

雷公藤红素通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路对胃癌 MFC 细胞增殖和凋亡的影响

杨 静¹, 马景涛², 闫 骏^{3*}

1. 天津市宁河区医院 病理科, 天津 301500

2. 天津市宁河区医院 消化科, 天津 301500

3. 天津市第一中心医院 病理科, 天津 300192

摘要: 目的 研究雷公藤红素对胃癌 MFC 细胞内 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响及其对胃癌 MFC 细胞增殖的抑制和促凋亡作用机制。方法 分别设置对照组和雷公藤红素低、中、高剂量 (5、10、20 mmol/L) 组, 采用 MTT 法检测雷公藤红素对胃癌 MFC 细胞增殖的影响; 采用流式细胞技术检测雷公藤红素对胃癌 MFC 细胞周期的影响及 MFC 细胞凋亡的情况; Western blotting 检测雷公藤红素对胃癌 MFC 细胞内凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 和 PI3K、AKT 和 mTOR 蛋白表达的影响; 实时定量 PCR 检测雷公藤红素对胃癌 MFC 细胞内 PI3K、AKT 和 mTOR mRNA 表达的影响。结果 与对照组比较, 雷公藤红素能够呈剂量相关性地显著抑制胃癌 MFC 细胞的增殖 ($P < 0.05$); 与对照组比较, 雷公藤红素能够呈剂量相关性地显著引起 MFC 细胞 G₂/M 期阻滞 ($P < 0.05$); 与对照组比较, 雷公藤红素能够呈剂量相关性地显著促进 MFC 细胞的凋亡 ($P < 0.05$); 与对照组比较, 雷公藤红素能够呈剂量相关性地显著抑制 MFC 细胞内抗凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白和 PI3K、AKT、mTOR 蛋白的表达 ($P < 0.05$), 显著促进 MFC 细胞内促凋亡蛋白 Bax 的表达 ($P < 0.05$); 与对照组比较, 雷公藤红素能够呈剂量相关性地显著抑制 MFC 细胞内 PI3K、AKT 和 mTOR mRNA 的表达 ($P < 0.05$)。结论 雷公藤红素能够抑制胃癌 MFC 细胞的增殖并促进胃癌 MFC 细胞凋亡, 其作用机制可能是通过抑制胃癌 MFC 细胞内 PI3K/AKT/mTOR 信号通路中 PI3K、AKT、mTOR 等蛋白的表达而抑制胃癌 MFC 细胞的增殖, 进而促进胃癌 MFC 细胞内促凋亡蛋白 Bax 的表达, 同时抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 从而促进胃癌 MFC 细胞凋亡。

关键词: 雷公藤红素; PI3K/AKT/mTOR 信号通路; 胃癌; 细胞增殖; 细胞凋亡

中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2020)08-1517-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.08.003

Effects of tripterine on the proliferation and apoptosis of gastric cancer MFC cells by regulating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway

YANG Jing¹, MA Jing-tao², YAN Jun³

1. Department of Pathology, Tianjin Ninghe Hospital, Tianjin 301500, China

2. Department of Gastroenterology, Tianjin Ninghe Hospital, Tianjin 301500, China

3. Department of Pathology, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China

Abstract: Objective To study the effect of tripterine on PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in gastric cancer MFC cells and its mechanism of inhibiting proliferation and promoting apoptosis of gastric cancer MFC cells. **Methods** The control group, low dose medium dose, and high dose (5, 10, 20 mmol/L) groups were used to test the proliferation of gastric cancer MFC cells. MTT assay was used to detect the effects of tripterine on the proliferation of gastric cancer MFC cells. The effects of tripterine on the cell cycle of gastric cancer MFC cells and the apoptosis of MFC cells were detected by flow cytometry. The effects of tripterine on apoptosis-related proteins Bax, Bcl-2, and the expression of PI3K, AKT and mTOR proteins in gastric cancer MFC cells were studied by Western blotting. The effects of tripterine on the expression levels of PI3K, AKT and mTOR mRNA in gastric cancer MFC cells were detected by real-time quantitative PCR. **Results** Compared with the control group, tripterine could significantly inhibit the proliferation of

收稿日期: 2020-06-11

基金项目: 京津冀基础研究合作专项项目 (H2018201306)

