

对叶百部总生物碱对人肺癌 A549 细胞凋亡、PI3K/Akt 和 JNK/p38 MAPK 信号通路的影响

林思^{1,2}, 秦慧真^{1,2}, 李泽宇¹, 许立拔², 邓玲玉^{1,2}, 罗静^{1,2}, 谢凤凤^{1,2}, 张淼^{1,2},
朱华^{1,2*}, 王孝勋^{1*}

(1. 广西中医药大学, 南宁 530200;
2. 广西中医药大学壮瑶药重点实验室, 南宁 530200)

[摘要] 目的:探讨对叶百部总生物碱对人肺癌 A549 细胞凋亡及磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)和 c-Jun 氨基末端激酶/p38 丝裂原活化蛋白激酶(JNK/p38 MAPK)信号通路的影响。方法:以人肺癌 A549 细胞为研究对象,设置空白组和不同质量浓度(100、150、200、250、300 mg·L⁻¹)对叶百部总生物碱组。利用噻唑蓝(MTT)比色法、平板克隆实验观察对叶百部总生物碱对 A549 细胞增殖的影响;采用 Hoechst 33258 染色法和流式细胞术膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)/碘化丙啶(PI)双染法观察细胞凋亡;蛋白免疫印迹法检测凋亡相关蛋白胱天蛋白酶-3(Caspase-3)、B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)相关 X 蛋白(Bax)和 Bcl-2 表达及 PI3K、磷酸化(p)-PI3K、Akt、p-Akt、JNK、p-JNK、p38 MAPK、p-p38 MAPK 蛋白的表达。结果:与空白组比较,对叶百部总生物碱组(150、200、250、300 mg·L⁻¹)细胞增殖抑制率显著增高($P<0.01$);对叶百部总生物碱组(150、200、250、300 mg·L⁻¹)细胞克隆抑制率显著升高,细胞克隆形成率显著降低($P<0.01$)。与空白组比较,对叶百部总生物碱组细胞出现染色质凝聚,荧光反应加强等典型的细胞凋亡特征。与空白组比较,对叶百部总生物碱组细胞凋亡率显著升高($P<0.01$);对叶百部总生物碱(150、200、250、300 mg·L⁻¹)能够明显上调 Caspase-3、Bax 蛋白表达($P<0.05, P<0.01$),显著下调 Bcl-2 蛋白表达($P<0.01$);对叶百部总生物碱对 PI3K、Akt、JNK、p38 MAPK 总蛋白表达无明显影响,对叶百部总生物碱(150、200、250、300 mg·L⁻¹)能够明显下调 PI3K、Akt 磷酸化水平($P<0.05, P<0.01$);明显上调 p38 MAPK 磷酸化水平($P<0.05, P<0.01$);对叶百部总生物碱(200、250、300 mg·L⁻¹)能够明显上调 JNK 磷酸化水平($P<0.05, P<0.01$)。结论:对叶百部总生物碱可抑制人肺癌 A549 细胞的增殖,并能诱导 A549 细胞凋亡,其机制可能与抑制 PI3K/Akt 信号通路和激活 JNK/p38 MAPK 信号通路有关。

[关键词] 对叶百部总生物碱; 肺癌; A549 细胞; 凋亡; 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)信号通路; c-Jun 氨基末端激酶/p38 丝裂原活化蛋白激酶(JNK/p38 MAPK)信号通路

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2023)04-0069-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221724

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220621.1135.006.html>

[网络出版日期] 2022-06-22 14:57:16

Effect of *Stemona tuberosa* Alkaloids on Apoptosis and PI3K/Akt and JNK/MAPK Signaling Pathways of Human Lung Cancer A549 Cells

LIN Si^{1,2}, QIN Huizhen^{1,2}, LI Zeyu¹, XU Liba², DENG Lingyu^{1,2}, LUO Jing^{1,2}, XIE Fengfeng^{1,2},
ZHANG Miao^{1,2}, ZHU Hua^{1,2*}, WANG Xiaoxun^{1*}

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 2. Guangxi Key Laboratory of

[收稿日期] 2022-04-12

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82060695);广西壮瑶药重点实验室项目(桂科基字[2014]32号);广西壮瑶药协同创新中心项目(桂教科研[2013]20号);广西第八批特聘专家项目(桂人才通字[2019]13号);广西民族药资源与应用工程研究中心项目(桂发改高技函[2020]2605号);广西中医药大学-中南大学壮瑶药研究联合实验室项目(桂科计字[2021]238号);广西产5种壮瑶药材质量标准与产品开发研究项目(桂科计字[2021]196号)

[第一作者] 林思,在读硕士,从事中药鉴定与分析研究,E-mail:1751493407@qq.com

[通信作者] *朱华,博士,教授,博士生导师,从事中药品种、质量及资源开发研究,E-mail:zhuhuagx@163.com;

