

# 松萝酸对 A549 和 NCI-H358 细胞增殖、凋亡及自噬的影响

李新伟,王延婷,李瑞雪,白慧敏,刘锦龙

(包头医学院免疫学教研室,包头 014040)

**摘要** **目的** 探究松萝酸(UA)对肺癌 A549 和 NCI-H358 细胞增殖、细胞周期、凋亡和自噬的影响。**方法** CCK-8 法检测 UA 对两种肺癌细胞增殖抑制作用。流式细胞术检测 UA 对两种肺癌细胞周期阻滞作用。DCFH-DA 探针法和流式细胞术检测 UA 诱导两种肺癌细胞生成活性氧(ROS)。Western blot 检测两种肺癌细胞经 UA 及 UA + ROS 抑制处理后凋亡相关蛋白 Bax、Caspase-3 和 Cleaved-Caspase-3 及自噬相关蛋白 LC3- I 和 LC3- II 的表达情况。**结果** ① UA 降低了两种细胞存活率,且抑制 A549 细胞增殖能力强于 NCI-H358 细胞。② UA 将 A549 细胞阻滞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期,NCI-H358 细胞阻滞在 G<sub>2</sub>/M 期和 S 期。③ UA 诱导两种细胞 ROS 含量增加,NCI-H358 细胞 ROS 增加量多于 A549 细胞,ROS 抑制剂会减少 UA 诱导的细胞内 ROS 增多。④ UA 引起了两种肺癌细胞凋亡相关蛋白 Bax 和 Cleaved-caspase-3 高表达及自噬相关蛋白 LC3- II/LC3- I 比值升高,其对 A549 促凋亡和自噬作用强于 NCI-H358;抑制 ROS 后,两种肺癌细胞的 Bax 和 Cleaved-Caspase-3 表达量和 LC3- II/LC3- I 比值均降低,其中 NCI-H358 细胞降低更多。**结论** UA 抑制肺癌 A549 和 NCI-H358 细胞增殖,诱导细胞周期阻滞,并引起癌细胞发生细胞凋亡与自噬,且 UA 对 A549 细胞抑制杀伤作用强于 NCI-H358 细胞。这其中诱导细胞 ROS 参与了 UA 对两种肺癌细胞的作用,相比 A549 细胞,ROS 可能更多介导 UA 诱导 NCI-H358 细胞凋亡和自噬发生。

**关键词** UA; A549; NCI-H358; 细胞周期; 活性氧; 凋亡; 自噬

**中图分类号** R 392

**文献标志码** A **文章编号** 1000 - 1492(2025)03 - 0455 - 08

doi:10. 19405/j. cnki. issn1000 - 1492. 2025. 03. 010

肺癌是发病率和病死率双高的恶性肿瘤<sup>[1-2]</sup>。2022 年肺癌新增病例数 250 万例,死亡 180 万人,位列癌症“死亡榜单”之首<sup>[3]</sup>。在约占肺癌病理类型 85% 的非小细胞肺癌中<sup>[4]</sup>,肺腺癌是最常见的组织学亚型。UA(usnic acid, UA)对肺腺癌细胞作用研究目前仅见对 A549 细胞的周期阻滞<sup>[5]</sup>,少见对其他肺腺癌细胞尤其未见对细支气管部位来源 NCI-H358 细胞的作用报道。该研究以同为肺腺癌但细胞形态不同的两种肺癌细胞 A549 和 NCI-H358 为研究对象,从细胞存活、细胞周期阻滞、凋亡和自噬几个角度探究 UA 对这两种细胞作用效果及其诱导细胞内产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)在凋亡和自噬中的作用地位,为进一步阐明 UA 对肺腺癌不同细胞学亚型细胞株抑制作用和探究 UA 与 ROS 相关信号通路以及后续松萝开发和临床用药提供数据支撑。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞材料** 人细胞肺癌 A549 和 NCI-H358 细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

**1.2 主要试剂与仪器** (+) - UA 购自上海梯希爱化成工业发展有限公司。A549 和 NCI-H358 细胞培养基、DMEM 高糖基础培养基购自中国武汉普诺赛公司。0.05% 的胰蛋白酶、胎牛血清购自美国 Gibco 公司。细胞培养级二甲基亚砜(DMSO)、CCK-8 试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。细胞周期检测试剂盒、DCFH-DA 探针购自苏州优逸兰迪生物技术有限公司。抗 Bax 抗体、抗 Cleaved-caspase-3 抗体、抗 Caspase-3 抗体、抗 LC3B 抗体、抗  $\beta$ -actin 抗体和羊抗兔二抗购自美国 Invitrogen 公司。TI-S 荧光倒置显微镜购自北京恒三江仪器销售有限公司。FACSCanto II 流式细胞仪、流式管购自美国 BD 公司。Bio Tek 全波长酶标仪购自美国伯腾仪器有限公司。

**1.3 CCK-8 法检测细胞增殖** A549 与 NCI-H358 细胞分别用含 10% 胎牛血清的细胞培养基于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 环境下培养,细胞接近融合时用 0.05% 胰蛋白酶消化、传代。UA 用 0.1% DMSO 溶解后配

2024 - 11 - 12 接收

基金项目:内蒙古自治区自然科学基金项目(编号:2020LH08006)

作者简介:李新伟,女,硕士研究生;

刘锦龙,男,副教授,硕士生导师,通信作者, E-mail: liujin-longxx@163.com

成相应浓度待用。取对数期生长 A549 和 NCI-H358 细胞,分别以每孔  $5 \times 10^3$  个细胞接种 96 孔板。细胞贴壁融合后,设空白组 (0  $\mu\text{mol/L}$  UA)、0.1% DMSO 组、25、50、100  $\mu\text{mol/L}$  UA 组,37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱继续培养 24 h 和 48 h 后,每孔加 CCK-8 溶液 10  $\mu\text{l}$ ,孵育 2 h,酶标仪 450 nm 波长测吸光度值,SPSS20 中 probit 模型计算  $\text{IC}_{50}$  值。