作者简介: 杨 静, 硕士, 主治医师, 从事恶性肿瘤的诊断。E-mail: cs13957@163.com

*通信作者 闫 骏, 博士, 主任医师。

gastric cancer MFC cells in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). Compared with the control group, tripteryne could significantly induce G₂/M phase arrest of MFC cells in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). Compared with the control group, tripteryne could significantly promote the apoptosis of MFC cells in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). Compared with the control group, tripteryne could significantly inhibit the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2, and PI3K, AKT, and mTOR proteins in MFC cells in a dose-dependent manner ($P < 0.05$), but promote the expression of pro-apoptotic protein Bax in MFC cells in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). Compared with the control group, tripteryne could significantly inhibit the transcription of PI3K, AKT and mTOR mRNA in MFC cells in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). **Conclusion** Tripteryne can inhibit the proliferation of gastric cancer MFC cells and promote the apoptosis of gastric cancer MFC cells. The mechanism of action may be to inhibit the proliferation of gastric cancer MFC cells by inhibiting the expression of PI3K, AKT, mTOR and other proteins in PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in gastric cancer MFC cells, and then promote the expression of apoptosis-promoting protein Bax in gastric cancer MFC cells. At the same time, it can inhibit the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 and promote the apoptosis of gastric cancer MFC cells.

Key words: tripteryne; PI3K/AKT/mTOR signaling pathway; gastric cancer; cell proliferation; cell apoptosis

胃癌是最常见的致死性癌症之一，致死率在癌症中位居第2位^[1-2]。尽管早期诊断、手术和辅助治疗改善了胃癌患者的预后，但由于大多数患者确诊时已发展为晚期，对于胃癌的治疗，目前仍无特效药物，因而导致其死亡率不断上升^[1-5]。雷公藤红素是从雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook.f.、南蛇藤 *Celastrus orbiculatus* Thunb.等卫矛科植物提取的具有醌甲基结构五环三萜类单体化合物，研究表明其对结肠癌、肺癌、胃癌、白血病、胶质瘤、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌等疾病均表现出很好的抗肿瘤作用^[6-10]。PI3K/AKT/mTOR 信号通路的激活能够导致机体细胞的异常增殖，从而导致肿瘤的发生^[11-12]。近年来研究发现雷公藤红素对胃癌细胞具有很好的抗肿瘤活性^[13-15]，但其作用机制尚不明确。本文通过研究雷公藤红素抑制胃癌 MFC 细胞增殖及促凋亡作用，为雷公藤红素的临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

雷公藤红素购买自成都格利普生物科技有限公司（批号 201908261，质量分数≥98%）；胃癌 MFC 细胞购自中科院上海细胞库（批号 A3561）；PI3K、AKT、mTOR、Bax、Bcl-2 和 GAPDH 抗体均购自 Proteintech 公司（批号 20584-1-AP、10176-2-AP、20657-1-AP、50599-2-Ig、12789-1-AP、10494-1-AP）；细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒、RIPA 蛋白裂解液购自上海碧云天公司（批号：C1052、P0013B），RPMI1640 培养基购自北京索莱宝科技有限公司（批号 31800）；ECL 显色液购自 Thermo 公司（批号 32106）；RNA 提取试剂盒和逆转录 cDNA 试剂盒购自 Promega 公司（批号 Z3100、A3500）；DxFLEX

流式细胞仪购自贝克曼库尔特商贸有限公司，1658001 双垂直电泳仪、DYC-ZY2 转印电泳仪、SYSTEM GelDoc XR 凝胶成像仪均购自伯乐生命科学产品有限公司。

1.2 细胞培养和传代

从-80℃冰箱中取出 MFC 细胞冻存管，于 37℃ 恒温水浴箱轻轻摇动，溶解后移至酒精消毒过的超净工作台，用移液枪吸出管内细胞悬液，转移至 10 mL 无菌离心管中，加入适量的 RPMI1640 培养基（含 10% 胎牛血清），1 000 r/min 条件下离心 8 min。弃去上清，加入适量培养基，轻轻吹打使细胞重悬，并小心接种于培养皿中，置于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱培养，每天更换新鲜培养液，隔天进行传代，当细胞传至第 10 代时，方可进行后续试验。

1.3 MTT 法检测雷公藤红素对胃癌 MFC 细胞增殖的影响

根据预实验结果在 96 孔板上分别设置雷公藤红素高、中、低剂量组、对照组和调零组，每组设置 3 个复孔，调零组只加入等量培养液，不加入细胞悬液，其余各组加入对数生长期的 MFC 细胞，并使其密度为 0.5×10^4 个/mL。各组在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h，然后对照组和调零组加入新鲜培养液，雷公藤红素低、中、高剂量组分别加入雷公藤红素，使其最终浓度分别为 5、10、20 mmol/L，继续于培养箱中培养 72 h。培养结束后，在避光的环境下每孔加入 20 μL MTT 溶液（5 mg/mL），于培养箱中避光孵育 4 h，然后轻柔地吸去上清液，每孔加入 150 μL DMSO，置于振荡器上震荡 5 min 至蓝紫色结晶完全溶解后于酶标仪 490 nm 处测定吸光度（A）值，并按照如下公式计算细胞抑制率。

$$\text{细胞抑制率} = 1 - (A_{\text{给药}} - A_{\text{调零}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{调零}})$$

