

· 药理 ·

去氢木香内酯激活凋亡与自噬抑制人肺癌 A549 细胞生长

田颖颖¹, 李依林¹, 田时秋¹, 裴海鸾¹, 于尚玥¹, 王子健², 左泽平^{2*}, 王志斌^{1,2*}

(1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100029;

2. 北京同仁堂股份有限公司 科学研究所, 北京 100079)

[摘要] 目的:研究去氢木香内酯(DL)对人肺癌细胞 A549 增殖、凋亡、自噬的影响,以期阐明其作用机制。方法:采用细胞增殖与活性检测法(CCK-8)研究 0、5、10、15、20、25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DL 对人肺癌 A549 细胞增殖能力的影响。通过细胞克隆形成实验研究 DL 对 A549 细胞克隆形成能力的影响。选择 10、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为 DL 低、高浓度组,采用荧光染料 Hoechst 33258 染色及蛋白免疫印迹法(Western blot)观察 DL 对 A549 细胞凋亡的影响。通过吖啶橙染色检测 DL 给药后自噬溶酶体的变化,利用免疫荧光实验和 Western blot 检测 DL 对微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)表达水平的影响,通过对比 DL 单独给药及其分别与自噬抑制剂巴佛洛霉素-A1(BAF-A1)、3-甲基腺嘌呤(3-MA)联合用药对 A549 细胞自噬的影响。通过 Western blot 观察 DL 对 A549 细胞信号通路调控的作用。结果:与空白组比较,10、15、20、25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DL 组 A549 细胞存活率均显著降低($P<0.01$); 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DL 可显著抑制 A549 克隆细胞形成($P<0.01$),说明 DL 能够抑制人肺癌 A549 细胞的增殖能力。与空白组比较,DL 组(10、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)凋亡细胞数目增多,DL 组(20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)中凋亡相关蛋白聚腺苷酸二磷酸核糖基聚合酶(PARP)和 B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)相关 X 蛋白(Bax)表达明显上升($P<0.05$, $P<0.01$),Bcl-2 表达显著下降($P<0.01$)。吖啶橙染色结果显示,与空白组比较,DL 组(20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)橙色荧光增强,说明自噬溶酶体的生成数量增多。DL 组(20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)还能使细胞内 LC3 橙色荧光颗粒明显增高,LC3 II 的表达水平显著上升($P<0.01$),且加入自噬抑制剂后,A549 细胞对 DL 作用的敏感性显著下降($P<0.01$),表明自噬参与了 DL 诱导的 A549 细胞死亡。与空白组比较,DL 组(20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)能够使自噬相关蛋白 3(Atg3)、自噬相关蛋白 5(Atg5)的表达增加并使蛋白激酶 B(Akt)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、信号传导与转录活化因子 3(STAT3)的磷酸化水平下降($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:DL 能够激活凋亡与自噬从而抑制人肺癌 A549 细胞增殖和克隆形成能力,其机制可能与抑制 Akt/mTOR/STAT3 信号通路有关。

[关键词] 去氢木香内酯; 肺癌; 凋亡; 自噬; 蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白/信号传导与转录活化因子 3(Akt/mTOR/STAT3)信号通路

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2023)02-0073-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221626

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220621.1702.008.html>

[网络出版日期] 2022-06-22 14:51

Dehydrocostus Lactone Inhibits Growth of Human Lung Cancer A549 Cells Through Activation of Apoptosis and Autophagy

TIAN Yingying¹, LI Yilin¹, TIAN Shiqiu¹, PEI Hailuan¹, YU Shangyue¹, WANG Zijian²,
ZUO Zeping^{2*}, WANG Zhibin^{1,2*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2. Research Institute of Beijing Tongrentang Co. Ltd., Beijing 100079, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the effects of dehydrocostus lactone (DL) on the proliferation,

[收稿日期] 2022-03-07

[基金项目] 国家科技重大专项(2018ZX09201-011,2018ZX09301-011-003)

[第一作者] 田颖颖,博士,从事中药活性成分抗肿瘤研究,E-mail: Tyingying1120@163.com

[通信作者] *左泽平,硕士,主管药师,从事中药生物活性测定研究,E-mail: zepingzuo@126.com;

