

中药荜茇活性成分荜茇酰胺抗胃癌的作用机制研究

贾贵清 彭婷 白兰

610072 四川成都, 电子科技大学附属医院, 四川省人民医院胃肠外科(贾贵清); 药学部(彭婷、白兰)

通讯作者: 白兰, Email: blci@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2018.04.019

【摘要】 目的 观察不同浓度中药荜茇活性成分荜茇酰胺作用不同时间对胃癌 MKN45 细胞增殖的影响,并探讨其可能的作用机制。**方法** 将培养至对数期的胃癌细胞株 MKN45 用不同浓度的荜茇酰胺处理后,选择 10 $\mu\text{mol/L}$ 荜茇酰胺用于后续实验,设定空白对照组、3 mmol/L 抗氧化剂 N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)组、10 $\mu\text{mol/L}$ 荜茇酰胺组和 3 mmol/L NAC 预处理 + 10 $\mu\text{mol/L}$ 荜茇酰胺组。采用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法测定细胞活性;采用流式细胞仪检测细胞周期、细胞凋亡率、活性氧簇(ROS)水平;采用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测通路中相关蛋白 p21、X 染色体连锁凋亡抑制蛋白(XIAP)、剪切聚腺苷二磷酸-核糖多聚酶(PARP)、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-9(caspase-9)的表达情况。**结果** ① 细胞活性:荜茇酰胺可抑制 MKN45 细胞活性,其作用呈浓度和时间的正相关性(均 $r > 0.8$, $P < 0.05$);② G1 期阻滞:荜茇酰胺可诱导 MKN45 细胞 G1 期阻滞,其作用呈浓度正相关性(均 $r > 0.8$, $P < 0.05$),0、5、7.5、10 $\mu\text{mol/L}$ 荜茇酰胺作用下 G1 期细胞为 (35.33 $\pm$ 3.56)%、(41.42 $\pm$ 4.04)%、(48.78 $\pm$ 5.24)%、(55.12 $\pm$ 5.78)%;③ 细胞凋亡:荜茇酰胺可诱导 MKN45 细胞凋亡,其作用呈浓度依赖性,0、5、7.5、10 $\mu\text{mol/L}$ 荜茇酰胺作用下细胞凋亡率分别为 (9.21 $\pm$ 2.13)%、(13.82 $\pm$ 3.45)%、(19.66 $\pm$ 4.73)%、(25.21 $\pm$ 5.05)%;④ caspase 细胞凋亡途径:0、5、7.5、10 $\mu\text{mol/L}$ 荜茇酰胺可下调抗凋亡蛋白 XIAP 表达,上调剪切 caspase-9 及剪切 PARP 表达(XIAP 为 0.432 $\pm$ 0.101、0.120 $\pm$ 0.022、0.023 $\pm$ 0.005、0.005 $\pm$ 0.001,剪切 caspase-9 为 0.003 $\pm$ 0.001、0.007 $\pm$ 0.001、0.225 $\pm$ 0.049、0.649 $\pm$ 0.132,剪切 PARP 为 0.005 $\pm$ 0.001、0.014 $\pm$ 0.003、0.428 $\pm$ 0.152、0.895 $\pm$ 0.111);即荜茇酰胺可激活 caspase 依赖性凋亡途径,其作用呈浓度依赖性;⑤ ROS-p53 细胞凋亡途径:荜茇酰胺能上调 ROS、p53、p21、p53 凋亡调控因子(PUMA)表达,其作用呈浓度依赖性,经 NAC 处理后,ROS 水平降低为 (850.48 $\pm$ 124.53) U/L, MKN45 细胞活性上升为 (73.45 $\pm$ 6.12)%, p53 降低为 0.732 $\pm$ 0.152、剪切 PARP 蛋白表达降低为 0.487 $\pm$ 0.108。**结论** 荜茇酰胺可抑制胃癌细胞 MKN45 增殖,降低其活性,阻滞细胞周期 G1 期,诱导凋亡,可能的作用机制为提高细胞 ROS 水平,激活 p53 与 caspase 凋亡途径有关。

【关键词】 胃癌; 荜茇酰胺; 细胞活性; 凋亡率; 增殖**基金项目:** 四川省医学科学院四川省人民医院青年基金(2015QN11); 国家临床药学重点专科建设项目(30305030698)

Study on mechanism of anti-gastric cancer action of active ingredient piperlongumine in Chinese herbal medicine long pepper Jia Guiqing, Peng Ting, Bai Lan

Department of Gastrointestinal Surgery, Affiliated Hospital of the University of Electronic Science and Technology of China, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, Sichuan, China (Jia GQ); Pharmacy Department, Affiliated Hospital of the University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610072, Sichuan, China (Peng T, Bai L)

