

木犀草素通过抑制 PTEN PI3K-AKT 信号通路以及对免疫功能的调节作用介导对肺癌模型大鼠的干预研究

周亮¹, 乔印玲², 王莉¹, 朱蕾¹, 张建勇^{1*}

¹遵义医学院附属医院 呼吸二科; ²贵州省航天医院妇科, 遵义 563000

摘要: 探讨木犀草素对肺癌模型大鼠的干预作用及其对 PTEN-PI3K-AKT 信号通路的抑制作用和对免疫功能的影响。采用灌注致癌碘油液制备大鼠肺癌模型, 分别给予木犀草素高、中、低剂量和环磷酰胺治疗 16 周后进行大鼠的一般情况、肺组织病理形态学和肺脏指数、脾脏指数变化的评价。酶联免疫吸附法检测各组大鼠 EGF、TGF- β 、VEGF 的表达。流式细胞术检测各组大鼠 T 淋巴细胞群 (CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺) 水平。实时荧光定量 PCR 法检测各组大鼠 AKT-1、CyclinD1、NF- κ B mRNA 的表达。Western blot 法检测各组大鼠 PTEN、p-PI3K、p-AKT 蛋白的表达。结果表明木犀草素可显著改善肺癌大鼠肺组织病理情况, 提高脾脏指数, 降低肺指数, 提高血 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 水平, 降低 CD8⁺ 水平, 显著降低肺组织中 EGF、TGF- β 、VEGF 的表达及 AKT-1、CyclinD1、NF- κ B mRNA 的表达水平, 提高肺组织中 PTEN 蛋白的表达, 降低 P-PI3K、p-AKT 蛋白表达水平。木犀草素可显著抑制肺癌的增殖和转移, 其机制可能与促进免疫器官的发育和分化, 促进 T 淋巴细胞亚群的功能, 提高机体免疫功能和下调 PI3K/AKT 信号通路的活性来发挥作用的。

关键词: 木犀草素; 肺癌; 肺指数; 脾指数; PTEN-PI3K-AKT

中图分类号: R73; X70

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.12.022

Effects of Luteolin on the Expression of PTEN PI3K-AKT Signaling Pathway and Immune Function in Lung Cancer Model Rats

ZHOU Liang¹, QIAO Yin-ling², WANG Li¹, ZHU Lei¹, ZHANG Jian-yong^{1*}

¹Department of Respiratory Medicine, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College; ²Department of Gynecology, Guizhou Aerospace Hospital, Zunyi 563000, China

Abstract: To investigate the effect of luteolin on PTEN-PI3K-AKT signal pathway and immune function in lung cancer model rats. The rats were given disposable infusion of carcinogenic iodized oil via left lobe bronchus to induce lung cancer model. The rats were treated with high, medium and low dose of luteolin and cyclophosphamide respectively for 16 weeks. The general condition, histopathology and lung index, spleen index were evaluated. The expression of EGF, TGF- β and VEGF was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ in T lymphocytes of rats were detected by flow cytometry. The expression of AKT-1, CyclinD1 and NF- κ B mRNA in each group were detected by Real-time fluorescent quantitative PCR. The expression of PTEN, p-PI3K and p-AKT protein was detected by Western blot. The results showed that luteolin can significantly improve the pathology of lung tissue, decrease the lung index and increase spleen index. Luteolin cannot only reduce the levels of EGF, TGF- β , VEGF and AKT-1, CyclinD1, NF- κ B mRNA and P-PI3K and p-AKT protein in lung tissue and the expression of CD8⁺ levels in blood, but also increase the expression of CD3⁺, CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺ levels in blood and PTEN protein in lung tissue. Luteolin can significantly improve the immune function and downregulate the activity of PI3K/AKT signaling pathway in the Lung Cancer Model Rats.

