

# PI3K/Akt 通路参与苦参碱抑制 raji 细胞增殖与凋亡过程的机制研究

翟丽娜<sup>1</sup>, 翁翔<sup>1</sup>, 黄强<sup>1,2</sup>

(1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江省人民医院, 浙江 杭州 310014)

**摘要:** [目的] 探讨苦参碱体外诱导非霍奇金淋巴瘤 raji 细胞增殖与凋亡的机制是否与 PI3K/Akt 信号通路有关。[方法] MTT 法检测苦参碱作用后 raji 细胞的增殖抑制率; 流式细胞仪检测苦参碱作用后 raji 细胞的细胞周期的变化; RT-PCR 检测苦参碱作用后 PTEN、Akt、caspase3 等 mRNA 水平的变化; Western blot 检测 PTEN、pBad、Bad、pAkt、Akt、caspase3 等蛋白的表达。[结果] 苦参碱可抑制 raji 细胞的增殖, 随着药物浓度的提高和作用时间的延长, 细胞的增殖抑制率逐渐升高, 与对照组比较, 差异均有显著 ( $P < 0.001$ ); 苦参碱诱导 raji 细胞周期停滞于 G<sub>1</sub> 期 ( $P < 0.05$ ); 苦参碱可通过磷酸化 Akt 来上调 PTEN 的表达, 引起 Bad、p21、p27 等的变化, 与对照组分别比较表达水平差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 最终诱导 caspase 家族级联反应, 引发肿瘤细胞的凋亡。[结论] 苦参碱可通过 PI3K/Akt 信号通路抑制非霍奇金淋巴瘤 raji 细胞的增殖, 诱导 raji 细胞凋亡。

**关键词:** 苦参碱; 非霍奇金淋巴瘤; PTEN; Akt; raji 细胞; 增殖; 凋亡

中图分类号: R733.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2015)06-0517-07

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2015.06.A017

## The Mechanism of Matrine Inhibits Raji Cells Proliferation and Apoptosis via PI3K/Akt Pathway

ZHAI Li-na<sup>1</sup>, WENG Xiang<sup>1</sup>, HUANG Qiang<sup>1,2</sup>

(1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;

2. Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 310014, China)

**Abstract:** [Purpose] To investigate the mechanism of the non-hodgkin's lymphoma raji cells proliferation and apoptosis induced by matrine in vitro, and whether that is associated with PI3K/Akt signaling pathways. [Methods] The raji cells growth inhibition rate treated with matrine was detected by MTT. The distribution of cell cycles was analyzed by Flow cytometry; further, the mRNA change of the PTEN, Akt and caspase3 was quantified by the real time-PCR and the protein expression of PTEN, pBad, Bad, pAkt, Akt and caspase3 was measured by Western blot. [Results] the growth of raji cells inhibited with the increase of drug concentration and the extension of time of Matrine, the cell growth inhibition rate increased (Compared with control,  $P$  all  $< 0.001$ ); Matrine induced the stagnation of the cell cycle in G<sub>1</sub> phase ( $P < 0.05$ ); the expression of PTEN increased by the Akt phosphorylated of Matrine, leading to the change of Bad, p21 and p27, and eventually induced the cascade of caspase family and triggered the apoptosis of tumor cells (compared with control,  $P$  all  $< 0.05$ ). [Conclusion] Matrine could suppress the non-hodgkin's lymphoma raji cells proliferation and induce cell apoptosis through PI3K/Akt pathway.

**Key words:** Matrine; non-hodgkin's lymphoma; PTEN; Akt; raji cells; cell proliferation; apoptosis

苦参碱(matrine)是从豆科类植物苦参、苦豆子、广豆根等几种常用中药中提取的一种有效生物碱, 药理作用广泛, 在抗病毒, 抗心律失常, 抗炎等方面均有一定作用。近年, 抗肿瘤作用成为研究的热点,

苦参碱不仅能改变肿瘤细胞周期, 抑制其生长, 而且能作用于肿瘤细胞内外源性凋亡途径的多个靶点, 引起肿瘤细胞的凋亡, 成为抗肿瘤的靶分子药物<sup>[1,2]</sup>。此外, 在非霍奇金淋巴瘤(non-hodgkin's lymphoma, NHL)的研究中发现磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt)信号通路表达异常, 参与肿瘤细胞增殖与

收稿日期: 2014-10-12; 修回日期: 2014-12-20

通讯作者: 黄强, E-mail: hq4998@yahoo.com

凋亡的过程。因此,本研究旨在通过检测苦参碱在抑制 raji 细胞的增殖与凋亡过程中,PI3K/Akt 信号通路相关分子蛋白的表达变化,来阐明此信号通路可能参与 raji 细胞的增殖与凋亡过程,为临床上非霍奇金淋巴瘤的治疗以及开展信号通路的靶向治疗提供一定的理论依据,也希望通过对信号通路的研究,为 NHL 的治疗带来新的突破。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞及试剂

