

5-对氟苄氧基杨梅醇对人肺腺癌 A549-Homo BIRC5 体内增殖的抑制作用及机制研究

陈思思^{1,2}, 陈璇^{1,2}, 任泽明^{1,2}, 童晔玲^{1,2}, 梅茜钰^{1,2}, 戴关海^{1,2*} (1.浙江省中医药研究院, 杭州 310007; 2.浙江省中药新药研发重点实验室, 杭州 310007)

摘要: 目的 研究 5-对氟苄氧基杨梅醇(myricanol 5-fluorobenzyloxy ether, 5FEM)对人肺腺癌 A549-Homo BIRC5 体内增殖的抑制作用及机制。方法 构建 A549-Homo BIRC5 裸鼠移植瘤模型, 随机分为模型组、溶剂(聚乙二醇 400, 2.5 mL·kg⁻¹)组和 5FEM 低、中、高剂量(20, 40, 80 mg·kg⁻¹)组, 每组 8 只。各组每日腹腔注射给药, 连续 5 周, 每周测量移植瘤体积用于绘制肿瘤生长曲线, 实验结束后处死裸鼠, 剥离瘤体并称重。TUNEL 法检测移植瘤组织细胞凋亡情况; RT-qPCR 测定移植瘤组织中 Caspase-9、PARP、Bax、Bcl-2 和 Survivin 的 mRNA 表达水平; ELISA 法检测瘤组织中 Caspase-9、Survivin 和 PARP 蛋白含量; 免疫组化法检测瘤组织中 Survivin、Caspase-9、Cleaved caspase-9、PARP 和 Cleaved PARP 蛋白水平。结果 与模型组相比, 5FEM(20, 40, 80 mg·kg⁻¹)能够显著减小移植瘤体积和减轻瘤重, 呈一定剂量依赖性。TUNEL 染色结果显示 5FEM 干预后肿瘤细胞凋亡较模型组明显增多。RT-qPCR 结果显示, 5FEM(20, 40, 80 mg·kg⁻¹)可以诱导瘤组织中 Caspase-9 和 Bax 的 mRNA 表达显著升高, 并诱导 Bcl-2、PARP 和 Survivin 的 mRNA 表达降低。ELISA 结果显示, 5FEM(40, 80 mg·kg⁻¹)可以显著增加瘤组织中 Caspase-9 蛋白表达量, 并显著降低瘤组织中 PARP 和 Survivin 蛋白的表达量。免疫组化结果显示, 5FEM(80 mg·kg⁻¹)处理后瘤组织中 Caspase-9、Cleaved caspase-9 和 Cleaved PARP 蛋白表达均显著升高, 而 PARP 和 Survivin 蛋白表达被不同程度抑制。结论 5FEM 可下调 Survivin 表达, 促进 Caspase-9 和 PARP 活化, 诱导肿瘤细胞凋亡, 抑制肺腺癌 A549-Homo BIRC5 裸鼠移植瘤生长。

关键词: 5-对氟苄氧基杨梅醇; A549-Homo BIRC5; 移植瘤; 凋亡

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2023)12-1704-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20230085

引用本文: 陈思思, 陈璇, 任泽明, 等. 5-对氟苄氧基杨梅醇对人肺腺癌 A549-Homo BIRC5 体内增殖的抑制作用及机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(12): 1704-1711.

Study on Inhibitory Effect and Mechanism of Myricanol 5-Fluorobenzyloxy Ether on Proliferation of Human Lung Adenocarcinoma Cells A549-Homo BIRC5 *in Vivo*

CHEN Sisi^{1,2}, CHEN Xuan^{1,2}, REN Zeming^{1,2}, TONG Yeling^{1,2}, MEI Xiyu^{1,2}, DAI Guanhai^{1,2*} (1.Zhejiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007, China; 2.Key Laboratory of Research and Development of Chinese Medicine of Zhejiang Province, Hangzhou 310007, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the inhibitory effect and mechanism of myricanol 5-fluorobenzyloxy ether(5FEM) on the proliferation of human lung adenocarcinoma A549-Homo BIRC5 *in vivo*. **METHODS** The model of A549-Homo BIRC5 xenograft tumors in nude mice was constructed and randomly divided into model group, solvent(polyethylene glycol 400, 2.5 mL·kg⁻¹) group and 5FEM low, medium, and high dose(20, 40, 80 mg·kg⁻¹, respectively) groups, with 8 mice in each group. Each group received daily intraperitoneal injection for 5 weeks, and the tumor volume was measured weekly to draw the tumor growth curve, and the nude mice were sacrificed after the experiment ended, solid tumors were harvested and weighed. The apoptosis of tumor tissue was analysed by TUNEL-staining. The mRNA expression level of Caspase-9, PARP, Bax, Bcl-2 and Survivin in tumor tissues were measured by RT-qPCR; ELISA assay was used to detect the protein levels of Caspase-9, Survivin and PARP in tumor tissues. Immunohistochemistry was adopted to detect the levels of Survivin, Caspase-9, Cleaved caspase-9, PARP and Cleaved PARP proteins in tumor tissues. **RESULTS** Compared with the model group, 5FEM(20, 40, 80 mg·kg⁻¹) could significantly reduce the volume and weight of the xenograft tumors in a dose-dependent manner. TUNEL staining showed that the apoptosis of tumor cells after 5FEM intervention was significantly higher than that in model group. RT-qPCR showed that 5FEM(20, 40, 80 mg·kg⁻¹) could significantly increase the mRNA expression of Caspase-9 and Bax, and decrease the mRNA expression of Bcl-2, PARP and Survivin in tumor tissues. ELISA results showed that 5FEM(40, 80 mg·kg⁻¹) could

