

## · 基础研究 ·

# 重楼皂苷 VII 通过 DNA 损伤介导的 p53 信号通路 诱导肺腺癌循环肿瘤细胞簇凋亡

上官文姬<sup>1, 2</sup> 于盼<sup>3</sup> 钱芳芳<sup>1</sup> 王盼盼<sup>3</sup> 阙祖俊<sup>3, 4</sup> 田建辉<sup>1, 3, 4</sup>

**摘要** 目的 研究中药复方金复康中有效组分重楼皂苷 VII 诱导人肺腺癌循环肿瘤细胞簇 (CTC-TJH-01) 凋亡的作用及机制。方法 采用不同浓度的重楼皂苷 VII (0、1.2、2.5、5、10、20  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理悬浮培养的 CTC-TJH-01 细胞簇, CCK-8 法检测对 CTC-TJH-01 细胞簇增殖的影响; FCM 法检测对细胞周期和细胞凋亡的影响; Hoechst 33258 染色后免疫荧光法检测对细胞核损伤的影响; RNA-seq 法检测对细胞基因表达的影响, 并用 Omics Bean-Cancer 数据库分析差异基因及涉及的信号通路; 蛋白质印迹法检测 DNA 损伤相关蛋白和 p53 信号通路相关蛋白的表达水平。结果 重楼皂苷 VII 的浓度高于为 2.5  $\mu\text{mol/L}$  时可抑制 CTC-TJH-01 细胞簇的增殖 ( $P < 0.05$ ); 浓度为 1.8、3.6  $\mu\text{mol/L}$  时即可诱导 CTC-TJH-01 细胞簇的细胞周期阻滞在 G0/G1 期 ( $P < 0.05$ ); 浓度为 3.6  $\mu\text{mol/L}$  时可诱导 CTC-TJH-01 细胞簇发生凋亡, 且细胞核的荧光呈现高亮状 ( $P < 0.05$ ); 蛋白质印迹法检测结果显示 DNA 损伤相关蛋白 DFF45 的表达水平下调; RNA-seq 结果显示差异基因主要涉及 p53 和细胞周期信号通路, 蛋白质印迹法检测结果显示, 重楼皂苷 VII 可上调 Cleaved-caspase 3、p53、p21 蛋白的表达水平, 下调 Cyclin E、CDK2 蛋白表达水平 ( $P < 0.05$ )。结论 重楼皂苷 VII 通过调控 DNA 损伤诱导肺腺癌循环肿瘤细胞簇凋亡, 进而通过 p53 信号通路抑制肺腺癌循环肿瘤细胞簇增殖, 这可能是金复康发挥抗肺癌转移作用的机制之一。

**关键词** 肺癌; 循环肿瘤细胞簇; DNA 损伤; 重楼皂苷 VII; 中药

**Polyphyllin VII Induces Apoptosis of Circulating Tumor Cell Clusters in Lung Adenocarcinoma by DNA Damage-Mediated p53 Signal Pathway** SHANGGUAN Wen-ji<sup>1, 2</sup>, YU Pan<sup>3</sup>, QIAN Fang-fang<sup>1</sup>, WANG Pan-pan<sup>3</sup>, QUE Zu-jun<sup>3, 4</sup>, and TIAN Jian-hui<sup>1, 3, 4</sup> 1 Department of Oncology, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (200032); 2 Department of Traditional Chinese Medicine, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai (200127); 3 Cancer Clinical Medical Center, Shanghai Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (200071); 4 Oncology Institute of Traditional Chinese Medicine, Shanghai Academy of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (200032)

**ABSTRACT Objective** To investigate the effect and mechanism of Polyphyllin VII, an active component of Chinese decoction Jinfukang, in inducing the apoptosis of circulating tumor cell clusters (CTC-TJH-01) in lung adenocarcinoma. **Methods** After suspension CTC-TJH-01 clusters were treated with different concentrations of Polyphyllin VII (0, 1.2, 2.5, 5, 10, 20  $\mu\text{mol/L}$ ), the influence on the proliferation of CTC-TJH-01 clusters was detected by CCK-8 assay. The influence on cell cycle and apoptosis was detected by flow cytometry. The effect on nuclear damage was detected by immunofluorescence assay after Hoechst 33258 staining, The effect on gene expression was detected by RNA-seq, and the differential genes and involved signal pathways were analyzed by Omics Bean-Cancer database. The expression levels of DNA damage-related proteins and p53 signal pathway

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No.81973517); 国家自然科学基金青年项目 (No.81803777)

作者单位: 1. 上海中医药大学附属龙华医院肿瘤科 (上海 200032); 2. 上海交通大学医学院附属仁济医院中医科 (上海 200127); 3. 上海中医药大学附属市中医医院肿瘤临床医学中心 (上海 200071); 4. 上海市中医药研究院中医肿瘤研究所 (上海 200032)

