

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.08.004

· 基础研究 ·

光甘草定对肺腺癌 A549 细胞恶性生物学行为的影响及其分子机制

贺彬丽¹, 李善智¹, 李一权¹, 韩继成¹, 李霄², 房金波¹, 金宁一^{1,2}, 田桐¹, 薛志龙¹, 朱羿龙¹, 李卓昕², 朱光泽³
(1. 长春中医药大学 吉林省院士工作站, 吉林 长春 130117; 2. 中国农业科学研究院 长春兽医研究所, 吉林 长春 130122; 3. 长春中医药大学附属医院 检验科, 吉林 长春 130021)

[摘要] **目的:** 探讨光甘草定对肺腺癌细胞 A549 恶性生物学行为的影响及其分子机制。**方法:** 常规方法培养 A549 细胞和正常人肺上皮细胞 BEAS-2B, 用不同浓度的光甘草定和或顺铂对其进行处理, 通过结晶紫染色、CCK-8 法检测光甘草定、顺铂对 A549、BEAS-2B 细胞增殖活力的影响, Transwell 小室实验、细胞划痕实验检测光甘草定对 A549 细胞侵袭、迁移能力的影响, 流式细胞术检测光甘草定对 A549 细胞凋亡的影响, 3D 超低黏附板培养法培养 A549 细胞后采用 CCK-8 法检测光甘草定对 A549 细胞增殖的影响, WB 法检测光甘草定对 A549 细胞中上皮间质转化(EMT)相关蛋白表达的影响; 构建 A549 细胞移植瘤模型后检测光甘草定、顺铂对移植瘤的生长以及移植瘤组织中 EMT 相关蛋白表达的影响。**结果:** 光甘草定、顺铂呈剂量依赖性地显著抑制 A549 细胞的增殖($P<0.05$ 或 $P<0.01$)、细胞迁移($P<0.05$ 或 $P<0.01$)和侵袭能力($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 光甘草定能诱导 A549 细胞凋亡($P<0.01$), 抑制 A549 细胞中 N-cadherin、snail 和 vimentin 蛋白的表达, 促进 E-cadherin 蛋白表达; 光甘草定、顺铂均能抑制 A549 移植瘤的生长, 抑制移植瘤组织中 Ki67、N-cadherin、snail 和 vimentin 蛋白的表达、促进 E-cadherin 蛋白的表达。**结论:** 光甘草定可通过抑制 A549 细胞的增殖、迁移和侵袭, 诱导 A549 细胞凋亡, 其机制可能与其抑制细胞的 EMT 进程而产生抑癌作用有关。

[关键词] 肺癌 A549 细胞; 光甘草定; 增殖; 侵袭; 迁移; 凋亡; 上皮间质转化

[中图分类号] R734.2; R730.52 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)08-0672-09

Effects of glabridin on malignant biological behaviors of lung adenocarcinoma A549 cells and its molecular mechanism

HE Binli¹, LI Shanzhi¹, LI Yiquan¹, HAN Jicheng¹, LI Xiao², FANG Jinbo¹, JIN Ningyi^{1,2}, TIAN Tong¹, XUE Zhilong¹, ZHU Yilong¹, LI Zhuoxin², ZHU Guangze³ (1. Academicians Workstation of Jilin Province, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, Jilin, China; 2. Changchun Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130122, Jilin, China; 3. Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130021, Jilin, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of glabridin on malignant biological behaviors of lung adenocarcinoma A549 cells and its molecular mechanism. **Methods:** A549 cells and human normal lung epithelial BEAS-2B cells were cultured by conventional methods and then treated with different concentrations of glabridin and/or cisplatin. The effects of glabridin and cisplatin on the proliferative vitality of A549 and BEAS-2B cells were detected by crystal violet staining and CCK-8 method. Transwell cell assay and cell scratch assay were used to detect the effect of glabridin on the invasion and migration ability of A549 cells. Flow cytometry was conducted to detect the effect of glabridin on the apoptosis of A549 cells. 3D ultra-low adhesion plate culture method was applied to culture A549 cells, and then the effects of glabridin on the proliferation of A549 cells and the expression of epithelial mesenchymal transition (EMT)-related proteins in A549 cells were detected using CCK-8 method and Western-blot, respectively. An A549 cell-transplanted tumor model was constructed to detect the effects of glabridin and cisplatin on the growth of transplanted tumors and the expression of EMT-related proteins in transplanted tumor tissues. **Results:** Glabridin and cisplatin significantly inhibited the proliferation ($P<0.05$ or $P<0.01$), cell migration ($P<0.05$ or $P<0.01$) and invasion ($P<0.05$ or $P<0.01$) of A549 cells in a dose-dependent manner. Glabridin could induce the apoptosis of A549 cells ($P<0.01$), inhibit the protein expression of N-cadherin, snail, and vimentin, but promote the protein expression of E-cadherin in A549 cells. Both glabridin and cisplatin could inhibit the growth of A549 cell-transplanted tumors, inhibit the protein expression of Ki67, N-cadherin, snail, and vimentin, and promote the protein expression of E-cadherin in

[基金项目] 吉林省科技发展规划(No.20220508075RC, No.20210101046JC); 吉林省教育厅科学技术研究(No.JJKH20220887KJ)

[作者简介] 贺彬丽(1997—), 女, 硕士生, 主要从事中药小分子抗肿瘤作用机制的相关研究, E-mail: 3313650059@qq.com

[通信作者] 朱光泽, E-mail: zhuguangze820@126.com; 李卓昕, E-mail: 13043393036@163.com; 朱羿龙, E-mail: zhuyulong66@163.com

transplanted tumor tissues. **Conclusion:** Glabridin can inhibit the proliferation, migration, and invasion of A549 cells, induce apoptosis of A549 cells, and inhibit EMT processes, thus exerting anti-tumor effect.

