



DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2023.02.08

文章编号: 2095-1264(2023)02-0181-06

## 白藜芦醇通过抑制 Akt/mTOR 信号通路活性促进肺癌细胞自噬发挥抗肿瘤效应的研究<sup>\*</sup>

闫 菊, 翟 飞<sup>\*</sup>, 熊小敏, 曾 茹, 赵世财, 向 静  
(广元市中心医院呼吸内科, 四川 广元, 628017)

**摘要:** **目的** 探讨白藜芦醇对肺癌细胞生长活性的抑制效应及可能的机制。**方法** 稳定培养肺癌细胞系 H292, 分别加入含 10、20、40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  白藜芦醇的培养基进行干预, 采用 CCK-8、流式细胞术、细胞集落形成实验检测白藜芦醇对 H292 细胞生长活性的影响, 采用免疫荧光、Western blotting 检测白藜芦醇对细胞 Akt/mTOR 信号通路相关蛋白的影响。**结果** (1) CCK-8 检测结果显示, 白藜芦醇对 H292 细胞增殖有明显抑制作用 ( $P<0.05$ ), 且呈时间和剂量依赖性, 同时对 H292 细胞周期有明显影响, 能阻滞细胞周期于  $G_2/M$  期。(2) 白藜芦醇可明显抑制 H292 细胞集落形成 ( $P<0.05$ ), 并呈剂量依赖性。(3) Western blotting 检测结果显示, 白藜芦醇以剂量依赖的方式诱导 H292 细胞中 LC3-II 的累积。免疫荧光检测发现, 白藜芦醇可诱导细胞核和线粒体中 GFP-LC3 显著增加。(4) 自噬抑制剂 3-MA 能有效减弱白藜芦醇对 H292 细胞活力的抑制作用, 溶酶体酸化抑制剂 Bafilomycin A1 则可促进白藜芦醇导致的 LC3-II 累积。(5) 白藜芦醇可下调 H292 细胞中 p-Akt、p-P70S6K、p-mTOR 蛋白的表达 ( $P<0.05$ ), 而对 Akt、P70S6K、mTOR 蛋白的表达无明显影响 ( $P>0.05$ )。**结论** 白藜芦醇可通过抑制 Akt/mTOR 信号通路抑制肺癌细胞的增殖。

**关键词:** 肺癌; 白藜芦醇; 细胞自噬

**中图分类号:** R734.2 **文献标识码:** A

## Antitumor effects of resveratrol by inhibiting the Akt/mTOR signaling pathway activity and promoting the autophagy of lung cancer cells<sup>\*</sup>

YAN Ju, ZHAI Fei<sup>\*</sup>, XIONG Xiaomin, ZENG Qie, ZHAO Shicai, XIANG Jing

(Department of Respiratory Medicine, Guangyuan Central Hospital, Guangyuan, 628017, Sichuan, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of resveratrol on the growth activity of lung cancer cells and its possible mechanism. **Methods** The lung cancer cell line H292 was stably cultured, and the medium containing resveratrol of different concentrations was added for intervention. CCK-8 test, flow cytometry and cell colony formation test were used to detect the effects of resveratrol on the growth activity of H292 cells. Immunofluorescence and Western blotting were used to detect the effects of resveratrol on the expressions of Akt/mTOR signaling pathway-related proteins in H292 cells. **Results** (1) CCK-8 results showed that resveratrol significantly inhibited the proliferation of H292 cells ( $P<0.05$ ) in a time- and dose-dependent manner. At the same time, resveratrol had a significant effect on the cell cycle of H292, which could arrest the cell cycle at  $G_2/M$  phase. (2) Resveratrol significantly inhibited the colony formation of H292 cells in a dose-dependent manner ( $P<0.05$ ). (3) Western blotting showed that resveratrol induced the accumulation of LC3-II in H292 cells in a dose-dependent manner. Immunofluorescence assay showed that resveratrol induced a significant increase of GFP-LC3 in the nucleus and

<sup>\*</sup>基金项目: 四川省卫生健康委员会科研课题(17PJ265)。

作者简介: 闫菊, 女, 硕士, 主管护师, 研究方向: 肺癌生物学。

<sup>\*</sup>通信作者: 翟飞, 男, 硕士, 主治医师, 研究方向: 肺癌生物学。

mitochondria. (4) Autophagy inhibitor 3-MA effectively weakened the inhibitory effect of resveratrol on the viability of H292 cells. Lysosomal acidification inhibitor Bafilomycin A1 promoted the accumulation of LC3-II which was induced by resveratrol. (5) Resveratrol down-regulated the expressions of p-Akt, p-P70S6K and p-mTOR proteins in H292 cells ( $P < 0.05$ ), but had no significant effects on the expressions of Akt, P70S6K and mTOR proteins ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Resveratrol can inhibit the proliferation of lung cancer cells by suppressing the Akt/mTOR signal pathway activity.

