

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2024.02.005

## 苍术素通过激活 RIPK1/RIPK3/MLKL 信号通路诱导非小细胞肺癌 A549 细胞程序性坏死并抑制裸鼠移植瘤生长

王乙波, 焦斌, 王小强, 陈峙行, 曾慈梅(海口市人民医院, 呼吸与危重症医学科, 海南 海口 570000)

**[摘要]** **目的:**探讨苍术素(ATR)通过调节受体相互作用蛋白激酶(RIPK)1/RIPK3/混合谱系激酶结构域样(MLKL)信号通路对非小细胞肺癌(NSCLC)A549细胞程序性死亡及裸鼠移植瘤生长的影响。**方法:**使用0~160  $\mu\text{mol/L}$ 的ATR处理A549细胞, MTT法检测细胞存活率以确定后续实验给药浓度。使用ATR和/或RIPK1抑制剂Nec-1(necrostatin-1)、caspase抑制剂Z-VAD-FMK处理A549细胞,验证ATR是否诱导A549细胞发生程序性坏死。将A549细胞分为对照组、ATR-L组、ATR-M组、ATR-H组(分别用0、10、20、40  $\mu\text{mol/L}$  ATR处理)、ATR+Nec-1组(40  $\mu\text{mol/L}$  ATR+50  $\mu\text{mol/L}$  Nec-1处理),处理24 h后,采用PI单染及Hoechst33342/PI双染法检测细胞死亡情况、透射电镜观察细胞死亡形态、DCFH-DA荧光探针法检测细胞内ROS水平、JC-1染色法检测线粒体膜电位、WB法检测细胞中RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路相关蛋白质的表达水平。构建A549细胞裸鼠移植瘤模型,用10 mg/kg ATR(溶于玉米油中)对裸鼠灌胃给药5周,观察ATR对移植瘤生长的影响, WB法检测移植瘤组织中RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路相关蛋白质的表达水平。**结果:**10~160  $\mu\text{mol/L}$ 的ATR可显著抑制A549细胞增殖,选择10、20、40  $\mu\text{mol/L}$ 的ATR进行后续实验。ATR组A549细胞存活率显著低于对照组( $P<0.01$ )和ATR+Nec-1组( $P<0.01$ ),而ATR+z-VAD组细胞存活率显著低于z-VAD组( $P<0.01$ ),说明ATR可诱导A549细胞发生程序性坏死而非凋亡。与对照组比较,ATR处理组A549细胞发生肿胀,线粒体内脊消失呈空泡化,细胞内容物向外泄漏,细胞核聚集,表现为坏死特征,ATR-L组、ATR-M组、ATR-H组A549细胞死亡率、ROS水平及p-RIPK1、p-RIPK3、p-MLKL表达水平均显著升高,线粒体膜电位显著降低(均 $P<0.01$ ),且呈药物浓度依赖性;与ATR-H组比较,ATR+Nec-1组细胞死亡率、ROS及p-RIPK1、p-RIPK3、p-MLKL表达水平降低,线粒体膜电位显著升高(均 $P<0.01$ )。裸鼠移植瘤实验结果显示,与对照组比较,ATR组裸鼠移植瘤体积、移植瘤质量均降低( $P<0.05$ ,或 $P<0.01$ ),而与瘤组织中p-RIPK1、p-RIPK3、p-MLKL蛋白表达水平均显著升高(均 $P<0.01$ )。**结论:**ATR可能通过激活RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路诱导A549细胞发生程序性坏死,抑制A549细胞及其裸鼠移植瘤的生长。

**[关键词]** 苍术素;RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路;非小细胞肺癌;A549细胞;程序性坏死

**[中图分类号]** R730.2; R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)02-0146-08

## Atractylodin induces programmed necrosis of non-small cell lung cancer A549 cells and inhibits xenograft growth in nude mice by activating the RIPK1/RIPK3/MLKL signaling pathway

WANG Yibo, JIAO Bin, WANG Xiaoqiang, CHEN Chixing, ZENG Cimei (Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Haikou People's Hospital, Haikou 570000, Hainan, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the influence of atractylodin (ATR) on programmed death of non-small cell lung cancer (NSCLC) A549 cells and the growth of xenografts in nude mice by regulating receptor-interacting protein kinase (RIPK) 1/RIPK3/mixed lineage kinase domain like (MLKL) signaling pathway. **Methods:** A549 cells were treated with 0~160  $\mu\text{mol/L}$  ATR, and the cell viability was detected by MTT method to determine the concentration of subsequent experiments. A549 cells were treated with ATR and/or RIPK1 inhibitor necrostatin-1 (Nec-1) and caspase inhibitor Z-VAD-FMK, to verify whether ATR induced programmed necrosis in A549 cells. A549 cells were divided into the control group, the ATR-L, ATR-M and ATR-H group (treated with 0, 10, 20 and 40  $\mu\text{mol/L}$  ATR, respectively) and the ATR+Nec-1 group (treated with 40  $\mu\text{mol/L}$  atractylodin and 50  $\mu\text{mol/L}$  Nec-1). After 24 h of treatment, PI single staining and Hoechst33342/PI double staining were used to detect cell death; transmission electron microscopy (TEM) was used to observe the morphology of cell death; DCFH-DA fluorescent probe was used to detect intracellular ROS level; JC-1 staining was

