

文章编号 1006-8147(2023)02-0131-06

论 著

PKG 抑制剂 KT-5823 对宫颈癌 HeLa 细胞活力、凋亡、自噬的影响

杨澜¹,周春雷²,王艺霖¹,董贺楠¹,杨磊²,穆红²

(1.天津医科大学一中心临床学院,天津 300192;2.天津市第一中心医院检验科,天津 300192)

摘要 目的:明确宫颈癌 HeLa 细胞对环鸟苷酸依赖性蛋白激酶(PKG)抑制剂 KT-5823 的敏感性,探究 KT-5823 对 HeLa 细胞活力、凋亡和自噬的影响及机制。方法:使用不同浓度的 KT-5823 干预 HeLa 细胞 24 h,CCK-8、免疫印迹试验分别测定细胞活力、PKG1 表达水平,进而确定后续药物刺激浓度。将 HeLa 细胞分为两组,即 DMSO 组(对照组)和 KT-5823 组(实验组),流式细胞术检测细胞凋亡,GFP-LC3B 荧光斑点实验检测自噬斑点形成数量,实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 PKG1、微管相关蛋白 1 轻链 3-II(LC3 II)、Beclin1 mRNA 的表达水平,免疫印迹试验检测 PKG1、自噬相关蛋白 LC3 II/I、Beclin1、自噬相关通路蛋白蛋白激酶 B(Akt)、磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR)、凋亡相关蛋白 B 细胞淋巴瘤 2 家族蛋白(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(Caspase 3)蛋白的表达水平。增加自噬抑制剂 SBI-0206965 组观察自噬在此过程中的作用。结果:与对照组相比,实验组在 3~100 $\mu\text{mol/L}$ 刺激浓度下均可导致 HeLa 细胞活力降低($t=10.23\sim 14.83$,均 $P<0.05$),PKG1 蛋白表达水平逐渐降低($t=10.01\sim 14.17$,均 $P<0.05$)。最终选取 3 $\mu\text{mol/L}$ 为刺激浓度,用于后续研究。与对照组相比,细胞凋亡增加($t=10.78$, $P=0.004$),荧光自噬斑点数量增加($t=10.12$, $P=0.0005$),PKG1 mRNA、蛋白的表达水平降低($t=13.56$, $P=0.0002$; $t=5.461$, $P=0.0005$)、LC3 II、Beclin1 mRNA($t=8.359$, $P=0.0011$; $t=5.782$, $P=0.0044$)、LC3 II/I、Beclin1 蛋白($t=6.924$, $P=0.0023$; $t=11.84$, $P=0.0003$)的表达水平增加,p-Akt/Akt($t=5.194$, $P=0.0065$)、p-mTOR/mTOR($t=12.78$, $P=0.0002$)、Bcl-2/Bax($t=13.79$, $P=0.0002$)的比值降低,Caspase 3 表达增加($t=9.341$, $P=0.0007$)。与实验组相比,30、50、70、100 $\mu\text{mol/L}$ 自噬抑制剂 SBI-0206965 组可增加细胞凋亡($t=7.616$, $P=0.0016$; $t=15.43$, $P=0.0001$; $t=11.01$, $P=0.0004$; $t=15.39$, $P=0.0001$)。结论:PKG 抑制剂 KT-5823 可有效抑制 HeLa 细胞增殖、促进细胞凋亡,同时可抑制 Akt-mTOR 通路诱导细胞发生自噬,且 KT-5823 诱导的自噬在此过程中起保护性作用,PKG 可成为宫颈癌临床治疗的新靶点。

关键词 PKG;KT-5823;宫颈癌;自噬;活力;凋亡

中图分类号 R737.33

文献标志码 A

Effects of PKG inhibitor KT-5823 on viability, apoptosis and autophagy of cervical cancer HeLa cells

YANG Lan¹,ZHOU Chun-lei²,WANG Yi-lin¹,DONG He-nan¹,YANG Lei²,MU Hong²

(1.The First Central Clinical School,Tianjin Medical University,Tianjin 300192,China; 2.Department of Clinical Laboratory,Tianjin First Central Hospital,Tianjin 300192,China)

