

Small-incision cholecystectomy (through a cylinder retractor) under local anaesthesia and sedation: a prospective observational study of five hundred consecutive cases[J]. *Langenbecks Arch Surg*, 2018, 403(6): 733~740.

[3] Sucandy I, Nadzam G, Duffy AJ, et al. Two-Port laparoscopic cholecystectomy: 18 patients human experience using the dynamic laparoscopic novatract retractor[J]. *Laparosc Adv Surg Tech A*, 2016, 26(8): 625~629.

[4] Singh AN, Kilambi R. Single-stage laparoscopic common bile duct exploration and cholecystectomy versus two-stage endoscopic stone extraction followed by laparoscopic cholecystectomy for patients with gallbladder stones with common bile duct stones: systematic review and meta-analysis of randomized trials with trial sequential analysis[J]. *Surg Endosc*, 2018, 32(9): 3763~3776.

[5] 崔磊, 瞿建国. 腹腔镜与小切口胆囊切除术治疗胆囊结石

合并胆囊炎疗效预后及生活质量比较研究[J]. *河北医学*, 2016, 22(4): 540~543.

[6] Rashid T, Naheed A, Farooq U, et al. Conversion of laparoscopic cholecystectomy into open cholecystectomy: an experience in 300 cases[J]. *Ayub Med Coll Abbottabad*, 2016, 28(1): 116~119.

[7] 高俊, 陈功. 不同方法胆囊切除术对胆结石患者血清免疫球蛋白和肠黏膜损伤程度的影响[J]. *实用肝脏病杂志*, 2018, 21(3): 443~446.

[8] Dong J, Li J, Cui L, et al. Cortisol modulates inflammatory responses in LPS-stimulated RAW264.7 cells via the NF- κ B and MAPK pathways[J]. *BMC Vet Res*, 2018, 14(1): 30.

[9] Jaafar G, Hammarqvist F, Enochsson L, et al. Patient-related risk factors for postoperative infection after cholecystectomy[J]. *World Surg*, 2017, 41(9): 2240~2244.

【文章编号】1006-6233(2020)07-1066-06

依托咪酯对 PI3K/AKT 通路及非小细胞肺癌 A549 细胞凋亡的影响

杜佳楠¹, 戴勤学², 容凤娇¹, 徐夏¹

(1 海南省三亚市中心医院/海南省第三人民医院麻醉科, 海南 三亚 572000

2. 温州医科大学附属第一医院麻醉科, 浙江 温州 325000)

【摘要】目的:探讨依托咪酯对磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKT)通路及非小细胞肺癌 A549 细胞凋亡的影响。**方法:**设 A549 细胞组、5-氟尿嘧啶组、依托咪酯低剂量组、高剂量组;5-氟尿嘧啶组、依托咪酯低剂量组、高剂量组分别加入 5-氟尿嘧啶组、不同浓度的依托咪酯,使其最终浓度为 100.0 μ g/mL、100.0 μ g/mL、200.0 μ g/mL,培养 72h。细胞计数试剂盒-8 评估细胞增殖水平,流式细胞仪测定细胞凋亡水平,Transwell 室测定细胞侵袭性,RT-PCR 法及 WEST-BLOT 法测定细胞磷酸化 PI3K(p-PI3K)、磷酸化 AKT(p-AKT)mRNA 和蛋白水平。**结果:**与 A549 细胞组比较,5-氟尿嘧啶组、依托咪酯低、高剂量组 OD 值、存活率水平、穿膜数、p-PI3K、p-AKT mRNA 和蛋白降低(P<0.05),凋亡率水平升高(P<0.05);且随着依托咪酯剂量的增加,依托咪酯各剂量组 OD 值、存活率、穿膜数、p-PI3K、p-AKT mRNA 和蛋白逐渐降低(P<0.05),凋亡率水平逐渐升高(P<0.05)。与 5-氟尿嘧啶组比较,依托咪酯低剂量组 OD 值、存活率水平、穿膜数、p-PI3K、p-AKT mRNA 和蛋白升高(P<0.05),凋亡率水平降低(P<0.05);依托咪酯高剂量组 OD 值、存活率水平、穿膜数、p-PI3K、p-AKT mRNA 和蛋白降低(P<0.05),凋亡率水平升高(P<0.05)。**结论:**依托咪酯能抑制肺癌 A549 细胞增殖、侵袭,促进肺癌 A549 细胞凋亡;其机制与依托咪酯通过减弱 p-PI3K、p-AKT mRNA 和蛋白磷酸化水平,进而抑制 PI3K/AKT 通路的激活传导有关。

