

氧化苦参碱对非小细胞肺癌细胞抗肿瘤作用及机制

罗娇^{1,2}, 解伟^{3,4}, 张坤驰^{3,5}, 王进⁵, 周莉^{1,2*}

- (1. 贵州医科大学临床医学院, 贵阳 550025; 2. 上海健康医学院附属周浦医院, 上海 201318;
3. 上海市分子影像学重点实验室, 上海 201318; 4. 上海健康医学院药学院, 上海 201318;
5. 贵州工程职业学院, 贵州 铜仁 554300)

[摘要] 目的:研究氧化苦参碱(OM)对非小细胞肺癌(NSCLC)细胞增殖、迁移及侵袭的影响,并探讨其可能的作用机制。方法:使用细胞增殖与活性检测(CCK-8)实验检测OM在不同浓度(0, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 32.0和64.0 mmol·L⁻¹)对NSCLC A549和H1299细胞增殖的影响;通过transwell小室法和划痕愈合实验观察不同浓度的OM(8.0, 16.0, 32.0 mmol·L⁻¹)对A549和H1299细胞侵袭与迁移能力的影响;采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测不同浓度OM(8.0, 16.0, 32.0 mmol·L⁻¹)对Notch信号通路相关蛋白的表达水平的影响。结果:OM可有效抑制NSCLC A549和H1299的细胞活力($P<0.05$, $P<0.01$),且呈浓度依赖性;此外,OM可抑制A549和H1299细胞的迁移与侵袭($P<0.01$),也呈一定的浓度依赖性。高浓度(32.0 mmol·L⁻¹)OM可以明显抑制Notch信号通路中Notch 1细胞内结构域(NICD),转录复合蛋白[肿瘤坏死因子- α 转化酶(TACE)和无毛重组结合蛋白抑制子(RBPSUH)]及其下游蛋白Hes家族发状分裂相关增强子1(Hes1)的蛋白表达水平。结论:OM可抑制A549和H1299细胞的增殖、迁移和侵袭能力,且可抑制Notch信号通路相关分子的表达。

[关键词] 氧化苦参碱; 非小细胞肺癌(NSCLC); 细胞增殖; Notch信号通路

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R73-3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)13-0043-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211396

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210513.1115.001.html>

[网络出版日期] 2021-5-13 14:56

Anti-tumor Effect of Oxymatrine on Non-small Cell Lung Cancer Cell Lines and Its Mechanism

LUO Jiao^{1,2}, XIE Wei^{3,4}, ZHANG Kun-chi^{3,5}, WANG Jin⁵, ZHOU Li^{1,2*}

- (1. School of Clinical Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China;
2. Zhoupu Hospital Affiliated to Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai 201318, China;
3. Shanghai Key Laboratory for Molecular Imaging, Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai 201318, China;
4. School of Pharmacy, Shanghai University of Medicine and Health Sciences, Shanghai 201318, China;
5. Guizhou Engineering Vocational College, Tongren 554300, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of oxymatrine(OM) on proliferation, migration, and invasion of non-small cell lung cancer(NSCLC) A549 and H1299 cells and to explore the possible mechanism. **Method:** A549 and H1299 cells were treated by OM of different concentrations(0, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 32.0, and 64.0 mmol·L⁻¹) and the cell viability was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) assay. Transwell invasion and wound healing assays were applied to determine the effect of OM of different concentrations (8.0,

[收稿日期] 20210128(021)

[基金项目] 上海市自然科学基金面上项目(18ZR1417800);浦东新区学科带头人培养项目(PWRd2017-02);国家自然科学基金项目(81801833,81703401);贵州省科技计划项目(黔科合基础1129号)

[第一作者] 罗娇,在读硕士,从事恶性肿瘤及脑转移相关机制研究,E-mail:l287923@163.com

[通信作者] *周莉,博士,教授,从事恶性肿瘤及脑转移相关机制研究,E-mail:lzhou_sh@hotmail.com

16.0, and 32.0 mmol·L⁻¹) on the invasion and migration of A549 and H1299 cells. Western blot was adopted to detect the changes in the expression of proteins related to the Notch signaling pathway after the treatment by OM of different concentrations (8.0, 16.0, and 32.0 mmol·L⁻¹). **Result:** Compared with the control, OM could inhibit the proliferation ($P<0.05$, $P<0.01$) and hinder the cell invasion and migration of A549 and H1299 cells ($P<0.01$) in a dose-dependent manner. The results of Western blot showed that OM (32.0 mmol·L⁻¹) could effectively counteract the expression levels of Notch1 intracellular domain (NICD), transcriptional complex proteins [TNF-alpha converting enzyme (TACE) and recombining binding protein suppressor of hairless (RBPSUH)], and Hes family hairy and enhancer of split 1 (Hes1) in A549 and H1299 cells. **Conclusion:** OM was capable of inhibiting the proliferation, migration, and invasion of A549 and H1299 cells and also hindering the expression of proteins related to Notch signaling pathway.

