



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/eng](http://www.elsevier.com/locate/eng)



Research  
Traditional Chinese Medicine—Article

## 丹参酮 IIA 通过 Beclin-1 介导的自噬性凋亡抑制非小细胞肺癌

白莎莎<sup>a, #</sup>, 崔赛男<sup>a, #</sup>, 温文浩<sup>a, #</sup>, 梁丽娴<sup>b</sup>, 白静<sup>a</sup>, 林慧媛<sup>a</sup>, 崔永飞<sup>a</sup>, 杨蕾<sup>a</sup>, 刘中秋<sup>a</sup>, 郑远<sup>c, \*</sup>, 张荣<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

<sup>b</sup> State Key Laboratory of Quality Research in Chinese Medicine/Macau Institute for Applied Research in Medicine and Health, Macau University of Science and Technology, Macau 999078, China

<sup>c</sup> Cardiothoracic Surgery Department, The Second Clinical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 6 May 2021

Revised 28 June 2021

Accepted 6 July 2021

Available online 9 September 2021

#### 关键词

丹参酮 IIA

自噬

细胞凋亡

Beclin-1

### 摘要

肺癌是癌症死亡的主要原因,因此有必要制定一种新的治疗策略。丹参酮 IIA (Tan IIA) 是常用中药丹参的一种有效成分,为开发治疗肺癌的新策略提供了新方向。Tan IIA 在体外和体内均可通过诱导自噬性细胞凋亡从而抑制肺癌。Tan IIA 在人类非小细胞肺癌 (NSCLC) 细胞系中增加凋亡细胞以及剪切型-半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (cleaved caspase) 3 和 cleaved caspase 9 的表达,降低 B 淋巴细胞瘤 (Bcl-2) 与 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 的比值;自噬激活剂雷帕霉素可促进此过程,而自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤 (3-MA) 减弱此作用。Tan IIA 诱导更多的自噬体,上调轻链 3β (LC-3B) I 和 LC-3B II,减少整合体 1 (SQSTM1/p62) 的表达, caspase 3 拮抗剂未能减弱此作用。此外, LC-3B 基因 (LC3B) 过表达和白噬基因 5 (ATG-5) 下调细胞株的实验结果进一步证实 Tan IIA 诱导 NSCLC 细胞发生了自噬相关凋亡。过表达和沉默 Beclin-1 都明显减弱 Tan IIA 的作用,提示 Tan IIA 诱导的自噬相关凋亡依赖于 Beclin-1。总之,研究证明 Tan IIA 是一种潜在的新的抗癌治疗选择。

© 2021 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. 引言

国际癌症研究机构 2020 年《世界癌症报告》(World Cancer Report) 显示,癌症约造成 960 万人死亡,是 2018 年世界癌症第二大死亡原因。在这些死亡中,169 万人(约 20%) 死于肺癌[1–2]。研究和开发新的有效的抗癌治疗策略已成为重要问题。中医作为中国几千年的瑰宝,已成为癌症治疗的一个新的研究方向。在丰富的辨证论治和肿瘤患者治疗经验的基础上,中医提出了关于治疗肿瘤的

几个主要原则[3–4]。肿瘤患者有气血两虚、气滞血瘀、热积痰浓、湿阻等方面的证候[5]。活血化瘀是癌症治疗的治则之一[6–9],许多科研工作者对活血化瘀的内在科学机制进行了深入的研究[10–11]。研究表明,许多中药及其活性成分可以杀死各种肿瘤,从而证明其抗肿瘤作用。但是,为了满足个性化治疗和精准医疗的需求,对中药药理机制的深入研究确实是有必要的,这也可以更好地促进中医药的国际化。

丹参是一种活血化瘀的中草药。该药的各种现代制剂

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: 1737180@qq.com (Y. Zheng), zhangrong@gzucm.edu.cn (R. Zhang).

# These authors contributed equally to this work.

已经应用于治疗心脑血管疾病多年[12–13]。丹参的抗肿瘤效果已被广泛研究[14–15]。丹参及其各种提取物均具有广泛的抗肿瘤活性。丹酚酸抑制肿瘤细胞增殖，促进肿瘤细胞凋亡[16–19]。丹参酮IIA (Tan IIA) 不仅具有上述功能，还能诱导肿瘤细胞自噬[20–24]。

自噬主要指巨自噬，是一种程序化的细胞过程。这一过程可以在不良环境中避免细胞死亡，然而过度自噬可以诱导细胞死亡。自噬在肿瘤早期抑制细胞突变或突变细胞增殖，从而抑制肿瘤生长[25]，在中晚期帮助突变细胞适应肿瘤微环境中的低血供和缺氧，促进肿瘤发展[26]。当化疗杀死肿瘤细胞时，自噬可以帮助肿瘤细胞逃避化疗，参与耐药和肿瘤复发[27]。因此，在癌症治疗中是诱导还是抑制自噬仍存在争议。诱导肿瘤自噬性细胞凋亡(ACD)的药物可能为这一方向相关研究提供线索[28–31]。

中医活血化瘀理论在治疗肿瘤方面也面临着类似的争议。已有研究表明自噬抑制剂可拮抗 Tan IIA 的抗肿瘤作用。自噬是 Tan IIA 抗肿瘤作用的关键吗？它是如何工作的？相反，Tan IIA 的特殊治疗机制是否有助于解释中医活血化瘀的理论？对这一机制的进一步研究可能有助于中医抗癌治疗机制的解释。因此，本研究探索了 Tan IIA 对肺癌细胞的治疗作用。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 试剂

Tan IIA (纯度高于 99%) 和顺铂 (DDP) (Aldrich Chemical Co., 美国) 溶于二甲基亚砜。3-甲基腺嘌呤(3-MA)、雷帕霉素、半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶(caspase) 激活剂 (PAC) -1 和 caspase 拮抗剂 (Z-DEVD-FMK) 均来自美国 Selleck Chemicals 公司。Annexin V-荧光素异硫氰酸酯 (FITC) /碘化丙啶 (PI) 试剂盒 (Best-bio, 中国) 用于细胞凋亡检测。抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH)、微管蛋白、轻链 3 $\beta$  (LC-3B)、螯合体 1 (SQSTM1/p62)、Beclin-1、剪切型-半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶 (c-caspases)、B 淋巴细胞瘤 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) (Cell Signaling Technology, 美国) 和辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联抗体 (杭州联科生物技术股份有限公司) 用于蛋白质检测。

### 2.2. 细胞培养

人肺癌细胞系 A549、PC-9、HCC827 和 H1975 在添加了 10% 胎牛血清 (FBS)、100 U 青霉素、100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  链霉素的 DMEM 培养基中培养。

### 2.3. 细胞活力测定

肺癌细胞以每毫升  $5 \times 10^4$  个细胞的浓度接种，并在适当的环境中 (5%  $\text{CO}_2$ , 37  $^\circ\text{C}$ ) 培养。在加入 Tan IIA 和溶剂对照 (0.1% 二甲基亚砜) 后的 12 h、24 h 和 48 h，分别用细胞计数 kit-8 (CCK-8) (DOJINDO, 日本) 检测细胞活力。以 630 nm 为参比，测量了 450 nm 处的光密度 ( $\text{OD}_{450}$ )。将未处理的溶剂对照组设为 100%，归一化数据，计算细胞活力指数。

### 2.4. 细胞凋亡测定

$1 \times 10^5$  个细胞在磷酸氢磷缓冲盐水 (PBS) 中离心。然后加入 Annexin V-FITC 和 PI 染色缓冲液。样品在 4  $^\circ\text{C}$  培养 10 min，然后在 FASCanto II (Becton Dickinson, 美国) 上快速检测后，用 FlowJo X 10.0.7 软件分析。

### 2.5. 免疫印迹

收集细胞并在冰上裂解，取上清进行蛋白质定量。样品预变性、分离、转膜。膜与抗体共孵育封闭过夜，清洗后与二抗体共孵育。用多功能凝胶成像仪 (ChemiDoc XRS+; Bio-Rad, 美国) 成像。用 Image Lab<sup>TM</sup> 软件 (适用于 PC Version 6.1; Bio-Rad, 美国) 计算蛋白质表达水平的灰度值比。

