

红芪蜜炙前后配伍醋莪术对肺癌细胞凋亡、自噬的影响

马定财^{1,2},王哲^{1,2},王毛毛^{1,2},
张育贵^{1,2},辛二旦^{1,2},边甜甜^{1,2},刘婷^{1,2},李越峰^{2*}

¹甘肃中医药大学药学院;²甘肃中医药大学科研实验中心,兰州 730000

摘要:研究炙红芪-醋莪术(honey processed Hedysari Radix-vinegar-processed Curcumae Rhizoma, HPHR-VPCR)和红芪-醋莪术(Hedysari Radix-vinegar-processed Curcumae Rhizoma, HR-VPCR)对 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞凋亡和自噬的影响,并探讨 HPHR-VPCR 诱导凋亡和自噬的机制。将 21 只 SPF 级 SD 大鼠随机分为 3 组:空白(control, Con)组、HR-VPCR 组、HPHR-VPCR 组,各药对给药剂量均为 4.63 g/kg,连续给药 7 d 后取含药血清;采用 Hoechst33258 染色检测细胞凋亡形态,流式细胞术检测细胞凋亡率;单丹磺酰尸胺(monodansylcadaverine, MDC)法检测细胞自噬情况;透射电镜检测自噬小体和自噬溶酶体;Western blot 分别检测泛素结合蛋白 P62 (ubiquitin-binding protein P62, P62)、Beclin 1 (beclin 1, BECN1)、B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, BCL-2)、BCL-2 相关 X 蛋白(BCL-2 associated X protein, BAX)蛋白的表达情况。Hoechst33258 和流式细胞术检测结果显示,HR-VPCR 和 HPHR-VPCR 组细胞染色质积累、细胞核浓缩和碎片化严重、凋亡荧光增强、凋亡比例增加;MDC 法检测结果显示,HR-VPCR 和 HPHR-VPCR 组绿色荧光增强,自噬体增加;Western blot 结果显示,与 Con 组比较,HPHR-VPCR 组 P62、BCL-2 蛋白表达显著降低,而 BECN1、BAX 蛋白表达显著升高($P < 0.01$, $P < 0.05$)。综上,HR-VPCR 和 HPHR-VPCR 均可诱导细胞凋亡和自噬,HPHR-VPCR 在诱导细胞凋亡和自噬方面优于 HR-VPCR。HPHR-VPCR 诱导肺癌细胞凋亡和自噬的作用与 P62、BCL-2 降低, BECN1、BAX 表达升高有关。

关键词:红芪-醋莪术;炙红芪-醋莪术;肺癌细胞;凋亡;自噬

中图分类号:R283.1;R285.5

文献标志码:A

文章编号:1001-6880(2026)8-1661-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2026.8.004

CSTR:32307.14.1001-6880.2026.8.004

Effects of Hedysari Radix before and after honey-processing paired with vinegar-processed Curcumae Rhizoma on apoptosis and autophagy of lung cancer cells

MA Ding-cai^{1,2}, WANG Zhe^{1,2}, WANG Mao-mao^{1,2},
ZHANG Yu-gui^{1,2}, XIN Er-dan^{1,2}, BIAN Tian-tian^{1,2}, LIU Ting^{1,2}, LI Yue-feng^{2*}

¹College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine; ²Scientific Research and Experimental Center, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

Abstract: This study aims to compare the effects of honey processed Hedysari Radix-vinegar-processed Curcumae Rhizoma (HPHR-VPCR) and Hedysari Radix-vinegar-processed Curcumae Rhizoma (HR-VPCR) on apoptosis and autophagy in A549 cells and NCI-H1299 cells, and explore the mechanism of HPHR-VPCR inducing apoptosis and autophagy. Twenty-one SPF grade SD rats were randomly divided into three groups: control (Con) group, HR-VPCR group, and HPHR-VPCR group. The dosage of each drug pair was 4.63 g/kg, and the drug containing serum was taken after continuous administration for seven days; Hoechst33258 staining was used to detect cell apoptosis morphology, and flow cytometry was used to detect cell apoptosis rate; The monodansylcadaverine (MDC) method was used to detect cellular autophagy; Transmission electron microscopy was used to detect autophagosomes and autolysosomes; Western blot was used to detect the expression of ubiquitin-binding protein P62 (P62), beclin1 (BECN1), B-cell lymphoma-2 (BCL-2), and BCL-2 associated X protein (BAX) proteins. The

收稿日期:2025-05-26 接受日期:2025-10-21

基金项目:国家自然科学基金(82160750);2024 年甘肃省人才重点项目(2024RCXM77);2024 年高校产业支撑计划(2024CYZC-41);2024 年甘肃省联合科研基金(24JRRA882)

* 通信作者 Tel:86-931-8765585; E-mail:lyftcm@163.com

results of Hoechst33258 and flow cytometry analysis showed that in the groups treated with HR-VPCR and HPHR-VPCR, chromatin accumulation, nuclear concentration and fragmentation were severe, apoptosis fluorescence was enhanced, and the proportion of apoptosis increased; The MDC method detection results showed that the green fluorescence of the HR-VPCR group and HPHR-VPCR group was enhanced, and autophagosomes were increased; The Western blot results showed that compared with the Con group, the expression of P62 and BCL-2 proteins was significantly reduced in HPHR-VPCR group, while the expression of BECN1 and BAX proteins was significantly increased ($P < 0.01$, $P < 0.05$). In summary, both HR-VPCR and HPHR-VPCR can induce cell apoptosis and autophagy. HPHR-VPCR is superior to HR-VPCR in inducing cell apoptosis and autophagy. The induction of apoptosis and autophagy in lung cancer cells by HPHR-VPCR is related to the decrease of P62 and BCL-2, as well as the increase of BECN1 and BAX expression.

