

# 胡椒碱诱导人胰腺癌 PANC-1 细胞凋亡的 Caspase 3/Bax/Bcl-2 信号通路机制研究

钟大仓<sup>1</sup>, 陈超<sup>1</sup>, 李桐<sup>2</sup>, 马宁<sup>3</sup>, 赵丽芳<sup>4</sup>, 徐宛玲<sup>4</sup>, 李建<sup>1\*</sup> (1.承德护理职业学院, 河北 承德 067000; 2.中国人民解放军总医院第四医学中心骨科, 北京 100048; 3.北京大学肿瘤医院消化肿瘤内科, 北京 100142; 4.漯河医学高等专科学校, 河南 漯河 462002)

**摘要:** 目的 观察胡椒碱对人胰腺癌 PANC-1 细胞增殖、凋亡的影响, 探讨其诱导凋亡的 Caspase 3/Bax/Bcl-2 信号通路机制。方法 将人胰腺癌 PANC-1 细胞分为阴性对照组和 40, 20, 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  胡椒碱组, 采用 MTT、台盼蓝染色计数及平板克隆形成试验法检测胡椒碱对 PANC-1 细胞增殖、生长曲线及克隆形成的影响; 采用 Hoechst 33258 染色法观察胡椒碱对 PANC-1 细胞凋亡形态学的影响; 采用 RT-PCR 和 Western blotting 法检测胡椒碱对 PANC-1 细胞 Caspase 3、cleaved-Caspase 3、Bax 及 Bcl-2 mRNA 及蛋白表达的影响。结果 MTT、台盼蓝染色计数和平板克隆形成实验结果显示 40, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  胡椒碱可明显抑制 PANC-1 增殖、细胞生长曲线和克隆形成; Hoechst 33258 染色实验显示 40, 20, 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  胡椒碱有诱导 PANC-1 细胞凋亡作用; RT-PCR 和 Western blotting 实验结果显示 40, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  胡椒碱可上调 PANC-1 细胞 Caspase 3、Bax mRNA 表达水平, 上调 cleaved-Caspase 3 和 Bax 蛋白表达水平, 下调 Bcl-2 mRNA 和蛋白表达水平。结论 胡椒碱可抑制人胰腺癌 PANC-1 细胞生长、增殖, 并诱导其凋亡, 其机制可能与调控 Caspase 3/Bax/Bcl-2 凋亡信号通路有关。

**关键词:** 胡椒碱; 人胰腺癌; PANC-1 细胞; 凋亡; Caspase 3/Bax/Bcl-2

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2020)14-1687-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.14.004

引用本文: 钟大仓, 陈超, 李桐, 等. 胡椒碱诱导人胰腺癌 PANC-1 细胞凋亡的 Caspase 3/Bax/Bcl-2 信号通路机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(14): 1687-1691.

## Study on the Caspase 3/Bax/Bcl-2 Signal Pathway Mechanism of Induction Apoptosis Effect of Piperine in Human Pancreatic Cancer PANC-1 Cell