*王孝勋,博士,研究员,硕士生导师,从事中药品种、质量及资源开发研究,E-mail:407977122@qq.com

Zhuang and Yao Ethnic Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of *Stemona tuberosa* alkaloids (STA) on apoptosis and phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) and c-Jun N-terminal kinase/p38 mitogen-activated protein kinase (JNK/p38 MAPK) signaling pathways in human lung cancer A549 cells. **Method:** A549 cells were classified into blank group and STA groups (100, 150, 200, 250, 300 mg·L⁻¹). Thiazole blue (MTT) assay and colony formation assay were used to evaluate the proliferation of A549 cells. Apoptosis was observed based on Hoechst 33258 staining, flow cytometry, and Annexin V-FITC/PI staining. Western blot was employed to detect the expression of apoptosis-related proteins cysteine-aspartic acid protease-3 (Caspase-3), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2)-associated X protein (Bax), and Bcl-2, and the expression of PI3K, phosphorylated (p)-PI3K, Akt, p-Akt, JNK, p-JNK, p38 MAPK, and p-p38 MAPK. **Result:** Compared with the blank group, STA groups (150, 200, 250, 300 mg·L⁻¹) demonstrated the increase in inhibition rate of cell proliferation ($P < 0.01$) and cell clone inhibition rate, and decrease in cell clone formation rate ($P < 0.01$). In comparison with the blank group, STA groups showed typical characteristics of apoptosis, such as chromatin condensation and enhanced fluorescence reaction. The apoptosis rate of STA groups was significantly higher than that of the blank group ($P < 0.01$). Compared with the blank group, STA (150, 200, 250, 300 mg·L⁻¹) significantly up-regulated the protein expression of Caspase-3 and Bax ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and down-regulated the expression of Bcl-2 protein ($P < 0.01$). Compared with the blank group, STA had no significant influence on the total protein expression of PI3K, Akt, JNK, and p38 MAPK. However, STA (150, 200, 250, 300 mg·L⁻¹) significantly decreased the levels of p-PI3K and p-Akt ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and increased the level of p-p38 MAPK ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the blank group, STA (200, 250, 300 mg·L⁻¹) significantly raised the level of p-JNK ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** STA can inhibit the proliferation and induce the apoptosis of A549 cells by inhibiting PI3K/Akt signaling pathway and activating JNK/p38 MAPK signaling pathway.

[Keywords] *Stemona tuberosa* alkaloids; lung cancer; A549 cells; apoptosis; phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway; c-Jun N-terminal kinase/p38 mitogen-activated protein kinase (JNK/p38 MAPK) signaling pathway

肺癌是全球范围内常见的恶性肿瘤之一,2020年全球约有180万人因肺癌死亡,其死亡率占比为18%,位居癌症第一,是癌症死亡的主要原因^[1]。肺癌最初无明显症状,发现时通常为晚期,往往需要多种手段联合治疗;尽管肺癌治疗策略(化疗、放疗、手术等)不断取得突破,但化学治疗仍是肺癌晚期患者常用的治疗方法,化疗可杀伤癌细胞,亦可影响正常细胞,且化疗容易引起患者恶心呕吐、脱发、疲劳、体质量锐减及感染等诸多不良反应,严重影响患者生活质量,导致患者5年生存率依然不高^[2-6]。在治疗肺癌方面,中医药具有独特的优势,可提高癌症患者生活质量,延长患者寿命,中西医结合治疗可改善化疗所引起的骨髓抑制,恶心呕吐等不良反应^[7-8];我国中药资源众多,价格易被人接受,故挖掘有效抗肺癌中药是广大学者的研究热点^[9]。对叶百部生物碱是从对叶百部中提取得到的一类生物碱,研究表明,该生物碱具有镇咳、抑菌、

杀虫、抗炎、抗肿瘤等活性^[10-12]。但对叶百部总生物碱抗肿瘤作用研究较少,本课题组前期研究发现其能够促进人肝癌SMMC-7721细胞凋亡^[13]。对叶百部总生物碱对肺癌A549细胞的相关作用目前还未见有报道。因此,本实验将探究对叶百部总生物碱对肺癌A549细胞的抑制作用及其相关作用机制,为其应用于治疗肺癌提供理论与实验数据支撑。

1 材料

1.1 细胞株 人肺癌A549细胞,购自江苏凯基生物技术股份有限公司,编号为KG007,用含10%胎牛血清(FBS),1%青-链霉素RPMI 1640完全培养液置于37℃、5%CO₂、饱和湿度的CO₂培养箱内培养。实验用细胞为5~11代。

1.2 药物与试剂 对叶百部总生物碱与文献[13]所用对叶百部总生物碱均为同一批次提取,经酸性染料比色法分析其纯度为82.15%,溶解于二甲基亚砜(DMSO)中,配制成250 g·L⁻¹母液,于-20℃避光

保存。胎牛血清(南美 Lonsera 公司,批号 RA01991);DMSO(美国 Sigma 公司,批号 RNB8184);噻唑蓝(MTT)、Hoechst 33258 染色液(北京索莱宝生物科技有限公司,批号分别为 309E058、20210705);磷酸盐缓冲液(PBS)、RPMI 1640 不完全培养液、胰蛋白酶-EDTA 消化液、结晶紫染色液(江苏凯基生物技术有限公司,批号分别为 20210908、20210824、20210818、20210419);膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素(AnnexinV-FITC)/碘化丙锭(PI)细胞凋亡检测试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号分别为 021921210512、062521210726);PVDF 膜(德国 Merk Millipore 公司,批号 R0AB93964);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)、磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)、磷酸化(p)-PI3K、p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)、p-p38 MAPK、蛋白激酶 B(Akt)、p-Akt、c-Jun 氨基末端激酶(JNK)、p-JNK 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号分别为 2118S、4223T、5023T、14220T、4257T、4228T、8690T、4511T、4691T、4063T、9252T、4668T);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗(武汉三鹰生物技术有限公司,批号 20000455)。

