

基于 p53/AMPK 信号通路观察益气扶正解毒汤对 A549 细胞自噬水平和生长的影响

吴俏兰¹, 宋婷², 陈泽涛², 陈修保², 张宜晨¹, 陈维达^{2*}

(1. 山东中医药大学第一临床医学院, 济南 250014;

2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250014)

[摘要] 目的:探讨益气扶正解毒汤对 A549 细胞自噬水平和生长的作用及机制。方法:制备益气扶正解毒汤含药血清干预 A549 肺癌细胞。蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 A549 细胞中自噬蛋白微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3),自噬关键分子酵母 Atg6 同系物 1(Beclin1), p62, p53 蛋白和腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK),磷酸化 AMPK(p-AMPK),哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)和磷酸化 mTOR(p-mTOR)蛋白的水平,免疫荧光(IF)检测微管相关蛋白 1A/1B 轻链 3B(MAP1LC3B)蛋白水平,5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶核苷(EDU)染色、侵袭实验(Transwell)和 β -半乳糖苷酶染色分别检测含药血清对细胞增殖、侵袭、衰老情况的影响;设置自噬抑制剂甲基腺嘌呤(3-MA, 5 mmol·L⁻¹)干预组,即分为 10% 胎牛血清组(空白组),10% 正常血清组(正常组),10% 含药血清低、中、高剂量组,10% 高剂量含药血清加 3-MA(高剂量+3-MA)组,检测各组细胞增殖、侵袭、衰老水平;并设置 p53 抑制剂(PFT- α , 10 μ mol·L⁻¹)组,即分为正常组,PFT- α 组,高剂量组,高剂量+PFT- α 组,检测自噬相关蛋白 LC3-II, Beclin1 表达水平和 MAP1LC3B 免疫荧光强度及各组细胞增殖、侵袭、衰老的情况。结果:与空白组、正常组比较,干预 A549 细胞 48 h,益气扶正解毒汤中、高剂量组 LC3-II 和 Beclin1 蛋白水平呈剂量依赖性升高($P<0.01$);益气扶正解毒汤低、中、高剂量组 p62, p-mTOR/mTOR 蛋白下降($P<0.05$, $P<0.01$), p53, p-AMPK/AMPK 蛋白表达升高($P<0.01$);益气扶正解毒汤低、中、高剂量组 A549 细胞增殖、侵袭数量明显降低,细胞衰老数量显著增多($P<0.01$),同时 MAP1LC3B 免疫荧光强度增强,且益气扶正解毒汤高剂量组效果最佳;与益气扶正解毒汤高剂量组比较,益气扶正解毒汤高剂量+3-MA 组、益气扶正解毒汤高剂量+PFT- α 组发生增殖、侵袭的细胞数量均增加,而发生衰老的细胞数量明显减少($P<0.05$, $P<0.01$),同时,高剂量+PFT- α 组的 MAP1LC3B 免疫荧光强度减弱及自噬相关蛋白 LC3-II, Beclin1 蛋白表达水平降低($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:益气扶正解毒汤可经 p53/AMPK 信号通路上调 A549 细胞自噬水平,进而抑制 A549 细胞增殖、侵袭迁移,促进细胞衰老,在抑制肺癌进展中具有重要作用。

[关键词] 益气扶正解毒汤; A549 细胞; 自噬; p53/腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)通路

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)22-0065-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212121

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210902.0848.001.html>

[网络出版日期] 2021-09-02 9:20

Effect of Yiqi Fuzheng Jiedu Decoction on Autophagy and Growth of A549 Cells: An Exploration Based on p53/AMPK Signaling Pathway

WU Qiao-lan¹, SONG Ting², CHEN Ze-tao², CHEN Xiu-bao², ZHANG Yi-chen¹, CHEN Wei-da^{2*}

(1. First Clinical Medical College, Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Jinan 250014, China; 2. Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Jinan 250014, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of Yiqi Fuzheng Jiedu decoction (YQFZJDD) on autophagy and growth of A549 cells. **Method:** A549 cells were intervened with YQFZJDD-

[收稿日期] 20210727(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82004281)

[第一作者] 吴俏兰,在读硕士,从事中西医结合老年医学相关疾病的研究,E-mail:wuqiaolan717@163.com

[通信作者] * 陈维达,博士,副主任医师,从事中西医结合老年医学病防治研究,Tel:0531-68617056,E-mail:chenweida_2000@126.com

containing serum prepared in advance. The levels of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), homologue of yeast autophagy-related gene 6 (Beclin1), p62, p53, adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase (AMPK), phosphorylated AMPK (p-AMPK), mammalian target of rapamycin (mTOR), and phosphorylated mTOR (p-mTOR) were detected by Western blot assay, and microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3B (MAP1LC3B) by immunofluorescence (IF) assay. The proliferation, invasion, and senescence of A549 cells were separately measured by 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EDU) staining, Transwell assay, and β -galactosidase staining. In the presence of autophagy inhibitor 3-methyladenine (3-MA, $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), the cells were divided into the 10% fetal bovine serum (blank) group, 10% control serum (control) group, low-, medium-, and high-dose 10% YQFZJDD-containing serum groups, and high-dose 10% YQFZJDD-containing serum + 3-MA group, followed by the measurement of A549 cell proliferation, invasion, and senescence. In the adoption of p53 inhibitor Pifithrin- α (PFT- α , $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), the cells were divided into the control group, PFT- α group, high-dose YQFZJDD-containing serum group, and high-dose YQFZJDD-containing serum + PFT- α group. Then the LC3- II and Beclin1 expression, MAP1LC3B fluorescence intensity, as well as A549 cell proliferation, invasion and senescence were determined. **Result:** Compared with the blank group and control group, YQFZJDD-containing serum at the medium and high doses up-regulated the protein expression levels of LC3- II and Beclin1 in A549 cells after 48-h intervention in a dose-dependent manner ($P < 0.01$). Besides, YQFZJDD-containing serum at the low-, medium-, and high-doses down-regulated p62 and p-mTOR/mTOR expression ($P < 0.05$, $P < 0.01$), elevated p53 and p-AMPK/AMPK ($P < 0.01$), decreased the number of proliferative and invasive cells, increased the number of senescent cells ($P < 0.01$), and enhanced the IF intensity of MAP1LC3B, with the optimal effect observed in the high-dose YQFZJDD-containing serum group ($P < 0.01$). Compared with the high-dose YQFZJDD-containing serum group, the high-dose YQFZJDD-containing serum + 3-MA group and high-dose YQFZJDD-containing serum + PFT- α group exhibited significantly increased proliferative and invasive cells but decreased senescent cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Meanwhile, the IF intensity of MAP1LC3B in the high-dose YQFZJDD-containing serum + PFT- α group was weakened and the LC3- II and Beclin1 protein expression levels declined ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** YQFZJDD promotes the autophagy of A549 cells through the p53/AMPK signaling pathway to inhibit their proliferation, invasion and migration but accelerate senescence, thus playing a crucial role in inhibiting the progression of lung cancer.

