

• 基础研究 •

川芎嗪联合顺铂通过调控 PI3K/AKT/mTOR 通路对人肺癌 A549 细胞侵袭能力及线粒体功能的影响*

庞皓玥, 胡凯文, 孙满强, 周天[△]

100029 北京, 北京中医药大学 第二临床医学院(庞皓玥、孙满强); 100078 北京, 北京中医药大学 东方医院 肿瘤科(胡凯文、周天)

[摘要] 目的: 探讨川芎嗪联合顺铂对人肺癌 A549 细胞侵袭能力及线粒体功能的影响。方法: 体外培养人肺癌 A549 细胞, 采用 CCK-8 法检测川芎嗪干预后细胞增殖抑制率并确定川芎嗪高中低浓度, 将细胞分为对照组, 顺铂组及顺铂联合高、中、低浓度川芎嗪组, 分别采用 Transwell 小室实验检测细胞侵袭能力, 透射电镜观察线粒体超微结构, JC-1 试剂盒检测线粒体膜电位变化, Western blot 检测 PI3K/AKT/mTOR 通路相关蛋白表达。结果: 与对照组相比, 川芎嗪呈剂量依赖性抑制肺癌 A549 细胞增殖; 经高、中、低剂量川芎嗪联合顺铂处理细胞 24 h 后, 各组肺癌 A549 细胞侵袭能力下降, 线粒体损伤减轻, 膜电位升高, PI3K/AKT/mTOR 通路蛋白表达降低, 且其效果与剂量呈正相关。结论: 川芎嗪联合顺铂可抑制人肺癌 A549 细胞增殖及侵袭能力, 其可能与改善线粒体功能, 影响癌细胞能量代谢有关。

[关键词] 川芎嗪; 肺癌; 细胞侵袭能力; 线粒体功能

[中图分类号] R734.2 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1674-0904.2021.03.003

引文格式: Pang HY, Hu KW, Sun MQ, et al. Effect of TMP and DDP on invasiveness and mitochondrial function of lung adenocarcinoma A549 cells via PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. J Cancer Control Treat, 2021, 34(3):199-206. [庞皓玥, 胡凯文, 孙满强, 等. 川芎嗪联合顺铂通过调控 PI3K/AKT/mTOR 通路对人肺癌 A549 细胞侵袭能力及线粒体功能的影响[J]. 肿瘤预防与治疗, 2021, 34(3):199-206.]

Effect of TMP and DDP on Invasiveness and Mitochondrial Function of Lung Adenocarcinoma A549 Cells via PI3K/AKT/mTOR Pathway

Pang Haoyue, Hu Kaiwen, Sun Manqiang, Zhou Tian

Second College of Clinical Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China (Pang Haoyue, Sun Manqiang), Department of Oncology, Dongfang Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China (Hu Kaiwen, Zhou Tian)

Corresponding author: Zhou Tian, E-mail: zhoutian_med@163.com

This study was supported by grants from Ministry of Education of the People's Republic of China (No. 2018-JYBZZ-JS101), National Administration of Traditional Chinese Medicine (No. 040101003063), Beijing Municipal Health Commission (No. 2018-1-4201) and Dongfang Hospital of Beijing University of Chinese Medicine (No. 030903010335).

[收稿日期] 2020-07-01 **[修回日期]** 2021-01-29

[基金项目] *中央高校基本科研业务费专项资金(编号: 2018-JYBZZ-JS101); 全国中医药创新人才培养(编号: 040101003063); 首都卫生发展科研专项资金(编号: 2018-1-4201); 北京中医药大学东方医院“1166”人才工程(编号: 030903010335)

[通讯作者] [△]周天, E-mail: zhoutian_med@163.com

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of tetramethylpyrazine (TMP) and cis-diamminedichloroplatinum (DDP) on invasiveness and mitochondrial function of lung adenocarcinoma A549 cells in vitro. **Methods:** A549 cells were cultured in vitro and intervened by TMP. The cell proliferation inhibition rates were detected using CCK-8. The cells were assigned to five groups, the control group, the DDP group, the

DDP + high-dosage TMP group, the DDP + middle-dosage TMP group, and the DDP + low-dosage TMP group. Transwell assay was used to determine the invasion ability of A549 cells. And we observed the mitochondrial structure with transmission electron microscope, assessed changes in mitochondrial membrane potential with 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1), and detected the expression of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway related-proteins by western blotting. **Results:** TMP inhibited the proliferation of A549 cells in a dose dependent manner. After being intervened with TMP and DDP for 24 h, the invasion ability of A549 cells was dose-dependently inhibited, with alleviated mitochondrial damage, increased mitochondrial membrane potential and decreased expressions of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway related-proteins. **Conclusion:** TMP + DDP could inhibit the invasion and proliferation of human lung adenocarcinoma A549 cells, potentially by improving mitochondrial function or affecting energy metabolism of cancer cells.

