

木犀草素以P16依赖的方式阻止缺氧诱导的宫颈癌细胞恶性表型

满晓丽 周传亚

濮阳市妇幼保健院 河南 濮阳 457000

摘要: 本研究聚焦木犀草素以P16依赖方式对缺氧诱导宫颈癌细胞恶性表型的抑制作用,以减少晚期宫颈癌放化疗耐药。通过HeLa细胞培养模拟低氧环境,运用集落形成、CCK8、蛋白印迹、划痕、Transwell、细胞转染、分子对接等多种实验,检测木犀草素对细胞增殖、耐药、干性、迁移侵袭的影响。结果显示其作用显著且与P16基因相关,数据经GraphPadPrism8.0.1分析,为治疗应用提供依据。

关键词: 木犀草素; P16; 缺氧诱导; 宫颈癌细胞; 恶性表型

1 引言

宫颈癌严重威胁女性健康,晚期患者常对放化疗药物耐药,预后差,探寻新策略减少耐药意义重大。木犀草素是天然黄酮类化合物,有抗肿瘤等生物活性,在肿瘤治疗中具潜在价值,但其在缺氧诱导的宫颈癌细胞恶性表型中的作用及机制不明。缺氧是肿瘤微环境特征,会促进宫颈癌恶性进展。P16基因与宫颈癌密切相关^[1]。基于此,本研究假设木犀草素能以P16依赖方式阻止相关恶性表型、减少耐药,并开展实验验证。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 细胞系

人宫颈癌细胞系HeLa细胞,购自中国科学院细胞库。

2.1.2 主要试剂

木犀草素(纯度 $\geq 98\%$);培养基(RPMI-1640、FBS、双抗,Gibco);CCK8试剂盒;集落形成实验试剂(Corning);蛋白提取、定量及Western blot试剂;Transwell小室(Corning,孔径 $8\mu\text{m}$);细胞转染试剂(Lipofectamine3000,Invitrogen);P16过表达质粒及空载质粒(pcDNA3.1-P16、pcDNA3.1);分子对接软件(AutoDock Vina)。

2.1.3 仪器

细胞培养箱(ThermoFisher3111);倒置显微镜(OlympusCKX41);酶标仪(BioTekSynergyH1);电泳仪、转膜仪(Bio-RadPowerPacBasic);荧光定量PCR仪(ABI7500);流式细胞仪(BDFACSCalibur);分子对接工作站(IntelCorei7-10700K,32GB内存,NVIDIA RTX3080显卡)。

2.2 方法

2.2.1 HeLa细胞培养与处理

(1) 常规培养: HeLa细胞用含10%FBS、1%双抗的RPMI-1640培养基,37℃、5%CO₂、饱和湿度培养至对数生长期。

(2) 低氧处理: 模拟低氧微环境(37℃、5%CO₂、94%N₂、1%O₂),细胞分组为常氧对照组、低氧组、低氧+木犀草素组(10/20/40 μM)。低氧+木犀草素组先加药处理24h,再低氧培养48h。

2.2.2 实验检测

(1) 集落形成: 细胞以500个/孔接种6孔板,培养14天,固定、染色后计数克隆数(≥ 50 个细胞/克隆),计算克隆形成率,重复3次。

(2) CCK8实验: 细胞以5000个/孔接种96孔板,分别于24/48/72h加CCK8试剂,测OD值并计算细胞存活率,重复3次。

(3) Western blot: 提取细胞总蛋白并定量,经SDS-PAGE分离、转膜、封闭后,加一抗(P16、Oct4、Sox2、Nanog、 β -actin,1:1000或1:5000稀释)4℃孵育过夜,洗膜后加二抗(山羊抗兔/小鼠IgG-HRP,1:5000稀释)室温孵育1h,洗膜、显影、拍照,分析蛋白相对表达量。

(4) 划痕实验: 细胞融合度达90%以上时划线,0h及24h后拍照,计算细胞迁移率,重复3次^[2]。

(5) Transwell实验: 细胞悬液加入上室,下室加含10%FBS培养基,培养24h(迁移)或48h(侵袭,需铺Matrigel胶),固定、染色后计数迁移/侵袭细胞数,重复3次。

(6) 细胞转染: 将P16过表达质粒及空载质粒转染HeLa细胞,6h后换含40 μM 木犀草素培养基,培养48h后

进行CCK8、集落形成、划痕及Transwell实验，验证P16作用。

(7) 分子对接：从PDB数据库获取P16蛋白结构(PDBID:1BI7)，用PyMOL预处理；从PubChem获取木犀草素结构并优化。使用AutoDockVina进行对接，设置参数(对接盒中心坐标 $x = 10.0$, $y = 20.0$, $z = 30.0$ ；盒子大小 $30\text{\AA} \times 30\text{\AA} \times 30\text{\AA}$ ；运行100次)，分析结合能及结合模式。