非霍奇金淋巴瘤细胞株 raji 细胞购自上海细胞库;胎牛血清购自 GIBCO 公司;苦参碱购自北京奥科生物技术有限公司;MTT 试剂盒购自北京美科美生物医学科技有限公司;DMSO 购自美国 Sigma 公司; $\beta$ -actin 抗体、单抗 Akt、pAkt、p21、p27、pBad、Bad、PTEN、caspase3、兔和鼠二抗均购自美国 e-Bioscience 公司。

### 1.2 主要仪器

低温高速离心机为美国 Fisher Scientific 公司产品;精密移液器为法国 Gilson 公司产品;FACS Calibur 购自美国流式细胞仪 Beckman Coulter 公司;ELX-800 酶标仪为 Bio-Tek 公司产品;MACS 细胞分选仪为 MiltenyiBiotec GmbH 公司产品。

### 1.3 细胞培养

将细胞置于含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液中,在 37℃、CO<sub>2</sub> 体积分数为 5%的培养箱中进行培养,2~3d 换液传代 1 次,保证细胞的生长状态。

### 1.4 MTT 检测苦参碱对 raji 细胞的增殖抑制率的影响

用流式细胞仪进行细胞计数,按  $1 \times 10^4$  个/孔在 96 孔板中接种 raji 细胞,分别加入终浓度为 1.0mg/ml、1.5mg/ml 和 2.0mg/ml 的苦参碱,同时设立空白对照组,每组设 3 个复孔,分别记录为对照组(Control)、实验组 M1(1.0 mg/ml)、M2(1.5mg/ml)、M3(2.0 mg/ml)。在药物分别作用 24、48、72 和 96h 后,每孔中加入 5g/L MTT 溶液 20 $\mu$ l,继续培养 4h 后,用 1000r/min 离心 10min 后弃上清,所有孔中均加入 150 $\mu$ l 的 DMSO,于振荡器上振荡 15min 后用酶标仪在 570nm 波长处测定每孔的吸光值(A)。细胞增殖抑

制率(%)=(1-实验组 A 值/对照组 A 值) $\times$ 100%。

### 1.5 流式细胞仪检测苦参碱作用 raji 细胞的细胞周期变化

调整苦参碱(1.0mg/ml)处理 48h 前后 raji 细胞数为  $1 \times 10^6$  个/ml,2 组分别记录为对照组(Control)和实验组(Matrine),取 100 $\mu$ l 细胞悬液与 500 $\mu$ l 碘化丙啶缓冲液(成分包括 450 $\mu$ l H<sub>2</sub>O、0.05mol/L 柠檬酸钠、50 $\mu$ g 碘化丙啶、0.05%Triton、100g/ml RNase)混合,在 4℃下避光放置 30min,用流式细胞仪检测细胞周期的分布变化情况。

### 1.6 RT-PCR 检测苦参碱作用 raji 细胞的 mRNA 变化

收集苦参碱 (1.0mg/ml) 处理 48h 作用前后 raji 细胞,2 组分别记录为对照组(Control)和实验组(Matrine),PBS 洗 2 次。用 Trizol 一步法直接提取总 RNA,并用紫外分光光度计测量提取的 RNA 总量。取 2 $\mu$ g 总 RNA,加入 20 $\mu$ l 逆转录体系(25mM MgCl<sub>2</sub> 2 $\mu$ l、10 $\times$ RT buffer 1 $\mu$ l、10mM dNTP Mixture 2 $\mu$ l、20 $\mu$ mol/L 特异性下游引物 0.5 $\mu$ l、rNase Inhibitor 10 $\mu$ l、AMV Reverse Transcriptase 2.5 $\mu$ l、RNase Free dH<sub>2</sub>O 3.75 $\mu$ l)混匀,经过 50℃ 20min、99℃ 5 min、5℃ 5min 后终止反应,然后直接在逆转录反应产物中加入 40 $\mu$ l PCR 反应体系 (5 $\times$ PCR buffer、TaKaRa ExTaq、20 $\mu$ mol/l 引物 0.5 $\mu$ l、ddH<sub>2</sub>O 29.75 $\mu$ l)并混匀。按照 95℃ 5min、95℃ 1min、65℃ 1min、72℃ 1min、30 个循环、72℃10min 进行反应。反应结束后,取 8 $\mu$ l PCR 产物加上样缓冲液 2 $\mu$ l,在 1.5%琼脂糖凝胶中 80V 电泳 1h,于凝胶成像分析仪上观察结果并对反转产物通过实时定量 PCR 进行定量。

### 1.7 Western blot 检测 PTEN、pAkt、Akt、pBad、Bad、p21、p27 蛋白表达

将 raji 细胞以每瓶  $1 \times 10^6$  的密度接种于培养瓶中,三组分别记录为对照组(Con)、实验组 M1 组、实验组 M2 组。细胞贴壁后弃上清,M1、M2 组分别加入终浓度为 1.0mg/ml、1.5mg/ml 的苦参碱。孵育 24h 后收集所有细胞,4℃ PBS 洗涤 2 次。加入预冷的细胞裂解缓冲液,冰上裂解 15min,裂解产物 4℃ 10000 $\times$ g 离心 30min。上清液用 Bradford 法测蛋白浓度。等量样品以 15%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质。电泳后将蛋白转至硝酸纤维素膜上,将用 5%脱脂奶粉溶液 37℃封闭 2h 后,分别与 pAkt、

