

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.04.003

· 基础研究 ·

基于 EGFR/AKT 和 JAK2/STAT3 通路研究 α -常春藤皂苷单独或与顺铂联用对非小细胞肺癌细胞增殖与凋亡的影响

朱志明^a, 王苏美^b, 唐青^b, 王晰^b, 万信良^b, 莫瀚丹^b, 贾璐瑜^b, 俞晓燕^b, 周绮纯^b (广州中医药大学 第二临床医学院 a. 药剂科; b. 中医药防治非小细胞肺癌临床与基础研究团队, 广东 广州 510120)

[摘要] **目的:** 探讨 α -常春藤皂苷 (α -Hed) 诱导非小细胞肺癌 (NSCLC) 细胞凋亡的作用靶点及其潜在机制, 明确 α -Hed 与顺铂 (DDP) 联用后对相应的靶点蛋白表达的影响。 **方法:** 采用 CCK-8 法检测不同浓度 α -Hed 处理后 NSCLC 细胞 A549、H1299 和 PC-9 的存活率, 采用 Annexin V-FITC/PI 染色流式细胞术检测细胞凋亡率, 采用 WB 法检测细胞中 C-caspase-3 和 Bcl-2 蛋白的表达。通过网络药理学相关方法筛选 α -Hed 的潜在靶点, 利用分子对接法分析其结合效果, WB 法检测靶点蛋白的表达。通过 CCK-8 法、细胞集落形成实验和 WB 法检测 α -Hed 与 DDP 联用对 NSCLC 细胞的抑制作用。 **结果:** 给药 24 和 48 h 后, 10、15 和 20 μ mol/L α -Hed 可以显著抑制 NSCLC 细胞增殖活力 (均 $P < 0.01$); 与对照组相比, 20 μ mol/L α -Hed 处理后细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.01$); α -Hed 可上调 NSCLC 细胞中 C-caspase-3 的表达 ($P < 0.05$), 下调 Bcl-2 的表达 ($P < 0.05$)。网络药理学和分子对接筛选出结合亲和力小于 -5 kcal/mol 的靶点 AKT1、STAT3、EGFR 和 JAK2。WB 法检测结果显示, α -Hed 处理后 A549、H1299 细胞中 EGFR、p-AKT/AKT、p-STAT3/STAT3 和 JAK2 蛋白的表达均明显下调 (均 $P < 0.05$)。 α -Hed 与 DDP 联用后, 更显著地抑制 NSCLC 细胞的增殖 ($P < 0.01$), 进一步下调 EGFR、p-AKT/AKT、p-STAT3/STAT3 和 JAK2 蛋白的表达 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。 **结论:** α -Hed 通过下调 EGFR 和 JAK2 的表达抑制 STAT3 和 AKT 的磷酸化, 诱导 NSCLC 细胞凋亡, 与 DDP 联用后其抑制效果增强, EGFR/AKT 和 JAK2/STAT3 通路也进一步被抑制。

[关键词] α -常春藤皂苷; 非小细胞肺癌; 增殖; 凋亡; AKT1; STAT3; EGFR; JAK2

[中图分类号] R734.2; R730.52 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)04-0333-09

Effects of α -hederin alone or in combination with cisplatin on the proliferation and apoptosis of non-small cell lung cancer cells based on EGFR/AKT and JAK2/STAT3 pathways

ZHU Zhiming^a, WANG Sumei^b, TANG Qing^b, WANG Xi^b, WAN Xinliang^b, MO Handan^b, JIA Luyu^b, YU Xiaoyan^b, ZHOU Qichun^b (a. Department of Pharmacy; b. Clinical and Basic Research Team of TCM Prevention and Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer, the Second Clinical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the targets and potential mechanism of α -hederin (α -Hed) inducing cell apoptosis on non-small cell lung cancer (NSCLC), and to clarify the effects of α -Hed in combination with cisplatin (DDP) on the expression of target proteins. **Methods:** The viability of NSCLC cells (A549, H1299 and PC-9 cells) treated with different concentrations of α -Hed was detected by CCK-8 method. The apoptosis rate was determined by flow cytometry with Annexin V-FITC/PI staining. The expressions of cleaved caspase-3 (C-caspase-3) and Bcl-2 proteins were detected by Western blot. The potential targets of α -Hed were screened by network pharmacology, and their binding effect was analyzed by molecular docking method. Besides, Western blot was applied to detect target protein expression. The suppressive effect of α -Hed in combination with DDP on NSCLC cells was detected by CCK-8 assay, colony formation assay and Western blot assay. **Results:** After 24 h and 48 h administration, α -Hed at 10, 15 and 20 μ mol/L significantly inhibited the proliferation viability of NSCLC cells (all $P < 0.01$). Compared with the control group, the apoptosis rate significantly increased after 20 μ mol/L α -Hed treatment ($P < 0.01$). C-caspase-3 expression in NSCLC cells was upregulated ($P < 0.05$) and Bcl-2 expression was downregulated after α -Hed administration. The targets of AKT1, STAT3, EGFR and JAK2 with the binding affinity less than -5 kcal/mol were screened out via network pharmacology and molecular docking. Western blot showed that the expressions of EGFR, p-AKT/AKT, p-STAT3/STAT3 and JAK2 proteins in A549 and H1299 cells were significantly downregulated after α -Hed treatment (all $P < 0.05$). Furthermore, α -Hed in combination with DDP more significantly

[基金项目] 广东省中医院拔尖人才科研专项 (No. BJ2022KY13); 广东省中医药局面上项目 (No. 20222085, No. 20231094)

[作者简介] 朱志明 (1981—), 男, 学士, 主管中药师, 主要从事中药抗肿瘤的作用及机制研究。E-mail: 353537020@qq.com

[通信作者] 周绮纯, E-mail: szyzqcky@126.com

inhibited the proliferation of NSCLC cells ($P < 0.01$) and downregulated the expression of EGFR, p-AKT/AKT, p-STAT3/STAT3 and JAK2 proteins ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** α -Hed induces the apoptosis of NSCLC by down-regulating EGFR and JAK2 expressions, and inhibiting the phosphorylation of STAT3 and AKT. Especially, the inhibitory effect is enhanced when α -Hed is used in combination with DDP, and the EGFR/AKT and JAK2/STAT3 pathways are further inhibited.

