

苦参碱通过 PI3K/Akt 信号通路诱导肺癌 A549 细胞凋亡机制研究

张小文 崔传宝 张平平 郝红娟 高尔 李聘 刘玉珍 赵军 朱凯 张开蒂

【摘要】 目的 探究苦参碱通过 PI3K/Akt 信号通路诱导肺癌 A549 细胞凋亡机制。**方法** 对人肺癌 A549 细胞进行培养,培养后分为对照组、低浓度组、中浓度组以及高浓度组,对照组中加入生理盐水,分别向低浓度组、中浓度组以及高浓度组,加入浓度为 30 mg/L、60 mg/L、120 mg/L 的苦参碱,作用 48 小时后采用流式细胞仪及 MTT 检测法检测 A549 细胞凋亡情况,计算生长抑制率,并采用 Western Blotting 和 real time PCR 检测 PI3K、p-AKT 蛋白以及 PI3K、AKT mRNA 表达水平,比较四组之间的差异。**结果** 高浓度组、中浓度组、低浓度组生长抑制率和凋亡率显著高于对照组 ($P < 0.05$),且随着浓度的升高生长抑制率和凋亡率显著升高 ($P < 0.05$);高浓度组、中浓度组、低浓度组 PI3K、AKT mRNA 及 PI3K、p-AKT 蛋白表达显著低于对照组 ($P < 0.05$),且随着浓度的升高 PI3K、AKT mRNA 及 PI3K、p-AKT 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。**结论** 苦参碱可诱导肺癌 A549 细胞凋亡,推测其作用机制与 PI3K/Akt 信号通路有关。

【关键词】 肺癌; A549 细胞; 苦参碱; PI3K/Akt 信号通路

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.08.005

Study on the apoptosis mechanism of lung cancer A549 cells induced by matrine through PI3K/Akt signaling pathway ZHANG Xiaowen, CUI Chuanbao, ZHANG Pingping, et al. *Pharmacology teaching and research section of QILU Medical University, Zibo 255213, China*
Corresponding author: ZHANG Xiaowen, E-mail: mted12@163.com

【Abstract】 Objective To explore the apoptosis mechanism of lung cancer A549 cells induced by matrine through PI3K/Akt signaling pathway. **Methods** Human lung cancer A549 cells were cultured, which were divided into control group, low concentration group, middle concentration group and high concentration group. The cells in control group were given normal saline, and the low concentration group, middle concentration group and high concentration group were respectively given matrine with concentrations of 30 mg/L, 60 mg/L, 120 mg/L, and the apoptosis situations of lung cancer A549 cells were detected by flow cytometry and MTT detection, and the growth inhibition rates were calculated, then the PI3K, p-AKT protein and PI3K, AKT mRNA levels were detected by Western Blotting and real time PCR, the differences between the four groups were compared. **Results** The growth inhibition rates and apoptosis rates of high concentration group, middle concentration group and low concentration group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$), which were significant increased with the increasing of concentrations ($P < 0.05$). The levels of PI3K, AKT mRNA and PI3K, p-AKT protein in the high concentration group, middle concentration group and low concentration group were significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$), which were significantly decreased with the increasing of concentrations ($P < 0.05$). **Conclusion** The matrine can induce the apoptosis of lung cancer A549 cells, and the action mechanism may relate to the PI3K/Akt signaling pathway.

【Key words】 Lung cancer; A549 cells; Matrine; PI3K/Akt signaling pathway

基金项目: 山东省高等学校科技计划(J14LM55)

作者单位: 255213 淄博, 齐鲁医药学院药理教研室

作者简介: 张小文(1980-), 女, 硕士, 讲师。研究方向: 药理学。

E-mail: mted12@163.com

肺癌多因肺支气管黏膜在物理、化学等致癌因素的作用下发生基因突变, 导致细胞癌基因活化, 抑癌基因失去活性^[1]。苦参碱是中药苦参所含的主要生物碱之一, 提取于苦豆子根部。有研

究指出^[2],苦参碱可通过影响肿瘤细胞 DNA 合成,抑制肿瘤细胞增殖,发挥其抗肿瘤作用。另有研究指出^[3],苦参碱可通过调控肿瘤相关基因的表达,通过影响多种通路,诱导细胞发生凋亡,从而发挥抗肿瘤作用。但关于苦参碱对 PI3K/Akt 信号通路影响的研究较少。本研究特探究苦参碱诱导肺癌 A549 细胞凋亡机制以及与 PI3K/Akt 信号通路的关系,旨在为临床重要抗肿瘤机制的研究提供新思路,同时为肺癌的治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞

人肺癌 A549 细胞株,由山东博德生物科技有限公司提供。

1.2 主要试剂

苦参碱,分子量为 248.36,购自南京广润生物制品有限公司,避光保存,实验中现用现配所需浓度。四甲基偶氮唑蓝(MTT),购自 Sigma 公司,用锡箔纸包装,避光保存备用,使用前常温下融化,有效期为一周。RPMI-1640 溶液:购自济南美森特生物科技有限公司;二甲基亚砜与荧光染料均购自 Sigma 公司;以及标记液、孵育缓冲液、PI 染色液。

1.3 实验仪器

二氧化碳孵育箱:型号 SANYO MCO-18M;流式细胞仪:型号 BD FACSCalibur;微量移液器:型号 HG211-WKY III;倒置显微镜:日本奥林巴斯;离心机:德国,型号 Eppendorf525L;荧光显微镜:日本奥林巴斯。培养液、培养板由 Corning 公司提供。

1.4 实验方法

细胞培养、传代:将浓度为 4×10^5 个/mL 的 A549 细胞接种于 96 孔培养板中,每组设置 6 个复孔。每孔滴入 180 μ L,培养时间为 48 小时。对照组加入生理盐水,低、中浓度组及高浓度组分别加入浓度为 30 mg/L、60 mg/L、120 mg/L 的苦参碱。

1.5 A549 细胞生长抑制率及凋亡率检测方法

48 小时后每孔滴入浓度为 5 g/L 的 MTT 液,共 20 μ L,作用时间为 4 小时,4 小时后将培养基撤弃,加入 150 μ L DMSO,震荡 15 分钟,采用酶标仪检测每孔在 490 nm 的吸光度值,观察 48 小时后苦参碱对肺癌 A549 细胞的抑制情况。48 小时后将细胞收集,经 PBS 洗涤后进行重悬,采用 70% 的乙醇将其固定,并将碘化丙啶(PI)加入其中进行 30 分钟的染色,采用流式细胞仪检测细胞的凋亡率。制作贴壁细胞,并使用 PBS 洗涤 1 次,可增加适量

干燥样品使细胞贴得更加牢固,使用免疫染色固定液固定细胞 60 分钟,再用 PBS 洗涤 1 次,加入含有 0.1% 的聚乙二醇辛基苯基醚的 PBS,冰浴孵育 2 分钟,采用荧光显微镜观察细胞凋亡情况,并计算凋亡率。

1.6 Real time PCR 法检测 PI3K、AKT mRNA 表达

采用紫外分光光度计测定 260 nm、280 nm OD 值,取样品低温保存备用。加入 79 μ L DEPC 水,紫外分光光度计测 OD 260、OD 280,当其比值为 1.8~2.0 时,提示样本中 RNA 纯度合格。在 37℃ 15 分钟,85℃ 5 秒为 1 个循环的反应条件下逆转录合成 cDNA。在反应体系为 20 μ L,95℃ 0.5 分钟,1 个循环,95℃ 5 秒、60℃ 34 秒、40 个循环,95℃ 15 秒、60℃ 60 秒、95℃ 15 秒,1 个循环的反应条件下,进行 PCR 扩增。将所扩增的 PCR 产物进行溶解度曲线分析,根据系统给出的数值,使用内参 actin,计算各组 PI3K、AKT mRNA 的表达水平。

1.7 PI3K、AKT 蛋白表达情况检测方法

根据 PI3K、p-AKT 蛋白质分子量配置相应的分离胶,混合均匀,置于烘箱中静置 30 分钟,直至水层与胶层出现明显界限,向其中灌注浓缩胶,室温静置 30 分钟,直至凝胶聚合。将制作的样本经 SDS-PAGE 电泳,转膜制作成转移“三明治”。将膜放入 TBST 冲洗 1 次,置于丽春红染色液中染色 5 分钟,放入盛有封闭液的容器中,封闭 1 小时,根据抗体说明书,使用脱脂奶粉溶液稀释一抗,将其加入到封闭容器中,放置于冰箱内过夜孵育。清除一抗,后室温下摇床孵育 2 小时进行二抗孵育。最后在暗盒内进行曝光鉴定。采用 Quantity One 凝胶图像分析软件对胶片进行分析光密度值。使用内参 GAPDH 条带的光密度比值表示 PI3K、p-AKT 蛋白表达水平。

