

黄芪多糖调控细胞DNA损伤修复发挥抗非小细胞肺癌活性的机制研究

曹松¹, 严晓燕¹, 马军¹, 景文江¹, 张淑莲¹, 王娟毅¹, 李翔¹, 吴翔², 余洪刚^{3*}

1. 西安交通大学医学部附属三二〇一医院 肿瘤内科, 陕西 汉中 723000

2. 西安交通大学医学院 基础医学院, 陕西 西安 710012

3. 西安市中医医院肺病科 陕西 西安 710012

摘要: 目的 探讨黄芪多糖通过DNA损伤修复发挥抗非小细胞肺癌(NSCLC)活性的作用及机制。方法 通过ip氨基甲酸酯(0.8 mg/g)建立NSCLC小鼠模型, 观察肺组织表面结节的数量及形态在体评价黄芪多糖(300 mg/kg)的抗肿瘤活性; CCK8法评价黄芪多糖体外抗人NSCLC细胞系A549(40.00、20.00、10.00、5.00、2.50、1.25 $\mu\text{mol/L}$)和HCC827(100、50、25 $\mu\text{mol/L}$)增殖活性; 并通过单细胞凝胶电泳测定(彗星试验)评价黄芪多糖对A549(40 $\mu\text{mol/L}$)和HCC827(50 $\mu\text{mol/L}$)细胞DNA损伤的影响; 通过实时荧光定量PCR(RT-qPCR)、Western blotting、RNA干扰、免疫荧光染色实验研究黄芪多糖对VRK1/P53BP1信号通路的作用。结果 与模型组小鼠比较, 黄芪多糖和吉非替尼(阳性药)组的结节数目显著减少($P < 0.05$ 、 0.01); 黄芪多糖组的肿瘤结节呈近似圆形, 与紧密排列的肿瘤结节边界清晰, 模型和吉非替尼组的结节呈现不规则结构, 细胞排列松散, 更具侵袭性。黄芪多糖呈剂量相关性抑制A549和HCC827细胞增殖, 显著缩短的彗尾和橄榄炬($P < 0.05$ 、 0.001), 保护DNA完整性; 显著增加NSCLC细胞中VRK1 mRNA和蛋白表达水平($P < 0.05$ 、 0.01), 同时免疫荧光分析发现P53BP1和VRK1蛋白表达水平升高, 且VRK1蛋白可在细胞核和细胞质之间移位; 通过VRK1敲低反向验证上述结果。结论 黄芪多糖通过激活VRK1/P53BP1信号转导途径增强DNA损伤修复, 进而抑制NSCLC细胞增殖。

关键词: 黄芪多糖; 非小细胞肺癌; VRK1; P53BP1; DNA损伤修复

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2020)06-1051-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.06.012

Anti-Non-small Cell Lung Cancer activity and potential mechanism of Astragalus Polysaccharide through regulating DNA damage repair

CAO Song¹, YAN Xiaoyan¹, MA Jun¹, JING Wenjiang¹, ZHANG Shulian¹, WANG Juanyi¹, LI Xiang¹, WU Xiang², YU Honggang³

1. Department of Oncology, 3201 Hospital Affiliated to Medical Department of Xi'an Jiaotong University, Hanzhong 723000, China

2. School of basic medicine, School of medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710012, China

3. Department of pulmonary diseases, Xi'an Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710012

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of the anti-non-small cell lung cancer activity of *Astragalus* polysaccharides (APS) through DNA damage repair. **Methods** NSCLC mouse model was established by ip carbamate (0.8 mg/g). The number and morphology of pulmonary surface nodules were observed to evaluate the antitumor activity of APS (300 mg/kg) *in vivo*. CCK8 method was used to evaluate the proliferation activity of APS against human NSCLC cell lines A549 (40.00, 20.00, 10.00, 5.00, 2.50, 1.25 $\mu\text{mol/L}$) and HCC827 (100, 50, 25 $\mu\text{mol/L}$) and the effect of APS on DNA damage of NSCLC cells lines A549 (40.00 $\mu\text{mol/L}$) and HCC827 (50 $\mu\text{mol/L}$) was evaluated by single cell gel electrophoresis (comet assay). The effects of APS on VRK1/P53BP1 signaling pathway were verified by experiments such as RT-qPCR, western blotting, siRNA, and immunofluorescence staining. **Results** Compared with the model group, the number of nodules in APS and gefitinib group decreased significantly ($P < 0.05$, 0.01). In *Astragalus* polysaccharide group, the tumor nodule was round, with clear boundary with closely arranged tumor nodule. In model group and gefitinib group, the nodule presented irregular structure, loose cell arrangement and more aggressive. APS inhibited the proliferation of A549 and HCC827 cells in a dose-dependent manner, significantly shortened coma tail and olive torch ($P < 0.05$, 0.001), and protected DNA integrity. It can significantly increase the expression level of VRK1 mRNA and protein in NSCLC cells ($P < 0.05$, 0.01), and it was found that the expression levels of P53BP1 and VRK1 proteins were

收稿日期: 2020-03-04

第一作者: 曹松(1968—), 主治医师, 硕士研究生, 研究方向为肺癌、食管、胃、乳腺癌。E-mail: liaoncaosong1968@163.com

*通信作者: 余洪刚(1980—), 副主任医师, 硕士研究生, 研究方向为中医药对肺系病的治疗、肺间质纤维化。E-mail: 253613860@qq.com

increased through immunofluorescence analysis. Besides, VRK1 protein could be shifted between the nucleus and the cytoplasm. Finally, the above results were verified by VRK1 knockdown. **Conclusion** APS can enhance the DNA damage repair by activating VRK1/P53BP1 signal transduction pathway, and then inhibit the proliferation of NSCLC cells.