[Keywords] Yiqi Fuzheng Jiedu decoction (YQFZJDD); A549 cells; autophagy; p53/adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway

肺癌是我国最为常见的恶性肿瘤,其发病率、死亡率逐年升高,其中非小细胞肺癌(NSCLC)约占肺癌总发病率的85%。目前,NSCLC的治疗方法包括手术治疗、放射疗法、免疫疗法或靶向药物疗法,辅助化疗仅可使早期NSCLC患者的5年生存率提高约5%,且存有严重的耐药性及不良反应^[1]。研究表明,中医药拥有疗效佳、不良反应少的优势,能够调控细胞自噬,介导细胞凋亡,抑制细胞增殖、转移、侵袭及抗炎、抗血管生成等,被广泛运用于治疗各种癌症,尤其在治疗NSCLC方面应用广泛^[2-5]。益气扶正解毒汤宗《万病回春》清肺汤之法,经适当加减裁化而成,易山栀为白花蛇舌草、当归为莪术,加黄芪益气扶正。现代药理学研究表明益气扶正

解毒汤中诸药均具有抗肿瘤、提高机体免疫力的作用^[6-7],方中黄芪味甘性温,大补肺脾之气;麦冬甘润,滋阴清热,补肺生津;黄芩味苦性寒,可泻肺火,消痰利气而解毒;莪术入肺经,行瘀血而消积聚;白花蛇舌草清热解毒,活血消痈;全方具有益气扶正、抗癌解毒的功效,临床应用疗效显著。

NSCLC中已知最常见的突变基因是p53,在45%~70%的腺癌和60%~80%的鳞状细胞癌中均可见。位于细胞质中的p53蛋白在细胞应激时通过多种激酶的直接或间接磷酸化作用转移到细胞核,核p53可诱导自噬和相关凋亡基因的转录,从而抑制肺癌细胞生长^[8-9]。细胞自噬在哺乳动物中普遍存在,可有效防止受损蛋白质和细胞器的毒性积累,

自噬的溶酶体降解途径由进化保守的自噬相关基因(Atg)介导,自噬功能障碍与包括肺癌在内许多疾病的病理过程有关,在肿瘤发生过程中,自噬可通过去除致癌蛋白并维持基因组稳定性在多个阶段抑制癌症的形成^[10-11]。自噬在肿瘤细胞存亡中发挥双刃剑作用,如低能量状态下可激活腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)促进自噬抑制肿瘤细胞,而营养丰富时激活哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)可抑制自噬作用^[12-13]。中医药可上调细胞自噬水平抑制肺癌发展^[14],其调控细胞自噬的作用通路和靶点众多,因此,本研究基于p53/AMPK信号通路探讨益气扶正解毒汤调控细胞自噬抑制A549细胞生长的机制,提出p53/AMPK通路是益气扶正解毒汤上调细胞自噬的作用通路(图1),以期后续探讨益气扶正解毒汤治疗NSCLC的分子生物学机制提供基础。

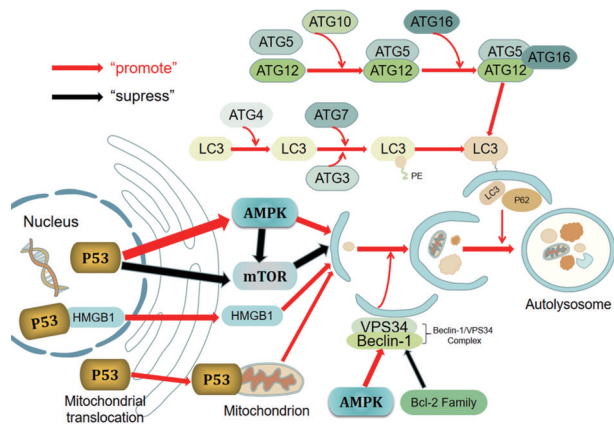


图1 益气扶正解毒汤通过p53/AMPK信号通路调控细胞自噬^[15]
Fig. 1 Yiqi Fuzheng Jiedu decoction regulates autophagy through p53/AMPK signaling pathway

1 材料

1.1 细胞及动物 人非小细胞肺癌细胞系A549细胞(Procell公司,批号CL-0016),用高糖完全培养基(含10%胎牛血清和0.5%青-链霉素)并于37℃,5%CO₂孵箱中培养,传至15~20代。雄性SPF级SD大鼠,(200±20)g,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司,合格证号SCXK(鲁)20190003,本实验动物及条件符合山东中医药大学附属医院实验动物伦理委员会要求(批号AWE-2019-053)。

1.2 药物与试剂 益气扶正解毒汤由黄芪28g,麦冬28g,黄芩22g,莪术28g,白花蛇舌草28g组成,中药饮片在山东中医药大学附属医院购买,所有药材均由山东中医药大学李峰教授鉴定为正品,符合2015年版《中华人民共和国药典》规范。DMEM高

糖培养基(南京凯基生物科技公司,批号KGM1280 0N-500);胎牛血清(南美Lonsera公司,批号S711-001S);5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶核苷(EDU)细胞增殖检测试剂盒(广州锐博生物科技公司,批号C10310-3);β-半乳糖苷酶染色试剂盒,BCA蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技公司,批号分别为G1508,PC0020);SDS-PAGE凝胶快速配置试剂盒(上海碧云天生物技术公司,P0012AC);ECL超敏化学发光试剂盒,二抗辣根过氧化物酶(HRP)-羊抗鼠免疫球蛋白(Ig)G,HRP-羊抗兔IgG(山东思科捷生物科技公司,批号分别为ED0015,EF0001,EF0002);抗体LC3,自噬关键分子酵母Atg6同系物1(Beclin1)(美国Cell Signaling Technology,批号分别为12741,3495);抗体p62(英国Abcam公司,ab91526);抗体p53,AMPK,磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶(p-AMPK),mTOR,磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR),β-肌动蛋白(β-actin)(北京博奥森生物技术公司,批号分别为bs-8687R,bs-1115R,bsm-52132R,bs-1992R,bs-3495R,bs-0061r);结晶紫(武汉赛维尔生物科技有限公司,G1014-50ML);自噬抑制剂甲基腺嘌呤(3-MA),p53抑制剂Pifithrin-α(PFT-α)(美国Sigma公司,批号分别为189490,P4359)。

1.3 仪器 1510型酶标仪,75007201型普通离心机(美国Thermo公司);VELOCITY 18R型高速冷冻离心机(澳大利亚Dynamica公司);Mini-PROTEAN Tetra型电泳槽,Mini-PROTEAN Tetra型转膜槽(美国Bio-Rad公司);DYY-6C型电泳仪电源(北京六一生物科技有限公司);Tanon 5200 Multi型全自动化学发光/荧光图像分析系统(上海天能科技有限公司);DM IL LED型荧光倒置显微镜(德国Leica公司)。

2 方法

2.1 益气扶正解毒汤含药血清制备 按照成人(60kg)与大鼠体表面积折算的等效剂量比值为6.2^[16]进行换算计算出大鼠每日生药剂量分别为低、中、高剂量7,14,28g·kg⁻¹组(临床给药剂量的0.5倍,等量临床给药剂量,2倍),常规水煎浓缩至含生药2.8g·mL⁻¹,冷却后分装置于4℃冰箱保存。大鼠随机分成4组(正常组,益气扶正解毒汤含药血清低、中、高剂量组),每组8只。中药组予灌胃相应剂量中药,正常组灌胃100g·mL⁻¹剂量生理盐水,每日2次,连续7d。末次给药1h内,经10%水合氯醛(3.5mL·kg⁻¹)腹腔注射麻醉,腹主动脉取血后常温

静置 2 h, $3\ 000\ r\cdot\min^{-1}$ 离心 15 min (离心半径 13.5 cm) 后取上清, $56\ ^\circ\text{C}$ 水浴灭活 30 min, 然后用 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤网除菌, 分装后置于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 冰箱备用。

