

基于 PAK6 和 Wnt/ β -catenin 信号通路的苦参碱对肺癌放疗敏感性的影响研究

李修炜, 王记南, 张 健

周口市中心医院 放疗科, 河南 周口 466000

摘要: **目的** 探究苦参碱对肺癌放疗敏感性的影响和作用机制。**方法** 人非小细胞肺癌 A549 细胞分为对照组、2 Gy 放疗组、4 Gy 放疗组、苦参碱组、苦参碱联合 2 Gy 组、苦参碱联合 4 Gy 组、甘氨双唑钠联合 2 Gy 组、甘氨双唑钠联合 4 Gy 组, 通过克隆形成、细胞增殖、细胞凋亡评价苦参碱对 A549 细胞放疗敏感性的影响; 建立裸鼠皮下移植瘤模型, 分为对照组、5 Gy 放疗组、苦参碱组、苦参碱联合 5 Gy 组、甘氨双唑钠联合 5 Gy 组, 记录小鼠瘤体积; Western blotting 法检测 A549 细胞和小鼠瘤组织中 β -连环蛋白 (β -catenin)、p21 激活蛋白激酶 6 (p21-activated protein kinase, PAK6)、c-myc、半胱氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3) 的表达。**结果** 与单独放疗组相比, 苦参碱联合放疗组 A549 细胞克隆形成、细胞增殖显著降低 ($P < 0.001$), 细胞凋亡显著增加 ($P < 0.001$), 裸鼠肿瘤体积显著降低 ($P < 0.001$), 细胞和裸鼠肿瘤组织中 PAK6、c-myc、磷酸化 β -catenin 蛋白表达显著下调 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), Caspase-3 蛋白表达显著上调 ($P < 0.001$)。 **结论** 苦参碱通过干扰 PAK6 表达, 抑制 Wnt/ β -连环蛋白 (Wnt/ β -catenin) 信号通路, 从而提高肺癌的放疗敏感性。

关键词: 肺癌; 苦参碱; p21 激活蛋白激酶 6; Wnt/ β -catenin 信号通路; 放疗敏感性

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2021)02 - 0447 - 07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.02.018

Sensitivity of matrine to radiotherapy for lung cancer based on PAK6 and Wnt/ β -catenin signaling pathways

LI Xiu-wei, WANG Ji-nan, ZHANG Jian

Radiotherapy Department of Zhoukou Central Hospital, Zhoukou 466000, China

Abstract: Objective To explore the effect and mechanism of matrine on radiosensitivity of lung cancer. **Methods** Human non-small cell lung cancer A549 cells were divided into control group, 2 Gy radiotherapy group, 4 Gy radiotherapy group, matrine group, matrine combined with 2 Gy group, matrine combined with 4 Gy group, glycinazole sodium combined with 2 Gy group and glycinazole sodium combined with 4 Gy group; Clonal formation, cell proliferation, apoptosis were used to evaluate the effect of matrine on radiosensitivity of A549 cells. Subcutaneous transplantation tumor model in nude mice was established, which were divided into control group, 5 Gy radiotherapy group, matrine group, matrine combined with 5 Gy radiotherapy group, glycinazole sodium combined with 5 Gy radiotherapy group, tumor volume of mice were recorded; Western blotting was used to detect the expressions of β -catenin, p21-activated protein kinase (PAK6), c-myc and Caspase-3. **Results** Compared with radiotherapy group, the cell maturation and proliferation were significantly reduced ($P < 0.001$), cell apoptosis was significantly increased ($P < 0.001$), tumor volume of nude mice was reduced ($P < 0.001$), the expressions of PAK6, c-myc and phosphorylation- β -catenin on A549 cells and tumor tissues were significantly downregulated ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), the expression of Caspase-3 was significantly increased ($P < 0.001$) in matrine combined with radiotherapy group. **Conclusion** Matrine could improve radiosensitivity of lung cancer through inhibiting the expression of PAK6 and Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key words: lung cancer; matrine; PAK6; Wnt/ β -catenin signaling pathway; radiotherapy sensitivity

肺癌作为癌症之首, 患者生存率仅 15%, 根据组织学差异将其分为小细胞肺癌和非小细胞肺癌, 非小细胞肺癌又分为腺癌、鳞状细胞癌和大细胞癌^[1]。肺癌早期临床症状不明显, 大多数患者确诊时已发展

收稿日期: 2020-06-20

基金项目: 河南省科技攻关项目 (116108351126)

作者简介: 李修炜, 硕士, 主治医师, 从事肿瘤相关研究。Tel: 18736236899 E-mail: lixiuwei1984@126.com

为中晚期, 预后较差^[2]。目前肺癌的治疗方式主要为手术治疗和放疗, 约 65% 非小细胞肺癌患者需要进行放疗来提高治疗效果, 但长期的放疗会产生放疗敏感性降低、组织损伤等不良反应^[3], 因此选择科学合理的用药方式联合放疗以提高放疗的敏感性, 对肺癌的临床治疗至关重要。