[Key words] lung cancer A549 cell; glabridin; proliferation; invasion; migration; apoptosis; epithelial mesenchymal transition

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(8): 672-680. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.08.004]

肺癌的发病率逐年升高,严重危害人类的生命健康^[1]。肺癌是转移率较高的一种癌症,晚期可出现多个器官的转移,引起相应的症状,常常给患者带来极大的痛苦,甚至威胁到生命。近些年来由于中药大健康产业快速发展,中医药在肺癌治疗中发挥着越来越重要的作用^[2]。中医药治疗肿瘤的特点在于“整体性”、“平衡性”、“多系统”、“多靶点”,相对于传统意义的放疗和化疗,中药治疗不良反应少、耐受性高、预后较好,能够通过调节免疫系统抑制肿瘤的发生^[3-5]。因此中医药治疗肿瘤成为了不可替代的治疗手段,从中药中筛选出高效低毒的抗肺癌单体,进而减缓患者痛苦和改善患者生活质量具有十分重要的意义^[6]。光甘草定(glabridin)是一种黄酮类物质,来源于光果甘草,具有抗氧化、抗菌、抗肿瘤、抗炎、骨质疏松、保护心血管、保护神经、清除自由基等作用^[7]。本实验利用光甘草定开展肺癌抑瘤实验,探究其对 A549 细胞增殖和转移的作用及其分子机制,并比较中药单体光甘草定与传统的化疗药物的优缺点,探索新型且不良反应少的抗肺癌药物。旨在为后续光甘草定联合化疗药治疗肺癌提供了前期科学基础,也为研究中药单体来抑制肿瘤的生长和转移提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物、细胞和主要试剂

6 周龄雌性 BABL/c 裸鼠购自斯贝福实验动物科技有限公司[SCXK(京)2019-0010, No. 110324220105341114]。小鼠的笼具需严格清洗,进行高压灭菌,使用 SPF 级灭菌的鼠粮、垫料和高压灭菌水饲养小鼠,饲养环境是无菌的、恒温恒湿的动物室。人肺腺癌细胞 A549 和人正常肺上皮细胞 BEAS-2B 均购自北纳生物公司,胎牛血清购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司,DMEM、RPMI 培养基均购自 Hyclone 公司,MammoCult™ 培养基(基础培养基+增殖添加剂+4.0 μg/mL 肝素+0.48 μg/mL 氢化可的松)购自加拿大 STEMCELL Technologies 公司,CCK-8 试剂购自日本同仁公司,结晶紫染色液购自碧云天公司,超低黏附六孔板、Transwell 小室均购自美国 Corning 公司,FITC Annexin V 凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司,抗 E-cadherin、N-cadherin、snail、vimentin 和 GAPDH 抗体均购自美国 CST 公司,光甘草定(纯度为 99.85%)

和顺铂(纯度为 99.80%)均购自美国 MCE 公司,PE/Cyanine7 抗小鼠 CD11c 抗体、APC 抗小鼠 F4/80 抗体、FITC 抗小鼠 CD206 抗体、MojoSort™ 缓冲液均购自美国 Biolegend 公司。

1.2 细胞培养及药物制备

将 BEAS-2B 细胞和 A549 细胞置于含 10% 胎牛血清、50 U/mL 青霉素和 50 U/mL 链霉素的 DMEM 培养基(BEAS0-2B)或 RPMI 培养基(A549 细胞)基中,37 °C、5% CO₂ 条件下培养。用培养基将光甘草定原液(将 10 mg 光甘草定溶于 3.08 mL DMSO 中,配制成 10 mmol/L 的母液)稀释至 20、40 和 80 μmol/L,用培养基将顺铂母液(将 10 mg 顺铂溶于 3.33 mL DMSO 中,配制成 10 mmol/L 的原液)稀释至 5、10 和 20 μmol/L。

1.3 结晶紫染色法检测光甘草定对 A549 细胞增殖的影响

将对数生长期的 A549 细胞接种(3×10^5 个/孔)于 12 孔培养板中,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后,用 20、40、80 μmol/L((每组设 3 个复孔))的光甘草定处理 24、48 和 72 h 后,加入结晶紫染色液,室温下染色 8 min,并用纯净水清洗 2 次,拍照并使用 Image J 软件进行分析计算。用含 0.1% DMSO 的培养基处理 A549 细胞作为对照组。实验重复 3 次。

1.4 CCK-8 法检测光甘草定、顺铂对 A549 和 BEAS-2B 细胞增殖的影响

将对数生长期的 A549 细胞和 BEAS-2B 细胞接种(5×10^3 个/孔)于 96 孔板中,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,用 0(空白对照)、20、40、80 μmol/L 光甘草定处理 24、48 和 72 h,每组设 3 个复孔。同时准备相同细胞密度的 96 孔板,用 0(空白对照)、5、10、20 μmol/L 的顺铂处理 24、48 和 72 h,每组设 3 个复孔。每孔加入 10 μL CCK-8 染液,在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中 90 min。用酶标仪在 490 nm 处测量每孔的光密度(D)值,按照公式计算细胞增殖抑制率=(对照孔 D 值-处理孔 D 值)/对照孔 D 值×100%。

1.5 超低黏附板 3D 培养法培养 A549 细胞后用 CCK-8 法检测光甘草定对其增殖的影响

取对数生长期的 A549 细胞接种(4×10^3 个/孔)于 6 孔超低黏附板中,添加(2 mL/孔)MammoCult™ 培养基,37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 7 d。用倒置显微镜观察细胞聚集和乳球状态的形成。以 295×g 离心 5 min 收集细胞,用 MammoCult™ 培养基悬浮细胞并

将其接种(5×10^4 个/孔)到96孔超低黏附板中,常规培养24 h后用光甘草定[0(空白对照)、40、80 $\mu\text{mol/L}$]或顺铂[0(空白对照)、5、10 $\mu\text{mol/L}$]处理24、48、72 h,每组设3个复孔。检测前每孔加入10 μL CCK-8溶液,继续培养90 min。使用Infinite 200多功能酶标仪在490 nm处测量每个孔 D 值。细胞增殖抑制率计算方法见1.4。