**1.4 流式细胞术检测细胞周期** 取  $5 \times 10^5$  个细胞铺 6 孔板。按空白 (0  $\mu\text{mol/L}$  UA)、0.1% DMSO 和 UA 系列终浓度 (25、50、100  $\mu\text{mol/L}$ ) 加入相应药物,孵育 24 h 和 48 h 后,弃培养基,PBS 洗后收集细胞,逐滴加入预冷无水乙醇,制成 70% 乙醇固定的细胞悬液,暗处 -20  $^{\circ}\text{C}$  过夜。预冷 PBS 洗细胞 2 次,收集细胞,每管加 500  $\mu\text{l}$  PI/RNase 染色,轻柔吹匀,室温避光孵育 15 min。过细胞筛,流式细胞仪进行细胞流式周期分析。

**1.5 DCFH-DA 探针法和流式细胞术检测 ROS** 按空白 (0  $\mu\text{mol/L}$  UA)、0.1% DMSO、25、50、100  $\mu\text{mol/L}$  UA 及 50  $\mu\text{mol/L}$  UA + 5 mmol/L N-乙酰-L-半胱氨酸 (NAC, ROS 抑制剂) 分组铺细胞及加药物,37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养 24 h。无血清培养基洗 3 次,加入 DCFH-DA 液,37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养 30 min。吸出探针液,无血清细胞培养基洗 3 次,每孔内留 0.5 ml 培养液,荧光倒置显微镜检测荧光。0.05% 胰酶消化细胞,PBS 洗 2 次,500  $\mu\text{l}$  培养基重悬细胞,上流式细胞仪检测 (FITC 通道检测 DCF)。

**1.6 Western blot 检测蛋白表达** 收集 0、25、50、100  $\mu\text{mol/L}$  UA 和 50  $\mu\text{mol/L}$  UA + 5 mmol/L NAC 处理 24 h 后的细胞,加入 RIPA 裂解液,BCA 法测定蛋白浓度。SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白后转 PVDF

膜,5% 脱脂牛奶室温封闭 90 min,PVDF 膜放入 TBST 稀释的一抗液体中,4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。次日 TBST 漂洗 3 次,每次 10 min。室温下加二抗孵育 90 min,TBST 漂洗 3 次,每次 10 min。ECL 显影,Image J 软件分析条带灰度值。

**1.7 统计学分析** 用 GraphPad Prism 8.0.2 和 FLOW JO 软件分析数据,所有数据均进行正态性检验及方差齐性检验,数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间差异比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

**2.1 UA 对 A549 和 NCI-H358 细胞增殖影响** CCK-8 实验显示,无论 24 h 还是 48 h,A549 和 NCI-H358 细胞 0.1% DMSO 组细胞存活率相比空白组差异均无统计学意义,说明 0.1% DMSO 对细胞毒性较小。随着 UA 浓度增加,两种肺癌细胞的细胞存活率降低,呈现浓度依赖性 (图 1)。各浓度 UA (25、50、100  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理后细胞存活率相比空白组均显示出极显著差异 (A549 24 h:  $F = 797.51, P < 0.0001$ ; A549 48 h:  $F = 819.72, P < 0.0001$ ; NCI-H358 24 h:  $F = 531.98, P < 0.0001$ ; NCI-H358 48 h:  $F = 569.03, P < 0.0001$ )。相同浓度 UA 对 A549 抑制作用比 NCI-H358 更强,UA 处理 A549 细胞 24 h 半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 为 ( $54.6 \pm 0.9$ )  $\mu\text{mol/L}$ ,NCI-H358 细胞  $\text{IC}_{50}$  值为 ( $64.0 \pm 3.3$ )  $\mu\text{mol/L}$ ;UA 处理 A549 细胞 48 h 的  $\text{IC}_{50}$  值为 ( $37.3 \pm 2.4$ )  $\mu\text{mol/L}$ ,NCI-H358 细胞  $\text{IC}_{50}$  值为 ( $41.9 \pm 1.3$ )  $\mu\text{mol/L}$ 。

**2.2 UA 对 A549 和 NCI-H358 细胞周期阻滞影响** A549 和 NCI-H358 细胞在不同浓度 UA 处理 24 h

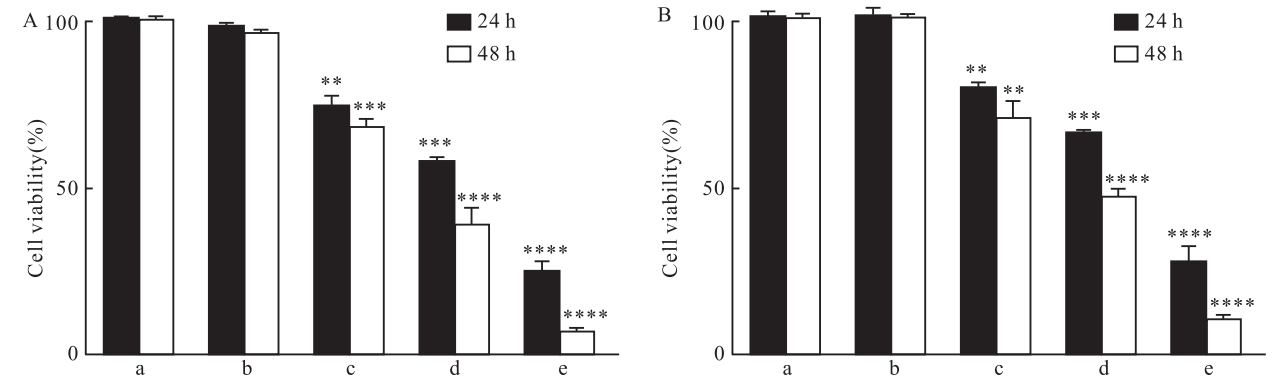


图 1 UA 对 A549 和 NCI-H358 细胞增殖的影响

Fig. 1 Effect of usnic acid on proliferation of A549 and NCI-H358 cells

A: Cell survival rate of A549 cells; B: Cell survival rate of NCI-H358 cells; a: blank control; b: 0.1% DMSO; c: 25  $\mu\text{mol/L}$  UA; d: 50  $\mu\text{mol/L}$  UA; e: 100  $\mu\text{mol/L}$  UA; \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$  vs blank control.

