

# 基于 CADD 探究新疆胀果甘草查尔酮 A 对宫颈癌细胞增殖、凋亡作用及其分子机制

艾孜提艾力·艾海提, 杨争, 木合布力·阿布力孜\*,  
米热古丽·买买提明, 赛力克阿拉·阿里汗, 玉苏普瓦吉木·阿力木江

新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011

**摘要:**以新疆胀果甘草查尔酮 A(licochalcone A, LicoA)为物质基础, 研究其对宫颈癌细胞的增殖抑制活性、促凋亡作用及对周期的影响, 并对其分子机制进行初探。从新疆胀果甘草中提取 LicoA 单体成分, 通过<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 及 HR-EI-MS 进行结构表征; 通过 MTT 法检测在不同浓度下 LicoA 对人宫颈癌细胞(SiHa 和 HeLa)的抑制率并计算 IC<sub>50</sub> 值, 选取 SiHa 细胞为研究对象, 采用流式细胞术, 以 AnnexinV-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率, 并测定对细胞周期的影响。通过 CADD 法预测 LicoA 作用靶点, 荧光定量 RT-PCR 法检测宫颈癌肿瘤干细胞标记物(Bcl-2、ALDH1A1、OCT-4、UHRF1、BIRC7、BIRC5)基因及细胞周期蛋白依赖性激酶 4(cyclin-dependent kinase 4, CDK4)基因的 mRNA 表达量。结果显示, LicoA 能显著抑制 2 种宫颈癌细胞增殖, 且呈现显著的时间和浓度依赖性; 随着 LicoA 浓度的增加, 细胞增殖速度减慢, 细胞呈皱缩形态; LicoA 诱导细胞凋亡作用显著, 在 30 μg/mL 时, SiHa 细胞凋亡率达 52.0%; LicoA 可能将 SiHa 细胞的增殖周期阻滞在 S 期和 G<sub>2</sub>/M 期; 分子对接结果显示对 CDK4 蛋白有较好结合能力, 预测可能具有较强的抑制作用; LicoA 显著下调宫颈癌肿瘤干细胞标记物(Bcl-2、ALDH1A1、OCT-4、UHRF1、BIRC7、BIRC5)的表达量, 同时抑制周期相关基因 CDK4 的 mRNA 表达。LicoA 抑制宫颈癌细胞增殖的机制可能是通过将 SiHa 细胞的增殖周期阻滞在 S 期和 G<sub>2</sub>/M 期, 诱导细胞凋亡及抑制细胞分化。

**关键词:**甘草查尔酮 A; 宫颈癌细胞; 增殖抑制活性; 流式细胞术; CADD; 肿瘤干细胞标记物

中图分类号: R931.6

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022)3-0359-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.3.001

## Exploring the effect of licochalcone A from Xinjiang *Glycyrrhiza inflata* Bat. on proliferation and apoptosis of cervical cancer cells and its molecular mechanism based on CADD

AIZITIAILU · Aihaiti, YANG Zheng, MOURBOUL · Ablise\*,  
MIHRIGUL · Mamtimin, SAILIKEALA · Alihan, YUSUPUWAJIMU · Alimujiang

College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

**Abstract:** In this study, licochalcone A (LicoA) was used as the substance basis to study its proliferation inhibitory activity, apoptotic and cell cycle arresting effect on cervical cancer cells, and its molecular mechanism was initially investigated. LicoA was purified from Xinjiang *Glycyrrhiza inflata* Bat., and its chemical structure was identified by <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR and HR-EI-MS methods. The inhibition rate of LicoA on human cervical cancer cells (SiHa and HeLa) at different concentrations was detected by MTT assay and IC<sub>50</sub> value was calculated. SiHa cells were selected as research object, flow cytometry was used to detect the apoptosis rate of cells by AnnexinV-FITC/PI double staining, and the effect on cell cycle was determined. The CADD method was used to predict the possible target of LicoA. The mRNA expression levels of marker (Bcl-2, ALDH1A1, OCT-4, UHRF1, BIRC7, BIRC5) and cyclin-dependent kinase 4 (cyclin-dependent kinase 4, CDK4) were detected by fluo-

rescence qRT-PCR method. The results showed that LicoA could significantly inhibit the proliferation of the two cervical cancer cells in a time-dependent and concentration-dependent manner. With the increase of LicoA concentration, the cell proliferation rate slowed, and the cells showed a shrunken form. LicoA induced apoptosis significantly, and the apoptosis rate of SiHa cells reached 52.0% at 30 μg/mL. LicoA may block the proliferation cycle of SiHa cells in S and G<sub>2</sub>/M phase. Molecular docking results showed that LicoA had a good binding ability to CDK4 protein, and predicted that LicoA might have a strong inhibitory activity. LicoA significantly down-regulated the expression of stem cell markers Bcl-2, ALDH1A1, OCT-4, UHRF1, BIRC7 and BIRC5, and inhibited the mRNA expression of CDK4. The mechanism that LicoA can inhibit the proliferation of SiHa may be by arresting the proliferation cycle of SiHa in S phase and G<sub>2</sub>/M phase, inducing cell apoptosis, and inhibiting cell differentiation.

