

异泽兰黄素通过EZH2/H3k27me3信号通路抑制非小细胞肺癌增殖和侵袭转移

徐波^{1,2}, 余贻汉³, 胡林凌^{3,4}, 江波³, 齐渝⁴, 袁沙沙¹, 范艺龄¹, 张继先^{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:探讨异泽兰黄素(Eup)通过zeste基因增强子同源物2/组蛋白H3第27位赖氨酸三甲基化(EZH2/H3k27me3)信号通路抑制非小细胞肺癌(NSCLC)增殖和侵袭转移的机制。方法:体内实验中通过构建H1299裸鼠皮下成瘤动物模型,评估Eup在体内的抗NSCLC的作用,并采用免疫组化(IHC-P)和检测增殖及侵袭转移相关蛋白:增殖细胞核抗原(PCNA)、基质金属蛋白酶(MMP)-2和MMP-9及血管内皮生长因子A(VEGFA)表达的影响。体外细胞实验中,采用细胞增殖与活性检测法(CCK-8)检测不同浓度Eup(0~200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)干预下H1299细胞的活性,筛选合适药物浓度。通过平板克隆、5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EdU)检测Eup对H1299细胞增殖的影响;通过划痕实验、侵袭实验评估Eup对H1299细胞迁移、侵袭的影响;通过人脐静脉内皮细胞(HUVEC)血管生成实验评估Eup对血管生成的影响;运用转录组学筛选Eup对H1299细胞的作用靶点和探究其主要功能,并进行分子对接及分子动力学模拟预测药物分子Eup与作用靶点之间的结合能力及结合状态;采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测Eup对EZH2/H3K27me3信号通路蛋白及增殖、侵袭转移相关蛋白PCNA、MMP-2、MMP-9及VEGFA表达的影响。结果:在裸鼠皮下成瘤动物模型中,与模型组比较,Eup干预组呈剂量依赖性抑制H1299细胞异种移植瘤体生长,且抑瘤率显著升高($P<0.05$);IHC-P结果显示,与模型组比较,Eup高剂量组在体内显著抑制了体内PCNA、MMP-2、MMP-9和VEGFA蛋白的表达($P<0.05$)。在体外细胞实验中,与空白组比较,Eup干预组呈浓度依赖性地抑制NSCLC细胞的增殖、侵袭和转移;进一步通过转录组学分析显示与空白组比较,Eup干预组可显著下调EZH2的表达且作用功能与抑制肿瘤转移相关。分子对接和分子动力学模拟也显示出药物小分子与EZH2具有较强的结合能力及结合的稳定性较好。Western blot检测显示与模型组比较,Eup干预组在体内外呈剂量依赖性显著抑制通路蛋白EZH2、H3K27me3及增殖、侵袭转移相关蛋白PCNA、MMP-2、MMP-9及VEGFA表达($P<0.05$),在体外细胞实验中,与空白组比较质粒转染过表达EZH2可部分逆转Eup对H1299细胞中增殖及侵袭转移关键蛋白的抑制作用。结论:Eup在体内外均可有效抑制H1299细胞增殖、迁移和侵袭,其机制可能与抑制EZH2/H3K27me3信号通路并抑制增殖及侵袭转移相关蛋白PCNA、MMP-2、MMP-9、VEGFA的表达有关;异泽兰黄素可能是抑制NSCLC增殖及侵袭转移的潜在活性药物。

[关键词] 非小细胞肺癌; 异泽兰黄素; zeste基因增强子同源物2/组蛋白H3第27位赖氨酸三甲基化(EZH2/H3k27me3)信号通路; 增殖; 侵袭转移

[中图分类号] R256;R563;R285 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2026)10-0058-12

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20251722

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.r.20250730.1026.001>

[网络出版日期] 2025-07-31 08:43:10 [增强出版附件] 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>



Eupatilin Inhibits Proliferation, Invasion, and Metastasis of Non-small Cell Lung Cancer via EZH2/H3K27me3 Signaling Pathway

XU Bo^{1,2}, YU Yihan³, HU Linling^{3,4}, JIANG Bo³, QI Yu⁴, YUAN Shasha¹, FAN Yiling¹,
ZHANG Jixian^{3*}, MIAO Qing¹

[收稿日期] 2025-06-20

[基金项目] 湖北省中医药管理局重点项目(ZY2023Z003);中国中医科学院西苑医院名老中医药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] *张继先,硕士,主任医师,从事中医药防治肺系疾病研究,E-mail:jxzhang1607@163.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

- (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 mechanisms by which eupatilin (Eup) inhibits proliferation, invasion, and metastasis of non-small cell lung cancer (NSCLC) through the enhancer of zeste homolog 2/histone H3 lysine 27 trimethylation (EZH2/H3K27me3) signaling pathway. **Methods:** *In vivo*, a subcutaneous xenograft tumor model was established in nude mice using H1299 cells to evaluate the anti-NSCLC effects of Eup. Immunohistochemistry (IHC-P) was used to detect the expression of proliferation- and invasion/metastasis-related proteins, including proliferating cell nuclear antigen (PCNA), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), and vascular endothelial growth factor A (VEGFA). *In vitro*, cell counting kit-8 (CCK-8) assays were performed to determine the viability of H1299 cells treated with different concentrations of Eup (0-200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and to select appropriate concentrations. Colony formation and 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) assays were used to evaluate cell proliferation. Wound healing and invasion assays were conducted to assess cell migration and invasion. Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) angiogenesis assays were used to evaluate the effects of Eup on angiogenesis. Transcriptomic analysis was performed to identify the targets of Eup in H1299 cells and to explore its major functions. Molecular docking and molecular dynamics simulations were conducted to predict the binding affinity and interaction stability between Eup and its target proteins. Western blot was used to detect the effects of Eup on the expression levels of EZH2/H3K27me3 pathway-related proteins and proliferation- and invasion/metastasis-related proteins, including PCNA, MMP-2, MMP-9, and VEGFA. **Results:** In the subcutaneous xenograft model, compared with the model group, Eup treatment dose-dependently inhibited the growth of H1299 xenograft tumors, and the tumor inhibition rate was significantly increased ($P<0.05$). IHC-P results showed that, compared with the model group, high-dose Eup significantly reduced the expression levels of PCNA, MMP-2, MMP-9, and VEGFA *in vivo* ($P<0.05$). *In vitro*, compared with the control group, Eup inhibited the proliferation, invasion, and metastasis of NSCLC cells in a concentration-dependent manner. Transcriptomic analysis further showed that, compared with the control group, Eup significantly downregulated EZH2 expression, and its functional effects were associated with inhibition of tumor metastasis. Molecular docking and molecular dynamics simulations indicated that Eup exhibited strong binding affinity with EZH2 and stable interactions. Western blot results demonstrated that, compared with the model group, Eup significantly inhibited, in a dose-dependent manner, the expression levels of EZH2, H3K27me3, and proliferation- and invasion/metastasis-related proteins (PCNA, MMP-2, MMP-9, and VEGFA) in both *in vivo* and *in vitro* experiments ($P<0.05$). *In vitro*, compared with the control group, overexpression of EZH2 via plasmid transfection partially reversed the inhibitory effects of Eup on the expression of key proteins involved in proliferation and invasion/metastasis in H1299 cells. **Conclusion:** Eup effectively inhibits the proliferation, migration, and invasion of H1299 cells both *in vivo* and *in vitro*. The underlying mechanism may be related to inhibition of the EZH2/H3K27me3 signaling pathway and downregulation of proliferation- and invasion/metastasis-related proteins, including PCNA, MMP-2, MMP-9, and VEGFA. Eup may serve as a potential therapeutic agent for suppressing proliferation and invasion/metastasis in NSCLC.

