

DOI:10.13350/j.cjpb.240208

• 论著 •

# 红景天苷调节 FAK/MEK/ERK 信号通路对 HPV 阳性 宫颈癌细胞发生发展的影响

张要盛\*,任晓,沈玲,杨秀丽

(河南省南阳医学高等专科学校第一附属医院肿瘤内科三病区,河南南阳 473000)

**【摘要】** 目的 探讨红景天苷(Sal)调节局部黏着斑激酶(FAK)/胞外信号调节激酶的激酶(MEK)/细胞外信号调节激酶(ERK)信号通路对人乳头瘤病毒(HPV)阳性宫颈癌细胞发生发展的影响。方法 分别用0、2、5、5、10、20、40、80、160、320  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Sal处理 HPV18 阳性人宫颈癌细胞 HeLa,根据细胞存活率确定适宜的 Sal 浓度用于正式实验。将 HeLa 细胞分为对照组、Sal 低剂量组、Sal 中剂量组、Sal 高剂量组、表皮细胞生长因子(EGF)(FAK 激活剂)组、Sal 高剂量+EGF 组,CCK-8 法、5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EdU)染色检测细胞增殖;Transwell 检测细胞迁移与侵袭;qRT-PCR 检测 HeLa 细胞中增殖细胞核抗原(PCNA)、转移侵袭增强因子 1(MIEN1)、基质金属蛋白酶 9(MMP-9)mRNA 表达;Western Blot 检测细胞中人乳头瘤病毒 18 型(HPV18)E6、HPV18 E7、p-FAK、p-MEK、p-ERK1/2 蛋白表达。结果 选取 Sal 浓度为 40、80、160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  用于正式实验。与对照组比较,Sal 低剂量组、Sal 中剂量组、Sal 高剂量组 HeLa 细胞  $A_{450}$  值、EdU 阳性细胞率、细胞迁移及侵袭数目、PCNA、MIEN1、MMP-9 mRNA 表达及 HPV18 E6、HPV18 E7、p-FAK、p-MEK、p-ERK1/2 蛋白表达降低,且呈剂量依赖性( $P < 0.05$ );与对照组比较,EGF 组 HeLa 细胞  $A_{450}$  值、EdU 阳性细胞率、细胞迁移及侵袭数目、PCNA、MIEN1、MMP-9 mRNA 表达及 HPV18 E6、HPV18 E7、p-FAK、p-MEK、p-ERK1/2 蛋白表达升高( $P < 0.05$ );与 Sal 高剂量组比较,Sal 高剂量+EGF 组 HeLa 细胞  $A_{450}$  值、EdU 阳性细胞率、细胞迁移及侵袭数目、PCNA、MIEN1、MMP-9 mRNA 表达及 HPV18 E6、HPV18 E7、p-FAK、p-MEK、p-ERK1/2 蛋白表达升高( $P < 0.05$ )。结论 Sal 可能通过抑制 FAK/MEK/ERK 信号通路抑制 HPV 阳性宫颈癌细胞发生发展。

**【关键词】** 红景天苷;局部黏着斑激酶/胞外信号调节激酶的激酶/细胞外信号调节激酶信号通路;人乳头瘤病毒;宫颈癌;增殖;侵袭

**【文献标识码】** A**【文章编号】** 1673-5234(2024)02-0166-06

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Feb;19(2):166-171.]

## Effect of salidroside on the occurrence and development of HPV positive cervical cancer cells by regulating the FAK/MEK/ERK signaling pathway

ZHANG Yaosheng, REN Xiao, SHEN Ling, YANG Xiuli (The Third Ward of the Oncology Department of the First Affiliated Hospital of Nanyang Medical College, Nanyang, Henan 473000, China)\*

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effects of salidroside (Sal) on the occurrence and development of human papillomavirus (HPV) positive cervical cancer cells by regulating the focal adhesion kinase (FAK)/mitogen-activated protein kinase (MEK)/extracellular regulated protein kinase (ERK) signaling pathway. **Methods** HPV18 positive human cervical cancer cells HeLa were treated with 0, 2, 5, 5, 10, 20, 40, 80, 160, and 320  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Sal, respectively. The appropriate Sal concentration was determined based on cell survival rate for formal experiments. HeLa cells were divided into control group, low-dose Sal group, medium-dose Sal group, high-dose Sal group, epidermal growth factor (EGF) (FAK activator) group, and high-dose Sal+EGF group, CCK-8 method and 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) staining were applied to detect cell proliferation; Transwell was applied to detect cell migration and invasion; qRT-PCR was applied to detect the mRNA expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), migration and invasion enhancer 1 (MIEN1), and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in HeLa cells; Western blot was applied to detect the expression of human papillomavirus 18 (HPV18) E6, HPV18 E7, p-FAK, p-MEK, and p-ERK1/2 proteins in cells. **Results** Sal concentrations of 40, 80, and 160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  were selected for formal experiments. Compared with the control group, the  $A_{450}$  value, EdU positive cell rate, cell migration and invasion numbers, PCNA, MIEN1, MMP-9 mRNA expression, and HPV18 E6, HPV18 E7, p-FAK, p-MEK, p-ERK1/2 protein expression of HeLa cells in the low-dose, medium-dose, and high-dose Sal groups were reduced, and were dose-dependent ( $P < 0.05$ ); compared with the control group, the  $A_{450}$  value, EdU

