

本文引用:郭利培,刘洁,张文青,史红健,范婧莹,王贤文,何迎春. 吴茱萸碱调控 PI3K/AKT 信号通路抑制鼻咽癌增殖和诱导凋亡[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(4): 612-618.

吴茱萸碱调控 PI3K/AKT 信号通路抑制鼻咽癌 细胞增殖和诱导凋亡

郭利培¹, 刘洁¹, 张文青¹, 史红健^{1,2,3}, 范婧莹^{1,2,3}, 王贤文^{2,3,4*}, 何迎春^{1,2,3*}

1. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208; 2. 中医药防治眼耳鼻喉疾病湖南省重点实验室, 湖南长沙 410208;

3. 湖南省中医药防治眼耳鼻喉疾病与视功能保护工程技术研究中心, 湖南长沙 410208;

4. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007

[摘要] **目的** 研究吴茱萸碱对鼻咽癌 5-8F 细胞增殖、凋亡及 PI3K/AKT 信号通路的影响。**方法** (1)将 5-8F 细胞分为溶剂对照组、不同浓度吴茱萸碱组(0.5、1.0、2.0、4.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、顺铂组(cisplatin, 4.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); (2)将 5-8F 细胞设为 5 组:溶剂对照组、SC79 2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、SC79+吴茱萸碱 2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、吴茱萸碱 2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、LY294002 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组。采用实时无标记细胞功能分析仪(real time cellular analysis technology, RTCA)监测细胞增殖的情况;Annexin V-FITC/PI 双荧光染色法检测细胞凋亡率, Hoechst 33342 染色法观察细胞凋亡形态;Western blot 法检测磷酸肌醇 3-激酶蛋白(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)、磷酸化蛋白质激酶 B(phosphorylated protein kinase B, p-AKT)、增殖细胞核抗原蛋白(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、X 连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis, XIAP)、存活蛋白(Survivin)的表达水平。**结果** 与溶剂对照组相比,不同浓度吴茱萸碱组(0.5、1.0、2.0、4.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)显著抑制 5-8F 细胞增殖($P<0.05$ 或 $P<0.01$);吴茱萸碱组(1.0、2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的细胞核荧光染色增强,凋亡率明显升高($P<0.01$);PI3K、p-AKT、PCNA、XIAP、Survivin 蛋白表达水平明显下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与吴茱萸碱 2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较,SC79+吴茱萸碱 2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组的 PI3K、p-AKT、PCNA、XIAP、Survivin 蛋白表达水平升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且吴茱萸碱抑制 5-8F 细胞增殖和诱导凋亡的效应降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 吴茱萸碱可能通过抑制 PI3K/AKT 信号通路活性,下调增殖及凋亡相关蛋白 PCNA、XIAP、Survivin 的表达水平,最终抑制鼻咽癌细胞增殖和诱导凋亡。

[关键词] 鼻咽癌细胞;吴茱萸碱;增殖;凋亡;PI3K/AKT 信号通路

[中图分类号]R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.04.006

Regulation of evodiamine on PI3K/AKT signaling pathway to inhibit proliferation and induce apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells

GUO Lipei¹, LIU Jie¹, ZHANG Wenqing¹, SHI Hongjian^{1,2,3}, FAN Jingying^{1,2,3}, WANG Xianwen^{2,3,4*}, HE Yingchun^{1,2,3*}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hunan Provincial Key Laboratory for the Prevention and Treatment of Ophthalmology and Otolaryngology Diseases with Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Hunan Provincial Ophthalmology and Otolaryngology Diseases Prevention and Treatment with Chinese Medicine and Visual Function Protection Engineering and Technological Research Center, Changsha, Hunan 410208, China; 4. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of evodiamine on proliferation and apoptosis of 5-8F cells in nasopharyngeal

[收稿日期]2022-11-07

[基金项目]国家自然科学基金项目(81973914,81874408);湖南省教育厅项目(21B0358,21C0241);湖南省中医药管理局项目(D2022105);2021 年度湖南中医药大学校级科研基金项目(2021XJJ014,2021XJJ008);湖南省卫生健康委员会项目(D202307017740)。

[第一作者]郭利培,女,硕士研究生,研究方向:中医药防治耳鼻喉疾病。

[通信作者]* 何迎春,女,博士,教授,博士研究生导师,E-mail:heyinchun@hnuem.edu.cn;王贤文,男,博士,副主任医师,硕士研究生导师,E-mail:zhuangzhilinyun@163.com。

