

得并发症发生率得以下降,可促进患儿康复。

〔参考文献〕

- (1) 张敏敏,刘存勇.经鼻间歇正压通气与经鼻持续气道正压通气治疗新生儿呼吸窘迫综合征的临床疗效比较(J).中国实用医药,2018,13(30):13-15.
- (2) 张志华.两种无创正压通气在新生儿呼吸窘迫综合征治疗中的应用研究(J).中国医学创新,2019,16(20):119-122.
- (3) 黄友清,麦华卓,罗有师,等.肺部超声与X线胸片在NRDS诊断中的优劣差异(J).现代医用影像学,2019,28(5):980-982.
- (4) 张靖.早期持续气道正压通气联合肺表面活性物质治疗新生儿呼吸窘迫综合征的效果及安全性分析(J).大医生,2019,4(15):71-72.
- (5) 舒先孝,陈超,唐军,等.气泡式与鼻塞式持续气道正压通气在早产儿呼吸窘迫综合征的疗效比较(J).中国当代儿科杂志,2018,20(6):433-437.
- (6) 郑增鑫,吴时光,张建华,等.鼻导管高流量加温湿化正压通气和经鼻持续正压通气治疗新生儿呼吸窘迫综合征疗效比较(J).中国医药科学,2018,8(20):64-67.

(文章编号) 1007-0893(2021)18-0010-03

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2021.18.004

## 南方红豆杉多糖对宫颈癌细胞增殖及凋亡的影响

宋 燕 于 杰

(广州医科大学附属中医医院,广东 广州 510000)

〔摘要〕 目的:探究南方红豆杉多糖对宫颈癌 HeLa 细胞株增殖、凋亡的影响及其作用机制。方法:经体外培养并取对数生长期人宫颈癌 HeLa 细胞,分别予以不同浓度红豆杉多糖(30、60、90、120  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),将其设为四组,并设对照组加入等量 0.9% 氯化钠溶液。应用 MTT 法检测细胞增殖情况,流式法检测细胞凋亡情况,Western blot 法检测 Survivin、Caspase-3、Bcl-2、P53 蛋白表达情况。结果:与对照组相比,30  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组、60  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组、90  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组、120  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组的宫颈癌 HeLa 细胞增殖抑制率、细胞凋亡率显著升高,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。P53 蛋白表达量明显升高,Survivin、Bcl-2、Caspase-3 蛋白水平显著降低,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论:南方红豆杉多糖可抑制宫颈癌 HeLa 细胞增殖,促进细胞凋亡,其作用机制可能与下调 Survivin、Bcl-2、Caspase-3 表达,上调 P53 表达有关。

〔关键词〕 宫颈癌; HeLa 细胞; 南方红豆杉多糖

〔中图分类号〕 R 737.3 〔文献标识码〕 A

### Effects of Taxus Chinensis Polysaccharide on Proliferation and Apoptosis of Cervical Cancer Cells

SONG Yan, YU jie

(The Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Guangzhou Medical University, Guangdong Guangzhou 510000)

〔Abstract〕 Objective To investigate the effect of Taxus chinensis polysaccharide on proliferation and apoptosis of cervical cancer HeLa cell line and its mechanism. Methods Human cervical cancer HeLa cells in logarithmic growth stage were cultured in vitro and treated with different concentrations of Taxus chinensis polysaccharide (30, 60, 90, 120  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) were divided into 4 groups, and the control group was added with the same amount of 0.9% sodium chloride solution. MTT assay was used to detect cell proliferation, flow cytometry was used to detect cell apoptosis, and Western blot was used to detect the expression of survivin, Caspase-3, Bcl-2 and p53 proteins. Results Compared with the control group, 30  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  group, 60  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  group, 90  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  group, 120  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  of the proliferation inhibition rate and apoptosis rate of HeLa cells were significantly increased ( $P < 0.05$ ). And the expression of p53 protein increased significantly, and the protein surface levels of Survivin, Bcl-2 and Caspase-3

〔收稿日期〕 2021-07-08

〔基金项目〕 广州市中医药和中西医结合科技项目资助课题(803109634039)

〔作者简介〕 宋燕,女,主治医师,主要研究方向是盆腔炎症性疾病。

decreased significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Taxus chinensis polysaccharide can inhibit the proliferation and promote apoptosis of cervical cancer HeLa cells. Its mechanism may be related to up regulating the expression of Survivin, Bcl-2 and Caspase-3 and down regulating the expression of p53.

