

· 基础研究 ·

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2025.08.004

丹皮酚通过 EZH2/NXPH4/CDKN2A 轴抑制肺癌 A549 细胞的增殖、迁移和侵袭能力

张亮¹, 杨波¹, 肖婷², 李晓平¹, 王旭¹, 张卫东¹, 李明江¹ (1. 天津市第一中心医院 胸外科, 天津 300192; 2. 南开大学 药学院, 天津 300350)

[摘要] **目的:** 探讨丹皮酚(Pae)通过调控果蝇 zeste 基因增强子同源物 2/神经外营养蛋白 4 抗体/细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 2A(EZH2/NXPH4/CDKN2A)轴对肺癌 A549 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。**方法:** 以梯度浓度(0、6.25、12.5、25、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$)的 Pae 处理肺癌 A549 细胞, 采用 CCK-8 法确定干预浓度; 将 A549 细胞分为对照组(未经任何处理的 A549 细胞)、Pae 组(12.5 $\mu\text{g/mL}$ Pae)、Pae + siEZH2 组(转染 siEZH2 + 12.5 $\mu\text{g/mL}$ Pae)、Pae+siNC 组(转染 siNC + 12.5 $\mu\text{g/mL}$ Pae)、Pae + vector NC 组(转染 vectorNC + 12.5 $\mu\text{g/mL}$ Pae)、Pae + vectorEZH2 组(转染 vector EZH2+12.5 $\mu\text{g/mL}$ Pae), 予以相应的处理后, 采用克隆形成实验检测细胞克隆数, 流式细胞术检测细胞周期分布, Transwell 实验检测细胞侵袭能力的变化, 划痕实验检测细胞迁移能力的变化, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况, WB 法检测 EZH2、NXPH4、CDKN2A、Bcl-2 和 caspase-3 蛋白表达量。在 A549 细胞中单独转染 siEZH2 或 siNC, 采用流式细胞仪测量细胞凋亡, WB 法检测 Bcl-2 和 caspase-3 蛋白表达。建立 A549 细胞裸鼠移植瘤模型, 评估 Pae 的体内抗肿瘤作用及其对相关蛋白表达的影响。**结果:** 选择 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 为后续实验干预浓度。与对照组相比, Pae 组细胞克隆数、S 期细胞比例、迁移、侵袭能力以及 EZH2、NXPH4 和 Bcl-2 蛋白表达量显著降低, G0/G1 期细胞比例、细胞凋亡率以及 CDKN2A 和 caspase-3 蛋白表达量明显升高(均 $P < 0.05$); 与 Pae + siNC 组相比, Pae + siEZH2 组细胞克隆数、S 期细胞比例、迁移侵袭能力以及 EZH2、NXPH4 和 Bcl-2 蛋白表达量下降幅度更大, G0/G1 期细胞比例、细胞凋亡率以及 CDKN2A 和 caspase-3 蛋白表达量升高幅度更大($P < 0.05$); 与 Pae+vectorNC 组相比, Pae + vectorEZH2 组细胞克隆数、S 期细胞比例、迁移侵袭能力以及 EZH2、NXPH4 和 Bcl-2 蛋白表达量显著升高, G0/G1 期细胞比例、细胞凋亡率以及 CDKN2A 和 caspase-3 蛋白表达量明显下降($P < 0.05$)。敲低 EZH2 后 A549 细胞凋亡率和 caspase-3 表达明显上升, Bcl-2 表达明显下降($P < 0.05$)。体内实验表明 Pae 可显著降低肿瘤体积和质量且抑制 EZH2/NXPH4/CDKN2A 通路的活性。**结论:** Pae 通过抑制 EZH2/NXPH4/CDKN2A 通路抑制 A549 细胞增殖、迁移和侵袭, 诱导细胞凋亡。

[关键词] 丹皮酚; 肺癌; A549 细胞; 增殖; 迁移; 侵袭; 果蝇 zeste 基因增强子同源物 2/神经外营养蛋白 4 抗体/细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 2A 轴

[中图分类号] R734.2; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025) 08-0814-09

Paeonol suppresses the proliferation, migration, and invasion abilities of lung cancer A549 cells via the EZH2/NXPH4/CDKN2A axis

ZHANG Liang¹, YANG Bo¹, XIAO Ting², LI Xiaoping¹, WANG Xu¹, ZHANG Weidong¹, LI Mingjiang¹ (1. Department of Thoracic Surgery, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China; 2. College of Pharmaceutical Sciences, Nankai University, Tianjin 300350, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of paeonol (Pae) on the proliferation, migration, and invasion abilities of lung cancer A549 cells by regulating the enhancer of zeste homolog 2/neurexophilin 4/cyclin dependent kinase inhibitor 2A (EZH2/NXPH4/CDKN2A) axis. **Methods:** A549 lung cancer cell lines were treated with Pae at gradient concentrations (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$). CCK-8 assay was used to screen for suitable Pae concentrations. A549 cells were assigned into the control group (untreated A549 cells), the Pae group (12.5 $\mu\text{g/mL}$ Pae), the Pae + siEZH2 group (transfected with siEZH2+12.5 $\mu\text{g/mL}$ Pae), the Pae + siNC group (transfected with siNC+12.5 $\mu\text{g/mL}$ Pae), the Pae + vectorNC group (transfected with vector NC + 12.5 $\mu\text{g/mL}$ Pae), and the Pae + vectorEZH2 group (transfected with vector EZH2 + 12.5 $\mu\text{g/mL}$ Pae). After the indicated treatments, the colony formation assay was applied to detect the number of cell clones. Cell cycle distribution was measured by flow cytometry. Transwell assay was used to detect

[基金项目] 天津市自然科学基金(No. 23JCYBJC01350)

[作者简介] 张亮(1987—), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事肺癌发病机制、临床诊断及外科为基础的综合治疗研究

[通信作者] 李明江(扫码获取作者联系方式)



