

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2023.11.005

· 基础研究 ·

山柰酚通过 Met/PI3K/Akt/mTOR 通路诱导非小细胞肺癌 NCI-H1650 细胞发生自噬进而影响其增殖

朱志明^a, 周绮纯^b, 王娟娟^c, 邓芷茵^b, 唐青^b, 吴万垠^b, 王晰^b, 万信良^b, 莫瀚丹^b, 王苏美^{a,b} (广州中医药大学第二临床医学院 a. 药剂科; b. 中医药防治非小细胞肺癌临床与基础研究团队; c. 省部共建中医湿证国家重点实验室, 广东 广州 510120)

[摘要] **目的:** 探讨山柰酚诱导人非小细胞肺癌(NSCLC)NCI-H1650 细胞发生自噬及其机制。**方法:** 常规培养 NCI-H1650 细胞, 用不同浓度山柰酚处理细胞, 用 CCK-8 法、MTT 法以及 EdU 法检测山柰酚对 NCI-H1650 细胞增殖能力的影响, 用自噬双标记腺病毒 mCherry-EGFR-LC3 感染实验检测山柰酚对 NCI-H1650 细胞发生自噬的影响, 用 WB 法检测山柰酚处理后 NCI-H1650 细胞中自噬相关蛋白及 Met/PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白的表达, 用 qPCR 法检测山柰酚处理后 NCI-H1650 细胞中 Met mRNA 的表达。采用荧光素酶标记 A549-luc 细胞建立裸鼠移植瘤模型后用山柰酚进行处理, 用活体动物成像技术观察移植瘤生长情况, 用 WB 法检测移植瘤组织中自噬相关蛋白以及 Met/PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白的表达。**结果:** 山柰酚能显著抑制 NCI-H1650 细胞的增殖能力($P<0.05$), 山柰酚处理后 NCI-H1650 细胞内的自噬小体数量明显增加($P<0.05$)、自噬标志蛋白 LC3B 和 beclin1 表达均明显上调(均 $P<0.05$)、P62 表达明显下调($P<0.05$), 山柰酚可明显抑制 NCI-H1650 细胞中 Met mRNA 和蛋白的表达(均 $P<0.05$)、抑制 p-PI3K p85、PI3K p85、p-Akt 和 p-mTOR 蛋白表达(均 $P<0.05$)。山柰酚抑制 A549 细胞裸鼠移植瘤的生长($P<0.05$)和影响其体内自噬、Met/PI3K/Akt/mTOR 通路相关蛋白的表达(均 $P<0.05$)。**结论:** 山柰酚通过影响 Met/PI3K/Akt/mTOR 通路诱导 NSCLC NCI-H1650 细胞发生自噬, 进而抑制其增殖能力。

[关键词] 山柰酚; 非小细胞肺癌; NCI-H1650 细胞; A549 细胞; 细胞自噬; Met/PI3K/Akt/mTOR 通路; 增殖

[中图分类号] R734.2; R730.5; R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)11-0965-08

Kaempferol promotes cell autophagy and affects cell proliferation of non-small cell lung cancer H1650 cells via regulating Met/PI3K/Akt/mTOR pathway

ZHU Zhiming^a, ZHOU Qichun^b, WANG Juanjuan^c, DENG Zhiyin^b, TANG Qing^b, WU Wanyin^b, WANG Xi^b, WAN Xinliang^b, MO Handan^b, WANG Sumei^{a,b} (a. Department of Pharmacy; b. Clinical and Basic Research Team of Traditional Chinese Medicine Prevention and Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer; c. State Key Laboratory of Dampness Syndrome of Chinese Medicine; Second Clinical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the specific effect and mechanism of kaempferol on inducing autophagy in non-small cell lung cancer (NSCLC) NCI-H1650 cells. **Methods:** Human NSCLC cell line NCI-H1650 was cultured and treated with kaempferol at different concentrations. The effects of kaempferol on NSCLC cell viability and proliferation were observed by CCK-8, MTT and EdU methods. LC3 adenovirus infection experiment was performed to investigate the effect of kaempferol on NSCLC cell autophagy. Western blot was used to detect the expression of key proteins of cell autophagy and relevant molecules of Met/PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. Meanwhile, qPCR was used to detect the mRNA expression of Met in NCI-H1650 cells after kaempferol treatment. The transplanted tumor model of nude mice was established by using luciferase labeled A549-luc cells. The tumor growth was observed by *in vivo* animal imaging, and the expression of autophagy related key proteins and molecules of Met/PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in the xenograft tissues were detected by Western blot. **Results:** Kaempferol significantly inhibited the proliferation of NCI-H1650 cells ($P<0.05$). After kaempferol treatment, the number of autophagosomes in NCI-H1650 cells was significantly increased ($P<0.05$), the expressions of autophagy related key proteins, LC3B and beclin1, were significantly increased (all $P<0.05$), and the expression of P62 was significantly decreased ($P<0.05$). Kaempferol significantly inhibited the mRNA and protein expression of Met,

[基金项目] 广东省中医药局面上研究项目(No. 20222085); 广东省教育厅研究项目(No. 2020KTSCX029); 广东省中医证候临床研究开放课题(No. ZH2020KF03); 省部共建中医湿证国家重点实验室项目(No. SZ2021ZZ38)

[作者简介] 朱志明(1981—), 学士, 主管中药师, 主要从事中药抗肿瘤作用及机制的研究。E-mail: 353537020@qq.com

[通信作者] 王苏美, E-mail: wangsume198708@163.com

and inhibited the protein expression of p-PI3K p85, PI3K p85, p-Akt and p-mTOR (all $P < 0.05$). Kaempferol inhibited the growth of transplanted tumor ($P < 0.05$) and affected autophagy and the expression of Met/PI3K/Akt/mTOR pathway-related proteins in nude mouse tumor models (all $P < 0.05$). **Conclusion:** Kaempferol induces autophagy in NSCLC NCI-H1650 cells by affecting the Met/PI3K/Akt/mTOR pathway, which in turn inhibits their proliferative capacity.