**(Key Words)** Cervical carcinoma; HeLa cells; Taxus chinensis polysaccharide

红豆杉为世界公认的天然珍稀抗癌植物, 国内有 4 种及 1 个变种红豆杉, 其中南方红豆杉为国内分布最为广泛的一种红豆杉属植物变种。现代药理学研究发现<sup>[1]</sup>, 南方红豆杉的主要有效成分是紫杉醇、多糖类、黄酮等, 有抗肿瘤、增强免疫力、防治心肌梗死等多种作用。紫杉醇的抗癌效果已获得临床认可, 但由于红豆杉中紫杉醇含量极低, 且大多分布于树皮中, 被提取紫杉醇后的红豆杉大都被废弃, 造成极大的资源浪费。而且紫杉醇有较为严重的毒副作用, 患者机体极易出现耐药<sup>[2]</sup>。随着学者对抗肿瘤中药不断研究发现<sup>[3]</sup>, 南方红豆杉多糖对癌症治疗有较好的增效减毒效果, 但其具体作用机制尚未明确。

宫颈癌是妇科最常见的恶性肿瘤之一, 其发生发展与细胞凋亡机制的紊乱密切相关, 而细胞凋亡是受很多基因调控的过程, 如 Survivin、Bcl-2 家族、Caspase 家族、抗癌基因 P53 等均可影响癌症发生发展<sup>[4]</sup>。现为进一步探究南方红豆杉多糖治疗宫颈癌的作用及其机制, 本研究观察其对宫颈癌 HeLa 细胞 Survivin、Caspase-3、Bcl-2 及 P53 蛋白表达的影响, 具体报道如下。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料

人宫颈癌 HeLa 细胞株为哈尔滨弘博生物科技有限公司提供; 南方红豆杉多糖采用南京泽朗医药科技有限公司, 规格 10 mL:0.2 g。

### 1.2 仪器和试剂

酶联免疫检测仪 (美国 Bio Tek); 流式细胞仪 (美国 FACSCAN Becton Dickison); 自动酶标仪 (美国 Bio-Rad E2500); 细胞凋亡试剂盒、抗人 Caspase-3、Bcl-2、p53 等多克隆抗体均购自福州迈新公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 细胞培养** 人宫颈癌 HeLa 置于含有 10% 胎牛血清, 1% 青霉素、链霉素的 RPMI1640 培养液中, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度环境中培养。每日换液 1 次, 每隔 2~3 d 对其进行 1 次换代, 选择对数生长期细胞做下一步研究。

**1.3.2 MTT 法测定细胞增殖情况** 将处于对数生长期的细胞接种到 96 孔板中, 在温度 37 °C、湿度 50%、5% CO<sub>2</sub> 环境中孵育 24 h, 将原培养液吸出置于 RPMI1640 培养基, 分别加入 30、60、90、120 μmol·L<sup>-1</sup> 浓度的南方红豆杉多糖, 设立相应的药物处理组。另设对照组加入等量 0.9% 氯化钠溶液。每组均设立 5 个观察孔, 培养 72 h 后添加 20 μL MTT 溶液, 再培养 4 h, 添加 150 μL DMSO, 应用酶

标仪计算细胞增殖抑制率。

**1.3.3 流式法测定细胞凋亡** 细胞分组和处理方法同上, 各组细胞均添加 70% 冷乙醇混合, 用于细胞固定, 在 4 °C 环境孵育过夜后添加 2 μL RNAase 溶液, 将其加热处理 30 min, 添加碘化丙啶染色液, 应用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

