

基于蛋白质组学和生物信息学研究莪术油注射液联合热疗通过改变细胞周期的进程增强肺癌的放疗敏感性

李怀永¹, 刘莉莉², 姜柏松¹, 杨清竹², 魏冬梅¹, 李 瑶², 刘 锐¹, 姚 越¹, 张伟伟^{2*}

1. 齐齐哈尔市第一医院 放化疗科, 黑龙江 齐齐哈尔 161000

2. 齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006

摘要: 目的 基于蛋白质组学和生物信息学探讨莪术油注射液(ZTO)联合热疗(HT)对非小细胞肺癌放疗(RT)增敏的作用机制。方法 裸鼠 sc 肺癌 A549 细胞成瘤后, 随机分成模型组(不做处理)、RT(6 Gy X 线照射处理, 每周 1 次)组、RT+HT(41~43 °C 加热处理 10 min, 2 d 1 次)组、RT+ZTO(2 d 1 次, 每次 200 mg·kg⁻¹)组、RT+HT+ZTO 组, 每组 5 只, 治疗 21 d。记录各组裸鼠肿瘤体积、质量变化, 苏木素-伊红(HE)染色观察肿瘤病理改变。体外培养人肺癌 A549 细胞, 分为对照组(不做处理)、RT(6 Gy X 线照射处理)组、RT+HT(43 °C 加热处理 30 min)组、RT+ZTO(100 μg·mL⁻¹)组、RT+HT+ZTO 组, 采用 MTT 法检测细胞存活率; 克隆形成实验、EdU 检测细胞增殖能力; 流式细胞术检测细胞周期变化; 定量蛋白质组学技术筛选各组差异表达蛋白(DEPs)并进行生物信息学分析; 流式细胞术检测细胞周期; 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)和 Western blotting 检测细胞周期蛋白依赖性激酶 4(CDK4)、细胞周期素 D3(CCND3)、周期素依赖性激酶抑制因子 1A(CDKN1A)表达。结果 与模型组相比, RT 组瘤体积和瘤质量显著缩小($P<0.001$); 与 RT 组比较, RT+HT、RT+ZTO 和 RT+HT+ZTO 组瘤体积呈下降趋势, 瘤质量显著减小($P<0.01$ 、 0.001), RT+HT+ZTO 组效果最显著。HE 染色显示, 模型组肿瘤细胞密集, 核异型性明显; 各处理组, 肿瘤细胞空泡化, 间质增生, 细胞密度降低, 细胞核染色质加深, RT+HT+ZTO 组最显著。与对照组相比, RT 组 A549 细胞相对存活率、克隆形成率、EdU 阳性细胞数量显著降低($P<0.01$ 、 0.001); 与 RT 组相比, RT+HT、RT+ZTO 和 RT+HT+ZTO 组相对存活率、克隆形成率、EdU 阳性细胞数量显著降低($P<0.01$ 、 0.001), RT+HT+ZTO 组治疗效果更明显。RT+HT+ZTO 处理后 DEPs 经生物信息学分析发现与细胞周期、细胞增殖等有关, 主要富集在细胞周期、细胞凋亡、代谢途径等信号通路。与对照组相比, RT 组 G₁ 期细胞比例升高、G₂ 期细胞比例降低($P<0.01$ 、 0.001); 与 RT 组相比, RT+ZTO 和 RT+HT+ZTO 组 G₁ 期细胞比例升高($P<0.05$ 、 0.001), RT+HT、RT+ZTO 和 RT+HT+ZTO 组 S 期细胞比例降低($P<0.01$ 、 0.001)。与对照组相比, RT 组 CDKN1A mRNA 和蛋白显著上调($P<0.001$), CDK4、CCND3 蛋白表达显著下调($P<0.001$); 与 RT 组比较, RT+HT、RT+ZTO 和 RT+HT+ZTO 组 CDKN1A mRNA 和蛋白显著上调($P<0.01$ 、 0.001), CCND3 mRNA 和蛋白显著下调($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), CDK4 蛋白表达显著下调($P<0.001$); RT+ZTO 和 RT+HT+ZTO 组 CDK4 mRNA 显著下调($P<0.05$ 、 0.01)。结论 ZTO 联合 HT 可通过调控 CDK4、CCND3 和 CDKN1A 表达进而调控细胞周期, 抑制肺癌 A549 细胞增殖; 还可能通过 DNA 复制、细胞凋亡、代谢途径等信号通路增强肺癌的 RT 敏感性。

关键词: 蛋白质组学; 细胞周期; 莪术油注射液; 非小细胞肺癌; 放疗增敏; 热疗

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2026)01-0048-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.01.005

Zedoary Turmeric Oil Injection combined with hyperthermia enhances radiosensitivity in lung cancer by modulating cell cycle progression based on proteomics and bioinformatics research

LI Huaiyong¹, LIU Lili², LOU Baisong¹, YANG Qingzhu², WEI Dongmei¹, LI Yao², LIU Rui¹, YAO Yue¹, ZHANG Weiwei²

1. Department of Chemoradiotherapy, The First Hospital of Qiqihar, Qiqihar 161000, China

2. School of Life Science and Agroforestry, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China

收稿日期: 2025-08-22

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目(LH2023H104); 黑龙江省中医药科研课题项目(ZHY2025-299)