[**Key words**] Tetramethylpyrazine; Lung cancer; Invasiveness; Mitochondrial function

肿瘤转移是癌症致死的主要原因,如何有效抗转移仍是临床肿瘤治疗难以攻克的关键问题。有研究发现,代谢模式变化在肿瘤转移中必不可少^[1]。癌细胞在有氧状态下,糖酵解途径供能增强,而有氧磷酸化供能比例下降,这种代谢模式可以通过保证缺氧条件下的供能、提供大量合成原料、形成酸性微环境抑制免疫等途径^[2],为癌细胞的侵袭转移创造有利条件。线粒体损伤是肿瘤代谢模式变化的基础,如线粒体内酶表达异常、膜通透性改变、ROS 生成异常等,均有助于肿瘤侵袭转移^[3]。因此,从能量代谢与线粒体损伤角度进行研究,对抑制肿瘤转移侵袭能力具有重要意义。

长期以来,中医活血化瘀法被广泛应用于晚期癌症患者的临床治疗中。川芎嗪(Tetramethylpyrazine, TMP)是经典活血化瘀药川芎的主要成分,具有抑制多种肿瘤细胞增殖的药理作用。顺铂(Cisplatin, DDP)是传统化疗药物,经研究证实, TMP 与 DDP 的联合,可以增强对非小细胞肺癌的抑制作用^[4-6]。本课题组前期研究表明, TMP 联合 DDP 可以调控 Twist 表达,从而抑制细胞增殖^[7],而 PI3K/AKT/mTOR 通路为 Twist 上游,是细胞能量代谢的关键调控因子。因此,本研究从能量代谢角度,探讨 TMP 联合 DDP 的抗肿瘤增殖与转移机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株及试剂

人肺腺癌 A549 细胞株购于上海盖宁生物科技有限公司。TMP 标准品购自上海源叶生物科技有限公司(货号: B20203); DDP 标准品购自上海源叶生物科技有限公司(货号: B24462); JC-1 试剂盒购于江苏凯基生物技术有限公司(货号: KGA602)。一抗: GAPDH monoclonal antibody、mTOR polyclonal Rabbit antibody、Phospho-mTOR (Ser2448) Rabbit Antibody、PI3K p85 Monoclonal antibody、AKT Mono-

clonal antibody 购于 Proteintech 公司(货号: 60004-1-Ig、20657-1-AP、AF3308、60225-1-Ig、60203-2-Ig); 二抗: Goat Anti-Rabbit IgG H + L、Goat Anti-Mouse IgG H + L 购于中杉金桥公司(货号: ZB-2301、ZB-2305)

1.2 细胞培养及分组

人肺腺癌 A549 细胞采用含 10% 胎牛血清、1% 双抗的 DMEM(高糖)培养基于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,每日观察其生长情况,取对数生长期细胞用于实验。将细胞分为空白对照组、DDP 组、DDP 联合高、中、低剂量 TMP 组(DDP + TMP)。根据 CCK-8 实验结果确定 TMP 高、中、低剂量药物浓度, DDP 药物浓度通过查找相关文献确定为 2 μg/mL^[8],药物处理时间 24 h。

1.3 CCK-8 法测定 TMP 对人肺腺癌 A549 细胞增殖的影响

以人肺腺癌 A549 细胞为测试细胞株,选用对数生长期的贴壁肿瘤细胞,用胰酶消化后,以含 10% 胎牛血清的完全培养基重悬细胞,调整细胞密度至 5 × 10⁴ 个/mL,将上述细胞悬液加入 96 孔板,每孔 100 μL,37℃、5% CO₂ 培养 12 h 后细胞贴壁。各实验组孔分别加入 16 mM、8 mM、4 mM、2 mM、1 mM、0.5 mM 梯度浓度的 TMP 标准品,对照组不加入药物,每组设置 6 个复孔,37℃、5% CO₂ 培养 24 h 后进行增殖能力检测。检测时每孔加入 CCK-8 溶液 10 μL,继续置于细胞培养箱中 1 h。采用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔 OD 值,计算各组抑制率。细胞增殖抑制率 = [(对照组平均 OD 值 - 实验组平均 OD 值) / (对照组平均 OD 值 - 空白组平均 OD 值)] × 100%。根据实验结果确定 DDP + TMP 高、中、低剂量组 TMP 的药物浓度。

1.4 TMP 联合 DDP 对肺癌 A549 细胞形态的影响

取对数生长期的肺癌 A549 细胞,以 5 × 10⁵ 个/mL 细胞/孔的密度接种于 6 孔板中,待细胞贴壁生长融合至 75% 以上时,按照分组加入 DDP 及不同浓

度 TMP 处理细胞。将干预后的细胞置于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后,倒置显微镜下(放大倍数为 200 倍)观察细胞形态的变化并拍照。

