

基于自噬途径观察飞龙掌血醇提物对NSCLC A549细胞凋亡的影响

洪岚^{1,2}, 吴昊^{1,3}, 田瑞^{1,4}, 冯佳¹, 侯孜明², 田梦杰², 陶柏楠², 沈玺², 曹春雨⁵, 袁林^{1,2*}

(1. 湖北民族大学 风湿性疾病发生与干预湖北省重点实验室, 湖北 恩施 445000;

2. 湖北民族大学 医学部, 湖北 恩施 445000;

3. 湖北恩施学院, 湖北 恩施 445000;

4. 湖北工业大学 生物工程与食品学院, 武汉 430070;

5. 三峡大学 医学院肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室, 湖北 宜昌 443002)

[摘要] 目的:观察飞龙掌血醇提物对NSCLCA549细胞自噬和凋亡的影响,并探讨其可能的作用机制。方法:体外培养A549细胞,采用细胞增殖与活性检测(CCK-8)法检测细胞增殖的情况,并计算A549细胞的存活率,筛选出药物的浓度。采用膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)/碘化丙锭(PI)法检测各组及加入自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤(3-MA)后细胞凋亡情况;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组及加入3-MA后凋亡相关蛋白B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、微管相关蛋白1轻链3(LC3 II)、活化的胱天蛋白酶-3(cleaved Caspase-3)、活化的聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(cleaved PARP1)及PARP1、活化的死亡激动剂(t-Bid)及Bid、泛素结合蛋白p62的表达情况。结果:与空白组比较,干预24 h,0.25 g·L⁻¹飞龙掌血醇提物组细胞存活率明显下降($P<0.05$),0.5、1、2、4 g·L⁻¹飞龙掌血醇提物组细胞存活率显著下降($P<0.01$);48 h时0.25、0.5、1、2、4 g·L⁻¹飞龙掌血醇提物组细胞存活率呈浓度依赖性显著下降($P<0.01$),且4 g·L⁻¹飞龙掌血醇提物细胞的存活率不到10%。流式细胞术结果显示,与空白组比较,0.5 g·L⁻¹飞龙掌血醇提物组细胞的总凋亡率明显增加($P<0.05$),1、2 g·L⁻¹飞龙掌血醇提物组时细胞凋亡率显著增加($P<0.01$);与2 g·L⁻¹飞龙掌血醇提物组和3-MA组比较,3-MA联合飞龙掌血醇提物组凋亡率显著降低($P<0.01$)。与空白组比较,1、2 g·L⁻¹飞龙掌血醇提物组促凋亡蛋白cleaved PARP1、Bax、t-Bid蛋白表达明显增加($P<0.05$, $P<0.01$);Bid蛋白表达在2 g·L⁻¹飞龙掌血醇提物组显著减少($P<0.01$);0.5、1、2 g·L⁻¹飞龙掌血醇提物组抗凋亡蛋白Bcl-2的蛋白表达明显减少($P<0.05$, $P<0.01$);0.5、1、2 g·L⁻¹飞龙掌血醇提物组p62的蛋白表达显著下调($P<0.01$),LC3 II蛋白表达显著上调($P<0.01$),具有浓度依赖性。结论:飞龙掌血醇提物能显著抑制A549细胞的增殖,其机制可能与促进细胞自噬和诱导细胞凋亡,共同促进细胞死亡有关。

[关键词] 飞龙掌血; 肺癌; 自噬; 凋亡

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)20-0078-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221223

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220414.1823.005.html>

[网络出版日期] 2022-04-16 12:03

Effect of *Toddalia asiatica* Alcohol Extract on Apoptosis of Non-small Cell Lung Cancer A549 Cells Based on Autophagy Pathway

HONG Lan^{1,2}, WU Hao^{1,3}, TIAN Rui^{1,4}, FENG Jia¹, HOU Ziming², TIAN Mengjie², TAO Bonan²,
SHEN Xi², CAO Chunyu⁵, YUAN Lin^{1,2*}

(1. Hubei Provincial Key Laboratory of Occurrence and Intervention of Rheumatic Diseases, Hubei Minzu University, Enshi 445000, China; 2. Medical School, Hubei Minzu University, Enshi 445000, China; 3. Hubei Enshi Collogee, Enshi 445000, China; 4. School of Biological Engineering and Food, Hubei

[收稿日期] 2021-11-30

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81860757);湖北省重点实验室开放基金项目(2020KZL05)

[第一作者] 洪岚, 硕士, 从事中医药及民族医药研究, E-mail:2877944853@qq.com

[通信作者] *袁林, 博士, 副教授, 从事中医药及民族医药研究, E-mail:171354806@qq.com

University of Technology, Wuhan 430070, China; 5. Hubei Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy, Medical College of China Three Gorges University, Yichang 443002, China)

