

## 葶苈大枣泻肺汤通过 Caspase-1 诱导 A549 细胞 焦亡与凋亡的机制

焦建玮<sup>1</sup>, 白玉杰<sup>1</sup>, 白玉莲<sup>2</sup>, 张艳景<sup>1</sup>, 焦平<sup>1\*</sup>

(1. 河北省中医院, 石家庄 050011; 2. 武警河北总队医院, 石家庄 050050)

**[摘要]** 目的:探讨葶苈大枣泻肺汤诱导 A549 细胞焦亡和凋亡的机制。方法:将 A549 细胞随机分为空白组、葶苈大枣泻肺汤低、中、高质量浓度组(中药低、中、高质量浓度组),中药低、中、高质量浓度组分别以葶苈大枣泻肺汤 20、40、60 mg·L<sup>-1</sup> 处理,空白组以等体积培养液处理。药物作用 48 h 后,划痕实验检测细胞迁移能力,流式细胞仪检测细胞凋亡,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)、NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)、消皮素 D(GSDMD)、细胞凋亡抑制因子(Survivin)蛋白及核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)通路蛋白相对表达量,DCFH-DA 荧光探针法检测细胞内活性氧(ROS)水平,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测细胞上清液肿瘤坏死因子- $\beta$ (TNF- $\beta$ )和白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )含量。结果:与空白组比较,中药低、中、高质量浓度组细胞划痕愈合率明显降低,细胞凋亡率明显增加,Survivin 蛋白相对表达量明显降低,Caspase-1、GSDMD、NLRP3 相对表达量明显增加,ROS 和 NF- $\kappa$ B 磷酸化水平明显上升,细胞上清液 TNF- $\beta$  和 IL-1 $\beta$  含量明显增加( $P < 0.05$ );与中药低质量浓度组比较,中药中、高质量浓度组细胞划痕愈合率明显降低,细胞凋亡率明显增加,Survivin 蛋白相对表达量明显降低,Caspase-1、GSDMD、NLRP3 相对表达量明显增加,ROS 和 NF- $\kappa$ B 磷酸化水平明显上升,细胞上清液 TNF- $\beta$  和 IL-1 $\beta$  含量明显增加( $P < 0.05$ );与中药中质量浓度组比较,中药高质量浓度组细胞划痕愈合率明显降低,细胞凋亡率明显增加,Survivin 蛋白相对表达量明显降低,Caspase-1、GSDMD、NLRP3 相对表达量明显增加,ROS 和 NF- $\kappa$ B 磷酸化水平明显上升,细胞上清液 TNF- $\beta$  和 IL-1 $\beta$  含量明显增加( $P < 0.05$ )。结论:葶苈大枣泻肺汤可提高 NLRP3 蛋白表达,抑制 Survivin 蛋白表达,促进 A549 细胞凋亡;同时,可激活 NF- $\kappa$ B 通路和 ROS 系统,上调细胞焦亡因子 Caspase-1、GSDMD 的表达,介导 A549 细胞焦亡。

**[关键词]** 非小细胞肺癌; 葶苈大枣泻肺汤; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(Caspase-1); 细胞焦亡; 细胞凋亡

**[中图分类号]** R2-0;R285;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)06-0054-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220636

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220120.1043.003.html>

**[网络出版日期]** 2022-01-20 16:12

### Mechanism of Tingli Dazao Xiefeitang on Cell Pyrolysis and Apoptosis Induced by Caspase-1 in A549 Cells

JIAO Jian-wei<sup>1</sup>, BAI Yu-jie<sup>1</sup>, BAI Yu-lian<sup>2</sup>, ZHANG Yan-jing<sup>1</sup>, JIAO Ping<sup>1\*</sup>

(1. Hebei Traditional Chinese Medicine Hospital, Shijiazhuang 050011, China;

2. The Hebei Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Shijiazhuang 050050, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the mechanism of coking death and apoptosis of A549 cells induced by Tingli Dazao Xiefeitang. **Method:** A549 cells were randomized into blank group, traditional Chinese medicine (TCM) low, medium, and high concentration groups, which were treated with 20, 40, 60 mg·L<sup>-1</sup> Tingli Dazao Xiefeitang, and TCM low, medium, and high concentration groups, respectively, and blank group was treated with equal volume culture medium. After 48 h of treatment, cell migration was detected by scratch assay and cell apoptosis was detected by flow cytometry. The relative expression levels of cysteine

**[收稿日期]** 2021-06-24

**[基金项目]** 河北省中医药管理局科研计划项目(2017043)

**[第一作者]** 焦建玮,在读硕士,主治医师,从事中医肿瘤内科工作,E-mail:oldaged@yeah.net

**[通信作者]** \*焦平,主任医师,从事消化系统疾病研究,E-mail:jiaoping50@126.com

aspartate protease-1 (Caspase-1), NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), dermoderin D (GSDMD), Survivin protein and nuclear transcription factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) pathway proteins were detected by Western blot. The levels of intracellular reactive oxygen species (ROS) were determined by DCFH-DA fluorescence probe, and the contents of tumor necrosis factor  $\beta$  (TNF- $\beta$ ) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in supernatant were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** Compared with blank group, the scratch healing rate, apoptosis rate, relative expression of Survivin protein, Caspase-1, GSDMD, NLRP3, ROS and NF- $\kappa$ B phosphorylation levels were significantly increased in low, medium and high concentration groups. The contents of TNF- $\beta$  and IL-1 $\beta$  in supernatant were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the low concentration group, the scratch healing rate, apoptosis rate, Survivin protein relative expression, Caspase-1, GSDMD, NLRP3 relative expression, ROS and NF- $\kappa$ B phosphorylation levels were significantly increased in the medium and high concentration groups. The contents of TNF- $\beta$  and IL-1 $\beta$  in supernatant were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the TCM group, the scratch healing rate, apoptosis rate, Survivin protein relative expression, Caspase-1, GSDMD, NLRP3 relative expression, ROS and NF- $\kappa$ B phosphorylation levels were significantly increased in the high concentration group. The contents of TNF- $\beta$  and IL-1 $\beta$  in supernatant were significantly increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Tingli Dazao Xiefeitang can improve NLRP3 protein expression, inhibit Survivin protein expression and promote apoptosis of A549 cells. At the same time, it can activate NF- $\kappa$ B pathway and ROS system, up-regulate the expression of Caspase-1 and GSDMD, mediate scortosis of A549 cells.