基金项目: 浙江省基础公益研究计划项目(LGF22H280014); 浙江省科技计划项目(2017C33169)

作者简介: 陈思思, 女, 硕士, 研究实习员 E-mail: sisichen_15@163.com *通信作者: 戴关海, 男, 硕士, 研究员 E-mail: 13989494472@163.com

significantly increase the expression of Caspase-9 protein in tumor tissues, and significantly decrease the expression of PARP and Survivin protein in tumor tissues. Immunohistochemical results showed that the expressions of Caspase-9, Cleaved caspase-9 and Cleaved PARP protein in tumor tissues were significantly increased after 5FEM(80 mg·kg⁻¹) treatment, while the expression of PARP and Survivin protein were inhibited in different degrees. **CONCLUSION** 5FEM can down-regulate the expression of Survivin, promote the activation of Caspase-9 and PARP, induce the apoptosis of tumor cells, and inhibit the growth of lung adenocarcinoma A549-Homo BIRC5 xenograft tumors in nude mice.

KEYWORDS: myricanol 5-fluorobenzyloxy ether; A549-Homo BIRC5; xenograft tumor; apoptosis

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率在中国一直呈上升趋势,严重危害国民健康^[1]。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占全部肺癌患者的80%,大部分NSCLC患者发现时已处于中晚期,IV期NSCLC患者的5年生存率<10%^[2-3]。目前针对中晚期NSCLC患者的一线治疗主要采用含铂化疗方案,但是人们逐渐意识到化学合成的抗肿瘤药物存在耐药性、不良反应和损伤机体正常器官等弊端^[4]。现代研究发现,中药单体具有多靶点、多途径、低毒性等优势,可以通过诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞侵袭和转移、改善肿瘤免疫微环境等途径来治疗肺癌^[5]。因此从中药和天然药物中寻找有效的抗肿瘤成分逐渐成为国际肿瘤研究的新热点。

杨梅在中国南方已有2000多年的栽培历史,杨梅醇是一种从其树皮中分离出来的二芳基庚烷类化合物,具有抗炎、抗肿瘤、抗神经退行性疾病等生物活性^[6]。5-对氟苄氧基杨梅醇(myricanol 5-fluorobenzyloxy ether, 5FEM)是杨梅醇经过化学修饰后得到的新型化合物。笔者所在课题组前期研究发现,5FEM与杨梅醇相比具有更强的抗肿瘤活性且对正常细胞的毒性更低^[7-8]。BIRC5是Survivin的编码基因,近年来Survivin作为凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族中发现的新成员,在细胞凋亡及细胞周期的调控中具有重要作用。前期体外研究发现,5FEM能显著抑制A549细胞增殖及诱导A549-Homo BIRC5细胞凋亡^[9],但其体内研究数据尚未见报道。鉴于Survivin可能是5FEM治疗NSCLC的重要靶点,因此本实验拟在前期研究基础上,构建A549-Homo BIRC5裸鼠移植瘤模型,进一步研究5FEM在体内对肺癌的影响,并对其机制进行初步探讨。

1 材料

1.1 仪器

3111型CO₂培养箱(美国Thermo公司);ECLIPSE型荧光显微镜(日本Nikon公司);Power Wave XS酶标仪(美国BioTek公司);StepOnePlus

实时荧光定量PCR仪(美国ABI公司);TP1020-1型组织脱水机、EG1150型石蜡包埋机、RM2235型石蜡切片机均购自德国Leica公司。

1.2 药物与试剂

5FEM(自制^[8],纯度>98%),临用前用无菌聚乙二醇400溶解配制成8,16,32 mg·mL⁻¹的溶液。Prime script RT试剂盒(货号:RR047A)、SYBR Premix EX Taq™ II试剂盒(货号:RR820A)均购自日本Takara公司;Caspase-9、Bax、Bcl-2、PARP、Survivin、GAPDH引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成;Caspase-9(1:200)、PARP(1:2000)、Survivin(1:600)兔多克隆抗体(货号:10380-1-AP、13371-1-AP、10508-1-AP)均购自美国Proteintech公司;Cleaved caspase-9(1:200)兔多克隆抗体(美国Affinity公司,货号:AF5240);Cleaved PARP兔单克隆抗体(1:100)(美国Abcam公司,货号:ab32064);BCA蛋白浓度测定试剂盒(康为世纪生物科技股份有限公司,货号:CW0014S);Caspase-9、PARP、Survivin ELISA试剂盒(货号:CSB-E08862h、CSB-E10705h、CSB-E11874h)均购自武汉华美生物工程有限公司。

1.3 细胞与动物

NSCLC细胞株A549购自中国科学院细胞库,A549-Homo BIRC5细胞株由笔者所在实验室构建^[9]。

BALB/c-nu裸小鼠,SPF级,♀,体质量19~22 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号:SCXK(京)2016-0006。所有裸鼠饲养于浙江省中医药研究院实验动物中心,环境温度保持在20~25℃,自由进食与饮水。本试验已获得浙江省中医药研究院实验动物伦理委员会批准(编号:[2019]008)。