[Keywords] non-small cell lung cancer; eupatilin; enhancer of zeste homolog 2/histone H3 lysine 27 trimethylation (EZH2/H3K27me3) signaling pathway; proliferation; invasion and metastasis

肺癌是我国及世界范围内发病率和死亡率较高的恶性肿瘤之一^[1-2]。在肺癌的组织学类型中,约85%为非小细胞肺癌(NSCLC)^[3]。肿瘤转移是导致大多数肺癌患者死亡的关键因素,调查显示60%~75%肺癌患者初诊时即已进展至局部晚期(Ⅲ期)或转移阶段(Ⅳ期),其中33%~40%的发生肝转移,15%~43%发展为脑转移,19%~33%发生骨转移,晚期患者5年生存率不足20%^[4]。尽管近年来NSCLC的治疗策略不断丰富,靶向治疗、免疫治疗等新型疗法的应用取得了一定进展,但由于存在不良反应较多、药物毒性大及易耐药的缺点,肺癌治疗效果仍不太理想^[5]。因此,寻找能够有效抑制

肺癌进展的新型治疗药物,并深入阐明其作用机制,已成为当前肺癌治疗研究的重要方向。近年来,中药凭借低毒性、不良反应较小和多靶点优势,在肺癌的防治领域越来越受到关注。传统中药艾叶具有温经止血、散寒止痛的功效,现代医学研究显示,其主要成分异泽兰黄素(Eup)具有抗菌、抗炎和抗氧化等多种作用,同时也在肾癌、黑色素中显示出一定的抗肿瘤效果^[6-7],但在肺癌中的作用及机制尚未见报道。zeste基因增强子同源物2(EZH2)是多梳抑制复合体2(PRC2复合体)的核心催化亚基,通过催化组蛋白H3第27位赖氨酸的三甲基化(H3K27me3)修饰参与表观遗传调控,在多种肿瘤

的增殖、侵袭和转移中起关键作用^[8]。研究表明, EZH2通过催化H3K27三甲基化, 沉默E-钙黏蛋白(E-cadherin)、磷酸酶及张力蛋白同源物(PTEN)等基因, 并上调基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9表达, 增强基质降解, 促进肿瘤细胞侵袭和转移; 同时, EZH2还可调控增殖细胞核抗原(PCNA)、血管内皮生长因子A(VEGFA)等因子, 促进肿瘤生长与转移^[9-10]。因此, 靶向EZH2/H3K27me3信号通路可能为抑制肿瘤进展提供新的治疗策略。然而, 目前尚无报道研究证实Eup是否通过调节EZH2/H3K27me3信号通路来抑制NSCLC的增殖和侵袭转移。本研究通过构建裸鼠皮下成瘤模型, 并结合体外细胞增殖与活性检测(CCK-8)法、划痕和Transwell侵袭实验, 首次评估了Eup对NSCLC增殖与侵袭转移的影响。同时, 结合转录组学、分子对接、分子动力学模拟及质粒转染实验, 探讨了Eup与EZH2/H3K27me3信号通路的潜在关系。研究旨在阐明Eup抗NSCLC的作用机制, 以期为中医药防治肺癌提供新的理论依据和研究方向。

1 材料

1.1 动物 共计30只SPF级BALB/c-nu裸鼠(4周龄, 体质量18~22 g), 由湖北武汉鼠来宝生物科技有限公司提供, 合格证号SCXK(京)2021-006。实验动物饲养环境符合SPF级实验小鼠饲养标准, 室温控制在18~24℃, 相对湿度为50%~60%, 光照与黑暗各12 h, 自由饮食与饮水。

1.2 伦理 所有动物实验方案按照《ARRIVE动物研究声明指南》进行操作, 经湖北武汉守正生物科技有限公司动物福利伦理审查委员会批准(伦理编号2024071601)。

1.3 细胞株 NSCLC细胞系(H1299, 批号CL-0165)、人脐静脉内皮细胞(HUVEC, 批号CL-0675)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。上述细胞呈对数生长后进行实验, 其中H1299细胞使用代次控制在第5~20代, HUVEC使用代次为第3~6代。

1.4 药品与试剂 Eup(成都仪捷睿生物科技有限公司, 批号YRY036-230901, 纯度≥98%, 1 g); 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); 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); 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(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, 批号分别为C0078S、C1026、C0371-1ml、C0121-100ml、FFN08、P0252); EZH2、VEGFA、免疫球蛋白G(IgG)二抗(上海埃必威生物科技有限公司, 批号分别为CY5984、CY8481、AB0101); H3K27me3、MMP-2、MMP-9、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)(Abclonal, 批号分别为A22006、A19080、A11521、A19056); 组蛋白(H3)、PCNA抗体[艾博抗(上海)贸易有限公司, 批号分别为AB1791、AB92552]; 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)。

1.5 仪器 HFsafe-12CY型细胞培养超净台生物安全柜(力康生物医疗科技控股有限公司); 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)。

2 方法

2.1 动物皮下植瘤模型 BALB/c-nu裸鼠(4~6周龄, 30只), 适应性喂养1周后皮下接种H1299细胞。取对数生长期的H1299细胞, 待培养皿中细胞密度达到70%~80%时, 弃去原培养基, 用PBS清洗细胞2次, 随后采用胰酶消化并离心。用PBS重悬细胞并进行计数, 调整细胞密度至 4.5×10^6 个/mL, 然后将细胞悬液接种于裸鼠右侧前肢腋下。自接种之日起, 每日观察裸鼠的状态及成瘤情况。接种约1周后, 待肿瘤生长至平均体积约100 mm³时^[11], 将裸鼠随机分为5组, 分别为模型组、顺铂(CDDP)组、Eup低、中、高剂量组, 每组6只。各组给药方式如下: 模型组每日给予0.2 mL生理盐水, 腹腔注射1次/d; CDDP组为CDDP 2 mg·kg⁻¹, 腹腔注射1次/2 d; Eup低剂量组为Eup 50 mg·kg⁻¹, 腹腔注射1次/d; Eup中

剂量组为 Eup 100 mg·kg⁻¹,腹腔注射 1 次/d; Eup 高剂量组为 Eup 150 mg·kg⁻¹,腹腔注射 1 次/d。整个给药过程持续 14 d。在实验期间,每日常规监测裸鼠的活动量、饮食及精神状态,每 3 天用游标卡尺测量肿瘤长径(a)和短径(b),根据公式 $V=a \times b^2/2$ 计算裸鼠肿瘤体积,给药 14 d 后,老鼠颈椎脱臼法处死,剥取移植瘤进行拍照、称质量并计算抑瘤率。

2.2 EdU 体内标记法检测肿瘤细胞增殖 取材前,向模型组、CDDP 组和 Eup 高剂量组荷瘤裸鼠瘤体注射 EdU 溶液,让 EdU 在体内被活跃分裂的细胞摄取并整合到 DNA 中,标记 2 h 后取材制样,处死小鼠,取出肿瘤组织,固定、切片,使用 EdU 试剂盒对切片进行荧光标记,用荧光显微镜观察并拍照,运用 Image J 软件统计阳性细胞数。

2.3 免疫组化法检测移植瘤组织中 PCNA 及 MMP-2、MMP-9、VEGFA 蛋白的表达 取裸鼠皮下移植瘤模型的肿瘤组织进行石蜡包埋切片,常规脱蜡至水。采用 3% 过氧化氢(H₂O₂)室温孵育 30 min,以阻断内源性过氧化物酶活性。随后加入 3% 牛血清白蛋白(BSA)封闭液,室温封闭 1 h。滴加 PCNA (1: 300)、MMP-2 (1: 200)、MMP-9 (1: 200)、VEGFA (1: 200)一抗,4 ℃孵育过夜。次日,切片经 PBS 洗涤后加入生物素标记的羊抗兔 IgG(H+L)(1: 1 000)二抗,室温孵育 1 h。使用 3, 3'-二氨基联苯胺(DAB)显色系统显色,并以苏木素复染细胞核。最后在光学显微镜下观察并采集图像。

2.4 细胞培养 将 H1299 细胞复苏后,使用 DMEM 培养基(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。

2.5 CCK-8 法检测细胞存活率 将处于对数生长期的 H1299 细胞分别以 4×10⁴ 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。Eup 的浓度分别为 10、20、40、60、80、100、120、150、180、200 μmol·L⁻¹,空白孔组加入等量的培养基,每组 6 个复孔,置于 37 ℃、5%CO₂ 饱和度环境下分别培养 24、48、72 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(IC₅₀)值。