[Key words] kaempferol; non-small cell lung cancer(NSCLC); NCI-H1650 cell; A549 cell; cell autophagy; Met/PI3K/Akt/mTOR pathway; proliferation

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(11): 965-972. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.11.005]

肺癌位居癌症相关性死因的首位,其5年生存率仅为19%。根据病理类型可分为小细胞肺癌和非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC),其中NSCLC占85%~90%,大多数肺癌患者在临床确诊时已处于中晚期,已失去手术机会^[1]。针对晚期NSCLC患者,临床主要的治疗方案为化疗、分子靶向治疗以及免疫治疗。然而,这些治疗方案不良反应明显、患者耐受性差、容易产生药物耐药及发生免疫相关的不良反应^[2-3]。因此,亟需研发更为安全有效的NSCLC治疗药物及策略。山柰酚(kaempferol),可从山柰、白花蛇舌草等多种中草药中提取^[4],具有明确的抗肿瘤、抗炎和抗氧化等作用^[5]。有研究^[6]发现,山柰酚可抑制肺癌细胞生长、增殖,但具体机制尚不清楚。细胞自噬是指在一定条件下,损坏的细胞器或蛋白被自噬小泡包裹后形成自噬体,与溶酶体结合后被降解的过程。自噬可通过消除潜在有害成分和突变DNA、克服应激条件或维持代谢来抑制癌症的发生发展^[7]。间质表皮转化因子(mesenchymal epithelial transition factor, Met)是一种穿膜酪氨酸激酶受体,其在肺癌中可发生突变,呈异常高表达状态,与肿瘤细胞的存活、代谢、生长和耐药密切相关;抑制Met的表达可诱导细胞自噬。在NSCLC中,PI3K/Akt/mTOR通路与肿瘤发生和进展密切相关^[8]。目前,山柰酚对NSCLC细胞的作用研究以及山柰酚诱导NSCLC细胞自噬相关的研究鲜有报道。本研究主要探讨山柰酚是否通过调控Met/PI3K/Akt/mTOR通路促进NSCLC发生细胞自噬进而抑制NSCLC细胞的增殖,旨在为治疗NSCLC治疗药物的筛选及开发提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 动物、细胞、试剂和仪器

雌性BALB/c裸鼠,6~8周,体重18~20 g,购自广东药康生物科技有限公司[(动物合格证号:SCXK(粤)2020-0054],动物实验研究方案获广东省中医院动物伦理委员会审查批准,批准号为2020079。自噬双标记腺病毒(mCherry-EGFR-LC3)购自汉恒生物科技(上海)有限公司。人NSCLC细胞NCI-H1650、A549购自中国科学院细胞库(上海),在37℃、5% CO₂的培养箱中培养,用含10%胎牛血清和1%青/链霉素双抗的RPMI 1640培养基培养。山柰酚纯度为98%,购自Targetmol公司,

用100% DMSO将其配成100 mmol/L的贮存液。RPMI 1640培养基、青/链霉素双抗、胎牛血清均购自美国Gibco公司,MTT试剂购自美国Sigma-Aldrich公司,CCK-8试剂盒、Triton X-100、4%多聚甲醛均购自碧云天公司,Cell-Light EdU细胞增殖试剂盒购自锐博公司,BCA蛋白定量试剂盒购自美国Thermo公司,Transcriptor First Strand cDNA Synthesis试剂盒、FastStart Essential DNA Green Master均购自瑞士Roche公司,抗Met、p-Met、PI3K p85、p-PI3K p85、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、beclin1、LC3B、GAPDH抗体(均为兔抗)与P62抗体(鼠抗)、辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔或鼠IgG均购自美国CST公司。Infinite M1000 PRO多功能酶标仪购自瑞士Tecan公司,Counter Star自动细胞分析仪购自美国Inno-Alliance Biotech公司,ChemiDoc XRS+化学发光成像系统购自美国Bio-Rad公司,LightCycler 96荧光定量PCR仪购自瑞士Roche公司,小动物活体成像仪购自美国Perkin Elmer公司,LMS710激光扫描共聚焦显微镜购自德国Zeiss公司。

1.2 CCK-8法、MTT法检测山柰酚对NCI-H1650细胞增殖的影响

取对数生长期的NCI-H1650细胞以 5×10^3 个/孔的密度接种于96孔板中。细胞贴壁后,向孔中加入不同浓度(10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$)的山柰酚,对照组不给药处理,培养基中含0.1% DMSO。处理不同时间(24、48、72 h)后进行CCK-8法或MTT法检测。CCK-8法:每孔加入10 μL CCK-8试剂,继续培养4 h,在酶标仪450 nm处检测光密度(D)值。MTT法:每孔加入100 μL 0.5 mg/mL的MTT溶液,继续培养4 h后弃上清液,每孔加入100 μL DMSO溶液,低速震荡10 min后,在酶标仪490 nm处检测D值。细胞增殖率=药物组D值/对照组D值 $\times 100\%$ 。

1.3 EdU法检测山柰酚对NCI-H1650细胞增殖能力的影响

取对数生长期NCI-H1650细胞,以 5×10^3 个细胞/孔接种于96孔板,细胞贴壁后,予20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 山柰酚处理24 h后,加入含50 $\mu\text{mol/L}$ EdU培养液处理2 h,PBS清洗后加入4%多聚甲醛固定液室温处理30 min。加入2 mg/mL甘氨酸在低速摇床处理5 min,PBS清洗2次,加入含0.5% Triton X-100渗透

