

蜂毒肽通过转化生长因子 β /SMAD 信号通路调控非小细胞肺癌的上皮-间质转化进程^{*}

阿布力米提·阿不来提 孙伟 阿迪力·萨来 孙晓宏 瓦热斯江·衣不拉音 高云飞 初建虎 徐克明
(新疆医科大学附属肿瘤医院胸外科, 新疆 乌鲁木齐 830011)

【摘要】 目的 探讨蜂毒肽对非小细胞肺癌转化生长因子 β (TGF- β)/SMAD 信号通路的调控作用及对 TGF- β 1 诱导的上皮-间质转化(EMT)进程的影响。**方法** 通过外源性 TGF- β 1 刺激构建非小细胞肺癌 A549 细胞 EMT 模型,将细胞分为对照组、TGF- β 1 组(加入 2 μ g/L TGF- β 1)、蜂毒肽组(加入 2.5 mg/L 蜂毒肽)、蜂毒肽+TGF- β 1 组(加入 2 μ g/L TGF- β 1 和 2.5 mg/L 蜂毒肽)。采用免疫印迹及逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)实验检测各组细胞 EMT 标志蛋白钙黏附蛋白 E、N-钙黏蛋白、波形蛋白及 mRNA 表达情况;同时检测各组细胞中 Smad2、p-Smad2 蛋白表达情况,分析蜂毒肽对非小细胞肺癌 TGF- β /SMAD 信号通路的影响。采用免疫荧光实验检测对照组及蜂毒肽组细胞中 TGF- β I 受体及 TGF- β II 受体表达情况,同时采用 Transwell 实验检测两组细胞迁移、侵袭能力。**结果** ①与对照组相比,TGF- β 1 组钙黏附蛋白 E mRNA 及蛋白表达水平明显降低,N-钙黏蛋白 mRNA 及蛋白与波形蛋白 mRNA 及蛋白表达水平明显升高(均 $P < 0.05$)。蜂毒肽+TGF- β 1 组钙黏附蛋白 E mRNA 及蛋白表达水平明显优于 TGF- β 1 组,且 N-钙黏蛋白 mRNA、蛋白以及波形蛋白 mRNA、蛋白表达水平低于 TGF- β 1 组(均 $P < 0.05$)。②对照组和蜂毒肽组细胞中 TGF- β I 受体表达比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),蜂毒肽组中 TGF- β II 受体含量明显少于对照组。③Transwell 实验结果显示,TGF- β 1 组细胞迁移、侵袭能力明显优于对照组,蜂毒肽+TGF- β 1 组细胞迁移、侵袭能力明显劣于 TGF- β 1 组细胞(均 $P < 0.05$)。**结论** 蜂毒肽可通过抑制 TGF- β /SMAD 信号通路抑制 Smad2 磷酸化,下调 TGF- β II 受体分布,从而抑制肿瘤细胞的侵袭、迁移,抑制 TGF- β 1 诱导的肺癌细胞 EMT 进程。

【关键词】 蜂毒肽;非小细胞肺癌;转化生长因子 β /SMAD;转化生长因子 β I / II 受体;上皮-间质转化

【中图分类号】 R-33 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 01. 005

Regulation of melittin on non-small cell lung cancer by TGF- β /SMAD on inhibiting TGF- β -induced EMT process

ABULIMITI·Abulaiti, SUN Wei, ADILI·Salai, SUN Xiaohong, WARESIJIANG·Yibulayin,
GAO Yunfei, CHU Jianhu, XU Keming

(Department of Thoracic Surgery, Cancer Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

【Abstract】 Objective To investigate the regulatory effect of betulin on transforming growth factor- β /Smad signaling pathway and its effect on TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition process of non-small cell lung cancer. **Methods** The EMT model of non-small cell lung cancer A549 cells was established by exogenous TGF- β 1 stimulation. The cells were divided into control group, TGF- β 1 group (adding 2 μ g/L TGF- β 1), melitotide group (adding 2.5 mg/L melitotide), TGF- β 1+ melitotide group (adding 2 μ g/L TGF- β 1 and 2.5 mg/L melitotide). Western blotting and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to detect the expression levels of EMT marker proteins calcadherin E, n-calcadherin, vimentin and their mRNA. Meanwhile, the protein expressions of Smad2 and p-Smad2 in each group were detected to analyze the effect of melitin on TGF- β / Smad signaling pathway in NSCLC. Using immunofluorescence experiments testing in the control group and TGF- β I melittin group cells receptors and TGF- β II receptor

基金项目:中国民族医药学会科研项目(2019KYXM-Z196-20)

