

新型化合物 F-2 对人肺癌 NCI-H520 细胞增殖、迁移及凋亡的影响

孟娜娜^{1,2}, 张瑞瑞², 刘超², 孙金月^{1,2*} (1.山东师范大学生命科学学院, 济南 250014; 2.山东省农业科学院农产品研究所, 济南 250100)

摘要: 目的 探讨新型化合物 F-2 对人非小细胞肺癌 NCI-H520 细胞增殖、迁移及凋亡的影响。方法 CCK-8 试验检测肺癌细胞增殖情况; 采用划痕试验检测化合物对 NCI-H520 细胞迁移的情况; 倒置显微镜观察化合物刺激对细胞形态的影响; 流式细胞术检测化合物对细胞凋亡的影响; Western blotting 检测化合物对细胞迁移及凋亡相关蛋白表达的影响。结果 化合物对 NCI-H520 细胞增殖有明显的抑制作用, 且与浓度和时间呈依赖性关系。划痕试验结果表明化合物能够明显抑制肿瘤细胞迁移, 并且 Western blotting 试验结果表明化合物处理 NCI-H520 细胞后可上调 E-cadherin 的表达, 下调 N-cadherin 蛋白的表达。Annexin-V/PI 双染法结果显示, 化合物可诱导 NCI-H520 细胞发生凋亡, 且随着药物浓度增加凋亡率上升, 并且增加了 BAX/Bcl-2 蛋白表达比率。结论 化合物能够明显抑制肺癌细胞的增殖、迁移及诱导细胞凋亡, 可能是通过阻断肿瘤细胞上皮间充质转化过程, 调节细胞凋亡过程中相关基因表达从而发挥抗肿瘤作用。

关键词: 细胞迁移; 细胞增殖; 细胞凋亡; 上皮间充质转化

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2020)18-2223-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.18.009

引用本文: 孟娜娜, 张瑞瑞, 刘超, 等. 新型化合物 F-2 对人肺癌 NCI-H520 细胞增殖、迁移及凋亡的影响[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(18): 2223-2228.

Effects of a Novel Compound F-2 on Proliferation, Migration and Apoptosis of Human Lung Cancer NCI-H520 Cells

MENG Nana^{1,2}, ZHANG Rui², LIU Chao², SUN Jinyue^{1,2*} (1.College of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan 250014, China; 2.Institute of Agro-Food Science and Technology, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the effects of novel compound F-2 on proliferation, migration and apoptosis of human non-small cell lung cancer NCI-H520 cells. **METHODS** The proliferation of lung cancer cells was detected by CCK-8 test. The migration of NCI-H520 cells was detected by wound scratch test. The effect of compound stimulation on cell morphology was observed by inverted microscope. The effect of compounds on apoptosis was detected by flow cytometry. The effects of compounds on cell migration and apoptosis-related protein expression were detected by Western blotting. **RESULTS** The compounds significantly inhibited the proliferation of NCI-H520 cells and was dependent on concentration and time. The Wound scratch test showed that the compound could significantly inhibit the migration of tumor cells. Western blotting results showed that the compound could up-regulate the expression of E-cadherin and down-regulate the expression of N-cadherin in NCI-H520 cells. Annexin-V/PI double staining showed that the compound could induce apoptosis of NCI-H520 cells, and the apoptotic rate increased with the increase of drug concentration, and the expression ratio of BAX/Bcl-2 protein increased. **CONCLUSION** Compounds can significantly inhibit the proliferation, migration and induce apoptosis of lung cancer cells, which may be through blocking the epithelial-mesenchymal transition process of tumor cells and regulating the expression of related genes during apoptosis.