和 48 h 后通过流式细胞仪检测细胞周期,利用 FLOW JO 软件分析细胞周期流式图并绘制柱状图(图 2)。两种细胞 0.1% DMSO 组细胞周期相比空白组差异无统计学意义,各浓度 UA 均导致 A549 发生  $G_0/G_1$  期细胞周期阻滞,相比空白组差异有统计学意义(24 h:  $F = 17.54, P < 0.01$ ; 48 h:  $F = 18.11, P < 0.01$ )(图 2A、B)。不同浓度 UA 处理 NCI-H358 细胞 24 h 导致其发生  $G_2/M$  期细胞周期阻滞,相比空白组差异显著( $F = 26.36, P < 0.01$ )(图 2C)。延长至 48 h,随 UA 浓度增加,NCI-H358 细胞周期阻滞提前到 S 期。相比空白组,UA100  $\mu\text{mol/L}$  组 S 期细胞占比差异显著( $F = 10.66, P < 0.05$ )(图 2D)。

**2.3 UA 对 A549 和 NCI-H358 细胞诱生 ROS 影响** 荧光显微镜检测 UA 及 UA + NAC 处理 A549 和 NCI-H358 细胞诱生 ROS 荧光(图 3A、B),流式细胞仪分析统计两种细胞的荧光强度。结果显示(图 3C、D)两种肺癌细胞 0.1% DMSO 组荧光强度相比空白组差异均无统计学意义,不同浓度 UA 组 ROS 荧光量随 UA 浓度增加而增多。A549 经中高

浓度 UA 处理产生 ROS 荧光量显著高于空白组( $F = 66.21, P < 0.001$ ),NCI-H358 经低浓度 UA 处理产生 ROS 荧光量相比空白组差异有统计学意义( $F = 11.95, P < 0.05$ );且同浓度 UA 刺激 NCI-H358 细胞产生 ROS 荧光量高于 A549 产生 ROS 荧光量。50  $\mu\text{mol/L}$  UA + NAC 处理两种肺癌细胞后细胞内 ROS 荧光量明显减少,相比只加 50  $\mu\text{mol/L}$  UA, A549 细胞 ROS 减少量差异有统计学意义( $F = 12.46, P < 0.05$ ),而 NCI-H358 细胞 ROS 减少量则显示出极显著差异( $F = 32.32, P < 0.01$ ),其减少荧光量是 A549 减少量的 2.5 倍。

**2.4 UA 及 UA + ROS 抑制对 A549 和 NCI-H358 细胞凋亡影响** Western blot 实验显示(图 4A、B),与空白组相比,Caspase-3 蛋白表达变化差异无统计学意义,而两种肺癌细胞 UA 组中 Bax、Cleaved-caspase-3 蛋白表达量和 Cleaved-caspase-3/Caspase-3 值均随 UA 浓度增加而增多,增加量差异有统计学意义(A549 Bax:  $F = 103.91, P < 0.001$ ; A549 Cleaved-caspase-3:  $F = 152.23, P < 0.001$ ; A549 Cleaved-

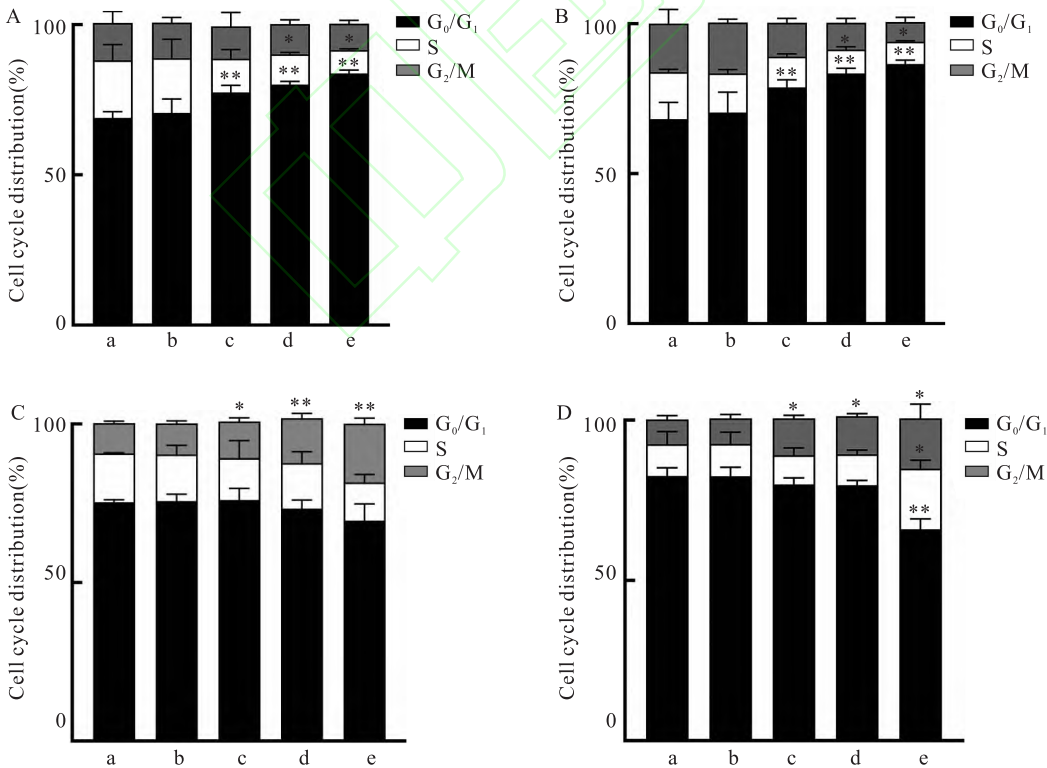


图 2 UA 对 A549 和 NCI-H358 细胞周期的影响

Fig. 2 Effect of usnic acid on the cell cycles of A549 and NCI-H358 cells

A: Percentage of A549 cells in each phase of the cell cycle after treatment with usnic acid for 24 h; B: Percentage of A549 cells in each phase of the cell cycle after treatment with usnic acid for 48 h; C: Percentage of NCI-H358 cells in each phase of the cell cycle after treatment with usnic acid for 24 h; D: Percentage of NCI-H358 cells in each phase of the cell cycle after treatment with usnic acid for 48 h; a: blank control; b: 0.1% DMSO; c: 25  $\mu\text{mol/L}$  UA; d: 50  $\mu\text{mol/L}$  UA; e: 100  $\mu\text{mol/L}$  UA; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs blank control.



