

· 中药活性成分抗非小细胞肺癌机制研究专题 ·

[编者按] 肺癌是全球范围内严重威胁人类健康的恶性肿瘤,耐药与转移仍是临床治疗瓶颈。中药凭借多靶点调控优势,在抗肿瘤领域备受关注。中药活性成分作为中药抗肿瘤药效的物质基础,为机制研究提供了关键切入点。该专题探讨了基于“阳虚致积”理论在肿瘤防治中的应用现状与科学依据,并揭示丹酚酸B、莪术醇、氧化白藜芦醇及异泽兰黄素4种中药活性单体抑制非小细胞肺癌(NSCLC)恶性进展的分子机制。丹酚酸B通过下调磷酸核糖氨基咪唑羧化酶/琥珀酸羧酰胺合成酶(PAICS)表达抑制上皮间质转化;莪术醇通过Janus激酶2/信号转导与转录激活因子3(JAK2/STAT3)信号通路抑制肿瘤增殖与转移;氧化白藜芦醇经磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路干预上皮间质转化进程;异泽兰黄素抑制zeste基因增强子同源物2(EZH2)活性并下调组蛋白H3第27位赖氨酸的三甲基化(H3K27me3)水平,进而调控表观遗传修饰抑制NSCLC进展。上述成果阐明4种中药活性单体干预NSCLC的作用机制,丰富了中药活性成分抗肺癌的分子机制研究,对后续药物开发及中西医结合治疗探索具有一定参考价值。

丹酚酸B通过下调PAICS表达抑制非小细胞肺癌 上皮间质转化机制

徐波^{1,2}, 张继先³, 胡林凌^{3,4}, 江波³, 袁沙沙¹, 范艺龄¹, 阮赓坤¹, 余贻汉^{3*}, 苗青^{1*}

(1. 中国中医科学院西苑医院, 北京 100091; 2. 中国中医科学院博士后流动站, 北京 100700;
3. 湖北省中西医结合医院, 武汉 430015; 4. 湖北中医药大学, 武汉 430065)

[摘要] 目的:探讨丹酚酸B(SaIB)通过下调磷酸核糖氨基咪唑羧化酶/琥珀酸羧酰胺合成酶(PAICS)表达抑制非小细胞肺癌(NSCLC)上皮-间质转化(EMT)的分子机制。方法:以非小细胞肺癌A549细胞和正常支气管上皮(BEAS-2B)细胞为模型,采用细胞增殖与活性检测(CCK-8)法评估SaIB(0、50、100、200、300、400、500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理24 h或48 h后的细胞活力,筛选其有效且安全的干预浓度;通过5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EdU)染色、流式细胞术分别检测SaIB对A549细胞增殖、周期及凋亡的影响;划痕与Transwell侵袭实验评估其对细胞迁移与侵袭的作用;RNA测序结合生物信息学分析差异基因及功能富集;分子对接预测SaIB与PAICS的结合能力,通过热稳定性实验(CETSA)评估SaIB对PAICS蛋白热稳定性的影响。蛋白免疫印迹法(Western blot)检测SaIB对PAICS及EMT相关蛋白[E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、Snail、Slug]表达的影响;通过PAICS质粒转染过表达,开展功能挽救实验。结果:与空白组比较,SaIB浓度依赖性抑制A549细胞活力($P<0.05$),且其有效浓度($\leq 300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对BEAS-2B细胞无显著增殖抑制作用;在此浓度范围内,与空白组比较,SaIB显著抑制A549细胞增殖、迁移、侵袭,并诱导G₀/G₁期阻滞与凋亡($P<0.05$)。转录组分析显示,SaIB显著下调PAICS表达,且其功能富集于细胞增殖及EMT;生物信息学显示PAICS在肺腺癌中高表达且与患者不良预后相关($P<0.01$)。分子对接表明SaIB与PAICS具有较强结合能力(结合能 $-9.1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$),CETSA结果显示,SaIB可显著提高PAICS蛋白的热稳定性($P<0.05$)。Western blot显示,与空白组比较,SaIB浓度依赖性抑制PAICS表达,上调E-cadherin,下调N-cadherin、Vimentin、Snail及Slug($P<0.05$)。功能挽救实验显示,与空载组比较,PAICS过表达显著增强A549细胞的增殖、迁移、侵袭能力,促进细胞周期进展并抑制凋亡($P<0.05$);同时,与空载组+SaIB高浓度组比较,PAICS过表达可部分逆转SaIB对恶性表型及EMT相关蛋白(N-cadherin、Vimentin、Snail、Slug)的抑制作用,并下调E-cadherin的表达($P<0.05, P<0.01$),表明PAICS是SaIB发挥抗肿瘤效应的关键功能靶点。结论:SaIB通过下调PAICS表达,有效抑制A549细胞EMT进程与细胞周期进展,发挥抗NSCLC作用。该研究不仅揭示了PAICS是SaIB调控EMT的关键功能靶点,也为SaIB作为抑制NSCLC转移的潜在候选药物提供了实验依据。

[关键词] 非小细胞肺癌; 丹酚酸B; 磷酸核糖氨基咪唑丁酰胺合成酶; 上皮间质转化; 迁移与侵袭

[收稿日期] 2025-12-24

[基金项目] 湖北省中医药管理局重点项目(ZY2023Z003);国家优势专科建设项目(fm20242503);中国中医科学院西苑医院名老中医专家学术经验传承项目(XYZX0101-38);国家自然科学基金项目(82305228)

[第一作者] 徐波,博士,从事中医药防治肺系疾病研究,E-mail:xubo20191207@126.com

[通信作者] *余贻汉,硕士,主任医师,从事中医药防治肺系疾病研究,E-mail:yuyihan2000@126.com;

*苗青,博士,主任医师,从事中医药防治肺系疾病研究,E-mail:miaoqing55@sina.com

[中图分类号] R256;R259;R285 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2026)10-0023-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20260622

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.r.20260205.1138.005>

[网络出版日期] 2026-02-05 17:15:02 [增强出版附件] 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



Mechanisms of Salvianolic Acid B in Inhibiting Epithelial-mesenchymal Transition in Non-small Cell Lung Cancer by Downregulating PAICS Expression

XU Bo^{1,2}, ZHANG Jixian³, HU Linling^{3,4}, JIANG Bo³, YUAN Shasha¹, FAN Yiling¹,
RUAN Zhishen¹, YU Yihan^{3*}, MIAO Qing^{1*}

(1. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China;