\* **【通讯作者(简介)】** 张要盛(1982-),男,河南镇平人,本科,主治医师,从事临床肿瘤内科,各种恶性肿瘤的诊断和治疗工作研究。  
E-mail:stmar123@126.com

positive cell rate, cell migration and invasion numbers, PCNA, MIEN1, MMP-9 mRNA expression, and HPV18 E6, HPV18 E7, p-FAK, p-MEK, and p-ERK1/2 protein expression of HeLa cells in the EGF group were increased ( $P < 0.05$ ); compared with the high-dose Sal group, the  $A_{450}$  value, EdU positive cell rate, cell migration and invasion numbers, PCNA, MIEN1, MMP-9 mRNA expression, and protein expression of HPV18 E6, HPV18 E7, p-FAK, p-MEK, and p-ERK1/2 in HeLa cells in the high-dose Sal+EGF group were increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Sal may inhibit the occurrence and development of HPV positive cervical cancer cells by inhibiting the FAK/MEK/ERK signaling pathway.

**【Key words】** salidroside; focal adhesion kinase/mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated protein kinase signaling pathway; human papillomavirus; cervical cancer; proliferation; invasion

宫颈癌在发展中国家发病率较高,是女性癌症相关死亡的最常见原因之一,严重威胁着女性的健康、生命和安全<sup>[1-2]</sup>。高危人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染被认为是宫颈癌最重要的危险因素,与宫颈癌的发生发展密切相关<sup>[3]</sup>。统计表明,感染高危型 HPV 的宫颈癌患者,尤其是 16 型和 18 型,占宫颈癌总病例的 70%左右<sup>[4]</sup>。相关研究已经尝试通过疫苗/免疫疗法治疗由 HPV 引起的宫颈癌。然而,由于局部和全身免疫抑制因子在 HPV 阳性肿瘤中的作用,其成功程度有限<sup>[5]</sup>。因此,亟需开发新型、更安全的方法治疗 HPV 阳性宫颈癌。红景天苷(Salidroside, Sal)是红景天的提取物,具有增强免疫功能、保护心血管、抵抗癌症等作用<sup>[6]</sup>。已有研究报道,Sal 可以抑制宫颈癌 C33A 细胞的增殖和侵袭、促进细胞凋亡<sup>[7]</sup>。但 Sal 对 HPV 阳性宫颈癌细胞发生发展的影响尚不清楚。研究显示,局部黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)/胞外信号调节激酶的激酶(mitogen-activated protein kinase, MEK)/胞外信号调节激酶(extracellular regulated protein kinase, ERK)信号通路的阻断可以抑制结肠癌细胞的迁移<sup>[8]</sup>;且 Sal 处理显著抑制了 ERK 和 FAK 的磷酸化,进而抑制了胃癌 BGC-823 细胞的迁移和侵袭<sup>[9]</sup>。但 Sal 能否通过调控 FAK/MEK/ERK 信号通路影响 HPV 阳性宫颈癌细胞发生发展尚不可知。

本研究以人乳头瘤病毒 18 型(human papillomavirus 18, HPV18)阳性的人宫颈癌细胞 HeLa 为研究对象,探究 Sal 对 HeLa 细胞增殖、迁移及侵袭的影响以及相应的作用机制。

## 材料与方 法

### 1 细胞

HPV18 阳性的人宫颈癌细胞 HeLa 购自中国科学院上海细胞库。

### 2 主要试剂

红景天苷标准品(纯度 $\geq 98\%$ )购自瑞威尔生物科技有限公司;FAK 激活剂表皮细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF)、CCK-8 试剂盒购自美国 MCE 公司;5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(5-ethynyl-2'-

deoxyuridine, EdU)染色试剂盒购自上海东寰生物科技有限公司;兔源一抗 HPV18 E6、HPV18 E7、p-FAK、p-MEK、p-ERK1/2、FAK、MEK、ERK1/2、GAPDH 及二抗均购自英国 Abcam 公司。

### 3 细胞培养及 Sal 浓度的筛选

将 HeLa 细胞置于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养。取  $1 \times 10^4$  个/孔的 HeLa 细胞接种 96 孔板中,分别用 0、2.5、5、10、20、40、80、160、320  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Sal 处理 48 h,再向各孔加入 CCK-8 试剂 10  $\mu\text{L}$ ,孵育 1.5 h 后测量  $A_{450}$  值,并计算细胞存活率 =  $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。最后筛选适宜的 Sal 浓度用于正式实验。

