

白藜芦醇通过诱导细胞自噬性死亡抑制宫颈癌的研究

孙晓东^{1,2#}, 周 珍^{1#}, 曾 炼¹, 谢丽霞¹, 杜凯丽¹, 桑 明^{1,2*}

¹湖北医药学院附属襄阳市第一人民医院, 襄阳 441000;

²湖北医药学院 武当特色中药研究湖北省重点实验室, 十堰 442000

摘要:白藜芦醇作为一种广泛存在于药食同源植物中的非黄酮类多酚化合物,其抗肿瘤效果受到广泛关注,但在抑制宫颈癌方面仍缺乏体内效应的实验依据。本研究通过体内实验发现白藜芦醇具有明显的抗肿瘤生长作用,组织水平 LC3B、P62 和 Beclin-1 表达改变,推测白藜芦醇可能通过促进癌细胞的过度自噬抑制宫颈癌的进展;进一步通过体外细胞实验验证,发现白藜芦醇诱导自噬相关蛋白的表达,促进自噬小体和自噬溶酶体形成增多,分别与自噬激活剂雷帕霉素、自噬抑制剂巴伐洛霉素 A1 联用后检测细胞自噬流以及线粒体膜电位和细胞凋亡指标,发现白藜芦醇在自噬激活与自噬抑制的情况下可通过不同方式促进宫颈癌细胞的死亡。

关键词:宫颈癌;白藜芦醇;细胞自噬;荷瘤模型

中图分类号:R34;Q291

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)2-0208-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.2.004

Resveratrol induces autophagic death of cervical cancer cells to exert antitumor effect

SUN Xiao-dong^{1,2#}, ZHOU Zhen^{1#}, ZENG Lian¹, XIE Li-xia¹, DU Kai-li¹, SANG Ming^{1,2*}

¹Xiangyang No. 1 People's Hospital, Hubei University of Medicine, Xiangyang 441000, China;

²Hubei Key Laboratory of Wudang Local Chinese Medicine Research, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China

Abstract: Resveratrol, a non-flavonoid polyphenol compound is widely present in Medicine and food homologous plants. Its anti-tumor effects have been widely recognized, but there is no experimental data reflecting the inhibition of cervical cancer *in vivo*. We found that resveratrol significantly inhibited tumor growth with upregulation of expression level of LC3B and Beclin-1, while the expression level of P62 was downregulated. Thus, this suggests that resveratrol may inhibit the progress of cervical cancer by promoting excessive autophagy. Furthermore, resveratrol induced autophagy-related VMP1, Beclin-1, and LC3B protein expression and promoted the formation of autophagosomes and autophagolysosomes *in vitro*. Finally, it was found that resveratrol promoted excessive autophagy when combined with the activator rapamycin. It also promoted cell apoptosis when combined with the autophagy inhibitor bafilomycin A1. In conclusion, resveratrol exhibits inhibitory effects on cervical cancer during both autophagy activation and inhibition.

Key words: autophagy; cervical cancer; resveratrol; tumor model

白藜芦醇(resveratrol, RES),是一种非黄酮类的多酚化合物,广泛存在于葡萄、花生等植物以及虎杖等中药材,作为低毒性的天然药物发挥抗炎、抗氧化、抗血小板聚集、抗动脉粥样硬化等作用,此外,白

藜芦醇也是一种很有前景的抗肿瘤药物^[1-3]。它的靶点广泛,如 mTOR、JAK、 β -amyloid、Adenylyl cyclase、IKK β 、DNA polymerase,也是一种特异性的 SIRT1 活化剂和有效的孕烷 X 受体(PXR)抑制剂^[4,5]。新近研究发现,RES 对多种肿瘤具有体内外抑制活性^[6-9],但 RES 作为一种抗癌药物的临床试验还是很有限,在肿瘤动物模型中测试 RES 的研究结果表明,RES 对胃肠道肿瘤主要发挥预防作用。而在乳腺癌动物模型中 RES 有可能成为癌症治疗剂,然而,这种有益作用取决于动物和细胞类型^[10]。RES

收稿日期:2020-07-07 接受日期:2020-11-30

基金项目:国家自然科学基金(81903005);湖北省实验动物资源开发及利用专项(2020DFE025);湖北省对外科技合作项目(2019AHB068);湖北医药学院药护学院团队项目(2017YHKT02)

* 通信作者 Tel:86-710-3124006;E-mail:smxd2000@126.com

共同第一作者

对于人类 HPV 病毒感染的宫颈癌模型发挥什么样的作用,相关报道较少。本研究主要利用 HeLa 细胞在裸鼠皮下成瘤,检测 RES 在体内的抑癌效应,通过检测 RES 在宫颈癌细胞自噬方面发挥的作用,从体内外两方面探讨 RES 通过促进细胞自噬性死亡抑制宫颈癌的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与仪器

