臭牡丹苯乙醇苷类成分的鉴定及体外抗人肺腺癌A549细胞的机制研究

王 芬[1],唐 皓[2],周厚元[1],余湘蓉[1],朱克俭[2],李顺祥[1],余 娜[1*],唐 林[3*]

[1]湖南中医药大学,长沙 410208;[2] 湖南省中医药研究院附属医院,长沙 410006;
[3]湖南中医药大学第一附属医院,长沙 410007

摘 要:臭牡丹提取物具有良好的抗肿瘤的作用,为了鉴定臭牡丹提取物的成分及探究其对A549细胞体外抑制的影响,采用超高效液相色谱-质谱联用技术、CCK-8、细胞划痕法、Transwell、Western blot、免疫荧光及流式细胞术等方法进行检测。鉴定了臭牡丹提取物中34个苯乙醇苷类化合物,其中类叶升麻苷含量为32.95%,异类叶升麻苷5.49%。体外实验表明,臭牡丹提取物能抑制A549细胞的增殖、迁移和侵袭,且IC_{50}为0.125 mg/mL,还能下调A549细胞中EphA2、p-AKT、mTOR、p-mTOR、p-GSK-3β和β-catenin的表达,上调EphrinA1的表达,减少EphA2在A549细胞膜与膜质上的表达,并将A549细胞周期阻滞于G1/S期。本研究证实臭牡丹地上部分富含苯乙醇苷类成分,尤以类叶升麻苷和异类叶升麻苷为多,且可通过调控EphA2/Akt/mTOR通路达到抗肺癌作用。

关键词:臭牡丹;苯乙醇苷;肺腺癌细胞;EphA2/AKT/mTOR通路

中图分类号:R965.2 **文献标识码**:A **文章编号**:1001-6880(2023)3-0444-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.3.010

Identification of phenylethanoid glycosides from *Clerodendrum bungei* and its mechanism of anti-human lung adenocarcinoma A549 cell *in vitro*

WANG Fen[1], TANG Hao[2], ZHOU Hou-yuan[1],
YU Xiang-rong[1], ZHU Ke-jian[2], LI Shun-xiang[1], YU Na[1*], TANG Lin[3*]

[1]*School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China*;
[2]*Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410006, China*; [3]*The First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China*

Abstract: *Clerodendrum bungei* extract has a good anti-tumor effect. In order to identify the ingredients of the *C. bungei* extract and explore its impact on the A549 *in vitro*, the ultra-high-efficiency liquid chromatography-mass spectrometry technology, CCK-8, cell scratch, Transwell, Western blot, immunofluorescence and flow cytometry methods were used to detect. The 34 phenylethanoid glycosides compounds of the *C. bungei* extract were identified, of which the content of acteoside was 32.95%, and isoacteoside was 5.49%. The *C. bungei* extract can inhibit the proliferation, migration and invasion of A549 cells *in vitro*, and the IC_{50} is 0.125 mg/mL. In addition, the *C. bungei* extract can reduce the expression of EphA2, P-AKT, mTOR, P-mTOR, P-GSK-3β, and β-cateninin in A549 cells, increase the expression of EphrinA1, reducing the expression of EphA2 in A549 cell membrane and membrane quality, and blocke the A549 cell cycle to the G1/S stage. This study has confirmed that the *C. bungei* is rich in phenylethanoid glycosides, especially acteoside and isoacteoside, and can achieve anti-lung cancer effect by regulating the EphA2/AKT/ mTOR pathway.

Key words: *Clerodendrum bungei*; phenylethanoid glycosides; A549; EphA2/AKT/mTOR pathway

收稿日期:2022-07-05 接受日期:2023-01-04

基金项目:湖南省自然科学基金(2020JJ5428);湖南省中医药管理局一般项目(201935);中药现代化研究室,湖南中医药大学中药学一流学科项目(校行科字[2018]3号)

*通信作者 E-mail:yuna0525@163.com,tanglin0018@163.com

肺癌是一种发生于支气管黏膜及腺体的恶性肿瘤。国家癌症中心提供的数据[1]显示,2022 年我国肺癌的发病率为 10.6%,死亡率为 24%,占据我国恶性肿瘤死亡率的首位,并且其中女性患者的比例逐年上升,且趋向于年轻化[2]。中药因其具有多成分、多靶点的优势,可通过多种途径延缓肿瘤进展、增强肿瘤细胞对放化疗的敏感性、降低术后感染和减少放化疗导致的不良反应,从而达到防治肿瘤复发转移、长期稳定肿块的目的[3,4]。臭牡丹发掘于湖南民间治疗恶性肿瘤的有效验方,并经过四十余年反复临床与科研实践遴选出来的一味中药[5,6]。臭牡丹性平,味辛、苦,具有"祛风除湿、解毒散瘀、消肿止痛"的功效,在湖湘地区广泛用于多种肿瘤的治疗[7,8],尤以肺癌为佳,但臭牡丹抗肿瘤的有效成分及其机制尚不太明确。课题组前期实验发现,臭牡丹中富含苯乙醇苷类成分,并具有较好的抗肿瘤活性[9,10],本研究中,我们将进一步鉴定臭牡丹中的苯乙醇苷类成分,并探讨其体外抑制 A549 细胞增殖的作用机制,以期对臭牡丹苯乙醇苷抗肿瘤作用及其机制进行更深入研究,为进一步开发高效低毒的中药制剂奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

人肺腺癌 A549 细胞(中国科学院细胞库);臭牡丹药材由湖南中医药研究院附属医院中药房提供。类叶升麻苷(acteoside)和异类叶升麻苷(isoacteoside)标准品(上海源叶生物公司);EphA2 抗体(美国 CST 公司,货号:#6997);p-EphA2 抗体(美国 CST 公司,货号:#6347);GSK-3β 抗体(美国 Proteintech 公司,货号:22014-1-AP);p-GSK-3β 抗体(美国 CST 公司,货号:#5558);AKT 抗体(美国 Proteintech 公司,货号:10176-2-AP);p-AKT 抗体(美国 Proteintech 公司,货号:66444-1-Ig);mTOR 抗体(美国 Proteintech 公司,货号:20657-1-AP);p-mTOR 抗体(美国 Abcam 公司,货号:ab109268);β-catenin 抗体(美国 Proteintech 公司,货号:51067-2-AP);β-actin 抗体(美国 Proteintech 公司,货号:60008-1-Ig0);EphrinA1 抗体(美国 Abcam 公司,货号:ab124911)。