### 2.6. 透射电子显微镜法

细胞用 0.5% 胰蛋白酶消化，离心至 Eppendorf 管顶端。加入 2.5% 预冷戊二醛溶液固定致密细胞团块。分别置于室温、1 h 和 4  $^\circ\text{C}$ 、3 h 后，将固定细胞更换到 PBS 中，根据标准操作程序用透射电镜 (TEM) (HT7800; HITACHI, 日本) 检查。

### 2.7. 细胞自噬体检测试剂盒法

细胞在爬片上培养，进行后续处理。去除培养基，单丹磺酰戊二胺 (MDC) 染色。制备 1 $\times$  洗涤缓冲液，并洗涤两次。细胞爬片在 MDC 染色工作液 (1:9 稀释) 中避光孵育 30 min。1 $\times$  缓冲液冲洗玻片，荧光显微镜 (Eclipse 80i; Nikon, 日本) 观察。

### 2.8. 体内异种移植模型

本研究经广州中医药大学伦理委员会批准，按照美国国家科学院推荐的指导方法进行。裸鼠 (18–20 g) 接种 A549 细胞，建立移植瘤模型。右侧腋下皮下注射  $5 \times 10^6$  个 A549 细胞 (200  $\mu\text{L}$ )。每隔一天测量并计算肿瘤体积 [肿瘤体积 = (宽度)<sup>2</sup>  $\times$  长度 / 2]。当肿瘤超过 200  $\text{m}^3$  时，将小鼠随机分组。各组给药方法如下，用 0.02  $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$  PBS 作溶剂对照；5  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、10  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  和 20  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$

Tan IIA 每天腹腔注射； $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  顺铂 (DDP)，每隔一天注射。三周后处死小鼠。

### 2.9. 苏木精和伊红染色

取出肿瘤组织，在 10% 福尔马林中固定，石蜡包埋，切片  $4 \mu\text{m}$ ，然后按照标准操作进行苏木精和伊红 (H&E) 染色。

### 2.10. 网络药理学分析

丹参、川芎、红花、桃仁、姜黄、巴旦木、当归、益母草的有效成分均来源于中药系统药理学数据库 (TC-MSP) (<https://tcmospw.com/tcmosp.php>)。PharmMapper 服务器可以根据化合物的结构预测可能的药物靶点，为潜在靶点获得评分值，并选择一定数量的靶点进行后续研究。将自噬作为关键词，疾病相关靶点在 GeneCard 数据库 (<https://www.genecards.org>) 中进行检索。基因本体论 (GO) 富集采用 David 数据库，京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 信号通路分析采用网络平台 (KOBAS) 数据库。

### 2.11. 统计分析

所有数据来自至少两次独立重复，并由 SPSS 进行统计分析。结果以平均值  $\pm$  标准差的形式呈现， $p < 0.05$  为具有统计学意义。

## 3. 结果

### 3.1. Tan IIA 对肺癌具有抗肿瘤作用

Tan IIA 可抑制 A549、PC-9、HCC827、H1975 四种不同肺癌细胞系的增殖 [图 1 (a)]，但 A549 和 PC-9 更敏感。因此在后续实验中选择 A549 和 PC-9 作为研究对象。Tan IIA 时间和剂量依赖性地抑制 A549 和 PC-9 增殖。Tan IIA 作用于 A549 12 h、24 h、48 h 后  $\text{IC}_{50}$  值分别为  $(10.04 + 2.80) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $(2.58 + 0.91) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $(0.95 + 0.40) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  [见附录 A 中的图 S1 (a)]，而 Tan IIA 作用于 PC-9 的  $\text{IC}_{50}$  值为  $(5.26 + 1.27) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $(1.94 + 0.57) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $(0.96 + 0.40) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  [见附录 A 中的图 S1 (b)]。在这些实验中，Tan IIA 对正常肺支气管上皮细胞没有明显的毒性作用，直到浓度升高到  $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  以上。因此，为了安全起见，除验证剂量效应关系外，后续研究中 Tan IIA 治疗细胞的首选浓度为  $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  [图 1 (b)]。

Annexin V-FITC/PI 染色数据显示，Tan IIA 可诱导 A549 和 PC-9 细胞凋亡，呈剂量依赖性 [图 1 (c)]。Western blot 检测细胞凋亡相关蛋白。Tan IIA 治疗后，c-caspase 3

和 c-caspase 9 明显升高 [图 1 (d)]。c-caspase 8 无明显变化 (数据未显示)。这一发现揭示了 Tan IIA 可诱导肺癌细胞线粒体凋亡。Bcl-2 和 Bax 的检测结果一致。

在 Tan IIA 处理后的肺癌细胞中，经 TEM 观察到更多的自噬体 [图 2 (a)]。与溶剂对照组相比，Tan IIA 上调 LC-3B II/LC-3B I 比值，下调 SQSTM1/p62 表达，说明细胞发生了自噬。该化合物还增加了 Beclin-1 的表达 [图 2 (b)]。

### 3.2. Tan IIA 可减少荷瘤小鼠的肿瘤体积

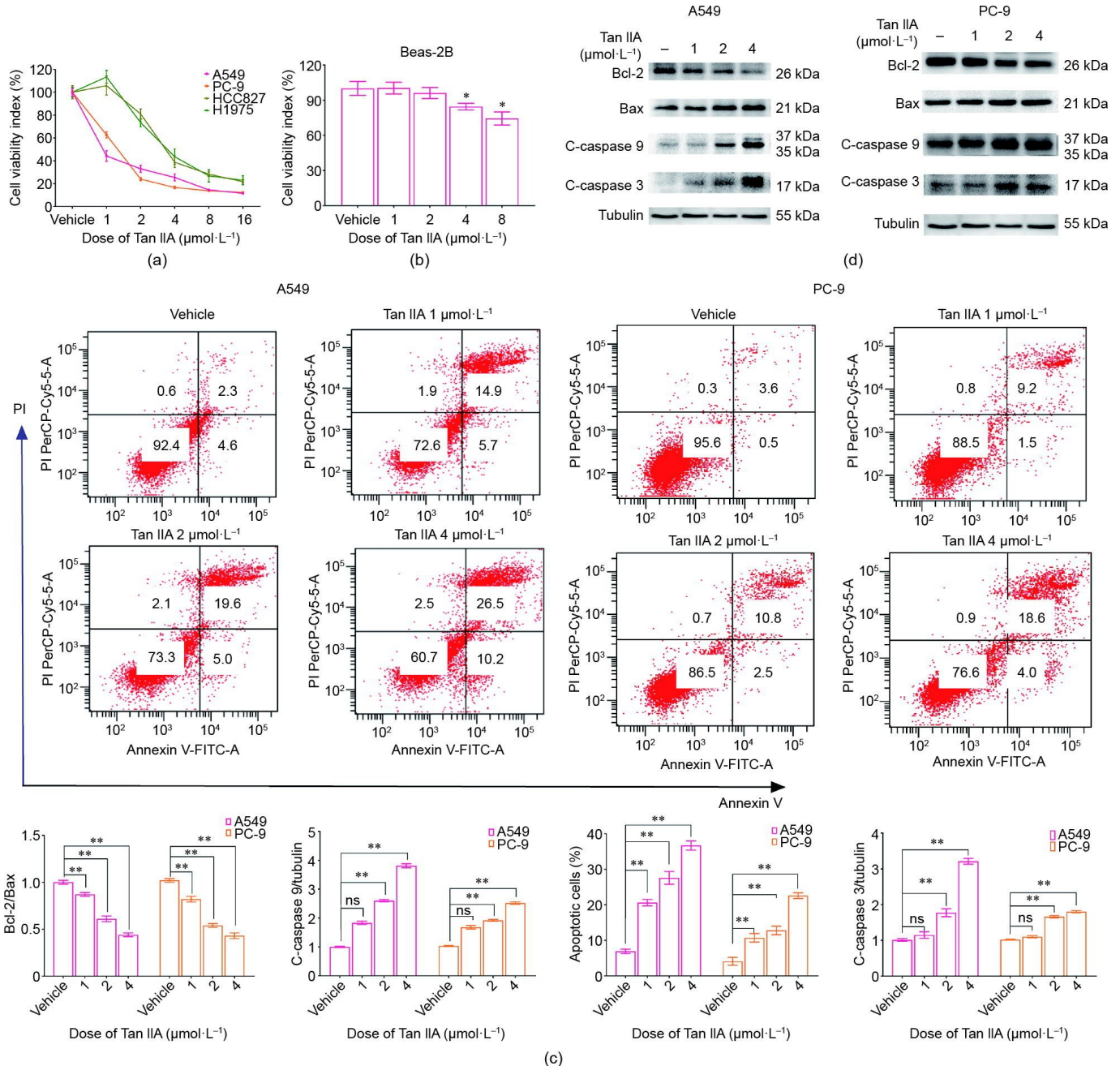
由 A549 细胞建立的荷瘤小鼠模型在注射 Tan IIA 后，肿瘤体积和质量均显著减小 [见图 3 (a) 和附录 A 中的图 S2 (a)]，多个器官指数结果显示该制剂无毒性 [见图 2 和附录 A 中的图 S2 (b)、(c)]。对荷瘤小鼠肿瘤组织切片进行 H&E 染色，然后显微镜下观察。对照组肿瘤组织边缘清晰，而 Tan IIA 组和 DDP 组肿瘤组织细胞排列松散无序，细胞核固缩 [图 3 (b)]，提示两种药物均诱导了细胞凋亡。

