DOI:10.16016/j.2097-0927.202403114

钩吻生物碱对肺癌的抑制作用及其机制

金明静[1],李艳萍[1],周欢思[1],王彬睿[1],吴卓玲[2],卢春花[3] 530200 南宁,广西中医药大学附属国际壮医医院壮瑶医药研究实验室[1];530021 南宁,南宁市第一人民医院:科研部[2],医学实验中心[3]

[摘要] **目的** 探讨钩吻素子(koumine,KOU)及钩吻总生物碱(total alkaloids of *Gelsemium elegans* Benth, TAG)抗肺癌的作用及其机制。**方法** 采用活细胞动态分析系统、集落形成实验研究低、中、高浓度(100、150、200 μg/mL)KOU 对人肺腺癌细胞 A549、SPCA1 的增殖作用。构建肺癌细胞小鼠移植瘤模型,分为模型组(Model 组)、环磷酰胺组(CTX 组,剂量为 20 mg/kg)、KOU 组(剂量为 2 mg/kg)和 TAG 组(剂量为 0.5 mg/kg),CTX 组和 KOU、TAG 组按 0.1 mL/10 g 隔天腹腔注射,给药 10 d 检测 KOU 和 TAG 对肺癌实体瘤生长的作用,采用 HE、免疫组化(immunohistochemistry,IHC)及 TUNEL 染色观察肿瘤组织,并计算肿瘤体积和肿瘤抑制率。对 TAG 作用 48 h 的 A549 细胞进行 RNA 测序分析,筛选差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs),并进行 KEGG(Kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)和 GO(Gene Ontology,GO)功能富集分析。采用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction,real-time-qPCR)进一步分析验证相关基因的表达。**结果** 活细胞动态分析系统拟合出 A549、SPCA1 细胞融合度下降,细胞数目减少,生长状态变差。集落形成实验结果证实 KOU 使细胞克隆数目形成减少,在高浓度 200 μg/mL 时最为显著($P<0.01$)。动物实验表明 KOU 组、TAG 组的肿瘤抑制率依次可达 24.55%、36.08%,与 Model 组相比,TAG 组肿瘤体积显著下降($P<0.05$)。RNA 测序分析筛选出 DEGs 总数为 2 793 个,其中上调基因 1 433 个,下调基因 1 360 个。富集分析发现 DEGs 主要富集于 IL-17 信号通路、肿瘤坏死因子信号通路及 p53 信号通路等。RT-qPCR 验证结果与 RNA 测序分析结果一致,GADD34、ZFP36、GADD45A、GADD45B、TP53INP2 基因在 TAG 组显著表达增加($P<0.01$)。**结论** 在体内、外水平钩吻生物碱均抑制肺癌增殖,转录组学发现其抑制肺癌作用的多个 DEGs 和通路。

[关键词] 钩吻;生物碱;肺癌;转录组学;细胞增殖

[中图法分类号] R282.71; R285.5; R734.2 [文献标志码] A

Inhibitory effect and mechanism of alkaloids derived from *Gelsemium elegans* Benth on lung cancer

JIN Mingjing[1], LI Yanping[1], ZHOU Huansi[1], WANG Binrui[1], WU Zhuoling[2], LU Chunhua[2] [1]Laboratory of Zhuang & Yao Medicine, Guangxi International Zhuang Medicine Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi Zhuang Autonomous Region, 530200; [2]Department of Scientific Research Affairs, [3]Medical Experimental Center, Nanning First People's Hospital, Nanning, Guangxi Zhuang Autonomous Region, 530021, China

[**Abstract**] **Objective** To determine the anti-lung cancer effect of koumine (KOU) and total alkaloids of *Gelsemium elegans* Benth (TAG) and investigate the underlying mechanism. **Methods** After

[基金项目] 广西中医药大学附属国际壮医医院引进人才科研启动基金(GZ2021RC016);广西中医药大学引进博士科研启动基金(2020BS034);广西研究生教育创新计划项目(YCSW2023388);广西中医药大学青年基金项目(2022QN026)

[通信作者] 卢春花,E-mail:chl-bb@163.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

low, medium and high concentrations (100, 150, 200 μg/mL) of KOU were used to treat human lung adenocarcinoma cell lines A549 and SPCA1, Live Cell Imaging and Analysis by Sartorius colony formation assay was employed to detect the cell proliferation. The transplanted tumor model of lung cancer cells in mice was constructed and divided into model group (model group), cyclophosphamide group (CTX group, 20 mg/kg), KOU group (2 mg/kg) and TAG group (0.5 mg/kg). After the mice of the CTX, KOU and TAG groups were intraperitoneally injected with 0.1 mL/10 g corresponding agents every other day for 10 d, the growth of lung cancer solid tumors was observed grossly and with HE staining, immunohistochemical (IHC) assay and TUNEL staining to and calculate the tumor size and growth inhibitory rate. RNA sequencing analysis was performed on A549 cells treated with TAG for 48 h to screen the differentially expressed genes (DEGs) between the treatment group and the control group, and the obtained DEGs were further analyzed with Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and Gene Ontology (GO) functional enrichment analyses. RT-qPCR was applied to further analyze and verify the expression of related genes. **Results** Live Cell Imaging and Analysis fitted that the confluence of A549 and SPCA1 cells was decreased and the number of cells in the treated groups was observed to decrease, with poor growth. The results of colony formation assay confirmed that KOU reduced the number of cell clones, especially at a dose of 200 μg/mL ($P<0.01$). Animal experiments showed that KOU and TAG treatment inhibited the tumor growth by 24.55% and 36.08%, respectively. TAG treatment resulted in significantly decreased tumor size when compared with the model group ($P<0.05$). RNA sequencing analysis revealed that there were totally 2 793 DEGs, including 1 433 up-regulated genes and 1 360 down-regulated ones. Enrichment analysis displayed that the DEGs were mainly enriched in IL-17 signaling pathway, tumor necrosis factor signaling pathway and P53 signaling pathway. The results of RT-qPCR were consistent with the results of RNA sequencing analysis. The expression levels of GADD34, ZFP36, GADD45 A, GADD45 B and TP53INP2 genes were significantly increased in the TAG group ($P<0.01$). **Conclusion** Alkaloids of *Gelsemium elegans* Benth inhibits the proliferation of lung cancer *in vivo* and *in vitro*. Transcriptomics find that KOU and TAG inhibit multiple DEGs and pathways of lung cancer.