2.2 观察指标及方法

2.2.1 EDU 染色检测细胞增殖情况 将细胞接种于 96 孔板中 (5×10^3 个/孔), 每组 3 个复孔, 设置自噬抑制剂甲基腺嘌呤 (3-MA, $5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 干预组, 即分为 10% 胎牛血清组 (空白组), 10% 正常血清组 (正常组), 10% 含药血清低、中、高剂量组, 10% 高剂量含药血清加 3-MA (高剂量+3-MA) 组和设置 p53 抑制剂 (PFT- α , $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 干预组, 即分为正常组, 10% 正常血清组加 PFT- α (PFT- α 组), 高剂量组, 高剂量+PFT- α 组 (高剂量+3-MA 组细胞用溶于 DMSO 的 $5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 3-MA 预处理 1 h, 再进行干预^[17]; PFT- α 组、高剂量+PFT- α 组细胞用溶于 DMSO 的 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PFT- α 预处理 1 h, 再进行干预^[18])。干预 48 h, 加入 EDU 培养基孵育 2 h, 4% 多聚甲醛固定 15 min, Apollo[®] 染色反应液室温避光染色 30 min, Hoechst 33342 反应液室温避光孵育 30 min, 洗涤, 于荧光显微镜下观察拍照。

2.2.2 侵袭实验检测细胞侵袭能力 将细胞接种于六孔板中 (5×10^4 个/孔), 每组 3 个复孔, 分组及给药同 2.2.1 项。干预 48 h 后, 无血清培养基以 1:8 稀释 Matrigel 胶, 并加 100 μL 至 Transwell 孔上室, 室温静置 30 min 后弃多余液体, 各组细胞重悬调整细胞密度为 1×10^5 个/mL, 上室加细胞悬液 (不含血清) 200 μL , 下室加完全培养基 (含 20% FBS) 600 μL , 培养 48 h, 甲醇固定 15 min, 0.2% 结晶紫染色 20 min, 洗涤, 用棉签清理小室残余基质胶, 晾干, 于显微镜下观察拍照。

2.2.3 β -半乳糖苷酶染色检测细胞衰老水平 将细胞接种于六孔板中 (5×10^4 个/孔), 每组 3 个复孔, 细胞分组及给药同 2.2.1 项。细胞干预 48 h, 用 β -半乳糖苷酶室温染色固定液固定 15 min, 洗涤, 加入染色工作液 $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育过夜, 次日于显微镜下观察拍照。

2.2.4 免疫荧光 (IF) 检测细胞微管相关蛋白 1A/1B

轻链 3B (MAP1LC3B) 表达水平 将细胞接种于六孔板中 (5×10^4 个/孔), 设置含药血清干预组, 即分为 10% 胎牛血清组 (空白组), 10% 正常血清组 (正常组), 10% 含药血清低、中、高剂量组和设置 PFT- α 干预组, 即分为正常组, PFT- α 组, 高剂量组, 高剂量+PFT- α 组。细胞干预 48 h, 洗涤、多聚甲醛固定封闭、洗涤、抗原修复、清除内源性过氧化物酶活性、山羊血清封闭、 $4\ ^\circ\text{C}$ 孵育一抗 (1:100) 过夜。次日, 室温避光孵育二抗 (1:1 000)、洗涤, 加入 DAPI 避光孵育 5 min 进行核染色, 抗荧光淬灭封片剂封片, 用荧光显微镜拍照摄影。

2.2.5 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测相关蛋白表达 细胞培养、分组及加药同 2.2.4 项。干预 48 h 后, 收集细胞提取蛋白、测定蛋白浓度, 电泳、转膜, 5% 奶粉封闭 1 h, $4\ ^\circ\text{C}$ 孵育相应一抗 (1:1 000) 过夜, 室温孵育二抗 (1:1 万) 1 h, 显影, 用软件 Image J 分析蛋白条带。

2.3 统计学分析处理 采用 Graphpad Prism 5.0 软件进行数据分析、统计、作图, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 计量资料数据多组间比较符合条件采用单因素方差分析, 两组之间比较采用 unpaired *t*-test 分析。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 益气扶正解毒汤含药血清对细胞自噬相关蛋白表达的影响 与空白组、正常组比较, 益气扶正解毒汤中、高剂量组 A549 细胞的自噬相关蛋白 LC3-II, Beclin1 表达水平均显著升高 ($P<0.01$), p62 蛋白表达显著减少 ($P<0.01$), 并呈剂量依赖性, 益气扶正解毒汤高剂量组效果更为显著。与空白组、正常组比较, 益气扶正解毒汤低剂量组 p62 蛋白表达下调 ($P<0.05$, $P<0.01$), 说明益气扶正解毒汤可上调 A549 细胞自噬水平。见表 1, 图 2。

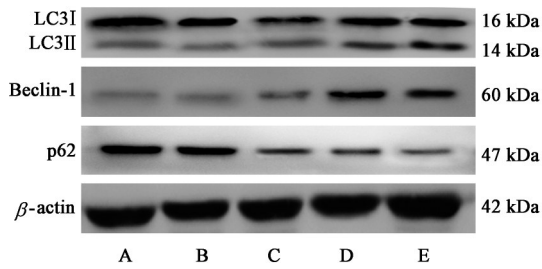
3.2 益气扶正解毒汤含药血清对细胞 MAP1LC3B 蛋白表达的影响 与空白组、正常组比较, 益气扶正解毒汤低、中、高剂量组细胞的免疫荧光强度明显增强, 且呈剂量依赖性, 益气扶正解毒汤高剂量

表 1 益气扶正解毒汤含药血清对 A549 细胞自噬相关蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 1 Effect of Yiqi Fuzheng Jiedu decoction-containing serum on expression of autophagy related proteins in A549 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	体积分数	LC3-II/ β -actin	Beclin1/ β -actin	p62/ β -actin
正常	10% 正常血清	1.01 \pm 0.16	1.09 \pm 0.27	1.12 \pm 0.17
益气扶正解毒汤	10% 低剂量含药血清	1.46 \pm 0.18	1.51 \pm 0.10	0.63 \pm 0.12 ^{1,3)}
	10% 中剂量含药血清	2.02 \pm 0.38 ^{2,3)}	2.59 \pm 0.22 ^{2,3)}	0.55 \pm 0.18 ^{2,3)}
	10% 高剂量含药血清	2.25 \pm 0.05 ^{2,3)}	2.75 \pm 0.39 ^{2,3)}	0.25 \pm 0.05 ^{2,3)}

注: 设空白组蛋白相对表达量为 1; 与空白组比较¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与正常组比较³⁾ $P<0.01$ 。



A. 空白组; B. 正常组; C-E. 益气扶正解毒汤低、中、高剂量组 (图3, 4同)

图2 益气扶正解毒汤含药血清对A549细胞自噬相关蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of Yiqi Fuzheng Jiedu decoction-containing serum on expression of autophagy related proteins in A549 cells

