

中图分类号: R965; R979.1

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2024)17-0061-05

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.17.015



壁虎多肽混合物对人非小细胞肺癌 H1299 细胞增殖和凋亡的影响*

姚志新, 刘嘉欣[△], 朱桂芬, 黄慧贤, 陈少娜

(广州中医药大学第一附属医院·广东省中医临床研究院, 广东 广州 510405)

摘要:目的 探讨壁虎多肽混合物(GPM)对人非小细胞肺癌 H1299 细胞增殖和凋亡的影响。方法 实验设正常对照组(等体积基础培养液)和 GPM 高、低剂量组(20, 10 mg/mL), 采用 CCK-8 法检测细胞增殖情况, 采用流式细胞术检测细胞凋亡情况, 采用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)法和免疫印迹(Western blot)法检测 B-细胞淋巴瘤因子 2(Bcl-2)、Bcl-2 关联 X 蛋白(Bax)、磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)mRNA 及蛋白表达水平。结果 与正常对照组比较, GPM 高、低剂量组 H1299 细胞存活率均显著降低($P < 0.01$), 细胞凋亡率均显著升高($P < 0.01$), PI3K 和 Bax mRNA 及蛋白表达水平均显著降低($P < 0.01$), Bcl-2 mRNA 及蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$)。结论 GPM 能抑制 H1299 细胞的增殖, 其作用机制可能与调控 PI3K, Bax, Bcl-2 mRNA 及蛋白的表达相关。

关键词:壁虎多肽混合物; 非小细胞肺癌; 磷脂酰肌醇-3-激酶; B-细胞淋巴瘤因子 2; Bcl-2 关联 X 蛋白

Effect of Gecko Peptides Mixture on the Proliferation and Apoptosis of Human Non - Small Cell Lung Cancer H1299 Cells

YAO Zhixin, LIU Jiaxin, ZHU Guifen, HUANG Huixian, CHEN Shaona

(The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine·Guangdong Clinical Research Academy of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, China 510405)

Abstract: Objective To investigate the effect of gecko peptides mixture (GPM) on the proliferation and apoptosis of human non - small cell lung cancer (NSCLC) H1299 cells. **Methods** The experiment was conducted with the normal control group (equal volume of basic culture medium), high - dose and low - dose GPM groups (20, 10 mg / mL). CCK - 8 method was used to detect cell proliferation. The flow cytometry was used to detect cell apoptosis. Real - time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT - qPCR), Western blot were used to detect the expression levels of B - cell lymphoma factor 2 (Bcl - 2), Bcl - 2 associated X protein (Bax), and phosphatidylinositol 3 - kinase (PI3K) mRNA and protein. **Results** Compared with those in the normal control group, the cell survival rate of H1299 cells significantly decreased ($P < 0.01$), while the cell apoptosis rate significantly increased in the high - dose and low - dose GPM groups ($P < 0.01$). The expression levels of PI3K and Bax mRNA and protein significantly decreased ($P < 0.01$), while the expression levels of Bcl - 2 mRNA and protein significantly increased in the high - dose and low - dose GPM groups ($P < 0.05$). **Conclusion** GPM can inhibit the proliferation of H1299 cells, and its mechanism may be related to the regulation of the PI3K, Bax, Bcl - 2 mRNA and protein expression.

Key words: gecko peptides mixture; non - small cell lung cancer; phosphatidylinositol 3 - kinase; B - cell lymphoma factor - 2; Bcl - 2 associated X protein

*基金项目: 广东省中医药局科研项目[20221152]。

第一作者: 姚志新, 男, 主管中药师, 研究方向为医院中药学和临床中药学, (电子信箱)2838988253@qq.com。

[△]通信作者: 刘嘉欣, 女, 大学本科, 主管中药师, 研究方向为中药鉴定学和临床中药学, (电子信箱)26828070@qq.com。

[17] ZHU R, NASU K, HIJIYA N, et al. Hsa - miR - 199a - 3p inhibits motility, invasiveness, and contractility of ovarian endometriotic stromal cells [J]. Reprod Sci, 2021, 28 (12): 3498 - 3507.

[18] 张玉萍, 郝芳, 刘丽, 等. 子宫内膜异位症患者血浆中 TXA₂、tPA 水平与预后的相关性研究[J]. 中国计划生育学杂志, 2019, 27(8): 1015 - 1018.