分离肿瘤组织后进行 Western blot 检测，分析凋亡相关蛋白。结果显示凋亡相关蛋白 (c-caspase 3、Bcl-2、Bax) 表达增加 [图 3 (c)]。在荷瘤小鼠肿瘤组织中经 Tan IIA 处理后自噬相关蛋白 LC-3B I、LC-3B II、SQSTM1/p62 表达升高，表明自噬的发生 [图 3 (d)]。

### 3.3. Tan IIA 诱导肺癌细胞自噬与凋亡的相互作用

进一步研究细胞自噬与凋亡的关系。自噬是否是肺癌细胞凋亡的保护反应？首先，在 Tan IIA 处理的不同时间点收集肺癌细胞进行蛋白检测。结果表明，经 Tan IIA 处理 4 h 后，A549 中 LC-3B II 的表达显著上调。c-caspase 3 在 8 h 前没有明显变化。这一发现表明自噬可能发生在凋亡之前 [图 4 (a)]。PC-9 细胞发生自噬的时间稍晚，但仍先于细胞凋亡 [图 4 (b)]。为探明自噬是否参与了 Tan IIA 诱导的肺癌细胞凋亡，本研究采用自噬激动剂雷帕霉素 (RAPA) 和拮抗剂 3-MA 预处理肺癌细胞。结果表明，RAPA 可以提高 Tan IIA 的 c-caspase 3 水平。相反，3-MA 削弱了 Tan IIA 的上述作用 [图 5 (a)]。结果初步证明肺癌细胞自噬不是由凋亡诱导的，而是由 Tan IIA 诱导的。同时，用 caspases 的激动剂和拮抗剂预处理肺癌细胞。Tan IIA 诱导的自噬在 caspase 拮抗剂 (Z-DEVD-FMK) 作用下没有明显改变，但在 caspase 3 激动剂 (PAC-1) 作用下被加剧 [图 5 (b)]。这一发现证明了 Tan IIA 诱导的自噬参与介导肺癌细胞凋亡。

为进一步验证，本文设计并合成自噬基因 5



**图 1.** Tan IIA 对 NSCLC 细胞的影响。(a) 四种 NSCLC 细胞株 (A549、PC-9、H1975 和 HCC827) 分别在添加 Tan IIA 或溶剂对照的培养基中培养。CCK-8 检测细胞活力。(b) 培养正常肺支气管上皮细胞 beas-2B 进行细胞毒性评价。(c) 流式细胞术研究细胞凋亡。各组均为正态分布。(d) 用免疫印迹法检测剪切型-半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶 (c-caspases) 3 和 c-caspases 9、Bax 和 Bcl-2 的表达。\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ;  $n = 4$ 。ns: 无意义。

(*ATG5*) - 发夹 RNA (shRNA), 构建慢病毒干扰载体, 转染 A549 细胞 (标记为 *ATG5*<sup>lo/lo</sup>) 进行后续研究。MDC 染色和 LC-3B 实验结果表明自噬已经被抑制 [图 6 (a)、(b)]。在这种情况下, A549 细胞对 Tan IIA 的敏感性较低 [图 6 (b)]。

建立自噬基因 LC-3B (*LC3B*) 稳定过表达的 A549 细胞株进行进一步检测。MDC 染色和免疫印迹检测显示 *LC3B*<sup>hi/hi</sup> 细胞株自噬上调 [图 6 (c)]。Tan IIA 增加

*LC3B*<sup>hi/hi</sup> 细胞株中 LC-3B 和 c-caspase 3 的表达, 而 Beclin-1 表达降低 [图 6 (d)]。这些数据提示 Tan IIA 可能通过 Beclin-1 诱导细胞自噬凋亡。

### 3.4. Tan IIA 通过 Beclin-1 诱导肺癌细胞自噬凋亡

在野生型 A549 细胞、PC-9 细胞和 *LC3B*<sup>hi/hi</sup> A549 细胞中, Tan IIA 处理后 Beclin-1 的表达水平明显升高 [图 2 (b) 和图 3 (d)]。 *ATG5*<sup>lo/lo</sup> A549 细胞中 Tan IIA 的作用减弱 [图 6 (d)]。因此构建了 *BECN1*<sup>hi/hi</sup> 和 *BECN1*<sup>lo/lo</sup> A549 细胞