changes in cell invasion ability. Scratch assay was employed to detect changes in cell migration ability. Flow cytometry was applied to detect cell apoptosis. WB assay was used to detect the protein expression levels of EZH2, NXPH4, CDKN2A, Bcl-2, and caspase-3. Only siEZH2 or only siNC were transfected into A549 cells. Cell apoptosis was measured by flow cytometry, and the expressions of Bcl-2 and caspase-3 proteins were detected by WB assay. An A549-cell nude-mouse transplant model was established to evaluate the *in vivo* antitumor efficacy of Pae and its effects on the expressions of relevant proteins. **Results:** 12.5 $\mu\text{g/mL}$ was chosen as the concentration for subsequent experiments. Compared with those in the control group, the cell clone number, the proportion of S phase cells, the migration ability, the invasion ability, and the expression levels of EZH2, NXPH4, and Bcl-2 proteins were significantly reduced in the Pae group, while the proportion of G0/G1 phase cells, the apoptosis rate and the expression levels of CDKN2A and caspase-3 proteins were significantly increased (all $P < 0.05$). Compared with those in the Pae + si NC group, the cell clone number, the proportion of S phase cells, the migration ability, the invasion ability, and the expression levels of EZH2, NXPH4, and Bcl-2 proteins decreased more markedly in the Pae + siEZH2 group, while the proportion of G0/G1 phase cells, the apoptosis rate and the expression levels of CDKN2A and caspase-3 proteins increased more markedly (all $P < 0.05$). Compared with those in the Pae+vector NC group, the cell clone number, the proportion of S phase cells, the migration and invasion abilities, and the expression levels of EZH2, NXPH4, and Bcl-2 proteins increased significantly in the Pae + vectorEZH2 group, while the proportion of G0/G1 phase cells, the apoptosis rate and the expression levels of CDKN2A and caspase-3 proteins decreased significantly ($P < 0.05$). After EZH2 knockdown, the apoptosis rate and caspase-3 expression of A549 cells increased significantly, while Bcl-2 expression decreased significantly (both $P < 0.05$). *In vivo* experiments showed that paeonol significantly reduced tumor volume and mass, and inhibited the activity of the EZH2/NXPH4/CDKN2A pathway. **Conclusion:** Pae inhibits the proliferation, migration and invasion of A549 cells and induces apoptosis by down-regulating the EZH2/NXPH4/CDKN2A pathway.

[Key words] paeonol (Pae); lung cancer; A549 cell; proliferation; migration; invasion; enhancer of zeste homolog 2/neurexophilin 4/cyclin dependent kinase inhibitor 2A (EZH2/NXPH4/CDKN2A) axis

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(8): 814-822. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.08.004]

肺癌是全球发病率和病死率均较高的恶性肿瘤,按组织学类型可分为小细胞肺癌和非小细胞肺癌,后者约占全部肺癌的85%。与肺癌发生有关的因素有很多,包括吸烟、家用燃料烟雾以及感染HPV。尽管肺癌在筛查、预防和治疗方面取得了一定进展,患者的5年生存率仍偏低。肿瘤细胞的迁移和侵袭是肺癌治疗失败和患者生存期缩短的主要原因^[1]。因此,寻找安全有效的药物抑制肺癌细胞的活性是治疗的关键。丹皮酚(paeonol, Pae)是从牡丹、芍药等中草药提取的有效活性成分,除了具有镇静、催眠、抗菌、抗炎和降血压等作用,还被发现临床上具有抗癌的作用。既往研究^[2]表明,含Pae的复合制剂能够促进肺癌移植瘤小鼠肿瘤细胞的凋亡、抑制其生长。李睿慧等^[3]发现,Pae经ITGB3/p38 MAPK通路抑制乳腺癌细胞增殖与侵袭。以上表明Pae能够通过靶向相关疾病通路,在抑制癌细胞活性方面发挥重要药理功效。果蝇zeste基因增强子同源物2/neurexophilin 4/cyclin dependent kinase inhibitor 2A (the enhancer of zeste homolog 2/neurexophilin 4/cyclin dependent kinase inhibitor 2A, EZH2/NXPH4/CDKN2A)轴在肺癌细胞增殖与迁移中起重要作用^[4]。其中EZH2是一种进化保守的基因,存在于多种物种中。现有证据^[5]表明,EZH2在胃癌、膀胱癌、肝癌等多种恶性肿瘤中过表达;而通过小分子抑制剂或基因敲除技术抑制EZH2的表达,可以减少肿瘤细胞的生长,抑制肿瘤的生成^[6]。神经嗜

酸性蛋白(neurexophilin, NXPH)家族包括成员NXPH1-4,是癌症(包括白血病、乳腺癌和膀胱癌)预后不良的生物标志物^[7]。NXPH4是一种神经肽样糖蛋白,在人体器官中广泛表达。研究^[8]表明,敲除NXPH4能明显抑制非小细胞肺癌的细胞增殖和迁移。CDKN2A属于细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂家族,是一个重要的抗肿瘤基因^[9]。NXPH4通过与CDKN2A相互作用,对CDKN2A蛋白的稳定性产生负面影响,从而参与调控细胞生长。综上,调控EZH2/NXPH4/CDKN2A轴或影响癌细胞活性。尚缺少研究阐明Pae是否经EZH2/NXPH4/CDKN2A轴影响肺癌细胞增殖与迁移。基于此,本研究旨在阐明Pae经EZH2/NXPH4/CDKN2A轴调控肺癌细胞增殖、迁移与侵袭的机制,阐明Pae发挥药效的可能作用机制,以期肺癌提供一种靶向治疗手段。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器

1.1.1 细胞与实验动物

将A549细胞从 -80°C 冷冻状态中取出,复苏后置于含10%胎牛血清(FBS)的DMEM培养基中培养,隔天更换培养液。当细胞汇合度达到90%左右时进行传代,取传代3次且处于对数生长期的细胞用于后续实验。无胸腺雄性裸鼠[BALB/c-nu, (20 ± 2) g]购自天津市中医药大学第一附属医院[生产许可证号:SCXK(津)2020-0005],饲养于无菌动物房中,使

用许可证号:SYXK(津)2024-0013。动物实验经本院动物伦理委员会批准(批号:H202403002)。

1.1.2 主要试剂与仪器

肺癌 A549 细胞(A3031)购自上海酶研生物科技有限公司, FBS(FBS-UE500)购自中科腾宇(广州)科技有限公司, Matrigel 人工基膜(354480)购自江苏康成百澳生物科技有限公司, Transwell 小室(354480)购自北京云肽生物科技有限公司, EzCell™ 细胞周期分析试剂盒购自 Abcam 公司, Lipofectamine™ 2000 转染试剂(11668019)购自上海善然生物科技有限公司, EZH2(ab307646)、NXPH4(ab228949)、CDKN2A(ab201980)、Bcl-2(ab196495)、caspase-3(ab184787)抗体均购自 Abcam 公司, EZH2 重组慢病毒委托晶莱生物公司制备, IXplore Pro 倒置显微镜购自奥林巴斯公司, DxFLEX 流式细胞仪购自贝克曼公司, GenoSens2250 凝胶成像系统(1801002)购自上海勤翔科学仪器有限公司。

1.2 CCK-8 法筛选 Pae 干预浓度

取对数生长期的 A549 细胞, 以 4×10^4 个/孔接种于 96 孔板中, 分别加入 0、6.25、12.5、25、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 的 Pae 干预 24 h, 然后向每孔中加入 CCK-8 溶液, 标准环境下处理 2 h 后检测在 450 nm 处的光密度(D)值并计算细胞存活率。

1.3 分组处理

取对数生长期的 A549 细胞, 将其分为对照组(未经任何处理的 A549 细胞)、Pae 组(12.5 $\mu\text{g/mL}$ Pae)、Pae + si EZH2 组(转染 si EZH2 + 12.5 $\mu\text{g/mL}$ Pae)、Pae + si NC 组(转染 siNC + 12.5 $\mu\text{g/mL}$ Pae)、Pae + vector NC 组(转染 vector NC + 12.5 $\mu\text{g/mL}$ Pae)、Pae + vector EZH2 组(转染 vector EZH2 + 12.5 $\mu\text{g/mL}$ Pae), 其中转染组在各自转染操作 48 h 后, 以 12.5 $\mu\text{g/mL}$ Pae 干预细胞。