通信作者:瓦热斯江·衣不拉音, E-mail: xjwares@sina.com

引用本文:阿布力米提·阿不来提,孙伟,阿迪力·萨来,等.蜂毒肽通过转化生长因子 β /SMAD 信号通路调控非小细胞肺癌的上皮-间质转化进

expression, at the same time the two groups of Transwell experiment testing cell migration, invasion ability. **Results** Compared with the control group, TGF- β 1 group significantly decreased the expression levels of cadherin mRNA and protein, and N-cadherin mRNA and protein and vimentin mRNA and protein, the expression level was significantly increased ($P < 0.05$). The expression levels of cadherin mRNA and protein in melittin + TGF- β 1 group were significantly higher than those in TGF- β 1 group. N-cadherin mRNA and protein in melittin + TGF- β 1 group were significantly higher than those in TGF- β 1 group and vimentin mRNA, protein were lower than TGF- β 1 group ($P < 0.05$). In the control group and melittin group cells TGF, there was no statistically significant difference beta I receptor expression ($P > 0.05$), TGF - beta II receptor content in melittin group obviously less than control group. Transwell test results showed that the cell migration and invasion ability of TGF- β 1 group was significantly better than that of the control group cells and The cell migration and invasion ability of betinin + TGF- β 1 group was significantly worse than that of TGF- β 1 group ($P < 0.05$). **Conclusion** Melittin can inhibit TGF- β /SMAD signaling pathway, inhibit phosphorylation Smad2, reduce TGF- β II receptors, inhibit the invasion and migration of tumor cells, and the EMT process of lung cancer cells induced by TGF- β 1 was inhibited.

[Key words] Melittin; Non-small cell lung cancer; Transforming growth factor- β /SMAD; TTransforming growth factor- β 1/II receptors; Epithelial-to-mesenchymal transition

肺癌是全球发病率和致死率最高的恶性肿瘤之一,肿瘤细胞的上皮-间质转化(Epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)是影响肿瘤侵袭、转移的主要因素之一^[1-2]。转化生长因子 β (Transforming growth factor β , TGF- β)的异常高表达及其激活诱导肿瘤的 EMT 进程是肿瘤发生、发展的重要途径^[3-4]。蜂毒治疗在我国历史悠久,而蜂毒的主要有效成分是蜂毒肽。有研究表明蜂毒肽能够抑制恶性肿瘤侵袭和转移,促进细胞凋亡^[5-6]。但目前蜂毒肽在 EMT 进程中的作用,如何影响 TGF- β 受体以及下游信号通路调控机制尚不清楚。根据前期研究数据, TGF- β 1 可诱导肺癌细胞发生 EMT,蜂毒肽处理可在一定程度上影响肺癌细胞紧密连接蛋白及骨架蛋白表达,从而抑制肿瘤细胞的 EMT 进程,但具体作用机制及信号通路尚未明确。因此,本研究通过对 TGF- β /SMAD 信号通路相关蛋白以及 TGF- β 受体 I/II 分布情况进行监测分析,旨在探讨蜂毒肽在肺腺癌侵袭和转移过程中的抑制作用,并为蜂毒的开发和推广提供基础医学的理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞 实验用人非小细胞肺癌细胞株 A549,购于美国模式培养物保藏所(American type culture collection, ATCC)。

1.2 主要试剂 DMEM 培养基、胎牛血清 FBS(Gibco 公司); TGF- β 1 (Pepro Tech 公司);裂解液 Trizol、RIPS 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒(Invitrogen 公司);细胞 RNA 提取试剂盒、实时荧光定量逆转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链反应(Polymerase chain reaction, PCR)试剂盒(均 TaKaRa 公司);兔抗鼠 β -actin 抗体、鼠抗人钙黏附蛋白 E、N-钙黏蛋白、波形

蛋白单克隆抗体、鼠抗人 Smad2、p-Smad2 单克隆抗体以及 TGF- β I、TGF- β II 单克隆抗体(Abcam 公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养及分组 A549 细胞置于含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基中,于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中常规培养。取对数生长期细胞传代,将细胞随机分为 4 组:对照组(control 组)、TGF- β 1 组(TGF- β 1 组)、蜂毒肽组(Melittin, MEL 组)及蜂毒肽 + TGF- β 1 组(MEL + TGF- β 1 组)。TGF- β 1 组细胞加入 2 μ g/L TGF- β 1,蜂毒肽组细胞加入 2.5 mg/L 蜂毒肽,蜂毒肽 + TGF- β 1 组细胞加入 2 μ g/L TGF- β 1 + 2.5 mg/L 蜂毒肽,对照组细胞加入等量生理盐水。常规培养。

1.3.2 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)实验 各组细胞总 RNA 提取按照 RNAprep Pure Micro Kit 说明操作,细胞总 RNA 采用 Trizol 法,用紫外分光光度仪测定总 RNA 浓度与纯度, A260/280 在 1.8~2.0。按照 mRNA 反转录试剂盒操作说明进行反转录,参照 SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒说明进行 RT-PCR 检测,反应程序:95℃ 10s, 95℃ 5s, 60℃ 20s, 40 个循环,所有试验重复 3 次,采用相对定量分析按照 $2^{-[\Delta\Delta Ct(\text{实验组}) - \Delta\Delta Ct(\text{对照组})]}$ 求出钙黏附蛋白 E、N-钙黏蛋白、波形蛋白 mRNA 表达水平。相关引物均由上海捷瑞生物工程有限公司设计合成。基因引物见表 1。

1.3.3 免疫印迹实验 取对数生长期细胞,弃去培养基,用磷酸缓冲液(Phosphate buffer saline, PBS)洗涤 3 次后,加入适量混匀的细胞裂解液及蛋白酶抑制剂,置冰上裂解 30 min,收集细胞置于 4℃、12 000 r/min 离心 15 min,离心半径 13.5 cm,吸取上清液, -80℃ 保存。使用 Bicinchoninic acid 蛋白(BCA 蛋白)定量试剂盒对提取的蛋白进行定量,根据标准曲线计算蛋