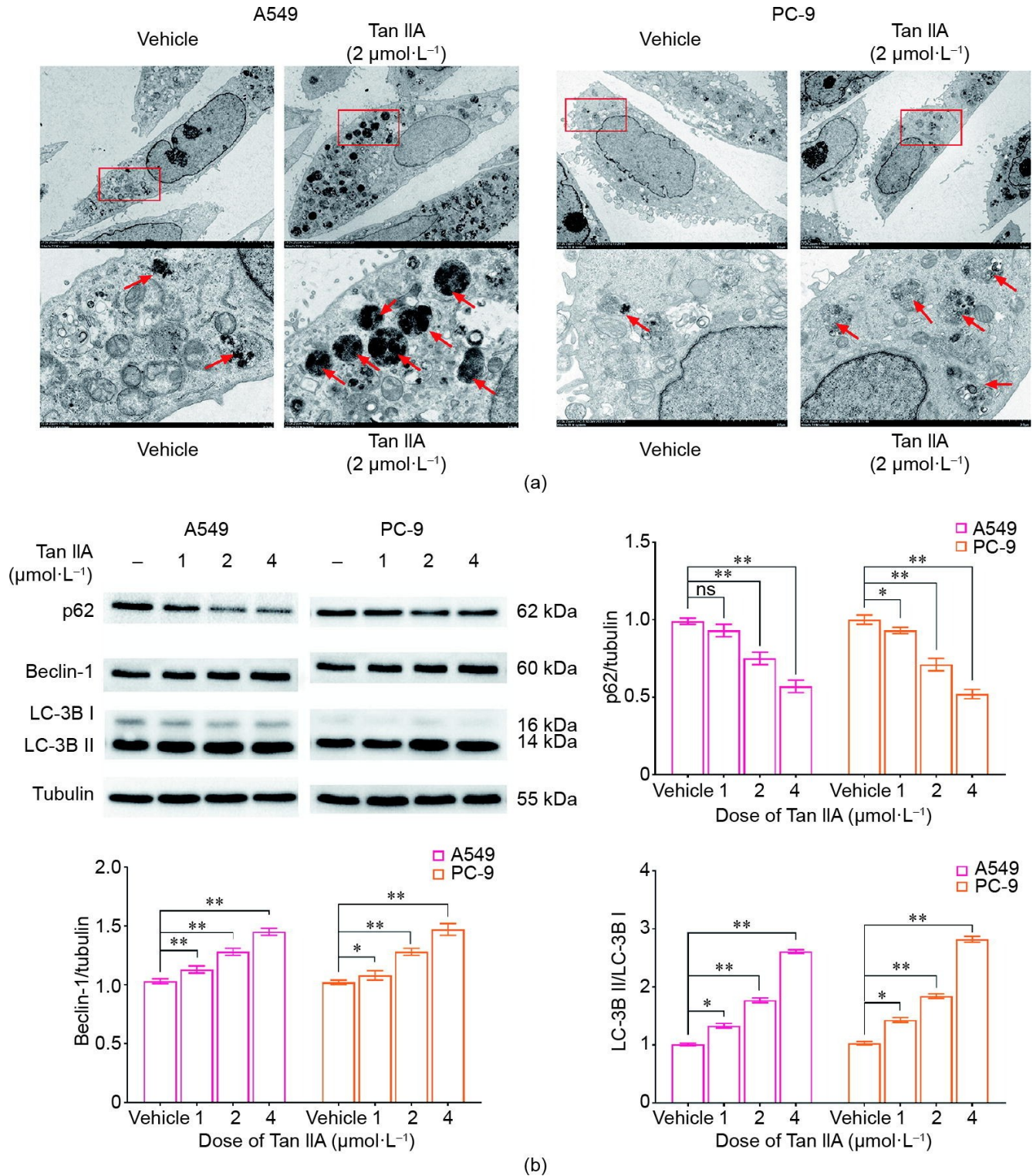
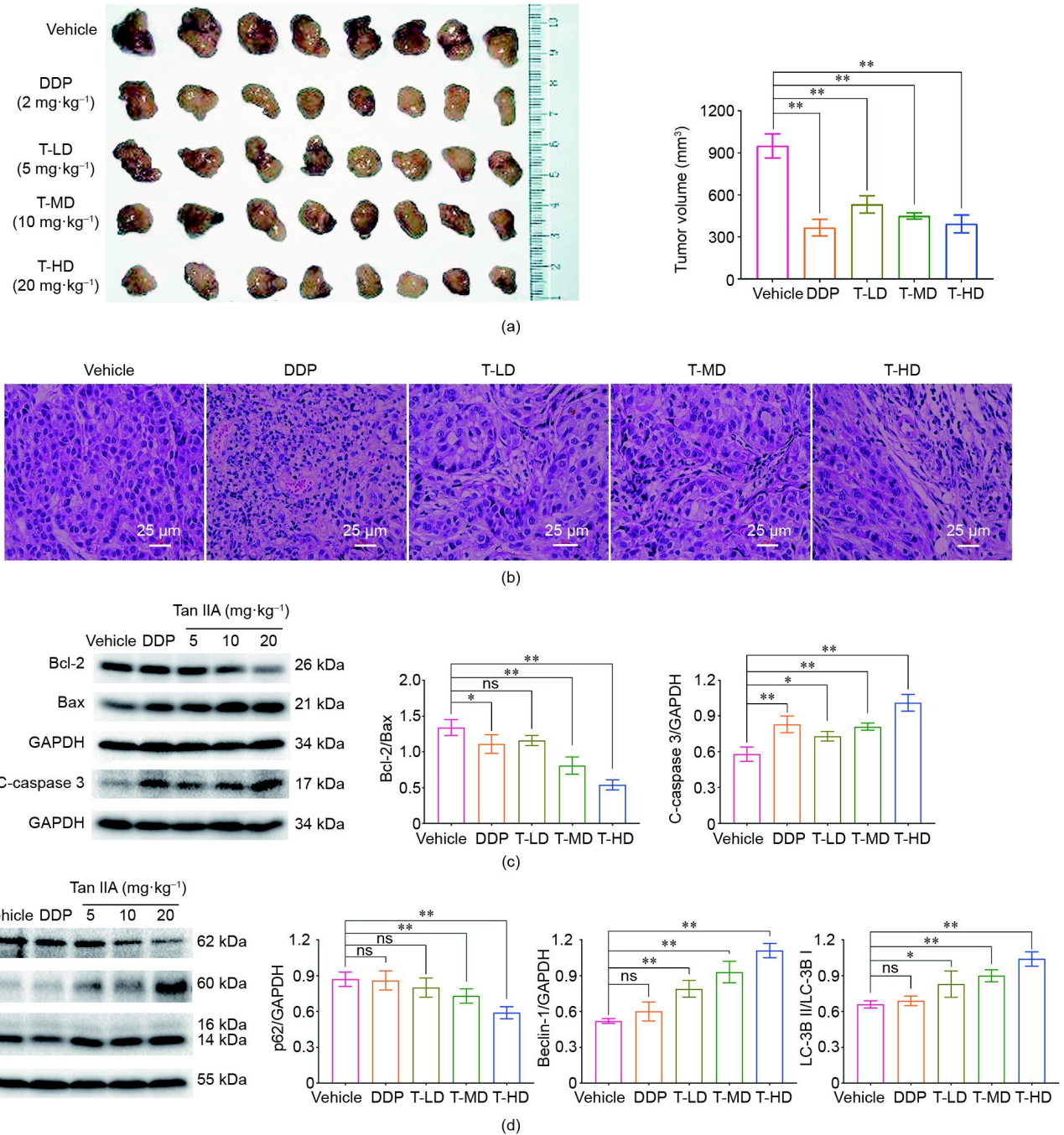


图2. Tan IIA 诱导 NSCLC 细胞自噬。(a) Tan IIA 处理后的细胞用 2.5% 戊二醛/0.1 PBS 固定，TEM 检测。图中红色箭头表示自噬体。(b) 使用 Tan IIA 对 A549 和 PC-9 细胞中 LC-3B I、LC-3B II、Beclin-1、SQSTM1/p62 和微管蛋白表达进行免疫印迹分析。\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ;  $n = 3$ . ns: 无意义。

株。结果表明，*BECN1*<sup>hi/hi</sup> 细胞中 LC-3B 和 c-caspase 3 水平升高，*BECN1*<sup>lo/lo</sup> 细胞中 LC-3B 和 c-caspase 3 水平降低。Tan IIA 在 *BECN1*<sup>hi/hi</sup> 和 *BECN1*<sup>lo/lo</sup> 细胞中均未增加 LC-3B 和 c-caspase 3 水平[图 6 (b) 和 (d)]。

#### 4. 讨论

2018 年，肺癌在全球 1800 万新诊断癌症病例中发病率和病死率最高，中国肺癌发病率较低（430 万新诊断病



**图3.** Tan IIA 诱导荷瘤小鼠自噬和凋亡。(a) 人肺癌移植模型小鼠肿瘤的照片和体积测量。(b) 肿瘤组织切片H&E染色观察。(c)、(d) 用免疫印迹法分析凋亡蛋白(Bcl-2、Bax和c-caspase 3)和自噬蛋白(LC-3B I、LC-3B II、SQSTM1/p62和Beclin-1)。\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ;  $n = 8$ 。ns: 无显著性差异; T-HD: Tan IIA 高剂量组; T-MD: Tan IIA 中剂量组; T-LD: Tan IIA 低剂量组。

例), 但死亡率较高(290万癌症死亡), 这是由预后不良而导致的[1,32–33]。如今, 因为缺乏良好的治疗, 癌症已成为导致死亡的主要原因。中医是中华民族的瑰宝, 几千年来在维护人民生命健康方面发挥着重要作用。因此, 中医药在肿瘤治疗中的应用越来越受到重视。

在本研究课题组早期关于中药及成分对肺癌影响的研究中, 通过网络药理分析, 筛选出20多种化合物进行疗

效验证。其中, Tan IIA 是疗效和安全性较好的成分之一。关于 Tan IIA 抗肿瘤机制的报道较多, 但其中一篇引起了人们的关注, Tan IIA 可能导致 ACD [30–31]。遗憾的是, 没有进一步的证据证实 Tan IIA 的治疗机制。

早在半个多世纪前 Richard Lockshin 就描述过 ACD, 但关于 ACD 确实存在激烈的争议[34–39]。有人认为 ACD 是第三种细胞死亡途径, 没有坏死和凋亡的形态学症状[40–41]。