2 方法

2.1 动物造模及给药

取对数生长期的A549-Homo BIRC5细胞经胰酶消化后调整浓度至1×10⁷·mL⁻¹,接种至裸鼠右腋皮下,每只0.2 mL。当肿瘤长到100 mm³左右,

将裸鼠随机分成模型组(2.5 mL·kg⁻¹ 生理盐水)、溶剂组(2.5 mL·kg⁻¹ 聚乙二醇 400, 阴性对照)和 5FEM 低、中、高剂量组(20, 40, 80 mg·kg⁻¹), 每组 8 只。溶剂组、5FEM 各剂量组裸鼠每日按照 2.5 mL·kg⁻¹ 腹腔注射给药, 连续 5 周, 称量裸鼠治疗前后的体质量。每 7 d 用游标卡尺测量肿瘤最大长径(a)和横径(b), 计算肿瘤体积: 肿瘤体积(mm³)=1/2×a×b²。实验结束时剥离实体瘤, 称瘤重, 计算抑瘤率(%)。肿瘤组织取部分放入 4% 甲醛溶液中固定, 用于免疫组化和细胞凋亡检测; 余下瘤组织液氮速冻后存入-80 °C 冰箱, 用于后续 mRNA 和蛋白检测。

2.2 TUNEL 法检测移植瘤组织细胞凋亡情况

移植瘤组织用 4% 甲醛溶液固定 24 h 后进行石蜡包埋, 切片常规脱蜡至水, 蛋白酶 K 处理 15 min, 3% 过氧化氢中浸泡 10 min。随后用末端脱氧核苷酸转移酶 (terminal deoxynucleotidyl transferase, TDT) 孵育, DAB 染色, 0.5% 甲基绿复染 10 min, 于光学显微镜下观察。在高倍镜(400×)下随机选取 5 个视野, 其中 TUNEL 阳性细胞呈现棕黄色, 计算 TUNEL 阳性细胞占总视野细胞总数的百分率(凋亡率), 判定各组细胞凋亡情况。

2.3 RT-qPCR 法检测 Caspase-9、Survivin、PARP、Bax 和 Bcl-2 的 mRNA 表达情况

取上述各组移植瘤组织 20 mg, 按照试剂盒说明书提取总 RNA 并逆转录合成 cDNA, 通过 RT-qPCR 检测相关基因(Caspase-9、Survivin、Bcl-2、Bax 和 PARP)的 mRNA 表达量。引物序列见表 1, 将 GAPDH 作为各个基因的内参。*Ct* 值取 3 次实验均数, 结果采用相对定量分析方法(2^{-ΔΔCt} 法)进行分析。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

基因	序列(5'-3')
<i>Caspase-9</i>	F: TCTGGAGGATTTGGTGATGTC R: CATTTTCTTGGCATCAGGTC
<i>Survivin</i>	F: CCCACTGAGAACGAGCCAGA R: AAAGGAAAGCGCAACCGGAC
<i>PARP</i>	F: ATGAAGTGAAGGCCATGATTG R: TCCTTTAACGATGTCCACCAG
<i>Bax</i>	F: AAGCTGAGCGAGTGTCTCAAG R: CAAAGTAGAAAAGGGCGACAAC
<i>Bcl-2</i>	F: ATGTGTGTGGAGAGCGTCAAC R: AGAGACAGCCAGGAGAAATCAAAC
<i>GAPDH</i>	F: GGTCTCTCTGACTTCAACA R: AGCCAAATTCGTTGTCATAC

2.4 ELISA 法检测移植瘤组织 Caspase-9、Survivin、PARP 蛋白含量

取上述各组移植瘤组织 100 mg, 剪成小块, 加入 1 mL PBS 制成组织匀浆液。匀浆液经反复冻融 2 次破坏细胞膜后, 5 000 ×g 离心 5 min 取上清液, 用 BCA 法测定蛋白浓度。再按 ELISA 试剂盒说明书测定上清液中 Caspase-9、Survivin、PARP 蛋白含量。

2.5 免疫组化法检测移植瘤组织 Caspase-9、Cleaved caspase-9、Survivin、PARP 及 Cleaved PARP 蛋白表达水平

取上述 4% 甲醛溶液固定的各组移植瘤组织, 经脱水、透明、浸蜡、包埋, 制成石蜡标本, 3 μm 连续切片, 通过 EDTA 液微波抗原修复、3% 过氧化氢阻断内源性过氧化物酶、3% BSA 封闭、加抗体孵育、DAB 显色、苏木素复染细胞核, 切片脱水, 最后中性树胶封片, 实验过程用 PBS 代替一抗作为空白对照。于光学显微镜下随机采集 5 个高倍镜(400×)视野进行拍摄, 并采用 Image J 软件分析积分光密度值。

2.6 统计学处理

应用 SPSS 21.0 软件进行数据分析, 并用 GraphPad Prism 9.0 软件绘图, 各组数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 5FEM 对裸鼠移植瘤生长的影响

在整个实验周期内, 各组裸鼠瘤体体积均有不同程度的增长, 其中模型组和溶剂组均生长迅速, 2 组之间差异无统计学意义, 5FEM 各剂量组的裸鼠瘤体体积生长相对缓慢。给药 35 d 后, 与模型组比较, 5FEM 各剂量组的移植瘤体积显著减小($P < 0.01$)。实验过程中各组裸鼠均没有出现死亡, 5FEM 高剂量组的裸鼠经治疗后体质量显著低于模型组($P < 0.01$), 其他各组体质量与模型组相比差异无统计学意义。5FEM 各剂量组的瘤重均显著低于模型组($P < 0.01$)。5FEM 各剂量组对 A549-Homo BIRC5 裸鼠移植瘤的抑瘤率均显著高于模型组($P < 0.01$), 呈现一定的剂量依赖性。结果见图 1 和表 2。

