

## 桂皮醛诱导人宫颈癌 Siha 细胞凋亡并下调 HPV E6/E7 蛋白表达

紫若·塔里哈提<sup>1,2</sup>, 曙丽盼·木拉提<sup>1,2</sup>, 张伟怡<sup>1,2\*</sup>, 周文婷<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>新疆医科大学药学院;<sup>2</sup>新疆天然药物活性组分与释药技术重点实验室, 乌鲁木齐 830011

**摘要:**桂皮醛作为一种天然的小分子化合物具有抗炎、镇痛及抗肿瘤的活性,为了探究其对宫颈癌 Siha 细胞凋亡及 HPV E6/E7 蛋白表达的影响,该文采用 CCK-8 法、流式细胞术、JC-1 荧光探针以及 Western blot 等多种手段进行检测。结果显示,桂皮醛具有明显的抗肿瘤生长作用,可导致 G2/M 期阻滞、线粒体膜电位降低并通过蛋白酶体途径抑制 E6/E7 蛋白的表达;进一步验证桂皮醛与化疗药物紫杉醇、顺铂及 5-氟尿嘧啶分别联合给药后的效果,证实其具有协同抗宫颈癌作用。

**关键词:**桂皮醛;宫颈癌;凋亡;E6/E7 蛋白

中图分类号:R931.6

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)9-1565-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.9.014

## Cinnamaldehyde induces apoptosis of human cervical cancer Siha cells and down-regulates the expression of HPV E6/E7 protein

ZIRUO · Talihati<sup>1,2</sup>, SHULIPAN · Mulati<sup>1,2</sup>, ZHANG Wei-yi<sup>1,2\*</sup>, ZHOU Wen-ting<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>School of Pharmacy, Xinjiang Medical University; <sup>2</sup>Key Laboratory of Active Components of Xinjiang Natural Medicine and Drug Release Technology, Urumqi 830011, China

**Abstract:** Cinnamaldehyde, as a natural small molecule compound, has anti-inflammatory, analgesic and anti-tumor activities. To investigate the possible mechanism of cinnamaldehyde on cell apoptosis and the expression of HPV E6/E7 protein in human cervical carcinoma Siha cells, CCK-8, flow cytometry, JC-1 fluorescence probe and Western blot methods were used to detect in this study. Results showed that cinnamaldehyde had significant anti-tumor growth effects, arrested G2/M phase and decreased mitochondrial membrane potential. Moreover, mechanism studies confirmed that cinnamaldehyde down-regulated the expression of E6/E7 protein through proteasome pathway. Further study verified that cinnamaldehyde had synergistic anti-cervical cancer effect combined with paclitaxel, cisplatin and 5-fluorouracil, respectively.

**Key words:** cinnamaldehyde; cervical cancer; apoptosis; E6/E7 protein

宫颈癌是妇女生殖系统中最常见的恶性肿瘤之一,超过 99% 的宫颈癌患者均伴有高危人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 的感染,其中 HPV 16 和 HPV 18 作为常见的高危表型<sup>[1]</sup>。近年来,其发病率明显升高,虽然药物放/化疗和手术治疗对早期宫颈癌有一定疗效,但对中晚期宫颈癌的治疗效果欠佳,且复发率高,副作用明显<sup>[2]</sup>。E6/E7 作为宫颈癌中主要的致癌基因,是上皮细胞发生初始变化的原因,能够促进宿主细胞增殖和病毒扩增<sup>[3]</sup>。研究表明,HPV E6/E7 癌蛋白成为治疗宫颈癌的潜

在药物靶点<sup>[4]</sup>。因此,诱导 E6/E7 降解的天然化合物可能是抗宫颈癌药物的重要来源。

肉桂作为临床上的常用中药之一,具有“百药之长”的称号<sup>[5]</sup>。桂皮醛 (cinnamaldehyde, CA) 作为肉桂挥发油中的主要成分,是一种天然的小分子化合物<sup>[6]</sup>。研究表明,其具有解热、抗炎及降糖等多种药理活性,同时能够抑制非小细胞肺癌、肝癌、胃癌以及黑色素瘤等多种肿瘤细胞增殖,呈现出一定的抗肿瘤作用<sup>[7-11]</sup>,但其诱导肿瘤细胞凋亡的分子机制尚未完全阐明,关于其抗宫颈癌的作用也少见报道。本研究利用人宫颈癌 Siha 细胞,检测 CA 在体外的抑癌效应及作用机制,为抗宫颈癌研究提供进一步的理论基础和实验依据。

收稿时间:2022-02-17 接收时间:2022-05-20

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金(2021D01C294)

\* 通信作者 Tel:86-015899168882; E-mail: zwy13132150812@163.

