

# 薄荷醇促进 SK-LU-1 细胞凋亡的机制

陶兴魁<sup>1,2</sup>, 段红<sup>1,2</sup>, 张兴桃<sup>1</sup>, 冯凡<sup>1\*</sup>

(1. 宿州学院生物与食品工程学院, 安徽宿州 234000; 2. 宿州市天然产物与功能性食品工程技术研究中心, 安徽宿州 234000)

**摘要:** 目的 阐释薄荷醇促进肺癌 SK-LU-1 细胞凋亡的机制。方法 设立对照组、薄荷醇组, 作用于肺癌 SK-LU-1 细胞 48 h 后采用 CCK-8 法、EdU 法检测细胞增殖, Transwell 迁移实验检测细胞迁移能力, 流式细胞术检测细胞凋亡, Western blot 法检测细胞 Bcl-2、Bax、caspase-3、caspase-9 蛋白表达。100  $\mu\text{mol/L}$  薄荷醇与自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤作用 48 h 后, 采用 Western blot 法检测细胞凋亡经典信号通路蛋白 LC-3 I/II、Beclin-1、Atg12 蛋白表达。结果 与对照组比较, 薄荷醇组可抑制细胞增殖, 并具有浓度依赖性, 48 h  $\text{IC}_{50}$  为 97.94  $\mu\text{mol/L}$ 。薄荷醇浓度为 50、100  $\mu\text{mol/L}$  时, 能抑制肺癌细胞的增殖和迁移, 在 100  $\mu\text{mol/L}$  下还可促进细胞凋亡及 LC-3 I/II、Beclin-1、Atg12 蛋白表达。结论 薄荷醇在体外对 SK-LU-1 细胞凋亡具有促进作用, 其机制可能与激活细胞自噬信号通路有关。

**关键词:** 薄荷醇; SK-LU-1 细胞; 细胞凋亡

**中图分类号:** R285.5

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2021)12-3472-05

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.12.041

薄荷醇, 又称薄荷脑, 是薄荷中的主要成分, 一种环类单萜化合物, 被广泛应用于食品、药品等领域<sup>[1]</sup>。近年来, 关于薄荷醇对各种癌症细胞的抗癌作用的基础研究取得了一些进展。研究发现, 薄荷醇对前列腺癌、结肠癌等多种肿瘤细胞均有抑制作用<sup>[2-5]</sup>, 其主要通过诱导肿瘤细胞的周期阻滞、凋亡及信号调控等方式抑制癌细胞增殖<sup>[6]</sup>。苗延青等<sup>[7]</sup>研究薄荷醇在适宜的浓度时, 对胃癌 SGC-7901 细胞的增殖抑制作用明显, 抑制率为 26.73%~42.53%。薄荷醇可激活 DU145 细胞中的 TRPM8 通道, 诱导肿瘤细胞中  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度, 从而起到抑制细胞增殖的作用<sup>[8]</sup>。

目前, 其他药物单体在抗肺癌细胞作用及相关机制等方面已有比较多的研究。罗林明等<sup>[9]</sup>研究发现, 百合总皂苷对肺癌 A549 细胞增殖、迁移及侵袭具有抑制作用, 可通过下调 PCNA 的表达抑制肺癌细胞 DNA 合成, 通过调控 Bcl-2、Bax 蛋白表达诱导肺癌细胞的凋亡。颜晓静等<sup>[10]</sup>研究丹参-人参组分配伍能够抑制肺癌 A549 细胞增殖, 诱导凋亡和降低细胞骨架的面积, 且抑制效果呈剂量依赖性。但目前关于薄荷醇在抗肺癌机制方面的研究报道较少, 对于其通过自噬促进细胞凋亡机制方面的研究鲜见报道。因此, 本实验以人肺癌 SK-LU-1 细胞为体外研究材料, 将不同浓度的薄荷醇作用于肺癌 SK-LU-1 细胞, 分析细胞增殖、凋亡及迁移特性, 并检测自噬信号通路 LC-3 I/II、Beclin-1、Atg12 蛋白表达, 以期薄荷醇通过细胞自噬促进肺癌 SK-LU-1 细胞的凋亡机制提供实验依据。