1.4 流式细胞术检测雷公藤红素对胃癌 MFC 细胞周期的影响

使用 6 孔板分别设置对照组和雷公藤红素 5、10、20 mmol/L 组, 每组设置 3 个复孔。取对数生长期的 MFC 细胞悬液, 使其密度成 1×10^4 个/mL 接种于 6 孔板中, 然后将 6 孔细胞培养板置于细胞培养箱静置培养 12 h 左右。待细胞均贴壁以后, 吸出培养基, 再按照分组进行加药处理。将 6 孔细胞培养板放置细胞培养箱中, 继续培养 72 h。收集 MFC 细胞, 用 $1 \times \text{PBS}$ 洗 2 遍后去除 PBS, 加入预冷的 70% 乙醇固定, 过夜。次日取出, $2\,500 \text{ r/min}$ 离心 5 min, 4°C , 用移液枪吸除上清液, 涡旋震荡使 MFC 细胞松散。用 $1 \times \text{PBS}$ 洗涤 MFC 细胞两次。洗涤后, 加入已配好的碘化丙啶染色液, 37°C 染色 30 min 后, 进行细胞周期检测。

1.5 Annexin V-FITC/PI 双染法检测雷公藤红素对胃癌 MFC 细胞凋亡的影响

使用 6 孔板分别设置对照组和雷公藤红素 5、10、20 mmol/L 组, 每组设置 3 个复孔。取对数生长期的 MFC 细胞悬液, 使其密度成 1×10^4 个/mL 接种于 6 孔板中, 然后将 6 孔细胞培养板置于细胞培养箱静置培养 12 h 左右。待 MFC 细胞均贴壁以后, 吸出培养基, 再按照分组进行加药处理。将 6 孔细胞培养板放置细胞培养箱中, 继续培养 72 h。培养完成后, 使用 PBS 洗涤 MFC 细胞, 加入适量不含 EDTA 的胰酶消化收集 MFC 细胞并 $1\,000 \text{ r/min}$ 离心 5 min, 弃上清, 加入适量培养基重悬细胞后, $2\,000 \text{ r/min}$ 离心 5 min, 弃上清液, 加入 $300 \mu\text{L}$ $1 \times \text{binding buffer}$ 悬浮细胞后, 再加入 $5 \mu\text{L}$ Annexin V-FITC 混匀后, 避光, 室温孵育 15 min, 然后加入 $5 \mu\text{L}$ 碘化丙啶 (PI) 染色液, 轻轻混匀, 冰浴避光孵育 5 min, 最后加入 200 mL $1 \times \text{binding buffer}$, 立即用流式细胞仪检测。

1.6 Western blotting 法检测雷公藤红素对胃癌 MFC 细胞内凋亡相关蛋白的影响

将培养好的 MFC 细胞接种于 6 孔板, 调节细胞密度为 1×10^4 个/孔, 24 h 后吸去上清液, 对照组加入新鲜培养基, 雷公藤红素低、中、高剂量组加入雷公藤红素, 使其最终浓度分别成 5、10、20 mmol/L, 各组作用 72 h 后, 收集各组细胞, 分别加入裂解液提取总蛋白, 采用 BCA 法测定蛋白浓度, 处理好待测样品后, 取 $50 \mu\text{g}$ 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分离, 转膜, 将分离的蛋白电转移至 PVDF 膜

上。封闭液室温封闭 1 h, 经 Bax、Bcl-2、PI3K、Akt、mTOR 抗体 ($1:1\,000$) 孵育, 4°C 过夜。PBST 充分洗膜后, 加入二抗 ($1:2\,000$) 室温孵育 1 h, PBST 清洗后显色液显影, 利用凝胶成像仪成像后, 进行灰度值检测。

1.7 实时定量 PCR 法检测雷公藤红素对胃癌 MFC 细胞内 PI3K、AKT 和 mTOR RNA 表达的影响

采用 Promega 公司的 RNA 提取试剂盒分别提取雷公藤红素 5、10、20 mmol/L 作用 72 h 后的胃癌 MFC 细胞的总 RNA。将提取的总 RNA 逆转录成 cDNA 后, 荧光定量 PCR 检测 MFC 细胞中 β -actin、PI3K、AKT 和 mTOR mRNA 的表达水平。各检测基因的实时定量 PCR 引物见表 1, 实时定量 PCR 结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对表达量。