[Abstract] Objective: To study the effects of *Toddalia asiatica* alcohol extract on autophagy and apoptosis of non-small cell lung cancer A549 cells, and to explore its possible mechanism. **Method:** A549 cells were cultured *in vitro*. Cell counting kit-8 (CCK-8) was used to detect the proliferation of A549 cells, and cell survival rate was calculated to screen the drug concentration. The apoptosis in each dose group and that after the use of 3-methyladenine (3-MA), an autophagy inhibitor, were detected by flow cytometry combined with Annexin V-FITC/PI double staining. Western blot was used to detect the expression levels of apoptosis-related proteins such as B cell lymphocytoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), cleaved cysteinyl aspartate-specific protease-3 (cleaved Caspase-3), activated poly (Adenosine diphosphate) ribonucleotide polymerase (cleaved PARP1), PARP1, activated death activator (t-Bid), Bid, and ubiquitin-binding protein p62 in each group and those after the use of 3-MA. **Result:** Compared with the conditions in the control group, the cell survival rate in 0.25 g·L⁻¹ group ($P<0.05$), and 0.5, 1, 2, 4 g·L⁻¹ groups ($P<0.01$) was decreased after 24 h intervention. Additionally, the cell survival rate was reduced in a concentration-dependent manner at 48 h and it was less than 10% at 4 g·L⁻¹ ($P<0.01$). Compared with the conditions in the control group, the total apoptosis rate in 0.5 g·L⁻¹ group was increased ($P<0.05$), and the apoptosis rate in 1 and 2 g·L⁻¹ groups was also increased ($P<0.01$). Compared with the 2 g·L⁻¹ group and 3-MA group, the 3-MA combined with *T. asiatica* alcohol extract had significantly decreased apoptosis rate ($P<0.01$). Compared with the conditions in the control group, elevated expression of pro-apoptotic proteins cleaved PARP1, Bax and t-Bid in 1 and 2 g·L⁻¹ groups ($P<0.05$, $P<0.01$), and reduced expression of Bid in the 2 g·L⁻¹ group ($P<0.01$) were found. Compared with the conditions in the control group, the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 ($P<0.05$, $P<0.01$) and the level of p62 ($P<0.01$) were down-regulated in 0.5, 1, 2 g·L⁻¹ groups, while the level of LC3 II protein was up-regulated ($P<0.01$), with certain concentration dependence. **Conclusion:** *T. asiatica* alcohol extract could significantly inhibit the proliferation of A549 cells, which might be related to promoting autophagy and inducing apoptosis.

[Keywords] *Toddalia asiatica*; lung cancer; autophagy; apoptosis

肺癌是全球最常见的癌症之一,大约85%的肺癌是非小细胞肺癌(NSCLC)。临床对于肺癌的主要治疗手段有手术、化疗、放疗和生物治疗等^[1]。完全手术切除虽有效但术后易发并发症导致病情恶化,放、化疗药物具有非特异性,往往产生严重的不良反应^[2]。中药因具有多靶点、多途径、多效应的作用特点在肿瘤的预防及治疗领域发挥了独特的作用。所以探索新的干预思路和药物治疗肺癌方式在临床上意义重大。飞龙掌血 *Toddalia asiatica* 是芸香科属植物,又名三百棒、大救驾、三文藤、牛麻筋,产自秦岭南坡以南各地,全株用作草药,多用其根^[3]。化学成分研究表明,飞龙掌血的主要化学成分为生物碱和香豆素^[4]。现代药理研究证实飞龙掌血提取物具有多种生物活性,包括抗关节炎^[5]、抗炎^[6-8]、抗微生物^[9-10]、抗寄生^[11]、抗氧化剂^[12-13]、抗血小板^[14]、抗肿瘤^[15]等多种作用。IWASAKI等^[16]研

究飞龙掌血中分离出来的生物碱在体外可以抑制小鼠和人肺腺癌细胞的增殖,对NSCLC A549细胞具有高度特异性的细胞增殖抑制作用。可上调凋亡相关基因,调节细胞周期基因表达,即抑制细胞增殖。学者们飞龙掌血中的生物碱在抗炎、镇痛、抗肿瘤等方面发挥着重要作用^[6,17]。但飞龙掌血醇提物对非NSCLC A549的增殖、凋亡、自噬研究几乎没有。本研究主要探讨飞龙掌血醇提物对NSCLC细胞凋亡、自噬的影响及分子机制,从而为抗NSCLC提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞株 人NSCLC细胞系A549细胞(中国科学院细胞库公司,批号CL-0024),用1640完全培养基(含10%胎牛血清和1%青-链霉素)并于37℃,5%CO₂孵箱中培养,传至8~10代。

1.2 试剂 胎牛血清(FBS,上海道鹏生物科技有

限公司,批号2110053),1640培养基(美国Gibco公司,批号8120481),青-链霉素溶液(吉诺生物医药技术有限公司,批号1712180106),膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)/碘化丙锭(PI)双染细胞凋亡检测试剂盒(上海贝博生物科技有限公司,批号BB21041),0.25%胰酶(浙江森瑞生物科技有限公司,批号1907260101),3-甲基腺嘌呤(3-MA,中国MCE公司,批号5142-23-4),ECL超敏发光液(武汉科瑞生物技术有限公司,批号KR0016),PMSF蛋白酶抑制剂(北京博奥森生物技术有限公司,批号CO5-01002),细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(大连美仑公司,批号MA0218-5),RIPA裂解液、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶配制试剂盒(中国碧云天生物技术有限公司,批号分别为P0013B、P0012A),羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G、羊抗鼠IgG、p62抗体、微管相关蛋白1轻链3(LC3,可分裂为LC3 I、LC3 II)抗体、聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(PARP1,可切割为cleaved PARP1)抗体、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)相关X蛋白(Bax)抗体、Bcl-2抗体、死亡激动剂(Bid,可分裂为Bidit-Bid)抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国Proteintech公司,批号分别为SA00001-2、SA00001-1、18420-1-AP、18725-1-AP、66520-1-Ig、50599-2-Ig、12789-1-AP、10988-1-AP、60004-1-Ig),活化的胱天蛋白酶-3(cleaved Caspase-3)抗体(Affinity Biosciences公司,批号ASP175)。