Key words: Hedysari Radix-vinegar-processed Curcumae Rhizoma; honey-processed Hedysari Radix-vinegar-processed Curcumae Rhizoma; lung cancer cells; apoptosis; autophagy

肺癌是癌症死亡原因居于首位的恶性肿瘤,其有效治疗是现代医学难题^[1]。细胞自噬与凋亡是细胞程序性死亡的2种方式,自噬和凋亡的相互作用对于肿瘤细胞的整体命运至关重要^[2]。现有化疗药物存在胃肠道疾病、出血耳力损失、肾脏问题以及耐药性等问题,中医药在逆转肺癌化疗耐药、减轻化疗毒性反应方面疗效确切^[3]。莪术药材为姜科植物蓬莪术 *Curcuma phaeocaulis* Val.、广西莪术 *Curcuma kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang 或温郁金 *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling 的干燥根茎^[4]。黄芪莪术药对首出自张锡纯所著的《医学衷中参西录》,其配比是1:1^[5]。现代药理学研究表明,黄芪-莪术药对多集中于治疗肝癌^[6]、结肠癌^[7]、胃癌^[8]、卵巢癌^[9]及肺癌^[10]等。红芪药材为豆科植物多序岩黄芪 *Hedysarum polybotrys* Hand. -Mazz. 的干燥根,与黄芪同科异属。黄芪和红芪功效主治相同,两者既有差异性,也有相似性。在我国陇南地区,红芪多替代黄芪与中药配伍组方治疗疾病。课题组前期研究发现,炙红芪-醋莪术抗结肠炎相关结肠癌药效最佳^[11]。炙红芪-醋莪术在防治结肠炎相关结肠方面优于红芪-醋莪术^[12]。Sun等^[13]研究发现,黄芪-莪术(2:1)在改善肿瘤小鼠体质量效果和抑制肿瘤肝转移方面效果最优。Yuan等^[14]研究发现,黄芪-莪术(2:1)抑制骨肉瘤143B细胞生长的效果最佳。Tan等^[15]研究发现,黄芪-莪术(2:1)抗肿瘤活性的莪术醇、 β -榄香烯等含量最高,抗肿瘤效果较好。综上,黄芪-莪术以及红芪-莪术在抗肿瘤方面疗效确切,红芪蜜炙前后配伍莪术抗肺癌作用未见相关报道,本研究基于凋亡和自噬比较红芪-醋莪术含药血清和炙红芪-醋莪术含药血清对A549细胞和NCI-H1299细胞凋亡和自噬的影响以及可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 药材

红芪采购于甘肃省陇南市武都区米仓山,经甘肃中医药大学药学院中药鉴定教研室王明伟副教授鉴定为豆科植物多序岩黄芪 (*Hedysarum Polybotrys* Hand. -Mazz.) 的干燥根,切片、晾晒后得红芪饮片。

莪术饮片(供货厂家:陇西县徽鑫药业;批号:221006)购买于甘肃中医药大学附属医院,经甘肃中医药大学药学院中药鉴定教研室王明伟副教授鉴定为姜科植物温郁金 *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling 的干燥根茎。

1.2 动物与细胞

21只SPF级雄性SD大鼠,6周龄,体质量220~240g,动物购自甘肃中医药大学SPF级实验动物中心(实验动物生产许可证号SCXK(甘)2021-0001)。动物饲养于甘肃中医药大学实验动物中心SPF实验室(实验动物使用许可证号SYXK(甘)2021-0004),饲养温度18~22℃、湿度50%~70%,光照周期12h/12h。本实验通过甘肃中医药大学实验动物伦理委员会批准(伦理号SY2024-217)。

人肺癌A549细胞、NCI-H1299细胞(目录号:TCHu150、TCHu160,中国科学院细胞库)。

1.3 实验试剂

CCK-8试剂盒(批号:20231012,新赛美生物科技有限公司);Hoechst33258、细胞自噬染色检测试剂盒、Ad-mCherry-GFP-LC3B(批号:C1011、C3018S、C3011,上海碧云天生物科技股份有限公司);泛素结合蛋白P62(ubiquitin-binding protein P62, P62)、 β -氯素1(Beclin 1, BECN1)、B淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, BCL-2)、BCL-2相关X蛋白(BCL-2 associated X protein, BAX)抗体(批号:IPB10029、IPB1342、IPB0341、IPB0172,泰州佰嘉生物科技有限

公司);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、山羊抗兔免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) 二抗(批号:PMK142S、PMK-014-090M,湖北普美生物科技有限公司);3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)(批号:HY-19312;MedChemExpress 公司);高纯度 RNA 提取试剂盒(批号:R40815,北京全式金生物技术股份有限公司);qPCR SYBR Green Master Mix (No Rox)(批号:11201ES60,翌圣生物科技(上海)股份有限公司)。

1.4 实验仪器

CKX41 + DP21 倒置显微镜(日本 Olympus 公司);CPY-180 CO₂ 培养箱(天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司);Axiovert 5 Digital mono 蔡司倒置荧光显微镜(德国卡尔蔡司公司);FACSCelesta 高端分析型流式细胞检测仪(美国 New Discovery 公司);lightcycler96 PCR 仪(德国 Handelsen 公司);DYCZ-40K Western blot 转膜仪、DYCZ-24K Western blot 电泳仪(北京六一生物科技股份有限公司)。