1.2　仪器

UHPLC-Q-TOF-MS 质谱仪系统(Waters, Milford, MA);C_{18}(Agilent ZORBAX Eclipse Plus C_{18}, 3.0 mm×100 mm, 1.8 μm);Neofuge 型超速离心机(上海力申科学仪器有限公司);CX33 奥林巴斯显微镜[同舟同德(北京)仪器仪表公司];800TS 型酶标仪(美国 BioTek 公司);TS-1 型摇床(江苏其林贝尔);DYY-6C 型电泳仪、DYCZ-40D 型转膜仪(北京六一)。

1.3　实验方法

1.3.1　臭牡丹苯乙醇苷类提取物的制备和鉴定

将臭牡丹干燥地上部分粉碎,按 1∶8、1∶6、1∶6 的比例加 70% 乙醇加热回流提取 3 次,冷却过滤提取液,蒸干得干膏。取干膏以 1∶10 的比例用纯净水溶解,用石油醚按 1∶3、1∶2、1∶1 反复萃取,水层用乙酸乙酯以同样方法萃取。收集乙酸乙酯层萃取液于蒸干得浸膏。将浸膏用无水乙醇 3 mL 溶解,加 2 mL 水稀释后以 1 滴/秒的速度通过大孔吸附柱,静置过夜。用 2BV 乙醇以 20%、30%、40%、50% 的梯度浓度洗脱。通过课题组前期实验发现,类叶升麻苷和异类叶升麻苷的含量在臭牡丹苯乙醇苷类中占据最多,故以二者含量为指标分离得臭牡丹苯乙醇苷部分。采用液相检测各洗脱液中二者的含量,将含量最多的 30% 和 40% 乙醇洗脱部分每半个柱体积分段接样,合并富集二者的部分,充分混匀后冷冻干燥,即得到臭牡丹苯乙醇苷提取物粉末。

色谱条件:柱温:30 ℃;流动相 A:0.1% 甲酸,流动相 B:乙腈;梯度洗脱:0 ~ 3 min, 5% B;3 ~ 17 min, 5% →20% B;17 ~ 32 min, 20% →33% B;32 ~ 42 min, 33% →90% B;42 ~ 48 min, 90% B;90% →5% B, 48 ~ 49 min;49 ~ 53 min, 5% B。流速:0.3 mL/min,进样量:3 μL;数据采集选用全扫描自动模式,电喷雾离子源,在负离子模式下进行扫描并采集高质量的 MS 数据;扫描范围 m/z 100 ~ 1 200,离子源温度 100 ℃,脱溶胶气温度 250 ℃,气帘气体积流量 900 L/h,毛细管电压 2.5 kV,锥形电压 0.035 kV。

1.3.2　臭牡丹苯乙醇苷提取物中类叶升麻苷和异类叶升麻苷的定量分析

将类叶升麻苷和异类叶升麻苷溶于甲醇中,制备为 0.507 2、0.224 mg/mL 的对照溶液,采用 UHPLC 测定臭牡丹苯乙醇类提取物类叶升麻苷和异类叶升麻苷的含量。

色谱条件:色谱柱:C_{18} 柱;柱温:30 ℃;色谱波长:330 nm;流动相 A:0.1% 甲酸,流动相 B:乙腈;梯度洗脱:0 ~ 6 min, 5% B;6 ~ 13min, 13% →18% B;18% →31% B;流速:0.4 mL/min;进样量:2 μL。

1.3.3　CCK-8 检测对 A549 细胞活性的影响

将对数生长期的 A549 细胞接种于 96 孔板中(1×10^4 个/孔),培养过夜,待细胞融合率达到 80% 以上后,以臭牡丹苯乙醇苷提取物(*Clerodendrum*

bungei extract, CB) 0.025、0.05、0.075、0.1、0.125、0.150、0.175、0.2、0.225 mg/mL 作用 48 h 后每孔加入 20 μL 的 CCK-8, 37 ℃孵育 4 h 后, 酶标仪在 450 nm 下测量各孔的 OD 值, 另设不加药为空白组, 实验重复三次, 按公式计算存活率: 存活率 = 给药组 OD 值/对照组 OD 值 ×100%。

1.3.4 细胞划痕实验

取对数生长的 A549 细胞, 调整细胞密度为 2×10^5 个/mL, 取 200 μL 细胞悬液接种于 6 孔板内(4×10^4 个/孔), 培养过夜, 待细胞融合率达到 80% 以上后, 用 200 μL 枪头沿培养板中轴均匀划一直线, PBS 洗去脱落细胞。各组给药浓度为臭牡丹低浓度组 0.125 mg/mL (CB-L)、高浓度组 0.25 mg/mL (CB-H), 另设不加药组为对照组(Con)。于给药后 0、24、48 h 多个位置定点拍照, 采用 Image J 软件计算各个时间点下的划痕面积, 并计算愈合率: 愈合率 = [(0 h 划痕宽度-培养后划痕宽度)/0 h 划痕宽度] ×100%。实验重复 3 次, 取平均值。

1.3.5 Transwell 实验

取对数生长的 A549 细胞, 调整细胞密度为 2×10^5 个/mL, 取 200 μL 细胞悬液加入小室上室内, 下室加入含 10% FBS 的 1640 培养液, 培养 6 h 后给药。分组与给药同“1.3.4”。加 200 μL 药液至上室中, 培养 48 h。收集各组细胞, 用甲醇: 冰醋酸(3∶1)固定, 0.1% 结晶紫避光染色, 于显微镜下观察, 取 5 个视野计数细胞数, 用 Image J 软件计算细胞数。实验重复 3 次, 计算平均值。

