

本文引用: 何甜甜, 吴柯楠, 朱洁, 黄成银, 侯宝龙, 王征, 梁艳妮. 熊果酸对非小细胞肺癌 H1975 细胞的体内外抑制作用研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(5): 825-835.

熊果酸对非小细胞肺癌 H1975 细胞的体内外抑制作用研究

何甜甜, 吴柯楠, 朱洁, 黄成银, 侯宝龙, 王征, 梁艳妮*

陕西中医药大学陕西中药资源产业化省部共建协同创新中心/陕西省创新药物研究中心, 陕西 咸阳 712083

【摘要】目的 研究熊果酸(UA)对非小细胞肺癌(NSCLC)H1975 细胞的体内外抑制作用, 探讨其对移植瘤裸鼠内源性代谢物的影响。**方法** 以 H1975 细胞为研究对象, MTT 法筛选 UA(0-75 $\mu\text{g}/\text{mL}$)作用细胞的最佳浓度。将细胞分为对照组及 UA 低(9.27 $\mu\text{mol}/\text{L}$)、中(18.53 $\mu\text{mol}/\text{L}$)、高(27.8 $\mu\text{mol}/\text{L}$)剂量组作用细胞 48 h, 划痕法检测细胞迁移能力, 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡, Western blot 法检测组织金属蛋白酶抑制因子-2(TIMP-2)、促凋亡 B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白(Bax)、活化的胱天蛋白酶-3(Cleaved-Caspase-3)、基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9 和抗凋亡蛋白 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)蛋白的表达。在裸鼠背部皮下注射 H1975 细胞建立移植瘤模型, 随机分为对照组、吉非替尼组(50 mg/kg)和 UA 低(100 mg/kg)、中(200 mg/kg)、高(400 mg/kg)剂量组, 每 3 天给药一次, 连续 18 d, 记录裸鼠体质量和移植瘤生长情况。采用 UPLC-MS/MS 法检测裸鼠血清内源性代谢物水平。**结果** UA 抑制 H1975 细胞增殖 IC_{50} (48 h)为 27.8 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。与对照组比较, UA 中、高剂量组阻滞细胞周期在 G_0/G_1 期、细胞凋亡率增加、细胞迁移能力下降($P < 0.05$); TIMP-2、Bax、Cleaved-Caspase-3 蛋白表达上调, MMP-2、MMP-9、Bcl-2 蛋白表达下调($P < 0.05$)。与 UA 低剂量组比较, UA 高剂量组阻滞细胞周期在 G_0/G_1 期、细胞凋亡率增加、细胞迁移能力下降($P < 0.05$); TIMP-2、Bax、Cleaved-Caspase-3 蛋白表达上调, MMP-2、MMP-9、Bcl-2 蛋白表达下调($P < 0.05$)。在体内实验中, 与对照组比较, UA 各剂量组与吉非替尼组对移植瘤裸鼠的肿瘤生长有抑制作用($P < 0.05$); 与 UA 低、中剂量组比较, UA 高剂量组对移植瘤裸鼠肿瘤生长有抑制作用($P < 0.05$)。代谢组学分析筛选出 5S, 15S-二羟基-6E, 8Z, 10Z, 13E-二十碳四烯酸、4-羟基苯甲醇、氧化三甲胺等 22 个差异代谢物, 主要涉及不饱和脂肪酸的生物合成、亚油酸代谢和酪氨酸代谢通路。**结论** UA 在体内外对 NSCLC H1975 细胞均有明显抑制作用, 其在体内的抑制作用可能与调节不饱和脂肪酸的生物合成、亚油酸代谢和酪氨酸代谢相关。

【关键词】 熊果酸; H1975 细胞; 细胞凋亡; 细胞增殖; 细胞迁移; 血清代谢组学

【中图分类号】R285.5

【文献标志码】A

【文章编号】doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.05.007

In vitro and in vivo inhibitory effects of ursolic acid on non-small cell lung cancer H1975 cells

HE Tiantian, WU Kenan, ZHU Jie, HUANG Chengyin, HOU Baolong, WANG Zheng, LIANG Yanni*

Shaanxi University of Chinese Medicine, Co-construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine Resources Industrialization by Shaanxi & Education Ministry/Shaanxi Innovative Drug Research Center, Xianyang, Shaanxi 712083, China

【Abstract】Objective To investigate the in vitro and in vivo inhibitory effects of ursolic acid (UA) on non-small cell lung cancer (NSCLC) H1975 cells, and explore its effects on endogenous metabolites in tumor-xenografted nude mice. **Methods** H1975

【收稿日期】 2024-12-20

【基金项目】 陕西省重点产业创新链项目(2018ZDCXL-SF-01-02-02); 陕西省教育厅创新团队项目(22JP019, 24JP047); 陕西高校青年创新团队项目(陕教[2019]90号)。

【通信作者】* 梁艳妮, 女, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, E-mail: aiziji_2005@126.com。

cells were used as the research object, and the optimal concentration of UA (0–75 $\mu\text{g/mL}$) for cell treatment was screened using the MTT assay. Cells were divided into control group, and low-, medium-, and high-dose UA (9.27 $\mu\text{mol/L}$, 18.53 $\mu\text{mol/L}$, 27.8 $\mu\text{mol/L}$) groups and all groups were treated for 48 hours. Cell migration was assessed by the scratch assay, cell cycle distribution and apoptosis were analyzed by flow cytometry, and protein expression levels of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2), pro-apoptotic Bcl-2-associated X protein (Bax), cleaved-caspase-3, matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and anti-apoptotic Bcl-2 were determined by Western blot. A xenograft tumor model was established by subcutaneous injection of H1975 cells into the back of nude mice, which were randomly divided into control, gefitinib (50 mg/kg), and low-, medium-, and high-dose UA (100 mg/kg, 200 mg/kg, 400 mg/kg) groups. Drugs were administered every three days for 18 consecutive days, and nude mouse body weight and tumor growth were recorded. UPLC-MS/MS was used to determine endogenous metabolite levels in nude mouse serum. **Results** The IC_{50} value of UA for inhibiting H1975 cell proliferation at 48 h was 27.8 $\mu\text{mol/L}$. Compared with the control group, medium- and high-dose UA groups arrested the cell cycle at the G_0/G_1 phase, and showed increased apoptosis rate and reduced cell migration ability ($P<0.05$). Additionally, the protein expression levels of TIMP-2, Bax, and Cleaved Caspase-3 were upregulated, while those of MMP-2, MMP-9, and Bcl-2 were downregulated ($P<0.05$). Compared with the low-dose UA group, the high-dose UA group arrested the cell cycle at the G_0/G_1 phase, and exhibited elevated apoptosis rate, reduced cell migration ability ($P<0.05$), and upregulated TIMP-2, Bax, and Cleaved-Caspase-3 protein expression levels, as well as downregulated MMP-2, MMP-9, and Bcl-2 protein expression levels ($P<0.05$). In vivo, compared with the control group, all dose groups of UA and the gefitinib group significantly inhibited tumor growth in tumor-xenografted nude mice ($P<0.05$). Furthermore, the high-dose UA group demonstrated enhanced tumor growth inhibition compared with the low- and medium-dose UA groups ($P<0.05$). Metabolomics analysis identified 22 differential metabolites, including 5S, 15S-dihydroxy-6E, 8Z, 10Z, 13E-icosatetraenoic acid, 4-hydroxybenzyl alcohol, and trimethylamine N-oxide, primarily involving pathways related to unsaturated fatty acid biosynthesis, linoleic acid metabolism, and tyrosine metabolism. **Conclusion** UA exhibits significant inhibitory effects on NSCLC H1975 cells both in vitro and in vivo. Its in vivo inhibitory effects may be associated with the regulation of unsaturated fatty acid biosynthesis, linoleic acid metabolism, and tyrosine metabolism pathways.