组细胞荧光强度最强, 空白组和正常组细胞荧光强度最弱, 提示益气扶正解毒汤能促进细胞中MAP1LC3B的表达。见图3。

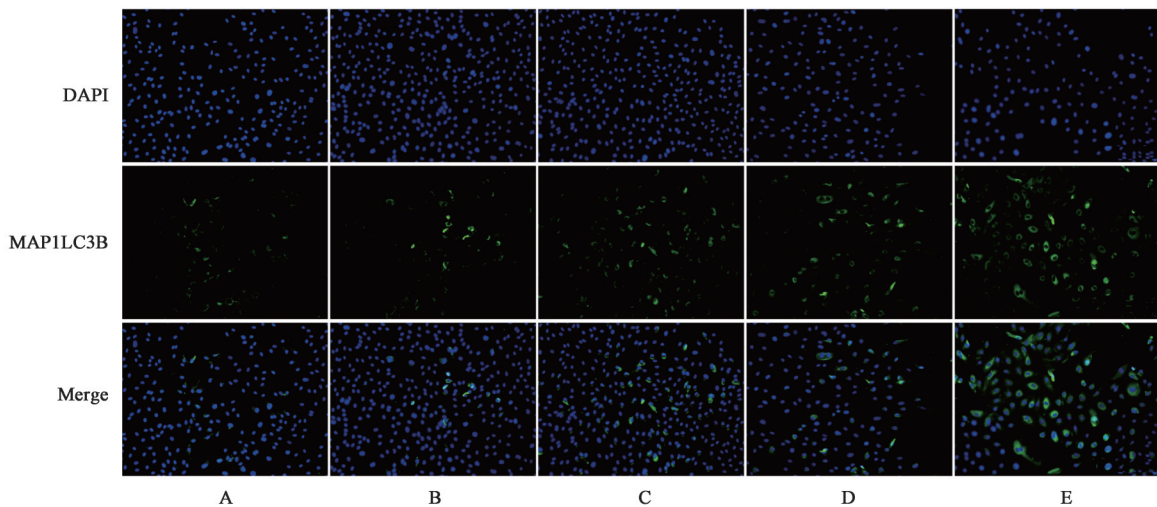


图3 益气扶正解毒汤含药血清对A549细胞MAP1LC3B蛋白表达的影响(IF, ×200)

Fig. 3 Effect of Yiqi Fuzheng Jiedu decoction-containing serum on expression of protein MAP1LC3B in A549 cells(IF, ×200)

表2 益气扶正解毒汤含药血清对A549细胞中p53, AMPK通路蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of Yiqi Fuzheng Jiedu decoction-containing serum on expression of p53/AMPK pathway proteins in A549 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	体积分数	p53/ β -actin	p-AMPK/AMPK	p-mTOR/mTOR
正常	10%正常血清	1.00 \pm 0.13	1.25 \pm 0.10	1.12 \pm 0.17
益气扶正解毒汤	10%低剂量含药血清	1.51 \pm 0.17 ^{1,2)}	1.95 \pm 0.09 ^{1,2)}	0.33 \pm 0.09 ^{1,2)}
	10%中剂量含药血清	3.15 \pm 0.17 ^{1,2)}	1.59 \pm 0.17 ^{1,2)}	0.37 \pm 0.07 ^{1,2)}
	10%高剂量含药血清	2.96 \pm 0.08 ^{1,2)}	2.65 \pm 0.22 ^{1,2)}	0.48 \pm 0.01 ^{1,2)}

注: 设空白组蛋白相对表达量为1; 与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与正常组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

与空白组和正常组比较, 益气扶正解毒汤低、中、高剂量组和益气扶正解毒汤高剂量+3-MA组中发生侵袭的细胞数量显著减少($P < 0.01$), 并呈剂量依赖性, 益气扶正解毒汤高剂量组侵袭细胞数目最少; 与益气扶正解毒汤高剂量组比较, 高剂量+

3.3 益气扶正解毒汤含药血清对p53, AMPK, mTOR蛋白表达的影响 与空白组、正常组比较, 益气扶正解毒汤含药血清各剂量组细胞的p53, p-AMPK/AMPK蛋白表达水平均升高, p-mTOR/mTOR蛋白表达水平下降($P < 0.01$), 差异有显著统计学意义。见表2, 图4。

3.4 3-MA和益气扶正解毒汤含药血清对A549细胞增殖、侵袭及促进细胞衰老的影响 空白组和正常组中A549细胞视野中均有较多增殖的细胞, 呈现出较高的增殖活力, 两组间差异无统计学意义; 与空白组、正常组比较, 益气扶正解毒汤低、中、高剂量组和益气扶正解毒汤高剂量+3-MA组的增殖细胞数量显著减少($P < 0.01$), 并呈剂量依赖性, 剂量越高, 数量越少; 与高剂量组比较, 高剂量+3-MA组的增殖细胞数量显著增加($P < 0.01$), 差异有显著统计学意义。见图5, 表3。

3-MA发生侵袭的细胞数量显著增加($P < 0.01$)。见图6, 表3。

与空白组和正常组比较, 益气扶正解毒汤低、中、高剂量组和益气扶正解毒汤高剂量+3-MA组衰老的细胞数量增多($P < 0.01$); 与益气扶正解毒汤高

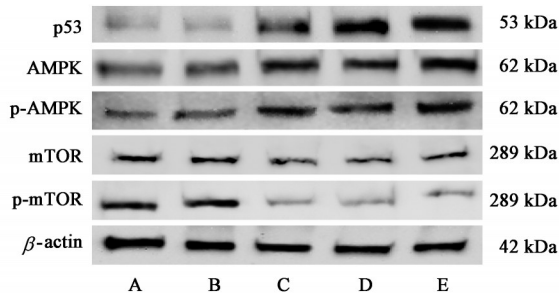


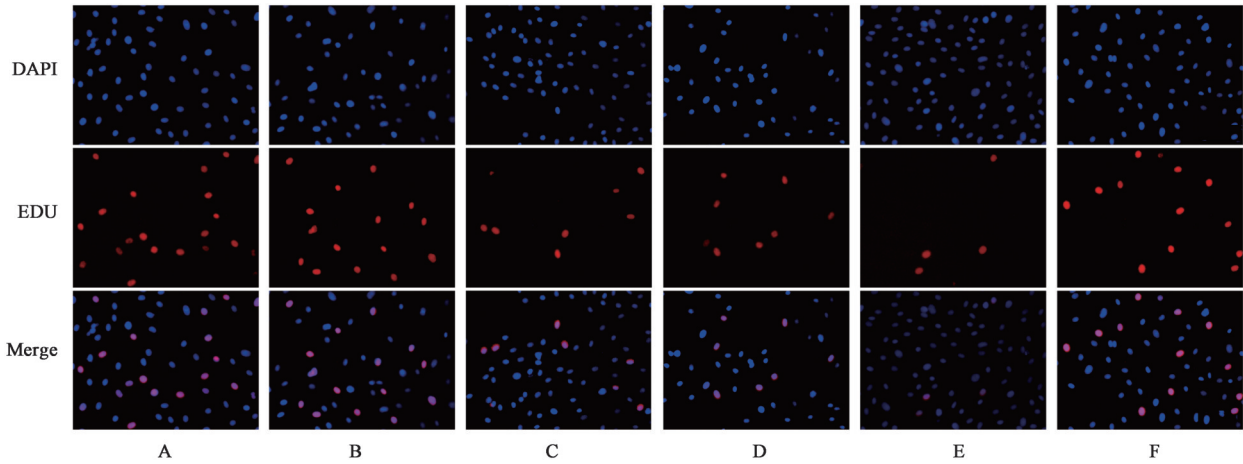
图 4 益气扶正解毒汤含药血清对 A549 细胞中 p53, AMPK 通路蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of Yiqi Fuzheng Jiedu decoction-containing serum on expression of p53/AMPK pathway proteins in A549 cells

剂量组比较, 益气扶正解毒汤高剂量+3-MA 组中发生衰老的细胞数量明显减少 ($P < 0.01$)。见图 7,

表 3。表明益气扶正解毒汤可上调细胞自噬水平抑制细胞增殖、侵袭, 促进细胞衰老, 且 3-MA 可减弱益气扶正解毒汤对 A549 细胞增殖、侵袭的抑制效应及细胞衰老的促进效应。