液摇床处理 10 min, PBS 清洗 1 次, 加入 1×Apollo 染色反应液避光轻摇处理 30 min, PBS 清洗 2 次, 加入 DNA 染色剂 Hoechst 避光轻摇处理 30 min, PBS 清洗 2 次。在倒置荧光显微镜下观察拍照, 每组 3 个复孔, 每孔选取 3~5 个视野进行拍照, 分别计算各组的 EdU 阳性率。EdU 阳性率=EdU 阳性细胞数/细胞总数×100%。

1.4 自噬双标记腺病毒(mCherry-EGFR-LC3)感染法检测山柰酚对 NCI-H1650 细胞自噬的影响

取 1×10^5 个对数生长期的 NCI-H1650 细胞, 均匀接种于共聚焦皿中, 细胞贴壁后, 按公司提供的操作步骤感染细胞, 主要步骤为取出 mCherry-EGFR-LC3 病毒, 冰上溶解, 分装, 按感染复数=50 计算所需病毒体积, 吸取相应病毒体积加入 1 mL 无双抗完全培养基中, 轻轻混匀。取出共聚焦皿, 吸弃旧培养基, 加入上述病毒混合液, 在培养箱处理 4 h, 往皿中再加入 1 mL 无双抗完全培养基, 继续放回培养箱培养 2~4 h 即感染完成。mCherry-EGFR-LC3 感染成功后, 分别予以 0、80 $\mu\text{mol/L}$ 山柰酚处理 24 h, 在激光共聚焦显微镜下观察细胞内自噬小体和自噬溶酶体情况。

1.5 qPCR 法检测山柰酚处理各组 NCI-H1650 细胞中 Met 的 mRNA 表达水平

用 TRIzol 法裂解提取 NCI-H1650 细胞内的总 RNA。按 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒的说明书将 RNA 逆转录成 cDNA, 按 FirstStart Essential DNA Green Master 试剂盒操作步骤进行 qPCR 反应。Met 正向引物: 5'-ATTGATTGCTGGTGTGT-3', 反向引物: 5'-TTTCTGTAGTTGGGCTTAC-3'; GAPDH 正向引物: 5'-CTCCTCCTGTTCGACAGTCAGC-3', 反向引物: 5'-CCCAATACGACCAAATCCGTT-3'。qPCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 共 40 个循环。以 GAPDH 为内参基因, 用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 公式计算目的基因的相对表达量。

1.6 A549-luc 细胞裸鼠移植瘤模型的制备及观察山柰酚对移植瘤生长的影响

移植瘤模型采用 A549-luc 细胞, 其带有荧光素酶报告基因。取荧光素酶标记 A549-luc 细胞重悬, 调整细胞密度为 1×10^7 个/mL, 每只裸鼠皮下注射 0.2 mL 细胞悬液。造模后用随机数字表法将裸鼠随机分为对照组(予生理盐水处理)、山柰酚低剂量组[20 mg/(kg·d)]、山柰酚高剂量组[60 mg/(kg·d)], 每组 7 只, 腹腔注射给药, 一天一次, 给药 28 d。在开始给药的前一天和给药结束后, 用小动物活体成像仪拍照并保存数据, 用 Living Image 软件分析生物发光信号强弱, 并进行统计。

1.7 WB 法检测山柰酚处理各组 NCI-H1650 细胞和

移植瘤组织中的蛋白表达水平

收集处理后各组 NCI-H1650 细胞、移植瘤组织, 提取其蛋白, 用 BCA 法检测蛋白浓度后, 按比例加入 5×上样缓冲液, 100 $^{\circ}\text{C}$ 处理 5 min 使蛋白变性。取 20~30 μg 蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜, 在 5% 脱脂奶中室温处理 1 h, 加入抗 Met、p-Met、PI3K p85、p-PI3K p85、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、beclin1、LC3B、P62、GAPDH 抗体(稀释比例均为 1:1 000)溶液, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下处理过夜。用 TBST 洗涤 3 次后, 加入 HRP 标记抗兔或鼠 IgG 二抗(1:3 000 稀释)溶液, 在室温下处理 1 h。TBST 洗涤 3 次后在化学发光成像系统下显影, Image J 软件分析结果。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析, 用 GraphPad Prism 进行图片制作。所有实验均独立重复 3 次。符合正态分布的计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 3 组及以上数据组间差异评估采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 2 组数据组间差异比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 山柰酚抑制 NCI-H1650 细胞的增殖活性

