

金复康口服液诱导肺癌细胞 A549 凋亡的机制

蒋义鑫¹, 徐元¹, 周之毅², 章丹丹^{1*}

- (1. 上海中医药大学交叉科学研究院, 上海 201203;
2. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032)

[摘要] 目的:研究金复康口服液(JFK)诱导人非小细胞肺癌细胞 A549 凋亡的作用机制。方法:取对数生长期的人非小细胞肺癌细胞 A549,随机分为空白组和药物组,采用溴化四甲基偶氮(MTT)比色法,考察不同质量浓度 JFK(0.3,1.5,3,7.5,15,30 g·L⁻¹)对 A549 细胞体外增殖能力的影响。通过平板克隆形成实验考察 JFK 对 A549 细胞平板克隆形成的影响,利用流式细胞仪考察 JFK 对 A549 细胞凋亡的影响;蛋白免疫印迹法(Western blot)考察 JFK 对裂解 DNA 修复酶(cleaved PARP),活化型半胱天冬酶-3(activated Caspase-3),Wnt/ β -联蛋白(β -catenin),细胞周期蛋白 D₁(cyclinD₁)的蛋白表达及对促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路和蛋白激酶 B(Akt)信号通路的影响,实验中设置空白组和药物组,药物组为 A549 细胞加入 15,30 g·L⁻¹ JFK,分别干预 24 h,30 min。结果:JFK 在 1.5~30 g·L⁻¹ 呈质量浓度依赖性的抑制 A549 细胞外增殖($P < 0.01$)。JFK 抑制 A549 细胞的平板克隆形成在 15~30 g·L⁻¹,其中 JFK 30 g·L⁻¹ 时抑制 A549 细胞的平板克隆最显著($P < 0.01$)。与空白组比较,JFK 15~30 g·L⁻¹ 可提高 Annexin V 和 PI 双阳细胞率,诱导 A549 细胞凋亡($P < 0.05$),且呈浓度依赖性提高 cleaved PARP 和 activated Caspase-3 的蛋白表达,并抑制 β -catenin 和 cyclinD₁ 在蛋白水平的表达($P < 0.05$, $P < 0.01$)。JFK 上调 MAPK 信号通路中 JNK 和 p38 的蛋白磷酸化水平($P < 0.05$),同时下调 Akt 信号通路中 Akt 在 T308 和 S473 的位点磷酸化水平($P < 0.05$)。结论:金复康口服液抑制人非小细胞肺癌细胞 A549 的体外增殖、平板克隆的形成并诱导其凋亡,部分通过调控 JNK/p38/MAPK 信号通路和 Akt 信号通路,抑制 β -catenin 和 cyclinD₁,同时提高凋亡相关蛋白 cleaved PARP 和 activated Caspase-3 的表达。

[关键词] 金复康口服液; 非小细胞肺癌; 细胞凋亡; 促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路; 蛋白激酶 B(Akt)信号通路

[中图分类号] R22;R285.5;R2-031;R273 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)09-0160-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180922

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180214.1359.001.html>

[网络出版时间] 2018-02-15 14:38

Mechanism of Jinfukang Oral Liquid in Inducing Apoptosis of Non-small Cell Lung Cancer Cell Line A549

JIANG Yi-xin¹, XU Yuan¹, ZHOU Zhi-yi², ZHANG Dan-dan^{1*}

- (1. Institute of Interdisciplinary Integrative Medicine Research, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shanghai 201203, China;
2. Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 200032, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of Jinfukang oral liquid (JFK) in inducing the apoptosis of non-small cell lung cancer cell line A549. **Method:** The non-small cell lung cancer cell lines A549 in logarithmic phase of growth were randomly divided into the control group and drug treatment groups. The 3- (4, 5-

[收稿日期] 20170901(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81773946,81573673,81001666);上海市教委创新项目(13YZ048);上海市卫计委青年项目(20144Y0143);上海市教委优秀青项目(SZY07029)