【关键词】 依托咪酯; PI3K/AKT 通路; 非小细胞肺癌; 凋亡

【文献标识码】 A 【doi】10.3969/j.issn.1006-6233.2020.07.003

Effects of Etomidate on PI3K / AKT Pathway and Apoptosis of Non-small Cell Lung Cancer A549 Cells

DU Jia'nan, et al

【基金项目】海南省卫生计生行业科研项目,(编号:18A200041)

【通讯作者】徐夏

(Sanya Central Hospital of Hainan Province, Hainan Sanya 572000, China)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of etomidate on PI3K/AKT pathway and apoptosis of non-small cell lung cancer A549 cell. **Methods:** A549 cell group, 5-fluorouracil group, etomidate low-dose group and high-dose group were set up. 5-fluorouracil group, etomidate low-dose group and high-dose group were added 5-fluorouracil group and etomidate at different concentrations, and the final concentration was 100.0ug/mL, 100.0ug/mL and 200.0ug/mL for 72 hours. Cell proliferation level was assessed by cell counting kit-8, apoptotic level was measured by flow cytometry, cell invasiveness was measured by Transwell chamber, p-PI3K, p-AKT mRNA and protein levels were measured by RT-PCR and WEST-BLOT. **Results:** Compared with A549 cell group, the OD value, survival rate, number of perforation, p-PI3K, p-AKT gene and protein were significantly decreased in 5-fluorouracil group, low-dose and high-dose etomidate group ($P < 0.05$), apoptotic rate were significantly increased ($P < 0.05$). And with the increase of etomidate dosage, the OD value, survival rate, number of perforation, p-PI3K, p-AKT gene and protein were gradually decreased ($P < 0.05$), apoptotic rate were gradually increased ($P < 0.05$). Compared with 5-fluorouracil group, the OD value, survival rate, number of perforations, p-PI3K, p-AKT mRNA and protein in low-dose etomidate group were significantly increased ($P < 0.05$), and apoptotic rate were significantly decreased ($P < 0.05$); while the OD value, survival rate, number of perforation, p-PI3K, p-AKT mRNA and protein in high-dose etomidate group were significantly decreased ($P < 0.05$), and apoptotic rate were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Etomidate can inhibit the proliferation and invasion of lung cancer A549 cells and promote the apoptosis of lung cancer A549 cells. Its mechanism is related to the inhibition of PI3K/AKT pathway activation and transmission by reducing the levels of p-PI3K, p-AKT mRNA and protein phosphorylation by etomidate.

【Key words】 Etomidate; PI3K/AKT pathway; Non-small cell lung cancer; Apoptosis

肺癌是世界上癌症死亡的主要原因,也是我国的一个主要健康问题,约占所有癌症相关死亡人数的 28%^[1]。肺癌的两种主要形式是小细胞肺癌(SCLC)和非小细胞肺癌(NSCLC),其分别占有所有病例的约 15%和 85%^[2]。NSCLC 通常会产生对放射和化疗的抵抗力,其整体 5 年生存率仅为 15%,因此寻求新的治疗方法对于减少 NSCLC 的发病率是必要的。依托咪酯系一种催眠性静脉全麻药,是咪唑类衍生物,安全性大,是麻醉诱导常用的药物之一。近期研究发现,依托咪酯具有抗氧化、抗炎、抗血小板聚集和预防癌症的特性,其对肝癌、直肠癌和肺腺癌的发生及增殖活性具有抑制作用^[3]。依托咪酯也具有抗炎和抗氧化作用。已证明丙泊酚可以抑制嗜中性粒细胞粘附于血管内皮细胞,清除氧自由基,减轻氧化损伤并减少炎症细胞因子如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)的释放。临床上使用的丙泊酚浓度可促进细胞凋亡并抑制人类癌细胞的侵袭。在肺癌中,依托咪酯通过下调 HOX 转录反义 RNA(HOTAIR)介导的雷帕霉素靶蛋白(mTOR)/p70 核糖体蛋白 S6 激酶(p70S6K)途径降低细胞活力并诱导细胞凋亡。此外依托咪酯可以抑制核转录因子 E2 相关因子 2(Nrf2),从而抑制肺癌细胞的增殖和侵