[**Keywords**] ursolic acid; H1975 cell; apoptosis; cell proliferation; cell migration; serum metabolomics

在全球癌症相关死亡中,由肺癌引发的死亡居首位,肺癌按组织学类型可分为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)和小细胞肺癌,其中NSCLC是最主要的类型^[1]。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)与肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移密切相关,EGFR为NSCLC的常见驱动基因,也是最容易发生突变和缺失的基因^[2-3]。临床采用EGFR-酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI)治疗NSCLC,但长期应用易产生耐药性^[3-4]。研究发现,患者在使用一线治疗药物吉非替尼6~12个月后可能引发继发性耐药问题^[5]。因此,亟须寻找新的治疗NSCLC的药物。

熊果酸(ursolic acid, UA)是一种五环三萜羧酸,白花蛇舌草、女贞子、山茱萸等多种中药均含有该成分^[6]。UA对乳腺癌、黑色素瘤、前列腺癌、NSCLC、胃癌、结肠癌、膀胱癌和肝癌等多种肿瘤的细胞系均有抑制作用^[7]。研究显示,UA可通过抑制核因子 κB (nuclear factor- κB , NF- κB)活化诱导细胞凋亡,通过激活胱天蛋白酶(cysteine aspartic acid

specific protease, Caspase)(如Caspase-3、Caspase-9、Caspase-8)促进肿瘤细胞凋亡^[8]。UA已被证明可以抑制信号转导及转录激活因子3(signal transduction and activator of transcription 3, STAT3)活化,抑制肿瘤细胞侵袭和迁移^[9]。也有研究表明,UA可以通过靶向整合素 $\alpha\text{V}\beta\text{5}$ /基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)信号通路抑制转化生长因子- β1 (transforming growth factor- β1 , TGF- β1)诱导的H1975细胞上皮-间质转化,为有前景的治疗NSCLC的药物^[10]。

代谢组学技术通过代谢物检测和生物学分析研究生物体的生理和疾病状态,可用于药物作用机制研究和疾病的临床诊断等^[11]。其中,LC-MS/MS法以能快速筛选多种样品和具有高分辨率而成为代谢研究的首选方法^[12]。血清代谢组学可以识别潜在的生物标志物和相关的代谢途径^[13]。因此,本研究探讨UA对EGFR-TKI耐药的NSCLC细胞系H1975细胞的体内外抑制作用,并采用UPLC-MS/MS方法检测荷瘤裸鼠血清中内源性差异代谢物,探讨UA对

NSCLC 体内代谢的影响。

1 材料

1.1 细胞和动物

H1975 细胞系购自中国西安茂鑫生物科技有限公司;60 只体质量(20 ± 2) g 的 5~6 周龄 SPF 级 BALB/c 雌性裸鼠[动物许可证号:SCXK(川)2020-0030]购自成都达硕实验动物有限公司。动物饲养于陕西中医药大学 SPF 级实验动物中心[批准号:SYXK(陕)2017-004],温度(24 ± 0.3) °C,湿度 $54\%\pm 1\%$,室内保持 12 h 明暗交替。动物实验按照陕西中医药大学伦理委员会批准的方案进行(动物伦理批准号:SUCMDL20200520001)。

1.2 主要试剂和仪器

UA(纯度 98%)、吉非替尼(纯度 99%)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:A1810044、F190168);组织金属蛋白酶抑制因子-2(tissue inhibitor of metalloprotease-2, TIMP-2)抗体(英国 Abcam 公司,批号:ab180630);B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Caspase-3、活化的胱天蛋白酶-3(Cleaved-Caspase-3)抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号:15071、9662、9661);MMP-2、MMP-9、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2-associated X, Bax)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:10373-2-AP、10375-2-AP、50599-2-Ig);PI 染色细胞周期检测试剂盒(沈阳万世生物科技有限公司,批号:14A109);Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(诺维生生物技术有限公司,批号:7E572G1)。

酶标仪(美国 BioTek 公司,型号:Synergy H11);荧光显微镜(日本 Olympus 公司,型号:Olympus FSX100);流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司,型号:FACSVerse);凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司,型号:ChemiDoc XRS+)。

2 方法

2.1 细胞培养和分组

H1975 细胞系在含有 100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素、10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中培养。H1975 细胞接种至 96 孔板中,每孔密度为 1×10^5 个细胞,24 h 后,用不同浓度($0\sim 75$ $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 UA 分别处理 H1975 细胞 24、48、72 h。加入 MTT 溶液(5 mg/mL),置于培养箱 4 h,每孔加入 DMSO 150 μL 。用酶标仪在 490 nm 处检测吸光度,并用 SPSS 26.0 软件计算 IC_{50} 值,得出 UA 作用细胞 48 h

的 IC_{50} 值为 27.8 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。因此,将细胞设置为对照组及 UA 低(9.27 $\mu\text{mol}/\text{L}$)、中(18.53 $\mu\text{mol}/\text{L}$)、高(27.8 $\mu\text{mol}/\text{L}$)剂量组进行划痕、免疫荧光、流式、Western bolt 实验。

2.2 细胞划痕实验

将 H1975 以 1×10^6 个/mL 密度接种于 6 孔板,待细胞贴壁后,用移液管尖端在孔中心划痕,然后在培养箱中培养 0、24、48 h。在每个时间点使用显微镜拍照,每次固定位置拍照,测量各时间点划痕宽度,根据公式计算:相对划痕间隙= t 时刻划痕间隙/ 0 h 划痕间隙。

2.3 免疫荧光实验

将 H1975 细胞接种于带有细胞爬片的 6 孔板中。待细胞贴壁后进行药物处理,48 h 后,用 PBS 洗涤细胞 2 次,用 4%多聚甲醛校正 10 min,用 0.1% Triton X-100 固定 10 min,用 5% BSA 封闭。将 Ki67 抗体稀释后加入细胞中,4 °C 过夜。二抗孵育 1 h,用 DAPI 试剂染色固定细胞核。使用荧光显微镜进行免疫荧光检测。

2.4 Western blot 法

用预冷 PBS 洗涤 H1975 细胞,用含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物的 RIPA 缓冲液裂解。采用 BCA 法对蛋白进行定量检测。蛋白经过 10%或 12%的 SDS-PAGE 进行分离,转移至 PVDF 膜上,用 2.5%脱脂奶粉在室温下封闭 2 h。取稀释后的抗体 [TIMP-2(1:1 000)、MMP-9(1:1 500)、MMP-2(1:800)、Bcl-2(1:1 000)、Bax(1:8 000)、Cleaved-Caspase-3(1:1 000)、Caspase-3(1:1 000)]加至膜上,在 4 °C 条件下孵育过夜。洗涤后,孵育二抗,37 °C 孵育 1 h,再次洗涤。PVDF 膜加入 ECL 检测试剂,使用凝胶成像系统进行检测。采用 ImageJ 软件对结果进行灰度值分析和量化。