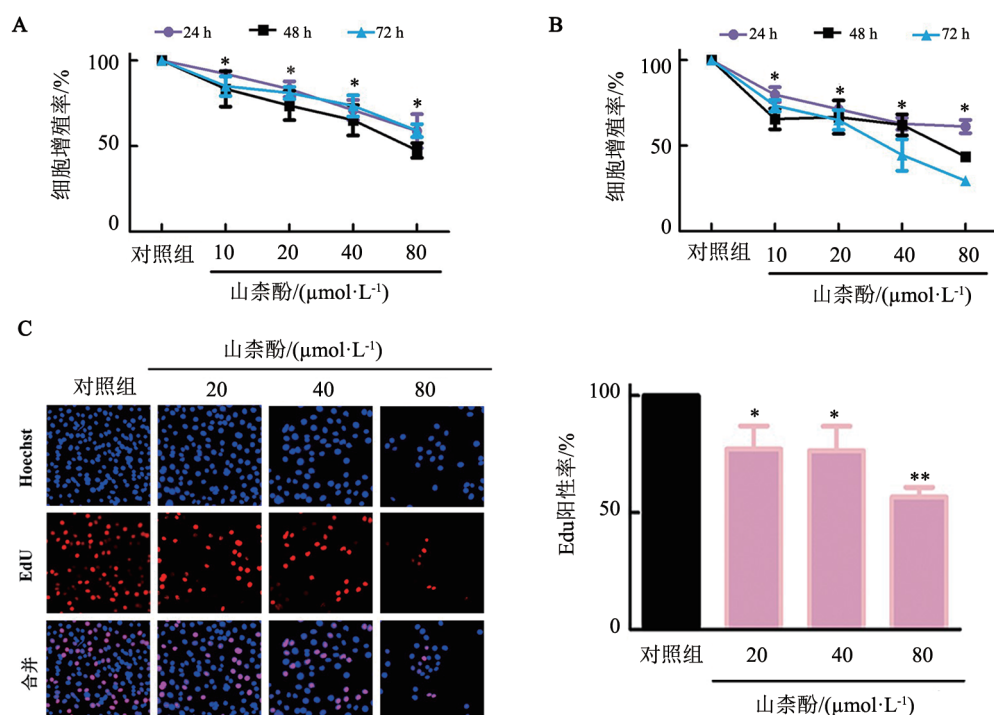
CCK-8 法和 MTT 法检测结果(图 1A)显示, 10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 的山柰酚处理 72 h 后均可明显抑制 NCI-H1650 细胞的增殖活性(均 $P < 0.05$)。EdU 染色检测结果(图 1B)显示, 20、40 和 80 $\mu\text{mol/L}$ 山柰酚均可明显抑制 NCI-H1650 细胞增殖(图 1B)。实验结果说明, 山柰酚可抑制 NCI-H1650 细胞的增殖活性。

2.2 山柰酚诱导 NCI-H1650 细胞发生自噬

自噬双标腺病毒感染检测结果(图 2A)显示, 山柰酚处理后 NCI-H1650 细胞内的自噬小体明显增加($P < 0.05$), 自噬溶酶体数量升高不明显($P > 0.05$)。实验结果提示山柰酚对 NCI-H1650 细胞自噬有激活作用, 但还需要结合其他实验进一步明确。WB 方法检测结果(图 2B)显示, 与对照组比较, 山柰酚处理组 NCI-H1650 细胞中 LC3B 和 beclin1 蛋白表达量明显上升, 同时 P62 蛋白表达明显下降(均 $P < 0.05$)。实验结果说明, 山柰酚可诱导 NCI-H1650 细胞发生自噬。

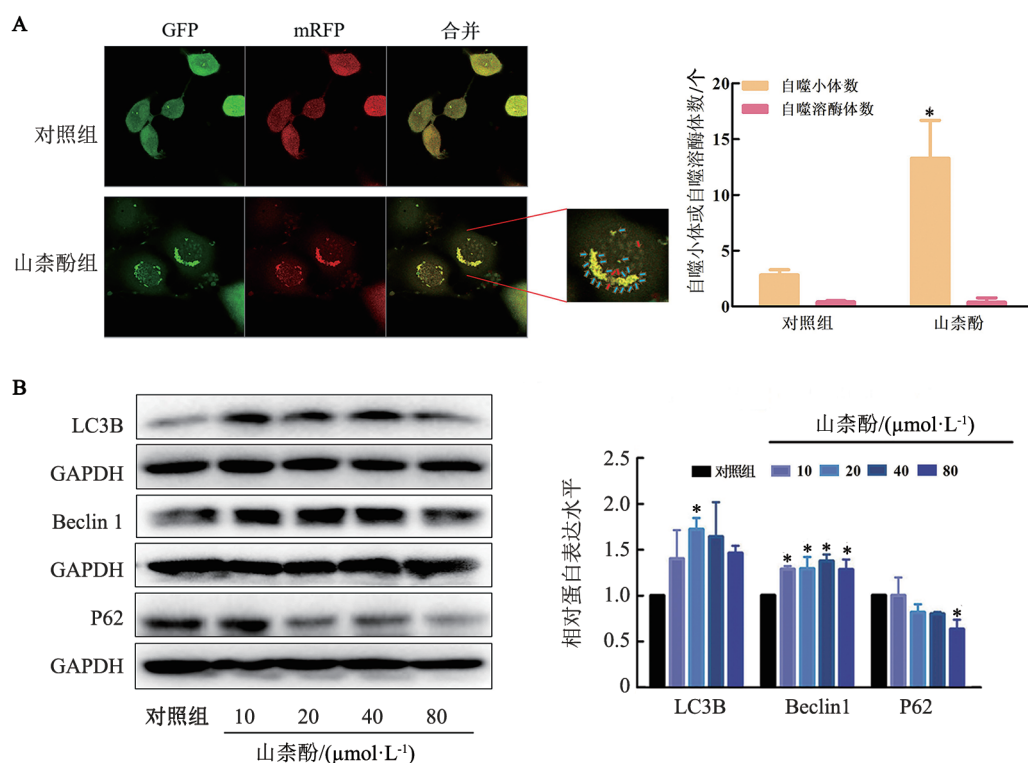
2.3 山柰酚在体外抑制 NCI-H1650 细胞内 Met/PI3K/Akt/mTOR 通路

WB 实验结果(图 3A)显示, 山柰酚处理后在 NCI-H1650 细胞中 p-Me、Met 均被明显抑制, 尤其是 p-Met 蛋白的表达抑制得更加明显(图 3A, 均 $P < 0.05$)。qPCR 实验结果显示, 与对照组 NCI-H1650 细胞中 Met mRNA 表达量(1.01 ± 0.01)比较, 10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 山柰酚组 NCI-H1650 细胞中 Met mRNA 表



