

小檗胺对肺腺癌 A549 细胞凋亡的影响及其机制研究

程汝滨, 杨波, 钟晓明, 黄真*

浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053

摘要: 目的 研究小檗胺体外对人肺腺癌 A549 细胞凋亡及 TNF- α -JNK 信号通路的影响。方法 MTT 比色法检测小檗胺对 A549 细胞增殖的影响; 显微镜观察 A549 细胞形态变化; Annexin V/PI 双标法检测细胞的凋亡率; Western blotting 法检测细胞凋亡标记蛋白 Bcl-x、Caspase-3 和 PARP 表达的变化, c-jun 氨基末端激酶 (JNK) 的蛋白表达及其磷酸化表达水平; 荧光定量 PCR 和 ELISA 检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 表达的变化; 通过 JNK 通路抑制剂进一步验证 TNF- α -JNK 信号通路在小檗胺药效中的作用。结果 小檗胺能够显著抑制 A549 细胞增殖, 并呈浓度相关性, 小檗胺给药后 24 h 的 IC₅₀ 值为 9.01 μ mol/L; 经小檗胺处理后, A549 细胞可见典型的凋亡形态学改变, Annexin V/PI 双标法检测结果也显示小檗胺可诱导 A549 细胞凋亡, 小檗胺 10 μ mol/L 组细胞早期凋亡率为 13.8%, 为对照组的 6.6 倍; 小檗胺可显著降低抗凋亡蛋白 Bcl-x 的表达, 明显增强促凋亡蛋白 Caspase-3 和 PARP 的活性, 显著提高 TNF- α 基因和蛋白表达及 JNK 蛋白的磷酸化表达水平, 激活 TNF- α -JNK 通路。结论 小檗胺能抑制 A549 细胞的增殖, 诱导其凋亡, 其作用机制可能与 TNF- α -JNK 信号通路的激活有关。

关键词: 小檗胺; 人肺腺癌 A549 细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡; TNF- α -JNK 通路

中图分类号: R282.710.5; R979.19 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)14-1967-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.14.019

Effect of berbamine on apoptosis in human pulmonary carcinoma cell A549 and its mechanism

CHENG Ru-bin, YANG Bo, ZHONG Xiao-ming, HUANG Zhen

College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective To investigate the effect of berbamine (BBM) on the induction of apoptosis in human lung cancer cell A549 cells and the activity of TNF- α -JNK signaling pathway. **Methods** After the A549 cells being treated with BBM at different concentration, the inhibitory effect of BBM on proliferation was detected by MTT assay. Cell morphological changes were detected by light microscope. Alteration of apoptosis rate of A549 cells was determined by Annexin V/PI double staining. Western blotting was used to detect the activity of apoptosis-related proteins, including Bcl-x, Caspase-3, and PARP. The expressions of c-jun N-terminal kinase (JNK) and p-JNK were determined by Western blotting. Changes of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) were detected by fluorescent quantitative PCR and ELISA, respectively. Finally, the impacts of BBM on the proliferation and apoptosis of A549 cells were detected in the absence or presence of a JNK inhibitor. **Results** BBM significantly inhibited the growth of A549 cells in a dose-dependent manner. The IC₅₀ of 24 h was 9.01 μ mol/L. Cells treated with BBM showed the typically morphological characteristics of apoptotic cells. Annexin V/PI double staining test indicated that BBM could induce the apoptosis of A549 cells in a dose-dependent manner. The early apoptotic population of cells treated with 10 μ mol/L BBM was 13.8%, which was 5.6 times higher than that of the control. BBM decreased the expression of anti-apoptotic protein Bcl-x and increased the activity of proapoptotic proteins of caspase-3 and PARP. The mRNA and the protein expression levels of TNF- α were significantly increased by BBM treatment. The p-JNK expression was also dramatically up-regulated after BBM treatment. The effects of BBM on the proliferation and apoptosis in A549 cells were significantly reduced when JNK pathway was blocked. **Conclusion** BBM could inhibit the growth and induce the apoptosis of A549 cells, and its mechanism may be related to the activated TNF- α -JNK signaling pathway.