[**Key words**] *Gelsemium elegans* Benth; alkaloids; lung cancer; transcriptomics; cell proliferation

Supported by the Scientific Research Initiation Fund for Introduced Talents of Guangxi International Zhuang Medicine Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine (GZ2021RC016), the Scientific Research Initiation Foundation for Introduced Doctors of Guangxi University of Chinese Medicine (2020BS034), the Innovation Project of Guangxi Graduate Education (YCSW2023388), and the Youth Fund Project of Guangxi University of Chinese Medicine (2022QN026). Corresponding author: LU Chunhua, E-mail: chl-bb@163.com

肺癌是癌症死亡的重要原因之一,其发病率和死亡率都很高。目前,肺癌已成为全球性问题和公共卫生问题,肺癌的预防与治疗也引起了全世界的广泛关注[1]。通过手术、放疗、化疗、靶向及免疫治疗等方式可延长肺癌患者的生存期,但同时也会产生副作用,如疲惫、呕吐及失眠等,给患者造成较大的经济和心理负担。肺癌早期症状较为隐匿,部分患者发现时已处于晚期,失去手术机会,需要更多其他治疗方式使患者获益。中医药治疗肺癌已取得较好的临床效果,在减轻患者的症状、提高生活质量和降低药物副作用等方面具有优势[2],同时中医药治疗肿瘤具有多靶点、多途径等特点,可直接抑制肿瘤生长、改善微环境及调节机体免疫功能等,因此开发新的抗肿瘤中药显得尤为必要。

钩吻是马钱科、钩吻属常绿木质藤本,属于我国传统中医药植物,又称为断肠草、大茶药、山砒霜等。在《神农本草经》和《本草纲目》中均有记载,由于其毒性较高,外用可以祛风、祛毒、止痒、杀虫、消毒等[3]。吲哚类生物碱是钩吻的主要活性成分,钩吻总生物碱(total alkaloids of *Gelsemium elegans* Benth,TAG)是从植物钩吻中提取到的总生物碱复合物,包含钩吻素子(koumine,KOU)、钩吻碱甲等多种生物碱化合物,其中以 KOU 的含量最多[4]。研究表明,钩吻生物碱对肺癌、结肠癌、肝癌、舌癌、胃癌等具有显著的抗肿瘤作

用[5-9],然而其作用机制尚不明确。本课题组前期研究发现 TAG 对多种肿瘤细胞均具有明显抑制作用,本研究进一步探讨 KOU 和 TAG 对肺癌细胞的抑制作用及其机制,并通过小鼠移植瘤模型检测 TAG 和 KOU 的体内抗肿瘤活性。

1 材料与方法

1.1 细胞株

人肺腺癌细胞 A549、SPCA1 和小鼠 Lewis 肺癌细胞(LLC 细胞)均由广西国际壮医医院壮瑶医药研究实验室保存。

1.2 主要仪器、试剂和药品

A549、SPCA1 和 LLC 细胞用含 10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素的 DMEM 培养基培养,于 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱中培养。主要仪器:活细胞动态功能分析系统(美国 Sartorius 公司,型号:Incucyte S3)、细胞计数器(美国 Beckman Coulter 公司,型号:Z Ⅰ型)、CO_2 培养箱(新加坡 Esco 公司,型号:CCL-240B-8)、高速台式离心机(德国 Eppendorf 公司,型号:5424R)、-80 ℃超低温冰箱(中国海尔公司,DW-86L626)。主要试剂:DMEM 培养基(美国 Gibco 公司,编号为 C11995500BT),胎牛血清(Excell Bio,编号为 FSP500),PBS 缓冲液、胰蛋白酶(北京 Solarbio 公司,编号分别为 P1020、T1300),青霉素-链霉素溶液(中国上海碧云天生物技术有限公司,编号为 C0222)。KOU 购自上海陶术生物科技有限公司(编号为 T5S0661,纯度:99.45%),钩吻生药材购自玉林市银丰国际中药港,经广西国际壮医医院壮瑶医药研究实验室陈少峰副主任药师鉴定为钩吻。从钩吻生药材中提取 TAG[10],将 TAG 和 KOU 分别溶解于二甲基亚砜中,配制成浓度为 4 g/mL 的储存液,4 ℃避光保存。

1.3 活细胞动态分析系统拟合细胞融合度及观察细胞凋亡形态

根据本课题组前期的工作,TAG 作用 A549、SPCA1 细胞的低、中、高浓度依次为 50、100、150 μg/mL,因此将 KOU 作用于 A549、SPCA1 细胞的低、中、高浓度依次确定为 100、150、200 μg/mL(KOU-L、KOU-M、KOU-H)。将处于对数生长期的 A549、SPCA1 细胞以 4 000 个/孔接种于 96 孔板,于培养箱中培养至细胞贴壁生长,以不加 KOU 为对照组,不同浓度的 KOU 作为实验组处理细胞,每组设置 3 个重复孔,将 96 孔板置于活细胞动态分析系统中动态检测 48 h,系统根据细胞融合度拟合 EC50 值及观察细胞凋亡形态。

1.4 集落形成实验

将处于对数生长时期的 A549、SPCA1 细胞,重悬细胞后使用细胞计数仪进行计数,调整细胞密度以 2 500 个/孔接种于 12 孔板中,于 37 ℃、5% CO_2 的培养箱培养至合适克隆团时,以不加 KOU 为对照组,不同浓度的 KOU(100、150、200 μg/mL)作为给药组处理细胞 48 h,每组设置 3 个重复孔,结晶紫染色。扫描仪扫描 12 孔板,用 Photoshop 软件对克隆团进行计数。

1.5 肺癌细胞小鼠移植瘤模型

1.5.1 动物模型建立及肿瘤测量 从广西中医药大学购买 5 周龄的雌性 BALB/C 裸鼠,适应性喂养 7 d 后,将处于对数生长期的 LLC 细胞用 DMEM 培养基和基质胶配置为 5×10^6/mL 的细胞悬液,按照 0.15 mL/只接种于小鼠皮下后肋部,构建肺癌细胞小鼠移植瘤模型。肿瘤细胞接种数天后,当瘤体体积超过 150 mm^3 时按照小鼠体质量简单随机分为 4 组:Model 组、CTX 组(剂量为 20 mg/kg)、KOU 组(剂量为 2 mg/kg)和 TAG 组(剂量为 0.5mg/kg),CTX 组和 KOU 组、TAG 组按 0.1 mL/10 g 隔天腹腔注射,给药 10 d。每 2 天测量肿瘤大小,解剖当日分别称取小鼠体质量,肿瘤质量及测量肿瘤体积。肿瘤体积=长×宽^2/2,肿瘤抑制率=(1-实验组肿瘤质量/模型组肿瘤质量)×100%,动物研究方案由广西中医药大学动物伦理委员会审查和批准(DW20230302-029-01),所有程序遵循相关法规和指南。

1.5.2 HE 染色 用 4%多聚甲醛固定瘤体至少 24 h,制作成石蜡切片进行 HE 染色。使用苏木精染料进行染色 3 min,流水稍洗去染料;用 0.1%盐酸乙醇进行分化,自来水洗去多余染料;苏木精反蓝液反蓝 20 min,自来水清洗;伊红液染色 5 min,染色完成后洗去多余染料,将切片依次放入 75%、85%乙醇、无水乙醇Ⅰ、无水乙醇Ⅱ中脱水,各 5 min,取出来稍晾干,中性树胶封片,进行镜检和图片采集。

1.5.3 免疫组化染色 将石蜡切片脱蜡至水,之后将组织切片置于盛满柠檬酸抗原修复缓冲液(pH6.0)的修复盒中于微波炉内进行抗原修复,自然冷却后将玻片置于 PBS(pH=7.4)中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5 min。阻断内源性过氧化物酶后,在组化圈内滴加 3% BSA 均匀覆盖组织,室温封闭 30 min。轻轻甩掉封闭液,在切片上滴加按 1∶50 配好的 Ki-67 抗体,切片平放于湿盒内 4 ℃ 孵育过夜。切片稍甩干后在圈内滴加与一抗相应种属的二抗(HRP 标记)覆盖组织,室温孵育 50 min。玻片置于 PBS 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5 min。切片稍甩干后在圈内滴加新鲜配制的 DAB 显色液,显微镜下控制显色时间,阳性为棕黄色,自来水冲洗切片终止显色。复染细胞核进行脱水封片,显微镜镜检,图像采集分析。

