

肿瘤的实验室检测专题·论著 DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2025.22.001

基于 NUSAP1、ADAM17 及 ERp5 表达探讨补阳还五汤对乏氧微环境下肺癌 A549 细胞的作用机制*

张领兄¹,贺新玉²,路世通²,张红^{3△}

1. 湖南省长沙市中医医院(长沙市第八医院)肿瘤血液科,湖南长沙 410100;2. 湖南中医药大学中医内科学,湖南长沙 410007;3. 湖南中医药大学第一附属医院肿瘤科,湖南长沙 410007

摘要:目的 基于仁纺锤体相关蛋白 1(NUSAP1)、解聚素-金属蛋白酶 17(ADAM17)及内质网蛋白 5(ERp5)表达探讨补阳还五汤对乏氧微环境下肺癌 A549 细胞的作用机制。方法 构建 NUSAP1 过表达、ADAM17 过表达、ERp5 过表达 A549 细胞系并使用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)进行验证,将 A549 细胞分为对照组、乏氧组、补阳组、补阳+pc-NUSAP1 组、补阳+pc-ADAM17 组、补阳+pc-ERp5 组,除对照组外其余各组细胞均在乏氧条件下培养,除对照组、乏氧组外其余各组均给予补阳还五汤干预(1 mg/mL),补阳+pc-NUSAP1 组转染 pcDNA-NUSAP1 质粒,补阳+pc-ADAM17 组转染 pcDNA-ADAM17 质粒,补阳+pc-ERp5 组转染 pcDNA-ERp5 质粒。采用 RT-qPCR 检测各组细胞 NUSAP1、ADAM17、ERp5 mRNA 相对表达量;比较各组细胞增殖、侵袭、迁移和自然杀伤(NK)细胞免疫杀伤情况;采用 Western blotting 检测各组细胞周期蛋白 A2(CCNA2)、细胞周期蛋白 D1(CCND1)、Vimentin、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、MHC I 类链相关分子 A(MICA)、MHC I 类链相关分子 B(MICB)蛋白相对表达量。结果 乏氧组细胞的 NUSAP1、ADAM17、ERp5 mRNA 相对表达量及 CCNA2、CCND1、Vimentin、MMP-9、MICA、MICB 蛋白相对表达量均高于对照组($P < 0.05$),细胞增殖率、细胞侵袭数、划痕愈合率高于对照组($P < 0.05$),NK 细胞杀伤活性低于对照组($P < 0.05$)。补阳组 NUSAP1、ADAM17、ERp5 mRNA 相对表达量及 CCND1、CCNA2、Vimentin、MMP-9、MICA、MICB 蛋白相对表达量均低于乏氧组($P < 0.05$),细胞增殖率、细胞侵袭数、划痕愈合率均低于乏氧组($P < 0.05$),NK 细胞杀伤活性高于乏氧组($P < 0.05$)。补阳+pc-NUSAP1 组的 NUSAP1 mRNA 相对表达量、细胞增殖率、细胞侵袭数、划痕愈合率及 CCND1、CCNA2、Vimentin、MMP-9 蛋白相对表达量均高于补阳组($P < 0.05$)。补阳+pc-ADAM17 组的 ADAM17 mRNA 相对表达量、细胞侵袭数、划痕愈合率和 Vimentin、MMP-9、MICA、MICB 蛋白相对表达量均高于补阳组($P < 0.05$),NK 细胞杀伤活性低于补阳组($P < 0.05$)。补阳+pc-ERp5 组 ERp5 mRNA 相对表达量和 MICA、MICB 蛋白相对表达量均高于补阳组($P < 0.05$),NK 细胞杀伤活性低于补阳组($P < 0.05$)。结论 补阳还五汤可抑制乏氧微环境下 A549 细胞增殖、转移和增加 NK 细胞对肿瘤的杀伤能力,可能与抑制 NUSAP1、ADAM17 及 ERp5 表达有关。

关键词:肺癌; 乏氧微环境; 补阳还五汤; 仁纺锤体相关蛋白 1; 解聚素-金属蛋白酶 17; 内质网蛋白 5; 细胞转移; 免疫逃逸

中图分类号:R446.1;R734.2

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2025)22-3025-07

Exploration on action mechanism of Buyang Huanwu Decoction on A549 cells in lung cancer under hypoxic microenvironment based on NUSAP1, ADAM17 and ERp5 expression*

ZHANG Lingxiong¹, HE Xinyu², LU Shitong², ZHANG Hong^{3△}

1. Department of Oncology and Hematology, Changsha Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine (Changsha Municipal Eighth Hospital), Changsha, Hunan 410100, China; 2. Internal Medicine of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 3. Department of Oncology, First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

Abstract: Objective To explore the action mechanism of Buyang Huanwu Decoction on lung cancer A549 cells under hypoxic microenvironment based on the expression of nucleolar and spindle associated protein 1

* 基金项目:湖南省中医药科研计划项目(C2023001)。

作者简介:张领兄,女,医师,主要从事肿瘤学方向(中医)的研究。△ 通信作者,E-mail:15111372876@163.com。

引用格式:张领兄,贺新玉,路世通,等.基于 NUSAP1、ADAM17 及 ERp5 表达探讨补阳还五汤对乏氧微环境下肺癌 A549 细胞的作用机制[J]. 检验医学与临床,2025,22(22):3025-3031.

(NUSAP1), a depolymerin and metalloteinase 17 (ADAM17) and endoplasmic reticulum protein 5 (ERp5).