Key words: luteolin; lung cancer; lung index; spleen index; PTEN-PI3K-AKT

近年来, 我国肺癌的发病率以每年 26.9% 的速

度逐年增高, 已成为威胁人类生命的最常见的恶性肿瘤之一。目前, 肺癌的治疗主要采用手术、放化疗、介入、生物治疗等综合疗法为主。但由于 80% 以上的肺癌患者确诊时, 已属晚期^[1], 失去了手术

收稿日期: 2017-05-05 接受日期: 2017-09-12

基金项目: 贵州省科技计划(黔科合 LH 字[2016]7473 号)

* 通信作者 E-mail: zhangjianyong@163.com

机会,只能通过化疗、靶向治疗、生物治疗和中药辅助治疗等姑息治疗手段来缓解病情。但化疗、靶向治疗及生物治疗毒副作用较大^[2]、治疗周期较长,且价格昂贵,易产生耐药性,部分患者难以接受,使晚期肺癌的治疗遇到了瓶颈。随着中医药在肺癌辅助治疗应用中的不断发展,其逐渐显示出了突出的优势。从传统中草药及天然植物中寻找有效抗癌成分成为目前关注的热点。木犀草素是一种天然黄酮类化合物,在自然界中分布广泛,现代药理研究证实^[3,4],其对多种肿瘤细胞具有抑制作用,可有效抑制肿瘤的侵袭和转移。据报道^[5],木犀草素对非小细胞肺癌细胞的转移及侵犯具有良好的抑制作用,但具体作用机制不清。故本研究成功复制肺癌大鼠模型,观察了其对于大鼠肺癌形成的抑制作用,旨在探讨其治疗肺癌的可能作用机制。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

清洁级 Wistar 大鼠 90 只,动物合格证号:SCXK(渝)20130005,雌雄各半,体质量 120 ~ 150 g,均购自第三军医大学大坪医院,所有大鼠均常规饲养饮食水 1 周后进入实验。

1.2 仪器

BSA6202S 精密电子天平由北京赛多利斯天平有限公司生产;CX41 生物显微镜由日本 Olympus 公司生产;UV2450 紫外-可见分光光度计由日本 Shimadzu 公司生产;5331 基因扩增仪由德国 Eppendorf 公司生产。

1.3 药品与试剂

木犀草素由南京朗泽医药科技有限公司生产,纯度:≥99%;环磷酰胺注射液由江苏盛迪医药有限公司生产,规格:0.2 g/3.6 mL;碘化油注射液由上海博莱科信谊药业有限责任公司生产,碘含量:37%~39%;PTEN 兔抗人单克隆抗体、p-PI₃K 兔抗人单克隆抗体及 p-AKT 兔抗人单克隆抗体均购自 Sant Cruz 公司;GAPDH 兔抗人单克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司。

2 实验方法

2.1 造模与分组

采用随机数字表法将 90 只大鼠随机分为正常对照组、模型组、环磷酰胺组和木犀草素高、中、低剂量组,每组各 15 只。参考文献^[6]报道的方法于大鼠

气管内一次性灌注致癌碘油液制备大鼠肺癌模型,灌注碘油液之前的 2 ~ 5 d,每组大鼠均预防性的给予注射用青霉素钠 5 万单位和注射用硫酸链霉素 50 mg 肌肉注射预防肺内感染。采用水合氯醛麻醉大鼠,将特制钝头注射器经会咽部插入大鼠的气管处,并将 0.1 mL 碘油液缓慢注入肺内,造模 1 周后,各给药组大鼠均给予背部肌肉注射相应药物治疗,给药剂量根据人与大鼠的体表面积进行换算,相当于成人用药剂量的用量的 4.5、9、18 倍作为大鼠的低、中、高给药剂量,分别为 50、100、200 mg/(kg·d),环磷酰胺换算后的给药剂量为 0.4 mL/(kg·d),每周给药 5 d,正常对照组和模型组大鼠均给予等体积生理盐水。所有大鼠均连续治疗 16 周,16 周后于给药结束后处死大鼠。