苦参碱是从豆科槐属植物苦参 *Sophora flavescens* Alt. 中提取到的生物碱, 对肿瘤有显著的治疗效果^[4-6]。研究表明, 苦参碱不仅可以抑制肿瘤细胞增殖, 促进肿瘤细胞凋亡, 还能够提高胃癌、乳腺癌等癌症的放疗敏感性^[7-11]。苦参碱对肺癌放疗的作用及机制尚不明确, 本研究通过考察苦参碱对肺癌放疗的影响和机制, 为肺癌的临床治疗提供参考。

1 材料与仪器

1.1 细胞

人非小细胞肺癌 A549 细胞购自中国科学院上海生命科学研究所以。

1.2 动物

SPF 级 Balb/c 雌性裸鼠 25 只, 4 周龄, 体质量 18~20 g, 购自郑州大学实验动物中心, 合格证号 SYXK (豫) 2018-0004, 饲养于恒温恒湿 12 h 昼夜交替的 SPF 级动物房内。所有动物实验遵循周口市中心医院有关实验动物管理和使用的规定, 均符合 3R 原则。

1.3 药品与试剂

苦参碱 (批号 519-02-8, 质量分数 98%) 购自上海迈瑞尔化学技术有限公司; 甘氨酸双唑钠 (批号 201205284, 质量分数 95.0%) 购自山东绿叶制药有限公司; DMEM 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司; BCA 蛋白定量试剂盒、MTT 检测试剂盒、细胞凋亡检测试剂盒购自沈阳万类生物技术有限公司; p21 激活蛋白激酶 6 (p21-activated protein kinase, PAK6) 抗体、半胱氨酸蛋白酶 3 (Casepase-3) 抗体、c-myc 抗体、磷酸化 β -连环蛋白 (β -catenin) 抗体、 β -catenin 抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体、山羊抗兔 IgG 抗体均购自美国 CST 公司。

1.4 仪器

酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 23Ex 医用高能电子直线加速器 (美国 Varian 公司); 流式细胞仪 (美国 Beckman 公司); 电子显微镜 (日本 Nikon 公司); 电泳仪 (上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

将于液氮保存的 A549 细胞于 37 °C 水浴锅中迅速解冻, 并用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 当细胞生长至融合率达 80% 时进行传代, 取对数生长期的细胞进行后续实验。

2.2 苦参碱对 A549 细胞增殖的影响

取对数生长期的 A549 细胞, 以 4×10^3 /孔接种于 96 孔板, 设置对照组和苦参碱 (2、4、8 $\mu\text{mol/L}$, 苦参碱以 DMEM 培养基溶解) 组。细胞贴壁后, 更换为含不同浓度苦参碱的 DMEM 培养基, 对照组加入不含药物的培养基, 分别培养 24、48、72 h 后, 每孔加入 20 μL MTT 溶液孵育 4 h, 加入 200 μL DMSO, 采用酶标仪于 490 nm 处测定吸光度 (A)。

2.3 苦参碱联合放疗对 A549 细胞增殖的影响

取对数生长期的 A549 细胞以 4×10^3 /孔接种于 96 孔板, 设置对照组、2 Gy 放疗组、4 Gy 放疗组、苦参碱 (4 $\mu\text{mol/L}$) 组、苦参碱 (4 $\mu\text{mol/L}$) 联合 2 Gy 组、苦参碱 (4 $\mu\text{mol/L}$) 联合 4 Gy 组、甘氨酸双唑钠 (25 $\mu\text{g/mL}$) 联合 2 Gy 组、甘氨酸双唑钠 (25 $\mu\text{g/mL}$) 联合 4 Gy 组。苦参碱、甘氨酸双唑钠分别以 DMEM 培养基溶解, 细胞贴壁后对照组加入不含药物的培养基, 各给药组更换为含相应药物的 DMEM 培养基, 各放疗组经 2、4 Gy 的电离辐射后, 每孔加入 20 μL MTT 溶液孵育 4 h, 加入 200 μL DMSO, 采用酶标仪于 490 nm 处测定 A。

电离辐射条件: 美国 Varian 23Ex 医用高能电子直线加速器, 6 MV X 射线, 照射时细胞培养皿覆盖 2 cm 厚的有机玻璃板, 照射源距离为 100 cm, 剂量率为 3.2 Gy/min。

2.4 苦参碱联合放疗对 A549 细胞克隆形成的影响

将处于对数生长期的 A549 细胞以 3×10^2 /孔的密度接种于 6 孔板中, 设置对照组、2 Gy 放疗组、4 Gy 放疗组、苦参碱 (4 $\mu\text{mol/L}$) 组、苦参碱 (4 $\mu\text{mol/L}$) 联合 2 Gy 组、苦参碱 (4 $\mu\text{mol/L}$) 联合 4 Gy 组、甘氨酸双唑钠 (25 $\mu\text{g/mL}$) 联合 2 Gy 组、甘氨酸双唑钠 (25 $\mu\text{g/mL}$) 联合 4 Gy 组。苦参碱、甘氨酸双唑钠分别以 DMEM 培养基溶解, 对照组加入不含药物的培养基, 各给药组加入含相应药物的 DMEM 培养基, 各放疗组用 2、4 Gy 的 X 线照射, 于培养箱中培养 10~20 d, 每 7 天更换 1 次培养基。当出现肉眼可见的克隆时终止培养, 弃去培养基, 于无水乙醇固定 30 min,