袭^[4]。PI3K/AKT 途径是涉及许多类型肿瘤发生的主要信号传导途径。磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)是 85-kDa 和 110-kDa 亚基的异二聚体并且具有酪氨酸激酶活性。PI3K 介导从生长因子受体到蛋白激酶 B(AKT)的激活信号,AKT 是一种转移到细胞核中的激酶,并磷酸化多种靶分子以介导信号^[5]。PI3K/AKT 途径在调节癌细胞功能中起着至关重要的作用,包括血管生成,细胞侵袭和转移,激活途径诱导上皮-间质转化(EMT)等。本研究拟探讨依托咪酯对 PI3K/AKT 通路及非小细胞肺癌 A549 细胞凋亡的影响,为非小细胞肺癌的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要药品、试剂与仪器: 依托咪酯、5-氟尿嘧啶(纯度 99.99%,美国 sigma 公司,批号 C7023、C5249); Dulbecco 改良的 Eagle 培养基(美国 Life Technologies 公司,批号 MN12657); 细胞计数试剂盒-8(CCK-8)、BCA 蛋白质测定试剂盒、RIPA 裂解缓冲液、ECL 化学发光试剂盒(碧云天生物技术研究,批号 CK04-500、CM04-611、P0519、P0816F); 膜联蛋白 V(Annexin V)异硫氰酸荧光素(FITC)和碘化丙啶(PI)凋亡检测试剂盒(美国赛默飞世尔科技公司,批号 V13241); Transwell 室(美国 Corning 公司,批号 BH41785); TR-

Izol 试剂(美国 Invitrogen 公司,批号 IK-0533);SYBR PrimeScript miRNA RT-PCR 试剂盒、聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(宝日生物技术北京有限公司,批号 RR716、RM5037);抗 p-PI3K、p-AKT、抗 β -肌动蛋白(英国 Abcam 公司,批号 ab14798、ab20158、ab30557);辣根过氧化物酶缀合的兔抗小鼠二抗(贵州赛兰博科技有限公司,批号 AQ43095);680 型全自动酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);Biosciences Accuri C6 型流式细胞仪(美国 BD Biosciences 公司);徕卡 DM2700P 正立金相显微镜(德国徕卡公司);LightCycler-480 荧光定量 PCR 仪(瑞士罗氏公司)。

1.2 实验细胞培养及分组:肺癌 A549 细胞购自中国医学科学院肿瘤细胞库。肺癌 A549 细胞在 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基中生长,补充有 10%热灭活的胎牛血清,置于 37℃,5%CO₂ 的环境中。5-氟尿嘧啶组、依托咪酯低、高剂量组的肺癌 A549 细胞培养方法同肺癌 A549 细胞组,各组分别加入 5-氟尿嘧啶以及不同浓度的依托咪酯,使得 5-氟尿嘧啶组最终浓度为 100.0 μ g/mL(预试验求出 5-氟尿嘧啶对肺癌 A549 细胞的 LC50 为 200.0 μ g/mL,以 1/2LC50 为作用剂量),依托咪酯低、高剂量组最终浓度为 100.0 μ g/mL、200.0 μ g/mL(预试验求出依托咪酯对肺癌 A549 细胞的 LC50 为 400.0 μ g/mL,以 1/2LC50 为高剂量,2 倍间距求出低剂量)。以上各组每孔设 6 个平行样,培养 72h。

1.3 细胞活力测定:通过细胞计数试剂盒-8(CCK-8)测定评估细胞增殖。各组细胞培养结束后,将细胞以 3.0 $\times 10^3$ 个/孔接种在 96 孔板中,用等体积的含有 10 μ L CCK-8 的新鲜培养基替换 100 μ L 用过的培养基在 37℃ 孵育 1h。使用酶标仪在 450nm 波长下测量每个孔的吸光度(OD 值)。计算细胞存活率,细胞存活率=(实验组 OD-空白组 OD)/(A549 细胞组 OD-空白组 OD)。每个测定重复 6 次。