[Key words] α -hederin (α -Hed); non-small cell lung cancer (NSCLC); proliferation; apoptosis; AKT1; STAT3; EGFR; JAK2

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(4): 333-341. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.04.003]

肺癌是严重危害人类生命和健康的疾病之一,其发病率和病死率均极高^[1]。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占所有肺癌类型的85%,大多数患者确诊时已处于中晚期,失去手术治疗的机会,主要治疗手段为化疗、分子靶向治疗和免疫治疗等^[2]。然而,传统化疗手段细胞毒作用广泛,患者易产生恶心、呕吐、腹泻、黏膜炎、耳毒性、肾毒性等严重不良反应^[3];靶向治疗药物和免疫检查点抑制剂不可避免地会产生治疗耐受^[4]。因此,寻找NSCLC的相关治疗靶点和治疗药物具有重要的意义。 α -常春藤皂苷(α -Hederin, α -Hed)是八月札、常春藤和白头翁等中药的活性成分,属于三萜类皂苷。研究结果^[5-9]表明, α -Hed具有良好的抗肿瘤活性,可抑制乳腺癌、肝癌、结肠癌、黑色素瘤等多种类型肿瘤细胞的增殖。 α -Hed可抑制NSCLC细胞的保护性自噬,减轻NSCLC对化疗药物紫杉醇的耐药性^[10];其通过破坏GSS/GSH/GPX2轴介导的谷胱甘肽氧化还原系统诱导NSCLC细胞发生铁死亡和细胞凋亡^[11];还可以通过抑制SIRT6依赖性糖酵解来抑制A549细胞的增殖^[12]。然而,关于 α -Hed对NSCLC的作用及其机制的研究较为少见, α -Hed抑制NSCLC作用的相关靶点及途径有待发掘和深入研究。本研究在体外观察 α -Hed对NSCLC细胞增殖与凋亡的影响,通过网络药理学分析 α -Hed的成分靶点并进行实验验证,同时观察 α -Hed与顺铂(DDP)的联用后相应的靶点通路的变化情况,旨在为探讨 α -Hed单独或与DDP联用抑制NSCLC细胞增殖及诱导细胞凋亡的具体作用靶点及其机制,为临床治疗晚期NSCLC提供科学合理的用药策略参考。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

人NSCLC细胞A549、H1299和PC-9细胞购自广州赛库生物技术有限公司,在含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素溶液的RPMI 1640培养基中,于37℃、5%CO₂条件下培养。

α -Hed(纯度98%,货号:H303293-5 mg)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司,DDP(纯度99%,货号:15663-27-1)购自美国MCE公司,RPMI 1640培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素溶液及0.25%胰蛋白酶-EDTA

消化液购自美国Gibco公司,不含EDTA的胰蛋白酶消化液购自北京索莱宝科技有限公司,CCK-8试剂盒购自日本Dojindo公司,Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司,BCA蛋白浓度测定试剂盒购自美国Thermo公司,5×SDS蛋白电泳上样缓冲液购自上海碧云天生物技术有限公司,HRP化学发光试剂盒购自美国Millipore公司,cleaved caspase-3(C-caspase-3)、caspase-3、Bcl-2、EGFR、p-STAT3、STAT3、p-AKT、AKT、JAK2、GAPDH等一抗和抗兔/抗鼠IgG抗体均购自美国CST公司。

1.2 CCK-8法检测 α -Hed对NSCLC细胞增殖的影响

将对数生长期的NSCLC细胞接种到96孔板(2×10^3 个/孔)中,待细胞贴壁后分别给予0、5、10、15、20 $\mu\text{mol/L}$ 的 α -Hed。联合DDP用药实验中,在5、10 $\mu\text{mol/L}$ 的 α -Hed基础上给予5 $\mu\text{mol/L}$ 的DDP。培养24、48 h时,向每个孔中加入10 μL CCK-8试剂,继续培养1~4 h后用酶标仪在波长450 nm处检测各孔的光密度(D)值,依据公式(细胞存活率=药物组D值/对照组D值 $\times 100\%$)计算细胞存活率。

1.3 Annexin V-FITC/PI染色流式细胞术检测 α -Hed对NSCLC细胞凋亡的影响

用不含EDTA的胰酶将经0、15、20 $\mu\text{mol/L}$ α -Hed处理的A549、H1299细胞消化后,以300 \times g、4℃下离心5 min并收集细胞。用预冷的PBS洗涤细胞2次,每次均以300 \times g、4℃下离心5 min,收集(1~5) $\times 10^5$ 个细胞。加入100 μL 1 \times 结合缓冲液重悬细胞,加入5 μL 的Annexin V-FITC和10 μL 的PI染色液,轻轻混匀,避光、室温中反应15 min,再加入400 μL 的1 \times 结合缓冲液,混匀后在1 h内上流式细胞仪检测细胞的凋亡水平。

1.4 WB法检测 α -Hed对NSCLC细胞中凋亡及筛选的靶点蛋白的表达

将对数生长期的细胞接种到6孔板(3×10^5 个/孔)中,待细胞贴壁后分别给予0、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 的 α -Hed处理24 h,根据生产说明书用BCA检测试剂盒对各组蛋白浓度进行定量。用10%SDS-PAGE分离蛋白质,将蛋白质条带转移到PVDF膜上,在5%的BSA中封闭1 h。加入稀释比例均为1:1 000的C-caspase-3、caspase-3、Bcl-2、EGFR、p-STAT3、STAT3、p-AKT、AKT、JAK2、GAPDH一抗,4℃反应过夜。次日,用TBST洗

膜3次(5 min/次),在抗兔/抗鼠IgG二抗(稀释比例为1:2 000)中反应2 h,再用TBST洗膜后,采用eblot接触式化学发光成像系统显色,用Image J软件分析蛋白质条带的灰度值。