com, sherry\_zwt@126.com

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

#### 1.1.1 主要试剂

人宫颈癌 Siha 细胞,购自武汉普诺赛生命科技有限公司。桂皮醛(CA)、紫杉醇(TAX)、顺铂(Pt)以及 5-氟尿嘧啶(5-FU)购自上海源叶生物科技有限公司(纯度均  $\geq 98\%$ )。CCK-8 试剂盒(Lot No: BA08198147)、 $\beta$ -Actin、Bax、Bcl-2 以及 Survivin 抗体购自北京 bioss 生物科技有限公司(纯度均  $\geq 98\%$ );PAGE 凝胶快速制备试剂盒(Lot No: 20201230)、Hoechst 33342 试剂盒(Lot No: 20210623)、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(Lot No: 20210512)以及细胞周期检测试剂盒(Lot No: 20201106)均购自北京索莱宝生物科技有限公司;细胞培养级二甲基亚砜 DMSO(Lot No: WXBD0293V)、DMEM 高糖培养基(Lot No: 2130206)以及胎牛血清 FBS 均购自美国 Gibco 公司;HPV E6 及 HPV E7 购自美国 Gene Tex 公司;化学发光试剂盒(货号:2021601)及 PVDF 膜(货号: R1MB52546)均购自美国 Millipore 公司;HPR-goat anti rabbit 抗体购自美国 CST 公司。

#### 1.1.2 主要仪器

细胞培养箱、多功能酶标仪、高速低温离心机以及垂直层流洁净工作台(美国 Thermo 公司);荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司);流式细胞仪(美国 BD 公司);智能成像系统(上海 Tanon 公司);蛋白电泳设备(美国伯乐公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

Siha 细胞采用含 10% FBS 的不同培养基,37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的细胞培养环境中培养细胞,根据细胞的生长情况约 2~3 天传代一次。

#### 1.2.2 CCK-8 法测定细胞增殖

Siha 细胞,以  $3.0 \times 10^3$  个/孔铺于 96 孔板内培养过夜。实验组分别加入不同浓度的化合物,空白组加入双蒸水(空白对照,药品用 DMSO 配成母液后,通过双蒸水进行稀释),对照组加入等倍稀释的溶剂 DMSO(溶剂对照)。每组设 3 个复孔,培养 72 h 后,每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液,于 37  $^{\circ}\text{C}$  作用 2 h,用酶标仪于 450 nm 处测定 OD 值。并按下列公式分别计算不同化合物对多种细胞生长抑制率。

细胞增殖抑制率 =

$$\frac{(OD_{\text{溶剂对照}} - OD_{\text{给药}})}{OD_{\text{溶剂对照}}} \times 100\%$$

运用 SPSS 软件,根据不同浓度化合物对细胞生长抑制率分别计算出其  $\text{IC}_{50}$ 。

#### 1.2.3 细胞迁移实验

在 6 孔板背面沿孔直径均匀划横线。Siha 细胞以  $2.0 \times 10^5$  个/孔铺于 6 孔板中培养过夜。用黄色吸头垂直于横线划痕。去培养基, PBS 清洗 2~3 次,加入不含血清的培养基。实验组分别加入不同浓度的 CA 培养 48 h,分别在划痕 0 h 和 48 h 后观察并拍照。使用 Image J 软件进行统计分析。

#### 1.2.4 细胞周期的流式细胞仪检测

Siha 细胞,以  $2.0 \times 10^5$  个/孔铺于 6 孔板中培养过夜。实验组分别加入不同浓度的 CA 培养 24 h。收集细胞样品于流式管中,4  $^{\circ}\text{C}$ 、1 200 r/min 离心 5 min 后,弃上清,加入 1 mL PBS 重悬后,再次按上述方法重复洗涤,弃上清。加入纯度为 95% 的冷乙醇,混匀后置于 4  $^{\circ}\text{C}$  固定过夜。取上述固定细胞,4  $^{\circ}\text{C}$ 、1 200 r/min 离心 5 min 后,去除乙醇后用 PBS 重悬,再次离心,重复此步骤两次。每管分别加入 400  $\mu\text{L}$  RNaseA 酶,置于 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min。随后每管分别加入 100  $\mu\text{L}$  的碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色液,避光置于 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min 后,上机进行流式检测。最后采用 Modfit 软件分析实验结果。

#### 1.2.5 Hoechst 33342 荧光染色法鉴定凋亡细胞

Siha 细胞以  $5.0 \times 10^4$  个/孔铺于共聚焦小皿中培养过夜。实验组分别加入不同浓度的 CA 培养 24 h。弃去培养液,用 4% 多聚甲醛在 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下固定 15 min。弃固定液, Hoechst 33342 染色液室温条件下染色 15 min。使用荧光显微镜观测。

#### 1.2.6 细胞中线粒体膜电位的检测

Siha 细胞以  $3.0 \times 10^5$  个/孔铺于 6 孔板中培养过夜。实验组分别加入不同浓度的 CA,阳性对照组加入 10  $\mu\text{mol/L}$  解偶联剂(chloro carbonyl cyanide phenyl hydrazone, CCCP, 能够携带质子穿透线粒体内膜),培养 24 h。加入 1 mL JC-1 染色工作液,充分混匀,孵育 20 min。随后,用 1  $\times$  的 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次。再加入 2 mL 细胞培养液,于共聚焦显微镜下观察。

#### 1.2.7 Western blot 检测

Siha 细胞以  $3.0 \times 10^5$  个/孔铺于 6 孔板中培养过夜。实验组分别加入不同浓度的 CA 培养 24 h。PBS 清洗后,加入高效 RIPA 细胞裂解液,冰上裂解 20 min,12 000 r/min 离心 15 min。分别收集上清,用 BCA 试剂盒进行蛋白定量。SDS-PAGE 凝胶电

