

麦冬醇提物抑制肺癌生长及自噬作用研究

袁嘉瑞¹, 汪春飞², 宋捷², 赵冰洁², 李超³, 田刚³, 董自波³, 封亮^{2*}, 贾晓斌^{2*},

1. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 江苏 南京 210028

2. 江苏省中医药研究院 国家中医药管理局中药释药系统重点实验室, 江苏 南京 210028

3. 江苏济川制药有限公司, 江苏 泰兴 225441

摘要: 目的 评价麦冬醇提物体内抑制肺癌生长及调控肺癌细胞自噬作用。方法 采用 C57BL/6 小鼠 Lewis 肺癌模型, 观察麦冬醇提物对肿瘤生长的抑制作用。采用 Visual Sonics Vevo 2100 小动物专用高频彩色超声仪测量 C57BL/6 小鼠 Lewis 肺癌肿瘤的体积, 称瘤质量, 并计算抑瘤率。采用免疫组织化学法和蛋白免疫印迹法检测肺癌组织中 Ki67 和 P53 蛋白的表达。采用电镜观察麦冬醇提物诱导 A549 肺癌细胞自噬, 结合 RT-PCR 和蛋白免疫印迹法检测诱导自噬相关蛋白表达。结果 麦冬醇提物对 Lewis 肺癌小鼠的肿瘤生长具有一定的抑制作用, 显著降低 Ki67 蛋白表达, 显著增强 P53 蛋白表达, 并且能诱导 A549 肺癌细胞产生自噬。结论 麦冬醇提物对肺癌具有明显的抑制作用, 并能诱导 A549 肺癌细胞产生自噬, 麦冬醇提物的抗肿瘤作用可能与其诱导肺癌细胞自噬有关。

关键词: 麦冬; 肺癌; 自噬; A549 肺癌细胞; Ki67; P53

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)09-1541-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.09.016

Inhibition of tumor growth and inducing autophagy effects of *Ophiopogon Japonicus* alcohol extract on lung cancer

YUAN Jia-rui¹, WANG Chun-fei², SONG Jie², ZHAO Bing-jie², LI Chao³, TIAN Gang³, DONG Zi-bo³, FENG Liang², JIA Xiao-bin²

1. Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

2. Key Laboratory of New Drug Delivery Systems of Chinese Materia Medica, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

3. Jumpcan Pharmaceutical Co., Ltd, Taixing 225400, China

Abstract: Objective To evaluate the effect of *Ophiopogon japonicus* alcohol extract (OJAE) on tumor growth of lung cancer and the regulation on autophagy of lung cancer cells. **Methods** Lewis tumor-bearing mice model was established to observe the effect of OJAE on tumor growth. The volume of tumor was observed and calculated by Visual Sonics Vevo 2100 Animal Dedicated High-frequency Color Ultrasound. To detect Ki67 and P53 protein expression in lung cancer tissue by Western blotting assay method and immunohistochemical assay method. The induction of OJAE on autophagy of A549 cells was evaluated by scanning electron microscopy, combining with Western blotting assay and RT-PCR methods. **Results** OJAE had certain inhibitory effect on Lewis lung cancer tumor growth. It also could make the expression of Ki67 significantly reduced and the expression of P53 significantly enhanced. It could induce autophagy. **Conclusion** OJAE has obvious inhibitory effect against lung cancer, and has the ability to induce autophagy. This study reveals the anti-lung cancer effect of OJAE may be related to its induction on autophagy, thus provides the basis for the research on anti-lung cancer effect of OJAE.

Key words: *Ophiopogon japonicus* (Thunb.) Ker Gawl.; lung cancer; autophagy; A549 lung cancer cell; Ki67; P53

收稿日期: 2015-08-10

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (81303275); 苏州市 2012 年科技计划医疗器械与新医药专项 (ZXY2012009)

作者简介: 袁嘉瑞, 硕士研究生。E-mail: yuanjiarui1990@126.com

*通信作者 封亮 E-mail: wenmoxiushi@163.com

贾晓斌, 教授, 研究员, 博士生导师。Tel: (025)85608672 E-mail: jxiaobin2005@hotmail.com

肺癌是全球死亡率最高的肿瘤疾病之一,近些年其发病率和死亡率均明显增加。在男性肿瘤患者中,肺癌已居首位;在女性中发病率也迅速升高。大量临床研究证实,中医药在抗肺癌方面具有一定的治疗效果,不但可以改善临床症状,还能提高生活质量,延长患者的带瘤生存期^[1]。因此,研究能够治疗肺癌的中药具有重要的临床意义。肺癌的病因至今尚不完全明确^[2]。目前,中医药抗肺癌作用的主要机制有诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤血管生成及侵袭转移和调节机体免疫功能^[3]。

