

## 虎杖苷调节 Akt/mTOR 信号通路对胰腺癌细胞凋亡和自噬的影响

王文真, 郑欣雨, 谢晨晨, 夏兴洲, 刘 谦

郑州大学第五附属医院 消化内科, 河南 郑州 450000

**摘要:** **目的** 探讨虎杖苷调节蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (Akt/mTOR) 通路对胰腺癌细胞凋亡和自噬的影响。**方法** 将人胰腺癌 PANC-1 细胞分为对照组、虎杖苷 (100、200、300  $\mu\text{mol/L}$ ) 组、SC79 组、虎杖苷+SC79 组。CCK-8 法检测细胞活力; 流式细胞术检测细胞凋亡; 单丹磺酰尸胺 (MDC) 染色检测细胞中自噬小体阳性率; 免疫荧光染色检测细胞中微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3) 阳性率; qRT-PCR 检测细胞中 Bcl-2 关联 X 蛋白 (*Bax*)、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3 (*Caspase-3*)、*Beclin1*、*p62* mRNA 表达; Western blotting 检测细胞中 LC3、*Beclin1*、*p62*、p-Akt、p-mTOR 蛋白相对表达量。**结果** 与对照组比较, 虎杖苷各剂量组 PANC-1 细胞活力、p62 蛋白和 mRNA 相对表达水平、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 显著降低, 细胞凋亡率、自噬小体阳性率、LC3 阳性率、*Bax*、*Caspase-3*、*Beclin1* mRNA 表达及 LC3-II/LC3-I、*Beclin1* 蛋白相对表达量显著升高, 且呈剂量相关性 ( $P < 0.05$ )。与虎杖苷 300  $\mu\text{mol/L}$  组比较, 虎杖苷+SC79 组 PANC-1 细胞活力、p62 蛋白和 mRNA 相对表达水平、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 显著升高, 细胞凋亡率、自噬小体阳性率、LC3 阳性率、*Bax*、*Caspase-3*、*Beclin1* mRNA 表达及 LC3-II/LC3-I、*Beclin1* 蛋白相对表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ )。**结论** 虎杖苷诱导 PANC-1 细胞自噬与凋亡的机制可能与抑制 Akt/mTOR 通路有关。

**关键词:** 虎杖苷; 胰腺癌; 自噬; 凋亡; 蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2025)01-0023-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.01.004

## Effects of polydatin on apoptosis and autophagy of pancreatic cancer cells by regulating Akt/mTOR signaling pathway

WANG Wenzhen, ZHENG Xinyu, XIE Chenchen, XIA Xingzhou, LIU Qian

Department of Gastroenterology, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China

**Abstract: Objective** To investigate the effects of polydatin on apoptosis and autophagy of pancreatic cancer cells by regulating Akt/mTOR pathway. **Methods** Human pancreatic cancer PANC-1 cells were separated into control group, polydatin (100, 200, 300  $\mu\text{mol/L}$ ) group, SC79 group, polydatin + SC79 group. CCK-8 method was applied to detect cell viability. Flow cytometry was applied to detect cell apoptosis. Monodansylcadaverine (MDC) staining was applied to detect the positive rate of autophagosomes in cells. Immunofluorescence staining was applied to detect the positive rate of microtubule associated protein 1 light chain 3 (LC3) in cells. qRT-PCR was applied to detect the mRNA expression of *Bax*, *Caspase-3*, *Beclin1*, and *p62* in cells. Western blotting was applied to detect LC3, *Beclin1*, *p62*, p-Akt, and p-mTOR proteins in cells. **Results** Compared with the control group, the PANC-1 cell viability, *p62* mRNA expression, and relative expression level of p62 protein, p-Akt/Akt, p-mTOR/mTOR were lower in polydatin groups, the apoptosis rate, autophagosome positivity rate, LC3 positive rate, *Bax*, *Caspase-3*, *Beclin1* mRNA expression, and LC3-II/LC3-I, the relative expression level of *Beclin1* protein were higher in a dose-dependent manner ( $P < 0.05$ ). Compared with polydatin 300  $\mu\text{mol/L}$  group, the PANC-1 cell viability, *p62* mRNA expression, and relative expression level of p62 protein, p-Akt/Akt, p-mTOR/mTOR in the polydatin + SC79 group were higher, the apoptosis rate, autophagosome positivity rate, LC3 positive rate, *Bax*, *Caspase-3*, and *Beclin1* mRNA expression, and LC3-II/LC3-I, the relative expression level of *Beclin1* protein were lower ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The mechanism by which polydatin induces autophagy and apoptosis in PANC-1 cells may be related to the inhibition of the Akt/mTOR pathway.