1.5 网络药理学及分子对接分析筛选 α -Hed的作用靶点

通过SwissTarget Prediction和PharmMapper数据库预测 α -Hed的成分靶点,通过Genecard和DisGeNET数据库收集NSCLC的疾病靶点,在Genecard获取靶点时设置相关性 >1.0 ,在DisGeNET获取靶点时设置Score_gda >0.1 。将 α -Hed成分靶点和NSCLC疾病靶点取交集得到共有靶点,通过STRING数据库进行蛋白相互作用(互作)分析,设置最低要求的互作评分为0.700,将结果导出到cytoscape软件分析各靶点的度(degree)值。蛋白互作分析中,重点关注与凋亡蛋白caspase-3、Bcl-2有互作的蛋白及评分。将筛选出来的靶点通过Autodock Vina软件与 α -Hed分子对接^[13],计算结合能,研究该蛋白与 α -Hed是否有直接互作,对接结果采用PyMOL软件进行可视化处理。通过PLIP平台分析筛选出来的靶点与 α -Hed之间互作的位点。最后,通过WB法验证以上生物信息学分析结果。

1.6 细胞集落形成实验检测 α -Hed与DDP联合使用的效果

取对数生长期的细胞接种到6孔板(5×10^2 个/孔)中,待细胞贴壁后进行给药,分别设置5 $\mu\text{mol/L}$ DDP单独给药组(DDP组)、5 $\mu\text{mol/L}$ α -Hed单独给药组(5 $\mu\text{mol/L}$ α -Hed组)、5 $\mu\text{mol/L}$ DDP+5 $\mu\text{mol/L}$ α -Hed联合给药组(5 $\mu\text{mol/L}$ α -Hed+DDP组)、10 $\mu\text{mol/L}$ α -Hed单独给药组(10 $\mu\text{mol/L}$ α -Hed组)和5 $\mu\text{mol/L}$ DDP+10 $\mu\text{mol/L}$ α -Hed联合给药组(10 $\mu\text{mol/L}$ α -Hed+DDP组),给药48 h后,换培养液继续培养7 d。将细胞集落固定后用0.1%结晶紫溶液染色15 min,通过Image J软件分析集落的数量并评分,依据公式“集落形成率=处理组集落数量/对照组集落数量 $\times 100\%$ ”计算细胞集落形成率。

1.7 统计学处理

CCK-8法、流式细胞术、WB法等实验均独立重复3次。采用SPSS 20.0统计软件进行统计分析。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组数据比较采用 t 检验,多组间数据比较采用单因素方差分析。单因素方差分析时,先进行方差齐性检验,当方差齐时,采用LSD检验;当方差不齐时,采用Dunnett 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 α -Hed显著抑制NSCLC细胞的增殖并促进凋亡

CCK-8法检测结果(图1A)显示,10、15和20 $\mu\text{mol/L}$ 的 α -Hed给药24、48 h后,A549、H1299细胞存活率均显著降低(均 $P < 0.01$),表明10、15和20 $\mu\text{mol/L}$ 的 α -Hed均可显著抑制A549、H1299细胞的增殖。通过分析发现, α -Hed给药24 h时,杀伤A549细胞的半数抑制浓度(IC_{50})为13.01 $\mu\text{mol/L}$,H1299细胞的 IC_{50} 为15.35 $\mu\text{mol/L}$; α -Hed给药48 h时,杀伤A549细胞的 IC_{50} 为12.08 $\mu\text{mol/L}$,H1299细胞的 IC_{50} 为13.56 $\mu\text{mol/L}$ 。

Annexin V-FITC/PI染色流式细胞术检测结果(图1B)显示,与对照组相比,15和20 $\mu\text{mol/L}$ α -Hed处理后A549、H1299细胞的凋亡细胞数增多,其中,20 $\mu\text{mol/L}$ α -Hed组细胞凋亡率具有显著统计学意义($P < 0.01$)。

WB法实验结果(图1C)显示,10 $\mu\text{mol/L}$ α -Hed处理后的A549、H1299细胞中凋亡相关蛋白C-caspase-3的表达上调、Bcl-2的表达下调(均 $P < 0.05$),表明 α -Hed诱导了NSCLC细胞的凋亡。

2.2 α -Hed的网络药理学和分子对接分析

通过SwissTarget Prediction和PharmMapper数据库预测 α -Hed的成分靶点,除去重复值共得到386个靶点。收集NSCLC的疾病靶点,除去重复值共得到2 454个靶点。将 α -Hed成分靶点和NSCLC疾病靶点取交集得到65个共有靶点(图2A)。将65个成分-疾病靶点通过STRING数据库进行蛋白互作分析,得到蛋白互作网络图(图2B)。通过cytoscape软件分析各靶点的度值,得到度值排名前十的靶点(表1)即核心靶点。蛋白互作分析中,共有15个蛋白与caspase-3互作评分在0.700以上,包括XIAP、caspase-8、MDM2、AKT1、caspase-7、caspase-1、ANXA5、BCL2L1、STAT3、MET、DAPK1、VEGFA、EGFR、CDK1和IL2。共有12个蛋白与BCL2L1互作评分在0.700以上,包括AKT1、STAT3、caspase-8、XIAP、CDK1、ANXA5、caspase-7、caspase-1、MDM2、SRC、JAK2和VEGFA。这其中属于核心靶点的有AKT1、STAT3、EGFR、JAK2、VEGFA、MDM2和SRC。

