

参麦注射液改善非小细胞肺癌顺铂耐药作用机制

董涵宇^{1,2}, 王淳³, 刘春英³, 刘文俊^{1,4*}

(1. 辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室, 沈阳 110847; 2. 辽宁中医药大学第一临床学院, 沈阳 110847; 3. 辽宁中医药大学基础医学院, 沈阳 110847; 4. 辽宁中医药大学教学实验中心, 沈阳 110847)

[摘要] 目的:观察参麦注射液是否通过影响非小细胞肺癌(NSCLC)顺铂耐药细胞脂质代谢,并诱导铁死亡改善其顺铂耐药。方法:选用人肺腺癌顺铂耐药A549/DDP细胞,分为空白组、顺铂组(23.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 顺铂)、参麦注射液组(20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 参麦注射液)、顺铂联合参麦注射液组(23.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 顺铂+20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 参麦注射液);顺铂联合铁死亡抑制剂/诱导剂Ferrostatin-1/Erastin组(23.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 顺铂+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ferrostatin-1/5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Erastin)、顺铂联合参麦注射液联合Ferrostatin-1/Erastin组(23.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 顺铂+20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 参麦注射液+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ferrostatin-1/5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Erastin)。联合使用网络药理学、转录组/代谢组学技术、细胞增殖与活性检测(CCK-8)法、透射电镜(TEM)法、比色法及蛋白免疫印迹法(Western blot)等,体外研究顺铂联合参麦注射液对A549/DDP细胞存活率、脂滴形成、脂质代谢物含量、线粒体功能、脂质过氧化水平、谷胱甘肽(GSH)含量、总铁离子及二价亚铁离子含量和铁死亡、自噬的蛋白水平的影响。结果:参麦注射液改善NSCLC顺铂耐药的作用靶点主要富集于A549/DDP细胞的脂代谢相关通路,其可在自噬、铁死亡、甘油磷脂代谢通路上影响肿瘤细胞的脂质代谢物水平。与顺铂组比较,顺铂联合参麦注射液A549/DDP细胞存活率显著降低($P<0.01$),脂滴积累显著升高($P<0.01$),最大呼吸值、基础呼吸值、线粒体膜电位、GSH含量和总铁离子及二价亚铁离子含量显著降低($P<0.01$)。同时,线粒体活性氧(ROS)显著升高($P<0.01$),脂质过氧化水平明显升高;而小鼠溶质载体家族7成员11(SLC7A11)、泛素结合蛋白(p62)蛋白表达明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。同时,铁蛋白重链(FTH)、微管相关蛋白1轻链3 II(LC3 II)蛋白表达明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。此外,与顺铂联合参麦注射液组比较,顺铂联合参麦注射液联合Ferrostatin-1组A549/DDP细胞存活率明显升高($P<0.05$),线粒体ROS水平明显降低($P<0.05$),线粒体皱缩现象减少,脂质过氧化水平明显降低;与顺铂联合参麦注射液组比较,顺铂联合参麦注射液联合Erastin组细胞存活率显著降低($P<0.01$)。结论:参麦注射液通过诱导氧化应激改善NSCLC顺铂耐药,其机制可能与脂滴自噬上调诱导的铁死亡有关。

[关键词] 非小细胞肺癌; 顺铂耐药; 参麦注射液; 网络药理学; 非靶向代谢组学; 脂滴自噬; 铁死亡

[中图分类号] R256;R285;R563 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)06-0131-12

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20251027

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.r.20250319.1039.001>

[网络出版日期] 2025-03-20 08:55:01 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>



Mechanisms of Shenmai Injection in Improving Cisplatin Resistance in Non-small Cell Lung Cancer

DONG Hanyu^{1,2}, WANG Chun³, LIU Chunying³, LIU Wenjun^{1,4*}

(1. Key Laboratory of Ministry of Education for Traditional Chinese Medicine (TCM) Viscera-State Theory and Applications, Liaoning University of TCM, Shenyang 110847, China;
2. First Clinical College, Liaoning University of TCM, Shenyang 110847, China;
3. School of Basin Medical Sciences, Liaoning University of TCM, Shenyang 110847, China;

[收稿日期] 2025-01-08

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82174254);辽宁中医药大学“中医脏象理论及应用教育部重点实验室”开放基金项目(zyzx2204);辽宁省科技计划联合计划(2023JH2/101700210);辽宁省教育厅高校基本科研项目(LJ212410162010);辽宁中医药大学中西医结合学院“岐济”人才支撑计划项目立项课题(2023QJ01001);辽宁省教育厅基本科研项目(自然科学类)(JYTQN2023457)

[第一作者] 董涵宇,在读硕士,从事中医药抗肿瘤研究,E-mail:2451507535@qq.com

[通信作者] *刘文俊,博士,高级实验师,从事中医药抗肿瘤研究,E-mail:liuwenjun8341@163.com

4. Teaching and Experimental Center, Liaoning University of TCM, Shenyang 110847, China)

[Abstract] Objective: To investigate whether Shenmai injection (SMI) improves cisplatin resistance in non-small cell lung cancer (NSCLC) by modulating lipid metabolism and inducing ferroptosis. **Methods:** Human lung adenocarcinoma cisplatin-resistant A549/DDP cells were divided into the following groups: Blank group, cisplatin group (23.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cisplatin), SMI group (20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ SMI), cisplatin combined with SMI group (23.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cisplatin + 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ SMI), cisplatin combined with ferroptosis inhibitor/inducer Ferrostatin-1/Erastin group (23.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cisplatin + 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ferrostatin-1/5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Erastin), and cisplatin combined with SMI and Ferrostatin-1/Erastin group (23.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cisplatin + 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ SMI + 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ferrostatin-1/5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Erastin). Network pharmacology, transcriptomics and metabolomics, Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay, transmission electron microscopy (TEM), colorimetric assays, and Western blot analysis were employed to evaluate the effects of these treatments on A549/DDP cell viability, lipid droplet formation, lipid metabolite levels, mitochondrial function, lipid peroxidation, glutathione (GSH) content, total and ferrous iron content, and effects on ferroptosis and autophagy related protein expression levels. **Results:** SMI improved cisplatin resistance in NSCLC mainly by targeting lipid metabolism-related pathways in A549/DDP cells, affecting tumor cell lipid metabolism via autophagy, ferroptosis, and glycerophospholipid metabolism pathways. Compared with the cisplatin group, the cisplatin combined with SMI group showed significantly decreased cell viability ($P<0.01$), increased lipid droplet accumulation ($P<0.01$), and reduced mitochondrial maximal respiration, basal respiration, mitochondrial membrane potential, GSH content, total iron, and ferrous iron (all $P<0.01$). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) was significantly elevated ($P<0.01$), and lipid peroxidation levels were significantly increased. Protein expression analysis showed significant downregulation of solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11) and p62 ($P<0.05, P<0.01$) and upregulation of ferritin heavy chain (FTH) and microtubule-associated protein 1 light chain 3 II (LC3 II) ($P<0.05, P<0.01$). Compared with the cisplatin combined with SMI group, addition of Ferrostatin-1 significantly increased cell viability ($P<0.05$), decreased mitochondrial ROS levels ($P<0.05$), alleviated mitochondrial shrinkage, and reduced lipid peroxidation. Conversely, addition of Erastin further decreased cell viability ($P<0.01$). **Conclusion:** SMI improves cisplatin resistance in NSCLC by inducing oxidative stress, which may trigger ferroptosis through upregulation of lipophagy.