2.6 细胞分组及质粒转染 通过 CCK-8 实验筛选 Eup 最佳浓度,使用 DMSO 配置 Eup 的母液浓度为 50 mmol·L⁻¹。在正向实验中将细胞分组为空白组(2.4% DMSO),Eup 低、中、高浓度组(Eup 浓度分别为 40、80、120 μmol·L⁻¹);在机制挽救实验中,将细胞分为空载组、EZH2 过表达组、空载+Eup 高浓度组、EZH2 过表达+Eup 高浓度组。使用 Opti-MEM 和 Lipofectamine 3000 转染试剂对细胞进行转染。H1299 细胞转染 3 000 μg·L⁻¹ 的 pcDNA3.1 (+)-EZH2 表达载体和 3 000 μg·L⁻¹ 的 pcDNA3.1 (+)-对照载体。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。所有组别中 DMSO 浓度最高为 2.4%,均不超过 3%。

2.7 EdU 细胞增殖实验 将处于对数生长期的 H1299 细胞分别以 1×10⁵ 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。

2.8 平板克隆实验 将处于对数生长期的 H1299 细胞分别以 2×10⁵ 个/mL 的密度接种于 6 孔板中,每孔 2 mL,培养 24 h 后,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并对各组细胞进行计数,以 600 个/mL 的密度将细胞均匀地接种在 12 孔板上,每孔 1 mL,每组 3 个复孔,置于 37 ℃、5%CO₂ 饱和度环境下培养,14 d 后终止培养。每孔加入 500 μL 多聚甲醛固定 20 min 后使用 PBS 清洗一遍,每孔加入结晶紫染液 500 μL 染色 15 min 后,加入 PBS 轻轻冲洗 2 次,开盖晾干。拍照并计算各组细胞克隆数量。

2.9 划痕实验 将处于对数生长期的 H1299 细胞分别以 1×10⁵ 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培养 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。随后更换为含不同浓度 Eup (40、80、120 μmol·L⁻¹) 及空白组(1.2% DMSO)、并含 5% FBS 的新鲜培养基,继续培养。分别在划痕后 0、24 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。

2.10 Transwell 侵袭实验 将处于对数生长期的H1299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 μ L,上室加入预冷基质胶100 μ L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 μ L),于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂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。

2.11 血管生成实验 将H1299细胞在6孔板中培养过夜后,进行分组干预48 h,离心收集上清液,获得条件培养基。将HUVECs细胞用不同的条件培养基重悬于100 μ L体积中,并以每孔 3×10^4 个细胞的密度接种于Matrigel包被的96孔板中,继续培养10 h后。在倒置显微镜下拍摄图像,观察HUVECs的血管生成情况,通过Image J软件统计血管连接点个数、血管分支点个数及血管总长度。

2.12 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 $|FC| > 1.6$ 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。

2.13 分子对接 通过蛋白结构数据库检索得到其蛋白结构,去除小分子和水等多余结构后,使用MGLTools 1.5.7将其转换为pdbqt文件。下载小分子结构文件,使用MGLTools将其处理成pdbqt文件。构建对接盒子,使得对接盒子包含整个蛋白。使用Autodock Vina 1.1.2对小分子和蛋白进行对接。

2.14 分子动力学模拟(MD) MD采用Gromacs2022程序,小分子采用GAFF力场,蛋白采用AMBER14SB力场和TIP3P水模型,合并蛋白和小分子配体的文件,构建复合物的模拟体系。在恒温恒压以及周期性边界条件下进行。在MD模拟过

程中,所有涉及氢键采用LINCS算法进行约束,积分步长为2 fs。静电相互作用采用(PME)方法计算,截断值设为1.2 nm。非键相互作用截断值设为10 $\text{\AA}$,每10步更新1次。采用V-rescale温度耦合方法控制模拟温度为298 K,采用Berendsen方法控制压力为1 bar。在298 K下,进行100 ps的正则系综(NVT)与等温等压系综(NPT)平衡模拟,并对复合体系进行100 ns的MD模拟,每10 ps保存1次构象。模拟完成后,使用VMD和PyMOL对模拟轨迹进行分析,使用g_mmpbsa程序对蛋白和小分子配体之间进行MMPBSA结合自由能分析。

2.15 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 EZH2/H3k27me3 信号通路相关蛋白在瘤体组织及细胞中的表达 将处于对数生长期的H1299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;在动物实验中,取裸鼠的瘤体组织,加入RIPA裂解液进行低温研磨。蛋白定量法(BCA)测定细胞和动物样本中蛋白浓度。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EZH2、H3、H3k27me3、MMP-2、MMP-9、VEGFA、PCNA(1:1 000),GAPDH(1:3 500),随后于4 $^{\circ}$ C孵育过夜。次日,TBST洗膜3次,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗,按1:10 000比例稀释于含5%脱脂奶粉的TBST中,室温孵育1 h。再次洗膜3次后,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。

2.16 统计学方法 使用GraphPad软件计算IC₅₀值,采用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, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 Eup对H1299细胞在裸鼠皮下异种移植瘤生长的影响 与模型组比较,Eup各剂量组及CDDP组的肿瘤生长速度均显著降低($P < 0.01$)。观察皮下移植瘤并结合瘤质量数据分析表明,与模型组比较,Eup干预组的瘤体体积均明显缩小($P < 0.05$, $P < 0.01$),Eup中、高剂量组裸鼠皮下肿瘤体积显缩小最为显著,

其抑瘤率显著升高($P<0.01$)。此外,在整个实验过程中,Eup低、中、高剂量组小鼠体重变化平稳,未见明显波动,表明该药物在实验剂量范围内系统毒性较低,具有较好的耐受性。见表1-表3、图1。

表1 Eup对小鼠肿瘤体积的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Effect of Eup on tumor volume of mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	肿瘤体积/ mm^3					
		0 d	3 d	6 d	9 d	12 d	14 d
模型组		86.86 $\pm$ 8.16	163.75 $\pm$ 17.78	312.18 $\pm$ 13.43	493.00 $\pm$ 63.33	703.78 $\pm$ 100.64	1 777.60 $\pm$ 186.28
CDDP组	2	87.57 $\pm$ 4.16	117.02 $\pm$ 7.20 ²⁾	205.07 $\pm$ 9.86 ²⁾	275.63 $\pm$ 23.30 ²⁾	362.27 $\pm$ 12.22 ²⁾	639.41 $\pm$ 105.48 ²⁾
Eup低剂量组	50	85.84 $\pm$ 0.62	154.22 $\pm$ 7.52	282.03 $\pm$ 9.48 ¹⁾	402.53 $\pm$ 47.90 ²⁾	600.03 $\pm$ 93.14 ¹⁾	1 588.38 $\pm$ 54.55 ¹⁾
Eup中剂量组	100	93.22 $\pm$ 0.70	141.92 $\pm$ 13.21	217.85 $\pm$ 9.63 ²⁾	315.88 $\pm$ 48.67 ²⁾	480.77 $\pm$ 61.09 ²⁾	1 319.25 $\pm$ 111.74 ²⁾
Eup高剂量组	150	84.87 $\pm$ 4.63	110.73 $\pm$ 13.66 ²⁾	168.97 $\pm$ 40.46 ²⁾	275.37 $\pm$ 41.01 ²⁾	354.08 $\pm$ 81.69 ²⁾	1 102.53 $\pm$ 198.48 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ (表2-表13同)

表2 Eup对小鼠体质量的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of Eup on tumor weight of mice in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	小鼠体质量/g					
		0 d	3 d	6 d	9 d	12 d	14 d
模型组		19.30 $\pm$ 0.32	19.38 $\pm$ 0.45	19.62 $\pm$ 0.34	20.13 $\pm$ 0.14	20.28 $\pm$ 0.15	20.43 $\pm$ 0.16
CDDP组	2	19.22 $\pm$ 0.55	19.45 $\pm$ 0.55	19.60 $\pm$ 0.30	19.88 $\pm$ 0.38	20.18 $\pm$ 0.13	20.35 $\pm$ 0.08
Eup低剂量组	50	19.12 $\pm$ 0.31	19.35 $\pm$ 0.38	19.68 $\pm$ 0.34	19.90 $\pm$ 0.35	20.13 $\pm$ 0.16	20.40 $\pm$ 0.09
Eup中剂量组	100	19.28 $\pm$ 0.38	19.58 $\pm$ 0.35	19.65 $\pm$ 0.32	19.93 $\pm$ 0.31	20.13 $\pm$ 0.24	20.37 $\pm$ 0.08
Eup高剂量组	150	19.27 $\pm$ 0.50	19.53 $\pm$ 0.42	19.62 $\pm$ 0.31	20.03 $\pm$ 0.47	20.17 $\pm$ 0.15	20.37 $\pm$ 0.12