[19] MIHALYI A, GEVAERT O, KYAMA CM, et al. Non - invasive diagnosis of endometriosis based on a combined analysis of six plasma biomarkers[J]. Hum Reprod, 2010, 25(3): 654 - 664.

[20] PATEISKY P, PILS D, SZABO L, et al. Hsa - miRNA - 154 - 5p expression in plasma of endometriosis patients is a potential

diagnostic marker for the disease [J]. Reprod Biomed Online, 2018, 37(4): 449 - 466.

[21] ZHOU S, HUANG CY, WANG W, et al. miR - 370 - 3p inhibits the development of human endometriosis by downregulating EDN1 expression in endometrial stromal cells [J]. Cell Biol Int, 2021, 45(6): 1183 - 1190.

[22] YANG RQ, TENG H, XU XH, et al. Microarray analysis of microRNA deregulation and angiogenesis - related proteins in endometriosis [J]. Genet Mol Res, 2016, 15(2): 826 - 834.

[23] 高巍, 张莉, 翟丽丽, 等. IL - 6, TNF - α , VEGF, MCP - 1 因子在子宫内膜异位症患者血清中的表达及临床意义 [J]. 宁夏医科大学学报, 2016, 38(6): 696 - 698.

(收稿日期: 2023 - 08 - 22; 修回日期: 2024 - 03 - 23)

肺癌是全球发病率和死亡率最高的恶性肿瘤^[1],是我国癌症致死的主要疾病,其中非小细胞肺癌(NSCLC)占肺癌发病率的80%,超过65%的患者晚期会出现转移^[2]。有研究显示,NSCLC患者出现神经系统症状的脑转移患者自然病程约为1个月,采用全脑放射辅以地塞米松治疗可促使中位生存期延长3~6个月^[3],但总体预后仍不佳。近年来,我国在肺癌的诊治方法上虽取得了较大进展,但仍存在早期诊断困难、手术根治率低、预后差等问题,导致其发病率和致死率仍呈上升趋势。肺癌属中医“肺积”“肺岩”“息贲”等范畴,治疗原则为扶正为正,祛邪为标,标本兼治。壁虎多肽混合物(GPM)是守宫抗癌的有效物质,性寒,味咸,小毒,有祛风、定惊、散结、解毒等功效。现代药理学研究表明,壁虎中的蛋白质类大分子化合物是抑制肺癌的有效成分^[4-5],临床常用于治疗NSCLC,分离纯化后的GPM具有广谱抗癌活性和抗癌选择性^[6-8],且中、低剂量对正常细胞无明显影响^[9-10]。故本研究中探讨了GPM对NSCLC的作用机制,旨在为开发新型抗肺癌药物提供理论依据。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与细胞

仪器:SW-CJ型超净台(苏州净化仪器厂);AE2000型倒置相差显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司);GenSpeed 416型低速离心机(美国Gene公司);GelDoc凝胶成像系统(美国Biorad公司);CMax Plus型酶标仪(美国Molecular Devices公司);Finpipette F1型可变量程移液器(美国Thermo Fisher公司)。

试剂:壁虎干粉(南京道斯夫生物科技有限公司,批号为20180801);CCK-8试剂盒(日本同仁化学研究所,批号为GB904);磷酸盐缓冲液(PBS,批号为8223512),胰酶(批号为1938787),澳洲胎牛血清(FBS,批号为8227841),1640 DMEM高糖培养基(批号为8198451),均购于美国Gibco公司;Tris-HCl缓冲液(上海源叶生物科技有限公司,批号为220309142);BCA试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司,批号为220309142);实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号为ml077691);B-细胞淋巴瘤因子2(Bcl-2)抗体(批号为2232514),Bcl-2关联X蛋白(Bax)抗体(批号为2235164),磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)抗体(批号为2239842),均购于澳大利亚Affinity Biosciences公司,含量均为20 μL;抗β-肌动蛋白(β-actin)抗体(美国Sigma公司,批号为2021012158)。