**Key words:** polydatin; pancreatic cancer; autophagy; apoptosis; protein kinase B/mammalian target of rapamycin pathway

收稿日期: 2024-10-18

基金项目: 河南省科技攻关项目 (222102310725)

作者简介: 王文真, 女, 主治医师, 硕士, 主要研究方向为消化道肿瘤诊疗与基础研究。E-mail: W1899Z@126.com

胰腺癌是一种高度侵袭性的消化道恶性肿瘤，发病率低但死亡率高，5 年生存率仅为 8%<sup>[1]</sup>。虽然手术切除仍是胰腺癌的主要治疗策略，但大多数患者因诊断时已为晚期而失去手术切除的机会<sup>[2]</sup>。除胰腺切除术外，FOLFIRINOX、厄洛替尼、奥拉帕尼和拉罗替尼等药物也用于治疗胰腺癌，但是，上述药物均存在着许多不良反应<sup>[3-4]</sup>。近年来，中药因其疗效显著、不良反应小、性价比高、来源广泛等优点，逐渐成为癌症研究和治疗的热点<sup>[5]</sup>。虎杖苷是主要存在于多年生草本植物虎杖和葡萄的根中的天然化合物，可影响细胞的凋亡和自噬行为<sup>[6-7]</sup>。据报道，虎杖苷可诱导多发性骨髓瘤细胞凋亡和自噬<sup>[8]</sup>。相关研究显示，蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(Akt/mTOR)通路的抑制可诱导胃癌细胞的凋亡和自噬行为<sup>[9]</sup>；且目前已有虎杖苷抑制 Akt/mTOR 通路诱导鼻咽癌细胞凋亡的研究<sup>[10]</sup>。基于此，本实验主要探究虎杖苷对胰腺癌细胞凋亡和自噬的影响及机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞** 人胰腺癌细胞 PANC-1 细胞购自上海慧颖生物科技有限公司。

**1.1.2 试剂** 虎杖苷(质量分数 99.57%，货号 HY-N0120A)、Akt 激活剂 SC79(美国 MCE 公司，批号 HY-18749)；CCK-8 试剂盒(广州研创生物技术发展有限公司，批号 20231001)；Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒(上海泽叶生物科技有限公司批号，20231121)；细胞自噬检测试剂盒-单丹磺酰尸胺(MDC)法(江苏凯基生物技术股份有限公司，批号 KGA2402)；兔源一抗微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)、Beclin1、自噬相关蛋白 p62、p-Akt、p-mTOR、β-肌动蛋白(β-actin)、Akt、mTOR(英国 Abcam 公司，批号 ab192890、ab302669、ab109012、ab38449、ab109268、ab8226、ab8805、ab134903)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞分组及给药** PANC-1 细胞分为对照组、虎杖苷(100、200、300 μmol/L)组、SC79 组、虎杖苷+SC79 组。对照组 PANC-1 细胞不做任何处理；虎杖苷各剂量组分别用 100、200、300 μmol/L 虎杖苷处理细胞 24 h<sup>[11]</sup>；SC79 组用 5 mg/L SC79 处理细胞 24 h<sup>[12]</sup>；虎杖苷+SC79 组用 300 μmol/L 虎杖苷和 5 mg/L SC79 处理细胞 24 h。处理结束后，开始指标检测。

**1.2.2 细胞活力的检测** PANC-1 细胞以  $5 \times 10^4$  个/孔接种于 96 孔板中，按照 1.2.1 项下各组进行对应处理后，向各孔中加入 10 μL CCK-8 溶液，37 °C 下孵育 1 h。利用酶标仪测量 450 nm 处吸光度(A)，并计算细胞活力。

$$\text{细胞活力} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

**1.2.3 细胞凋亡的检测** 用预冷磷酸盐缓冲盐水冲洗各组 PANC-1 细胞，将细胞重悬于 100 μL 结合缓冲液中，再向细胞悬液中加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL 碘化丙啶。黑暗条件下孵育 15 min 后，每个样品加入 400 μL 结合缓冲液。使用流式细胞仪评估细胞凋亡率。

**1.2.4 自噬小体阳性率的检测** 各组 PANC-1 细胞( $5 \times 10^4$  个/mL)接种于 96 孔板中，向各孔加 0.05 mmol/L MDC 染液并孵育 1 h，荧光显微镜观察自噬小体形成，并计算细胞中自噬小体阳性率。

**1.2.5 细胞中 LC3 表达的免疫荧光染色** 各组 PANC-1 细胞置于含有圆形玻片的 24 孔板中，对 PANC-1 细胞进行固定、洗涤、封闭处理后，向细胞中加一抗 LC3(1:3 000)孵育 2 h，再用荧光二抗(1:3 000)孵育细胞 1 h，洗涤、封片后，观察并评估 LC3 阳性率。

**1.2.6 PANC-1 细胞中 Bcl-2 关联 X 蛋白(Bax)、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)、Beclin1、p62 mRNA 表达的检测** 使用 Trizol 试剂提取 PANC-1 细胞总 RNA。将 1 μg RNA 逆转录为 cDNA 后，以 cDNA 为模板在实时 PCR 系统中使用 SYBR Green Master Mix 进行 qPCR 检测。β-actin 为内参，通过  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法测定 Bax、Caspase-3、Beclin1、p62 mRNA 表达。引物序列为 Bax 正向：5'-CTCAAGCGCATCGGGGACGA-3'；反向：5'-CAGCTGACATGTTTTCTGAC-3'；Caspase-3 正向：5'-GCTGTTATGTAACAGCCTCA-3'；反向：5'-AGGAGAGATGAAATCTACTG-3'；Beclin1 正向：5'-CCAGTTTAACTCTGAGGAGC-3'；反向：5'-CCTCACAATTTTATAACAAA-3'；p62 正向：5'-AAGCAGCTGCTGCTCTGACC-3'；反向：5'-GGGCGCCCTGAGGAACAGAT-3'；β-actin 正向：5'-AGATGGCCACCGCTGCCAGC-3'；反向：5'-GCTGCCCGAGGCCCTGTTC-3'。