作者简介: 李怀永, 硕士, 工程师, 主要从事肿瘤学研究。E-mail: lhy880220@126.com

*通信作者: 张伟伟, 博士, 教授, 主要从事肿瘤分子生物学研究。E-mail: zww121@163.com

Abstract: Objective The mechanism of the sensitization effect of Zedoary Turmeric oil Injection (ZTO) combined with hyperthermia (HT) on radiotherapy (RT) for non-small cell lung cancer (NSCLC) was explored based on proteomics and bioinformatics. **Methods** After subcutaneous inoculation of A549 lung cancer cells in nude mice, the mice were randomly divided into the model group (no treatment), the RT group (6 Gy X-ray irradiation once a week), the RT + HT group (heating at 41—43 °C for 10 min, twice a day), the RT + ZTO group (200 mg·kg⁻¹ twice a day), and the RT + HT + ZTO group, with 5 mice in each group. The treatment lasted for 21 days. The tumor volume and mass of each group of nude mice were recorded, and the pathological changes of the tumors were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. Human lung cancer A549 cells were cultured *in vitro* and divided into the control group (no treatment), the RT group (6 Gy X-ray irradiation), the RT + HT group (heating at 43 °C for 30 min), the RT + ZTO group (100 µg·mL⁻¹), and the RT + HT + ZTO group. Cell survival rate was detected by MTT assay; cell proliferation ability was detected by colony formation assay and EdU assay; cell cycle changes were detected by flow cytometry; differentially expressed proteins (DEPs) in each group were screened by quantitative proteomics technology and analyzed by bioinformatics; cell cycle was detected by flow cytometry; the expression of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4), cyclin D3 (CCND3), and cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (CDKN1A) was detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blotting. **Results** Compared with the model group, the tumor volume and mass in the RT group were significantly reduced ($P < 0.001$); compared with the RT group, the tumor volume in the RT + HT, RT + ZTO, and RT + HT + ZTO groups showed a downward trend, and the tumor mass was significantly reduced ($P < 0.01$, 0.001), with the most significant effect in the RT + HT + ZTO group. HE staining showed that the tumor cells in the model group were dense, with obvious nuclear atypia; in each treatment group, the tumor cells were vacuolated, with interstitial hyperplasia, decreased cell density, and deepened nuclear chromatin staining, with the most significant effect in the RT + HT + ZTO group. Compared with the control group, the relative survival rate, colony formation rate, and the number of EdU-positive cells in the A549 cells in the RT group were significantly decreased ($P < 0.01$, 0.001); compared with the RT group, the relative survival rate, colony formation rate, and the number of EdU-positive cells in the RT + HT, RT + ZTO, and RT + HT + ZTO groups were significantly decreased ($P < 0.01$, 0.001), with the most significant effect in the RT + HT + ZTO group. After RT + HT + ZTO treatment, the DEPs were analyzed by bioinformatics and found to be related to the cell cycle, cell proliferation, etc., mainly enriched in the cell cycle, apoptosis, and metabolic pathways. Compared with the control group, the proportion of G₁ phase cells in the RT group increased, and the proportion of G₂ phase cells decreased ($P < 0.01$, 0.001); compared with the RT group, the proportion of G₁ phase cells in the RT + ZTO and RT + HT + ZTO groups increased ($P < 0.05$, 0.001), and the proportion of S phase cells in the RT + HT, RT + ZTO, and RT + HT + ZTO groups decreased ($P < 0.01$, 0.001). Compared with the control group, the mRNA and protein expression of CDKN1A in the RT group were significantly upregulated ($P < 0.001$), and the protein expression of CDK4 and CCND3 was significantly downregulated ($P < 0.001$). Compared with the RT group, the mRNA and protein levels of CDKN1A were significantly upregulated ($P < 0.01$ and 0.001), while the mRNA and protein levels of CCND3 were significantly downregulated ($P < 0.05$, 0.01, 0.001), and the protein expression of CDK4 was significantly downregulated ($P < 0.001$) in the RT + HT, RT + ZTO, and RT + HT + ZTO groups. In the RT + ZTO and RT + HT + ZTO groups, the mRNA level of CDK4 was significantly downregulated ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** ZTO combined with hyperthermia enhances NSCLC radiosensitivity by modulating CDK4, CCND3, and CDKN1A, thereby disrupting cell cycle progression, potentially via DNA replication, apoptosis, and metabolic pathways.

Key words: proteomics; cell cycle; Zedoary Turmeric Oil Injection; non-small cell lung cancer; radiosensitization; hyperthermia

肺癌是世界上发生率和死亡率最高的恶性肿瘤, 据 2022 年数据统计, 全球肺癌新增近 250 万例, 死亡病例超过 180 万, 分别占有所有病例的 12.2% 和 18.7%^[1], 其中 85% 的患者组织学分类为非小细胞肺癌 (NSCLC)^[2]。NSCLC 早期阶段常因缺乏特异性症状而难以被发现, 导致多数患者在进展至晚期才被确诊。因此超过三分之一的 NSCLC 患者首次就诊的临床分期为 IIIA 或 IIIB, 在此时期的患者难以利用手术彻底清除病灶, 其治疗以化疗、放射治疗 (RT)、免疫以及分子靶向治疗为主^[3]。

RT 是胸部恶性肿瘤患者的重要治疗方式^[4], 局部晚期 NSCLC 患者 RT 是对肺部肿瘤和纵隔淋巴瘤进行高辐射剂量治疗, 随着 RT 剂量的增加, 局部治疗效果提高, 但并发症也随之增多, 15%~40% 的病例出现放射性肺炎和食管炎等并发症^[5]。此外 RT 抵抗也是导致局部治疗失败、甚至癌症复发的原因^[6]。如何提高 RT 敏感性, 减少患者 RT 耐药性是临床研究的热点和难点。

通过整合手术、RT、化疗、靶向治疗、免疫治疗及中医药等手段的多学科综合治疗 (MDT) 已成

为 NSCLC 核心治疗策略,可显著提高患者的生存率和生活质量。化疗是通过化学药物杀灭或抑制癌细胞的治疗方式,具有全身性作用,与手术、RT 并称癌症治疗的 3 大手段。常规化疗药物虽然可以抑制癌细胞的分裂,但是不良反应不可避免,例如恶心、食欲不振以及白细胞和血小板减少等^[7]。在肿瘤药物筛选中,中药因其多靶点、不良反应少等独特优势成为一种良好的辅助疗法,对患者的生存、生活质量和毒性的降低都有显著影响^[8]。莪术油注射液(ZTO)的主要成分是莪术中提取的莪术油,含有姜黄烯、 β -榄香烯、吉马酮、莪术醇、莪术二酮、新莪术二酮等多种有效成分^[9-13],具有抗菌^[14]、消炎^[15]、抗肿瘤^[16]等作用。研究结果显示,ZTO 能够抑制肺腺癌 A549 细胞增殖^[17],通过抑制结直肠癌癌细胞增殖和血管生成,从而增强结直肠癌 RT 的敏感性抑制肿瘤生长^[18-19]。

热疗(HT)是将肿瘤负载组织的温度升高至 40~43 °C 的治疗程序,因其无不良反应、不损伤人体正常组织、不损害自身免疫力等优点,已成为继手术、RT、化疗、免疫治疗之后的第 5 种癌症治疗途径,在多种癌症的多学科治疗中发挥着越来越重要的作用^[20]。HT 与 RT 联合使用,可以产生协同作用,提高肿瘤组织的放射敏感性,从而增强 RT 效果^[21-22]。但莪术油联合 HT 对 RT 的作用效果尚未见报道。

本研究以人肺癌 A549 细胞为研究对象,通过体内和体外实验观察 ZTO 联合 HT 对人肺癌 RT 敏感性的影响。运用蛋白质组学和生物信息技术探讨 ZTO 联合 HT 对 NSCLC RT 增敏的作用机制,为 NSCLC 的综合治疗提供新的理论依据和实践指导。

1 材料

1.1 实验动物及细胞

无菌 Balb/c nude 雌性 6 周龄小鼠,购自赛业(苏州)生物科技有限公司,实验动物生产许可证号 SCXK(苏)2022-0016。对动物的使用与饲养严格遵守国家实验动物福利伦理的相关规定以及齐齐哈尔大学实验动物管理与使用条例(动物伦理委员会审查受理号 Qiqihar UEC20230117)。

人肺腺癌 A549 细胞(批号 CL-0016,武汉普诺赛生命科技有限公司)。

1.2 药物及主要试剂

ZTO(批号 423020101,浙江天瑞药业有限公

司);DAPI、BeyoClick™ EdU 细胞增殖检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒、蛋白裂解液(RIPA)、4%多聚甲醛(PEA)、BCA 蛋白质测定试剂盒(批号 C1002、C0071S、C1052、P0013B、P0099、P0012,碧云天生物公司);胎牛血清(FBS)、DMEM 培养基(批号 A5256701、11320033, Gibco 生物公司);细胞周期蛋白依赖性激酶 4(CDK4)一抗、细胞周期素 D3(CCND3)一抗、周期素依赖性激酶抑制因子 1A(CDKN1A)一抗(批号 CY5836、CY5828、CY5843,上海埃必威生物技术有限公司)和 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(批号 ab8227, Abcam 中文官网);IRDye 800CW 山羊抗兔 IgG 二抗、IRDye 800CW 山羊抗小鼠 IgG 二抗(批号 926-32211、926-32210, LI-COR Biosciences);反转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒(批号 AG0304-B、AH0104-B, 思科捷)。