1.4 克隆形成实验检测 Pae 和 EZH2 对 A549 细胞克隆形成能力的影响

取各组细胞, 制备 1×10^4 个/mL 的悬液, 接种至 6 孔板中, 每孔 1×10^3 个细胞。在 37 °C 下培养 14 d, 分别用多聚甲醛和结晶紫处理 30 min, 拍照并计数每孔中的克隆数。

1.5 流式细胞术检测 Pae 和 EZH2 对 A549 细胞周期分布的影响

采用 EzCell™ 细胞周期分析试剂盒检测细胞周期。各组细胞经胰蛋白酶消化后, 4 °C 下 $300 \times g$ 离心 5 min, 4 °C 下 70% 乙醇固定 24 h。PBS 洗涤, 在添加 RNase A 的染色液中进行 PI 染色, 室温下染色 30 min。使用 FACScan 流式细胞仪评估细胞周期分布, 并使用 CellQuest 软件进行分析。

1.6 划痕愈合实验检测 Pae 和 EZH2 对 A549 细胞迁移能力的影响

取对数生长期的各组 A549 细胞接种在 24 孔板中培养, 24 h 后使用移液器的吸头尖端在板孔底部划线, 洗去脱落的细胞, 继续培养。分别在 0 h 和 24 h 时, 在倒置显微镜下观察细胞迁移情况, 计算划痕愈合率。划痕愈合率 = (0 h 划痕宽度 - 24 h 划痕宽度) / 0 h 划痕宽度 $\times 100\%$ 。

1.7 Transwell 实验检测 Pae 和 EZH2 对 A549 细胞侵袭能力的影响

在 100 μL 无血清培养基中以 5×10^4 /孔将 A549 细胞接种到 Transwell 系统涂有 Matrigel 的上室中。下室中加入含 20% FBS 的培养基。在培养箱中放置 48 h 后, 细胞在室温下经 4% 多聚甲醛固定 30 min、结晶紫染色 15 min。在显微镜下观察计算侵袭细胞数。

1.8 流式细胞术检测 Pae 和 EZH2 对 A549 细胞凋亡的影响

各组细胞接种至 96 孔板培养 48 h, 随后分离细胞, 用 PBS 洗涤后离心 ($12\,000 \times g$, 5 min), 然后根据 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒的步骤方法将细胞与反应试剂混合, 在 37 °C 下孵育后, 流式细胞仪检测细胞凋亡。在 A549 细胞中单独转染 siEZH2 和 siNC, 作为 siEZH2 组和 siNC 组, 采用上述方法测量细胞凋亡。

1.9 WB 法检测 Pae 和 EZH2 对 A549 细胞中 EZH2、NXPH4、CDKN2A、Bcl-2 和 caspase-3 蛋白表达的影响

收集各组 A549 细胞, 加入预冷的 RIPA 裂解液裂解后提取总蛋白, BCA 法测定浓度。蛋白变性后经 SDS-PAGE 分离, 湿转至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 4 °C 孵育 EZH2、NXPH4、CDKN2A、Bcl-2、caspase-3 及 β -actin 一抗 4 °C 下处理过夜, 随后加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗, ECL 显色后成像并进行灰度分析。

1.10 动物实验

BALB/c 裸鼠(雄性, 20 ± 2 g)按随机数字表分为 5 组: Control、Pae-L (25 mg/kg)、Pae-H (100 mg/kg)、Pae-H+空载体、Pae-H + EZH2 过表达慢病毒, 每组 6 只。右侧腋下皮下接种 5×10^4 个 A549 细胞, 1 周后灌胃给药, 每日 1 次, 连续 14 d; 对照组给予等体积生理盐水。Pae-H + EZH2 组在灌胃前瘤内注射 EZH2 慢病毒, 每 7 d 一次。末次给药后, 腹腔注射过量戊巴比妥钠处死小鼠, 剥离肿瘤称质量、测体积, WB 法检测 EZH2、NXPH4、CDKN2A 表达。

1.11 统计学处理

采用 SPSS 24.0 软件对数据进行分析, 符合正态分布的计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因

素方差分析或 *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 Pae 浓度筛选

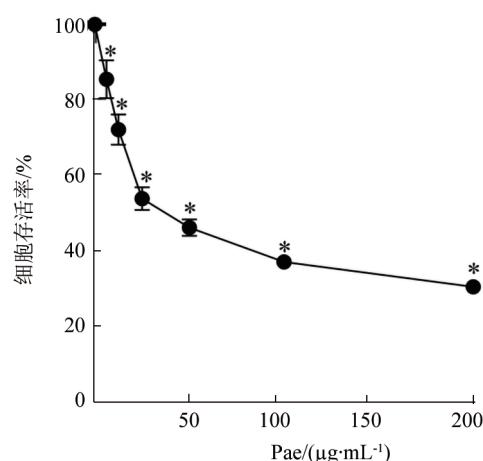
CCK-8 法检测结果(图 1)显示,与 0 $\mu\text{g/mL}$ 相比,6.25、12.5、25、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 的 Pae 处理 A549 细胞后,随着 Pae 浓度的加大,A549 细胞存活率显著降低($P < 0.05$),且 12.5 $\mu\text{g/mL}$ Pae 组的细胞存活率接近 70%,细胞存活率较为理想且利于后续相关实验研究。结合王石等^[11]的研究结果,本实验选取 12.5 $\mu\text{g/mL}$ Pae 进行后续实验。

2.2 Pae 抑制 A549 细胞的克隆形成能力

克隆形成实验检测结果(图 2)显示,与对照组相比,Pae 组细胞克隆数显著降低($P < 0.05$);与 Pae + siNC 组相比,Pae + siEZH2 组细胞克隆数降低更显著($P < 0.05$);与 Pae + vectorNC 组相比,Pae + vectorEZH2 组细胞克隆数明显升高($P < 0.05$)。

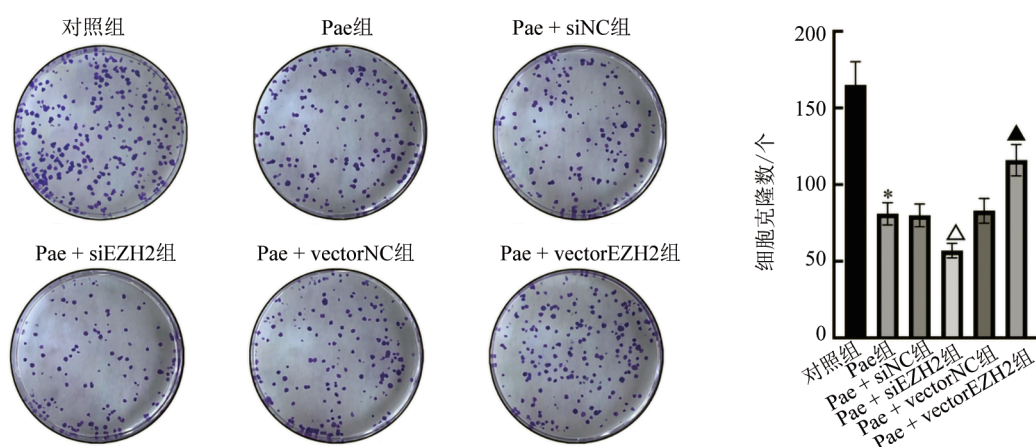
2.3 Pae 处理对 A549 细胞周期的影响

流式细胞术检测结果(图 3)显示,与对照组相比,Pae 组 G0/G1 期细胞比例上升,S 期细胞比例下降($P < 0.05$);与 Pae + siNC 组相比,Pae + siEZH2 组 G0/G1 期细胞比例上升,S 期细胞比例下降($P < 0.05$);与 Pae + vectorNC 组相比,Pae + vectorEZH2 组 G0/G1 期细胞比例下降,S 期细胞比例上升($P < 0.05$)。



