

基于ERK/mTOR通路探讨蔓性千斤拔素A对非小细胞肺癌细胞自噬的影响

徐志鹏^{1,2}, 唐云丽^{1,2}, 杨世林^{1,2}, 高红伟^{1,2*}, 苑仁玮坤^{1,2*}

1. 广西中医药大学 药学院, 广西 南宁 530020

2. 广西优势中成药与民族药开发工程技术中心, 广西 南宁 530020

摘要: **目的** 探讨蔓性千斤拔素A通过细胞外调节蛋白激酶(ERK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路对非小细胞肺癌细胞自噬的影响。**方法** 将A549细胞分为对照组及蔓性千斤拔素A低、中、高浓度(20、25、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组或对照组、蔓性千斤拔素A 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、SCH772984 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +蔓性千斤拔素A 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和SCH772984 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组, 对照组细胞培养液为含1%胎牛血清的RMPI 1640培养基, 其余各组分别加入蔓性千斤拔素A或SCH772984(预处理细胞1 h)使达到相应浓度, 连续培养12 h。MTT法检测细胞活力; 细胞集落形成实验检测细胞集落形成的情况; 细胞自噬染色检测试剂盒检测细胞内自噬的情况; 免疫荧光检测细胞内LC3B蛋白表达水平的变化; Western blotting实验检测细胞内磷酸化的细胞外调节蛋白激酶(p-ERK)、磷酸化的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR)、自噬相关蛋白Beclin 1(Beclin 1)、整合体1(P62)蛋白表达水平的变化。**结果** 与对照组比较, MTT法检测结果显示各浓度(20、25、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)蔓性千斤拔素A能够显著抑制A549细胞活力($P<0.05$ 、 0.001), SCH772984(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)能够显著逆转蔓性千斤拔素A诱导的A549细胞死亡($P<0.01$); 细胞集落形成实验显示20、25、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔓性千斤拔素A能显著抑制A549细胞集落的形成($P<0.001$); 细胞自噬染色检测试剂盒结果显示20、25、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔓性千斤拔素A能显著抑制A549细胞自噬, SCH772984 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 能够显著逆转蔓性千斤拔素A介导的A549细胞自噬抑制; 免疫荧光结果显示蔓性千斤拔素A 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 能够显著减弱LC3B的荧光, SCH772984 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 能够显著逆转蔓性千斤拔素A导致的LC3B荧光减弱; Western blotting实验结果表明, 20、25、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔓性千斤拔素A能够使A549细胞内p-ERK、p-mTOR、P62蛋白表达水平显著升高及Beclin 1蛋白表达水平显著降低($P<0.001$), SCH772984 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 能够显著逆转蔓性千斤拔素A导致的A549细胞内p-ERK、p-mTOR、P62蛋白表达水平升高及Beclin 1蛋白降低($P<0.001$)。**结论** 蔓性千斤拔素A可通过ERK/mTOR通路抑制非小细胞肺癌细胞自噬并导致细胞死亡。

关键词: 蔓性千斤拔素A; 蔓性千斤拔; ERK/mTOR信号通路; 非小细胞肺癌; 自噬

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2024)09-2090-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.09.017

Effect of flemiphilippinin A on autophagy in non-small cell lung cancer cells based on ERK/mTOR pathway

XU Zhipeng^{1,2}, TANG Yunli^{1,2}, YANG Shilin^{1,2}, GAO Hongwei^{1,2}, YUAN Renyikun^{1,2}

1. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530020, China

2. Guangxi Engineering Technology Center for Development of Superior Chinese Patent Medicine and Ethnic Medicine, Nanning 530020, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of flemiphilippinin A on autophagy in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells through the ERK/mTOR signaling pathway. **Methods** A549 cells were divided into control, flemiphilippinin A low, medium and

收稿日期: 2024-05-03

基金项目: 广西中医药大学2022年引进博士科研启动基金项目(2022BS008); 2023年度广西高校中青年教师科研基础能力提升项目(2023KY0303); 广西中医药大学-柳药集团青年科技创新能力提升计划项目(YXY0000305); 广西研究生教育创新计划项目(YCSW2023402)

第一作者: 徐志鹏(1997—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药药理学。E-mail: elwin0526@163.com

***共同通信作者:** 高红伟, 男, 博士, 研究员, 主要研究方向为中药抗炎与免疫药理学及肿瘤微环境。E-mail: gaohongwei06@126.com
苑仁玮坤, 女, 博士, 副研究员, 主要研究方向为中药抗炎与免疫药理学及肿瘤微环境。E-mail: yryk0808@163.com

high concentration (20, 25 and 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) groups or control, flemiphipilipinin A 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, SCH772984 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + flemiphipilipinin A 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and SCH772984 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ concentration groups. The cells in the control group were cultured in RMPI 1640 medium containing 1% fetal bovine serum, and the cells in the other groups were pretreated with flemiphipilipinin A or SCH772984 for 1 h to achieve the corresponding concentration, and the cells were continuously cultured for 12 h. Cell viability was detected by the MTT assay. Cell colony formation assay was used to detect cell colony formation. Autophagy staining detection kit was used to detect autophagy in cells. The expression of the LC3B protein was detected by immunofluorescence. The protein expression levels of p-ERK, p-mTOR, Beclin 1, and P62 were detected by Western blotting. **Results** The results of MTT assay showed that each concentration of flemiphipilipinin A could significantly inhibit the viability of A549 cells ($P < 0.05, 0.001$). SCH772984 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) could reverse the inhibition of flemiphipilipinin A-induced proliferation of A549 cells ($P < 0.01$). The cell colony formation assay showed that flemiphipilipinin A (20, 25, and 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) could inhibit the colony formation of A549 cells ($P < 0.01$). The results of the autophagy staining assay kit showed that flemiphipilipinin A (20, 25, and 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) could inhibit autophagy in A549 cells, and SCH772984 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ could reverse the flemiphipilipinin A-mediated autophagy inhibition in A549 cells. Immunofluorescence results showed that the fluorescence of LC3B induced by flemiphipilipinin A (30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) was decreased, and SCH772984 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) could reverse the decrease of LC3B fluorescence induced by flemiphipilipinin A. The results of Western blotting showed that the expression levels of p-ERK, p-mTOR, and P62 proteins in A549 cells were significantly increased, and the expression level of Beclin 1 protein was significantly decreased of flemiphipilipinin A (20, 25, and 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) ($P < 0.001$). 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SCH772984 could significantly reverse the increase of p-ERK, p-mTOR, and P62 protein expression levels and the decrease of Beclin 1 protein in A549 cells induced by flemiphipilipinin A ($P < 0.001$). **Conclusion** Flemiphipilipinin A can inhibit autophagy and cause cell death in non-small-cell lung cancer cells through the ERK/mTOR pathway.