加入 1 mL 0.01% 结晶紫孵育 1 h, 弃去染色液, 清洗后于显微镜下统计单克隆集落数, 计算集落形成率。

集落形成率 (PE) = 集落数/接种细胞数

2.5 苦参碱联合放疗对 A549 细胞凋亡的影响

将处于对数生长期的 A549 细胞以 5×10^5 /孔接种于 6 孔板中, 设置对照组、2 Gy 放疗组、4 Gy 放疗组、苦参碱 (4 $\mu\text{mol/L}$) 组、苦参碱 (4 $\mu\text{mol/L}$) 联合 2 Gy 组、苦参碱 (4 $\mu\text{mol/L}$) 联合 4 Gy 组、甘氨酸双唑钠 (25 $\mu\text{g/mL}$) 联合 2 Gy 组、甘氨酸双唑钠 (25 $\mu\text{g/mL}$) 联合 4 Gy 组。苦参碱、甘氨酸双唑钠分别以 DMEM 培养基溶解, 对照组加入不含药物的培养基, 各给药组加入含相应药物的 DMEM 培养基, 各放疗组用 2、4 Gy 的 X 线照射。按照细胞凋亡检测试剂盒说明书, 取 5×10^5 个细胞于离心管中, 加入 500 μL Binding Buffer 重悬, 加入 5 μL Annexin V-FLTC、5 μL PI 染料, 混匀后室温避光孵育 15 min, 并设置 Annexin V-FLTC 和 PI 单阳性组用于调节荧光补偿, 空白组用于调电压。采用流式细胞仪检测样品的荧光值, 使用 FlowJo v5.573 软件分析细胞凋亡数。

2.6 苦参碱联合放疗对裸鼠皮下移植瘤模型的影响

根据预实验和文献报道^[11-12], 裸鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为对照组、5 Gy 放疗组、苦参碱 (50 mg/kg) 组、苦参碱 (50 mg/kg) 联合 5 Gy 组、甘氨酸双唑钠 (25 mg/kg) 联合 5 Gy 组, 每组 5 只。收集处于对数生长期的 A549 细胞, 以 PBS 重悬, 调整细胞密度为 $1 \times 10^8/\text{mL}$; 75% 乙醇溶液消毒小鼠左侧腋下, 于裸鼠左侧腋下 sc 100 μL A549 细胞。苦参碱、甘氨酸双唑钠溶于生理盐水, 当裸鼠肿瘤体积达 100 mm^3 时, 小鼠每 2 天 ig 100 μL 相应药物, 对照组 ig 等体积生理盐水; 放疗组小鼠每 3 天放疗 1 次。治疗期间隔天测量并计算瘤体积, 给药 3 周后, 小鼠脱颈椎处死, 取肿瘤组织。

2.7 苦参碱联合放疗对 A549 细胞和肿瘤组织中 PAK6、Casepase-3、c-myc、 β -catenin 蛋白表达的影响

取肿瘤组织 50 mg 于离心管中, 加入 250 μL RIPA 蛋白裂解液和 2.5 μL 的 PMSF 蛋白酶抑制剂, 冰上匀浆后 $12\ 000 \times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 取上清, 即为组织总蛋白。取经苦参碱联合放疗后的 A549 细胞, 加入 200 μL RIPA 蛋白裂解液和 2 μL PMSF 蛋白酶抑制剂, 冰上裂解后 $12\ 000 \times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 取上清, 即为细胞总蛋白。

BCA 蛋白定量后于沸水浴加热变性, 经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 转至 PVDF 膜, 用 5%

脱脂牛奶封闭 2 h, 加入 PAK6、Casepase-3、c-myc、磷酸化 β -catenin、 β -catenin、GAPDH 抗体 (1 : 1000) 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗涤后加入二抗, 于室温孵育 1.5 h, TBST 洗涤后按照 ECL 试剂盒说明书配制发光液, 将 PVDF 膜浸入发光液中反应 0.5 min, 曝光并拍照, 用 Image J 软件进行分析。

2.8 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间差异使用方差分析 (one-way ANOVA), 两组间比较采用 LSD 法。

3 结果

3.1 苦参碱对 A549 细胞增殖的影响

如图 1 所示, 与对照组相比, 苦参碱 (2、4、8 $\mu\text{mol/L}$) 组作用 24、48、72 h 后, A549 细胞活力均显著下降 ($P < 0.001$), 说明苦参碱能够有效抑制 A549 细胞增殖。结合文献报道^[9], 选择中剂量 4 $\mu\text{mol/L}$ 苦参碱进行后续实验。

3.2 苦参碱联合放疗对 A549 细胞增殖的影响

如图 2 所示, 与对照组相比, 除 2 Gy 放疗组外, 其余各组细胞活力均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、

