

青藤碱通过调控 NF- κ B 信号通路抑制胰腺癌 Capan-1 细胞增殖并诱导细胞凋亡

陈伟毅¹, 秦春宏², 唐峰¹, 陈延¹ (1.常德职业技术学院, 湖南 常德 415000; 2.南华大学附属第二医院, 湖南 衡阳 421000)

摘要: 目的 探讨青藤碱对胰腺癌 Capan-1 细胞增殖、凋亡的影响及机制。方法 CCK8 法检测细胞活力, DAPI/TUNEL 双染检测细胞凋亡, 流式细胞术 Annexin V-FITC/PI 染色法检测细胞凋亡率, Western blotting 检测 cleaved caspase-3 蛋白、细胞核 NF- κ B 蛋白表达。结果 CCK8 结果表明青藤碱抑制胰腺癌 Capan-1 细胞增殖, 并具有时间、浓度依赖性; DAPI/TUNEL 染色结果表明, 在青藤碱作用下, 胰腺癌 Capan-1 细胞凋亡增多; 流式细胞术 Annexin V-FITC/PI 结果表明, 在青藤碱作用下, 胰腺癌 Capan-1 细胞凋亡率增高; Western blotting 结果表明, 在青藤碱作用下, 胰腺癌 Capan-1 细胞 cleaved caspase-3 表达升高, 细胞核 NF- κ B 表达降低。TNF- α 降低青藤碱对胰腺癌 Capan-1 细胞增殖抑制作用、凋亡诱导作用和 cleaved caspase-3 表达的上调作用。结论 青藤碱通过调控 NF- κ B 信号通路抑制胰腺癌 Capan-1 细胞增殖并诱导细胞凋亡。

关键词: 青藤碱; 胰腺癌细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡; NF- κ B

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2020)18-2190-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.18.003

引用本文: 陈伟毅, 秦春宏, 唐峰, 等. 青藤碱通过调控 NF- κ B 信号通路抑制胰腺癌 Capan-1 细胞增殖并诱导细胞凋亡[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(18): 2190-2195.

Sinomenine Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis of Pancreatic Cancer Capan-1 Cells by Regulating NF- κ B Signaling Pathway

CHEN Weiyi¹, QIN Chunhong², TANG Feng¹, CHEN Yan¹ (1.Changde Vocational Technical College, Changde 415000, China; 2.Second Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect and mechanism of sinomenine on apoptosis of pancreatic cancer Capan-1 cells. **METHODS** CCK8 assay was used to detect cell viability. DAPI/TUNEL staining was used to detect cell apoptosis. Flow cytometry Annexin V-FITC/PI was used to detect cell apoptotic rate. Western blotting was used to detect the expression of cleaved caspase-3 and nuclear NF- κ B protein. **RESULTS** Result of CCK8 assay showed that sinomenine can inhibit the proliferation of Capan-1 cells effectively in a dose and time dependent manner. Result of DAPI/TUNEL staining showed that the apoptosis of Capan-1 cells increased by treated with sinomenine. Flow cytometric analysis staining with Annexin V-FITC/PI showed that the apoptosis rates of Capan-1 cells increased by treated with sinomenine. Result of Western blotting analysis showed that the expression of cleaved caspase-3 increased and the expression of nuclear NF- κ B decreased in Capan-1 cells by treated with sinomenine. TNF- α could reversed the effect of sinomenine on the proliferation and apoptosis of Capan-1 cell. TNF- α could reversed the up-regulated effect of sinomenine on the expression of cleaved caspase-3 in Capan-1 cells. **CONCLUSION** Sinomenine inhibits proliferation and induces apoptosis of pancreatic cancer Capan-1 cells by regulating the NF- κ B signaling pathway.

KEYWORDS: sinomenine; pancreatic cancer cells; cell proliferation; cell apoptosis; NF- κ B

胰腺癌是一种常见的高度恶性的消化系统肿瘤, 其 5 年生存率 $\leq 8\%$, 平均中位生存期 < 6 个月^[1]。国家癌症中心最新发布的数据显示^[2], 2015 年中国胰腺癌发病率居恶性肿瘤的第 10 位, 死亡率居恶性肿瘤死因的第 6 位。因此, 胰腺癌已经成为严重危害我国居民生命健康的重要公共卫生问题。

胰腺癌的治疗主要是手术和化疗。由于胰腺

癌起病隐匿, 转移早、发现晚、进展迅速, 约 85% 的患者在就诊时已失去手术机会, 只能采取化疗^[3]。而化疗效果并不理想, 由于胰腺癌对化疗药物不敏感, 耐药性高, 化疗药物无法抑制肿瘤生长和转移, 经常导致化疗失败, 患者最终死亡^[4-5]。因此, 寻找新的有效的抗胰腺癌药物, 提高患者生存率, 是目前治疗胰腺癌的迫切需要。