*王志斌,博士,教授,从事中药生物活性成分及药理毒理研究,E-mail: wangzhibin4804@126.com

apoptosis, and autophagy of human lung cancer cell A549 and to elucidate its related mechanism. **Method:** The effect of DL with different concentrations (0, 5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on the proliferation of human lung cancer A549 cells was investigated by cell counting kit-8 (CCK-8), and its impact on the clonogenic ability of A549 cells was studied by cell clonogenic assay. The concentrations 10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ were selected as DL low-dose group and high-dose group. Hoechst 33258 staining and western blot were used to observe the effect of DL on apoptosis of A549 cells. Autolysosomes were detected by acridine orange staining, and the expression level of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) was determined by immunofluorescence and western blot. In addition, the effects of DL in combination with autophagy inhibitors bafilomycin A1 (BAF-A1) or 3-methyladenine (3-MA) on the autophagy of A549 cells was checked by CCK-8 assay. Finally, the role of DL in the regulation of A549 cell signaling pathway was explored by Western blot. **Result:** Compared with the conditions in the control group, the survival rate of A549 cells in the DL groups (10, 15, 20, 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) was decreased ($P<0.01$), and 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DL could inhibited the formation of A549 clone cells ($P<0.01$), indicating that DL could inhibit the proliferation of human lung cancer A549 cells. The number of apoptotic cells was higher in both DL low-dose and high-dose groups than that in the control group, and the expression of apoptosis-related proteins poly (ADP ribose) polymerase (PARP) and B lymphocytoma-2 (Bcl-2)-associated X protein (Bax) were up-regulated ($P<0.05$, $P<0.01$), while the expression of Bcl-2 was down-regulated ($P<0.01$) in DL high-dose group. The acridine orange staining showed that the orange fluorescence in the DL high-dose group was enhanced compared with that in the control group, indicating that DL could dramatically promote the formation of autolysosomes. Moreover, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DL could increase the orange fluorescent particles of LC3 and up-regulated the expression level of LC3 II ($P<0.01$). After addition of autophagy inhibitors, the sensitivity of A549 cells to the effects of DL was attenuated ($P<0.01$), which suggested that autophagy was involved in DL-induced A549 cell death. Compared with the control group, DL high-dose group had increased expression of autophagy-related protein 3 (Atg3) and autophagy-related protein 5 (Atg5) while reduced phosphorylation levels of protein kinase B (Akt), mammalian target of rapamycin (mTOR) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** DL could activate apoptosis and autophagy to inhibit the proliferation and clonogenic ability of A549 cells via suppressing Akt/mTOR/STAT3 signaling pathway.

[Keywords] dehydrocostus lactone; lung cancer; apoptosis; autophagy; protein kinase B (Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR)/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling pathway

全球癌症发病率和死亡率正在迅速增长,由国际癌症研究机构发布的最新信息——GLOBOCAN 2020为全球展现了目前癌症的严峻形势^[1]。2020年,肺癌已成为第二常见的癌症,有220万新发肺癌病例,占比11.4%,180万人死亡,是癌症致死的主要原因^[2]。近些年中医药以其独特的自身优势逐渐活跃在大众视野,一些具有抗肿瘤活性的天然产物的研究引起人们的广泛关注,为抗癌药物研发提供了众多候选结构^[3-5]。去氢木香内酯(DL)来源于天然植物药物菊科云木香属植物木香 *Aucklandia lappa* 的干燥根,是一个倍半萜类化合物^[6]。大量研究表明其具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤等多种生物学活性^[7]。研究发现DL能够抑制人喉癌细胞的活力、迁

移和增殖,而对人正常喉上皮HBE细胞几乎没有增殖抑制作用,并通过抑制胞内磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)基因相关启动子(PI3K/Akt/Bad)信号通路从而激活细胞凋亡,体内实验进一步证实了其对喉癌细胞的抗癌作用^[8]。DL还可以通过线粒体途径诱导人脑星形胶质母细胞瘤U87细胞凋亡是通过靶向IKK激酶复合物 β 亚基(IKK β)的途径从而抑制核转录因子(NF)- κ B/环氧化酶-2(COX-2)信号发挥作用的^[9]。有研究表明DL给药后人胃癌SGC-7901细胞增殖率明显下降,裸鼠移植瘤的生长明显抑制,这可能与酵母自噬基因6同系物1(Beclin1)、微管相关蛋白1轻链3(LC3)II/LC3I和自噬相关蛋白(Atg)7蛋白表达

高,上调 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)/Bcl-2 蛋白,从而激活凋亡与自噬有关^[10]。DL 抑制 A549 细胞转移作用的机制可能涉及基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9 及 Akt/糖原合成酶激酶 3 β (GSK3 β)通路^[11]。但 DL 对肺癌细胞的自噬和凋亡作用研究较少,其具体的作用机制鲜有报道。细胞凋亡和自噬是维持生命稳态的 2 种重要方式,细胞程序性死亡异常对加速肿瘤的发展都起着不可忽视的作用^[12]。因此,本研究探讨 DL 对肺癌细胞凋亡、自噬的影响,以期研究 DL 可能的抗肺癌作用机制,为后续 DL 的结构修饰及临床应用奠定一定基础,推动中医药的开发利用。