1.5 Transwell 小室实验测定肿瘤细胞侵袭能力

在 Transwell 小室上室面加入 100 μL 用 DMEM 培养基稀释的 Matrigel(体积稀释比例为 1:8),下室面用移液枪头涂抹 Fibronectin(浓度 0.5 mg/mL),置于 37℃ 培养箱中包被 2 h,使 Matrigel 凝固成胶,4℃ 过夜风干。取对数生长期的 A549 细胞,加入 DDP 及 TMP 处理细胞,用药干预 24 h。接种细胞前拿出小室,吸出小室中残余液体,每小室加入 100 μL DMEM,37℃ 孵育 30 min,水化基底膜。收集各组细胞,重悬于不含胎牛血清的 DMEM 培养液中,调整细胞浓度为 5 × 10⁴ 个/mL 细胞。将各组细胞接种于 Transwell 小室的上室中,接种体积为 200 μL(1 × 10⁴ 个细胞),下室中加入 600 μL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液。37℃、5% CO₂ 培养 24 h 后取出小室,PBS 洗 2 次,加入 4% 多聚甲醛,室温固定 15 min,PBS 洗 2 次,用棉签擦拭小室上室面未穿过小室膜的细胞,用结晶紫染色 15 min 后,在倒置显微镜(放大倍数为 200 倍)下观察穿膜细胞数。实验独立重复 2 次。

1.6 透射电镜观察线粒体超微结构

取各组细胞消化,离心,制备成 1 × 10⁶ 个/mL 细胞,弃上清,留下层细胞,加入 3% 戊二醛固定液固定 2 h,1% 锇酸固定 1 h,逐级乙醇、丙酮脱水后,环氧树脂包埋,超薄切片,经铀、铅双重染色后,1200EX 透射电镜观测各组细胞线粒体超微结构变化。

1.7 JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒检测线粒体膜电位

收集 DDP 及 TMP 干预后各组细胞量为 1 × 10⁶ 个/管,用 PBS 洗涤细胞 2 次(离心 2 000 r/min,5 min),取 100 μL 10 × Incubation Buffer 加 900 μL 灭菌去离子水稀释成 1 × Incubation Buffer,混匀并预热至 37℃,吸取 500 μL 加入 1 μL JC-10,涡旋混匀配成 JC-10 工作液,取 500 μL JC-10 工作液将细胞均匀悬浮,37℃、5% CO₂ 的培养箱中孵育 15 ~ 20 min;室温离心(2 000 r/min,5 min)收集细胞,用 1 × Incubation Buffer 洗两次;吸取 500 μL 1 × Incubation Buffer 重新悬浮细胞;用流式细胞仪检测(Ex = 488 nm;Em = 530 nm)线粒体膜电位,设未经处理的正常细胞为阴性对照组和阳性对照组,根据阴性和阳性对照组的双参数散点图来设定门的位置。实验独立重复 2 次。

1.8 Western blot 检测 PI3K、AKT、mTOR、p-mTOR 的表达

取培养至对数生长期的 A549 细胞,调整细胞密度为 5 × 10⁵ 个/mL 细胞接种于 6 孔板中,待细胞贴壁生长融合至 75% 以上时,加入 DDP 及相应浓度的 TMP 干预细胞,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 24 h。各组细胞加入细胞裂解液(RIPA:PMSF = 100:1),用细胞刮刀刮下,收集至离心管,冰上裂解 25 min 后,12 000 r/min,4℃,离心 10 min,取上清液为蛋白样品,采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度,将蛋白样品加入 5 × 蛋白上样缓冲液,置于 100℃ 水浴中变性 5 min。SDS-PAGE 分离蛋白,根据目的蛋白的相对分子量配制相应的分离胶浓度(10%)。加样后分别进行蛋白电泳、蛋白电转移至 PVE 膜,5% 脱脂奶粉常温封闭 1.5 h。将封闭后的膜按照目标蛋白所处位置进行剪切,分别加入对应的一抗 PI3K(1:1 000)、AKT(1:1 000)、mTOR(1:1 000)、p-mTOR(1:1 000),4℃ 反应过夜。TBST 洗膜 3 次,5 min/次;根据一抗的种属选择相应的二抗(Goat Anti-Rabbit IgG、Goat Anti-Mouse IgG,稀释比例为 1:10 000)37℃ 孵育 2 h。最后 ECL 发光、显影、拍照。相对蛋白含量用各蛋白条带灰度值/内参蛋白条带的灰度值来表示。实验独立重复 2 次。

1.9 统计学方法

运用软件 SPSS 17.0 进行分析统计,计量资料采用均数 ± 标准差表示。多组均数比较采用单因素分析,*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TMP 对人肺癌 A549 细胞增殖的影响,确定给药浓度

CCK-8 结果显示,运用梯度浓度 TMP 干预肺癌 A549 细胞后,细胞增殖抑制率呈剂量依赖性,随着 TMP 浓度升高,其增殖抑制率也增高。与对照组相比,TMP 对 A549 肺癌细胞的抑制差异具有统计学意义(*P* < 0.001)。取 TMP 干预肺癌 A549 细胞的近半数抑制浓度,确认 TMP 高、中、低给药剂量分别为 2 mM、1 mM、0.5 mM(表 1)。

2.2 TMP + DDP 对 A549 肺癌细胞形态的影响

各组细胞生长状况良好,细胞呈细长梭形,细胞间排列紧密形成集落。实验组细胞随药物浓度的增高数量减少,形态改变;其中 DDP + TMP(2 mM)组、DDP + TMP(1 mM)组、DDP + TMP(0.5 mM)组细胞由具有较高侵袭能力的细长梭形变为侵袭能力较弱

的圆形,细胞体积缩小,部分可见细胞核固缩,胞浆内可见颗粒和碎片,细胞生长明显受到抑制(图 1)。

表 1 CCK-8 测定 TMP 对肺癌 A549 细胞增殖的抑制作用 (N=6)

Table 1. Inhibition of the Proliferation of Lung Adenocarcinoma A549 Cells by TMP Detected by CCK-8 (N=6)

Group	Dose (mM)	Inhibition (%)
Control	-	0.00 ± 0.00
TMP 1	0.5	24.40 ± 11.56 ^a
TMP 2	1	30.75 ± 13.39 ^a
TMP 3	2	45.98 ± 7.83 ^a
TMP 4	4	65.92 ± 5.87 ^a
TMP 5	8	78.56 ± 7.38 ^a
TMP 6	16	88.55 ± 8.11 ^a

^a Compared with the control group, *P* < 0.001.

