

[药 理]

土槿皮乙酸通过调控 PAX2 对宫颈癌细胞的影响

关德凤¹, 秦天生², 杨永秀^{1,3*}
(1. 兰州大学第一临床医学院, 甘肃 兰州 730000; 2. 甘肃省人民医院妇科, 甘肃 兰州 730000; 3. 兰州大学第一医院妇科, 甘肃省妇科肿瘤重点实验室, 甘肃 兰州 730000)

摘要: **目的** 探讨土槿皮乙酸通过调控 PAX2 对宫颈癌细胞的影响及其分子机制。**方法** MTT 法检测细胞增殖情况; shRNA 干扰技术构建 PAX2 低表达 HeLa 细胞株, 分为空白组、阴性对照组、sh-PAX2 组、土槿皮乙酸组、土槿皮乙酸+sh-PAX2 组; 流式细胞术检测各组细胞凋亡情况; Transwell 小室迁移实验检测各组细胞迁移能力; String 预测 PAX2 潜在作用蛋白; Western blot 检测蛋白表达; 免疫荧光实验观察各组细胞中 β -catenin 的定位。**结果** 土槿皮乙酸可时间-浓度依赖地抑制宫颈癌细胞增殖。各宫颈癌细胞中 PAX2 蛋白表达与土槿皮乙酸对各细胞的 IC₅₀ 均呈负相关 ($P<0.05$)。土槿皮乙酸可抑制 HeLa 细胞中 PAX2 蛋白表达; 土槿皮乙酸和低表达 PAX2 均可诱导 HeLa 细胞凋亡并抑制其迁移, 可降低 Bcl-2、Cyclin D1、Survivin、MMP2、MMP9、 β -catenin 和 p- β -catenin 蛋白和升高 BAX 蛋白表达 ($P<0.05$), 可使 HeLa 细胞中 β -catenin 的进核量减少。**结论** 土槿皮乙酸在宫颈癌细胞中抑制 PAX2 表达和 Wnt/ β -catenin 信号通路进而诱导细胞凋亡并抑制其转移。

关键词: 土槿皮乙酸; PAX2; 宫颈癌; 凋亡; 迁移; Wnt/ β -catenin 信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2020)09-2291-08

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.09.009

Effects of Pseudolaric acid B on cervical cancer cells via PAX2 regulation

GUAN De-feng¹, QIN Tian-sheng², YANG Yong-xiu^{1,3*}
(1. The First Clinical Medical College of Lanzhou University, Lanzhou, 730000, China; 2. Department of Gynecology, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou, 730000, China; 3. Department of Gynecology, The First Hospital of Lanzhou University, Gansu Key Laboratory of Gynecologic Oncology, Lanzhou, 730000, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the effects of Pseudolaric acid B (PAB) on cervical cancer (CC) cells and its molecular mechanism via PAX2 regulation. **METHODS** Both MTT assay in the determinations of cells proliferation, and shRNA interference technology in the construction of weak PAX2 expression in HeLa cells were performed. CC cells divided into blank group, negative control group, sh-PAX2 group, PAB group, PAB + sh-PAX2 group were subjected to determinations of cellular apoptosis by flow cytometry, determinations of cells migration ability by transwell chamber migration experiment, and had their potential protein of PAX2 predicted by String, their proteins expression identified by Western blot. And the localization of β -catenin was observed by immunofluorescence assay. **RESULTS** PAB inhibited CC cells proliferation in a time- and concentration-dependent manner. The expression of PAX2 protein in CC cells was negatively correlated with the IC₅₀ of PAB on each cell ($P<0.05$). Inhibiting PAX2 protein expression in HeLa cells, PAB worked in the way of weak PAX2 expression in inducing HeLa cells apoptosis, inhibiting their migration, reducing BCL-2, Cyclin D1,

收稿日期: 2019-10-08
基金项目: 国家自然科学基金项目 (81801419); 兰州大学中央高校基本科研业务费专项资金资助 (561219009); 兰州大学第一医院院内基金项目 (ldyyyn2018-36); 兰州大学第一临床医学院卓越计划项目 (201900600099)
作者简介: 关德凤 (1991—), 女, 博士生, 研究方向为妇科肿瘤的诊治。Tel: 18794843624, E-mail: defengguan@126.com
* 通信作者: 杨永秀 (1964—), 女, 博士, 主任医师, 研究方向为妇科肿瘤的诊治。Tel: 13893156627, E-mail: yongxiuyang@163.com
网络出版日期: 2020-07-10
网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20200709.1517.002.html>

Survivin, MMP2, MMP9, β -catenin and p- β -catenin protein and increasing BAX protein expression ($P<0.05$), and decreasing the amount of β -catenin in Hela cells nucleus. **CONCLUSION** PAB inhibits PAX2 expression and Wnt/ β -catenin signaling pathway in CC cells, and therefore induces cells apoptosis and inhibits their metastasis.