[第一作者] 蒋义鑫,在读硕士,从事抗肿瘤药物筛选及机制研究,E-mail:18049155657@163.com

[通信作者] *章丹丹,博士,副研究员,从事中药干预肿瘤微环境的机制研究,Tel:021-51322534,E-mail:izhangdd@126.com

dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay was used to investigate the effects of different concentrations of JFK (0.3, 1.5, 3, 7.5, 15, 30 g·L⁻¹) on the proliferation of A549 cells *in vitro*. The plate colony formation assay and flow cytometry were used to observe the effects of JFK on the colony formation and apoptosis of A549 cells, respectively. Protein expressions of cleaved PARP, active Caspase-3, β -catenin, cyclinD₁, and the mitogen-activated protein kinase (MAPK) /protein kinase B (Akt) signaling pathways were investigated by Western blot. Cells were divided into control group and drug groups treated at the concentrations of 15, 30 g·L⁻¹, and each group was intervened for 24 h or 30 min. **Result:** JFK inhibited the proliferation of A549 cells in a dose-dependent manner within the range from 1.5-30 g·L⁻¹ ($P < 0.01$). JFK inhibited colony formation at 15-30 g·L⁻¹ ($P < 0.01$). JFK increased the ratio of Annexin V and PI double positive cells at the concentrations of 15-30 g·L⁻¹, suggesting that JFK induced apoptosis in A549 cells ($P < 0.05$). The protein expressions of cleaved PARP and activated Caspase-3 were increased, while the expressions of β -catenin and cyclinD₁ were suppressed in a dose-dependent manner ($P < 0.05$, $P < 0.01$) after treatment with JFK. And the phosphorylation levels of JNK and p38 were up-regulated, while that of T308 and S473 sites of Akt were down-regulated ($P < 0.05$). **Conclusion:** Jinfukang decoction inhibited the proliferation and colony formation of non-small cell lung cancer cells A549. JFK induced apoptosis with the increase of the protein expressions of cleaved PARP and activated Caspase-3, and the decrease of the protein expressions of β -catenin and cyclinD₁, partly through JNK/p38/MAPK and Akt signaling pathways.

[**Key words**] Jinfukang oral liquid; non-small cell lung cancer; apoptosis; mitogen-activated protein kinases signaling pathway; Akt signaling pathway

原发性肺癌是当前世界最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率居高不下,其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占7~8成^[1]。非小细胞肺癌患者约70%在首诊时已属于晚期,总体预后不良^[2-5]。

金复康口服液以国医大师刘嘉湘教授“扶正治癌”理论为指导,针对肺癌患者气阴两虚的特点,选取黄芪、北沙参、麦冬、女贞子、石上柏等12味中药研制而成的复方中药制剂。金复康口服液在治疗气阴两虚的肺鳞癌、肺腺癌患者和治疗原发性非小细胞肺癌的临床疗效评价中,其生存周期明显高于化疗组,提高多项免疫指标,且对化疗患者具有显著的增效减毒作用^[6-8]。在常规治疗支气管鳞状细胞癌的基础上,加用金复康口服液能提高疗效^[9]。金复康联用吉非替尼更显著得抑制PC-9R细胞的增殖,更显著降低磷酸化表皮生长因子受体(p-EGFR)蛋白和基因的表达^[10]。金复康口服液干预裸鼠人肺腺癌荷瘤模型,抑瘤率达到50%左右,主要通过降低抗凋亡蛋白B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)的蛋白表达,增加Bcl-2相关X蛋白(Bax)和死亡因子(Fas)基因、蛋白表达,增加抑癌基因p53蛋白表达^[11]。金复康口服液能够促进荷瘤宿主脾细胞分泌Th1类细胞因子,抑制分泌Th2类细胞因子,从而提高T细胞免疫功能而抑制肿瘤生长^[12]。金复康口服液治疗肝癌

也取得了一定的效果^[13]。综上,金复康口服液可有效延长肺癌患者生存期、联合化疗和联合用药可发挥增效减毒作用、同时提高机体免疫功能等,值得深入研究其干预肺癌发展的分子机制。本研究考察金复康口服液对非小细胞肺癌细胞A549体外增殖、克隆形成和细胞凋亡的影响,并基于Wnt/ β -联蛋白通路(β -catenin),促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)信号通路、蛋白激酶B(Akt)信号通路,进一步探索其发挥抗肿瘤效应的作用机制。

