

纤细薯蓣皂苷诱导肺癌 A549 细胞自噬的作用及机制^Δ

李 燕^{1*}, 李亚梅², 雷歌燕¹, 康佳兰³, 刘明轩¹, 张敏鸿², 杨建琼^{2#} (1. 赣南医学院第一附属医院药学部, 江西 赣州 341000; 2. 赣南医学院第一附属医院临床医学研究中心, 江西 赣州 341000; 3. 泰和县人民医院药剂科, 江西 吉安 343700)

中图分类号 R965; R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)08-0912-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.08.03



摘要 目的 探讨吉祥草中纤细薯蓣皂苷(gracillin)诱导人非小细胞肺癌 A549 细胞自噬的作用及机制。方法 以 A549 细胞为对象, 采用 CCK-8 法检测不同浓度(0.25、0.5、1、2、4 $\mu\text{mol/L}$) gracillin 作用不同时间(12、24、48 h)对细胞增殖的影响。与不加药物的对照组进行比较, 采用生物透射电子显微镜观察 gracillin(2 $\mu\text{mol/L}$)作用 24 h 对细胞自噬小体形成的影响; 通过 GFP-LC3 质粒转染实验检测 gracillin(0.25、0.5、1、2 $\mu\text{mol/L}$)作用 24 h 后 GFP-LC3 在细胞自噬小体膜上的聚集情况; 采用实时定量聚合酶链式反应法和 Western blot 法检测 gracillin(0.25、0.5、1、2 $\mu\text{mol/L}$)作用 24 h 后 A549 细胞中序列相似性家族 102 成员 A(FAM102A) mRNA 和蛋白的表达水平, 以及自噬相关蛋白[p62、Beclin-1、微管相关蛋白 1 轻链 3B(LC3B)]和磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(又名 Akt)信号通路相关蛋白的表达水平。结果 gracillin 对 A549 细胞具有一定的增殖抑制作用, 且呈浓度和时间依赖趋势; 其作用 24 h 的半数抑制浓度为 2.55 $\mu\text{mol/L}$ 。gracillin 作用 24 h 后, 细胞胞浆内可见含双层膜结构的自噬小体; 自噬小体膜上可见明显的 GFP-LC3 绿色荧光斑点, 且有随药物浓度升高而增多的趋势。与对照组比较, gracillin 不同浓度组细胞中 FAM102A mRNA 和蛋白的表达水平(0.5、1、2 $\mu\text{mol/L}$ 组)、Beclin-1 蛋白的表达水平(1、2 $\mu\text{mol/L}$ 组)和 LC3B-II/LC3B-I 比值(2 $\mu\text{mol/L}$ 组)均显著升高, p62 蛋白的表达水平(1、2 $\mu\text{mol/L}$ 组)和 Akt 蛋白(1、2 $\mu\text{mol/L}$ 组)、PI3K 蛋白(2 $\mu\text{mol/L}$ 组)的磷酸化水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 gracillin 可能通过上调 FAM102A mRNA 和蛋白的表达、抑制 PI3K/Akt 信号通路来促进 A549 细胞发生自噬, 从而发挥抑制细胞增殖的作用。

关键词 吉祥草; 纤细薯蓣皂苷; 非小细胞肺癌细胞; 自噬; FAM102A; PI3K/Akt 信号通路

Effect and mechanism of gracillin-induced autophagy in lung cancer A549 cells

LI Yan¹, LI Yamei², LEI Geyan¹, KANG Jialan³, LIU Mingxuan¹, ZHANG Minhong², YANG Jianqiong² (1. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Gannan Medical University, Jiangxi Ganzhou 341000, China; 2. Clinical Medicine Research Center, the First Affiliated Hospital of Gannan Medical University, Jiangxi Ganzhou 341000, China; 3. Dept. of Pharmacy, Taihe People's Hospital, Jiangxi Ji'an 343700, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the effect and mechanism of gracillin from *Reineckia carnea* on autophagy in non-small cell lung cancer A549 cells. **METHODS** Using A549 cells as subjects, the effects of different concentrations of gracillin (0.25, 0.5, 1, 2, 4 $\mu\text{mol/L}$) on the proliferation of cells were detected by CCK-8 after being treated for different time (12, 24, 48 h). Compared with the control group without medication, the effect of gracillin (2 $\mu\text{mol/L}$) on the formation of autophagosomes in cells was observed by transmission electron microscope after 24 h of exposure. The aggregation of GFP-LC3 on autophagosome membrane was detected by GFP-LC3 plasmid transfection after being treated with gracillin (0.25, 0.5, 1, 2 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h. Quantitative real-time PCR and Western blot assay were used to detect the mRNA and protein expressions of family with sequence