## 1 材料

1.1 细胞 人肺癌 SK-LU-1 细胞, 购自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所。

1.2 试剂与药物 薄荷醇 (上海麦克林生化科技有限公司, 批号 C10458801, 纯度  $\geq 99.5\%$ )。细胞培养基 DMEM (北京索莱宝科技有限公司, 批号 11965); BI 胎牛血清 (美国 Gibco 公司, 批号 10270106); CCK-8 试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号 07302020); 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷 (EdU) 试剂盒 (广州市锐博生物科技有限公司, 批号 R1127); LC-3 I/II、Atg12、Beclin-1、GAPDH 抗体 (英国 Biorbyt 公司, 批号 orb33328、orb33381、orb380530、orb555879); Bcl-2、Bax、caspase-3、caspase-9 抗体 (美国 CST 公司, 批号 4223-T、5023-T、14220-T、9502-T), 保存于宿州学院生物与食品工程学院实验室; 3-甲基腺嘌呤 (3-MA) (美国 Sigma 公司, 批号 M9281); 二抗抗体 (美国 Bioworld 公司, 批号 BS13278); Transwell 小室 (美国 Corning 公司, 批号 353090)。其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器 IX71 倒置荧光显微镜、CX41 型光学显微镜 (日本 Olympus 公司); 流式细胞仪 (美国 BD 公司); Infinite 200 PRO 型多功能酶标仪 (瑞士 Tecan 公司); 电子天平 (万分之一, 美国奥豪斯公司); 微量分光光度计 (美国 Thermo 公司); 电泳仪、转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司); 荧光成像系统 (美国 ProteinSimple 公司)。

**收稿日期:** 2021-04-25

**基金项目:** 安徽省高等学校自然科学研究重点项目 (KJ2017ZD36, KJ2019A0665); 安徽省校企合作实践教育基地项目 (2017sjjd032); 宿州学院科研平台开放课题 (2020ykf20)

**作者简介:** 陶兴魁 (1983—), 男, 硕士, 高级实验师, 从事药用植物技术研究。Tel: 18725579609, E-mail: szxytk@163.com

\* **通信作者:** 冯凡 (1987—), 男, 博士, 从事肿瘤多药耐药研究。Tel: 13236381136, E-mail: fengfan\_514@163.com

## 2 方法

2.1 细胞培养 37℃水浴加热解冻 SK-LU-1 细胞,接种于 DMEM 培养基(含 12%胎牛血清、100 U/mL 青霉素-链霉素)中, PBS 洗涤后胰酶消化,置于 5% CO<sub>2</sub>, 37℃、饱和湿度培养箱中培养, 3~4 d 传代 1 次,共培养 3~4 代,取对数生长期的细胞进行实验。

2.2 CCK-8 法检测薄荷醇对细胞增殖的影响 待细胞生长到对数生长期、密度达到 80% 以上后将其消化,制成细胞悬液,设置对照组(不加薄荷醇)和给药组(薄荷醇浓度 25、50、100、200、400 μmol/L),每组 6 个复孔,每孔 100 μL 细胞悬液(0.6×10<sup>5</sup>/mL)接种于 96 孔板中<sup>[11]</sup>,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 h 后,每孔加入 100 μL CCK-8 溶液(纯 CCK-8:纯培养基=1:9),放入 CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 2 h 左右,将处理好的培养板置于酶联免疫检测仪中,在 450 nm 波长处测定吸光度值(A),生长抑制率=(1-A<sub>给药组</sub>/A<sub>对照组</sub>)×100%。

2.3 5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶核苷(EdU)检测方法检测薄荷醇对细胞增殖的影响 以每孔 1.0×10<sup>4</sup> 个细胞接种于 96 孔板中,置于培养箱中培养 24 h,吸弃细胞板旧培养液,给药组加入含薄荷醇 50、100 μmol/L 的完全培养液,另外设置对照组(不加薄荷醇),平行 6 个复孔,加入 250 μL 溶液,培养箱培养 48 h 后参照 EdU 试剂盒步骤进行 EdU 标记细胞、固定促渗、检测及 DNA 复染等操作<sup>[12]</sup>,最后将培养板置于 IX71 倒置荧光显微镜下,随机选择拍摄荧光图像,采用 Image J 软件进行计数。