1.3 主要仪器

FC500 型流式细胞仪(贝克曼库尔特有限公司);荧光定量 PCR 仪(德国艾本德股份公司);Odyssey 红外荧光扫描成像系统(美国 LI-COR 公司);Spark 10M 多孔酶标仪(瑞士 Tecan 公司)。

2 方法

2.1 裸鼠荷瘤实验

小鼠在实验室适应性饲养 1 周后,将 A549 细胞(5×10^6 个、200 μ L)sc 至裸鼠腋窝。接种后每天记录裸鼠的精神状态、饮食状态和体质量等,当瘤体积约 100 mm³ 时,随机分成模型组、RT 组、RT+HT 组、RT+ZTO 组和 RT+HT+ZTO 组。RT 每周 1 次 X 线照射,每次 6 Gy;HT 2 d 1 次,41~43 °C 10 min;ip ZTO 每 2 d 1 次,每次 200 mg·kg⁻¹^[19];对照组不接受任何治疗。每天用游标卡尺测量肿瘤大小,计算肿瘤体积 $V=a^2b/2$ (a 和 b 分别是肿瘤的短径和长径),治疗 2 周后,断颈处死裸鼠,解剖异种移植肿瘤称质量。

2.2 苏木精-伊红(HE)染色

福尔马林固定肿瘤,脱水,石蜡包埋,切片后经二甲苯 I、II 各 15 min 脱蜡,梯度乙醇(100%、95%、85%、70%)复水,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 5 min $\times$ 3 次。滴加苏木素染液 3 min,水洗 1 min,1%盐酸乙醇分化 3 s, PBS 返蓝。伊红染液染色 30 s,水洗 1 min。梯度乙醇(85%、95%、100%)脱水各 2 min,正丁醇 2 min,二甲苯透明 5 min,中性树胶封固。镜下观察拍照。

2.3 细胞培养

将 A549 细胞培养于添加 10% 胎牛血清、1% 青霉素和 1% 链霉素的 DMEM 培养基中, 37 °C、5% CO₂ 下培养。

2.4 MTT 实验

将 A549 细胞按 5×10^4 个·mL⁻¹、每孔 100 μL 接种于 96 孔板中培养 12 h 后, 实验分组和处理方法如表 1 所示^[17]。治疗 48 h 后每孔加入 10 μL 0.5 μg·μL⁻¹ 噻唑蓝 (MTT) 溶液在 37 °C 下孵育 4 h, 每孔加 150 μL 二甲基亚砷 (DMSO) 溶液后静置 10 min, 使用多孔酶标仪在 570 nm 处测定吸光度 (*A*) 值, 并进行计算。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

表 1 实验分组及处理方法

Table 1 Experimental grouping and processing methods

组别	处理方法
空白	不接种细胞
对照	仅接种细胞
RT	6 Gy
RT+HT	6 Gy+43 °C、30 min
RT+ZTO	6 Gy+100 μg·mL ⁻¹ ZTO ^[17]
RT+HT+ZTO	6 Gy+43 °C、30 min+100 μg·mL ⁻¹ ZTO

2.5 克隆形成实验

将 A549 细胞按照表 1 处理 48 h 后, 胰酶消化收集细胞, 取 1 mL 浓度为 100 个·mL⁻¹ 的细胞接种在 12 孔板中, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 7~10 d, 待培养皿中形成约 50 个细胞克隆团后停止培养, PBS 冲洗 2 次, 随后用甲醇在室温下固定 0.5 h, 加入 0.1% 结晶紫在室温下孵育 1 h, 用流水冲洗, 晾干后拍照, 并通过 Image J 软件统计克隆形成数量。

2.6 EdU 法检测 A549 细胞的增殖

将 A549 细胞按 5×10^5 个·mL⁻¹、每孔 2 mL 接种于 6 孔板中培养 12 h 后, 按照表 1 处理, 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 48 h, EdU 法检测肺癌细胞增殖情况。具体步骤参照 EdU 细胞增殖检测试剂盒说明书。

2.7 定量蛋白质组学分析

将 A549 细胞按 1.0×10^6 个·mL⁻¹、每皿 10 mL 接种至 100 mm 培养皿中培养 12 h 后, 按照表 1 处理 48 h 后, 消化收集各组细胞液氮速冻后, 干冰运输到上海美吉生物公司进行蛋白质组测序, 所得数据均上传到美吉云平台 (cloud.majorbio.com) 进行

分析。采用 R 语言中的 *t.test* 函数计算组间差异显著性 *P* 值和差异倍数 (FC)。显著性检验 *P*<0.05, 同时 FC>1.2 的蛋白为差异表达蛋白 (DEPs)。选择基因本体 (GO) 数据库 (<http://geneontology.org/>) 对所有的差异蛋白从生物学过程 (BP)、细胞组分 (CC) 和分子功能 (MF) 3 个方面进行 GO 注释分析功能聚类分析; 采用京都基因与基因组百科全书 (KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg/>) 通路数据库对差异蛋白涉及的代谢通路进行分析。

2.8 细胞周期检测

将 A549 细胞按 5×10^5 个·mL⁻¹、每皿 5 mL 接种至 60 mm 细胞培养皿中培养 12 h, 按照表 1 处理 48 h 后, 胰酶 (不含 EDTA) 消化收集细胞, 1 000×*g* 离心 5 min 弃上清, 加入 1.5 mL 预冷的无水乙醇, 充分混匀, 4 °C 固定 18 h。1 000×*g* 离心 5 min, 弃上清用 PBS 洗 3 次, 加 500 μL 碘化丙啶 (PI) 染液重悬细胞, 加入 RNase A 12.5 μL, 37 °C 避光反应 30 min, 400 目滤网滤过后使用 Cytomics FC500 流式细胞仪评估所有样品, 并使用 CXP 软件 2.3 版进行分析。

2.9 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 实验

将 A549 细胞按 5×10^5 个·mL⁻¹、每皿 5 mL 接种至 60 mm 细胞培养皿中培养 12 h, 按照表 1 处理 48 h 后, 总 RNA 按照 Trizol 抽提试剂盒说明书提取。使用 qRT-PCR 检测 *CCND3*、*CDK4*、*CDKN1A* 的 mRNA 表达水平, 进行 3 次重复实验, 数据计算采用 2^{-ΔΔC_t} 法。热循环条件如下: 95 °C 预变性 2 min, 95 °C 15 s, 60 °C 30 s 循环 40 次。所用引物的序列见表 2。

2.10 Western blotting 实验

将 A549 细胞按 5×10^5 ·mL⁻¹、每皿 5 mL 接种至 60 mm 细胞培养皿中培养 12 h, 按照表 1 处理 48 h

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequence

基因	引物序列 (5'→3')
<i>CDK4</i>	F: CCATCAGCACAGTTCGTGAGGT R: TCAGTTCGGGATGTGGCACAGA
<i>CCND3</i>	F: AAACCTGGCTGAGCAGAGCA R: AGACAGGTAGCGATCCAGGT
<i>CDKN1A</i>	F: GCAGACCAGCATGACAGATTCTA R: GAACCTCTCATTCAACCGCCT
<i>β-actin</i>	F: AGCGAGCATCCCCCAAAGTT R: GGGCACGAAGGCTCATCATT

