

血根碱通过调控 PI3K/Akt 信号通路诱导 胰腺癌细胞凋亡的机制

田龙夫¹, 张琦², 王波涛³, 崔立华², 杨磊², 马波^{2*}, 崔云峰^{2*}
(1. 黄冈市中心医院, 湖北黄冈 438000; 2. 天津市南开医院, 天津 300100;
3. 天津医科大学, 天津 300070)

[摘要] 目的:探讨血根碱对胰腺癌细胞凋亡的影响及其信号通路调控机制。方法:不同浓度血根碱(2,4,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理小鼠胰腺癌 Panc02 细胞不同时间(24,48,72 h)后,采用噻唑蓝(MTT)比色法检测血根碱对细胞生长抑制作用的影响;采用磷脂结合蛋白 V/碘化丙啶(Annexin V/PI)双染色试剂盒通过流式细胞仪检测血根碱对 Panc02 细胞凋亡影响;采用花青染料(JC-1)探针试剂盒荧光染料分析检测线粒体膜电位的变化;采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax),总蛋白激酶 B(Akt),磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt),总磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K),磷酸化磷脂酰肌醇 3 激酶(p-PI3K)的表达情况。结果:与空白组比较,不同浓度的血根碱作用同一时间后,随着药物浓度的增加细胞生长抑制率逐渐升高($P < 0.05$),与空白组比较,同一浓度作用不同时间后,随着时间的增加细胞生长抑制率逐渐升高($P < 0.05$);与空白组比较,血根碱 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组的细胞凋亡率无明显升高,与空白组比较,血根碱 4,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组的细胞凋亡率均明显升高($P < 0.05$);与空白组比较,血根碱 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组时红绿荧光无变化,血根碱 4,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组红色荧光减弱,绿色荧光增强,Panc02 细胞线粒体膜电位降低;与空白组比较,血根碱 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组处理的 Bax,Bcl-2,p-PI3K,p-Akt,Akt 和 PI3K 蛋白表达均无变化,血根碱 6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 Bax 蛋白表达增高,Bcl-2 及 PI3K/Akt 信号通路中关键蛋白 p-PI3K,p-Akt 表达降低($P < 0.05$)。结论:血根碱通过抑制 PI3K/Akt 信号通路有效地诱导小鼠胰腺癌 Panc02 细胞经线粒体凋亡途径发生凋亡。

[关键词] 胰腺癌; 血根碱; 细胞凋亡; Panc02 细胞; 磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B 信号通路

[中图分类号] R735;R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)19-0166-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181719

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180614.1141.004.html>

[网络出版时间] 2018-06-14 15:26

Mechanism of Sanguinarine in Inducing Apoptosis in Murine Pancreatic Cancer Cells by Inhibiting PI3K/Akt Signaling Pathway

TIAN Long-fu¹, ZHANG Qi², WANG Bo-tao³, CUI Li-hua², YANG Lei²,
MA Bo^{2*}, CUI Yun-feng^{2*}

(1. Huanggang Central Hospital, Huanggang 438000, China;

2. Tianjin Hospital of ITCWM Nankai Hospital, Tianjin 300100, China;

3. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of sanguinarine on pancreatic cancer cell apoptosis and its signal pathway regulation mechanism. **Method:** After Panc02 cells were treated with different concentrations of

[收稿日期] 20171218(023)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81602496)

[第一作者] 田龙夫, 硕士, 医师, 从事消化道肿瘤的基础与临床研究, E-mail:271143639@qq.com

[通信作者] * 马波, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 从事消化道肿瘤的基础与临床研究, E-mail:mabo1968@sina.cn;

* 崔云峰, 博士, 主任医师, 博士生导师, 从事胆石病遗传学研究、慢性胰腺炎外科治疗及胰腺癌个体化治疗, E-mail:15022633356@139.com