ZHONG Dacang<sup>1</sup>, CHEN Chao<sup>1</sup>, LI Tong<sup>2</sup>, MA Ning<sup>3</sup>, ZHAO Lifang<sup>4</sup>, XU Wanling<sup>4</sup>, LI Jian<sup>1\*</sup> (1.Chengde Nursing Vocational College, Chengde 067000, China; 2.Department of Orthopedics, the Fourth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100048, China; 3.Department of Gastrointestinal Oncology, Beijing Cancer Hospital, Beijing 100142, China; 4.Luohe Medical College, Luohe 462002, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To observe the effect of piperine on proliferation and apoptosis of human pancreatic cancer PANC-1 cell, and to explore its mechanism of Caspase 3/Bax/Bcl-2 signaling pathway. **METHODS** The human pancreatic cancer PANC-1 cells were divided into negative control group and 40, 20 and 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  piperine groups. MTT assay, Trypan blue staining counting method and plate colony formation assays were used to test the effects of piperine on proliferation, growth curve of cells and colony formation. Hoechst 33258 staining was used to detect the effects of piperine on apoptosis of PANC-1 cells. Reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) and Western blotting were used to detect the effects of piperine on the expression levels of Caspase 3, cleaved-Caspase 3, Bax and Bcl-2 mRNA and protein in PANC-1 cells. **RESULTS** MTT, Trypan blue staining and plate colony formation assays showed that 40 and 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  piperine could inhibit the proliferation, growth curve of cells and colony formation of PANC-1 cells. Hoechst 33258 staining showed that piperine 40, 20, 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  could induce the apoptosis of PANC-1 cells. The results of RT-PCR and Western blotting showed that piperine 40, 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  could up-regulate the expression of Caspase 3, Bax mRNA, up-regulate the expression of cleaved-Caspase 3 and Bax protein, and down-regulate the expression of Bcl-2 mRNA and protein in PANC-1 cells. **CONCLUSION** Piperine can inhibit the growth, proliferation and induce apoptosis in human pancreatic cancer PANC-1 cells, and its mechanism may be related to the regulation of the Caspase 3/Bax/Bcl-2 signaling pathway.

**KEYWORDS:** piperine; human pancreatic cancer; PANC-1 cell; apoptosis; Caspase 3/Bax/Bcl-2

胰腺癌是一种发病隐袭、恶性程度高、易侵袭转移的消化系统肿瘤, 临床治疗效果差, 复发率、病死率高。目前, 临床上主要采用手术、放

疗、化疗及联合治疗等措施进行诊疗, 但治疗效果极不理想, 1 年生存率 $<10\%$ <sup>[1-2]</sup>。研究证实, 细胞凋亡障碍与肿瘤的发生发展、增殖、侵袭、迁

基金项目: 河南省科技计划项目(182102310348, 152102310219)

作者简介: 钟大仓, 男 Tel: 15176751966 E-mail: 15176751966@163.com \*通信作者: 李建, 女, 副教授 Tel: 13603144943 E-mail: Lijian5104@sianc.com

移以及预后等密切相关, 同样在胰腺癌的发生发展过程中, 凋亡抑制亦扮演着重要角色<sup>[3]</sup>。

胡椒碱是一种从中药胡椒属植物果实中提取分离的桂皮酰胺类生物碱, 属酚类化合物, 具有抗炎、保护心脏、抗氧化、改善脂代谢紊乱、抗气道平滑肌增殖、免疫调节、神经保护、抑制卵巢癌细胞及黑色素瘤细胞增殖等药理活性<sup>[4-6]</sup>。本研究旨在观察胡椒碱对人胰腺癌 PANC-1 细胞增殖、凋亡的影响, 同时检测胡椒碱对 PANC-1 细胞 Caspase 3/Bax/Bcl-2 信号通路的影响, 探讨其诱导胰腺癌细胞的凋亡机制。

## 1 材料与仪器

### 1.1 仪器与试剂

胡椒碱(成都埃法生物科技有限公司, 纯度 $\geq 98\%$ , CAS No.: 94-62-2), 用二甲基亚砜(DMSO)溶解, 使用时用细胞培养液配制成相应浓度。

优级胎牛血清(杭州四季青, 批号: 180526); 青霉素-链霉素溶液(批号: 2018050052)、0.25%胰酶溶液(批号: 20180609)、DMSO 溶液(批号: 20180429)、DMEM 高糖液体培养基(批号: 20180523)、培养细胞总蛋白提取试剂(批号: 20180615)、RIPA 蛋白裂解液(批号: 20180314)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号: 20180219)、彩色预染标准蛋白 Marker(批号: 20171215)、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(批号: 20180426)、超敏 ECL 化学发光液(批号: 20180512)、PVDF 转印膜(批号: AR0136-02)、MTT 试剂(批号: 20180524)及 PBS 缓冲液(批号: 20180428)等由武汉博士德生物工程有限公司提供; 兔抗人 cleaved-Caspase 3(批号: 20180912)、Bax(批号: 20180815)、Bcl-2(批号: 20180920)及 $\beta$ -actin(批号: 20180725)抗体由美国 Affinity Biosciences(艾菲)公司提供; TRNzol Universal 总 RNA 提取试剂(批号: DP180424)、FastKing 一步法 RT-PCR 试剂盒(批号: KR180123)及 Caspase 3、Bax、Bcl-2、 $\beta$ -actin mRNA 引物的设计与合成, 均由天根生化科技(北京)有限公司提供。