Abstract Objective: To determine the sensitivity of cervical cancer HeLa cells to cGMP-dependent protein kinase(PKG) inhibitor KT-5823 and explore the effects and mechanisms of KT-5823 on the viability,apoptosis and autophagy of HeLa cells. **Methods:** Different concentrations of KT-5823 were used to intervene HeLa cells for 24 hours. The cell viability and PKG1 expression level were detected by CCK-8 and Western blotting respectively. Then the subsequent drug stimulation concentration was determined. HeLa cells were divided into two groups,namely DMSO group(control group) and KT-5823 group(experimental group). Apoptosis was detected by flow cytometry. The number of autophagy spots was detected by GFP-LC3B fluorescence spot test. The mRNA expression level of PKG1,microtubule associated protein 1 light chain 3-II(LC3 II) and Beclin1 was detected by real-time fluorescent quantitative PCR(RT-qPCR).The expression levels of PKG1,autophagy related protein LC3 II/I,Beclin1,autophagy related pathway protein kinase B(Akt),phosphorylated protein kinase B(p-Akt),mammalian rapamycin target protein(mTOR),phosphorylated mammalian rapamycin target protein(p-mTOR),apoptosis related protein B-cell Lymphoma 2 family protein(Bcl-2),Bcl-2 related X protein(Bax) and Caspase 3 protein were detected by Western blotting. The autophagy inhibitor SBI-0206965 group was increased to observe the role of autophagy in this process. **Results:** Under the stimulation concentration of 3~100 $\mu\text{mol/L}$,the activity of HeLa cells reduced in the experimental group,compared with the control group($t=10.23\sim 14.83$,all $P<0.05$). The experimental group decreased PKG1 protein expression levels gradually($t=10.01\sim 14.17$,all $P<0.05$) compared with the control group. Final selection 3 $\mu\text{mol/L}$ was the stimulation concentration for subsequent study. Compared with the control group,apoptosis rates increased ($t=10.78$, $P=0.004$),

基金项目 国家自然科学基金青年科学基金项目(81602403);天津市医学重点学科(专科)建设项目(TJYXZDXK-015A)

作者简介 杨澜(1997-),女,硕士在读,研究方向:医学技术;通信作者:穆红,E-mail:tjmuhongsci@126.com。

number of fluorescent autophagy spots increased ($t=10.12, P=0.000\ 5$), expression levels of PKG1 mRNA and protein of HeLa cells decreased ($t=13.56, P=0.000\ 2; t=5.461, P=0.005\ 5$), LC3 II and Beclin1 mRNA ($t=8.359, P=0.001\ 1; t=5.782, P=0.004\ 4$) and protein ($t=6.924, P=0.002\ 3; t=11.84, P=0.000\ 3$) express level increased. The proteins of P-Akt/Akt ($t=5.194, P=0.006\ 5$), p-mTOR/mTOR ($t=12.78, P=0.000\ 2$), Bcl-2/Bax ($t=13.79, P=0.000\ 2$) ratios decreased and Caspase 3 expression ($t=9.341, P=0.000\ 7$) increased in the experimental group. Compared with the experimental group, the autophagy inhibitor SBI-0206965 group (30、50、70、100 $\mu\text{mol/L}$) increased apoptosis ($t=7.616, P=0.001\ 6; t=15.43, P=0.000\ 1; t=11.01, P=0.000\ 4; t=15.39, P=0.000\ 1$). **Conclusion:** PKG inhibitor KT-5823 can effectively inhibit the proliferation and apoptosis of HeLa cells. At the same time, it can induce autophagy by suppressing Akt/mTOR pathway and the autophagy induced by KT-5823 plays a protective role in this process. PKG may become a new target for clinical treatment of cervical cancer.

Key words PKG; KT-5823; cervical cancer; autophagy; vitality; apoptosis

宫颈癌是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤之一, 每年全球约有 50 万新发病例, 26 万死亡病例^[1]。宫颈癌新发病例主要集中于发展中国家, 我国发病率较高, 每年发病率为 16.6/100 000^[2], 且有向年轻化发展的趋势^[3]。目前宫颈癌的治疗策略包括手术切除、常规化疗、放疗, 但疗效有限, 多数患者仍会出现复发和转移, 随后死亡^[4], 亟需寻找新的治疗方案。

环鸟苷酸依赖性蛋白激酶 (cGMP-dependent protein kinase, PKG) 是在哺乳动物中普遍存在的一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 可被 cGMP 激活, 进而影响细胞的生物学功能^[5]。有研究证实, PKG 的活化在减少肿瘤细胞自发凋亡^[6]、增强肿瘤细胞干性和转移^[7]、增加肿瘤恶性程度^[8]等方面发挥重要作用。同时 PKG 可作为多种肿瘤潜在的治疗靶点, 如卵巢癌^[9]、胰腺癌^[10]、前列腺癌^[11]等, 但抑制 PKG 对宫颈癌的作用还未有报道。KT-5823 是 PKG 的特异性抑制剂, 本研究拟探讨 KT-5823 对宫颈癌 HeLa 细胞活力、凋亡和自噬的影响, 并研究其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料 人宫颈癌细胞株 HeLa 购自于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。PKG 抑制剂 KT-5823, 纯度 $\geq 85\%$, 购自 Sigma, 货号: K1388。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 EnSpire Mutilabel Reader 酶标仪 (美国 PerkinElmer 公司); Alpha Innotech FluroChem FC2 凝胶成像分析系统 (美国 Alpha Innotech 公司); LightCycle96 荧光定量 PCR 仪 (瑞士 Roche 公司); BD Accuri C6 Plus 流式细胞仪 (美国 BD Sciences 公司); 倒置显微镜 (日本 Olympus IX71 公司); 离心机 (德国 Eppendorf 公司); 正置荧光显微镜 (日本 Nikon 公司); CO₂ 细胞培养箱 (美国 Thermo 公司); 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2.2 试剂 MEM-Alpha 培养基 (以色列 Biological Industries 公司); 胎牛血清 (北京钮因泰克生物技术有限公司); PBS、青霉素/链霉素复合液 (北京