Key words: berbamine; human pulmonary carcinoma cell A549; cell proliferation; apoptosis; TNF- α -JNK pathway

收稿日期: 2012-09-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81202820); 浙江省自然科学基金资助项目 (LQ12H28005); 浙江省中医药管理局项目 (2012ZQ006); 浙江省教育厅科研项目 (Y201223804); 浙江省 2012 年第一批省级重点科技创新团队项目 (2010R50044-12); 浙江中医药大学人才专项项目 (2012ZR05)

作者简介: 程汝滨 (1982—), 男, 山东滨州人, 助理研究员, 主要从事中药抗肿瘤药理学研究。Tel: (0571)86633015 E-mail: taocheng82@163.com

*通信作者 黄真 Tel: (0571)86633088 E-mail: biothcheng@hotmail.com

小檗属 *Berberis* L. 植物具有泻火解毒、清热燥湿的功效。小檗胺 (berbamine, BBM) 是从小檗属植物中提取的双苜基异喹啉生物碱, 是一种新型钙调蛋白拮抗剂。药理学研究表明小檗胺具有抗氧化、免疫抑制、升高白细胞等多种作用, 还可以调节细胞内游离钙浓度, 下调多药耐药基因表达以逆转多药耐药和抑制多种肿瘤细胞增殖^[1-5], 体外对多种实体瘤, 如宫颈癌、黑色素瘤及 HL-60、K562、Jurkat、NB4 等白血病细胞具有显著抑制作用^[2-3]。但小檗胺对肺腺癌的作用及其机制的研究鲜见报道, 因此本实验采用肺腺癌细胞 A549, 探讨小檗胺对 A549 细胞凋亡的影响及其可能的作用机制, 为其开发成为一种新型的抗肺腺癌药物的提供实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

小檗胺, 中国药品生物制品检定所, 质量分数为 98%, 批号 38642-49-8, 用二甲基亚砜 (DMSO) 配制成 40 mmol/L 工作母液, 保存于 -20 °C 备用, 使用前以 RPMI-1640 培养液调至所需浓度。RPMI-1640 培养基、0.25% 胰蛋白酶, 杭州科易生物技术有限公司; 胎牛血清, Hyclone 公司; 细胞培养皿、96 孔板、24 孔板, Nunc 公司; 四甲基偶氮唑蓝 (MTT), Sigma 公司; DMSO, 无锡海硕生物有限公司; Annexin V/PI 双染试剂盒, BD 生物公司; 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 酶联免疫检测试剂盒, R&D 公司; 总 RNA 抽提试剂 (RNAiso Reagent)、荧光定量 PCR 试剂 (SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II), TaKaRa 公司; JNK 通路抑制剂 Sp600125、RIPA 裂解液, 碧云天生物技术研究所; Bcl-x (#1018-1) 一抗, Epitomics 公司; c-jun 氨基末端激酶 (JNK) 一抗 (#3708)、磷酸化 JNK (p-JNK) 一抗 (#4668)、cleaved Caspase 3 一抗 (#9664)、cleaved PARP 一抗 (#5625)、 β -actin 一抗 (#4970), Cell Signaling 公司; HRP 标记山羊抗小鼠二抗 IgG。

1.2 细胞系

人肺腺癌 A549 细胞株购自中国科学院上海细胞生物学研究所。

1.3 仪器

Thermo Varioskan Flash 型多功能酶标仪、Thermo MicroCL 17R 型离心机, 美国 Thermo 公司; 日本 Olympus IX71 型倒置显微镜; 超净工作台, 上海上净净化设备有限公司; FACSCanto II 流式细胞仪美国 BD 公司; ABI Prism 7900 型荧光定量 PCR

仪, 美国 ABI 公司。

2 方法

2.1 细胞培养

A549 细胞株置于含 10% 胎牛血清和双抗 (青霉素 100 μ g/L、链霉素 100 μ g/L) 的 RPMI-1640 培养液中, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 细胞呈贴壁生长, 每周传代 2 次, 隔天换液 1 次, 实验用细胞均为对数生长期细胞。

2.2 MTT 检测 A549 细胞增殖和 JNK 通路的作用

实验设对照组、顺铂阳性对照组和小檗胺不同浓度组。A549 细胞常规培养后选取对数生长期细胞, 以 5×10^3 接种于 96 孔板, 细胞贴壁后分别加入不同浓度的小檗胺 (0、2.5、5、10、20、40 μ mol/L), 或顺铂 (10 μ g/mL), 每组 3 个复孔。继续培养 24 h 后, 向每孔中加入 5 g/L 的 MTT 20 μ L, 继续培养 4 h, 800 r/min 离心 5 min, 弃上清, 向每孔中加入 DMSO 150 μ L, 37 °C 震荡 15 min, 直至紫褐色沉淀完全溶解。用酶标仪测定每孔在 490 nm 波长处的吸光度 (A) 值, 以 $A_{\text{给药}}/A_{\text{对照}}$ 表示细胞相对活力。