泳后,电转移至 PVDF 膜上,经 5% 脱脂牛奶封闭后,分别加入按相应比例稀释后的一抗溶液( $\beta$ -Actin、E6、E7、Bcl-2、Survivin 及 Bax),4 °C 孵育过夜。经 TBST 室温清洗 3 次,每次 10 min。随后加入 1:5 000 稀释的二抗溶液,室温孵育 1 h。经 TBST 充分清洗后,加入化学发光液进行曝光检测。使用 Image J 软件进行灰度统计分析。

### 1.2.8 药物协同指数计算

利用 CompuSyn 软件,可计算出两种药物之间共同作用的联用指数(combination index, CI)。CI 值 >1,两种化合物为拮抗;CI 值 = 1,两种化合物为相加;CI 值 <1,两种化合物具为协同。

### 1.2.9 数据统计分析

所有数据均进行统计学处理,通过平均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。使用单因素方差分析对多次比较数据进行统计,使用  $t$  检验对单次比较数据进行统计。采用  $P < 0.05$  表示具有统计学差异。

## 2 实验结果

### 2.1 CA 抑制 Siha 细胞的增殖和迁移

首先对 CA 在不同时间、浓度下对 Siha 细胞的生长抑制作用分别进行检测。结果如图 1A 所示,CA 呈时间、浓度依赖性地抑制 Siha 细胞的生长,且给药后 24、48 和 72 h 的  $IC_{50}$  分别为 110.96、85.52、47.05  $\mu\text{mol/L}$ ,说明 CA 能够抑制 Siha 细胞的增殖。

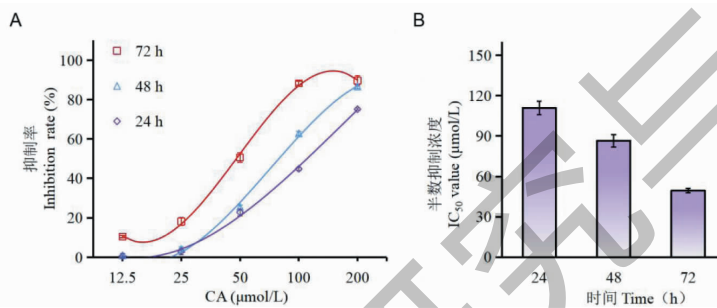


图 1 CA 对 Siha 细胞增殖的抑制作用 ( $n = 3$ )

Fig. 1 Inhibitory effect of CA on the proliferation in Siha cells ( $n = 3$ )

为了进一步验证 CA 对 Siha 细胞生长的抑制作用,我们进行了细胞划痕实验。结果如图 2 所示,与空白对照组(Ctrl)相比,随着 CA 给药浓度的升高,

能够明显抑制 Siha 细胞的迁移,证实 CA 能够有效抑制 Siha 细胞的迁移能力。

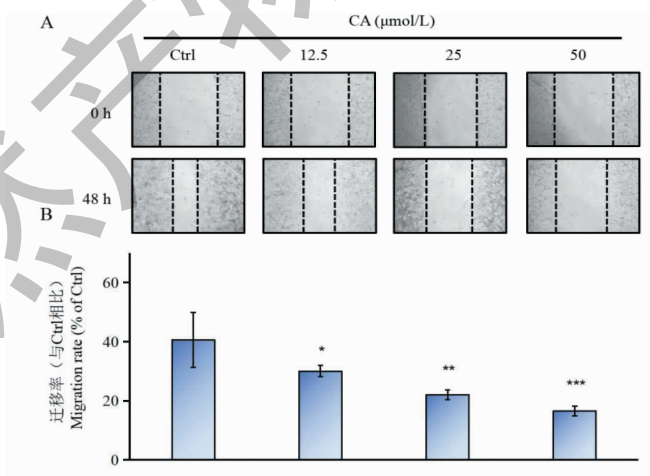


图 2 CA 对 Siha 细胞迁移能力的影响 ( $n = 3$ )

Fig. 2 Effect of CA on migration in Siha cells ( $n = 3$ )

注:与 Ctrl 组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ,下同。Note:Compared with Ctrl group,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ , the same below.

### 2.2 CA 阻滞 Siha 细胞周期并诱导凋亡

目前常用的细胞周期检测方法为 PI 染色,由于

PI 能够嵌入到 DNA 双链之间,从而被激光激发出红色荧光,随后再通过 RNaseA 酶孵育去除 RNA。

我们利用该方法,通过流式细胞术检测 CA 对 Siha 细胞周期的影响,结果如图 3 所示,与空白对照组 (Ctrl) 相比,随 CA 浓度的升高,G2/M 期的比例从 21.62% 上升至 33.91%,并具有明显的浓度依赖性,说明 CA 能够阻滞在 Siha 细胞的 G2/M 期。