sanguinarine (2, 4, 6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for different periods of time (24, 48, 72 h), the inhibition of cell growth was determined by 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay. The effect of sanguinarine on cell apoptosis was determined by phospholipid binding protein V/propidium iodide (Annexin V-FITC/PI) double staining flow cytometer assay. The changes in mitochondrial membrane potential were examined by cyanine dye (JC-1) staining assay. The expressions of protein B-lymphoblast-2 (Bcl-2), Bcl-2 related X protein (Bax), total protein kinase B (Akt), phosphorylated protein kinase B (p-Akt), total phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K), phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinase (p-PI3K) were measured by Western blot analysis. **Result:** Compared with the blank group, the growth inhibition rate of Panc02 cells increased gradually with the rise of the drug concentration, after being treated with different concentrations of sanguinarine for the same period of time ($P < 0.05$). Compared with the blank group, the inhibition rate of cell growth increased gradually with the rise of time, after being treated with the same concentration for different periods of time ($P < 0.05$). Compared with the blank group, the apoptosis rate was not obviously increased at the dose of the 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sanguinarine. Compared with the blank group, the apoptotic rate was increased at the dose of the 4, 6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sanguinarine ($P < 0.05$). Compared with the blank group, there was no change in the red and green fluorescence at the dose of 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, but a decrease in red fluorescence, an increase in green fluorescence and a reduction in Panc02 mitochondrial membrane potential at the dose of 4, 6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sanguinarine. Compared with the blank group, the expressions of Bax, Bcl-2, p-PI3K, p-Akt, Akt and PI3K were not changed at the dose of the 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sanguinarine. The expression of Bax was increased, while the expressions of Bcl-2 and PI3K/Akt signaling pathway in key proteins p-PI3K, p-Akt were decreased at the dose of 6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sanguinarine ($P < 0.05$). **Conclusion:** Sanguinarine can effectively induce the apoptosis of pancreatic cancer Panc02 cells through the mitochondrial apoptotic pathway by inhibiting the PI3K/Akt signaling pathway.

[**Key words**] pancreatic cancer; sanguinarine; cell apoptosis; Panc02 cells; phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) /protein kinase B (Akt) signaling pathway

胰腺癌是一种消化道恶性肿瘤,其具有恶性程度高、进展迅速、生存期短、病死率极高的特征。近年来,全球胰腺癌的发病率呈逐年上升趋势,目前其病因尚无十分明确,尤其吸烟、慢性胰腺炎是主要的危险因素,遗传因素、饮食因素、糖尿病、职业因素等也可能相关^[1]。其最佳治疗方案是没有手术并发症的胰腺手术治疗,但治疗晚期胰腺癌的主要方法以内科治疗为主,延长生存期,改善生活质量为原则的多学科综合性治疗^[2]。目前,尚无明显有效提高胰腺癌患者生存率的治疗手段,因此,寻找毒性低、高靶向性的抗胰腺癌药物,是有效控制胰腺癌的迫切需要。

血根碱是一种苯菲啶喹啉类生物碱,粉末状,其分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{NO}_4$,相对分子质量为 332.33 Da,主要存在于博落回和白屈菜的全草、紫堇的块和根、血水草的地上部分,血根碱具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗微生物、增强免疫力等功效^[3]。近年来,国内外对血根碱抗肿瘤作用研究仍是一个热点,关于血根碱抗肿瘤进行了广泛研究,血根碱对鳞状细胞癌、胃癌、结肠癌、膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌等均具有抗

肿瘤作用^[4]。但是关于血根碱是否通过磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 信号通路作用于小鼠胰腺癌 Panc02 细胞,国内外均未见报道。本实验以 Panc02 细胞系为研究对象,研究血根碱通过抑制 PI3K/Akt 信号通路经线粒体凋亡途径促进胰腺癌细胞凋亡作用的影响变化,并探讨血根碱抗胰腺癌作用及其分子机制。

1 材料

1.1 细胞系 小鼠胰腺癌 Panc02 细胞系由天津市南开医院分子生物学实验室张琦博士惠赠。

1.2 试剂 血根碱(成都 Purechem-Standard Co. Ltd. 公司,批号 2447-54-3);DMEM 培养基,胎牛血清(FBS),细胞裂解液(RIPA),BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Thermo 公司,批号分别为 GIBCO11995065, GIBCO10099-141-FBS,89901,23224);二甲基亚砜(DMSO,中国 Solarbio 公司,批号 MW:78.13);3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT,美国 Amresco 公司,批号 0793);Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(中国 Wanleibio 公司,批号 WLA001c);JC-1 线粒体膜电位荧光染料试剂盒