细胞:H1299细胞(美国菌种保藏中心,批号为

20181208)。

1.2 方法

细胞培养:将H1299细胞冻存管从液氮中取出,迅速置37℃水浴锅中(冻存管浸水浴锅中,但不浸湿管帽),并不断摇动,待细胞悬液彻底溶化后,用75%乙醇擦拭冻存管表面,并转移至生物安全柜中,用移液枪将细胞悬液转移至5 mL离心管中,离心(转速为1 000 r/min)5 min,弃上清液,用1 mL 1640 DMEM高糖培养基(添加青霉素100 U/mL,链霉素0.1 mg/mL,10%FBS)重悬细胞,向直径为10 cm的培养皿中加入7 mL 1640 DMEM高糖培养基,将上述细胞悬液转移至培养皿中。混匀,置37℃、饱和湿度、5% CO₂恒温箱中培养。

GPM制备及配制:取壁虎干粉1 000 g,置4 000 mL Tris-HCl缓冲液(pH 7.4)中,浸泡过夜,超声破碎细胞,离心(转速为11 000 r/min)20 min,重复2次,取上清液,加无水乙醇至终体积分数为55%,置4℃冰柜中,每30 min搅拌1次,4 h后离心(转速为11 000 r/min)20 min,取上清液,真空旋转蒸发回收乙醇,冷冻干燥得64 g壁虎醇提物,实验前用1640 DMEM高糖培养基稀释至目标浓度,0.22 μm微孔滤膜滤过。

CCK-8法测定H1299细胞活性:按 8×10^4 个/mL的细胞密度接种至96孔板,每孔加入100 μL细胞悬液,转移至37℃细胞培养箱中培养24 h,待细胞生长状态良好后,将96孔板随机分为正常对照组(等体积基础培养液)和GPM高、低剂量组(20, 10 mg/mL),每组设置3个复孔和空白调零孔。按各组对应要求完成培养后,吸弃96孔板中的培养基,采用无菌PBS洗涤2次,各孔加入110 μL含10% CCK-8的1640 DMEM高糖培养基,37℃条件下恒温孵育2 h,采用酶标仪于450 nm波长处测定光密度(OD)。细胞存活率(%) = $(OD_{\text{GPM组}} - OD_{\text{空白调零孔}}) / (OD_{\text{正常对照组}} - OD_{\text{空白调零孔}}) \times 100\%$ 。

流式细胞术检测细胞凋亡情况:取对数生长期的H1299细胞,以 2×10^5 个/mL的细胞密度接种于4个直径为10 cm的培养皿,37℃培养24 h,将H1299细胞随机分为正常对照组和GPM高、低剂量组(20, 10 mg/mL)。弃去原培养液,用PBS洗涤3次,每组用不含EDTA的胰酶消化,收集 5×10^5 个细胞,加入500 μL Binding buffer重悬细胞和5 μL Annexin V-FITC,混匀,再加入5 μL Propidium iodide,混匀,室温避光反应15 min,用流式细胞仪[激发波长(E_x)488 nm,发射波长(E_m)530 nm]检测细胞凋亡情况,并计算凋亡率。细胞凋亡率为Q2与Q4象限百分率的和。

Western blot法检测细胞蛋白表达水平:取对数生

长期的H1299细胞,以 2×10^5 个/mL的细胞密度接种于4个直径为10 cm的培养皿,37℃培养24 h,将H1299细胞随机分为正常对照组和GPM高、低剂量组(20, 10 mg/mL),完成分组培养后,弃培养基,将培养皿转移至冰上,用PBS洗涤,吸取适量含蛋白酶及磷酸酶抑制剂的蛋白裂解液裂解细胞,刮取细胞,转移至无菌EP管中,置冰上裂解30 min,待细胞完全裂解后,4℃条件下离心(转速为11 000 r/min)10 min,取上清液,转移至已预冷的无菌EP管中,提取细胞总蛋白,采用BCA试剂盒检测细胞蛋白浓度,根据各组细胞蛋白的最低浓度调节各组蛋白浓度,并加入适量缓冲液,置95℃水浴锅中加热10 min,使其变性,冷却至室温,保存于-20℃环境,备用。配制10%SDA-PAGE凝胶,每孔20 μL蛋白样品,电泳,用PVDF膜转膜,转膜完成后,用5% BSA溶液封闭2 h,加入PI3K抗体、Bax抗体、Bcl-2抗体(1:1 000),4℃条件下孵育12~16 h,再用TBST溶液洗涤条带3次,每次5 min,用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG, 1:3 000)于室温对条带孵育1 h,再用TBST溶液洗涤条带3次,每次5 min,用适量增强型化学发光剂对条带曝光显影,记录显影结果,采用Quantity One软件对条带显影结果进行灰度扫描及图像分析,检测目标蛋白的表达水平。