KEY WORDS: Pseudolaric acid B (PAB); PAX2; cervical cancer (CC); apoptosis; migration; Wnt/ β -catenin signaling pathway

宫颈癌 (Cervical cancer, CC) 是最常见的妇科恶性肿瘤, 其发病率和死亡率在女性所有癌症中位列第四^[1]。控制肿瘤细胞的恶性增殖并诱发其凋亡是治疗癌症的重要途径^[2]。土槿皮乙酸是从土槿皮中分离提取的具有生物活性的二萜类化合物, 具有广泛的抗癌作用^[3], 可诱发 caspases 的激活, 引起肿瘤细胞凋亡并有效减弱肿瘤细胞对于化疗的耐药性^[4], 但其对宫颈癌的治疗作用及其分子机制尚不明确。PAX2 是 PAX 转录因子家族成员之一, 在成年个体除在特定组织中表达外几乎被完全沉默, 近年来研究显示, PAX2 在多种肿瘤组织中被重新激活并表现出促进癌细胞增殖、迁移的特性^[5-6]。Wnt/ β -catenin 信号通路在恶性肿瘤中起关键作用^[7], 当 Wnt 配体和 Wnt 通路调节分子突变时导致 Wnt 信号异常激活, 进而促进 CC 细胞的生长和侵袭, 研究表明在不同 CC 细胞系和活检组织中, Wnt4、Wnt8A、Wnt10B 和 Wnt14 相对高表达而 Wnt7A 则被强烈下调^[8-9]; 而抑制 Wnt 信号能够不同程度的抑制 CC 细胞增殖并促进其凋亡^[10]。因此本研究分析了土槿皮乙酸对 CC 细胞凋亡、迁移的影响, 探究了土槿皮乙酸对 PAX2 和 Wnt/ β -catenin 信号通路的作用, 初步阐明土槿皮乙酸通过调控 PAX2 对 CC 细胞产生影响。

1 材料

1.1 细胞 人 CC 细胞 Hela、SiHa、CaSki、C33A 和 MS751 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)。

1.2 药物与试剂 土槿皮乙酸 (美国 Sigma 公司, 货号 L8170); MTT (北京索莱宝科技有限公司, 货号 IM0280); 细胞凋亡检测试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 货号 CA1040); Transwell 小室 (美国 Chemicon 公司, 货号 ECM550); Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent (美国 Thermo Fisher 公司, 货号 11668027); Matrigel (北京索莱宝科技有限公司, 货号 356231); RIPA 裂解液 (上海碧云天生物技术有限公司, 货号 P0013C); 兔抗 BAX 单克隆抗体 (英国 Abcam 公司, 货号 ab32503); 兔抗 Bcl-2 单克隆抗体

(英国 Abcam 公司, 货号 ab185002); 兔抗 MMP2 单克隆抗体 (英国 Abcam 公司, 货号 ab215986); 兔抗 MMP9 多克隆抗体 (英国 Abcam 公司, 货号 ab38898); 兔抗 Cyclin D1 单克隆抗体 (英国 Abcam 公司, 货号 ab134175); 兔抗 Survivin 单克隆抗体 (英国 Abcam 公司, 货号 ab76424); 兔抗 PAX2 单克隆抗体 (英国 Abcam 公司, 货号 ab79389); 兔抗 β -catenin 单克隆抗体 (英国 Abcam 公司, 货号 ab32572); 兔抗 p- β -catenin 多克隆抗体 (英国 Abcam 公司, 货号 ab27798); 兔抗 GAPDH 单克隆抗体 (美国 CST 公司, 货号 5174); 山羊抗兔 IgG H&L 抗体 (英国 Abcam 公司, 货号 ab97051); Alexa Fluor © 647 标记的山羊抗兔二抗 (英国 Abcam 公司, 货号 ab150083)。

2 方法

2.1 细胞培养 C33A、Hela 和 SiHa 细胞采用 DMEM 培养基培养, MS751 和 CaSki 细胞采用 RPMI 1640 培养基培养。培养基中均加入 10% FBS、1% 青霉素和链霉素。所有细胞在 5% CO₂、37 °C 下无菌培养。

2.2 MTT 实验 待细胞生长至 80% 汇合度时, 胰蛋白酶消化配制成浓度为 $1.5\times10^5/\text{mL}$ 的单细胞悬液, 以每孔 100 μL 接种于 96 孔板中, 过夜培养后加入不同浓度的土槿皮乙酸 (2.5、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 或者 0.16% DMSO 分别处理细胞 24、48、72 h。处理结束后向培养板中加入新鲜的 MTT (5 mg/mL), 培养 4 h, 加入 DMSO 进行溶解, 在 570 nm 波长下检测吸光度值 (OD), 并计算抑制率和 IC₅₀, 抑制率 = $[(OD_{\text{空白组}} - OD_{\text{给药组}}) / OD_{\text{空白组}}] \times 100\%$ 。

2.3 shRNA 干扰技术构建 PAX2 低表达 Hela 细胞株 将 PAX2 shRNA 和 NC shRNA 序列与 Age I 酶切位点一起加入, 并在酶消化后与 pGC-FU 载体连接。然后将重组质粒转染到 HEK293T 细胞中, 筛选出阳性细胞, 提取质粒。将 Hela 细胞接种到 6 孔板上, 根据 lipofectamine 2000 的说明, 在细胞密度达到 70% ~ 80% 后转染细胞。使用 250 μL 无血

清培养基 Opti-MEM 分别稀释 100 pmol PAX2 shRNA 和 100 pmol NC shRNA 序列质粒, 在室温下孵育 5 min, 使用 250 μ L 无血清培养基 Opti-MEM 稀释 5 μ L lipofectamine 2000, 在室温下孵育 5 min, 将稀释后的 PAX2 shRNA、NC shRNA 序列质粒分别与稀释后的 lipofectamine 2000 充分混合后, 室温温育 20 min, 然后加入预先接种好细胞的培养孔中。细胞在 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 下培养 8 h 使质粒转入细胞, 然后将细胞在完全培养基中培养 24~48 h, 用于后续的实验。