Key words: *Astragalus* polysaccharide; non-small cell lung cancer; VRK1; P53BP1; DNA damage repair

在恶性肿瘤死亡中,男性、女性排在第一位的都是肺癌,非小细胞肺癌(NSCLC)约占所有肺癌病例的85%^[1-2]。除了传统的化疗药物外,近年来还发现了针对表皮生长因子受体(EGFR)的药物,如吉非替尼^[3-4]。尽管这些化疗药物在改善生活质量和提高患者生存率方面显示出良好的性能,但治疗效果受到适应症、毒性、副作用和耐药性的限制^[5-7]。此外,最近的证据表明,化疗药物与肿瘤转移和侵袭等相关^[8-9]。DNA损伤修复在肿瘤中发挥重要作用,有研究报道,增加DNA修复活性可抑制肿瘤发生或发挥促进细胞凋亡的作用^[10]。黄芪多糖具有广泛的生物活性,包括抗NSCLC活性^[11-14],本研究旨在探索黄芪多糖作用于NSCLC对DNA损伤修复的作用,并明确其潜在作用机制,为黄芪多糖作为抗NSCLC药物的开发提供理论参考。

1 材料

1.1 药物和主要试剂

黄芪多糖(批号1122A023,质量分数≥90.0%)、吉非替尼(批号20170825,质量分数≥98.0%),购自北京索莱宝科技有限公司;氨基甲酸酯(氨基甲酸乙酯,批号94300,质量分数≥99.0%),购自Sigma;兔属VRK1和抗P53BP1一抗,购自Biosynthesis;HRP标记和FITC标记的二抗,购自Servicebio;VRK1 siRNA(VRK1 siRNA)和阴性对照siRNA(NC siRNA)购自GenePharm;Lipofectamine 2000试剂(Invitrogen)。

1.2 实验动物和细胞

C57BL/6小鼠,4~5周龄,雄性,上海斯莱克实验动物有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(沪)2019-0032。

人NSCLC细胞系A549和HCC827,购自北京协和医院细胞资源中心。细胞系不含支原体。通过PCR确认细胞的物种起源,并用STR谱分析平台(FBI,CODIS)鉴定。

2 方法

2.1 动物实验

所有动物实验均经我院实验委员会批准,非小细胞肺癌模型制备参考文献方法^[15],C57BL/6小鼠购买后于实验环境中适应5 d后,ip溶于0.9%NaCl的氨基甲酸酯(0.8 mg/g),每周2次,每次间隔72 h,

持续5周,观察肺结节出现情况评价造模成功性。将模型成功小鼠随机分为3组:模型组、黄芪多糖(300 mg/kg,剂量来自参考文献^[13])组、吉非替尼(45 mg/kg)组,每组7只。ig给药,每天1次,持续13周,模型组以0.7%DMSO的生理盐水代替治疗。每周称体质量1次,实验结束时,所有小鼠均被人道处死,并立即切除肺组织,拍照并浸入4%多聚甲醛中以进行外部结节计数和组织化学检查分析。

2.2 组织病理分析

将来自“2.1”项的小鼠肺组织固定于4%多聚甲醛中,包埋于石蜡中,切成5 μm厚的标本,HE染色,在显微镜下观察。

2.3 细胞培养和转染

人NSCLC细胞系A549和HCC827细胞培养于含10%胎牛血清和1%抗生素的DMEM培养基,并于37℃、5%CO₂培养箱中生长。

对于RNA干扰实验,细胞密度至70%~80%时,通过Lipofectamine 2000试剂转染VRK1 siRNA(VRK1-KD组)或NC siRNA(NC组),转染成功后,进行后续实验。

2.4 细胞增殖测定^[16]

①评估黄芪多糖对所用细胞系抗增殖活性:将细胞以每孔4×10⁴个的密度接种到96孔板中,培养24 h贴壁后,使用黄芪多糖(A549细胞:40.00、20.00、10.00、5.00、2.50、1.25 μmol/L;HCC827细胞:100、50、25 μmol/L)处理72 h;②观察VRK1敲减对黄芪多糖抗增殖活性的影响:细胞转染VRK1 siRNA(VRK1-KD组)或NC siRNA(NC组)后,加入黄芪多糖(A549细胞:40 μmol/L;HCC827细胞:50 μmol/L)处理72 h;加入10%的CCK8溶液并温育1 h,使用酶标仪读取数据。

2.5 彗星实验

将细胞以每孔1×10⁵个的密度接种到6孔板中培养24 h贴壁后,使用黄芪多糖(A549细胞:40 μmol/L;HCC827细胞:50 μmol/L)处理96 h,收集细胞悬液,并细胞计数。根据文献报道^[17],通过碱性单细胞凝胶电泳分析(彗星实验)评估核DNA的损伤。将所有载玻片快速浸入0.04%氮羟甲基丙烯酰胺(NMA)溶液中,并在使用前风干成超薄薄膜,以免脱胶。第一层凝胶由200 μL 0.5% NMA形

成,第二层由 20 μL $4\times 10^4/\text{mL}$ 细胞悬液与 100 μL 0.7% 低熔点琼脂糖(LMA)混合形成。1 V/cm 电泳 20 min 后,浸入中和缓冲液(0.4 mol/L Tris pH 7.5)中 10 min,该步骤重复 2 次后,将载玻片用 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI 染色 5 min,并在荧光显微镜下观察。从细胞核释放的 DNA 片段迁移形成彗尾,较长的彗尾长度和彗尾橄榄矩表示严重损坏。

2.6 免疫组化

将细胞以每孔 1×10^5 个的密度接种到 6 孔板中培养 24 h 贴壁后,使用黄芪多糖(A549 细胞:40 $\mu\text{mol}/\text{L}$; HCC827 细胞:50 $\mu\text{mol}/\text{L}$)处理 72 h,细胞用 4% 多聚甲醛固定 15 min,PBS 浸洗 3 次后,使用 0.5% Triton-X100 室温通透 20 min,PBS 洗涤后滴加正常山羊血清,室温封闭 30 min,取出封闭液,加入一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜后,PBST 洗涤 3 次,加入荧光二抗,室温孵育 1 h,PBST 洗涤后,滴加 DAPI/FITC/TRITC 避光孵育 5 min,PBST 洗涤后,使用含抗荧光淬灭剂的封片液封片,在荧光显微镜下观察细胞。使用 Echo revolve 软件来获取图像。