Akt、caspase3、PTEN 等一抗 37℃反应 2h,PBST 清洗 2 次,每次 15min,再与辣根酶标记的第二抗体 37℃反应 1h,用 PBST 充分洗涤后,以 DAB 显色,扫描记录,应用抗 actin 抗体确定上样量的一致性。

## 1.8 统计学处理

应用 SPSS 16.0 软件进行数据分析,数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,并采用配对样本  $t$  检验和双因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

# 2 结果

## 2.1 苦参碱作用 raji 细胞的增殖抑制率变化

MTT 结果显示,不同浓度苦参碱作用于 raji 细胞不同时间后吸光值不同,相同作用时间下,吸光值随苦参碱浓度的升高而逐渐降低;相同浓度作用下,吸光值随作用时间的延长而逐渐升高,实验组 M1、M2、M3 分别与对照组(Control)比较,差异均有显著性( $P < 0.001$ )(见 Table 1)。

相同时间作用下,细胞增殖抑制率随苦参碱浓度升高而逐渐增高。苦参碱作用于 raji 细胞 24h 后,实验组 M1 (1.0 mg/ml)、M2 (1.5mg/ml)、M3 (2.0 mg/ml) 组的细胞增殖抑制率分别为 29.69%、32.66%和 38.29%,三组与对照组(Con)比较差异均有显著性( $P < 0.001$ );苦参碱作用 48h、72h、96h 后,相同作用时间下,实验组 M1、M2、M3 与对照组(Con)比较,差异均有显著性( $P < 0.001$ )(见 Table 2)。

相同浓度苦参碱作用时间不同,细胞增殖抑制率不同,作用时间越长,细胞增殖抑制率越高,抑制作用越显著。实验组 M1(1.0 mg/ml)作用 24、48、72 和 96h 后细胞增殖抑制率分别为 29.69%、31.51%、35.96%和 37.08%,与对照组(Con)比较,差异均有显著性( $P < 0.001$ );实验组 M2(1.5mg/ml)、实验组 M3(2.0mg/ml)作用 24、48、72

和 96h 后细胞增殖抑制率与对照组(Con)比较差异也均有显著性( $P < 0.001$ )(见 Table 2)。提示随着苦参碱浓度的不断升高和作用时间的不断延长,raji 细胞的增殖抑制率不断升高(见 Figure 1)。

## 2.2 苦参碱作用 raji 细胞周期变化

结果显示,对照组(Control)的  $G_1$  期细胞占 49.5%,S 期细胞占 25.0%, $G_2$  期细胞占 25.5%;苦参碱作用 48h 后即实验组(Matrine)的  $G_1$  期细胞占 62.9%,S 期细胞占 24.7%, $G_2$  期细胞占 12.4%,实验组与对照组比较  $G_1$  期细胞比例差异有统计学意义 ( $t = 6.842, P = 0.0024$ ); $G_2$  期差异有统计学意义 ( $t =$

Table 1 Raji cell's absorption value treated by matrine in different concentration and time

| Group    | 24h              | 48h              | 72h              | 96h              |
|----------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Control  | 0.7160 ± 0.0655  | 0.8100 ± 0.0436  | 0.8375 ± 0.0267  | 0.8757 ± 0.0132  |
| M1       | 0.5003 ± 0.0171* | 0.6020 ± 0.0456* | 0.6695 ± 0.0388* | 0.6820 ± 0.0937* |
| <i>t</i> | 7.799            | 8.061            | 8.724            | 5.010            |
| M2       | 0.4089 ± 0.0265* | 0.5928 ± 0.0162* | 0.6804 ± 0.0278* | 0.7512 ± 0.0243* |
| <i>t</i> | 10.630           | 11.410           | 9.968            | 11.000           |
| M3       | 0.2675 ± 0.0241* | 0.3618 ± 0.0103* | 0.4492 ± 0.0198* | 0.5276 ± 0.0738* |
| <i>t</i> | 15.730           | 24.450           | 28.570           | 11.370           |

Compared with control group, \*:  $P < 0.001$

Table 2 Raji cell's inhibition rate treated by matrine in different concentration and time

| Group    | 24h(%)        | 48h(%)        | 72h(%)        | 96h(%)         |
|----------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| Control  | 0             | 0             | 0             | 0              |
| M1       | 29.69 ± 6.11* | 31.51 ± 6.72* | 35.96 ± 5.60* | 37.08 ± 10.98* |
| <i>t</i> | 11.890        | 9.296         | 8.726         | 4.927          |
| M2       | 32.66 ± 3.93* | 38.59 ± 5.27* | 40.64 ± 5.31* | 42.18 ± 3.76*  |
| <i>t</i> | 26.580        | 12.350        | 8.587         | 9.236          |
| M3       | 38.29 ± 5.40* | 42.18 ± 3.46* | 46.27 ± 3.87* | 52.77 ± 8.12*  |
| <i>t</i> | 28.201        | 38.960        | 29.230        | 11.990         |