1 材料

1.1 试剂 DL[成都曼思特生物科技有限公司,批号 MUST-20111209,纯度 99.2%,化学文摘社(CAS)号为 477-43-0],DMEM 基础培养基、磷酸盐缓冲液(PBS)、青-链霉素溶液(美国 Gibco 公司,批号分别为 C11995500BT、C10010500BT、15140-122),0.25% 胰酶、胎牛血清(美国 Sigma 公司,批号分别为 T4049、F8318),细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒、Hoechst 33258 染色液(北京百瑞极生物科技有限公司,批号分别为 BN15201、BN20705),1% 结晶紫水溶液(北京博奥森生物技术有限公司,批号 S0286),巴佛洛霉素-A1(BAF-A1,阿拉丁试剂有限公司,批号 88899-55-2),3-甲基腺嘌呤(3-MA,美国 Santa Cruz Biotechnology 公司,批号 sc-205596), β -肌动蛋白(β -actin)、聚腺苷二磷酸核苷聚合酶(PARP)、Bcl-2、Bax、LC3、Atg3、Atg5、Akt、磷酸化(p)-Akt、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、p-mTOR、信号传导与转录活化因子 3(STAT3)、p-STAT3 抗体(美国 CST 公司,批号分别为 4970T、9532T、15071T、5023T、12741T、3415T、12994T、4691T、4060T、2983T、5536T、9139T、9145T),辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗、辣根过氧化物酶标记的马抗小鼠二抗(美国 CST 公司,批号分别为 7074P2、7076P2),DyLight 594 标记的山羊抗兔二抗(亚科因生物技术有限公司,批号 A23410),化学超敏发光液(美国 GE Healthcare 公司,批号 RPN2232),吖啶橙染色液(北京索莱宝科技有限公司,批号 CA1143)。

1.2 仪器 IX73 型倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司),Epoch2 型多功能酶标检测仪(美国 Bio Tek 公司),Operetta CLS 型高内涵细胞成像与分析系统(美国 PerkinElmer 公司),Odyssey FC 型蛋白电泳

仪、转膜仪及免疫印迹成像系统(德国 LI-COR 公司),Multifuge \times 4R Pro 型离心机,HERA cell 150 型 CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 人肺癌 A549 细胞购买于中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心,传至第 3 代。A549 细胞采用 DMEM 完全培养基培养,培养条件为 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂,饱和湿度培养。

2.2 CCK-8 检测细胞增殖 将生长良好的 A549 细胞稀释成 3.5 \times 10⁴ 个/mL 的单细胞悬液,以每孔 100 μ L 铺于 96 孔板中。待其完全贴壁后,加入 5、10、15、20、25 μ mol \cdot L⁻¹ DL,每个浓度设 3 个复孔,分别作用 24、48、72 h,将药液吸除,每孔加入 0.5 g \cdot L⁻¹ CCK-8 溶液 10 μ L,于培养箱中孵育 2 h,置于酶标仪中检测 450 nm 下的吸光度 *A*,计算细胞存活率。

2.3 细胞克隆形成实验 细胞克隆形成实验被公认能够准确判断肿瘤细胞的增殖能力,常用作评价抗癌药物细胞增殖抑制的“金标准”^[13]。将人肺癌 A549 细胞以 3 000 个/孔接种于 6 孔板,贴壁后,将 DL 母液稀释成 5 μ mol \cdot L⁻¹ 的工作液进行给药处理,设置空白组和 5 μ mol \cdot L⁻¹ DL 组,每组 3 个复孔,细胞每隔 3 d 换液。给药 10 d,用 PBS 清洗,用 4% 多聚甲醛溶液固定,用 0.1% 结晶紫溶液染色 30 min,对培养板中被染色的细胞集落进行拍照计数分析。

2.4 Hoechst 33258 染色 Hoechst 33258 染色是一种核染料,正常细胞进入较少而呈现浅蓝色,而凋亡细胞通透性较强,能够使细胞核致密浓染从而呈现亮蓝色荧光,因此常用来评价细胞凋亡^[14]。PARP 的剪切水平常用来作为衡量凋亡的标志物^[15]。将 A549 细胞铺于 6 孔板中,贴壁后分别加入浓度为 0、10、20 μ mol \cdot L⁻¹ DL 处理继续培养 48 h。待 DL 处理结束,先用 PBS 清洗,而后加入 4% 多聚甲醛固定,加入 Hoechst 33258 染色液 1 mL,于培养箱中避光孵育 30 min。最后置于倒置荧光显微镜下观察,并拍照记录。

2.5 吖啶橙染色 吖啶橙染料进入自噬溶酶体中,经荧光激发后会呈现橙红色荧光,荧光强弱能间接反应细胞的自噬水平^[16]。将 A549 细胞按照上述 2.4 项下铺板及给药处理,孵育 24 h,用 PBS 清洗,每孔分别加入 4% 多聚甲醛固定,用 PBS 将吖啶橙染色液稀释为 10 μ g \cdot L⁻¹,加入 6 孔板,避光孵育 30 min。将 6 孔板置于倒置荧光显微镜下观察,拍照记录。