Key words: flemiphipilipinin A; *Moghania philippinensis* (Merr. et Rolfe) Li.; ERK/mTOR signaling pathway; non-small cell lung cancer; autophagy

肺癌是一种恶性异质性肿瘤,是全球癌症相关死亡的主要原因^[1]。非小细胞肺癌(NSCLC)是最常见的肺癌类型,占有肺癌类型的85%~90%^[2]。目前,NSCLC的临床治疗手段主要包括手术、放疗、化疗、免疫治疗和靶向治疗等^[3],尽管在NSCLC的治疗方面取得了很大进展,但复发和转移率仍高达30%~40%,5年总生存率低于15%^[4]。因此,寻找和开发治疗NSCLC的新型治疗药物和方法具有十分重要的意义。

近年来,传统中医药具有增强机体免疫、多靶点等优势,成为治疗NSCLC的热点之一。民族特色药千斤拔来源于豆科植物蔓性千斤拔 *Moghania philippinensis* (Merr. et Rolfe) Li.、大叶千斤拔 *M. macrophylla* (Willd.) O. Kuntze 或绣毛千斤拔 *M. ferruginea* (Wall. ex Benth.) Li. 的根,其味甘、微涩,性温,归肝、肾经,具有壮腰健肾、祛风利湿等功效^[5]。研究表明,千斤拔具有良好的抗肿瘤活性^[6],能够显著抑制人肺腺癌细胞(A549)^[7]、人乳腺癌细胞(MCF-7)等增殖^[8],其发挥抗肿瘤作用的主要活性成分为黄酮类化合物^[9],其中蔓性千斤拔素A是从蔓性千斤拔的根中提取的含量较为丰富的黄酮类化合物^[9],具有抗肿瘤、抗氧化等药理活性^[10]。研究表明,蔓性千斤拔素A对人肝癌细胞(BEL-402)、人肺腺癌细胞(A549)等多种肿瘤细胞活性同样具

有显著的抑制作用^[9],然而其抗肿瘤的作用机制尚未阐明。

自噬是细胞存活和适应环境变化的重要机制,异常的自噬可能导致细胞死亡、细胞功能受损、细胞内积聚物的堆积和炎症反应的增强,进而对细胞产生损害^[11]。现有研究表明,细胞外调节蛋白激酶(ERK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路与细胞自噬有着密切的关系^[12]。因此,本研究拟基于ERK/mTOR通路探讨蔓性千斤拔素A对非小细胞肺癌细胞自噬的影响,旨在初步探索蔓性千斤拔素A抗肿瘤的作用机制,为民族药千斤拔的开发利用提供基础理论支撑。

1 材料

1.1 细胞株

人非小细胞肺癌 A549 细胞购自于中国科学院上海细胞库。

1.2 药品与主要试剂

蔓性千斤拔素A(成都普瑞法科技开发有限公司, CAS: 140366-64-9, 批号: PRF21053141, 质量分数: 98.1%); 噻唑蓝(MTT, Sigma Aldrich 公司, 批号: M2128); ERK 一抗(批号: AF6248)、 β -actin 一抗(批号: 5402802), AFFINIT 公司; p-ERK 一抗(批号: 4370S)、mTOR 一抗(批号: 2983S)、p-mTOR 一抗(批号: 5536S)、Beclin-1 一抗(批号: 3495S)、P62

一抗(批号:39749S)、LC3B一抗(批号:3868S)、二抗(山羊抗兔)IgG辣根(批号:7074P2),CST公司;Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG(proteintech 公司,批号:SA000013-2);细胞自噬染色检测试剂盒(MDC 法)(碧云天公司,批号:C3018S);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(Thermo Fisher Scientific 公司,批号:A55864);Omni-ECL 超灵敏化学发光检测试剂盒(雅酶生物公司,批号:SQ201);Western blotting 及 IP 细胞裂解液(碧云天公司,批号:P0013);二甲基亚砜(DMSO,麦克林公司,批号:D821822);Hoechst33342(Sigma Aldrich 公司,批号:14533);SCH772984(Selleck 公司,批号:S7101)。

1.3 实验仪器

BX53 型荧光正置显微镜(日本 Olympus 公司);BSC-1004 II A2 型生物安全柜(瑞士 ESCO BIOTECH 公司);BB-15 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo Fisher 公司);MLS-3781L-PC 型高压蒸汽灭菌锅(日本 Panasonic 公司);HH6-型数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司);ME204E 型电子天平(METTLER TOLEDO 公司);4 °C、-20 °C 低温冰箱(日本 Panasonic 公司);-80 °C 超低温冰箱(澳柯玛公司);SYNERGYH1 型多功能微孔板检测仪、化学发光凝胶成像系统、PowerPac HC 蛋白电泳仪、转膜仪,美国 Bio-Tek 公司;BLL-10B 型恒温金属浴(上海比朗仪器公司);IMS-85 型自动雪花制冰机(常熟学科公司);PS-M3D 型多功能三维摇床(Grant 公司);XW-80A 型涡旋机(海门其林贝尔公司);5430R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);Milli-Q IQ 7000 超纯水系统(美国 Millipore 公司);SB-800DTD 型超声波清洗机(宁波新芝公司);SP5II 型激光扫描共聚焦显微镜(美国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 细胞的培养