Methods The A549 cell lines with overexpression of NUSAP1, ADAM17 and ERp5 were constructed and verified by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR). The A549 cells were divided into the control group, hypoxia group, Buyang Huanwu Decoction group, Buyang Huanwu Decoction + pc-NUSAP1 group, Buyang Huanwu Decoction + pc-ADAM17 group and Buyang Huanwu Decoction + pc-ERp5 group. Except for the control group, the other groups were cultured under hypoxia. Except for the control group and hypoxia group, the other groups were treated with Buyang Huanwu Decoction (1 mg/mL). The pcDNA-NUSAP1 plasmid was transfected into the Buyang Huanwu Decoction + pc-NUSAP1 group, the pcDNA-ADAM17 plasmid was transfected into the Buyang Huanwu Decoction + pc-ADAM17 group, and the pcDNA-ERp5 plasmid was transfected into the Buyang Huanwu Decoction + pc-ERp5 group. The relative mRNA expression levels of NUSAP1, ADAM17 and ERp5 in each group of cells were detected by RT-qPCR. The proliferation, invasion, migration and natural killer (NK) cell immune killing were compared among the groups. The relative protein expression levels of cyclin A2 (CCNA2), cyclin D1 (CCND1), Vimentin, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MHC class I chain-related A (MICA) and MHC class I chain-related B (MICB) in each group of cells were detected by Western blotting. **Results** The relative mRNA expression levels of NUSAP1, ADAM17 and ERp5, as well as the relative protein expression levels of CCNA2, CCND1, Vimentin, MMP-9, MICA and MICB in the hypoxia group were higher than those in the control group ($P < 0.05$), and the cell proliferation rate, invasion number and scratch healing rate were higher than those in the control group ($P < 0.05$), while the NK cell killing activity was lower than that in the control group ($P < 0.05$). The relative mRNA expression levels of NUSAP1, ADAM17 and ERp5, as well as the relative protein expression levels of CCND1, CCNA2, Vimentin, MMP-9, MICA and MICB in the Buyang Huanwu Decoction group were lower than those in the hypoxia group ($P < 0.05$), and the cell proliferation rate, invasion number and scratch healing rate were lower than those in the hypoxia group ($P < 0.05$), while the NK cell killing activity was higher than that in the hypoxia group ($P < 0.05$). The relative mRNA expression level of NUSAP1, cell proliferation rate, invasion number, scratch healing rate and the relative protein expression levels of CCND1, CCNA2, Vimentin and MMP-9 in the Buyang Huanwu Decoction + pc-NUSAP1 group were higher than those in the Buyang Huanwu Decoction group ($P < 0.05$). The relative mRNA expression level of ADAM17, invasion number, scratch healing rate and the relative protein expression levels of Vimentin, MMP-9, MICA and MICB in the Buyang Huanwu Decoction + pc-ADAM17 group were higher than those in the Buyang Huanwu Decoction group ($P < 0.05$), while the NK cell killing activity was lower than that in the Buyang Huanwu Decoction group ($P < 0.05$). The relative mRNA expression level of ERp5 and the relative protein expression levels of MICA and MICB in the Buyang Huanwu Decoction + pc-ERp5 group were higher than those in the Buyang Huanwu Decoction group ($P < 0.05$), while the NK cell killing activity was lower than that in the Buyang Huanwu Decoction group ($P < 0.05$). **Conclusion** Buyang Huanwu Decoction could inhibit the proliferation and metastasis of A549 cells in hypoxic microenvironment and increase the killing ability of NK cells against tumors, which may be related to the inhibition of the expression of NUSAP1, ADAM17 and ERp5.

Key words: lung cancer; hypoxic microenvironment; Buyang Huanwu Decoction; nucleolar and spindle associated protein 1; a depolymerin and metalloteinase 17; endoplasmic reticulum protein 5; cell metastasis; immune escape

肺癌是发生于肺部组织的恶性肿瘤,肺腺癌是其常见的病理类型。尽管化疗、放疗以及分子靶向治疗等在肺癌治疗中显示出较好的疗效,但彻底治愈仍难以实现,这与肺癌复杂的肿瘤发生、转移和免疫逃逸机制有关。恶性肿瘤生长具有不受限特征,使其组织代谢处于较高状态,导致组织内部出现缺氧,在乏氧微环境下可促进肿瘤细胞转移^[1]和免疫逃逸^[2],降低肿瘤治疗敏感性^[3],加重肿瘤病情。仁纺锤体相关蛋白 1(NUSAP1)既是有丝分裂的调节因子,又是肿瘤缺氧调控的靶点之一,降低其表达可抑制缺氧所致的

肺癌细胞增殖和转移过程^[4]。解聚素-金属蛋白酶 17(ADAM17)是金属蛋白酶超家族成员,在细胞信号传导、调控中发挥关键性作用,可促进肿瘤侵袭,还参与肿瘤耐药性和免疫逃逸调节^[5]。内质网蛋白 5(ERp5)是分布于内质网的蛋白酶,可与肿瘤细胞表面的 MHC I 类链相关分子 A(MICA)作用使 MICA 脱落,为肿瘤细胞逃避免疫细胞监视提供有利条件^[6]。中医认为“邪之所凑,其气必虚”,人体正气不足,脏腑功能失调,因虚致病是疾病发展的根本,肿瘤存在必然会引起气血受阻,阻滞脉中,使脉内血行不