**[基金项目]** 海南省自然科学基金项目(No. 822RC868)

**[作者简介]** 王乙波(1987—),女,主治医师,主要从事呼吸病学相关研究。E-mail: dprsr@163.com

**[通信作者]** 曾慈梅, E-mail: zengcimei@163.com

used to detect mitochondrial membrane potential, and WB method was used to detect the expression level of RIPK1/RIPK3/MLKL signaling pathway-related proteins in cells. A xenograft model of A549 cells was constructed in nude mice, and 10 mg/kg ATR (dissolved in corn oil) was administered to nude mice by gavage for 5 weeks to observe the effect of atractylodin on xenograft growth. The expression level of RIPK1/RIPK3/MLKL signaling pathway-related proteins in xenograft tissues was detected by WB method. **Results:** 10-160  $\mu\text{mol/L}$  ATR could significantly inhibit the proliferation of A549 cells, and the concentrations of 10, 20 and 40  $\mu\text{mol/L}$  were selected for follow-up experiments. The survival rate of A549 cells in the ATR group was significantly lower than that in the control group ( $P<0.01$ ) and ATR+Nec-1 group ( $P<0.01$ ), while the cell survival rate in the ATR+z-VAD group was significantly lower than that in the z-VAD group ( $P<0.01$ ), indicating that ATR could induce programmed necrosis of A549 cells instead of apoptosis. Compared with the control group, A549 cells in the ATR-treated groups were swollen; the mitochondria were vacuolated; the inner ridge disappeared, the cell contents leaked outward, and the nuclei were aggregated, showing necrotic characteristics. The mortality rate, ROS level, expression levels of p-RIPK1, p-RIPK3 and p-MLKL in the ATR-L group, ATR-M group and ATR-H group A549 cells increased significantly, while the mitochondrial membrane potential decreased significantly (all  $P<0.01$ ), all of which were concentration-dependent. Compared with the ATR-H group, the mortality rate, ROS level, and expression levels of p-RIPK1, p-RIPK3 and p-MLKL in the ATR+Nec-1 group decreased, while the mitochondrial membrane potential increased significantly (all  $P<0.01$ ). The results of nude mouse xenograft experiment showed that compared with the control group, the volume and mass of xenografts were decreased ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), and the protein expression levels of p-RIPK1, p-RIPK3 and p-MLKL in the tumor tissues in the ATR group increased significantly (all  $P<0.01$ ). **Conclusion:** ATR may induce programmed necrosis of A549 cells by activating the RIPK1/RIPK3/MLKL signaling pathway, and inhibit the growth of A549 cells and their nude mouse xenografts.

**[Key words]** atractylodin (ATR); RIPK1/RIPK3/MLKL signal pathway; non-small cell lung cancer (NSCLC); A549 cell; programmed necrosis

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(2): 146-153. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.02.005]

非小细胞肺癌(NSCLC)占肺癌的75%~80%,具有发病率与病死率高的特点,手术、放疗或化疗为其主要治疗手段,但由于复发率高及产生耐药性,患者预后较差,因此寻找安全有效的抗肿瘤药物意义重大<sup>[1-2]</sup>。苍术素(atractylodin, ATR)是从中药苍术中提取的活性成分,具有抗炎、抗肿瘤、降糖等多种药理学作用,研究<sup>[3]</sup>显示,ATR可通过诱导肺癌细胞内ROS积累作为启动信号,诱导细胞周期阻滞和凋亡,抑制细胞增殖与迁移。细胞程序性坏死是细胞死亡的一种方式,受体相互作用蛋白激酶1(receptor-interacting protein kinase, RIPK1)和RIPK3是细胞坏死的关键调节因子,两者相互作用形成复合体即死亡小体,可诱导混合谱系激酶结构域样(mixed lineage kinase domain like, MLKL)蛋白激活,使MLKL从细胞质向细胞膜转位,引发细胞坏死<sup>[4]</sup>。MLKL在NSCLC组织中呈低表达,且其低表达与患者预后较差有关<sup>[5]</sup>。程序性坏死已成为新的治疗肿瘤靶点,激活RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路介导的程序性坏死,可抑制细胞增殖,发挥抗肿瘤效应<sup>[6]</sup>。ATR是否通过诱导程序性坏死抑制肺癌细胞增殖尚未见报道,本研究旨在探索ATR对NSCLC A549细胞增殖、凋亡的影响及其可能的作用机制,为ATR应用于NSCLC的治疗提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

人NSCLC细胞A549购自中科院上海细胞库。

12只SPF级BALB/c雄性裸鼠,5周龄,体质量20~22 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2021-0011,饲养在海南医学院动物研究中心,使用许可证号:SYXK(琼)2022-0013;本实验符合3R原则,且经海南医学院动物伦理委员会批准(审批号:IACUC20210502)。ATR(纯度 $\geq 98\%$ )购自上海诗丹德生物技术有限公司(使用时用DMSO溶解,再用培养基稀释至所需浓度);Nec-1(necrostatin-1,一种RIPK1抑制剂)、Z-VAD-FMK(caspase抑制剂)购自MCE公司;MTT检测试剂盒(ZY111105)购自上海泽叶生物科技有限公司;DCFH-DA活性氧ROS荧光探针(QN1289-GZX)、JC-1(YT147-SKJ)、PI(QN1306-TYI)均购自北京百奥莱博科技有限公司;p-RIPK1(K009942M)、RIPK1(K009941M)、p-MLKL(K200099M)、MLKL(K200087M)抗体均购自索莱宝生物科技有限公司;p-RIPK3(ab240383)、RIPK3(ab305054)抗体和HRP标记的山羊抗兔IgG二抗(ab6721)均购自Abcam公司。

### 1.2 MTT法检测ATR杀伤A549细胞的 $\text{IC}_{50}$

A549细胞培养至对数生长期时,胰酶消化细胞制成单细胞悬液,以每孔 $1 \times 10^4$ 个细胞接种于96孔板中,使用0、10、20、40、80、160  $\mu\text{mol/L}$ 的ATR处理A549细胞,使用MTT试剂盒分别检测24、48、72 h时的光密度( $D$ )值,根据公式“( $D_{\text{药物处理组}} - D_{\text{空白孔}}$ ) / ( $D_{\text{对照组}} - D_{\text{空白孔}}$ )  $\times 100\%$ ”计算细胞存活率,绘制生长曲线并计算 $\text{IC}_{50}$ 。