在 JNK 通路阻断实验中, A549 细胞用 20 μ mol/L 的 JNK 通路阻滞剂 Sp600125 预处理细胞 1 h, 然后加入不同浓度的小檗胺, 给药后具体操作步骤同上, 检测 JNK 通路对小檗胺药效的影响。

2.3 Annexin V/PI 双标法检测细胞凋亡

取对数生长期细胞, 调整细胞悬液密度至 5×10^5 /mL, 以 5 mL 接种于直径 60 mm 培养皿内, 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养 24 h, 对照组加入不含药物的新鲜培养液, 给药组分别加入含小檗胺的新鲜培养液 (小檗胺终浓度 5、10 μ mol/L), 继续培养 24 h, 离心收集各组细胞并用预冷的磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 1 次。按照试剂盒说明书, 用稀释的结合缓冲液重悬细胞, 调整细胞密度为 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ /mL, 取 100 μ L 细胞悬液于 5 mL 流式管中, 加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 10 mg/L 的碘化丙啶 (PI) 溶液 10 μ L, 混匀后室温避光孵育 15 min, 加入 400 μ L 稀释的结合缓冲液, 用流式细胞仪检测细胞凋亡百分率。同时取上述经过药物处理的 A549 细胞, 甲醇固定 20 min, 倒置显微镜下 ($\times 200$) 观察细胞数目及形态的变化。

2.4 Western blotting 法检测相关蛋白表达及磷酸化水平

A549 细胞分别用 0、5、10 μ mol/L 小檗胺干预 24 h, 离心收集细胞, 用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋

白, Western blotting 法检测 Bcl-x、JNK、p-JNK、cleaved Caspase-3、剪切多聚 ADP-核糖聚合酶 (cleaved PARP)、 β -actin 蛋白表达。蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 然后转印到 PVDF 膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液封闭 1 h, 一抗孵育过夜, 再用 TBST 漂洗 3 次, 加入辣根酶标记的二抗, 室温作用 2 h, 用显色剂 ECL 试剂盒显色^[6], 结果在 Bio-Rad 的化学发光成像仪上显影, 利用 Quantity One 软件分析各组的灰度值, 以 β -actin 为内参计算各蛋白的变化。

2.5 荧光定量 PCR 法检测 TNF- α mRNA 表达

细胞培养、分组与给药同“2.3”项。小檗胺给药后培养 24 h, 离心收集各组细胞于 1.5 mL 离心管中, 加入总 RNA 抽提试剂, 按照说明书提取总 RNA, 利用随机引物并按照标准程序进行反转录, 获得各组细胞的 cDNA 模板。定量 PCR 采用 SYBR Green I 荧光染料。TNF- α 和 GAPDH 的引物序列: TNF- α 正向引物 5'-GGCGTGGAGCTGAGAGATA-AC-3', 反向引物 5'-GGTGTGGGTGAGGAGCAC-AT-3'; GAPDH 正向引物 5'-GACCATCAAATCCC-ATCTTCCAGG-3', 反向引物 5'-GAGCCCCAGCC-TTCTCCATG-3'。25 μ L 反应体系包括: 2 \times SYBR Primer Ex Taq 12.5 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, cDNA 模板 2 μ L, 无菌水 8.5 μ L。反应条件: 预变性, 95 $^{\circ}$ C、2 min; 变性, 95 $^{\circ}$ C、15 s; 退火延伸, 60 $^{\circ}$ C、1 min; 40 个循环。以 GAPDH 基因为内参, 采用相对定量的方法检测 TNF- α 基因在各组细胞中的 mRNA 表达水平。

2.6 ELISA 法检测 TNF- α 表达

分组与给药同“2.3”项。小檗胺给药后细胞培养 24 h, 每组设 3 个复孔。取对数生长期细胞, 调整细胞悬液密度至 5×10^4 /mL, 按每孔 1 mL 接种于 24 孔平底培养板, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内培养 24 h, 对照组更换为只含 DMSO 的新鲜培养液, 小檗胺组更换为含相应浓度小檗胺的新鲜培养液, 继续培养 24 h, 收集各组细胞培养上清液, 4 $^{\circ}$ C 下 2 000 r/min 离心 15 min, 取上清在 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。ELISA 板条中除空白孔外, 以 100 μ L/孔分别加入内标和各组上清液, 胶纸封板后 37 $^{\circ}$ C 孵育 90 min, 弃上清液, 洗板 5 次, 每孔再加入生物素化抗体工作液 100 μ L, 胶纸封板后 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min, 弃上清液, 洗板 5 次, 每孔加入酶结合物工作液 100 μ L, 胶纸封板后 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 洗板 5 次, 每孔加

