

氧化白藜芦醇通过PI3K/Akt信号通路抑制非小细胞肺癌 上皮间充质转化的机制

胡林凌^{1,2}, 江波², 齐涪¹, 邹义龙², 范存愈², 范艺龄³, 余贻汉^{1,2*}, 徐波^{3,4*}

(1. 湖北中医药大学, 武汉 430065; 2. 湖北省中西医结合医院, 武汉 430015;

3. 中国中医科学院西苑医院, 北京 100091; 4. 中国中医科学院博士后流动站, 北京 100700)

[摘要] 目的:探讨氧化白藜芦醇(OXY)通过磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路抑制非小细胞肺癌(NSCLC)上皮-间充质转化(EMT)的机制。方法:采用细胞增殖与活性检测(CCK-8)法检测不同浓度OXY干预下A549、H1299细胞的存活率,筛选出合适药物浓度(0、30、60、90 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。通过5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EdU)细胞增殖、平板克隆实验检测OXY对A549、H1299细胞增殖能力的影响;通过划痕实验、Transwell侵袭实验检测OXY对A549、H1299细胞迁移、侵袭能力的影响,并通过蛋白免疫印迹法(Western blot)检测OXY对A549、H1299细胞中Snail、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)表达水平的影响。运用网络药理学、分子对接预测OXY的作用机制,采用Western blot检测OXY对PI3K/Akt信号通路蛋白表达的影响。应用PI3K/Akt信号通路激动剂740Y-P进行挽救实验研究,在PI3K/Akt信号通路激活条件下,检测OXY对A549、H1299细胞增殖、迁移和侵袭表型、PI3K/Akt信号通路相关蛋白及EMT标志物(Snail、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin)表达水平的影响。结果:正向实验中,CCK-8实验结果显示与空白组比较,OXY干预组(20~120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)NSCLC细胞生存率明显降低($P<0.05$),计算OXY干预48 h后A549、H1299细胞的半数抑制浓度(IC_{50})值分别为113.6、92.53 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,因此以0、30、60、90 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为浓度梯度进行表型和机制研究;与空白组比较,OXY组(30、60、90 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)NSCLC细胞的增殖率、克隆数量、迁移率、侵袭数均明显下降($P<0.05$, $P<0.01$);Western blot结果显示,与空白组比较,OXY组NSCLC细胞的Snail、N-cadherin和Vimentin蛋白表达水平显著下降($P<0.05$),E-cadherin蛋白表达水平显著上升($P<0.01$);网络药理学和分子对接结果显示OXY可作用于PI3K/Akt信号通路,并与PI3K、Akt蛋白具有良好的结合能力;进一步Western blot结果显示,与空白组比较,OXY组NSCLC细胞的PI3K、Akt蛋白表达水平差异无统计学意义,而磷酸化(p)-PI3K、p-Akt蛋白表达水平明显下降($P<0.05$)。挽救实验中,与空白组比较,740Y-P组(15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)NSCLC细胞的增殖率、克隆数量、迁移率、侵袭数均显著升高($P<0.01$);与空白+OXY组(90 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)比较,740Y-P+OXY组(15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +90 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)NSCLC细胞的增殖率、克隆数量、迁移率、侵袭数均显著升高($P<0.01$);在Western blot结果显示,与空白组比较,740Y-P组NSCLC细胞的PI3K、Akt蛋白表达水平差异无统计学意义,p-PI3K、p-Akt、Snail、N-cadherin、Vimentin蛋白表达水平明显上升($P<0.05$),E-cadherin蛋白表达水平显著下降($P<0.01$);与空白+OXY组比较,740Y-P+OXY组NSCLC细胞的PI3K、Akt蛋白表达水平差异无统计学意义,p-PI3K、p-Akt、Snail、N-cadherin和Vimentin蛋白表达水平明显升高($P<0.05$),E-cadherin蛋白表达水平明显下降($P<0.05$)。结论:OXY可通过抑制PI3K/Akt信号通路并抑制EMT过程,从而发挥抗非小细胞肺癌转移的作用。

[关键词] 非小细胞肺癌;氧化白藜芦醇;磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt);上皮-间充质转化(EMT);增殖与侵袭

[中图分类号] R256;R563;R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)10-0046-12

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20251721

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20250729.1948.010>

[网络出版日期] 2025-07-30 09:23:35 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



Mechanisms of Oxyresveratrol in Inhibiting Epithelial-mesenchymal Transition in Non-small Cell Lung Cancer via PI3K/Akt Signaling Pathway

HU Linling^{1,2}, JIANG Bo², QI Yu¹, ZOU Yilong², FAN Cunyu², FAN Yiling³, YU Yihan^{1,2*}, XU Bo^{3,4}

[收稿日期] 2025-05-19

[基金项目] 湖北省中医药管理局重点项目(ZY2023Z003);国家自然科学基金项目(82305228)

[第一作者] 胡林凌,在读硕士,从事中医药防治肺部肿瘤疾病研究,E-mail:linlinghullh@163.com

[通信作者] *余贻汉,硕士,主任医师,研究生导师,从事中西医结合防治肺部肿瘤研究,E-mail:yuyihan2000@126.com;

*徐波,博士,从事中西医结合防治肺部肿瘤研究,E-mail:xubo20191207@126.com

- (1. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;
2. Hubei Provincial Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Wuhan 430015, China;
3. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China;
4. Postdoctoral Mobile Workstation, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanisms by which oxyresveratrol (OXY) inhibits epithelial-mesenchymal transition (EMT) in non-small cell lung cancer (NSCLC) through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway. **Methods:** Cell counting kit-8 (CCK-8) assays were used to determine the survival rates of A549 and H1299 cells treated with different concentrations of OXY, and appropriate concentrations (0, 30, 60, 90 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) were selected. The effects of OXY on the proliferation of A549 and H1299 cells were evaluated using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) assays and colony formation assays. Wound healing assays and Transwell invasion assays were performed to assess the effects of OXY on cell migration and invasion. Western blot (WB) was used to detect the expression levels of Snail, E-cadherin, N-cadherin, and Vimentin in A549 and H1299 cells. Network pharmacology and molecular docking were applied to predict the mechanism of action of OXY, and WB was used to evaluate the effects of OXY on proteins in the PI3K/Akt signaling pathway. Rescue experiments were conducted using the PI3K/Akt signaling pathway agonist 740Y-P. Under activation of the PI3K/Akt pathway, the effect of OXY on proliferation, migration, and invasion phenotypes, as well as on the expression levels of PI3K/Akt pathway-related proteins and EMT markers (Snail, E-cadherin, N-cadherin, and Vimentin), were examined. **Results:** In the forward experiments, CCK-8 assay results showed that, compared with the control group, the survival rates of NSCLC cells in the OXY-treated groups (20-120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) were significantly decreased ($P<0.05$). The half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values of A549 and H1299 cells after 48 h of OXY treatment were 113.6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and 92.53 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. Therefore, concentrations of 0, 30, 60, 90 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ were selected as the gradient for subsequent phenotypic and mechanistic studies. Compared with the control group, the proliferation rate, colony number, migration rate, and invasion number of NSCLC cells in the OXY groups (30, 60, and 90 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) were significantly decreased ($P<0.01$, $P<0.05$). WB results showed that, compared with the control group, the protein expression levels of Snail, N-cadherin, and Vimentin in NSCLC cells of the OXY groups were significantly decreased ($P<0.05$), whereas E-cadherin expression was significantly increased ($P<0.01$). Network pharmacology and molecular docking results indicated that OXY could act on the PI3K/Akt signaling pathway and exhibited good binding affinity with PI3K and Akt proteins. Further WB results showed that, compared with the control group, there were no statistically significant differences in the expression levels of PI3K and Akt proteins in NSCLC cells of the OXY groups, whereas the expression levels of phosphorylated PI3K (p-PI3K) and phosphorylated Akt (p-Akt) were significantly decreased ($P<0.05$). In the rescue experiments, compared with the control group, the proliferation rate, colony number, migration rate, and invasion number of NSCLC cells in the 740Y-P group (15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) were significantly increased ($P<0.01$). Compared with the control + OXY group (90 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), these indices in the 740Y-P + OXY group (15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + 90 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) were also significantly increased ($P<0.01$). WB results showed that, compared with the control group, there were no statistically significant differences in the expression levels of PI3K and Akt proteins in the 740Y-P group. However, the expression levels of p-PI3K, p-Akt, Snail, N-cadherin, and Vimentin were significantly increased ($P<0.05$), while E-cadherin expression was significantly decreased ($P<0.01$). Compared with the control + OXY group, there were no statistically significant differences in PI3K and Akt protein expression in the 740Y-P + OXY group. However, the expression levels of p-PI3K, p-Akt, Snail, N-cadherin, and Vimentin were significantly increased ($P<0.05$), while E-cadherin expression was significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** OXY inhibits the PI3K/Akt signaling pathway and suppresses the EMT process, thereby exerting anti-metastatic effects in NSCLC.