1.3.6 Western blot 检测 EphA2/AKT/mTOR 相关蛋白表达

取对数生长的 A549 细胞, 调整细胞密度为 2×10^5 个/mL, 以每孔 200 μL 细胞悬液接种于 6 孔板内, 培养过夜, 待细胞生长密度达到 80% 后, 给与臭牡丹低浓度组 0.125 mg/mL (CB-L) 干预 48 h, 另设不给药组为空白对照组。收集各组细胞, PBS 洗涤两次, 加入裂解液裂解细胞提取总蛋白, 计算并调整蛋白浓度, Westerm blot 法检测各组相关蛋白的表达。

1.3.7 免疫荧光法检测 EphA2 的表达

取对数生长的 A549 细胞, 调整细胞密度为 2×10^5 个/mL, 以每孔 200 μL 细胞悬液铺于预先放有玻片的培养孔内爬片生长, 细胞分组与给药同“1.3.6”。收集各组细胞, 4% 多聚甲醛固定, 加入 0.3% 曲拉通, 在 37 ℃下通透 30 min, 5% BSA 封闭 60 min, 孵育一抗、二抗(Anti-Rabbit IgG), DAPI 染核 10 min, 荧光显微镜下观察, 拍照。

1.3.8 流式细胞术检测 A549 细胞周期

取对数生长的 A549 细胞, 调整细胞密度为 2×10^5 个/mL, 以每孔 200 μL 细胞悬液接种于 6 孔板内, 培养过夜, 待细胞生长密度达到 80% 后, 细胞分组与给药同“1.3.6”。收集各组细胞后, 用乙醇固定过夜, 加入 5 μL PI 工作液, 4 ℃避光染色 30 min, 流式检测 A549 细胞周期。

1.3.9 数据分析

数据使用 SPSS 23.0、GraphPad Prism 7.0 软件进行分析, 实验均独立重复 3 次及以上, 所有数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)描述。两组间比较采用不配对 t 检验, 多组间比较采用单因素方差(One-way ANOVA)分析, 方差齐时用 LSD 检验, 方差不齐时用 Tamhane T2 和 Dunnet T3 检验。$P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 臭牡丹苯乙醇苷类成分的鉴定及主要成分的定量分析

经 UHPLC-Q-TOF-MS 检测所得的质谱信息, 应用谱库检索并参考有关文献, 鉴定了臭牡丹苯乙醇苷提取物中含有 34 个主要成分(见表 1)。结合臭牡丹生药水煎液以及提取物的液相图, 我们发现类叶升麻苷和异类叶升麻苷的含量在臭牡丹中占绝对优势。UHPLC 法测定臭牡丹苯乙醇苷提取物中二者的含量, 方法学考察显示两者具有较好的灵敏度和精确度, 其中类叶升麻苷的含量为 32.95%, 异类叶升麻苷含量为 5.49 %(见图 1、表 2)。

表 1 在 UHPLC-MS/MS 的 ESI 负离子模式下分析臭牡丹苯乙醇苷类提取物的成分

Table 1 Components of phenylethanoid glycosides extract of *C. bungei* in ESI negative mode by UHPLC-MS/MS

编号 No.	保留时间 t_R (min)	理论值 Calculated value (m/z)	实际值 Measured value (m/z)	偏差 Deviation ($\times 10^{-6}$)	分子式 Molecular formula	碎片离子 Fragment ion (m/z)	鉴定 Identification
1	3.45	461.163 0	461.166 4	-3.4	$C_{20}H_{29}O_{12}$	315.153 4	去咖啡酰基类叶升麻苷 Decaffeoyl-acteosoide
2	4.45	487.143 5	487.145 3	-3.3	$C_{21}H_{27}O_{13}$	325.341 2	肉苁蓉苷 F Cistanoside F

续表 1(Continued Tab. 1)