### 1.3 MTT法检测ATR、Nec-1和z-VAD对A549细胞存活率的影响

A549细胞接种于96孔板后,将细胞随机分为对照组、ATR组、Nec-1组、ATR+Nec-1组、z-VAD组、ATR+z-VAD组。ATR组用40  $\mu\text{mol/L}$ 的ATR处理A549细胞24 h;Nec-1组、z-VAD组分别用50  $\mu\text{mol/L}$ 的Nec-1、Z-VAD-FMK处理A549细胞1 h;ATR+Nec-1组、ATR+z-VAD组分别用50  $\mu\text{mol/L}$ 的Nec-1、Z-VAD-FMK处理A549细胞1 h,再用40  $\mu\text{mol/L}$ 的ATR处理A549细胞24 h,MTT试剂盒检测细胞存活率。

### 1.4 ATR单独或联合Nec-1处理对A549细胞影响的检测

#### 1.4.1 细胞分组及处理

将对数生长期A549细胞分为对照组、ATR低、中、高浓度组(ATR-L组、ATR-M组、ATR-H组)、ATR+Nec-1组,每组设置6个复孔,ATR-L组、ATR-M组、ATR-H组分别使用浓度为10、20、40  $\mu\text{mol/L}$ 的ATR处理细胞24 h,ATR+Nec-1组使用50  $\mu\text{mol/L}$ 的Nec-1预处理1 h,用40  $\mu\text{mol/L}$ 的ATR处理A549细胞24 h,对照组仅加入含等量DMSO的培养液。

#### 1.4.2 PI单染及Hoechst33342/PI双染法检测细胞死亡

收集各组A549细胞,1 000 $\times$ g离心5 min,PBS洗涤后,加入5  $\mu\text{g/mL}$ 的PI染液避光反应5 min,流式细胞仪检测细胞死亡。再取各组处理的A549细胞,PBS洗涤后,加入Hoechst33342染色液,避光染色10 min,PBS洗涤后PI复染,荧光显微镜下观察并拍照。

#### 1.4.3 透射电镜观察细胞死亡

收集各组A549细胞,用PBS洗涤后,加2.5%戊二醛固定0.5 h,PBS洗涤后再用1%的锇酸固定液固定1 h,使用梯度乙醇脱水包埋,超薄切片,用醋酸铅铀双染法进行切片染色,电镜下观察。

#### 1.4.4 DCFH-DA荧光探针法检测细胞内ROS水平

收集各组A549细胞,PBS洗涤后,加入终浓度为10  $\mu\text{mol/L}$ 的荧光探针(DCFH-DA)工作液,避光反应30 min,于倒置荧光显微镜下观察并用Image J软件分析相对荧光强度。

#### 1.4.5 JC-1染色法检测线粒体膜电位

收集各组A549细胞,制成细胞悬液,加JC-1染色液,于37  $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光染色30 min,再加入染色缓冲液洗涤3次,流式细胞仪检测。正常细胞线粒体膜电位高,JC-1进入线粒体基质呈现红色荧光,凋亡细胞因JC-1以单体形式存在胞质中而发出绿色荧光,流式细胞仪检测荧光强度,以红色荧光强度/绿色荧光强度的百分比作为线粒体膜电位水平。

### 1.4.6 WB法检测RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路相关蛋白质的表达

收集各组A549细胞,加入RIPA裂解液提取总蛋白,BCA法检测蛋白浓度,经SDS-PAGE、转膜、封闭后,分别加入p-RIPK1、RIPK1、p-RIPK3、RIPK3、p-MLKL、MLKL和 $\beta$ -actin抗体(均为1:1 000)稀释液,4  $^{\circ}\text{C}$ 处理过夜,加入HRP标记的山羊抗兔IgG二抗,室温、避光处理2 h,以 $\beta$ -actin为内参分析蛋白表达。

### 1.5 裸鼠移植瘤实验检测ATR对移植瘤生长和瘤组织中RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路相关蛋白质表达影响

将12只BALB/c雄性裸鼠用随机数字表法随机分为对照组与ATR组,每组6只,使用PBS调整A549细胞密度为 $5\times 10^7$ 个/mL,向两组裸鼠右侧股背处皮下注射0.2 mL细胞悬液,接种14 d后,ATR组裸鼠使用10 mg/kg剂量ATR(溶于玉米油中)灌胃给药,对照组给予等量玉米油,每周测量肿瘤体积,给药5周后,用颈椎脱臼法处死裸鼠,摘取移植瘤组织并称重,用RIPA裂解液提取瘤组织总蛋白,采用WB法检测移植瘤中p-RIPK1、RIPK1、p-RIPK3、RIPK3、p-MLKL、MLKL蛋白表达,方法同1.4.6。

### 1.6 统计学处理

上述主要实验至少独立重复3次。实验数据采用SPSS 23.0软件进行统计分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间采用单因素方差分析,组间多重比较采用SNK- $q$ 检验,两组间比较采用独立样本 $t$ 检验。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ATR明显抑制A549细胞的增殖能力

MTT法检测结果(图1)显示,10~160  $\mu\text{mol/L}$ 的ATR均可抑制A549细胞增殖( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),ATR处理24、48、72 h时对A549细胞的 $\text{IC}_{50}$ 值分别为80.58、37.07、17.99  $\mu\text{mol/L}$ ,因此,选择ATR处理时间24 h,低于 $\text{IC}_{50}$ 值的10、20、40  $\mu\text{mol/L}$ 的ATR进行后续实验。

### 2.2 ATR诱导A549细胞程序性坏死

MTT法检测结果(图2)显示,与对照组相比,ATR组A549细胞存活率显著降低( $P<0.01$ );与ATR组比较,ATR+Nec-1组A549细胞存活率显著升高( $P<0.01$ );与z-VAD组比较,ATR+z-VAD组细胞存活率显著降低( $P<0.01$ ),对照组、Nec-1组、z-VAD组三组之间细胞存活率比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。说明ATR处理并非通过凋亡通路而是通过程序性坏死通路导致细胞死亡。