[Keywords] non-small cell lung cancer; oxyresveratrol; phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt); epithelial-mesenchymal transition (EMT); proliferation and invasion

肺癌是我国发病率和死亡率均高居首位的恶性肿瘤,根据2024年国家癌症中心的最新统计,2022年我国新发肺癌病例约106.06万,发病率约为75.13/10万,死亡病例约73.33万,死亡率约为51.94/10万^[1]。非小细胞肺癌(NSCLC)是我国最常见的肺癌亚型,约占85%^[2]。转移是导致肺癌死亡的最主要原因,研究显示I期术后的NSCLC患者20%~40%出现肿瘤复发转移,生存率仅15%~16.6%^[3],Ⅲ期转移患者5年内生存率也仅20%^[4]。尽管肺癌

的诊断和治疗取得实质性进展,但是肺癌患者死亡率依然高居不下,尤其是在疾病进展至晚期或发生远处转移的患者中,预后仍不乐观。因此,探索有效抑制肺癌转移的药物并揭示其作用机制成为肿瘤研究的重要方向。近年来,天然来源的药物特别是中药单体成分,在抗肿瘤研究中展现出独特优势,逐渐成为肿瘤治疗领域的重要研究方向之一^[5]。氧化白藜芦醇(OXY)是一种多羟基二苯乙烯类化合物,广泛存在于多种药用植物中,目前主要从中

药桑白皮、藜芦中提取^[6-7]。白藜芦醇作为氧化白藜芦醇的母体化合物,其抗肿瘤作用已得到广泛而深入的研究。OXY在化学结构上与白藜芦醇相似,但由于多一个双键,可能具备更强的稳定性和独特的生物学活性。然而,目前关于OXY在抗肿瘤领域的研究仍相对有限。近年来,虽有少量研究报道显示OXY在肝癌、乳腺癌等肿瘤中具有较强的抗癌活性^[8-10],但关于OXY对NSCLC的作用及其机制的研究,尚未见相关报道。磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路是生物体内重要的信号传导系统之一,在细胞的增殖、分化、凋亡等过程中发挥至关重要的作用^[11]。大量研究表明,PI3K/Akt调控上皮间充质转化(EMT)在促进肺癌转移过程中发挥着关键作用,抑制PI3K/Akt信号通路的激活,可以调控Snail、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)等EMT关键蛋白达到抗肿瘤作用^[12]。因此,靶向PI3K/Akt信号通路在抗肿瘤药物开发中受到广泛关注^[13]。本研究通过体外细胞增殖与活性检测(CCK-8)、划痕及Transwell侵袭等实验,首次评估了OXY对NSCLC增殖与转移的影响,并探讨其通过PI3K/Akt信号通路抑制NSCLC EMT的作用机制,旨在为OXY抗NSCLC的作用机制提供实验依据,也为肺癌转移的预防和治疗策略提供新的研究方向。

1 材料

1.1 细胞株 人NSCLC细胞系A549、H1299(武汉普赛诺生命科技有限公司,批号分别为CL-0016、CL-0165)。

1.2 药品与试剂 氧化白藜芦醇(成都仪捷睿生物,批号YRY171-241001,纯度 $\geq 98\%$,1 g);二甲基亚砜(DMSO,北京拜尔迪生物技术有限公司,批号219605580);达尔伯克改良伊格尔(DMEM)培养基、胰蛋白酶消化液、磷酸盐缓冲液(PBS)、放射免疫沉淀法(RIPA)裂解液、蛋白上样缓冲液(湖北塞维尔生物,批号分别为G4511-500ML、G4001-100ML、G4202-500ML、G2001-30ML、G2013-1ML);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(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,批号7E3010K4);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);PI3K、磷酸化(p)-PI3K、Akt、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)(上海埃必威生物科技有限公司,批号分别为CY5355、CY6427、CY5561、CY5288、CY5015、CY5134、AB0101);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、p-Akt、Snail抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司,批号分别为A19056、AP0637、A11794);740Y-P(美国MCE公司,批号1236188-16-1)。

1.3 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);IX81型倒置显微镜、IX51/IX81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)。

2 方法

2.1 网络药理学及分子对接 通过Swiss Target Prediction(<http://swisstargetprediction.ch/>,检索日期2025-04-12)、Pharm Mapper(<https://lilab-ecust.cn/pharmmapper/index.html>,检索日期2025-04-13)网站进行检索,对于Swiss网站以Probability>0为筛选条件^[14],获取OXY相关靶点信息。在基因名片数据库(GeneCards, www.genecards.org 检索日期2024-08-04)、在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM, www.omim.org 检索日期2024-08-04)、药物靶标数据库(TTD, <https://db.idrblab.net/ttd/>检索日期2024-08-04)以“Non-Small-Cell Lung Cancer”为搜索关键词进行检索,对于GeneCards数据库以Score ≥ 10 为筛选条件^[15],获取非小细胞肺癌相关靶点。利用Evenn(<https://www.bic.ac.cn/EVenn/>)在线制作Venn图并导出交集靶点数据。将交集靶点导入蛋白互作网络分析数据库(String, <https://cn.string-db.org/>),物种设定为“Homo sapiens”,置信度>0.7,获取靶点相互作用网络图及相关数据,利用Cytoscape 3.10.2软件,筛选出核心基因。将共同靶点导入注释、可视化和集成发现数据库(DAVID, <https://davidbioinformatics.nih.gov/>)进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析,通过微信信

(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)绘制作用通路气泡图。通过蛋白结构数据库检索得到核心基因及PI3K的蛋白结构,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OXY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,得到对应结合能后绘制核心基因热图,最后通过PyMOL进行可视化分析。

2.2 细胞培养 将A549、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。

2.3 CCK-8法检测细胞存活率 将处于对数生长期的A549、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。OXY的浓度为20、40、60、80、100、120 μmol·L⁻¹,对照孔加入3%的DMSO,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40 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_{药物孔}-A_{溶剂孔})/(A_{空白孔}-A_{溶剂孔})×100%,使用GraphPad软件计算半数抑制浓度(IC₅₀)值。

2.4 细胞分组及干预 通过CCK-8实验筛选最佳OXY浓度,使用DMSO配置OXY的母液浓度为100 mmol·L⁻¹。正向实验中依据2种细胞48 h的IC₅₀,将细胞分为空白组(0.9%DMSO)、OXY低、中、高(30、60、90 μmol·L⁻¹)浓度组;挽救实验中,在给予OXY处理前,分别向A549、H1299中加入740Y-P(15 μmol·L⁻¹)预刺激2 h,以激活PI3K/Akt通路,将细胞分为空白组(0.9%DMSO)、740Y-P(15 μmol·L⁻¹)组、空白+OXY(90 μmol·L⁻¹)组、740Y-P(15 μmol·L⁻¹)+OXY(90 μmol·L⁻¹)组。所有组别中DMSO体积分数最高为0.9%,均不超过3%。

2.5 EdU细胞增殖实验 将处于对数生长期的A549、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,进行分组加药,分组同2.3项,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、0.3%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。

2.6 平板克隆实验 将处于对数生长期的A549、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,进行分组加药。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。每孔加入多聚甲醛500 μL固定20 min后使用PBS清洗1遍,每孔加入结晶紫染液500 μL染色0.5 h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。