Corresponding author: Bai Lan, Email: blci@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effects of different concentrations of active ingredient piperlongumine of Chinese herbal medicine (TCM) long pepper acting for different times on the proliferation of gastric cancer MKN45 cells, and to explore its possible mechanism. **Methods** After the gastric cancer cell strain MKN45 cultured to log phase and co-treated with different concentrations of guanidinamid (piperlongumine) and 3 mmol/L antioxidant N-acetyl-L-cysteine (NAC), 10 $\mu\text{mol/L}$ guanidinamid was selected for subsequent experiments; the following groups were prepared: blank control group, 3 mmol/L NAC group, 10 $\mu\text{mol/L}$ guanidinamid group and 3 mmol/L NAC pretreatment + 10 $\mu\text{mol/L}$ guanidinamid group. The cell viability was determined by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) colorimetric assay; the cell cycle, apoptosis rate and reactive oxygen species (ROS) levels were detected by flow cytometry; Western Blot was used to detect the expressions in the pathway of related proteins p21, X-chromosome linked inhibitor of apoptosis (XIAP), cleaved polyadenylation diphosphate-ribose polymerase (PARP) and aspartic acid specific cysteine protease-9 (caspase-9). **Results** ① Cellular viability: piperlongumine can inhibit the viability of MKN45 cells, and its effect was positively correlated with its concentration and incubation time (all $r > 0.8$, $P < 0.05$); ② G1 phase block: piperlongumine can induce G1 phase arrest in MKN45 cells, and its effect was positively correlated with its concentration (all $r > 0.8$, $P < 0.05$), and the percentages of G1 phase cells were (35.33 $\pm$ 3.56)%, (41.42 $\pm$ 4.04)%, (48.78 $\pm$ 5.24)%, (55.12 $\pm$ 5.78)% respectively under the actions of 0, 5, 7.5, 10 $\mu\text{mol/L}$ guanidinamid; ③ Apoptosis: guanidinamid can induce apoptosis in MKN45 cells in a concentration-dependent manner; apoptosis rates under the actions of 0, 5, 7.5, 10 $\mu\text{mol/L}$ guanidinamid were (9.21 $\pm$ 2.13)%, (13.82 $\pm$ 3.45)%, (19.66 $\pm$ 4.73)%, and (25.21 $\pm$ 5.05)%, respectively; ④ Apoptosis pathway of caspase: guanidinamid can down-regulate the expression of anti-apoptotic protein XIAP, up-regulate the expression of cleaved caspase-9 and cleaved PARP under the action of 0, 5.0, 7.5, and 10.0 $\mu\text{mol/L}$ guanidinamid, respectively (the expression levels of XIAP were 0.432 $\pm$ 0.101,

0.120±0.022, 0.023±0.005, 0.005±0.001; the expression levels of cleaved caspase-9 were 0.003±0.001, 0.007±0.001, 0.225±0.049, 0.649±0.132; the expression levels of cleaved-PARP were 0.005±0.001, 0.014±0.003, 0.428±0.152, 0.895±0.111; that is, guanidinamide could activate caspase-dependent apoptotic pathway, its effect is concentration dependent; ⑤ ROS-p53 cell apoptosis pathway: guanidinamide can up-regulate the expressions of ROS, p53, p21, p53 modulator of apoptosis (PUMA) in a concentration-dependent manner, after NAC treatment, the ROS level was reduced to (850.48±124.53) U/L, MKN45 cell viability was increased to (73.45±6.12)%, p53 decreased to 0.732±0.152, and cleaved-PARP protein expression decreased to 0.487±0.108. **Conclusion** Guanidinamide can inhibit the proliferation of gastric cancer cells MKN45, decrease its viability, block cell cycle G1, induce apoptosis, and the mechanism is possibly related to the increase of the level of ROS in cells and activation of p53 and caspase apoptosis pathway.

【Key words】 Gastric cancer; Piperlongumine; Cell viability; Apoptosis rate; Proliferation

Fund program: Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital of Youth Fund (2015QN11); The National Key Specialty Construction Project of Clinical Pharmacy (30305030698)

胃癌是发生于胃黏膜上皮、居全世界最常见癌症死亡第 2 位的消化道恶性肿瘤,在我国居癌症相关性死亡数的第 3 位^[1]。有研究表明,经手术治疗后我国胃癌患者的 5 年生存率低于 50%^[2]。临床上胃癌有侵袭性高、易复发、转移和预后较差的特征,严重影响患者的生命质量及预后。中药莨菪主要用于治疗脘腹冷痛、呕吐吞酸、泄泻痢疾等疾病,而莨菪的提取物莨菪酰胺是一种生物碱,故又名莨菪明碱^[3]。近年来,研究表明,莨菪酰胺能特异性杀伤结肠癌、卵巢癌、肝癌等多种肿瘤细胞,而对正常细胞无损伤,亦无明显的毒副作用,同时还具有抗病原微生物、镇静、抗惊厥等多种药理学活性^[4]。但目前莨菪酰胺对胃癌细胞影响的研究报道较少,其抗胃癌的作用机制尚未完全明了。本研究旨在观察莨菪酰胺对胃癌生物学行为的影响,并探讨其可能的作用机制,为临床研究莨菪酰胺的药用价值与应用提供药理学依据及参考,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 细胞培养:人胃癌细胞株 MKN45 购自上海生博生物医药科技有限公司。在无菌条件下培养 24 h 后,当细胞铺满瓶底接近 80%~90% 时即可传代。取对数生长期的细胞用于试验。