2.2 观察指标

2.2.1 各组大鼠一般情况观察

实验期间观察各组大鼠的活动量、皮毛颜色、饮食水情况、呼吸频率、咳嗽次数等一般情况。

2.2.2 各组大鼠肺组织病理形态学观察

处死大鼠后,留取约 50 g 肺组织,给予 10% 中性甲醛固定,石蜡包埋、切片,HE 染色观察各组大鼠肺组织病理形态学变化情况。

2.2.3 各组大鼠肺脏指数、脾脏指数变化

分别于实验期间称取各组大鼠体质量,观察其体质量变化。实验结束后,处死大鼠,分别称取左右肺、脾脏重量,-80 °C 保存备用,以脾重量/体质量计算脾指数、以肺重量/体质量计算肺指数。

2.2.4 各组大鼠免疫功能变化

分别于实验结束后,通过心脏取血,采用流式细胞术检测各组大鼠 T 淋巴细胞群(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺; CD4⁺/CD8⁺)水平,比较各组大鼠免疫功能变化。

2.2.5 酶联免疫吸附法检测各组大鼠 EGF、TGF-β、VEGF 的表达

于实验结束后,处死大鼠,留取部分肺组织,采用酶联免疫吸附法检测各组大鼠肺组织 EGF、TGF-β、VEGF 的表达情况,严格按照试剂盒说明书进行操作。

2.2.6 实时荧光定量 PCR 法检测各组大鼠 AKT-1、CyclinD1、NF-κB mRNA 的表达

将 100 mg 肺组织置于 EP 管中,采用 Trizol 法提取肺组织中的总 RNA,通过逆转录合成 cDNA,引物设计均由上海宝成生物工程有限公司合成。以 cDNA 为模板实时荧光定量 PCR 的扩增,每个样本重复试验 3 次。引物序列:GAPDH 上游引物:5'-

TGATTCCACCCATGGCAAATTCC-3', 下游引物: 5'-ACAGCCTTGGCAGCGCCAGTAGA-3'; AKT1 上游引物: 5'-AAGAAGGAAGTCATCGTGG-3', 下游引物: 5'-GGACAGGTGGAAGAACAGC-3'; CyclinD1 上游引物: 5'-AGAAGCTGTGCATCTACACCGACA-3', 下游引物: 5'-TGGAGGGCGGATTGGAAATGAACT-3'; NF- κ Bp65 上游引物: 5'-GGACCAGCAAAGGTTATTGTTC-3', 下游引物: 5'-TTATACACGCCTCTGTCATTG-3'。反应条件: 95 °C 预变性 30 s, 94 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。采用 2- $\Delta\Delta$ Ct 法计算 AKT-1、CyclinD1、NF- κ B mRNA 的相对表达量。

2.2.7 Western blot 法检测各组大鼠 PTEN、p-PI₃K、p-AKT 蛋白的表达

将 100 mg 肺组织置于 EP 管中, 液氮速冻后粉碎抽提总蛋白, BCA 法检测各组总蛋白的含量, 上样量设置为 20 μ g, 吸取总蛋白进行预变性后, 经 SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜、封闭后, 加入相应的一抗及二抗, 孵育后, ECL 化学发光法显色, ChemiDocXRS 对目的条带进行曝光显影, 采用 Image 软件分析分析 PTEN、p-PI₃K、p-AKT 蛋白的相对表达量。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行分析。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 LSD 检验。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组大鼠一般情况比较

造模后, 各组大鼠一般情况尚可, 均能站立, 活

动可。但造模后 2 d 各组大鼠的进食和饮水量均有一定程度的下降, 后随着实验的开展, 模型组大鼠逐渐出现呼吸增快, 咳嗽增多, 进食量和饮水量均显著少于其他组大鼠, 到实验结束时, 模型组大鼠消瘦明显, 活动度减少, 进食较少, 处于垂死状态, 伴有严重的呼吸困难。而各给药组大鼠仅轻微咳嗽, 体重逐渐增长, 活动自如, 进食及饮水量均正常, 与正常对照组大鼠无明显差异。

