

## 地参多糖对非小细胞肺癌 A549 细胞抗肿瘤作用及机制

程婷婷<sup>1</sup>, 李岩<sup>1</sup>, 陈贵元<sup>1,2\*</sup>

(1. 大理大学基础医学院, 云南大理 671000;

2. 云南省昆虫生物医药研发重点实验室, 云南大理 671000)

**[摘要]** 目的:观察地参多糖(LLP)的体外抗肿瘤活性及机制。方法:细胞增殖与活性检测(CCK-8)法检测LLP(0,5,10,15,20 g·L<sup>-1</sup>)对A549细胞不同作用时间(24,48,72 h)的增殖抑制作用;采用细胞划痕,transwell实验检测LLP(10,20 g·L<sup>-1</sup>)作用24,48 h后A549细胞的迁移侵袭能力;碘化丙啶(PI)单染法检测LLP(10,20 g·L<sup>-1</sup>)对A549细胞周期的影响;异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)/PI凋亡试剂盒检测LLP(10,20 g·L<sup>-1</sup>)诱导A549细胞的凋亡作用;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测LLP(10,20 g·L<sup>-1</sup>)对A549细胞中半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3),半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-8(Caspase-8),半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-9(Caspase-9),细胞周期依赖性激酶-1(CDK-1),细胞周期蛋白B<sub>1</sub>(Cyclin B<sub>1</sub>) mRNA表达的影响;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测LLP对A549细胞中Caspase-3,Caspase-8,Caspase-9,B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)相关X蛋白(Bax),CDK-1,细胞周期依赖性激酶4(CDK-4),细胞周期依赖性激酶-6(CDK-6),Cyclin B<sub>1</sub>,细胞周期蛋白D<sub>1</sub>(Cyclin D<sub>1</sub>)蛋白表达的影响。结果:与空白组比较,LLP组A549细胞的增殖、迁移和侵袭能力均降低( $P<0.05$ , $P<0.01$ );DNA合成准备期/DNA合成前期(G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期)比例升高( $P<0.05$ );凋亡率升高( $P<0.05$ , $P<0.01$ );Caspase-3,Caspase-8,Caspase-9 mRNA表达水平升高( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),CDK-1,Cyclin B<sub>1</sub> mRNA表达水平降低( $P<0.05$ , $P<0.01$ );Caspase-3,Caspase-8,Caspase-9,Bax蛋白表达水平升高( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),Bcl-2,CDK-1,CDK-4,CDK-6,Cyclin B<sub>1</sub>,Cyclin D<sub>1</sub>蛋白表达水平降低( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。结论:LLP可抑制A549细胞的增殖,使其周期阻滞在G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期,同时可能包含DNA合成后期/DNA分裂期(G<sub>2</sub>/M期),并通过线粒体凋亡途径和死亡受体途径诱导细胞凋亡。

**[关键词]** 地参多糖;非小细胞肺癌;细胞增殖;凋亡;细胞周期

**[中图分类号]** R22;R242;R2-031;R285.5;R34 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)03-0083-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220221

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211112.1841.004.html>

**[网络出版日期]** 2021-11-15 16:40

### Anti-tumor Effect and Mechanism of *Lycopus lucidus* Polysaccharide on Non-small Cell Lung Cancer A549 Cells

CHENG Ting-ting<sup>1</sup>, LI Yan<sup>1</sup>, CHEN Gui-yuan<sup>1,2\*</sup>

(1. Basic Medicine School, Dali University, Dali 671000, China;

2. Provincial Key Laboratory of Entomology Biopharmaceutical R&D, Dali 671000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the anti-tumor activity and mechanism of *Lycopus lucidus* polysaccharide (LLP) *in vitro*. **Method:** Cell counting kit-8 (CCK-8) assay was used to detect the inhibitory effect of LLP (0, 5, 10, 15, 20 g·L<sup>-1</sup>) on the proliferation of A549 cells at different time points (24, 48, 72 h). The migration and invasion abilities of A549 cells were detected by wound healing assay and transwell assay after LLP (10, 20 g·L<sup>-1</sup>) treatment for 24, 48 h. Propidium iodide (PI) single staining was applied to determine

**[收稿日期]** 20210720(010)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(31860252);云南省自然科学基金高校联合面上项目(2017FH001-084);云南省昆虫生物医药研发重点实验室项目(2015);大理大学博士科研启动费项目(KYBS201401)

**[第一作者]** 程婷婷,在读硕士,从事天然产物的分离纯化与生物学活性研究,E-mail:1147882842@qq.com;

**[通信作者]** \*陈贵元,副教授,博士,硕士生导师,从事天然产物的分离提取纯化及生物学活性研究,E-mail:cgylxy@163.com

the effect of LLP of different concentrations (10, 20 g·L<sup>-1</sup>) on the cell cycle of A549. The apoptosis of A549 cells induced by LLP (10, 20 g·L<sup>-1</sup>) was detected by Annexin V-FITC/PI kit. Real-time fluorescence-based quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was adopted to measure effect of LLP (10, 20 g·L<sup>-1</sup>) on gene expression of cysteine aspartate protease-3 (Caspase-3), cysteine aspartate protease-8 (Caspase-8), cysteine aspartate protease-9 (Caspase-9), cyclin-dependent kinase-1 (CDK-1), and Cyclin B<sub>1</sub> in A549 cells. Western blot was used to detect the effect of LLP on protein expression of Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9, B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)-associated X protein (Bax), CDK-1, cyclin-dependent kinase-4 (CDK-4), cyclin-dependent kinase-6 (CDK-6), Cyclin B<sub>1</sub>, and Cyclin D<sub>1</sub> in A549 cells. **Result:** Compared with the blank group, the LLP group showed decreased proliferation, migration, and invasion of A549 cells ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), increased proportion of G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase ( $P<0.05$ ), enhanced apoptosis rate ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), elevated mRNA expression of Caspase-3, Caspase-8, and Caspase-9 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), reduced mRNA expression of CDK-1 and Cyclin B<sub>1</sub> ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), up-regulated protein expression of Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9, and Bax ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), and down-regulated protein expression of Bcl-2, CDK-1, CDK-4, CDK-6, Cyclin B<sub>1</sub>, and Cyclin D<sub>1</sub> ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion:** LLP can inhibit the proliferation of A549 cells, block the cell cycle in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase (also G<sub>2</sub>/M phase), and induce cell apoptosis via the mitochondrial apoptosis pathway and death receptor pathway.

