



DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2022.02.07

文章编号: 2095-1264(2022)02-0183-08

## 木犀草素逆转宫颈癌细胞对阿霉素耐药性的机制研究

许一诺<sup>1</sup>, 唐 姣<sup>1</sup>, 任诗帆<sup>1</sup>, 易宇凌<sup>2\*</sup>

(湖南省妇幼保健院<sup>1</sup>妇产科, <sup>2</sup>急诊科, 湖南长沙, 410008)

**摘要:** **目的** 探讨木犀草素(Lut)逆转宫颈癌对阿霉素(Dox)耐药性的效应及其机制。**方法** 建立Dox耐药的宫颈癌HeLa/Dox细胞株,利用Dox、Lut单独或联合作用于细胞,分为control组、Dox组、Lut组、Dox+Lut组,检测各组细胞存活率及凋亡率。构建小鼠移植瘤模型,经腹腔注射3 mg·kg<sup>-1</sup> Dox和/或5 mg·kg<sup>-1</sup> Lut,检测小鼠肿瘤生长情况及肿瘤中相关蛋白的表达。**结果** (1) CCK-8检测结果显示,Dox+Lut组细胞的生长活性明显受到抑制,存活率显著低于Dox组和Lut组( $P<0.01$ )。细胞克隆形成实验显示出与CCK-8实验相似的细胞生长趋势。流式细胞术检测结果显示,Dox单药对HeLa/Dox细胞的凋亡无明显促进作用,而Lut单药可显著诱导HeLa/Dox细胞凋亡。(2) Dox单药对HeLa/Dox细胞迁移的影响较小( $P<0.05$ ),而Lut单药处理的HeLa/Dox细胞迁移数目明显减少,Dox与Lut联合应用对HeLa/Dox细胞迁移能力的抑制作用最强( $P<0.01$ )。(3)与对照组相比,Dox组、Lut组、Dox+Lut组HeLa/Dox细胞中PI3K、Cleaved caspase-3蛋白表达均显著上调,p-Akt、p-mTOR、p70S6K蛋白表达显著下调( $P<0.05$ ),且Dox+Lut组蛋白表达水平变化最为显著。(4)对照组、Dox组、Lut组、Dox+Lut组小鼠肿瘤体积分别为(1265.8±123.3)mm<sup>3</sup>、(456.4±68.7)mm<sup>3</sup>、(479.9±57.2)mm<sup>3</sup>、(108.1±14.0)mm<sup>3</sup>,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。联合应用Dox和Lut后,肿瘤组织中PI3K和Cleaved caspase-3的表达显著上调( $P<0.01$ ),而p70S6K和Ki-67的表达显著下调( $P<0.01$ )。**结论** Lut可通过调节PI3K/Akt信号通路的活性逆转宫颈癌细胞对阿霉素的耐药性,从而抑制肿瘤细胞的增殖和转移,并促进其凋亡。

**关键词:** 宫颈癌;阿霉素;木犀草素;耐药性

**中图分类号:** R737.3 **文献标识码:** A

## Luteolin reverses doxorubicin resistance in cervical cancer by regulating PI3K/Akt signaling pathway

XU YINUO<sup>1</sup>, TANG JIAO<sup>1</sup>, REN SHIFAN<sup>1</sup>, YI YULING<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, <sup>2</sup> Department of Emergency, Hunan Maternity and Child Health Hospital, Changsha, Hunan, 410008, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects and mechanism of luteolin (Lut) in reversing doxorubicin (Dox) resistance of cervical cancer. **Methods** Dox-resistant HeLa/Dox cell line was established, and the HeLa/Dox cells were divided into control group, Dox group, Lut group, Dox+Lut group after treated with Dox or/and Lut to detect the survival rate and apoptosis rate. The model of transplanted tumor in mice was established, and they were treated with 3 mg·kg<sup>-1</sup> Dox or/and 5 mg·kg<sup>-1</sup> Lut. Detect the growth of the tumor in mice and the changes of related proteins in tumor. **Results** (1) The results of CCK-8 assay showed that the cell growth of Dox+Lut group was significantly inhibited and its survival rate was lower than that of the Lut group and Dox group ( $P<0.01$ ). Cell clone formation experiments showed a similar trend of cell growth as CCK-8 assay. Flow cytometry showed that Dox alone did not promote the apoptosis of HeLa/Dox cells, but Lut alone

作者简介:许一诺,女,硕士,住院医师,研究方向:妇科肿瘤。

\*通信作者:易宇凌,女,硕士,副主任医师,研究方向:妇科肿瘤。

could significantly cause the apoptosis of HeLa/Dox cells. (2) Dox alone showed few effects on the migration of HeLa/Dox cells ( $P<0.05$ ), while Lut alone significantly inhibited the migration of HeLa/Dox cells. Dox combined with Lut showed the strongest inhibitory effects on HeLa/Dox cell migration ( $P<0.01$ ). (3) Compared with the control group, the expressions of PI3K and cleaved caspase-3 proteins in Dox group, Lut group and Dox+Lut group were up-regulated. The expression levels of PI3K and cleaved caspase-3 proteins in Dox+Lut group were the highest. The protein expressions of p-Akt, p-mTOR and p70S6K proteins was significantly decreased in Dox+Lut group ( $P<0.05$ ). (4) The tumor volume of control group, Dox group, Lut group and Dox+Lut group were respectively  $(1265.8\pm123.3) \text{ mm}^3$ ,  $(456.4\pm68.7) \text{ mm}^3$ ,  $(479.9\pm57.2) \text{ mm}^3$  and  $(108.1\pm14.0) \text{ mm}^3$ , with statistical differences ( $P<0.05$ ). Immunohistochemistry showed that the expression of PI3K and cleaved caspase-3 increased significantly in Dox+Lut group ( $P<0.01$ ), while the expression of P70S6K and Ki-67 decreased significantly ( $P<0.01$ ). **Conclusion** Lut can reverse the drug resistance of cervical cancer cells to doxorubicin by regulating the activity of PI3K/Akt signaling pathway, and inhibit the proliferation and metastasis and promote the apoptosis of tumor cells.