畅,日久即成淤血。补阳还五汤出自《医林改错》,具有补气、活血化瘀的功效。本课题组前期研究表明补阳还五汤可改善肺癌脑转移患者的临床症状^[7],联合贝伐单抗治疗也能提升肺癌脑转移患者的生存质量^[8],但其中的作用机制是否与调节肿瘤细胞的增殖、转移或免疫逃逸有关尚不明确。本研究拟在细胞体外实验中,通过检测 NUSAP1、ADAM17 及 ERp5 表达探讨补阳还五汤对乏氧微环境下肺癌 A549 细胞的潜在作用机制,希望能为补阳还五汤用于肺癌治疗提供实验依据。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞 肺癌 A549 细胞(北京伊塔生物科技有限公司,货号:YT800136),人自然杀伤(NK)细胞(武汉赛奥斯生物科技有限公司,货号:PC-021h)。本研究经长沙市中医医院(长沙市第八医院)伦理委员会批准(伦审[2023]研第 002 号)。

1.2 主要试剂与仪器 pcDNA-NUSAP1 质粒、pcDNA-ADAM17 质粒、pcDNA-ERp5 质粒及其阴性对照均购自北京科瑞思搏生物科技有限公司;细胞培养基(货号:000111)购自上海中乔新舟生物科技有限公司;Lipofectamine 3000(货号:L3000-015)购自美国 Invitrogen 公司;TRIzol 法抽提总 RNA 试剂盒(货号:YT527-IHR)购自北京百奥莱博科技有限公司;SYBR Green qPCR Mix(货号:D7501)购自上海碧云天生物技术股份有限公司;MTT 细胞增殖试剂盒(货号:NDC-EKX-QR5IP1-500)购自艾美捷科技有限公司;细胞周期蛋白 A2(CCNA2)、细胞周期蛋白 D1(CCND1)、Vimentin、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、MICA、MHC I 类链相关分子 B(MICB)、3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)抗体均购自美国 Sigma 公司,货号分别为 HPA020626、SAB4502603、SAB1305445、AB19016、SAB2101479、ZRB1439、AB2302。酶标仪 PR 4100 购自美国 Bio-Rad 公司;CFX ConnectTM 荧光定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞转染 肺癌 A549 细胞复苏后置于含有胎牛血清的培养基中培养,正常培养条件为 37 ℃、5%CO₂ 和常氧环境,待细胞融合至 90%时进行传代,取第 3 代细胞用于实验。取对数期 A549 细胞,待其生长融合至 50%时,更换为无血清的培养基培养,细胞中分别加入 pcDNA-NUSAP1 质粒(pc-NUSAP1 细胞)及其阴性对照(pc-NC1 细胞)、pcDNA-ADAM17 质粒(pc-ADAM17 细胞)及其阴性对照(pc-NC2 细胞)、pcDNA-ERp5 质粒(pc-ERp5 细胞)及其阴性对照(pc-NC3 细胞),加入 Lipofectamine 3000 转染液体,孵育 6 h 后更换为含血清培养基培养,转染 48 h 后,收集细胞。

1.3.2 实时荧光定量 PCR 检测 NUSAP1、ADAM17、ERp5 mRNA 表达 提取 1.3.1 转染后细胞的总 RNA,待 RNA 纯度合格后,测定其浓度,将所得

RNA 反转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板,采用 SYBR Green qPCR Mix 在 CFX ConnectTM 实时荧光定量 PCR 仪上进行扩增,反应体系 20 μL。扩增条件:95 ℃预变性 2 min,95 ℃变性 30 s,60 ℃退火 35 s,70 ℃延伸 5 s,38 个循环。内参基因为 GAPDH。引物由北京科瑞思搏生物科技有限公司合成。GAPDH 正向引物序列为 5'-GGTGAAGGTCGGTGTGAACG-3',反向引物序列为 5'-CTCGCTCCTGGAAGATGGTG-3';NUSAP1 正向引物序列为 5'-CTTGGGTCTGAAGGGGTCAC-3',反向引物序列为 5'-AGCAGAATTCCCCGTGATGG-3';ADAM17 正向引物序列为 5'-AGAGCTGACCCAGATCCAT-3',反向引物序列为 5'-TACTCTCTCCCTCTGCCC-3';ERp5 正向引物序列为 5'-TG-GCTCTCCTGGTGCTCGGT-3',反向引物序列为 5'-AAGCCTCTGTTGTGGCTCTCA-3'。采用 2^{-ΔΔCt} 法计算转染后各细胞相应的 NUSAP1、ADAM17、ERp5 mRNA 相对表达量,以验证转染效率。

1.3.3 细胞分组及干预 将 A549 细胞分为对照组、乏氧组、补阳组、补阳+pc-NUSAP1 组、补阳+pc-ADAM17 组、补阳+pc-ERp5 组。除对照组外,其余各组细胞均在乏氧条件下(37 ℃、94%N₂、5%CO₂、1%O₂)培养 48 h,对照组是在正常条件下(37 ℃、5%CO₂、21%O₂)培养 48 h。补阳+pc-NUSAP1 组转染 pcDNA-NUSAP1 质粒,补阳+pc-ADAM17 组转染 pcDNA-ADAM17 质粒,补阳+pc-ERp5 组转染 pcDNA-ERp5 质粒,除对照组、乏氧组外剩下各组均给予补阳还五汤干预(1 mg/mL)^[9],干预 48 h。补阳还五汤的方药组成:黄芪 120 g,当归 6 g,赤芍 4.5 g,川芎、红花、桃仁、地龙各 3 g。各药经浸泡、煎煮、过滤、浓缩后,生药含量约 5 mg/mL。按照 1.3.2 方法检测各组细胞 NUSAP1、ADAM17、ERp5 mRNA 相对表达量。

1.3.4 细胞增殖检测 采用 MTT 法检测细胞增殖能力。将各组细胞接种至 96 孔板(5×10³ 个/孔),预培养 12 h 后,给予相应处理 48 h,弃去培养液,每孔加入 100 μL MTT 溶液,孵育 4 h,弃去培养基,加入 DMSO 孵育 20 min,采用酶标仪测定 570 nm 波长处吸光度(A)值,计算细胞增殖率。