carcinoma cells and the role of PI3K/AKT signaling pathway. **Methods** The 5-8F cells were divided into solvent control group, evodiamine (0.5, 1.0, 2.0, 4.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) groups and cisplatin (4.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group; in addition, the 5-8F cells were divided into 5 groups: solvent control group, SC79 (2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group, SC79+evodiamine (2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group, evodiamine (2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group, and LY294002 (50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group. The cell proliferation was monitored by real time cellular analysis technology (RTCA), the apoptosis rate was detected by annexin V-FITC/PI double fluorescence staining, and the apoptosis morphology was observed by Hoechst 33342 staining. The expression levels of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), phosphorylated protein kinase B (p-AKT), proliferating cell nuclear antigen (PCNA), X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) and Survivin were detected by Western blot. **Results** Compared with the solvent control group, different concentrations of evodiamine (0.5, 1.0, 2.0, 4.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) significantly inhibited the proliferation of 5-8F cells ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the nuclear fluorescence staining and apoptosis rate of cells in evodiamine group (1.0, 2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) increased significantly ($P<0.01$). The protein expression of PI3K, p-AKT, PCNA, XIAP and Survivin decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with evodiamine (2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group, the protein expression levels of PI3K, p-AKT, PCNA, XIAP and Survivin in SC79+evodiamine (2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group were elevated ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the effects of evodiamine on inhibiting proliferation and inducing apoptosis of 5-8F cells decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** Evodiamine may inhibit proliferation and induce apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells by inhibiting the activity of PI3K/AKT signaling pathway and down-regulating the expression of proliferation and apoptosis-related proteins PCNA, XIAP and Survivin.

[**Keywords**] nasopharyngeal carcinoma cell; evodiamine; proliferation; apoptosis; PI3K/AKT signaling pathway

鼻咽癌是由鼻咽部鳞状上皮黏膜病变引起的头颈部恶性肿瘤之一,其发病具有明显的地域倾向和性别差异,中国鼻咽癌的发病率约占全球的 50%^[1]。由于头颈部器官结构复杂,且鼻咽癌的好发部位咽隐窝位置隐匿,发病初期无特异性表现,因此,鼻咽癌的早期发现和传统手术治疗成为了医学上的难点。近年来,调强放疗使鼻咽癌治愈率显著提高,但很多患者出现术后不耐受,生活质量受到严重影响^[2]。因此,寻找安全有效的抗鼻咽癌药物仍然是当前医学领域亟待解决的难题。

中药因其治疗作用广泛并且毒副作用小,在肿瘤的治疗中取得良好效果,中药单体为中药的有效提取物,其抗肿瘤活性成分的基础研究也成为了当前研究的热点^[3]。吴茱萸碱(evodiamine)是从芸香科植物吴茱萸中提取出的一种吲哚喹啉生物碱。研究表明,吴茱萸碱对人甲状腺癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、胃癌等多种肿瘤细胞有抑制作用^[4-6]。磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphoinositide 3-kinases, PI3K)/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(serine threonine protein kinase, AKT)信号通路是细胞内重要的生存信号通路之一,已有研究报道,PI3K/AKT 信号通路在多数肿瘤中存在异常激活,并且吴茱萸碱能够通过 PI3K/AKT 信号通路抑制肿瘤细胞增殖和诱导凋亡^[7-12]。在鼻咽癌中,尚无吴茱萸碱对 PI3K/AKT 信号通路影响的报道。本实验旨在通过研究吴茱萸碱对鼻咽癌 5-8F 细胞增殖、凋亡的影响,并探讨 PI3K/AKT 信号通路在吴

茱萸碱抗鼻咽癌中的作用,初步阐明吴茱萸碱抗鼻咽癌的部分分子机制。

1 实验材料

1.1 细胞株

人高转移鼻咽癌 5-8F 细胞株(批号:BNCC341932)购自商城北纳创联生物科技有限公司,由本实验室传代培养。

1.2 主要试剂与药物

RPMI-1640 培养基(批号:WH0022X041)、青霉素-链霉素混合液(批号:WH0621K6)、胰蛋白酶-EDTA 消化液(批号:20220115,北京索莱宝公司)均购自武汉普诺赛生命科技有限公司;胎牛血清(批号:2204031,美国 Gibco 公司);BCA 蛋白定量试剂盒(批号:A11244,北京康为世纪生物科技有限公司);Hoechst 33342 染色液(批号:20210818,北京索莱宝公司);膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素(annexin V-FITC)/碘化丙啶(propidium iodide,PI)凋亡检测试剂盒(批号:70-AP101-100,美国 BD 公司);顺铂(cisplatin,批号:MKCM2435,美国 Sigma 公司);对照品吴茱萸碱(批号:23743,质量分数 $\geq 99.86\%$)、SC79(批号:#17945)、LY294002(批号:#51598)均购自 MCE 公司;PI3K 抗体(批号:10)、p-AKT 抗体(批号:25)、增殖细胞核抗原蛋白 PCNA 抗体(批号:7)、Survivin 抗体(批号:15)、XIAP 抗体(批号:5)、GAPDH 抗体(批号:8)均购自 CST 公司;山羊抗兔

荧光二抗(批号:C70426-05)、山羊抗小鼠荧光二抗(批号:D00115-03)购自 LICOR 公司。

1.3 主要仪器

CO₂ 培养箱(型号:HERAcell150i,赛默飞世尔公司);全自动酶标分析仪(型号:ELX800,BioTek 公司);实时无标记细胞分析仪(real time cellular analysis technology, RTCA,型号:xCELLigence RTCA DPlus,艾森生物科技公司);双荧光细胞分析仪(型号:Cellometer K2, Nexcelom Bioscience 公司);细胞成像多功能检测系统(型号:Cytation™ 5, BioTek 公司);双红外荧光成像系统(型号:Odyssey CLX, LICOR 公司);台式高速冷冻离心机(型号:Microfuge 20R, Beckman Coulter 公司)。