细胞培养及研究所用的 DMEM(11965-092)、胰酶(25300054)(Gibco 公司,美国);二甲基亚砜(DMSO,D2650)、Trizol 试剂(93289-100ML)(Sigma 公司,美国);逆转录酶(M1705)、RNA 酶抑制剂(N2511)(Promega 公司,美国);SYBR Green PCR Mix(1725204)(Bio-Rad 公司,美国);Rabbit Anti-LC3 Polyclonal Antibody(abs127815)、Rabbit anti-p62/SQSTM1 Polyclonal Antibody(abs143300)、Rabbit Anti-TMEM49 Polyclonal Antibody(abs126424)、Rabbit Anti-Beclin 1 Polyclonal Antibody(abs122672)(爱必信生物科技有限公司,中国);细胞凋亡-Hoechst 染色试剂盒(C0003)、Ad-GFP-LC3B(C3006-1ml)、Ad-mCherry-p62(C3016-1ml)、Ad-mCherry-GFP-LC3B(C3011-1ml)、Mito-Tracker Red CMXRos(C1049-50 μg)、HRP 标记的山羊抗兔二抗(A0208)、山羊抗小鼠二抗(A0216)(碧云天生物科技有限公司,中国);SpectraMax i3x 酶标仪(Molecular Devices 公司,美国);IX70 倒置荧光显微镜(Olympus 公司,日本);ABI 7500-PCR 仪(Life technology 公司,美国);BD FACSAria II 流式细胞仪(BD 公司,美国)。

1.1.2 实验动物

SPF 级 BALB/c 裸小鼠,6 周龄,雌性,体重 18~20 g,购自湖南斯莱克景达公司[SCXK(湘)2019-0004],在本实验室无特定病原体(specific-pathogen free, SPF)的饲养间【SCXK(鄂)2017-0093】饲养。按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀,所有动物实验通过襄阳市第一人民医院动物伦理委员会审批(审批号:20170622)。

1.2 方法

1.2.1 动物及肿瘤细胞株

18 只 Balb/C nude 鼠,均于右侧腋中线皮下注射瘤细胞(2×10^7 /mL, 100 μL/只),每三天测量并根据公式($V = a \times b^2/2$)计算瘤体的体积,做记录,

对实验小鼠进行称重。瘤体直径大于 2 mm 视为成瘤,将小鼠随机分成 3 组:对照组、RES 治疗组(50 mg/kg)、RES 治疗组(100 mg/kg),每组 6 只。RES 治疗组采用灌胃给药,对照组给予等体积含相同浓度溶剂的生理盐水。每天给药一次,连续给药三周。给药期间观察各组小鼠的精神、活动、饮食、饮水情况。给药三周后处死全部裸鼠。

HeLa 细胞(人宫颈癌细胞,HPV18 阳性)、SiHa 细胞(人宫颈癌细胞,HPV16 阳性)、End1/E6E7 细胞购自湖南丰汇生物科技有限公司,通过 STR 鉴定,与文献报道一致^[11,12]。培养于高糖 DMEM,添加 10% 胎牛血清,37 °C,5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2.2 免疫组化检测 LC3B、Beclin-1 和 P62 蛋白在肿瘤组织中的表达

取肿瘤组织,4% 多聚甲醛固定、石蜡包埋,5 μm 连续切片。采用免疫组化检测肿瘤组织中 LC3B、Beclin-1 和 P62 蛋白的表达,阳性染色呈棕黄色,先在低倍镜下扫视整个组织切片,在细胞染色清晰,背景良好的区域选择 4 个视野,进行高倍镜拍照,用 Image J 软件读取 4 个视野的阳性面积,计算相对表达量。

1.2.3 Real-time RT-PCR 检测自噬相关基因表达

HeLa 细胞用不同浓度 RES(10、20、40 μM)、Rapa 处理 24 h,采用 TRIzol 试剂提取总 RNA,合成 cDNA,用 SYBR Green PCR Mix 进行 PCR 反应条件:95 °C 预变性 5 min,然后 95 °C 15 s、56 °C 30 s、72 °C 30 s 进行 40 个循环,熔解曲线检测引物特异性。以 GAPDH 作为内参照, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算目的基因相对表达量。引物由金凯瑞生物科技有限公司合成(武汉),序列如下表 1。

1.2.4 Western blot 检测自噬相关蛋白的表达

HeLa 细胞同“1.2.3”处理,用预冷的 PBS 清洗培养板的细胞,加蛋白裂解液冰上提取蛋白。BCA 法测定蛋白浓度,调整蛋白浓度后加样缓冲液混合,100 °C 煮 5 min。在 12% SDS-PAGE 电泳胶中电泳分离,转膜,孵育一抗、二抗,以 GAPDH 为内参照,用 ECL 发光法显色,用 Bio-Rad 成像设备曝光采图,Image Lab 软件读取条带灰度值,计算相对表达量。

1.2.5 腺相关病毒 Ad-GFP-LC3B、Ad-mCherry-p62、Ad-mCherry-GFP-LC3B 感染 HeLa 细胞

HeLa 细胞接种到 24 孔细胞爬片上,每孔 2.5×10^4 个细胞,培养 24 h 完全贴壁后,换 800 μL 新鲜培养液,按照美国 CDC 的生物安全等级及其操作与

表 1 引物列表
Table 1 List of primers

基因 Gene	上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer
VMP1	5'-GGTGGCTTTCATTGGTGCTG-3'	5'-GAGCCTCCAGGTACTCCTGA-3'
Beclin-1	5'-GGGCTCCCAGGGATGG-3'-3'	5'-GGGGATGAATCTGCGAGAG-3'
P62	5'-CCGTGAAGGCCTACCTTCTG-3'	5'-TCCTCGTCACTGAAAAGGC-3'
GAPDH	5'-AGAAGGCTGGGGCTATTG-3'	5'-AGGGCCATCCACAGTTCTTC-3'