2.7 划痕实验 将处于对数生长期的A549、H1299细胞分别以1×10⁵个/mL的密度接种于12孔板中,每孔1 mL,培养24 h后,用200 μL无菌吸头在细胞表面力道均匀、垂直地划一道线,PBS润洗后,为避免细胞增殖对划痕结果的影响,用减血清培养基(3%FBS培养基)进行分组加药,每组3个复孔。分别在0、24、48 h置于倒置显微镜下拍照并记录每组划痕宽度。拍照结束后计算迁移率。

2.8 Transwell侵袭实验 将处于对数生长期的A549、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,进行分组加药,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每组细胞进行计数,调整细胞为3×10⁴个/孔。24孔板下室中加入600 μL完全培养基,上室加入预冷基质胶100 μL待其凝固后加入200 μL细胞悬液,于37℃、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。

2.9 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测蛋白表达

将处于对数生长期的A549、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。加药干预48 h后,裂解细胞并提取蛋白,蛋白样品煮沸变性10 min,进行十二烷基硫酸钠-PAGE(SDS-PAGE)10%凝胶电泳,转至硝酸纤维素(NC)膜上,使用快速封闭液封闭15 min。加入PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、N-cadherin、Vimentin、E-cadherin(1:1 000),GAPDH(1:3 500),4℃孵育过夜,TBST漂洗后加入对应二抗(1:10 000),室温孵育1 h,TBST漂洗后使用显影液显色,采用ECL

化学成像系统显影、拍照。使用Image J计算各蛋白灰度值。

2.10 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,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 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 OXY对NSCLC细胞活性的影响 与空白组比较,OXY组A549细胞、H1299细胞生存率明显下降($P<0.05$, $P<0.01$),并随着OXY浓度的逐渐升高及干预时间的延长,2种细胞生存率呈明显下降趋势,表明OXY可显著抑制A549、H1299细胞的活性。计算OXY干预A549、H1299细胞48 h后的IC₅₀,分别为113.6、92.53 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,因此在后续实验中选取OXY干预的浓度梯度为OXY低、中、高浓度(30、60、90 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组。见表1、表2。

表1 OXY对A549细胞活性的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1 Effect of OXY 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	72 h
空白组		100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00
OXY干预组	20	101.41±1.45	100.10±2.61	102.00±2.08
	40	98.58±1.47	98.19±2.82 ²⁾	100.34±2.02 ¹⁾
	60	97.55±2.13	93.88±4.45 ²⁾	91.68±2.99 ²⁾
	80	95.14±3.40 ²⁾	72.94±3.82 ²⁾	68.66±1.14 ²⁾
	100	85.07±4.60 ²⁾	55.62±4.34 ²⁾	37.60±1.26 ²⁾
	120	76.01±4.50 ²⁾	43.13±2.30 ²⁾	25.39±0.72 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ (表2-表11同)

表2 OXY对H1299细胞活性的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 2 Effect of OXY 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±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00
OXY干预组	20	98.44±3.61	100.35±4.33	96.54±7.90 ¹⁾
	40	95.90±4.28 ¹⁾	91.05±3.63 ²⁾	71.14±4.47 ²⁾
	60	90.94±4.50 ²⁾	72.91±2.05 ²⁾	51.10±271 ²⁾
	80	84.69±3.83 ²⁾	54.76±2.11 ²⁾	32.76±2.35 ²⁾
	100	75.48±2.22 ²⁾	41.73±1.81 ²⁾	24.10±1.27 ²⁾
	120	65.40±2.27 ²⁾	35.04±1.24 ²⁾	18.14±1.60 ²⁾

3.2 OXY对NSCLC细胞增殖的影响

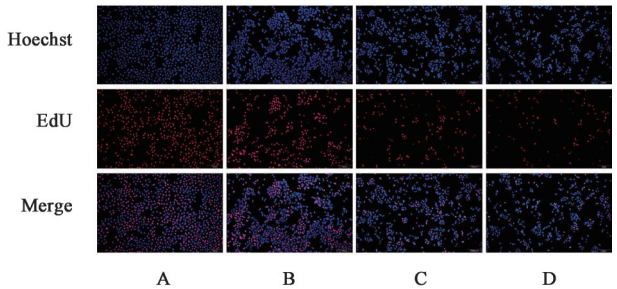
3.2.1 OXY对A549细胞、H1299细胞增殖能力的影响 与空白组比较,OXY组A549细胞、H1299细胞

增殖率呈浓度依赖性下降($P<0.01$),表明OXY可抑制NSCLC细胞的增殖。见表3,图1、图2。

表3 OXY对A549、H1299细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 3 Effect of OXY on proliferation of A549 and H1299 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	增殖率/%	
		A549	H1299
空白组		45.55±1.40	53.67±6.13
OXY低浓度组	30	37.16±2.13 ²⁾	29.71±0.77 ²⁾
OXY中浓度组	60	25.74±1.02 ²⁾	23.15±1.73 ²⁾
OXY高浓度组	90	20.23±1.66 ²⁾	17.11±0.84 ²⁾



注:A.空白组;B.OXY低浓度组;C.OXY中浓度组;D.OXY高浓度组(图2-图8同)

图1 OXY对A549细胞增殖的影响(倒置荧光显微镜,×100)

Fig. 1 Effect of OXY on proliferation of A549 cells (inverted fluorescence microscope, ×100)

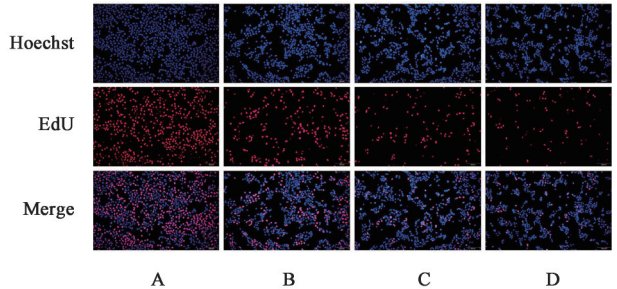


图2 OXY对H1299细胞增殖的影响(倒置荧光显微镜,×100)

Fig. 2 Effect of OXY on proliferation of H1299 cells (inverted fluorescence microscope, ×100)

3.2.2 OXY对A549细胞、H1299细胞克隆能力的影响 与空白组比较,OXY组A549细胞、H1299细胞克隆数量显著减少($P<0.01$),表明OXY可抑制NSCLC细胞的克隆,且具有浓度依赖性。见表4、图3。

3.3 OXY可显著抑制NSCLC细胞迁移和侵袭

3.3.1 OXY对A549细胞、H1299细胞迁移能力的影响 与空白组比较,OXY组划痕愈合距离显著缩短($P<0.01$),并且迁移距离与时间呈正比,与药物浓度呈反比,表明OXY具有抑制A549细胞、H1299细

表4 OXY对A549、H1299细胞克隆形成的作用($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 4 Effect of OXY on clonogenic ability of A549 and H1299 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	克隆数量/个	
		A549	H1299
空白组		466.33 $\pm$ 28.02	401.00 $\pm$ 11.53
OXY低浓度组	30	355.00 $\pm$ 28.80 ²⁾	305.00 $\pm$ 7.00 ²⁾
OXY中浓度组	60	117.33 $\pm$ 9.50 ²⁾	265.00 $\pm$ 7.00 ²⁾
OXY高浓度组	90	66.67 $\pm$ 1.53 ²⁾	183.00 $\pm$ 10.44 ²⁾

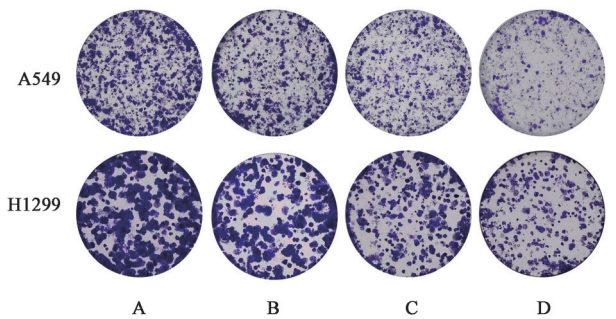


图3 OXY对A549、H1299细胞克隆形成的影响(结晶紫)
Fig. 3 Effect of OXY on clonogenic ability of A549 and H1299 cells (crystal violet)

