

## 毛兰素通过 Akt 抑制膀胱癌细胞 5637 增殖

杨凤娟<sup>1</sup>, 周萍<sup>2</sup>, 程潭<sup>1</sup>, 张天禹<sup>2</sup>, 曾常春<sup>3</sup>, 谭宁<sup>1\*</sup>

(1. 桂林医学院基础医学院, 广西桂林 541199;

2. 桂林医学院附属医院, 广西桂林 541001;

3. 深圳市龙华区中心医院, 广东深圳 518110)

**[摘要]** 目的:探讨蛋白激酶 B(Akt)过表达对毛兰素抑制人膀胱癌细胞 5637 增殖作用的影响及相关机制。方法:运用慢病毒载体建立 5637 细胞 Akt 稳定过表达株,并进行如下分组,以空载体感染 5637 细胞作为空白组, Akt 组,空载体加药组(毛兰素  $62.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), Akt 加药组(毛兰素  $62.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ );采用细胞增殖与活性检测(CCK-8)法测定细胞活性;通过克隆形成实验检测各组 5637 细胞克隆形成情况;进行流式细胞术检测,评价细胞周期分布情况;采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测磷酸化(p)-Akt, Akt, p21 蛋白表达;进行糖摄取测定实验和乳酸分泌实验,检测 5637 细胞糖酵解情况。结果:与空白组比较,毛兰素可以抑制膀胱癌 5637 细胞的增殖( $P<0.05$ ),过表达 Akt 能部分逆转毛兰素对膀胱癌 5637 细胞的增殖抑制作用( $P<0.05$ )。与空白组比较,毛兰素可以抑制膀胱癌 5637 细胞的克隆形成( $P<0.05$ ),过表达 Akt 能部分逆转毛兰素对膀胱癌 5637 细胞的克隆形成抑制作用( $P<0.05$ )。与空白组比较,毛兰素能诱导膀胱癌 5637 细胞 DNA 合成前期( $G_1$ 期)阻滞( $P<0.05$ ),过表达 Akt 能逆转毛兰素对 5637 细胞的周期阻滞作用( $P<0.05$ )。与空白组比较,毛兰素可以促进 p21 蛋白表达并抑制 p-Akt, Akt 蛋白表达( $P<0.05$ ),过表达 Akt 能够逆转毛兰素对 p21 蛋白表达的上调作用( $P<0.05$ )。与空白组比较,毛兰素能抑制膀胱癌细胞 5637 的葡萄糖摄取和乳酸分泌( $P<0.05$ ),过表达 Akt 能够逆转毛兰素对 5637 细胞糖酵解的抑制作用( $P<0.05$ )。结论:毛兰素对膀胱癌细胞 5637 增殖具有抑制作用,可以促进 p21 表达并抑制 p-Akt 的表达;Akt 过表达可逆转毛兰素对膀胱癌细胞 5637 的增殖抑制作用。提示 Akt 在毛兰素抑制 5637 细胞增殖过程中发挥着重要作用,为毛兰素应用于膀胱癌治疗提供了新的靶向依据。

**[关键词]** 毛兰素;膀胱癌;细胞增殖;蛋白激酶 B(Akt);糖酵解

**[中图分类号]** R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)03-0076-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220124

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211104.1001.001.html>

**[网络出版日期]** 2021-11-04 15:00

### Erianin Inhibits Proliferation of Bladder Cancer 5637 Cells Through Akt

YANG Feng-juan<sup>1</sup>, ZHOU Ping<sup>2</sup>, CHENG Tan<sup>1</sup>, ZHANG Tian-yu<sup>2</sup>, ZENG Chang-chun<sup>3</sup>, TAN Ning<sup>1\*</sup>

(1. Basic Medical College, Guilin Medical University, Guilin 541199, China;

2. Affiliated Hospital, Guilin Medical University, Guilin 541001, China;

3. Shenzhen Longhua District Central Hospital, Shenzhen 518110, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the role of protein kinase B (Akt) overexpression in the inhibition of human bladder cancer 5637 cell proliferation by erianin and related mechanisms. **Method:** The 5637 cells stably over-expressing Akt were induced using the lentivirus vector. The 5637 cells infected with the empty vector were classified into blank group. Then the Akt group, empty vector combined with erianin ( $62.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) group, and Akt combined with erianin ( $62.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) group were set up. The cell viability was detected by cell

**[收稿日期]** 20210917(012)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81360377);广西自然科学基金重点项目(2015GXNSF DA139027);广西壮族自治区卫生健康委员会科研项目(Z20201223);桂林医学院硕士研究生科研项目(GYYK2021009)