为了分析 CA 是否能够诱导 Siha 细胞凋亡,我

们首先通过 Hoechst 33342 染色观察细胞凋亡情况。结果如图 4 所示,CA 处理后,细胞核呈现亮蓝色荧光,且具有浓度依赖性,提示 CA 诱导 Siha 细胞凋亡。为了进一步验证该结果,我们进行 JC-1 染色,通过荧光共聚焦显微镜观察 CA 作用于 Siha 细胞后线粒体膜电位的变化情况。结果如图 5 所示,与阳

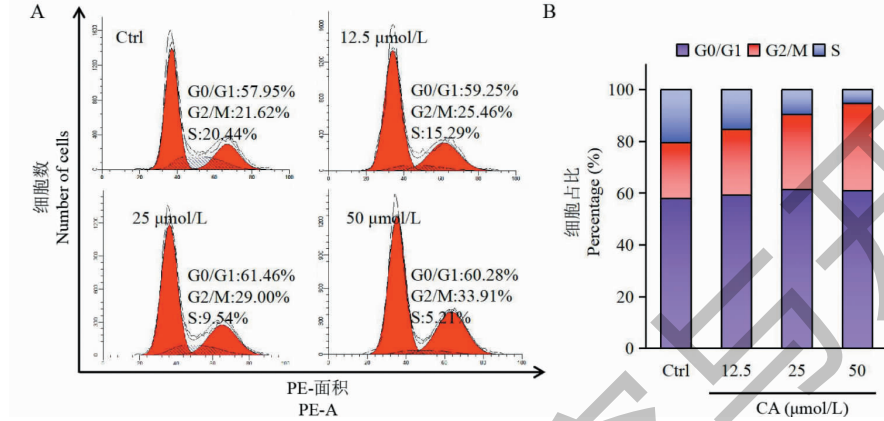


图 3 CA 对 Siha 细胞周期的影响

Fig. 3 Effect of CA on cell cycle in Siha cells

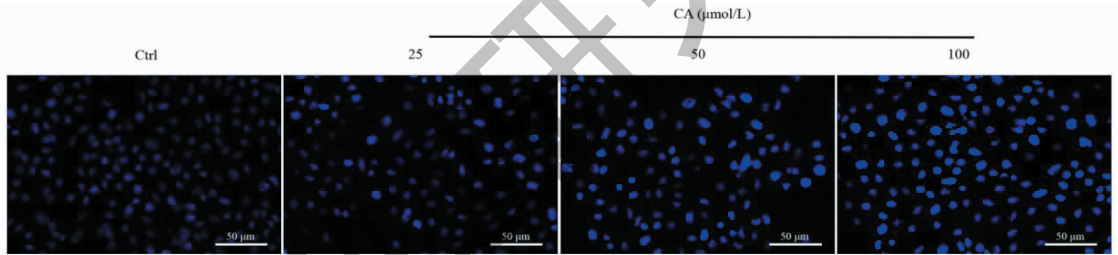


图 4 CA 对 Siha 细胞核染色质的形态学变化影响 (标尺:50 μm)

Fig. 4 Effect of CA on the morphology of nuclear chromatin in Siha cells (scale:50 μm).

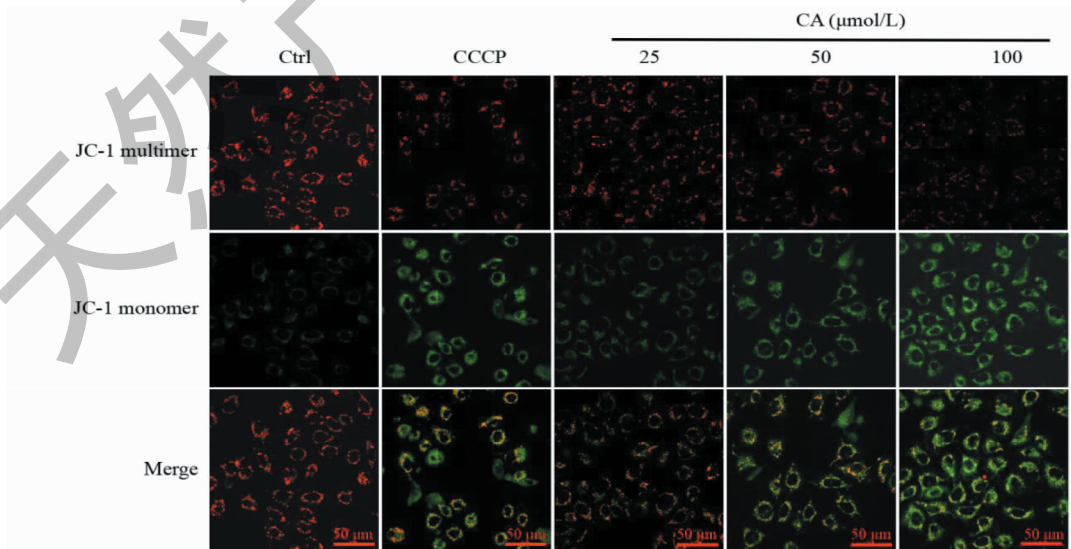


图 5 CA 对 Siha 细胞中线粒体跨膜电位的影响 (标尺:50 μm)

Fig. 5 Effect of CA on mitochondrial membrane potential in Siha cells (scale:50 μm)