**Key words:** licochalcone A; cervical cancer cells; proliferation inhibitory activity; flow cytometry; CADD; tumor stem cell markers

宫颈癌是严重威胁妇女健康的恶性肿瘤之一,近几年其发病率呈现上升态势<sup>[1]</sup>。研究发现,在我国宫颈癌患者的病死率以每年3.35%的速度在递增,10年增长率为29.9%,且年轻人发病趋势日益明显<sup>[2]</sup>。根据一项针对近千名女性HPV人乳头瘤病毒(human papilloma viruses, HPV)筛查结果可知,感染率为17.46%<sup>[3]</sup>,可见宫颈癌的预防及治疗面临严峻挑战。目前宫颈癌的常规治疗措施为放化疗及手术治疗,存在毒副作用大、易发生肿瘤耐药及易复发等难题<sup>[4]</sup>。肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)是一类自我更新能力,能够启动和驱动肿瘤细胞生长及转移,在肿瘤的复发、转移过程中具有重要作用的细胞<sup>[5]</sup>。CSCs是存在于肿瘤微环境中的一小部分群体,有研究报道从宫颈癌细胞中可以鉴定分离出宫颈癌干细胞(cervical cancer stem cells, CCSCs)<sup>[6,7]</sup>。肿瘤干细胞对多数化疗药物不敏感,是患者在康复阶段导致癌症复发的主要原因,严重影响放化疗以后的患者2~5年生存率<sup>[8]</sup>。因此,从天然药物活性成分中寻找和筛选结构新颖、高抗癌活性、低毒性且具有抑制肿瘤干细胞活性的抗宫颈癌先导化合物在创新药物研究中具有较好的深入研究意义。

甘草作为药食两用的药材资源,在我国药用历史悠久。虽然甘草存在多种品种,而《中国药典》(2020年版一部)收录其原植物有2种,即胀果甘草(*Glycyrrhiza inflata* Bat.)和光果甘草(*Glycyrrhiza glabra* L.),其中胀果甘草在新疆南部、甘肃等西北地区分布资源比较丰富<sup>[9]</sup>。不同品种的甘草中所含的查尔酮类成分的化学结构有所差异。研究证实,查尔酮A(licochalcone A, LicoA)具有抗肿瘤<sup>[10]</sup>、抗菌<sup>[11]</sup>、抗炎<sup>[12]</sup>、保肝<sup>[13]</sup>、免疫调节<sup>[14]</sup>等作用,而关于其对宫颈癌相关肿瘤干细胞标记物的调

控方面鲜见报道。本课题组在前期基础研究的基础上,改良一种用于治疗宫颈糜烂的传统医院制剂,加入了含LicoA的胀果甘草提取物,正在研发具有预防宫颈癌潜力并可用于阴道抑菌消炎及宫颈糜烂的阴道泡腾片。在天然有效成分的抗癌活性筛选中发现,胀果甘草查尔酮成分LicoA对宫颈癌细胞的增殖、凋亡及周期方面具有显著活性外,且对宫颈癌肿瘤干细胞标记物(Bcl-2、ALDH1A1、OCT-4、UHRF1、BIRC7、BIRC5)基因及细胞周期蛋白依赖性激酶4(cyclin-dependent kinase 4, CDK4)基因产生明显的调节有用。经计算机辅助药物设计法(CADD法)等手段预测其可能的作用靶点,研究LicoA对以上基因mRNA表达量的影响,为进一步阐明LicoA对宫颈癌细胞抗癌活性方面的作用及可能的分子机制探索提供更充分的参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

#### 1.1.1 主要试剂

顺铂注射液(江苏豪森药业集团有限公司);人子宫颈癌细胞SiHa、HeLa均购买于新疆医科大学中心实验室细胞库;DMEM高糖培养基(美国Sigma公司,货号:AF29561079);胎牛血清(美国Sigma公司,货号:1644044);扩增试剂盒(日本TaKaRa公司,货号:RR047A)、逆转录试剂盒(日本TaKaRa公司,货号:RR820A);RNA提取试剂盒(上海生物工程技术有限公司,货号:00170212)。

#### 1.1.2 主要仪器

WRX-4显微熔点仪(宁波科诚仪器有限公司,中国);Unity-Inova600超导核磁共振仪(Varian公司,美国);LTQ-Orbitrap XL赛默飞组合式高分辨质谱仪(赛默飞世尔科技公司,美国);KQ5200DE数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,中国);

ZF-7 型暗箱三用紫外分析仪(上海嘉鹏科技有限公司,中国);Heracell CO<sub>2</sub> 培养箱(赛默飞世尔科技公司,美国);Multiskan GO 酶标分析仪(赛默飞世尔科技公司,美国);BD 流式细胞仪(BD 公司,美国);QuantStudio™6Flex 实时荧光定量 PCR 仪(赛默飞世尔科技公司,美国)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 胀果甘草查尔酮 A 的制备

取干燥的胀果甘草根粉碎,称取 50.0 g,以料液比(W: V)为 1:15 的 95% 乙醇中浸泡 24 h,45 ℃条件下超声 15 min,80 ℃加热回流提取 2 h,抽滤,得滤液 a。滤渣于 500 mL 的 95% 乙醇中浸泡过夜,同上述方法处理,得滤液 b,合并滤液 a、b,45 ℃减压浓缩,50 ℃干燥。将粗提物用适量 30% 乙醇溶解上样于提前处理好的聚酰胺色谱柱,吸附 24 h,先水洗 3 BV,然后用 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 乙醇梯度洗脱 3 BV,分别收集流分,浓缩,合并具有相同特征的流分,于 50 ℃减压旋蒸并干燥得到总黄酮粉末<sup>[15]</sup>。

将上述粉末溶解于适量 20% 乙醇中,上样于提前备好的 AB-8 大孔吸附树脂,吸附 24 h,先水洗 3 BV,然后 30%、50%、60%、70%、80% 乙醇各洗脱 3 BV,分别收集流分,浓缩,具有相同特征的流分合并,于 50 ℃减压旋蒸干燥后得到总黄酮粉末。称取总黄酮粉末 100 mg,用适量甲醇溶解,于制备薄层板上点样,以 LicoA 对照品为对照,以石油醚:乙酸乙酯 =1:1,加 1 滴甲酸为展开剂展开,于 365 nm 紫外光下观察斑点,标记与对照品对应的斑点(LicoA 具有亮蓝绿色的斑点),干燥后刮去,加甲醇溶解,45 ℃减压浓缩,50 ℃干燥,得到黄色粉末。之后以硅胶柱层析法纯化,石油醚:乙酸乙酯 =2:1 洗脱,收集亮黄色斑点的流分,浓缩,干燥,得到亮黄色粉末,取少量测定其熔点并经过<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 及 HR-EI-MS 进行结构鉴定。