**1.2.7 PANC-1 细胞中 LC3、Beclin1、p62、p-Akt、p-mTOR 蛋白检测** RIPA 缓冲液裂解 PANC-1 细胞 20 min 后，离心收集细胞上清液即为 PANC-1 细胞总蛋白，BCA 法定量蛋白浓度后，将 30 μg 蛋白质

进行电泳分离并转移到 PVDF 膜上。5%脱脂牛奶在摇床上阻断膜 1 h 后,在 4 ℃下将膜与一抗 LC3 (1:3 000)、Beclin1 (1:1 000)、p62 (1:5 000)、p-Akt (1:6 000)、p-mTOR (1:5 000)、β-actin (1:2 000)、Akt (1:3 000)、mTOR (1:4 000) 在室温下孵育 1 h。使用 ECL 试剂可视化蛋白质条带,Image-Pro Plus 软件进行灰度值分析,以 LC3-II 与 LC3-I 比值作为 LC3 蛋白的相对表达水平,Beclin1、p62 分别除以 β-actin 灰度值作为 Beclin1、p62 蛋白相对表达水平;p-Akt/Akt 值、p-mTOR/mTOR 值分别作为 p-Akt、p-mTOR 蛋白相对表达水平。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行分析,并以  $\bar{x} \pm s$  表示。单因素方差分析及 SNK-*q* 事后检验用于多组间比较。

2 结果

2.1 虎杖苷对 PANC-1 细胞活力的影响

与对照组比较,虎杖苷各剂量组细胞活力显著降低,且呈剂量相关性,SC79 组细胞活力显著升高 ( $P<0.05$ );与虎杖苷 300 μmol/L 组比较,虎杖苷+SC79 组细胞活力显著升高 ( $P<0.05$ ),见表 1。

表 1 各组 PANC-1 细胞活力比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
Table 1 Comparison of PANC-1 cell activity in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

| 组别       | 剂量                                             | 细胞活力/%        |
|----------|------------------------------------------------|---------------|
| 对照       | —                                              | 99.41±0.35    |
| 虎杖苷      | 100 μmol·L <sup>-1</sup>                       | 87.96±3.64*   |
|          | 200 μmol·L <sup>-1</sup>                       | 72.26±3.17*#  |
|          | 300 μmol·L <sup>-1</sup>                       | 50.08±2.13*#& |
| SC79     | 5 mg·L <sup>-1</sup>                           | 115.56±3.69*  |
| 虎杖苷+SC79 | 300 μmol·L <sup>-1</sup> +5 mg·L <sup>-1</sup> | 76.69±3.58△   |

与对照组比较: \* $P<0.05$ ;与虎杖苷 100 μmol·L<sup>-1</sup> 组比较: # $P<0.05$ ;与虎杖苷 200 μmol·L<sup>-1</sup> 组比较: & $P<0.05$ ;与虎杖苷 300 μmol·L<sup>-1</sup> 组比较: △ $P<0.05$ 。  
\* $P<0.05$  vs control group; # $P<0.05$  vs polydatin 100 μmol·L<sup>-1</sup> group; & $P<0.05$  vs polydatin 200 μmol·L<sup>-1</sup> group; △ $P<0.05$  vs polydatin 300 μmol·L<sup>-1</sup> group.

2.2 虎杖苷对 PANC-1 细胞凋亡的影响

与对照组比较,虎杖苷各剂量组细胞凋亡率显著升高,且呈剂量相关性,SC79 组细胞凋亡率降低 ( $P<0.05$ );与虎杖苷 300 μmol/L 组比较,虎杖苷+SC79 组细胞凋亡率显著降低 ( $P<0.05$ ),见图 1 和表 2。

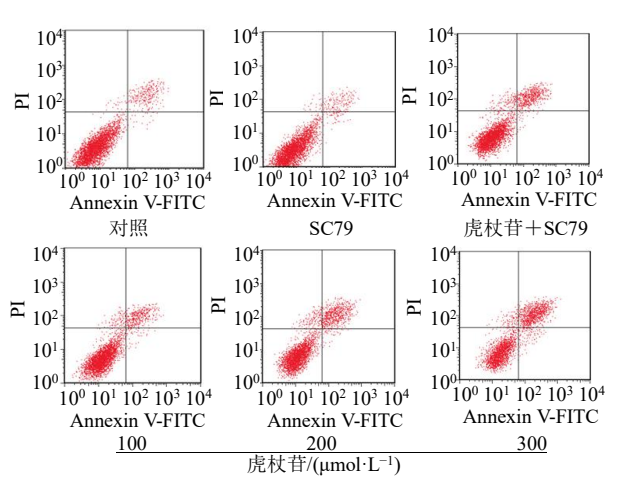


图 1 PANC-1 细胞凋亡的流式细胞术检测  
Fig. 1 Flow cytometry of PANC-1 cell apoptosis

表 2 各组 PANC-1 细胞凋亡率比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
Table 2 Comparison of apoptosis rate of PANC-1 cells in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