基金项目: 2019 年湖南省教育厅科学研究项目(19C0244)

作者简介: 陈伟毅, 男, 硕士, 助教 Tel: (0736)2550175 E-mail: cwyeason@163.com

青藤碱是从防己科防己属植物青风藤和毛青藤的干燥藤茎中提取的生物碱单体, 分子式为 $C_{19}H_{23}NO_4$, 结构类似于吗啡, 具有抗炎、镇痛等作用^[6]。多项研究表明青藤碱可以抑制肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭, 如肝癌、肺癌、胃癌等^[7-9], 但对胰腺癌的作用尚未明确, 相关研究甚少。

NF- κ B 是一种广泛存在的转录因子, 在炎症反应和先天性免疫应答中发挥重要作用。通常情况下 NF- κ B 位于细胞质内, 并与抑制蛋白 I κ B 结合处于失活状态。细胞外刺激可激活 I κ B, 使其降解, 从而使 NF- κ B 释放出来, NF- κ B 随即进入细胞核, 启动或增强相关基因的转录^[10-11]。多项研究表明^[12-13], 激活 NF- κ B 信号通路后可以抗胰腺癌细胞凋亡。

本研究拟探讨青藤碱对胰腺癌 Capan-1 细胞增殖及凋亡的影响, 为青藤碱在临床上应用于胰腺癌治疗提供依据, 并探讨青藤碱对胰腺癌 Capan-1 细胞 NF- κ B 信号通路的影响, 从 NF- κ B 信号通路阐明青藤碱对胰腺癌 Capan-1 细胞的作用机制, 为研究青藤碱抗肿瘤作用机制提供新的方向和思路。

1 仪器与试剂

AE2000 型光学倒置显微镜(美国麦克奥迪公司); iMARK 酶标仪(美国 BIO-RAD 公司); BX63 型荧光显微镜(日本奥林巴斯公司); Cyto FLEX 型流式细胞仪(美国 Beckman 公司); Mint-PROTEAN Tetra 型聚丙烯酰胺垂直电泳系统、蛋白湿转模仪、凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

青藤碱(湖南正清制药有限公司, 批号: 1509428-037); DMEM(赛默飞公司, 批号: 12491-015); CCK8 试剂盒(货号: C0038)、DAPI 染色液(货号: C1005)、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(货号: C1062M)均购自碧云天公司; 一抗: GAPDH(上海生工公司, 批号: D110016); NF- κ B 抗体(批号: 8242)、cleaved caspase-3 抗体(批号: 9661)购自美国 CST 公司。

2 方法

2.1 细胞及培养

胰腺癌 Capan-1 细胞购于中科院上海细胞库, 培养于含 10% 的胎牛血清、青霉素、链霉素($100\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$)的 DMEM 培养基培养, 每 48 h 用 0.25% 的胰酶消化传代进行后续实验。

2.2 CCK8 检测细胞活力 OD 值

取对数生长期的细胞接种在 96 孔板中, 细胞

浓度为 $1\times 10^5\cdot\text{mL}^{-1}$, 每孔 100 μL , 随机分成对照组, 青藤碱 400, 800, 1 600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组, 待细胞铺满孔底约 80% 时, 根据实验分组给予相应处理 24, 48, 72 h; 或随机分成对照组、青藤碱 1 600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、青藤碱 1 600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +TNF- α 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、TNF- α 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组, 待细胞铺满孔底约 80% 时, 根据实验分组给予相应处理 48 h 后, 加入每孔 10 μL CCK-8 溶液继续培养 1 h, 利用酶标仪(检测波长 450 nm)检测 OD 值。

2.3 DAPI/TUNEL 双染检测细胞凋亡

配置好 TUNEL 检测液, 取对数生长期的细胞接种在 24 孔板中, 细胞浓度为 $1\times 10^5\cdot\text{mL}^{-1}$, 每孔 200 μL , 随机分成对照组、青藤碱 400, 800, 1 600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组, 待细胞铺满孔底约 80% 时, 根据实验分组予以相应处理 48 h 后, 去除培养液, 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min, PBS 洗 1 次, 加入含 0.3% Triton X-100 的 PBS 200 μL , 室温孵育 5 min, 每孔加 50 μL TUNEL 检测液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 60 min, PBS 洗 3 次, 用抗荧光淬灭封片液封片后荧光显微镜下观察(发射波长为 540 nm, 绿色荧光), 每孔加入 50 μL DAPI 染色液, 室温放置 5 min, PBS 洗 3 次, 在荧光显微镜下观察(发射波长为 430 nm, 蓝色荧光), 用 Image J 软件进行细胞计数。