**1.3.4 Western blot 法测定 Survivin、Caspase-3、Bcl-2、P53 蛋白表达** 先应用 BCA 法测定每份样品蛋白浓度。灌制 SDS-PAGE 胶进行电泳。然后进行转膜、封闭处理, 并添加 Bcl-2 蛋白一抗、二抗, 与化学发光试剂 A、B 混合, 孵于细胞膜上, 去掉残液, 应用显像仪使其显影, 并用 Quanti Scan 软件分析 Bcl-2 表达水平。同法检测其他蛋白指标。

### 1.4 观察指标

- (1) 比较各组的细胞增殖抑制率、细胞凋亡率;
- (2) 比较各组细胞 Survivin、Caspase-3、Bcl-2、P53 蛋白表达差异。

### 1.5 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行数据处理, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 *t* 检验, 计数资料用百分比表示, 采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组细胞增殖抑制率、细胞凋亡率的比较

与对照组相比, 30 μmol·L<sup>-1</sup> 组、60 μmol·L<sup>-1</sup> 组、90 μmol·L<sup>-1</sup> 组、120 μmol·L<sup>-1</sup> 组的细胞增殖抑制率、细胞凋亡率显著升高, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。且随着剂量增加, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。

表 1 各组细胞增殖抑制率、细胞凋亡率的比较 ( $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ , %)

组别	细胞增殖抑制率	细胞凋亡率
对照组	0.00 ± 0.00	2.25 ± 0.23
30 μmol·L <sup>-1</sup> 组	33.71 ± 4.31 <sup>a</sup>	20.26 ± 3.29 <sup>a</sup>
60 μmol·L <sup>-1</sup> 组	42.88 ± 2.22 <sup>ab</sup>	23.12 ± 3.31 <sup>ab</sup>
90 μmol·L <sup>-1</sup> 组	53.34 ± 3.87 <sup>abc</sup>	34.55 ± 4.06 <sup>abc</sup>
120 μmol·L <sup>-1</sup> 组	69.72 ± 3.80 <sup>abcd</sup>	41.95 ± 3.56 <sup>abcd</sup>

与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 30 μmol·L<sup>-1</sup> 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与 60 μmol·L<sup>-1</sup> 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与 90 μmol·L<sup>-1</sup> 组比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$

### 2.2 各组细胞 Survivin、Caspase-3、Bcl-2、P53 蛋白表达水平的比较

与对照组相比, 30 μmol·L<sup>-1</sup> 组、60 μmol·L<sup>-1</sup> 组、90 μmol·L<sup>-1</sup> 组、120 μmol·L<sup>-1</sup> 组的 P53 表达量明显升高,

Survivin、Bcl-2、Caspase-3 表达量显著降低, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 2。

表 2 各组细胞 Survivin、Caspase-3、Bcl-2、P53 蛋白表达水平的比较 ( $n = 5, \bar{x} \pm s$ )

组别	Caspase-3	Survivin	Bcl-2	P53
对照组	25.14 ± 1.25	1.10 ± 0.10	0.58 ± 0.07	0.55 ± 0.11
30 μmol · L <sup>-1</sup> 组	20.75 ± 1.44 <sup>e</sup>	0.76 ± 0.05 <sup>e</sup>	0.48 ± 0.02 <sup>e</sup>	0.69 ± 0.05 <sup>e</sup>
60 μmol · L <sup>-1</sup> 组	15.70 ± 1.20 <sup>ef</sup>	0.63 ± 0.02 <sup>ef</sup>	0.39 ± 0.03 <sup>ef</sup>	0.93 ± 0.08 <sup>ef</sup>
90 μmol · L <sup>-1</sup> 组	9.37 ± 1.50 <sup>efg</sup>	0.54 ± 0.04 <sup>efg</sup>	0.32 ± 0.04 <sup>efg</sup>	1.25 ± 0.11 <sup>efg</sup>
120 μmol · L <sup>-1</sup> 组	6.07 ± 0.71 <sup>efgh</sup>	0.44 ± 0.04 <sup>efgh</sup>	0.24 ± 0.04 <sup>efgh</sup>	1.50 ± 0.14 <sup>efgh</sup>