^Δ **基金项目** 国家自然科学基金项目(No.82260985); 江西省卫生健康委科技计划项目(No.202210939); 江西省教育厅科学技术研究项目(No. GJJ2201459); 赣州市科技计划重点实验室项目(No. 2022DSYS9969)

* **第一作者** 副主任药师。研究方向: 医院药学、天然药物。E-mail: liyan7112@163.com

通信作者 副教授, 硕士。研究方向: 天然药物抗肿瘤作用。电话: 0797-8283981。E-mail: yangjianqiong2010@163.com

similarity 102 member A (FAM102A), the expressions of autophagy-related proteins [p62, Beclin-1, microtubule-associated protein 1 light chain 3B (LC3B)], and the expressions of phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway-related proteins in A549 cells after being treated with gracillin (0.25, 0.5, 1 and 2 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h. **RESULTS** Gracillin significantly inhibited the proliferation of A549 cells in a concentration- and time-

dependent manner. The IC_{50} was 2.55 $\mu\text{mol/L}$ at 24 h. After 24 h of gracillin treatment, autophagosomes with bilayer membrane structure were found in the cell cytoplasm, and GFP-LC3 green fluorescent spots on autophagosome membrane were obvious, representing an increasing trend as drug concentration. Compared with the control group, mRNA and protein expressions of FAM102A (0.5, 1, 2 $\mu\text{mol/L}$ groups), protein expression of Beclin-1 (1, 2 $\mu\text{mol/L}$ groups) and LC3B- II/LC3B- I ratio (2 $\mu\text{mol/L}$ group) were significantly increased in different concentrations of gracillin groups, while the protein expression of p62 (1, 2 $\mu\text{mol/L}$ groups), and the protein phosphorylations of Akt (1, 2 $\mu\text{mol/L}$ groups) and PI3K (2 $\mu\text{mol/L}$ group) were all decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSIONS** Gracillin can promote excessive autophagy in A549 cells by up-regulating mRNA and protein expressions of FAM102A and inhibiting PI3K/Akt signaling pathway, thus inhibiting cell proliferation.

KEYWORDS *Reineckia carnea*; gracillin; non-small cell lung cancer cells; autophagy; FAM102A; PI3K/Akt signaling pathway

吉祥草为百合科植物吉祥草 *Reineckia carnea* (Andr.) Kunth 的干燥全草,具有润肺、止咳、镇痛等功效^[1]。研究指出,吉祥草主要含甾体皂苷、黄酮等化学成分,具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎等药理活性^[2]。本课题组前期从吉祥草提取物中分离得到一个甾体皂苷类化合物——纤细薯蓣皂苷(gracillin),对肺癌细胞具有较好的增殖抑制作用^[3-4];此外有研究者发现,gracillin 对人肝癌 H7402、HepG2 细胞等多种肿瘤细胞具有细胞毒活性^[5]。可见,该成分极具开发潜力。目前,gracillin 国内外相关研究主要集中在细胞毒活性和促进细胞凋亡、调节能量代谢方面^[6],而其对肺癌的作用机制尚不明确。

本课题组前期通过高通量转录组测序、基因本体(gene ontology, GO)富集、京都基因和基因组数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析发现,对比对照组, *FAM102A* 基因在 gracillin 组 A549 细胞中的表达显著升高,且富集于自噬相关通路。*FAM102A* 是雌激素 α 受体(estrogen receptor α , ER α)的靶基因,而 ER α 是磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, 又名 Akt)信号通路的磷酸化靶点^[7],在调控细胞自噬方面具有重要作用^[8]。基于此,本研究拟从 *FAM102A* 基因和 PI3K/Akt 信号通路出发,考察 gracillin 对人非小细胞肺癌 A549 细胞增殖和自噬的影响及潜在机制,旨在为 gracillin 抗肿瘤作用的深入研究提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括 Varioskan Flash 型连续光谱多功能酶标仪、NanoDrop One 型微量紫外分光光度计、331 型细胞培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、CFX Connect™ 型荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪、Chemi Doc XRS+ 型化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司)、HT7800 型生物透射电子显微镜(日本 Hitachi 公司)、LSM880 型激光共聚焦显微镜(德国 Zeiss 公

