胡黄连苷Ⅱ对非小细胞肺癌恶性进展的影响Δ

郭寰宇[1*]，王卫芳[2#]，徐丽伟[3]，董文博[4]（1.长春中医药大学临床医学院实验中心，长春 130117；2.长春中医药大学临床医学院生物化学教研室，长春 130117；3.长春中医药大学附属医院肿瘤血液科，长春 130112；4.吉林大学第一医院二部检验科，长春 130061）

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1001-0408（2024）04-0430-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.04.09

摘 要 目的 探讨胡黄连苷Ⅱ对非小细胞肺癌（NSCLC）恶性进展的影响及机制。**方法** 将A549细胞分组为对照组，胡黄连苷Ⅱ低、中、高浓度组，K6PC-5[鞘氨醇激酶1（SPHK1）激活剂]组，胡黄连苷Ⅱ高剂量+K6PC-5组，检测细胞增殖、迁移、侵袭情况，以及细胞中增殖细胞核抗原（PCNA）、基质金属蛋白酶2（MMP-2）、MMP-9、SPHK1、1-磷酸鞘氨醇受体3（S1PR3）及胞外信号调节激酶1/2（ERK1/2）蛋白的表达情况。以BALB/c裸鼠为对象，通过皮下接种A549细胞悬液建立NSCLC裸鼠移植瘤模型，并将其分为裸鼠-对照组，裸鼠-胡黄连苷Ⅱ低、中、高剂量组，裸鼠-K6PC-5组，裸鼠-胡黄连苷Ⅱ高剂量+K6PC-5组（每组5只），考察胡黄连苷Ⅱ对其瘤体质量及体积的影响。**结果** 与对照组比较，胡黄连苷Ⅱ低、中、高浓度组的细胞OD_{450}值、EdU阳性细胞率、划痕愈合率、细胞侵袭数及PCNA、MMP-2、MMP-9、SPHK1、S1PR3、ERK1/2蛋白的相对表达量均显著降低；与裸鼠-对照组比较，裸鼠-胡黄连苷Ⅱ低、中、高剂量组裸鼠体内的瘤体质量及体积均显著降低或缩小，上述指标均呈浓度/剂量依赖性变化（$P<0.05$）；K6PC-5组细胞和裸鼠-K6PC-5组裸鼠对应指标的变化趋势则相反（$P<0.05$）。与胡黄连苷Ⅱ高浓度组或裸鼠-胡黄连苷Ⅱ高剂量组比较，胡黄连苷Ⅱ高浓度+K6PC-5组细胞和裸鼠-胡黄连苷Ⅱ高剂量+K6PC-5组裸鼠的上述定量指标均显著升高或增大（$P<0.05$）。**结论** 胡黄连苷Ⅱ可能通过抑制SPHK1/1-磷酸鞘氨醇/S1PR3信号通路来抑制NSCLC的恶性进展。

关键词 胡黄连苷Ⅱ；非小细胞肺癌；增殖；迁移；侵袭；鞘氨醇激酶1/1-磷酸鞘氨醇/1-磷酸鞘氨醇受体3信号通路

Effect of picroside Ⅱ on the malignant progression of non-small cell lung cancer

GUO Huanyu[1], WANG Weifang[2], XU Liwei[3], DONG Wenbo[4] (1. Experimental Center, School of Clinical Medicine, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 2. Dept. of Biochemistry, School of Clinical Medicine, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 3. Dept. of Hematology and Oncology, the Affiliated Hospital of Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130112, China; 4. Dept. of Clinical Laboratory, the Second Division of the First Hospital of Jilin University, Changchun 130061, China)

ABSTRACT OBJECTIVE To investigate the effect and mechanism of picroside Ⅱ on the malignant progression of non-small cell lung cancer (NSCLC). **METHODS** A549 cells were divided into the control group, picroside Ⅱ low-, medium- and high-concentration groups, K6PC-5 [sphingosine kinase 1 (SPHK1) activator] group, and picroside Ⅱ high-dose+K6PC-5 group. Cell proliferation, migration and invasion were detected. Besides, the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), MMP-9, SPHK1, sphingosine-1-phosphate receptor 3 (S1PR3) and extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) protein in the cells were also observed. BALB/c nude mice were subcutaneously inoculated with A549 cell suspension to establish NSCLC xenograft models. Then they were assigned to the nude mouse-control group, nude mouse-picroside Ⅱ low-, medium- and high-dose groups, nude mouse-K6PC-5 group, and nude mouse-picroside Ⅱ high-dose+K6PC-5 group (with 5 mice in each group) to investigate the effect of picroside Ⅱ on their tumor mass and volume. **RESULTS** Compared with the control group, the OD_{450} values, EdU-positive cell rates, scratch healing rates, cell invasion number, and the relative expression levels of PCNA, MMP-2, MMP-9, SPHK1, S1PR3 and ERK1/2 protein in the low-, medium- and high-concentration groups of picroside Ⅱ were significantly decreased. Compared with the nude mouse-control group, the tumor mass and volume in the nude mouse-low-, medium- and high-dose groups of picroside Ⅱ were significantly decreased or shrunk. The changes of above indicators were concentration/dose-dependent ($P<0.05$). The changing trend of the corresponding indicators in the K6PC-5 group and the nude mouse-K6PC-5 group was opposite ($P<0.05$). Compared with the picroside Ⅱ high-concentration group or the nude mice-picroside Ⅱ high-dose group, the above quantitative indicators in the picroside Ⅱ high-

Δ **基金项目** 吉林省科技发展计划项目（No. YDZJ202201-ZYTS181）

＊**第一作者** 实验师，硕士。研究方向：生物化学与分子生物学。E-mail：2545363766@qq.com

＃**通信作者** 副教授，博士。研究方向：药物物质基础及作用机制。E-mail：736792268@qq.com

concentration+K6PC-5 group cells and the nude mouse-picroside Ⅱ high-dose+K6PC-5 group nude mice were significantly increased or enlarged ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Picroside Ⅱ may inhibit the malignant progression of NSCLC by inhibiting SPHK1/sphingosine-1-phosphate/S1PR3 signaling pathway.