1.5.4 TUNEL 染色 将石蜡切片脱蜡至水,之后

修复、破膜,阻断内源性过氧化物酶后,切片稍甩干在圈内滴加 buffer 覆盖组织,去掉平衡液后,按照 Recombinant TdT enzyme∶Biotin-dUTP Labeling Mix∶Equilibration Buffer=1 μL∶5 μL∶50 μL 比例混合,切片平放于湿盒内,37 ℃孵育 1 h。洗涤玻片后,Streptavidin-HRP 和 TBST 按 1∶200 比例混合,切片平放于湿盒内,37 ℃温箱孵育 30 min,切片甩干后在圈内滴加新鲜配制的 DAB 显色液,显微镜下控制显色时间,阳性的细胞核呈棕黄色,纯水冲洗切片终止显色,苏木精复染细胞核、脱水封片后镜检、拍照。

1.6 转录组学

选用 A549 细胞为样本,分为对照组和 TAG 给药组,用 TRIzol 试剂从细胞中提取总 RNA,采用琼脂糖凝胶电泳、Qubit4.0 荧光计和 Qsep400 生物分析仪对样本 RNA 进行检测,从总 RNA 中去除核糖体 RNA,从而得到 mRNA。加入 fragmentation buffer 将 RNA 打断成短片段,以短片段 RNA 为模板,用六碱基随机引物合成第 1 链 cDNA,然后加入缓冲液、dNTPs(dUTP、dATP、dGTP 和 dCTP)和 DNA polymerase Ⅰ合成第 2 链 cDNA,利用 AMPure XP beads 纯化双链 cDNA。纯化的双链 cDNA 再进行末端修复、加 A 尾并连接测序接头,用 AMPure XP beads 进行片段大小选择,进行 PCR 富集得到最终的 cDNA 文库。q-PCR 方法对文库的有效浓度进行准确定量(文库有效浓度>2 nmol/L),完成库检。库检合格后,不同文库按照目标下机数据量进行 pooling,用 Illumina 平台进行测序。对照组和 TAG 给药组差异基因的筛选条件为 $|\log_2(\text{Fold Change})|\geqslant 1$,且 FDR<0.05。

1.7 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction,real-time-qPCR)实验

选择生长状态良好的 A549 细胞,分别给予高浓度的 KOU 和 TAG 药物处理后放置细胞培养箱中培养 48 h,收集细胞后采用 RNA 提取试剂盒提取 RNA,用超微量分光光度计测 RNA 浓度,使用 HiScript Ⅲ ALL-in-one RT SuperMix Perfect for qPCR 试剂盒进行逆转录,之后使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒进行 PCR 扩增,以 GAPDH 作为内参对照。实验中所采用的 miRNA 引物由武汉赛维尔生物科技有限公司设计与合成。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 mRNA 的相对水平,引物序列见表 1。

1.8 统计学分析

使用 GraphPad Prism 9.5 软件进行统计分析,连续型数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 引物相关序列

基因名称	引物序列(5′→3′)
GADD34	正向:CGCCCAGAAACCCCTACTCAT
	反向:GATGGGGGCTAAAGGTGGGT
ZFP36	正向:TGACTGCCATCTACGAGAGCCT
	反向:AAGTGGGTGAGGGTGACAGC
GADD45A	正向:AGAAGACCGAAAGCGACCCC
	反向:GATGTTGATGTCGTTCTCGCAG
GADD45B	正向:ACATCAACATCGTGCGGGTG
	反向:GGGTTCGTGACCAGGAGACAAT
TP53INP2	正向:TTGGATCACAGAGAGGGCG
	反向:CTGTCCGGCAGGTCAATGAT
GAPDH	正向:GGAAGCTTGTCATCAATGGAAATC
	反向:TGATGACCCTTTTGGCTCCC