Compared with control group, \*:  $P < 0.001$

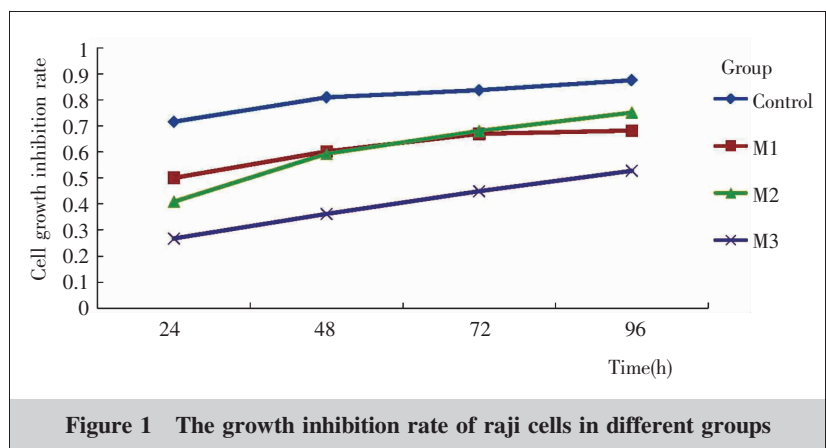


Figure 1 The growth inhibition rate of raji cells in different groups

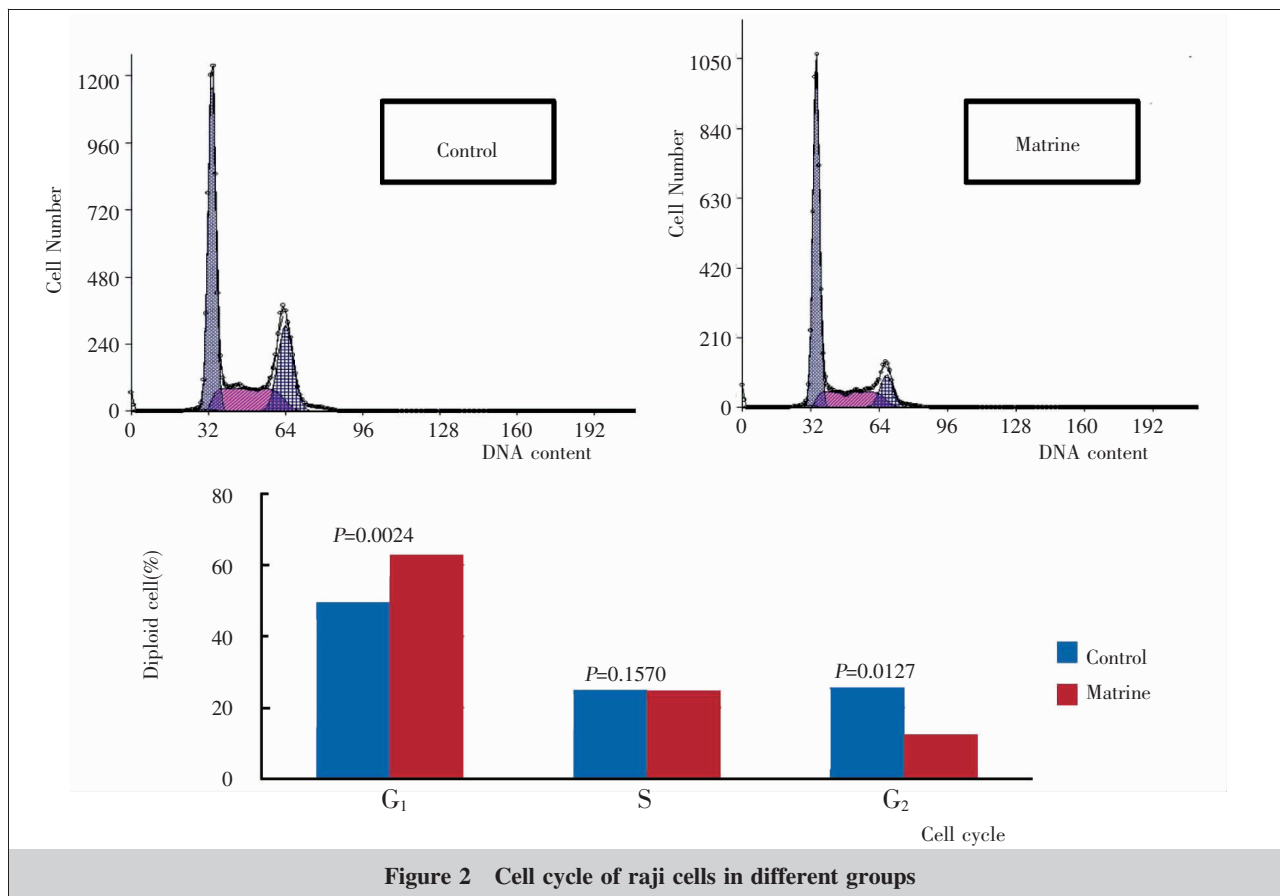


Figure 2 Cell cycle of raji cells in different groups

4.290,  $P=0.0127$ ); S 期差异无统计学意义( $t=1.739$ ,  $P=0.1570$ ) (见 Figure 2)。实验组 G<sub>1</sub> 期前出现明显的凋亡峰, 提示苦参碱可使 raji 细胞发生 G<sub>1</sub> 期阻滞, 使处于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期的细胞数增多, S 和 G<sub>2</sub>/M 期细胞数减少, 从而诱导 raji 细胞的凋亡。

### 2.3 苦参碱作用 raji 细胞内 PTEN、AKt、caspase3 mRNA 表达变化

RT-PCR 结果显示, 实验组(Matrine)与对照组(Control)比较, 苦参碱作用于 raji 细胞 48h 后, 实验组 PTEN 的相对表达量明显高于对照组, 差异有统计学意义( $t=15.610$ ,  $P=0.0039$ ); AKt 的相对表达量明显高于对照组, 差异有统计学意义( $t=1.574$ ,  $P=0.0023$ ); caspase3 的相对表达量也明显高于对照组, 差异有统计学意义( $t=7.116$ ,  $P=0.0188$ ); 即苦参碱作用于 raji 细胞后, raji 细胞内与细胞凋亡相关的 PTEN、caspase3 的表达均明

显上调, AKt 表达也出现一定程度上调, 这可能与 AKt 发挥作用需要的磷酸化负性调节相关(见 Figure 3)。

### 2.4 苦参碱作用 raji 细胞 PTEN、pAKt、AKt、pBad、Bad、p21、p27、caspase3 表达变化

Western blot 结果显示, 苦参碱作用后, 实验组 M1(1.0mg/ml)、M2(1.5mg/ml)与对照组(Control)比较, 随着药物浓度的增高, pBad 相对表达呈下调趋势,