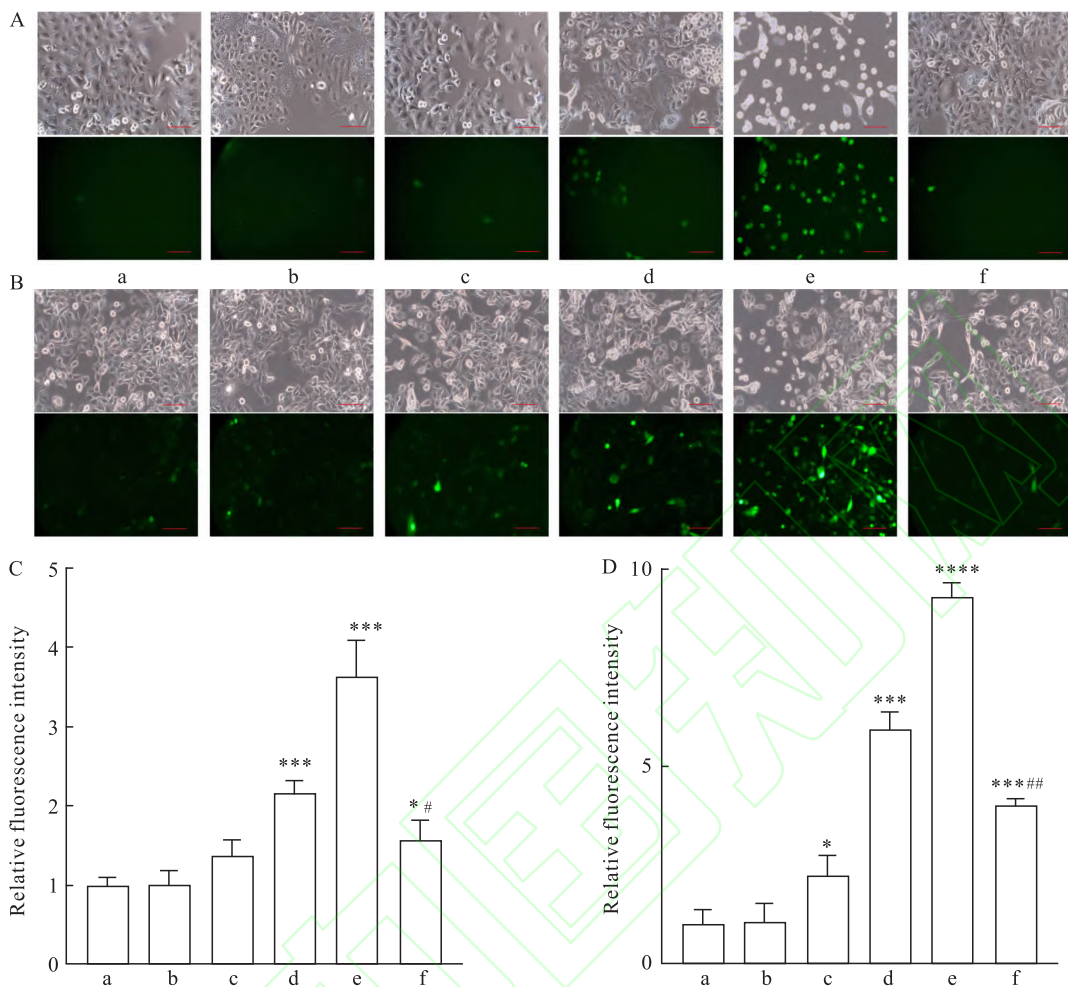


图3 UA对A549和NCI-H358细胞诱导ROS的影响

Fig. 3 Effect of usnic acid on ROS induction in A549 and NCI-H358 cells

A: ROS fluorescence in A549 cells  $\times 200$ ; B: ROS fluorescence in NCI-H358 cells  $\times 200$ ; C: Relative fluorescence intensity of A549 cells; D: Relative fluorescence intensity of NCI-H358 cells; a: blank control; b: 0.1% DMSO; c: 25  $\mu\text{mol/L}$  UA; d: 50  $\mu\text{mol/L}$  UA; e: 100  $\mu\text{mol/L}$  UA; f: 50  $\mu\text{mol/L}$  UA + 5mmol/L NAC; \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$  vs blank control; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs 50  $\mu\text{mol/L}$  UA.

caspase-3/Caspase-3:  $F = 177.92$ ,  $P < 0.0001$ ; NCI-H358 Bax:  $F = 50.02$ ,  $P < 0.01$ ; NCI-H358 Cleaved-caspase-3:  $F = 61.57$ ,  $P < 0.001$ ; NCI-H358 Cleaved-caspase-3/Caspase-3:  $F = 66.89$ ,  $P < 0.001$ ), 说明 UA 对两种肺癌细胞均具有促凋亡作用且呈浓度依赖性。相比 NCI-H358 细胞, UA 促 A549 细胞凋亡作用更强。抑制 ROS 后, 50  $\mu\text{mol/L}$  UA 处理两种肺癌细胞凋亡相关蛋白 Bax、Cleaved-caspase-3 表达量及 Cleaved-caspase-3/Caspase-3 值比无 ROS 抑制同浓度 UA 处理的细胞均降低 (A549 Bax:  $F = 13.22$ ,  $P < 0.05$ ; A549 Cleaved-caspase-3:  $F = 11.76$ ,  $P < 0.05$ ; A549 Cleaved-caspase-3/Caspase-3:  $F = 16.95$ ,  $P < 0.05$ ; NCI-H358 Bax:  $F = 18.18$ ,  $P < 0.01$ ; NCI-H358 Cleaved-caspase-3:  $F = 19.85$ ,  $P < 0.01$ ; NCI-H358 Cleaved-caspase-3/Caspase-3:  $F = 20.03$ ,  $P <$

0.01)。NCI-H358 细胞的 Cleaved-caspase-3/Caspase-3 值降低的倍数是 A549 相同比值的 1.4 倍, 表明抑制 ROS 在一定程度上会减弱 UA 对两种肺癌细胞促凋亡作用, 相比 A549 细胞, ROS 可能在 NCI-H358 细胞凋亡中发挥更大作用。