防护要求进行感染实验,每孔以 MOI 值为 5 进行腺病毒感染,感染后约 24 h,除去含有病毒的培养液,每孔加入 1 mL 新鲜的完全培养液,按照分组对细胞进行干预,继续培养 24 h 后,用 Hoechst 染细胞核,PBS 清洗后,取出细胞爬片,扣于有封片剂的载玻片上,荧光显微镜下观察细胞生长状况及荧光蛋白表达情况,根据荧光强度判断细胞自噬水平。

1.2.6 JC-1 试剂盒检测细胞线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential) $\Delta\Psi_m$

JC-1 是一种广泛用于检测 $\Delta\Psi_m$ 的理想荧光探针。在 $\Delta\Psi_m$ 较高时,JC-1 聚集在线粒体的基质 (matrix) 中,形成聚合物 (J-aggregates),可以产生红色荧光;在 $\Delta\Psi_m$ 较低时,JC-1 不能聚集在线粒体的基质中,此时 JC-1 为单体 (monomer),可以产生绿色荧光。常用红绿荧光的相对比例来衡量线粒体去极化的比例。 $\Delta\Psi_m$ 的下降是细胞凋亡早期的一个标志性事件。通过 JC-1 从红色荧光到绿色荧光的转变可以很容易地检测到 $\Delta\Psi_m$ 的下降,同时也可以作为细胞凋亡早期的一个检测指标。将 HeLa 和 SiHa 细胞分为对照、RES、自噬激活剂雷帕霉素 (rapamycin, Rapa)、自噬抑制剂巴伐洛霉素 A1 (bafilomycin A1, BAF A1)、RES + Rapa、RES + BAF A1,共 6 组,RES 工作浓度为 40 μM ,Rapa 工作浓度为 100 nM,BAF A1 工作浓度为 100 μM 。处理 24 h,用 PBS 洗涤细胞两次,直接用 1 mL JC-1 染色工作液孵育细胞,或用 0.25% 的胰酶消化后收集细胞,用 1 mL JC-1 染色工作液充分混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min,根据试剂说明,用流式细胞仪检测进行检测。

1.2.7 一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (红色荧光) 检测细胞凋亡

将 HeLa 按照“1.2.6”方法处理 24 h,用 PBS 洗涤细胞两次,4% 多聚甲醛固定细胞 30 min,用 PBS 洗涤一次,加入含 0.3% Triton X-100 的 PBS,室温孵育 5 min,用一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒

进行检测,TdT 酶与荧光标记液按 1: 9 配制,每孔细胞加 TUNEL 检测液 50 μL ,室温避光孵育 60 min,PBS 洗涤 3 次,用抗荧光淬灭封片剂封片,荧光显微镜下观察拍照。

1.3 统计学处理

所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用组间 t 检验,多样本均数间多重比较的方差分析及 q 检验,数据分析采用 GraphPad Prism 7 软件完成, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RES 显著抑制裸鼠皮下移植瘤生长

用药期间,每组裸鼠进食、饮水、体重及活动状况良好,未见明显不良反应。与对照组相比,RES (50 mg/kg) 和 RES (100 mg/kg) 治疗组肿瘤大小和质量明显低于 Vehicle 组 ($P < 0.05$)。结果见图 1a 和 1b。

2.2 RES 显著促进肿瘤组织中 LC3B 和 Beclin-1 表达、抑制 P62 表达

免疫组化检测肿瘤组织中 LC3B、P62 和 Beclin-1 蛋白的表达量,结果显示 RES 可以上调 LC3 和 Beclin-1 的蛋白表达水平同时下调 P62 蛋白表达水平,且有一定的浓度依赖。结果如图 1c 所示。这提示 RES 抑制宫颈癌生长可能与促进细胞自噬有关。

2.3 RES 调控细胞自噬相关基因 mRNA 和蛋白的表达

为证实 RES 是否调控宫颈癌细胞自噬,我们通过 Real-time RT-PCR 检测细胞自噬相关基因 VMP1、Beclin-1 和 P62 的 mRNA 表达,结果显示 RES 可以显著促进自噬基因 VMP1、Beclin-1 的表达,显著抑制 P62 的表达,与自噬激活剂 Rapa 的效果相似,其中 40 μM RES 与对照组相比均有统计学意义 ($P < 0.05$),结果如图 2a 所示。Western blot 检测结果也显示 RES 促进自噬相关蛋白 VMP1、Beclin-1 和 LC3B 的表达,如图 2b 所示。Ad-GFP-LC3B