KEYWORDS: cell migration; cell proliferation; cell apoptosis; epithelial-mesenchymal transition

肺癌是全球癌症死亡的主要原因, 每年发病数约 130 万例^[1]。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)占所有肺癌病例的 80%~85%, >60% 的患者在诊断时出现局部晚期或病灶转移, 存活率低, 预后效果较差^[2]。肿瘤细胞的异常增殖和转移是恶性肿瘤致死最主要的原因^[3]。因此, 发现一种低毒高效的新的化疗药物对于抑制肿瘤

细胞增殖和转移是一项迫在眉睫的任务, 对提高肺癌患者生存、改善预后有重要意义。

目前, 治疗肺癌的主要方法包括手术、化疗和放疗, 其中化疗是最主要的选择^[4]。目前在临床上已进行包括 NSCLC 在内的多种癌症的协同治疗试验, 通过系统性化疗方案来增强一些化疗药物的治疗效果。尽管抗肿瘤治疗的主要目

基金项目: 山东省自然科学基金重大基础研究项目(ZR2018ZC0944)

作者简介: 孟娜娜, 女, 硕士 Tel: 13385433668 E-mail: 840976130@qq.com *通信作者: 孙金月, 男, 博士, 研究员 Tel: (0531)66659825 E-mail: moon_s731@hotmail.com

的是杀死肿瘤细胞且不损害正常细胞,但是癌症治疗的功效有限,常常对恶性和正常细胞均起作用,对患者产生不良影响。因此,具有抗肿瘤活性且不良反应较小的有效治疗方法亟需开发^[5-6]。从药物发展的历史来看,因天然产物或其衍生物在肿瘤细胞中比在正常细胞中诱导更多凋亡的特征而可能成为一种有前途的癌症治疗方法。据报道,在癌症领域,从1940年到2014年底批准的175个小分子中有131个(75%)不是“S”(合成)分子,其中有85个(49%)实际上是天然产物或天然产物衍生物,因此,天然产物或天然产物衍生物在药物发现和开发过程中继续发挥着非常重要的作用^[7]。

药材翻白草(*Potentilla discolor* Bge.)最早记载于明朝永乐年间的《救荒本草》,是我国传统中医学中一味常见中药,通常以带根全草入药,主治咳血、痢疾等症状。现代医学研究证实,翻白草具有抗菌、止泻、抗肿瘤及降血糖等疗效。课题组前期从翻白草中分离获得了3个新的羽扇豆烷型三萜化合物,与一般三萜类化合物不同的是,3个新发现化合物的羧基均位于C-14位,该类型化合物在自然界中发现较少^[8]。与另外2个新化合物3位连接羟基不同的是,化合物F-2为3位连乙酰基类化合物:3 α -乙酰基-19 α -氢-29-醛基-27-羽扇豆酸,该化合物已被证实其抗肿瘤活性比同类C-17连羧基化合物活性更强^[9-10]。因此,本研究的主要目的是研究化合物F-2抑制肺癌细胞迁移,增殖和促进凋亡的能力。此外,课题组还研究了化合物对调节NSCLC迁移和凋亡过程中对特定蛋白质的表达和活化的影响。

1 仪器与试剂

3111型二氧化碳培养箱、Multiskan FC酶标仪均来自赛默飞世尔科技有限公司;CytoFLEX流式细胞仪(贝克曼库尔特生物科技有限公司);ChemiDocXRS+化学发光成像系统(伯乐生命医学产品有限公司)。

实验细胞株:人NSCLC细胞株NCI-H520及正常支气管上皮细胞(human bronchial epithelial cells, HBE)购自中国科学院上海细胞库;植物材料:由山东师范大学实验室张晶博士从翻白草中分离出的F-2化合物,此化合物采用乙醇提取法进行提取,硅胶柱层析法进行分离。使用HPLC测定F-2的纯度,纯度为96.35%^[8],化合物结构见

图1A;细胞培养液RPMI1640(批号:8119275)、胰蛋白酶(批号:01367E)、PBS缓冲液(批号:8117204)及胎牛血清(批号:1739463)均购自美国Gibco公司;DMSO溶剂(美国Sigma公司,批号:RNBG7127);Annexin V-FITC试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:C1062M-1)、CCK-8试剂(南京诺唯赞公司,批号:7E303G9);BAX(批号:2870)、Bcl-2(批号:2772)、E-cadherin(批号:3195)、N-cadherin(批号:4)、Cleaved-PARP(批号:16)及GAPDH(批号:5174)抗体均购自CST公司;HRP标记的二抗(批号:兔20000135,鼠2000175)购自武汉三鹰生物技术有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养