2.4 流式细胞术 Annexin V-FITC/PI 法检测细胞凋亡率

取对数生长期的细胞接种在 12 孔板中, 细胞浓度为 $1\times 10^5\cdot\text{mL}^{-1}$, 每孔 500 μL , 随机分成对照组、青藤碱 400, 800, 1 600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组或对照组、青藤碱 1 600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、青藤碱 1 600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +TNF- α 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、TNF- α 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组, 根据实验分组给予相应处理 48 h 后, 0.25% 胰酶消化细胞, 收集细胞配置成 $1\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}$ 细胞悬液, 每个 Falcon 试管中加入 100 μL 细胞悬液, 再加入 5 μL PI 和 5 μL Annexin V-FITC, 避光孵育 15 min 后, 加入结合缓冲液, 1 h 后用流式细胞仪检测细胞凋亡情况, 以右上象限+右下象限细胞比例为细胞凋亡率。

2.5 Western blotting 检测 cleaved caspase-3、细胞核 NF- κ B 蛋白表达

取对数生长期的细胞接种在 6 孔板中, 细胞浓度为 $1\times 10^5\cdot\text{mL}^{-1}$, 每孔 1 mL, 随机分成对照组, 青藤碱 400, 800, 1 600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组或对照组、青藤

碱 1 600 mg·L⁻¹ 组、青藤碱 1 600 mg·L⁻¹+TNF-α 20 mg·L⁻¹ 组、TNF-α 20 mg·L⁻¹ 组, 根据实验分组给予相应处理 48 h 后, 提取细胞蛋白或细胞核蛋白, 每组取 20 μg 蛋白裂解液进行 SDS 凝胶电泳 (SDS-PAGE) 后将蛋白转移到硝酸纤维素膜上, 封闭后孵育一抗 4 ℃ 过夜, 二抗孵育 2 h 显色进行相对定量, 用 Image J 软件进行灰度分析, 与甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)蛋白、组蛋白 H3 校准。

2.6 数据分析

所有实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 组间比较应用单因素方差分析, 两两比较采用 Dunnett-*t* 检验和 *q* 检验, 以 *P*<0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 青藤碱对胰腺癌 Capan-1 细胞增殖的影响

CCK8 检测结果显示, 青藤碱 400, 800, 1 600 mg·L⁻¹ 作用于胰腺癌 Capan-1 细胞 24, 48, 72 h 后, 细胞存活率下降, 与对照组相比, 除了青藤碱 400 mg·L⁻¹ 作用 24 h 无统计学差异外, 其余各组均有统计学差异(*P*<0.05 或 *P*<0.01), 结果见图 1。结果表明青藤碱抑制胰腺癌 Capan-1 细胞增殖。

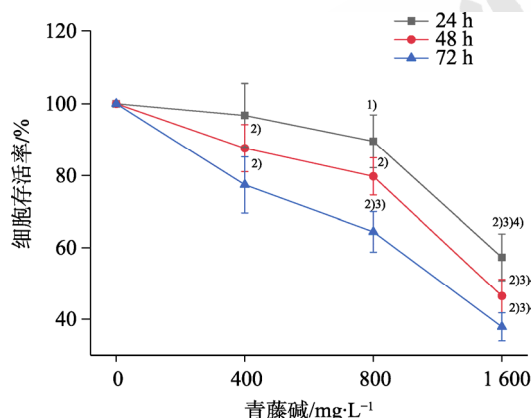


图 1 青藤碱对胰腺癌 Capan-1 细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s$, *n*=5)

与对照组(0 mg·L⁻¹ 青藤碱)比较, ¹⁾*P*<0.05, ²⁾*P*<0.01; 与青藤碱 400 mg·L⁻¹ 组比较, ³⁾*P*<0.01; 与青藤碱 800 mg·L⁻¹ 组比较, ⁴⁾*P*<0.01。

Fig. 1 Effect of sinomenine on the survival rate of pancreatic cancer Capan-1 cells($\bar{x} \pm s$, *n*=5)

Compared with control group(0 mg·L⁻¹ sinomenine), ¹⁾*P*<0.05, ²⁾*P*<0.01; compared with sinomenine 400 mg·L⁻¹ group, ³⁾*P*<0.01; compared with sinomenine 800 mg·L⁻¹ group, ⁴⁾*P*<0.01。

3.2 青藤碱对胰腺癌 Capan-1 细胞凋亡的影响

DAPI/TUNEL 双染结果显示, 青藤碱 400, 800, 1 600 mg·L⁻¹ 作用胰腺癌 Capan-1 细胞 48 h 后, 凋亡细胞数逐渐增多, 凋亡细胞数占总细胞数的比例分别为 4.4%, 8.4%, 26.7%, 高于对照

