

# 葛根抑制组蛋白去甲基化酶 LSD1 抗肺癌的作用机制研究

秦婷婷<sup>1,2</sup>, 马金莲<sup>1</sup>, 袁永<sup>1</sup>, 杜锟<sup>2</sup>, 苗晋鑫<sup>1</sup>, 李晓芳<sup>1</sup>, 曾华辉<sup>1</sup>,  
武香香<sup>1\*</sup>, 李中华<sup>1\*</sup>

(1. 河南中医药大学 中医药科学院, 河南 郑州 450046; 2. 河南中医药大学 药学院, 河南 郑州 450046)

**[摘要]** 该研究旨在探究葛根提取物基于组蛋白去甲基化酶(lysine specific demethylase 1, LSD1)对肺癌细胞 H1975 和 H1299 增殖、转移与上皮-间质转化过程(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的影响及作用机制。LSD1 酶活筛选结果显示葛根提取物在蛋白水平能够有效抑制 LSD1 活性,通过 Western blot 验证了葛根在细胞水平通过下调 LSD1 表达量来上调底物 H3K4me2 和 H3K9me2 的表达;MTT 与克隆形成结果表明葛根能有效抑制肺癌细胞的增殖;通过流式细胞术和 DAPI 染色验证了葛根能够促进 H1975 和 H1299 细胞凋亡;划痕实验、Transwell 与 Western blot 结果显示葛根能显著抑制 H1975 和 H1299 细胞的迁移能力,通过上调上皮细胞标志物上皮型钙黏附素(E-cadherin)的表达,下调间质细胞标志物被神经型钙黏附素(N-cadherin)、锌指转录因子(slug)和波形蛋白(vimentin)的表达,逆转2种肺癌细胞的 EMT 进程。综上,葛根具有良好的抗肺癌作用,其机制可能与其下调肺癌细胞中 LSD1 的表达,促进肺癌细胞凋亡,抑制肺癌细胞转移和 EMT 过程有关。该研究为葛根抗肺癌的作用机制提供了新内容,并为基于表观遗传修饰的中药抗肿瘤作用研究提供新思路。

**[关键词]** 葛根;组蛋白去甲基化酶1;肺癌;抗肿瘤;上皮-间质转化

## Mechanism of Puerariae Lobatae Radix against lung cancer by inhibiting histone demethylase LSD1

QIN Ting-ting<sup>1,2</sup>, MA Jin-lian<sup>1</sup>, YUAN Yong<sup>1</sup>, DU Kun<sup>2</sup>, MIAO Jin-xin<sup>1</sup>, LI Xiao-fang<sup>1</sup>, ZENG Hua-hui<sup>1</sup>,  
WU Xiang-xiang<sup>1\*</sup>, LI Zhong-hua<sup>1\*</sup>

(1. Academy of Chinese Medical Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;  
2. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

**[Abstract]** Histone lysine-specific demethylase 1 (LSD1) has become a promising molecular target for lung cancer therapy. Upon the screening platform for LSD1 activity, some Chinese herbal extracts were screened for LSD1 activity inhibition, and the underlying mechanism was preliminarily investigated at both molecular and cellular levels. The results of LSD1 inhibition showed that Puerariae Lobatae Radix extract can effectively reduce LSD1 expression to elevate the expression of H3K4me2 and H3K9me2 substrates in H1975 and H1299 cells. Furthermore, Puerariae Lobatae Radix was evaluated for its anti-lung cancer activity. It had a potent inhibitory ability against the proliferation and colony formation of both H1975 and H1299 cells. Flow cytometry and DAPI staining assays indicated that Puerariae Lobatae Radix can induce the apoptosis of lung cancer cells. In addition, it can significantly suppress the migration and reverse the epithelial-mesenchymal transition (EMT) process of lung cancer cells by activating E-cadherin and suppressing the expression of N-cadherin, slug and vimentin. To sum up, Puerariae Lobatae Radix displayed a robust inhibitory activity against lung cancer, and the mechanism may be related to the down-regulation of LSD1 expression to induce the cell apoptosis and suppress the cell migra-

**[收稿日期]** 2022-03-30

**[基金项目]** 河南省高校科技创新团队支持计划项目(21HIRTSTHN026);河南省高等学校重点科研项目(21A350005, 22A360003, 21A360021);河南省科技攻关计划项目(212102311086)

**[通信作者]** \*武香香, 博士, 教授, E-mail: wuxx-415@126.com; \*李中华, 博士, 助理研究员, E-mail: lizh@hactcm.edu.cn

**[作者简介]** 秦婷婷, 硕士研究生, E-mail: 981512845@qq.com

tion and EMT process. These findings will provide new insights into the action of Puerariae Lobatae Radix as an anti-lung cancer agent and offer new ideas for the study on the anti-cancer action of Chinese medicine based on the epigenetic modification.

[Key words] Puerariae Lobatae Radix; LSD1; lung cancer; anti-tumor activity; epithelial-mesenchymal transition

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20220421.705

目前,癌症已成为全球第二大死亡原因,其死亡人数和发病例数呈逐年上升趋势。其中,肺癌是最常见的恶性肿瘤之一,发病率和病死率均长期高居癌症之首,对社会发展和人类健康带来沉重负担<sup>[1]</sup>。尽管在放化疗、分子靶向以及免疫治疗等方面取得了重要进展,但仍存在耐药、不良反应和应答率低等问题,肺癌的临床治疗现状并不乐观,缺乏早期诊断的生物标志物和有效的治疗靶点仍然是治疗肺癌面临的重要挑战<sup>[2-5]</sup>。

组蛋白赖氨酸特异性去甲基化酶 1(histone lysine-specific demethylase 1, LSD1)是首个被发现的组蛋白去甲基化酶,通过特异性去除组蛋白 H3K4 和 H3K9 的单双甲基化修饰来调控下游基因转录,进而影响细胞的生物学功能,与癌症的发生发展及不良预后密切相关<sup>[6-9]</sup>。LSD1 在包括肺癌的多种肿瘤中异常高表达,已成为表观遗传学抗肿瘤的重要靶点,寻找对 LSD1 具有抑制作用的新型药物是抗肿瘤药物研发的新策略之一。目前,已有多种天然小分子 LSD1 抑制剂被陆续报道,如异槲皮苷和  $\alpha$ -倒捻子素等,均表现出良好的抗肿瘤活性<sup>[10-11]</sup>。中药是现代创新药物开发的重要源泉,从中寻找具有 LSD1 抑制活性的新型天然分子,以及基于 LSD1 所介导的表观遗传调控探讨中药抗肿瘤作用机制研究具有重要意义。

