

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2024.09.002

❖ 基础研究 ❖

# 芍药苷通过影响 EGFR/RhoA 通路在非小细胞肺癌 A549 细胞中的抗肿瘤活性

侯益<sup>1</sup>, 冯先虎<sup>2</sup>, 冷衍恩<sup>1</sup>, 魏榆洵<sup>3</sup>, 曾悦<sup>1</sup>, 石林<sup>1</sup>, 李虹<sup>4</sup>, 权甜<sup>1</sup>

(1. 中江县人民医院临床药学科, 四川 德阳 618100; 2. 南充市中心医院个体化药物治疗南充市重点实验室, 四川 南充 637000; 3. 中江县人民医院药剂科, 四川 德阳 618100; 4. 四川大学华西临床医学院, 四川 成都 610000)

**【摘要】目的:** 探究基于生信靶点和基础实验研究芍药苷(PF)对人非小细胞肺癌细胞(A549)的潜在抗肿瘤活性机制。**方法:** 分别采用 CCK-8 实验、平板克隆实验、细胞划痕实验及流式细胞术实验检测 PF 对 NSCLC 细胞系 A549 生长、迁移和凋亡的影响; 利用 SwissTargetPrediction、PharmMapper 和 ChEMBL 数据库检索 PF 的相关靶点, 通过 GeneCards、DisGeNET 和 OMIM 数据库中检索 NSCLC 的靶点, 使用 STRING 和 DAVID 数据库进行蛋白质-蛋白质分析与富集分析, 运用 SYBYL 软件对排名前 10 靶点对应的蛋白质与 PF 进行分子对接, 应用 Western blot 检测 PF 对 p-AKT 和 p-EGFR 和 RhoA 蛋白表达。**结果:** CCK-8 和平板克隆实验表明 PF 能有效抑制肺癌细胞生长。50  $\mu\text{mol/L}$  和 100  $\mu\text{mol/L}$  的 PF 在 24 h 对 A549 细胞的迁移率分别为 22.89%、13.78%, 低于空白组的 55.85% ( $P < 0.05$ )。PF 在 24 h 对 A549 细胞的凋亡率高于对照组 ( $P < 0.05$ )。基因靶点预测与验证结果显示: PF 与 NSCLC 的核心靶点为 32 个, 对 NSCLC 富集分析发现, 包含 PI3K-AKT、MAPK、Ras、Rap1、雌激素、FoxO 和 VEGF 信号通路等 7 条潜在作用通路。分子对接结果显示, 与 PF 作用排名前三的蛋白质分别为 RhoA、AKT 和 EGFR。与对照组相比, PF 干预 A549 细胞后 p-AKT 和 p-EGFR 和 RhoA 的表达水平降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。**结论:** PF 可能通过调控 EGFR/RhoA 通路抑制非小细胞肺癌 A549 细胞生长、迁移并促进其凋亡。

**【关键词】** 芍药苷; 非小细胞肺癌; 抗癌机制; EGFR/RhoA 信号通路

**【中图分类号】** R96 **【文献标志码】** A

## The antitumor activity of paeoniflorin in non-small cell lung cancer A549 cells via EGFR / RhoA pathway

HOU Yi<sup>1</sup>, FENG Xian-hu<sup>2</sup>, LENG Yan-en<sup>1</sup>, WEI Yu-xun<sup>3</sup>, ZENG Yue<sup>1</sup>, SHI Lin<sup>1</sup>, LI Hong<sup>4</sup>, QUAN Tian<sup>1</sup>

(1. Department of Clinical Pharmacology, Zhongjiang County People's Hospital, Deyang 618100; 2. Nanchong Key Laboratory of Personalized Medicine Therapy, Nanchong Central Hospital, Nanchong 637000; 3. Department of Pharmacy, Zhongjiang People's Hospital, Deyang 618100; 4. West China College of Clinical Medicine, Sichuan University, Chengdu 610000, Sichuan, China)