### 1.2.2 细胞培养

取生长状态良好的 SiHa 和 HeLa 细胞,用含 10% 胎牛血清、链霉素(100 μg/L)、庆大霉素(100 μg/L)的 DMEM 完全培养液(pH = 7.5),在 37 ℃,5% CO<sub>2</sub> 氧饱和湿度的恒温培养箱中培养 24 h,取对数生长期细胞进行以下各项实验。

### 1.2.3 宫颈癌细胞活力检测

采用 MTT 法检测 LicoA 对宫颈癌细胞 SiHa、HeLa 的增殖抑制活性。取处于对数生长期的 Si-

Ha、HeLa 细胞,以  $5 \times 10^4$  个/mL 的密度铺在 96 孔板,培养 24 h,待 96 孔中细胞长至视野的 80% 左右时,弃去每孔上清液,将浓度为 0、10、25、50、75、100 μg/mL 的用完全培养基配制的 LicoA 溶液,按每孔 200 μL,每个浓度 6 个复孔,加入到 96 孔板中,以同样浓度梯度的含顺铂的完全培养液作为阳性对照,只加完全培养液的细胞悬液为空白对照,分别作用 24、48、72 h 后加入 MTT 溶液,用酶标仪于 490 nm 测定吸光度(A),计算细胞抑制率,进一步用 SPSS 26.0 软件分别计算出 IC<sub>50</sub> 值。细胞抑制率 = (A<sub>空白</sub> - A<sub>实验</sub>) / A<sub>空白</sub> × 100%。

### 1.2.4 细胞形态观察

根据 LicoA 对 SiHa、HeLa 细胞的 IC<sub>50</sub> 值,对其进行形态学研究。取对数生长期细胞,收集,用细胞计数法以每孔细胞数为  $3 \times 10^5$  个接种于 6 孔板,待细胞贴壁生长至视野 80% ~ 90%,用完全培养基配制终浓度为 0、10、25、50 μg/mL LicoA 溶液,分别作用于 SiHa、HeLa 细胞 24 h 后,在倒置显微镜下观察细胞形态学变化并拍照。

### 1.2.5 SiHa 细胞凋亡检测

取对数生长期 SiHa 细胞,调整细胞密度为  $1 \times 10^6$  个/mL,接种于 6 孔板中,培养 24 h 后弃去培养基,每孔加入 2 mL 用完全培养基配置的 20 μg/mL 的顺铂溶液及浓度为 0、10、20、30 μg/mL 的 LicoA 溶液干预细胞(根据“1.2.3”结果筛选分析得出),作用 24 h 后,PBS 冲洗并离心,完全弃去上清后每一组分别加 100 μL Binding Buffer(Buffer: PBS = 1:9 配制)轻柔吹打均匀,每组分别加入 AnnexinV-和 PI 各 5 μL,室温避光染色 15 min,再每组分别补加 400 μL Binding Buffer 混合均匀,经 300 目网筛过滤,上机检测。

### 1.2.6 SiHa 细胞周期检测

取生长良好的 SiHa 细胞,收集、计数、稀释成  $1 \times 10^5$  个/mL 的细胞悬液,按每孔 2 mL 铺于 6 孔板内,置于恒温培养箱培养 24 h。弃去培养液,每孔加入 2 mL 用完全培养基配置的 20 μg/mL 的顺铂溶液及浓度为 0、10、20、30 μg/mL 的 LicoA 溶液,作用 24 h,每孔分别收集上清,加 PBS 清洗、消化、收集备用。收集好的细胞各加 4 ~ 5 mL 预冷的 75% 乙醇混合均匀,放置 4 ℃冰箱固定 24 h。1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,分别加 3 mL PBS 冲洗 3 次,弃去上清液,收集细胞,每组分别加 400 μL PI/RNase Staining Buffer 混合均匀,室温避光染色 15 min,经

300 目网筛过滤,上机检测。

### 1.2.7 分子对接实验

#### 1.2.7.1 分子对接参数

对接个数(num\_modes)是 20 个,能量范围(energy\_range)是 5,可能性构象搜寻(exhaustiveness)值为 100,除了有特别说明外,其余参数均采取默认值。

#### 1.2.7.2 对接口袋

经可能的结合位点的筛选之后,选择由 CDK4 基因所编码的 CDK4 蛋白与目标单体 LicoA 进行分子对接。由于数据库中未能检索到有特定配体与之结合的构象,故采用全构象对接方式进行分析。CDK4(见图 1),活性口袋的坐标为:center\_x = -1, center\_y = -2, center\_z = 75;size\_x = 52, size\_y = 40, size\_z = 44。

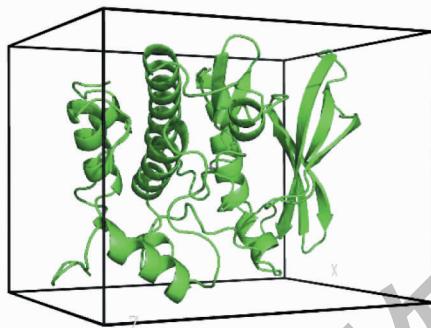


图 1 CDK4 蛋白的对接口袋

Fig. 1 Docking pocket of CDK4 protein

#### 1.2.8 对宫颈癌相关肿瘤标记物的影响

通过荧光定量 RT-PCR 法,以  $\beta$ -actin 为内参,对 SiHa 细胞中 Bcl-2、ALDH1A1、OCT-4、UHRF1、BIRC7、BIRC5 等肿瘤干细胞标记物的 mRNA 表达量进行测定。取生长良好的 SiHa 细胞,收集,计数,稀释成  $1 \times 10^5$  个/mL 的细胞悬液,按每孔 2 mL 铺于 6 孔板内,置于恒温培养箱培养 24 h。每孔加入 2 mL 用完全培养基配置的浓度为 0、10、25、50  $\mu$ g/mL 的 LicoA 溶液,作用 24 h。按照总 RNA 提取试剂盒(Trizol)的说明书规范操作,提取 SiHa 细胞总 RNA,定量并测定其纯度后逆转录得到不同干预组的 cDNA,按说明书加入引物及扩增试剂,上 PCR 扩增仪进行扩增反应,扩增条件为 TaKaRa 扩增试剂盒说明书中两步扩增程序,最终得 PCR 产物并分析结果。PCR 引物序列见下表 1。

