DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.02.035

射干苷通过PI3K/Akt/mTOR信号通路诱导胃癌HGC-27细胞凋亡和自噬

刘鑫雨[1],王志强[2],姚宁宁[2],韩磊[2],陆玉成[2]
(1.广州中医药大学临沂市人民医院研究生培养基地,广东 广州 510405;2.广州中医药大学临沂市人民医院,山东 临沂 276000)

摘要:目的 探讨射干苷(Tectoridin,Tec)对人胃癌细胞HGC-27细胞自噬和凋亡的影响。方法 采用CCK-8和克隆形成检测细胞增殖能力,流式细胞术检测细胞凋亡率,自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤(3-MA)用于检测自噬;蛋白免疫印迹法检测Beclin-1、Bcl-2、Bax和p53的蛋白表达;进行生物信息学方法预测其可能的靶点及信号通路,分子对接用于评估靶点与Tec的结合程度;蛋白免疫印迹法检测相关蛋白的表达水平。结果 Tec以时间和剂量依赖的方式抑制胃癌HGC-27细胞增殖,促进细胞的自噬和凋亡,上调自噬因子Beclin-1、凋亡因子p53、BAX的蛋白表达,减少凋亡分子Bcl-2的蛋白表达。蛋白互作(protein-protein interaction,PPI)网络可视化分析显示Tec与AKT1等靶点的亲和力强,KEGG富集分析表明Tec抑制胃癌的作用机制可能与PI3K/Akt/mTOR信号通路密切相关;PI3K/Akt/mTOR信号通路p-PI3K、p-Akt、p-mTOR的蛋白表达下调。结论 Tec可以通过抑制PI3K/Akt/mTOR通路诱导细胞凋亡和自噬来抑制HGC-27细胞的生长。

关键词:射干苷;胃癌;分子机制;自噬;凋亡
中图分类号:R285.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-7717(2026)02-0206-08

Tectoridin Induces Apoptosis and Autophagy in Gastric Cancer Cells Through PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway

LIU Xinyu[1],WANG Zhiqiang[2],YAO Ningning[2],HAN Lei[2],LU Yucheng[2]
(1. Graduate Training Base of Guangzhou University of Chinese Medicine at Linyi People's Hospital,Guangzhou 510405,Guangdong,China;
2. Linyi People's Hospital,Guangzhou University of Chinese Medicine,Linyi 276000,Shandong,China)

基金项目:国家自然科学基金项目(32100618);山东省中医药科技项目(M-2023131);徐州医科大学附属医院发展基金项目(XYFM202346)
作者简介:刘鑫雨(1996-),女,山东临沂人,硕士在读,研究方向:中药单体抗肿瘤。
通讯作者:陆玉成(1983-),男,山东临沂人,研究员,硕士研究生导师,博士,研究方向:中药抗肿瘤的分子机制。E-mail:luyu-20@163.com。

[27] 程梦娟,耿晓桐,张宝,等. 不同种质怀地黄生育期根际土壤挥发性有机物变化分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2022,50(10):87-96.
[28] 古力,陶晓赛,王丰青,等. 基于GC-MS代谢组学分析间作玉米下地黄根际土壤中挥发性有机物特征[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(10):102-108.
[29] 王光志,严铸云,马云桐,等. 川芎栽培地土壤有机物变化初步研究[C]//中药与天然药高峰论坛暨第十二届全国中药和天然药物学术研讨会论文集. 海口,2012:254-259.
[30] 薛亚,朱海青,张立超,等. 论地黄产地变迁、炮制方法与气候变化的关系[J]. 上海中医药杂志,2023,57(1):12-15,24.
[31] 刘跃红,闫小珍,焦振法,等. 焦作气候生态环境对四大怀药生长的影响[J]. 气象,2007,33(5):105-110.
[32] 李雨薇. 便携式土壤基础养分检测仪的设计与实现[D]. 哈尔滨:黑龙江大学,2021.
[33] MCCARTHY K A,JOHNSON R L. Transport of volatile organic compounds across the capillary fringe[J]. Water Resour Res,1993,29(6):1675-1683.
[34] SHEN R,PENNELL K G,SUUBERG E M. Influence of soil moisture on soil gas vapor concentration for vapor intrusion[J]. Environ Eng Sci,2013,30(10):628-637.
[35] JOHNSON P C,ETTINGER R A. Heuristic model for predicting the intrusion rate of contaminant vapors into buildings[J]. Environ Sci Technol,1991,25(8):1445-1452.
[36] 汪涛,袁飞云,宋阳,等. 基于RSEI的近30年来泸石高速公路路域生态环境质量评价[J]. 公路,2023,68(8):355-363.
[37] 李艳玲,宋阿琳,卢玉秋,等. 不同土壤玉米根际挥发性有机物组成和微生物群落特征[J]. 植物营养与肥料学报,2019,25(10):1633-1645.
[38] 唐仕欢,杨洪军,黄璐琦. 论自然环境因子变化对中药药性形成的影响[J]. 中国中药杂志,2010,35(1):126-128.
[39] 倪新兴. 中药材品质影响因素研究[D]. 南京:南京中医药大学,2015.
[40] 赵萌,印春生,厉成伟,等. Miseq测序分析围垦后海三棱藨草湿地土壤微生物群落多样性的季节变化[J]. 上海海洋大学学报,2018,27(5):718-727.
[41] RAZA W,LING N,YANG L D,et al. Response of tomato wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* to the volatile organic compounds produced by a biocontrol strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR-9[J]. Sci Rep,2016,6:24856.
[42] 陈敬忠. 基于关键种理论下根际微生物塑造大果木姜子道地性的潜在机制研究[D]. 贵阳:贵州大学,2023.