1.4 细胞凋亡水平测定:使用膜联蛋白 V(Annexin V)异硫氰酸荧光素(FITC)和碘化丙啶(PI)凋亡检测试剂盒测定细胞的凋亡率。各组细胞培养结束后,收获细胞并重悬于 500 μ L 结合缓冲液中。将细胞悬浮液与 5 μ L 膜联蛋白 V(Annexin V)异硫氰酸荧光素(FITC)和碘化丙啶(PI)凋亡检测试剂在暗处温育 15min。向每个样品中加入 50 μ g/mL PI,之后使用流式细胞仪测定 MCF-7 细胞的凋亡。

1.5 细胞侵袭迁移能力的测定:细胞培养结束后,收集细胞并以 5 $\times 10^4$ 个/mL 的浓度重悬于无血清培养基中,然后将 200 μ L 细胞悬浮液加入上室中。在底室中

填充 500 μ L 含有 10%胎牛血清的培养基。温育 24h 后,用棉签除去未侵入的细胞,用结晶紫染色膜下表面的细胞并计数。

1.6 细胞 p-PI3K、p-AKT mRNA 水平的测定:根据制造商的方案,使用 TRIzol 试剂从组织细胞中提取总 RNA。使用 SYBR PrimeScript miRNA RT-PCR 试剂盒从提取的 RNA 逆转录成 cDNA。RT-qPCR 反应的温度循环曲线如下:95℃ 持续 30s;40 个循环的 95℃ 持续 5s;和 60℃ 持续 20s。为了验证 PCR 产物的特异性,在扩增后立即进行熔解曲线分析,如下:加热至 95℃ 20s;冷却至 60℃,持续 20s;加热至 95℃,转换速率为 0.11C/sec,同时连续采集荧光信号。所有反应均在 LightCycler-480 荧光定量 PCR 仪上进行,并一式三份。循环量化(Cq)值在三次重复中没有差异超过 0.5。将靶基因的水平标准化为内部对照基因的水平,以允许计算 2^{- $\Delta\Delta C_q$} 值。Cq 定义为荧光通过固定阈值的分数循环数。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成,U6 为内参基因。引物序列如下:p-PI3K 正向,5'-GAAAGTGCCTTCCTTTTATAGGG-3'和反向,5'-CAATGAGTCGTCCTTTCCTTGGGAATC-3';p-AKT 正向,5'-CCGTGGTAGTCCTTCCTGAT-3'和反向,5'-TTGCATGCGTCCTTTCCTTCCTGAT-3';U6 正向,5'-CTCGCTTCGGCAGCACACA-3'和反向,5'-ACGCTTCACGAATTTGCCGT-3'。

1.7 细胞 p-PI3K、p-AKT 蛋白水平的测定:用 Hanks'平衡盐溶液洗涤细胞两次,并在 RIPA 裂解缓冲液中裂解,并在 13000g,4℃ 下离心 20min。随后使用 BCA 蛋白质测定试剂盒根据制造商的说明书测定蛋白质浓度。将蛋白质样品(20 μ g)用 4 \times 上样缓冲液(TaKaRa)在 95℃ 下变性 5min。用补充有 5%非磷酸盐的磷酸盐缓冲液(PBS)封闭 PVDF。将等量的蛋白质进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,并将凝胶转移到 PVDF 膜上。然后将 PVDF 膜与下列抗体一起温育:抗 p-PI3K(1:500 稀释)、p-AKT(1:500 稀释)和抗- β -肌动蛋白(1:2000 稀释),在 4℃ 下过夜。用含有 5%Tween 的 PBS 洗涤 PVDF 膜三次,并与辣根过氧化物酶缀合的兔抗小鼠二抗在室温下孵育 2h。根据制造商的说明,使用 ECL 化学发光试剂盒来显现蛋白质条带。使用 Image-ProPlus 6.0 软件以 β -actin 作为内参蛋白分析相对蛋白质表达水平。