通讯作者: 田建辉, Tel: 021-56639828, Email: tjhhawk@shutcm.edu.cn

DOI: 10.7661/j.cjm.20220606.018

related proteins were detected by Western Blot. **Results** Polyphyllin VII can significantly inhibit the proliferation of CTC-TJH-01 clusters at concentrations over 2.5  $\mu\text{mol/L}$  ( $P<0.05$ ), induce the cell cycle arrest of CTC-TJH-01 clusters at the of phase G0/G1 at concentrations 1.8 and 3.6  $\mu\text{mol/L}$  ( $P<0.05$ ), and induce the apoptosis of CTC-TJH-01 clusters and the bright fluorescence of the nuclei at the concentration of 3.6  $\mu\text{mol/L}$  ( $P<0.05$ ). The result of Western Blot showed that expression of DNA damage-related protein DFF45 was down-regulated, the expression levels of Cleaved-caspase3, p53 and p21 proteins were up-regulated, but the expression levels of Cyclin E and CDK2 proteins were down-regulated ( $P<0.05$ ). The RNA-seq result showed that differentially expressed genes were mainly involved in p53 and the cell cycle signal pathway. **Conclusion** Polyphyllin VII can induce the apoptosis of circulating tumor cell clusters in lung adenocarcinoma by regulating DNA damage, and inhibit the proliferation of circulating tumor cell clusters through the p53 signal pathway, which is probably the mechanism of preventing and treating lung cancer metastasis by Jinfukang.

**KEYWORDS** lung cancer; circulating tumor cell clusters; DNA damage; Polyphyllin VII; Chinese herb

流行病学调查显示,肺癌是导致恶性肿瘤患者死亡的首要原因,而转移是导致 90% 肿瘤患者死亡的关键临床事件<sup>[1]</sup>。转移的发生包括原发灶、外周循环和转移灶等多个环节,其中循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)是从原发灶脱落后在外周血中循环进而引起转移的关键环节<sup>[2]</sup>,因此靶向 CTCs 研发抗肺癌转移新药具有重大的临床意义。田建辉在传承国医大师刘嘉湘教授“扶正治癌”学术思想的基础上,融合《黄帝内经》“正气”理论和现代肿瘤学进展,创新提出“正虚伏毒”为肺癌转移核心病机的学说,认为免疫抑制、免疫逃逸、免疫衰老等免疫功能紊乱为“正气亏虚”的表现,而将循环肿瘤细胞、肿瘤干细胞和休眠肿瘤细胞等归纳为“伏毒”范畴,“正气”与“伏毒”相互博弈,正胜则伏而不作,正虚则出而为病<sup>[3]</sup>。临床研究发现,肺癌术后患者外周血中 CTCs 的数目与远期复发转移呈正相关<sup>[4]</sup>。课题组前期从 1 例 II a 期女性肺腺癌患者外周血中成功富集分离了 CTCs,建立了首株稳定传代的人肺腺癌循环肿瘤细胞系,命名为 CTC-TJH-01<sup>[5]</sup>。为模拟 CTCs 在人体外周血中的生长状态,课题组采用超低吸附的培养皿对 CTC-TJH-01 细胞进行 3D 悬浮培养,发现其具有聚集成簇的特性。

临床研究表明,金复康口服液具有改善非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者症状、提高免疫功能、延长生存期和预防复发转移的功效<sup>[6]</sup>。重楼皂苷 VII 是金复康组分重楼的有效活性成分,已有研究发现其可通过活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)/核因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B)/NLR 结构域蛋白(LRR and PYD domains-containing protein 3, NLRP3)/GSDMD 蛋白(gasdermin D)信号轴诱导半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(cysteiny l aspartate specific proteinase,

Caspase) 1 介导的人肺癌细胞 A549 及 H1299 发生凋亡<sup>[7]</sup>,然而对 CTC-TJH-01 细胞的作用及机制尚不明确。因此,本研究在前期基础上进一步探讨重楼皂苷 VII 对 CTC-TJH-01 细胞簇的影响,旨在为中医药防治肺癌转移提供新的策略。

## 材料与方 法

1 细胞 人肺腺癌循环肿瘤细胞(CTC-TJH-01),由田建辉课题组与施奇惠课题组联合从 II a 期肺腺癌患者外周血中富集、分离、培养建立细胞系<sup>[5, 8]</sup>。CTC-TJH-01 细胞采用含 10% 胎牛血清的 F12K 完全培养基,使用超低吸附培养皿(购自美国 Corning 公司),置于 37℃、含 5% CO<sub>2</sub>、70% 湿度的培养箱中培养。

