灯盏花素调节 PI3K/AKT 通路增强人非小细胞肺癌 A549 细胞顺铂化疗敏感性*

韦辉，王天珩，高世奇

邯郸市第一医院，河北 邯郸 056002

摘要：目的：观察灯盏花素对人非小细胞肺癌 A549 细胞顺铂化疗敏感性的影响，并基于磷脂酰肌醇 3－激酶/蛋白激酶 B（phosphatidylinositol－3－kinase/protein kinase B，PI3K/AKT）通路探讨潜在作用机制。方法：以 0、2、4、8、16、32 μmol·L^{-1}灯盏花素和 0、1、2、4、8、16 μmol·L^{-1}顺铂干预 A549 细胞，MTT 法检测细胞增殖活力，并计算半抑制浓度 $IC_{50灯盏花素}$ 和 $IC_{50顺铂}$。将 A549 细胞分为空白组、灯盏花素组、顺铂组、灯盏花素＋顺铂组、灯盏花素＋顺铂＋LY294002 组。培养 48 h 后，MTT 法检测细胞活力，平板克隆实验检测细胞克隆形成能力，流式细胞术检测细胞凋亡，RT－PCR 法检测细胞 *PI3K*、*AKT* 基因表达水平，Western blot 法检测细胞 PI3K、AKT、B 细胞淋巴瘤－2（B－cell lymphoma－2，Bcl－2）、Bcl－2 相关 X 蛋白（Bax）、半胱氨酸蛋白酶（Caspase）－9、Cleaved Caspase－9、Caspase－3、Cleaved Caspase－3 蛋白表达水平。结果：灯盏花素和顺铂对 A549 细胞增殖活力的抑制作用均呈剂量依赖性，$IC_{50灯盏花素}$ 和 $IC_{50顺铂}$ 分别为 14.36 μmol·L^{-1}和 5.72 μmol·L^{-1}。与空白组相比，其余组细胞增殖活力、克隆形成数目降低，凋亡率升高，*PI3K* mRNA、*AKT* mRNA 水平降低（$P<0.05$）。与灯盏花素组或顺铂组相比，灯盏花素＋顺铂组和灯盏花素＋顺铂＋LY294002 组细胞增殖活力、克隆形成数目降低，凋亡率升高，*PI3K* mRNA、*AKT* mRNA 水平降低（$P<0.05$）。与灯盏花素＋顺铂组相比，灯盏花素＋顺铂＋LY294002 组细胞增殖活力、克隆形成数目降低，凋亡率升高，*PI3K* mRNA、*AKT* mRNA 水平降低（$P<0.05$）。与空白组相比，其余组细胞 PI3K、AKT、Bcl－2 蛋白表达水平降低，Bax、Cleaved Caspase－9、Cleaved Caspase－3 蛋白表达水平及 Bax/Bcl－2、Cleaved Caspase－9/Caspase－9、Cleaved Caspase－3/Caspase－3 比值升高（$P<0.05$）。与灯盏花素组或顺铂组相比，灯盏花素＋顺铂组和灯盏花素＋顺铂＋LY294002 组细胞 PI3K、AKT、Bcl－2 蛋白表达水平降低，Bax、Cleaved Caspase－9、Cleaved Caspase－3 蛋白表达水平及 Bax/Bcl－2、Cleaved Caspase－9/Caspase－9、Cleaved Caspase－3/Caspase－3 比值升高（$P<0.05$）。与灯盏花素＋顺铂组相比，灯盏花素＋顺铂＋LY294002 组细胞 PI3K、AKT、Bcl－2 蛋白表达水平降低，Bax、Cleaved Caspase－9、Cleaved Caspase－3 蛋白表达水平及 Bax/Bcl－2、Cleaved Caspase－9/Caspase－9、Cleaved Caspase－3/Caspase－3 比值升高（$P<0.05$）。结论：灯盏花素可能通过抑制 PI3K/AKT 通路，抑制细胞增殖并促进其凋亡，从而增强 A549 细胞化疗敏感性。

关键词：非小细胞肺癌；灯盏花素；顺铂；A549 细胞；PI3K/AKT 通路；化疗

DOI：10.16368/j.issn.1674－8999.2025.05.178

中图分类号：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674－8999(2025)05－1108－08

Calendulin Enhancing Cisplatin Chemosensitivity in Human Non－small Cell Lung Cancer A549 Cells by Regulating PI3K/AKT pathway

WEI Hui，WANG Tianheng，GAO Shiqi

The First Hospital of Handan，Handan Hebei China 056002

Abstract：Objective：To observe the effect of lanugoin on the sensitivity of human non－small cell lung cancer A549 cells to cisplatin chemotherapy，and to explore the potential mechanism of action based on phosphatidylinositol－3－kinase/protein kinase B（PI3K/AKT）pathway. Methods：A549 cells were intervened with 0，2，4，8，16，and 32 μmol·L^{-1} luciferin and 0，1，2，4，8，and 16 μmol·L^{-1} cispla-