Abstract: *Objective* To investigate the effect of Tectoridin (Tec) on autophagy and apoptosis of human gastric cancer cell line HGC-27. *Methods* The cell proliferation ability was detected by CCK-8 and clone formation assay, the cell apoptosis rate was detected by flow cytometry, and the autophagy inhibitor 3-MA was used to detect the autophagy. Western blotting was used to detect the protein expression levels of Beclin-1, Bcl-2, Bax and p53. Bioinformatics methods were used to predict the potential targets and signaling pathways, molecular docking was used to evaluate the binding degree between targets and Tec. Western blotting was used to detect the expressions of PI3K/Akt/mTOR pathway related proteins. *Results* Tec can inhibit gastric cancer proliferation in a time-dependent and dose-dependent manner, promote the autophagy and apoptosis of HGC-27 cells, up-regulate the protein expressions of autophagy factor Beclin-1, apoptosis factor p53 and Bax, and reduce the protein expressions of apoptosis molecule Bcl-2. PPI network visualization analysis showed a strong affinity between Tec and targets such as AKT1, while KEGG enrichment analysis suggested that the inhibitory effect of Tec on gastric cancer may be closely related to the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. The protein expressions of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, including p-PI3K, p-Akt and p-mTOR, were down-regulated. *Conclusion* Tec can induce the cell apoptosis and autophagy through the PI3K/Akt/mTOR pathway to inhibit the growth of HGC-27 cells.

Keywords: Tectoridin; gastric cancer; molecular mechanism; autophagy; apoptosis

胃癌是全球范围内第五大最为常见的肿瘤类型，同时也是引发癌症相关死亡的第五大诱因[1]。由于该疾病在早期的症状较为隐匿，并且筛查时的检出率较低，致使绝大多数患者在确诊时已处于疾病晚期[2]。当前的治疗手段，普遍存在疾病耐药性、不良反应明显、患者在治疗过程中依从性差以及手术后生存率低等问题[3-4]。因此，胃癌的治疗依旧面临着极为严峻的挑战，迫切需要开发出一种天然、高效且低毒的抗胃癌药物，以此来填补当前治疗现状的不足。

长期以来，天然产物一直是新药研发过程中重要的来源。数据显示，美国食品药品监督管理局（FDA）批准的抗癌药物中，约60%的药物成分来自天然产物[5]。射干苷（Tectoridin，Tec）作为鸢尾科植物中的一种特征性成分[6]，其药理作用多样化，在降血糖[7-8]、抗炎[9]以及保肝[10]等多方面发挥着积极作用。已有研究证实，Tec通过抑制PKC/p38MAPK途径减缓结肠癌的疾病进展[11]；在对肺癌[12]、前列腺癌[13]和膀胱癌[14]等癌症类型的研究中，Tec也具有显著的抗肿瘤活性；不仅如此，Tec还可调节PI3K/Akt信号通路，抑制卵巢癌SK-OV-3细胞的活性[15]。鉴于此，本研究旨在探讨Tec通过调节PI3K/Akt/mTOR信号通路，对人胃癌HGC-27细胞凋亡及自噬的影响，以期为胃癌的临床治疗提供全新的理论依据与创新思路。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器

