

## 斑蝥酸钠注射液靶向 PI3K/AKT/mTOR 信号通路对 人肺腺癌细胞 A549 迁移能力的影响\*

房传赐 钱亚云

扬州大学 江苏 扬州 225001

**摘要:**目的:探讨斑蝥酸钠注射液对人肺腺癌细胞 A549 侵袭与转移的影响及其作用机制。方法:分别用  $0.3125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.625 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的斑蝥酸钠注射液处理 A549 细胞,MTT 法检测斑蝥酸钠注射液对 A549 细胞增殖的影响,并计算半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC50);根据 MTT 结果,在后续实验中,将细胞分为对照组(control)、斑蝥酸钠注射液低剂量组、斑蝥酸钠注射液高剂量组及顺铂组(DDP),通过细胞划痕实验检测斑蝥酸钠注射液对 A549 细胞侵袭与转移能力的影响;Western Blot 检测斑蝥酸钠注射液对 A549 细胞磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(phosphatidylinositol 3 kinases/protein kinase B/mammalian target of rapamycin, PI3K/AKT/mTOR) 通路相关蛋白表达的影响。结果:斑蝥酸钠注射液显著提高 A549 细胞的增殖抑制率( $P < 0.05$ ),且呈浓度及时间依赖性;与 control 组比较,不同剂量的斑蝥酸钠注射液能显著降低 A549 细胞的迁移率及 PI3K、AKT、mTOR、P70 S6 和 VEGF-C 的蛋白表达水平,且呈浓度依赖性。结论:斑蝥酸钠注射液能显著抑制肺癌 A549 细胞的增殖和迁移,作用机制可能与其抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路及血管生成有关。

**关键词:**斑蝥酸钠;肺腺癌;细胞迁移;PI3K/AKT/mTOR 通路;血管生成

**DOI:** 10.16368/j.issn.1674-8999.2021.09.410

中图分类号:R285.5 文献标志码:A 文章编号:1674-8999(2021)09-1954-05

### Effect of Sodium Cantharidinate Injection Targeting PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway on the Migration Ability of Human Lung Adenocarcinoma Cell A549

FANG Chuanci, QIAN Yayun

Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, China 225001

**Abstract:** Objective: To investigate the effect of sodium cantharidate injection on the invasion and metastasis of human adenocarcinoma cancer cell A549 and its mechanism. Methods: Lung cancer A549 cells were treated with sodium cantharidate injection of  $0.3125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $0.625 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $1.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  and  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  respectively. The effect of sodium cantharidate injection on the proliferation of lung cancer A549 cells was detected by MTT method, and the half maximal inhibitory concentration (IC50) was calculated; according to the MTT results, in the follow-up experiment, the cells were divided into control group, low-dose group, high-dose group and cisplatin (DDP) group. The effect of sodium cantharidate injection on the invasion and metastasis of lung cancer A549 cells was detected by cell scratch test; the effect of sodium cantharidate injection on the expression of phosphatidylinositol 3 kinases/protein kinase B/mammalian target of rapamycin (PI3K/AKT/mTOR) pathway related proteins in lung cancer A549 cells was detected by Western Blot. Results: Sodium cantharidate injection significantly increased the cell proliferation inhibition rate of A549 cells ( $P < 0.05$ ) in a concentration and time-dependent manner; compared with the control group, different doses of sodium cantharidate injection could significantly reduce the migration rate of A549 cells and the protein expression of PI3K, AKT, mTOR, P70S6 and VEGF-C in a concentration dependent manner. Conclusion: Sodium cantharidate injection can sig-

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(81403232);江苏省自然科学基金面上项目(BK20171290);扬州大学研究生实践创新计划项目(XSJCX18087)

• 1954 •

nificantly inhibit the proliferation and migration of lung adenocarcinoma A549 cells and its mechanism may be related to its inhibition of the activation of PI3K/AKT/mTOR pathway and angiogenesis.