1.8 统计学处理

利用统计学软件 SPSS 20.0 对本实验进行数据分析,计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)描述,当数据呈正态分布,方差齐时,多组间比较采用单因素方差检验,两组间比较采用 LSD 检验,不符合正态分布、方差不齐时,采用秩和检验,检验水准 $\alpha=0.05$,当 $P<0.05$ 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺癌 A549 细胞生长抑制率及凋亡率比较

高浓度组、中浓度组、低浓度组生长抑制率和凋亡率显著高于对照组($P<0.05$),且随着浓度的升

高,生长抑制率和凋亡率显著升高($P<0.05$),其中高浓度组生长抑制率和凋亡率最高。详见表 1。

表 1 四组肺癌 A549 细胞 48 生长抑制率及凋亡率比较结果(%)

组别	样本数	生长抑制率	凋亡率 (流式细胞仪)	凋亡率 (TUNEL 法)
对照组	6	0	0	0
低浓度组	6	9.65±1.36 ^a	5.62±1.12 ^a	5.45±1.17 ^a
中浓度组	6	20.36±1.26 ^{ab}	15.62±1.20 ^{ab}	15.24±1.25 ^{ab}
高浓度组	6	34.26±2.01 ^{abc}	21.25±1.41 ^{abc}	20.55±1.34 ^{abc}

注:与对照组相比,^a $P<0.05$;与低浓度组相比,^b $P<0.05$;与中浓度组相比,^c $P<0.05$ 。

2.2 四组 PI3K、AKT mRNA 表达情况比较

高浓度组、中浓度组、低浓度组 PI3K、AKT mRNA 表达显著低于对照组($P<0.05$),且随着浓度的升高 PI3K、AKT mRNA 表达水平显著降低($P<0.05$),其中高浓度组 PI3K、AKT mRNA 表达水平最低。详见表 2。

表 2 四组 PI3K、AKT mRNA 表达情况比较结果

组别	样本数	PI3K	AKT
对照组	6	1.015±0.025	1.006±0.021
低浓度组	6	0.821±0.014 ^a	0.714±0.041 ^a
中浓度组	6	0.587±0.028 ^{ab}	0.562±0.037 ^{ab}
高浓度组	6	0.408±0.021 ^{abc}	0.356±0.057 ^{abc}

注:与对照组相比,^a $P<0.05$;与低浓度组相比,^b $P<0.05$;与中浓度组相比,^c $P<0.05$ 。

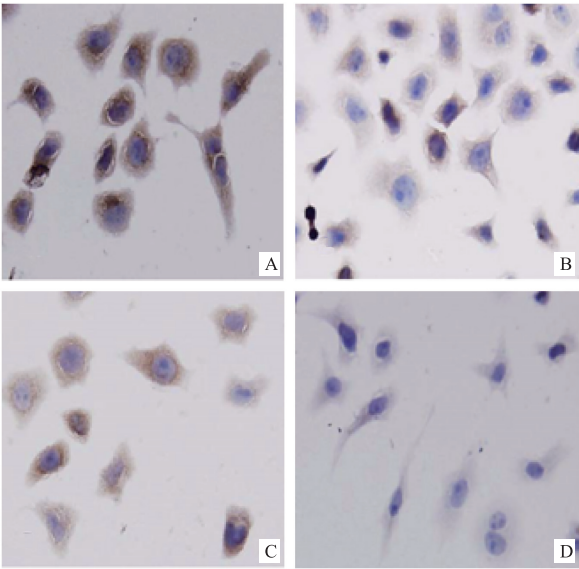
2.3 四组 PI3K、AKT 蛋白表达情况比较

与对照组相比,苦参碱处理细胞 48 小时后,随浓度的增加,A549 细胞可见染色质凝集、核碎裂等形态学改变,PI3K 和 Akt 蛋白表达在细胞浆及细胞核中的均明显减弱,由棕黄色逐渐变浅,提示 PI3K 和 Akt 蛋白阳性表达下降(见图 1、图 2)。Western Blotting 定量分析结果与此一致,显示出高浓度组、中浓度组、低浓度组 PI3K、AKT 蛋白表达显著低于对照组($P<0.05$),且随着浓度的升高 PI3K、AKT 蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。详见表 3、图 3。

