

萆茛酰胺衍生物 C12 对人非小细胞肺癌 H1299 细胞的抗肿瘤作用及其机制研究

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

(1. 贵州大学药学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州大学, 贵州省合成药物工程实验室, 贵州 贵阳 550025;
3. 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,
贵州 贵阳 550025)

摘要: (E)-1-(4-(3-(5-氯-6-氧代-3,6-二氢吡啶-1(2H)-基)-3-氧代丙基-1-烯-1-基)苯基)-3-(4-氟苯基)脲 (以下简称 C12) 是课题组前期合成的一个新型萆茛酰胺衍生物。本研究以人非小细胞肺癌 H1299 细胞为研究对象, 探讨 C12 对人非小细胞肺癌的体外抗肿瘤作用及其作用机制。采用噻唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 法、划痕实验、平板克隆实验和 Transwell 细胞侵袭实验检测 C12 对 H1299 细胞增殖、迁移和侵袭的影响; 通过流式细胞术检测 C12 对 H1299 细胞周期、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生、线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 和细胞凋亡的影响; 通过蛋白印迹实验检测 p21、Cyclin B1、CDK1、Bax、Bcl-2、JNK、p-JNK、Erk1/2、p-Erk1/2、p38 和 p-p38 的表达, 探讨 C12 的抗肿瘤作用机制。结果显示, C12 呈时间和浓度依赖性地抑制 H1299 的增殖、迁移和侵袭; 流式细胞结果显示, C12 能阻滞 H1299 细胞周期于 G2/M 期, 升高 ROS 水平, 降低 MMP 并诱导细胞凋亡; 蛋白印迹结果显示, C12 通过下调 Cyclin B1 和 CDK1 蛋白表达将 H1299 细胞阻滞于 G2/M 期, 上调 Bax/Bcl-2 水平诱导细胞凋亡, 上调 MAPK 通路中 p-JNK、p-Erk1/2 和 p-p38 的表达。综上所述, C12 能够显著抑制 H1299 的增殖、迁移和侵袭, 并诱导细胞周期阻滞和细胞凋亡, 其机制可能与激活 MAPK 信号通路有关。

关键词: 萆茛酰胺衍生物; H1299 细胞; 增殖; 凋亡; MAPK 信号通路

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)10-2773-09

The antitumor activity and mechanisms of piperlongumine derivative C12 on human non-small cell lung cancer H1299 cells

LONG Hai-tao¹, LEI Xue¹, CHEN Jia-yi¹, MENG Jiao³, SHAO Li-hui³, LI Zhu-rui^{1,2},
CHEN Dan-ping¹, WANG Zhen-chao^{1,2,3}, ZHOU Yue^{1,2*}, LI Cheng-peng^{1,2*}

(1. College of Pharmacy, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Guizhou Engineering Laboratory for Synthetic Drugs, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 3. National 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)

Abstract: The compound (E)-1-(4-(3-(5-chloro-6-oxo-3,6-dihydropyridin-1(2H)-yl)-3-oxo-propyl-1-ene-1-yl)phenyl)-3-(4-fluorophenyl) urea (C12), a novel derivative of piperlongumine previously synthesized by our research

收稿日期: 2024-04-23; 修回日期: 2024-06-05.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (22007022, 32360689, 22364008, 32260694, 21867004); 贵州省自然科学基金 (ZZK[2021]034); 贵州省教育厅拔尖科技人才计划 (2022075).

*通讯作者 Tel: 18286065090, E-mail: lichp11@163.com;

Tel: 18585031877, E-mail: yzhou8@gzu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0395

group, was investigated in this study to examine its effects on human non-small cell lung cancer cell line H1299 *in vitro* and elucidate its potential mechanism of action. The impact of **C12** on the proliferation, migration, and invasion abilities of H1299 cells were assessed using methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay, wound healing assay, cloning formation assay, and Transwell assay. Flow cytometry was employed to evaluate the influence of **C12** on cell cycle progression, reactive oxygen species (ROS) production, mitochondrial membrane potential (MMP), and apoptosis induction in H1299 cells. Western blot analysis was conducted to investigate the expression levels of p21, Cyclin B1, CDK1, Bax, Bcl-2, JNK, p-JNK, Erk1/2, p-Erk1/2, p38 and p-p38 proteins for exploring the anti-tumor mechanism underlying **C12**'s actions. The results demonstrated that **C12** exerted inhibitory effects on the proliferation, migration, and invasion capacities of H1299 cells in a time-dependent and concentration-dependent manner. Moreover, **C12** induced G2/M phase arrest in the cell cycle, reduced MMP levels, elevated ROS production, and triggered apoptotic processes. Flow cytometry analysis revealed that **C12** downregulated Cyclin B1 and CDK1 protein expressions, resulting in G2/M phase arrest. **C12** also upregulated Bax/Bcl-2 ratio, promoting apoptosis. Furthermore, **C12** activated MAPK signaling pathway by enhancing phosphorylation levels of JNK, Erk1/2, and p38 proteins. In conclusion, **C12** significantly suppressed proliferation, migration, and invasion capabilities while inducing cell cycle arrest and apoptosis in H1299 cells. These effects may be attributed to activation of the MAPK signaling pathway.

Key words: piperlongumine derivative; H1299 cell; proliferation; apoptosis; MAPK signaling pathway

在所有癌症类型中,肺癌是造成全球癌症相关死亡的主要原因^[1]。超过85%的肺癌患者被诊断为非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC)^[2]。由于大多数患者经诊断后已处于晚期或转移期,使得NSCLC患者的5年生存率低于20%^[3-5]。肺癌的转移涉及到血管生成、上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)、侵袭、循环和转移病灶的建立等过程,病理情况复杂^[6]。目前NSCLC的治疗多采用全身治疗手段,包括化疗、靶向治疗 (小分子抑制剂、抗体或抗体-药物偶联物) 和免疫治疗^[7]。尽管这些治疗手段正在不断改进和完善,但是由于预后效果不佳,临床疗效仍然不够理想,肺癌的死亡率较高。因此,迫切需要开发新型安全有效的NSCLC治疗药物,并探索新的治疗靶点,以提高肺癌治疗的整体效果。