2.6 免疫荧光检测相关蛋白表达 LC3 可以作为

标志物用来衡量自噬发生^[17]。细胞悬液以6 000个/孔铺于PE特制96孔板,贴壁后分别加入浓度为0、10、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的DL,培养24 h,用PBS清洗3次,用4%多聚甲醛固定,0.5% Triton X-100透化,1% BSA溶液37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭1 h。于每孔中滴加LC3一抗(1:200)200 μL ,在4 $^{\circ}\text{C}$ 环境中孵育过夜。PBS清洗,于每孔中滴加DyLight 594标记的兔抗山羊二抗(1:200)200 μL ,在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育60 min。再滴加10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ DAPI染色液200 μL ,室温避光孵育5 min,对样品进行染核。复染核完成后置于高内涵下观察并记录。

2.7 蛋白免疫印迹法检测相关蛋白表达 收集DL作用A549细胞24 h的细胞,置于金属电加热块99 $^{\circ}\text{C}$ 加热10 min。SDS-PAGE凝胶的每个泳道上样10 μL ,恒压电泳70 min(150 V,300 mA),恒流电

转45 min(200 V,400 mA)。电转结束后,于5%的脱脂牛奶中封闭1.5 h, TBST清洗后,加入一抗(1:1 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,次日用TBST清洗3次,每次10 min,加入二抗(1:2 000),室温孵育2 h, TBST清洗,用近红外双色激光和化学发光双功能成像系统曝光,使用Image Studio Ver 5.2软件进行统计分析。

2.8 数据处理 数据均通过Graphpad Prism 8.0.2软件进行统计分析,采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间统计学差异比较用*t*检验进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 DL对人肺癌细胞A549增殖的影响 与空白组比较,10、15、20、25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DL组A549细胞活力显著降低($P < 0.01$),且DL抑制A549细胞的增殖表现出浓度和时间依赖性。见表1。

表1 DL对A549细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	24 h	48 h	72 h
空白组		100.000 \pm 1.666	100.000 \pm 0.735	100.000 \pm 4.389
DL组	5	92.311 \pm 6.183	90.705 \pm 5.924	83.864 \pm 6.044 ¹⁾
	10	77.324 \pm 1.758 ²⁾	62.646 \pm 0.280 ²⁾	56.938 \pm 2.640 ²⁾
	15	29.619 \pm 1.847 ²⁾	12.875 \pm 0.503 ²⁾	6.961 \pm 0.173 ²⁾
	20	28.129 \pm 1.326 ²⁾	12.257 \pm 0.323 ²⁾	6.298 \pm 0.140 ²⁾
	25	27.148 \pm 0.604 ²⁾	11.005 \pm 0.053 ²⁾	6.253 \pm 0.140 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表3、表4、表7同)

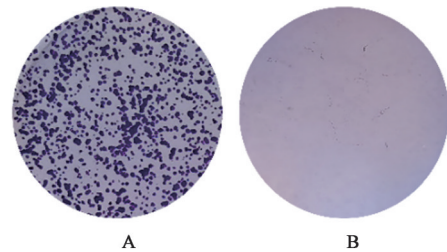
3.2 DL对A549细胞的克隆形成能力的影响 与空白组比较,DL组A549细胞形成集落数目显著减少($P < 0.01$),说明DL能够明显地抑制人肺癌A549细胞的增殖能力。见表2和图1。

表2 DL对A549细胞形成克隆数的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞克隆数/个
空白组		456.333 \pm 43.844
DL组	5	26.333 \pm 17.388 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$ (表5、表6同)

3.3 DL对诱导人肺癌细胞A549凋亡的影响 与空白组比较,20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的DL组处理A549细胞48 h,呈现亮蓝色荧光的凋亡细胞数目逐渐增多,说明DL能够诱导A549细胞发生凋亡。与空白组比较,20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DL组能够上调PARP及Bax表达水平($P < 0.05$, $P < 0.01$),下调Bcl-2表达($P < 0.01$),可进一步证实DL能够诱导人肺癌A549细胞发生凋亡。



注:A.空白组;B.DL组(5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

图1 DL对人肺癌A549细胞克隆形成的影响(结晶紫)

Fig. 1 Effect of DL on colony formation of A549 cells (crystal violet)

见表3、图2、图3。

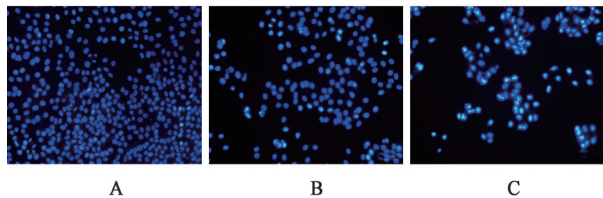
3.4 DL对人肺癌细胞A549中自噬溶酶体生成的影响 与空白组细胞比较,DL组能够增强人肺癌A549细胞中红色荧光的强度,以20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DL组橙红色荧光最为显著。由此可见,DL能够诱导人肺癌细胞产生自噬溶酶体而使细胞呈现出橙红色荧光。见图4。