将NCI-H520细胞和HBE细胞均培养在含有10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)及1%青霉素-链霉素(双抗)的RPMI-1640培养基中,并置于37℃、5%CO₂培养箱中进行孵育,待细胞单层融合度达到90%左右时进行传代处理,取对数生长期的细胞接种到相应孔板中,进行后续实验。

2.2 CCK-8 试验检测细胞增殖

取处于对数生长期的NCI-H520细胞进行胰酶消化,完全培养基吹打均匀,细胞悬液接种至96孔板中,调整至每孔5000个细胞,同时设置对照组,每组设3个复孔,37℃培养箱孵育过夜。弃掉旧培养基,加入含有不同浓度的(0, 6.25, 12.5, 25, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)化合物培养液分别培养24, 48, 72 h。终止培养后,每孔加入含有10 μL CCK-8试剂的100 μL 新鲜培养基继续培养2 h。用酶标仪测定450 nm处的吸光值,并计算其抑制率及存活率。

2.3 倒置显微镜观察细胞形态

将对数生长期的细胞接种至12孔板中,培养箱中孵育过夜,随后弃掉原有培养基,加入含有不同浓度的(0, 5, 10, 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)化合物RPMI1640培养液进行培养48 h,使用倒置显微镜观察NCI-H520细胞形态的变化。

2.4 划痕试验

将对数生长期的细胞接种至6孔板中,培养箱孵育过夜,待细胞达到单层融合度时,用200 μL 枪头进行划痕。随后弃掉原有培养基,PBS洗涤2次,加入含有不同浓度的(0, 3, 5, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)化合物,RPMI1640培养液进行培养,在一定时间

点置于倒置显微镜下进行拍照,记录划痕愈合的情况。

2.5 Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡试验

用 Annexin V-FITC/PI 双染色试剂盒测定细胞凋亡。将对数生长期的细胞以 2×10^5 个细胞/孔的密度接种在 6 孔板中并培养 12 h。然后,用含有不同浓度的化合物处理细胞 48 h。将细胞消化,离心收集细胞,取 5×10^4 细胞并重悬于 195 μL Annexin V-FITC 结合缓冲液中,将 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI 试剂依次加入细胞中,并在室温下避光孵育 20 min。通过流式细胞术检测染色的细胞。

2.6 Western blotting 试验

对于蛋白质印迹测定,在用不同浓度化合物刺激处理 48 h 后收集细胞,并在含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液中裂解。采用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。定量后按照每孔约 40~60 μg 蛋白上样量,通过 10%~12% SDS-PAGE 胶进行电泳分离蛋白质,随后转移至 PVDF 膜。5%脱脂牛奶在室温下封闭 1 h。然后,将膜与目标抗体结合在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,用 TBST 洗膜 3 次,然后在室温下与 HRP 偶联的二抗孵育 2 h,用 TBST 洗膜 3 次。将 ECL 化学发光液滴加到膜上,在 Bio-Rad 化学发光成像系统中检测目的蛋白条带,并使用 Image J 软件进行蛋白质灰度定量分析。

2.7 数据统计分析

所有实验均平行重复 3 次。使用 Student's *t* 检验进行数据组之间的差异分析。数据表示为 $\bar{x} \pm s$ 。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义, $P < 0.01$ 和 $P < 0.001$ 认为在统计学上具有非常显著差异。采用 GraphPad Prism 7.0 软件计算 IC_{50} 值并作图。

3 结果

3.1 化合物对 NCI-H520 细胞增殖能力的影响

CCK-8 结果显示,与未用药物处理的对照组相比,化合物在 0~50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 内,能够明显降低 NCI-H520 细胞活力。且随着药物浓度的增加,细胞的存活率逐渐降低,并且在同一浓度下,随着作用时间的延长,细胞活力显著下降。经计算,化合物作用于 NCI-H520 细胞 24, 48, 72 h 的 IC_{50} 值分别为 (26.42 ± 0.81) , (15.72 ± 1.1) , $(11.54 \pm 0.97) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 结果见图 1B。然而,化合物对正常的细胞毒性较弱,作用 HBE 细胞 48 h 后 IC_{50} 值为 $(52.80 \pm 1.23) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 结果见图 1C。