与对照组比较, <sup>e</sup> $P < 0.05$ ; 与 30 μmol · L<sup>-1</sup> 组比较, <sup>f</sup> $P < 0.05$ ; 与 60 μmol · L<sup>-1</sup> 组比较, <sup>g</sup> $P < 0.05$ ; 与 90 μmol · L<sup>-1</sup> 组比较, <sup>h</sup> $P < 0.05$

### 3 讨论

本研究结果显示, 南方红豆杉多糖能够显著提高宫颈癌 HeLa 细胞增殖抑制率、细胞凋亡率, 且具有剂量依赖性, 说明南方红豆杉多糖对宫颈癌细胞有诱导癌细胞凋亡、阻止癌细胞增殖的作用。细胞凋亡的信号通路有线粒体凋亡和死亡受体介导 2 个途径, 其中线粒体凋亡途径中的关键步骤是线粒体膜电位降低, 致使线粒体膜出现异常病理改变。Bcl-2 的主要作用位点线粒体膜, 属于一种抗凋亡蛋白, 其比值降低提示促进癌细胞凋亡。P53 是抑癌基因, 对肿瘤有抑制作用<sup>[5]</sup>。Caspase-3 为目前临床公认的一种原癌基因, 同时也是调控肿瘤细胞周期的关键蛋白, 其可以通过增加 CDK4 的活性促进细胞增殖<sup>[6]</sup>。另外 Survivin 是当前发现的抑制细胞凋亡作用最强的基因, 可促进细胞增殖。有研究指出<sup>[7]</sup>, Caspase-3 与 Survivin 有协同作用, 能够使肿瘤细胞增殖失控。本研究中, 30 μmol · L<sup>-1</sup> 组、60 μmol · L<sup>-1</sup> 组、90 μmol · L<sup>-1</sup> 组、120 μmol · L<sup>-1</sup> 组的细胞 P53 蛋白表达量明显高于对照组, Survivin、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达量显著低于对照组, 表明南方红豆杉多糖抑制宫颈癌 HeLa 细胞的机制可能是通过激活 p53, 调控 Bcl-2 基因和 Caspase-3 与 Survivin 蛋白表达以介导细胞凋亡。

综上所述, 南方红豆杉多糖可抑制宫颈癌 HeLa 细胞增

殖, 促进细胞凋亡, 其机制可能与下调 Survivin、Bcl-2、Caspase-3 表达, 上调 P53 表达有关。

### [参考文献]

- (1) 吴长桥, 蒋路园, 杨艳芳, 等. 红豆杉属植物中紫杉烷化合物含量比较与分析 (J). 中草药, 2021, 52(2): 538-543.
- (2) 肖云斌, 李萍, 舒琦瑾. 南方红豆杉水提物联合紫杉醇抑制人肺癌 A549 细胞及对耐药基因的影响 (J). 中华中医药杂志, 2020, 35(11): 5756-5759.
- (3) 蔡伟, 夏苗芬, 熊耀康. 南方红豆杉总黄酮、总多糖与紫杉醇配伍增效减毒作用研究 (J). 世界科学技术-中医药现代化, 2015, 17(3): 556-562.
- (4) 于慧玲, 李冬梅, 屠军, 等. 宫颈鳞癌患者血液、癌组织中 Survivin、caspase-3、Bcl-2 和 Bax 的表达及其相互关系 (J). 中国妇幼保健, 2014, 29(26): 4213-4215.
- (5) 杨帆, 杨磊, 郑雪绒, 等. PATZ-P53 相互作用参与调控宫颈癌细胞凋亡与侵袭的分析 (J). 临床和实验医学杂志, 2019, 18(15): 1601-1604.
- (6) 凌能, 刘妍, 叶茂. CDK2 在肿瘤中的非细胞周期功能 (J). 中国细胞生物学学报, 2021, 43(1): 201-207.
- (7) 姜明霞, 祁玲, 李燕京. Caspase 家族在肿瘤细胞焦亡中的研究进展 (J). 肿瘤, 2020, 40(12): 872-880.