3.5 PFT- α 和益气扶正解毒汤含药血清对蛋白 LC3- II, Beclin1 表达的影响 与正常组及 PFT- α 组比较, 益气扶正解毒汤高剂量组 LC3- II, Beclin1 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$), 益气扶正解毒汤高剂量+PFT- α 组的 LC3 II 蛋白水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与益气扶正解毒汤高剂量组比较, 益气扶正解毒汤高剂量+PFT- α 组中的 LC3- II, Beclin1 蛋白水平明显降低 ($P < 0.05$)。说明 PFT- α 可减弱益气扶正解毒汤对细胞自噬的诱导作用, 提示 p53 是益气扶正解毒汤促进细胞自噬的作用靶点。见表 4, 图 8。



A. 空白组; B. 正常组; C~E. 益气扶正解毒汤低、中、高剂量组 F. 益气扶正解毒汤+3-MA 组 (图 6, 7 同)

图 5 益气扶正解毒汤含药血清对 A549 细胞的增殖能力的影响 (EDU, $\times 200$)

Fig. 5 Electrophoresis of Yiqi Fuzheng Jiedu decoction-containing serum on proliferation of A549 cells (EDU, $\times 200$)

表 3 益气扶正解毒汤含药血清对 A549 细胞增殖、侵袭、衰老水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of Yiqi Fuzheng Jiedu decoction-containing serum on proliferation, invasion and senescence of A549 cells ($\bar{x} \pm s$) 个				
组别	浓度	增殖细胞数 (n=4)	侵袭细胞数 (n=6)	衰老细胞数 (n=4)
空白	10% 胎牛血清	21.00 \pm 3.37	139.00 \pm 22.39	64.50 \pm 6.56
正常	10% 正常血清	19.25 \pm 2.50	142.17 \pm 10.94	49.50 \pm 8.89
益气扶正解毒汤	10% 低剂量含药血清	10.25 \pm 2.22 ^{1,2)}	102.00 \pm 18.27 ^{1,2)}	111.75 \pm 11.41 ^{1,2)}
	10% 中剂量含药血清	9.25 \pm 2.22 ^{1,2)}	55.50 \pm 17.74 ^{1,2)}	169.50 \pm 14.62 ^{1,2)}
	10% 高剂量含药血清	4.75 \pm 0.96 ^{1,2)}	38.17 \pm 7.68 ^{1,2)}	239.50 \pm 13.96 ^{1,2)}
益气扶正解毒汤+3-MA	10% 高剂量含药血清+5 mmol \cdot L ⁻¹	12.00 \pm 2.16 ^{1,2,3)}	94.83 \pm 17.23 ^{1,2,3)}	108.00 \pm 9.35 ^{1,2,3)}

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与正常组比较²⁾ $P < 0.01$; 与益气扶正解毒汤高剂量组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

3.6 PFT- α +益气扶正解毒汤含药血清对 MAP1LC3B 表达的影响 与正常组比较, PFT- α 组细胞中的 MAP1LC3B 蛋白免疫荧光强度差异无统计学意义;

与正常组, PFT- α 组比较, 益气扶正解毒汤高剂量组, 益气扶正解毒汤高剂量+PFT- α 组的免疫荧光强度均较强; 与益气扶正解毒汤高剂量组比较, 益气

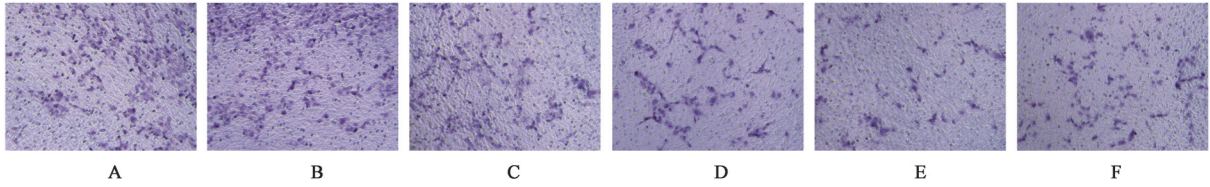


图 6 益气扶正解毒汤含药血清对 A549 细胞的侵袭能力的影响(结晶紫, ×200)

Fig. 6 Electrophoresis of Yiqi Fuzheng Jiedu decoction-containing serum on invasion of A549 cells (crystal violet, ×200)

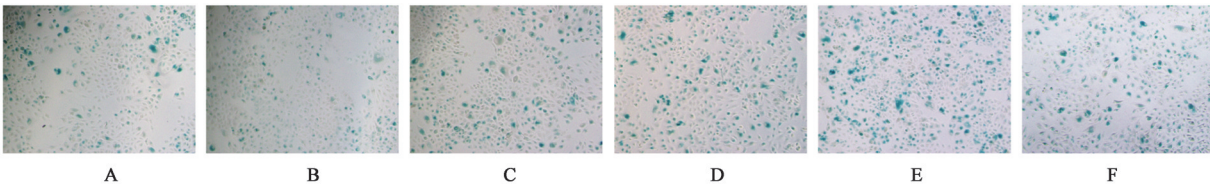


图 7 益气扶正解毒汤含药血清对 A549 细胞的衰老水平的影响(β-半乳糖苷酶, ×200)

Fig. 7 Electrophoresis of Yiqi Fuzheng Jiedu decoction-containing serum on senescence of A549 cells (β-galactosidase, ×200)

表 4 益气扶正解毒汤含药血清对 A549 细胞蛋白 LC3-II 和 Beclin1 表达的影响(̄x±s, n=3)

Table 4 Effect of Yiqi Fuzheng Jiedu decoction-containing serum on expression of proteins LC3-II and Beclin1 in A549 cells (̄x±s, n=3)

组别	浓度	LC3-II /β-actin	Beclin1/β-actin
PFT-α	10% 正常血清+10 μmol·L ⁻¹	0.96±0.09	1.09±0.17
益气扶正解毒汤	10% 高剂量含药血清	1.79±0.12 ^{1,2)}	1.98±0.42 ^{1,2)}
益气扶正解毒汤+PFT-α	10% 高剂量含药血清+10 μmol·L ⁻¹	1.42±0.06 ^{1,2,4)}	1.47±0.14 ³⁾

注: 设正常组蛋白相对表达为 1; 与正常组比较¹⁾P<0.01; 与 PFT-α 组比较²⁾P<0.01; 与益气扶正解毒汤高剂量组比较³⁾P<0.05, ⁴⁾P<0.01。

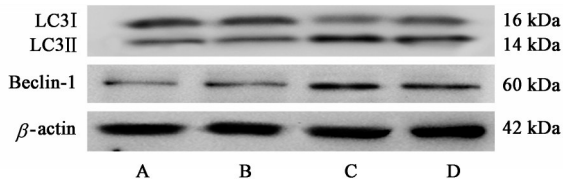


图 8 益气扶正解毒汤含药血清作用 A549 细胞蛋白 LC3-II 和 Beclin1 表达电泳

Fig. 8 Electrophoresis of Yiqi Fuzheng Jiedu decoction-containing serum on expression of proteins LC3-II and Beclin1 in A549 cells

扶正解毒汤高剂量+PFT-α 组细胞的免疫荧光强度较弱。说明高剂量含药血清可促进 A549 细胞 MAP1LC3B 蛋白表达, 且其促进效应能被 PFT-α 减

弱, 提示阻断 p53 能够抑制益气扶正解毒汤对细胞自噬的促进作用。见图 9。

3.7 PFT-α 和益气扶正解毒汤含药血清对 A549 细胞增殖、侵袭及促进细胞衰老的影响 与正常组比较, PFT-α 组中 A549 细胞的增殖数目增多(P<0.01), 益气扶正解毒汤高剂量组、益气扶正解毒汤高剂量+PFT-α 组中细胞增殖数量显著减少(P<0.01); 与益气扶正解毒汤高剂量组比较, 益气扶正解毒汤高剂量+PFT-α 组的增殖细胞数目较多(P<0.05)。见表 5, 图 10。