司)等。

1.2 主要药品与试剂

gracillin 由本课题组前期从吉祥草 *R. carnea* (Andr.) Kunth 的干燥全草中提取分离得到^[3],经高效液相色谱法检测纯度大于 98%。

F12K 培养基、胎牛血清、0.25% 胰酶溶液(批号分别为 2444952、2556132P、25200-056)均购自美国 Gibco 公司;兔抗人序列相似性家族 102 成员 A (family with sequence similarity 102 member A, FAM102A) 抗体、Opti-MEM 无血清培养基、Lipofectamine 2000 转染试剂(批号分别为 PA5-70892、31985062、11668030)均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;兔抗人 p62、Beclin-1、微管相关蛋白 1 轻链 3B (microtubule-associated protein 1 light chain 3B, LC3B)、PI3K、磷酸化 PI3K (phosphorylated PI3K, p-PI3K)、Akt、磷酸化 Akt (phosphorylated Akt, p-Akt) 抗体(批号分别为 5114-6、3738S-3、2775S-13、4249T-11、4428T-5、9272S、9271T)均购自美国 Cell Signaling Technology 公司;CCK-8 试剂盒(批号 GK10001)购自美国 GlpBio 公司;鼠抗人甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(批号 C1312)购自北京普利莱基因技术有限公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠、羊抗兔免疫球蛋白 G 抗体(批号分别为 RGAM001、RGAR001)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;GFP-LC3 质粒购自武汉淼灵生物科技有限公司。

1.3 细胞

人非小细胞肺癌细胞株 A549(批号 SCSP-503)购自中国科学院上海生科院细胞资源中心。

2 方法

2.1 细胞培养

取 A549 细胞,接种于 F12K 完全培养基(即含 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素双抗的 F12K 培养基,下同)中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养,并依据细胞生长状态及时更换培养基。

2.2 gracillin 干预浓度和作用时间筛选

取对数生长期的 A549 细胞,按 3 000 个/孔接种于 96 孔板中,培养 24 h 后,将其分为 gracillin 不同浓度组(0.25、0.5、1、2、4 $\mu\text{mol/L}$,浓度参考相关文献^[3]设置)和正常对照组(不加药物),并设置不加药物、不加细胞的空白组,每组设置 3 个复孔。各组细胞分别于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 12、24、48 h 后,弃去培养液,加入 CCK-8 溶液 10 μL 和 F12K 完全培养基 100 μL ,继续培养 2 h。使用连续光谱多功能酶标仪于 450 nm 波长处检测各孔的光密度(optical density, OD)值并计算细胞存活率[细胞存活率=(实验组平均 OD 值-空白组平均 OD 值)/(正常对照组平均 OD 值-空白组平均 OD 值) $\times$ 100%]。以 gracillin 浓度为横坐标、细胞存活率为纵坐标绘制细胞生长曲线,应用两点法计算半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})。

2.3 gracillin 对 A549 细胞自噬小体形成的影响

取对数生长期的 A549 细胞,按 8×10^5 个/皿接种于 10 cm 培养皿中,将其分为对照组(不加药物)和 gracillin 组(2 $\mu\text{mol/L}$,浓度参考“2.2”项实验结果设置),培养 24 h。收集细胞,用预冷的磷酸盐缓冲液清洗 1~2 次后转移至 1.5 mL EP 管中,以 1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,细胞于 2% 戊二醛 1 mL 中静置过夜,经固定、制片后,使用生物透射电子显微镜观察自噬小体生成情况并采集图像。

2.4 gracillin 对 A549 细胞自噬小体膜上 GFP-LC3 聚集的影响

取对数生长期的 A549 细胞,按 2×10^5 个/皿接种于激光共聚焦小皿上,待细胞生长融合至 80% 时,进行质粒转染。转染时,先用 Opti-MEM 无血清培养基稀释 Lipofectamine 2000 转染试剂和 GFP-LC3 质粒,随后将该转染复合物加至细胞中,转染 6~8 h 后更换新的 F12K 完全培养基,置于培养箱中培养过夜。将上述细胞分为对照组(不加药物)和 gracillin 不同浓度组(0.25、0.5、1、2 $\mu\text{mol/L}$,浓度参考“2.2”项实验结果设置),培养 24 h。收集细胞,用 4% 多聚甲醛固定,加入 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染液,于室温避光条件下染色 10 min,用磷酸盐缓冲液洗涤后置于激光共聚焦显微镜下观察 GFP-LC3 在自噬小体膜上的聚集情况。