KEYWORDS picroside Ⅱ; non-small cell lung cancer; proliferation; migration; invasion; sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate/sphingosine-1-phosphate receptor 3 signaling pathway

非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer,NSCLC)是肺癌最普遍的组织学亚型,占所有肺癌病例的85%～90%[1]。目前,NSCLC的治疗主要以西医手段为主,包括手术、化疗、放疗、靶向治疗和免疫治疗等[2]。然而,这些治疗通常伴有复发、转移、患者预后差等不良结局,且治疗成本较高等[3]。此外,诸多靶向药物虽可延长晚期NSCLC患者的生存期,但耐药性会严重影响其长期疗效[4]。

研究表明,中医药对NSCLC的辅助治疗或患者预后有促进作用,可减少不良反应的发生,并具有良好的耐受性[5]。胡黄连苷Ⅱ是中药胡黄连提取物的主要活性成分之一,具有抗氧化、抗炎和抗肿瘤等作用[6]。已有研究报道,胡黄连苷Ⅱ可抑制人肾癌ACHN细胞的增殖并促进其凋亡[7],还可抑制人乳腺癌MDA-MB-231细胞的迁移和侵袭[8]。这提示胡黄连苷Ⅱ具有一定的抗肿瘤活性,但其能否抑制NSCLC的恶性进展尚不明确。相关研究显示,抑制鞘氨醇激酶1(sphingosine kinase 1,SPHK1)/1-磷酸鞘氨醇(sphingosine-1-phosphate,S1P)/1-磷酸鞘氨醇受体3(sphingosine-1-phosphate receptor 3,S1PR3)信号通路可抑制乳腺癌干细胞的增殖[9],以及肺淋巴管肌瘤细胞的增殖与侵袭[10]。这提示SPHK1/S1P/S1PR3信号通路参与了肿瘤的进展,但胡黄连苷Ⅱ能否通过调节SPHK1/S1P/S1PR3信号通路来抑制NSCLC的恶性进展尚不清楚。基于此,本研究拟基于上述信号通路探究胡黄连苷Ⅱ对NSCLC恶性进展的影响及潜在机制,以期为NSCLC的治疗药物提供更多选择。

1 材料

1.1 主要仪器

xMark型酶标仪、165-8001型蛋白电泳仪、Bio-Rad GelDoc XR+凝胶成像系统均购自美国Bio-Rad公司;DM2500型荧光显微镜购自德国Leica公司;E100型光学显微镜购自日本Nikon公司;SCO2W-2型细胞培养箱购自美国SHELLAB公司。

1.2 主要药品与试剂

胡黄连苷Ⅱ对照品(批号39012-20-9,纯度≥98%)购自上海陌孚医药科技有限公司;K6PC-5对照品(SPHK1激活剂,批号SML1709,纯度≥98%)购自北京百奥创新科技有限公司;CCK-8试剂盒(批号20220703)购自北京沃比森科技有限公司;5-乙炔基-2′-脱氧尿苷(EdU)染色试剂盒(批号CA1170)购自北京索莱宝科技有限公司;兔源增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)、基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase-2,MMP-2)、MMP-9、SPHK1、S1PR3、胞外信号调节激酶1/2(extracellular signal-regulated kinase 1/2,ERK1/2)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体和辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔IgG二抗(批号分别为ab92552、ab92536、ab76003、ab302714、ab248131、ab184699、ab128915、ab6721)均购自英国Abcam公司;RPMI 1640培养基(批号R10-041)购自北京毕特博生物技术有限责任公司;电化学发光试剂(批号20221226)购自北京三品医疗科技有限公司。

1.3 实验动物与细胞

SPF级雄性BALB/c裸鼠30只,5～6周龄,体重18.5～19.5 g,购自山东艾莱克生物科技有限公司,动物生产许可证号为SCXK(鲁)2022 0007。本研究方案获得长春中医药大学实验动物伦理委员会批准,批准编号为2021309。

人NSCLC细胞系A549购自中国科学院上海生科院细胞资源中心。

2 方法

2.1 细胞实验

2.1.1 细胞培养及胡黄连苷Ⅱ干预浓度的筛选

取A549细胞,于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中培养。取对数生长期的A549细胞,以1×10^4个/孔接种于96孔板中,分别用0(对照组)、1.25、2.5、5、10、20、40、80 μmol/L的胡黄连苷Ⅱ处理24 h,并设置不含细胞、不含药物的空白组(每个浓度设置6个复孔);随后,于每孔中加入CCK-8试剂10 μL,于37 ℃下孵育2 h,使用酶标仪于450 nm波长处检测各孔的光密度(OD)值,计算细胞存活率[细胞存活率=(实验组OD值-空白组OD值)/(对照组OD值-空白组OD值)×100%],并将细胞存活率接近50%时对应的胡黄连苷Ⅱ浓度作为胡黄连苷Ⅱ干预的高浓度用于后续实验。

