

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.18.005

# 葫芦巴碱调节 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路对非小细胞肺癌增殖、 迁移和侵袭能力的影响\*

杨震<sup>1</sup> 赵志杰<sup>1 $\Delta$</sup>  冯宗妹<sup>2</sup> 张春和<sup>1</sup> 曹永生<sup>1</sup>

(1 河北省沧州市人民医院检验科 河北 沧州 061000; 2 河北省沧州市人民医院西药房 河北 沧州 061000)

**摘要 目的:**探究葫芦巴碱(TRG)调节缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )/血管内皮生长因子(VEGF)信号通路对非小细胞肺癌(NSCLC)细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。**方法:**(1)体外实验:将 NSCLC 细胞株(A549)随机分为对照组(Control 组,正常培养)、TRG 低浓度组(TRG-Low 组,25  $\mu$ M)、TRG 高浓度组(TRG-High 组,50  $\mu$ M)、TRG 高浓度+HIF-1 $\alpha$  激活剂二甲基草酰甘氨酸组(TRG-High+DMOG 组,50  $\mu$ M TRG+10  $\mu$ M DMOG)。分别采用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法、细胞划痕实验以及转移小室(Transwell)实验检测各组细胞的增殖能力、迁移能力以及侵袭能力。(2)体内实验:将 60 只 SPF 级雄性 Rowett 裸鼠随机分为正常组(NC 组)、原位 NSCLC 模型组(Model 组)、TRG 低剂量组(TRG-Low 组,40 mg/kg TRG)、TRG 高剂量组(TRG-High 组,80 mg/kg TRG)和 TRG 高剂量+DMOG 组(TRG-High+DMOG 组,80 mg/kg TRG+40 mg/kg DMOG),TRG、DMOG 采用腹腔注射的方式,每组 12 只。实验结束后摘取各组大鼠肺部组织进行肺重量指数和肿瘤总负荷的测量。苏木精-伊红(HE)染色观察各组大鼠肺部病理学变化;原位末端标记法(TUNEL)实验评估肺组织中的细胞凋亡率;免疫印迹实验(Western Blot)实验检测各组大鼠肺组织中 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、细胞周期蛋白 D1(cyclinD1)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)的表达。**结果:**(1)体外实验:TRG-Low 组和 TRG-High 组 A549 细胞存活率、细胞迁移率和细胞侵袭数目显著低于 Control 组( $P<0.05$ )。TRG-High+DMOG 组 A549 细胞存活率、细胞迁移率和细胞侵袭数目显著高于 TRG-High 组( $P<0.05$ )。(2)体内实验:Model 组大鼠肺重量指数、肿瘤总负荷、HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、CyclinD1、Vimentin 蛋白表达显著高于 NC 组( $P<0.05$ ),细胞凋亡率、E-cadherin 蛋白表达显著降低( $P<0.05$ ),肺组织病理损伤严重,有明显 NSCLC 病灶;TRG-High 组大鼠肺重量指数、肿瘤总负荷、HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、CyclinD1、Vimentin 蛋白表达显著低于 Model 组( $P<0.05$ ),细胞凋亡率、E-cadherin 蛋白表达水平显著高于 Model 组( $P<0.05$ ),肺组织病理学损伤减轻,NSCLC 病灶减小。DMOG 减轻了 TRG 对 NSCLC 的抑制作用( $P<0.05$ )。**结论:**TRG 可能在体内外通过抑制 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路抑制 NSCLC 细胞增殖、迁移和侵袭以阻止 NSCLC 进展。

**关键词:**葫芦巴碱;HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路;非小细胞肺癌;细胞增殖;细胞迁移;细胞侵袭

中图分类号:R-33;R734.2 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2024)18-3429-08

## Effects of Trigonelline on the Proliferation, Migration and Invasion of Non-Small Cell Lung Cancer by Regulating HIF-1 $\alpha$ /VEGF Signaling Pathway\*

YANG Zhen<sup>1</sup>, ZHAO Zhi-jie<sup>1 $\Delta$</sup> , FENG Zong-mei<sup>2</sup>, ZHANG Chun-he<sup>1</sup>, CAO Yong-sheng<sup>1</sup>

(1 Department of Clinical Laboratory, Cangzhou People's Hospital of Hebei Province, Cangzhou, Hebei, 061000, China;

2 Department of Pharmacy, Cangzhou People's Hospital of Hebei Province, Cangzhou, Hebei, 061000, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effects of trigonelline (TRG) on the proliferation, migration and invasion of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells by regulating hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )/vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway. **Methods:** (1) In vitro experiments: NSCLC cell lines (A549) were randomly divided into control group (Control group, normal culture), TRG low concentration group (TRG-Low group, 25  $\mu$ M), TRG high concentration group (TRG-High group, 50  $\mu$ M), TRG high concentration+HIF-1 $\alpha$  activator dimethyl oxalylglycine group (TRG-High+DMOG group, 50  $\mu$ M TRG+10  $\mu$ M DMOG). The proliferation, migration and invasion abilities of cells in each group were detected by Cell Counting Kit-8 (CCK-8) method, cell scratch assay, and transfer the chamber (Transwell), respectively. (2) In vivo experiment: 60 SPF male Rowett nude mice were randomly divided into normal group (NC group), in situ NSCLC model group (Model group), TRG low dose group (TRG-Low group, 40 mg/kg TRG), TRG high dose group (TRG-High group, 80 mg/kg TRG) and TRG high dose+DMOG group (TRG-High+DMOG group, 80 mg/kg TRG+40 mg/kg DMOG), TRG and DMOG were injected intraperitoneally, with 12 mice in each group. The lung tissue in each group of rats was taken

\* 基金项目:河北省卫生健康委科研项目(20220323)