3.2 各组大鼠肺组织病理形态学观察结果

实验结束后处死大鼠, 观察其肺脏大体形态, 模型组大鼠肺脏体积较其他组大鼠明显增大, 且缺乏弹性, 表面质硬粗糙, 支气管管腔内可见大量粘性分泌物, 清理分泌物后可见气管黏膜充血红肿。15 只造模大鼠中, 5 只可见肺部肿块, 1 只出现对侧肺转移灶。木犀草素高、中、低剂量组大鼠肺脏大体形态明显好于模型组, 肺脏增大不明显, 弹性尚可。经病理形态学观察结果显示, 模型组大鼠肺泡囊显著扩张、纤毛上皮细胞破损明显, 肿块切片可见大量癌细胞, 核仁深染, 排列紊乱, 呈片状或条索状排列, 伴有腺样或乳头状结构。木犀草素各给药组大鼠肺组织病理明显改善, 肺泡囊及纤毛上皮细胞结构清晰, 基本正常。见图 1。

3.3 各组大鼠的脾指数及肺指数比较

模型组大鼠的脾指数显著低于, 肺指数显著高于正常组, 差异具有统计学意义 (P < 0.05)。而木犀草素各给药组大鼠的脾指数显著高于, 肺指数显著低于模型组, 差异具有统计学意义 (P < 0.05)。环磷酰胺组大鼠仅肺指数显著低于模型组, 差异具

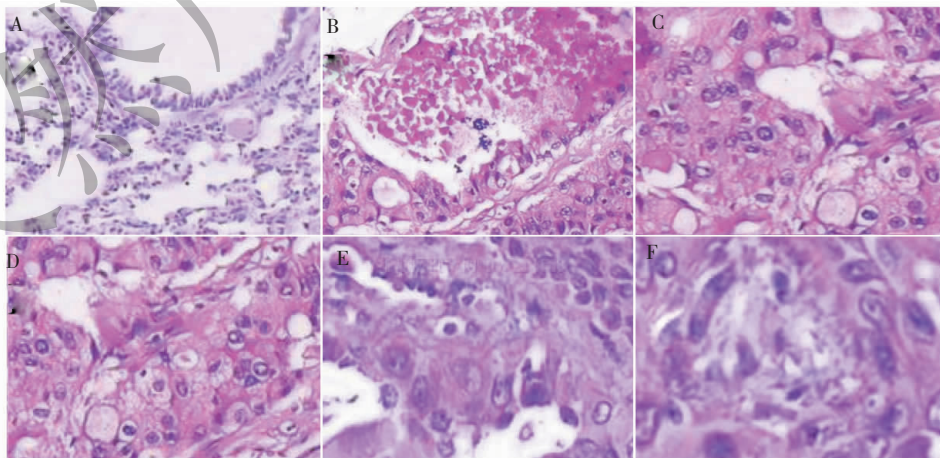


图 1 正常组(A)、模型组(B)、木犀草素高剂量组(C)、中剂量组(D)、低剂量组(E)及环磷酰胺组(F)大鼠肺组织病理形态学观察结果((400)

Fig. 1 Histopathological observation of lung tissue in rats of normal group (A), model group (B), luteolin high dose group (C), middle dose group (D), low dose group (E) and cyclophosphamide group (F) ((400)

表 1 各组大鼠的脾指数及肺指数比较($\bar{x} \pm s$, mg/g)Table 1 Comparison of spleen index and lung index in each group($\bar{x} \pm s$, mg/g)