2.5 流式细胞实验

H1975 细胞接种于 6 孔板中,用不同浓度的 UA 处理 H1975 细胞 48 h,用胰蛋白酶消化。PBS 洗涤 2 次,悬浮于缓冲液中,与 Annexin V-FITC 和 PI 在室温下避光孵育 10 min。染色后 1 h 内使用 FACS-Verse 流式细胞仪进行检测。

2.6 裸鼠肿瘤异种移植实验

将约 2×10^6 个 H1975 细胞悬浮于 0.2 mL 空白培养基中,注射至裸鼠背部皮下,每 2 天记录体质量和肿瘤体积(V), $V=0.5\times \text{长}\times \text{宽}^2$,当 V 约为 50 mm^3 时(肿瘤接种后 10 d),将裸鼠随机分为每组 10 只。每 3 天腹腔注射给药 1 次,连续 18 d。分组及剂量如下:对照组(生理盐水)、吉非替尼组(50 mg/kg)和

UA 低(100 mg/kg)、中(200 mg/kg)、高(400 mg/kg)剂量组^[14-15]。最后一次给药后,裸鼠禁食不禁水过夜,麻醉后取血清和裸鼠肿瘤组织,于-80℃保存。

2.7 血清代谢组学分析

2.7.1 血清样品制备 于冰上解冻采集的血清,取对照组和UA中剂量组,每个血清样品(50 μL)与纯甲醇(300 μL)混合,4℃、12 000 r/min离心10 min(离心半径6 cm)。收集上清液,-20℃放置30 min后,4℃、12 000 r/min离心3 min(离心半径6 cm)。取150 μL上清液进行UPLC-MS/MS分析。取各样品等体积混合,获得质量控制(quality control, QC)样品,每10个样品中插入1个QC样品以监测分析过程的可重复性。

2.7.2 仪器检测条件 采用LC-ESI-MS/MS系统进行色谱分析,所有分析均采用Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.8 μm)。流动相由溶剂A(0.1%甲酸水溶液)和溶剂B(0.1%甲酸乙腈水溶液)组成。梯度洗脱:0~10 min,95%~10%A;10~11 min,10%A;11.0~11.1 min,10%~95%A;11.1~14.0 min,95%A。流速0.4 mL/min,柱温40℃,进样量2 μL。

采用电喷雾电离对样品进行正、负离子模式检测。在500℃条件下建立三重四极线性离子阱质谱LC-MS/MS体系。MS在电压为5 500 V的正离子模式或电压为4 500 V的负离子模式下工作。离子源气体I的压力为55 psi(1 psi≈6.895 kPa),离子源气体II的压力为60 psi,气帘气的压力为25 psi,碰撞诱导电离参数设置为高。

2.7.3 代谢组学数据处理 使用Analyst 1.6软件对质谱数据进行分析;MultiQuant 3.03软件对色谱峰进行整合和校正;R 3.5.0软件(www.r-project.org/)对代谢物数据进行统计分析,包括主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)。根据变量对OPLS-DA模型的投影(VIP≥1)和差异倍数(Log₂FC绝对值≥1)筛选差异代谢物。使用KEGG数据库(<http://www.kegg.jp/kegg/compound/>)对代谢物进行注释,并将注释代谢物输入KEGG Pathway数据库(<http://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>)。通过MetaboAnalyst 5.0数据库(<https://www.metaboanalyst.ca/>)对筛选的差异代谢物进行代谢途径分析。

2.8 统计学分析

实验数据均以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。GraphPad Prism 8.0软件用于统计分析和绘图。单因素方差分析用于多

组之间的比较,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 UA对H1975细胞活力、周期和增殖的影响

UA升高H1975细胞抑制率,呈剂量和时间相关性;UA作用于细胞24、48、72 h的IC₅₀分别为70.2、27.8、12.9 μmol/L。详见图1。

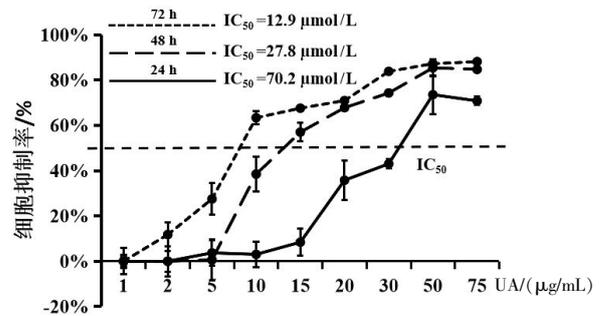


图1 UA对H1975细胞活力的影响

Fig.1 Effects of UA on H1975 cell viability

与对照组及UA低剂量组比较,UA中、高剂量组G₀/G₁期的细胞比例增加($P < 0.05$),G₂期和S期的比例降低($P < 0.05$)。与UA中剂量组比较,UA高剂量组G₀/G₁期的细胞比例增加($P < 0.05$),S期的比例降低($P < 0.05$)。与对照组比较,UA各剂量组H1975细胞中Ki67荧光强度减弱。详见图2。

3.2 UA对H1975细胞凋亡的影响

与对照组比较,UA各剂量组H1975细胞凋亡率升高($P < 0.05$),UA中、高剂量组Bcl-2表达降低($P < 0.05$),UA各剂量组Bax和Cleaved-Caspase-3表达升高($P < 0.05$)。与UA低剂量组比较,UA高剂量组H1975细胞凋亡率和Cleaved-Caspase-3表达升高($P < 0.05$),UA中、高剂量组Bcl-2表达降低($P < 0.05$),Bax表达升高($P < 0.05$)。与UA中剂量组比较,UA高剂量组H1975细胞凋亡率和Cleaved-Caspase-3表达升高($P < 0.05$)。详见图3。

3.3 UA对H1975细胞迁移的影响

与对照组比较,作用24 h后UA中、高剂量细胞划痕间隙增加($P < 0.05$),作用48 h后UA各剂量组细胞划痕间隙增加($P < 0.05$);UA各剂量组H1975细胞TIMP-2表达水平升高($P < 0.05$),MMP-2和MMP-9表达降低($P < 0.05$)。与UA低剂量组比较,作用24、48 h后,UA中、高剂量组细胞划痕间隙增加($P < 0.05$);UA高剂量组MMP-2表达降低($P < 0.05$),UA中、高剂量组TIMP-2表达升高($P < 0.05$),MMP-9表达降低($P < 0.05$)。与UA中剂量组比较,作用24、48 h后,UA高剂量组细胞划痕间隙增加($P < 0.05$);

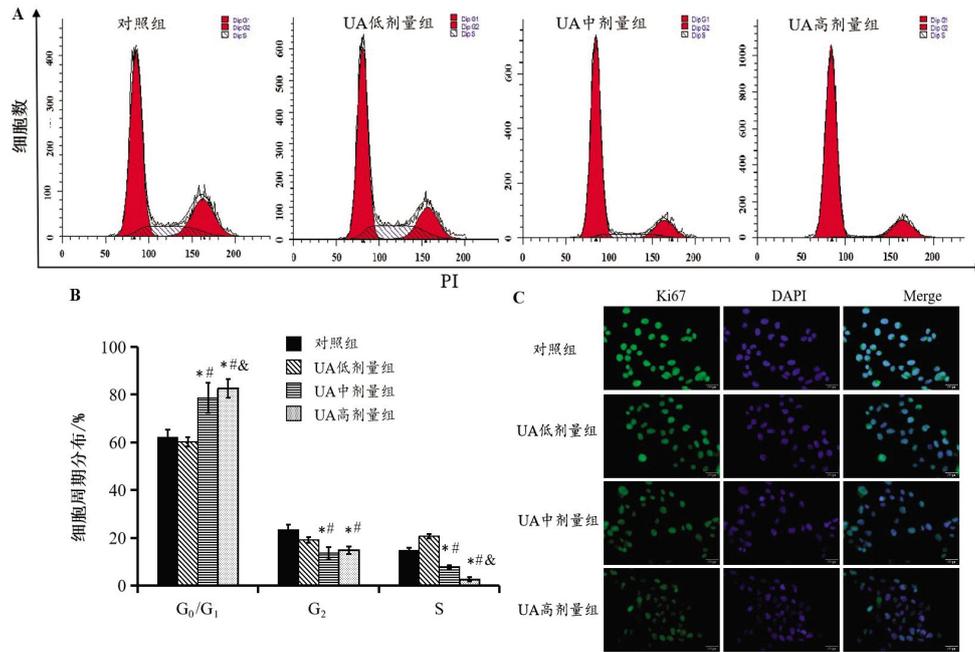


图2 各组 H1975 细胞周期和增殖比较(×20, 标尺=500 μm)