天然产物及其衍生物是抗肿瘤药物的重要来源。茛菪酰胺 (piperlongumine, PL) 是从胡椒属植物中提取的生物碱,具有抗菌、抗炎、抗血管生成、抗糖尿病、神经保护和抗肿瘤等药理活性^[8,9]。近年来的研究指出PL可抑制多种癌细胞的增殖,调控肿瘤相关通路诱导细胞凋亡^[10-14]。有研究报道PL可通过细胞外调节蛋白激酶 1/2 (extracellular regulated protein kinases 1/2, Erk1/2) 信号通路抑制 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞增殖、迁移和细胞外基质的产生^[15],也通过上调 miR-34b-3p 并调控转化生长因子 β 受体 1 信号通路,抑制NSCLC细胞 (A549和H1299) 增殖并诱导其凋亡^[16]。

本课题组设计、合成了一系列含双芳基脲结构的PL衍生物^[17],肿瘤抑制活性筛选显示 (*E*)-1-(4-(3-(5-氯-6-氧代-3,6-二氢吡啶-1(2*H*)-基)-3-氧代丙基-1-烯-1-基)苯基)-3-(4-氟苯基)脲 (**C12**) 表现出良好的体

外抗肺癌活性,但其作用机制尚不清楚。基于此,本研究通过检测**C12**对NSCLC细胞H1299增殖、迁移和侵袭、活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP)、细胞周期和细胞凋亡的影响,揭示**C12**抑制H1299细胞转移并诱导细胞凋亡的作用。初步研究结果表明:**C12**可能通过激活丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路诱导细胞凋亡。这些发现为后续茛菪酰胺类抗肿瘤小分子的开发提供了理论和实验基础。

材料与方法

主要材料与试剂 化合物**C12**由课题组前期工作合成^[17]。**C12**用DMSO (上海阿拉丁生化股份有限公司,批号:D670831) 配制成浓度为10 mmol·L⁻¹的母液,放于-20 °C冰箱保存备用;胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、RPMI 1640培养基、青霉素-链霉素溶液 (上海源培生物科技有限公司,批号:M43117、L211126、C121102); 3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT) (上海皓鸿生物科技有限公司,批号:IM0280); 结晶紫染色液、PBS缓冲液粉末、Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒、DNA含量定量检测 (细胞周期) 试剂盒、JC-1线粒体膜电位检测试剂盒、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 (北京索莱宝生物科技有限公司,批号:G1062、P1010、CA1020、CA1510、M8650、CA1410、PC0020、P1260); *N*-乙酰半胱氨酸 (*N*-acetyl-*L*-cysteine, NAC)、细胞裂解液RIPA (上海碧云天生物科技有限公司,批号:ST1546-2g、P0013); Cyclin B1、CDK1、

GAPDH 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司, 28603-1-AP、67575-1-Ig、HRP-60004); p21、p38、磷酸化 p38 (p-p38)、Erk、磷酸化 Erk (p-Erk)、JNK、磷酸化 JNK (p-JNK) 抗体 (美国 Cell Signaling technology 公司, 批号: 2947T、8690T、4511T、4695T、4370T、9252T、4668T); Bcl-2、Bax 抗体 (美国 Santa Cruz Biotechnology 公司, 批号: sc-8044、sc-7480); 化学发光底物 (美国 Merck Millipore 公司, 批号: WBKLS0500)。

细胞培养 人非小细胞肺癌细胞 H1299 购自中国科学院昆明细胞库。用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 RPMI-1640 完全培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养细胞。

MTT 法检测细胞活力 选取对数生长期的 H1299 细胞, 细胞悬液浓度调整至每毫升 4×10^4 个, 接种于 96 孔细胞培养板中, 培养 24 h。用不同浓度 C12 处理细胞 24、48 和 72 h 后, 每孔加入 20 μ L MTT 溶液, 于 37 °C 下培养 4 h。去除培养基后, 每孔加入 150 μ L DMSO, 摇床避光震荡, 酶标仪检测悬液在 490 nm 处的吸光度。

划痕实验 将 H1299 细胞以每毫升 1×10^6 个接种于 6 孔板中, 每孔 1 mL 过夜培养。当细胞融合至 90% 时, 用 10 μ L 枪头垂直于孔底划出“伤口”, 并用 PBS 冲洗去除漂浮的细胞碎片。随后用不同浓度 C12 处理细胞, 并在处理后 0、24、48 h, 使用倒置荧光显微镜观察划痕愈合过程并拍照。使用 Image J 软件计算划痕面积并计算迁移率。

平板克隆实验 将 H1299 细胞以每毫升 1×10^5 个的密度接种于 6 孔板中, 每孔 1 mL 培养过夜。然后用不同浓度的 C12 处理细胞 24 h。C12 处理后的细胞以每孔 1 000 个细胞的数量接种于新的 6 孔板, 继续培养 14 天, 期间 2~3 天更换一次新鲜培养基, 当观察到肉眼可见细胞集落形成时终止培养。弃去培养基, 用 4% 多聚甲醛固定, 0.1% 结晶紫染色, 拍照并计算集落形成数。

Transwell 细胞侵袭实验 使用 Transwell 小室进行细胞侵袭实验。将 2×10^5 个 H1299 细胞悬浮于 100 μ L 含不同浓度 C12 的无血清培养基中, 加入到 Matrigel 包被好的 Transwell 小室的上室中, 下室中加入 600 μ L 10% 血清培养基。培养 24 h 后, 用 PBS 清洗小室 2 次, 用棉签擦拭去除上室中残留的细胞, 用 4% 多聚甲醛固定, 0.1% 结晶紫染色。使用倒置显微镜选取不同视野拍照, 并用 Image J 分析细胞侵袭能力。

细胞周期检测 利用 DNA 含量测定法确定细胞周期变化。将 H1299 细胞以每毫升 2×10^5 个的密度接种于 6 孔板中, 每孔 1 mL, 培养 24 h。然后加入不同浓度

的 C12 和阳性对照 PL 处理细胞 24 h。随后收集细胞, 离心, 加入 70% 预冷乙醇重悬, 置于 4 °C 固定过夜。将固定好的细胞离心, 加入 PBS 清洗 2 次后, 加入 RNase A 重悬, 放于 37 °C 水浴锅中孵育 30 min。加入 PI 染液 4 °C 避光孵育 30 min, 使用流式细胞仪检测, 并用 Flow J 软件进行数据分析。

细胞凋亡检测 将 H1299 细胞以每毫升 2×10^5 个的密度接种于 6 孔板中, 每孔 1 mL 培养 24 h。然后加入不同浓度的 C12 和阳性对照 PL 处理细胞 48 h。处理结束后, 收集细胞, 离心, 并用 PBS 洗涤 2 次, 悬浮于 100 μ L 1 \times 结合缓冲液中。分别加入约 5 μ L 的 Annexin V-FITC 和 PI, 避光孵育染色。加入 400 μ L 的 1 \times 结合缓冲液混匀后, 使用流式细胞仪检测, 并用 FlowJo 软件进行数据分析。