[Keywords] non-small cell lung cancer; cisplatin resistance; Shenmai injection; network pharmacology; non-target metabolomics; lipophagy; ferroptosis

肺癌是全世界癌症相关死亡的主要原因。2022年最新癌症数据显示,全球新增肺癌病例近250万例,因肺癌死亡的患者约有180万人^[1]。铂类药物虽然是目前应用最广泛的抗癌药物之一,但耐药现象严重影响疗效^[2]。多学科联合是防治非小细胞肺癌(NSCLC)的有效策略,肺癌中西医结合诊疗专家共识^[3]指出,肺脾气虚是肺癌发病的内在根本原因,而气阴两虚是其基本证候要素。生脉散是主治气阴两虚证的代表方剂,源于金代张元素的《医学启源》,由人参、麦冬、五味子组成^[4]。而参麦注射液是在古方生脉散基础上应用现代制剂技术制成、质量可控的中药注射剂型^[5]。一项真实世界研究报道,参麦注射液主要用于中、老年肿瘤患者化疗的辅助治疗,而使用最多的癌症即肺癌^[6]。代谢重编程是肿瘤细胞的核心特征之一,其主要表现为糖酵解增强、谷氨酰胺代谢活跃及脂质代谢异常^[7]。本课题组前期研究亦发现,NSCLC顺铂耐药细胞具有更强的代谢适应性^[8]。最新研究报道,电离辐射诱导线粒体-脂滴被溶酶体包裹,并促进人非小细胞肺癌A549细胞自噬依赖性铁死亡^[9]。铁死亡是铁依赖、细胞膜脂质过氧化损伤驱动的程序性细胞死

亡,并呈现出独特的氧化磷脂谱^[10]。而脂滴调节多不饱和脂肪酸(PUFAs)/单不饱和脂肪酸平衡的生物利用度,为铁死亡的发生提供代谢底物^[11]。课题组前期研究发现,参麦注射液通过影响糖酵解、线粒体动力学等改善NSCLC顺铂耐药^[12]。然而,其是否通过影响脂代谢重编程改善NSCLC顺铂耐药并不清楚。据此,本研究拟通过网络药理学结合代谢组学等现代分子生物学技术,阐明起效成分明确、作用靶标清楚的参麦注射液协同增效、逆转肺腺癌顺铂耐药的药理机制网络,为参麦注射液在临床的广泛应用提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞株 人肺腺癌顺铂耐药A549/DDP细胞株,购自中国医学科学院肿瘤细胞库(编号PUMC000519),传至15代。

1.2 药品与试剂 参麦注射液(川大华西药业股份有限公司,国药准字Z20053303,批号221003,规格每支20 mL,含生药4 g);DMEM/F12基础培养液(武汉普诺赛生命科技有限公司,批号WH1022Z211);胎牛血清(北京全式金生物技术有限公司,批号SA230316);顺铂、铁死亡抑制剂(Ferrostatin-1)、铁

死亡诱导剂(Erastin)、乙酸铵(美国Sigma公司,批号分别为P4394-25MG、SML0583-5MG、E7781-1MG、73594);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,批号10407010130);线粒体膜电位(MMP)检测试剂盒、活性氧(ROS)荧光探针(DCFH-DA)、10×十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳缓冲液、无蛋白快速封闭液、4×SDS-PAGE浓缩胶缓冲液、4×SDS-PAGE分离胶缓冲液、30%制胶液(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为20171116、20220826、20211112、GC2404006、CR2401026、20201128、2400030022305001);还原型谷胱甘肽(GSH)含量检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号20200911);脂质过氧化荧光探针(C11-BODIPY^{581/591},美国Invitrogen公司,批号2263504);脂滴荧光探针(BODIPY^{493/503},美国Med Chem Express公司,批号T36957);亚铁离子荧光探针(FerroOrange,日本同仁化学研究所,批号F374);总铁离子水平检测试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号E-BC-K139-S);海马(Seahorse)探针板、Seahorse XFe 96孔细胞培养板、Seahorse XF DMEM、Seahorse XF校正液、Seahorse线粒体压力测定试剂盒(美国Agilent公司,批号分别为03521、W02021、103575、14320001、103015);2.5%戊二醛透射电镜固定液(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号G1102);蛋白定量法(BCA)蛋白浓度测定试剂盒、放射免疫沉淀法(RIPA)蛋白裂解液(强)、5×蛋白上样缓冲液(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为P0010、P0013B、P0015);增强化学发光试剂(ECL)显影液(美国Bio-Rad公司,批号为1705061);铁蛋白重链(FTH)抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司,批号为32j4044);微管相关蛋白1轻链3 II(LC3 II)抗体(成都正能生物技术有限公司,批号kk1206);小鼠溶质载体家族7成员11(SLC7A11)、泛素结合蛋白(p62)、鼠抗 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为00083740、00052579、10004156);羊抗兔二抗(美国Affinity公司,批号S0001)。

1.3 仪器 HERA CELL 150i型CO₂培养箱(中国精宏实验设备有限公司);DFC450型倒置生物显微镜、EM UC7型超薄切片仪(德国Leica公司);SC-3610型低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);Thermo ST16R型高速冷冻离心机、Q Exactive Plus型质谱仪、Varioskan LUX型多功能荧

光酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);Nexera X2 LC-30AD型超高压液相色谱仪(日本Shimadzu公司);Waters Acquity UPLC HSS C₁₈色谱柱(美国Waters公司);Bioruptor型超声波系统(比利时Diagenode公司);Concentrator plus型真空离心浓缩仪(德国Eppendorf公司);HT7800型透射电子显微镜(日本HITACHI公司);WFHM-150 150目铜网芳华膜载网(圆孔)(中国Servicebio公司);WD-2102B型全自动酶标仪(北京六一生物科技有限公司);5200Multi型化学发光成像系统(中国天能生命科学有限公司);ZOE1450031型荧光细胞成像仪、JY-ZY5型垂直电泳槽、1704150型Trans-Blot Turbo转印系统(美国Bio-Rad公司)。

1.4 数据库及软件 中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)数据库;中医药百科全书(ETCM)数据库;STRING;PubChem数据库;Swiss Target Prediction;Metascape;UniProt;LIPEA;Sangerbox 3.0在线平台;CytoScape 3.8.0软件、MSDAIL 4.0.9软件;R 4.3.1软件;Image J 1.52软件;GraphPad Prism 8.0软件;Microsoft Excel 2019软件。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 参麦注射液、耐药靶点及交集靶点获取 使用TCMSP、ETCM数据库查找红参、麦冬对应成分及靶点、使用Pubchem网站获取成分分子式、Swiss Target Prediction网站进行靶点预测,取口服利用率 $\geq 30\%$ 和类药性 ≥ 0.18 或可能性 >0 的靶点作为参麦注射液对应靶点。使用课题组前期转录组测序(RNA-Seq)测序结果作为A549/DDP耐药靶点^[13]。

2.1.2 核心靶点获取及互作网络构建 使用Sangerbox 3.0在线平台进行韦恩图绘制,获取共有靶点。将共有靶点导入STRING网站,选择物种为“智人”,选择置信度为0.900,去除游离节点,获得蛋白互作信息后,将互作信息导入CytoScape 3.8.0软件,利用CytoNCA插件进行连接度、紧密度、介度等计算,根据得分中位数进行两轮筛选,得到核心靶点,并构建其互作网络。

2.1.3 交集靶点功能与通路富集分析 将2.1.2项获得的共有靶点导入Metascape网站,进行基因本体(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析,保留 $P < 0.01$ 的结果,使用Sangerbox 3.0在线平台进行结果可视化。

2.2 脂质代谢组学分析

2.2.1 给药处理 给药24 h后,收集顺铂组和顺铂

联合参麦注射液组样本细胞, 4 °C、2 500 r·min⁻¹离心 5 min(离心半径 8.65 cm), 分别弃除上清后加入 0 °C 甲醇 400 μL, 冰浴超声 15 min。加入冰甲基叔丁基醚 1 mL 充分涡旋振荡, 置于 4 °C 冰箱中旋转混匀, 继续冰浴超声 15 min。加入水 250 μL, 涡旋振荡 1 min, 室温静置 10 min。4 °C、8×10⁴ r·min⁻¹离心 15 min(离心半径 2.5 cm), 取分层后的上层液体, 即为脂质组分, -80 °C 保存备用。