1.6 划痕实验检测光甘草定对A549细胞迁移能力的影响

将A549细胞接种(5×10^5 个/孔)至6孔板中,待细胞成单层后弃培养液,用无菌移液器枪头划痕,PBS洗涤3次,在倒置显微镜下(0 h)捕获图像。用0、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ (每组设3个复孔)光甘草定处理细胞,24、48 h后在倒置显微镜下捕获图像,测量每个时间点的划痕宽度。计算细胞迁移变化率 $= [1 - (0 \text{ h 划痕宽度} - 24 \text{ 或 } 48 \text{ h 划痕宽度}) / 0 \text{ 划痕宽度}] \times 100\%$ 。

1.7 Transwell实验检测光甘草定对A549细胞侵袭能力的影响

用无血清培养基悬浮A549细胞并将其接种(1×10^5 个/孔)于预铺基质胶的Transwell小室上室,在其下室中添加600 μL 含10%胎牛血清的RPMI培养基。用0、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ (每组设3个复孔)光甘草定处理24、48 h,用棉签除去上室中残留的细胞,4%多聚甲醛固定,1%结晶紫染色,PBS冲洗,在光学显微镜下随机选取5个视野进行观察、拍照、计算侵袭细胞数量。

1.8 WB法检测光甘草定对A549细胞中上皮间质转化(EMT)相关蛋白表达的影响

将A549细胞接种(3×10^5 个/孔)于6孔培养板中,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养24 h,用40 $\mu\text{mol/L}$ 光甘草定、5 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂(阳性对照)(每组设3个复孔)处理48 h后收集细胞,用蛋白裂解液裂解细胞并提取各组细胞的总蛋白,用BCA法进行蛋白定量,SDS-PAGE分离、转膜,脱脂奶粉封闭1 h,抗E-cadherin(1:1 000)、N-cadherin(1:1 000)、snail(1:500)和vimentin(1:2 000)抗体4 $^{\circ}\text{C}$ 下处理过夜,辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗室温下处理1 h,ECL显影液显影,使用Image J软件进行分析,计算各组细胞中目的蛋白的相对表达量。

1.9 流式细胞术检测光甘草定对A549细胞凋亡的影响

将A549细胞接种(3×10^5 个/孔)于6孔培养板中,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养24 h后,用0、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ (每组设3个复孔)光甘草定处理24、48、72 h后用胰酶消化细胞,PBS洗涤,将细胞悬浮于检测缓冲液中,加入Annexin V-FITC和PI,避光处理20 min,利用C6Plus流式细胞仪进行检测并分析细胞

凋亡的百分率。

1.10 A549细胞移植瘤实验检测光甘草定和顺铂对移植瘤生长的影响

取对数生长期且状态良好A549细胞,将其密度调整为 1×10^7 个/mL,在裸鼠右腋近胸皮下注射(100 μL /只)A549细胞,建立移植瘤裸鼠模型后,按随机数字表法将其分为光甘草定高(50 mg/kg)、中(25 mg/kg)、低(12.5 mg/kg)剂量组、溶剂组(DMSO)、阳性药物组(顺铂15 mg/kg)和对照组,每组6只。成功建立裸鼠皮下荷瘤模型后,从第二周开始,每3 d注射一次药物,连续治疗3周。记录肿瘤质量和小鼠体质量。

1.11 免疫组化法检测移植瘤组织中EMT相关蛋白的表达

剥离移植瘤组织后进行固定、石蜡包埋、切片、脱蜡复水、抗原修复、去内源性过氧化物酶、封闭处理后,滴加兔抗Ki67(1:500)、E-cadherin(1:400)、N-cadherin(1:400)、snail(1:200)和vimentin(1:400)抗体4 $^{\circ}\text{C}$ 下处理过夜,TBST洗涤3次,辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗处理室温下处理30 min,TBST洗涤,DAB显色液显色,苏木素复染,脱水后中性树脂封片,镜下观察并采集图像。使用Image J对目标蛋白的表达进行定量分析。

1.12 统计学处理

采用GraphPad Prism 5统计软件进行数据处理。所有实验均独立重复3次。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

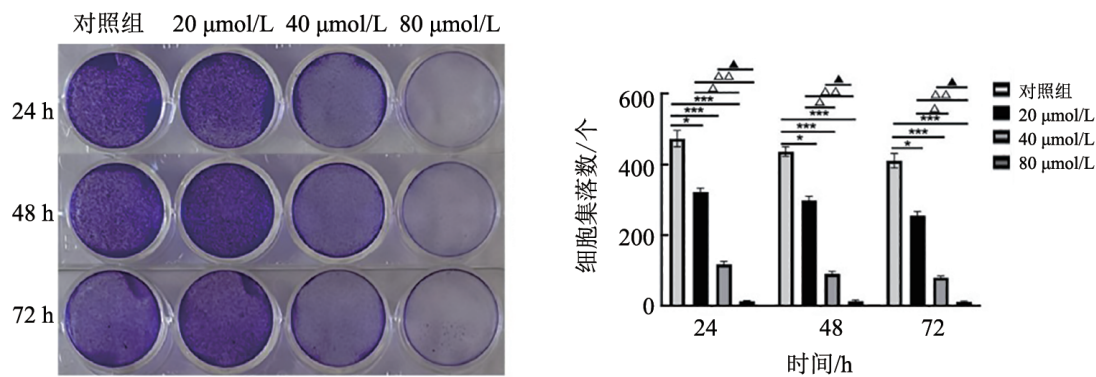
2 结果

2.1 结晶紫染色法检测结果显示光甘草定抑制A549细胞增殖

结晶紫染色法检测结果(图1)显示,与对照组比较,不同浓度的光甘草定处理A549细胞后其细胞增殖均被明显抑制($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$),且呈现出剂量依赖性。