Fig.2 Comparison of cell cycle and proliferation among each group of H1975 cells (×20, scale bar=500 μm)

注:A.细胞周期分布图;B.细胞周期分布量化图;C.免疫荧光检测各组 Ki67 表达情况。与对照组比较,* $P<0.05$;与 UA 低剂量组比较,# $P<0.05$;与 UA 中剂量组比较,§ $P<0.05$ 。

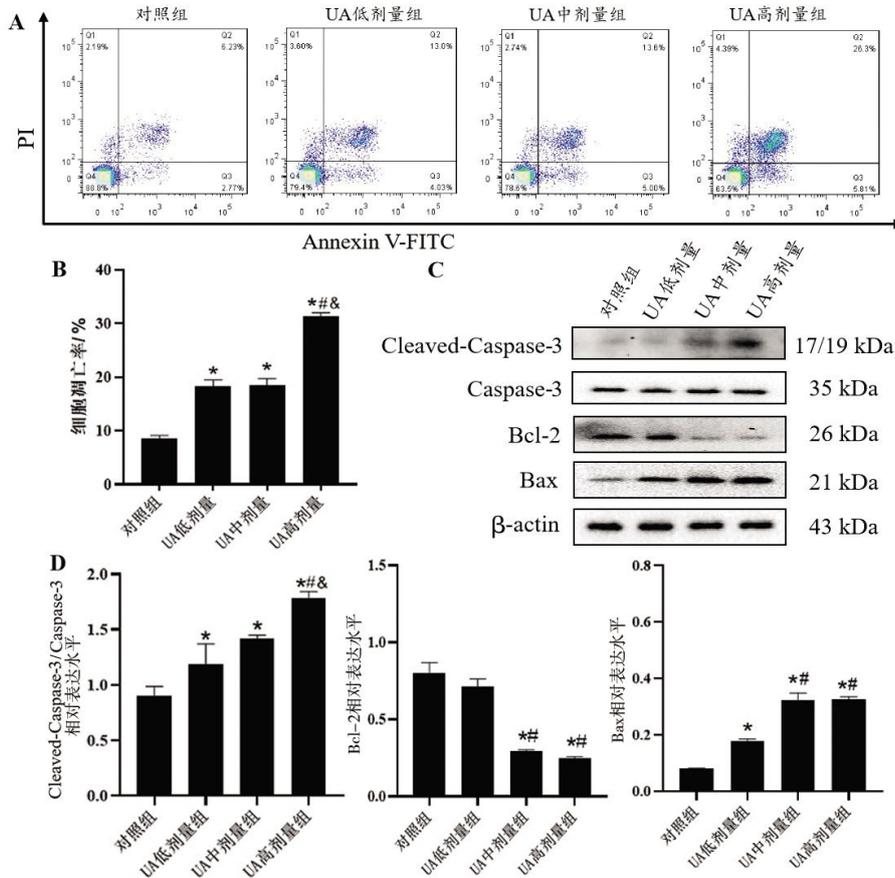


图3 各组 H1975 细胞凋亡及凋亡相关蛋白表达比较

Fig.3 Comparison of apoptosis and apoptosis-related protein expressions in H1975 cells among different groups

注:A.细胞凋亡情况图;B.细胞凋亡率量化图;C.Bcl-2、Cleaved-Caspase-3、Caspase-3、Bax 蛋白表达图;D.蛋白表达量化图。与对照组比较,* $P<0.05$;与 UA 低剂量组比较,# $P<0.05$;与 UA 中剂量组比较,§ $P<0.05$ 。

UA 高剂量组 TIMP-2、MMP-2 和 MMP-9 表达降低 ($P<0.05$)。详见图 4。

3.4 UA 对 H1975 细胞移植瘤裸鼠肿瘤生长的影响
各组裸鼠体质量无显著变化。与对照组比较,在

第 28 天,吉非替尼组和 UA 各剂量组抑制 H1975 异种移植瘤裸鼠的肿瘤增长 ($P<0.05$);与 UA 低、中剂量比较,UA 高剂量组抑制 H1975 异种移植瘤裸鼠的肿瘤增长 ($P<0.05$)。详见图 5。

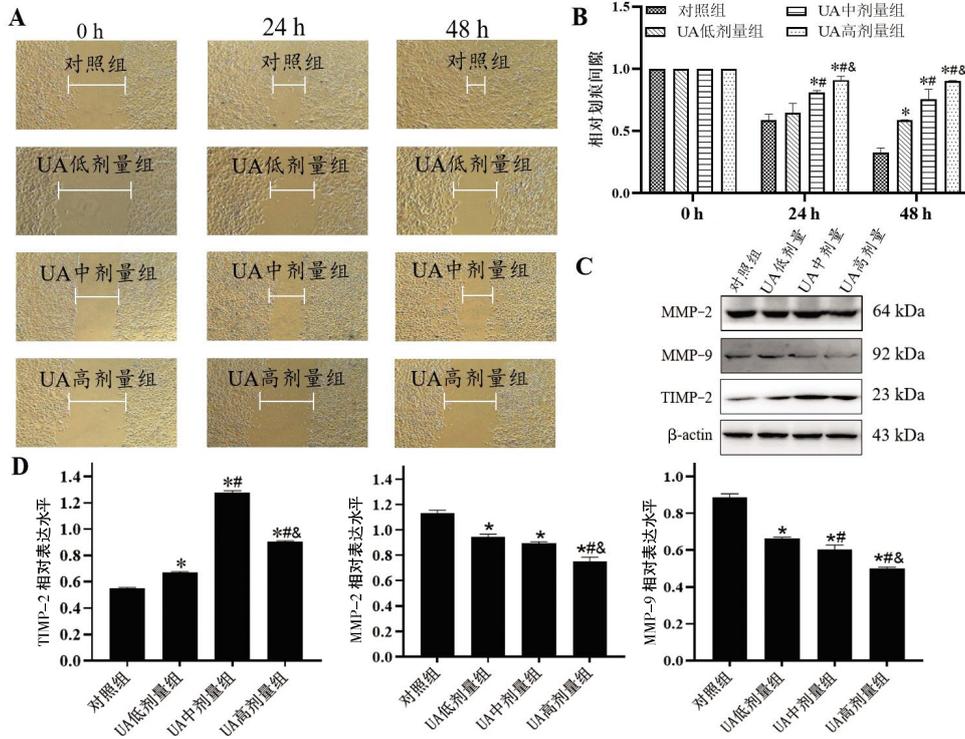


图 4 各组 H1975 细胞迁移及迁移相关蛋白表达比较

Fig4 Comparison of H1975 cell migration and migration-related protein expressions among different groups
注:A.细胞迁移图;B.细胞迁移量化图;C.MMP-9、MMP-2、TIMP-2 蛋白表达图;D.蛋白表达量化图。与对照组比较,* $P<0.05$;与 UA 低剂量组比较,# $P<0.05$;与 UA 中剂量组比较,& $P<0.05$ 。

