DOI:10.16016/j.1000-5404.201508031

吴茱萸碱抑制 PI3K/AKT 通路诱导小细胞肺癌 H1688 和 H446 细胞凋亡

祁 迪,谭群友,王如文,邓 波,方春抒,韦转琴,康珀铭,陶绍霖,范小青,刘 玲 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所全军胸外科研究所)

[**摘要**] **目的** 探讨 PI3K/AKT 通路在吴茱萸碱(evodiamine, EVO)诱导小细胞肺癌 H1688 和 H446 细胞凋亡中的作用。**方法** 分别以不同浓度(1、5、20 μmol/L)和不同作用时间(3、6、12、24、48 h)的 EVO 处理 H1688 和 H446 细胞,Western blot 检测 p-AKT 的表达水平。以 EVO 分别作用于经过 PI3K/AKT 通路激活剂 IGF-1 或抑制剂 LY294002 预处理后的 H1688 和 H446 细胞,Western blot 检测 p-AKT 蛋白的表达。将 EVO 作用于 IGF-1 预处理的 H1688 细胞后,Annexin-V/PI 染色检测细胞凋亡率,Western blot 检测 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白的表达水平。以不同浓度的 EVO 处理 H1688 细胞,Western blot 检测 t-AKT、PTEN 蛋白表达,RT-PCR 检测 AKT mRNA 表达。**结果** 与对照组相比,不同浓度和不同作用时间的 EVO 处理后 H1688 和 H446 细胞中 p-AKT 表达水平下降($P<0.05$)。而 IGF-1 可减弱 EVO 下调 H1688 和 H446 细胞 p-AKT 的作用($P<0.05$),并降低 EVO 在 H1688 中的增殖抑制和凋亡诱导作用。EVO 与 LY294002 下调 p-AKT 蛋白的效果差异无统计学意义($P>0.05$)。EVO 对 H1688 细胞 t-AKT 蛋白和 AKT mRNA 的表达无影响,EVO 可明显上调 PTEN 的表达($P<0.05$)。**结论** 抑制 PI3K/AKT 通路活性是 EVO 诱导 H1688 和 H446 细胞凋亡的重要机制之一。

[**关键词**] 小细胞肺癌;吴茱萸碱;PI3K/AKT;PTEN;凋亡
[**中图法分类号**] R285.5;R73-361;R734.2 [**文献标志码**] A

Evodiamine induces apoptosis of small-cell lung cancer H1688 and H446 cells *via* inhibiting PI3K/AKT pathway

Qi Di, Tan Qunyou, Wang Ruwen, Deng Bo, Fang Chunshu, Wei Zhuanqin, Kang Boming, Tao Shaolin, Fan Xiaoqing, Liu Ling (Department of Thoracic Surgery, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the role of evodiamine (EVO) in inducing apoptosis of small-cell lung cancer H1688 and H446 cells by inhibiting PI3K/AKT pathway. **Methods** H1688 and H446 cells were treated with EVO at different concentrations (1, 5, 20 μmol/L) for different time periods (3, 6, 12, 24 and 48 h), respectively. Thereafter, p-AKT was assayed by Western blotting. After pretreatment with PI3K/AKT pathway activator IGF-1 or inhibitor LY294002, H1688 and H446 cells were treated with EVO. Subsequently, p-AKT was detected by Western blotting. After H1688 cells were pretreated with IGF-1 and then treated with EVO, they were stained with Annexin-V/PI, and analyzed by flow cytometry. The expression of Bcl-2, Bax and Caspase-3 was detected by Western blotting respectively. After H1688 cells were treated with different concentrations of EVO, the expression levels of PTEN and t-AKT were assayed byWestern blotting, and AKT mRNA level was detected by RT-PCR. **Results** Compared with the control group, p-AKT expression was decreased in H1688 and H446 cells treated with different concentrations of EVO for different times ($P<0.05$). In addition, IGF-1 attenuated down-regulation of p-AKT in H1688 and H446 cells induced by EVO

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81172239)
[**通信作者**] 谭群友,电话:(023)68757986,E-mail:tanqy001@163.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151204.1340.025.html(2015-12-04)

($P<0.05$), and inhibited the apoptosis of H1688 cells induced by EVO. There was no significant difference between EVO and LY294002 in the effect of down-regulating p-AKT ($P>0.05$). EVO showed no significant effect on the expression of t-AKT protein and AKT mRNA ($P>0.05$). However, EVO significantly increased the expression of PTEN protein($P<0.05$). **Conclusion** Inhibition of PI3K/AKT pathway plays a key role in EVO-induced apoptosis of small-cell lung cancer H1688 and H446 cells.

[**Key words**] small-cell lung cancer; evodiamine; PI3K/AKT; PTEN; apoptosis

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81172239). Corresponding author: Tan Qunyou, Tel:86-23-68757986, E-mail: tanqy001@163.com

小细胞肺癌(small-cell lung cancer, SCLC)的发病率在所有肺癌类型中约占15%[1],是一种恶性程度极高的神经内分泌型肺肿瘤。尽管已进行广泛的基础和临床研究,近30年来SCLC的治疗并未取得突破性进展[2]。虽然SCLC对放疗和化疗敏感性较高,但因SCLC细胞具有很强的增殖和转移活性[2],难以早期诊断和治疗,多数患者就诊之初即丧失手术适应证,5年生存率不足5%[3]。传统放疗、化疗并不能得到理想的疗效,而且毒副作用较强,因而在小细胞肺癌的综合治疗中开发新型药物很有意义。