**Keywords:** Cervical cancer; Doxorubicin; Luteolin; Drug resistance

## 前言

宫颈癌是全球最常见的恶性肿瘤之一,也是我国女性癌症相关死亡的第二大常见原因<sup>[1]</sup>。尽管宫颈癌的治疗在过去几十年中取得了长足进步,但其治疗结果在很大程度上仍然取决于肿瘤特异性的分子特征<sup>[2]</sup>。木犀草素(luteolin, Lut)是一种天然黄酮类化合物,存在于多种植物中,具有多种药理活性,如抗炎、抗过敏、降尿酸、抗肿瘤、抗菌、抗病毒等<sup>[3]</sup>。虽然大量临床前研究已揭示 Lut 在不同方面的生物学效应,但其在临床治疗中的广泛应用仍具有挑战性<sup>[4]</sup>。阿霉素(doxorubicin, Dox)是一种高效抗肿瘤药物,广泛应用于肾癌、肝细胞癌、胶质瘤等多种肿瘤的治疗<sup>[5]</sup>。临床试验证明,Dox 会导致一系列不良反应,给接受传统 Dox 依赖方案化疗的患者带来负面影响。而化疗耐药是许多宫颈癌患者治疗失败或死亡的重要原因<sup>[6]</sup>。Hu 等<sup>[7]</sup>证实,Dox 获得性耐药可促进乳腺癌细胞的迁移和侵袭,而 Lut 可通过调节 PTEN/Akt 信号通路抑制上皮-间充质转化,发挥逆转乳腺癌对 Dox 耐药的作用。但 Lut 在宫颈癌中的作用机制目前尚不清楚。因此,本研究旨在探讨 Lut 逆转宫颈癌对 Dox 耐药的效应及其机制,以期优化临床治疗方案提供更多依据。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞、动物、试剂和仪器** 人宫颈癌 HeLa、C33A 细胞系购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库(上海)。40 只 SPF 级 BALB/c 小鼠购自中国科学院动物研究所(实验动物生产许可证号:SCXK(京)2018-0005)。胎牛血清和 Dulbecco 改良

Eagle 培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)购自上海源叶生物科技有限公司,CCK-8 试剂盒、Transwell 小室、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒均购自美国 Sigma 公司。磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)、蛋白激酶 B(Akt)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)、p70 核糖体蛋白 S6 激酶(p70 ribosomal protein S6 kinase, p70S6K)和活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Cleaved caspase-3)蛋白均购自美国 Invitrogen 公司。CP-ST50A 型细胞培养箱购自长沙长锦科技有限公司,JC-XSP-A 光学显微镜购自河南秋佐仪器设备有限公司,JY300 型电泳仪购自无锡久平仪器有限公司,NovoCyte 1040 型流式细胞仪购自艾米森生物科技有限公司。

**1.2 Dox 耐药宫颈癌细胞系的构建** 所有细胞均用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养,在 37 ℃、含 5% CO<sub>2</sub> 的潮湿条件下孵育。在 HeLa 细胞株的基础上建立 Dox 耐药表型 HeLa/Dox 细胞株,采用 DMEM 稀释法测定 Dox 浓度对 HeLa 细胞耐药表型的影响。将 HeLa 细胞以  $1\times10^5$  个/mL 接种于不含 Dox 的 DMEM 培养基中培养 24 h,收集对数生长期细胞,用含低剂量 Dox( $0.125 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )的培养基替换原培养液。丢弃废液,将收集的细胞重新接种至不含 Dox 的 DMEM 培养基中,增加 Dox 的浓度。在下次 Dox 干预前使用无 Dox 培养基恢复细胞。如 HeLa 细胞能在高浓度 Dox( $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )作用下存活,即表示 Dox 耐药 HeLa 细胞系构建成功。将细胞株在无药 DMEM 培养基中保存 2 天后,进行后续实验。

**1.3 CCK-8 检测及细胞集落形成实验** 采用 CCK-8 法检测不同浓度 Dox( $0.5$ 、 $1$ 、 $2$ 、 $4$ 、 $8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )

或 Lut (10、20、50、100、200  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 对 HeLa 细胞和 C33A 细胞活性的影响。将约  $1\times 10^4$  个细胞接种于 96 孔板中,培养 24 h 后,加入不同剂量 Dox 或 Lut。每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液,孵育 2 h 后,在 450 nm 处测量光密度(optical density, OD)值,并绘制细胞生长曲线。细胞集落形成实验:将细胞置于 6 孔板中培养 48 h,胰酶消化,调整细胞密度为  $3\times 10^2$  个/孔,置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中无药培养 2 周,10% 甲醇溶液固定,0.1% 结晶紫染色,置于显微镜下观察并拍照。

**1.4 划痕实验及 Transwell 实验** 划痕实验:将 HeLa 细胞和 HeLa/Dox 细胞接种于 6 孔板,根据不同的药物处理情况分组。当细胞完全铺满培养皿时,使用 10  $\mu\text{L}$  无菌枪头尖端划痕,置于含不同剂量 Dox 和/或 Lut 的 DMEM 培养基中培养,分别于 0 h、24 h、48 h 使用倒置显微镜拍摄细胞愈合图像。Transwell 实验:用 Dox 和/或 Lut 处理 HeLa 细胞和 HeLa/Dox 细胞 48 h 后,将约  $8\times 10^4$  个细胞悬液接种至无血清 DMEM 培养基,加入 Transwell 上室,下室加入完全培养基,上下室之间用聚碳酸酯膜隔开。孵育 36 h 后,用 10% 甲醇溶液固定细胞,0.1% 结晶紫染色,随机选择 3 个视野拍摄下室细胞并计数。