3.5 DL对人肺癌A549细胞中自噬标志物LC3表达的影响 与空白组比较,DL组LC3荧光强度更

表3 DL对A549细胞中凋亡相关蛋白的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of DL on apoptosis-related proteins in A549 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	PARP/ β -actin	Bcl-2/ β -actin	Bax/ β -actin
空白组		0.998 \pm 0.173	1.001 \pm 0.172	1.002 \pm 0.285
DL组	10	1.425 \pm 0.260	0.547 \pm 0.115 ¹⁾	1.379 \pm 0.140
	20	2.730 \pm 0.534 ²⁾	0.337 \pm 0.044 ²⁾	1.669 \pm 0.271 ¹⁾



注:A.空白组;B.DL组($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$);C.DL组($20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
(图3-图7同)

图2 DL对人肺癌A549细胞凋亡的影响(倒置荧光显微镜, $\times 10$)

Fig. 2 Effect of DL on apoptosis induction of A549 cells (inverted fluorescence microscope, $\times 10$)

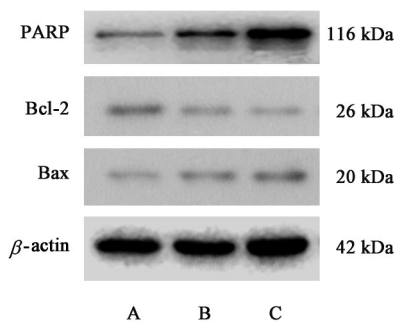


图3 DL对A549细胞PARP、Bcl-2及Bax蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of DL on expression of PARP, Bcl-2 and Bax in A549 cells

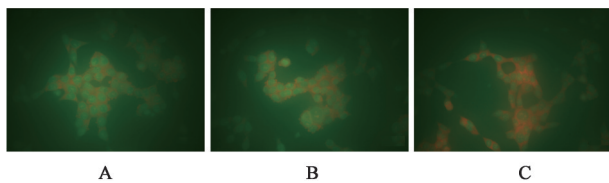


图4 DL对人肺癌A549细胞自噬的影响(倒置荧光显微镜, $\times 20$)

Fig. 4 Effect of DL on autophagy of A549 cells (inverted fluorescence microscope, $\times 20$)

强,呈现了多处点状聚集,说明LC3表达量增加。与空白组比较,DL组中LC3蛋白表达水平明显升高($P<0.05, P<0.01$),证实DL能够诱导人肺癌A549细胞发生自噬。见图5、表4和图6。

3.6 DL对人肺癌A549细胞增殖的影响 为进一步探究自噬在DL诱导人肺癌A549细胞死亡中的作用,将自噬特异性抑制剂BAF-A1和3-MA分别与0、10、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DL联合给予人肺癌A549细胞,并通过CCK-8对细胞活力进行检测。与空白组比较,BAF-A1和3-MA联合给药,人肺癌A549细胞的

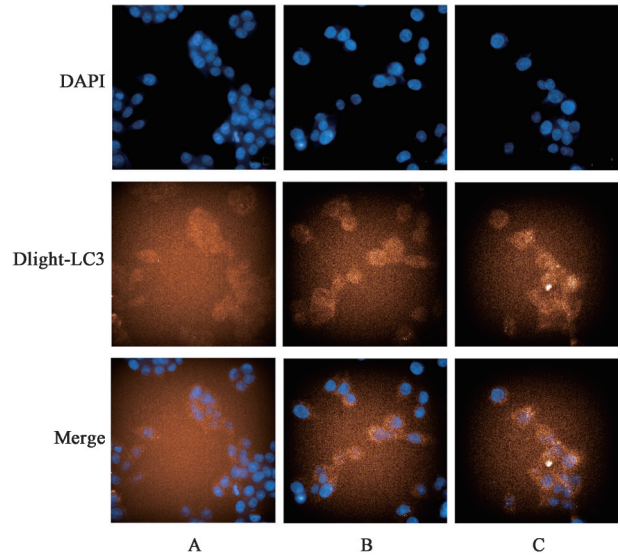


图5 DL对人肺癌A549细胞LC3表达的影响(高内涵, $\times 63$)

Fig. 5 Effect of DL on expression of LC3 in A549 cells (high content imaging analysis system, $\times 63$)

表4 DL对A549细胞中LC3蛋白的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of DL on LC3 protein in A549 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	LC3/ β -actin
空白组		0.999 \pm 0.277
DL组	10	1.807 \pm 0.203 ¹⁾
	20	3.795 \pm 0.506 ²⁾