组别 Group	n	脾脏指数 Spleen index	肺脏指数 Lung index
正常组 Normal group	15	3.241 ± 0.422	4.609 ± 0.713
模型组 Model group	15	1.833 ± 0.369 [*]	6.513 ± 0.588 [*]
木犀草素高剂量组 Luteolin high dose group	15	2.901 ± 0.291 [#]	4.984 ± 0.682 [#]
木犀草素中剂量组 Luteolin middle dose group	15	2.669 ± 0.254 [#]	5.379 ± 0.793 [#]
木犀草素低剂量组 Luteolin low dose group	15	2.512 ± 0.267 [#]	5.667 ± 0.813 [#]
环磷酰胺组 Cyclophosphamide group	15	2.106 ± 0.334 [#]	5.219 ± 0.513 [#]

注:与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$ 。

Note: Compared with normal group, * $P < 0.05$; compared with model group, [#] $P < 0.05$ 。

有统计学意义($P < 0.05$); 而脾指数与模型组相比无显著性差异($P > 0.05$)。见表 1。

3.4 各组大鼠免疫功能变化比较

模型组大鼠血 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 水平均明显低于, CD8⁺ 水平明显高于正常组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。而木犀草素各剂量组大鼠

血 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 水平均明显高于, CD8⁺ 水平明显低于模型组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。但各给药组比较差异不具有统计学意义($P < 0.05$)。环磷酰胺组大鼠血 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 及 CD8⁺ 水平与模型组水平比较无明显差异($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠免疫功能变化比较($\bar{x} \pm s$, %)Table 2 Comparison of immune function in each group($\bar{x} \pm s$, %)

组别 Group	n	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD8 ⁺
正常组 Normal group	15	65.13 ± 2.26	46.73 ± 2.54	1.94 ± 0.24	23.11 ± 3.22
模型组 Model group	15	46.09 ± 2.33 [*]	32.91 ± 2.82 [*]	1.05 ± 0.53 [*]	32.47 ± 2.51 [*]
木犀草素高剂量组 Luteolin high dose group	15	57.92 ± 1.97 [#]	40.25 ± 2.42 [#]	1.63 ± 0.47 [#]	19.42 ± 1.87 [#]
木犀草素中剂量组 Luteolin middle dose group	15	54.82 ± 2.31 [#]	38.65 ± 2.08 [#]	1.55 ± 0.41 [#]	17.08 ± 2.51 [#]
木犀草素低剂量组 Luteolin low dose group	15	52.66 ± 2.04 [#]	36.54 ± 2.31 [#]	1.46 ± 0.55 [#]	18.09 ± 1.95 [#]
环磷酰胺组 Cyclophosphamide group	15	44.94 ± 1.91	31.73 ± 2.14	1.07 ± 0.49	30.79 ± 2.66

注:与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$ 。

Note: Compared with normal group, * $P < 0.05$; compared with model group, [#] $P < 0.05$ 。

3.5 各组大鼠 EGF、TGF-β、VEGF 的表达水平比较

模型组大鼠肺组织中 EGF、TGF-β、VEGF 表达水平均明显高于正常组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。而木犀草素各剂量组和环磷酰胺组大鼠肺

组织中 EGF、TGF-β、VEGF 表达水平均显著低于模型组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。但各给药组比较差异不具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组大鼠 EGF、TGF-β、VEGF 的表达水平比较($\bar{x} \pm s$, mg/g)Table 3 Comparison of expression levels of EGF, TGF-β and VEGF in each group($\bar{x} \pm s$, mg/g)

组别 Group	n	EGF	TGF-β	VEGF
正常组 Normal group	15	74.32 ± 37.09	70.94 ± 19.75	44.06 ± 11.24
模型组 Model group	15	298.54 ± 63.16 [*]	172.09 ± 31.07 [*]	97.83 ± 14.51 [*]
木犀草素高剂量组 Luteolin high dose group	15	187.45 ± 43.81 [#]	108.43 ± 27.11 [#]	67.31 ± 10.95 [#]
木犀草素中剂量组 Luteolin middle dose group	15	204.66 ± 48.09 [#]	123.65 ± 27.08 [#]	71.22 ± 12.33 [#]
木犀草素低剂量组 Luteolin low dose group	15	216.73 ± 45.06 [#]	137.21 ± 34.09 [#]	79.65 ± 13.55 [#]
环磷酰胺组 Cyclophosphamide group	15	205.69 ± 48.91 [#]	134.25 ± 36.66 [#]	76.77 ± 13.09 [#]