《新刊仁斋直指(附遗方论)》指出“癌者上高下深,岩穴之状,颗颗累垂,热毒深藏”,热毒蕴结是肿瘤发生发展的关键因素,尤其在肿瘤的早、晚期<sup>[12]</sup>。葛根为豆生植物野葛的干燥根茎,始载于《神农本草经》,是一味药食同源的中药材,可解肌透热、生津止渴、透发斑疹、升阳止泻。现代药理学研究表明,葛根粗提物能够促进肺癌细胞 H446 细胞凋亡,抑制 H446 细胞的生长与增殖<sup>[13]</sup>;葛根的活性成分之一葛根素具有广泛的药理活性,能够通过 miR-490/E3 泛素连接酶抑制非小细胞肺癌细胞生长、侵袭和迁移<sup>[14]</sup>。本文利用自行构建的 LSD1 酶活筛选平台,对葛根等中药文库进行了活性筛选。对 LSD1 抑制活性较好的葛根提取物,进一步探究其抗肺癌

作用以及初步作用机制,为葛根抗肺癌作用研究提供了新的内容,同时为基于 LSD1 的中药抗肿瘤研究提供依据。

## 1 材料

**1.1 试剂** 人肺癌细胞株 H1299、H460、H1975 和 A549 购自中国科学院细胞库;葛根等中药材购于郑州药材市场,经河南中医药大学药学教研室董诚明教授鉴定;胎牛血清(fatal bovine serum, FBS)、RIPM 1640、DMEM/F12 培养基(BI 公司,货号 04-001-1ACS、01-100-1ACS、01-172-1ACS);RIPA 裂解液、MTT 粉末、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、青链霉素混合液、Triton X-100(北京索莱宝科技有限公司,货号 R0020、298-31-1、PC0020、P1400、9002-93-1);Transwell 小室、结晶紫、咪唑、凋亡试剂盒、ECL 发光液、异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG)粉末(大连美仑生物技术有限公司,货号 TSC-003-024、548-62-9、288-32-4、MA0220、MA0186、367-93-1);CD86 抗体(Boster 公司,货号 BM4121);LSD1 抗体(abcam 公司,货号 ab129195);GAPDH(杭州贤至生物科技有限公司,货号 AB-P-R001);锌指转录因子(slug)抗体(Cell Signaling Technology 公司,货号 9585T);波形蛋白(vimentin)抗体、上皮型钙黏附素(E-cadherin)抗体、被神经型钙黏附素(N-cadherin)抗体、组蛋白 3(histone 3, H3)抗体、H3K4me2 抗体、H3K9me2 抗体(杭州华安生物技术有限公司,货号 ET1610-39、ET1607-75、ET1607-37、EM30605、R1110-3、ET1611-51);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG、辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司,货号 ZB-2301、ZB-2305); $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)(成都正能生物技术有限公司,货号 250132);荧光红(10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine, Amplex Red)染料(Cayman chemical 公司,货号 10010469);H3K4me2 多肽(吉尔生化上海有限公司,货号 198897);辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)粉末(BC Grade 公司,货号 A500691-0100);HEPES、NP-40(北京博奥拓达科技有限公司,货号 9016-45-9、

7365-45-9)。

**1.2 仪器** CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(ThermoFisher Scientific 公司,型号 3111);全波长酶标仪(ThermoFisher-Scientific 公司,型号 Multiskan GO);正置荧光显微镜(Nikon 公司,型号 Eclipse Tiz);电泳仪电源、垂直电泳槽(北京六一生物科技有限公司,型号 Tanon VE-180B、DYY-6C);自动凝胶成像系统(Bio-Rad 公司,型号 Universal Hood III);pH 计(上海仪电科学仪器有限公司,型号 PHS-3C);流式细胞仪(BD 公司,型号 FACSCanto™)。

## 2 方法

**2.1 Amplex Red 荧光法筛选中药提取物** 利用 Amplex Red 荧光法筛选 LSD1 抑制活性<sup>[15]</sup>。通过 RT-PCR 获得编码 LSD1 的 cDNA,制备 pET-28b-LSD1 质粒。将质粒转染到 BL21(DE3) 中,加入 0.25 mmol·L<sup>-1</sup> 的 IPTG,20 ℃ 过夜培养以诱导 LSD1 高表达。收集菌体,超声破碎后收集菌体总蛋白,通过亲和色谱、离子交换色谱对其进行纯化。然后,将终浓度为 100 μg·mL<sup>-1</sup> 的中药提取物与 LSD1 重组蛋白、底物 H3K4me2 共同孵育。加入 HRP 和 Amplex Red 测量激发波长 530 nm 和发射波长 590 nm 下的荧光,计算中药提取物的抑制率。

**2.2 细胞培养** H1299、H1975 和 H460 细胞接种于 10% 胎牛血清、1% 青链霉素混合液的 RPMI 1640 培养基中,A549 细胞接种于 10% 胎牛血清、1% 青链霉素混合液的 DMEM/F12 培养基中,于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养,每 2~3 d 进行传代。

**2.3 MTT 法检测细胞增殖活性** 将处于对数生长期的细胞均匀铺于 96 孔板中(5 000~6 000 个/孔)。中药提取物活性筛选过程中,中药提取物终浓度为 2 mg·mL<sup>-1</sup>,对照组加入空白培养基。葛根提取物 IC<sub>50</sub> 检测实验中,终浓度为 4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.062 5 mg·mL<sup>-1</sup>,对照组加入空白培养基。在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下孵育,48 h 时更换 1 次含药培养基。72 h 后加入 20 μL 的 MTT 溶液,37 ℃ 避光培养 4 h 后弃去上清,加入 150 μL 的 DMSO 并在摇床上振荡 10 min 以充分溶解板底甲瓨。然后在 490 nm 条件下检测每孔吸光度,计算细胞活力,抑制率 =  $(1 - A_{\text{给药组}} / A_{\text{对照组}}) \times 100\%$ ,A 为吸光度。