**Keywords:** Lung cancer; Resveratrol; Autophagy

## 前言

肺癌是全世界范围内发病率最高的恶性肿瘤, 每年死亡人数约 159 万<sup>[1]</sup>, 且肺癌患者的 5 年总体生存率不足 18%, 严重影响其预后及生活质量<sup>[2]</sup>。白藜芦醇是一种非黄酮类多酚化合物, 是许多植物受到刺激时产生的一种抗毒素<sup>[3]</sup>, 对新陈代谢、心血管和神经退行性疾病有很强的保护作用, 在多种类型的肿瘤中均具有抗氧化和预防作用<sup>[4]</sup>, 但其在肺癌中的作用及机制尚待研究。mTOR 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶, 属于 PI3K 相关激酶家族, 参与介导细胞生长、营养、能量获取等诸多生理过程, 负责调控细胞的增殖、凋亡等<sup>[5]</sup>。mTOR 处于肿瘤信号通路的关键位置, 针对 mTOR 的抑制剂已被广泛应用于肿瘤的靶向治疗<sup>[6]</sup>。近年来发现, 该信号通路也可通过激活 mTOR 控制肿瘤细胞自噬和生长, 是许多临床药物的作用靶点<sup>[7]</sup>。在本研究中, 我们探讨了白藜芦醇是否可通过 mTOR 相关途径抑制肺癌的生长, 以期能为肺癌治疗药物的选择提供更多可能。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞系及试剂** 肺癌细胞系 H292 购自中国科学院细胞库(上海)。将细胞加入含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素的改良 Eagle's 培养基, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵育箱内进行培养。白藜芦醇标准品购于 Sigma 公司, 纯度 99%, 分别以不同浓度(10、20、40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )加入培养基, 对 H292 细胞进行处理。LC3 抗体、Akt 抗体、p-Akt 抗体、p-mTOR 抗体、mTOR 抗体购于美国 Cell Signal Technology。

**1.2 CCK-8 及流式细胞术** CCK-8 检测细胞增殖: 将 H292 细胞以  $3\times 10^3$  个/孔的密度接种到 96 孔板中, 18 h 后加入含 0、10、20、40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  白藜芦醇的新培养基, 对照组(Control 组)细胞不加药物, 于接种后不同时间点(0、24、48、72 h)每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液, 37 °C 孵育 2 h 后, 在 450 nm 处测定光密度(optical density, OD)值, 检测细胞增殖情况。流式细胞术分析细胞周期: 采用不同浓度白藜芦醇处

理 H292 细胞 24 h, 离心后用 PBS 洗涤, 再用核糖核酸酶和碘化丙啶孵育, 流式细胞仪分析细胞周期分布。细胞凋亡检测按照 Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒说明书进行。

**1.3 细胞集落形成** 将 H292 细胞分别用 10、20、40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  白藜芦醇处理, 以 300 个/孔接种于 6 孔培养板, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 14 天。第 15 天, 用 4% 多聚甲醛固定细胞, 用 0.005% 结晶紫(Sigma 公司)染色, PBS 洗涤后, 在倒置光学显微镜下计算菌落数, 计数含 50 个以上细胞的克隆。

**1.4 免疫荧光** 将 H292 细胞按照  $1.5\times 10^5$  个/孔接种于含 1% 明胶的玻璃片上, 置于 6 孔培养板中, 培养至 60% 融合。用 PBS 洗涤细胞 3 次, 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, 0.3% Triton X-100 处理 20 min, 再用含 5% 胎牛血清的 PBS 与吐温 20(PBS-T)孵育 30 min, 与抗 LC3 抗体 4 °C 孵育过夜, 再用 PBS-T 洗涤, 室温下在黑暗潮湿小室中用荧光标记的二抗染色 2 h, 共聚焦显微镜下观察。