自噬是在进化过程中高度保守的、广泛存在于真核细胞内的一种溶酶体依赖性的降解途径。自噬的生理功能包括清除细胞内受损的蛋白质和(或)衰老的细胞器,调节固有免疫和适应性免疫等^[4]。近年来研究表明,自噬与肿瘤的发生、发展有着密切联系^[5],自噬具有抑制肿瘤的作用^[6],尤其是在肿瘤形成的早期阶段^[7]。

麦冬为百合科沿阶草属 *Ophiopogon* Ker-Gawl. 植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* (Thunb.) Ker-Gawl. 的干燥块根。麦冬的主要药用成分甾体皂苷可用于治疗心肌缺血、血栓、高血糖等疾病^[8-9],目前关于麦冬抗肺癌效果的研究报道较少,本实验通过小鼠 Lewis 肺癌模型,研究麦冬的抗肺癌活性,并通过 A549 肺癌细胞模型来进行麦冬醇提物抗肺癌活性及调节自噬作用机制研究。

1 材料

1.1 动物及瘤株

C57BL/6 小鼠 60 只,雌性,体质量(20±3)g,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,合格证号 SCXK(沪)2015-0002。实验动物饲养于江苏省中医药研究院 SPF 级实验动物中心,每笼 10 只,饲料与饮水保持充足。室温(25±1)℃,湿度(65±5)%,每天光照 12 h,黑暗 12 h。小鼠 Lewis 肺癌瘤株、A549 肺癌瘤株,均购于中国医学科学院肿瘤研究所。

1.2 仪器与试剂

LABCONCO Class II 生物安全柜(美国 Labconco 公司);HERA Cell 150 CO₂ 培养箱(美国热电集团);COIC XDS-1B 相差倒置显微镜(重庆光电仪器总公司);Anke TDL-40B 离心机(上海安亭科学仪器厂);HH-60 数显恒温搅拌循环水箱(常州国华仪器有限公司);便携式电子天平-PL1502-S(上海 Mettler Tledo 仪器有限公司);T06001 天平(天津天马恒基仪器有限公司);紫外-ZXC 型紫外

消毒车(江苏巨光光电科技有限公司);Agilent1200 高效液相色谱仪(Agilent Technologies)。

麦冬(川)购于亳州万珍中药饮片厂,批号 20150108,经南京中医药大学吴德康教授鉴定为麦冬 *Ophiopogon japonicus* (Thunb.) Ker-Gawl. 的干燥块根。顺铂(DDP,南京制药有限公司,规格 20 mL/瓶,质量浓度为 13 mg/mL,批号 20150204);氯化钠注射剂(南京小营药业有限公司,规格 100 mL/瓶,批号 12012120808);甲基麦冬二氢高异黄酮 B、麦冬甲基黄烷酮 A、麦冬皂苷 D 对照品(批号分别为 110867-201406、110852-201406、110766-201519,质量分数≥98%,中国食品药品检定研究院)。

2 方法

2.1 麦冬醇提物的制备

称取 1 kg 麦冬,加入 70%乙醇 10 L 煮沸 1 h,共 2 次,4 层纱布滤过后,回收乙醇,5 000 r/min 离心 15 min,取上清,高压蒸汽灭菌后,于 4℃ 冰箱中贮存备用。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取氧化甲基麦冬二氢高异黄酮 B、麦冬甲基黄烷酮 A 和麦冬皂苷 D 对照品,置 10 mL 棕色量瓶中,甲醇定容至刻度,得到质量浓度分别为 14、20、123 μg/mL 混合对照品溶液。

2.3 麦冬醇提物的 HPLC 分析

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Prevail C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为 A(乙腈)-B(纯水),梯度洗脱条件:0~10 min, 20% A; 10~20 min, 20%~30% A; 20~25 min, 30% A; 25~30 min,

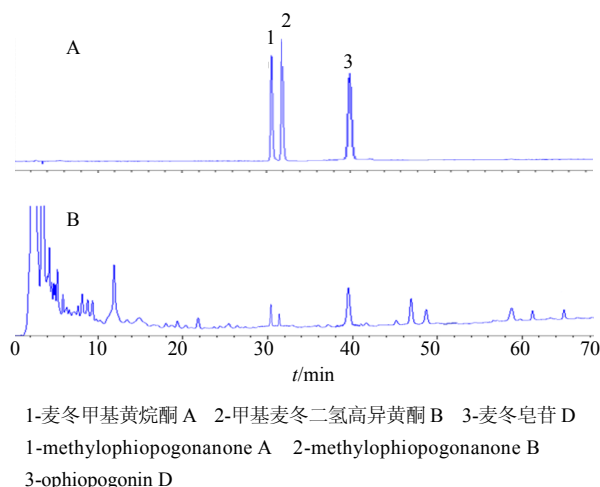


图 1 混合对照品 (A) 和麦冬醇提物 (B) HPLC 图
Fig. 1 HPLC of reference substances (A) and extract of OJAE (B)