**[Keywords]** *Lycopus lucidus* polysaccharide; non-small cell lung cancer; cell proliferation; apoptosis; cell cycle

肺癌是全球公认的最常见的肿瘤之一,非小细胞肺癌(NSCLC)是其主要的发病类型,约占全球癌症的11.6%<sup>[1]</sup>,其发病率与死亡率正逐年上升。肺癌起源于不同的上皮组织,按病理分型,肺腺癌是肺癌的主要病理类型<sup>[2]</sup>,其中女性最多见。小结节的外周病灶是肺腺癌的典型表现,不易被发现,且预后较鳞癌差,易发生转移,故患者的5年生存率低。目前对于肺癌的治疗方法有手术治疗、靶向治疗、全身化疗、放疗及联合治疗,这些治疗方式往往给患者的身心带来极大的痛苦,因此开发具有疗效好、不良反应低的抗肺癌新型药物已经成为必然趋势,其中植物多糖因具有安全、高效、低毒等特点,其抗肺癌的研究也成为热点。邓小娟等<sup>[3]</sup>通过建立A549细胞体外模型和体内移植瘤小鼠模型,表明芦根多糖具有治疗NSCLC的潜能,其可能通过激活自噬和促进凋亡抑制A549细胞增殖;刘艳玲等<sup>[4]</sup>通过皮下注射Lewis肺癌细胞建立小鼠肺癌移植模型,证明黄芪多糖(APS)可能通过抑制Toll样受体4(TLR4)/髓样分化因子88(MyD88)/核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路活化达到抗Lewis肺癌作用和免疫调节作用;李志强等<sup>[5]</sup>研究表明灵芝多糖通过干预B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2),磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K),蛋白激酶B(Akt)相关蛋白表达,对人肺癌A549细胞增殖凋亡起到调控作用。

地参别名虫草参,银条菜,地蚕子,为白族民间

传统习用草药。地参主要分布在云南大理和丽江等地,其地上部分作为蔬菜食用,地下根茎部分可药、食两用。研究表明,地参多糖(LLP)具有多种生物学活性,熊伟等<sup>[6]</sup>通过小鼠免疫抑制模型,用LLP处理模型小鼠后,小鼠非特异性和特异性体液免疫功能显著增强,证明LLP具有免疫调节活性;LEE等<sup>[7]</sup>研究表明LLP能减轻HepG2细胞脂肪变性和高脂饮食诱导的肥胖小鼠非酒精性脂肪肝,说明LLP具有抗肝损伤、降血脂的功能。还有报道显示,LLP具有抗氧化<sup>[8]</sup>、降血糖<sup>[9]</sup>等生物活性。本课题组前期已对LLP的提取工艺进行了研究<sup>[10]</sup>,且目前有关LLP抗肺癌的作用机制及临床应用均尚未见报道。本研究充分利用云南西部地区丰富的地参资源,将LLP作用于NSCLC A549细胞,从分子及细胞水平阐明LLP对A549细胞的增殖、迁移和侵袭的作用及机制。

## 1 材料

**1.1 细胞与LLP制备** A549细胞株,购买自上海科学院细胞库(细胞号107),传至第3代用于后续实验;地参购于大理市中药批发市场,由大理大学基础医学院左绍远教授鉴定为唇形科多年生草本植物地参*Lycopus lucidus*的根部(GB/T1014-1999标准)。参照文献[10]的方法提取LLP,采用Sevag法脱蛋白,真空冷冻干燥,获得精制LLP备用。根据葡聚糖标准曲线测得多糖提取率为20.77%。

**1.2 试剂** DMEM高糖培养液(美国Gibco公司,批号8121247);特级胎牛血清(FBS,Qua Cell南美血源,批号B21001);增强型细胞增殖与活性检测-8(CCK-8)试剂盒,BCA蛋白定量试剂盒(中国碧云天生物研究所,产品编号分别是C0042,P0010);FastKing cDNA第一链合成试剂盒(去基因组),荧光定量预混试剂增强版(天根生化科技有限公司,批号KR116-02,FP205-02);超敏ECL化学发光试剂盒(大连美仑生物科技有限公司,货号MA0186-L);细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒(北京四正柏生物科技有限公司,批号FXP0211-100); $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin),半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3),半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-8(Caspase-8),半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-9(Caspase-9),Bcl-2相关X蛋白(Bax),Bcl-2,细胞周期蛋白(Cyclin) B<sub>1</sub>(美国Cell Signaling Technology公司,货号分别为4967S,14220S,4790S,9508S,5023T,15071T,4135S);细胞周期依赖性激酶-1(CDK-1,亚克因生物技术有限公司,货号ABP50939);细胞周期依赖性激酶-4(CDK-4),细胞周期依赖性激酶-6(CDK-6),Cyclin D<sub>1</sub>,辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(中国碧云天生物研究所,货号分别为AF2515,AF2536,AF1183,A0208);彩虹130广谱蛋白marker,SDS-PAGE凝胶制备试剂盒,姬姆萨染液(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为PR1950,P1200,G1010)。