2.4 细胞分组与处理 选择对数生长期的细胞分为空白组、阴性对照组 (用 NC shRNA 质粒转染), sh-PAX2 组 (用 PAX2 shRNA 质粒转染), 土槿皮乙酸组 (用 15 μ mol/L 土槿皮乙酸处理未转染的 Hela 细胞), 土槿皮乙酸+sh-PAX2 组 (用 15 μ mol/L 土槿皮乙酸处理并用 PAX2 shRNA 质粒转染)

2.5 流式细胞术检测细胞凋亡 细胞接种于 6 孔板, 过夜培养, 按照“2.4”项下加入药物处理 24 h 后, 胰酶消化成单细胞悬液, 用 PBS 洗涤细胞, 然后收集 $1\times 10^5\sim 5\times 10^5$ 个细胞, 每管中加入 500 μ L 结合缓冲液以悬浮细胞, 然后加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI, 充分混合后, 室温下避光静置孵育 10 min。在 1 h 内, 将细胞转移至流式细胞仪进行检测。通过软件分析构建包括四个象限的细胞直方图。

2.6 Transwell 小室迁移实验 将 4 $^{\circ}$ C 预冷的以 1:5 稀释的基质胶加入到 Transwell 上室中, 铺匀后在 37 $^{\circ}$ C 下干燥 70 min。制备各组细胞悬浮液, 每组设置 5 个重复孔, 将细胞浓度调节至 5×10^5 /mL。向上室添加 200 μ L 细胞悬浮液, 向下室添加 500 μ L 含有 20% FBS 的培养基作为趋化因子。按照“2.4”项下加入药物后将小室放入 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 下培养 24 h, 棉签擦去上室中未转移的细胞, PBS 漂洗, 甲醇固定细胞, 用 0.1% 结晶紫染色后, 每孔选取 5 个视野在光学显微镜下拍照, 统计各组迁移细胞数目。

2.7 String 预测 PAX2 潜在作用蛋白 在 <https://string-db.org/> 网站上对 PAX2 的作用蛋白进行预测。

2.8 免疫荧光实验 将生长至对数期的各组细胞以 4.5×10^4 个接种至 6 孔板中, 过夜后按照“2.4”项下加入药物处理细胞 24 h, 洗涤细胞, 4% 多聚甲醛固定细胞, 0.25% Triton $\times$ 100 透膜, 10% 山羊血清封闭, 加入一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜, 洗涤, 加

入二抗, 室温 2 h, 洗涤, 倒置荧光显微镜拍照。

2.9 Western blot 实验 待细胞生长至对数期, 按照“2.4”项下加入药物处理细胞 24 h 后, 采用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, 加入上样缓冲液。同时取一小部分用 BCA 法检测蛋白浓度。通过 10% 或 12% 的 SDS-PAGE 电泳分离蛋白质并转移到硝酸纤维素膜上。将膜用含有 5% 脱脂牛奶的 TBST 室温封闭 2 h。(PAX2、MMP2、MMP9、Bcl-2、BAX、GAPDH 以 1:1 000 稀释, Cyclin D1、Survivin 以 1:1 500 稀释, β -catenin 以 1:5 000 稀释, p- β -catenin 以 1:800 稀释) 4 $^{\circ}$ C 下孵育一抗过夜, TBST 洗涤后室温孵育二抗 2 h, 洗涤, 加入 ECL 发光液显色并在自动曝光仪中拍照。采用 ImageProPlus 软件分析各蛋白条带的灰度值, 计算相对表达量。

2.10 统计学分析 采用 SPSS 25.0 进行统计分析, 计量资料以 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 相关性分析采用 Pearson 相关分析, 以 $P\leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 土槿皮乙酸对 CC 细胞增殖的影响 在同一时间下土槿皮乙酸对各细胞增殖的抑制率均随浓度的增加而增加, 在同一浓度下土槿皮乙酸对各细胞增殖的抑制率均随时间的增加而增加, 提示土槿皮乙酸可时间-浓度依赖地抑制 CC 细胞增殖 (图 1)。此外在同一处理时间下, 土槿皮乙酸对各细胞的 IC₅₀ 不同, 其中在 24、48、72 h 下的 IC₅₀ 由大到小依次均为 MS751、C33A、CaSki、SiHa 和 Hela (表 1)。由于 Hela 细胞对土槿皮乙酸最敏感, 故本研究选取 Hela 细胞作为后续研究对象, 土槿皮乙酸处理 Hela 细胞 24 h, IC₅₀ 约为 15 μ mol/L, 因此后续土槿皮乙酸处理浓度选为 15 μ mol/L。

3.2 各 CC 细胞中 PAX2 蛋白表达及其与土槿皮乙酸对各细胞的 IC₅₀ 的相关性分析 在各 CC 细胞中, PAX2 蛋白表达由高到低依次为 Hela、SiHa、CaSki、C33A 和 MS751。经相关性分析发现, 在各 CC 细胞中 PAX2 表达与土槿皮乙酸对各细胞 24、48、72 h 的 IC₅₀ 均呈负相关, 其中 48、72 h 的 IC₅₀ 与 PAX2 表达呈显著性负相关 ($P<0.05$) (图 2)。

3.3 shRNA 转染 Hela 细胞后各组细胞中 PAX2 蛋白表达 土槿皮乙酸可抑制 Hela 细胞中 PAX2 蛋白表达, 与空白组相比, 阴性对照组细胞中 PAX2 蛋白表达无差异 ($P>0.05$); 与阴性对照组相比, sh-PAX2 组、土槿皮乙酸组和土槿皮乙酸+sh-PAX2 组细胞中 PAX2 蛋白表达均降低 ($P<0.05$) (图 3)。