2 实验药物 重楼皂苷 VII 单体(SP8480),纯度  $\geq 98\%$ ,购自北京索莱宝生物科技有限公司。

3 主要试剂及仪器 F12K 培养液(21127-022)、胎牛血清(10099-141)及胰蛋白酶(25200-056)等均购自美国 Gibco 公司;CCK-8 检测试剂盒(CK04)购自日本同仁株式会社化学研究所;细胞周期与凋亡(C1052)、Hoechst 33528(C0003)染色试剂盒均购自碧云天生物技术公司;鼠抗人 GAPDH、兔抗人 DFF45 和兔抗人 PARP 单克隆抗体购自美国 Proteintech 公司;兔抗人 Cleaved-caspase 3、兔抗人 ACINUS、兔抗人 GAS、兔抗人 Cyclin E、兔抗人 CDK2 单克隆抗体和鼠抗人 p53、兔抗人 p21 多克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 和羊抗鼠 IgG 购自美国 Rockland 公司。FACS Verse 全自动多色分析流式细胞仪系统,美国 BD Biosciences; TCS-SP8 激光共聚焦显微镜、DMI3000B 荧光倒置显微镜均购自德国 Leica 公司;Mini-PROTEAN Tetra 蛋白

垂直电泳系统、GelDoc XR 凝胶成像系统均购自美国 Bio-Rad 公司。

**4 CCK-8 法检测 CTC-TJH-01 细胞簇增殖** 将对数生长期的贴壁培养的 CTC-TJH-01 细胞传代后,接种于超低吸附培养皿中培养,使其处于悬浮状态。72 h 后收集细胞,消化成单细胞后,以  $1 \times 10^5$  个/mL 的细胞密度,每孔 0.1 mL 接种于超低吸附的 96 孔板内,每组设 3 个复孔。24 h 后加入用 F12K 培养基配制的含不同药物浓度的重楼皂苷 VII (0、1.2、2.5、5、10、20  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理,同时设立空白对照孔。药物作用 48 h 后,每孔加入 10  $\mu\text{L}$  的 CCK-8 溶液,继续培养 3 h 后,采用酶联免疫检测仪在波长为 450 nm 处测量各孔的 OD 值,并计算细胞的存活率。细胞存活率 (%) = (实验组 OD 值 - 空白对照组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白对照组 OD 值)  $\times 100\%$ 。

**5 FCM 法检测 CTC-TJH-01 细胞簇细胞周期和细胞凋亡** 细胞周期:将悬浮培养的 CTC-TJH-01 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔的密度接种于超低吸附的 24 孔板中,24 h 后加入用 F12K 培养基配制的不同浓度重楼皂苷 VII (0、1.8、3.6  $\mu\text{mol/L}$ ) 进行处理,每组设 3 个复孔;药物作用 48 h 后收集并消化为单细胞悬液,离心弃上清,加入预冷的 70% 乙醇置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱内固定 2 h;离心弃上清并用 PBS 洗涤 1 遍;每个样品加入 400  $\mu\text{L}$  的碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染液,室温下避光染色 30 min,采用流式细胞仪检测细胞周期。细胞凋亡:细胞培养和药物处理同上,消化为单细胞悬液,离心弃上清;用 Binding Buffer 洗涤细胞 1 次,离心弃上清后加入 200  $\mu\text{L}$  的 Binding Buffer 重悬细胞,再加入 5  $\mu\text{L}$  的 Annexin V -FITC 避光染色 15 min;离心弃上清,用 100  $\mu\text{L}$  的 Binding Buffer 重悬细胞,再加入 5  $\mu\text{L}$  的 PI 染液避光染色 5 min;加入 Binding Buffer 补足细胞悬液至 300  $\mu\text{L}$  以上,最后使用流式细胞仪检测。实验数据应用 Flowjo 软件分析。

**6 Hoechst 33258 染色法检测 CTC-TJH-01 细胞簇核形态** 将悬浮培养的 CTC-TJH-01 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔的密度接种于超低吸附的 24 孔板中,24 h 后加入用 F12K 培养基配制的不同浓度重楼皂苷 VII (0、1.8、3.6  $\mu\text{mol/L}$ ) 进行处理,每组设 3 个复孔;药物作用 48 h 后收集细胞簇,离心弃上清;加入 0.3 mL 固定液室温固定 10 min,离心弃上清;用 2 mL 的 PBS 洗涤细胞 2 遍;加入 0.5 mL 的 Hoechst 33258 染液,充分混匀后室温染色 5 min;随后将细胞转移至激光共聚焦的小皿内,在荧光显微镜下观察并

