

伊曲康唑通过激活 AMPK 诱导内质网应激凋亡途径抑制 A549 细胞增殖的实验研究

黎媛, 赵嘉璐, 蓝秀, 吕祝庆, 孙蕾, 李伟文* (浙江大学丽水医院呼吸科, 浙江 丽水 323000)

摘要:目的 探讨伊曲康唑(itraconazole, Itra)抑制肺癌 A549 细胞增殖的作用及其机制。方法 Itra 处理肺癌 A549 细胞 24、48、96 h,用 MTT 法检测细胞存活率,并计算半抑制浓度(IC₅₀)。将实验分为对照组、Itra 组、AMPK 抑制剂(compound C, Comp C) + Itra 组,内质网应激抑制剂(4-PBA) + Itra 组,用 AnnexinV/PI 法检测细胞凋亡,Western blot 检测 CHOP、GRP78、PERK、AMPK、磷酸化 AMPK(p-AMPK)、Bax 和 Bcl-2 的表达。结果 Itra 显著降低 A549 细胞的存活率,在 24、48、96h 时的 IC₅₀ 分别为 62.89、28.34、11.64 μmol·L⁻¹。与对照组相比,Itra 组细胞存活率明显降低,细胞凋亡率明显增加(P<0.05)。与 Itra 组相比,Comp C + Itra 组和 4-PBA + Itra 组细胞存活率明显增加、凋亡率明显降低(P<0.05)。与对照组相比,Itra 组 CHOP、GRP78、PERK、p-AMPK 表达增加;与 Itra 组相比,Comp C + Itra 组和 4-PBA + Itra 组 CHOP、GRP78、PERK、p-AMPK 表达降低(P<0.05)。结论 Itra 显著抑制肺癌 A549 细胞增殖,与其激活 AMPK 诱导内质网应激性凋亡有关。

关键词:伊曲康唑;AMPK;内质网应激;细胞凋亡;A549 细胞

doi:10.11669/cpj.2019.07.007 中图分类号:R965 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2019)07-0558-05

Inhibition Effects of Itraconazole on A549 Cells Proliferation Via AMPK Mediated Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis *In Vitro*

LI Yuan, ZHAO Jia-lu, LAN Xiu, LÜ Zhu-qing, SUN Lei, LI Wei-wen* (Department of respiration, Lishui Hospital, Zhejiang University, Lishui 323000, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To investigate the effects and mechanism of itraconazole (Itra) on proliferation in lung cancer A549 cell line. **METHODS** A549 cells were treated with indicated dose of Itra for 24, 48 and 96h. The cell survival rate was detected by MTT and the semi-inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated. The cells were divided into four groups including control group, Itra group, compound C (Comp C) + Itra group, 4-PBA + Itra group. The apoptosis was detected by AnnexinV/PI. Western blot (WB) was used to detect the expression of CHOP, GRP78, PERK, Bcl-2, Bax, AMPK, phosphorylated-AMPK (p-AMPK). **RESULTS** The survival rate of A549 cells was inhibited by Itra. The IC₅₀ at 24, 48, and 96h were 62.89, 28.34 and 11.64 μmol·L⁻¹ respectively. Compared with control group, the cell survival rate decreased, the apoptosis rate increased obviously in Itra group. Compared with group Itra, the cell survival rate decreased, the apoptosis rate increased in Comp C + Itra group and 4-PBA + Itra group (P<0.05). Compared with control group, the expression of CHOP, GRP78, PERK and p-AMPK increased in Itra group (P<0.05). The expression of CHOP, GRP78, PERK and p-AMPK were lower in Comp C + Itra group and 4-PBA + Itra group than that in control group (P<0.05). **CONCLUSION** Itra induces endoplasmic reticulum stress related apoptosis via activating AMPK signaling.

KEY WORDS: itraconazole; AMPK; endoplasmic reticulum stress; apoptosis; A549 cells

肺癌(lung cancer)是发病率和死亡率最高的恶性肿瘤,据数据显示在世界范围内肺癌患者每年新增人数约 182 万,死亡人数达到 160 万^[1]。在肺癌中以非小细胞肺癌(NSCLC)最为普遍,约占肺癌发病总数的 85%,大部分在诊断时即为中晚期肺癌^[2]。目前中晚期肺癌仍缺乏有效治疗手段。经典化疗方案对 NSCLC 患者预后仍然较差,有效率仅为 25%~30%,