作者简介:杨震(1982-),男,本科,主管技师,研究方向:医学检验、免疫学,E-mail: yangzhenrm@163.com

$\Delta$  通讯作者:赵志杰(1983-),女,硕士,副主任技师,研究方向:临床血液学检验,E-mail: zzzjrm@163.com

(收稿日期:2024-03-06 接受日期:2024-03-28)

for lung weight index and total tumor load measurement at the end of the experiment. The pathological changes of lung in each group were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The apoptosis rate in lung tissue was evaluated by in situ end labeling (TUNEL) assay. The expression of HIF-1 $\alpha$ , VEGF, cyclin D1 (cyclinD1), E-cadherin (E-cadherin) and vimentin (Vimentin) in lung tissue of rats in each group were detected by immunoblot experiments (Western Blot). **Results:** (1) In vitro experiments: The survival rate, cell migration rate and cell invasion number of A549 cells in TRG-Low group and TRG-High group were significantly lower than those in control group ( $P<0.05$ ). The survival rate, cell migration rate and cell invasion number of A549 cells in TRG-High+DMOG group were significantly higher than those in TRG-High group ( $P<0.05$ ). (2) In vivo experiment: The lung weight index, total tumor load, HIF-1 $\alpha$ , VEGF, CyclinD1 and Vimentin protein expression in Model group were significantly higher than those in NC group ( $P<0.05$ ), and the apoptosis rate and E-cadherin protein expression were significantly decreased ( $P<0.05$ ). The pathological damage of lung tissue was serious, and there were obvious NSCLC lesions. The lung weight index, total tumor load, HIF-1 $\alpha$ , VEGF, CyclinD1 and Vimentin protein expression in TRG-High group were significantly lower than those in Model group ( $P<0.05$ ), the apoptosis rate and E-cadherin protein expression level were significantly higher than those in Model group ( $P<0.05$ ), the pathological damage of lung tissue was reduced, and the NSCLC lesions were reduced. DMOG alleviated the inhibitory effect of TRG on NSCLC ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** TRG may inhibit the proliferation, migration and invasion of NSCLC cells by inhibiting the HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling pathway in vitro and in vivo to prevent progression of NSCLC.

**Key words:** Trigonelline; HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling pathway; Non small cell lung cancer; Cell proliferation; Cell migration; Cell invasion

**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R734.2 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2024)18-3429-08

## 前言

据报道,肺癌的发病率和死亡率在所有恶性肿瘤中均居首位,肺癌严重威胁着人类的生命健康<sup>[1]</sup>。非小细胞肺癌(NSCLC)占肺癌的大多数<sup>[2]</sup>。目前临床治疗 NSCLC 主要手段有手术切除、化疗和放射治疗,虽对肿瘤有一定抑制作用,但其预后不理想,晚期 NSCLC 患者的 5 年生存率仅为 15%<sup>[3]</sup>。因此,寻找新的治疗 NSCLC 的药物和靶点是当前需要攻克的科研难题之一。葫芦巴碱(TRG)是植物葫芦巴中主要的活性成分,属于水溶性非异喹啉类生物碱<sup>[4]</sup>。研究表明,TRG 具有降低胆固醇、抗糖尿病、抗氧化、抗炎等多种药理作用<sup>[5-7]</sup>,另有研究发现其能用于诱导卵巢癌细胞凋亡,具有一定的抗肿瘤作用<sup>[8]</sup>。目前关于 TRG 能否从体内外抑制 NSCLC 的肿瘤进展尚无相关报道。缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )在缺氧条件下表达水平高,在正常氧气浓度下表达降低<sup>[9]</sup>。血管内皮生长因子(VEGF)能促进血管生成和内皮细胞增殖,进而促进肿瘤进展<sup>[10,11]</sup>。研究发现,HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路与癌症的上皮间质转化和肿瘤血管生成密切相关,起到诱导的作用,抑制该通路也能阻碍肺癌荷瘤小鼠的肿瘤生长<sup>[12]</sup>。本研究从体内外水平评价 TRG 对 NSCLC 的肿瘤抑制作用,并初步研究其抗肿瘤机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞

人类 NSCLC 细胞 A549 由上海细胞生物学研究所提供。

### 1.2 实验动物

选取 60 只雄性 Rowett 裸鼠(均购自北京维通利华实验动物技术有限公司),动物许可证号:SYXK(京)2022-0052。裸鼠实验前饲养于温度 22 $\pm$  2 $^{\circ}$ C、相对湿度 45%~60%的特定 SPF 环境中,进行 12 h 的光明/黑暗循环,自由饮高压去离子水和摄取辐照灭菌后食物。本实验经本院动物伦理委员会批准。所

有裸鼠适应性饲养一周后开始实验。

### 1.3 主要试剂与仪器

葫芦巴碱购自安诺论(北京)生物科技有限公司;美国 MedChemExpress 公司生产的二甲基草酰甘氨酸(DMOG);美国 Cell Signaling Technology 公司生产的胰蛋白酶、磷酸盐缓冲溶液(PBS);细胞计数试剂盒-8(CCK-8)试剂盒购自日本同仁化学研究所;美国 Gibco 公司生产的胎牛血清、RPMI 1640 培养基;Matrigel 基质胶购自美国 Becton, Dickinson and Company 公司;转移小室(Transwell)小室购自 Corning 公司;上海碧云天生物技术股份有限公司生产的原位末端标记法(TUNEL)染色试剂盒及苏木精-伊红(HE)染色试剂盒;英国 Abcam 公司生产的辣根过氧化物酶(HRP)山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 二抗及 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、CyclinD1、E-cadherin、Vimentin 一抗。光学显微镜购自德国 Leica Microsystems 公司。

### 1.4 细胞培养与分组

A549 细胞放于 RPMI 1640 培养基(37 $^{\circ}$ C 含 10%胎牛血清)中,后置于培养箱(含 5%二氧化碳)中培养,每 2-3 天更换一次新鲜培养基,后续实验选取良好生长状态的对数生长期细胞。A549 细胞随机分为对照组(Control 组,正常培养)、TRG 低浓度组(TRG-Low 组,25  $\mu$ M)、TRG 高浓度组(TRG-High 组,50  $\mu$ M<sup>[13]</sup>)、TRG 高浓度组+HIF-1 $\alpha$  激活剂二甲基草酰甘氨酸组(TRG-High+DMOG 组,50  $\mu$ M TRG+10  $\mu$ M DMOG<sup>[14]</sup>)。