**[第一作者]** 杨凤娟,在读硕士,从事肿瘤代谢研究,E-mail:964667651@qq.com

**[通信作者]** \* 谭宁,博士,副研究员,从事抗肿瘤药物研究,E-mail:653651606@qq.com

counting kit-8 (CCK-8) assay, and the clone formation of 5637 cells in each group was determined in the clone formation experiment. The cell cycle distribution was detected by flow cytometry. Western blot was used to assay the protein expression levels of phosphorylated (p)-Akt, Akt, p21. The glycolysis of 5637 cells was determined in glucose uptake and lactate secretion assays. **Result:** Compared with the blank group, erianin inhibited the proliferation of bladder cancer 5637 cells ( $P<0.05$ ). Overexpression of Akt partially reversed the inhibitory effect of erianin on the proliferation of bladder cancer 5637 cells ( $P<0.05$ ). Clone formation assay showed that erianin inhibited the clone formation of bladder cancer 5637 cells ( $P<0.05$ ), which was partially reversed by the overexpressed Akt ( $P<0.05$ ). As revealed by comparison with the blank group, erianin arrested the bladder cancer 5637 cells in  $G_1$  phase ( $P<0.05$ ), which was also reversed by the overexpressed Akt ( $P<0.05$ ). Western bolt showed that erianin promoted the expression of p21 but suppressed the expression of p-Akt and Akt ( $P<0.05$ ). By contrast, the overexpression of Akt down-regulated the elevated p21 protein expression induced by erianin ( $P<0.05$ ). Compared with the blank group, erianin inhibited the glucose uptake and lactate secretion of bladder cancer 5637 cells ( $P<0.05$ ). Overexpression of Akt weakened the inhibitory effect of erianin against the glycolysis of 5637 cells ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Erianin is able to inhibit the proliferation of bladder cancer 5637 cells, promote the expression of p21, and inhibit the expression of p-Akt. Overexpressed Akt reduces the inhibitory effect of erianin on the proliferation of bladder cancer 5637 cells, suggesting that Akt plays an important role in the inhibition of 5637 cell proliferation by erianin, which has provided a new target for the application of erianin in the treatment of bladder cancer.

**[Keywords]** erianin; bladder cancer; cell proliferation; protein kinase B (Akt); glycolysis

膀胱癌是指发生在膀胱黏膜上的恶性肿瘤,其发病率在泌尿生殖系统恶性肿瘤中居第2位。根据美国癌症学会发布的全球癌症统计表明,2020年膀胱癌全球新发病例约为59.7万例;且大多数地区膀胱癌发病率有明显性别差异,以东亚地区为例,男性膀胱癌发病率约为女性发病率的4倍<sup>[1]</sup>。膀胱癌的病因复杂,既有内在的遗传因素,又有外在的环境因素,其中吸烟和职业接触芳香胺类化学物质是较为明确的两大致病危险因素<sup>[2]</sup>。膀胱癌常规治疗手段有经尿道肿瘤电切、膀胱部分切除/全切、放疗、靶向治疗等,但是由于膀胱癌具有多灶性、种植性、尿源性等特点,导致膀胱癌术后容易复发,治疗效果不理想<sup>[2]</sup>。

石斛是生长在我国黔、桂、浙等地的有名的一类中药材,传统中医药中石斛常用于滋阴补益,现代药理学研究表明石斛具有扩张血管、抗衰老、增强人体免疫力等作用<sup>[3]</sup>。毛兰素  $C_{18}H_{22}O_5$ , 2-甲氧基-5-[2-(3,4,5-三甲氧基-苯基)-乙基]-苯酚是从石斛提取物中分离得到的一种低分子量联苄类化合物,相对分子质量为318.36,是鼓槌石斛、金钗石斛<sup>[4]</sup>发挥药用价值的重要生物活性成分。毛兰素具有抗菌<sup>[5]</sup>、抗病毒<sup>[6]</sup>及抗血管生成等活性,近年来研究显示,毛兰素及其衍生物在抗肿瘤临床治疗方面应用潜力巨大<sup>[7]</sup>。洪卫等<sup>[8]</sup>研究表明,毛兰素可抑

制胃癌细胞SGC-7901端粒酶活性,使端粒无法维持稳定长度,端粒随肿瘤细胞的分化而缩短,最终致细胞衰老死亡;苏鹏等<sup>[9]</sup>研究也表明,毛兰素可通过抑制蛋白激酶B(Akt)活性,下调髓细胞白血病-1(Mcl-1)蛋白表达及激活DNA修复酶(PARP),阻滞其细胞周期于DNA合成后期/DNA分裂期( $G_2/M$ 期),从而对人肝癌细胞Huh7起到增殖抑制作用;GONG等<sup>[10]</sup>研究表明,毛兰素可下调人脐静脉内皮细胞乳酸产量,葡萄糖消耗和细胞内腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)水平,抑制内皮细胞代谢的效用提示了毛兰素的抗血管生成作用。

