新型荜茇酰胺衍生物C12阻滞A549细胞 周期、诱导细胞凋亡和自噬

龙海洮¹ 雷雪¹ 陈佳宜¹ 孟娇² 邵利辉² 李洙锐^{1,3} 陈丹萍¹ 王贞超^{1,2,3} 周玥^{1,3*} 李成朋^{1,3*}

(¹贵州大学药学院,贵阳 550025; ²绿色农药国家重点实验室,绿色农药与农业生物工程教育部重点实验室, 贵州大学精细化学品研发中心,贵阳 550025; ³贵州大学贵州省合成药物工程实验室,贵阳 550025)

摘要 该研究旨在探讨荜茇酰胺衍生物C12对非小细胞肺癌(NSCLC) A549的体外抑制活性 及其作用机制。采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法和克隆形成实验检测C12对细胞增殖的影响;划痕 实验和Transwell实验检测C12对细胞迁移和侵袭的影响;流式细胞术检测对细胞周期和凋亡的影 响;采用转录组测序检测C12处理后的差异表达基因;Western blot验证C12对相关蛋白表达变化的 影响。结果显示,C12能有效抑制A549的增殖、迁移和侵袭,阻滞细胞周期于G₂/M期,并通过调控 Bax和Bcl-2的表达水平诱导细胞凋亡;其调控基因主要存在于细胞染色体组分中,显著富集于催化 活性和DNA结合相关的分子功能、细胞周期生物学过程和MAPK、PI3K/Akt信号通路;C12能上 调细胞内的ROS水平,通过上调p-JNK、p-Erk1/2和p-p38的表达来激活MAPK信号通路诱导细胞凋 亡;同时,C12通过下调p-Akt和p-mTOR,上调LC3-II诱导细胞自噬。总之,C12在A549中可以激活 MAPK信号通路诱导细胞凋亡和抑制PI3K/Akt/m-TOR信号通路诱导细胞自噬。

关键词 荜茇酰胺衍生物; A549; 细胞凋亡; 周期; 自噬

Novel Piperlongumine Derivative C12 Induces Cell Cycle Arrest, Apoptosis, and Autophagy in A549 Cells

LONG Haitao¹, LEI Xue¹, CHEN Jiayi¹, MENG Jiao², SHAO Lihui², LI Zhurui^{1,3}, CHEN Danping¹, WANG Zhenchao^{1,2,3}, ZHOU Yue^{1,3*}, LI Chengpeng^{1,3*}

(¹College of Pharmacy, Guizhou University, Guiyang 550025, China; ²National Key Laboratory of Green Pesticide, Key Laboratory of Green Pesticide and Agricultural Bioengineering, Ministry of Education, Center for R&D of Fine Chemicals of Guizhou University, Guiyang 550025, China; ³Guizhou Engineering Laboratory for Synthetic Drugs, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract This study aimed to investigate the inhibitory effect of Piperlongumine derivative C12 on NSCLC (non-small cell lung cancer) cell line A549 and its mechanism *in vitro*. MTT assay and colony formation assay were used to detect the effect of C12 on cell proliferation. Scratch assay and Transwell assay were used to detect the effects of C12 on cell migration and invasion. Cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry. Transcriptome sequencing was used to predict DEGs (differentially expressed genes) after C12 treatment. Western

收稿日期: 2024-03-11 接受日期: 2024-04-10

国家自然科学基金(批准号: 22007022、32360689、22364008、32260694、21867004)、贵州省自然科学基金(批准号: ZK (2022) 073、ZZK (2021) 034)、贵州省青年科技人才培养项目(批准号: KY (2022) 146)和贵州省教育厅拔尖科技人才计划(批准号: 2022075)资助的课题

^{*}通信作者。Tel: 18585031877, E-mail: yzhou8@gzu.edu.cn; Tel: 18286065090, E-mail: lichp11@163.com

Received: March 11, 2024 Accepted: April 10, 2024

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.22007022, 32360689, 22364008, 32260694, 21867004), the Guizhou Provincial Natural Science Foundation (Grant No.ZK (2022) 073, ZZK (2021) 034), the Guizhou Provincial Young Science and Technology Talents Development Project (Grant No.KY (2022) 146), and the Top Science and Technology Talent Program of Guizhou Education Department (Grant No.2022075) *Corresponding authors. Tel: +86-18585031877, E-mail: yzhou8@gzu.edu.cn; Tel: +86-18286065090, E-mail: lichp11@163.com

blot was used to verify the effect of C12 on the expression of related proteins. The results showed that C12 could effectively inhibit the proliferation, migration, and invasion of A549 cells, arrest cell cycle at G₂/M phase and induce cell apoptosis by regulating the expression of Bax and Bcl-2. The regulatory genes were mainly present in the chromosomal component and were significantly enriched in molecular functions related to catalytic activity and DNA binding, cell cycle biological processes, and MAPK and PI3K/Akt signaling pathways. C12 could increase intracellular ROS level and activate MAPK signaling pathway to induce cell apoptosis by up-regulating the expression of p-JNK, p-Erk1/2 and p-p38. At the same time, C12 induced autophagy by down-regulating p-Akt and p-mTOR and up-regulating LC3-II. In conclusion, C12 could activate MAPK signaling pathway to induce apoptosis and inhibit PI3K/Akt/m-TOR signaling pathway to induce autophagy in A549 cells.