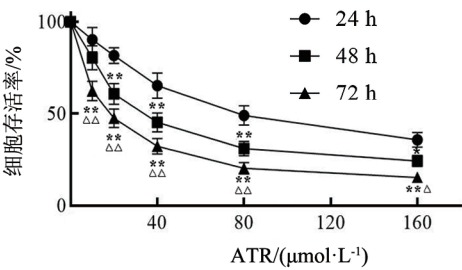
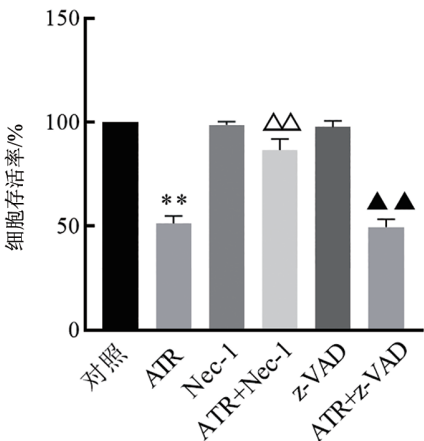


图1 不同浓度的 ATR 对 A549 细胞增殖的影响



与对照组比较, \*\* $P<0.01$ ; 与 ATR 组比较,  $\Delta\Delta P<0.01$ ; 与 z-VAD 组比较,  $\Delta\Delta P<0.01$ 。

图2 ATR 诱导 A549 细胞程序性坏死( $n=6$ )

2.3 ATR 促进 A549 细胞死亡而 Nec-1 预处理可部分逆转这种作用

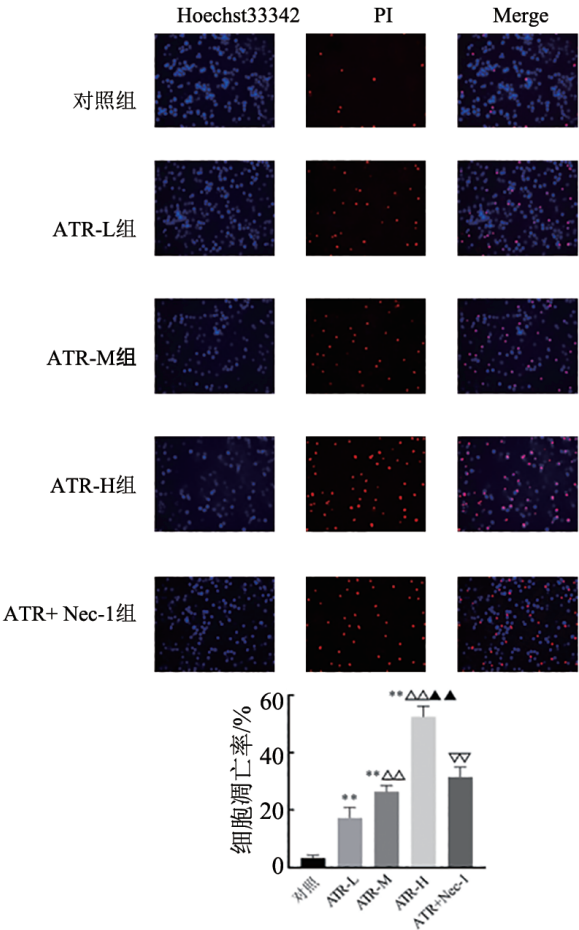
Hoechst33342/PI 双染法检测结果(图3)显示, PI 标记显示红色荧光的为死亡细胞, Hoechst33342 标记显示蓝色荧光的为活细胞, 与对照组比较, ATR-L 组、ATR-M 组、ATR-H 组显示红色荧光增多, 蓝色荧光减少, A549 细胞死亡率均显著升高(均  $P<0.01$ ); 与 ATR 组比较, ATR+Nec-1 组显示红色荧光减少, 蓝色荧光增多, A549 细胞死亡率均显著降低(均  $P<0.01$ )。实验结果表明, ATR 可明显促进 A549 细胞死亡。

2.4 电镜检测结果显示 ATR 诱导 A549 细胞坏死

电镜下观察发现(图4), 对照组细胞形态正常, 细胞线粒体等细胞器的超微结构正常; ATR 处理的细胞表现细胞肿胀, 线粒体内脊消失呈空泡化, 细胞内容物向外泄漏, 细胞核聚集, 表现为坏死特征; ATR+Nec-1 组细胞也表现为细胞肿胀、细胞器向外泄漏等坏死特征。与对照组比较, ATR-L 组、ATR-M 组、ATR-H 组细胞死亡数目明显增多(均  $P<0.01$ ); 与 ATR-H 组比较, ATR+Nec-1 组细胞死亡数目明显减少( $P<0.01$ )。实验结果说明, ATR 诱导 A549 细胞死亡的形式是坏死。

2.5 ATR 呈剂量依赖性地提升 A549 细胞中 ROS 水平并抑制线粒体膜点位

DCFH-DA 荧光探针法(图5)、JC-1 染色法(图6)检测结果显示, 与对照组比较, ATR-L 组、ATR-M 组、ATR-H 组 A549 细胞内 ROS 水平显著升高, 线粒体膜电位显著降低(均  $P<0.01$ ), 且呈 ATR 浓度依赖性( $P<0.05$ ); 与 ATR-H 组比较, ATR+Nec-1 组 ROS 水平显著降低, 线粒体膜电位显著升高(均  $P<0.01$ )。