| 组别       | 剂量                                             | 细胞凋亡率/%       |
|----------|------------------------------------------------|---------------|
| 对照       | —                                              | 5.67±0.23     |
| 虎杖苷      | 100 μmol·L <sup>-1</sup>                       | 14.29±0.69*   |
|          | 200 μmol·L <sup>-1</sup>                       | 27.65±1.38*#  |
|          | 300 μmol·L <sup>-1</sup>                       | 49.66±2.46*#& |
| SC79     | 5 mg·L <sup>-1</sup>                           | 2.11±0.15*    |
| 虎杖苷+SC79 | 300 μmol·L <sup>-1</sup> +5 mg·L <sup>-1</sup> | 20.76±0.98△   |

与对照组比较: \* $P<0.05$ ;与虎杖苷 100 μmol·L<sup>-1</sup> 组比较: # $P<0.05$ ;与虎杖苷 200 μmol·L<sup>-1</sup> 组比较: & $P<0.05$ ;与虎杖苷 300 μmol·L<sup>-1</sup> 组比较: △ $P<0.05$ 。  
\* $P<0.05$  vs control group; # $P<0.05$  vs polydatin 100 μmol·L<sup>-1</sup> group; & $P<0.05$  vs polydatin 200 μmol·L<sup>-1</sup> group; △ $P<0.05$  vs polydatin 300 μmol·L<sup>-1</sup> group.

2.3 虎杖苷对 PANC-1 细胞中自噬小体阳性率的影响

与对照组比较,虎杖苷各剂量组细胞中自噬小体阳性率显著升高,且呈剂量相关性,SC79 组细胞中自噬小体阳性率显著降低 ( $P<0.05$ );与虎杖苷 300 μmol/L 组比较,虎杖苷+SC79 组细胞中自噬小体阳性率降低 ( $P<0.05$ ),见图 2、表 3。

2.4 虎杖苷对 PANC-1 细胞中 LC3 表达的影响

与对照组比较,虎杖苷各剂量组细胞中 LC3 阳性率显著升高,且呈剂量相关性,SC79 组细胞中 LC3 阳性率显著降低 ( $P<0.05$ );与虎杖苷 300 μmol/L 组比较,虎杖苷高剂量+SC79 组细胞中 LC3 阳性率显著降低 ( $P<0.05$ ),见图 3、表 4。

2.5 虎杖苷对 PANC-1 细胞中 Bax、Caspase-3、Beclin1、p62 mRNA 表达的影响

与对照组比较,虎杖苷各剂量组细胞中 Bax、

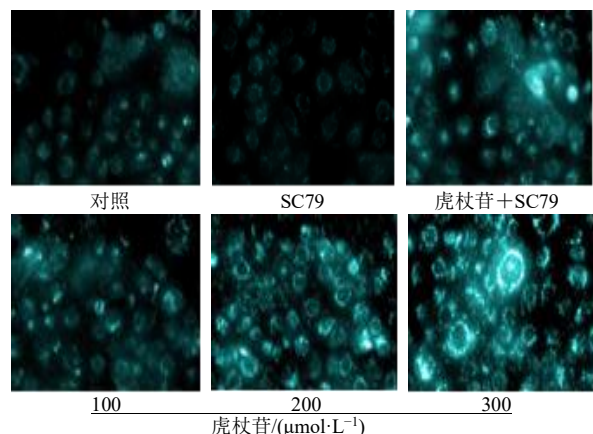


图 2 PANC-1 细胞中自噬小体形成的 MDC 染色 (×200)  
Fig. 2 MDC staining of autophagosome formation in PANC-1 cells (×200)

表 3 各组 PANC-1 细胞中自噬小体阳性率比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Table 3 Comparison of the positive rate of autophagosomes in PANC-1 cells in each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

| 组别       | 剂量                                             | 自噬小体阳性率/%     |
|----------|------------------------------------------------|---------------|
| 对照       | —                                              | 12.68±0.54    |
| 虎杖苷      | 100 μmol·L <sup>-1</sup>                       | 19.77±0.83*   |
|          | 200 μmol·L <sup>-1</sup>                       | 30.43±1.46*#  |
|          | 300 μmol·L <sup>-1</sup>                       | 47.76±2.23*#& |
| SC79     | 5 mg·L <sup>-1</sup>                           | 5.18±0.23*    |
| 虎杖苷+SC79 | 300 μmol·L <sup>-1</sup> +5 mg·L <sup>-1</sup> | 25.59±1.16△   |

与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与虎杖苷 100 μmol·L<sup>-1</sup> 组比较: # $P < 0.05$ ; 与虎杖苷 200 μmol·L<sup>-1</sup> 组比较: & $P < 0.05$ ; 与虎杖苷 300 μmol·L<sup>-1</sup> 组比较: △ $P < 0.05$ 。

\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs polydatin 100 μmol·L<sup>-1</sup> group;

& $P < 0.05$  vs polydatin 200 μmol·L<sup>-1</sup> group; △ $P < 0.05$  vs polydatin 300 μmol·L<sup>-1</sup> group.