吴茱萸碱(evodiamine, EVO)是传统中药吴茱萸果实提取物中的主要成分,可有效抑制多种恶性肿瘤细胞生长,而对正常细胞无明显毒性[4],这提示EVO在多种恶性肿瘤的治疗中具有潜在的应用价值,已成为近年来的研究热点。本课题组前期研究发现,以EVO处理SCLC H1688和H446细胞,可引起细胞周期G_2/M期阻滞,并经线粒体和内质网途径诱导细胞凋亡[5]。然而EVO诱导SCLC凋亡的具体分子机制尚未完全阐明,需要进一步研究。

磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/AKT)信号通路参与增殖、凋亡、迁移等重要细胞活动的调节,其失调与多种恶性肿瘤的发生、发展及化疗耐药密切相关,已成为颇具研究价值的治疗靶点[6-8]。PI3K/AKT通路在SCLC的发生过程中起重要作用[9],对该通路的抑制可有效影响SCLC细胞的存活、增殖及肿瘤生长[10]。此外SCLC中PI3K/AKT通路的异常及其相关基因突变在亚洲人群中具有可识别的特征,这可被视为该人群重要的治疗优势[11]。有研究表明EVO对黑色素瘤、胰腺癌发挥抗肿瘤作用,通过抑制PI3K/AKT通路诱导凋亡是其中重要的机制之一[12-13]。EVO作用于SCLC细胞是否抑制了PI3K/AKT通路活性,以及PI3K/AKT通路的抑制是否进而诱导细胞凋亡尚不明确。因此,本研究以SCLC H1688和H446细胞为对象,验证PI3K/AKT通路在EVO诱导细胞凋亡中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞株、主要药物和试剂

人小细胞肺癌细胞株NCI-H1688和NCI-H446分别购自中国医学科学院细胞库和中国科学院上海细胞库。吴茱萸碱(EVO)购自武汉远程科技发展有限公司,纯度99.13%。胰岛素样生长因子1(IGF-1)购自北京博奥森生物技术有限公司。LY294002购自美国Selleck公司。胰蛋白酶、RPMI1640培养基、胎牛血清(FBS)购自赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司。一抗p-AKT(S308)购自美国Cell signal technology公司,一抗β-actin购自Thermo Fisher Scientific公司,一抗Bcl-2、Bax、Caspase-3、t-AKT和二抗辣根过氧化物酶山羊抗兔IgG购自北京博奥森生物技术有限公司。第10号染色体缺失的磷脂酶和张力蛋白类似物(PTEN)购自美国Bioworld Technology公司,Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒购自上海碧云天生物科技研究所。

1.2 方法

1.2.1 药物配制 参照预实验情况及前期研究[5]结果,将EVO溶解于二甲基亚砜(DMSO)制成终浓度为40 mmol/L的储存液,-20 ℃避光分装保存备用,实验前以RPMI1640培养基稀释至所需浓度,DMSO终浓度小于0.025%。

1.2.2 细胞培养 RPMI1640培养基加入10% FBS以及100 IU/mL青霉素、100 mg/mL链霉素,于含5% CO_2、饱和湿度的细胞培养箱中37 ℃恒温培养,选取处于对数生长期的H1688和H446细胞进行实验。

1.2.3 Western blot检测EVO作用H1688和H446细胞后p-AKT蛋白的表达 将H1688和H446细胞以5×10^5/孔接种于6孔板内培养24 h,实验组加入不同浓度(1、5、20 μmol/L)的EVO作用24 h或加入5 μmol/L的EVO作用不同时间(3、6、12、24、48 h),对照组加入与实验组等量的溶媒DMSO培养相应时间,收集细胞并加入含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液,于冰上裂解细胞后离心取上清液提取总蛋白。测定各组蛋白浓度

并调至一致,加入上样缓冲液后于 SDS-PAGE 凝胶中进行电泳分离,以半干法转移到 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶封闭 1 h,加入一抗 p-AKT(1∶2 000),β-actin(1∶2 000),4 ℃孵育过夜。TBST 洗膜后加入二抗并室温孵育 1 h,TBST 再次洗膜后加入显影液,通过 ChemiDoc XRS 化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司)检测。使用 Image J 软件对图像进行灰度分析,计算目的蛋白与 β-actin 灰度比,进而得出各实验组蛋白与对照组的相对表达量。

1.2.4 Western blot 检测 EVO 作用于 IGF-1 或 LY294002 预处理的 H1688、H446 细胞后 p-AKT 蛋白和凋亡相关蛋白的表达 将 H1688 和 H446 细胞以 5×10^5/孔接种于 6 孔板内培养 24 h,将5 μmol/L 的 EVO(对照为相应量溶媒 DMSO)分别加入到 100 ng/mL 的 IGF-1(对照相应量溶媒 PBS)或 10 μmol/L 的 LY294002(对照为相应量 DMSO)预处理的细胞中,分组情况为:对照组、EVO 组、IGF-1(或 LY29400)组、EVO + IGF-1(或 LY294002)组,继续培养 24 h 后收集细胞提取总蛋白。参照 1.2.3 方法通过 Western blot 检测 p-AKT 蛋白。选取 H1688 细胞,参照上述方法处理,分为对照组、EVO 组、IGF-1 组、EVO + IGF-1 组,提取蛋白后经 Western blot 检测凋亡相关蛋白(Bcl-2、Bax、Caspase-3),使用 Image J 软件对图像进行灰度分析,并计算相对表达量。

1.2.5 流式细胞术检测 EVO 作用于 IGF-1 预处理的 H1688 细胞后细胞凋亡率 参照 1.2.4 方法分组处理 H1688 细胞,分组情况为:对照组、EVO 组、IGF-1 组、EVO + IGF-1 组,消化收集各组细胞后离心弃上清,以 PBS 缓冲液洗涤 3 次,并用 Annexin V-FITC 结合液重悬细胞,按试剂盒说明书先后加入 Annexin V-FITC 和 PI 室温避光孵育 10 min,随即使用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