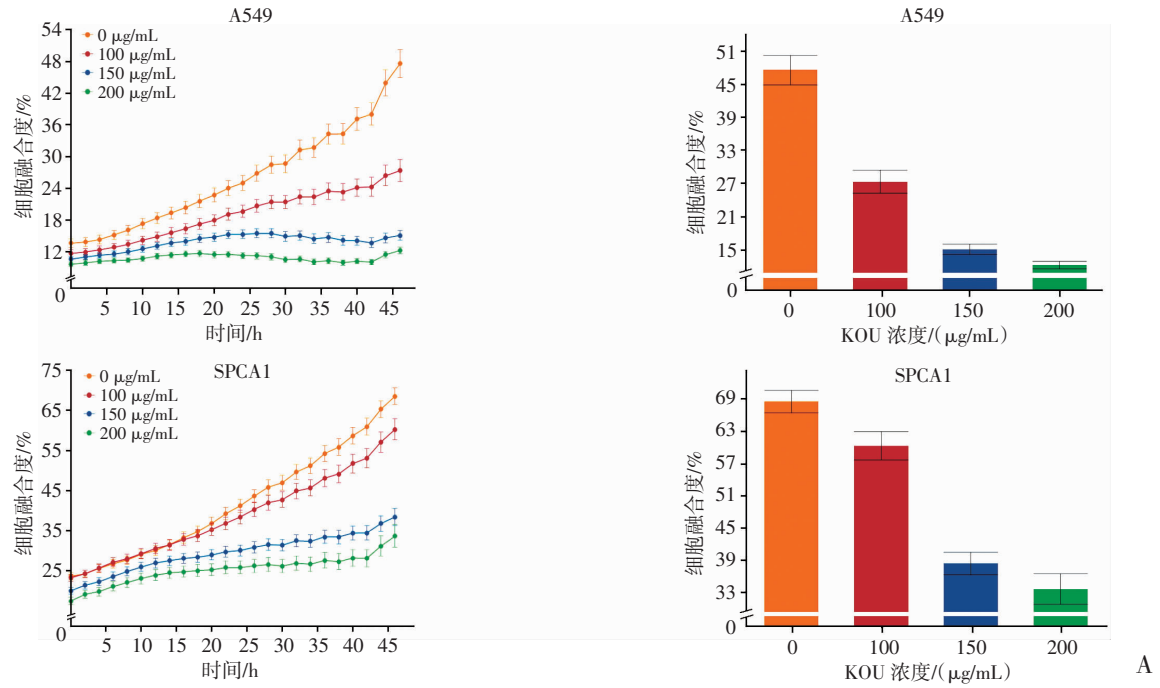
2 结果

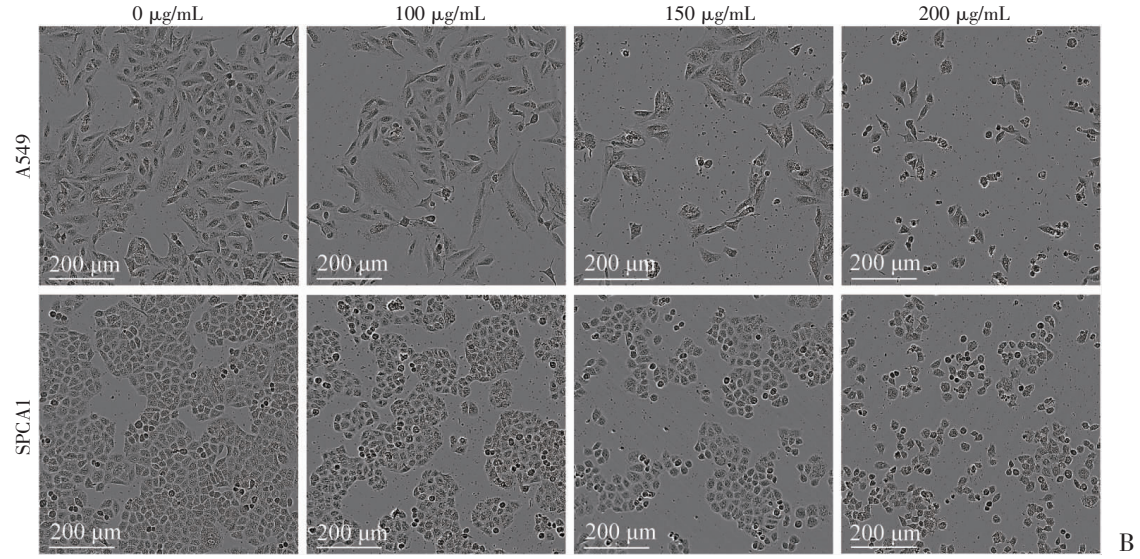
2.1 KOU 抑制肺癌细胞增殖

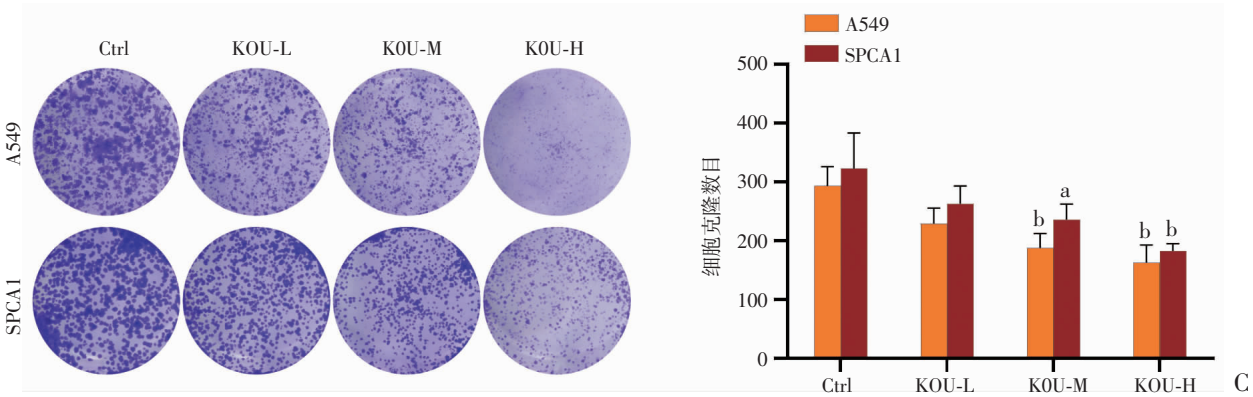
如图 1A、B 所示,活细胞动态分析系统拟合细胞融合度统计图及进行细胞拍照,发现随着 KOU 浓度的升高,A549、SPCA1 的细胞融合度逐渐降低,并且细胞数变少、形态逐渐变小变圆、生长状态变差。集落形成实验证实低、中、高浓度的 KOU 抑制 A549、SPCA1 细胞增殖,使细胞克隆数目减少,并具有一定的剂量依赖性(图 1C)。

2.2 KOU 和 TAG 抑制肺癌实体瘤的生长

为了研究 KOU 和 TAG 在体内抑制肺癌的作用,构建肺癌细胞小鼠移植瘤模型。与对照组相比,KOU、TAG 给药组均具有抑制肺癌实体瘤生长的作用(图 2A、B),解剖当日数据发现,与阳性对照药物 CTX 组的肿瘤抑制率 43.34%相比,KOU、TAG 给药组的肿瘤抑制率可达 24.55%、36.08%,且 KOU、TAG 组的小鼠体质量、肿瘤质量及体积均较 Model 组有不同程度的下降(图 2C~E)。另外发现,与 KOU 组相比,TAG 组的抑瘤作用更明显(图 2B、D、E)。HE 染色发现给药组肿瘤组织中存在大量的坏死细胞、核固缩和核碎裂,肿瘤组织的坏死面积显著大于 Model 组,肿瘤坏死组织周围水肿,细胞间隙显著加宽;Ki-67 的 IHC 结果显示,Model 组显色较强,呈棕褐色,给药组着色较浅,无着色或呈淡黄色,说明给药组的肿瘤增殖能力低于 Model 组;TUNEL 检测发现,Model 组肿瘤组织呈淡黄色或无着色,KOU、TAG 组的阳性显色较强,呈现棕黄色、棕褐色,提示给药组肿瘤组织的细胞发生凋亡更明显(图 2F)。以上结果表明 KOU 和 TAG 在体内和体外均具有显著的抑制肺癌作用。