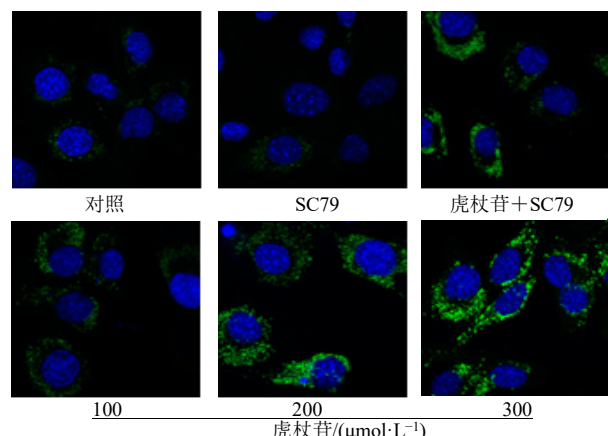


图 3 PANC-1 细胞中 LC3 表达的免疫荧光染色 (×400)  
Fig. 3 Immunofluorescence staining of LC3 expression in PANC-1 cells (×400)

表 4 各组 PANC-1 细胞中 LC3 阳性率比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Table 4 Comparison of the positive rate of LC3 in PANC-1 cells in each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

| 组别       | 剂量                                             | LC3 阳性率/%     |
|----------|------------------------------------------------|---------------|
| 对照       | —                                              | 15.77±0.69    |
| 虎杖苷      | 100 μmol·L <sup>-1</sup>                       | 22.34±1.15*   |
|          | 200 μmol·L <sup>-1</sup>                       | 31.69±1.49*#  |
|          | 300 μmol·L <sup>-1</sup>                       | 45.56±2.08*#& |
| SC79     | 5 mg·L <sup>-1</sup>                           | 6.22±0.31*    |
| 虎杖苷+SC79 | 300 μmol·L <sup>-1</sup> +5 mg·L <sup>-1</sup> | 28.73±1.34△   |

与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与虎杖苷 100 μmol·L<sup>-1</sup> 组比较: # $P < 0.05$ ; 与虎杖苷 200 μmol·L<sup>-1</sup> 组比较: & $P < 0.05$ ; 与虎杖苷 300 μmol·L<sup>-1</sup> 组比较: △ $P < 0.05$ 。

\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs polydatin 100 μmol·L<sup>-1</sup> group;

& $P < 0.05$  vs polydatin 200 μmol·L<sup>-1</sup> group; △ $P < 0.05$  vs polydatin 300 μmol·L<sup>-1</sup> group.

Caspase-3、Beclin1 mRNA 表达显著升高, p62 mRNA 表达降低, 且呈剂量相关性, SC79 组细胞中 Bax、Caspase-3、Beclin1 mRNA 表达显著降低, p62 mRNA 表达升高 ( $P < 0.05$ )。与虎杖苷 300 μmol/L 组比较, 虎杖苷+SC79 组细胞中 Bax、Caspase-3、Beclin1 mRNA 表达显著降低, p62 mRNA 表达升高 ( $P < 0.05$ ), 见表 5。

## 2.6 虎杖苷对 PANC-1 细胞中 LC3、Beclin1、p62 蛋白及 Akt/mTOR 通路蛋白表达的影响

与对照组比较, 虎杖苷各剂量组细胞中 p62、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 蛋白相对表达量显著降低, LC3-II/LC3-I、Beclin1 蛋白相对表达量显著升高, 且呈剂量相关性, SC79 组细胞中 p62、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 蛋白相对表达量显著升高, LC3-II/LC3-I、Beclin1 蛋白相对表达量降低 ( $P < 0.05$ ); 与虎杖苷 300 μmol/L 组比较, 虎杖苷+SC79 组细胞中 p62、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 蛋白相对表达量显著升高, LC3-II/LC3-I、Beclin1 蛋白相对表达量显著降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 4 和表 6。

## 3 讨论

胰腺癌是一种侵袭性恶性肿瘤, 治疗选择很少, 迫切需要改进治疗策略<sup>[13]</sup>。虎杖苷是一种属于二苯乙烯家族的化合物, 具有广泛的生物活性, 包括抗氧化、抗炎、抗癌、保肝、神经保护等<sup>[14-16]</sup>。已有研究报道, 虎杖苷可诱导结肠癌细胞凋亡、人骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡和自噬<sup>[17-18]</sup>。以上研究表明虎杖苷可通过诱导细胞凋亡和自噬发挥抗癌作用。Bax、Caspase-3 是量化细胞凋亡的标志分子, 上调其表达可加剧细胞凋亡行为<sup>[19]</sup>。本研究中各剂量虎

表 5 各组 PANC-1 细胞中 *Bax*、*Caspase-3*、*Beclin1*、*p62* mRNA 表达比较 (  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$  )