1.3.5 细胞侵袭检测 使用 Transwell 实验检测细胞侵袭能力,使用 Matrigel 胶包被 Transwell 小室,将各组细胞悬液密度调成一致(2×10⁵/mL),取 100 μL 细胞悬液至 Transwell 小室,培养 48 h 后,对下室的细胞进行 0.1%结晶紫染色(20 min),选取 5 个不重叠视野,统计细胞数目,计算其均值。

1.3.6 细胞迁移检测 使用划痕实验检测细胞的迁移能力。待各组细胞生长单层时,使用移液枪头做直线划痕,记录划痕宽度(W1),磷酸缓冲液洗去细胞后,继续培养 48 h 并记录划痕宽度(W2),计算划痕愈合率=(W1-W2)/W2×100%。

1.3.7 NK 细胞免疫杀伤活性检测 将各组处理后的细胞与 NK 细胞进行共培养 24 h, 以 1 900 r/min 离心 5 min 后, 取上清液, 将所得上清液加入 96 孔板 (100 μ L/孔), 加入 100 μ L 乳酸脱氢酶溶液作用 5 min, 加入 30 μ L 1 mol/L 盐酸, 采用酶标仪测定 490 nm 波长处 A 值, 计算 NK 细胞杀伤活性。

1.3.8 Western blotting 检测蛋白表达 提取各组细胞的总蛋白, 测定蛋白浓度, 上样取液 70 μ g 蛋白, 依次经聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳、转膜, 加入 CCNA2、CCND1、Vimentin、MMP-9、MICA、MICB、GAPDH 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 以 GAPDH 为内参蛋白。加入标记二抗孵育 1 h, 化学发光显影、曝光, 使用 Quantity One 凝胶图像分析软件分析蛋白相对表达量。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据处理。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 多组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 转染细胞 RT-qPCR 验证 pc-NUSAP1 细胞的 NUSAP1 mRNA 相对表达量 (5.32 \pm 0.42) 明显高于 pc-NC1 细胞 (1.01 \pm 0.03), 差异有统计学意义 ($t=25.073, P<0.001$)。pc-ADAM17 细胞的 ADAM17 mRNA 相对表达量 (4.84 \pm 0.34) 明显高于 pc-NC2 细胞 (1.03 \pm 0.05), 差异有统计学意义 ($t=27.157, P<0.001$)。pc-ERp5 细胞的 ERp5 mRNA 相对表达量 (5.01 \pm 0.38) 明显高于 pc-NC3 细胞 (1.01 \pm 0.04), 差异有统计学意义 ($t=25.642, P<0.001$)。

2.2 各组细胞 NUSAP1、ADAM17、ERp5 mRNA 相对表达量比较 乏氧组细胞的 NUSAP1、ADAM17、ERp5 mRNA 相对表达量均高于对照组 ($P<0.05$); 补阳组细胞的 NUSAP1、ADAM17、ERp5 mRNA 相对表达量均低于乏氧组 ($P<0.05$); 补阳+pc-NUSAP1 组的 NUSAP1 mRNA 相对表达量高于补阳组 ($P<0.05$); 补阳+pc-ADAM17 组 ADAM17 mRNA 相对表达量高于补阳组 ($P<0.05$); 补阳+pc-ERp5 组 ERp5 mRNA 相对表达量高于补阳组 ($P<0.05$)。见表 1。

2.3 各组细胞增殖率和 CCND1、CCNA2 蛋白相对

表达量比较 乏氧组细胞增殖率和 CCND1、CCNA2 蛋白相对表达量均高于对照组 ($P<0.05$); 补阳组细胞增殖率和 CCND1、CCNA2 蛋白相对表达量均低于乏氧组 ($P<0.05$); 补阳+pc-NUSAP1 组细胞增殖率和 CCND1、CCNA2 蛋白相对表达量均高于补阳组 ($P<0.05$)。见表 2。

2.4 各组细胞侵袭、迁移能力和 Vimentin、MMP-9 蛋白相对表达量比较 乏氧组细胞侵袭数、划痕愈合率和 Vimentin、MMP-9 蛋白相对表达量均高于对照组 ($P<0.05$), 补阳组细胞侵袭数、划痕愈合率和 Vimentin、MMP-9 蛋白相对表达量均低于乏氧组 ($P<0.05$), 补阳+pc-NUSAP1 组、补阳+pc-ADAM17 组的细胞侵袭数、划痕愈合率和 Vimentin、MMP-9 蛋白相对表达量均高于补阳组 ($P<0.05$)。见表 3 和图 1、2。

表 1 各组细胞 NUSAP1、ADAM17、ERp5 mRNA 相对表达量比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	NUSAP1 mRNA	ADAM17 mRNA	ERp5 mRNA
对照组	1.01 \pm 0.03	1.00 \pm 0.04	1.01 \pm 0.05
乏氧组	3.44 \pm 0.12 [*]	3.94 \pm 0.07 [*]	2.85 \pm 0.07 [*]
补阳组	1.68 \pm 0.07 [#]	1.87 \pm 0.05 [#]	1.38 \pm 0.06 [#]
补阳+pc-NUSAP1 组	5.27 \pm 0.34 ^{&}	1.85 \pm 0.07	1.37 \pm 0.05
补阳+pc-ADAM17 组	1.72 \pm 0.06	4.80 \pm 0.31 ^{&}	1.35 \pm 0.08
补阳+pc-ERp5 组	1.70 \pm 0.05	1.88 \pm 0.07	5.04 \pm 0.07 ^{&}
<i>F</i>	643.922	676.645	3 478.452
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注: 与对照组比较, ^{*} $P<0.05$; 与乏氧组比较, [#] $P<0.05$; 与补阳组比较, [&] $P<0.05$ 。