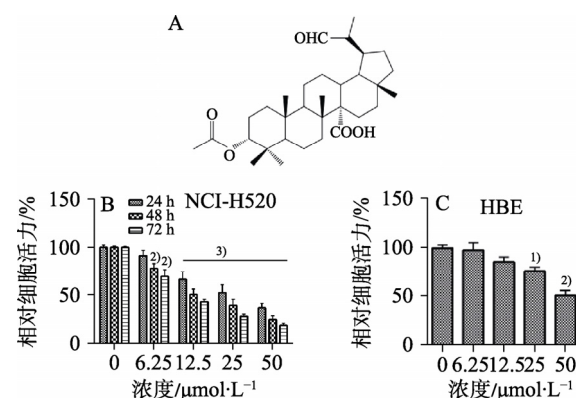


图1 化合物对 NCI-H520 细胞活力的影响

A—化合物的结构式; B—CCK-8 检测 NCI-H520 细胞活力; C—CCK-8 试验检测正常支气管上皮细胞 HBE 活力; 与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$ 。

Fig. 1 Effect of compounds on the viability of NCI-H520 cells

A—molecular structure of compound; B—CCK-8 assay detected the activity of NCI-H520 cell; C—CCK-8 assay detected the activity of HBE in normal bronchial epithelial cells; compared with the control group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$.

3.2 化合物对 NCI-H520 细胞形态的影响

使用 5~15 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 不同浓度的化合物处理细胞 48 h 后,在倒置显微镜下观察细胞形态。未用药物处理的对照组,细胞生长状态良好,细胞呈梭形,细胞轮廓边缘清晰,细胞增殖数目较多。而化合物处理后细胞数目明显少于对照组,且呈浓度依赖性降低,处理后细胞边缘模糊,细胞皱缩,细胞膜破裂,大量细胞崩解成细胞碎片,呈现坏死样状态,结果见图 2。

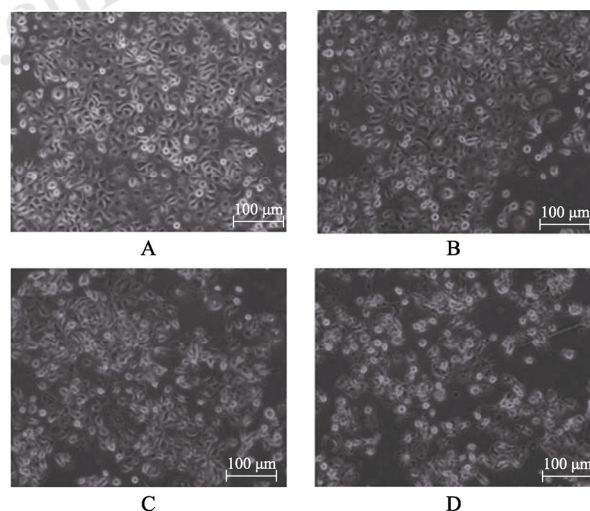


图2 不同浓度的化合物对细胞形态的影响(100 $\times$)

A—对照组($0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); B— $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 化合物组; C— $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 化合物组; D— $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 化合物组。

Fig. 2 Effect of different concentrations of compounds on cell morphology(100 $\times$)

A—control group($0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); B— $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ compound group; C— $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ compound group; D— $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ compound group.

3.3 化合物对 NCI-H520 细胞迁移能力的影响

为排除细胞毒性对迁移的影响,选择 3, 5, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 3 个低细胞毒性浓度作用 NCI-H520 细胞,随后进行划痕试验。结果显示,与未用药物处理的对照组相比,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 化合物处理组 NCI-H520 细胞的迁移能力明显降低,且具有统计学意义。随着处理的时间、剂量的增加,其划痕愈合程度呈逐渐降低趋势,并具有一定的剂量依赖关系,结果见图 3。