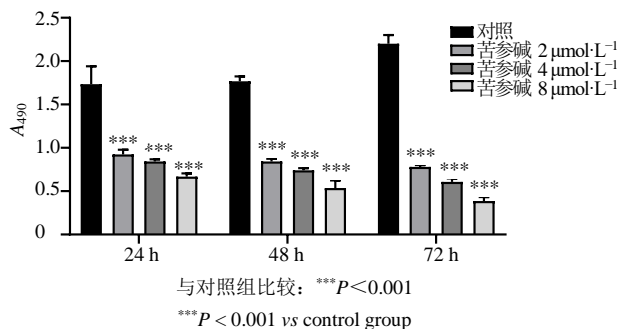


图 1 苦参碱对 A549 细胞增殖的影响

Fig. 1 Effect of matrine on proliferation in A549 cells

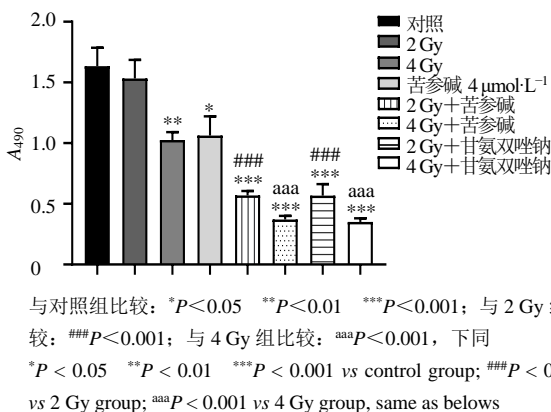


图 2 苦参碱联合放疗对 A549 细胞增殖作用的影响

Fig. 2 Effect of matrine combined with radiotherapy on proliferation in A549 cells

0.001); 与 2 Gy 放疗组相比, 2 Gy 放疗联合苦参碱、2 Gy 放疗联合甘氨酸双唑钠组细胞活力显著降低 ($P < 0.001$); 与 4 Gy 放疗组相比, 4 Gy 放疗联合苦参碱、4 Gy 放疗联合甘氨酸双唑钠组细胞活力显著降低 ($P < 0.001$); 与甘氨酸双唑钠联合放疗组相比, 苦参碱联合放疗组细胞活力无显著差异。表明苦参碱能够增加 A549 细胞放疗的敏感性, 与放疗增敏剂甘氨酸双唑钠效果相当。

3.3 苦参碱联合放疗对 A549 细胞克隆形成的影响

如图 3 所示, 对照组、2 Gy 放疗组、4 Gy 放疗组、苦参碱组、苦参碱联合 2 Gy 组、苦参碱联合 4 Gy 组、甘氨酸双唑钠联合 2 Gy 组、甘氨酸双唑钠联合 4 Gy 组细胞克隆形成率分别为 $(59.36 \pm 2.29)\%$ 、

$(58.67 \pm 1.13)\%$ 、 $(34.06 \pm 2.30)\%$ 、 $(38.09 \pm 1.08)\%$ 、 $(26.33 \pm 0.87)\%$ 、 $(19.04 \pm 1.18)\%$ 、 $(24.42 \pm 3.19)\%$ 、 $(16.34 \pm 1.97)\%$ 。与对照组相比, 除 2 Gy 放疗组外, 其余各组细胞克隆形成率均显著降低 ($P < 0.001$); 与 2、4 Gy 放疗组比较, 苦参碱联合放疗、甘氨酸双唑钠联合放疗组细胞克隆形成率显著降低 ($P < 0.001$); 苦参碱联合放疗组与甘氨酸双唑钠联合放疗组细胞克隆形成率无显著差异。表明苦参碱能够显著提高 A549 细胞的体外放疗敏感性。

3.4 苦参碱联合放疗对 A549 细胞凋亡的影响

如图 4 所示, 对照组、2 Gy 放疗组、4 Gy 放疗组、苦参碱组、苦参碱联合 2 Gy 组、苦参碱联合 4 Gy 组、甘氨酸双唑钠联合 2 Gy 组、甘氨酸双唑钠联

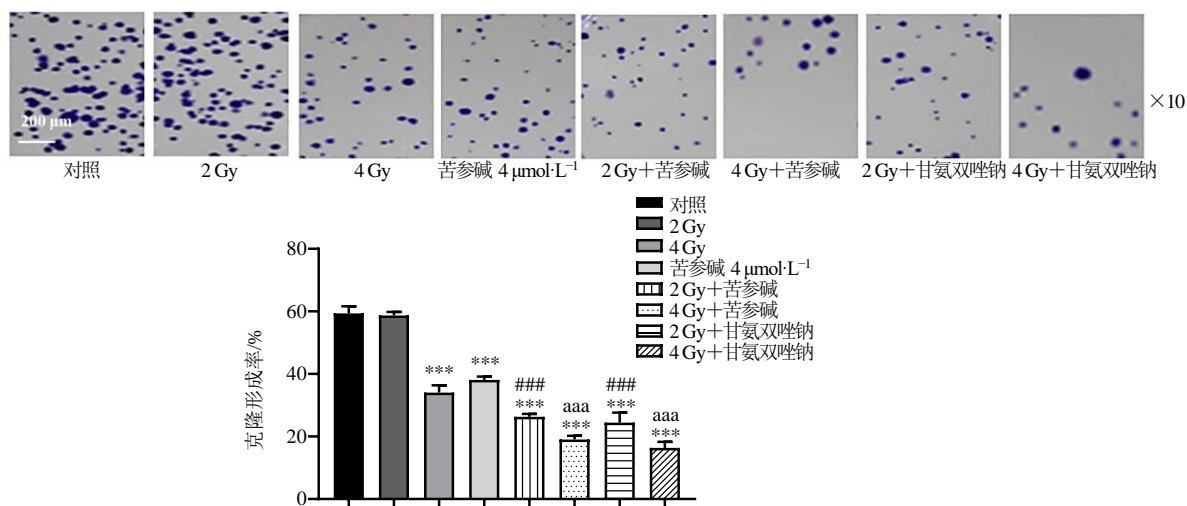


图 3 苦参碱联合放疗对 A549 细胞克隆形成的影响

Fig. 3 Effect of matrine combined with radiotherapy on clonal formation in A549 cells