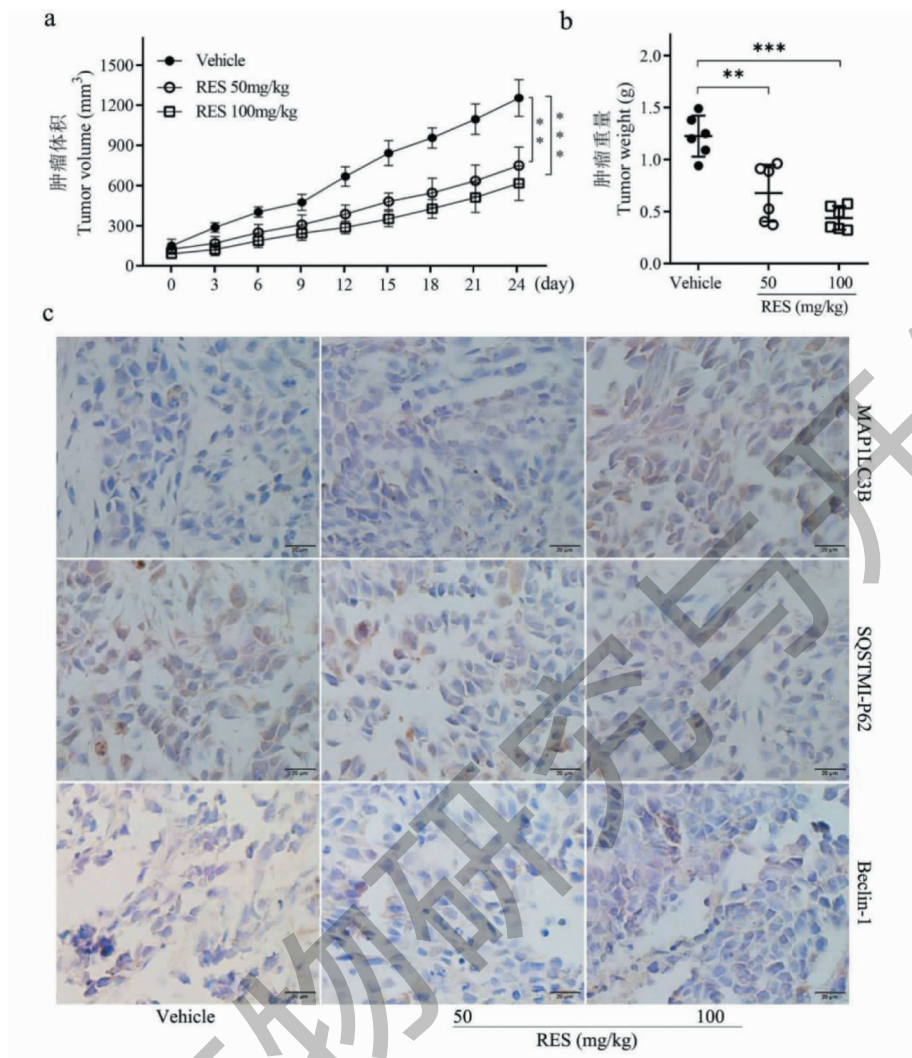


图1 RES抑制宫颈癌裸鼠皮下移植瘤的生长

Fig. 1 RES inhibits the growth of cervical cancer subcutaneous xenografts in nude mice

注:(a) HeLa 细胞裸鼠皮下移植肿瘤生长体积;(b) HeLa 细胞裸鼠皮下移植肿瘤重量,与 Vehicle 组相比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; (c) 肿瘤组织切片进行免疫组化检测自噬相关蛋白 P62、Beclin-1 和 LC3B (标尺:20 μm)。Note: (a) The tumor volume; (b) The tumor weight, compared with vehicle, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (c) The autophagy-related protein levels of P62, Beclin-1, and LC3B in tumor tissue was detected using immunohistochemical (Scale bar; 20 μm).

和 Ad-mCherry-p62 感染细胞后,荧光显微镜检测结果显示,RES 抑制 P62 的表达,促进 LC3B 的表达,如图 2c 所示。

2.4 RES 促进 HeLa 细胞发生细胞自噬

为检测 RES 诱导的细胞自噬是否与线粒体损伤相关,在感染 Ad-GFP-LC3B 后,RES、Rapa、BAFA1 单独或联合作用细胞 24 h 后,再用 Mito-Tracker Red CMXRos 标记线粒体,然后用荧光显微镜检测拍照,结果发现 GFP-LC3B 标记的自噬小体增加伴随 Mito-Tracker Red CMXRos 标记的线粒体的减少,如图 3a 所示。因为 BAFA1 抑制自噬小体

的酸化,所以 RES 与 BAFA1 联合组自噬小体累积明显(图 3a)。而 P62 蛋白在 RES 组、Rapa 组、RES + Rapa 组都明显降低,BAFA1 组、BAFA1 + RES 组没有明显变化(图 3b),这也说明 BAFA1 或者 BAFA1 与 RES 联用抑制自噬小体的降解。另外,为检测 RES 对自噬流的影响,用双荧光标记的腺病毒载体 Ad-mCherry-GFP-LC3B 感染 HeLa 细胞,24 h 后再用 RES、Rapa、BAFA1 单独或联合作用细胞 24 h,然后用荧光显微镜检测拍照,在非自噬的情况下,荧光显微镜下 mCherry-GFP-LC3B 以弥散的黄色荧光(mCherry 和 GFP 的综合效果)形式存在于细