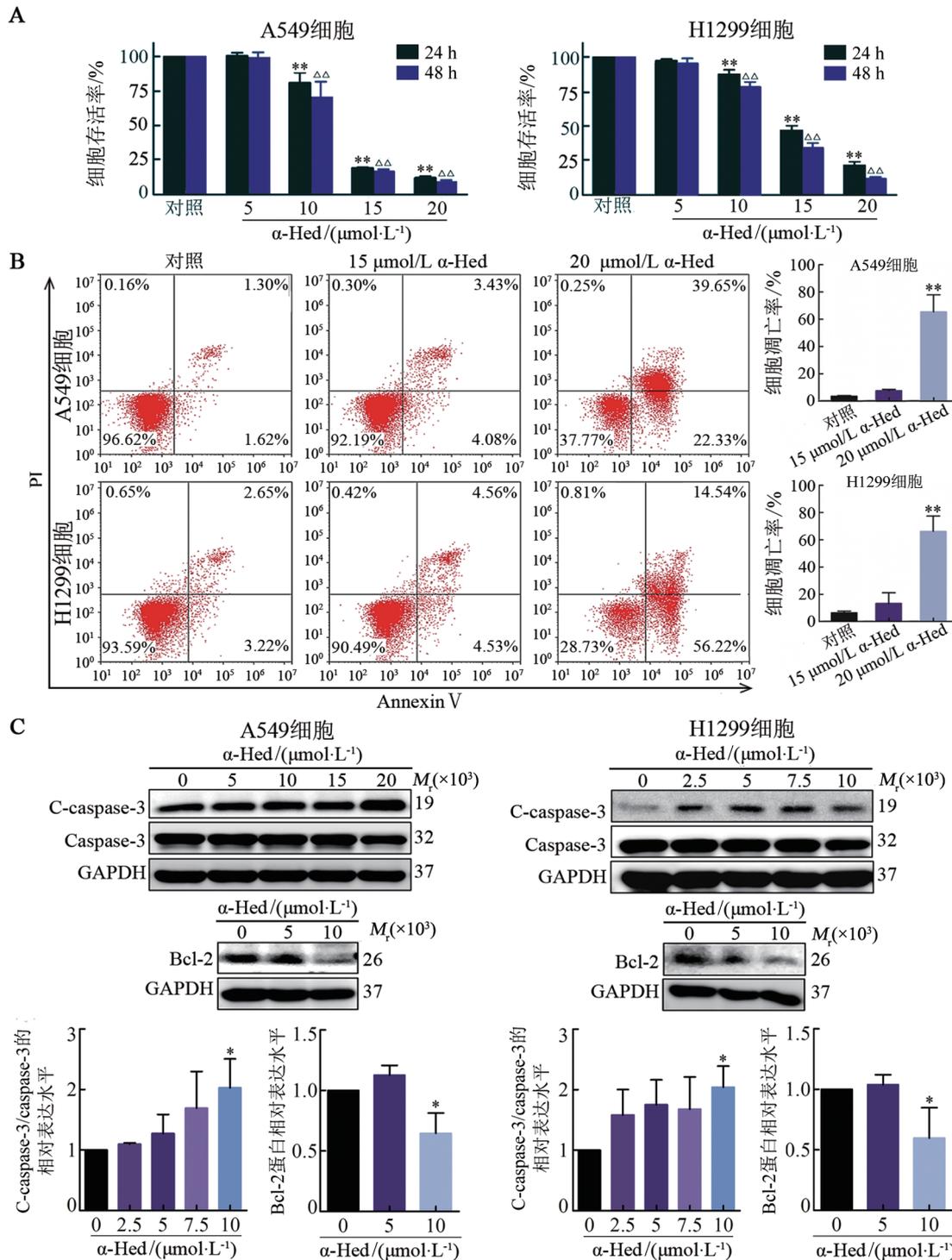
表1 Cytoscape分析所得的核心靶点

靶点	度值	介数中心度	紧密中心度	聚类系数
AKT1	27	0.249	0.607	0.236
STAT3	23	0.108	0.574	0.308
SRC	21	0.085	0.557	0.324
EGFR	19	0.096	0.557	0.374
VEGFA	19	0.199	0.563	0.316
CASP3	15	0.075	0.519	0.419
GRB2	15	0.029	0.514	0.467
BCL2L1	13	0.029	0.500	0.500
JAK2	13	0.034	0.466	0.385
MDM2	12	0.019	0.466	0.455

通过分子对接分析研究 AKT1、STAT3、EGFR 和 JAK2 与 α -Hed 是否有直接相互作用。一般认为, 结合能小于 -5 kcal/mol 则具有较好的结合活性。结果发现, AKT1、STAT3、EGFR 和 JAK2 与 α -Hed 的结合能分别为 -17.3 、 -10.4 、 -14.1 和 -15.8 kcal/mol, AKT1、STAT3、EGFR 和 JAK2 可通过特定位点与 α -Hed 之间产生较强的结合作用(图 2B、C)。

2.3 α -Hed 对 NSCLC 细胞内 EGFR、AKT、STAT3 和 JAK2 蛋白表达的影响

WB 法检测结果(图 3)显示, α -Hed 处理 24 h 后, A549、H1299 细胞中 EGFR、p-STAT3/STAT3、p-AKT/AKT 和 JAK2 蛋白的表达均显著下调(均 $P < 0.05$)。结果表明, α -Hed 下调 EGFR 和 JAK2 的表达、抑制 STAT3 和 AKT 的磷酸化。



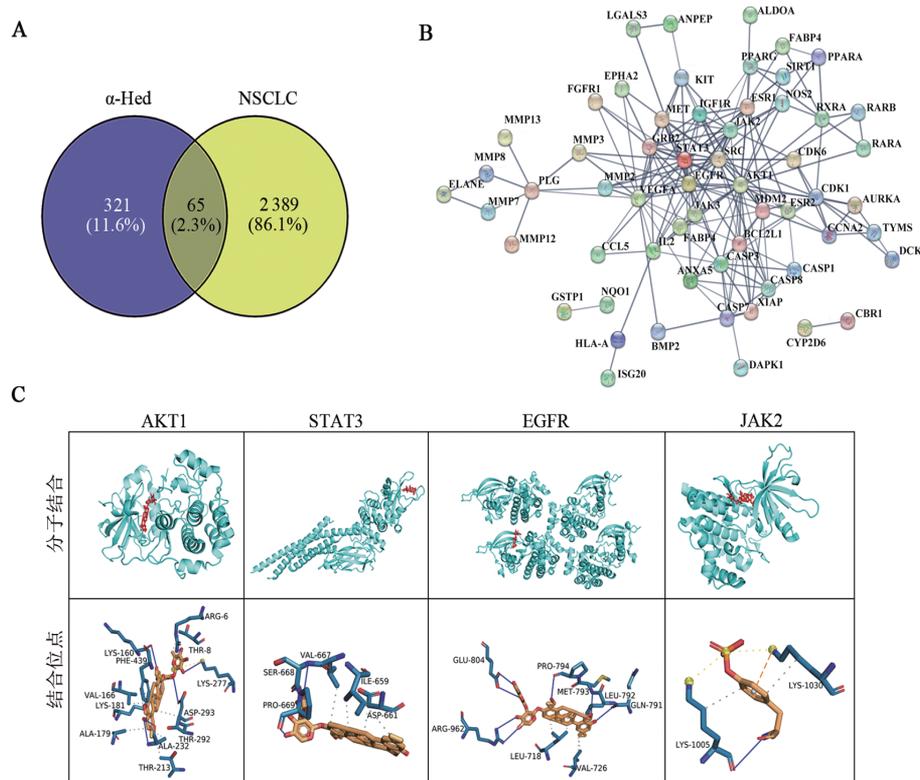
A: CCK-8 法检测 A549、H1299 细胞的存活率; B: Annexin V-FITC/PI 染色流式细胞术检测 A549、H1299 细胞的凋亡率; C: WB 法检测 A549、H1299 细胞中凋亡相关蛋白的表达。与对照组相比, $P < 0.05$, $*P < 0.01$; 给药 48 h 时, 与对照组相比, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图 1 不同浓度 α -Hed 对 NSCLC 细胞增殖和凋亡的影响