细胞 ROS 检测 将 H1299 细胞以每毫升 3×10^4 个的密度接种于 12 孔板中, 每孔 1 mL, 培养 24 h 后, 分别加入 C12 或 NAC 处理 24 h, 弃去培养基, 加入 PBS 清洗 2 次, 用稀释好的 DCFH-DA 探针溶液在 37 °C 避光染色 20 min, 无血清培养基洗涤细胞 2 次, 最后加入无血清培养基, 用倒置荧光显微镜拍照。

细胞线粒体膜电位检测 将 H1299 细胞以每毫升 2×10^5 个的密度接种于 6 孔板中, 每孔 1 mL 培养 24 h。随后用不同浓度 C12 和 PL 处理细胞 24 h, 收集细胞、离心, 并用 PBS 清洗 2 次。加入配制好的 JC-1 工作液混匀, 37 °C 避光染色 20 min, 染色结束后用染色缓冲液清洗 2 次, 使用流式细胞仪检测, 并用 FlowJo 进行数据分析。

Western blot 检测蛋白表达^[8] 用 C12 和 PL 分别处理 48 h 后收集细胞, 加入 RIPA 裂解缓冲液和蛋白酶、磷酸酶抑制剂, 离心取上清。用 BCA 检测试剂盒进行蛋白定量, 变性后保存备用。等量的蛋白样品通过电泳、转膜、封闭后加入一抗 4 °C 孵育过夜。次日在室温下孵育 1 h, 然后用 TBST 洗涤, 加入二抗在室温下孵育 1 h。最后利用化学发光系统对蛋白条显影, 利用 Image J 软件进行灰度分析。

数据处理与分析 所有数据采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计学分析, 数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间比较采用单因素方差分析 (one-way analysis of variance, one-way ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结果

1 C12 对 H1299 细胞增殖的抑制作用

为了探究 C12 对 H1299 细胞增殖的影响, 使用不同浓度的 C12 和阳性对照 PL (0、0.625、1.25、2.5、5、

10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (C12 和 PL 结构见图 1A) 分别处理 H1299 细胞 24、48 和 72 h 后, 利用 MTT 法检测。研究结果表明 (图 1B): C12 浓度为 1.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 对 H1299 细胞有明显的抑制作用; C12 对 H1299 细胞的抑制效果呈现时间依赖性增强, 且处理 24、48 和 72 h 的 IC_{50} 值分别为 3.51、1.52 和 0.68 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 显著低于 PL (6.79、4.33 和 3.35 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。结果显示, C12 呈浓度和时间依赖性地抑制 H1299 细胞增殖, 且在相同的处理时间和浓度下, C12 对 H1299 细胞的抑制作用明显强于阳性对照 PL。

2 C12 对 H1299 细胞迁移的抑制作用

在明确 C12 可以显著抑制 H1299 细胞增殖后, 进一步通过细胞划痕实验评估 C12 对 H1299 细胞迁移的

影响。与对照组相比 (图 2), C12 能够显著抑制 H1299 细胞的迁移。当 C12 处理时间相同时, 0.6 和 0.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下的细胞迁移率均大于 1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 说明 C12 抑制细胞迁移具有浓度依赖性。

3 C12 对 H1299 细胞集落形成和细胞侵袭的抑制作用

采用 Transwell 实验检测 C12 对 H1299 细胞侵袭的影响。结果显示 (图 3A), 0.6、0.8、1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ C12 都能使 Transwell 小室中侵袭的细胞数量减少, 说明 C12 对 H1299 细胞的侵袭能力有抑制作用, 且具有浓度依赖性, 当浓度为 1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 抑制作用最明显。细胞集落形成是检测细胞增殖能力的有效方法, 使用平板克隆实验检测 C12 对细胞集落形成的影响, 与对

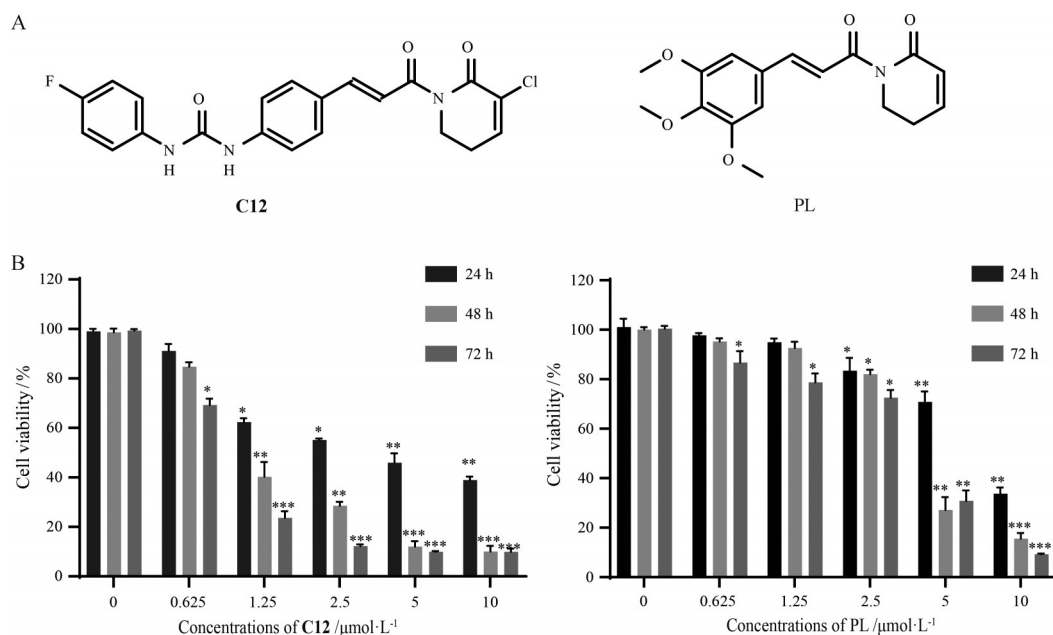


Figure 1 C12 exhibited antiproliferative effects in H1299 cells. A: Chemical structure of C12 and PL; B: The viability of cells after treatment of C12 or PL with different concentrations and time were detected by MTT assay. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group (0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). PL: Pierlongumine