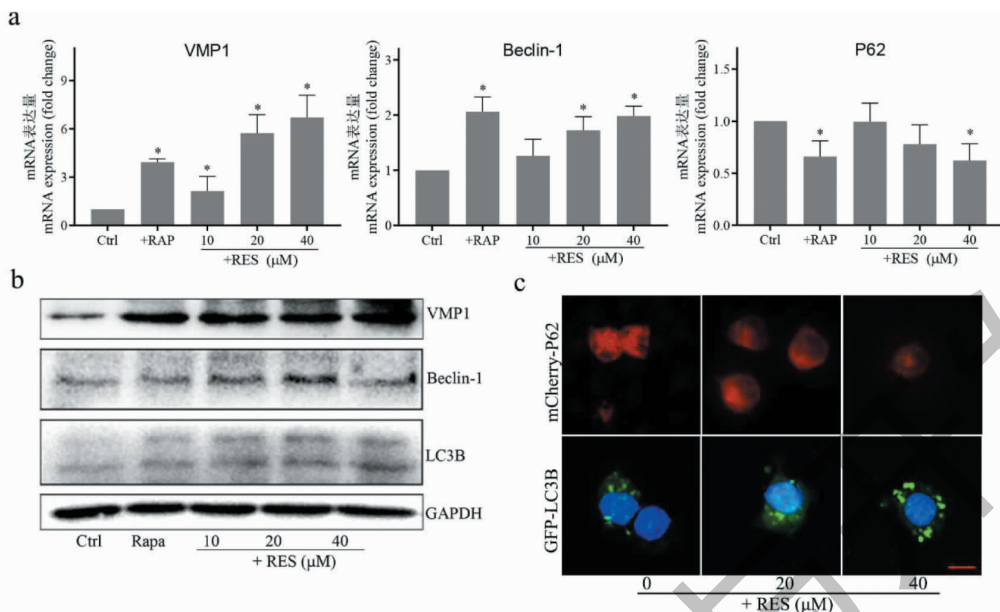


图2 RES促进宫颈癌细胞自噬

Fig. 2 RES promotes autophagy of cervical cancer cells

注:(a)Real-time RT-PCR检测HeLa细胞中VMP1、Beclin-1、P62 mRNA表达水平,与对照组比,* $P < 0.05$;(b)Western blotting检测HeLa细胞中VMP1、Beclin-1、LC3B蛋白表达水平;(c)Ad-GFP-LC3B和Ad-mCherry-p62感染细胞后,荧光显微镜检测小体(标尺:20 μm)。Note:(a)The expression levels of VMP1, Beclin-1, P62 mRNA in HeLa cells was detected using Real-time RT-PCR, compared with the control group, * $P < 0.05$;(b)The protein levels of VMP1, Beclin-1, LC3B in HeLa cells was detected using Western blotting;(c)RES inhibited the expression of P62 and promoted the expression of LC3B, increased the number of autophagosomes (Scale bar:20 μm).

胞质中;而在自噬的情况下,荧光显微镜下 mCherry-GFP-LC3B 则聚集在自噬体膜上,以黄色斑点的形式表现出来(LC3B dot or punctae);当自噬体与溶酶体融合后,因 GFP 荧光的部分淬灭而以红色斑点的形式表现出来。结果显示 RES 促进 HeLa 细胞自噬流的发生,RES 组与对照组相比,细胞内黄色斑点明显增加,说明自噬小体形成增多;RES + Rapa 组比 Rapa 组红色斑点增加,说明自噬溶酶体增多;BAFA1 组、RES + BAFA1 组只有绿色荧光,而且绿色荧光有进入细胞核的现象,如图 3c。这些提示 RES 促进细胞自噬流的形成,而 BAFA1 阻断自噬流后 RES 不能再恢复自噬流。

2.5 RES 抑制宫颈癌与降低 $\Delta\Psi_m$ 相关

JC-1 检测结果显示 RES, Rapa 和 BAFA1 对宫颈癌细胞的 $\Delta\Psi_m$ 具有不同的影响,RES 和 BAFA1 不同程度的诱导 HeLa 细胞(图 4a、c)和 SiHa(图 4b、c) $\Delta\Psi_m$ 降低,Rapa 对 $\Delta\Psi_m$ 的影响不明显(图 4a、b、c);与单独使用 RES 组相比,同时使用 RES 和 Rapa, $\Delta\Psi_m$ 降低比例有所减少,但没有统计学差异,而同时使用 RES 和 BAFA1 组的细胞 $\Delta\Psi_m$ 降低更加显著,如图 4a、b、c。 $\Delta\Psi_m$ 的降低,是细胞凋

亡级联反应过程中最早发生的事件,它可引起线粒体膜发生一连串的生物化学变化,导致细胞凋亡级联反应,因此 JC-1 可以用于早期的细胞凋亡检测, $\Delta\Psi_m$ 下降的比例增加,也说明发生早期凋亡的细胞比例也增加。接下来,用 TUNEL 试剂检测 HeLa 细胞各组处理后的凋亡情况,发现 HeLa 细胞凋亡比例的变化与 $\Delta\Psi_m$ 降低的比例基本一致,RES 和 BAFA1 不同程度的诱导 HeLa 细胞凋亡,两者联合使用后,细胞凋亡比例增加;Rapa 对细胞凋亡没有明显作用,与单独使用 RES 相比,RES 和 Rapa 联合组细胞凋亡比例有所下降(如图 4d)。这些结果提示 RES 对线粒体膜电位以及细胞凋亡的作用在与 BAFA1 联用后有叠加效应,与 Rapa 联用后有消减效应,说明 RES 对宫颈癌细胞的自噬和凋亡都有影响,自噬激活的情况下凋亡减弱,自噬抑制的情况下凋亡增强。

3 讨论

宫颈癌治疗以手术为主,术后联合化、放疗。由于化疗药物大多具有较强的不良反应和易产生耐药性,限制了宫颈癌的临床治疗及预后,因而寻找抗癌效果好而毒性低的药物是临床治疗的紧迫需求。近