1.3 仪器 NovoCyte 2060R 型流式细胞仪[艾森生物(杭州)有限公司];CKX53 型倒置生物显微镜(日本 Olympus 公司);Epoch2 型全波长酶标仪(美国 Bio Tek 公司);JIMBIO-FIL 型流式图像细胞计数仪(江苏卓微生物科技有限公司);UVP ChemStudio 815 型多功能分子成像系统(德国耶拿公司);C170 型 CO₂ 培养箱(德国 Binder 公司);ECLIPSE Ni-U 型正置荧光生物显微镜(日本 Nikon 公司);Mini-PROTEAN Tetra Cell 型垂直电泳仪、mini trans-blot cell 型蛋白转印模块(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 MTT 比色法检测细胞增殖 将 A549 细胞稀释至 2.5×10^4 个/mL,接种于 96 孔板,200 μ L/孔,培养 24 h,吸弃培养基,根据预实验结果,给药组分别加入不同浓度(0、100、150、200、250、300 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的对叶百部总生物碱药液 200 μ L,每组重复 6 个复孔,于培养箱分别孵育 24、48、72 h,加入 5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT 溶液 20 μ L,继续培养 4 h。吸弃上清液,每孔加入 DMSO 溶液 150 μ L,酶标仪于 490 nm 波长处测定各孔的吸光度 A ,并利用 A 计算细胞增殖抑制率。抑制率 = $(A_{\text{空白组}} - A_{\text{给药组}}) / A_{\text{空白组}} \times 100\%$ 。

2.2 平板克隆实验检测克隆形成率 将 A549 细胞 1 000 个/孔接种于 6 孔板,培养 24 h。按 2.1 项下分组,药物干预 24 h,弃去孔中液体,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 2 次,加入含 10% FBS 的新鲜完全培养基,每 3 d 换液 1 次,继续培养 7~8 d。弃去上清,PBS 清洗 2 次,加入 4% 多聚甲醛 1 mL 固定 15 min,吸弃多聚甲醛,PBS 清洗 3 次,结晶紫染色液染色 10 min,PBS 清洗多次,室温下自然干燥,拍照并利用 Image J 计数(计数细胞克隆数 > 50 的为 1 个克隆)并计算克隆形成率。克隆形成率 = 细胞克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

2.3 Hoechst 33258 染色观察细胞核凋亡形态 将 A549 细胞以 1.0×10^6 个/孔接种于 6 孔板(内置无菌盖玻片)中,培养 24 h。按 2.1 项下分组,药物干预 24 h,弃培养基,PBS 洗涤 2 次,4% 多聚甲醛固定 15 min,弃固定液,PBS 清洗 3 次,每孔加入 Hoechst 33258 染色液 500 μ L 避光染色 10 min,弃染色液,PBS 洗涤 3 次,取出盖玻片,于荧光显微镜下观察细胞核凋亡形态并拍照。

2.4 流式细胞术 AnnexinV-FITC/PI 双染法检测细胞的凋亡率 将 A549 细胞以 1.5×10^5 个/mL,接种于 6 孔板中,每孔 2 mL,培养 24 h 至细胞贴壁后,吸弃孔内培养基,按 2.1 项下分组,给予药物干预 48 h,收集上清液,PBS 液清洗 3 次,用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化并收集全部细胞,1 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min(离心半径 10 cm,下同),吸弃上清液,用预冷 PBS 液清洗 3 次,离心收集细胞,按照凋亡试剂盒说明书加入 AnnexinV-FITC 结合液 195 μ L 重悬细胞,再分别加入 AnnexinV-FITC 5 μ L 和 PI 染色液 10 μ L 混匀,室温避光孵育 15 min,于半小时内上机检测。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达 按 2.1 项下分组,收集不同药液干预 24 h 的细胞,加入 RIPA 裂解液,于冰上裂解 30 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 25 min,收集上清液,BCA 法测蛋白浓度。加入适量上样蛋白缓冲液,混匀,沸水浴,高温变性 8 min。蛋白(上样量 30 μ g)经 SDS-PAGE 电泳分离,转膜,转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭 1 h(根据条带背景情况适当延长封闭时间),于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜孵育一抗(1:1 000),室温孵育二抗(1:3 000)1 h,加入 ECL 发光试剂显影,以 GAPDH 为内参,采用 Image J 统计蛋白条带灰度值。

2.6 统计学分析 数据采用 SPSS 17.0 统计分析,以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对叶百部总生物碱对A549细胞增殖的影响

与空白组比较,对叶百部总生物碱(150、200、250、300 mg·L⁻¹)处理A549细胞24 h,细胞增殖抑制率显著增加($P<0.01$);与空白组比较,对叶百部总生物碱处理A549细胞48、72 h,细胞增殖抑制率显著增加($P<0.01$),呈现一定的浓度-时间依赖性,对叶百部总生物碱处理24、48、72 h的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为360.24、236.61、202.66 mg·L⁻¹。见表1。

表1 对叶百部总生物碱对A549细胞增殖抑制率的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Effect of *Stemona tuberosa* alkaloids on proliferation inhibition rate of A549 cells ($\bar{x}\pm s, n=6$) %