1.2 分组及处理:取对数生长期的细胞接种于 96 孔板中,设置 8 个复孔,封闭,铺板贴壁后,待细胞铺满接近 80%~90% 时,弃上清液,分别加入 0、5、7.5、10 μmol/L 的莨菪酰胺〔购自上海朝瑞生物科技有限公司,规格高效液相色谱法(HPLC)≥98%, 5 mg〕和 3 mmol/L N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)培养 24、48、72 h,选择 10 μmol/L 莨菪酰胺用于后续实验,设定空白对照组、3 mmol/L NAC 组、10 μmol/L 莨菪酰胺组和 3 mmol/L NAC 预处理 + 10 μmol/L 莨菪酰胺组。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法测定细胞活

性:实验终止前 4 h,每孔加 20 μL MTT,继续孵育 > 4 h。去除孔内液体,避光操作,每孔添加 100 μL 二甲基亚砜(DMSO),振荡 10 min,测定 490 nm 处每孔细胞吸光度(A)值,绘制生长曲线,计算细胞存活率〔细胞存活率=(A_{药物组}-A_{空白组})/(A_{细胞对照组}-A_{空白组})×100%〕。

1.3.2 细胞周期检测:胰酶消化、收集各组细胞,离心 5 min,弃上清液用 PBS 洗涤 3 次,加入 400 mg/L 碘化丙啶(PI)、10 mg/L RNA 酶(RNase),300 μL 曲通-100 染液,每组设 8 个复孔。在室温下避光染色 20 min 后,采用流式细胞仪检测细胞周期。

1.3.3 细胞凋亡率检测:胰酶消化、收集各组细胞离心 5 min,弃上清液用 PBS 洗涤 2 次,加入 5 μL PI、5 μL Annexin V/异硫氰酸荧光素(FITC)、400 μL 1×结合缓冲液,每组设 8 个复孔。在室温下避光染色 15 min 后,采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况,计算细胞凋亡率。

1.3.4 活性氧簇(ROS)水平检测:胰酶消化、收集各组细胞,加入 10 μmol/L 2',7'-二氢二氯荧光黄双乙酸钠(DCFH-DA)37℃培养 30 min, PBS 洗涤 2 次,采用流式细胞仪检测 ROS 活性。

1.3.5 用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测 p21、X 染色体连锁凋亡抑制蛋白(XIAP)、多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(PARP)、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-9(caspase-9)的表达:试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,使用 BCA 试剂盒检测各组细胞总蛋白,用 8% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)50 μg 总蛋白后转膜,用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后加入 1:200 稀释的羊抗鼠一抗,4℃孵育 12 h;用含吐温的磷酸盐缓冲液(TBST)清洗 3 次,加入 1:300 稀释的羊抗兔二抗,重复清洗,最后用超敏电化学发光(ECL)测定灰度值,以目的蛋白与内参照 β-肌动蛋白(β-actin)的灰度值比值表示。

1.4 统计学方法: 使用 SPSS 16.0 统计软件分析数据,符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 苳茛酰胺对 MKN45 细胞活性的影响 (表 1): 与作用 24 h 比较, 48 h 与 72 h 后 MKN45 细胞活性均明显降低 (均 $P < 0.05$), 作用呈时间正相关性 (均 $r > 0.9$, $P < 0.05$); 在同样的作用时间下, 随着苳茛酰胺浓度的增加, 对 MKN45 细胞活性的抑制作用明显增加 (均 $P < 0.05$), 其作用呈浓度正相关性 (均 $r > 0.8$, $P < 0.05$)。

表 1 不同浓度苳茛酰胺作用不同时间点
对 MKN45 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

苳茛酰胺 浓度	样本数 (孔)	细胞活性 (A 值)		
		24 h	48 h	72 h
0 $\mu\text{mol/L}$	8	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00
5 $\mu\text{mol/L}$	8	90.23 $\pm$ 4.34 ^a	78.13 $\pm$ 3.44 ^{ad}	58.35 $\pm$ 4.56 ^{ade}
7.5 $\mu\text{mol/L}$	8	77.35 $\pm$ 3.47 ^{ab}	56.63 $\pm$ 4.27 ^{abde}	23.56 $\pm$ 2.05 ^{abde}
10 $\mu\text{mol/L}$	8	37.52 $\pm$ 2.91 ^{abc}	18.56 $\pm$ 2.54 ^{abcde}	10.38 $\pm$ 1.32 ^{abcde}