Table 5 Comparison of mRNA expression of *Bax*, *Caspase-3*, *Beclin1* and *p62* in PANC-1 cells of each group (  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$  )

| 组别       | 剂量                                             | mRNA 相对表达量             |                        |                        |                        |
|----------|------------------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|          |                                                | <i>Bax</i>             | <i>Caspase-3</i>       | <i>Beclin1</i>         | <i>p62</i>             |
| 对照       | —                                              | 1.00±0.00              | 1.00±0.00              | 1.00±0.00              | 1.00±0.00              |
| 虎杖苷      | 100 μmol·L <sup>-1</sup>                       | 1.31±0.10*             | 1.28±0.11*             | 1.41±0.12*             | 0.86±0.06*             |
|          | 200 μmol·L <sup>-1</sup>                       | 1.68±0.12*#            | 1.56±0.13*#            | 1.79±0.15*#            | 0.65±0.05*#            |
|          | 300 μmol·L <sup>-1</sup>                       | 2.05±0.14*#&           | 1.98±0.14*#&           | 2.39±0.18*#&           | 0.31±0.03*#&           |
| SC79     | 5 mg·L <sup>-1</sup>                           | 0.78±0.07*             | 0.63±0.05*             | 0.34±0.03*             | 1.46±0.12*             |
| 虎杖苷+SC79 | 300 μmol·L <sup>-1</sup> +5 mg·L <sup>-1</sup> | 1.46±0.14 <sup>△</sup> | 1.33±0.12 <sup>△</sup> | 1.68±0.13 <sup>△</sup> | 0.70±0.06 <sup>△</sup> |

与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与虎杖苷 100 μmol·L<sup>-1</sup> 组比较: # $P < 0.05$ ; 与虎杖苷 200 μmol·L<sup>-1</sup> 组比较: & $P < 0.05$ ; 与虎杖苷 300 μmol·L<sup>-1</sup> 组比较: <sup>△</sup> $P < 0.05$ 。

\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs polydatin 100 μmol·L<sup>-1</sup> group; & $P < 0.05$  vs polydatin 200 μmol·L<sup>-1</sup> group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  vs polydatin 300 μmol·L<sup>-1</sup> group.

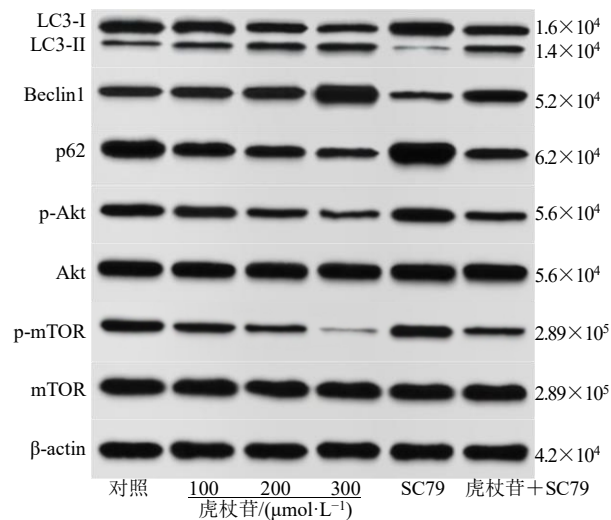


图 4 PANC-1 细胞中 LC3、Beclin1、p62、p-Akt、p-mTOR 蛋白检测

Fig. 4 Detection of LC3, Beclin1, p62, p-Akt and p-mTOR proteins in PANC-1 cells

杖苷均可抑制人胰腺癌 PANC-1 细胞活力, 诱导细胞凋亡, 上调 *Bax*、*Caspase-3* mRNA 表达, 且呈剂量相关性, 表明虎杖苷可诱导 PANC-1 细胞凋亡。越来越多的研究表明, 细胞凋亡和自噬高度相关, 它们在肿瘤的治疗过程中起着关键的作用<sup>[20]</sup>。自噬是整个进化过程中一种高度保守的代谢机制, 内源性和外源性刺激都可以诱导自噬, 以维持内部环境的稳定性<sup>[21]</sup>。自噬可发生在细胞凋亡之前, 持续自噬可诱导细胞死亡, 增加细胞凋亡<sup>[5]</sup>。LC3、Beclin1、p62 是最常研究的自噬标志物, LC3 是自噬体膜的一个组分, 其较高的表达水平可能反映自噬体数量增加<sup>[22]</sup>; p62 在自噬体形成过程中直接接触 LC3, 并通过自噬降解, 使得 p62 水平与自噬激活呈负相关<sup>[23]</sup>; Beclin1 作为自噬刺激因子, 可增强自噬通量并激活自噬<sup>[24]</sup>。本研究中, 与对照组比较, 虎杖苷各剂量组 PANC-1 细胞中自噬小体阳性率、LC3 阳性率、*Beclin1* mRNA 表达及 LC3-II/LC3-I、Beclin1

表 6 各组 PANC-1 细胞中 LC3、Beclin1、p62、p-Akt、p-mTOR 蛋白比较 (  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$  )