2. Postdoctoral Mobile Workstation, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

3. Hubei Provincial Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Wuhan 430015, China;

4. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

[Abstract] Objective: To investigate the molecular mechanisms by which salvianolic acid B (SalB) inhibits epithelial-mesenchymal transition (EMT) in non-small cell lung cancer (NSCLC) by downregulating phosphoribosylaminoimidazole carboxylase and phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase (PAICS) expression. **Methods:** NSCLC A549 cells and normal bronchial epithelial cells (bronchial epithelium transformed with Ad12-SV40 2B, BEAS-2B) were used as models. Cell viability was assessed using the cell counting kit-8 (CCK-8) assay after treatment with SalB (0, 50, 100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 24 or 48 h to determine effective and safe intervention concentrations. Cell proliferation, cell cycle distribution, and apoptosis were evaluated by 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) staining and flow cytometry, respectively. Wound healing and Transwell invasion assays were performed to assess cell migration and invasion. RNA sequencing combined with bioinformatic analysis was conducted to identify differentially expressed genes and functional enrichment. Molecular docking was used to predict the binding ability between SalB and PAICS, and the cellular thermal shift assay (CETSA) was performed to evaluate the effect of SalB on the thermal stability of the PAICS protein. Western blot (WB) was used to detect the effects of SalB on PAICS and EMT-related proteins (E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, Snail, and Slug). A functional rescue assay was conducted by PAICS overexpression via plasmid transfection. **Results:** Compared with the control group, SalB inhibited A549 cell viability in a dose-dependent manner ($P<0.05$), and the effective concentrations ($\leq 300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) showed no significant cytotoxicity in BEAS-2B cells. Within this concentration range, SalB significantly inhibited A549 cell proliferation, migration, and invasion, and induced G_0/G_1 phase arrest and apoptosis ($P<0.05$). Transcriptomic analysis showed that SalB significantly downregulated PAICS expression, and its functions were enriched in cell proliferation and EMT. Bioinformatic analysis indicated that PAICS is highly expressed in lung adenocarcinoma and is associated with poor prognosis ($P<0.01$). Molecular docking showed that SalB has strong binding ability to PAICS (binding energy $-9.1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$). CETSA results showed that SalB significantly increased the thermal stability of the PAICS protein ($P<0.05$). WB results showed that, compared with the control group, SalB dose-dependently downregulated PAICS expression, upregulated E-cadherin, and downregulated N-cadherin, Vimentin, Snail, and Slug ($P<0.05$). Functional rescue experiments showed that, compared with the empty vector group, PAICS overexpression significantly enhanced A549 cell proliferation, migration, and invasion, promoted cell cycle progression, and inhibited apoptosis ($P<0.05$). Meanwhile, compared with the empty vector + SalB-H group, PAICS overexpression partially reversed the inhibitory effects of SalB on malignant phenotypes and EMT-related proteins (N-cadherin, Vimentin, Snail, and Slug), and downregulated E-cadherin expression ($P<0.05, P<0.01$), indicating that PAICS is a key functional target mediating the antitumor effects of SalB. **Conclusion:** SalB effectively inhibits EMT progression and cell cycle progression in A549 cells by downregulating PAICS expression, thereby exerting anti-NSCLC effects. This study not only reveals that PAICS is a key functional target through which SalB regulates EMT, but also provides experimental evidence supporting SalB as a potential candidate drug for inhibiting NSCLC metastasis.

[Keywords] non-small cell lung cancer; salvianolic acid B; phosphoribosylaminoimidazole carboxylase and phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase; epithelial-mesenchymal transition; migration and invasion

肺癌是全球癌症死亡的首要原因,其中非小细胞肺癌(NSCLC)约占85%^[1]。远处转移是导致肺

癌患者死亡的关键因素,尽管靶向和免疫治疗已取得显著进展,但晚期NSCLC患者的5年生存率仍低

于20%^[2]。因此,亟需探索抗转移的新靶点及对应治疗策略,以改善临床疗效。上皮-间质转化(EMT)是驱动肿瘤侵袭转移的关键生物学程序。在此过程中,肿瘤细胞失去上皮极性 & 细胞间黏附,如E-钙黏蛋白(E-cadherin)下调,获得间质表型特征,波形蛋白(Vimentin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、转录因子Snail及Slug上调,从而增强迁移、侵袭及抗凋亡能力^[3-4]。因此,抑制EMT调控程序的活化被视为抑制转移的关键。近年来,中医药凭借多靶点干预与低不良反应优势,也成为开发抗肿瘤候选药物的重要来源之一^[5]。中医理论认为,“血瘀”是肿瘤发生发展及转移的重要病机之一,活血化瘀是抗肿瘤增殖、转移的重要治法^[6-7]。丹参作为中医活血化瘀的经典代表药物,其抗肿瘤活性已获广泛研究,尤其在抑制肿瘤细胞增殖、诱导凋亡及抑制转移等方面展现出多靶点干预潜力^[8-9]。研究显示丹酚酸B(SalB)作为丹参的主要活性成分可抑制多种肿瘤进展^[10-12],但其在NSCLC中的作用及机制尚未明确。磷酸核糖氨基咪唑羧化酶/琥珀酸酰胺合成酶(PAICS)是嘌呤合成反应的双功能酶。研究表明,PAICS除介导嘌呤核苷酸合成外,还在多种恶性肿瘤中异常高表达,并显著促进侵袭与转移^[13-14]。然而,PAICS在NSCLC中的作用机制,以及能否被天然小分子化合物选择性干预,目前尚缺乏直接实验证据。本研究通过体外细胞增殖与活性检测(CCK-8)法、5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EdU)、周期、划痕、Transwell侵袭和凋亡实验,评估了SalB对NSCLC细胞增殖、侵袭转移和凋亡的影响。同时,结合转录组学、生物信息学、分子对接、蛋白免疫印迹法(Western blot)、热稳定性实验(CETSA)及质粒转染挽救实验,探讨了SalB通过下调PAICS表达抑制非小细胞肺癌EMT的作用机制。上述发现揭示了PAICS在调控EMT中的关键作用,并验证了SalB抑制NSCLC侵袭转移的潜在科学价值。

1 材料

1.1 细胞株 人NSCLL细胞株A549、人正常支气管上皮细胞(BEAS-2B)(武汉普诺赛生物科技有限公司,批号分别为CL-0016、CP-H009)。

1.2 药品与试剂 SalB(成都仪捷睿生物科技有限公司,批号YRD029-230401,纯度≥98%);达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM)培养基、胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液(PBS)(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为G4511-500ML、G4001-100ML、G4202-500ML);胎牛血清(FBS,浙江美森细胞科技有限公

司,批号ctcc-002-071);CCK-8试剂(南京恩晶生物科技有限公司,批号E1CK-000208-10);Annexin V-FITC 碘化丙啶(PI)(美国ApexBio公司,批号K2003-100 Assays);PI与RNase A(中国上海MedChemExpress公司,批号HY-K1071);10%聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)凝胶快速制备试剂盒、三色预染蛋白Marker(上海雅酶生物医药科技有限公司,批号分别为WJ103L、PG112);增强化学发光法(ECL)化学发光试剂盒、VAHTS mRNA Capture Beads 2.0、VAHTS Universal V10 RNA-seq Library Prep Kit试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,批号分别为7E3010K4、7E0992L3、7E831C4);Transwell小室(广州洁特生物过滤股份有限公司,批号TCS-003-024);EdU-594细胞增殖检测试剂盒、Hoechst 33342染色液、基质胶、结晶紫染色液、硝酸纤维素膜、快速封闭液(上海碧云天生物科技有限公司,批号分别为C0078S、C1026、C0371-1ml、C0121-100ml、FFN08、P0252);PAICS、E-cadherin、N-cadherin抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为86255-2-RR、83991-4-RR、22018-1-AP);Vimentin、Snail、Slug、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司,批号分别为A11952、A5243、A1057、A19056);免疫球蛋白G(IgG)二抗(上海埃必威生物科技有限公司,批号AB0101);Opti-MEM、Lipofectamine 3000转染试剂(上海赛默飞世尔科技有限公司,批号分别为31985062、L3000015)。

1.3 仪器 HFsafe-12CY型细胞培养超净台·生物安全柜(中国力康生物有限公司);PowerPac™ Basic型垂直电泳转印系统(美国Bio-Rad公司);IX 51/IX 81型荧光显微镜(日本Olympus公司);EnSpire型多功能酶标仪(美国PerkinElmer公司);ChemiScope 6200型ECL化学成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司);DNBSEQ-T7型基因测序仪(深圳华大智造科技股份有限公司);DxFLEX型流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 将A549细胞复苏后,使用DMEM(含有10%FBS)接种,在37℃、5%CO₂饱和度环境下培养,细胞生长至80%~90%密度后进行传代,所有细胞复苏并传至3代后进行实验。BEAS-2B使用DMEM培养基,均含10%FBS及1%青链霉素,置于37℃、5%CO₂恒温培养箱中培养。细胞生长至80%~90%融合时,采用0.25%胰蛋白酶消化,按