**Key words:** sodium cantharidate; lung adenocarcinoma; cell migration; PI3K/AKT/mTOR pathway; angiogenesis

肺癌是临床常见的恶性肿瘤,在我国发病率与死亡率均居所有癌症首位<sup>[1]</sup>。早期肺癌多采用手术治疗的方式,但肺癌的高转移性与高侵袭性使得多数患者发现时已是中晚期<sup>[2-3]</sup>。因此,肺癌的治疗多采用手术为主,化疗联合中医药治疗的综合治疗方案<sup>[4]</sup>。

中医认为,肺癌为本虚标实之证,临床治疗肺癌在扶正的基础上,多与“清热解毒”“化痰散结”以及“活血化瘀”等祛邪法相结合<sup>[4]</sup>。斑蝥味辛,性热,具有破血逐瘀、散结消癥、攻毒蚀疮的功效,斑蝥素是其主要成分,具有很强的抗癌作用,但同时具有较强的毒副作用。运用现代工艺提取得到的斑蝥酸钠既保留了斑蝥素的抗癌作用,也使其毒性大大降低<sup>[5]</sup>。以斑蝥酸钠为主要成分的斑蝥酸钠注射液作为肺癌的辅助化疗药物,较广泛应用于临床<sup>[6]</sup>,但对于肺癌的具体作用机制尚未明确。

磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(phosphatidylinositol 3 kinases/protein kinase B/mammalian target of rapamycin, PI3K/AKT/mTOR)信号通路在肿瘤的发生发展中起重要作用,能够调节肿瘤细胞的生长、增殖,影响肿瘤细胞的血管生成及侵袭与转移能力<sup>[7]</sup>。本研究探究了斑蝥酸钠注射液干预下肺腺癌A549细胞增殖、侵袭与转移能力的变化,并初步探讨对PI3K/AKT/mTOR信号通路蛋白表达的影响,为斑蝥酸钠对肺癌相关疾病的作用机制研究提供参考。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 人肺腺癌A549细胞,由中国科学院上海细胞库提供,于37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下,采用1640完全培养基培养。

**1.2 药物与试剂** 顺铂(cisplatin, DDP)注射液(江苏豪森制药有限公司,国药准字:H20040813);斑蝥酸钠注射液(贵州金桥药业有限公司,国药准字:H52020601)。MTT粉末、胰蛋白酶(美国Sigma公司,批号:M2003、J170013);1640培养基(美国HyClone公司,批号:SH30809.01);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 美国Gibco公司,批号:10437028);细胞裂解缓冲液、BCA蛋白浓度测定试剂盒(中国碧云天公司,批号:P0013、P0010);PI3K、AKT、

mTOR、P70 S6、GAPDH抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号:4249、4691、2983、2708、5174);VEGF-C抗体(美国Abcam公司,批号:ab191274);HRP标记的羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(华安生物公司,批号:G170628);ECL化学发光试剂盒(美国Bio-Rad公司,批号:1705062)。

**1.3 仪器** Heracell 150i型恒温培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司);IX71型倒置荧光显微镜(日本Olympus公司);Universal Hood II型SDS-PAGE凝胶成像分析仪、721BR08904型蛋白电泳槽(美国Bio-Rad公司);Enspire型多功能酶标仪(美国PerkinElmer公司)。

## 2 方法

**2.1 MTT实验** 取对数生长期的A549细胞,用胰蛋白酶消化后,将细胞悬液浓度调整为 $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 。96孔板中每孔加入100 μL细胞悬液,并分别加入含0 mg·L<sup>-1</sup>、0.312 5 mg·L<sup>-1</sup>、0.625 mg·L<sup>-1</sup>、1.25 mg·L<sup>-1</sup>、2.5 mg·L<sup>-1</sup>、5 mg·L<sup>-1</sup>斑蝥酸钠注射液的10% FBS培养基100 μL,设5个平行孔,处理24 h、48 h、72 h后,弃去上清,每孔加入20 μL MTT溶液,4 h后吸除上清液,加入150 μL DMSO,低速震荡10 min,酶标仪检测490 nm波长处的吸光度值,计算肿瘤细胞增殖抑制率。