#### 1.2.9 统计学处理

数据结果通过 SPSS 26.0 软件处理,计量资料

表 1 引物序列表

Table 1 Sequences of primers

引物名称 Primer name	上、下游引物序列(5'→3') Forward and reverse primer sequences(5'→3')
CDK4	F:GCCTGGCCAGAACATCTACAGCTAC R:CCTGTGGATGACTGAGTACCGAAC
Bcl-2	F:CCTGTGGATGACTGAGTACCGAAC R: CAGACTCTCAGAGACAGCCAGGA
ALDH1A1	F:TTGTCCAGCCCACAGTGTCTC R:TGTCTTGGTAAACACTCCIGCIGA
4-Oct	F:GTGCCGTGAAGCIGGAGAA R: TGCTCGTTGGCTGAATACCIT
$\beta$ -actin	F:GGAAACGAAATAAACTAGCAGCA R: ACCACAAACTCCAGACGTTCC
UHRF1	F:AATGTCAAGGGTGGCAAGAATA R: GCCACTATTTCACAACCTIGTA
BIRC7	F:GGTGAGGTGCTTCTCTGCTATGG R: GCTGCGTCTTCGGTTCTTCC
BIRC5	F:CCGCATCTACATTCAAGAAC R: CTCCTGAAGCAGAAGAACAC

采用  $\bar{x} \pm s$  表示,数据做方差齐性检验,若满足正态分布方差齐,采用多样本单因素方差分析;若不满足正态分布方差齐,则采用非参数检验, $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  均表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 甘草查尔酮 A 的结构表征

甘草查尔酮 A,黄色粉末,得率 0.36%;分子式:  
 $C_{21}H_{22}O_4$ ;mp. 136 ~ 137 °C;HR-EI-MS:  $m/z$  339.159 2  
[M]<sup>+</sup> (calcd for  $C_{21}H_{23}O_4$ , 339.159 1);<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 10.31 (1H, s, OH-4'), 10.14 (1H, s, OH-4), 7.98 (2H, d,  $J$  = 9.0 Hz, H-2', H-6'), 7.91 (1H, d,  $J$  = 15.6 Hz, H- $\beta$ ), 7.59 (1H, d,  $J$  = 15.6 Hz, H- $\alpha$ ), 7.54 (1H, s, 6-H), 6.89 (2H, d,  $J$  = 8.4 Hz, H-3', H-5'), 6.53 (1H, s, H-3), 6.25 (1H, s, H-10), 4.94 (1H, s, H-11), 3.83 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 1.46 (6H, s, CH<sub>3</sub>);<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 187.8 (s, C=O), 162.1 (s, C4'), 160.2 (s, C-2), 158.7 (s, C-4), 147.9 (s, C-10), 139.2 (s, C- $\beta$ ), 131.2 (s, C-2', C-6'), 130.1 (s, C-1'), 128.2 (s, C-6), 127.0 (s, C-5), 118.3 (s, C- $\alpha$ ), 115.7 (s, C-3', C-5'), 114.0 (s, C-1), 110.5 (s, C-11), 100.4 (s, C-3), 55.9 (d, CH<sub>3</sub>), 40.1 (s, C-7), 27.5 (d, CH<sub>3</sub>)。以上<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 数据与文献<sup>[16]</sup>对比基本一致,确定该成分为甘草查尔酮 A (LicoA),其结构如图 2 所

示。

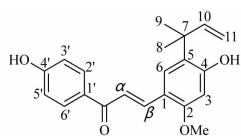


图 2 LicoA 的化学结构

Fig. 2 The chemical structure of LicoA

## 2.2 对宫颈癌细胞增殖抑制活性

如表 2, SiHa、HeLa 细胞分别用 0~100  $\mu\text{g}/\text{mL}$

浓度范围内的含 LicoA 和阳性对照药顺铂的完全培养基作用 24、48、72 h, 根据其抑制率利用 SPSS 26.0 求相应的  $\text{IC}_{50}$ 。阳性药顺铂分别对两种细胞作用 24、48、72 h 后, 对 SiHa 细胞的  $\text{IC}_{50}$  值分别为 20.53、7.75、4.49  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 对 HeLa 细胞的  $\text{IC}_{50}$  值分别为 20.71、8.92、5.76  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; LicoA 分别对两种细胞作用 24、48、72 h 后, 对 SiHa 细胞的  $\text{IC}_{50}$  值分别为 68.38、38.48、24.49  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 对 HeLa 细胞的  $\text{IC}_{50}$  值分别为 39.31、14.91、6.90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 2 甘草查尔酮 A 及顺铂对 SiHa、HeLa 细胞半数抑制浓度 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 LicoA and Cisplatin to SiHa and HeLa cells  $\text{IC}_{50}$  ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

细胞 Cell	甘草查尔酮 A $\text{IC}_{50}$ LicoA $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )			顺铂 $\text{IC}_{50}$ Cisplatin $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
HeLa	39.31 $\pm$ 1.78 *	14.91 $\pm$ 0.57 *	6.90 $\pm$ 1.52 *	20.71 $\pm$ 1.18 *	8.92 $\pm$ 0.45 *	5.76 $\pm$ 1.01 *
SiHa	68.38 $\pm$ 3.12 *	38.48 $\pm$ 1.03 *	24.49 $\pm$ 0.94 *	20.53 $\pm$ 1.19 *	7.75 $\pm$ 0.73 *	4.49 $\pm$ 0.58 *

注:与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$ 。

Note: Compared with control, \*  $P < 0.05$ .