注: 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 苳茛酰胺比较, ^a $P < 0.05$; 与 5 $\mu\text{mol/L}$ 苳茛酰胺比较, ^b $P < 0.05$; 与 7.5 $\mu\text{mol/L}$ 苳茛酰胺比较, ^c $P < 0.05$; 与 24 h 比较, ^d $P < 0.05$; 与 48 h 比较, ^e $P < 0.05$

2.2 不同浓度苳茛酰胺对 MKN45 细胞 G1 期阻滞的影响 (表 2; 图 1~2): 苳茛酰胺作用 MKN45 细胞 24 h 后, 可诱导 MKN45 细胞 G1 期阻滞 ($P < 0.05$)。Western Blot 检测显示, 随着苳茛酰胺浓度的增加, MKN45 细胞周期负调控因子 p21 蛋白明显增加 (均 $P < 0.05$), 呈浓度正相关性 (均 $r > 0.8$, $P < 0.05$)。

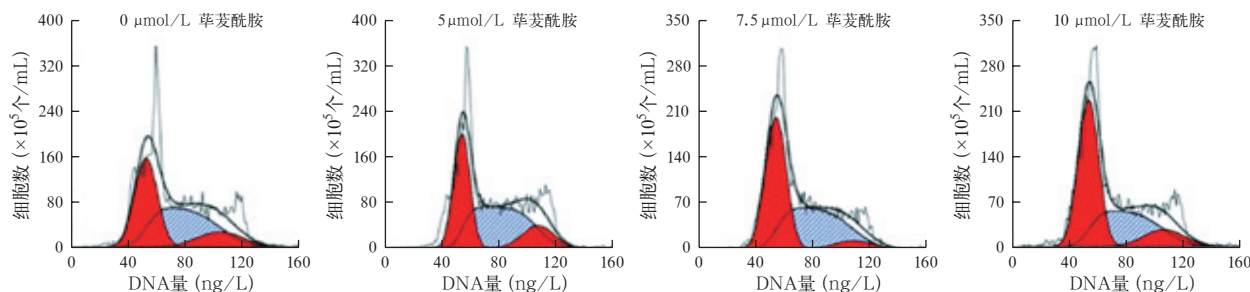


图 1 不同浓度苳茛酰胺对 MKN45 细胞 G1 期阻滞的影响

表 2 不同浓度苳茛酰胺作用 24 h 对 MKN45 细胞 G1 期阻滞、细胞凋亡率及相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

苳茛酰胺 浓度	样本 数(孔)	G1 期阻滞 (%)	细胞凋亡率 (%)	XIAP 蛋白表达 (灰度值)	caspase-9 蛋白 表达(灰度值)	PARP 蛋白表达 (灰度值)	p53 蛋白表达 (灰度值)	p21 蛋白表达 (灰度值)	PUMA 蛋白 表达(灰度值)
0 $\mu\text{mol/L}$	8	35.33 $\pm$ 3.56	9.21 $\pm$ 2.13	0.432 $\pm$ 0.101	0.003 $\pm$ 0.001	0.005 $\pm$ 0.001	0.028 $\pm$ 0.009	0.012 $\pm$ 0.004	0.032 $\pm$ 0.011
5 $\mu\text{mol/L}$	8	41.27 $\pm$ 4.04 ^a	13.82 $\pm$ 3.45 ^a	0.120 $\pm$ 0.022 ^a	0.007 $\pm$ 0.001 ^{ab}	0.014 $\pm$ 0.003 ^a	0.134 $\pm$ 0.071 ^a	0.112 $\pm$ 0.059 ^a	0.206 $\pm$ 0.082 ^a
7.5 $\mu\text{mol/L}$	8	48.78 $\pm$ 5.24 ^{ab}	19.66 $\pm$ 4.73 ^{ab}	0.023 $\pm$ 0.005 ^{ab}	0.225 $\pm$ 0.049 ^{ab}	0.428 $\pm$ 0.152 ^{ab}	0.484 $\pm$ 0.123 ^{ab}	0.312 $\pm$ 0.077 ^{ab}	0.506 $\pm$ 0.112 ^{ab}
10 $\mu\text{mol/L}$	8	55.12 $\pm$ 5.78 ^{abc}	25.21 $\pm$ 5.05 ^{abc}	0.005 $\pm$ 0.001 ^{abc}	0.649 $\pm$ 0.132 ^{abc}	0.895 $\pm$ 0.111 ^{abc}	0.762 $\pm$ 0.201 ^{abc}	0.513 $\pm$ 0.124 ^{abc}	0.778 $\pm$ 0.202 ^{abc}

注: 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 苳茛酰胺比较, ^a $P < 0.05$; 与 5 $\mu\text{mol/L}$ 苳茛酰胺比较, ^b $P < 0.05$; 与 7.5 $\mu\text{mol/L}$ 苳茛酰胺比较, ^c $P < 0.05$