Keywords Piperlongumine derivative; A549; apoptosis; cell cycle; autophagy

根据全球癌症统计数据,每年约200多万人被 诊断为肺癌,约180万人死于肺癌^[1]。肺癌的新发病 例持续上升,这使之成为最常见的恶性疾病之一,肺 癌也是造成癌症相关死亡的主要原因^[2-3]。超过85% 的肺癌病例被归类为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC),因为大多数患者经诊断后已处 于不可手术的晚期或转移期,导致NSCLC患者5年 生存率低于20%^[4-7]。NSCLC的治疗手段包括放疗、 化疗、靶向治疗和免疫治疗。由于预后差,临床疗 效不理想,肺癌患者的发病率和死亡率并没有得到 很好的控制^[8-9]。因此,迫切需要开发新的安全有效 的NSCLC治疗药物,寻找新的治疗靶点,来提高肺 癌治疗的效果。

天然产物及其衍生物已经成为抗肿瘤药物的重 要来源之一^[10]。荜茇酰胺(Pierlongumine, PL)是1967 年从胡椒属植物的根和果实中提取的天然生物碱, 具有多种药理作用,包括免疫活性、抗炎活性、神 经保护活性和抗肿瘤活性[11-12]。近年来,大量文献指 出PL可抑制多种癌细胞的生长或诱导其凋亡,并在 肿瘤异种移植模型中有效抑制肿瘤生长,且无明显 不良反应^[13-21]。PL作用于多种癌症靶点,包括信号 转导与转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)^[22]、核转录因子-кB(nuclear transcription factor-kappa B, NF-кB)^[23]、磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶点(phosphoinositide-3 kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin, PI3K/Akt/mTOR)^[14,21]和丝裂原活化蛋白 激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)^[16]信号 通路等。此外,其抗肿瘤活性还依赖于活性氧(reactive oxygen species, ROS)的积累^[13,18,20]。据报道, 双芳基脲 结构具有抗肿瘤特性,许多含有其结构片段的药物

(如索拉非尼和替沃扎尼等)已被批准上市^[24-25]。因此, 探索具有双芳基脲结构的新型荜茇酰胺衍生物的抗 肿瘤机制对NSCLC的小分子抑制剂的开发具有重 要意义。

在本课题组近期的研究中,合成了一系列新的 含有双芳基脲结构的PL衍生物,并评估了其对肿瘤 细胞的细胞毒性,其中C12对NSCLC表现出较好的抗 肿瘤活性,但其作用机制尚不清楚^[26]。因此本研究 首次证明了C12的抗NSCLC活性,并阐明了其潜在的 作用机制,包括抑制细胞迁移和侵袭、G₂/M周期阻 滞和细胞凋亡。此外,C12通过产生ROS激活MAPK 信号通路诱导细胞凋亡,抑制PI3K/Akt/mTOR通路 诱导细胞自噬。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

化合物C12来源于课题组前期工作。胎牛血 清(fetal bovine serum, FBS)和RPMI-1640培养基购 自上海源培生物科技有限公司;青霉素/链霉素溶液 购自广州硕谱生物科技有限公司;MTT[3-(4,5-二甲 基-2-噻唑基)-2,5-二苯基四氮唑溴铵)]购自上海皓鸿 生物医药科技有限公司;Annexin V-FITC凋亡检测 试剂盒、DNA含量定量检测(细胞周期)试剂盒、活 性氧检测试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒、蛋白 酶和磷酸酶抑制剂购自北京索莱宝生物科技有限公 司;NAC(*N*-acetyl-L-cysteine)和细胞裂解液RIPA购 自上海碧云天生物科技有限公司;3-MA(3-methyladenine)和PD98059购自美国MedChemexpress公司; Cyclin B1、CDK1、LC3和GAPDH抗体购自武汉 三鹰生物技术有限公司;p38、p-p38、Erk、p-Erk、 JNK、p-JNK、Akt、p-Akt(Ser437)、mTOR和p-mTOR 抗体购自美国Cell Signaling Technology公司; Bcl-2 和Bax抗体购自美国Santa Cruz公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 A549购自中国科学院细胞库(昆明)。细胞用含10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素的 RPMI-1640培养基培养,放置于37°C、5% CO₂的细胞培养箱,选取对数期生长细胞用于实验。

 1.2.2 MTT法检测细胞增殖 将A549细胞以每 孔4×10³个细胞的密度接种于96孔板并培养过夜。
用C12处理细胞24 h、48 h和72 h。随后,每孔中加 入20 μL MTT,在37 °C下孵育4 h。去除培养基后, 每孔加入150 μL DMSO,摇床室温振荡(150 r/min)
15 min。随后,使用酶标仪(Tecan, Infinite M200 Pro) 测量悬液在490 nm处的吸光度值。

1.2.3 平板克隆实验 将A549细胞接种于6孔板中 过夜培养。随后用C12处理细胞24h。药物处理后 的细胞以每孔1000个细胞的数量接种于6孔板,培 养14天,有肉眼可见细胞集落形成时终止培养。弃 去培养基,加4%多聚甲醛室温固定30min,0.1%结 晶紫室温染色15min,观察集落形成情况。