**1.5 流式细胞术检测细胞凋亡** 采用 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测细胞凋亡。用不含乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetra-acetic acid, EDTA)的胰蛋白酶消化干预前后的细胞,然后用预冷的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)清洗 2 次,结合缓冲液悬浮细胞,37  $^{\circ}\text{C}$  黑暗环境下采用 Annexin-V-FITC 和 PI 连续双染 15 min, FACSCanto II 流式细胞仪分析细胞凋亡情况。

**1.6 Western blotting 检测蛋白表达** 收集约  $1\times 10^5$  个 HeLa/Dox 细胞,用预冷的 PBS 洗涤后,加入裂解缓冲液裂解细胞。将裂解产物在 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下以  $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 15 min, BCA 蛋白分析试剂盒测定总蛋白浓度。总蛋白经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离后转移至 PVDF 膜,5% BSA 封闭液封闭,加入抗 PI3K、抗 Akt、抗磷酸化 Akt (p-Akt)、抗 mTOR、抗 p-mTOR、抗 p70S6K 和抗 Cleaved caspase-3 (稀释浓度均为 1:500) 抗体孵育过夜,然后加入辣根过氧化物酶连接的二抗孵育 3 h。TBST 缓冲液洗涤, ECL 发光显影。采用 Image J 软件对图像进行分析。

**1.7 小鼠肿瘤模型构建及干预** 实验开始前至少 1 周,将小鼠安置在温度( $23\pm 2$ )  $^{\circ}\text{C}$ 、12 h 光照/黑暗周期交替、湿度 50%~60% 的动物饲养笼中。所有动物实验程序均严格按照实验动物相关规程进行。

将  $1\times 10^7$  个 HeLa/Dox 细胞接种于小鼠左侧腹股沟皮下。2 周后,将小鼠随机分为四组,每组 10 只。具体分组如下:(1)阴性对照组:注射同等体积生理盐水;(2)Dox 组:经腹腔注射  $3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Dox;(3)Lut 组:经腹腔注射  $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Lut;(4)Dox+Lut 组:同时注射 Dox 及 Lut,剂量同上。Dox 溶于 NaCl 溶液,Lut 用 10% 二甲基亚砜稀释。每 3 d 给药 1 次,持续 27 d。肿瘤体积计算公式: $V(\text{mm}^3)=1/2\times\text{长}\times\text{宽}\times\text{高}$ 。用卡尺测量裸鼠肿瘤的长度、宽度及高度,每周 1 次。最后处死所有小鼠,收集肿瘤组织进行免疫组织化学分析。

**1.8 免疫组化染色** 将肿瘤组织用 4% 福尔马林固定,连续切成 3 mm 厚的切片,二甲苯脱蜡,乙醇梯度脱水,去离子水冲洗,然后在 pH 8.0 的 Tris-EDTA 溶液中加热 10 min,回收组织抗原,3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液封闭,加入一抗(1:200)孵育,PBS 洗涤 3 次,加入二抗孵育 3 h,用新制备的二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)试剂盒初染,苏木精复染。显微镜下观察组织切片,并使用图像处理软件进行图像采集和分析。

**1.9 统计学分析** 采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。每个实验至少独立重复 3 次,计量资料用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组数据比较采用非配对  $t$  检验,三组或多组间比较采用方差分析, $P<0.05$  认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Dox 和 Lut 对宫颈癌细胞系生长的影响** Dox 对 HeLa 细胞存活率有明显的抑制作用,且呈剂量和时间依赖性( $P<0.05$ );但 Dox 浓度达到  $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时对 C33A 细胞存活率无明显抑制作用( $P>0.05$ ) (图 1A)。Lut 对 HeLa 细胞存活率有抑制作用,随着 Lut 处理时间和浓度的增加,细胞抑制率也随之上升( $P<0.05$ );但在  $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  或更低浓度范围内,Lut 对 C33A 细胞存活率的抑制作用无时间依赖性( $P>0.05$ ) (图 1B)。由此可见,HeLa 细胞对 Dox 和 Lut 均有较高的敏感性,可作为后续实验的对象。

**2.2 HeLa/Dox 细胞的 Dox 抗性鉴定** 进一步验证 HeLa 细胞和 HeLa/Dox 细胞对 Dox 的抗性差异,测定



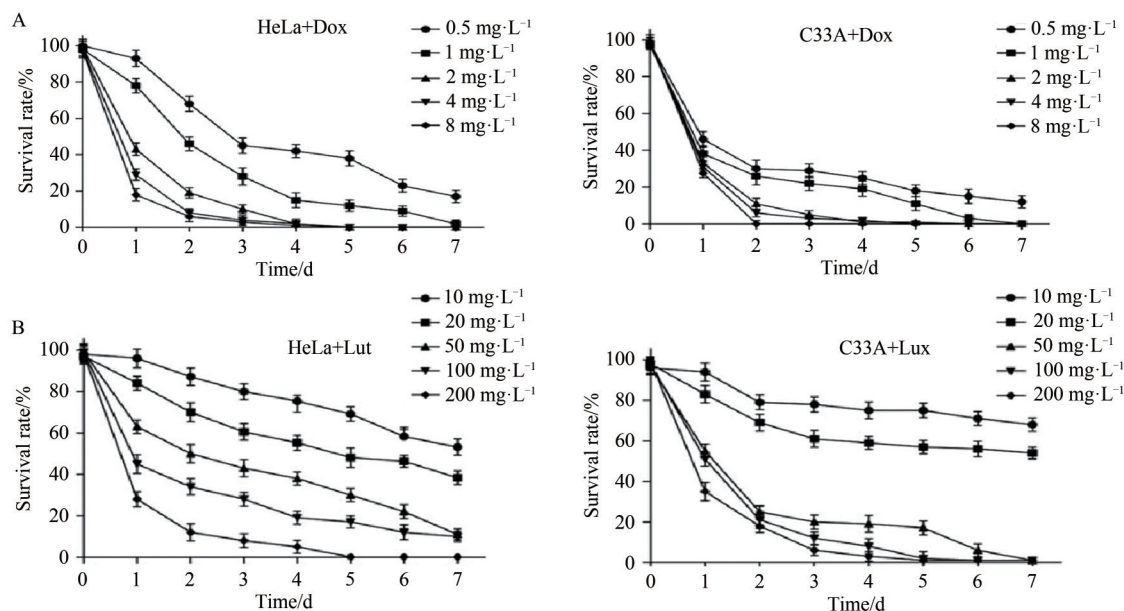
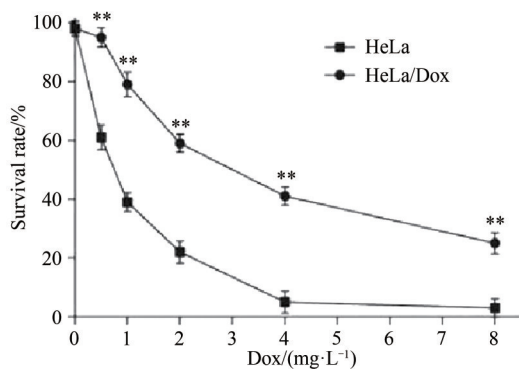