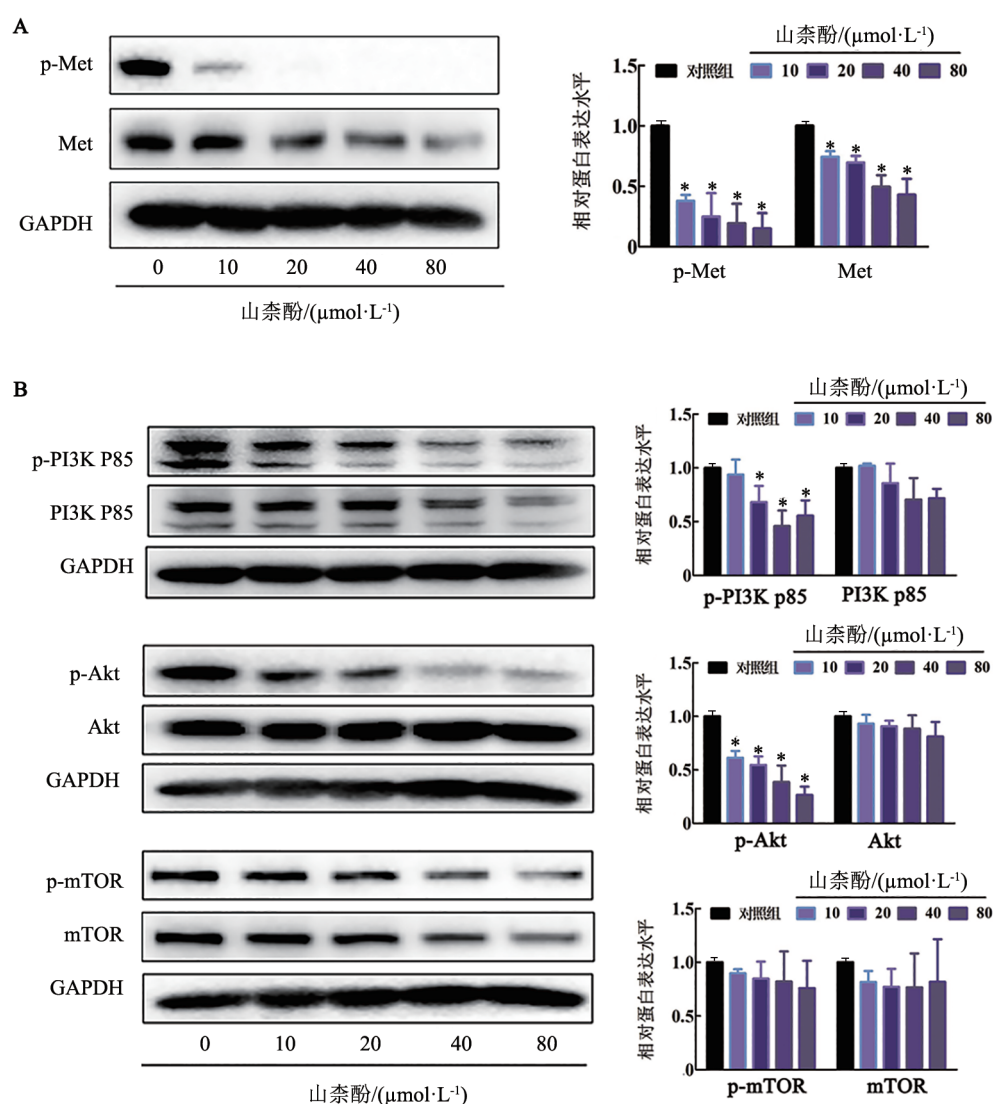
A: CCK-8法检测山奈酚对NCI-H1650细胞增殖活性的影响; B: MTT法检测山奈酚对NCI-H1650细胞增殖活性的影响;
C: EdU法检测山奈酚对NCI-H1650细胞增殖能力的影响($\times 400$)。
与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图1 山奈酚对NCI-H1650细胞的增殖活性的影响



A: 自噬双标腺病毒感染法检测山奈酚处理后NCI-H1650细胞自噬小体及自噬溶酶体的变化($\times 600$),
蓝色箭头所指为自噬小体, 红色箭头所指为自噬溶酶体; B: WB法检测山奈酚处理后NCI-H1650
细胞内自噬标志蛋白LC3B、beclin1和P62的表达变化。
与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图2 山奈酚诱导NCI-H1650细胞发生细胞自噬



A: WB法检测经山柰酚处理后Met及p-Met在NCI-H1650细胞中的表达;B: WB法检测经山柰酚处理后NCI-H1650细胞中p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、p-mTOR和mTOR蛋白的表达。与对照组相比,* $P<0.05$ 。

图3 山柰酚抑制NCI-H1650细胞中Met/PI3K/Akt/mTOR通路相关蛋白的表达

达量(0.81 ± 0.07 、 0.74 ± 0.5 、 0.65 ± 0.08 、和 0.58 ± 0.06)均明显降低(均 $P<0.05$)。为了明确山柰酚诱导NCI-H1650细胞自噬的分子机制,再检测了自噬经典通路PI3K/Akt/mTOR通路关键蛋白的表达。结果(图3B)显示,随着山柰酚剂量的增高,p-PI3K p85和PI3K p85表达量均明显降低,与对照组比较,80 $\mu\text{mol/L}$ 山柰酚组细胞内的PI3K p85蛋白及磷酸化水平显著下降($P<0.05$)。细胞内p-Akt和p-mTOR蛋白水平有较明显的降低趋势(图3B)。实验结果提示,山柰酚可能通过调控Met/PI3K/Akt/mTOR通路诱导NSCLC细胞发生自噬。