表 1 4 种基因上游和下游引物

Table 1 Upstream and downstream primers of 4 genes

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(3'-5')
钙黏附蛋白 E	CTTAGAGGTCAGCG TGTGTG	AGCAAGAGCAGCAGA ATCAG
N-钙黏蛋白	CCAGCAGAGGCATA AGGTTC	AGCAAGAGCAGCAGA ATCAG
波形蛋白	CAGGAGGAGATGC TTCAGAGAG	CCGTGAGGTCAGGCT TGG
GAPDH	CCTCTGACTTCAA CAGCGACA	TGGTCCAGGGGTCTT ACTCC

注:GAPDH. 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

白含量。各组以 30~60 μg 相同的蛋白上样量,煮沸变性后进行 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(Sodium dodcyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)。电泳完成后,使用半干转仪转移至聚偏二氟乙烯膜(Polyvinylidene fluoride, PVDF),然后用 5%脱脂牛奶封闭 1 h,随后用 1%脱脂牛奶稀释一抗,4℃ 孵育过夜。次日使用 Tris-HCl 缓冲盐溶液(Tris buffered saline tween, TBST)洗脱一抗,再 37℃ 孵育二抗 1 h,采用化学发光剂显影。观察各组细胞钙黏附蛋白 E、N-钙黏蛋白、波形蛋白及 Smad2、p-Smad2 蛋白表达情况。

1.3.4 免疫荧光实验 取对数生长期细胞,以 1×10⁵个/孔接种于 24 孔板中,按对照组和蜂毒肽组分组处理后,常规培养 12 h。采用冰甲醇固定 10 min,5% Triton 处理 3 min, PBS 洗涤 3 次。给予 1%牛血清白蛋白(Bovine albumin, BSA)封闭 30 min,加入 TGF-βⅡ受体一抗 4℃ 孵育过夜。PBS 洗涤 3 次,加入标记的山羊抗兔 IgG 抗体室温孵育 1 h。于激光光共聚焦显微镜下观察两组细胞 TGF-βⅡ受体表达及分布情况。

1.3.5 Transwell 迁移实验 取对数生长期细胞制成 5×10⁵个/mL 无血清细胞悬液,向每个 Transwell 小室中加入 200 μl 细胞悬液,并在 24 孔板每孔对应

加入 600 μl 的完全培养基,将小室放入孔中,培养箱培养 24 h,进行固定及染色。计数穿过微孔移到滤膜下层的细胞总数,共计数中央及四周各 5 个视野并取其平均值。

1.3.6 Transwell 侵袭实验 用无血清培养基对 8 g/L 的 Matrigel 胶进行水化,取 50 μl 包被于 Transwell 小室底部,37℃ 静置 2 h,取对数生长期细胞制成 1×10⁵个/mL 无血清细胞悬液,向每个铺胶的 Transwell 小室中加入 200 μl 细胞悬液,并在 24 孔板每孔对应加入 600 μl 的完全培养基,然后将小室放入孔中,培养箱培养 24 h,进行细胞固定及染色。计数穿过微孔移到滤膜下层的细胞总数,共计数中央及四周各 5 个视野并取其平均值。

1.4 统计学分析 数据采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计学分析。采用 Shapro-Wilk 检验数据是否符合正态分布, Bartlett 检验进行方差齐性检验。符合正态分布的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组数据间比较采用方差分析,两组数据间均数比较采用 SNK-*q* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 蜂毒肽对 TGF-β1 诱导的 A549 细胞 EMT 标志蛋白 mRNA 表达情况的影响 RT-PCR 结果显示, TGF-β1 组细胞钙黏附蛋白 E mRNA 表达水平明显低于对照组, TGF-β1 组细胞 N-钙黏蛋白、波形蛋白 mRNA 表达水平则明显高于对照组(均 *P*<0.05)。采用蜂毒肽干预后,蜂毒肽+ TGF-β1 组细胞钙黏附蛋白 E mRNA 表达水平明显高于 TGF-β1 组细胞,且蜂毒肽+ TGF-β1 组细胞 N-钙黏蛋白、波形蛋白 mRNA 表达水平明显低于 TGF-β1 组(均 *P*<0.05),见图 1。

2.2 蜂毒肽对 TGF-β1 诱导的 A549 细胞 EMT 标志蛋白表达情况的影响 免疫印迹实验结果显示,与对

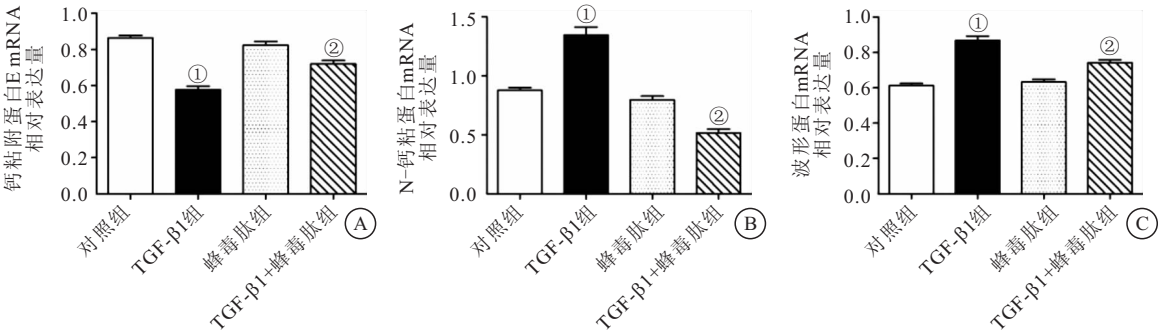


图 1 蜂毒肽对 TGF-β1 诱导的 A549 细胞上皮-间质转化标志蛋白钙黏附蛋白 E、N-钙黏蛋白、波形蛋白 mRNA 表达情况的影响
Figure 1 Effect of melittin on mRNA expression of cadherin E, n-cadherin and vimentin, markers of epithelial-mesenchymal transformation induced by TGF-β1 in A549 cells