**1.3 仪器** Unique-S15型多功能超纯水系统(中国厦门锐思捷纯化技术有限公司);MB-530型多功能酶标分析仪(中国深圳市汇松科技发展有限公司);TGL-16B型高速离心机(中国上海安亭科学仪器厂);DYCP-31DN型电泳仪(中国北京六一生物科技有限公司);HF212型二氧化碳培养箱(中国上海申力科学仪器有限公司);CKX53型生物倒置相差显微镜(日本奥林巴斯公司);BD FACSCanto™ II型流式细胞仪(美国艾森生物科学公司);One Step实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR) System(美国Thermo Fisher Scientific公司,型号2720500413)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养及传代** 将A549细胞培养于含有10% FBS,1%青霉素与链霉素的DMEM高糖培养基中,然后将T25瓶缓慢放在37℃,5% CO<sub>2</sub>的恒温培养箱中。1~2 d取生长状态良好的肿瘤细胞(铺满培养瓶80%及以上),小心吸去已有培养基,磷酸盐

缓冲液(PBS)洗涤细胞3次,加入0.25%含EDTA的胰蛋白酶2 mL消化细胞,2 min后加入含有10% FBS的DMEM培养基3 mL终止消化,将细胞悬液转移至15 mL离心管中,1 000 r·min<sup>-1</sup>离心5 min(离心半径11 cm,下同),弃上清,在此离心管中加入新的含有10%胎牛血清和1%青-链霉素的DMEM培养基与细胞混匀后,均分在2个培养瓶中,按照1:2进行传代。

**2.2 增强型CCK-8试剂检测A549细胞存活率** 将细胞分组为0 g·L<sup>-1</sup>LLP组(溶剂孔),LLP(5,10,15,20 g·L<sup>-1</sup>)组(药物组)和空白组。取细胞悬液,以7×10<sup>3</sup>个/(100 μL)的密度均匀地接到3个96孔板的小孔内,空白组为每孔100 μL完全培养基,每组均设置3个平行复孔。加入LLP继续培养24,48,72 h,每孔加入增强型CCK-8试剂20 μL,在450 nm波长下使用酶标仪测吸光度A。细胞存活率=(A<sub>药物孔</sub>-A<sub>空白孔</sub>)/(A<sub>溶剂孔</sub>-A<sub>空白孔</sub>)。分析半数抑制浓度,确定后续实验采用10,20 g·L<sup>-1</sup>为LLP组。

**2.3 后续实验分组** 0 g·L<sup>-1</sup>LLP为空白组,10,20 g·L<sup>-1</sup>LLP为LLP组。

**2.4 划痕实验检测A549细胞的迁移能力** 取6孔板,在其背面用直尺以0.7 cm为间隔划分区域,以备后续拍照确认位置。将处于对数生长状态的A549细胞制成细胞悬液,以细胞密度为3×10<sup>6</sup>个/mL接于6孔板。待每组细胞生长完全融合后,用无菌枪头在每个区域中间划线,分别在药物作用0,24,48 h后使用倒置显微镜在同一位置进行拍照,随后测量划痕宽度进行统计学分析。

**2.5 transwell实验检测A549细胞的侵袭能力** 取对数生长期的A549细胞,用不含血清的DMEM培养基制成单细胞悬液,小室下层加入完全培养基600 μL,小室上层加入7×10<sup>4</sup>个/mL的单细胞悬液200 μL,充分混匀后继续培养6~8 h,然后将小室上层换成不同浓度的LLP。培养48 h,用组织固定液1 mL将小室固定15 min,然后使用姬姆萨染液染色20 min。倒置显微镜拍照,随机选取视野。计数进行分析。

**2.6 碘化丙啶(PI)单染法检测A549细胞周期** 将每组细胞加药处理48 h后,按照细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒说明书处理细胞。将细胞悬液转移至15 mL离心管中,缓慢滴加预冷的无水乙醇重悬细胞,1 000 r·min<sup>-1</sup>离心5 min,弃上清液,收集细胞。每个样本加入染色缓冲液0.5 mL,PI染色液25 μL,RNase A 10 μL制成混合液,混匀后,每个样本加入

PI染色液500 μL。37℃避光孵育30 min,置于冰水浴中避光保存。随后使用美国BD FACSCanto™ II流式细胞仪进行上机操作。使用Flow Jo V10软件分析数据。

**2.7 Annexin V-FITC/PI双染检测 A549细胞凋亡** 细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒说明书处理细胞。每组细胞在药物作用48 h完全,胰酶消化,并转移至离心管中,收集细胞,然后用PBS重悬细胞1 mL,轻轻上下吹打细胞使其成为单细胞悬液。每个药物组样本中依次加入Annexin V-FITC结合液195 μL,Annexin V-FITC 5 μL,PI染色液10 μL;空白组加入等量,灭菌的PBS缓冲液210 μL;PI单染孔单独加入PI染色液10 μL与PBS 200 μL;FITC单染孔单独加入Annexin V-FITC结合液195 μL,Annexin V-FITC 5 μL和PBS 10 μL。每组样本混匀后应避光冰浴保存,使用流式细胞仪完成上机检测。应用Flow Jo V10软件分析数据。