胃癌细胞系HGC-27由王朴教授（长治医学院）友情提供；Tec（硕恒生物科技有限公司，CAS号：611-40-5）；DMEM培养基（美国Hyclone公司，货号为PM150210）；灭活胎牛血清、青、链霉素及胰蛋白酶（美国Gibco公司，货号分别为16000-044、PB180120、PB180229）；CCK-8检测试剂盒；AnnexinV-异硫氰酸荧光素（Fluoresce inisothiocya-nate，FITC）/碘化丙啶（Propidium iodide，PI）；总蛋白提取试剂盒（上海贝博生物公司，货号分别为GK10001、70-AP101-100、BB-3101）；BCA蛋白定量检测试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司，商品编号为P001）；SDS-PAGE凝胶快速制备试剂盒（北京兰博利德商贸有限公司，货号P1250）；预染蛋白Marker（美国Thermo公司，货号P1018）；ECL化学发光试剂盒和PVDF膜（北京兰杰柯科技有限公司，货号分别为WP20005、BS-PVDF-45）；3-甲基腺嘌呤（3-methyladenine，3-MA）（美国APEXBIO公司，货号IM0190-50 mg）；兔抗人Beclin-1、p53、Bax、Bcl-2一抗、抗-GAPDH（山东赛汶赛德生物科技有限公司，货号分别为abx159347、ab32049、ab32503、ab302710、ab8245）；兔抗人PI3K、p-PI3K、m-TOR，p-mTOR、Akt和p-Akt抗体、HRP-羊抗兔（杭州华安生物技术有限公司，货号分别为ET1609-30、HA721673、ET1608-5、HA721632、ET1609-51、ET1607-73和HA1001）。CO_2培养箱（美国赛默飞世尔科技公司，型号371e）；倒置荧光显微镜（日本尼康株式会社，型号CKX53SF）；生物安全柜（上海力康生物医疗科技控股有限公司，型号HFsafe-1800LC）；高速冷冻离心机[美国赛默飞世尔科技（中国）有限公司，型号ST8R]。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将HGC-27细胞接种于含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素混合液的DMEM培养基中，置于37 ℃，5% CO_2的全湿培养箱中培养，通过显微镜下观察细胞生长状态，待细胞融合度达到或超过80%时，用胰蛋白酶消化传代，共传代15次，取对数生长期的HGC-27细胞用于后续实验。

1.2.2 CCK-8试剂盒检测细胞活力 取对数生长期HGC-27细胞接种于96孔板中（3000 cells/孔），贴壁培养24 h后，每组设5个复孔，分别使用不同浓度（0、15、30和45 μmol/L）的含Tec培养基处理细胞，处理24、48和72 h后每孔加入10%的CCK-8试剂，在37 ℃，5% CO_2培养箱培养4 h后，使用酶标仪检测450 nm波长处吸光度，以吸光度值表示细胞增殖能力，吸光度值越大表示细胞增殖能力越强。

1.2.3 平板克隆形成实验检测细胞增殖能力 将HGC-27细胞接种于6孔板中，待细胞贴壁后，用不同浓度（0、15、30和45 μmol/L）的含Tec培养基在6孔板（500 cells/孔）中培养2周。每3天更换1次培养基。然后，用4%多聚甲醛固定细胞，并用结晶紫染色10 min。使用显微镜检查以计数由50多个细胞组成的细胞集落，并根据这些观察结果计算集落形成率。

1.2.4 3-MA抑制剂法检测细胞自噬能力 将HGC-27细胞以每孔3×10^3 cells的密度在96孔板中培养，待细胞贴壁后，分别用Tec（50 μmol/L）、3-MA（0.1 μmol/L）和不同浓度的Tec和3-MA混合液（50 μmol/L Tec+0.1 μmol/L 3-MA、