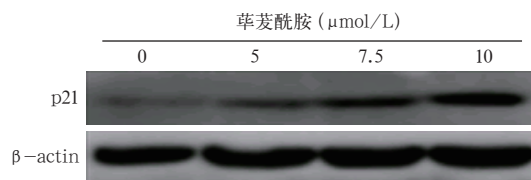


图 2 不同浓度苳茛酰胺对 MKN45 细胞
p21 蛋白表达的影响

2.3 不同浓度苳茛酰胺对 MKN45 细胞凋亡的影响 (表 2; 图 3): 苳茛酰胺作用 MKN45 细胞 24 h 后, 随着苳茛酰胺浓度的增加, 苳茛酰胺诱导 MKN45 细胞凋亡越明显 ($P < 0.05$); Western Blot 结果显示, 苳茛酰胺可下调抗凋亡蛋白 XIAP 表达, 上调剪切 caspase-9 及剪切 PARP 表达, 即激活 caspase 依赖性凋亡途径。

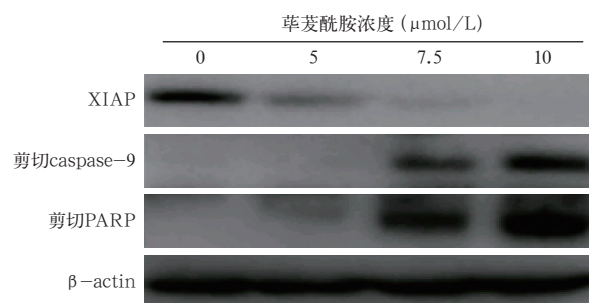
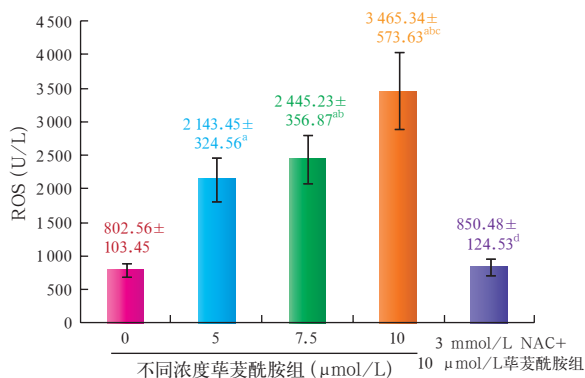


图 3 不同浓度苳茛酰胺对 MKN45 细胞
相关凋亡途径蛋白表达的影响

2.4 不同浓度苳茛酰胺及 NAC 对 ROS-p53 途径诱导细胞凋亡及相关凋亡途径蛋白表达的影响 (表 2; 图 4~5): 苳茛酰胺作用 MKN45 细胞 6 h 后, 随着苳茛酰胺浓度的增加, ROS 水平明显升高, 而经

3 mmol/L 抗氧化剂 NAC 预处理 10 μ mol/L 茛菪酰胺细胞后 ROS 水平明显降低 ($P < 0.05$) ; Western Blot 结果显示, 茛菪酰胺可使 p53 及其下游靶基因 p21、凋亡调控因子 (PUMA) 蛋白表达明显增加, 提示茛菪酰胺可能通过升高 ROS 水平激活 p53 途径而诱导细胞凋亡。



注: 与 0 μ mol/L 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 5 μ mol/L 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 7.5 μ mol/L 组比较, ^c $P < 0.05$; 与 10 μ mol/L 组比较, ^d $P < 0.05$

图 4 不同浓度茛菪酰胺及 NAC 对 ROS 水平的影响

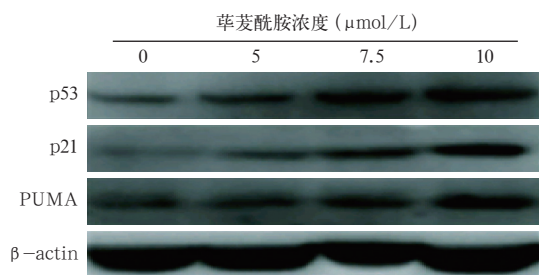


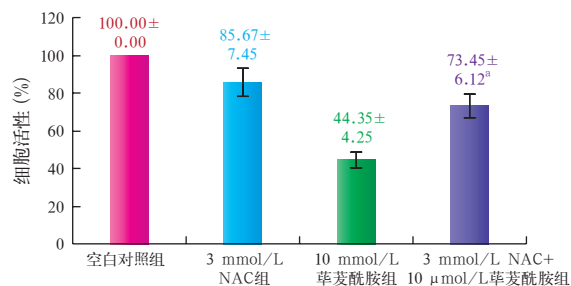
图 5 不同浓度茛菪酰胺对 ROS-p53 途径诱导细胞凋亡相关蛋白表达的影响

2.5 NAC 对 MKN45 细胞增殖及相关蛋白表达的影响 (表 3; 图 6 ~ 7): NAC 预处理 MKN45 细胞 1 h 后, 加入 10 μ mol/L 茛菪酰胺作用 24 h 后, MKN45 细胞活性明显上升 ($P < 0.05$), 提示 NAC 预处理可逆转茛菪酰胺对 MKN45 细胞增殖的抑制作用; Western Blot 结果显示, p53、剪切 PARP 蛋白表达下调, 进一步验证茛菪酰胺通过 ROS-p53 途径诱导细胞凋亡。