2.4 Transwell 法检测薄荷醇对细胞迁移的影响 取对数生长期细胞, PET 膜铺板,每小室加入 200 μL 细胞悬液,铺板时细胞数量为 2.6×10<sup>4</sup> 个/孔放入每孔提前加好 500 μL 20% DMEM 的下室中, 37℃放入二氧化碳培养箱中培养 12 h,次日观察。进行薄荷醇培养操作,设置对照组(不加薄荷醇)和给药组(加入含薄荷醇 50、100 μmol/L 的完全培养液),每组 3 个复孔,每个上室加入 200 μL 溶液,下室加入 500 μL 溶液,孵育 48 h 后室温固定 30 min,染色 30 min,棉签蘸水后吸干,在光学显微镜下随机拍摄图像,观察细胞形态<sup>[13]</sup>,采用 Image J 软件进行计数。

2.5 Annexin V/PI 双染色法检测细胞凋亡 取对数生长期细胞,将细胞密度 1.0×10<sup>5</sup>/mL 的悬浮液接种于培养板上,每组 4 个复孔,随机分为对照组(不加薄荷醇)、薄荷醇组(100 μmol/L),在培养箱中孵育 48 h 后取出,1 000 r/min 离心,弃去上清液,根据 Annexin V/PI 试剂盒说明,用 PBS 洗细胞 2~3 次,不含 EDTA 的胰蛋白酶消化,再用 4% PBS 洗细胞 2 次,收集细胞进行重悬,加入 5 μL Annexin V/PI,室温避光染色 10~15 min,加入 2.5 μL PI 试剂后,30 min 内完成细胞凋亡的检测。

2.6 Western blot 法检测自噬相关蛋白表达 取对数生长期细胞,接种在培养皿中培养,当细胞饱和度达到 80% 以上时分为对照组(不加薄荷醇)、薄荷醇组(100 μmol/L)、抑制剂组(自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤)、薄荷醇+抑制剂组

(薄荷醇 100 μmol/L+自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤),培养 48 h,离心分离收集细胞, PBS 漂洗 2 次,加入细胞裂解液进行裂解,收集细胞总蛋白。取蛋白样品 25 μg 上样, SDS-PAGE 电泳分离后转移至 PVDF 膜,室温封闭 2 h,加入 LC-3 I/II、Beclin-1、Atg12 蛋白(1:1 000)、GAPDH(1:8 000)抗体,4℃孵育 12 h, PBS 漂洗 3 次,加入二抗(1:10 000),室温下孵育 1.5 h, TBST 洗膜 2 次, ECL 显色,用凝胶成像系统拍照,采用 Image J 软件分析灰度,计算 LC-3 I/II, Beclin-1、Atg12 蛋白相对表达。

2.7 统计学分析 通过 SPSS 22.0、Graphpad Prism 7.0 软件进行处理,数据以( $\bar{x}\pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

3.1 薄荷醇对 SK-LU-1 细胞增殖的影响 图 1 显示,与对照组比较,不同浓度薄荷醇处理 48 h 后抑制率升高,并呈浓度依赖性, IC<sub>50</sub> 为 97.94 μmol/L,故选择 50、100 μmol/L 作为后续实验药物浓度。图 2 显示,50 μmol/L 薄荷醇对细胞增殖的影响不明显,而在 100 μmol/L 下具有抑制作用( $P<0.01$ )。