拍照。

**7 蛋白质印迹法检测 CTC-TJH-01 细胞簇增殖和凋亡相关蛋白表达** 将悬浮培养的 CTC-TJH-01 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔的密度接种于超低吸附的 24 孔板中,24 h 后加入用 F12K 培养基配制的不同浓度重楼皂苷 VII (0、1.8、3.6  $\mu\text{mol/L}$ ) 进行处理,药物作用 48 h 后收集细胞,用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,并用 BCA 法检测蛋白浓度;各取 40  $\mu\text{g}$ /孔蛋白上样行 SDS-PAGE 分离蛋白,将电泳分离后的蛋白转移至 PVDF 膜上;用含 5% 脱脂奶粉的封闭液处理后,分别加入一抗 [鼠抗人 GAPDH (内参)、兔抗人 DFF45 和兔抗人 PARP 单克隆抗体,兔抗人 Cleaved-caspase 3、兔抗人 ACINUS、兔抗人 GAS、兔抗人 Cyclin E、兔抗人 CDK2 单克隆抗体和鼠抗人 p53、兔抗人 p21 多克隆抗体 (体积稀释比例均为 1:1 000)] 4  $^{\circ}\text{C}$  反应过夜;TBST 洗涤 4 次,每次 5 min;再加入二抗 [辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 和羊抗鼠 IgG (体积稀释比例均为 1:2 000)] 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下进行反应;再用 TBST 洗涤 4 次,每次 5 min;最后加入 ECL 发光液采用 UVP 显影仪进行显影。数据图片应用 Image J 软件分析目的条带的灰度值,以目的条带与内参蛋白的灰度值比值表示目的蛋白的相对表达量。

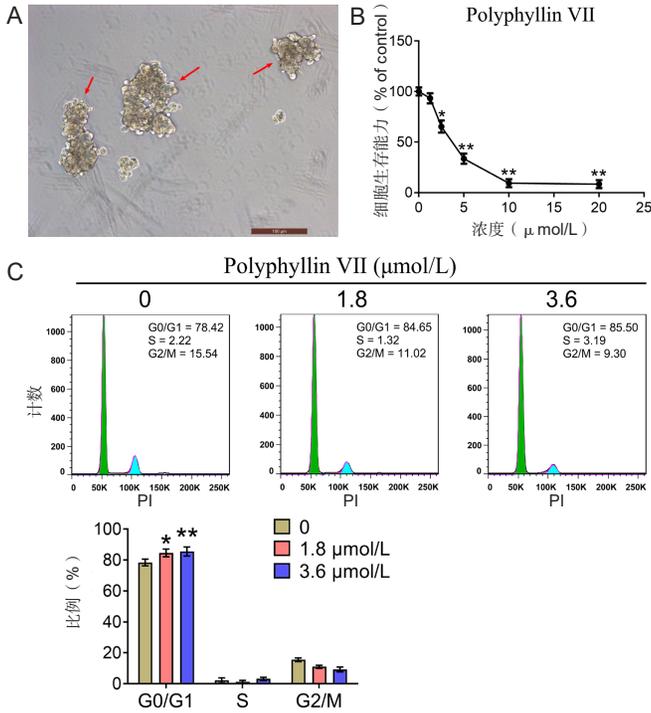
**8 RNA-seq 检测 CTC-TJH-01 细胞簇基因表达** 将悬浮培养的 CTC-TJH-01 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔的密度接种于超低吸附的 24 孔板中,24 h 后加入用 F12K 培养基配制的不同浓度重楼皂苷 VII (0、3.6  $\mu\text{mol/L}$ ) 进行处理,每组设立 3 个复孔,药物作用 48 h 后收集细胞,送至上海鲸舟基因科技有限公司进行测序。采用 OmicsBean-Cancer 数据库对差异基因进行功能富集和 KEGG 信号通路富集。

**9 统计学方法** 采用 SPSS 25.0 统计软件对实验数据进行统计学分析,所有实验均独立重复 3 次。采用 GraphPad Prism 8.0 软件对实验数据和统计结果进行绘图。单因素方差分析比较组间差异, LSD 检验比较组内差异。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

**1 重楼皂苷 VII 抑制 CTC-TJH-01 细胞簇增殖 (图 1)** CTC-TJH-01 在悬浮培养条件下聚集成簇 (图 1A);重楼皂苷 VII 的药物浓度为 2.5、5、10、20  $\mu\text{mol/L}$  时对 CTC-TJH-01 细胞簇的增殖具有明显的细胞毒作用,并呈现浓度依赖性 ( $P < 0.05$ )。重楼皂苷 VII 作用 CTC-TJH-01 细胞簇 48 h 时的  $\text{IC}_{50}$  值