Table 6 Comparison of LC3, Beclin1, p62, p-Akt and p-mTOR proteins in PANC-1 cells of each group (  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$  )

| 组别       | 剂量                                             | 蛋白相对表达量                |                        |                        |                        |                        |
|----------|------------------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|          |                                                | LC3-II/LC3-I           | Beclin1/β-actin        | p62/β-actin            | p-Akt/Akt              | p-mTOR/mTOR            |
| 对照       | —                                              | 0.26±0.02              | 0.69±0.06              | 1.23±0.12              | 0.80±0.08              | 0.65±0.06              |
| 虎杖苷      | 100 μmol·L <sup>-1</sup>                       | 0.37±0.03*             | 0.78±0.07*             | 1.00±0.09*             | 0.69±0.06*             | 0.51±0.04*             |
|          | 200 μmol·L <sup>-1</sup>                       | 0.53±0.05*#            | 0.92±0.08*#            | 0.81±0.08*#            | 0.52±0.05*#            | 0.33±0.03*#            |
|          | 300 μmol·L <sup>-1</sup>                       | 0.91±0.08*#&           | 1.46±0.14*#&           | 0.45±0.04*#&           | 0.34±0.03*#&           | 0.12±0.01*#&           |
| SC79     | 5 mg·L <sup>-1</sup>                           | 0.11±0.01*             | 0.30±0.03*             | 1.71±0.15*             | 0.92±0.07*             | 0.79±0.07*             |
| 虎杖苷+SC79 | 300 μmol·L <sup>-1</sup> +5 mg·L <sup>-1</sup> | 0.50±0.05 <sup>△</sup> | 0.88±0.07 <sup>△</sup> | 0.76±0.07 <sup>△</sup> | 0.58±0.05 <sup>△</sup> | 0.36±0.03 <sup>△</sup> |

与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与虎杖苷 100 μmol·L<sup>-1</sup> 组比较: # $P < 0.05$ ; 与虎杖苷 200 μmol·L<sup>-1</sup> 组比较: & $P < 0.05$ ; 与虎杖苷 300 μmol·L<sup>-1</sup> 组比较: <sup>△</sup> $P < 0.05$ 。

\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs polydatin 100 μmol·L<sup>-1</sup> group; & $P < 0.05$  vs polydatin 200 μmol·L<sup>-1</sup> group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  vs polydatin 300 μmol·L<sup>-1</sup> group.



蛋白相对表达量显著升高, *p62* mRNA 及蛋白相对表达量显著降低, 且呈剂量相关性, 证明了虎杖苷可诱导 PANC-1 细胞自噬。因此, 诱导细胞凋亡与自噬可能是治疗胰腺癌的有效策略之一。

Akt/mTOR 通路是自噬关键上游负调控因子, 该通路激活可抑制自噬并导致肿瘤恶性进展<sup>[25]</sup>。据报道, 抑制 Akt/mTOR 通路可以触发胰腺癌细胞凋亡<sup>[26]</sup>; 下调 Akt/mTOR 通路可诱导胰腺癌细胞凋亡与自噬<sup>[27]</sup>。本研究结果与其基本一致, 与对照组比较, SC79 组 PANC-1 细胞中 p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 显著升高, 细胞自噬与凋亡被抑制, 且 SC79 为 Akt 激活剂, 表明 Akt/mTOR 通路参与了 PANC-1 细胞自噬与凋亡过程。SC79 组细胞活力高于对照组, 表明 Akt/mTOR 通路的激活进一步引发了 PANC-1 细胞恶性增殖过程, 这与上述细胞凋亡受到抑制的结果是相吻合的。此外, 各剂量虎杖苷均可抑制 PANC-1 细胞中 p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR, 且呈剂量相关性, 推测虎杖苷诱导 PANC-1 细胞自噬与凋亡的机制可能与抑制 Akt/mTOR 通路有关。为了验证上述推测, 本实验用 SC79 进行了回复实验, 结果显示, SC79 减弱了虎杖苷对 PANC-1 细胞自噬与凋亡的促进作用。