1:4~1:3进行传代,实验均选取传至第3代后呈对数生长期细胞进行。

2.2 CCK-8法检测细胞存活率 将处于对数生长期的A549、BEAS-2B细胞分别以 4×10^4 个/mL的密度接种于96孔板中,每孔100 μL ,培养24 h后,加入药物。SalB的浓度为50、100、200、300、400、500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,溶剂加入2.5%的二甲基亚砜(DMSO),每组6个复孔,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和度环境下分别培养24、48 h。吸除培养基后加入含10% CCK-8溶液的完全培养基,同时设置溶剂孔(仅含有10% CCK-8的完全培养基),每孔100 μL ,避光孵育60 min后,使用酶标仪检测在波长为450 nm的条件下各孔的吸光度 A ,计算细胞存活率。细胞存活率 $= (A_{\text{药物孔}} - A_{\text{溶剂孔}}) / (A_{\text{空白孔}} - A_{\text{溶剂孔}}) \times 100\%$,使用GraphPad软件计算半数抑制浓度(IC_{50})。

2.3 细胞分组及质粒转染 通过CCK-8实验筛选的SalB最佳浓度,使用DMSO配置SalB的母液浓度为120 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在正向实验中将细胞分组为空白组(2.5% DMSO),SalB低(SalB 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、中(SalB 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、高(SalB 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)浓度组;在机制挽救实验中,将细胞分为空载组、PAICS过表达组、空载+SalB高浓度组、PAICS过表达+SalB高浓度组。使用Opti-MEM和Lipofectamine 3000转染试剂对细胞进行转染。A549细胞转染了由武汉奇景生物科技有限公司(中国武汉)提供的PAICS过表达质粒(PAICS NM_006452.4-pcDNA3.1-FLAG)及空载体对照[(pcDNA3.1(+))。转染6 h后更换为新鲜培养基,继续孵育过夜,次日对细胞进行相应药物处理。

2.4 EdU细胞增殖实验 将处于对数生长期的A549细胞分别以 1×10^5 个/mL的密度接种于48孔板中,每孔300 μL ,培养24 h后,进行分组干预,每组5个复孔。24 h后吸除培养基,加入PBS清洗后,加入EdU标记2 h后,使用4%多聚甲醛固定15 min、3%曲拉通通透10 min后,按照EdU检测试剂盒说明避光配置并进行点击反应30 min、Hoechst 33342染色15 min,加入PBS清洗后用荧光倒置显微镜进行观察、拍照。

2.5 细胞周期实验 将A549细胞以每孔 2×10^5 个的密度接种于6孔板中,经不同浓度SalB处理48 h后收集细胞。细胞于4 $^{\circ}\text{C}$ 下用70%乙醇固定过夜,随后加入含50 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ PI和20 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ RNase A的染色液,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min。最后采用流式细胞仪检测细胞周期分布。

2.6 划痕实验 将处于对数生长期的A549细胞分别以 1×10^5 个/mL的密度接种于12孔板中,每孔1 mL,置于培养箱中培养至细胞融合度达80%。使用200 μL 无菌吸头在细胞表面力道均匀、垂直地划一道线,尽量保持划痕宽度一致,并用PBS轻轻冲洗2遍以去除脱落细胞。用减血清培养基(3% FBS培养基)进行分组加药,每组3个复孔,继续培养。分别在划痕后0 h、24 h和48 h使用倒置荧光显微镜在相同放大倍数下拍摄各组细胞划痕图像。采用Image J软件对划痕宽度进行定量分析,测量并记录各时间点划痕区域的相对愈合距离,计算细胞迁移率。

2.7 Transwell侵袭实验 将处于对数生长期的A549细胞分别以 2×10^5 个/mL的密度接种于6孔板中,每孔2 mL,培养24 h,进行分组干预48 h后,吸除培养基,PBS清洗后使用胰酶消化收集细胞,使用无血清培养基重悬后对各组细胞进行计数,调整细胞浓度。将24孔板下室中加入完全培养基600 μL ,上室加入预冷基质胶100 μL 待其凝固后,按每孔 3.5×10^4 个细胞的密度接种至Transwell上室(每孔体积200 μL),于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和度环境下培养24 h后将小室置于4%多聚甲醛中固定15 min后充分晾干,使用结晶紫染色,倒置显微镜下观察、拍照并通过Image J软件计算各组侵袭细胞数量。

2.8 流式凋亡实验 将A549细胞接种于6孔板中,分别用不同浓度的SalB处理48 h。吸除培养基后,用无EDTA胰酶消化细胞,PBS洗涤,重悬于500 μL 1 \times 结合缓冲液中;随后加入Annexin V-FITC 5 μL 和PI 5 μL ,轻柔混匀;室温避光孵育15 min后,最后采用流式细胞仪检测A549细胞的凋亡情况。

2.9 转录组测序 使用VAHTS mRNA Capture Beads 2.0试剂盒从总RNA中捕获mRNA后,使用VAHTS Universal V10 RNA-seq Library Prep Kit试剂盒进行转录组文库构建,通过DNBSEQ-T7测序平台进行高通量测序。基于差异倍数绝对值 $|\text{FC}|>2$ 且 $P<0.05$ 的标准,筛选出差异表达基因(DEGs)。通过基因本体(GO)、京都基因与基因组百科全书(KEGG)及基因集富集分析(GSEA)对DEGs进行功能注释,并采用Benjamini-Hochberg错误发现率算法校正 P 值。

2.10 分子对接 PAICS的晶体结构从蛋白质数据库(PDB)中获取。使用PyMOL软件(版本2.5,美国Schrödinger公司)去除结构中的水分子及内源性配体,随后添加氢原子并优化质子化状态。经处理后

的结构以 PDBQT 格式保存。SalB 的二维结构自 PubChem 数据库获取,并采用 Avogadro 软件(版本 1.95)进行能量优化,随后亦转换为 PDBQT 格式。分子对接使用 AutoDock Vina 软件(版本 1.2.3)完成,选取结合自由能(ΔG)最低的前 10 个构象进行分析。关键相互作用(如氢键、疏水接触)及反复出现的结合残基均通过 PyMOL 进行可视化呈现。

2.11 Western blot 实验 将处于对数生长期的 A549 细胞分别以 2×10^5 个/mL 的密度接种于 6 孔板中,每孔 2 mL,培养 24 h,分组干预 48 h 后,使用放射免疫沉淀法(RIPA)裂解液提取蛋白;取等量蛋白样品,在 10% 十二烷基硫酸钠-PAGE(SDS-PAGE)凝胶中进行电泳分离,随后转至硝酸纤维素膜(NC 膜)上。使用 QuickBlock™ Western 封闭液封闭 15 min。加入一抗 PAICS(1:1 000)、E-cadherin(1:20 000)、N-cadherin(1:2 000)、Vimentin(1:1 000)、Snail(1:1 000)、Slug(1:1 000)、GAPDH(1:3 500),随后于 4 °C 孵育过夜。次日, TBST 洗膜,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗,按 1:10 000 稀释于含 5% 脱脂奶粉的 TBST 中,室温孵育 1 h。再次洗膜,使用 ChemiScope6200 化学发光成像系统显影。采用 Image J 软件对蛋白条带灰度值进行定量分析。以 GAPDH 作为内参,目标蛋白表达水平通过与 GAPDH 的比值进行标准化处理。