**【Abstract】 Objective:** To explore the potential antitumor mechanism of Paeoniflorin (PF) induced human non-small cell lung cancer (A549) cells by combination with basic experiments and bioinformation methods. **Methods:** The effects of PF on the viability, migration and apoptosis of NSCLC cell line A549 were detected by CCK-8 assay, colony-formation assay, wound healing assay and flow cytometry respectively. The related targets of PF were collected from SwissTargetPrediction, PharmMapper and ChEMBL databases. The NSCLC targets were collected from GeneCards, DisGeNET and OMIM databases. STRING and DAVID databases were used to conduct protein-protein analysis and enrichment analysis of common targets. SYBYL software was used to simulated the interaction of PF with the proteins corresponding to the top 10 targets, and Western blot was used to detect the expression of p-AKT, p-EGFR, and RhoA protein treated by PF on A549 cells. **Results:** The CCK-8 and colony-formation experiment showed that PF could inhibit cell growth effectively. The migration rates of A549 cells treated with 50  $\mu\text{mol/L}$  and 100  $\mu\text{mol/L}$  PF at 24 h was 22.89% and 13.78%, respectively, which was lower than that of the 0  $\mu\text{mol/L}$  group (55.85%,  $P < 0.05$ ). The apoptosis rate of A549 cells treated with PF at 24 h was higher than that of the control group ( $P < 0.05$ ). The results of gene target prediction and verification showed 32 core targets of PF and NSCLC were identified by topological analysis. KEGG enrichment analysis revealed 7 pathways including PI3K-AKT, MAPK, Ras, Rap1, estrogen, FoxO and VEGF signaling pathways. SYBYL showed that RhoA, AKT and EGFR were the top 3 proteins with the highest binding scores to PF. Compared with the control group, the expression of core proteins including p-AKT, p-EGFR and RhoA was de-

基金项目: 四川省德阳市重点研发项目(2022SZ043; 2023SZZ111; 2023SZZ115)

作者简介: 侯益(1994-), 男, 硕士, 主管药师。E-mail: houyi94@163.com

通讯作者: 权甜。E-mail: tianquan26@163.com

creased after PF intervention, which were statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** PF could inhibit the proliferation, migration and promote apoptosis of NSCLC A549 cells by regulating the EGFR/RhoA pathway.

**【Key words】** Paeoniflorin; Non-small cell lung cancer; Anticancer mechanism; EGFR/RhoA signaling pathway

肺癌是世界上第二常见的癌症,也是死亡率最高的癌症之一。肺癌可分为小细胞肺癌和非小细胞肺癌,值得注意的是85%的肺癌为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)。世界卫生组织(WHO)研究<sup>[1]</sup>表明,肺癌是我国发病率和致死率最高的肿瘤之一。目前,针对NSCLC的治疗仍然以手术治疗、放射治疗、化疗和免疫治疗为主要手段<sup>[2-4]</sup>。近年来,新兴发展的靶向治疗极大的提高了患者的生存率和生活质量。但总体仍未取得令人满意的成效。同时,NSCLC细胞容易发生靶点突变使其对药物的敏感性降低,也对药物的研发带来了巨大挑战<sup>[5]</sup>。传统中药是我国的物质文化瑰宝,在抗肿瘤方面有广泛应用,具有多靶点、多途径、毒副作用小、降低放化疗药物的毒性及预防肿瘤的复发转移等多重作用,已被广大肿瘤患者所接受,成为开发新型抗肿瘤药物的重要资源。因此,从传统中药中寻找具有潜在抗肿瘤活性成分已成为近年来药物开发领域的研究热点。

芍药苷(paeoniflorin, PF)为芍药(paeonia lactiflora pall)中一种单萜糖苷类的活性单体成分,具有多种药理活性,其主要药理作用为保肝、镇痛、抗炎、抗肿瘤等<sup>[6-9]</sup>。PF对多种癌症均有良好的抗癌效果。然而,对于肺癌而言,特别是NSCLC,目前仅有少量文献<sup>[10]</sup>研究PF对肺癌的作用。遗憾的是,PF对NSCLC的作用机制目前仍缺乏深入探究。同时,对于PF对NSCLC的作用靶点仍然未有一个明确的结论。在此基础上,本研究拟通过研究PF对NSCLC细胞的增殖、迁移和凋亡的影响,并结合分子靶点和蛋白组学探讨PF治疗NSCLC的潜在作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株

人A549细胞株、人正常肺上皮细胞BEAS-2B株(四川大学临床医学院及西南医科大学附属医院肿瘤科提供)。

### 1.2 主要试剂与仪器

芍药苷(PF,购自阿拉丁,纯度 $\geq 98\%$ );DMEM培养基、0.25% Trypsin(美国Gibco公司),细胞毒性检测试剂盒(CCK-8,上海 Beyotime 公司);AKT、EGFR及RhoA抗体购自(cell signaling technology, CST)公司。CO<sub>2</sub>恒温培养箱(日本SANYO);倒置显微镜(日本OLYMPUS);酶标仪(美国Thermo);

流式细胞仪(美国BECKMAN);电泳仪、转膜仪(北京六一生物科技有限公司);低速离心机(德国Eppendorf);全视野细胞扫描仪(美国Nexcelom)。

### 1.3 方法

1.3.1 细胞培养 采用DMEM培养基(含10% FBS + 1% 双抗)对A549、BEAS-2B细胞进行培养,培养条件:温度37℃,5% CO<sub>2</sub>。