1.2.6 RT-PCR 和 Western blot 检测 EVO 作用于 H1688 细胞后 t-AKT mRNA 和蛋白水平的表达以及 PTEN 蛋白水平改变 将 H1688 细胞以 5×10^5/孔接种于6 孔板内培养24 h,实验组加入不同浓度(1、5、20 μmol/L)的 EVO 作用24 h,对照组加入与实验组等量的溶媒 DMSO 培养相应时间。以试剂盒提取各组细胞总 RNA,按反转录试剂盒说明书合成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 t-AKT 的 PCR 扩增,PCR 反应的循环条件为 94 ℃ 3 min 进入循环;94 ℃ 30 s,40 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共 35 个循环;72 ℃ 5 min。扩增产物于琼脂糖凝胶中进行电泳,通过 ChemiDoc XRS 化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司)检测。根据 NCBI 数据库中基因序列设计引物,AKT 正义链:5′-GCCCACACGCTTACTGAGA-3′,反义链:5′-AGCCCGAAGTCCGTTATCTT-3′,PCR 反应产物 308 bp。β-actin 正义链:5′-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-3′,反义链:5′-GCTGTCACCTTCACCGTTCC-3′,PCR 反应产物 268 bp。参照 1.2.3 方法通过 Western blot 检测 t-AKT 蛋白表达水平。使用 Image J 软件对图像进行灰度分析,并计算相对表达量。

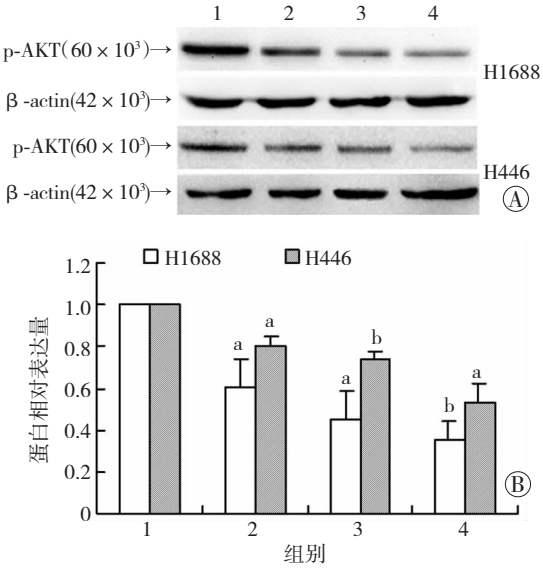
1.3 统计学分析

实验均重复 3 次,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,多组间均数的比较采用方差分析,两组间均数比较采用 t 检验。

2 结果

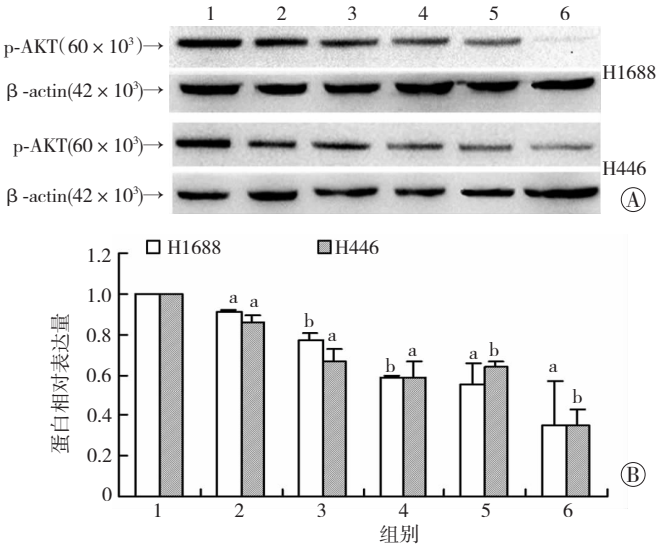
2.1 在 EVO 作用下 SCLC 细胞中 p-AKT 蛋白的表达水平下降

以 1、5、20 μmol/L 的 EVO 作用于 H1688 和 H446 细胞 24 h 后,检测各组细胞中 p-AKT 蛋白的相对表达量,相比于对照组均有下降,各组间差异有统计学意义($P<0.05$,图 1),并且呈浓度-效应依赖性。以 5 μmol/L的 EVO 作用于 H1688 和 H446 细胞 3、6、12、24、48 h 后,p-AKT 蛋白相对表达量与对照组相比均有不同程度下降,各组间差异有统计学意义($P<0.05$,图 2),且表现出时间-效应依赖性。



A:Western blot 检测 p-AKT 蛋白的表达;B:p-AKT 蛋白相对表达量;1:对照(DMSO)组;2:1 μmol/L EVO 组;3:5 μmol/L EVO 组;4:20 μmol/L EVO 组;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

图 1 Western blot 检测不同浓度 EVO 作用 SCLC 细胞 24 h 后 p-AKT 蛋白的表达



A:Western blot 检测 p-AKT 蛋白的表达;B:p-AKT 蛋白相对表达量;1:对照(DMSO)组;2:EVO 作用 3 h 组;3:EVO 作用 6 h 组;4:EVO 作用 12 h 组;5:EVO 作用 24 h 组;6:EVO作用 48 h 组;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