* **基金项目**：河北省医学科学研究课题项目（20220506）

tin, and the cell proliferation viability was detected by MTT assay, and the semi - inhibitory concentrations IC50 luciferin and IC50 cisplatin were calculated. The A549 cells were divided into blank group, lampericin group, cisplatin group, lampericin + cisplatin group, and lampericin + cisplatin + LY294002 group. After 48 h of culture, cell viability was detected by MTT assay, cell clone formation ability was detected by plate cloning assay, cell apoptosis was detected by flow cytometry, cell expression levels of *PI3K* and *AKT* genes were detected by RT - PCR, and cell PI3K, AKT, B - cell lymphoma - 2 (Bcl - 2), Bcl - 2 - related X protein (Bax), cysteine protease (Caspase) - 9, Cleaved Caspase - 9, Caspase - 3, Cleaved Caspase - 3 protein expression levels. Results: The inhibitory effects of both lamprophyllin and cisplatin on the proliferation viability of A549 cells were dose - dependent, with IC50 lamprophyllin and IC_{50} cisplatin being 14.36 μmol · L^{-1} and 5.72 μmol · L^{-1}, respectively. compared with the blank group, the proliferation viability and the number of clone formation of the cells in the rest of the group were reduced, the apoptosis rate was elevated, and the levels of *PI3K* mRNA and *AKT* mRNA were decreased ($P<0.05$). Compared with the lanugin group or the cisplatin group, the cell proliferation vigor, the number of clone formation decreased, the apoptosis rate increased, and the levels of *PI3K* mRNA and *AKT* mRNA decreased in the lanugin + cisplatin group and the lanugin + cisplatin + LY294002 group ($P<0.05$). Compared with the lanugin + cisplatin group, cell proliferation vigor, number of clone formation decreased, apoptosis rate increased, and *PI3K* mRNA, *AKT* mRNA levels decreased in the lanugin + cisplatin + LY294002 group ($P<0.05$). Compared with the blank group, the cellular PI3K, AKT, and Bcl - 2 protein expression levels were reduced in the rest of the group, and the protein expression levels of Bax, Cleaved Caspase - 9, Cleaved Caspase - 3 and Bax/Bcl - 2, Cleaved Caspase - 9/Caspase - 9, Cleaved Caspase - 3/Caspase - 3 ratio were elevated ($P<0.05$). Compared with the lanugin group or the cisplatin group, the cellular PI3K, AKT, and Bcl - 2 protein expression levels were decreased in the lanugin + cisplatin group and the lanugin + cisplatin + LY294002 group, and the protein expression levels of Bax, Cleaved Caspase - 9, and Cleaved Caspase - 3 protein expression levels and the ratio of Bax/Bcl - 2, Cleaved Caspase - 9/Caspase - 9, and Cleaved Caspase - 3/Caspase - 3 ratio were elevated ($P<0.05$). Compared with the lanugin + cisplatin group, the cellular PI3K, AKT, and Bcl - 2 protein expression levels were decreased in the lanugin + cisplatin + LY294002 group, and the protein expression levels of Bax, Cleaved Caspase - 9, Cleaved Caspase - 3, and the ratios of Bax/Bcl - 2, Cleaved Caspase - 9/Caspase - 3/Caspase - 3 were increased ($P<0.05$). Conclusion: Lampetin may enhance the chemosensitivity of A549 cells by inhibiting cell proliferation and promoting apoptosis through inhibiting the PI3K/AKT pathway.

Key words: non - small cell lung cancer; calendulin; cisplatin; A549 cell; PI3K/AKT pathway; chemotherapy

肺癌是全球发病率与死亡率均位居首位的恶性肿瘤，主要有非小细胞肺癌和小细胞肺癌两种病理分型，其中非小细胞肺癌占比超过 80%[1-2]。因肺癌早期缺乏特异性的临床症状，约 83% 的患者确诊时已发展至中晚期，失去了最佳的手术治疗时机[3]。化疗是中晚期肺癌患者的主要治疗方案，其中以顺铂为代表的铂类药物为肺癌化疗一线用药，但化疗耐受性增加是导致肺癌治疗失败的主要原因[4]。因此，探索能够提高肺癌化疗敏感性的药物对于改善患者预后具有重要意义。

肺癌可归属中医“肺积”“息贲”等范畴，正虚邪盛、肺脾两虚所致气滞血瘀、痰瘀互结、痰热壅肺是其主要病机，宜采取扶正祛邪、活血化瘀、清热化痰的治疗方案[5]。中药灯盏花为菊科植物短尊飞蓬的干燥全草，性温、味辛，具有祛风除湿、活血化瘀、通经活络等功效。灯盏花素（又名灯盏细辛、灯盏乙素）是中药灯盏花的主要活性成分，属于黄酮类化合物，临床主要用于脑络瘀阻、中风偏瘫、胸痹心痛等症的治疗。药理学研究发现，灯盏花素具有广泛的抗肿瘤活性[5]。细胞过度增殖与凋亡受阻是恶性肿瘤的关键病理机制，而磷脂酰肌醇 3 - 激酶/蛋白激酶 B（phosphatidylinositol - 3 - kinase/protein kinase B，PI3K/AKT）通路在细胞增殖和凋亡的调控机制中发挥重要作用。灯盏花素能够通过抑制 PI3K/AKT 通路，进而抑制结直肠癌 SW480 细胞和 HCT116 细胞、前列腺癌 PC3 细胞和 DU145 细胞增殖并促进其凋亡[6-7]。研究证实，通过药物抑制 PI3K/AKT 通路能够增强非小细胞肺癌细胞对顺铂、胶质瘤细胞对替莫唑胺、胆囊癌细胞对吉西他滨的化疗敏感性[8-10]。本研究旨在探讨灯盏花素对人非小细胞肺癌 A549 细胞顺铂化疗敏感性的影响，并基于 PI3K/AKT 通路探讨其潜在作用机制，以期为临床治疗非小细胞肺癌提供新思路。

1　材料

1.1　细胞　人非小细胞肺癌 A549 细胞株购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库，货号：SCSP - 503。