2 实验方法

2.1 细胞培养及药物配制

将鼻咽癌 5-8F 细胞培养于 37 °C、5% CO₂、湿度饱和的培养箱中,待细胞密度达到 80%以上,取对数生长期细胞用于后续实验。吴茱萸碱粉末用 DMSO 溶解,配制成 200 mmol·L⁻¹ 的储备液,避光保存于-80 °C 冰箱,使用时用含 10%胎牛血清、90% RPMI-1640 培养基的完全培养基稀释。

2.2 实时无标记细胞分析仪监测细胞增殖

参考胡晶等人^[13]的方法,将 5×10³ 个/100 μL 的细胞悬液接种于 RTCA 专用板,在细胞生长曲线进入平台期之前加入不同浓度吴茱萸碱(0.5、1.0、2.0、4.0 μmol·L⁻¹),继续监测细胞增殖。机制部分以 SC79 为 PI3K/AKT 信号通路激活剂,LY294002 作为信号通路抑制剂,分组设置为溶剂对照组、SC79 2.5 μmol·L⁻¹ 组、SC79+吴茱萸碱 2.0 μmol·L⁻¹ 组、吴茱萸碱 2.0 μmol·L⁻¹ 组、LY294002 50 μmol·L⁻¹ 组。实验均重复 3 次。

2.3 Annexin V-FITC/PI 双荧光染色法检测细胞凋亡率

根据 RTCA 监测结果,发现吴茱萸碱 1.0、2.0 μmol·L⁻¹ 的浓度抑制细胞增殖效果较好,因此设置分组为溶剂对照组、吴茱萸碱 1.0 μmol·L⁻¹、吴茱萸碱 2.0 μmol·L⁻¹ 组、顺铂组 4.0 μg·mL⁻¹,检测凋亡率;机制部分分组同“2.2”项。

干预细胞 24 h 后收集上清液于 EP 管,用不含 EDTA 的胰酶消化贴壁细胞,加入 2 mL 全培终止消化,将细胞悬液收集到含有上清液的 EP 管,离心弃

去上清液,用 PBS 重悬转移至新的 1.5 mL EP 管,继续离心去上清,加入 100 μL 1×Binding Buffer 轻轻吹打重悬,分别加入 annexin V-FITC 5 μL 和 PI 5 μL 染色液避光染色 15 min,再加入 100 μL 1×Binding Buffer 终止染色。使用双荧光细胞分析仪检测凋亡率,实验重复 3 次。

2.4 Hoechst 33342 染色法观察细胞凋亡形态

常规消化细胞后接种于 6 孔板,细胞贴壁后弃除上清液加入不同浓度吴茱萸碱 1.0、2.0 μmol·L⁻¹。培养 24 h,弃上清,用 PBS 清洗 2 次,于每孔加入 1 mL 10 mg·L⁻¹ 的 Hoechst 33342 染色工作液,避光孵育 20 min, PBS 洗涤 2 次。Cytation™ 5 观测细胞形态并拍照,实验重复 3 次。

2.5 Western blot 检测 PI3K、p-AKT、PCNA、XIAP、Survivin 表达水平

药物分组同“2.3”项,干预细胞 24 h 后,提取总蛋白定量,配制蛋白样品、凝胶分离体系,将蛋白样品加入泳道,在浓缩胶中采用 40 V 电压浓缩,进入分离胶后加压至 80 V 分离,200 mA 恒流转膜 2.5 h,5%脱脂奶粉封闭 1 h,一抗置于 4 °C 冰箱孵育过夜,二抗室温避光孵育 1.5 h。双色红外荧光成像系统进行扫膜,并用 Image Studio 分析条带信号值,实验重复 3 次。

2.6 统计学分析

使用 SPSS 26.0 软件分析数据,计量资料用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,多组间比较服从正态分布,采用单因素方差分析,组间方差齐时用 LSD 检验,方差不齐,选择 Games-Howell(A) 检验;不服从正态分布资料,采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 吴茱萸碱对鼻咽癌 5-8F 细胞增殖的影响

与溶剂对照组相比,不同浓度(0.5、1.0、2.0、4.0 μmol·L⁻¹)吴茱萸碱组的细胞增殖曲线降低,且细胞相对增殖率显著低于溶剂对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),表明吴茱萸碱能够抑制 5-8F 细胞增殖。详见图 1。

3.2 吴茱萸碱对鼻咽癌 5-8F 细胞凋亡率的影响

与溶剂对照组比较,吴茱萸碱组细胞凋亡率明显提高($P < 0.01$)(见表 1 和图 2)。Hoechst 33342 染色结果显示,吴茱萸碱组细胞核亮蓝色荧光增强,细胞核边缘不清晰,核内出现点状式破碎等凋亡特征(见图 3)。