性对照组相比,随 CA 浓度的升高,剂量组绿色荧光显著增强,说明 CA 破坏了线粒体跨膜电位,诱导 Siha 细胞凋亡。

此外,进一步通过 Western blot 法检测了 CA 对 Siha 细胞中凋亡相关蛋白的影响。结果如图 6 所

示,通过灰度统计分析可以看出,抗凋亡蛋白 Bcl-2、Survivin 的表达减少,促凋亡蛋白 Bax 的表达增多。以上结果均进一步证明了 CA 可以诱导 Siha 细胞发生凋亡。

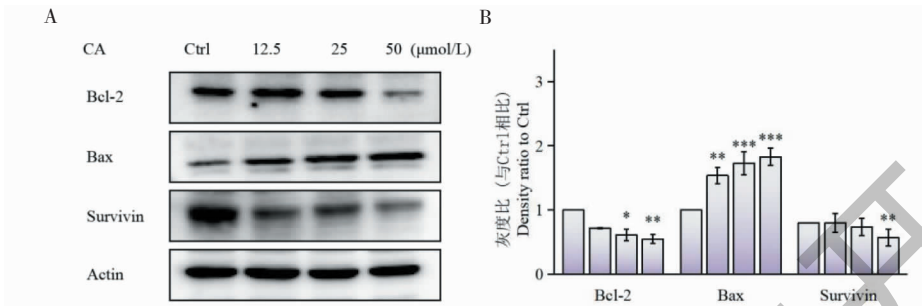


图 6 CA 对 Siha 细胞凋亡的影响 (n = 3)

Fig. 6 Effect of CA on apoptosis in Siha cells (n = 3)

### 2.3 CA 通过蛋白酶体途径抑制 Siha 细胞中 HPV E6/E7 的表达

考虑到 HPV E6/E7 在伴有 HPV 感染的癌细胞 (如 Siha) 的生存中起着关键作用,我们进一步探究

了 CA 对 Siha 细胞中 E6/E7 蛋白表达的影响。结果显示,CA 显著降低了 Siha 细胞中 E6/E7 的表达水平,并呈现一定的浓度依赖性 (见图 7)。

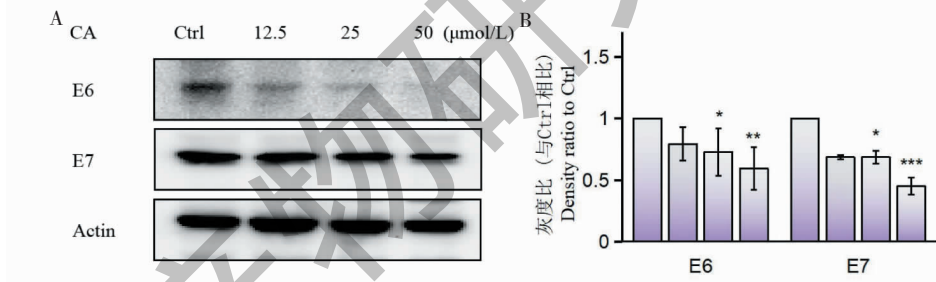


图 7 CA 对 Siha 细胞中 HPV E6/E7 的影响 (n = 3)

Fig. 7 Effect of CA on HPV E6/E7 in Siha cells (n = 3)

随后,进一步探究 CA 抑制 E6/E7 表达的作用机制。预先加入一种蛋白酶体抑制剂 MG132 处理

1 h,再加入 CA 共同作用 6 h 后检测,结果如图 8 所示,当 MG132 与 CA 共同作用后,E6/E7 表达明显

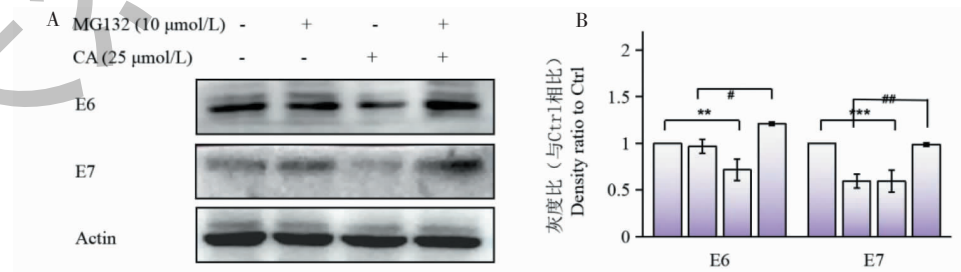


图 8 蛋白酶体抑制剂 MG132 对 CA 抑制 Siha 细胞中 HPV E6/E7 表达的影响 (n = 3)

Fig. 8 Effect of proteasome inhibitor MG132 on the inhibition of CA on HPV E6/E7 expression in Siha cells (n = 3)

注:与 Ctrl 组比较, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001; 与 MG132 10 μmol/L 组比较, # P < 0.05; ## P < 0.01。Note: Compared with Ctrl group, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001; Compared with MG132 10 μmol/L group, # P < 0.05; ## P < 0.01。

增加,表明 CA 通过蛋白酶体途径抑制 E6/E7 表达。

## 2.4 CA 与不同宫颈癌化疗药物联用后具有协同效果

TAX、Pt 以及 5-FU 均为治疗宫颈癌的常用化疗药物,为了检测 CA 是否能与这三种化疗药物产生协同效果,我们分别检测了 TAX、Pt、5-FU 这三种药物在 Siha 细胞中的抑制作用,并计算其  $IC_{50}$  值。