1.3 仪器 U-LH100HG型倒置荧光显微镜(日本Olympus公司),5333ZO959089型多功能酶标仪(美国Thermo Scientific公司),153BR 79456型电泳槽、电转膜仪(美国Bio Rad公司),LE-SH800SEP型流式细胞仪(日本索尼公司),9702022型凝胶成像系统(美国GE公司)。

2 方法

2.1 飞龙掌血醇提物的制备^[18] 飞龙掌血采于湖北省恩施州咸丰县,经湖北民族学院附属民大医院制剂室张国安主任药师鉴定为飞龙掌血 *T. asiatica* 的根及根皮。取飞龙掌血根皮100 g粉碎,加入5倍体积70%的乙醇浸泡40 min,回流提取,待沸腾后再继续恒温煎煮2 h,过滤出药液,再次加入相同体积70%乙醇回流提取2 h。将2次煎煮的药液合并负压浓缩至100 mL,生药含量为1 g·mL⁻¹。将浓缩后的药液平铺分装至多个底面平整的容器内,并用保鲜膜封口,放入-20℃冰箱过夜。真空冷冻干燥24 h,装袋、称质量、标记,保存在干燥处防止

受潮。

2.2 药物处理 称取飞龙掌血醇提物冻干粉1.5 g放入50 mL的离心管中,用磷酸盐缓冲液(PBS)溶解药粉,定容至15 mL封口,超声1 h,在超净工作台中打开,用0.22 μm的微孔滤膜过滤3次,离心管封装放入4℃冰箱备用。

2.3 细胞培养和分组 A549细胞株在RPMI 1640培养液(含10%胎牛血清和1%的青-链霉素)中培养,置于5%CO₂培养箱中,温度为37℃。倒置荧光显微镜下观察细胞生长情况,当细胞生长至80%~90%时,加入0.25%胰酶1 mL,消化1~2 min,按1:3进行传代。药物分组同2.1项,分为空白组,飞龙掌血醇提物低、中、高浓度组;另分为空白组、自噬早期抑制剂3-MA组、飞龙掌血醇提物组、3-MA+飞龙掌血醇提物组。

2.4 CCK-8法检测细胞增殖 取对数生长期细胞,采用RPMI 1640培养液调整细胞浓度5×10⁴个/孔,每组设6个复孔,接种于96孔板中培养过夜。同时设置溶剂组(只含培养基),并加入不同浓度的药物干预24、48 h,每个孔加入CCK-8增强型溶液10 μL,继续放入培养箱内培养1~2 h,用酶标仪450 nm处测定各孔吸光度A,计算细胞存活率。存活率=(A_{药物组}-A_{溶剂组})/(A_{空白组}-A_{溶剂组})×100%。

2.5 Annexin-FITC/PI双染流式细胞术检测细胞凋亡 将A549细胞按2×10⁵个/孔铺至六孔板内过夜,分组同2.3项。3-MA预处理6 h,加入飞龙掌血醇提物(干预24 h)后用预冷过的PBS洗涤,加入胰酶常规消化2~4 min,收集细胞,4℃,1 500 r·min⁻¹离心5 min(离心半径为1.8 cm)。预冷的PBS洗涤,用1×Annexin结合液400 μL悬浮细胞,加入Annexin V-FITC染色液5 μL,于4℃避光条件下孵育15 min,再加入PI 5 μL,继续孵育5 min,用流式细胞仪检测并用Flowjo软件分析。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测凋亡和自噬相关蛋白表达 细胞分组及给药同2.4项,收集细胞并在冰上用含有蛋白酶抑制剂的RIPA裂解缓冲液提取蛋白质,用BCA测定蛋白的浓度,将样本通过SDS-PAGE在12%凝胶上分离,并转移到硝酸纤维素膜上,取膜用5%脱脂牛奶于室温水平摇床上封闭2 h。TBST洗膜,孵育一抗p62、LC3、Bax、PARP1、Bid、Bcl-2、GAPDH(1:1 000)4℃过夜。TBST清洗3次,加入对应的二抗(1:2万),室温摇床缓慢摇1~2 h。TBST清洗,取膜加入显影液避光反应1 min,立即进行显影观察。

2.7 统计学处理 所有数据采用SPSS 20.0统计软件分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较满足正态分布条件及方差齐时,采用单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著性差异法(LSD)检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 飞龙掌血醇提取物对A549细胞增殖的影响 与空白组比较,干预24 h,0.25 g·L⁻¹飞龙掌血醇提取物组细胞存活率下降($P < 0.05$),0.5、1、2 g·L⁻¹飞龙掌血醇提取物组细胞存活率显著下降($P < 0.01$);48 h时细胞存活率呈浓度依赖性下降,且在4 g·L⁻¹时细胞的存活率不到10%($P < 0.01$)。24 h时在0.25 g·L⁻¹时细胞存活率较高,在1 g·L⁻¹时细胞存活率为50%左右,在4 g·L⁻¹时细胞的存活率不到10%,干预细胞48 h后细胞存活没有达到50%,故筛选出0.5、1、2 g·L⁻¹作为飞龙掌血醇提取物组,并与3-MA联用,干预时间为24 h,用于后续实验。见表1。