**1.5 细胞转染与处理** 取对数生长期 H292 细胞进行转染。根据 Lipofectamine™ 3000 说明书, 将转染 pHRI-NC 或 pHRI-ATG5 和 Lipofectamine 3000 的混合溶液加入细胞中, 转染 4 h 后更换培养基, 24 h 后通过 RT-qPCR 检测是否转染成功。将未转染和转染后的细胞分别用 5 mmol·L<sup>-1</sup> 3-MA、40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  白藜芦醇或 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  溶酶体酸化抑制剂 Bafilomycin A1 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下处理 24 h, CCK-8 检测细胞增殖及 LC3-II、蛋白表达水平。

**1.6 Western blotting** 将 H292 细胞用 RIPA 缓冲液裂解, 10%~15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离等效蛋白量(20  $\mu\text{g}$ ), 电转移到硝酸纤维素膜上。用 5% 的脱脂牛奶在 Tris-Buffer 生理盐水中封闭膜, 一抗浓度 1:1 000, 孵育过夜后, TBST 清洗, 兔抗鼠二抗(1:5 000)孵育, ECL 法显影定影。采用 Quantity One 软件分析蛋白条带灰度, 以  $\beta$ -actin 为内参, 检测 LC3-II、p-Akt、p-P70S6K、p-mTOR、Akt、P70S6K、mTOR 蛋白的表达。

**1.7 统计学方法** 采用 SPSS 16.0 统计学软件分析

数据, GraphPad Prism 5.0 作图。符合正态分布的计量资料采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间比较采用独立  $t$  检验,  $P<0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 白藜芦醇对肺癌细胞增殖活性及细胞周期的影响** CCK-8 检测结果显示, 白藜芦醇对 H292 细胞的增殖有明显抑制作用, Control 组、 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组、 $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组、 $40\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组 48 h 的细胞数分别为  $(8.7\pm 1.1)\times 10^5$ 、 $(6.6\pm 0.8)\times 10^5$ 、 $(3.4\pm 0.5)\times 10^5$ 、 $(2.2\pm 0.4)\times 10^5$ , 凋亡细胞比例分别为  $(17.5\pm 2.6)\%$ 、 $(22.4\pm 3.5)\%$ 、 $(28.6\pm 3.2)\%$ 、 $(39.4\pm 5.6)\%$ , 差异均具有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 抑制效应呈明显的时间和剂量依赖性。白藜芦醇对 H292 细胞周期有明显影响, 能阻滞细胞周期于  $G_2/M$  期, 同时能够促进细胞

凋亡(图 1)。

**2.2 白藜芦醇对细胞集落形成的影响** 集落形成实验显示, Control 组、 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组、 $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组、 $40\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组细胞集落数量分别为  $(316.5\pm 46.9)$ 、 $(241.3\pm 42.0)$ 、 $(96.7\pm 22.4)$ 、 $(52.9\pm 13.8)$ , 差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 表明白藜芦醇对 H292 细胞的集落形成活性有明显抑制作用。随着干预浓度的提高, 细胞集落形成数量逐渐减少, 呈剂量依赖性(图 2)。

**2.3 白藜芦醇诱导肺癌细胞自噬** 用白藜芦醇分别处理 H292 细胞 24、48 h。Western blotting 结果显示, 白藜芦醇可以剂量依赖的方式诱导细胞中 LC3-II 的累积。进一步免疫荧光检测发现, 细胞核和线粒体中绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 标记的 LC3 阳性自噬小体 (GFP-LC3) 显著增加(图 3)。