注:与对照组比较,①*P*<0.05;与 TGF-β1 组比较,②*P*<0.05

照组比较, TGF- β 1 组细胞中钙黏附蛋白 E 蛋白表达水平明显降低, 其 N-钙黏蛋白、波形蛋白蛋白表达水平则明显增高(均 $P < 0.05$)。蜂毒肽+TGF- β 1 组细

胞中钙黏附蛋白 E 蛋白表达水平明显高于 TGF- β 1 组, 而 N-钙黏蛋白、波形蛋白明显低于 TGF- β 1 组水平($P < 0.05$), 见图 2。

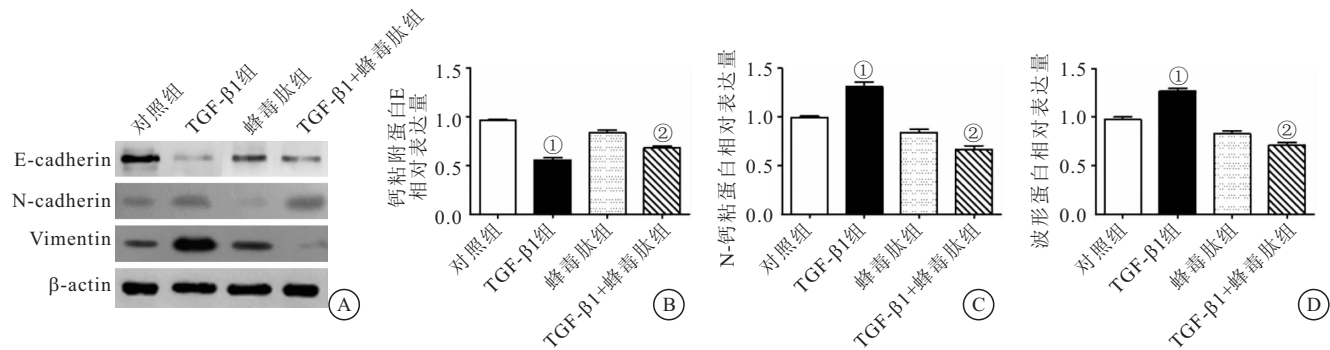


图 2 蜂毒肽对 TGF- β 1 诱导的 A549 细胞上皮-间质转化标志蛋白钙黏附蛋白 E、N-钙黏蛋白、波形蛋白表达情况的影响
Figure 2 The effect of melittin on the expression of cadherin E, n-cadherin and vimentin, markers of epithelial-mesenchymal transformation induced by TGF- β 1 in A549 cells

注: 样本均为同一株细胞株, 重复 3 次实验。A. 电泳图; B. 黏附蛋白 E 蛋白相对表达量; C. N-钙黏蛋白相对表达量; D. 波形蛋白相对表达量。与对照组比较, ① $P < 0.05$; 与 TGF- β 1 组比较, ② $P < 0.05$

2.3 蜂毒肽对 TGF- β 1 诱导的 A549 细胞中 TGF- β II 受体表达情况的影响 免疫荧光实验结果显示, 对照组细胞中 TGF- β II 受体表达量明显优于蜂毒肽组细胞, 见图 3。

激后, TGF- β 1 组中 p-Smad2 表达水平明显增加, TGF- β 1+蜂毒肽组中 p-Smad2 表达水平与 TGF- β 1 组相比, 明显降低($P < 0.05$), 见图 4。

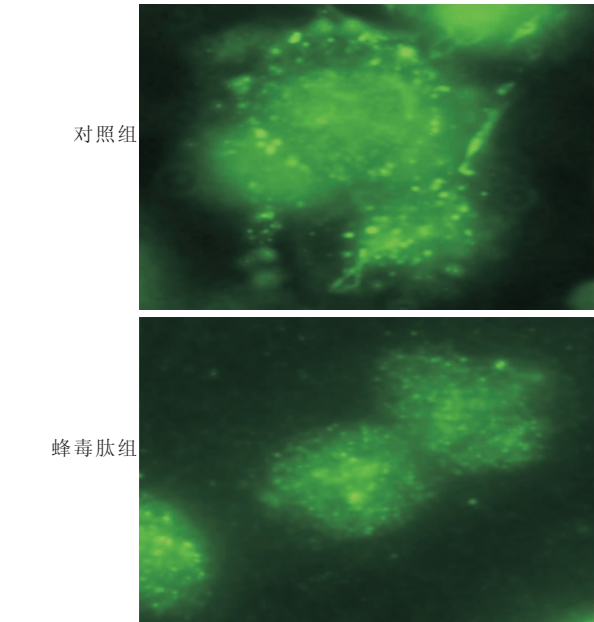


图 3 蜂毒肽对 TGF- β 1 诱导的 A549 细胞中 TGF- β II 受体表达情况的影响
Figure 3 Melittin of TGF- β 1 induced TGF- β II receptor expression in A549 cells