2.4 山柰酚抑制A549细胞移植瘤组织内自噬、Met/PI3K/Akt/mTOR通路相关蛋白表达和其生长

A549细胞移植瘤模型检测结果(图4A)显示,与对照组比较,山柰酚处理组第28天的移植瘤组织荧光强度明显减弱($P<0.05$)。WB法检测结果显示,

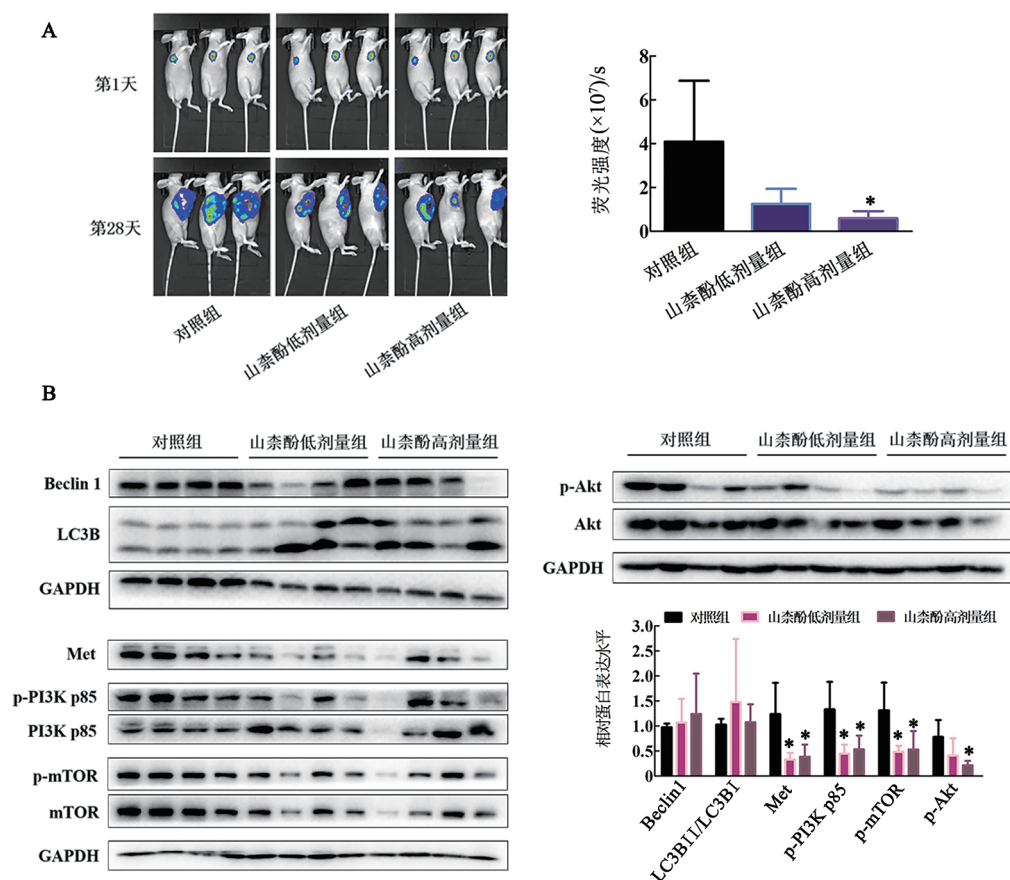
与对照组比较,山柰酚处理组beclin1和LC3B蛋白表达均有所上调,Met蛋白表达下降(均 $P<0.05$),p-PI3K p85、p-Akt及p-mTOR的表达均明显降低(均 $P<0.05$)。实验结果说明,山柰酚可能通过调控Met/PI3K/Akt/mTOR诱导A549细胞发生自噬,进而抑制移植瘤的生长。

3 讨论

山柰酚作为一种潜在的抗肿瘤药物,可以通过促进细胞内活性氧生成,使多数肿瘤细胞周期G2/M期发生阻滞以及调控肿瘤细胞内PI3K/Akt、表皮生长因子受体、MAPK、Wnt等信号通路而发挥抗肿瘤作用^[9-15]。有研究^[16]表明,山柰酚可以选择性降低Nrf2 mRNA和蛋白质水平,下调Nrf2相关靶基因的转录从而诱导NSCLC细胞凋亡。山柰酚还可以通过与PI3K结合抑制其下游Akt1活性,从而抑制TGF- β 1

诱导的 NSCLC 细胞 MET 和细胞迁移^[17]。但目前山柰酚诱导 NSCLC 细胞自噬相关的研究鲜有报道。PI3K/Akt/mTOR 通路是诱导肿瘤细胞自噬的经典通路,有研究^[18]发现,山柰酚通过抑制人内皮细胞中 PI3K/Akt/mTOR 途径上调自噬来缓解氧化低密度脂

蛋白诱导的内皮细胞凋亡,山柰酚也可以通过 SOX2/miR-124-3p/PI3K/Akt/mTOR 轴介导显著促进骨髓间充质干细胞的成骨作用^[19]。但山柰酚是否可以通过 PI3K/Akt/mTOR 途径诱导 NSCLC 细胞自噬,目前少有报道。



A: 通过小动物活体成像观察各组裸鼠的移植瘤生长情况; B: WB 法检测移植瘤组织中 beclin 1、LC3B 以及 Met/PI3K/Akt/mTOR 通路相关蛋白的表达。与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图4 山柰酚在 A549 细胞移植瘤组织中调控 Met/PI3K/Akt/mTOR 通路蛋白表达进而抑制其生长

首先,本研究通过 CCK8 法、MTT 法和 EdU 实验明确了山柰酚对 NCI-H1650 细胞的增殖活性的抑制作用。其次,本研究通过自噬双标腺病毒感染实验发现,山柰酚处理后 NSCLC 细胞内自噬小体的数量明显增加, WB 法结果也显示,自噬标志蛋白 LC3B 和 beclin1 表达量明显上升, P62 表达量明显下降。生理状况下,在肿瘤自噬保护性机制中,为维持细胞自噬在可调控范围内,细胞内 P62 蛋白表达往往呈上升趋势,而本研究发现,山柰酚处理 NSCLC 细胞后,细胞内 P62 蛋白的表达下降,并且自噬标志性蛋白 LC3B、beclin1 的表达上调,结果提示山柰酚可能通过诱导 NSCLC 细胞自噬进而抑制 NSCLC 细胞生长。本研究进一步发现,山柰酚处理 NSCLC 细胞后,可明显抑制 Met mRNA 和蛋白的表达,抑制 p-PI3K p85、PI3K p85、p-Akt 和 p-mTOR 蛋白水平,从而诱导细胞自噬。