1.2　药物与试剂　灯盏花素（四川维克奇生物科技公司，纯度≥98%，货号：WKQ - 0004798）；顺铂（山东

罗欣药业集团股份公司，批号：2022A0705013）；PI3K 抑制剂 LY294002、RT－PCR 扩增试剂盒（北京索莱宝生物科技公司，货号：IL0270、PC1320）；RPMI 1640 高糖培养基、胎牛血清、RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒（大连美仑生物技术公司，货号：MA0315、PWL001、MA0151、MA0082）；0.25% 胰蛋白酶（含 EDTA）、0.25% 胰蛋白酶（不含 EDTA）、MTT 检测试剂盒、Trizol 总 RNA 提取液（武汉赛维尔生物科技公司，货号：G4010、G4013、G4101、G3013）；结晶紫、Annexin V－FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒、ECL 发光液（上海碧云天生物科技公司，货号：C0121、C1062M、P0018M）；PI3K、AKT、B 细胞淋巴瘤－2（B－cell lymphoma－2，Bcl－2）、Bcl－2 相关 X 蛋白（Bcl－2 associated X protein，Bax）、半胱氨酸蛋白酶（Caspase）－9、激活型 Caspase－9（Cleaved Caspase－9）、Caspase－3、Cleaved Caspase－3、β－actin 抗体（美国 Affinity 公司，货号：AF6241、AF6261、AF6139、AF0120、AF6348、AF5240、AF6311、AF7022、AF7018）；羊 IgG 二抗（北京博奥森生物技术公司，货号：bs－0294P）。

1.3　主要仪器　150i 型 CO_2 细胞培养箱（美国 ThermoFisher Scientific 公司）；MB－530 型酶标仪（深圳汇松科技公司）；FACSCalibu 型流式细胞仪（美国 BD 公司）；5424R 型冷冻离心机（德国 Eppendorf 公司）；7500 型 RT－PCR 仪、Mini Tetra 型蛋白电泳转膜系统、XRS＋型凝胶成像仪（美国 Bio－Rad 公司）。

2　方法

2.1　细胞培养　A549 细胞接种于 RPMI 1640 培养基（含 10% 胎牛血清和 1% 青链双抗），置于 CO_2 细胞培养箱（37 ℃、5% CO_2、饱和湿度）中进行培养，隔天换液。当细胞融合至 80% 时，按 1∶3 传代培养，取传代 4 次后的对数生长期 A549 细胞进行后续研究。

2.2　MTT 法检测 A549 细胞增殖活力　取对数生长期的 A549 细胞，0.25% 胰蛋白酶（含 EDTA）进行消化，以每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔板。使用含 0、2、4、8、16、32 μmol·L^{-1}灯盏花素或 0、1、2、4、8、16 μmol·L^{-1}顺铂的 RPMI 1640 培养基处理细胞 48 h，加入 MTT 溶液（每孔 20 μL）后继续培养 4 h，加入二甲基亚砜（DMSO，每孔 100 μL）震荡孵育 10 min。通过酶标仪检测细胞在 490 nm 处的光密度值（A），并计算增殖活力及 $IC_{50灯盏花素}$、$IC_{50顺铂}$作为后续实验浓度。独立重复 3 次实验。

细胞增殖活力＝（$A_{药物孔}/A_{空白孔}$）×100%

2.3　细胞分组及干预　取对数生长期的 A549 细胞，0.25% 胰蛋白酶（含 EDTA）消化并收集细胞，以每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔板，设空白组、灯盏花素组、顺铂组、灯盏花素＋顺铂组、灯盏花素＋顺铂＋LY294002 组。其中，空白组加常规培养基，灯盏花素组加含 14.36 μmol·L^{-1}灯盏花素的培养基，顺铂组加含 5.72 μmol·L^{-1}顺铂的培养基，灯盏花素＋顺铂组加含 14.36 μmol·L^{-1}灯盏花素和 5.72 μmol·L^{-1}顺铂的培养基，灯盏花素＋顺铂＋LY294002 组加含 14.36 μmol·L^{-1}灯盏花素、5.72 μmol·L^{-1}顺铂和 20 μmol·L^{-1} LY294002 的培养基[11]，培养 48 h。加入 MTT 溶液（每孔 20 μL）后继续培养 4 h，加入 DMSO（每孔 100 μL）振荡孵育 10 min 后，通过酶标仪检测 490 nm 处的光密度值（A），并计算细胞增殖活力。独立重复 3 次实验。

2.4　平板克隆实验检测细胞克隆形成能力　取对数生长期的 A549 细胞，0.25% 胰蛋白酶（含 EDTA）消化并收集细胞，以每孔 200 个细胞接种于 6 孔板，按照“2.3”分组后干预 48 h，更换常规培养基继续培养 12 d 后，吸弃培养基，每孔加 1 mL 4% 多聚甲醛和 1 mL 0.1% 结晶紫固定染色 1 h，PBS 溶液冲洗后室温干燥，显微镜下观察并计数不少于 50 个细胞的克隆形成数目。独立重复 3 次实验。

2.5　流式细胞术检测细胞凋亡　取对数生长期的 A549 细胞，0.25% 胰蛋白酶（含 EDTA）消化并收集细胞，以每孔 5×10^3 个细胞接种于 6 孔板，按照“2.3”分组后干预 48 h，经 0.25% 胰蛋白酶（不含 EDTA）消化后，加结合液重悬细胞，每孔加入 5 μL Annexin V－FITC 染液和 10 μL PI 染液，轻轻混匀后避光孵育 15 min，然后通过流式细胞仪检测细胞凋亡率。独立重复 3 次实验。

2.6　RT－PCR 法检测细胞 *PI3K*、*AKT* 基因表达水平　取对数生长期的 A549 细胞，0.25% 胰蛋白酶（含 EDTA）消化并收集细胞，按照“2.3”分组后干预 48 h，消化并收集细胞，Trizol 法提取总 RNA。按照试剂盒操作说明，将 RNA 逆转录成 cDNA。PCR 扩增反应包括 95 ℃ 预变性 5 min，95 ℃ 变性 10 s，60 ℃ 退火 30 s，72 ℃ 延伸 30 s，共 40 个循环。引物序列由金斯瑞生物科技股份有限公司设计与合成，见表 1。以 *β－actin* 为内参基因，运用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *PI3K* mRNA、*AKT* mRNA 的相对表达量。独立