**2.8 Real-time PCR检测细胞中的mRNA表达水平** 将各组A549细胞按照trizol试剂的说明书提取总RNA,测定RNA的浓度及纯度。然后使用逆转录试剂盒快速将反转录反应体系在PCR仪中42℃反应15 min,95℃反应3 min,RNA逆转录得到cDNA。按照荧光定量预混试剂增强版说明书进行加样,上机检测,采用两步法PCR反应程序进行反应,95℃条件下预变性15 min,95℃条件下变性10 s,60℃条件下退火/延伸30 s,PCR反应共40个循环。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算各个基因相对表达水平,采用Primer primer 5.0设计引物,由金斯瑞生物科技有限公司合成。见表1。

**2.9 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 A549细胞中的蛋白表达水平** 各组A549细胞LLP作用48 h,加入适量蛋白裂解液,获得总蛋白,100℃变性后放入-80℃冰箱保存备用。使用前BCA法测定总蛋白浓度。SDS-PAGE胶配制及电泳,配制分离胶(12%)室温静置40 min后配制浓缩胶(5%),根据不同浓度的蛋白上样,电泳(浓缩胶50 V,40 min,分离胶120 V,90 min),转膜(湿转,300 mA,45 min),然后在4℃条件下孵育一抗(1:1 000)约14 h,常温条件下孵育二抗(1:1 000)1 h。洗膜3次,每次5 min,最后使用ECL化学发光液在凝胶成像系统中曝光显影。使用Image J软件系统分析各个条带的灰度值。

**2.10 统计学方法** 以上实验均重复3次。统计学分析采用SPSS 20.0软件,实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ ,组间

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列	长度 /bp
Caspase-3	上游 5'-GGTTCATCCAGTCGCTTTG-3'	99
	下游 5'-ATTCTGTTGCCACCTTTTCG-3'	
Caspase-8	上游 5'-TTCCTGAGCCTGGACTACATT-3'	202
	下游 5'-GAAGTTCCTTTCCATCTCCT-3'	
Caspase-9	上游 5'-ACTAACAGGCAAGCAGCAAA-3'	140
	下游 5'-CCAAATCCTCCAGAACCAAT-3'	
CDK-1	上游 5'-GATTCTATCCCTCCTGGTCAGT-3'	163
	下游 5'-CAGCCAGTTTAATTGTTCCCTTT-3'	
Cyclin B <sub>1</sub>	上游 5'-GTCGGGAAGTCACTGGAAC-3'	118
	下游 5'-AACCGATCAATAATGGAGACAG-3'	
β-actin	上游 5'-CTGGGACGACATGGAGAAA-3'	182
	下游 5'-GCACAGCCTGGATAGCAAC-3'	

比较采用两独立样本t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 LLP对A549细胞的增殖抑制作用** 与空白组比较,LLP组A549细胞的增殖率逐渐降低,存在时间依赖性和剂量依赖性( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见表2。

表2 LLP对A549细胞活性的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Effect of LLP on A549 cells activity ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度 /g·L <sup>-1</sup>	细胞生存率/%		
		24 h	48 h	72 h
空白		100.00±0.04	100.00±0.15	100.00±0.11
LLP	5	86.00±0.11 <sup>1)</sup>	82.72±0.07 <sup>2)</sup>	60.90±0.09 <sup>2)</sup>
	10	61.23±0.11 <sup>2)</sup>	60.69±0.21 <sup>2)</sup>	58.77±0.05 <sup>2)</sup>
	15	43.53±0.07 <sup>2)</sup>	22.02±0.04 <sup>2)</sup>	15.24±0.03 <sup>2)</sup>
	20	35.79±0.04 <sup>2)</sup>	6.36±0.02 <sup>2)</sup>	2.54±0.00 <sup>2)</sup>

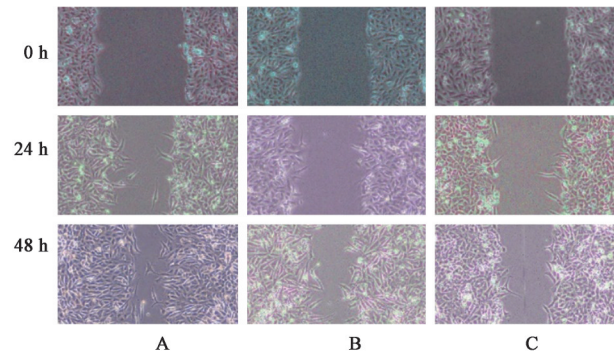
注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ (表3~9同)。

**3.2 LLP对A549细胞的迁移影响** 与空白组比较,LLP组A549细胞的划痕宽度逐渐变窄,迁移距离逐渐降低,且有时间依赖性和剂量依赖性( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见图1,表3。

**3.3 LLP对A549细胞的侵袭影响** 与空白组比较,LLP组A549细胞穿过小室的个数逐渐减少,侵袭能力逐渐降低,且呈剂量依赖性( $P < 0.01$ )。见图2,表4。

### 3.4 LLP对细胞周期阻滞作用

**3.4.1 对A549细胞周期的影响** 与空白组比较,LLP组A549细胞的DNA合成准备期/DNA合成前



A. 空白组; B, C. LLP(10, 20 g·L<sup>-1</sup>)组(图2~4同)  
图1 LLP对A549细胞迁移的影响(倒置显微镜, ×40)  
Fig. 1 Effect of LLP on A549 cells migration (inverted microscope, ×40)

表3 LLP对A549细胞迁移的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
Table 3 Effect of LLP on A549 cells migration ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	迁移距离/cm		
		0 h	24 h	48 h
空白		12.5±0.17	5.0±0.70	2.5±0.35
LLP	10	10.2±0.36 <sup>2)</sup>	7.5±0.36 <sup>2)</sup>	3.0±0.36 <sup>1)</sup>
	20	11.0±0.44 <sup>1)</sup>	8.0±0.53 <sup>2)</sup>	5.0±0.56 <sup>1)</sup>