表 1 用于实时定量 PCR 检测的基因引物序列

Table 1 Sequence of gene primers for real-time quantitative PCR detection

基因	引物名称	引物序列
PI3K	正向引物	5'-CATCACTTCCTCCTGCTCTAT-3'
	反向引物	5'-CAGTTGTTGGCAATCTTCTTC-3'
AKT	正向引物	5'-GGACAACCGCCATCCAGACT-3'
	反向引物	5'-GCCAGGGACACCTCCATCTC-3'
mTOR	正向引物	5'-CGCTGTCATCCCTTTATCG-3'
	反向引物	5'-ATGCTCAAACACCTCCACC-3'
β -actin	正向引物	5'-CACTGTGTTGGCGTACAGGT-3'
	反向引物	5'-TCATCACCATTGGCAATGAG-3'

1.8 数据处理

应用统计学软件 SPSS 19.0 对数据进行分析及 Graphpad prism 5 进行作图, 应用 Image J 软件进行免疫印迹灰度值检测, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 雷公藤红素对胃癌 MFC 细胞的增殖抑制作用

与对照组相比, 雷公藤红素能够显著抑制 MFC 细胞的增殖 ($P < 0.05$), 且随着雷公藤红素剂量的增加, 雷公藤红素对 MFC 细胞的增殖抑制作用逐渐增强 ($P < 0.05$), 即表现出剂量相关性; 提示雷公藤红素能够呈剂量相关性地抑制胃癌 MFC 细胞的增殖。见表 2。

2.2 雷公藤红素对胃癌 MFC 细胞周期的影响

与对照组相比, 雷公藤红素 5、10、20 mmol/L 组 MFC 细胞均出现显著的 G_2/M 期阻滞现象 ($P <$

0.05), 且随着雷公藤红素剂量的增大, G_2/M 期的 MFC 细胞所占的比例也增加, 即 MFC 细胞 G_2/M 期阻滞加重; 提示雷公藤红素能够呈剂量相关性诱导胃癌 MFC 细胞 G_2/M 期阻滞, 干扰胃癌 MFC 细胞的细胞周期, 从而抑制胃癌 MFC 细胞的增殖, 见表 3、图 1。

2.3 雷公藤红素对胃癌 MFC 细胞凋亡的影响

与对照组相比, 雷公藤红素能够显著性促进 MFC 细胞的凋亡 ($P < 0.05$), 且随着雷公藤红素剂量的增大, MFC 细胞凋亡比例也不断增加 ($P < 0.05$); 这提示雷公藤红素能够呈剂量相关性诱导胃癌 MFC 细胞凋亡, 从而起到抗肿瘤作用, 见图 2 和表 4。

2.4 雷公藤红素对胃癌 MFC 细胞内 Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响

与对照组相比, 雷公藤红素作用于胃癌 MFC 细胞 72 h 后, 雷公藤红素 5、10、20 mmol/L 组胃癌 MFC 细胞内 Bax 蛋白表达水平显著增加 ($P < 0.05$), 且表现出剂量相关性, 然而, 雷公藤红素 5、10、20 mmol/L 组 MFC 细胞内 Bcl-2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 同样表现出剂量相关性; 提示雷公藤红素能够呈剂量相关性促进胃癌 MFC 细胞内 Bax 蛋白的表达, 同时呈剂量相关性抑制胃癌 MFC 细胞内 Bcl-2 蛋白的表达。见图 3 和表 5。

表 2 雷公藤红素对胃癌 MFC 细胞的增殖抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 2 Inhibitory effect of tripterine on the proliferation of MFC cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量/(mmol·L ⁻¹)	A 值	细胞抑制率/%
对照	—	0.97 ± 1.32	—
雷公藤红素	5	0.71 ± 0.98*	26.80 ± 0.80
	10	0.45 ± 1.18*#	53.61 ± 0.91#
	20	0.22 ± 1.28*#&	77.32 ± 1.25*#&

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与雷公藤红素 5 mmol·L⁻¹ 组比较: # $P < 0.05$;

与雷公藤红素 10 mmol·L⁻¹ 组比较: & $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs tripterine 5 mmol·L⁻¹ group;

& $P < 0.05$ vs tripterine 10 mmol·L⁻¹ group

表 3 雷公藤红素对胃癌 MFC 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 3 Effect of tripterine on cell cycle of MFC cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量/(mmol·L ⁻¹)	G_2/M /%
对照	—	18.11 ± 1.65
雷公藤红素	5	26.39 ± 1.81*
	10	30.71 ± 1.45*#
	20	36.79 ± 1.38*#&

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与雷公藤红素 5 mmol·L⁻¹ 组比较: # $P < 0.05$;