与 0 $\mu\text{g/mL}$ 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 1 Pae 对 A549 细胞存活率的影响



与对照组相比, * $P < 0.05$; 与 Pae + siNC 组相比, ^ $P < 0.05$; 与 Pae + vectorNC 组相比, ^ $P < 0.05$ 。

图 2 Pae 处理和 EZH2 表达对 A549 细胞克隆形成能力的影响

2.4 Pae 处理抑制 A549 细胞的迁移能力

划痕愈合实验结果(图 4)显示,与对照组相比,Pae 组细胞划痕愈合率显著降低($P < 0.05$);与 Pae + siNC 组相比,Pae + siEZH2 组细胞划痕愈合率更低($P < 0.05$);与 Pae + vectorNC 组相比,Pae + vectorEZH2 组细胞划痕愈合率更高($P < 0.05$)。

2.5 Pae 处理抑制 A549 细胞的侵袭能力

Transwell 侵袭实验检测结果(图 5)显示,与对照组相比,Pae 组侵袭细胞数显著降低($P < 0.05$);与 Pae + siNC 组相比,Pae + siEZH2 组侵袭细胞数降低更显著($P < 0.05$);与 Pae + vectorNC 组相比,Pae + vectorEZH2 组侵袭细胞数明显升高($P < 0.05$)。

2.6 Pae 处理促进 A549 细胞凋亡

流式细胞术检测结果(图 6)显示,与对照组相比,Pae 组细胞凋亡率显著升高($P < 0.05$);与 Pae + siNC 组相比,Pae + siEZH2 组细胞凋亡率升高幅度更大($P < 0.05$);与 Pae + vectorNC 组相比,Pae + vectorEZH2 组细胞凋亡率明显下降($P < 0.05$)。

2.7 Pae 处理对 A549 细胞中 EZH2、NXPH4、CDKN2A、Bcl-2 和 caspase-3 蛋白表达的影响

如图 7 所示,与对照组相比,Pae 组 EZH2、NXPH4 和 Bcl-2 蛋白表达量显著降低,CDKN2A 和 caspase-3 蛋白表达量明显升高(均 $P < 0.05$);与 Pae + siNC 组相比,Pae + siEZH2 组 EZH2、NXPH4 和 Bcl-2 蛋白表达量显著降低,CDKN2A 和 caspase-3 蛋白表达量明显升高(均 $P < 0.05$);与 Pae + vectorNC

组相比, Pae + vectorEZH2 组 EZH2、NXPH4 和 Bcl-2 蛋白表达量显著升高, CDKN2A 和 caspase-3 蛋白表达量明显降低(均 $P < 0.05$)。