人非小细胞肺癌 A549 细胞培养于 RPMI-1640 完全培养基内(含 10% 胎牛血清、100 U·mL⁻¹青霉素和 0.1 mg·mL⁻¹链霉素),置于 37 °C 含 5% CO₂ 的培养箱中,隔天换液。

2.2 细胞的分组处理

将 A549 细胞分为对照组、蔓性千斤拔素 A 低、中、高浓度(20、25、30 μmol·L⁻¹)组或对照组、蔓性千斤拔素 A 30 μmol·L⁻¹、SCH772984 10 μmol·L⁻¹+蔓性千斤拔素 A 30 μmol·L⁻¹和 SCH772984 10 μmol·L⁻¹浓度组,其中对照组细胞培养液为含 1% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,其余各组分别加入蔓性千斤拔

素 A 或 SCH772984(预处理细胞 1 h)使达到相应浓度,连续培养 12 h。

2.3 MTT 法检测 A549 细胞增殖活性

取对数期生长状态良好的 A549 细胞接种于 96 孔板中,每孔 5×10³ 个,24 h 培养贴壁后,分组加药继续培养 12 h。弃去培养基,每孔加入 100 μL MTT 试剂,避光孵育 4 h 后,1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min。弃去上清,每孔加入 100 μL DMSO 溶液,摇晃 10 min 使甲臞充分溶解。酶标仪测定各孔 490 nm 波长处吸光度(A)值,计算细胞存活率。

$$\text{存活率} = A_{\text{对照}} / A_{\text{药物}}$$

2.4 细胞集落形成实验检测细胞增殖能力

取对数期生长状态良好的 A549 细胞接种于 6 孔板中,每孔 1×10³ 个,3 d 更换一次培养基,待肉眼可见集落形成时,按“2.2”项分组给药,继续培养 24 h。弃去培养基,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 1~2 次,4% 多聚甲醛固定 20 min,0.1% 结晶紫染色 10 min,拍照,统计。

2.5 Western blotting 实验检测细胞内 ERK/mTOR 信号通路及自噬相关蛋白的表达水平

取对数期生长状态良好的 A549 细胞接种于 6 cm 细胞培养皿中,每皿 6×10⁴ 个,24 h 培养贴壁后,按“2.2”项分组给药继续培养 12 h 后,收集细胞提取蛋白,检测蛋白浓度,蛋白变性,进行蛋白凝胶电泳,转膜,封闭,一抗 4 °C 孵育过夜,二抗常温孵育 2 h,最后通过凝胶成像系统检测,进行条带灰度值统计分析。

2.6 细胞自噬染色检测试剂盒检测细胞内自噬水平

细胞按“2.2”项给药处理后,弃去培养基,每孔加入 1 mL MDC 染色液,37 °C 避光孵育 30 min。弃去 MDC 染色液,使用 Assay Buffer 清洗 1~2 次。荧光显微镜下用紫外激发光激发,观察绿色荧光,拍照。

2.7 免疫荧光检测细胞内 LC3B 蛋白的表达水平

接种 A549 细胞于共聚焦细胞培养皿内,培养 24 h 贴壁后,按“2.2”项药物处理 12 h。弃去培养基,加入 4% 多聚甲醛常温固定 20 min。弃液,加入 0.2% Trion-100 溶液常温破膜 15 min。弃液,加入 5% 牛血清白蛋白(BSA)溶液常温封闭 30 min。弃液,加入一抗 4 °C 孵育过夜。弃液,加入二抗常温避光孵育 2 h。弃液,加入 Hoechst 33342 稀释液常温孵育 10 min。加入 1 mL PBS 并于激光共聚焦显微镜观察拍照。

2.8 统计学分析

通过 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析。所有实验至少重复 3 次以上,通过 one-way ANOVA 和 Dunnett's 多重比较对组间差异显著性进行分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

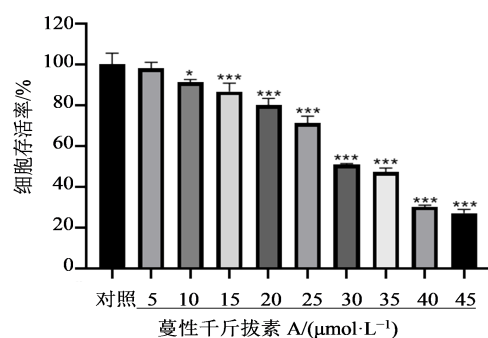
3 结果

3.1 蔓性千斤拔素A对A549细胞活力的影响

如图1 MTT 结果所示,与对照组比较,各浓度的蔓性千斤拔素A干预12 h后,均能显著抑制A549细胞存活率($P<0.05$ 、 0.001)。结果表明,蔓性千斤拔素A能够浓度相关性显著抑制A549细胞的增殖。

3.2 蔓性千斤拔素A对A549细胞集落形成的影响

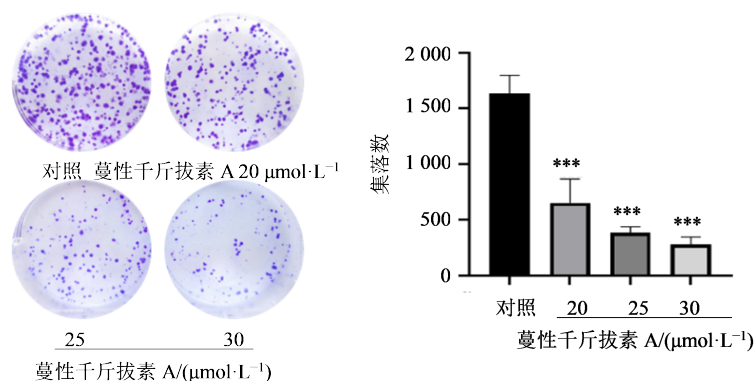
如图2细胞集落形成实验结果显示,选择不同



与对照组比较: * $P<0.05$ *** $P<0.001$ 。

* $P<0.05$ *** $P<0.001$ vs control group.