2.7 VRK1 mRNA 定量实验

细胞接种及给药操作同“2.6”项,Trizol 法从细胞中提取总 RNA,根据试剂盒说明进行逆转录;以

SYBR-Green 在 Step-One Plus RT-qPCR 系统中进行反应,反应条件设定为:94 $^{\circ}\text{C}$ 、60 s;98 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s;60 $^{\circ}\text{C}$ 、40 s;68 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,循环 25 次,随后 72 $^{\circ}\text{C}$ 下延伸 10 min。引物序列如下:VRK1, forward 5'-CTA CCAACGAGCTGCAAAACC-3', reverse 5'-TCA CTCCCAAAGCGATCCATTA-3'; GAPDH, forward 5'-ATCAGCAATGCCTCCTGCAC-3', reverse 5'-CGTCAAAGGTGGAGGAGTGG-3'。GAPDH 作为内参。结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算。

2.8 蛋白质免疫印迹

细胞接种及给药操作同“2.6”项,参照文献方法进行蛋白质印迹分析^[18],使用 P53BP1 或 VRK1 兔多克隆一抗和适当的 HBP 标记二抗检测蛋白表达。 β -actin 作为内参。

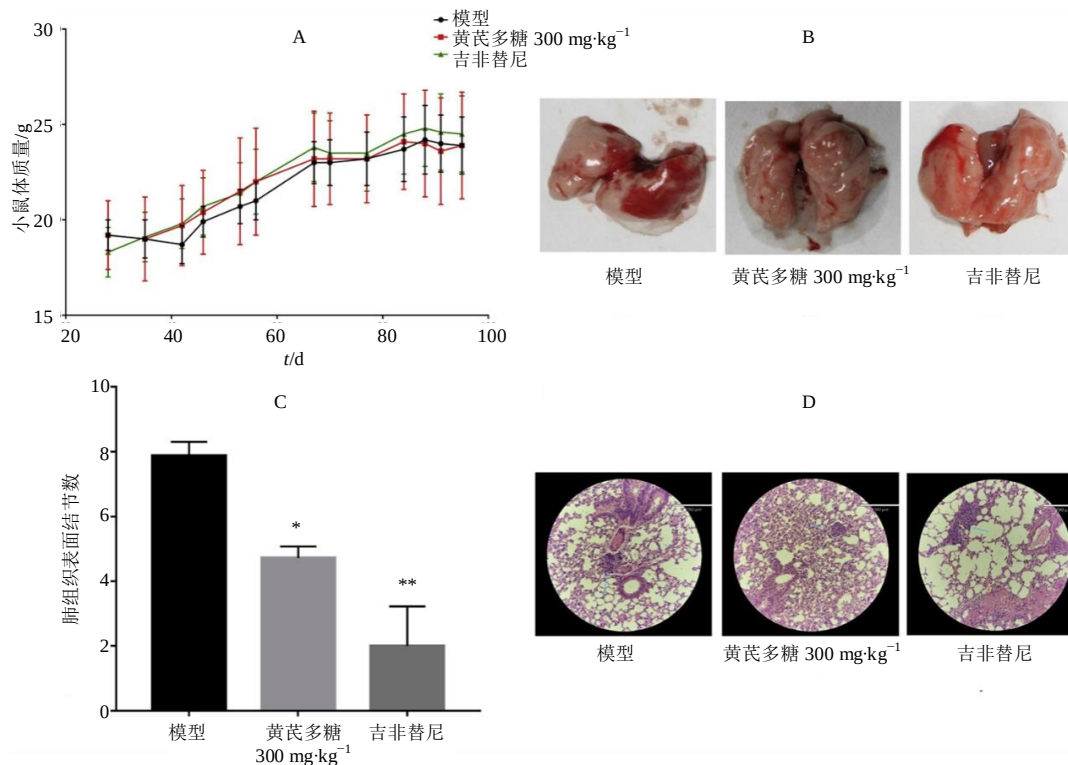
2.9 统计学分析

数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示,并通过 GraphPad Prism 7 进行统计分析。统计学分析通过 2-tailed student *t* 检验,one-way ANOVA 检验或 Newman-Keuls 检验进行。

3 结果

3.1 黄芪多糖对氨基甲酸酯诱导的 NSCLC 小鼠模型的影响

图 1A 结果表明,与模型和吉非替尼组比较,黄



A - 小鼠体质量变化; B - 肺组织的代表性图像; C - 肺组织中肺结节数目,与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; D - HE 染色结果
A - Changes in body weight of mice; B - Representative images of lung tissue; C - Average number of lung nodules in lung tissue, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group; D - H & E staining results

图 1 黄芪多糖对 NSCLC 模型小鼠的影响 ($\bar{x} \pm s, n=7$)

Fig. 1 Effect of Astragalus Polysaccharide on NSCLC mice model ($\bar{x} \pm s, n=7$)

芪多糖组的小鼠的平均体质量无显著性差异。解剖后每组的肺组织中结节数量存在差异(图1B),对肺组织表面结节进行计数发现(图1C),与模型组比较,黄芪多糖和吉非替尼组的结节数目显著减少($P < 0.05, 0.01$)。进一步的组织病理学检查表明(图1D),与黄芪多糖组比较,模型组和吉非替尼组中被癌症侵蚀的肺组织具有更多的肿瘤结节,并伴有更广泛严重的炎症、坏死和纤维化。同时黄芪多糖组的肿瘤结节呈近似圆形,与紧密排列的肿瘤结节边界清晰。而其他组的结节则呈现出不规则的结构,细胞排列松散,表明它们更具侵略性。