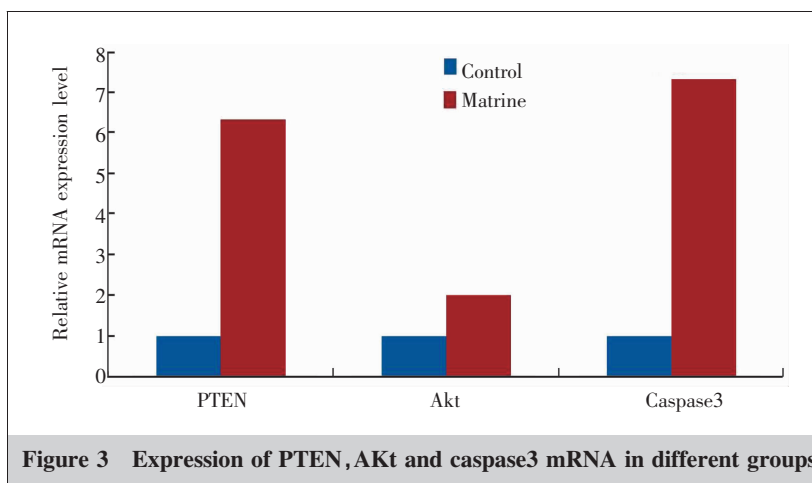


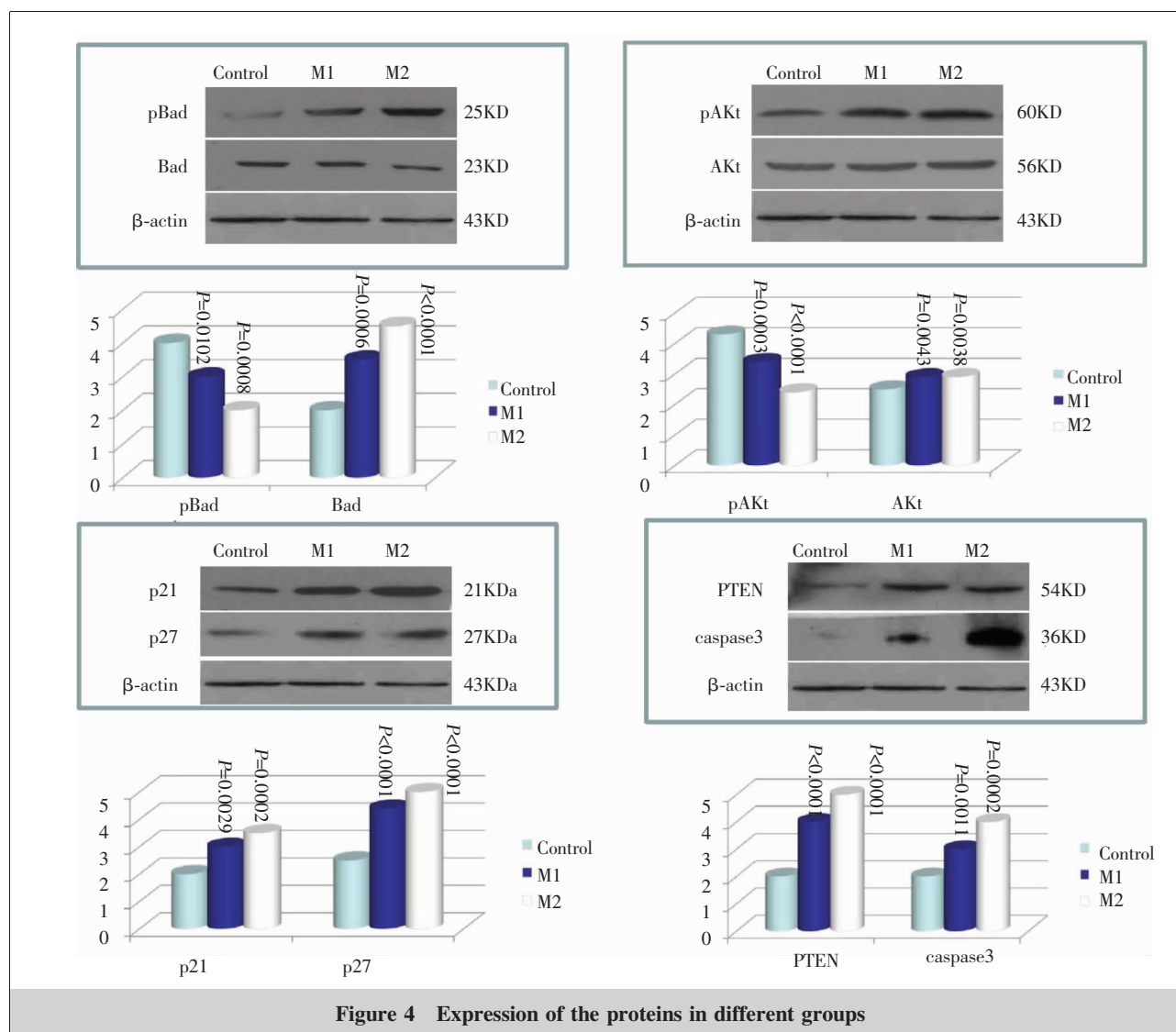
Figure 3 Expression of PTEN, AKt and caspase3 mRNA in different groups

其中 M1、M2 组的相对表达量均明显低于对照组( $t=4.580, P=0.0102$ ;  $t=9.161, P=0.0008$ ); Bad 相对表达呈上调趋势, M1、M2 组的相对表达量均明显高于对照组( $t=10.020, P=0.0006$ ;  $t=22.150, P<0.0001$ ); pAKt 的相对表达呈下调趋势, M1、M2 组的相对表达量均明显低于对照组( $t=11.590, P=0.0003$ ;  $t=22.500, P<0.0001$ ); AKt 相对表达呈上调趋势, 其中 M1、M2 组相对表达量呈现一致性, 均明显高于对照组 ( $t=5.835, P=0.0043$ ;  $t=6.030, P=0.0038$ ); p21、p27 均呈相对表达上调趋势, p21 的 M1、M2 组与对照组比较有显著性差异 ( $t=6.491, P=0.0029$ ;  $t=12.960, P=0.0002$ ), p27 的 M1、M2 组与对照组比较有显著性差异 ( $t=31.380, P<0.0001$ ;  $t=30.931, P<0.0001$ ); PTEN 与 caspase3 也均呈现相对表达上调趋势, M1 组相对表达