2.12 CETSA 实验 A549 细胞用 SalB $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 或 2.5% DMSO 处理 2 h 后,收集细胞并重悬于含蛋白酶抑制剂混合物的 PBS 中。将细胞悬液分装,利用梯度聚合酶链式反应(PCR)仪在 42、47、52、57、62、67 °C 下分别加热 3 min,随后立即置于冰上冷却 3 min。样品离心后收集上清;经蛋白浓度标准化后,Western blot 检测 PAICS 的热稳定性。

2.13 统计学方法 运用 SPSS 27.0 软件统计分析数据,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间数据比较采用单因素方差分析(ANOVA),两组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 SalB 对 A549 细胞增殖的影响 计算 SalB 干预 A549 细胞 48 h 后的 IC_{50} 为 $322.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,与空白组比较, $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SalB 处理 A549 细胞 24 h 后细胞活力显著下降($P < 0.01$),而以相同浓度干预 BEAS-2B 细胞的活力无明显变化。根据上述结果,设定 0、100、200、300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为 SalB 的用药梯度。上述结果提示,SalB 对 NSCLC 细胞具有浓度依赖性的增殖抑制作用和相对选择性增殖抑制,在相同

浓度下对 BEAS-2B 细胞活性无明显影响,表现出良好的细胞安全性。见表 1、表 2。

表 1 SalB 对 A549 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Effect of SalB on viability of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞生存率/%	
		24 h	48 h
空白组		102.70±4.25	99.77±1.93
SalB 干预组	50	96.89±7.10	90.90±2.22 ¹⁾
	100	96.73±2.48	86.44±1.38 ²⁾
	200	84.84±4.36 ¹⁾	79.96±6.36 ²⁾
	300	70.67±6.05 ²⁾	54.26±2.47 ²⁾
	400	44.49±4.41 ²⁾	39.64±4.85 ²⁾
	500	28.83±3.96 ²⁾	22.00±1.64 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2-表 9 同)

表 2 SalB 对 BEAS-2B 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of SalB on viability of BEAS-2B cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞生存率/%	
		24 h	48 h
空白组		102.50±4.26	100.00±7.28
SalB 干预组	50	108.20±6.60	107.20±9.14
	100	106.20±9.99	99.11±7.80
	200	99.84±5.98	96.80±6.30
	300	98.70±11.00	96.51±6.56
	400	98.10±8.32	87.57±7.41 ¹⁾
	500	90.23±1.52 ¹⁾	82.51±8.38 ²⁾

3.2 SalB 抑制 A549 细胞增殖并诱导细胞 G_0/G_1 期阻滞 EdU 结果显示,与空白组比较,随着 SalB 干预浓度增加(100、200、300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) A549 细胞的 EdU 阳性率显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$);流式周期检测显示,与空白组比较,随着 SalB 浓度升高, A549 细胞明显阻滞于 G_0/G_1 期($P < 0.05$, $P < 0.01$)。上述结果表明,SalB 呈浓度依赖性地抑制 A549 细胞增殖,并诱导细胞 G_0/G_1 期阻滞。见表 3、表 4,图 1。

表 3 SalB 对 A549 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

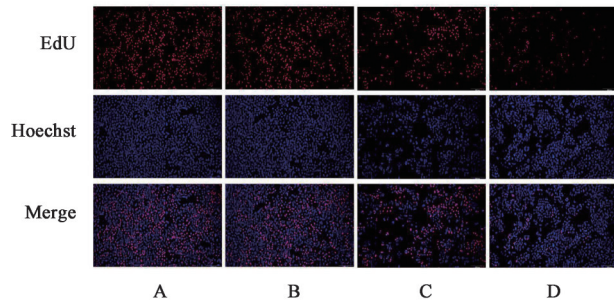
Table 3 Effect of SalB on proliferation ability of A549 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	增殖率/%
空白组		59.42±2.70
SalB 低浓度组	100	43.63±2.88 ²⁾
SalB 中浓度组	200	34.03±1.91 ²⁾
SalB 高浓度组	300	17.20±1.70 ²⁾

表 4 SalB 对 A549 细胞周期的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of SalB on cell cycle of A549 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	G_0/G_1
空白组		48.03±1.31
SalB 低浓度组	100	53.60±1.42 ¹⁾
SalB 中浓度组	200	63.03±2.47 ²⁾
SalB 高浓度组	300	72.23±2.01 ²⁾



注: A. 空白组; B. SalB 低浓度组; C. SalB 中浓度组; D. SalB 高浓度组(图 2-图 4、图 6 同)

图 1 SalB 对 A549 细胞增殖的影响(倒置荧光显微镜, $\times 100$)

Fig. 1 Effect of SalB on proliferation ability of A549 cells (inverted fluorescence microscope, $\times 100$)

3.3 SalB 抑制 A549 细胞迁移和侵袭 与空白组比较, SalB 组划痕愈合距离显著缩短, 迁移距离与时间呈正比, 与药物浓度呈反比($P<0.01$)。与空白组比较, A549 细胞中 SalB 组细胞侵袭个数明显降低($P<0.05, P<0.01$), 且与 SalB 浓度呈反比。上述结果表明 SalB 呈浓度依赖性抑制 A549 细胞迁移和侵袭。见表 5、表 6, 图 2、图 3。

表 5 SalB 对 A549 细胞迁移的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of SalB on migration of A549 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	迁移率/%	
		24 h	48 h
空白组		38.24±3.78	60.49±1.45
SalB 低浓度组	100	28.75±1.95 ²⁾	38.80±2.45 ²⁾
SalB 中浓度组	200	18.05±4.39 ²⁾	28.02±3.43 ²⁾
SalB 高浓度组	300	6.62±1.49 ²⁾	14.34±2.45 ²⁾

表 6 SalB 对 A549 细胞侵袭的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of SalB on invasion of A549 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	侵袭数/个
空白组		1 554.00±109.00
SalB 低浓度组	100	1 338.00±89.00 ¹⁾
SalB 中浓度组	200	638.00±58.00 ²⁾
SalB 高浓度组	300	169.00±14.00 ²⁾

3.4 SalB 诱导 A549 细胞凋亡 流式检测结果显示, 与空白组比较, SalB 低浓度组凋亡率未见明显

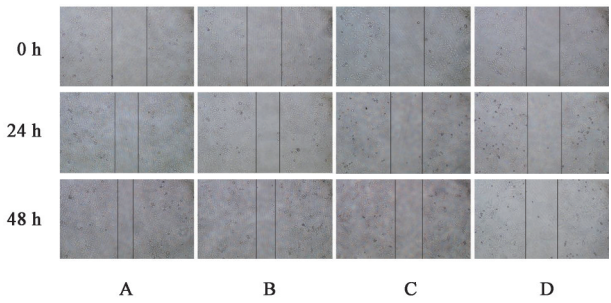


图 2 SalB 对 A549 细胞迁移的影响(倒置显微镜, $\times 100$)

Fig. 2 Effect of SalB on migration of A549 cells (inverted microscope, $\times 100$)

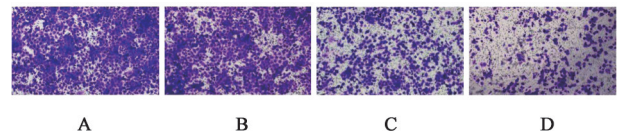


图 3 SalB 对 A549 细胞侵袭的影响(结晶紫, $\times 100$)