图1 蔓性千斤拔素A对A549细胞活力的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)
Fig. 1 Effect of flempilipin A on A549 cell viability ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)



与对照组比较: *** $P<0.001$ 。

*** $P<0.001$ vs control group.

图2 蔓性千斤拔素A对A549细胞集落形成的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)
Fig. 2 Effect of flempilipin A on colony formation of A549 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

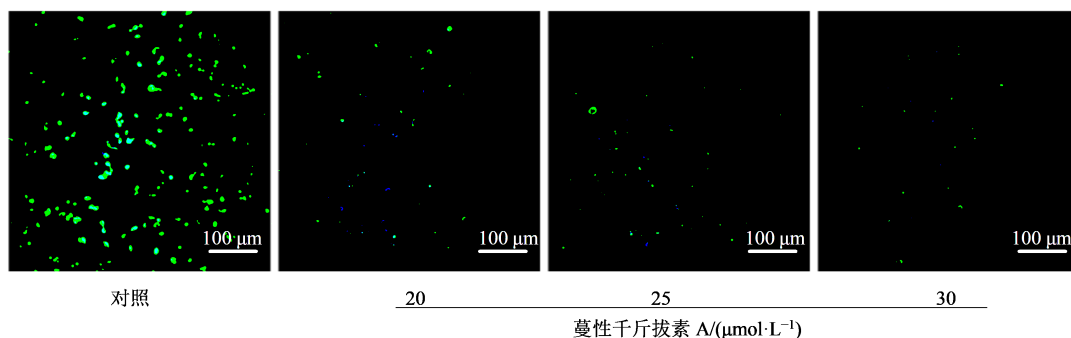


图3 蔓性千斤拔素A对A549细胞自噬的影响

Fig. 3 Effect of flempilipin A on autophagy in A549 cells

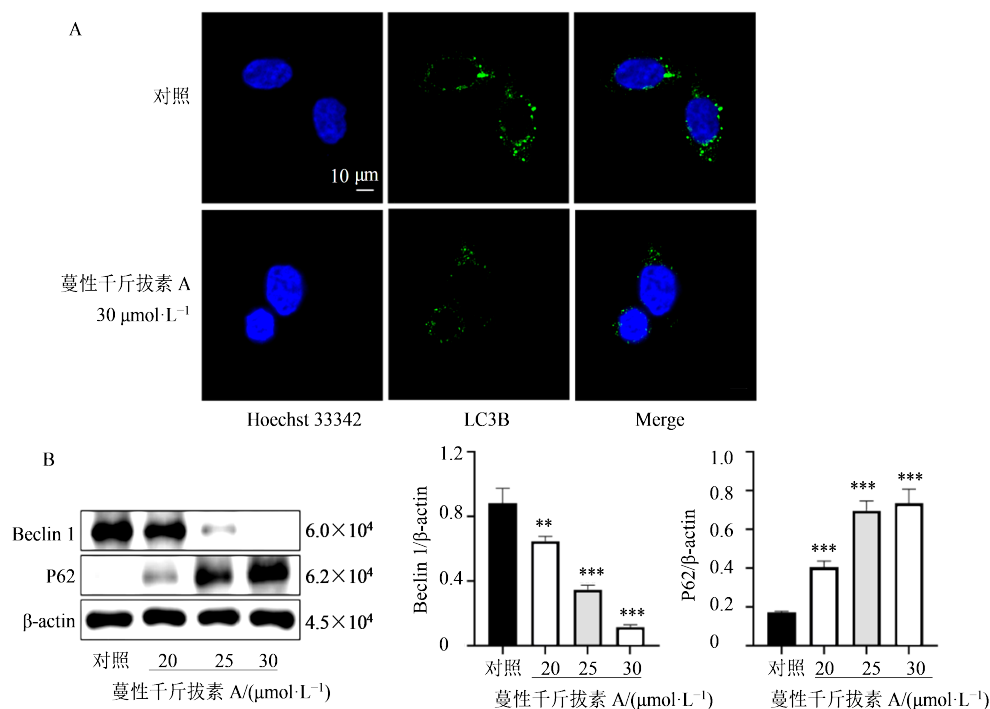
浓度(20、25、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)蔓性千斤拔素A干预A549细胞24 h后,与对照组比较,A549细胞集落数均显著减少($P<0.001$)。细胞集落形成实验进一步说明蔓性千斤拔素A呈浓度相关性抑制A549细胞的增殖活性。

3.3 蔓性千斤拔素A对A549细胞自噬的影响

如图3所示,使用细胞自噬染色检测试剂盒染色,紫外激发光观察,在给予20、25、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的蔓性千斤拔素A 12 h后,与对照组比较,蔓性千斤拔素A在各浓度下自噬小体荧光强度(绿色荧光)均显著减弱,表明蔓性千斤拔素A对A549细胞自噬呈抑制作用。

3.4 蔓性千斤拔素A对自噬相关蛋白表达的影响

自噬标志物LC3B免疫荧光如图4-A所示,与对照组相比,蔓性千斤拔素A 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 干预A549细胞12 h后,LC3B荧光强度显著降低。Western blotting法检测蔓性千斤拔素A对自噬标志物P62、Beclin 1蛋白表达的影响(见图4-B),与对照组比较,蔓性千斤拔素A梯度浓度(20、25、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)干预均能显著降低Beclin 1蛋白表达水平,使P62蛋白表达水平显著升高($P<0.01$ 、 0.001)。



与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; A-免疫荧光实验; B-Western blotting 实验。

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; A-immunofluorescence test; B-Western blotting test.