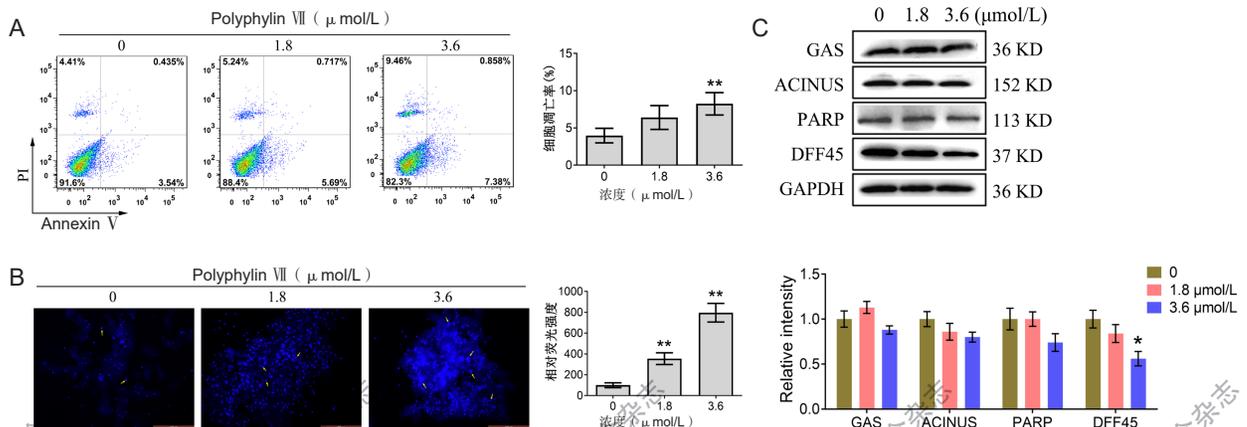
约为 3.6  $\mu\text{mol/L}$ ，因此，后续实验采用 1/2  $\text{IC}_{50}$  值和  $\text{IC}_{50}$  值的药物浓度进行研究。重楼皂苷 VII 干预 CTC-TJH-01 细胞簇 48 h 后，与空白对照组 (0  $\mu\text{mol/L}$ ) 比较，重楼皂苷 VII 浓度为 1.8、3.6  $\mu\text{mol/L}$  时可将 CTC-TJH-01 细胞簇的细胞周期阻滞在 G0/G1 期 ( $P < 0.05$ )。



注：A 为箭头所指为显微镜下观察的 CTC-TJH-01 细胞簇；B 为 CCK-8 法检测不同药物浓度的重楼皂苷 VII 对 CTC-TJH-01 细胞簇增殖的影响；C 为重楼皂苷 VII 干预 CTC-TJH-01 细胞簇 48 h 后，流式细胞术检测细胞周期分布情况；与 0  $\mu\text{mol/L}$  组比较，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$

图 1 不同浓度重楼皂苷 VII 对 CTC-TJH-01 细胞簇增殖的影响

## 2 重楼皂苷 VII 诱导 CTC-TJH-01 细胞簇凋亡 (图 2)



注：A 为重楼皂苷 VII 干预 CTC-TJH-01 细胞簇 48 h 后，流式细胞术检测细胞凋亡情况；B 为 Hoechst 33258 染色实验检测 CTC-TJH-01 细胞簇的凋亡情况，箭头所指为凋亡的 CTC-TJH-01 细胞；C 为蛋白质免疫印迹法检测重楼皂苷 VII 对 CTC-TJH-01 细胞簇中 DNA 损伤相关蛋白表达的影响；与 0  $\mu\text{mol/L}$  比较，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$

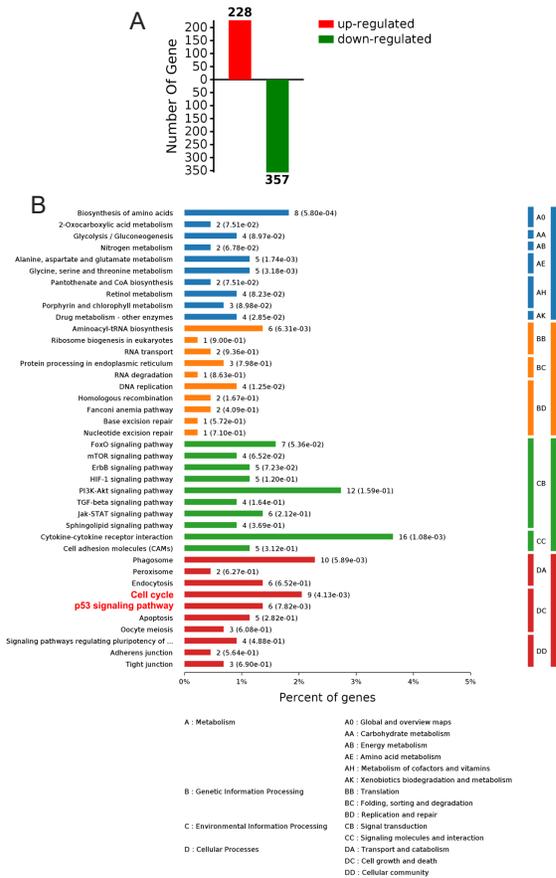
图 2 不同浓度的重楼皂苷 VII 对 CTC-TJH-01 细胞簇凋亡的影响

较，高浓度重楼皂苷 VII (3.6  $\mu\text{mol/L}$ ) 可诱导 CTC-TJH-01 细胞簇发生凋亡 ( $P < 0.01$ )。Hoechst 33258 染色结果同样显示，1.8  $\mu\text{mol/L}$  和 3.6  $\mu\text{mol/L}$  的重楼皂苷 VII 干预 CTC-TJH-01 细胞簇后，细胞核呈现出高亮荧光，且荧光强度与药物浓度呈正相关 ( $P < 0.01$ )。通过对 DNA 损伤相关蛋白的检测发现，与对照组比较，高浓度组 DFF45 蛋白表达下调 ( $P < 0.05$ )。