(中国 Yeasen 公司, 批号 40705ES03); Immobilon-P 转印膜(美国 Millipore 公司, 批号 IPVH00010); 兔抗小鼠 B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax), PI3K, 磷酸化 Akt (p-Akt), Akt, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 一抗, 二抗 (Anti-Rabbit-IgG) (Cell Signaling Technology 公司, 批号分别为 #2876S, #2772S, #4257S, #4060S, #4691S, #212738, #212738); 磷酸化-PI3K (p-PI3K) 一抗(英国 Abcam 公司, 批号 3821S)。

1.3 仪器 BHC-1300IIA2 型超净工作台(中国金净公司); HF90 型细胞培养箱(中国 Heal Force 公司); MC170 型倒置显微镜, CTR4000 型倒置荧光显微镜(德国 Leica 公司); KHB ST-360 型酶标仪(中国科华公司); NovoCyte 2060R 型流式细胞仪(美国 Acea 公司); Trans-Blot SD Cell 型蛋白印迹转膜仪, ChemiDoc XRS 型化学发光分析仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 药物制备 采用 0.1% DMSO 溶解药品血根碱, 配制成 $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液作为储备液, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。实验临用时, 使用含 10% FBS 的 DMEM 培养基分别稀释成 $0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为工作液作用于 Panc02 细胞, 使 DMSO 终质量浓度 $< 0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ [5-6]。

2.2 细胞培养 Panc02 细胞培养于含 10% FBS 的 DMEM 培养基中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中培养, 约 3~4 d 细胞状态呈对数生长期时, 进行传代、冻存。

2.3 MTT 比色法检测细胞生长抑制率 取对数生长期 Panc02 细胞, 胰酶常规消化后, 制成单细胞悬液, 计数后, 按约 5×10^3 个细胞/($200 \text{ } \mu\text{L}$) 接种于 96 孔培养板, 在培养箱中待细胞完全贴壁后清洗 2 次加入含有 $0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 血根碱的 DMEM 完全培养基 $200 \text{ } \mu\text{L}$, 每个浓度设 5 个复孔, 另设调零孔, 继续培养。分别在 24, 48, 72 h 时每孔加入 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT $20 \text{ } \mu\text{L}$, 置于培养箱中 4 h 后终止培养, 吸掉上清液, 每孔加入 DMSO $150 \text{ } \mu\text{L}$, 常温下低速振荡 10~15 min, 随后, 在全自动酶标仪 570 nm 波长测量每孔吸光度 A , 细胞生长抑制率按公式计算, 生长抑制率 = $(1 - A_{\text{加药组}}/A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

2.4 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞仪检测细胞凋亡率 取 Panc02 细胞, 制成单细胞悬液, 每孔约含 3×10^5 个细胞后接种于 6 孔板中, 待贴壁后, 分别加入含有 $0, 2, 4, 6 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 血根碱浓度的 DMEM 培

养液 2 mL , 继续培养 24 h 后, 用胰酶消化后收集细胞放置 $-4 \text{ }^\circ\text{C}$, $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 倒掉上清, 用已经预冷的 PBS 重悬细胞, 离心后倒掉上清, 用 $1 \times$ Binding Buffer 1 mL 重悬细胞并离心倒掉上清, 加 $1 \times$ Binding Buffer $200 \text{ } \mu\text{L}$ 重悬细胞, 在细胞悬液中分别加入 Annexin V-FITC 染色液 $5 \text{ } \mu\text{L}$, 混匀后室温避光 10 min, 加 PI 染色液 $10 \text{ } \mu\text{L}$, 混匀后避光反应 5 min, 上流式细胞仪行细胞凋亡率检测并分析。

2.5 JC-1 试剂盒荧光染料分析检测 Panc02 细胞线粒体膜电位的变化 取 Panc02 细胞, 计数后接种于 12 孔板中, 待细胞完全贴壁, 采用血根碱 ($0, 2, 4, 6 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理 Panc02 细胞, 继续培养 24 h 后进行诱导凋亡, 加入 JC-1 染料工作液 ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 孵育 15~30 min。用 PBS 洗 5 次, 加入 PBS 缓冲液 0.5 mL , 于倒置荧光显微镜下观察红色荧光(激发波长 585 nm; 发射波长 590 nm) 与绿色荧光(激发波长 514 nm; 发射波长 529 nm) 并拍照保存。