注:与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$ 。

Note: Compared with normal group, * $P < 0.05$; compared with the model group, [#] $P < 0.05$ 。

3.6 各组大鼠肺组织中 AKT-1、CyclinD1、NF- κ B mRNA 的表达

模型组大鼠肺组织中 AKT-1、CyclinD1、NF- κ B mRNA 表达水平均明显高于正常组,差异具有统计

学意义($P < 0.05$)。而木犀草素各剂量组肺组织中 AKT-1、CyclinD1、NF- κ B mRNA 均显著低于模型组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。但各给药组比较差异不具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 各组大鼠肺组织中 AKT-1、CyclinD1、NF- κ B mRNA 的表达($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Expression of AKT-1, CyclinD1 and NF- κ B mRNA in lung tissue of each group($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	<i>n</i>	AKT-1	CyclinD1	NF- κ B
正常组 Normal group	15	0.126 \pm 0.018	0.097 \pm 0.024	0.071 \pm 0.017
模型组 Model group	15	0.975 \pm 0.071 *	1.315 \pm 0.109 *	0.974 \pm 0.087 *
木犀草素高剂量组 Luteolin high dose group	15	0.372 \pm 0.044 #	0.408 \pm 0.062 #	0.514 \pm 0.064 #
木犀草素中剂量组 Luteolin middle dose group	15	0.419 \pm 0.063 #	0.517 \pm 0.055 #	0.534 \pm 0.055 #
木犀草素低剂量组 Luteolin low dose group	15	0.593 \pm 0.055 #	0.622 \pm 0.061 #	0.707 \pm 0.063 #
环磷酰胺组 Cyclophosphamide group	15	0.462 \pm 0.021 #	0.574 \pm 0.054 #	0.624 \pm 0.033 #

注:与正常组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, # $P < 0.05$ 。

Note: Compared with normal group, * $P < 0.05$; compared with the model group, # $P < 0.05$.

3.7 各组大鼠肺组织中 PTEN、P-PI3K、p-AKT 蛋白的表达

木犀草素各剂量组和环磷酰胺组大鼠肺组织中 PTEN 显著高于、P-PI₃K、p-AKT 蛋白表达水平显著

低于模型组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。但各给药组比较差异不具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 5、图 2。

表 5 各组大鼠肺组织中 PTEN、P-PI₃K、p-AKT 蛋白的表达($\bar{x} \pm s$, mg/g)

Table 5 Expression of PTEN, P-PI₃K and p-AKT proteins in lung tissue of each group($\bar{x} \pm s$, mg/g)

组别 Group	<i>n</i>	PTEN	P-PI ₃ K	p-AKT
正常组 Normal group	15	0.009 \pm 0.002	0.001 \pm 0.004	0.005 \pm 0.002
模型组 Model group	15	0.519 \pm 0.041 *	1.023 \pm 0.089 *	0.973 \pm 0.083 *
木犀草素高剂量组 Luteolin high dose group	15	0.807 \pm 0.065 #	0.519 \pm 0.057 #	0.714 \pm 0.077 #
木犀草素中剂量组 Luteolin middle dose group	15	0.715 \pm 0.055 #	0.597 \pm 0.063 #	0.766 \pm 0.039 #
木犀草素低剂量组 Luteolin low dose group	15	0.618 \pm 0.043 #	0.694 \pm 0.085 #	0.793 \pm 0.054 #
环磷酰胺组 Cyclophosphamide group	15	0.796 \pm 0.041 #	0.552 \pm 0.066 #	0.761 \pm 0.061 #

注:与正常组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, # $P < 0.05$ 。

Note: Compared with normal group, * $P < 0.05$; compared with the model group, # $P < 0.05$.