### 4 分组及处理

取 HeLa 细胞分组为:对照组、Sal 低剂量组、Sal 中剂量组、Sal 高剂量组、EGF(FAK 激活剂)组、Sal 高剂量+EGF 组。Sal 低剂量组、Sal 中剂量组、Sal 高剂量组 HeLa 细胞分别用 40、80、160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Sal 处理 48 h;EGF 组<sup>[10]</sup> HeLa 细胞用 10 nmol/L EGF 处理 48 h;Sal 高剂量+EGF 组 HeLa 细胞用 160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Sal 和 10 nmol/L EGF 同时处理 48 h;对照组则为正常培养的 HeLa 细胞。

### 5 CCK-8 检测 HeLa 细胞增殖

将 HeLa 细胞以  $1 \times 10^4$  个/孔的密度接种于 96 孔板上。37  $^{\circ}\text{C}$  培养 12 h 后,分别按上述分组在 37  $^{\circ}\text{C}$  下处理 48 h。随后在每孔中加入 CCK-8 试剂(10  $\mu\text{L}$ ),细胞在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  下孵育 2 h。使用酶标仪在波长 450 nm 处检测吸光度。

### 6 EdU 染色检测 HeLa 细胞增殖

HeLa 细胞接种于 96 孔板( $1 \times 10^4$  个/孔)后,向各孔加入 50  $\mu\text{mol}/\text{L}$  EdU 孵育 2 h,4% 多聚甲醛固定细胞 1 h,阿波罗染色后再用 DAPI 染色细胞核 20 min。通过荧光显微镜下观察并计算 EdU 阳性细胞率(%) =  $\text{EdU 阳性细胞数} / \text{总细胞数} \times 100\%$ 。

### 7 Transwell 检测 HeLa 细胞迁移与侵袭

迁移实验:各组 HeLa 细胞悬浮在无胎牛血清的 DMEM 培养基中,上腔加入细胞( $2 \times 10^4$  个/孔),下腔加入 0.6 mL 含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基,

在 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 24 h 后,已迁移到膜下表面的细胞在室温下用 4% 多聚甲醛固定 20 min。用 PBS 洗涤三次膜,然后在室温下用 0.1% 结晶紫染色 30 min。通过光学显微镜观察细胞迁移。

侵袭实验:各组 HeLa 细胞悬浮在无胎牛血清的 DMEM 培养基中,覆盖有基质胶的上腔加入细胞(2 × 10<sup>4</sup> 个/孔),下腔加入 0.6 mL 含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基,其他操作同细胞迁移。

### 8 qRT-PCR 检测 HeLa 细胞中 PCNA、MIEN1、MMP-9 mRNA 表达变化

用 Trizol 试剂收集 HeLa 的总 RNA。将 RNA 逆转录为 cDNA 后,使用 SYBR Green PCR 预混液对 cDNA 进行 PCR。以 GAPDH 为内参,用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 方法计算增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)、转移侵袭增强因子 1(migration and invasion enhancer 1,MIEN1)、基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase 9,MMP-9)mRNA 相对表达量。引物为:GAPDH 正向:5'-AAAGGGTCATCATCTCTG-3',反向:5'-GCTGTTGTCATACTTC TC-3';PCNA 正向:5'-GCGGATATGGGACACTT A-3',反向:5'-TGGCATCTTAGAAGCAGTT-3';MIEN1 正向:5'-ACTCTCCTCACTCACAAG-3',反向:5'-GACGACCAGATCATTCTTAT-3';MMP-9 正向:5'-AACTGGTATTCTGTTCTG-3',反向:5'-GGTTAGAGAATCCAAGTT-3'。

### 9 Western blot 检测 HeLa 细胞中 HPV18 E6、HPV18 E7、p-FAK、p-MEK、p-ERK1/2 蛋白表达

用 RIPA 裂解缓冲液收集 HeLa 细胞的蛋白质。用 12% SDS-PAGE 凝胶分离蛋白质并转移到 PVDF 膜上。在 37 °C 下用 5% 脱脂牛奶封闭膜 2 h。用 PBS 洗涤后,将膜与一抗 HPV18 E6(1 : 5000)、HPV18 E7(1 : 5000)、p-FAK(1 : 3000)、p-MEK(1 : 5000)、p-ERK1/2(1 : 4000)、FAK(1 : 5000)、MEK(1 : 2000)、ERK1/2(1 : 5000)、GAPDH(1 : 3000)在 4 °C 下孵育过夜。次日,将膜与二抗(1 : 4000)在 37 °C 下孵育 1.5 h。用 ECL 试剂检测蛋白印迹,并用 ImageJ 软件评估蛋白灰度值。

### 10 统计学分析

采用 SPSS25.0 统计软件对实验数据进行分析。数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间的差异比较采用单因素方差分析,进一步两两差异比较采用 SNK-q 检验, $P < 0.05$  被认为具有统计学意义。

## 结 果

### 1 不同浓度 Sal 对 HeLa 细胞存活率的影响

随着 Sal 浓度的逐渐升高,HeLa 细胞存活率呈逐

渐下降趋势( $P < 0.05$ ),在 Sal 浓度为 40、80、160、320  $\mu\text{g/mL}$  Sal 处理下 HeLa 细胞存活率均高于且接近 50%,且 160  $\mu\text{g/mL}$  Sal 与 320  $\mu\text{g/mL}$  Sal 对 HeLa 细胞存活率的影响差异不显著( $P > 0.05$ )。因此,选取 Sal 浓度为 40、80、160  $\mu\text{g/mL}$  用于正式实验,见表 1。