TMP: Tetramethylpyrazine.

2.3 TMP + DDP 对 A549 细胞侵袭能力的影响

Transwell 小室法检测结果显示,与对照组相比,各实验组细胞均可使穿过铺有人工基质 Matrigel 滤膜的细胞数量明显降低,DDP + TMP (2mM) 组细胞穿膜数量最低。随着 TMP 浓度的增高,细胞侵袭数逐渐减少,侵袭抑制作用逐渐增强,且穿膜面细胞形态趋于圆形(图 2)。

2.4 TMP + DDP 对 A549 细胞线粒体结构的影响

运用透射电镜观察各组癌细胞线粒体结构可见,与对照组相比,应用 DDP 使细胞内出现大量空泡坏死,线粒体多呈圆形,双层膜结构模糊,线粒体嵴数量较少,排列紊乱,肌节断裂;联合应用 TMP 后,细胞内线粒体形状趋于椭圆形,且随 TMP 剂量增高,线粒体形态更加饱满,线粒体嵴数量较多,排列较清晰(图 3)。

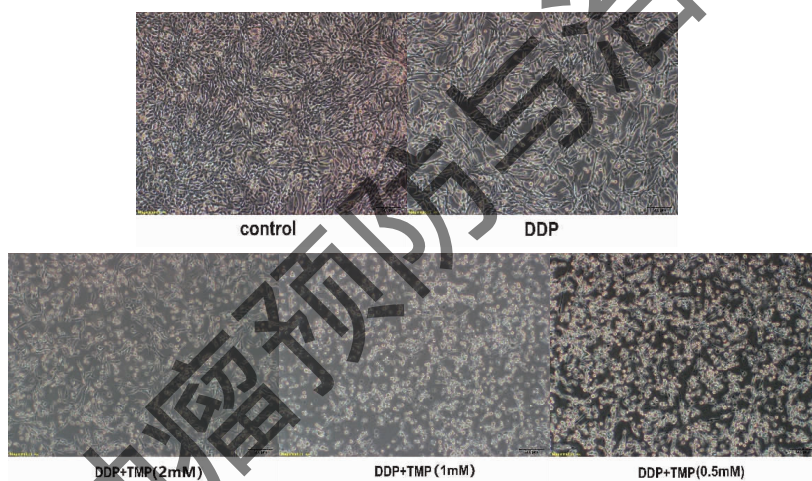


图 1 不同浓度 TMP + DDP 对于 A549 细胞形态的影响 (×200)

Figure 1. Effects of DDP + Different Concentrations of TMP on the Morphology of A549 Cells (×200)

DDP: Cis-diamminedichloroplatinum; TMP: Tetramethylpyrazine.

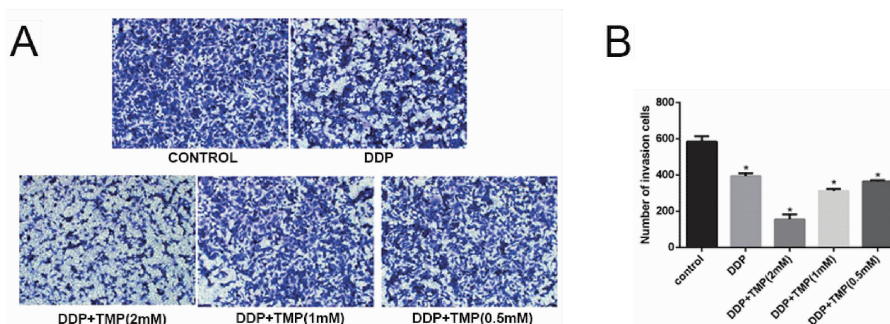


图 2 不同浓度 TMP + DDP 对于 A549 细胞侵袭能力的影响 (×200)

Figure 2. Effects of DDP + Different Concentrations of TMP on the Invasion Ability of A549 Cells (×200)

A. A549 cells under an inverted microscope in Transwell invasion assay; B. Number of invasion cells in Transwell invasion assay.

^{*} Compared with the control group, *P* < 0.05.

Abbreviations as indicated in Figure 1.