入显色剂 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 10 min, 最后每孔加入终止液 100 μ L, 混匀后立即用酶标仪测定 450 nm 处的 *A* 值。最后根据标准曲线求出细胞因子的终浓度。实验重复 3 次。

2.7 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 统计软件进行数据分析。两组间比较用 *t* 检验。

3 结果

3.1 对 A549 细胞增殖的影响

MTT 法检测结果显示, 小檗胺处理 A549 细胞 24 h 后, 细胞生长受到明显抑制, 与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$ 、0.01), 并呈浓度相关性, 浓度为 5~40 μ mol/L 时, A549 细胞生长抑制率为 32.6%~95%, IC₅₀ 值为 (9.01 \pm 0.41) μ mol/L, 表明小檗胺能够有效抑制肺腺癌细胞 A549 增殖。结果见图 1。

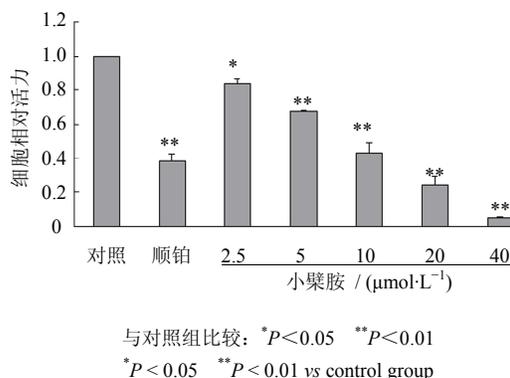


图 1 小檗胺对 A549 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

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

3.2 对 A549 细胞凋亡的影响

倒置显微镜观察可见, 小檗胺给药组 A549 细胞的密度显著减少, 形态发生改变, 且细胞碎片的数量增加, 呈现典型的细胞凋亡形态改变。结果见图 2。流式细胞仪计数细胞凋亡率, 结果表明对照组 A549 细胞的早期凋亡率仅为 1.8%, 而经小檗胺 5、10 μ mol/L 处理 24 h 后, 细胞早期凋亡率分别为 7.4%、13.8%, 分别提高了 3.1、6.6 倍, 表明小檗胺可以通过诱导 A549 细胞凋亡发挥抗肿瘤作用。结果见图 3。

3.3 对细胞凋亡标记蛋白表达的影响

小檗胺给药组 A549 细胞抗凋亡蛋白 Bcl-x 的表达水平显著降低, 促凋亡蛋白 Caspase-3 和 PARP 的表达显著上调, 且呈浓度相关性。结果见图 4。

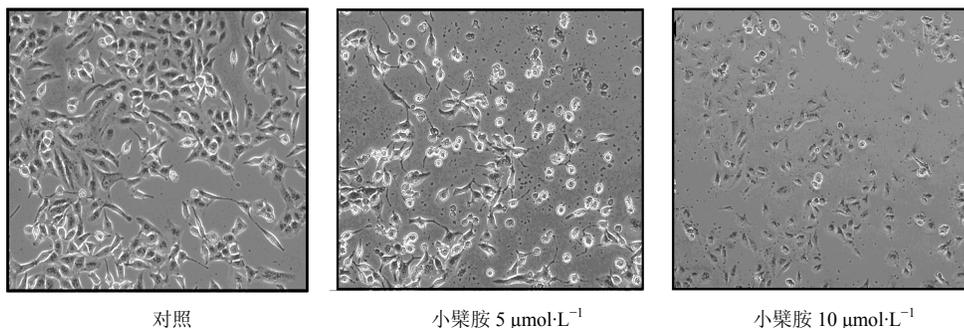
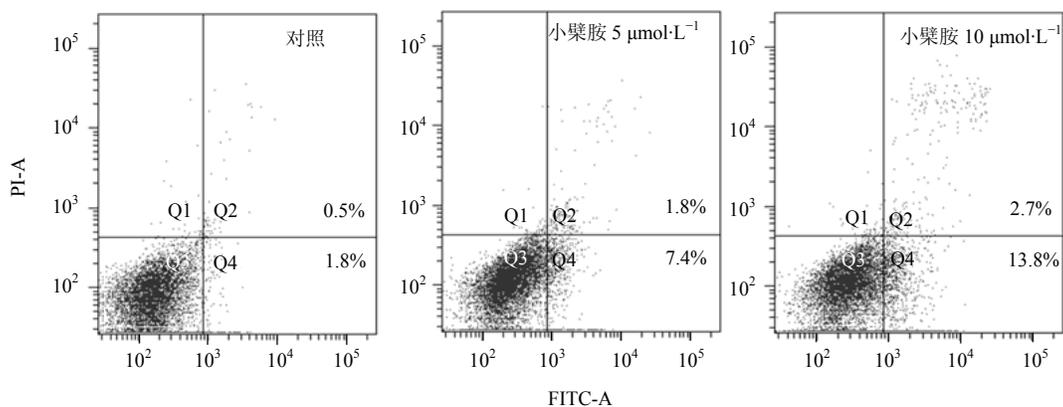