2.2.2 色谱条件 采用超高液相色谱仪进行分离, 流动相 A 为 60% 乙腈+40% 水, B 为 10% 乙腈+90% 异丙醇, 梯度洗脱(0~2 min, 30%~32% B; 2~25 min, 32%~97% B; 25~30 min, 97%~32% B)。柱温 40 °C, 进样器温度 4 °C, 流速 0.3 mL·min⁻¹, 进样量 8 μL。

2.2.3 质谱条件 分别采用电喷雾电离正离子和负离子模式进行检测。样品经超高压液相色谱仪分离后使用质谱仪进行质谱分析。正模式: 离子源温度 300 °C, 鞘气流速 45 arb, 辅助气流速 15 arb, 挡锥气流速 1arb, 毛细管电压 3.0 kV, 毛细管温度 350 °C, 扫描范围 200~1 500; 负模式: 离子源温度 300 °C, 鞘气流速 45 arb, 辅助气流速 15 arb, 挡锥气流速 1 arb, 毛细管电压 3.5 kV, 毛细管温度 350 °C, 扫描范围 200~1 500。

2.2.4 数据处理 原始数据采用 MSDAIL 4.0.9 进行峰提取、鉴定、峰对齐, 随后进行总峰面积归一化, 数据经单变量标准化预处理后, 进行无监督主成分(PCA)分析, 以差异倍数(FC)>1.5 且 P<0.05 作为筛选标准, 采用 LIPEA 工具对筛选的差异脂质进行 KEGG 代谢通路分析, 最终以富集程度较显著的通路作为进一步分析的重点, R 软件进行结果可视化。

2.3 体外实验验证

2.3.1 细胞培养和处理 A549/DDP 细胞使用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 完全培养基, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养。根据课题组前期研究, 探究顺铂联合参麦注射液对 A549/DDP 细胞影响时, 顺铂对 A549/DDP 细胞的 20% 抑制浓度(IC₂₀) 为 23.3 μmol·L⁻¹, 参麦注射液对 A549/DDP 细胞的 IC₂₀ 为 20 g·L⁻¹[13]。探究 Ferrostatin-1/Erastin 能否逆转/增强顺铂联合参麦注射液对 A549/DDP 细胞影响时, Ferrostatin-1 浓度为 10 μmol·L⁻¹, Erastin 浓度为 5 μmol·L⁻¹[14]。故探究顺铂联合参麦注射液对 A549/DDP 细胞影响时, 将细胞分为 4 组, 分别为: 空白组、顺铂组(23.3 μmol·L⁻¹ 顺铂)、参麦注射液组

(20 g·L⁻¹ 参麦注射液)、顺铂联合参麦注射液组(23.3 μmol·L⁻¹ 顺铂+20 g·L⁻¹ 参麦注射液); 探究 Ferrostatin-1 能否逆转顺铂联合参麦注射液对 A549/DDP 细胞影响时, 将细胞分为四组, 分别为顺铂组(23.3 μmol·L⁻¹ 顺铂)、顺铂联合 Ferrostatin-1 组(23.3 μmol·L⁻¹ 顺铂+10 μmol·L⁻¹ Ferrostatin-1)、顺铂联合参麦注射液组(23.3 μmol·L⁻¹ 顺铂+20 g·L⁻¹ 参麦注射液)、顺铂联合参麦注射液联合 Ferrostatin-1 组(23.3 μmol·L⁻¹ 顺铂+20 g·L⁻¹ 参麦注射液+10 μmol·L⁻¹ Ferrostatin-1); 探究 Erastin 能否增强顺铂联合参麦注射液对 A549/DDP 细胞影响时, 将细胞分为四组, 分别为顺铂组(23.3 μmol·L⁻¹ 顺铂)、顺铂联合 Erastin 组(23.3 μmol·L⁻¹ 顺铂+5 μmol·L⁻¹ Erastin)、顺铂联合参麦注射液组(23.3 μmol·L⁻¹ 顺铂+20 g·L⁻¹ 参麦注射液)、顺铂联合参麦注射液联合 Erastin 组(23.3 μmol·L⁻¹ 顺铂+20 g·L⁻¹ 参麦注射液+5 μmol·L⁻¹ Erastin), 给药时间均为 24 h。

2.3.2 透射电镜观察细胞内脂滴及线粒体形态

将 A549/DDP 细胞接种在 75 cm² 培养瓶中, 按照 2.3.1 项分组进行药物干预, 弃去培养液, 加入常温 2.5% 戊二醛透射电镜固定液 2 mL, 固定 10 min 后使用细胞刮刀刮取细胞。将细胞液转移至离心管, 4 °C、2 500 r·min⁻¹ 离心 5 min(离心半径 8.65 cm), 弃去固定液并加入新的电镜固定液, 室温固定 30 min。经 1% 锇酸固定, 乙醇、丙酮梯度脱水, 环氧树脂包埋聚合后, 进行切片并拍照。

2.3.3 CCK-8 法检测细胞活力 将 A549/DDP 细胞以 5×10³ 个/孔细胞密度接种于 96 孔板中, 按照 2.3.1 项分组进行药物干预, 每孔加入 CCK-8 显色液 10 μL, 37 °C 下避光孵育 30 min, 读取 450 nm 波长下吸光度 A, 计算细胞活力。细胞存活率=(A_{实验组}-A_{空白孔})/(A_{空白组}-A_{空白孔})×100%。

2.3.4 荧光染色法检测细胞内脂滴 将 A549/DDP 细胞以 2×10⁴ 个/孔细胞密度接种于 24 孔板中, 按照 2.3.1 项分组进行药物干预, 磷酸盐缓冲液(PBS) 洗涤细胞, 加入浓度为 5 μmol·L⁻¹ 的 BODIPY^{493/503} 和 Hoechst 染色试剂, PBS 洗细胞, 荧光酶标仪、荧光显微镜检测细胞内荧光信号强度。

2.3.5 Seahorse 法检测线粒体最大呼吸值及基础呼吸值 将 A549/DDP 细胞以 8×10³ 个/孔细胞密度接种于 Seahorse XFe 96 孔细胞培养板, 孔板中含有 100 μL DMEM/F12 完全培养液, 接种后于生物安全柜静置 1 h 使其自然沉降后, 入 CO₂ 培养箱孵育 24 h; 向 Seahorse 探针板中每孔加入 Seahorse XF 校

正液 200 μL , 以水化 Seahorse 探针板, 入 Seahorse 培养箱孵育过夜, 并仔细排除探针版底部气泡; 按照 2.3.1 项分组进行药物干预, 观察细胞生长状态, 使用 Seahorse XF DMEM 配制检测培养液 (2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺, 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 丙酮酸钠, 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖), 清洗细胞培养板, 最终体积 180 μL ; 配制 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 寡霉素, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 线粒体解偶联剂, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 鱼藤酮储备液; 向加药孔按顺序加入寡霉素 (1.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 20 μL , 线粒体解偶联剂 (1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 22 μL , 鱼藤酮 (0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 25 μL ; 退出水化探针板, 更换为细胞培养板, 上机检测线粒体最大呼吸值及基础呼吸值。

2.3.6 比色法测定 GSH 含量 将 A549/DDP 细胞接种在 25 cm^2 培养瓶中, 按照 2.3.1 项分组进行药物干预, 根据 GSH 试剂盒说明书收集细胞, 并在 405 nm 处检测 A, 计算 GSH 含量。

2.3.7 荧光染色法测定 MMP 将 A549/DDP 细胞以 2×10^4 个/孔细胞密度接种于 24 孔板中, 按照 2.3.1 项分组进行药物干预, 加入配置好的 500 μL JC-1 染色工作液, 充分混匀, 细胞培养箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min, 吸除上清, 用 JC-1 染色缓冲液 (1 \times) 洗涤。加入 2 mL 细胞培养液, 检测荧光信号强度。