组 0.69%, 结果见图 2。结果表明青藤碱诱导胰腺癌 Capan-1 细胞凋亡。

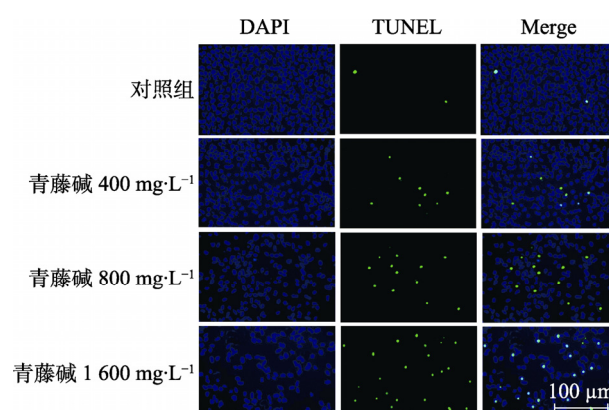


图 2 青藤碱对胰腺癌 Capan-1 细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effect of sinomenine on the apoptosis of pancreatic cancer Capan-1 cells

3.3 青藤碱对胰腺癌 Capan-1 细胞凋亡率的影响

Annexin V-FITC/PI 结果显示, 青藤碱 400, 800, 1 600 mg·L⁻¹ 作用胰腺癌 Capan-1 细胞 48 h 后, 细胞凋亡率升高, 与对照组相比有统计学差异(*P*<0.01 或 *P*<0.001), 结果见图 3。结果表明青藤碱诱导胰腺癌 Capan-1 细胞凋亡。

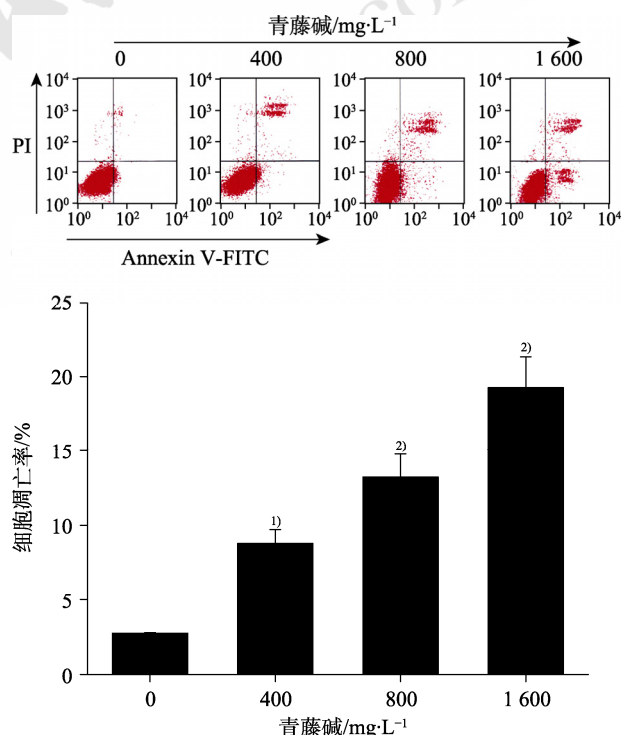


图 3 青藤碱对胰腺癌 Capan-1 细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s$, *n*=5)

与对照组(0 mg·L⁻¹ 青藤碱)比较, ¹⁾*P*<0.01, ²⁾*P*<0.001。

Fig. 3 Effect of sinomenine on the apoptotic rate of pancreatic cancer Capan-1 cells($\bar{x} \pm s$, *n*=5)

Compared with control group(0 mg·L⁻¹ sinomenine), ¹⁾*P*<0.01, ²⁾*P*<0.001。

3.4 青藤碱对胰腺癌 Capan-1 细胞 cleaved caspase-3、核内 NF- κ B 蛋白表达的影响

Western blotting 结果显示, 青藤碱 400, 800, 1 600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用胰腺癌 Capan-1 细胞 48 h 后, cleaved caspase-3 蛋白表达上升, 细胞核 NF- κ B 蛋白下降, 与对照组相比有统计学差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 见图 4。结果表明, 青藤碱上调胰腺癌 Capan-1 细胞 cleaved caspase-3 蛋白表达, 并下调细胞核 NF- κ B 蛋白含量。