表 2 各组细胞增殖率和 CCND1、CCNA2 蛋白相对表达量比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	细胞增殖率 (%)	CCND1 蛋白	CCNA2 蛋白
对照组	100.00 \pm 0.00	0.37 \pm 0.06	0.29 \pm 0.04
乏氧组	164.55 \pm 8.45 [*]	0.83 \pm 0.05 [*]	0.78 \pm 0.05 [*]
补阳组	124.87 \pm 5.63 [#]	0.52 \pm 0.04 [#]	0.45 \pm 0.05 [#]
补阳+pc-NUSAP1 组	147.52 \pm 6.92 ^{&}	0.67 \pm 0.06 ^{&}	0.61 \pm 0.06 ^{&}
补阳+pc-ADAM17 组	126.88 \pm 6.12	0.50 \pm 0.05	0.44 \pm 0.05
补阳+pc-ERp5 组	125.31 \pm 7.11	0.48 \pm 0.07	0.42 \pm 0.08
<i>F</i>	73.653	51.087	55.445
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注: 与对照组比较, ^{*} $P<0.05$; 与乏氧组比较, [#] $P<0.05$; 与补阳组比较, [&] $P<0.05$ 。

表 3 各组细胞侵袭、迁移能力和 Vimentin、MMP-9 蛋白相对表达量比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	细胞侵袭数 (个)	划痕愈合率 (%)	Vimentin 蛋白	MMP-9 蛋白
对照组	36.45 \pm 4.66	34.84 \pm 3.11	0.19 \pm 0.03	0.23 \pm 0.04
乏氧组	101.27 \pm 5.69 [*]	86.21 \pm 4.08 [*]	0.87 \pm 0.05 [*]	0.96 \pm 0.06 [*]
补阳组	65.84 \pm 4.19 [#]	56.46 \pm 4.19 [#]	0.43 \pm 0.06 [#]	0.48 \pm 0.05 [#]
补阳+pc-NUSAP1 组	81.36 \pm 5.34 ^{&}	73.51 \pm 3.72 ^{&}	0.66 \pm 0.04 ^{&}	0.73 \pm 0.05 ^{&}
补阳+pc-ADAM17 组	77.82 \pm 5.07 ^{&}	71.98 \pm 4.01 ^{&}	0.63 \pm 0.06 ^{&}	0.71 \pm 0.07 ^{&}
补阳+pc-ERp5 组	63.48 \pm 6.34	54.38 \pm 4.18	0.40 \pm 0.07	0.45 \pm 0.06
<i>F</i>	101.758	129.365	120.000	127.880
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: 与对照组比较, ^{*} $P<0.05$; 与乏氧组比较, [#] $P<0.05$; 与补阳组比较, [&] $P<0.05$ 。

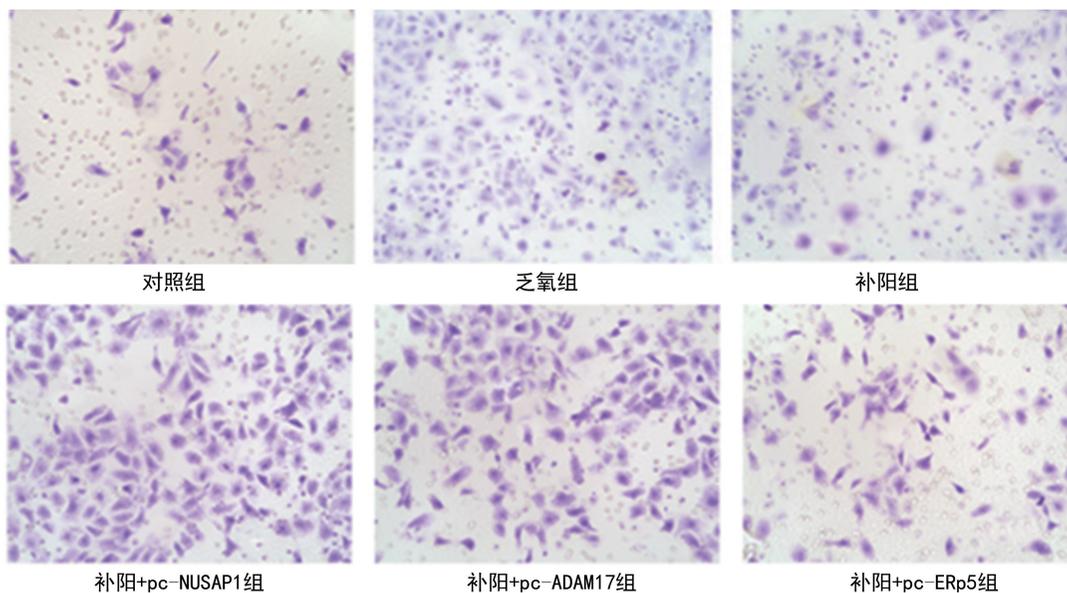


图 1 各组细胞侵袭结果 (Transwell 实验, 结晶紫染色, $\times 200$)