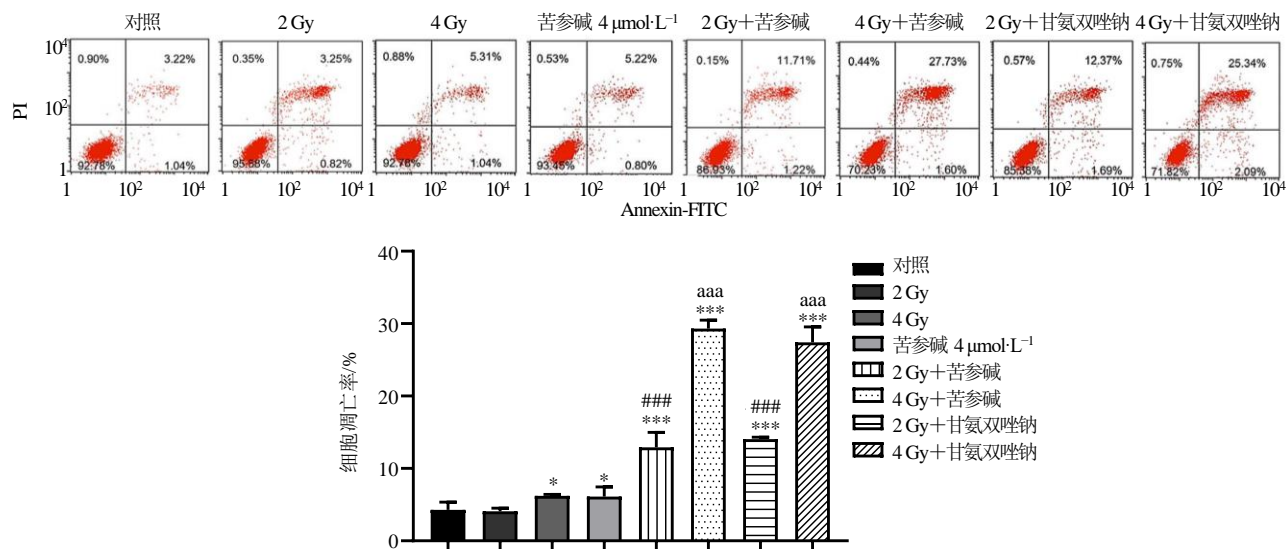


图 4 苦参碱联合放疗对 A549 细胞凋亡的影响

Fig. 4 Effect of matrine combined with radiotherapy on apoptosis in A549 cells

合 4 Gy 组细胞凋亡率分别为 (4.28±1.07)%、(4.07±0.43)%、(6.20±0.20)%、(6.11±1.34)%、(12.93±2.06)%、(29.33±1.15)%、(14.06±0.27)%、(27.43±2.11)%。与对照组相比,除 2 Gy 放疗组外,其余各组细胞凋亡率均显著升高 ($P<0.05$ 、 0.001);与 2 Gy、4 Gy 放疗组比较,苦参碱联合放疗、甘氨双唑钠联合放疗组细胞凋亡率显著升高 ($P<0.001$);苦参碱联合放疗组与甘氨双唑钠联合放疗组细胞凋亡率无显著差异。表明苦参碱联合放疗能够显著增加细胞的放疗敏感性。

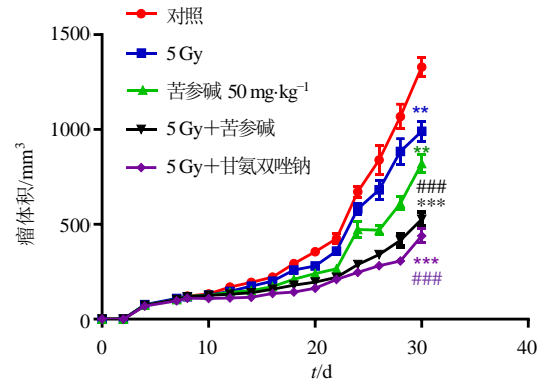
3.5 苦参碱联合放疗对裸鼠皮下移植瘤的影响

如图 5 所示,与对照组比较,各组裸鼠瘤体积均显著降低 ($P<0.01$ 、 0.001);与 5 Gy 放疗组比较,5 Gy 联合苦参碱组和 5 Gy 联合甘氨双唑钠组裸鼠瘤体积均显著降低 ($P<0.001$),表明苦参碱能够显著增加裸鼠肺癌放疗敏感性。

3.6 苦参碱联合放疗对 A549 细胞和肿瘤组织中 PAK6、Caspase-3、c-myc、 β -catenin 蛋白表达的影响

如图 6 所示,A549 细胞中,与对照组比较,除 2 Gy 放疗组中仅 c-myc 蛋白表达显著降低外 ($P<0.001$),其余各组 PAK6、c-myc、磷酸化 β -catenin