表3 Eup对小鼠肿瘤质量及抑瘤率的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Eup on tumor weights and tumor inhibition rates of mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

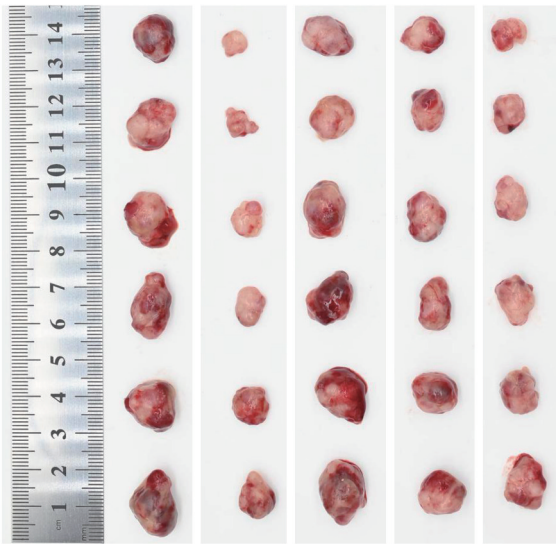
组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	肿瘤质量/g	抑瘤率/%
模型组		0.97 $\pm$ 0.13	—
CDDP组	2	0.26 $\pm$ 0.14 ²⁾	72.59 $\pm$ 13.95 ²⁾
Eup低剂量组	50	0.77 $\pm$ 0.10 ¹⁾	20.52 $\pm$ 10.10 ²⁾
Eup中剂量组	100	0.59 $\pm$ 0.15 ²⁾	38.97 $\pm$ 15.40 ²⁾
Eup高剂量组	150	0.43 $\pm$ 0.11 ²⁾	55.34 $\pm$ 11.23 ²⁾

3.2 Eup对裸鼠皮下瘤体肺癌细胞增殖的影响

与模型组比较,CDDP组和Eup高剂量组EdU阳性细胞数量均显著减少($P<0.01$),表明Eup在裸鼠体内可显著抑制肺癌细胞增殖。见表4、图2。

3.3 Eup对细胞增殖和侵袭相关蛋白表达的影响

在裸鼠肿瘤组织中,模型组小鼠瘤体组织中PCNA、MMP-2、MMP-9和VEGFA蛋白表达较强,阳性信号呈棕黄色,主要定位于细胞核、细胞质及细胞膜中;与模型组比较,Eup高剂量组中PCNA、MMP-2、MMP-9和VEGFA蛋白表达显著下调($P<0.01$),阳性细胞比例显著减少($P<0.01$),染色强度显著降低($P<0.01$),提示Eup可能通过抑制增殖和侵袭相关蛋白PCNA、MMP-2、MMP-9、VEGFA的表达在体内发挥抗肿瘤作用。见图3、表5。



A B C D E

注:A.模型组;B.CDDP组;C.Eup低剂量组;D.Eup中剂量组;E.Eup高剂量组

图1 Eup对各组裸鼠肿瘤体积的影响

Fig.1 Effect of Eup on tumor volumes in different treatment groups of nude mice

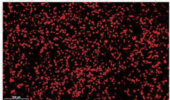
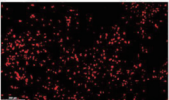
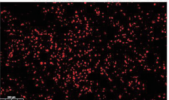
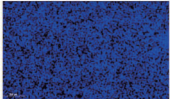
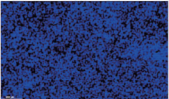
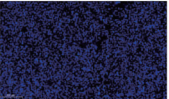
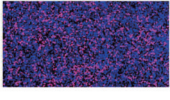
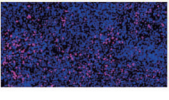
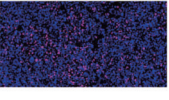
3.4 Eup对H1299细胞增殖的影响

与空白组比较,Eup干预组随着Eup浓度的逐渐升高及干预时间的延长,细胞活性呈明显下降趋势($P<0.05$,

表4 Eup在裸鼠体内对肺癌细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Eup on lung cancer cell proliferation in nude mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	增殖率/%
模型组		46.13 $\pm$ 1.01
CDDP组	2	20.21 $\pm$ 0.82 ²⁾
Eup高剂量组	150	30.22 $\pm$ 0.89 ²⁾

EdU			
Hoechst			
Merge			
	A	B	C

注:A.模型组;B.CDDP组;C.Eup高剂量组

图2 Eup在裸鼠体内对肺癌细胞增殖的影响(倒置荧光显微镜, $\times 100$)

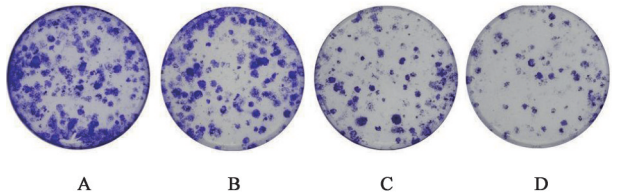
Fig. 2 Effect of Eup on lung cancer cell proliferation in nude mice (inverted fluorescence microscope, $\times 100$)

$P<0.01$)。计算Eup干预H1299细胞48 h后的 IC_{50} 为 $123.6\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,根据上述结果,设定0、40、80、 $120\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为后续实验给药浓度,干预时间为

表5 Eup对细胞PCNA、MMP-2、MMP-9和VEGFA蛋白阳性细胞的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Eup on PCNA, MMP-2, MMP-9, VEGFA expression of positive cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	PCNA	MMP-2	MMP-9	VEGFA
模型组		20.32 $\pm$ 1.30	23.02 $\pm$ 1.61	13.68 $\pm$ 1.50	27.15 $\pm$ 1.30
Eup高剂量组	150	11.36 $\pm$ 2.36 ²⁾	9.57 $\pm$ 0.66 ²⁾	8.57 $\pm$ 0.90 ²⁾	13.73 $\pm$ 1.46 ²⁾

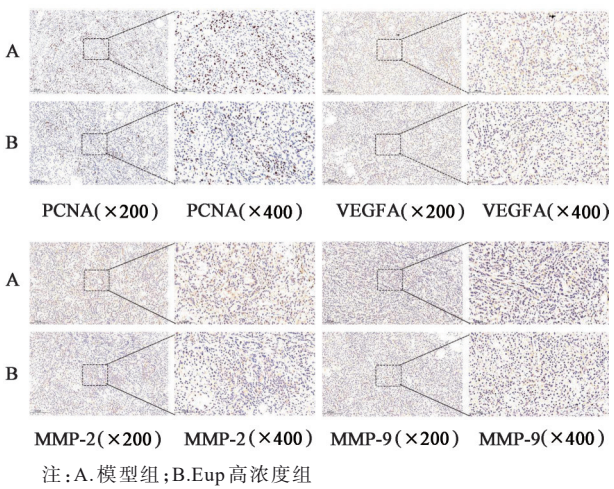


注:A.空白组;B.Eup低浓度组;C.Eup中浓度组;D.Eup高浓度组(图5、图10同)

图4 Eup对H1299细胞克隆形成的影响(结晶紫, $\times 100$)

Fig. 4 Effect of Eup on clonogenic ability of H1299 cells (crystal violet, $\times 100$)

3.5 Eup对H1299细胞迁移、侵袭和血管形成的影响 在给予Eup处理24 h和48 h后,与空白组比较,Eup呈浓度和时间依赖性抑制H1299细胞的迁移率($P<0.01$);在Transwell侵袭实验中,与空白组比较,随着Eup浓度的增加,侵袭至小室下膜的H1299细胞数量明显减少,其中以 $120\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度作用最