与正常组, PFT-α 组比较, 益气扶正解毒汤高剂量组、益气扶正解毒汤高剂量+PFT-α 组发生侵袭的细胞数量显著减少(P<0.01); 与益气扶正解毒汤高剂量组比较, 益气扶正解毒汤高剂量+PFT-α 发生侵

表 5 益气扶正解毒汤含药血清对 A549 细胞增殖、侵袭、衰老能力的影响(̄x±s)

Table 5 Effect of Yiqi Fuzheng Jiedu decoction-containing serum on proliferation, invasion and senescence of A549 cells (̄x±s) 个

组别	浓度	增殖细胞数 /(n=4)	侵袭细胞数 /(n=6)	衰老细胞数 /(n=4)
正常	10% 正常血清	18.50±2.65	140.83±17.02	67.00±14.77
PFT-α	10% 正常血清+PFT-α(10 μmol·L ⁻¹)	25.50±2.08 ¹⁾	147.17±11.99	56.00±17.00
益气扶正解毒汤	10% 高剂量含药血清	4.75±1.50 ^{1,2)}	51.67±10.71 ^{1,2)}	190.75±31.98 ^{1,2)}
益气扶正解毒汤+PFT-α	10% 高剂量含药血清+PFT-α(10 μmol·L ⁻¹)	9.25±2.06 ^{1,2,3)}	84.33±12.34 ^{1,2,4)}	144.75±5.91 ^{1,2,3)}

注: 与正常组比较¹⁾P<0.01; 与 PFT-α 组比较²⁾P<0.01; 与高剂量组比较³⁾P<0.05, ⁴⁾P<0.01。

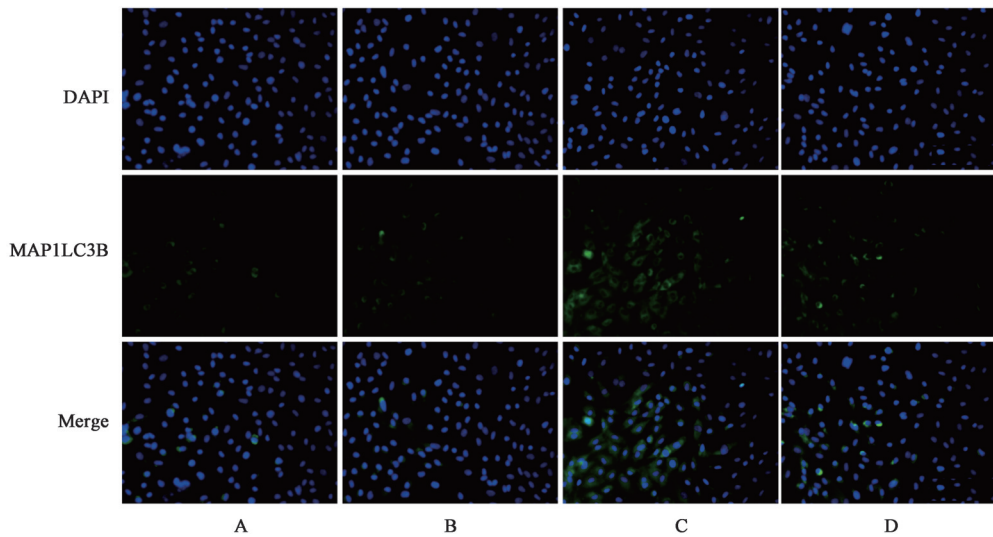


图9 益气扶正解毒汤含药血清对A549细胞蛋白MAP1LC3B的表达(IF, ×400)

Fig. 9 Electrophoresis of Yiqi Fuzheng Jiedu decoction-containing serum on MAP1LC3B in A549 cells detected by IF assay (IF, ×400)

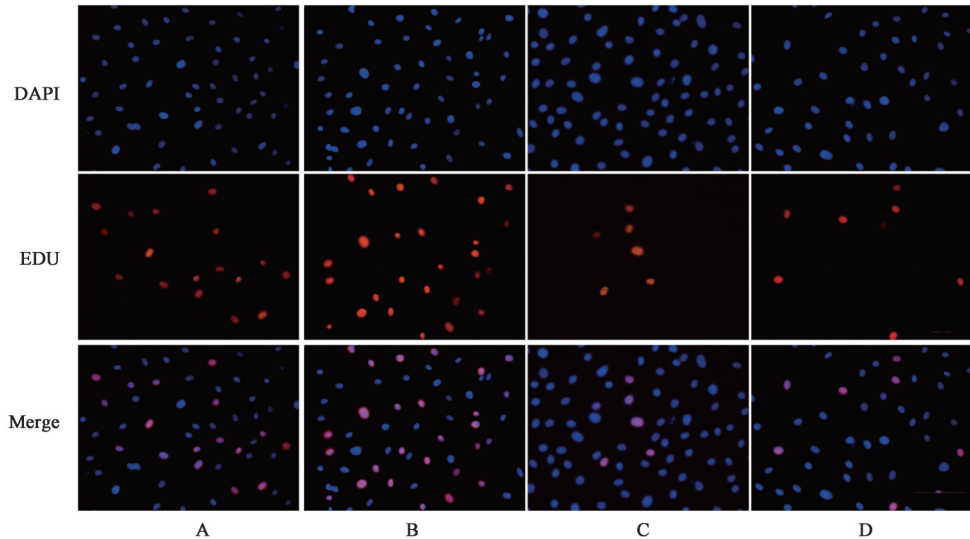


图10 益气扶正解毒汤含药血清对A549细胞增殖情况的影响(EDU, ×200)

Fig. 10 Electrophoresis of Yiqi Fuzheng Jiedu decoction-containing serum on detect proliferation of A549 cells (EDU, ×200)

袭的细胞数目显著增多,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图11,表5。

另外,与正常组,PFT- α 组比较,益气扶正解毒汤高剂量组,益气扶正解毒汤高剂量+PFT- α 组中发生衰老的细胞数量显著上升($P < 0.01$);与益气扶正解毒汤高剂量组比较,益气扶正解毒汤高剂量+PFT- α 发生衰老的细胞数明显减少($P < 0.05$)。见图12,表5。表明益气扶正解毒汤可通过调控p53蛋白干预A549细胞增殖、侵袭、衰老水平,且PFT- α 可减弱益气扶正解毒汤对A549细胞增殖、侵袭的抑制效应及细胞衰老的促进效应。

4 讨论

肺癌是癌症相关死亡的首要原因,2020年全球约有220万新发肺癌确诊病例和180万肺癌死亡病

例,发病率和死亡率分别为11.4%,18.0%,随着社会经济快速发展和人口老龄化加重,预计到2040年,全球新增癌症病例达2840万例,比2020年增加47%,由此可见,癌症防治面临着巨大的挑战^[1,19]。

中医在治疗肺癌方面历史悠久,疗效显著,中医学理论认为,肺癌的基本病理性质是虚实夹杂,虚乃正气亏虚,实则责之痰、瘀、毒内蕴,正气不足是癌症发生发展的根本病因,而癌毒内蕴是关键病理因素。《黄帝内经·素问》云:“邪之所凑,其气必虚”,肺癌发病之初,皆由正气不足,气虚无力抗邪,邪滞体内,气血津液壅滞不行,渐致阴阳失调,痰瘀内生,阻滞肺络,变生积聚,发为肺癌,病程日久化热成毒,耗气伤阴,虚实并见,易见肺癌复发、转移、扩散^[20]。自拟方益气扶正解毒汤,由黄芪、麦冬、黄