与雷公藤红素 10 mmol·L⁻¹ 组比较: & $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs tripterine 5 mmol·L⁻¹ group;

& $P < 0.05$ vs tripterine 10 mmol·L⁻¹ group

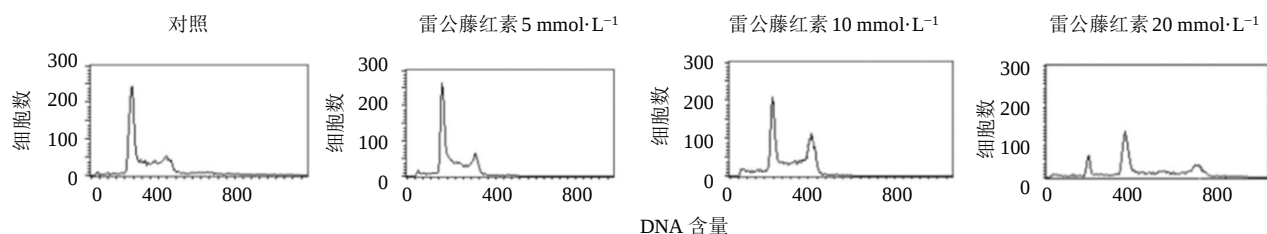


图 1 雷公藤红素对胃癌 MFC 细胞周期的影响

Fig. 1 Effect of tripterine on cell cycle of MFC cells

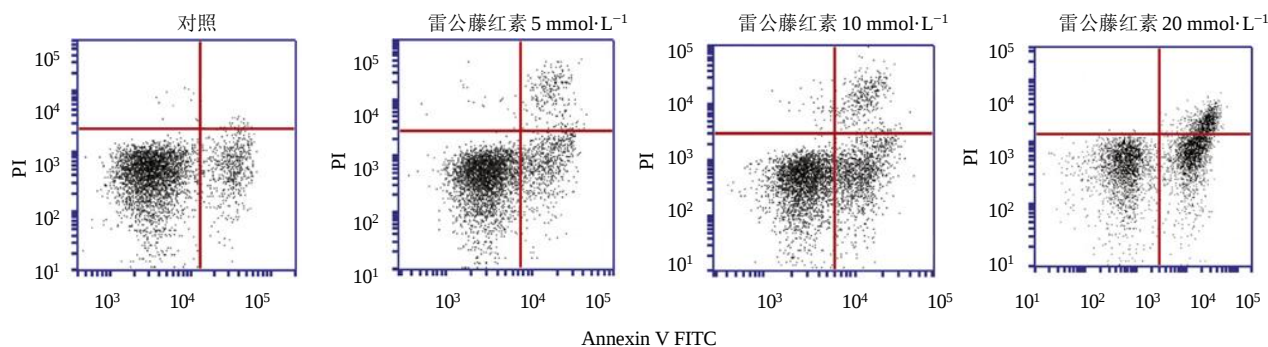


图 2 雷公藤红素对胃癌 MFC 细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effect of tripterine on apoptosis of MFC cells

表4 雷公藤红素对胃癌 MFC 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 4 Effect of tripterine on apoptosis of MFC cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/(mmol·L ⁻¹)	细胞凋亡比例/%
对照	—	7.43±1.51
雷公藤红素	5	19.87±1.58*
	10	38.41±0.75*#
	20	54.72±1.36*#&

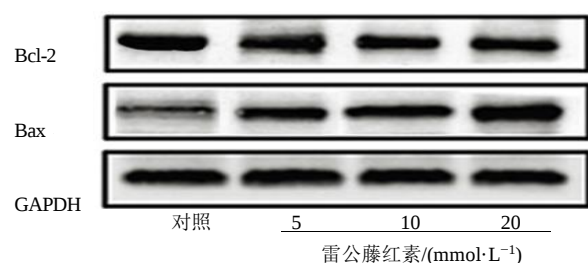
与对照组比较: * $P<0.05$; 与雷公藤红素 5 mmol·L⁻¹ 组比较: # $P<0.05$;与雷公藤红素 10 mmol·L⁻¹ 组比较: & $P<0.05$ * $P<0.05$ vs control group; # $P<0.05$ vs tripterine 5 mmol·L⁻¹ group;& $P<0.05$ vs tripterine 10 mmol·L⁻¹ group

图3 雷公藤红素对胃癌 MFC 细胞内 Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of tripterine on expression of Bax and Bcl-2 proteins in MFC cells

表5 雷公藤红素对胃癌 MFC 细胞内 Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 5 Effect of tripterine on expression of Bax and Bcl-2 proteins in MFC cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/(mmol·L ⁻¹)	Bcl-2/GAPDH	Bax/GAPDH
对照	—	1.16±0.13	0.28±0.04
雷公藤红素	5	0.94±0.08*	0.49±0.06*
	10	0.81±0.04*#	0.77±0.05*#
	20	0.67±0.07*#&	0.98±0.11*#&