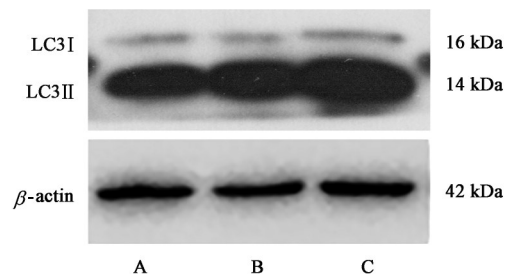


图6 DL作用A549细胞中LC3蛋白表达电泳

Fig. 6 Electrophoresis of DL upregulated expression of LC3 in A549 cells

存活率显著降低($P<0.01$),但比DL单独给药存活率有升高趋势,表明A549细胞对DL给药的敏感性被削弱,自噬的激活参与了DL诱导的人肺癌细胞死亡。见表5、表6。

表5 DL与BAF-A1联用对A549增殖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of DL and BAF-A1 on proliferation in A549 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	存活率/%
空白组		100.000 \pm 18.307
DL组	10	61.750 \pm 9.874
	20	17.480 \pm 0.617
空白组		100.000 \pm 1.598
DL+BAF-A1组	10	68.830 \pm 2.128
	20	28.520 \pm 0.668 ¹⁾

3.7 DL对人肺癌A549细胞中Akt/mTOR/STAT3信号通路蛋白表达的影响 自噬在细胞、组织和有机体稳态中发挥着重要作用,并由进化上保守的自噬相关基因介导,其在癌症过程中扮演重要角色^[18]。与空白组比较,DL组能够上调自噬相关蛋

表6 DL与3-MA联用对A549增殖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of DL and 3-MA on proliferation in A549 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	存活率/%
空白组		100.000 \pm 4.085
DL组	10	63.840 \pm 1.620
	20	20.120 \pm 0.093
空白组		100.000 \pm 1.595
DL+3-MA组	10	70.190 \pm 1.091 ¹⁾
	20	25.910 \pm 0.589 ¹⁾

白家族中的Atg3、Atg5蛋白($P<0.05$)。与空白组比较,DL组中Akt、mTOR和STAT3的磷酸化水平明显降低($P<0.05$),说明DL可能通过抑制人肺癌A549细胞中Akt/mTOR/STAT3信号通路从而发挥抗肺癌作用。见表7、图7。

表7 DL对A549细胞中Akt/mTOR/STAT3信号蛋白的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of DL on Akt/mTOR/STAT3 proteins in A549 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Atg3/ β -actin	Atg5/ β -actin	p-Akt/ β -actin	Akt/ β -actin	p-mTOR/ β -actin	mTOR/ β -actin	p-STAT3/ β -actin	STAT3/ β -actin
空白组		1.002 \pm 0.226	1.000 \pm 0.441	1.043 \pm 0.127	1.04 \pm 0.262	1.237 \pm 0.251	1.216 \pm 0.500	1.137 \pm 0.324	0.957 \pm 0.195
DL组	10	1.399 \pm 0.210	1.175 \pm 0.479	0.380 \pm 0.165 ²⁾	1.004 \pm 0.115	0.795 \pm 0.274	1.188 \pm 0.140	0.744 \pm 0.112 ¹⁾	0.971 \pm 0.025
	20	1.705 \pm 0.152 ¹⁾	1.871 \pm 0.164 ¹⁾	0.367 \pm 0.134 ²⁾	0.848 \pm 0.223	0.582 \pm 0.183 ¹⁾	1.293 \pm 0.275	0.475 \pm 0.180 ¹⁾	0.876 \pm 0.184

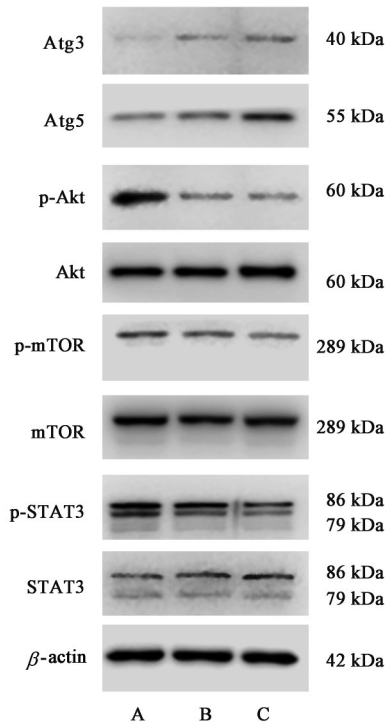


图7 A549细胞Atg3、Atg5及Akt/mTOR/STAT3活性蛋白电泳

Fig. 7 Electrophoresis of DL on Atg3, Atg5 and Akt/mTOR/STAT3 signaling activity in A549 cells