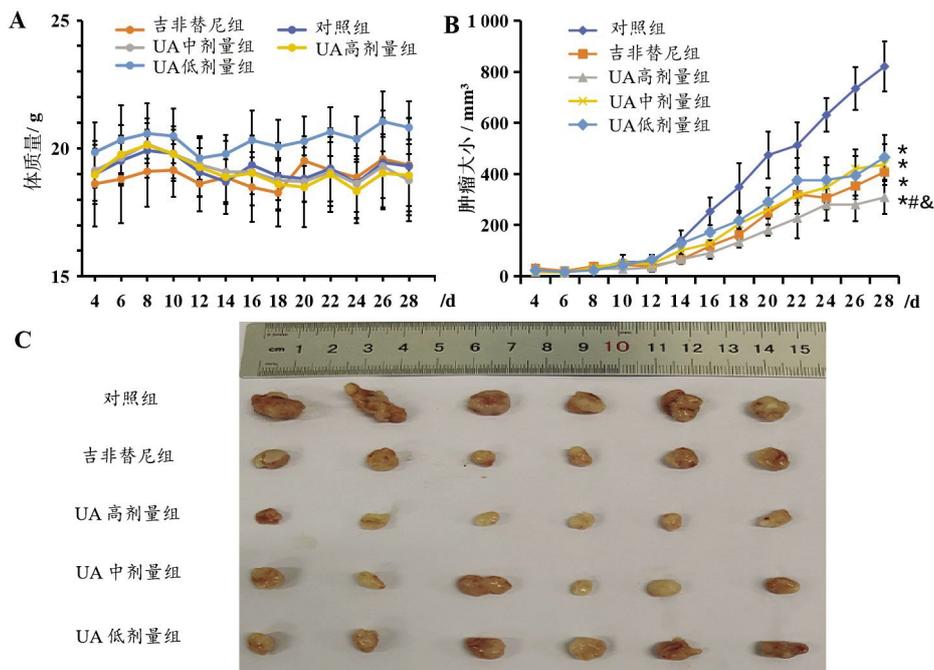


图 5 各组移植瘤裸鼠体质量及肿瘤大小比较

Fig.5 Comparison of body weight and tumor size in tumor-xenografted nude mice among different groups
注:A.体质量变化图;B.肿瘤大小变化统计图;C.肿瘤大小图。与对照组比较,* $P<0.05$;与 UA 低剂量组比较,# $P<0.05$;与 UA 中剂量组比较,& $P<0.05$ 。

3.5 UA 对 H1975 移植瘤裸鼠血清代谢组学的影响

PCA 结果显示,各组血清样本之间有分离的趋势,UA 中剂量组给药后血清样本远离对照组,表明 UA 中剂量组治疗后裸鼠血清代谢发生变化。O-PLS-DA 评分图结果显示,UA 中剂量组和对照组可以较好分开。根据各变量的分布确定各组化合物的差异。对照组和 UA 中剂量组的 $R^2Y=0.998, Q^2=0.722$,表明所建立的两模型的数据均有效且可靠。详见图 6。

3.5.1 血清内源性差异代谢物 与对照组比较,UA 中剂量组维生素 D₃、阿糖肌苷、甲基马来酸、黄嘌呤核苷、5S,15S-二羟基-6E,8Z,10Z,13E-二十碳四烯酸、前列腺素 F_{2α}、维生素 B₅ 和肾上腺酸 8 个代谢物上调;4-羟基苯甲醇、N-乙酰-L-酪氨酸、3-脲基丙酸、9,12-十八碳二烯酸、高-γ-亚麻酸、氧化三甲胺、23-脱甲脱氧胆酸和左旋甲状腺素等 14 个代谢物下调。KEGG 通路富集结果显示,UA 中剂量组处理后差异代谢物主要富集于甲状腺激素合成、甲状

腺激素信号通路、自身免疫性甲状腺疾病等 20 条通路中。详见表 1、图 7。

3.5.2 差异代谢物代谢通路 将显著变化的差异代谢物通过 MetaboAnalyst 5.0 进行通路富集分析,有 9 条代谢途径与 UA 的抗肿瘤作用相关。UA 干预 NSCLC 主要与酪氨酸代谢($P=0.01, Impact=0.01$)、亚油酸代谢($P=0.05, Impact=1.00$)和不饱和脂肪酸的生物合成($P=0.05, Impact=0.00$)有关。根据代谢途径中的差异代谢物构建代谢网络图。详见图 8—9。

4 讨论

目前,解决治疗 NSCLC 药物出现的耐药性是治疗 NSCLC 的首要问题。有研究表明,UA 对 NSCLC 细胞系 H460、H1975、A549、H1299、H520 均有抑制作用,能够诱导 NSCLC 细胞的凋亡和自噬,通过抑制 mTOR 信号通路而非激活 ERK1/2 信号通路^[6]。因此,本研究从体内外实验进一步探讨 UA 治疗 NSCLC 的作用机制。

