 二十碳五烯酸抑制自噬反应提高膀胱癌细胞化疗敏感性 [J]. *中华实验外科杂志*, 2018, 35(12): 2202-2204.
- [18] 陈 璐, 张 娟, 栾丽平. 黄芩苷通过增强自噬介导顺铂对宫颈癌 C-33A/cis 细胞敏感性的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2018, 34(5): 44-47.
- [19] Hamurcu Z, Delibaşı N, Geçene S, *et al*. Targeting LC3 and Beclin-1 autophagy genes suppresses proliferation, survival, migration and invasion by inhibition of Cyclin-D1 and uPAR/Integrin β 1/ Src signaling in triple negative breast cancer cells [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2018, 144(3): 415-430.
- [20] Gao J, Chen S, Qiu Z, *et al*. Myricitrin ameliorates ethanol-induced steatosis in mouse AML12 liver cells by activating AMPK, and reducing oxidative stress and expression of inflammatory cytokines [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(5): 7381-7387.
- [21] Yang P, Ling L, Sun W, *et al*. Ginsenoside Rg1 inhibits apoptosis by increasing autophagy via the AMPK/mTOR signaling in serum deprivation macrophages [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2018, 50(2): 144-155.

【责任编辑 刘东博】