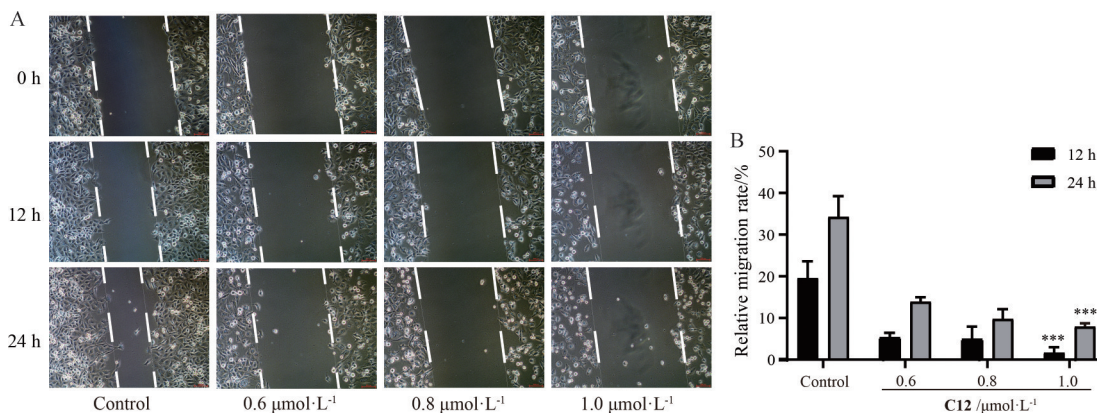


Figure 2 Inhibition of C12 on migration of H1299 cells. A: The migration ability of H1299 cells after C12 treatment was detected by wound healing assay; B: The migration rate of H1299 cells upon C12 treatment. Scale: 100 μm . $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs control group

照组相比, C12 处理后可以使 H1299 细胞形成的集落数明显减少, 且抑制作用呈浓度依赖性 (图 3B)。这些结果表明, C12 呈浓度依赖性地抑制 H1299 细胞的侵袭和增殖。

4 C12 对 H1299 细胞周期的阻滞作用

利用流式细胞术 PI 染色法检测 C12 对 H1299 细

胞周期的影响。结果显示 (图 4A), 与对照组相比, C12 可使 H1299 细胞的 G2/M 期受到阻滞, 细胞比例依次从 23.4% 增加到 28.85%、30.1%、35.8%。使用 Western blot 检测细胞周期 G2/M 相关的关键信号蛋白 p21、Cyclin B1 和 CDK1 的表达 (图 4B)。与对照组相比, C12 处理对细胞内 p21 的表达没有显著影响, 却显著

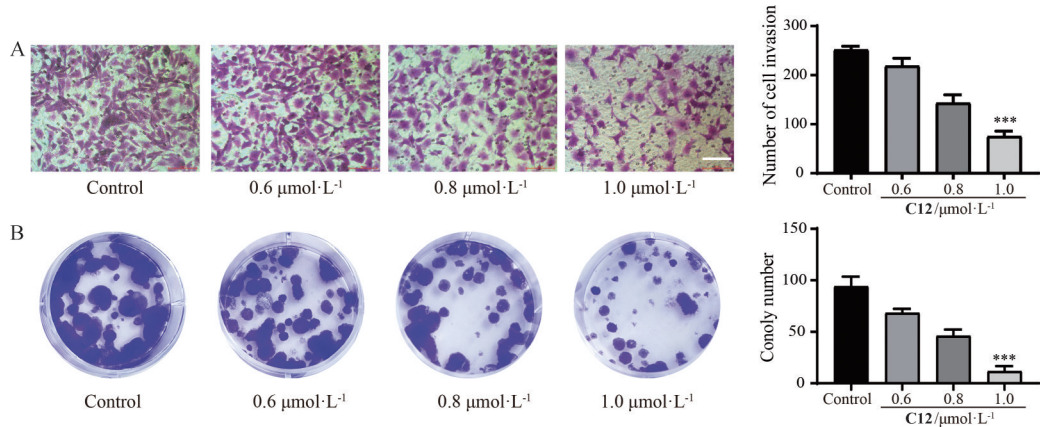


Figure 3 C12 inhibited cell invasion and colony formation of H1299 cells. A: The Transwell assay was used to determine the invasiveness of H1299 after exposure to C12; B: The colony formation assay was used to test the inhibition of C12. Scale: 100 μm . $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs control group