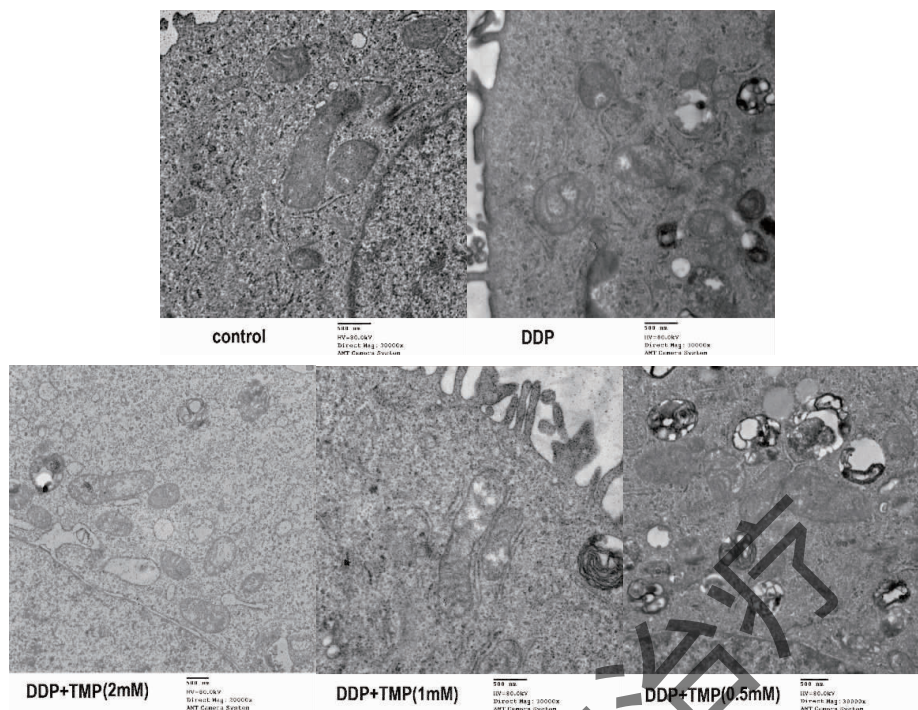


图 3 电镜观察不同浓度 TMP + DDP 干预 A549 细胞线粒体结构 (×30 000)
 Figure 3. Effects of DDP + Different Concentrations of TMP on the Mitochondrial Structure of A549 Cells (×30,000)
 Abbreviations as indicated in Figure 1.

2.5 TMP + DDP 对 A549 细胞线粒体膜电位的影响

JC-1 法检测线粒体膜电位显示,与对照组相比,各组线粒体膜电位均显著降低 ($P < 0.05$),但 DDP + TMP 组线粒体膜电位较 DDP 组升高,且随

TMP 浓度升高,线粒体膜电位有升高的趋势,DDP + TMP(2mM)组较 DDP 组线粒体膜电位升高差异有统计学意义, $P < 0.05$ (图 4)。

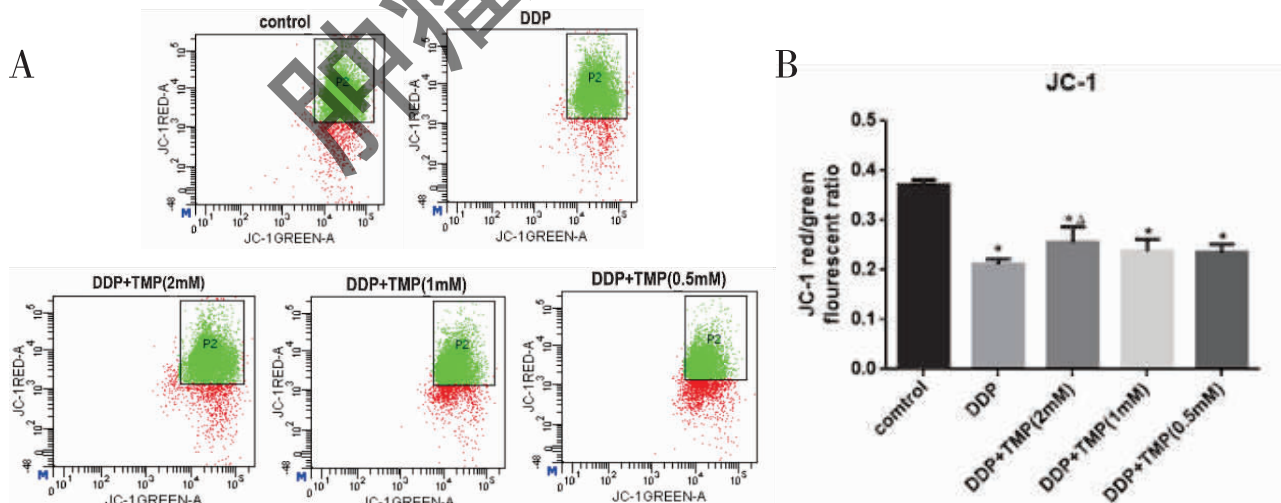


图 4 不同浓度 TMP + DDP 干预 A549 细胞线粒体膜电位变化 (JC-1)
 Figure 4. Effects of DDP + Different Concentrations of TMP on Mitochondrial Membrane Potential of A549 Cells (JC-1)
 A. Mitochondrial membrane potential detected by flow cytometry; B. JC-1 red/green fluorescent ratio indicating mitochondrial membrane potential.

* Compared with the control group, $P < 0.05$; [△] Compared with the DDP group, $P < 0.05$.