图 4 蔓性千斤拔素 A 对自噬相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 4 Effect of flemiphilippinin A on the expression of autophagy-related proteins($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.5 蔓性千斤拔素 A 对 ERK/mTOR 信号通路蛋白的影响

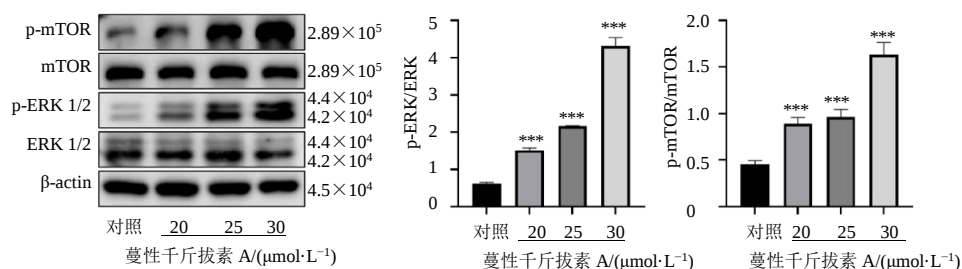
据报道,自噬的发生发展与多种细胞通路有关,MAPKs 家族蛋白 ERK 及下游效应子 mTOR 信号通路参与肿瘤细胞的自噬的发生过程^[13],其中 mTOR 为肿瘤细胞中主要的自噬负调节因子,其激活可抑制细胞自噬发生^[14],因此本研究探讨蔓性千斤拔素 A 是否介导 ERK/mTOR 信号途径激活,抑制肺癌细胞自噬的发生。

Western blotting 法检测蔓性千斤拔素 A 对 A549 细胞中自噬相关通路 ERK/mTOR 蛋白表达的影响,结果如图 5 所示。与对照组比较,蔓性千斤拔

素 A 梯度浓度(20、25、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组中 ERK、mTOR 蛋白表达水平基本无变化,而不同浓度蔓性千斤拔素 A 干预均可升高 p-ERK、p-mTOR 蛋白表达($P < 0.001$),结果表明蔓性千斤拔素 A 可能通过调控 ERK/mTOR 信号途径抑制 A549 细胞自噬。

3.6 ERK 对蔓性千斤拔素 A 诱导 A549 细胞死亡的影响

为进一步验证 ERK/mTOR 信号途径对蔓性千斤拔素 A 诱导的 A549 细胞死亡的影响,A549 细胞预孵育 ERK 特异性抑制剂 SCH772984(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 1 h 后,再给予 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔓性千斤拔素 A 干预 12 h,如图 6 MTT 结果显示,SCH772984 显著逆转了蔓性



与对照组比较: *** $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group.

图 5 蔓性千斤拔素 A 对 ERK/mTOR 通路相关蛋白的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Effect of flemiphilippinin A on ERK/mTOR pathway-related proteins($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

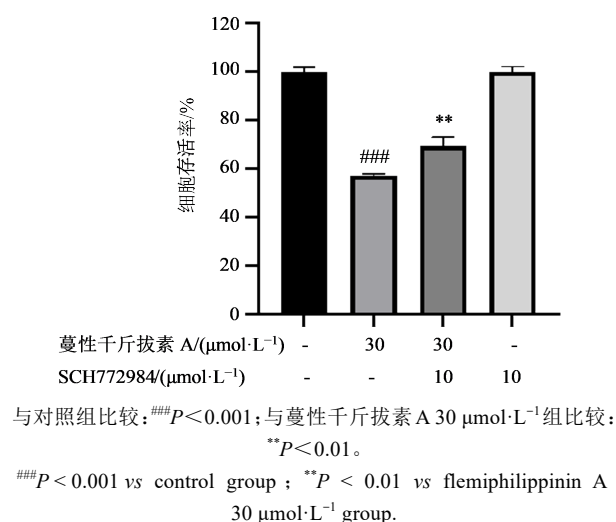


图6 ERK对蔓性千斤拔素A诱导的A549细胞死亡的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 6 Effect of ERK on death of A549 cells induced by flemipilippinin A ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

千斤拔素A诱导的A549细胞死亡($P < 0.001$),表明ERK在蔓性千斤拔素A诱导的细胞死亡中发挥着重要的作用。

3.7 ERK在蔓性千斤拔素A诱导的A549细胞死亡中对mTOR蛋白表达的影响

如图7所示, A549细胞预孵育 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

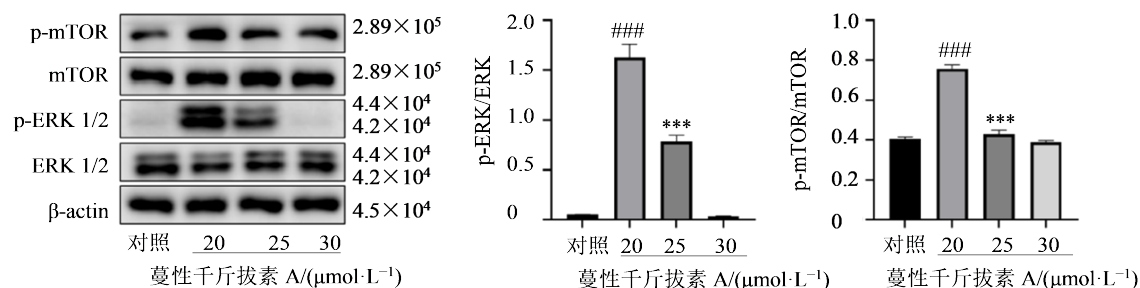


图7 ERK在蔓性千斤拔素A诱导的A549细胞死亡中对mTOR蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 7 Effect of ERK on mTOR protein expression in A549 cell death induced by flemipilippinin A ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