CKX53 倒置显微镜[奥林巴斯(中国)有限公司]; Thermo BB15 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(美国 Thermo Scientific); FA2204B 电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司); H2050R 台式高速冷冻离心机(湘仪离心机仪器有限公司); 垂直电泳槽、水平电泳槽、转印电泳槽及凝胶成像系统, 均为美国伯乐公司产品。

## 1.2 细胞系

人胰腺癌 PANC-1 细胞株, 由赛百慷(上海)生物科技股份有限公司提供。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养及处理

将 PANC-1 细胞培养在 DMEM 培养液中含 10%胎牛血清及 100 U·mL<sup>-1</sup>青霉素-100  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>链霉素溶液, 设置培养箱温度为 37 °C、CO<sub>2</sub> 浓度为 5%, 每 2~3 d 更换培养液 1 次, 待细胞铺满培养瓶底部 80%~90%时进行消化传代, 进入对数生长期后进行相关实验。

### 2.2 MTT 法检测细胞活性

取对数生长期 PANC-1 细胞接种于 96 孔板中, 细胞浓度为 2 $\times 10^4$ ·mL<sup>-1</sup>, 每孔 100  $\mu$ L, 待 24 h 细胞贴壁后, 实验组分别加入终浓度为 10, 20, 40  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>的胡椒碱, 阴性对照组加入等体积培养液, 每组设 5 个复孔, 置培养箱中继续培养 72 h 后将培养液轻轻吸弃, 每孔加入 100  $\mu$ L 0.5% MTT 溶液, 继续培养 4 h 后吸弃孔内溶液, 然后将 100  $\mu$ L DMSO 加入培养孔, 避光并充分振荡使结晶充分溶解, 用酶标仪于 570 nm 波长下测定各孔吸光度值(OD), 用以下公式计算细胞增殖抑制率: 细胞增殖抑制率(%)=(阴性对照组平均 OD 值-实验组平均 OD 值)/阴性对照组平均 OD 值 $\times 100$ 。

### 2.3 PANC-1 细胞生长曲线的测定

将浓度为 1 $\times 10^4$ ·mL<sup>-1</sup>的 PANC-1 细胞接种于 24 孔板中, 待 24 h 细胞贴壁后, 实验组分别加入终浓度为 10, 20, 40  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>的胡椒碱, 阴性对照组加入等体积培养液, 每组设 21 个复孔, 于加药后每天每组取 3 孔细胞进行台盼蓝染色计数, 连续计数 7 d, 绘制 PANC-1 细胞生长曲线。

### 2.4 Hoechst 33258 染色法检测细胞凋亡试验

取对数生长期 PANC-1 细胞, 以 2 $\times 10^4$ ·mL<sup>-1</sup>接种于 6 孔板中, 待 24 h 细胞贴壁后, 实验组分别加入终浓度为 10, 20, 40  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>的胡椒碱, 阴性对照组加入等体积培养液, 每组设 5 个复孔, 继续孵育 48 h, 然后吸弃培养液, 用 PBS 缓冲液轻轻冲洗 3~5 次, 于 4 °C 下用 4%多聚甲醛固定 60 min, PBS 缓冲液洗涤 3~5 次, 室温避光条件下加 300  $\mu$ L Hoechst 33258 染色液加入孔中, 20 min 后荧光显微镜下观察细胞凋亡形态学变化。