索莱宝生物技术有限公司); 胰蛋白酶-EDTA 消化液 (0.25%) 酚红 (美国 Invitrogen 公司); GFP-LC3B 质粒 (湖南科爱医疗器械有限公司); SBI-0206965 (美国默克公司); 细胞凋亡检测试剂盒 (天津三箭生物技术股份有限公司); 膜再生液 (北京索莱宝生物技术有限公司); Lipofectamine™ 3000 (美国 Thermo Fisher 公司); RNA 逆转录试剂盒、SYBR Green、荧光定量 PCR 试剂盒 (日本 Takara 生物技术有限公司); 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒、曝光液 (Boster 生物工程有限公司); 甘氨酸、Tris、SDS 粉末、氯化钠、脱脂牛奶、抗体稀释液 (北京索莱宝生物技术有限公司); 兔抗人 PKG1、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)、磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (p-mTOR)、蛋白激酶 B (Akt)、磷酸化蛋白激酶 B (p-Akt)、微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3) II/I 抗体 (美国 CST 公司); Beclin1、B 细胞淋巴瘤 2 家族蛋白 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 (Caspase 3)、GAPDH、HRP 标记羊抗兔抗体 (美国 Proteintech 公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 HeLa 细胞使用 MEM-Alpha 培养基 (含有 10% 胎牛血清、1% 青链霉素双抗) 培养, 置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养, 当细胞密度达到 80%~90% 进行传代种板。

1.3.2 试剂溶解与实验分组 KT-5823 用 DMSO 溶解成储存液, 将储存液分装到若干 EP 管中, -20℃ 保存, 避免反复冻融。将 HeLa 细胞分为 DMSO 组 (对照组)、KT-5823 组 (实验组), 干预 24 h 后收集细胞用于后续实验。

1.3.3 CCK-8 检测细胞存活率 取对数生长期的 HeLa 细胞制备单细胞悬液, 以每孔 3 000 个细胞接种于 96 孔培养板中, 每组设 3 个复孔, 过夜培养。更换新培养基, 将不同浓度的 KT-5823 分别加入对应孔中, 刺激 24 h。每孔加入 10 μL CCK8 溶液, 孵育 2 h。酶标仪检测 450 nm 波长处吸光度值。根据

下列公式计算细胞存活率:

细胞存活率=[(实验孔-空白孔)/(对照孔-空白孔)] \times 100%

1.3.4 流式细胞术检测细胞凋亡 将 HeLa 细胞(每孔 1×10^5 个)接种到 24 孔板,每组设 3 个复孔,贴壁后待细胞密度达到 70%~80% 加入药物处理 24 h,收集细胞,采用 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率。

1.3.5 GFP-LC3B 荧光斑点实验 将 HeLa 细胞(每孔 0.8×10^5 个)接种到 24 孔板。待细胞密度达到 60%~70%,使用 Lipofectamine™ 3000 转染 GFP-LC3B

表 1 引物序列

Tab 1 Primer sequences

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
<i>β-actin</i>	5'-AGTTGCGTTACACCTTTCTTG-3'	5'-TGTCACCTTCACCGTTCAGT-3'
<i>PKG</i>	5'-GAGTTGGAGGTTTCGGACGACT-3'	5'-GATGTGCTCCTGCTGCTTGTG-3'
<i>LC3II</i>	5'-GAGAAGCAGCTTCCTGTTCTGG-3'	5'-GTGTCCGTTACCAACAGGAAG-3'
<i>Beclin1</i>	5'-CTGGACACTCAGCTCAACGTCA-3'	5'-CTCTAGTGCCAGCTCCTTTAGC-3'

注:Becl-2;B 细胞淋巴瘤 2 家族蛋白;PKG;环鸟苷酸依赖性蛋白激酶;LC3 II:微管相关蛋白 1 轻链 3- II

1.3.7 蛋白免疫印迹试验检测各蛋白表达水平 收集 KT-5823 干预之后的 HeLa 细胞,加入含磷酸酶抑制剂的裂解液裂解细胞提取蛋白,用 BCA 法进行蛋白定量。蛋白样品(30 μ g/孔)加入不同浓度 SDS-PAGE 凝胶中进行电泳,分开蛋白条带。转膜后脱脂牛奶封闭 2 h(5%),孵育兔抗人 PKG1、LC3 II/I、Beclin1、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、Bcl-2、Bax、Caspase-3、GAPDH(1:1 000)抗体过夜(4℃),洗涤后孵育二抗(1:1 000)1 h,加入 ECL 显影液后在蛋白凝胶成像仪中显影观察,Image J 分析蛋白条带灰度值,实验独立重复 3 次。