### 1.5 CCK-8 法检测细胞增殖能力

将 A549 细胞接种于 96 孔板中,24 h 后按 1.4 中所述对各组细胞加入相应药物进行处理,每组设置 6 个复孔。实验共设置 3 个检测时间点:24、48 和 72 h。加入相应药物处理 24、48 和 72 h 后,加入 CCK-8 试剂并用酶标仪检测各孔 2 h 后 450 nm 下的 OD 值,计算 A549 细胞存活率。

### 1.6 细胞划痕实验检测细胞迁移能力

将 A549 细胞接种于 6 孔板中,密度为 5 $\times$  10<sup>5</sup> 个/孔。并

按 1.4 方法进行相应药物处理。待细胞生长约至 80% 时,在细胞板中间用枪头划一条竖线,分别记录 0 h 和培养 24 h 后的横线宽度,计算细胞迁移率。

### 1.7 Transwell 实验检测细胞侵袭能力

将基质胶铺入 Transwell 小室中过夜。上室中加入 A549 细胞悬液,下室中加入完全培养基,培养 1 d。用棉签轻轻擦去上层多余细胞,加入多聚甲醛固定,洗膜后添加结晶紫并置于暗处染色 20 min,拍照,再对侵袭细胞进行计数。

### 1.8 大鼠原位 NSCLC 模型的建立

参考文献方法,构建大鼠原位 NSCLC 模型<sup>[15]</sup>。使用 64% N<sub>2</sub>O-32%O<sub>2</sub>-4%异氟醚混合气体麻醉大鼠,并通过鼻内滴注的方法将 2×10<sup>7</sup> 个 A549 细胞接种到大鼠的肺中。采用生物发光成像观察到小鼠肺部原位肿瘤形成,说明 NSCLC 模型构建成功。本研究共成功构建了 48 只大鼠原位 NSCLC 模型,将其随机分为原位 NSCLC 模型组 (Model 组),TRG 低剂量组 (TRG-Low 组,40 mg/kg TRG)、TRG 高剂量组 (TRG-High 组,80 mg/kg TRG<sup>[16]</sup>) 和 TRG 高剂量组 +DMOG 组 (TRG-High+DMOG 组,80 mg/kg TRG+40 mg/kg DMOG<sup>[17]</sup>),每组 12 只。另设 12 只大鼠为正常组 (NC 组),NC 组大鼠麻醉后鼻内滴注等量的含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基。TRG 溶液的配制采用生理盐水溶解,随后各组采取腹腔注射相应剂量的 TRG 与 DMOG,1 次/d,共给药一周,NC 组腹腔注射等量的生理盐水。

### 1.9 肺重量指数和肿瘤总负荷的测量

末次给药结束后脱颈处死大鼠,解剖取其肺组织和肿瘤组织。测量并记录大鼠的体重和肺湿重,计算肺重量指数:肺重量指数 = 肺湿重 (mg) / 解剖当天大鼠体重 (g)。根据表面肿瘤和可触及的实质肿瘤,使用 1~4 的评分系统来评价肿瘤总负荷 (1 级:轻微;2 级:轻度;3 级:中度;4 级:严重)<sup>[18]</sup>。

### 1.10 HE 染色观察大鼠肺组织病理学变化

将取出的肺组织一部分固定在 10% 多聚甲醛中,常温固定

24 h,进行常规石蜡包埋操作。将组织切成 5 μm 厚的切片,并在室温下用 HE 染色 5 min。在光学显微镜下观察各组大鼠肺组织的病理学变化情况。另一部分置于 -80℃ 进行冻存。

### 1.11 TUNEL 法检测大鼠肺组织细胞凋亡率

对肺组织切片进行脱蜡与再水化,根据 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒说明书进行操作,评估各组大鼠肺组织细胞凋亡率。从每个肺组织切片中随机选取 6 个区域,在光学显微镜下计算阳性染色细胞的比率 (凋亡细胞呈棕黄色,正常细胞呈蓝色)。

### 1.12 免疫印迹实验 (Western Blot) 检测大鼠肺组织中 HIF-1α/VEGF 信号通路蛋白、增殖、迁移侵袭相关蛋白的表达

取 1.10 中冻存的大鼠肺组织,组织蛋白采用放射性免疫沉淀法裂解液提取,并采用二喹啉甲酸法定量。用 10% SDS-PAGE 分离每个样品中的蛋白质,并进行转膜。封闭后,加入 HIF-1α、VEGF、CyclinD1、E-cadherin、Vimentin (稀释比均为 1:1000) 一抗孵育过夜 (4℃ 条件)。次日,在常温下加入相应二抗 (1:4000),接着孵育 2 h,加入电化学发光试剂进行显色,以 β-actin 蛋白作为内参,在凝胶成像仪下进行曝光,计算目标蛋白的灰度值。

### 1.13 统计学方法

实验中计量资料的数据分析采用 Graph Pad Prism 7.0,以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。多组间比较采用 F 检验,组间比较采用 t 检验。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 A549 细胞存活率比较

TRG-Low 组、TRG-High 组细胞存活率 (24 h、48 h 和 72 h) 显著低于 Control 组 ( $P<0.05$ ); TRG-High 组细胞存活率 (24 h、48 h 和 72 h) 显著低于 TRG-Low 组 ( $P<0.05$ ); TRG-High+DMOG 组细胞存活率 (24 h、48 h 和 72 h) 显著高于 TRG-High 组 ( $P<0.05$ )。见表 1。

表 1 A549 细胞存活率比较 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 1 Comparison of survival rate of A549 cells ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Groups	Survival rate of cells (%)		
	24 h	48 h	72 h
Control group	100.56± 4.24	103.41± 7.20	104.23± 8.20
TRG-Low group	81.23± 8.36*	57.89± 5.84*	34.56± 3.13*
TRG-High group	67.30± 6.15**	22.13± 2.06**	10.34± 1.89**
TRG-High+DMOG group	80.34± 8.01*	55.78± 5.44*	29.46± 3.04*
F	23.740	223.100	450.500
P	<0.001	<0.001	<0.001

Note: Compared with the control group, \* $P<0.05$ ; Compared with the TRG-Low group, # $P<0.05$ ; Compared with the TRG-High group, & $P<0.05$ .