5 年存活率也小于 15%^[2-3]。新型的分子靶向药物有效提高了患者的总生存时间,但容易耐药、价格贵等严重限制了其临床应用^[4]。因此,寻找有效的抗肺癌的药物显得十分必要。伊曲康唑(itraconazole, Itra)是一种新型的抗真菌性药物。近年来,研究证实 Itra 具有显著抗肿瘤作用^[5-9]。然而,其抗肺癌的作用及其机制仍未完全明确,本研究中,以肺癌 A549 细胞为

基金项目:浙江省自然科学基金资助(LQ16H160019);浙江省科技厅公益性技术应用研究计划项目资助(2016C37100)

作者简介:黎媛,女,副主任医师 研究方向:肺癌临床与基础研究 *通讯作者:李伟文,男,副主任医师 研究方向:肺癌临床与基础研究 Tel:(0578)2285327 E-mail:385908814@qq.com

研究对象,重点观察 Itra 的抗肺癌作用,并探讨其可能的分子机制,重点阐明 AMPK 诱导的内质网应激凋亡途径在 Itra 抗肺癌的作用。

1 材料

1.1 主要试剂

Itra(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:84625-61-6,相对分子质量 705.63,纯度 $\geq 98\%$),4-苯基丁酸钠(4-PBA,批号:S4125),AMPK 抑制剂(Comp C,批号:S1802,Selleck 公司), β -肌动蛋白(β -actin)、Bcl-2、Bax、AMPK、p-AMPK、CHOP、GRP78 和 PERK 单克隆抗体(美国 Cell Signal Technology 公司)。细胞凋亡检测试剂盒,批号:C1063,购自中国碧云天生物有限公司。

1.2 细胞

肺癌 A549 细胞(中国医学科学院细胞库)。

2 方法

2.1 细胞培养

使用含体积分数 10% 胎牛血清杜尔伯科改良伊格尔培养基(DMEM)($100 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素, $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素)培养,将 A549 细胞接种于培养皿后,置入 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度的细胞培养箱中培养。

2.2 实验分组

将 A549 细胞分为:对照组、Itra 组、AMPK 抑制剂(Comp C) + Itra 组,内质网应激抑制剂(4-PBA) + Itra 组。Itra 组给予终浓度为 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Itra 处理,Comp C + Itra 组和 4-PBA + Itra 组分别用 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Comp C 和 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 4-PBA 预处理半小时后,再用 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Itra 处理,对照组给予等量的 PBS 处理。将所有细胞置于培养箱中继续培养 48 h。

2.3 MTT 法检测细胞生长存活率

调整 A549 细胞密度为 2×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$,接种于 96 孔培养板,每孔 $200 \mu\text{L}$,过夜,加药后,置于培养箱中继续培养 48 h。加入 $20 \mu\text{L}$ MTT, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 温箱孵育 2 h 后,用二甲基亚砜(DMSO) $120 \mu\text{L}$ 终止反应。以调零孔吸光度(A)值调零校准,用酶标仪在 492 nm 波长处检测 A 值。计算细胞抑制率、 IC_{50} 和细胞存活率,细胞存活率计算公式为(各浓度 A 值/对照组 A 值) $\times 100\%$ 。

2.4 细胞凋亡检测

用 1×10^6 个 A549 细胞接种于 6 孔板,经 0、25、50 和 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 灯盏花素处理 48 h 后,收集细胞,加入 1 mL PBS 洗涤 3 次,再加入 $500 \mu\text{L}$ Binding

buffer,并依次加入 $5 \mu\text{L}$ Annexin V-FITC、 $5 \mu\text{L}$ PI,室温下避光孵育 15 min,用流式细胞仪检测。

2.5 蛋白免疫印迹(WB)法检测

1×10^6 个 A549 细胞接种于 6 孔板,加药 48 h 后,PBS 漂洗 2 次后,加入细胞裂解液冰上裂解 15 min, $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,吸取上清。经 BAC 法定量后,取 $20 \mu\text{g}$ 总蛋白 4% ~ 12% 聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳分离,电转至 PVDF 膜上,3% 脱脂牛奶室温封闭 1 h。加入一抗 4°C 孵育过夜,随后 PBST 缓冲液洗 PVDF 膜 3 次,每次 8 min,加入 HRP 标记的第二抗体室温孵育 1 ~ 2 h,再用 PBST 缓冲液洗 PVDF 膜 3 次,每次 8 min,ECL 试剂发光、显影和定影。并用 image J 分析。