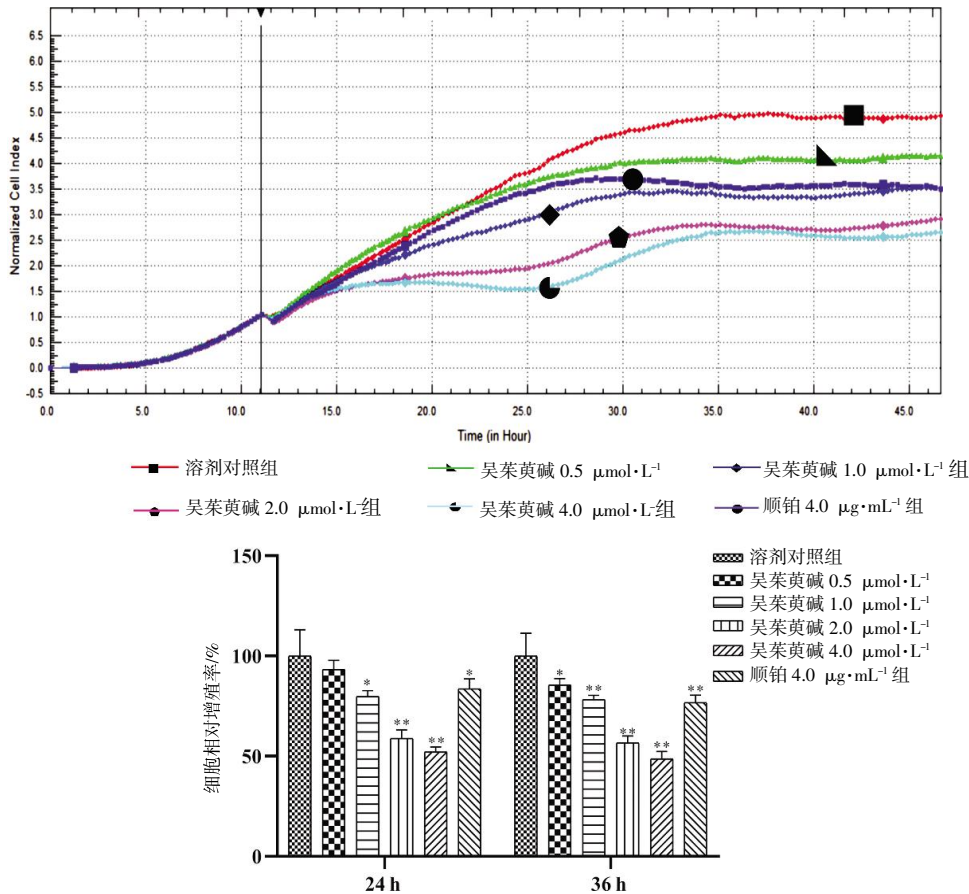


图1 不同浓度吴茱萸碱对5-8F细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

注:与溶剂对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

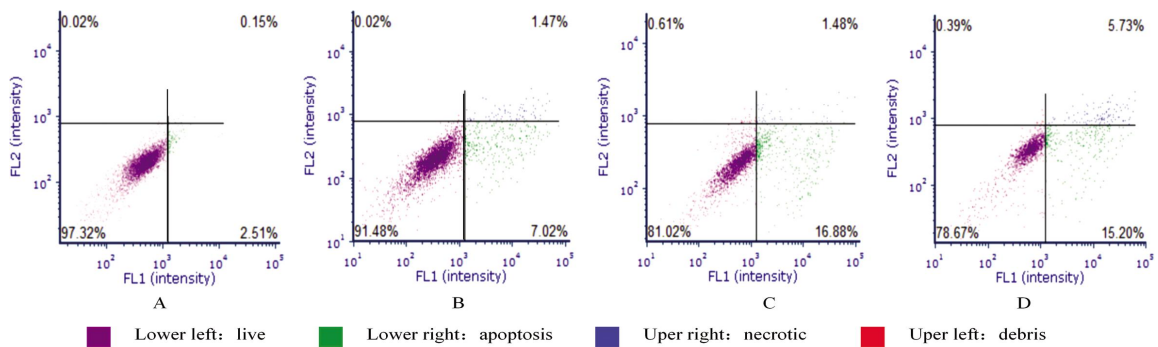


图2 吴茱萸碱对鼻咽癌5-8F细胞凋亡的影响

注:A.溶剂对照组;B.吴茱萸碱 $1.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组;C.吴茱萸碱 $2.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组;D.顺铂 $4.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组。

表1 吴茱萸碱干预鼻咽癌细胞24 h后的凋亡率($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	细胞凋亡率/%
溶剂对照组	2.57±0.37
吴茱萸碱 $1.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	7.63±0.87**
吴茱萸碱 $2.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	19.15±0.98**
顺铂 $4.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组	20.92±0.13**