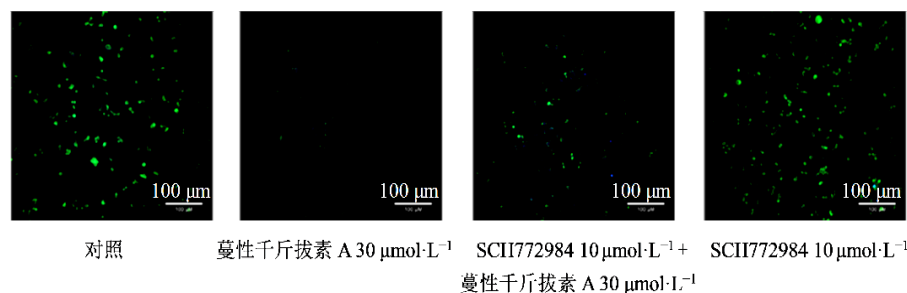


图8 ERK对蔓性千斤拔素A诱导的A549细胞自噬抑制的影响

Fig. 8 Effect of ERK on flemipilippinin A-mediated autophagy inhibition in A549 cells

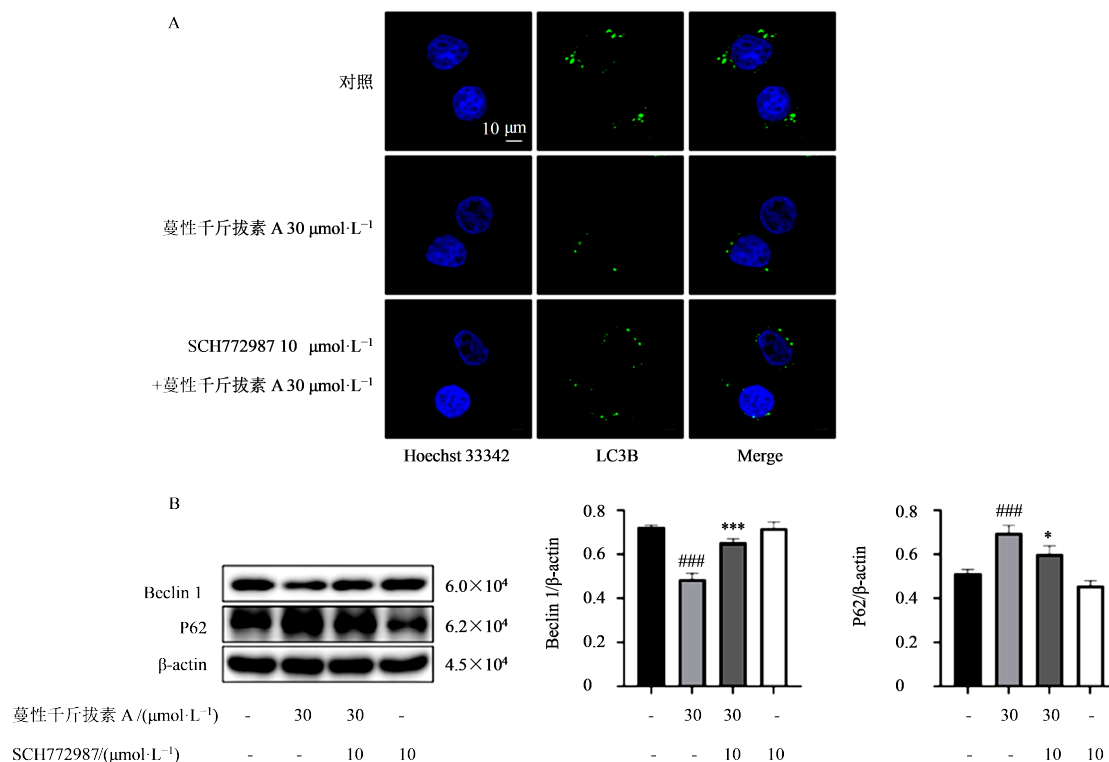
SCH772984 1 h后, 给予 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔓性千斤拔素 A 12 h, Western blotting结果显示, SCH772984作用后, 显著抑制蔓性千斤拔素A导致的p-ERK蛋白和p-mTOR蛋白的升高($P < 0.001$), 表明了蔓性千斤拔素A可能通过ERK/mTOR通路诱导A549细胞死亡。

3.8 ERK对蔓性千斤拔素A诱导的A549细胞自噬抑制的影响

如图8所示, 为验证ERK对蔓性千斤拔素A诱导的A549细胞自噬抑制的影响, A549细胞预孵育 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SCH772984 1 h后, 再给予 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔓性千斤拔素 A 12 h, MDC染色结果显示, 与蔓性千斤拔素A干预组相比, 预孵育SCH772984后, 蔓性千斤拔素A导致的绿色荧光减弱显著逆转, 表明ERK在蔓性千斤拔素A诱导的A549细胞自噬抑制中发挥重要作用。

3.9 ERK对蔓性千斤拔素A诱导的自噬相关蛋白水平变化的影响

为进一步验证蔓性千斤拔素A是否通过ERK/mTOR通路影响A549细胞自噬相关蛋白的变化, 如图9-A免疫荧光结果所示, 与蔓性千斤拔素A干预组比较, A549细胞预孵育 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SCH772984 1 h后, 显著抑制LC3B荧光强度的增加, 结果表明



与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与蔓性千斤拔素 A 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{***} $P < 0.001$; A-ERK 对蔓性千斤拔素 A 介导的 LC3B 免疫荧光变化的影响; B-ERK 对蔓性千斤拔素 A 介导的 Beclin 1、P62 蛋白表达水平变化的影响。

^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{***} $P < 0.001$ vs flemiphilippinin A 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; A-Effect of ERK on flemiphilippinin A-mediated changes in LC3B immunofluorescence; B-Effect of ERK on flemiphilippinin A mediated changes in Beclin 1 and P62 protein expression levels.