3.2 5FEM 对裸鼠移植瘤组织细胞凋亡的影响

TUNEL 染色后细胞核呈棕色, 指示细胞发生明显凋亡。结果显示, 模型组和溶剂组均存在少量散在的 TUNEL 阳性细胞, 经 5FEM 干预后, 阳

性细胞明显增多。5FEM 各剂量组的细胞凋亡率均显著高于模型组($P<0.01$)。提示 5FEM 能够通过诱导 A549-Homo BIRC5 肿瘤细胞凋亡来抑制体内肿瘤生长。结果见图 2。

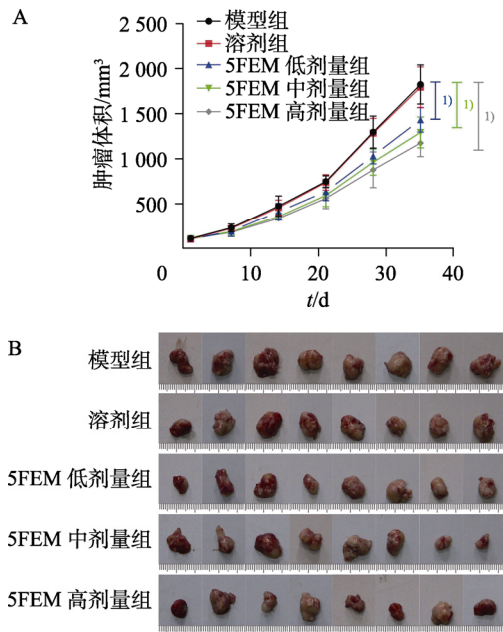


图 1 5FEM 抑制肺腺癌裸鼠移植瘤的生长($\bar{x} \pm s, n=8$)
A-各组移植瘤生长曲线; B-各组移植瘤剥离观察图; 与模型组相比,
¹⁾ $P<0.01$ 。
Fig. 1 5FEM inhibits the growth of xenograft tumors in nude mice with lung adenocarcinoma ($\bar{x} \pm s, n=8$)
A-growth curve of xenograft tumors in each group; B-observation chart of xenograft tumors peeling in each group; compared with model group, ¹⁾ $P<0.01$.

表 2 5FEM 对裸鼠体质量、肿瘤质量及抑瘤率的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)
Tab. 2 Effect of 5FEM on body weight, tumor weight and tumor inhibition rate in nude mice($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	初始体质量/ g	终末体质量/ g	肿瘤质量/ g	抑瘤率/ %
模型组	19.4±0.75	21.6±0.96	1.67±0.19	/
溶剂组	19.7±0.72	21.5±0.79	1.63±0.21	2.11
5FEM 低剂量组	19.6±0.62	21.2±0.69	1.29±0.17 ¹⁾	22.41 ¹⁾
5FEM 中剂量组	19.5±0.80	20.9±0.98	1.16±0.15 ¹⁾	30.26 ¹⁾
5FEM 高剂量组	19.6±0.42	20.4±0.33 ¹⁾	0.97±0.14 ¹⁾	41.67 ¹⁾

注: 与模型组相比, ¹⁾ $P<0.01$ 。
Note: Compared with model group, ¹⁾ $P<0.01$.

3.3 5FEM 对裸鼠移植瘤组织中 Caspase-9、PARP、Bax、Bcl-2 和 Survivin mRNA 表达的影响
与模型组比较, 5FEM 低、中、高剂量组的 Bax 和 Caspase-9 mRNA 表达均显著增高($P<0.01$), 而 5FEM 各剂量组的 Bcl-2 和 PARP mRNA 表达显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 5FEM 中、高剂量组的 Survivin mRNA 表达显著降低($P<0.01$)。结果见图 3。

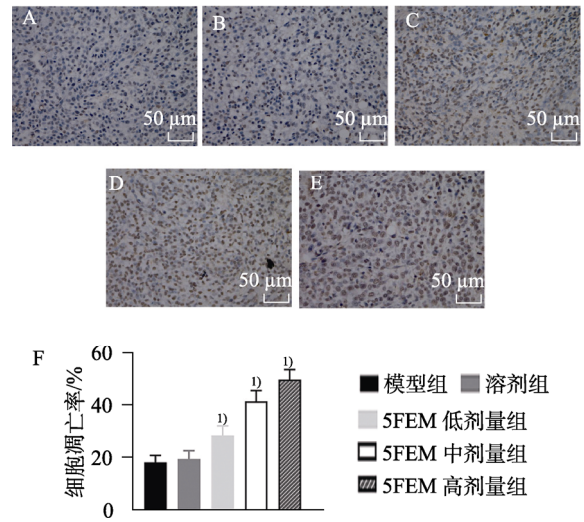


图 2 TUNEL 法检测各组瘤组织中细胞凋亡情况(400×; $\bar{x} \pm s, n=8$)
A-模型组; B-溶剂组; C-5FEM 低剂量组; D-5FEM 中剂量组; E-5FEM 高剂量组; F-各组肿瘤组织 TUNEL 分析柱状图; 与模型组相比,
¹⁾ $P<0.01$ 。
Fig. 2 Apoptosis of tumor tissues in each group was detected by TUNEL method(400×; $\bar{x} \pm s, n=8$)
A-model group; B-solvent group; C-5FEM low dose group; D-5FEM medium dose group; E-5FEM high dose group; F-histogram of TUNEL analysis of tumor tissues in each group; compared with model group, ¹⁾ $P<0.01$.