40 μmol/L Tec + 0.1 μmol/L 3 - MA、30 μmol/L Tec + 0.1 μmol/L 3 - MA)处理48 h,每孔加入10% CCK - 8试剂,于37 ℃,5% CO_2 培养箱培养4 h后测其450 nm处光吸收值。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡 取对数生长期HGC - 27细胞(1×10^5 cells/孔)接种在6孔组织培养板中,待细胞贴壁后用不同浓度的含药DMEM(0、15、30、45 μmol/L)培养细胞48 h,每组设2个复孔。用冷磷酸缓冲盐水(PBS)洗涤两次,用不含乙二胺四乙酸(EDTA)的胰酶消化,从6孔培养板收集所有漂浮和黏附细胞,重悬后加入500 μL结合缓冲液、5 μL Annexin V和10 μL PI,在黑暗中孵育样品5 min。用流式细胞仪对细胞进行计数。

1.2.6 蛋白质印迹法检测相关蛋白的表达 将HGC - 27细胞给予不同浓度Tec(0、15、30、45 μmol/L)处理48 h,药物处理结束后,弃去培养基,并用PBS洗涤细胞,弃去PBS,将HGC - 27细胞置于冰上,使用含有磷酸酶抑制剂混合物(1∶100)、蛋白磷酸酶抑制剂(1∶50)和PMSF(1∶200)的预冷RIPA缓冲液进行裂解,裂解时间为30 min。然后12 000 r/min,4 ℃离心20 min,收集上清液,使用BCA蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度,然后加入一定体积的Loading buffer准备蛋白样品,在100 ℃下煮沸5 ~ 10 min。用5%脱脂乳封闭2 h后,根据预染色标记物的分子量切割转移膜。将膜与特异性一抗在4 ℃下孵育过夜。用TBST洗涤膜3次,并与相应的二抗在室温下孵育2 h。最后,采用化学发光法检测蛋白免疫反应带。并用ImageJ软件分析密度测定结果。

1.2.7 分子机制预测 通过PubChem(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)数据库获得Tec的SMILES序列号。使用Swiss TargetPrediction数据库(http://www.swisstarget - prediction.ch/),Super - PRED数据库(https://prediction.charite.de/index.php)和PharmMapper数据库(http://lilab - ecust.cn/pharmmapper/)进行检测以获得Tec潜在作用靶点。以“gastric carcinoma”为关键词用DisGeNET(https://www.disgenet.org/)数据库、GeneCards(https://www.genecards.org/)和OMIM(https://omim.org/)进行查找和筛选胃癌靶点。合并所有的靶点蛋白信息,并删去靶点蛋白信息中的重复值,获得胃癌疾病的目标靶蛋白基因。对Tec靶点与胃癌靶点绘制韦恩图取交集,将交集靶点提交至STRING数据库(www.string - db.org/),物种选择为“Homo sapiens”,置信度设置为“high confidence(0.700)”,构建蛋白互作(protein - protein interaction,PPI)网络模型。将交集靶点录入Metascape平台(metascape.org),设置 $P < 0.001$,分析其主代谢通路。从TCMSP平台获取Tec的mol2格式文件,PDB数据库(http://www.rcsb.org)获取关键目标的PDB格式文件。使用AutoDockVina软件(autodock.squipps.edu)进行分子对接,使用Pymol(https://www.pymol.org)软件进行可视化。

1.3 统计学分析

采用GraphPad Prism 9软件进行统计学分析,其中计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 t 检验。$P < 0.05$ 时差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Tec抑制HGC - 27细胞增殖

给予HGC - 27细胞不同浓度(0 ~ 200 μmol/L)的Tec,分别处理24、48和72 h,使用CCK - 8试剂盒检测Tec对HGC - 27细胞增殖影响。结果显示,Tec对细胞增殖的抑制作用呈现出剂量和时间依赖性(插页Ⅺ图1A),经计算可知Tec的 IC_{50} 值为25.41 μmol·L^{-1}(插页Ⅺ图1B)。因此,选取0、15、30和45 μmol/L浓度梯度进行后续实验。克隆形成实验结果显示(插页Ⅺ图2),与对照组相比,不同浓度Tec处理后,细胞集落形成能力显著减弱。上述结果提示,Tec以剂量和时间依赖性抑制HGC - 27细胞增殖。

2.2 Tec诱导HGC - 27细胞自噬

3 - 甲基腺嘌呤(3 - MA),是PI3K的选择性抑制剂,可阻断自噬体的形成,通常用作自噬抑制剂。HGC - 27细胞在Tec和3 - MA共处理48 h后,使用CCK - 8试剂盒检测HGC - 27细胞活力。结果发现细胞存活率介于单独使用Tec与3 - MA之间,并且随着Tec和3 - MA共处理的药物浓度的增加细胞存活率逐渐降低(插页Ⅺ图3A)。