注:A.模型组;B.Eup高浓度组

图3 Eup对细胞增殖和侵袭相关蛋白表达的影响(免疫组化)

Fig. 3 Eup suppressed expression of proliferation-and invasion related proteins in xenograft tumor tissues (IHC)

48 h。在平板克隆实验中,与模型组比较,40、80、 $120\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Eup组的集落形成能力受到显著抑制,差异具有统计学意义($P<0.01$);在Edu实验中,非小细胞肺癌H1299细胞的增殖能力在40、80、 $120\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Eup的作用下均受到显著抑制,差异具有统计学意义($P<0.01$)。上述结果表明,Eup在体外可呈浓度依赖性抑制H1299细胞的增殖。见图4、图5、表6-表8。

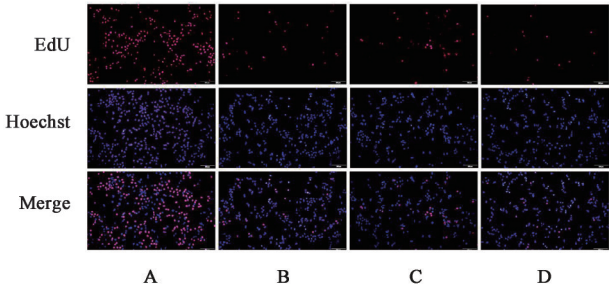


图5 Eup对H1299细胞增殖的影响(倒置荧光显微镜, $\times 100$)

Fig. 5 Effect of Eup on proliferation ability of H1299 cells (inverted fluorescence microscope, $\times 100$)

为显著($P<0.01$);在血管形成实验中,与空白组比较,Eup呈浓度依赖性显著抑制HUVEC细胞血管连接点数量、血管分支数量及血管的总长度($P<0.05$, $P<0.01$)。上述结果表明,Eup呈浓度依赖性抑制NSCLC细胞迁移、侵袭和HUVEC细胞血管形成。

表6 Eup对H1299细胞活性的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 6 Effect of Eup on viability of H1299 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	72 h
空白组		100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00
Eup 干预组	10	100.22 $\pm$ 3.29	92.29 $\pm$ 4.57 ¹⁾	74.93 $\pm$ 2.91 ²⁾
	20	96.87 $\pm$ 3.58	87.07 $\pm$ 6.52 ²⁾	66.14 $\pm$ 7.07 ²⁾
	30	94.24 $\pm$ 3.27 ¹⁾	82.58 $\pm$ 7.63 ²⁾	53.06 $\pm$ 4.46 ²⁾
	40	87.57 $\pm$ 4.40 ²⁾	74.60 $\pm$ 4.76 ²⁾	45.07 $\pm$ 6.87 ²⁾
	50	84.61 $\pm$ 3.53 ²⁾	69.35 $\pm$ 4.25 ²⁾	38.84 $\pm$ 2.29 ²⁾
	60	80.73 $\pm$ 3.70 ²⁾	67.56 $\pm$ 4.22 ²⁾	34.18 $\pm$ 2.84 ²⁾
	70	78.10 $\pm$ 3.02 ²⁾	64.34 $\pm$ 4.59 ²⁾	32.28 $\pm$ 1.88 ²⁾
	80	76.71 $\pm$ 3.31 ²⁾	62.76 $\pm$ 4.94 ²⁾	32.15 $\pm$ 2.94 ²⁾
	90	73.44 $\pm$ 3.71 ²⁾	59.65 $\pm$ 7.13 ²⁾	29.72 $\pm$ 3.28 ²⁾
	100	70.19 $\pm$ 4.26 ²⁾	54.81 $\pm$ 4.01 ²⁾	28.49 $\pm$ 3.54 ²⁾
	120	66.89 $\pm$ 4.17 ²⁾	48.70 $\pm$ 8.78 ²⁾	27.44 $\pm$ 3.83 ²⁾
	150	62.00 $\pm$ 5.71 ²⁾	43.85 $\pm$ 6.31 ²⁾	26.59 $\pm$ 3.76 ²⁾
	180	57.20 $\pm$ 4.69 ²⁾	36.72 $\pm$ 4.60 ²⁾	23.77 $\pm$ 3.59 ²⁾
	200	54.57 $\pm$ 3.30 ²⁾	36.52 $\pm$ 4.51 ²⁾	21.06 $\pm$ 4.99 ²⁾

表7 Eup对H1299细胞克隆形成的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of Eup on clonogenic ability of H1299 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	克隆数/个
空白组		463.67 $\pm$ 7.51
Eup 低浓度组	40	360.33 $\pm$ 5.86 ²⁾
Eup 中浓度组	80	126.67 $\pm$ 6.35 ²⁾
Eup 高浓度组	120	63.67 $\pm$ 4.93 ²⁾

表8 Eup对H1299细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 8 Effect of Eup on proliferation ability of H1299 cells ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	增殖率/个
空白组		64.48 $\pm$ 11.20
Eup 低浓度组	40	32.19 $\pm$ 8.54 ²⁾
Eup 中浓度组	80	30.22 $\pm$ 5.95 ²⁾
Eup 高浓度组	120	13.69 $\pm$ 5.70 ²⁾

见表9-表11、图6-图8。

表9 Eup对H1299细胞迁移的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 9 Effect of Eup on migration of H1299 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		30.62 $\pm$ 2.15	65.07 $\pm$ 3.50
Eup 低浓度组	40	24.95 $\pm$ 2.25 ²⁾	49.04 $\pm$ 1.43 ²⁾
Eup 中浓度组	80	11.91 $\pm$ 1.38 ²⁾	25.92 $\pm$ 2.20 ²⁾
Eup 高浓度组	120	4.64 $\pm$ 1.51 ²⁾	13.16 $\pm$ 1.08 ²⁾

表10 Eup对H1299细胞侵袭的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 10 Effect of Eup on invasion of H1299 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		1 420.33 $\pm$ 128.90
Eup 低浓度组	40	1 020.67 $\pm$ 60.96 ²⁾
Eup 中浓度组	80	704.67 $\pm$ 52.37 ²⁾
Eup 高浓度组	120	139.33 $\pm$ 4.93 ²⁾

表11 Eup对Huvec细胞血管形成的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table11 Effect of Eup on blood vessel formation in HUVEC cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	血管连接点/个	血管分支点/个	血管总长度/px
空白组		287.00 $\pm$ 6.25	81.33 $\pm$ 6.43	19 025 $\pm$ 519.50
Eup 低浓度组	40	196.33 $\pm$ 21.55 ²⁾	58.67 $\pm$ 5.69 ¹⁾	16 134 $\pm$ 520.66 ²⁾
Eup 中浓度组	80	76.32 $\pm$ 5.67 ²⁾	53.67 $\pm$ 6.48 ²⁾	9 052.67 $\pm$ 525.60 ²⁾
Eup 高浓度组	120	4.00 $\pm$ 1.00 ²⁾	10.65 $\pm$ 1.53 ²⁾	4 358.67 $\pm$ 387.95 ²⁾

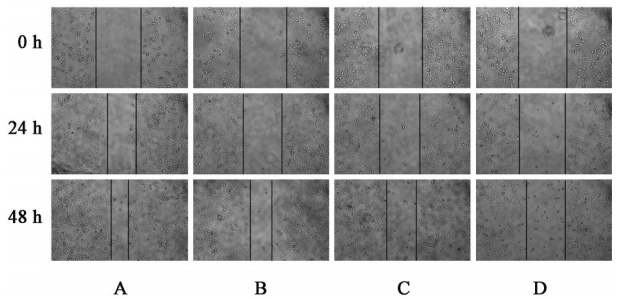


图6 Eup对H1299细胞迁移的影响(倒置显微镜, $\times 100$)

Fig. 6 Effect of Eup on migration of H1299 cells (inverted microscope, $\times 100$)

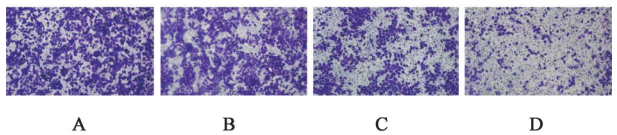


图7 Eup对H1299细胞侵袭的影响(结晶紫, $\times 100$)