### 2.5 平板克隆形成试验

取对数生长期 PANC-1 细胞, 胰酶消化并吹打

成单细胞悬液,按照每孔 500 个细胞接种于 6 孔培养板中,待 24 h 细胞贴壁生长良好时,实验组分别加入终浓度为 10, 20, 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的胡椒碱,阴性对照组加入等体积培养液,每组设 5 个复孔,当出现肉眼可见的克隆时,终止培养,弃去上清,PBS 缓冲液轻洗 2~3 遍,用 4% 多聚甲醛溶液固定 20 min,弃去固定液,然后用 Giemsa 染色液染色 15 min,弃染色液,室温下晾干,于显微镜下拍照计数(以细胞数>50 个细胞的细胞团为 1 个克隆),并计算各组细胞克隆形成率。克隆形成率(%)=克隆数/接种细胞数 $\times$ 100。

## 2.6 RT-PCR 法检测 Caspase 3、Bax 及 Bcl-2 mRNA 表达

取对数生长期 PANC-1 细胞,按照每孔  $2\times 10^5$  个将细胞接种于 6 孔培养板中,待 24 h 细胞贴壁后,实验组加入终浓度为 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的胡椒碱,同时设置阴性对照组,继续培养 48 h,收集细胞,用 TRNzol Universal 总 RNA 提取试剂进行 RNA 抽提,按照 FastKing 一步法 RT-PCR 试剂盒操作要求进行 RT-PCR 试验。将 PCR 扩增产物于 2% 琼脂糖凝胶进行电泳,以  $\beta$ -actin 基因条带为内参,检测 Caspase 3、Bax 及 Bcl-2 基因的表达水平。实验中用引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 试验用引物序列

Tab. 1 Primer sequences for RT-PCR

基因	引物序列	片段长度/bp
Caspase 3	5'-GGAACCATCATACATGGAAGCG-3'	317
	5'-TCACCATGGCTCAGAAGCAC-3'	
Bax	5'-TCGGGAGATGCTCATTGGAC-3'	496
	5'-GACTCAGATGCCGAAGTGTG-3'	
Bcl-2	5'-AACATCGCCCTGTGGATGAC-3'	211
	5'-GACTTCACTTGTGGCCAGAT-3'	
$\beta$ -actin	5'-CTTCGCGGGCGACGAT-3'	104
	5'-CCACATAGGAATCCTTCTGACC-3'	

## 2.7 Western blotting 法检测 cleaved-Caspase 3、Bax 及 Bcl-2 蛋白表达

取对数生长期 PANC-1 细胞,按照每孔  $2\times 10^5$  个将细胞接种于 6 孔培养板中,待 24 h 细胞贴壁后,实验组加入终浓度为 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的胡椒碱,同时设置阴性对照组,继续培养 48 h,收集细胞,加入 RIPA 裂解液于冰上使细胞裂解 30 min 后提取蛋白,测定各样本蛋白浓度并调整一致,将样品与蛋白上样缓冲液 1:1 混匀煮沸 5 min 使蛋白变性,然后依次进行 SDS-PAGE 凝胶电泳、转印、抗原封闭、一抗和二抗孵育、ECL 显色及凝胶成像仪下成像拍照,以  $\beta$ -actin 蛋白条带灰度值为内

参,检测 cleaved-Caspase 3、Bax 及 Bcl-2 蛋白相对表达水平。

## 2.8 统计学方法

实验结果以  $\bar{x}\pm s$  表示,应用 SPSS 18.0 统计软件进行数据处理,多组间样本均数差异采用单因素方差分析法进行比较,以  $P<0.05$  为统计学比较差异具有显著性。

## 3 结果

### 3.1 胡椒碱对人胰腺癌 PANC-1 细胞增殖的影响

MTT 法检测结果显示,与阴性对照组比较,40, 20, 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  胡椒碱组 PANC-1 细胞 OD 值均明显降低( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ),对 PANC-1 细胞增殖抑制率分别为 60.26%, 34.95%, 17.89%。结果见表 2。

表 2 胡椒碱对 PANC-1 细胞增殖的影响( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Tab. 2 Effect of piperine on proliferation in PANC-1 cell ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	OD 值	增殖抑制率/%
阴性对照组	-	0.633 $\pm$ 0.043	-
胡椒碱组	40	0.252 $\pm$ 0.037 <sup>2)</sup>	60.26
	20	0.412 $\pm$ 0.042 <sup>2)</sup>	34.95
	10	0.520 $\pm$ 0.044 <sup>1)</sup>	17.89

注:与阴性对照组比较, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ 。

Note: Compared with negative control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ .

### 3.2 胡椒碱对人胰腺癌 PANC-1 细胞生长曲线的影响

与阴性对照组比较,第 2 天给予胡椒碱 40, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组的 PANC-1 细胞计数显著减少;第 3~7 天给予 40, 20, 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  胡椒碱组的 PANC-1 细胞计数较阴性对照组明显减少( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。结果见图 1。

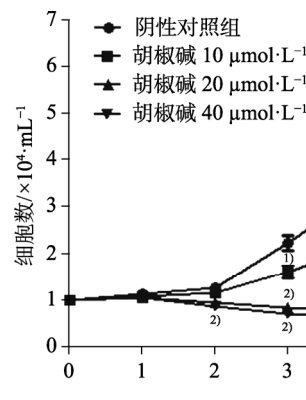


图 1 胡椒碱对 PANC-1 细胞生长曲线的影响( $\bar{x}\pm s, n=4$ ) 与阴性对照组比较, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ 。

Fig. 1 Effect of piperine on growth curve in PANC-1 cell ( $\bar{x}\pm s, n=4$ )

Compared with negative control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ .

### 3.3 胡椒碱对人胰腺癌 PANC-1 细胞凋亡形态的影响

Hoechst 33258 染色结果显示, 阴性对照组 PANC-1 细胞形态一致, 细胞核荧光染色均一, 未见明显浓染和强荧光染色; 给予 40, 20, 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  胡椒碱后, 可见 PANC-1 细胞有凋亡现象, 表现为多量不同程度的散在细胞核碎裂或固缩, 并呈颗粒状的密集强荧光(箭头所示), 其中以 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  剂量组最为明显, 结果见图 2。

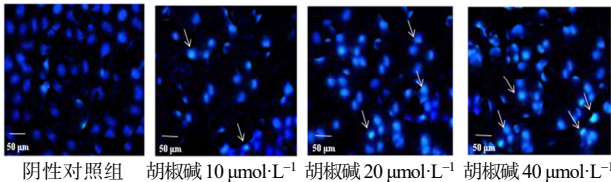


图 2 胡椒碱对 PANC-1 细胞凋亡形态的影响(Hoechst 33258, 200 $\times$ )

Fig. 2 Effect of piperine on apoptosis morphology in PANC-1 cell (Hoechst 33258, 200 $\times$ )

### 3.4 胡椒碱对人胰腺癌 PANC-1 细胞克隆形成的影响

与阴性对照组比较, 40, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  胡椒碱组 PANC-1 细胞克隆形成数明显降低( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 克隆形成率分别为 35.40% 和 56.07%。结果见图 3、表 3。

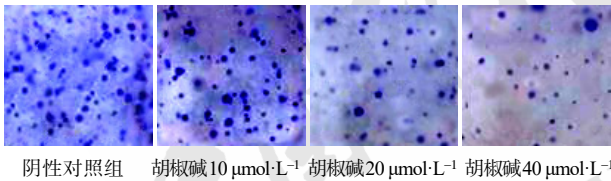


图 3 胡椒碱对 PANC-1 细胞克隆形成的影响(100 $\times$ )

Fig. 3 Effect of piperine on colony formation in PANC-1 cell(100 $\times$ )

表 3 胡椒碱对 PANC-1 细胞克隆形成的影响( $\bar{x}\pm s, n=5$ )  
Tab. 3 Effect of piperine on proliferation in PANC-1 cell ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	克隆形成数/个	克隆形成率/%
阴性对照组	-	354.33 $\pm$ 55.90	70.87
胡椒碱组	40	177.00 $\pm$ 43.09 <sup>2)</sup>	35.40
	20	280.33 $\pm$ 25.32 <sup>1)</sup>	56.07
	10	321.33 $\pm$ 39.11	64.27

注: 与阴性对照组比较, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ 。

Note: Compared with negative control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ .

### 3.5 胡椒碱对人胰腺癌 PANC-1 细胞 Caspase 3、Bax 及 Bcl-2 mRNA 表达水平的影响

与阴性对照组比较, 胡椒碱 40, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组 PANC-1 细胞 Caspase 3、Bax mRNA 表达水平明显上调, Bcl-2 mRNA 表达水平显著下调( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ); 胡椒碱 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组 PANC-1 细胞

Bax mRNA 表达水平明显上调( $P<0.05$ )。结果见图 4、表 4。

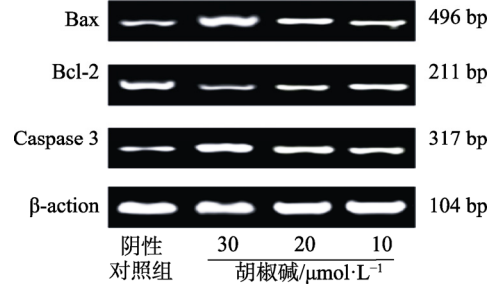


图 4 胡椒碱对 PANC-1 细胞 Caspase 3、Bax 及 Bcl-2 mRNA 表达水平的影响

Fig. 4 Effect of piperine on expression levels of Caspase 3, Bax and Bcl-2 mRNA in PANC-1 cell

表 4 胡椒碱对 PANC-1 细胞 Caspase 3、Bax 及 Bcl-2 mRNA 表达水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Tab. 4 Effect of piperine on expression levels of Caspase 3, Bax and Bcl-2 mRNA in PANC-1 cell( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Caspase 3/ $\beta$ -actin	Bcl-2/ $\beta$ -actin	Bax / $\beta$ -actin
阴性对照组	-	0.283 $\pm$ 0.033	0.478 $\pm$ 0.048	0.257 $\pm$ 0.046
胡椒碱组	40	0.567 $\pm$ 0.036 <sup>2)</sup>	0.216 $\pm$ 0.032 <sup>2)</sup>	0.631 $\pm$ 0.061 <sup>2)</sup>
	20	0.430 $\pm$ 0.047 <sup>1)</sup>	0.303 $\pm$ 0.041 <sup>1)</sup>	0.479 $\pm$ 0.055 <sup>2)</sup>
	10	0.331 $\pm$ 0.029	0.422 $\pm$ 0.049	0.375 $\pm$ 0.044 <sup>1)</sup>

注: 与阴性对照组比较, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ 。

Note: Compared with negative control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ .

### 3.6 胡椒碱对人胰腺癌 PANC-1 细胞 cleaved-Caspase 3、Bax 及 Bcl-2 蛋白表达水平的影响

与阴性对照组比较, 40, 20, 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  胡椒碱组 PANC-1 细胞 cleaved-Caspase 3、Bax 蛋白表达水平明显上调, Bcl-2 蛋白表达水平显著下调( $P<0.01$ )。结果见图 5、表 5。

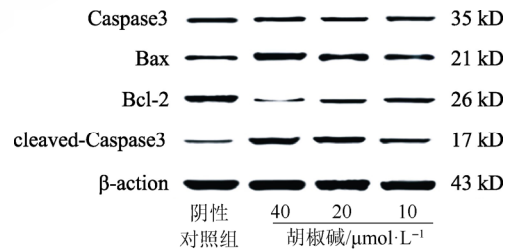


图 5 胡椒碱对 PANC-1 细胞 Caspase 3、cleaved-Caspase 3、Bax 及 Bcl-2 蛋白表达水平的影响

Fig. 5 Effect of piperine on expression levels of Caspase 3, cleaved-Caspase 3, Bax and Bcl-2 protein in PANC-1 cell