与对照组比较: * $P<0.05$; 与雷公藤红素 5 mmol·L⁻¹ 组比较: # $P<0.05$;与雷公藤红素 10 mmol·L⁻¹ 组比较: & $P<0.05$ * $P<0.05$ vs control group; # $P<0.05$ vs tripterine 5 mmol·L⁻¹ group;& $P<0.05$ vs tripterine 10 mmol·L⁻¹ group表6 雷公藤红素对胃癌 MFC 细胞内 PI3K、AKT 和 mTOR 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 6 Effect of tripterine on expression of PI3K, AKT and mTOR proteins in MFC cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/(mmol·L ⁻¹)	PI3K/GAPDH	AKT/GAPDH	mTOR/GAPDH
对照	—	0.96±0.23	1.37±0.32	1.06±0.29
雷公藤红素	5	0.83±0.14*	0.93±0.27*	0.82±0.23*
	10	0.71±0.15*#	0.78±0.27*#	0.69±0.31*#
	20	0.52±0.17*#&	0.58±0.16*#&	0.56±0.18*#&

与对照组比较: * $P<0.05$; 与雷公藤红素 5 mmol·L⁻¹ 组比较: # $P<0.05$; 与雷公藤红素 10 mmol·L⁻¹ 组比较: & $P<0.05$ * $P<0.05$ vs control group; # $P<0.05$ vs tripterine 5 mmol·L⁻¹ group; & $P<0.05$ vs tripterine 10 mmol·L⁻¹ group

2.5 雷公藤红素对胃癌 MFC 细胞内 PI3K、AKT 和 mTOR 蛋白表达的影响

与对照组相比, 雷公藤红素能够显著抑制胃癌 MFC 细胞内 PI3K、AKT 及 mTOR 蛋白的表达 ($P<0.05$), 且随着雷公藤红素剂量的增加, MFC 细胞内 PI3K、AKT 和 mTOR 蛋白的表达量也逐渐降低 ($P<0.05$), 即表现出剂量相关性; 提示雷公藤红素能够呈剂量依赖性的显著抑制胃癌 MFC 细胞内 PI3K、AKT 和 mTOR 蛋白的表达, 从而抑制 MFC 细胞的增殖。见图 4、表 6。

2.6 雷公藤红素对胃癌 MFC 细胞内 PI3K、AKT 和 mTOR mRNA 表达的影响

与对照组相比, 雷公藤红素 5、10、20 mmol/L 组胃癌 MFC 细胞内 PI3K、AKT 和 mTOR mRNA 表达水平均显著下降 ($P<0.05$), 且随着雷公藤红素剂量的增加, PI3K、AKT 和 mTOR mRNA 表达水平也不断降低 ($P<0.05$); 提示雷公藤红素能够呈剂量相关性地显著抑制胃癌 MFC 细胞内 PI3K、AKT 和 mTOR mRNA 表达水平, 从而抑制胃癌 MFC 细胞 PI3K、AKT 和 mTOR 的表达, 雷公藤红素对胃癌 MFC 细胞内 PI3K、AKT 和 mTOR mRNA 表达的影响见表 7。

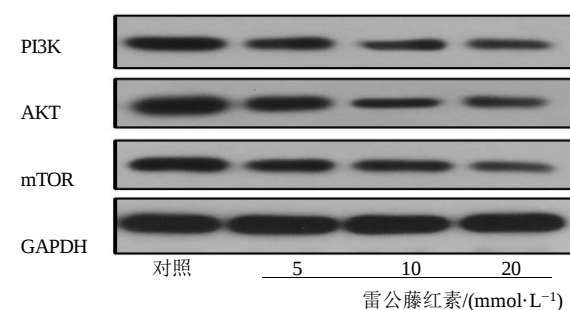


图4 雷公藤红素对胃癌 MFC 细胞内 PI3K、AKT 和 mTOR 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of tripterine on expression of PI3K, AKT and mTOR proteins in MFC cells

表7 雷公藤红素对胃癌 MFC 细胞内 PI3K、AKT 和 mTOR mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Table 7 Effect of tripterygium on expression of PI3K, AKT and mTOR mRNA in MFC cells in MFC cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量/(mmol·L ⁻¹)	PI3K mRNA	AKT mRNA	mTOR mRNA
对照	—	1.00	1.00	1.00
雷公藤红素	5	0.89 ± 0.16*	0.66 ± 0.15*	0.59 ± 0.13*
	10	0.54 ± 0.12**	0.46 ± 0.12**	0.38 ± 0.11**
	20	0.36 ± 0.09*#&	0.31 ± 0.04*#&	0.22 ± 0.05*#&