2.5 gracillin 对 A549 细胞中 FAM102A mRNA 表达的影响

采用实时定量 PCR 法检测。取对数生长期的 A549 细胞,按 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,待细胞生长融合超过 70% 时,将其分为对照组(不加药物)和 gracillin 不同浓度组(0.25、0.5、1、2 $\mu\text{mol/L}$,浓度参考“2.2”项实验

结果设置),每组设置 3 个复孔,培养 24 h。收集细胞,以 Trizol 法提取总 RNA,经超微量紫外分光光度计定量后,按相应试剂盒说明书方法将其反转录成 cDNA,以所得 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。反应体系包括 1 μg cDNA、1 μL 随机引物、1 μL 逆转录酶、10 μL 2 $\times$ 反应混合液,加无核酶水至 20 μL 。反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,共 40 个循环。以 FAM102A 与内参(GAPDH)的扩增量比值表示 FAM102A mRNA 的表达水平,结果以对照组为参照进行归一化处理。FAM102A 的正向引物为 5'-TCA-GGCGGAAGAAGGACTC-3',反向引物为 5'-GTGT-TGCTGCCATCTGTGAAC-3',产物大小为 121 bp;GAPDH 的正向引物为 5'-ACGGATTGTCGTATTGGG-3',反向引物为 5'-TGATTTTGGAGGGATCTCGC-3',产物大小为 171 bp。

2.6 gracillin 对 A549 细胞中 FAM102A 蛋白、自噬相关蛋白以及 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达的影响

采用 Western blot 法检测。取对数生长期的 A549 细胞,按“2.5”项下方法分组、给药、培养。收集细胞,加入含 1% 苯甲基磺酰氟和 1% 磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液,离心获取总蛋白;以 BCA 法检测总蛋白浓度后,按比例加入上样缓冲液,于沸水中加热 10 min 变性。取变性蛋白样品适量,电泳分离后转膜,用 5% 牛血清白蛋白于室温下封闭 1 h;加入 FAM102A 蛋白、自噬相关蛋白(p62、Beclin-1、LC3B)、PI3K/Akt 通路相关蛋白(PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt)、内参蛋白(GAPDH)一抗(稀释比例均为 1:1 000),于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜;用 TBST 缓冲液洗膜,加入相应二抗(稀释比例均为 1:2 000),于室温下孵育 1 h;用 TBST 缓冲液洗膜,滴加 ECL 曝光液,于室温下放置 1 min 后,置于化学发光成像系统下曝光显影。采用 Image J 软件分析各蛋白的条带灰度值,以目的蛋白与内参蛋白的条带灰度值比值表示目的蛋白的表达水平(结果以对照组为参照进行归一化处理),以 p-PI3K 与 PI3K、p-Akt 与 Akt 的表达水平比值表示 PI3K、Akt 蛋白的磷酸化水平。

2.7 统计学方法

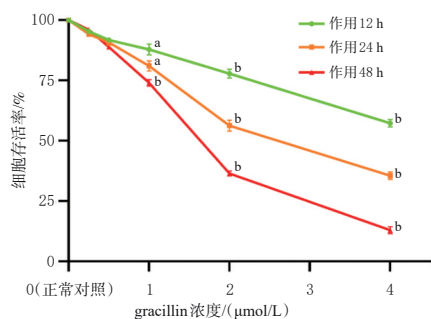
使用 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两组间比较采用 LSD- t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 gracillin 干预浓度和作用时间筛选结果

gracillin 对 A549 细胞具有增殖抑制作用,且呈浓度和时间依赖性趋势(图 1)。由于 12 h 作用时间太短,48 h

细胞状态受影响太大,故根据作用 24 h 的细胞存活率计算 IC_{50} ,结果显示,gracillin 作用 24 h 的 IC_{50} 为 2.55 $\mu\text{mol/L}$ 。本研究根据上述 IC_{50} 值,在确保大部分细胞存活的条件,将后续机制研究的 gracillin 梯度浓度依次设置为 0.25、0.5、1、2 $\mu\text{mol/L}$,作用时间为 24 h。



a: 与正常对照组比较, $P<0.05$; b: 与正常对照组比较, $P<0.01$ 。

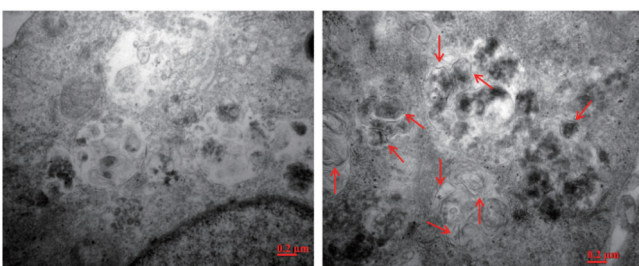
图1 gracillin 对 A549 细胞存活率的影响

3.2 A549 细胞自噬小体形成情况

对照组 A549 细胞结构完整,未见明显异常;gracillin 组 A549 细胞胞浆内可见含双层膜结构的自噬小体,同时可见含多层膜结构的自噬泡以及细胞器碎片。结果见图 2。