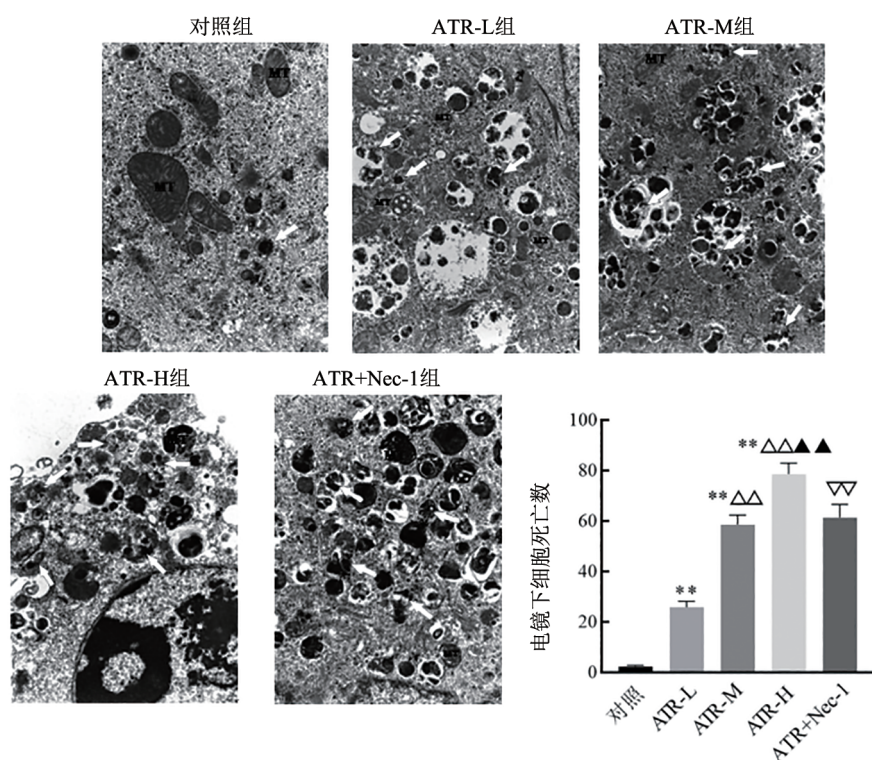


与对照组比较, \*\* $P<0.01$ ; 与 ATR-L 组比较,  $\Delta\Delta P<0.01$ ; 与 ATR-M 组比较,  $\Delta\Delta P<0.01$ ; 与 ATR-H 组比较,  $\Delta\Delta P<0.01$ 。

图3 ATR 和 Nec-1 处理对 A549 细胞死亡的影响 (Hoechst33342/PI 染色,  $\times 100$ ,  $n=6$ )

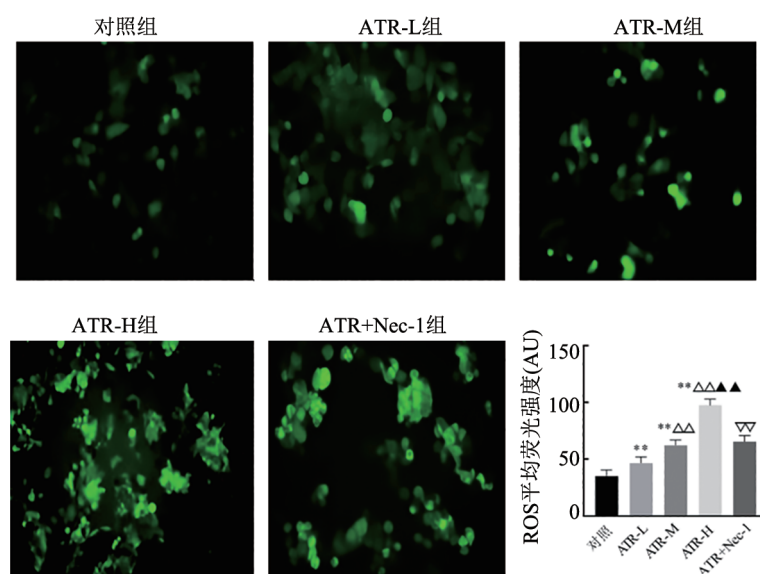
2.6 ATR 能显著提升 A549 细胞中 RIPK1/RIPK3/MLKL 磷酸化水平而 Nec-1 可逆转这一作用

WB 法检测结果(图7)显示, 与对照组比较, ATR-L 组、ATR-M 组、ATR-H 组 p-RIPK1、p-RIPK3、p-MLKL 蛋白表达水平均显著升高(均  $P<0.01$ ), 且呈药物浓度依赖性( $P<0.05$ ); 与 ATR-H 组比较, ATR+Nec-1 组 p-RIPK1、p-RIPK3、p-MLKL 蛋白表达水平显著降低(均  $P<0.01$ ), 各组之间 RIPK1、RIPK3、MLKL 表达差异无统计学意义( $P>0.05$ )。



与对照组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与 ATR-L 组比较, <sup>△△</sup> $P < 0.01$ ; 与 ATR-M 组比较, <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$ ; 与 ATR-H 组比较, <sup>▽▽</sup> $P < 0.01$ 。白色箭头所指为死亡细胞; MT: 线粒体。

图4 电镜观察 ATR 诱导 A549 细胞死亡(×10 000, n=6)



与对照组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与 ATR-L 组比较, <sup>△△</sup> $P < 0.01$ ; 与 ATR-M 组比较, <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$ ; 与 ATR-H 组比较, <sup>▽▽</sup> $P < 0.01$ 。

图5 ATR 和 Nec-1 处理对 A549 细胞 ROS 水平的影响(DCFH-DA 荧光染色, ×200, n=6)