移植瘤模型实验检测结果显示,山柰酚处理后移植瘤的生长明显减慢, Met、p-PI3K p85、p-Akt 和 p-mTOR 的蛋白水平也明显降低,进一步表明山柰酚是通过 Met/PI3K/Akt/mTOR 通路诱导了 NSCLC 细胞自噬,进而抑制其生长。

细胞自噬在肿瘤中具有双重作用。虽然自噬在代谢应激下可促进存活,但当细胞自噬过度激活状态时,会使细胞内重要物质也消化降解,引起细胞内生理功能紊乱,使细胞启动死亡程序;同时,自噬激活也可有效抑制肿瘤细胞染色体的不稳定性,使维持染色体不稳定性物质被自噬消化吸收,间接地抑制肿瘤代谢增殖,诱导致死性细胞自噬^[20]。目前,已有研究^[21-23]表明,山柰酚可以通过影响 AMPK/AKT、IRE1-JNK-CHOP、PI3K/AKT/mTOR 通路分别诱导肝癌、胃癌和结直肠癌细胞发生致死性自噬,山柰酚还

可以通过影响线粒体膜电位诱导神经胶质瘤细胞发生自噬和焦亡^[24]。而本研究明确了山柰酚可以通过调控Met/PI3K/AKT/mTOR通路诱导NSCLC细胞发生自噬。除了影响肿瘤的自噬,山柰酚也可以诱导多种肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤的侵袭和迁移^[25-27],这提示山柰酚可以作为抗肿瘤药物进行开发利用。同时,基于山柰酚诱导NSCLC细胞引起的自噬,其具体作用机制值得进一步深入研究。

综上所述,山柰酚可以通过调控Met/PI3K/AKT/mTOR通路诱导NSCLC细胞发生自噬,进而抑制NSCLC细胞的增殖,发挥其抗肺癌的作用(图5)。本研究为中药抗肿瘤活性成分山柰酚抗NSCLC的作用提供了重要的实验依据,也为其日后的研究开发及临床应用提供了实验参考。