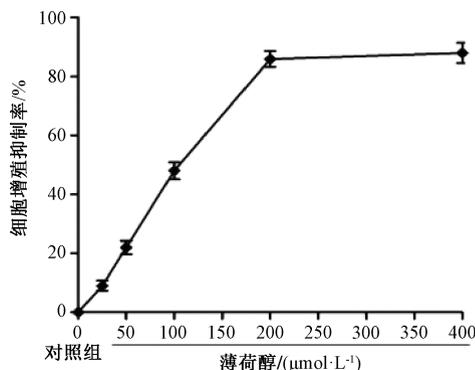
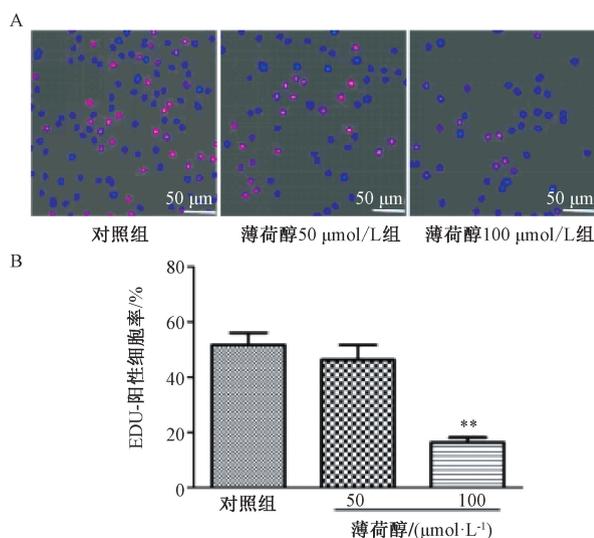


图 1 薄荷醇对 SK-LU-1 细胞增殖的抑制率( $\bar{x}\pm s$ , n=6)



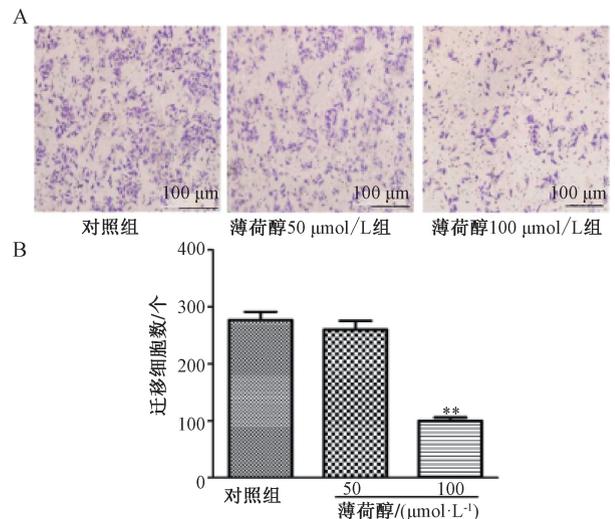
注: A 为染色成像图(EdU, ×200), B 为阳性细胞百分率柱状图( $\bar{x}\pm s$ , n=6)。与对照组比较, \*\*  $P<0.01$ 。

图 2 薄荷醇对 SK-LU-1 细胞增殖的影响

**3.2 薄荷醇对SK-LU-1细胞迁移能力的影响** 图3显示, PET膜上迁移的细胞数目在薄荷醇浓度为50 μmol/L时减少不明显,而在100 μmol/L下可抑制细胞迁移侵袭,与对照组比较,差异具有统计学意义( $P<0.01$ ),与“3.1”项下结果基本一致。

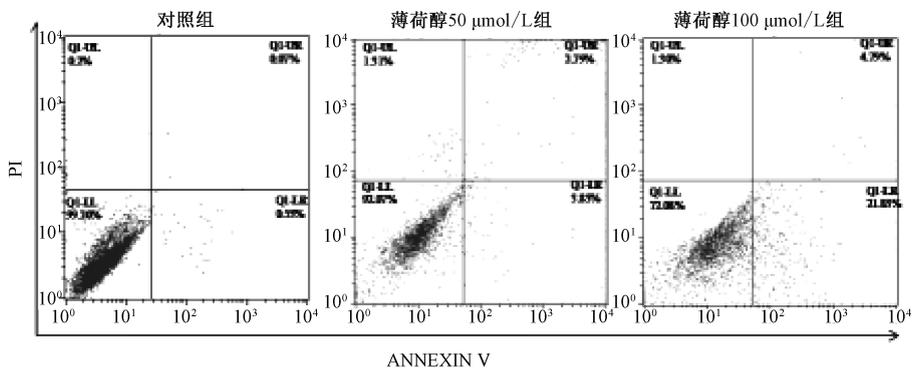
**3.3 薄荷醇对SK-LU-1细胞凋亡的影响** 图4显示,对照组和给药组(50、100 μmol/L)细胞早期凋亡率分别为(0.53±0.12)%、(3.83±1.20)%、(21.83±1.87)%,中期凋亡率分别为(0.07%±0.03)%、(2.79±0.78)%、(4.79±1.40)%,晚期凋亡率分别为(0.20±0.05)%、(1.31±0.62)%、(1.30±0.57)%,表明100 μmol/L薄荷醇能促进细胞凋亡( $P<0.01$ )。图5显示,100 μmol/L薄荷醇处理后Bcl-2表达降低,Bax、caspase-3、caspase-9表达升高。