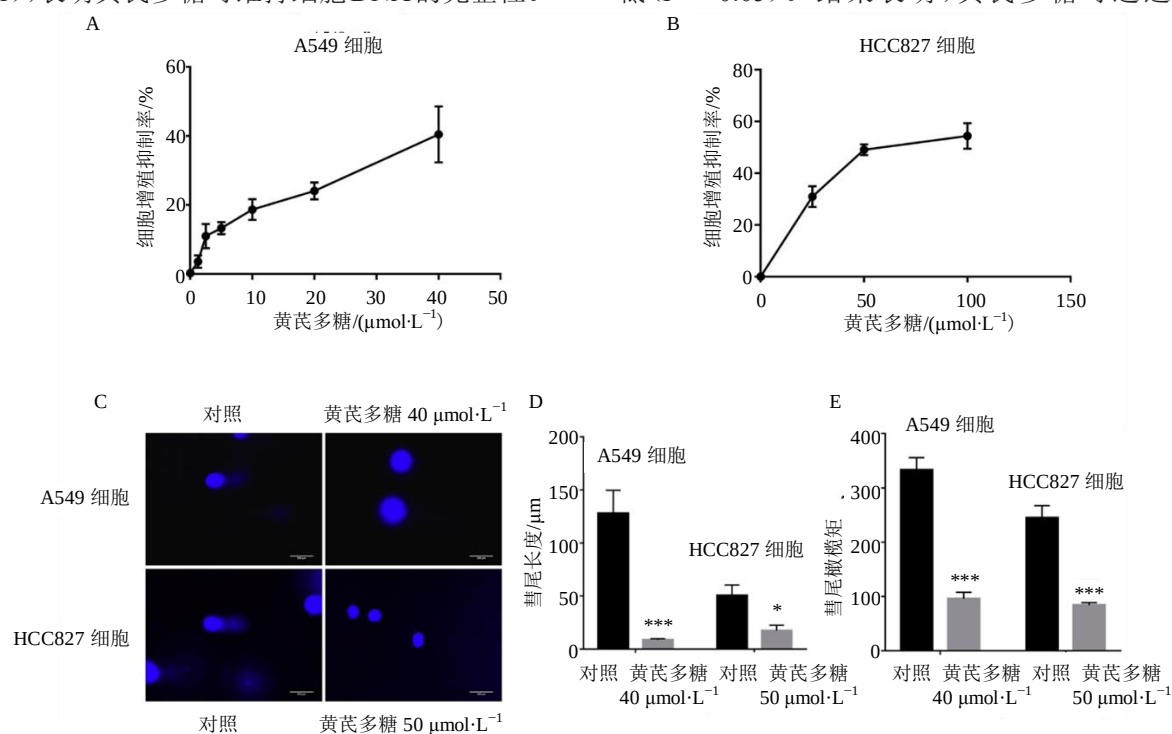
3.2 黄芪多糖对 NSCLC 细胞增殖和 DNA 完整性的影响

如图2A和2B所示,黄芪多糖呈剂量相关性地抑制 A549 和 HCC827 细胞增殖,表明黄芪多糖可有效抑制 NSCLC 细胞的生长。通过单细胞凝胶电泳测定(彗星实验)评估黄芪多糖处理后 A549 和 HCC827 细胞的 DNA 损伤。如图2C、D和E所示,与对照组比较,黄芪多糖组在 A549 和 HCC827 细胞中均显示出显著缩短的彗尾和橄榄矩($P < 0.05, 0.001$),表明黄芪多糖可维持细胞 DNA 的完整性。

3.3 黄芪多糖对 VRK1/P53BP1 信号通路的影响

如图3A、B所示,与对照组比较,黄芪多糖处理后,在 A549 细胞和 HCC827 细胞中,VRK1 mRNA 水平均显著增加($P < 0.05, 0.01$),VRK1 和 P53BP1 蛋白表达显著升高。通过免疫荧光染色进一步研究 VRK1 和 P53BP1 蛋白在细胞中的表达和定位,图3C显示,处理后 72 h,与对照组比较,黄芪多糖组中 VRK1 蛋白表达在 A549 和 HCC827 细胞核中显著降低,但在细胞的细胞质中显著增加。图3D显示,黄芪多糖组中磷酸化的 P53BP1 蛋白的表达显著高于对照组,并且黄芪多糖处理后磷酸化的 P53BP1 蛋白集中于细胞核中(图3E)。

通过 siRNA 干扰降低 HCC827 细胞中 VRK1 表达,明确黄芪多糖对 VRK1 的潜在影响。RT-qPCR 结果表明(图4A),与 NC 组比较,黄芪多糖可显著增加 VRK1 mRNA 表达水平($P < 0.01$);而 VRK1-KD 组和 VRK1-KD+黄芪多糖组之间 VRK1 mRNA 水平无显著差异。Western blotting 分析得出相似的结果(图4B)。CCK8 测定表明(图4C),VRK1 敲低后,黄芪多糖对 HCC827 细胞的抑制率显著降低($P < 0.05$)。结果表明,黄芪多糖可通过上调