注:与溶剂对照组比较,** $P<0.01$ 。

3.3 吴茱萸碱对鼻咽癌5-8F细胞PI3K/AKT信号通路和增殖、凋亡相关蛋白表达水平的影响

与溶剂对照组比较,吴茱萸碱 $1.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组

p-AKT、Survivin蛋白表达下降,但差异无统计学意义($P>0.05$),PI3K、XIAP、PCNA明显降低($P<0.01$);吴茱萸碱 $2.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组PI3K、p-AKT、PCNA、XIAP、Survivin蛋白表达水平均明显降低($P<0.01$)。详见图4。

3.4 吴茱萸碱通过PI3K/AKT信号通路对鼻咽癌细胞增殖凋亡的影响

与溶剂对照组相比,PI3K/AKT信号通路激活剂(SC79)能够提高PI3K、p-AKT、PCNA、XIAP、Survivin的表达水平($P<0.01$ 或 $P<0.05$),而PI3K/AKT信号通

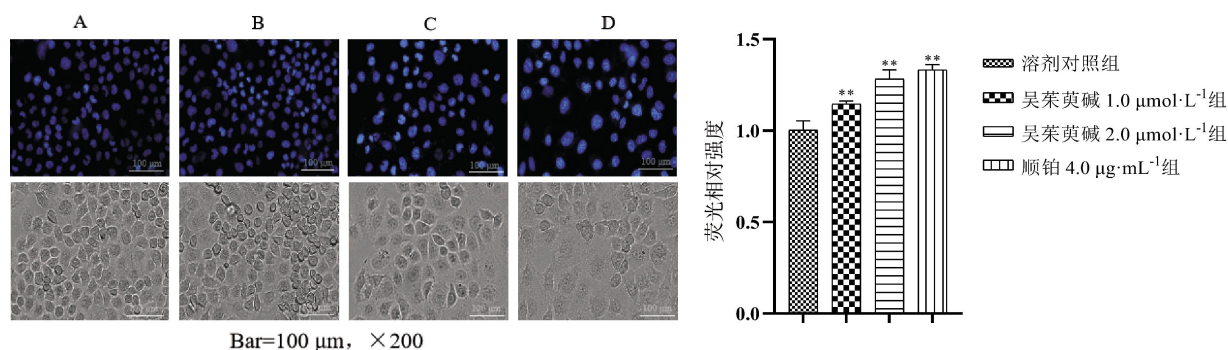


图3 吴茱萸碱对鼻咽癌 5-8F 细胞形态的影响

注:A.溶剂对照组;B.吴茱萸碱 1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组;C.吴茱萸碱 2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组;D.顺铂 4.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组。与溶剂对照组比较,** $P<0.01$ 。

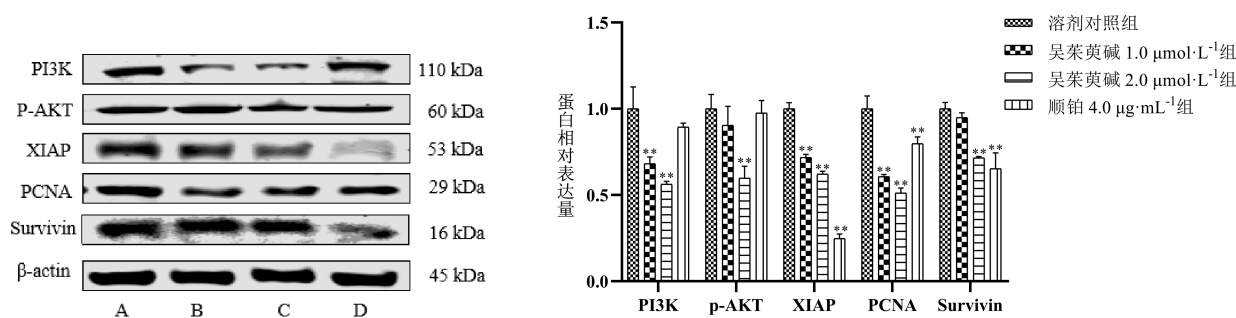
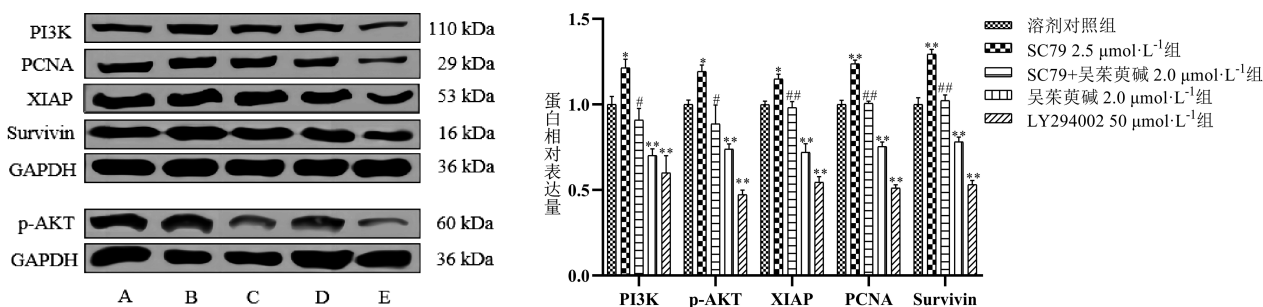