图 1 阿霉素和木犀草素对宫颈癌细胞株生长的影响  
Fig. 1 Effects of doxorubicin and luteolin on the growth of cervical cancer cell lines

两种细胞经不同剂量 Dox 处理后的半数抑制浓度 (50% inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)。结果显示, HeLa 细胞的 IC<sub>50</sub> 值为 0.982 4 mg·L<sup>-1</sup>, 而 HeLa/Dox 细胞的 IC<sub>50</sub> 值为 2.895 3 mg·L<sup>-1</sup>, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 提示 HeLa/Dox 细胞较 HeLa 细胞具有更强的 Dox 抗性 (图 2), 表明 Dox 耐药细胞系构建成功, 可用于进一步实验研究。



注: 与 HeLa 细胞比较, \*\* $P < 0.01$ 。

Note: Compared with HeLa cells, \*\* $P < 0.01$ .

图 2 HeLa/Dox 细胞阿霉素抗性鉴定

Fig. 2 Identification of doxorubicin resistance in HeLa/Dox cells

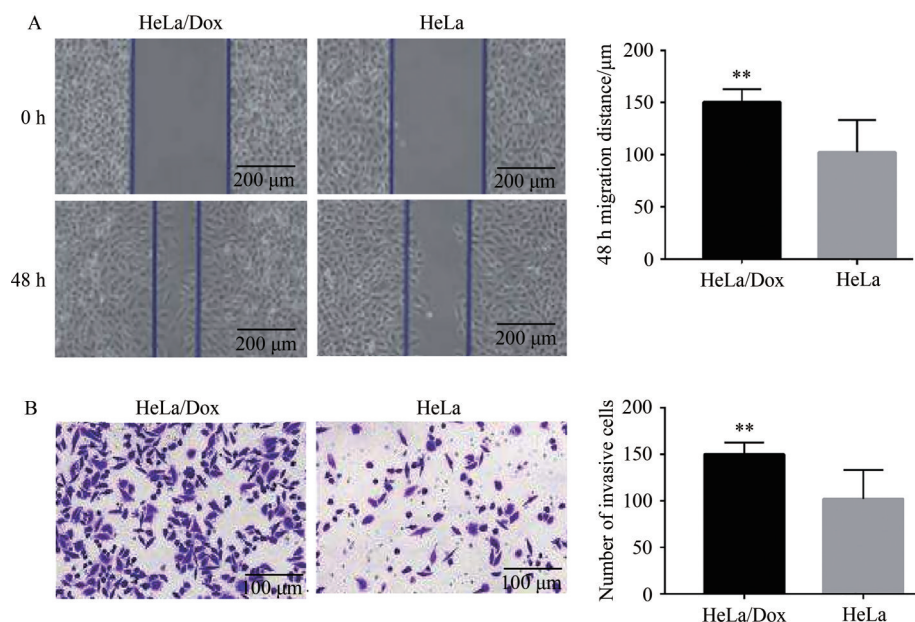
**2.3 HeLa/Dox、HeLa 细胞迁移、侵袭能力比较** HeLa/Dox 细胞与 HeLa 细胞的划痕宽度分别为 (102.35±31) μm、(150.74±12.26) μm, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ) (图 3A)。HeLa/Dox 细胞与 HeLa 细胞的侵袭细胞数目分别为 (684±46) 个、(372±33)

个, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ) (图 3B)。

**2.4 HeLa/Dox、HeLa 细胞 PI3K/Akt/mTOR 信号通路活性比较** 与 HeLa 细胞相比, HeLa/Dox 细胞 p70S6K、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达水平明显升高, Cleaved caspase-3 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ ) (图 4)。

**2.5 Lut 对 HeLa/Dox 细胞生长的影响** 分别将 1 mg·L<sup>-1</sup> Dox、10 mg·L<sup>-1</sup> Lut 单独或联合作用于 HeLa/Dox 细胞。Dox+Lut 组细胞存活率最低 ( $P < 0.01$ ), Lut 组细胞存活率明显低于 Dox 组 ( $P < 0.01$ ) (图 5A)。细胞克隆形成实验结果显示与 CCK-8 实验结果相似的生长趋势。Dox 组细胞集落数略有减少, 而 Lut 组细胞集落数明显减少, Dox+Lut 组细胞增殖能力显著受到抑制 ( $P < 0.01$ ) (图 5B)。与对照组相比, Dox 组细胞凋亡无明显变化 ( $P > 0.05$ ), Lut 组、Dox+Lut 组细胞凋亡显著 ( $P < 0.01$ ) (图 5C), 表明 1 mg·L<sup>-1</sup> Dox 联合 10 mg·L<sup>-1</sup> Lut 可协同诱导 HeLa/Dox 细胞凋亡。