考虑到3 - MA作为自噬抑制剂的非特异性,通过蛋白质印迹检测自噬标志物Beclin - 1(52 kDa)的蛋白质水平。Tec可显著提高Beclin - 1的表达(插页Ⅺ图3B和插页Ⅺ图3C),并且以剂量依赖的方式增强。上述结果提示,Tec能够促进HGC - 27细胞的自噬过程。

2.3 Tec诱导HGC - 27细胞凋亡

用不同浓度的Tec(0、15、30、45 μg/mL)处理HGC - 27细胞48 h后,使用Annexin V - FITC和PI染色,通过流式细胞仪检测细胞凋亡情况。如插页Ⅺ图4所示,凋亡细胞群(早期和晚期凋亡)分别增加到20.16%、37.60%和50.60%,与对照细胞相比分别增加了2.32、4.32和5.81倍。这些数据表明,Tec促进HGC - 27细胞凋亡,并且凋亡细胞的比例随剂量增加而增加。

此外,这一发现与观察到的重要凋亡相关蛋白(如Bcl - 2、Bax和p53)的水平变化一致(插页Ⅺ图4B、插页Ⅺ图4C、插页Ⅺ图4D)。上述结果提示,Tec可以促进HGC - 27细胞的凋亡。

2.4 Tec诱导细胞自噬、凋亡的分子机制预测

为了进一步研究Tec诱导HGC - 27细胞自噬,凋亡的潜在机制,我们从PubChem数据库获得的Tec的SMILES序列号“COC1 = C(C = C2C(=C1O)C(=O)C(=CO2)C3 = CC = C(C = C3)O)OC4C(C(C(C(O4)CO)O)O)O”在PharmMapper数据库以Norm Fit标准化拟合得分 ≥0.5为筛选条件,在Swiss TargetPrediction数据库以Probability > 0.1为筛选条件和Super - PRED数据库共获得了244个Tec潜在靶点。以“gastric carcinoma”为关键词在DisGeNET(https://www.disgenet.org/)数据库以得分≥0.01为筛选条件,得到胃癌靶点1849个;在GeneCards(https://www.genecards.org/)数据库中以得分 > 12.8为筛选条件,得到胃癌靶点1717个;在OMIM(https://omim.org/)数据库得到胃癌靶点510个。综合这3个数据库,去除不同数据库中重复靶点基因合并所有靶点,最终得到胃癌疾病靶点共3042个。将Tec靶点数据库与胃癌疾病靶点数据库导入Venny2.1.0在线工具,绘制出疾病和药物靶点的韦恩图并取交集(插页Ⅻ图5A),交集基因即Tec治疗胃癌

的潜在作用靶点。将所获得的114个交集靶点导入STRING数据库,设置人源性的物种来源,默认其余参数设置,构建PPI网络图(插页Ⅻ图5B)。

根据centiscape 2.2计算拓扑参Degree值进行排名,获得前19个富集靶点(插页Ⅻ图5C)。结果表明,AKT1、SRC、HSP90AA1等靶点可能在Tec的抗HGC作用中发挥重要作用。其中,AKT是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,有3种亚型:AKT1、AKT2和AKT3[16],AKT1编码的亚型可以调节细胞凋亡[17]。我们推测AKT1在Tec诱导的HGC细胞凋亡中起关键作用。因此,进行了分子对接和KEGG通路富集分析以验证这一假设。如插页Ⅻ图5D和插页Ⅻ图5E所示,Tec与AKT1的结合自由能为-5.01 kJ/mol,具有良好的结合亲和力。KEGG通路富集分析结果显示Tec作用于GC主要涉及PI3K/Akt/mTOR信号通路。

2.5 Tec对HGC-27细胞PI3K/Akt/mTOR信号通路的影响

以上研究结果提示,Tec可以显著诱导细胞凋亡和自噬。根据靶点及信号通路的预测结果,AKT1排名靠前的蛋白质,PI3K/Akt/mTOR通路是排名靠前的信号通路,可能在Tec对胃癌的治疗作用中发挥关键作用。蛋白免疫印迹结果显示Tec以剂量依赖性的方式降低了p-PI3k、p-Akt和p-mTOR的蛋白表达(插页Ⅻ图6)。进一步验证了Tec通过抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路介导胃癌细胞的凋亡和自噬。