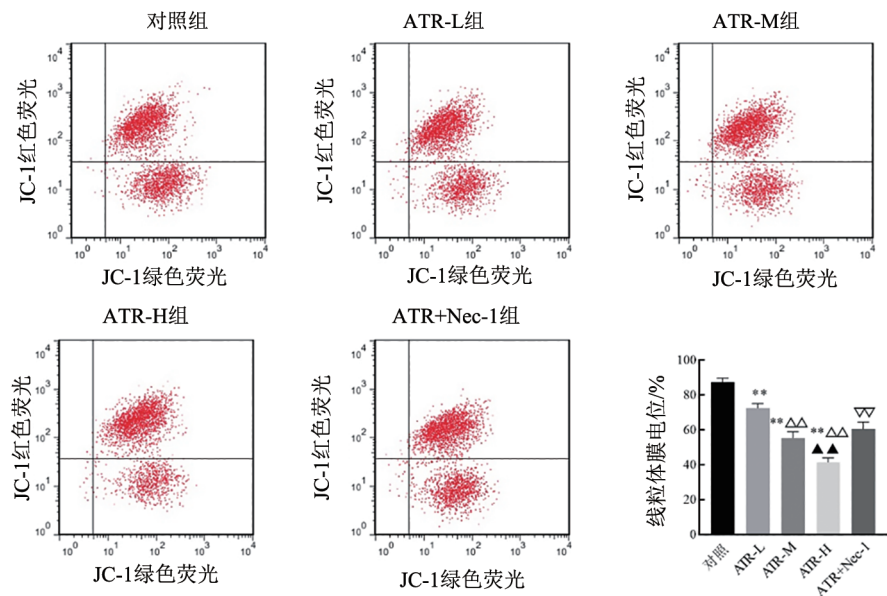
## 2.7 ATR 抑制裸鼠 A549 细胞移植瘤的生长

裸鼠移植瘤实验结果显示, 给与裸鼠 10 mg/kg ATR 治疗后, 与对照组比较, ATR 组裸鼠移植瘤生长缓慢( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ , 图 8), 移植瘤质量显著降低[(0.47±0.13)g vs (1.05±0.21)g,  $P < 0.01$ ], 瘤组织中 p-RIPK1、p-RIPK3、p-MLKL 蛋白表达水平显著升高( $P < 0.05$ , 图 9)。

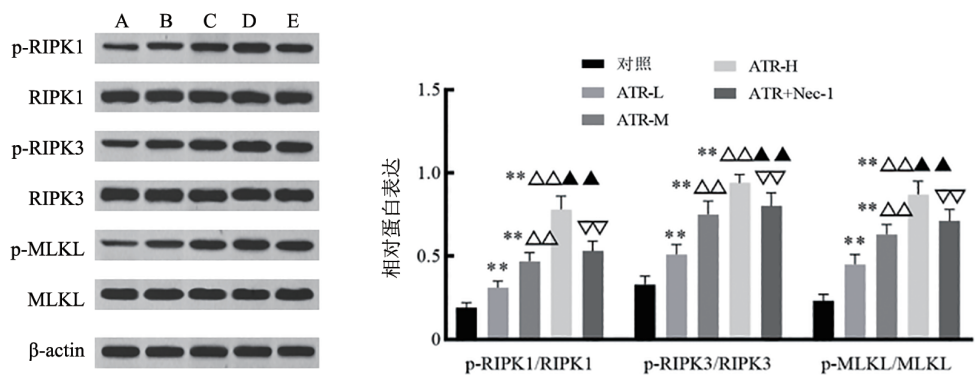
## 3 讨论

ATR 对多种肿瘤表现出抗肿瘤活性, 如在胆管癌中, ATR 通过调节 PI3K/AKT/mTOR 和 p38MAPK 信号通路诱导胆管癌细胞自噬, 抑制胆管癌细胞增殖<sup>[7]</sup>; 在乳腺癌中, ATR 可通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路诱导氧化应激介导的细胞凋亡和自噬, 抑制乳腺癌细胞增

殖<sup>[8]</sup>。本研究显示,10~160 μmol/L 的 ATR 可显著抑制 抗肿瘤活性。  
A549 细胞增殖,与报道结果一致。再次证实 ATR 具有

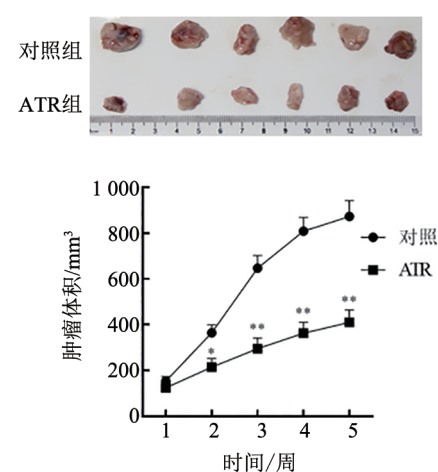


与对照组比较,\*\* $P<0.01$ ;与 ATR-L 组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ ;与 ATR-M 组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ ;与 ATR-H 组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ 。  
图 6 ATR 和 Nec-1 处理对 A549 细胞线粒体膜电位的影响(JC-1 染色, $n=6$ )



A: 对照组;B: ATR-L 组;C: ATR-M 组;D: ATR-H 组;E: ATR+Nec-1 组。与对照组比较,\*\* $P<0.01$ ;与 ATR-L 组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ ;  
与 ATR-M 组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ ;与 ATR-H 组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

图 7 A549 细胞 RIPK1/RIPK3/MLKL 通路活化可被 ATR 激活而被 Nec-1 抑制( $n=6$ )



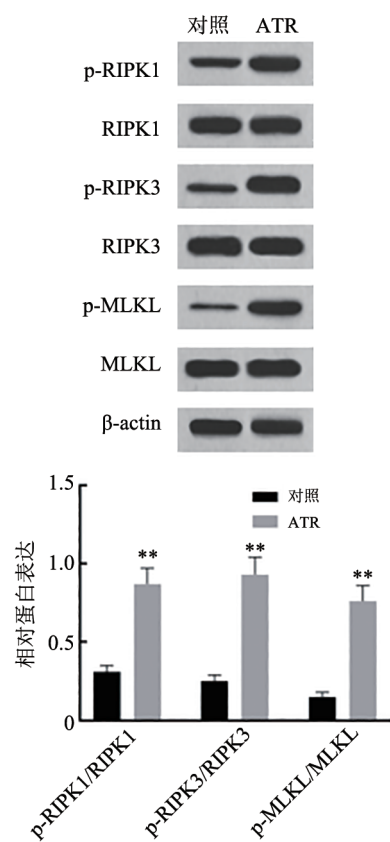
与对照组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ 。