综上所述, 虎杖苷诱导 PANC-1 细胞自噬与凋亡的机制可能与抑制 Akt/mTOR 通路有关, 该研究为胰腺癌的治疗提供依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Wagle N S, *et al.* Cancer statistics, 2023 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2023, 73(1): 17-48.
- [2] Wen C M, Ruan Q Q, Li Z F, *et al.* Corynoxine suppresses pancreatic cancer growth primarily via ROS-p38 mediated cytostatic effects [J]. *Br J Cancer*, 2022, 127(12): 2108-2117.
- [3] Kim A, Ha J, Kim J, *et al.* Natural products for pancreatic cancer treatment: From traditional medicine to modern drug discovery [J]. *Nutrients*, 2021, 13(11): 3801.
- [4] Das R, Agrawal S, Kumar P, *et al.* Network pharmacology of apigenin/flavan: A novel bioactive compound of *Trema orientalis* Linn. in the treatment of pancreatic cancer through bioinformatics approaches [J]. *3 Biotech*, 2023, 13(5): 160.
- [5] An W X, Zhang Y X, Lai H L, *et al.* *Alpinia katsumadai* Hayata induces growth inhibition and autophagy-related apoptosis by regulating the AMPK and Akt/mTOR/p70S6K signaling pathways in cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2022, 48(2): 142.
- [6] Ma C, Wen B, Zhang Q, *et al.* Polydatin regulates the apoptosis and autophagy of fibroblasts obtained from patients with ankylosing spondylitis [J]. *Biol Pharm Bull*, 2019, 42(1): 50-56.
- [7] 梁春晓, 王珊珊, 陈淑静, 等. 虎杖化学成分及药理活性研究进展 [J]. *中草药*, 2022, 53(4): 1264-1276.
- [8] Yang B J, Zhao S X. Polydatin regulates proliferation, apoptosis and autophagy in multiple myeloma cells through mTOR/p70s6k pathway [J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 10: 935-944.
- [9] He P Z, He Y, Ma J J, *et al.* Thymoquinone induces apoptosis and protective autophagy in gastric cancer cells by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Phytother Res*, 2023, 37(8): 3467-3480.
- [10] 钟华林, 李玲波, 覃焕桦, 等. 基于 PI3K/AKT/mTOR 信号通路探讨虎杖苷诱导鼻咽癌细胞凋亡的初步研究 [J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2019, 26(10): 536-540.
- [11] Bae H, Lee W, Song J, *et al.* Polydatin counteracts 5-fluorouracil resistance by enhancing apoptosis via calcium Influx in colon cancer [J]. *Antioxidants*, 2021, 10(9): 1477.
- [12] 王瑞娟, 李超, 段丽娟, 等. 氯普噻吨调节 Akt/mTOR 通路对人急性髓系白血病细胞自噬和凋亡的影响 [J]. *实用医学杂志*, 2023, 39(20): 2584-2590.
- [13] Hara K, Horikoshi Y, Morimoto M, *et al.* TYRO3 promotes chemoresistance via increased LC3 expression in pancreatic cancer [J]. *Transl Oncol*, 2023, 28: 101608.
- [14] Shah M A, Hamid A, Faheem H I, *et al.* Uncovering the anticancer potential of polydatin: A mechanistic insight [J]. *Molecules*, 2022, 27(21): 7175.
- [15] Jeandet P, Vannozzi A, Sobarzo-Sánchez E, *et al.* Phytostilbenes as agrochemicals: Biosynthesis, bioactivity, metabolic engineering and biotechnology [J]. *Nat Prod Rep*, 2021, 38(7): 1282-1329.
- [16] Jeandet P, Sobarzo-Sánchez E, Uddin M S, *et al.* Resveratrol and cyclodextrins, an easy alliance: Applications in nanomedicine, green chemistry and biotechnology [J]. *Biotechnol Adv*, 2021, 53: 107844.
- [17] De Gregorio A, Krasnowska E K, Zonfrillo M, *et al.* Influence of polydatin on the tumor microenvironment *in vitro*: Studies with a colon cancer cell model [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(15): 8442.
- [18] Jiang C Q, Ma L L, Lv Z D, *et al.* Polydatin induces apoptosis and autophagy via STAT3 signaling in human osteosarcoma MG-63 cells [J]. *J Nat Med*, 2020, 74(3): 533-544.

- [19] Babakanrad E, Mohammadian T, Esmaceli D, *et al.* Studying the effect of gene fusion of A and C types capsular synthesizing enzymes and anticancer sequence on inducing the expression of apoptotic BCL-2, BAX, and Caspase-3 genes by Real-time RT-PCR method [J]. *Heliyon*, 2023, 9(5): e16326.
- [20] Alizadeh J, da Silva Rosa S C, Weng X H, *et al.* Ceramides and ceramide synthases in cancer: Focus on apoptosis and autophagy [J]. *Eur J Cell Biol*, 2023, 102(3): 151337.
- [21] Li J, Zhan H X, Ren Y D, *et al.* Sirtuin 4 activates autophagy and inhibits tumorigenesis by upregulating the p53 signaling pathway [J]. *Cell Death Differ*, 2023, 30(2): 313-326.
- [22] Jovanović L, Nikolić A, Dragičević S, *et al.* Prognostic relevance of autophagy-related markers p62, LC3, and Beclin1 in ovarian cancer [J]. *Croat Med J*, 2022, 63(5): 453-460.
- [23] Adelipour M, Naghashpour M, Roshanazadeh M R, *et al.* Evaluation of Beclin1 and mTOR genes and p62 protein expression in breast tumor tissues of Iranian patients [J]. *Mol Biol Res Commun*, 2024, 13(1): 11-19.
- [24] Hu N, Tian Y H, Song Y M, *et al.* The inhibition of Beclin1-dependent autophagy sensitizes PTC cells to ABT737-induced death [J]. *Genet Mol Biol*, 2024, 47(1): e20220170.
- [25] Zhang M J, Wang J L, Guo Y, *et al.* Activation of PI3K/AKT/mTOR signaling axis by UBE2S inhibits autophagy leading to cisplatin resistance in ovarian cancer [J]. *J Ovarian Res*, 2023, 16(1): 240.
- [26] Lin M M, Xiao Y Y, Dai Y L, *et al.* Chloroxine inhibits pancreatic cancer progression through targeted antagonization of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Clin Transl Oncol*, 2024, 26(4): 951-965.
- [27] Qian X, Bi Q Y, Wang Z N, *et al.* Qingyihuaji Formula promotes apoptosis and autophagy through inhibition of MAPK/ERK and PI3K/Akt/mTOR signaling pathway on pancreatic cancer *in vivo* and *in vitro* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 307: 116198.

[责任编辑 高源]