后,使用 RIPA 裂解缓冲液提取全细胞裂解物。将裂解物在 4℃ 下 13 000×g 离心 15 min,吸上清液并使用 BCA 蛋白质测定试剂盒测定蛋白质浓度。每组取 12 μg 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳,采用湿转法将蛋白条带转移到聚偏二氟乙烯膜(PVDF)上,用 1×TBST 配制 10%脱脂牛奶在室温下封闭 1 h,加入 CDK4、CCND3、CDKN1A、β-actin 一抗 4℃ 孵育过夜。然后将膜与 IRDye 800CW 山羊抗兔 IgG 二抗抗体或 IRDye 800CW 山羊抗小鼠 IgG 二抗在室温下孵育 1 h,并用 PBST 洗涤。使用 Odyssey IR 成像系统进行可视化。Image J 用于分析条带,并将每个条带归一化为 β-actin。

2.11 统计学处理

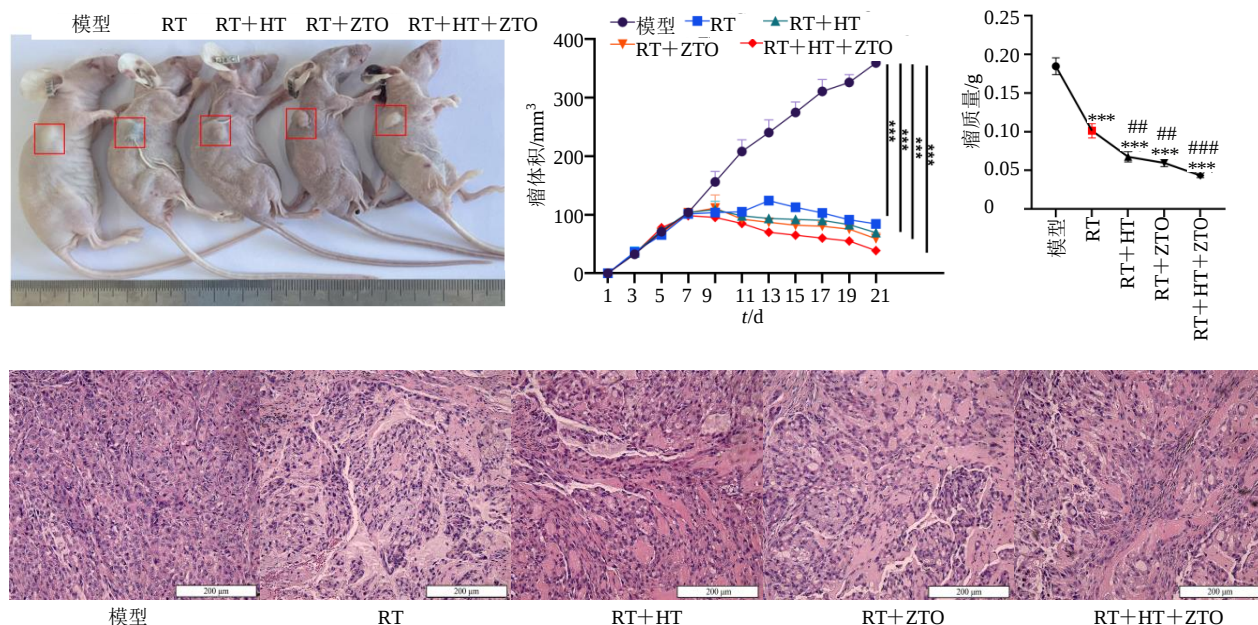
采用 SPSS 25.0 和 GraphPad Prism 8.0 统计软件进行统计分析,分析过程中采用单因素方差,

组间差异性检测使用 *T*-test 法,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 ZTO 联合 HT 增强肺癌 RT 的敏感性

如图 1 所示,与模型组相比,RT 抑制了小鼠体内肿瘤生长,瘤体积和瘤质量显著缩小 ($P < 0.001$);与 RT 组比较,RT+HT、RT+ZTO 和 RT+HT+ZTO 组肿瘤的增长被进一步抑制,瘤体积呈下降趋势,瘤质量显著减小 ($P < 0.01$ 、 0.001),RT+HT+ZTO 组效果最显著。随后对肿瘤组织进行 HE 染色观察,结果表明模型组肿瘤细胞密集,核异型性明显;各处理组,肿瘤细胞空泡化,间质增生,细胞密度降低,细胞核染色质加深,RT+HT+ZTO 组最显著。裸鼠体内实验证实 ZTO 联合 HT 增强肿瘤对 RT 的敏感性,抑制肿瘤的生长。



与模型组比较: *** $P < 0.001$; 与 RT 组比较: ### $P < 0.01$ #### $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs model group; ### $P < 0.01$ #### $P < 0.001$ vs RT group.

图 1 ZTO 联合 RT、HT 对裸鼠肿瘤生长的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 1 Inhibitory effect of ZTO combined with RT and HT on tumor growth in nude mice ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