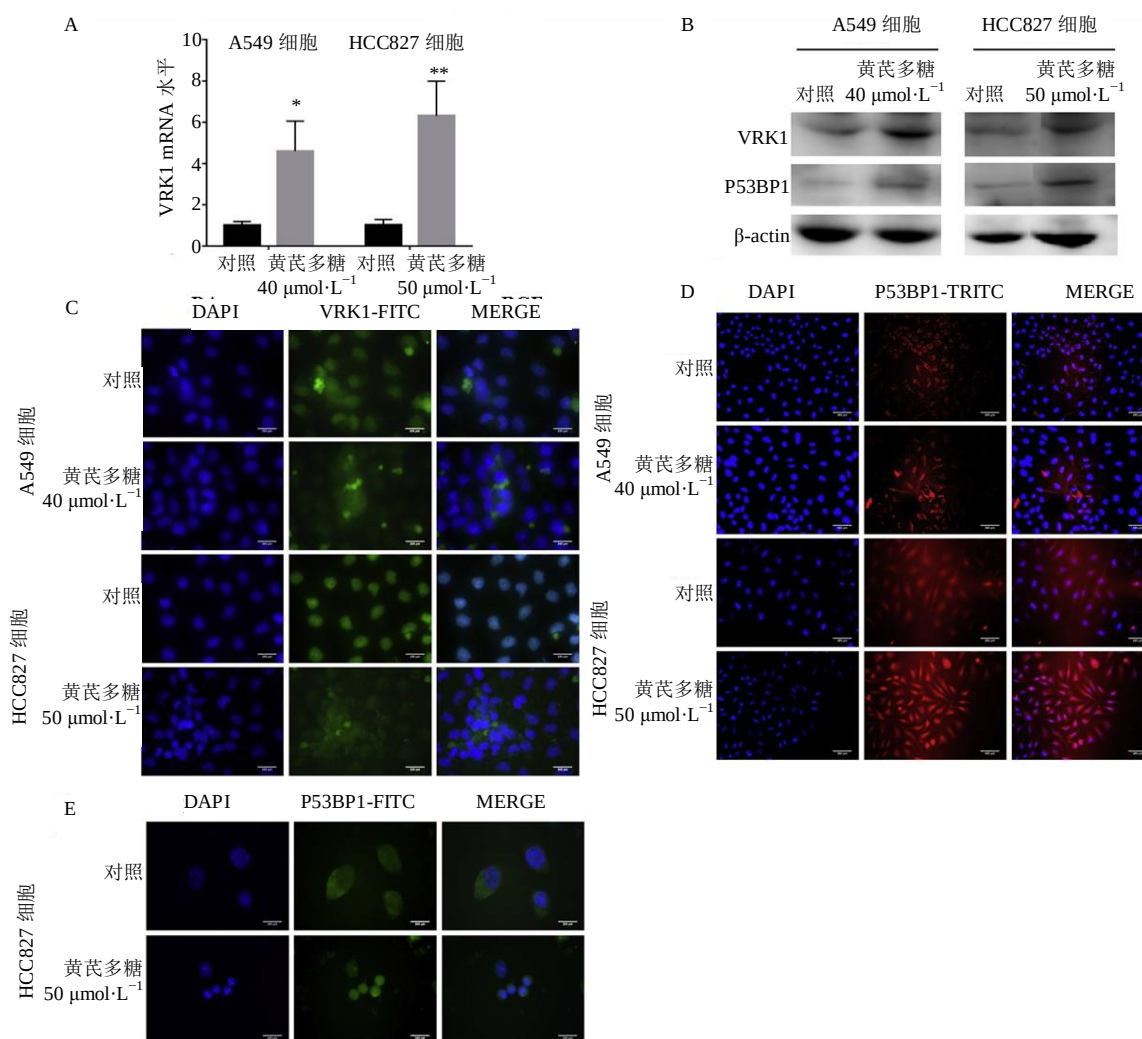


黄芪多糖对 A549(A)及 HCC827(B)细胞增殖抑制率的影响;黄芪多糖(A549细胞:40 μmol/L;HCC827细胞:50 μmol/L)处理 96 h 后彗星试验代表性图片(C)、彗尾长度(D)、彗尾橄榄矩(E),与对照组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ 。

Effect of *Astragalus* polysaccharide on A549 (A) and HCC827 (B) cell proliferation; Representative results of comet test (C), dcomet tail length (D); comet tail olive moment (E) after 96 h of *Astragalus* polysaccharide (A549 cell: 40 μmol/L;HCC827 cell: 50 μmol/L) treatment, * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs control group

图2 黄芪多糖对细胞增殖和 DNA 完整性的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effect of APS on cell proliferation and DNA stability ($\bar{x} \pm s, n=3$)



A-黄芪多糖对A549及HCC827细胞中VRK1 mRNA水平的影响,与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; B-western blotting检测VRK1和磷酸化P53BP1蛋白的表达; C-免疫荧光染色检测VRK1蛋白表达及定位; D、E-免疫荧光染色检测HCC827中磷酸化P53BP1蛋白的定位

A - RT-qPCR detection of VRK1 mRNA levels in A549 and HCC827 cells, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; B - Western blotting detection of VRK1 and phosphorylated P53BP1 protein expression; C - immunofluorescence staining to detect VRK1 protein expression and localization; D, E - immunofluorescence staining to detect location of phosphorylated P53BP1 protein in HCC827

图3 黄芪多糖对VRK1和P53BP1 mRNA和蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Effect of APS on VRK1 and P53BP1 mRNA and protein expression levels ($\bar{x} \pm s, n=3$)