期(G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期)增加, A549细胞被阻滞在G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期, 且有剂量依赖性(P<0.01)。见表5。

3.4.2 对CDK-1, Cyclin B<sub>1</sub> mRNA与蛋白水平的影响 与空白组比较, LLP(10, 20 g·L<sup>-1</sup>)组A549细

表6 LLP对A549细胞中Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9, CDK-1, Cyclin B<sub>1</sub> mRNA的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 6 Effect of LLP on mRNA of Caspase-3, Caspase-8, caspase-9, CDK-1 and Cyclin B<sub>1</sub> in A549 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	Caspase-3	Caspase-8	Caspase-9	CDK-1	Cyclin B <sub>1</sub>
空白		1.00±0.32	1.00±0.25	1.00±0.25	1.00±0.08	1.00±0.11
LLP	10	2.54±0.16 <sup>1)</sup>	1.59±0.05 <sup>1)</sup>	1.61±0.11 <sup>1)</sup>	0.28±0.41 <sup>1)</sup>	0.44±0.16 <sup>1)</sup>
	20	3.62±0.07 <sup>2)</sup>	2.72±0.08 <sup>2)</sup>	2.52±0.24 <sup>1)</sup>	0.31±0.26 <sup>2)</sup>	0.56±0.19 <sup>1)</sup>

3.4.3 对CDK-4, CDK-6, Cyclin D<sub>1</sub>蛋白表达水平的影响 与空白组比较, LLP(10, 20 g·L<sup>-1</sup>)组A549细胞中CDK-4, CDK-6, Cyclin D<sub>1</sub>蛋白表达水平均

表7 LLP对A549细胞中CDK-1, CDK-4, CDK-6, Cyclin B<sub>1</sub>, Cyclin D<sub>1</sub>蛋白的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 7 Effect of LLP on CDK-1, CDK-4, CDK-6, Cyclin B<sub>1</sub> and Cyclin D<sub>1</sub> proteins in A549 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	CDK-1/β-actin	CDK-4/β-actin	CDK-6/β-actin	Cyclin B <sub>1</sub> /β-actin	Cyclin D <sub>1</sub> /β-actin
空白		0.69±0.32	0.56±0.12	1.10±0.25	0.42±0.08	0.86±0.16
LLP	10	0.47±0.22 <sup>1)</sup>	0.36±0.12 <sup>2)</sup>	0.74±0.15 <sup>1)</sup>	0.24±0.04 <sup>2)</sup>	0.51±0.10 <sup>1)</sup>
	20	0.29±0.17 <sup>1)</sup>	0.26±0.13 <sup>2)</sup>	0.52±0.12 <sup>1)</sup>	0.15±0.02 <sup>1)</sup>	0.31±0.03 <sup>1)</sup>

### 3.5 LLP对细胞凋亡的作用

3.5.1 对A549细胞凋亡的影响 与空白组比较, LLP组的A549细胞总凋亡率升高, 且有剂量依赖性

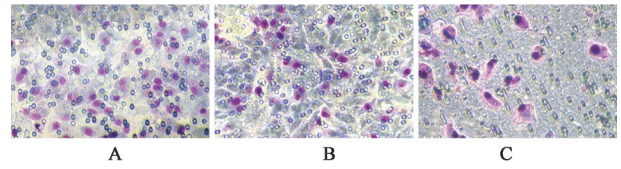


图2 LLP对A549细胞侵袭的影响(姬姆萨染色, ×200)  
Fig. 2 Effect of LLP on A549 cell invasion (Giemsa stain, ×200)

表4 LLP对A549细胞侵袭的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

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

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	侵袭个数/个	侵袭率/%
空白		51.00±2.65	
LLP	10	36.33±1.53 <sup>2)</sup>	71.37±5.00 <sup>2)</sup>
	20	11.67±3.51 <sup>2)</sup>	23.14±8.00 <sup>2)</sup>

表5 LLP对A549细胞周期的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 5 Effect of LLP on A549 cell cycle ( $\bar{x} \pm s, n=3$ ) %

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> 期	DNA合成期(S期)	DNA合成后期/DNA分裂期(G <sub>2</sub> /M期)
空白		58.2±2.6	29.0±2.1	10.0±0.7
LLP	10	68.3±0.5 <sup>2)</sup>	25.2±0.2 <sup>1)</sup>	6.8±0.1 <sup>2)</sup>
	20	75.6±0.6 <sup>2)</sup>	20.6±0.2 <sup>2)</sup>	5.9±0.2 <sup>2)</sup>

胞中CDK-1, Cyclin B<sub>1</sub>在mRNA和蛋白水平表达均降低(P<0.05, P<0.01), LLP对A549细胞阻滞时期可能也包含G<sub>2</sub>/M期。见表6, 7, 图3。

明显降低, 差异有统计学意义(P<0.05, P<0.01), LLP对A549细胞阻滞时期可能是G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期。见表7, 图3。

(P<0.05, P<0.01)。见表8。

3.5.2 对Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9 mRNA表达水平的影响 与空白组比较, LLP组对A549细