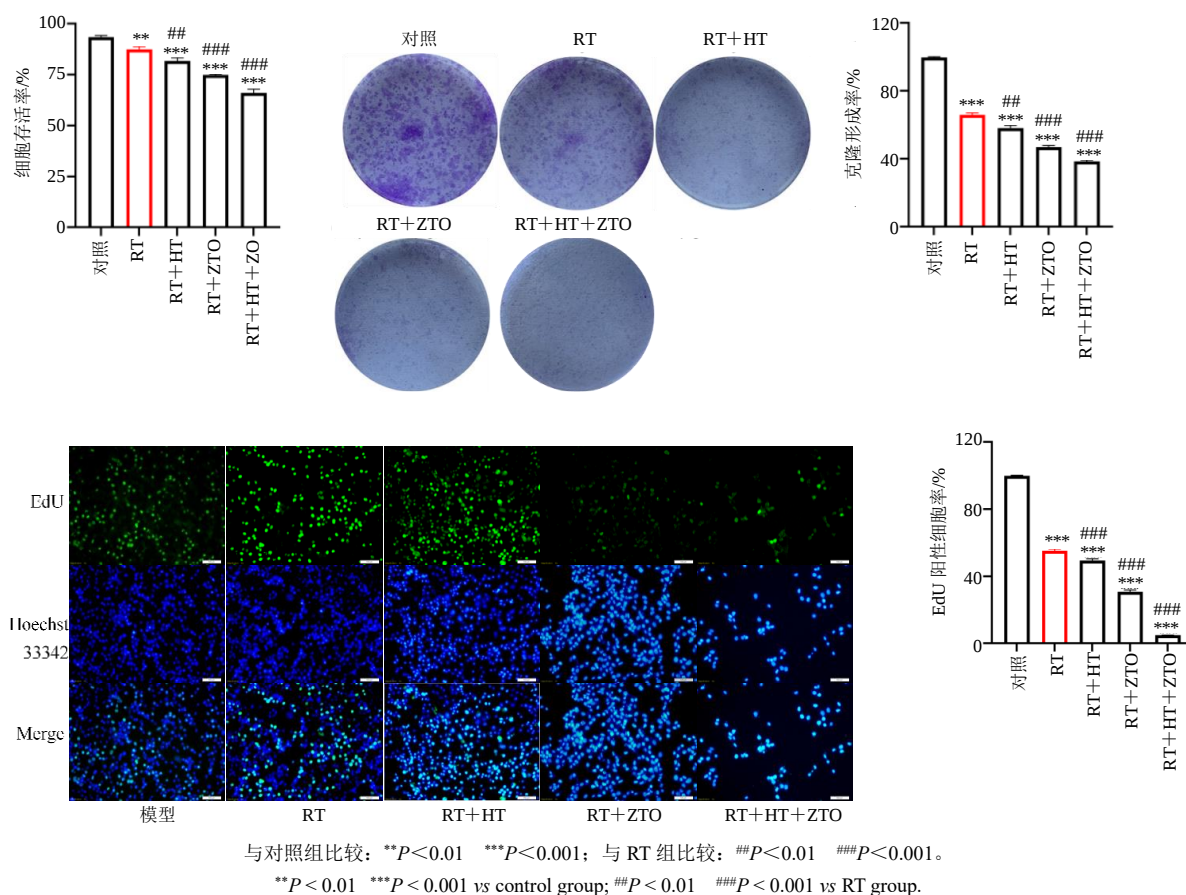
3.2 ZTO 联合 RT、HT 对肺癌 A549 细胞增殖的影响

图 2 结果显示,与对照组相比,RT 组 A549 细胞相对存活率、克隆形成率、EdU 阳性细胞数量显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001);与 RT 组相比,RT+HT、RT+ZTO 和 RT+HT+ZTO 组相对存活率、克隆形成率、EdU 阳性细胞数量显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001);RT+HT+ZTO 组治疗效果更明显。结果表明,ZTO 联合 HT 增强 A549 细胞 RT 的敏感性,

抑制了 A549 细胞增殖。

3.3 ZTO 联合 HT、RT 对肺癌 A549 细胞蛋白质表达谱的影响及分析

结果如图 3-A 所示,与对照组比较,RT 组 A549 细胞中共鉴定出 214 个 DEPs,其中 102 个上调,112 个下调;RT+HT+ZTO 组 A549 细胞中共鉴定出 447 个 DEPs,其中 249 个上调,198 个下调;与 RT 组比较,RT+HT+ZTO 组 A549 细胞中共鉴定出 447 个 DEPs,其中 251 个上调,196 个下调。

图 2 ZTO 联合 RT、HT 对肺癌 A549 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Fig. 2 Effect of ZTO combined with RT and HT on proliferation of A549 lung cancer cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

将各组中差异的 DEPs 进行 GO 富集, 结果如图 3-B 所示, 与对照组相比, RT 组 DEPs 主要与正调控 DNA 损伤反应, p53 类介质的信号转导导致 p21 类介质的转录、细胞周期相变的调控、DNA 双链断裂加工等 BP 有关, 与蛋白质-DNA 复合物、异染色质、核端粒帽复合体等 CC 有关, 与 DNA 损伤传感器活性、组蛋白乙酰转移酶活性、趋化因子结合等 MF 有关。

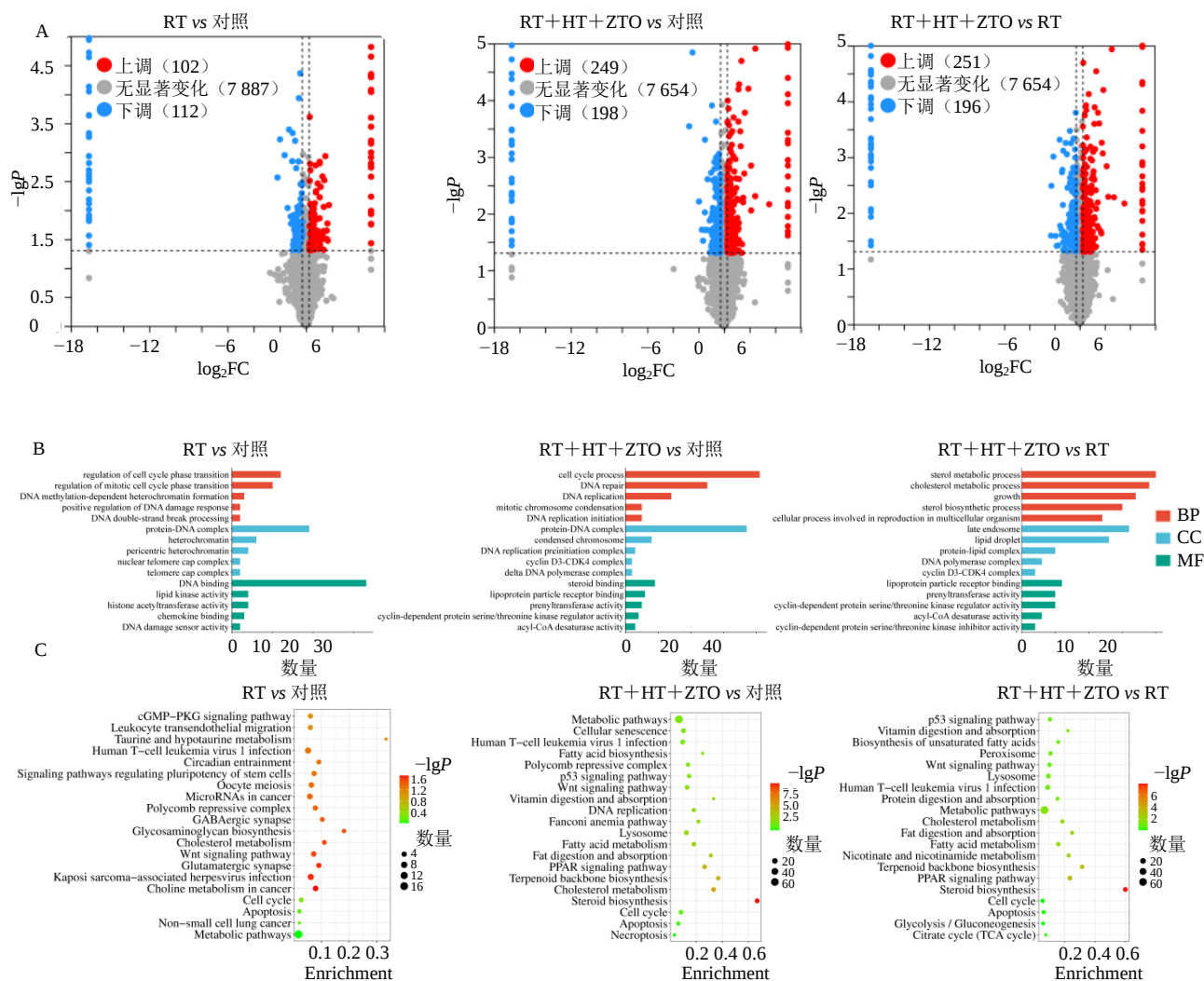
RT+HT+ZTO 处理后 DEPs 主要与细胞周期过程、DNA 复制、DNA 修复等 BP 有关, 与细胞周期蛋白 D3-CDK4 复合物、DNA 复制起始前复合物等 CC 有关, 与周期蛋白依赖蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶调节因子活性、酰基辅酶 a 去饱和酶活性等 MF 有关, 主要与生长、多细胞生物中涉及生殖的细胞过程有关。

将各组中差异的 DEPs 进行 KEGG 分析, 结果如图 3-C 所示, 与对照组相比, RT 组 DEPs 主要与细胞周期、细胞凋亡、Wnt 信号通路等有关, RT+HT+ZTO 处理后 DEPs 主要与细胞衰老、代谢途

径、P53 信号通路、Wnt 信号通路、DNA 复制、范可尼贫血途径等信号通路有关。与 RT 组相比, RT+HT+ZTO 主要与 PPAR 信号通路、代谢途径、细胞周期、糖酵解/糖异生、柠檬酸循环 (TCA 循环)、细胞凋亡等信号通路有关。