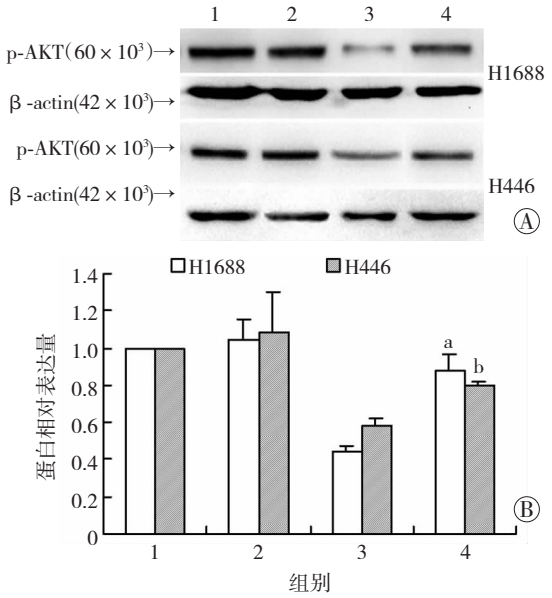
图 2　Western blot 检测 5 μmol/L EVO 作用 SCLC 细胞不同时间后 p-AKT 蛋白的表达

2.2　PI3K/AKT 通路激活剂可减弱 EVO 下调 SCLC 细胞 p-AKT 蛋白的作用

以 EVO (5 μmol/L)和 IGF-1 (100 ng/mL)作为干预因素分组处理 H1688 和 H446 细胞 24 h 后,各组间 p-AKT 的表达差异具统计学意义($P<0.05$)。EVO + IGF-1 组与 EVO 组相比,H1688 和 H446 细胞中p-AKT 蛋白的相对表达量均有显著上升($P<0.05$),见图 3。这提示 EVO 下调 SCLC 细胞中 p-AKT 表达的作用机制可能与抑制 PI3K/AKT 通路有关。

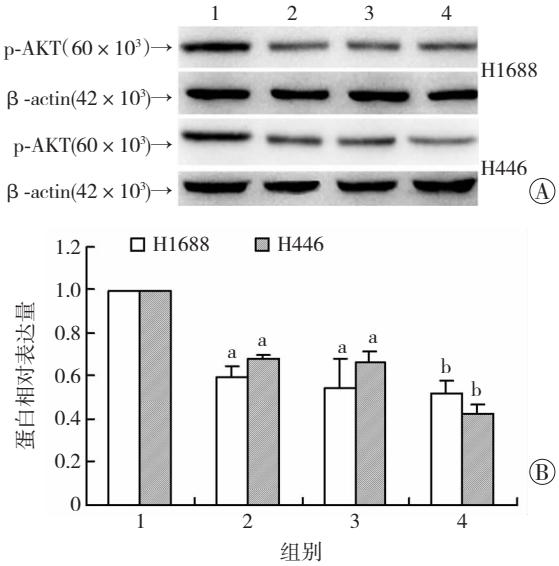
2.3　EVO 抑制 SCLC 细胞 PI3K/AKT 通路的作用效果接近于 PI3K 特异性抑制剂

将 PI3K 特异性抑制剂 LY294002(10 μmol/L)和 EVO(5 μmol/L)单独并联合作用于 H1688 和 H446 细胞,各组间 p-AKT 的表达差异有统计学意义($P<0.05$)。EVO 组和 LY294002 组的 H1688 和 H446 细胞中 p-AKT 的相对表达量与对照组相比均有显著下降,差异具统计学意义($P<0.05$),而 EVO 组与 LY294002 组之间差异无统计学意义。在 H1688 细胞中,EVO + LY294002 组 p-AKT 的相对表达量与 EVO 组、LY294002 组相比无明显降低,而在 H446 细胞中,EVO + LY294002 组 p-AKT 的相对表达量与 EVO 组、LY294002 组相比有显著下降($P<0.05$)。见图 4。说明 EVO 对 SCLC 细胞 PI3K/AKT 通路的抑制强度与 PI3K 特异性抑制剂 LY294002 相近,两者在 H446 细胞中表现出协同作用,而 H1688 细胞中无明显的协同作用。



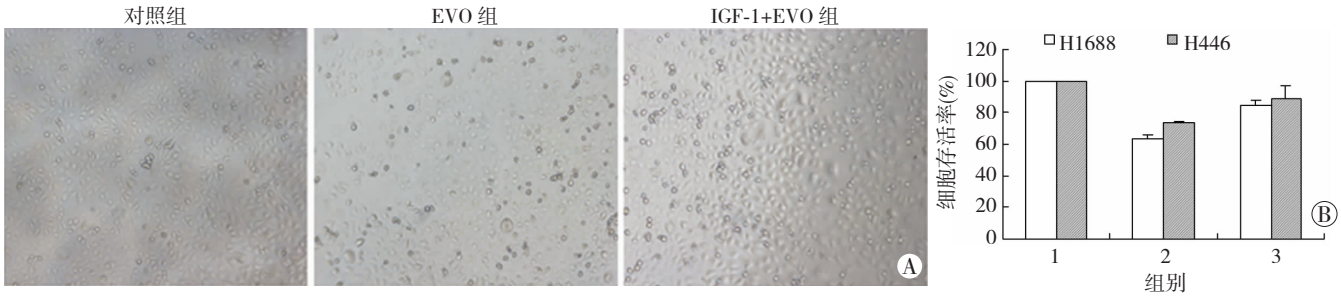
A:Western blot 检测 p-AKT 蛋白的表达;B:p-AKT 蛋白相对表达量;1:对照(溶媒)组;2:IGF-1(100 ng/mL)组;3:EVO(5 μmol/L)组;4:IGF-1 (100 ng/mL) + EVO (5 μmol/L)组;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 EVO(5 μmol/L)组比较