3 重楼皂苷 VII 抑制 CTC-TJH-01 细胞簇增殖并诱导其凋亡的作用机制 (图 3、4) 重楼皂苷 VII (3.6  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理 CTC-TJH-01 细胞簇 48 h 后，转录组测序结果显示，与对照组比较，重楼皂苷 VII 组共有 228 个基因表达上调，357 个基因表达下调 (差异 1.5 倍)。通过对差异表达基因进行 KEGG 信号通路富集分析发现，与肿瘤增殖相关且差异显著的信号通路主要有细胞周期和 p53 信号通路 (图 3B)。在 p53 信号通路中，p21、Gadd45 和 Sestrins 基因表达上调，而 Cyclin E、CDK2 和 IGF-BP3 基因表达下调 (图 3C)。通过蛋白质免疫印迹实验检测发现，重楼皂苷 VII 处理 CTC-TJH-01 细胞簇 48 h 后，与对照组比较，Cleaved-caspase 3、p53 和 p21 蛋白的表达上调，而 Cyclin E 和 CDK2 蛋白的表达显著下调 ( $P < 0.01$ )。

## 讨论

肿瘤复发转移是导致肺癌患者预后不良的主要原因，由于肺癌早期术后患者外周血中存在 CTCs，这些 CTCs 最终会导致肺癌复发和转移。课题组前期研究也发现，NSCLC 患者外周血中 CTCs 数目与临床分期呈负相关，肺癌早期术后患者 CTCs 的数量甚至高于晚期肺癌无法手术的患者<sup>[9]</sup>，提示靶向



注: A 为重楼皂苷 VII (3.6 μmol/L) 作用 CTC-TJH-01 细胞簇 48 h 后, 转录组测序分析差异 1.5 倍以上的基因数目; B 为差异基因 KEGG 信号通路富集分析; C 为 p53 信号通路相关基因差异表达情况; D 为蛋白质免疫印迹法检测不同浓度的重楼皂苷 VII 对 CTC-TJH-01 细胞簇中 Cleaved-caspase 3、p53、p21、Cyclin E 和 CDK2 蛋白表达的影响, 以 GAPDH 作为内参蛋白; 与 0 μmol/L 比较, \*P<0.05, \*\*P<0.01

图 3 重楼皂苷 VII 诱导 CTC-TJH-01 细胞簇凋亡的作用机制

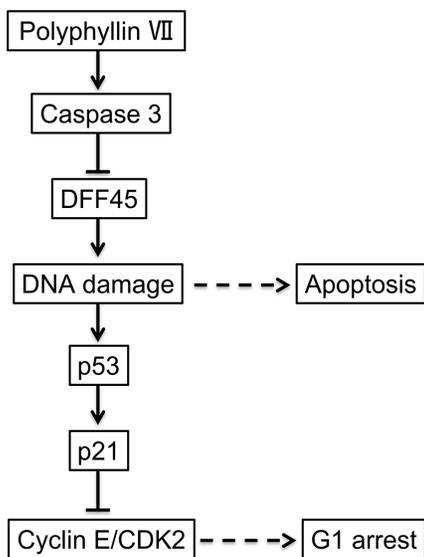


图 4 重楼皂苷 VII 抑制 CTC-TJH-01 细胞簇增殖并诱导其凋亡的作用机制示意图

杀伤 CTCs 对预防肺癌转移和提高患者生存期具有重要的意义。

研究表明, CTCs 簇比具有相同遗传背景的单

CTCs 具有更强的转移能力<sup>[10, 11]</sup>。Aceto N 等<sup>[10]</sup>在小鼠体内研究发现, 单个 CTCs 形成细胞簇之后, 其转移潜能增加了 23~50 倍, 且小鼠的生存期显著缩短。临床研究也发现可检出 CTCs 簇的乳腺癌患者转移发生的时间和生存期都更短<sup>[10, 12, 13]</sup>, 而在肺癌、结直肠癌和肝癌等癌种中也有类似的报道<sup>[14-17]</sup>。由于单个 CTCs 形成细胞簇之后有利于其获得失巢凋亡抵抗和免疫逃逸的能力, 这促进了转移的发生<sup>[18, 19]</sup>。因此, 靶向杀伤 CTCs 簇对于防治肺癌转移具有重要意义。