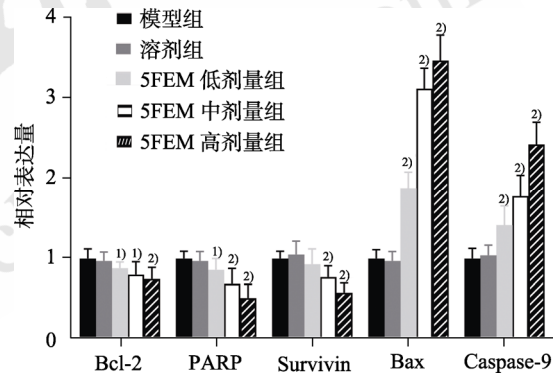


图 3 5FEM 对瘤组织中 Caspase-9、PARP、Bax、Bcl-2 和 Survivin mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)
与模型组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。
Fig. 3 Effects of 5FEM on the mRNA expression of Caspase-9, PARP, Bax, Bcl-2 and Survivin in tumor tissues($\bar{x} \pm s, n=8$)
Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

3.4 5FEM 对裸鼠移植瘤组织中 Caspase-9、Cleaved caspase-9、Survivin、PARP 及 Cleaved PARP 蛋白表达的影响

首先采用 ELISA 法定量分析瘤组织中的蛋白表达。结果表明, 与模型组相比, 5FEM 中、高剂量组瘤组织中的 Caspase-9 蛋白含量显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 5FEM 中、高剂量组瘤组织中的 PARP 蛋白含量显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),

5FEM 各剂量组瘤组织中的 Survivin 蛋白含量明显下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见图 4。

在此基础上,笔者采用免疫组化对肿瘤组织进行分析。结果显示,镜下清晰可见 Caspase-9、Cleaved caspase-9、Survivin、PARP 及 Cleaved PARP 阳性染色呈棕黄色颗粒状,并通过积分光密度值比较各组肿瘤组织中的蛋白表达的差异。结果表明,与模型组比较,5FEM 低、中、高剂量组裸鼠移植瘤组织的 Caspase-9 表达均显著增高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),5FEM 高剂量组的 Cleaved caspase-9 和 Cleaved PARP 含量均显著增高($P<0.05$),5FEM 高剂量组的 PARP 表达显著降低($P<0.05$),5FEM 各剂量组的 Survivin 表达均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见图 5。

4 讨论

细胞凋亡是一种细胞死亡诱导过程,对正常组织中的细胞数量调节具有重要作用,然而当细胞出现凋亡失调会导致肿瘤、自身免疫病以及神经退行性疾病等多种疾病的发生^[10]。Homo BIRC5 基因位于人 17 号染色体上,又名 Survivin,是经典的凋亡抑制因子^[11]。Survivin 在正常成人细胞和组织中一般低表达或者不表达,而在多种肿瘤细胞中高度表达^[12],尤其在乳腺癌和肺癌中表达水平很高^[13]。马建梅等^[14]通过免疫组化法发现 Survivin 在肺癌组织中高表达、在癌旁组织中低表达,而在良性病变和正常组织中几乎不表达。王凯忠等^[15]分析了 45 例肺癌患者标本,发现 I~II 期和 III 期肺癌患者的 Survivin 蛋白阳性表达率分别为 51.8% 和 83.3%,存在明显差异。已有研究报道^[16-18]中药单体能通过下调 Survivin 有关的信号通路来发挥抗肿瘤作用。因此 Survivin 有望成为中药

抗 NSCLC 的关键靶点。笔者所在课题组前期已发现 5FEM 可抑制多种肿瘤细胞增殖,并在体外水平诱导 A549-Homo BIRC5 细胞凋亡,但尚未明确 5FEM 对 A549-Homo BIRC5 细胞的体内药效。本研究通过构建肺癌细胞裸鼠皮下移植瘤模型,发现 5FEM 在体内能明显减轻 A549-Homo BIRC5 移植瘤质量、缩小瘤体积,从而抑制肺癌的生长,这与前期体外试验^[9]得出的结论一致,进一步证明了 5FEM 具有作为肺癌治疗药物的开发潜力。

目前生物体内主要存在 2 种凋亡途径:外源性和内源性凋亡通路,都是通过激活 Caspase 来触发细胞凋亡^[19]。Caspase 家族由机体内 12 种半胱氨酸蛋白酶组成,其中 Caspase-9 会与凋亡酶激活因子和细胞色素 C 组成一种凋亡小体复合物来激活内源性凋亡途径^[20]。Survivin 作为凋亡抑制蛋白家族中重要成员,它可以直接抑制下游 Caspase-3、Caspase-7 和 Caspase-9 的激活,导致凋亡过程的失活^[21]。已有研究报道通过抑制 Survivin 的表达能促进 Caspase-9 的表达和剪切活化来诱导线粒体介导的细胞凋亡^[22-23]。本研究发现,与模型组相比,5FEM 给药组 Survivin 的 mRNA 及蛋白表达随着 5FEM 干预明显下调,呈现剂量依赖性,而 Caspase-9 的 mRNA 及蛋白表达明显上调,同时 Caspase-9 剪切体的含量有不同程度增加。TUNEL 结果显示,5FEM 给药组的细胞凋亡率显著高于模型组。提示 5FEM 可能通过抑制 Survivin 表达,促进 Caspase-9 表达和活化,来诱导肺癌细胞凋亡。