图 3　Western blot 检测 EVO 作用于 IGF-1 预处理的 SCLC 细胞 24 h 后 p-AKT 蛋白的表达



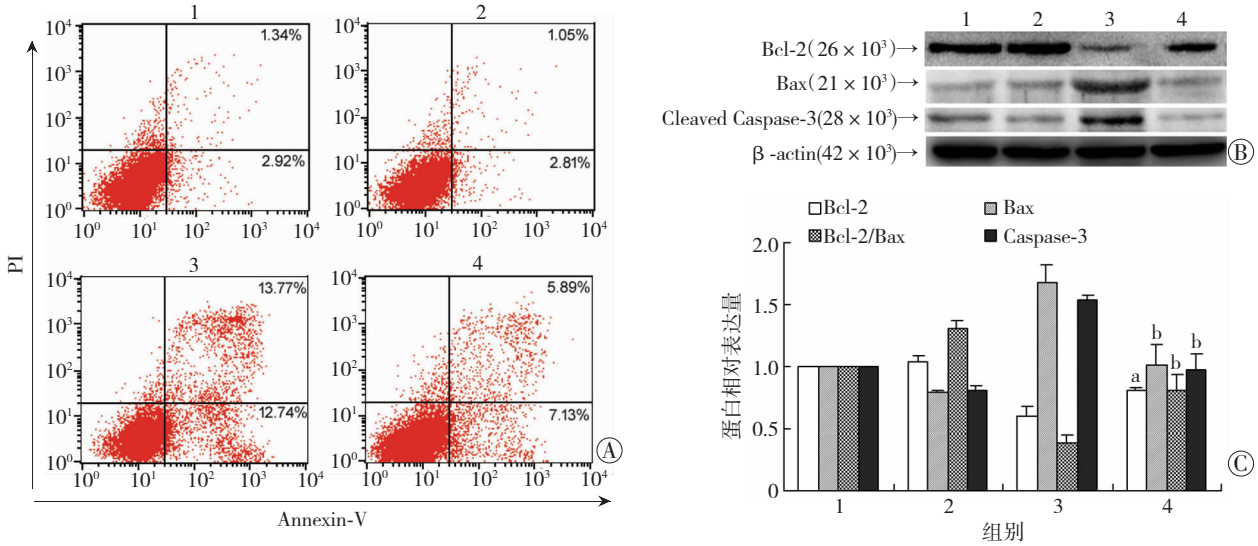
A:Western blot 检测 p-AKT 蛋白的表达;B:p-AKT 蛋白相对表达量;1:对照(溶媒)组;2:LY294002(10 μmol/L)组;3:EVO(5 μmol/L)组;4:LY294002(10 μmol/L) + EVO (5 μmol/L)组;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

图 4　Western blot 检测 EVO 和 LY294002 作用于 SCLC 细胞 24 h 后 p-AKT 蛋白的表达



A:细胞形态学观察(光学显微镜×40);B:MTT 法检测细胞存活率 1:对照(溶媒)组;2:EVO(5 μmol/L)组;3:IGF-1 (100 ng/mL) + EVO (5 μmol/L)组

图 5 EVO 作用于 IGF-1 预处理的 SCLC 细胞 24 h 后的细胞活性



1:对照(溶媒)组;2:IGF-1(100 ng/mL)组;3:EVO(5 μmol/L)组;4: IGF-1 (100 ng/mL) + EVO (5 μmol/L)组 A:流式细胞术 Annexin V-FITC/PI 染色检测 H1688 细胞凋亡率;B:Western blot 检测凋亡相关蛋白的表达;C:凋亡相关蛋白相对表达量 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 EVO(5 μmol/L)组比较

图 6 EVO 作用于 IGF-1 预处理的 SCLC 细胞 24 h 后细胞凋亡率及凋亡相关蛋白的改变

2.4 PI3K/AKT 通路激活剂可减弱 EVO 在 SCLC 细胞中抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡的作用

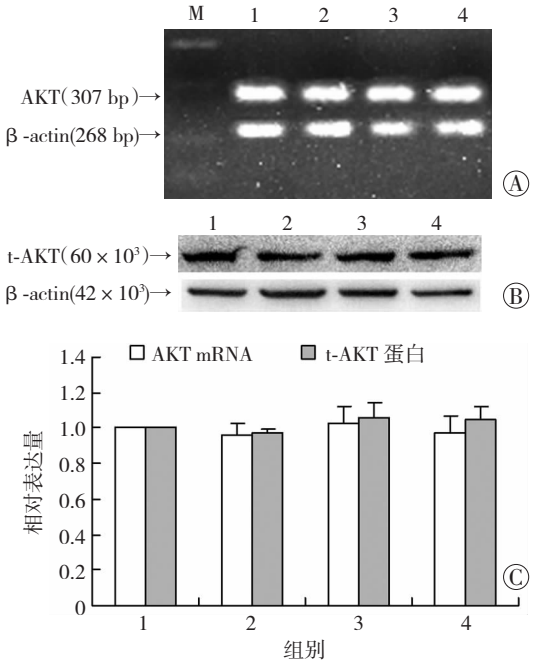
在 5 μmol/L EVO 作用下,H1688 和 H446 细胞伪足回缩,部分变圆、漂浮,存活率明显下降,而 IGF-1 的加入可以减弱 EVO 的作用,使细胞存活率回升。见图 5。此外 EVO 可显著提高 H1688 细胞的凋亡率,抑制 Bcl-2 蛋白的表达,并促进 Bax 蛋白的表达以及 Caspase-3 蛋白的活化。而 EVO (5 μmol/L) 加入到 IGF-1 (100 ng/mL) 预处理的 H1688 细胞中作用 24 h,与 EVO 单独作用的细胞相比,可发现细胞凋亡率显著下降($P<0.05$)、Bcl-2 蛋白的相对表达量增加($P<0.05$),Bax 蛋白的相对表达量下降 ($P<0.01$),Bax/Bcl-2 比值上升 ($P<0.01$),活化 Caspase-3 蛋白的相对表达量下降 ($P<0.01$)。见图 6。