1.8 统计学分析:采用 SPSS19.0 对数据进行录入、统计学分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析比较,多重比较采用 LSD-t 检验,P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组肺癌 A549 细胞 OD 值、存活率水平的比较: 与 A549 细胞组比较, 5-氟尿嘧啶组、依托咪酯低、高剂量组 OD 值、存活率水平降低 ($P < 0.05$), 且随着依托

咪酯剂量的增加, 依托咪酯各剂量组 OD 值、存活率逐渐降低 ($P < 0.05$); 与 5-氟尿嘧啶组比较, 依托咪酯低剂量组 OD 值、存活率水平升高 ($P < 0.05$), 依托咪酯高剂量组 OD 值、存活率水平降低 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组肺癌 A549 细胞 OD 值存活率水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	例数	OD 值	存活率 (%)
A549 细胞组		6	0.94 \pm 0.04	96.17 \pm 0.17
5-氟尿嘧啶组	100.0	6	0.48 \pm 0.07 ^a	23.79 \pm 10.49 ^a
依托咪酯低剂量组	100.0	6	0.73 \pm 0.03 ^{ab}	48.78 \pm 3.57 ^{ab}
依托咪酯高剂量组	200.0	6	0.25 \pm 0.07 ^{abc}	15.74 \pm 4.37 ^{abc}

注: 与 A549 细胞组相比, a $P < 0.05$; 与 5-氟尿嘧啶组相比, b $P < 0.05$; 与依托咪酯低剂量组相比, c $P < 0.05$

2.2 各组肺癌 A549 细胞凋亡率水平的比较: 与 A549 细胞组比较, 5-氟尿嘧啶组、依托咪酯低、高剂量组凋亡率水平升高 ($P < 0.05$), 且随着依托咪酯剂量的增加, 依托咪酯各剂量组凋亡率水平逐渐升高 ($P < 0.05$); 与 5-氟尿嘧啶组比较, 依托咪酯低剂量组凋亡率水平降低 ($P < 0.05$), 依托咪酯高剂量组凋亡率水平升高 ($P < 0.05$)。见表 2。

较, 依托咪酯低剂量组 p-PI3K、p-AKT mRNA 升高 ($P < 0.05$), 依托咪酯高剂量组 p-PI3K、p-AKT mRNA 降低 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 2 各组肺癌 A549 细胞凋亡率水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	例数	凋亡率 (%)
A549 细胞组		6	1.85 \pm 0.89
5-氟尿嘧啶组	100.0	6	18.71 \pm 2.04 ^a
依托咪酯低剂量组	100.0	6	7.43 \pm 2.59 ^{ab}
依托咪酯高剂量组	200.0	6	23.74 \pm 2.54 ^{abc}

注: 与 A549 细胞组相比, a $P < 0.05$; 与 5-氟尿嘧啶组相比, b $P < 0.05$; 与依托咪酯低剂量组相比, c $P < 0.05$

2.3 各组肺癌 A549 细胞侵袭迁移能力的比较: 与 A549 细胞组比较, 5-氟尿嘧啶组、依托咪酯低、高剂量组穿膜数降低 ($P < 0.05$), 且随着依托咪酯剂量的增加, 依托咪酯各剂量组穿膜数逐渐降低 ($P < 0.05$); 与 5-氟尿嘧啶组比较, 依托咪酯低剂量组穿膜数升高 ($P < 0.01$), 依托咪酯高剂量组穿膜数降低 ($P < 0.05$)。见表 3、图 1。

表 3 各组肺癌 A549 细胞侵袭迁移能力的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	例数	穿膜数 (个)
A549 细胞组		6	412.87 \pm 36.4
5-氟尿嘧啶组	100.0	6	95.47 \pm 25.38
依托咪酯低剂量组	100.0	6	163.74 \pm 26.47
依托咪酯高剂量组	200.0	6	69.39 \pm 18.47 ^a

注: 与 A549 细胞组相比, a $P < 0.05$; 与 5-氟尿嘧啶组相比, b $P < 0.05$; 与依托咪酯低剂量组相比, c $P < 0.05$