1.3.2 CCK-8检测细胞活性 A549和BEAS-2B细胞接种到96孔板( $4 \times 10^3$ 细胞/孔)培养24h,经PF(0、1.56、3.125、6.25、12.5、25、50、100、200、400  $\mu\text{mol/L}$ )处理24h。用CCK-8加入10  $\mu\text{L}$ /孔,培养2h。450nm处测定吸光度。细胞活力的计算公式如下:细胞活力(%) = (药物组吸光度/对照组吸光度)  $\times 100\%$ 。

1.3.3 细胞划痕实验检测迁移实验 将A549细胞以每孔2mL细胞悬液接种于6孔板中,待细胞愈合度达到80%~90%时,用无菌枪头在细胞贴壁部分划出一块空白区域,PBS洗涤两次后,显微镜拍照记录0h的细胞划痕宽度(W)。PF溶液培养24h后,PBS洗涤两次后,显微镜下拍照记录24h的细胞划痕愈合情况。划痕愈合率 = (W<sub>0h</sub> - W<sub>24h</sub>) / W<sub>0h</sub>  $\times 100\%$ 。W<sub>0h</sub>、W<sub>24h</sub>分别表示0、24h的细胞划痕宽度。

1.3.4 平板克隆形成实验 A549细胞接种于6孔板中,细胞密度为 $5 \times 10^3$ 个/孔,分别加入浓度为0、50和100  $\mu\text{mol/L}$ 的PF,培养6h后去除含药培养基,加入相同体积的培养基继续培养1周。PBS洗涤两次,使用0.1%结晶紫染色液染色30min。冲洗后用4%多聚甲醛固定30min,在低倍镜下计数,并用相机和细胞扫描仪进行拍照,采用Image J进行分析统计。

1.3.5 细胞凋亡检测 A549细胞接种于6孔板中( $1.5 \times 10^5$ 细胞/孔),待细胞愈合度达到80%~90%时,分别加入浓度为0、50和100  $\mu\text{mol/L}$ 的PF作用24h,将A549细胞重悬,将5  $\mu\text{L}$  AnnexinV-FITC/PI在避光条件下加入进行染色30min,后加入缓冲液,使用流式细胞仪检测PF对凋亡情况的影响。

1.3.6 PF、NSCLC靶点收集 PubChem数据库中获取PF的结构文件,分别从SwissTargetPrediction、PharmMapper和ChEMBL三个数据库中根据PF结构检索并获取靶点。将各数据库的靶点通过Uni-

prot 去除重复项得到 PF 的药物靶点。以“non-small cell lung cancer”为关键词从 GeneCards、DisGeNET 和 OMIM 三个数据库中检索搜集 NSCLC 的靶点。分别对检索到的靶点进行规范,去除重复项,从而得到 NSCLC 的疾病靶点。

1.3.7 蛋白质-蛋白质互作网络构建及核心靶点分析 使用 jvenn 在线工具来确定 PF 和 NSCLC 的交集靶点,并建立 Venn 图。将交集靶点导入 STRING 数据库进行蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)分析,设置置信度为 0.4,去除孤立靶点,PPI 结果导入 Cytoscape v 3.7.1 软件中进行拓扑分析并可视化作图。以度值(degree) > 2 倍中值,中介中心性(betweenness centrality)和接近中心性(closeness centrality)分别大于其中值进行筛选得到核心靶点。

1.3.8 GO 与 KEGG 富集分析 将交集靶点导入 DAVID 数据库,限定物种为“Homo Sapiens”,进行 GO 和 KEGG 富集分析。分别选取 GO 富集分析中生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)富集分析数据中, $P$ 值从小到大排名前 10 的条目,以及 KEGG 通路富集分析中  $P$ 值从小到大排名前 20 的条目,导入分析网站(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)中绘制 GO 或 KEGG 可视化图。

1.3.9 分子对接 将 1.3.8 得到的排名前 10 的核心靶点相关蛋白进行分子对接。从 PDB 数据库中分别获取靶蛋白的三维结构,从 PubChem 数据库中获取 PF 的三维结构。将 SDF 格式的化合物导入 SYBYL-X 2.0 软件,添加原子电荷,指定原子类型。采用 Surflex Dock (SFXC) 作为对接模式。以 SFXC 评分评价其结合亲和力,得分大于 7.00 表示具有较强的结合活性。

1.3.10 细胞相关分子蛋白水平 采用 Western blot 法检测相关分子蛋白水平。收集 PF 干预后的 A549 细胞,提取蛋白,经 BCA 蛋白测定后,变性保存。按照 SDS-PAGE 凝胶制备方法,配置分离胶,并进行蛋白质电泳。电泳完毕后转移到 PVDF 膜进行转膜。次经洗涤后,标记一抗 1:1 000 稀释,4 °C 孵育过夜。后洗涤,再标记二抗 1:5 000 稀释,洗涤显色后曝光。采用 Image J 软件进行蛋白条带分析。