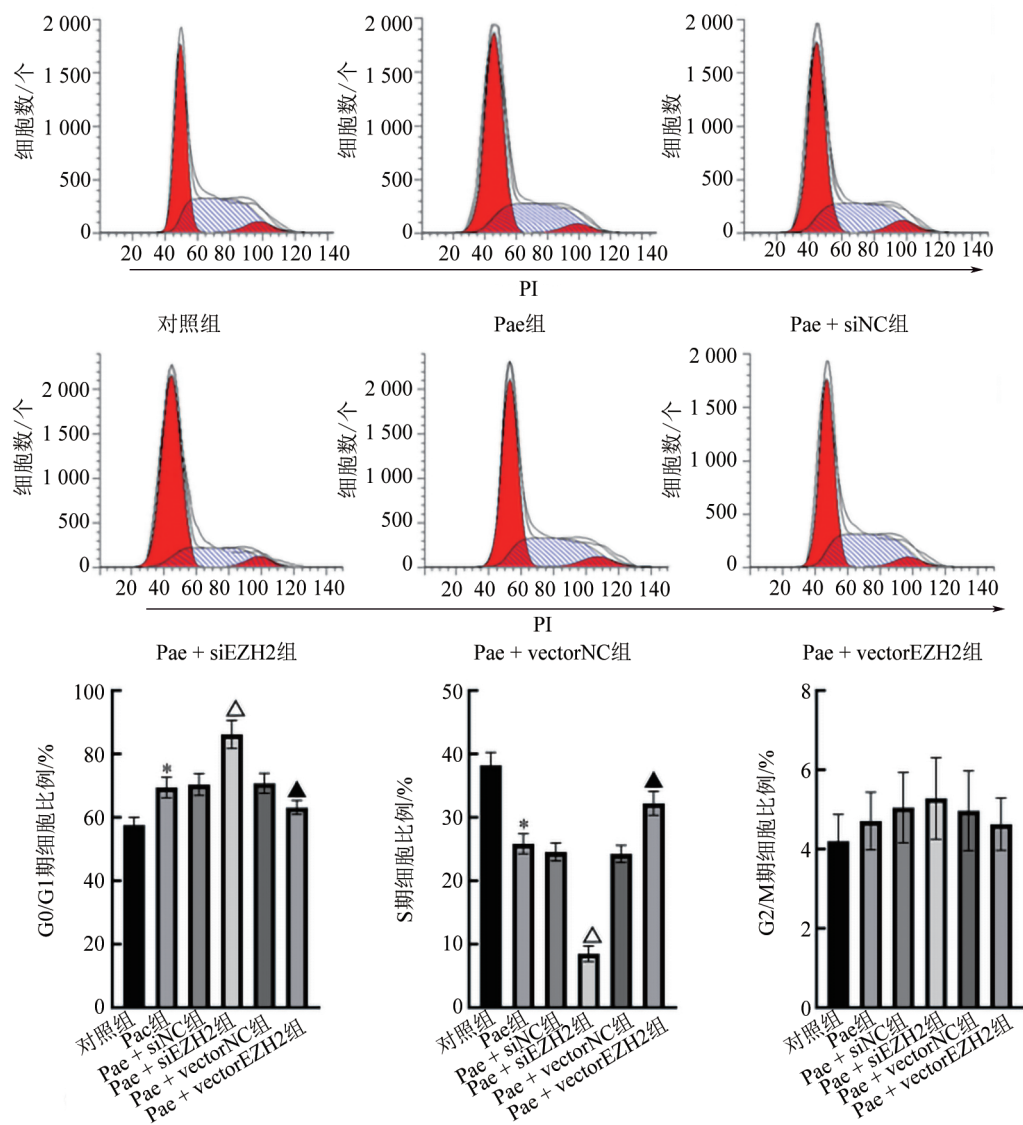
2.8 敲低 EZH2 表达促进 A549 细胞凋亡

流式细胞术检测结果(图 8、9)显示, 与对照组和 si NC 组相比, siEZH2 组凋亡率和 caspase-3 表达均显

著升高, Bcl-2 表达显著下降(均 $P < 0.05$)。

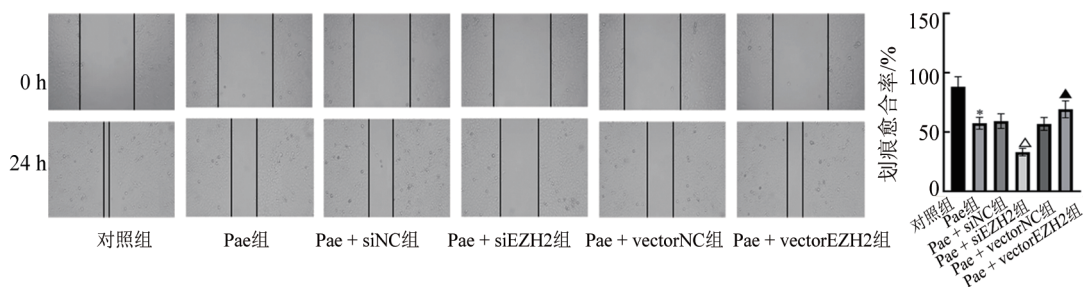
2.9 Pae 抑制 A549 细胞裸鼠移植瘤生长

移植瘤实验检测结果(图 10)显示, 与对照组相比, Pae-L、Pae-H 组裸鼠肿瘤质量和体积明显降低(均 $P < 0.05$); 与 Pae-H + 空载体组相比, Pae-H + EZH2 慢病毒组裸鼠肿瘤质量和体积明显升高(均 $P < 0.05$)。



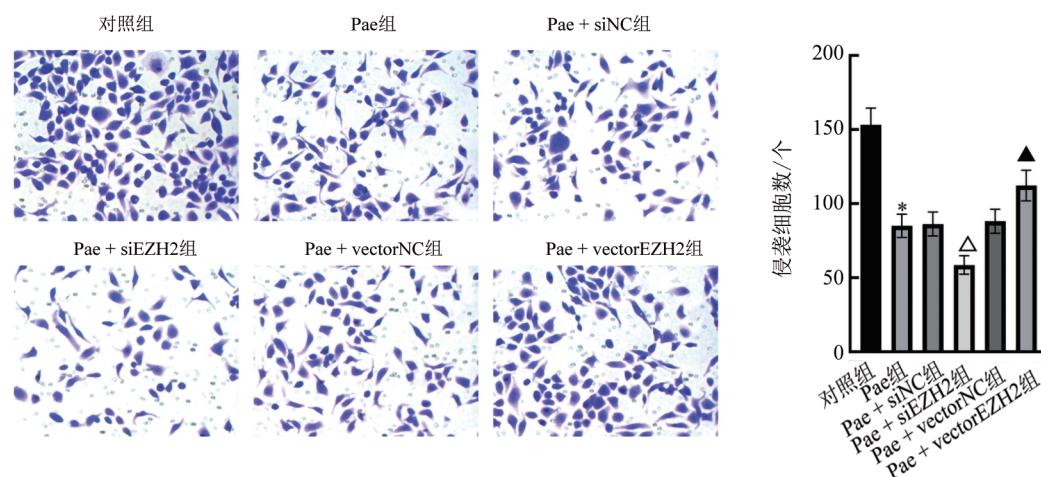
与对照组相比, $*P < 0.05$; 与 Pae+siNC 组相比, $^{\Delta}P < 0.05$; 与 Pae + vectorNC 组相比, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

图3 Pae 处理和 EZH2 表达对 A549 细胞周期的影响



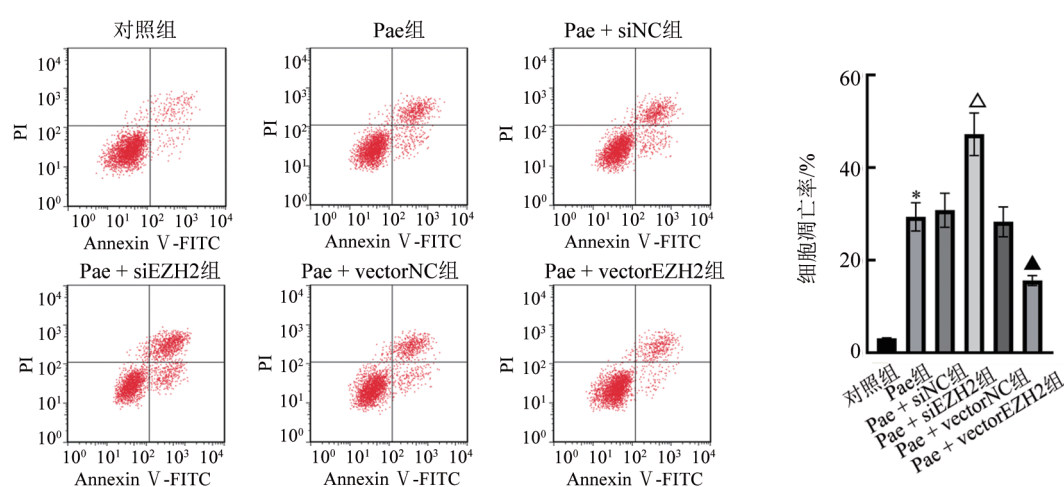
与对照组相比, $*P < 0.05$; 与 Pae+siNC 组相比, $^{\Delta}P < 0.05$; 与 Pae+vectorNC 组相比, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

图4 Pae 处理和 EZH2 表达对 A549 细胞迁移能力的影响



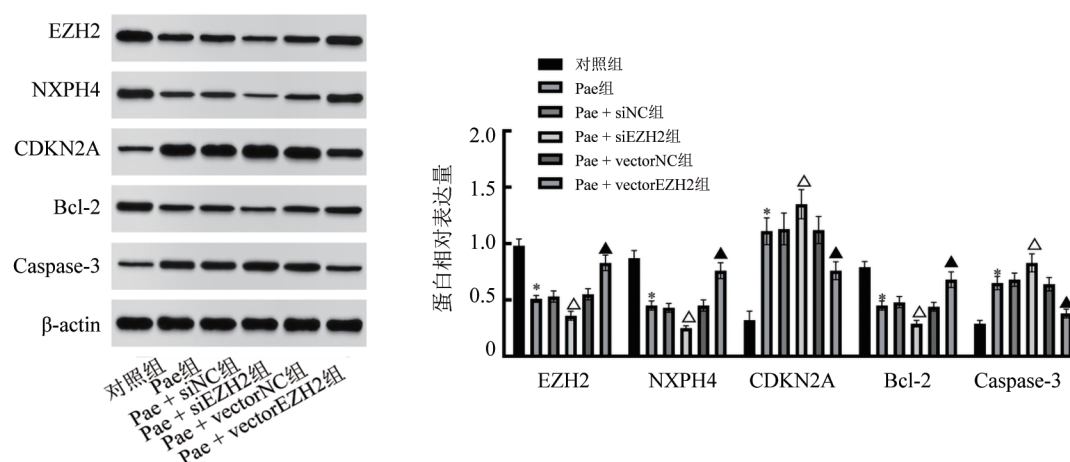
与对照组相比, * $P < 0.05$; 与 Pae+siNC 组相比, [△] $P < 0.05$; 与 Pae+vectorNC 组相比, [▲] $P < 0.05$ 。