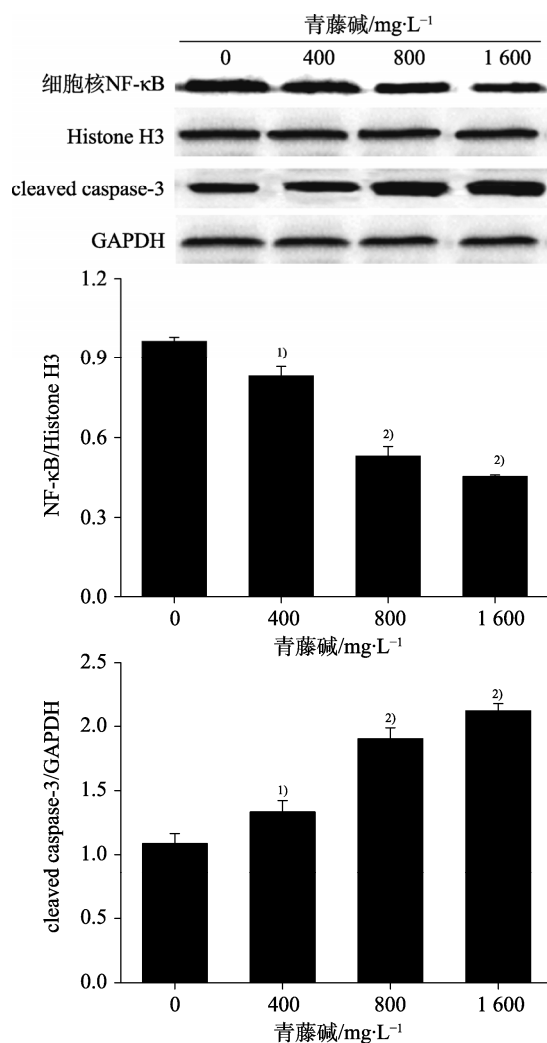


图 4 青藤碱对胰腺癌 Capan-1 细胞 cleaved caspase-3、细胞核 NF- κ B 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=5$)
与对照组($0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 青藤碱)比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 4 Effect of sinomenine on the expression of cleaved caspase-3 and nuclear NF- κ B protein in pancreatic cancer Capan-1 cells($\bar{x}\pm s$, $n=5$)
Compared with control group($0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ sinomenine), ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

3.5 TNF- α 降低青藤碱对胰腺癌 Capan-1 细胞增殖的抑制作用

CCK8 结果显示, 青藤碱 1 600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、青藤碱 1 600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +TNF- α 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、TNF- α 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

作用于胰腺癌 Capan-1 细胞 48 h 后, 青藤碱 1 600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞存活率低于对照组($P<0.01$); 青藤碱 1 600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +TNF- α 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞存活率高于青藤碱 1 600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组($P<0.01$), 结果见图 5。结果表明 TNF- α 降低青藤碱对胰腺癌 Capan-1 细胞增殖的抑制作用。

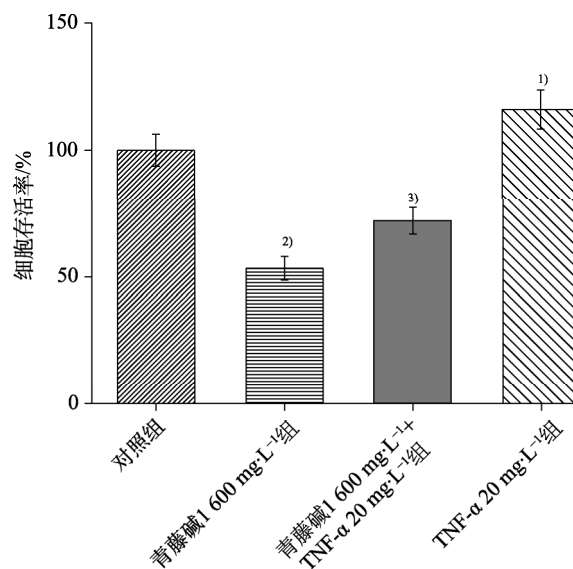


图 5 TNF- α 降低青藤碱对胰腺癌 Capan-1 细胞增殖的抑制作用($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

与对照组($0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 青藤碱)比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与 1 600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 青藤碱组比较, ³⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 5 TNF- α reduces the inhibitory effect of sinomenine on proliferation of pancreatic cancer Capan-1 cells($\bar{x}\pm s$, $n=5$)
Compared with control group($0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ sinomenine), ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with sinomenine 1 600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ group, ³⁾ $P<0.01$.