1.2.4 细胞划痕实验 将A549接种于6孔培养板中并 过夜培养。当孔中细胞数达到90%以上时,用20μL枪 头垂直于孔底画3条竖线,用PBS冲洗去除漂浮的细 胞。用含不同浓度C12的1%血清培养基培养细胞。 用倒置荧光显微镜(NIKON, Japan)观察划痕愈合过 程,并于0、24、48 h拍照。最后使用ImageJ软件计 算细胞迁移率。

1.2.5 细胞侵袭实验 用Transwell小室进行细胞侵 袭实验。将2×10⁵个细胞悬浮于100 μL含不同浓度 C12(0、0.6、0.8、1.0 μmol/L)的无血清培养基中,并 将其加入到Matrigel包被的上室中。下室加入600 μL 含不同浓度C12的10%血清培养基。培养24 h后,用 PBS洗涤Transwell小室2次,用棉签仔细擦拭去除上 室中的细胞。然后用4%多聚甲醛室温固定15 min, 用0.1%结晶紫室温染色。使用倒置显微镜观察细胞 染色情况,用ImageJ分析细胞侵袭能力。

1.2.6 流式细胞术检测细胞周期 将细胞接种于 6孔板中,培养24 h,然后用不同浓度的C12(0、0.6、 0.8、1.0 μmol/L)处理24 h。收集细胞,PBS清洗2次 后加70%乙醇重悬,4°C固定过夜。取出固定后的 细胞室温2000 r/min离心5 min,弃去固定液,加PBS 清洗细胞2次,加入100 μL RNase A, 37°C孵育30 min。 加入400 µL PI染液, 4 °C避光孵育30 min。使用流式 细胞仪(FACS Calibur, Becton Dickenson)检测周期分 布情况。采用Flow Jo进行数据分析。

1.2.7 流式细胞术检测细胞凋亡 使用 Annexin V-FITC/PI试剂盒检测细胞凋亡。将细胞接种于6孔 板中,培养24 h,然后用不同浓度的C12(0、0.6、0.8、 1.0 μmol/L)处理48 h。收集细胞,用PBS洗涤2次,悬 浮于100 μL结合缓冲液中。分别加入约5 μL的 Annexin V-FITC和PI,室温避光孵育染色。加入400 μL 的1×结合缓冲液后,采用流式细胞仪(FACS Calibur, Becton Dickenson)检测细胞凋亡情况。采用Flow Jo 进行数据分析。

1.2.8 活性氧检测 将细胞接种于12孔板中,培养 24 h后,分别加入C12或NAC处理。利用DCFH-DA 荧光探针检测细胞内ROS水平的变化。用DCFH-DA探针染液在37 °C避光染色20 min,加入无血清 培养基洗涤细胞3次,用倒置荧光显微镜(NIKON, Japan)拍照。

1.2.9 透射电镜(transmission electron microscopy, TEM) 用C12处理细胞24 h后,收集细胞,用2.5% 戊二醛固定。室温2 000 r/min离心5 min, PBS洗涤 细胞,用镊子将细胞沉淀包裹在琼脂糖中。将细胞 置于1%锇酸中室温避光固定2 h,随后用乙醇和丙 酮脱水并包埋。用超显微切片机(Leica UC7, Jena, Germany)切片。加入2%乙酸铀饱和乙醇溶液室温 避光染色15 min,依次使用70%乙醇和超纯水冲洗。 在无CO₂条件下,采用2.6%柠檬酸铅溶液染色,然后 用超纯水冲洗,室温干燥过夜。用透射电子显微镜 (Hitachi HT7800, Tokyo, Japan)进行图像采集。

1.2.10 转录组测序 用C12处理细胞24 h后,用 TRIzol试剂收集细胞。RNA-seq分析在苏州帕诺米 克生物科技有限公司进行,通过生物云平台(www. biodeep.com)在线平台进行数据分析,根据|log2(fold change)|≥1和P<0.05为标准筛选差异表达基因,对 差异基因进行基因本体论(gene ontology, GO)和 KEGG富集分析。

1.2.11 Western blot 用C12处理后收集细胞,用 RIPA裂解缓冲液裂解,并提取细胞总蛋白。然后使 用BCA检测试剂盒,根据使用说明进行蛋白定量。 等量的蛋白样品通过SDS-PAGE凝胶分离并转移 至PVDF膜上。用5%脱脂奶粉室温封闭1.5 h后,用 TBST洗涤,然后加入一抗(1:1 000)4°C孵育过夜。 次日在室温下孵育1h,然后用TBST洗涤,加入二抗 (1:10 000)在室温下孵育1h。最后利用化学发光系 统对蛋白条带进行可视化分析。

1.3 统计分析

采用GraphPad Prism 9.0软件进行统计学分析,数据以*x*±s表示。组间比较采用单因素方差分析, P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 C12抑制A549细胞的增殖

C12的结构如图1A所示。为了探究C12对A549 细胞生长的影响,用不同浓度的C12处理A549细胞 24 h、48 h和72 h后,利用MTT法检测。结果如图 1B所示,C12处理后细胞的增殖受到明显抑制。此

外,通过显微镜观察,C12处理后的细胞表现出圆形 形态,细胞收缩并从培养板的底面脱落,这表明细 胞活力丧失(图1C)。通过平板克隆实验进一步评 估C12对细胞生长的抑制作用,结果显示与对照组 相比,C12处理显著抑制了细胞的集落形成(图1D)。 这些结果表明C12对A549细胞具有潜在的抗增殖作 用。