本课题组前期实验发现毛兰素能够抑制膀胱癌细胞T24增殖活性,并下调Akt表达水平。本实验以膀胱癌细胞5637为研究对象,进一步验证毛兰素对膀胱癌细胞Akt表达水平的影响,并通过慢病毒载体建立5637细胞Akt稳定过表达株,探讨Akt在毛兰素介导的膀胱癌细胞5637增殖活性抑制及糖酵解调控中的意义,为毛兰素抗肿瘤提供新的理论依据。

## 1 材料

**1.1 细胞** 膀胱癌5637细胞株(已传40代)购自中科院上海生物科学研究所细胞资源中心。Akt稳定过表达5637细胞株(已传10代)由上海市肿瘤研究所癌基因及相关基因国家重点实验室郭维杰博士

赠送。

**1.2 药品及试剂** 毛兰素(上海源叶生物科技有限公司,批号B20844,纯度 $\geq 98\%$ ),采用二甲基亚砜(DMSO)试剂(美国Sigma-Aldrich公司,批号D2438)作溶剂溶解毛兰素,过滤除菌后,室温避光存放备用。DMEM高糖培养基(美国Sigma-Aldrich公司,批号D2438);胎牛血清(FBS,美国Corille公司,批号C1015-05);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂(上海同仁化学研究所,批号CK04);p21单克隆抗体,p27单克隆抗体,Akt单克隆抗体,磷酸化(p)-Akt单克隆抗体,辣根过氧化物酶标记的兔抗和鼠抗(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为2947S,2552S,C67E7,S473,7074P2,7076P2); $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)单克隆抗体(美国Proteintech公司,批号66009-1-Ig);BCA蛋白定量试剂盒(美国Thermo公司,批号23327);细胞周期检测试剂盒,Annexin-V-FITC/碘化丙啶(PI)双染色法流式细胞检测试剂盒(美国Invitrogen公司,批号分别为F10797,V13241);葡萄糖摄取检测试剂盒,乳酸含量检测试剂盒(美国Promega公司,批号分别为J1341,J5021);结晶紫染液(中国上海碧云天生物技术有限公司,批号C0121)。

**1.3 仪器** Elix3+30L+3YNERGY型超纯水系统(美国Millipore公司);311型气套式CO<sub>2</sub>培养箱(美国Thermo公司);Infinite M200 pro Nano Quant型光栅型连续波长酶标仪(瑞士Tecan公司);Allegra X-22R型冷冻离心机(美国贝克曼库尔特公司);CytoFLEX型流式细胞仪(美国BD公司);Mini-PROTEAN Tetra System型电泳仪和转膜仪,ChemiDoc XRS+型凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司);GloMax® Discover Microplate Reader型微孔板检测仪(美国Progenia公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** 将5637细胞接种于DMEM培养基中,培养于37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱中,胰蛋白酶常规消化传代,选择处于对数生长期的细胞进行实验。

**2.2 细胞增殖实验检测过表达Akt后毛兰素对5637细胞增殖的影响** 胰酶室温常规消化细胞后,用含FBS的DMEM培养基吹打成分布均匀的单细胞悬液,以每孔2 000个细胞的密度接种于96孔板中,每组设置3个复孔,培养于37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱中,细胞贴壁24 h,加入毛兰素进行干预,其终质量浓度为62.5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。培养细胞2 h,1 d,2 d,3 d,4 d,5 d,空白组给予等体积DMSO(即0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 毛兰素处

理组)。检测时,每孔加入CCK-8溶液20  $\mu\text{L}$ ,继续培养2 h,使用酶标仪检测450 nm波长处各组吸光度A,并计算各组细胞存活率。细胞存活率= $A_{\text{实验组}}/A_{\text{空白组}}\times 100\%$ 。

**2.3 克隆形成实验检测过表达Akt后毛兰素对5637细胞克隆形成的影响** 胰酶室温常规消化细胞后,用含FBS的DMEM培养基吹打成分布均匀的单细胞悬液,以每孔2 000个细胞的密度接种于6孔板中,继续培养于恒温培养箱中。培养6 d后加毛兰素,使其终质量浓度为62.5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,以等体积DMSO代替毛兰素作为空白组,同一浓度设置3个复孔,再继续培养6 d后弃去上层培养基,磷酸盐缓冲液(PBS)洗板2次,细胞用4%多聚甲醛固定15 min,弃去多聚甲醛,结晶紫溶液染色15 min,清水反复浸洗,室温晾干,采集图像保存后,每孔加入10%的冰乙酸溶液2 mL溶解结晶紫,每孔再取100  $\mu\text{L}$ 置于96孔板中,使用酶标仪检测各孔560 nm波长处A,并计算各组细胞存活率。细胞存活率= $A_{\text{实验组}}/A_{\text{空白组}}\times 100\%$ 。