图 2 各组 A549 细胞形态学观察
Fig. 2 Morphological observation on A549 cells in each group



Q2-中晚期凋亡率 Q4-早期凋亡率
Q2-represents the late apoptotic rates Q4-represents the early apoptotic rates

图 3 小檗胺对 A549 细胞凋亡的影响 (n = 3)
Fig. 3 Effect of BBM on apoptosis of A549 cells (n = 3)

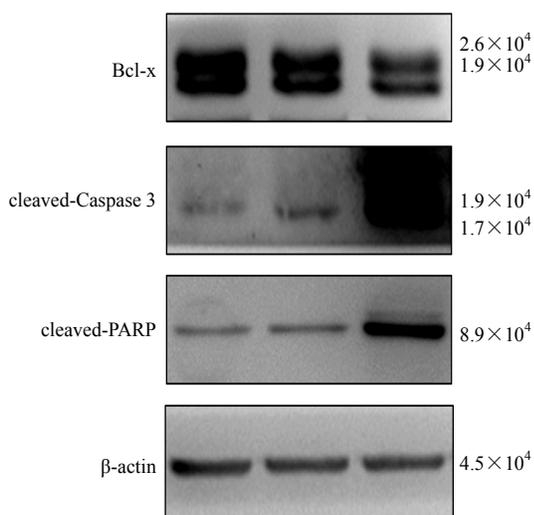


图 4 小檗胺对细胞凋亡标记蛋白表达的影响 (n = 3)
Fig. 4 Effect of BBM on expressions of apoptosis-marked proteins (n = 3)

Western blotting 半定量分析结果显示, 与对照组相比, 以小檗胺 10 μmol/L 处理 A549 细胞 24 h 后, Bcl-x 的表达水平下调 39%, 而 Caspase 3 和 PARP 的活性降解产物的表达分别上调 16.4、7.49 倍 (表 1), 该结果进一步表明小檗胺对 A549 细胞凋亡具诱导作用。

3.4 对 TNF-α-JNK 通路的影响

TNF-α-JNK 通路在肿瘤细胞凋亡的过程起重要作用^[7-10]。荧光定量 PCR 检测结果表明, 经小檗胺 5、10 μmol/L 处理的 A549 细胞中 TNF-α 基因表达水平比对照组分别上调 1.51、3.42 倍。ELISA 检测结果表明, 对照组细胞上清中 TNF-α 的量为 18 pg/mL, 而小檗胺 5、10 μmol/L 组中 TNF-α 量分别为 21.2、27.1 pg/mL, 比对照组分别提高了 17.8%、50.1%, 表明小檗胺诱导 A549 细胞凋亡可能是通过促进 TNF-α 的表达完成的。TNF-α 诱导肿瘤细胞调