**[Keywords]** non-small cell lung cancer; Tingli Dazao Xiefeitang; cysteinyl aspartate-specific proteinase-1 (Caspase-1); cell pyrolysis; cell apoptosis

肺癌为我国居民常见恶性肿瘤和主要恶性肿瘤死因<sup>[1]</sup>。非小细胞肺癌(NSCLC)约占肺癌的85%左右,由于早期诊断率较低,导致患者预后多不良,且大多数在确诊5年内死亡。除根治术外,化疗为NSCLC常用治疗手段。但临床实践发现,即使是第3代化疗药物应用于NSCLC患者中的有效率也只有30%左右,相较于小细胞癌,NSCLC对化疗药物敏感性较低。有研究表明,中药汤剂在提高NSCLC化疗敏感性中具有一定的价值,可以一定程度上延长NSCLC患者生存时间<sup>[2-3]</sup>。葶苈大枣泻肺汤常用于治疗胸胁胀满,擅泻肺气,通利小便,现代药理学研究表明,葶苈大枣泻肺汤中富含槲皮素、 $\beta$ -谷固醇、豆固醇、山奈酚等物质,可促进细胞凋亡,发挥抗肿瘤作用<sup>[4]</sup>。细胞焦亡在先天免疫反应中具有一定作用,焦亡的主要过程为细胞不断胀大至致细胞膜破裂,细胞内容物释放,同时激活炎症反应,共同参与细胞程序性死亡,故细胞焦亡又被称之为炎症坏死<sup>[5]</sup>。相关研究发现细胞焦亡在肿瘤的发生及治疗中发挥重要作用;其中正常细胞受到刺激发生焦亡的过程中释放大量炎症因子,形成炎症微环境导致正常细胞转化为肿瘤细胞;因此,诱导肿瘤细胞发生焦亡可以抑制肿瘤的发生和发展。徐飞等<sup>[6]</sup>研究发现分析焦亡的分子调节机制可以为肺癌

的治疗提供潜在的作用靶点。金磊等<sup>[7]</sup>研究发现苜蓿酰胺通过促进B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)相关X蛋白(Bax)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)的表达并抑制凋亡蛋白Bcl-2的表达从而诱导肺癌细胞凋亡和焦亡。

Caspase是细胞凋亡过程起促凋亡作用的关键介质,有研究表明,Caspase-1不仅在细胞凋亡中发挥重要作用,还可诱导细胞焦亡<sup>[8]</sup>。消皮素D(GSDMD)为细胞焦亡相关蛋白,激活后可诱导细胞凋亡向细胞焦亡发展,或直接进入细胞焦亡,进而增加化疗药物对肿瘤细胞杀伤作用<sup>[9]</sup>。研究发现,Caspase-1可通过激活GSDMD,介导细胞焦亡<sup>[10]</sup>。同时在GSDMD缺陷细胞中,Caspase-1可通过调控促凋亡蛋白Bid表达,诱导细胞凋亡<sup>[11]</sup>。NOD样受体蛋白3(NLRP3)可与Caspase-1结合形成NLRP3炎性小体,促进炎症因子释放,从而参与Caspase-1介导细胞程序性坏死。其中活性氧(ROS)介导的核转录因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)通路被认为是NLRP3炎性小体的重要触发因子<sup>[12-13]</sup>。近年研究发现,通过诱导Caspase-1介导的肿瘤细胞焦亡,可明显提高肿瘤细胞对化疗的敏感性<sup>[14]</sup>。但关于中药汤剂对于肿瘤细胞焦亡的影响机制研究并不多见。A549细胞作为人肺泡腺癌基底上皮细胞,体

外培养时单层贴壁生长,在肺癌体外实验研究中较为常用。因此,本研究通过分析葶苈大枣泻肺汤诱导A549细胞焦亡与凋亡的可能机制,为葶苈大枣泻肺汤在治疗NSCLC方面提供理论基础。

## 1 材料

**1.1 药物** 葶苈大枣泻肺汤<sup>[15]</sup>:组方为葶苈子15g(安徽,批号191201746)、大枣10g(山东,批号200816647)、紫苏子8g(四川,批号190925413)、炒莱菔子8g(安徽,批号200314157)、白芥子8g(安徽,批号201108276)、桂枝5g(贵州,批号190623546)、茯苓5g(安徽,批号191216791)、车前子5g(安徽,批号200607451)、丹参5g(山东,批号200110548)、桃仁5g(安徽,批号190726397),均由河北省中医院药剂科提供,所有饮片均经河北省中医院药学部程杰主任药师鉴定。取7份药材,用蒸馏水浸泡40min,保留浸泡液体,再加入7倍蒸馏水一煎,沸水煎40min,过滤;加入6倍蒸馏水二煎,沸水煎煮30min,过滤;将2次煎煮滤液混合,干燥后以1:1浓缩,装至广口试剂瓶,4℃保存备用。高效液相色谱法对葶苈大枣泻肺汤进行质控检测:精密称取腺苷对照品,加10%甲醛制成35mg·L<sup>-1</sup>的溶液(对照品溶液);将6瓶葶苈大枣泻肺汤混匀后吸取25mL,加三氯甲烷振摇提取2次,每次10mL,弃去三氯甲烷,蒸干,加10%甲醛溶解,定量转移至5mL量瓶中,加10%甲醛稀释摇匀后过滤得供试品溶液;分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液10μL,注入液相色谱仪测定,本品每10mL含葶苈大枣泻肺汤以腺苷计,不得少于0.025mg。