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	24 h	48 h	72 h
对叶百部总生物碱组	100	2.74±3.74	15.81±8.96 ²⁾	15.02±6.59 ²⁾
	150	12.53±4.24 ²⁾	30.60±5.04 ²⁾	39.60±6.39 ²⁾
	200	17.36±5.60 ²⁾	41.02±14.79 ²⁾	55.83±8.37 ²⁾
	250	24.81±9.61 ²⁾	44.79±7.63 ²⁾	66.20±2.55 ²⁾
	300	28.64±3.93 ²⁾	70.49±7.50 ²⁾	78.40±1.66 ²⁾

注:空白组细胞增殖抑制率为0;与同时时间点空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ (表2-表6同)

3.2 对叶百部总生物碱对A549细胞克隆形成能力的影响

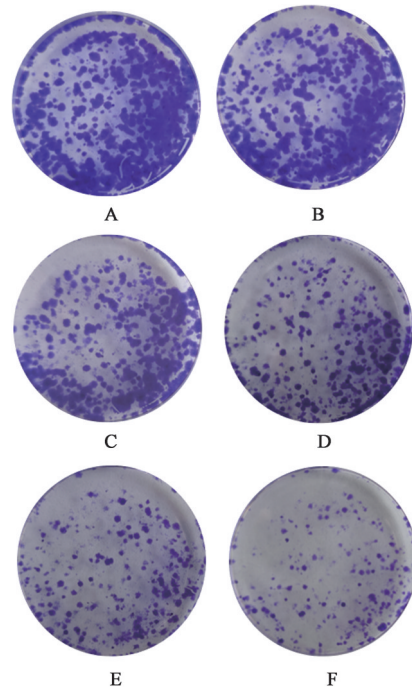
与空白组比较,对叶百部总生物碱组(150、200、250、300 mg·L⁻¹)A549细胞克隆数和克隆形成率显著降低($P<0.01$);与空白组比较,对叶百部总生物碱组(150、200、250、300 mg·L⁻¹)细胞克隆形成抑制率显著升高($P<0.01$),并且随着对叶百部总生物碱浓度的增加而升高,表明对叶百部总生物碱能够显著抑制A549细胞集落形成。见图1、表2。

3.3 对叶百部总生物碱对A549细胞凋亡形态学的影响

空白组A549细胞呈现微弱荧光,细胞核分布均匀,总体呈淡蓝色染色,偶见亮蓝色染色的凋亡细胞;与空白组比较,不同浓度对叶百部总生物碱干预A549细胞24 h后,细胞核呈亮蓝色染色的细胞数量显著增加,细胞在荧光显微镜下出现强荧光反应,部分细胞因染色质浓缩,呈梭形等不规则形态,细胞出现明显的凋亡形态学特征,凋亡细胞数量与药物存在浓度依赖性,随着药物浓度增大,凋亡细胞数量显著增加。见图2。

3.4 对叶百部总生物碱对A549细胞凋亡率的影响

与空白组比较,对叶百部总生物碱干预A549细胞48 h,细胞凋亡率显著升高($P<0.01$),细胞凋亡率随药物浓度增加升高,呈浓度依赖效应。见表3。



注:A.空白组;B~F.对叶百部总生物碱组(100、150、200、250、300 mg·L⁻¹)(图2-图4同)

图1 对叶百部总生物碱对A549细胞克隆形成能力的影响(结晶紫)

Fig. 1 Effect of *Stemona tuberosa* alkaloids on clone formation ability of A549 cells (crystal violet)

表2 对叶百部总生物碱对A549细胞克隆形成能力的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of *Stemona tuberosa* alkaloids on clone formation ability of A549 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	细胞克隆数/个	克隆形成率/%	克隆形成抑制率/%
空白组		151±6	100	0
对叶百部总生物碱组	100	134±10 ²⁾	88.55±10.58	11.45±10.58
	150	101±13 ²⁾	66.74±12.77 ²⁾	33.26±12.77 ²⁾
	200	91±9 ²⁾	60.13±9.64 ²⁾	39.87±9.64 ²⁾
	250	83±11 ²⁾	55.07±11.37 ²⁾	44.93±11.37 ²⁾
	300	73±10 ²⁾	48.24±10.54 ²⁾	51.76±10.54 ²⁾

3.5 对叶百部总生物碱对A549细胞凋亡相关蛋白表达的影响

与空白组比较,对叶百部总生物碱(150、200、250、300 mg·L⁻¹)组促凋亡蛋白Caspase-3表达明显升高($P<0.05, P<0.01$);促凋亡蛋白Bax表达明显升高($P<0.05, P<0.01$);抑凋亡蛋白Bcl-2表达显著降低($P<0.01$)。见图3、表4。

3.6 对叶百部总生物碱对A549细胞通路蛋白表达的影响

与空白组比较,对叶百部总生物碱对PI3K、Akt、JNK、p38 MAPK总蛋白表达无明显影响,差异不具有统计学意义;对叶百部总生物碱可

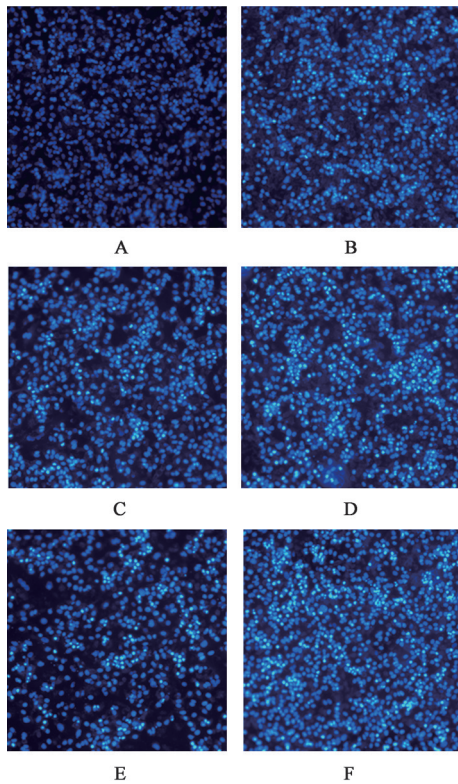


图2 对叶百部总生物碱对A549细胞形态的影响(免疫荧光, ×100)
Fig. 2 Effect of *Stemona tuberosa* alkaloids on apoptotic morphology of A549 cells (immunofluorescence, ×100)