表 3 NAC 对 MKN45 细胞增殖、p53 及剪切 PARP 相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (孔)	细胞活性 (%)	p53 蛋白表达 (灰度值)	剪切 PARP 蛋白表达 (灰度值)
空白对照组	8	100.00 $\pm$ 0.00	1.000 $\pm$ 0.000	1.000 $\pm$ 0.000
3 mmol/L NAC 组	8	85.67 $\pm$ 7.45	0.014 $\pm$ 0.005	0.005 $\pm$ 0.001
10 μ mol/L 茛菪酰胺组	8	44.35 $\pm$ 4.25	0.019 $\pm$ 0.007	0.008 $\pm$ 0.002
3 mmol/L NAC + 10 μ mol/L 茛菪酰胺组	8	73.45 $\pm$ 6.12 ^a	0.732 $\pm$ 0.152 ^a	0.487 $\pm$ 0.108 ^a

注: 与 10 μ mol/L 茛菪酰胺组比较, ^a $P < 0.05$



注: 与 10 μ mol/L 茛菪酰胺组比较, ^a $P < 0.05$

图 6 茛菪酰胺和 NAC 对 MKN45 细胞增殖的影响

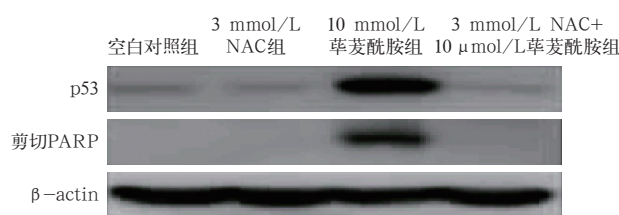


图 7 茛菪酰胺和 NAC 对 MKN45 增殖相关蛋白表达的影响

3 讨论

胃癌细胞侵袭性高, 患者病死率较高。目前, 由于内分泌治疗、分子靶向治疗对胃癌不敏感, 早期主要利用蒽环和紫杉类药物进行全身化疗或新辅助化疗, 但在后期会发生耐药、复发或转移, 放化疗、手术治疗虽明显提高了患者生存率, 降低了复发率, 但毒性大, 易发生耐药性等并发症, 预后较差^[4-5]。

中药可减轻癌症放化疗的不良反应, 增强机体免疫力, 降低并发症发生率、复发率及转移风险^[6]。研究显示, 茛菪酰胺既可抑制肿瘤细胞增殖, 促进细胞凋亡, 且无明显不良反应, 又能明显改善患者预后, 提高远期生存率^[7]。茛菪酰胺对肝癌、肺癌和乳腺癌等多种肿瘤细胞有明显抑制效果, 且不良反应小, 若联合相关化疗药物效果更明显^[8-9]。研究证实, 茛菪酰胺可通过诱导肿瘤细胞凋亡, 抑制肿瘤细胞黏附、侵袭、迁移和血管生成, 增强机体免疫力等途径发挥抑制肿瘤作用^[10]。有研究显示, 超过 90% 的癌症患者死亡是因肿瘤细胞转移导致的, 其转移过程非常复杂, 从病灶分离, 通过血管或淋巴循环进入体其他器官黏附于基底膜, 定植并形成转移灶, 导致预后不良和生存率降低^[11-12]。肖楠等^[13]研究显示, 茛菪酰胺能增加 A549 细胞辐射敏感性, 抑制细胞增殖, 促进细胞凋亡, 可能与细胞 G0/G1 期比例增多有关。文远超等^[14]和张倩等^[15]发现, 茛菪酰胺可通过提高细胞内 ROS 及过氧化物还原酶 4 的表达而诱导胶质瘤细胞凋亡。本研究显示, 茛菪酰胺对 MKN45 细胞的作用呈浓度和时间依赖

性。合适的茛菪酰胺浓度与作用时间可最大限度发挥抑制 MKN45 细胞增殖,达到治疗胃癌的作用^[16]。同时本研究还显示,茛菪酰胺可诱导 MKN45 细胞 G1 期阻滞,且随茛菪酰胺浓度增加, MKN45 细胞周期负调控因子 p21 蛋白明显增加,呈浓度正相关性。