### 2.2 各组 A549 细胞迁移能力的比较

TRG-Low 组、TRG-High 组细胞迁移率显著低于 Control 组 ( $P<0.05$ ); TRG-High 组细胞迁移率显著低于 TRG-Low 组 ( $P<0.05$ ); 与 TRG-High 组相比, TRG-High+DMOG 组细胞迁移率显著升高 ( $P<0.05$ )。见表 2、图 1。

### 2.3 各组 A549 细胞侵袭能力的比较

TRG-Low 组、TRG-High 组较 Control 组细胞侵袭数目降低 ( $P<0.05$ ); 随着 TRG 浓度升高, TRG-High 组细胞侵袭数目进一步降低 ( $P<0.05$ ); TRG-High+DMOG 组较 TRG-High 组细胞侵袭数目增多 ( $P<0.05$ )。见表 3、图 2。

表 2 各组 A549 细胞迁移能力的比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 2 Comparison of migration ability of A549 cells in each group( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Groups	Cell migration rate(%)
Control group	57.89± 6.03
TRG-Low group	42.23± 4.57*
TRG-High group	30.49± 3.25* <sup>#</sup>
TRG-High+DMOG group	40.58± 3.79 <sup>&amp;</sup>
<i>F</i>	37.430
<i>P</i>	<0.001

Note: Compared with the control group, \* $P < 0.05$ ; Compared with the TRG-Low group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; Compared with the TRG-High group, <sup>&</sup> $P < 0.05$ .

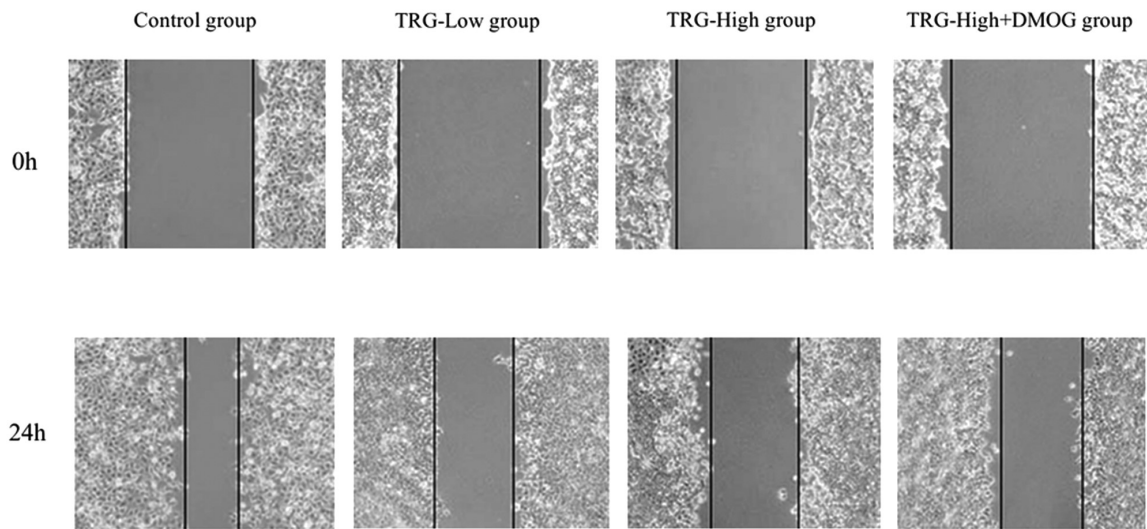


图 1 A549 细胞迁移能力检测结果

Fig.1 The migration ability of A549 cells test Results

表 3 各组 A549 细胞细胞侵袭数目的比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 3 Comparison of the number of A549 cell invasion in each group( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Groups	Number of cell invasions(Number/ View)
Control group	476.25± 40.56
TRG-Low group	312.78± 29.46*
TRG-High group	124.50± 13.47* <sup>#</sup>
TRG-High+DMOG group	279.41± 24.32 <sup>&amp;</sup>
<i>F</i>	152.000
<i>P</i>	<0.001

Note: Compared with the control group, \* $P < 0.05$ ; Compared with the TRG-Low group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; Compared with the TRG-High group, <sup>&</sup> $P < 0.05$ .

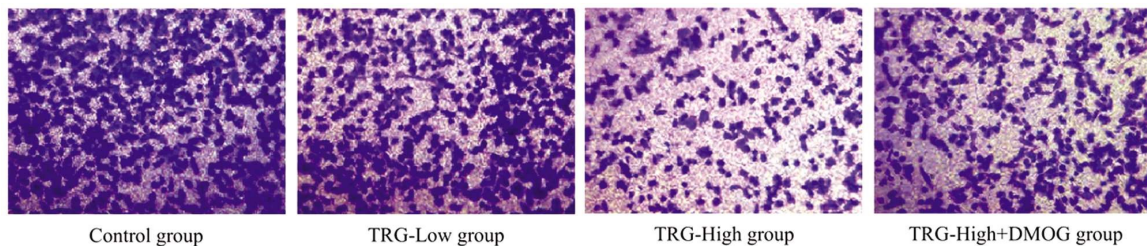


图 2 A549 细胞迁移能力检测结果( $\times 200$ )

Fig.2 The migration ability of A549 cells test Results ( $\times 200$ )

2.4 各组大鼠肺重量指数与肿瘤总负荷比较

与 NC 组相比, Model 组大鼠肺重量指数、肿瘤总负荷显

著升高( $P < 0.05$ ); 与 Model 组相比, TRG-High 组大鼠肺重量

指数、肿瘤总负荷显著降低( $P < 0.05$ ), 与 TRG-Low 组相比无



显著性差异( $P>0.05$ );与 TRG-Low 组相比,TRG-High 组大鼠肺重量指数、肿瘤总负荷显著降低( $P<0.05$ );与 TRG-High 组相比,TRG-High+DMOG 组大鼠肺重量指数、肿瘤总负荷显著升高( $P<0.05$ )。见表 4。

表 4 各组大鼠肺重量指数与肿瘤总负荷比较( $\bar{x}\pm s, n=12$ )

Table 4 Comparison of lung weight index and total tumor load in each group of rats( $\bar{x}\pm s, n=12$ )

Groups	Lung weight index	Total tumor load(Scores)
NC group	7.15± 0.58	0.00± 0.00
Model group	16.45± 1.52*	2.97± 0.54*
TRG-Low group	15.47± 1.49	2.54± 0.49
TRG-High group	8.61± 0.84 <sup>#</sup>	1.57± 0.33 <sup>#</sup>
TRG-High+DMOG group	13.16± 1.20 <sup>^</sup>	2.48± 0.40 <sup>^</sup>
<i>F</i>	145.600	105.100
<i>P</i>	<0.001	<0.001

Note: Compared with the NC group, \* $P<0.05$ ; Compared with the Model group, <sup>#</sup> $P<0.05$ ; Compared with the TRG-Low group, <sup>^</sup> $P<0.05$ ; Compared with the TRG-High group, <sup>^</sup> $P<0.05$ .