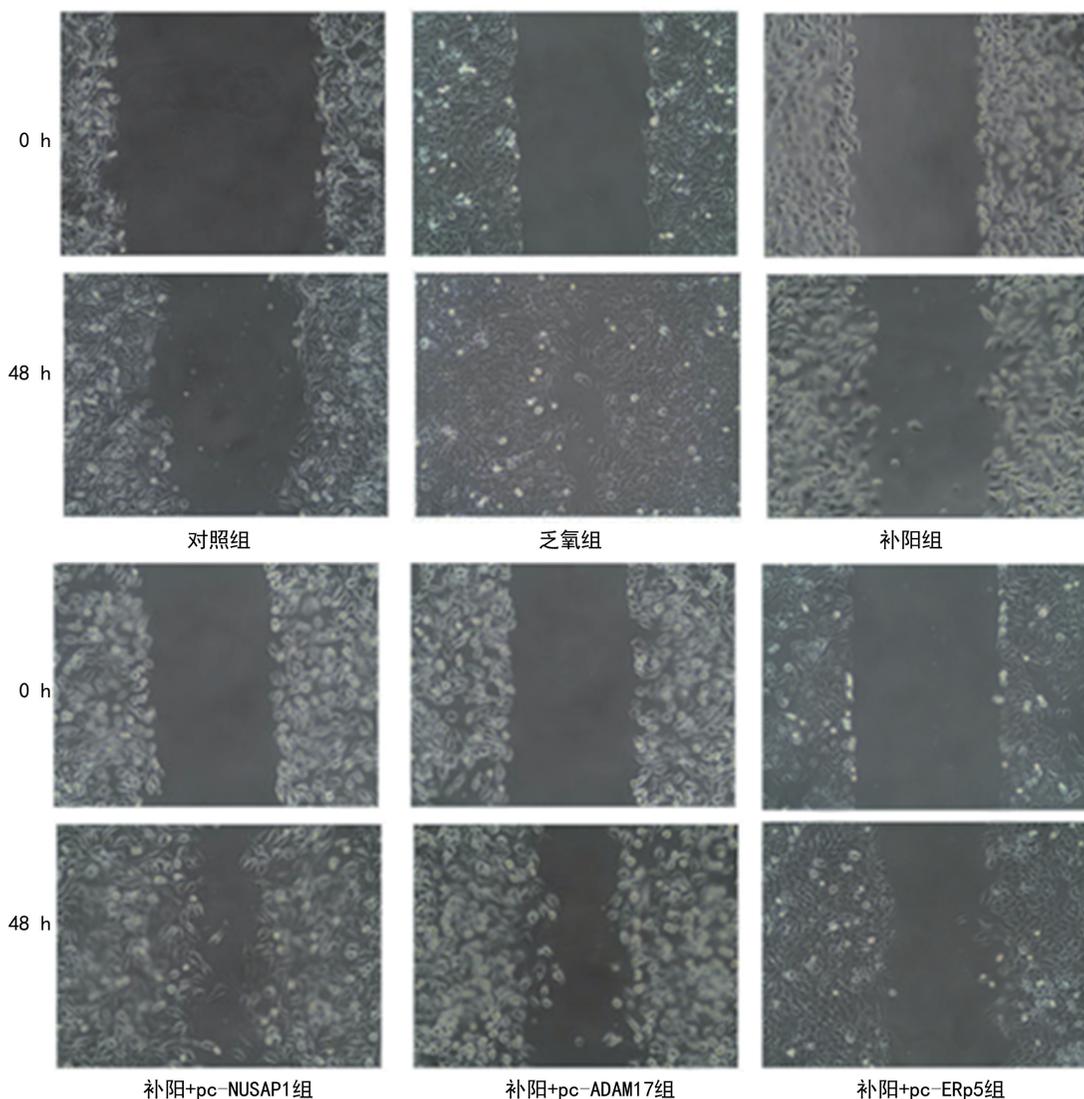


图 2 各组细胞迁移结果 ($\times 100$)

2.5 NK 细胞对各组细胞杀伤情况和各组 MICA、MICB 蛋白相对表达量比较

乏氧组 NK 细胞杀伤活

性低于对照组 ($P < 0.05$), MICA、MICB 蛋白相对表达量均高于对照组 ($P < 0.05$); 补阳组 NK 细胞杀伤

活性高于乏氧组($P < 0.05$), MICA、MICB 蛋白相对表达量均低于乏氧组($P < 0.05$); 补阳+pc-ADAM17 组、补阳+pc-ERp5 组 NK 细胞杀伤活性低于补阳组($P < 0.05$), MICA、MICB 蛋白相对表达量均高于补阳组($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 NK 细胞对各组细胞杀伤情况和各组 MICA、MICB 蛋白相对表达量比较($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	NK 细胞杀伤活性(%)	MICA 蛋白	MICB 蛋白
对照组	23.41±2.12	0.26±0.05	0.21±0.04
乏氧组	10.39±1.04*	0.77±0.06*	0.80±0.05*
补阳组	18.94±1.37 [#]	0.46±0.05 [#]	0.51±0.04 [#]
补阳+pc-NUSAP1 组	18.18±1.54	0.44±0.06	0.50±0.05
补阳+pc-ADAM17 组	13.82±1.33 ^{&}	0.65±0.05 ^{&}	0.69±0.04 ^{&}
补阳+pc-ERp5 组	14.31±1.27 ^{&}	0.62±0.06 ^{&}	0.67±0.05 ^{&}
F	57.700	65.285	125.932
P	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与乏氧组比较,[#] $P < 0.05$;与补阳组比较,[&] $P < 0.05$ 。

3 讨 论

肺癌虽无传染性,但表现出家族聚集性,具有较高的发病率和病死率,乏氧环境有利于肿瘤细胞恶性生长、转移和躲避免疫细胞杀伤。本课题组研究前期临床研究已证实补阳还五汤在肺癌脑转移患者中取得不错治疗效果^[7-8],本研究进一步分析发现在乏氧环境下 A549 细胞的 NUSAP1、ADAM17、ERp5 mRNA 相对表达量明显升高,而给予补阳还五汤干预可以部分降低 NUSAP1、ADAM17、ERp5 mRNA 相对表达量,说明乏氧环境可促进 A549 细胞 NUSAP1、ADAM17、ERp5 mRNA 相对表达量,补阳还五汤可以抑制乏氧环境所致的 A549 细胞 NUSAP1、ADAM17、ERp5 mRNA 表达。