胞迁移的能力。见表5、图4、表6、图5。

表5 OXY对A549细胞迁移的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 5 Effect of OXY 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		42.06 $\pm$ 0.83	60.46 $\pm$ 0.88
OXY低浓度组	30	32.00 $\pm$ 0.52 ²⁾	41.41 $\pm$ 0.39 ²⁾
OXY中浓度组	60	16.15 $\pm$ 0.33 ²⁾	29.28 $\pm$ 0.53 ²⁾
OXY高浓度组	90	5.31 $\pm$ 0.27 ²⁾	11.75 $\pm$ 0.34 ²⁾

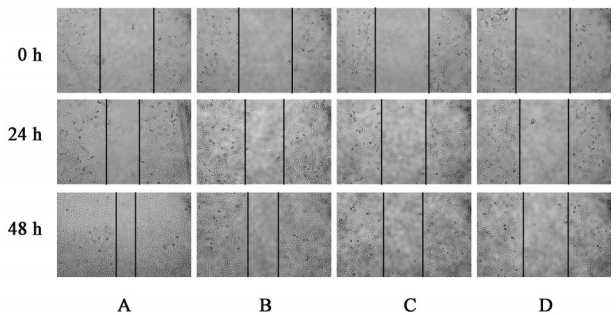


图4 OXY对A549细胞迁移的影响(倒置显微镜, $\times 100$)
Fig. 4 Effect of OXY on migration of A549 cells (inverted microscope, $\times 100$)

3.3.2 OXY对NSCLC细胞侵袭能力的影响 与空白组比较,OXY各浓度组A549细胞、H1299细胞的侵袭个数明显减少($P<0.05, P<0.01$),且与OXY浓度呈反比。表明OXY可抑制A549细胞、H1299细胞的侵袭。见表7、图6。

表6 OXY对H1299细胞迁移的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 6 Effect of OXY 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		22.09 $\pm$ 0.37	81.73 $\pm$ 0.19
OXY低浓度组	30	13.35 $\pm$ 0.19 ²⁾	30.58 $\pm$ 0.24 ²⁾
OXY中浓度组	60	8.08 $\pm$ 0.37 ²⁾	20.04 $\pm$ 0.25 ²⁾
OXY高浓度组	90	5.14 $\pm$ 0.24 ²⁾	7.72 $\pm$ 0.44 ²⁾

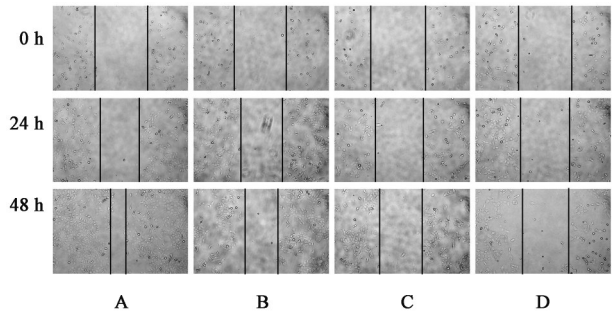


图5 OXY对H1299细胞迁移的影响(倒置显微镜, $\times 100$)
Fig. 5 Effect of OXY on migration of H1299 cells (inverted microscope, $\times 100$)

表7 OXY对A549、H1299细胞侵袭的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 7 Effect of OXY on invasion of A549 and H1299 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	侵袭数/个	
		A549	H1299
空白组		1 499.67 $\pm$ 102.62	1 533.33 $\pm$ 66.15
OXY低浓度组	30	1 176.33 $\pm$ 46.18 ¹⁾	1 278.67 $\pm$ 56.86 ²⁾
OXY中浓度组	60	1 030.00 $\pm$ 52.14 ²⁾	867.00 $\pm$ 47.44 ²⁾
OXY高浓度组	90	705.67 $\pm$ 126.50 ²⁾	722.33 $\pm$ 72.78 ²⁾

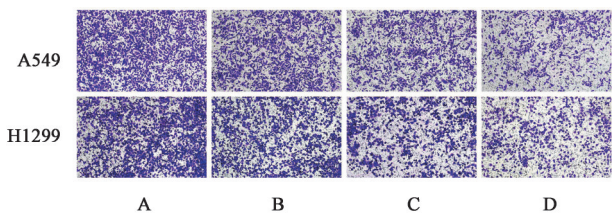


图6 OXY对A549、H1299细胞侵袭的影响(结晶紫, $\times 100$)
Fig. 6 Effect of OXY on invasion of A549 and H1299 cells (crystal violet, $\times 100$)

3.4 OXY对NSCLC细胞中EMT关键蛋白表达的影响 与空白组比较,OXY组A549细胞、H1299细胞中EMT关键蛋白(Snail、N-cadherin、Vimentin)表达水平显著下降,差异具有统计学意义($P<0.01$),而E-cadherin蛋白的表达显著上升,差异具有统计学意义($P<0.01$),且均具有浓度依赖性。见表8、表9、图7。

表 8 OXY 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 OXY on 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
空白组		0.32±0.06	0.87±0.03	0.83±0.10	0.94±0.03
OXY 低浓度组	30	0.47±0.03 ²⁾	0.47±0.03 ²⁾	0.59±0.04 ²⁾	0.69±0.05 ²⁾
OXY 中浓度组	60	0.71±0.13 ²⁾	0.34±0.04 ²⁾	0.45±0.03 ²⁾	0.55±0.02 ²⁾
OXY 高浓度组	90	1.11±0.07 ²⁾	0.20±0.06 ²⁾	0.38±0.01 ²⁾	0.37±0.03 ²⁾

表 9 OXY 对 H1299 细胞中 EMT 关键蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 9 Effect of OXY on EMT-related proteins expression in H1299 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
空白组		0.53±0.05	1.06±0.10	1.06±0.16	1.05±0.09
OXY 低浓度组	30	0.72±0.09 ²⁾	0.78±0.01 ²⁾	0.82±0.09 ²⁾	0.83±0.03 ²⁾
OXY 中浓度组	60	0.84±0.11 ²⁾	0.63±0.08 ²⁾	0.72±0.07 ²⁾	0.70±0.09 ²⁾
OXY 高浓度组	90	0.95±0.07 ²⁾	0.39±0.26 ²⁾	0.18±0.04 ²⁾	0.54±0.02 ²⁾

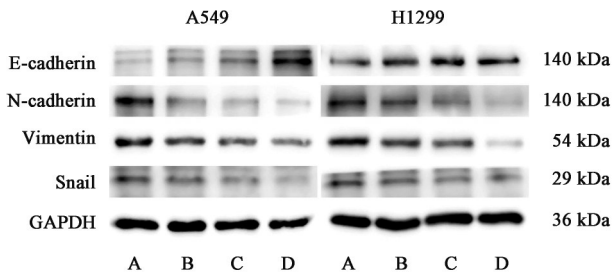


图 7 A549、H1299 细胞中 EMT 关键蛋白表达电泳
Fig. 7 Electrophoresis of EMT-related proteins expression in A549 and H1299 cells

3.5 生物信息学分析结果 通过生物信息学分析处理得到 OXY 与非小细胞肺癌交集基因,共 197 个,通过筛选得到表皮生长因子受体(EGFR)、B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)、Akt1、雌激素受体 1(ESR1)、热休克蛋白 90 α 家族 A 类成员 1(HSP90AA1)、原癌基因酪氨酸蛋白激酶(SRC)、Bcl-2 样蛋白 1(BCL2L1)、Harvey 鼠肉瘤病毒原癌基因同源物(HRAS)、糖原合酶激酶-3 β (GSK3B)共 10 个核心基因。对交集基因进行 KEGG 通路富集分析,显示 PI3K/Akt 是 OXY 作用于 NSCLC 的主要信号通路之一。分子对接结果显示 Akt 与 OXY 的结合能为 $-7.07\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,在 OXY 与 10 个核心基因分子对接结果中位列第三。此外 OXY 与 PI3K 结合能为 $-6.542\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,提示 OXY 与 PI3K、Akt 均有较强的结合能力。网络药理学及分子对接结果见增强出版附加材料。