2.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测蛋白表达变化 经血根碱 ($0, 2, 6 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 作用 24 h, 在冰上 RIPA 裂解液裂解细胞并提取细胞总蛋白, 使用 BCA 法测定蛋白含量, 提取蛋白变性, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱冻存备用, 制备凝胶, 按总蛋白量 $40 \text{ } \mu\text{g}$ 上样, 电泳, 采用蛋白印迹转膜仪将蛋白质转移到 PVDF 膜, 经脱脂奶粉封闭, 依次与一抗孵育, Bcl-2, Bax, PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt 及 GAPDH 均为 1:1 000, 二抗 (1:1 000) 孵育反应, 洗膜, 使用 ECL (A-B 1:1) 发光试剂盒, 在 ChemiDoc XRS 型化学发光分析仪暗室中曝光显影并保存图片, 以 Quantity One 软件分析目的蛋白条带的灰度值并计算平均值。

2.7 统计学处理 采用 SPSS 21.0 软件进行统计描述性分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较均值, 采用单因素方差分析, 组间两两比较, 采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 血根碱对 Panc02 细胞生长抑制率影响 同时间采用血根碱 ($2, 4, 6 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 作用 Panc02 细胞后, 与空白组比较, 随着药物浓度的增加细胞生长抑制率逐渐升高 ($P < 0.05$); 不同时间 (24, 48, 72 h) 血根碱作用 Panc02 细胞后, 血根碱同浓度组随着时间的增加细胞生长抑制率逐渐升高 ($P < 0.05$), 提示血根碱对小鼠胰腺癌 Panc02 细胞生长具有抑制作用, 其抑制率呈浓度-时间依赖性, 结果见表 1。

表 1 血根碱对 Panc02 细胞生长抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of sanguinarine on growth inhibition rates of Panc02 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h	48 h	72 h
空白	-	0	0	0
血根碱	0.5	6.75 ± 1.38	8.15 ± 2.87	9.85 ± 2.64
	1	7.02 ± 3.81	14.29 ± 2.05	16.35 ± 3.08
	2	11.32 ± 3.46 ¹⁾	23.69 ± 1.05 ^{1,2)}	33.35 ± 2.73 ^{1,2,3)}
	3	20.91 ± 0.65	33.20 ± 2.47	45.27 ± 1.35
	4	32.46 ± 1.29 ¹⁾	60.95 ± 0.91 ^{1,2)}	70.53 ± 0.83 ^{1,2,3)}
	5	68.38 ± 3.45	86.21 ± 1.60	91.51 ± 2.91
6	77.74 ± 0.36 ¹⁾	94.69 ± 1.34 ^{1,2)}	99.41 ± 0.85 ^{1,2,3)}	

注:与空白组同一时间比较¹⁾ $P < 0.05$;与血根碱组同浓度 24 h 比较²⁾ $P < 0.05$;与血根碱组同浓度 48 h 比较³⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 血根碱对 Panc02 细胞凋亡率的影响 血根碱 ($2, 4, 6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 作用 Panc02 细胞 24 h 后,与空白组比较,血根碱 $4, 6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组细胞凋亡率均升高 ($P < 0.05$),表明血根碱可诱导胰腺癌 Panc02 细胞凋亡,见表 2。

表 2 血根碱对 Panc02 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of sanguinarine on apoptosis rate of Panc02 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞凋亡/%
空白	-	2.74 ± 0.19
血根碱	2	3.97 ± 0.67
	4	7.49 ± 1.99 ¹⁾
	6	14.14 ± 1.51 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$ (表 3 同)。

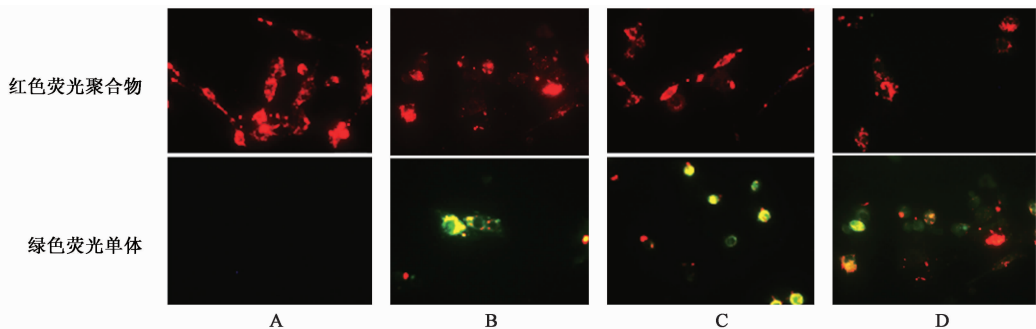
3.3 血根碱对 Panc02 细胞线粒体膜电位变化的影响 未凋亡的活细胞因 JC-1 聚集线粒体呈红色荧光聚合物,凋亡和坏死细胞 JC-1 呈单体形式存在,线粒体呈绿色荧光。血根碱 ($2, 4, 6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 作用 Panc02 细胞 24 h 后,空白组主要显示红色荧光,