JC-1: 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide; other abbreviations as indicated in Figure 1.

2.6 TMP + DDP 对 A549 细胞 PI3K、AKT、mTOR、p-mTOR 蛋白表达的影响

Western blot 检测 PI3K/AKT/mTOR 通路蛋白, 结果显示(图 5), 与对照组相比, DDP 组及 DDP + TMP 组均可下调 PI3K、AKT、mTOR、p-mTOR 蛋白表达($P < 0.05$)。DDP + TMP 组在降低各蛋白表达方

面优于单独应用 DDP 组, 且随 TMP 浓度升高, 各蛋白表达量呈现降低的趋势。与 DDP 组相比, DDP + TMP(2mM) 组可明显下调 PI3K、mTOR 和 p-mTOR 蛋白表达($P < 0.05$), DDP + TMP(1mM) 组可下调 mTOR、p-mTOR 蛋白表达($P < 0.05$)。

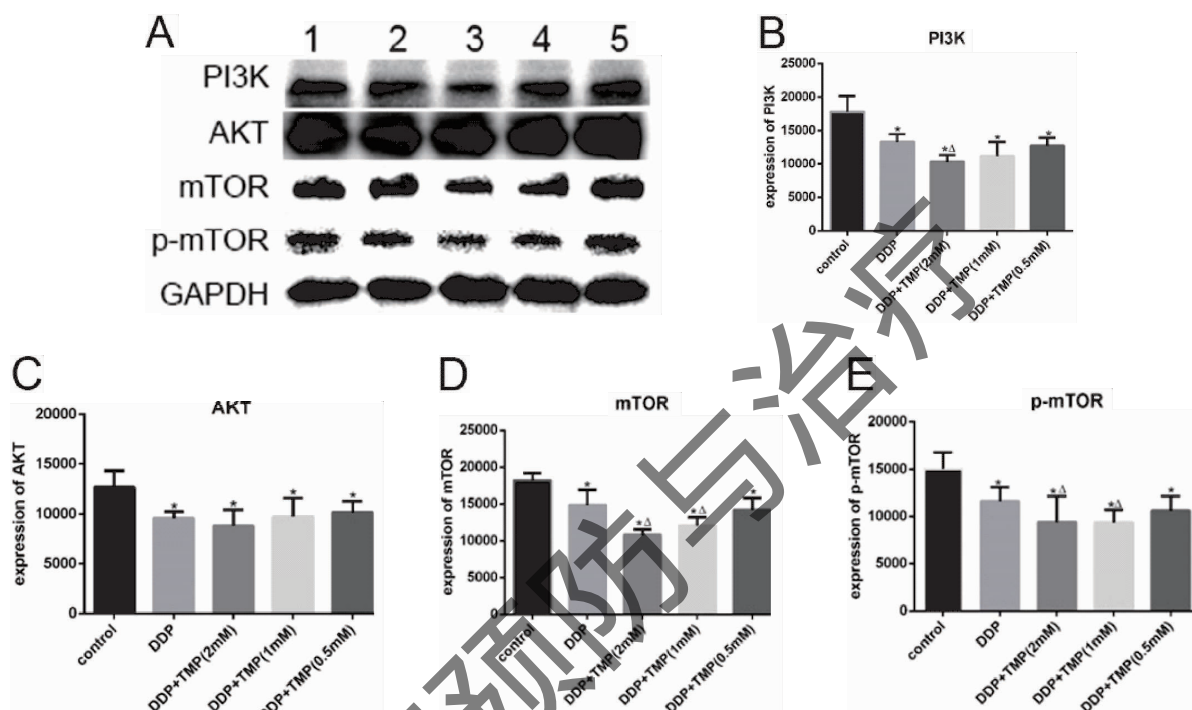


图 5 DDP + TMP 对 A549 细胞内 PI3K/AKT/mTOR 信号通路表达的影响

Figure 5. Effect of TMP + DDP on the Expression of PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway Related-Proteins in A549 Cells

A. Expressions of PI3K, AKT, mTOR, p-mTOR and GAPDH proteins in western blotting; B. Expression of PI3K; C. Expression of AKT; D. Expression of mTOR; E. Expression of p-mTOR.

* Compared with the control group, $P < 0.05$; ^ Compared with the DDP group, $P < 0.05$.

Abbreviations as indicated in Figure 1.

3 讨论

近年来,有关癌细胞能量代谢特征的研究受到越来越多重视,能量代谢重构被认为参与了癌症的增殖、侵袭与转移过程。早在 1920s,科学家发现肿瘤细胞能量代谢的糖酵解途径异常活跃,并认为其与线粒体损伤有关^[9]。肿瘤细胞极活跃的代谢活动,造成周围环境的缺氧状态,而癌细胞线粒体功能受损,促进了糖酵解途径供能,保证了肿瘤生长及转移的能量需求^[10]。线粒体功能受损还与肿瘤细胞抵抗凋亡、逃避免疫监督等有助于肿瘤转移的特性密切相关^[11]。这使靶向线粒体的治疗手段成为近年来肿瘤治疗领域的热点。