1 材料

1.1 细胞 人非小细胞肺癌细胞株A549购自美国ATCC公司,编号CCL-185。

1.2 药物 金复康口服液(JFK)购自吉林金复康药业有限公司,国药准字Z19991043, 3 g·L⁻¹。

1.3 试剂 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)培养基干粉,胎牛血清,0.25%胰蛋白酶(美国Gibco公司,批号分别为1860045, 1565565, 1877048);溴化四甲基偶氮(MTT, 中国美仑生物技术有限公司,批号M0108A),二甲基亚砜(DMSO, 美国Sigma公司,批号RNB1402);AnnexinV/PI细胞凋亡试剂盒(美国BD公司,批号6155987);姬姆萨染色液(北京索莱宝科技有限公司,批号20161009);BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天公

司,批号 P0009);聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(美国 Millipore 公司,批号 R6PA1559G);细胞周期蛋白 D₁(cyclinD₁),裂解 DNA 修复酶(cleaved PARP),活化型半胱天冬酶-3(activated Caspase-3)一抗,辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗兔二抗(美国 Abcam 公司,批号分别为 GR192733-42,GR258729-1,GR297363-7,GR253040-5);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH,美国 Proteintech 公司,批号 00044915); β -catenin, JNK, p-JNK, p38, p-p38, p-Akt^{S473}, p-Akt^{T308}, Akt 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号分别为 5, 15, 14, 23, 20, 23, 5, 27);ECL 化学发光试剂盒(美国 Millipore 公司,批号 1616002)。

1.4 仪器 HEPA CLASS100 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司);IX 71 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);Spectra MAX190 型酶标仪(美国 MD 公司);QB-9006 恒温微孔板快速振荡器(中国上海书培实验设备有限公司);Eppendorf Centrifuge5810R 型低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司);Mini PROTEAN 3 Cell 型电泳仪及转膜仪(美国 Bio-Rad 公司);Tanon NIM2045 型凝胶成像系统(中国 Tanon 公司);FACS Calibur™ Flow Cytometer REF 34295 型流式细胞仪(美国 BD 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 A549 细胞株用 DMEM 培养基(添加体积分数为 10% 胎牛血清),放置于 37 °C 5% CO₂ 的培养箱中培养。用 0.25% 胰蛋白酶消化及传代,取对数生长期的 A549 细胞进行实验。

2.2 MTT 比色法检测 JFK 对 A549 细胞增殖的影响 取对数生长期的 A549 细胞,经 0.25% 的胰酶消化后,按照每孔 5 000 个细胞的密度接种于 96 孔板中,每孔 100 μ L。每个浓度组设置 3 个复孔,放置于 37 °C 培养箱中,培养过夜。加入终质量浓度为 0.3, 1.5, 3, 7.5, 15, 30 $g \cdot L^{-1}$ 的 JFK,培养 24 h,MTT 用磷酸盐缓冲液(PBS)配制质量浓度为 5 $g \cdot L^{-1}$ 溶液,每孔加 10 μ L,37 °C 温育 4 h,弃上清,加 DMSO,100 μ L/孔,在恒温微孔板快速振荡器上振动 10 min,于 490 nm 波长测定每孔吸光度 A,并取 3 复孔均值。

$$\text{细胞增殖抑制率} = (A_{\text{空白组}} - A_{\text{实验组}}) / A_{\text{空白组}} \times 100\%$$

2.3 平板克隆形成实验 A549 细胞用胰酶消化,吹打混匀为单个细胞悬液,200 个细胞/孔接种于 6 孔板中,贴壁过夜。设置药物组与空白组,药物组加入 15,30 $g \cdot L^{-1}$ JFK,培养孵育 24 h 后,更换为新鲜完全培养液继续培养。以空白组克隆中细胞数量达