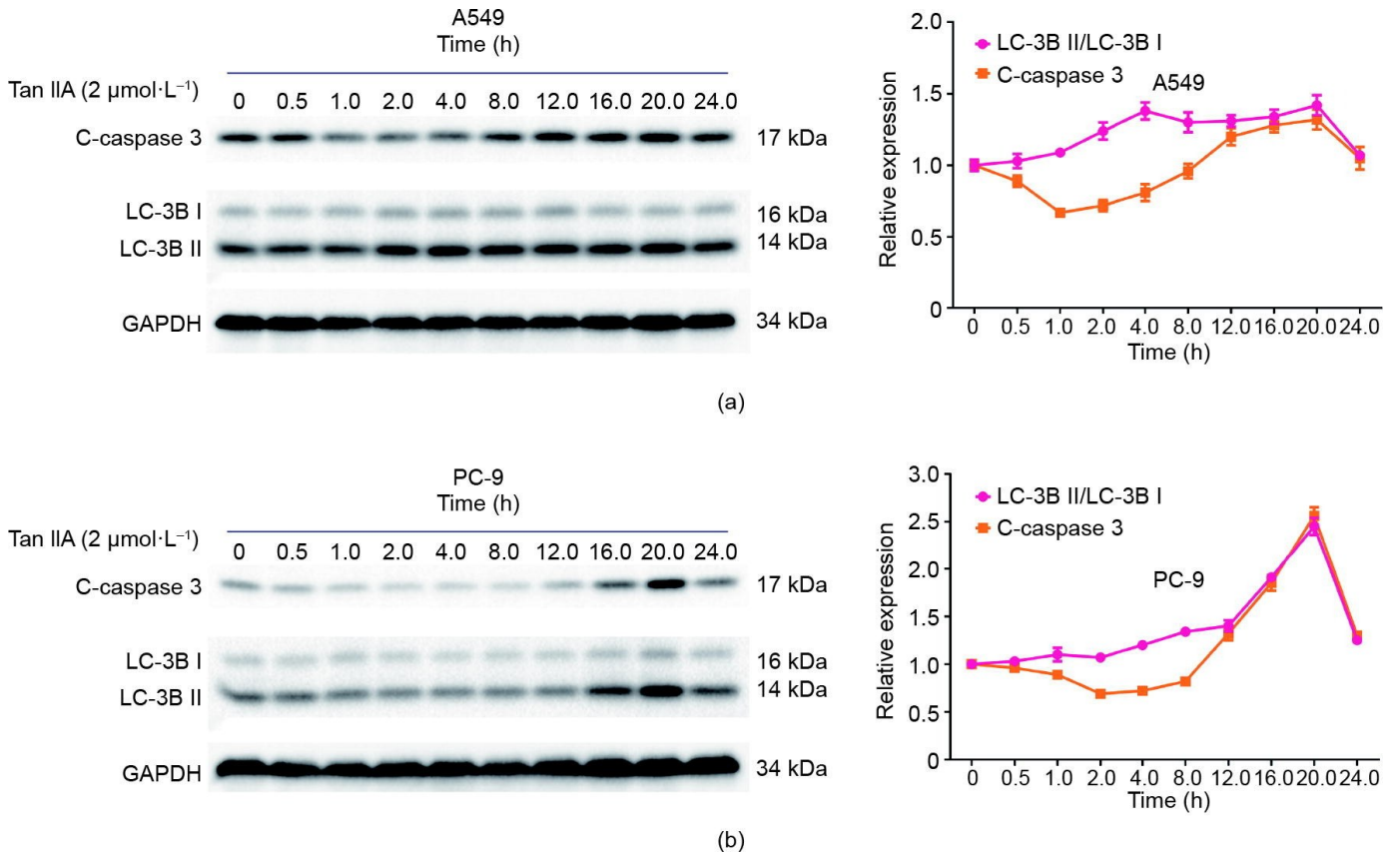


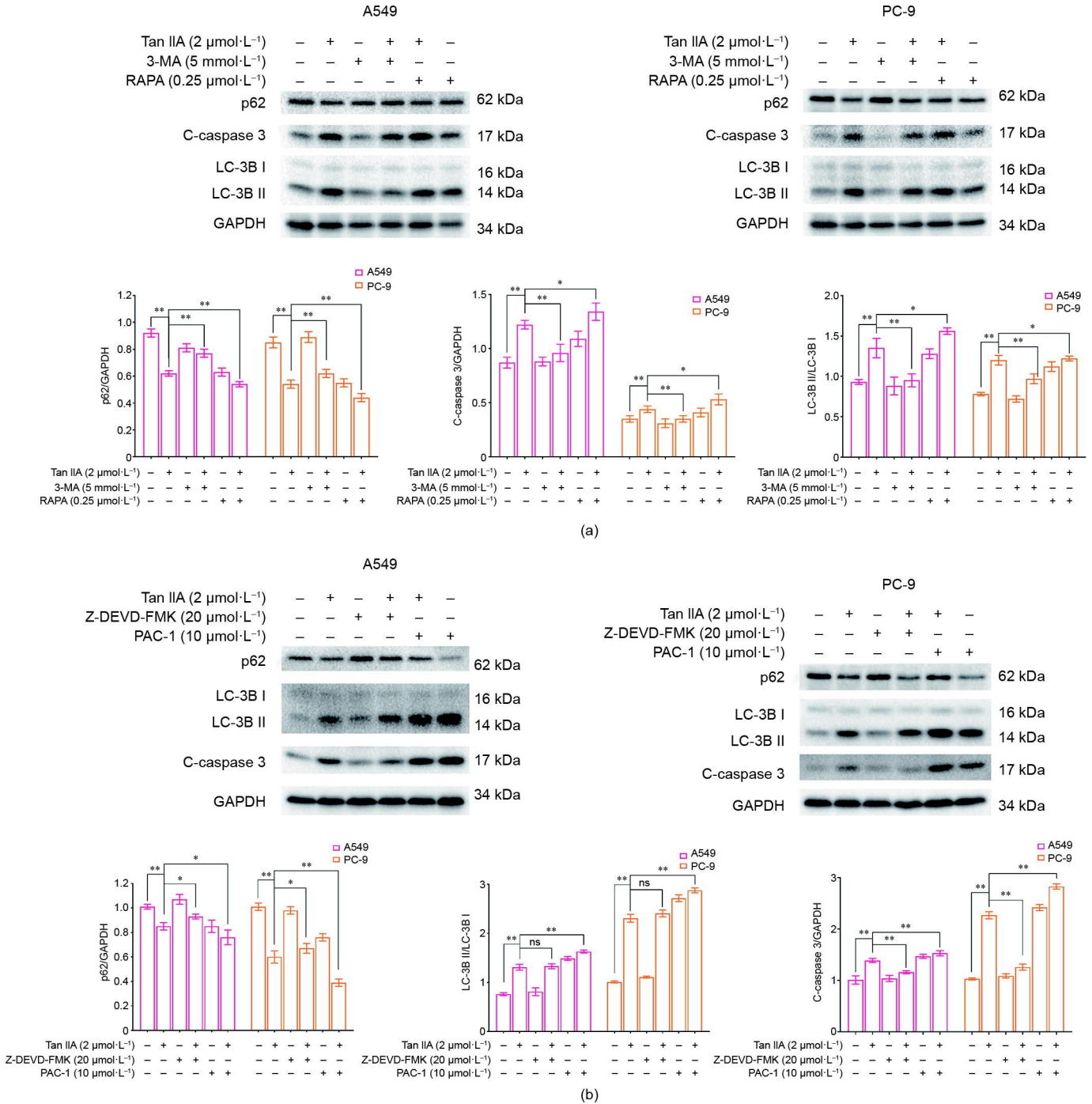
图4. Tan IIA 诱导 NSCLC 细胞自噬与凋亡的关系。(a) 免疫印迹法检测不同 Tan IIA ( $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 处理时间下 A549 细胞的自噬和凋亡标志物 (LC-3B I、LC-3B II 和 c-caspase 3)。(b) 免疫印迹法检测不同 Tan IIA ( $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 处理时间下 PC-9 细胞中自噬和凋亡标志物 LC-3BI、LC-3B II 和 c-caspase 3 的变化。

另一方面,有人试图用三个特征来定义 ACD: 诱导自噬、自噬平行或先于细胞死亡、抑制自噬可以阻止细胞死亡[34, 36,42–43]。无论如何定义,自噬都是“关键角色”。