qPCR法检测细胞相关蛋白mRNA表达水平:取对数生长期的H1299细胞,以每孔 2×10^5 个/mL的细胞密度接种至7个直径为10 cm的培养皿中,传代培养,随机分为正常对照组和GPM高、低剂量组(20, 10 mg/mL),参照Trizol说明书提取H1299细胞中的总RNA,用微量核酸仪检测RNA的纯度和浓度,将RNA逆转录为cDNA,以cDNA为模板进行扩增。引物序列如下,PI3K上游引物为5'-TGTCCGGAGGATTCTGATT,下游引物

为5'-AGCCTTAAGTGGAGCCTCTA;Bax上游引物为5'-CTACGGTGCGGAGATTGTGT,下游引物为5'-TCCTTGATATCCCTCCTTGCA;Bcl-2上游引物为5'-AGCCTTGGCCAGGGAATTAT,下游引物为5'-GGACTTGGTGCATGGAACAC。反应条件如下,95℃预变性1 min,95℃变性30 s,60℃退火1 min,72℃延伸30 s,共45个循环;72℃延伸10 min。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算PI3K, Bax, Bcl-2 mRNA的表达量。

1.3 统计学处理

采用SPSS 19.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,多组间比较行方差分析,两组间比较行 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对细胞活性的影响

与正常对照组比较,GPM高、低剂量组细胞的存活率随GPM浓度的增加呈降低趋势($P < 0.05$)。详见图1和表1。

表1 各组细胞活性测定结果比较($n = 3$)

Tab.1 Comparison of cell activities in each group ($n = 3$)

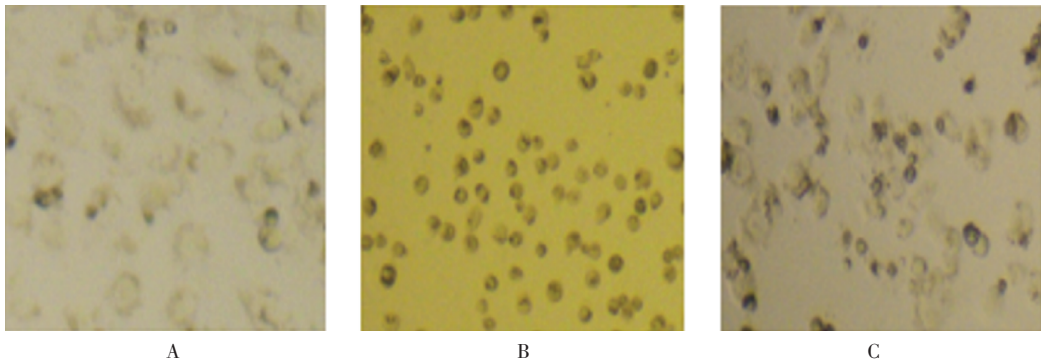
组别	OD值($\bar{X} \pm s$)	细胞存活率(%)
正常对照组	1.286 0 $\pm$ 0.021 9	100.00
GPM高剂量组	0.661 4 $\pm$ 0.071 3**	51.43**
GPM低剂量组	0.812 6 $\pm$ 0.041 0**	63.19**

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。图2至图3同。

Note:Compared with those in the normal control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ (for Tab.1 and Fig.2-3).

2.2 对细胞凋亡的影响

与正常对照组比较,GPM高、低剂量组的细胞凋亡率随GPM浓度的增加呈升高趋势($P < 0.05$)。详见图2。



A. 正常对照组 B. GPM高剂量组 C. GPM低剂量组
图1 壁虎多肽混合物对H1299细胞活性的影响($\times 100, n = 3$)
A. Normal control group B. High-dose GPM group C. Low-dose GPM group
Fig.1 Effect of GPM on the activity of H1299 cells ($\times 100, n = 3$)