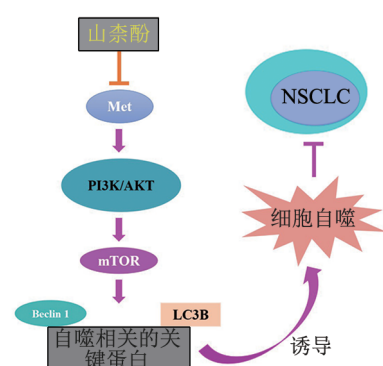


图5 山柰酚调控Met/PI3K/Akt/mTOR通路诱导NSCLC细胞发生自噬

参考文献

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, *et al.* Cancer statistics, 2022[J]. CA A Cancer J Clinicians, 2022, 72(1): 7-33. DOI: 10.3322/caac.21708.
- [2] PIOTROWSKA Z, ISOZAKI H, LENNERZ J K, *et al.* Landscape of acquired resistance to osimertinib in EGFR-mutant NSCLC and clinical validation of combined EGFR and RET inhibition with osimertinib and BLU-667 for acquired RET fusion[J]. Cancer Discov, 2018, 8(12): 1529-1539. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-18-1022.
- [3] MOSLEHI J J, SALEM J E, SOSMAN J A, *et al.* Increased reporting of fatal immune checkpoint inhibitor-associated myocarditis[J/OL]. Lancet, 2018, 391(10124): 933[2023-07-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29536852/>. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)30533-6.
- [4] DABEEK W M, MARRA M V. Dietary quercetin and kaempferol: bioavailability and potential cardiovascular-related bioactivity in humans[J/OL]. Nutrients, 2019, 11(10): 2288[2023-07-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31557798/>. DOI: 10.3390/nu11102288.
- [5] REN J, LU Y F, QIAN Y H, *et al.* Recent progress regarding kaempferol for the treatment of various diseases[J]. Exp Ther Med, 2019, 18(4): 2759-2776. DOI: 10.3892/etm.2019.7886.
- [6] GOVINDARAJU S, ROSHINI A, LEE M H, *et al.* Kaempferol conjugated gold nanoclusters enabled efficient for anticancer therapeutics to A549 lung cancer cells[J]. Int J Nanomed, 2019, 14: 5147-5157. DOI: 10.2147/ijn.s209773.
- [7] LEVY J M M, TOWERS C G, THORBURN A. Targeting autophagy in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2017, 17(9): 528-542. DOI: 10.1038/nrc.2017.53.
- [8] DRILON A, CLARK J W, WEISS J, *et al.* Antitumor activity of crizotinib in lung cancers harboring a MET exon 14 alteration[J]. Nat Med, 2020, 26(1): 47-51. DOI: 10.1038/s41591-019-0716-8.
- [9] WANG F J, WANG L, QU C, *et al.* Kaempferol induces ROS-dependent apoptosis in pancreatic cancer cells via TGM2-mediated Akt/mTOR signaling[J/OL]. 21(1): 396[2023-07-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33845796/>. DOI: 10.1186/s12885-021-08158-z.
- [10] LOMPHITHAK T, JAIKLA P, SAE-FUNG A, *et al.* Natural flavonoids quercetin and kaempferol targeting G2/M cell cycle-related genes and synergize with smac mimetic LCL-161 to induce necroptosis in cholangiocarcinoma cells[J/OL]. Nutrients, 2023, 15(14): 3090[2023-07-10]. <https://doi.org/10.3390/nu15143090>. DOI: 10.3390/nu15143090.
- [11] KUBINA R, KRZYKAWSKI K, DZIEDZIC A, *et al.* Kaempferol and fisetin-related signaling pathways induce apoptosis in head and neck cancer cells[J/OL]. Cells, 2023, 12(12): 1568[2023-07-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37371038/>. DOI: 10.3390/cells12121568.
- [12] 赵文杰, 杨森, 张城栋. 基于PI3K/AKT/mTOR轴山柰酚对前列腺癌22RV1细胞增殖、转移的作用研究[J]. 临床泌尿外科杂志, 2023, 38(4): 271-276. DOI: 10.13201/j.issn.1001-1420.2023.04.007.
- [13] LEE J, KIM J H. Kaempferol inhibits pancreatic cancer cell growth and migration through the blockade of EGFR-related pathway *in vitro*[J/OL]. PLoS One, 2016, 11(5): e0155264[2023-07-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4866780/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0155264.
- [14] CHOI J B, KIM J H, LEE H, *et al.* Reactive oxygen species and p53 mediated activation of p38 and caspases is critically involved in kaempferol induced apoptosis in colorectal cancer cells[J]. J Agric Food Chem, 2018, 66(38): 9960-9967. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b02656.
- [15] 瞿小祥, 孔东波, 鲁小红, 等. 山柰酚调控Wnt/ β -catenin途径对前列腺癌小鼠T细胞的影响及作用机制[J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(16): 1946-1951. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2022.16.005.
- [16] FOUZDER C, MUKHUTY A, KUNDU R. Kaempferol inhibits Nrf2 signalling pathway via downregulation of Nrf2 mRNA and induces apoptosis in NSCLC cells[J/OL]. Arch Biochem Biophys, 2021, 697: 108700[2023-07-10]. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108700>. DOI: 10.1016/j.abb.2020.108700.
- [17] JO E, PARK S J, CHOI Y S, *et al.* Kaempferol suppresses transforming growth factor- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and migration of A549 lung cancer cells by inhibiting Akt1-mediated phosphorylation of Smad3 at threonine-179[J]. Neoplasia, 2015, 17(7): 525-537. DOI: 10.1016/j.neo.2015.06.004.
- [18] CHE J B, LIANG B, ZHANG Y, *et al.* Kaempferol alleviates ox-LDL-induced apoptosis by up-regulation of autophagy via inhibiting PI3K/

- Akt/mTOR pathway in human endothelial cells[J]. *Cardiovasc Pathol*, 2017, 31: 57-62. DOI: 10.1016/j.carpath.2017.08.001.
- [19] GAN L, LENG Y, MIN J, *et al.* Kaempferol promotes the osteogenesis in rBMSCs *via* mediation of SOX2/miR-124-3p/PI3K/Akt/mTOR axis[J/OL]. *Eur J Pharmacol*, 2022, 927: 174954[2023-07-10]. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.174954>. DOI: 10.1016/j.ejphar.2022.174954.
- [20] RABIEE S, TAVAKOL S, BARATI M, *et al.* Autophagic, apoptotic, and necrotic cancer cell fates triggered by acidic pH microenvironment[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7): 12061-12069. DOI: 10.1002/jcp.27876.
- [21] HAN B, YU Y Q, YANG Q L, *et al.* Kaempferol induces autophagic cell death of hepatocellular carcinoma cells *via* activating AMPK signaling[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(49): 86227-86239. DOI: 10.18632/oncotarget.21043.
- [22] KIM T W, LEE S Y, KIM M, *et al.* Kaempferol induces autophagic cell death *via* IRE1-JNK-CHOP pathway and inhibition of G9a in gastric cancer cells[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2018, 9: 875[2023-07-10]. <https://www.nature.com/articles/s41419-018-0930-1>. DOI: 10.1038/s41419-018-0930-1.
- [23] 顾超, 王恺纯, 徐勤芬, 等. 山柰酚调控PI3K/Akt/mTOR通路诱导人结直肠癌RKO细胞自噬[J]. *中南药学*, 2020, 18(10): 1668-1673.. DOI: 10.7539/j.issn.1672-2981.2020.10.010
- [24] CHEN S Q, MA J, YANG L, *et al.* Anti-glioblastoma activity of kaempferol *via* programmed cell death induction: involvement of autophagy and pyroptosis[J/OL]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 614419[2023-07-10]. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.614419>. DOI: 10.3389/fbioe.2020.614419.
- [25] LIU Z Q, YAO G L, ZHAI J, *et al.* Kaempferol suppresses proliferation and induces apoptosis and DNA damage in human gallbladder cancer cells through the CDK4/CDK6/cyclin D1 pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25(3): 1311-1321. DOI: 10.26355/eurrev_202102_24836.
- [26] RUAN G Y, YE L X, LIN J S, *et al.* An integrated approach of network pharmacology, molecular docking, and experimental verification uncovers kaempferol as the effective modulator of HSD17B1 for treatment of endometrial cancer[J/OL]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 204[2023-07-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36932403/>. DOI: 10.1186/s12967-023-04048-z.
- [27] JU P C, HO Y C, CHEN P N, *et al.* Kaempferol inhibits the cell migration of human hepatocellular carcinoma cells by suppressing MMP-9 and Akt signaling[J]. *Environ Toxicol*, 2021, 36(10): 1981-1989. DOI: 10.1002/tox.23316.
- [收稿日期] 2023-08-15 [修回日期] 2023-10-25
[本文编辑] 向正华, 沈志超