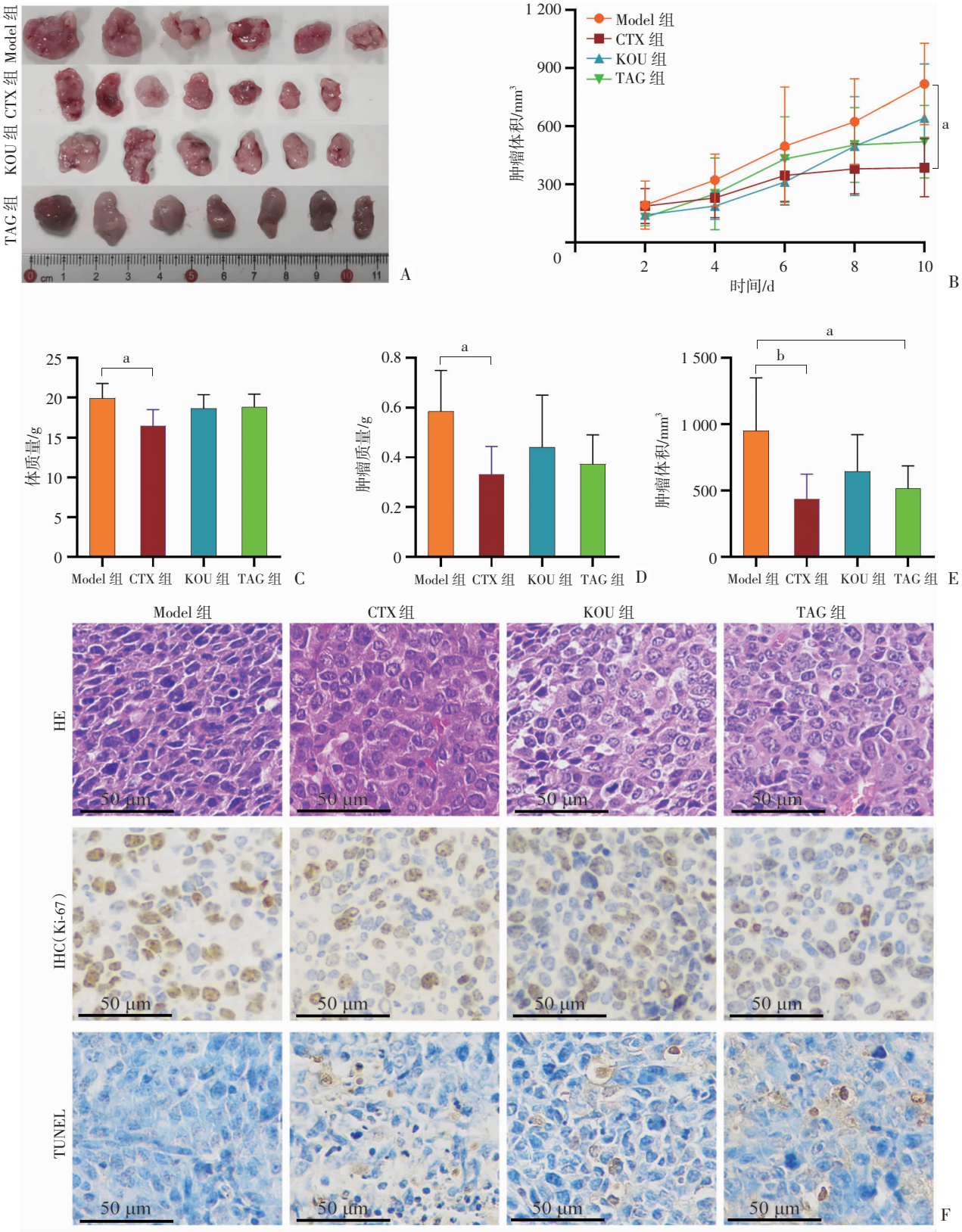




a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 Ctrl 组比较

A:KOU 不同浓度和时间作用细胞后融合度的改变;B:KOU 不同浓度对细胞形态的影响;C:KOU 对细胞克隆的影响

图 1 KOU 对肺癌细胞增殖及形态的影响



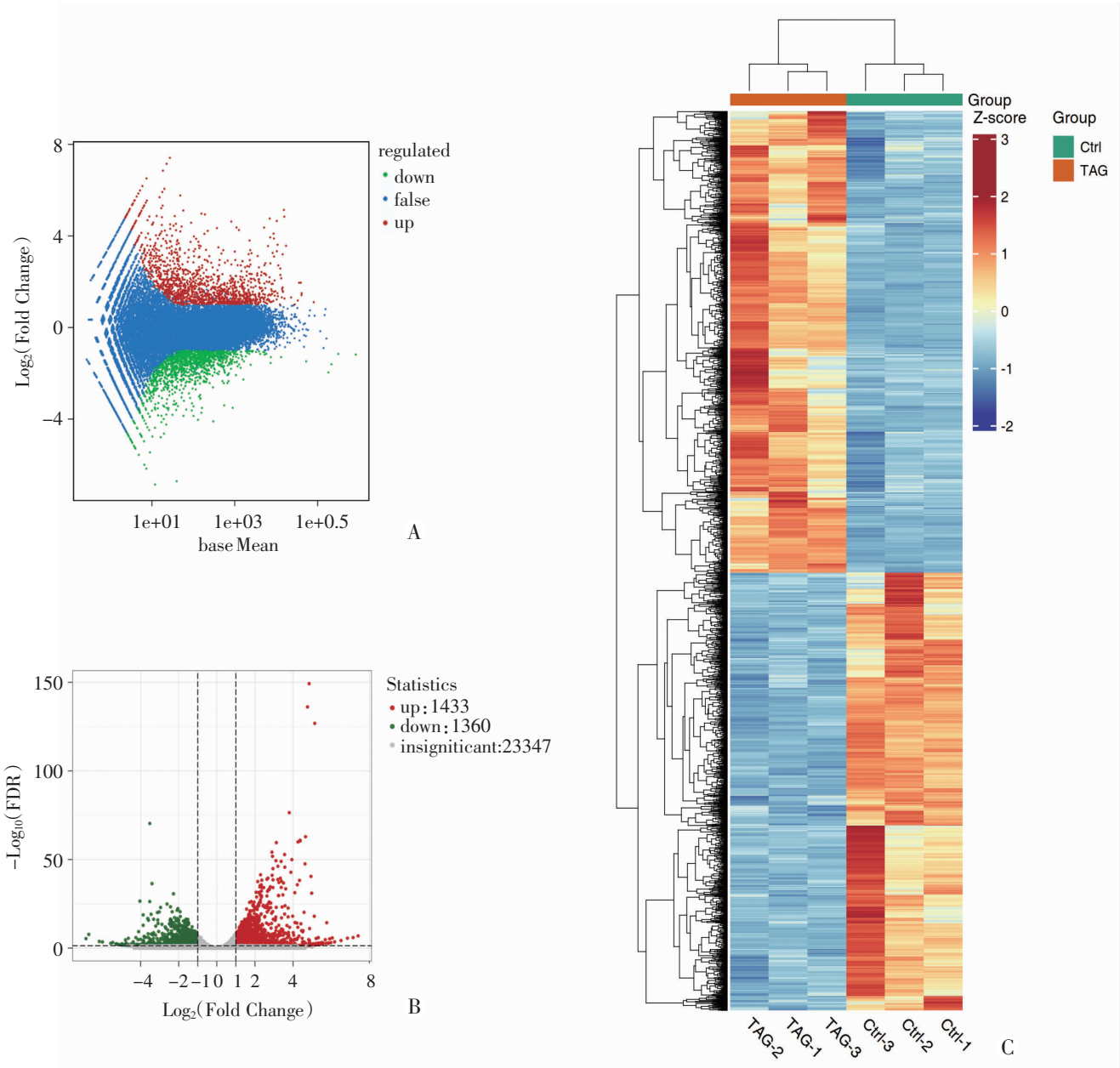
a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

A:KOU 和 TAG 对 LLC 肺癌小鼠实体瘤的观察;B:给药后肿瘤体积变化;C~E:解剖当日小鼠体质量、肿瘤质量及肿瘤体积的结果;F:肿瘤组织 HE、IHC 及 TUNEL 染色结果

图 2 钩吻生物碱对肺癌实体瘤的影响

2.3 DEGs 相关分析

DEGs 分析结果统计得到的 DEGs 总数为 2 793 个,其中上调基因 1 433 个,下调基因 1 360 个。通过 MA 图可直观地展示基因的表达水平和差异倍数的整体分布(图 3A),根据火山图可以看出 TAG 组和 Ctrl 组之间差异基因的显著性大小(图 3B),使用 Z-score 对 DEGs 进行标准化处理后绘制得到聚类热图(图 3C)。根据筛选出的 DEGs 中按照*P* 值由小到大排列前 20 DEGs 分别是 PPP1R15A、PIM3、ZFP36、TSC22D3、CACNG8、DUSP5、HSPA1B、H2BC21、FOS、SLC2A3、NR1D1、INSIG1、ENSG00000290792、HSPA1A、CCNL1、DDIT3、ENSG00000249007、GADD45B、ELF3、MAFF,详见表 2。



A:DEGs MA 图;B:DEGs 火山图;C:DEGs 聚类热图

图 3 DEGs 分析图

表 2 根据 P 值由小到大前 20 的 DEGs

基因序列	基因名称	log_2(FoldChange)	*P* 值	调节
ENSG00000087074	PPP1R15A	4.84	2.71E-154	上调
ENSG00000198355	PIM3	4.76	7.48E-141	上调
ENSG00000128016	ZFP36	5.14	2.17E-131	上调
ENSG00000157514	TSC22D3	3.80	7.08E-81	上调
ENSG00000142408	CACNG8	-3.51	1.20E-74	下调
ENSG00000138166	DUSP5	4.65	4.38E-67	上调
ENSG00000204388	HSPA1B	4.37	4.51E-65	上调
ENSG00000184678	H2BC21	4.37	1.42E-64	上调
ENSG00000170345	FOS	4.26	5.49E-64	上调
ENSG00000059804	SLC2A3	3.12	1.54E-63	上调
ENSG00000126368	NR1D1	2.89	3.94E-58	上调
ENSG00000186480	INSIG1	3.56	9.66E-57	上调
ENSG00000290792	ENSG00000290792	2.92	1.07E-55	上调
ENSG00000204389	HSPA1A	3.94	8.13E-54	上调
ENSG00000163660	CCNL1	3.10	3.51E-53	上调
ENSG00000175197	DDIT3	3.38	9.55E-53	上调
ENSG00000249007	ENSG00000249007	4.63	2.52E-51	上调
ENSG00000099860	GADD45B	3.20	6.14E-50	上调
ENSG00000163435	ELF3	3.57	2.09E-49	上调
ENSG00000185022	MAFF	2.95	1.46E-48	上调