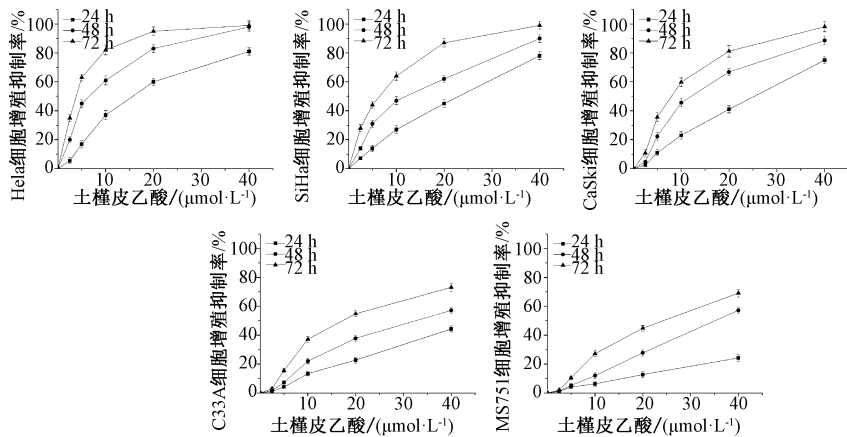


图1 土槿皮乙酸对CC细胞增殖的影响 (n=3)
Fig.1 Effects of PAB on CC cells proliferation (n=3)

表1 土槿皮乙酸对各CC细胞的IC₅₀ (μmol/L, $\bar{x} \pm s$, n=3)

Tab.1 IC ₅₀ of PAB on all CC cells (μmol/L, $\bar{x} \pm s$, n=3)				
细胞种类	24 h	48 h	72 h	
HeLa	15.02±2.34	6.14±1.21	3.8±0.88	
SiHa	19.04±2.66	10.07±2.12	5.39±1.77	
CaSki	21.54±2.93	12.11±2.73	7.38±2.12	
C33A	42.71±3.12	28.44±3.68	17.76±3.03	
MS751	103.32±2.45	34.49±3.01	21.95±2.92	

3.4 土槿皮乙酸和低表达PAX2对Hela细胞凋亡的影响 与空白组比较,阴性对照组细胞的早晚期凋亡率无变化 ($P>0.05$), sh-PAX2组、土槿皮乙酸组和土槿皮乙酸+sh-PAX2组细胞的早晚期凋亡率较阴性对照组均升高 ($P<0.05$) (图4)。

3.5 土槿皮乙酸和低表达PAX2对Hela细胞迁移的影响 与空白组比较,阴性对照组的迁移数无变化 ($P>0.05$), sh-PAX2组、土槿皮乙酸组和

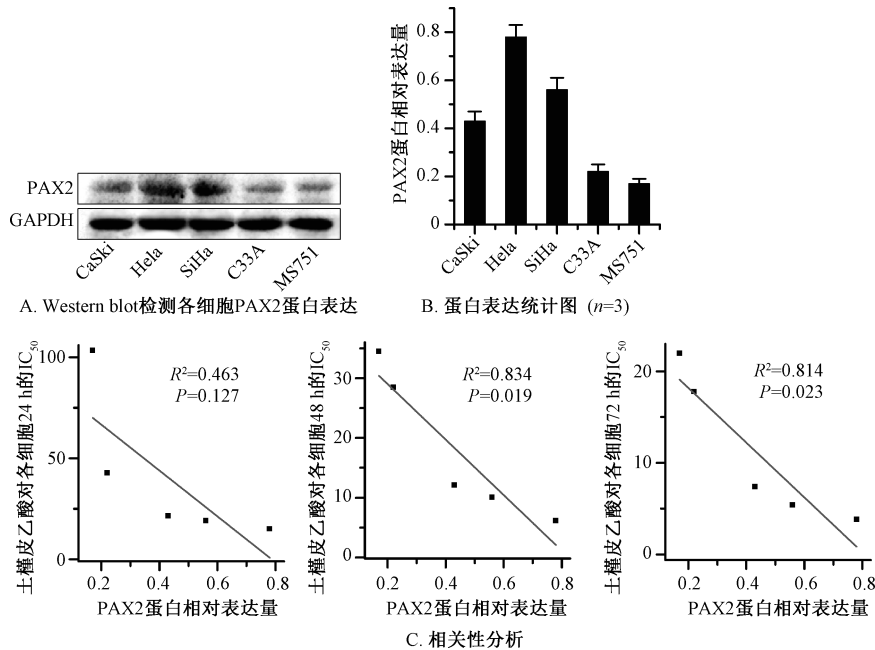


图2 各CC细胞中PAX2蛋白表达及其与土槿皮乙酸对各细胞的IC₅₀的相关性分析
Fig.2 PAX2 protein expression in all CC cells and its correlation with IC₅₀ of PAB on all CC cells

土槿皮乙酸+sh-PAX2组细胞的迁移数较阴性对照组比较,均降低 ($P<0.05$) (图5)。

3.6 土槿皮乙酸和低表达PAX2对Hela细胞凋亡

及转移相关蛋白表达的影响 与空白组比较,阴性对照组细胞中Bcl-2、BAX、Cyclin D1、Survivin、MMP2和MMP9蛋白表达无变化 ($P>0.05$); 与阴