[Key words] oxymatrine; non-small cell lung cancer (NSCLC); cell proliferation; Notch signaling pathway

肺癌是全球常见的恶性肿瘤之一,美国癌症协会最新统计显示,2021年美国肺癌的预计新发病例数约为23.5万,较2020年有所上升,预计死亡病例数约为13万^[1]。在我国,2015年肺癌新发病例数约78.7万,居恶性肿瘤发病率和死亡率首位^[2]。非小细胞肺癌(NSCLC)占有肺癌的80%~85%,其是临床上最常见的肺癌病理类型^[3-4]。目前手术治疗联合放化疗是早期肺癌最主要的治疗手段;由于早期诊断难度较大,许多NSCLC患者临床确诊时已发展为晚期,失去早期手术机会,治疗上首选放化疗,治疗疗效欠佳,预后差^[5-6]。Notch信号通路在多个物种的进化中高度保守,可通过调节相邻细胞间的通讯来调控细胞、组织和器官的分化和发育,其还可诱导肿瘤细胞发生上皮间质转化(EMT),细胞增殖和迁移等,在肿瘤的发生和发展中发挥重要作用^[7-9]。Notch信号通路与NSCLC肿瘤的发生、发展和产生耐药性有关,且在肺肿瘤干细胞(CSC)形成中起重要作用^[4],通过靶向Notch信号通路治疗NSCLC可能是一种新的治疗途径。因此,有必要寻找与Notch信号通路相关的抗肿瘤药物。

当前,有关新型天然抗肿瘤药物中药的开发已引起关注,研究发现传统中药能够有效的抑制肿瘤细胞的生长,减轻肿瘤的并发症,不良反应相对较少^[10]。氧化苦参碱(OM)是从苦参中提取的一种生物碱,具有抗病毒、抗炎、抗纤维化、心血管保护、免疫等作用^[11-12]。已证明OM对胃癌^[13]、乳腺癌^[14]、肝细胞癌^[15]、膀胱癌^[16]和结肠癌^[17]等多种肿瘤细胞有抑制作用,其通过减少血管内皮生长因子的表达量、抑制Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin)信号通路、调控上EMT等来达到其抗肿瘤效应^[18]。肺癌相关的研

究发现OM通过抑制表皮生长因子受体信号通路和调控miR-367-3p的表达来达到其抗肿瘤作用^[19-20]。目前其相关机制研究仍相对较少,因此,本研究旨在探讨OM对NSCLC细胞增殖、迁移和侵袭及Notch信号通路相关蛋白的影响,为其应用于临床提供一定的理论依据。

1 材料

1.1 细胞株 人NSCLC细胞A549和H1299购于美国模式培养物集存库(ATCC),批号分别为CCL-185,CRL-5803,传至第15代。

1.2 药品与试剂 OM,DAPT(上海邦邦生物有限公司,批号分别为A800926, HY-13027);DMEM, RPMI-1640培养基(美国Gibco公司,批号分别为1210046,1228161);胎牛血清,0.25%乙二胺四乙酸(EDTA)胰蛋白酶(北京全式金生物有限公司,批号分别为K20107,N40524),100 \times 青-链霉素(生工生物工程股份有限公司,批号E607011-0100);Western及Immuno precipitation(IP)细胞裂解液(江苏凯基生物技术股份有限公司,批号20180928);BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号P0010);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂(日本同仁公司,批号CK04);transwell小室(美国Millipore公司,批号PI8P 01250);重组Homo血管内皮生长因子(VEGF)₁₆₅(北京义翘神州有限公司,批号YB696Hu014); β -肌动蛋白(β -actin),Notch细胞内结构域(NICD),转录复合蛋白[肿瘤坏死因子- α 转化酶(TACE)和无毛重组结合蛋白抑制子(RBPSUH)], Hes家族发状分裂相关增强子1(Hes1)单克隆抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为4967S,4147,3976,5313,11988),山羊抗兔辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗[生工

生物工程(上海)股份有限公司,批号D110058];增强化学发光法(ECL)化学发光超敏显色试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司,批号36208ES76)。