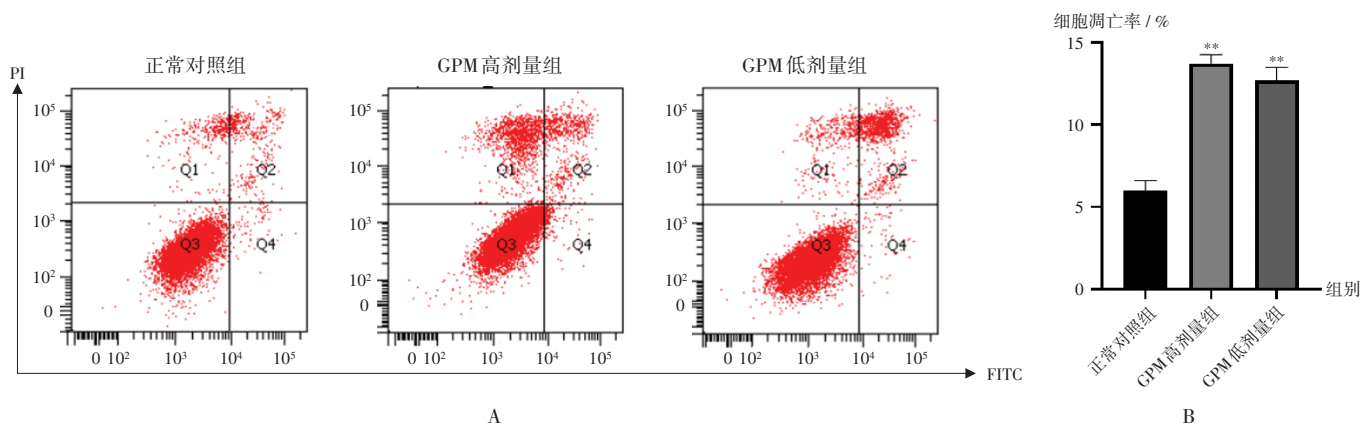


图 2 壁虎多肽混合物对 H1299 细胞凋亡的影响 ($\bar{X} \pm s, n = 3$)
A. Flow scatter B. Bar chart

Fig. 2 Effect of GPM on the apoptosis of H1299 cells ($\bar{X} \pm s, n = 3$)