到 50 个细胞及以上时,弃去培养液,用 PBS 漂洗 2 次,用纯甲醇固定细胞 30 min,吸去纯甲醇后用 PBS 漂洗 2 次,加适量姬姆萨染液染色 30 min,然后用去离子水缓慢洗去染色液,倒扣干燥。将 6 孔板在倒置显微镜下计数,含 50 个细胞及其以上的细胞集落为单个克隆,计算平板克隆形成率。

$$\text{平板克隆形成率} = \text{克隆个数} / \text{接种细胞数} \times 100\%$$

2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡 取对数生长期的细胞,分为药物组与空白组,药物组用 15,30 $g \cdot L^{-1}$ JFK 处理 24 h。按细胞凋亡检测试剂盒说明书操作。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达 取对数生长期细胞,分药物组和空白组,药物组加入 15,30 $g \cdot L^{-1}$ JFK 处理 30 min 或 24 h 后,提取各组细胞总蛋白,用 BCA 法测定蛋白浓度。10% ~ 12% 的 SDS-PAGE 分离胶浓度,蛋白每孔上样量 15 ~ 30 μ g,进行电泳和转膜。封闭使用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温孵育 1 h,用 β -catenin (1:1 000), cyclinD₁ (1:10 000), cleaved PARP (1:5 000), activated Caspase-3 (1:500), GAPDH (1:8 000) 及 JNK(1:1 000), p-JNK(1:1 000), p38 (1:1 000), p-p38(1:1 000), p-Akt^{S473} (1:2 000), p-Akt^{T308} (1:1 000), Akt(1:1 000) 抗体于摇床 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤后,二抗室温孵育 1 h, TBST 漂洗膜 3 ~ 5 次后,利用凝胶成像系统进行成像和灰度值分析。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,成组设计资料采用 *t* 检验进行统计学分析, *P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 JFK 对 A549 细胞体外增殖的影响 与空白组比较,1.5 ~ 30 $g \cdot L^{-1}$ JFK 处理 24 h 对 A549 细胞增殖作用显著(*P* < 0.01),且随 JFK 剂量的增加,抑制率也随之提高。见表 1。

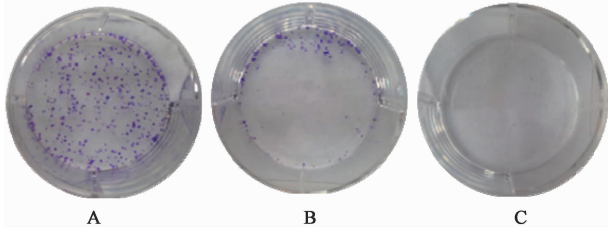
表 1 JFK 对 A549 细胞增殖活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of JFK on proliferation of A549 cells *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | 质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$ | 细胞增殖活性 A |
|-----|------------------------|-------------------------------|
| 空白 | - | 0.96 \pm 0.03 |
| JFK | 0.3 | 0.94 \pm 0.04 |
| | 1.5 | 0.92 \pm 0.02 ¹⁾ |
| | 3.0 | 0.82 \pm 0.03 ¹⁾ |
| | 7.5 | 0.74 \pm 0.06 ¹⁾ |
| | 15.0 | 0.66 \pm 0.03 ¹⁾ |
| | 30.0 | 0.43 \pm 0.01 ¹⁾ |

注:与空白组比较¹⁾ *P* < 0.01(表 2 同)。

3.2 JFK 对 A549 细胞克隆形成的影响 15, 30 g·L⁻¹ JFK 对 A549 细胞克隆形成均有抑制效果, 与空白组比较, 30 g·L⁻¹ JFK 可显著抑制克隆的形成 ($P < 0.01$)。见图 1, 表 2。



A. 空白组; B. JFK 15 g·L⁻¹组; C. JFK 30 g·L⁻¹组

图 1 JFK 对 A549 细胞克隆形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of JFK on colony formation of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 2 JFK 对 A549 细胞克隆形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of JFK on colony formation of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | 质量浓度/g·L ⁻¹ | 克隆形成率/% |
|-----|------------------------|---------------------------|
| 空白 | - | 82.00 ± 0.11 |
| JFK | 15.0 | 42.80 ± 0.16 |
| | 30.0 | 0.00 ± 0.00 ¹⁾ |

3.3 JFK 对 A549 细胞凋亡的影响 15, 30 g·L⁻¹ JFK 均能诱导 A549 细胞凋亡, 与空白组比较, A549 细胞晚期凋亡率随 JFK 浓度增加而升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且 30 g·L⁻¹ JFK 可显著诱导细胞的晚期凋亡。见表 3。