1.3 仪器 Countess™ II型细胞计数仪,51119770DP型多功能酶标仪,311气套式CO₂恒温培养箱(美国Thermo公司);DMi5型荧光倒置显微镜(德国Leica公司);SYSTEM GelDoc XR+IMAGELAB型凝胶成像系统,Mini-PROTEAN® Tetra型蛋白电泳仪、转膜仪(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 细胞培养及传代 A549细胞培养在含10%胎牛血清,1%青-链霉素的DMEM培养基,H1299细胞在含10%胎牛血清,1%青-链霉素的RPMI1640培养基,置于37℃5%CO₂的恒温培养箱中培养,2~3d更换培养基1次。实验取对数生长期细胞。细胞传代,待细胞融合至80%~90%,用0.25%EDTA胰蛋白酶消化,待细胞从培养瓶壁上脱落,加入新鲜完全培养基,吹打成细胞悬液,1300 r·min⁻¹室温离心4 min(离心半径14.5 cm,下同),弃上清,用新鲜完全培养基重悬,置于恒温培养箱中培养。

2.2 OM对NSCLC细胞增殖的影响

2.2.1 实验分组 空白组;阳性药组(DAPT组,DAPT又称GSI-IX,是一种γ-分泌酶抑制剂,Notch信号通路抑制剂^[21]);药物组(OM组),OM组A549和H1299细胞分别加入0,1.0,2.0,4.0,8.0,16.0,32.0和64.0 mmol·L⁻¹的OM;各组进行相应处理后继续培养48 h进行后续实验。

2.2.2 CCK-8法检测OM对NSCLC细胞的增殖的影响 取对数生长期的NSCLC A549,H1299用胰蛋白酶消化后接种于96孔板中(3×10³个/孔),置于37℃5%CO₂培养箱中培养24 h后,OM组分别加入OM使终浓度为0,1.0,2.0,4.0,8.0,16.0,32.0,64.0 mmol·L⁻¹,DAPT组终浓度为2 μmol·L⁻¹,每组均设置3个复孔。作用48 h后,每个孔中加入CCK-8溶液10 μL,37℃5%CO₂培养箱中2 h,随后用酶标仪在波长450 nm测定吸光度A,计算细胞增殖能力= $A_{\text{实验组}}/A_{\text{对照组}} \times 100\%$,绘制细胞增殖曲线。

2.3 OM对NSCLC细胞迁移、侵袭的影响

2.3.1 划痕损伤修复实验检测OM对肺癌细胞迁移能力的影响 取对数生长期的A549和H1299细胞(2×10⁵个/mL)接种于6孔培养板中,每孔2 mL培养基培养。待细胞汇合度达到80%~90%时,用10 μL枪头垂直于孔板呈“一”字形划痕,横竖各3条,尽量保证每孔划痕宽度一致,除去培养液;加入不同浓

度的OM(0,8.0,16.0和32.0 mmol·L⁻¹)和DAPT(2 μmol·L⁻¹)孵育48 h后,待药物分别作用0,24,48 h后时用倒置荧光显微镜拍照,Image J软件分析药物作用后划痕的宽度,细胞迁移距离= $(L_0-L_n)/2$ (L₀代表0 h的划痕宽度,L_n分别代表24,48 h的划痕宽度)。

2.3.2 transwell侵袭实验检测OM对肺癌细胞侵袭能力的影响 用预冷的空白培养基稀释Matrigel基质胶,比例为1:2,每个小室内均匀地加入稀释后的Matrigel基质胶30 μL,培养箱中凝固1 h。对数期生长的A549,H1299细胞消化后使其在无血清培养基中的密度为2×10⁵个/mL。用无血清培养基将OM分别稀释至2×(0,16,32,64 mmol·L⁻¹),DAPT稀释成2×(4 μmol·L⁻¹)。每组设3个复孔。在铺胶后的transwell小室中分别加入含细胞的培养基50 μL和配好的药物50 μL,药物作用终浓度为OM 0,8.0,16.0,32.0 mmol·L⁻¹,DAPT 2 μmol·L⁻¹,置于培养箱中孵育30 min;在24孔板每孔中加入完全培养基600 μL,培养基中VEGF₁₆₅的质量浓度为20 μg·L⁻¹,将小室小心转移到24孔板中,在37℃5%CO₂培养箱中培养12 h后;取出小室用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗3次,在24孔板每孔中加入预冷的4%多聚甲醛600 μL并放入小室,固定20 min后将小室倒扣风干,用棉签擦掉小室里面的基质胶和细胞。0.1%结晶紫染色20 min,漂洗3次,风干后拍照。用Photoshop软件对5个不同区域的细胞进行计数,取平均值,A549和H1299细胞的侵袭率=(用药组侵袭细胞数/对照组侵袭细胞数)×100%。