3.4 ZTO 联合 RT、HT 改变肺癌 A549 细胞的周期进程

根据蛋白质组学定量分析、GO 和 KEGG 富集分析发现, A549 细胞经过 RT+HT+ZTO 处理后, 细胞周期相关蛋白变化差异显著, RT+HT+ZTO 与对照组、RT+HT+ZTO 与 RT 组比较, 均富集到了细胞周期, 因此对 A549 细胞周期的变化进行了检测, 结果如图 4 所示, 与对照组相比, RT 组 G₁ 期细胞比例升高、G₂ 期细胞比例降低 ($P < 0.01$ 、 0.001), S 期细胞比例降低; 与 RT 组相比, RT+ZTO 和 RT+HT+ZTO 组 G₁ 期细胞比例升高 ($P < 0.05$ 、 0.001), RT+HT、RT+ZTO 和 RT+HT+ZTO 组 S 期细胞比例降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)。



A-各组细胞中 DEPs; B-各组 DEPs GO 分析; C-各组 DEPs KEGG 分析。

A-DEPs in each group of cells; B-DEPs GO analysis in each group, C-DEPs KEGG analysis in each group.

图 3 ZTO 联合 RT、HT 对肺癌 A549 细胞蛋白表达的影响

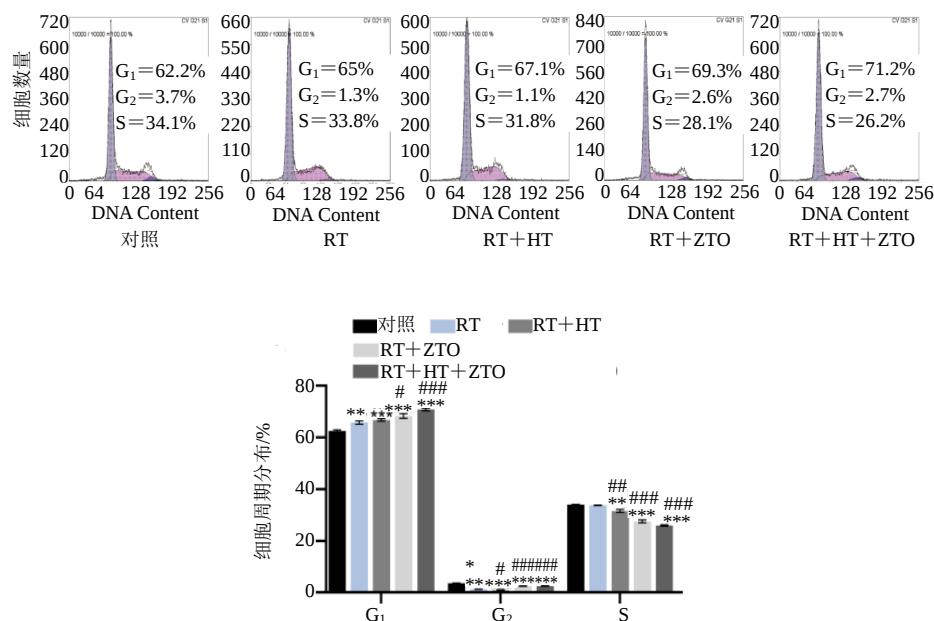
Fig. 3 Effects of ZTO combined with RT and HT on protein expression in lung cancer A549 cells

随后对蛋白质组中差异表达的 CCND3、CDK4、CDKN1A 蛋白进行验证,结果如图 5 所示,与对照组相比,RT 组 CDKN1A mRNA 和蛋白显著上调 ($P<0.001$),CDK4、CCND3 蛋白表达显著下调 ($P<0.001$);与 RT 组比较,RT+HT、RT+ZTO 和 RT+HT+ZTO 组 CDKN1A mRNA 和蛋白显著上调 ($P<0.001$),CCND3 mRNA 和蛋白显著下调 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)、CDK4 蛋白表达显著下调 ($P<0.001$);RT+ZTO 和 RT+HT+ZTO 组 CDK4 mRNA 显著下调 ($P<0.05$ 、 0.01)。

4 讨论

肺癌严重威胁人类健康,RT 是肺癌治疗中覆盖各分期的核心治疗手段,由于 RT 本质是局

部治疗,受限于无法覆盖全身病灶和易出现肿瘤抵抗等。部分化疗药物可干扰肿瘤细胞的 DNA 修复,使 RT 对 DNA 的损伤无法修复,从而增强 RT 对癌细胞的杀伤,HT 将热量传递给肿瘤,增加肿瘤局部血流和氧供,使缺氧细胞转化为氧合良好的细胞,对 RT 更敏感^[23-24]。因此,联合 RT、化疗和 HT 是治疗肺癌的有效手段。本实验结果表明,ZTO 联合 HT 可增强肺癌的 RT 敏感性,抑制小鼠肿瘤的生长,缓解肺癌组织病理改变。细胞水平上,三者联合处理可显著降低 A549 细胞活力、EdU 阳性细胞数量和克隆形成率,揭示 ZTO 联合 HT 和 RT 可成为肺癌潜在的治疗方式。

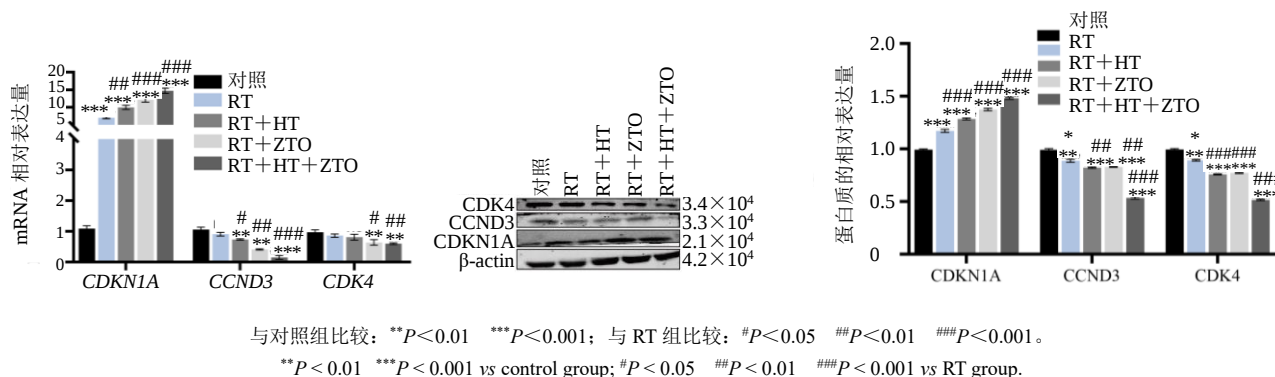


与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与 RT 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs RT group.

图 4 ZTO 联合 RT、HT 对肺癌 A549 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 4 Effects of ZTO combined with RT and HT on cell cycle in lung cancer A549 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与 RT 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs RT group.