2.6 统计学方法

采用 SPSS22.0 统计软件进行统计学处理,统计资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行显著性检验,组间两两比较采用 LSD-t 检验,计算 P 值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 Itra 对 A549 细胞增殖的抑制作用

0、1、2.5、5、10、20、40、80、160 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理肺癌 A549 细胞 24、48、96h 后,MTT 结果显示,Itra 呈浓度和时间依赖性抑制 A549 细胞的增殖作用,24、48、96h 时的 IC_{50} 分别为:62.89、28.34、11.64 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。见图 1。

3.2 Itra 诱导 A549 细胞凋亡

流式细胞仪检测结果显示 5、10、20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Itra 处理 48 h 后细胞凋亡率显著高于对照组(0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)均显著增加。WB 结果显示 Bcl-2 表达下降,Bax 表达显著增加。见图 2。

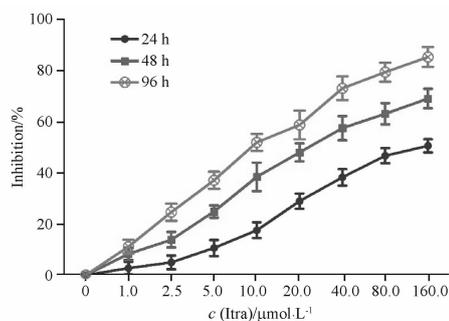


图 1 伊曲康唑(itraconazole, Itra)抑制 A549 细胞增殖。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 1 Itraconazole (Itra) inhibited the proliferation of A549 cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$

3.3 Itra 增加 p-AMPK 和内质网应激蛋白 CHOP、GRP78、PERK 表达

WB 结果显示 5、10、20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Itra 处理 48 h 后细胞内 p-AMPK 表达分别为:较对照组明显增加,而 AMPK 无显著增加;CHOP、GRP78、PERK 表达均高于对照组($P < 0.05$)。见图 3。

3.4 AMPK 诱导内质网应激凋亡途径介导 Itra 抑制 A549 细胞增殖

与对照组相比,Itra 组细胞存活率明显降低,细胞凋亡率明显增加($P < 0.05$);与 Itra 组相比,Comp C + Itra 组和 4-PBA + Itra 组细胞存活率明显增加、凋亡率明显降低($P < 0.05$)。与对照组相比,Itra 组 CHOP、GRP78、PERK 表达增加($P < 0.05$);与 Itra 组相比,COMPOUND C + Itra 组和 4-PBA + Itra 组 CHOP、GRP78、PERK 表达降低($P < 0.05$)。与对照组相比,Itra 组 p-AMPK 表达增加,Comp C + Itra 组和 4-PBA + Itra 组表达无显著增加($P < 0.05$);与 Itra 组相比,Comp C + Itra 组和 4-PBA + Itra 组 p-AMPK 表达均明显降低($P < 0.05$)。见图 4。

4 讨论

近年来,Itra 的抗癌作用备受人们关注,体内外研究证实 Itra 能够显著抑制胃癌、卵巢癌、胰腺癌、

乳腺癌等多种实体肿瘤^[6-7, 9-10]。也有研究证实 Itra 具有抑制非小细胞肺癌肿瘤血管生成的作用^[5],并在临床上应用 Itra 辅助治疗转移性肺癌^[11],然而研究重点阐明了 Itra 对肺癌血管的抑制作用,其对肺癌细胞的影响及其机制仍未完全阐明。在本研究

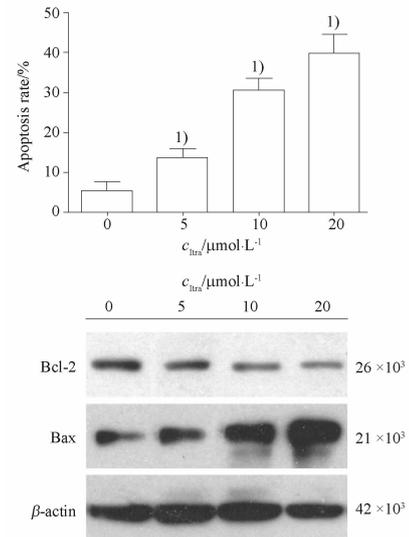


图 2 Itra 诱导 A549 细胞凋亡. $n = 3, \bar{x} \pm s$ 与对照组相比,¹⁾ $P < 0.05$

Fig. 2 Itra induced apoptosis of A549 cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$ ¹⁾ $P < 0.05$, compared with control group