1.5 实验方法

1.5.1 药物的制备

炙红芪的炮制方法采用课题组蜜烘法^[16],醋莪术采用《中华人民共和国药典》2020 年版方法制备^[4]。称取饮片红芪-醋莪术(100 g:50 g)、炙红芪-醋莪术(100 g:50 g),将饮片置于圆底烧瓶中,加入 10 倍量纯水浸泡 0.5 h,采用 Zhang 等^[11]水蒸气蒸馏联合回流法,回流提取 1 h,挥发油提取器收集挥发油,提取 2 次,分别合并两次提取液和挥发油,置 4 ℃ 冰箱备用。提取液经减压浓缩到 0.93 g/mL,置 4 ℃ 冰箱备用。

1.5.2 含药血清的制备

将 21 只 SD 雄性大鼠随机分为含药血清组(红芪-醋莪术、炙红芪-醋莪术)和空白血清组,各组均 7 只。适应性喂养 7 d 后,红芪-醋莪术(Hedysari Radix-vinegar-processed Curcuma Rhizoma, HR-VPCR)、炙红芪-醋莪术(honey processed Hedysari Radix-vinegar-processed Curcuma Rhizoma, HPHR-VPCR)组用 1 mL/100 g 的中药提取液灌胃(按比例加入挥发油,震荡搅拌),空白(control, Con)组给予等量生理盐水,每天灌胃给药 2 次,间隔 6 h,连续 7 d。末次灌胃 1 h 后,0.3% 戊巴比妥钠(40~50 mg/kg)腹腔内注射麻醉后,心脏采血,4 ℃ 静置 2 h,3 000 r/min 离心 10 min,收集血清,同组血清混匀后分装,56 ℃ 灭

活 30 min,0.22 μm 微孔滤膜过滤,-80 ℃ 保存备用。

1.5.3 含药血清浓度筛选

将 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞分别以 5×10^3 个/mL 的细胞密度接种于 96 孔板中,每组设置 3 个复孔,设 HR-VPCR 组和 HPHR-VPCR 组,给药浓度分别是 5%、10%、15%、20%,对照组加入等体积的空白血清。待细胞融合至 60% 左右时,按照上述分组分别加入对应浓度的培养基,培养 48 h 后,加入 CCK-8 溶液,培养箱孵育 20~50 min 后,450 nm 波长处测定吸光度。按公式(1)计算细胞抑制率(I)并筛选最佳给药浓度。

$$I = (A_0 - A_2) / (A_0 - A_1) \times 100\% \quad (1)$$

式中, A_0 为空白孔吸光度; A_1 为对照孔吸光度; A_2 为实验孔吸光度。

1.5.4 Hoechst33258 染色检测细胞凋亡形态

将 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞以 1×10^6 个/mL 铺于 6 孔板中(内置无菌盖玻片),分为 Con 组、HR-VPCR 组、HPHR-VPCR 组,干预 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞 48 h,PBS 洗涤 1 次后,每孔用 0.5 mL 4% 组织细胞固定液室温固定约 15 min,室温下用 Hoechst33258 5 μg/mL 染色约 15 min,PBS 洗涤 2~3 遍,载玻片上滴入少量甘油,将染色的爬片细胞放在载玻片上,荧光显微镜拍照分析。

1.5.5 流式细胞术检测细胞凋亡

将 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞以 1×10^6 个/mL 铺于 6 孔板中,分组同“1.5.4”,干预 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞 48 h,收集各组细胞,加入结合缓冲液 400 μL,向细胞悬液中加入 Annexin V-FITC 5 μL 和 PI 5 μL,室温避光反应 15 min,用流式细胞仪检测各组细胞的凋亡情况,FlowJo VX 软件分析细胞凋亡结果图。

1.5.6 细胞自噬染色检测试剂盒检测细胞自噬荧光表达

将 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞以 1×10^6 个/mL 铺于 6 孔板中,分组同“1.5.4”,干预 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞 48 h,PBS 洗涤 1 次后,每孔加入 1 mL 单丹磺酰尸胺(monodansylcadaverin, MDC)染色液,37 ℃ 避光孵育 30 min,吸净 MDC 染色液(1×),使用检测缓冲液(1×)洗涤 3 次,在荧光显微镜下观察绿色荧光。

1.5.7 透射电镜观察 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞自噬小体和自噬溶酶体

将 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞以 1×10^6 个/mL 铺于 6 孔板中,分为 Con 组和 HPHR-VPCR 组,

分别干预 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞 48 h, 弃去培养基, 加入 2.5% 的常温戊二醛固定液, 常温固定 5 min, 用细胞刮刀轻轻刮下细胞, 离心, 加电镜固定液, 4 ℃ 保存备用。历经漂洗和后固定, 脱水, 切片, 染色, 使用透射电子显微镜观察染色后的切片, 通过荧光屏捕捉图像, 进行分析。

1.5.8 Western blot 检测 P62、BECN1、BCL-2、BAX 蛋白表达

将 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞接种于 6 孔板, 贴壁培养 24 h, 设置 Con 组、HPHR-VPCR 组、3-MA 组、3-MA + HPHR-VPCR 组, 干预 A549 细胞 48 h, 收集细胞, 用 PBS 洗涤 2 次, 弃去培养液, 加入含蛋白酶的 RIPA 裂解液在冰上裂解提取总蛋白, 离心取上清, 用 BCA 法检测蛋白浓度, 取适量蛋白样本, 加上样缓冲液并混匀, 100 ℃ 金属浴 10 min 使蛋白变性, 凝胶电泳, 电转至 PVDF 膜上, 洗涤 3 次, 10% 脱脂奶粉封闭 2 h, 加 P62、BECN1、BCL-2、BAX (1:1 000) 一抗 4 ℃ 过夜孵育; 洗涤 3 次加二抗, 室