图4 吴茱萸碱对鼻咽癌 5-8F 细胞蛋白表达的影响

注:A.溶剂对照组;B.吴茱萸碱 1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组;C.吴茱萸碱 2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组;D.顺铂 4.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组。与溶剂对照组比较,** $P<0.01$ 。

图5 吴茱萸碱通过 PI3K/AKT 信号通路对增殖凋亡相关蛋白的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

注:A.溶剂对照组;B. SC79 2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组;C. SC79+吴茱萸碱 2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组;D.吴茱萸碱 2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组;E. LY294002 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组。与溶剂对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与吴茱萸碱 2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

路抑制剂(LY294002)能够降低 PI3K、p-AKT、PCNA、XIAP、Survivin 的表达水平($P<0.01$)。与吴茱萸碱 2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比,激活剂联合药物(SC79+吴茱萸碱 2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组的 PI3K、p-AKT、PCNA、XIAP、Survivin 表达水平升高($P<0.01$ 或 $P<0.05$)(见图 5)。使用 PI3K/AKT 信号通路激活剂后,与吴茱萸碱 2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组相比,SC79+吴茱萸碱 2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞的增殖曲线升高,且细胞增殖率增加($P<0.01$ 或 $P<0.05$),凋亡率降低($P<0.01$)(见表 2、图 6-7)。

4 讨论

鼻咽癌发生位置隐蔽,前期症状不典型,如何实现鼻咽癌的精准诊治,制订“高效低毒”的治疗方案,

表2 PI3K/AKT 信号通路激活后吴茱萸碱对鼻咽癌细胞凋亡率的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	凋亡率/%
溶剂对照组	2.93±1.04
SC79 2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	2.55±0.48*
SC79+吴茱萸碱 2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	14.93±0.70**##
吴茱萸碱 2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	19.56±1.06**
LY294002 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	9.74±0.65**

注:与溶剂对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与吴茱萸碱 2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较,## $P<0.01$ 。

仍是亟待解决的问题。中药单体对抑制鼻咽癌细胞恶性生物学行为具有一定的抑制作用,本课题组前期研究发现黄芩苷能够促进自噬^[14];刘洁等^[15]发现

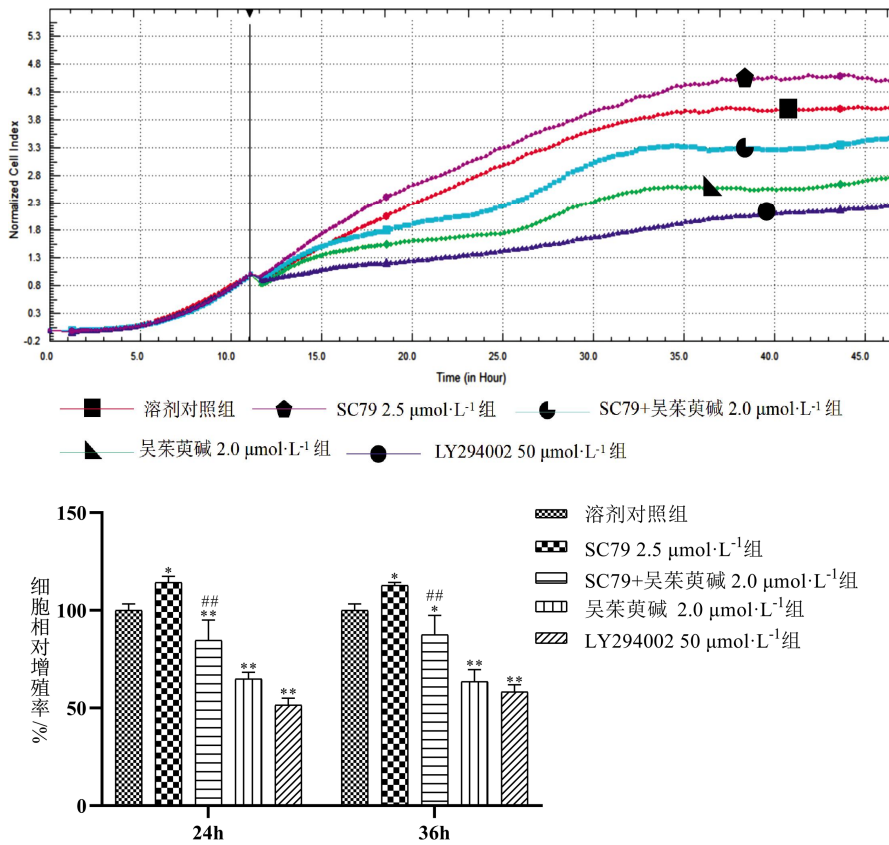


图6 吴茱萸碱通过PI3K/AKT信号通路对5-8F细胞增殖活性的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