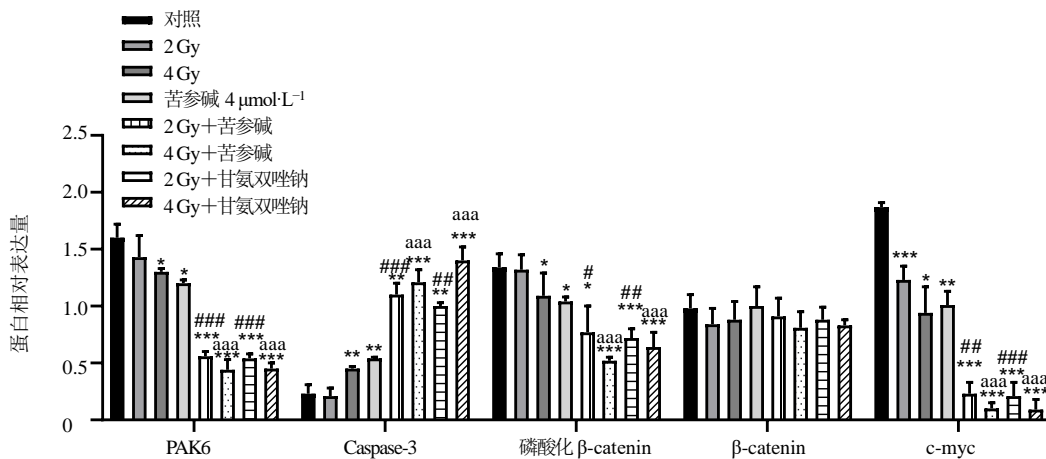
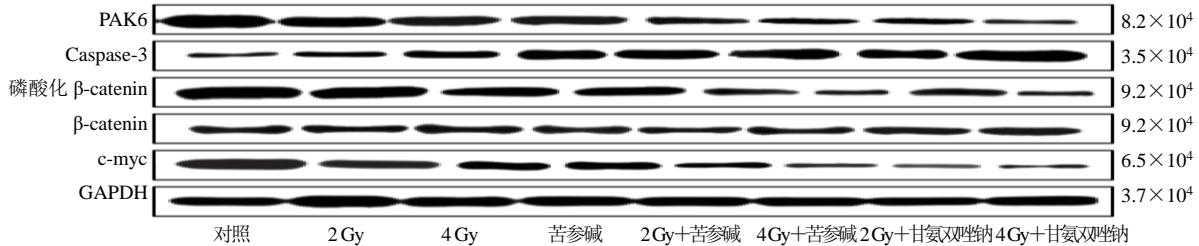
蛋白表达均显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),Caspase-3 蛋白表达显著升高 ($P<0.01$ 、 0.001);与 2、4 Gy 放疗组比较,苦参碱联合放疗组、甘氨双唑钠联合放疗组 PAK6、c-myc、磷酸化 β -catenin 显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),Caspase-3 蛋白表达显著升高 ($P<0.01$ 、 0.001),表明苦参碱能够



与对照组比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$; 与 5 Gy 组比较: #### $P<0.001$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group; #### $P<0.001$ vs 5 Gy group

图 5 苦参碱联合放疗对裸鼠瘤体积的影响

Fig. 5 Effect of matrine combined with radiotherapy on tumor volume in nude mice



与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$; 与 2 Gy 组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$; 与 4 Gy 组比较: aaa $P<0.001$ * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ vs 2 Gy group; aaa $P<0.001$ vs 4 Gy group

图 6 苦参碱联合放疗对 A549 细胞 PAK6、Caspase-3、 β -catenin、c-myc 蛋白表达的影响

Fig. 6 Effect of matrine combined with radiotherapy on expressions of PAK6, Caspase-3, β -catenin and c-myc in A549 cells

下调 A549 细胞 PAK6 表达, 抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路, 促进细胞凋亡。

如图 7 所示, 皮下移植瘤裸鼠中, 与对照组比较, 各组 PAK6、c-myc、磷酸化 β -catenin 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 苦参碱联合放疗组、甘氨酸双唑钠联合放疗组 Caspase-3 蛋白表

达显著升高 ($P < 0.001$); 与 5 Gy 放疗组比较, 苦参碱联合放疗组、甘氨酸双唑钠联合放疗组 PAK6、c-myc、磷酸化 β -catenin 显著降低 ($P < 0.001$), Caspase-3 蛋白表达显著升高 ($P < 0.001$), 表明苦参碱能够下调裸鼠皮下移植瘤模型 PAK6 表达, 抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路。