1.3.8 利用自噬抑制剂 SBI 观察诱导的自噬的作用 将 HeLa 细胞(以 1×10^5 /孔的密度)接种到 24 孔板,细胞分为 3 组:DMSO 组(对照组)、KT-5823 组(实验组)、实验组+自噬抑制剂组,每组设 3 个复孔。预实验自噬抑制剂选取的剂量分别为 10、30、50、70 μ mol/L SBI 和 100 μ mol/L,过夜培养。待细胞密度达到 70%~80%,分别在对应孔加入自噬抑制剂 SBI-0206965 刺激 2 h,然后加入 3 μ mol/L 的 KT-5823 刺激 24 h,收集细胞,用流式细胞术检测细胞凋亡。

1.4 统计学处理 应用 GarphPad Prism9.0、SPSS 16.0 软件进行统计分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 KT-5823 对 HeLa 细胞增殖能力的影响 CCK8 结果显示,与对照组相比(图 1A),3~100 μ mol/L

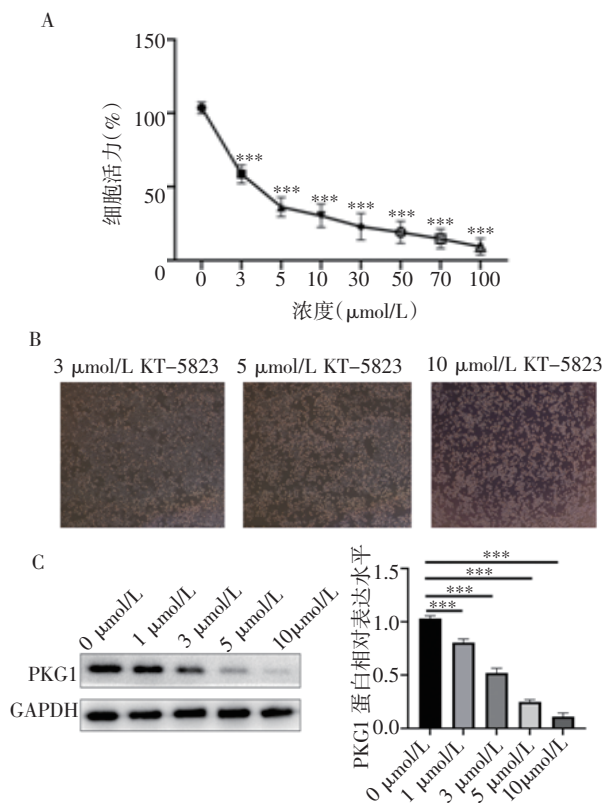
质粒 6 h 后,更换新鲜完全培养基培养 24 h 后再加入药物刺激 24 h,用 4%多聚甲醛固定细胞 20 min,PBS 清洗 3 次。荧光显微镜观察 GFP-LC3 斑点的形成。

1.3.6 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR) 收集干预之后的细胞,使用 Trizol 提取细胞总 RNA,测定 RNA 浓度,按照试剂盒说明书将 RNA 逆转录为 cDNA。用 TB Green 进行 RT-qPCR 检测 PKG1、LC3 II、Beclin1、 β -actin mRNA 的表达水平,2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 计算 mRNA 的相对表达。荧光定量热循环条件为:预变性:95℃,2 min;3 步扩增:95℃,10 s;58℃,10 s;72℃,10 s,循环 45 次。引物序列如表 1 所示。

不同浓度的 KT-5823 均可明显抑制 HeLa 细胞的增殖(3 μ mol/L: $t=10.23$, $P=0.000 5$;5 μ mol/L: $t=10.65$, $P=0.000 4$;10 μ mol/L: $t=14.28$, $P=0.000 1$;30 μ mol/L: $t=13.22$, $P=0.000 2$;50 μ mol/L: $t=14.83$, $P=0.000 1$;70 μ mol/L: $t=12.10$, $P=0.000 3$;100 μ mol/L: $t=13.56$, $P=0.000 2$),且 3 μ mol/L KT-5823 接近半数抑制浓度。显微镜图片显示(图 1B),KT-5823 刺激 HeLa 细胞 24 h 后,细胞形态从规则梭形变成圆形并出现细胞碎片,这种形态变化随浓度的增加而逐渐加剧。免疫印迹实验结果显示,与对照组相比(图 1C),随 KT-5823 的浓度增加,PKG1 蛋白表达水平逐渐降低(1 μ mol/L: $t=10.01$, $P=0.000 6$;3 μ mol/L: $t=13.83$, $P=0.000 2$;5 μ mol/L: $t=11.86$, $P=0.000 3$;10 μ mol/L: $t=14.17$, $P=0.000 1$)。综合考虑,最终选取了浓度梯度中的有效剂量 3 μ mol/L 用于后续研究。