2.2 C12抑制A549细胞的迁移和侵袭

通过细胞划痕实验和Transwell实验来评估C12 对细胞迁移和侵袭的影响。与Control组相比,C12 处理显著抑制了A549细胞的迁移(图2A)。此外, Transwell实验结果表明,C12有效地抑制了A549细 胞的侵袭(图2B)。总的来说,C12对A549细胞的迁 移和侵袭均表现出明显的抑制作用。



A: C12的化学结构; B: MTT法检测C12对A549细胞的抑制作用; C: 显微镜下观察细胞在C12作用24 h后细胞形态的变化; D: C12对细胞集落形成的影响。****P<0.000 1, 与Control组相比。

A: chemical structures of C12; B: the inhibitory effect of C12 on A549 cells was detected by MTT assay; C: the cell morphology of cells after treatment with C12 for 24 h was observed under microscope; D: effect of C12 on cell colony formation. ****P<0.000 l compared with Control group.

图1 C12抑制A549细胞增殖

Fig.1 C12 exhibited antiproliferative effects in A549 cells



A: 划痕实验检测C12处理后A549细胞的迁移能力; B: Transwell实验检测C12处理后A549细胞的侵袭能力。***P<0.001, 与Control组相比。 A: the migration ability of A549 cells after C12 treatment was detected by scratch test; B: Transwell assay was used to detect the invasion ability of A549 cells after C12 treatment. ***P<0.001 compared with Control group.



2.3 C12阻滞A549细胞周期于G2/M期

使用 PI染色结合流式细胞仪来检测 C12对细胞 周期的影响。与 Control组相比, C12可使 A549细胞 的 G₂/M期细胞比例从 6.21%增加到 14.5%, 这说明 C12可以将细胞周期阻滞在 G₂/M期(图 3A)。使用 Western blot检测了细胞周期 G₂/M期调节蛋白 p21、 Cyclin B1和 CDK1的表达水平(图 3B)。与 Control组 相比, C12和PL处理均导致了 p21表达水平的增加和 Cyclin B1和 CDK1表达水平的降低。这些结果表明 C12通过调节 p21、Cyclin B1和 CDK1蛋白的表达诱 导A549细胞的细胞周期阻滞于G₂/M期。

2.4 C12诱导A549细胞凋亡

使用 Annexin V-FITC/PI双染流式细胞术检测 细胞凋亡。与 Control组相比,当 C12浓度分别为 0.6、0.8和1.0 µmol/L时,细胞的总凋亡率依次为 16.84%、19.20%、24.82%, C12呈浓度依赖性地 诱导 A549细胞的凋亡(图4A)。检测凋亡相关蛋白 的表达,发现 C12处理细胞下调了 Bcl-2的表达,上

调了Bax的表达(图4B)。以上的数据表明, C12通 过影响凋亡相关蛋白的表达来诱导A549细胞凋 亡。

2.5 转录组测序分析揭示C12可能的作用通路

为了阐明C12对A549细胞的作用机制,我们进行了转录组测序分析。火山图和柱状图(图5A和图5B)结果显示,与Control组相比,C12处理导致A549细胞中有885个基因表达上调,546个基因表达下调。GO分析显示差异表达基因在生物学过程、细胞成分和分子功能方面的功能富集。在差异基因富集前10的GO项中,观察到生物学过程中的细胞周期及相关过程受到C12的显著影响。细胞组分的变化主要涉及染色体。此外,与催化活性和DNA结合相关的分子功能存在显著差异(图5C)。KEGG通路富集分析可发现与差异表达基因相关的关键通路。C12处理后,细胞周期、MAPK、PI3K/Akt信号通路差异基因富集最多,提示这些通路在介导C12发挥的抗肿瘤活性方面具有潜在作用(图5D)。

2.6 C12激活A549细胞内的MAPK信号通路

基于转录组学数据的KEGG分析,C12处理可以调节MAPK信号通路。MAPK信号通路。MAPK信号通路是诱导肿

瘤细胞凋亡的关键通路,为了进一步研究C12诱导 细胞凋亡的机制是否与这一通路的调控有关,利用 Western blot检测了MAPK信号通路相关蛋白JNK、



A: 流式细胞术检测C12和PL处理后细胞周期的分布情况; B: Western blot检测G₂/M期相关蛋白p21、Cyclin B1、CDK1的表达水平。数据以3次 实验的均值±标准差表示。*P<0.05, **P<0.01, 与Control组相比。

A: flow cytometry was used to detect the cell cycle distribution after C12 and PL treatment. B: Western blot was used to detect the expression levels of G_2/M phase related proteins p21, Cyclin B1 and CDK1. The data were expressed as the $\bar{x}\pm s$ of triplicate experiment. *P<0.05, **P<0.01 compared with Control group.



图3 C12诱导A549细胞周期阻滞于G₂/M期 Fig.3 C12 induced G₂/M cell cycle arrest in A549 cells

A: 流式细胞术检测C12和PL处理后A549细胞的凋亡率; B: Western blot检测凋亡相关蛋白Bax和Bcl-2的表达水平。数据以3次实验的均值±标准 差表示。**P<0.01, ***P<0.001, 与Control组相比。

A: the apoptosis rate of A549 cells treated with C12 and PL was detected by flow cytometry. B: the expression levels of apoptosis-related proteins Bax and Bcl-2 were detected by Western blot. The data were expressed as the $\overline{x}\pm s$ of triplicate experiment. **P<0.01, ***P<0.001 compared with Control group.