30%~50% A; 30~60 min, 50%~80% A; 60~70 min, 80%~100% A。体积流量 1 mL/min; 柱温 25 °C; 检测波长 210 nm; 进样量 10 μ L。混合对照品和麦冬醇提物, HPLC 图谱见图 1。

2.3.2 线性关系考察

精密量取对照品溶液 0.4、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL, 分别置于 10 mL

量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 得到不同质量浓度的对照品溶液, 按“2.3.1”项的色谱条件, 以对照品峰面积 (Y) 对其质量浓度 (X , μ g/mL) 进行线性回归, 得回归方程, 见表 1。

表 1 麦冬中各对照品回归方程

Table 1 Regression equations of each standard of OJAE

化合物	回归方程	R^2	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
甲基麦冬二氢高异黄酮 B	$Y=11.74 X+4.74$	0.999 9	4.00~128.00
麦冬甲基黄烷酮 A	$Y=22.10 X-180.44$	0.999 9	3.56~114.00
麦冬皂苷 D	$Y=6.41 X+32.42$	0.999 9	3.28~105.00

2.3.3 精密度试验 取甲基麦冬二氢高异黄酮 B、麦冬甲基黄烷酮 A 和麦冬皂苷 D 对照品稀释 4 倍溶液进行精密度考察。按色谱条件连续 5 次进样; 计算峰面积的 RSD 分别为 0.39%、0.56%、0.23%, 表明仪器的精密度良好。

2.3.4 重复性试验 精密称取麦冬醇提物样品平行制备 6 份供试品, 连续进样测定甲基麦冬二氢高异黄酮 B、麦冬甲基黄烷酮 A 和麦冬皂苷 D 质量分数的 RSD 分别为 1.24%、1.35%和 1.33%, 说明其具有较好的重复性。

2.3.5 稳定性试验 取麦冬醇提物样品, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 时进样测定, 结果甲基麦冬二氢高异黄酮 B、麦冬甲基黄烷酮 A 和麦冬皂苷 D 的峰面积基本不变, RSD 分别为 1.10%、1.41%和 1.06%, 说明供试品溶液在 24 h 内各成分稳定性较好。

2.3.6 加样回收率试验 取 6 份已测定麦冬醇提物样品, 吸取 1.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 精密加入甲基麦冬二氢高异黄酮 B、麦冬甲基黄烷酮 A 和麦冬皂苷 D 对照品, 蒸馏水定容至刻度, 计算甲基麦冬二氢高异黄酮 B、麦冬甲基黄烷酮 A 和麦冬皂苷 D 的平均加样回收率为 97.21%、98.71%和 98.47%。RSD 分别为 1.51%、1.27%、1.16%。

2.3.7 样品测定 取麦冬醇提物制备供试品溶液, 按照上述色谱条件测定峰面积, 计算甲基麦冬二氢高异黄酮 B、麦冬甲基黄烷酮 A 和麦冬皂苷 D 的质量分数, 结果显示麦冬醇提物中甲基麦冬二氢高异黄酮 B、麦冬甲基黄烷酮 A 和麦冬皂苷 D 的质量分数分别为 0.005 1%、0.007 5%和 0.006 4%。

2.4 Lewis 肺癌细胞悬液的制备

Lewis 肺癌细胞培养至对数生长期, 用 0.25%

胰酶消化, 于 37 °C, 5% CO_2 培养箱中消化 2 min, 待细胞呈流沙样流下时, 迅速加入完全培养基终止消化, 吹打细胞转移至离心管中 (2 000 r/min 离心 2 min), 收集底部细胞。用灭菌 PBS 将细胞制备成细胞悬液, 显微镜下计数, 调节细胞密度至 1×10^7 个/mL。接种于 4 只小鼠右腋下, 取接种 Lewis 肺癌细胞 5 d 的小鼠, 处死并于 75%乙醇中浸泡 2 min, 无菌条件取瘤组织中生长良好新鲜部分, 按肿瘤质量 (g) 与细胞培养基 (mL) 1:10 比例研磨成匀浆, 多次离心弃去上清, 最后用培养基混匀制成 20 mL 肺癌细胞的混悬液。