肿瘤细胞增殖抑制率 = (1 - 药物组 OD 值 / 对照组 OD 值) × 100%

**2.2 细胞划痕实验** 取对数生长期A549细胞接种于6孔板,每孔约 $5 \times 10^4$ 个细胞,待细胞铺满后沿中线划出2 mm左右划痕,PBS清洗3次,加入无血清培养基,设空白对照组(control)、斑蝥酸钠注射液低剂量组(0.4 mg·L<sup>-1</sup>)、斑蝥酸钠注射液高剂量组(1 mg·L<sup>-1</sup>)、顺铂组(DDP 2 mg·L<sup>-1</sup>),置入培养箱,24 h后记录各孔划痕的距离。

**2.3 Western blot实验** A549细胞分组同2.2,孵育24小时后,用细胞裂解缓冲液在冰上提取30 min,用BCA蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。取25 ng待测样品进行10% SDS-PAGE电泳分离,然后转移到PVDF膜。用5%脱脂奶粉封闭2 h,一抗(1:1 000)孵育过夜,二抗(1:2 000)孵育2 h,

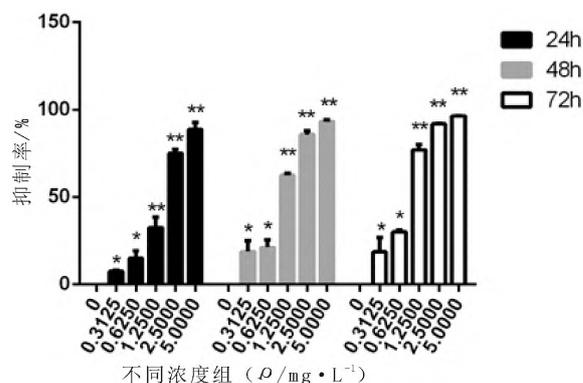
应用凝胶成像系统扫描各蛋白条带灰度值,以待测蛋白和内参蛋白的灰度值比值作为待测蛋白的相对表达量。

**2.4 统计学分析** 采用 SPSS 19.0 统计软件分析,计量数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,组间比较用单因素方差分析,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 斑蝥酸钠注射液对 A549 细胞增殖的影响

MTT 法检测不同浓度斑蝥酸钠注射液对 A549 细胞增殖能力的影响。药物干预 24 h、48 h、72 h 后,斑蝥酸钠注射液能够明显抑制 A549 细胞的增殖 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),且具有浓度与时间依赖性。见图 1。后续实验选取 24 h 为药物干预时间,计算斑蝥酸钠注射液干预 A549 细胞 24 h 后,其半数抑制浓度 (half maximal inhibition concentration,  $IC_{50}$ ) 为  $1.58 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

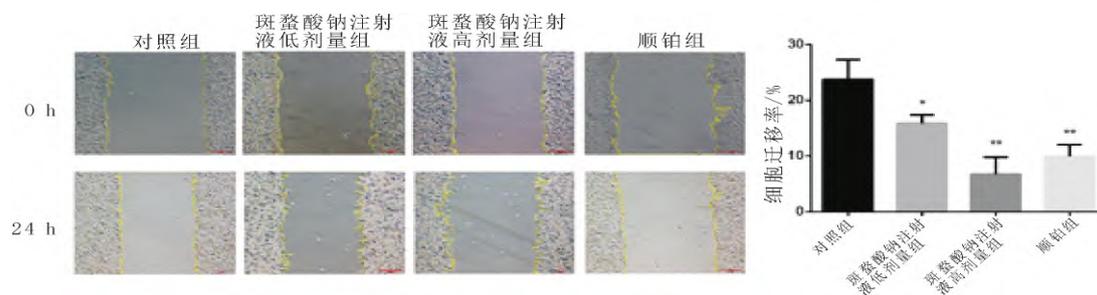


注:与  $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

图1 斑蝥酸钠注射液对 A549 细胞增殖的影响

#### 3.2 斑蝥酸钠注射液对 A549 细胞迁移能力的影响

细胞划痕实验检测斑蝥酸钠注射液对 A549 细胞迁移能力的影响。与对照组比较,经不同浓度斑蝥酸钠注射液处理后,各孔细胞迁移率显著降低 ( $P < 0.05$ ),提示斑蝥酸钠注射液能够抑制细胞迁移,并呈浓度依赖性。见图 2。