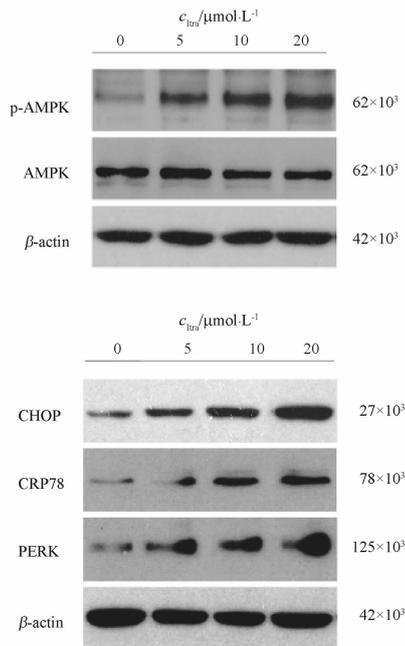


图 3 Itra 对 p-AMPK 和内质网应激蛋白表达的影响. $n = 3, \bar{x} \pm s$ 与对照组相比,¹⁾ $P < 0.05$

Fig. 3 The expression of p-AMPK and endoplasmic reticulum stress related protein by Itra in A549 cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$

¹⁾ $P < 0.05$, compared with control group

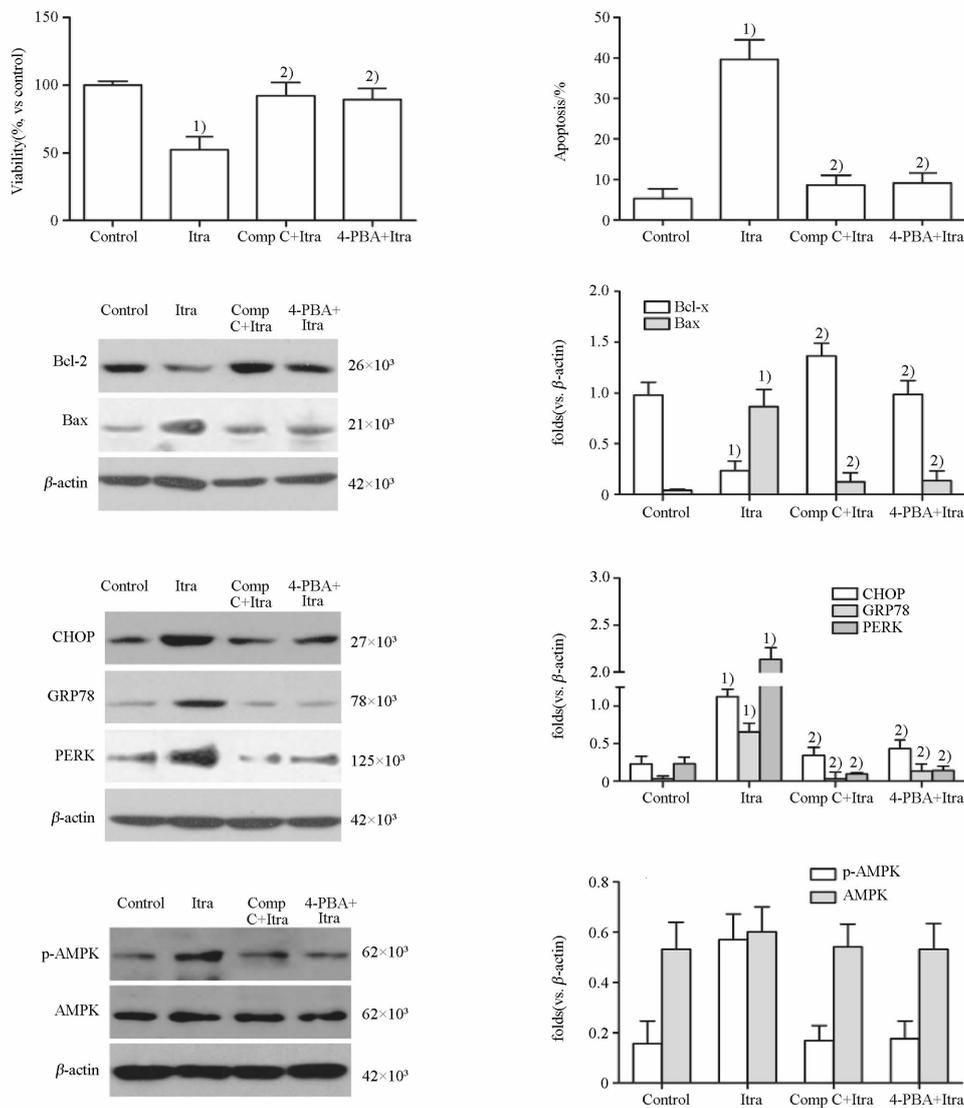


图4 Itra 激活 AMPK 信号通路,诱导 A549 细胞内质网应激性细胞凋亡. $n = 3, \bar{x} \pm s$
与对照组相比,¹⁾ $P < 0.05$;与 Itra 组相比,²⁾ $P < 0.05$