图4 C12诱导A549细胞凋亡 Fig.4 C12 induced apoptosis of A549 cells



图5 转录组测序分析

Fig.5 Transcriptome sequencing analysis

Erk1/2、p38及其磷酸化蛋白的表达水平。结果如 图6A和图6B所示,与Control组相比,C12处理显著上 调了JNK、Erk1/2和p38蛋白的磷酸化水平,而JNK、 Erk1/2和p38的表达水平没有显著变化。同时,使用 Erk抑制剂PD98059(30 µmol/L)发现,与C12单独处 理组相比,C12和PD98059共同处理组的p-Erk1/2的 表达水平显著下调(图6C和图6D)。这些结果表明, C12是通过激活MAPK信号通路来诱导A549细胞调 亡的。

2.7 C12刺激A549细胞产生ROS进而激活MAPK 信号通路

肿瘤细胞中MAPK信号通路与ROS的激活密切

相关。进一步探讨 C12对 ROS产生的影响,发现与 Control组相比,C12处理组中观察到 ROS水平(绿色 荧光)的显著增加(图7A)。随后使用ROS清除剂NAC 来验证这一发现,如图 7B所示,NAC有效地逆转了 ROS水平的升高。MTT结果表明,当使用 NAC抑制 C12诱导的 ROS产生时,出现了细胞活力的逆转,这 证实了 ROS的产生可抑制细胞增殖(图 7C)。随后, 研究了 C12诱导的细胞凋亡是否也依赖于细胞内活 性氧水平的升高。结果表明,C12单独处理组的细 胞凋亡率为28.6%,而C12和NAC共同处理组的总凋 亡率降低至12.94%(图7D)。这些结果说明,C12诱导 细胞内ROS水平的升高可能与细胞凋亡相关。随后,



A、B: Western blot检测MAPK通路相关蛋白表达水平; C、D: Western blot检测C12、PD98059或C12+PD98059处理后细胞内p-Erk1/2蛋白的表达水平; 数据以3次实验的均值±标准差表示。*P<0.05, **P<0.01, 与Control组相比; ^{###}P<0.001, 与C12(1.0 µmol/L)组相比。 A,B: Western blot analysis of the protein expression levels of MAPK pathway-related proteins; C,D: Western blot analysis of the protein expression levels of p-Erk1/2 in cells treated with C12, PD98059 or C12+PD98059. Data are expressed as x±s of triplicate experiment. *P<0.05, **P<0.01 compared with Control group; ^{###}P<0.001 compared with C12 (1.0 µmol/L) group.

图6 Western blot分析C12对MAPK信号通路相关蛋白表达水平的影响 Fig.6 Effect of C12 on expression levels of proteins in MAPK signaling pathway was determined by Western blot

利用NAC处理的细胞组进一步阐述ROS和MAPK通路之间的关系(图7E)。正如预想的那样,NAC显著抑制了C12诱导的JNK、Erk1/2和p38蛋白磷酸化水平的升高,表明ROS作用于MAPK信号级联的上游,调控MAPK信号通路的激活。上述结果表明,C12可以激活细胞内ROS产生,进而激活MAPK信号通路。

2.8 C12通过Akt/mTOR信号通路诱导A549细胞 自噬

为了探究 C12是否在 A549细胞中引发细胞自 噬,首先通过透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM)观察了C12处理后的A549细胞中自 噬体数量的变化。与Control组相比, C12处理后细胞 内形成了更多的自噬空泡(图8A)。检测自噬相关蛋 白LC3的表达水平, C12处理后LC3-II的表达量增加, 使用自噬抑制剂 3-MA(10 μmol/L)逆转了这一现象 (图8B),说明 C12可以诱导 A549细胞自噬。此外,与 C12单独处理组相比, 3-MA和C12共同处理组的细胞 活力显著降低(图8C)、细胞凋亡率显著升高(图8D)。 这些结果说明, C12诱导A549细胞自噬对细胞起保护 作用。据报道, PI3K/Akt/mTOR信号通路参与了药物 诱导的细胞凋亡和自噬。而且KEGG数据提示C12 对PI3K/Akt信号通路存在调控作用。为了探究C12 是否通过调节PI3K/Akt/mTOR通路诱导细胞自噬, Western blot分析Akt和mTOR及其磷酸化表达水平的 变化。结果如图8E所示, C12处理显著降低了细胞内 p-Akt和p-mTOR的表达水平。这些结果表明, C12可 以通过负调控A549细胞中PI3K/Akt/mTOR通路来诱 导细胞自噬。

3 讨论

在本课题组的前期研究中,合成了一系列具有 抗肿瘤活性的荜麦酰胺衍生物。然而,在这些化合物 中,C12对A549细胞的抑制作用及其机制有待阐明。 因此,本研究进一步探讨C12对A549细胞的作用机 制。研究结果证明C12有效地抑制了A549细胞的增 殖、迁移和侵袭。抑制细胞周期进程是抗肿瘤的有 效策略之一,周期蛋白CDK1通过与调节亚基Cyclin B1结合而激活其活性,从而调节细胞在G₂/M期的进





A: ROS was detected by DCFH-DA staining; B: effect of NAC treatment on C12-induced ROS accumulation; C: MTT assay was used to detect the effect of NAC and C12 on cell viability; D: flow cytometry was used to detect the apoptosis rate of C12, NAC or C12+NAC treated cells for 24 h; E: Western blot analysis of the protein expression levels of p-JNK, p-Erk1/2 and p-p38 in cells treated with C12, NAC or C12+NAC. Data are presented as the $\bar{x}\pm s$ of triplicate experiment. **P<0.01, ***P<0.001 compared with Control group.