2.3.8 荧光染色法测定 ROS 将 A549/DDP 细胞以 2×10^4 个/孔细胞密度接种于 24 孔板中, 按照 2.3.1 项分组进行药物干预, 准备终浓度为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DCFH-DA 染色工作液, 去除细胞培养液, 使用温热 PBS 洗涤, 加入染色工作液 500 μL , 细胞培养箱内孵育 20 min, 用 DMEM/F12 基础培养液洗涤细胞, 荧光显微镜、荧光酶标仪检测荧光信号强度。

2.3.9 荧光染色法测定脂质过氧化 将 A549/DDP 细胞以 2×10^4 个/孔细胞密度接种于 24 孔板中, 按照 2.3.1 项分组进行药物干预, 准备终浓度为 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 C11-BODIPY^{581/591}, 去除细胞培养液, 使用温热 PBS 洗涤, 每孔加入 C11-BODIPY^{581/591} 500 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱内孵育 30 min, 荧光显微镜观察荧光信号强度。

2.3.10 比色法测定总铁离子含量 将 A549/DDP 细胞接种在 25 cm^2 培养瓶中, 按照 2.3.1 项分组进行药物干预, 使用细胞刮刀刮取细胞, 剧烈涡旋后取上清, 室温放置待测。根据说明书配制铁显色液, 将待测液与显色液混匀后, 沸水浴 5 min, 流水冷却, 在 5 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min (离心半径 8.65 cm), 取上清。在 520 nm 波长处测定 A, 测定总铁离子含量。

2.3.11 荧光染色法测定亚铁离子含量 将 A549/DDP 细胞以 2×10^4 个/孔细胞密度接种于 24 孔板中, 按照 2.3.1 项分组进行药物干预, 准备终浓度为 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 FerroOrange 染色工作液, 去除细胞培养液, 使用温热 PBS 洗涤 3 次, 加入染色工作液 400 μL , 细胞培养箱内孵育 20 min, 用 DMEM/F12 基础培养液洗涤细胞, 荧光显微镜、荧光酶标仪检测荧光信号强度。

2.3.12 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测细胞蛋白表达 将 A549/DDP 细胞接种在 25 cm^2 培养瓶中, 使用细胞刮刀刮取给药 24 h 处理后的 A549/DDP 细胞, 收集细胞, 于冰上裂解 30 min, 吸取上清, 使用 BCA 法测定蛋白浓度, 蛋白变性后保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。使用 10% 分离胶进行电泳, 110 V 电泳 3 h 后, 玻璃板从电泳架下取下, 按照正极-海绵-滤纸-膜-胶-滤纸-海绵-负极的顺序安装, 参数设定为 25 V、1 A、30 min。转膜后将聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜转移至无蛋白快速封闭液中, 室温封闭 15 min, 加入一抗 (FTH、LC3 II、 β -actin、SLC7A11 1:1 000, p62 1:10 000, β -actin 1:20 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 加入二抗 (1:5 000), 室温摇床孵育 1 h 后, 经聚山梨醇酯-20 缓冲盐溶液漂洗 30 min, 使用 ECL 显影液进行发光, 用 Image J 1.52 软件进行条带分析。

2.3.13 统计学方法 采用 GraphPad Prism 8.0 软件和 Microsoft Excel 2019 对实验结果进行统计分析及作图, 数值结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 网络药理学分析

3.1.1 参麦注射液、耐药靶点及交集靶点的获取 使用 TCMSP、ETCM 数据库查找参麦注射液的靶点, 将数个数据库获得靶点合并并删除重复项后, 共获得参麦注射液的靶点 991 个, 前期研究通过高通量测序得到耐药靶点 6 409 个^[13]。

3.1.2 核心靶点获取及互作网络的构建 将 991 个参麦注射液靶点和 6 409 个耐药靶点取交集, 共获取共有靶点 333 个。使用 CytoScape 根据两轮打分共获取核心靶点 21 个, 并绘制核心靶点的蛋白互作网络。网络包含 21 个点, 86 条边。参麦注射液与 RNA-Seq 交集靶点韦恩图及核心靶点蛋白互作网络图见增强出版附加材料。

3.1.3 交集靶点功能与通路富集分析 对 333 个共有靶点进行 GO 富集分析, 得到 172 条富集结果, 富集于 20 个集群, 将集群条目进行可视化, 结果包括

激酶活性的调控、对激素的反应、蛋白质自身磷酸化、激酶结合、蛋白激酶复合物、生长调节、细胞对脂质的反应等。KEGG 结果分析表明,参麦注射液改善 NSCLC 顺铂耐药涉及 146 条有显著意义的通路,包括癌症途径、脂质和动脉粥样硬化、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路等。GO 和 KEGG 分析结果均表明,参麦注射液改善 NSCLC 顺铂耐药可能与“脂质”相关,进一步将富集原始结果中的脂质相关条目依据生物过程(BP)、细胞组分(CC)、分子功能(MF)进行分类并使用 $-\log_2 10P$ 排序,其中包括细胞组分 1 条,分子功能 4 条,生物过程 47 条。选择细胞组分、分子功能及生物过程的前 35 条进行可视化分析发现,这些条目与糖脂、磷脂、脂滴等密切相关。GO、KEGG 分析图及 GO 分析中脂质相关条目见增强出版附加材料。

3.2 脂质代谢组学

3.2.1 样本间相关性分析 主成分分析结果表明,顺铂组和顺铂联合参麦注射液组细胞可明显区分,且相对独立。说明两组细胞脂质谱差异明显,本实验建立的模型具有较高可靠性。PCA 得分图见增强出版附加材料。

3.2.2 潜在差异脂质代谢物的筛选 火山图展示单变量统计分析筛选的差异脂质分子。与顺铂组比较,顺铂联合参麦注射液组共鉴定出 1 065 种差异脂质代谢物,其中有 315 种差异脂质代谢物上调,286 种差异脂质代谢物下调。热图展示顺铂组和顺铂联合参麦注射液组差异脂质的层次聚类结果,而矩阵热图展示了顺铂给药组和联合给药组细胞差异脂质的相关性分析结果。结果提示,与顺铂组比较,顺铂联合参麦注射液组的脂质代谢物存在显著差异。分类环形统计图统计了差异脂质的类别,这些差异脂质以甘油磷脂占比最大,为 55.78%,其次为糖脂类,为 20.22%。差异脂质分子火山图、差异脂质的层次聚类热图、相关系数矩阵热图 TOP 10、分类统计环形图见增强出版附加材料。该结果与网络药理学所富集的脂质相关条目一致。

3.2.3 潜在差异脂质分子的 KEGG 通路分析 使用 LIPEA 工具对差异脂质分子进行通路富集分析,得到潜在差异脂质的 KEGG 富集情况,可富集到自噬、铁死亡、甘油磷脂代谢通路等。差异脂质分子 KEGG 通路分析见增强出版附加材料。综上所述,联合网络药理学和非靶向代谢组学,结果表明,参麦注射液改善 NSCLC 顺铂耐药可能与脂滴、铁死亡、自噬等相关。

3.3 体外实验

3.3.1 参麦注射液对 A549/DDP 细胞存活率及脂滴形成的影响 与顺铂组比较,顺铂联合参麦注射液组细胞存活率显著降低($P<0.01$);透射电镜法观察发现,与顺铂组比较,顺铂联合参麦注射液组脂滴大量累积;此外,使用 BODIPY^{493/503} 染色发现,与顺铂组比较,顺铂联合参麦注射液组脂滴数量显著升高($P<0.01$)。见表 1、表 2、图 1、图 2。上述结果表明,参麦注射液可能通过影响脂滴形成降低 A549/DDP 细胞的存活率。