2.4 α -Hed 联合 DDP 显著抑制 NSCLC 细胞增殖

α -Hed 对 EGFR 突变的细胞 PC-9 也具有明显的抑制作用, 分析结果(图 4A)显示, PC-9 细胞 24 h 的 IC_{50} 为 20.95 $\mu\text{mol/L}$, 48 h 的 IC_{50} 为 16.45 $\mu\text{mol/L}$ 。5、10 $\mu\text{mol/L}$ 的 α -Hed 与 DDP 联用后, 与单独用药相比细胞存活率更低 ($P < 0.01$), 细胞集落形成率更低

($P < 0.01$), 细胞形态改变, 死亡更多(图 4 B~D)。WB 实验结果(图 4E)显示, α -Hed 与 DDP 联用后, 进一步下调了 EGFR、JAK2、p-AKT/AKT 和 p-STAT3/STAT3 蛋白的表达。实验结果表明, α -Hed 与 DDP 联用后通过进一步抑制 EGFR/AKT 和 JAK2/STAT3 信号通路使 α -Hed 对 NSCLC 细胞的抑制效果增强。



A: α -Hed 与 NSCLC 的共有靶点交集; B: 成分-疾病靶点的蛋白互作网络;
C: α -Hed 与 AKT1、STAT3、EGFR 和 JAK2 的分子对接图及结合位点。

图 2 α -Hed 的网络药理学和分子对接分析

3 讨论

α -Hed 具有良好的抗肿瘤活性, 可以诱导胃癌、肝癌、食管癌和结直肠癌细胞凋亡^[14-17], 其主要机制是增加细胞内活性氧水平, 通过激活线粒体途径诱导细胞内促凋亡蛋白表达升高、抗凋亡蛋白表达降低。 α -Hed 还可以在 G2/M 检查点阻断细胞周期, 并通过阻断结肠癌细胞中的 NF- κ B 信号转导来促进细胞线粒体途径凋亡^[18]。CAO 等^[19]研究发现, α -Hed 可通过抑制肝癌细胞中血小板活化因子刺激的 STAT3 活化来降低 MMP-2 表达, 从而抑制肝癌细胞迁移和侵袭及肺转移。目前, 对于 α -Hed 抑制 NSCLC 细胞增殖及诱导细胞凋亡的作用及相关机制的研究还较少, α -Hed 抑制 NSCLC 作用的相关靶点和途径有待发掘和深入研究。

首先, 本研究明确了 α -Hed 对人 NSCLC 细胞 A549 和 H1299 的增殖和凋亡的影响, 结果显示, α -Hed 可以显著抑制 A549 和 H1299 细胞的增殖, 显著升高细胞凋亡率以及上调凋亡蛋白 C-caspase-3 的表达, 下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达。为了探究 α -Hed 对 NSCLC 细胞的具体作用靶点, 本研究采用网络药理学分析筛选出作用靶点 AKT1、STAT3、EGFR 和 JAK2。这 4 个靶点不仅在蛋白交互网络中具有较高的度值, 也与凋亡蛋白 caspase-3 和 Bcl2L1 (Bcl-2 家族成员) 有较高的互作评分, 可能是 α -Hed 诱导 NSCLC 细胞凋亡的关键靶点。通过分子对接技术分析发现, AKT1、STAT3、EGFR 和 JAK2 与 α -Hed 均具有较强的结合作用。

表皮生长因子受体 (EGFR) 是一种具有细胞质激酶活性的穿膜蛋白, 可转导重要的生长因子信号。

EGFR 是治疗 NSCLC 的重点靶点, 在临床治疗中已经开发出许多靶向 EGFR 的抑制剂药物, 可以有效地治疗 NSCLC^[20]。AKT/PKB 是一种丝氨酸苏氨酸激酶, 作为 EGFR 的下游信号可以参与肿瘤细胞存活、增殖、侵袭、凋亡和血管生成等多种关键途径。许多的刺激和激酶都可以导致 AKT 途径激活, 驱动肿瘤细胞的增殖和存活。靶向抑制 AKT 可以起到良好的抗肿瘤作用^[21]。STAT3 是一种与细胞各种生物过程密切相关的转录因子, 可以调节细胞的增殖、转移、血管生成、免疫反应和化学抵抗^[22]。JAK2 是 STAT3 的上游蛋白, 其持续激活与肿瘤的进展和不良预后

有关, 抑制 JAK2/STAT3 通路可以抑制肿瘤的进展^[23-25]。为了验证网络药理学筛选出来的靶点, 本研究通过 WB 实验检测 α -Hed 对 A549 和 H1299 细胞内 EGFR、p-STAT3、STAT3、p-AKT、AKT 和 JAK2 表达的影响, 结果发现, α -Hed 可以下调细胞中 EGFR 和 JAK2 的表达, 抑制 STAT3 和 AKT 蛋白的磷酸化。研究^[26]表明, 与正常人相比, NSCLC 患者体内的 EGFR、AKT 和 STAT3 的激活水平明显升高。 α -Hed 可以抑制 EGFR/AKT 和 JAK2/STAT3 的表达, 是治疗 NSCLC 的一种极具前景和潜力的药物。