### 2.5 各组大鼠肺组织病理学变化比较

NC 组大鼠肺部细胞结构清晰完整,排列紧密,未见肿瘤组织结构 and 明显病变。Model 组大鼠肺部组织可见肿瘤病灶,且肿瘤细胞体积大、形状不整、排列紊乱。与 Model 组相比,

TRG-Low 组、TRG-High 组大鼠肺部组织结构的病变和肿瘤病灶减轻,其中 TRG-High 组的减轻更显著。与 TRG-High 组相比,TRG-High+DMOG 组的肺组织结构病变和肿瘤病灶面积显著增加。见图 3。

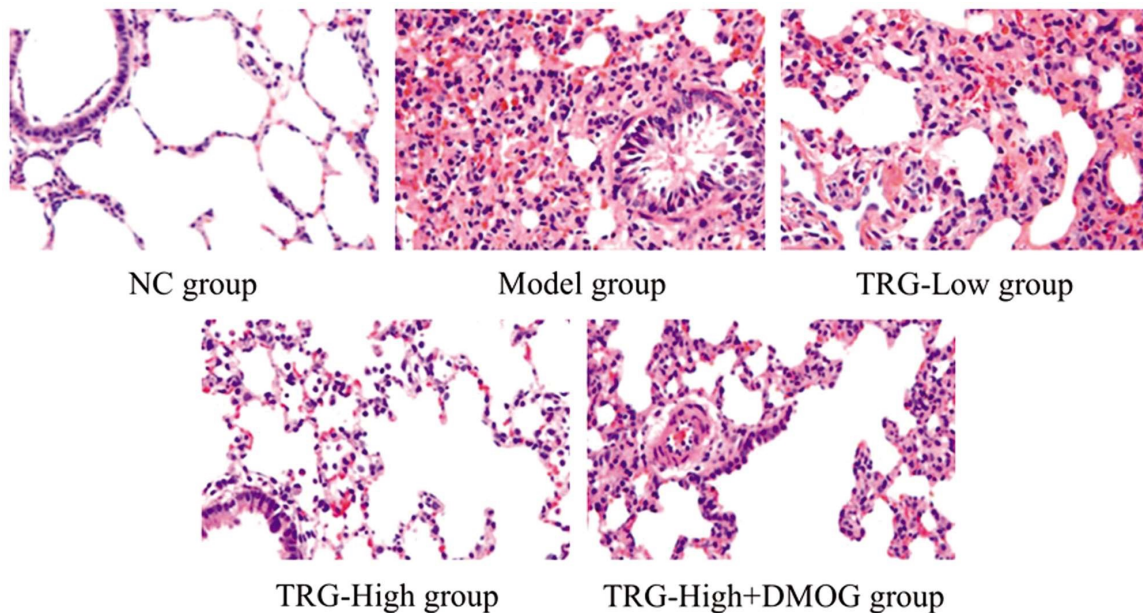


图 3 HE 染色观察各组大鼠肺部组织病理学变化( $\times 200$ )

Fig.3 HE staining was used to observe the pathological changes of lung tissue in each group ( $\times 200$ )

### 2.6 各组大鼠肺部组织细胞凋亡情况比较

Model 组大鼠肺细胞凋亡率显著低于 NC 组 ( $P<0.05$ ); TRG-High 组大鼠细胞凋亡率显著高于 Model 组( $P<0.05$ ),与 TRG-Low 组比较,无显著性差异( $P>0.05$ );与 TRG-Low 组相比,TRG-High 组大鼠细胞凋亡率显著升高 ( $P<0.05$ );与 TRG-High 组相比,TRG-High+DMOG 组大鼠细胞凋亡率显著降低( $P<0.05$ )。见表 5 和图 4。

### 2.7 各组大鼠肺组织中 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路蛋白表达与增殖、迁移侵袭相关蛋白表达的情况

与 NC 组相比,Model 组大鼠肺组织中 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、

CyclinD1、Vimentin 蛋白表达显著升高 ( $P<0.05$ ),E-cadherin 蛋白表达显著降低 ( $P<0.05$ );TRG-High 组大鼠肺组织中 E-cadherin 蛋白表达显著高于 Model 组 ( $P<0.05$ ),HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、CyclinD1、Vimentin 蛋白表达显著低于 Model 组 ( $P<0.05$ ),与 TRG-Low 组相比无显著性差异( $P>0.05$ );随着 TRG 剂量升高,TRG-High 组大鼠肺组织中 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、CyclinD1、Vimentin 表达进一步降低( $P<0.05$ ),E-cadherin 蛋白表达进一步升高 ( $P<0.05$ );TRG-High+DMOG 组大鼠肺组织中 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、CyclinD1、Vimentin 表达升高( $P<0.05$ ),E-cadherin 蛋白表达降低( $P<0.05$ )。见表 6、图 5。

表 5 各组大鼠肺部组织细胞凋亡率比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 5 Comparison of apoptosis rate in lung tissue of rats in each group( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Groups	Apoptosis rate(%)
NC group	9.56± 1.13
Model group	2.97± 0.32*
TRG-Low group	3.02± 0.33
TRG-High group	8.46± 0.92 <sup>#&amp;</sup>
TRG-High+DMOG group	4.15± 0.46 <sup>^</sup>
<i>F</i>	116.400
<i>P</i>	<0.001

Note: Compared with the NC group, \* $P < 0.05$ ; Compared with the Model group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; Compared with the TRG-Low group, <sup>&</sup> $P < 0.05$ ; Compared with the TRG-High group, <sup>^</sup> $P < 0.05$ .