2.4 DEGs KEGG 富集分析

将筛选得到的 DEGs 进行 KEGG 富集分析,选取富集分析结果中 Q 值最低的 50 个 KEGG 通路绘制富集条目柱形图,发现 DEGs 主要参与细胞过程中的细胞衰老、程序性坏死;环境信息过程中的 MAPK 信号通路、细胞因子与其受体相互作用及肿瘤坏死因子信号通路;基因信息中的内质网蛋白过程;人类疾病中的脂质与动脉粥样硬化、EB 病毒感染、沙门氏菌感染、大肠埃希氏菌感染及癌症转录失调;代谢中的脂肪酸代谢;生物系统中的 IL-17 信号通路等(图 4A)。根据 Rich factor、Q 值和富集到此通路上的差异基因个数来绘制气泡图(图 4B),其中较显著的通路包括 IL-17 信号通路、肿瘤坏死因子信号通路及 p53 信号通路等。

2.5 DEGs GO 富集分析

将 DEGs 进行 GO 功能富集分析,发现 DEGs 主要富集在生物过程中的细胞过程、生物调控及代谢过程;细胞组成中的细胞解剖学实体,含蛋白质复合物;分子功能中的结合、催化活性及转录调节活性等(图 5A)。气泡图显示 DEGs 主要富集在 DNA 结合抑制转录活动、对温度刺激的反应、RNA 聚合酶Ⅱ特异的 DNA 结合转录抑制和促进活性等 GO 条目(图 5B)。

2.6 钩吻生物碱促进相关基因的表达

通过 DEGs 分析,选取了 GADD34、ZFP36、GADD45A、GADD45B、TP53INP2 等 5 个表达升高的基因进一步验证,经实验分析得知 RT-qPCR 结果与转录组学分析结果一致。TAG 组中 GADD34、GADD45A、GADD45B 及 TP53INP2 基因的表达较 Ctrl 组显著升高($P<0.01$),GADD34、GADD45A 和 GADD45B 的表达较 KOU 组显著增加($P<0.01$),见图 6。

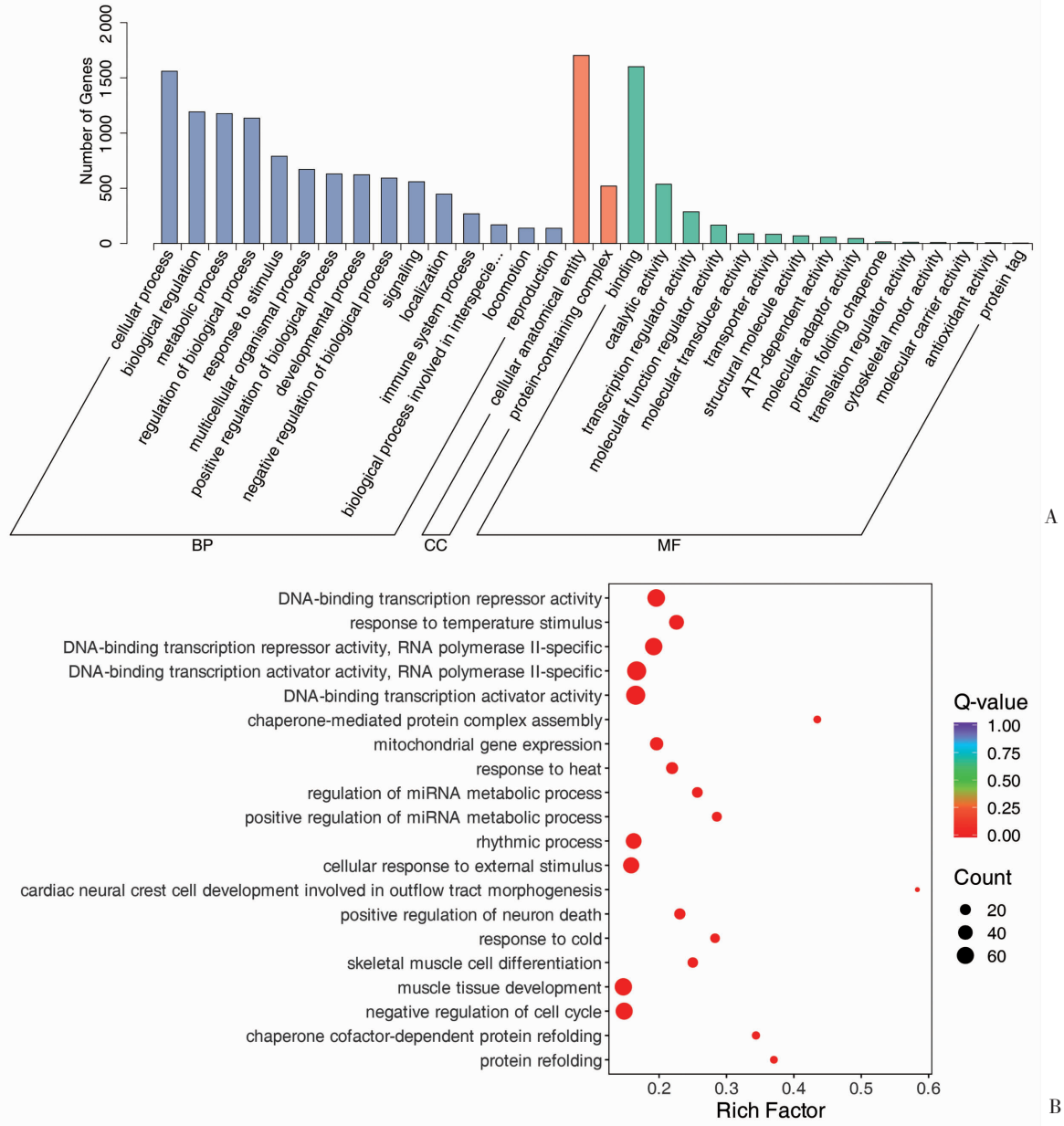
3 讨论

本课题组前期研究发现 TAG 具有抑制肺癌细胞 A549、SPCA1 增殖且促进其凋亡的作用,在此基础上,本研究进一步利用体内动物实验和转录组学等实验技术探究钩吻生物碱对肺癌的作用机制。动物实验设置了 TAG 和 KOU 2 种药物治疗组,结果发现 2 种药物都具有抗癌作用,且 TAG 组比 KOU 组的抗癌作用显著。但植物钩吻具有较强的毒性,口服可致中毒,主要表现