2.1.2 细胞分组与处理

取对数生长期的A549细胞,随机分为对照组,胡黄连苷Ⅱ低、中、高浓度组,K6PC-5组,胡黄连苷Ⅱ高浓度+K6PC-5组。各药物浓度参考“2.1.1”项下结果及相关文献[8,11]设定,具体处理过程如下:胡黄连苷Ⅱ低、中、高浓度组细胞分别用10、20、40 μmol/L的胡黄连苷Ⅱ处理24 h;K6PC-5组细胞用10 μmol/L的K6PC-5处理24 h;胡黄连苷Ⅱ高浓度+K6PC-5组细胞用40 μmol/L的胡黄连苷Ⅱ和10 μmol/L的K6PC-5共同处理24 h;对照组细胞正常培养24 h。

2.1.3 细胞增殖检测

(1)CCK-8实验:取对数生长期的A549细胞,以2×10^3个/孔接种于96孔板上,按照“2.1.2”项下方法分组(每组设6个复孔)、处理。随后,于每孔中加入CCK-8试剂10 μL,于37 ℃下孵育2 h,使用酶标仪在450 nm波

长处检测各孔的OD值，用以反映细胞增殖情况。

（2）EdU染色实验：取对数生长期的A549细胞，以1×10^4个/孔接种于96孔板中，按照“2.1.2”项下方法分组（每组设6个复孔）、处理。随后，于每孔中加入50 μmol/L的EdU染液适量，染色2 h；弃去染液，细胞以4%多聚甲醛固定1 h后，以阿波罗染液染色30 min，再以4′，6-二脒基-2-苯基吲哚（DAPI）染液染核20 min。使用荧光显微镜观察，使用Image J软件对EdU阳性细胞（呈绿色荧光）进行计数并按下式计算EdU阳性细胞率：EdU阳性细胞率＝EdU阳性细胞数/总细胞数×100%。

2.1.4　细胞迁移能力检测

采用划痕实验检测。取对数生长期的A549细胞，以2×10^5个/孔接种于24孔板中，培养，待细胞铺满后，用无菌移液器枪头在板内垂直划线，用磷酸盐缓冲液清洗后，将细胞按照“2.1.2”项下方法分组（每组设6个复孔）、处理。使用光学显微镜分别于处理0、24 h时观察并测量各组细胞的划痕宽度，并按下式计算划痕愈合率：划痕愈合率＝（0 h时的划痕宽度－24 h时的划痕宽度）/0 h时的划痕宽度×100%。

2.1.5　细胞侵袭能力检测

采用Transwell实验检测。取对数生长期的A549细胞，用不含血清的RPMI 1640培养基重悬至1×10^6个/mL，取上述细胞悬液100 μL置于Transwell上室，同时将含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基500 μL置于Transwell下室，培养24 h。将上层细胞按照“2.1.2”项下方法分组（每组设6个复孔）、处理。随后，去除上室底部未穿膜的细胞，将侵袭细胞（即穿膜细胞）用4%多聚甲醛固定，再以0.1%结晶紫染液染色，使用光学显微镜观察细胞侵袭情况并记录侵袭细胞数。

2.1.6　细胞中PCNA、MMP-2、MMP-9蛋白及SPHK1/S1P/S1PR3信号通路相关蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取对数生长期的A549细胞，以2×10^5个/孔接种于24孔板中，按照“2.1.2”项下方法分组（每组设6个复孔）、处理。随后，收集各组细胞，裂解并提取其总蛋白。对蛋白进行定量、变性、电泳分离、转膜、封闭后，加入PCNA、MMP-2、MMP-9、SPHK1、S1PR3、ERK1/2、GAPDH一抗（稀释比例分别为1∶4 000、1∶4 000、1∶3 000、1∶3 000、1∶3 000、1∶4 000、1∶5 000），于4 ℃下孵育过夜；洗膜后，加入相应二抗（稀释比例为1∶2 000），于室温下孵育1.5 h；洗膜后，以电化学发光试剂显影，再置于凝胶成像系统下成像。使用Image J软件分析各蛋白的灰度值，以目的蛋白与内参蛋白（GAPDH）的灰度值比值作为目的蛋白的相对表达量。

2.2　移植瘤裸鼠实验

取1×10^7个/mL的A549细胞悬液0.2 mL，皮下接种于BALB/c裸鼠腋窝，建立NSCLC移植瘤裸鼠模型（接种后第7天，若移植瘤长径＞5 mm，则判定造模成功[12]）。取造模成功的裸鼠30只，随机分为裸鼠-对照组，裸鼠-胡黄连苷Ⅱ低、中、高剂量组，裸鼠-K6PC-5组，裸鼠-胡黄连苷Ⅱ高剂量+K6PC-5组，每组5只。各药物剂量参考预实验结果及相关文献[8,13]设定，具体处理过程如下：裸鼠-胡黄连苷Ⅱ低、中、高剂量组裸鼠分别腹腔注射25、50、100 mg/kg的胡黄连苷Ⅱ；裸鼠-K6PC-5组裸鼠腹腔注射0.007 5 mg/kg的K6PC-5；裸鼠-胡黄连苷Ⅱ高剂量+K6PC-5组裸鼠同时腹腔注射100 mg/kg的胡黄连苷Ⅱ和0.007 5 mg/kg的K6PC-5；裸鼠-对照组裸鼠腹腔注射生理盐水。各组裸鼠均每天注射1次，持续30 d。30 d后，处死裸鼠，分离并收集其瘤体，称定瘤体质量并按下式计算瘤体体积：肿瘤体积＝$0.5\times a\times b^2$（式中，a为瘤体长径，b为瘤体短径）。