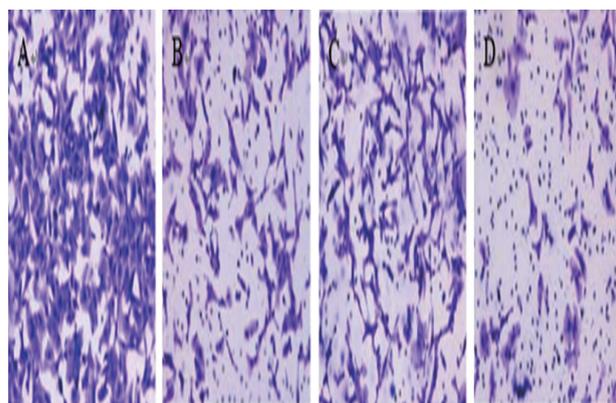


图 1 各组肺癌 A549 细胞穿膜数数目比较 (结晶紫染色, 200 倍)

注 A: A549 细胞组, B: 5-氟尿嘧啶组, C: 依托咪酯低剂量组, D: 依托咪酯高剂量组

2.4 各组肺癌 A549 细胞 p-PI3K、p-AKT mRNA 的表达: 与 A549 细胞组比较, 5-氟尿嘧啶组、依托咪酯低、高剂量组 p-PI3K、p-AKT mRNA 降低 ($P < 0.05$), 且随着依托咪酯剂量的增加, 依托咪酯各剂量组 p-PI3K、p-AKT mRNA 逐渐降低 ($P < 0.05$); 与 5-氟尿嘧啶组比

表4 各组肺癌 A549 细胞 p-PI3K p-AKT mRNA 表达水平的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	例数	p-PI3K	p-AKT
A549 细胞组		6	5.69 \pm 0.18	5.36 \pm 0.37
5-氟尿嘧啶组	100.0	6	0.83 \pm 0.22 ^a	0.94 \pm 0.43 ^a
依托咪酯低剂量组	100.0	6	1.49 \pm 0.28 ^{ab}	1.65 \pm 0.24 ^{ab}
依托咪酯高剂量组	200.0	6	0.59 \pm 0.18 ^{abc}	0.54 \pm 0.23 ^{abc}

注:与 A549 细胞组相比, aP<0.05; 与 5-氟尿嘧啶组相比, bP<0.05; 与依托咪酯低剂量组相比, cP<0.05

2.5 各组肺癌 A549 细胞 p-PI3K、p-AKT 蛋白的表达:与 A549 细胞组比较,5-氟尿嘧啶组、依托咪酯低、高剂量组 p-PI3K、p-AKT 蛋白降低 (P<0.05), 且随着依托咪酯剂量的增加, 依托咪酯各剂量组 p-PI3K、p-

AKT 蛋白逐渐降低 (P<0.05); 与 5-氟尿嘧啶组比较, 依托咪酯低剂量组 p-PI3K、p-AKT 蛋白升高 (P<0.05), 依托咪酯高剂量组 p-PI3K、p-AKT 蛋白降低 (P<0.05)。见表 5、图 2。

表5 各组肺癌 A549 细胞 p-PI3K p-AKT 蛋白表达水平的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	例数	p-PI3K	p-AKT
A549 细胞组		6	6.54 \pm 0.19	6.54 \pm 0.41
5-氟尿嘧啶组	100.0	6	0.98 \pm 0.23 ^a	0.84 \pm 0.43 ^a
依托咪酯低剂量组	100.0	6	1.56 \pm 0.29 ^{ab}	1.99 \pm 0.37 ^{ab}
依托咪酯高剂量组	200.0	6	0.46 \pm 0.22 ^{abc}	0.44 \pm 0.32 ^{abc}