图5 Pae处理和EZH2表达对A549细胞侵袭能力的影响($\times 200$; $\bar{x} \pm s, n = 6$)



与对照组相比, * $P < 0.05$; 与 Pae + siNC 组相比, [△] $P < 0.05$; 与 Pae+vectorNC 组相比, [▲] $P < 0.05$ 。

图6 Pae处理和EZH2表达对A549细胞凋亡的影响



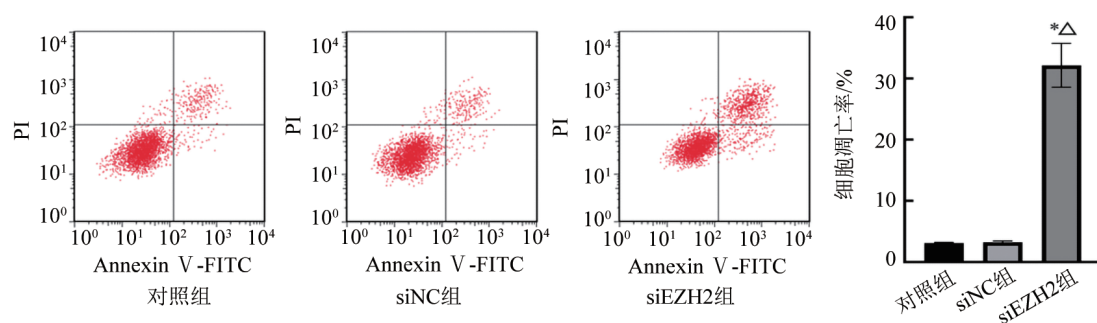
与对照组相比, * $P < 0.05$; 与 Pae+siNC 组相比, [△] $P < 0.05$; 与 Pae+vectorNC 组相比, [▲] $P < 0.05$ 。

图7 Pae处理和EZH2表达对A549细胞EZH2、NXPH4、CDKN2A、Bcl-2和caspase-3蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.10 Pae对移植瘤组织中EZH2、NXPH4、CDKN2A蛋白表达的影响

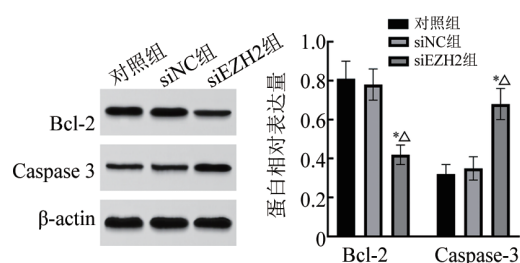
WB检测结果(图11)显示,与对照组相比, Pae-L、Pae-H组移植瘤组织中EZH2、NXPH4蛋白表

达量显著下调、CDKN2A蛋白表达量显著上调(均 $P < 0.05$); 与 Pae-H + 空载体组相比, Pae-H + EZH2 慢病毒组 EZH2、NXPH4 蛋白表达量显著上调、CDKN2A 蛋白表达量显著下调(均 $P < 0.05$)。



与对照组相比, $^*P < 0.05$; 与 siNC 组相比, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

图8 敲低 EZH2 对 A549 细胞凋亡的影响



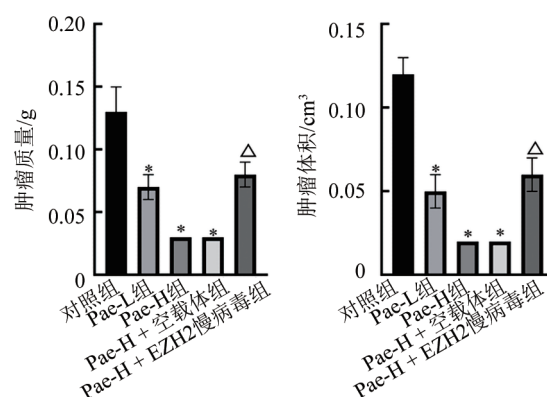
与对照组相比, $^*P < 0.05$; 与 siNC 组相比, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

图9 敲低 EZH2 对 A549 细胞凋亡蛋白表达的影响

3 讨论

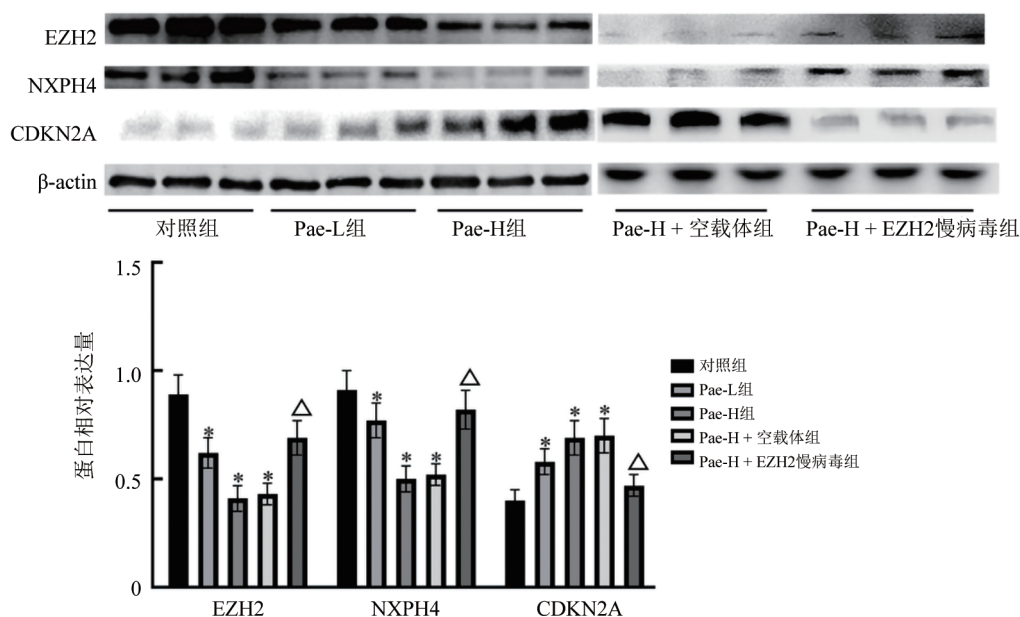
肺癌是呼吸系统恶性病变的结果,其致病因素复杂多样。手术切除是早期肺癌的有效治疗手段,而多数患者确诊时已属临床晚期。晚期肺癌患者的预后较差,恶性肿瘤除局部侵犯肺部外还侵犯血管和淋巴管,并伴有转移现象。肺癌发生和发展的分子机制复杂多样,目前尚不完全明确^[12]。然而,近期研究显示,转移能力强的肺癌细胞可逃避正常的细