表 1 参麦注射液对 A549/DDP 细胞存活率的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Effect of Shenmai injection (SMI) on cell viability in A549/DDP cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

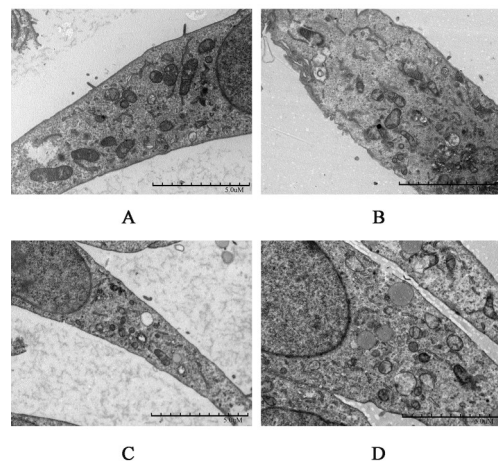
组别	浓度	存活率/%
空白组		99.99±4.26
顺铂组	23.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	93.00±4.04
参麦注射液组	20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	78.04±4.05
顺铂联合参麦注射液组	23.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	70.08±5.63 ¹⁾

注:与顺铂组比较¹⁾ $P<0.01$ (表 2-表 4 同)

表 2 参麦注射液对 A549/DDP 细胞脂滴形成的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of SMI on lipid droplets formation in A549/DDP cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	浓度	相对荧光强度($\times 10^6$)
空白组		2.29±0.18
顺铂组	23.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	2.39±0.73
参麦注射液组	20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	5.85±0.77
顺铂联合参麦注射液组	23.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	7.07±1.08 ¹⁾



注:A.空白组;B.顺铂组;C.参麦注射液组;D.顺铂联合参麦注射液组(图 2-图 6 同)

图 1 参麦注射液对 A549/DDP 细胞脂滴积累的影响(透射电镜, $\times 4 000$)

Fig. 1 Effect of SMI on lipid droplets accumulation in A549/DDP cells (TEM, $\times 4 000$)

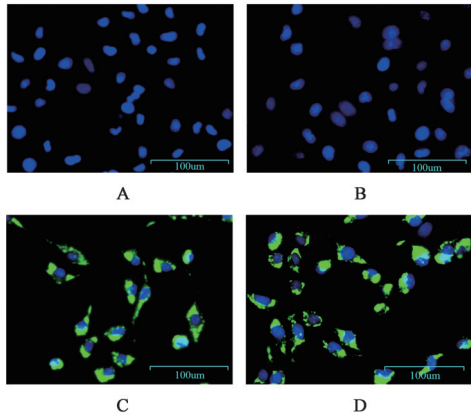


图2 参麦注射液对A549/DDP细胞脂滴形成的影响(荧光显微镜, ×400)

Fig. 2 Effects of SMI on lipid droplets accumulation in A549/DDP cells (Fluorescence Microscope, ×400)

3.3.2 参麦注射液对A549/DDP细胞线粒体氧化应激/脂质过氧化的影响 脂滴可封存PUFAs防止其参与脂质过氧化,而线粒体是细胞氧化应激主要场所。为此本实验围绕线粒体氧化应激和脂质过氧化进一步研究。首先通过Mitotracker染色观察形态学发现,与顺铂组比较,顺铂联合参麦注射液组线粒体聚集于细胞两端,且线粒体分布多为分裂状态。提示顺铂联合参麦注射液组A549/DDP细胞可能在线粒体功能受损或能量代谢异常。进一步联合使用Seahorse法等检测线粒体功能,结果发现,与顺铂组比较,顺铂联合参麦注射液组线粒体基础呼吸值和最大呼吸值显著降低($P < 0.01$),MMP和GSH含量显著降低($P < 0.01$),线粒体ROS生成显著升高($P < 0.01$)。最后,使用脂质过氧化探针C11-BODIPY^{581/591}染色发现,与顺铂组比较,顺铂联合参麦注射液组脂质过氧化水平明显升高。见图3~图4,表3、表4,图5~图6。综上表明,参麦注射液可能通过上调细胞内氧化应激

和脂质过氧化水平降低A549/DDP细胞的存活率。

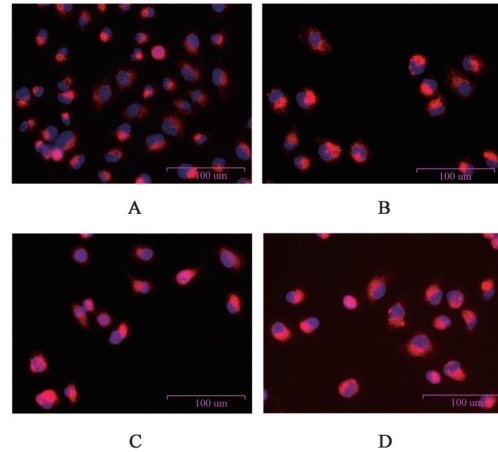


图3 参麦注射液对A549/DDP细胞线粒体网络的影响(荧光显微镜, ×400)

Fig. 3 Effect of SMI on mitochondrial network in A549/DDP cells (fluorescence microscope, ×400)

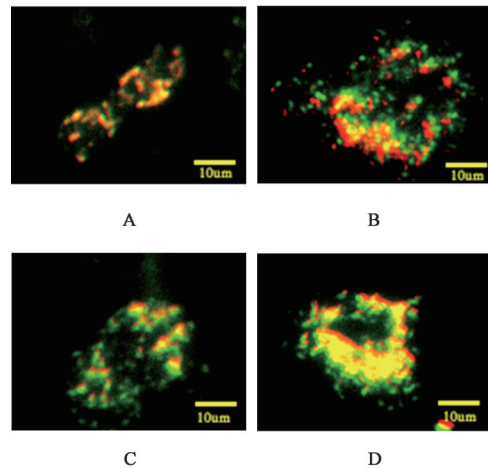


图4 参麦注射液对A549/DDP细胞MMP的影响(免疫荧光, ×1000)

Fig. 4 Effect of SMI on MMP in A549/DDP cells(IF, ×40)

表3 参麦注射液对A549/DDP细胞线粒体最大呼吸值、基础呼吸值的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	浓度	最大呼吸值	基础呼吸值
空白组		77.17±11.73	76.37±10.56
顺铂组	23.3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	74.34±14.96	70.40±10.74
参麦注射液组	20 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	49.42±10.97	42.07±7.06
顺铂联合参麦注射液组	23.3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ +20 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	40.94±6.81 ¹⁾	32.54±5.23 ¹⁾

表4 参麦注射液对A549/DDP细胞MMP、ROS、GSH含量的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	浓度	MMP相对荧光强度比	ROS平均荧光强度/ $\times 10^6$	GSH含量/ $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$
空白组		0.62±0.05	4.52±0.64	581.58±16.66
顺铂组	23.3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.68±0.08	4.73±0.41	646.75±4.90
参麦注射液组	20 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	0.58±0.08	38.73±3.18	422.75±5.96
顺铂联合参麦注射液组	23.3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ +20 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	0.53±0.06 ¹⁾	49.03±3.09 ¹⁾	475.53±7.43 ¹⁾

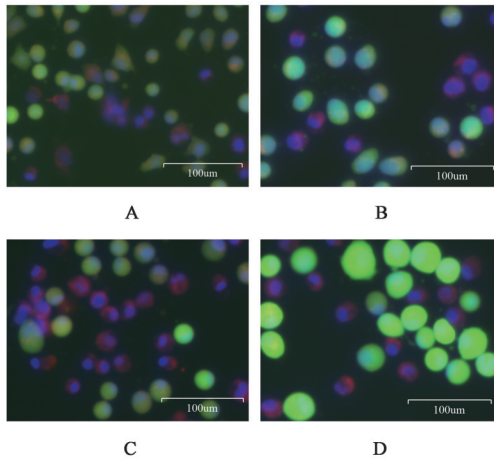


图5 参麦注射液对A549/DDP细胞线粒体ROS水平的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 5 Effect of SMI on mitochondrial ROS levels in A549/DDP cells (IF,×400)