**2.4 流式细胞仪检测5637细胞周期分布** 将5637细胞于室温消化后,以每皿 $1\times 10^6$ 个的密度接种于6 cm培养皿,每皿加入培养基5 mL。培养24 h后加入毛兰素进行干预,其终质量浓度为62.5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。24 h后胰酶消化法收集细胞,用预冷PBS洗涤细胞2次,再以预冷PBS重悬成单细胞悬液,缓慢滴加预冷乙醇,轻轻吹打混匀后,4℃固定过夜。染色前取出细胞以预冷PBS洗涤2次,PBS重悬细胞,加入RNase A溶液,37℃水浴30 min;加入PI染色液重悬细胞,4℃避光孵育30 min。上机检测激发波长为488 nm,采用FlowJo软件分析各组细胞周期分布。

**2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测蛋白表达** 细胞培养及加药同2.4项。加等体积DMSO作为空白组,作用48 h后收集细胞,采用RIPA裂解细胞提取细胞总蛋白,用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白质浓度,在蛋白样品中加入上样缓冲液混匀,95℃水浴10 min,冰上放置10 min后,保存于-20℃冰箱备用。采用SDS-PAGE凝胶电泳分离总蛋白样品,转移至NC膜上,5%脱脂奶粉(TBST配制)室温摇床封闭1 h,4℃孵育一抗过夜(p21,p27,p-Akt,Akt 1:500; $\beta$ -actin 1:5 000),洗膜,室温孵育二抗1.5 h(兔源性二抗1:800,鼠源性二抗1:1 000),洗膜,与ECL发光液反应2~3 min,X射线片曝光,显影,定影,采用Gel-Pro Analyzer图像分析系统计算分析X

射线片A。

**2.6 葡萄糖摄取量测定** 胰酶室温常规消化细胞后,用含FBS的DMEM培养基吹打成分布均匀的单细胞悬液,按 $1\times 10^5$ 个/孔接种于24孔板中,培养于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ , $5\%$   $\text{CO}_2$ 培养箱中,细胞贴壁生长24 h,加入毛兰素进行干预,其终质量浓度为 $62.5\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,以等体积DMSO作为空白组,同一浓度设置3个复孔,培养1 d,按照葡萄糖检测试剂盒说明书将预混样品转移至96孔板中,检测前每孔加入2-脱氧葡萄糖-6-磷酸(2DG6P)检测液 $100\ \mu\text{L}$ ,室温孵育30 min,在发光波长560 nm处检测记录各组细胞荧光素酶荧光强度,即相对发光单位(RLU),评价葡萄糖摄取情况。葡萄糖摄取抑制率 $= (1 - \text{药物组RLU} / \text{空白组RLU}) \times 100\%$ 。

**2.7 乳酸生成量的测定** 细胞培养及加药同2.6项,按照乳酸检测说明书,将样品转移至96孔板,每孔加入预混乳酸检测工作液 $50\ \mu\text{L}$ ,室温孵育1 h,在发光波长560 nm处检测记录各组细胞RLU,评价乳酸含量。乳酸生成抑制率 $= (1 - \text{药物组RLU} / \text{空白组RLU}) \times 100\%$ 。

**2.8 统计学分析** 以上实验均重复3次,所有数据均采用SPSS 18.0软件进行统计学分析,数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多个样本间的均数比较采用单因素ANOVA分析, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 过表达Akt对毛兰素介导的膀胱癌细胞5637增殖活性抑制的影响** 与空白组比较,毛兰素组膀胱癌细胞5637  $A_{450\text{ nm}}$ 明显降低,且随着药物浓度增加,毛兰素组膀胱癌细胞存活率逐渐下降( $P<0.05$ ),提示毛兰素可抑制膀胱癌细胞5637增殖活性。半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )为 $(129.1\pm 0.07)\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。见表1。

与空白组比较,从1 d开始,Akt组细胞在 $A_{450\text{ nm}}$ 明显升高,且细胞活性明显升高( $P<0.05$ );从1 d开始,空载体加药组细胞在 $A_{450\text{ nm}}$ 明显降低,细胞存活率明显下降( $P<0.05$ ),表明毛兰素能够抑制膀胱癌细胞5637增殖活性。与空载体加药组比较,Akt加药组细胞 $A_{450\text{ nm}}$ 明显升高,且细胞存活率上升( $P<0.05$ ),表明过表达Akt能够削弱毛兰素对5637细胞增殖的抑制作用,部分恢复细胞活力。见表2。

**3.2 过表达Akt对毛兰素介导的膀胱癌细胞5637克隆形成抑制的影响** 与空白组比较,Akt组膀胱癌细胞5637结晶紫染色图像 $A_{560\text{ nm}}$ 明显升高,细胞活性明显增加( $P<0.05$ );空载体加药组膀胱癌细胞5637结晶紫染色图像 $A_{560\text{ nm}}$ 明显降低,克隆形成受