2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测蛋白表达水平 将对数期生长的A549和H1299细胞(2×10⁵个/mL),接种于6孔板中。细胞融合度为80%~90%时,用不同浓度的OM(0,8.0,16.0,32.0 mmol·L⁻¹),DAPT(2 μmol·L⁻¹),作用48 h。弃培养基,用PBS 1 mL清洗细胞2次,根据药物作用后孔中的细胞密度加入合适体积的细胞裂解液,冰上孵育15 min,用移液枪吹打裂解液直至将细胞吹下来,转移至1.5 mL离心管中,4℃,12 000 r·min⁻¹,离心20 min,留取上清,-20℃冰箱中保存。用BCA蛋白浓度测定试剂盒对提取蛋白进行定量分析,配制分离胶、浓缩胶[7.5%和12.5%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)],上样后进行电泳(80 V,30 min;120 V,1.5 h)并将分离后的蛋白转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上(300 mA,2 h)。用

含5%脱脂牛奶室温封闭2 h后,用TBST清洗,孵育一抗[用TBST稀释NICD(1:500),RBPSUH(1:500),TACE(1:500)和Hes1(1:500), β -actin(1:1000)],4℃孵育过夜;回收一抗,用TBST洗膜3次,每次5 min;加入带有HRP标签的山羊抗兔二抗(1:5000),摇床孵育1 h,用TBST洗膜3次,每次5 min;使用ECL化学发光超敏显色试剂盒对PVDF膜进行曝光显影,成像扫描分析系统测定目的和内参照条带。 β -actin作为内参蛋白,采用Image J软件分析各目的条带的灰度值。

2.5 统计学方法 应用GraphPad Prism 8.0软件对所有实验结果进行统计学分析,实验结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示,对数据进行方差齐性检验后,采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对A549和H1299细胞增殖的影响 OM可有效抑制NSCLC细胞A549和H1299的增殖,增殖率随着OM浓度的增大而减小,呈剂量依赖性,差异具有统计学意义($P<0.05, P<0.01$)。见表1,2。

表1 OM对A549细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	浓度/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	A	抑制率/%
空白		2.300±0.115	-
OM	1.0	2.093±0.047 ²⁾	8.83±4.06 ¹⁾
	2.0	2.038±0.049 ²⁾	11.18±5.26 ²⁾
	4.0	2.017±0.065 ²⁾	12.10±5.07 ²⁾
	8.0	1.827±0.120 ²⁾	20.23±8.19 ²⁾
	16.0	1.254±0.027 ²⁾	45.34±3.43 ²⁾
	32.0	0.645±0.243 ²⁾	72.20±9.74 ²⁾
	64.0	0.326±0.041 ²⁾	85.83±1.51 ²⁾
DAPT	0.002	0.260±0.030 ²⁾	88.68±1.30 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05, ^{2)}$ $P<0.01$ (表2~10同)。

3.2 对A549和H1299细胞迁移和侵袭的影响 与空白组比较,OM组(8.0, 16.0, 32.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)A549和H1299细胞的迁移距离均显著减少($P<0.01$),且随OM浓度增加迁移的距离越来越小。见表3,4。与空白组比较,OM组(8.0, 16.0, 32.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)A549和H1299细胞的侵袭能力均显著降低($P<0.01$),且随浓度增加侵袭率逐渐降低,呈一定的剂量依赖性。见表5,6,图1。

3.3 对A549和H1299细胞Notch信号通路蛋白表达的影响 Western blot结果显示,与空白组比较,OM(8.0, 16.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)组Notch信号通路相关蛋白

表2 OM对H1299细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	浓度/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	A	抑制率/%
空白		1.747±0.293	-
OM	1.0	1.646±0.333	6.21±5.28
	2.0	1.630±0.307	6.90±4.82
	4.0	1.559±0.293	10.85±8.63 ²⁾
	8.0	1.348±0.170 ¹⁾	22.27±5.22 ²⁾
	16.0	1.238±0.206 ²⁾	29.07±2.93 ²⁾
	32.0	0.954±0.188 ²⁾	45.40±5.40 ²⁾
	64.0	0.859±0.183 ²⁾	50.78±3.58 ²⁾
DAPT	0.002	0.900±0.162 ²⁾	48.53±2.87 ²⁾