3.4 化合物对 NCI-H520 细胞迁移相关蛋白表达的影响

细胞迁移往往涉及到上皮-间充质细胞转变(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的过程。基于上述划痕试验的结果,化合物能够抑制 NCI-H520 细胞迁移过程。因此,本研究检测了 EMT 过程中相关蛋白的表达。Western blotting 结果显示,与对照组(0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)相比,3~10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 化合物作用 NCI-H520 细胞 48 h 后,可明显诱导上皮细胞标记物 E-cadherin 蛋白表达量增加,间充质标记物 N-cadherin 蛋白表达量显著降低,且随着浓度的增加具有一定的依赖性关系,结果见图 4。以上结果表明,化合物能够抑制 NCI-H520 细胞迁移,可能是通过抑制肿瘤细胞的 EMT 过程发挥作用。

3.5 化合物对 NCI-H520 细胞凋亡的影响

为了检测化合物是否可以诱导 NCI-H520 细胞凋亡,Annexin V-FITC/PI 染色流式细胞试验结果显示,与对照组相比,随着药物浓度的增加,NCI-H520 细胞凋亡的比例也随之增加。在 5, 10, 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下作用 NCI-H520 细胞 48 h 其凋

亡率分别为 19.49%, 27.51%, 40.3%, 显著高于 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组(7.24%)。以上结果表明,化合物能够诱导 NCI-H520 细胞凋亡,从而抑制其增殖过程,结果见图 5。

3.6 化合物对细胞凋亡相关蛋白表达的影响

Western blotting 结果显示,5, 10, 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 化合物作用细胞 48 h,抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平降低,促凋亡蛋白 BAX 的表达量增加。PARP 的剪切体被认为是细胞凋亡的一个重要指标,随着药物浓度的增加,Cleaved PARP 的表达量呈上升趋势,结果见图 6。因此,以上结果表明,化合物可以通过影响凋亡相关蛋白的表达从而诱导肺癌细胞凋亡。

4 讨论

肺癌是全球最常见的癌症,也是导致恶性肿瘤的首要原因,肺癌还是全球男性癌症死亡的主要原因,也是女性癌症死亡的第二大原因^[1]。

本研究将不同浓度的化合物作用肺癌 NCI-H520 细胞,观察该药物对肺癌细胞生长活力的影响。随着化合物浓度从 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 增加到 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,作用时间从 24 h 至 72 h, CCK-8 结果显示化合物能明显抑制肺癌 NCI-H520 细胞增殖,并与时间和剂量呈依赖关系。本化合物通过抑制细胞增殖,在阻断人 NSCLC 发生、发展方面具有潜在能力。

肿瘤细胞的转移即从原发性肿瘤位置扩散并侵入邻近组织,最终转移到远处的器官,这仍然是癌症死亡的主要原因^[12]。划痕结果显示,化合物能够有效地抑制 NCI-H520 细胞迁移。EMT 是一种上皮细胞失去细胞极性转换成具有较高迁移

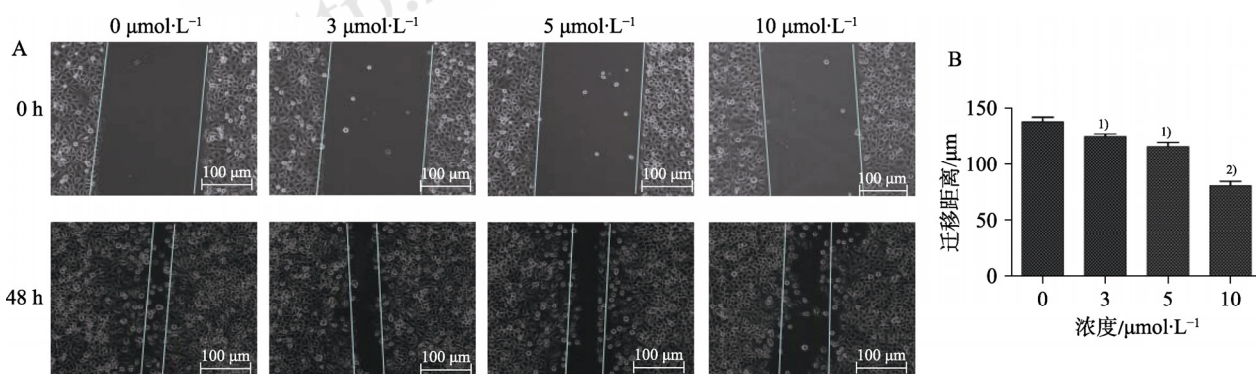


图3 划痕试验检测 NCI-H520 细胞的迁移能力(100 $\times$)