表1 飞龙掌血醇提取物对人肺癌A549细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

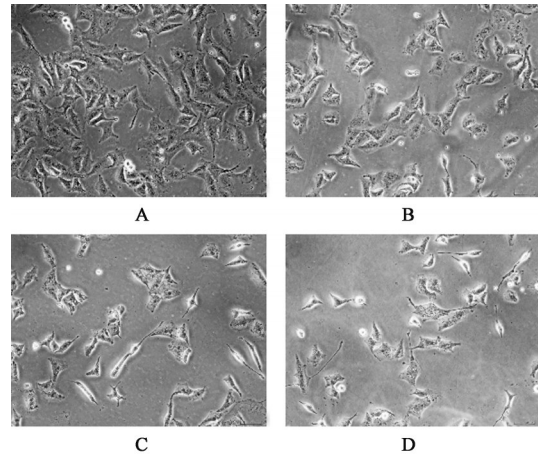
Table 1 Effect of *Toddalia asiatica* alcohol extract on survival rate of human lung cancer A549 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=6$) %

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	24 h 细胞存活率	48 h 细胞存活率
空白组		100±0.00	100±0.00
飞龙掌血醇提取物组	0.25	84.40±4.45 ¹⁾	24.50±4.34 ²⁾
	0.5	70.20±5.76 ²⁾	16.70±5.53 ²⁾
	1	53.00±9.77 ²⁾	8.86±5.05 ²⁾
	2	25.40±11.06 ²⁾	3.04±0.32 ²⁾
	4	8.00±1.22 ²⁾	3.42±0.53 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表2-表4同)

3.2 飞龙掌血醇提取物对A549细胞的形态学的影响 空白组的细胞呈上皮样、多角形、贴壁生长且大小分布均匀、数量比较多,基本上无细胞漂浮。随着飞龙掌血醇提取物浓度提高,细胞形态上逐渐变圆肿胀,贴壁的细胞数量越来越少、大小分布不均、漂浮的细胞逐渐增多、细胞间的间隙也逐渐变宽,当浓度为2 g·L⁻¹时其作用最明显。因此推测飞龙掌血醇提取物诱导A549细胞凋亡机制与细胞凋亡有关。见图1。

3.3 飞龙掌血醇提取物对人A549细胞凋亡率及主要蛋白表达的影响 与空白组比较,飞龙掌血醇提取物组(0.5、1、2 g·L⁻¹)细胞凋亡率明显增加($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与空白组比较,飞龙掌血醇提取物组(1、2 g·L⁻¹)促凋亡蛋白cleaved PARP1、Bax、t-Bid蛋白



注:A.空白组;B~D.飞龙掌血醇提取物组(0.5、1、2 g·L⁻¹)(图2、图3同)

图1 飞龙掌血醇提取物对细胞形态的影响(倒置显微镜,×200)

Fig. 1 Effect of *Toddalia asiatica* alcohol extract of corydalis on cell morphology (inverted microscope, ×200)

表达明显增加($P < 0.05$, $P < 0.01$);飞龙掌血醇提取物组(2 g·L⁻¹)Bid蛋白表达显著减少($P < 0.01$);飞龙掌血醇提取物组(0.5、1、2 g·L⁻¹)抗凋亡蛋白Bcl-2的蛋白表达明显减少($P < 0.05$, $P < 0.01$)。说明飞龙掌血醇提取物可以诱导A549细胞凋亡。见表2、图2、表3。

表2 飞龙掌血醇提取物对人肺癌A549细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Effect of *Toddalia asiatica* alcohol extract on apoptosis rate of human lung A549 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	细胞凋亡率/%
空白组		9.67±1.53
飞龙掌血醇提取物组	0.5	16.2±1.77 ¹⁾
	1.0	21.00±2.65 ²⁾
	2.0	40.47±1.84 ²⁾

3.4 飞龙掌血醇提取物对人肺癌A549细胞p62、LC3蛋白表达的影响 与空白组比较,飞龙掌血醇提取物组(0.5、1、2 g·L⁻¹)p62蛋白表达水平显著下调($P < 0.01$),LC3 II的蛋白表达显著上调($P < 0.01$),具有浓度依赖性。表明飞龙掌血醇提取物增加了LC3 II的表达并抑制了p62的表达,促进A549细胞自噬。见图3、表4。

3.5 飞龙掌血醇提取物对A549细胞自噬促进细胞凋亡率的影响 与飞龙掌血醇提取物组(2 g·L⁻¹)比较,3-MA+飞龙掌血醇提取物组凋亡率显著减少($P < 0.01$),与3-MA组比较,3-MA+飞龙掌血醇提取物组凋亡率明显减少($P < 0.05$)。见表5。