表1 毛兰素对膀胱癌细胞5637存活率的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table1 Effect of different concentrations of Erianin on survival rate in 5637 cells ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$A_{450\text{ nm}}$	存活率/%
空白		0.707±0.013	100.000±0.000
毛兰素	3.91	0.557±0.016 <sup>1)</sup>	76.842±4.358 <sup>1)</sup>
空白		0.719±0.016	100.000±0.000
毛兰素	7.81	0.493±0.003 <sup>1)</sup>	67.275±1.382 <sup>1)</sup>
空白		0.714±0.014	100.000±0.000
毛兰素	15.62	0.435±0.005 <sup>1)</sup>	59.899±0.630 <sup>1)</sup>
空白		0.735±0.006	100.000±0.000
毛兰素	31.25	0.410±0.010 <sup>1)</sup>	56.990±1.339 <sup>1)</sup>
空白		0.733±0.011	100.000±0.000
毛兰素	62.5	0.381±0.009 <sup>1)</sup>	53.146±1.219 <sup>1)</sup>
空白		0.735±0.023	100.000±0.000
毛兰素	125	0.366±0.005 <sup>1)</sup>	50.588±0.778 <sup>1)</sup>
空白		0.702±0.009	100.000±0.000
毛兰素	250	0.335±0.006 <sup>1)</sup>	45.774±2.172 <sup>1)</sup>
空白		0.750±0.003	100.000±0.000
毛兰素	500	0.313±0.002 <sup>1)</sup>	43.763±1.289 <sup>1)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ 。

到抑制( $P<0.05$ ),表明毛兰素能够抑制膀胱癌细胞5637克隆形成。与空载体加药组比较,Akt加药组膀胱癌细胞5637结晶紫染色图像 $A_{560\text{ nm}}$ 升高,细胞活性增加( $P<0.05$ ),结果表明过表达Akt能逆转毛兰素对5637细胞克隆形成的抑制作用。见图1,表3。

**3.3 过表达Akt对毛兰素介导的膀胱癌细胞5637周期阻滞的影响** 与空白组比较,Akt组细胞DNA合成前期( $G_1$ 期)数目减少,DNA合成期(S期)及DNA合成后期( $G_2$ 期)细胞数增多( $P<0.05$ )空载体加药组5637细胞 $G_1$ 期的细胞比例明显升高,S期和 $G_2$ 期的细胞比例明显减少( $P<0.05$ ),表明毛兰素能够诱导膀胱癌细胞5637细胞 $G_1$ 期阻滞。与空载体加药组比较,Akt加药组细胞 $G_1$ 期细胞数减少,S期和 $G_2$ 期的细胞比例明显增多( $P<0.05$ ),结果表明过表达Akt能够逆转毛兰素对膀胱癌细胞5637的周期阻滞作用。见表4。

**3.4 过表达Akt对细胞周期相关蛋白的影响** 与空白组比较,Akt组5637细胞中p21蛋白表达下降,p-Akt水平升高( $P<0.05$ );空载体加药组细胞周期相关蛋白p21的表达上调,p-Akt蛋白表达下调( $P<0.05$ )。与空载体加药组比较,Akt加药组5637细胞

表 2 过表达 Akt 对 5637 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Effect of overexpression of Akt on survival rate in 5637 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	时间	$A_{450 \text{ nm}}$	存活率/%
空白		2 h	0.276±0.007	100.000±0.000
Akt			0.271±0.001	98.036±2.222
空载体加药	62.5		0.268±0.002	97.050±2.081
Akt 加药	62.5		0.277±0.001	100.063±2.470
空白		1 d	0.568±0.009	100.000±0.000
Akt			0.637±0.012 <sup>1)</sup>	112.185±1.817 <sup>1)</sup>
空载体加药	62.5		0.340±0.005 <sup>1)</sup>	59.909±0.417 <sup>1)</sup>
Akt 加药	62.5		0.393±0.015 <sup>2)</sup>	69.202±2.890 <sup>2)</sup>
空白		2 d	0.843±0.025	100.000±0.000
Akt			1.106±0.072 <sup>1)</sup>	131.454±8.953 <sup>1)</sup>
空载体加药	62.5		0.508±0.007 <sup>1)</sup>	60.412±1.125 <sup>1)</sup>
Akt 加药	62.5		0.663±0.011 <sup>2)</sup>	78.843±2.312 <sup>2)</sup>
空白		3 d	1.537±0.023	100.000±0.000
Akt			2.087±0.026 <sup>1)</sup>	135.903±3.585 <sup>1)</sup>
空载体加药	62.5		0.598±0.019 <sup>1)</sup>	38.931±1.109 <sup>1)</sup>
Akt 加药	62.5		0.872±0.016 <sup>2)</sup>	56.780±1.811 <sup>2)</sup>
空白		4 d	2.137±0.089	100.000±0.000
Akt			2.813±0.051 <sup>1)</sup>	132.230±7.326 <sup>1)</sup>
空载体加药	62.5		0.702±0.023 <sup>1)</sup>	32.928±1.285 <sup>1)</sup>
Akt 加药	62.5		1.128±0.008 <sup>2)</sup>	52.983±2.272 <sup>2)</sup>
空白		5 d	2.792±0.014	100.000±0.000
Akt			3.449±0.149 <sup>1)</sup>	123.520±5.467 <sup>1)</sup>
空载体加药	62.5		0.817±0.006 <sup>1)</sup>	29.248±0.106 <sup>1)</sup>
Akt 加药	62.5		1.535±0.022 <sup>2)</sup>	54.996±0.999 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,与空载体加药组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ (表 3~6 同)。