2.5 荷瘤动物模型的制备、动物分组及给药

分别于 40 只 C57BL/6 小鼠右侧腋下皮下接种 0.2 mL 肺癌细胞悬液。实验中 10 只未接种肿瘤细胞的小鼠作为对照组, 接种小鼠随机分为 4 组: 模型组、阳性药组 (顺铂)、麦冬醇提物高剂量 (10 g/kg) 组、麦冬醇提物低剂量 (5 g/kg) 组。每组 10 只小鼠。麦冬醇提物高、低剂量组每天分别 ig 0.2 mL 对应的麦冬醇提物。对照组和模型组小鼠每天 ig 生理盐水 0.2 mL, 阳性药组 ip 顺铂, 每只小鼠注射 0.2 mL (相当于 3 mg/kg), 现用现配。连续给药 11 d, 末次给药 1 h 后测定肿瘤体积, 处死小鼠。剥离肿瘤, 分别称瘤质量和体质量, 计算抑瘤率。

$$\text{抑瘤率} = 1 - \frac{\text{给药组平均瘤质量}}{\text{模型组平均瘤质量}}$$

2.6 小鼠肿瘤体积测定

运用小动物专用高频彩色超声仪对小鼠肿瘤的体积进行测量, 采用加拿大 Visual Sonics 产的 Vevo 2100 高分辨小动物超声成像系统 (MS 400 探头, 频率设置为 30 MHz, 探测深度为 8 mm, 宽度为 10.36 mm), 小鼠采取吸入 2%异氟烷麻醉, 仰卧

位固定于 37 ℃ 恒温加热板上, 探头置于小鼠右腋下肿瘤处, 记录各切面的面积, 并将 3 个切面组合成一张三维图, 从而计算肿瘤体积。

2.7 免疫组织化学法检测肺癌中 Ki67 和 P53 蛋白的表达

将剥离下来的肿瘤组织制成石蜡病理切片, 将石蜡病理切片放置于 65 ℃ 恒温箱中 2 h 后, 二甲苯溶液进行浸泡脱蜡, 无水乙醇、95% 乙醇、85% 乙醇进行梯度浸泡脱水后, 用重蒸水漂洗 3~5 次后进行抗原修复。石蜡病理切片在柠檬酸缓冲溶液中煮沸后冷却 10 min, 然后将柠檬酸缓冲溶液冲洗掉。Elivison 两步法进行免疫组织化学染色, 使用 DM2500 光学显微镜进行照片的拍摄。

2.8 A549 细胞培养

A549 细胞用 RPMI 1640 不完全培养基 (含有 10% 胎牛血清、2 g/L 葡萄糖、0.3 g/L L-谷氨酰胺、2 g/L 碳酸氢钠、80 U/mL 青霉素、0.08 mg/mL 链霉素) 培养。A549 细胞放在培养箱 (37 ℃, 5% CO₂) 中培养。培养基需要每天换 1 次, 每 2~3 天传代 1 次。

2.9 透射电镜观察自噬体的形成

将 A549 细胞均匀接种至培养瓶, 过夜贴壁后加入终质量浓度为 1 mg/mL 的麦冬醇提取物 (MTT 筛选麦冬醇提取物 1 mg/mL 时细胞抑制率 > 50%), 以未加麦冬醇提取物的细胞作为对照组。24 h 后, 收集所有悬浮和贴壁细胞。先用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 制成单细胞悬液, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清后用预冷的 PBS 洗 2 次, 然后沿管壁缓缓加入预冷的 2.5% 戊二酸, 注意加液时一定要冲散细胞团, 在 4 ℃ 固定 90 min。用 PBS 漂洗后, 再用 1% 四氧化锇在 4 ℃ 固定 30 min, 再用 PBS 漂洗。将细胞用 50%~100% (以 10% 为梯度) 的系列乙醇和纯丙酮脱水, 然后用 Epon812 树脂包埋。将包埋块用切片机切成超薄切片, 并用醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色后在透射电镜下观察细胞超微结构变化。

2.10 蛋白免疫印迹法检测 A549 肺癌细胞中与自噬相关蛋白的表达

将消化下来的细胞用 PBS 缓冲溶液冲洗 2 遍, 用 RIPA 裂解液裂解组织 (400 μL IRI-PA+4 μL IPMSF) 提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 取 50 μg 蛋白样品进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。将电泳后的蛋白转移至 PVDF 膜, 封闭液封闭 (4 ℃ 过夜), 分别用 LC3 II 抗体、LC3 I 抗体、Beclin-1

抗体 (1:200) 和 β-actin 兔多克隆抗体 (1:1 000) 孵育, 室温轻摇 180 min 后, 再用 TBS (Tris-HCl 缓冲盐溶液) 洗涤 3 次 (10 min/次) 后, 再分别用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG (1:2 000) 室温孵育 120 min, TBS 洗涤 3 次 (15 min/次), 最后 X 线片曝光、显影和定影后观察结果。

2.11 实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 检测 Beclin-1 和 LC3 mRNA 表达