**3.4 薄荷醇对SK-LU-1细胞自噬信号通路关键调控蛋白的影响** 图6显示,与对照组比较,给药组SK-LU-1细胞自噬信号通路蛋白LC-3 II/I, Beclin-1、Atg12表达升高,差异具有统计学意义( $P<0.01$ );虽然抑制剂组(自噬抑

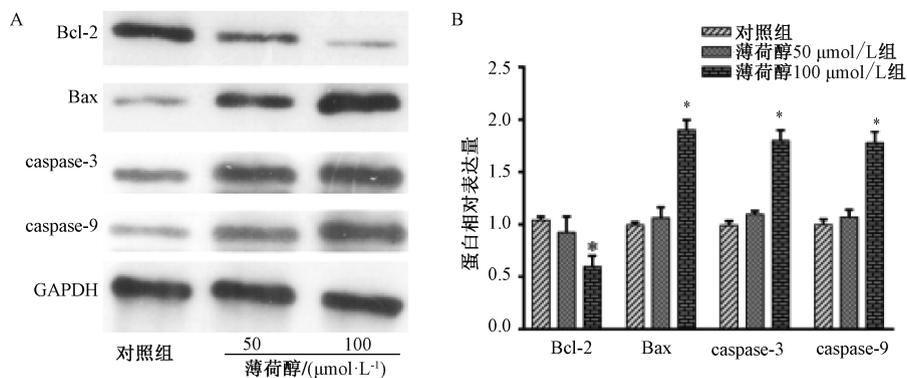


注: A为染色成像图(结晶紫染色, ×200), B为阳性细胞迁移数柱状图( $\bar{x}\pm s, n=3$ )。与对照组比较, \*\* $P<0.01$ 。

**图3 薄荷醇对SK-LU-1细胞迁移的影响**



**图4 薄荷醇对SK-LU-1细胞凋亡的影响**



注: A为蛋白免疫印迹图, B为蛋白条带灰度值扫描柱状图( $\bar{x}\pm s, n=3$ )。与对照组比较, \* $P<0.05$ 。

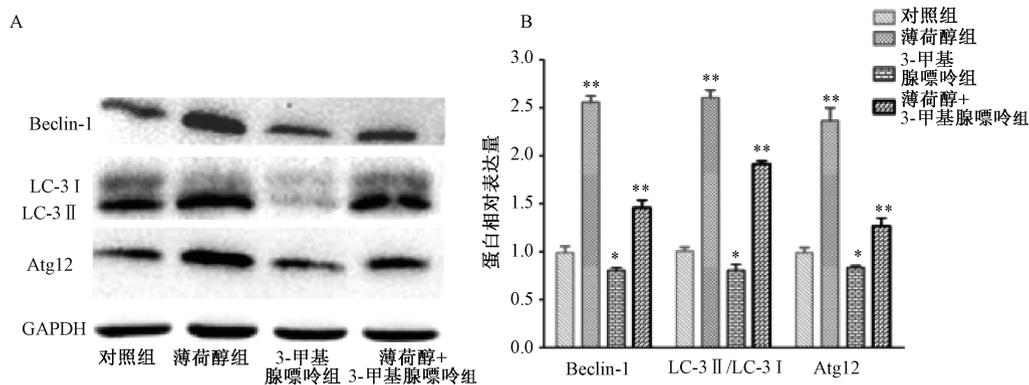
**图5 薄荷醇对SK-LU-1细胞凋亡通路蛋白表达的影响**

制剂3-甲基腺嘌呤)抑制了自噬信号通路蛋白表达( $P<0.05$ ),但薄荷醇+抑制剂组(100 μmol/L薄荷醇+自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤)有所提高( $P<0.01$ )。