展^[27-28]。而p21作为CDK抑制剂可以抑制 cdc2/Cyclin A和cdc2/Cyclin B复合物的表达,通过诱导细胞周期 阻滞和衰老发挥抗肿瘤作用^[29]。本研究发现C12处 理可导致细胞G₂/M期细胞比例增加,p21表达水平上 调, cyclin B1和CDK1蛋白表达水平下调。进一步讨论C12对细胞凋亡的影响,发现C12通过上调抗凋亡 蛋白 Bax表达水平和下调促凋亡蛋白 Bcl-2表达水平 来诱导细胞凋亡。

ROS的过度积累是细胞在各种刺激下死亡的一个诱发因素,越来越多的证据表明,过量的ROS可引发细胞凋亡^[30]。而ROS的积累可以通过激活MAPK 来诱导细胞死亡,MAPK通路中的JNK、Erk1/2和 p38可以被依次磷酸化而被激活^[31-32]。JIA等^[33]发现, 荷叶黄酮能增加A549细胞内ROS的水平,上调p38 MAPK、caspase-3和Bax,下调Nrf2和Bcl-2的蛋白表 达水平,诱导细胞凋亡。CAO等^[34]研究发现,镉通过 增加人支气管上皮细胞(BEAS-2B)内ROS水平,导 致细胞氧化应激,激活JNK、Erk和p38 MAPK通路, 最终通过线粒体介导的内源性细胞凋亡通路导致 BEAS-2B细胞凋亡。荜麦酰胺主要通过促进ROS的 产生诱导癌细胞的自噬和死亡^[35-36]。C12作为荜麦 酰胺衍生物,在本研究中通过DCFH-DA荧光探针检 测细胞内ROS水平的变化,发现C12呈浓度依赖性的 增加A549细胞内ROS水平;当加入ROS清除剂NAC





A: 透射电镜观察自噬体形成; B: Western blot检测LC3蛋白的表达水平; C: MTT法检测3-MA(10 mol/L)和C12对细胞活力的影响; D: 流式细胞术 检测C12、3-MA或C12+3-MA处理细胞24 h后细胞的凋亡率; E: Western blot检测Akt、p-Akt、mTOR和p-mTOR蛋白的表达水平; 数据以3次实 验的均值±标准差表示。**P<0.01,与Control组相比; ^{##}P<0.01, 与C12(1.0 μ mol/L)组相比。

A: autophagosome formation was observed under TEM; B: the expression level of LC3 protein was detected by Western blot. C: MTT assay was used to detect the effect of 3-MA and C12 on cell viability; D: flow cytometry was used to detect the apoptosis rate of C12, 3-MA or C12+3-MA treated cells for 24 h; E: Western blot was used to detect the expression levels of Akt, p-Akt, mTOR and p-mTOR proteins. The data are expressed as the $\bar{x}\pm s$ of triplicate experiment. **P<0.05 compared with Control group; ^{##}P<0.01, ^{###}P<0.001 compared with C12 (1.0 µmol/L) group.

图8 C12通过调控PI3K/Akt/mTOR信号通路诱导A549细胞发生自噬

Fig.8 C12 induced autophagy in A549 cells through PI3K/Akt/mTOR signaling pathway

后,C12诱导的ROS产生被有效抑制,同时C12诱导的周亡能力也相应降低。Western blot实验结果显示,NAC显著抑制了C12诱导的JNK、Erk1/2和p38蛋白磷酸化水平的升高。这些结果表明,在A549细胞中C12能诱导ROS的积累、激活MAPK信号通路进而诱导细胞凋亡。

自噬是一种保守的细胞分解代谢过程,随着自 噬研究的不断深入,自噬在肿瘤治疗中的意义也越 来越受到人们的关注[37]。细胞自噬与癌症之间的关 系是多样的,一种是保护性自噬,通过清除细胞内 错误折叠的蛋白质和异常的细胞器,维持胞质内环 境稳态,促进细胞存活;另一种则是启动细胞主动 性的II型细胞死亡程序,发生自噬性细胞死亡^[38-39]。 有研究发现PL可以增加人宫颈癌KB细胞和胆管癌 OCUG-1细胞内LC3-II的表达水平, PL和自噬抑制剂 3-MA联合处理显著降低细胞活力,并增加PL诱导细 胞凋亡的能力,表明PL可以诱导KB和OCUG-1细胞 发生保护性自噬^[40-41]。自噬相关蛋白与磷脂酰乙醇 胺结合并随后与LC3-I结合导致LC3-II的形成, LC3-II是作为评估自噬活性关键的标志物之一^[42]。本研 究通过TEM观察发现C12能增加A549细胞内自噬体 的数量, Western blot发现C12增加了LC3-II的表达水 平,这说明C12可以诱导细胞发生细胞自噬。使用自 噬抑制剂3-MA抑制自噬过程显著降低了C12抑制的 细胞活力并且增加了C12诱导的细胞凋亡,表明自 噬对C12诱导的细胞死亡具有细胞保护作用。研究 报道,抑制PI3K/Akt/mTOR通路可以通过自噬或调 亡机制诱导细胞死亡^[43]。本研究结果发现, C12处理 下调了细胞中p-Akt和p-mTOR的表达水平。这说明, C12通过抑制PI3K/Akt/mTOR通路诱导A549细胞自 噬。