金复康口服液为国医大师刘嘉湘教授发明的国家级肺癌治疗新药, 具有益气养阴、解毒抗癌的功效, 临床应用广泛。研究发现, 金复康可抑制 Integrin/ Src 信号通路诱导 CTC-TJH-01 细胞失巢凋亡<sup>[20]</sup>。正常贴壁细胞长时间处于悬浮状态即可导致失巢凋亡, 然而, 本研究发现, CTC-TJH-01 细胞经悬浮培养后并未发生失巢凋亡, 而是聚集成簇并进入休眠状态, 表现为 Ki-67 蛋白表达下调和低增殖活性, 且对化疗药物紫杉醇和顺铂表现出耐药性 (数据待发表)。

重楼皂苷 VII 是中药重楼的主要有效活性成分之一, 前期研究表明, 重楼皂苷 VII 对众多癌种的癌细胞都具有很强的抑制作用。本研究也发现重楼皂苷 VII 对 CTC-TJH-01 细胞簇具有细胞毒作用, 可抑制其增殖, 将其细胞周期阻滞在 G0/G1 期, 且诱导其发生 DNA 损伤相关的细胞凋亡<sup>[21]</sup>。Wang H 等<sup>[22]</sup> 研究也发现重楼皂苷 VII 具有增强吉非替尼抑制 H1975 细胞增殖的作用, 并将 H1975 细胞的增殖阻滞在 G1 期。然而, 也有研究表明, 重楼皂苷 VII 可抑制 A549 和 NCI-H1299 细胞的增殖, 并将细胞周期阻滞在 G2/M 期<sup>[23]</sup>。此外, 重楼皂苷 VII 被证明通过抑制磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) / 蛋白激酶 (AKT)、NF- $\kappa$ B 信号通路诱导 A549 细胞发生凋亡<sup>[24]</sup>。本研究发现, 重楼皂苷 VII 一方面通过激活 Caspase 3 剪切 DFF45, 诱导 DNA 损伤相关的细胞凋亡, 另一方面通过激活 p53/p21 通路, 下调细胞周期相关蛋白 Cyclin E 和 CDK2 的表达水平, 从而将 CTC-TJH-01 细胞周期阻滞于 G0/G1 期。

综上所述, 本研究初步揭示了重楼皂苷 VII 诱导 CTC-TJH-01 细胞簇凋亡的作用及机制, 而诱导肺癌患者外周血中的 CTCs 簇凋亡, 可能是重楼皂苷 VII 发挥抗肺癌转移的作用机制, 这为金复康抗肺癌转移的临床疗效提供了科学依据, 同时也丰富了“正虚伏毒”肺癌转移核心病机的内涵。

**利益冲突:** 无利益冲突。

#### 参 考 文 献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, DOI: 10.3322/caac.21660.
- [2] Ganesh K, Massagué J. Targeting metastatic cancer[J]. Nature Med, 2021, 27 (1): 34-44.
- [3] 田建辉. 中西医融合提高肿瘤综合治疗疗效的思考[J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37 (9): 1032-1033.
- [4] Li Z, Xu K, Tartarone A, et al. Circulating tumor cells can predict the prognosis of patients with non-small cell lung cancer after resection: a retrospective study[J]. Transl Lung Cancer Res, 2021, 10 (2): 995-1006.
- [5] Que Z, Luo B, Zhou Z, et al. Establishment and characterization of a patient-derived circulating lung tumor cell line *in vitro* and *in vivo*[J]. Cancer Cell Int, 2019, 19: 21.
- [6] 刘嘉湘, 潘敏求, 黎月恒, 等. 金复康口服液治疗原发性非小细胞肺癌临床研究[J]. 肿瘤, 2001, 6: 463-465.
- [7] Teng JF, Mei QB, Zhou XG, et al. Polyphyllin VI induces caspase-1-mediated pyroptosis via the induction of ROS/NF- $\kappa$ B/NLRP3/GSDMD signal axis in non-small cell lung cancer[J]. Cancers, 2020, 12 (1), DOI: 10.3390/cancers12010193.
- [8] Wang Z, Wu W, Wang Z, et al. *Ex vivo* expansion of circulating lung tumor cells based on one-step microfluidics-based immunomagnetic isolation[J]. Analyst, 2016, 141 (12): 3621-3625.
- [9] 田建辉, 罗斌, 毕凌, 等. 非小细胞肺癌循环肿瘤细胞表达规律及其与“伏邪”致病关系的研究[J]. 上海中医药杂志, 2016, 50 (1): 15-19, 33.
- [10] Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis[J]. Cell, 2014, 158 (5): 1110-1122.
- [11] Liu X, Taftaf R, Kawaguchi M, et al. Homophilic CD44 interactions mediate tumor cell aggregation and polyclonal metastasis in patient-derived breast cancer models[J]. Cancer Discov, 2019, 9 (1): 96-113.
- [12] Cheung KJ, Padmanaban V, Silvestri V, et al. Polyclonal breast cancer metastases arise from collective dissemination of keratin 14-expressing tumor cell clusters[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113 (7): E854-863.
- [13] Costa C, Muinelo-Romay L, Cebey-López V, et al. Analysis of a real-world cohort of metastatic breast cancer patients shows circulating tumor cell clusters (CTC-clusters) as predictors of patient outcomes[J]. Cancers, 2020, 12 (5): 32365530.
- [14] Zeinali M, Lee M, Nadhan A, et al. High-throughput label-free isolation of heterogeneous circulating tumor cells and CTC clusters from non-small-cell lung cancer patients[J]. Cancers, 2020, 12 (1): 127, doi: 10.3390/cancers12010127.
- [15] Guan Y, Xu F, Tian J, et al. The prognostic value of circulating tumour cells (CTCs) and CTC white blood cell clusters in patients with renal cell