2.3　统计学方法

采用SPSS 25.0软件对数据进行统计分析。实验数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间差异分析采用单因素方差分析，进一步两两比较采用SNK-q检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3　结果

3.1　细胞实验结果

3.1.1　胡黄连苷Ⅱ干预浓度的筛选结果

随着胡黄连苷Ⅱ浓度的升高，细胞存活率显著降低（$P<0.05$），且有一定的浓度依赖趋势：在0、1.25、2.5、5、10、20、40、80 μmol/L胡黄连苷Ⅱ作用下，细胞存活率依次为（99.97±0.03）%、（97.78±0.12）%、（89.95±0.23）%、（80.55±0.36）%、（73.36±0.28）%、（65.57±0.23）%、（54.43±0.26）%、（43.94±0.22）%。因此，本研究选择胡黄连苷Ⅱ 40 μmol/L作为后续干预的高浓度，以10、20 μmol/L作为后续干预的低、中浓度。

3.1.2　胡黄连苷Ⅱ对A549细胞增殖的影响

与对照组比较，胡黄连苷Ⅱ各浓度组的细胞OD_{450}值、EdU阳性细胞率均显著降低，且呈浓度依赖性（$P<0.05$）；而K6PC-5组的细胞OD_{450}值、EdU阳性细胞率均显著升高（$P<0.05$）。与胡黄连苷Ⅱ高浓度组比较，胡黄连苷Ⅱ高浓度+K6PC-5组的细胞OD_{450}值、EdU阳性细胞率均显著升高（$P<0.05$）。结果见表1、图1。

表1　各组A549细胞OD_{450}值、EdU阳性细胞率比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	OD_{450}值	EdU阳性细胞率/%
对照组	0.92±0.06	58.86±2.37
胡黄连苷Ⅱ低浓度组	0.83±0.07[a]	50.69±2.15[a]
胡黄连苷Ⅱ中浓度组	0.71±0.06[ab]	43.37±2.06[ab]
胡黄连苷Ⅱ高浓度组	0.44±0.03[abc]	28.85±1.33[abc]
K6PC-5组	1.21±0.11[a]	66.72±2.85[a]
胡黄连苷Ⅱ高浓度+K6PC-5组	0.75±0.06[d]	46.65±2.17[d]

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与胡黄连苷Ⅱ低浓度组比较，$P<0.05$；c：与胡黄连苷Ⅱ中浓度组比较，$P<0.05$；d：与胡黄连苷Ⅱ高浓度组比较，$P<0.05$。

3.1.3　胡黄连苷Ⅱ对A549细胞迁移的影响

与对照组比较，胡黄连苷Ⅱ各浓度组细胞的划痕愈合率均显著降低，且呈浓度依赖性（$P<0.05$）；而K6PC-5组细胞的划痕愈合率显著升高（$P<0.05$）。与胡黄连苷Ⅱ高浓度组比较，胡黄连苷Ⅱ高浓度+K6PC-5组细胞的划痕愈合率显著升高（$P<0.05$）。结果见表2、图2。