3.3 A549 细胞中 GFP-LC3 在自噬小体膜上的聚集情况

与对照组比较,gracillin 不同浓度组细胞自噬小体膜上可见明显的 GFP-LC3 绿色荧光斑点,且随着药物浓



A. 对照组 B. gracillin 组

红色箭头: 双层膜结构的自噬小体。

图2 各组 A549 细胞中自噬小体形成情况的显微图

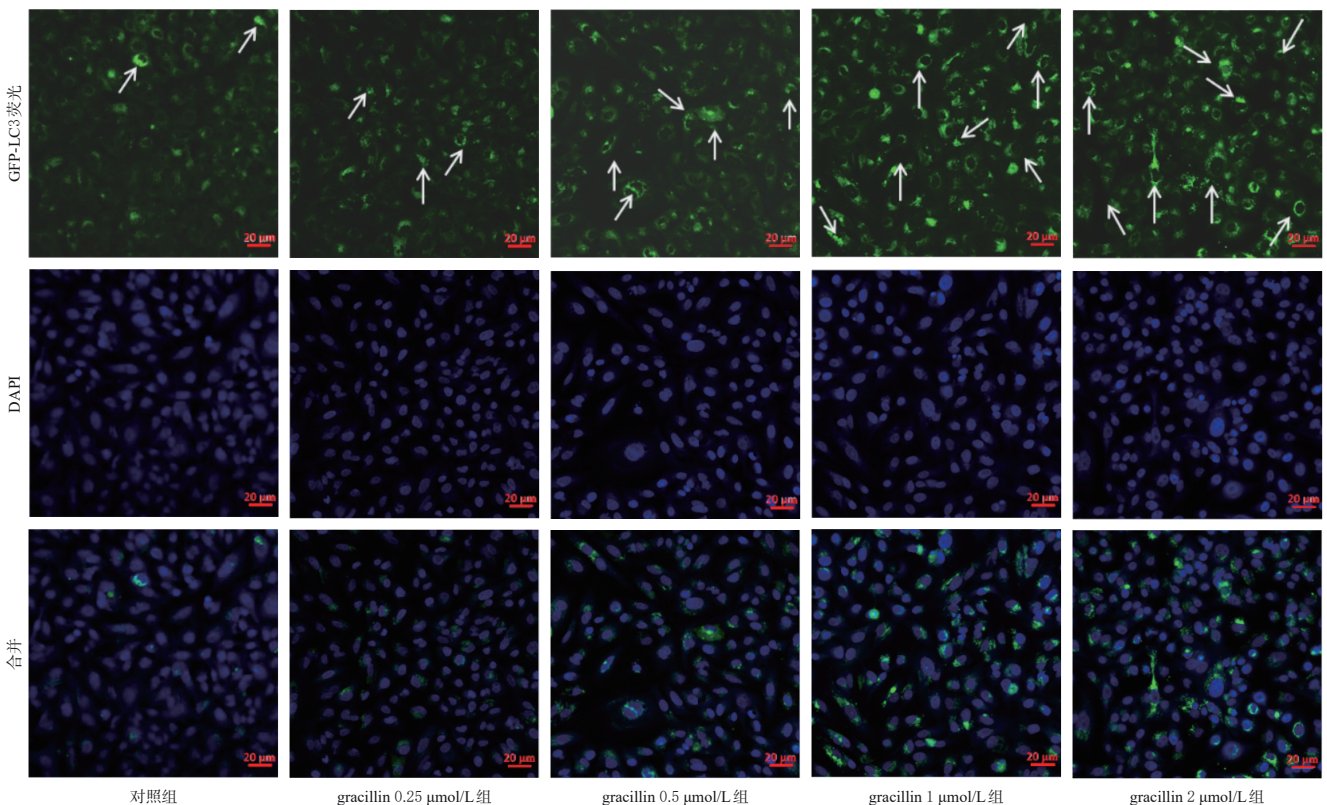
度的升高,膜上的 GFP-LC3 绿色荧光斑点增多,表明该成分能诱导细胞产生自噬,有一定的浓度依赖趋势。结果见图 3。