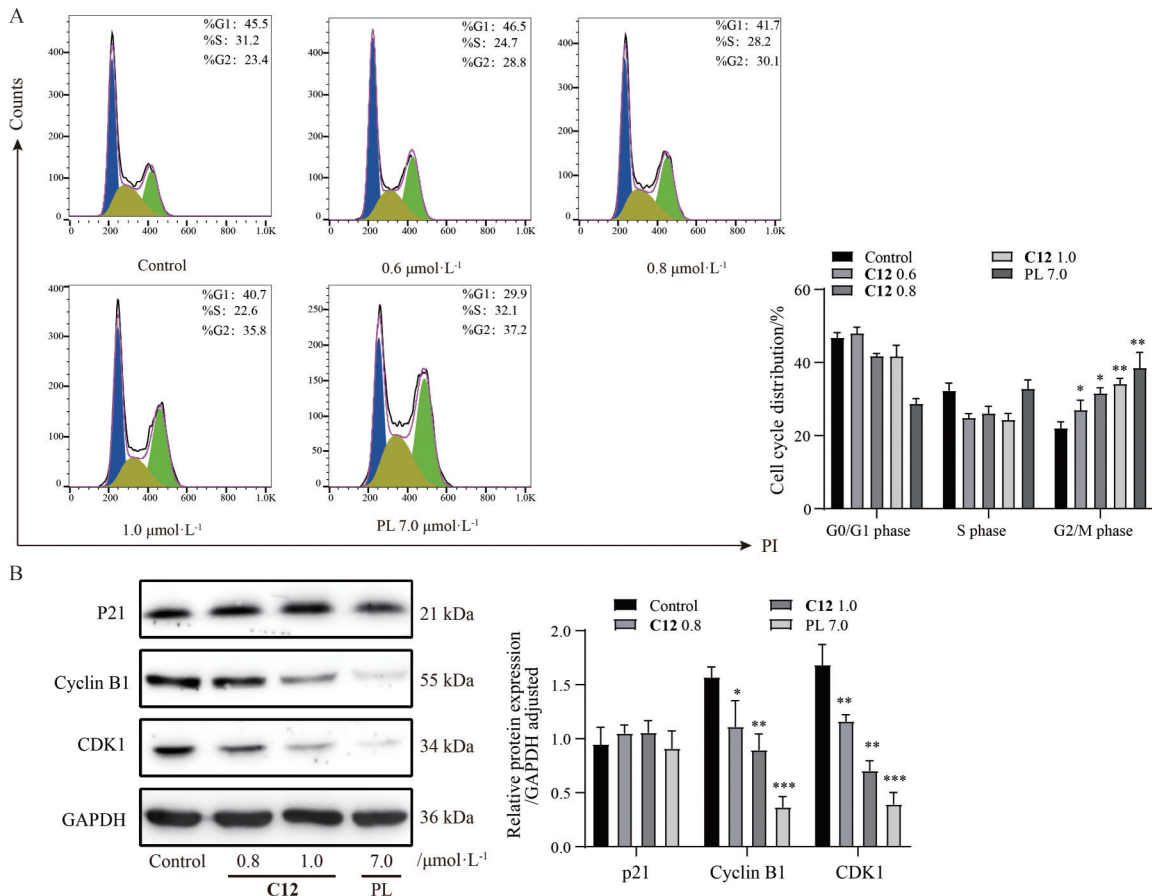


Figure 4 C12 induced G2/M cell cycle arrest in H1299 cells. A: Flow cytometry was used to detect the cell cycle distribution after C12 and PL treatment; B: Western blot was used to detect the expression levels of G2/M phase related proteins p21, Cyclin B1 and CDK1. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group

降低了 Cyclin B1 和 CDK1 的表达。结果表明, C12 通过调节 Cyclin B1 和 CDK1 蛋白的表达, 诱导 H1299 细胞的周期阻滞于 G2/M 期。

5 C12 对 H1299 细胞线粒体膜电位和凋亡的影响

利用 JC-1 染色法检测 C12 处理后 H1299 细胞线粒体膜电位的变化情况。C12 处理组 (0.6、0.8、1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 去极化细胞的比例分别为 8.21%、13.5% 和 15.8%, 与对照组的 5.25% 相比, 显著升高 ($P < 0.05$), 说明 C12 处理 H1299 细胞后线粒体膜电位降低 (图 5A)。随后, 使用 Annexin V-FITC/PI 双染法检测 C12 对 H1299 细胞凋亡作用的影响。结果显示, 与对照组 7.12% 相比, 当 C12 浓度分别为 0.6、0.8 和 1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 细胞的总凋亡率依次为 11.08%、16.95%、18.53%, 说明 C12 呈浓度依赖性地诱导 H1299 细胞的凋亡 (图 5B)。同时, Western blot 结果显示, C12 诱导 H1299 促凋亡蛋白 Bax 表达显著上调, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 显著下调, 且呈浓度依赖性 (图 5C)。综

上所述, C12 通过降低线粒体膜电位、上调 Bax 表达、下调 Bcl-2 来诱导 H1299 细胞凋亡。

6 C12 对 H1299 细胞内 ROS 水平的影响

使用 DCFH-DA 荧光探针染色法通过荧光显微镜观察 C12 处理细胞内 ROS 水平的变化。结果显示, 与对照组相比, C12 处理组 ROS 水平显著升高, 显示出较多的明亮绿色荧光, 当 C12 浓度为 1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时现象最为明显 (图 6A)。使用活性氧清除剂 NAC 验证这一结果 (图 6B)。结果显示, NAC 和 C12 共同处理组的细胞绿色荧光减少, 说明 C12 诱导的 ROS 产生被有效抑制。进一步说明 C12 处理可以升高细胞内 ROS 的水平。同时, 通过 MTT 检测发现, NAC 和 C12 共同处理组的细胞存活率高于 C12 单独处理组 (图 6C)。流式细胞术检测进一步证实, C12 与 NAC 共同处理组的细胞凋亡率显著低于 C12 单独处理组, C12 诱导的细胞凋亡现象被 NAC 有效逆转 (图 6D)。以上结果说明, C12 诱导 H1299 细胞产生 ROS 并参与细胞凋亡过程。