4 讨论

肺癌恶性程度高,增殖速度快、存活率低、死亡率高、具有转移潜能,随着医学进步,治疗和诊断方面的取得了重要进展^[19],加快开发高效低毒的抗肺癌药物依然具有重要的现实意义。中药作为我国传统治疗药物,历史悠久,近年来在肿瘤防治方面取得的进步非凡^[20]。目前从中药中发现有效的抗肿瘤活性成分、研发抗肿瘤药物具有广阔的前景和巨大的潜力^[21]。木香在我国始载于《神农本草经》,近年来,随着木香中成分及其药理作用研究逐渐深入,已证明其在抗肿瘤疾病方面表现出良好的药理活性^[5]。

细胞凋亡是一种生理自毁机制,能够清除异常物质,对于维持机体健康和稳态平衡方面尤为重要^[22]。临床肿瘤学一直致力于开发通过促进细胞凋亡进而有效消除癌细胞的疗法,靶向肿瘤细胞中的凋亡途径是一种有效的方法抗癌策略,一些具有很大的潜力的候选药物也为肿瘤治疗提供更多的可能性^[23]。中药有效成分通过诱导细胞凋亡发挥抗肿瘤活性的研究比比皆是。研究发现华良姜素

能削弱 HepG2 细胞增殖能力,触发其凋亡,可能与调控 PI3K/Akt 信号通路有关^[24]。人结肠癌细胞 SW620 经过桦木酸作用后,可以通过调节 PI3K/Akt/mTOR 信号通路而诱发凋亡和自噬^[25]。鸦胆子苦素 D 通过激活肺癌 A549 和 NCI-H292 细胞发生凋亡和自噬途径从而抑制肺癌细胞的生长,体内外都表现出良好的抗肿瘤活性^[26]。自噬能够将体内受损的细胞器转至溶酶体消化,是细胞内一种分解代谢降解过程,属于 II 型细胞程序性死亡,与自噬相关的家族蛋白在癌症中发挥着至关重要的作用^[27-28]。在早期肿瘤发生中,自噬能够有效地防止肿瘤发生并抑制癌症进展,这预示着调节自噬过程可以作为一种介入癌症治疗的有效策略^[29]。中药成分金松双黄酮可以通过促进自噬从而诱导肺癌细胞发生死亡,这是通过介导 Akt/mTOR/磷酸化 70 核糖体蛋白 S6 激酶(p70S6K)信号通路来完成的^[30]。SONG 等^[31]采用吡啶橙染色、蛋白免疫印迹法研究表明四氢姜黄素(THC)可以通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路来诱导自噬从而增强 THC 对非小细胞肺癌细胞(NSCLC)的治疗效果。

本研究通过 CCK-8 和克隆形成实验证明 DL 对 A549 有明显的抑制作用,Hoechst 33258 染色发现 DL 处理后荧光增强,凋亡细胞数目增加,还能够下调抗凋亡 Bcl-2 蛋白,且凋亡标志物 PARP 的剪切水平及促凋亡蛋白 Bax 显著上调。通过研究发现 DL 能够激活 A549 细胞发生自噬,自噬标志物 LC3 表达增加,自噬相关基因 Atg3 和 Atg5 表达量也增加。当 DL 与自噬抑制剂联用时,削弱了 DL 对 A549 的抑制作用,表明 DL 能通过自噬来抑制 A549 细胞的生长。DL 能够明显降低 Akt、mTOR 和 STAT3 的磷酸化表达水平,抑制 Akt/mTOR/STAT3 信号通路从而发挥作用。

综上所述,DL 能够抑制人肺癌 A549 细胞的增殖和克隆形成能力,能够诱导肺癌细胞发生凋亡和自噬,从分子机制上说,DL 是通过抑制 Akt/mTOR/STAT3 信号通路诱导细胞凋亡和自噬进而发挥抗肿瘤活性。本研究对 DL 抗肿瘤活性进行探讨,以期后期结构修饰及深入机制研究提供思路,为获得新的候选药物做准备,推动现代中医药的开发与利用。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 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.

[2] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics, 2021 [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(1): 7-33.

[3] SHINKAI K, AKEDO H, MUKAI M, et al. Inhibition of *in vitro* tumor cell invasion by ginsenoside Rg₃ [J]. Jpn J Cancer Res, 1996, 87(4): 357-362.

[4] MOCHIZUKI M, YOO Y C, MATSUZAWA K, et al. Inhibitory effect of tumor metastasis in mice by saponins, ginsenoside-Rb₂, 20 (R) - and 20 (S) - ginsenoside-Rg₃, of red ginseng [J]. Biol Pharm Bull, 1995, 18(9): 1197-1202.

[5] 秦峥, 郑尚李. 抗肿瘤中药单体研究进展[J]. 中国药物评价, 2014, 31(2): 89-91.