Fig. 4 Itra induced endoplasmic reticulum stress related apoptosis via activating AMPK signaling in A549 cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$

¹⁾ $P < 0.05$, compared with control group; ²⁾ $P < 0.05$, compared with Itra group

中,体内外研究也证实 Itra 能够呈浓度和时间依赖性增加肺癌 A549 细胞抑制率和细胞凋亡率,提示 Itra 具有抑制 A549 细胞增殖、诱导细胞凋亡的作用。

有关 Itra 的抗肿瘤的机制, Hu 等^[9]发现 Itra 的抗胃癌作用与其抑制 Hedgehog 有关。Wang 等^[10]则认为 Itra 能够通过激活细胞自噬凋亡途径发挥抗乳腺癌作用。Chen 等^[6]发现 Itra 通过抑制 TGF β /SMAD2/3 信号通路抗胰腺癌细胞迁移、防止肿瘤转移。本研究中,发现 Itra 具有诱发 CHOP、GRP78、PERK 表达的作用,提示 Itra 的抗肺癌作用可能与内质网应激有关。

内质网应激凋亡途径是指内质网应激状态持续或强化条件下,激活凋亡信号调节激酶 1 (ASK1) 及其下游分子如 p38、JNK 等,并在转录水平上调节 C/EBP 同源蛋白 (CHOP, 引起细胞凋亡。内质网应激相关蛋白 PERK 和 ATF6 亦可通过调节 CHOP 转录水平,参与凋亡途径信号传导。Yang 等^[12]发现二甲双胍通过诱发内质网应激依赖的细胞凋亡,抑制前列腺癌生长。Zhang 等^[13]表明姜黄素衍生物的抗结肠癌作用与其诱导内质网应激凋亡途径有关。Gu 等^[14]发现抗癌药物白藜芦醇和三氧化二砷通过诱发 A549 细胞内内质网应激凋亡途径发挥抗癌作用, Ma 等^[15]也证实茯苓酸通过诱导细胞内内质网

应激,促进肺癌细胞凋亡。为了进一步证明内质网应激凋亡途径 Itra 抗肺癌的作用,我们用内质网应激抑制剂 4-PBA 预处理 A549 细胞后,Itra 对 A549 细胞的抑制率和凋亡率降低,Bax 表达降低、Bcl-2 表达增加,说明了内质网凋亡途径参与 Itra 诱导 A549 细胞增殖抑制。

AMP 依赖的蛋白激酶(AMPK)是一种丝/苏氨酸蛋白激酶,被肝激酶 B1(LKB1)、钙调蛋白依赖性蛋白激酶激酶(CaMKK)等上游激酶磷酸化而活化,是细胞内能量代谢的传感器,与细胞内应激有关。研究证实 Itra 是 AMPK 的新型激活剂,能够促进 AMPK 磷酸化调控细胞功能。Head 等^[8]证实 Itra 通过 AMPK/mTOR 信号通路调控内皮细胞生成。Na 等则发现 Itra 能通过激活 AMPK 促进肝细胞糖摄取。Chen 等^[7]也表明 Itra 通过促进 AMPK 活化抑制食管癌细胞的增殖。我们的研究也发现,5、10、20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Itra 处理 48h 后 A549 细胞内 p-AMPK 表达明显增加;体内研究进一步证实了 25 和 50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Itra 能够增加瘤体内 p-AMPK 的表达。

AMPK 与内质网应激凋亡途径密切相关。Lin 等^[16]表明 AMPK 介导的内质网应激凋亡途径是二甲双胍抗头颈部恶性肿瘤的关键环节。Yang 等^[17]证实钼通过激活 AMPK 依赖的内质网应激诱导胰岛 β 细胞功能紊乱和凋亡。为了证实 AMPK 介导 Itra 诱导内质网应激凋亡途径,我们用 AMPK 抑制剂 Comp C 预处理 A549 细胞后,Itra 诱导 CHOP、GRP78、PERK 表达的作用,且细胞抑制率和细胞凋亡率降低,Bcl-2 表达增加,Bax 表达降低;上述说明 AMPK 在 Itra 诱导内质网应激凋亡途径发挥关键作用。