自噬是肿瘤发生过程中众所周知的“双刃剑” [27,29, 38,44]。在治疗肿瘤时,是诱导还是抑制自噬一直是有争议的问题。在本研究中, Tan IIA 诱导自噬促进细胞死亡,发挥抗肿瘤作用。然而,更多的报道表明自噬可以保护肿瘤细胞免受化疗的破坏或介导免疫逃逸,自噬抑制剂氯喹也被报道具有成为抗肿瘤药物的潜力[45–47]。在中医药治疗肿瘤方面也存在类似的争论。对于活血化瘀能否帮助肿瘤形成更好的供血并促进肿瘤生长或促进肿瘤的血转移,同时治疗肿瘤的问题,有报道称,活血化瘀单味中药促进小鼠 Lewis 肺癌细胞血管生成,或损害免疫细胞功能,导致癌细胞释放到血液中,加速肿瘤的血液转移[48–49]。但也发现,与对照组鼻咽癌放疗患者相比,接受活血化瘀治疗的患者 5 年生存率及复发率均无统计学意义 [50–51]。近年来,越来越多的学者提出活血化瘀可以使肿瘤血管生成和微环境正常化,从而起到治疗癌症的作用 [52–54]。在本研究中,发现丹参的活性成分 Tan IIA 具有

显著的抗肿瘤作用,并且在 Tan IIA 处理的小鼠中没有发现原位转移的明显增加。综上所述,这样类似的情况让人们相信自噬与 Tan IIA 具有活血化瘀作用的抗肿瘤作用机制一定存在某种关系。自噬细胞死亡会是关键吗?的确,根据研究结果, Tan IIA 确实人在 NSCLC 细胞中诱导自噬细胞死亡,更具体地说是自噬细胞凋亡。结果表明, Tan IIA 可诱导肺癌细胞自噬和凋亡。但自噬发生较早,抑制自噬可阻断细胞凋亡。然而,抑制细胞凋亡并不能阻止自噬,尽管诱导细胞凋亡可以增强自噬。

为了进一步证实,本文选取 ACD 中的关键信号分子进行干预[55–56]。Beclin-1 是自噬过程中的关键分子,可与 Bcl-2 结合而失活[57–59]。一旦从 Bcl-2 中分离出来,它也可以被 unc-51 磷酸化,如自噬激活激酶 1 (ULK1),以增加液泡蛋白分类 34 (VPS34) 复合体的活性[57,60–61]。这一步对于自噬的发生至关重要。自噬信号释放后,上调的 Beclin-1 可与多个 Bcl-2 分子结合,释放出一组促凋亡分子(如 Bax、Bad),与线粒体膜结合,引发内源性凋亡。在 *BECN1*<sup>hi/hi</sup> 细胞和 *BECN1*<sup>lo/lo</sup> 细胞中的结果均显示, Tan IIA 诱导的凋亡减弱;由于 Tan IIA 不能诱导肺癌



**图5.** Tan IIA 相互作用诱导 NSCLC 细胞自噬和凋亡。(a) 在 Tan IIA 处理前 1 h 加入自噬激动剂[雷帕霉素 (RAPA)]和拮抗剂 (3-MA), 检测 A549 和 PC-9 细胞的自噬和凋亡标志物。(b) 细胞凋亡激动剂 (PAC-1) 和拮抗剂 (Z-DEVD-FMK) 预处理 1 h, 然后进行同样的操作。\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ;  $n = 3$ . ns: 无意义。

细胞表达更多的 Beclin-1 去结合 Bcl-2, Tan IIA 诱导的自噬凋亡作用明显减弱。

综上所述, 本文解释和阐明了 Tan IIA 抑制肺癌的分子机制。本研究首次较系统深入地研究了 Tan IIA 中 ACD 对抗肺癌的作用, 为后续研究丹参其他成分的抗肿瘤机制奠定了基础 (图 7)。根据中药活血化瘀与自噬相关性的网络药理分析结果, 中药有效成分与自噬相关的多个靶点

形成了一个非常紧密的相互作用网络 (见附录 A 中的图 S3), 在 GO 富集后, 在 KEGG 数据库中可以看到与凋亡相关的多条通路及其调控机制 (见附录 A 中的图 S4), 同时发现凋亡与肿瘤发生发展相关的多条信号机制被富集 (见附录 A 中的图 S5), 因此也提示 ACD 很可能是肿瘤治疗中活血化瘀的“关键角色”。然而, ACD 的规律还需要经过更系统的验证。



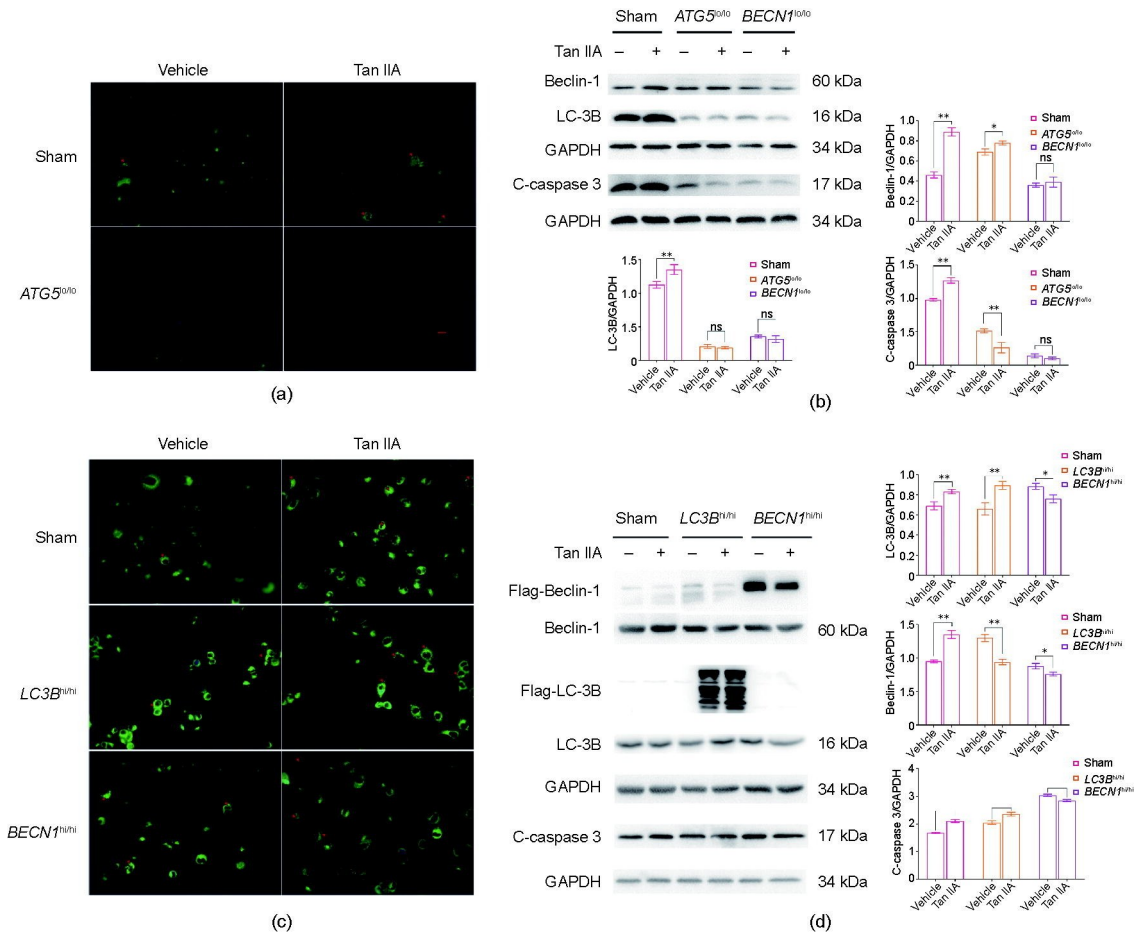


图6. Tan IIA 诱导 NSCLC 细胞自噬凋亡。(a) 在 Tan IIA 以  $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  处理 24 小时后, 将随机小干扰 RNA (siRNA) 和 *ATG5* siRNA 转染 A549 细胞, 进行 MDC 染色。(b) 以同样的方式处理转染 A549 细胞的随机 shRNA、*LC3B* shRNA 和 *BECN1* shRNA 进行 MDC 染色。(c)、(d) 采用免疫印迹法检测 *ATG5*<sup>siRNA</sup>、*BECN1*<sup>siRNA</sup>、*LC3B*<sup>siRNA</sup> 和 *BECN1*<sup>siRNA</sup> 细胞中 c-caspase 3、LC-3B 和 Beclin-1 的水平。\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ;  $n = 3$ 。ns: 无意义。