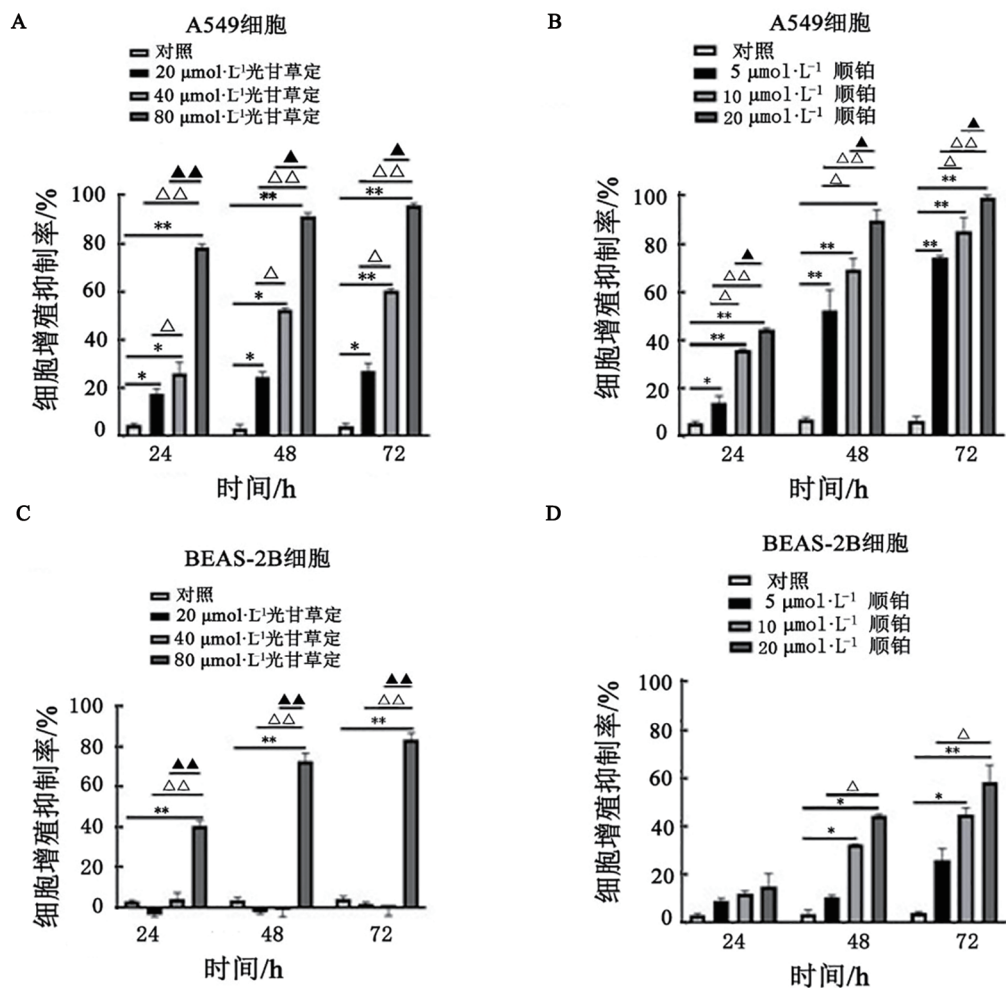
2.2 CCK-8法检测结果显示光甘草定、顺铂均可明显抑制A549细胞的增殖

CCK-8法检测结果(图2A)显示,与对照组比较,不同浓度的光甘草定、顺铂对A549细胞增殖均有明显的抑制作用(图A、B, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且各自呈剂量依赖性。与对照组比较,20、40 $\mu\text{mol/L}$ 光甘草定对BEAS-2B细胞增殖没有观察到明显影响(图2C),但80 $\mu\text{mol/L}$ 光甘草定处理能明显抑制BEAS-2B细胞增殖($P < 0.01$)。5 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂处理的BEAS-2B细胞其增殖能力(图D)没有观察到明显影响,但10、20 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂能明显抑制BEAS-2B细胞的增殖($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。



与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.001$; 与 20 μmol/L 光甘草定组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$; 与 40 μmol/L 光甘草定组比较, $\Delta\Delta\Delta P<0.05$ 。

图1 光甘草定对 A549 细胞增殖的影响



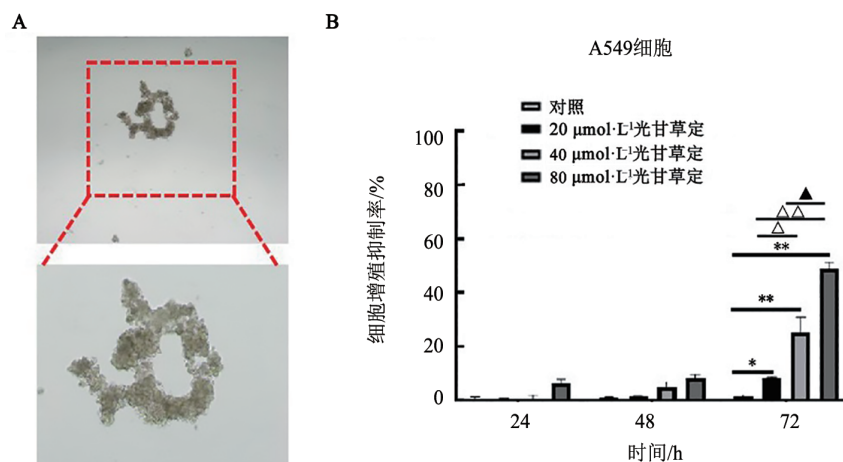
A: 光甘草定对 A549 细胞活力的影响; B: 顺铂对 A549 细胞活力的影响; C: 光甘草定对 BEAS-2B 细胞活力的影响; D: 顺铂对 BEAS-2B 细胞活力的影响。与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 20 μmol/L 光甘草定组或 5 μmol/L 顺铂组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$; 与 40 μmol/L 光甘草定组或 10 μmol/L 顺铂组比较, $\Delta\Delta\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta\Delta\Delta P<0.05$ 。

图2 CCK-8 检测光甘草定和顺铂对 A549、BEAS-2B 细胞增殖能力的影响

2.3 超低黏附板培养法培养 A549 细胞后 CCK-8 法检测光甘草定明显抑制 A549 细胞的成球增殖

A549 细胞经过超低黏附板三维培养, 细胞经过聚集, 形成了乳球状(图 3A)。CCK-8 法检

测结果(图 3B)显示, 与对照组比较, 不同浓度的光甘草定处理 A549 细胞 72 h 后其细胞成球增殖均被明显抑制 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 且呈现出剂量依赖性。