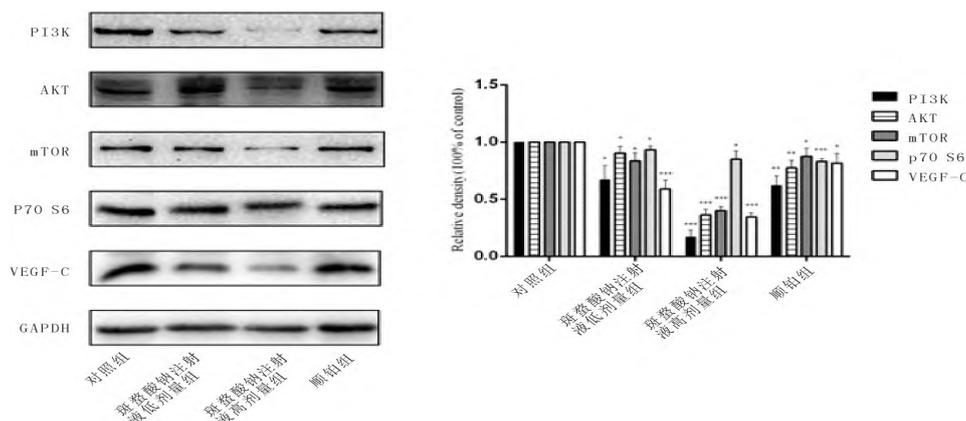
注:与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

图2 斑蝥酸钠注射液对 A549 细胞迁移能力的影响 ( $\times 200$ )

#### 3.3 斑蝥酸钠注射液对 A549 细胞 PI3K/AKT/mTOR 通路蛋白表达的影响

为探讨斑蝥酸钠注射液抑制 A549 细胞侵袭与转移的作用机制,用 Western blot 检测 PI3K/AKT/mTOR 通路相关蛋白的表达水平。与对照组比较,斑蝥酸钠注射液处理

后,PI3K、AKT、mTOR、P70 S6 及 VEGF - C 的蛋白表达量显著降低 ( $P < 0.05$ )。表明斑蝥酸钠注射液可能通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路激活而抑制 A549 细胞的侵袭与转移。见图 3。



注:与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

图3 斑蝥酸钠注射液对 A549 细胞中 PI3K/AKT/mTOR 通路相关蛋白表达水平的影响

## 4 讨论

恶性增殖和转移是恶性肿瘤的重要特点,在肿瘤的发生发展中起到重要的作用,因此,抑制细胞增殖与转移是治疗恶性肿瘤的重要策略之一<sup>[8]</sup>。斑蝥是常用的抗肿瘤虫类中药,斑蝥酸钠是其主要成分斑蝥素的小分子衍生物<sup>[9]</sup>。斑蝥酸钠注射液在多种肿瘤治疗中均有良好效果<sup>[10-12]</sup>,在肺癌的治疗中亦有应用。研究表明,斑蝥酸钠注射液联合化疗治疗非小细胞肺癌,能够提高治疗的总有效率,且联合组患者治疗后血清中 VEGF 水平明显低于常规化疗组患者,而肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 和白细胞介素-12 (interleukin-12, IL-12) 水平明显高于常规化疗组患者<sup>[13]</sup>。

本研究采用不同浓度斑蝥酸钠注射液干预 A549 细胞后,细胞增殖受到抑制,且与浓度和时间呈现明显依赖性。划痕实验显示,细胞向中心迁移的能力受抑制。这些结果均表明斑蝥酸钠注射液可抑制 A549 细胞的增殖和迁移,具有明显的抗肿瘤活性。

为进一步探讨斑蝥酸钠注射液抑制 A549 细胞增殖与转移的分子机制,本文研究了斑蝥酸钠注射液对 A549 细胞 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响。PI3K/AKT/mTOR 信号通路在肿瘤研究中起重要作用<sup>[14]</sup>,该通路的异常激活能够抑制肿瘤的凋亡与自噬<sup>[15-16]</sup>,促进肿瘤的增殖与转移<sup>[17]</sup>,影响肿瘤微环境<sup>[18]</sup>等。而大约 90% 的非小细胞肺癌细胞株,包括 A549 细胞,均存在 PI3K/AKT/mTOR 通路的激活<sup>[19]</sup>,其中,PI3K 的亚单位 p85a 和 p115a 均呈现过表达的现象,而 PI3K 下游的信号因子 AKT 也因此呈现活化状态,活化的 AKT 能够促进糖原合成酶激酶-3 $\beta$  (glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ )、叉头框蛋白 O (forkhead box protein O, FOXO) 转录因子、核转录因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 等多个基因的表达,从而促进细胞增殖<sup>[20]</sup>。mTOR 作为 PI3K/AKT 的下游信号因子,因 PI3K/AKT 的激活而呈活化状态。研究表明,mTOR 能够参与调控上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transformation, EMT),调控血管内皮生长因子,影响肿瘤免疫微环境等多种细胞进程,从而影响