3.6 OXY 可显著抑制 NSCLC 细胞中 PI3K/Akt 信号通路磷酸化蛋白表达 Western blot 法检测研究结果显示,与空白组比较,OXY 组 NSCLC 细胞的

PI3K、Akt 表达水平比较,差异无统计学意义;p-PI3K、p-Akt 表达水平随着 OXY 浓度升高呈下降趋势($P<0.05, P<0.01$)。见图 8,表 10、表 11。

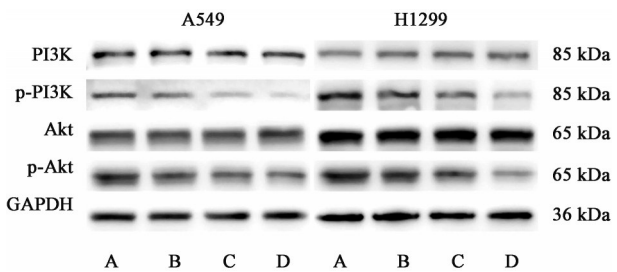


图 8 A549、H1299 细胞蛋白表达电泳
Fig. 8 Electrophoresis of protein expression of A549, H1299 cells

表 10 OXY 对 A549 细胞中 PI3K/Akt 信号通路蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 10 Effect of OXY on expression of PI3K/Akt signaling pathway proteins in A549 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	PI3K /GAPDH	p-PI3K /GAPDH	Akt /GAPDH	p-Akt /GAPDH
空白组		0.81±0.03	1.13±0.18	1.01±0.08	1.03±0.05
OXY 低浓度组	30	0.78±0.10	0.86±0.03 ¹⁾	0.95±0.12	0.85±0.06 ²⁾
OXY 中浓度组	60	0.81±0.23	0.52±0.14 ²⁾	0.97±0.14	0.72±0.04 ²⁾
OXY 高浓度组	90	0.79±0.18	0.23±0.14 ²⁾	1.03±0.19	0.51±0.01 ²⁾

3.7 PI3K/Akt 信号通路激动剂 740Y-P 可部分逆转 OXY 抑制 A549 细胞增殖的效应 与空白组比较,740Y-P 组 A549 细胞、H1299 细胞的增殖率及克隆数量显著增加($P<0.01$),表明 740Y-P 预处理能有效增强 A549、H1299 细胞增殖;与空白+OXY 组比较,740Y-P+OXY 组 A549 细胞、H1299 细胞的增殖率及克隆数量显著增加($P<0.01$)。表明 740Y-P 能够在

表 11 OXY 对 H1299 细胞蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 11 Effect of OXY on expression of PI3K/Akt signaling pathway proteins in H1299 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	PI3K/GAPDH	p-PI3K/GAPDH	Akt/GAPDH	p-Akt/GAPDH
空白组		0.89±0.04	1.08±0.09	1.08±1.00	1.22±0.05
OXY 低浓度组	30	0.93±0.21	0.92±0.11 ¹⁾	1.08±0.05 ²⁾	0.91±0.03 ²⁾
OXY 中浓度组	60	0.97±0.29	0.68±0.09 ²⁾	1.14±0.04 ²⁾	0.79±0.07 ²⁾
OXY 高浓度组	90	1.00±0.32	0.36±0.04 ²⁾	1.09±0.05 ²⁾	0.54±0.11 ²⁾

定程度上逆转 OXY 对 NSCLC 细胞增殖的抑制作用。见表 12、表 13、图 9-图 11。

表 12 740Y-P 预处理后, OXY 对 A549、H1299 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 12 Effect of OXY on proliferation of A549 and H1299 cells following 740Y-P treatment ($\bar{x} \pm s, n=5$)

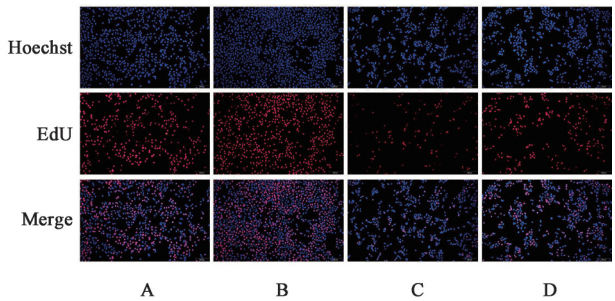
组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	增殖率/%	
		A549	H1299
空白组		18.52±0.52	32.40±4.49
740Y-P 组	15	33.75±2.06 ²⁾	49.99±1.43 ²⁾
空白+OXY 组	90	9.41±0.79	13.46±0.93
740Y-P+OXY 组	15+90	14.10±0.52 ⁴⁾	20.46±1.65 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与空白+OXY 组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表 13-表 17 同)

表 13 740Y-P 预处理对 A549、H1299 细胞克隆形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 13 Effect of OXY on clonogenic ability of A549 and H1299 cells following 740Y-P treatment ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	克隆数量/个	
		A549	H1299
空白组		326.67±10.60	324.67±10.50
740Y-P 组	15	465.67±10.97 ²⁾	428.33±5.86 ²⁾
空白+OXY 组	90	147.00±9.54	213.33±10.02
740Y-P+OXY 组	15+90	285.33±8.14 ⁴⁾	288.67±10.50 ⁴⁾



注: A. 空白组; B. 740Y-P 组; C. 空白+OXY 组; D. 740Y-P+OXY 组(图 10-图 15 同)

图 9 740Y-P 预处理对 A549 细胞增殖的影响(倒置荧光显微镜, $\times 100$)

Fig. 9 Effect of OXY on proliferation of A549 cells following 740Y-P treatment (inverted fluorescence microscope, $\times 100$)

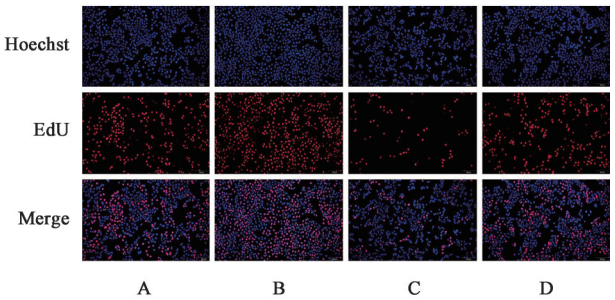


图 10 740Y-P 预处理对 H1299 细胞增殖的影响(倒置荧光显微镜, $\times 100$)

Fig. 10 Effect of OXY on proliferation of H1299 cells following 740Y-P treatment (inverted fluorescence microscope, $\times 100$)

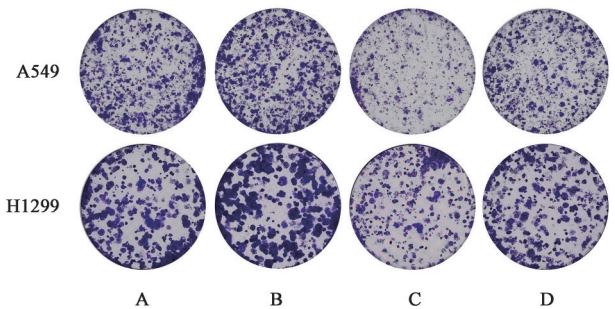


图 11 740Y-P 预处理对 A549、H1299 细胞克隆形成的影响(结晶紫)

Fig. 11 Effect of OXY on clonogenic ability of A549 and H1299 cells following 740Y-P treatment (crystal violet)

3.8 PI3K/Akt 信号通路激动剂 740Y-P 可部分逆转 OXY 抑制 A549 细胞迁移和侵袭的效应 与空白组比较,740Y-P 组 A549 细胞、H1299 细胞的迁移率和侵袭数均显著升高($P<0.01$),表明 740Y-P 预处理可有效增强 A549、H1299 细胞迁移和侵袭;与空白+OXY 组比较,740Y-P+OXY 组 A549 细胞、H1299 细胞的迁移率和侵袭数均显著升高($P<0.01$),表明 740Y-P 能够在一定程度上逆转 OXY 对 NSCLC 细胞迁移和侵袭的抑制作用。见表 14、表 15、图 12-图 14。