与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 20 $\mu\text{mol/L}$ 甘草定组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$; 与 40 $\mu\text{mol/L}$ 甘草定组比较, $\Delta P<0.05$ 。

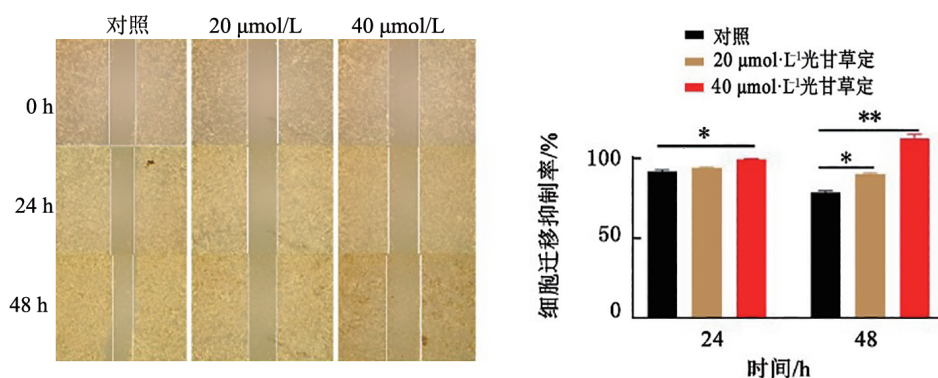
A: A549 超低黏附平板培养($\times 50$) 7 d 后的细胞形态; B: 甘草定对 A549 细胞增殖的影响。

图3 甘草定对在3D超低黏附平板培养7 d的A549细胞增殖的影响

2.4 甘草定能抑制 A549 细胞的迁移

划痕试验结果(图4)显示,与对照组比较,

20、40 $\mu\text{mol/L}$ 甘草定组细胞的迁移能力均被显著抑制($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。



与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图4 甘草定对A549细胞迁移能力的影响

2.5 甘草定能明显抑制 A549 细胞的侵袭能力

Transwell 小室实验检测结果(图5)显示,与对照组比较,20、40 $\mu\text{mol/L}$ 甘草定处理组细胞的侵袭能力均被明显抑制($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.6 流式细胞术检测结果显示甘草定能诱导 A549 细胞凋亡

流式细胞术检测结果(图6)显示,与对照组比较,20、40 $\mu\text{mol/L}$ 甘草定组细胞凋亡率均明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