编号 No.	保留时间 t_R(min)	理论值 Calculated value(m/z)	实际值 Measured value(m/z)	偏差 Deviation ($\times 10^{-6}$)	分子式 Molecular formula	碎片离子 Fragment ion(m/z)	鉴定 Identification
3	13.36	639.194 3	639.192 5	2.8	$C_{29}H_{35}O_{16}$	621.459 1	(*R*)-Campneoside II
4	13.56	639.194 3	639.192 5	2.8	$C_{29}H_{35}O_{16}$	621.459 1	(*S*)-Campneoside II
5	14.42	481.167 8	481.171 0	-9.5	$C_{23}H_{29}O_{11}$	161.012 3	6′′-*O*-[(*E*)-Caffeoyl] rengyoside
6	14.87	639.194 3	639.192 5	2.8	$C_{29}H_{35}O_{16}$	459.179 1	Isocampneoside II
7	15.27	637.181 6	637.176 9	0.6	$C_{29}H_{33}O_{16}$	475.255 4	Oxoacteoside
8	16.25	637.181 6	637.176 9	0.6	$C_{29}H_{33}O_{16}$	475.179 7	Oxoisoacteoside
9	16.43	581.185 5	653.208 2	2.6	$C_{30}H_{37}O_{16}$	621.179 5	Campneoside I
10	17.14	623.201 9	623.203 5	-2.6	$C_{29}H_{36}O_{15}$	461.179 1	类叶升麻 Acteoside
11	17.61	581.185 5	581.188 4	-2.6	$C_{27}H_{33}O_{14}$	431.167 3	Phlomisethanoside
12	17.81	593.185 9	593.187 0	-1.9	$C_{28}H_{33}O_{14}$	461.447 2	香蜂草苷 Didymin
13	18.09	623.201 9	623.203 5	3.5	$C_{29}H_{36}O_{15}$	623.461 1、791.610 2	异类叶升麻苷 Isoacteoside
14	18.72	607.205 2	607.202 7	4.1	$C_{29}H_{35}O_{14}$	461.445 2、991.619 2	Kankanoside G
15	19.39	637.212 6	637.213 8	-0.6	$C_{30}H_{37}O_{15}$	461.175 3	Leucosceptoside A
16	20.20	637.212 6	637.213 8	-0.6	$C_{30}H_{37}O_{15}$	475.179 1	Cistanoside C
17	20.4	621.184 5	621.182 5	3.4	$C_{29}H_{33}O_{15}$	487.179 3	Crenatoside isomer
18	20.94	637.212 6	637.213 2	-0.6	$C_{30}H_{37}O_{35}$	461.193 4	Plantainoside C
19	21.27	621.184 2	621.182 5	3.4	$C_{29}H_{33}O_{15}$	475.161 2	Dihydroroseoside
20	22.06	523.214 8	523.217 9	-5.9	$C_{26}H_{35}O_{11}$	361.341 5	Bungnate B
21	22.13	577.192 9	577.192 7	1.4	$C_{28}H_{33}O_{13}$	415.269 7	Cuneataside
22	22.38	665.215 2	665.214 0	1.8	$C_{24}H_{41}O_{21}$	623.503 1	2-乙酰基毛蕊花糖苷 2′-Acetylacteoside
23	22.56	507.222 9	507.233 6	-0.2	$C_{27}H_{40}O_9$	345.012 4	16-*O*-*β*-D-Glucopyranosyl-3*β*-20-epoxy-3-hydroxyabieta-8,11,13-triene
24	22.86	651.227 5	651.228 9	-2.1	$C_{31}H_{39}O_{15}$	475.193 1	角胡麻甙 D Cistanoside D
25	23.56	651.227 5	651.228 9	-2.1	$C_{31}H_{39}O_{15}$	475.193 1	Martinoside
26	24.37	651.227 5	651.228 9	-2.1	$C_{31}H_{39}O_{15}$	505.475 1、931.750 1	异地黄苷 Isomartynoside
27	24.81	591.207 2	591.207 8	-1.0	$C_{29}H_{35}O_{13}$	161.012 3	吉奥诺苷 C Jionoside C
28	25.01	657.312 2	657.315 1	-2.9	$C_{32}H_{49}O_{14}$	495.161 6	Ajugaside A
29	26.41	693.237 4	693.239 5	-3.0	$C_{33}H_{41}O_{16}$	651.505 1	3′′-*O*-Acetylmartynoside
30	26.59	693.242 8	693.239 5	-3.0	$C_{33}H_{42}O_{16}$	651.505 1	2′′-*O*-Acetylmartynoside
31	28.09	693.242 8	693.239 5	-3.0	$C_{33}H_{42}O_{16}$	651.505 1	单乙酰松香碱 Monoacetylmarynoside
32	30.03	735.249 1	735.250 0	-1.2	$C_{33}H_{43}O_{17}$	693.505 1	Acetylmartynoside A
33	30.64	735.249 1	735.250 0	-1.2	$C_{33}H_{43}O_{17}$	693.559 5、171.751 2	Acetylmartynoside B
34	31.07	735.249 1	735.250 0	-1.2	$C_{33}H_{43}O_{17}$	693.505 1	3′′,4′′-Di-*O*-Acetylmartynoside

2.2　臭牡丹提取物对 A549 细胞增殖、迁移和侵袭的影响

CCK-8 实验显示,随着给药浓度增加,A549 细胞活性逐渐下降,其 IC_{50} 为 0.125 mg/mL。划痕试验中,与对照组相比,臭牡丹提取物各组的愈合率均明显降低($P<0.001$)。Transwell 侵袭实验中,与对照组相比,臭牡丹各组的穿模细胞数均显著降低($P<0.001$)(见图 2~4 和表 3、4)。

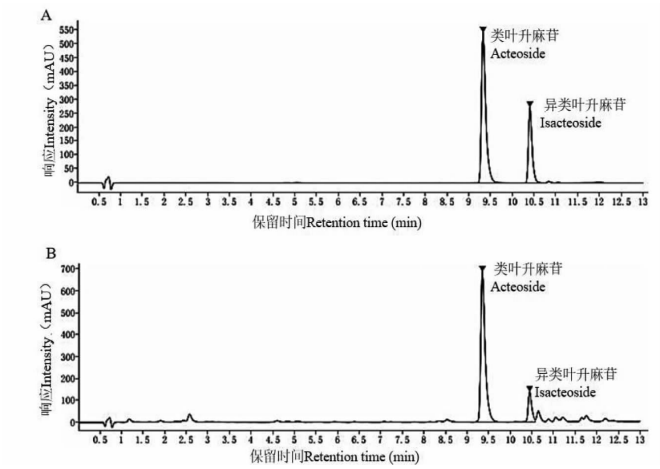

图 1 UHPLC 法检测臭牡丹苯乙醇苷类中类叶升麻苷和异类叶升麻苷的含量

Fig. 1 Determination of acteoside and isacteoside in phenylethanoid glycosides extract of *C. bungei* by UHPLC

注：A：臭牡丹苯乙醇苷类提取物；B：类叶升麻苷与异类叶升麻苷。Note：A：*C. bungei* extract；B：Acteoside and isacteoside.

表 2 UHPLC 对臭牡丹苯乙醇苷类提取物中两种成分定量分析的方法学考察

Table 2 Methodological investigation of the quantitative analysis of two components in the phenylethanoid glycosides extract of *C. bungei* by UHPLC

成分 Compound	回归方程 Regression equation	区间 Range（mg/mL）	相关系数 r	检测限 LOD（ng）	定量限 LOQ（ng）	精密度 Precision（$n=6$）	RSD(%) 可重复性 Repeatability（$n=6$）	RSD(%) 稳定性 Stability（$n=6$）	RSD(%) 回收率 Recovery（$n=6$）
类叶升麻苷 Acteoside	$y=7312.3x-3.9716$	0.1268～1.268	0.9997	0.40	0.18	2.3	0.33	0.88	1.76
异类叶升麻苷 Isacteoside	$y=7037.9x-2.7701$	0.056～0.56	0.9997	0.84	0.54	2.2	0.31	0.71	2.03