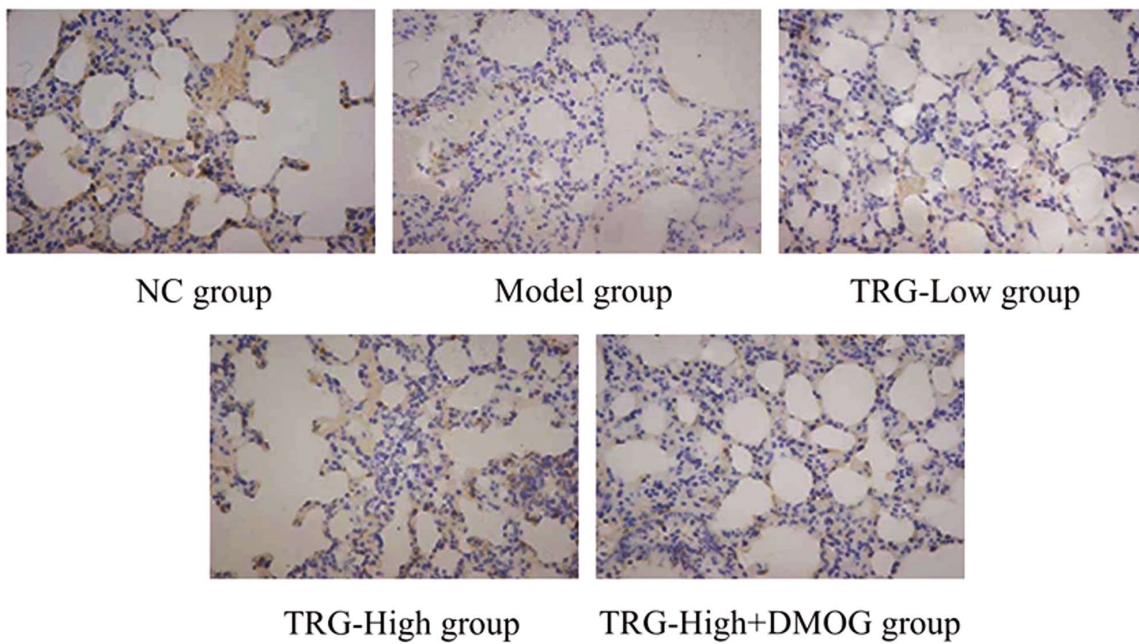


图 4 TUNEL 染色观察各组大鼠肺部细胞凋亡情况

Fig.4 TUNEL staining was used to observe the apoptosis of lung cells in each group

表 6 各组大鼠肺组织中 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路蛋白表达与增殖、迁移侵袭相关蛋白表达比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 6 Comparison of HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling pathway protein expression and proliferation, migration and invasion related protein expression in lung tissue of rats in each group( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Groups	HIF-1 $\alpha$ / $\beta$ -actin	VEGF/ $\beta$ -actin	CyclinD1/ $\beta$ -actin	E-cadherin/ $\beta$ -actin	Vimentin/ $\beta$ -actin
NC group	0.42± 0.05	0.37± 0.04	0.23± 0.02	0.93± 0.09	0.30± 0.03
Model group	0.89± 0.09*	0.82± 0.08*	0.78± 0.08*	0.34± 0.03*	0.87± 0.09*
TRG-Low group	0.81± 0.08	0.76± 0.07	0.76± 0.08	0.36± 0.04	0.85± 0.09
TRG-High group	0.53± 0.05 <sup>#&amp;</sup>	0.49± 0.05 <sup>#&amp;</sup>	0.40± 0.04 <sup>#&amp;</sup>	0.82± 0.08 <sup>#&amp;</sup>	0.38± 0.04 <sup>#&amp;</sup>
TRG-High+DMOG group	0.70± 0.07 <sup>^</sup>	0.68± 0.07 <sup>^</sup>	0.65± 0.07 <sup>^</sup>	0.44± 0.04 <sup>^</sup>	0.71± 0.07 <sup>^</sup>
<i>F</i>	46.410	56.660	87.910	123.300	90.090
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Note: Compared with the NC group, \* $P < 0.05$ ; Compared with the Model group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; Compared with the TRG-Low group, <sup>&</sup> $P < 0.05$ ; Compared with the TRG-High group, <sup>^</sup> $P < 0.05$ .

### 3 讨论

NSCLC 的发病因素较多, 主要与年龄、环境、肿瘤家族史等因素有关, 近年来, 我国 NSCLC 的发病率和死亡率高居不

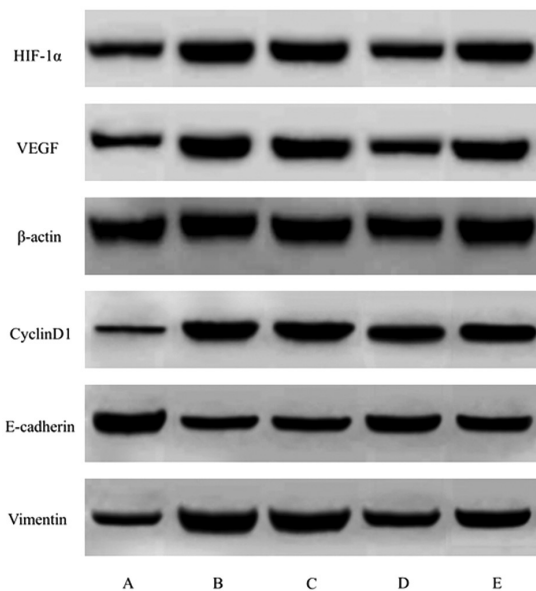


图5 Western Blot 检测大鼠肺组织 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路蛋白、增殖、迁移侵袭相关蛋白表达

Fig.5 Western Blot was used to detect the expression of HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling pathway protein, proliferation, migration and invasion related protein in rat lung tissue

Note: A: NC group; B: Model group; C: TRG-Low group;  
D: TRG-High group; E: TRG-High+DMOG group.