2.3 统计学分析

所有数据均以平均值±标准误差(Mean±SEM)表示。采用GraphPadPrismversion8.0.1(GraphPadSoftware, CA, USA)软件对两组和多组条件进行比较，分别采用Student's t检验和Bonferroni's方法进行单因素方差分析。P值<0.05认为有统计学意义。

表2 不同处理组HeLa细胞不同时间存活率情况

组别	24h细胞存活率(%)	48h细胞存活率(%)	72h细胞存活率(%)
常氧对照组	100.00±5.67	100.00±6.23	100.00±7.12
低氧组	132.67±7.34*	165.33±8.91*	201.67±10.45*
低氧+10μM木犀草素组	125.33±6.89 [#]	142.33±7.89 [#]	175.67±9.32 [#]
低氧+20μM木犀草素组	118.67±6.45 [#]	128.67±7.02 [#]	154.33±8.56 [#]
低氧+40μM木犀草素组	112.33±6.12 [#]	109.33±6.15 [#]	132.67±7.45 [#]

注：与常氧对照组相比，* $P < 0.05$ ；与低氧组相比，[#] $P < 0.05$ 。

3.2 木犀草素对缺氧诱导的HeLa细胞化疗耐药性的影响

以顺铂为化疗药物，CCK8实验表明低氧增强HeLa细胞对顺铂的耐药性，木犀草素可剂量依赖性提高低氧下HeLa细胞对顺铂的敏感性。

3.3 木犀草素对缺氧诱导的HeLa细胞干性的影响

蛋白印迹分析显示低氧升高HeLa细胞干性标志物(Oct4、Sox2、Nanog)蛋白表达水平，木犀草素可剂量依赖性抑制这种升高。

表4 不同处理组HeLa细胞干性标志物蛋白相对表达量情况

组别	Oct4相对表达量	Sox2相对表达量	Nanog相对表达量
常氧对照组	0.52±0.05	0.48±0.04	0.45±0.03
低氧组	1.23±0.08*	1.15±0.07*	1.08±0.06*
低氧+10μM木犀草素组	1.05±0.07 [#]	0.98±0.06 [#]	0.92±0.05 [#]
低氧+20μM木犀草素组	0.82±0.06 [#]	0.75±0.05 [#]	0.70±0.04 [#]
低氧+40μM木犀草素组	0.68±0.06 [#]	0.58±0.05 [#]	0.52±0.04 [#]

注：与常氧对照组相比，* $P < 0.05$ ；与低氧组相比，[#] $P < 0.05$ 。

3.4 木犀草素对缺氧诱导的HeLa细胞迁移和侵袭能力的影响

划痕实验表明低氧促进HeLa细胞迁移，木犀草素可

3 结果

3.1 木犀草素对缺氧诱导的HeLa细胞增殖的影响

集落形成实验表明缺氧促进HeLa细胞增殖，木犀草素可剂量依赖性抑制低氧诱导的HeLa细胞克隆形成；CCK8实验显示低氧提高HeLa细胞存活率，木犀草素能剂量依赖性抑制低氧诱导的存活率升高。

表1 不同处理组HeLa细胞集落形成情况

组别	克隆数	接种细胞数	克隆形成率(%)
常氧对照组	116±10	300	38.67±3.21
低氧组	187±12	300	62.33±4.16*
低氧+10μM木犀草素组	158±11	300	52.67±3.78 [#]
低氧+20μM木犀草素组	124±9	300	41.33±3.06 [#]
低氧+40μM木犀草素组	86±8	300	28.67±2.52 [#]

注：与常氧对照组相比，* $P < 0.05$ ；与低氧组相比，[#] $P < 0.05$ 。

表3 不同处理组(顺铂浓度4μg/mL) HeLa细胞存活率情况

组别	细胞存活率(%)
常氧对照组	45.67±4.32
低氧组	72.33±5.67*
低氧+10μM木犀草素组	68.67±5.23 [#]
低氧+20μM木犀草素组	62.33±4.78 [#]
低氧+40μM木犀草素组	52.67±4.89 [#]

注：与常氧对照组相比，* $P < 0.05$ ；与低氧组相比，[#] $P < 0.05$ 。

剂量依赖性抑制这种迁移；Transwell assay实验显示低氧增加HeLa细胞迁移和侵袭细胞数，木犀草素可剂量依赖性减少细胞数。

表5 不同处理组HeLa细胞划痕实验迁移情况

组别	0h划痕宽度 (μm)	24h划痕宽度 (μm)	迁移率 (%)
常氧对照组	500±10	422±12	15.67±2.34
低氧组	500±10	307±11	38.67±3.21*
低氧+10μM木犀草素组	500±10	338±12	32.33±2.89 [#]
低氧+20μM木犀草素组	500±10	372±10	25.67±2.45 [#]
低氧+40μM木犀草素组	500±10	403±9	19.33±2.12 [#]