图9 ERK对蔓性千斤拔素A介导的自噬相关蛋白水平变化的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 9 Effect of ERK on levels of autophagy-related proteins mediated by flemiphilippinin A ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

SCH772984 显著逆转蔓性千斤拔素 A 诱导的自噬标志物 LC3B 表达的下降。Western blotting 结果显示(见图9-B),与对照组相比,蔓性千斤拔素 A 组 Beclin 1 蛋白表达显著减少,而 P62 蛋白水平增加($P < 0.001$);与蔓性千斤拔素 A 干预组比较, SCH772948 组 Beclin 1 蛋白表达水平显著增加($P < 0.001$)、P62 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$),综上所述表明蔓性千斤拔素 A 可能通过 ERK/mTOR 通路影响 A549 细胞自噬相关蛋白的变化。

4 讨论

自噬是细胞内一种依赖于溶酶体以去除受损或衰老细胞器的重要降解途径,其与癌症的发生发展有着密切的联系^[15]。在过去的几十年中,已发现许多天然化合物如白藜芦醇^[6]、熊果酸^[16]等可通过靶向自噬发挥抗癌作用。mTOR 是肿瘤细胞自噬起始阶段的主要负调节因子^[17],可通过 ERK/MAPK 信号通路激活^[18]。本研究结果发现,天然化合物蔓性千斤拔素 A 能够促进 ERK 和 mTOR 蛋白的磷酸化水平,表明其可能通过 ERK/mTOR 途径的激活抑制自噬的发生,抑制非小细胞肺癌细胞的增殖

活性。

当细胞发生自噬时,自噬启动蛋白 Beclin 1 与 VPS34(类脂激酶 III)形成复合物促进自噬囊泡的形成^[19]。LC3B 由可溶性形式 LC3B-I 被修饰为与脂质结合的 LC3B-II,然后与自噬囊泡膜结合^[20]。此时, P62 通过与 LC3B 相互作用,将需要降解的废旧蛋白聚集成团,然后与 LC3B 结合进入自噬囊泡,最终通过自噬溶酶体降解^[21]。Beclin 1、LC3B 和 P62 分别在自噬的不同阶段发挥着重要的调控作用,是自噬的重要标志物^[22]。因此,本研究通过测定 Beclin 1、LC3B 和 P62 蛋白的表达水平研究蔓性千斤拔素 A 对自噬的影响,结果显示,蔓性千斤拔素 A 在 20、25、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下可减少 Beclin 1 和 LC3B 蛋白表达,并促进 P62 蛋白的表达升高,表明蔓性千斤拔素 A 可抑制非小细胞肺癌细胞自噬发生。

为进一步确认蔓性千斤拔素 A 介导的自噬抑制是否与 ERK/mTOR 途径有关,研究通过 SCH772984 抑制 ERK 蛋白的磷酸化^[23],结果发现抑制 ERK 蛋白后,蔓性千斤拔素 A 介导的 mTOR 蛋白

磷酸化显著减少,Beclin 1和LC3B蛋白表达水平上升,P62蛋白表达水平下降,细胞死亡逆转,表明蔓性千斤拔素A介导的自噬抑制可能与ERK/mTOR途径有关。