3 讨论

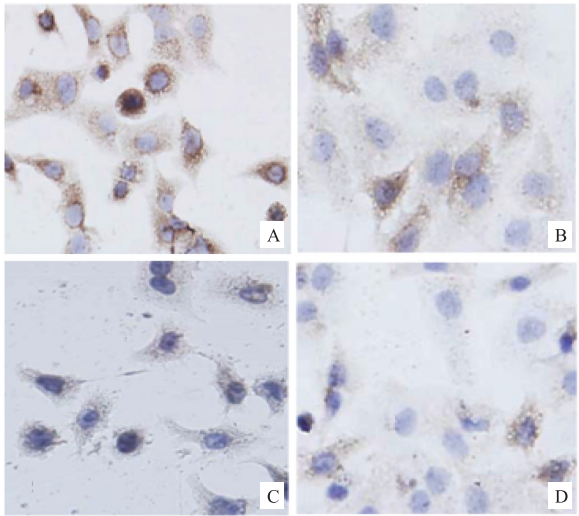
肺癌是常见的恶性肿瘤,目前对于该病的治疗临床上多采用手术、放疗、化疗以及分子靶向药物治疗,但治疗效果不理想^[4-5],且毒副作用明显,尤其是化疗药物对患者骨髓造血功能有明显的抑制作用,导致患者不得不中断治疗^[6-7]。

近年来,PI3K/Akt 信号通路引起国内外研究人员的注意,其传导途径为 PI3K 激活后在质膜上产



注:A 对照组;B 低浓度组;C 中浓度组;D 高浓度组

图 1 免疫细胞化学法检测 A549 细胞中 PI3K 蛋白表达的影响(×400)



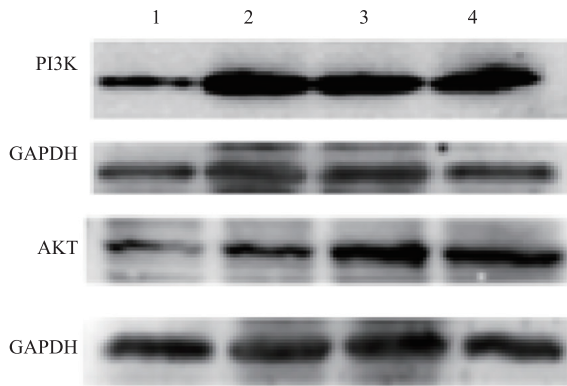
注:A 对照组;B 低浓度组;C 中浓度组;D 高浓度组

图 2 免疫细胞化学法检测 A549 细胞中 p-AKT 蛋白表达的影响(×400)

表 3 四组 PI3K、AKT 蛋白表达情况比较结果($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	PI3K	p-AKT
对照组	6	1.256±0.125	1.145±0.114
低浓度组	6	0.897±0.087 ^a	0.784±0.084 ^a
中浓度组	6	0.645±0.058 ^{ab}	0.587±0.047 ^{ab}
高浓度组	6	0.412±0.084 ^{abc}	0.498±0.067 ^{abc}

注:与对照组相比,^a $P<0.05$;与低浓度组相比,^b $P<0.05$;与中浓度组相比,^c $P<0.05$ 。



注:1 高浓度组;2 中浓度组;3 低浓度组;4 对照组

图3 Western Blotting 检测 PI3K、AKT 在各组中表达

生信使 PIP3, PIP3 与细胞内 PH 结构的信号蛋白 Akt 和 PDK1 结合,促进 PDK1 磷酸化 AKT 蛋白的 Ser308,进而导致 AKT 激活,并通过磷酸化多种酶和转录因子等下游因子,调节细胞功能^[8-9]。有关研究发现,肺癌肿瘤细胞抗凋亡的主要作用机制为 PI3K/Akt 信号转导通路的激活。细胞在一系列内外因素作用下,通过启动 PI3K/Akt 信号通路,诱导细胞增殖分化,减少细胞的凋亡^[10-11]。

苦参碱属于四环的喹啉啶类,分子骨架为 2 个喹啉啶环的杂体。有研究表明^[11-12],苦参碱具有抗肿瘤作用,且可抑制多种细胞增殖,并诱导其凋亡。其主要作用机制可能为苦参碱可增强促凋亡因子的表达,同时抑制促癌基因的表达。有关研究指出,苦参碱可通过多种途径影响肿瘤细胞的增殖分化,诱导肿瘤细胞的凋亡,其中 MAPK/ERK 以及 MAPK、JAK-STAT 信号通路在作用机制中发挥重要作用^[13]。此外,苦参碱可通过影响人端粒酶逆转录酶的表达对肺癌 A549 细胞的凋亡产生影响^[14]。