温孵育 2 h, 洗涤后加 ECL 试剂显影检测。

1.5.9 统计方法

采用 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行分析, 实验结果以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 若数据符合正态分布且方差齐, 采用组间单因素方差分析; 若数据不符合正态分布且方差不齐, 采用 W-H 秩和检验。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HR-VPCR、HPHR-VPCR 含药血清干预 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞的最佳浓度

与 Con 组比较, 5%、10%、15%、20% HR-VPCR 和 HPHR-VPCR 对 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞的抑制率均显著升高 ($P < 0.01$), 10%、15%、20% HR-VPCR、HPHR-VPCR 对 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞的抑制率随着血清浓度的增大, 抑制率反而降低, 10% HR-VPCR、10% HPHR-VPCR 对 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞的抑制率均最高 (见表 1、表 2)。因此, 后续采用含药血清的浓度为 10% 进行实验。

表 1 HR-VPCR 含药血清对 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of HR-VPCR drug containing serum on the proliferation of A549 cells and NCI-H1299 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别 Group	浓度 Concentration (%)	抑制率 Inhibition rate (%)	
		A549	NCI-H1299
Con	—	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
HR-VPCR	5	9.60 ± 1.08 **	14.92 ± 0.83 **
	10	29.74 ± 0.25 **	31.86 ± 1.12 **
	15	12.14 ± 2.09 **	24.84 ± 0.43 **
	20	6.65 ± 1.28 **	9.15 ± 1.44 **

注: 与 Con 组比较, ** $P < 0.01$, 下同。
Note: Compared with Con group, ** $P < 0.01$, the same below.

表 2 HPHR-VPCR 含药血清对 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of HPHR-VPCR drug containing serum on the proliferation of A549 cells and NCI-H1299 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别 Group	浓度 Concentration (%)	抑制率 Inhibition rate (%)	
		A549	NCI-H1299
Con	—	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
HPHR-VPCR	5	20.20 ± 4.56 **	20.71 ± 1.71 **
	10	36.17 ± 3.02 **	35.71 ± 1.98 **
	15	26.53 ± 3.55 **	21.60 ± 0.93 **
	20	12.99 ± 5.19 **	16.18 ± 1.67 **

2.2 HR-VPCR、HPHR-VPCR 对 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞凋亡形态的影响

如图 1 所示, Con 组 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞的核结构无明显变化; 与 Con 组相比, HR-VPCR 组、HPHR-VPCR 组细胞均出现了染色质积累、核浓缩

和碎片化的现象, 且核凋亡细胞的比例均增加。与 HR-VPCR 组比较, HPHR-VPCR 组上述现象更明显。提示 HR-VPCR 组、HPHR-VPCR 组均可诱导 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞凋亡, HPHR-VPCR 诱导细胞凋亡的作用更明显。

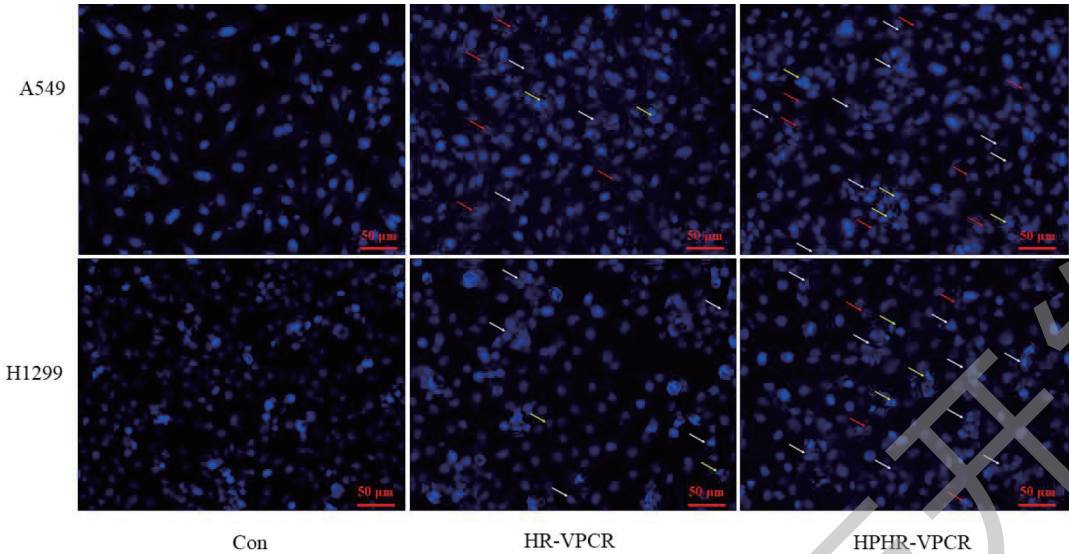


图1 HR-VPCR、HPHR-VPCR 对 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞凋亡形态的影响(×200)

Fig. 1 Effects of HR-VPCR and HPHR-VPCR on the apoptosis morphology of A549 cells and NCI-H1299 cells(×200)
注:红色箭头标示染色质积累,黄色箭头标示核浓缩,白色箭头标示细胞核碎片化。Note:The red arrow indicates chromatin accumulation, the yellow arrow indicates nuclear concentration, and the white arrow indicates nuclear fragmentation.