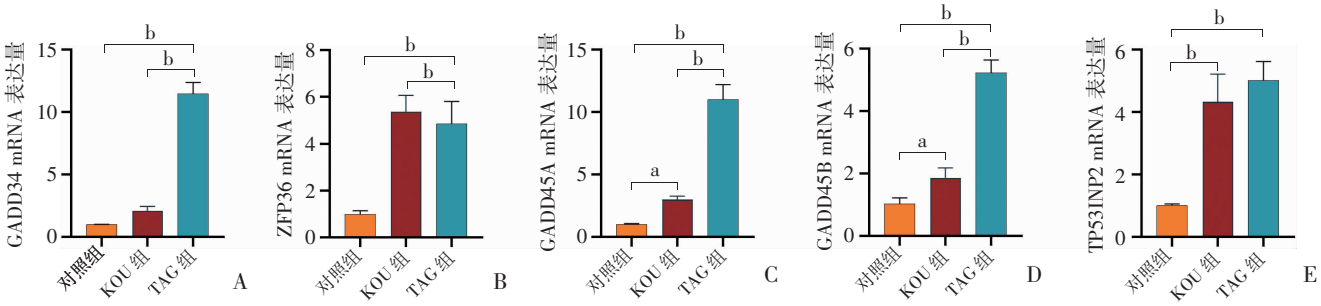
A:DEGs KEGG 富集条目柱形图;B:DEGs KEGG 富集分析气泡图

图 4 KEGG 富集分析



A:DEGs GO 分类柱状图;B:DEGs GO 富集分析气泡图

图 5 GO 富集分析



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

A:GADD34;B:ZFP36;C:GADD45A;D:GADD45B;E:TP53INP2

图 6 钩吻生物碱对相关基因表达量的影响

为神经系统、消化系统、循环系统及呼吸系统等一系列中毒症状[4],TAG作为从植物钩吻中提取到的钩吻总碱复合物,其毒性要比钩吻生物碱化合物KOU高,因此在研究钩吻生物碱抗肿瘤疗效的同时,开发高效低毒的生物碱化合物及其衍生物显得非常必要,并且需要更多的体内实验和临床试验来研究生物碱的抗肿瘤疗效及安全性。

本研究转录组学DEGs数据中,PPP1R15A即蛋白磷酸酶1调节亚基15A,是哺乳动物综合应激反应的关键因子,可能在肿瘤发生中起关键作用。在应激性生长停滞和DNA损伤剂处理的条件下PPP1R15A的转录水平会增加,该基因诱导细胞生长停滞和DNA损伤诱导蛋白34(GADD34)的表达,而GADD34的激活属于凋亡信号通路中的下游,可直接促进凋亡过程的发生[11]。有学者通过分析小鼠肿瘤模型的单细胞转录组数据,发现PPP1R15A的抑制剂Sephin1处理后会减少抗肿瘤免疫细胞类型和降低细胞毒性相关基因表达水平,可导致更高水平的综合应激反应活性和更低水平的抗肿瘤免疫活性,且Sephin1可抑制肿瘤特异性T细胞的克隆性扩增[12],这意味着PPP1R15A发挥关键的抗肿瘤作用,提示PPP1R15A可能成为肿瘤治疗的有效靶点。传统中药红景天苷具有抗缺氧、抗衰老、抗肿瘤及抗疲劳的作用,在脓毒症相关急性肺损伤的大鼠模型中,红景天苷通过抑制内质网应激靶向PPP1R15A改善脓毒症相关肺损伤,PPP1R15A在脓毒症模型中表达降低,而红景天苷增加PPP1R15A的表达,沉默PPP1R15A可逆转红景天苷对细胞活力、凋亡和内质网应激的影响[13]。

ZFP36是一种RNA结合蛋白,虽然ZFP36最初被描述为炎症反应的重要调节因子,但越来越多的研究表明,与正常细胞相比,在癌细胞中ZFP36表达是较少的[14],可通过干扰不同的途径提高其表达来抑制恶性肿瘤进展[15-17]。ZFP36和该基因家族的其他成员如ZFP36L1,能够诱导降解编码癌基因的mRNA。有学者通过实验证明ZFP36的高表达能够减少肝细胞癌的生长并增加肝癌细胞和小鼠异种移植模型中对氟尿嘧啶的化疗敏感性[18],另外ZFP36的过表达可降低体外上皮间充质转化和克隆形成,并促进对阿霉素或索拉非尼的化疗敏感性,进一步提示上调ZFP36对肝癌细胞化疗敏感性起积极作用[19]。

生长停滞和DNA损伤诱导(GADD)45家族包括3种普遍分布的小蛋白(GADD45A、GADD45B和GADD45G),它们参与应激信号传导和损伤反应相关的许多细胞过程[20],且GADD45基因家族在抗肿瘤免疫反应中发挥重要的作用[21]。GADD45A是一种公认的肿瘤抑制因子,能够在多个水平上延缓甚至预防肿瘤发生,在调节细胞凋亡方面发挥了重要作用,同时也参与DNA修复并抑制细胞迁移,避免受损细胞转化为恶性细胞[22]。许多肿瘤中的GADD45A蛋白水平降低,并且几种肿瘤抑制因子可诱导其转录[20]。GADD45A表达水平与食管鳞状细胞癌患者较高的生存率和更好的预后呈正相关[23],甚至有学者提出,血清中GADD45A蛋白的水平可作为预测胃癌患者辅助化疗后的反应和生存率的生物标志物[24]。橙皮苷(hesperadin)被认为具有抗肿瘤作用,有学者通过转录组分析发现,GADD45A是橙皮苷抗胰腺癌的潜在靶标,橙皮苷通过ATF4增加胰腺癌细胞中GADD45A的表达,从而导致癌细胞凋亡[25],也有报道指出苦参碱通过促进GADD45B的表达来抑制前列腺癌的进展,提高患者生存率[26]。在本研究转录组学数据中给药组GADD45A、GADD45B、GADD45G均表达上升,且均是差异表达基因,这与上述文献研究结果一致,通过RT-qPCR验证结果显示,在KOU和TAG组中GADD45A和GADD45B的表达相较于Ctrl组显著增加($P<0.05$),提示其或许是钩吻生物碱治疗肺癌的潜在治疗靶点。

最后,本研究从体内、外实验角度验证KOU和TAG的抗肺癌疗效,并采取转录组学技术探究TAG抑制肺癌作用的相关差异基因的表达,为后续研究钩吻生物碱抗肿瘤作用及机制提供新的见解,同时也为开发新的抗肿瘤化疗药物提供参考。

参考文献:

[1] THANDRA K C, BARSOUK A, SAGINALA K, *et al*. Epidemiology of lung cancer[J]. Contemp Oncol (Pozn), 2021,25(1):45-52. DOI: 10.5114/wo.2021.103829.

[2] 李伟伟, 曹强, 杨扬. 中医药对未放化疗晚期非小细胞肺癌患者生活质量的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2018, 27(30): 3392-3395. DOI: 10.3969/j.issn.1008-8849.2018.30.027.
LI W W, CAO Q, YANG Y. Effect of traditional Chinese medicine on quality of life of patients with advanced non-small cell lung cancer without radiotherapy and chemotherapy[J].

Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2018, 27(30): 3392-3395. DOI: 10.3969/j.issn.1008-8849.2018.30.027.

[3] LIN H L, QIU H Q, CHENG Y, *et al*. *Gelsemium elegans* Benth: chemical components, pharmacological effects, and toxicity mechanisms[J]. Molecules, 2021, 26(23): 7145. DOI: 10.3390/molecules26237145.

[4] 孙铭学, 徐庆强, 孟文琪, 等. 钩吻药理及毒理机制研究进展[J]. 毒理学杂志, 2020, 34(4): 336-341. DOI: 10.16421/j.cnki.1002-3127.2020.04.013.
SUN M X, XU Q Q, MENG W Q, *et al*. Research progress on pharmacology and toxicological mechanism of *Gelsemium elegans*[J]. J Toxicol, 2020, 34(4): 336-341. DOI: 10.16421/j.cnki.1002-3127.2020.04.013.