## 4 讨论

肿瘤的发生发展机制十分复杂, 但细胞失控性增殖和凋亡抑制是其共同特点, 因此抑制肿瘤细胞增殖和(或)促进凋亡是抗肿瘤的重要策略<sup>[7]</sup>。在本研究中, 作者发现胡椒碱可抑制人胰腺癌 PANC-1 细胞增殖和克隆形成, 减缓其生长, 且 Hoechst 33258 染色结果显示其可使 PANC-1 细胞

表 5 胡椒碱对 PANC-1 细胞 Caspase 3、cleaved-Caspase 3、Bax 及 Bcl-2 蛋白表达水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Tab. 5 Effect of piperine on expression levels of Caspase 3, cleaved-Caspase 3, Bax and Bcl-2 protein in PANC-1 cell ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Caspase 3/ $\beta$ -actin	cleaved-Caspase 3/ $\beta$ -actin	Bcl-2/ $\beta$ -actin	Bax/ $\beta$ -actin
阴性对照组	-	0.343 $\pm$ 0.022	0.195 $\pm$ 0.047	0.816 $\pm$ 0.04	0.358 $\pm$ 0.041
胡椒碱组	40	0.338 $\pm$ 0.029	0.523 $\pm$ 0.045 <sup>2)</sup>	0.209 $\pm$ 0.027 <sup>2)</sup>	0.603 $\pm$ 0.028 <sup>2)</sup>
	20	0.331 $\pm$ 0.032	0.481 $\pm$ 0.035 <sup>2)</sup>	0.366 $\pm$ 0.038 <sup>2)</sup>	0.584 $\pm$ 0.056 <sup>2)</sup>
	10	0.349 $\pm$ 0.034	0.310 $\pm$ 0.032 <sup>1)</sup>	0.463 $\pm$ 0.044 <sup>2)</sup>	0.481 $\pm$ 0.039 <sup>1)</sup>

注: 与阴性对照组比较, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ 。

Note: Compared with negative control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ .

出现核凝固或碎裂及染色质浓集等细胞凋亡现象。以上结果提示胡椒碱在体外可抑制人胰腺癌 PANC-1 细胞增殖, 并诱导其凋亡。

细胞凋亡是指在基因严格控制下, 由促凋亡蛋白(Bax、Bak 及 Bad 等)、抗凋亡蛋白(Bcl-2、Bcl-xL 及 Bcl-w 等)和凋亡调控因子(Caspase 家族等)等共同参与下的细胞有序性死亡<sup>[8-10]</sup>。通常情况下, 细胞膜表面的死亡受体受到胞外死亡信号刺激, 促使线粒体释放细胞色素 C 至胞浆, 与 Caspase 9 及凋亡酶激活因子 1(Apaf-1)等形成复合体(即凋亡小体), 继而在 ATP 的作用下 Caspase 9 酶切并激活 Caspase 3, 使其由无活性的 Procaspase-3 酶原转化为有活性的 cleaved-Caspase 3, 启动激酶级联反应, 从而促进细胞凋亡, Caspase 3 激活是细胞进入不可逆凋亡阶段的标志<sup>[11-12]</sup>。Bax 和 Bcl-2 是同属 Bcl-2 家族蛋白, 是作用互为拮抗的 2 种凋亡调控蛋白。正常情况下, Bax 和 Bcl-2 以适当比例存在, 参与细胞的基本生理过程, 当细胞受到外界凋亡信号后, 二者的含量或比例发生变化。当 Bcl-2 表达增多时, 促使 Bax/Bax 复合体解离, 进而与 Bcl-2 结合形成更加牢固的 Bcl-2/Bax 异源二聚体, 抑制凋亡的发生或进程; 当 Bax 表达增多时, 形成的 Bax/Bax 同二聚体明显增多, 使线粒体膜通透性增加, 细胞色素 C 释放增多, 激活 Caspase 家族蛋白, 特别是 Caspase 3<sup>[13-15]</sup>。本研究结果发现, 40, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 胡椒碱可上调 PANC-1 细胞 Caspase 3、Bax mRNA 表达水平, 上调 cleaved-Caspase 3 和 Bax 蛋白表达水平, 下调 Bcl-2 mRNA 和蛋白表达水平, 提示胡椒碱诱导 PANC-1 细胞凋亡与其调控 Caspase 3/Bax/Bcl-2 凋亡信号通路有关。