2.3 HR-VPCR、HPHR-VPCR 对 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞凋亡率的影响

如图 2 所示,在 A549 细胞中,与 Con 组比较,HPHR-VPCR 组总凋亡率显著升高($P<0.01$),HR-VPCR 组细胞总凋亡率升高,但无统计学意义;在

NCI-H1299 细胞中,与 Con 组相比,HR-VPCR 组、细胞总凋亡率显著升高($P<0.01$) HPHR-VPCR 组细胞总凋亡率升高,但无统计学意义(见表 3)。以上结果提示,HR-VPCR、HPHR-VPCR 均可以诱导细胞凋亡。

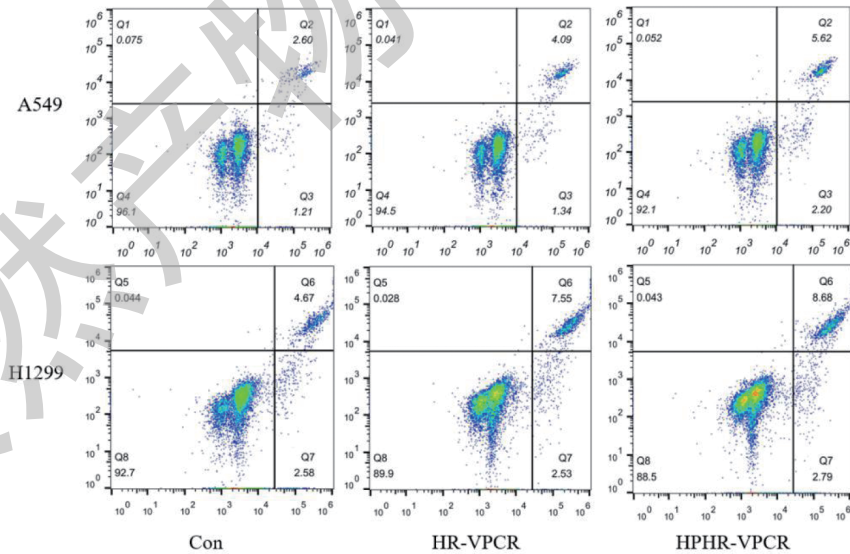


图2 HR-VPCR、HPHR-VPCR 对 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞凋亡率的影响

Fig. 2 Effects of HR-VPCR and HPHR-VPCR on the apoptosis rate of A549 cells and NCI-H1299 cells

2.4 HR-VPCR、HPHR-VPCR 对 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞自噬的影响

如图 3 所示,在 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞

中,Con 组绿色荧光表达较弱,与 Con 组相比,HR-VPCR 组、HPHR-VPCR 组绿色荧光表达增强,表明自噬体数目增加,与 HR-VPCR 组比较,HPHR-

VPCR 组绿色荧光表达进一步增强,表明自噬体数目增加。提示 HR-VPCR、HPHR-VPCR 均可诱导 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞自噬,HPHR-VPCR 在诱导细胞自噬方面作用更突出。

表 3 HR-VPCR、HPHR-VPCR 对 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞总凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别 Group	总凋亡率 Total apoptosis rate(%)	
	A549	NCI-H1299
Con	3.88 ± 0.54	7.03 ± 0.37
HR-VPCR	6.48 ± 1.00	9.87 ± 0.21 ^{**}
HPHR-VPCR	9.14 ± 1.14 ^{**}	10.22 ± 2.30

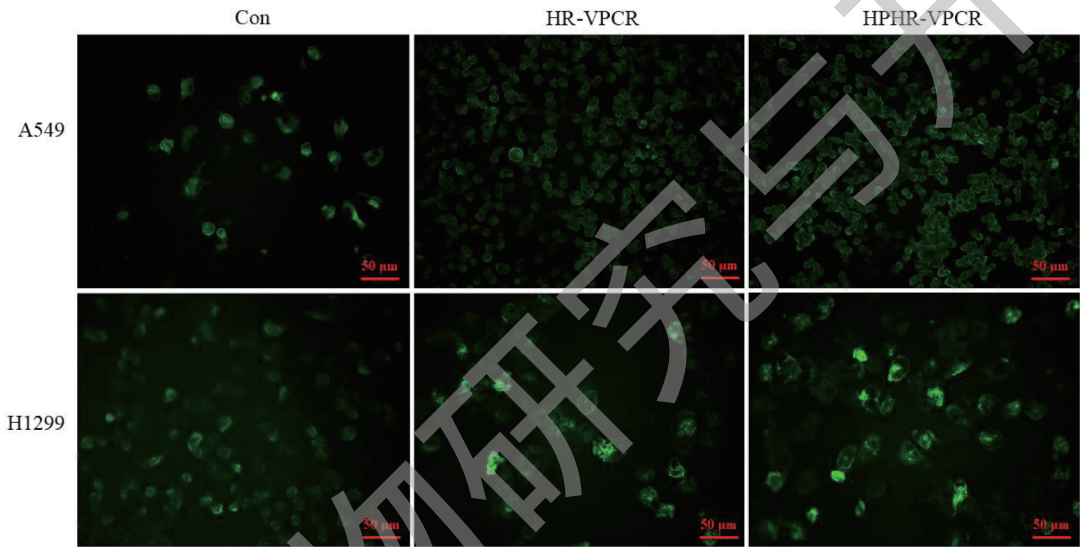


图 3 HR-VPCR、HPHR-VPCR 对 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞自噬的影响(×200)

Fig. 3 Effects of HR-VPCR and HPHR-VPCR on autophagy in A549 cells and NCI-H1299 cells(×200)