3.6 飞龙掌血醇提取物对A549细胞自噬相关蛋白的影响 与空白组比较,飞龙掌血醇提取物组p62、Bid

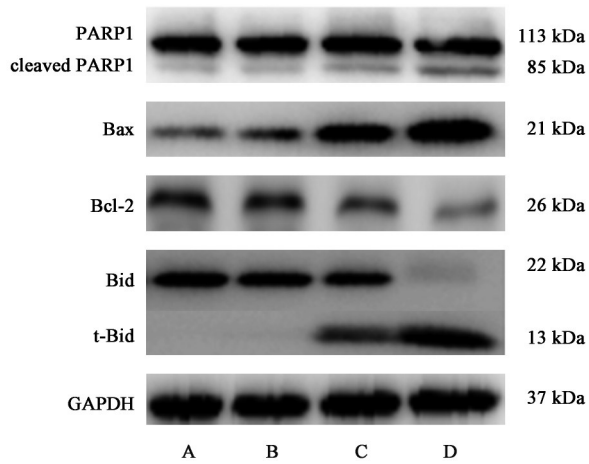


图2 各组细胞cleaved PARP1、PARP1、Bax、Bcl-2、Bid、t-Bid蛋白电泳

Fig. 2 Electrophoresis of cleaved PARP1, PARP1, Bax, Bcl-2, Bid, and t-Bid protein expression in cell

蛋白表达减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), LC3 II、cleaved Caspase-3、cleaved PARP1、t-Bid蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$); 3-MA组 p62蛋白表达减少 ($P < 0.05$),

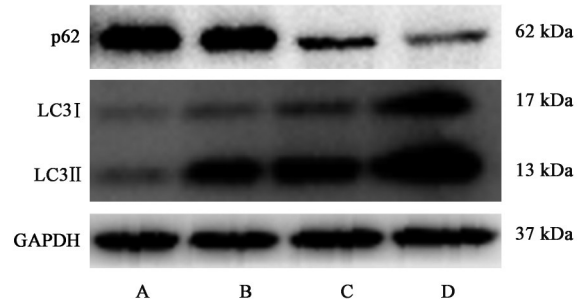


图3 各组p62、LC3蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of p62 and LC3 protein expression in each group

LC3 II蛋白表达减少 ($P < 0.05$); 和飞龙掌血醇提物组比较, 3-MA+飞龙掌血醇提物组中 p62、LC3 II、cleaved Caspase-3、cleaved PARP1、t-Bid蛋白表达降低 ($P < 0.05$); 和3-MA组比较, 3-MA+飞龙掌血醇提物组 p62蛋白表达降低 ($P < 0.05$), LC3 II、cleaved Caspase-3、cleaved PARP1、t-Bid、Bid蛋白表达均增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。说明飞龙掌血醇提物通过诱导细胞自噬促进A549细胞凋亡。见图4、表6。

表3 飞龙掌血醇提物对人肺癌A549细胞cleaved PARP1、PARP1、Bax、Bcl-2、Bid、t-Bid蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of *T. asiatica* alcohol extract on cleaved PARP1, PARP1, Bax, Bcl-2, Bid and t-Bid protein expresses of human lung A549 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	cleaved PARP1 /GAPDH	Bax /GAPDH	Bcl-2 /GAPDH	t-Bid /GAPDH	PARP1 /GAPDH	Bid /GAPDH
空白组		0.17±0.05	0.37±0.21	1.01±0.18	0.08±0.07	1.32±0.44	1.40±0.10
飞龙掌血醇提物组	0.5	0.57±0.05	0.75±0.10 ¹⁾	0.74±0.12 ¹⁾	0.47±0.15	1.43±0.53	1.22±0.25
	1.0	0.89±0.11 ¹⁾	0.85±0.65 ²⁾	0.48±1.29 ²⁾	1.54±0.24 ²⁾	1.70±0.40	1.29±0.15
	2.0	1.67±0.46 ²⁾	1.20±0.10 ²⁾	0.33±0.06 ²⁾	2.48±0.43 ²⁾	1.30±0.25	0.29±0.11 ²⁾

表4 飞龙掌血醇提物对人肺癌A549细胞中p62、LC3 II和LC3 II/LC3 I蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of *T. asiatica* alcohol extract on p62, LC3 II and LC3 II/LC3 I protein expresses of human lung A549 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	p62/GAPDH	LC3 II/GAPDH	LC3 II/LC3 I
空白组		1.28±0.25	0.38±0.11	1.43±0.26
飞龙掌血醇提物组	0.5	0.66±0.13 ²⁾	0.95±0.13 ²⁾	1.59±0.23
	1.0	0.44±0.10 ²⁾	1.31±0.15 ²⁾	1.18±0.27
	2.0	0.15±0.10 ²⁾	1.80±0.17 ²⁾	1.11±0.03

4 讨论

肺癌作为一种常见的肿瘤性疾病,对人类健康有很大影响^[19]。肿瘤的特征在于异常的细胞增殖,各种抗肿瘤药物诱导肿瘤细胞凋亡,从而抑制肿瘤细胞的异常增殖,发挥抗肿瘤活性。合理诱导肿瘤细胞凋亡是治疗肿瘤的有效手段^[20-22]。飞龙掌血中的主要生物碱成分可以抑制HepG2细胞的增殖和促进细胞凋亡^[23]。LI等^[24]评估了不同飞龙掌血提取物对人结肠癌细胞(HT-29)生长的影响,诱导

Caspase-8、Caspase-3、Caspase-9,表明飞龙掌血中的DF可以诱导细胞凋亡。还有研究说明飞龙掌血的粗乙醇提取物中的生物碱成分以时间依赖性方式诱导A549细胞的凋亡细胞死亡^[16]。