A—不同浓度化合物处理 0, 48 h 后细胞迁移的距离; B—细胞迁移距离的量化; 与对照组(0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 3 Wound healing test to detect the migration ability of NCI-H520 cells(100 $\times$)

A—distance of cell healing after 0, 48 h treatment at different concentrations of compounds; B—quantification of cell migration distance; compared with the control group(0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

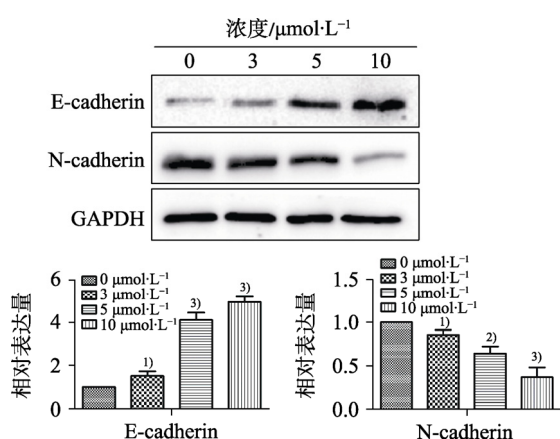


图 4 化合物对肺癌 NCI-H520 细胞 E-cadherin、N-cadherin 蛋白表达水平的影响
与对照组($0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$ 。
Fig. 4 Effect of compounds on the expression levels of E-cadherin and N-cadherin proteins in lung cancer NCI-H520 cells
Compared with the control group($0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$.

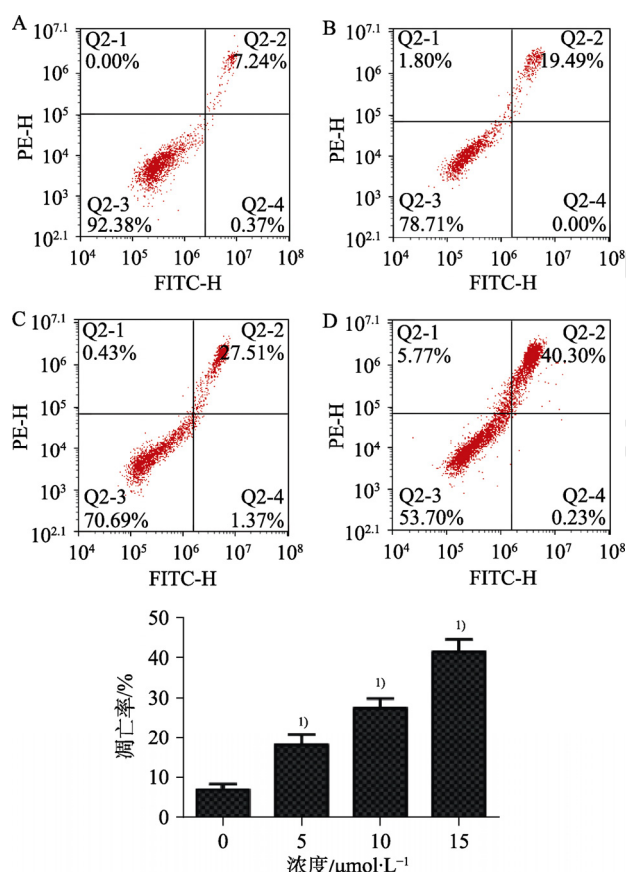


图 5 流式细胞术检测细胞凋亡的情况
A- $0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 化合物组; B- $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 化合物组; C- $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 化合物组; D- $15\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 化合物组; 与对照组($0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)比较, ¹⁾ $P<0.001$ 。
Fig. 5 Flow cytometry for detection of apoptosis
A- $0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ compound group; B- $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ compound group; C- $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ compound group; D- $15\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ compound group; compared with the control group($0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), ¹⁾ $P<0.001$.