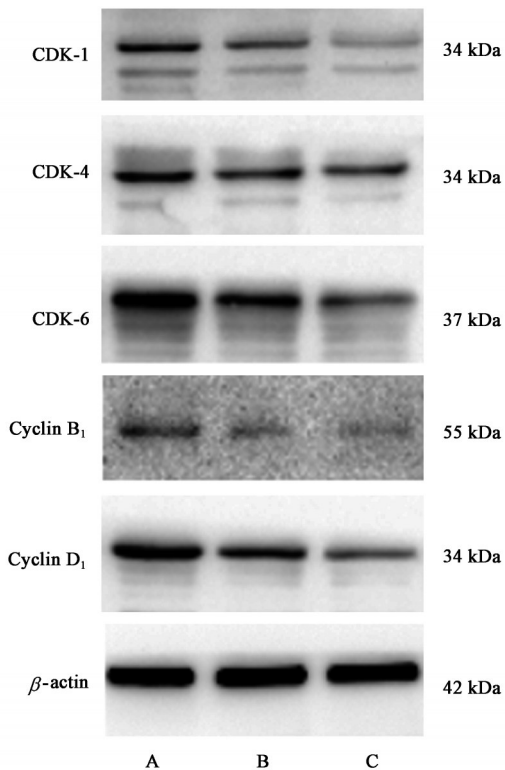


图3 LLP对A549细胞中CDK-1, CDK-4, CDK-6, Cyclin B<sub>1</sub>, Cyclin D<sub>1</sub>蛋白电泳

Fig. 3 Electrophoresis of LLP on CDK-1, CDK-4, CDK-6, Cyclin B<sub>1</sub> and Cyclin D<sub>1</sub> proteins in A549 cells

表8 LLP对A549细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 8 Effect of LLP on A549 cells apoptosis ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	总凋亡率/%
空白		2.94±0.66
LLP	10	7.97±0.84 <sup>1)</sup>
	20	15.09±2.52 <sup>2)</sup>

胞中Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9 mRNA表达水平升高 ( $P<0.05, P<0.01$ ), 且有浓度依赖性。见表6。

**3.5.3 对Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9, Bax, Bcl-2蛋白表达的影响** 与空白组比较, LLP组A549细胞中Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9, Bax蛋白表达水平升高 ( $P<0.05, P<0.01$ ), Bcl-2蛋白表达水平降低 ( $P<0.05$ ), 且有剂量依赖性。见表9, 图4。

表9 LLP对A549细胞中Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9, Bax, Bcl-2蛋白的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 9 Effect of LLP on Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9, Bax and Bcl-2 proteins in A549 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	Caspase-3/ $\beta$ -actin	Caspase-8/ $\beta$ -actin	Caspase-9/ $\beta$ -actin	Bax/ $\beta$ -actin	Bcl-2/ $\beta$ -actin
空白		0.30±0.19	0.34±0.14	0.52±0.22	0.29±0.37	0.61±0.22
LLP	10	0.51±0.10 <sup>2)</sup>	0.63±0.23 <sup>1)</sup>	0.60±0.21 <sup>1)</sup>	0.35±0.40 <sup>1)</sup>	0.35±0.16 <sup>1)</sup>
	20	0.61±0.22 <sup>2)</sup>	0.98±0.24 <sup>2)</sup>	0.78±0.30 <sup>1)</sup>	0.48±0.40 <sup>1)</sup>	0.24±0.11 <sup>1)</sup>

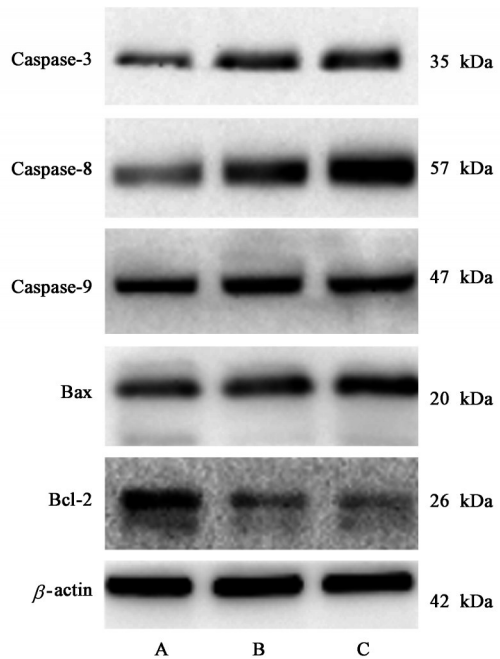


图4 A549细胞中Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9, Bax, Bcl-2蛋白电泳

Fig. 4 Electrophoresis of LLP on Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9, Bax and Bcl-2 proteins in A549 cells

#### 4 讨论

肺癌的发病率在全球一直居高不下, 临床治疗中分为小细胞肺癌(SCLC)和NSCLC, NSCLC的发病率约为80%, 其中以肺腺癌最多发。研究表明, 信号转导通路、细胞凋亡通路、细胞周期调节、免疫机制调节等主要作为肺癌的治疗靶点, 且在治疗手段上, SCLC几乎没有局限性, 大部分患者采用化学疗法, 而NSCLC患者在I期和II期大多数(56%)采用手术治疗, III期患者中只有18%接受手术治疗, 大多数(62%)接受放疗<sup>[11]</sup>。虽然肺癌治疗手段在不断完善, 但查阅文献发现, 植物多糖在抗肺癌中低毒高效的优势仍无可替代。赵喆等<sup>[12]</sup>研究发现秦艽多糖通过调控STMN1的表达, 进而影响肺癌细胞增殖、迁移及侵袭; 王艳霞<sup>[13]</sup>报道了蒺藜皂苷通过上调PDCD4表达阻滞肺癌A549细胞周期, 抑制细胞增殖, 并诱导细胞凋亡。本研究发现, LLP能够有效抑制A549细胞的增殖, 且存在时间依赖性和剂量依赖性。