Fig. 7 Effect of Eup on the invasion of H1299 cells (crystal violet, $\times 100$)

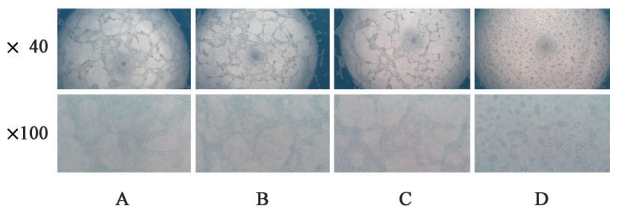


图8 Eup对Huvec细胞血管形成的影响(倒置显微镜, $\times 100$)

Fig. 8 Effect of Eup on tube formation by HUVEC cells (inverted microscope, $\times 100$)

3.6 转录组学、分子对接和分子动力学模拟

H1299细胞经120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Eup处理48 h后靶点EZH2显著下调(下调差异倍数为1.75倍, $P=1.37\times 10^{-50}$),GO富集分析显示,Eup可负向调控H1299细

胞的侵袭。分子对接结果显示,Eup与EZH2的结合能是 $-6.97\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$;分子动力学模拟结果显示,RMSD和SASA结果显示Eup与EZH2结合趋于稳定,并进一步计算MMPBSA结合自由能为 $-(79.64\pm 4.321)$ 。上述结果提示,Eup可能具有抑制H1299细胞侵袭转移的作用,其机制可能与抑制EZH2靶点的表达有关,同时分子对接和分子动力学模拟也提示药物分子Eup与蛋白EZH2具有较强的结合能力和稳定的结合状态。Eup干预H1299后mRNA测序及Eup与EZH2的分子对接和分子动力学分析见增强出版附加材料。

表12 Eup对异种移植瘤体中关键信号蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s,n=3$)

Table 12 Effect of Eup on expression of key signaling proteins in tumor ($\bar{x}\pm s,n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	EZH2/GAPDH	H3k27me3/H3	PCNA/GAPDH	MMP-2/GAPDH	MMP-9/GAPDH	VEGFA/GAPDH
模型组		1.22±0.02	1.30±0.10	0.95±0.03	0.98±0.02	0.95±0.03	0.91±0.08
Eup低浓度组	40	0.83±0.24	0.99±0.08	0.79±0.07	0.84±0.14	0.76±0.06	0.70±0.09
Eup中浓度组	80	0.75±0.18 ¹⁾	0.64±0.19 ²⁾	0.65±0.12 ¹⁾	0.66±0.14 ¹⁾	0.58±0.10 ²⁾	0.56±0.12 ²⁾
Eup高浓度组	120	0.48±0.07 ²⁾	0.38±0.04 ²⁾	0.45±0.11 ²⁾	0.42±0.02 ²⁾	0.35±0.09 ²⁾	0.28±0.03 ²⁾

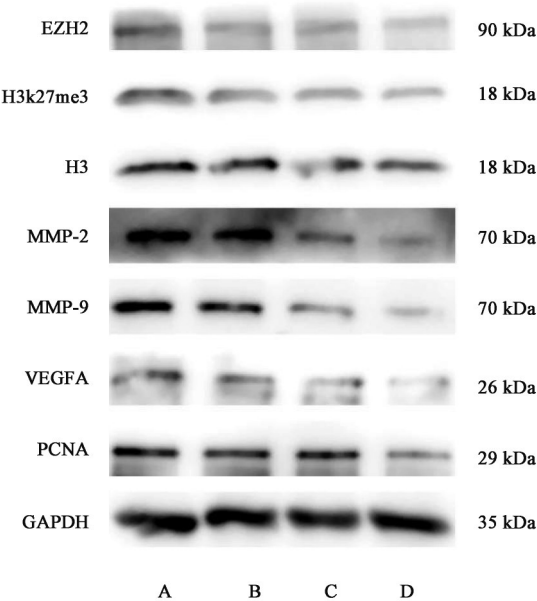


图9 在体内抑制EZH2/H3k27me3通路激活下调增殖与侵袭转移相关蛋白表达电泳

Fig. 9 *In vivo*, electrophoresis of EZH2/H3K27me3 signaling pathway, thereby reducing expression of critical proteins associated with tumor cell proliferation and metastasis

3.8 Eup对H1299细胞EZH2/H3k27me3及增殖、侵袭转移相关蛋白表达的影响 与空白组比较,Eup干预组随着Eup浓度(40、80、120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的增加,H1299细胞中EZH2和H3k27me3的表达水平呈浓度依赖性下降($P<0.01$),同时细胞中PCNA、MMP-2、MMP-9及VEGFA表达明显下调($P<0.05,P<0.01$)。

3.7 Eup在体内对EZH2/H3K27me3信号通路及增殖、侵袭转移相关蛋白表达的影响 在动物实验中,与模型组比较,Eup干预组中随着Eup浓度升高(40、80、120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),瘤体中EZH2、H3k27me3的表达水平呈明显下降,差异有统计学意义($P<0.05,P<0.01$),且瘤体中PCNA、MMP-2、MMP-9及VEGFA的表达水平明显下调($P<0.05,P<0.01$),表明Eup在体内能有效抑制EZH2/H3k27me3信号通路的激活,并能够有效地降低EZH2/H3k27me3信号通路下游增殖、侵袭转移相关蛋白PCNA、MMP-2、MMP-9、VEGFA的表达。见表12、图9。

为了进一步验证Eup在H1299细胞中的作用机制,将过表达的EZH2质粒瞬时转染至H1299细胞中后,与空白组比较,EZH2过表达组中EZH2蛋白表达水平显著上调,同时其催化产物H3K27me3修饰水平显著升高($P<0.01$),表明EZH2转染效率良好。此外,与空白组比较,EZH2过表达组中PCNA、MMP-2、MMP-9及VEGFA的蛋白表达水平明显升高($P<0.05,P<0.01$);另外,与空载+Eup高剂量组比较,EZH2过表达+Eup组中PCNA、MMP-2、MMP-9及VEGFA的表达上调,显示EZH2部分逆转了Eup对这些靶点的抑制作用($P<0.05,P<0.01$)。上述结果表明进一步表明,Eup可能通过抑制EZH2/H3k27me3信号通路发挥抗NSCLC增殖、侵袭转移的效果。见表13、表14,图10、图11。

4 讨论

肿瘤转移是恶性肿瘤进展过程中的关键环节,约90%的癌症相关死亡都与转移密切相关,这一复杂过程包括原发肿瘤的异常增殖及癌细胞突破组织屏障并迁移至远处器官形成新的病灶,从而显著降低患者的生存率^[12-13]。NSCLC是肺癌中的主要类型,不仅具有异常活跃的增殖能力,还表现出高度侵袭性和早期转移倾向,是导致肺癌高死亡率的主要原因^[14-16]。近年来,中医药在肿瘤治疗中的独特优势逐渐受到关注,尤其是中药单体成分因其明确的化学结构和相对单一的药理作用,成为抗肿瘤药物研究的热点^[17-18]。Eup作为艾叶中的主要活性

表 13 Eup 对 H1299 细胞中关键信号蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table13 Effect of curcumol on expression of key signaling proteins in H1299 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	EZH2/GAPDH	H3k27me3/H3	PCNA/GAPDH	MMP-2/GAPDH	MMP-9/GAPDH	VEGFA/GAPDH
空白组		0.98±0.09	0.96±0.58	0.90±0.05	0.97±0.04	0.93±0.05	0.89±0.07
Eup 低浓度组	40	0.54±0.10 ²⁾	0.86±0.17 ²⁾	0.60±0.17	0.85±0.02 ¹⁾	0.79±0.02 ¹⁾	0.69±0.01 ¹⁾
Eup 中浓度组	80	0.37±0.01 ²⁾	0.76±0.31 ²⁾	0.44±0.17 ¹⁾	0.79±0.09 ²⁾	0.67±0.10 ²⁾	0.31±0.08 ²⁾
Eup 高浓度组	120	0.29±0.18 ²⁾	0.63±0.12 ²⁾	0.22±0.16 ²⁾	0.64±0.07 ²⁾	0.62±0.08 ²⁾	0.30±0.17 ²⁾