重复 3 次实验。

表 1　引物序列

基因	上游(5′－3′)	下游(5′－3′)	长度/bp
PI3K	CTGGAGAGCTTGGAGGACGA	TCGCAAGAACCAGAATAAGAAGTG	164
AKT	ATGGACTTCCGGTCAGGTTCA	GCCCTTGCCCAGTAGCTTCA	126
β－actin	CTCCATCCTGGCCTCGCTGT	GCTGTCACCTTCACCGTTCC	97

2.7　Western blot 法检测细胞 PI3K、AKT、Bcl－2、Bax、Caspase－9、Cleaved Caspase－9、Caspase－3、Cleaved Caspase－3 蛋白表达水平　取对数生长期的 A549 细胞，0.25% 胰蛋白酶(含 EDTA)消化并收集细胞，按照“2.3”分组后干预 48 h，消化并收集细胞，RIPA 法提取总蛋白，BCA 法测定蛋白浓度。取 30 μg 总蛋白经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，转膜、封闭后，加一抗稀释液 PI3K(1∶1 000)、AKT(1∶1 000)、Bcl－2(1∶1 000)、Bax(1∶1 000)、Caspase－9(1∶500)、Cleaved Caspase－9(1∶500)、Caspase－3(1∶1 000)、Cleaved Caspase－3(1∶500)、β－actin(1∶1 500)4 ℃避光孵育过夜，洗膜后加二抗稀释液(1∶3 000)室温孵育 2 h，洗膜后加 ECL 显影，通过 Image J 软件分析蛋白条带的灰度值。

2.8　统计学方法　运用 SPSS 20.0 软件进行数据统计分析，计量资料符合正态分布以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较行单因素方差分析，方差齐时两两比较行 *LSD－t* 检验，方差不齐时两两比较行 *Dunnett's T3* 检验。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3　结果

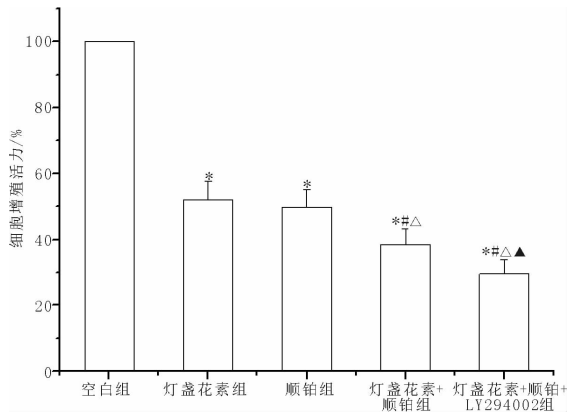
3.1　不同浓度灯盏花素或顺铂对 A549 细胞增殖活力的影响及 $IC_{50灯盏花素}$、$IC_{50顺铂}$　灯盏花素和顺铂对 A549 细胞增殖活力的抑制作用均呈现剂量依赖性，$IC_{50灯盏花素}$ 为 14.36 μmol·L^{-1}，$IC_{50顺铂}$ 为 5.72 μmol·L^{-1}，见表 2。

表 2　不同浓度灯盏花素或顺铂处理 A549 细胞增殖活力比较　($\bar{x} \pm s$,%)

灯盏花素浓度(c/μmol·L^{-1})	细胞增殖活力	顺铂浓度(c/μmol·L^{-1})	细胞增殖活力
0	100.00 ± 0.00	0	100.00 ± 0.00
2	92.82 ± 12.54	1	90.75 ± 11.63
4	75.28 ± 10.36	2	70.28 ± 9.41
8	63.63 ± 8.45	4	56.71 ± 7.28
16	47.64 ± 6.92	8	42.93 ± 5.16
32	36.57 ± 4.86	16	34.05 ± 4.78

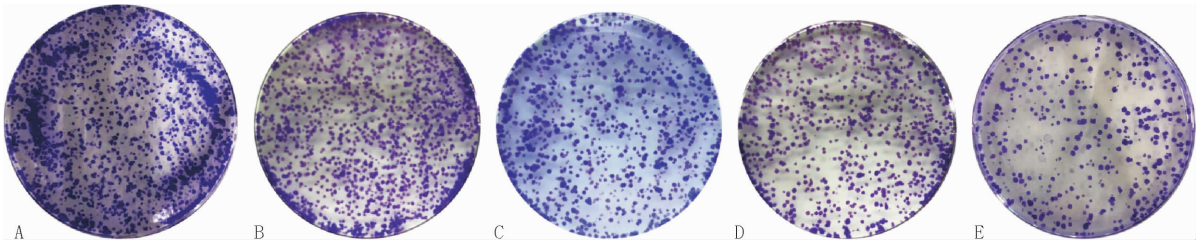
3.2　灯盏花素或顺铂对 A549 细胞增殖活力的影响　与空白组相比，灯盏花素组、顺铂组、灯盏花素＋顺铂组及灯盏花素＋顺铂＋LY294002 组 A549 细胞增殖活力降低($P<0.05$)。与灯盏花素组或顺铂组相比，灯盏花素＋顺铂组和灯盏花素＋顺铂＋LY294002 组 A549 细胞增殖活力降低($P<0.05$)。与灯盏花素＋顺铂组相比，灯盏花素＋顺铂＋LY294002 组 A549 细胞增殖活力降低($P<0.05$)，见图 1。

3.3　灯盏花素或顺铂对 A549 细胞克隆形成能力的影响　与空白组相比，灯盏花素组、顺铂组、灯盏花素＋顺铂组及灯盏花素＋顺铂＋LY294002 组 A549 细胞克隆形成数目减少($P<0.05$)。与灯盏花素组或顺铂组相比，灯盏花素＋顺铂组和灯盏花素＋顺铂＋LY294002 组 A549 细胞克隆形成数目减少($P<0.05$)。与灯盏花素＋顺铂组相比，灯盏花素＋顺铂＋LY294002 组 A549 细胞克隆形成数目减少($P<0.05$)，见图 2、图 3。