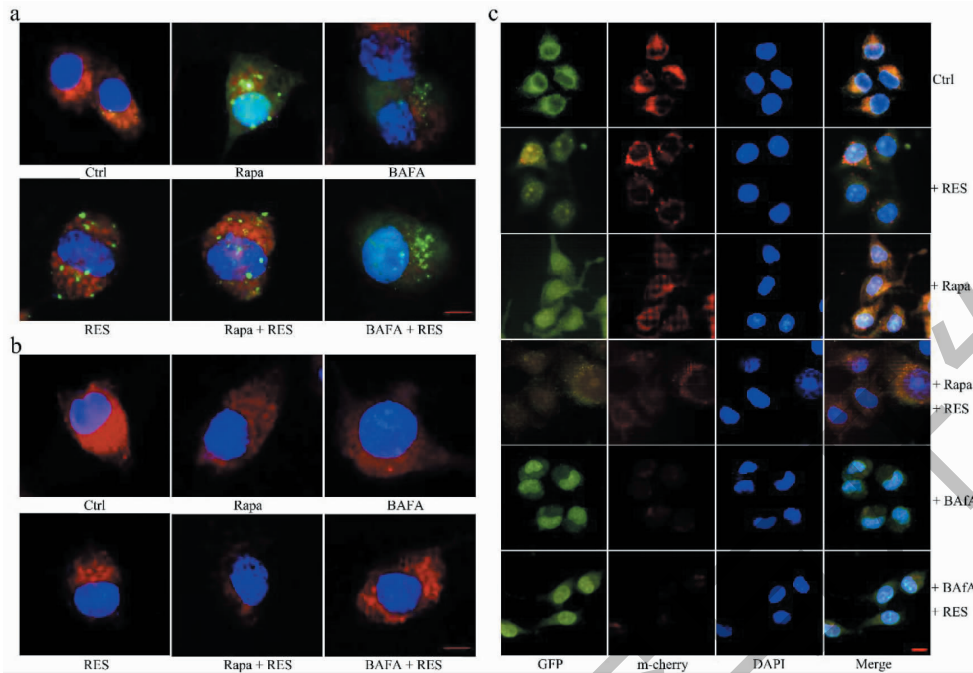


图3 RES对HeLa细胞自噬的影响

Fig. 3 Effects of RES on autophagy of HeLa cells

注:(a) Ad-GFP-LC3B 标记自噬小体, Mito-Tracker Red CMXRos 标记线粒体, 荧光显微镜观察自噬小体的变化(标尺: 20 μm); (b) Ad-mCherry-p62 标记 P62, RES 与 Rapa、BAFA1 处理 HeLa 细胞 24 h 后, 荧光显微镜拍照(标尺: 20 μm); (c) Ad-mCherry-GFP-LC3B 检测自噬流(标尺: 20 μm)。Note: (a) Ad-GFP-LC3B labeled autophagosomes, Mito-Tracker Red CMXRos labeled mitochondria, the changes of autophagosomes was observed by fluorescence microscope (Scale: 20 μm); (b) Ad-mCherry-p62 labeled P62, RES and Rapa, BAFA1 treated HeLa cells for 24 h, the changes of autophagosomes was observed by fluorescence microscope (Scale: 20 μm); (c) Autophagic flow of HeLa cells was detected by using Ad-mCherry-GFP-LC3B (Scale bar: 20 μm).

年来的大量研究证实 RES 具有良好的抗肿瘤能力, 在肿瘤发生、发展中均有功效^[6,7,9,13]。研究证实, 在宫颈癌细胞中组织蛋白酶 L 介导了白藜芦醇诱导的自噬性和凋亡性细胞死亡^[14], 白藜芦醇诱导宫颈癌细胞系的线粒体膜电位降低, 促进其凋亡的发生, 也可以增加溶酶体通透性^[15]。本研究进一步通过体内外实验验证了白藜芦醇通过自噬途径抑制宫颈癌的效应, 首先通过体内实验证实 RES 显著抑制宫颈癌的进展, 而且, 组织水平检测发现自噬相关蛋白的表达受到 RES 的调节, 因此推测 RES 抑制宫颈癌的机制可能与 RES 诱导自噬性细胞死亡 (autophagic cell death, ACD) 的发生有关。ACD 是细胞发生过度自噬的结果, 也是与细胞凋亡不同的 Caspase 非依赖性的 II 型程序性细胞死亡^[16], 其主要特征为细胞质中出现大量自噬体和自噬溶酶体, 胞质中绝大部分物质被降解, 但细胞核依然保持完整性^[17]。在持续的应激状态及持续进展的自噬作用下, 细胞会由于过度的自我损耗而死亡^[18]。这类细胞的死亡常常带有自噬特征, 主要表现为 Beclin1 的过表达

以及细胞中产生大量自噬体和自噬溶酶体^[19]。液泡膜蛋白 (vacuole membrane protein-1, VMP1) 是公认的自噬蛋白, 其表达水平与肿瘤恶性程度负相关^[20], 与 Beclin-1 共同作为激活自噬的分子开关^[21]。VMP1 在宫颈癌中的表达以及作用还未见报道。