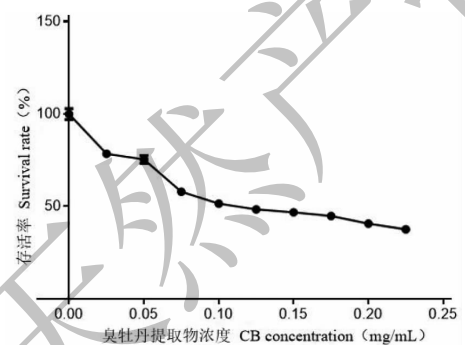

图 2 臭牡丹苯乙醇苷提取物对 A549 细胞增殖的影响（$\bar{x}\pm s, n=3$）

Fig. 2 Effect of CB on A549 cell proliferation（$\bar{x}\pm s, n=3$）

2.3 臭牡丹提取物对 EphA2/AKT/mTOR 通路相关蛋白表达的影响

Westerm blot 结果显示，臭牡丹提取物干预后的 A549 细胞中 EphA2、mTOR、p-mTOR、β-catenin、GSK-3β、p-GSK-3β 和 p-AKT 蛋白表达均下调（$P<0.05$），其中 β-catenin、p-AKT 和 p-GSK-3β 的下调尤为显著（$P<0.01$）。而 EphrinA1、AKT 表达明显上调（$P<0.05$），p-EphA2 的表达也上调（$P<0.05$）。免疫荧光显示，EphA2 主要在 A549 细胞中的胞膜和胞质中表达，臭牡丹干预后其表达有下降的趋势（见图 5、6）。

表 3 给药 48 h 后各组细胞迁移能力的比较（$\bar{x}\pm s, n=3$）

Table 3 Comparison of cell migration capabilities after 48 h（$\bar{x}\pm s, n=3$）

组别 Group	愈合率 Healing rate(%)
Con	50.38 ± 5.43
CB-L	32.15 ± 3.77***
CB-H	15.98 ± 1.37***

注：与对照组相比，*** $P<0.001$，下同。

Note：Compared with control，*** $P<0.001$，the same below.

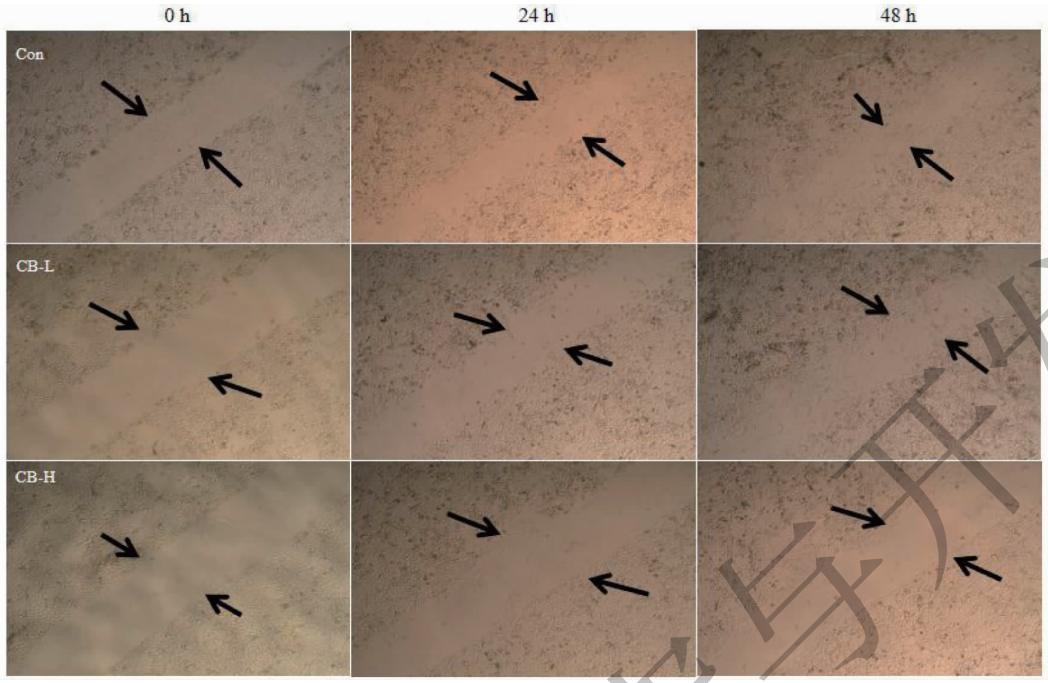

图 3　细胞划痕中各组细胞在 0、24、48 h 后的迁移情况(×4)

Fig. 3　Migration of each group of cells after 0, 24 and 48 h in the cell scratch(×4)

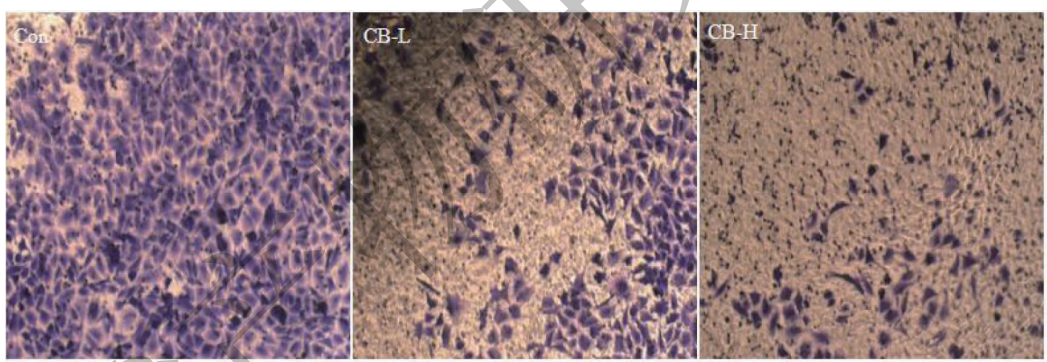

图 4　各组 Transwell 实验中细胞染色情况(×10)

Fig. 4　Cell staining in Transwell experiments in each group(×10)