表 1 不同浓度 Sal 对 HeLa 细胞存活率的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )  
Table 1 Effect of different concentrations of Sal on the survival rate of HeLa cells

Sal( $\mu\text{g/mL}$ )	细胞存活率(%) Cell survival rate
0	99.97 ± 0.03
2.5	97.78 ± 0.15*
5	92.23 ± 0.21*
10	85.56 ± 0.37*
20	80.33 ± 0.26*
40	67.96 ± 0.23*
80	60.51 ± 0.27*
160	53.25 ± 0.34*
320	52.84 ± 0.28*

注:与 0  $\mu\text{mol/L}$  Sal 比较,\*  $P < 0.05$ 。

### 2 Sal 对 HeLa 细胞增殖的影响

与对照组比较,Sal 低剂量组、Sal 中剂量组、Sal 高剂量组 HeLa 细胞 A<sub>450</sub> 值、EdU 阳性细胞率降低,且呈剂量依赖性( $P < 0.05$ );与对照组比较,EGF 组 HeLa 细胞 A<sub>450</sub> 值、EdU 阳性细胞率升高( $P < 0.05$ );与 Sal 高剂量组比较,Sal 高剂量+EGF 组 HeLa 细胞 A<sub>450</sub> 值、EdU 阳性细胞率升高( $P < 0.05$ ),见图 1 和表 2。

表 2 各组 HeLa 细胞 A<sub>450</sub> 值、EdU 阳性细胞率变化比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )  
Table 2 Comparison of A450 values and EdU positive cell rates of HeLa cells in different groups

分组 Groups	A <sub>450</sub> 值 A <sub>450</sub> value	EdU 阳性细胞率(%) EdU positive cell rate
对照组	0.99 ± 0.08	57.65 ± 2.33
Sal 低剂量组	0.86 ± 0.08*	51.03 ± 2.19*
Sal 中剂量组	0.75 ± 0.07*#	42.68 ± 2.05*#
Sal 高剂量组	0.47 ± 0.04*#&	28.85 ± 1.36*#&
EGF 组	1.21 ± 0.12*	63.34 ± 2.55*
Sal 高剂量+EGF 组	0.78 ± 0.07@	46.68 ± 1.95@

注:\* 与对照组相比,\*  $P < 0.05$ ;# 与 Sal 低剂量组相比, $P < 0.05$ ;& 与 Sal 中剂量组相比, $P < 0.05$ ;@ 与 Sal 高剂量组相比, $P < 0.05$ 。

### 3 Sal 对 HeLa 细胞迁移及侵袭的影响

与对照组比较,Sal 低剂量组、Sal 中剂量组、Sal 高剂量组 HeLa 细胞迁移及侵袭数目降低,且呈剂量依赖性( $P < 0.05$ );与对照组比较,EGF 组 HeLa 细胞迁移及侵袭数目升高( $P < 0.05$ );与 Sal 高剂量组比较,Sal 高剂量+EGF 组 HeLa 细胞迁移及侵袭数目升高( $P < 0.05$ ),见图 2 和表 3。



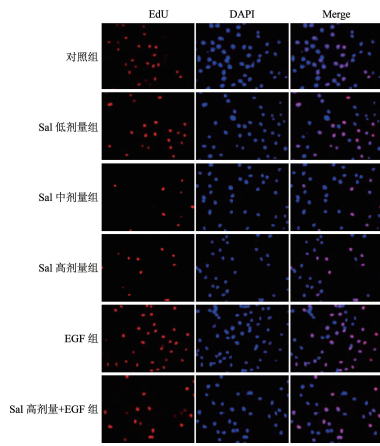


图1 HeLa细胞增殖的EdU染色结果图(200×)  
Fig. 1 EdU staining results of HeLa cell proliferation