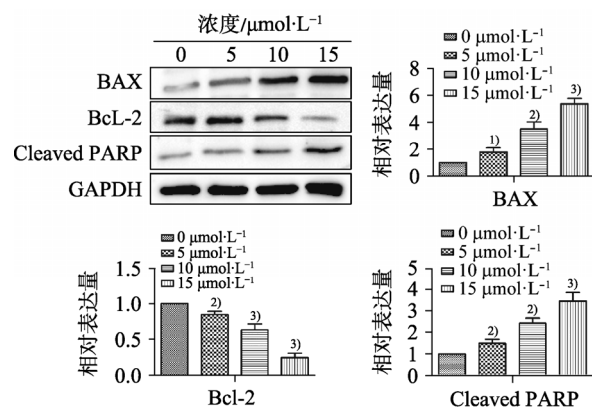


图 6 化合物对肺癌 NCI-H520 细胞凋亡相关蛋白表达水平的影响
与对照组($0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$ 。
Fig. 6 Effect of compounds on the expression of apoptosis-related proteins in lung cancer NCI-H520 cells
Compared with the control group($0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$.

和侵袭能力间充质样细胞的过程^[13-14]。在各种细胞外和组织特异性 EMT 诱导信号的刺激下, 上皮-间质转化转录因子激活导致编码上皮连接蛋白的基因下调, 从而分解黏附的连接, 使顶-基底极性丧失, 同时, 间充质基因如 N-cadherin, 纤连蛋白, 波形蛋白的表达也被上调, 这种向间充质状态的转变促进了肿瘤细胞运动^[15]。本研究结果显示, 化合物可明显增加 E-cadherin 蛋白表达, 同时抑制了 N-cadherin 蛋白的表达, 说明化合物抑制 NSCLC 细胞迁移可能是通过抑制 EMT 过程发挥作用的。

细胞凋亡或程序性死亡对于细胞的稳定性和生长以及在分子水平上的控制都很重要。它与几种疾病, 特别是癌症有关。凋亡是一个活跃且高度有序的过程, 其中涉及一系列参与基因调节的酶。细胞凋亡被认为是主要的抗肿瘤机制。化疗药物可通过调节细胞内凋亡相关信号通路及相关蛋白的表达降低肿瘤细胞存活率, 诱导细胞凋亡, 因此诱导细胞凋亡已成为癌症治疗的常用方法, 也是评价抗肿瘤药物疗效的重要指标^[16-18]。细胞凋亡是一个复杂的生理过程, 涉及许多途径, 主要是死亡受体途径和线粒体途径。流式细胞术分析显示, 用化合物处理 48 h 后, NCI-H520 细胞发生凋亡。随着药物浓度的增加, 凋亡细胞的比例显著增加。Bcl-2 是 Bcl-2 家族中重要的抗凋亡成员, 可以增强细胞对大多数 DNA 损伤因子的抵抗力, 抑制细胞凋亡和坏死^[19]。Bcl-2 和 BAX

位于 caspase-3 的上游, caspase-3 是凋亡信号传导中的主要执行者^[20]。在凋亡过程中, PARP 作为 caspase 的切割底物, 其剪切体被认为是细胞凋亡的一个重要指标。此外有研究表明 Cleaved PARP 表达量增加, 能够促进肿瘤细胞凋亡^[21]。在研究中, 课题组发现化合物处理后 Bcl-2 蛋白的表达显著降低, 而 BAX、Cleaved PARP 蛋白的表达与未处理组相比明显增加。BAX/Bcl-2 比值显著增加, 表明化合物处理后 NCI-H520 细胞出现凋亡趋势。

综上所述, 化合物能够以浓度, 时间依赖性关系降低 NCI-H520 细胞的存活率, 抑制肿瘤细胞迁移, 并可以诱导细胞发生凋亡。其机制可能是通过抑制肿瘤细胞 EMT 过程, 以及调节细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 BAX 的表达发挥抗肿瘤作用。因此, 化合物 F-2 有望成为一种治疗 NSCLC 的新型抗肿瘤药物。