表 4　各组给药 48 h 后穿膜细胞数($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4　Number of membrane penetrating cells in each group 48 h after drug administration($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别 Group	穿膜细胞数 Number of membrane cells
Con	50.38 ± 5.43
CB-L	329.12 ± 49.71***
CB-H	259.04 ± 32.72***

2.4　臭牡丹苯乙醇苷类提取物对 A549 细胞周期的影响

与对照组比较,臭牡丹提取物组 A549 细胞 S 期细胞数减少($P < 0.05$),而 G1 期细胞数增加($P < 0.05$),结果见图 7。由此可知,臭牡丹提取物对 A549 细胞周期 G1/S 进程具有阻滞作用。

3　讨论与结论

肺癌是一种发生于支气管黏膜及腺体的恶性肿瘤,属于中医“肺积”“肺岩”等范畴。当代医家认为肺癌的不断增加是由于环境污染或长期吸烟导致毒邪蕴肺,肺的气机升降失常,毒与气血胶结日久发为肺积。最基本的病机是癌毒痰瘀胶结,虚实夹杂是主要病机变化[8]。借鉴著名中医学家、湖湘欧阳氏杂病流派传承人欧阳锜教授治疗肺癌及其术后预防

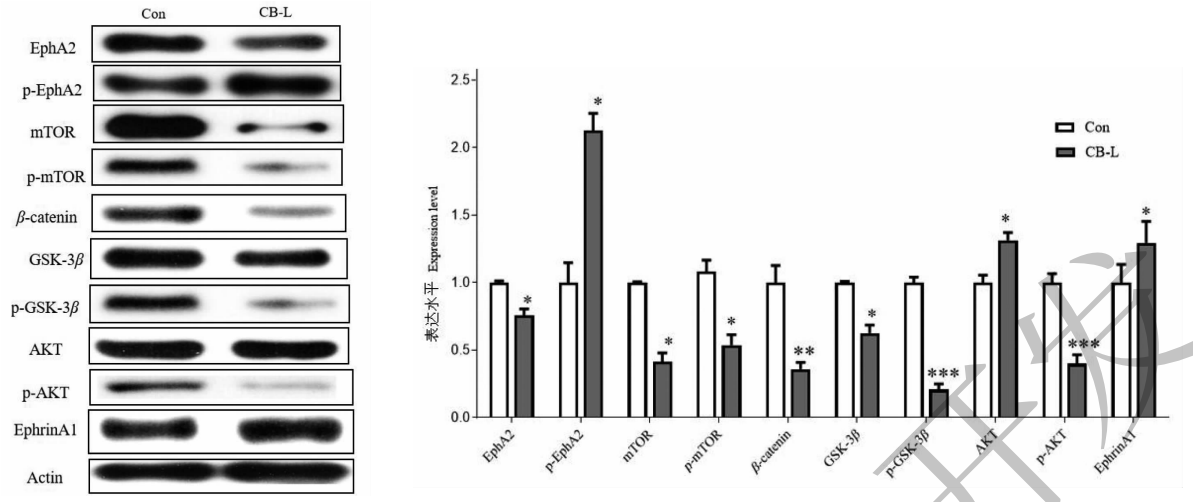

图 5　臭牡丹提取物对 A549 细胞中 EphA2/AKT/mTOR 通路相关蛋白的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5　Effect of CB on EphA2/AKT/mTOR pathway related proteins in A549 cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与对照组比较,$^{*}P < 0.05$,$^{**}P < 0.01$,$^{***}P < 0.001$,下同。Note:Compared with control,$^{*}P < 0.05$,$^{**}P < 0.01$,$^{***}P < 0.001$, the same below.

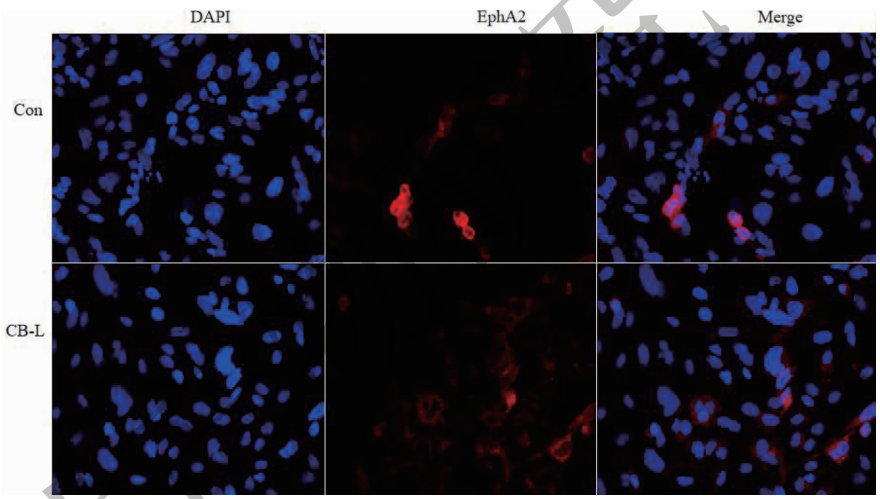

图 6　EphA2 在 A549 细胞中的定位表达

Fig. 6　Localized expression of EphA2 in A549 cells

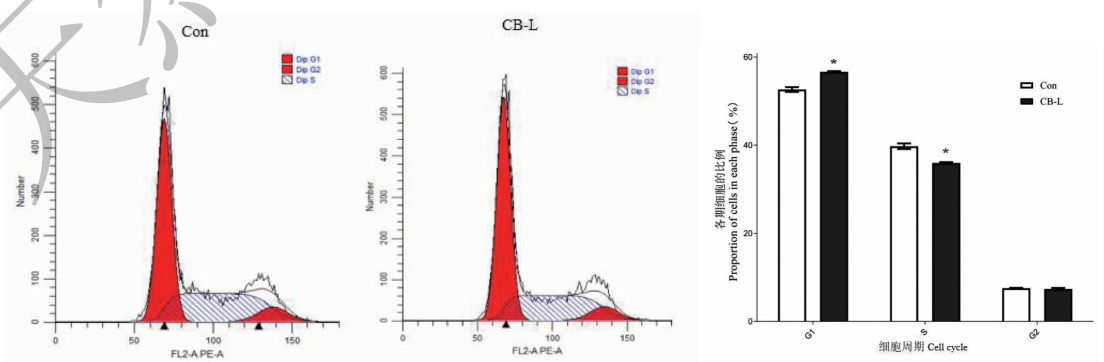

图 7　臭牡丹提取物对 A549 细胞周期分布的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7　Effect of CB on A549 cell cycle distribution($\bar{x} \pm s, n = 3$)