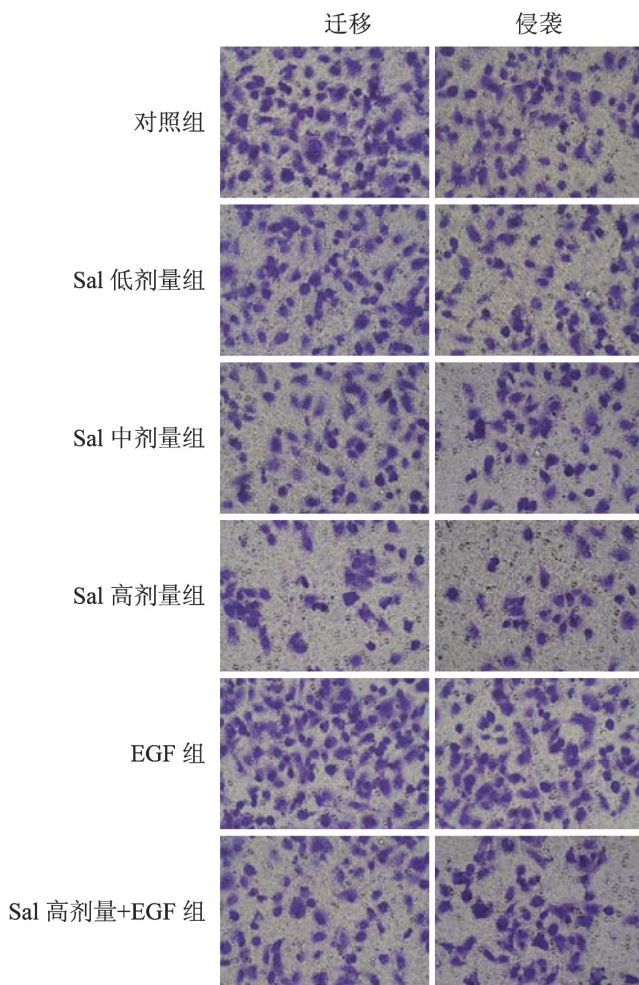


图2 HeLa细胞迁移及侵袭的Transwell检测结果(200×)  
Fig. 2 Transwell detection results of HeLa cell migration and invasion

#### 4 Sal对HeLa细胞中PCNA、MIEN1、MMP-9 mRNA表达变化的影响

与对照组比较,Sal低剂量组、Sal中剂量组、Sal高剂量组HeLa细胞中PCNA、MIEN1、MMP-9 mRNA表达降低,且呈剂量依赖性( $P < 0.05$ );与对照组比较,EGF组HeLa细胞中PCNA、MIEN1、

MMP-9 mRNA表达升高( $P < 0.05$ );与Sal高剂量组比较,Sal高剂量+EGF组HeLa细胞中PCNA、MIEN1、MMP-9 mRNA表达升高( $P < 0.05$ ),见表4。

表3 各组HeLa细胞迁移及侵袭数目变化比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )  
Table 3 Comparison of changes in migration and invasion numbers of HeLa cells in each group

分组 Groups	细胞迁移数目(个) Number of cell migration	细胞侵袭数目(个) Number of cell invasions
对照组	95.56±3.15	81.14±3.65
Sal低剂量组	84.43±2.93*	72.55±3.41*
Sal中剂量组	73.36±2.76*#	60.66±2.15*#
Sal高剂量组	42.23±2.02*#&	31.32±1.25*#&
EGF组	113.35±5.78*	91.83±4.15*
Sal高剂量+EGF组	78.25±3.13@	65.58±2.34@

注: \*与对照组相比,  $P < 0.05$ ; #与Sal低剂量组相比,  $P < 0.05$ ; &与Sal中剂量组相比,  $P < 0.05$ ; @与Sal高剂量组相比,  $P < 0.05$ 。

表4 各组HeLa细胞中PCNA、MIEN1、MMP-9 mRNA表达变化比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 4 Comparison of mRNA expression changes of PCNA, MIEN1, and MMP-9 in HeLa cells of different groups

分组 Groups	PCNA mRNA	MIEN1 mRNA	MMP-9 mRNA
对照组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
Sal低剂量组	0.91±0.07*	0.85±0.07*	0.81±0.07*
Sal中剂量组	0.75±0.06*#	0.69±0.06*#	0.63±0.06*#
Sal高剂量组	0.56±0.05*#&	0.41±0.05*#&	0.36±0.03*#&
EGF组	1.36±0.11*	1.43±0.12*	1.58±0.13*
Sal高剂量+EGF组	0.83±0.07@	0.71±0.07@	0.66±0.07@

注: \*与对照组相比,  $\bar{x} < 0.05$ ; #与Sal低剂量组相比,  $\bar{x} < 0.05$ ; &与Sal中剂量组相比,  $\bar{x} < 0.05$ ; @与Sal高剂量组相比,  $\bar{x} < 0.05$ 。

#### 5 Sal对HeLa细胞中HPV18 E6、HPV18 E7蛋白及FAK/MEK/ERK通路相关蛋白表达变化的影响

与对照组比较,Sal低剂量组、Sal中剂量组、Sal高剂量组HeLa细胞中HPV18 E6、HPV18 E7、p-FAK、p-MEK、p-ERK1/2蛋白表达降低,且呈剂量依赖性( $P < 0.05$ );与对照组比较,EGF组HeLa细胞中HPV18 E6、HPV18 E7、p-FAK、p-MEK、p-ERK1/2蛋白表达升高( $P < 0.05$ );与Sal高剂量组比较,Sal高剂量+EGF组HeLa细胞中HPV18 E6、HPV18 E7、p-FAK、p-MEK、p-ERK1/2蛋白表达升高( $P < 0.05$ ),见图3和表5。