注:与 A549 细胞组相比, aP<0.05; 与 5-氟尿嘧啶组相比, bP<0.05; 与依托咪酯低剂量组相比, cP<0.05

31.2m

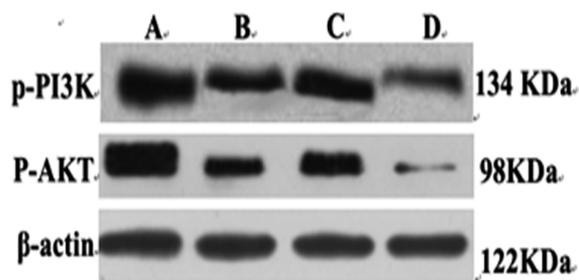


图2 各组肺癌 A549 细胞 p-PI3K、p-AKT 蛋白表达水平的比较

注 A: A549 细胞组, B: 5-氟尿嘧啶组, C: 依托咪酯低剂量组, D: 依托咪酯高剂量组

3 讨论

肺癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,近十年来,我国肺癌的发病率翻了一倍。最常见的肺癌类型是非小细胞肺癌 (NSCLC), 占病例的 80-85%^[6]。由于缺乏有效的治疗或早期诊断, NSCLC 患者术后生存率较低, 肿瘤转移和复发决定了患者的生存状况。因此寻求新的治疗手段对于 NSCLC 患者预后具有重要意义。依托咪酯已被证明在体内和体外具有癌症预防活

性^[7]。动物和细胞培养模型研究表明依托咪酯抑制肿瘤形成、癌症的发生和转移。依托咪酯通过增强 GADD153 mRNA 的表达和转录活性, 显著抑制前列腺 DU145 和 LNCaP 癌细胞的增殖, 导致细胞周期停滞和抑制增殖^[8]。此外, 依托咪酯能够促进垂体瘤细胞凋亡^[9]。有研究表明, 依托咪酯参与调节关键信号通路, 依托咪酯通过减少活性氧的生成来抑制 LPS 诱导的 AKT 活化和磷酸化, 这对于巨噬细胞中 LPS 诱导的炎症反应至关重要。同时, 低剂量依托咪酯预处理可增加细胞外信号调节激酶 1/2 的激活, 抑制 AKT 的激活^[10]。依托咪酯激活抑制 PI3K/AKT 途径, 这被认为是癌症进展的关键环节。本次研究结果显示, 与 A549 细胞组比较, 5-氟尿嘧啶组、依托咪酯低、高剂量组 OD 值、存活率水平、穿膜数降低, 凋亡率水平升高, 且随着依托咪酯剂量的增加, 依托咪酯各剂量组 OD 值、存活率、穿膜数逐渐降低, 凋亡率水平逐渐升高; 与 5-氟尿嘧啶组比较, 依托咪酯高剂量组 OD 值、存活率水平、穿膜数降低, 凋亡率水平升高。这与上述讨论符合, 同时提示, 依托咪酯能抑制肺癌 A549 细胞增殖、侵袭, 促进肺癌 A549 细胞凋亡。

PI3K/AKT 途径在调节生理和病理过程中起重要

作用。在肿瘤发生和发展过程中,PI3K/AKT 通路调节多种细胞行为,包括增殖,迁移和转移等。此外,PI3K/AKT 途径被证明是调节癌细胞化疗耐药性的关键途径^[11]。AKT 是 PI3K/AKT 途径中的关键分子,其异常表达可直接影响 PI3K/AKT 途径的功能。AKT 是一种新的肌动蛋白结合蛋白,参与肌动蛋白细胞骨架的形成并增强 PI3K 磷酸化。AKT 也被证实是一种致癌基因,在肿瘤的发生和发展中起着重要作用;在该过程中涉及大量信号传导途径,包括 PI3K/AKT 信号传导途径。AKT 作用于 PI3K 结合并激活 Gαi3,这是一种调节肿瘤细胞增殖和凋亡的经典信号通路^[12]。体外细胞试验发现,AKT 在胰腺癌组织和细胞中以高水平表达,并与胰腺癌恶性程度相关。此外,微阵列分析揭示了 AKT 水平与病理分级之间的正相关关系;AKT 的表达与肿瘤恶性程度密切相关,包括组织学分级和转移,以及无进展生存期(PFS)和总生存期^[13-15]。研究表明,AKT 沉默通过 PI3K/AKT 信号通路抑制胶质瘤细胞的迁移和侵袭。本次研究结果显示,与 A549 细胞组比较,5-氟尿嘧啶组、依托咪酯低、高剂量组 p-PI3K、p-AKT mRNA 和蛋白降低,且随着依托咪酯剂量的增加,依托咪酯各剂量组 p-PI3K、p-AKT mRNA 和蛋白逐渐降低;与 5-氟尿嘧啶组比较,依托咪酯高剂量组 p-PI3K、p-AKT mRNA、蛋白降低。这提示依托咪酯通过减弱 p-PI3K、p-AKT mRNA 和蛋白磷酸化水平,进而抑制 PI3K/AKT 通路的激活传导。