[6] 魏华, 彭勇, 马国需, 等. 木香有效成分及药理作用研究进展[J]. 中草药, 2012, 43(3): 613-620.

[7] LONG H Y, HUANG Q X, YU Y Y, et al. Dehydrocostus lactone inhibits *in vitro* gastrinoma cancer cell growth through apoptosis induction, sub-G₁ cell cycle arrest, DNA damage and loss of mitochondrial membrane potential [J]. Arch Med Sci, 2019, 15(3): 765-773.

[8] ZHANG R, HAO J, WU Q, et al. Dehydrocostus lactone inhibits cell proliferation and induces apoptosis by PI3K/Akt/Bad and ERS signaling pathway in human laryngeal carcinoma [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(11): 6028-6042.

[9] WANG J, YU Z, WANG C, et al. Dehydrocostus lactone, a natural sesquiterpene lactone, suppresses the biological characteristics of glioma, through inhibition of the NF- κ B/COX-2 signaling pathway by targeting IKK β [J]. Am J Cancer Res, 2017, 7(6): 1270-1284.

[10] 邵玉普, 刘斌, 李伟明, 等. 去氢木香内酯诱导胃癌细胞自噬和凋亡及氧化应激[J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(12): 27-34.

[11] SHENG W, MAO H, WANG C, et al. Dehydrocostus lactone enhances chemotherapeutic potential of doxorubicin in lung cancer by inducing cell death and limiting metastasis [J]. Med Sci Monit, 2018, doi: 10.12659/MSM.911410.

[12] 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.

- [13] KRONSTEIN W R, TONN T. Colony formation: An assay of hematopoietic progenitor cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, doi: 10.1007/978-1-4939-9574-5.
- [14] LONG Y, WANG D. Inhibition of colon cancer cell growth by imidazole through activation of apoptotic pathway [J]. *Med Sci Monit*, 2019, doi: 10.12659/MSM.917779.
- [15] GOLDAR S, KHANIANI M S, DERAKHSHAN S M, et al. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(6): 2129-2144.
- [16] THOME M, FILIPPI-CHIELA E, VILLODRE E, et al. Ratiometric analysis of acridine orange staining in the study of acidic organelles and autophagy [J]. *J Cell Sci*, 2016, 129(24): 4622-4632.
- [17] LIM J, KIM H, YOUDIM M B, et al. Binding preference of p62 towards LC3- II during dopaminergic neurotoxin-induced impairment of autophagic flux [J]. *Autophagy*, 2011, 7(1): 51-60.
- [18] LEVINE B, KROEMER G. Biological functions of autophagy genes: A disease perspective [J]. *Cell*, 2019, 176(1/2): 11-42.
- [19] JONES G S, BALDWIN D R. Recent advances in the management of lung cancer [J]. *Clin Med (Lond)*, 2018, 18(Suppl 2): s41-s46.
- [20] SU X L, WANG J W, CHE H, et al. Clinical application and mechanism of traditional Chinese medicine in treatment of lung cancer [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2020, 133(24): 2987-2997.
- [21] 尹婕, 李琦, 孙立东, 等. 天然产物抗癌研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(1): 19-27.
- [22] PISTRITTO G, TRISCIUOGLIO D, CECI C, et al. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies [J]. *Aging (Albany NY)*, 2016, 8(4): 603-619.
- [23] CARNEIRO B A, EL-DEIRY W S. Targeting apoptosis in cancer therapy [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17(7): 395-417.
- [24] 姚红, 侯宇芯, 任晋宏, 等. 基于PI3K/Akt信号通路探讨华良姜素抗肝癌细胞HepG2凋亡的作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20220799.
- [25] 卓清缘, 陈美先, 王羚邴, 等. 桦木酸通过调节PI3K/Akt/mTOR信号通路诱导人结肠癌细胞SW620凋亡及自噬 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20220921.
- [26] FAN J, REN D, WANG J, et al. Bruceine D induces lung cancer cell apoptosis and autophagy via the ROS/MAPK signaling pathway *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(2): 126.
- [27] LEVINE B, KLIONSKY D J. Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy [J]. *Dev Cell*, 2004, 6(4): 463-477.
- [28] MIZUSHIMA N, YOSHIMORI T, OHSUMI Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2011, doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154005.
- [29] LI X, HE S, MA B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 12.
- [30] SUI Y, YAO H, LI S, et al. Delicaflavone induces autophagic cell death in lung cancer via Akt/mTOR/p70S6K signaling pathway [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2017, 95(3): 311-322.
- [31] SONG G, LU H, CHEN F, et al. Tetrahydrocurcumin-induced autophagy via suppression of PI3K/Akt/mTOR in non-small cell lung carcinoma cells [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(4): 5964-5969.

[责任编辑 张丰丰]