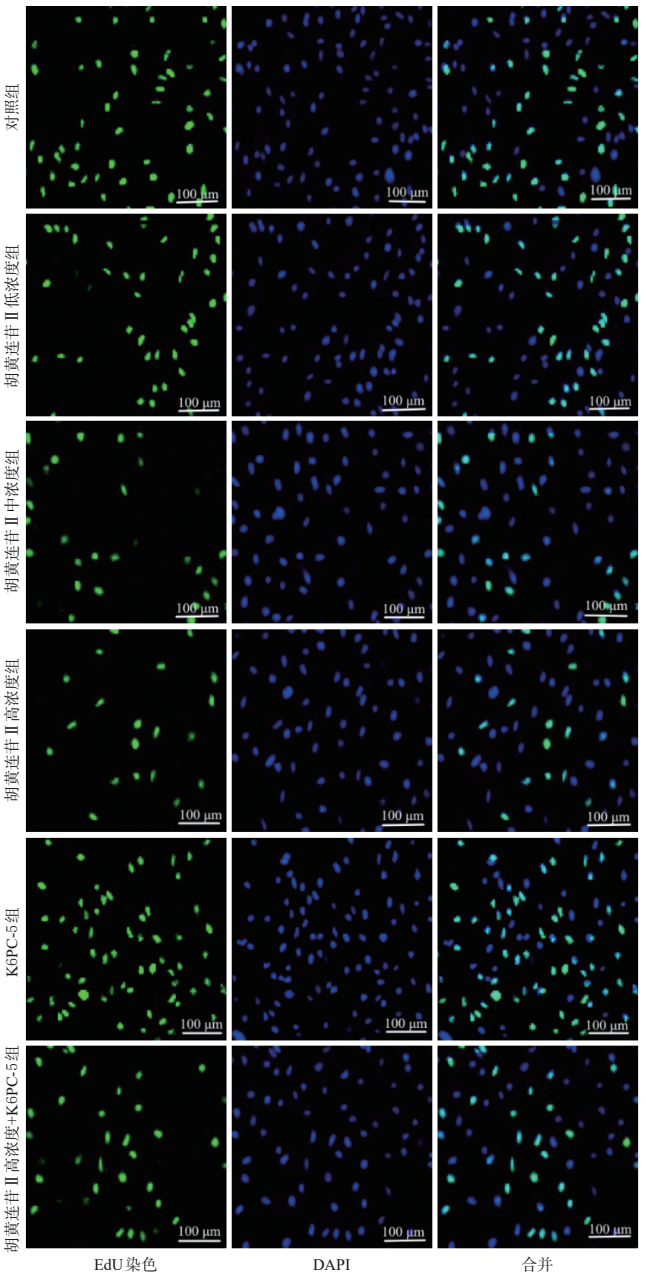


图1　各组A549细胞增殖的EdU染色显微图

表2　各组A549细胞划痕愈合率变化比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	划痕愈合率/%	细胞侵袭数/个
对照组	62.23±2.96	86.65±3.84
胡黄连苷Ⅱ低浓度组	54.43±2.68[a]	75.86±3.16[a]
胡黄连苷Ⅱ中浓度组	45.52±2.39[ab]	62.28±2.94[ab]
胡黄连苷Ⅱ高浓度组	29.66±1.68[abc]	31.18±1.43[abc]
K6PC-5组	69.94±2.88[a]	95.45±3.66[a]
胡黄连苷Ⅱ高浓度+K6PC-5组	48.87±2.35[d]	67.73±2.88[d]

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与胡黄连苷Ⅱ低浓度组比较，$P<0.05$；c：与胡黄连苷Ⅱ中浓度组比较，$P<0.05$；d：与胡黄连苷Ⅱ高浓度组比较，$P<0.05$。

3.1.4　胡黄连苷Ⅱ对A549细胞侵袭的影响

与对照组比较，胡黄连苷Ⅱ各浓度组的细胞侵袭数均显著降低，且呈浓度依赖性（$P<0.05$）；而K6PC-5组的细胞侵袭数显著升高（$P<0.05$）。与胡黄连苷Ⅱ高浓度组比较，胡黄连苷Ⅱ高浓度+K6PC-5组的细胞侵袭数显著升高（$P<0.05$）。结果见表2、图3。

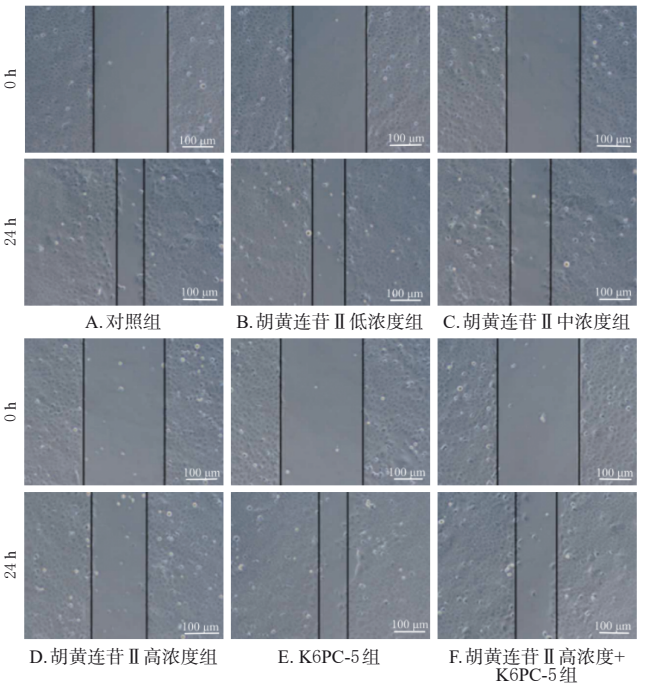


图2　各组A549细胞迁移情况的显微图

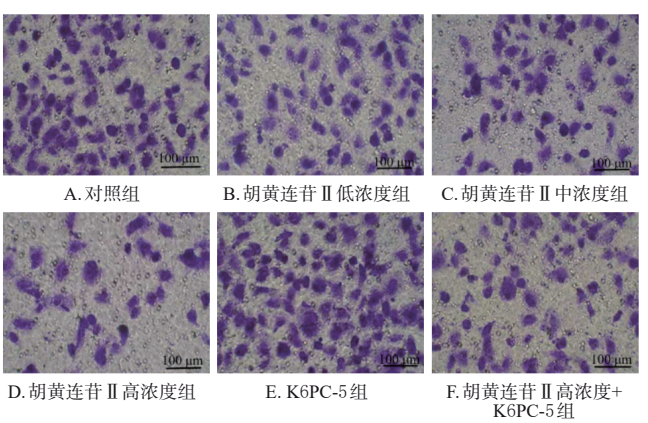


图3　各组A549细胞侵袭情况的显微图

3.1.5　胡黄连苷Ⅱ对A549细胞中相关蛋白表达的影响

与对照组比较，胡黄连苷Ⅱ各浓度组细胞中PCNA、MMP-2、MMP-9、SPHK1、S1PR3、ERK1/2蛋白的相对表达量均显著降低，且呈浓度依赖性（$P<0.05$）；而K6PC-5组细胞中上述蛋白的相对表达量均显著升高（$P<0.05$）。与胡黄连苷Ⅱ高浓度组比较，胡黄连苷Ⅱ高浓度+K6PC-5组细胞中PCNA、MMP-2、MMP-9、SPHK1、S1PR3、ERK1/2蛋白的相对表达量均显著升高（$P<0.05$）。结果见表3、图4。