表3 OM对A549细胞迁移的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	迁移距离/ μm	
		24 h	48 h
空白		22.64±1.84	45.41±4.16
OM	8.0	9.57±3.04 ²⁾	17.49±6.47 ²⁾
	16.0	5.68±1.74 ²⁾	7.34±5.64 ²⁾
	32.0	3.53±2.41 ²⁾	2.98±1.87 ²⁾
DAPT	0.002	2.06±0.76 ²⁾	10.46±2.38 ²⁾

表4 OM对H1299细胞迁移的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	迁移距离/ μm	
		24 h	48 h
空白		33.50±6.63	63.30±4.45
OM	8.0	8.57±2.77 ²⁾	18.94±5.21 ²⁾
	16.0	3.62±2.64 ²⁾	5.08±4.40 ²⁾
	32.0	3.10±2.03 ²⁾	4.75±2.58 ²⁾
DAPT	0.002	10.11±1.78 ²⁾	22.07±3.72 ²⁾

表5 OM对A549细胞侵袭的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	侵袭个数/个	侵袭率/%
空白		107.60±5.03	-
OM	8.0	76.80±5.07 ²⁾	71.45±4.95 ²⁾
	16.0	59.80±3.96 ²⁾	55.67±2.05 ²⁾
	32.0	21.00±2.92 ²⁾	19.47±2.05 ²⁾
DAPT	0.002	22.20±2.59 ²⁾	20.61±1.91 ²⁾

无明显改变,DAPT组和OM(32.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)组A549和H1299细胞中Notch信号通路中的NICD, TACE, RBPSUH及Hes1蛋白的相对表达水平均明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见表7,8,图2。

表6 OM对H1299细胞侵袭的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of OM on invasion abilities H1299 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

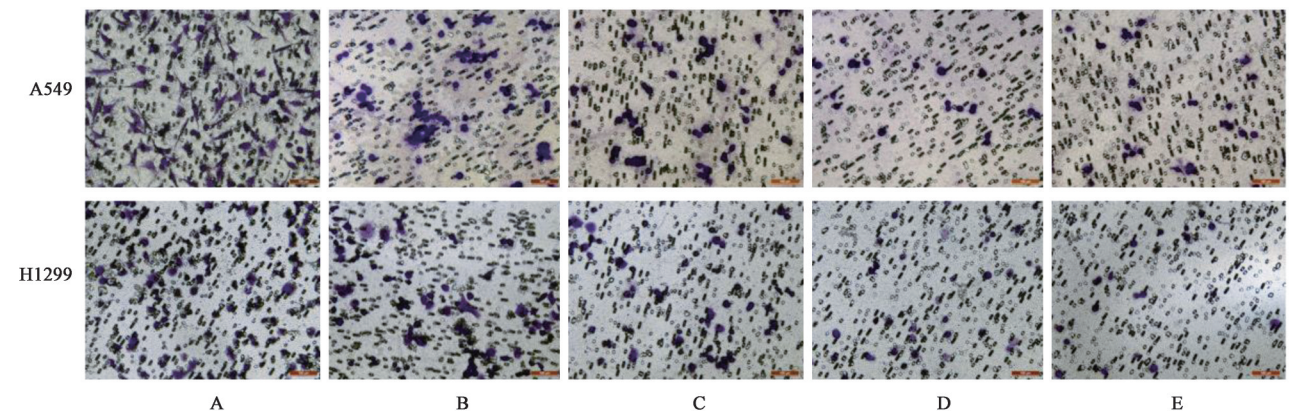
组别	浓度/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	侵袭个数/个	侵袭率/%
空白		104.40 \pm 5.50	-
OM	8.0	73.40 \pm 2.07 ²⁾	70.40 \pm 2.55 ²⁾
	16.0	46.40 \pm 2.19 ²⁾	44.53 \pm 2.97 ²⁾
	32.0	26.00 \pm 3.94 ²⁾	24.91 \pm 3.67 ²⁾
DAPT	0.002	31.40 \pm 3.05 ²⁾	32.85 \pm 9.18 ²⁾

4 讨论

肺癌是呼吸系统中最常见的恶性肿瘤之一,居我国恶性肿瘤发病率和死亡率的第1位,其中80%~85%为NSCLC^[4]。目前NSCLC的治疗方法主要包括手术切除、放化疗、靶向和免疫治疗,尽管治疗手