表3 对叶百部总生物碱对A549细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 3 Effect of *Stemona tuberosa* alkaloids on apoptotic rate of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	凋亡率/%
空白组		4.97±1.34
对叶百部总生物碱组	100	11.60±0.68 ²⁾
	150	12.57±1.63 ²⁾
	200	23.49±4.69 ²⁾
	250	46.37±4.63 ²⁾
	300	54.28±2.19 ²⁾

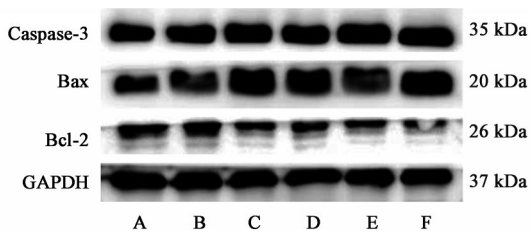


图3 对叶百部总生物碱作用后A549细胞凋亡相关蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of *Stemona tuberosa* alkaloids on expression of apoptosis-related proteins in A549 cells

明显下调 p-PI3K 蛋白的表达 ($P < 0.05, P < 0.01$); 对叶百部总生物碱 (150、200、250、300 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 能够明显下调 p-Akt 蛋白的表达 ($P < 0.01$), 明显上调 p-p38

表4 对叶百部总生物碱对A549细胞凋亡相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of *Stemona tuberosa* alkaloids on expression of apoptosis-related proteins in A549 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Caspase-3 /GAPDH	Bax /GAPDH	Bcl-2 /GAPDH
空白组		0.86±0.07	0.79±0.14	0.92±0.09
对叶百部总生物碱组	100	0.97±0.05	0.87±0.11	0.76±0.08
	150	1.12±0.10 ¹⁾	1.11±0.08 ¹⁾	0.46±0.02 ²⁾
	200	1.11±0.10 ¹⁾	1.14±0.03 ¹⁾	0.45±0.06 ²⁾
	250	1.44±0.16 ²⁾	1.22±0.12 ¹⁾	0.35±0.06 ²⁾
	300	1.43±0.12 ²⁾	1.31±0.14 ²⁾	0.30±0.03 ²⁾

MAPK 蛋白的表达 ($P < 0.05, P < 0.01$); 对叶百部总生物碱 (200、250、300 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 能够显著上调 p-JNK 蛋白表达 ($P < 0.05, P < 0.01$), 表明对叶百部总生物碱能够通过抑制 PI3K/Akt 信号通路和激活 JNK/p-p38 MAPK 信号通路诱导 A549 细胞凋亡。见图 4 和表 5、表 6。

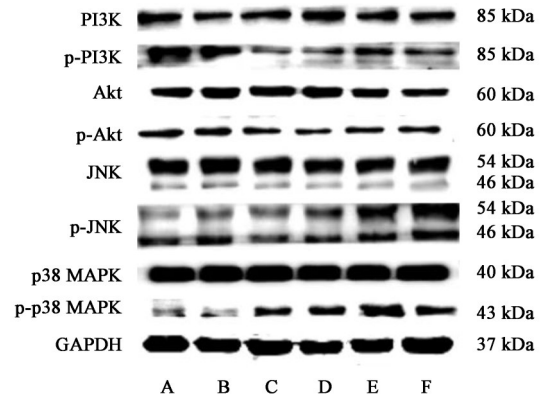


图4 对叶百部总生物碱作用A549细胞通路蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of *Stemona tuberosa* alkaloids on expression of pathway proteins in A549 cells

4 讨论

肺癌是一种发病率和病死率极高的临床常见恶性肿瘤, 早期症状不明显、晚期易转移、复发、产生抗药性及预后不良是其显著特点^[14]。肺癌已成为我国发病率和死亡率最高的恶性肿瘤, 我国2020年新增肺癌病例82万例, 死亡71万例, 并且肺癌的发病年龄逐渐年轻化, 严重危害我国人民生命健康^[1]。因此, 研究新型抗肺癌药物具有极其重要的现实意义。