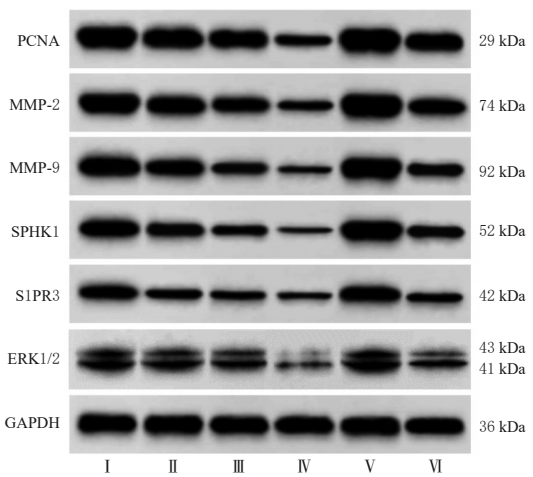
3.2　胡黄连苷Ⅱ对裸鼠体内移植瘤生长的影响

与裸鼠-对照组比较，裸鼠-胡黄连苷Ⅱ各剂量组裸鼠体内的瘤体质量均显著降低，体积均显著缩小，且均呈剂量依赖性（$P<0.05$）；而裸鼠-K6PC-5组裸鼠体内的瘤体质量显著升高，体积显著增大（$P<0.05$）。与裸鼠-胡黄连苷Ⅱ高剂量组比较，裸鼠-胡黄连苷Ⅱ高剂量+K6PC-5组裸鼠体内的瘤体质量显著升高，体积显著增大（$P<0.05$）。结果见图5、表4。

表3　各组A549细胞中PCNA、MMP-2、MMP-9、SPHK1、S1PR3、ERK1/2蛋白相对表达量比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

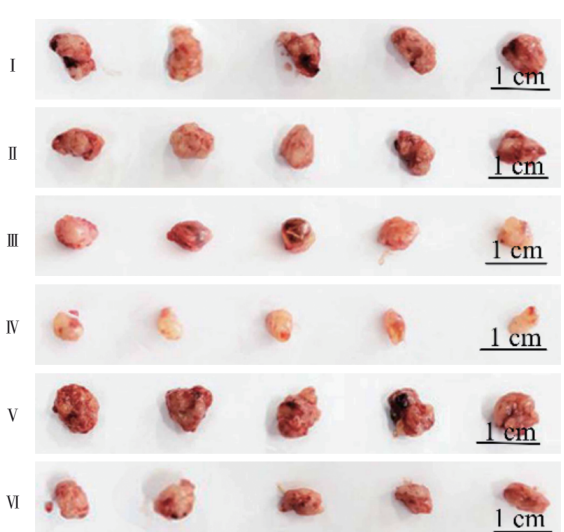
组别	PCNA	MMP-2	MMP-9	SPHK1	S1PR3	ERK1/2
对照组	1.52±0.14	1.36±0.12	1.14±0.11	0.93±0.08	0.72±0.06	0.61±0.05
胡黄连苷Ⅱ低浓度组	1.27±0.11^{a}	1.03±0.10^{a}	0.85±0.07^{a}	0.81±0.08^{a}	0.65±0.05^{a}	0.43±0.04^{a}
胡黄连苷Ⅱ中浓度组	1.01±0.08^{ab}	0.81±0.08^{ab}	0.62±0.05^{ab}	0.64±0.06^{ab}	0.51±0.04^{ab}	0.34±0.03^{ab}
胡黄连苷Ⅱ高浓度组	0.63±0.05^{abc}	0.52±0.05^{abc}	0.31±0.03^{abc}	0.27±0.03^{abc}	0.30±0.03^{abc}	0.14±0.01^{abc}
K6PC-5组	1.87±0.16^{a}	1.69±0.14^{a}	1.33±0.12^{a}	1.21±0.13^{a}	0.89±0.08^{a}	0.94±0.08^{a}
胡黄连苷Ⅱ高浓度+K6PC-5组	1.12±0.13^{d}	0.94±0.08^{d}	0.73±0.06^{d}	0.70±0.06^{d}	0.57±0.05^{d}	0.38±0.03^{d}

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与胡黄连苷Ⅱ低浓度组比较，$P<0.05$；c：与胡黄连苷Ⅱ中浓度组比较，$P<0.05$；d：与胡黄连苷Ⅱ高浓度组比较，$P<0.05$。



Ⅰ：对照组；Ⅱ：胡黄连苷Ⅱ低浓度组；Ⅲ：胡黄连苷Ⅱ中浓度组；Ⅳ：胡黄连苷Ⅱ高浓度组；Ⅴ：K6PC-5组；Ⅵ：胡黄连苷Ⅱ高浓度+K6PC-5组。

图4　各组A549细胞中PCNA、MMP-2、MMP-9、SPHK1、S1PR3、ERK1/2蛋白表达的电泳图



Ⅰ：裸鼠-对照组；Ⅱ：裸鼠-胡黄连苷Ⅱ低剂量组；Ⅲ：裸鼠-胡黄连苷Ⅱ中剂量组；Ⅳ：裸鼠-胡黄连苷Ⅱ高剂量组；Ⅴ：裸鼠-K6PC-5组；Ⅵ：裸鼠-胡黄连苷Ⅱ高剂量+K6PC-5组。