**2.6 Lut 对 HeLa/Dox 细胞迁移、侵袭的影响** Dox 对 HeLa/Dox 细胞迁移的抑制作用不明显 ( $P > 0.05$ ), 而 Lut 可显著抑制 HeLa/Dox 细胞的迁移, Dox 与 Lut 联用对 HeLa/Dox 细胞迁移的抑制作用最强 ( $P < 0.01$ ) (图 6A)。各组侵袭细胞数目从高到低依次为 Dox 组、对照组、Lut 组、Dox+Lut 组 (图 6B), 表明 Lut 可恢复 HeLa/Dox 细胞对 Dox 的敏感性, 抑制其增殖, 并诱导其凋亡。

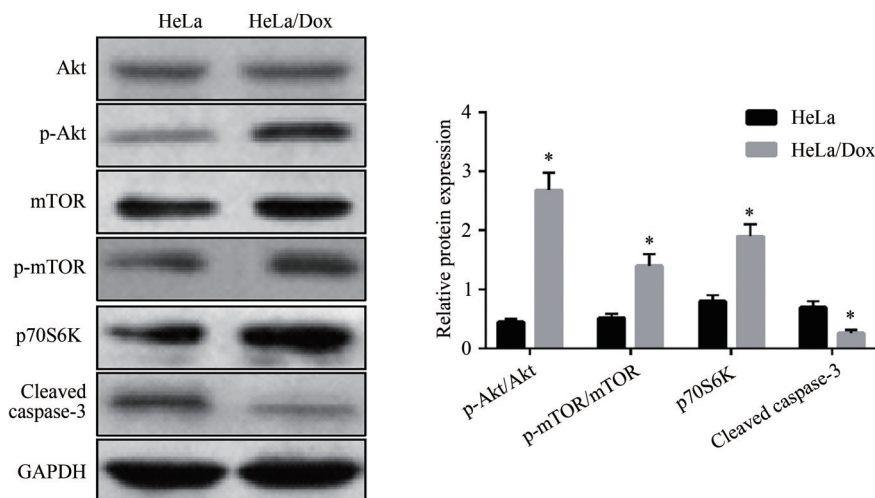


注: 与 HeLa 细胞比较, \*\* $P < 0.01$ 。

Note: Compared with HeLa cells, \*\* $P < 0.01$ .

图 3 HeLa/Dox 与 HeLa 细胞迁移能力、侵袭能力比较

Fig. 3 Comparison of migration and invasion between HeLa/Dox and HeLa cells



注: 与 HeLa 细胞比较, \* $P < 0.05$ 。

Note: Compared with HeLa cells, \* $P < 0.05$ .

图 4 HeLa/Dox 与 HeLa 细胞 PI3K/Akt/mTOR 信号通路活性比较

Fig. 4 Comparison of PI3K/Akt/mTOR pathway activity between HeLa/Dox and HeLa cells

**2.7 Lut 对 HeLa/Dox 细胞 PI3K/Akt 信号通路的影响** 与对照组相比, Dox 组、Lut 组、Dox+Lut 组细胞 PI3K 蛋白表达水平显著上升 ( $P < 0.05$ ), 且 Dox+Lut 组 PI3K 蛋白表达水平最高 ( $P < 0.01$ )。Dox 和 Lut 联合作用可使 Cleaved caspase-3 蛋白表达显著上调, p-Akt、p-mTOR、p70S6K 蛋白表达显著下调 ( $P < 0.05$ ) (图 7), 提示 Lut 与 Dox 联合应用可抑制 Akt 和 mTOR 磷酸化, 降低 PI3K/Akt 信号通路活性, 表明

Lut 可通过上调 PI3K 表达抑制 Akt 信号通路的激活。

**2.8 Lut 与 Dox 对肿瘤生长的协同抑制作用** 对照组、Dox 组、Lut 组、Dox+Lut 组小鼠肿瘤体积分别为 ( $1265.8 \pm 123.3$ )  $\text{mm}^3$ 、( $456.4 \pm 68.7$ )  $\text{mm}^3$ 、( $479.9 \pm 57.2$ )  $\text{mm}^3$ 、( $108.1 \pm 14.0$ )  $\text{mm}^3$ , 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 表明 Dox 和 Lut 对肿瘤增殖均具有抑制作用, 二者联合可产生协同抑制效应, 使肿瘤体积明