2.5 EVO 作用下总 AKT(t-AKT)的表达无明显变化

以 1、5、20 μmol/L 的 EVO 作用于 H1688 细胞 24 h后,与对照组相比,t-AKT 的表达量在 mRNA 和蛋白的表达水平均无明显变化。见图 7。

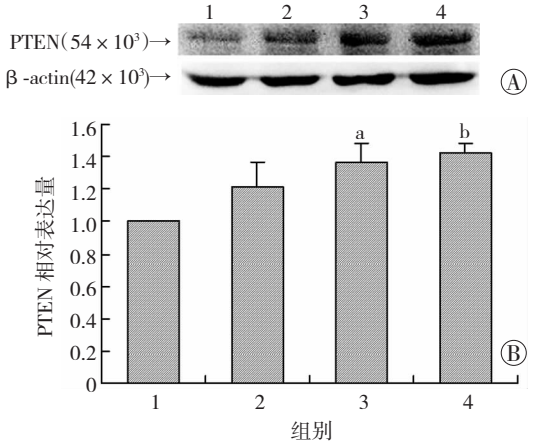
2.6 EVO 上调 SCLC 中 PTEN 的表达

以 1、5、20 μmol/L 的 EVO 作用于 H1688 细胞 24 h后,检测 PTEN 蛋白的相对表达量,结果显示 5 μmol/L和 20 μmol/L 的 EVO 组与对照组相比明显增加($P<0.05$),并表现出剂量-效应依赖性。见图 8。



M:DL2000 DNA Marker; 1:对照(溶媒 DMSO)组;2:1 μmol/L EVO 组;3:5 mol/L EVO 组;4:20 μmol/L EVO 组 A:RT-PCR 检测 AKT mRNA 的表达;B:Western blot 检测t-AKT蛋白的表达;C:AKT mRNA 和 t-AKT 蛋白相对表达量

图 7 RT-PCR 和 Western blot 检测不同浓度 EVO 作用 H1688 细胞 24 h 后 t-AKT mRNA 和蛋白的表达水平



1:对照(溶媒 DMSO)组;2:1 μmol/L EVO 组;3:5 mol/L EVO 组;4:20 μmol/L EVO 组;A:Western blot 检测 PTEN 蛋白的表达;B:PTEN 蛋白相对表达量;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

图 8 Western blot 检测不同浓度 EVO 作用 H1688 细胞 24 h 后 PTEN 蛋白的表达

3 讨论

PI3K/AKT 信号通路的异常激活在恶性肿瘤中广泛存在,是重要的肿瘤细胞存活途径[14]。在该信号转导通路中 AKT 蛋白处于中心位置,经磷酸化激活形成 p-AKT 后可进一步磷酸化多种下游蛋白,进而调控肿瘤细胞的存活、增殖和凋亡等[15]。AKT 蛋白的磷酸化水平(即 p-AKT 蛋白水平)可以反映 PI3K/AKT 通路的激活情况。本研究发现 EVO 作用于 H1688 和 H446 细胞后 p-AKT 蛋白水平显著降低,且表现出剂量依赖性和时间依赖性。有研究[12-13]显示 EVO 通过抑制 PI3K/AKT 通路在黑色素瘤细胞和胰腺癌细胞中诱导凋亡。这提示 PI3K/AKT 通路可能是 EVO 诱导 SCLC 细胞凋亡的重要途径之一。

有研究[16]证实 PI3K/AKT 通路激活剂 IGF-1 具有体外激活 PI3K/AKT 通路的作用,促进 AKT 蛋白磷酸化进而调控下游效应分子的活性。为进一步探究 EVO 引起的 p-AKT 蛋白下调是否通过 PI3K/AKT 通路介导,使用 IGF-1 进行验证。结果显示 IGF-1 可以明显减弱 EVO 诱导的 SCLC H1688 和 H446 细胞 p-AKT 蛋白下调,提示 EVO 下调 p-AKT 蛋白的作用与抑制 PI3K/AKT 通路有关。LY294002 作为一种 PI3K 高特异性抑制剂,具有抑制 PI3K/AKT 通路活性的作用[17]。为考查 EVO 抑制 PI3K/AKT 通路的作用强度,将 LY294002 和(或)EVO 加入到 SCLC 细胞中检测 p-AKT 蛋白水平,结果表明 EVO 抑制 PI3K/AKT 通路的作用效果接近于高效抑制剂 LY294002,而且在 H446 细胞中二者表现出明显的协同效应。然而尽管 EVO 在 H1688 细胞中的抑制作用更明显,但与 LY294002 的协同作用并不显著,这一现象的原因尚需进一步研究。

本课题组前期研究[5]结果表明 EVO 可显著抑制 SCLC H1688 和 H446 细胞活性,上调 Caspase-3、Caspase-9、Caspase-12 等凋亡相关蛋白,促进 Bax 并抑制 Bcl-2 mRNA 的表达,进而诱导凋亡。为进一步证实 EVO 抑制 PI3K/AKT 通路与其诱导凋亡之间的关系,选择 EVO 抑制 PI3K/AKT 通路作用更明显的 H1688 细胞为研究对象,以 EVO 作用于 IGF-1 预处理的 H1688 细胞。结果显示与 EVO 单独作用相比,IGF-1 加入可明显降低细胞凋亡率、凋亡执行因子 Caspase-3 的表达,而反映凋亡抑制情况的 Bcl-2/Bax 比明显升高。提示 IGF-1 可明显减弱 EVO 诱导 SCLC 细胞凋亡的作用,表明 PI3K/AKT 通路在 EVO 诱导 SCLC 细胞凋亡中发挥重要作用。此外,IGF-1 处理组与对照组相比,H1688 细胞中 p-AKT 的表达仅有小幅度的上调,这与 IGF-1 逆转 EVO 作用时表现出的显著效果并不相符。可能的原因是:H1688 细胞本身已存