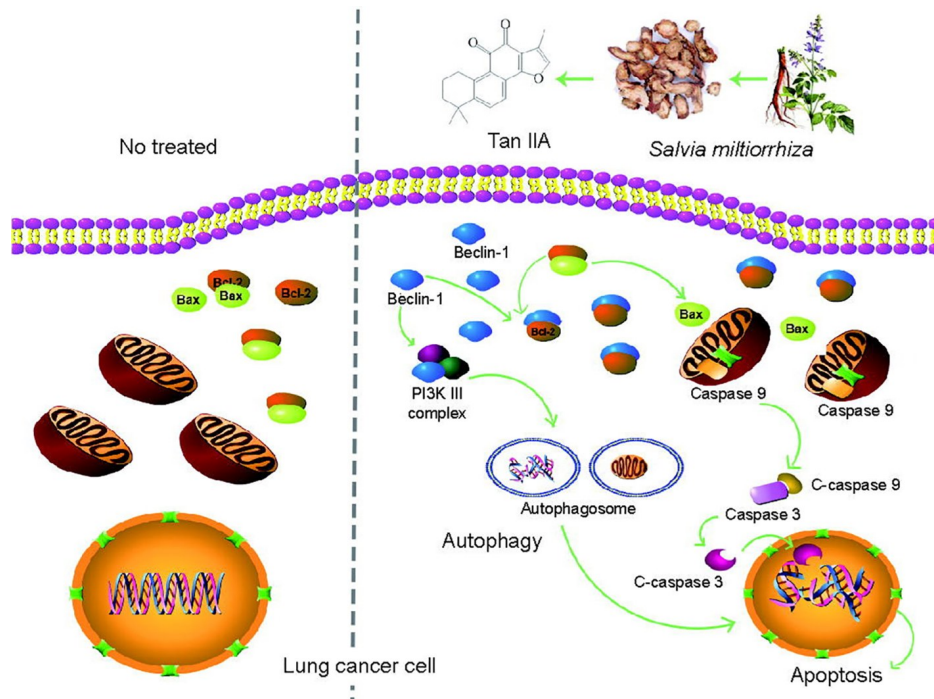


图7. Tan IIA 诱导自噬细胞凋亡的分子机制。

“活血化瘀”是中医治疗肿瘤的主要原则之一。解释这一原理的现代科学分子机制，对于肿瘤治疗新方法和新策略的研究及开发至关重要。

## 5. 结论

丹参主要成分 Tan IIA 可诱导荷瘤小鼠 A549 和 PC-9 细胞的 ACD，并能减小荷瘤小鼠的肿瘤体积，且无明显毒性。Tan IIA 通过诱导自噬细胞凋亡对肺癌有药理作用。

## 致谢

感谢国家自然科学基金项目(81903943、82074219)、广东省自然科学基金项目(2017A030310502)的资助。该研究还得到了教育部重点项目(2018KZDXM020)、广州市科技计划项目(202002030009)的支持。

## Compliance with ethics guidelines

Shasha Bai, Sainan Cui, Wenhao Wen, Elaine Lai-Han Leung, Jing Bai, Huiyuan Lin, Yongfei Cui, Lei Yang, Zhongqiu Liu, Yuan Zheng, and Rong Zhang declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

## Authors' contribution

Shasha Bai designed and performed the experiments. Sainan Cui wrote the initial version of the manuscript, and Elaine Lai-Han Leung revised it. Wenhao Wen assisted with the conduct of the experiments and analyzed the data. Huiyuan Lin assisted with animal experiments. Jing Bai and Yongfei Cui contributed to manuscript preparation and assisted with animal experiments. Lei Yang contributed reagents, materials, analysis tools. Yuan Zheng and Rong Zhang formulated the hypotheses. Zhongqiu Liu supervised the study. All authors reviewed the manuscript.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online

at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.07.014>.

## References

- [1] Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A, Fedewa SA, Butterly LF, Anderson JC, et al. Colorectal cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin* 2020;70(3):145–64.
- [2] Forouzanfar MH, Afshin A, Alexander LT, Anderson HR, Bhutta ZA, Biryukov S, et al.; 2015 Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the global burden of disease study 2015. *Lancet* 2016;388(10053):1659–724.
- [3] Liao X, Bu Y, Jia Q. Traditional Chinese medicine as supportive care for the management of liver cancer: past, present, and future. *Genes Dis* 2020;7(3):370–9.
- [4] Li Z, Zhang F, Li G. Traditional Chinese medicine and lung cancer—from theory to practice. *Biomed Pharmacother* 2021;137:111381.
- [5] Smith ME, Bauer-Wu S. Traditional Chinese medicine for cancer-related symptoms. *Semin Oncol Nurs* 2012;28(1):64–74.
- [6] Zhang Z, Zhao X, Gao Q, Zhao Y, Zhai L, Jia S, et al. Investigation and study on the TCM syndrome distribution of malignant tumor. *World J Integr Tradit West Med* 2019;14(2):261–7. Chinese.
- [7] Yang XB, Long SQ, Deng H, Liu W, He WF, Pan ZQ, et al. Distribution characteristics of syndrome types in TCM in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Liaoning Univ TCM* 2013;15(3):188–90. Chinese.
- [8] Zhu P, Li ZG, Dong CW. Progress on lung cancer with syndrome differentiation in traditional Chinese medicine. *J Pract Tradit Chin Intern Med* 2017;31(3):91–3. Chinese.
- [9] Xiang Y, Guo Z, Zhu P, Chen J, Huang Y. Traditional Chinese medicine as a cancer treatment: modern perspectives of ancient but advanced science. *Cancer Med* 2019;8(5):1958–75.
- [10] Zhao LN, Yang YQ, Wang WW, Li Q, Xiao H. The effects of traditional Chinese medicine combined with chemotherapy on immune function and quality of life in patients with non-small cell lung cancer: a protocol for systematic review and meta-analysis. *Medicine* 2020;99(45):e22859.
- [11] Lee YW, Chen TL, Shih YR, Tsai CL, Chang CC, Liang HH, et al. Adjunctive traditional Chinese medicine therapy improves survival in patients with advanced breast cancer: a population-based study. *Cancer* 2014;120(9):1338–44.
- [12] Wan AKS, Leung SWS, Zhu DY, Man RYK. Vascular effects of different lipophilic components of “Danshen”, a traditional Chinese medicine, in the isolated porcine coronary artery. *J Nat Prod* 2008;71(11):1825–8.
- [13] Ren J, Fu L, Nile SH, Zhang J, Kai GY. *Salvia miltiorrhiza* in treating cardiovascular diseases: a review on its pharmacological and clinical applications. *Front Pharmacol* 2019;10:753.
- [14] Liao S, Han L, Zheng X, Wang X, Zhang P, Wu J, et al. Tanshinol borneol ester, a novel synthetic small molecule angiogenesis stimulator inspired by botanical formulations for angina pectoris. *Brit J Pharmacol* 2019;176(17):3143–60.
- [15] Gao H, Sun W, Zhao J, Wu X, Lu JJ, Chen X, et al. Tanshinones and diethyl blechnics with anti-inflammatory and anti-cancer activities from *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Danshen). *Sci Rep* 2016;6:33720.
- [16] Wang LQ, Hua DF, Li XM, Li J, Guan Y. Salvianolic acid-A induces apoptosis, mitochondrial membrane potential loss and DNA damage in small cell lung cancer cell lines. *Trop J Pharm Res* 2015;14(8):1399–404.
- [17] Tang XL, Yan L, Zhu L, Jiao DM, Chen J, Chen QY. Salvianolic acid A reverses cisplatin resistance in lung cancer a549 cells by targeting c-met and attenuating Akt/mTOR pathway. *J Pharmacol Sci* 2017;135(1):1–7.
- [18] Guan Y, Zhu JP, Shen J, Jia YL, Jin YC, Dong XW, et al. Salvianolic acid B improves airway hyperresponsiveness by inhibiting MUC5AC overproduction associated with Erk1/2/P38 signaling. *Eur J Pharmacol* 2018;824:30–9.
- [19] Ye YT, Zhong W, Sun P, Wang D, Wang C, Hu LM, et al. Apoptosis induced by the methanol extract of *Salvia miltiorrhiza* Bunge in non-small cell lung cancer through PTEN-mediated inhibition of PI3K/Akt pathway. *J Ethnopharmacol* 2017;200:107–16.
- [20] Guo R, Li L, Su J, Li S, Duncan SE, Liu ZH, et al. Pharmacological activity and mechanism of Tanshinone IIA in related diseases. *Drug Des Dev Ther* 2020;14:4735–48.
- [21] Zhang Y, Jiang P, Ye M, Kim SH, Jiang C, Lu JX, et al. Tanshinones: sources, pharmacokinetics and anti-cancer activities. *Int J Mol Sci* 2012;13(10):13621–66.
- [22] Zhang Y, Geng Y, He JT, Wu D, Zhang T, Xue L, et al. Tanshinone IIA induces