VRK1表达抑制HCC827细胞的增殖。

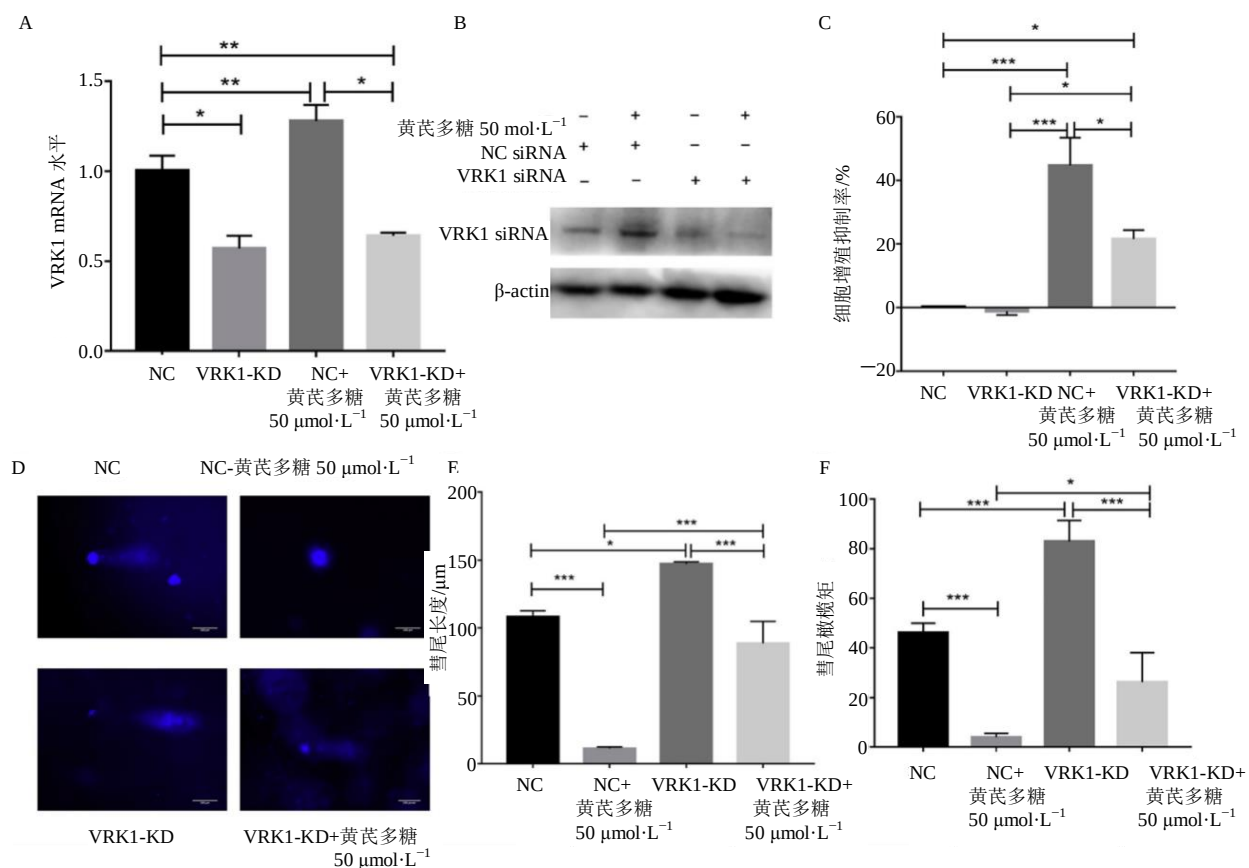
彗星实验(图4D、E、F)表明,与NC组和VRK1-KD组比较,黄芪多糖处理后,彗尾长度和彗星橄榄炬均显著减小($P < 0.001$)。与VRK1-KD+黄芪多糖组比较,NC+黄芪多糖组的彗尾长度($P < 0.001$)和彗星橄榄炬($P < 0.05$)均显著减小,进一步证实黄芪多糖可保护DNA完整性,而VRK1敲低后作用下降。

为了研究VRK1蛋白表达和细胞内定位的动态变化,在黄芪多糖处理24、48和72 h后,进行免疫荧光染色以追踪HCC827细胞中的VRK1蛋白。如图5所示,黄芪多糖在处理24 h显著增强VRK1蛋白的表达。48和72 h后,VRK1蛋白表达的增加更

为显著。通过FITC标记VRK1蛋白和DAPI-标记细胞核共定位,发现对照组中VRK1蛋白主要在细胞核中表达,而黄芪多糖组在24 h时,细胞质中VRK1的表达显著增加,48 h时,VRK1蛋白在细胞核中的表达显著增加,但72 h时在细胞质中高表达。结果表明黄芪多糖不仅可改变VRK1蛋白的表达数量,同时可改变其位置。此外,VRK1 siRNA转染48 h后,VRK1蛋白的表达降低了约60%。黄芪多糖通过增加VRK1蛋白表达来修复DNA的能力可被VRK1敲除所阻断,表明黄芪多糖的作用确实是由VRK1介导的。

4 讨论

NSCLC的发生是一个复杂的过程,涉及多个因



A - RT-qPCR检测VRK1 mRNA表达水平; B - western blotting检测VRK1蛋白表达水平; C - CCK8法检测黄芪多糖对有无VRK1细胞的抗增殖作用; D - 彗星试验的代表性图像; E - 彗星长度; F - 彗星橄榄矩

A - RT-qPCR was used to detect VRK1 mRNA expression in VRK1 siRNA or negative control siRNA (NC) -transfected HCC827; B - Western blotting was used to detect VRK1 protein expression; C - CCK8 was used to detect antiproliferation activity of *Astragalus polysaccharides* in the cells with the presence or absence of VRK1; D - Representative images of comet assays showing effects on DNA; E - Comet tail length; F - comet olive moment

图4 黄芪多糖对VRK1-KD的HCC827细胞的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Effect of APS on VRK1-KD HCC827 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

素、阶段和步骤,其主要致病机制是由于各种因素所致的原癌基因的激活或抗癌基因的失活,包括DNA损伤修复能力受损。由DNA损伤引起的压力的细胞反应对于维持遗传物质的稳定性、防止基因突变和维持细胞功能尤为重要^[9]。环境因素引起的DNA损伤是正常细胞转化为癌细胞的关键因素之一,而细胞对DNA损伤的反应可预防肿瘤发生。大量研究表明,DNA修复系统的过度激活可以促进癌细胞的侵袭和转移^[19-20]。因此,DNA损伤修复活性在肿瘤中具有双重作用。由于植物来源的天然产物可提供大量候选药物,因此一直是人们研究的焦点。而且,大多数抗癌中药不会像化学治疗药物一样引发DNA损伤或致癌作用。黄芪作为传统中草药,具益气固表、利水消肿等功效,其所包含的黄芪多糖成分具有多重活性,包括免疫调节、抗氧化、抗肿瘤等作用,已有研究表明,黄芪多糖具有抗非小细胞肺癌作用,然而其在非小细胞肺癌的DNA损伤

和修复活性中的关系尚不清楚。本研究通过一系列实验明确黄芪多糖可增强DNA损伤修复以保护DNA完整性。

DNA损伤反应受VRK1/P53BP1信号转导途径调控^[21],VRK1参与DNA损伤后的早期细胞反应,它可以激活P53BP1来微调DNA的检测和修复过程。同时有研究表明VRK1参与细胞分裂,并在细胞周期G₀-G₁/S阶段起着重要作用,VRK1表达降低可抑制细胞周期进程^[22]。此外,VRK1可调节染色体浓度和DNA损伤反应,与正常细胞相比,VRK1与肺腺癌细胞基因网络中的有丝分裂基因显著相关^[23]。VRK1的底物包括酪蛋白、组蛋白、转录因子和端粒维持蛋白,VRK1还可与DNA修复相关蛋白(如P53BP1和P53)形成稳定的复合物,进而在细胞核中包围所有DNA^[24]。因此,由DNA损伤引起的染色质局部变形可能被VRK1捕获。本研究通过体内和体外实验,探讨黄芪多糖在非小细胞肺癌发