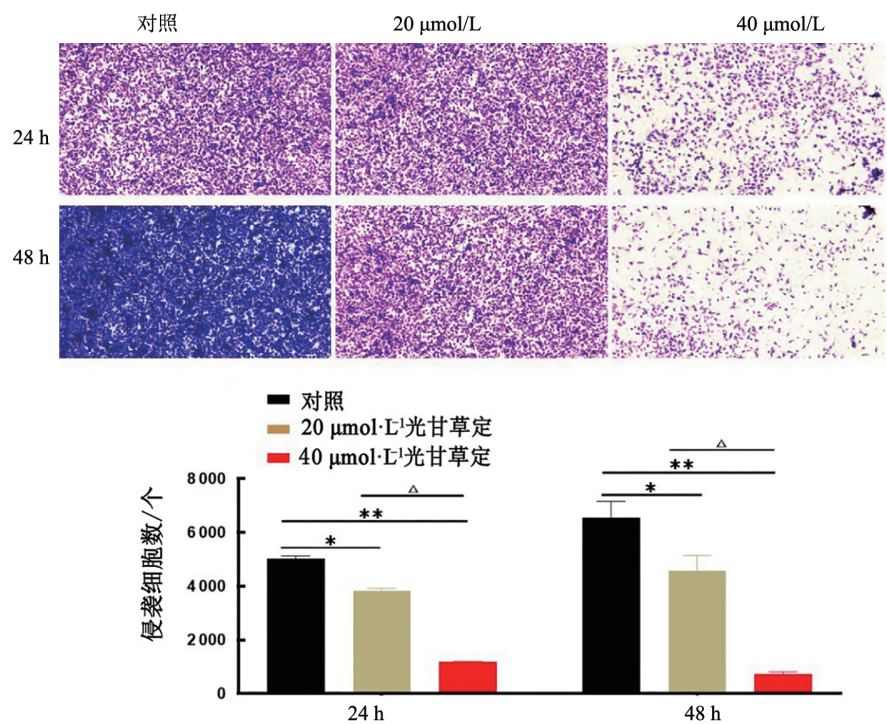
2.7 移植瘤实验检测结果显示甘草定、顺铂均能抑制移植瘤的生长

移植瘤实验检测结果(图7)显示,与对照组比较,甘草定和顺铂组小鼠移植瘤质量均明显减少($P<0.05$ 或 $P<0.001$),与顺铂组比较,不同剂

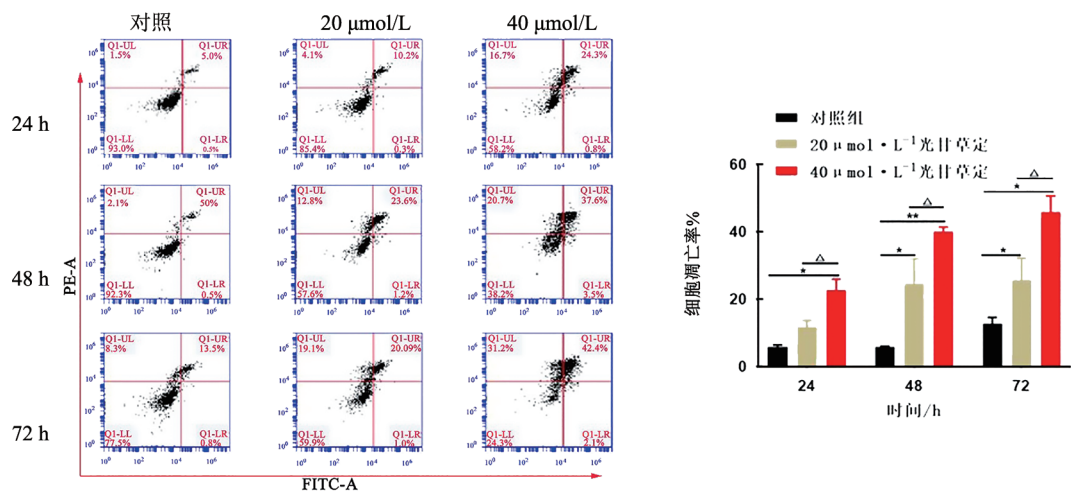
量的甘草定组小鼠体质量均明显增加(图7B, 均 $P<0.001$)。

2.8 WB法检测结果显示甘草定抑制 A549 细胞和移植瘤组织的 EMT 进程

WB法检测结果(8A)显示,与对照组比较,40 $\mu\text{mol/L}$ 甘草定、5 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂处理组 A549 细胞中 E-cadherin 蛋白的表达水平明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), N-cadherin、snail 和 vimentin 蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。免疫组化染色检测结果(图8B)显示,与对照组比较,甘草定、顺铂处理组移植瘤组织中 Ki67、N-cadherin、snail 和 vimentin 表达水平均显著性降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)、E-cadherin 表达水平升高($P<0.01$)。



与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 20 $\mu\text{mol/L}$ 光甘草定组比较, $\Delta P<0.05$ 。
图5 光甘草定对 A549 细胞侵袭能力的影响



与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 20 $\mu\text{mol/L}$ 光甘草定组比较, $\Delta P<0.05$ 。
图6 光甘草定诱导 A549 细胞凋亡

3 讨论

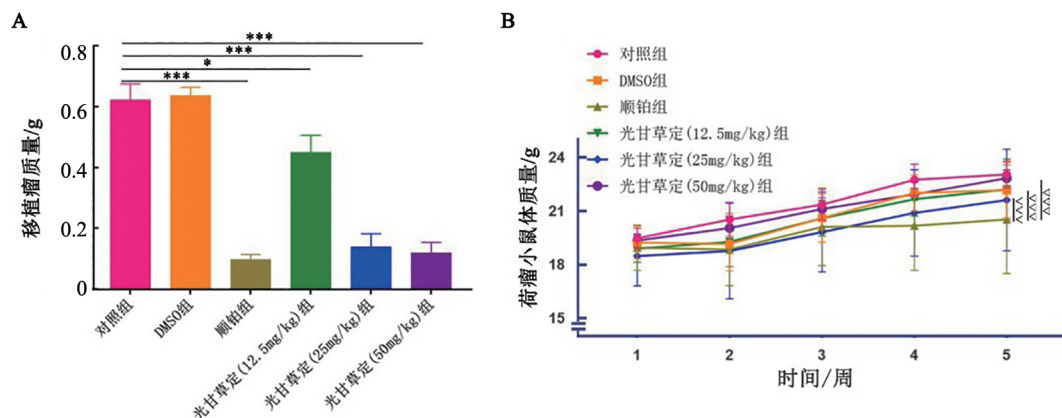
目前治疗肺癌的手段比较单一, 仍为手术治疗加上化疗和放疗, 大多数化疗药物对患者的不良反应都很大, 包括白细胞下降、脱发、恶心和呕吐等^[8]。当前, 化疗药物以顺铂为主, 作为一种新的铂类药物, 其作用机理是与细胞 DNA 链间及链内产生交链, 形成 DDP-DNA 复合物, 从而对 DNA 复制产生影响, 但是它的不良反应非常显著, 很多患者并不能耐受。本研究主要将传统化疗药物顺铂作为阳性对照药物^[9-13], 与中药单体光甘草定进行比较, 从而对中药单体治疗肺癌

提供了一定的参考依据。且进一步证明光甘草定可能是一种新的抗癌药物, 可通过抑制 A549 细胞迁移、侵袭等不同的方式抑制其恶性生物学行为。

本研究通过结晶紫染色法和 CCK-8 实验检测结果发现光甘草定对 A549 细胞增殖有较强的抑制作用, 其中 CCK-8 实验除了传统的细胞培养法还运用了 3D 超低黏附板培养法, 使细胞不再是单层状态, 而形成了立体结构, 所以能更好地模拟了肿瘤组织生长特性。在用药浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$, 72 h 对 A549 细胞的抑制率在 50% 以上, 对 BEAS-2B 细胞 (肺正常上皮细胞) 的抑制率在 5% 以下, 与 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂