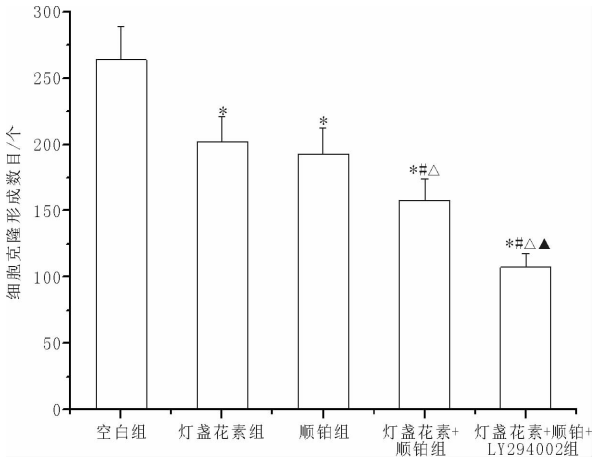
注：与空白组比较，$*P<0.05$；与灯盏花素组比较，$\#P<0.05$；与顺铂组比较，$\triangle P<0.05$；与灯盏花素＋顺铂组比较，$\blacktriangle P<0.05$。

图 1　各组 A549 细胞增殖活力比较



注：A：空白组；B：灯盏花素组；C：顺铂组；D：灯盏花素＋顺铂组；E：灯盏花素＋顺铂＋LY294002 组。

图 2　各组 A549 细胞平板克隆实验染色图

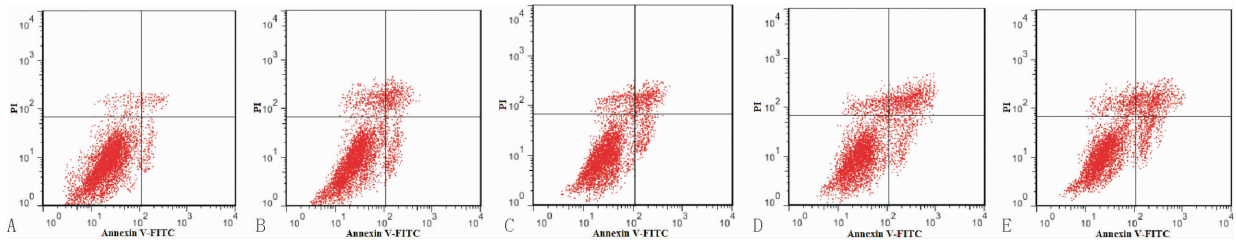


注：与空白组比较，＊$P<0.05$；与灯盏花素组比较，#$P<0.05$；与顺铂组比较，△$P<0.05$；与灯盏花素＋顺铂组比较，▲$P<0.05$。

图 3　各组 A549 细胞克隆形成数目比较

3.4　灯盏花素或顺铂对 A549 细胞凋亡的影响　与空白组相比，灯盏花素组、顺铂组、灯盏花素＋顺铂组及灯盏花素＋顺铂＋LY294002 组 A549 细胞凋亡率升高（$P<0.05$）。与灯盏花素组或顺铂组相比，灯盏花素＋顺铂组和灯盏花素＋顺铂＋LY294002 组 A549 细胞凋亡率升高（$P<0.05$）。与灯盏花素＋顺铂组相比，灯盏花素＋顺铂＋LY294002 组 A549 细胞凋亡率升高（$P<0.05$），见图 4、图 5。

3.5　灯盏花素或顺铂对 A549 细胞 *PI3K*、*AKT* 基因表达水平的影响　与空白组相比，灯盏花素组、顺铂组、灯盏花素＋顺铂组及灯盏花素＋顺铂＋LY294002 组 A549 细胞 *PI3K* mRNA、*AKT* mRNA 水平降低（$P<0.05$）。与灯盏花素组或顺铂组相比，灯盏花素＋顺铂组和灯盏花素＋顺铂＋LY294002 组 A549 细胞 *PI3K* mRNA、*AKT* mRNA 水平降低（$P<0.05$）。与灯盏花素＋顺铂组相比，灯盏花素＋顺铂＋LY294002 组 A549 细胞 *PI3K* mRNA、*AKT* mRNA 水平降低（$P<0.05$），见图 6。