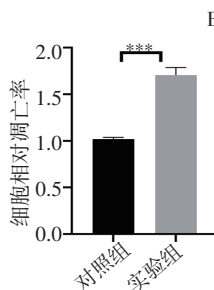
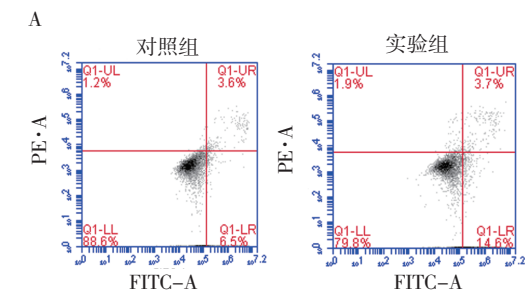
2.2 KT-5823 对 PKG1 的抑制作用 RT-qPCR 结果显示,与对照组相比(图 2A),实验组 PKG1 mRNA 表达水平显著降低($t=13.56$, $P=0.000 2$);免疫印迹实验与 RT-qPCR 结果一致,与对照组相比(图 2B),实验组 PKG1 蛋白表达水平显著降低($t=5.461$, $P=0.005 5$),KT-5823 可明显抑制 PKG1 的表达。

2.3 KT-5823 对 HeLa 细胞凋亡的影响 流式细胞术结果显示,与对照组相比(图 3A),KT-5823 可促进 HeLa 细胞凋亡($t=10.78$, $P=0.004$)。免疫印迹试验结果显示,与对照组相比(图 3B),KT-5823 可上调 HeLa 细胞凋亡相关蛋白 Caspase 3 的表达($t=9.341$, $P=0.000 7$),降低 Bcl2/Bax 的比值($t=13.79$, $P=0.000 2$)。



注:A:不同浓度 KT-5823 干预对 HeLa 细胞活力的影响;B:KT-5823 对 HeLa 细胞形态的影响(40×);C:不同浓度 KT-5823 对 PKG1 蛋白表达水平的影响;*** $P<0.001$;PKG:环鸟苷酸依赖性蛋白激酶

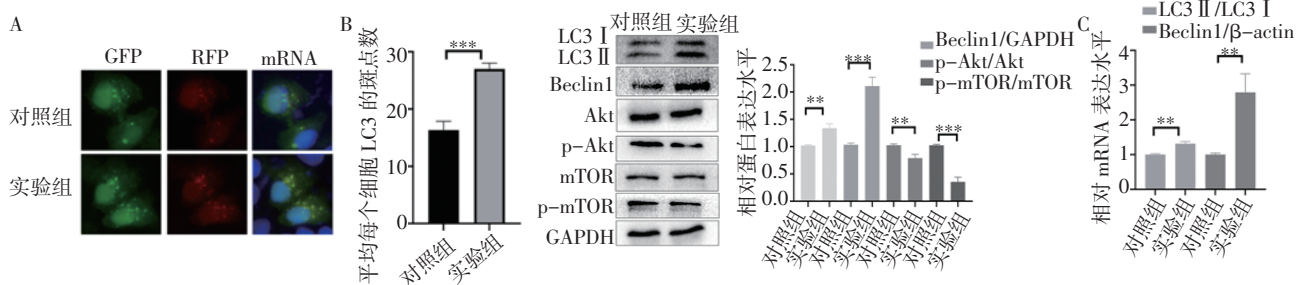
图 1 KT-5823 可有效抑制 HeLa 细胞的增殖能力



注:A:流式细胞术检测 KT-5823 对细胞凋亡影响;B:Western 印迹检测 KT-5823 对凋亡相关蛋白表达水平的影响;*** $P<0.001$

图 3 KT-5823 对 HeLa 细胞凋亡的影响

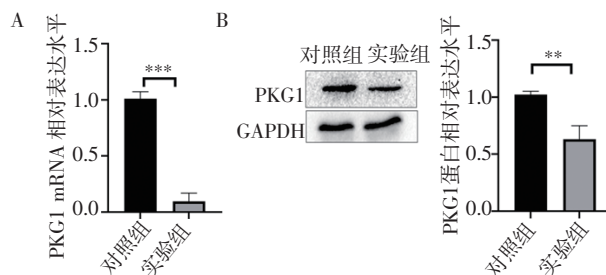
Fig 3 Effects of KT-5823 on apoptosis in HeLa cells



注:A:KT-5823 刺激下 GFP-LC3 斑点形成的数量(400×);B:Western 印迹检测 KT-5823 对自噬相关蛋白的影响;C:自噬相关基因 mRNA 的表达;*** $P<0.001$;LC3II:微管相关蛋白 1 轻链 3;Akt:蛋白激酶 B;p-Akt:磷酸化蛋白激酶 B;哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR);p-mTOR:磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

图 4 KT-5823 对 HeLa 细胞自噬的影响

Fig 4 Effects of KT-5823 on autophagy in HeLa cells



注:A:KT-5823 对 PKG1 mRNA 表达水平的统计分析图;B:Western 印迹检测 KT-5823 对 PKG1 蛋白表达水平的影响;*** $P<0.001$;** $P<0.01$;PKG:环鸟苷酸依赖性蛋白激酶