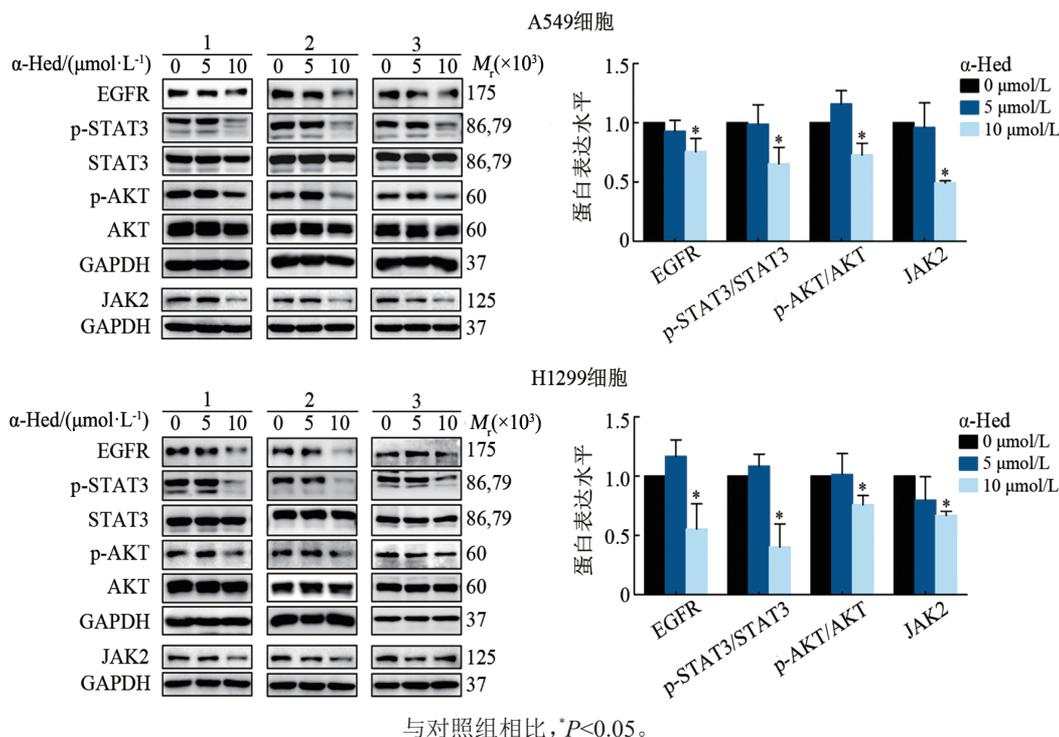
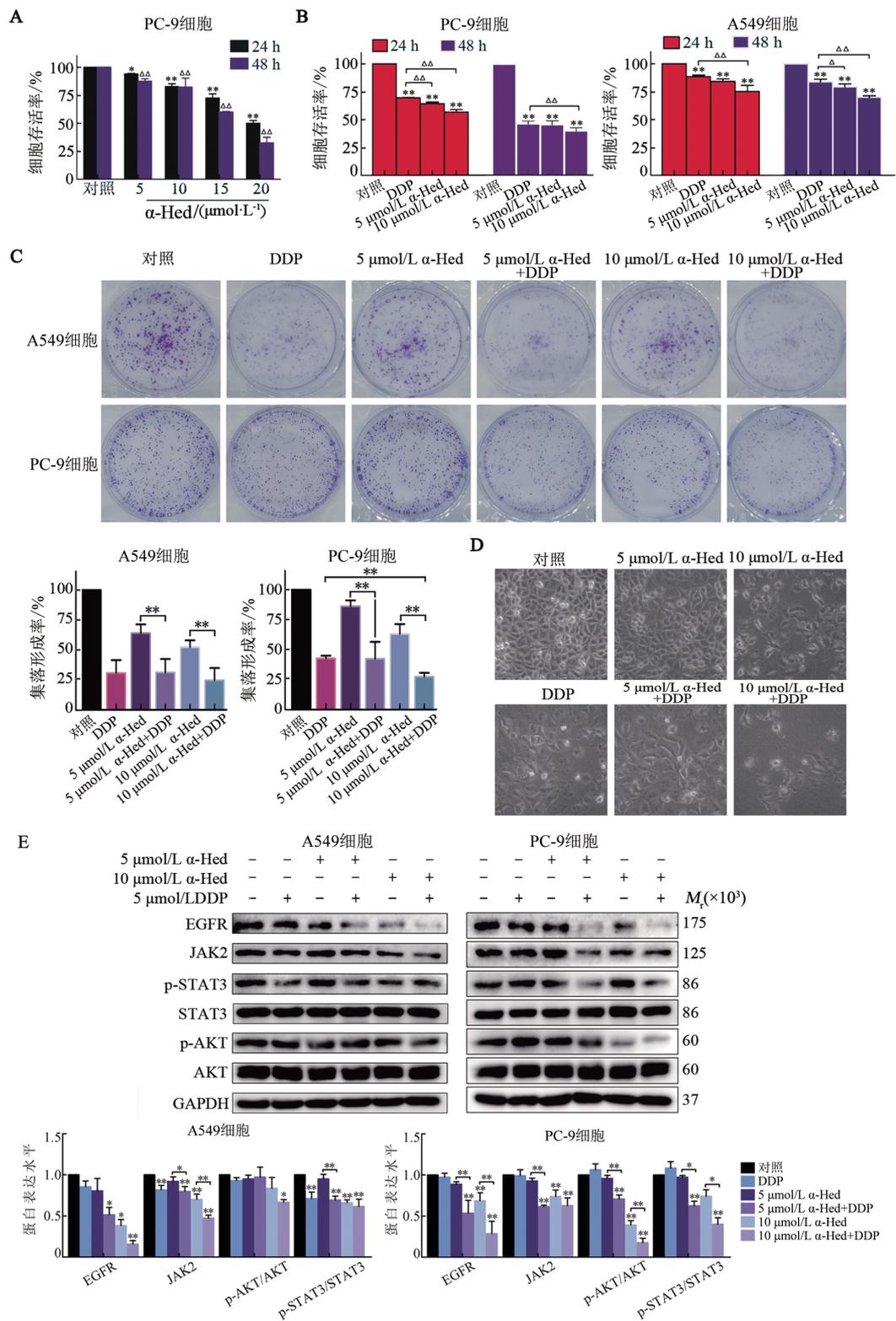