表 4 过表达 Akt 对膀胱癌细胞 5637 周期分布的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

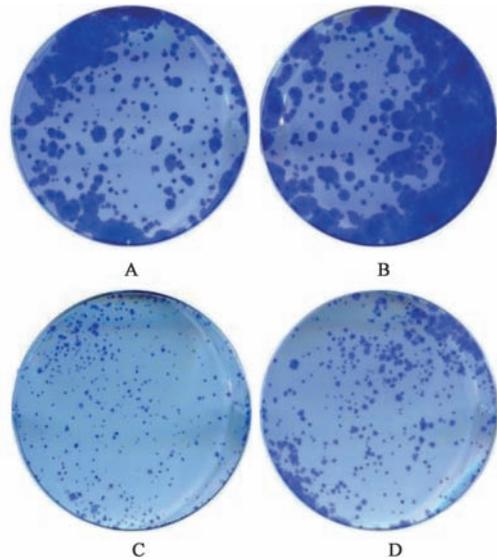
Table 4 Effect of overexpression of Akt on cycle distribution in 5637 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$G_1$ 期	S 期	$G_2$ 期
空白		43.667±0.690	42.322±0.678	14.010±0.070
Akt		36.433±0.379 <sup>1)</sup>	49.223±0.410 <sup>1)</sup>	14.343±0.296 <sup>1)</sup>
空载体加药	62.5	80.510±0.227 <sup>1)</sup>	18.120±0.302 <sup>1)</sup>	1.370±0.243 <sup>1)</sup>
Akt 加药	62.5	55.960±1.368 <sup>2)</sup>	28.173±0.762 <sup>2)</sup>	15.870±0.622 <sup>2)</sup>

表 5 过表达 Akt 对膀胱癌细胞 5637 p21, p-Akt 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 5 Effect of overexpression of Akt on p21, p-Akt protein expression ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	p21/ $\beta$ -actin	p-Akt/ $\beta$ -actin	Akt/ $\beta$ -actin
空白		0.645±0.002	0.486±0.004	0.513±0.003
Akt		0.626±0.001 <sup>1)</sup>	0.749±0.003 <sup>1)</sup>	0.868±0.001 <sup>1)</sup>
空载体加药	62.5	0.825±0.001 <sup>1)</sup>	0.135±0.001 <sup>1)</sup>	0.443±0.001 <sup>1)</sup>
Akt 加药	62.5	0.695±0.002 <sup>2)</sup>	0.172±0.002 <sup>2)</sup>	0.298±0.002 <sup>1)</sup>



A. 空白组; B. Akt 组; C. 空载体加药组; D. Akt 加药组

图 1 过表达 Akt 对膀胱癌细胞 5637 克隆形成的影响(结晶紫)

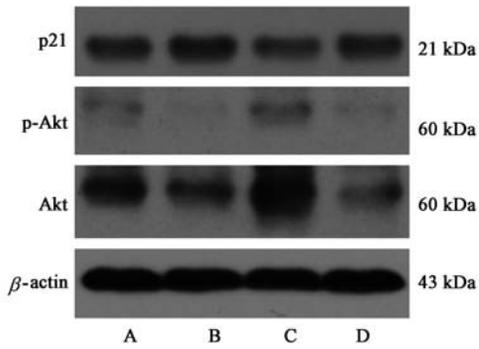
Fig. 1 Effect of overexpression of Akt on clone formation in 5637 cells (crystal violet)

表 3 过表达 Akt 对膀胱癌细胞 5637 克隆形成的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of overexpression of Akt on clone formation in 5637 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$A_{560 \text{ nm}}$	存活率/%
空白		1.270±0.047	100.000±0.00
Akt		1.630±0.028 <sup>1)</sup>	129.552±4.650 <sup>1)</sup>
空载体加药	62.5	0.161±0.003 <sup>1)</sup>	12.854±0.588 <sup>1)</sup>
Akt 加药	62.5	0.364±0.006 <sup>2)</sup>	28.888±0.815 <sup>2)</sup>

p21 蛋白表达下降, p-Akt 水平升高 ( $P < 0.05$ )。表明毛兰素能够上调 5637 细胞 p21 蛋白表达, 过表达 Akt 能够逆转毛兰素对 5637 细胞 p21 蛋白的调控作用。见表 5, 图 2。