图 5 ZTO 联合 RT、HT 对肺癌 A549 细胞周期相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Effects of ZTO combined with RT and HT on expression of cycle-related proteins in lung cancer A549 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

RT 在肺癌的不同阶段有不同应用。早期肺癌中, 立体定向 RT (SBRT) 可作为手术的替代方案, 尤其是对于无法手术的患者, 效果接近手术。中期肺癌中, RT 常与化疗、免疫治疗联合, 作为同步放化疗的一部分, 提高治疗效果。晚期肺癌中, RT 用于缓解症状, 如骨转移和脑转移的姑息治疗^[25-26]。本研究体内和体外实验结果表明单独 RT 可以抑制肺腺癌 A549 细胞的增殖、抑制肿瘤生长。但是 RT 可能损伤周围正常组织, 导致长期并发症如肺纤维化, 尤其是在高剂量或大范围照射时。为了解决这个问题, 本实验分别进行了 RT, HT 联合 RT, ZTO

联合 RT, ZTO 联合 RT、HT 的组合方式, 结果表明各治疗组均可不同程度的抑制肺腺癌 A549 细胞增殖, 其中三者联合处理效果最显著, 即在相同放射剂量前提下, 三者联合处理可以更有效的抑制肿瘤细胞的增殖, 使 RT 更有效。

蛋白质组学是在基因组学和转录组学的基础上迅速发展的学科, 旨在研究蛋白质在任何阶段的表达、结构、功能、相互作用和修饰, 可以结合生物信息学工具来阐述涉及复杂疾病的生化过程和发展规律, 对疾病的早期诊断、治疗、预后判断有指导作用^[27-28]。为了探明三者联合处理的作用机

制, 本实验将 ZTO、HT 和 X 线照射处理的 A549 细胞进行了蛋白质组测序, 三者联合组与单独 RT 组表达差异蛋白比较, 联合组 A549 细胞中共鉴定出 447 个 DEPs, 其中 251 个上调, 196 个下调, ZTO 联合 HT 可能通过调控这些 DEPs 发挥 RT 增敏作用。

RT 利用高能射线, 如 X 射线、 γ 射线、质子等破坏癌细胞的 DNA, 直接或间接 (通过自由基) 造成 DNA 损伤, 进而引起 DNA 损伤感应、DNA 损伤修复和细胞周期进程的调节^[29], 并且 DNA 变异的累积会改变蛋白质的表现形式^[30]。HT 诱导蛋白质变性, 导致细胞凋亡或者坏死, 热损伤的组织还会降低辐射耐药性, 从而增强肿瘤治疗效果^[31-32]。本实验首先对 DEPs 进行 GO 分析, 发现 DEPs 主要与 DNA 损伤修复和细胞周期等 BP 有关、与 CCND3-CDK4 复合物等 CC 有关, 与周期蛋白依赖蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶调节因子活性等 MF 有关。说明 ZTO 联合 HT 对 A549 细胞 RT 增敏主要与细胞周期调控有关。此外, 通过差异蛋白分析发现 CCND3、CDK4、CDKN1A 蛋白表达均存在差异。

接下来对 DEPs 进行 KEGG 分析, 结果表明 ZTO 联合 HT 增敏 RT 主要与代谢途径、细胞周期等信号通路有关。癌症被认为是一种代谢性疾病, 癌细胞的代谢方式比正常细胞更有利于增殖^[33]。尤其是糖酵解途径, 由于糖酵解比线粒体氧化磷酸化产生 ATP 的速度更快, 会刺激细胞周期信号传导, 如细胞周期蛋白依赖性激酶 (CDK) 的活性^[34-35]。上述结果表明 ZTO 联合 HT 增敏 RT 与细胞周期途径有关。

根据蛋白质组学定量分析、GO 和 KEGG 富集分析结果可知, A549 细胞经过 ZTO、HT 和 X 线照射后, 细胞周期相关蛋白变化差异显著。为了验证三者联合是否会影响 A549 细胞的细胞周期, 本实验检测了不同处理后 A549 细胞周期变化, 结果发现 ZTO 联合 RT、HT 使得 A549 细胞阻滞于 G₁ 期。当辐射通过遗传物质时, 能量的沉积会引发广泛的 DNA 损伤, 引发细胞死亡或细胞周期阻滞。G₁ 检查点作为细胞周期最重要的阶段 S 期的门户。当检测到 DNA 损伤时, G₁ 检查点通过停止细胞周期进程来稳定基因组完整性^[36-37]。ZTO 联合 HT 使得 RT 造成的 DNA 损伤不能及时得到修复, 从而抑制了细胞增殖。

增殖依赖的细胞周期由各种 CDKs 与其细胞周

期蛋白 (Cyclins) 伴侣协同工作调节。细胞周期调控中的 CDK 活性受到密切调节: 它被促有丝分裂信号激活, 并可被响应 DNA 损伤的细胞周期检查点激活所阻断。CCND3 编码的蛋白质属于高度保守的细胞周期蛋白家族, 该细胞周期蛋白与 CDK4 或 CDK6 形成复合物并作为其调节亚单位发挥作用, 其活性是细胞周期 G₁/S 转换所必需的^[38]。当发现 DNA 损伤时, p53 被激活, 也会激活细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 CDKN1A (p21 WAF1/CIP1)^[39-40]。本实验采用 qRT-PCR 以及 Western blotting 检测了 CCND3、CDK4 和 CDKN1A 的表达变化, 结果显示 CCND3、CDK4 表达下调、CDKN1A 表达上调, 与蛋白质组测序结果一致。说明 ZTO 联合 RT、HT 可能是通过上调 CDKN1A, 下调 CCND3、CDK4 使得 A549 细胞阻滞于 G₁ 期。综上所述, ZTO 联合 RT、HT 可通过改变细胞周期进程影响肺癌治疗的效果, 但是其具体作用机制有待进一步研究。

ZTO 联合 RT、HT 能够抑制小鼠肺癌肿瘤模型中肿瘤生长。在细胞水平上, ZTO 联合 RT、HT 能够抑制肺腺癌 A549 细胞增殖, 通过蛋白质学和生物信息学分析发现 ZTO 联合 HT 通过改变细胞周期进程增强肺腺癌 A549 细胞 RT 效果。通过 qRT-PCR 以及 Western blotting 实验验证 ZTO 联合 HT 可能是通过下调 CDK4、CCND3 和上调 CDKN1A 使细胞阻滞于 G₁ 期增强肺腺癌 A549 细胞对辐射的敏感性。综上所述, ZTO 联合 HT 可通过调控细胞周期发挥 RT 增敏作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-263.
- [2] Herbst R S, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer [J]. Nature, 2018, 553(7689): 446-454.
- [3] Harðardóttir H, Jonsson S, Gunnarsson O, et al. Advances in lung cancer diagnosis and treatment-a review [J]. Laeknabladid, 2022, 108(1): 17-29.
- [4] Latrèche A, Bourbonne V, Lucia F. Unrecognized thoracic radiotherapy toxicity: A review of literature [J]. Cancer/Radiothérapie, 2022, 26(4): 616-621.
- [5] Baker S, Fairchild A. Radiation-induced esophagitis in lung cancer [J]. Lung Cancer (Auckl), 2016, 7: 119-127.