肺癌细胞的增殖与迁移<sup>[21-23]</sup>。Western Blot 实验表明,斑蝥酸钠注射液能够明显下调 A549 细胞中 PI3K/AKT/mTOR 通路相关蛋白的表达。因此,斑蝥酸钠注射液抑制 A549 细胞增殖与转移的作用机制可能与抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路激活有关。

同时,PI3K/AKT 可在基因水平上促进 VEGF 的合成<sup>[24]</sup>,VEGF-C 作为 VEGF 家族中的一员,能够促进淋巴管内皮细胞的增殖及迁移,是诱导淋巴管生成的重要指标<sup>[25]</sup>,且在肺癌中高表达,与肺癌的增殖与转移密切相关<sup>[26]</sup>。已有研究表明,斑蝥酸钠能够有效抑制胃癌、肝癌等恶性肿瘤中 VEGF-C 的表达<sup>[27-28]</sup>,但对于肺癌中 VEGF-C 表达的影响鲜有报道。本研究表明,斑蝥酸钠注射液干预 A549 细胞后,VEGF-C 的表达亦被抑制,表明斑蝥酸钠注射液抑制 A549 细胞增殖与转移可能的作用机制还可能与抑制血管生成有关,但具体机制仍需进一步探讨。

综上所述,斑蝥酸钠注射液能够抑制 A549 细胞的侵袭与转移,其机制可能与抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路激活及血管生成有关。

## 参考文献:

- [1] 孙可欣, 郝荣寿, 张思维, 等. 2015 年中国分地区恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2019, 28(1): 1-11.
- [2] HIRSCH F R, SCAGLIOTTI G V, MULSHINE J L, et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments[J]. Lancet, 2017, 389(10066): 299-311.
- [3] BRODERICK S R. Adjuvant and neoadjuvant immunotherapy in non-small cell lung cancer[J]. Thorac Surg Clin, 2020, 30(2): 215-220.
- [4] 朱盼, 李泽庚, 董昌武. 肺癌中医证型研究概况[J]. 实用中医内科杂志, 2017, 31(3): 91-93.
- [5] 单思, 严小军, 刘红宁. 中医药治疗恶性肿瘤的研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(10): 4539-4541.
- [6] 周杰, 吴敬波. 斑蝥素及其衍生物抗肿瘤研究近况[J]. 西南军医, 2014, 16(3): 271-274.
- [7] HUANG S, HOUGHTON P J. Targeting mTOR signaling for cancer therapy[J]. Curr Opin Pharmacol, 2003, 3(4): 371-377.
- [8] 李倩, 刘颖, 郭君兰. 红景天苷对人肺癌 A549 细胞裸鼠移植瘤生长的影响及对 MAPK/ERK1/2 信号通路的调控作用[J]. 中医学报, 2020, 35(7): 1469-1476.
- [9] 邱立强, 夏豪, 李雯静, 等. 斑蝥素及其衍生物在抗肿瘤及抗心血管疾病中的分子机制研究进展[J]. 河北医学, 2019, 25(10):