中医对癌症常伴有血瘀状态的认知,与肿瘤周围低氧、酸性微环境的形成十分相似。研究表明,活血化瘀中药可以通过抑制血管生成,改善乏氧微环境等机制,发挥抗肿瘤作用^[12]。而癌细胞有氧糖酵解的能量代谢异常,增强了其对周围环境的适应性。因此,我们推测中医活血化瘀药改善乏氧微环境状态,从根本上改变了线粒体损伤的环境压力,从而使线粒体有氧代谢的功能恢复,抑制糖酵解的发生,最终控制肿瘤生长转移。研究显示,活血化瘀中药改善缺氧环境作用与 PI3K/AKT/mTOR 信号通路密切相关^[13]。其中,AKT 磷酸化后可降低线粒体 ATP 的消耗,使组织维持较低的线粒体膜电位,进而减少钙离子进入线粒体和再灌注初期活性氧的生成^[14]。

因此,PI3K/AKT/mTOR 通路很可能是活血化瘀中药调节线粒体功能发挥抗肿瘤作用的关键机制。目前该研究思路还鲜有报道,值得深入挖掘。

TMP 是传统中医活血药川芎、当归的主要成分,可以通过改善血液高凝状态、抗肿瘤血管生成,改善乏氧微环境等方面抑制肿瘤细胞的增殖及转移^[15]。DDP 是治疗非小细胞肺癌常用的化疗药物,其通过阻碍肿瘤细胞 DNA 复制,从而抑制细胞的有丝分裂,虽然抗肿瘤效果明显但毒性较强。TMP 与 DDP 联合使用,不仅能增强抗肿瘤效果,还能降低化疗药物引起的毒副作用,多项研究支持 TMP 联合 DDP 在肺癌治疗领域良好的应用前景^[16-17]。本研究拟从改善肿瘤代谢角度,阐述 DDP 联合 TMP 抑制肺癌细胞过程中 TMP 发挥的作用。

本研究首先通过 CCK-8 法确定 TMP 的用药浓度,再观察 TMP 联合 DDP 对肿瘤细胞生长侵袭能力的影响。经 TMP 及 DDP 干预 24 h 后,显微镜下观察肺癌 A549 细胞体积缩小,变为圆形,部分细胞内可见颗粒和碎片,细胞增殖速度减慢,与对照组形成较大差异。Transwell 小室侵袭实验显示,各实验组细胞穿膜数量均少于对照组($P < 0.05$),且 TMP 联合 DDP 对细胞穿膜的抑制明显增强。以上结果说明 TMP 联合 DDP 可以抑制 A549 细胞的生长及侵袭,且随 TMP 剂量升高效用更加明显。因此可以推测,TMP 联合 DDP 增强了对 A549 细胞增殖及侵袭能力的抑制作用,较单独应用 DDP 效果更佳,且表现出剂量依赖性。

线粒体功能正常有赖于其结构的完整,已有的研究显示,肿瘤细胞的线粒体普遍存在 DNA 突变,拷贝数变化、线粒体膜稳定性以及线粒体结构动态改变等结构异常,而线粒体功能随之发生紊乱,并与实体肿瘤的发生发展密切相关^[18]。如线粒体膜电位发生改变,增加抗凋亡蛋白的表达,延长肿瘤细胞寿命,减少转移侵袭过程中的损耗^[19]。本研究通过透射电镜观察各组细胞线粒体结构发现,单独使用 DDP 后细胞主要发生空泡坏死,线粒体受损,表现为嵴数量较少且排列紊乱;联合应用 TMP 后,线粒体形态更为饱满,且形状趋于椭圆形,可见排列清晰的嵴。这提示 TMP 可以降低线粒体损伤程度,使其发挥正常功能。同时,本研究还对线粒体膜电位进行了检测,结果发现,与对照组相比,DDP 及 DDP + TMP 组线粒体膜电位均显著下降($P < 0.05$),但联合应用 TMP 使线粒体膜电位较单独应用 DDP 有所升高,且随 TMP 浓度升高,线粒体膜电位有升高的

趋势,其中,高剂量组线粒体膜电位升高较为明显($P < 0.05$)。因此,我们推测 TMP 可以促进线粒体的正常功能,从而影响肿瘤细胞代谢。

PI3K/AKT 通路是调控细胞能量代谢的经典通路,研究表明,其可以通过调节缺氧诱导因子 HIF-1 α 表达,从而调控癌细胞的能量代谢模式,增加癌细胞对周围乏氧环境的适应性^[20]。mTOR 是 PI3K/AKT 下游的关键激酶,PI3K/AKT/mTOR 通路可以上调癌细胞糖酵解相关酶的活性,加强糖酵解过程^[21]。另有一项三阴性乳腺癌细胞的研究显示,AKT 的激活可以调节癌细胞的线粒体代谢和氧化磷酸化^[22]。本研究利用 Western blot 检测肺癌 A549 细胞 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的蛋白表达发现,TMP 联合 DDP 可使肺癌 A549 细胞内 PI3K、AKT 及 mTOR 蛋白表达均显著降低($P < 0.05$),TMP 联合 DDP 组对 PI3K/AKT/mTOR 通路的抑制作用要优于单独应用 DDP 组,且呈浓度依赖性。同时,mTOR 磷酸化修饰(p-mTOR)减少,即 mTOR 蛋白活性也受到了影响。这提示 TMP 联合 DDP 增强了对 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的抑制作用,与肺癌 A549 细胞的线粒体功能及能量代谢改变相关。