表 14 EZH2 过表达后,Eup 对 H1299 细胞中 PCNA、MMP-2、MMP-9 及 VEGFA 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 14 EZH2 overexpression partially reversed the inhibitory effect of Eup on PCNA, MMP-2, MMP-9, and VEGFA in H1299 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度	EZH2 /GAPDH	H3k27me3 /H3	PCNA /GAPDH	MMP-2 /GAPDH	MMP-9 /GAPDH	VEGFA /GAPDH
空白组		0.88±0.11	0.52±0.10	0.67±0.02	1.16±0.11	0.64±0.86	0.94±0.43
EZH2 过表达组	3 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	1.40±0.07 ²⁾	0.81±0.05 ²⁾	0.77±0.3 ²⁾	1.57±0.03 ²⁾	0.90±0.53 ¹⁾	1.27±0.12 ¹⁾
空载+Eup 高浓度组	0+120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.58±0.78	0.28±0.07	0.22±0.01	0.60±0.31	0.29±0.02	0.43±0.05
EZH2 过表达+Eup 高浓度组	3 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.80±0.67 ³⁾	0.42±0.04 ³⁾	0.40±0.09 ³⁾	0.74±0.10 ³⁾	0.39±0.01 ⁴⁾	0.56±0.05 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与空载+Eup 高浓度组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$

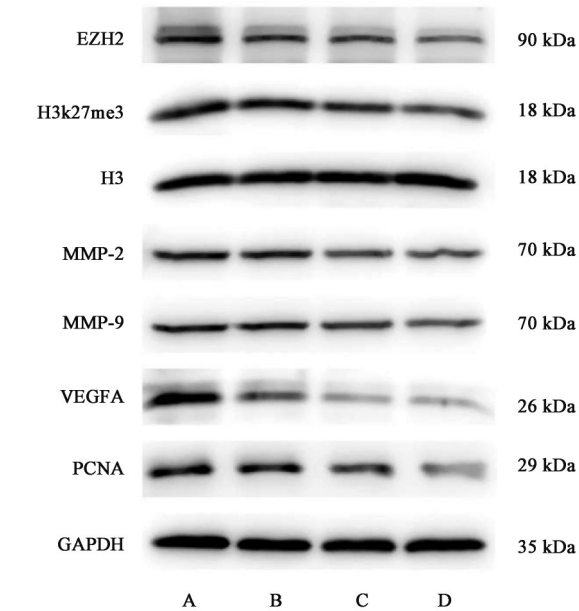
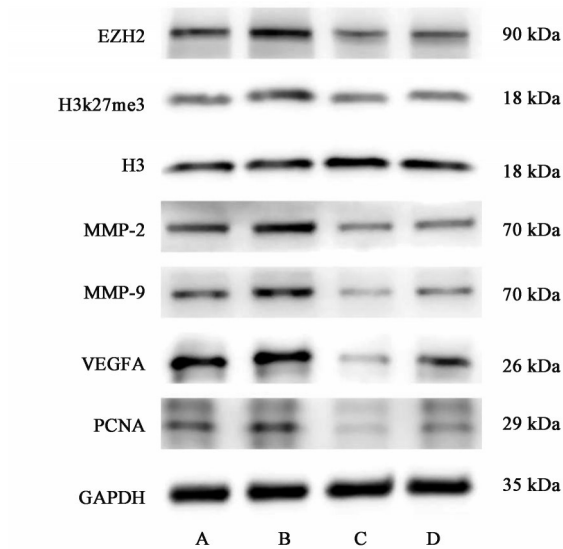


图 10 体外抑制 EZH2/H3k27me3 通路激活并下调迁移、侵袭关键蛋白表达电泳
Fig. 10 Electrophoresis of EZH2/H3K27me3 pathway *in vitro*, leading to downregulation of key proteins involved in metastasis and invasion

成分,近年来其抗肿瘤的作用也逐渐受到关注,但在肺癌中的作用效果及机制仍不明确,本研究针对 Eup 在 NSCLC 中的作用及机制进行了深入探究。

H1299 细胞是一种具有较强增殖及侵袭转移能力的 NSCLC 细胞系,是研究 NSCLC 增殖与侵袭转移的常用细胞模型^[11]。本研究通过 H1299 细胞构建的体内外模型,首次发现 Eup 具有抗 NSCLC 细胞



注:A.空载组;B.EZH2 过表达;C.空载+Eup 高浓度组;D.EZH2 过表达+Eup 高浓度组

图 11 EZH2 过表达部分逆转了 Eup 对 H1299 细胞中 PCNA、MMP-2、MMP-9 及 VEGFA 的抑制作用
Fig. 11 EZH2 overexpression partially reversed inhibitory effects of Eup on PCNA, MMP-2, MMP-9, and VEGFA in H1299 cells

增殖、侵袭转移的作用。在体内研究中,Eup 可显著抑制 H1299 细胞异种移植瘤体生长,以 Eup 中、高剂量最为显著,但对裸鼠体重无影响,表现出良好的安全性;免疫组化结果显示 Eup 可显著抑制肿瘤增殖相关蛋白 PCNA 及侵袭转移相关蛋白 MMP-9、MMP-2 及 VEGFA 的表达。在体外实验中,CCK-8、EdU 及平板克隆实验显示 Eup 呈浓度依赖性显著抑制 H1299 细胞的增殖、迁移和侵袭;血管形成实验

表明 Eup 显著抑制 HUVECs 细胞血管形成。上述表型研究结果显示, Eup 在体内外均表现出显著的抗 NSCLC 增殖和侵袭转移能力。

金属基质蛋白酶家族中的 MMP-2 与 MMP-9, 以及 VEGFA, 是促进癌细胞侵袭和远处转移的重要效应分子^[19-21]。MMP-2 和 MMP-9 通过降解 IV 型胶原蛋白和明胶等细胞外基质成分, 破坏组织屏障, 促进肿瘤细胞侵袭转移; 同时, 他们还可降解细胞外基质或膜结合蛋白, 释放 VEGFA、TGF- β 等生物活性因子, 并促进 DNA 修复蛋白 PCNA 的激活, 增强肿瘤细胞的增殖与存活能力^[22-23]。VEGFA 作为调控血管生成的核心因子, 可促进内皮细胞增殖与迁移, 诱导新生血管形成, 从而促进肿瘤生长和转移^[24-26]。

EZH2 在表观遗传调控中发挥关键作用。其中, H3K27me3 是 EZH2 最早被发现且研究最为深入的经典表观遗传调控机制^[27-28]。在该机制中, EZH2 作为 PRC2 复合体的核心催化酶, 通过催化 H3K27me3 修饰水平升高, 沉默抑癌基因, 参与调控细胞增殖、迁移、侵袭等多种生物学过程^[29-30]。越来越多的证据表明在包括肺癌在内的多种肿瘤中, EZH2 可通过上调 H3K27me3 的水平调控 PCNA、MMP-2、MMP-9 及 VEGFA 的表达水平, 进而显著促进肿瘤的增殖、侵袭与转移^[31-33]。因此靶向 EZH2/H3K27me3 的治疗策略成为抗肿瘤药物研发的重要方向。

本研究首次发现 Eup 抗 NSCLC 增殖、侵袭转移的机制与抑制 EZH2/H3K27me3 信号通路相关。通过转录组学研究发现, Eup 可显著下调 EZH2 基因的表达; 在 GO 功能分析中显示 Eup 可抑制癌细胞侵袭和上皮间质转化。分子对接和分子动力学模拟研究结果显示, 药物分子 Eup 与 EZH2 蛋白具有较强的结合能力和稳定的结合状态。Western blot 研究进一步证实, 在 H1299 细胞中 Eup 处理显著降低了 EZH2、H3k27me3 蛋白表达, 并下调了与肿瘤增殖和侵袭转移密切相关的 PCNA、MMP-2、MMP-9 和 VEGFA 蛋白的表达水平。为进一步验证 EZH2/H3k27me3 信号通路是否介导了 Eup 的抗 NSCLC 的作用, 本课题组开展了挽救实验, 将过表达的 EZH2 质粒瞬时转染至 H1299 细胞中, 结果显示, EZH2 蛋白表达水平显著上调, 同时其催化产物 H3K27me3 修饰水平也随之升高, 表明 EZH2 转染效率良好。此外, EZH2 过表达能够促进 H1299 细胞中 PCNA、MMP-2、MMP-9 和 VEGFA 蛋白的表达水平, 并且部分逆转 Eup 对上述增殖与侵袭转移关键蛋白的抑制作用。上述结果支持了 Eup 通过抑制 EZH2/H3k27me3 信