**2.5 UA 及 UA + ROS 抑制对 A549 和 NCI-H358 细胞自噬影响** 检测自噬相关蛋白 LC3-I 和 LC3-II 显示 (图 5A、5B), 随着 UA 浓度增加, 两种肿瘤细胞 UA 组 LC3-I 表达量减少、LC3-II 表达量增多、LC3-II/LC3-I 值增高且均相比空白组变化量差异有统计学意义 (A549 LC3-I:  $F = 78.04$ ,  $P < 0.001$ ; A549 LC3-II:  $F = 97.81$ ,  $P < 0.001$ ; A549 LC3-II/LC3-I:  $F = 146.53$ ,  $P < 0.001$ ; NCI-H358 LC3-I:  $F = 42.42$ ,  $P < 0.01$ ; NCI-H358 LC3-II:  $F = 86.62$ ,  $P < 0.001$ ; NCI-H358 LC3-II/LC3-I:  $F = 122.92$ ,  $P$

<0.001),说明两种肿瘤细胞经 UA 作用后细胞内 LC3- I 蛋白均向 LC3- II 蛋白发生转化,细胞自噬增多。对比 NCI-H358 细胞,UA 促 A549 细胞自噬作用更强。在 ROS 抑制后,50  $\mu\text{mol/L}$  UA 处理两种肺癌细胞自噬相关蛋白 LC3- I 和 LC3- II 表达量相比无 ROS 抑制同浓度 UA 处理的细胞均有变化(A549 LC3- I :  $F = 12.25, P < 0.05$ ; A549 LC3- II :  $F = 15.83, P < 0.05$ ; A549 LC3- II /LC3- I :  $F = 12.86, P < 0.05$ ; NCI-H358 LC3- I :  $F = 13.69, P < 0.05$ ; NCI-H358 LC3- II :  $F = 19.46, P < 0.01$ ; NCI-H358 LC3- II /LC3- I :  $F = 19.21, P < 0.01$ ),其中 LC3- I 表达量增多,LC3- II 表达量减少,NCI-H358 细胞 LC3- II /LC3- I 值降低倍数是 A549 细胞相同比值降低

的 2.2 倍,暗示 ROS 抑制后一定程度上减弱 UA 对两种肺癌细胞促自噬作用,相比 A549 细胞,NCI-H358 细胞自噬可能更依赖 ROS。

3 讨论

植物化学物质(包括植物次生代谢物)是研发具有抗癌活性药物的潜在来源<sup>[6]</sup>,UA 是地衣次生代谢产物之一,其对多种肿瘤具有抑制作用<sup>[7-10]</sup>。课题组选择同为肺腺癌但细胞学亚型不同的 A549 和 NCI-H358 细胞为研究对象,探究 UA 对同属肺腺癌但细胞结构有差异的两种细胞是否存在同样的杀伤作用和机制,为明确 UA 抑制肺腺癌细胞范围及未来开发用药奠定前期基础。

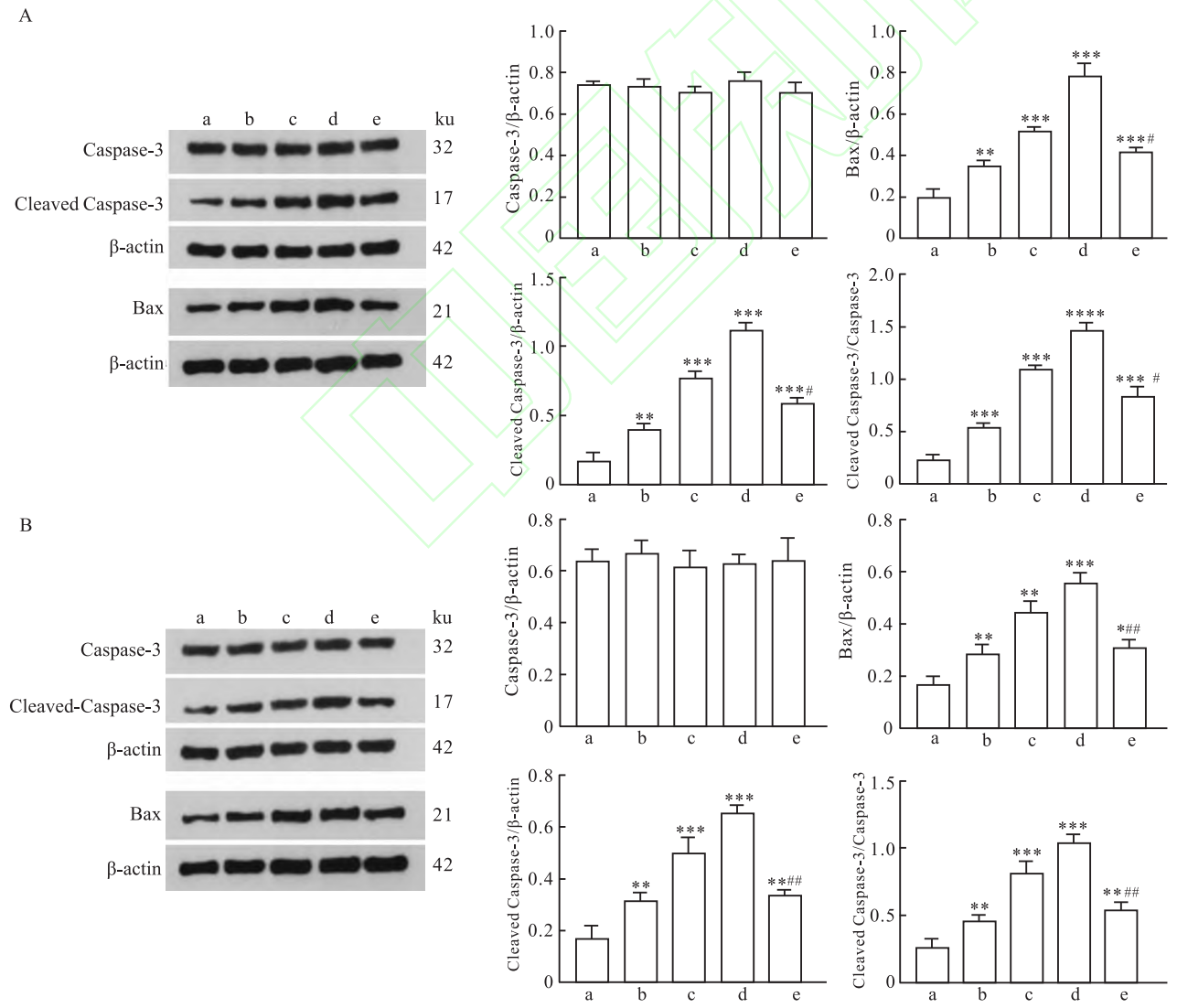


图 4 UA 及 UA + ROS 抑制对 A549 和 NCI-H358 细胞凋亡影响

Fig. 4 Effect of usnic acid and usnic acid + ROS inhibition on apoptosis of A549 and NCI-H358 cells