#### 4 讨论

薄荷醇在抑制多种肿瘤细胞的增殖方面已有大量研究,其抑制肿瘤细胞增殖和迁移的可能机制也有不少报道。研究薄荷醇对小鼠皮肤癌变的预防潜力中发现,薄荷

醇能明显抑制皮肤癌细胞的增殖和生长,显著降低肿瘤发生率<sup>[5]</sup>。越来越多的证据表明,薄荷醇通过TRPM8非依赖性途径抵抗多种人类的癌症细胞增殖扩散。薄荷醇通过独立于TRPM8的Ca<sup>2+</sup>流入机制,促使Ca<sup>2+</sup>在PC-3细胞中增加,在高浓度薄荷醇作用下可诱导前列腺癌细胞凋亡<sup>[14]</sup>。研究薄荷醇对PC-3前列腺癌细胞基因表达的影响发现,薄荷醇诱导G<sub>2</sub>/M阻滞,特别是显著下调了G<sub>2</sub>/M期进展的关



注：A为蛋白免疫印迹图，B为蛋白条带灰度值扫描柱状图（ $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ ）。与对照组比较，\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

图6 薄荷醇对SK-LU-1细胞自噬通路蛋白表达的影响

键调控因子  $PLK_1$ ，并抑制了其下游信号通路<sup>[15]</sup>。还有研究表明薄荷醇可以通过 TRPM8 通道诱导人膀胱癌细胞系 T24 细胞线粒体膜去极化，导致细胞死亡<sup>[16]</sup>。

本研究通过 CCK-8 法和 EdU 法研究薄荷醇对肺癌 SK-LU-1 细胞增殖的影响，结果表明薄荷醇对肺癌 SK-LU-1 细胞增殖有抑制作用。当薄荷醇浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$ ，肺癌 SK-LU-1 细胞在作用 48 h 后抑制作用显著 ( $P < 0.01$ )；分析 Transwell 迁移实验结果，薄荷醇对肺癌 SK-LU-1 细胞迁移作用在 100  $\mu\text{mol/L}$  时抑制效果明显 ( $P < 0.01$ )，综合该部分薄荷醇实验结果发现，当薄荷醇浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$  时，肺癌 SK-LU-1 细胞增殖和迁移抑制作用显著。

本研究选用肺癌 SK-LU-1 细胞，流式细胞术检测薄荷醇对肺癌 SK-LU-1 细胞凋亡的影响，并且免疫印迹实验检测薄荷醇对细胞凋亡通路蛋白表达的影响。结果表明薄荷醇能够通过降低凋亡通路蛋白 Bcl-2 的表达以及提高 Bax、caspase-3、caspase-9 的表达促进肺癌细胞发生细胞凋亡，同时提高自噬信号通路关键蛋白 LC-3 II/I、Beclin-1、Atg12 的表达。目前的研究显示 Atg5 和 Atg12 为自噬小体形成的“核心”，是启动自噬小泡形成的重要蛋白质，在癌细胞凋亡过程中起到关键调控作用。Atg5 可以被 Caplains 剪切，导致 Atg5 N 端片段以一种特定未知的机制转移，在线粒体上与抗凋亡蛋白 Bcl-xL 结合，促使线粒体细胞大量释放 C 色素，从而诱导细胞凋亡<sup>[17]</sup>。研究发现在不同凋亡因子刺激下，Atg12 不但是 caspase 激活所必需蛋白，它还可通过不同途径结合 Bcl-2、Mcl-1 表现促凋亡能力，进一步研究发现，Atg12 是因为具备和 Bcl-2、Mcl-1 结合的 BH3 结构域而具有促使细胞凋亡功能<sup>[18]</sup>。而薄荷醇对肺癌 SK-LU-1 细胞具有明显的促凋亡作用，且能够提高 Atg12 蛋白表达，同时能够促进形成自噬小体关键囊泡蛋白 LC-3 II/I 和 Beclin-1 的表达，说明薄荷醇能够活化肺癌细胞的自噬信号通路，从而诱导肺癌细胞发生凋亡，抑制肺癌细胞的增殖和迁移。该结果为薄荷醇抗肿瘤研究及其分子机制研究提供了新思路，为薄荷醇在治疗肺癌上提供了新的理论和实验基础。

参考文献：

[1] 于清跃, 朱新宝. 薄荷种植与薄荷精油提取研究进展[J].