**1.2 试剂** 7-AAD染液(上海翊圣生物科技有限公司,批号HB170616);细胞ROS分析试剂盒(北京百奥莱博科技有限公司,批号110251);BCA蛋白定量试剂盒(美国赛默飞世尔公司,批号23227);兔抗人Caspase-1、NLRP3、GSDMD、NF-κB、细胞凋亡抑制因子(Survivin)、β-肌动蛋白(β-actin)、辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗(美国Abcam公司,批号分别为207802、263899、210070、207297、76424、197345、150077);ECL化学发光法检测试剂盒(上海信帆生物科技有限公司,批号1052050);肿瘤坏死因子-β(TNF-β)、白细胞介素-1β(IL-1β)(深圳市科润达生物工程有限公司,批号分别为2016232、123562)。

**1.3 仪器** 203000型激光共聚焦扫描显微镜(日本Olympus公司);11096型酶标仪(南京德铁实验设备有限公司);CytoFLEX LX型流式细胞仪(美国贝克曼库尔特公司);Agilent1120型液相色谱仪(盐城庆

盛实验室装备有限公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** 人非小细胞肺癌A549细胞,购自上海盖宁生物科技有限公司,置于含细胞悬液冻存管中,37℃水浴迅速摇晃解冻;加入含10%胎牛血清和1%青霉素的RPMI-1640培养基,1000r·min<sup>-1</sup>离心5min(离心半径5cm),弃上清,加新培养基,吹打均匀,37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱过夜;细胞密度达80%时,弃上清液,磷酸盐缓冲液(PBS)洗2次;加入胰蛋白酶消化2min,显微镜下观察;细胞大部分变圆并脱落时,加入完全培养基,轻轻吹打细胞层;1000r·min<sup>-1</sup>离心5min(离心半径5cm),弃上清;加培养液,将细胞悬液按1:2分装至含新培养基的培养瓶内,37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱内培养;10次传代,台盼蓝染色法和相对比显微镜法测定活细胞计数,细胞融合度达到70%~80%换无血清的培养基同步化24h,冻存。

**2.2 药物处理** 取对数生长期细胞,随机分为空白组、葶苈大枣泻肺汤低、中、高质量浓度组(中药低、中、高质量浓度组),中药各质量浓度组分别加入葶苈大枣泻肺汤20,40,60mg·L<sup>-1</sup>,空白组以等体积培养液处理,37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱内培养。

**2.3 划痕实验检测细胞迁移能力** 药物作用48h后取细胞,胰蛋白酶消化细胞,制备1×10<sup>5</sup>个/mL细胞悬液;接种于6孔板,37℃过夜孵育;弃去旧培养基,用干净的200μL枪头垂直于板底部划痕,每孔至少穿过6条横线;PBS冲洗,去除划下细胞;加入无血清培养基,37℃,5%CO<sub>2</sub>培养;于0h时,倒置显微镜拍照并测量划痕面积,标记为T0;后继续培养24h,再次倒置显微镜拍照并测量划痕面积,标记为T1;实验重复3次,划痕愈合率=(T0时划痕面积-T1时划痕面积)/T0时划痕面积×100%。

**2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡** 药物作用48h后取细胞,含EDTA的0.25%胰酶37℃消化1~3min;PBS洗涤细胞后,2000r·min<sup>-1</sup>离心5min(离心半径6cm),收集1×10<sup>5</sup>个细胞于离心管中;加入Binding buffer 500μL悬浮细胞,加入Annexin V-PE 1μL混匀;室温、避光、反应15min;加入7-AAD染液5μL,混匀;室温、避光、反应15min;1h内用流式细胞仪检测,每个样本实验重复3次取平均值;凋亡率=(早期凋亡细胞数+晚期凋亡细胞数)/总细胞数×100%。

**2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各蛋白表达** 药物作用48h后取细胞,弃上层培养液,滴加胰蛋白酶消化1h,BCA法进行蛋白定量分析;PBS

重悬细胞,取蛋白样品 20 μg 进行琼脂糖凝胶电泳,后转至 PVDF 膜;膜封闭液作用 30 min~1 h,滴加稀释后的兔抗人 Caspase-1 抗体(1:2 000),NLRP3 抗体(1:2 000),GSDMD 抗体(1:2 000),NF-κB 抗体(1:2 000),Survivin 抗体(1:2 000),内参 β-actin(1:1 000),4 °C 孵育过夜;PBST 溶液清洗,滴加 HRP 标记的二抗,室温孵育 1~2 h;ECL 化学发光法曝光显影,凝胶成像系统采集条带图像信息,Image Pro Plus 软件定量分析蛋白相对表达量。

**2.6 DCFH-DA 荧光探针法检测细胞内 ROS 水平**  
药物作用 48 h 后取细胞,弃上层培养液,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;按照试剂盒说明书,激光共聚焦扫描显微镜测定激发波长 488 nm、吸收波长 590 nm 处的吸光度 A;实验重复 3 次,A 越强提示细胞内 ROS 水平越高。