下,且正在不断升高,NSCLC 已被列为我国重点防治的癌症之一<sup>[19]</sup>。NSCLC 的发生发展、肿瘤细胞的迁移侵袭是由多种基因、多个步骤共同完成,且伴随着大量微血管生成和肺组织损伤,肿瘤细胞的增殖、迁移侵袭等生物学过程共同促进了 NSCLC 的进展<sup>[20]</sup>。本研究通过建立大鼠原位 NSCLC 模型,结果显示与 NC 组相比,Model 组大鼠的肺重量指数、肿瘤总负荷显著升高;HE 染色观察 Model 组大鼠的肺组织出现明显的病理性损伤和肿瘤病灶,说明大鼠原位 NSCLC 模型建立成功。

TRG 具有温肾、祛寒、止痛的功效,现代药理学研究表明 TRG 具有降血糖、降血脂、抗肿瘤、治疗皮肤病、刺激毛发和指甲生长等活性作用<sup>[21]</sup>。近年来,研究者们越来越关注 TRG 的抗肿瘤作用,瞿润等<sup>[22]</sup>研究发现 TRG 可以显著下调 MMP-2 和 MMP-9,抑制胆管癌细胞的增殖和迁移,具有抗胆管癌的作用。Foudzer 等<sup>[13]</sup>研究发现 TRG 可以通过抑制 EGFR 信号通路阻断细胞核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)激活与其核移位,其提高了 NSCLC 细胞对顺铂和足叶乙苷的敏感性。Pirpour 等<sup>[23]</sup>研究发现负载 TRG 的胶束作为 Nrf2 抑制剂,可以抑制结肠癌细胞的增殖、迁移,并能克服其对奥沙利铂的耐药性。本研究从体外水平分析了 TRG 对 NSCLC 的抑制作用。体外实验中发现,TRG 干预后抑制了 A549 细胞的存活、迁移和侵袭。体内实验结果显示,与 Model 组相比,TRG-High 组大鼠的肺重量指数、肿瘤总负荷以及肺组织的 Vimentin、CyclinD1 蛋白表达显著降低,肺组织癌细胞凋亡率显著升高,且肺组织病理性损伤减轻、肿瘤病灶减小,E-cadherin 蛋白表达水平升高。这些结果提示 TRG 能在体内水平上阻止 NSCLC 进展,可能是通过抑制 NSCLC 细胞增殖、迁移以及侵袭发挥的作用。

HIF-1 $\alpha$  在调节氧平衡、血管生成、肿瘤进展等过程中都具

有重要作用<sup>[24]</sup>。当组织或细胞缺氧或受到病理刺激时,其表达显著升高并诱导 VEGF 基因表达,促进肿瘤血管生成,进而促进肿瘤进展<sup>[25]</sup>。姚菲菲等<sup>[26]</sup>研究发现重组人 Rab17 可能通过抑制 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路的传导抑制 A549 细胞的增殖、迁移和侵袭。因此下调 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路可能作为抑制肿瘤发生发展的有效靶点之一。

本实验结果显示,与 NC 组相比,Model 组大鼠肺组织中 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 蛋白表达显著增加;与 Model 组相比,TRG-High 组大鼠肺组织 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 蛋白表达显著降低。这提示 TRG 抑制 NSCLC 可能与下调 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路有关。为了验证该猜想,本研究使用 HIF-1 $\alpha$  激活剂 DMOG 来干预高剂量 TRG 组大鼠,结果显示 DMOG 减弱了 TRG 对 NSCLC 的抑制作用。

综上所述,TRG 可能在体内水平通过下调 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路抑制 NSCLC 进展,可能与该通路可以抑制 NSCLC 细胞增殖、迁移和侵袭有关。本研究为临床治疗 NSCLC 提供了新的靶点。

#### 参考文献(References)

- [1] Abu Rous F, Singhi EK, Sridhar A, et al. Lung Cancer Treatment Advances in 2022[J]. Cancer Invest, 2023, 41(1): 12-24.
- [2] Osmani L, Askin F, Gabrielson E, et al. Current WHO guidelines and the critical role of immunohistochemical markers in the subclassification of non-small cell lung carcinoma (NSCLC): Moving from targeted therapy to immunotherapy [J]. Semin Cancer Biol, 2018, 52(Pt 1): 103-109.
- [3] Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer[J]. Nature, 2018, 553(7689): 446-454.
- [4] 刘永巧,魏颖,高佳琪,等. 葫芦巴碱对 HepG2 细胞胰岛素抵抗的影响[J]. 中医药导报, 2018, 24(4): 7-10.
- [5] Nugrahi AD, Ishida M, Nakagawa T, et al. Trigonelline: An alkaloid with anti-degranulation properties [J]. Mol Immunol, 2020, 118(2): 201-209.
- [6] Rao AS, Hegde S, Pacioretty LM, et al. Nigella sativa and Trigonella foenum-graecum Supplemented Chapatis Safely Improve HbA1c, Body Weight, Waist Circumference, Blood Lipids, and Fatty Liver in Overweight and Diabetic Subjects: A Twelve-Week Safety and Efficacy Study[J]. J Med Food, 2020, 23(9): 905-919.
- [7] Peerapen P, Thongboonkerd V. Protective roles of trigonelline against oxalate-induced epithelial-to-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells: An in vitro study [J]. Food Chem Toxicol, 2020, 135(1): 110915.
- [8] 陈玉凤,屠丽亚,李晶,等. 葫芦巴碱通过调控 Nrf2/ROS 信号通路诱导卵巢癌 SKOV-3 细胞凋亡[J]. 中药材, 2022, 45(7): 1746-1752.
- [9] 崔炜仑,高子龙,郭泽宇,等. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征日间过度嗜睡与 HIF-1 $\alpha$  水平的相关性[J]. 锦州医科大学学报, 2023, 44(06): 72-76.
- [10] Zhang N, Chen J, Ferraro GB, et al. Anti-VEGF treatment improves neurological function in tumors of the nervous system[J]. Exp Neurol, 2018, 299(Pt B): 326-333.
- [11] 吴国玉,杨俊,熊绍权,等. 人参皂苷 Rh2 对大鼠 C6 胶质瘤细胞 Siah-1、Synaptophysin、MMP9 及 VEGF 表达的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2023, 23(13): 2419-2423.