图3 α -Hed 调控 NSCLC 细胞中 EGFR、AKT、STAT3 和 JAK2 蛋白的表达

在临床上, 晚期 NSCLC 化疗常常是联合用药, 因此本研究就 α -Hed 与临床常用化疗药物 DDP 的联合使用进行了研究, 结果发现, α -Hed 和 DDP 联合使用可以发挥更显著的抑制 NSCLC 细胞的作用。并且, 联合给药组的 EGFR、JAK2、p-AKT/AKT 和 p-STAT3/STAT3 蛋白相比单独给药时均明显下调了。表明 α -Hed 和 DDP 联用可以通过抑制 EGFR/AKT 和 JAK2/STAT3 信号通路来抑制 NSCLC 细胞的增殖。

有趣的是, 有研究^[27]发现, NSCLC 中 EGFR 信号转导的异常激活可以通过上调 NSCLC 细胞上的 PD-L1 表达来逃避宿主免疫应答, 而 AKT/STAT3 通路可以成为 EGFR 信号转导的新型下游靶标, 用于调节 NSCLC 细胞上的 PD-L1 表达。即使在吉非替尼耐药的 NSCLC 中, 抑制 AKT 或 STAT3 也可以下调

PD-L1 的表达。这将 AKT/STAT3 信号通路 with NSCLC 的抗肿瘤免疫应答联系起来。JAK2 在肿瘤免疫中扮演重要角色。有研究^[28]表明, 密度调节的再启动和释放因子缺失导致的 JAK2 翻译减少, JAK/STAT 信号通路受损, 从而通过增强肿瘤微环境中 CD8⁺ T 细胞的抗肿瘤杀伤活性, 降低肿瘤细胞中 PD-L1 的表达, 抑制肿瘤生长。也有研究^[29]表明, 在 II 型 IFN 刺激下选择性抑制 JAK2 能下调 NSCLC 细胞中 PD-L1 的表达。本研究在蛋白互作分析中也发现, 核心靶点中的 MDM2 也与肿瘤免疫有关。MDM2 高表达的细胞对 T 细胞介导的肿瘤杀伤耐受性更高, 靶向 MDM2 并阻断其表达, 或者与 PD-1 抑制剂联用, 都可以增强免疫疗法的疗效^[30]。这些结果提示, α -Hed 可能对 NSCLC 的抗肿瘤免疫有影响, 但具体是否有此效应需要进一步开展实验深入研究。



A: CCK-8法检测不同浓度 α -Hed对PC-9细胞存活率的影响; B: CCK-8法检测 α -Hed、DDP对A549和PC-9细胞存活率的影响; C: 细胞集落形成实验检测 α -Hed、DDP对A549和PC-9细胞集落形成的影响; D: α -Hed、DDP对A549细胞形态的影响 ($\times 200$); E: WB法检测 α -Hed、DDP对A549和PC-9细胞EGFR、AKT、STAT3和JAK2蛋白表达的影响。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图4 α -Hed+DDP对NSCLC细胞增殖、集落形成、凋亡及相关蛋白表达的影响

综上所述, 本研究发现 α -Hed 可以通过抑制 EGFR/AKT 和 JAK2/STAT3 通路抑制 NSCLC 细胞增

殖, 诱导 NSCLC 细胞凋亡。 α -Hed 与 DDP 联用后抑制 NSCLC 细胞的效果增强, 提示其可与其他化疗药

物联合使用以应用于临床。 α -Hed与DDP联用更显著地抑制了EGFR/AKT和JAK2/STAT3通路,为治疗NSCLC的基础研究和临床应用提供了有价值的参考依据。同时本研究对 α -Hed的研究发现也表明, α -Hed具有作为抗肿瘤新药的巨大潜力,为治疗NSCLC的新药开发提供了新选择。