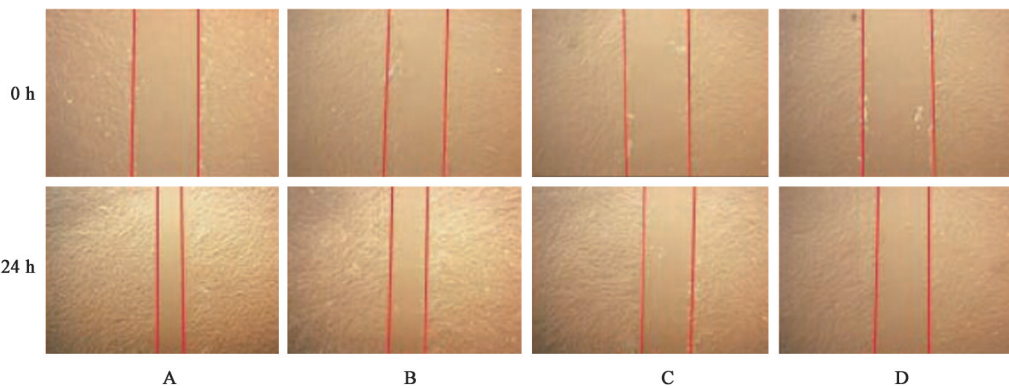
**2.7 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测细胞上清**

液 TNF-β 和 IL-1β 含量 药物作用 48 h 后取细胞,弃旧培养基,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;加入无血清培养基,1 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min(离心半径 5 cm),吸取上清液;按照试剂盒说明书操作,采用 ELISA 检测细胞上清液 TNF-β 和 IL-1β 含量。

**2.8 统计学处理** 采用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析,两两比较用 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

**3 结果**

**3.1 对大鼠 A549 细胞迁移的影响** 与空白组比较,中药低、中、高质量浓度组细胞划痕愈合率明显降低( $P < 0.05$ );与中药低质量浓度组比较,中药中、高质量浓度组细胞划痕愈合率明显降低( $P < 0.05$ );与中药中质量浓度组比较,中药高质量浓度组细胞划痕愈合率明显降低( $P < 0.05$ )。见图 1 和表 1。



注:A.空白组;B.中药低质量浓度组;C.中药中质量浓度组;D.中药高质量浓度组(图2-图5同)

图1 葶苈大枣泻肺汤对大鼠 A549 细胞迁移的影响(倒置显微镜,×400)

Fig. 1 Effect of Tingli Dazhao Xiefeitang on migration of rat A549 cells (invert microscope, ×400)

表1 葶苈大枣泻肺汤对大鼠 A549 细胞迁移的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 1 Effect of Tingli Dazhao Xiefeitang on migration of rat A549 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	细胞划痕愈合率/%
空白组		82.44±4.51
中药低质量浓度组	20	62.34±4.38 <sup>1)</sup>
中药中质量浓度组	40	42.51±4.53 <sup>1,2)</sup>
中药高质量浓度组	60	33.25±4.42 <sup>1,2,3)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,与中药低质量浓度组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ,与中药中质量浓度组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ (表2-表7同)

**3.2 对大鼠 A549 细胞凋亡的影响** 与空白组比较,中药低、中、高质量浓度组细胞凋亡率明显增加,Survivin 蛋白相对表达量明显降低( $P < 0.05$ );与中药低质量浓度组比较,中药中、高质量浓度组细胞凋亡率明显增加,Survivin 蛋白相对表达量明显

降低( $P < 0.05$ );与中药中质量浓度组比较,中药高质量浓度组细胞凋亡率明显增加,Survivin 蛋白相对表达量明显降低( $P < 0.05$ )。见图 2 和表 2。

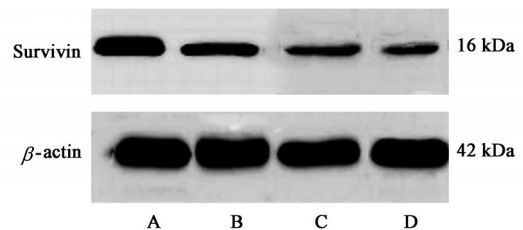


图2 A549 细胞 Survivin 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of survivin protein expression in A549 cells

**3.3 对大鼠 A549 细胞 ROS 水平的影响** 与空白组比较,中药低、中、高质量浓度组细胞 ROS 水平明显上升( $P < 0.05$ );与中药低质量浓度组比较,中药中、高质量浓度组细胞 ROS 水平明显上升( $P < 0.05$ );与

表2 葶苈大枣泻肺汤对A549细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Effect of Tingli Dazao Xiefeitang on apoptosis of A549 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	细胞凋亡率 /%	Survivin蛋白相对表达量
空白组		23.69±4.68	0.99±0.08
中药低质量浓度组	20	50.25±6.18 <sup>1)</sup>	0.74±0.12 <sup>1)</sup>
中药中质量浓度组	40	62.45±6.23 <sup>1,2)</sup>	0.62±0.08 <sup>1,2)</sup>
中药高质量浓度组	60	65.89±6.42 <sup>1,2,3)</sup>	0.51±0.11 <sup>1,2,3)</sup>

中药中质量浓度组比较,中药高质量浓度组细胞ROS水平明显上升( $P<0.05$ )。见表3。

表3 葶苈大枣泻肺汤对A549细胞ROS水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of Tingli Dazao Xiefeitang on ROS level of A549 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	吸光度A
空白组		42.69±5.32
中药低质量浓度组	20	58.48±5.36 <sup>1)</sup>
中药中质量浓度组	40	73.14±5.45 <sup>1,2)</sup>
中药高质量浓度组	60	87.39±5.51 <sup>1,2,3)</sup>