通过 RT-PCR、Western blot 以及自噬小体检测均证实, RES 促进宫颈癌细胞 ACD 的发生。结果显示, 在宫颈癌细胞中 Beclin-1、VMP1 以及位于自噬小体和自噬溶酶体内膜的 LC3B 可以被 RES 诱导高表达, 效应与 Rapa 相似。Rapa 是哺乳动物 TOR (mTOR) 激酶的抑制剂, 与 FKBP12 结合抑制 mTORC1 激活自噬, 从而发挥肿瘤抑制作用^[22,23]。进一步检测自噬小体及自噬流, 发现 RES 和 Rapa 均可促进自噬小体和自噬溶酶体的形成, 两者联用后自噬小体和自噬溶酶体进一步增加, 伴随 P62 和线粒体的减少, 但细胞核仍保持完整; 同时, 我们观察到 BAFA1 可阻断 RES 造成的宫颈癌细胞的自噬流, BAFA1 与 RES 联用造成自噬小体和 P62 的累

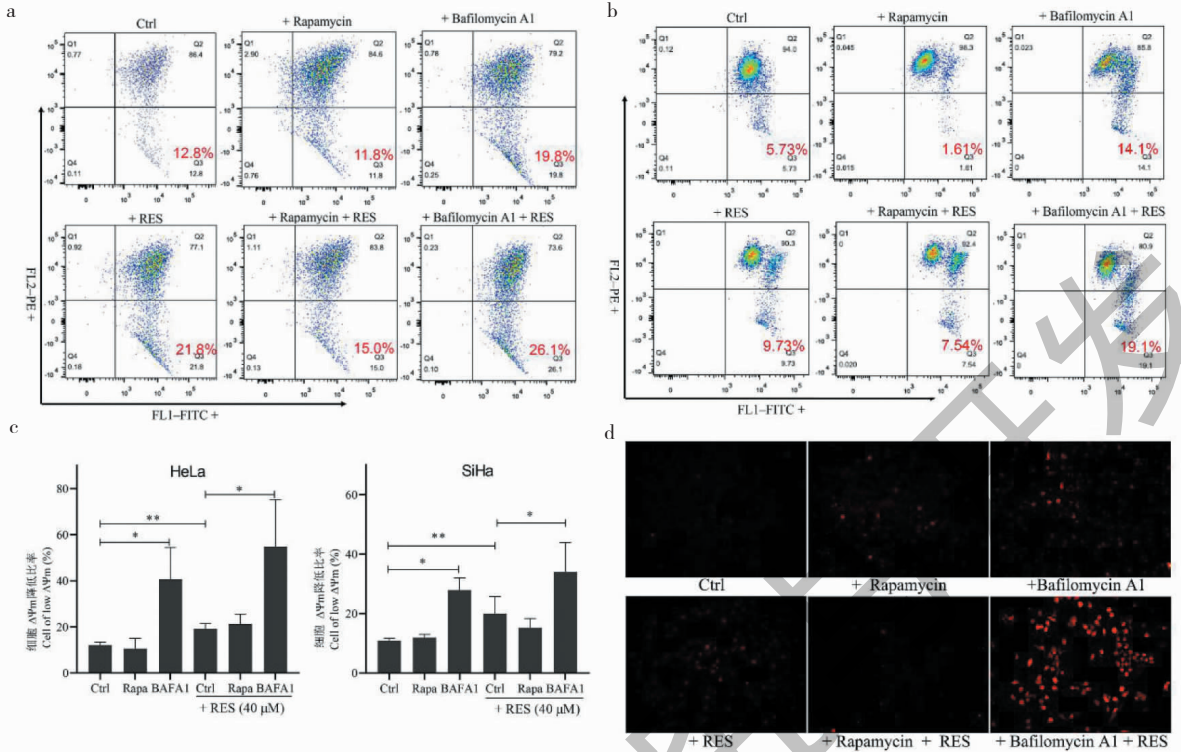


图4 RES与Rapa、BAFA1诱导宫颈癌细胞凋亡

Fig. 4 RES and Rapa,BAFA1 induce cervical cancer cell apoptosis

注:(a)流式检测RES与Rapa、BAFA1对HeLa细胞线粒体膜电位的影响;(b)流式检测RES与Rapa、BAFA1对SiHa细胞线粒体膜电位的影响;(c)图a和图b结果的统计分析,与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;(d)荧光显微镜检测RES与Rapa、BAFA1对HeLa细胞凋亡的影响。Note:(a) The effect of RES,Rapa,and BAF1 on the mitochondrial membrane potential of HeLa cells;(b) The effect of RES,Rapa,and BAF1 on the mitochondrial membrane potential of SiHa cells;(c) Statistical analysis of (a) and (b),compared with the control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;(d) The effect of RES,Rapa,and BAF1 on apoptosis of HeLa cells was used by fluorescence microscopy.

积,伴随线粒体的显著减少,而且细胞核明显异常与其它组。BAFA1是一种从链霉菌属物种中分离的大环内酯类抗生素,是特异的 vacuolar-type H⁺ ATPase(V-ATPase)抑制剂。BAFA1可以靶向线粒体,诱导凋亡诱导因子从线粒体转至细胞核,促进 caspase 非依赖性凋亡。此外,BAFA1诱导 Beclin-1与 Bcl-2结合,进一步抑制自噬,促进细胞凋亡^[24]。我们的实验结果也证实了这一点,通过检测线粒体膜电位和 TUNEL 阳性率,我们发现 RES 可以诱导线粒体膜电位下降促进细胞凋亡,而在自噬激活和自噬抑制的情况下会产生对宫颈癌细胞的不同反应。有文献报道,RES 阻止 Rapa 诱导的 P62 降解,因此 Rapa 和 RES 的联合能够阻止自噬的上调并诱导乳腺癌细胞凋亡^[25]。但在本研究中,我们发现 RES 和 Rapa 联用可促进宫颈癌细胞过度自噬,自噬溶酶体的大量形成造成 ACD 的发生;而当宫颈癌细胞的自噬流被阻断,RES 又可通过降低线粒体膜电