随着药物浓度的增加,红色荧光逐渐减少,绿色荧光逐渐增多,其中 $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度时红绿色荧光无变化, $4, 6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组时红色荧光减弱,绿色荧光增强,表明 Panc02 细胞线粒体膜电位受到重度破坏而降低,见图 1。

3.4 血根碱对胰腺癌细胞 Panc02 凋亡相关蛋白表达的影响 血根碱 ($2, 6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 作用 Panc02 细胞 24 h 后,与空白组比较,血根碱 ($6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理 Bax 蛋白表达增高, Bcl-2 及 PI3K/Akt 信号通路中关键蛋白 p-PI3K, p-Akt 表达降低 ($P < 0.05$),表明血根碱可能通过 PI3K/Akt 信号通路经线粒体途径诱导胰腺癌 Panc02 凋亡,见图 2,表 3。

4 讨论

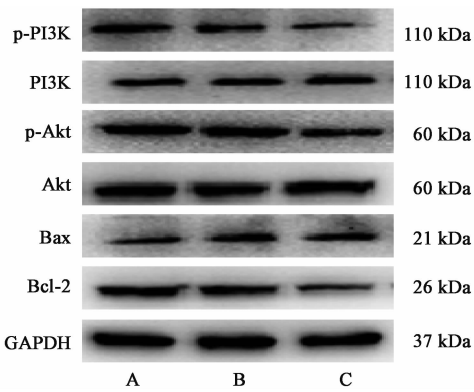
血根碱已被逐步证实具有较好的抗癌活性,近年来,在体外研究中,Choi 等^[7] 发现,在人胃腺癌 AGS 细胞中,血根碱和肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体联合处理可有效地通过下调 Akt 蛋白表达通过线粒体膜电位途径激活半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 诱导细胞凋亡,在人结肠癌 HT-29 细胞



A. 空白组; B ~ D. 血根碱 ($2, 4, 6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组

图 1 血根碱对 Panc02 细胞线粒体膜电位的变化

Fig. 1 Changes in mitochondrial membrane potential of Panc02 cells by sanguinarine



A. 空白组; B, C. 血根碱(2, 6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组

图 2 血根碱对胰腺癌细胞 Panc02 凋亡相关蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of Sanguinarine on apoptosis-related protein expressions in Panc02 cells

表 3 血根碱对胰腺癌细胞 Panc02 凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of Sanguinarine on apoptosis-related protein expressions in Panc02 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Bcl-2 /GAPDH	Bax /GAPDH	Akt /GAPDH	p-Akt /GAPDH	PI3K /GAPDH	p-PI3K /GAPDH
空白	-	0.397 \pm 0.031	0.481 \pm 0.042	1.156 \pm 0.038	0.817 \pm 0.041	1.016 \pm 0.075	0.908 \pm 0.065
血根碱	2	0.328 \pm 0.013	0.515 \pm 0.045	1.155 \pm 0.064	0.736 \pm 0.064	1.009 \pm 0.081	0.847 \pm 0.057
	6	0.189 \pm 0.011 ¹⁾	0.751 \pm 0.054 ¹⁾	1.158 \pm 0.096	0.128 \pm 0.007 ¹⁾	1.006 \pm 0.077	0.432 \pm 0.031 ¹⁾

细胞 BxPC-3, MIA PaCa-2 中上调双特异性磷酸酶 4 蛋白表达, 下调低氧诱导因子-1 和增殖细胞核抗原蛋白表达, 同时降低聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶和半胱氨酸蛋白酶-7 表达, 结果也证明血根碱具有明显抑制人胰腺癌细胞的生长作用。