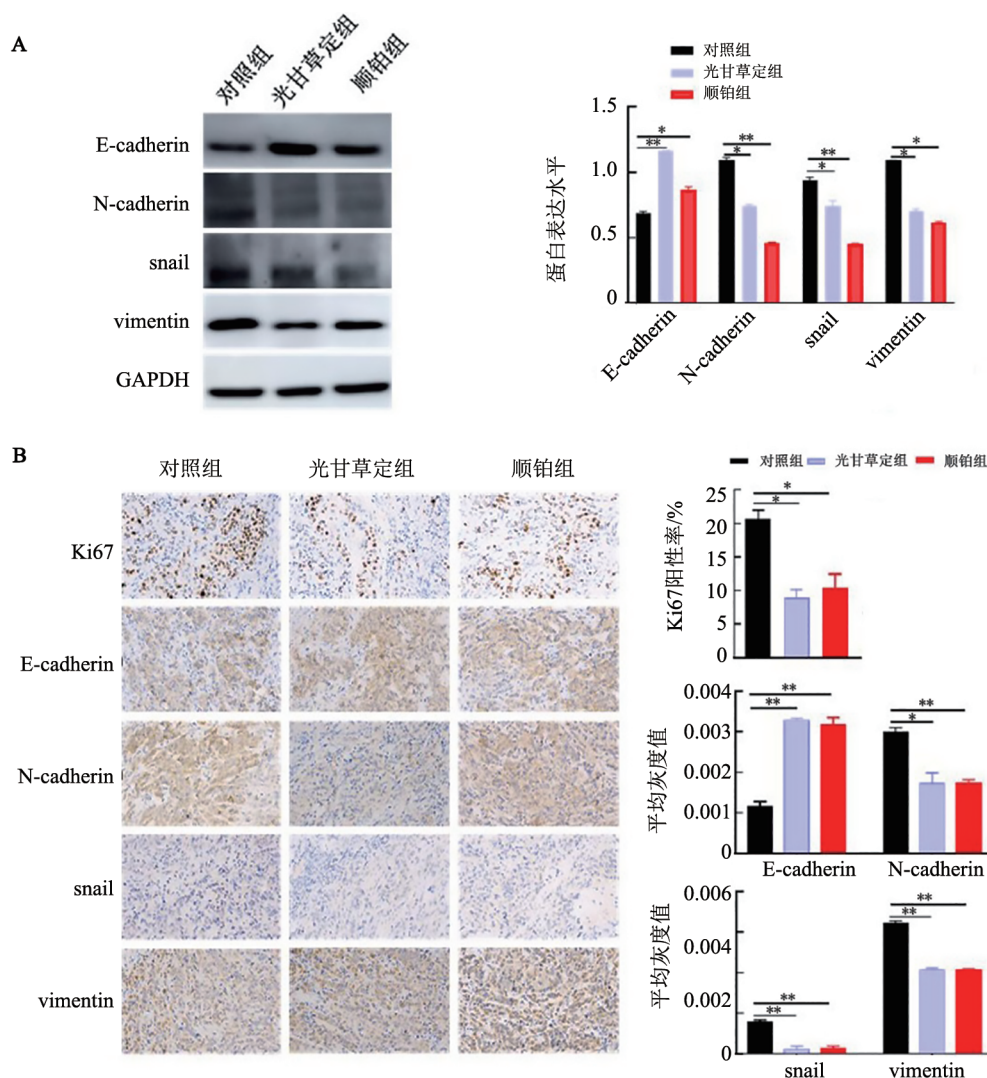
相比,对 BEAS-2B 细胞的抑制率更小。这说明光甘草定对正常细胞 BEAS-2B 的抑制作用较小,进而证明光甘草定可在临床上具有较高的潜在应用价值^[14],

也为以后研究光甘草定通过肿瘤微环境调控肺癌的发生和转移提供前期理论基础。



A: 移植瘤质量; B: 荷瘤小鼠体质量的变化。与对照组比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; 与顺铂组比较, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ 。

图7 光甘草定、顺铂对 A549 细胞移植瘤生长的影响



与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: WB法检测光甘草定及顺铂处理的 A549 细胞中 EMT 相关蛋白的表达; B: 免疫组化检测移植瘤组织中 EMT 相关蛋白的表达 ($\times 200$)。

图8 光甘草定和顺铂对 A549 细胞和移植瘤组织中 EMT 相关蛋白表达的影响

本研究通过体内外实验,初步确定光甘草定抑制 A549 细胞增殖、侵袭和迁移的作用效果与作用机制。肿瘤细胞的侵袭和迁移能力越强,临床治疗就越困难,所以针对肿瘤细胞的侵袭和迁移能力的研究成为热点^[15-16]。EMT 是一种多发生于上皮细胞间的重要过程,它可以改变细胞间的黏附方式,从而影响细胞之间的黏附、细胞增殖和分化。目前 EMT 被看成是导致肿瘤进展的重要病理过程。在肿瘤的恶性演进过程中,EMT 使得肿瘤细胞得以侵袭和转移,还可能使肿瘤细胞逃逸并避免其凋亡。近年来发现,钙黏附素家族是影响肿瘤侵袭和转移的重要因素之一。N-神经型钙黏蛋白(neural cadherin, N-cadherin)与上皮型钙黏蛋白(epithelial cadherin, E-cadherin)同属于经典钙黏蛋白,它们在肿瘤侵袭与转移中具有相反的作用。其中 E-cadherin 是一种钙依赖的细胞-细胞黏附分子,在上皮细胞行为、组织形成和抑制癌症中发挥关键作用,其表达量下调与 EMT 过程密切相关^[17-18]。而 N-cadherin 则与 E-cadherin 具有相反的表达模式,高表达与肿瘤的生长、迁移、侵袭及淋巴结转移显著正相关^[19-20]。锌指蛋白(snail)通过与 E-cadherin 启动子区的 E 一盒(E-box)结合直接抑制 E-cadherin 的表达,可以促进 EMT 而使细胞失去级性和细胞间连接,降解细胞外基质成分,促进细胞生存和抑制细胞凋亡,调控细胞的运动和黏附,从而使细胞运动及侵袭力增强,促进肿瘤细胞间质浸润和转移^[21-23]。本研究通过 WB 法检测和免疫组化法检测发现光甘草定可以上调 A549 细胞和移植瘤组织中 E-cadherin 蛋白的表达量,下调 N-cadherin、snail 和 vimentin 蛋白的表达量,通过抑制 EMT 进程,产生抑癌作用。

综上所述,光甘草定可以有效抑制 A549 细胞的增殖、迁移和侵袭,诱导其凋亡,并且抑制其 EMT 进程。为肺癌治疗提供新的思路和新的方向。

[参 考 文 献]