号通路发挥抗 NSCLC 增殖、侵袭转移的效果。

综上所述, 本研究通过体内动物模型结合体外细胞实验, 首次系统评价了 Eup 对 NSCLC 增殖与侵袭转移的抑制作用, 并初步揭示其作用机制可能与其抑制 EZH2/H3k27me3 信号通路的激活密切相关, 这些发现为 Eup 作为潜在的抗肺癌增殖与转移药物提供了科学依据。然而, 本研究仍存在一定局限性。本研究对 Eup 的作用和机制仅针对 H1299 细胞系进行了体内外验证, 也未进行动物体内的挽救实验。后续研究应在多个 NSCLC 细胞系中进行验证, 进一步构建转移模型并进行动物体内挽救实验研究, 以更全面、更深入地验证 Eup 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] XIA C, DONG X, LI H, et al. Cancer Statistics in China and United States, 2022: Profiles, trends, and determinants [J]. Chin Med J (Engl), 2022, 135(5): 584-590.
- [2] 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.
- [3] HERBST R S, MORGENZTERN D, BOSHOF C. The biology and management of non-small cell lung cancer [J]. Nature, 2018, 553(7689): 446-454.
- [4] WOOD S L, PERNEMALM M, CROSBIE P A, et al. The role of the tumor-microenvironment in lung cancer-metastasis and its relationship to potential therapeutic targets [J]. Cancer Treat Rev, 2014, 40(4): 558-566.
- [5] ETTINGER D S, WOOD D E, AISNER D L, et al. Non-small cell lung cancer, version 3. 2022, NCCN clinical practice guidelines in oncology [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2022, 20(5): 497-530.
- [6] ZHONG W, WU Z, CHEN N, et al. Eupatilin inhibits renal cancer growth by downregulating MicroRNA-21 through the activation of YAP1 [J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 5016483.
- [7] ROSA A, PIRAS F, POLLASTRO F, et al. Comparative evaluation of anticancer activity of natural methoxylated flavones xanthomicrol and eupatilin in A375 Skin melanoma cells [J]. Life (Basel), 2024, 14(3): 304.
- [8] DUAN R, DU W, GUO W. EZH2: A novel target for cancer treatment [J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 104.
- [9] XIA L, ZHU X, ZHANG L, et al. EZH2 enhances expression of CCL5 to promote recruitment of macrophages and invasion in lung cancer [J]. Biotechnol Appl Biochem, 2020, 67(6): 1011-1019.
- [10] GENG J, LI X, ZHOU Z, et al. EZH2 promotes tumor

- progression via regulating VEGF-A/Akt signaling in non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Lett*, 2015, 359 (2) : 275-287.
- [11] CHEN B, SONG Y, ZHAN Y, et al. Fangchinoline inhibits non-small cell lung cancer metastasis by reversing epithelial-mesenchymal transition and suppressing the cytosolic ROS-related Akt-mTOR signaling pathway [J]. *Cancer Lett*, 2022, 543:215783.
- [12] LI Y, LIU F, CAI Q, et al. Invasion and metastasis in cancer: molecular insights and therapeutic targets [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2025, 10(1):57.
- [13] MASSAGUÉ J, OBENAU F A C. Metastatic colonization by circulating tumour cells [J]. *Nature*, 2016, 529 (7586) : 298-306.
- [14] XIE T, QIU B M, LUO J, et al. Distant metastasis patterns among lung cancer subtypes and impact of primary tumor resection on survival in metastatic lung cancer using SEER database [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1):22445.
- [15] 郭兰伟, 蔡林, 朱称心, 等. 中国人群肺癌疾病负担分析 [J]. *中华流行病学杂志*, 2024, 45(5):626-632.
- GUO L W, CAI L, ZHU C X, et al. Analysis of lung cancer burden in the Chinese population [J]. *Chin J Epidemiol*, 2024, 45(5):626-632.
- [16] CHEN P, LIU Y, WEN Y, et al. Non-small cell lung cancer in China [J]. *Cancer Commun*, 2022, 42(10):937-970.
- [17] 宋姗姗, 姜敏, 刘馨心, 等. 中药活性成分及复方对肺癌上皮间质转化干预作用的研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2026, 32(6):336-346.
- SONG S S, JIANG M, LIU X X, et al. Research progress on the intervention effects of active components and formulas of traditional Chinese medicine on epithelial-mesenchymal transition in lung cancer [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2026, 32(6):336-346.
- [18] 郑凤雨, 李佳, 孙旭, 等. 中医药抑制肺癌侵袭转移的研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31(14):293-302.
- ZHENG F Y, LI J, SUN X, et al. Research progress on traditional Chinese medicine in inhibiting invasion and metastasis of lung cancer [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2025, 31(14):293-302.
- [19] CABRAL-PACHECO G A, GARZA-VELOZ I, CASTRUITA-DE LA ROSA C, et al. The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(24):9739.
- [20] SHOARI A, ASHJA ARDALAN A, DIMESA A M, et al. Targeting invasion: The role of MMP-2 and MMP-9 inhibition in colorectal cancer therapy [J]. *Biomolecules*, 2024, 15(1): 9739.
- [21] PATEL S A, NILSSON M B, LE X, et al. Molecular mechanisms and future implications of VEGF/VEGFR in cancer therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2023, 29(1):30-39.
- [22] YE Y, KUANG X, XIE Z, et al. Small-molecule MMP2/MMP9 inhibitor SB-3CT modulates tumor immune surveillance by regulating PD-L1 [J]. *Genome Med*, 2020, 12(1):83.
- [23] PRAKASH J, SHAKED Y. The interplay between extracellular matrix remodeling and cancer therapeutics [J]. *Cancer Discov*, 2024, 14(8):1375-1388.
- [24] ZHAO Y, GUO S, DENG J, et al. VEGF/VEGFR-targeted therapy and immunotherapy in non-small cell lung cancer: Targeting the tumor microenvironment [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(9):3845-3858.
- [25] YANG Y, CAO Y. The impact of VEGF on cancer metastasis and systemic disease [J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 86(Pt 3): 251-261.
- [26] LORENC P, SIKORSKA A, MOLEND A S, et al. Physiological and tumor-associated angiogenesis: Key factors and therapy targeting VEGF/VEGFR pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 180:117585.
- [27] ENTEZARI M, TAHERIAZAM A, PASKEH M D A, et al. The pharmacological and biological importance of EZH2 signaling in lung cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 160:114313.
- [28] GAO M, LI Y, CAO P, et al. Exploring the therapeutic potential of targeting polycomb repressive complex 2 in lung cancer [J]. *Front Oncol*, 2023, 13:1216289.
- [29] XU M, XU C, WANG R, et al. Treating human cancer by targeting EZH2 [J]. *Genes Dis*, 2025, 12(3):101313.
- [30] GAN L, YANG Y, LI Q, et al. Epigenetic regulation of cancer progression by EZH2: From biological insights to therapeutic potential [J]. *Biomark Res*, 2018, 6:10.
- [31] CHIEN Y C, LIU L C, YE H Y, et al. EZH2 promotes migration and invasion of triple-negative breast cancer cells via regulating TIMP2-MMP-2/-9 pathway [J]. *Am J Cancer Res*, 2018, 8(3):422-434.
- [32] LIU C, YANG Z, DENG Z, et al. Downregulated miR-144-3p contributes to progression of lung adenocarcinoma through elevating the expression of EZH2 [J]. *Cancer Med*, 2018, 7 (11):5554-5566.
- [33] CAMPOLO M, SCUDERI S A, FILIPPONE A, et al. EZH2 inhibition to counteract oral cancer progression through Wnt/ β -catenin pathway modulation [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2024, 17(8):1102.

[责任编辑 张丰丰]