综上所述, C12对A549细胞具有较好的抑制活性, 通过抑制A549细胞增殖、迁移和侵袭, 阻滞细胞周期于G₂/M期, 并诱导细胞凋亡。进一步的机制研究表明, C12导致ROS过度积累并激活MAPK信号通路, 最终诱导细胞凋亡。同时, C12通过负调控PI3K/Akt/mTOR通路来诱导细胞自噬。然而, 本研究尚有不足之处, 只在细胞水平进行了机制研究, 后续会通过体内实验进一步验证。

参考文献 (References)

[1] REBECCA L. SIEGEL M, KIMBERLY D, et al. Cancer statis-

tics, 2022 [J]. CA Cancer J Clin, 2022, 1(72): 7-33.

- [2] CHEN H L, TU Y K, CHANG H M, et al. Systematic review and network meta-analysis of immune checkpoint inhibitors in combination with chemotherapy as a first-line therapy for extensivestage small cell carcinoma [J]. Cancers, 2020, 12(12): 3629.
- [3] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-49.
- [4] YE Z, HUANG Y, KE J, et al. Breakthrough in targeted therapy for non-small cell lung cancer [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 133: 111079.
- [5] HUANG C Y, JU D T, CHANG C F, et al. A review on the effects of current chemotherapy drugs and natural agents in treating nonsmall cell lung cancer [J]. Biomedicine, 2017, 7(4): 23.
- [6] ZAPPA C, MOUSA S A. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances [J]. Transl Lung Cancer Res, 2016, 5(3): 288-300.
- [7] ULAHANNAN D, KHALIFA J, FAIVRE-FINN C, et al. Emerging treatment paradigms for brain metastasis in non-small-cell lung cancer: an overview of the current landscape and challenges ahead [J]. Ann Oncol, 2017, 28(12): 2923-31.
- [8] THOMAS A, LIU S V, SUBRAMANIAM D S, et al. Refining the treatment of NSCLC according to histological and molecular subtypes [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2015, 12(9): 511-26.
- [9] QIU Y F, LIU Z G, YANG W J, et al. Research progress in the treatment of small cell lung cancer [J]. J Cancer, 2017, 8(1): 29-38.
- [10] ASMA S T, ACAROZ U, IMRE K, et al. Natural products/bioactive compounds as a source of anticancer drugs [J]. Cancers, 2022, 14(24): 6203.
- [11] ZHU P, QIAN J, XU Z, et al. Overview of Piperlongumine analogues and their therapeutic potential [J]. Eur J Med Chem, 2021, 220: 113471.
- [12] TRIPATHI S K, BISWAL B K. Piperlongumine, a potent anticancer phytotherapeutic: perspectives on contemporary status and future possibilities as an anticancer agent [J]. Pharmacol Res, 2020, 156: 104772.
- [13] ZHANG Q, CHEN W, LÜ X, et al. Piperlongumine, a novel TrxR1 inhibitor, induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells by ROS-mediated ER stress [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 1180.
- [14] WANG F, MAO Y, YOU Q, et al. Piperlongumine induces apoptosis and autophagy in human lung cancer cells through inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. Int J Immunopath Ph, 2015, 28(3): 362-73.
- [15] RAWAT L, NAYAK V. Piperlongumine induces ROS mediated apoptosis by transcriptional regulation of SMAD4/P21/P53 genes and synergizes with doxorubicin in osteosarcoma cells [J]. Chem Biol Interact, 2022, 354: 109832.
- [16] CHOI E Y, HAN E J, JEON S J, et al. Piperlongumine induces apoptosis and cytoprotective autophagy via the MAPK signaling pathway in human oral cancer cells [J]. Biomedicines, 2023, 11(9): 2442.
- [17] GONG L H, CHEN X X, WANG H, et al. Piperlongumine induces apoptosis and synergizes with cisplatin or paclitaxel in human ovarian cancer cells [J]. Oxid Med Cell Longev, 2014, 2014:

906804.