量约分别为对照组的 2 倍、2.5 倍, PTEN 的 M1、M2 组与对照组比较有显著性差异( $t=20.362, P<0.0001$ ;  $t=28.523, P<0.0001$ ), caspase3 的 M1、M2 组与对照组比较也有显著性差异 ( $t=8.412, P=0.0011$ ;  $t=13.544, P=0.0002$ )(见 Figure 4)。

### 3 讨论

磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/丝氨酸苏氨酸激酶 (Akt)信号转导通路参与细胞的生长、凋亡等许多重要的生物学过程。研究发现, PI3K/Akt 信号传导通路参与抑制肿瘤细胞凋亡、促进肿瘤细胞增殖等方面, 且与临床肺癌、乳腺癌、结直肠癌、前列腺癌、卵巢癌、肝癌及淋巴瘤等恶性肿瘤的发生发展密切相关<sup>[3]</sup>。当



基因发生变异、PTEN 缺失或生长因子受体的表达增加时均能够激活 PI3K 信号通路,PI3K 信号通路激活后促使 Akt 持续磷酸化,磷酸化的 pAkt 通过诱导抗凋亡蛋白的表达以及磷酸化凋亡调节蛋白从而抑制肿瘤细胞凋亡<sup>[4]</sup>。其中,PTEN 基因编码的产物可使 3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇(PIP3)发生去磷酸化后生成 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇(PIP2),从而负性调节 PI3K/Akt 信号通路,最终参与抑制细胞增殖和促进细胞凋亡<sup>[5]</sup>。研究表明该信号通路是人类肿瘤的发生与发展密切相关,在肿瘤细胞恶性增殖、转移以及对放化疗的拮抗中均起着重要作用,因此 PI3K/Akt 信号通路有望成为恶性肿瘤治疗的新靶点<sup>[6,7]</sup>。