2.4 蜂毒肽对 TGF- β 1 诱导的 A549 细胞中 Smad2、p-Smad2 蛋白表达情况的影响 免疫印迹实验结果显示, Smad2 在各组细胞中均存在阳性表达, 对照组和蜂毒肽组中, p-Smad2 基本不表达, 加入 TGF- β 1 刺

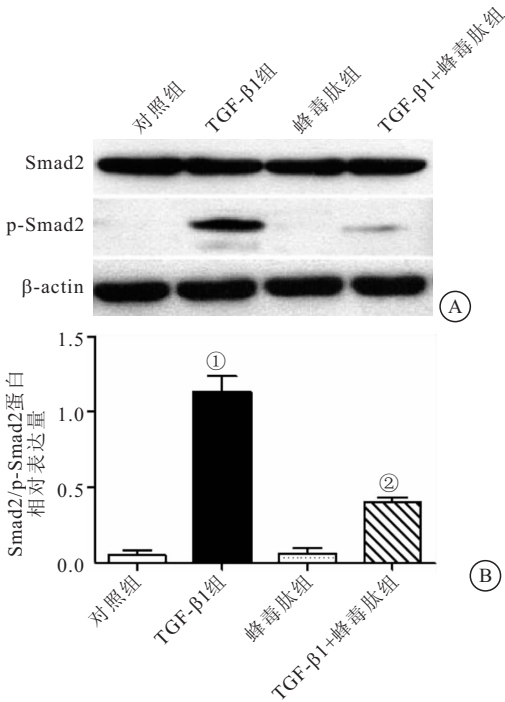


图 4 蜂毒肽对 TGF- β 1 诱导的 A549 细胞中 Smad2、p-Smad2 蛋白表达情况的影响
Figure 4 Effects of melittin on the protein expression of Smad2 and p-Smad2 in TGF- β 1-induced A549 cells

注: 样本均为同一株细胞株, 重复 3 次实验。A. 电泳图; B. Smad2/p-Smad2 蛋白相对表达量。与对照组比较, ① $P < 0.05$; 与 TGF- β 1 组比较, ② $P < 0.05$

2.5 蜂毒肽对 TGF- β 1 诱导的 A549 细胞迁移能力

的影响 Transwell 迁移实验结果显示,与对照组比较,蜂毒肽组细胞迁移能力差异无统计学意义($P>0.05$),TGF- β 1 组细胞迁移优势明显($P<0.05$)。加

入蜂毒肽干预后,与 TGF- β 1 组比较,蜂毒肽+TGF- β 1 组细胞迁移能力减小($P<0.05$),见图 5。

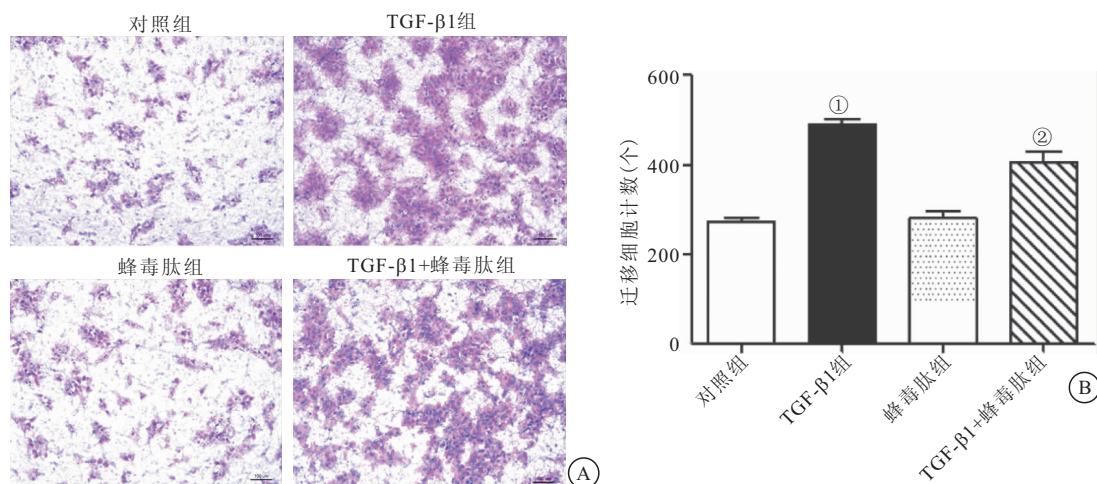


图 5 蜂毒肽对 TGF- β 1 诱导的 A549 细胞迁移能力的影响(结晶紫染色,40 $\times$)

Figure 5 Effect of melittin on TGF- β 1-induced migration of A549 cells

注:样本均为同一株细胞株,重复 3 次实验,每次 3 个副孔。A. Transell 细胞迁移实验结晶紫染色光学显微镜检测结果;B. 迁移实验计数结果。与对照组比较,① $P<0.05$;与 TGF- β 1 组比较,② $P<0.05$