注:与溶剂对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与吴茱萸碱 $2.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较,## $P<0.01$ 。

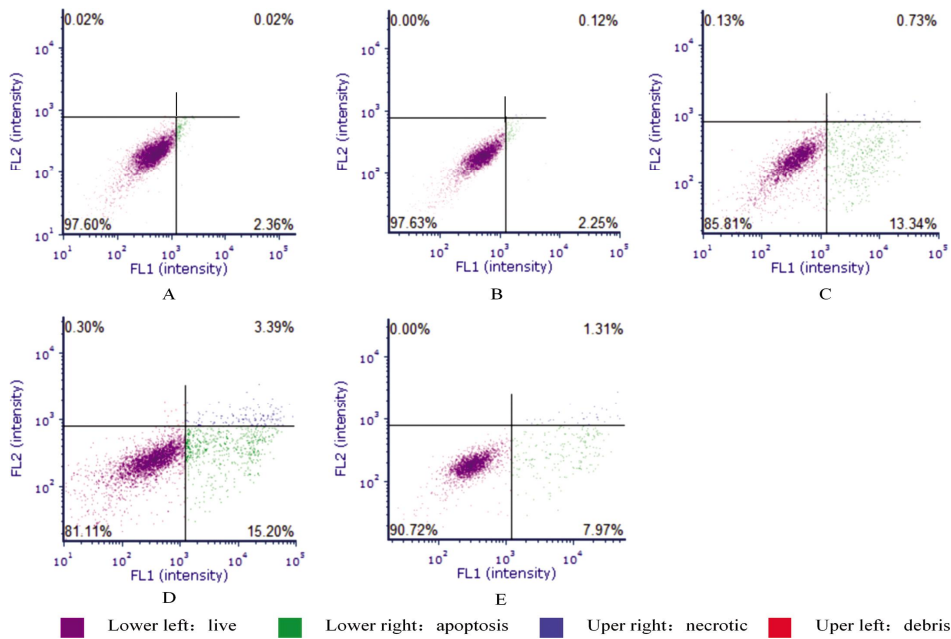


图7 PI3K/AKT信号通路在吴茱萸碱诱导鼻咽癌细胞凋亡中的作用

注:A.溶剂对照组;B.SC79 $2.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组;C.SC79+吴茱萸碱 $2.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组;D.吴茱萸碱 $2.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组;E.LY294002 $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组。

黄芩苷能够通过调控TGF- β 1/ERK1/2信号通路抑制鼻咽癌CNE2细胞增殖;周芳亮等^[16]证实小檗碱联合人参皂苷可协同抑制鼻咽癌细胞迁移。

X连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apop-

osis protein, XIAP)在鼻咽癌中呈高表达,抑制XIAP蛋白的表达能够促进鼻咽癌细胞的凋亡^[17],存活蛋白Survivin具有抗凋亡及促进增殖作用,研究表明,抑制Survivin的表达能够减缓鼻咽癌细胞增殖活

性,并加快肿瘤细胞的凋亡进度^[18]。增殖细胞核抗原蛋白(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)可促进 DNA 复制与修复,促使肿瘤细胞增殖,在肿瘤中能够反映肿瘤细胞增殖活性^[19]。本实验通过 RTCA 证实了不同浓度吴茱萸碱能够抑制鼻咽癌细胞增殖,在吴茱萸碱作用下,细胞核亮蓝荧光染色增强,胞核边界模糊,细胞凋亡率升高,并且吴茱萸碱下调了鼻咽癌 5-8F 细胞中 XIAP、Survivin、PCNA 的表达水平,提示吴茱萸碱抑制鼻咽癌增殖和诱导凋亡的效应可能与抑制 XIAP、Survivin、PCNA 蛋白的表达相关。PI3K/AKT 信号通路是细胞内重要的信号通路之一,人体内多数肿瘤蛋白和肿瘤抑制因子在 PI3K/AKT 信号转导通路中以一种平衡的方式会聚参与细胞代谢和信号调节,但在肿瘤发展中,这种平衡可通过激活和失活机制打破。在多数肿瘤细胞中,吴茱萸碱能够调控 PI3K/AKT 信号通路诱导肿瘤细胞的凋亡^[20-22],在鼻咽癌中尚无报道。本研究证实吴茱萸碱能够抑制 PI3K/AKT 信号通路活性,且使用 PI3K/AKT 信号通路激活剂后,吴茱萸碱抑制 PI3K、p-AKT、PCNA、XIAP、Survivin 蛋白表达的能力被减弱,同时吴茱萸碱抑制鼻咽癌细胞增殖和诱导凋亡的效应受到了抑制。而 LY294002 组的蛋白表达水平和增殖活性均降低,凋亡率升高,与吴茱萸碱组对细胞的作用趋势一致,提示吴茱萸碱抑制鼻咽癌 5-8F 细胞增殖和诱导凋亡的部分机制是通过调控 PI3K/AKT 信号通路实现的。