**2.4 克隆形成实验** 取对数生长期细胞,均匀铺于 6 孔板中,每孔约 1 000 个。待贴壁后分别将不同浓

度的葛根提取物加入对应的孔中,使 H1975 细胞组的终浓度为 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 mg·mL<sup>-1</sup>,H1299 细胞组的终浓度为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1 mg·mL<sup>-1</sup>。置于培养箱内培养 8~10 d,每 2 d 换 1 次液。将 6 孔板取出,弃去上层培养基并用 PBS 冲洗 2 次,4% 多聚甲醛室温固定 10 min,弃去多聚甲醛,PBS 清洗 2 次。加入 0.1% 结晶紫溶液染色 2 min,洗去染料后晾干拍照。

**2.5 DAPI 法细胞核染色** 在 24 孔板中根据需求铺对应个数的细胞爬片,将细胞以  $1 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^4$  个/孔的密度接种于 24 孔板中,加培养基至 1 mL。将 24 孔板置于培养箱中,待细胞贴壁于爬片上,弃旧培养基,加入不同浓度的葛根提取物,使 H1975 细胞组的终浓度为 0、2.8、4、4.4 mg·mL<sup>-1</sup>,H1299 细胞组的终浓度为 0、2、3.2、4.4 mg·mL<sup>-1</sup>。37 ℃ 培养 48 h 后,弃去原培养基,PBS 洗涤 2 次后,用 4% 多聚甲醛溶液固定 20 min。然后,用 PBS 洗涤 3 次,加入 0.5% Triton X-100 室温孵育 20 min。再用 PBS 洗涤 3 次,用 10% BSA 溶液封闭 30 min。加入 DAPI 溶液孵育 2 min,PBS 洗涤 3 次后,用微弯的 1 mL 针头翘起爬片,倒扣于已滴加约 10 μL 抗淬灭剂的载玻片上封片,荧光显微镜下拍照。

**2.6 流式细胞术** 将处于对数生长期的细胞均匀铺于 6 孔板中,待贴壁后加入不同浓度的葛根提取物,使 H1975 细胞组的终浓度为 0、1、2、3 mg·mL<sup>-1</sup>,H1299 细胞组的终浓度为 0、1、2、4 mg·mL<sup>-1</sup>。置于培养箱中 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下孵育 48 h。弃去原培养基,用不含 EDTA 的 0.25% 胰酶消化细胞,加入 2 mL 培养基终止消化,3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 4 min 收集细胞,PBS 洗涤 2 次,加入 1×binding buffer 重悬细胞,使细胞浓度达到  $1 \times 10^6$  个/mL。取 100 μL 细胞悬液,每管加入 5 μL Annexin-FITC 与 10 μL 的 PI 染料避光孵育 15 min。孵育完成后,每孔加入 400 μL 1×binding buffer,混匀后用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。另设经凋亡诱导的正常细胞、PI 单染、Annexin-FITC 单染 3 个对照组。

**2.7 细胞划痕实验** 将处于对数生长期的细胞按每孔  $2.5 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$  个的密度均匀铺于 6 孔板中,待细胞贴壁且密度达 80%~90% 时,用 200 μL 枪头在每孔孔底划宽度均匀、方向一致的直线。划完之后弃去原培养基,用 PBS 轻轻洗涤 2 次,洗去漂浮的细胞。配制含有不同浓度葛根提取物的 2% FBS

培养基,使 H1975、H1299 细胞组的终浓度均为 0、0.4、0.8、1.2 mg·mL<sup>-1</sup>。显微镜下拍照记录划痕后画面。置于培养箱内 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 36 h 后拍照,观察用药后细胞划痕的愈合情况。

**2.8 Transwell 实验** 下室加入 600 μL 含有 20% 胎牛血清的培养基。上室接种 15 000 个细胞/孔,在 1%FBS 培养基中培养,同时加入葛根提取物,使 H1975、H1299 细胞组的终浓度均为 0、1.6、2、2.4 mg·mL<sup>-1</sup>。在培养箱中孵育 48 h 后,用 PBS 洗 2 次。用棉签擦拭上室表面未穿过膜的细胞,将穿过膜的细胞用甲醛固定 10 min。0.1%结晶紫染色 30 min,显微镜下拍照。每个小室取 5 个视野,对染色细胞进行计数。

**2.9 组蛋白提取** 收集对数生长期细胞并进行细胞计数,将细胞以 2.5×10<sup>5</sup>~2.6×10<sup>5</sup> 个/孔的密度均匀铺于 6 孔板中,细胞贴壁后不同浓度含药培养基 37 ℃ 孵育 48 h,其中 H1975 组浓度分布为 0、0.5、1、1.5 mg·mL<sup>-1</sup>,H1299 组浓度分布为 0、1、1.5、2 mg·mL<sup>-1</sup>。0.25%胰蛋白酶溶液消化并收集细胞,离心后弃上清。PBS 洗涤重悬,3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 4 min。重复 2 次后加入 1 mL NP-40 裂解液,置于冰上裂解 30 min。10 000 r·min<sup>-1</sup> 条件下 4 ℃ 离心 5 min,弃上清并加入 100 μL 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 的盐酸溶液,冰上静置 30 min。10 000 r·min<sup>-1</sup> 条件下 4 ℃ 离心 10 min,收集上清液转移至新 EP 管内,加入 15 μL 的 1 mol·L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液。混合均匀并加入对应体积的蛋白酶抑制剂、蛋白磷酸酶抑制剂后存放于-80 ℃。

**2.10 Western blot 实验** 不同浓度葛根提取物处理细胞后,分别提取 H1975、H1299 组蛋白与总蛋白,其中 H1975 组质量浓度分布为 0、0.5、1、1.5 mg·mL<sup>-1</sup>,H1299 组质量浓度分布为 0、1、1.5、2 mg·mL<sup>-1</sup>。对蛋白样品分别进行 BCA 定量后,加入上样缓冲液,加热至 95 ℃、10 min,使蛋白质变性。SDS-PAGE 凝胶电泳,转移至 PVDF 膜上。用 5% 的脱脂牛奶密封后,用一抗在 4 ℃ 下孵育一夜。次日用 PBST 冲洗 PVDF 膜,二抗孵育 1 h。显影后图像通过 Image Lab 进行分析。

**2.11 统计学分析** 所有数据使用 GraphPad 9.0 与 SPSS 21.0 进行统计学处理,均以  $\bar{x}\pm\text{SEM}$  表示,组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。P<0.05 为差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 中药提取物抑制 LSD1 酶活性的筛选** 将 32 种中药提取物配制成 100 mg·mL<sup>-1</sup> 的水溶液,利用基于荧光的 LSD1 抑制剂筛选方法进行初步检测。筛选结果见表 1,在 100 μg·mL<sup>-1</sup> 时有 8 种中药提取物对 LSD1 酶活性的抑制率在 85% 以上。