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与雷公藤红素 5 mmol·L⁻¹ 组比较: # $P < 0.05$; 与雷公藤红素 10 mmol·L⁻¹ 组比较: & $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs tripterygium 5 mmol·L⁻¹ group; & $P < 0.05$ vs tripterygium 10 mmol·L⁻¹ group

3 讨论

随着近年来胃癌的发生率不断升高,对于胃癌的治疗越来越受到人们的重视,目前临床上常用的治疗胃癌的药物大多存在消化道不良反应及引起肝肾功能异常等副作用,这不仅可能加剧胃癌患者疾病的进一步进展,还严重影响患者的生存质量,而且,这些药物还可能存在无效的现象。据报道,胃癌的发生与地理位置、饮食、幽门螺杆菌感染、胃酸分泌减少及遗传因素有关。因此,胃癌被认为是一种高度异质性的疾病。近年来,已发现多种蛋白表达异常参与胃癌的发生和发展,包括 p53、EGFR、PTEN 和 PI3K/AKT/mTOR 等^[5-8, 11]。

PI3K/AKT/mTOR 通路是由调节细胞生长、细胞存活、细胞周期进程、蛋白质翻译和代谢等多种生理功能的多种细胞刺激激活的。PI3K 是一种胞内磷脂酰肌醇激酶^[12-17],其本身具有丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)激酶的活性,可以和蛋白激酶 B (PKB, Akt) 的 N 端 PH 结构域结合。使 Akt 从细胞质转移到细胞膜上,促进 Akt 蛋白上的苏氨酸磷酸化位点(Thr308)和丝氨酸磷酸化位点(Ser473)磷酸化而使其激活。激活后的 Akt 通过直接和间接两种途径激活其底物雷帕霉素靶体蛋白(mTOR):直接磷酸化 mTOR,或通过失活结节性硬化复合物 2(TSC2)从而维持 Rheb 的 GTP 结合态,然后增强 mTOR 的激活。研究证实肿瘤抑制基因通过实现 PI3K/Akt 信号通路的负性调节,从而起到抑制细胞增殖和促进细胞凋亡的作用。Bax 是细胞中促凋亡基因,而 Bcl-2 是细胞中抑制凋亡的基因,有研究表明,PI3K/AKT/mTOR 通路的异常激活能够促进 Bcl-2 的表达,抑制 Bax 的表达,促进细胞增殖;而抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路则可以促进 Bax 的表达,抑制 Bcl-2 的表达,促进细胞凋亡^[12-15]。所以,调节 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白的表达,能

够调节细胞内相关凋亡信号的表达,进而发挥抗肿瘤作用。

雷公藤红素又名南蛇藤素,是从雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f.、南蛇藤 *Celastrus orbiculatus* Thunb.等卫矛科植物提取的具有醌甲基结构五环三萜类单体化合物,是治疗类风湿病药物雷公藤片、雷公藤多苷片等制剂的主要有效成分之一。雷公藤红素在前列腺癌、肝癌、肺癌、白血病、胶质瘤、结肠癌、卵巢癌、乳腺癌等肿瘤细胞中均有抗肿瘤作用。研究表明雷公藤红素可抑制血管内皮生长因子 VEGF 和 JNK 等信号通路而起到对抗胃癌、结肠癌的作用,而雷公藤红素对胃癌细胞中 PI3K/AKT/mTOR 通路作用目前尚无明确报道^[6-8]。

本文主要研究了雷公藤红素 5、10、20 mmol/L 对 MFC 细胞的增殖抑制作用及促凋亡作用,结果表明雷公藤红素能够呈剂量相关性地显著抑制胃癌 MFC 细胞的增殖;同时,雷公藤红素能够呈剂量相关性地显著抑制 MFC 细胞内 PI3K、AKT 和 mTOR mRNA 的表达水平,并能够呈剂量相关性地显著抑制 MFC 细胞内 PI3K、AKT 和 mTOR 蛋白的表达,这表明雷公藤红素抑制胃癌 MFC 细胞增殖的作用机制可能是通过抑制 MFC 细胞内 PI3K/AKT/mTOR 信号通路中 PI3K、AKT 和 mTOR 蛋白的表达,从而抑制了该通路下游相关靶点蛋白的激活,也阻断了该通路上游蛋白信号的传导,从而发挥其抗肿瘤活性细胞周期检测结果表明,雷公藤红素能够呈剂量相关性地显著引起 MFC 细胞 G₂/M 期阻滞;细胞凋亡检测结果表明,雷公藤红素能够呈剂量相关性地显著诱导 MFC 细胞的凋亡,同时雷公藤红素能够呈剂量依赖性的显著促进 MFC 细胞内促凋亡蛋白 Bax 的表达,同时抑制 MFC 细胞内抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,这表明雷公藤红素对胃癌 MFC 细胞的促凋亡的机制可能是通过抑制细胞内 PI3K/AKT/

mTOR 信号通路的激活,进而促进胃癌 MFC 细胞内促凋亡蛋白 Bax 蛋白的表达,同时抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白的表达