3.9 740Y-P 可部分逆转 OXY 对 PI3K/Akt 信号通路的抑制作用及其对 EMT 关键蛋白的调控作用 与空白组比较,740Y-P 组 NSCLC 细胞中 PI3K、Akt 蛋白的表达水平比较,差异无统计学意义,而 p-PI3K、p-Akt 表达水平显著增高($P<0.01$),并且 EMT 关键

表 14 740Y-P 预处理后,OXY 对 A549 细胞迁移率的影响 ($\bar{x}\pm s,n=3$)
Table 14 Effect of OXY on migration rate of A549 cells following 740Y-P treatment ($\bar{x}\pm s,n=3$) %

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	A549 细胞		H1299 细胞	
		24 h	48 h	24 h	48 h
空白组		30.20±0.59	40.81±0.59	13.99±0.61	36.60±0.37
740Y-P 组	15	42.77±0.41 ²⁾	75.58±0.25 ²⁾	31.49±0.81 ²⁾	61.69±0.63 ²⁾
空白+OXY 组	90	17.14±0.84	24.11±0.41	3.30±0.25	11.51±0.31
740Y-P+OXY 组	15+90	25.58±0.65 ⁴⁾	37.00±0.66 ⁴⁾	9.41±0.82 ⁴⁾	26.20±1.17 ⁴⁾

表 15 740Y-P 预处理后,OXY 对 A549、H1299 细胞侵袭的作用 ($\bar{x}\pm s,n=3$)
Table 15 Effect of OXY on A549 and H1299 cell invasion following 740Y-P treatment ($\bar{x}\pm s,n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	侵袭数/个	
		A549	H1299
空白组		1 349.33±91.43	1 303.33±19.04
740Y-P 组	15	1 790.67±50.30 ²⁾	1 524.00±23.43 ²⁾
空白组+OXY 组	90	838.33±115.51	820.33±54.61
740Y-P+OXY 组	15+90	1 169.00±25.57 ⁴⁾	1 187.00±73.43 ⁴⁾

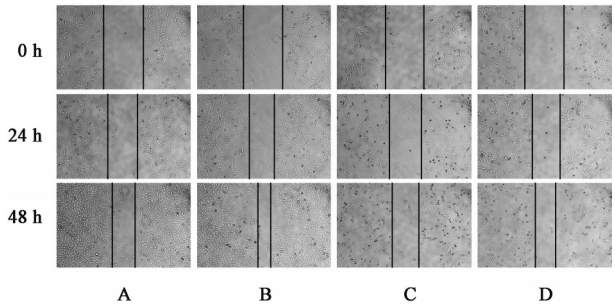


图 12 740Y-P 预处理 OXY 对 A549 细胞迁移的影响 (倒置显微镜,×100)
Fig. 12 Effect of OXY on migration of A549 cells following 740Y-P treatment (inverted microscope,×100)

蛋白 Snail、N-cadherin 和 Vimentin 的表达显著升高 ($P<0.01$), E-cadherin 表达水平显著下降 ($P<0.01$), 表明 740Y-P 可有效激活 PI3K/Akt 信号通路并调控 EMT 关键蛋白的表达; 与空白+OXY 组比较, 740Y-P+OXY 组 NSCLC 细胞 PI3K/Akt 信号通路

表 16 740Y-P 预处理 OXY 对 A549 细胞蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s,n=3$)
Table 16 Effect of OXY on protein expression of A549 cells following 740Y-P treatment ($\bar{x}\pm s,n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	PI3K /GAPDH	p-PI3K /GAPDH	Akt /GAPDH	p-Akt /GAPDH	E-cadherin /GAPDH	N-cadherin /GAPDH	Vimentin /GAPDH	Snail /GAPDH
空白组		1.07±0.11	0.72±0.07	1.00±0.09	0.72±0.10	0.93±0.04	0.35±0.10	0.57±0.07	0.74±0.11
740Y-P 组	15	0.94±0.02	0.98±0.05 ²⁾	0.94±0.07	1.16±0.11 ²⁾	0.57±0.05 ²⁾	0.78±0.10 ²⁾	1.12±0.15 ²⁾	0.98±0.10 ²⁾
空白+OXY 组	90	0.96±0.09	0.50±0.05	1.02±0.01	0.56±0.06	1.11±0.06	0.03±0.03	0.47±0.01	0.46±0.03
740Y-P+OXY 组	15+90	0.95±0.12	0.78±0.07 ⁴⁾	1.00±0.14	0.93±0.09 ⁴⁾	0.75±0.16 ³⁾	0.13±0.05 ³⁾	0.33±0.05 ⁴⁾	0.63±0.10 ⁴⁾

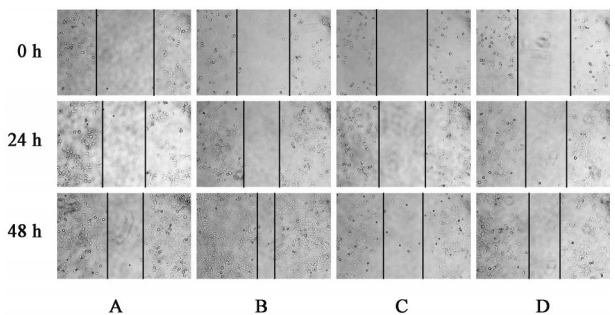


图 13 740Y-P 预处理 OXY 对 H1299 细胞迁移的影响 (倒置显微镜,×100)
Fig. 13 Effect of OXY on migration of H1299 cells following 740Y-P treatment (inverted microscope,×100)

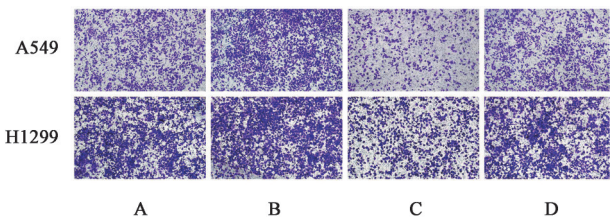


图 14 740Y-P 预处理对 A549、H1299 细胞侵袭的影响 (结晶紫,×100)
Fig. 14 Effect of OXY on A549 and H1299 cell invasion following 740Y-P treatment (crystal violet,×100)

p-PI3K、p-Akt 及 EMT 关键蛋白 Snail、N-cadherin 和 Vimentin 的表达水平明显升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), E-cadherin 的表达水平明显下降 ($P<0.05$), 进一步提示 PI3K/Akt 信号通路可能在 OXY 调控 NSCLC 细胞 EMT 过程中发挥关键作用。见表 16、表 17、图 15。

表 17 740Y-P 预处理 OXY 对 H1299 细胞蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 17 Effect of OXY on protein expression of H1299 cells following 740Y-P treatment ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	PI3K /GAPDH	p-PI3K /GAPDH	Akt /GAPDH	p-Akt /GAPDH	E-cadherin /GAPDH	N-cadherin /GAPDH	Vimentin /GAPDH	Snail /GAPDH
空白组		0.98±0.02	0.82±0.06	0.99±0.10	0.93±0.06	0.96±0.08	0.54±0.01	0.93±0.07	0.83±0.02
740Y-P 组	15	1.01±0.12	1.12±0.14 ¹⁾	0.99±0.11	1.22±0.08 ²⁾	0.69±0.05 ²⁾	1.00±0.12 ²⁾	1.27±0.08 ²⁾	1.07±0.10 ²⁾
空白+OXY 组	90	0.93±0.12	0.31±0.04	1.09±0.12	0.66±0.05	1.27±0.19	0.41±0.05	0.55±0.05	0.36±0.06
740Y-P+OXY 组	15+90	0.95±0.09	0.59±0.10 ³⁾	1.11±0.08	0.92±0.12 ³⁾	0.84±0.06 ³⁾	0.51±0.02 ³⁾	0.93±0.09 ⁴⁾	0.62±0.04 ⁴⁾