#### 1.4 统计学分析

采用 SPSS 22.0 和 Prism 6.01 软件对数据进行分析。计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PF 对 A549 细胞增殖的影响

据文献<sup>[11]</sup>报道,PF 抑制 A549 的作用呈浓度依赖性。为得到适宜的实验浓度,分别探究了 PF 对肺正常 BEAS-2B 细胞和 A549 细胞进行了试验。在低浓度( $\leq 25 \mu\text{mol/L}$ )时,PF 对正常细胞几乎无作用。随着浓度的增加,PF 对 A549 细胞呈现一定的浓度依赖性。对于 BEAS-2B 细胞,PF 仅在 200  $\mu\text{mol/L}$  和 400  $\mu\text{mol/L}$ ,呈现较弱的抑制作用。见图 1。

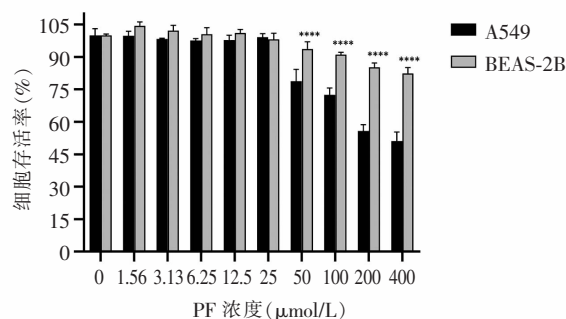


图 1 芍药苷(PF)对 A549 和 BEAS-2B 细胞的增殖作用( $n=3$ )  
\*\*\*\* $P < 0.001$ ,与 A549 组相比。

### 2.2 PF 对细胞迁移的影响

细胞划痕实验表明,50  $\mu\text{mol/L}$  和 100  $\mu\text{mol/L}$  的 PF 经过 24 h 干预后,其迁移率分别为 22.89%、13.78%,均低于空白组迁移率 55.85%,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 2。

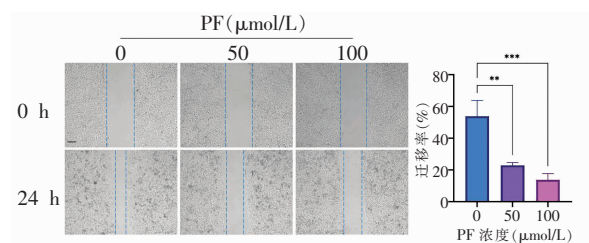


图 2 芍药苷(PF)对 A549 细胞迁移的影响( $n=3$ )  
\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ,与 0  $\mu\text{mol/L}$  PF 组相比。

### 2.3 PF 对肺癌细胞克隆形成的影响

平板克隆形成实验显示,50  $\mu\text{mol/L}$  和 100  $\mu\text{mol/L}$  的 PF 在短暂干预细胞后,对 A549 细胞集落分别为( $246.66 \pm 86.68$ )和( $86.66 \pm 13.61$ ),均低于空白对照组的集落数量( $541.66 \pm 94.92$ ),差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 3。

### 2.4 PF 对肺癌细胞凋亡的影响

经流式细胞仪检测显示,A549 细胞在 50、100  $\mu\text{mol/L}$  浓度的 PF 作用 24 h 后,A549 细胞的凋亡率分别 19.75% 和 27.65%,与对照组相比,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 4。

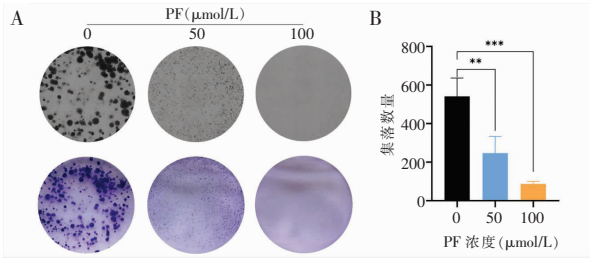


图 3 芍药苷(PF)对 A549 细胞克隆形成的作用(n=3)  
A. 仪器扫描及相机拍照图;B. PF 浓度与集落数量柱状图, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , 与 0  $\mu\text{mol/L}$  PF 组相比。

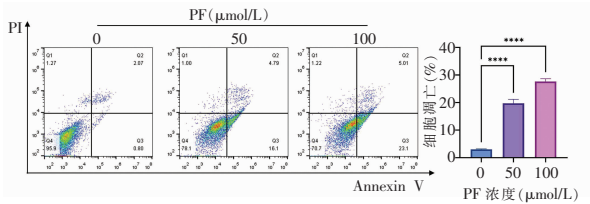


图 4 芍药苷对 A549 细胞凋亡率的影响(n=3)  
\*\*\*\* $P < 0.0001$ , 与 0  $\mu\text{mol/L}$  PF 组相比。