A. 空白组; B. 空载体加药组; C. Akt组; D. Akt加药组  
图2 细胞周期相关蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of cell cycle associated protein expression

表6 过表达Akt对葡萄糖摄取和乳酸生成RLU的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 6 Effect of overexpression of Akt on RLU of glucose uptake and lactate production in 5637 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	葡萄糖	乳酸
空白		145 868.667 $\pm$ 4 399.886	221 660.333 $\pm$ 7 481.861
Akt		214 614.333 $\pm$ 3 504.569 <sup>1)</sup>	307 677.333 $\pm$ 5 422.568 <sup>1)</sup>
空载体加药	62.5	69 030.667 $\pm$ 848.785 <sup>1)</sup>	102 009.000 $\pm$ 3 530.499 <sup>1)</sup>
Akt加药	62.5	105 424.000 $\pm$ 3 396.018 <sup>2)</sup>	149 547.617 $\pm$ 4 040.879 <sup>2)</sup>

#### 4 讨论

癌症中的许多细胞过程归因于激酶信号网络。磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/Akt信号通路是已被确定为癌症发生的3种主要信号传导途径之一<sup>[11]</sup>,其中Akt在该信号通路中起主要作用<sup>[12]</sup>。Akt由PI3K或3-磷酸肌醇依赖性激酶(PDK)及生长因子,炎症和DNA损伤激活,其激活位点为丝氨酸(Ser473)和苏氨酸(Thr308)磷酸化,活化的Akt能够磷酸化下游效应物如哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物(mTORC),糖原合成酶激酶3 $\beta$ (GSK3 $\beta$ ),调节细胞存活,增殖,生长,凋亡和糖原代谢等<sup>[13]</sup>。在包括卵巢癌、肺癌和胰腺癌在内的许多癌症中都观察到Akt的异常过表达或激活,并且与癌细胞增殖和存活增加相关<sup>[12]</sup>。因此,Akt可为癌症的预防和治疗提供重要途径。

近年来,中药有效成分在肿瘤治疗方面具有显著疗效,且具有不良反应较小等优点,具有较强的应用前景。研究表明,黄芪-白花蛇舌草能够抑制肺癌A549细胞增殖<sup>[14]</sup>;黄酮类(槲皮素),生物碱类(苦参碱),萜类(双氢青蒿素、霞草苷II)等化合物,能够通过PI3K/Akt信号通路对前列腺癌起到一定的治疗保护作用<sup>[15]</sup>;另有研究表明,中药消癌解毒方提取物能够抑制乳腺癌细胞增殖活力、调节细胞周期蛋白表达,且该作用与抑制PI3K/Akt有关<sup>[16]</sup>。

人类通过对肿瘤的长期研究认识到能量代谢

3.5 过表达Akt对毛兰素介导的5637细胞糖酵解抑制作用的影响 与空白组比较,Akt组细胞葡萄糖摄取明显增加,细胞乳酸生成明显增加,差异有统计学意义( $P<0.05$ );空载体加药组葡萄糖摄取和乳酸生成明显受到抑制,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与空载体加药组比较,Akt加药组细胞葡萄糖摄取和乳酸生成明显升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。表明毛兰素能够抑制膀胱癌细胞5637葡萄糖摄取及乳酸生成,过表达Akt能够逆转毛兰素对葡萄糖摄取和乳酸生成的抑制作用。见表6。

的重编程是肿瘤的固有特征。Otto Warburg首先观察到癌细胞即便在有氧环境中也优先选择供能效率极低的糖酵解途径来供能,这便是著名的Warburg效应<sup>[17]</sup>。肿瘤细胞的Warburg效应发生的主要相关机制有信号转导通路异常(主要为PI3K/Akt信号通路),糖酵解酶表达异常,缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ ),癌基因的激活或抑癌基因失活,线粒体氧化磷酸化功能抑制,肿瘤微环境的改变等。其中,PI3K/Akt信号通路是调控Warburg效应的关键分子机制,它能够影响肿瘤细胞的糖酵解过程,促进肿瘤的发生、肿瘤的侵袭转移、肿瘤的存活及控制血管的生成等<sup>[18]</sup>。肿瘤细胞通过Warburg效应生成的大量乳酸,借助单羧酸转运蛋白1(MCT1)输出分泌到细胞外基质,通过多种途径诱导肿瘤细胞发生免疫逃避及诱导血管生成<sup>[19]</sup>。例如,细胞外大量乳酸能够干扰T细胞受体,从而触发p38信号通路激活,导致 $\gamma$ 干扰素(IFN- $\gamma$ )生成受阻,细胞毒性T淋巴细胞(CTLs)效应器功能受损,丧失其杀伤肿瘤细胞的细胞毒效应,导致肿瘤细胞发生免疫逃逸<sup>[19]</sup>;乳酸作为HIF-1 $\alpha$ /血管内皮生长因子(VEGF)信号通路的重要刺激因子,能显著促进血管新生,刺激多种肿瘤细胞膜表面乳酸受体GPR81的表达,这种乳酸介导的GPR81活化通过激活细胞内PI3K/Akt信号通路,增加双调蛋白等促血管形成因子的分泌,促进病理性血管的新生<sup>[20]</sup>。