表 1 中药提取物的 LSD1 抑制活性( $\bar{x}\pm\text{SEM}$ ,n=3)

Table 1 Inhibitory activity of Chinese herbal extracts against LSD1 ( $\bar{x}\pm\text{SEM}$ ,n=3) %

药物名称	抑制率	药物名称	抑制率
半枝莲	53.36±0.16	芦根	59.28±0.07
穿心莲	47.85±0.12	罗汉果	77.33±0.22
大黄	82.50±0.01	马齿苋	82.80±0.15
大青叶	70.02±0.03	牡丹皮	31.23±0.08
丹参	73.91±0.04	蒲公英	91.73±0.11
葛根	95.60±0.01	七叶一枝花	94.76±0.03
枸杞	3.69±0.13	人参	-13.03±0.14
贯众	70.04±0.06	忍冬藤	86.54±0.11
黄柏	52.56±0.09	三七	60.03±0.04
黄连	72.51±0.11	山豆根	87.93±0.01
黄芩	61.06±0.08	熟地黄	47.81±0.04
金荞麦	55.70±0.17	水飞蓟	71.37±0.02
金银花	96.12±0.06	土茯苓	82.37±0.05
苦参	54.94±0.05	夏枯草	89.99±0.08
连翘	76.79±0.05	鱼腥草	74.47±0.10
龙葵	87.42±0.07	栀子	83.88±0.07

**3.2 中药提取物抑制肺癌细胞增殖活性的筛选** 利用 MTT 法初步评价 LSD1 酶活性抑制率大于 85% 的 8 种中药提取物对肺癌细胞株 H1299、H460、H1975 和 A549 增殖活性的影响,见表 2,在 2 mg·mL<sup>-1</sup> 时葛根提取物对 4 株细胞的增殖活性抑制率均达到了 50% 以上,而金银花和山豆根仅对 H1299 细胞表现出较好的抑制作用。结合表 1 中药提取物酶活性筛选结果,发现葛根同时具有良好的抑制 LSD1 酶活性与肺癌细胞活性的能力,作者选用葛根提取物进行了下一步研究。

**3.3 葛根提取物抑制肺癌细胞 LSD1 活性** 将 H1299 和 H1975 细胞用葛根提取物处理 48 h 后,分别提取组蛋白与总蛋白,用 Western blot 检测 LSD1 底物 H3K4me2、H3K9me2 以及 LSD1 蛋白的表达量,见图 1。H1975 与 H1299 细胞中 H3K4me2 和 H3K9me2 表达量均明显升高,而 LSD1 蛋白表达量下降。这些结果表明,葛根提取物能够在细胞水平通过降低 LSD1 表达量,来上调其底物 H3K4me2 和

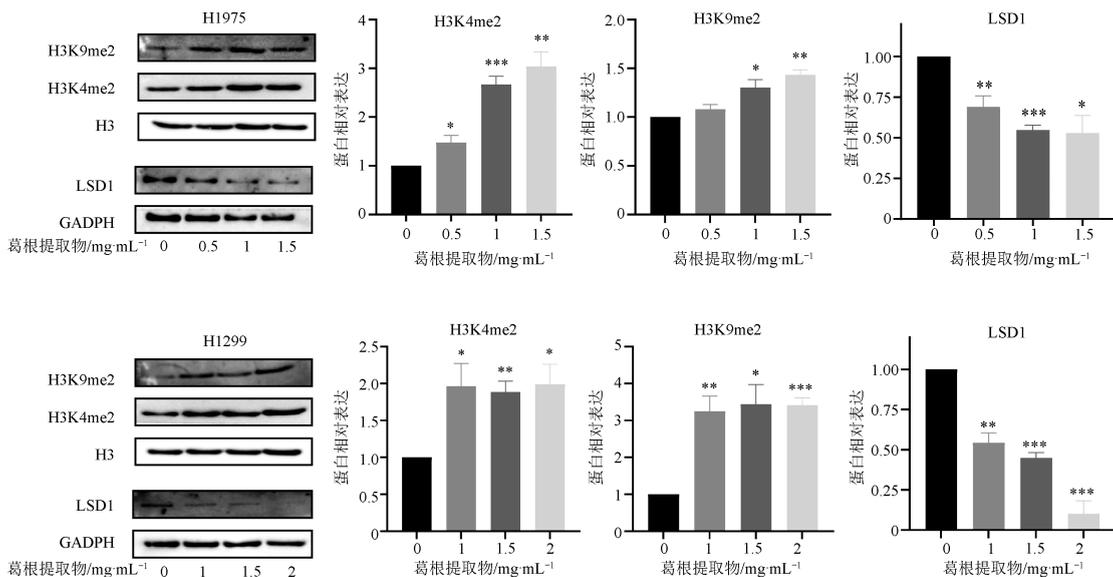
表2 中药提取物抑制肺癌细胞增殖活性( $\bar{x}\pm\text{SEM}, n=3$ )

Table 2 Antiproliferative ability of Chinese herbal extracts against lung cancer cells ( $\bar{x}\pm\text{SEM}, n=3$ ) %

药物名称	H1299 抑制率	H460 抑制率	A549 抑制率	H1975 抑制率
葛根	53.01±0.30	59.88±0.07	50.11±0.07	66.41±0.02
金银花	58.93±0.02	<50	<50	<50
蒲公英	<50	<50	<50	<50
龙葵	<50	<50	<50	<50
七叶一枝花	<50	<50	<50	<50
忍冬藤	<50	<50	<50	<50
山豆根	74.19±0.02	<50	<50	<50
夏枯草	<50	<50	<50	<50