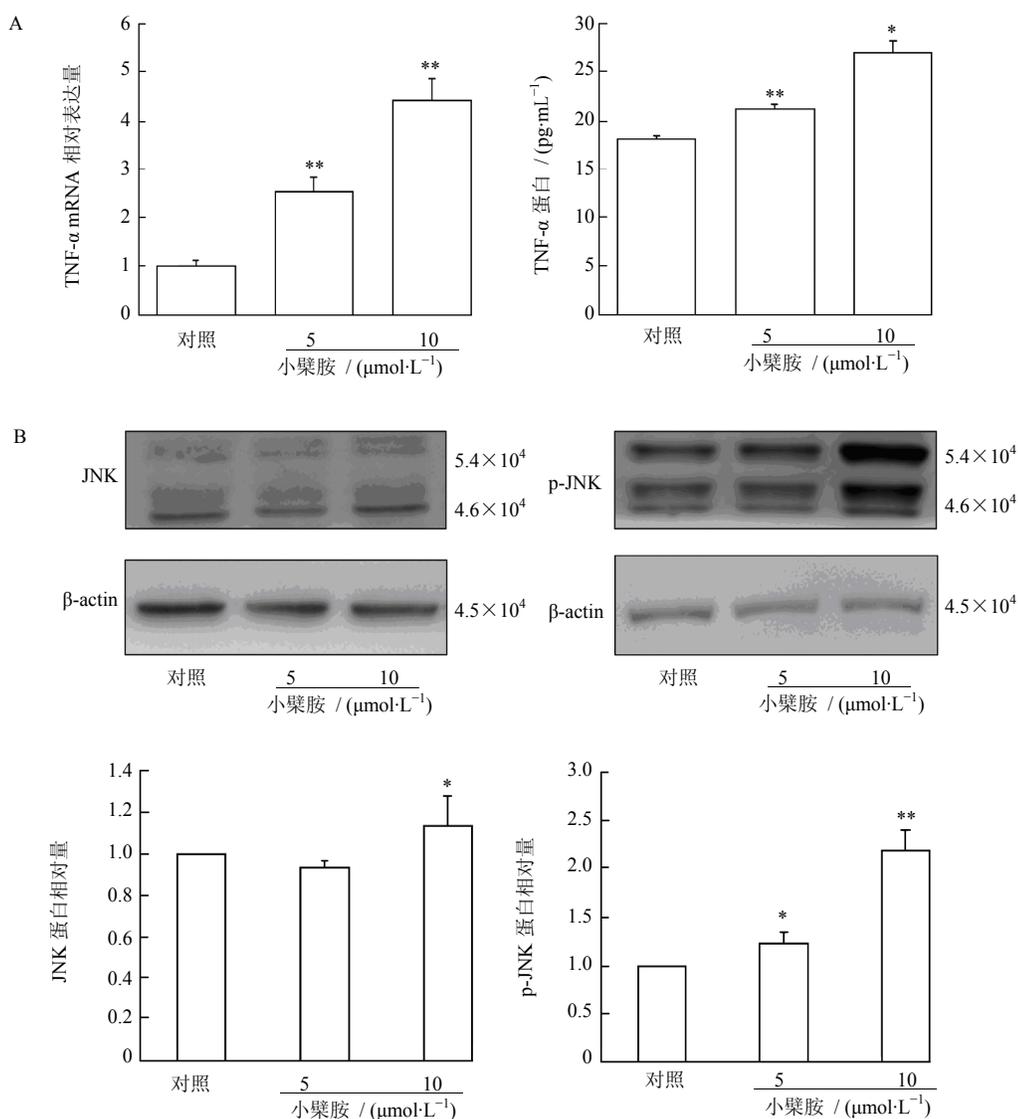
表1 各组细胞凋亡标记蛋白 Western blotting 半定量分析 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Semi-quantitative analysis on apoptosis-marked proteins in each group by Western blotting ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	C/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Bcl-x/ β -actin	cleaved-Caspase 3/ β -actin	cleaved-PARP/ β -actin
对照	—	1.0	1.0	1.0
小檗胺	5	0.81 \pm 0.18	2.51 \pm 0.24	1.41 \pm 0.19
	10	0.59 \pm 0.11	16.4 \pm 0.28	7.49 \pm 0.22

亡的过程中往往伴随 JNK 通路的激活^[11-12], 本实验结果表明小檗胺对 JNK 总蛋白的表达影响较小, 但可显著提高 JNK 蛋白的磷酸化水平, 经小檗胺 10 $\mu\text{mol/L}$ 处理 24 h 后, A549 细胞内 JNK 总蛋白表达提高约 13%, 而 JNK 蛋白磷酸化水平则提高 1.19 倍, 与对照组比较差异显著。结果见图 5。该结果表明小檗胺通过激活细胞内 TNF- α -JNK 信号通路的活性, 诱导 A549 细胞凋亡。

MTT 法检测结果显示, Sp600125 显著降低小檗胺对 A549 细胞生长的抑制率和细胞凋亡率,



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

图5 小檗胺对 TNF- α -JNK 通路 A549 细胞 TNF- α 基因和蛋白表达 (A)、JNK 蛋白表达和 p-JNK 蛋白磷酸化水平 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of BBM on expression of TNF- α and protein (A) and JNK and p-JNK (B) in TNF- α -JNK pathway ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Sp600125 组 A549 细胞生长抑制率和细胞早期凋亡率分别为 3.1%、1.1%，而 Sp600125 联合小檗胺 10 $\mu\text{mol/L}$ 组 A549 细胞生长抑制率由未给予 Sp600125 时的 56.7% 降至 34.3%，细胞早期凋亡率由未给予 Sp600125 时的 13.70% 降至 8.17% (表 2)，提示小檗胺通过 A549 细胞内 JNK 信号转导途径诱导细胞凋亡。