3.3.3 参麦注射液对A549/DDP细胞线粒体铁死亡水平的影响 首先使用铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 观察发现,与顺铂联合参麦注射液组比较,顺铂联合参麦注射液联合 Ferrostatin-1 组的A549/DDP细胞存活率明显升高($P<0.05$),表明 Ferrostatin-1 可挽救顺铂联合参麦注射液诱导的A549/DDP细胞存活率降低。进一步使用铁死亡诱导剂 Erastin 观察发现,与顺铂组比较,顺铂联合 Erastin 组的A549/DDP细胞存活率显著降低($P<0.01$);与顺铂联合参麦注射液组比较,顺铂联合参麦注射液联合 Erastin 组细胞存活率显著降低

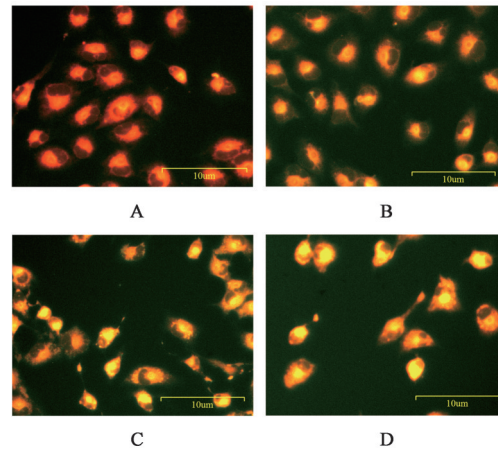


图6 参麦注射液对A549/DDP细胞脂质过氧化水平的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 6 Effect of SMI on lipid peroxidation levels in A549/DDP cells (IF,×400)

($P<0.01$)。这些结果共同表明,顺铂联合参麦注射液诱导的细胞死亡与 Erastin 具有同样的诱导细胞死亡作用,并且三者联用可进一步促进细胞死亡。最后,与顺铂联合参麦注射液组比较,顺铂联合参麦注射液联合 Ferrostatin-1 组的线粒体皱缩现象明显减少,脂质过氧化水平明显降低;与顺铂联合参麦注射液组比较,顺铂联合参麦注射液联合 Ferrostatin-1 组的A549/DDP细胞线粒体ROS水平明显降低($P<0.05$)。见表5~表7,图7~图9。综上所述,参麦注射液可能通过诱导铁死亡降低A549/DDP细胞存活率。

表5 Ferrostatin-1对顺铂联合参麦注射液诱导A549/DDP细胞存活率变化的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of Ferrostatin-1 on cell viability induced by cisplatin combined with SMI in A549/DDP cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	浓度	存活率/%
顺铂组	23.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	99.95±5.05
顺铂联合 Ferrostatin-1 组	23.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	93.70±8.59
顺铂联合参麦注射液组	23.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	79.56±2.98
顺铂联合参麦注射液联合 Ferrostatin-1 组	23.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	85.74±3.79 ¹⁾

注:与顺铂联合参麦注射液组比较¹⁾ $P<0.05$

表6 Erastin对顺铂联合参麦注射液诱导A549/DDP细胞存活率变化的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 6 Effect of Erastin on cell viability induced by cisplatin combined with SMI in A549/DDP cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	浓度	存活率
顺铂组	23.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	100.00±8.00
顺铂联合 Erastin 组	23.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	84.18±6.01 ¹⁾
顺铂联合参麦注射液组	23.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	87.34±2.76
顺铂联合参麦注射液组联合 Erastin 组	23.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	62.46±8.20 ²⁾

注:与顺铂组比较¹⁾ $P<0.01$;与顺铂联合参麦注射液组比较²⁾ $P<0.01$

3.3.4 参麦注射液对A549/DDP细胞总铁离子及二价亚铁离子的影响 铁死亡过程依赖二价亚铁离

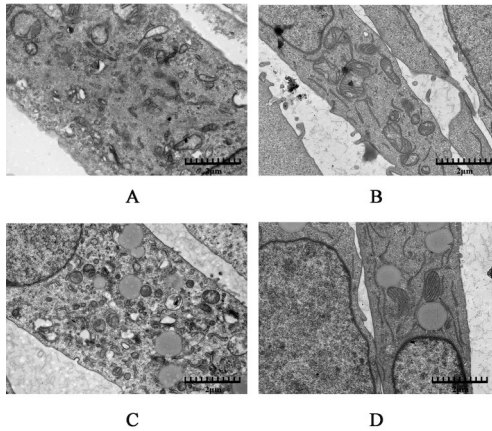
子触发的芬顿反应诱导的脂质过氧化,为此本研究围绕铁的代谢进一步验证。结果发现,与顺铂组比

表7 Ferrostatin-1对顺铂联合参麦注射液诱导A549/DDP细胞线粒体ROS水平的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 7 Effect of Ferrostatin-1 on mitochondrial ROS levels induced by cisplatin combined with SMI in A549/DDP cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	浓度	ROS平均荧光强度($\times 10^6$)
顺铂组	23.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	14.20 \pm 2.21
顺铂联合Ferrostatin-1组	23.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	23.70 \pm 1.24
顺铂联合参麦注射液组	23.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	44.86 \pm 3.89
顺铂联合参麦注射液联合Ferrostatin-1组	23.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	38.01 \pm 2.39 ¹⁾

注:与顺铂联合参麦注射液组比较¹⁾ $P<0.05$



注:A.顺铂组;B.顺铂联合Ferrostatin-1组;C.顺铂联合参麦注射液组;D.顺铂联合参麦注射液联合Ferrostatin-1组(图8、图9同)
图7 Ferrostatin-1对顺铂联合参麦注射液诱导的A549/DDP细胞铁死亡的影响(透射电镜, $\times 15\ 000$)

Fig. 7 Effect of Ferrostatin-1 on ferroptosis induced by cisplatin combined with SMI in A549/DDP cells (TEM, $\times 15\ 000$)

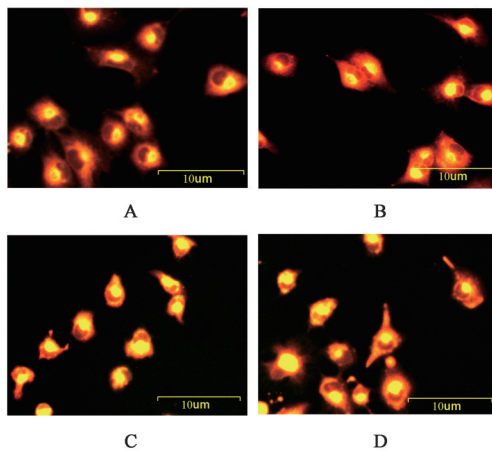


图8 Ferrostatin-1对顺铂联合参麦注射液对A549/DDP细胞脂质过氧化物的影响(免疫荧光, $\times 400$)

Fig. 8 Effect of Ferrostatin-1 on lipid peroxidation levels induced by cisplatin combined with SMI in A549/DDP cells (IF, $\times 400$)

较,顺铂联合参麦注射液组总铁离子及二价亚铁离子含量显著降低($P<0.01$)。见表8、表9、图10。综上所述,参麦注射液诱导的A549/DDP细胞铁死亡伴随铁元素的代谢稳态失衡。