胞凋亡和分裂调控,导致肺癌治疗失败^[13]。因此抑制肺癌细胞的增殖和转移,寻找有效的治疗方法成为研究重点。



与对照组相比, $^*P < 0.05$; 与 Pae-H + 空载体组比, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

图10 Pae 对 A549 细胞裸鼠移植瘤质量(A)和体积(B)的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)



与对照组相比, $^*P < 0.05$; 与 Pae-H + 空载体组比, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

图11 A549细胞裸鼠移植瘤组织中 EZH2、NXPH4、CDKN2A 蛋白表达水平($\bar{x} \pm s, n = 6$)

目前越来越多的研究关注天然制剂的抑癌潜力。

其中一些生物碱和多酚具有良好的抗癌性能,已成功

应用于临床治疗。丹皮酚(Pae)^[14]是从芍药、旱金莲等中草药植物中提取的生物活性酚,已被证实具有多种生物活性,如抗炎、免疫调节、抗糖尿病、抗氧化、改善精神分裂症和缓解子宫内膜增生等。Pae最初因逆转白血病细胞耐药性而受到关注,之后通过大量的体内外实验证明了Pae的抗肿瘤活性^[15]。多项研究^[16-17]表明Pae通过多种信号通路,如调控磷酸肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/AKT)、转化生长因子 β -Smad蛋白3(TGF- β /Smad3)信号通路,抑制细胞增殖、侵袭和迁移,诱导细胞凋亡和周期阻滞,调节免疫抑制性炎症肿瘤微环境,表现出广泛的抗癌药理作用。GAN等^[18]研究表明,Pae可通过调控MAPK通路有效抑制肺癌细胞增殖,并诱导细胞凋亡。LV等^[19]的研究也发现,Pae可显著抑制肺癌细胞活力、迁移、侵袭和上皮-间充质转化,可作为肺癌治疗的潜在药物。

本研究发现,Pae显著降低A549细胞克隆形成及迁移侵袭能力,诱导细胞周期阻滞在G0/G1期,进一步证实Pae的抗癌活性。Bcl-2蛋白是bcl-2原癌基因的编码产物,当Bcl-2蛋白表达被抑制时会导致细胞凋亡^[20]。Caspase-3是重要的抗癌靶点,其裂解和激活诱导细胞凋亡,最终导致癌细胞死亡^[21]。在本研究中,Pae干预肺癌A549细胞后,细胞凋亡率显著提高,Bcl-2蛋白表达量减少、caspase-3蛋白表达量增加,激活凋亡信号通路,表明Pae在一定程度上可促进肺癌细胞的凋亡。以上结果表明Pae可抑制肺癌A549细胞的增殖、迁移和侵袭,并诱导细胞凋亡和周期阻滞;体内实验进一步证明了Pae可抑制肿瘤的生长。以上结果印证了Pae抗癌的潜在价值,但其具体作用机制有待进一步研究。

EZH2/NXPH4/CDKN2A轴可能是干预肺癌细胞增殖和迁移的重要通路,CDKN2A位于人类染色体9p21.3上,已确认为关键抑癌基因^[8,22]。NXPH4是一种突触分泌蛋白,属于NXPH家族。NXPH4在膀胱癌、肝癌、乳腺癌等多种类型的癌症中高表达;NXPH4敲低可以抑制细胞增殖和迁移,导致肺癌细胞在S1期出现明显的细胞周期停滞;CDKN2A与NXPH4的相互作用会影响肺癌细胞的生物学特性,如细胞周期、细胞增殖和迁移能力^[23]。EZH2是一种组蛋白甲基转移酶,其高表达与肺癌患者的早期发病机制和预后相关,并经相关信号通路促进肿瘤进展^[24]。靶向EZH2信号通路被认为是抑制肿瘤增殖和转移并提高肿瘤治疗敏感性的一种有前途的方法。研究^[25-26]表明,下调EZH2表达可抑制肺癌细胞的细胞活力、促进细胞凋亡并增强化疗敏感性。本研究也发现,敲减EZH2表达能够诱导A549细胞凋亡,并提高促凋亡蛋白caspase-3表达,抑制抗凋亡蛋

白Bcl-2表达。YANG等^[8]证实NXPH4是EZH2的下游转录调控靶点,NXPH4通过靶向CDKN2A对CDKN2A蛋白的稳定性产生负面影响,从而参与细胞周期调控。本研究假设Pae可通过调控EZH2/NXPH4/CDKN2A通路活性进而影响肺癌细胞活性,进一步开展研究。在本研究中,相较于A549细胞组,Pae组EZH2和NXPH4的蛋白表达量明显降低、CDKN2A的蛋白表达量显著升高,同时A549细胞的增殖、迁移和侵袭能力降低,推测Pae经EZH2/NXPH4/CDKN2A轴调控A549细胞恶性表型。为进一步验证,本研究在Pae干预的基础上,分别设立敲减、过表达EZH2组,结果显示,敲减EZH2下调NXPH4、Bcl-2并上调CDKN2A、caspase-3,进一步增强对A549细胞增殖、侵袭及迁移的抑制、促进细胞凋亡和周期阻滞;而过表达EZH2后,NXPH4、Bcl-2的蛋白表达量明显上调、CDKN2A、caspase-3的蛋白表达量明显下调,A549细胞增殖、侵袭及迁移能力增强,凋亡率降低,G0/G1期比例下降,提示EZH2/NXPH4/CDKN2A轴活性改变介导A549细胞恶性表型,同时表明Pae可通过抑制EZH2/NXPH4/CDKN2A轴活性及蛋白的表达进而抑制肺癌A549细胞增殖、侵袭及迁移,促进细胞凋亡和周期阻滞,从而发挥抗肺癌作用。体内实验进一步证明Pae可抑制EZH2/NXPH4/CDKN2A轴活性。

综上所述,Pae通过抑制EZH2/NXPH4/CDKN2A轴降低肺癌细胞活性,抑制其增殖、侵袭及迁移能力,促进肺癌细胞凋亡并诱导细胞周期阻滞。但本研究不足之处在于仅基于细胞水平探讨Pae作用,后续需在动物水平进一步验证。

[参考文献]

- [1] SMOLARZ B, ŁUKASIEWICZ H, SAMULAK D, *et al.* Lung cancer-epidemiology, pathogenesis, treatment and molecular aspect (review of literature)[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(5): 2049 [2025-07-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40076671/>. DOI:10.3390/ijms26052049.
- [2] 刘瑾, 杨宗统, 隋在云, 等. 复方丹皮酚纳米乳对A549裸鼠移植瘤生长的影响[J]. *中成药*, 2023, 45(3): 935-939.
- [3] 李睿慧, 董航, 王宸因, 等. 丹皮酚调控ITGB3/p38MAPK抑制乳腺癌细胞增殖侵袭与上皮-间质转化[J]. *国际免疫学杂志*, 2024, 47(1):1-5.
- [4] YANG Z, WEI B, QIAO A B, *et al.* A novel EZH2/NXPH4/CDKN2A axis is involved in regulating the proliferation and migration of non-small cell lung cancer cells[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2022, 86(3): 340-350. DOI:10.1093/bbb/zbab217.
- [5] SALEHI-MAZANDARANI S, MAHMOUDIAN-HAMEDANI S, FARAJZADEGAN Z, *et al.* EZH2: a crucial competing endogenous RNA in cancer research-a scoping review[J]. *Adv Biomed Res*, 2025, 14: 53 [2025-07-05]. DOI:10.4103/abr.abr_561_24.