综上所述,雷公藤红素能够抑制胃癌 MFC 细胞的增殖并促进胃癌 MFC 细胞凋亡,其作用机制可能是通过抑制胃癌 MFC 细胞内 PI3K/AKT/mTOR 信号通路中 PI3K、AKT、mTOR 等蛋白的表达而抑制胃癌 MFC 细胞的增殖,进而促进胃癌 MFC 细胞内促凋亡蛋白 Bax 的表达,同时抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,从而促进胃癌 MFC 细胞凋亡。

参考文献

- [1] 郭继尧,杜奕奇,李兆申. 根除幽门螺杆菌是降低胃癌发病率的必由之路 [J]. 中国实用内科杂志, 2019, 39(6): 506-510.
- [2] 刘天艺,焦宇飞. 胃黏膜活检标本中上皮内瘤变及早期癌的病理诊断 [J]. 中华病理学杂志, 2014, 43(9): 644-646.
- [3] 程向东. 术前新辅助治疗在进展期胃癌中的研究进展 [J]. 中国肿瘤, 2017, 26(7): 544-549.
- [4] 邢 龙,布仁巴图. 晚期胃癌的化疗进展 [J]. 中国社区医师, 2016, 32(6): 14-16.
- [5] Yang X F, Li Y X, He Y H, *et al.* Cordycepin alleviates airway hyperreactivity in a murine model of asthma by attenuating the inflammatory process [J]. *Int. Immunopharmacol*, 2015, 26(2): 401-408.
- [6] Chaicharoenaudomrung N, Jaroonwitchawan T, Noisa P. Cordycepin induces apoptotic cell death of human brain cancer through the modulation of autophagy [J]. *Toxicol In Vitro*, 2018, 46: 113-121.
- [7] Chen J, Yuan J R, Zhou L Q, *et al.* Regulation of different components from *Ophiopogon japonicus* on autophagy in human lung adenocarcinoma A549 cells through PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 87: 118-126.
- [8] 王宇锋,陈 超,杨 春,等. 6-姜烯酚诱导人结直肠癌细胞凋亡及与 Bax、BCL2、Caspase3 和 PARP1 基因表达的影响 [J]. 现代食品科技, 2017, 33(11): 7-15.
- [9] 陈 颖,毕芳芳,杨 清. PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制剂在卵巢癌治疗中的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(5): 1273-1277.
- [10] 张 献,冯 欣. PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制剂在宫颈癌治疗中的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(5): 1278-1284.
- [11] Gao R L, Chen X R, Li Y N, *et al.* Berberine hydrochloride inhibits bladder cancer cell T24 invasion through inhibiting the expression of MMP2 and MMP9 via P13K/AKT signaling pathway [J]. *J Jinan Univ*, 2015, 36(6): 472-476.
- [12] Kim S J, Lee H W, Baek J H, *et al.* Activation of nuclear PTEN by inhibition of Notch signaling induces G2/M cell cycle arrest in gastric cancer [J]. *Oncogene*, 2016, 35(2): 251-260.
- [13] Sun L C, Zheng J F, Wang Q Q, *et al.* NHERF1 regulates actin cytoskeleton organization through modulation of alpha-actinin-4 stability [J]. *FASEB J*, 2016, 30(2): 578-589.
- [14] Tao T, Yang X, Zheng J, *et al.* PDZK1 inhibits the development and progression of renal cell carcinoma by suppression of SHP-1 phosphorylation [J]. *Oncogene*, 2017, 36(44): 6119-6131.
- [15] Hu M J, Luo Q, Alitongbieke G, *et al.* Celastrol-induced Nur77 interaction with TRAF2 alleviates inflammation by promoting mitochondrial ubiquitination and autophagy [J]. *Mol Cell*, 2017, 66(1): 141-153.
- [16] Liu J L, Lee J, Hernandez M A S. *et al.* Treatment of obesity with celastrol [J]. *Cell*, 2015, 161: 999-1011.
- [17] Kashyap D, Sharma A, Tuli H S, *et al.* Molecular targets of celastrol in cancer: recent trends and advancements [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2018, 128: 70-81.