4 讨论与结论

研究表明^[7],肿瘤细胞中 PTEN 基因的突变缺失及 PI3K 的活化突变在肿瘤的复发转移中发挥重要作用。在人体中,PTEN 和 PI3K 之间呈现动态平衡,PKB/AKT 信号通路的活化可通过多种机制促进肿瘤转移的发生^[8]。PIP3 水平的持续增加可引起 PTEN 和 PI3K 的平衡失调,PI3K-AKT 信号通路被活化,导致癌细胞的活性增强,增殖和运动活性增加。同时,PI3K-AKT 信号通路被活化后,可促进 Ang-1 和 VEGF 等内皮活性因子的分泌和生成,促进内皮细胞的增殖,抑制其凋亡,并可通过促进 Cad

的降解过程,抑制微管蛋白的乙酰化,减少细胞间的粘附性,增强癌细胞的运动迁移过程,促进上皮-间质转化(EMT)来改变自身细胞的特性,促进肿瘤细胞的增殖与转移。EMT 是肿瘤细胞浸润与转移的关键环节^[9]。在肿瘤细胞中,PI3K-AKT 信号通路还可促进 MMP 表达的增加,促使细胞间质 E-Cad 降解增加,促进核转录因子 Slug、Snail 的表达增加,从而进一步抑制 E-cad 蛋白表达。同时,肿瘤细胞的浸润和转移过程与 EGF、TGF- β 及 VEGF 等细胞因子过度表达密切相关^[10],上述因子的过度表达可使酪氨酸受体相关通路发生过度活化,导致肿瘤的复发与转移。另外,PI3K-AKT 信号激活后,其下游

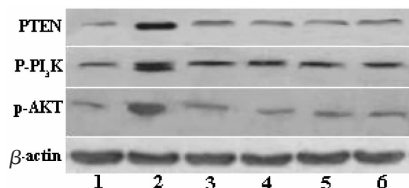


图2 各组大鼠肺组织中 PTEN、P-PI₃K、p-AKT 蛋白的表达

Fig. 2 Expression of PTEN, P-PI₃K and p-AKT protein in lung tissue of each group

注:1. 正常组;2. 模型组;3. 木犀草素高剂量组;4. 木犀草素中剂量组;5. 木犀草素低剂量组;6. 环磷酰胺组

Note:1. normal group;2. model group;3. luteolin high dose group;4. luteolin middle dose group;5. luteolin low dose group;6. Cyclophosphamide group

信号分子 GSK3 和 mTOR 还可促进细胞周期素 D1 的表达上调,促进癌细胞在 G₁/S 期的转换,使癌细胞发生增殖与转移。而 AKT 磷酸化后被活化还可激活其下游信号 IKK 的表达与活化,促进核转录因子 NF- κ B 的活化^[11],使 TNF 受体相关因子 (TRAF1/TRAF2) 等多种凋亡相关因子被激活,促进癌细胞逃逸凋亡,同时,还可进一步上调 CyclinD1 的表达,促进肿瘤细胞的增殖和活化。PTEN 具有抑制 PI3K 信号通路相关基因的作用,当 PTEN 被磷酸化后,可导致 PIP3 失活,从而使 PI3K 信号通路及其下游相关信号因子的表达活化受到抑制,抑制癌细胞增殖并促进其细胞凋亡过程。