PARP 是一个蛋白质超家族,在维持基因组稳定性、调节信号通路和调控肿瘤细胞凋亡中起着重要作用^[24]。目前 PARP 抑制剂(PARPi)疗法作为一种新的治疗方法已被批准用于多种癌症的临床治

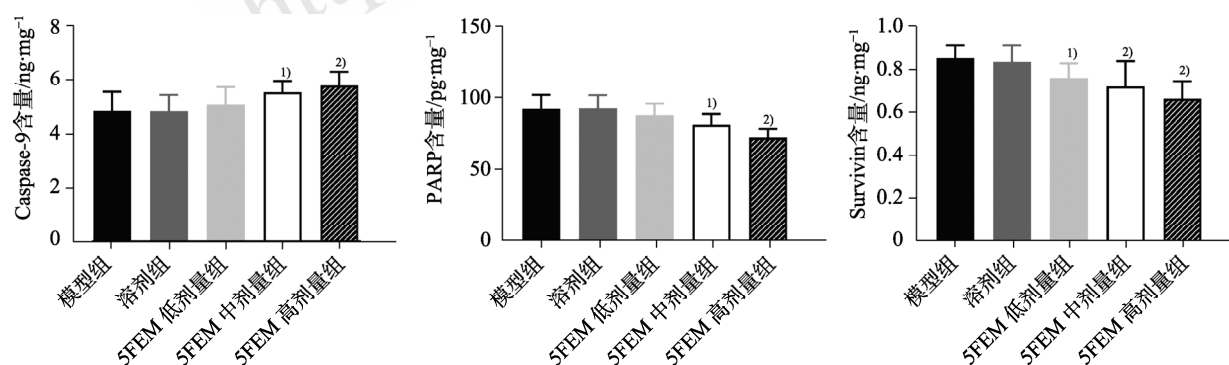


图 4 各组裸鼠瘤组织中 Caspase-9、PARP、Survivin 蛋白含量差异($\bar{x} \pm s$, $n=8$)
与模型组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 4 Differences of Caspase-9, PARP and Survivin protein contents in tumor tissues of nude mice in each group($\bar{x} \pm s$, $n=8$)
Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