细胞凋亡是具有特殊形态特征的细胞死亡, 是一种细胞内在的程序性自杀机制^[12]。凋亡可分为线粒体凋亡途径和死亡受体途径。Park 等^[13]报道, 血根碱可通过外源性和内源性两条途径诱导人骨肉瘤细胞凋亡, 在内源性线粒体途径中^[14], PI3K/Akt 信号通路主要通过抑制 Bcl-2 家族相关蛋白基因 (Bax, Bad), 启动凋亡调控时线粒体功能、结构发生障碍, 抑制细胞色素 C 释放到细胞浆中, 阻滞结合细胞质中的凋亡蛋白激活因子, 导致 Caspase 级联反应减弱, 从而抑制细胞凋亡; 反之, 使 PI3K, Akt 表达下调, 则可诱导凋亡作用。线粒体完整性受 Bcl-2 家族蛋白调控, 包括蛋白 Bcl-2, Bax 等, Bax 是重要促细胞凋亡基因, 而 Bcl-2 是关键抑制凋亡基因, Bax/Bcl-2 是具有决定细胞凋亡抑制作用强弱的关键因素^[15]。Min 等^[16]研究发现, 血根碱促进白血病细胞 U937 凋亡是通过上调 Bax 和下调 Bcl-2 诱导 Caspase-3 活化。

中, 通过调节 Bax/Bcl-2 诱导细胞凋亡^[8], 在大肠癌 HCT-116 细胞也可通过产生活性氧使线粒体功能障碍诱导凋亡^[9], 同样在人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中通过活性氧介导的线粒体途径激活 Caspase-3, Caspase-3 诱导细胞凋亡^[10], 在体内实验中, 血根碱对胶质瘤细胞 C6 大鼠, 经下调 Akt 和细胞外信号调节 Bcl-2 家族蛋白激活 Caspase-3 诱导细胞凋亡^[11]。然而, 在胰腺癌中, Ahsan 等^[5]发现, 血根碱处理人胰腺癌 AsPC-1, BxPC-3 细胞后, 使胰腺癌细胞周期停滞 G₀/G₁ 期, 降低抗凋亡 Bcl-2 蛋白表达, 升高促凋亡 Bcl-2 相关蛋白 (Bax, Bid, Bak) 表达, 且使抑癌基因 p53 减少, 从而抑制其细胞增殖及诱导细胞凋亡作用。随后, Singh 等^[6]发现, 血根碱在人胰腺癌

PI3K/Akt 信号通路在凋亡、细胞生长、分化等占重要地位, PI3K 产生调节一系列信号传导蛋白如 Akt, 这些 PI3K 效应器控制一系列细胞输出, 包括细胞周期进程, 细胞存活、代谢、翻译、转录和运动^[17-18]。PI3K/Akt 信号通路在胰腺癌肿瘤发生中占有十分重要的地位^[19], 当代, 通过研究阻断 PI3K/Akt 通路产生信号传导作用分子机制可以为药物开发提供新靶点和新思路, 能增强癌细胞对化疗药物的敏感性, 使特异性抗癌新药的研发成为可能^[20]。临床已经上市的渥曼青霉素为常用的 PI3K 抑制剂, 所以进一步研发新药抑制 PI3K/Akt 信号通路的相关基因蛋白, 是目前肿瘤治疗研究的热门主题^[21]。由于血根碱药理作用具有多样性, 对于其具体作用机制还有待更深入了解, 然而国内外还未见相关文献报道血根碱是否能通过 PI3K/Akt 信号通路经线粒体途径作用于胰腺癌。

本实验对血根碱诱导小鼠胰腺癌 Panc02 细胞凋亡的影响研究发现, 采用 MTT 比色法发现, 血根碱能有效地抑制 Panc02 细胞生长, 其生长抑制率呈浓度-时间效应性。流式细胞仪分析示 Panc02 细胞凋亡率随血根碱浓度的增加而升高, 与空白组比较, 血根碱 4, 6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组更加明显, 出现明显的剂量

效应性。当用 JC-1 染色倒置荧光显微镜检测显示, 血根碱药物作用 Panc02 细胞后, 线粒体膜电位受到重度破坏而下降。Western blot 结果发现血根碱 $6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 Bax 蛋白表达增高, Bcl-2 及 PI3K/Akt 信号通路中关键蛋白 p-PI3K, p-Akt 表达降低。综上所述, 血根碱可以抑制胰腺癌细胞生长, 其作用机制可能与抑制 PI3K/Akt 信号通路经线粒体凋亡途径对胰腺癌的诱导凋亡作用有关。

[参考文献]

[1] Amundadottir L T. Pancreatic cancer genetics [J]. *Int J Biol Sci*, 2016, 12(3): 314-325.