2.6 蜂毒肽对 TGF- β 1 诱导的 A549 细胞侵袭能力的影响 Transwell 侵袭实验结果显示,蜂毒肽组细胞与对照组细胞侵袭能力比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。TGF- β 1 组细胞与对照组细胞侵袭能力

比较,优势明显($P<0.05$)。蜂毒肽+TGF- β 1 组细胞与 TGF- β 1 组细胞比较,其侵袭能力明显降低($P<0.05$),见图 6。

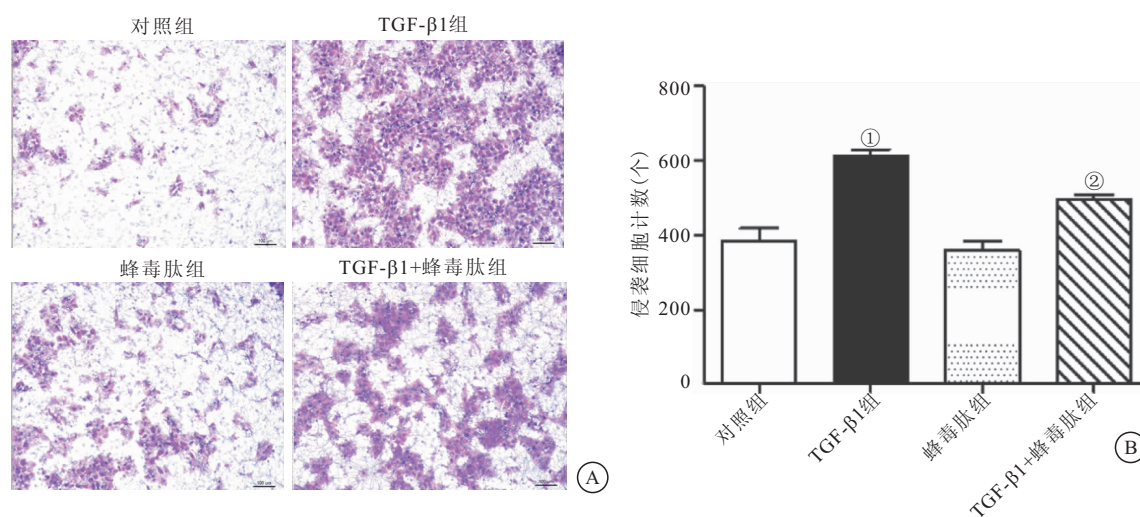


图 6 蜂毒肽对 TGF- β 1 诱导的 A549 细胞侵袭能力的影响(结晶紫染色,40 $\times$)

Figure 6 Effect of melittin on invasion ability of A549 cells induced by TGF- β 1

注:样本均为同一株细胞株,重复 3 次实验,每次 3 个副孔。A. Transell 细胞侵袭实验结晶紫染色光学显微镜检测结果;B. 侵袭实验计数结果。与对照组比较,① $P<0.05$;与 TGF- β 1 组比较,② $P<0.05$

3 讨论

EMT 主要发生在上皮来源肿瘤的早期转移,不仅影响细胞骨架蛋白的表达变化,对细胞侵袭、迁移等生物学行为能力也有一定影响^[7-8]。EMT 的发生

是多种信号通路共同作用的结果,探讨不同信号通路间的相互作用关系,对于明确发病机制及指导临床用药具有积极意义。

有研究显示,TGF- β /SMAD 信号通路参与 TGF- β

诱导的肿瘤细胞 EMT 发生过程^[9-10]。TGF- β 属于转化生长因子家族成员,是机体生长发育过程中的经典信号通路之一,其可与细胞膜上的受体相结合,发挥信号转导作用^[11-12]。既往文献指出,TGF- β 在癌症发病早期对上皮细胞的异常增殖具有一定的抑制作用,但随着肿瘤发病过程的进展,在肿瘤发病晚期,TGF- β 则扮演着促进肿瘤细胞增殖的角色,提示 TGF- β 在肿瘤的发病过程中具有重要地位^[13-14]。在经典的 TGF- β /SMAD 信号通路中,被激活的 TGF- β 可通过与细胞膜上的 TGF- β R II 直接结合,可形成复合体,介导 TGF- β R II 磷酸化反应,从而与 TGF- β R I 发生结合,进而激活 TGF- β R II 相关的丝/苏氨酸酶活性,刺激其信号通路下游 Smad 家族蛋白的活化^[15-16]。Smad 蛋白是由 *Smad* 基因编码的小分子蛋白,是 TGF- β 受体复合物下游的调节蛋白之一,可介导相关信号由细胞膜向细胞核的传递。Smad 家族蛋白活化后可作为 TGF- β 受体复合物的底物,可促进活化的 Smad2、Smad3 蛋白与 Smad4 相互作用,发生结合,形成 Smad2/3-Smad4 异聚体复合物并转移进入细胞核,从而参与细胞核内相关靶基因的转录及表达调控^[17-18]。