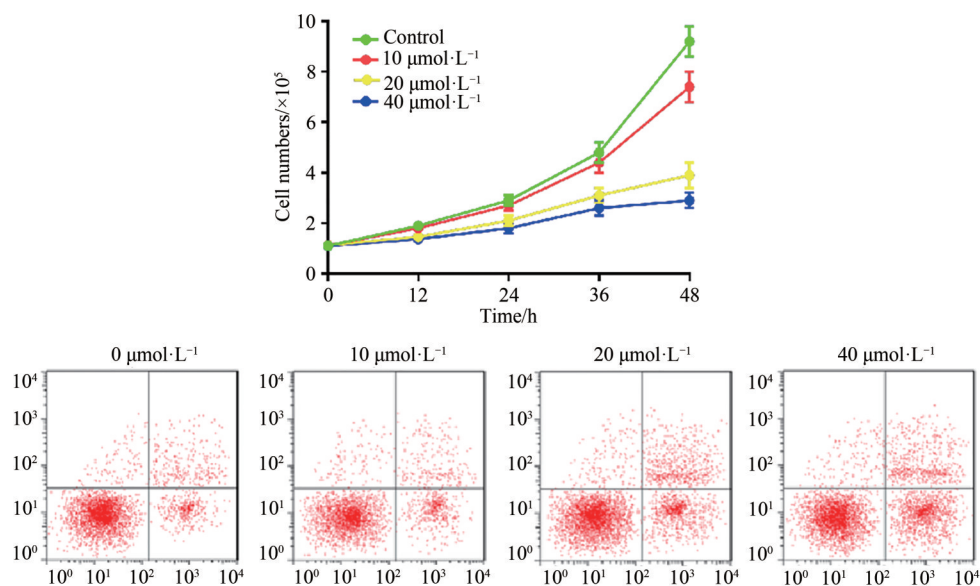


图 1 白藜芦醇对肺癌细胞增殖活性及细胞周期的影响

Fig. 1 Effects of resveratrol on proliferation activity and cell cycle of lung cancer cells