**3.4 对大鼠A549细胞NF-κB通路蛋白表达的影响** 与空白组比较,中药低、中、高质量浓度组细胞NF-κB磷酸化水平明显上升( $P<0.05$ );与中药低质量浓度组比较,中药中、高质量浓度组细胞NF-κB磷酸化水平明显上升( $P<0.05$ );与中药中质量浓度组比较,中药高质量浓度组细胞NF-κB磷酸化水平明显上升( $P<0.05$ )。见图3和表4。

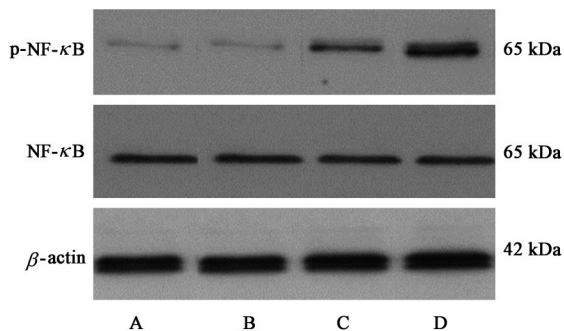


图3 A549细胞NF-κB通路蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of NF-κB pathway protein of A549 cells

**3.5 对大鼠A549细胞Caspase-1和GSDMD蛋白表达的影响** 与空白组比较,中药低、中、高质量浓度组细胞Caspase-1和GSDMD蛋白相对表达量明显增加( $P<0.05$ );与中药低质量浓度组比较,中药中、

表4 葶苈大枣泻肺汤对A549细胞NF-κB通路蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of Tingli Dazao Xiefeitang on NF-κB pathway protein expression of A549 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	NF-κB /β-actin	p-NF-κB /β-actin
空白组		1.27±0.02	0.23±0.03
中药低质量浓度组	20	1.32±0.03 <sup>1)</sup>	0.43±0.05 <sup>1)</sup>
中药中质量浓度组	40	1.33±0.02 <sup>1)</sup>	0.57±0.04 <sup>1,2)</sup>
中药高质量浓度组	60	1.34±0.01 <sup>1)</sup>	0.65±0.05 <sup>1,2,3)</sup>

高质量浓度组细胞Caspase-1和GSDMD蛋白相对表达量明显增加( $P<0.05$ );与中药中质量浓度组比较,中药高质量浓度组细胞Caspase-1和GSDMD蛋白相对表达量明显增加( $P<0.05$ )。见图4和表5。

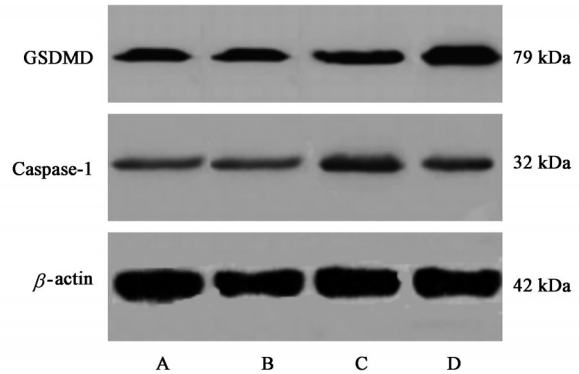


图4 A549细胞Caspase-1和GSDMD蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of Caspase-1 and GSDMD protein expression in A549 cells

表5 葶苈大枣泻肺汤对A549细胞Caspase-1和GSDMD表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 5 Effect of Tingli Dazao Xiefeitang on expression of Caspase-1 and GSDMD in A549 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	Caspase-1 /β-actin	GSDMD /β-actin
空白组		0.15±0.03	9.81±2.32
中药低质量浓度组	20	0.33±0.05 <sup>1)</sup>	15.98±2.34 <sup>1)</sup>
中药中质量浓度组	40	0.58±0.04 <sup>1,2)</sup>	26.78±2.43 <sup>1,2)</sup>
中药高质量浓度组	60	0.89±0.06 <sup>1,2,3)</sup>	43.15±2.38 <sup>1,2,3)</sup>

**3.6 对大鼠A549细胞NLRP3蛋白表达的影响**

与空白组比较,中药低、中、高质量浓度组细胞NLRP3相对表达量明显增加( $P<0.05$ );与中药低质量浓度组比较,中药中、高质量浓度组细胞NLRP3相对表达量明显增加( $P<0.05$ );与中药中质量浓度组比较,中药高质量浓度组细胞NLRP3相对表达量

明显增加( $P<0.05$ )。见图5和表6。

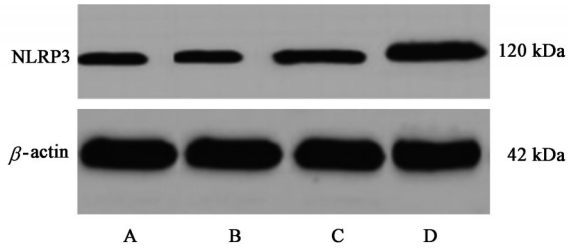


图5 A549细胞NLRP3蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of NLRP3 protein expression in A549 cells

表6 葶苈大枣泻肺汤对A549细胞NLRP3表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 6 Effect of Tingli Dazao Xiefeitang on NLRP3 expression in A549 cells ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	NLRP3 /β-actin
空白组		0.17±0.04
中药低质量浓度组	20	0.46±0.05 <sup>1)</sup>
中药中质量浓度组	40	0.59±0.06 <sup>1,2)</sup>
中药高质量浓度组	60	0.97±0.08 <sup>1,2,3)</sup>