- [12] 李玲, 刘杨, 夏凡, 等. 吴茱萸碱对肺癌荷瘤小鼠生长及 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路的影响 [J]. 世界中医药, 2023, 18(13): 1867-1871.
- [13] Fouzder C, Mukhty A, Mukherjee S, et al. Trigonelline inhibits Nrf2 via EGFR signalling pathway and augments efficacy of Cisplatin and Etoposide in NSCLC cells[J]. Toxicol In Vitro, 2021, 70(1): 105038.
- [14] 姚刘旭, 滕文彬, 黄素琴, 等. mTOR/P70S6K/HIF-1 $\alpha$  信号通路在脂多糖诱导 Caco-2 细胞屏障损伤中的作用及机制[J]. 中国病理生理杂志, 2022, 38(1): 122-129.
- [15] Wang H, Jia R, Lv T, et al. Resveratrol Suppresses Tumor Progression via Inhibiting STAT3/HIF-1 $\alpha$ /VEGF Pathway in an Orthotopic Rat Model of Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC)[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13(6): 7057-7063.
- [16] Khalili M, Alavi M, Esmail-Jamaat E, et al. Trigonelline mitigates lipopolysaccharide-induced learning and memory impairment in the rat due to its anti-oxidative and anti-inflammatory effect [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 61(1): 355-362.
- [17] 王玉龙, 滕文彬, 单跃, 等. HIF-1 $\alpha$  激动剂或拮抗剂对腺毒蛙大鼠肠道黏膜通透性的影响 [J]. 基础医学与临床, 2021, 41(11): 1618-1623.
- [18] Song JM, Molla K, Anandharaj A, et al. Triptolide suppresses the in vitro and in vivo growth of lung cancer cells by targeting hyaluronan-CD44/RHAMM signaling [J]. Oncotarget, 2017, 8(16): 26927-26940.
- [19] Wood DE, Kazerooni EA, Baum SL, et al. Lung Cancer Screening, Version 3.2018, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2018, 16(4): 412-441.
- [20] 辜正策, 邓小婧, 李璐池. 赤芍总苷对肺癌大鼠肺组织的作用机制 [J]. 世界中医药, 2022, 17(2): 177-181.
- [21] 林涛, 耿慧春, 陈兴连, 等. 葫芦巴碱标准物质的研制[J]. 化学分析计量, 2018, 27(4): 1-5.
- [22] 翟润, 厉冰, 张海洋, 等. 葫芦巴碱对荷胆囊癌小鼠抑制作用及其机制[J]. 中华实验外科杂志, 2021, 38(12): 2410-2413.
- [23] Pirpour Tazehkand A, Salehi R, Velaei K, et al. The potential impact of trigonelline loaded micelles on Nrf2 suppression to overcome oxaliplatin resistance in colon cancer cells[J]. Mol Biol Rep, 2020, 47(8): 5817-5829.
- [24] 陈水龄, 元泽峰, 褚文丽, 等. 姜黄素通过 AKT/HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路在体外抑制脉络膜新生血管的机制 [J]. 国际眼科杂志, 2022, 22(4): 541-548.
- [25] 刘黎, 杨帆, 张匠, 等. 下调 miR-155 通过抑制 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 通路增强人结直肠癌细胞的放射敏感性 [J]. 广西医科大学学报, 2021, 38(7): 1356-1362.
- [26] 姚菲菲, 王富霞, 李增艳. 重组人 Rab17 通过调节 STAT3/HIF- $\alpha$ /VEGF 信号通路影响非小细胞肺癌增殖和侵袭[J]. 临床肺科杂志, 2020, 25(10): 1473-1477.

(上接第 3474 页)

- [22] Bitter EE, Skidmore J, Allen CI, et al. TK1 expression influences pathogenicity by cell cycle progression, cellular migration, and cellular survival in HCC 1806 breast cancer cells[J]. PLoS One, 2023, 18(11): e0293128.
- [23] Huang P, Zhou X, Zheng M, et al. Regulatory T cells are associated with the tumor immune microenvironment and immunotherapy response in triple-negative breast cancer [J]. Front Immunol, 2023, 9(14): 1263537.
- [24] 郭军华, 陈检明, 宋志明, 等. 血清 sCD 105、Periostin、TK1 在 III A-N2 期非小细胞肺癌患者根治性切除术后复发中的临床应用价值研究[J]. 现代生物医学进展, 2023, 23(6): 1095-1099.
- [25] 刘晶晶, 丁琼, 高明, 等. 人生长分化因子 3 白细胞介素 -1 $\beta$  及胸苷激酶 1 在乳腺癌患者中的表达及意义 [J]. 中国妇幼保健, 2021, 36(12): 2700-2702.
- [26] 中国抗癌协会肿瘤营养专业委员会, 中华医学会肠外肠内营养学分会. 乳腺癌患者的营养治疗专家共识 [J]. 肿瘤代谢与营养电子杂志, 2021, 8(4): 374-379.
- [27] Sambataro D, Politi MR, Messina A, et al. Relationship of inflammatory parameters and nutritional status in cancer patients[J]. Anticancer Res, 2023, 43(6): 2821-2829.
- [28] Manolis AA, Manolis TA, Melita H, et al. Low serum albumin: A neglected predictor in patients with cardiovascular disease [J]. Eur J Intern Med, 2022, 8(102): 24-39.
- [29] 祝保玺, 王锐, 任小伟, 等. CD64 指数、C 反应蛋白与清蛋白比值对乳腺癌改良根治术后感染的预测价值 [J]. 肿瘤研究与临床, 2023, 35(2): 124-127.
- [30] Bossi P, Delrio P, Mascheroni A, et al. The spectrum of malnutrition/cachexia/sarcopenia in oncology according to different cancer types and settings: a narrative review [J]. Nutrients, 2021, 13(6): 1980.