Bid是Bcl-2家族的一种促凋亡蛋白,在细胞凋亡的启动中起着至关重要的作用,在大多数情况下,Bid在细胞质中处于非活动状态。在凋亡刺激下,Bid可以成为一系列蛋白酶的底物,包括Caspase-8、Granzyme B、钙蛋白酶和组织蛋白酶,他

表5 飞龙掌血醇提物和3-MA对人肺癌A549细胞凋亡率的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of *T. asiatica* alcohol extract and 3-MA on apoptosis rate of human lung A549 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度	凋亡率/%
空白组		11.81±1.72
飞龙掌血醇提物组	2 g·L ⁻¹	38.73±3.16 ¹⁾
3-MA组	5 μmol·L ⁻¹	11.68±1.86
3-MA+飞龙掌血醇提物组	5 μmol·L ⁻¹ +2 g·L ⁻¹	5.23±3.02 ^{2,3)}

注:与空白组比较¹⁾P<0.01;与飞龙掌血醇提物组比较²⁾P<0.01;与3-MA组比较³⁾P<0.01

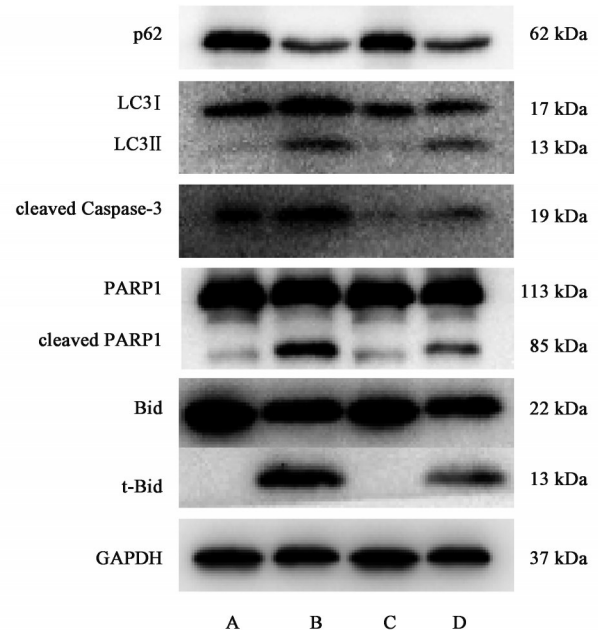
们产生截断的Bid(tBid),诱导细胞的凋亡。PARP被认为是DNA损伤的受体,可以识别和修复断裂的DNA片段,其裂解增加表明细胞凋亡^[25]。Bid、Bax是促凋亡基因,Bcl-2是抗凋亡基因,Bax、Bcl-2拮抗调控细胞凋亡,Bax、Bcl-2比例情况决定着细胞凋亡状态^[26-28]。自噬被认为在癌细胞中具有两种截然不同的作用,促进和抑制。首先,自噬为癌细胞提供了能量来源,癌细胞可以在不利于正常细胞的环境中生存。尽管缺乏成熟的血管,癌细胞可以在缺氧和酸性条件下存活。对于能量产生,癌细胞主要依赖糖酵解途径(Warburg效应),其效率低于三羧酸循环途径,因此,癌细胞比正常细胞需要更多的葡萄糖摄取^[29]。各种癌症患者的不良预后与自噬相关LC3的高表达密切相关^[30]。LC3是一种自噬体标志蛋白,在自噬过程中,LC3 I会被修饰和加工为一种膜结合形式即LC3 II,并定位到自噬小体,LC3 II可以很好的反映细胞的自噬活性,p62是细胞自噬的特异性降解底物,可以与LC3相互作用,并通过自噬-溶酶体系统降解,其表达水平可以反映细胞的自噬活性^[31]。细胞凋亡是一个主动的、

表6 飞龙掌血醇提物和3-MA对人肺癌A549细胞中p62、LC3 II、cleaved Caspase-3、cleaved PARP1、t-Bid、PARP1和Bid蛋白表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of *T. asiatica* alcohol extract and 3-MA on p62, LC3 II, cleaved PARP1, cleaved Caspase-3, t-Bid, PARP1 and Bid protein expresses of human lung A549 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度	p62 /GAPDH	LC3 II /GAPDH	LC3 II /LC3 I	cleaved Caspase-3 /GAPDH	cleaved PARP1 /GAPDH	t-Bid /GAPDH	PARP1 /GAPDH	Bid /GAPDH
空白组		0.91±0.34	0.41±0.17	0.74±0.19	0.38±0.17	0.41±0.10	0.13±0.11	0.94±0.21	1.15±0.19
飞龙掌血醇提物组	2 g·L ⁻¹	0.42±0.06 ¹⁾	1.55±0.28 ²⁾	1.20±0.23	1.30±0.28 ²⁾	1.22±0.41 ²⁾	1.45±0.22 ²⁾	1.08±0.07	0.57±0.09 ²⁾
3-MA组	5 μmol·L ⁻¹	0.49±0.15 ¹⁾	0.10±0.07 ¹⁾	0.87±0.17	0.32±0.10	0.54±0.06	0.25±0.44	1.38±0.03	1.39±0.22
3-MA+飞龙掌血醇提物组	5 μmol·L ⁻¹ +2 g·L ⁻¹	0.17±0.06 ^{3,4)}	0.87±0.15 ^{3,4)}	1.05±0.38	0.66±0.19 ^{3,4)}	0.77±0.06 ^{3,5)}	0.94±0.16 ^{3,5)}	2.21±0.18	0.84±0.16 ⁵⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与飞龙掌血醇提物组比较³⁾P<0.05;与3-MA组比较⁴⁾P<0.05,⁵⁾P<0.01