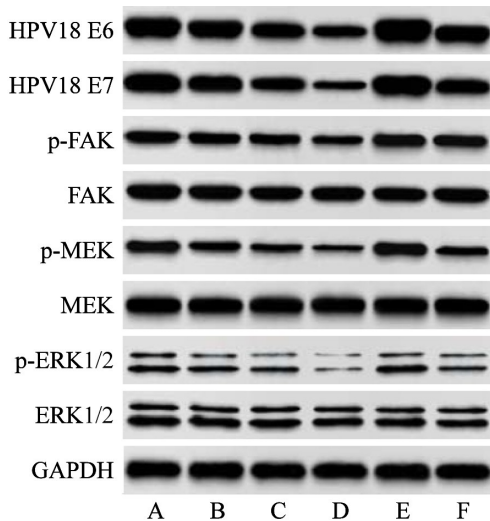
### 讨论

宫颈癌主要由高危型HPV感染引起,是全球性的重大负担<sup>[11]</sup>。宫颈癌治疗的一个主要挑战在于由HPV癌蛋白介导的肿瘤细胞逃避免疫监视的能力,可有助于疾病的进展,导致临床预后不良<sup>[12]</sup>。因此,开发新的治疗干预措施至关重要。

表 5 各组 HeLa 细胞中 HPV18 E6、HPV18 E7、p-FAK、p-MEK、p-ERK1/2 蛋白表达变化比较 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )  
Table 5 Comparison of protein expression changes of HPV18 E6, HPV18 E7, p-FAK, p-MEK, and p-ERK1/2 in HeLa cells of each group

分组 Groups	HPV18 E6/ GAPDH	HPV18 E7/ GAPDH	p-FAK/ FAK	p-MEK/ MEK	p-ERK1/2/ ERK1/2
对照组	1.56±0.13	1.21±0.13	0.86±0.07	0.80±0.07	0.73±0.07
Sal 低剂量组	1.21±0.10*	1.03±0.11*	0.72±0.07*	0.65±0.05*	0.61±0.05*
Sal 中剂量组	1.03±0.09*#	0.85±0.07*#	0.63±0.06*#	0.50±0.04*#	0.40±0.04*#
Sal 高剂量组	0.65±0.05*#&	0.43±0.04*#&	0.51±0.05*#&	0.32±0.03*#&	0.18±0.01*#&
EGF 组	1.89±0.12*	1.39±0.10*	0.96±0.03*	0.92±0.05*	0.83±0.06*
Sal 高剂量+ EGF 组	1.15±0.12@	0.92±0.08@	0.66±0.05@	0.53±0.04@	0.43±0.04@

注: \*与对照组相比,  $P < 0.05$ ; #与 Sal 低剂量组相比,  $P < 0.05$ ; &与 Sal 中剂量组相比,  $P < 0.05$ ; @与 Sal 高剂量组相比,  $P < 0.05$ 。



A 对照组 B Sal 低剂量组 C Sal 中剂量组 D Sal 高剂量组 E EGF 组 F Sal 高剂量+EGF 组

图 3 HeLa 细胞中 HPV18 E6、HPV18 E7、p-FAK、p-MEK、p-ERK1/2 蛋白表达的 Western blot 检测图

A Control group B Sal low-dose group C Sal medium dose group D Sal high-dose group E EGF group F Sal high-dose + EGF group

Fig. 3 Western blot detection of HPV18 E6, HPV18 E7, p-FAK, p-MEK, and p-ERK1/2 protein expression in HeLa cells

天然产物因其作为新型治疗剂的潜在来源而在癌症研究中获得了相当大的关注<sup>[13]</sup>。Sal 是从红景天根茎中分离得到的活性成分,其不仅具有抗缺氧、抗炎、抗衰老、增强免疫力等功能,还具有免疫调节、抗癌等多种药理作用<sup>[14]</sup>。相关研究表明,Sal 可抑制宫颈癌 HeLa 细胞增殖<sup>[15]</sup>;Sal 可抑制卵巢癌细胞增殖并促进细胞凋亡<sup>[16]</sup>。以上研究表明了 Sal 的抗癌作用。本研究结果与其是一致的,本研究显示,Sal 可呈剂量依赖性地抑制 HPV18 阳性的人宫颈癌细胞 HeLa 增殖、迁移及侵袭。此外,对于 HPV 致癌机制,HPV18 E6 和 HPV18 E7 是重要的致癌蛋白,它们对于在细胞中产生一系列变化至关重要,增加了有助于肿瘤发展的突变<sup>[17-18]</sup>;PCNA 对于癌细胞中的 DNA 复制至关重要,具有促进细胞增殖的作用<sup>[19]</sup>;MIEN1、MMP-

9 作为常见的评估细胞迁移与侵袭的标志物,对促进细胞的迁移与侵袭能力至关重要<sup>[20-21]</sup>。本研究发现,Sal 可呈剂量依赖性地抑制 HPV18 阳性的 HeLa 中 HPV18 E6、HPV18 E7 蛋白及 PCNA、MIEN1、MMP-9 mRNA 表达,再次从分子水平上证实了 Sal 可通过抑制细胞增殖、迁移及侵袭的方式抑制 HPV 阳性宫颈癌细胞发生发展。提示 Sal 可能成为治疗 HPV 阳性宫颈癌的潜在有效药物之一。