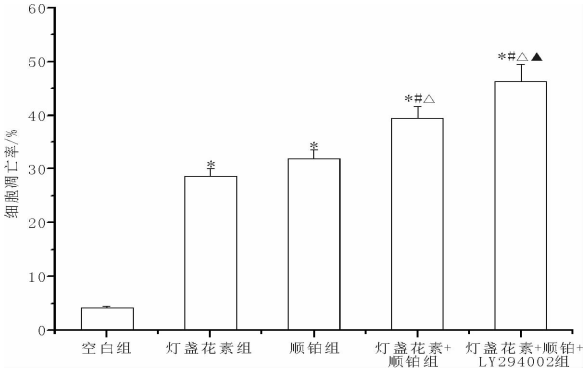


注：A：空白组；B：灯盏花素组；C：顺铂组；D：灯盏花素＋顺铂组；E：灯盏花素＋顺铂＋LY294002 组。

图 4　各组 A549 细胞凋亡流式图

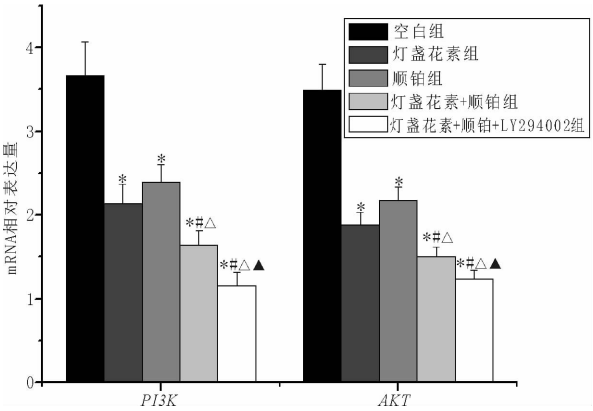
3.6　灯盏花素或顺铂对 A549 细胞 PI3K、AKT、Bcl－2、Bax、Caspase－9、Cleaved Caspase－9、Caspase－3、Cleaved Caspase－3 蛋白表达水平的影响　与空白组相比，灯盏花素组、顺铂组、灯盏花素＋顺铂组及灯盏花素＋顺铂＋LY294002 组 A549 细胞 PI3K、AKT、Bcl－2 蛋白表达水平降低，Bax、Cleaved Caspase－9、Cleaved Caspase－3 蛋白表达水平及 Bax/Bcl－2、Cleaved Caspase－9/Caspase－9、Cleaved Caspase－3/Caspase－3 比值升高（$P<0.05$）。与灯盏花素组或顺铂组相比，灯盏花素＋顺铂组和灯盏花素＋顺铂＋LY294002 组 A549 细胞 PI3K、AKT、Bcl－2 蛋白表达水平降低，Bax、Cleaved Caspase－9、Cleaved Caspase－3 蛋白表达水平及 Bax/Bcl－2、Cleaved Caspase－9/Caspase－9、Cleaved Caspase－3/Caspase－3 比值升高（$P<0.05$）。与灯盏花素＋顺铂组相比，灯盏花素＋顺铂＋LY294002 组 A549 细胞 PI3K、AKT、Bcl－2 蛋白表达水平降低，Bax、Cleaved Caspase－9、Cleaved Caspase－3 蛋白表达水平及 Bax/Bcl－2、Cleaved Caspase－9/Caspase－9、Cleaved Caspase－3/

Caspase－3 比值升高($P<0.05$)，见图 7—图 9。



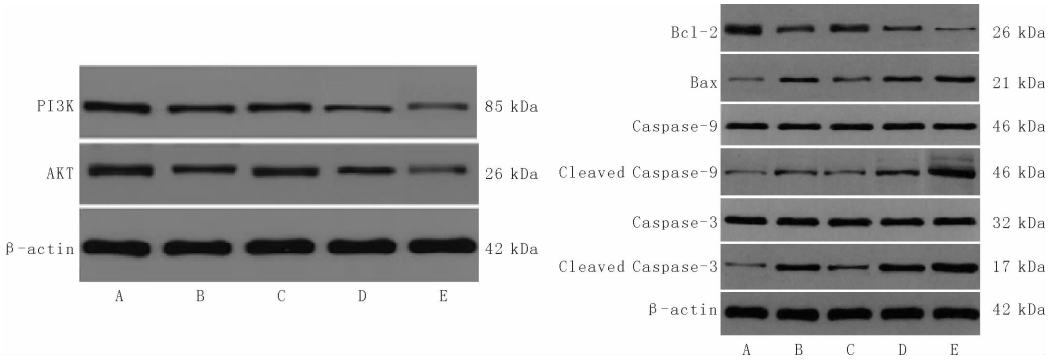
注：与空白组比较，$*P<0.05$；与灯盏花素组比较，$\#P<0.05$；与顺铂组比较，$\triangle P<0.05$；与灯盏花素＋顺铂组比较，$\blacktriangle P<0.05$。

图 5　各组 A549 细胞凋亡率比较



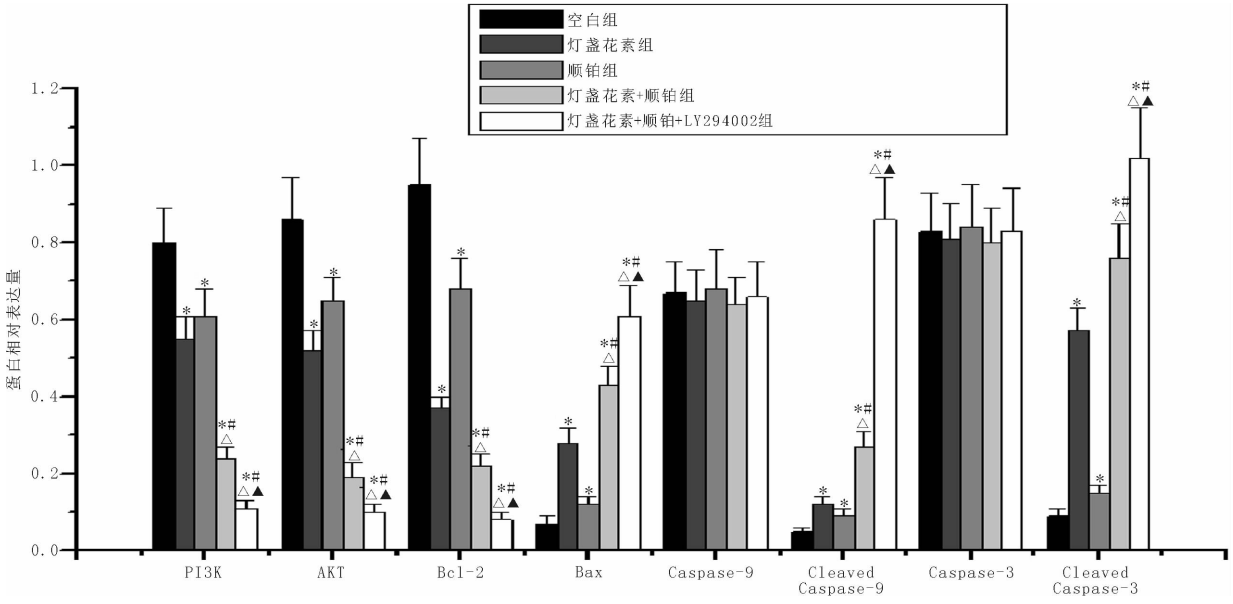
注：与空白组比较，$*P<0.05$；与灯盏花素组比较，$\#P<0.05$；与顺铂组比较，$\triangle P<0.05$；与灯盏花素＋顺铂组比较，$\blacktriangle P<0.05$。