A: Apoptosis protein in A549 cells; B: Apoptosis protein in NCI-H358 cells; a: blank control; b: 25  $\mu\text{mol/L}$  UA; c: 50  $\mu\text{mol/L}$  UA; d: 100  $\mu\text{mol/L}$  UA; e: 50  $\mu\text{mol/L}$  UA + 5mmol/L NAC; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$  vs blank control; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs 50  $\mu\text{mol/L}$  UA.

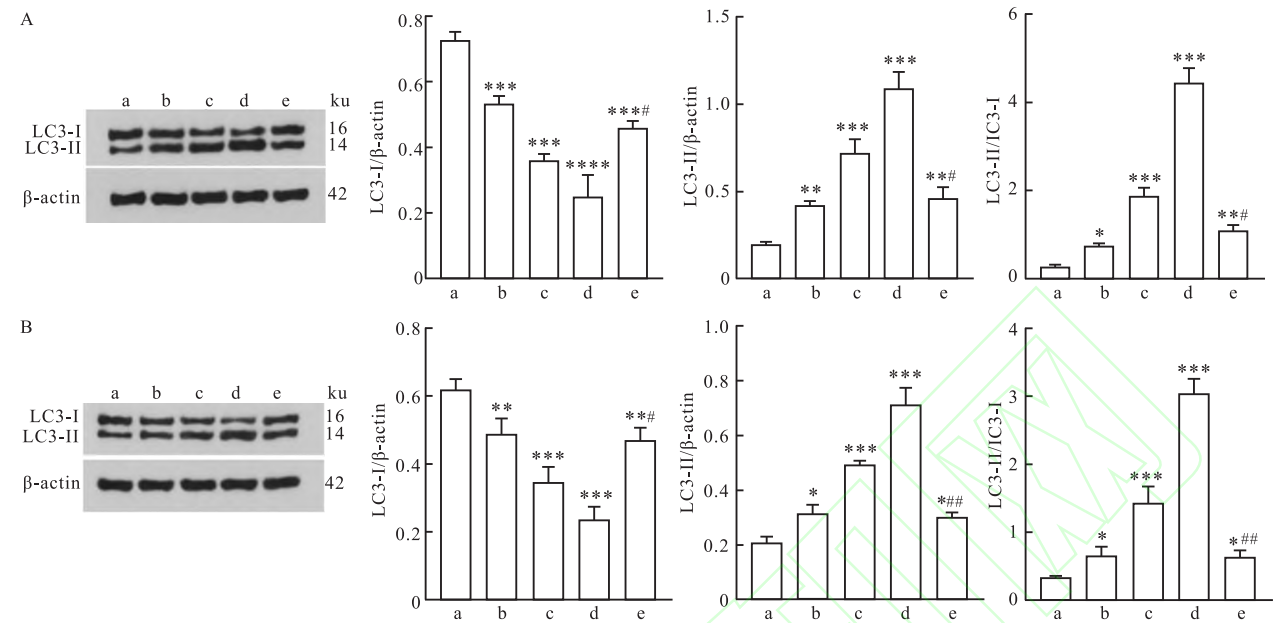


图5 UA及UA+ROS抑制对A549和NCI-H358细胞凋亡影响  
Fig. 5 Effect of usnic acid and usnic acid + ROS inhibition on autophagy of A549 and NCI-H358 cells

A: Autophagy protein in A549 cells; B: Autophagy protein in NCI-H358 cells; a: blank control; b: 25 μmol/L UA; c: 50 μmol/L UA; d: 100 μmol/L UA; e: 50 μmol/L UA + 5 mmol/L NAC; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs blank control; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs 50 μmol/L UA.

A549 细胞来源人肺泡细胞癌,具有肺泡 II 型上皮细胞特征。NCI-H358 细胞来源细支气管肺泡癌,具有 Clara 细胞分化特征;肺泡 II 型上皮细胞腺癌与 Clara 细胞腺癌在光镜下极为相似,只能通过电镜进行鉴别,有报道<sup>[11]</sup>显示通过 2D-DIGE 和 MALDI-TOF-MS/MS 实验发现 A549 和 NCI-H358 细胞之间有 5 种不同蛋白,包括泛素羧基末端水解酶同工酶 L1 (ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1, UTCHL1)、细胞角蛋白 19 (cytokeratin 19,CK19)、细胞角蛋白 8 (cytokeratin 8,CK8)、内质网氧化还原酶 1α (endoplasmic reticulum oxidoreductin 1-α,ERO1L) 和过氧化还原酶 2 (peroxiredoxin 2, PRDX2),进一步验证发现 ERO1L 在 NCI-H358 细胞中高表达,但在 A549 细胞中未观察到条带,两种细胞系之间存在显著差异。这可能是造成同为肺腺癌的 A549 和 NCI-H358 细胞在本研究中对 UA 响应程度差别的原因。

本研究数据结果显示,UA 抑制肺癌细胞 A549 和 NCI-H358 增殖,相比 NCI-H358,UA 对 A549 细胞增殖抑制作用更强。流式结果表明,UA 将 A549 细胞周期阻滞在  $G_0/G_1$  期,之前也有学者证明 UA 对肺癌 A549 细胞周期阻滞在  $G_0/G_1$  期<sup>[5]</sup>,本研究与之吻合。本研究中,UA 可将 NCI-H358 细胞阻滞在  $G_2/M$  期和 S 期,显示 UA 对两种肺癌细胞周期