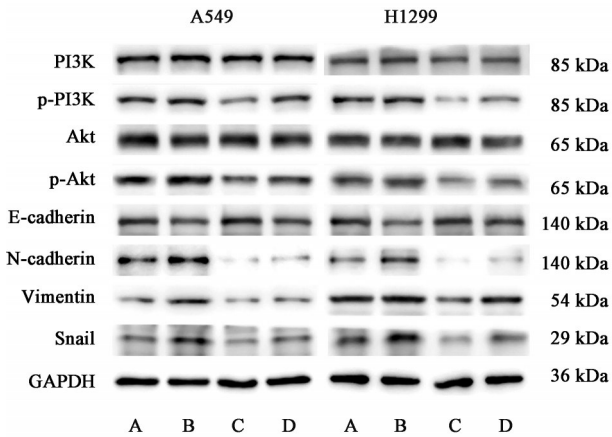


图 15 740Y-P 预处理 A549、H1299 细胞蛋白表达电泳
Fig. 15 Electrophoresis of protein expression of A549, H1299 cells following 740Y-P treatment

4 讨论

肺癌作为全球致死率最高的恶性肿瘤之一,严重威胁人类生命健康。虽然针对 NSCLC 的诊疗手段不断进步,肺癌转移仍是一个尚未有效突破的瓶颈,是临床面临的重大挑战^[16]。近年来,中药单体化合物由于其结构单一和良好的安全性,并能通过多靶点、多通路发挥生物学效应,在抗肿瘤治疗中的潜力日益受到重视^[17]。大量研究表明,多种中药来源的单体化合物,如二苯乙烯类、黄酮类、生物碱类等,可通过调控细胞增殖、凋亡、自噬、侵袭转移及肿瘤微环境等多种通路,发挥显著的抗肿瘤活性,显示出良好的开发潜力与临床应用价值^[18-20]。OXY 属于反式二苯乙烯类化合物,研究显示反式二苯乙烯类化合物具有广谱抗癌活性,能够抑制处于各种阶段的癌细胞^[21-22]。A549 与 H1299 细胞系广泛应用于药物对 NSCLS 的机制研究,尤其是 H1299 具有较强的侵袭能力,是研究 EMT 的经典细胞模型^[23]。本研究以 A549、H1299 细胞模型进行研究,发现 OXY 具有抑制 A549、H1299 肺癌细胞增殖、迁移和侵袭的作用;在 Western blot 检测中,显示 OXY 呈浓度依赖性上调 E-cadherin 和下调 Snail、N-cadherin、Vimentin。上述研究结果表明 OXY 可

通过调控 EMT 抑制 A549、H1299 肺癌细胞增殖、迁移和侵袭的作用。

EMT 是多种细胞因子和信号通路参与的一种重要细胞生物学过程,在肿瘤细胞侵袭转移中发挥重要作用^[24]。其中 E-cadherin 是维持上皮细胞极性和细胞间黏附的关键分子,其表达下调是 EMT 的标志性事件之一,可导致细胞间黏附能力减弱,促进细胞迁移和侵袭^[25]。N-cadherin 是钙黏蛋白家族的重要成员,其异常升高与多种恶性肿瘤的侵袭性增强密切相关^[26]。此外,Vimentin 是 EMT 的经典间质标志物,不仅在维持间质样细胞形态和机械稳定性方面发挥作用,还通过参与细胞骨架重塑促进肿瘤细胞迁移与侵袭^[27]。Snail 是调控 EMT 的核心转录因子之一,可通过抑制 E-cadherin 表达,并上调 N-cadherin 和 Vimentin 等间质相关基因的表达,增强细胞的迁移与侵袭能力^[28]。在恶性肿瘤侵袭转移过程中,EMT 的典型特征表现为上皮细胞逐渐丧失极性和细胞间黏附能力,转变为具有间质样特性的细胞,通常伴随 Snail 等 EMT 相关转录因子的上调及间质标志物的高表达。这一过程不仅赋予肿瘤细胞更强的迁移和侵袭潜能,还与其对化疗和放疗的耐受性增加及免疫逃逸能力密切相关^[29]。

PI3K/Akt 信号通路是真核细胞中高度保守的信号转导系统,在调控细胞存活、增殖及周期进程中发挥核心作用,是肿瘤发生发展的重要驱动因素之一^[30-32]。研究表明,该通路是人类癌症中最常被激活的信号传导机制之一,约 50% 的恶性肿瘤(包括 NSCLC)存在 PI3K/Akt 信号通路的异常激活,并且与肿瘤细胞的侵袭、转移及不良预后密切相关^[33-34]。值得注意的是,PI3K/Akt 信号通路在肿瘤细胞 EMT 的进程密切相关,在肿瘤转移机制中,PI3K 的激活会在 Akt 下游生成第二信使 PIP3,后者通过磷酸化调控下游靶蛋白的活性,抑制 E-cadherin 表达,同时上调 Snail、N-cadherin 和 Vimentin,从而促进 EMT 的发生^[35]。因此,靶向抑制 PI3K/Akt 信号通路以调控 EMT 已成为抗肿瘤治

疗的重要研究方向之一。

本研究通过网络药理学发现 PI3K/Akt 信号通路可能是 OXY 发挥作用的最主要的通路之一。分子对接结果表明药物分子 OXY 与 PI3K、Akt 蛋白具有较好的结合能力。此外,进一步通过 Western blot 检测也证实 OXY 可显著抑制磷酸化蛋白 p-PI3K、p-Akt 的表达。上述研究初步表明 OXY 可能通过调控 PI3K/Akt 信号通路抑制非小细胞肺癌 EMT 进程发挥抗转移的作用。

740Y-P 是 PI3K/Akt 信号通路重要的激活剂,该化合物通过靶向结合 PI3K 调控并增强 p-Akt 活性,是研究 PI3K/Akt 信号转导机制的重要工具分子,常被用于肿瘤控制机制的探索研究^[36]。有学者研究通关藤苷 H 抑制胶质母细胞瘤的作用机制时发现,该化合物可通过调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路抑制肿瘤发展,而 PI3K 激动剂 740Y-P 能部分逆转其抑制效应,证实通关藤苷 H 可能通过 PI3K/Akt/mTOR 通路发挥作用^[37]。在本研究中,为了进一步阐明 OXY 抑制非小细胞肺癌增殖、迁移和侵袭的机制,应用 740Y-P 进行挽救实验研究。结果显示 740Y-P 能够促进 A549、H1299 细胞增殖、迁移与侵袭,且 740Y-P 部分逆转了 OXY 对恶性表型的抑制作用,同样在 Western blot 检测中 740Y-P 也显示出相似的效果,部分逆转了 OXY 抑制 p-PI3K、p-Akt、Snail、N-cadherin、Vimentin 蛋白的表达和上调 E-cadherin 的效应。上述结果表明 OXY 可能通过抑制 PI3K/Akt 信号通路的激活从而调控 EMT 关键蛋白的表达进而达到抑制 NSCLC 上皮间充质转化的作用。

综上,本研究表明,OXY 通过靶向 PI3K/Akt 信号通路抑制非小细胞肺癌 EMT 进程进而发挥抑制肺癌细胞增殖、迁移和侵袭的作用,也初步证实 OXY 可能是抗非小细胞肺癌转移的潜在活性药物,但其对动物模型的作用及机制尚不明确,仍有待进一步研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 郑荣寿,陈茹,韩冰峰,等. 2022 年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志,2024,46(3):221-231.
ZHENG R S, CHEN R, HAN B F, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022 [J]. Chin J Oncol, 2024, 46(3): 221-231.
- [2] 国家卫生健康委办公厅. 原发性肺癌诊疗指南(2022 年版) [J]. 协和医学杂志,2022,13(4):549-570.