3 讨论

根据中医对胃癌的认识,胃癌在中医上可归属于“胃脘痛”“积聚”“伏梁”“噎膈”“反胃”和“心下痞”等范畴[18]。中医学对肿瘤病理的认识基本达成共识,总结为“正”“邪”消长两方面,在治法上不外乎“扶正”和“祛邪”[19]。中医药和植物来源的化合物因其可用性和相对较低的毒性,在癌症的预防和治疗中发挥着至关重要的作用[20]。Tec是一种天然化合物,具有结构多样性、毒性较低和来源广泛等特点[21],此次研究首次通过体外实验证明了Tec对HGC的抑制作用及其机制。

在本研究中,CCK-8实验和克隆形成实验结果表明Tec以时间-剂量依赖性的方式抑制HGC-27增殖。当采用50 μmol/L Tec和0.1 mmol/L 3-MA共处理HGC-27细胞后,发现细胞存活率介于单独使用50 μmol/L Tec与0.1 mmol/L 3-MA之间,并且细胞存活率随着药物浓度(30 μmol/L Tec+0.1 mmol/L 3-MA、40 μmol/L Tec+0.1 mmol/L 3-MA、50 μmol/L Tec+0.1 mmol/L 3-MA)的增加而降低。流式细胞术对细胞凋亡的分析表明,细胞的凋亡情况随Tec浓度的增加而增加。以上研究结果提示,Tec能够抑制HGC-27细胞的增殖,并促进其凋亡和自噬,且这一作用与浓度和时间有一定相关性。

通过生物信息学的方法,鉴定出了114个与Tec治疗胃癌相关的潜在基因,通过PPI分析选择了19个中枢靶基因,根据Degree值排名,结果提示AKT1靶点与其关联度最高。KEGG通路分析表明,PI3K/Akt信号通路排名靠前。提示Tec可能通过调节PI3K/Akt信号通路发挥抗肿瘤作用。

PI3K/Akt信号通路是细胞中调节细胞生长、增殖、运动、代谢和存活的核心信号通路之一[22]。在维持正常细胞功能方面起着重要作用。PI3K启动这一信号通路并调节不同的信号,以防止细胞凋亡并促进细胞增殖和存活[23],其作用机制是磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)特异性催化磷脂酰肌醇(PI)磷酸化[24],磷酸肌醇环为丝氨酸/苏氨酸(ser/thr)激酶、蛋白激酶B(PKB,通常称为Akt)和磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-1(PDK1)提供对接位点。将PDK1募集到质膜和PKB附近会导致ser/thr AKT激酶的磷酸化和激活[23]。Akt被磷酸化和激活,进一步调节靶基因[25]。许多研究表明,AKT1基因在胃癌、乳腺癌、结直肠癌和其他癌症中扩增[26]。此外,研究发现杠柳苷通过PI3K/Akt/mTOR途径抑制癌症生长,并诱导细胞凋亡和保护性自噬[27]。百里香醌通过抑制PI3K/Akt/mTOR途径,抑制GC细胞增殖并诱导细胞死亡和保护性自噬[28]。因此,推测AKT1和PI3K/Akt/mTOR信号通路可能是Tec抑制癌症细胞增殖、促进细胞凋亡和自噬的关键靶点和途径。

近年来,研究自噬对胃癌细胞的干预机制已经成为胃癌诊疗的新方向。自噬能够有效抑制GC细胞的增殖、提高机体对化疗靶向药物的敏感性[29]。自噬基因Beclin1是哺乳动物参与自噬的特异性基因,能够正向调节自噬的发生。上调Beclin1表达可以诱导自噬的发生[30]。Beclin1既可以与Ⅲ型磷脂酰肌醇3激酶(PI3KC3)相互结合,形成Beclin1-PI3KC3-Vps15复合体,促进自噬发生,又可以与抗凋亡基因B淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2,Bcl-2)相互结合,形成Beclin1-Bcl-2复合体,抑制自噬活性。本实验结果显示,Tec可上调Beclin1蛋白表达,诱导胃癌细胞自噬。