注:A.空白组;B.2飞龙掌血醇提物组;C.3-MA组;D.3-MA+飞龙掌血醇提物组

图4 各组细胞p62、LC3、cleaved Caspase-3、cleaved PARP1、t-Bid、Bid和PARP1蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of p62, LC3, cleaved Caspase-3, cleaved PARP1, t-Bid, Bid and PARP1 protein expresses in cell

顺序的和程序性的细胞死亡过程,自噬是一种生存过程,其中真核细胞解受损或衰老的细胞器和蛋白质以进行细胞更新^[32]。肿瘤细胞通过激活自噬将细胞内积累的抗肿瘤药物排出体外,起到抗肿瘤药物的作用^[33],抑制肿瘤细胞自噬活性是治疗肿瘤的潜在新策略。自噬和细胞凋亡之间可能会发生串扰^[34-36]。在某些情况下,自噬可能通过诱导细胞凋亡来促进细胞死亡。无论是互补还是拮抗,细胞凋亡和自噬都密切相关,两者都调节细胞存活。因此,自噬和细胞凋亡之间复杂的相互作用决定了细胞的命运。

本研究表明随着飞龙掌血醇提物浓度的增加,各用药组细胞凋亡率增加,细胞凋亡相关蛋白 cleaved PARP1、t-Bid、Bax 呈浓度依赖性增加, Bcl-2 蛋白表达呈浓度依赖性减少。因此可以得出飞龙掌血醇提物可以抑制肿瘤的异常增殖,发挥其抗癌的作用。在本研究中,随着飞龙掌血醇提物浓度的提高上调了 LC3 II 的蛋白表达,下调了 p62 的蛋白表达,提示飞龙掌血醇提物可以促进 A549 细胞的自噬降解,从而促进自噬。3-MA+飞龙掌血醇提物组诱导细胞凋亡减弱。结果表明飞龙掌血醇提物可以通过抑制自噬可以减弱飞龙掌血醇提物诱导 A549 细胞的凋亡。

综上,飞龙掌血醇提物对 NSCLCA549 细胞的增殖作用可能与促进 A549 细胞自噬,从而诱导细胞凋亡,共同促进 NSCLCA549 细胞的死亡有关。接下来还需进一步研究飞龙掌血醇提物的质控标准明确飞龙掌血醇提物的药物成分、增设阳性对照药物以及体内验证、进一步研究飞龙掌血醇提物促进 A549 细胞自噬诱导凋亡的通路研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] SKRIRICKOVA J, KADLEC B, VENCLICEK O, et al. Lung cancer[J]. Cas Lek Cesk, 2018, 157(5): 226-236.
- [2] BUNN P J. Early-stage non-small-cell lung cancer: Current perspectives in combined-modality therapy [J]. Clin Lung Cancer, 2004, 6(2): 85-98.
- [3] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京:科技出版社,1997,43(2):1-6.
- [4] SUKIEUM S, SANG-AROON W, YENJAI C. Coumarins and alkaloids from the roots of *Toddalia asiatica*[J]. Nat Prod Res, 2018, 32(8): 944-952.
- [5] YANG K, TONG L, CHEN C, et al. Therapeutic effects of extracts from Radix *Toddaliae Asiaticae* on collagen-induced arthritis in Balb/c mice [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 146(1): 355-362.
- [6] HAO X Y, PENG L, YE L, et al. A study on anti-inflammatory and analgesic effects of alkaloids of *Toddalia asiatica* [J]. Zxyjhx, 2004, 2(6): 450-452.
- [7] KARIUKI H N, KANUI T I, YENESEW A, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Toddalia asiatica* (L) Lam. (Rutaceae) root extract in Swiss albino mice [J]. Pan Afr Med J, 2013, doi: 10.11604/pamj.2013.14.133.2130
- [8] TONG L, CHEN T, CHEN Z, et al. Anti-inflammatory activity of omphalocarpin isolated from Radix *Toddaliae Asiaticae* [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 155(3): 1553-1560.
- [9] DURAI PANDIYAN V, IGNACIMUTH U. Antibacterial and antifungal activity of Flindersine isolated from the traditional medicinal plant, *Toddalia asiatica* (L.) Lam [J]. J Ethnopharmacol, 2009, 123(3): 494-498.
- [10] KARUNAI RAJ M, BALACHANDRAN C, DURANPANDIYAN V, et al. Antimicrobial activity of Ulopterol isolated from *Toddalia asiatica* (L.) Lam a traditional medicinal plant [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 140(1): 161-165.
- [11] SHAN X F, MENG Q F, KANG Y H, et al. Isolation of active compounds from methanol extracts of *Toddalia asiatica* against *Ichthyophthirius multifiliis* in goldfish (*Carassius auratus*) [J]. Vet Parasitol, 2014, 199(3/4): 250-254.
- [12] STEPHEN IRUDAYARAJ S, SUNIL C, DURAI PANDIYAN V, et al. Antidiabetic and antioxidant activities of *Toddalia asiatica* (L.) Lam. leaves in streptozotocin induced diabetic rats [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 143(2): 515-523.
- [13] TSAI I L, WUN M F, TENG C M, et al. Anti-platelet aggregation constituents from Formosan *Toddalia asiatica* [J]. Phytochemistry, 1998, 48(8): 1377-1382.
- [14] IWASAKI H, OKU H, TAKARA R, et al. The tumor specific cytotoxicity of dihydronitidine from *Toddalia asiatica* Lam [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2006, 58(4): 451-459.
- [15] GUO G F, WANG Y X, ZHANG Y J, et al. Predictive and prognostic implications of 4E-BP1, Beclin-1, and LC3 for cetuximab treatment combined with chemotherapy in advanced colorectal cancer with wild-type KRAS: Analysis from real-world data [J]. World J Gastroenterol, 2019, 25(15): 1840-1853.
- [16] IWASAKI H, OKABE T, TAKARA K, et al. Tumor-selective cytotoxicity of benzo phenanthridine derivatives from *Toddalia asiatica* Lam [J]. Cancer Chemother, Pharmacol, 2010, 65(4): 719-726.
- [17] HU J, SHI X, CHEN J, et al. Alkaloids from *Toddalia asiatica* and their cytotoxic, antimicrobial and antifungal activities [J]. Food Chem, 2014, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.12.058.
- [18] 张誉丹. 基于 TLR/NF- κ B 信号通路探讨土家族药飞龙掌血抑制 RA 滑膜增殖的作用机制 [D]. 武汉: 湖