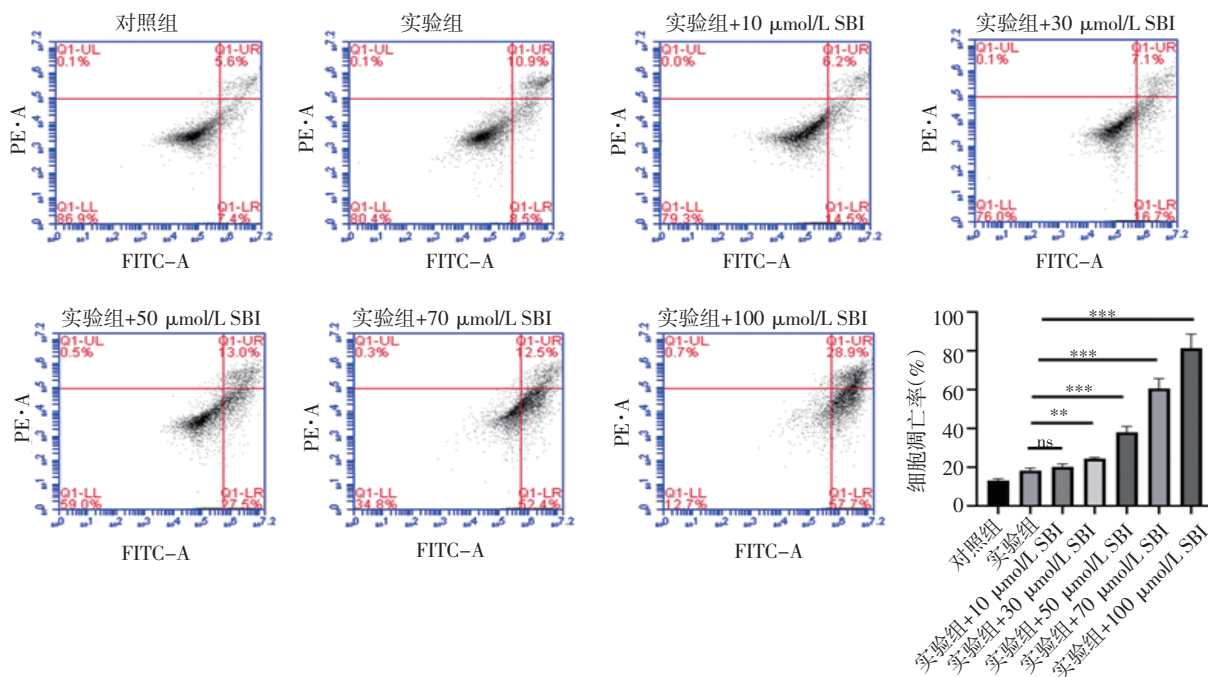
图 2 KT-5823 对 PKG1 表达的影响

Fig 2 Effect of KT-5823 on the expression of PKG1

2.4 KT-5823 对 HeLa 细胞自噬的影响 转染 GFP-LC3 质粒后,与对照组相比(图 4A),KT-5823 可促进 GFP-LC3B 斑点的形成($t=10.12, P=0.0005$),表明 KT-5823 可促进 HeLa 细胞自噬体的形成。免疫印迹实验结果显示,与对照组相比(图 4B),KT-5823 可上调 LC3 II / I、Beclin1 蛋白的表达($t=6.924, P=0.0023$; $t=11.84, P=0.0003$),降低自噬相关通路蛋白 p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 的比值($t=5.194, P=0.0065$; $t=12.78, P=0.0002$)。与蛋白结果一致,RT-qPCR 结果显示,与对照组相比(图 4C),KT-5823 可上调 HeLa 细胞自噬相关基因 LC3 II、Beclin1 mRNA 的表达($t=8.359, P=0.0011$; $t=5.782, P=0.0044$)。

2.5 自噬抑制剂SBI对KT-5823诱导细胞凋亡的影响 流式细胞术实验结果显示(图5),与实验组相比,当自噬抑制剂剂量超过10 $\mu\text{mol/L}$ 后,随自噬抑制剂剂量的增加,细胞凋亡也逐步增加(实验组+

30 $\mu\text{mol/L}$ SBI: $t=7.616, P=0.0016$;实验组+50 $\mu\text{mol/L}$ SBI: $t=15.43, P=0.0001$;实验组+70 $\mu\text{mol/L}$ SBI: $t=11.01, P=0.0004$;实验组+100 $\mu\text{mol/L}$ SBI: $t=15.39, P=0.0001$)。



注:ns:无显著性差异;** $P<0.01$ *** $P<0.001$

图5 流式细胞术检测KT-5823联合SBI-0206965对细胞凋亡的影响

Fig 5 Effects of KT-5823 combined with SBI-0206965 on apoptosis detected by flow cytometry assay