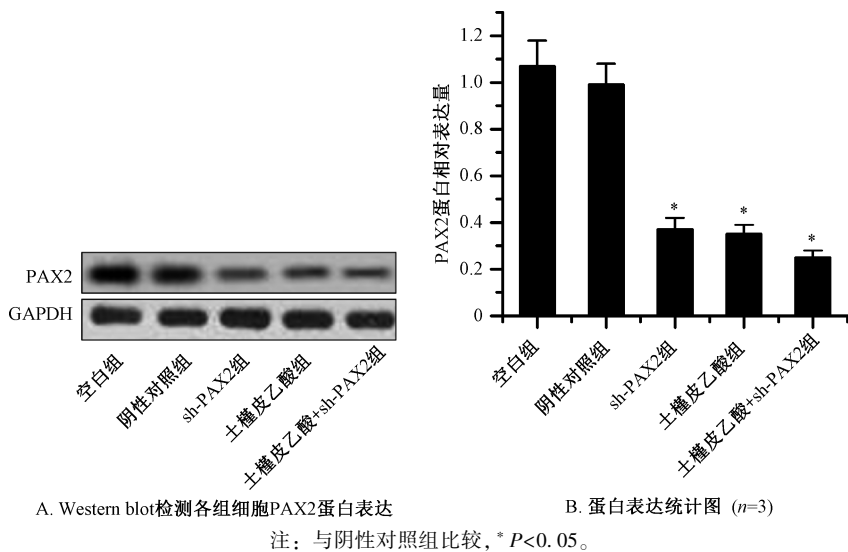


图 3 各组细胞中 PAX2 蛋白表达

Fig. 3 PAX2 protein expression in cells of each group

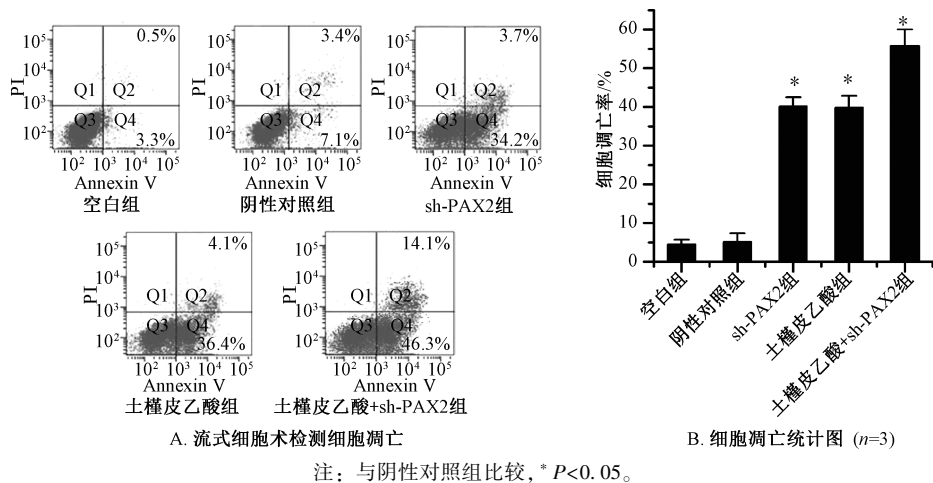


图 4 土槿皮乙酸和低表达 PAX2 对 Hela 细胞凋亡的影响

Fig. 4 Effects of PAB and weak PAX2 expression on Hela cells apoptosis

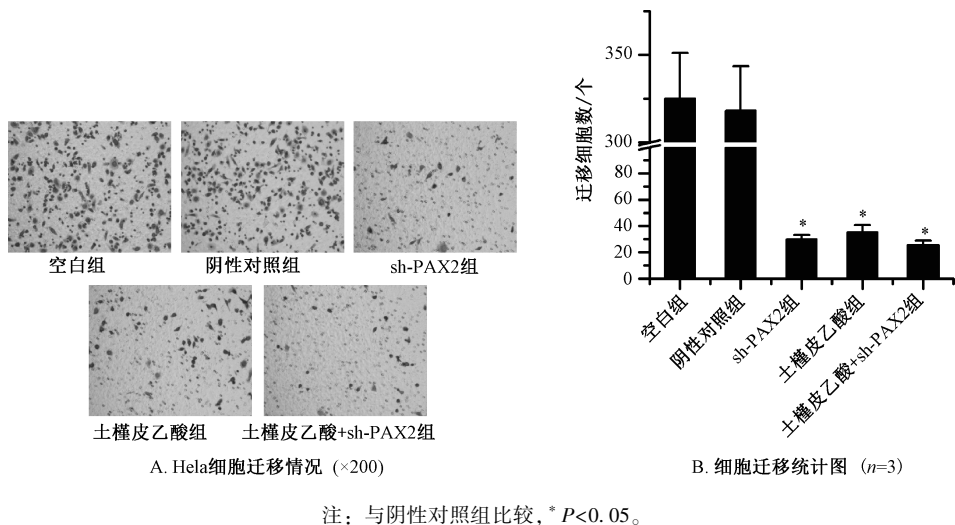
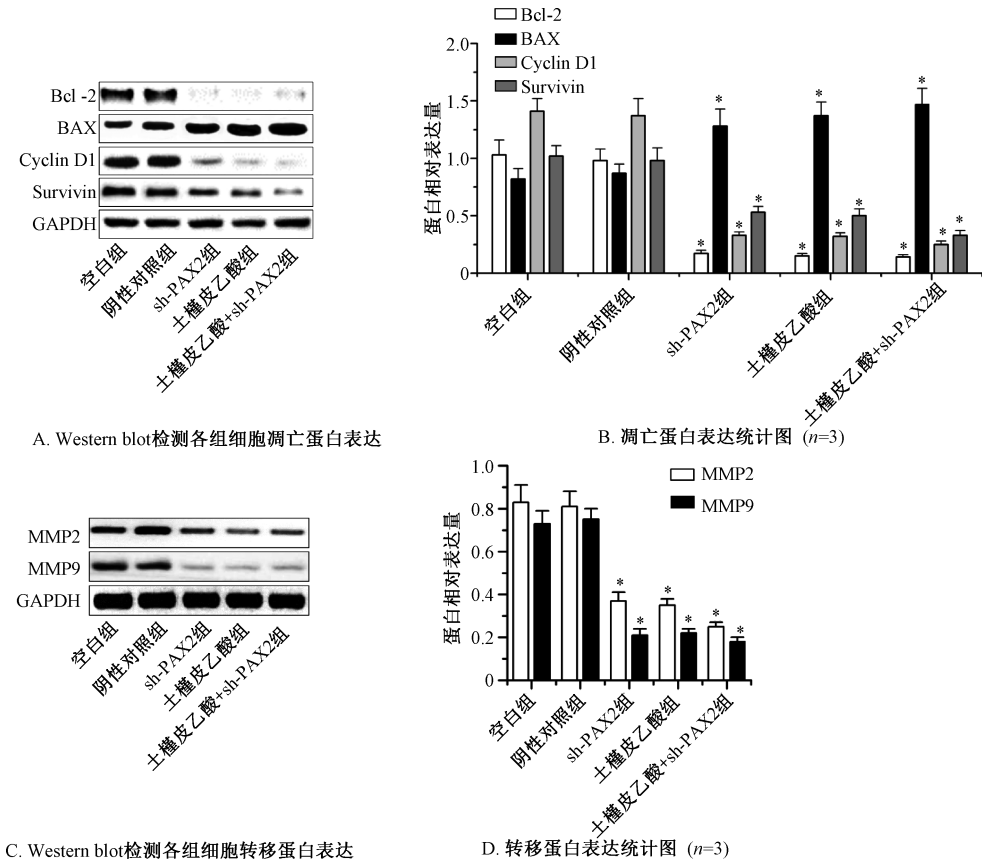


图 5 土槿皮乙酸和低表达 PAX2 对 Hela 细胞迁移的影响

Fig. 5 Effects of PAB and weak PAX2 expression on Hela cells migration