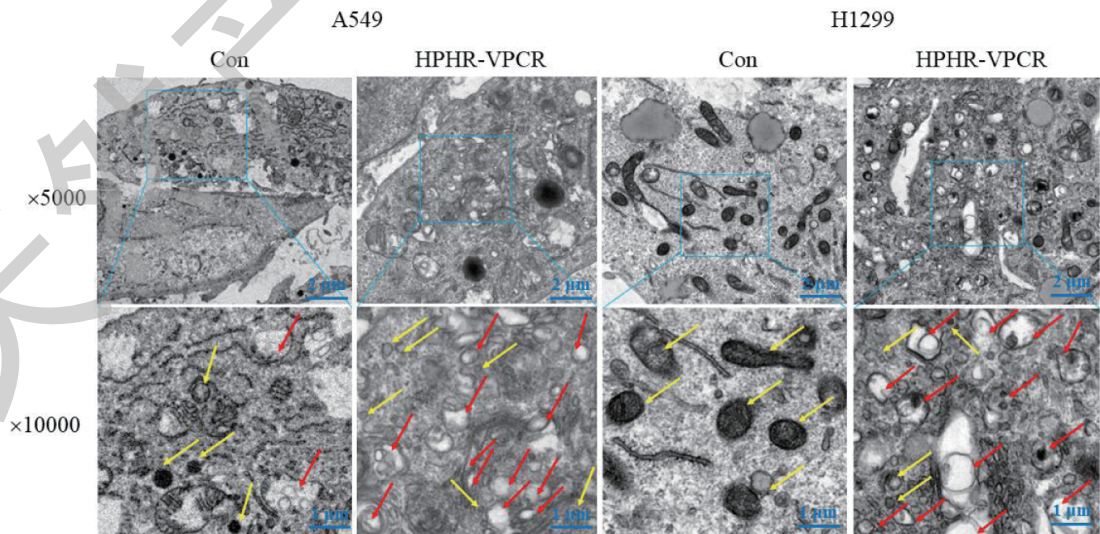


图 4 HPHR-VPCR 对 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞自噬小体和自噬溶酶体的影响

Fig. 4 Effects of HPHR-VPCR on autophagosome and autophagy lysosome in A549 cells and NCI-H1299 cells

注:黄色箭头表示自噬体,红色箭头表示自噬溶酶体。Note:The yellow arrow represents autophagosomes, and the red arrow represents autolysosomes.

2.5 HPHR-VPCR 对 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞自噬小体和自噬溶酶体的影响

如图 4 所示,在 A549 细胞中,Con 组有少量自噬小体和溶酶体;与 Con 组比较,HPHR-VPCR 组出现大量的自噬小体及自噬溶酶体(黄色箭头表示自噬体,红色箭头表示自噬溶酶体)。在 NCI-H1299 细胞中,Con 组有少量自噬小体;与 Con 组比较,HPHR-VPCR 组出现大量自噬溶酶体。提示 HPHR-VPCR 可诱导 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞自噬。

2.6 HPHR-VPCR 对 P62、BECN1、BAX、BCL-2 蛋白表达的影响

如图 5 所示,与 Con 组比较,HPHR-VPCR 组 P62、BCL-2 蛋白表达显著降低,而 BECN1、BAX 蛋白表达显著升高($P < 0.01$),3-MA 组 BECN1、BCL-2 表达显著降低,P62、BAX 蛋白表达显著升高($P < 0.01, P < 0.05$)。与 3-MA 组比较,3-MA + HPHR-VPCR 组 P62、BCL-2 蛋白表达显著降低($P < 0.01$)、BECN1、BAX 表达显著升高($P < 0.01$)。