细胞增殖对癌症进展十分关键,茛菪酰胺抑制肿瘤增殖可能与相关蛋白质和通路相关。李先佳等^[17]发现,马鞭草总黄酮可能是通过提高 ROS 水平,并上调 caspase-9、p53 蛋白水平,从而诱导肝癌 HepG-2 细胞凋亡。赵行宇等^[18]发现,6-姜烯酚可能参与 caspase-3 介导的细胞凋亡途径而诱导胃癌 BGC-823 凋亡。本研究显示,随着茛菪酰胺浓度的增加,茛菪酰胺诱导 MKN45 细胞凋亡越明显,ROS 水平就明显上升,同时可下调抗凋亡蛋白 XIAP 表达,上调剪切 caspase-9、PARP 表达,即激活 caspase 依赖性凋亡途径;而经抗氧化剂 NAC 预处理后可降低 ROS 水平,同时上调 p53 及其下游靶基因 p21、PUMA 蛋白表达,提示茛菪酰胺可能通过升高 ROS 水平激活 p53 途径而诱导细胞凋亡。最后, NAC 预处理可逆转茛菪酰胺对 MKN45 细胞增殖的抑制作用,同时下调 p53、剪切 PARP 蛋白表达,表明茛菪酰胺可通过 ROS-p53 途径诱导细胞凋亡。黄军祥等^[19]认为环孢素 A 可能通过提高细胞内 ROS 以及 caspase-3 水平,阻滞 MGC80-3 细胞生长周期而抑制细胞凋亡,与刘畅等^[20]的研究结果相似,本研究结果也证实了这一机制。

综上所述,茛菪酰胺可抑制胃癌细胞 MKN45 增殖,降低其活性,阻滞细胞周期 G1 期,诱导凋亡,其机制可能与提高细胞 ROS 水平,激活 p53 与 caspase 凋亡途径有关。本研究虽验证了茛菪酰胺可抑制胃癌细胞增殖,但仍有待于深入研究合适的作用剂量与时间,同时进一步发现更多的作用途径与信号通路以便更好地发挥其抗胃癌效果。

参考文献

- [1] Takatsu Y, Hiki N, Nunobe S, et al. Clinicopathological features of gastric cancer in young patients [J]. Gastric Cancer, 2016, 19 (2): 472-478. DOI: 10.1007/s10120-015-0484-1.
- [2] Zhao X, Jiang K, Liang B, et al. Anticancer effect of xanthohumol induces growth inhibition and apoptosis of human liver cancer through NF- κ B/p53-apoptosis signaling pathway [J]. Oncol Rep, 2016, 35 (2): 669-675. DOI: 10.3892/or.2015.4455.
- [3] 李丹, 杨昇卉, 赖智睿, 等. 茛菪化学成分和药理活性研究现状 [J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 33 (6): 565-569. Li D, Yang YH, Lai RZ, et al. Status of chemical constituents and pharmacological activities of *Piper longum* L. [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2017, 33 (6): 565-569.
- [4] 卜文静, 许尤琪. 中医药抗胃癌转移机制的研究进展 [J]. 现代中西医结合杂志, 2016, 25 (27): 3074-3076. Bu WJ, Xu YQ. Advances in the mechanism of TCM against gastric cancer metastasis [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2016, 25 (27): 3074-3076.
- [5] 李洪森, 李雁. 茛菪明碱调控 TGF- β /ERK 信号通路抗肺癌