**3.7 对大鼠A549胞炎性因子分泌的影响** 与空白组比较,中药低、中、高质量浓度组细胞上清液TNF-β和IL-1β含量明显增加( $P<0.05$ );与中药低质量浓度组比较,中药中、高质量浓度组细胞上清液TNF-β和IL-1β含量明显增加( $P<0.05$ );与中药中质量浓度组比较,中药高质量浓度组细胞上清液TNF-β和IL-1β含量明显增加( $P<0.05$ )。见表7。

表7 葶苈大枣泻肺汤对A549细胞炎性因子分泌的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 7 Effect of Tingli Dazhao Xiefeitang on secretion of inflammatory factors in A549 cells ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	TNF-β	IL-1β
空白组		78.31±16.69	62.87±16.54
中药低质量浓度组	20	144.82±18.45 <sup>1)</sup>	96.38±17.21 <sup>1)</sup>
中药中质量浓度组	40	213.48±21.67 <sup>1,2)</sup>	161.27±19.42 <sup>1,2)</sup>
中药高质量浓度组	60	366.59±23.36 <sup>1,2,3)</sup>	233.15±18.48 <sup>1,2,3)</sup>

#### 4 讨论

由于早期诊断率较低,大部分NSCLC患者确诊时已处于中晚期,根治术后1年生存率仅有40%左右<sup>[16]</sup>。因此,以化疗为主的非手术方法成为中晚期NSCLC患者主要选择。临床实践发现,相对于小细胞癌,NSCLC患者对化疗敏感性并不高,且受

多因素影响<sup>[17]</sup>。细胞凋亡与化疗敏感性具有一定关联。研究表明,通过促进细胞凋亡可明显增加肺癌耐药细胞株的化疗敏感性<sup>[18]</sup>。古往至今,中医在癌症治疗中发挥重要作用。研究表明,中医药不仅可防治化疗引起的骨髓抑制,一定程度上还可提高化疗药物效果<sup>[19]</sup>。

葶苈大枣泻肺汤出自《金匮要略》,主治痰涎壅盛、咳喘胸满。方中葶苈子具有泻肺平喘、利水消肿功效,为君药;佐以大枣和中扶正,缓解药力;加以紫苏子、炒莱菔子、白芥子,起祛痰、降气和平喘之效;桂枝、茯苓、丹参、桃仁具有调和气血、改善机体免疫功能作用<sup>[20]</sup>;车前子具有清热化痰功效,现代药理研究表明,其具有明显的抗炎作用<sup>[21]</sup>;诸药合用,共奏泻肺行水之功效。有研究将葶苈大枣泻肺汤用于肺脓肿治疗中发现,其可明显降低患者血清促炎因子水平,改善血气和肺功能作用<sup>[22]</sup>。李枋霏等<sup>[23]</sup>将其应用于晚期肺癌合并恶性胸腔积液患者治疗中发现,可改善患者免疫功能,并在一定程度上提高临床疗效。葶苈大枣泻肺汤主要包含槲皮素、β-谷固醇、豆固醇、山柰酚等活性成分。研究表明,槲皮素可呈浓度依赖性诱导获得性耐药NSCLC细胞凋亡,从而发挥较强的抗肿瘤作用<sup>[24]</sup>;β-谷固醇可通过ROS介导的线粒体失调,上调Caspase-3和Caspase-9表达,诱导NSCLC细胞凋亡<sup>[25]</sup>;豆固醇可通过激活内质网线粒体轴、刺激ROS产生等,抑制人卵巢癌细胞迁移和血管生成,并诱导细胞凋亡<sup>[26]</sup>;山柰酚可抑制A549细胞增殖和迁移<sup>[27]</sup>。近年研究发现,相较于细胞凋亡,细胞焦亡可能发生更快,并伴有大量促炎症细胞因子释放,有可能成为抗肿瘤治疗新切入点<sup>[28]</sup>。而葶苈大枣泻肺汤对NSCLC细胞凋亡和焦亡的影响及其机制,目前国内外均研究较少且尚未完全明确。

细胞凋亡被称之为程序性细胞死亡,而细胞焦亡被定义为程序性死亡,细胞焦亡是由Caspases的蛋白酶引起的,细胞焦亡是由于GSDMD蛋白被Caspase-1水解引起的,说明Caspase-1可在不同的情况下诱导细胞凋亡及焦亡,而增加癌细胞凋亡及焦亡,在控制癌症发展,延长患者生存时间中具有重要作用。Survivin蛋白是凋亡抑制蛋白家族中分子质量最小的成员,具有抗凋亡作用,能通过多条信号通路干扰细胞凋亡进程,促进肿瘤传播,同时给予肿瘤细胞治疗逃避特性<sup>[29]</sup>。