首先对其单独在 Siha 细胞中的活性进行检测。结果如图 9A、9B、9C 所示,给药 72 h 后,其中 TAX 的  $IC_{50}$  为 16  $\mu\text{mol/L}$ ,Pt 的  $IC_{50}$  为 36  $\mu\text{mol/L}$ ,5-FU 的  $IC_{50}$  为 31  $\mu\text{mol/L}$ 。为了进一步检测其与 CA 联

合在 Siha 细胞中是否有协同效果,我们根据其亚致死浓度,设定联合给药的浓度,并分别与 CA 进行联合给药考察抑制效果。通过计算  $IC_{50}$  值发现,与单独给药组相比,TAX/Pt/5-FU 分别与不同浓度的 CA 联用后抑制作用明显增强,且具有一定的浓度依赖性(图 9D、9E、9F)。随后,将上述结果分别投入到联合指数计算软件中进行计算,发现 TAX/Pt/5-FU 与 CA 在一定浓度范围内均具有协同效果(图 9G、9H、9I,协同指数见表 1)。

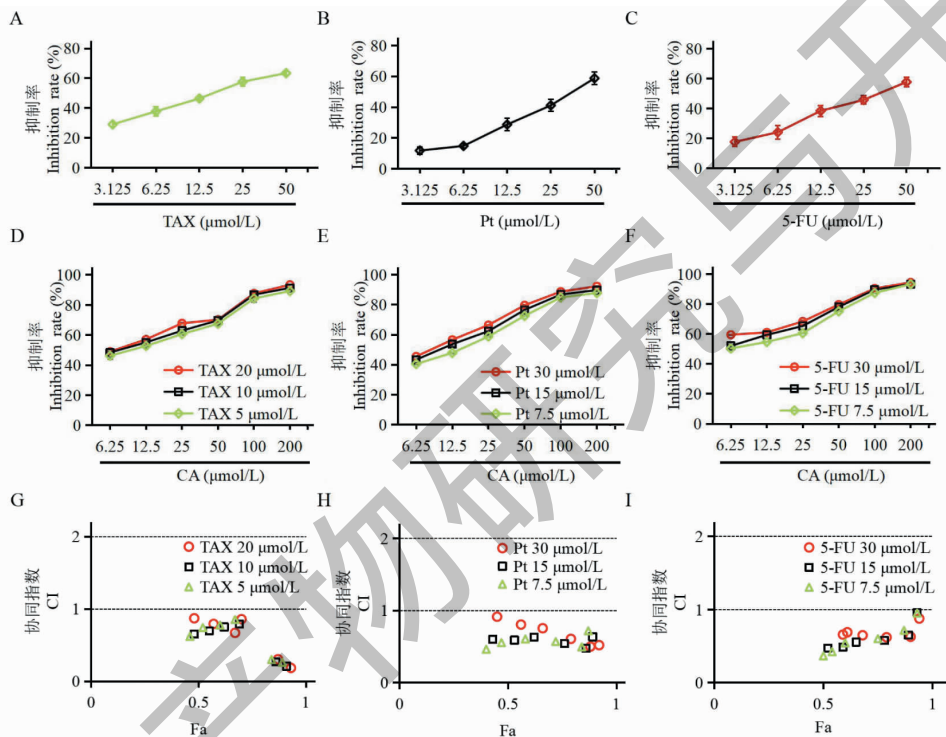


图 9 三种宫颈癌化疗药物对 Siha 细胞的抗肿瘤效果及与 CA 的协同效果

Fig. 9 Anti-tumor effect of three cervical cancer chemotherapy drugs and synergistic effect with CA in Siha cells

表 1 CA 联合三种宫颈癌化疗药物在 Siha 细胞中的协同指数

Table 1 Synergistic index of CA combined with three cervical cancer chemotherapy drugs

化疗药物 Chemotherapeutic drugs	协同指数 Synergy index	CA 浓度 Drug concentration ( $\mu\text{mol/L}$ )					
		6.25	12.5	25	50	100	200
+ TAX (5 $\mu\text{mol/L}$ )	Fa	0.46	0.52	0.60	0.67	0.84	0.89
	CI	0.62	0.74	0.78	0.85	0.30	0.26
+ TAX (10 $\mu\text{mol/L}$ )	Fa	0.48	0.55	0.62	0.69	0.86	0.91
	CI	0.65	0.70	0.75	0.79	0.27	0.21
+ TAX (20 $\mu\text{mol/L}$ )	Fa	0.48	0.57	0.67	0.7	0.87	0.93

续表 1 (Continued Tab. 1)