安徽农业科学, 2012, 40(13): 7911-7913.

[2] Oz M, El Nebrisi E G, Yang K H S, et al. Cellular and molecular targets of menthol actions [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 472.

[3] Prasad N, Vijay S, Reddy A Y, et al. Effects of menthol-flavored substances at the cellular level on oral mucosal sites [J]. *Dent Res J (Isfahan)*, 2019, 16(1): 7-11.

[4] Yee N S. Roles of TRPM8 ion channels in cancer: proliferation, survival, and invasion [J]. *Cancers (Basel)*, 2015, 7(4): 2134-2146.

[5] Liu Z G, Shen C S, Tao Y, et al. Chemopreventive efficacy of menthol on carcinogen-induced cutaneous carcinoma through inhibition of inflammation and oxidative stress in mice [J]. *Food Chem Toxicol*, 2015, 82: 12-18.

[6] 陈晨, 刘兆国, 汪思亮, 等. 薄荷醇及其受体 TRPM8 与肿瘤关系研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(3): 312-314.

[7] 苗延青, 梁静, 刘漫. 黄芩苷协调大黄素-薄荷醇对胃癌 SGC-7901 细胞增殖抑制作用的研究 [J]. *山西医药杂志*, 2019, 48(8): 888-890.

[8] 于文建, 王磊, 韩利平, 等. 雄激素非依赖性前列腺癌 DU145 细胞中 TRPM8 和 TRPA1 的表达及活性研究 [J]. *癌症进展*, 2017, 15(7): 754-758.

[9] 罗林明, 覃丽, 詹济华, 等. 百合皂苷对肺癌细胞增殖、凋亡及侵袭转移的作用及其初步机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(22): 4498-4505.

[10] 颜晓静, 杨焯, 毕蕾, 等. 丹参-人参组分配伍对肺癌 A549 增殖、凋亡和骨架的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(22): 4436-4441.

[11] 彭珍桂, 卢小玲. MTT 法和 CCK-8 法检测人肝癌细胞活性的对比研究 [J]. *生物技术世界*, 2016, 100(3): 319.

[12] 刘雷, 杨立业. EdU 在检测细胞增殖中的应用 [J]. *医学综述*, 2010, 16(19): 2901-2904.

[13] 郭苇, 谭为, 王昌俊. miRNA 与肝癌的关系 [J]. *广州中医药大学学报*, 2015, 32(3): 569-572.

[14] Liu B Y, Fan L, Balakrishna S, et al. TRPM8 is the principal mediator of menthol-induced analgesia of acute and inflammatory pain [J]. *Pain*, 2013, 154(10): 2169-2177.

- [15] Kim S H, Lee S, Piccolo S R, *et al.* Menthol induces cell-cycle arrest in PC-3 cells by down-regulating G<sub>2</sub>/M genes, including polo-like kinase 1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 422(3): 436-441.
- [16] Li Q, Wang X H, Yang Z H, *et al.* Menthol induces cell death *via* the TRPM8 channel in the human bladder cancer cell line T24[J]. *Oncology*, 2009, 77(6): 335-341.
- [17] Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, *et al.* Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis[J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(10): 1124-1132.
- [18] Rubinstein A D, Eisenstein M, Ber Y, *et al.* The autophagy protein Atg12 associates with antiapoptotic Bcl-2 family members to promote mitochondrial apoptosis[J]. *Mol Cell*, 2011, 44(5): 698-709.