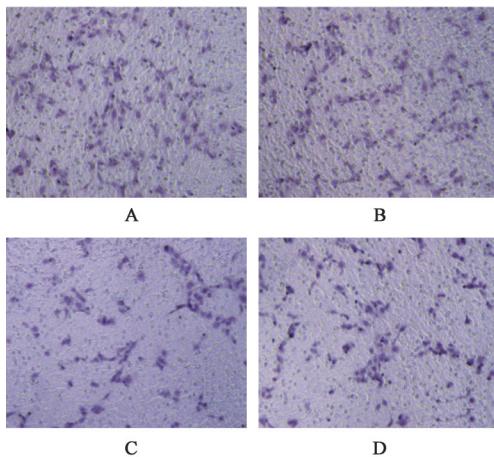


图11 益气扶正解毒汤含药血清对A549细胞的侵袭能力的影响(结晶紫, ×200)

Fig. 11 Electrophoresis of Yiqi Fuzheng Jiedu decoction-containing serum on invasion of A549 cells (crystal violet, ×200)

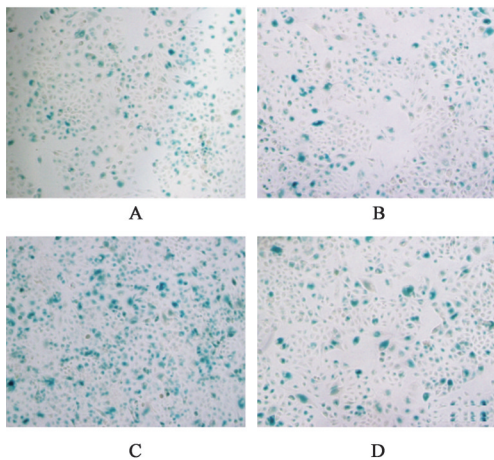


图12 益气扶正解毒汤含药血清对检测A549细胞衰老水平的影响(β-半乳糖苷酶, ×200)

Fig. 12 Electrophoresis of Yiqi Fuzheng Jiedu decoction-containing serum on senescence of A549 cells (β-galactosidase, ×200)

芩、莪术、白花蛇舌草5味药组成,由《万病回春》的清肺汤加减裁化而成,《医学衷中参西录》中记录黄芪“能补气,兼能升气,善治胸中大气下陷”,能补能升,是补中益气的要药;《雷公炮制药性解》言麦冬能“退肺中隐伏之火,生肺中不足之金”,尤善养肺胃之阴,培土生金;加之黄芩苦平可清肺,莪术为治积聚诸气最要之药,舌草具消痛散结、清热解毒之功效,五药合用,既能培本扶正,又可抗癌祛邪。

研究表明,中医药调控细胞自噬是治疗肺癌的一大热点,中药含有大量的生物有效活性成分,毒副作用小、疗效佳,可激活或抑制多种靶点或信号通路,在肺癌的治疗中具有独特优势^[21-22]。自噬是细胞程序性死亡的机制,必需自噬基因的缺失会导致肿瘤生长,在肿瘤侵袭迁移的过程中,癌细胞首

先通过减少自噬和凋亡来增加自身的增殖能力^[23]。CASSIDY等^[24]研究发现,Atg5基因敲除的小鼠中LC3 I向膜结合LC3- II的转换率降低,蛋白LC3- II水平明显下降;另外,Beclin1是调节自噬过程的关键基因,能通过增加自噬细胞的活性以抑制肿瘤生长,并在各种肿瘤细胞系中以低水平表达,而沉默Beclin1基因可导致促进A549细胞增殖,抑制癌细胞凋亡^[25]。p62蛋白是自噬的选择性底物,其表达水平受自噬过程调节,p62蛋白负性调节细胞自噬活性,当p62蛋白水平下降且LC3 I向LC3- II转化增加时,则表明自噬激活,p62蛋白还可诱导细胞凋亡,如激活自噬体膜上的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Caspase)-8^[26]。而肿瘤抑制基因p53是肺癌的最常见突变基因,p53缺失或突变会导致细胞生长失控,并导致肺癌进展和化疗耐药性,抑制细胞凋亡,从而促进肿瘤的形成。有研究发现,在NSCLC患者中Beclin1蛋白表达率较低,突变体p53蛋白的过表达和Beclin1功能的降低参与了肺癌的进展,而AMPK与p53呈正相关关系,AMPK激活会导致细胞周期停滞和肿瘤生长抑制,在癌症预防中发挥关键作用^[27-28]。

本研究结果显示,益气扶正解毒汤含药血清可显著上调A549细胞中自噬相关蛋白LC3- II,Beclin1的水平,降低p62蛋白的表达,提高p53蛋白水平,并促进AMPK磷酸化,抑制mTOR磷酸化,并且还能抑制A549细胞增殖,侵袭迁移,诱导细胞衰老,并成剂量依赖性,高剂量血清组效果最佳。表明益气扶正解毒汤可上调A549细胞自噬水平,抑制细胞增殖、侵袭,促进细胞衰老,这可能是通过p53/AMPK信号通路发挥作用的。进一步的实验结果证明,自噬抑制剂3-MA可减弱益气扶正解毒汤抑制A549细胞增殖、侵袭迁移及促进细胞衰老的效应,而p53抑制剂PFT-α不仅可减弱益气扶正解毒汤抑制A549细胞增殖、侵袭迁移及促进细胞衰老的能力,还明显抑制高剂量含药血清对自噬蛋白LC3- II,Beclin1及MAP1LC3B表达的促进效应。这一实验结果验证了上述假设,证明益气扶正解毒汤能够通过p53/AMPK信号通路参与调控A549细胞自噬水平,抑制A549细胞增殖、侵袭迁移,促进细胞衰老,进而发挥抑制NSCLC进展的作用。现代药理学研究证明,本方中的药物及其提取物具有多种与细胞自噬相关的生物活性,包括抗癌、抗炎、提高免疫力等^[29]。如,黄芪甲苷可以诱导Hela细胞自噬,上调LC3- II / I,Atg7,Atg12蛋白表达水平,

以抑制宫颈癌细胞增殖、侵袭^[30];麦冬皂苷D通过RIPK1相关途径诱导前列腺癌细胞凋亡,抑制PC3和DU145前列腺癌移植瘤裸鼠的生长^[31];黄芩素可诱导A549和H1299肺癌细胞线粒体发生膜电位缺失,促进细胞自噬,而敲除AMPK基因会降低线粒体分裂、细胞自噬和凋亡水平^[32],另外,黄芩素还能通过上调A549细胞的p53蛋白水平,进而诱导肺癌细胞凋亡^[33];莪术可通过JAK/STAT信号通路显著降低Walker-256肺癌大鼠肺组织中STAT3, STAT5, survivin蛋白表达而发挥抗肺癌作用^[34],并且莪术提取物莪术醇能上调LC3-II/I水平,诱导细胞自噬和凋亡,进而抑制SiHa, HCC94宫颈癌细胞增殖发挥抗宫颈癌作用^[35];而白花蛇舌草可诱导细胞周期阻滞,促进细胞凋亡,其抑制肿瘤细胞生长和诱导细胞凋亡过程可涉及线粒体凋亡通路,并剂量依赖性上调B淋巴细胞瘤-2基因相关X蛋白(Bax), p53等蛋白表达水平,还可增加胞质内自噬小体形成,促进自噬溶酶体产生,提高蛋白Beclin1, LC3-II表达水平^[36-37]。

综上所述,本研究证明益气扶正解毒汤能通过p53/AMPK信号通路上调A549细胞自噬水平,抑制A549细胞增殖、侵袭迁移,并促进细胞衰老,从而发挥其抗NSCLC作用。但本实验未检测细胞凋亡相关指标,未确定益气扶正解毒汤是否通过调控细胞自噬与凋亡协同发挥抗肺癌作用,并且,许多研究证明中医药可增强顺铂等化疗药物的治疗作用并减轻毒副作用,在下一步实验研究中将基于p53/AMPK信号通路进一步探讨益气扶正解毒汤对NSCLC细胞自噬和凋亡作用的影响并探究中医药发挥增效减毒的作用机制。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] GAO S, LI N, WANG S, et al. Lung cancer in people's republic of China[J]. J Thorac Oncol, 2020, 15(10): 1567-1576.