3.6 TNF- α 降低青藤碱对胰腺癌 Capan-1 细胞凋亡的诱导作用

Annexin V-FITC/PI 结果显示, 青藤碱 1 600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、青藤碱 1 600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +TNF- α 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、TNF- α 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用于胰腺癌 Capan-1 细胞 48 h 后, 青藤碱 1 600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组凋亡率高于对照组($P<0.01$); 青藤碱 1 600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +TNF- α 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组凋亡率低于青藤碱 1 600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组($P<0.01$), 结果见图 6。结果表明 TNF- α 降低青藤碱对胰腺癌 Capan-1 细胞凋亡的诱导作用。

3.7 TNF- α 降低青藤碱对胰腺癌 Capan-1 细胞 cleaved caspase-3 蛋白表达的上调作用

Western blotting 结果显示, 青藤碱 1 600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、青藤碱 1 600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +TNF- α 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、TNF- α 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用于胰腺癌 Capan-1 细胞 48 h 后, 青藤碱 1 600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 cleaved caspase-3 蛋白表达高于对照组($P<0.01$); 青藤碱 1 600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +TNF- α 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 cleaved caspase-3 蛋白表达低于青藤

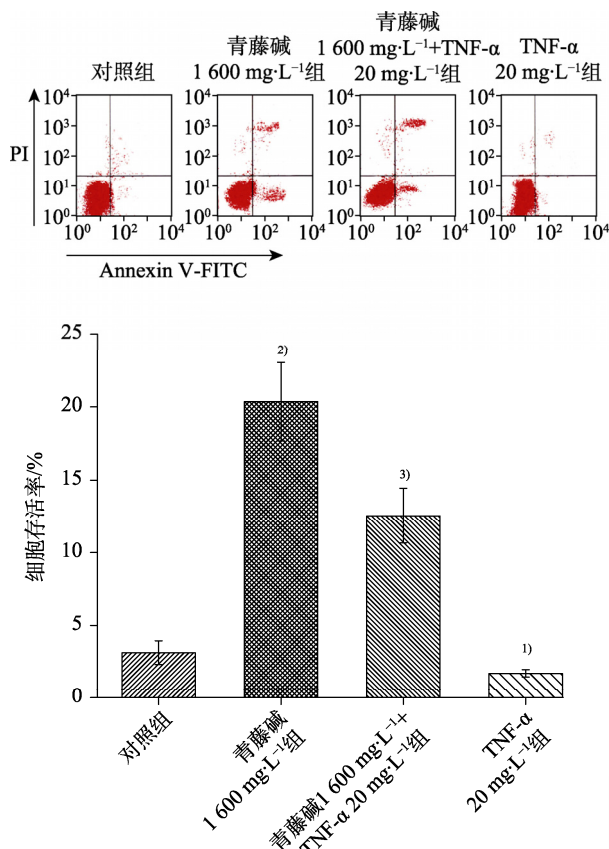


图 6 TNF- α 降低青藤碱对胰腺癌 Capan-1 细胞凋亡的诱导作用($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

与对照组($0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 青藤碱)比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与青藤碱 $1 600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较, ³⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 6 TNF- α reduces the induction of sinomenine on the apoptosis of pancreatic cancer Capan-1 cells($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Compared with control group($0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ sinomenine), ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; compared with sinomenine $1 600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ group, ³⁾ $P < 0.01$.

碱 $1 600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组($P < 0.01$), 结果见图 7。结果表明 TNF- α 降低青藤碱对胰腺癌 Capan-1 细胞 cleaved caspase-3 蛋白表达的上调作用。

4 讨论

本研究结果表明青藤碱抑制胰腺癌 Capan-1 细胞增殖并诱导其凋亡, 其机制与调控 NF- κ B 信号通路有关。

通过 CCK8 试验, 本研究发现青藤碱可以抑制胰腺癌 Capan-1 细胞增殖。通过 DAPI/TUNEL 双染试验发现青藤碱可以诱导胰腺癌 Capan-1 细胞凋亡。通过流式细胞术 Annexin V-FITC/PI 检测, 本研究进一步证明了青藤碱可以诱导胰腺癌 Capan-1 细胞凋亡。

然后本研究检测了 cleaved caspase-3、细胞核 NF- κ B 这 2 个蛋白, 结果显示青藤碱可以下调胰腺癌 Capan-1 细胞核 NF- κ B 蛋白含量, 并上调 cleaved caspase-3 蛋白表达。因此, 笔者认为青藤