采用 miRNeasy Mini Kit (美国 Qiagen 公司) 提取 A549 细胞 RNA, RNA 溶于 20 μL RNAase-free H₂O 中, 并测纯度和浓度, A₂₆₀/A₂₈₀ 在 1.8~2.0 内, 反转录反应采用 Takara 公司的反转录试剂盒, 总体积为 20 μL, 其中 Prime Script RT Master Mix 4 μL, RNA 溶液 16 μL, 取 300 ng 总 RNA 上样量, 反应条件: 37 ℃、15 min, 85 ℃、5 s; 4 ℃ 冷却, RT-PCR 采用了 Takara 公司引物及 SYBR Premix EX Taq II 和 ABI 7500 型基因扩增仪, 总体积 20 μL, 其中 10 μL SYBR Premix EX Taq II, 6 μL ddH₂O, 相应上、下游引物各 1 μL, 2 μL cDNA 模板, 以内源性 β-actin 作参照, 扩增条件: 95 ℃ 预变性 30 s, 95 ℃、5 s, 64 ℃ 退火延伸 34 s, 共 45 个循环。

2.12 统计学处理

数据表示为 $\bar{x} \pm s$ 的形式, SPSS 16.0 统计软件分析数据, 计量资料采用单因素方差分析, 组间比较采用 LSD, 方差不齐用 *H* 检验, 组间比较用 *N* 检验。

3 结果

3.1 对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤生长的抑制作用

连续 ig 给药 11 d, 通过小动物专用高频彩色超声仪对肿瘤体积进行测量, 结果见图 2, 麦冬醇提取物 10、5 g/kg 组小鼠的肿瘤体积分别为 (433.28 ± 130.66)、(587.46 ± 148.12) mm³, 与模型组 [(867.56 ± 150.87) mm³] 相比显著性降低 (*P* < 0.05、0.01)。可以看出, 麦冬醇提取物具有显著抑制肿瘤生长的作用。随后将各组小鼠处死, 解剖观察见肿瘤质硬有薄层膜状结构包绕表面, 且有血管生长分布。麦冬醇提取物高、低剂量及顺铂对荷瘤小鼠的瘤质量均有不同程度的抑制作用 (表 2)。以抑瘤率评价药物抗肿瘤疗效的评价标准: 抑瘤率 < 30% 为无效; 抑瘤率 ≥ 30%, 并且与模型组比较差异显著 (*P* < 0.05) 为有效。因此可认为麦冬醇提取物具有抗肿瘤的效果。

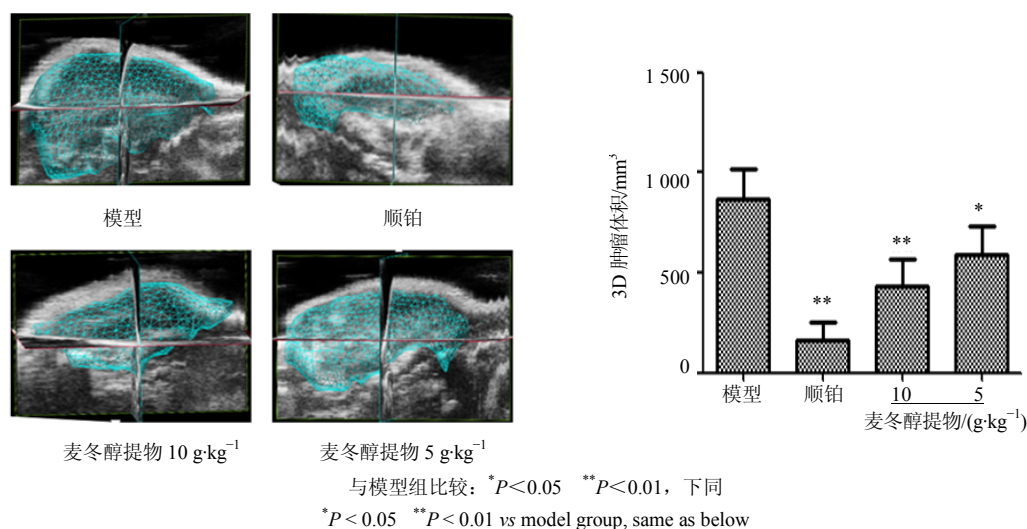


图 2 麦冬醇提取物对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤体积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 Effect of OJAE on tumor volume of mice with Lewis lung cancer ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

表 2 麦冬醇提取物对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of OJAE on tumor weight of mice with Lewis lung cancer ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	瘤质量/g	抑瘤率/%
模型	—	4.07 ± 1.01	—
顺铂	0.003	0.75 ± 0.25**	81.57 ± 6.44
麦冬醇提取物	10	2.03 ± 0.79**	50.49 ± 5.83
	5	2.75 ± 0.70*	32.43 ± 3.78

3.2 对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤组织中 Ki67 和 P53 蛋白表达的影响