3.4 JFK 对凋亡相关蛋白和相关信号通路的影响

与空白组比较, 15, 30 g·L⁻¹ JFK 呈剂量依赖性提高凋亡相关蛋白 cleaved PARP 和 activated Caspase-3 蛋白表达, 抑制 β -catenin 和 cyclinD₁ 蛋白水平的

表 3 JFK 诱导 A549 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 3 Effect of JFK on apoptosis of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

| 组别 | 质量浓度/g·L ⁻¹ | 凋亡率/% |
|-----|------------------------|-----------------------------|
| 空白 | - | 11.24 ± 1.85 |
| JFK | 15.0 | 18.47 ± 4.56 ¹⁾ |
| | 30.0 | 57.23 ± 17.29 ²⁾ |

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 4 同)。

表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。提高 MAPK 信号通路中 JNK 和 p38 的蛋白磷酸化水平 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。同时下调 Akt 信号通路中 Akt 在 T308 和 S473 位点的磷酸化水平 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图 2, 表 4。

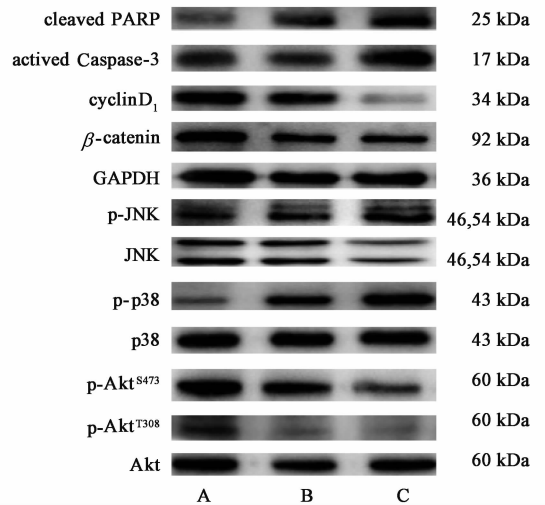


图 2 JFK 作用细胞后凋亡相关蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of JFK on apoptosis-related proteins and related signal pathways

表 4 JFK 对凋亡相关蛋白和相关信号通路的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of JFK on apoptosis-related proteins and related signal pathways ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | 质量浓度/g·L ⁻¹ | cleaved PARP /GAPDH | activated Caspase-3 /GAPDH | β -catenin /GAPDH | cyclinD ₁ /GAPDH | p-JNK /JNK | p-p38 /p38 | p-Akt ^{S473} /Akt | p-Akt ^{T308} /Akt |
|-----|------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 空白 | - | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 |
| JFK | 15.0 | 1.63 ± 0.52 | 1.10 ± 0.00 | 0.84 ± 0.09 ²⁾ | 0.69 ± 0.02 ²⁾ | 1.69 ± 0.61 | 1.32 ± 0.40 | 0.97 ± 0.01 ¹⁾ | 0.83 ± 0.22 |
| | 30.0 | 3.46 ± 0.49 ¹⁾ | 1.25 ± 0.01 ²⁾ | 0.67 ± 0.17 ²⁾ | 0.43 ± 0.08 ¹⁾ | 4.69 ± 3.09 ¹⁾ | 2.47 ± 1.92 ¹⁾ | 0.78 ± 0.03 ²⁾ | 0.60 ± 0.11 ¹⁾ |

4 讨论

晚期癌症患者由于邪毒留滞、热伤阴液、耗气伤阴, 导致正气虚损。临床辨证阴虚型和气阴两虚型约占肺癌 78% 左右^[13]。中医治病崇尚“标本兼治”及“治病必先求本”。国学大师刘嘉湘教授总结多年临床经验, 发现以扶正为主、佐以祛邪的治疗方法

在稳定和缩小肿瘤、提高生存质量和生存期等方面具有较好疗效, 研制出 JFK^[14]。君药黄芪性甘微温, 归肺脾经, 有补气升阳、生津养血、托毒生肌之功; 女贞子和麦冬等归肝、肾经, 可滋补肝肾、养阴润肺; 石上柏和七叶一枝花等有清热解毒、化瘀止痛等功效。本研究结果显示 JFK 能够明显抑制非小细