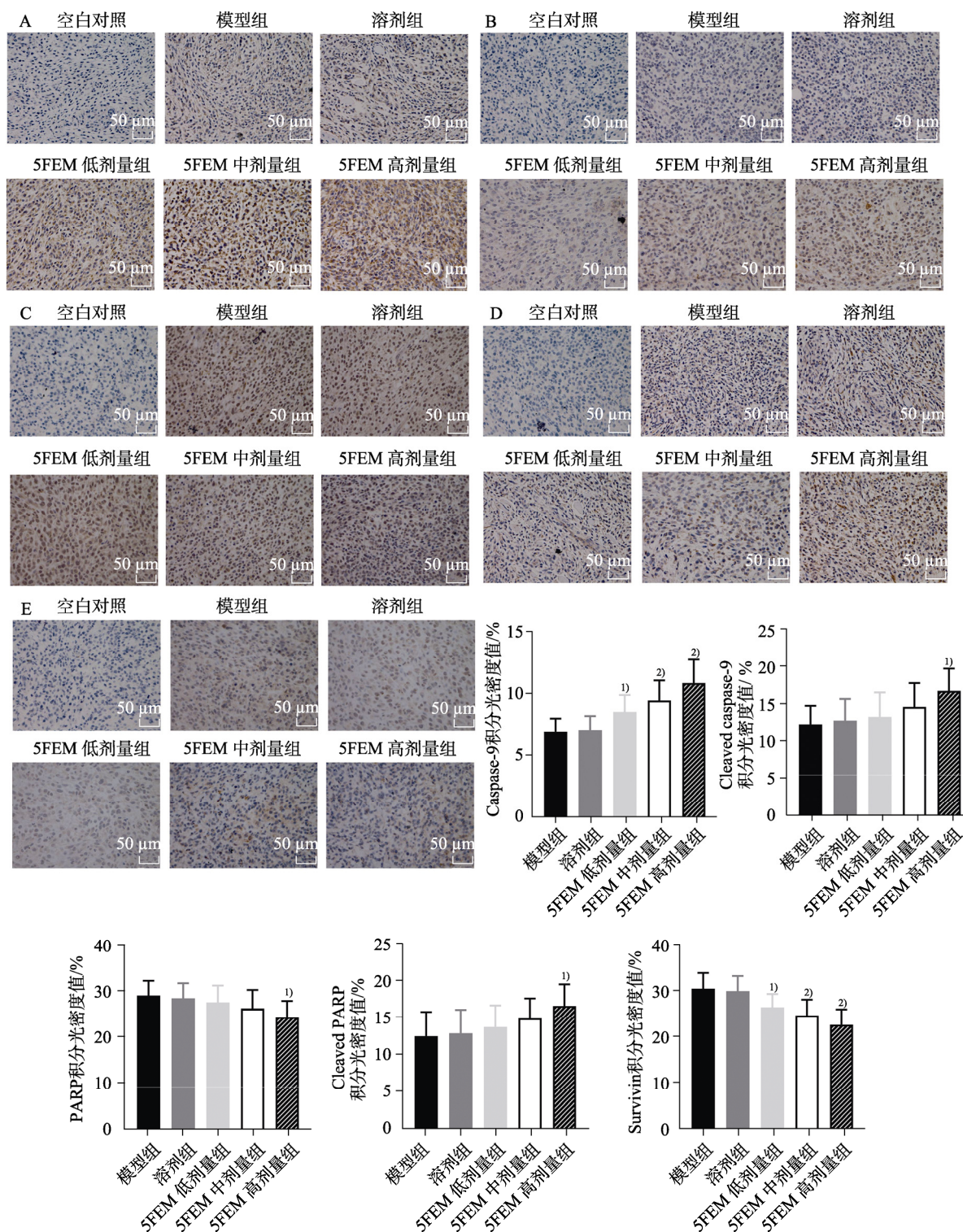


图5 各组裸鼠肿瘤组织的免疫组化结果(400×; $\bar{x} \pm s$, $n=8$)

A-Caspase-9; B-Cleaved caspase-9; C-PARP; D-Cleaved PARP; E-Survivin; 与模型组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 5 Immunohistochemical results of tumor tissues in nude mice of each group(400×; $\bar{x} \pm s$, $n=8$)

A-Caspase-9; B-Cleaved caspase-9; C-PARP; D-Cleaved PARP; E-Survivin; compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

疗,如卵巢癌^[24]、前列腺癌^[25]、三阴性乳腺癌等^[26]。在细胞凋亡过程中, PARP 可被 Caspase-3 和 Caspase-7 识别并切割, PARP 的切割被认为是细胞凋亡的标志之一^[27]。已有研究发现通过下调

Survivin 能促进 Caspase-3 剪切活化,间接地促进下游的 PARP 裂解激活,从而诱导细胞凋亡^[22,28]。本研究发现 5FEM 可以不同程度地促进 PARP 活化增加,其中高剂量组具有显著差异。提示 5FEM

抑制移植瘤增殖,促进肺癌细胞凋亡的机制可能与下调 Survivin 表达,促进 Caspase-9 和 PARP 活化有关。

已知凋亡通路中, Bcl-2 家族蛋白之间相互作用也可以调控内源性凋亡途径,其中 Bax 和 Bcl-2 分别是家族中经典的促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白^[29]。当 Bax 的表达异常减少或 Bcl-2 表达异常增加都会引起细胞稳态失衡,导致细胞过度增殖及肿瘤的发生^[30]。Bax 的过表达可拮抗 Bcl-2 的保护作用,并最终导致肺癌细胞死亡^[31]。Caspase-3 和 Caspase-7 的激活会抑制 Bcl-2,引起线粒体膜通透性增加和细胞色素 C 释放,来诱导肿瘤细胞凋亡。本实验 RT-qPCR 结果显示,与模型组相比,5FEM 给药可以显著上调瘤组织中 Bax 的 mRNA 表达,抑制 Bcl-2 表达,并有一定剂量依赖性。这一结果表明,5FEM 诱导肺癌细胞凋亡的作用机制可能与下调 Bcl-2 和上调 Bax 相关。

综上所述,5FEM 可下调 Survivin 表达,促进 Caspase-9 和 PARP 活化,诱导肿瘤细胞凋亡,抑制肺腺癌 A549-Homo BIRC5 裸鼠移植瘤生长。本研究为开发 5FEM 相关的抗肿瘤药物提供实验依据。