H3K9me2 的表达,其调控 LSD1 表达下调的具体作用机制有待进一步探讨。

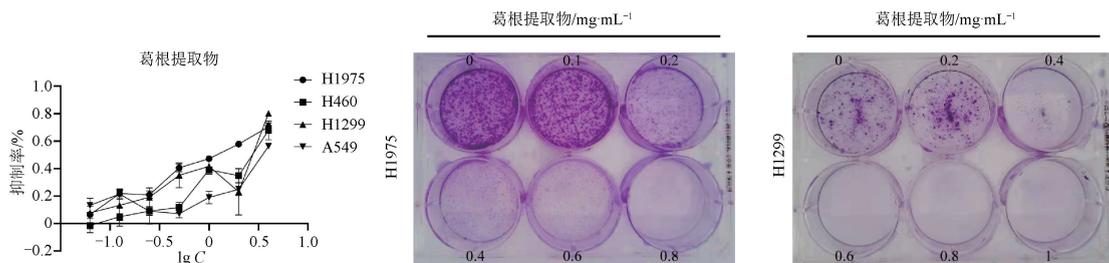
**3.4 葛根提取物抑制肺癌细胞增殖活性** 用 MTT 法进一步测定了葛根对 4 种肺癌细胞株 H1299、H1975、H460 和 A549 的  $IC_{50}$ , 见图 2, 葛根对 4 株细胞均有较好的增殖抑制作用, 其  $IC_{50}$  分别为 1.66、1.16、2.69、9.64  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。此外, 克隆形成实验结果表明, 随着葛根提取物浓度的增加, H1975、H1299 细胞克隆数量明显减少, 说明葛根抑制了肺癌细胞 H1975 和 H1299 的克隆形成能力。



与对照组 ( $0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 比较 \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ , \*\*\*  $P<0.001$  (图 5, 6 同)。

图 1 葛根提取物在细胞水平对 LSD1 活性的影响( $\bar{x}\pm\text{SEM}, n=3$ )

Fig. 1 Effect of Puerariae Lobatae Radix extract on LSD1 activity at cell level ( $\bar{x}\pm\text{SEM}, n=3$ )



C. 葛根提取物质量浓度, 单位为  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

图 2 葛根提取物对肺癌细胞增殖活性的影响( $\bar{x}\pm\text{SEM}, n=3$ )

Fig. 2 Effect of Puerariae Lobatae Radix extract on proliferation of lung cancer cells ( $\bar{x}\pm\text{SEM}, n=3$ )

**3.5 葛根提取物促进肺癌细胞凋亡** 将葛根处理 H1975 和 H1299 细胞 48 h 后, 用 DAPI 染色进行细胞形态学观察, 对照组细胞核均着色均匀, 整体比较

暗淡。而随着葛根浓度的增加, 2 种细胞的形态均发生明显变化, 细胞核均表现出不同程度的皱缩和分裂, 且有凋亡小体产生, 如箭头所示。进一步, 经

Annexin V-FITC/PI 染色后用流式细胞仪检测葛根对细胞凋亡的影响。随着葛根浓度的增大,H1975 细胞中凋亡细胞比例从 0 逐步增大至 30.6%;

H1299 细胞中凋亡细胞比例从 0.1% 增加到 25.4%,表明葛根能够剂量依赖性诱导 H1975 和 H1299 细胞凋亡,见图 3。

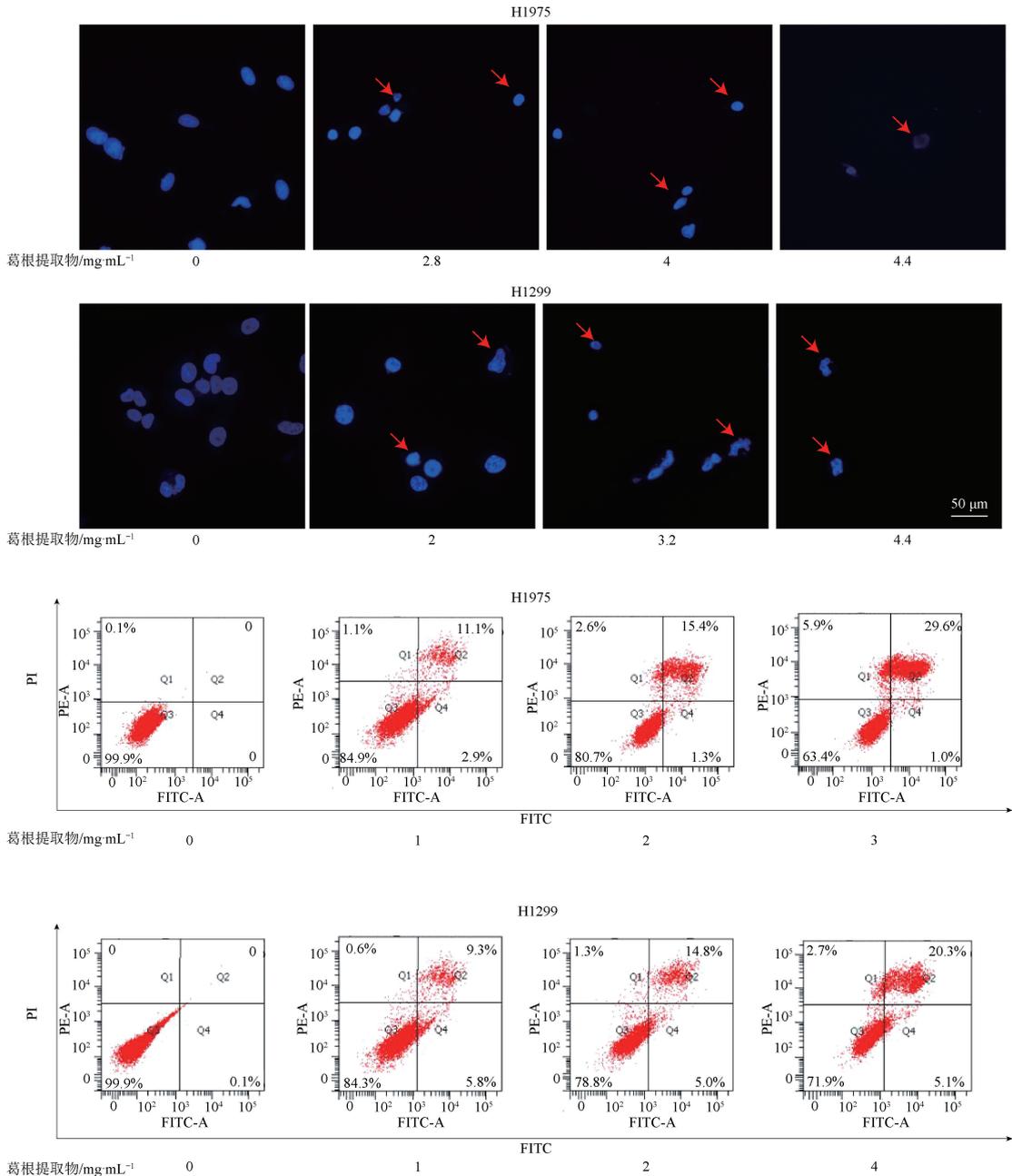


图 3 葛根提取物对肺癌细胞凋亡的影响

Fig. 3 Effect of Puerariae Lobatae Radix extract on the apoptosis of lung cancer cells