- [6] Chandra R A, Keane F K, Voncken F E M, et al. Contemporary radiotherapy: Present and future [J]. *Lancet*, 2021, 398(10295): 171-184.
- [7] Forde P M, Spicer J, Lu S, et al. Neoadjuvant nivolumab plus chemotherapy in resectable lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2022, 386(21): 1973-1985.
- [8] Kong F M, Wang C R, Zhao L L, et al. Traditional Chinese medicines for non-small cell lung cancer: Therapies and mechanisms [J]. *Chin Herb Med*, 2023, 15(4): 509-515.
- [9] Yang Z R, Wang Z Z, Li J L, et al. Network pharmacology-based dissection of the underlying mechanisms of dyspnoea induced by zedoary turmeric oil [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2022, 130(5): 606-617.
- [10] Wu Y Z, Zhang Q, Li H, et al. Zedoary turmeric oil injection ameliorates lung inflammation via platelet factor 4 and regulates gut microbiota disorder in respiratory syncytial virus-infected young mice [J]. *Chin Med*, 2024, 19(1): 83.
- [11] Liu S Y, Zhao Y, Tang X, et al. *In vitro* inhibition of six active sesquiterpenoids in zedoary turmeric oil on human liver cytochrome P450 enzymes [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 322: 117588.
- [12] Wang Z Z, Wang A T, Wang X F, et al. β -Elemene in zedoary turmeric oil injection induces dyspnea by binding to hemoglobin and upregulating HIF-1 α [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 321: 117531.
- [13] 孔红芳, 袁书同, 袁飞龙, 等. 莪术油注射液化学成分、药理作用和临床应用的研究进展 [J]. *中草药*, 2023, 54(12): 4053-4060.
- Kong H F, Yuan S T, Yuan F L, et al. Research progress on chemical components, pharmacological effects and clinical application of Zedoary Turmeric Oil Injection [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, 54(12): 4053-4060.
- [14] Wang B, Liu F, Li Q, et al. Antifungal activity of zedoary turmeric oil against *Phytophthora capsici* through damaging cell membrane [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2019, 159: 59-67.
- [15] Wu Y Z, Zhang Q, Wei X H, et al. Multiple anti-inflammatory mechanisms of Zedoary Turmeric Oil Injection against lipopolysaccharides-induced acute lung injury in rats elucidated by network pharmacology combined with transcriptomics [J]. *Phytomedicine*, 2022, 106: 154418.
- [16] Zhu G H, Shen Q, Jiang H, et al. Curcumin inhibited the growth and invasion of human monocytic leukaemia SHI-1 cells *in vivo* by altering MAPK and MMP signalling [J]. *Pharm Biol*, 2020, 58(1): 25-34.
- [17] 袁文珺, 赵小梅, 杨志军, 等. 莪术油对人肺腺癌 A549 细胞增殖、迁移及细胞周期的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 2020, 31(11): 1312-1317.
- Yuan W J, Zhao X M, Yang Z J, et al. Effect of zedoary turmeric oil on the proliferation, migration and cell cycle of human lung adenocarcinoma A549 cells *in vitro* [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2020, 31(11): 1312-1317.
- [18] Kunnumakkara A B, Diagaradjane P, Guha S, et al. Curcumin sensitizes human colorectal cancer xenografts in nude mice to gamma-radiation by targeting nuclear factor-kappaB-regulated gene products [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(7): 2128-2136.
- [19] 王洪倩. 莪术油下调 OPN 基因表达抑制结肠癌细胞增殖及肝转移分子机制的研究 [D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2019.
- Wang H Q. Molecular mechanism of zedoary turmeric oil down-regulating OPN gene expression and inhibiting colon cancer cell proliferation and liver metastasis [D]. Hangzhou: Zhejiang Chinese Medical University, 2019.
- [20] Lin T Y, Jia J S, Luo W R, et al. ThermomiR-377-3p-induced suppression of Ctrbp expression is required for effective elimination of cancer cells and cancer stem-like cells by hyperthermia [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2024, 43(1): 62.
- [21] Lassche G, Crezee J, Van Herpen C L. Whole-body hyperthermia in combination with systemic therapy in advanced solid malignancies [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2019, 139: 67-74.
- [22] Dharmaiah S, Zeng J, Rao V S, et al. Clinical and dosimetric evaluation of recurrent breast cancer patients treated with hyperthermia and radiation [J]. *Int J Hyperthermia*, 2019, 36(1): 986-992.
- [23] Son B, Jeon J, Lee S, et al. Radiotherapy in combination with hyperthermia suppresses lung cancer progression via increased NR4A3 and KLF11 expression [J]. *Int J Radiat Biol*, 2019, 95(12): 1696-1707.
- [24] Yan L, Wu M, Ba N, et al. Changes in T-lymphocytes in lung cancer patients after hyperthermic intraperitoneal chemotherapy or radiotherapy [J]. *Genet Mol Res*, 2016, 15(2): GMRvol.15, 210.4238/gmr.15027865.10Jun.2016.
- [25] Wu Y, Song Y Q, Wang R Z, et al. Molecular mechanisms of tumor resistance to radiotherapy [J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 96.
- [26] Larionova I, Rakina M, Ivanyuk E, et al. Radiotherapy resistance: Identifying universal biomarkers for various human cancers [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2022, 148(5): 1015-1031.
- [27] Monti C, Zilocchi M, Colugnat I, et al. Proteomics turns

- functional [J]. J Proteomics, 2019, 198: 36-44.
- [28] KhalKhal E, Rezaei-Tavirani M, Rostamii-Nejad M. Pharmaceutical advances and proteomics researches [J]. Iran J Pharm Res, 2019, 18(Suppl1): 51-67.
- [29] Kumari N, Raghavan S C. G-quadruplex DNA structures and their relevance in radioprotection [J]. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2021, 1865(5): 129857.
- [30] Ding Z Y, Wang N, Ji N, et al. Proteomics technologies for cancer liquid biopsies [J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 53.
- [31] Kang J K, Kim J C, Shin Y, et al. Principles and applications of nanomaterial-based hyperthermia in cancer therapy [J]. Arch Pharm Res, 2020, 43(1): 46-57.
- [32] Li Y M, Zhao Q L, Ogawa R, et al. Synergistic inhibition of autophagic flux and induction of apoptosis in cervical cancer cells by Mito-TEMPO and hyperthermia [J]. Environ Health Prev Med, 2025, 30: 67.
- [33] Wishart D S. Is cancer a genetic disease or a metabolic disease ? [J]. EBioMedicine, 2015, 2(6): 478-479.
- [34] Mao Y Z, Zhang J J, You M Q, et al. CDH1 orchestrates anabolic events to promote cell cycle initiation [J]. Adv Sci (Weinh), 2025, 12(47): e07584.
- [35] Lin J, Liu G, Chen L D, et al. Targeting lactate-related cell cycle activities for cancer therapy [J]. Semin Cancer Biol, 2022, 86: 1231-1243.
- [36] Halazonetis T D, Gorgoulis V G, Bartek J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development [J]. Science, 2008, 319(5868): 1352-1355.
- [37] Larsen B D, Benada J, Yung P Y K, et al. Cancer cells use self-inflicted DNA breaks to evade growth limits imposed by genotoxic stress [J]. Science, 2022, 376(6592): 476-483.
- [38] Crozier L, Foy R, Mouery B L, et al. CDK4/6 inhibitors induce replication stress to cause long-term cell cycle withdrawal [J]. EMBO J, 2022, 41(6): e108599.
- [39] Ahmed M B, Alghamdi A A A, Islam S U, et al. The complex roles of DNA repair pathways, inhibitors, hyperthermia, and contact inhibition in cell cycle halts [J]. Mini Rev Med Chem, 2023, 23(5): 514-529.
- [40] Khan M G M, Wang Y. Advances in the current understanding of how low-dose radiation affects the cell cycle [J]. Cells, 2022, 11(3): 356.

[责任编辑 兰新新]