## 2.3 对细胞形态的影响

LicoA 对 HeLa 细胞形态的影响比对 SiHa 细胞明显, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时开始影响 HeLa 细胞形态, 细胞呈

现皱缩现象, 而对 SiHa 形态的影响开始于 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 10、25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时影响不明显(见图 3)。

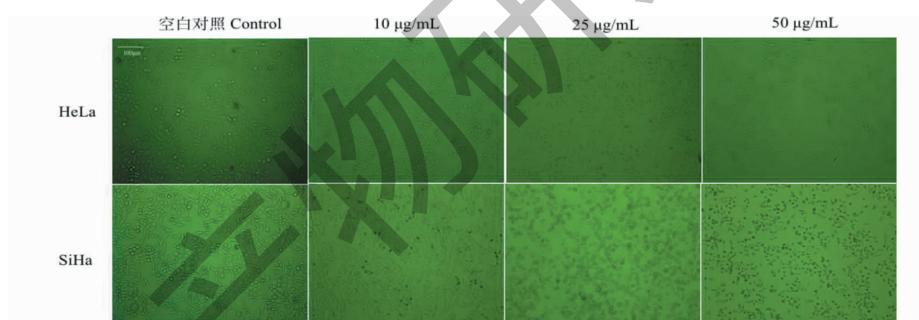


图 3 LicoA 对 2 种细胞的形态学变化 (100  $\mu\text{m}$ )

Fig. 3 Morphological changes of LicoA on two cells (100  $\mu\text{m}$ )

## 2.4 对宫颈癌细胞凋亡的影响

顺铂在 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时对 SiHa 细胞作用 24 h 时的凋亡率为 47.60%。与空白组对比, LicoA 干预

SiHa 细胞 24 h 后的促凋亡作用较为显著。在 10~30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度范围内, LicoA 对 SiHa 细胞的凋亡率从 12.6% 增加到 52.0%, 结果见表 3 及图 4。

表 3 LicoA 对 SiHa 细胞作用 24 h 的凋亡率 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Apoptosisrate of LicoA on SiHa cells for 24 h ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别 Group	Q1 (%)	Q2 (%)	Q3 (%)	Q4 (%)	$Q_2 + Q_4$ (%)
空白对照 Control	1.40 $\pm$ 0.13	4.00 $\pm$ 0.31	91.6 $\pm$ 1.03	2.9 $\pm$ 1.27	6.90
顺铂 Cisplatin	8.50 $\pm$ 1.37	27.2 $\pm$ 0.28 *	43.9 $\pm$ 1.38	20.4 $\pm$ 0.38 *	47.60
LicoA 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.10 $\pm$ 0.14	4.50 $\pm$ 0.19	86.3 $\pm$ 0.73	8.1 $\pm$ 1.05 *	12.60
LicoA 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.50 $\pm$ 1.11	6.40 $\pm$ 1.36	74.0 $\pm$ 0.65	19.1 $\pm$ 1.43 *	25.50
LicoA 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.80 $\pm$ 0.37	11.7 $\pm$ 0.75 *	47.2 $\pm$ 0.77	40.3 $\pm$ 1.33 **	52.00

注:Q1: 机械损伤和坏死; Q2: 晚期凋亡和坏死; Q3: 活细胞; Q4: 早期凋亡。与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

Note: Q1: Mechanical damage and necrosis; Q2: Late apoptosis and necrosis; Q3: Living cells; Q4: Early apoptosis. Compared with control, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

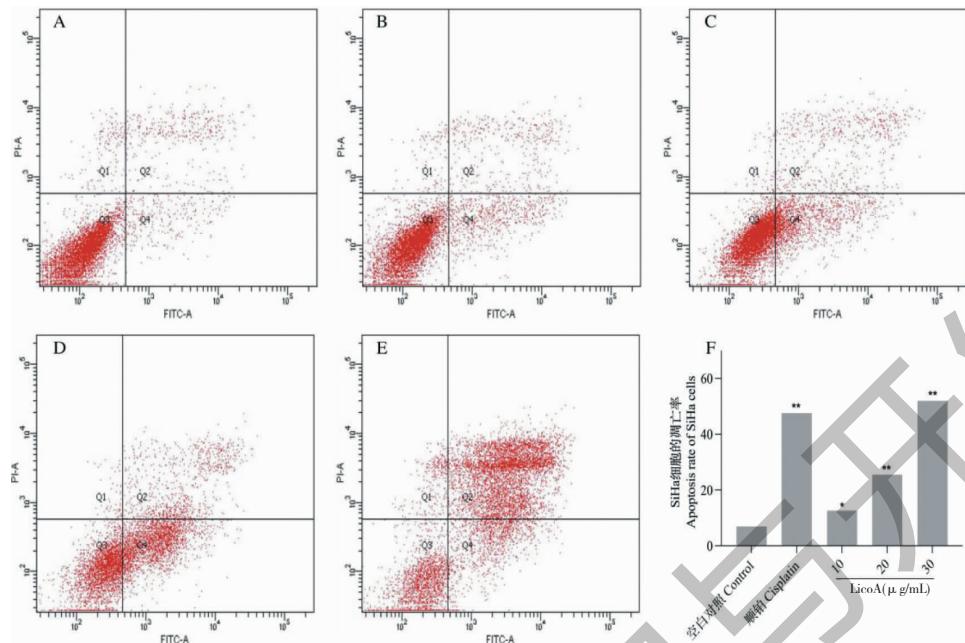


图 4 LicoA 和顺铂对 SiHa 细胞的凋亡实验结果

Fig. 4 Apoptosis results of LicoA and cisplatin on SiHa cells

注:A:空白对照;B:查尔酮 A 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;C:查尔酮 A 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;D:查尔酮 A 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;E:顺铂 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;F:图 A ~ E 结果的统计分析。与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。Note: A: Control; B: LicoA 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; C: LicoA 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; D: LicoA 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; E: Cisplatin 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; F: Statistical analysis of A-E. Compared with control, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