为了解蜂毒肽在非小细胞肺癌 TGF- β /SMAD 信号通路中的作用极其具体机制,本研究将 A549 细胞分成 4 个组,即对照组、TGF- β 1 组、蜂毒肽组、TGF- β 1 + 蜂毒肽组。免疫印迹实验及 RT-PCR 结果显示,与对照组相比,TGF- β 1 组细胞钙黏附蛋白 E mRNA 及蛋白表达水平明显降低,其 N-钙黏蛋白、波形蛋白 mRNA 及蛋白表达水平则明显升高(均 $P < 0.05$),蜂毒肽 + TGF- β 1 组细胞钙黏附蛋白 E mRNA 及蛋白表达水平明显优于 TGF- β 1 组($P < 0.05$),提示蜂毒肽可改变上皮样特征蛋白及间质样特征蛋白的表达,进而影响肺癌细胞的 EMT 进程。Transwell 迁移及侵袭实验结果显示,TGF- β 1 组细胞迁移、侵袭能力明显优于对照组,蜂毒肽 + TGF- β 1 组细胞迁移、侵袭能力明显小于 TGF- β 1 组细胞(均 $P < 0.05$),提示蜂毒肽对 TGF- β 1 诱导的 EMT 进程中的肺癌细胞的运动、迁移及侵袭能力具有一定影响。免疫印迹实验结果显示,Smad2 在各组细胞中均存在阳性表达,对照组和蜂毒肽组中 p-Smad2 基本不表达,TGF- β 1 组细胞中 p-Smad2 表达水平明显较对照组高,TGF- β 1 + 蜂毒肽组中 p-Smad2 表达水平明显较 TGF- β 1 组降低(均 $P < 0.05$),提示 TGF- β 1 刺激可上调肿瘤细胞中 p-Smad2 表达水平,即 TGF- β 1 可刺激肿瘤细胞中 Smad2 的磷酸化,与既往研究结果一致。此外本研究还发现,加入蜂毒肽处理后,TGF- β 1 + 蜂毒肽组中 p-Smad2 表达水平明显较 TGF- β 1 组降低($P < 0.05$),

提示蜂毒肽可抑制 Smad2 的磷酸化反应,由此可进一步影响细胞核内相关靶基因的转录及表达,影响 EMT 进程。

通常情况下,TGF- β 相关信号通路的信号传导有赖于 TGF- β R I 与 TGF- β R II 的共同存在^[19]。TGF- β R 是 TGF- β 细胞膜表面具有高亲和力的结合蛋白,其中 TGF- β RI 与 TGF- β RTGF- β R II 同属于丝氨酸和苏氨酸激酶受体家族成员,均为跨膜蛋白,在机体细胞中广泛表达;TGF- β R III 作为广泛分布在细胞膜表面的大分子跨膜蛋白,主要发挥细胞内激酶底物的作用^[20-22]。TGF- β 首先与 TGF- β R II 结合,TGF- β 的构像会发生改变,从而易被 TGF- β R I 识别而形成 TGF- β II /TGF- β /TGF- β RI 复合物,TGF- β R II 可通过磷酸化激活 TGF- β R I 上的 GS 区,TGF- β R I 的磷酸化是信号传导的关键步骤,活化的 TGF- β RI 进而可特异性的识别和磷酸化信号通路上受体调节性的 Smad 蛋白^[23-25]。为了解蜂毒肽在此过程的作用,本研究将肺癌细胞 A549 分为对照组和蜂毒肽组,蜂毒肽组给予 2.5 mg/L 蜂毒肽干预 12 h 后,采用免疫荧光染色处理后,分布观察两组细胞中 TGF- β II 含量及分布情况的变化。实验结果显示,对照组和蜂毒肽组细胞中 TGF- β II 表达存在明显差异,蜂毒肽组细胞中 TGF- β II 含量明显少于对照组细胞($P < 0.05$),提示蜂毒肽可明显改善 A549 细胞中 TGF- β II 的表达及分布,可能与蜂毒肽引起的 p-Smad2 磷酸化及 TGF- β /SMAD 信号通路激活有关。

4 结论

本研究结果显示,蜂毒肽通过抑制 TGF- β /SMAD 信号通路作用,抑制 Smad2 磷酸化,下调 TGF- β II 分布,从而抑制肿瘤细胞的侵袭、迁移,抑制 TGF- β 1 诱导的肺癌细胞 EMT 进程。

【参考文献】

- [1] 姚云峰,王俊,王宝成. 非小细胞肺癌酪氨酸激酶抑制剂原发性耐药机制研究进展[J]. 中华肿瘤杂志, 2016, 38(11):801-805.
- [2] PETRUK NATALIA, TUOMINEN SANNI, ÅKERFELT MALIN, *et al.* CD73 facilitates EMT progression and promotes lung metastases in triple-negative breast cancer[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 6035.
- [3] DASH SUBHRA, SARASHETTI PRASAD M, RAJASHEKAR BALAJI, *et al.* TGF- β 2-induced EMT is dampened by inhibition of autophagy and TNF- α treatment[J]. Oncotarget, 2018, 9(5): 6433-6449.
- [4] ZHIHONG L, YOUFU Z, ZHIDAN X. UNC119 promotes the growth and migration of hepatocellular carcinoma via Wnt/ β -catenin and TGF/ β -EMT signaling pathways[J]. J BUON,