- [1] WU Y N, YUAN M, WANG C L, *et al.* T lymphocyte cell: a pivotal player in lung cancer[J/OL]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1102778 [2023-05-10]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1102778>. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1102778.
- [2] HAAF K, AALST C M, KONING H J, *et al.* Personalising lung cancer screening: an overview of risk-stratification opportunities and challenges[J]. *Int J Cancer*, 2021, 149(2): 250-263. DOI: 10.1002/ijc.33578.
- [3] 王院春. 基于“癌毒”病机理论的复肺解毒方治疗非小细胞肺癌临床及代谢组学研究[D]. 南京: 南京中医药大学.
- [4] 宋卓. 结直肠癌因性疲乏中医药干预的信息富集研究[D]. 北京: 中国中医科学院.
- [5] 刘同心. “循证+价值医疗”视角下中医优势病种的卫生经济学研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学.
- [6] KACHURI L, JOHANSSON M, RASHKIN S R, *et al.* Immune-mediated genetic pathways resulting in pulmonary function impairment increase lung cancer susceptibility[J/OL]. *Nat Commun*, 2020, 11: 27[2023-05-10]. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13855-2>. DOI: 10.1038/s41467-019-13855-2.
- [7] PASTORINO G, CORNARA L, SOARES S, *et al.* Liquorice (*Glycyrrhiza glabra*): a phytochemical and pharmacological review[J]. *Phytother Res*, 2018, 32(12): 2323-2339. DOI: 10.1002/ptr.6178.
- [8] RUDIN C M, BRAMBILLA E, FAIVRE-FINN C, *et al.* Small-cell lung cancer[J/OL]. *Nat Rev Dis Primers*, 2021, 7: 3[2023-05-10]. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00235-0>. DOI: 10.1038/s41572-020-00235-0.
- [9] WANG L, WANG Y Q, WANG F, *et al.* Disparity in lung cancer screening among smokers and nonsmokers in China: prospective cohort study[J/OL]. *JMIR Public Health Surveill*, 2023, 9: e43586 [2023-05-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36917151/>. DOI: 10.2196/43586.
- [10] CHEN L, LIU Z X, ZHAO X Y, *et al.* Self-assembled pH-responsive metal-organic frameworks for enhancing the encapsulation and anti-oxidation and melanogenesis inhibition activities of glabridin[J/OL]. *Molecules*, 2022, 27(12): 3908[2023-05-10]. <https://doi.org/10.3390/molecules27123908>. DOI: 10.3390/molecules27123908.
- [11] CHANDA D, PRIETO-LLORET J, SINGH A, *et al.* Glabridin-induced vasorelaxation: evidence for a role of BKCa channels and cyclic GMP[J]. *Life Sci*, 2016, 165: 26-34. DOI: 10.1016/j.lfs.2016.09.018.
- [12] SU WEI POH M, VOON CHEN YONG P, VISESWARAN N, *et al.* Estrogenicity of glabridin in ishikawa cells[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0121382. DOI: 10.1371/journal.pone.0121382.
- [13] ZHANG C J, LU Y J, AI Y, *et al.* Glabridin liposome ameliorating UVB-induced erythema and leathery skin by suppressing inflammatory cytokine production[J/OL]. *J Microbiol Biotechnol*, 2021, 31(4): 630-636[2023-05-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9706034/>. DOI: 10.4014/jmb.2011.11006.
- [14] YE X Q, JIANG F, LI Y, *et al.* Glabridin attenuates the migratory and invasive capacity of breast cancer cells by activating microRNA-200c[J]. *Cancer Sci*, 2014, 105(7): 875-882. DOI: 10.1111/cas.12426.
- [15] XU Y N, DENG M S, LIU Y F, *et al.* Tight junction protein CLDN17 serves as a tumor suppressor to reduce the invasion and migration of oral cancer cells by inhibiting epithelial-mesenchymal transition[J/OL]. *Arch Oral Biol*, 2022, 133: 105301[2023-05-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34781072/>. DOI: 10.1016/J.ARCHORALBIO.2021.105301.
- [16] SNIGIREVA V A, MORENKOV S O, SKARGA Y Y, *et al.* A 2,5-dihydroxybenzoic acid-gelatin conjugate inhibits the basal and hsp90-stimulated migration and invasion of tumor cells[J/OL]. *J Func Biomate*, 2020, 11(2): 39[2023-05-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32503118/>. DOI: 10.3390/jfb11020039.
- [17] KHAITOV B, KARIMOV A, KHAITBAEVA J, *et al.* Perspectives of licorice production in harsh environments of the aral sea regions[J/OL]. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, 19(18): 11770[2023-05-10]. <https://doi.org/10.3390/ijerph191811770>. DOI: 10.3390/ijerph191811770.

- [18] SHEN Z H, PU X Z, WANG S M, *et al.* Silicon improves ion homeostasis and growth of liquorice under salt stress by reducing plant Na^+ uptake[J/OL]. *Sci Rep*, 2022, 12: 5089[2023-05-10]. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09061-8>. DOI: 10.1038/s41598-022-09061-8.
- [19] KUCUK U, EKMEKCI S, TALU C, *et al.* Relationship of E-cadherin, Beta-catenin, N-cadherin, ZEB1 and α SMA as epithelial mesenchymal transition markers with prognostic factors in early and advanced stage laryngeal squamous cell carcinomas[J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2022, 66(2): 237-245. DOI: 10.4103/ijpm.ijpm_530_21.
- [20] KADEH H, ARBABI KALATI F, RAMEZANINEJAD M. Expression patterns of E-cadherin and N-cadherin proteins in the periodontal pocket epithelium of chronic periodontitis[J]. *J Dent (Shiraz)*, 2023, 24 (1 suppl): 125-131. DOI: 10.30476/dentjods.2022.92474.1652.
- [21] WANG X P, ZHANG Y, YANG J. Transcriptome analysis reveals synergistic modulation of E-cadherin/N-cadherin in hMSC aggregates chondrogenesis[J]. *Genes Genom*, 2023, 45(5): 681-692. DOI: 10.1007/s13258-022-01362-6.
- [22] WANG W M, JIN J, ZHOU Z, *et al.* Snail inhibits metastasis via regulation of E-cadherin and is associated with prognosis in colorectal cancer[J/OL]. *Oncol Lett*, 2023, 25(6): 271[2023-05-10]. <https://doi.org/10.3892/ol.2023.13857>. DOI: 10.3892/ol.2023.13857.
- [23] SHAN S F, BAO Q X, MA G C, *et al.* Human antigen R affects the migration and invasion of human lung cancer A549 cells and regulates E-cadherin suppressor Snail[J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2022, 68(6): 9-16. DOI: 10.14715/cmb/2022.68.6.2.
- [收稿日期] 2023-05-10 [修回日期] 2023-07-31
[本文编辑] 向正华, 沈志超