段有所进步,但其5年生存率仍较低,约15%^[22]。NSCLC具有高侵袭性,早期可通过侵犯血管而发生远处转移,是引起患者预后不良的重要原因之一;因发生转移的患者无法进行手术治疗,其5年生存率仅为5%^[23]。因此有必要寻找一种有效且毒性小的抗肿瘤药物来治疗和改善NSCLC患者的生存质量。OM是从苦参中提取出来的一种生物碱,具有多种生物学特性,可通过抑制肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭,诱导其凋亡及减少肿瘤血管生成等发挥抗肿瘤作用,在抗肿瘤临床疗效中具有潜在的应用开发价值^[19,24]。体外实验证实OM可影响肺癌、胃癌、乳腺癌、肝细胞癌和结肠癌等肿瘤细胞生长^[19]。

哺乳动物中Notch信号通路由5个配体和4种不同亚型的受体组成,且Notch信号通路参与了



A. 空白组;B~D. OM(8,16,32 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)组;E. DAPT组(图2同)

图1 OM对A549和H1299细胞的侵袭的影响(结晶紫, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of OM on invasion abilities A549 and H1299 cells (CV, $\times 200$)

表7 OM对A549细胞中TACE, NICD, RBPSUH和Hes1蛋白表达量的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of OM on expression of TACE, NICD, RBPSUH and Hes1 in A549 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	TACE/ β -actin	NICD/ β -actin	RBPSUH/ β -actin	Hes1/ β -actin
空白		0.809 \pm 0.027	0.713 \pm 0.067	0.867 \pm 0.021	1.083 \pm 0.028
OM	8.0	0.891 \pm 0.042	0.818 \pm 0.021	0.932 \pm 0.038	0.822 \pm 0.066 ²⁾
	16.0	0.885 \pm 0.067	0.687 \pm 0.078	0.916 \pm 0.067	0.817 \pm 0.069 ²⁾
	32.0	0.194 \pm 0.014 ²⁾	0.712 \pm 0.051	0.665 \pm 0.015 ²⁾	0.158 \pm 0.020 ²⁾
DAPT	0.002	0.051 \pm 0.003 ²⁾	0.050 \pm 0.006 ²⁾	0.150 \pm 0.018 ²⁾	0.110 \pm 0.009 ²⁾

表8 OM对H1299细胞中TACE, NICD, RBPSUH和Hes1蛋白表达量的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 8 Effect of OM on expression of TACE, NICD, RBPSUH and Hes1 in H1299 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	TACE/ β -actin	NICD/ β -actin	RBPSUH/ β -actin	Hes1/ β -actin
空白		0.950 \pm 0.061	0.964 \pm 0.016	0.962 \pm 0.004	0.827 \pm 0.082
OM	8.0	0.943 \pm 0.083	0.978 \pm 0.036	1.010 \pm 0.041	0.527 \pm 0.088 ²⁾
	16.0	1.052 \pm 0.032	0.866 \pm 0.028	1.026 \pm 0.047	0.508 \pm 0.137 ²⁾
	32.0	0.606 \pm 0.034 ²⁾	0.621 \pm 0.053 ²⁾	0.826 \pm 0.017 ²⁾	0.521 \pm 0.088 ²⁾
DAPT	0.002	0.051 \pm 0.003 ²⁾	0.050 \pm 0.006 ²⁾	0.176 \pm 0.012 ²⁾	0.153 \pm 0.021 ²⁾

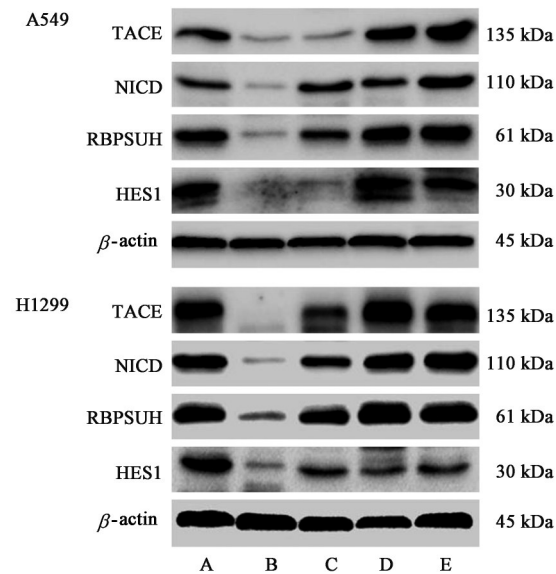


图2 OM作用A549和H1299细胞后TACE, NICD, RBPSUH和Hes1蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of OM on expression of TACE, NICD, RBPSUH and Hes1 in A549 and H1299 cells