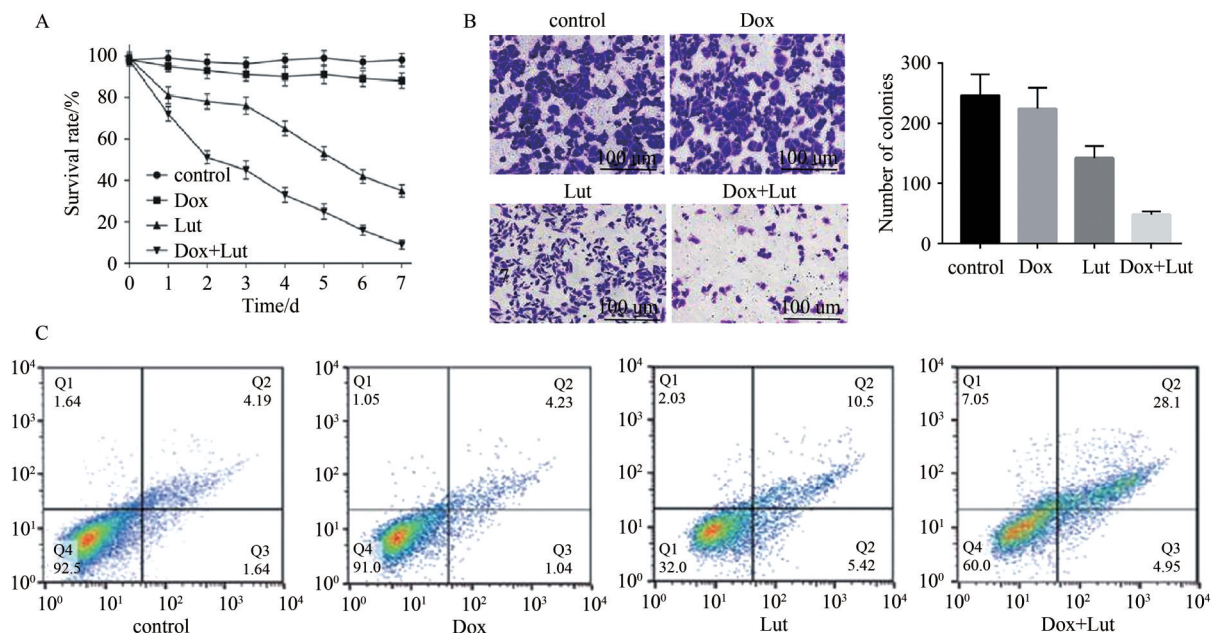


图 5 木犀草素对 HeLa/Dox 细胞株的影响  
 Fig. 5 Effects of luteolin on HeLa/Dox cell line

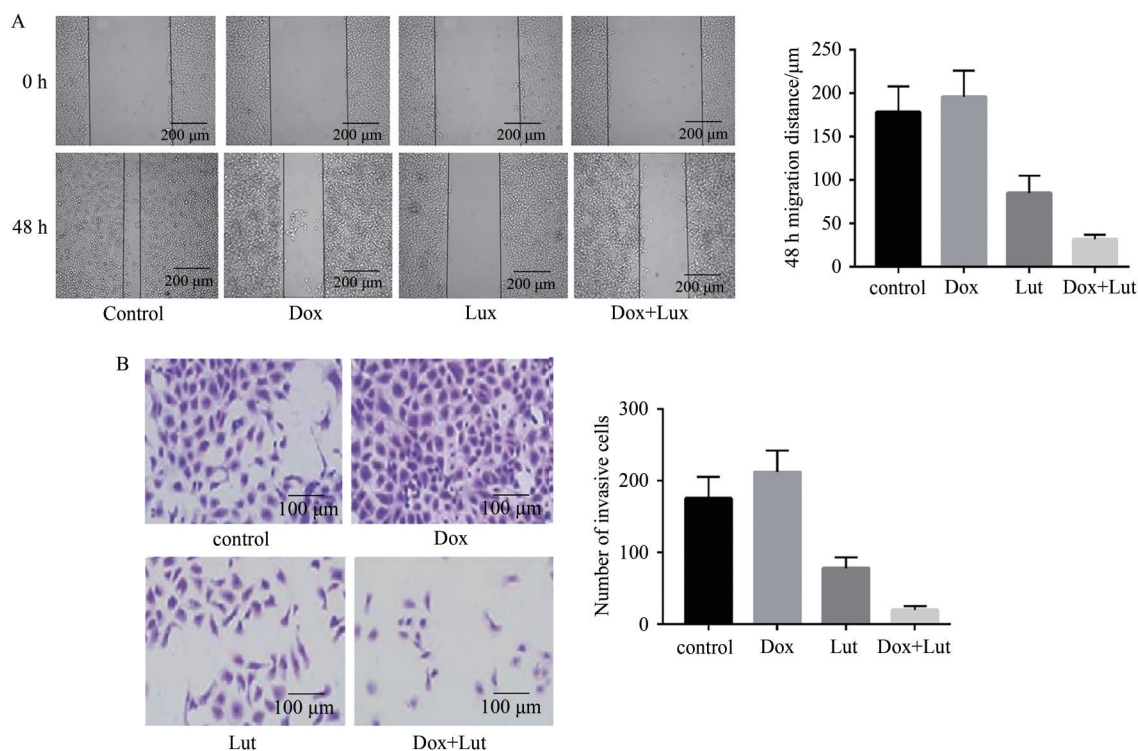


图 6 木犀草素对 HeLa/Dox 细胞迁移/侵袭能力影响  
 Fig. 6 Effects of luteolin on migration/invasion of HeLa/DOX cells

显缩小( $P<0.01$ )。联合应用 Dox 和 Lut 后,小鼠肿瘤组织中 PI3K 和 Cleaved caspase-3 表达水平显著上升( $P<0.01$ ),而 p70S6K 和 Ki-67 表达水平显著降低( $P<0.01$ )(图 8)。