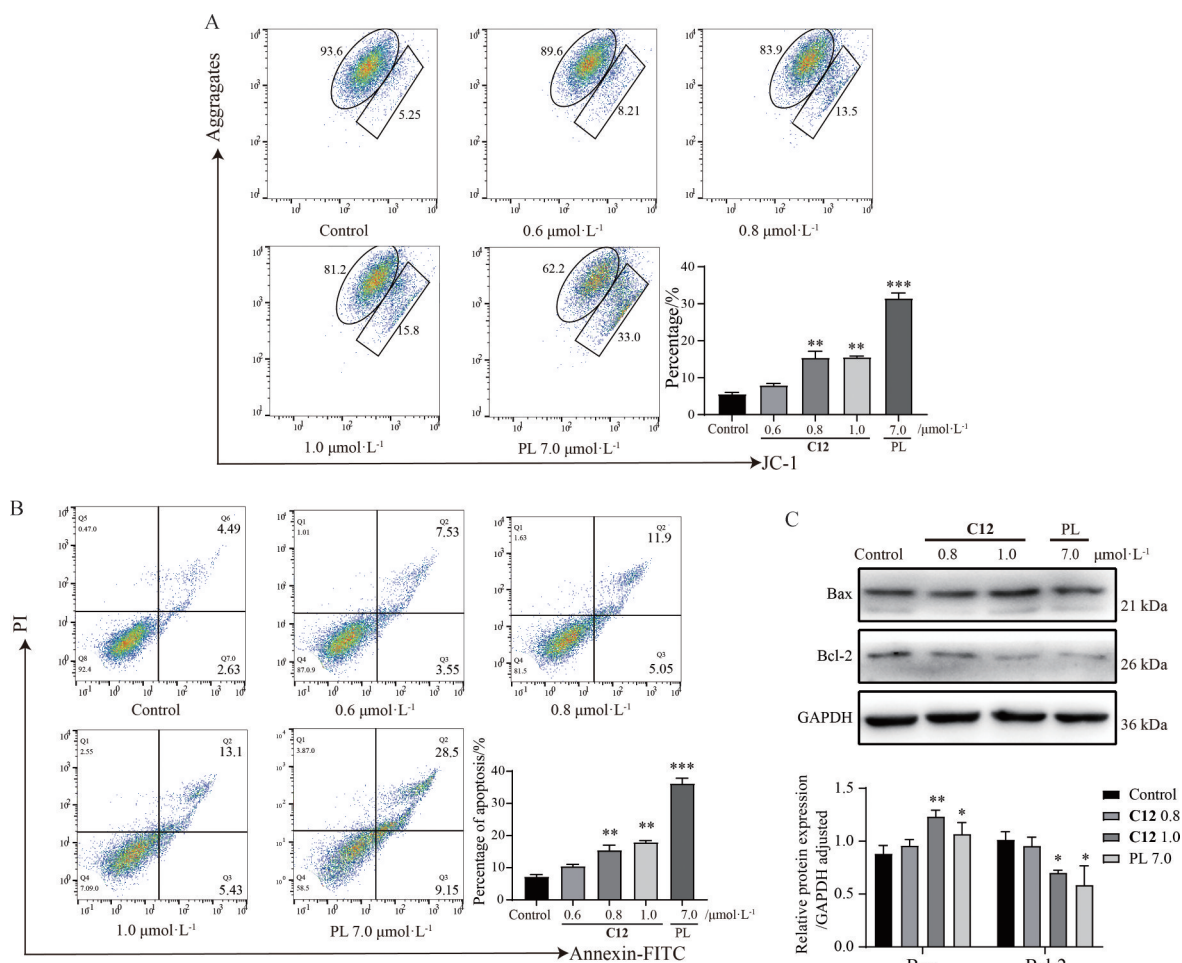


Figure 5 C12 induced apoptosis in H1299 cells. A: Measurement of mitochondrial membrane potential in H1299 cells. The cells were stained with JC-1 staining and then analyzed by flow cytometry; B: The apoptosis rate of H1299 cells treated with C12 and PL was detected by flow cytometry; C: The expression levels of Bax and Bcl-2 were detected by Western blot. $n = 3, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group. Bax: Bcl-2 associated X protein; Bcl-2: B-cell lymphoma-2

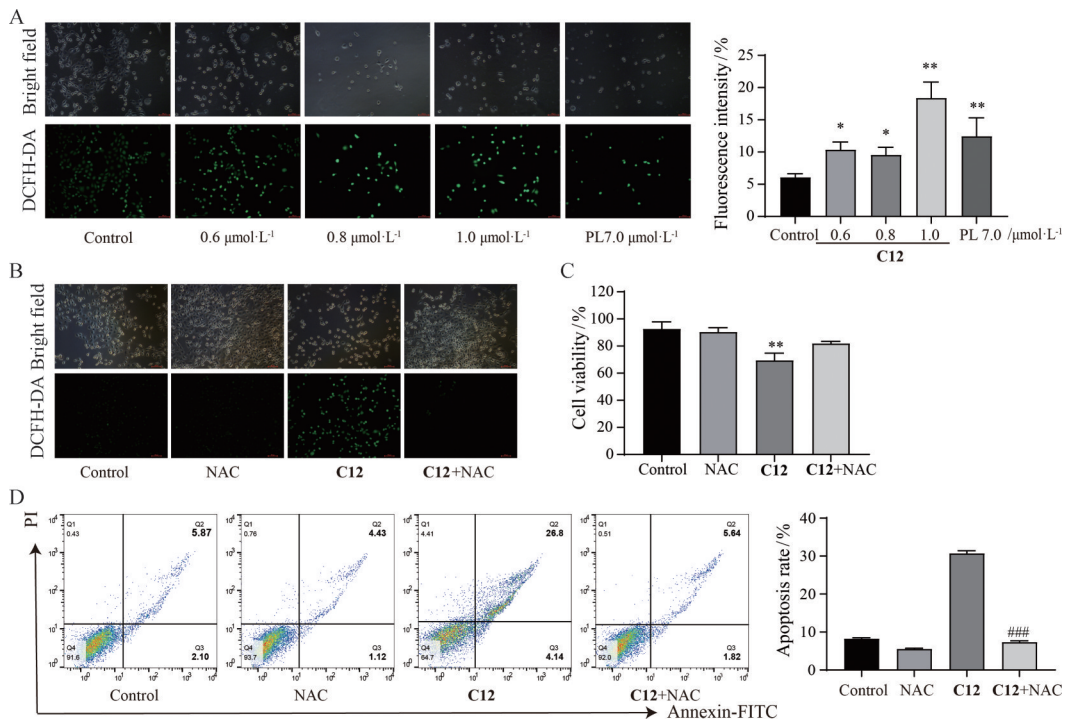


Figure 6 ROS are involved in C12-induced apoptosis in H1299 cells. A, B: H1299 cells were cultured with C12 with or without NAC (5 mmol·L⁻¹) and stained with DCFH-DA (10 μmol·L⁻¹) for 20 min. Cells were analyzed by a fluorescence microscope; C: Cell viability effects of NAC and C12 were detected by MTT assay; D: Cell apoptosis rate was measured by flow cytometry after treated with C12 with or without NAC for 24 h. *n* = 3, $\bar{x} \pm s$. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 vs control group; ###*P* < 0.001 vs C12 (1.0 μmol·L⁻¹). ROS: Reactive oxygen species, NAC: *N*-Acetyl-*L*-cysteine

7 C12对MAPK信号通路蛋白表达水平的影响

利用 Western blot 检测了 MAPK 信号通路相关蛋白 JNK、Erk1/2 和 p38 及其磷酸化蛋白在 C12 处理后表达水平的变化。与对照组相比, C12 处理后, JNK、Erk1/2 和 p38 的表达水平没有显著变化, 而 p-JNK、p-Erk1/2 和 p-p38 蛋白的表达水平均显著上调 (图 7)。结果显示, C12 通过上调 p-JNK、p-Erk1/2 和 p-p38 的表