- apoptosis and autophagy in acute monocytic leukemia via downregulation of PI3K/Akt pathway. *Am J Transl Res* 2019;11(5):2995–3006.
- [23] Wang X, Shao M, Wang Y. GW29-e0760 Tanshinone IIA protects H9c2 cells from reactive oxygen species through inhabiting excessive autophagy via activation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *J Am Coll Cardiol* 2018; 72(16):C24.
- [24] Ding L, Wang S, Qu X, Wang J. Tanshinone IIA sensitizes oral squamous cell carcinoma to radiation due to an enhanced autophagy. *Environ Toxicol Pharmacol* 2016;46:264–9.
- [25] Onorati AV, Dyczynski M, Ojha R, Amaravadi RK. Targeting autophagy in cancer. *Cancer* 2018;124(16):3307–18.
- [26] White E, Mehnert JM, Chan CS. Autophagy, metabolism, and cancer. *Clin Cancer Res* 2015;21(22):5037–46.
- [27] Mulcahy Levy JM, Thorburn A. Autophagy in cancer: moving from understanding mechanism to improving therapy responses in patients. *Cell Death Differ* 2020;27(3):843–57.
- [28] Levy JMM, Towers CG, Thorburn A. Targeting autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 2017;17(9):528–42.
- [29] Amaravadi RK, Kimmelman AC, Debnath J. Targeting autophagy in cancer: recent advances and future directions. *Cancer Discov* 2019;9(9):1167–81.
- [30] Qiu Y, Li C, Wang Q, Zeng X, Ji P. Tanshinone IIA induces cell death via Beclin-1-dependent autophagy in oral squamous cell carcinoma SCC-9 cell line. *Cancer Med* 2018;7(2):397–407.
- [31] Yun SM, Jung JH, Jeong SJ, Sohn EJ, Kim B, Kim SH. Tanshinone IIA induces autophagic cell death via activation of AMPK and ERK and inhibition of mTOR and p70 S6K in KBM-5 leukemia cells. *Phytother Res* 2014;28(3):458–64.
- [32] Mattiuzzi C, Lippi G. Current cancer epidemiology. *J Epidemiol Glob Health* 2019;9(4):217–22.
- [33] Feng RM, Zong YN, Cao SM, Xu RH. Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 global cancer statistics? *Cancer Commun* 2019; 39(1):1–12.
- [34] Denton D, Kumar S. Autophagy-dependent cell death. *Cell Death Differ* 2019; 26:605–16.
- [35] Kroemer G, Levine B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:1004–10.
- [36] Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 741–52.
- [37] Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2009. *Cell Death Differ* 2009;16:3–11.
- [38] Longo DL, Mizushima N, Levine B. Autophagy in human diseases. *N Engl J Med* 2020;383:1564–76.
- [39] Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* 2004;306(5698):990–5.
- [40] Shen S, Kepp O, Michaud M, Martins I, Minoux H, Métévier D, et al. Association and dissociation of autophagy, apoptosis and necrosis by systematic chemical study. *Oncogene* 2011;30:4544–56.
- [41] Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2012. *Cell Death Differ* 2012; 19: 107–20.
- [42] Luciani MF, Giusti C, Harms B, Oshima Y, Kikuchi H, Kubohara Y, et al. Atg1 allows second-signaled autophagic cell death in *Dicyostelium*. *Autophagy* 2011;7(5):501–8.
- [43] Tasdemir E, Galluzzi L, Maiuri MC, Criollo A, Vitale I, Hangen E, et al. Methods for assessing autophagy and autophagic cell death. *Methods Mol Biol* 2008;445:29–76.
- [44] Kocaturk NM, Akkoc Y, Kig C, Bayraktar O, Gozuacik D, Kutlu O. Autophagy as a molecular target for cancer treatment. *Eur J Pharm Sci* 2019;134:116–37.
- [45] Burikhanov R, Hebban N, Noothi SK, Shukla N, Sledziona J, Araujo N, et al. Chloroquine-inducible Par-4 secretion is essential for tumor cell apoptosis and inhibition of metastasis. *Cell Rep* 2017;18(2):508–19.
- [46] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57–70.
- [47] Yamamoto K, Venida A, Yano J, Biancur DE, Kakiuchi M, Gupta S, et al. Autophagy promotes immune evasion of pancreatic cancer by degrading MHC-I. *Nature* 2020;581:100–5.
- [48] Sun M, Hu K, Yang X, Chen Q, Liu Y, Zhou T, et al. Effect and metabolism of high-dose Danshen and Chuanxiong on tumor invasive and metastasis in Lewis lung cancer mouse. *World J Integr Tradit West Med* 2018;13:4. Chinese.
- [49] Ding G, Song MZ, Yu EX. Study on the mechanism of Danshen, Chishao affecting walker 256 liver metastasis in experimental rats. *Chin Oncol* 2001; 11(4):364–6. Chinese.
- [50] Cai W, Xu G, Hu Y, Gu X, Yan J, Qin D, et al. Long-term results of combination of radiation with destagnation in the treatment of nasopharyngeal carcinoma (NPC)—a prospective randomized trial on 188 cases. *Chin J Radiat Oncol* 1992;1(1):8–10. Chinese.
- [51] Wang HZ, Liang XY, Leng X, An J, Wu DL, Qiu SJ. The effect of blood-activating and stasis-removing Chinese medicine on the changes of white matter microstructure of patients with nasopharyngeal carcinoma after radiation therapy: an DTI-TBSS study. *J Clin Radiol* 2020;39(7):1273–7. Chinese.
- [52] Zang W, Bian H, Huang X, Yin G, Zhang C, Han LI, et al. Traditional Chinese medicine (TCM) *Astragalus membranaceus* and *Curcuma wenyujin* promote vascular normalization in tumor-derived endothelial cells of human hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 2019;39(6):2739–47.
- [53] Wang WQ, Liu L, Sun HC, Fu YL, Xu HX, Chai ZT, et al. Tanshinone IIA inhibits metastasis after palliative resection of hepatocellular carcinoma and prolongs survival in part via vascular normalization. *J Hematol Oncol* 2012;5:69.
- [54] Zhang Y, Tie MH, Bi F, Wang K. Tanshinone II improves distribution and anti-tumor efficacy of pegylated liposomal doxorubicin via normalizing the structure and function of tumor vasculature in Hepa1-6 hepatoma mice model. *J Tradit Chin Med* 2018;38(6):815–22.
- [55] Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S, et al. Regulation of an ATG7-Beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science* 2004;304(5676): 1500–2.
- [56] Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ* 2011;18:571–80.
- [57] Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 2005;122(6): 927–39.
- [58] Xu HD, Qin ZH. Beclin 1, Bcl-2 and autophagy. *Adv Exp Med Biol* 2019;1206: 109–26.
- [59] Li P, Shi M, Maique J, Shaffer J, Yan S, Moe OW, et al. Beclin 1/Bcl-2 complex-dependent autophagy activity modulates renal susceptibility to ischemia-reperfusion injury and mediates renoprotection by klotho. *Am J Physiol Renal Physiol* 2020;318(3):F772–92.
- [60] Toton E, Lisiak N, Sawicka P, Rybczynska M. Beclin-1 and its role as a target for anticancer therapy. *J Physiol Pharmacol* 2014;65(4):459–67.
- [61] Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, Cualing HD, Sun M, Sato Y, et al. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol* 2007;9:1142–51.