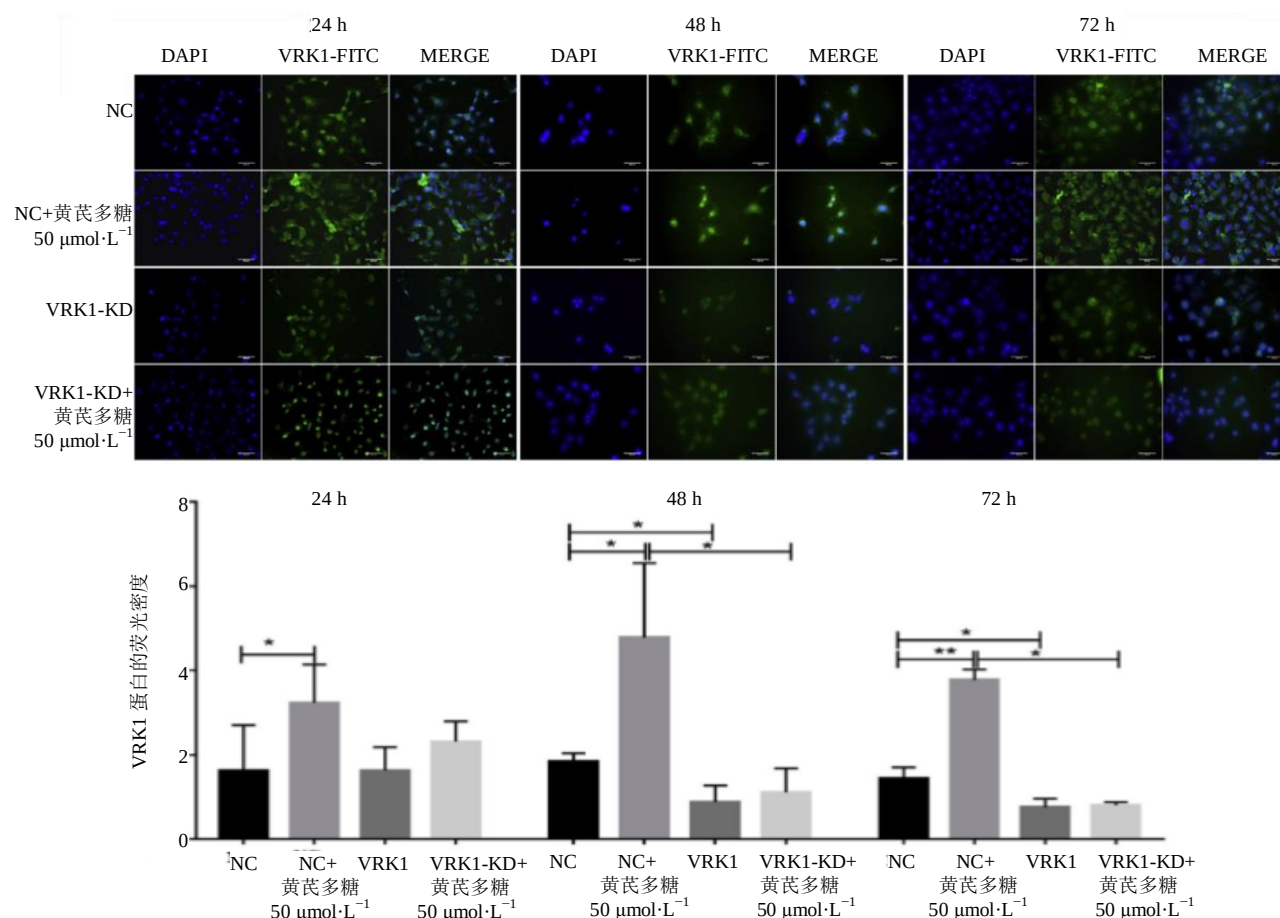


图5 免疫荧光染色检测黄芪多糖处理24、48、72 h后,VRK1蛋白在HCC827细胞中的表达和定位($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Immunofluorescence staining to detect expression and localization of VRK1 protein in HCC827 cells after 24/48/ 72 h of APS treatment ($\bar{x} \pm s, n=3$)

生和发展过程中对DNA损伤和修复活性的调节作用和机制。对肿瘤的发生率和病理学特征的分析表明,黄芪多糖可以减少DNA损伤并抑制肿瘤细胞的侵袭性,抑制肿瘤进展,并使用专门评估DNA损伤的彗星试验证实了这一现象。尽管许多化学治疗药物通过破坏DNA来杀死和抑制肿瘤细胞,但是通过增加特异性DNA保护并不会促进肿瘤的发展,相反,其可抑制肿瘤活性,并减缓肿瘤的发展和侵袭性。黄芪多糖可显著增加VRK1表达,这可能是黄芪多糖对DNA损伤修复的影响的关键因素。P53bp1作为下游蛋白,与VRK1介导的DNA损伤和修复过程相关,Western blotting和免疫荧光测定验证黄芪多糖可上调该蛋白表达,表明黄芪多糖通过上调VRK1的表达和P53BP1灶的形成来促进DNA修复,并通过细胞中VRK1敲低实验进一步验证上述结果。