FAK/MEK/ERK 信号通路参与许多细胞功能,包括细胞存活和迁移,抑制该通路已被证明可以阻止多种类型细胞的迁移<sup>[22]</sup>。据报道,抑制 FAK/MEK/ERK 通路可促进 5-氟尿嘧啶诱导的结直肠癌细胞凋亡<sup>[23]</sup>。本研究显示,与对照组比较,EGF 组 HeLa 细胞中 p-FAK、p-MEK、p-ERK1/2 蛋白表达升高,细胞增殖、迁移及侵袭能力增强,且 EGF 为 FAK 激活剂,表明 FAK/MEK/ERK 通路确实参与了 HPV 阳性宫颈癌的发生与发展。此外,本研究还发现,Sal 可呈剂量依赖性地抑制 HPV18 阳性人宫颈癌细胞 HeLa 中 p-FAK、p-MEK、p-ERK1/2 蛋白表达,推测 Sal 可能通过抑制 FAK/MEK/ERK 信号通路抑制 HPV 阳性宫颈癌细胞发生发展。为了验证该猜想是否与实际一致,本研究用高剂量 Sal 和 EGF 共同处理 HPV18 阳性人宫颈癌细胞 HeLa,结果显示,EGF 减弱了高剂量 Sal 对 HPV18 阳性人宫颈癌细胞 HeLa 发生发展的抑制作用。证实了猜想的合理性。

综上所述,Sal 可能通过抑制 FAK/MEK/ERK 信号通路抑制 HPV 阳性宫颈癌细胞增殖、迁移及侵袭,进而抑制肿瘤的发生发展。未进行体内动物实验进一步验证该结论是否成立是本研究设计的不足之一,后期将继续深入探究。

【参考文献】

- [1] Sadri Nahand J, Moghoofoei M, Salmaninejad A, et al. Pathogenic role of exosomes and microRNAs in HPV-mediated inflammation and cervical cancer: A review[J]. Int J Cancer, 2020, 146(1): 305-320.
- [2] Yu F, Liu J, Dong W, et al. The diagnostic value of miR-145 and miR-205 in patients with cervical cancer[J]. Am J Transl Res, 2021, 13(1): 1825-1832.
- [3] Dong A, Xu B, Wang Z, et al. Survival-related DLEU1 is associated with HPV infection status and serves as a biomarker in HPV-infected cervical cancer[J]. Mol Med Rep, 2022, 25(3): 77-85.
- [4] Wu S, Liu L, Xu H, et al. The involvement of MALAT1-ALKBH5 signaling axis into proliferation and metastasis of human papillomavirus-positive cervical cancer[J]. Cancer Biol Ther, 2023, 24(1): 2249174-2249187.
- [5] Cakir MO, Bilge U, Naughton D, et al. Ficus carica latex modulates immunity-linked gene expression in human