- General Office of National Health Commission of the People's Republic of China. Clinical practice guideline for primary lung cancer (2022 version) [J]. Med J Pumch, 2022, 13(4): 549-570.
- [3] 中华医学会呼吸病学分会. 早期肺癌诊断中国专家共识(2023 年版) [J]. 中华结核和呼吸杂志,2023,46(1):1-18.
Chinese Thoracic Society. Chinese expert consensus on diagnosis of early lung cancer (2023 Edition) [J]. Chin J Tuberc Respir Dis, 2023, 46(1): 1-18.
- [4] 黄丛秀,王少军,林宇,等. 放疗序贯免疫治疗Ⅲ期非小细胞肺癌的真实世界研究[J]. 中华放射肿瘤学杂志,2025,34(1):57-64.
HUANG C X, WANG S J, LIN Y, et al. A real-world study of radiotherapy sequential immunotherapy for stage Ⅲ non-small cell lung cancer [J]. Chin J Radiat Oncol, 2025, 34(1): 57-64.
- [5] XI Z, DAI R, ZE Y, et al. Traditional Chinese medicine in lung cancer treatment [J]. Mol Cancer, 2025, 24(1): 57.
- [6] 王苗,周德来,许晓辉,等. UPLC-MS/MS 法同时测定桑白皮中 11 种成分的含量 [J]. 中成药, 2024, 46(10): 3207-3212.
WANG M, ZHOU D L, YU X H, et al. Simultaneous content determination of eleven constituents in Mori Cortex by UPLC-MS/MS [J]. Chin Tradit Pat Med, 2024, 46(10): 3207-3212.
- [7] 韩文杰,张屏,常福厚,等. 内蒙古 3 种野生藜芦化学成分的定性定量分析 [J]. 中国药房,2022,33(8):937-942.
HAN W J, ZHANG P, CHANG F H, et al. Qualitative and quantitative analysis of chemical compounds in 3 species of wild Veratrum from Inner Mongolia [J]. China Pharm, 2022, 33(8): 937-942.
- [8] PASSOS C L A, FERREIRA C, DE CARVALHO A G A, et al. Oxyresveratrol in breast cancer cells: Synergistic effect with chemotherapeutics doxorubicin or melphalan on proliferation, cell cycle arrest, and cell death [J]. Pharmaceutics, 2024, 16(7): 873.
- [9] XIANG L, LI Q, GUAN Z, et al. Oxyresveratrol as a novel ferroptosis inducer exhibits anticancer activity against breast cancer via the EGFR/PI3K/Akt/GPX4 signalling axis [J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1527286.
- [10] LIU Y, REN W, BAI Y, et al. Oxyresveratrol prevents murine H22 hepatocellular carcinoma growth and lymph node metastasis via inhibiting tumor angiogenesis and lymphangiogenesis [J]. J Nat Med, 2018, 72(2): 481-492.
- [11] TAN A C. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. Thorac Cancer, 2020, 11(3): 511-518.
- [12] MOGHBELI M. PI3K/Akt pathway as a pivotal regulator of epithelial-mesenchymal transition in lung tumor cells [J]. Cancer Cell Int, 2024, 24(1): 165.
- [13] IKSEN, POTHONGSRISIT S, PONGRAKHANANON V. Targeting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in lung cancer: An update regarding potential drugs and natural

- products[J]. *Molecules*, 2021, 26(13):4100.
- [14] 王俊亮,梁佩华,马学莉,等. 基于网络药理学、分子对接和细胞实验验证研究西黄丸抗乳腺增生作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2026, 32(4):41-49.
- WANG J L, LIANG P H, MA X L, et al. Study on mechanism of anti-mammary hyperplasia action of Xihuang pills based on network pharmacology, molecular docking and cellular experimental validation [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2026, 32(4):41-49.
- [15] 王浩贤,李久现,刘妍,等. 基于网络药理学研究和细胞实验验证探讨菟丝子-丹参调控 IL-6/STAT3 信号通路治疗复发性流产的作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31(20):22-30.
- WANG H X, LI J X, LIU Y, et al. Exploring mechanism of cuscuteae semen-salvia miltiorrhiza regulating IL-6/STAT3 signaling pathway treating recurrent miscarriage based on network pharmacology and cell experiment validation [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2025, 31(20):22-30.
- [16] 李安娜,江本元,徐崇锐,等. 肺癌新型治疗方法:机会与挑战[J]. *循证医学*, 2025, 25(1):1-18.
- LI A N, JIANG B Y, XU C R, et al. Opportunities and challenges of new treatment strategy in non-small cell lung cancer[J]. *J Evid Based Med*, 2025, 25(1):1-18.
- [17] LIU Y, YANG S, WANG K, et al. Cellular senescence and cancer: Focusing on traditional Chinese medicine and natural products[J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(10):e12894.
- [18] GARBICZ D, TOBIASZ P, BORYS F, et al. The stilbene and dibenzo [b, f] oxepine derivatives as anticancer compounds [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 123:109781.
- [19] SLIKA H, MANSOUR H, WEHBE N, et al. Therapeutic potential of flavonoids in cancer: ROS-mediated mechanisms [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 146:112442.
- [20] KOOCHAKI R, AMINI E, ZAREHOSSINI S, et al. Alkaloids in cancer therapy: Targeting the tumor microenvironment and metastasis signaling pathways [J]. *Fitoterapia*, 2024, 179:106222.
- [21] PARIDA P K, MAHATA B, SANTRA A, et al. Inhibition of cancer progression by a novel trans-stilbene derivative through disruption of microtubule dynamics, driving G₂/M arrest, and p53-dependent apoptosis[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(5):448.
- [22] SAVIO M, FERRARESI A, CORPINA C, et al. Resveratrol and its analogue 4, 4'-dihydroxy-trans-stilbene inhibit Lewis lung carcinoma growth *in vivo* through apoptosis, autophagy and modulation of the tumour microenvironment in a murine model[J]. *Biomedicines*, 2022, 10(8):1784.
- [23] 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.
- [24] BABAEI G, AZIZ S G, JAGHI N Z Z. EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 133:110909.
- [25] NA T, SCHECTERSON L, MENDONSA A M, et al. The functional activity of E-cadherin controls tumor cell metastasis at multiple steps [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(11):5931-5937.
- [26] CAO Z, WANG Z, LENG P. Aberrant N-cadherin expression in cancer[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118:109320.
- [27] VAN LOON K, VAN BREEST SMALLENBURG M E, HUIJBERS E J M, et al. Extracellular vimentin as a versatile immune suppressive protein in cancer [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2023, 1878(6):188985.
- [28] WANG Y, SHI J, CHAI K, et al. The role of Snail in EMT and tumorigenesis [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2013, 13(9):963-972.
- [29] FONTANA R, MESTRE-FARRERA A, YANG J. Update on epithelial-mesenchymal plasticity in cancer progression [J]. *Annu Rev Pathol*, 2024, 19:133-156.
- [30] KHEZRI M R, HSUEH H, MOHAMMADIPANAH S, et al. The interplay between the PI3K/Akt pathway and circadian clock in physiologic and cancer-related pathologic conditions [J]. *Cell Prolif*, 2024, 57(7):e13608.
- [31] HOXHAIJ G, MANNING B D. The PI3K-Akt network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism [J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20(2):74-88.
- [32] GLAVIANO A, FOO A S C, LAM H Y, et al. PI3K/Akt/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer [J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1):138.
- [33] YU L, WEI J, LIU P. Attacking the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway for targeted therapeutic treatment in human cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 85:69-94.
- [34] GU J, HUANG K, ZHAO W, et al. NCAPD2 augments the tumorigenesis and progression of human liver cancer via the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2024, 54(4):84.
- [35] XU W, YANG Z, LU N. A new role for the PI3K/Akt signaling pathway in the epithelial-mesenchymal transition [J]. *Cell Adh Migr*, 2015, 9(4):317-324.
- [36] HU S, LI S, XU Y, et al. The antitumor effects of herbal medicine Triphala on oral cancer by inactivating PI3K/Akt signaling pathway: Based on the network pharmacology, molecular docking, *in vitro* and *in vivo* experimental validation [J]. *Phytomedicine*, 2024, 128:155488.
- [37] DONG J, QIAN Y, ZHANG W, et al. Tenacissoside H repressed the progression of glioblastoma by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 968:176401.

[责任编辑 张丰丰]