综上所述,TMP 联合 DDP 能抑制肿瘤细胞增殖及侵袭能力,其机制可能通过调节 PI3K/AKT/mTOR 通路,改善线粒体功能,进而使癌细胞能量代谢模式发生改变,发挥联合抗肿瘤作用。

作者声明:本文全部作者对于研究和撰写的论文出现的不端行为承担相应责任;并承诺论文中涉及的原始图片、数据资料等已按照有关规定保存,可接受核查。

学术不端:本文在初审、返修及出版前均通过中国知网(CNKI)科技期刊学术不端文献检测系统的学术不端检测。

同行评议:经同行专家双盲外审,达到刊发要求。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

文章版权:本文出版前已与全体作者签署了论文授权书等协议。

[参考文献]

- [1] Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism[J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11(2): 85-95.
- [2] San-Millan I, Brooks GA. Reexamining cancer metabolism: Lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect[J]. Carcinogenesis, 2017, 38(2):

- 119-133.
- [3] 李琪, 陈斌, 秦泽莲. 线粒体功能障碍的原因及其对肿瘤作用的研究进展[J]. 中国微创外科杂志, 2016, 16(12): 1150-1154.
- [4] 姜雪滨, 尹晓芹, 宋芳华, 等. 川芎嗪联合顺铂对老年肺癌患者 SDF-1/Livin 与 MMPs 表达的影响[J]. 河北医药, 2019, 41(5): 667-670.
- [5] 王布, 张志华, 顾鑫, 等. 川芎嗪注射液联合顺铂注射剂对 Lewis 肺腺癌小鼠移植瘤生长及血管生成的抑制作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 32(22): 2085-2088.
- [6] 张长洪, 张志林, 张志华, 等. 川芎嗪联合顺铂对 Lewis 肺腺癌小鼠抑制生长的作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(11): 942-945.
- [7] 迟笑怡, 周天, 胡凯文, 等. 盐酸川芎嗪联合顺铂对小鼠 Lewis 肺癌细胞黏附能力的影响[J]. 肿瘤学杂志, 2018, 24(5): 411-417.
- [8] Huang CS, Huang AC, Huang PH, *et al.* Synergistic antitumor effect of oligogalacturonides and cisplatin on human lung cancer A549 cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6): 1769.
- [9] Warburg OH. The classic: The chemical constitution of respiration ferment [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2010, 468(11): 2833-2839.
- [10] 霍宏宇, 胡苏琼, 孙洋, 等. 肿瘤微环境及其能量代谢的重编程[J]. 生命科学. 2017(01): 70-76.
- [11] Yi HS, Chang JY, Kim KS, *et al.* Oncogenes, mitochondrial metabolism, and quality control in differentiated thyroid cancer [J]. *Korean J Intern Med*, 2017, 32(5): 780-789.
- [12] 闫梓乔, 张佳艺, 顾伟, 等. 活血化瘀中药调节肿瘤微环境研究进展[J]. 中医药导报, 2019, 25(5): 120-123.
- [13] Li Q, Shen L, Wang Z, *et al.* Tanshinone IIA protects against myocardial ischemia reperfusion injury by activating the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84: 106-114.
- [14] 张月红, 林辉, 徐大量, 等. 丹参饮提取物 A 通过 PI3K-Akt 信号通路抗细胞凋亡机制的研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(4): 473-477.
- [15] 迟笑怡, 周天, 胡凯文. 川芎对恶性肿瘤侵袭与转移影响研究进展[J]. 中医学报, 2019, 34(3): 495-500.
- [16] 杨佳慧, 呼佩霓, 官颖, 等. 川芎嗪拮抗顺铂耳毒性损伤耳蜗 STAT1 表达的实验研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(6): 1318-1320, 1327.
- [17] 来岳标, 姚庆华. 川芎嗪对肺癌顺铂耐药细胞 A549/DDP 凋亡的影响 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2019, 29(1): 21-24, 18.
- [18] 徐冰洁, 何昌龙, 赵静, 等. 线粒体功能紊乱与肿瘤 [J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26(5): 772-776.
- [19] Lu JR, Tan M, Cai QS. The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism [J]. *Cancer Lett*, 2015, 356(2 Pt A): 156-164.
- [20] Xie YB, Shi XF, Sheng K, *et al.* PI3K/Akt signaling transduction pathway, erythropoiesis and glycolysis in hypoxia [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(2): 783-791.
- [21] Corti F, Nichetti F, Raimondi A, *et al.* Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in biliary tract cancers: A review of current evidences and future perspectives [J]. *Cancer Treat Rev*, 2019, 72: 45-55.
- [22] Hossain F, Sorrentino C, Ucar DA, *et al.* Notch signaling regulates mitochondrial metabolism and NF-kappa B activity in triple-negative breast cancer cells via IKK alpha-dependent non-canonical pathways [J]. *Front Oncol*. 2018, 8: 575.