### 2.5 PF 治疗 NSCLC 的潜在作用靶点

根据 PF 的结构从 SwissTargetPrediction、PharmMapper、ChEMBL 分别检索得到 63、287 和 12 个靶点, 去除重复项后得到 347 个靶点。从 GeneCards、DisGeNET 和 OMIM 三个数据库中检索到 4 762、3 926 和 410 个与 NSCLC 相关的靶点, 去除重复项后得到 6 123 个靶点。以 jvenn 可视化平台绘制 PF 与 NSCLC 韦恩图, 得到 172 个交集靶点(共同靶点)。见图 5。

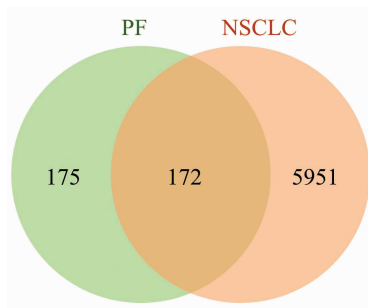


图 5 芍药苷(PF)与 NSCLC 交集靶点 Venn 图

### 2.6 PPI 网络及核心靶点

将 PF 治疗 NSCLC 的交集靶点分别导入 STRING 分析, 并利用 Cytoscape 软件建立 PPI 网络。通过 Cytoscape 软件分析数据, PF 与 NSCLC 的交集靶点中 2 倍度值分别为 28 和 20, 中介中心性分别为 0.018 48 和 0.021 27, 接近中心性分别为 0.480 8 和 0.426 5, 筛选出 PF 治疗 NSCLC 的核心靶点为 32 个。见表 1 及图 6。

### 2.7 GO 及 KEGG 富集分析

从 DAVID 数据库中得到交集靶点的 GO 和 KEGG 富集分析结果, 选取 GO 富集前 10 条目,

KEGG 富集前 20 条目进行可视化。结果表明, PF 干预 NSCLC 与 PI3K-AKT、MAPK、Ras、Rap1、雌激素、FoxO 和 VEGF 等信号通路具有相关性。见图 7。

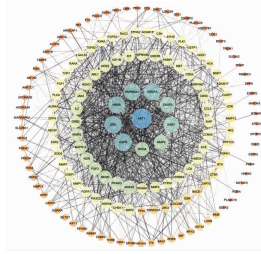


图 6 芍药苷(PF)与 NSCLC 蛋白互作 PPI 网络图

表 1 芍药苷与 NSCLC 的核心靶点蛋白

核心靶点	中介中心性	接近中心性	度值
丝氨酸/苏氨酸激酶 1 (AKT1)	1.059 607 926	0.752 747 253	100
表皮生长因子受体 (EGFR)	1.511 862 106	0.724 637 681	80
SRC 原癌基因, 非受体酪氨酸激酶 (SRC)	0.880 500 643	0.875 000 000	80
原癌基因 HRAS, GTP ase (HRAS)	3.009 122 155	0.672 897 196	76
热休克蛋白 90 $\alpha$ 家族 A 类成员 1 (HSP90AA1)	2.826 579 970	0.696 969 697	75
血管内皮生长因子 A (VEGFA)	0.089 301 531	1.000 000 000	75
含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (CASP3)	1.227 833 870	0.642 857 143	67
雌激素受体 $\alpha$ (ESR1)	1.307 348 126	0.644 927 536	66
基质金属蛋白酶 9 (MMP9)	0.931 015 700	0.604 651 163	56
RhoGTP 酶 Ras 同源家族成员 A (RH0A)	0.489 467 391	0.625 000 000	53
膜连蛋白 A5 (ANXA5)	0.127 534 130	0.600 000 000	50
过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (PPARG)	0.458 205 068	0.714 285 714	48
E3 泛素蛋白连接酶 Mdm2 (MDM2)	0.843 211 864	0.594 594 595	46
成纤维细胞生长因子 2 (FGF2)	0.403 966 822	0.551 020 408	45
激酶插入域受体 (KDR)	0.412 803 037	0.546 391 753	44
丝裂原活化蛋白激酶 14 (MAPK14)	0.703 541 928	0.614 035 088	43
基质金属蛋白酶 2 (MMP2)	0.179 073 170	0.557 377 049	42
生长因子受体结合蛋白 (GRB2)	0.410 788 943	0.561 151 079	38
白细胞介素 2 (IL2)	0.611 591 180	0.595 959 596	38
Janus 激酶 2 (JAK2)	0.387 792 544	0.544 554 455	36
组蛋白去乙酰化酶 (HDAC1)	0.422 963 638	0.548 148 148	35
胰岛素样生长因子 1 受体 (IGF1R)	0.109 088 491	0.554 455 446	34
内皮型一氧化氮合酶 (NOS3)	0.446 748 664	0.628 571 429	34
受体酪氨酸激酶 (KIT)	0.329 363 463	0.510 204 082	33
热休克蛋白 90 $\alpha$ 家族 B 类成员 1 (HSP90AB1)	0.166 935 926	0.534 482 759	33
糖原合成酶激酶-3 (GSK3B)	0.137 109 127	0.542 857 143	33
间质上皮转化因子 (MET)	0.209 182 413	0.528 571 429	31
聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶 1 (PARP1)	0.143 690 249	0.653 846 154	31
细胞周期蛋白依赖性激酶 2 (CDK2)	0.076 102 395	0.500 000 000	30
纤溶酶原激活物抑制剂-1 (SERPINE1)	0.059 641 842	0.571 428 571	30
周期蛋白依赖性激酶 (CDK6)	0.123 982 712	0.500 000 000	29
趋化因子配体 5 (CCL5)	0.153 824 308	0.504 807 692	29