在 PI3K/AKT 通路的异常激活,已经有很高的 p-AKT 表达水平,有研究[18]发现 SCLC 细胞中 IGF-1 的分泌及其与 IGF-1R 的结合水平很高,因而在此基础上施加外源性 IGF-1,对本已处于高位的 p-AKT 水平的上调幅度有限。

为进一步探究 EVO 抑制 PI3K/AKT 通路的机制,将不同浓度的 EVO 作用于 H1688 细胞,检测 t-AKT 蛋白以及 AKT mRNA 的表达水平,结果表明 EVO 对 t-AKT 蛋白及 AKT mRNA 的表达无明显影响。提示 EVO 下调 p-AKT 是通过抑制 AKT 的磷酸化,而非抑制 AKT 的表达实现的。PTEN 是一种通过 PI3K/AKT 通路起作用的肿瘤抑制基因。PTEN 蛋白可促进磷脂酰肌醇-1,4,5-三磷酸(PIP3)转化为磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(PIP2),进而抑制 AKT 蛋白的磷酸化,发挥负性调控 PI3K/AKT 通路活性的作用[19]。本研究发现不同浓度的 EVO 作用于 H1688 细胞后,PTEN 蛋白的表达水平发生剂量依赖性升高。这表明通过上调 PTEN 蛋白表达间接抑制 PI3K/AKT 通路是 EVO 诱导 H1688 细胞凋亡的可能机制之一,该作用机制有待进一步研究验证。此外,有研究[20]证明 PTEN 基因异常是 SCLC 进展的重要驱动因素,在啮齿类动物模型中 PTEN 异常可通过肿瘤抑制基因 Rb 和 P53 的缺失加速 SCLC 的进展,而且这一独特效应未见于其它类型肿瘤。这表明 EVO 上调 PTEN 的作用在 SCLC 治疗中具有潜在应用优势。在我们前期研究[5]也发现相比于 NSCLC 细胞(H460 和 A549)EVO 对 SCLC 细胞(H1688 和 H446)的活性抑制更明显,该现象可以通过 EVO 上调 PTEN 表达的作用得以部分解释。

非小细胞肺癌的靶向治疗已获得成功应用,酪氨酸激酶抑制剂可有效改善上皮生长因子受体突变型患者的预后[21]。然而有临床意义的 SCLC 药物治疗基因靶点尚未被发现,以 PI3K/AKT/mTOR 通路为目标的靶向治疗药物被寄予厚望[11]。但是 PI3K/AKT 通路同时参与正常细胞功能,单一靶点的靶向治疗即便有效也可能带来广泛的副作用。EVO 虽然通过下调 PI3K/AKT 通路活性有效抑制 SCLC H1688 和 H446 细胞生长,但对人胚肺成纤维细胞 WI38 并未表现出明显细胞毒性[4],这表明 EVO 具有副作用小的应用优势。此外 PI3K/AKT 通路异常激活与化疗耐药及放疗抵抗有密切关系[22-23],已有研究[24-26]证实 EVO 可有效逆转包括肺癌在内的多种肿瘤细胞耐药,这为 SCLC 综合治疗中 EVO 与化疗、放疗联合应用提供了理论基础。

综上所述,本研究结果显示 EVO 能够有效抑制 SCLC H1688 和 H446 细胞 PI3K/AKT 信号转导通路的活性,降低 p-AKT 蛋白的水平,进而调控下游凋亡相关蛋白的表达,诱导 SCLC 细胞凋亡,而上调 SCLC 细胞中 PTEN 的表达可能是 EVO 抑制 PI3K/AKT 通路的重要机制之一。进一步阐明了 EVO 诱导 SCLC 细胞凋亡的机制,表明相比于 NSCLC 等其它肿瘤,在 SCLC 中 EVO 具有潜在的应用优势,有望成为 SCLC 综合治疗中有效的辅助用药。很多关于 EVO 抗肿瘤活性及机制的研究已见诸多报道[4-5,12-13,24-26],与以往研究不同的是,本研究将着重于 EVO 诱导 SCLC 细胞凋亡的机制,在干预措施上设定了不同的药物剂量和作用时间,并通过使用 PI3K/AKT 通路激动剂和抑制剂进行验证,同时检测了该通路的上游调控因子和下游效应蛋白的变化。然而,EVO 在体内实验中对 SCLC 的作用机制是否与体外实验一致,体内实验中药物的安全性,以及 EVO 作用下 SCLC 中 PI3K/AKT 信号通路与其他通路间发生的交互作用,有待进一步研究验证。

参考文献:

[1] Kalemkerian G P, Akerley W, Bogner P, *et al*. Small cell lung cancer[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2013, 11(1): 78-98.

[2] William W N Jr, Glisson B S. Novel strategies for the treatment of small-cell lung carcinoma[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2011, 8(10): 611-619. DOI: 10.1038/nrclinonc.2011.90

[3] D'Angelo S P, Pietanza M C. The molecular pathogenesis of small cell lung cancer[J]. Cancer Biol Ther, 2010, 10(1): 1-10. DOI: 10.4161/cbt.10.1.12045

[4] Zou Y, Qin X, Xiong H, *et al*. Apoptosis of human non-small-cell lung cancer A549 cells triggered by evodiamine through MTDH-dependent signaling pathway[J]. Tumour Biol, 2015, 36(7): 5187-5193. DOI: 10.1007/s13277-015-3174-z

[5] Fang C, Zhang J, Qi D, *et al*. Evodiamine induces G2/M arrest and apoptosis *via* mitochondrial and endoplasmic reticulum pathways in H446 and H1688 human small-cell lung cancer cells[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e115204. DOI: 10.1371/journal.pone.0115204

[6] 韩娇艳, 朱方强, 徐祥, 等. 川芎嗪通过 Akt 信号通路影响前列腺癌 PC3 细胞的增殖和凋亡[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(2): 105-108.