[参 考 文 献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(1): 5-29. DOI: 10.3322/caac.21254.
- [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] ZRAIK I M, HEB-BUSCH Y. Management of chemotherapy side effects and their long-term sequelae[J/OL]. Urologe A, 2021, 60(7): 862-871[2023-11-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/3317544/>. DOI: 10.1007/s00120-021-01569-7.
- [4] ALDEA M, ANDRE F, MARABELLE A, *et al.* Overcoming resistance to tumor-targeted and immune-targeted therapies[J]. Cancer Discov, 2021, 11(4): 874-899. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-20-1638.
- [5] CHENG L, XIA T S, WANG Y F, *et al.* The anticancer effect and mechanism of α -hederin on breast cancer cells[J]. Int J Oncol, 2014, 45(2): 757-763. DOI: 10.3892/ijo.2014.2449.
- [6] 张夜航, 卢文丽, 彭佩克, 等. α -常春藤皂苷协同雷公藤红素对SMMC7721肝癌细胞增殖和周期的影响[J]. 中成药, 2022, 44(4): 1099-1106. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.04.011.
- [7] CHEN T Q, SUN D D, WANG Q J, *et al.* α -hederin inhibits the proliferation of hepatocellular carcinoma cells *via* hippo-yes-associated protein signaling pathway[J/OL]. Front Oncol, 2022, 12: 839603[2023-11-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8927085/>. DOI: 10.3389/fonc.2022.839603.
- [8] 王国娟, 余文燕, 郭红飞, 等. α -常春藤皂苷抗结肠癌增殖作用研究[J]. 中药药理与临床, 2017, 33(4): 41-45. DOI: 10.13412/j.cnki.zyyl.2017.04.012.
- [9] 张步鑫, 赵献敏, 成琼, 等. α -常春藤皂苷对黑色素瘤B16细胞增殖和凋亡的影响及机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(12): 81-85. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20181118.
- [10] ZHAN Y J, WANG K, LI Q, *et al.* The novel autophagy inhibitor α -hederin promoted paclitaxel cytotoxicity by increasing reactive oxygen species accumulation in non-small cell lung cancer cells[J/OL]. Int J Mol Sci, 2018, 19(10): 3221[2023-11-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6214018/>. DOI: 10.3390/ijms19103221.
- [11] WU Y, WANG D L, LOU Y Q, *et al.* Regulatory mechanism of α -hederin upon cisplatin sensibility in NSCLC at safe dose by destroying GSS/GSH/GPX2 axis-mediated glutathione oxidation-reduction system[J/OL]. Biomed Pharmacother, 2022, 150: 112927[2023-11-18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35398749/>. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.112927.
- [12] FANG C, LIU Y H, CHEN L Y, *et al.* α -Hederin inhibits the growth of lung cancer A549 cells *in vitro* and *in vivo* by decreasing SIRT6 dependent glycolysis[J/OL]. Pharm Biol, 2021, 59(1): 11-20[2023-11-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7782159/>. DOI: 10.1080/13880209.2020.1862250.
- [13] TROTT O, OLSON A J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading[J/OL]. J Comput Chem, 2010, 31(2): 455-461[2023-11-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3041641/>. DOI: 10.1002/jcc.21334.
- [14] WANG J, DENG H Y, ZHANG J X, *et al.* α -Hederin induces the apoptosis of gastric cancer cells accompanied by glutathione decrement and reactive oxygen species generation *via* activating mitochondrial dependent pathway[J]. Phytother Res, 2020, 34(3): 601-611. DOI: 10.1002/ptr.6548.
- [15] LI J, WU D D, ZHANG J X, *et al.* Mitochondrial pathway mediated by reactive oxygen species involvement in α -hederin-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells[J/OL]. World J Gastroenterol, 2018, 24(17): 1901-1910[2023-11-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5937207/>. DOI: 10.3748/wjg.v24.i17.1901.
- [16] 李娇, 马静静, 胡雪, 等. α -常春藤皂苷通过活性氧—线粒体途径促进食管癌细胞凋亡的研究[J]. 疑难病杂志, 2018, 17(9): 932-935, 939, 974. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2018.09.016.
- [17] SUN J, FENG Y, WANG Y, *et al.* α -hederin induces autophagic cell death in colorectal cancer cells through reactive oxygen species dependent AMPK/mTOR signaling pathway activation[J/OL]. Int J Oncol, 2019, 54(5): 1601-1612[2023-11-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6438428/>. DOI: 10.3892/ijo.2019.4757.
- [18] SUN D D, SHEN W X, ZHANG F, *et al.* α -hederin arrests cell cycle at G2/M checkpoint and promotes mitochondrial apoptosis by blocking nuclear factor- κ B signaling in colon cancer cells[J/OL]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 2548378[2023-11-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6180961/>. DOI: 10.1155/2018/2548378.
- [19] CAO L N, ZHANG Y W, MI J X, *et al.* α -hederin inhibits the platelet activating factor-induced metastasis of HCC cells through disruption of PAF/PTAFR axis cascaded STAT3/MMP-2 expression[J]. Pharmacol Res, 2022, 178: 106180. DOI: 10.1016/j.phrs.2022.106180.
- [20] YE L Y, CHEN X X, ZHOU F. EGFR-mutant NSCLC: emerging novel drugs[J]. Curr Opin Oncol, 2021, 33(1): 87-94. DOI: 10.1097/CCO.0000000000000701.
- [21] SHARIATI M, MERIC-BERNSTAM F. Targeting AKT for cancer therapy[J/OL]. Expert Opin Investig Drugs, 2019, 28(11): 977-988[2023-11-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6901085/>. DOI: 10.1080/13543784.2019.1676726.
- [22] EL-TANANI M, AL KHATIB A O, ALADWAN S M, *et al.* Importance of STAT3 signalling in cancer, metastasis and therapeutic interventions[J/OL]. Cell Signal, 2022, 92: 110275[2023-11-18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35122990/>. DOI: 10.1016/j.cellsig.2022.110275.
- [23] FAN X H, FU H T, XIE N, *et al.* Inhibition of JAK2/STAT3 signaling pathway by panaxadiol limits the progression of pancreatic cancer[J/OL]. Aging, 2021, 13(19): 22830-22842[2023-11-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8544303/>. DOI: 10.18632/aging.203575.
- [24] 马涛, 王红梅, 赵婷, 等. 阿曼托双黄酮通过JAK2-STAT3通路影响甲状腺癌SW579细胞的增殖和凋亡[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2023, 30(3): 211-216. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.03.004.

- [25] YUAN K T, YE J N, LIU Z G, *et al.* Complement C3 overexpression activates JAK2/STAT3 pathway and correlates with gastric cancer progression[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 9[2023-11-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6956509/>. DOI: 10.1186/s13046-019-1514-3.
- [26] GORGISEN G, OZES D, PEHLIVANOGLU S, *et al.* Differential expression and activation of epidermal growth factor receptor 1 (EGFR1), ERK, AKT, STAT3, and TWIST1 in nonsmall cell lung cancer (NSCLC) [J]. *Exp Lung Res*, 2013, 39(9): 387-398. DOI: 10.3109/01902148.2013.831960.
- [27] ABDELHAMED S, OGURA K, YOKOYAMA S, *et al.* AKT-STAT3 pathway as a downstream target of EGFR signaling to regulate PD-L1 expression on NSCLC cells[J]. *J Cancer*, 2016, 7(12): 1579-1586. DOI: 10.7150/jca.14713.
- [28] CHEN B W, HU J J, HU X T, *et al.* DENR controls JAK2 translation to induce PD-L1 expression for tumor immune evasion[J/OL]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 2059[2023-11-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9018773/>. DOI: 10.1038/s41467-022-29754-y.
- [29] PITRODA S P, STACK M E, LIU G F, *et al.* JAK2 inhibitor SAR302503 abrogates PD-L1 expression and targets therapy-resistant non-small cell lung cancers[J]. *Mol Cancer Ther*, 2018, 17(4): 732-739. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0667.
- [30] SAHIN I, ZHANG S L, NAVARAJ A, *et al.* AMG-232 sensitizes high MDM2-expressing tumor cells to T-cell-mediated killing[J/OL]. *Cell Death Discov*, 2020, 6: 57[2023-11-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7338458/>. DOI: 10.1038/s41420-020-0292-1.

[收稿日期] 2023-11-20

[修回日期] 2024-02-17

[本文编辑] 党瑞山