图 8 ATR 对裸鼠移植瘤生长的影响

坏死性细胞凋亡是一种程序性细胞死亡,与凋亡和自噬途径不同,程序性坏死表现为细胞膜肿胀破裂、细胞膜完整性丧失、细胞质渗漏和线粒体功能障碍为主要特征的细胞死亡方式<sup>[9-10]</sup>。程序性坏死依赖 caspase 酶的级联反应,在肿瘤细胞中,caspase-8 活性被抑制,导致坏死小体的形成,RIPK1 的调控功能从凋亡转换为程序性坏死(又称坏死性凋亡),程序性坏死在肿瘤治疗中有广阔的前景<sup>[11-12]</sup>。如吴茱萸碱通过激活辣椒素受体使细胞外的  $\text{Ca}^{2+}$  内流,增加 ROS 生成,激活 RIP1/RIP3/MLKL 信号通路,诱导胃癌细胞程序性坏死<sup>[13]</sup>。本研究结果显示,与 ATR 单独处理组相比,使用 caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 与 ATR 共同处理 A549 细胞并不能增加细胞存活率,而使用



RIPK1 抑制剂 Nec-1 可提高 ATR 处理的 A549 细胞存活率, 减弱 ATR 的抗肿瘤活性, 证实 ATR 可能通过 RIPK1 诱导 A549 细胞发生程序性坏死。此外, 透射电镜结果显示, ATR 处理的细胞出现细胞肿胀、线粒体内脊消失呈空泡化、细胞内容物向外泄漏、细胞核聚集等现象, 符合坏死特征, 表明程序性坏死途径是 ATR 诱导 A549 细胞死亡的作用机制之一。



与对照组比较, \*\* $P < 0.01$ 。

图9 ATR对移植瘤中p-RIPK1、RIPK1、p-RIPK3、RIPK3、p-MLKL、MLKL蛋白表达的影响( $n=6$ )

RIPK1/RIPK3 复合体是程序性坏死的核心调控机制, MLKL 是 RIPK3 的底物, 当细胞启动程序性坏死时, MLKL 发生磷酸化, 磷酸化的 MLKL 可与细胞磷脂酰肌醇脂质 (phosphatidylinositol lipids, PIP) 结合, 引起细胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Na}^{+}$  流紊乱, 引发细胞器肿胀, 造成细胞呈坏死样死亡<sup>[14-15]</sup>。ROS 位于 RIPK1、RIPK3 的下游通路, ROS 水平增加又可促进 RIPK1/RIPK3 复合体形成<sup>[16-17]</sup>。线粒体是细胞内 ROS 生成的主要来源, RIPK1 与 RIPK3 活性增加, 可增强细胞线粒体能量代谢水平, 造成 ROS 蓄积与线粒体膜电位下降, 促进细胞程序性坏死过程<sup>[18-20]</sup>。研究<sup>[21]</sup>显示, 激活 RIPK1/RIPK3/MLKL 程序性坏死途径可抑制前列腺癌生长。另有研究<sup>[22]</sup>显示, 激活 RIP1/RIP3/MLKL 通路可通过诱导坏死性凋亡增加 NSCLC 对吉非替尼的

敏感性。本研究发现, 使用不同浓度的 ATR 处理 A549 细胞后, ROS 水平升高, 线粒体膜电位降低, p-RIPK1、p-RIPK3、p-MLKL 蛋白表达水平均升高, 且呈浓度依赖性, 推测 ATR 可能通过激活 RIPK1/RIPK3/MLKL 信号通路诱导程序性坏死, 诱导肺癌细胞死亡。为了验证此推测, 本研究在 ATR 处理的基础上使用 RIPK1 抑制剂 Nec-1 进行干预, 结果显示, Nec-1 可抑制 RIPK1/RIPK3/MLKL 信号通路, 减弱 ATR 对 A549 细胞程序性坏死的影响; 此外, 裸鼠移植瘤实验显示, ATR 可抑制 NSCLC 移植瘤生长, 并上调移植瘤体 p-RIPK1、p-RIPK3、p-MLKL 蛋白表达水平, 证实 ATR 对 A549 细胞生长的抑制作用可能是通过激活 RIPK1/RIPK3/MLKL 信号通路实现的。

综上所述, ATR 可能通过激活 RIPK1/RIPK3/MLKL 信号通路抑制 NSCLC 细胞生长, ATR 对 NSCLC 的抗肿瘤活性仍需结合动物模型进行更深入的研究。在未来课题组将设置不同剂量的 ATR 进行体内实验, 进一步验证其作用与机制, 并筛选其最佳给药剂量, 为 ATR 的临床应用提供实验参考。