## 2.5 对细胞周期的影响

阳性药顺铂在 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时对 SiHa 细胞作用 24 h 后, 细胞周期  $G_0/G_1$  期占比为 52.55%, S 期为 35.91%,  $G_2/M$  期为 11.54%; 空白组 SiHa 细胞在  $G_0/G_1$  期的比值为 74.53%, S 期为 16.19%,  $G_2/M$  期为 8.56%; LicoA 在 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 对 SiHa 细胞在

$G_0/G_1$  期的比值为 43.58%, S 期分别为 35.18%,  $G_2/M$  期分别为 21.25%; 与空白组对比, LicoA 在 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时 SiHa 细胞  $G_0/G_1$  的比值减少了 30.95%, S 期和  $G_2/M$  期分别增加了 18.99% 和 12.69% (见表 4、图 5)。

表 4 LicoA 和顺铂对 SiHa 细胞周期的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Cell cycle effects of LicoA and cisplatin on SiHa ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别 Group	SiHa		
	$G_0/G_1 (\%)$	S (%)	$G_2/M (\%)$
空白对照 Control	74.53 $\pm$ 0.38	16.19 $\pm$ 0.77	8.56 $\pm$ 0.75
顺铂 Cisplatin	52.55 $\pm$ 0.79 *	35.91 $\pm$ 0.34 *	11.54 $\pm$ 0.73 *
LicoA 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	51.62 $\pm$ 1.22 *	31.80 $\pm$ 0.38 *	16.58 $\pm$ 0.38 *
LicoA 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$	49.36 $\pm$ 1.31 *	32.99 $\pm$ 0.73 *	17.65 $\pm$ 0.08 **
LicoA 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$	43.58 $\pm$ 0.23 **	35.18 $\pm$ 0.65 *	21.25 $\pm$ 0.33 **

注:与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

## 2.6 分子对接实验结果

LicoA 与 CDK4 蛋白最低结合能为 -8.6 kcal/mol, 选择打分最高的对接构象进行具体的结合模式分析后可知, LicoA 能较好地结合在 CDK4 形成的结合口袋内。结合口袋的作用主要含 A、B、C 三个关

键的结合位点, LicoA 两侧苯环一端均插入到 CDK4 形成的结合口袋内, 可以和周围氨基酸残基形成作用力, 羧基上的氧可与周围残基形成部分作用力, LicoA 一侧苯环上的羟基与 ASN-145 可形成一个 2.7 Å 的较强氢键; 羧基上的氧与 GLY-15 可形成一

个 $2.4 \text{ \AA}$ 的较强氢键;A 环上的苯环与 ASP-158 可

形成 Pi-阴离子作用(见图 6)。

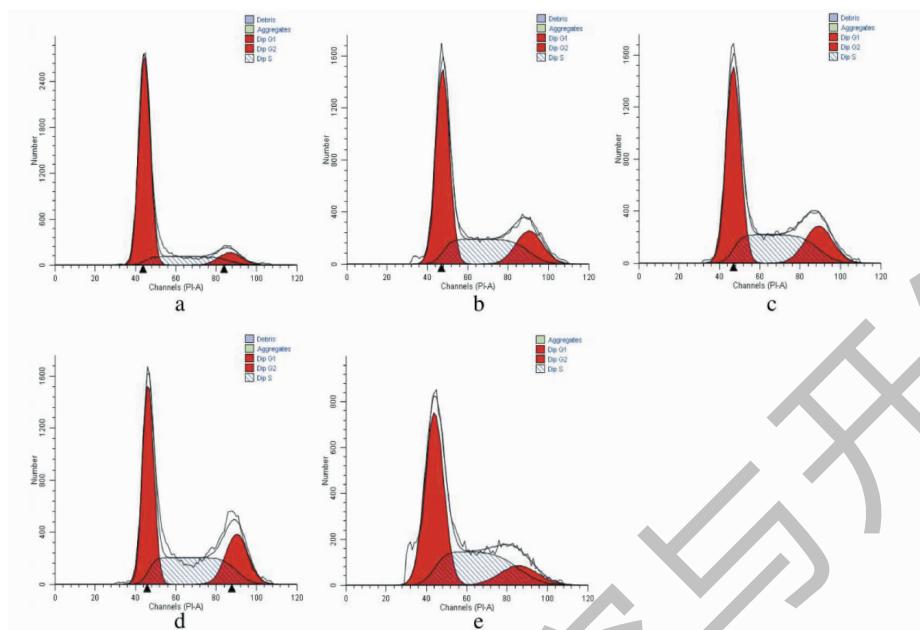


图 5 LicoA 对 SiHa 细胞周期的影响

Fig. 5 Cell cycle effects of LicoA on SiHa

注:a:空白对照;b:查尔酮 A  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ;c:查尔酮 A  $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ ;d:查尔酮 A  $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ ;e:顺铂  $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。Note:a;Control;b:LicoA  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ;c:LicoA  $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ ;d:LicoA  $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ ;e:Cisplatin  $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ .

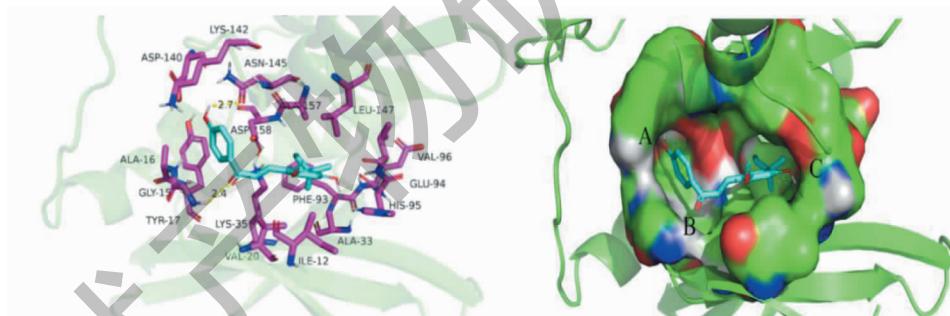


图 6 LicoA 和 CDK4 的结合模式

Fig. 6 Binding mode of LicoA and CDK4

## 2.7 对宫颈癌肿瘤标记物 mRNA 相对表达量的影响

如图 7 所示,LicoA 在浓度为  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$  条件下作用于 SiHa 细胞  $24 \text{ h}$  后,周期相关基因 CDK-4 的相对表达量下调至  $0.012$ ;Bcl-2、ALDH1A1、OCT-4、UHRF1、BIRC7、BIRC5 等基因的相对表达量随着 LicoA 干预浓度的提高,分别出现了不同程度的下调。与空白对照组( $0 \mu\text{g}/\text{mL}$ )相比,干预组( $25$ 、 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ )SiHa 细胞各基因 mRNA 表达量有显著性差异( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。

## 3 讨论与结论

目前,临幊上对于宫颈癌的治疗措施仍以外科手术切除为主,配合化疔和放疗辅助治疗。肿瘤干细胞学说的提出对宫颈肿瘤的发生、发展和治疗做出了新的诠释。研究证实,肿瘤干细胞既是肿瘤细胞放化疗耐受的根源所在,也是引起肿瘤细胞转移和复发的原因之一<sup>[17]</sup>。因此,利用天然活性成分,安全有效的干预肿瘤干细胞,从而降低宫颈癌的发病可能及预防治疗后宫颈癌的复发是一个新的研究方向。

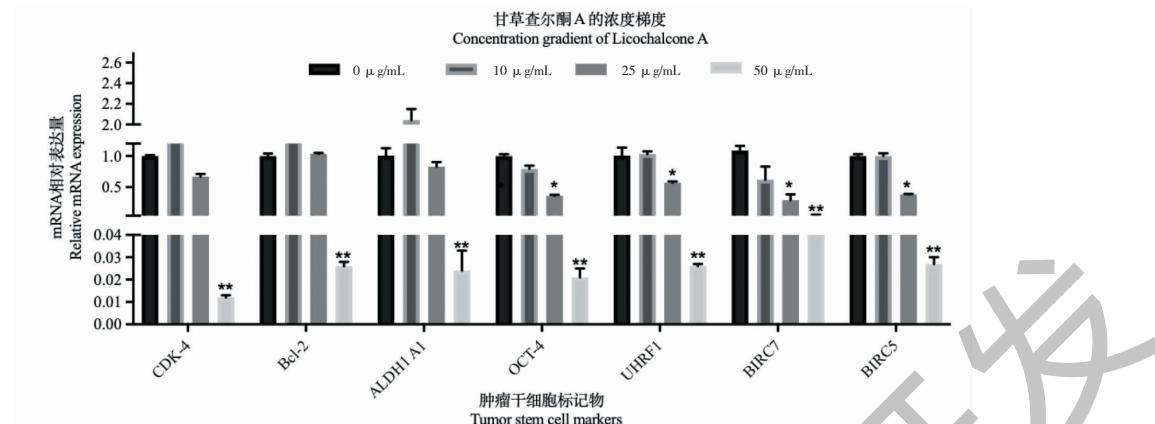


图 7 不同浓度 LicoA 干预 SiHa 细胞后各基因相对表达量 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 7 Relative expression of genes after intervention of different concentrations of LicoA in SiHa cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

注:与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。Note: Compared with control, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

目前研究证实,甘草具有抗肿瘤、抗菌、抗炎、保肝、免疫调节等作用。新疆地区胀果甘草资源丰富,甘草查尔酮 A 成分主要分布于其根茎中。本课题组在前期研究中开发和建立胀果甘草中查尔酮 A 的检测鉴定系统并申报了一项仪器装备相关的实用新型专利(专利号:ZL201721685479.2),在此基础上提取并制备了 LicoA 成分。LicoA 抗肿瘤的机制可能是通过诱导肿瘤细胞凋亡,但关于其对宫颈癌肿瘤干细胞标记物的调控作用的研究较为少见。本研究结果显示,新疆胀果甘草查尔酮 A 对宫颈癌细胞的增殖具有明显的抑制作用,并且呈现浓度和时间依赖性,能够诱导 SiHa 细胞凋亡并且可能阻滞细胞周期于 S 期和 G<sub>2</sub>/M 期,并对宫颈癌肿瘤干细胞标记物具有显著下调作用。

在正常情况下,视网膜母细胞瘤(Rb)与细胞周期的 G<sub>1</sub> 期的 E2F 转录因子形成复合物并被抑制。CDK4 能磷酸化 Rb 复合物导致 E2F 的释放,以转录细胞周期由 G<sub>1</sub> 期进入 S 期所必需基因,而没有这种磷酸化活性的情况下细胞阻滞在 G<sub>1</sub> 期<sup>[18]</sup>,本研究中 CDK4 基因在甘草查尔酮 A 浓度为 25、50 μg/mL 时被显著抑制。干细胞标记物 ALDH1A1 和 OCT4 在宫颈癌及其前体病变中表达上调,特别是在外周血中表达上调,提示 ALDH1A1 和 OCT4 可作为生物标志物用于早期发现宫颈癌或监测患者的治疗<sup>[19]</sup>。ALDH1A1 参与视黄醇在细胞质中氧化成视黄酸的过程,而视黄酸又被转入细胞核并启动参与早期干细胞分化的基因的转录,促进肿瘤干细胞增殖<sup>[20,21]</sup>。八聚体结合蛋白 4(OCT-4)是一种在胚胎和成体干细胞中表达的转录因子,与细胞增殖、分