性对照组相比, sh-PAX2 组、土槿皮乙酸组和土槿皮乙酸+sh-PAX2 组细胞中 Bcl-2、Cyclin D1、Sur-

vivin、MMP2 和 MMP9 蛋白表达均显著降低, BAX 蛋白表达均升高 ($P<0.05$) (图 6)。



注：与阴性对照组相比, * $P<0.05$ 。

图 6 土槿皮乙酸和低表达 PAX2 对 Hela 细胞凋亡及转移相关蛋白表达的影响

Fig. 6 Effects of PAB and weak PAX2 expression on the expression of proteins relevant to the apoptosis and metastasis of Hela cells

3.7 String 预测 PAX2 潜在作用蛋白 借助蛋白质网络的相互作用分析,发现癌症信号传导过程中 PAX2 与 Wnt 信号关系密切 (图 7)。

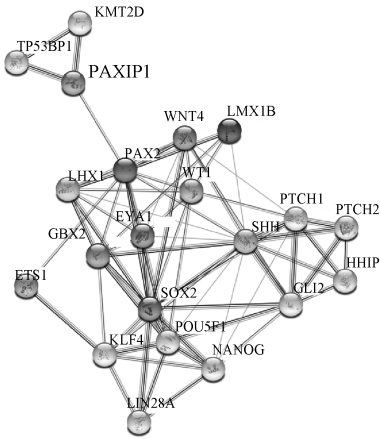
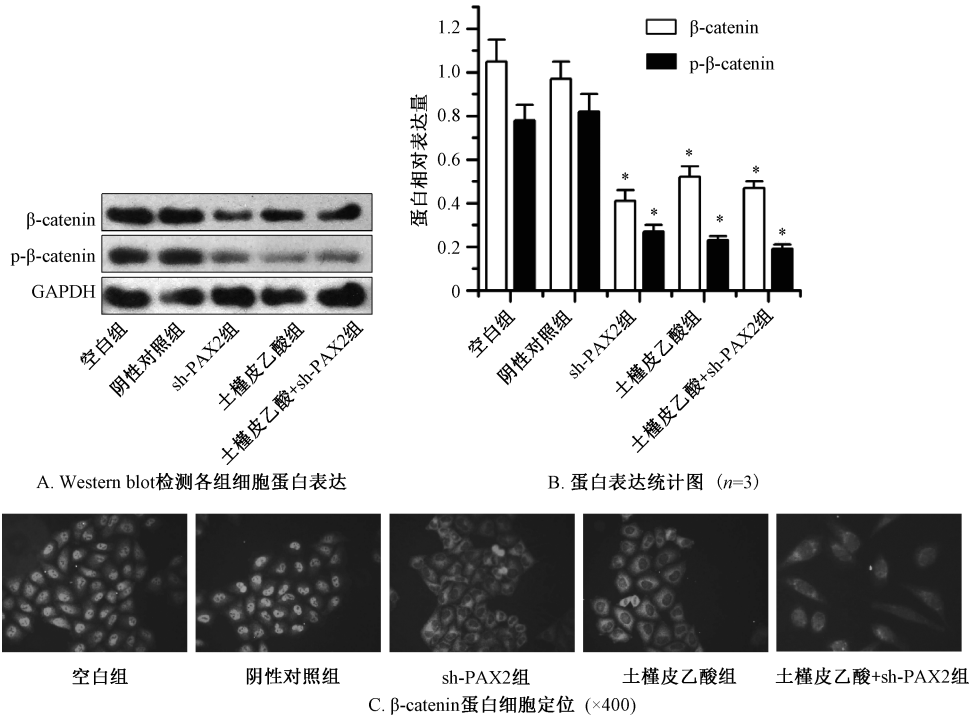