## 槲皮素对 A549 细胞 PI3K/Akt 信号通路及肿瘤恶性特征的调控机制

吴洪皓, 杨 华, 吴 鹏\*

(江西省赣州市中医院, 江西 赣州 341000)

**摘要:** 目的 探究槲皮素对肺腺癌 A549 细胞 PI3K/Akt 信号通路及肿瘤恶性特征的调控机制。方法 体外培养肺腺癌 A549 细胞, 用 20、50、100  $\mu\text{mol/L}$  槲皮素处理 24 h, CCK8 法、流式细胞术、Transwell 分别检测细胞增殖率、细胞凋亡情况以及细胞侵袭水平, RT-qPCR 检测 *PI3K*、*Akt* mRNA、miR-29b 表达, Western blot 检测 PI3K、Akt 和相关功能蛋白表达。结果 与对照组比较, 槲皮素组细胞增殖率、侵袭水平均降低, 与槲皮素浓度呈负相关, 而凋亡率升高, 与槲皮素浓度呈正相关 ( $P < 0.05$ )。与对照组比较, 槲皮素组的 miR-29b、Bax 表达升高, 而 PI3K、Akt、MMP-2、MMP-9、Bcl-2 表达降低 ( $P < 0.05$ )。结论 槲皮素可能通过促进 miR-29b 表达抑制 PI3K/Akt 信号通路的激活, 进而促进肺腺癌 A549 细胞的凋亡, 抑制其凋亡。

**关键词:** 槲皮素; A549 细胞; miR-29b; PI3K/Akt

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2021)12-3476-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.12.042

肺癌 (lung cancer) 是常见的恶性肿瘤, 并且是五年生存率最低的恶性肿瘤之一。本世纪以来, 无论在我国还是全世界, 肺癌的年发病人数、年致死人数均已跃居第一<sup>[1-2]</sup>, 其全球年发病人数 180 万, 死亡人数 160 万<sup>[3]</sup>, 是严重危害人类生命健康的公共卫生问题。肺癌可以分为非小细胞肺癌和小细胞肺癌两大类, 其中非小细胞肺癌占肺癌的大多数, 而肺腺癌 (lung adenocarcinoma) 是非小细胞肺癌的三大亚型之一, 占总肺癌发病人数的 40% 以上<sup>[4]</sup>。尽管早期肺腺癌相对容易治疗, 但肺腺癌发病较隐匿, 大多数患者就诊时已进展到中晚期, 癌细胞已经发生侵袭或转移, 导致肺腺癌成为五年生存率较低的恶性肿瘤之一<sup>[5]</sup>。靶向治疗及免疫治疗的应用在一定程度上改善了这种现状, 使患者的生存期得到了延长<sup>[6-7]</sup>, 但耐药以及治疗后的转移仍是亟待解决的一大难题。因此探究合适的治疗药物和治疗靶点对于肺腺癌的研究和治疗意义重大。槲皮素 (quercetin) 是一种天然黄酮类物质, 有研究表明其在肺腺癌中有一定治疗作用<sup>[8]</sup>; 目前 microRNAs (miRNAs)

在肿瘤中的研究愈加深入, 其中已有大量文献报道 miR-29b 在肿瘤发生进程中参与肿瘤细胞侵袭转移等关键作用机制。而槲皮素介导 miR-29b 在肺腺癌中的调控机制鲜有报道, 因此本研究旨在探究槲皮素通过调节 miR-29b 介导 PI3K/Akt 信号通路缓解肺腺癌 A549 细胞癌变分子机制。

### 1 材料

1.1 细胞 人肺癌细胞系 A549 (批号 PT-1034, 美国模式培养物保藏中心 ATCC), 用基础培养基 + 20% FBS + 8% DMSO 培养。

1.2 药物 槲皮素 (纯度  $\geq 93\%$ , CAS 号 117-39-5, 江苏永健医药科技有限公司), 溶于二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 中, 配成 20、50、100  $\mu\text{mol/L}$  溶液, 在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  下保存备用。

### 1.3 仪器与试剂

1.3.1 仪器 酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司); Annexin V-FITC/PI (上海硕嘉生物技术有限公司); XL 型流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司); BPH-9052 型细胞培养箱

收稿日期: 2020-12-10

基金项目: 江西省卫生计生委中医药科研课题 (2017A174); 江西省卫生厅中医药科研基金课题 (2011A104); 赣州市科技计划项目 [赣市科发 (2020) 3]

作者简介: 吴洪皓 (1978—), 男, 硕士, 副主任中医师, 研究方向为肺部疾病的中医治疗。Tel: 15079766920

\* 通信作者: 吴 鹏 (1983—), 男, 副主任中医师, 研究方向为内科疾病的临床诊疗。Tel: 13879787573