位诱导内源性的细胞凋亡。

由此可见,RES 在妇科肿瘤宫颈癌的治疗方面有良好的应用前景,而且与自噬激活剂 Rapa 或者自噬抑制剂 BAFA1 联合使用,能从促进自噬性死亡或者促进细胞凋亡两个途径起到更加积极的抗癌作用。

参考文献

- Jiang Z, Chen K, Cheng L, et al. Resveratrol and cancer treatment; updates[J]. Ann N Y Acad Sci, 2017, 1403(1): 59-69.
- Xiao Q, Zhu W, Feng W, et al. A review of resveratrol as a potent chemoprotective and synergistic agent in cancer chemotherapy[J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 1534.
- Dai Y, Cao DJ. Synthesis and anti-tumor activity of conjugate of resveratrol and furoxans[J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2019, 31: 502-505.
- Tian Y, Song W, Li D, et al. Resveratrol as a natural regulator

- of autophagy for prevention and treatment of cancer[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12:8601-8609.
- 5 Wu Y, Liu F. Targeting mTOR: evaluating the therapeutic potential of resveratrol for cancer treatment[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2013, 13:1032-1038.
 - 6 Stakleff KS, Sloan T, Blanco D, et al. Resveratrol exerts differential effects *in vitro* and *in vivo* against ovarian cancer cells[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13:1333-1340.
 - 7 Shindikar A, Singh A, Nobre M, et al. Curcumin and resveratrol as promising natural remedies with nanomedicine approach for the effective treatment of triple negative breast cancer[J]. *J Oncol*, 2016, 2016:9750785.
 - 8 Schlachterman A, Valle F, Wall KM, et al. Combined resveratrol, quercetin, and catechin treatment reduces breast tumor growth in a nude mouse model[J]. *Transl Oncol*, 2008, 1(1):19-27.
 - 9 Riha J, Brenner S, Bohmdorfer M, et al. Resveratrol and its major sulfated conjugates are substrates of organic anion transporting polypeptides(OATPs): impact on growth of ZR-75-1 breast cancer cells[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2014, 58:1830-1842.
 - 10 Carter LG, D'Orazio JA, Pearson KJ. Resveratrol and cancer: focus on *in vivo* evidence[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2014, 21(3):R209-225.
 - 11 Saha SK, Khuda-Bukhsh AR. Berberine alters epigenetic modifications, disrupts microtubule network, and modulates HPV-18 E6-E7 oncoproteins by targeting p53 in cervical cancer cell HeLa; a mechanistic study including molecular docking[J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 744:132-146.
 - 12 Souza RP, Bonfim-Mendonca PS, Gimenes F, et al. Oxidative stress triggered by apigenin induces apoptosis in a comprehensive panel of human cervical cancer-derived cell lines[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017:1512745.
 - 13 Le Corre L, Chalabi N, Delort L, et al. Resveratrol and breast cancer chemoprevention: molecular mechanisms[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2005, 49:462-471.
 - 14 Hsu KF, Wu CL, Huang SC, et al. Cathepsin L mediates resveratrol-induced autophagy and apoptotic cell death in cervical cancer cells[J]. *Autophagy*, 2009, 5:451-460.
 - 15 García-Zepeda SP, García-Villa E, Díaz-Chávez J, et al. Resveratrol induces cell death in cervical cancer cells through apoptosis and autophagy[J]. *Eur J Cancer Prev*, 2013, 22:577-584.
 - 16 Chen Y, Li X, Guo L, et al. Combining radiation with autophagy inhibition enhances suppression of tumor growth and angiogenesis in esophageal cancer[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12:1645-1652.
 - 17 Chen Y, McMillan-Ward E, Kong J, et al. Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells[J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(1):171-182.
 - 18 Mah LY, Ryan KM. Autophagy and cancer[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4(1):a008821.
 - 19 Denton D, Nicolson S, Kumar S. Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts[J]. *Cell Death Differ*, 2012, 19(1):87-95.
 - 20 Guo XZ, Ye XL, Xiao WZ, et al. Downregulation of VMP1 confers aggressive properties to colorectal cancer[J]. *Oncol Rep*, 2015, 34:2557-2566.
 - 21 Gu J, Wang Y, Liu Y, et al. Inhibition of autophagy alleviates cadmium-induced mouse spleen and human B cells apoptosis[J]. *Toxicol Sci*, 2019, 170(1):109-122.
 - 22 Zhang JW, Zhao F, Sun Q. Metformin synergizes with rapamycin to inhibit the growth of pancreatic cancer *in vitro* and *in vivo*[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15:1811-1816.
 - 23 Rangaraju S, Verrier JD, Madorsky I, et al. Rapamycin activates autophagy and improves myelination in explant cultures from neuropathic mice[J]. *J Neurosci*, 2010, 30:11388-11397.
 - 24 Yuan N, Song L, Zhang S, et al. Bafilomycin A1 targets both autophagy and apoptosis pathways in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Haematologica*, 2015, 100:345-356.
 - 25 Alayev A, Berger SM, Kramer MY, et al. The combination of rapamycin and resveratrol blocks autophagy and induces apoptosis in breast cancer cells[J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116:450-457.