Ki67 和 P53 蛋白是常用的检测癌细胞数量以及活跃程度的指标^[9]。从图 3 可以看出, 与对照组相比, 模型组 Ki67 蛋白的表达显著增强, P53 蛋白的表达显著减弱, 而麦冬醇提取物高、低剂量组与模型组相比, Ki67 蛋白的表达显著降低, P53 蛋白的表达显著增强, 从而说明麦冬醇提取物高、低剂量组小鼠的肺癌细胞得到一定程度的抑制, 进一步说明了麦冬醇提取物具有一定的抗肺癌效果。

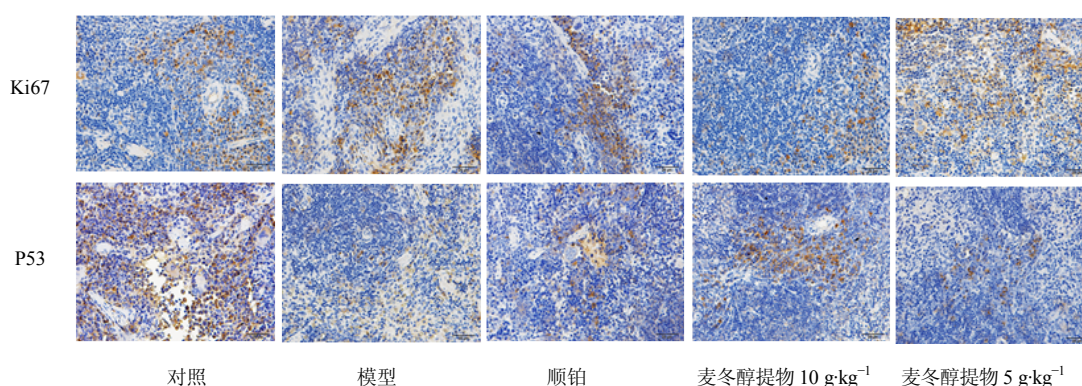


图 3 麦冬醇提取物对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤组织中 Ki67 和 P53 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of OJAE on Ki67 and P53 protein expression in tumor tissue of mice with Lewis lung cancer

3.3 对 A549 细胞中自噬体形成的影响

透射电镜是诊断自噬的可靠方法, 本实验采用透射电镜检测麦冬醇提取物干预后 A549 细胞。如图 4 所示, 对照组细胞显示正常的细胞质、细胞器和

细胞核形态。麦冬醇提取物处理组细胞质中出现大量的、大小不等的自噬泡, 并可在电镜下见到包裹有线粒体的自噬体, 而细胞核未见明显异常。结果表明麦冬醇提取物处理后 A549 细胞有自噬发生。

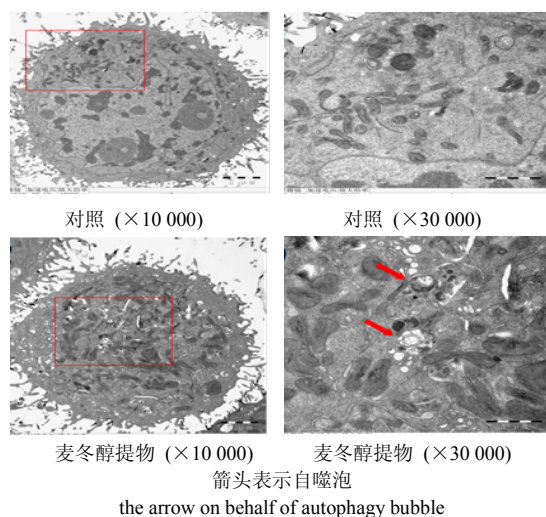
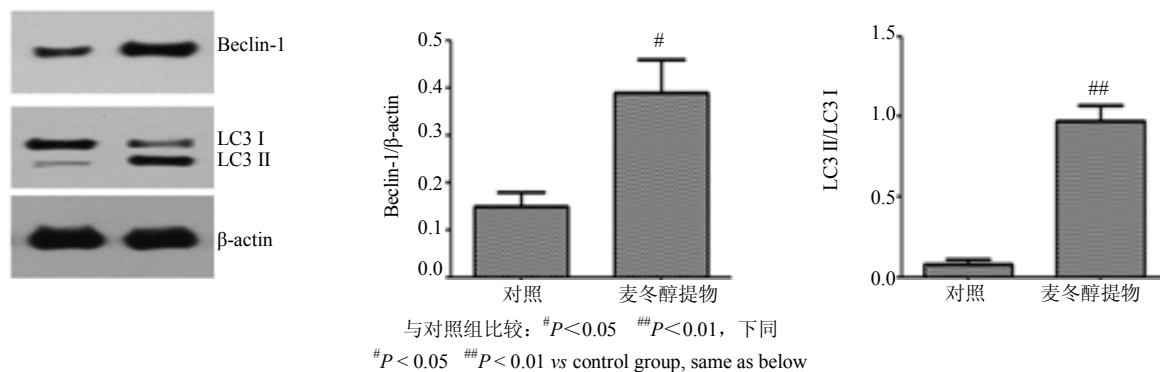
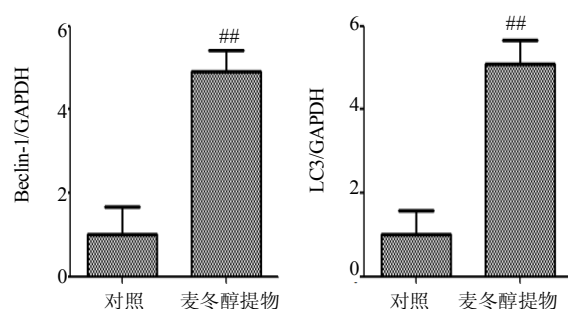