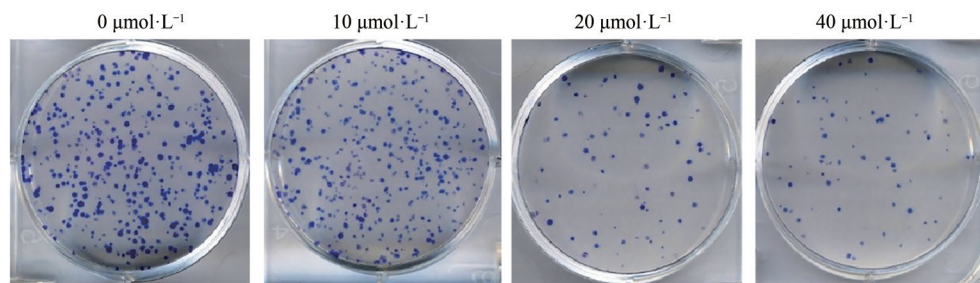


图 2 白藜芦醇对肺癌细胞集落形成的影响

Fig. 2 Effects of resveratrol on the colony formation of lung cancer cells

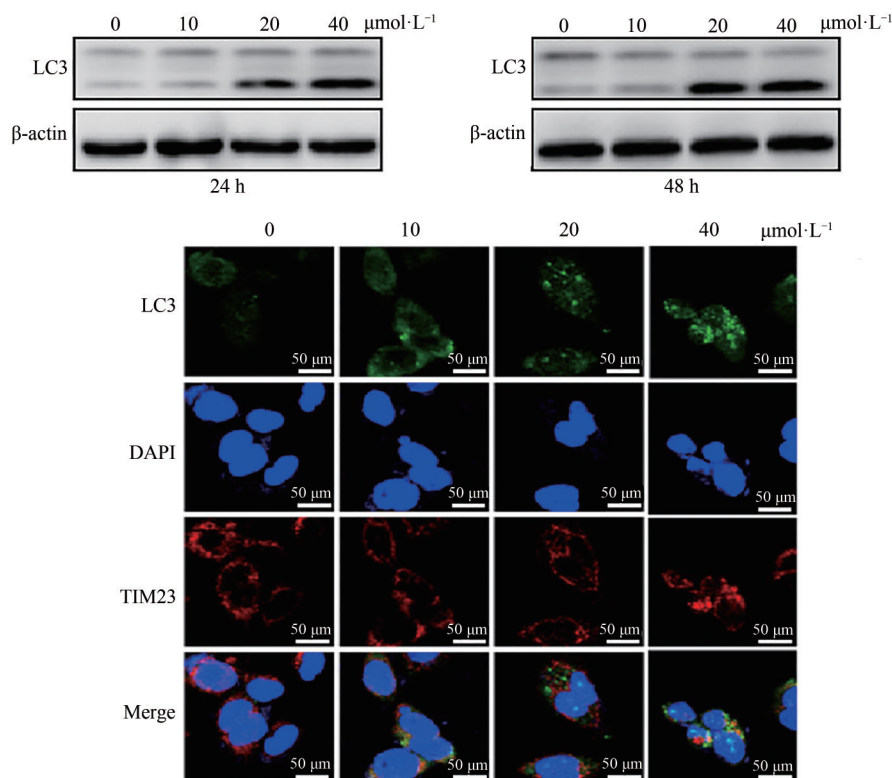


图3 白藜芦醇诱导H292细胞自噬  
 Fig. 3 H292 autophagy induced by resveratrol

**2.4 自噬抑制剂3-MA对白藜芦醇效应的抑制作用** CCK-8检测结果显示,自噬抑制剂3-MA能有效减弱白藜芦醇对H292细胞活力的抑制作用。溶酶体酸化抑制剂Bafilomycin A1则可促进白藜芦醇导致的LC3-II累积。在白藜芦醇处理的H292细胞中,通过siRNA敲低ATG5可以减少LC3-II的表达。

上述结果表明,白藜芦醇可诱导肺癌细胞发生自噬(图4)。

**2.5 白藜芦醇对mTOR信号通路的影响** 白藜芦醇可下调H292细胞中p-Akt、p-P70S6K、p-mTOR蛋白的表达( $P<0.05$ ),而对Akt、P70S6K、mTOR蛋白的表达无明显影响( $P>0.05$ )(图5)。

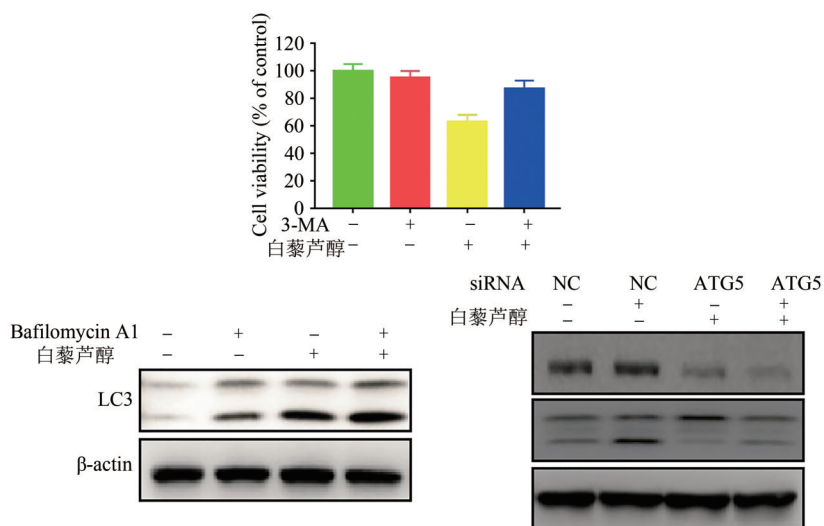


图4 自噬抑制剂3-MA对白藜芦醇效应的抑制作用  
 Fig. 4 Inhibition of resveratrol effects by autophagy inhibitor 3-MA