表 2 JNK 通路抑制剂对小檗胺作用的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	C / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	相对生长抑制率 / %	细胞早期凋亡率 / %
对照	—	—	1.83 \pm 0.21
Sp600125	20	3.1 \pm 0.21	1.13 \pm 0.28
小檗胺	5	32.1 \pm 1.31	7.57 \pm 0.17*
	10	56.7 \pm 0.63	13.70 \pm 0.37*
小檗胺 + Sp600125	5 + 20	11.4 \pm 0.98	4.83 \pm 0.21*
	10 + 20	34.3 \pm 1.16	8.17 \pm 0.33*

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

4 讨论

小檗胺不良反应小，长期服用毒性很低，是一种极具应用前景的中药单体^[13-14]。小檗胺对多种肿瘤细胞增殖具有抑制作用和诱导凋亡作用，且能降低肺调节的各种功能为主要表现，并不会出现明显癌细胞的迁移能力^[15-16]，降低耐药细胞株中耐药基因的表达水平，提高细胞对化疗药物的敏感性，逆转细胞耐药^[4-5]。肺腺癌是肺癌的主要类型之一，具有易侵袭、易转移和易产生耐药等特点^[17]。TNF- α -JNK 通路在肿瘤化疗过程中起重要作用。本实验采用肺腺癌 A549 细胞，研究小檗胺的细胞凋亡诱导作用及其相关机制，结果表明小檗胺可能通过激活 TNF- α -JNK 信号通路诱导细胞凋亡。这在一定程度上阐释了小檗胺与其他化疗药物联合治疗肺腺癌分子机制。

TNF- α 是一个具有广泛生物功能的前炎性细胞因子，与细胞膜表面受体结合形成活性复合体后可激活下游一系列信号通路。TNF- α 可激活核转录因子- κB (NF- κB) 通路，抑制细胞凋亡，增强细胞的存活能力；也可激活 Caspase-8 和 JNK 通路，促进细胞凋亡^[18]。因此，TNF- α 通路十分复杂，在大部分细胞中 TNF- α 与受体结合后同时活化上述 3 种途径，在细胞死亡与存活之间保持平衡，但多以 NF- κB 细胞凋亡数目的增加^[19]。只有当 NF- κB 通路被抑制

时，TNF- α 激活的 Caspase-8 通路和 JNK 通路活性被进一步释放，TNF- α 表现出抗肿瘤活性^[20]。小檗胺是新型的 NF- κB 通路抑制剂，可抑制 NF- κB 通路活性，降低 NF- κB 调节的系列细胞凋亡抑制蛋白的表达^[21]。在本实验中，小檗胺显著降低 NF- κB 调节的抗凋亡蛋白 Bcl-x 的表达，激活 caspase-8 凋亡途径的相关蛋白的活性，进一步表明了小檗胺在 A549 细胞中同样抑制了 NF- κB 通路的活性。此外，TNF- α 体外对 A549 细胞还具有直接抑制效应，并与部分化疗药物联合应用对 A549 细胞产生显著协同抑制效应^[7]。

JNK 属于丝裂原活化蛋白酶家族，是细胞内重要的信号转导通路之一^[22]。在细胞中 JNK 蛋白经磷酸化反应激活后，胞浆中的 JNK 移位到细胞核，通过对 c-jun、重组人活化转录因子-2 (ATF-2)、Elk-1 等转录因子的表达调控而引起细胞凋亡^[23]。此外，JNK 通路的激活可导致非 Caspase-8 依赖的 Bid 剪切，产生 Bid 的活性蛋白水解片段 jBid，jBid 进入线粒体后能够诱导调节细胞凋亡的蛋白 Smac 的释放，从而促进细胞凋亡的发生^[18]。因此 JNK 通路是化疗药物、紫外线照射及 Fas 蛋白等诱导细胞凋亡所必需的通路，必须持续激活 JNK 才能诱导细胞凋亡^[24]。在本实验中小檗胺能明显提高 TNF- α 基因和蛋白的表达量，显著增加 JNK 蛋白的磷酸化水平，且呈明显的浓度相关性，JNK 通路的阻断显著降低小檗胺抑制 A549 细胞增殖和诱导凋亡的药效，提示小檗胺诱导肺腺癌细胞 A549 细胞的机制可能与 TNF- α -JNK 通路的异常激活有关。本实验结果对肺癌的防治具有现实意义，也表明小檗胺具有广阔的药物研发和临床应用前景。

参考文献

- [1] 朱灿阳. 小檗胺药理作用分析 [J]. 中国热带医学, 2005, 5(1): 109-110.
- [2] Lin C C, Kao S T, Chen G W, et al. Apoptosis of human leukemia HL-60 cells and murine leukemia WEHI-3 cells induced by berberine through the activation of caspase-3 [J]. *Anticancer Res*, 2006, 26(1A): 227-242.
- [3] Pazhang Y, Ahmadian S, Mahmoudian M, et al. Berberine-induced apoptosis via decreasing the survivin protein in K562 cell line [J]. *Med Oncol*, 2011, 28(4): 1577-1583.
- [4] Pan G Y, Wang G J, Liu X D, et al. The involvement of P-glycoprotein in berberine absorption [J]. *Pharmacol Toxicol*, 2002, 91(4): 193-197.