图 4 麦冬醇提取物对 A549 细胞自噬体形成的影响

Fig. 4 Effect of OJAE on inducing autophagy in A549

图 5 麦冬醇提取物对 A549 细胞中 Beclin-1 和 LC3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Fig. 5 Effect of OJAE on Beclin-1 and LC3 protein expression in A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)图 6 麦冬醇提取物对 A549 细胞中 Beclin-1 和 LC3 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Fig. 6 Effect of OJAE on Beclin-1 and LC3 mRNA expression in A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

提取物可抑制肿瘤的体积和质量, 这表明麦冬醇提取物具有一定的抑制小鼠 Lewis 肺癌肿瘤生长的效果。

Ki67 是细胞活性和增殖的一种指标^[12], 其基因

3.4 对 A549 细胞中 Beclin-1 和 LC3 蛋白和 mRNA 表达的影响

电镜结果表明, 在麦冬醇提取物抗肺癌过程中, 自噬被激活, 而 Beclin-1 是第一个被确认的哺乳动物自噬基因, 是自噬形成的早期阶段所必需的^[10]。LC3 是自噬标志物, 自噬形成时, 胞浆型 LC3 (即 LC3 I) 会酶解掉一小段多肽, 转为 LC3 II, LC3 II 与 LC3 I 的比值越大说明自噬的水平越高^[11]。根据图 5 和 6 可以看出, 与对照组相比, 麦冬醇提取物处理过的 A549 细胞中的 Beclin-1 蛋白表达增强 ($P < 0.05$), LC3 II 与 LC3 I 的比值显著增加 ($P < 0.01$), 进一步说明麦冬醇提取物能够诱导 A549 肺癌细胞产生自噬。

4 讨论

本实验制备小鼠 Lewis 肺癌模型, 观察麦冬醇提取物对小鼠 Lewis 肺癌生长的影响。研究发现, 麦冬醇

定位于第 10 号染色体, 其蛋白质产物定位于细胞核, 由相对分子质量 345 000 和 395 000 两条多肽链组成, 其在 G₁ 后期开始出现, 在 S 期和 G₂ 期逐渐升高, M 期达到高峰, 有丝分裂结束后迅速降解消失, G₀ 期无表达。Ki67 蛋白表达量的多少与细胞的增殖、分化密切相关, 目前常被用来作为肿瘤发生、发展及细胞活性的指标。P53 蛋白是一种肿瘤抑制蛋白^[13], 在所有恶性肿瘤中, 50% 以上会出现该基因的突变, 像所有其他肿瘤抑制因子一样, P53 蛋白在正常情况下对细胞分裂起着减慢或监视的作用。P53 基因是细胞生长周期中的负调节因子, 与细胞周期的调控、DNA 修复、细胞分化、细胞凋亡等重要的生物学功能有关^[14]。通过蛋白免疫印迹法的检测结果可以看出麦冬醇提取物对 C57BL/6 小鼠 Lewis 肺癌的癌细胞具有一定的抑制作用, 从而

进一步说明麦冬醇提物具有一定的抗肺癌作用。

本实验进一步从自噬的角度研究麦冬醇提物抗肺癌的机制。首先通过透射电镜观察细胞中自噬体的形成,可以看出麦冬醇提物处理过的 A549 细胞细胞质中出现了自噬泡,这说明麦冬醇提物可诱导 A549 细胞的自噬作用。

LC3 是至关重要的自噬蛋白并且被用作自噬的一个标记物^[15]。在自噬过程中, LC3 I 会酶解掉一小段多肽转变为 LC3 II。所以, LC3 II 与 LC3 I 的比值被作为评价自噬水平的一个标准。Beclin-1 又称 BECN-1, 是最早被发现的哺乳动物调控自噬性死亡的基因, 与酵母自噬基因 ATG6 同源, 位于人染色体 17q21 上, 编码一个含有 450 个氨基酸, 分子量是 60 KD 的蛋白质, 是介导其他自噬蛋白定位于前自噬小体的关键因子, 参与哺乳动物自噬体早期形成的调控^[16]。本实验通过蛋白印迹法和免疫组织化学法检测细胞中的 Beclin-1 和 LC3 蛋白的表达, 来进一步研究麦冬醇提物是否诱导 A549 细胞自噬。实验结果显示, 麦冬醇提物处理过的 A549 细胞中的 LC3 II 与 LC3 I 的比值显著增大, 并且 Beclin-1 的表达明显增强, 进一步说明麦冬醇提物诱导 A549 细胞产生自噬。