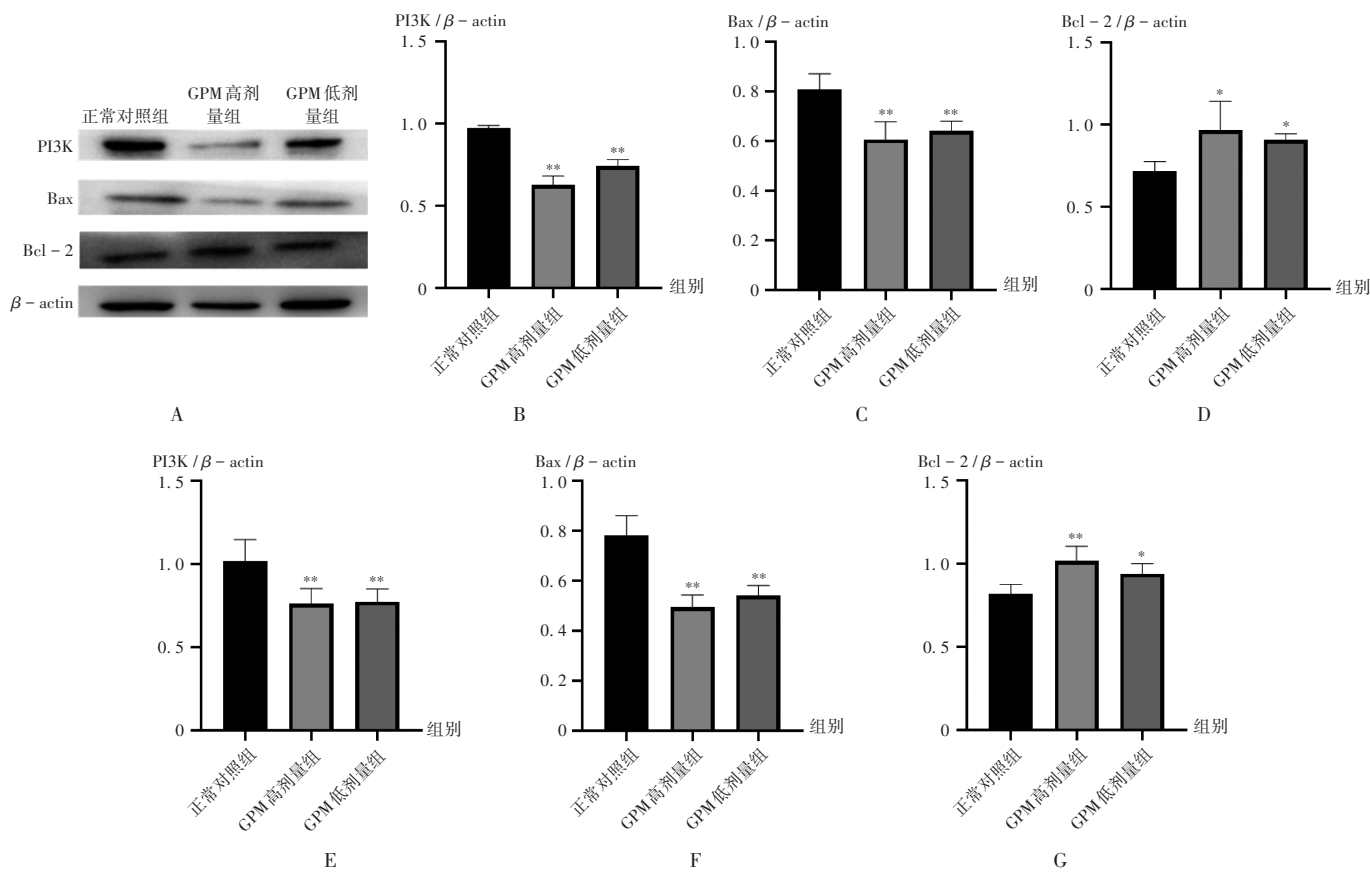


图 3 壁虎多肽混合物对相关蛋白表达水平的影响 ($\bar{X} \pm s, n = 3$)
A. 蛋白电泳图 B - D. mRNA 表达水平 E - G. 蛋白表达水平

A. Protein electropherogram B - D. mRNA expression levels E - G. Protein expression levels
Fig. 3 Effect of GPM on the expression levels of related proteins ($\bar{X} \pm s, n = 3$)

2.3 对 PI3K, Bcl-2, Bax mRNA 及蛋白表达的影响
与正常对照组比较, GPM 高、低剂量组的 PI3K 和 Bax mRNA 及蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$), Bcl-2 mRNA 及蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$), 表明 GPM 对 H1299 细胞有抑制作用。详见图 3。

3 讨论
壁虎为壁虎科动物无蹼壁虎、多疣壁虎及其他壁虎的干燥全体, 具有攻毒疗疮、散结止痛、活血化瘀功效, 治疗恶性肿瘤效果明显^[11-12]。GPM 具有高效、低毒、选择性高等特点, 抗肿瘤药物开发前景良好^[11]。

PI3K为经典抗凋亡、促增殖信号传导通路的主要效应因子,下游直接靶点蛋白为丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶(AKT),能通过激活PI3K使AKT磷酸化,最终启动下游级联反应,进而对细胞周期进行调控,并抑制细胞凋亡^[13-15]。本研究结果显示,20 mg/mL GPM能显著下调PI3K mRNA及蛋白的表达,抑制H1299细胞的增殖。Bcl-2可抑制细胞凋亡,对细胞原癌基因与抑癌基因起调控作用^[16]。研究表明,Bcl-2能降低氧自由基及脂质过氧化物的产生,并上调胞内谷胱甘肽等抗氧化剂的产生,最终起到抑制细胞凋亡的作用。Bax为人体最主要的凋亡基因,属Bcl-2家族,能与Bcl-2结合,抑制其抗凋亡作用。同时,广泛表达于肝细胞、肾小管上皮细胞等,Bcl-2/Bax可反映细胞凋亡的抑制程度^[17-18]。本研究结果显示,20 mg/mL GPM能显著上调Bcl-2 mRNA及蛋白的表达,并下调Bax mRNA及蛋白的表达,从而抑制细胞增殖。