3.4 A549 细胞中 FAM102A mRNA 和蛋白的表达情况

与对照组比较,gracillin 0.5、1、2 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞中 FAM102A mRNA 和蛋白的表达水平均显著升高 ($P<0.01$)。结果见图 4。

3.5 A549 细胞中自噬相关蛋白的表达情况

与对照组比较,gracillin 1、2 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞中 p62 蛋白的表达水平均显著降低,Beclin-1 蛋白的表达水平均显著升高 ($P<0.05$) ; gracillin 2 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞中 LC3B- II/LC3B- I 比值显著升高 ($P<0.01$)。结果见图 5。



箭头: GFP-LC3 绿色荧光斑点。

图3 各组 A549 细胞中 GFP-LC3 在自噬小体膜上聚集的激光共聚焦图

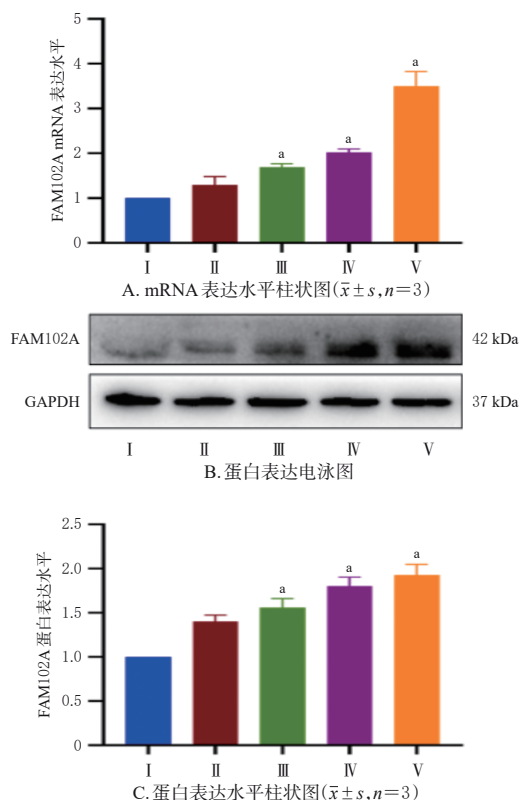


图4 各组A549细胞中FAM102A mRNA和蛋白的表达情况

I : 对照组; II : gracillin 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 组; III : gracillin 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 组; IV : gracillin 1 $\mu\text{mol/L}$ 组; V : gracillin 2 $\mu\text{mol/L}$ 组; a: 与对照组比较, $P < 0.01$ 。

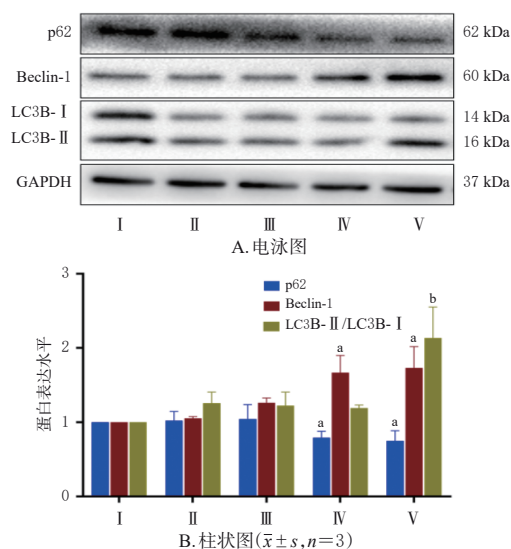


图5 各组A549细胞中自噬相关蛋白的表达情况

3.6 A549细胞中PI3K/Akt自噬信号通路相关蛋白的表达情况

与对照组比较, gracillin 2 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞中PI3K蛋白的磷酸化水平和gracillin 1、2 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞中Akt蛋白的磷酸化水平均显著降低($P < 0.05$)。结果见图6。