NSCLC的发生和发展过程^[25-27]。Notch信号通路被激活时,配体与受体结合后经一系列蛋白酶水解后形成NICD,其被释放并转移至细胞核,诱导下游靶基因的表达,包括Hes1,从而影响细胞分化、增殖和凋亡过程^[28-30]。研究证实KIAA0247是抑癌基因p53的靶向基因,体外实验发现NSCLC细胞中过表达的KIAA0247可通过抑制Notch信号通路活性来抑制肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭^[21]。另一项研究表明NSCLC组织和细胞中存在过表达的GRWD1蛋白(其在多种肿瘤中过表达,与肿瘤预后相关),其激活Notch信号通路后引起Notch受体细胞内结构域NICD表达上调,并且转录复合蛋白(TACE和RBPSUH)和下游靶蛋白Hes1的表达水平也上调,从而促进了NSCLC细胞的增殖和迁移^[31]。因此,有必要寻找与Notch信号通路相关的抗肿瘤药物。

本研究首先通过CCK-8实验检测OM对NSCLC A549和H1299细胞活力的影响,结果显示OM能有效地抑制NSCLC A549和H1299细胞活力,且随药物浓度的增加,细胞活力明显下降。采用不同浓度的OM(8.0, 16.0, 32.0 mmol·L⁻¹)处理细胞后进行划痕损伤愈合实验与transwell小室实验,结果表明OM能够显著抑制A549和H1299细胞的迁移和侵袭的能力,且随OM浓度的增加,其抑制作用越明显。使用Notch通路抑制剂DAPT作为阳性药,与空白组相比,DAPT处理组的细胞增殖、迁移和侵袭能力均受到明显抑制。为明确OM对Notch

信号通路相关蛋白的影响,本研究通过Western blot实验发现,与空白组相比,中、低(8.0, 16.0 mmol·L⁻¹)浓度OM作用细胞后对Notch信号通路相关蛋白的无明显作用,但DAPT和高浓度(32.0 mmol·L⁻¹)OM处理细胞后引起Notch信号通路相关蛋白的NICD呈现明显低表达,且转录复合蛋白TACE, RBPSUH和下游靶分子Hes1的表达水平也明显降低;结合既往研究结果,课题组推测OM能够抑制NSCLC细胞A549和H1299的细胞活力,可能通过抑制Notch信号通路对NSCLC细胞的增殖、迁移和侵袭产生抑制作用。

综上所述,OM可抑制NSCLC细胞的增殖、迁移和侵袭,且能抑制Notch信号通路相关蛋白的表达,为其以后作为抗NSCLC的一种相对有效和安全的方案提供一定的理论基础。但NSCLC的发病机制十分复杂,可能存在多个靶点和多种信号通路的共同作用,后续需进行体内和体外实验来进一步研究其作用机制。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics, 2021 [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71 (1): 7-33.
- [2] ZHENG R S, SUN K X, ZHANG S W, et al. Report of cancer epidemiology in China, 2015 [J]. Chin J Oncol, 2019, 41 (1): 19-28.
- [3] PARKIN D M. Global cancer statistics in the year 2000 [J]. Lancet Oncol, 2001, 2 (9): 533-43.
- [4] ZOU B, ZHOU X L, LAI S Q, et al. Notch signaling and non-small cell lung cancer [J]. Oncol Lett, 2018, 15 (3): 3415-3421.
- [5] KUBOTA K, KAWAHARA M, OGAWARA M, et al. Vinorelbine plus gemcitabine followed by docetaxel versus carboplatin plus paclitaxel in patients with advanced non-small-cell lung cancer: a randomised, open-label, phase III study [J]. Lancet Oncol, 2008, 9 (12): 1135-1142.
- [6] DESANTIS C E, LIN C C, MARIOTTO A B, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014 [J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64 (4): 252-271.
- [7] LI L, TANG P, LI S, et al. Notch signaling pathway networks in cancer metastasis: a new target for cancer therapy [J]. Med Oncol, 2017, 34 (10): 180.
- [8] SIEBEL C, LENDAHL U. Notch signaling in development, tissue homeostasis, and disease [J].