3 讨论

KT-5823是一种可穿透细胞膜的PKG特异性抑制剂,可用于细胞研究。因PKG存在组织器官差异,研究多集中于心脏^[12]、血管^[13]、成纤维细胞^[14]等方面。近年来,PKG与肿瘤的研究逐渐丰富,研究表明PKG对肿瘤有促进作用^[6-8],因此笔者对抑制PKG是否可用于宫颈癌治疗进行了探索。本研究首先应用CCK-8检测了不同浓度的KT-5823对HeLa细胞增殖能力的影响,结果发现,KT-5823在3 $\mu\text{mol/L}$ 以上浓度均可显著抑制HeLa细胞的增殖能力,且随KT-5823刺激浓度的增加,细胞活力逐渐降低。与CCK-8实验结果相吻合,分别用3、5、10 $\mu\text{mol/L}$ KT-5823刺激细胞后,细胞形态出现明显加剧的毒性变化,表现为变圆变亮的细胞比例逐渐增加。这与不同剂量KT-5823对PKG1活性的抑制程度有关。以上实验结果证明了KT-5823具有抑制HeLa细胞生长的作用。

细胞凋亡是一种多基因参与调控的细胞程序性死亡形式^[15]。Caspase 3在细胞凋亡过程中位于级联反应下游,执行凋亡过程。Bax和Bcl-2同属于Bcl-2家族蛋白,Bcl-2是一种抑制凋亡的基因,主要通过阻止线粒体释放凋亡因子来发挥抗凋亡作

用,而Bax是一种促凋亡基因。正常情况下,Bax和Bcl-2以适当的比例存在,但受到外界凋亡信号刺激后,二者的含量或比例会发生变化。当Bcl-2表达增多时,会促使Bax/Bcl-2复合体解离,进而与Bcl-2结合形成更加牢固的Bcl-2/Bax异源二聚体,抑制凋亡的发生;当Bax表达增多时,Bax/Bcl-2同二聚体会明显增多,进而激活Caspase家族蛋白^[16]。前期的流式细胞术实验结果显示,KT-5823能够促进宫颈癌细胞凋亡。为进一步研究KT-5823对宫颈癌细胞凋亡的影响,并对凋亡相关蛋白Caspase 3、Bcl-2、Bax蛋白进行了检测,结果显示,KT-5823可提高促凋亡相关基因Caspase 3、Bax的表达,下调抗凋亡基因Bcl-2的表达,降低Bcl-2/Bax比值。以上实验结果表明KT-5823可通过调节Caspase 3、Bcl-2和Bax蛋白的表达进而诱导HeLa细胞发生凋亡,这与前人关于抑制cGMP/PKG通路可抑制宫颈癌细胞生长的实验结果相吻合^[17]。

自噬是一种降解和消除错误折叠蛋白质和受损细胞器的分解代谢过程^[18]。自噬在肿瘤细胞中具有双重作用,一方面肿瘤细胞可利用自噬对受损细胞器和陈旧蛋白质进行机械化降解,维持细胞稳态,且在面对应激反应时肿瘤细胞可通过激活自噬

免除细胞死亡^[19];另一方面当自噬超过阈值时,可能会引发自噬性细胞死亡或激活其他细胞死亡方式,最终导致细胞死亡^[20]。笔者首先通过转染 GFP-LC3 质粒探究了抑制 PKG1 对宫颈癌细胞自噬的影响,发现与对照组相比,KT-5823 能够增加宫颈癌细胞自噬泡的形成。然后通过 RT-qPCR 和免疫印迹试验检测自噬基因 LC3 II、Beclin1 的表达水平发现,与对照组相比,实验组 LC3 II/I、Beclin1 表达水平增加。PI3K/Akt/mTOR 信号通路是经典的自噬通路,mTOR 是调节自噬的明星因子^[21]。此信号通路也是细胞内关键的信号转导通路,可促进细胞生长并抑制细胞凋亡^[22]。基于此,笔者研究了 KT-5823 刺激后 Akt-mTOR 信号通路的变化,发现 p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 比值降低。以上研究结果表明宫颈癌细胞在 KT-5823 刺激后,可通过抑制 Akt-mTOR 信号通路诱导细胞自噬水平增加。为了探究自噬在宫颈癌细胞 PKG1 抑制中的作用,笔者应用了自噬特异性抑制剂 SBI-0206965,发现自噬抑制剂与 PKG1 抑制剂 KT-5823 共处理宫颈癌细胞后,与单独使用 KT-5823 处理组相比,细胞凋亡率增加,且随自噬抑制剂剂量的增加细胞凋亡程度加剧。结果表明,KT-5823 干预后细胞上调的自噬水平并未达到自噬过度激活的阈值,而是发挥降低 KT-5823 刺激造成不利影响的保护作用。这也表明 KT-5823 通过联合靶向抑制自噬可提高抗宫颈癌治疗的效果。

综上所述,本文证实 PKG 特异性抑制剂 KT-5823 可抑制宫颈癌细胞的增殖能力,通过调控 Caspase 3/Bax/Bcl2 促进细胞凋亡的发生。同时,KT-5823 抑制 PKG 后,宫颈癌细胞可通过调控 Akt/mTOR 信号通路发生保护性细胞自噬,而抑制这种自噬可进一步加剧宫颈癌细胞死亡。在未来笔者准备进一步研究 PKG 基因敲除对宫颈癌细胞的作用,同时可加入动物实验进一步支持验证。总之,本研究为靶向 PKG 治疗宫颈癌提供了实验和理论依据,为临床治疗提供了新的靶点。