Fig. 3 Effect of SalB on invasion of A549 cells (crystal violet, $\times 100$)

升高, 差异无统计学意义, 随着 SalB 浓度的增加, A549 细胞的凋亡率显著升高($P<0.01$)。见表 7。

表 7 SalB 对 A549 细胞凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of SalB on apoptosis in A549 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	凋亡率/%
空白组		5.78±0.26
SalB 低浓度组	100	6.58±0.45
SalB 中浓度组	200	13.84±1.70 ²⁾
SalB 高浓度组	300	24.90±1.52 ²⁾

3.5 SalB 对 A549 细胞中 EMT 相关蛋白的影响

Western blot 研究结果显示, 与空白组比较, SalB 中、高浓度组明显抑制 EMT 关键蛋白(N-cadherin、Vimentin、Snail、Slug)表达, 并上调 E-cadherin 表达($P<0.05, P<0.01$)。结果表明, SalB 可调控 A549 细胞 EMT 进程。见表 8、图 4。

3.6 转录组学(RNA-seq)与生信分析 为探究 SalB 抗肿瘤机制, 本研究对 SalB 处理的 A549 细胞进行转录组与生物信息学整合分析。RNA-seq 显示干预组与空白组显著分离, GO-BP 富集提示 SalB 抑制细胞增殖及 EMT; 差异表达分析鉴定 PAICS 为显著下调靶点($\log_2\text{FC}=-1.50, |\text{FC}|=2.83, P=3.22\times 10^{-4}$)。基于基因表达水平值的交互式分析平台(GEPIA)数据库显示 PAICS 在肺腺癌中较正常组织明显高表达($P<0.05$), 且随 TNM 分期升高而显著上调($P<0.01$), 高表达者总生存期显著缩短(log-rank $P<0.01$)。上述结果提示 PAICS 为 NSCLC 的关键促癌因子, 且为 SalB 发挥抗癌作用的潜在靶点。

表 8 SalB 对 A549 细胞中 EMT 关键蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 8 Effect of SalB on key EMT-related proteins expression in A549 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	E-cadherin/GAPDH	N-cadherin/GAPDH	Vimentin/GAPDH	Snail/GAPDH	Slug/GAPDH
空白组		0.22±0.04	0.71±0.10	1.10±0.01	1.01±0.09	1.07±0.01
SalB 低浓度组	100	0.45±0.03 ²⁾	0.49±0.13	0.92±0.05 ¹⁾	0.91±0.53	0.88±0.07
SalB 中浓度组	200	0.81±0.08 ²⁾	0.40±0.14 ¹⁾	0.64±0.10 ²⁾	0.82±0.05 ¹⁾	0.64±0.12 ²⁾
SalB 高浓度组	300	1.03±0.06 ²⁾	0.25±0.01 ²⁾	0.52±0.03 ²⁾	0.54±0.14 ²⁾	0.24±0.01 ²⁾

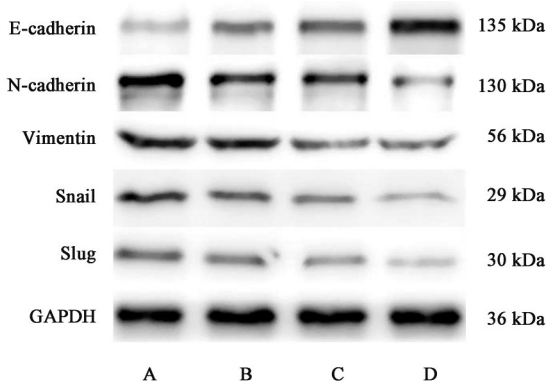


图 4 A549 细胞中 EMT 关键蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of key EMT-related proteins expression in A549 cells

表 9 SalB 对 PAICS 蛋白的热稳定性的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 9 Effect of SalB on thermal stability of PAICS ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度	42 °C	47 °C	52 °C	57 °C	62 °C	67 °C
DMSO 组	2.5%	0.98±0.03	0.96±0.05	0.90±0.05	0.50±0.05	0.29±0.05	0.23±0.01
SalB 组	300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	1.01±0.08	0.94±0.01	0.91±0.02	0.78±0.04 ²⁾	0.50±0.04 ²⁾	0.40±0.06 ²⁾

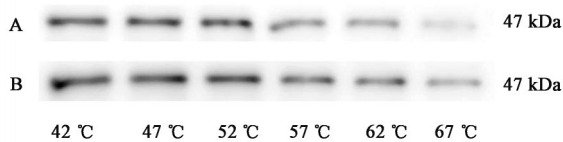
注:与 DMSO 组比较 ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$

表 10 SalB 对 PAICS 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 10 Effect of SalB on PAICS expression ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	PAICS/GAPDH
空白组		0.98±0.01
SalB 低浓度组	100	0.83±0.07 ¹⁾
SalB 中浓度组	200	0.46±0.03 ²⁾
SalB 高浓度组	300	0.19±0.03 ²⁾

注:与空白组比较 ¹⁾ $P<0.05$;与 SalB 低浓度组比较 ²⁾ $P<0.01$



注:A.DMSO 2.5% 组;B.SalB 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组

图 5 SalB 对 PAICS 蛋白的热稳定性的影响

Fig. 5 Effect of SalB on thermal stability of PAICS

3.8 PAICS 过表达部分逆转了 SalB 抑制 A549 细胞增殖和诱导细胞周期阻滞的效应 与空载组比较, PAICS 过表达显著增强 A549 细胞的增殖能力,表现

SalB 处理 A549 细胞的转录组特征及 PAICS 的生信分析见增强出版附加材料。

3.7 分子对接、热稳定性及 Western blot 实验 分子对接(增强出版附加材料)结果显示, SalB 与 PAICS 的结合能是 $-9.1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, 提示 SalB 与 PAICS 具有良好结合作用。CETSA 结果显示, 与 DMSO 组比较, SalB 处理显著提高了 PAICS 蛋白在升温过程中的热稳定性($P<0.05$)。此外, SalB 呈浓度依赖性抑制 PAICS 表达($P<0.05$)。上述结果表明, SalB 可与 PAICS 蛋白结合, 并呈浓度依赖性地下调其蛋白表达。提示 SalB 可能通过抑制 PAICS 的活性来发挥其生物学效应。见表 9、表 10, 图 5、图 6。

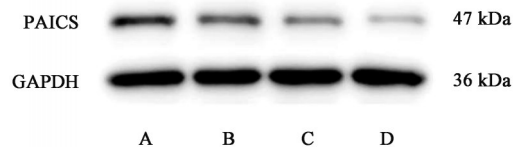


图 6 SalB 对 PAICS 表达的影响

Fig. 6 Effect of SalB suppresses PAICS expression

为 EdU 阳性率明显升高($P<0.05$), G_0/G_1 期细胞比例显著降低($P<0.01$); 与空载组+SalB 高浓度组比较, PAICS 过表达部分逆转了 SalB 对 A549 细胞增殖的抑制作用及对细胞周期的阻滞效应, 表现为 PAICS 过表达+SalB 高浓度组中 EdU 阳性率明显升高($P<0.05$), G_0/G_1 期细胞比例显著下降($P<0.01$)。上述结果表明, PAICS 介导了 SalB 对 A549 细胞增殖的抑制作用。见表 11、表 12、图 7。

3.9 PAICS 过表达部分逆转 SalB 抑制 A549 细胞迁移及侵袭的效应 与空载组比较, PAICS 过表达显著增强了 A549 迁移和侵袭的能力, 表现为 A549 细胞迁移率和侵袭能力的显著增强($P<0.01$); 与空载

表 11 PAICS 过表达后, SalB 对 A549 细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 11 Effect of SalB on A549 cell proliferation following PAICS overexpression ($\bar{x}\pm s, n=5$)