细胞增殖是肿瘤生长基础,NUSAP1 是微管结合蛋白,可参与纺锤体微管形成,NUSAP1 缺失可引起纺锤体发生组装异常,使细胞无法进行正常的有丝分裂^[10]。有研究表明通过抑制 NUSAP1 表达可抑制非小细胞肺癌细胞的增殖和转移能力^[11]。NUSAP1 能与 CCNA2 结合促进细胞周期进程^[12],CCNA2 为 CDK2 激酶,能通过促进细胞周期 G₁/S 期和 G₂/M 期过渡以确保细胞在适当时间进行复制和有丝分裂^[13]。CCND1 是细胞从 G₁ 期进入 S 期的关键调控蛋白,其与细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)4/6 结合形成活性复合物,磷酸化 Rb 蛋白,促使 E2F 释放并启动 S 期相关基因的转录,从而推动细胞进入 DNA 合成期。有研究也表明 NUSAP1 对 CCND1 有调节作用^[14]。本研究结果显示:乏氧环境下 A549 细胞增

殖率和 CCND1、CCNA2 蛋白相对表达量升高,给予补阳还五汤干预可以降低 A549 细胞增殖率和 CCND1、CCNA2 蛋白相对表达量;而 NUSAP1 过表达可部分逆转补阳还五汤的抑制效应,使细胞增殖率和 CCND1、CCNA2 蛋白相对表达量明显升高。以上结果说明补阳还五汤可抑制乏氧环境下 A549 细胞增殖,可能与抑制 NUSAP1 表达有关。从药物成分的现代药理机制来看,补阳还五汤方中当归含有的阿魏酸具有抗氧化、抗炎作用,对肿瘤细胞的增殖产生一定的抑制作用^[15]。还有研究显示,红花中的红花黄色素成分可以抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭^[16]。

肿瘤细胞的侵袭、迁移能力是肿瘤细胞发生远处转移的关键。Vimentin 是一种细胞骨架蛋白,MMP-9 是一种明胶酶,二者均可促进肿瘤细胞侵袭、迁移。有研究表明,NUSAP1 可通过促进 MMP-9 表达进而促进非小细胞肺癌细胞迁移^[17]。ADAM17 可以通过调节黏附因子、内皮因子等使膜分子发生水解,从而促进细胞转移^[18]。本研究结果显示:乏氧环境下 A549 细胞侵袭数、划痕愈合率和 Vimentin、MMP-9 蛋白相对表达量升高,给予补阳还五汤干预可降低 A549 细胞侵袭数、划痕愈合率和 Vimentin、MMP-9 蛋白相对表达量;而 NUSAP1 过表达、ADAM17 过表达可部分逆转补阳还五汤的抑制效应,使细胞侵袭数、划痕愈合率和 Vimentin、MMP-9 蛋白相对表达量升高。以上结果说明补阳还五汤可抑制乏氧环境下 A549 细胞转移、侵袭的能力可能与抑制 NUSAP1、ADAM17 表达有关。分析其原因可能是赤芍含有的芍药苷具有活血化痰作用,能抑制肿瘤血管生成,限制肿瘤细胞营养供应;川芎所含的川芎嗪能扩张血管、抗血小板聚集,降低血液黏稠度,协同防止肿瘤细胞转移^[19-20]。

NK 细胞是抗癌的首要防线,无需肿瘤抗原预刺激就能直接杀伤肿瘤细胞,同时又能通过释放细胞因子诱导细胞凋亡,对所有的癌细胞类型均有免疫杀伤作用。肿瘤细胞对治疗药物产生免疫逃逸,主要与免疫监视功能受损导致免疫杀伤作用减弱有关。有研究表明降低 ADAM17 表达会增强 NK 细胞对肿瘤细胞的杀伤能力^[21]。ADAM17、ERp5 对肿瘤细胞表面的 MICA、MICB 蛋白的 α3 区产生水解作用,使 MICA、MICB 从肿瘤细胞表面脱落,MICA、MICB 会引起 NK 细胞膜表面受体结构改变,从而削弱 NK 细胞对肿瘤细胞的免疫杀伤作用^[22-23]。本研究结果显示:乏氧环境下 NK 细胞杀伤活性降低,而 MICA、MICB 蛋白相对表达量升高,给予补阳还五汤干预可以升高 NK 细胞杀伤活性和降低 MICA、MICB 蛋白相对表达量;而 ADAM17 过表达、ERp5 过表达可部分逆转补阳还五汤的作用,使 NK 细胞杀伤活性降低,MICA、MICB

蛋白相对表达量升高。以上结果说明补阳还五汤可增强乏氧环境下 NK 细胞对 A549 细胞的作用,其作用效果可能与抑制 NUSAP1、ADAM17 表达有关。据报道,黄芪增强免疫功能的特性及当归调节免疫细胞活性的作用都有助于提升 NK 细胞的抗癌能力^[24-25]。

综上所述,补阳还五汤可抑制乏氧微环境所致的 A549 细胞增殖、转移能力增强情况,还能增加 NK 细胞对肿瘤的免疫杀伤能力,可能与其抑制 NUSAP1、ADAM17、ERp5 表达有关。但本研究受研究条件限制,仅在 mRNA 水平分析 NUSAP1、ADAM17 及 ERp5 表达,未涉及蛋白水平验证,无法排除转录后调控对最终蛋白功能的影响,后续还需要深入研究补阳还五汤的调控机制。

参考文献

[1] 刘辉,杨小琼,朱烟林,等. PD-L1 与缺氧诱导的肺癌细胞自噬及增殖相关性的研究[J]. 肿瘤预防与治疗,2020,33(9):739-745.