- 作用机制研究 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32 (5): 2149-2153. Li HL, Li Y. Effect mechanism of piperlongumine on regulating the ERK signaling pathway anti-lung cancer [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2017, 32 (5): 2149-2153.
- [6] 李海娇, 李琪, 吕秀梅, 等. 基于中医传承辅助平台的藏医药治疗胃痛用药规律分析 [J]. 成都中医药大学学报, 2017, 40 (4): 96-99. Li HJ, Li Q, Lyu XM, et al. Analysis on medication rules of Tibetan medicines in treating stomachache based on traditional Chinese medicine inheritance assistance system [J]. J Chengdu Univ Tradit Chin Med, 2017, 40 (4): 96-99.
- [7] 谭芳, 杨涛, 高鸿亮, 等. 茛菪根提取物对胆盐相关性胃炎模型大鼠 TNF- α 、COX-2 表达的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36 (19): 1657-1661. Tan F, Yang T, Gao HL, et al. Effects of *Radix Piperis longi* extract on TNF- α and COX-2 expression in bile salts correlation gastritis model rats [J]. Chin J Hospital Pharm, 2016, 36 (19): 1657-1661.
- [8] 滕文静, 李洪森, 李雁. 基于 Cytoscape 等生物信息学分析软件预测茛菪明碱抗肿瘤靶基因 [J]. 广州中医药大学学报, 2017, 34 (5): 785-789. Teng WJ, Li HL, Li Y. Based on bioinformatics analysis software such as Cytoscape predict piperlongumine antitumor target genes [J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med, 2017, 34 (5): 785-789.
- [9] Kim DH, Park KW, Chae IG, et al. Carnosic acid inhibits STAT3 signaling and induces apoptosis through generation of ROS in human colon cancer HCT116 cells [J]. Mol Carcinog, 2016, 55 (6): 1096-1110. DOI: 10.1002/mc.22353.
- [10] 李月灵, 王高峰, 彭红, 等. 五味子乙素抑制胃癌 SNU-1 细胞增殖和转移的作用机制研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2017, 33 (12): 1815-1818, 1827. Li YL, Wang GF, Peng H, et al. Research of inhibitory mechanism of salidroside B on proliferation and metastasis of gastric cancer SNU-1 cells [J]. Chin J Immunol, 2017, 33 (12): 1815-1818, 1827.
- [11] Zhou Y, Wei L, Zhang H, et al. FV-429 induced apoptosis through ROS-mediated ERK2 nuclear translocation and p53 activation in gastric cancer cells [J]. J Cell Biochem, 2015, 116 (8): 1624-1637. DOI: 10.1002/jcb.25118.
- [12] Wang SQ, Wang C, Chang LM, et al. Geridonin and paclitaxel act synergistically to inhibit the proliferation of gastric cancer cells through ROS-mediated regulation of the PTEN/PI3K/Akt pathway [J]. Oncotarget, 2016, 7 (45): 72990-73002. DOI: 10.18632/oncotarget.12166.
- [13] 肖楠, 徐党辉, 潘志尧, 等. 茛菪酰胺对人肺腺癌 A549 细胞辐射敏感性的影响 [J]. 山东医药, 2017, 57 (6): 13-16. Xiao N, Xu DH, Pan ZY, et al. Effect of piperlongumine on radiosensitization of human pulmonary adenocarcinoma A549 cells [J]. Shandong Med J, 2017, 57 (6): 13-16.
- [14] 文远超, 余云湖, 付晓红, 等. 茛菪酰胺对胶质瘤细胞增殖影响 [J]. 中国公共卫生, 2017, 33 (3): 468-470. Wen YC, Yu YH, Fu XH, et al. Impact of piperlongumine on glioma proliferation [J]. Chin J Public Health, 2017, 33 (3): 468-470.
- [15] 张倩, 徐文茂. 茛菪酰胺对胶质瘤细胞的影响 [J/CD]. 临床检验杂志 (电子版), 2017, 6 (1): 61-64. Zhang Q, Xu WM. Role of piperlongumine in glioma proliferation [J/CD]. Clin Lab J (Electronic Edition), 2017, 6 (1): 61-64.
- [16] Wei B, Huang Q, Huang S, et al. Trichosanthin-induced autophagy in gastric cancer cell MKN-45 is dependent on reactive oxygen species (ROS) and NF- κ B/p53 pathway [J]. J Pharmacol Sci, 2016, 131 (2): 77-83. DOI: 10.1016/j.jphs.2016.03.001.
- [17] 李先佳, 任丽平, 金少举. 马鞭草总黄酮诱导肝癌 HepG-2 细胞凋亡及可能机制 [J]. 国际药学研究杂志, 2017, 44 (8): 790-794. Li XJ, Ren LP, Jin SJ. Apoptosis of HepG-2 cells induced by total flavonoids of *Verbena officinalis* L. and possible mechanism [J]. J Int Pharm Res, 2017, 44 (8): 790-794.
- [18] 赵行宇, 侯以森, 刘雅范, 等. 6-姜烯酚诱导胃癌 BGC-823 细胞凋亡及其机制研究 [J]. 上海中医药杂志, 2018, 52 (2): 84-88. Zhao XY, Hou YS, Liu YF, et al. Apoptosis of BGC-823 cells induced by 6-shogaol and its mechanism in gastric cancer [J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2018, 52 (2): 84-88.
- [19] 黄军祥, 胡咏梅, 石海, 等. 环孢素 A 对人胃癌 MGC80-3 细胞周期影响以及诱导其凋亡相关机制的研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52 (2): 169-173. Huang JX, HU YM, Shi H, et al. Effects of cyclosporin A induced cell line arrest and related mechanism of apoptosis in human gastric adenocarcinoma MGC80-3 cells [J]. Acta Univ Med Anhui, 2017, 52 (2): 169-173.
- [20] 刘畅, 罗英花, 朴仙姬, 等. 靛茜素通过 MAPK 及 Akt 信号途径诱导人胃癌 AGS 细胞凋亡 [J]. 南方医科大学学报, 2017, 37 (8): 1085-1091. Liu C, Luo YH, Piao XJ, et al. Quinalizarin induces apoptosis in gastric cancer AGS cells via MAPK and Akt signaling pathway [J]. J South Med Univ, 2017, 37 (8): 1085-1091.

(收稿日期: 2018-05-07)