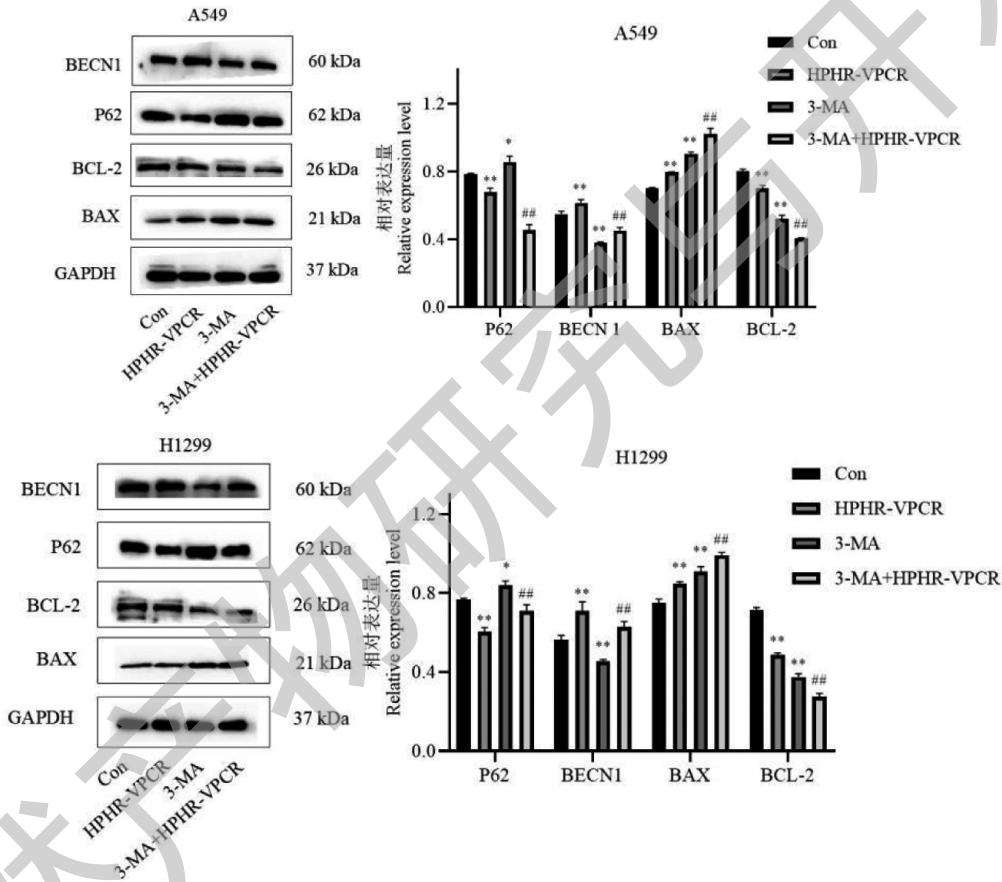


图 5 HPHR-VPCR 对 P62、BECN1、BAX、BCL-2 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effects of HPHR-VPCR on the expression of P62, BECN1, BAX and BCL-2 proteins($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与 Con 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 3-MA 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。Note: Compared with Con group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with 3-MA group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

3 讨论与结论

凋亡是一种由基因调控的细胞程序性死亡,癌细胞常因凋亡逃逸而过度增殖,因此诱导凋亡也是抗癌的有效策略^[17]。研究发现,黄芪-莪术提取物可通过调节 SIRT3/HIF-1 α 信号通路诱导肺癌细胞凋亡^[18]。黄芪-莪术含药血清可上调结肠癌 HT-29 细胞 BCL-2,下调 BAX、Caspase-3、cleaved Caspase-3,诱导结肠癌细胞凋亡^[7]。大叶蛇葡萄总黄酮提

取物能明显抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖和凋亡,3-MA 抑制自噬时可能通过线粒体途径促进 MCF-7 细胞凋亡,大叶蛇葡萄总黄酮联合 3-MA 可进一步增强细胞凋亡^[19]。课题组前期研究发现,红芪蜜炙前后毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷和香草酸含量显著降低,毛蕊异黄酮和芒柄花素含量均显著上升^[20]。HPHR-VPCR 与单味 HPHR、VPCR 比较,香草酸、毛蕊异黄酮苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷、芒柄花

素吉马酮、莪术二酮含量降低,莪术醇含量升高^[21]。HPHR-VPCR 防治结肠炎相关结直肠癌优于 HR-VPCR^[12]。本研究发现,各组改变了 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞的核结构,染色质积累、核浓缩和碎片化的现象,且核凋亡细胞的比例均增加,提示各组可诱导细胞凋亡,流式细胞术检测细胞凋亡显示,各组总凋亡率均增加。3-MA + HPHR-VPCR 组细胞凋亡进一步增强,提示抑制自噬可增强凋亡现象;HPHR-VPCR 组 BAX 表达升高,BCL-2 表达降低;3-MA + HPHR-VPCR 组 BAX 表达进一步升高,BCL-2 表达进一步降低,表明 HPHR-VPCR 可通过升高 BAX,降低 BCL-2 诱导 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞凋亡,3-MA 和 HPHR-VPCR 具有协同诱导凋亡的作用。

自噬,又被称为Ⅱ型程序性死亡,是真核细胞清除代谢产物或已损伤细胞器而维持正常的生理过程,自噬已经被证实与肿瘤的发生发展有关^[22]。研究发现,黄芪-莪术可升高 BECN1、LC3-Ⅱ,下调 P62,增强体内自噬系统逆转大鼠胃癌前病变^[23]。黄芪多糖可增加肺癌 A549 细胞自噬小体的数目,诱导自噬进而发挥抗肿瘤作用^[24]。莪术醇通过调控 PTEN/PI3K/AKT 通路介导的细胞自噬和上皮间质转化抑制肝癌细胞增殖、迁移和侵袭^[25]。本研究发现,HR-VPCR、HPHR-VPCR 均可诱导 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞自噬。3-MA 抑制自噬,3-MA + HPHR-VPCR 可逆转 3-MA 对自噬的抑制作用,提示 HPHR-VPCR 可诱导 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞自噬。HPHR-VPCR 组 BECN1 表达升高,P62 表达降低;3-MA 组 BECN1 表达降低,P62 表达升高,3-MA + HPHR-VPCR 组 BECN1 表达升高,P62 表达降低,表明炙 HR-VPCR 可通过升高 BECN1,降低 P62 诱导 A549 细胞和 NCI-H1299 细胞自噬。

综上,HR-VPCR 和 HPHR-VPCR 均可诱导细胞凋亡和自噬,HPHR-VPCR 在诱导细胞凋亡和自噬方面优于 HR-VPCR。HPHR-VPCR 诱导肺癌细胞凋亡和自噬的作用与 P62、BCL-2 降低,BECN1、BAX 表达升高有关。

数据可用性声明: 本篇论文的关联数据可在 ScienceDB 数据库 (<https://doi.org/10.57760/sciencedb.45504>) 中访问获取。

参考文献

1 Ma DC,Wang Z,Wang MM,et al. Research progress in As-

tragali Radix and its active ingredients in treatment of lung cancer[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志),2024,49:294-303.

2 Ma DC,Wang MM,Wang Z,et al. Current research status on the anti-tumor effect of traditional Chinese medicine regulating autophagy apoptosis balance related signaling pathways[J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志),2025,41:1191-1195.

3 Zhang Y,Lin Y,Tao L. Study on mechanisms of reversing antineoplastic drug resistance by traditional Chinese medicine[J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊),2023,41:183-189.

4 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中华人民共和国药典)[M]. Beijing:China Medical Science Press,2020.