## 4 讨论

宫颈癌是一种恶性程度较高的肿瘤,其发病率在全球范围内呈逐年上升趋势。化疗是宫颈癌的综合治疗手段之一,尤其是在晚期宫颈癌患者中,



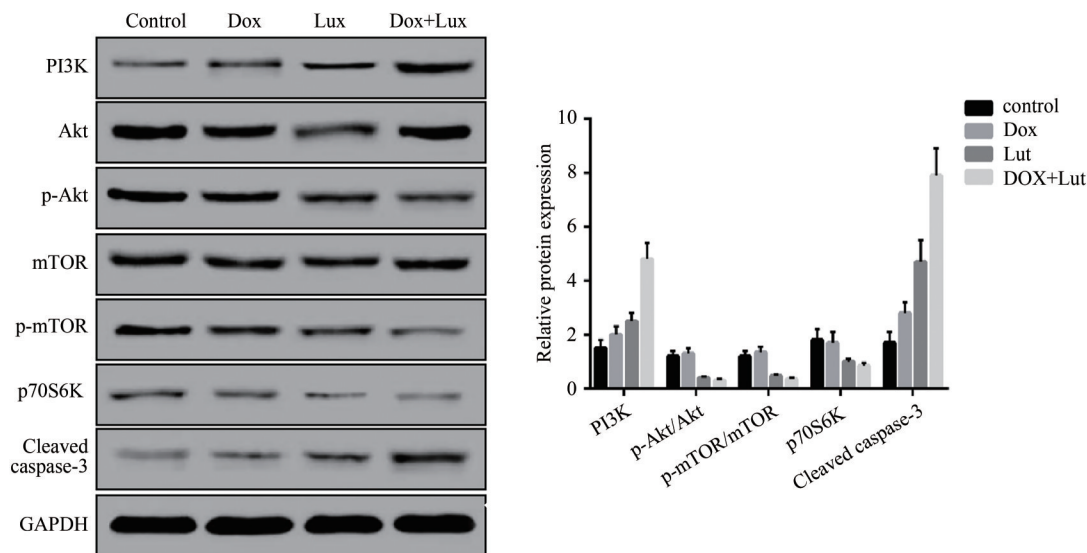
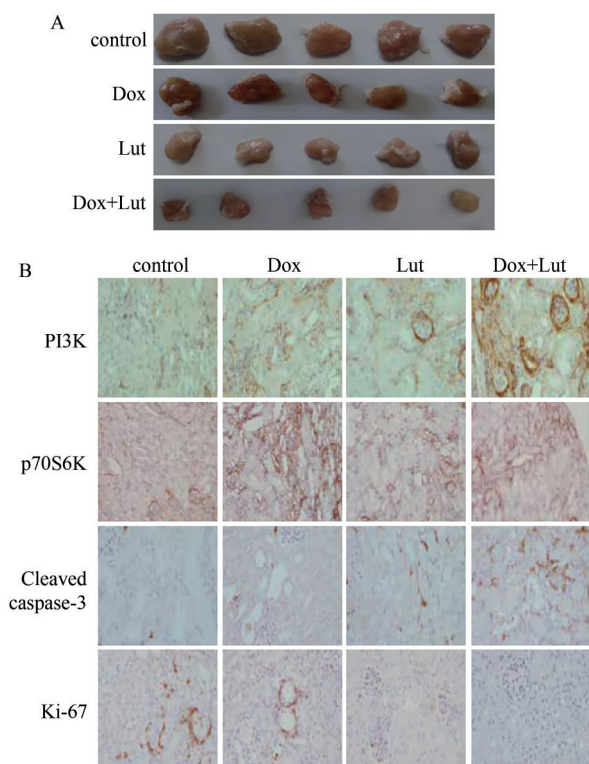


图 7 木犀草素对 HeLa/Dox 细胞 PI3K/Akt 信号通路活性影响  
Fig. 7 Effects of luteolin on PI3K/Akt signaling pathway in HeLa/Dox cells



注:免疫组化染色倍数(×200)。

Note: Immunohistochemical staining times (×200).

图 8 木犀草素与阿霉素对体内肿瘤生长的协同抑制作用

Fig. 8 Synergistic inhibitory effect of luteolin and doxorubicin on tumor growth *in vivo*

介导的肿瘤细胞外排药物增加、细胞凋亡机制异常、肿瘤细胞中一些酶的活性改变等,皆可降低肿瘤细胞对化疗药物的敏感性<sup>[9]</sup>。

本研究探讨了 Dox 在宫颈癌中的作用机制,并检测了 Dox 耐药性宫颈癌细胞的生物学行为,在进行细胞系筛选时选择人宫颈癌细胞系 HeLa、C33A 作为研究对象。HeLa 细胞是第一个来自人体组织并通过连续培养维持非整倍体的上皮样细胞系,属于宫颈腺癌,其角蛋白表达阳性,p53 表达量较低,视网膜母细胞瘤蛋白(retinoblastoma protein, pRb)表达正常。与其他肿瘤细胞株相比,HeLa 细胞具有不衰老致死、可无限分裂、增殖异常迅速、感染性极强等特点。C33A 细胞属于宫颈鳞癌细胞,在培养初期表现出亚二倍体核型及上皮细胞形态,经连续传代可观察到核型不稳定。C33A 细胞中也存在一定表达量的 pRb,且 p53 表达明显上调。本研究结果显示,DOX 及 Lut 可呈剂量和时间依赖性抑制 HeLa 细胞增殖,而 Lut 不能以剂量和时间依赖性降低 C33A 细胞的存活率。因此,我们选择 HeLa 细胞作为后续研究对象。HeLa 细胞为宫颈腺癌细胞,HPV 表达阳性,C33A 为宫颈鳞癌细胞,HPV 表达阴性,二者均是宫颈癌研究中常用的细胞系。但肿瘤属于异质性、多态性、分化不均的细胞群体,临床经常发现同一组织学类型的肿瘤对同一化疗药物的敏感性存在显著差异,且肿瘤多药耐药现象普遍存在,可直接影响化疗效果。CCK-8 检测结果表明,DOX 可抑制肿瘤细胞增殖,并促进其凋亡。DOX 的抗

化疗可通过抑制肿瘤细胞的扩散和转移,在一定程度上延长其生存期<sup>[8]</sup>。然而,化疗耐药一直是困扰临床医生的难题,更是导致许多患者治疗失败甚至死亡的重要原因。化疗耐药的机制复杂,转运蛋白

肿瘤作用可因细胞长期暴露于梯度浓度药物中而逐渐减弱,因此,本研究成功地以 HeLa 细胞为基础培养了 Dox 耐药细胞 HeLa/Dox。Zhang 等<sup>[10]</sup>证实,五味子可通过抑制 p65 和 STAT3 的磷酸化,逆转 Dox 耐药的人宫颈癌细胞株。目前已发现多条信号通路参与宫颈癌的形成、生长和转移,一些通路蛋白通常被认为是潜在的治疗靶点,例如,干扰 Fas 信号可阻断宫颈癌相关炎症反应,从而抑制肿瘤生长和转移<sup>[11]</sup>。有研究表明,NF- $\kappa$ B 信号通路是宫颈癌预防和治疗的靶点<sup>[12]</sup>。此外,PI3K/Akt、AMPK、雌激素受体、mTOR、HER2、IGF1R 等也已被确认为宫颈癌的治疗靶点。