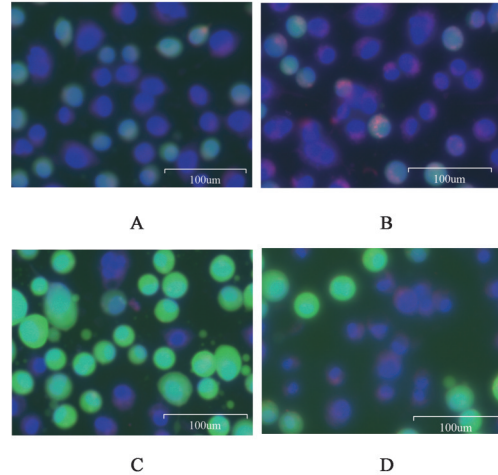


图9 Ferrostatin-1对顺铂联合参麦注射液对A549/DDP细胞线粒体ROS水平的影响(免疫荧光, $\times 400$)

Fig. 9 Effect of Ferrostatin-1 on mitochondrial ROS level induced by cisplatin combined with SMI in A549/DDP cells (IF, $\times 400$)

表8 参麦注射液对A549/DDP细胞匀浆总铁离子的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 8 Effect of SMI on total iron of cell lysate in A549/DDP cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

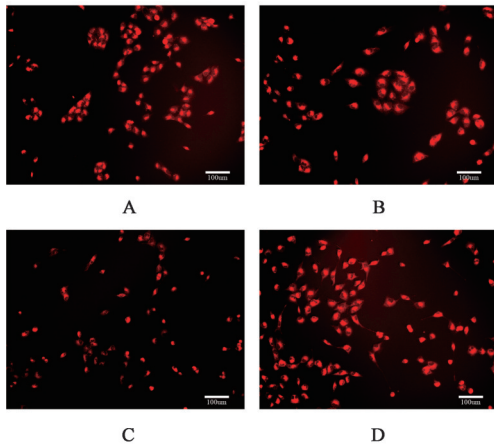
组别	浓度	细胞匀浆总铁离子/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$
空白组		66.47 \pm 16.38
顺铂组	23.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	209.02 \pm 13.62
参麦注射液组	20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	66.82 \pm 15.11
顺铂联合参麦注射液组	23.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	90.96 \pm 31.79 ¹⁾

注:与顺铂组比较¹⁾ $P<0.01$ (表9同)

表9 参麦注射液对A549/DDP细胞内亚铁离子的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 9 Effect of SMI on ferrous ion in A549/DDP cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	浓度	相对荧光强度($\times 10^5$)
空白组		9.3 \pm 0.7
顺铂组	23.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	20.6 \pm 5.6
参麦注射液组	20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	6.7 \pm 0.9
顺铂联合参麦注射液组	23.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	7.2 \pm 0.8 ¹⁾



注:A.空白组;B.顺铂组;C.参麦注射液组;D.顺铂联合参麦注射液(图11同)

图10 参麦注射液对A549/DDP细胞内亚铁离子的影响(免疫荧光,×40)

Fig. 10 Effect of SMI on ferrous ion in A549/DDP cells (IF, ×40)

3.3.5 参麦注射液对A549/DDP细胞铁死亡及自噬相关蛋白表达的影响

与顺铂组比较,顺铂联合参

表10 参麦注射液对A549/DDP细胞SLC7A11、FTH、LC3 II、p62的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 10 Effect of SMI on protein expression of SLC7A11, FTH, LC3 II and p62 in A549/DDP cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度	SLC7A11/ β -actin	FTH/ β -actin	LC3 II/ β -actin	p62/ β -actin
空白组		0.75±0.35	0.35±0.20	0.83±0.26	1.60±0.85
顺铂组	23.3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.63±0.17	0.36±0.22	0.67±0.06	0.89±0.20
参麦注射液组	20 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	0.53±0.22	0.36±0.17	0.96±0.10	0.76±0.14
顺铂联合参麦注射液组	23.3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ +20 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	0.19±0.05 ²⁾	1.44±0.20 ²⁾	1.09±0.15 ¹⁾	0.33±0.04 ¹⁾

注:与顺铂组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$

4 讨论

由于大多数患者确诊肺癌时多属晚期,故化疗是目前治疗NSCLC的最常用手段,顺铂作为常用的化疗药物,探明其耐药机制,解决其耐药问题,寻找更合适的治疗方案是目前基础及临床研究面临的迫切需求。参麦注射液由生脉散去五味子,并易人参为红参化裁而来。其中红参为君,可大补元气,复脉固脱,益气摄血;麦冬养阴,生津,润肺,清心。麦冬以其甘寒阴柔,与红参的甘苦温补结合,共行益气固脱,养阴生津之功^[5]。网络药理学研究结果发现,顺铂联合参麦注射液可能通过影响脂质代谢、磷脂结合等方式改善NSCLC顺铂耐药。进一步通过代谢组学研究发现,参麦注射液改善NSCLC顺铂耐药与甘油磷脂代谢密切相关。甘油磷脂作为构成生物膜系统的基本骨架,其变化提示细胞内可能存在某些膜性细胞器,如脂滴等的变化。脂滴是由中性脂核组成的细胞内储存囊泡,由甘油磷脂膜包围,可以通过隔离胞内过多的

麦注射液组SLC7A11、p62蛋白表达水平明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$),而FTH、LC3 II蛋白表达水平明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图11、表10。结果表明,参麦注射液诱导的A549/DDP细胞铁死亡与自噬有关。

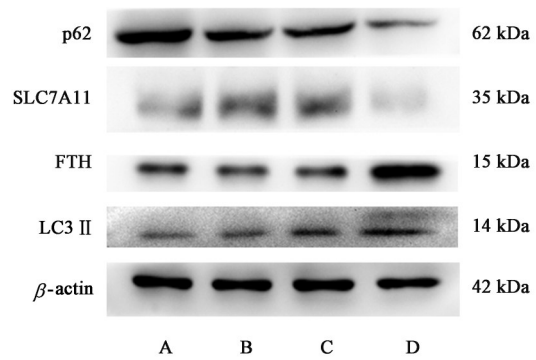


图11 A549/DDP细胞p62、SLC7A11、FTH和LC3 II蛋白表达电泳
Fig. 11 Electrophoresis of SMI on protein expression of p62, SLC7A11, FTH and LC3 II in A549/DDP cells

PUFAs,进而保护细胞^[15]。如LU等^[16]发现,脂滴沉积诱导的脂质积累可增加胰腺神经内分泌肿瘤的发展。然而,脂滴的合成、分解及存储异常将导致脂质稳态失衡,导致严重的氧化应激。本研究通过电镜和荧光染色证实,顺铂联合参麦注射液显著诱导NSCLC顺铂耐药细胞的脂滴积累。据此推测,参麦注射液改善NSCLC顺铂耐药可能与脂滴异常积累诱导的氧化应激有关。

氧化应激和多种细胞死亡相关,如细胞凋亡、自噬、铁死亡、铜死亡等^[17-18]。其中,铁死亡的生物化学特征之一是PUFAs的过氧化导致的胞内氧化应激增加。当脂滴中存在过多的PUFAs时,不受限制的脂解会释放致死水平的PUFAs,使细胞对铁死亡敏感^[19-20]。首先,通过荧光染色、比色法和Seahorse法,明确顺铂联合参麦注射液可上调A549/DDP细胞的脂质过氧化和ROS水平,下调其基础、最大呼吸值和MMP、GSH含量,即顺铂联合参麦注射液诱导NSCLC顺铂耐药细胞氧化应激。其次,

通过CCK-8、荧光染色等发现, Ferrostatin-1可以挽救顺铂联合参麦注射液诱导的生长抑制作用,且能够挽救顺铂联合参麦注射液诱导的脂质过氧化和ROS水平的变化。此外,顺铂联合参麦注射液能够诱导NSCLC顺铂耐药细胞总铁离子及二价亚铁离子含量显著下调。最后,通过Western blot,发现顺铂联合参麦注射液抑制SLC7A11、提高FTH蛋白表达。SLC7A11蛋白能够在细胞应激下重建氧化还原稳态^[21], FTH具有铁氧化酶活性,可调控储存铁离子^[22]。因此,参麦注射液改善NSCLC顺铂耐药可能与氧化应激诱导的铁死亡有关。