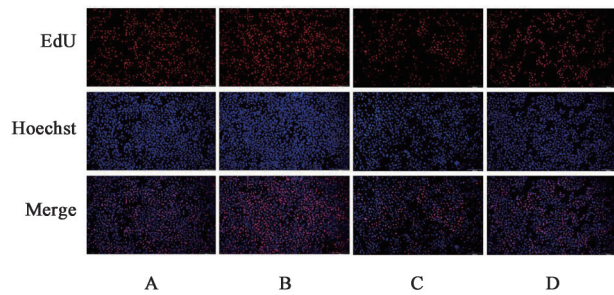
组别	增殖率/%
空载组	69.97±3.38
PAICS 过表达组	82.72±4.76 ¹⁾
空载+SalB 高浓度组	21.10±1.48
PAICS 过表达+SalB 高浓度组	37.20±2.09 ³⁾

注: PAICS 过表达组用药浓度 $3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 空载+SalB 高浓度组用药浓度 $300\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, PAICS 过表达+SalB 高浓度组用药浓度 $3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+300\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 与空载组比较¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与空载组+SalB 高浓度组比较³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$ (表 12-表 16 同)

表 12 PAICS 过表达后, SalB 对 A549 细胞周期的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 12 Effect of SalB on cell cycle of A549 cells following PAICS overexpression ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	G_0/G_1
空载组	54.37±1.25
PAICS 过表达组	44.63±1.10 ²⁾
空载+SalB 高浓度组	72.10±1.83
PAICS 过表达+SalB 高浓度组	60.00±1.30 ⁴⁾



注: A. 空载组; B. PAICS 过表达组; C. 空载+SalB 高浓度组; D. PAICS 过表达+SalB 高浓度组(图 8-图 10 同)

图 7 PAICS 过表达后 SalB 对 A549 细胞增殖的影响(免疫荧光, $\times 100$)

Fig. 7 Effect of SalB on A549 cell proliferation following PAICS overexpression (IF, $\times 100$)

组+SalB 高浓度组比较, PAICS 过表达部分逆转了 SalB 对 A549 细胞迁移、侵袭的抑制作用, 表现为 A549 细胞迁移率和侵袭能力显著升高, 差异具有统计学意义($P<0.01$)。上述结果表明, PAICS 介导了 SalB 对 A549 细胞迁移和侵袭的抑制作用。见表 13、表 14, 图 8、图 9。

3.10 PAICS 过表达可部分逆转 SalB 对 A549 细胞凋亡的诱导作用 流式凋亡研究结果显示, 与空载组比较, PAICS 过表达显著抑制了 A549 细胞凋亡 ($P<0.01$)。然而, 与空载组+SalB 高浓度组比较, PAICS 表达能够部分逆转 SalB 诱导凋亡的作用, 表现为 A549 细胞凋亡率显著下降 ($P<0.01$)。研究表

表 13 PAICS 过表达 SalB 对 A549 细胞迁移的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 13 Effect of SalB on migration of A549 cells following PAICS overexpression ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	迁移率/%	
	24 h	48 h
空载组	30.40±1.58	59.02±3.11
PAICS 过表达组	50.39±3.05 ²⁾	73.03±2.32 ²⁾
空载+SalB 高浓度组	19.08±3.64	27.78±3.21
PAICS 过表达+SalB 高浓度组	31.86±4.83 ⁴⁾	42.25±1.81 ⁴⁾

表 14 PAICS 过表达对 A549 细胞侵袭的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 14 Effect of SalB on A549 cell invasion following PAICS overexpression ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	侵袭数/个
空载组	805.00±59.00
PAICS 过表达组	1 252.00±74.00 ²⁾
空载+SalB 高浓度组	132.00±20.00
PAICS 过表达+SalB 高浓度组	508.00±61.00 ⁴⁾

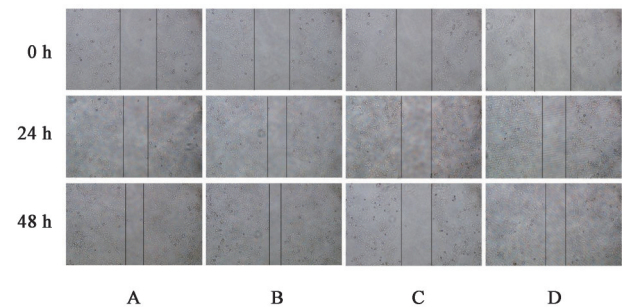


图 8 PAICS 过表达 SalB 对 A549 细胞迁移的影响(倒置显微镜, $\times 100$)

Fig. 8 Effect of SalB on migration of A549 cells following PAICS overexpression (inverted microscope, $\times 100$)

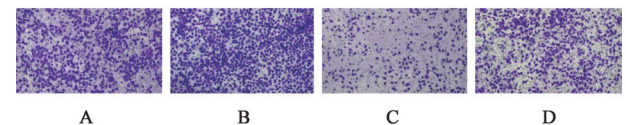


图 9 PAICS 过表达 SalB 对 A549 细胞侵袭的影响(结晶紫, $\times 100$)

Fig. 9 Effect of SalB on migration of A549 cells following PAICS overexpression (crystal violet, $\times 100$)

明 PAICS 介导了 SalB 诱导 A549 细胞凋亡的作用。见表 15。

3.11 PAICS 过表达可部分逆转 SalB 对 A549 中 EMT 关键蛋白调控作用 为了进一步探究 SalB 在 A549 细胞中的作用机制, 将过表达的 PAICS 质粒瞬时转染至 A549 细胞中后, 与空载组比较, PAICS 过表达组中 PAICS 蛋白表达水平显著上调 ($P<0.01$), 表明 PAICS 转染效率良好。此外, 与空载组比较, PAICS 过表达组中 N-cadherin、Vimentin、Snail 及

表 15 PAICS 过表达对 A549 细胞凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 15 Effect of SalB on A549 cell invasion following PAICS overexpression ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	凋亡率/%
空载组	5.96±0.09
PAICS 过表达组	3.96±0.54 ²⁾
空载+SalB 高浓度组	19.33±1.08
PAICS 过表达+SalB 高浓度组	13.42±0.92 ⁴⁾

Slug 的蛋白表达水平显著升高, E-cadherin 表达下调, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$); 与空载+SalB 高浓度组比较, PAICS 过表达+SalB 高浓度组中 N-cadherin、Vimentin、Snail 及 Slug 的蛋白表达上调, E-cadherin 表达下调, 差异具有统计学意义 ($P<0.05, P<0.01$), 显示 PAICS 过表达部分逆转了 SalB 对这些靶点的调控作用。上述结果表明进一步表明, SalB 通过下调 PAICS 表达发挥抑制 NSCLC 增

表 16 PAICS 过表达对 A549 中 EMT 关键蛋白调控的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 16 Effect of SalB on key EMT markers in A549 cells following PAICS overexpression ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	PAICS/GAPDH	E-cadherin/GAPDH	N-cadherin/GAPDH	Vimentin/GAPDH	Snail/GAPDH	Slug/GAPDH
空载组	0.70±0.04	0.74±0.12	0.69±0.09	1.00±0.04	0.87±0.01	0.88±0.04
PAICS 过表达组	0.89±0.03 ²⁾	0.41±0.09 ¹⁾	0.93±0.08 ¹⁾	1.20±0.08 ¹⁾	0.97±0.05 ¹⁾	1.10±0.06 ²⁾
空载+SalB 高浓度组	0.23±0.02	1.09±0.08	0.27±0.03	0.52±0.04	0.27±0.01	0.40±0.06
PAICS 过表达+SalB 高浓度组	0.54±0.14 ³⁾	0.89±0.07 ³⁾	0.48±0.10 ³⁾	0.80±0.03 ⁴⁾	0.51±0.03 ⁴⁾	0.63±0.07 ⁴⁾