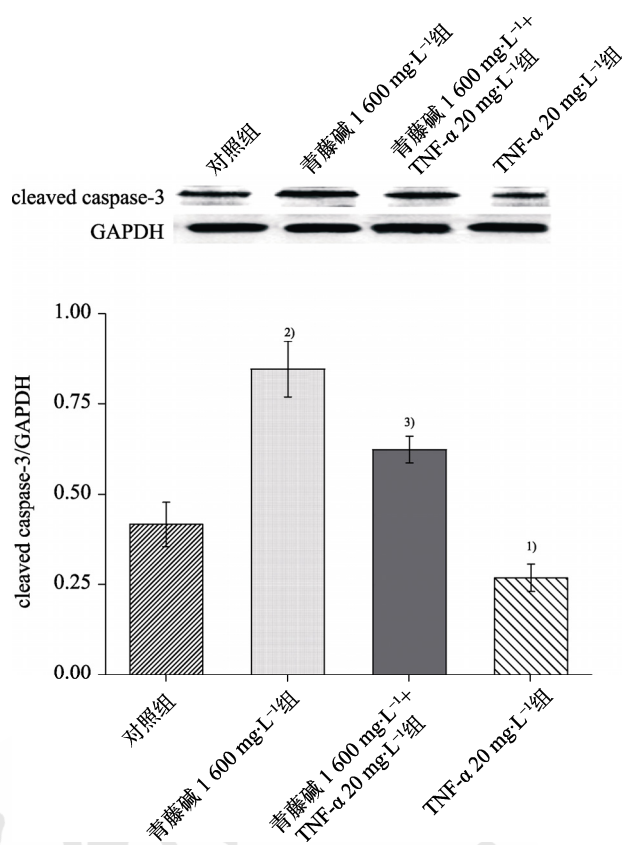


图 7 TNF- α 降低青藤碱对胰腺癌 Capan-1 细胞 cleaved caspase-3 蛋白表达的上调作用($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

与对照组($0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 青藤碱)比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 $1 600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 青藤碱组比较, ³⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 7 TNF- α reduces the up-regulation of cleaved caspase-3 protein of pancreatic cancer Capan-1 cells by sinomenine($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Compared with control group($0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ sinomenine), ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; compared with $1 600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ sinomenine group, ³⁾ $P < 0.01$.

碱可以抑制 NF- κ B 信号通路激活, 上调 cleaved caspase-3 表达。

为了进一步明确青藤碱对胰腺癌的作用机制, 采用 NF- κ B 信号通路激活剂 TNF- α 进行实验。实验结果显示, TNF- α 可以降低青藤碱对胰腺癌 Capan-1 细胞增殖的抑制作用、诱导凋亡作用和 cleaved caspase-3 蛋白表达的上调作用。由于 TNF- α 是 NF- κ B 信号通路激活剂, 因此笔者认为, TNF- α 通过激活 NF- κ B 信号通路降低了青藤碱对胰腺癌 Capan-1 细胞增殖的抑制作用和凋亡的诱导作用。

NF- κ B 是一种调节炎症和免疫基因表达的核转录因子, 能与细胞核内多种启动子或增强子结合, 调控其转录和表达^[10-11]。研究表明, 活化的 NF- κ B 可以上调抗凋亡因子和细胞凋亡抑制蛋白的表达, 抑制细胞凋亡; 同时可以激活细胞周期因子的转录, 促进细胞周期进程, 在细胞凋亡和

增殖中发挥重要作用^[14]。

本研究表明,青藤碱作用于胰腺癌 Capan-1 细胞后,细胞增殖受到抑制,细胞核 NF- κ B 表达下降,提示青藤碱可能通过抑制 NF- κ B 信号通路激活,下调细胞周期因子的转录,影响细胞周期进程,使肿瘤细胞的失控性增殖受到阻断。研究还发现,青藤碱可以诱导胰腺癌 Capan-1 细胞凋亡并上调 cleaved caspase-3 表达,表明青藤碱可能通过抑制 NF- κ B 信号通路激活,下调肿瘤细胞抗凋亡因子和细胞凋亡抑制蛋白的表达,使 cleaved caspase-3 表达上升,促进细胞凋亡。而用 TNF- α 激活 NF- κ B 信号通路后,青藤碱对细胞增殖的抑制作用、凋亡的诱导作用均降低,进一步说明了 NF- κ B 信号通路在青藤碱发挥抗胰腺癌作用中具有重要地位。

大量研究表明,青藤碱可以抑制多种肿瘤细胞增殖并诱导凋亡,如肺癌、肾癌、乳腺癌等^[15-17]。其机制有研究认为与调控 PI3K/Akt/mTOR 通路有关^[16],也有研究认为与降低线粒体膜电位、促进细胞色素 C 释放有关^[15],还有文献认为与提高 p-ERK, p-JNK, p-38 MAPK 表达有关^[17]。本研究发现其机制是通过抑制 NF- κ B 信号通路激活实现的。