铁死亡是一种自噬性死亡,细胞能够通过自噬降解细胞内成分,导致脂质过氧化或铁元素增加,进而驱动铁死亡的发生^[23]。代谢组学结果表明,参麦注射液改善NSCLC顺铂耐药与自噬、铁死亡密切相关。通过检测自噬相关蛋白LC3 II和p62,发现顺铂联合参麦注射液能够提高LC3 II,降低p62表达。杨鹏飞^[9]发现,脂滴在应激状态下能够通过自噬作用被溶酶体降解导致细胞内游离脂肪酸的含量升高和脂质过氧化风险急剧增加。据此认为参麦注射液通过诱导氧化应激改善NSCLC顺铂耐药,其机制可能与脂滴自噬上调诱导的铁死亡有关。

综上所述,联合给药后,肿瘤细胞可能通过增加胞内脂滴储量以抵抗药物带来的氧化应激变化,如脂质过氧化积累增加和GSH含量的降低,使自身免受ROS损伤,但在自噬作用的影响下,储存的PUFAs被释放,导致铁死亡。但是,本研究尚未对参麦注射液的活性成分进行深入探讨,也暂未对其在自噬依赖性铁死亡中的确切作用进行进一步阐明;同时,本研究还发现,铁代谢失衡参与参麦注射液改善NSCLC顺铂耐药,可能与胞内铁的储存、转运、释放或其他氧化应激通路相关,但仍需进一步研究。综上,本研究运用网络药理学、脂质代谢组学探究顺铂联合参麦注射液改善非小细胞肺癌顺铂耐药的可能机制,并结合体外实验验证探究其通过调控脂代谢重编程及自噬依赖性铁死亡改善非小细胞肺癌顺铂耐药的作用,为后续参麦注射液治疗非小细胞肺癌顺铂耐药的研究提供新思路、新方向,为进一步研究其作用机制提供数据支撑。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer

statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-263.

[2] ROTTENBERG S, DISLER C, PEREGO P. The rediscovery of platinum-based cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2021, 21(1): 37-50.

[3] 林丽珠, 王思愚, 黄学武. 肺癌中西医结合诊疗专家共识[J]. 中医肿瘤学杂志, 2021, 3(6): 1-17.

LIN L Z, WANG S Y, HUANG X W. Expert consensus on the diagnosis and treatment of lung cancer by integrated traditional Chinese and Western medicine[J]. J Oncol Chin Med, 2021, 3(6): 1-17.

[4] 钱紫莹, 孙雪杨, 张辰明, 等. 生脉方化学成分及分析方法研究进展[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2023, 25(8): 2699-2708.

QIAN Z X, SUN X Y, ZHANG C M, et al. The research progress on the chemical constituents and analytical methods of Shenmai decoction[J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2023, 25(8): 2699-2708.

[5] 魏靖恒, 石晓路, 杨威, 等. 生脉散调控气阴两虚型心律失常的心脏重构机制探析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(4): 248-259.

WEI J H, SHI X L, YANG W, et al. Mechanism of Shengmai powder regulating cardiac remodeling of arrhythmias with deficiency of Qi and Yin[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2024, 30(4): 248-259.

[6] 王明霞, 王淑梅, 刘明, 等. 真实世界中30012例参麦注射液使用情况与安全性评价[J]. 中国循证医学杂志, 2021, 21(2): 133-138.

WANG M X, WANG S M, LIU M, et al. Usage and safety of Shenmai injection: A real-world study based on 30012 patients[J]. Chin J Evid-Based Med, 2021, 21(2): 133-138.

[7] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: The next generation[J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.

[8] LIU W J, PAN P Y, SUN Y, et al. Deferoxamine counteracts cisplatin resistance in A549 lung adenocarcinoma cells by increasing vulnerability to glutamine deprivation-induced cell death[J]. Front Oncol, 2021, 11: 794735.

[9] 杨鹏飞. 电离辐射通过诱导线粒体自噬促进铁死亡发生的机理研究[D]. 兰州: 中国科学院大学(中国科学院近代物理研究所), 2023.

YANG P F. Study on the mechanism of ionizing radiation inducing mitochondrial autophagy to promote ferroptosis[D]. Lanzhou: University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences), 2023.

[10] AI Y, MENG Y, YAN B, et al. The biochemical pathways of apoptotic, necroptotic, pyroptotic, and ferroptotic cell death[J]. Mol Cell, 2024, 84(1): 170-179.

[11] EBNER M, PUCHKOV D, LÓPEZ-ORTEGA O, et al. Nutrient-regulated control of lysosome function by signaling lipid conversion[J]. Cell, 2023, 186(24): 5328-5346.

- [12] SUN Y, CHEN Y, XU M, et al. Shenmai injection suppresses glycolysis and enhances cisplatin cytotoxicity in cisplatin-resistant A549/DDP cells via the Akt-mTOR-c-Myc signaling pathway[J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020:9243681.
- [13] 孙冶. miRNA-21 调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路抑制肿瘤细胞糖酵解改善 NSCLC 顺铂耐药及参麦注射液干预机制的研究[D]. 沈阳:辽宁中医药大学, 2021.
SUN Y. Study on the mechanism of miRNA-21 regulating PI3K/Akt/mTOR signaling pathway to inhibit tumor cell glycolysis, improve cisplatin resistance in NSCLC, and intervene with Shenmai injection [D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2021.
- [14] 刘文俊. 基于谷氨酰胺代谢重编程探讨四君子汤抑制 p62/Keap1/Nrf2 通路诱导铁死亡改善 NSCLC 顺铂耐药[D]. 沈阳:辽宁中医药大学, 2023.
LIU W J. Study on the mechanism of glutamine metabolism reprogramming in inhibiting p62/Keap1/Nrf2 pathway to induce ferroptosis and improve cisplatin resistance in NSCLC using Sijunzi decoction [D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2023.
- [15] LARSON T S, DIPROSPERO T J, GLISH G L, et al. Differential lipid analysis of oxaliplatin-sensitive and resistant HCT116 cells reveals different levels of drug-induced lipid droplet formation [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2024, 416(1): 151-162.
- [16] LU F, YE M, HU C, et al. FABP5 regulates lipid metabolism to facilitate pancreatic neuroendocrine neoplasms progression via FASN mediated Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Cancer Sci*, 2023, 114(9):3553-3567.
- [17] ARFIN S, JHAN K, JHAN S K, et al. Oxidative stress in cancer cell metabolism [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(5):642.
- [18] WANG Y, DING Y, YAO D, et al. Copper-based nanoscale coordination polymers augmented tumor radioimmunotherapy for immunogenic cell death induction and T-cell infiltration [J]. *Small*, 2021, 17(8):e2006231.
- [19] ALDROVANDI M, FEDOROVA M, CONRAD M. Juggling with lipids, a game of russian roulette [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2021, 32(7):463-473.
- [20] LANGE M, WAGNER P V, FEDOROVA M. Lipid composition dictates the rate of lipid peroxidation in artificial lipid droplets [J]. *Free Radic Res*, 2021, 55(4):469-480.
- [21] KOPPULA P, ZHANG Y, ZHUANG L, et al. Amino acid transporter SLC7A11/xCT at the crossroads of regulating redox homeostasis and nutrient dependency of cancer [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2018, 38(1):12.
- [22] JIE J, XIN L, XUE Z, et al. Circular RNA FEACR inhibits ferroptosis and alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury by interacting with NAMPT [J]. *J Biomed Sci*, 2023, 30(1):45.
- [23] GAO M, MONIAN P, PAN Q, et al. Ferroptosis is an autophagic cell death process [J]. *Cell Res*, 2016, 26(9): 1021-1032.

[责任编辑 张丰丰]