- [18] THONGSOM S, SUGINTA W, LEE K J, et al. Piperlongumine induces G₂/M phase arrest and apoptosis in cholangiocarcinoma cells through the ROS-JNK-ERK signaling pathway [J]. Apoptosis, 2017, 22(11): 1473-84.
- [19] LEE H N, JIN H O, PARK J A, et al. Heme oxygenase-1 determines the differential response of breast cancer and normal cells to Piperlongumine [J]. Mol Cells, 2015, 38(4): 327-35.
- [20] SONG X, GAO T, LEI Q, et al. Piperlongumine induces apoptosis in human melanoma cells via reactive oxygen species mediated mitochondria disruption [J]. Nutr Cancer, 2018, 70(3): 502-11.
- [21] WANG H, WANG Y, GAO H, et al. Piperlongumine induces apoptosis and autophagy in leukemic cells through targeting the PI3K/Akt/mTOR and p38 signaling pathways [J]. Oncol Lett, 2018, 15(2): 1423-8.
- [22] YAO Y, SUN Y, SHI M, et al. Piperlongumine induces apoptosis and reduces bortezomib resistance by inhibiting STAT3 in multiple myeloma cells [J]. Oncotarget, 2016, 7(45): 73497-508.
- [23] ZHENG J, SON D J, GU S M, et al. Piperlongumine inhibits lung tumor growth via inhibition of nuclear factor kappa B signaling pathway [J]. Sci Rep, 2016, 6(1): 62357.
- [24] CHEN J N, WANG X F, LI T, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of novel quinazolinyl-diaryl urea derivatives as potential anticancer agents [J]. Eur J Med Chem, 2016, 107: 12-25.
- [25] KILIC-KURT Z, OZMEN N, BAKAR-ATES F. Synthesis and anticancer activity of some pyrimidine derivatives with aryl urea moieties as apoptosis-inducing agents [J]. Bioorg Chem, 2020, 101: 104028.
- [26] 欧阳贵平, 王贞超, 龙雪莎, 等. 一类含双芳基脲结构的荜菱 酰胺类衍生物的制备方法及其应用[P](OUYANG G P, WANG Z C, LONG X S, et al. Preparation method and application of Piperlongumine derivative containing diaryl urea structure [P]). 115974768, 2023-04-18.
- [27] GAO S Y, LI J, QU X Y, et al. Downregulation of Cdk1 and cyclinB1 expression contributes to oridonin-induced cell cycle arrest at G₂/M phase and growth inhibition in SGC-7901 gastric cancer cells [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(15): 6437-41.
- [28] NOMURA N, NOMURA M, NEWCOMB E W, et al. Geldanamycin induces G₂ arrest in U87MG glioblastoma cells through downregulation of Cdc2 and cyclin B1 [J]. Biochem Pharmacol, 2007, 73(10): 1528-36.
- [29] HUANG W S, KUO Y H, KUO H C, et al. CIL-102-induced cell cycle arrest and apoptosis in colorectal cancer cells via upregulation of p21 and GADD45 [J]. PLoS One, 2017, 12(1): e168989.
- [30] LIOU G Y, STORZ P. Reactive oxygen species in cancer [J]. Free

Radic Res, 2010, 44(5): 479-96.

- [31] ZHANG G, HE J, YE X, et al. beta-Thujaplicin induces autophagic cell death, apoptosis, and cell cycle arrest through ROS-mediated Akt and p38/ERK MAPK signaling in human hepatocellular carcinoma [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(4): 255.
- [32] WANG L J, LEE Y C, HUANG C H, et al. Non-mitotic effect of albendazole triggers apoptosis of human leukemia cells via SIRT3/ROS/p38 MAPK/TTP axis-mediated TNF-alpha upregulation [J]. Biochem Pharmacol, 2019, 162: 154-68.
- [33] JIA X B, ZHANG Q, XU L, et al. Lotus leaf flavonoids induce apoptosis of human lung cancer A549 cells through the ROS/p38 MAPK pathway [J]. Biol Res, 2021, 54(1): 7.
- [34] CAO X, FU M, BI R, et al. Cadmium induced BEAS-2B cells apoptosis and mitochondria damage via MAPK signaling pathway [J]. Chemosphere, 2021, 263: 128346.
- [35] LIN T H, KUO C H, ZHANG Y S, et al. Piperlongumine induces cellular apoptosis and autophagy via the ROS/Akt signaling pathway in human follicular thyroid cancer cells [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(9): 8048.
- [36] XIONG X X, LIU J M, QIU X Y, et al. Piperlongumine induces apoptotic and autophagic death of the primary myeloid leukemia cells from patients via activation of ROS-p38/JNK pathways [J]. Acta Pharmacol Sin, 2015, 36(3): 362-74.
- [37] MAIURI M C, ZALCKVAR E, KIMCHI A, et al. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(9): 741-52.
- [38] AMARAVADI R K, KIMMELMAN A C, DEBNATH J. Targeting autophagy in cancer: recent advances and future directions [J]. AACR, 2019, 9(9): 1167-81.
- [39] TEWARI D, PATNI P, BISHAYEE A et al. Natural products targeting the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway in cancer: a novel therapeutic strategy [J]. Semin Cancer Biol, 2022, 80: 1-17.
- [40] HAN E J, CHOI E Y, JEON S J, et al. Piperlongumine induces apoptosis and autophagy via the PI3K/Akt/mTOR pathway in KB human cervical cancer cells [J]. Food Chem Toxicol, 2023, 180: 114051.
- [41] SHANGGUAN J, LIANG C, LIAN M X, et al. Tanshinone I induces apoptosis and protective autophagy in human glioblastoma cells via a reactive oxygen species-dependent pathway [J]. Int J Mol Med, 2020, 45(4): 983-92.
- [42] JIANG P, MIZUSHIMA N. LC3 and p62-based biochemical methods for the analysis of autophagy progression in mammalian cells [J]. Methods, 2015, 75: 13-8.
- [43] ZHAO H, ZHANG X, WANG M, et al. Stigmasterol simultaneously induces apoptosis and protective autophagy by inhibiting Akt/mTOR pathway in gastric cancer cells [J]. Front Oncol, 2021, 11: 629008.