图 6　各组 A549 细胞 *PI3K*、*AKT* 基因表达水平比较



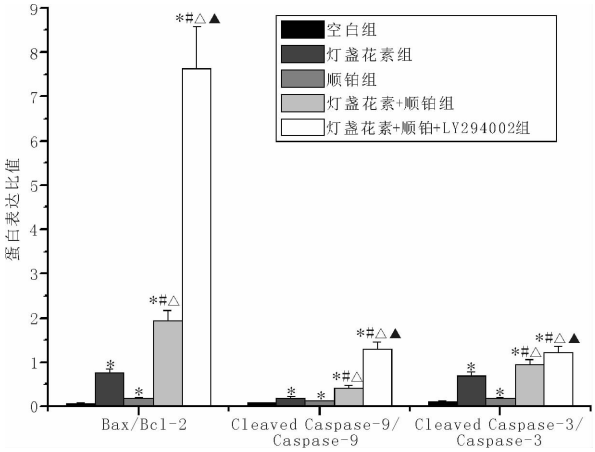
注：A：空白组；B：灯盏花素组；C：顺铂组；D：灯盏花素＋顺铂组；E：灯盏花素＋顺铂＋LY294002 组。

图 7　各组 A549 细胞 PI3K、AKT、Bcl－2、Bax、Caspase－9、Cleaved Caspase－9、Caspase－3、Cleaved Caspase－3 蛋白条带图



注：与空白组比较，$*P<0.05$；与灯盏花素组比较，$\#P<0.05$；与顺铂组比较，$\triangle P<0.05$；与灯盏花素＋顺铂组比较，$\blacktriangle P<0.05$。

图 8　各组 A549 细胞 PI3K、AKT、Bcl－2、Bax、Caspase－9、Cleaved Caspase－9、Caspase－3、Cleaved Caspase－3 蛋白表达水平比较



注：与空白组比较，$*P<0.05$；与灯盏花素组比较，$\#P<0.05$；与顺铂组比较，$\triangle P<0.05$；与灯盏花素＋顺铂组比较，$\blacktriangle P<0.05$。

图 9　各组 A549 细胞 Bax/Bcl－2、Cleaved Caspase－9/Caspase－9、Cleaved Caspase－3/Caspase－3 比值比较

4　讨论

随着肺癌筛查技术的进步及居民健康体检意识的增强，肺癌患者数量呈逐年上升的趋势。据统计，2020 年亚太地区新确诊的肺癌病例已超过 130 万例[2]。早期肺癌通过手术切除联合放化疗等综合治疗，可有效延长患者的生存期，5 年生存率超过 70%。中晚期肺癌以化疗为主，但预后较差，5 年生存率不足 10%[12]。肺癌细胞对化疗药物的耐受性增强是导致疾病进展的重要原因，因此探索高效的化疗增敏剂对于提高肺癌治疗效果具有积极意义。

铂类药物作为肺癌化疗一线药物被广泛应用，但其耐药问题严重影响临床疗效。本研究选择人非小细胞肺癌 A549 细胞作为受试对象，探讨灯盏花素对肺癌细胞化疗敏感性的影响。结果显示，灯盏花素联合顺铂在抑制 A549 细胞增殖活力与克隆形成能力，以及促进细胞凋亡的作用，均明显优于单独应用灯盏花素或顺铂。此外，LY294002 能够显著增强灯盏花素＋顺铂对 A549 细胞增殖、克隆形成及凋亡等生物学行为的调控作用。由此推测，灯盏花素可提高 A549 细胞对顺铂的化疗敏感性，其机制可能与调控 PI3K/AKT 通路有关。

诱导细胞凋亡是铂类药物抗肿瘤的主要机制之一。线粒体凋亡通路是重要的内源性细胞凋亡途径，其中 Bcl－2 蛋白家族（Bcl－2、Bax 等）和 Caspase 蛋白家族（Caspase－9、Caspase－3 等）在线粒体凋亡通路调控机制中扮演着重要角色[13－14]。Bax 可聚合形成同源寡聚物并转移至线粒体膜，在线粒体膜形成孔道，导致细胞色素 C（Cyt C）等内容物由线粒体释放进入细胞质。Cyt C 可剪切激活 Caspase－9，Cleaved Caspase－9 进一步诱导 Caspase－3 活化，Cleaved Caspase－3 能够促进染色体、DNA 片段化并抑制其修复，从而导致细胞凋亡。此外，Bax 与 Bcl－2 形成异源寡聚物，可抑制线粒体膜孔道形成，进而抑制 Cyt C/Caspase－9/Caspase－3 凋亡信号传导通路[15－17]。Bax/Bcl－2 比值可反映 Bax 同源寡聚化和异源寡聚化的形成情况，进而揭示 Bcl－2 蛋白家族对细胞凋亡的影响[18]。PI3K/AKT 通路可调节细胞增殖、凋亡等病理生理过程，且与肿瘤的发生发展密切相关。Bcl－2 作为 AKT 的下游效应分子，AKT 上调 Bcl－2 表达已在多种肿瘤细胞中得到证实[19]。于菲等[20]和王娟娟等[21]研究发现，通过抑制 PI3K/AKT 通路可影响 Bcl－2、Caspase 蛋白家族的表达与活化，进而促进非小细胞肺癌细胞凋亡。本研究结果显示，灯盏花素＋顺铂组 A549 细胞的 *PI3K*、*AKT* 基因和蛋白表达量以及 Bax/Bcl－2、Cleaved Caspase－9/Caspase－9、Cleaved Caspase－3/Caspase－3 比值明显低于灯盏花素单药组和顺铂单药组。此外，LY294002 能够显著增强灯盏花素与顺铂联合作用的效果。由此说明，灯盏花素提高 A549 细胞对顺铂化疗敏感性的作用可能与抑制 PI3K/AKT 通路，促进细胞凋亡有关。