VRK1是一种可以磷酸化其他蛋白及自身的丝氨酸激酶,是一种涉及多种过程和信号通路的上游蛋白质。为防止VRK1过度激活,其下游蛋白P53

被依赖于P53的DRAM^[25](与死亡相关的自噬调节剂,可促进VRK1与Beclin1一起从核向溶酶体的转运)介导的自噬激活诱导或抑制。因此,可以通过类似的负反馈方法自动下调VRK1的表达,并且可以根据其在细胞中定位进行评估。VRK1蛋白表达和细胞内定位的动态变化可能反映出黄芪多糖调控的下游过程的状态。首先,黄芪多糖上调了VRK1的表达,特别是在RNA水平(转录)和胞浆内蛋白水平。随后,VRK1蛋白被转运到细胞核以激活下游蛋白,例如P53BP1。最终,下游级联蛋白将VRK1转运回细胞质进行降解。通过免疫荧光确定VRK1的核易位,初步证实了以下假设:VRK1蛋白可以以自噬小体的形式从细胞核易位,仍需进一步的研究来验证这一假设。

黄芪多糖通过在体内和体外激活VRK1/P53BP1信号转导途径,可显著抑制NSCLC细胞的增殖并保护DNA完整性,为黄芪多糖在NSCLC中的作用提供更深入的理论依据,并为开发新型抗肿瘤药物提供基础。

参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2019 [J]. CA: A Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34.
- [2] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [3] Lemjabbar-Alaoui H, Hassan O U, Yang Y W, et al. Lung cancer: Biology and treatment options [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1856(2): 189-210.
- [4] Han S Y, Ding H R, Zhao W, et al. Enhancement of gefitinib-induced growth inhibition by *Marsdenia tenacissima* extract in non-small cell lung cancer cells expressing wild or mutant EGFR [J]. BMC Complementary Altern Med, 2014, 14(1): 165.
- [5] Ettinger D S, Aisner D L, Wood D E, et al. NCCN guidelines insights: non-small cell lung cancer, version 5.2018 [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2018, 16(7): 807-821.
- [6] Nagano T, Tachihara M, Nishimura Y. Mechanism of resistance to epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors and a potential treatment strategy [J]. Cells, 2018, 7(11): E212.
- [7] Yu H A, Arcila M E, Rekhtman N, et al. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers [J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(8): 2240-2247.
- [8] Keklikoglou I, Cianciaruso C, Güç E, et al. Chemotherapy elicits pro-metastatic extracellular vesicles in breast cancer models [J]. Nat Cell Biol, 2019, 21(2): 190-202.
- [9] Karagiannis G S, Condeelis J S, Oktay M H. Chemotherapy-induced metastasis: mechanisms and translational opportunities [J]. Clin Exp Metastasis, 2018, 35(4): 269-284.
- [10] Nikolova T, Roos W P, Krämer O H, et al. Chloroethylating nitrosoureas in cancer therapy: DNA damage, repair and cell death signaling [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2017, 1868(1): 29-39.
- [11] Lv J, Zhang Y H, Tian Z Q, et al. *Astragalus* polysaccharides protect against dextran sulfate sodium-induced colitis by inhibiting NF- κ B activation [J]. Int J Biol Macromol, 2017, 98: 723-729.
- [12] Wei W, Xiao H T, Bao W R, et al. TLR-4 may mediate signaling pathways of *Astragalus* polysaccharide RAP induced cytokine expression of RAW264. 7 cells [J]. J ethnopharmacol, 2016, 179: 243-252.
- [13] Wu C Y, Ke Y, Zeng Y F, et al. Anticancer activity of *Astragalus* polysaccharide in human non-small cell lung cancer cells [J]. Cancer Cell Int, 2017, 17: 115.
- [14] 张莹, 贾英杰, 李小江, 等. 注射用黄芪多糖联合CIK细胞治疗中晚期气虚型非小细胞肺癌的临床观察 [J]. 中草药, 2018, 49(7): 1647-1651.
- [15] Du G J, Sun T, Zhang Y P, et al. The mitochondrial dysfunction plays an important role in urethane-induced lung carcinogenesis [J]. Eur J Pharmacol, 2013, 715(1/2/3): 395-404.
- [16] Jiang Y, Yang N, Zhang H F, et al. Enhanced *in vivo* antitumor efficacy of dual-functional peptide-modified docetaxel nanoparticles through tumor targeting and Hsp90 inhibition [J]. J Control Release, 2016, 221: 26-36.
- [17] Nowsheen S, Xia F, Yang E S. Assaying DNA damage in hippocampal neurons using the comet assay [J]. JoVE, 2012(70): e50049.
- [18] Jiao Y N, Wu L N, Xue D, et al. *Marsdenia tenacissima* extract induces apoptosis and suppresses autophagy through ERK activation in lung cancer cells [J]. Cancer Cell Int, 2018, 18: 149.
- [19] Wang Z R, Kang W T, You Y H, et al. USP7: novel drug target in cancer therapy [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 427.
- [20] Rachmadi L, Siregar N C, Kanoko M, et al. Role of cancer stem cell, apoptotic factor, DNA repair, and telomerase toward radiation therapy response in stage IIIB cervical cancer [J]. Oman Med J, 2019, 34(3): 224-230.
- [21] Sanz-García M, Monsalve D M, Sevilla A, et al. Vaccinia-related kinase 1 (VRK1) is an upstream nucleosomal kinase required for the assembly of 53BP1 foci in response to ionizing radiation-induced DNA damage [J]. J Biol Chem, 2012, 287(28): 23757-23768.
- [22] Cantarero L, Sanz-García M, Vinograd-Blyk H, et al. VRK1 regulates Cajal body dynamics and protects coilin from proteasomal degradation in cell cycle [J]. Sci Rep, 2015, 5: 10543.
- [23] Kim I J, Quigley D, To M D, et al. Rewiring of human lung cell lineage and mitotic networks in lung adenocarcinomas [J]. Nat Commun, 2013, 4: 1701.
- [24] Valbuena A, Castro-Obregón S, Lazo P A. Downregulation of VRK1 by p53 in response to DNA damage is mediated by the autophagic pathway [J]. PLoS One, 2011, 6(2): e17320.
- [25] Campillo-Marcos I, Lazo P A. Implication of the VRK1 chromatin kinase in the signaling responses to DNA damage: a therapeutic target ? [J]. Cell Mol Life Sci, 2018, 75(13): 2375-2388.