细胞增殖与凋亡均是正常的生理新陈代谢现象, 两者的动态平衡是调节人体内环境稳态的关键, 而肿瘤细胞能够异常增殖却极少发生凋亡, 导

表5 对叶百部总生物碱对A549细胞通路蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of *Stemona tuberosa* alkaloids on expression of pathway proteins in A549 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	PI3K /GAPDH	p-PI3K /GAPDH	p-PI3K /PI3K	Akt /GAPDH	p-Akt /GAPDH	p-Akt /Akt
空白组		0.84±0.09	1.09±0.06	1.31±0.07	0.92±0.03	0.82±0.07	0.89±0.08
对叶百部总生物碱组	100	0.77±0.07	0.76±0.13 ¹⁾	0.98±0.09 ²⁾	0.91±0.02	0.73±0.01	0.80±0.02
	150	0.82±0.11	0.78±0.06 ²⁾	0.96±0.13 ¹⁾	0.93±0.02	0.59±0.04 ²⁾	0.63±0.04 ²⁾
	200	0.96±0.12	0.78±0.14 ¹⁾	0.80±0.06 ²⁾	1.15±0.06	0.51±0.06 ²⁾	0.44±0.03 ²⁾
	250	0.98±0.13	0.70±0.11 ²⁾	0.73±0.16 ²⁾	1.00±0.02	0.57±0.02 ²⁾	0.57±0.03 ²⁾
	300	0.87±0.13	0.76±0.06 ²⁾	0.89±0.17 ¹⁾	0.90±0.06	0.48±0.04 ²⁾	0.54±0.01 ²⁾

表6 对叶百部总生物碱对A549细胞通路蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of *Stemona tuberosa* alkaloids on expression of pathway proteins in A549 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	JNK /GAPDH	p-JNK /GAPDH	p-JNK /JNK	p38 MAPK /GAPDH	p-p38 MAPK /GAPDH	p-p38 MAPK /p38 MAPK
空白组		0.86±0.01	0.50±0.14	0.58±0.15	0.97±0.05	0.71±0.04	0.73±0.05
对叶百部总生物碱组	100	0.92±0.03	0.51±0.13	0.56±0.15	0.95±0.03	0.68±0.12	0.72±0.11
	150	0.78±0.04	0.53±0.04	0.68±0.02	0.95±0.01	0.84±0.03 ¹⁾	0.89±0.04 ¹⁾
	200	0.85±0.02	0.81±0.05 ¹⁾	0.95±0.07 ²⁾	1.04±0.07	0.96±0.10 ¹⁾	0.92±0.06 ²⁾
	250	0.91±0.05	1.08±0.06 ²⁾	1.18±0.02 ²⁾	1.18±0.01	1.17±0.10 ²⁾	0.99±0.07 ²⁾
	300	0.82±0.04	1.10±0.07 ²⁾	1.34±0.06 ²⁾	1.01±0.06	0.89±0.03 ²⁾	0.88±0.06 ¹⁾

致细胞组织被破坏,严重危害人体正常生命活动与秩序^[15]。目前,抑制肿瘤细胞增殖及诱导肿瘤细胞凋亡是抗肿瘤药物发挥活性的关键,而放、化疗等抗肿瘤手段均与诱导细胞凋亡密切相关^[16-17]。本研究采用MTT比色法检测A549细胞增殖,结果显示,对叶百部总生物碱能够显著抑制A549细胞增殖,且对叶百部总生物碱浓度越大,作用时间越久,其增殖抑制效果越明显;采用Hoechst 33258染色法观察A549细胞凋亡形态,结果显示,空白组细胞呈淡蓝色微弱荧光,偶见细胞核被染成亮蓝色,而对叶百部总生物碱组干预A549细胞24 h后,细胞在荧光显微镜下呈现强荧光反应,细胞核出现固缩、不规则形状的细胞数目明显增多,随着药物干预的浓度的增加,其死亡细胞数目也随之增加,提示对叶百部总生物碱有一定促凋亡作用;采用流式细胞术AnnexinV-FITC/PI双染法检测细胞凋亡,结果显示,对叶百部总生物碱能够促进A549细胞凋亡,与空白组比较,药物干预组细胞凋亡率显著升高,且凋亡率随着药物浓度的增加而升高,呈现浓度依赖性。表明对叶百部总生物碱能够抑制A549细胞增殖并诱导其发生凋亡。

Caspase-3已被公认为是细胞凋亡调节的关键因子,肿瘤细胞凋亡状态与Caspase-3的表达及活性密切相关,活化Caspase-3能够激活激酶级联反应,

促进细胞发生凋亡^[18-19]。Bcl-2家族成员包括Bax和Bcl-2,Bax为促凋亡蛋白,能够通过够损坏线粒体膜,形成通透性孔道,促进细胞凋亡;Bcl-2为抑凋亡蛋白,可保持线粒体膜的完整性,从而抑制细胞凋亡,两者共同作用调控细胞凋亡过程^[20-21]。本研究表明,对叶百部总生物碱不仅能够下调抑凋亡蛋白Bcl-2的表达,而且能够上调促凋亡蛋白Bax和凋亡调控因子Caspase-3蛋白的表达,提示对叶百部总生物碱能够通过调控凋亡相关蛋白的表达,进而诱导A549细胞凋亡。

PI3K/Akt信号通路与肿瘤细胞发生发展密切相关,该通路在肿瘤细胞中常过度表达,能够促进肿瘤细胞的增殖,并且该通路在肺癌的发生过程中也常被过度激活^[22-23]。PI3K是一种异源二聚体,由p110和p85亚基组成,能够被多种生长因子受体以及癌基因激活,可通过磷酸化Akt磷酸化位点Ser473和Thr308实现对下游Akt蛋白的调控^[24]。Akt蛋白的活化通常被认为是癌症的标志,能够促进肿瘤细胞增殖与迁移,抑制肿瘤细胞凋亡,增加肿瘤突变率进而促进癌症的发展^[25]。研究表明,抑制Akt蛋白的磷酸化能够抑制PI3K/Akt信号通路的活化,并且能够降低癌症细胞的活性,进而抑制癌细胞的增殖^[26-27]。MAPK信号通路是调控细胞增殖与凋亡的重要途径,在细胞内参与多种细胞生命周