图 7 String 预测 PAX2 潜在作用蛋白
Fig. 7 Potential protein of PAX2 predicted by String

3.8 土槿皮乙酸和低表达 PAX2 对 Hela 细胞 β -catenin、p- β -catenin 蛋白的影响 与空白组相比, 阴性对照组细胞中 β -catenin、p- β -catenin 蛋白表达无变化 ($P>0.05$), 可见大量 β -catenin 蛋白定位于细胞核; 与阴性对照组相比, sh-PAX2 组、土槿皮乙酸组和土槿皮乙酸+sh-PAX2 组细胞中 β -catenin、p- β -catenin 蛋白表达均降低 ($P<0.05$), 可见定位于细胞核的 β -catenin 蛋白明显减少 (图 8)。

4 讨论

土槿皮乙酸越来越多的被认为是一种潜在的抗癌活性物质, 具有促进不同类型肿瘤细胞凋亡的作用, 包括胃癌、肺癌、乳腺癌、黑色素瘤、甲状腺癌、胰腺癌和 CC 等^[11-12]。本研究发现土槿皮乙酸可时间-浓度依赖地抑制多种 CC 细胞增殖, 其中土槿皮乙酸对 Hela 细胞 24、48、72 h 的 IC₅₀ 均最小, 提示 Hela 细胞对土槿皮乙酸的干预最为敏感。



注：与阴性对照组比较，* $P<0.05$ 。

图 8 土槿皮乙酸和低表达 PAX2 对 HeLa 细胞 β-catenin、p-β-catenin 蛋白的影响
Fig. 8 Effects of PAB and weak PAX2 expression on β-catenin and p-β-catenin proteins in HeLa cells

前期研究发现土槿皮乙酸通过抑制 PAX2 表达来诱导 HeLa 细胞凋亡并抑制其转移，但是相关分子机制的文献报道较少，有研究者在其他肿瘤细胞中对土槿皮乙酸抗肿瘤作用的分子机制做了大量的研究，发现土槿皮乙酸诱导肿瘤细胞凋亡并抑制其转移所涉及的信号通路和靶分子多种多样，包括 PI3K/Akt、ERK1/2 信号或者 Bcl-2、PKC 和 caspase 家族的多种分子^[4, 11]。本研究首先对各 CC 细胞中 PAX2 蛋白表达进行检测，并结合前面测出的土槿皮乙酸对各细胞的 IC₅₀，分析两者之间的相关性，发现在各 CC 细胞中，PAX2 蛋白表达由高到低依次为 HeLa、SiHa、CaSki、C33A 和 MS751，并且与土槿皮乙酸对各细胞 24、48、72 h 的 IC₅₀均呈负相关，提示土槿皮乙酸对各细胞增殖抑制能力与 PAX2 表达呈正相关，PAX2 表达越高，细胞对土槿皮乙酸的增殖抑制的敏感性越高，土槿皮乙酸可能直接或间接靶向作用于 PAX2，从而实现对 HeLa 细胞增殖和转移的抑制，并诱导其凋亡。

PAX2 在起源于苗勒氏管的输卵管、子宫内膜、宫颈和上部阴道的上皮细胞中表达^[13]。PAX2 在子宫内膜癌细胞中高表达，下调 PAX2 可抑制细胞增殖、迁移和侵袭^[14]。由于卵巢癌不同的组织学类型，PAX2 在卵巢癌中可能具有致癌和抑癌功

能，这可能取决于卵巢癌细胞的表观遗传学改变^[15]。PAX2 在 CC 细胞中表达也大幅上调，用 CP-31398 或 sh-PAX2 处理 HeLa 和 SiHa 细胞，可以抑制细胞增殖、侵袭和迁移，诱导细胞凋亡^[16]。PAX2 越来越多的被认为是生殖器官相关癌症发生的标志基因。本研究发现通过敲低 HeLa 细胞中 PAX2 表达可显著诱导 HeLa 细胞凋亡，上调促凋亡因子 BAX 表达和下调抑凋亡因子 Bcl-2、Survivin 和 Cyclin D1 表达；同时抑制 HeLa 细胞迁移以及下调 MMP2 和 MMP9 表达，MMP2 和 MMP9 均通过降解细胞外基质促进肿瘤转移；提示降低 CC 细胞中 PAX2 表达可诱导 CC 细胞凋亡，抑制其转移。进一步研究发现土槿皮乙酸可显著抑制 CC 细胞中 PAX2 表达，同时诱导细胞凋亡并抑制其转移。以上揭示土槿皮乙酸导致的 PAX2 下调在土槿皮乙酸诱导的 CC 细胞凋亡和抑制其转移过程中扮演重要角色，但是其中的具体机制仍需进一步研究。