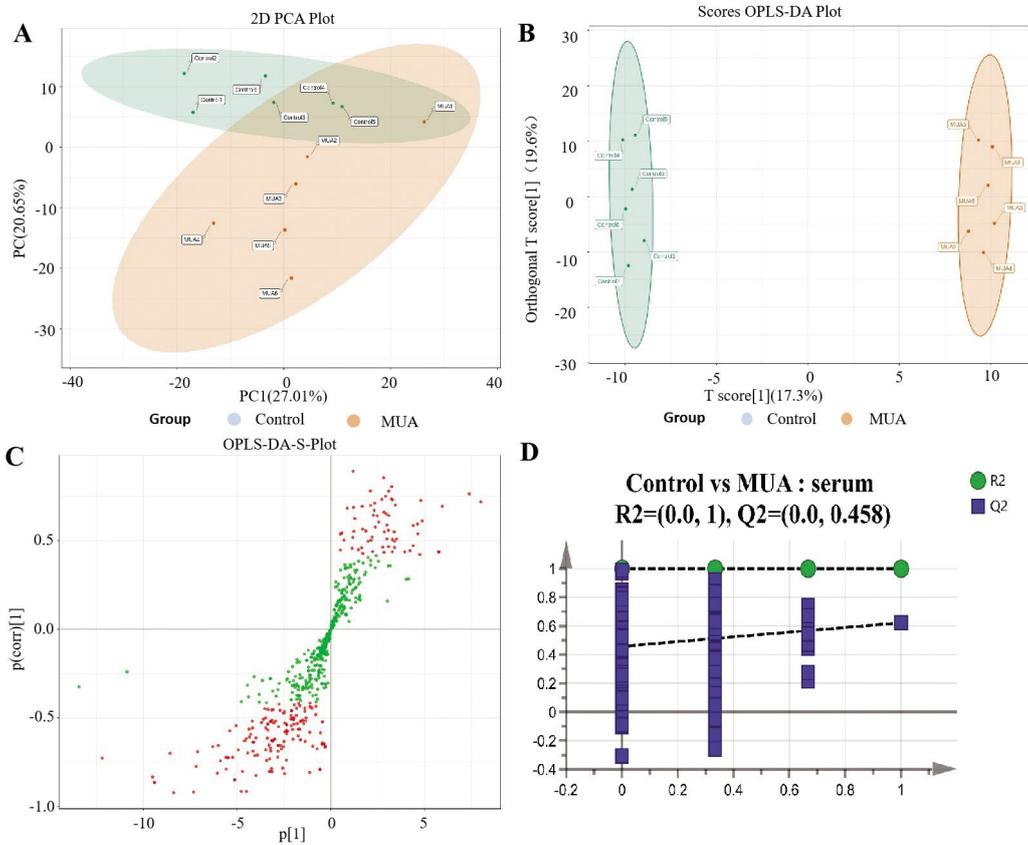


图 6 各组移植瘤裸鼠血清代谢分析

Fig.6 Serum metabolomic analysis of tumor-xenografted nude mice in each group

注:A.PCA 评分图;B.OPLS-DA 评分图;C.OPLS-DA S 图;D.基于 200 次 OPLS-DA 模型的置换检验图, MUA 为 UA 中剂量组、Control 为对照组。

表 1 血清差异代谢物

Table 1 Differential serum metabolites

序号	代谢物	分子式	所属代谢通路	VIP	Log ₂ FC	UA 中剂量组 vs 对照组
1	维生素 D ₃	C ₂₇ H ₄₄ O	类固醇生物合成	1.29	1.08	↑
2	阿糖肌苷	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₅	嘌呤代谢	1.66	1.30	↑
3	甲基马来酸	C ₅ H ₆ O ₄	嘌呤代谢	1.83	1.39	↑
4	黄嘌呤核苷	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₆	嘌呤代谢	1.06	1.06	↑
5	5S,15S-二羟基-6E,8Z,10Z,13E-二十碳四烯酸	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	不饱和脂肪酸的生物合成	1.42	1.05	↑
6	前列腺素 F _{2α}	C ₂₀ H ₃₄ O ₅	不饱和脂肪酸的生物合成	1.13	1.10	↑
7	D-泛酸钙(维生素 B ₅)	C ₁₈ H ₃₄ N ₂ O ₁₀	泛酸和辅酶 A 生物合成	1.01	1.09	↑
8	肾上腺酸	C ₂₂ H ₃₆ O ₂	酪氨酸代谢	1.72	1.61	↑
9	4-羟基苯甲醇	C ₇ H ₈ O ₂	酪氨酸代谢	1.68	-1.52	↓
10	N-乙酰-L-酪氨酸	C ₁₁ H ₁₃ NO ₄	酪氨酸代谢	1.89	-1.04	↓
11	3-脲基丙酸	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	嘧啶代谢	1.59	-1.02	↓
12	高-γ-亚麻酸	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	亚油酸代谢	1.95	-1.12	↓
13	9,12-十八碳二烯酸	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	亚油酸代谢	1.86	-1.27	↓
14	顺 6,9,12,15-十八碳四烯酸	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	亚油酸代谢	1.66	-1.09	↓
15	N-苄乙酰基-L-谷氨酰胺	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₄	β-丙氨酸代谢	1.38	-1.21	↓
16	氧化三甲胺	C ₃ H ₉ NO	不饱和脂肪酸的生物合成	2.07	-1.82	↓
17	23-脱甲脱氧胆酸	C ₂₃ H ₃₈ O ₄	类固醇生物合成	1.74	-2.64	↓
18	三碘甲状腺原氨酸	C ₁₅ H ₁₂ I ₃ NO ₄	类固醇生物合成	2.21	-1.35	↓
19	左旋甲状腺素	C ₁₅ H ₁₁ I ₄ NO ₄	类固醇生物合成	2.21	-1.54	↓
20	甲硫基丙醇	C ₄ H ₁₀ OS	甲硫氨酸代谢	1.78	-1.08	↓
21	DL-1-氨基-2-丙醇	C ₃ H ₉ NO	苏氨酸代谢	2.07	-1.82	↓
22	乙酰基组胺	C ₇ H ₁₁ N ₃ O	组氨酸代谢	2.00	-1.77	↓

注:与对照组比较,“↑”表示 UA 中剂量组差异代谢物上调,“↓”表示 UA 中剂量组差异代谢物下调。

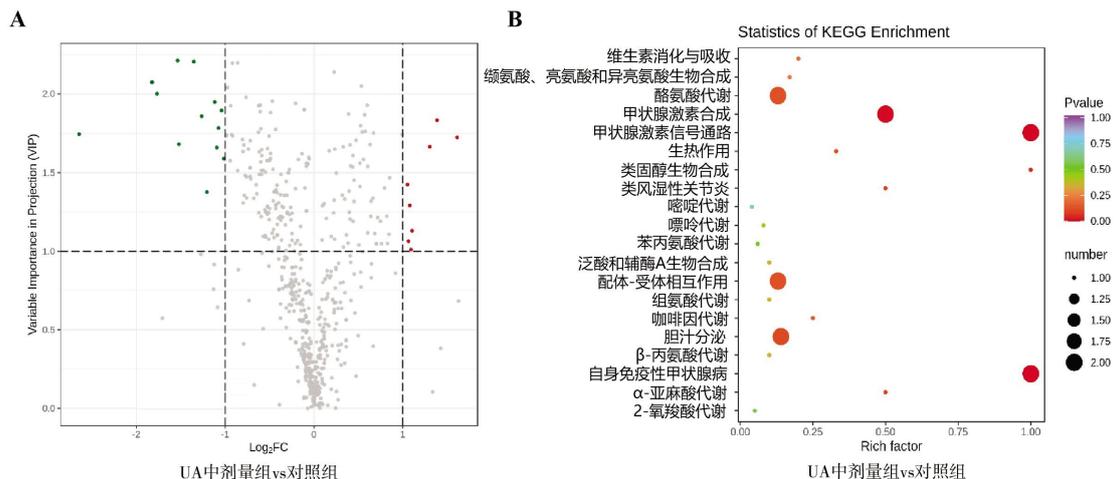


图 7 血清差异代谢物分析

Fig.7 Analysis of differential serum metabolites

注:A.火山图;B.KEGG 富集图。图 A 中灰色点表示差异代谢物不显著,绿色点表示差异代谢物显著下调(VIP≥1,FC≤0.5),红色点表示差异代谢物显著上调(VIP≥1,FC≥2)。

癌细胞周期发生异常会导致细胞快速增殖,因此,调控癌细胞周期进程对其增殖具有重要意义^[17]。本研究结果表明,UA 能阻断 H1975 细胞于 G₀/G₁

期,使其在 DNA 准备复制阶段受到抑制,而抑制细胞增殖。有研究表明,UA 作用于 NSCLC A549 细胞可诱导细胞周期阻滞在 G₀/G₁期^[18]。细胞凋亡是一