**3.6 葛根提取物抑制肺癌细胞的转移** 研究表明,LSD1 过表达与肺癌细胞的转移与侵袭有关,抑制 LSD1 活性对肿瘤细胞的转移和侵袭具有抑制作用<sup>[16]</sup>。将不同浓度的葛根提取物处理 H1975

和 H1299 细胞 36 h 后,通过划痕实验观察葛根对细胞迁移能力的影响,见图 4,与对照组相比,随着葛根浓度的升高,2 种肺癌细胞的迁移能力均显著下降。

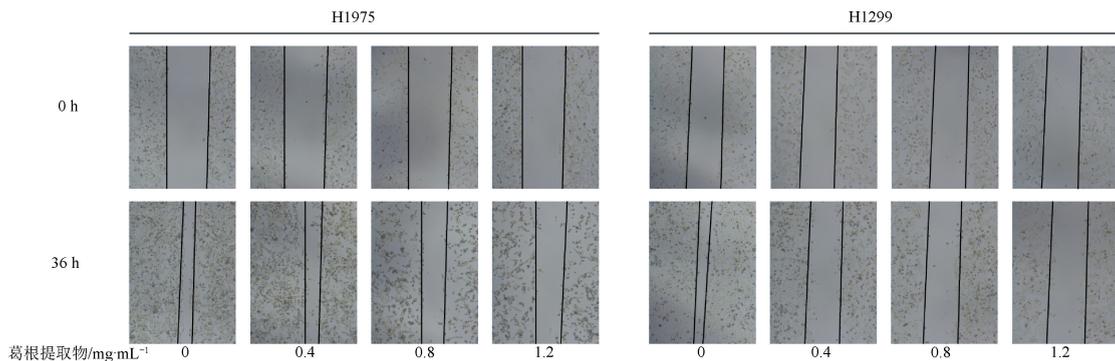
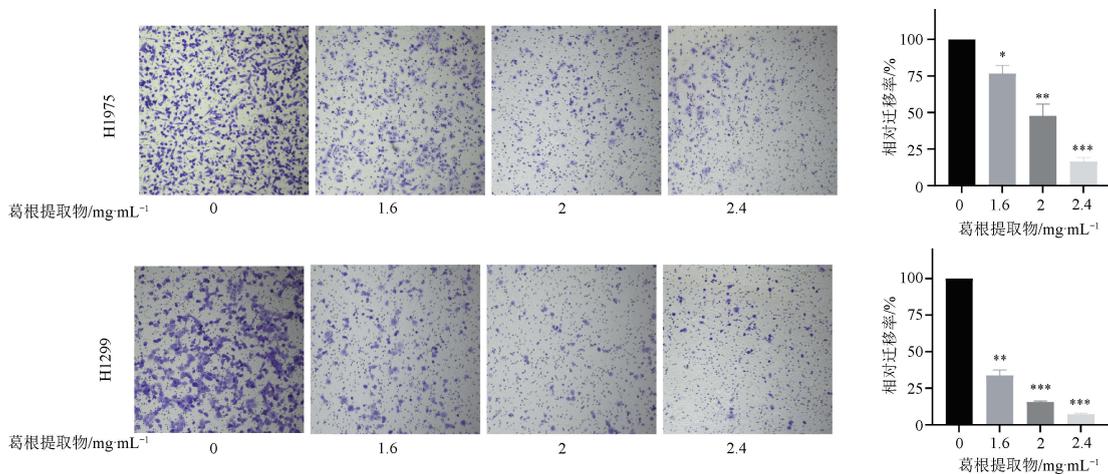


图4 划痕实验检测葛根提取物对肺癌细胞迁移能力的影响

Fig. 4 Effect of Puerariae Lobatae Radix extract on migration of lung cancer cells in wound healing assay

在 Transwell 小室迁移实验中,随着葛根提取物浓度的增加,与对照组相比,穿透过小室细胞数量均

明显越少,见图5,表明葛根能够剂量依赖性抑制 H1975 和 H1299 细胞的转移。

图5 Transwell 检测葛根提取物对肺癌细胞迁移能力的影响( $\bar{x}\pm\text{SEM}$ ,  $n=3$ )Fig. 5 Effect of Puerariae Lobatae Radix extract on migration of lung cancer cells in transwell assay ( $\bar{x}\pm\text{SEM}$ ,  $n=3$ )

**3.7 葛根提取物逆转肺癌细胞上皮-间质转化 (EMT) 过程** 将葛根提取物处理 H1975 和 H1299 细胞株 48 h 后提取总蛋白,检测 EMT 相关蛋白上皮型钙黏附素 E-cadherin、被神经型钙黏附素 N-cadherin、锌指转录因子 slug、波形蛋白 vimentin 的表达,见图6,随着葛根浓度的增加,与对照组相比,2种肺癌细胞中上皮细胞标志物 E-cadherin 的蛋白表达量均显著升高,而间质细胞标志物 N-cadherin、slug 和 vimentin 均被下调。这些结果说明葛根提取物对2种受试肺癌细胞的 EMT 过程均有抑制作用。

#### 4 讨论

随着靶向治疗和免疫治疗的快速发展,肺癌的

诊疗现状已有了显著改变,但仍面临耐药和临床响应率低等缺点,探索新的分子靶点及靶向药物具有重要意义。LSD1 是一种重要的表观遗传修饰酶,通过调控肿瘤细胞的脂质代谢、EMT、凋亡和自噬等过程,与肿瘤的发生发展关系密切<sup>[7,17-20]</sup>。LSD1 在肺癌中普遍高表达,通过调节 EMT 进程并促进肺癌的转移与侵袭,与肺癌的不良预后高度相关<sup>[16,21]</sup>。

中药在治疗肺癌等恶性肿瘤方面潜力巨大,如人参、姜黄、半枝莲、金荞麦等,亦有多种来源于这些中药的天然药物分子被报道具有抗肺癌活性<sup>[22-26]</sup>。但目前用于临床的成药不多,相关机制研究还不够深入,有待进一步深入探索。本文基于 LSD1 对自