- 1748 - 1750.
- [10] 刘国建, 李娟, 王朝霞, 等. 斑蝥酸钠注射液联合化疗治疗晚期非小细胞肺癌的临床观察[J]. 肿瘤基础与临床, 2015, 28(5): 416 - 418.
- [11] 徐艳琴, 李进, 曾庆松, 等. 斑蝥酸钠抑制人结肠癌细胞增殖及与 STAT3 信号通路的关系[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(11): 1139 - 1141, 1159.
- [12] 曹辉, 许冲, 鲁亮, 等. 斑蝥酸钠注射液联合放疗治疗食管癌的 Meta 分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(16): 214 - 217.
- [13] 李丽静, 臧亚茹, 于文会, 等. 化疗联合斑蝥酸钠维生素 B6 注射液对非小细胞肺癌患者的治疗效果及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2018, 44(6): 1286 - 1290.
- [14] AOKI M, FUJISHITA T. Oncogenic roles of the PI3K/AKT/mTOR axis[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2017, 407: 153 - 189.
- [15] SAXTON R A, SABATINI D M. mTOR signaling in growth, metabolism and disease[J]. Cell, 2017, 168(6): 960 - 976.
- [16] YUE Z Q, GUAN X, CHAO R, et al. Diallyl disulfide induces apoptosis and autophagy in human osteosarcoma MG - 63 cells through the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. Molecules, 2019, 24(14): E2665.
- [17] 刘陆, 高小玲, 李墨颜, 等. PI3K/Akt 信号通路影响食管癌细胞生长的机制及中药干预作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(14): 217 - 224.
- [18] 刘嘉诚, 刘洁. 基于 PI3K/Akt/mTOR 通路探讨半夏泻心汤对 PLGC 大鼠黏膜微环境的影响[J]. 湖南中医杂志, 2018, 34(12): 117 - 119.
- [19] SHARMA S, GURU S K, MANDA S, et al. A marine sponge alkaloid derivative 4 - chloro faspaplysin inhibits tumor growth and VEGF mediated angiogenesis by disrupting PI3K/Akt/mTOR signaling cascade[J]. Chem Biol Interact, 2017, 275: 47 - 60.
- [20] 胡志英, 朱新江, 陈舒晨, 等. 非小细胞肺癌 PI3K/AKT/MTOR 信号通路的研究现状与进展[J]. 癌症进展, 2018, 16(6): 671 - 674.
- [21] 杜兵强, 张伟霞, 张连平. 槲寄生素对人骨肉瘤 U2OS 细胞的抑制及对 PI3K/Akt/mTOR 通路的调控作用[J]. 中医学报, 2020, 35(2): 323 - 329.
- [22] 于哲, 李晓敏, 槐梅, 等. 核仁纺锤体相关蛋白 1 激活 AKT/mTOR 信号通路促进肺癌进展[J]. 中华肿瘤杂志, 2020, 42(7): 551 - 555.
- [23] 陈美娟, 赵若琳, 张旭. 麦冬皂苷对非小细胞肺癌细胞株 NCI - H157 细胞周期及 PI3K - AKT - mTOR 信号通路的影响研究[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(5): 40 - 44.
- [24] 徐永良, 张大伟, 赵毅玲, 等. FAK、VEGF - C 和 LMVD 联合检测判断直肠癌组织中淋巴管生成的临床意义[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(21): 5191 - 5193.
- [25] 兰杰. 培美曲塞联合顺铂对晚期非小细胞肺癌患者血清 VEGF - C、IL - 6、MMP9 表达的影响[J]. 中国地方病防治杂志, 2017, 32(6): 701 - 703.
- [26] 李璟波, 张文, 夏晖, 等. 肺腺癌组织血管内皮生长因子受体 3 (VEGFR3) 高表达与患者预后不良正相关[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2019, 35(11): 1023 - 1029.
- [27] 单福新, 沙春艳. 斑蝥酸钠注射液可有效降低炎症因子与血管内皮生长因子的表达[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(4): 1685 - 1690.
- [28] 徐文会, 赵浩亮, 魏文贵, 等. 斑蝥酸钠对人肝癌细胞 HepG2 的增殖作用及血管内皮生长因子表达的影响[J]. 中国医疗前沿, 2012, 7(4): 4 - 5.

收稿日期: 2021 - 03 - 21

作者简介: 房传赐(1993 -), 男, 江苏扬州人, 医学硕士, 研究方向: 中西医结合抗肿瘤。

通信作者: 钱亚云(1974 -), 女, 江苏扬州人, 副教授, 博士, 研究方向: 中西医结合抗肿瘤。E - mail: yyqian@yzu.edu.cn

编辑: 孙亚萍