多重耐药是影响化疗疗效的主要障碍。Lut 是一种天然产物,也是一种潜在的多重耐药调节剂。负载 Dox-Lut 的纳米粒已经显示出克服 Dox 耐药性的作用<sup>[13]</sup>。相关研究表明,在乳腺癌中,Dox 与 Lut 联合治疗可显著增强 Dox 诱导的耐药性细胞的化疗敏感性,从而发挥协同效应<sup>[14]</sup>。本研究证实了 Lut 可通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路逆转宫颈癌细胞对 Dox 耐药的假设。在该信号通路中,磷酸化 Akt 可激活 mTOR,导致 p70S6K 磷酸化<sup>[15]</sup>。因此,Lut 干预可下调 PI3K/Akt 信号通路活性,抑制细胞增殖和迁移,并恢复 HeLa/Dox 细胞对 Dox 的敏感性。

综上所述,本研究通过长期递增剂量的 Dox 处理获得了 HeLa/Dox 细胞系,其特点是具有耐药性,且迁移能力显著增强。Lut 干预可恢复 HeLa/Dox 细胞对 Dox 的敏感性,在体外可促进其凋亡,在体内可抑制其增殖。此外,本研究还证实,Lut 可通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路活性和上调促凋亡蛋白 Cleaved caspase-3 表达,影响宫颈癌对 Dox 的耐药性,有望为减轻 Dox 化疗对宫颈癌患者的副作用提供治疗依据。

## 参考文献

- [1] STEWART C J R, KOAY M H E, LESLIE C, et al. Cervical carcinomas with a micropapillary component: a clinicopathological study of eight cases [J]. Histopathology, 2018, 72(4): 626–633. DOI: 10.1111/his.13419.
- [2] LIU G Y. CDH1 promoter methylation in patients with cervical carcinoma: a systematic meta-analysis with trial sequential analysis [J]. Future Oncol, 2018, 14(1): 51–63. DOI: 10.2217/fon-2017-0267.
- [3] YAO Z H, YAO X L, ZHANG Y, et al. Luteolin could improve cognitive dysfunction by inhibiting neuroinflammation [J]. Neurochem Res, 2018, 43(4): 806–820. DOI: 10.1007/s11064-018-2482-2.
- [4] CHEN T J, LI B, XU Y, et al. Luteolin reduces cancer-induced skeletal and cardiac muscle atrophy in a Lewis lung cancer mouse model [J]. Oncol Rep, 2018, 40(2): 1129–1137. DOI: 10.3892/or.2018.6453.
- [5] DONG D W, GAO W, LIU Y J, et al. Therapeutic potential of targeted multifunctional nano complex co-delivery of siRNA and low-dose doxorubicin in breast cancer [J]. Cancer Lett, 2015, 359(2): 178–186. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.01.011.
- [6] SHARMA A, DE R, JAVED S, et al. Sonic hedgehog pathway activation regulates cervical cancer stem cell characteristics during epithelial to mesenchymal transition [J]. J Cell Physiol, 2019; 234(9): 15726–15741. DOI: 10.1002/jcp.28231.
- [7] HU G N, ZHAO X K, WANG J, et al. miR-125b regulates the drug-resistance of breast cancer cells to doxorubicin by targeting HAX-1 [J]. Oncol Lett. 2018, 15(2): 1621–1629. DOI: 10.3892/ol.2017.7476.
- [8] KOLEINI N, KARDAMI E. Autophagy and mitophagy in the context of doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. Oncotarget, 2017, 8(28): 46663–46680. DOI: 10.18632/oncotarget.16944.
- [9] LIU G W, LIU Y H, JIANG G S, et al. The reversal effect of Ginsenoside Rh2 on drug resistance in human colorectal carcinoma cells and its mechanism [J]. Hum Cell, 2018, 31(3): 189–198. DOI: 10.1007/s13577-017-0189-3.
- [10] ZHANG Z L, JIANG Q C, WANG S R. Schisandrin A reverses doxorubicin-resistant human breast cancer cell line by the inhibition of P65 and Stat3 phosphorylation [J]. Breast Cancer, 2018, 25(2): 233–242. DOI: 10.1007/s12282-017-0821-9.
- [11] ZHAN Y Z, ZHANG H, DAI B L, et al. A novel biphenyl urea compound, TPD7, stimulates apoptosis through modulating Fas signaling and Bcl-2 family proteins in cervical cancer [J]. Oncol Rep, 2018, 40(2): 1064–1072. DOI: 10.3892/or.2018.6472.
- [12] SUN Q M, HU B, FU P Y, et al. Long non-coding RNA 00607 as a tumor suppressor by modulating NF- $\kappa$ B p65/p53 signaling axis in hepatocellular carcinoma [J]. Carcinogenesis, 2018, 39(12): 1438–1446. DOI: 10.1093/carcin/bgy113.
- [13] REJINOLD N S, YOO J, JON S, et al. Curcumin as a novel nanocarrier system for doxorubicin delivery to MDR cancer cells: *in vitro* and *in vivo* evaluation [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2018, 10(34): 28458–28470. DOI: 10.1021/acsami.8b10426.
- [14] PARK Y Y, JUNG S Y, JENNINGS N B, et al. FOXM1 mediates Dox resistance in breast cancer by enhancing DNA repair [J]. Carcinogenesis, 2012, 33(10): 1843–1853. DOI: 10.1093/carcin/bgs167.
- [15] AHMADI F, ZADEH M G, HABIBI A H, et al. Effect of resistance training with Spirulina platensis on PI3K/Akt/mTOR/p70S6k signaling pathway in cardiac muscle [J]. Sci Sports, 2020, 35(2): 91–98. DOI: 10.1016/j.scispo.2019.06.003.

收稿日期: 2020-08-18 校稿: 王娟 李征

**本文引用格式:** 许一诺, 唐姣, 任诗帆, 等. 木犀草素逆转宫颈癌细胞对阿霉素耐药性的机制研究[J]. 肿瘤药学, 2022, 12(2): 183–190. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2022.02.07.

**Cite this article as:** XU Yinu, TANG Jiao, REN Shifan, et al. Luteolin reverses doxorubicin resistance in cervical cancer by regulating PI3K/Akt signaling pathway [J]. Anti-tumor Pharmacy, 2022, 12(2): 183–190. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2022.02.07.