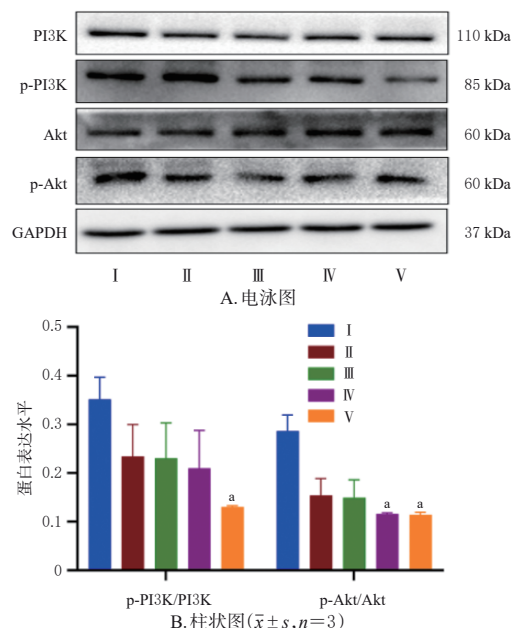


图6 各组A549细胞中PI3K/Akt信号通路相关蛋白的表达水平

I : 对照组; II : gracillin 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 组; III : gracillin 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 组; IV : gracillin 1 $\mu\text{mol/L}$ 组; V : gracillin 2 $\mu\text{mol/L}$ 组; a: 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

4 讨论

细胞自噬即细胞自体吞噬,是真核生物体内一种高度保守的进化过程,可通过降解吸收受损细胞器、无用蛋白和衰老核酸来维持物质代谢、细胞器更替及能量平衡,但过度自噬最终会导致细胞死亡^[9]。本研究结果显示,gracillin能明显抑制A549细胞的增殖,并有一定的浓度和时间依赖趋势。另外,通过生物透射电子显微镜观察发现,2 $\mu\text{mol/L}$ 的gracillin作用于A549细胞24 h后,细胞胞浆内可见具典型双层膜结构的自噬小体,表明gracillin可诱导A549细胞发生自噬。GFP-LC3蛋白在自噬小体膜上的聚集是判断自噬发生的另一个重要指标^[9],当未发生自噬时,GFP-LC3融合蛋白弥散分布于胞浆内;当发生自噬时,GFP-LC3融合蛋白会转移至自噬小体膜上,形成多个明亮的绿色荧光斑点,每个荧光斑点相当于1个自噬小体,故可通过荧光斑点的聚集程度来评价细胞自噬水平的高低;此外,在自噬发生过程中,位于胞浆的LC3- I被修饰和加工成LC3- II并定位到自噬小体中,故LC3- II/LC3- I比值的大小亦可用于评估自噬水平的高低^[10]。Beclin-1作为形成自噬小体的必需蛋白和自噬通路的反应中间体,参与调控自噬囊泡的形成和自噬的启动,与其他自噬相关蛋白相互作用,直接或间接影响自噬及肿瘤的反馈调节,该蛋白表达下调或缺失会导致自噬功能受损^[11]。p62作为机体重要的自噬调控因子,可将自噬与其他信号通路联系起来,通

过与聚集的异常蛋白或细胞器结合,将两者定向转移到自噬囊泡中进行降解;同时作为信号分子,p62可参与调节细胞生长、炎症反应和氧化应激等多种细胞过程,而p62表达或功能异常可能导致自噬功能紊乱和细胞内废弃物的积累,从而对肿瘤的发生和发展产生影响^[12]。本研究结果显示,转染GFP-LC3质粒后,gracillin不同浓度组细胞自噬小体膜上可见明显的GFP-LC3绿色荧光斑点,且随着药物浓度的升高,绿色荧光斑点增多;同时,Western blot实验结果显示,经不同浓度gracillin作用后,细胞中LC3B- II/LC3B- I 比值(gracillin 2 $\mu\text{mol/L}$ 组)和自噬相关蛋白Beclin-1蛋白表达水平(gracillin 1、2 $\mu\text{mol/L}$ 组)均显著升高,p62蛋白表达水平(gracillin 1、2 $\mu\text{mol/L}$ 组)显著降低。以上结果均表明,gracillin能明显诱导A549细胞自噬的发生。

PI3K/Akt信号通路是调控细胞自噬的一条经典信号通路^[13]。FAM102A被认为是早期雌激素受体1,其编码基因在CD4⁺、CD8⁺T细胞以及巨噬细胞中广泛表达^[14],该蛋白可参与合成天然雌激素或雌激素类化合物,并可增强巨噬细胞的吞噬作用^[8]。本研究结果显示,0.5、1、2 $\mu\text{mol/L}$ 的gracillin可使FAM102A mRNA和蛋白的表达显著上调,并可显著抑制PI3K蛋白(gracillin 2 $\mu\text{mol/L}$ 组)、Akt蛋白(gracillin 1、2 $\mu\text{mol/L}$ 组)的磷酸化水平。