[2] SCHLICHTNER S, YASINSKA IM, KLENOVA E, et al. L-kynurenine participates in cancer immune evasion by downregulating hypoxic signaling in T lymphocytes [J]. *Oncoimmunology*,2023,12(1):2244330.

[3] 刘洪良,周寒静,周丽,等. 乏氧条件下坎地沙坦增加肺腺癌 A549 细胞放射敏感性[J]. 中国免疫学杂志,2021,37(12):1472-1476.

[4] 李晓敏,于哲,何金萍,等. 缺氧微环境诱导 NUSAPI 表达促进肺癌细胞的增殖和转移[J]. 河北医药,2023,45(17):2612-2615.

[5] LIU J, YE L, LIN K, et al. miR-4299 inhibits tumor progression in pancreatic cancer through targeting ADAM17 [J]. *Mol Cell Biochem*,2023,478(8):1727-1742.

[6] 杨春媚. 人参皂苷 Rh2 干预 sMICA 相关蛋白酶 ERp5 促进 NK 细胞的肿瘤免疫监视[D]. 南京:南京中医药大学,2021.

[7] 张红,尹秀东,李祥. 补阳还五汤加味配合头部伽玛刀治疗气虚血瘀型肺癌脑转移的临床观察[J]. 中医药导报,2017,23(2):49-50.

[8] 朱纪烨,杨泽芳,张红. 补阳还五汤加味联合贝伐单抗治疗肺癌脑转移临床观察[J]. 实用中医内科杂志,2021,35(4):117-120.

[9] 张红,苏运,朱纪烨,等. 补阳还五汤提取物调控肺癌细胞对乏氧环境适应性的作用及机制[J]. 哈尔滨医科大学学报,2022,56(4):305-311.

[10] ZHU Y, LIU Y, ZHANG L, et al. NUSAP1 regulates basal cell carcinoma migration, invasion and DNA damage through activation of the Hedgehog signaling pathway[J]. *Physiol Int*,2023,110(2):160-172.

[11] 李晓敏,于哲,槐梅,等. miR-758-3p 通过靶向核仁纺锤体相关蛋白 1 抑制非小细胞肺癌细胞增殖和侵袭[J]. 中华肿瘤杂志,2021,43(1):113-117.

[12] WANG H, LIU Z, WU P, et al. NUSAP1 accelerates osteosarcoma cell proliferation and cell cycle progression via upregulating CDC20 and cyclin A2[J]. *Onco Targets Ther*,2021,14:3443-3454.

[13] SILVA CASCALES H, BURDOVA K, MIDDLETON A, et al. Cyclin A2 localises in the cytoplasm at the S/G2 transition to activate PLK1[J]. *Life Sci Alliance*,2021,4(3):e202000980.

[14] ZHU W, XU J, CHEN Z, et al. Analyzing roles of NUSAP1 from clinical, molecular mechanism and immune perspectives in hepatocellular carcinoma[J]. *Front Genet*,2021,12:689159.

[15] 徐志伟,李季文,马新换,等. 当归不同药用部位的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中华中医药学刊,2024,42(4):74-77.

[16] 易琰斐,许美瑾,王琪. 红花黄色素对非霍奇金淋巴瘤的作用与机制[J]. 中国临床药理学杂志,2024,40(6):839-843.

[17] 李晓敏,于哲,曹珊珊,等. NUSAP1 在肿瘤相关巨噬细胞中的表达及对非小细胞肺癌的影响[J]. 河北医药,2024,46(2):205-209.

[18] WU Z, WU Y, LIU Z, et al. L1CAM deployed perivascular tumor niche promotes vessel wall invasion of tumor thrombus and metastasis of renal cell carcinoma[J]. *Cell Death Discov*,2023,9(1):112.

[19] 刘芸,陈浩月,米静,等. 芍药苷对舌鳞癌 CAL27 细胞的抑制作用及机制探讨[J]. 上海口腔医学,2023,32(6):597-602.

[20] 付宏伟,万慧芳,刘卓琦,等. 川芎嗪对宫颈癌细胞增殖和侵袭转移的抑制作用及分子机制[J]. 南昌大学学报(医学版),2023,63(4):13-18.

[21] 罗小宁,刘洁文,张羽,等. ADAM17 下调影响 NK 细胞对非小细胞肺癌杀伤作用的实验研究[J]. 中国现代医学杂志,2022,32(2):38-42.

[22] WU J, MISHRA H K, WALCHECK B. Role of ADAM17 as a regulatory checkpoint of CD16A in NK cells and as a potential target for cancer immunotherapy[J]. *J Leukoc Biol*,2019,105(6):1297-1303.

[23] MORIMOTO Y, YAMASHITA N, DAIMON T, et al. MUC1-C is a master regulator of MICA/B NKG2D ligand and exosome secretion in human cancer cells[J]. *J Immunother Cancer*,2023,11(2):e006238.

[24] 王雅楠,屈莲平,张治宽,等. 黄芪多糖在肿瘤免疫治疗中的研究进展[J]. 中国现代应用药理学,2023,40(24):3452-3458.

[25] 何沅聪,尤朋涛,黄雅宁,等. 当归多糖作为潜在佐剂对细胞的免疫激活及机制研究[J]. 药学学报,2025,60(3):637-645.