复发的经验,我们认为肺癌病因病机是由于邪毒侵袭,正气不足以致肺失宣降,痰饮聚滞,积聚日久以致机体气血阴阳两虚,最终导致肺部癌变的发生。“邪实痰凝毒聚、气滞血瘀”是肺癌的主要发病机制,其治疗原则为“解毒化瘀、消痰散结”。臭牡丹为马鞭草科植物臭牡丹(*Clerodendrum bungei* Steud.)的茎叶,在中国分布广泛,药物资源丰富。其性平,味辛、苦,古籍文献记载其有“祛风除湿、解毒散瘀、消肿止痛”之功,正符合肺癌“解毒化瘀、消痰散结”的治疗原则。研究显示,臭牡丹复方以及提取物均具有较好的抗肿瘤活性,尤以抗肺癌活性最佳[11-13]。前期研究中,课题组通过对臭牡丹水煎液及不同提取组分进行多次液质分析,发现臭牡丹的主要成分为苯乙醇苷类,其中类叶升麻苷与异类叶升麻苷其主要成分,并且经过实验筛选论证发现臭牡丹苯乙醇苷部分具有较好的抗肿瘤作用[10],因此推测以类叶升麻苷与异类叶升麻苷为主的苯乙醇苷类成分可能是臭牡丹抗肿瘤的主要成分。

EphA2 为受体酪氨酸激酶(RKTs)最大亚族 Eph 家族的主要成员,在多种恶性肿瘤中过表达,尤其在恶性程度高、侵袭转移能力强的肿瘤中其表达量更高,并参与肺癌的侵袭转移[14,15]。研究发现,EphA2 受体在肺癌患者以及肺癌细胞系中显著表达,且表达程度越高预示着患者预后越差[16,17]。在肺癌组织中,观察到表皮生长因子(EGFR)中的磷酸化 EphA2 S897 发生突变,并在细胞膜上发现外显子 19 缺失[18]。EphA2 发挥生物学效应存在配体依赖和配体非依赖两种形式。一方面,当配体 EphrinA1 与 EphA2 受体结合后,EphA2 发生内化,继而通过泛素化降解;同时,EphA2 被酪氨酸激酶激活发生磷酸化,而 EphA2 S897 位点去磷酸化,继而抑制 PI3K/ATK、Ras/MAPK 等信号通路,发挥配体依赖性的抑瘤作用[19]。另一方面,当配体 EphrinA1 低表达,EphA2 高表达时,EphA2 通过 S897 位点磷酸化激活,同时其酪氨酸磷酸化水平下降,继而激活 PI3K/AKT/mTOR 和 Pyk2/c-Src 信号通路,发挥配体非依赖性的促瘤作用[20,21]。非配体依赖性 EphA2 信号可促进肿瘤增殖和转移,促进肿瘤的耐药并维持肿瘤干细胞样特性[22,23]。可见 EphA2 具有配体活化的抑癌与非配体活化的促癌双重活性,而 EphA2 S897 位点的去磷酸化或磷酸化是控制两种相反生物学效应的开关。EphA2 S897 的去磷酸化与配体 EphrinA1 有关,而 EphA2 S897 上的磷酸化与 AKT 有关,AKT 是最早的也是公认的重要因素。AKT 磷酸化是 EphA2 因子可促进细胞迁移和侵袭的重要因素[24,25],而 Ephrin-A1 配体与 EphA2 结合则抑制 AKT 的激活,抑制肿瘤细胞的迁移。有报道称,EphA2 既是 AKT 的上游负调控因子,也是其下游效应因子[26,27]。PI3K/Akt/mTOR 通路的激活,加上配体 Ephrin-As 的缺失,使 EphA2 从肿瘤抑制因子转变为受 AKT 磷酸化而促进肿瘤恶性发展的促瘤因子。据报道,在胃癌细胞中,EphA2 通过 Wnt-β-catenin 通路促进 EMT 的进展[28,29]。

课题组前期研究显示,臭牡丹提取物可显著降低肺癌中 EMT 相关因子 Vimentin、Slug、Snail、Twist、C-myc 的表达,并通过调控 Wnt/β-catenin 通路抑制肺癌 EMT 进程[10]。在本研究中,我们发现臭牡丹苯乙醇苷类提取物能显著抑制 A549 细胞的增殖、迁移和侵袭,并抑制 EphA2、mTOR、p-mTOR、β-catenin、GSK-3β、p-GSK-3β 和 p-AKT 蛋白的表达,其中下调 p-AKT 的作用尤为显著,且下调 EphA2 蛋白的同时还可上调 EphrinA1 的表达。臭牡丹苯乙醇苷类提取物可诱导 EphA2 与配体 EphrinA1 的结合,促进配体 EphrinA1 依赖的抑癌通路,并通过抑制 EphA2、p-AKT、mTOR 等因子,阻断 EphA2/AKT/mTOR 信号通路而发挥抑瘤作用。而 p-EphA2 的上升是由于在配体依赖中,虽然 EphA2 上的 S897 位点发生去磷酸化,但 EphA2 酪氨酸激酶会被磷酸化激活,因此总的 p-EphA2 有可能是上调的。但抗肿瘤的机制是非常复杂的,肿瘤细胞的命运并不是由一条途径决定的。本研究为确定臭牡丹的抗肿瘤分子机制,开发针对 EphA2 靶点的高效低毒的中药提取物提供一定的实验依据。

参考文献

1　Yin ZYi, Wang MY, You WC, et al. Interpretation on the report of American cancer statistics, 2022 and comparison of cancer prevalence in China and America[J]. J Multidscip Caner Manag: Electron(肿瘤综合治疗电子杂志), 2022, 8: 54-63.