#### [参考文献]

- [1] CHHOURI H, ALEXANDRE D, GRUMOLATO L. Mechanisms of acquired resistance and tolerance to EGFR targeted therapy in non-small cell lung cancer[J/OL]. *Cancers*, 2023, 15(2): 504[2023-08-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36672453/>. DOI: 10.3390/cancers15020504.
- [2] CHEN P X, LIU Y H, WEN Y K, *et al.* Non-small cell lung cancer in China[J]. *Cancer Commun*, 2022, 42(10): 937-970. DOI: 10.1002/cac2.12359.
- [3] ZHANG T, LI S M, LI Y N, *et al.* Atractyolide induces apoptosis and inhibits the migration of A549 lung cancer cells by regulating ROS-mediated signaling pathways[J/OL]. *Molecules*, 2022, 27(9): 2946[2023-08-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35566297/>. DOI: 10.3390/molecules27092946.
- [4] SPEIR M, NOWELL C J, CHEN A A, *et al.* Ptpn6 inhibits caspase-8- and Ripk3/Mlkl-dependent inflammation[J]. *Nat Immunol*, 2020, 21(1): 54-64. DOI: 10.1038/s41590-019-0550-7.
- [5] 陈少慕, 张标, 冯军. 混合系列蛋白激酶样结构域蛋白在非小细胞肺癌组织的表达及其临床意义[J]. *中华实验外科杂志*, 2018, 35(12): 2333-2335. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2018.12.052.
- [6] 黄静山, 张洪岩, 鲁继斌. 紫草素诱导非小细胞肺癌 A549 细胞程序性坏死的实验研究[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2021, 26(6): 488-492. DOI: 10.3969/j.issn.1009-0460.2021.06.002.
- [7] ACHARYA B, CHAIJAROENKUL W, NA-BANGCHANG K. Atractyolide inhibited the migration and induced autophagy in cholangiocarcinoma cells via PI3K/AKT/mTOR and p38MAPK signalling pathways[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2021, 73(9): 1191-1200. DOI: 10.1093/jpp/rgab036.
- [8] LI Z W, SONG Y L, HOU W J, *et al.* Atractyolide induces oxidative stress-mediated apoptosis and autophagy in human breast cancer MCF-7 cells through inhibition of the PI3K/Akt/mTOR

- pathway[J/OL]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2022, 36(8): e23081[2023-08-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35478473/>. DOI: 10.1002/jbt.23081.
- [9] WANG Q, WANG P P, ZHANG L, *et al.* Epigenetic regulation of RIP3 suppresses necroptosis and increases resistance to chemotherapy in NonSmall cell lung cancer[J]. *Transl Oncol*, 2020, 13(2): 372-382. DOI: 10.1016/j.tranon.2019.11.011.
- [10] LEE J H, PARK J E, HONG M J, *et al.* Genetic variants in key necroptosis regulators predict prognosis of non-small cell lung cancer after surgical resection[J]. *Thorac Cancer*, 2023, 14(26): 2678-2686. DOI: 10.1111/1759-7714.15054.
- [11] SUN W, YU J, GAO H W, *et al.* Inhibition of lung cancer by 2-methoxy-6-acetyl-7-methyljuglone through induction of necroptosis by targeting receptor-interacting protein 1[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2019, 31(2): 93-108. DOI: 10.1089/ars.2017.7376.
- [12] YU Y Q, GAMEZ-BELMONTE R, PATANKAR J V, *et al.* The role of programmed necrosis in colorectal cancer[J/OL]. *Cancers*, 2022, 14(17): 4295[2023-08-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36077828/>. DOI: 10.3390/cancers14174295.
- [13] 刘丽平, 李德亮, 李峰, 等. 吴茱萸碱诱导人胃腺癌细胞 MGC-803 程序性坏死的作用机制[J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(4): 2259-2263.
- [14] SHRESTHA A, GOHARI I M, MCCLANE B A. RIP1, RIP3, and MLKL contribute to cell death caused by *Clostridium perfringens* enterotoxin[J/OL]. *mBio*, 2019, 10(6): e02985-e02919[2023-08-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31848291/>. DOI: 10.1128/mBio.02985-19.
- [15] JACOBSEN A V, PIEROTTI C L, LOWES K N, *et al.* The Lck inhibitor, AMG-47a, blocks necroptosis and implicates RIPK1 in signalling downstream of MLKL[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(4): 291[2023-08-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35365636/>. DOI: 10.1038/s41419-022-04740-w.
- [16] BARATI M, JAVIDI M A, DARVISHI B, *et al.* Necroptosis triggered by ROS accumulation and Ca<sup>2+</sup> overload, partly explains the inflammatory responses and anti-cancer effects associated with 1Hz, 100mT ELF-MF *in vivo*[J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 169: 84-98. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.04.002.
- [17] DU S L, LIANG H S, ZHOU L, *et al.* Effect of doramectin on programmed cell death pathway in glioma cells[J]. *Clin Transl Oncol*, 2023, 25(10): 2871-2883. DOI: 10.1007/s12094-023-03147-z.
- [18] MENG H Y, LIU Z, LI X Y, *et al.* Death-domain dimerization-mediated activation of RIPK1 controls necroptosis and RIPK1-dependent apoptosis[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(9): E2001-E2009[2023-08-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29440439/>. DOI: 10.1073/pnas.1722013115.
- [19] JANTAS D, CHWASTEK J, GRYGIER B, *et al.* Neuroprotective effects of necrostatin-1 against oxidative stress-induced cell damage: an involvement of cathepsin D inhibition[J]. *Neurotox Res*, 2020, 37(3): 525-542. DOI: 10.1007/s12640-020-00164-6.
- [20] 刘巧, 刘小东, 张兵钱, 等. 特异性激活 G 蛋白偶联雌激素受体通过活性氧途径调控结肠癌细胞迁移[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2023, 30(10): 868-873. DOI: 10.38727.issn.1007-385x.2023.10.003.
- [21] XU H, ZENG X K, WEI X C, *et al.* Rosin derivative IDOAMP inhibits prostate cancer growth via activating RIPK1/RIPK3/MLKL signaling pathway[J/OL]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 9325973[2023-08-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35965682/>. DOI: 10.1155/2022/9325973.
- [22] TAN H Y, WANG N, CHAN Y T, *et al.* ID1 overexpression increases gefitinib sensitivity in non-small cell lung cancer by activating RIP3/MLKL-dependent necroptosis[J]. *Cancer Lett*, 2020, 475: 109-118. DOI: 10.1016/j.canlet.2020.01.025.

[收稿日期] 2023-08-27

[修回日期] 2024-01-23

[本文编辑] 黄静怡