阻滞的不同。部分凋亡蛋白和自噬相关蛋白检测再次证明了,相比 NCI-H358,UA 对 A549 细胞有更强的杀伤作用。在等量 UA 处理下,NCI-H358 细胞 ROS 生成量明显高于 A549。当抑制 ROS 后,UA 对两种肺腺癌细胞诱导凋亡和自噬都减弱,两种细胞均有一定程度的恢复生长且 NCI-H358 细胞存活率高于 A549,说明 ROS 参与了 UA 对两种细胞抑制杀伤作用,而且表明 ROS 可能在 UA 抑制杀伤 NCI-H358 细胞中起更重要的作用,而 A549 细胞中可能存在比 ROS 更主要的促凋亡自噬机制。

综上所述,UA 对同是肺腺癌细胞的 A549 和 NCI-H358 均有抑制杀伤作用,一定程度上体现其开发用药的广谱性,同时 UA 对两种肺腺癌细胞又存在不同程度诱导 ROS 和促凋亡和自噬作用,结合 ERO1L 在两种肺腺癌细胞中表达差异,暗示 UA 可能通过影响 ERO1L 和 ROS 等成分对不同肺腺癌细胞发挥作用。在后续实验中,将以此为基础进一步开展 UA 作用肺腺癌细胞的信号通路研究。

参考文献

[1] Siegel R L, Giaquinto A N, Jemal A. Cancer statistics, 2024 [J]. CA A Cancer J Clin, 2024, 74 (1): 12 - 49. doi:10.3322/caac.21820.  
[2] Zhu D, Shi X, Nicholas S, et al. Estimated annual prevalence, medical service utilization and direct costs of lung cancer in urban

- China[J]. Cancer Med, 2021, 10(8): 2914–23. doi:10.1002/cam4.3845.
- [3] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229–63. doi:10.3322/caac.21834.
- [4] 冯笑, 李云, 卜凡, 等. hsa-let-7e-5p 对肺腺癌细胞迁移的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2022, 57(12): 1964–70, 1978. doi:10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2022.12.020.
- [4] Feng X, Li Y, Bu F, et al. Hsa-let-7e-5p inhibits the migration of lung adenocarcinoma cells[J]. Acta Univ Med Anhui, 2022, 57(12): 1964–70, 1978. doi:10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2022.12.020.
- [5] Singh N, Nambiar D, Kale R K, et al. Usnic acid inhibits growth and induces cell cycle arrest and apoptosis in human lung carcinoma A549 cells[J]. Nutr Cancer, 2013, 65(Suppl 1): 36–43. doi:10.1080/01635581.2013.785007.
- [6] Sevastre A S, Manea E V, Popescu O S, et al. Intracellular pathways and mechanisms of colored secondary metabolites in cancer therapy[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(17): 9943. doi:10.3390/ijms23179943.
- [7] Gimla M, Pyrczak-Felczykowska A, Malinowska M, et al. The pyrazole derivative of usnic acid inhibits the proliferation of pancreatic cancer cells *in vitro* and *in vivo*[J]. Cancer Cell Int, 2023, 23(1): 210. doi:10.1186/s12935–023–03054–x.
- [8] Studzińska-Sroka E, Majchrzak-Celińska A, Zalewski P, et al. Lichen-derived compounds and extracts as biologically active substances with anticancer and neuroprotective properties[J]. Pharmaceuticals (Basel), 2021, 14(12): 1293. doi:10.3390/ph14121293.
- [9] Azhamuthu T, Kathiresan S, Senkuttuvan I, et al. Usnic acid attenuates 7, 12–dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) induced oral carcinogenesis through inhibiting oxidative stress, inflammation, and cell proliferation in male golden Syrian Hamster model[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2024, 38(1): e23553. doi:10.1002/jbt.23553.
- [10] Wang Y, Yan Y, Huo Y, et al. mRNA sequencing and CyTOF analysis revealed ASP2 altered the response patterns of hepatocellular carcinoma HepG2 cells to usnic acid[J]. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2023, 396(8): 1847–56. doi:10.1007/s00210–023–02428–2.
- [11] Hou W L, Chang M, Liu X F, et al. Proteomic and ultrastructural analysis of Clara cell and type II alveolar epithelial cell-type lung cancer cells[J]. Transl Cancer Res, 2020, 9(2): 565–76. doi:10.21037/tcr.2019.12.04.

## Effects of usnic acid on proliferation, apoptosis and autophagy of A549 and NCI-H358 cells

Li Xinwei, Wang Yanting, Li Ruixue, Bai Huimin, Liu Jinlong

(Teaching and Research Section of Immunology, Baotou Medical College, Baotou 014040)

**Abstract Objective** To investigate the effects of usnic acid(UA) on proliferation, cell cycle, apoptosis and autophagy of lung cancer cells A549 and NCI-H358. **Methods** The CCK-8 method was used to detect the inhibitory effect of UA on two kinds of lung cancer cells proliferation. Flow cytometry was used to detect the cell cycle arrest effect of UA on two types of lung cancer cells. The fluorescence amount of UA-induced reactive oxygen species (ROS) in two kinds of lung cancer cells were detected by DCFH-DA probe assay and flow cytometry. Western blot was used to detect the expression of apoptosis related proteins Bax, Caspase-3, Cleaved-Caspase-3, and autophagy related proteins LC3- I and LC3- II in two types of lung cancer cells after treatment with UA and UA + ROS inhibition. **Result** ① Usnic acid reduced the survival rates of two types of cells and had a stronger ability to inhibit the proliferation of A549 cells than NCI-H358 cells. ② Usnic acid blocked A549 cells in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase, while NCI-H358 cells in the G<sub>2</sub>/M and S phases. ③ Usnic acid induced an increase in ROS content in two types of cells. Compared to A549, NCI-H358 cells showed a greater increase in ROS, and the ROS inhibitor reduced the intracellular ROS increase induced by UA. ④ Usnic acid induced high expression of apoptosis-related proteins Bax and Cleaved Caspase-3 and increased the ratio of autophagy-related proteins LC3- II/LC3- I in both lung adenocarcinoma cells, and its pro-apoptotic and autophagic effects were stronger in A549 than in NCI-H358. After ROS inhibition, the expression levels of Bax and Cleaved Caspase-3 and the LC3- II/LC3- I ratio of both lung adenocarcinoma cells decreased, and the decrease was greater in NCI-H358 cells. **Conclusion** Usnic acid inhibits the proliferation of lung cancer A549 and NCI-H358 cells, induces cell cycle arrest, and induces apoptosis and autophagy in cancer cells. The inhibitory and killing effect of UA on A549 cells is stronger than that on NCI-H358 cells. In this case, the induced cell ROS are involved in the action of UA in two types of lung cancer cells. In contrast to A549