本研究以不同浓度葶苈大枣泻肺汤处理A549细胞发现,与空白组比较,葶苈大枣泻肺汤处理后

细胞划痕愈合率明显降低,细胞凋亡率明显增加, Survivin蛋白相对表达量明显降低,且作用呈浓度依赖性,且葶苈大枣泻肺汤对正常细胞并不会产生影响。以上研究结果提示葶苈大枣泻肺汤可抑制A549细胞迁移,诱导细胞凋亡,有可能成为NSCLC患者辅助治疗药物。氧化应激是导致细胞凋亡重要因素之一。既往研究表明,NF- $\kappa$ B通路激活后可以增加细胞内ROS水平,可促进氧化应激,进一步诱导NSCLC细胞凋亡<sup>[30-31]</sup>。本研究中,葶苈大枣泻肺汤处理后,A549细胞NF- $\kappa$ B磷酸化水平明显上升,表明葶苈大枣泻肺汤可使原本处于静息状态的NF- $\kappa$ B持续激活,促进细胞内氧化应激和免疫应答的发生,促进细胞凋亡。既往报道豆蔻素通过NF- $\kappa$ B信号通路诱导ROS介导的鼻咽癌细胞G<sub>2</sub>/M期阻滞和凋亡<sup>[32]</sup>。本研究中NF- $\kappa$ B的持续激活可促进A549细胞ROS水平上升,加速细胞凋亡。提示葶苈大枣泻肺汤通过促进NF- $\kappa$ B表达诱导ROS介导的细胞凋亡,但其具体机制需在今后的研究中加以关注。Caspase-1属于Caspases家族,能通过激活白活化的细胞因子受体激活炎症,在很长一段时间内,细胞焦亡被看做为Caspase所介导的细胞死亡过程。NLRP3为炎症反应中重要的传感蛋白之一,NLRP3激活后可触下游一系列的炎症反应,让胞内无活性的IL-1 $\beta$ 前体转变为成熟的IL-1 $\beta$ ,分泌大量的TNF- $\beta$ ,导致炎症级联扩增。本研究结果显示,葶苈大枣泻肺汤处理后,A549细胞Caspase-1和NLRP3相对表达明显增加,以上结果提示,葶苈大枣泻肺汤不仅可诱导细胞凋亡,还可增加Caspase-1介导的细胞焦亡相关因子,在各种肺癌细胞株及组织标本中普遍表达,可诱导细胞焦亡,从而起到抑癌作用<sup>[33]</sup>。GSDMD在A549细胞中有表达,本研究发现,葶苈大枣泻肺汤处理后,A549细胞GSDMD相对表达量明显增加,表明葶苈大枣泻肺汤可通过提高GSDMD水平,引发细胞焦亡,进一步证实了葶苈大枣泻肺汤在促进细胞焦亡的重要作用。既往研究表明,通过增加Caspase-1介导的细胞焦亡,可提高癌细胞化疗敏感性<sup>[34]</sup>。故葶苈大枣泻肺汤有可能对提高NSCLC化疗敏感性具有一定作用,拟在今后研究中进行分析。检测细胞上清液TNF- $\beta$ 和IL-1 $\beta$ 含量发现,与空白组比较,葶苈大枣泻肺汤处理后细胞上清液TNF- $\beta$ 和IL-1 $\beta$ 含量明显增加,与既往研究显示的葶苈大枣泻肺汤具有抗炎作用结果不一致,分析原因可能为葶苈大枣泻肺汤抗肿瘤作用主要通过激活NLRP3炎性小体,进一步增加

细胞焦亡水平完成。

综上所述,葶苈大枣泻肺汤可提高NLRP3蛋白表达,抑制Survivin蛋白表达,促进A549细胞凋亡;同时,可激活NF- $\kappa$ B通路和ROS系统,上调细胞焦亡因子Caspase-1、GSDMD的表达,介导A549细胞焦亡。本研究尚存在不足之处,未明确葶苈大枣泻肺汤诱导NSCLC细胞焦亡和凋亡具体有效成分及相关机制,拟在今后研究中进一步探讨。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 辛雯艳,黄磊,闫贻忠. 2005-2013年中国肿瘤登记地区肺癌流行和疾病负担时间趋势分析[J]. 中华肿瘤防治杂志,2019,26(15):1059-1065.
- [2] 吴健彬,陈壮忠,钟丽霞,等. 健脾益气方联合化疗对肺脾气虚证晚期非小细胞肺癌患者疗效及生活质量的影响[J]. 广州中医药大学学报,2021,38(5):865-870.
- [3] 叶轩婷,焦丽静,王喆,等. 中医药对EGFR突变非小细胞肺癌靶向治疗的临床研究循证述评[J]. 中医肿瘤学杂志,2021,3(4):26-30,36.
- [4] FREIRE R, WU L, PEDRAZZI G, et al. Cleavage of the bloom's syndrome gene product during apoptosis by Caspase-3 results in an impaired interaction with topoisomerase I  $\beta$  [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 29(15):3172-3180.
- [5] GROSSI S, FENINI G, KOCKMANN T, et al. Inactivation of the cytoprotective major vault protein by Caspase-1 and -9 in epithelial cells during apoptosis [J]. J Invest Dermatol, 2019, 140(7):1335-1345.
- [6] 徐飞,吴俏兰,陈修保,等. 细胞焦亡的分子调控机制及其在肺癌中的研究进展[J]. 肿瘤学杂志,2021,27(1):69-73.
- [7] 金磊,罗震宇,吕昂. 葶苈酰胺对活性氧诱导肺癌NCI-H460细胞凋亡与焦亡的影响[J]. 中国药理学杂志,2020,55(12):35-40.
- [8] SUN X, ZHOU R, LEI Y, et al. The ligand-gated ion channel P2X7 receptor mediates NLRP3/Caspase-1-mediated pyroptosis in cerebral cortical neurons of juvenile rats with sepsis [J]. Brain Res, 2020, 1748(18):147109.
- [9] MAI FY, HE P, YE J Z, et al. Caspase-3-mediated GSDME activation contributes to cisplatin- and doxorubicin-induced secondary necrosis in mouse macrophages [J]. Cell Prolif, 2019, 52(507):12663.
- [10] ORNING P, LIEN E, FITZGERALD K A. Gasdermins and their role in immunity and inflammation [J]. J Exp Med, 2019, 216(11):2453-2465.