- [5] Lin H L, Liu T Y, Wu C W, *et al.* Berberine modulates expression of mdrl gene product and the responses of digestive track cancer cells to Paclitaxel [J]. *Br J Cancer*, 2002, 81(3): 416-422.
- [6] Cheng R B, Ma R J, Wang Z K, *et al.* PTEN status is related to cell proliferation and self-renewal independent of CD133 phenotype in the glioma-initiating cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 349(1/2): 149-157.
- [7] 夏 晖, 李 捷, 于长海, 等. TNF- α 对人肺癌 A549 细胞凋亡的影响 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2005, 10(12): 1381-1383.
- [8] Liu J, Lin A. Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword [J]. *Cell Res*, 2005, 15(1): 36-42.
- [9] Tang G, Minemoto Y, Dibling B, *et al.* Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes [J]. *Nature*, 2011, 414(6861): 313-317.
- [10] Liu J, Yan J, Jiang S, *et al.* Site-specific ubiquitination is required for relieving the transcription factor Miz1-mediated suppression on TNF-alpha-induced JNK activation and inflammation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(1): 191-196.
- [11] Chang L, Kamata H, Solinas G, *et al.* The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNFalpha-induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover [J]. *Cell*, 2006, 124(3): 601-613.
- [12] Zheng X, Zheng W, Liu S, *et al.* Crosstalk between JNK and NF-kappaB in the KDO2-mediated production of TNFalpha in HAPI cells [J]. *Cell Mol Neurobiol*, doi: 10.1007/s10571-012-9864-9, 2012.
- [13] Wei Y L, Xu L, Liang Y, *et al.* Berbamine exhibits potent antitumor effects on imatinib-resistant CML cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 30(4): 451-457.
- [14] 董庆华, 郑 树, 徐荣臻, 等. 小檗胺对多药耐药 K562/Adr 细胞作用的研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2004, 24(9): 820-822.
- [15] Duan H, Luan J, Liu Q, *et al.* Suppression of human lung cancer cell growth and migration by berbamine [J]. *Cytotechnology*, 2010, 62(4): 341-348.
- [16] Wang S, Liu Q, Zhang Y, *et al.* Suppression of growth, migration and invasion of highly-metastatic human breast cancer cells by berbamine and its molecular mechanisms of action [J]. *Mol Cancer*, doi: 10.1186/1476-4598-8-81.
- [17] 中国抗癌协会肺癌专业委员会. 2010 中国肺癌临床指南 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [18] Deng Y, Ren X, Yang L, *et al.* A JNK-dependent pathway is required for TNFalpha-induced apoptosis [J]. *Cell*, 2003, 115(1): 61-70.
- [19] Heyninck K, Beyaert R. Crosstalk between NF-kappaB-activating and apoptosis-inducing proteins of the TNF-receptor complex [J]. *Mol Cell Biol Res Commun*, 2001, 4(5): 259-265.
- [20] 欣 李, 王剑宁, 熊习昆, 等. 白杨素提高肿瘤坏死因子-A 诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡能力的研究 [J]. *中草药*, 2010, 41(11): 1828-1834.
- [21] Liang Y, Xu R Z, Zhang L, *et al.* Berbamine, a novel nuclear factor kappaB inhibitor, inhibits growth and induces apoptosis in human myeloma cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 30(12): 1659-1665.
- [22] Nix P, Hisamoto N, Matsumoto K, *et al.* Axon regeneration requires coordinate activation of p38 and JNK MAPK pathways [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(26): 10738-10743.
- [23] Brnjic S, Olofsson M H, Havelka A M, *et al.* Chemical biology suggests a role for calcium signaling in mediating sustained JNK activation during apoptosis [J]. *Mol Biosyst*, 2010, 6(5): 767-774.
- [24] Igaki T. Correcting developmental errors by apoptosis: lessons from Drosophila JNK signaling [J]. *Apoptosis*, 2009, 14(8): 1021-1028.