5 Bao N,Chen ZC,Zhao CQ,et al. Research progress on anti-hepatocellular carcinoma mechanisms of Astragali Radix-Curcumae Rhizoma herb pair and its active ingredients[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2023,54:5101-5111.

6 Bao N,Chen ZC,Liu MY,et al. Mechanisms of Astragali Radix-Curcumae Rhizoma herb pair for anti-hepatocellular carcinoma by integrating bioinformatics and experimental validation[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2024,55:114-126.

7 Yang Q,Sun Z,Zhu YM,et al. Astragali Radix-Curcumae Rhizoma combination inhibits proliferation,migration,and invasion of colon cancer HT-29 cells by regulating EMT[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志),2023,48:736-743.

8 Tan XY,Tao J,Zhang Y,et al. Mechanism of Astragali Radix-Curcumae Rhizoma in treating gastric cancer based on network pharmacology and experimental verification[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志),2023,48:5056-5067.

9 Zu Y,Liang Y,Suo RL,et al. Study on effective components and mechanism of Astragalus-Zedoary against ovarian cancer based on network pharmacology and molecular docking[J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med(南京中医药大学学报),2023,39:645-656.

10 Yang QY,Yan ZQ,Li X,et al. Inhibition of angiogenesis of lung cancer by Astragali radix-Curcumae rhizoma and its effects on EGFR/PI3K/AKT and HIF-1 α /VEGF signaling pathways[J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志),2022,37:4039-4043.

11 Zhang Y,Wang Y,Xin E,et al. Network pharmacology and experimental verification reveal the mechanism of Hedysari Radix and Curcumae Rhizoma with the optimal compatibility

- ratio against colitis-associated colorectal cancer[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 322:117555.
- 12 Zhang YG, Zhang ZH, Wang YJ, et al. Comparative study on efficacy for Hedysari Radix before and after honey-processing paired with vinegar-processed Curcumae Rhizoma against colitis-associated colorectal cancer[J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*(中华中医药杂志), 2024, 39:2349-2356.
- 13 Sun RL, Tang DC, Gu JF. Study on intervention effect of Astragali Radix-Curcumae Rhizoma on growth and metastasis of colon cancer in orthotopic transplantation mice model of colon cancer[J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2021, 46:2267-2275.
- 14 Yuan DT, Zhang ZM, Gong R, et al. Astragali Radix-Curcumae Rhizoma drug pair inhibits growth of osteosarcoma by affecting cell adhesion and angiogenesis via PI3K/Akt/HIF-1 α pathway[J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2025, 50:2217-2228.
- 15 Tan XY, Liu S, Lu Y, et al. Study on the content changes of four volatile components in Curcumae Rhizoma with different proportions of Astragali Radix and Curcumae Rhizoma[J]. *Pharm Clin Res*(药学与临床研究), 2024, 32:36-39.
- 16 Niu JT, Cao R, Bian TT, et al. Comparison of effects of Hedysari Radix and Hedysari Radix Praeparata Cum Melle on Buzhong Yiqi and differential analysis of its chemical compositions[J]. *Chin Tradit Herb Durges*(中草药), 2019, 50:3107-3112.
- 17 Kang HY, Li SS, Wei DD, et al. Research progress on compatibility effect and mechanism of *Astragalus membranaceus-Curcuma zedoaria* on antitumor: a review[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志):1-18[2025-06-11]. <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20250221>.
- 18 Zhou YK, Su HH. Effects of milkvetch root and zedoary rhizome combined on the invasion and migration of A549 cells through regulating the SIRT3/HIF-1 α pathway[J]. *Jilin J Tradit Chin Med*(吉林中医药), 2023, 43:566-571.
- 19 Xu SY, Miao SY, Zhang TX, et al. Effects of total flavone extract from *Ampelopsis megalophylla* mediated by autophagy inhibitor 3-MA on proliferation and apoptosis of human breast cancer cells[J]. *Chin Pharm Bulletin*(中国药理学通报), 2024, 40:1115-1123.
- 20 Niu JT, Cao R, Si XL, et al. Study on composition difference of Hedysari Radix before and after honey-processing based on multiple statistical analysis[J]. *Chin J Inform Tradit Chin Med*(中国中医药信息杂志), 2021, 28:93-97.
- 21 Li YF, Dou FY, Zhang ZH, et al. Study on chemical constituents and fingerprints of Hedysari Radix Praeparata cum Melle and vinegar processed Curcumae Rhizoma before and after compatibility[J]. *Chin J Inform Tradit Chin Med*(中国中医药信息杂志), 2025, 32:141-147.
- 22 Liu QL, Zheng XR, Li WJ, et al. Effect of eriodictyol on autophagy in glioma cells via Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2023, 35:13-21.
- 23 Huang LX, He FY, Li L. Mechanism of Astragalus Zedoary drug-pair blocking precancerous lesions of gastric cancer via AKT/FOXO3 signal pathway[J]. *Mod J Integr Tradit Chin West Med*(现代中西医结合杂志), 2023, 32:1767-1772.
- 24 Wang XL, Li Y, Liu D, et al. Effect of astragalus polysaccharide on autophagy and PI3K/AKT signaling pathway in lung cancer A549 cells induced by xanthine oxidase[J]. *Chin Pharm Bull*(中国药理学通报), 2019, 35:1676-1680.
- 25 Fang CK, Liu SL, Zheng H, et al. Mechanism of curcumol regulating autophagy and epithelialing mesenchymal transformation in hepatocellular carcinoma cells PTEN/PI3K/AKT pathway[J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*(中华中医药杂志), 2023, 38:2450-2455.