图5　各组裸鼠体内移植瘤生长情况

表4　各组裸鼠体内肿瘤质量与体积变化比较（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	瘤体质量/g	肿瘤体积/mm^3
裸鼠-对照组	0.76±0.06	158.33±6.14
裸鼠-胡黄连苷Ⅱ低剂量组	0.65±0.05^{a}	135.42±5.84^{a}
裸鼠-胡黄连苷Ⅱ中剂量组	0.54±0.04^{ab}	112.52±5.25^{ab}
裸鼠-胡黄连苷Ⅱ高剂量组	0.23±0.02^{abc}	47.92±2.13^{abc}
裸鼠-K6PC-5组	0.89±0.07^{a}	185.42±6.53^{a}
裸鼠-胡黄连苷Ⅱ高剂量+K6PC-5组	0.57±0.04^{d}	118.75±5.03^{d}

a：与裸鼠-对照组比较，$P<0.05$；b：与裸鼠-胡黄连苷Ⅱ低剂量组比较，$P<0.05$；c：与裸鼠-胡黄连苷Ⅱ中剂量组比较，$P<0.05$；d：与裸鼠-胡黄连苷Ⅱ高剂量组比较，$P<0.05$。

4　讨论

胡黄连苷Ⅱ是一种糖苷类衍生物，可抑制人食管癌Eca109细胞和人结直肠癌SW480、SW620细胞的增殖、侵袭与转移[14-15]，提示该成分具有一定的抗肿瘤活性。本研究结果显示，胡黄连苷Ⅱ可浓度/剂量依赖性地抑制A549细胞的增殖、迁移、侵袭以及裸鼠体内移植瘤的生长，表明该成分能够抑制NSCLC的恶性进展。

作为细胞增殖的标志蛋白，PCNA对于肿瘤细胞的DNA复制至关重要[16]；MMP-2和MMP-9可降解细胞外基质并参与肿瘤细胞的侵袭和转移，其表达水平与肿瘤细胞的侵袭、迁移能力成正比[17]。本研究检测了A549细胞中PCNA、MMP-2、MMP-9蛋白的表达情况，结果显示，胡黄连苷Ⅱ可浓度依赖性地抑制细胞中PCNA、MMP-2、MMP-9蛋白的表达，从蛋白水平上初步证实了胡黄连苷Ⅱ对A549细胞增殖、侵袭、迁移的抑制作用。与此同时，本研究结果还显示，胡黄连苷Ⅱ可剂量依赖性地抑制移植瘤裸鼠体内的肿瘤生长，从动物水平上初步证实了该成分对恶性肿瘤的体内抑制作用。由此可见，胡黄连苷Ⅱ有望成为NSCLC的潜在治疗药物之一。

由SPHK1产生的S1P是鞘脂代谢的中心分子，S1P可与S1PR3结合，进而激活S1P下游分子ERK1/2的表达，从而调节肿瘤细胞存活、迁移等生物学过程[10,18]；另有研究证实，SPHK1/S1P/S1PR3信号通路可参与卵巢癌细胞的血管生成[19]。以上研究表明，SPHK1/S1P/S1PR3信号通路在肿瘤的恶性进展中具有重要作用。此外，SPHK1/S1P/S1PR3信号通路中S1P的活化包括其受体（S1PR）及受体活化所引起的一系列细胞反应[20]，故可通过检测SIPR3的表达来反映S1P的活性。鉴于此，本研究检测了SPHK1、S1PR3、ERK1/2蛋白的表达情况。结果显示，胡黄连苷Ⅱ可浓度依赖性地下调细胞中SPHK1、S1PR3、ERK1/2蛋白的表达，推测该成分对NSCLC恶性进展的抑制作用可能与抑制SPHK1/S1P/S1PR3信号通路有关。同时，本研究结果还显示，经SPHK1激活剂K6PC-5干预后，细胞中SPHK1/S1P/S1PR3信号通路相关蛋白SPHK1、S1PR3、ERK1/2的表达均较对照组显著升高，细胞的增殖、迁移、侵袭能力亦显著增强，裸鼠体内移植瘤的生长明显加快，表明SPHK1/S1P/S1PR3信号通路确实参与了NSCLC的恶性进展。为验证上述推测，本研究在高剂量胡黄连苷Ⅱ的

基础上联合该激活剂来干预A549细胞及移植瘤裸鼠，结果显示，K6PC-5减弱了高剂量胡黄连苷Ⅱ对A549细胞增殖、迁移、侵袭的抑制作用以及对裸鼠移植瘤生长的抑制作用，进一步证实了胡黄连苷Ⅱ抑制NSCLC恶性进展的作用可能是通过抑制SPHK1/S1P/S1PR3信号通路来实现的。

综上所述，胡黄连苷Ⅱ可能通过抑制SPHK1/S1P/S1PR3信号通路来抑制NSCLC的恶性进展。但胡黄连苷Ⅱ抑制NSCLC恶性进展还可能涉及其他机制，还有待后续研究深入探讨。

参考文献

[1] KIM J W，MARQUEZ C P，KOSTYRKO K，et al. Antitumor activity of an engineered decoy receptor targeting CLCF1-CNTFR signaling in lung adenocarcinoma[J]. Nat Med，2019，25(11)：1783-1795.

[2] UPADHYA A，YADAV K S，MISRA A. Targeted drug therapy in non-small cell lung cancer：clinical significance and possible solutions：part Ⅰ[J]. Expert Opin Drug Deliv，2021，18(1)：73-102.

[3] ZHENG J，XU T T，CHEN F，et al. miRNA-195-5p functions as a tumor suppressor and a predictive of poor prognosis in non-small cell lung cancer by directly targeting CIAPIN1[J]. Pathol Oncol Res，2019，25(3)：1181-1190.