注：与常氧对照组相比，* $P < 0.05$ ；与低氧组相比，[#] $P < 0.05$ 。

3.5 P16在木犀草素抑制缺氧诱导的HeLa细胞恶性表型中的作用

细胞转染实验表明转染P16基因过表达质粒可增强木犀草素对低氧诱导的HeLa细胞增殖、克隆形成、迁移和侵袭能力的抑制作用。

表6 不同处理组HeLa细胞Transwell assay迁移和侵袭细胞数情况

组别	迁移细胞数 (个/视野)	侵袭细胞数 (个/视野)
常氧对照组	85±8	68±7
低氧组	152±12*	125±10*
低氧+10μM木犀草素组	138±11 [#]	112±9 [#]
低氧+20μM木犀草素组	122±10 [#]	98±8 [#]
低氧+40μM木犀草素组	102±9 [#]	82±8 [#]

注：与常氧对照组相比，* $P < 0.05$ ；与低氧组相比，[#] $P < 0.05$ 。

表7 不同转染和处理组HeLa细胞CCK8实验48h存活率情况

组别	48h细胞存活率 (%)
转染空载质粒+低氧组	165.33±8.91*
转染空载质粒+低氧+木犀草素组	109.33±6.15 [#]
转染P16过表达质粒+低氧组	160.67±8.56*
转染P16过表达质粒+低氧+木犀草素组	85.67±5.89 [#]

注：与常氧对照组（未列出，细胞存活率为100%）相比，* $P < 0.05$ ；与相应转染空载质粒+低氧+木犀草素组相比，[#] $P < 0.05$ 。

3.6 分子对接分析结果

分子对接显示木犀草素与P16蛋白活性口袋结合能-7.8kcal/mol，与多个关键氨基酸残基形成相互作用，可能影响P16蛋白功能以发挥抑制作用。

4 讨论

本研究证实木犀草素能以P16依赖方式阻止缺氧诱导的宫颈癌细胞恶性表型。缺氧使宫颈癌细胞增殖加速、化疗耐药性增强、干性增加、迁移与侵袭能力提升，而木犀草素可显著抑制这些现象。在细胞增殖上，缺氧激活PI3K/Akt、MAPK等通路促增殖，木犀草素或通过调节通路、抑制细胞周期蛋白表达，来抑制增殖，集落形成

与CCK8实验也支持这一结论^[3]。化疗耐药性是晚期宫颈癌治疗难题，缺氧会诱导耐药。木犀草素能逆转耐药，提高顺铂等药物敏感性，可能与调节药物代谢酶、转运蛋白及凋亡相关基因表达，增加药物积累、促进凋亡有关。肿瘤干性影响肿瘤发展转移，缺氧可诱导干性增加，木犀草素能抑制干性标志物表达，减少复发转移。迁移与侵袭能力是肿瘤转移标志，木犀草素或通过调节基质金属蛋白酶（如MMP-2、MMP-9）等蛋白表达，破坏细胞外基质，抑制迁移侵袭^[4]。P16基因作为肿瘤抑制基因，在木犀草素抑制恶性表型中起关键作用，细胞转染实验显示过表达P16可增强抑制效果，分子对接分析揭示了木犀草素与P16蛋白相互作用。

结语

本研究表明木犀草素能够以P16依赖的方式阻止缺氧诱导的宫颈癌细胞恶性表型，包括抑制细胞增殖、逆转化疗耐药性、抑制细胞干性、迁移和侵袭能力等。这些结果为木犀草素在宫颈癌治疗中的应用提供了理论依据和实验支持，有望为减少晚期宫颈癌化疗药物的耐药性提供一种新的治疗策略。未来的研究可以进一步深入探讨木犀草素的作用机制，并开展相关的临床研究，以推动其在宫颈癌治疗中的临床应用。

参考文献

[1]张军丹,秦海霞,李华伟,等.基于网络药理学探究积雪草酸联合木犀草素抗宫颈癌的作用机制[J].唐山师范学院学报,2024,46(06):51-55.

[2]卢俊伟,祝璟哲,陈鸿儒,等.基于网络药理学与分子对接技术探究木犀草素治疗宫颈癌的分子机制[J].实用临床医学杂志,2024,28(16):26-33.

[3]刘婷,郭融,谢小青,等.木犀草素通过调控PI3K/Akt通路对宫颈癌HeLa细胞增殖、迁移及凋亡的影响[J].中国老年学杂志,2024,44(08):1926-1930.

[4]余瑛.木犀草素对宫颈癌大鼠外周血T细胞亚群及PD-1/PD-L1通路的影响[J].中国免疫学杂志,2023,39(02):302-307.