4 讨论

肺癌是全球范围内发病率和病死率最高的恶性肿瘤之一, 肺癌细胞不仅表现出异常活跃的增殖能力, 还易通过淋巴系统和血液循环向骨、脑、肝及肾上腺等多个器官发生远处转移, 严重影响患者的预后和生存质量^[15-16]。尽管治疗手段不断进步, 但靶向治疗的耐药性与脱靶效应、免疫检查点抑制剂的低应答率, 以及化疗相关的不良反应^[17-19], 仍是目前制约 NSCLC 患者实现长期生存获益的主要临床挑战。中医理论认为“血瘀”是肿瘤发生、发展及转移的重要病机之一, 这一认识与现代医学关于肿瘤患者普遍存在血液高凝状态相似, 这种病理改变也被认为是促进肿瘤转移的关键因素^[20]。基于“活血化瘀”的干预策略, 成为抑制肿瘤进展与转移的重要思路。丹参作为临床常用的活血化瘀类抗肿瘤中药, 其多种活性成分展现出明确的抗转移效应^[21]。其中, 作为主要成分之一的丹参酮 II_A 的抗肿瘤作用已在肺癌等多种恶性肿瘤中得到广泛验证^[22-24]; 相比之下, 同为丹参主要活性成分的 SalB, 其在 NSCLC 中的作用及机制仍缺乏系统研究。

殖、侵袭转移的作用。见图 10、表 16。

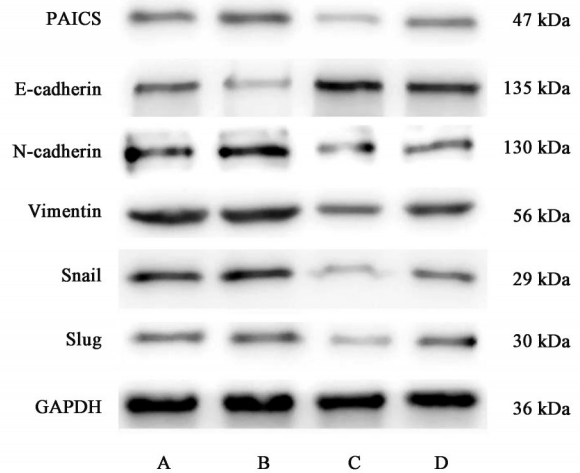


图 10 PAICS 过表达 A549 中 EMT 关键蛋白表达电泳

Fig. 10 Electrophoresis of key EMT markers protein expression in A549 cells following PAICS overexpression

本研究显示, 在体外实验中, CCK-8、EdU 实验表明, SalB 呈浓度依赖性抑制 A549 细胞增殖, 显示出较强的抗肿瘤活性; 在抑制转移方面, 细胞划痕愈合实验和 Transwell 侵袭实验结果表明, SalB 对 A549 细胞迁移和侵袭能力的抑制作用呈浓度依赖性; 此外, 本研究还评估了 SalB 对 A549 细胞周期和凋亡的影响, 结果显示, SalB 呈浓度依赖性阻滞细胞于 G₀/G₁ 期, 并诱导 A549 细胞凋亡, 这与 SalB 在乳腺癌和胃癌中的研究结果一致^[25-26]。此外本研究还评估了 SalB 的安全性, 在细胞实验中高浓度 SalB 对正常支气管上皮细胞活力无明显影响。综上所述, SalB 不仅具有显著的抗 A549 细胞增殖和侵袭的活性, 还具有良好的细胞安全性。

EMT 是驱动肿瘤侵袭转移的关键机制, EMT 程序的激活与肿瘤进展、耐药及免疫抑制密切相关^[27-28]; E-cadherin 表达下调与 Snail、Slug 激活所驱动的间质效应分子协同上调, 构成该过程的核心分子基础^[29-30]。因此, 靶向 EMT 关键节点已成为抑制转移的重要策略。既往研究表明, SalB 在胃癌、乳腺癌及肝癌中可抑制 EMT 并诱导细胞周期阻

滞^[31-32]。与上述研究一致,在本研究中,SalB呈浓度依赖性地抑制A549细胞EMT表型,具体表现为显著抑制Snail、Slug、N-cadherin及Vimentin的表达,并上调E-cadherin。然而SalB调控EMT的上游靶点尚不清楚,本研究整合转录组学与生物信息学分析,发现PAICS在NSCLC中显著高表达,且与不良预后相关,是潜在的促癌基因;更重要的是,转录组学分析显示,PAICS是SalB干预后下调的关键差异基因。通过分子对接预测显示,SalB与PAICS具有较强的结合能力。CETSA结果也显示SalB可显著提高PAICS蛋白在升温过程中的热稳定性。Western blot实验进一步证实,SalB呈浓度依赖性抑制PAICS蛋白表达。因此,PAICS可能是SalB抑制EMT并发挥抗NSCLC效应的关键上游调控分子。

PAICS是嘌呤从头合成中的双功能酶,既往研究提示其在多种肿瘤中异常表达并促进恶性进展,被认为是抗肿瘤治疗的潜在作用靶点^[33-34]。然而,其在NSCLC中是否参与EMT调控尚未完全阐明。本研究首次在NSCLC中证实,PAICS是驱动EMT进程的一个重要调控因子。在机制研究中,笔者通过质粒转染过表达PAICS进行功能挽救实验。结果显示,PAICS过表达能显著增强A549细胞的增殖、迁移、侵袭能力,促进细胞周期进展并抑制凋亡;同时,促进EMT关键蛋白(N-cadherin、Vimentin、Snail、Slug)表达,并下调E-cadherin表达。更重要的是,PAICS过表达可部分逆转SalB对上述恶性表型及关键蛋白表达的抑制作用。以上结果表明,PAICS不仅是非小细胞肺癌EMT进程的关键调控因子,也是SalB抑制EMT的关键上游靶点。

综上所述,SalB可通过下调PAICS表达,进而抑制A549细胞EMT进程,发挥抗NSCLC作用。本研究不仅揭示了PAICS在NSCLC中驱动EMT的关键作用,更重要的是首次阐释了SalB通过PAICS抑制NSCLC侵袭转移的核心机制,为NSCLC治疗提供了新靶点,也为SalB作为抑制NSCLC转移的潜在候选药物提供了实验依据。然而,本研究仍存在一定局限性,虽然本研究通过分子对接和CETSA验证了SalB可作用于PAICS,但仍缺乏表面等离子共振(SPR)等直接证据;此外,尽管课题组在细胞水平进行了质粒转染过表达开展了挽救实验,但还未在动物模型层面开展相关验证。后续研究应完善SPR研究,并进一步通过体内实验明确药效及机制研究,以更全面地验证SalB的作用机制和治疗潜力。