本研究结果显示,对照组 A549 细胞株生长抑制率和凋亡率显著低于其他组,且浓度越高生长抑制率和凋亡率越高,提示药物浓度越高对肺癌 A549 细胞增殖的抑制作用以及促进其凋亡作用越明显。显微镜下可观察到随着药物浓度的增加,坏死细胞脱落逐渐增多,贴壁细胞逐渐减少,呈现出明显的浓度依赖性^[15]。此外,本研究中苦参碱三个浓度组 PI3K、AKT 蛋白以及 PI3K、AKT mRNA 表达显著低于对照组,且随着浓度的升高表达水平显著降低,提示药物浓度越高抑制 PI3K、AKT 蛋白和 mRNA 的表达作用越强。

综上所述,苦参碱可诱导肺癌 A549 细胞的凋亡,其可能作用机制为通过 PI3K/Akt 信号转导通

路,调控相关基因和蛋白的表达,且随着药物浓度的增加,生长抑制率和凋亡率以及对相关基因和蛋白的抑制作用越明显。

参 考 文 献

- [1] 侯晓玮,庄兴俊,宋谦,等. CT 引导经皮肺穿刺活检检测晚期非小细胞肺癌表皮生长因子受体基因突变[J]. 介入放射学杂志,2013,22(2):125-128.
- [2] 何光耀,谢貌,唐安洲,等. 苦参碱对人鼻咽癌 CNE2 细胞裸鼠移植瘤生长及凋亡相关基因表达的影响[J]. 郑州大学学报(医学版),2014,49(2):169-172.
- [3] 周娟,倪松石,袁素琴. 苦参碱对人肺癌 A549 细胞增殖及 HIF-10 α , VEGF 表达的影响[J]. 山东医药,2012,52(3):25-27.
- [4] 蔡俊霞,谭洁,王彬,等. DC-CIK 治疗 43 例晚期非小细胞肺癌的近期疗效观察[J]. 现代肿瘤医学,2014,22(1):67-70.
- [5] Hsieh M J, Tsai T L, Hsieh Y S, et al. Dioscin-induced autophagy mitigates cell apoptosis through modulation of PI3K/Akt and ERK and JNK signaling pathways in human lung cancer cell lines[J]. Archives of toxicology, 2013, 87(11):1927-1937.
- [6] 敖曼,连相尧,刘承一,等. 参芪扶正注射液对肺癌化疗患者造血功能和免疫功能的影响[J]. 山东医药,2012,52(3):60-61.
- [7] 丁春杰,杨磊. 参芪扶正注射液对晚期非小细胞肺癌化疗患者免疫功能的影响[J]. 西部中医药,2012,25(1):7-9.
- [8] 殷舞,钟晓刚,黄顺荣,等. PI3K/Akt/mTOR 信号通路在大肠腺癌恶性转化中的表达及意义[J]. 广东医学,2013,34(2):238-240.
- [9] 隋华,付晓伶,潘树芳,等. PI3K/Akt/NF- κ B 通路调控 ABCB1/P-gp 介导的人结肠癌细胞多药耐药的研究[J]. 中国癌症杂志,2014,24(2):106-111.
- [10] Gadgil S M, Wozniak A. Preclinical rationale for PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors as therapy for epidermal growth factor receptor inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer[J]. Clinical lung cancer, 2013, 14(4):322-332.
- [11] 成撒诺,徐亚丽,戴晓波,等. Krüppel 样转录因子 8 在肝细胞癌中经 PI3K/Akt 通路调控 VEGFA 的表达[J]. 肿瘤,2016,34(12):1075.
- [12] 鲍娇琳,陆金健,陈修平,等. 苦参碱与氧化苦参碱抗肿瘤作用及其机制的研究进展[J]. 中药新药与临床药理,2012,23(3):369-373.
- [13] 殷飞,赵军艳,姚树坤. 苦参碱对 SMMC-7721 细胞 MAPK, JAK-STAT 信号通路的影响[J]. 肿瘤防治研究,2008,35(2):84-87.
- [14] 陈晓峡,向小庆,叶红. 苦参碱及氧化苦参碱抗肿瘤作用的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(11):361-364.
- [15] Papadimitrakopoulou V. Development of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors and their application in personalized therapy for non-small-cell lung cancer[J]. Journal of Thoracic Oncology, 2012, 7(8):1315-1326.

(收稿日期:2016-10-27)

(本文编辑:禹佳)