[5] 黄静, 苏燕评, 俞昌喜, 等. 钩吻生物碱化合物体外抗消化系统肿瘤的活性[J]. 海峡药学, 2010, 22(3): 197-200. DOI: 10.3969/j.issn.1006-3765.2010.03.106.
HUANG J, SU Y P, YU C X, *et al*. Cytotoxic effects of alkaloidal compounds from *Gelsemium elegans* Benth on the tumor cells of digestive system *in vitro*[J]. Strait Pharm J, 2010, 22(3): 197-200. DOI: 10.3969/j.issn.1006-3765.2010.03.106.

[6] 林满遍, 陈亮, 吴水生. 钩吻总碱对人结肠癌细胞增殖、凋亡的影响及其机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(4): 149-153. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.2018040149.
LIN M B, CHEN L, WU S S. Effect and mechanism of total alkaloids of gelsmium elegans on human colonic carcinoma cells proliferation and apoptosis[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2018, 24(4): 149-153. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.2018040149.

[7] 王文义, 檀兴慧, 张萍萍, 等. 钩吻总碱抑制人结肠癌细胞增殖及血管新生的作用研究[J]. 中国药房, 2020, 31(8): 957-962. DOI: 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.08.11.
WANG W Y, TAN X H, ZHANG P P, *et al*. Study on inhibitory effects of total alkaloids of *Gelsemium elegans* on the proliferation and angiogenesis of human colon cancer cells[J]. China Pharm, 2020, 31(8): 957-962. DOI: 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.08.11.

[8] 魏薇, 唐祎, 代婧, 等. 钩吻总碱通过 JAK2/STAT3/Survivin 通路调控人舌癌细胞株 Tca8113 增殖、凋亡的作用探讨[J]. 临床和实验医学杂志, 2020, 19(2): 140-144. DOI: 10.3969/j.issn.1671-4695.2020.02.008.
WEI W, TANG Y, DAI J, *et al*. Effects of *Gelsemium elegans* Benth on proliferation and apoptosis of human tongue cancer cell line Tca8113 via by the regulation JAK2/STAT3/Survivin pathway[J]. J Clin Exp Med, 2020, 19(2): 140-144. DOI: 10.3969/j.issn.1671-4695.2020.02.008.

[9] 赵雅婷, 武淑鹏, 胡春丽, 等. 钩吻的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(3): 200-210. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20182118.
ZHAO Y T, WU S P, HU C L, *et al*. Reviews on chemical compositions and pharmacological effect of *Gelsemium elegans*[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2019, 25(3): 200-210. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20182118.

[10] ZHANG W, ZHANG S Y, WANG G Y, *et al*. Five new koumine-type alkaloids from the roots of *Gelsemium elegans*[J]. Fitoterapia, 2017, 118: 112-117. DOI: 10.1016/j.fitote.2017.03.004.

[11] HOLLANDER M C, SHEIKH M S, YU K, *et al*. Activation of Gadd34 by diverse apoptotic signals and suppression of its growth inhibitory effects by apoptotic inhibitors[J]. Int J Cancer, 2001, 96(1): 22-31. DOI: 10.1002/1097-0215(20010220)96: 122: aid-ijc3>3.0.co;2-k.

[12] WANG R J, ZHANG Y C, GUO S W, *et al*. Single-cell RNA sequencing reveals the suppressive effect of PPP1R15A inhibitor Sephin1 in antitumor immunity[J]. iScience, 2023, 26(2): 105954. DOI: 10.1016/j.isci.2023.105954.

[13] JIANG L, XU L Y, ZHENG L Z, *et al*. Salidroside attenuates sepsis-associated acute lung injury through PPP1R15A mediated endoplasmic reticulum stress inhibition[J]. Bioorg Med Chem, 2022, 71: 116865. DOI: 10.1016/j.bmc.2022.116865.

[14] BRENNAN S E, KUWANO Y, ALKHAROUF N, *et al*. The mRNA-destabilizing protein tristetraprolin is suppressed in many cancers, altering tumorigenic phenotypes and patient prognosis[J]. Cancer Res, 2009, 69(12): 5168-5176. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4238.

[15] GRISERI P, BOURCIER C, HIEBLOT C, *et al*. A synonymous polymorphism of the Tristetraprolin (*TTP*) gene, an AU-rich mRNA-binding protein, affects translation efficiency and response to Herceptin treatment in breast cancer patients[J]. Hum Mol Genet, 2011, 20(23): 4556-4568. DOI: 10.1093/hmg/ddr390.

[16] CHA H J, LEE H H, CHAE S W, *et al*. Tristetraprolin downregulates the expression of both VEGF and COX-2 in human colon cancer[J]. Hepatogastroenterology, 2011, 58(107/108): 790-795.

[17] BAOU M, JEWELL A, MUTHURANIA A, *et al*. Involvement of Tis11b, an AU-rich binding protein, in

induction of apoptosis by rituximab in B cell chronic lymphocytic leukemia cells[J]. Leukemia, 2009, 23(5): 986-989. DOI: 10.1038/leu.2008.340.

[18] CHEN W Q, CHEN M J, ZHAO Z W, *et al*. ZFP36 binds with PRC1 to inhibit tumor growth and increase 5-fu chemosensitivity of hepatocellular carcinoma[J]. Front Mol Biosci, 2020, 7: 126. DOI: 10.3389/fmolb.2020.00126.

[19] KRÖHLER T, KESSLER S M, HOSSEINI K, *et al*. The mRNA-binding protein TTP/ZFP36 in hepatocarcinogenesis and hepatocellular carcinoma[J]. Cancers, 2019, 11(11): 1754. DOI: 10.3390/cancers11111754.

[20] SALVADOR J M, BROWN-CLAY J D, JR FORNACE A J. Gadd45 in stress signaling, cell cycle control, and apoptosis[J]. Adv Exp Med Biol, 2013, 793: 1-19. DOI: 10.1007/978-1-4614-8289-5_1.

[21] JU S G, ZHU Y B, LIU L, *et al*. Gadd45b and Gadd45g are important for anti-tumor immune responses[J]. Eur J Immunol, 2009, 39(11): 3010-3018. DOI: 10.1002/eji.200839154.

[22] CRETU A, SHA X J, TRONT J, *et al*. Stress sensor Gadd45 genes as therapeutic targets in cancer[J]. Cancer Ther, 2009, 7(A): 268-276.

[23] ISHIGURO H, KIMURA M, TAKAHASHI H, *et al*. GADD45A expression is correlated with patient prognosis in esophageal cancer[J]. Oncol Lett, 2016, 11(1): 277-282. DOI: 10.3892/ol.2015.3882.

[24] NAPIERALSKI R, OTT K, KREMER M, *et al*. Combined GADD45A and thymidine phosphorylase expression levels predict response and survival of neoadjuvant-treated gastric cancer patients[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(8): 3025-3031. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1605.

[25] ZHANG Y X, WU J Z, FU Y, *et al*. Hesperadin suppresses pancreatic cancer through ATF4/GADD45A axis at nanomolar concentrations[J]. Oncogene, 2022, 41(25): 3394-3408. DOI: 10.1038/s41388-022-02328-4.

[26] HUANG H, WANG Q, DU T, *et al*. Matrine inhibits the progression of prostate cancer by promoting expression of GADD45B[J]. Prostate, 2018, 78(5): 327-335. DOI: 10.1002/pros.23469.

(**收稿**:2024-03-28;**修回**:2024-05-31)

(编辑 汪勤俭)