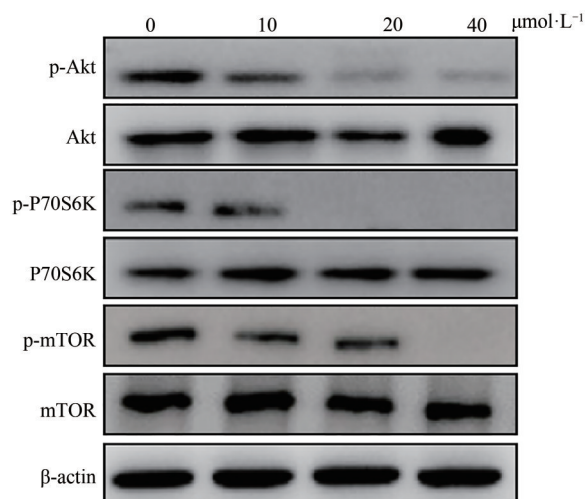


图 5 白藜芦醇对 mTOR 信号通路的影响

Fig. 5 Effects of resveratrol on mTOR signaling pathway

### 3 讨论

白藜芦醇是蒽醌萜类化合物,主要来源于蓼科植物虎杖的根茎提取物,在红葡萄皮、红葡萄酒和葡萄汁中含量也很高,是一种天然抗氧化剂<sup>[8]</sup>。白藜芦醇可降低血液黏稠度,抑制血小板凝集和血管舒张,保持血流畅通,延缓衰老<sup>[9]</sup>;还具有抗动脉粥样硬化和防治冠心病、缺血性心脏病、高血脂的作用<sup>[10]</sup>;此外,还可预防肿瘤的发生发展,并具有雌激素样作用,可用于治疗乳腺癌等疾病<sup>[11]</sup>。本研究发现,白藜芦醇对 H292 细胞的增殖有明显抑制作用,且呈时间和剂量依赖性,同时可阻滞细胞周期于 G<sub>2</sub>/M 期,抑制细胞集落形成,表明其对肺癌细胞有明显的增殖抑制作用。

有研究报道,自噬和凋亡在同一细胞中可同时发生,它们可能通过某种信号通路相互联系<sup>[12]</sup>。PI3K/Akt/mTOR 和 AMPK 信号通路是自噬和凋亡的关键环节<sup>[13]</sup>。一些抗凋亡信号如 PI3K/Akt/mTOR 信号通路和 Bcl-2 可抑制自噬,而凋亡信号如 AMPK 信号通路和 Bax 可激活自噬<sup>[14-15]</sup>。自噬在肿瘤中的作用是多种多样的,自噬和自噬相关过程甚至在同一类型的肿瘤中也会产生不同作用,这取决于疾病进展阶段、细胞类型、致癌驱动因素和激活信号强度<sup>[16]</sup>。自噬在肺癌中的抑制作用越来越多地被报道,因此,区分自噬在肿瘤发生中的细胞保护作用 and 细胞毒性作用是很重要的。本研究发现,白藜芦醇具有抑制肺癌细胞增殖和诱导自噬的作用,表现为 LC3-II 蛋白表达上调以及免疫荧光下 GFP 标记

的 LC3 阳性自噬小体形成,同时还伴随着细胞的生长活性下降,表明白藜芦醇介导的细胞自噬主要发挥抗肿瘤作用。丝氨酸/苏氨酸激酶 Akt 作为一种原癌基因,调控着多个生物过程,包括细胞存活、增殖、生长和糖原代谢<sup>[17]</sup>。Akt 可通过作用于 TSC1/TSC2 复合体以及 mTOR 信号通路调节细胞生长。mTOR 是一种非典型丝氨酸/苏氨酸激酶,存在于 mTORC1、mTORC2 两种不同的复合体中<sup>[18]</sup>。本研究发现,肺癌细胞中 p-Akt、p-mTOR 和 p-P70S6K 蛋白表达水平均显著降低,表明 Akt/mTOR 信号通路的活性被抑制,这可能是其发挥抗肿瘤效应的机制之一。

综上所述,白藜芦醇可通过抑制 Akt/mTOR 信号通路的活性,从而抑制肺癌细胞的增殖。

### 参考文献

- [1] MAJEM M, JUAN O, INSA A, et al. SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small cell lung cancer (2018) [J]. *Clin Transl Oncol*, 2019, 21(1): 3-17. DOI: 10.1007/s12094-018-1978-1.
- [2] YAKAL S, SOFYALI S, ÖZKAN B, et al. Oxygen uptake efficiency slope and prediction of post-operative morbidity and mortality in patients with lung cancer [J]. *Lung*, 2018, 196(2): 255-262. DOI: 10.1007/s00408-018-0085-y.
- [3] LV Z M, LING M Y, CHEN C. Comparative proteomics reveals protective effect of resveratrol on a high-fat diet-induced damage to mice testis [J]. *Syst Biol Reprod Med*, 2020, 66(1): 37-49. DOI: 10.1080/19396368.2019.1701138.
- [4] EL-FAR S W, HELMY M W, KHATTAB S N, et al. Phytosomal bilayer-enveloped casein micelles for codelivery of *Monascus* yellow pigments and resveratrol to breast cancer [J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2018, 13(5): 481-499. DOI: 10.2217/nmm-2017-0301.
- [5] ZHONG Z, SEPRAMANIAM S, CHEW X H, et al. PORCN inhibition synergizes with PI3K/mTOR inhibition in Wnt-addicted cancers [J]. *Oncogene*, 2019, 38(40): 6662-6677. DOI: 10.1038/s41388-019-0908-1.
- [6] DUARTE A, ANDRÉ-GRÉGOIRE G, TRILLET K, et al. Inhibition of mTOR in head and neck cancer cells alters endothelial cell morphology in a paracrine fashion [J]. *Mol Carcinog*, 2019, 58(1): 161-168. DOI: 10.1002/mc.22911.
- [7] MROUEH F M, NOURELDEIN M, ZEIDAN Y H, et al. Unmasking the interplay between mTOR and Nox4: novel insights into the mechanism connecting diabetes and cancer [J]. *FASEB J*, 2019, 33(12): 14051-14066. DOI: 10.1096/fj.201900396RR.
- [8] NANA A W, CHIN Y T, LIN C Y, et al. Tetrac downregulates  $\beta$ -catenin and HMGA2 to promote the effect of resveratrol in colon cancer [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2018, 25(3): 279-293. DOI: 10.1530/ERC-17-0450.
- [9] LEE S R, JIN H, KIM W T, et al. Tristetraprolin activation by resveratrol inhibits the proliferation and metastasis of colorectal cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2018, 53(3): 1269-1278. DOI: 10.3892/ijo.2018.4453.