综上所述,GPM对NSCLC的H1299细胞具有增殖抑制作用,其作用机制可能与调控PI3K,Bax,Bcl-2 mRNA及蛋白的表达相关。

参考文献

- [1] TAN KS, HSU M, ADUSUMILLI P, Pathologic node - negative lung cancer: Adequacy of lymph node yield and a tool to assess the risk of occult nodal disease[J]. Lung Cancer, 2022, 174:60-66.
- [2] ZAI J, ALA AM, FILLAHIHASANAH T, et al. Pneumocystis jirovecii colonization in bronchoalveolar lavage among naïve non - small cell lung cancer from tertiary respiratory hospital in Jakarta, Indonesia[J]. J Infect Dev Ctries, 2022, 16: 1643 - 1647.
- [3] HORNDALSVEEN H, ALVER TN, DALSGAARD AM, et al. Atezolizumab and stereotactic body radiotherapy in patients with advanced non - small cell lung cancer: safety, clinical activity and ctDNA responses - the ComIT - 1 trial[J]. Mol Oncol, 2022, 17(3):487-498.
- [4] 马 玥,徐振晔,邓海滨,等. 中医药调控细胞自噬抗肺癌转移作用机制的研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2022, 31(17):2472-2477.
- [5] 于 弘,胡 倩,周光飏. 肺癌中医证型与用药规律的研究[J]. 中成药, 2022, 44(7):2273-2278.
- [6] 尹慧萍,王兵兵,黄泽月,等. 壁虎粗多肽对SH-SY5Y细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(6):681-684.
- [7] 王 璐. 中药壁虎多肽成分的体外抗肿瘤筛选及其结构解析[D]. 济南:山东中医药大学, 2014.
- [8] 崔朝初. 壁虎醇提取物(Ⅱ)的抗肿瘤作用研究[D]. 洛阳:河南科技大学, 2013.
- [9] 徐新丽,王建刚,李瑞芳,等. 壁虎多肽混合物对人食管癌EC109细胞生长的抑制作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2013, 29(8):602-604.
- [10] 段一梦,段冷昕,刘 玲,等. 壁虎多肽混合物对HepG2细胞增殖及内质网应激途径的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(2):148-151.
- [11] 靳 颖,刘 玲,段冷昕,等. 壁虎多肽混合物对肝癌SMMC7721细胞增殖及其自噬的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 33(9):798-801.
- [12] 宋 莹,王建刚,崔朝初,等. 壁虎粗多肽诱导人肝癌细胞HepG2凋亡的机制研究[J]. 中药材, 2012, 35(6):863-866.
- [13] 凡 蝶,田泽众,马熙麟,等. 水溶性番茄浓缩物 Fruitflow 通过调控血小板PI3K/Akt和MAPKs信号通路抑制其活化、聚集及血栓形成[J]. 中山大学学报(医学版), 2020, 41(2):243-250.
- [14] 卢根林,吴爱兵,王宏宾. H2S对小肠缺血/再灌注损伤大鼠PI3K/Akt信号通路表达的影响[J]. 中华危重病急救医学, 2020, 32(10):1247-1250.
- [15] 高 微,吴 伟,周凯丽,等. IGF-1对睡眠剥夺模型小鼠认知功能的影响及海马IGF-1/PI3K/Akt信号通路的调节作用[J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2020, 29(5):419-425.
- [16] SHESTAKOVA A, REZK S, GHASEMIZADEH D, et al. High - grade B - cell Lymphoma with MYC and BCL2 Rearrangement Arising from Follicular Lymphoma: Presentation as a Large Peripancreatic Mass[J]. Diagnostics, 2020, 10(3):157-166.
- [17] LI X, CHEN M, SHI Q, et al. Hydrogen sulfide exposure induces apoptosis and necroptosis through lncRNA3037/miR-15a/BCL2-A20 signaling in broiler trachea[J]. The Science of the Total Environment, 2020, 699(10):134296. 1-134296. 11.
- [18] ZHANG X, WANG J, LIU Z, et al. LINC00657/miR-26a-5p/CKS2 ceRNA network promotes the growth of esophageal cancer cells via the MDM2/p53/Bcl2/Bax pathway[J]. Bioscience Reports, 2020, 40(6):1-11.

(收稿日期:2023-02-07;修回日期:2023-12-28)

中国科技核心期刊 中国科技论文统计源期刊

《中国药业》杂志 欢迎投稿! 欢迎订阅!

邮发代号:78-130,各地邮局均可订阅;补订、破月订可向本刊办理。电话兼传真:(023) 86592565

网上投稿:http://www.zhongguoyaoye023.com或中国药业在线投稿系统