期的调控^[28]。JNK、p38 MAPK均属于MAPK信号通路,当外界刺激传递至细胞时,MAPK信号通路会被部分或者全部激活,各信号通路能够独立调控亦可协同作用调节细胞功能^[29-30]。JNK在细胞增殖、凋亡和肿瘤的发生发展过程中起着关键作用^[31-32]。JNK信号通路的激活是诱导细胞凋亡的有效途径,与细胞凋亡有着密切联系^[33-34]。研究表明,JNK信号通路的激活可诱导Caspase级联反应,加速细胞凋亡;而阻断JNK的激活则抑制细胞凋亡^[35]。p38 MAPK在受到应激刺激、促炎症因子或病原体的作用后,以磷酸化形式被激活,进而参与调控细胞凋亡、炎症反应及肿瘤的发生发展过程^[36]。相关研究证实,激活p38 MAPK信号通路能够诱导宫颈癌HeLa细胞、卵巢癌SKOV3细胞凋亡,并且能够抑制两者的侵袭与迁移^[37-38]。此外,p38 MAPK信号通路还能参与细胞增殖、分化及周期等的调控,能够降低细胞周期蛋白的表达,进而抑制肿瘤细胞的增殖^[39-40]。本研究中,对叶百部总生物碱能够下调p-Akt、p-PI3K的表达,上调p-JNK、p-p38 MAPK的表达,表明对叶百部总生物碱可通过失活PI3K/Akt信号通路和激活JNK/p38 MAPK信号通路,进而诱导A549细胞凋亡。

综上所述,对叶百部总生物碱能够抑制肺癌A549细胞增殖并诱导其发生凋亡,其作用机制可能是通过抑制PI3K/Akt信号通路和上调JNK/p38 MAPK信号通路实现对肺癌A549细胞的抑制作用。本研究为对叶百部总生物碱的开发利用提供了理论依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global Cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.

[2] NASIM F, SABATH B F, EAPEN G A. Lung cancer [J]. Med Clin North Am, 2019, 103(3):463-473.

[3] CLARK J W, LONGO D L. Recent progress in systemic treatment for lung cancer [J]. Curr Opin Pulm Med, 2018, 24(4):355-366.

[4] MINGUET J, SMITH K H, BRAMLAGE P. Targeted therapies for treatment of non-small cell lung cancer-Recent advances and future perspectives [J]. Int J Cancer, 2016, 138(11): 2549-2561.

[5] 于同月,崔昊震,张松男,等. 参一胶囊对晚期非小细胞肺癌临床化疗效果及免疫功能的影响分析[J]. 中国免疫学杂志,2018,34(7):1012-1016.

[6] 安海萍,任俏丽. 预见性护理联合营养干预对肺癌化疗患者预后及不良反应的影响[J]. 中国药物与临床,2021,21(12):2227-2228.

[7] 夏凡,李平,张梅. 晚期非小细胞肺癌的中西医结合药物治疗现状[J]. 安徽医药,2016,20(3):583-585.

[8] 陈杨,王成阳,胡健,等. 中医药联合化疗治疗晚期非小细胞肺癌的Meta分析[J]. 辽宁中医杂志,2018,45(06):1135-1138.

[9] 程伟,陈新梅. 中药抗非小细胞肺癌作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(24):227-234.

[10] CHUNG H S, HON P M, LIN G, et al. Antitussive activity of *Stemona* alkaloids from *Stemona tuberosa* [J]. Planta Med, 2003, 69(10): 914-920.

[11] LEE K Y, JEONG E J, SANG H S, et al. *Stemona* alkaloids isolated from *Stemona tuberosa* roots and their inhibitory activity on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production[J]. Rec Nat Prod, 2015, 10(1): 109-112.

[12] BUT P H, SHAW P C, LIN G E, et al. Authentication and quality assessment of the antitussive Herb Baibu (*Radix Stemona*) [J]. Adv Bot Res, 2012, 2012(62): 1-33.

[13] 林思,朱华,秦慧真,等. 对叶百部总生物碱对人肝癌SMMC-7721细胞凋亡及Bcl-2, Bax和cleaved Caspase-3蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(19):73-79.

[14] LIAO Y, WANG X, ZHONG P, et al. A nomogram for the prediction of overall survival in patients with stage II and III non-small cell lung cancer using a population-based study. [J]. Oncol Lett, 2019, 18(6): 5905-5916.

[15] 林思,秦慧真,邓玲玉,等. 紫草素抗肿瘤作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(9):273-282.

[16] 李龙妹,黄锦鹏,河文峰,等. 龙葵提取物澳洲茄碱诱导A549细胞凋亡的机制研究[J]. 中药新药与临床药理,2020,31(12):1422-1427.

[17] GONG Y, ZHANG L, ZHANG A Q, et al. GATA4 inhibits cell differentiation and proliferation in pancreatic cancer [J]. PLoS One, 2018, 13(8): e0202449.

[18] HENTZEN N B, MOGAKI R, OTAKE S, et al. Intracellular photoactivation of Caspase-3 by molecular glues for spatiotemporal apoptosis induction [J]. J Am Chem Soc, 2020, 142(18): 8080-8084.