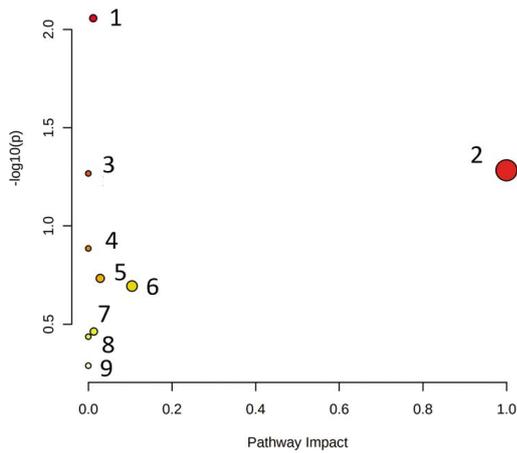


图8 差异代谢通路分析

Fig.8 Differential metabolic pathway analysis

注:1.酪氨酸代谢;2.亚油酸代谢;3.不饱和脂肪酸的生物合成;
4.α-亚麻酸代谢;5.泛酸和辅酶A生物合成;6.β-丙氨酸代
谢;7.嘧啶代谢;8.类固醇生物合成;9.嘌呤代谢。

种程序性死亡,其能有效清除受损细胞,在癌症治疗中发挥重要作用^[19]。Bcl-2家族通过高度调控抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax 之间的平衡,影响细胞凋亡的进程^[20]。Cleaved-Caspase-3 是 Caspase-3 的活性形式,也存在于凋亡细胞中。本研究结果显示,UA 可显著上调 Bax 和 Cleaved-Caspase-3 蛋白水平,下调 Bcl-2 蛋白水平,促进细胞凋亡。MMPs 与

肿瘤的生长发育密切相关,MMP-2 和 MMP-9 是肿瘤转移过程中重要的蛋白酶,而 TIMPs 抑制 MMP-2 和 MMP-9 的活性^[21]。本研究结果显示,UA 可显著下调 MMP-2 和 MMP-9 的表达,上调 TIMP-2 的表达,阻止 H1975 细胞迁移。综上所述,本研究结果表明UA 可以抑制 H1975 细胞的增殖、迁移并促进细胞凋亡。体内研究结果显示,UA 对 H1975 细胞移植瘤裸鼠肿瘤生长有抑制作用,表明其能抑制荷瘤动物肿瘤生长。

肿瘤代谢过程中,代谢物水平反映代谢酶活性,干预其活性或途径可能抑制肿瘤进展^[22]。据报道,UA 在含有原型辅酶 II 生成系统的人肝微粒体孵育液中发生代谢,且 UA 能够抑制人肝微粒体中的 CYP450 同工酶,而 CYP450 可能参与 UA 在机体内的代谢过程^[23]。在 NSCLC 异种移植模型中 UA 的血清代谢组学研究尚未见报道。在本研究中,UA 改变了 H1975 荷瘤裸鼠的内源性代谢物。对照组氧化三甲胺水平上调,该内源代谢物上调可诱发心血管疾病、代谢综合征和癌症^[24]。高水平的氧化三甲胺促进炎症发生,能形成或产生 N-亚硝基化合物和超氧化物,导致和诱发癌症的发生^[25-27]。氧化三甲胺的升高

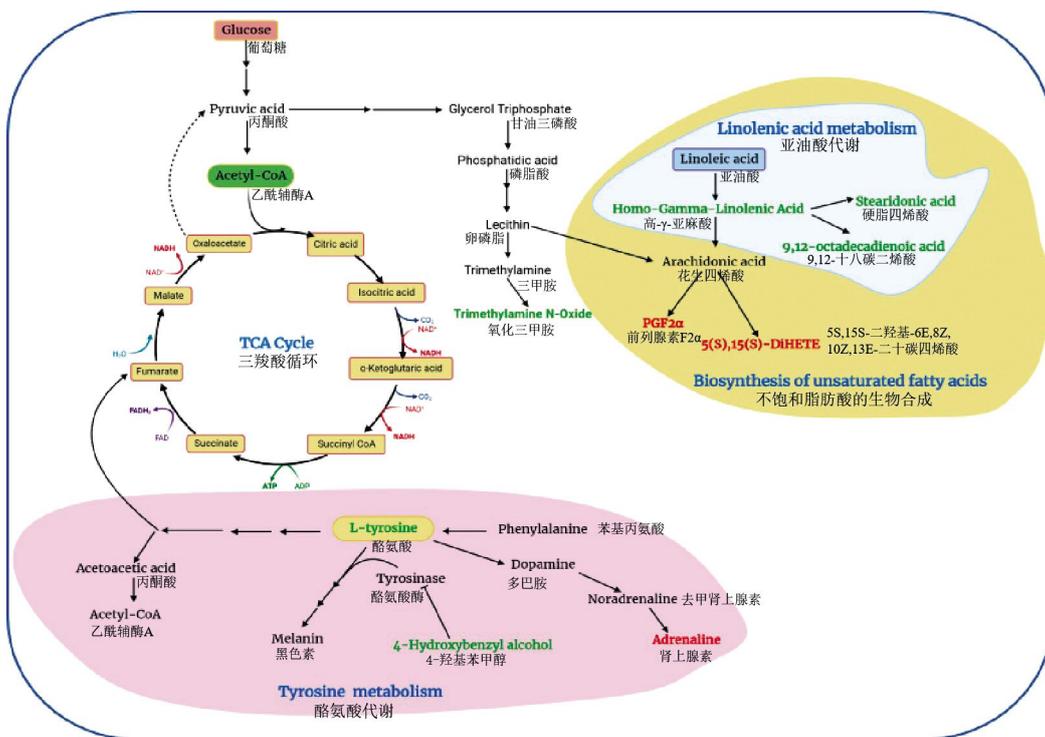


图9 代谢通路网络图

Fig.9 Metabolic pathway network

注:与对照组比较,UA 中剂量组处理后,红色标记代谢物呈上调,绿色标记代谢物呈下调。

被认为是肿瘤组织增殖的标志^[28]。B 族维生素和维生素 D 可降低氧化三甲胺的水平^[29]。在本研究中, UA 干预后, NSCLC 裸鼠体内维生素 D 含量升高, 氧化三甲胺含量降低。

5S,15S-二羟基-6E,8Z,10Z,13E-二十碳四烯酸可以抑制花生四烯酸衍生的 5-脂氧合酶代谢物的合成, 进而减少双高- γ -亚麻酸代谢产生的花生四烯酸促炎产物^[30]。在本研究中, UA 处理后 5S, 15S-二羟基-6E, 8Z, 10Z, 13E-二十碳四烯酸上调。目前, 蛋白酪氨酸激酶是抗肿瘤靶向药物研发中最理想的“靶点”, 50%以上的原癌基因和癌基因产物为酪氨酸激酶, 其与肿瘤的侵袭、转移、新生血管生成以及化疗耐药性密切相关^[31]。酪氨酸激酶的异常表达会打乱细胞增殖的规则, 导致肿瘤发生^[32]。据报道, 对羟基苯甲醇可抑制蘑菇酪氨酸酶活性, 当对羟基苯甲醇与该酶结合时, 酶的构象发生改变, 活性降低^[33]。在本研究中, UA 处理后对羟基苯甲醇和 L-酪氨酸减少。对差异代谢物通路进行分析发现, UA 治疗 NSCLC 的机制可能与亚油酸代谢、酪氨酸代谢和不饱和脂肪酸生物合成三条代谢通路有关。

综上所述, UA 可明显抑制 NSCLC 细胞系 H1975 细胞在体外的增殖和迁移, 促进其凋亡, 同时还能抑制 H1975 细胞在体内的生长。本研究首次探究了 UA 对 H1975 细胞移植瘤裸鼠血清差异代谢物的影响, 发现其抗肿瘤作用可能与不饱和脂肪酸生物合成、亚油酸代谢和酪氨酸代谢有关。本研究可为 UA 治疗 NSCLC 的应用提供实验依据。