- [11] TSUCHIYA K, NAKAJIMA S, HOSIJIMA S, et al. Caspase-1 initiates apoptosis in the absence of gasdermin D[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):2091.
- [12] WANG W, MAO S, YU H, et al. Pinellia pedatisecta lectin exerts a proinflammatory activity correlated with ROS-MAPKs/NF- $\kappa$ B pathways and the NLRP3 inflammasome in RAW264.7 cells accompanied by cell pyroptosis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 66(8):1-12.
- [13] 段晶晶,徐慧欣,骆璞,等. DEPTOR 诱导 Caspase-1 介导的细胞焦亡提高食管鳞癌细胞顺铂化疗敏感性 [J]. *药学学报*, 2019, 54(10):1845-1850.
- [14] 张漂,司富春,刘子提. 葶苈大枣泻肺汤治疗肺癌的网络药理学分析 [J]. *中药药理与临床*, 2020, 206(2):197-203.
- [15] 陶银煜,袁卫东. 葶苈大枣泻肺汤加减联合常规治疗对肺脓肿患者的临床疗效 [J]. *中成药*, 2018, 40(12):2640-2643.
- [16] ISAKA M, KOJIMA H, TAKAHASHI S, et al. Risk factors for local recurrence after lobectomy and lymph node dissection in patients with non-small cell lung cancer: implications for adjuvant therapy [J]. *Lung Cancer*, 2018, 115(8):28-33.
- [17] 袁梦,韩琤波,马洁韬,等. 不可手术局部晚期非小细胞肺癌放疗安全性及疗效分析 [J]. *中国医科大学学报*, 2017, 46(12):1124-1128.
- [18] 黄晖,李丽华,万敏娜,等. 非小细胞肺癌化疗敏感性与 EML4-ALK, EGFR, KRAS, c-MET 基因状态的关系 [J]. *中国现代医学杂志*, 2019, 29(5):59-64.
- [19] SEIDL C, PANZITT K, BERTSCH A, et al. MicroRNA-182-5p regulates hedgehog signaling pathway and chemosensitivity of cisplatin-resistant lung adenocarcinoma cells via targeting GLI2 [J]. *Cancer Lett*, 2020, 469(15):266-276.
- [20] 田兆兴,杨倩. 中医药防治肿瘤放疗后骨髓抑制的应用及研究进展 [J]. *中国医院药学杂志*, 2017, 37(2):190-193.
- [21] 龚年金,梁欢. 补元汤合桂枝茯苓丸对中晚期非小细胞肺癌患者免疫功能的改善作用 [J]. *肿瘤药学*, 2020, 10(2):110-114.
- [22] 王月,彪雅宁,储心乔,等. 车前子对腹泻大鼠炎症因子和结肠组织 AQP4 mRNA 和蛋白表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(20):59-65.
- [23] 李枋霏,王维,张仲妍,等. 葶苈大枣泻肺汤辅助化疗治疗肺癌恶性胸腔积液临床研究 [J]. *国际中医中药杂志*, 2018, 40(3):214-217.
- [24] 王静,袁媛,彭佳,等. 槲皮素通过 Stat3/Mcl-1 途径介导肺癌 PC9/GR 细胞凋亡的研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2017, 52(12):1782-1785.
- [25] RAJAVEL T, PACKIYARAJ P, SURYANARAYANAN V, et al.  $\beta$ -Sitosterol targets TRX/TRX1 reductase to induce apoptosis in A549 cells via ROS mediated mitochondrial dysregulation and p53 activation [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):2071.
- [26] BAE H, SONG G, LIM W. Stigmasterol causes ovarian cancer cell apoptosis by inducing endoplasmic reticulum and mitochondrial dysfunction [J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12(6):488.
- [27] GOVINDARAJU S, ROSHINI A, LEE M H, et al. Kaempferol conjugated gold nanoclusters enabled efficient for anticancer therapeutics to A549 lung cancer cells [J]. *Int J Nanomedicine*, 2019, 14(8):5147-5157.
- [28] TAABAZUING C Y, OKONDO M C, BACHOVCHIN D A. Pyroptosis and apoptosis pathways engage in bidirectional crosstalk in monocytes and macrophages [J]. *Cell Chem Biol*, 2017, 24(4):507-514.
- [29] 祝丽双,王浩,刘畅,等. 肿瘤中与 Survivin 有关的信号通路及分子以及靶向 Survivin 的治疗前景 [J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15(11):2181-2184.
- [30] 李琳,连树林,楚云杰,等.  $\beta$ -榄香烯对非小细胞肺癌 A549 细胞凋亡及氧化应激的影响 [J]. *肿瘤*, 2020, 40(9):625-632.
- [31] HE Z J, ZHU F Y, LI S S, et al. Inhibiting ROS-NF- $\kappa$ B-dependent autophagy enhanced brazilin-induced apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Food Chem Toxicol*, 2017, 101(23):55-66.
- [32] JUN Z, YAN Y, YANG Y, et al. Polydatin suppresses proliferation and metastasis of non-small cell lung cancer cells by inhibiting NLRP3 inflammasome activation via NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 108(2):130-136.
- [33] LI Y, QIN Y, YANG C, et al. Cardamonin induces ROS-mediated G<sub>2</sub>/M phase arrest and apoptosis through inhibition of NF- $\kappa$ B pathway in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 10(4):289.
- [34] LU H, ZHANG S, WU J, et al. Molecular targeted therapies elicit concurrent apoptotic and gsdme-dependent pyroptotic tumor cell death [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(23):6066-6077.

[责任编辑 孙丛丛]