胞肺癌 A549 细胞的增殖和克隆形成,且促进其凋亡,验证了 JFK 的临床疗效^[10]。

MAPK 是一类细胞内重要的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在细胞增殖、存活、分化和凋亡等生理过程中起至关重要的作用。氨基末端激酶 c-JNK 和 p38 都是 MAPK 家族的一员。JNK 是一种细胞膜结合蛋白激酶,也被称为应激活化蛋白激酶,被生长因子、细胞因子和周围的应激反应激活,参与众多的细胞进程^[15]。JNK/MAPK 信号通路在细胞凋亡中具有重要作用。据目前研究认为,JNK 介导细胞凋亡的途径主要有 2 条,①活化的 JNK 与转录因子 c-Jun 和 ATF2 的氨基末端结合,使转录因子的活性区域磷酸化,以 c-Jun/c-Fos 异二聚体和 c-Jun 同二聚体的形式,与启动子上的活化蛋白(AP-1)及 AP-1 样位点结合,促进相关凋亡基因的表达和相关凋亡蛋白的合成。同时激活 Fas 配体(FasL)的启动子,使 FasL 表达增强而促进细胞凋亡。②活化的 JNK 能通过激活内源性通路,促使细胞色素 C 释放而激活 Caspase 级联反应,最后激活 Caspase-3,其与凋亡底物结合导致细胞凋亡^[16-20]。p38 蛋白激酶又称再活化激酶,是细胞内的一种重要信号转导通路^[21]。p38 MAPK 信号转导通路通常在细胞分化、炎症以及细胞凋亡等中异常活化。p38 MAPK 信号通路促进细胞凋亡的机制多种多样,包括增强 c-Myc 的表达、磷酸化 p53 的特殊位点、激活 c-Jun 和 c-Fos,参与 Fas/FasL 介导的凋亡、增强肿瘤坏死因子(TNF)- α 表达,通过 Caspase 依赖性途径或 Caspase 非依赖性途径诱导细胞凋亡,亦可以对抗凋亡蛋白 Bcl-2 的家族成员直接作用而诱发细胞的凋亡^[22-25]。实验结果显示 JFK 呈浓度依赖性提高凋亡相关蛋白 activated Caspase-3 和 cleaved PARP 的蛋白表达,伴随着 JNK 和 p38 蛋白磷酸化水平的提高,提示活化 JNK 和 p38 信号通路。

Akt 属于蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶,是激活细胞生存信号通路的重要枢纽点。现有研究证明在大部分肿瘤细胞中 Akt 信号通路处于激活状态^[26-27]。非小细胞肺癌中的磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/Akt 信号通路处于异常激活状态,Akt 的磷酸化水平上调能够促进肺癌细胞的增殖和抗细胞凋亡^[28-29]。实验结果显示 JFK 可下调 Akt 在 T308 和 S473 的位点磷酸化水平,使 Akt 信号通路失活。

综上所述,JFK 可抑制 A549 细胞的体外增殖、克隆形成及诱导凋亡,部分通过活化 JNK/p38/MAPK 信号通路,同时抑制 PI3K/Akt 信号通路的激

活,从而抑制 A549 细胞的增殖和诱导其晚期凋亡。

[参考文献]