[4] ZHU L，CHEN Z，ZANG H J，et al. Targeting c-Myc to overcome acquired resistance of EGFR mutant NSCLC cells to the third-generation EGFR tyrosine kinase inhibitor，osimertinib[J]. Cancer Res，2021，81(18)：4822-4834.

[5] ZHANG X，GUO Q J，LI C H，et al. Immortal time bias-corrected effectiveness of traditional Chinese medicine in non-small cell lung cancer（C-EVID）：a prospective cohort study[J]. Front Oncol，2022，12：845613.

[6] WANG Y K，HONG Y J，ZHANG C Y，et al. Picroside Ⅱ attenuates hyperhomocysteinemia-induced endothelial injury by reducing inflammation，oxidative stress and cell apoptosis[J]. J Cell Mol Med，2019，23(1)：464-475.

[7] 张璐，胡莹. 胡黄连苷Ⅱ通过线粒体途径诱导肾癌细胞凋亡的实验研究[J]. 临床肾脏病杂志，2020，20(6)：504-507.
ZHANG L，HU Y. An experimental study renal cancer cell apoptosis induced by picroside Ⅱ through mitochondrial pathway[J]. J Clin Nephrol，2020，20(6)：504-507.

[8] LOU C H，ZHU Z H，XU X T，et al. Picroside Ⅱ，an iridoid glycoside from *Picrorhiza kurroa*，suppresses tumor migration，invasion，and angiogenesis *in vitro* and *in vivo*[J]. Biomed Pharmacother，2019，120：109494.

[9] WANG Y C，TSAI C F，CHUANG H L，et al. Benzyl butyl phthalate promotes breast cancer stem cell expansion via SPHK1/S1P/S1PR3 signaling[J]. Oncotarget，2016，7(20)：29563-29576.

[10] LI F，ZHANG Y F，LIN Z J，et al. Targeting SPHK1/S1PR3-regulated S-1-P metabolic disorder triggers autophagic cell death in pulmonary lymphangiomyomatosis（LAM）[J]. Cell Death Dis，2022，13(12)：1065.

[11] LIU H，ZHANG Z Q，XU M，et al. K6PC-5 activates SphK1-Nrf2 signaling to protect neuronal cells from oxygen glucose deprivation/re-oxygenation[J]. Cell Physiol Biochem，2018，51(4)：1908-1920.

[12] NIU H K，WANG D X，WEN T T，et al. Anwuligan inhibits the progression of non-small cell lung cancer via let-7c-3p/PI3K/AKT/mTOR axis[J]. Cancer Med，2023，12(5)：5908-5925.

[13] HEYDARI A H，FATHI M，HEYDARI S，et al. Advanced glycation end product blocker drugs have a great potential to prevent diabetic cardiomyopathy in an animal model of diabetes mellitus type-2[J]. Cardiovasc Ther，2022，2022：7014680.

[14] 杨谦，张军，马玉泉，等. 胡黄连苷Ⅱ通过MEK/ERK通路抑制食管癌细胞增殖及侵袭转移的机制研究[J]. 中国医院用药评价与分析，2021，21(7)：820-825.
YANG Q，ZHANG J，MA Y Q，et al. Mechanism of picroside Ⅱ inhibiting proliferation，invasion and metastasis of esophageal cancer cells through MEK/ERK pathway[J]. Eval Anal Drug Use Hosp China，2021，21(7)：820-825.

[15] 李佳怿. 探究胡黄连苷Ⅱ对人结直肠癌细胞的抑制作用及其可能的作用机制[D]. 昆明：昆明医科大学，2021.
LI J Y. The inhibitory effect of picroside Ⅱ on colorectal cancer cells and its possible mechanism[D]. Kunming：Kunming Medical University，2021.

[16] WANG Y L，WU W R，LIN P L，et al. The functions of PCNA in tumor stemness and invasion[J]. Int J Mol Sci，2022，23(10)：5679.

[17] IBÁÑEZ GASPAR V，MCMORROW T. The curcuminoid EF24 in combination with TRAIL reduces human renal cancer cell migration by decreasing MMP-2/MMP-9 activity through a reduction in H_2O_2[J]. Int J Mol Sci，2023，24(2)：1043.

[18] 文培培，高宇，王晓云，等. 温针疗法联合豨莶草对风湿性关节炎大鼠滑膜细胞活性及SphK1/S1P/S1PR1信号的影响[J]. 针灸临床杂志，2022，38(11)：75-81.
WEN P P，GAO Y，WANG X Y，et al. Effects of warm needling combined with Siegesbeckiae Herba on activity of synovial cells and SphK1/S1P/S1PR1 signaling pathway in rats with RA[J]. J Clin Acupunct Moxibustion，2022，38(11)：75-81.

[19] DAI L，LIU Y X，XIE L，et al. Sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate（S1P）/S1P receptor axis is involved in ovarian cancer angiogenesis[J]. Oncotarget，2017，8(43)：74947-74961.

[20] 王燕，肖雄，郭峰，等. 和血柔肝方对肝纤维化大鼠SphK1/S1P/S1PR信号通路的影响[J]. 中国中医药信息杂志，2022，29(3)：85-91.
WANG Y，XIAO X，GUO F，et al. Effects of Hexue rougan prescription on SphK1/S1P/S1PR signaling pathway in liver fibrosis rats[J]. Chin J Inf Tradit Chin Med，2022，29(3)：85-91.

（收稿日期：2023-08-28　修回日期：2023-12-19）
（编辑：张元媛）