- 北民族学院, 2018.
- [19] WANG D, BI L, RAN J, et al. Gas6/Axl signaling pathway promotes proliferation, migration and invasion and inhibits apoptosis in A549 cells[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(5): 1321.
- [20] LIUY, KANG X, NIU G, et al. Shikonin induces apoptosis and prosurvival autophagy in human melanoma A375 cells via ROS-mediated ER stress and p38 pathways[J]. *ACNB*, 2019, 47(1):626-635.
- [21] KANG X, WANG H, LI Y, et al. Alantolactone induces apoptosis through ROS-mediated Akt pathway and inhibition of PINK1-mediated mitophagy in human HepG2 cells[J]. *ACNB*, 2019, 47(1): 1961-1970.
- [22] QIU C, ZHANG T, ZHANG W, et al. Licochalcone A inhibits the proliferation of human lung cancer cell lines A549 and H460 by inducing G₂/M cell cycle arrest and ER stress[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(8): 1761.
- [23] HAN C, ZHU GF. Mechanism of apoptosis induced by chelerythrine in HepG2 cells[J]. *CJETMF*, 2016 (11):127-130.
- [24] LI X, QIU Z, JIN Q, CHEN G, et al. Cell Cycle Arrest and Apoptosis in HT-29 cells induced by dichloromethane fraction from *Toddalia asiatica* (L.) Lam [J]. *Front Pharmacol*, 2018, doi: 10.3389/fphar.2018.00629
- [25] AZIMIAN H, DAYYANI M, TOOSI M T B, et al. Bax/Bcl-2 expression ratio in prediction of response to breast cancer radiotherapy[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2018, 21(3): 325-332.
- [26] ZHAO T, FU Y, SUN H, et al. Ligustrazine suppresses neuron apoptosis via the Bax/Bcl-2 and Caspase-3 pathway in PC12 cells and in rats with vascular dementia[J]. *Iubmb Life*, 2018, 70(1): 60-70.
- [27] LEE H, KIM K C, HONG Y M. Changes of Bax, Bcl-2, CCR-2, MCP-1, and TGF- β_1 genes in the left ventricle of spontaneously hypertensive rat after losartan treatment [J]. *Korean J Pediatr*, 2019, 62(3): 95-101.
- [28] LIU J Z, HU Y L, FENG Y, et al. Rafoxanide promotes apoptosis and autophagy of gastric cancer cells by suppressing PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Exp Cell Res*, 2019, 385(2): 111691.
- [29] KIMURA T, TAKABATAKE Y, TAKAHASHI A, et al. Chloroquine in cancer therapy: A double-edged sword of autophagy [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(1): 3-7.
- [30] TAN W X, XU T M, ZHOU Z L, et al. TRP14 promotes resistance to cisplatin by inducing autophagy in ovarian cancer[J]. *Oncol Rep*, 2019, 42(4): 1343-1354.
- [31] MORALES J, LI L, FATTAH F J, et al. Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases[J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2014, 24(1): 15-28.
- [32] WANG G, ZHANG T, SUN W, et al. Arsenic sulfide induces apoptosis and autophagy through the activation of ROS/JNK and suppression of Akt/mTOR signaling pathways in osteosarcoma[J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 106(5): 24-37.
- [33] 林增海, 陆军, 王凯松. 槲皮素对5-FU诱导的结直肠癌SW480细胞耐药及自噬调控机制研究[J]. *陕西中医*, 2021, 42(10): 1338-1343.
- [34] NOWAK K L, EDELSTEIN C L. Apoptosis and autophagy in polycystic kidney disease(PKD)[J]. *Cell Signal*, 2020, doi:10.1016/j.cellsig.2019.109518.
- [35] LISKIEWICZD K. The cell on the edge of life and death: Crosstalk between autophagy and apoptosis [J]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2017, 71: 825-841.
- [36] D'ARCY M S. Cell death: A review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy [J]. *Cell Biol Int*, 2019, 43(6):582-592.

[责任编辑 张丰丰]