### 2.8 分子对接结果验证

分别对排名前 10 名的核心靶点与 PF 进行对接。其中, 3 个核心蛋白的对接分数大于 7.00, 根据排名先后分别为 RhoA (对接分数: 7.961 8)、AKT (对接分数: 7.803 6) 和 EGFR (对接分数: 7.131 5)。

见表 2 及图 8。

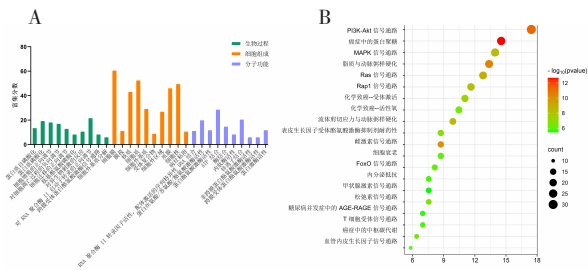


图 7 富集分析图

A. 芍药苷(PF)治疗 NSCLC 活性成分-疾病共同靶点 GO 富集图; B. KEGG 分析。

表 2 分子对接结果

等级	基因名称	蛋白名称	PDB ID	得分(分)
10	RhoA	Ras 同系物家族成员 A	5a0f	7.961 8
1	AKT1	RAC- $\alpha$ 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶	6npz	7.803 6
2	EGFR	表皮生长因子受体	7jxq	7.131 5
8	ESR1	雌激素受体	1err	6.722 4
5	HSP90AA1	热休克蛋白 90 $\alpha$ 家族 A 类成员 1	2bz5	6.570 3
15	KDR(VGFR2)	血管内皮生长因子受体 2	1y6a	6.409 1
6	VEGFA	血管内皮生长因子 A	3qtk	6.387 4
12	PPARG	过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$	1zeo	6.310 7
16	MAPK14	丝裂原活化蛋白激酶激酶 14	1a9u	6.136 9
9	MMP9	基质金属蛋白酶-9	1itv	5.607 4
13	MDM2	E3 泛素蛋白连接酶 Mdm2	6q9h	5.416 1
7	CASP3	半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3	1nmq	5.273 5
14	FGF2	碱性成纤维细胞生长因子 2	1bif	4.479 7
11	ANXA5	人膜联蛋白 A5	1anw	4.451 6
3	SRC	SRC 原癌基因, 非受体酪氨酸激酶	1o4h	4.411 7
4	HRAS	HRas 原癌基因, GTP 酶	6zj0	3.641 7

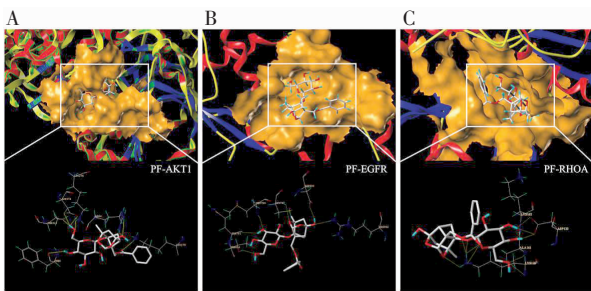


图 8 分子对接 3D 图

A. 芍药苷 (PF) 与 AKT1 对接结果; B. PF 与 EGFR 对接结果; C. PF 与 RhoA 对接结果。

### 2.9 PF 对肺癌 p-AKT、p-EGFR 和 RhoA 蛋白表达的影响

Western Blot 检测肺癌细胞 A549 细胞中 AKT、EGFR 和 RhoA 的蛋白表达的结果,与未加 PF 的组相比,50  $\mu\text{mol/L}$  和 100  $\mu\text{mol/L}$  的 PF 在干预细胞后,p-AKT、p-EGFR 和 RhoA 的表达降低,且 p-AKT/AKT、p-EGFR/EGFR 和 RhoA 的抑制作用均强于空白对照,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 9。