当生长因子、胰岛素等因子作用于细胞膜上的受体可使 PI3K 激活,可诱发其下游底物的级联改变:激活后的 PI3K 作用于细胞膜上的 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇(PIP2)使其转变为 3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇(PIP3),此后,通过激活的磷酸肌醇依赖的蛋白激酶(PDK)激活 Akt,活化的 Akt 分别通过磷酸化 caspase9, FHTR, BAD, GSK-3 等蛋白或酶而达到促进细胞生成和抑制细胞凋亡的作用<sup>[8,9]</sup>。活化的 Akt 可以使 Bad 的 Ser136 位点磷酸化,从而有效阻断细胞凋亡;诱导细胞死亡信号通路酶 caspase9 的前体第 196 位 Ser 磷酸化,阻止 caspase9 对 Apaf-1 的结合与活化作用,使其失活,从而阻断内源性凋亡途径;此外,Akt 也能磷酸化 Bcl-2 家族成员 Bax 的 Ser184 位点,负调控促凋亡功能<sup>[10]</sup>。

细胞的凋亡是一个多分子参与的程序性过程,在凋亡过程中 caspase 家族的激活起着关键的作用。Caspase 家族现已发现有 14 种以上家族成员,目前发现只有 caspase 3、6、7、9 是引起细胞凋亡的具体执行酶,其中 caspase 3 处于枢纽地位,是细胞凋亡的主要效应因子<sup>[11]</sup>。研究发现,线粒体膜断裂释放细胞色素 c,可启动 caspases 酶家族的级联反应,caspase 3 被激活后裂解产生相对分子质量 17 000 大小的活性亚单位,可进一步激活核酸内切酶,使 DNA 裂解破坏,形成 DNA 片段;同时也可消化破坏细胞内多种蛋白酶复合体,破坏细胞的钙泵功能,造成细胞内钙超载,最终导致细胞的不可逆损伤,诱导凋亡<sup>[12]</sup>。

苦参碱是目前临床上选择的高效低毒药物,研究发现其对多种肿瘤如胆囊癌、骨肉瘤等均有重要

作用,主要参与抑制肿瘤细胞的增殖以及诱导肿瘤细胞的凋亡过程。研究表明,苦参碱作用后使 Bcl-2 蛋白表达下调,Bax 蛋白表达增加,Bcl-2/Bax 比例下降,Bcl-2 与 Bax 的异源二聚体减少,Bax 同源二聚体增多,诱发 caspases 家族发生级联反应,最终促使肿瘤细胞凋亡<sup>[13]</sup>。此外,Li 等<sup>[14]</sup>研究发现,苦参碱可以通过下调 miR-21 依次磷酸化 AKt 来上调 PTEN 的表达,引起 Bad、p21、p27 的聚集,从而诱导乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖与凋亡,但对 NHL 的研究中未见此方面的类似报道。

本研究表明,苦参碱作用后 raji 细胞内凋亡相关的 PTEN、caspase3 mRNA 表达相对明显上调,Akt 也出现一定程度的上调,这可能与细胞内 Akt 的磷酸化相关,暗示该过程出现 PI3/Akt 信号通路的负性调节,有待进一步研究确认。此外,苦参碱作用后 raji 细胞 PTEN、pAKt、AKt、pBad、Bad、p21、p27、caspase3 等蛋白的表达变化均出现不同程度的上调或下调,说明苦参碱作用于 raji 细胞的过程,可能与 PI3K/Akt 信号通路的调节相关,具体关系尚需更多的实验研究证实。

在多种 NHL 中,PI3K/Akt 信号通路均有异常表达,针对该通路的靶向药物也逐步应用于 NHL 的治疗<sup>[15]</sup>。Uddin 等<sup>[16]</sup>应用免疫组织化学研究发现,在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)中有 51.5% 的患者有 pAKt 的过度表达,而且与不良预后相关。此外,在 DLBCL 的研究中发现,该通路可能参与 cAMP 相关的细胞凋亡的调控<sup>[17]</sup>。应用 LY294002 抑制 PI3K 可促进线粒体释放细胞色素 C 并激活 caspases,导致 DLBCL 细胞凋亡。研究证明,该通路中的许多位点都可成为治疗肿瘤的靶点,如 PI3K、AKt 和 mTOR 等,但 mTOR 的抑制剂是唯一可用于临床试验阶段的抑制剂<sup>[18]</sup>。近来研究致力于发现新型 mTOR 抑制剂,在动物实验及临床前实验中证实一种称为 TOR 活化位点抑制剂能较纳巴霉素及其衍生物更全面的抑制该通路<sup>[19]</sup>。另一种抑制剂 mTOR-NVP-BEZ235,在治疗 FL 中获得较好疗效<sup>[20]</sup>。