2　Zhang RF, Zhang Y, Wen FB, et al. Analysis of pathological types and clinical epidemiology of 6,058 patients with lung cancer[J]. Chin J Lung Caner(中国肺癌杂志), 2016, 19: 129-135.

3　Lin YJ, Chai SR, Long KL. Effects of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg flavone on immune function and apoptosis-related proteins in tumor tissues of Lewis lung cancer mice

[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2021,33:8-15.

4 Wang GX,Wang WB,Wang YL,et al. Research on the current status of traditional Chinese medicine treatment of lung cancer[J]. Gansu Sci Technol(甘肃科技),2020,36:165-166.

5 Zhu KJ,Zhang YL,Ou YJ,et al. Research on clinical epidemiology of Bao Fei Yin prevention of lung cancer[J]. Chin J Tradit Med Sci Technol(中国中医药科技),1997,4:332-333.

6 Sun ZQ,Zhu KJ,Liu LY,et al. Influence of Bao Fei Yin on rats with induced lung cancer[J]. Chin J Surg Integr Tradit West Med(中国中西医结合外科杂志),1998,4:12-14.

7 Liu TS,Rong K,Tan XN,et al. Effect of compound *Clerodendrum bungei* on serum levels of transforming growth factor-beta 1, interleukin-4, and interleukin-10 in mice with lung cancer[J]. Hunan J Tradit Chin Med(湖南中医杂志),2017,33:129-131.

8 Hu Q,Zhu DY,Tan XN,et al. Antitumor effect and mechanism of *Clerodendron bungei* extract on H22 tumor -bearing mice[J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志),2019,35:1459-1462.

9 Yu N, Tang L, Xie ZX, et al. The antineoplastic activity screening of different extracts from *Clerodendrum bungei* Steud and their effects on emt-related proteins in nude mice with transplanted tumor[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med(中药药理与临床),2020,36:124-131.

10 Yu Na,Zhu Kejian,Xie Yi. Screening for compounds with antitumor activity in the aerial part of *Clerodendrum bungei* [J]. Hunan J Tradit Chin Med(湖南中医杂志),2017,33:147-150.

11 Na Yu,Ke-Jian Zhu,Si-Jing Ma,et al. The total flavonoids of *Clerodendrum bungei* suppress A549 cells proliferation, migration, and invasion by impacting Wnt/β-catenin signaling [J]. World J Tradit Chin Med(世界中医药杂志),2017,3:15-20.

12 Yu Na,Zhu Kejian,Ma Sijing,et al. Effects of total flavonoids of *Clerodendrum bungei* on epithelial-mesenchymal transition (EMT) of A549 cells by regulating Wnt/β-catenin signal pathway[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2018,49:663-670.

13 Yu N,Ma SJ,Zhu KJ,et al. Effect of the total flavonoid of *Clerodendron bungei* Steud on the epithelial mesenchymal transition related proteins in A549 cells[J]. J Hunan Univ Chin Med(湖南中医药大学学报),2016,36:10-13.

14 Angie M,Torres A,Heidi V,et al. Eicosapentaenoic acid in combination with EPHA2 inhibition shows efficacy in preclinical models of triple-negative breast cancer by disrupting cellular cholesterol efflux[J]. Oncogene, 2019, 38:2135-2150.

15 Lévêque R, Corbet C, Aubert L, et al. ProNGF increases breast tumor aggressiveness through functional association of TrkA with EphA2[J]. Cancer Lett,2019,449:196-206.

16 Flavia AM,Luciano P,Concetta DN,et al. Sam domain-based stapled peptides: structural analysis and interaction studies with the Sam domains from the EphA2 receptor and the lipid phosphatase Ship2[J]. Bioorg Chem,2018,80:602-610.

17 Takahashi Y, Hamasaki M, Aoki M, et al. Activated EphA2 processing by MT1-MMP is involved in malignant transformation of ovarian tumours *in vivo*[J]. Anticancer Res, 2018, 38:4257-4266.

18 Ning L,Shao HL,Ming JS,et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells redirected to EphA2 for the immunotherapy of non-small cell lung cancer[J]. Transl Oncol, 2018, 11:11-17.

19 Faoro L,Singleton PA,Cervantes GM,et al. EphA2 mutation in lung squamous cell carcinoma promotes increased cell survival, cell invasion, focal adhesions and mammalian target of rapamycin activation[J]. J Biol Chem, 2010, 285: 18575-18585.

20 Zhou Y,Yamada N,Tanaka T,et al. Crucial roles of RSK in cell motility by catalysing serine phosphorylation of EphA2 [J]. Nat Commun,2015,6:7679.

21 Yeddula N,Xia YF,Ke E,et al. Screening for tumor suppressors: loss of ephrin receptor A2 cooperates with oncogenic KRas in promoting lung adenocarcinoma[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2015,112:E6476-E6485.

22 Taddei ML, Parri M, Angelucci A, el al. Kinase-dependent and -independent roles of EphA2 in the regulation of prostate cancer invasion and metastasis[J]. Am J Pathol,2009,174:1492-1503.

23 Chih TC, Li ZL, Ching HL, et al. Quantitative phosphoproteomic analysis identifies the potential therapeutic target EphA2 for overcoming sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma cells[J]. Exp Mol Med,2020,52:497-513.

24 Dunne PD,Dasgupta S,Blayney JK,et al. EphA2 expression is a key driver of migration and invasion and a poor prognostic marker in colorectal cancer[J]. Clin Cancer Res,2016,22:230-242.

25 Miao H,Gale NW,Guo H,Q,et al. EphA2 promotes infiltrative invasion of glioma stem cells *in vivo* through cross-talk with Akt and regulates stem cell properties[J]. Oncogene,2015,34:558-567.

(下转第 459 页)