治疗癌症的关键问题之一是如何有效地抑制术后复发及转移。肿瘤细胞发生侵袭转移需要多种因素共同参与,有研究表明,肿瘤的侵袭转移与上皮间充质转化(EMT)过程十分密切,即细胞外基质降解,使细胞极性消失,运动能力增强,从而获得侵袭迁移的能力。本实验通过LLP处理细胞,进行了细胞划痕实验,transwell实验,结果表明LLP具有抑制A549细胞迁移和侵袭的能力,由此推断其机制可能与抑制上皮间充质转化有关,需后续实验验证<sup>[14-16]</sup>。

Cyclin,CDK是参与细胞周期调控的分子基础,Cyclin依靠CDK的活性发挥作用。相关研究表明,Cyclin D<sub>1</sub>是细胞周期开始循环运行的关键蛋白,促进细胞增殖<sup>[17]</sup>。Cyclin D<sub>1</sub>通过结合并激活G<sub>1</sub>时期特有的周期蛋白依赖性激酶CDK-4和CDK-6,形成Cyclin D-CDK4/6复合体,其作为G<sub>1</sub>/S细胞周期检验点的关键因子,使G<sub>1</sub>期周期抑制蛋白(Rb)被磷酸化,促使转录因子E2F和Rb的解离,E2F作为调节细胞转录的因子,推动细胞周期由G<sub>1</sub>期到S期的进行<sup>[18]</sup>。邓龙等<sup>[19]</sup>通过哌柏西利作用于人黑素瘤细胞的研究发现,Cyclin D<sub>1</sub>/CDK4/6的表达水平下调,引起细胞周期G<sub>1</sub>期阻滞。另外,有研究发现,G<sub>2</sub>/M期的关键蛋白是Cyclin B<sub>1</sub>和CDK-1,过表达促进G<sub>2</sub>/M期转换,甚至导致细胞恶性增殖或转化<sup>[20-21]</sup>。成熟促进因子(MPF)由调节亚基Cyclin B<sub>1</sub>和催化亚基CDK-1组成,是有丝分裂精确调控的关键点。在细胞分裂前期,Cyclin B<sub>1</sub>含量较低,到G<sub>2</sub>期时Cyclin B<sub>1</sub>积累到峰值,与CDK-1结合成MPF酶复合物,CDK-1的Thr14,Tyr15,Thr161结合Cyclin B<sub>1</sub>后发生磷酸化,激活MPF酶复合物,进而调控G<sub>2</sub>期到M期的转换。朱梦云等<sup>[22]</sup>用姜黄素作用于人晶状体上皮细胞的研究发现,Cyclin B<sub>1</sub>/CDK-1的表达水平下调,通过Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路诱导G<sub>2</sub>/M细胞阻滞使细胞停止分裂。在本实验中,流式细胞术结果表明LLP干预后的A549细胞停滞在G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期,且呈浓度依赖性。后续蛋白水平实验结果显示G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期相关蛋白CDK-4,CDK-6,Cyclin D<sub>1</sub>表达水平均降低,表明LLP可能将A549细胞阻滞在G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期,与流式细胞术所得结果一致。但在基因和蛋白水平的实验结果还得到了G<sub>2</sub>/M期相关mRNA和蛋白CDK-1,Cyclin B<sub>1</sub>表达水平也均降低,提示LLP可能对A549细胞周期中G<sub>2</sub>/M期也有阻滞作用,还需要后续实验证明。由此可以推断,LLP可能通过周期阻滞作用抑制A549细胞的恶性发展。

死亡受体途径(外源性)和线粒体途径(内源性)是凋亡途径的两种主要方式,且两种途径相互关联,密不可分<sup>[23]</sup>。植物多糖抗肿瘤作用作为目前研究热点之一<sup>[24]</sup>,其主要通过调节信号通路传导、抑制癌细胞生长、促进细胞凋亡、调控细胞周期、增强免疫力、抑制肿瘤血管生成和清除自由基等方式实现抗肿瘤作用。在诱导细胞凋亡的作用中<sup>[25]</sup>,Caspase是执行细胞凋亡的蛋白酶家族,同时参与死亡受体通路和线粒体通路。在线粒体凋亡途径中<sup>[26]</sup>,各种促凋亡信号的释放会诱导线粒体释放细胞色素C,使Caspase-9通过自我剪接而活化,活化后的Caspase-9召集并激活Caspase-3,Caspase-3作为凋亡的主要执行者,从而启动Caspase级联反应诱导肿瘤细胞凋亡。同时,Bcl-2家族也参与线粒体凋亡通路。其中促凋亡因子Bax和抗凋亡因子Bcl-2相互拮抗,Bax通过促进细胞色素C的释放促进肿瘤细胞凋亡,Bcl-2则相反。另外,外源性途径涉及死亡受体的激活<sup>[27]</sup>,TNF家族的成员Fas是死亡受体的代表,Fas与其配体结合后,增强Caspase-8完成自我剪接,激活下游的Caspase家族,Caspase-3作为线粒体凋亡通路和死亡受体通路的交汇点,完成Caspase-8活化后诱导的凋亡反应。本实验中A549细胞经LLP药物处理后,Caspase-3,Caspase-8,Caspase-9,Bax表达升高,Bcl-2表达降低,LLP可能通过死亡受体通路和线粒体凋亡通路诱导A549细胞发生凋亡,抑制肿瘤细胞的恶性生长。