化、多能性和自我更新有关,在胚胎干细胞中敲除 OCT-4 会导致其分化及干细胞特性消失<sup>[22]</sup>。甘草查尔酮 A 也能使以上 2 种标记物( ALDH1A1、OCT4)的 mRNA 表达量显著下调。此外,本研究所筛选的 Bcl-2、UHRF1、BIRC7、BIRC5 等均为宫颈癌细胞中高表达的肿瘤标记物<sup>[23]</sup>,其 mRNA 表达量也均被甘草查尔酮 A 不同程度地下调,提示新疆胀果甘草查尔酮 A 成分可能具有良好的预防宫颈癌复发的研究潜力。

## 参考文献

- Zhu XQ, Liu ZQ, Wang BL. Mechanism of quercetin against cervical cancer based on biomolecular network and molecular docking[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2020, 32:23-31.
- Sulaiya H, Han L, Wang L, et al. Factors associated with high-risk HPV infection and cervical cancer screening methods among rural Uyghur women aged >30 years in Xinjiang [J]. BMC Cancer, 2018, 18:1162-1171.
- Zhang J, Gao C. Analysis of current status of female HPV infection in Xinjiang[J]. Lab Med Clin(检验医学与临床), 2021, 18:2093-2096.
- Liu X, Yang X, Li M, et al. Licochalcone A inhibits proliferation and promotes apoptosis of colon cancer cell by targeting programmed cell death-ligand 1 via the NF-κB and Ras/Raf/MEK pathways [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 273: 1139-1189.
- Chavvachote P. Iron induces cancer stem cells and aggressive phenotypes in human lung cancer cells[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2016, 310(9):C728-C739.

- 6 Tomiyama N, Ikeda R, Nishizawa Y, et al. S100A16 up-regulates Oct4 and Nanog expression in cancer stem-like cells of Yumoto human cervical carcinoma cells [J]. *Oncol lett*, 2018, 15:9929-9933.
- 7 Javed S, Sharma BK, Sood S, et al. Significance of CD133 positive cells in four novel HPV-16 positive cervical cancer-derived cell lines and biopsies of invasive cervical cancer [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1):357-369.
- 8 Reid PA, Wilson P, Li Y, et al. Current understanding of cancer stem cells: Review of their radiobiology and role in head and neck cancers [J]. *Head Neck*, 2017, 39: 1920-1932.
- 9 Shirzat A, Yang XC, Mourboul A, et al. Determination of licochalcone A in whole plant of Xinjiang *Glycyrrhiza inflata* by HPLC[J]. *Northwest Pharm J*(西北药学杂志), 2016, 2: 130-132.
- 10 Yuan YG, Zhang XY, Zhu XJ, et al. Effect of licochalcone A on apoptosis in human breast cancer MDA-MB-231 cells [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2021, 27(20):95-100.
- 11 Shi QY, Deng XM, Yu L, et al. Study on the inhibitory activity of licorice chalcone A on the biofilm of *Staphylococcus aureus*[C]. Proceedings of the Twelfth Symposium of the Veterinary Pharmacology and Toxicology Branch of the Chinese Society of Animal Husbandry and Veterinary Medicine in 2013(2013年中国畜牧兽医学会兽医药理毒理学分会第十二次学术讨论会), 2013:132-133.
- 12 Zhang MF, Shen YQ. Advances in studies on *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* and its active components in anti-inflammation and mechanism[J]. *Drugs Clin*(现代药物与临床), 2011, 26(4):261-268.
- 13 Li XM, Bai YF, Hang AW, et al. Exploring the hepatoprotective effect of Peony *Glycyrrhiza* decoction based on internet pharmacology[J]. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2021, 43: 1924-1932.
- 14 Kandoth C, McLellan MD, Vandine F, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types[J]. *Nature*, 2013, 502:333-339.
- 15 Mireguli M. Preparation and anti-cervical cancer activity of *Glycyrrhiza inflata* chalcones and its derivatives [D]. Urumqi:Xinjiang Medical University(新疆医科大学), 2020.
- 16 Hidemasa N, Ju XH, Tadato T, et al. Antispasmodic activity of licochalcone A, a species-specific ingredient of *Glycyrrhiza inflata* roots[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2007, 59:1421-1426.
- 17 Kennedy AL, Rai R, Isingizwe ZR, et al. Complementary targeting of Rb phosphorylation and growth in cervical cancer cell cultures and a xenograft mouse model by SHetA2 and palbociclib[J]. *Cancers*, 2020, 12:1269-1283.
- 18 Qian L, Murakami T, Kimura Y, et al. Saikosaponin A-induced cell death of a human hepatoma cell line (HUH-7): the significance of the ‘sub-G1 peak’ in a DNA histogram [J]. *Pathol Int*, 1995, 45(3):207-214.
- 19 Tulake W, Yuemaier R, Sheng L, et al. Upregulation of stem cell markers ALDH1A1 and OCT4 as potential biomarkers for the early detection of cervical carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16:5525-5534.
- 20 Chute JP, Muramoto GG, Whitesides J, et al. Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103:11707-11712.
- 21 Marcato P, Dean CA, Giacomantonio CA, et al. Aldehyde dehydrogenase: Its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform[J]. *Cell Cycle*, 2011, 10:1378-1384.
- 22 Monsef N, Soller M, Isaksson M, et al. The expression of pluripotency marker Oct 3/4 in prostate cancer and benign prostate hyperplasia[J]. *Prostate*, 2009, 69:909-916.
- 23 Chen T, Yang S, Xu J, et al. Transcriptome sequencing profiles of cervical cancer tissues and SiHa cells[J]. *Funct Integr Genomics*, 2020, 20:211-221.