木犀草素属天然黄酮类化合物,在自然界中广泛存在,可用于治疗高血压、炎症和肿瘤等疾病。张文静^[12]等研究发现木犀草素对人肺腺癌细胞株的运动迁移具有显著地抑制作用,并呈现时间依赖性。同时,王洪燕^[13]研究亦发现木犀草素对人非小细胞肺癌细胞的增殖具有显著地抑制作用,可促进癌细胞的凋亡,且与顺铂联用可产生明显的抗增殖作用。上述研究均表明木犀草素对肺癌细胞的增殖具有良好的抑制作用,并可增加化疗的敏感性。但上述实验均为体外实验,其对实体肿瘤的疗效尚未见研究报道。本研究成功复制大鼠肺癌模型,研究木犀草素对肺癌的疗效,结果显示,模型组大鼠出现呼吸增快,咳嗽增多,进食量和饮水量较少,消瘦及活动度减少等表现,处死大鼠后,可见大鼠肺脏体积明显增大,且缺乏弹性,表面质硬粗糙,支气管管腔内可见大量粘性分泌物,清理分泌物后可见气管黏膜充血红肿,部分大鼠可见肺部肿块及对侧肺转移灶。病理组织学检查显示模型组大鼠肺泡囊显著扩张、

纤毛上皮细胞破损明显,肿块切片可见大量癌细胞,核仁深染,排列紊乱,呈片状或条索状排列,伴有腺样或乳头状结构。说明造模成功。而经治疗后,各给药组大鼠仅轻微咳嗽,体重逐渐增长,活动自如,进食及饮水量均正常,且肺脏的大体形态和病理组织学均优于模型组。说明经木犀草素治疗后大鼠的肺癌得到了有效控制,疗效与环磷酰胺相当。

结果还显示,给予木犀草素干预后,木犀草素高、中、低剂量组大鼠的脾指数显著增加,肺指数显著降低 ($P < 0.05$)。且木犀草素各剂量组大鼠血 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 水平均明显高于,CD8⁺ 水平明显低于模型组 ($P < 0.05$)。但各给药组比较差异不具有统计学意义 ($P < 0.05$)。环磷酰胺组大鼠血 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 及 CD8⁺ 水平与模型组水平比较无明显差异 ($P > 0.05$)。提示运用木犀草素可显著促进脾脏等免疫器官的发育和分化,促进 T 淋巴细胞亚群的功能,提高机体的免疫功能,抑制肺癌的病理进程,有效预防肺癌的发生。

同时,进一步观察木犀草素对 PTEN-PI₃K-AKT 信号通路的影响,结果显示,木犀草素各剂量组大鼠肺组织中 PTEN 显著高于、P-PI₃K、p-AKT 蛋白表达水平显著低于模型组 ($P < 0.05$)。且其下游的 AKT-1、CyclinD1、NF- κ B mRNA 均显著低于模型组 ($P < 0.05$)。说明木犀草素可显著上调 PTEN 蛋白、下调 p-PI₃K、p-AKT 蛋白的表达水平,并进一步下调其下游信号分子 AKT-1、CyclinD1、NF- κ B mRNA 的表达来抑制肺癌的浸润与转移。

EGF、TGF- β 、VEGF 是 PTEN-PI₃K-AKT 信号通路最下游的信号分子,参与了肿瘤细胞的浸润与转移。本研究结果显示,木犀草素各剂量组大鼠肺组织中 EGF、TGF- β 、VEGF 表达水平均显著低于模型组,说明了木犀草素可显著下调 EGF、TGF- β 、VEGF 表达水平,抑制肺癌的发生发展,同时,进一步佐证了其 PTEN-PI₃K-AKT 信号通路的调控作用。

综上所述,木犀草素可显著抑制肺癌的增殖和转移,其机制可能与促进免疫器官的发育和分化,提高机体免疫功能和下调 PI₃K/AKT 信号通路的活性来发挥作用的。

参考文献

- 1 Lu FF (卢锋峰), Chen YS (陈愉生), Li HR (李鸿茹), et al. Young lung cancer and elderly lung cancer clinical characteristics of comparative analysis. *Int J Respir* (国际呼吸杂志), 2012, 32: 113-117.