综上,LLP能有效抑制A549细胞的增殖,阻滞A549细胞周期于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期,同时可能包含G<sub>2</sub>/M期,并通过线粒体凋亡途径和死亡受体途径诱导细胞凋亡。本研究阐明了LLP对NSCLCA549细胞的作用机制,可为筛选新型、高效、不良反应小、具有应用前景的抗肺癌多糖类药物提供基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] FREDDIE B, JACQUES F, ISABELLE S, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *Cancer J Clin*, 2018, 68 (6) : 394-424.
- [2] 于正伦,张曙光,许顺. 148例肺腺癌患者的预后影响因素分析[J]. *中国医科大学学报*, 2019, 48(11) : 1045-1048.
- [3] 邓小娟,敖素华. 芦根多糖诱导自噬和凋亡抑制非小细胞肺癌A549细胞增殖[J]. *医药导报*, 2020, 39

- (8): 1041-1046.
- [4] 刘艳玲,袁娟,郭敏,等. 基于TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B信号通路探讨黄芪多糖对肺癌小鼠免疫功能的影响及对Th1/Th2的调节作用[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(6): 676-682.
- [5] 李志强,何玉霞. 芝多糖对人肺癌A549细胞增殖凋亡的作用[J]. 现代食品科技, 2021, 37(5): 38-42.
- [6] 熊伟,谭德勇,陈贵元,等. 地参多糖对小鼠免疫功能影响的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(1): 11-13.
- [7] LEE M R, YANG H J, PARK K I, et al. *Lycopus lucidus* Turcz. ex Benth. Attenuates free fatty acid-induced steatosis in HepG2 cells and non-alcoholic fatty liver disease in high-fat diet-induced obese mice [J]. *Phytomedicine*, 2019, doi: 10.1016/j.phymed. 2018.07.008
- [8] 林春榕,左绍远,熊伟,等. 地参多糖对D-半乳糖所致衰老小鼠的抗氧化作用研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(18): 9646-9647.
- [9] 熊伟,谭德勇,陈贵元,等. 地参多糖对正常及实验性糖尿病小鼠血糖的影响实验研究[J]. 生命科学仪器, 2010, 8(5): 64-66.
- [10] 陈贵元,张翠香,罗永会,等. 地参多糖的提取工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 38-40.
- [11] MILLER K D, NOGUEIRA L, MARIOTTO A B, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(5): 363-385.
- [12] 赵喆,陈海洋,苏鹏. 秦艽多糖通过调控STMN1表达影响肺癌细胞增殖、迁移及侵袭[J]. 中国药师, 2021, 24(7): 276-281.
- [13] 王艳霞. 蒺藜皂苷通过上调PDCD4表达阻滞肺癌A549细胞周期并诱导细胞凋亡[J]. 中国药师, 2020, 23(10): 1894-1898.
- [14] ZOU B, ZHOU X L, LAI S Q, et al. Notch signaling and non-small cell lung cancer (review) [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(3): 3415-3421
- [15] WU C, ZHU X, LIU W, et al. NFIB promotes cell growth, aggressiveness, metastasis and EMT of gastric cancer through the Akt/STAT3 signaling pathway [J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(3): 1565-1573.
- [16] XIANG Y, LIAO X, YU C, et al. MiR-93-5p inhibits the EMT of breast cancer cells via targeting MKL-1 and STAT3 [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 357(1): 135-144.
- [17] 陈彦洁,柳传毅,吕满霞,等. 鱼藤素诱导肺癌细胞凋亡和细胞周期阻滞的分子机制[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(8): 1109-1114.
- [18] LIU B, LI X, SUN F, et al. HP-CagA<sup>+</sup> regulates the expression of CDK4/CyclinD<sub>1</sub> via Reg<sub>3</sub> to change cell cycle and promote cell proliferation [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(1): 224.
- [19] 邓龙,徐敏,付蕾,等. CDK4/6抑制剂哌柏西利对人黑素瘤细胞增殖、周期和凋亡的影响[J]. 肿瘤, 2020, 40(8): 521-530.
- [20] YE C, WANG J, WU P, et al. Prognostic role of cyclin B<sub>1</sub> in solid tumors: a Meta-analysis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(2): 2224-2232.
- [21] HUANG T, CHEN S, HAN H, et al. Expression of Hsp90 $\alpha$  and cyclin B<sub>1</sub> were related to prognosis of esophageal squamous cell carcinoma and keratin pearl formation [J]. *Int J of Clin Exp Patho*, 2014, 7(4): 1544-1552.
- [22] 朱梦云,崔双慧,郝泽宇,等. 姜黄素通过Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路诱导人晶状体上皮细胞的凋亡和细胞周期阻滞[J]. 南方医科大学学报, 2021, 41(5): 722-728.
- [23] 李帅,张炳东. 细胞凋亡途径的研究进展[J]. 山东医药, 2017, 57(37): 103-106.
- [24] NIU J F, WANG S P, WANG B L, et al. Structure and anti-tumor activity of a polysaccharide from *bletilla ochracea* schltr [J]. *Int J of Biol Macromol*, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac. 2019. 11.039.
- [25] YIN F, ZHOU H, FANG Y. Astragaloside IV alleviates ischemia reperfusion-induced apoptosis by inhibiting the activation of key factors in death receptor pathway and mitochondrial pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, doi: 10.1016/j.jep. 2019. 112319.
- [26] 张凯媛,吕玲玲,陈敬贤,等. 莪术二酮对MDA-MB-231细胞周期和凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(12): 74-81.
- [27] ZHUANG W LIU J, LI W. Hsa-miR-33-5p as a therapeutic target promotes apoptosis of breast cancer cells via selenoprotein T [J]. *Front Med*, 2021, doi: 10.3389/fmed. 2021. 651473.

[责任编辑 张丰丰]