网络出版时间： 网络出版地址：

# 一种 PTEN 基因下调的孤独症幼鼠模型构建的改良方法

党伟利<sup>1,2</sup>, 梁绿圆<sup>1,2</sup>, 曹佳蕾<sup>1,2</sup>, 丁申奥<sup>1,2</sup>, 魏炳琦<sup>1,2</sup>, 邱霞<sup>1,2</sup>, 马丙祥<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> 河南中医药大学第一附属医院儿科医院, 郑州 450099; <sup>2</sup> 河南中医药大学儿科医学院, 郑州 450046)

**摘要** 目的 构建一种丙戊酸(VPA)和 PTEN 腺病毒(ADV)联合应用的 PTEN 基因下调 ASD 幼鼠模型(VPA-ADV), 并与 VPA 和 ADV 两种传统模型进行比较, 证明此模型在针刺治疗 ASD 造模的优势。**方法** 将怀孕 12.5 d 的 Wistar 大鼠随机分为 2 组, 分别给予 VPA(600 mg/kg)和等剂量的生理盐水作为 VPA 和正常组。记录新生幼鼠体质量、睁眼时间、尾巴畸形情况。正常组幼鼠随机分为 3 组, 每组 10 只, 设置为: 正常(NS)组、病毒(ADV)组、病毒阴性对照(ADV-NC)组; VPA 组幼鼠 20 只, 随机分为 2 组, 每组 10 只, 设置为丙戊酸(VPA)组、丙戊酸结合病毒干扰(VPA + ADV)组。观察 5 组幼鼠出生后的体质量、尾长、弯尾、负趋地性反射时间、骨骼畸形情况、21 日龄神经行为学表现、脑组织电镜髓鞘结构; 通过免疫组化、Western blot、q-PCR 方法检测 PTEN、PI3K、AKT、GSK3 $\beta$ 、MBP 表达水平。**结果** 与 NS 组孕鼠活产幼鼠对比, VPA 组孕鼠活产幼鼠畸形率显著增加, 体质量增长慢, 尾长增长慢, 负趋地性反射时间长( $P < 0.05$ )。3 个模型组较 NS 组体重增长慢, 尾长增长慢, 负趋地性反射时间长( $P < 0.05$ ), 且 VPA + ADV 组表现最为显著。3 组模型旷场试验跨中央格时间、跨边缘格次数、跨边缘格时间与 NS 组差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。自我捋毛实验中 VPA + ADV 组互动次数最少( $P < 0.05$ ), 且挖掘、自我捋毛次数最多( $P < 0.05$ )。三箱社交实验中, VPA + ADV 组进入社交箱平均次数以及停留时间最短( $P < 0.05$ ), 其在水迷宫实验中找到平台所用的时间越长, 穿越第三象限次数越少( $P < 0.05$ )。透射电镜观察胼胝体区髓鞘板层结构显示 NS 组结构清晰完整。与 NS 组相比, ADV-NC 组髓鞘结构近似, 3 个模型组髓鞘结构分层、断裂, 存在 ASD 病理改变及髓鞘损伤, 其中 VPA + ADV 组髓鞘增厚、分层明显, 严重的可见崩解。免疫组化、Western blot 及 q-PCR 结果均表明 VPA + ADV 组的 PTEN 表达下调约 50%, 最为明显。AKT、MBP 均表达增高, GSK3 $\beta$  表达降低( $P < 0.05$ )。免疫组化和 Western blot 结果表示 3 个模型组与 NS 组 PI3K 表达无统计学差异, 但 q-PCR 结果表示 3 个模型组的 PI3K-mRNA 表达显著提高( $P < 0.05$ ), 其中 VPA + ADV 组变化最为显著。**结论** VPA + ADV 新型 PTEN-ASD 模型更符合 ASD 髓鞘发育异常的表现, 且较 2 种传统模型有着造模价格低、活产率高、PTEN 基因下调明显的优势。

**关键词** PTEN; 孤独症; 动物模型; 丙戊酸

**中图分类号** Q 95-33

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2025)03-0462-10

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.03.011

2024-12-10 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 81973904); 河南省特色骨干学科中医学学科建设项目(编号: STG-ZYX06-202144、STG-ZYXKY-2020023); 2023 年度河南省中医学“双一流”创建科学研究专项课题(编号: HSRP-DFCTCM-2023-2-08、HSRP-DFCTCM-2023-3-06、HSRP-DFCTCM-2023-05-08); 河南省中医药科学研究专项课题(编号: 2023ZY2057、2021ZY2111)

作者简介: 党伟利, 女, 副主任医师, 硕士生导师;

马丙祥, 男, 主任医师, 教授, 通信作者, E-mail: mbx1963@126.com

孤独症谱系障碍(autistic disorder, ASD), 简称孤独症, 又称自闭症, 其病因中遗传因素约占 50%, 多基因遗传约占 50%, 单基因突变或拷贝数变异约占 10%<sup>[1]</sup>, 这表明临床表型的异质性是多种遗传结构变异累加的结果, 单个基因仅发挥较小的风险因素。尽管单基因仅占病因的一小部分, 但单基因突变为寻找 ASD 的病因提供了新的起点。磷酸酶和张力蛋白同源基因(phosphatase and tensin homolog gene, PTEN)作为 ASD 的风险基因之一, 越来越受到重视。PTEN 蛋白是 ASD 相关基因产物信号网络

cells, ROS might play a more significant role in mediating the apoptosis and autophagy induced by usnic acid in NCI-H358 cells.

**Key words** usnic acid; A549; NCI-H358; cell cycle; ROS; apoptosis; autophagy

**Fund program** Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (No. 2020LH08006)

**Corresponding author** Liu Jinlong, E-mail: liujinlongxx@163.com