综上所述,gracillin可能通过上调FAM102A mRNA和蛋白的表达、抑制PI3K/Akt信号通路来促进A549细胞发生自噬,从而发挥抑制细胞增殖的作用。

参考文献

[1] 邱德文,杜江. 中华本草:苗药卷[M]. 贵阳:贵州科技出版社,2005:254.
QIU D W, DU J. Chinese herbal medicine: Miao medicine volume[M]. Guiyang: Guizhou Science and Technology Publishing House, 2005: 254.

[2] 刘海,杨建琼,熊亮,等. 吉祥草化学成分和药理活性研究[J]. 中成药,2012,34(9):1785-1789.
LIU H, YANG J Q, XIONG L, et al. Studies on chemical constituents and pharmacological activities of *Reineckia carnea*[J]. Chin Tradit Pat Med, 2012, 34(9): 1785-1789.

[3] YANG J Q, CAO L, LI Y M, et al. Gracillin isolated from *Reineckia carnea* induces apoptosis of A549 cells via the mitochondrial pathway[J]. Drug Des Devel Ther, 2021, 15:233-243.

[4] LI Y M, LIU H, LIU X X, et al. Gracillin shows potential efficacy against non-small cell lung cancer by inhibiting the mTOR pathway[J]. Front Oncol, 2022, 12:851300.

[5] 陆礼和,吴德松,彭玲芳,等. 纤细薯蓣皂苷衍生物及其抗肿瘤活性研究[J]. 云南大学学报(自然科学版),2015,

37(3):415-421.

LU L H, WU D S, PENG L F, et al. Study on gracillin derivatives and their antitumor activity[J]. J Yunnan Univ Nat Sci Ed, 2015, 37(3): 415-421.

[6] MIN H Y, PEI H L, HYUN S Y, et al. Potent anticancer effect of the natural steroidal saponin gracillin is produced by inhibiting glycolysis and oxidative phosphorylation-mediated bioenergetics[J]. Cancers, 2020, 12(4): 913.

[7] WANG D Y, FULTHORPE R, LISS S N, et al. Identification of estrogen-responsive genes by complementary deoxyribonucleic acid microarray and characterization of a novel early estrogen-induced gene: EEIG1[J]. Mol Endocrinol, 2004, 18(2): 402-411.

[8] FJAERLI H O, BUKHOLM G, SKJAERET C, et al. Cord blood gene expression in infants hospitalized with respiratory syncytial virus bronchiolitis[J]. J Infect Dis, 2007, 196(3): 394-404.

[9] YORIMITSU T, KLIONSKY D J. Autophagy: molecular machinery for self-eating[J]. Cell Death Differ, 2005, 12(Suppl 2): 1542-1552.

[10] TANIDA I, UENO T, KOMINAMI E. LC3 and autophagy[J]. Methods Mol Biol, 2008, 445: 77-88.

[11] 张学文,吴念平,周策凡,等. Beclin1在自噬中的作用机制及其蛋白修饰的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2023, 36(6): 751-758, 763.
ZHANG X W, WU N P, ZHOU C F, et al. Research progress on mechanism and protein modification of Beclin1 in autophagy[J]. Chin J Biol, 2023, 36(6): 751-758, 763.

[12] 陈佳锋,傅修涛,丁振斌. 自噬调控多功能蛋白p62/SQSTM1参与肿瘤及其微环境的研究进展[J]. 中国临床医学, 2020, 27(2): 321-326.
CHEN J F, FU X T, DING Z B. Advances in autophagy-regulated multifunctional protein p62/SQSTM1 in tumor and its microenvironment[J]. Chin J Clin Med, 2020, 27(2): 321-326.

[13] POPOVA N V, JÜCKER M. The role of mTOR signaling as a therapeutic target in cancer[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(4): 1743.

[14] 高正,陈佳锋,傅修涛,等. 自噬调控巨噬细胞参与构建肿瘤微环境研究进展[J]. 中国临床医学, 2021, 28(5): 894-899.
GAO Z, CHEN J F, FU X T, et al. Advances in autophagy regulation of macrophages involved in the construction of tumor microenvironment[J]. Chin J Clin Med, 2021, 28(5): 894-899.

(收稿日期:2023-10-17 修回日期:2024-03-26)

(编辑:邹丽娟)