化疗药物 Chemotherapeutic drugs	协同指数 Synergy index	CA 浓度 Drug concentration ( $\mu\text{mol/L}$ )					
		6.25	12.5	25	50	100	200
+ Pt (7.5 $\mu\text{mol/L}$ )	CI	0.87	0.79	0.67	0.86	0.30	0.18
	Fa	0.40	0.47	0.58	0.72	0.84	0.87
+ Pt (15 $\mu\text{mol/L}$ )	CI	0.46	0.56	0.61	0.57	0.50	0.72
	Fa	0.43	0.53	0.62	0.76	0.86	0.89
+ Pt (30 $\mu\text{mol/L}$ )	CI	0.60	0.59	0.63	0.54	0.47	0.63
	Fa	0.45	0.56	0.66	0.79	0.88	0.92
+ 5-FU (7.5 $\mu\text{mol/L}$ )	CI	0.91	0.81	0.75	0.61	0.50	0.52
	Fa	0.50	0.54	0.60	0.75	0.87	0.93
+ 5-FU (15 $\mu\text{mol/L}$ )	CI	0.37	0.42	0.54	0.60	0.72	0.95
	Fa	0.52	0.59	0.65	0.78	0.89	0.93
+ 5-FU (30 $\mu\text{mol/L}$ )	CI	0.47	0.49	0.56	0.58	0.65	0.96
	Fa	0.59	0.61	0.68	0.79	0.90	0.94
	CI	0.66	0.69	0.65	0.62	0.63	0.88

注:表中 Fa 为抑制率,最大单位为 1;CI 值为协同指数,CI < 1 为协同,CI > 1 为拮抗,CI = 1 为相加。

Note: In the table, Fa is the inhibition rate, with the maximum unit of 1; CI: synergy index, CI < 1: synergy, CI > 1: antagonism, CI = 1: additivity.

### 3 讨论与结论

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一,常伴有高复发率和高转移率的特点,严重威胁女性健康<sup>[12]</sup>。近年来,天然化合物通过抑制 E6/E7,已广泛探索其作为宫颈癌治疗的潜在用途。例如,丹参酮 IIA 在转录水平抑制 E6/E7,对宫颈癌细胞形成 p53 依赖的生长抑制<sup>[13]</sup>;茴香酸通过蛋白酶体降解在蛋白水平下调宫颈癌细胞中的 E6/E7 表达,并诱导 p53 非依赖性线粒体凋亡<sup>[14]</sup>;n-苄基肉桂酰胺通过抑制 E6/E7 mRNA 水平促进人宫颈癌细胞凋亡<sup>[15]</sup>。在本研究中,我们首次报道了 CA 能够诱导 Siha 细胞凋亡并下调 HPV E6/E7 蛋白的表达水平。

细胞周期异常是肿瘤形成的主要原因之一,其调控机制包括细胞周期驱动和监控。当驱动机制受损时,会促使正常细胞生长失控,并向肿瘤细胞转化;当监控机制受损时,会诱导细胞在 DNA 修复以及细胞死亡等环节发生功能紊乱,恶化整个调控机制<sup>[16,17]</sup>。我们通过流式细胞仪检测发现,CA 能够诱导 Siha 细胞中 G2/M 期的细胞比例明显增加,说明 CA 阻滞在 G2/M 期。细胞凋亡是细胞程序性死亡的一种形式<sup>[18,19]</sup>,其过程主要涉及死亡受体信号通路、线粒体信号通路和内质网信号通路<sup>[20,21]</sup>。其中“线粒体信号通路”中的代表蛋白为 Bcl-2 及 Bax 等,它们在接收到胞内的死亡信号后激活,在线粒体外膜或胞浆中产生相互作用,从而引起线粒体膜通

透性的改变、跨膜电位的丢失,进而释放细胞色素 C 和其他蛋白<sup>[22]</sup>。前期实验我们首先通过 Hoechst 33342 染色证实 CA 诱导 Siha 细胞凋亡;随后通过 JC-1 荧光探针检测,发现 CA 显著降低 Siha 细胞中线粒体的跨膜电位;进一步的 Western blot 验证发现 CA 使 Siha 细胞中的抗凋亡蛋白 Bcl-2, survivin 减少,促凋亡蛋白 Bax 增多,进一步说明细胞发生凋亡。E6/E7 蛋白有助于维持伴有 HPV 感染的宫颈癌细胞的恶性表型,并且能够调节许多与细胞存活、凋亡通路相关的分子。本文证明 CA 能够下调 E6/E7 的表达水平,从而诱导伴有 HPV 感染的 Siha 细胞发生凋亡。随后我们探究了 CA 诱导 E6/E7 降解的具体机制。结果证实用蛋白酶体抑制剂 MG132 预先作用后,能够明显减弱 CA 诱导的 E6/E7 降解现象,说明这两个蛋白之前是由于蛋白酶体而发生降解。

小分子药物对基因功能的影响都具有浓度依赖性<sup>[23]</sup>。如果一个小分子药物能够发挥抗肿瘤作用,它就可以采用亚致死浓度去筛选出能够与其协同致死的药物,这种方法被称为化学基因组学筛选策略<sup>[24]</sup>。由于目前临床上治疗宫颈癌的化疗药物对患者具有一定的选择性,且长期使用会出现耐药性等副作用,而现有的临床联合给药方案也仅对部分患者有效。因此,寻找并开发出新的治疗药物和联合给药的方案是我们需要进行的研究工作。在本研