[2] LIN Q J, FENG Y, CHEN J, et al. Current status and progress of pancreatic cancer in China [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(26): 7988-8003.

[3] Gaziano R, Moroni G, Buè C, et al. Antitumor effects of the benzophenanthridine alkaloid sanguinarine: evidence and perspectives [J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2016, 8(1): 30-39.

[4] Achkar I W, Mraiche F, Mohammad R M, et al. Anticancer potential of sanguinarine for various human malignancies [J]. *Future Med Chem*, 2017, 9(9): 933-950.

[5] Ahsan H, Reaganshaw S, Breur J, et al. Sanguinarine induces apoptosis of human pancreatic carcinoma AsPC-1 and BxPC-3 cells via modulations in Bcl-2 family proteins [J]. *Cancer Lett*, 2006, 249(2): 198-208.

[6] Singh C K, Kaur S, George J, et al. Molecular signatures of sanguinarine in human pancreatic cancer cells: A large scale label-free comparative proteomics approach [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(12): 10335-10348.

[7] Choi W Y, Jin C Y, Han M H, et al. Sanguinarine sensitizes human gastric adenocarcinoma AGS cells to TRAIL-mediated apoptosis via down-regulation of Akt and activation of Caspase-3 [J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(11): 4457-4465.

[8] Lee J S, Jung W K, Jeong M H, et al. Sanguinarine induces apoptosis of HT-29 human colon cancer cells via the regulation of Bax/Bcl-2 ratio and Caspase-9-dependent pathway [J]. *Int J Toxicol*, 2012, 31(1): 70-77.

[9] Han M H, Kim G Y, Yoo Y H, et al. Sanguinarine induces apoptosis in human colorectal cancer HCT-116 cells through ROS-mediated Egr-1 activation and mitochondrial dysfunction [J]. *Toxicol Lett*, 2013, 220(2): 157-166.

[10] Choi W Y, Kim G Y, Lee W H, et al. Sanguinarine, a benzophenanthridine alkaloid, induces apoptosis in MDA-MB-231 human breast carcinoma cells through a

reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway [J]. *Chemotherapy*, 2008, 54(4): 279-287.

[11] Han M H, Kim S O, Kim G Y, et al. Induction of apoptosis by sanguinarine in C6 rat glioblastoma cells is associated with the modulation of the Bcl-2 family and activation of Caspases through down-regulation of extracellular signal-regulated kinase and Akt [J]. *Anticancer Drugs*, 2007, 18(8): 913-921.

[12] Nomi T, Sho M, Akahori T, et al. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(7): 2151-2157.

[13] Park H, Bergeron E H, Guillemette K, et al. Sanguinarine induces apoptosis of human osteosarcoma cells through the extrinsic and intrinsic pathways [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 399(3): 446-451.

[14] Estaquier J, Vallette F, Vayssiere J L, et al. The mitochondrial pathways of apoptosis [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 942(1): 157-183.

[15] Hockenbery D, Nuñez G, Millman C, et al. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death [J]. *Nature*, 1990, 348(6299): 334-336.

[16] Min H H, Yoo Y H, Choi Y H. Sanguinarine-induced apoptosis in human leukemia U937 cells via Bcl-2 down-regulation and Caspase-3 activation [J]. *Chemotherapy*, 2008, 54(3): 157-165.

[17] Baer R, Cintas C, Theriville N, et al. Implication of PI3K/Akt pathway in pancreatic cancer: when PI3K isoforms matter? [J]. *Adv Biol Regul*, 2015, 59(2): 19-35.

[18] Chang F, Lee J T, Navolanic P M, et al. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy [J]. *Leukemia*, 2003, 17(3): 590-603.

[19] Jr P J, Janku F. Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 142(2): 164-175.

[20] Akinleye A, Avvaru P, Furqan M, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitors as cancer therapeutics [J]. *J Hematol Oncol*, 2013, 6(1): 88-105.

[21] Mabuchi S, Kuroda H, Takahashi R, et al. The PI3K/Akt/mTOR pathway as a therapeutic target in ovarian cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2015, 137(1): 173-179.

[责任编辑 张丰丰]