综上表明,蔓性千斤拔素A可能通过ERK/mTOR信号通路抑制非小细胞肺癌细胞自噬,从而导致细胞死亡。本实验研究为蔓性千斤拔素A的临床开发利用提供了实验基础和理论指导,同时为民族药千斤拔的开发利用提供了基础理论支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 刘玉才,刘亚群,庄海涛,等. 黄芪抗非小细胞肺癌作用机制研究进展[J]. 中国民族民间医药,2023,32(16): 52-56.
Liu Y C, Liu Y Q, Zhuang H T, et al. Research progress in the mechanism of astragali *Radix* against non-small cell lung cancer [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharmacy, 2023, 32(16): 52-56.
- [2] 王赛,王灵杰,李艳丽,等. 桔皮素通过调节PI3K/AKT/mTOR信号通路抑制非小细胞肺癌的肿瘤干性[J]. 中国胸心血管外科临床杂志,2023,30(4): 614-621.
Wang S, Wang L J, Li Y L, et al. Tangeretin inhibits tumor stemness of non-small cell lung cancer by regulating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. Chin J Clin Thorac Cardiovasc Surg, 2023, 30(4): 614-621.
- [3] 董靖雯,况泽安,殷明晓,等. 金丝桃苷通过下调PD-L1表达发挥抗非小细胞肺癌作用研究[J]. 药学报,2021,56(10): 2817-2824.
Dong J W, Kuang Z A, Yin M X, et al. Hyperoside exerts its anti-tumor activity by reducing the PD-L1 level in non-small cell lung cancer [J]. Acta Pharm Sin, 2021, 56(10): 2817-2824.
- [4] Raskova Kafkova L, Mierzwicka J M, Chakraborty P, et al. NSCLC: From tumorigenesis, immune checkpoint misuse to current and future targeted therapy [J]. Front Immunol, 2024, 15: 1342086.
- [5] 杨德泉. 民族药千斤拔和单面针及金樱根的考释[J]. 吉首大学学报(自然科学版),2023,44(1): 84-89.
Yang D Q. Literature research and explanation of ethnic medicine *Radix et caulis flemigiae*, *Radix et caulis zanthoxyli*, *Radix et caulis rosae* [J]. J Jishou Univ Nat Sci Ed, 2023, 44(1): 84-89.
- [6] Kong F H, Zhang L F, Zhao X D, et al. Resveratrol augments paclitaxel sensitivity by modulating miR-671-5p/STOML2/PINK1/Parkin-mediated autophagy signaling in A549 cell [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2024, 38(1): e23557.
- [7] 范贤,王永良,李玉兰,等. 不同方法提取瑶药千斤拔挥发油的对比研究[J]. 精细化工,2009,26(11): 1085-1089,1144.
Fan X, Wang Y L, Li Y L, et al. Comparative research on volatile oil extracted from Yao medicine *Flemingia philippinensis* merr.et rolfe.by different methods [J]. Fine Chem, 2009, 26(11): 1085-1089, 1144.
- [8] 彭开锋,张鹏,阳苗,等. 千斤拔药理作用研究进展[J]. 中国医院用药评价与分析,2016,2(S1): 251.
Peng K F, Zhang P, Yang M, et al. Research progress on pharmacological action of *Flemingia philippinensis* [J]. Eval Anal Drug Use Hosp China, 2016, 2(S1):251.
- [9] 王娇,范贤,岑颖洲. 千斤拔的抗肿瘤活性成分研究[J]. 天然产物研究与开发,2013,25(10): 1315-1319,1361.
Wang J, Fan X, Cen Y Z. Studies on the antitumor constituents in *Flemingia philippinensis* merr. et Rolfe [J]. Nat Prod Res Dev, 2013, 25(10): 1315-1319, 1361.
- [10] 杜沛霖,周雨晴,黄贵华,等. 千斤拔属植物的化学成分·药理作用·临床应用研究进展[J]. 安徽农业科学,2017,45(6): 109-111.
Du P L, Zhou Y Q, Huang G H, et al. Research progress on chemical constituents, pharmacological effects and clinical application of monomania plants [J]. J Anhui Agric Sci, 2017, 45(6): 109-111.
- [11] 刘展,蔡美云,庄文欣,等. 山柰酚通过mTOR通路诱导细胞自噬保护帕金森病模型小鼠多巴胺能神经元[J]. 中药新药与临床药理,2022,33(4): 446-453.
Liu Z, Cai M Y, Zhuang W X, et al. Kaempferol protects dopaminergic neurons of Parkinson's disease mice by inducing autophagy through mTOR signaling pathway [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2022, 33(4): 446-453.
- [12] Xing J N, Shang Y N, Yu Z L, et al. LncRNA HCP5-encoded protein contributes to adriamycin resistance through ERK/mTOR pathway-mediated autophagy in breast cancer cells [J]. Genes Dis, 2024, 11(4): 101024.
- [13] Li R L, Li H, Lan J, et al. Damnacanthal isolated from morinda species inhibited ovarian cancer cell proliferation and migration through activating autophagy [J]. Phytomedicine, 2022, 100: 154084.
- [14] Wang N, Pan W D, Zhu M F, et al. Fangchinoline induces autophagic cell death via p53/sestrin2/AMPK signalling in human hepatocellular carcinoma cells [J]. Br J Pharmacol, 2011, 164(2b): 731-742.
- [15] 徐静,吴孟华,张建业,等. 大黄蒽醌类化合物调节细胞自噬抑制肿瘤的研究进展[J]. 中药材,2021,44(7): 1797-1801.
Xu J, Wu M H, Zhang J Y, et al. Research progress of rhubarb anthraquinone compounds regulating autophagy and inhibiting tumor [J]. J Chin Med Mater, 2021, 44(7): 1797-1801.

- 1797-1801.
- [16] Wang Z N, Zhang P P, Jiang H, et al. Ursolic acid enhances the sensitivity of MCF-7 and MDA-MB-231 cells to epirubicin by modulating the autophagy pathway [J]. *Molecules*, 2022, 27(11): 3399.
- [17] 谭化蛟, 廖琼. 自噬与非小细胞肺癌治疗研究进展 [J]. *实用肿瘤杂志*, 2021, 36(3): 209-214.
- Tan H J, Liao Q. Advances in autophagy and treatment of non-small cell lung cancer [J]. *J Pract Oncol*, 2021, 36 (3): 209-214.
- [18] Wang X Y, Zhang Y, Ding Z H, et al. Cross-talk between the RAS-ERK and mTOR signalings-associated autophagy contributes to tripterygium glycosides tablet-induced liver injury [J]. *Biomedecine Pharmacother*, 2023, 160: 114325.
- [19] Yue Z Q, Guan X, Chao R, et al. Diallyl disulfide induces apoptosis and autophagy in human osteosarcoma MG-63 cells through the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Molecules*, 2019, 24(14): 2665.
- [20] Amaravadi R K, Kimmelman A C, Debnath J. Targeting autophagy in cancer: Recent advances and future directions [J]. *Cancer Discov*, 2019, 9(9): 1167-1181.
- [21] Alcober-Boquet L, Zang T, Pietsch L, et al. The PB1 and the ZZ domain of the autophagy receptor p62/SQSTM1 regulate the interaction of p62/SQSTM1 with the autophagosome protein LC3B [J]. *Protein Sci*, 2024, 33 (1): e4840.
- [22] Zou R J, Shi W T, Ceylan A F, et al. Cardiomyocyte-specific deletion of endothelin receptor A (ET_A) obliterates cardiac aging through regulation of mitophagy and ferroptosis [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2024, 1870(2): 166958.
- [23] Ma C X, Liu M, Feng W X, et al. Loss of SETD2 aggravates colorectal cancer progression caused by SMAD4 deletion through the RAS/ERK signalling pathway [J]. *Clin Transl Med*, 2023, 13(11): e1475.

[责任编辑 齐静雯]