REFERENCES

- AKRAM A, KHALIL S, HALIM S A, et al. Therapeutic uses of HSP90 inhibitors in non-small cell lung carcinoma(NSCLC) [J]. *Curr Drug Metab*, 2018, 19(4): 335-341.
- SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019 [J]. *CA: A Cancer J Clin*, 2019, 69(1): 7-34.
- RENO T A, KIM J Y, RAZ D J. Triptolide inhibits lung cancer cell migration, invasion, and metastasis [J]. *Ann Thorac Surg*, 2015, 100(5): 1817-1825.
- HIRSCH F R, SCAGLIOTTI G V, MULSHINE J L, et al. Lung cancer: Current therapies and new targeted treatments [J]. *Lancet*, 2017, 389(10066): 299-311.
- YE H N, CHE J. Mechanism of synergistic effect of YM-155 on cisplatin-induced cytotoxicity against NSCLC [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2019, 36(17): 2160-2165.
- GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ A G, JUÁREZ-PORTILLA C, OLIVARES-BAÑUELOS T, et al. Anticancer activity of seaweeds [J]. *Drug Discov Today*, 2018, 23(2): 434-447.
- NEWMAN D J, CRAIG G M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014 [J]. *J Nat Prod*, 2016, 79(3): 629-661.
- ZHANG J, LIU C, HUANG R Z, et al. Three new C-27-carboxylated-lupane-triterpenoid derivatives from *Potentilla discolor* Bunge and their *in vitro* antitumor activities [J]. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0175502. Doi:10.1371/journal.pone.0175502.
- ZHANG Y B, PENG X Y, SUN H X. A new cytotoxic, apoptosis-inducing triterpenoid from the rhizomes of *Astilbe chinensis* [J]. *ChemInform*, 2008, 5(1): 189-196.
- WANG J J, CHEN X F, ZHOU Z H, et al. The inhibitory effect of 3 β -hydroxy-12-oleanen-27-oic acid on growth and motility of human hepatoma HepG2 cells through JNK and Akt signaling pathway [J]. *Evid-Based Complementary Altern Med*, 2013(2013): 1-17.
- TORRE L A, SIEGEL R L, JEMAL A. Lung cancer statistics [M]//*Lung Cancer and Personalized Medicine*. Cham: Springer International Publishing, 2015: 1-19.
- VAN ROOSMALEN W, LE DÉVÉDEC S E, GOLANI O, et al. Tumor cell migration screen identifies SRPK₁ as breast cancer metastasis determinant [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(4): 1648-1664.
- JIE X X, ZHANG X Y, XU C J. Epithelial-to-mesenchymal transition, circulating tumor cells and cancer metastasis: Mechanisms and clinical applications [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(46): 81558-81571.
- JIANG J W, WANG K, CHEN Y, et al. Redox regulation in tumor cell epithelial-mesenchymal transition: Molecular basis and therapeutic strategy [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2(1): 17036.
- YEUNG K T, YANG J. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis [J]. *Mol Oncol*, 2017, 11(1): 28-39.
- ZHANG Z, ZHANG G J, KONG C Z. Targeted inhibition of Polo-like kinase 1 by a novel small-molecule inhibitor induces mitotic catastrophe and apoptosis in human bladder cancer cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(4): 758-767.
- WANG X, LU X C, ZHU R L, et al. Betulinic acid induces apoptosis in differentiated PC12 cells via ROS-mediated mitochondrial pathway [J]. *Neurochem Res*, 2017, 42(4): 1130-1140.
- GUAN L, WU Y H, SHEN Y Y. Effects of scutellarin on JAK/STAT signal pathway in non-small cell lung cancer cells [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2019, 36(12): 1483-1486.
- ZHANG B, YI J, ZHANG C L, et al. MiR-146a inhibits proliferation and induces apoptosis in murine osteoblastic MC3T3-E1 by regulating Bcl2 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(17): 3754-3762.
- WU R D, TANG S, WANG M, et al. MicroRNA-497 induces apoptosis and suppresses proliferation via the bcl-2/bax-Caspase9-Caspase3 pathway and cyclin D2 protein in HUVECs [J]. *PLoS One*, 2016, 11(12): e0167052. Doi:10.1371/journal.pone.0167052.
- ZHANG Z, ZHANG G, KONG C. Targeted inhibition of Polo-like kinase 1 by a novel small-molecule inhibitor induces mitotic catastrophe and apoptosis in human bladder cancer cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 21(4): 758-767.

收稿日期: 2019-07-11
(本文责编: 曹粤锋)