- Physiol Rev, 2017, 97 (4): 1235-1294.
- [9] MEURETTE O, MEHLEN P. Notch signaling in the tumor microenvironment [J]. Cancer Cell, 2018, 34 (4): 536-548.
- [10] WANG X J, ZHOU R J, ZHANG N, et al. 20(S)-ginsenoside Rg₃ sensitizes human non-small cell lung cancer cells to icotinib through inhibition of autophagy [J]. Eur J Pharmacol, 2019, 850: 141-149.
- [11] LIU Y, XU Y, JI W, et al. Anti-tumor activities of matrine and oxymatrine: literature review [J]. Tumour Biol, 2014, 35 (6): 5111-5119.
- [12] LU M L, XIANG X H, XIA S H. Potential signaling pathways involved in the clinical application of oxymatrine [J]. Phytother Res, 2016, 30 (7): 1104-1112.
- [13] SONG M Q, ZHU J S, CHEN J L, et al. Synergistic effect of oxymatrine and angiogenesis inhibitor NM-3 on modulating apoptosis in human gastric cancer cells [J]. World J Gastroenterol, 2007, 13 (12): 1788-1793.
- [14] ZHANG Y, PIAO B, ZHANG Y, et al. Oxymatrine diminishes the side population and inhibits the expression of beta-catenin in MCF-7 breast cancer cells [J]. Med Oncol, 2011, 28(Suppl 1): S99-S107.
- [15] LIU Y, BI T, DAI W, et al. Oxymatrine synergistically enhances the inhibitory effect of 5-fluorouracil on hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo [J]. Tumour Biol, 2016, 37 (6): 7589-7597.
- [16] LI S, ZHANG Y, LIU Q, et al. Oxymatrine inhibits proliferation of human bladder cancer T24 cells by inducing apoptosis and cell cycle arrest [J]. Oncol Lett, 2017, 13(6): 4453-4458.
- [17] WANG X, LIU C, WANG J, et al. Oxymatrine inhibits the migration of human colorectal carcinoma RKO cells via inhibition of PAI-1 and the TGF-beta1/Smad signaling pathway [J]. Oncol Rep, 2017, 37 (2): 747-753.
- [18] WU J, CAI Y, LI M, et al. Oxymatrine promotes S-phase arrest and inhibits cell proliferation of human breast cancer cells *in vitro* through mitochondria-mediated apoptosis [J]. Biol Pharm Bull, 2017, 40 (8): 1232-1239.
- [19] LI W, YU X, TAN S, et al. Oxymatrine inhibits non-small cell lung cancer via suppression of EGFR signaling pathway [J]. Cancer Med, 2018, 7 (1): 208-218.
- [20] YU Q, LUO J, ZHANG J, et al. Oxymatrine inhibits the development of non-small cell lung cancer through miR-367-3p upregulation and target gene SGK3 downregulation [J]. Am J Transl Res, 2020, 12 (9): 5538-5550.
- [21] XU Y, REN H, JIANG J, et al. KIAA0247 inhibits growth, migration, invasion of non-small-cell lung cancer through regulating the Notch pathway [J]. Cancer Sci, 2018, 109 (4): 1055-1065.
- [22] ANG M K, MOK T S K. Twenty-five years of respirology: advances in lung cancer [J]. Respirology, 2020, 25 (1): 26-31.
- [23] ZHANG Z, BIEN J, MORI M, et al. A way forward for cancer prevention therapy: personalized risk assessment [J]. Oncotarget, 2019, 10 (64): 6898-6912.
- [24] LIN B, LI D, ZHANG L. Oxymatrine mediates Bax and Bcl-2 expression in human breast cancer MCF-7 cells [J]. Pharmazie, 2016, 71 (3): 154-157.
- [25] ALLEN T D, RODRIGUEZ E M, JONES K D, et al. Activated Notch1 induces lung adenomas in mice and cooperates with Myc in the generation of lung adenocarcinoma [J]. Cancer Res, 2011, 71 (18): 6010-6018.
- [26] LICCIULLI S, AVILA J L, HANLON L, et al. Notch1 is required for Kras-induced lung adenocarcinoma and controls tumor cell survival via p53 [J]. Cancer Res, 2013, 73 (19): 5974-5984.
- [27] FLEMING R J. Structural conservation of Notch receptors and ligands [J]. Semin Cell Dev Biol, 1998, 9 (6): 599-607.
- [28] ANDERSSON E R, LENDAHL U. Therapeutic modulation of Notch signalling are we there yet? [J]. Nat Rev Drug Discov, 2014, 13 (5): 357-378.
- [29] KAGEYAMA R, OHTSUKA T. The Notch-Hes pathway in mammalian neural development [J]. Cell Res, 1999, 9 (3): 179-188.
- [30] BRUTSCH R, LIEBLER S S, WUSTEHUBE J, et al. Integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 attenuates sprouting angiogenesis [J]. Circ Res, 2010, 107 (5): 592-601.
- [31] WANG Q, REN H, XU Y, et al. GRWD1 promotes cell proliferation and migration in non-small cell lung cancer by activating the Notch pathway [J]. Exp Cell Res, 2020, 387 (2): 111806.

[责任编辑 王鑫]