综上所述, 胡椒碱对人胰腺癌 PANC-1 细胞具有抑制增殖、诱导其凋亡作用, 其机制与调控 Caspase 3/Bax/Bcl-2 凋亡信号通路有关。

## REFERENCES

- [1] LIN Q J, YANG F, JIN C, et al. Current status and progress of pancreatic cancer in China [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(26): 7988-8003.
- [2] KUNOVAKY L, TESARIKOVA P, KALA Z, et al. The use

- of biomarkers in early diagnostics of pancreatic cancer [J]. Can J Gastroenterol Hepatol, 2018(201): 5389820.
- [3] OLECHOWSKA-JARZĄB A, PTAK-BELOWSKA A, BRZOZOWSKI T. Therapeutic importance of apoptosis pathways in pancreatic cancer [J]. Folia Med Cracov, 2016, 56(1): 61-70.
- [4] XU J, GUO Z, SUN H X, et al. Effect and mechanism of piperine on invasion and apoptosis of SKOV-3 ovarian cancer cell line [J]. J Clin Pathol Res (临床与病理杂志), 2017, 37(8): 1571-1575.
- [5] SANTOS J, BRITO M, FERREIRA R, et al. Th1-biased immunomodulation and *in vivo* antitumor effect of a novel piperine analogue [J]. Int J Mol Sci, 2018; 19(9). pii: E2594.
- [6] WAN C P, WEI Y G, LI X X, et al. Piperine regulates glucose metabolism disorder in HepG2 cells of insulin resistance models via targeting upstream target of AMPK signaling pathway [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2017, 42(3): 542-547.
- [7] ZHANG Z L, LIU G C, PENG L, et al. Effect of PAK1 gene silencing on proliferation and apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines MHCC97-H and HepG2 and cells in xenograft tumor [J]. Gene Ther, 2018, 25(4): 284-296.
- [8] QIAO M L, LUO J Y, YANG M H, et al. Effect of *Ferula ferulaeoides* on growth and apoptosis of human gastric cancer MGC-803 transplantation tumor in nude mice [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2019, 44(13): 2827-2834.
- [9] MOSHREFI M, SPOTIN A, KAFIL H S, et al. Tumor suppressor p53 induces apoptosis of host lymphocytes experimentally infected by Leishmania major, by activation of Bax and caspase-3: a possible survival mechanism for the parasite [J]. Parasitol Res, 2017, 116(8): 2159-2166.
- [10] GU Z R, XU A X, LI F, et al. Progress of central neuroprotective effects of TCMS and its active constituents based on PI3K/Akt signaling pathway [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2019, 28(13): 1593-1599.
- [11] JUNG J, KIM HY, MAENG J, et al. Interaction of translationally controlled tumor protein with Apaf-1 is involved in the development of chemoresistance in HeLa cells [J]. BMC Cancer, 2014(14): 165.
- [12] ZHAO L, WU P, ZHANG PG, et al. Effect of triptolide on expression of Bax/Bcl-2 and cleaved Caspase 3 in HCT116 cells [J]. World Chin J Digestol, 2016, 24(24): 3580-3586.
- [13] ZHONG F F, WU C L, SUN X F, et al. Effect of Buyang Huanwu decoction combined with edaravone on the apoptosis of neuron and expression of Bcl-2 and Bax cerebral ischemia-reperfusion in mice [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(11): 1392-1396.
- [14] XIE T F, WANG L Y, LIU L, et al. Berberine inhibits growth and metastasis of laryngeal carcinoma cells by regulating PI3K/Akt pathway [J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2020, 39(1): 43-48.
- [15] REN L P, LI X J, JIN S J, et al. Influence of sophoridine on proliferation and caspase-3/bcl-2/bax signaling pathway of human pancreatic cancer cell line Capan-1 cells [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(3): 325-328.

收稿日期: 2019-12-28

(本文责编: 蔡珊珊)