细胞凋亡主要包括两条途径:涉及B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)家族蛋白的内在途径和由死亡受体(DR)配体介导的外在途径[31]。p53可以诱导大量基因参与细胞凋亡,这些基因可以通过诱导BH3-only蛋白,改变线粒体外膜通透性,参与内源性凋亡途径,也可以通过Fas和DR5参与外源性凋亡途径[32]。Bcl-2蛋白家族可以调节内源性凋亡途径[33]。Bax作为Bcl-2蛋白家族的成员,在细胞凋亡中起着重要的促进作用[34]。Bcl-2属于抗凋亡蛋白,通过螯合Bim来抑制Bax和Bak的激活,从而防止细胞凋亡[35]。肿瘤中Bcl-2和Bax表达水平的平衡决定了凋亡的发生。通过Western blotting实验发现Tec能够上调p53、Bax蛋白的相对表达水平,同时降低Bcl-2蛋白的相对水平,从而诱导HGC-27细胞凋亡。此外,Tec治疗后PI3K、Akt和mTOR的磷酸化显著降低,表明Tec抑制了人HGC-27细胞PI3K/Akt/mTOR信号通路。

综上所述,Tec能够增加自噬相关蛋白Beclin-1及凋亡蛋白p53和Bax的表达,同时降低Bcl-2蛋白的表达。此外,Tec还显著减少了磷酸化的PI3K、Akt和mTOR蛋白的表达,提示Tec通过抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路诱导HGC-27细胞的自噬和凋亡,这为Tec临床治疗癌症提供了理论依据,射干苷有望成为新型的治疗药物。

参考文献

[1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-263.