REFERENCES

- [1] CHEN P X, LIU Y H, WEN Y K, et al. Non-small cell lung cancer in China[J]. Cancer Commun (Lond), 2022, 42(10): 937-970.
- [2] ZHANG S Z, ZHANG L Y, CHEN Y, et al. Advances in research on pyroptosis and lung cancer[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2022, 39(14): 1901-1907.
- [3] SIMEONE J C, NORDSTROM B L, PATEL K, et al. Treatment patterns and overall survival in metastatic non-small-cell lung cancer in a real-world, US setting[J]. Future Oncol, 2019, 15(30): 3491-3502.
- [4] ZHU Y, XIE N, CHAI Y L, et al. Apoptosis induction, a sharp edge of berberine to exert anti-cancer effects, focus on breast, lung, and liver cancer[J]. Front Pharmacol, 2022(13): 803717.
- [5] WEI Z C, CHEN J, ZUO F, et al. Traditional Chinese medicine has great potential as candidate drugs for lung cancer: A review[J]. J Ethnopharmacol, 2023(300): 115748.
- [6] SHEN S N, LIAO Q W, LIU J X, et al. Myricanol rescues dexamethasone-induced muscle dysfunction via a sirtuin 1-dependent mechanism[J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2019, 10(2): 429-444.
- [7] NIE X J, REN Z M, FAN C J, et al. Effect of 5-(p(m, o)-fluorobenzyloxy) myricanol on resisting A549 *in vitro*[J]. Zhejiang J Integrat Tradit Chin Western Med(浙江中西医结合杂志), 2017, 27(9): 744-746, 732.
- [8] TONG Y L, DAI G H, REN Z M, et al. Preparation of myricanol and myricanol 5-fluorobenzyloxy ether and its effect on the activity of HepG₂ cells[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2018, 35(3): 375-378.
- [9] DAI G H, CHEN X, REN Z M, et al. Myricanol 5-fluorobenzyloxy ether regulation of survivin pathway inhibits human lung adenocarcinoma A549 cells growth *in vitro*[J]. BMC Complement Med Ther, 2020, 20(1): 269.
- [10] SU Z Y, YANG Z Z, XU Y Q, et al. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis[J]. Mol Cancer, 2015(14): 48.
- [11] BEDING A F, LARSSON P, HELOU K, et al. Pan-cancer analysis identifies BIRC5 as a prognostic biomarker[J]. BMC Cancer, 2022, 22(1): 322.
- [12] CHEUNG C H, HUANG C C, TSAI F Y, et al. Survivin-biology and potential as a therapeutic target in oncology[J]. Onco Targets Ther, 2013(6): 1453-1462.
- [13] CHEN X, DUAN N, ZHANG C G, et al. Survivin and tumorigenesis: Molecular mechanisms and therapeutic strategies[J]. J Cancer, 2016, 7(3): 314-323.
- [14] MA J M, CHEN C, HUANG W. Significance of the expressions of survivin in lung cancer and para-carcinoma tissues and benign lesion[J]. Anhui Med and Pharm J(安徽医药), 2014, 18(2): 264-266.
- [15] WANG K Z, ZHAO H, FU X, et al. Expression and clinical significance of survivin, inhibitor of apoptosis proteins, in Lung cancer[J]. Chin J Lab Diagn(中国实验诊断学), 2009, 13(7): 901-904.
- [16] ZHANG W W, NING N, HUANG J. Artesunate suppresses the growth of lung cancer cells by downregulating the AKT/survivin signaling pathway[J]. Biomed Res Int, 2022(2022): 9170053.
- [17] WANG T L, OUYANG C S, LIN L Z. β -Asarone suppresses Wnt/ β -catenin signaling to reduce viability, inhibit migration/invasion/adhesion and induce mitochondria-related apoptosis in lung cancer cells[J]. Biomed Pharmacother, 2018(106): 821-830.
- [18] BAO M, YANG W L, PAN S, et al. Effect of β -hydroxyisovaleryl shikonin on growth of lung adenocarcinoma cells A549 in nude mice and its mechanism[J]. Chin Tradit Herbal Drugs(中草药), 2018, 49(22): 5339-5344.
- [19] ZHANG C G, ZHANG F. The multifunctions of WD40 proteins in genome integrity and cell cycle progression[J]. J Genomics, 2015(3): 40-50.
- [20] NISHIHARA S, YAMAOKA T, ISHIKAWA F, et al. Mechanisms of EGFR-TKI-induced apoptosis and strategies targeting apoptosis in EGFR-mutated non-small cell lung cancer[J]. Genes (Basel), 2022, 13(12): 2183.
- [21] MITA A C, MITA M M, NAWROCKI S T, et al. Survivin: Key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(16): 5000-5005.
- [22] SHI X P, WANG P C, ZHU Y N, et al. Regulation of survivin and caspase/Bcl-2/cyto-C signaling by TDB-6 induces apoptosis of colorectal carcinoma LoVo cells[J]. J Gastrointest Oncol, 2022, 13(5): 2322-2332.
- [23] ESLAMI F, MAHDAVI M, BABAEI E, et al. Down-

- regulation of Survivin and Bcl-2 concomitant with the activation of caspase-3 as a mechanism of apoptotic death in KG1a and K562 cells upon exposure to a derivative from ciprofloxacin family[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020(409): 115331.
- [24] LAU C H, SEOW K M, CHEN K H. The molecular mechanisms of actions, effects, and clinical implications of PARP inhibitors in epithelial ovarian cancers: A systematic review[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(15): 8125.
- [25] BIEŃKOWSKI M, TOMASIK B, BRAUN M, et al. PARP inhibitors for metastatic castration-resistant prostate cancer: Biological rationale and current evidence[J]. *Cancer Treat Rev*, 2022(104): 102359.
- [26] MENEZES M C S, RAHEEM F, MINA, et al. PARP inhibitors for breast cancer: Germline *BRCA1/2* and beyond[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(17): 4332.
- [27] LOHBERGER B, GLÄNZER D, KALTENEGGER H, et al. Shikonin derivatives cause apoptosis and cell cycle arrest in human chondrosarcoma cells via death receptors and MAPK regulation[J]. *BMC Cancer*, 2022, 22(1): 758.
- [28] AHMAD B, GAMALLAT Y, SU P Y, et al. Alantolactone induces apoptosis in THP-1 cells through STAT3, survivin inhibition, and intrinsic apoptosis pathway[J]. *Chem Biol Drug Des*, 2021, 97(2): 266-272.
- [29] YAN W W, LI G H, JIA Y M, et al. Effects of paeoniflorin on apoptosis and Bcl-2/Bax protein expression in hippocampal neurons induced by lead acetate[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2022, 39(6): 730-737.
- [30] KALONI D, DIEPSTRATEN S T, STRASSER A, et al. BCL-2 protein family: Attractive targets for cancer therapy[J]. *Apoptosis*, 2023, 28(1/2): 20-38.
- [31] LI Y L, WANG Y X, YU X, et al. Radix *Tetragium* inhibits the non-small cell lung cancer via Bax/Bcl-2/caspase-9/caspase-3 pathway[J]. *Nutr Cancer*, 2022, 74(1): 320-332.
- 收稿日期: 2023-01-12
(本文责编: 李艳芳)