综上所述,Itra 具有抑制肺癌 A549 细胞增殖的作用,与其激活 AMPK 诱导内质网应激凋亡途径有关。

REFERENCES

[1] FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136 (5):359-386.
[2] AGGARWAL C, BORGHAELI H. Rational use of cetuximab in the treatment of advanced non-small cell lung cancer [J]. *Oncol Targets Ther*, 2009, 2: 251-260.
[3] ALLEMANI C, WEIR H K, CARREIRA H, *et al.* Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual da-

ta for 25,676,887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2) [J]. *Lancet*, 2015, 385 (9972):977-1010.

[4] DAVIES J, PATEL M, GRIDELLI C, *et al.* Real-world treatment patterns for patients receiving second-line and third-line treatment for advanced non-small cell lung cancer: A systematic review of recently published studies [J]. *PLoS One*, 2017, 12 (4):175679-175698.
[5] AFTAB B T, DOBROMILSKAYA I, LIU J O, *et al.* Itraconazole inhibits angiogenesis and tumor growth in non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Res*, 2011, 71 (21):6764-6772.
[6] CHEN K, CHENG L, QIAN W, *et al.* Itraconazole inhibits invasion and migration of pancreatic cancer cells by suppressing TGF-beta/SMAD2/3 signaling [J]. *Oncol Reports*, 2018, 39 (4):1573-1582.
[7] CHEN M B, LIU Y Y, XING Z Y, *et al.* Itraconazole-Induced Inhibition on Human Esophageal Cancer Cell Growth Requires AMPK Activation [J]. *Mol Cancer Ther*, 2018, 17 (6):1229-1239.
[8] HEAD S A, SHI W, ZHAO L, *et al.* Antifungal drug itraconazole targets VDAC1 to modulate the AMPK/mTOR signaling axis in endothelial cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112 (52):276-285.
[9] HU Q, HOU Y C, HUANG J, *et al.* Itraconazole induces apoptosis and cell cycle arrest via inhibiting Hedgehog signaling in gastric cancer cells [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36 (1): 50-61.
[10] WANG X, WEI S, ZHAO Y, *et al.* Anti-proliferation of breast cancer cells with itraconazole: Hedgehog pathway inhibition induces apoptosis and autophagic cell death [J]. *Cancer Lett*, 2017, 385: 128-136.
[11] RUDIN C M, BRAHMER J R, JUERGENS R A, *et al.* Phase 2 study of pemetrexed and itraconazole as second-line therapy for metastatic nonsquamous non-small-cell lung cancer [J]. *J Thor Oncol*, 2013, 8(5):619-623.
[12] YANG J, WEI J, WU Y, *et al.* Metformin induces ER stress-dependent apoptosis through miR-708-5p/NNAT pathway in prostate cancer [J]. *Oncogenesis*, 2015, 4:158-166.
[13] ZHANG J, FENG Z, WANG C, *et al.* Curcumin derivative WZ35 efficiently suppresses colon cancer progression through inducing ROS production and ER stress-dependent apoptosis [J]. *Am J Cancer Res*, 2017, 7(2):275-288.
[14] GU S, CHEN C, JIANG X, *et al.* ROS-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction underlie apoptosis induced by resveratrol and arsenic trioxide in A549 cells [J]. *Chem Biol Interact*, 2016, 245: 100-109.
[15] MA J, LIU J, LU C, *et al.* Pachymic acid induces apoptosis via activating ROS-dependent JNK and ER stress pathways in lung cancer cells [J]. *Cancer Cell Int*, 2015, 15: 78-90.
[16] LIN Y C, WU M H, WEI T T, *et al.* Metformin sensitizes anti-cancer effect of dasatinib in head and neck squamous cell carcinoma cells through AMPK-dependent ER stress [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(1):298-308.
[17] YANG T Y, YEN C C, LEE K I, *et al.* Molybdenum induces pancreatic beta-cell dysfunction and apoptosis via interdependent of JNK and AMPK activation-regulated mitochondria-dependent and ER stress-triggered pathways [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2016, 294: 54-64.

(收稿日期:2018-08-01)