综上所述,本研究证实吴茱萸碱能够抑制鼻咽癌细胞增殖并诱导凋亡,并初步验证了其抗鼻咽癌作用与抑制 PI3K/AKT 信号通路,进而降低增殖和凋亡相关蛋白 PCNA、XIAP、Survivin 的表达水平有关。

参考文献

- [1] 潘 锋.免疫疗法开启复发转移头颈肿瘤治疗新时代:2021《CSCO 头颈部肿瘤诊疗指南》发布[J].中国医药导报,2021,18(15):1-3.
- [2] 康 敏.中国鼻咽癌放射治疗指南(2020 版)[J].中华肿瘤防治杂志,2021,28(3):167-177.
- [3] 周 雄,杨 明,李 翔,等.中药单体成分调节肿瘤微环境的研究进展[J].中草药,2021,52(14):4398-4409.
- [4] WANG T T, QI D, HU X Y, et al. A novel evodiamine amino derivative as a PI3K/AKT signaling pathway modulator that induces apoptosis in small cell lung cancer cells[J]. European Journal of Pharmacology, 2021, 906: 174215.
- [5] 易礼俊,徐其银,黄 君.吴茱萸碱对人甲状腺癌细胞增殖和凋亡的影响及其机制[J].安徽医药,2021,25(12):2369-2372.
- [6] 孙 强,刘茂伦,杨 寒,等.吴茱萸碱通过调控 Hedgehog 信号通路诱导结直肠癌 HCT-116 细胞凋亡的研究[J].中药药理与临床,

- 2022,38(1):71-77.
- [7] NOOROLYAI S, SHAJARI N, BAGHBANI E, et al. The relation between PI3K/AKT signalling pathway and cancer[J]. Gene, 2019, 698: 120-128.
- [8] MIRICESCU D, TOTAN A, STANESCU-SPINU I I, et al. PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in breast cancer: From molecular landscape to clinical aspects[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 22(1): 173.
- [9] CHEN H X, ZHOU L, WU X R, et al. The PI3K/AKT pathway in the pathogenesis of prostate cancer[J]. Frontiers in Bioscience, 2016, 21(5): 1084-1091.
- [10] EDIRIWEERA M K, TENNEKOON K H, SAMARAKOON S R. Role of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in ovarian cancer: Biological and therapeutic significance[J]. Seminars in Cancer Biology, 2019, 59: 147-160.
- [11] FATTAHI S, AMJADI-MOHEB F, TABARIPOUR R, et al. PI3K/AKT/mTOR signaling in gastric cancer: Epigenetics and beyond [J]. Life Sciences, 2020, 262: 118513.
- [12] JIANG N N, DAI Q J, SU X R, et al. Role of PI3K/AKT pathway in cancer: The framework of malignant behavior[J]. Molecular Biology Reports, 2020, 47(6): 4587-4629.
- [13] 胡 晶,戴 娜,徐冰雁,等.益气解毒方通过 MAPK/ERK 信号通路抑制鼻咽癌细胞增殖[J].中国中药杂志,2018,43(6):1221-1227.
- [14] 苏 芮,邹 攀,朱镇华,等.黄芩苷通过调控细胞自噬抑制鼻咽癌细胞增殖[J].生命的化学,2022,42(2):361-370.
- [15] 刘 洁,史红健,熊 雨,等.黄芩苷通过 TGF- β 1/ERK1/2 信号通路抑制鼻咽癌细胞增殖[J].湖南中医药大学学报,2021,41(8): 1154-1159.
- [16] 周芳亮,胡 晶,蔺 婷,等.PI3K/Akt 信号通路在小檗碱联合人参皂苷 Rg3 诱导鼻咽癌细胞凋亡中的调控作用[J].中国药理学通报,2021,37(1):43-52.
- [17] 梁 猛.XIAP 基因对 TNF- α 诱导的鼻咽癌细胞凋亡及 VEGF 和 COX-2 表达的机制研究[J].蚌埠医学院学报,2022,47(3):284-288.
- [18] 曾 宸.鼻咽癌中 Survivin 和 Caspase-3 表达的相关性研究[D].贵阳:贵州医科大学,2016.
- [19] 姚 利,聂国辉,蔡 智,等.Hedgehog 信号通路中 Shh 与 PCNA 蛋白在鼻咽癌中的表达及临床意义[J].中国肿瘤外科杂志,2017, 9(1):17-20.
- [20] WANG R, DENG D N, SHAO N Y, et al. Evodiamine activates cellular apoptosis through suppressing PI3K/AKT and activating MAPK in glioma[J]. OncoTargets and Therapy, 2018, 11: 1183-1192.
- [21] HONG Z, WANG Z H, ZHOU B, et al. Effects of evodiamine on PI3K/Akt and MAPK/ERK signaling pathways in pancreatic cancer cells[J]. International Journal of Oncology, 2020, 56(3): 783-793.
- [22] HWANG S T, UM J Y, CHINNATHAMBI A, et al. Evodiamine mitigates cellular growth and promotes apoptosis by targeting the c-met pathway in prostate cancer cells[J]. Molecules, 2020, 25(6): 1320.