[19] GREGORASZCZUK E L, RAK-MARDYŁA A, RYŚ

- J, et al. Effect of chemotherapeutic drugs on Caspase-3 activity, as a key biomarker for apoptosis in ovarian tumor cell cultured as monolayer. A pilot study [J]. Iran J Pharm Res, 2015, 14(4): 1153-1161.
- [20] ESTAPHAN S, ABDEL-MALEK R, RASHED L, et al. Cimetidine a promising radio-protective agent through modulating Bax/Bcl2 ratio: An *in vivo* study in male rats [J]. J Cell Physiol, 2020, 235(11): 8495-8506.
- [21] ZHAO D G, ZHANG M L, YUAN H P, et al. Ginsenoside Rb₁ protects against spinal cord ischemia-reperfusion injury in rats by downregulating the Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 and p-Ask-1 levels [J]. Exp Mol Pathol, 2018, 105(3): 229-235.
- [22] 王莹,唐兴华,孙立燕,等. 麦冬皂苷D通过抑制PI3K/Akt信号通路减轻大气细颗粒物对肺泡上皮细胞的氧化损伤 [J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(2): 397-399.
- [23] TAN AARON C. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. Thorac Cancer, 2020, 11(3): 511-518.
- [24] KHAN M A, JAIN V K, RIZWANULLAH M, et al. PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors in triple-negative breast cancer: A review on drug discovery and future challenges [J]. Drug Discov Today, 2019, 24(11): 2181-2191.
- [25] SONG M, BODE A M, DONG Z, et al. Akt as a therapeutic target for cancer [J]. Cancer Res, 2019, 79(6): 1019-1031.
- [26] HUA R, PEI Y, GU H, et al. Antitumor effects of flavokawain-B flavonoid in gemcitabine-resistant lung cancer cells are mediated via mitochondrial-mediated apoptosis, ROS production, cell migration and cell invasion inhibition and blocking of PI3K/Akt Signaling pathway [J]. J Buon, 2020, 25(1): 262-267
- [27] 叶玉兰,刘单,邓述恺. 塞来昔布联合培美曲塞对人肺腺癌A549细胞株增殖、凋亡及PI3K/AKT信号通路相关蛋白的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2019, 29(7): 18-23.
- [28] YOU Z, LIU S P, DU J, et al. Advancements in MAPK signaling pathways and MAPK-targeted therapies for ameloblastoma: A review [J]. J Oral Pathol Med, 2019, 48(3): 201-205.
- [29] LIU YT, HSIEH M J, LIN J T, et al. Erianin induces cell apoptosis through ERK pathway in human nasopharyngeal carcinoma [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 111(3): 262-269.
- [30] BUROTTO M, CHIOU V L, LEE J, et al. The MAPK pathway across different malignancies: A new perspective [J]. Cancer, 2015, 120(22): 3446-3456.
- [31] WOLIN I A V, HEINRICH I A, NASCIMENYO A P M, et al. ConBr lectin modulates MAPKs and Akt pathways and triggers autophagic glioma cell death by a mechanism dependent upon Caspase-8 activation [J]. Biochimie, 2021, 180: 186-204.
- [32] ZHOU N, WEI Z, QI Z, et al. Abscisic acid-induced autophagy selectively via MAPK/JNK signalling pathway in glioblastoma [J]. Cell Mol Neurobiol, 2021, 41(4): 813-826.
- [33] 董彩凤,孙丽红,张健,等. Delta-catenin蛋白通过抑制JNK通路活性而减少肺癌细胞的凋亡 [J]. 中国癌症杂志, 2016, 26(11): 902-907.
- [34] XU P, DAVIS R J. Correction for Xu and Davis, "c-Jun NH2-terminal kinase is required for lineage-specific differentiation but not stem cell self-renewal" [J]. Mol Cell Biol, 2017, 37(17): e00280-e002817.
- [35] TSOI H, YU A C, CHEN Z S, et al. A novel missense mutation in CCDC88 activates the JNK pathway and causes a dominant form of spinocerebellar ataxia [J]. J Med Genet, 2014, 51(9): 590-595.
- [36] MARTÍNEZ-LIMÓN A, JOAQUIN M, CABALLERO M, et al. The p38 pathway: From biology to cancer therapy [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(6): 1913-1930.
- [37] XUE B, WU W, HUANG K, et al. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) enhances cells invasion by $\alpha_5\beta_1$ integrin-mediated signaling in ovarian cancer [J]. Mol Cell Biochem, 2013, 380(1/2): 177-184.
- [38] ZHANG H, ZHAO X, LIU H B, et al. Trichostatin A inhibits proliferation of PC3 prostate cancer cells by disrupting the EGFR pathway [J]. Oncol Lett, 2019, 18(1): 687-693.
- [39] WANG T, SEAH S, LOH X, et al. Simvastatin-induced breast cancer cell death and deactivation of PI3K/Akt and MAPK/ERK signalling are reversed by metabolic products of the the mevalonate pathway [J]. Oncotarget, 2016, 7(3): 2532-2544.
- [40] STRAMUCCI L, PRANTEDA A, BOSSI G. Insights of crosstalk between p53 protein and the MKK3/MKK6/p38 MAPK signaling pathway in cancer [J]. Cancers (Basel), 2018, 10(5): 131.

[责任编辑 张丰丰]