综上所述, 本实验发现麦冬醇提物对肺癌具有一定的抑制作用, 并且麦冬醇提物能够诱导肺癌细胞产生自噬, 从而发现自噬在麦冬醇提物抗肺癌过程中的作用, 揭示了诱导自噬是麦冬醇提物抗肺癌的机制之一, 从而为研究麦冬醇提物抗肺癌机制提供了一定的实验基础。

参考文献

- [1] 张莹, 王蕾. 中药逆转肺癌多药耐药的研究新进展[J]. 药物评价研究, 2015, 38(6): 686-689.
- [2] 吴国明. 2010 年美国临床肿瘤学会肺癌研究进展 [J]. 中华肺部疾病杂志, 2010, 3(5): 1.
- [3] 蔡鹏涛, 吴志强, 郭会, 等. 中药抑制非小细胞肺癌 PI3K/Akt/mTOR 信号通路克服 EGFR-TKIs 获得性耐药研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(12): 1849-1852.
- [4] Xu L, Liu J H, Zhang J, *et al.* Blockade of autophagy aggravates endoplasmic reticulum stress and improves paclitaxel cytotoxicity in human cervical cancer cells [J]. *Cancer Res Treat*, 2015, 47(2): 313-321.
- [5] Wang Y, Li Y B, Yin J J, *et al.* Autophagy regulates inflammation following oxidative injury in diabetes [J]. *Autophagy*, 2013, 9(3): 272-277.
- [6] Lee T G, Jeong E H, Kim S Y, *et al.* The combination of irreversible EGFR TKIs and SAHA induces apoptosis and autophagy-mediated cell death to overcome acquired resistance in EGFR T790M-mutated lung cancer [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(11): 2717-2729.
- [7] Zhang X, Sun J, Xin W, *et al.* Anti-inflammation effect of methyl salicylate 2-O- β -D-lactoside on adjuvant induced-arthritis rats and lipopolysaccharide (LPS)-treated murine macrophages RAW264. 7 cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 25(1): 88-95.
- [8] 童菊华, 庞小存, 王威, 等. 杭麦冬与川麦冬中高异黄酮类成分和抗氧化活性的比较 [J]. 中草药, 2015, 46(20): 3091-3095.
- [9] 袁春丽, 孙立, 袁胜涛, 等. 麦冬有效成分的药理活性及作用机制研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2013, 22(21): 2946-2502.
- [10] Li S, Li X, Zhao H, *et al.* Overexpression of microRNA-125a-3p effectively inhibits the cell growth and invasion of lung cancer cells by regulating the mouse double minute 2 homolog/p53 signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(4): 5482-5486.
- [11] Yang C, Pan Y. Fluorouracil induces autophagy-related gastric carcinoma cell death through Beclin-1 upregulation by miR-30 suppression [J]. *Tumour Biol*, 2015.doi: 10.1007/s13277-015-3775-6.
- [12] Liu X, Klionsky D J. The TP53INP2/DOR protein chaperones deacetylated nuclear LC3 to the cytoplasm to promote macroautophagy [J]. *Autophagy*, 2015, 11(9): 1441-1442.
- [13] 姜宁, 黄争, 范一宏, 等. 中药辨证治疗对胃癌前病变患者 APC、p53、Ki67 蛋白表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(2): 356-360.
- [14] Li K L, Kang J, Zhang P, *et al.* Efficacy of recombinant adenoviral human p53 gene in the treatment of lung cancer-mediated pleural effusion [J]. *Oncol Lett*, 2015, 9(5): 2193-2198.
- [15] Pérez-Hernández M, Gadea I, Escribano J M, *et al.* Expression and characterization of the gD protein of HSV-2 fused to the tetramerization domain of the transcription factor p53 [J]. *Protein Expr Purif*, 2015, 115: 54-60.
- [16] Yao Q, Fu T, Wang L U, *et al.* Role of autophagy in the ω -3 long chain polyunsaturated fatty acid-induced death of lung cancer A549 cells [J]. *Oncol Lett*, 2015, 9(6): 2736-2742.
- [17] Hieke N, Löffler A S, Kaizuka T, *et al.* Expression of a ULK1/2 binding-deficient ATG13 variant can partially restore autophagic activity in ATG13-deficient cells [J]. *Autophagy*, 2015, 11(9): 1471-1483.