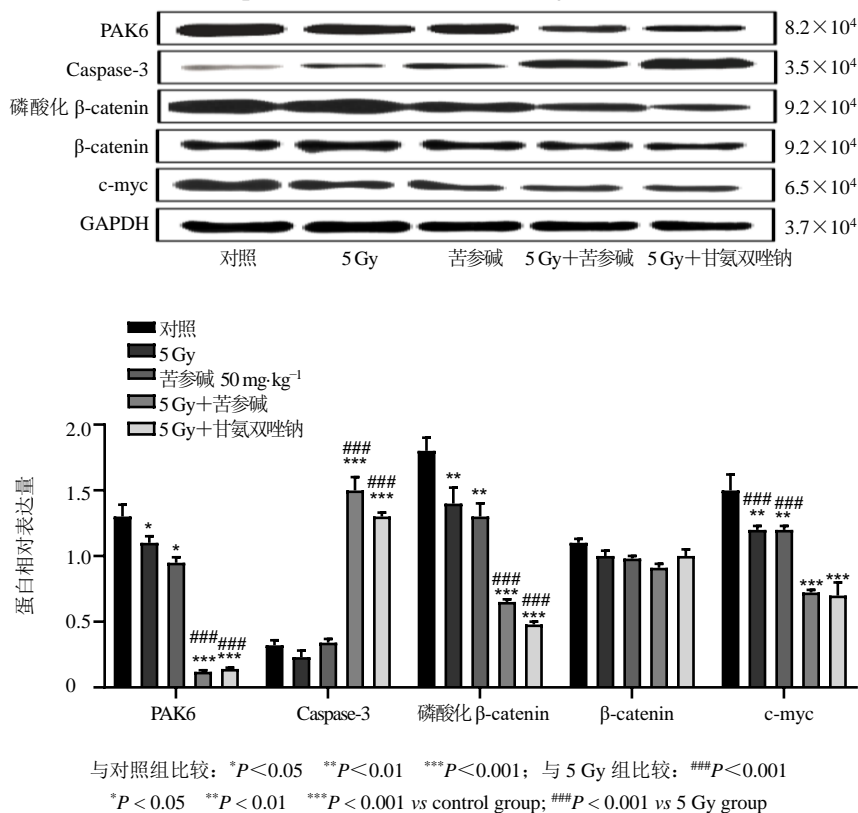


图 7 苦参碱联合放疗对小鼠肿瘤组织 PAK6、Caspase-3、 β -catenin、c-myc 蛋白表达的影响

Fig. 7 Effect of matrine combined with radiotherapy on expressions of PAK6, Caspase-3, β -catenin and c-myc in tumor of mice

4 讨论

肺癌是世界上发病率和死亡率最高的恶性肿瘤, 其主要治疗方式为手术和放疗, 虽然目前较先进的三维立体放疗技术可以显著提高放疗的效果, 但放疗敏感性问题的仍未得到解决^[13]。增加放疗频率和剂量是提高肿瘤放疗敏感性的主要手段, 但其造成的严重肺损伤不利于患者的预后^[14]。中药复合物、中药单体等用于肿瘤具有治疗效果良好、不良反应小等特点, 因此越来越多的研究集中在中药联合放疗治疗肿瘤。苦参碱是从豆科槐属植物苦参中提取到的生物碱, 可有效抑制肿瘤的增殖和迁移, 但其联合放疗治疗肺癌尚未有明确的研究。本研究发现苦参碱联合放疗对 A549 细胞的增殖、克隆形成的抑制作用和对细胞凋亡的促进作用显著优于单独放疗; 与单独放疗相比, 苦参碱联合放疗可显著

抑制裸鼠皮下移植瘤模型肿瘤的生长, 表明苦参碱可提高放疗的治疗效果, 增加放疗的敏感性。

PAK 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶, 能够调控细胞形态维持、骨架支撑等^[15]。研究表明, PAK6 在肺癌、乳腺癌、前列腺癌等癌症中高表达, 可促进肿瘤的发生发展^[16-18]。本研究发现放疗后 A549 细胞中 PAK6 蛋白表达显著降低; 苦参碱联合放疗后 PAK6 蛋白表达下调更加显著, 表明苦参碱能够下调肺癌细胞 PAK6 蛋白表达, 从而提高放疗的敏感性。细胞凋亡是一个复杂的细胞程序性死亡的过程, 由细胞内多种基因共同调控。Caspase-3 是 Caspase 蛋白家族的成员之一, 是细胞凋亡的执行因子, Caspase-3 活化后, 酶切 Caspase-3 表达升高, 细胞凋亡进入不可逆阶段。研究表明, 干扰肿瘤细胞 PAK6 的表达可促进凋亡蛋白 Caspase-3 表达^[19-20]。本研究发现苦参

碱联合放疗可显著增加 Caspase-3 蛋白表达,提示苦参碱可能通过抑制 PAK6 表达,促进 Caspase-3 表达,进而促进细胞凋亡。Wnt/ β -catenin 信号通路是肿瘤细胞内经典的信号转导通路,可调控肿瘤的生长和转移,病理条件状态下,Wnt/ β -catenin 信号通路激活, β -catenin 与其他蛋白分子结合形成复合物,调控相关蛋白的表达,促进肿瘤的发生发展^[21]。c-myc 是 Wnt 信号通路下游的靶基因,调控原癌基因和抑癌基因的表达。PAK 家族蛋白与 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活密切相关^[22-23]。本研究发现与单独放疗相比,苦参碱联合放疗能够显著抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路和下游 c-myc 的激活。