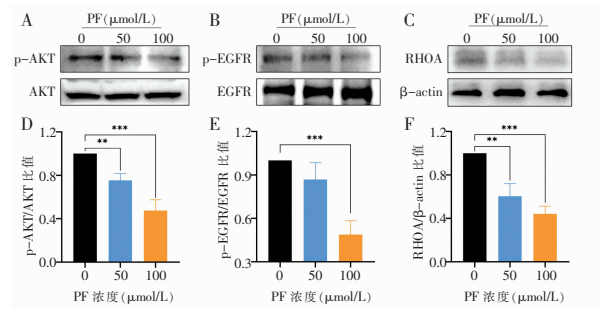


图 9 核心蛋白表达结果

A-C. 芍药苷(PF)对 A549 细胞中 AKT、EGFR 和 RhoA 的表达; D-F. 直方图显示了相对密度的统计分析。\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ,与 0  $\mu\text{mol/L}$  PF 组相比。

### 3 讨论

报道<sup>[12]</sup>显示,肺癌的发病率和死亡率仍位居我国癌症首位。在放疗、化疗以及联合靶向治疗及免疫治疗的新形势下,虽疗效和生存率略有提高,但患者仍会出现不同程度的耐药及副作用<sup>[13]</sup>。中药在临床治疗中,常作为辅助用药配合西医治疗 NSCLC。已有大量实践和研究<sup>[14]</sup>证明,中药在肺癌靶向治疗的疗程中起着一定的作用,如减轻毒副作用保证靶向治疗疗程的完整性、减轻肺癌症状改善生活质量、增强抗肿瘤疗效、逆转靶向药物耐药、提高生存率等。

在肿瘤治疗方面,PF 可能通过 BNIP3、Bcl-2 家族蛋白、NF- $\kappa$ B 信号通路、Fas/FasL 信号通路、JNK 信号通路等不同信号通路诱导癌细胞凋亡,同时可能通过胞外信号调节激酶(ERK)抑制肿瘤发生和发展<sup>[15]</sup>。但是,PF 对肺癌的作用靶点及通路尚未有研究证实。

本研究中,通过细胞迁移实验、平板克隆实验和细胞凋亡实验,验证了 PF 对 NSCLC 具有良好的抗肿瘤活性,表明 PF 可以通过抑制细胞增殖和迁移以及促进细胞凋亡来抑制癌细胞的生长和转移。

为了探索 PF 对细胞的凋亡机制,本研究对 PF 治疗 NSCLC 的核心靶点和作用机制进行了研究。结果显示,PF 治疗 NSCLC 的排名前三的蛋白分别是 RhoA、AKT 和 EGFR。RhoA 是小分子 GTP 酶,而 ROCK 是 RhoA 信号通路下游的一个靶标,RhoA/ROCK 通路参与细胞的生长、分化、迁移和发育<sup>[16]</sup>,并可通过增强细胞屏障的通透性从而调节细胞炎症<sup>[17]</sup>。表皮生长因子受体(EGFR)是一种跨膜受体酪氨酸激酶,该区域的激活即磷酸化对癌细胞增殖、存活和血管生成具有重要作用<sup>[18]</sup>,可通过 EGFR-Ras/Raf/MEK/ERK 和 EGFR-PI3K/AKT 通路诱导肿瘤细胞的增殖和迁移。此外,EGFR 可以通过定位于细胞核以促进细胞增殖,介导自噬细胞活性的失调,

刺激几种基质金属蛋白酶对促进癌症侵袭和转移的作用,以及介导抑制致癌转录因子的 mRNA 丰度的减少,促进肿瘤细胞的生长<sup>[19]</sup>。同时,AKT 是一种丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶,磷酸化的 AKT 能抑制细胞凋亡,刺激细胞周期进程。AKT 可间接激活细胞生长和代谢的主调节因子 mTORC1,从而促进癌细胞生长<sup>[20]</sup>。分子内对接结果表明,PF 与 RhoA、AKT 和 EGFR 蛋白具有强结合力。Western blot 结果表明,PF 可以抑制 RhoA、p-AKT 和 p-EGFR 蛋白表达,进一步验证了 PF 可通过抑制细胞生长、迁移和促进细胞凋亡来阻断 NSCLC 的发展。

GO 及 KEGG 结果显示,PF 治疗 NSCLC 主要涉及 PI3K-AKT、MAPK、Ras 等通路。PI3K/Akt/mTOR 通路和信号级联在调节细胞生长和代谢中起着至关重要的作用。在 NSCLC 中,激活 PI3K/Akt 信号通路可抑制细胞凋亡,促进肿瘤组织的侵袭和转移<sup>[21]</sup>。Ras/MAPK 信号可通过调控 RhoA、cyclins 和 MMPs23,促进肿瘤的增殖和迁移。在 NSCLC 中,Ras/MAPK 的过度表达可诱导肿瘤细胞的增殖迁移<sup>[22]</sup>。上述实验均表明,PF 可以通过抑制肿瘤细胞的增殖和迁移发挥治疗 NSCLC 的作用。

综上,PF 具有抗 NSCLC 的作用,其可能与 PI3K/AKT 和 EGFR/RhoA 通路抑制相关,为 PF 的后续基础研究和临床应用提供理论依据和实验基础。

#### 参考文献

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA: a Cancer Journal for Clinicians, 2021, 71(3): 209 - 249.