[2] GUAN W L, HE Y, XU R H. Gastric cancer treatment: recent pro-

gress and future perspectives[J]. J Hematol Oncol, 2023, 16(1): 57.
[3] AJANI J A, D'AMICO T A, BENTREM D J, et al. Gastric cancer, version 2.2022, NCCN clinical practice guidelines in oncology[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2022, 20(2): 167-192.
[4] ZENG Y J, JIN R U. Molecular pathogenesis, targeted therapies, and future perspectives for gastric cancer[J]. Semin Cancer Biol, 2022, 86(Pt 3): 566-582.
[5] SAINI N, SIROHI R, A A, et al. Marine-derived natural products as anticancer agents[J]. Med Chem, 2023, 19(6): 538-555.
[6] 张明发, 沈雅琴. 射干药理研究进展[J]. 中国执业药师, 2010, 7(1): 14-19.
[7] CHEN Y, WU C M, DAI R J, et al. Combination of HPLC chromatogram and hypoglycemic effect identifies isoflavones as the principal active fraction of *Belamcanda* chinensis leaf extract in diabetes treatment[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2011, 879(5-6): 371-378.
[8] JUNG S H, LEE Y S, LEE S, et al. Isoflavonoids from the rhizomes of *Belamcanda* chinensis and their effects on aldose reductase and sorbitol accumulation in streptozotocin induced diabetic rat tissues[J]. Arch Pharm Res, 2002, 25(3): 306-312.
[9] PAN C H, KIM E S, JUNG S H, et al. Tectorigenin inhibits IFN-gamma/LPS-induced inflammatory responses in murine macrophage RAW 264.7 cells[J]. Arch Pharm Res, 2008, 31(11): 1447-1456.
[10] ZHOU H X, ZHANG Y, LIANG H, et al. A novel multidimensional strategy to evaluate *Belamcanda* chinensis (L) DC and Iris tectorum Maxim based on plant metabolomics, digital reference standard analyzer and biological activities evaluation[J]. Chin Med, 2021, 16(1): 85.
[11] XIONG L F, GUO W H, YANG Y, et al. Tectoridin inhibits the progression of colon cancer through downregulating PKC/p38 MAPK pathway[J]. Mol Cell Biochem, 2021, 476(7): 2729-2738.
[12] WANG M, ZHAO F, LI Z S, et al. Tectoridin and PLK1 inhibitor synergistically promote the apoptosis of lung adenocarcinoma cells: Bioinformatic analysis of TCGA and TCMSP[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2023, 396(10): 2417-2426.
[13] MORRISSEY C, BEKTIC J, SPENGLER B, et al. Phytoestrogens derived from *Belamcanda* chinensis have an antiproliferative effect on prostate cancer cells *in vitro*[J]. J Urol, 2004, 172(6 Pt 1): 2426-2433.
[14] ZHANG Q J, WANG L Y, YU L, et al. Tectoridin inhibits the growth of bladder cancer by regulating PI3K/MAPK pathway through RAB27B[J]. Mol Carcinog, 2024, 63(6): 1106-1116.
[15] 王丽娟,史惠蓉. 射干苷对卵巢癌 SK-OV-3 细胞增殖迁移和侵袭的影响[J]. 中华肿瘤杂志,2020,42(7): 570-574.
[16] REVATHIDEVI S, MUNIRAJAN A K. Akt in cancer: mediator and more[J]. Semin Cancer Biol, 2019, 59: 80-91.
[17] DATTA S R, BRUNET A, GREENBERG M E. Cellular survival: a play in three akts[J]. Genes Dev, 1999, 13(22): 2905-2927.
[18] 薛雷, 周丽萍. 李晓龙主任医师治疗胃癌术后临证经验[J]. 亚太传统医药, 2024, 20(6): 125-128.
[19] 袁宇晴, 龙丹, 谢超群, 等. 三物白散对胃癌细胞自噬相关蛋白 Beclin1、LC3、p62 表达的影响[J]. 中医药导报, 2024, 30(3): 30-36.
[20] GALI-MUHTASIB H, HMADI R, KAREH M, et al. Cell death mechanisms of plant-derived anticancer drugs: beyond apoptosis[J]. Apoptosis, 2015, 20(12): 1531-1562.
[21] 张旋, 黄宁, 郑永唐. 我国中药来源的抗 HIV 天然化合物研究进展[J]. 药学学报, 2010, 45(2): 141-153.
[22] YANG J W, WU S, ALACHKAR H. Characterization of upregulated adhesion GPCRs in acute myeloid leukemia[J]. Transl Res, 2019, 212: 26-35.
[23] KAUFFMANN-ZEH A, RODRIGUEZ-VICIANA P, ULRICH E, et al. Suppression of c-myc-induced apoptosis by ras signalling through PI(3)K and PKB[J]. Nature, 1997, 385(6616): 544-548.
[24] GONCALVES M D, HOPKINS B D, CANTLEY L C. Phosphatidylinositol 3-kinase, growth disorders, and cancer[J]. N Engl J Med, 2018, 379(21): 2052-2062.
[25] DI BLASIO L, GAGLIARDI P A, PULIAFITO A, et al. Serine/threonine kinase 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) as a key regulator of cell migration and cancer dissemination[J]. Cancers (Basel), 2017, 9(3): 25.
[26] STAAL S P. Molecular cloning of the Akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84(14): 5034-5037.
[27] RONG L, LI Z D, LENG X, et al. Salidroside induces apoptosis and protective autophagy in human gastric cancer AGS cells through the PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 122: 109726.
[28] HE P Z, HE Y, MA J J, et al. Thymoquinone induces apoptosis and protective autophagy in gastric cancer cells by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. Phytother Res, 2023, 37(8): 3467-3480.
[29] TANG X L, GUO Y Y, ZHANG S J, et al. Solanine represses gastric cancer growth by mediating autophagy through AAMDC/MYC/ATF4/Sesn2 signaling pathway[J]. Drug Des Devel Ther, 2023, 17: 389-402.
[30] 洪寅雯, 文科, 吴本升, 等. 基于 mTOR/Beclin1 通路探讨血竭散对克罗恩病大鼠结肠组织自噬和炎症小体的影响[J]. 安徽中医药大学学报, 2022, 41(1): 65-72.
[31] BERTHELOOT D, LATZ E, FRANKLIN B S. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death[J]. Cell Mol Immunol, 2021, 18(5): 1106-1121.
[32] CARNEIRO B A, EL-DEIRY W S. Targeting apoptosis in cancer therapy[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2020, 17(7): 395-417.
[33] XU X B, LAI Y Y, HUA Z C. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials[J]. Biosci Rep, 2019, 39(1): BSR20180992.
[34] CHIN H S, LI M X, TAN I K L, et al. VDAC2 enables BAX to mediate apoptosis and limit tumor development[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 4976.
[35] KASHYAP D, GARG V K, GOEL N. Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: role in cancer development and prognosis[J]. Adv Protein Chem Struct Biol, 2021, 125: 73-120.