- carcinoma[J]. BMC cancer, 2021, 21 ( 1 ): 826.
- [ 16 ] Yu JJ, Shu C, Yang HY, et al. The presence of circulating tumor cell cluster characterizes an aggressive hepatocellular carcinoma subtype[J]. Front Oncol, 2021, 11: 734564.
- [ 17 ] Qiu Y, Zhang X, Deng X, et al. Circulating tumor cell-associated white blood cell cluster is associated with poor survival of patients with gastric cancer following radical gastrectomy[J]. Eur J Surg Oncol, 2022, 48 ( 5 ): 1039–1045.
- [ 18 ] Marrella A, Fedi A, Varani G, et al. High blood flow shear stress values are associated with circulating tumor cells cluster disaggregation in a multi-channel microfluidic device[J]. PloS One, 2021, 16 ( 1 ): e0245536.
- [ 19 ] Ward MP, Kane LE, Norris LA, et al. Platelets, immune cells and the coagulation cascade; friend or foe of the circulating tumour cell?[J]. Mol Cancer, 2021, 20 ( 1 ): 59.
- [ 20 ] Que ZJ, Yang Y, Liu HT, et al. Jinfukang regulates integrin/Src pathway and anoikis mediating circulating lung cancer cells migration[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 267: 113473.
- [ 21 ] Que Z, Zhou Z, Luo B, et al. Jingfukang induces anti-cancer activity through oxidative stress-mediated DNA damage in circulating human lung cancer cells[J]. BMC Complement Altern Med, 2019, 19 ( 1 ): 204.
- [ 22 ] Wang H, Fei Z, Jiang H. Polyphyllin VII increases sensitivity to gefitinib by modulating the elevation of p21 in acquired gefitinib resistant non-small cell lung cancer[J]. J Pharmacol Sci, 2017, 134 ( 3 ): 190–196.
- [ 23 ] Lin Z, Liu Y, Li F, et al. Anti-lung cancer effects of Polyphyllin VI and VII potentially correlate with apoptosis *in vitro* and *in vivo*[J]. Phytother Res, 2015, 29 ( 10 ): 1568–1576.
- [ 24 ] He H, Xu C, Zheng L, et al. Polyphyllin VII induces apoptotic cell death via inhibition of the PI3K/Akt and NF- $\kappa$  B pathways in A549 human lung cancer cells[J]. Mol Med Rep, 2020, 21 ( 2 ): 597–606.

(收稿: 2021-08-11 在线: 2022-07-01)

责任编辑: 赵芳芳

## 第十次世界中西医结合大会征文通知

由中国中西医结合学会主办, 四川省中西医结合学会承办的第十次世界中西医结合大会定于 2022 年 12 月上旬在四川省成都市召开。大会将全面展示近年来世界结合医学的最新成果和研究进展, 并邀请国内外著名专家学者进行精彩报告, 通过相互交流和共同提高, 促进医学创新。征文通知如下。

### 征文内容:

1. 中西医结合理论研究, 包括对结合医学学术地位与作用的认识, 对新形势下发展结合医学的思路、途径和方法的理论探讨与经验总结等。
2. 近五年来结合医学在临床、基础、药学、教学、学科建设、政策研究等方面取得的重要成果和宝贵经验。
3. 结合医学各临床专业学科新诊疗经验的总结和分析, 中西医结合新技术、新方法的推介与评价, 以及实现科研成果向临床应用转化的新经验与新模式。
4. 中西医结合优势病种临床诊疗路径的实践经验与临床共性问题的探讨, 中西医结合标准化研究等。
5. 结合医学的未来研究, 以及其他促进结合医学发展的相关研究等。

### 征文要求:

1. 向本次大会所提交的论文应为未正式发表的论文全文;
2. 中、英文摘要约 800 字;
3. 投稿前应成为大会官网正式注册用户并详细填写真实信息, 务必注明作者所属专业委员会(专业)、工作单位、职务职称、通讯地址、电子邮箱及手机号码等信息。
4. 投稿方式: 仅接受网站投稿, 请登录官网录管网: <http://www.wimco2022.com>。
5. 截稿日期: 2022 年 9 月 30 日。