参考文献:

- [1] SHRESTHA A D, NEUPANE D, VEDSTED P, et al. Cervical cancer prevalence, incidence and mortality in low and middle income countries: a systematic review[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2018, 19(2): 319-324.
- [2] 于洗河, 张景茹, 降海蕊, 等. 中国女性 1990—2019 年宫颈癌和乳腺癌疾病负担分析[J]. *中国公共卫生*, 2022, 38(5): 534-538.
- [3] ZHANG S, XU H, ZHANG L, et al. Cervical cancer: epidemiology, risk factors and screening[J]. *Chin J Cancer Res*, 2020, 32(6): 720-728.
- [4] WANG L, LIU Y, ZHOU Y, et al. Zoledronic acid inhibits the growth of cancer stem cell derived from cervical cancer cell by attenuating their stemness phenotype and inducing apoptosis and cell cycle arrest through the Erk1/2 and Akt pathways[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 93.
- [5] LASA M, MARIN O, PINNA L A. Rat liver golgi apparatus contains a protein kinase similar to the casein kinase of lactating mammary gland[J]. *Eur J Biochem*, 1997, 243(3): 719-725.
- [6] FRASER M, CHAN S L, CHAN S S, et al. Regulation of p53 and suppression of apoptosis by the soluble guanylyl cyclase/cGMP pathway in human ovarian cancer cells[J]. *Oncogene*, 2006, 25(15): 2203-2212.
- [7] LV Y, WANG X, LI X, et al. Nucleotide de novo synthesis increases breast cancer stemness and metastasis via cGMP-PKG-MAPK signaling pathway[J]. *PLoS Biol*, 2020, 18(11): e3000872.
- [8] KONG X, WANG J S, YANG H. Upregulation of lncRNA DARS-AS1 accelerates tumor malignancy in cervical cancer by activating cGMP-PKG pathway[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2021, 35(6): 1-11.
- [9] LEUNG E L, WONG J C, JOHLFS M G, et al. Protein kinase G type Ialpha activity in human ovarian cancer cells significantly contributes to enhanced Src activation and DNA synthesis/cell proliferation[J]. *Mol Cancer Res*, 2010, 8(4): 578-591.
- [10] SOLTEK S, KARAKHANOVA S, GOLOVASTOVA M, et al. Anti-tumor properties of the cGMP/protein kinase G inhibitor DT3 in pancreatic adenocarcinoma [J]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2015, 388(11): 1121-1128.
- [11] WANG Z, ZHANG C, CHANG J, et al. LncRNA EMX2OS, regulated by TCF12, interacts with FUS to regulate the proliferation, migration and invasion of prostate cancer cells through the cGMP-PKG signaling pathway[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 21(13): 7045-7056.
- [12] GÁSPÁR R, GÓMÓRI K, KISS B, et al. Decorin protects cardiac myocytes against simulated ischemia/reperfusion injury[J]. *Molecules*, 2020, 25(15): 3426.
- [13] HUNG Y, LIU Y, WU B, et al. Cinaciguat prevents postnatal closure of ductus arteriosus by vasodilation and anti-remodeling in neonatal rats[J]. *Front Physiol*, 2021, 29(12): 661171.
- [14] MATEI A E, BEYER C, GYORFI A H, et al. Protein kinases G are essential downstream mediators of the antifibrotic effects of sGC stimulators[J]. *Ann Rheum Dis*, 2018, 77(3): 459.
- [15] CARNEIRO B A, EL-DEIRY W S. Targeting apoptosis in cancer therapy[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17(7): 395-417.
- [16] 钟大仓, 陈超, 李桐, 等. 胡椒碱诱导人胰腺癌 PANC-1 细胞凋亡的 Caspase 3/Bax/Bcl-2 信号通路机制研究[J]. *中国现代应用药理学*, 2020, 37(14): 1687-1691.
- [17] GONG L, LEI Y, TAN X, et al. Propranolol selectively inhibits cervical cancer cell growth by suppressing the cGMP/PKG pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 3(111): 1243-1248.
- [18] YUN C, LEE S. The roles of autophagy in cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(11): 3466.
- [19] DAS S, SHUKLA N, SINGH S S, et al. Mechanism of interaction between autophagy and apoptosis in cancer [J]. *Apoptosis*, 2021, 26(9-10): 512-533.
- [20] CHMURSKA A, MATCZAK K, MARCZAK A. Two faces of autophagy in the struggle against cancer[J]. *Int J Mol Sci* 2021, 22(6): 2981.
- [21] 张雯琪, 李东娜, 马萌萌, 等. 注射用丹参多酚酸通过调节 Akt/mTOR 通路介导的自噬对氧糖剥夺/再灌注 Neuro-2a 细胞凋亡的影响[J]. *中草药*, 2022, 53(9): 2706-2714.
- [22] SUN D, LEI W, HOU X, et al. PUF60 accelerates the progression of breast cancer through down-regulation of PTEN expression[J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 17(11): 821-830.