本实验以膀胱癌细胞5637为目标,研究发现毛兰素对膀胱癌细胞增殖活性具有抑制作用,运用慢病毒载体建立5637细胞Akt稳定过表达株,发现过表达Akt能够逆转毛兰素对膀胱癌细胞5637增殖的抑制作用,表明毛兰素通过PI3K/Akt通路抑制膀胱癌细胞5637增殖,为毛兰素发挥抗肿瘤作用提供了新的靶向依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 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.

[2] 叶小汉, 王忠伟. 紫杉醇联合顺铂治疗膀胱癌的疗效观察 [J]. 数理医药学杂志, 2021, 34(8): 1201-1203.

[3] 陈晓梅, 郭顺星. 石斛属植物化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2001(1): 70-75.

[4] 许莉, 王江瑞, 郭力, 等. 金钗石斛化学成分的研究 [J]. 中成药, 2018, 40(5): 1110-1112.

[5] KAMORY E, KESERU G M, PAPP B. Isolation and antibacterial activity of marchantin A, a cyclic bis (bibenzyl) constituent of hungarian marchantia polymorpha [J]. Planta Med, 1995, 61(4): 387-388.

[6] NG T B, LIU F, WANG Z T. Antioxidative activity of natural products from plants [J]. Life Sci, 2000, 66(8): 709-723.

[7] WANG H, ZHANG T, SUN W, et al. Erianin induces G<sub>2</sub>/M-phase arrest, apoptosis, and autophagy via the ROS/JNK signaling pathway in human osteosarcoma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Cell Death Dis, 2016, 7(6): e2247.

[8] 洪卫, 郭勇, 马胜林, 等. 毛兰素对胃癌细胞SGC-7901端粒酶活性的影响 [J]. 浙江实用医学, 2009, 14(3): 181-182.

[9] 苏鹏, 王晶, 安君霞, 等. 毛兰素对人肝癌Huh7细胞的抑制作用 [J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17

(5): 662-665.

[10] GONG Y Q, FAN Y, LIU L, et al. Erianin induces a JNK/SAPK-dependent metabolic inhibition in human umbilical vein endothelial cells [J]. In Vivo, 2004, 18(2): 223-228.

[11] BARTHOLOMEUSE C, GONZALEZ-ANGULO A M. Targeting the PI3K signaling pathway in cancer therapy [J]. Expert Opin Ther Targets, 2012, 16(1): 121-130.

[12] SONG M Q, BODE A M, DONG Z G, et al. Akt as a therapeutic target for cancer [J]. Cancer Res, 2019, 79(6): 1019-1031.

[13] DATTA S R, BRUNET A, GREENBERG M E. Cellular survival: a play in three Akts [J]. Genes Dev, 1999, 13(22): 2905-2927.

[14] 孙海鹏, 马山, 庄贺, 等. 黄芪-白花蛇舌草抑制肺癌A549细胞增殖机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(19): 28-35.

[15] 罗佳承, 阮豪南, 王露露, 等. 中药成分通过调节PI3K/Akt信号通路在前列腺癌治疗中的研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(9): 1148-1152.

[16] 刘兵, 马英创. 消癌解毒方提取物对乳腺癌细胞增殖活力、细胞周期蛋白、PI3K/Akt通路的调节作用 [J]. 中国处方药, 2021, 19(7): 7-9.

[17] WILDE L, ROCHE M, DOMINGO-VIDAL M, et al. Metabolic coupling and the reverse Warburg effect in cancer: implications for novel biomarker and anticancer agent development [J]. Semin Oncol, 2017, 44(3): 198-203.

[18] GANAPATHY-KANNIAPPAN S, GESCHWIND J F. Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: progress and prospects [J]. Mol Cancer, 2013, 12: 152.

[19] 杨芙蓉, 张雨婷, 陈志鹏, 等. 肿瘤代谢介导的免疫逃逸及血管生成研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2021, 37(6): 756-760.

[20] LI X R, SUN X D, CARMELIET P. Hallmarks of endothelial cell metabolism in health and disease [J]. Cell Metab, 2019, 30(3): 414-433

[责任编辑 张丰丰]