借助蛋白质网络的相互作用分析，发现癌症信号传导过程中 PAX2 与 Wnt 信号关系密切。经典的 Wnt/β-catenin 信号通路被发现与 CC 细胞的增殖、转移等相关^[17]。在该通路中 β-catenin 的异常磷酸化使其在细胞内积累并进入细胞核与 TCF/LEF 形成转录复合物，调节多种下游周期和增殖相关因子

的表达，包括 cMYC、Cyclin D1、Survivin、Axin2 和 MMPs^[18]。本研究发现土槿皮乙酸和低表达 PAX2 均可降低 Hela 细胞中 β -catenin 和p- β -catenin 蛋白表达，另外通过免疫荧光实验对 Hela 细胞中 β -catenin 进行定位，发现土槿皮乙酸和低表达 PAX2 组 Hela 细胞核中 β -catenin 表达显著降低；结合前面土槿皮乙酸对 CC 细胞 PAX2 表达的抑制作用，提示土槿皮乙酸可通过影响 PAX2 与 Wnt/ β -catenin 信号通路的相互作用，诱导 CC 细胞凋亡并抑制其转移。

综上所述，在 CC 细胞中，土槿皮乙酸通过抑制 PAX2 表达和 Wnt/ β -catenin 信号通路来诱导细胞凋亡，抑制其转移。提示土槿皮乙酸是诱导宫颈癌 Hela 细胞凋亡的潜在治疗药物。

参考文献:

[1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, *et al.* Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *Ca-Cancer J Clin*, 2018, 68(6) : 394-424.

[2] Plati J, Bucur O F, Khosravi-Far R. Dysregulation of apoptotic signaling in cancer: molecular mechanisms and therapeutic opportunities[J]. *J Cell Biochem*, 2008, 104(4) : 1124-1149.

[3] Wang D, Tian Y, Feng W, *et al.* Pseudolaric acid B induces endometrial cancer Ishikawa cell apoptosis and inhibits metastasis through AKT-GSK - 3 β and ERK1/2 signaling pathways[J]. *Anticancer Drugs*, 2017, 28(6) : 603-612.

[4] Wen C, Chen J, Zhang D, *et al.* Pseudolaric acid B induces mitotic arrest and apoptosis in both 5-fluorouracil-sensitive and-resistant colorectal cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2016, 383(2) : 295-308.

[5] Kaur G, Li C G, Chantry A, *et al.* SMAD proteins directly suppress PAX2 transcription downstream of transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) signalling in renal cell carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(42) : 26852-26867.

[6] Jahangiri R, Mosaffa F, Gharib M, *et al.* PAX2 expression is correlated with better survival in tamoxifen-treated breast carcinoma patients[J]. *Tissue Cell*, 2018, 52: 135-142.

[7] Taciak B, Pruszyńska I, Kiraga L, *et al.* Wnt signaling pathway in development and cancer[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2018, 69(2) : 185-196.

[8] Wei H, Wang N, Zhang Y, *et al.* Wnt - 11 overexpression promoting the invasion of cervical cancer cells [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(9) : 11789-11798.

[9] Ramos-Solano M, Meza-Canales I D, Torres-Reyes L A, *et al.* Expression of WNT genes in cervical cancer-derived cells: implication of WNT7A in cell proliferation and migration[J]. *Exp Cell Res*, 2015, 335(1) : 39-50.

[10] Ramachandran I, Thavathiru E, Ramalingam S, *et al.* Wnt inhibitory factor 1 induces apoptosis and inhibits cervical cancer growth, invasion and angiogenesis *in vivo*[J]. *Oncogene*, 2012, 31(22) : 2725-2737.

[11] Yao G, Qi M, Ji X, *et al.* ATM-p53 pathway causes G2/M arrest, but represses apoptosis in pseudolaric acid B-treated HeLa cells[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2014, 558: 51-60.

[12] Li X, Zhao X, Song W, *et al.* Pseudolaric acid B inhibits proliferation, invasion and epithelial-to-mesenchymal transition in human pancreatic cancer cell[J]. *Yonsei Med J*, 2018, 59(1) : 20-27.

[13] Tong G X, Chiriboga L, Hamele-Bena D, *et al.* Expression of PAX2 in papillary serous carcinoma of the ovary: immunohistochemical evidence of fallopian tube or secondary Müllerian system origin? [J]. *Mod Pathol*, 2007, 20(8) : 856-863.

[14] Wang J, Jia N, Lyv T, *et al.* Paired box 2 promotes progression of endometrial cancer via regulating cell cycle pathway [J]. *J Cancer*, 2018, 9(20) : 3743-3754.

[15] Song H, Kwan S Y, Izaguirre D I, *et al.* PAX2 expression in ovarian cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(3) : 6090-60105.

[16] Liu L, Yu T T, Ren C C, *et al.* CP - 31398 inhibits the progression of cervical cancer through reversing the epithelial mesenchymal transition via the downregulation of PAX2s [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(3) : 2929-2942.

[17] Bahrami A, Hasanzadeh M, Shahidsales S, *et al.* Clinical significance and prognosis value of wnt signaling pathway in cervical cancer [J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(10) : 3028-3033.

[18] Krishnamurthy N, Kurzrock R. Targeting the Wnt/ β -catenin pathway in cancer: update on effectors and inhibitors [J]. *Cancer Treat Rev*, 2018, 62: 50-60.