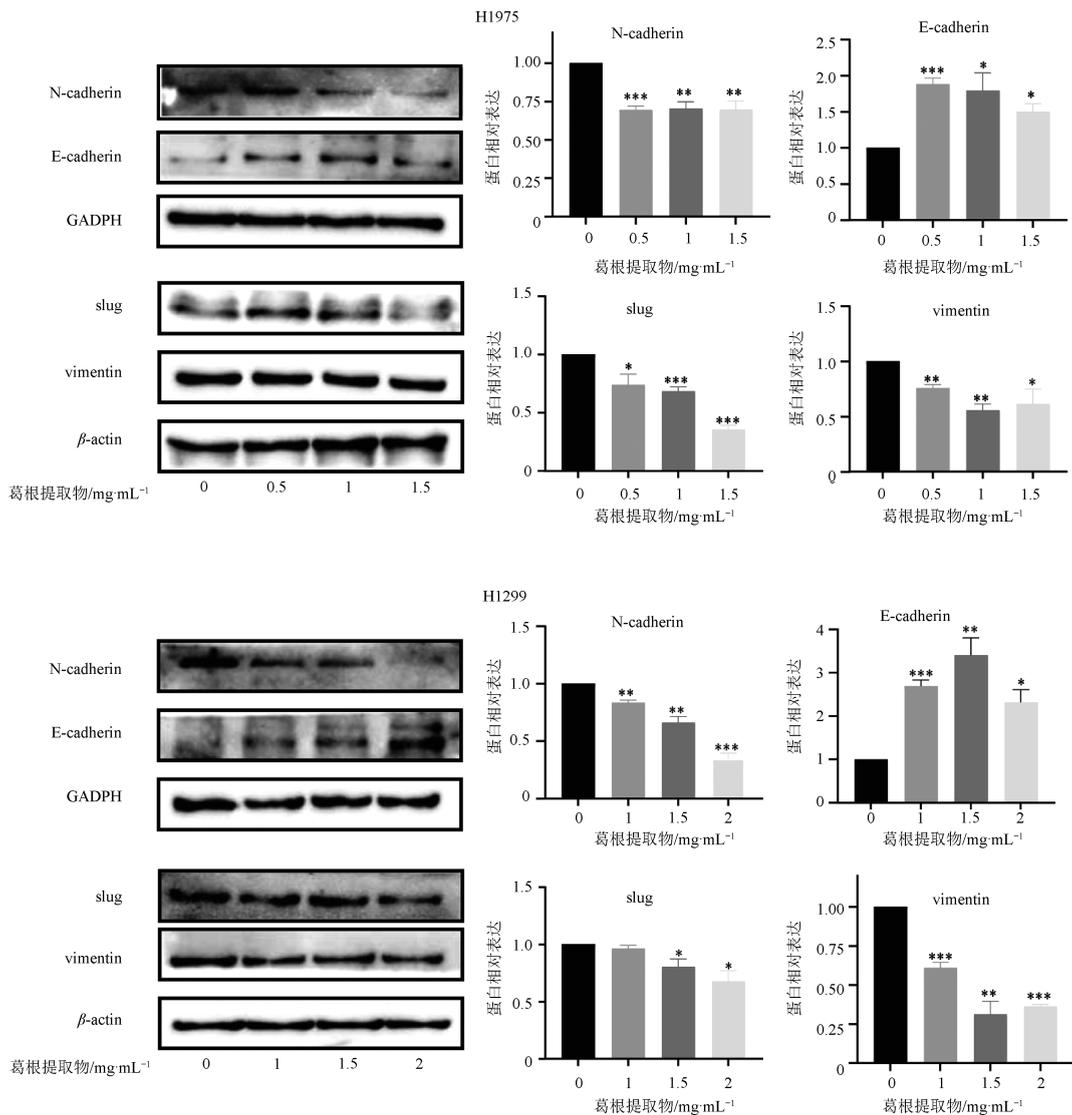


图 6 葛根提取物对肺癌细胞上皮-间质转化过程 (EMT) 过程的影响 ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ,  $n = 3$ )

Fig. 6 Effect of Puerariae Lobatae Radix extract on epithelial-mesenchymal transition (EMT) process of lung cancer cells ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ,  $n = 3$ )

建中药文库进行酶活筛选和抗肺癌活性评价,对于新型 LSD1 抑制剂的发现以及中药抗肿瘤作用的表现遗传机制具有一定意义。

通过对 32 种中药提取物进行 LSD1 抑制活性评价,发现葛根具有较好的 LSD1 抑制活性。MTT 实验结果表明,葛根提取物对 4 株 LSD1 高表达的肺癌细胞株 H1975、H1299、H460 和 A549 均具有明显的增殖抑制作用。为了进一步验证葛根对 LSD1 的抑制作用,通过 Western blot 验证了葛根在 H1975 和 H1299 2 株细胞水平上能够通过抑制 LSD1 的表达量来上调 H3K4me2 和 H3K9me2 的表达。

H3K4me2 和 H3K9me2 是 LSD1 的催化底物,可以被 LSD1 特异性识别去除其二甲基化,通过检测 H3K4me2、H3K9me2 的表达能够反映 LSD1 的表达量和活性变化<sup>[6]</sup>。目前,已报道的 LSD1 小分子抑制剂均是通过与 LSD1 蛋白结合来抑制其酶活,而本实验中葛根则是通过抑制 LSD1 表达来诱导其底物上调,其调控 LSD1 表达下调的具体作用机制值得进一步探讨。

细胞凋亡是一种主动的、定期发生的、维持内环境稳态的程序性死亡方式,能够起到细胞更新换代,维持机体内部稳定平衡的作用<sup>[27]</sup>。细胞凋亡的紊

乱与肿瘤的发生发展紧密相关<sup>[28]</sup>。本文通过 DAPI 染色法与流式细胞术检测发现,葛根能够诱导肺癌细胞 H1975 和 H1299 的早、晚期凋亡细胞比例增加,形态学观察发现葛根能够诱导肿瘤细胞发生皱缩,细胞核裂解以及凋亡小体的产生。