究中,我们利用化学基因组学筛选策略,对 CA 与临床上常用的治疗宫颈癌药 TAX、Pt、5-FU 在 Siha 细胞中进行协同效果的检测。结果证实,CA 联合上述化疗药物均能在一定浓度下呈现协同效果,且联合用药组的作用效果优于单独用药组,差异有统计学意义。据文献报道,在抗肿瘤过程中,上述化疗药物均可引起 DNA 损伤,并阻滞细胞周期;其中,TAX 可阻滞 G<sub>2</sub>M 期<sup>[25]</sup>;Pt 可阻滞 G<sub>2</sub>M 期<sup>[26]</sup>;5-FU 可阻滞 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期<sup>[27]</sup>。根据本文研究结果,提示 CA 可能与上述化疗药物通过共同阻滞细胞周期,发挥协同增效的作用,进而诱导细胞凋亡,增强其抗宫颈癌效果。

综上所述,本研究证实 CA 通过线粒体途径诱导 Siha 细胞凋亡,并通过蛋白酶体途径下调 HPV E6/E7 蛋白的表达;同时与多种宫颈癌常用化疗药物均能在细胞水平上呈现协同效果。以上研究为更好地治疗宫颈癌提供了新的研究思路,同时也提出了新的联合给药方案,为减轻患者在抗宫颈癌治疗中的耐药性,提高对患者的有效率,提供了理论依据。

#### 参考文献

- 1 Yuan Y, Cai X, Shen F, et al. HPV post-infection microenvironment and cervical cancer [J]. *Cancer Lett*, 2021, 497: 243-254.
- 2 Aizitaili A, Yang Z, Mouboul A, et al. 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 [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2022, 34: 359-367.
- 3 Balasubramaniam SD, Balakrishnan V, Oon CE, et al. key molecular events in cervical cancer development [J]. *Medicina* (Kaunas), 2019, 55 (7): 384.
- 4 Hoppe SK, Bossler F, Braun JA, et al. The HPV E6/E7 oncogenes: key factors for viral carcinogenesis and therapeutic targets [J]. *Trends Microbiol*, 2018, 26 (2): 158-168.
- 5 Hajimonfarednejad M, Ostovar M, Raee MJ, et al. Cinnamon: a systematic review of adverse events [J]. *Clin Nutr*, 2018, 38: 594-602.
- 6 Dorri M. Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) as an antidote or a protective agent against natural or chemical toxicities: a review [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2018, 41: 338-351.
- 7 Kim DH, Kim CH, Kim MS, et al. Suppression of age-related inflammatory NF-kappaB activation by cinnamaldehyde [J]. *Biogerontology*, 2007, 8: 545-554.

- 8 Cabello CM, Bair WB, Lamore SD, et al. The cinnamon-derived Michael acceptor cinnamic aldehyde impairs melanoma cell proliferation, invasiveness, and tumor growth [J]. *Free Radical Bio Med*, 2009, 46: 220-231.
- 9 Lu T, Sheng H, Wu J, et al. Cinnamon extract improves fasting blood glucose and glycosylated hemoglobin level in Chinese patients with type 2 diabetes [J]. *Nutr Res*, 2012, 32: 408-412.
- 10 Chen BJ, Fu CS, Li GH, et al. Cinnamaldehyde analogues as potential therapeutic agents [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2017, 17 (1): 33-43.
- 11 Zhang LQ, Zhang ZG, Fu Y, et al. Research progress of *trans*-cinnamaldehyde pharmacological effects [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2015, 40: 4568-4572.
- 12 Wang R, Pan W, Jin L, et al. Human papillomavirus vaccine against cervical cancer: opportunity and challenge [J]. *Cancer Lett*, 2020, 471: 88-102.
- 13 Munagala R, Aqil F, Jeyabalan J, et al. Tanshinone IIA inhibits viral oncogene expression leading to apoptosis and inhibition of cervical cancer [J]. *Cancer Lett*, 2015, 356: 536-546.
- 14 Paul P, Rajendran SK, Peuhu E, et al. Novel action modality of the diterpenoid anisomelic acid causes depletion of E6 and E7 viral oncoproteins in HPV-transformed cervical carcinoma cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 89: 171-184.
- 15 Xiong Y, Chen L, Luo P. *N*-Benzylcinnamide induces apoptosis in HPV16 and HPV18 cervical cancer cells via suppression of E6 and E7 protein expression [J]. *IUBMB Life*, 2015, 67: 374-379.
- 16 Diaz MS, Tarrado CM, Miranda A, et al. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy [J]. *Pharmacol Ther*, 2013, 138: 255-271.
- 17 Barnum KJ, Connell MJ. Cell cycle regulation by checkpoints [J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1170: 29-40.
- 18 Pistrutto G, Trisciuglio D, Ceci C, et al. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies [J]. *Aging*, 2016, 8: 603-619.
- 19 Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer [J]. *Nature*, 2001, 411 (6835): 342-348.
- 20 D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy [J]. *Cell Biol Int*, 2019, 43: 582-592.
- 21 Carneiro BA, El-Deir WS. Targeting apoptosis in cancer therapy [J]. *Net Rev Clin Oncol*, 2020, 17 (7): 395-417.
- 22 Green DR. Cancer and apoptosis: who is built to last [J]. *Cancer cell*, 2017, 31 (1): 2-4.