- [1] Paul A, Kelly K. New combinations in the treatment of lung cancer; a time for optimism [J]. Chest, 2000, 117 (4 Suppl 1): 138S-143S.
- [2] American Society of Clinical Oncology. Clinical practice guidelines for the treatment of unresectable non-small-cell lung cancer [J]. J Clin Oncol, 1997, 15 (8): 2996-3018.
- [3] American Thoracic Society, European Respiratory Society. Pretreatment of non-small cell lung cancer [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1997, 156(1): 320-331.
- [4] David E A, Clark J M, Cooke D T, et al. The role of thoracic surgery in the therapeutic management of metastatic non-small cell lung cancer [J]. Thorac Oncol, 2017, 12(11): 1636-1645.
- [5] 汤钊猷. 现代肿瘤学 [M]. 2 版. 上海: 上海医科大学出版社, 2000: 637.
- [6] 刘嘉湘, 施志明, 徐振晔, 等. 金复康口服液治疗非小细胞肺癌的临床观察 [J]. 中医杂志, 1997, 38(12): 727-729, 708.
- [7] 刘嘉湘, 潘敏求, 黎月恒, 等. 金复康口服液治疗原发性非小细胞肺癌临床研究 [J]. 肿瘤, 2001, 21(6): 463-465.
- [8] 林静. 金复康口服液治疗非小细胞肺癌的临床研究 [J]. 江西中医药, 2003, 34(2): 19-21.
- [9] 孙书贤. 金复康口服液对原发性支气管鳞状细胞癌疗效及血清 MMP-9 的影响 [J]. 海南医学院学报, 2012, 18(8): 1061-1063.
- [10] 孙玺媛, 姜梅, 张伟, 等. 金复康口服液对非小细胞人肺癌吉非替尼获得性耐药的影响 [J]. 中药材, 2014, 37(7): 1254-1258.
- [11] 孙建立, 刘嘉湘. 金复康口服液对裸鼠人肺癌细胞凋亡相关基因表达的影响 [J]. 上海中医药杂志, 2007, 41(10): 69-71.
- [12] 孙玺媛, 孙建立, 刘嘉湘. 金复康口服液对 Lewis 肺癌荷瘤鼠脾细胞分泌 Th1/Th2 类细胞因子的影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(9): 160-162.
- [13] 李和根, 陈秀华, 姚玉龙, 等. 金复康治疗肝癌的实验研究 [J]. 中草药, 2000, 31(7): 533-535.
- [14] 刘嘉湘. 金复康口服液治疗肺癌的研究 [C] // 首届国际中西医结合肿瘤研究论坛论文集, 上海, 2008: 36-39.
- [15] 陈临溪, 李兰芳, 王毅. 细胞信号转导 (药理与临床) [M]. 北京: 人民军医出版社, 2014: 17-20.
- [16] 王文, 任玲, 王健楠. MAPK 信号通路 with 细胞凋亡的关系 [J]. 中国实用医药, 2010, 5(15): 260-261.

- [17] 陈建勇,王聪,王娟,等. MAPK 信号通路研究进展[J]. 中国医药科学,2011,1(8):32-34.
- [18] 黄春香. MAPK 信号通路及乳腺癌的研究进展[J]. 中医学报,2010,25(1):36-38.
- [19] 徐伟丽,孙文广,马莺. MAPK 信号通路及结直肠癌[J]. 现代肿瘤医学,2010,18(2):389-392.
- [20] LU X, LI Y, LI X, et al. Luteolin induces apoptosis in vitro through suppressing the MAPK and PI3K signaling pathways in gastric cancer [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(2):1993-2000.
- [21] Brewster J L, de Valoir T, Dwyer N D, et al. An osmosensing signal transduction pathway in yeast [J]. *Science*, 1993, 259(5102):1760-1763.
- [22] 黄川,袁铿. JNK、p38 MAPK 信号通路及肿瘤细胞凋亡[J]. 实验与检验医学,2012,30(5):447-452.
- [23] 崔婷婷,席淑华. MAPK 信号传导通路及肿瘤的发生[J]. 实用肿瘤杂志,2013,28(5):550-552.
- [24] 张旭峰,赵琳,徐培. 从 p38 MAPK 通路探讨复方参鹿颗粒对较低危 MDS 骨髓患者 CD34⁺ 细胞凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(16):152-157.
- [25] 张频捷,朱立新,耿小平. p38 MAPK 信号传导通路及其抑制剂的研究现状[J]. 安徽医药,2010,14(5):596-598.
- [26] Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer [J]. *Apoptosis*, 2004, 9(6):667-676.
- [27] 赵陈琛,顾康生. PI3K/Akt/mTOR 在表阿霉素抑制 Jurkat 细胞增殖和诱导凋亡中的作用[J]. 临床肿瘤学杂志,2012,17(9):780-784.
- [28] Henshall D C, Araki T, Schindler C K, et al. Activation of Bcl-2 associated death protein and counter-response of Akt within cell populations during serzure-induced neuronal death [J]. *Neurosci*, 2002, 22(19):8458-8465.
- [29] XIN M, DENG X. Nicotine inactivation of the proapoptotic function of Bax through phosphorylation[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(11):10781-10789.

[责任编辑 张丰丰]