综合实验各个因子和结果来看,苦参碱可显著抑制 raji 细胞增殖,并通过活化 caspase 途径诱导 raji 细胞的凋亡。通过对苦参碱作用于肿瘤细胞过程中,PTEN、pAKt、AKt、caspase3 等的变化,为临床治疗 NHL 提供新的思路,可以尝试将苦参碱与

PI3K/Akt/mTOR 信号转导途径的抑制剂如 LY294002 等联合使用,产生协同作用,进一步提高 NHL 患者的生存率和生存质量。

## 参考文献:

- [1] Liang CZ,Zhang JK,Shi ZL,et al. Matrine induces caspase-dependent apoptosis in human osteosarcoma cells in vitro and in vivo through the upregulation of Bax and Fas/FasL and downregulation of Bcl-2[J]. Cancer Chemother Pharmacol,2012,69(2):317-331.
- [2] Zhang SH,Zhang Y,Zhuang Y,et al. Matrine induces apoptosis in human acute myeloid leukemia cells via the mitochondrial pathway and Akt inactivation[J].PLoS One,2012,7(10):e46853.
- [3] Karar J,Maity A. PI3K/Akt/mTOR pathway in angiogenesis[J].Front Mol Neurosci,2011,4(51):1-7.
- [4] Chao X,Zao J,Xiao YG,et al. Blocking of PI3K/AKT induces apoptosis by its effect on NF- $\kappa$ B activity in gastric carcinoma cell line SGC7901 [J].Biomed Pharm,2010,64(9):600-604.
- [5] Manna P,Jain SK. Hydrogen sulfide and L-cysteine increase PIP3 and glucose utilization by inhibiting PTEN and activating PI3K/AKT/PKC $\zeta$ / $\lambda$  in 3T3L1 adipocytes[J].J Biol Chem,2011,286(46):39848-39859.
- [6] Parsons R. Human cancer,PTEN and the PI-3 kinase pathway[J].Semin Cell Dev Biol,2004,15(2):171-176.
- [7] Yu BH,Zhou XY. Research progress of PI3K/Akt/mTOR signal pathway in malignant tumor [J]. Chinese Journal of Pathology,2005,34(10):674-676.[于宝华,周晓燕. PI3K/Akt/mTOR 的信号传导通路在恶性肿瘤中的研究进展 [J].中华病理学杂志,2005,34(10):674-676.]
- [8] Kong D,Yamori T. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors:promising drug candidates for cancer therapy[J]. Cancer Sci,2008,99(9):1734-1740.
- [9] Song G,Ouyang GL,Bao SD. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival [J]. J Cell Mol Med,2005,9(1):59-71.
- [10] Xin MG,Deng XM. Nicotine inactivation of the proapoptotic function of Bax through phosphorylation [J].J Biol Chem,2005,280(3):10781-10789.
- [11] Choi BH,Kim W,Wang QC,et al. Kinetin riboside preferentially induces apoptosis by modulating Bcl-2 family proteins and caspase-3 in cancer cells [J].Cancer Lett,2008,261(1):37-45.
- [12] Spierings D,McStay G,Saleh M,et al. Connected to death:the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis[J].Science,2005,310 (5745):66-67.
- [13] Zhang ZP,Wang XF,Wu WG,et al. Effects of matrine on proliferation and apoptosis in gallbladder carcinoma cells (GBC-SD)[J].Phytother Res,2012,26(6):932-937.
- [14] Li LQ,Li XL,Wang L,et al. Matrine inhibits breast cancer growth via miR-21/PTEN/Akt pathway in MCF-7 cells [J].Cell Phy Bio,2012,30(3):631-641.
- [15] Zhang XY,Wang X. Roles of signal transduction pathway in Non-Hodgkin's Lymphoma [J].Exp Hematol,2011,19(2):532-536.
- [16] Uddin S,Hussain AR,Siraj AK,et al. Role of phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT pathway in diffuse large B-cell lymphoma survival[J].Blood,2006,108(13):4178-4186.
- [17] Smith PG,Wang F,Wilkinson KN,et al. The phosphodiesterase PDE4B limits cAMP-associated PI3K/AKT-dependent apoptosis in diffuse large B-cell lymphoma [J]. Blood,2005,105(1):308-316.
- [18] Georgakis GV,Younes A. From Rapamycin to rapamycin: targeting PI3K/Akt/mTOR for cancer therapy[J].Expert Rev Anticancer Ther,2006,6(1):131-140.
- [19] Vu C,Fuman DA. Targeting of rapamycin signaling in leukemia and lymphoma[J]. Clin Cancer Res,2010,16( 22): 5374-5380.
- [20] Bhende PM,Park SI,Lim MS,et al. The dual PI3K/mTOR inhibitor,NVP-BEZ235,is efficacious against follicular lymphoma[J].Leukemia,2010,24(10):1781-1784.