[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] CHENG Y, ZHANG T, XU Q. Therapeutic advances in non-small cell lung cancer: Focus on clinical development of targeted therapy and immunotherapy[J]. Med Comm (2020), 2021, 2(4): 692-729.
- [3] FONTANA R, MESTRE-FARRERA A, YANG J. Update on epithelial-mesenchymal plasticity in cancer progression[J]. Annu Rev Pathol, 2024, 19: 133-156.
- [4] XIE S, WU Z, QI Y, et al. The metastasizing mechanisms of lung cancer: Recent advances and therapeutic challenges[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 138: 111450.
- [5] LUO H, VONG C T, CHEN H, et al. Naturally occurring anti-cancer compounds: Shining from Chinese herbal medicine[J]. Chin Med, 2019, 14: 48.
- [6] 周飘, 杜全宇, 王飞. 益气活血类中药复方干预恶性肿瘤血行转移机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(1): 226-233.
ZHOU P, DU Q Y, WANG F. Mechanism of Chinese herbal compounds capable of invigorating Qi and in intervention of hematogenous metastasis of malignant tumors: A review activating blood[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2022, 28(1): 226-233.
- [7] 赵书艺, 尹双双, 王蕊, 等. 活血化瘀药在抗恶性肿瘤转移中的应用探讨[J]. 天津中医药大学学报, 2020, 39(2): 231-236.
ZHAO S Y, YIN S S, WANG R, et al. Exploration on the application of blood-activating and stasis-resolving drugs in combating malignant tumor metastasis[J]. J Tianjin Univ Tradit Chin Med, 2020, 39(2): 231-236.
- [8] 廖江龙, 范子祥, 孟秋月, 等. 丹参活性成分抗肿瘤分子机制研究进展[J]. 中草药, 2024, 55(18): 6402-6415.
LIAO J L, FAN Z X, MENG Q Y, et al. Research progress on antitumor molecular mechanism of active ingredient in *Salvia miltiorrhiza*[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(18): 6402-6415.
- [9] 郭嘉宁, 倪晓晨, 张开源, 等. 丹参及其活性成分抗结肠癌分子机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2026, 32(4): 307-314.
GUO J N, NI X C, ZHANG K Y, et al. Research progress on molecular mechanisms of *Salvia miltiorrhiza* and its active ingredients against colorectal cancer: A review[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2026, 32(4): 307-314.
- [10] CHANDA W, MIYANDA P M, KAMVUMA K, et al. Salvianolic acid B in cancer therapy: Pharmacokinetic profile, anticancer mechanisms and translational potential[J]. Med Oncol, 2025, 42(8): 347.

- [11] IANNI A, RUGGERI P, BELLIO P, et al. Salvianolic acid B strikes back: New evidence in the modulation of expression and activity of matrix metalloproteinase 9 in MDA-MB-231 human breast cancer cells [J]. *Molecules*, 2022, 27 (23) : 8514.
- [12] XU W, SHI Z, YU X, et al. Salvianolic acid B exerts an anti-hepatocellular carcinoma effect by regulating the Hippo/YAP pathway and promoting pSmad3L to pSmad3C simultaneously [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 939: 175423.
- [13] AGARWAL S, CHAKRAVARTHI B, BEHRING M, et al. PAICS, a purine nucleotide metabolic enzyme, is involved in tumor growth and the metastasis of colorectal cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(4):772.
- [14] LANG L, TAO J, YANG C, et al. Tumor suppressive role of microRNA-4731-5p in breast cancer through reduction of PAICS-induced FAK phosphorylation [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1):154.
- [15] NI L, LIU Z, XIANG L, et al. Comprehensive evaluation of risk factors for LNM and distant metastasis in patients with NSCLC [J]. *Sci Rep*, 2025, 15(1):30809.
- [16] ZHANG Y, CHEN M, FANG X, et al. Progression and metastasis of lung cancer: Clinical features, molecular mechanisms, and clinical managements [J]. *Med Comm*, 2025, 6(12):e70477.
- [17] NAGASAKI J, ISHINO T, TOGASHI Y. Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors [J]. *Cancer Sci*, 2022, 113(10):3303-3312.
- [18] PASSARO A, BRAHMER J, ANTONIA S, et al. Managing resistance to immune checkpoint inhibitors in lung cancer: Treatment and novel strategies [J]. *J Clin Oncol*, 2022, 40(6) : 598-610.
- [19] JUTHANI R, PUNATAR S, MITTRA I. New light on chemotherapy toxicity and its prevention [J]. *BJC Rep*, 2024, 2(1):41.
- [20] 姚舒宁, 孙婉婷, 陈珍雨, 等. 恶性肿瘤所致高凝状态的病理机制与中西医防治研究 [J]. *中草药*, 2025, 56(21) : 8005-8014.
- YAO S N, SUN W T, CHEN Z Y, et al. Pathogenesis and management strategies of hypercoagulable state in malignant tumors: Integrating traditional Chinese and western medicine [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2025, 56(21): 8005-8014.
- [21] HUANG J, ZHANG J, SUN C, et al. Adjuvant role of *Salvia miltiorrhiza* Bunge in cancer chemotherapy: A review of its bioactive components, health-promotion effect and mechanisms [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 318 (Pt B) : 117022.
- [22] ZHANG L, XU C, HUANG J, et al. Tanshinone II_A reverses gefitinib resistance in EGFR-mutant lung cancer via inhibition of SREBP1-mediated lipogenesis [J]. *Phytother Res*, 2024, 38 (3) : 1574-1588.
- [23] ZHANG Y Z, LAI H L, HUANG C, et al. Tanshinone II_A induces ER stress and JNK activation to inhibit tumor growth and enhance anti-PD-1 immunotherapy in non-small cell lung cancer [J]. *Phytomedicine*, 2024, 128: 155431.
- [24] LI X, JIA Q, ZHOU Y, et al. Tanshinone II_A attenuates the stemness of breast cancer cells via targeting the miR-125b/STARD13 axis [J]. *Exp Hematol Oncol*, 2022, 11(1):2.
- [25] KATARY M A, ABDELSAYED R, ALHASHIM A, et al. Salvianolic acid B slows the progression of breast cancer cell growth via enhancement of apoptosis and reduction of oxidative stress, inflammation, and angiogenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(22):5653.
- [26] CHEN B, HUANG C, ZHANG Y, et al. *Salvia bowleyana* Dunn root is a novel source of salvianolic acid B and displays antitumor effects against gastric cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2020, 20(1):817-827.
- [27] SHIBUE T, WEINBERG R A. EMT, CSCs, and drug resistance: The mechanistic link and clinical implications [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14(10) : 611-629.
- [28] XU Z, ZHANG Y, DAI H, et al. Epithelial-mesenchymal transition-mediated tumor therapeutic resistance [J]. *Molecules*, 2022, 27(15):4750.
- [29] DEBNATH P, HUIREM R S, DUTTA P, et al. Epithelial-mesenchymal transition and its transcription factors [J]. *Biosci Rep*, 2022, 42(1):BSR20211754.
- [30] TOMECKA P, KUNACHOWICZ D, GÓRCZYŃSKA J, et al. Factors determining epithelial-mesenchymal transition in cancer progression [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(16) : 8972.
- [31] WANG J, MA Y, GUO M, et al. Salvianolic acid B suppresses EMT and apoptosis to lessen drug resistance through Akt/mTOR in gastric cancer cells [J]. *Cytotechnology*, 2021, 73 (1) : 49-61.
- [32] TENG M, HU C, YANG B, et al. Salvianolic acid B targets mortalin and inhibits the migration and invasion of hepatocellular carcinoma via the RECK/STAT3 pathway [J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1):654.
- [33] HUO A, XIONG X. PAICS as a potential target for cancer therapy linking purine biosynthesis to cancer progression [J]. *Life Sci*, 2023, 331: 122070.
- [34] HUANG N, XU C, DENG L, et al. PAICS contributes to gastric carcinogenesis and participates in DNA damage response by interacting with histone deacetylase 1/2 [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(7):507.

[责任编辑 张丰丰]