参考文献

- [1] 中国抗癌协会肿瘤病理专业委员会肺癌协作组, 中国抗癌协会肿瘤病理专业委员会分子病理协作组, 国家癌症中心, 等. 非小细胞肺癌 BRAF V600E 突变免疫组织化学检测中国专家共识[J]. 临床与实验病理学杂志, 2024, 40(10): 1021-1026.
- [2] OGISO H, ISHITANI R, NUREKI O, et al. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains[J]. Cell, 2002, 110(6): 775-787.
- [3] 王安, 李涛, 卢迪, 等. 晚期经治非小细胞肺癌 EGFR-TKIs 获得性 RET 融合突变耐药的研究进展[J]. 解放军医学杂志, 2024, 49(9): 1080-1087.
- [4] WANG S H, CANG S D, LIU D L. Third-generation inhibitors targeting EGFR T790M mutation in advanced non-small cell lung cancer[J]. Journal of Hematology & Oncology, 2016, 9: 34.
- [5] SINGH M, JADHAV H R. Targeting non-small cell lung cancer with small-molecule EGFR tyrosine kinase inhibitors[J]. Drug Discovery Today, 2018, 23(3): 745-753.
- [6] IKEDA Y, MURAKAMI A, OHIGASHI H. Ursolic acid: An anti- and pro-inflammatory triterpenoid[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2008, 52(1): 26-42.
- [7] NGUYEN H N, ULLEVIG S L, SHORT J D, et al. Ursolic acid and related analogues: Triterpenoids with broad health benefits[J]. Antioxidants, 2021, 10(8): 1161-1185.
- [8] LI Y L, XING D, CHEN Q, et al. Enhancement of chemotherapeutic agent-induced apoptosis by inhibition of NF- κ B using ursolic acid[J]. International Journal of Cancer, 2010, 127(2): 462-473.
- [9] 刘荣荣, 张涛, 相芬芬, 等. 熊果酸对 IL-6 介导的乳腺癌细胞侵袭与迁移的抑制作用[J]. 中国药房, 2023, 34(8): 955-960.
- [10] RUAN J S, ZHOU H, YANG L, et al. Ursolic acid attenuates TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in NSCLC by targeting integrin α V β 5/MMPs signaling[J]. Oncology Research, 2019, 27(5): 593-600.
- [11] HE W J, CAO D M, CHEN Y B, et al. Explore of the beneficial effects of Huang-Lian-Jie-Du Decoction on diabetic encephalopathy in db/db mice by UPLC-Q-Orbitrap HRMS/MS based untargeted metabolomics analysis[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2021, 192: 113652.
- [12] ZHOU B, XIAO J F, TULI L, et al. LC-MS-based metabolomics[J]. Molecular BioSystems, 2012, 8(2): 470-481.
- [13] JOHNSON C H, IVANISEVIC J, SIUZDAK G. Metabolomics: Beyond biomarkers and towards mechanisms[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2016, 17(7): 451-459.
- [14] SHANMUGAM M K, RAJENDRAN P, LI F, et al. Ursolic acid inhibits multiple cell survival pathways leading to suppression of growth of prostate cancer xenograft in nude mice[J]. Journal of Molecular Medicine, 2011, 89(7): 713-727.
- [15] HSU H Y, YANG J J, LIN C C. Effects of oleanolic acid and ursolic acid on inhibiting tumor growth and enhancing the recovery of hematopoietic system postirradiation in mice[J]. Cancer Letters, 1997, 111(1/2): 7-13.
- [16] WANG M, YU H, WU R, et al. Autophagy inhibition enhances the inhibitory effects of ursolic acid on lung cancer cells[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2020, 46(5): 1816-1826.
- [17] LUO Y H, LI J Q, ZHANG Y, et al. Quinalizarin induces cycle arrest and apoptosis via reactive oxygen species-mediated signaling pathways in human melanoma A375 cells[J]. Drug Development Research, 2019, 80(8): 1040-1050.

- [18] KANG D Y, SP N, LEE J M, et al. Antitumor effects of ursolic acid through mediating the inhibition of STAT3/PD-L1 signaling in non-small cell lung cancer cells[J]. *Biomedicines*, 2021, 9(3): 297.
- [19] PISTRITTO G, TRISCIUOGLIO D, CECI C, et al. Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies[J]. *Aging*, 2016, 8(4): 603-619.
- [20] HAFEZI S, RAHMANI M. Targeting BCL-2 in cancer: Advances, challenges, and perspectives[J]. *Cancers*, 2021, 13(6): 1292.
- [21] QUINTERO-FABIÁN S, ARREOLA R, BECERRIL-VILLANUEVA E, et al. Role of matrix metalloproteinases in angiogenesis and cancer[J]. *Frontiers in Oncology*, 2019, 9: 1370-1391.
- [22] SCHMIDT D R, PATEL R, KIRSCH D G, et al. Metabolomics in cancer research and emerging applications in clinical oncology[J]. *CA Cancer Journal for Clinicians*, 2021, 71(4): 333-358.
- [23] KIM K A, LEE J S, PARK H J, et al. Inhibition of cytochrome P450 activities by oleanolic acid and ursolic acid in human liver microsomes[J]. *Life Sciences*, 2004, 74(22): 2769-2779.
- [24] GATAREK P, KALUZNA-CZAPLINSKA J. Trimethylamine N-oxide (TMAO) in human health[J]. *EXCLI Journal*, 2021, 20: 301-319.
- [25] SELDIN M M, MENG Y H, QI H X, et al. Trimethylamine N-oxide promotes vascular inflammation through signaling of mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- κ B[J]. *Journal of the American Heart Association*, 2016, 5(2): e002767.
- [26] OELLGAARD J, WINTHER S A, HANSEN T S, et al. Trimethylamine N-oxide (TMAO) as a new potential therapeutic target for insulin resistance and cancer[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2017, 23(25): 3699-3712.
- [27] KHODABAKHSHI A, MONFARED V, ARABPOUR Z, et al. Association between levels of trimethylamine N-oxide and cancer: A systematic review and meta-analysis[J]. *Nutrition and Cancer*, 2023, 75(2): 402-414.
- [28] CHHIBBER-GOEL J, GAUR A, SINGHAL V, et al. The complex metabolism of trimethylamine in humans: Endogenous and exogenous sources[J]. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 2016, 18: e8.
- [29] OBEID R, AWWAD H M, KIRSCH S H, et al. Plasma trimethylamine-N-oxide following supplementation with vitamin D or D plus B vitamins[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2017, 61(2): 1600358-1600382.
- [30] WANG X P, LIN H P, GU Y. Multiple roles of dihomo- γ -linolenic acid against proliferation diseases[J]. *Lipids in Health and Disease*, 2012, 11: 25-34.
- [31] 陈思宇, 王毅刚. 新型受体酪氨酸激酶 ROR1 及其靶向肿瘤治疗的研究进展[J]. *中国细胞生物学学报*, 2025, 47(1): 111-122.
- [32] 李雪滢, 王觅柱. 脾酪氨酸激酶在肿瘤发生发展中作用的研究进展[J]. *癌症进展*, 2022, 20(17): 1737-1741, 1746.
- [33] LIU S H, PAN I H, CHU I M. Inhibitory effect of p-hydroxybenzyl alcohol on tyrosinase activity and melanogenesis[J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2007, 30(6): 1135-1139.

(本文编辑 周 旦)