- 2018, 23(1):188-192.
- [5] 胡赞, 李万瑶. 蜂毒肽通过阻止 NF- κ B 和 AP-1 依赖 MMP-9 的表达抑制 PMA 诱导肿瘤细胞浸润[J]. 中国蜂业, 2011, 62(2):58-62.
 - [6] 杨志林, 柯以铨, 徐如祥, 等. 蜂毒肽对人神经胶质瘤细胞的增殖抑制和诱导凋亡作用[J]. 南方医科大学学报, 2007, 27(11):1775-1777.
 - [7] CUIJU MO, TIANHUA LIU, SHU ZHANG, *et al.* Reduced N-acetyl glucosaminyl transferase III expression via Smad3 and Erk signaling in TGF- β 1-induced HCC EMT model[J]. *Discovery Medicine*, 2017, 23(124):7-17.
 - [8] MODY HR, HUNG SW, PATHAK RK, *et al.* miR-202 Diminishes TGF β Receptors and Attenuates TGF β 1-Induced EMT in Pancreatic Cancer[J]. *Mol. Cancer Res*, 2017, 15(8):1029-1039.
 - [9] 范冬利, 于文成, 刘亚秋, 等. TGF- β /SMAD 信号通路及 EMT 及肺纤维化关系的研究进展[J]. 青岛大学医学院学报, 2017, 53(5):618-621.
 - [10] 靳祎祎, 林珊, 杨弘, 等. 白花蛇舌草调控 TGF- β /Smad 信号通路介导的 EMT 抑制大肠癌细胞转移的研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2018, 13(8):1090-1094.
 - [11] QIUYUAN S, CHUNMING J, CHENG S, *et al.* Tanshinone IIA mitigates peritoneal fibrosis by inhibiting EMT via regulation of TGF- β /smad pathway[J]. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2018, 16(12):2857.
 - [12] SUNDONG L, LECHU Y, YONGQING N, *et al.* Fibroblast Growth Factor 21 Attenuates Diabetes-Induced Renal Fibrosis by Negatively Regulating TGF- β -p53-Smad2/3-Mediated Epithelial-to-Mesenchymal Transition via Activation of AKT[J]. *Diabetes & metabolism journal*, 2020, 44(1):158-172.
 - [13] 吴志超, 林伯斌, 孙少杰, 等. 肝癌组织中 TGF- β 1, β -catenin 和 EMT 相关蛋白表达水平及临床意义[J]. 中国现代普通外科进展, 2019, 22(12):930-934.
 - [14] YUANYUAN Z, JIANJIE Z, DAN S, *et al.* Repression of Smad4 by miR-205 moderates TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition in A549 cell lines[J]. *International Journal of Oncology*, 2016, 49(2):700-708.
 - [15] 李文娜, 李庆伟, 王浩. TGF- β 对肿瘤微环境中免疫监视及细胞外基质的调控作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2020, 36(3):32-39.
 - [16] DU L, LEI Y, CHEN J, *et al.* Potential Ameliorative Effects of Qing Ye Dan Against Cadmium Induced Prostatic Deficits via Regulating Nrf-2/HO-1 and TGF- β 1/Smad Pathways[J]. *Cellular Physiology & Biochemistry*, 2017, 43(4):1359.
 - [17] MING W, DAN-QIAN C, MIN-CHANG W, *et al.* Poricoic acid ZA, a novel RAS inhibitor, attenuates tubulo-interstitial fibrosis and podocyte injury by inhibiting TGF- β /Smad signaling pathway[J]. *Phytomedicine*, 2017, 36:243-253.
 - [18] SAKAMOTO R, KAJIHARA I, MAEDA-OTSUKA S, *et al.* 470 Endoglin enhances the progression of angiosarcoma through the regulation of non-Smad TGF- β signaling[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2019, 139(9):S295.
 - [19] MA JIFANG, ZHANG LEI, HAO JIANBING, *et al.* Up-regulation of microRNA-93 inhibits TGF- β 1-induced EMT and renal fibrogenesis by down-regulation of Orail[J]. *J Pharmacol Sci*, 2018, 136(4):218-227.
 - [20] VITIELLO G A F, AMARA/J. JNTE M K, BANIN-HIRATA B K, *et al.* Transforming growth factor beta receptor II (TGFBR2) promoter region polymorphism in Brazilian breast cancer patients: association with susceptibility, clinicopathological features, and interaction with TGFBI haplotypes[J]. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2019, 178(1):207-219.
 - [21] 程荆, 范燕琴, 周汉, 等. TGF- β 信号通路在胶质瘤中的作用及分子机制[J]. 中国临床神经外科杂志, 2019, 24(4):58-60.
 - [22] SONG JIANGUO, SHI WEIWEI. The concomitant apoptosis and EMT underlie the fundamental functions of TGF- β [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2018, 50(1):91-97.
 - [23] ZHU L, YU C L, ZHENG Y. NSD2 inhibition suppresses metastasis in cervical cancer by promoting TGF- β /TGF- β RI/SMADs signaling[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, 519(3):489-496.
 - [24] HOLMGAARD R B, SCHAEER D A, YANXIA L, *et al.* Targeting the TGF β pathway with galunisertib, a TGF β RI small molecule inhibitor, promotes anti-tumor immunity leading to durable, complete responses, as monotherapy and in combination with checkpoint blockade[J]. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2018, 6(1):47.
 - [25] 耿文文, 蒲倩, 高海东. Runx2 在 TGF- β 1 诱导的肺癌 A549 细胞上皮-间质转化过程中的作用研究[J]. 中国癌症杂志, 2019, 29(09):7-13.

(收稿日期:2021-01-18;修改日期:2021-03-22;编辑:郭翠)