- [6] LAI Y W, HAN X, XIE B, *et al.* EZH2 suppresses ferroptosis in hepatocellular carcinoma and reduces sorafenib sensitivity through epigenetic regulation of TFR2[J]. *Cancer Sci*, 2024, 115(7): 2220-2234. DOI:10.1111/cas.16186.
- [7] SUN X C, XIN S Y, JIN L, *et al.* Neurexophilin 4 is a prognostic biomarker correlated with immune infiltration in bladder cancer[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(5): 13986-13999. DOI:10.1080/21655979.2022.2085284.
- [8] GALLARDO A, MOLINA A, ASENJO H G, *et al.* EZH2 endorses cell plasticity to non-small cell lung cancer cells facilitating mesenchymal to epithelial transition and tumour colonization[J]. *Oncogene*, 2022, 41(28): 3611-3624. DOI: 10.1038/s41388-022-02375-x.
- [9] KREUGER I Z M, SLIEKER R C, VAN GRONINGEN T, *et al.* Therapeutic strategies for targeting CDKN2A loss in melanoma[J]. *J Invest Dermatol*, 2023, 143(1): 18-25. DOI:10.1016/j.jid.2022.07.016.
- [10] 韩成龙, 李苏阳, 韩雅萌. 丹皮酚对 5-FU 诱导的小鼠肠道黏膜损伤的保护作用及对其抗肿瘤活性的影响[J]. *西部医学*, 2022, 34(8): 1128-1132.
- [11] 王石, 谭小武. 丹皮酚抑制人肺癌 A549 细胞增殖、迁移和侵袭及对 MAPKs 信号通路的影响[J]. *中南药学*, 2018, 16(1): 55-59. DOI:10.7539/j.issn.1672-2981.2018.01.010.
- [12] NOORELDEEN R, BACH H. Current and future development in lung cancer diagnosis[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 8661 [2025-07-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34445366/>. DOI: 10.3390/ijms22168661.
- [13] ZHOU Z, QU C H, ZHOU P J, *et al.* Extracellular vesicles activated cancer-associated fibroblasts promote lung cancer metastasis through mitophagy and mtDNA transfer[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2024, 43(1): 158 [2025-07-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38825680/>. DOI:10.1186/s13046-024-03077-w.
- [14] WANG Y, LI B S, ZHANG Z H, *et al.* Paeonol repurposing for cancer therapy: from mechanism to clinical translation[J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 165: 115277 [2025-07-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37544285/>. DOI:10.1016/j.biopha.2023.115277.
- [15] CHANG X D, FENG X T, DU M, *et al.* Pharmacological effects and mechanisms of paeonol on antitumor and prevention of side effects of cancer therapy[J/OL]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1194861 [2025-07-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37408762/>. DOI:10.3389/fphar.2023.1194861.
- [16] DU J K, SONG D B, LI J W, *et al.* Paeonol triggers apoptosis in HeLa cervical cancer cells: the role of mitochondria-related caspase pathway[J]. *Psychopharmacology*, 2022, 239(7): 2083-2092. DOI: 10.1007/s00213-021-05811-0.
- [17] CHEN X M, JIA C L, ZHU Z Y. Paeonol impacts ovarian cancer cell proliferation, migration, invasion and apoptosis *via* modulating the transforming growth factor beta/smad3 signaling pathway[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2023, 74(6): 1-11. DOI:10.26402/jpp.2023.6.06.
- [18] GAN W, CHEN C, HUANG M L, *et al.* Therapeutic effects of paeonol on non-small cell lung cancer cells *via* regulation of the MAPK pathway[J/OL]. *Oncol Lett*, 2024, 28(6): 560 [2025-07-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39372664/>. DOI: 10.3892/ol.2024.14693.
- [19] LV J, ZHU S B, CHEN H P, *et al.* Paeonol inhibits human lung cancer cell viability and metastasis *in vitro via* miR-126-5p/ZEB2 axis[J]. *Drug Dev Res*, 2022, 83(2): 432-446. DOI: 10.1002/ddr.21873.
- [20] KALONI D, DIEPSTRATEN S T, STRASSER A, *et al.* BCL-2 protein family: attractive targets for cancer therapy[J]. *Apoptosis*, 2023, 28(1/2): 20-38. DOI:10.1007/s10495-022-01780-7.
- [21] SRIVASTAVA N, SAXENA A K. Caspase-3 activators as anticancer agents[J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2023, 24(10): 783-804. DOI: 10.2174/1389203724666230227115305.
- [22] ZHU C Y, SOTO-FELICIANO Y M, MORRIS J P, *et al.* MLL3 regulates the CDKN2A tumor suppressor locus in liver cancer[J/OL]. *eLife*, 2023, 12: e80854 [2025-07-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37261974/>. DOI:10.7554/eLife.80854.
- [23] FAN Q L, HE W, SHANG Y J. Forkhead box protein K1-regulated neurexophilin 4 promotes proliferation, metastasis and glycolysis in colorectal cancer[J/OL]. *Exp Ther Med*, 2023, 26(3): 434 [2025-07-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37602314/>. DOI: 10.3892/etm.2023.12133.
- [24] XIA L L, ZHU X H, ZHANG L, *et al.* EZH2 enhances expression of CCL5 to promote recruitment of macrophages and invasion in lung cancer[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2020, 67(6): 1011-1019. DOI:10.1002/bab.1875.
- [25] ENTEZARI M, TAHERIAZAM A, PASKEH M D A, *et al.* The pharmacological and biological importance of EZH2 signaling in lung cancer[J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 160: 114313 [2025-07-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36738498/>. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.114313.
- [26] CAO Z Y, WU W, WEI H T, *et al.* Downregulation of histone-lysine N-methyltransferase EZH2 inhibits cell viability and enhances chemosensitivity in lung cancer cells[J/OL]. *Oncol Lett*, 2021, 21(1): 26 [2025-07-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33240432/>. DOI:10.3892/ol.2020.12287.

[收稿日期] 2024-12-27

[修回日期] 2025-07-17

[本文编辑] 黄静怡