达, 激活 H1299 细胞内 MAPK 信号通路发挥抗肿瘤活性。

讨论

肺癌是全球第二大恶性肿瘤, 严重威胁人类生命。NSCLC 作为肺癌的主要亚型, 转移性强、治愈率低^[19]。尽管铂类药物联合其他化疗药和靶向治疗在近年来取

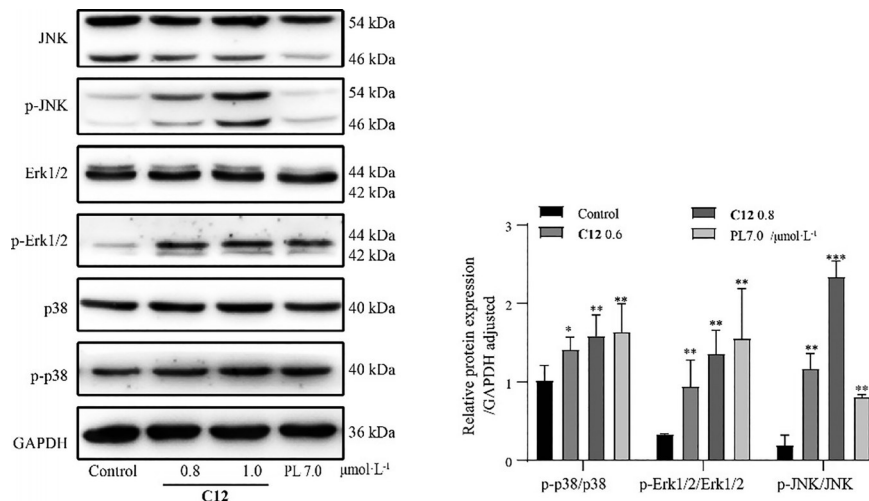


Figure 7 Effect of C12 on expression levels of proteins in MAPK signaling pathway. Data are depicted as a ratio of p-JNK to total JNK, p-Erk1/2 to total Erk1/2, p-p38 to total p38. *n* = 3, $\bar{x} \pm s$. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 vs control group. JNK: c-Jun N-terminal kinase

得了一定疗效,但由于剂量限制性毒性和获得性耐药,患者的生存率并未得到改善^[20]。寻找新的有效的治疗方法和开发新的NSCLC小分子抑制剂仍是当前研究的重点。本研究在前期工作的基础上,对具有抗肿瘤活性的萜萜酰胺衍生物**C12**进行了进一步的机制探究。

破坏细胞周期进程,将肿瘤细胞阻滞于某一关键时期,被认为是抑制肿瘤细胞增殖的有效策略之一^[21]。G2期到M期是肿瘤细胞增殖的关键阶段,Cyclin B1/cdc2复合物的激活在调节细胞从G2期进入有丝分裂中起着至关重要的作用^[22]。Cyclin B1蛋白的过度表达加速了G2/M期转变,甚至导致癌细胞异常增殖^[23]。Jeong等^[24]研究发现,PL可显著增加乳腺癌细胞MCF-7中G2/M期的细胞,调节Cyclin B1、Cyclin D1、CDK1、CDK4和CDK6蛋白的表达来诱导细胞周期阻滞,从而抑制细胞增殖。在本研究中,**C12**和PL均能通过下调Cyclin B1和CDK1蛋白表达来诱导H1299细胞G2/M期阻滞,且 $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ **C12**处理H1299后处于G2/M期的细胞百分比(35.8%)与 $7\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PL(37.2%)相似,表明**C12**在较低的浓度下对H1299细胞有很好的周期阻滞作用。

线粒体是能量代谢、细胞信号转导和细胞凋亡调节过程的中央处理器^[25]。当细胞受到外界因素刺激而发生凋亡时,可渗透的线粒体外膜被视为激活细胞凋亡程序不可逆的标志^[26]。Rawat等^[27]发现,PL升高人结直肠癌HCT-116细胞内ROS水平,诱导氧化应激和线粒体功能障碍,上调p53、p21、Bax和SMAD4蛋白的表达,下调Bcl-2和survivin蛋白的表达,诱导HCT-116细胞的凋亡。Li等^[28]发现萜萜酰胺衍生物L50377通过ROS介导的NF- κ B抑制来诱导A549细胞凋亡和细胞焦亡。探究**C12**对线粒体膜电位的影响,本研究发现**C12**以剂量依赖性的方式降低线粒体膜电位。流式细胞术检测细胞凋亡的结果显示,**C12**处理H1299细胞后,细胞总凋亡率呈浓度依赖性显著升高。Bcl-2家族蛋白在调节线粒体凋亡途径发挥着重要的作用,进一步验证发现,**C12**通过上调促凋亡蛋白Bax和下调抗凋亡蛋白Bcl-2表达来诱导细胞凋亡。ROS在**C12**诱导的细胞凋亡过程中也起到了重要作用。ROS的积累与抗癌药物诱导的细胞凋亡机制相关^[29]。本研究观察到**C12**处理导致H1299细胞内ROS水平显著升高,且这一作用能够被活性氧清除剂NAC所逆转;这表明,ROS参与**C12**诱导的细胞凋亡过程,使用NAC能够逆转**C12**对H1299细胞增殖的抑制和凋亡的诱导。

MAPK通路包括Erk1/2、JNK和p38三个经典通路,是细胞内信号转导的重要途径,在细胞生长、增殖、自噬和凋亡等多种细胞过程中发挥着重要作用^[30]。

Erk1/2与细胞存活相关,而JNK和p38与诱导分化和凋亡相关^[31]。研究指出,PL通过激活MAPK/Erk信号通路中p-Erk、p-JNK和p-p38的表达来诱导人黑色素瘤细胞A375SM和A375P凋亡^[32];同时在口腔癌细胞的治疗中,PL通过MAPK通路的激活诱导MC-3和HSC-4细胞凋亡和自噬^[10]。Wang等^[33]研究发现,葡萄籽原花青素通过诱导p-Erk、p-JNK和p-p38的表达来促进HepG2细胞凋亡和细胞周期阻滞;Liu等^[34]研究表明,穿心莲内酯通过激活p38 MAPK和JNK抑制人黑色素瘤细胞的增殖。以上研究提示,MAPK信号通路在不同肿瘤存在着不同的生物学调控机制,与细胞增殖与凋亡密切相关。在本研究中,经**C12**处理后H1299细胞内JNK、Erk1/2和p38的磷酸化水平显著增加,表明在H1299细胞中,**C12**通过激活MAPK信号通路发挥抗肿瘤活性。

综上所述,**C12**作为一种具有抗肿瘤活性的萜萜酰胺衍生物,在H1299细胞中通过抑制细胞的增殖、迁移和侵袭显示出较高的抗癌活性。此外,**C12**能够将细胞周期阻滞在G2/M期,并诱导ROS的产生,进而降低线粒体膜电位并触发细胞凋亡。进一步研究发现,**C12**通过上调p-JNK、p-Erk1/2和p-p38的表达,激活了H1299细胞内的MAPK信号通路,从而发挥了其抗肿瘤活性。这些发现为**C12**作为潜在的抗癌药物提供了理论基础。