[7] 张小丽, 高建, 贾茜, 等. 肝癌干细胞样细胞的分离及其

耐药性受 PI3K/Akt 通路调节[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(2): 99 – 104.

[8] 毛蜀, 何密斯, 刘桂元, 等. 姜黄素对髓母细胞瘤 PI3K/Akt 信号通路的作用[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(6): 518 – 522.

[9] Wakuda K, Kenmotsu H, Serizawa M, *et al*. Molecular profiling of small cell lung cancer in a Japanese cohort[J]. Lung Cancer, 2014, 84(2): 139 – 144. DOI: 10.1016/j.lungcan.2014.02.013

[10] Wojtalla A, Fischer B, Kotelevets N, *et al*. Targeting the phosphoinositide 3-kinase p110-α isoform impairs cell proliferation, survival, and tumor growth in small cell lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(1): 96 – 105. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1138

[11] Umemura S, Mimaki S, Makinoshima H, *et al*. Therapeutic priority of the PI3K/AKT/mTOR pathway in small cell lung cancers as revealed by a comprehensive genomic analysis [J]. J Thorac Oncol, 2014, 9(9): 1324 – 1331. DOI: 10.1097/JTO.0000000000000250

[12] Wang C, Li S, Wang M. Evodiamine-induced human melanoma A375-S2 cell death was mediated by PI3K/Akt/caspase and Fas-L/NF-κB signaling pathways and augmented by ubiquitin-proteasome inhibition[J]. Toxicol *In Vitro*, 2010, 24(3): 898 – 904. DOI: 10.1016/j.tiv.2009.11.019

[13] Wei W T, Chen H, Wang Z H, *et al*. Enhanced antitumor efficacy of gemcitabine by evodiamine on pancreatic cancer *via* regulating PI3K/Akt pathway[J]. Int J Biol Sci, 2012, 8(1): 1 – 14. DOI: 10.7150/ijbs.8.1

[14] Stegeman H, Span P N, Kaanders J H, *et al*. Improving chemoradiation efficacy by PI3-K/AKT inhibition[J]. Cancer Treat Rev, 2014, 40(10): 1182 – 1191. DOI: 10.1016/j.ctrv.2014.09.005

[15] Vivanco I, Sawyers C L. The phosphatidylinositol 3-Kinase-AKT pathway in human cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(7): 489 – 501. DOI: 10.1038/nrc839

[16] Ma Y, Xia H, Liu Y, *et al*. Silencing miR-21 sensitizes non-small cell lung cancer A549 cells to ionizing radiation through Inhibition of PI3K/Akt[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 617868. DOI: 10.1155/2014/617868

[17] 张靖, 马虎, 韩静, 等. ABCG2 在非小细胞肺癌厄洛替尼耐药中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(10): 987 – 991.

[18] Zinn R L, Gardner E E, Marchionni L, *et al*. ERK phosphorylation is predictive of resistance to IGF-1R inhibition in small cell lung cancer[J]. Mol Cancer Ther, 2013, 12(6): 1131 – 1139. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0618

[19] Cui M, Augert A, Rongione M, *et al*. PTEN is a potent suppressor of small cell lung cancer[J]. Mol Cancer Res, 2014, 12(5): 654 – 659. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0554

[20] McFadden D G, Papagiannakopoulos T, Taylor-Weiner A, *et al*. Genetic and clonal dissection of murine small cell lung carcinoma progression by genome sequencing[J]. Cell, 2014, 156(6): 1298 – 1311. DOI: 10.1016/j.cell.2014.02.031

[21] Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, *et al*. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR[J]. N Engl J Med, 2010, 362(25): 2380 – 2388. DOI: 10.1056/NEJMoa0909530

[22] Holland W S, Chinn D C, Lara P N Jr, *et al*. Effects of AKT inhibition on HGF-mediated erlotinib resistance in non-small cell lung cancer cell lines[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2015, 141(4): 615 – 626. DOI: 10.1007/s00432-014-1855-4

[23] Willers H, Azzoli C G, Santivasi W L, *et al*. Basic mechanisms of therapeutic resistance to radiation and chemotherapy in lung cancer[J]. Cancer J, 2013, 19(3): 200 – 207. DOI: 10.1097/PPO.0b013e318292e4e3

[24] 农丽, 伍钢, 戴晓芳, 等. 吴茱萸碱逆转人肺癌细胞株 A549/DDP 耐药机理的实验研究[J]. 临床肿瘤学杂志, 2010, 15(6): 487 – 492. DOI: 10.3969/j.issn.1009-0460.2010.06.002

[25] Khan M, Bi Y, Qazi J I, *et al*. Evodiamine sensitizes U87 glioblastoma cells to TRAIL *via* the death receptor pathway [J]. Mol Med Rep, 2015, 11(1): 257 – 262. DOI: 10.3892/mmr.2014.2705

[26] Pan X, Hartley J M, Hartley J A, *et al*. Evodiamine, a dual catalytic inhibitor of type Ⅰ and Ⅱ topoisomerases, exhibits enhanced inhibition against camptothecin resistant cells[J]. Phytomedicine, 2012, 19(7): 618 – 624. DOI: 10.1016/j.phymed.2012.02.003

(**收稿**:2015-08-09;**修回**:2015-10-08)

(编辑 王 红)