综上所述,本研究发现青藤碱通过调控 NF- κ B 信号通路激活抑制胰腺癌 Capan-1 细胞增殖并诱导细胞凋亡。本研究为青藤碱在临床上应用于抗胰腺癌治疗提供了理论依据,并首次从 NF- κ B 信号通路阐明了青藤碱的抗肿瘤作用,为研究青藤碱抗肿瘤机制提供了新的方向和思路。由于目前已有青藤碱缓释片、盐酸青藤碱注射剂、正清风痛宁片等多种青藤碱制剂用于临床,因此青藤碱在临床应用于抗肿瘤治疗时可不必再做临床药理试验。虽然青藤碱可以抑制胰腺癌 Capan-1 细胞增殖并诱导细胞凋亡,但在其他的胰腺癌细胞系中是否有相同的作用,尚不清楚。青藤碱除了通过调控 NF- κ B 信号通路来抑制胰腺癌 Capan-1 细胞增殖和诱导细胞凋亡外,是否还有其他通路,还需要进一步研究。

REFERENCES

- [1] GUPTA R, AMANAM I, CHUNG V. Current and future therapies for advanced pancreatic cancer [J]. J Surg Oncol, 2017, 116(1): 25-34.
- [2] CHEN W Q, ZHENG R S, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA: A Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [3] PEŹZIWIATR M, MAŁCZAK P, MAJOR P, et al. Minimally invasive pancreatic cancer surgery: What is the current evidence? [J]. Med Oncol, 2017, 34(7): 1-6.
- [4] GRASSO C, JANSEN G, GIOVANNETTI E. Drug resistance in pancreatic cancer: Impact of altered energy metabolism [J]. Crit Rev Oncol, 2017, 114: 139-152.
- [5] MAO Q F, WANG H, CHEN H L, et al. Artesunate enhances the anti-tumor effect of gemcitabine on pancreatic cancer [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2019, 36(8): 924-929.
- [6] LIU W W, ZHU Y, WANG Y. Advance on active ingredients and pharmacological effects of *Caulis sinomenii* Alkaloid [J]. Liaoning J Tradit Chin Med(辽宁中医杂志), 2016, 43(8): 1765-1769.
- [7] WANG Y, LI M, YU X S, et al. Sinomenine hydrochloride inhibits cell survival in human hepatoma Huh7 cells [J]. Biom Rep, 2018, 8(6): 510-516. Doi: 10.3892/br.2018.1084.
- [8] JIANG S L, GAO Y B, HOU W, et al. Sinomenine inhibits A549 human lung cancer cell invasion by mediating the STAT3 signaling pathway [J]. Oncol Lett, 2016, 12(2): 1380-1386.
- [9] JI Y B, RU X, LU L, et al. Research progress in anti-tumor effects and mechanisms of sinomenine [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2018, 27(18): 2159-2163.
- [10] MITCHELL J P, CARMODY R J. NF- κ B and the transcriptional control of inflammation [M]. International Review of Cell and Molecular Biology. Amsterdam: Elsevier, 2018: 41-84.
- [11] ZHOU L, GUO L, WANG M, et al. Glycyrrhizic acid suppress post-inflammatory hyperpigmentation via MAPK p38/NF- κ B signalling pathway [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2019, 36(8): 930-934.
- [12] GRETEN F R, WEBER C K, GRETEN T F, et al. Stat3 and NF- κ B activation prevents apoptosis in pancreatic carcinogenesis [J]. Gastroenterology, 2002, 123(6): 2052-2063.
- [13] LI Y L, WANG Y W, LI L, et al. Hyperoside induces apoptosis and inhibits growth in pancreatic cancer via Bcl-2 family and NF- κ B signaling pathway both *in vitro* and *in vivo* [J]. Tumor Biol, 2016, 37(6): 7345-7355.
- [14] 姜一弘, 张丹, 张天择, 等. 核因子 κ B(NF- κ B)信号通路在炎症与肿瘤中作用的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2018, 34(12): 1130-1135.
- [15] JIANG T, ZHOU L, ZHANG W, et al. Effects of sinomenine on proliferation and apoptosis in human lung cancer cell line NCI-H460 *in vitro* [J]. Mol Med Rep, 2009, 3(1): 51-56. Doi: 10.3892/mmr.00000217.
- [16] DENG F, MA Y X, LIANG L, et al. The pro-apoptosis effect of sinomenine in renal carcinoma via inducing autophagy through inactivating PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 97: 1269-1274.
- [17] LI X, WANG K, REN Y, et al. MAPK signaling mediates sinomenine hydrochloride-induced human breast cancer cell death via both reactive oxygen species-dependent and -independent pathways: an *in vitro* and *in vivo* study [J]. Cell Death Dis, 2014, 5(7): e1356.

收稿日期: 2019-08-20
(本文责编: 李艳芳)