综上所述，灯盏花素可能通过抑制 PI3K/AKT 通路，抑制非小细胞肺癌 A549 细胞增殖并促进其凋亡，从而增强 A549 细胞的化疗敏感性。本研究为灯盏花素作为非小细胞肺癌化疗的辅助用药提供理论依据，但其作用机制尚需进一步探究。

参考文献：

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, WAGLE N S, et al. Cancer statistics, 2023[J]. CA A Cancer J Clinicians, 2023, 73(1): 17－48.

[2] 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): 209－249.

[3] 朱玲玲，伍娟，王艇，等. 2023 年第 2 版 NCCN 肺癌筛查临床实践指南更新解读[J]. 实用肿瘤杂志，2023，38(5)：399－407.

[4] WANG W X, SUN Y, LI H T, et al. Surgical modality for stage IA non－small cell lung cancer among the elderly: a-

nalysis of the Surveillance, Epidemiology, and End Results database[J]. J Thorac Dis, 2020, 12(11): 6731 - 6742.

[5]朱子焕,李子豪,罗丽丹,等. 灯盏花乙素抗肿瘤药理作用及机制研究进展[J]. 湖北科技学院学报:医学版, 2023, 37(4): 364 - 368.

[6]NIU P F, LIU F, LEI F M, et al. Breviscapine regulates the proliferation, migration, invasion, and apoptosis of colorectal cancer cells via the PI3K/AKT pathway[J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 9674.

[7]YE J W, GAO M Q, GUO X W, et al. Breviscapine suppresses the growth and metastasis of prostate cancer through regulating PAQR4 - mediated PI3K/Akt pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 127: 110223.

[8]刘瀚文,王旸,杨峥. 龙胆苦苷对非小细胞肺癌细胞 A549 株化疗敏感性的影响分析[J]. 实用癌症杂志, 2023, 38(9): 1398 - 1402.

[9]张明杰,李少一,刘云会. 水飞蓟宾对胶质瘤细胞替莫唑胺化疗敏感性的影响[J]. 现代肿瘤医学, 2016, 24(12): 1850 - 1853.

[10]徐明,沈火剑,朱宏毅,等. 胆囊癌细胞对吉西他滨化疗敏感性的试验研究[J]. 肝胆胰外科杂志, 2015, 27(4): 303 - 307.

[11]赵智,董仁松. 铜绿假单胞菌注射液对肺癌 A549 细胞自噬及 PI3K/Akt 通路的影响[J]. 临床肺科杂志, 2021, 26(2): 260 - 265.

[12]ZENG H M, RAN X H, AN L, et al. Disparities in stage at diagnosis for five common cancers in China: a multicentre, hospital - based, observational study[J]. Lancet Public Health, 2021, 6(12): e877 - e887.

[13]PENG Z, GILLISSEN B, RICHTER A, et al. Enhanced apoptosis and loss of cell viability in melanoma cells by combined inhibition of ERK and mcl - 1 is related to loss of mitochondrial membrane potential, caspase activation and upregulation of proapoptotic Bcl - 2 proteins[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(5): 4961.

[14]王强,何超,胡城,等. 羽扇豆醇通过抑制 NF - κB 活化改善克雷伯菌感染大鼠肺损伤[J]. 中医学报, 2022, 37(10): 2177 - 2183.

[15]冯健愉,朱玉山,陈佺,等. Bcl - 2 家族蛋白的生理功能及结构基础[J]. 中国细胞生物学学报, 2019, 41(8): 1477 - 1489.

[16]郑凯,杨梅桂,闫朝君,等. 线粒体动力学与细胞凋亡[J]. 中国细胞生物学学报, 2019, 41(8): 1467 - 1476.

[17]LIN K N, ZHAO W, HUANG S Y, et al. Grape seed proanthocyanidin extract induces apoptosis of HL - 60/ADR cells via the Bax/Bcl - 2 caspase - 3/9 signaling pathway[J]. Transl Cancer Res, 2021, 10(9): 3939 - 3947.

[18]张学亚,郭熙哲,吴诗馨. 2 - 甲氧基雌二醇上调 Bax/Bcl - 2 比例诱导淋巴瘤 Raji 细胞凋亡的研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2021, 29(2): 489 - 493.

[19]MAYER I A, ARTEAGA C L. The PI3K/AKT pathway as a target for cancer treatment[J]. Annu Rev Med, 2016, 67: 11 - 28.

[20]于菲,罗卓,黎骊,等. 氯化两面针碱通过 PI3K/Akt/Bcl - 2/caspase - 3/PARP 通路诱导小细胞肺癌细胞 H1688 和 H446 凋亡[J]. 中国药理学通报, 2022, 38(7): 1023 - 1031.

[21]王娟娟,王苏美,吴万垠,等. 山柰酚调控 Akt/Bcl - 2/Caspase 通路促进非小细胞肺癌细胞发生凋亡[J]. 中药材, 2021, 44(8): 1946 - 1950.

收稿日期:2024 - 11 - 21

作者简介:韦辉(1986 -),女,河北邯郸人,理学硕士,副主任药师,研究方向:药理学与临床药学。

编辑:刘凯歌