作者贡献: 龙海洮、雷雪、陈佳宜进行实验研究、数据采集及分析、论文撰写;孟娇、邵利辉、李锐铨、陈丹萍进行文献调研与分析;王贞超、周玥、李成朋进行实验设计、研究思路指导、论文撰写与修改、提供研究经费。

利益冲突: 无利益冲突。

References

- [1] Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, et al. Cancer statistics 2023 [J]. CA A Cancer J Clin, 2023, 73: 17-48.
- [2] Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer [J]. Nature, 2018, 553: 446-454.
- [3] Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances [J]. Transl Lung Cancer Res, 2016, 5: 288-300.
- [4] Okuno T, Isobe T, Tsubata Y. Current pharmacologic treatment of brain metastasis in non-small cell lung cancer [J]. Clin Exp Metastasis, 2024. DOI: 10.1007/s10585-024-10276-4.
- [5] Ye ZC, Huang YM, Ke JH, et al. Breakthrough in targeted therapy for non-small cell lung cancer [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 133: 111079.
- [6] Popper HH. Progression and metastasis of lung cancer [J].

- Cancer Metastasis Rev, 2016, 35: 75-91.
- [7] Wang C, Chen SZ. Advances in the mechanisms of acquired resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2019, 54: 1364-1371.
- [8] Tripathi SK, Biswal BK. Piperlongumine, a potent anticancer phytotherapeutic: perspectives on contemporary status and future possibilities as an anticancer agent [J]. Pharmacol Res, 2020, 156: 104772.
- [9] Zhu P, Qian JQ, Xu ZY, et al. Overview of piperlongumine analogues and their therapeutic potential [J]. Eur J Med Chem, 2021, 220: 113471.
- [10] Choi EY, Han EJ, Jeon SJ, et al. Piperlongumine induces apoptosis and cytoprotective autophagy *via* the MAPK signaling pathway in human oral cancer cells [J]. Biomedicines, 2023, 11: 2442.
- [11] 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.
- [12] Song XJ, Gao TT, Lei Q, et al. Piperlongumine induces apoptosis in human melanoma cells *via* reactive oxygen species mediated mitochondria disruption [J]. Nutr Cancer, 2018, 70: 502-511.
- [13] Zhang QQ, Chen WQ, Lv XL, 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 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: 1423-1428.
- [15] Wu XC, Liu YX, An JH, et al. Piperlongumine inhibits angiotensin II-induced extracellular matrix expression in cardiac fibroblasts [J]. J Cell Biochem, 2018, 119: 10358-10364.
- [16] Lu XH, Xu CY, Xu ZX, et al. Piperlongumine inhibits the growth of non-small cell lung cancer cells *via* the miR-34b-3p/TGFBR1 pathway [J]. BMC Complement Med Ther, 2021, 21: 15.
- [17] Ouyang GP, Wang ZC, Long XS, et al. Preparation method and application of piperlongumine derivative containing diaryl urea structure: CN, 202310016105.5 [P]. 2023-04-18.
- [18] Zou YY, Zhang GL, Li CP, et al. Discovery of tryptanthrin and its derivatives and its activities against NSCLC *in vitro* *via* both apoptosis and autophagy pathways [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24: 1450.
- [19] Chen Z, Fillmore CM, Hammerman PS, et al. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases [J]. Nat Rev Cancer, 2014, 14: 535-546.
- [20] Chen XC, Wu QP, Chen YM, et al. Diosmetin induces apoptosis and enhances the chemotherapeutic efficacy of paclitaxel in non-small cell lung cancer cells *via* Nrf2 inhibition [J]. Br J Pharmacol, 2019, 176: 2079-2094.
- [21] Yang DQ, Zhang Q, Ma YF, et al. Augmenting the therapeutic efficacy of adenosine against pancreatic cancer by switching the Akt/p21-dependent senescence to apoptosis [J]. EBioMedicine, 2019, 47: 114-127.
- [22] Smits VA, Medema RH. Checking out the G2/M transition [J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1519: 1-12.
- [23] Chen JP, Li L, Su JY, et al. Proteomic analysis of G2/M arrest triggered by natural borneol/curcumin in HepG2 cells, the importance of the reactive oxygen species-p53 pathway [J]. J Agric Food Chem, 2015, 63: 6440-6449.
- [24] Jeong CH, Ryu H, Kim DH, et al. Piperlongumine induces cell cycle arrest *via* reactive oxygen species accumulation and IKK β suppression in human breast cancer cells [J]. Antioxidants (Basel), 2019, 8: 553.
- [25] Pickles S, Vigie P, Youle RJ. Mitophagy and quality control mechanisms in mitochondrial maintenance [J]. Curr Biol, 2018, 28: 170-185.
- [26] Ye HL, Gan Q, Wang LL, et al. Protopine inhibits the growth of hepatocellular carcinoma through a mitochondrially mediated apoptosis pathway [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2021, 56: 2223-2229.
- [27] Rawat L, Hegde H, Hoti SL, et al. Piperlongumine induces ROS mediated cell death and synergizes paclitaxel in human intestinal cancer cells [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 128: 110243.
- [28] Li Q, Chen LP, Dong ZJ, et al. Piperlongumine analogue L50377 induces pyroptosis *via* ROS mediated NF- κ B suppression in non-small-cell lung cancer [J]. Chem Biol Interact, 2019, 313: 108820.
- [29] Kim SH, Kim KY, Park SG, et al. Mitochondrial ROS activates ERK/autophagy pathway as a protected mechanism against deoxy podophyllotoxin-induced apoptosis [J]. Oncotarget, 2017, 8: 111581-111596.
- [30] Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases [J]. Science, 2002, 298: 1911-1912.
- [31] Kwak AW, Lee MJ, Lee MH, et al. The 3-deoxysappanchalcone induces ROS-mediated apoptosis and cell cycle arrest *via* JNK/p38 MAPKs signaling pathway in human esophageal cancer cells [J]. Phytomedicine, 2021, 86: 153564.
- [32] Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. Bcl-2 family proteins: changing partners in the dance towards death [J]. Cell Death Differ, 2018, 25: 65-80.
- [33] Wang LH, Zhan JC, Huang WD. Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis and cell cycle arrest of HepG2 cells accompanied by induction of the MAPK pathway and NAG-1 [J]. Antioxidants (Basel), 2020, 9: 1200.
- [34] Liu G, Chu HH. Andrographolide inhibits proliferation and induces cell cycle arrest and apoptosis in human melanoma cells [J]. Oncol Lett, 2018, 15: 5301-5305.