综上所述,苦参碱能够提高肺癌的放疗敏感性,其机制可能与抑制 PAK6 表达和 Wnt/ β -catenin 信号通路,进而调控肿瘤细胞的生长和凋亡有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Liu C C, Shi J F, Liu G X, *et al.* Cost-effectiveness of lung cancer screening worldwide: A systematic review [J]. *Chin J Epidemiol*, 2019, 40(2): 218-226.
- [2] Franciosi V, Barbieri R, Aitini E, *et al.* Gemcitabine and oxaliplatin: A safe and active regimen in poor prognosis advanced non-small cell lung cancer patients [J]. *Lung Cancer*, 2003, 41(1): 101-106.
- [3] 张洁, 张小陆, 于杰, 等. 治疗前中性粒细胞与淋巴细胞比值对小细胞肺癌患者预后的意义 [J]. *河北医科大学学报*, 2019, 40(3): 292-295.
- [4] 曹建, 魏润杰, 邓茹芸, 等. 苦参碱及氧化苦参碱抑制肿瘤作用机制研究进展及展望 [J]. *中草药*, 2019, 50(3): 753-760.
- [5] 张明发, 沈雅琴. 苦参碱的药理学研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2020, 43(12): 2571-2578.
- [6] 毛俐, 汪广杰, 张鑫, 等. 氧化苦参碱及苦参碱 Au(III) 金属配合物对肿瘤细胞增殖的影响及分子机制初探 [J]. *中草药*, 2019, 50(3): 639-646.
- [7] Zhao L, Zhang X, Cui S. Matrine inhibits TPC-1 human thyroid cancer cells via the miR-21/PTEN/Akt pathway [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(3): 2965-2970.
- [8] 刘平, 陈晓杰. 苦参碱上调 LncRNA BDNF-AS 抑制宫颈鳞癌细胞增殖的机制研究 [J]. *中草药*, 2020, 51(6): 1593-1599.
- [9] Luo C, Zhu Y, Jiang T, *et al.* Matrine induced gastric cancer MKN45 cells apoptosis via increasing pro-apoptotic molecules of Bcl-2 family [J]. *Toxicology*, 2007, 229(3): 245-252.
- [10] 庞琪, 朱燕, 李陶, 等. 苦参碱通过抑制 microRNA-192 调控顺铂耐受肺腺癌 A549 细胞对顺铂的敏感性 [J]. *中草药*, 2019, 50(3): 653-658.
- [11] Xiao X, Ao M, Xu F, *et al.* Effect of matrine against breast cancer by downregulating the vascular endothelial growth factor via the Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(2): 1691-1697.
- [12] 曾晖, 邹冰, 谭慧珍, 等. 苦参碱联合 5-FU 抑制人胃癌裸鼠移植瘤的生长作用及机制 [J]. *广州中医药大学学报*, 2006, 23(2): 164-167.
- [13] 李红, 张震, 黄建敏, 等. 细胞因子诱导的杀伤细胞治疗晚期肺癌的临床观察 [J]. *郑州大学学报: 医学版*, 2019, 54(3): 348-352.
- [14] Rydén A, Blackhall F, Kim H R, *et al.* Patient experience of symptoms and side effects when treated with osimertinib for advanced non-small-cell lung cancer: A qualitative interview substudy [J]. *Patient*, 2017, 10(5): 593-603.
- [15] Cai S W, Dong-Xia L I, Jun A N, *et al.* PAK6 signaling attenuates migratory and invasive abilities of non-small cell lung cancer cells [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2014, 30(1): 67-71.
- [16] Raja R, Sahasrabudhe N A, Radhakrishnan A, *et al.* Chronic exposure to cigarette smoke leads to activation of p21 (RAC1)-activated kinase 6 (PAK6) in non-small cell lung cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(38): 61229-61245.
- [17] Lee S R, Ramos S M, Ko A, *et al.* AR and ER interaction with a p21-activated kinase (PAK6) [J]. *Mol Endocrinol*, 2002, 16(1): 85-99.
- [18] Kaur R, Xin Y, Lu M L, *et al.* Increased PAK6 expression in prostate cancer and identification of PAK6 associated proteins [J]. *Prostate*, 2010, 68(14): 1510-1516.
- [19] Zhao W, Yang J, Shi W, *et al.* Upregulation of p21-activated Kinase 6 in rat brain cortex after traumatic brain injury. [J]. *J Mol Histol*, 2011, 42(3): 195-203.
- [20] Chen J, Lu H, Yan D, *et al.* PAK6 increase chemoresistance and is a prognostic marker for stage II and III colon cancer patients undergoing 5-FU based chemotherapy [J]. *Oncotarget*, 2014, 6(1): 355-367.
- [21] 朱睿明, 邢方岚, 张起顺, 等. miRNA-21 过表达对小鼠星形胶质细胞凋亡及 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达的影响 [J]. *郑州大学学报: 医学版*, 2018, 53(6): 768-771.
- [22] Chen W, Xu W H. Wnt/ β -catenin signaling regulates *Helicoverpa armigera* pupal development by up-regulating c-Myc and AP-4 [J]. *Insect Biochem Molec*, 2014, 53: 44-53.
- [23] Romero L E A, Cruz O V, Chernoff J. Pak1 links the Wnt/ β -catenin pathway to ErbB2 signaling in breast cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2012, 73(12): 3671-3682.

[责任编辑 李亚楠]