- [10] LI W P, SHI Y, WANG R X, et al. Resveratrol promotes the sensitivity of small-cell lung cancer H446 cells to cisplatin by regulating intrinsic apoptosis [J]. *Int J Oncol*, 2018, 53(5): 2123–2130. DOI: 10.3892/ijo.2018.4533.
- [11] CHEN X, HU X Y, LI Y, et al. Resveratrol inhibits Erk1/2-mediated adhesion of cancer cells via activating PP2A-PTEN signaling network [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(3): 2822–2836. DOI: 10.1002/jcp.27100.
- [12] XIONG X X, LU B, TIAN Q Z, et al. Inhibition of autophagy enhances cinobufagin-induced apoptosis in gastric cancer [J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(1): 492–500. DOI: 10.3892/or.2018.6837.
- [13] LIU Z, WANG F, ZHOU Z W, et al. Alisertib induces G2/M arrest, apoptosis, and autophagy via PI3K/Akt/mTOR- and p38 MAPK-mediated pathways in human glioblastoma cells [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(3): 845–873.
- [14] ZHANG Q, ZHU H X, XU X S, et al. Inactivated Sendai virus induces apoptosis and autophagy via the PI3K/Akt/mTOR/p70S6K pathway in human non-small cell lung cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 465(1): 64–70. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.07.130.
- [15] HE Y J, MO Q, LUO B, et al. Induction of apoptosis and autophagy via mitochondria- and PI3K/Akt/mTOR-mediated pathways by *E. adenophorum* in hepatocytes of Saanen goat [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(34): 54537–54548. DOI: 10.18632/oncotarget.10402.
- [16] LIANG Z H, WAN D, YI Q Y, et al. A cyclometalated iridium (III) complex induces apoptosis and autophagy through inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Transition Met Chem*, 2018, 43(3): 243–257. DOI: 10.1007/s11243-018-0210-z.
- [17] WANG X Y, ZHANG X H, PENG L, et al. Bardoxolone methyl (CDDO-Me or RTA402) induces cell cycle arrest, apoptosis and autophagy via PI3K/Akt/mTOR and p38 MAPK/Erk1/2 signaling pathways in K562 cells [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(10): 4652–4672.
- [18] TSAI J P, LEE C H, YING T H, et al. Licochalcone A induces autophagy through PI3K/Akt/mTOR inactivation and autophagy suppression enhances Licochalcone A-induced apoptosis of human cervical cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(30): 28851–28866. DOI: 10.18632/oncotarget.4767.

校稿: 李征 王娟

**本文引用格式:** 闫菊, 翟飞, 熊小敏, 等. 白藜芦醇通过抑制 Akt/mTOR 信号通路活性促进肺癌细胞自噬发挥抗肿瘤效应的研究[J]. *肿瘤药 学*, 2023, 13(2): 181–186. DOI: 10.3969/j. issn. 2095–1264.2023.02.08.

**Cite this article as:** YAN Ju, ZHAI Fei, XIONG Xiaomin, et al. Antitumor effects of resveratrol by inhibiting the Akt/mTOR signaling pathway activity and promoting the autophagy of lung cancer cells [J]. *Anti-tumor Pharmacy*, 2023, 13(2): 181–186. DOI: 10.3969/j. issn. 2095–1264.2023.02.08.