[2] Wang M, Herbst RS, Boshoff C. Toward personalized treatment approaches for non-small-cell lung cancer[J]. Nature Medicine, 2021, 27(8): 1345 - 1356.

[3] Vinod SK, Hau E. Radiotherapy treatment for lung cancer: current status and future directions[J]. Respiriology, 2020, 25(Suppl 2): 61 - 71.

[4] Zugazagoitia J, Paz-Ares L. Extensive-stage small-cell lung cancer: first-line and second-line treatment options[J]. Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology, 2022, 40(6): 671 - 680.

[5] To KKW, Chow JCH, Cheung KM, et al. Circumvention of gefitinib resistance by repurposing flunarizine via histone deacetylase inhibition[J]. ACS Pharmacology & Translational Science, 2023, 6(10): 1531 - 1543.

[6] 章丽,赵冰洁,袁嘉瑞,等.牡丹皮、赤芍与白芍对急性血瘀模型大鼠活血功效的比较研究[J].中草药,2016,47(15): 2676 - 2683.

[7] 牟翔宇,郭英慧,孙文君,等.柴胡配伍白芍治疗 PMDD 肝气郁证的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(20):192 - 199.

[8] 左志燕,詹淑玉,黄媛,等.白芍总苷保肝作用的药动学和药效学研究进展[J].中国中药杂志,2017,42(20):3860 - 3865.

[9] 王成龙.基于白芍养血柔肝功效的芍药苷、芍药内酯苷药理作用研究[D].北京:北京中医药大学,2017.

[10] 李燕,彭亮,蒋立峰,等.芍药苷干预 Hippo 信号通路诱导非小细胞肺癌凋亡的机制[J].中国实验方剂学杂志,2024,30(12):1 - 7.

[11] Hung JY, Yang CJ, Tsai YM, et al. Antiproliferative activity of paeoniflorin is through cell cycle arrest and the Fas/Fas ligand-mediated apoptotic pathway in human non-small cell lung cancer A549 cells[J]. Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology, 2008, 35(2):141 - 147.

[12] Chhikara BS, Parang K. Global cancer statistics 2022: The trends projection analysis[J]. Chemical Biology Letters, 2023, 10(1): 451 - 451.

[13] 崔少华,葛晓晓,李向阳.免疫相关不良事件在肺癌中发生和结局的真实世界研究[J].中国肺癌杂志,2023,26(4): 257 - 264.

[14] 周珍,张莹莹.中医中药在肺癌靶向治疗中研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2018,20(9):167 - 170.

[15] 葛永斌,程孝中,燕傲蕾,等.芍药苷抗肿瘤作用机制研究进展[J].中药材,2015,38(3):636 - 639.

[16] 李萍,孙敏,吴伟. lncRNA HOXB-AS3 靶向 miR-379-5p 调节类风湿性关节炎滑膜成纤维细胞增殖、迁移和侵袭的机制研究[J].河北医药,2021,43(11):1616 - 1620.

[17] Zheng X, Mai L, Wang T, et al. Brusatol-enriched *Brucea javanica* oil ameliorated dextran sulfate sodium-induced colitis in mice: involvement of NF- $\kappa$ B and RhoA/ROCK signaling pathways[J]. BioMed Research International, 2021, 2021:5561221.

[18] Singh B, Coffey RJ. Trafficking of epidermal growth factor receptor ligands in polarized epithelial cells[J]. Annual Review of Physiology, 2014, 76:275 - 300.

[19] Rajaram P, Chandra P, Ticku S, et al. Epidermal growth factor receptor: role in human cancer[J]. Indian Journal of Dental Research: Official Publication of Indian Society for Dental Research, 2017, 28(6):687 - 694.

[20] Fumarola C, Bonelli MA, Petronini PG, et al. Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in non small cell lung cancer[J]. Biochemical Pharmacology, 2014, 90(3):197 - 207.

[21] Tan AC. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. Thoracic Cancer, 2020, 11(3): 511 - 518.

[22] Liu Z, Zhao M, Jiang X, et al. Upregulation of KLHL17 promotes the proliferation and migration of non-small cell lung cancer by activating the Ras/MAPK signaling pathway[J]. Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology, 2022, 102(12):1389 - 1399.

(收稿日期:2024-01-18

修回日期:2024-05-30)