综上所述,依托咪酯能抑制肺癌 A549 细胞增殖、侵袭,促进肺癌 A549 细胞凋亡;其机制与依托咪酯通过减弱 p-PI3K、p-AKT mRNA 和蛋白磷酸化水平,进而抑制 PI3K/AKT 通路的激活传导有关。

【参考文献】

[1] 辛雯艳,黄磊,闫贻忠.2005-2013 年中国肿瘤登记地区肺癌流行和疾病负担时间趋势分析[J].中华肿瘤防治杂志,2019,26(15):1059~1065.
[2] 崔晓霞,宋鹏,张力.小细胞肺癌诊疗新进展[J].中国肺癌杂志,2019,22(6):355~362.
[3] 王春,朱昌娥,章赛吉,等.依托咪酯用量对左向右分流先天性心脏病患儿血流动力学及脑电双频指数的影响[J].上海交通大学学报(医学版),2017,37(12):1650~1652.
[4] 康建勋,国世刚,李经利.地佐辛联合依托咪酯用于肝癌

射频消融术的效果[J].中国医药导报,2017,14(9):182~185.
[5] 王雷,牛志强,郑孟良,等.右美托咪定复合依托咪酯麻醉对直肠癌术后医院感染患者免疫功能及炎症因子的影响分析[J].中华医院感染学杂志,2017,27(21):4949~4952.
[6] Dey N, De P, Leyland-Jones B. PI3K-AKT-mTOR inhibitors in breast cancers: from tumor cell signaling to clinical trials[J]. Pharmacol Ther, 2017, 175(1):91~106.
[7] 林安琪,陈雨晴,张小利,等.非小细胞肺癌免疫治疗“超进展”[J].肿瘤,2019,39(8):680~690.
[8] Komatsu R, You J, Rajan S, et al. Steroid administration after anaesthetic induction with etomidate does not reduce in-hospital mortality or cardiovascular morbidity after non-cardiac surgery[J]. Br Anaesth, 2018, 120(3):501~508.
[9] Gupta P, Gupta M. Comparison of different doses of intravenous lignocaine on etomidate-induced myoclonus: a prospective randomised and placebo-controlled study[J]. Indian Anaesth, 2018, 62(2):121~126.
[10] Katz J, Greenberg S. Etomidate Is NOT a First-Line Induction Agent in Critically Ill Patients[J]. Crit Care Med, 2018, 46(9):1495~1496.
[11] 朱敏,刘亚华,于婵娟.依托咪酯对垂体瘤细胞迁移能力影响的研究[J].中国临床药理学杂志,2018,34(11):1357~1360.
[12] Diaz-Serrano A, Angulo B, Dominguez C, et al. Genomic profiling of HER2-positive gastric cancer: PI3K/Akt/mTOR pathway as predictor of outcomes in HER2-Positive advanced gastric cancer treated with trastuzumab[J]. Oncologist, 2018, 23(9):1092~1102.
[13] Mazzon M, Castro C, Thaa B, et al. Alphavirus-induced hyperactivation of PI3K/AKT directs pro-viral metabolic changes[J]. Plos Pathogens, 2018, 14(1):e1006835.
[14] Mao Y, Xi L, Li Q, et al. Combination of PI3K/Akt pathway inhibition and Plk1 depletion can enhance chemosensitivity to gemcitabine in pancreatic carcinoma[J]. Transl Oncol, 2018, 11(4):852~863.
[15] Zhou R, Chen H, Chen J, et al. Extract from Astragalus membranaceus inhibit breast cancer cells proliferation via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. BMC Complement Altern Med, 2018, 18(1):83~94.

欢 迎 投 稿 欢 迎 指 正