- papillomavirus positive cervical cancer cell lines: Evidence from RNA Seq transcriptome analysis[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(17): 13646-13656.
- [6] Liu S, Li Y, Li Z. Salidroside suppresses the activation of nasopharyngeal carcinoma cells via targeting miR-4262/GRP78 axis[J]. Cell Cycle, 2022, 21(7): 720-729.
- [7] 黄进, 刘福蓉, 温婷, 等. 红景天苷通过 JAK2/STAT3 通路影响宫颈鳞癌 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.
- [8] Jang HJ, Bak Y, Pham TH, et al. STK899704 inhibits stemness of cancer stem cells and migration via the FAK-MEK-ERK pathway in HT29 cells[J]. BMB Rep, 2018, 51(11): 596-601.
- [9] Qi Z, Tang T, Sheng L, et al. Salidroside inhibits the proliferation and migration of gastric cancer cells via suppression of Src-associated signaling pathway activation and heat shock protein 70 expression[J]. Mol Med Rep, 2018, 18(1): 147-156.
- [10] 张珊珊, 刘嗣同, 石洪爽, 等. 刺芒柄花素通过 FAK/AKT/Bcl-2 通路促进外阴鳞癌 SW962 细胞凋亡[J]. 解剖科学进展, 2021, 27(6): 653-656.
- [11] Burmeister CA, Khan SF, Schafer G, et al. Cervical cancer therapies: Current challenges and future perspectives [J]. Tumour Virus Res, 2022, 13(1): 200238-200251.
- [12] Singh G, Sharma SK, Singh SK. miR-34a negatively regulates cell cycle factor Cdt2/DTL in HPV infected cervical cancer cells [J]. BMC Cancer, 2022, 22(1): 777-787.
- [13] Kubiczak M, Szustka A, Rogalinska M. Molecular targets of natural compounds with anti-cancer properties [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(24): 13659-13685.
- [14] Yang P, Chai Y, Wei M, et al. Mechanism of salidroside in the treatment of endometrial cancer based on network pharmacology and molecular docking [J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 14114-14123.
- [15] 张洋, 董天睿, 倪锦红. 红景天苷对宫颈癌 HeLa 细胞增殖抑制作用的研究 [J]. 国际妇产科学杂志, 2017, 44(4): 396-398, 481.
- [16] 袁肇方, 时小凤, 张向博, 等. 红景天苷抑制卵巢癌细胞 SKOV3 增殖的基因水平研究 [J]. 西北民族大学学报(自然科学版), 2022, 43(1): 32-39.
- [17] Mogi K, Koya Y, Yoshihara M, et al. 9-oxo-ODAs suppresses the proliferation of human cervical cancer cells through the inhibition of CDKs and HPV oncoproteins [J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 19208-19220.
- [18] Morale MG, Tamura RE, Cintra R, et al. TLR4 and SARM1 modulate survival and chemoresistance in an HPV-positive cervical cancer cell line [J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 6714-6725.
- [19] Wang YL, Wu WR, Lin PL, et al. The Functions of PCNA in Tumor Stemness and Invasion [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(10): 5679-5690.
- [20] Xu J, Qu Q, Liu B, et al. The circular RNA circ\_0030018/miR-136/migration and invasion enhancer 1 (MIEN1) axis promotes the progression of polycystic ovary syndrome [J]. Bioengineered, 2022, 13(3): 5999-6011.
- [21] Li Z, Wei J, Chen B, et al. The role of MMP-9 and MMP-9 inhibition in different types of thyroid carcinoma [J]. Molecules, 2023, 28(9): 3705-3732.
- [22] Niu X, Han Q, Li X, et al. EDIL3 influenced the  $\alpha\beta$ -FAK/MEK/ERK axis of endothelial cells in psoriasis [J]. J Cell Mol Med, 2022, 26(20): 5202-5212.
- [23] Yang K, Gao K, Hu G, et al. CTGF enhances resistance to 5-FU-mediated cell apoptosis through FAK/MEK/ERK signal pathway in colorectal cancer [J]. Onco Targets Ther, 2016, 9(1): 7285-7295.
- 【收稿日期】 2023-10-11 【修回日期】 2024-01-20
- ~~~~~
- (上接 161 页)
- [23] Kullaya V, van der Ven A, Mpagama S, et al. Platelet-monocyte interaction in *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. Tuberculosis (Edinb), 2018, 111: 86-93.
- [24] Biswas SK M M S E. Exploring the role of C-C motif chemokine ligand-2 single nucleotide polymorphism in pulmonary tuberculosis: a genetic association study from north india [J]. J Immunol Res, 2020, 2020: 1019639.
- [25] Badewa AP, Quinton LJ, Shellito JE, et al. Chemokine receptor 5 and its ligands in the immune response to murine tuberculosis [J]. Tuberculosis (Edinb), 2005, 85(3): 185-195.
- [26] Ness TL, Carpenter KJ, Ewing JL, et al. CCR1 and CC chemokine ligand 5 interactions exacerbate innate immune responses during sepsis [J]. J Immunol, 2004, 173(11): 6938-6948.
- [27] Pydi SS, Ghousunnissa S, Devalraju KP, et al. Down regulation of RANTES in pleural site is associated with inhibition of antigen specific response in tuberculosis [J]. Tuberculosis (Edinb), 2019, 116S: S123-S130.
- [28] Vesosky B, Rottinghaus EK, Stromberg P, et al. CCL5 participates in early protection against *Mycobacterium tuberculosis* [J]. J Leukoc Biol, 2010, 87(6): 1153-1165.
- ~~~~~
- (上接 165 页)
- [9] Azzouz N, Kamena F, Laurino P, et al. *Toxoplasma gondii* secretory proteins bind to sulfated heparin structures [J]. Glycobiology, 2013, 23(1): 106-120.
- [10] Lourenco EV, Pereira SR, Faca VM, et al. *Toxoplasma gondii* micronemal protein MIC1 is a lactose-binding lectin [J]. Glycobiology, 2001, 11(7): 541-547.
- [11] Zhang Y, Lai BS, Juhás M, et al. *Toxoplasma gondii* secretory proteins and their role in invasion and pathogenesis [J]. Microbiol Res, 2019, 227: 126293.
- [12] Boothroyd JC, Dubremetz JF. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries [J]. Nat Rev Microbiol, 2008, 6(1): 79-88.
- [13] Sinai AP, Joiner KA. The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane [J]. J Cell Biol, 2001, 154(1): 95-108.
- [14] Rezaei F, Sharif M, Sarvi S, et al. A systematic review on the role of GRA proteins of *Toxoplasma gondii* in host immunization [J]. J Microbiol, 2019, 165: 105696.
- [15] 胡玲英, 张念章, 王金磊, 等. 弓形虫致密颗粒蛋白的生物学功能及免疫原性研究的新进展 [J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 31(7): 663-668.
- [16] 柳方远, 李双星, 印春生, 等. 弓形虫主要分泌蛋白及其功能的研究进展 [J]. 中国动物传染病学报, 2020, 28(5): 94-102.
- ~~~~~
- 【收稿日期】 2023-09-14 【修回日期】 2023-12-10