[2] 叶松山, 刘云鹤, 李文涛, 等. 基于网络药理学和生物信息学探究黄芪抗非小细胞肺癌的关键靶点和分子机制[J]. 实用药物与临床, 2020, 23(10): 876-885.

[3] 王信, 马传江, 杨培民, 等. 白花蛇舌草抗炎、抗肿瘤作用研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(19): 2420-2427.

[4] 曹慧娟, 李君, 孙淑军, 等. 黄芩素对人肺腺癌A549细胞的药效作用及机制探讨[J]. 中国实验方

剂学杂志, 2017, 23(2): 98-103.

[5] 陈旭, 王娟, 蒋晓山, 等. 莪术醇对肺癌A549细胞凋亡诱导因子、聚ADP核糖聚合酶及Caspase-3表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 157-159.

[6] 米雪, 亓润智, 花宝金. 肺癌中医证治规律分析探讨[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(6): 1510-1512.

[7] 陈婷婷, 王应天, 田甜. 数据挖掘法浅析中医治疗肺癌用药规律及相关机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(11): 206-210.

[8] LIU G, PEI F, YANG F, et al. Role of autophagy and apoptosis in non-small-cell lung cancer[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(2): 367-370.

[9] KRUSE J P, GU W. Modes of p53 regulation [J]. Cell, 2009, 137(4): 609-622.

[10] LEVINE B, KROEMER G. Biological functions of autophagy genes: a disease perspective [J]. Cell, 2019, 176(1/2): 11-42.

[11] GALLUZZI L, PIETROCOLA F, BRAVO-SAN P J, et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression [J]. EMBO J, 2015, 34(7): 856-880.

[12] KOCATURK N M, AKKOC Y, KIG C, et al. Autophagy as a molecular target for cancer treatment [J]. Eur J Pharm Sci, 2019, 134(6): 116-137.

[13] RUSSO M, RUSSO G L. Autophagy inducers in cancer [J]. Biochem Pharmacol, 2018, 153(14): 51-61.

[14] 程伟, 陈新梅. 中药抗非小细胞肺癌作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(24): 227-234.

[15] CICCHINI M, KARANTZA V, XIA B. Molecular pathways: autophagy in cancer--a matter of timing and context[J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(3): 498-504.

[16] NAIR A, JACOB S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human [J]. J Basic Clin Pharma, 2016, 7(2): 27-31.

[17] CHEN X, MAO R, SU W, et al. Circular RNA circHIPK3 modulates autophagy via MIR124-3p-STAT3-PRKAA/AMPKalpha signaling in STK11 mutant lung cancer [J]. Autophagy, 2020, 16(4): 659-671.

[18] LI X, QU Z, JING S, et al. Dioscin-6'-O-acetate inhibits lung cancer cell proliferation via inducing cell cycle arrest and caspase-dependent apoptosis [J]. Phytomedicine, 2019, 53: 124-133.

[19] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of

- incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [20] 王雄文, 周岱翰. 肺癌发病的病因及藏象经络机制[J]. *时珍国医国药*, 2009, 20(10): 2641-2642.
- [21] ZHANG X, LIU W, JIANG H, et al. Chinese herbal medicine for advanced non-small-cell lung cancer: a systematic review and Meta-analysis [J]. *Am J Chin Med*, 2018, 46(5): 923-952.
- [22] XIAO Z, WANG C, ZHOU M, et al. Clinical efficacy and safety of Aidi injection plus paclitaxel-based chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer: a Meta-analysis of 31 randomized controlled trials following the PRISMA guidelines [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 228(1): 110-122.
- [23] WANG K, CHEN Q, SHAO Y, et al. Anticancer activities of TCM and their active components against tumor metastasis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 133(1): 111044-111060.
- [24] CASSIDY L D, YOUNG A R, PEREZ-MANCERA P A, et al. A novel Atg5-shRNA mouse model enables temporal control of autophagy *in vivo* [J]. *Autophagy*, 2018, 14(7): 1256-1266.
- [25] WANG W, FAN H, ZHOU Y, et al. Knockdown of autophagy-related gene BECLIN1 promotes cell growth and inhibits apoptosis in the A549 human lung cancer cell line [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(5): 1501-1505.
- [26] ISLAM M, SOORO M, ZHANG P. Autophagic regulation of p62 is critical for cancer therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(5): 1405-1419.
- [27] LIU J, LIN Y, YANG H, et al. The expression of p33ING1, p53, and autophagy-related gene Beclin1 in patients with non-small cell lung cancer [J]. *Tumour Biol*, 2011, 32(6): 1113-1121.
- [28] PIFFOUX M, ERIAU E, CASSIER P A. Autophagy as a therapeutic target in pancreatic cancer [J]. *Br J Cancer*, 2021, 124(2): 333-344.
- [29] SHAN H, ZHENG X, LI M. The effects of astragalus membranaceus active extracts on autophagy-related diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(8): 1-12.
- [30] XIA C, HE Z, CAI Y. Quantitative proteomics analysis of differentially expressed proteins induced by astragaloside IV in cervical cancer cell invasion [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2020, 25(1): 1-14.
- [31] LU Z, WANG H, ZHU M, et al. Ophiopogonin D', a natural product from radix ophiopogonis, induces *in vitro* and *in vivo* RIPK1-dependent and caspase-independent apoptotic death in androgen-independent human prostate cancer cells [J]. *Front Pharmacol*, 2018, doi: 10.3389/fphar.2018.00432.
- [32] DENG X, LIU J, LIU L, et al. Drp1-mediated mitochondrial fission contributes to baicalein-induced apoptosis and autophagy in lung cancer via activation of AMPK signaling pathway [J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(8): 1403-1416.
- [33] GAO J, MORGAN W A, SANCHEZ-MEDINA A, et al. The ethanol extract of *Scutellaria baicalensis* and the active compounds induce cell cycle arrest and apoptosis including upregulation of p53 and Bax in human lung cancer cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2011, 254(3): 221-228.
- [34] 赵明哲, 刘海英, 张晓玲. 莪术对肺癌大鼠肿瘤抑制作用及对 JAK-STAT 信号通路的影响 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2020, 29(33): 3658-3661.
- [35] 刘发英, 邹阳, 杨必成, 等. 莪术醇对子宫颈癌 SiHa 和 HCC94 细胞增殖、自噬及凋亡的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2018, 34(1): 62-66.
- [36] 杨培伟. 半枝莲和白花蛇舌草提取物对 HBV 相关性肝细胞癌的作用及对 circRNAs 差异表达的影响 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2019.
- [37] LI Y L, ZHANG J, MIN D, et al. Anticancer effects of 1,3-dihydroxy-2-methylanthraquinone and the ethyl acetate fraction of *hedyotis diffusa* willd against HepG2 carcinoma cells mediated via apoptosis [J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e151502-e151521.

[责任编辑 张丰丰]