EMT 是上皮细胞向间质细胞转化的过程,上皮细胞的标志物表达量降低,同时获得间质细胞标志物而具有间质细胞的特征,使细胞之间失去黏附性和细胞极性,运动性和侵袭能力增加,病理状态下,EMT 过程会引起不可逆的器官纤维化和促进肿瘤的转移和恶化<sup>[29-30]</sup>。各种癌症类型中发生 EMT 的主要常规典型标记物包括上皮细胞表型标志物 E-cadherin 和间充质细胞表型标志物 vimentin、N-cadherin 以及转录因子 slug 等。EMT 过程中转录因子 slug 可以与 E-cadherin 启动子区的 E-box 结合,抑制 E-cadherin 的表达<sup>[31]</sup>。当肿瘤细胞中 E-cadherin 下调时,会使细胞极性增强,细胞间联结力减弱,同时伴随着 vimentin 蛋白表达的增加<sup>[30,32]</sup>。LSD1 可与锌指转录因子 snail/slug 相互作用,去除上皮细胞标志物 E-cadherin 基因启动子区 H3K4 的单双甲基化修饰,抑制其基因转录,促进 EMT 的发生<sup>[18,33]</sup>。因此,对于高表达 LSD1 的肿瘤细胞,抑制 LSD1 的酶活性或者降低 LSD1 的蛋白表达能够显著逆转细胞的 EMT 过程,抑制肿瘤细胞的侵袭和转移能力<sup>[7,34]</sup>。作者检测了 EMT 相关标志性蛋白的表达,结果表明葛根能够有效上调上皮细胞标志物 E-cadherin 的表达,同时下调间质细胞标志物 N-cadherin、slug 和 vimentin 的表达,表明葛根能够抑制肺癌细胞的 EMT 过程。同时,划痕实验与 Transwell 实验结果表明葛根对 H1975 和 H1299 2 株细胞均具有显著的增殖和转移抑制作用。

综上所述,葛根能够有效抑制 LSD1 的表达,抑制肺癌细胞的增殖和转移,诱导肺癌细胞凋亡,阻止肺癌细胞的 EMT 进程。本研究为葛根抗肿瘤作用机制提供了新的内容和依据,有望为基于表观遗传调控的中药抗肿瘤研究提供参考。另外,基于中药抗肿瘤多成分、多通路的作用特点,进一步探讨葛根调控 LSD1 表达的具体分子机制具有重要意义。

#### [参考文献]

[1] YANG L, LI N, WANG M, et al. Tumorigenic effect of TERT and its potential therapeutic target in NSCLC[J]. *Oncol Rep*, 2021, 46 (2):182.

[2] VYFHUIS M A L, ONYEUKU N, DIWANJI T, et al. Advances in proton therapy in lung cancer[J]. *Ther Adv Respir Dis*, 2018, 12: 1.

[3] LIU P, XIANG Y, LIU X, et al. Cucurbitacin B induces the lysosomal degradation of EGFR and suppresses the CIP2A/PP2A/Akt signaling axis in gefitinib-resistant non-small cell lung cancer[J]. *Molecules*, 2019, 24 (3):647.

[4] LU H, JIANG Z. Advances in antibody therapeutics targeting small-cell lung cancer[J]. *Adv Clin Exp Med*, 2018, 27 (9): 1317.

[5] DENG H, LIU J, CAI X, et al. Radical minimally invasive surgery after immuno-chemotherapy in initially-unresectable stage III B non-small cell lung cancer[J]. *Ann Surg*, 2022, 275 (3): e600.

[6] SHI Y, LAN F, MATSON C, et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1[J]. *Cell*, 2004, 119 (7): 941.

[7] ZHANG J, ZHAO D, LI Q, et al. Upregulation of LSD1 promotes migration and invasion in gastric cancer through facilitating EMT[J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 4481.

[8] DERR R S, VAN HOESEL A Q, BENARD A, et al. High nuclear expression levels of histone-modifying enzymes LSD1, HDAC2 and SIRT1 in tumor cells correlate with decreased survival and increased relapse in breast cancer patients[J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 604.

[9] KASHYAP V, AHMAD S, NILSSON E M, et al. The lysine specific demethylase-1 (LSD1/KDM1A) regulates VEGF-A expression in prostate cancer[J]. *Mol Oncol*, 2013, 7 (3): 555.

[10] XU X, PENG W, LIU C, et al. Flavone-based natural product agents as new lysine-specific demethylase 1 inhibitors exhibiting cytotoxicity against breast cancer cells *in vitro*[J]. *Bioorg Med Chem*, 2019, 27 (2): 370.

[11] HAN C, LI Z, HOU J, et al. Bioactivity evaluation of natural product  $\alpha$ -mangostin as a novel xanthone-based lysine-specific demethylase 1 inhibitor to against tumor metastasis[J]. *Bioorg Chem*, 2018, 76: 415.

[12] 巨大维,魏品康. 清热解毒中药在恶性肿瘤防治中的药用机理与应用[J]. *吉林中医药*, 2007, 27(1):60.

[13] 韩萍,裴兰英,李娟,等. 葛根粗提物、葛根素对肺癌 H446 细胞增殖的抑制作用及其机制[J]. *山东医药*, 2008, 48 (15): 7.

[14] 张钰欣,张臻臻,赵利刚,等. 葛根素通过 miR-490/E3 泛素连接酶抑制非小细胞肺癌细胞生长、侵袭和迁移[J]. *中国医学科学院学报*, 2022, 44 (1): 91.

[15] LI Z, QIN T, LI Z, et al. Discovery of quinazoline derivatives as a novel class of potent and *in vivo* efficacious LSD1 inhibitors by drug repurposing[J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 225: 113778.

[16] LV T, YUAN D, MIAO X, et al. Over-expression of LSD1 promotes proliferation, migration and invasion in non-small cell lung cancer[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7 (4): e35065.

- [17] CHAO A, LIN C Y, CHAO A N, et al. Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) destabilizes p62 and inhibits autophagy in gynecologic malignancies[J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (43): 74434.
- [18] FENG J, XU G, LIU J, et al. Phosphorylation of LSD1 at Ser112 is crucial for its function in induction of EMT and metastasis in breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2016, 159 (3): 443.
- [19] LI Y, QIAN X, LIN Y, et al. Lipidomic profiling reveals lipid regulation by a novel LSD1 inhibitor treatment[J]. *Oncol Rep*, 2021, 46 (5): 233.
- [20] ZOU Z K, HUANG Y Q, ZOU Y, et al. Silencing of LSD1 gene modulates histone methylation and acetylation and induces the apoptosis of JeKo-1 and MOLT-4 cells[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40 (2): 319.
- [21] MOHAMMAD H P, SMITHEMAN K N, KAMAT C D, et al. A DNA hypomethylation signature predicts antitumor activity of LSD1 inhibitors in SCLC[J]. *Cancer Cell*, 2015, 28 (1): 57.
- [22] CHEN Z, CHEN X, LU B, et al. Up-regulated LINC01234 promotes non-small-cell lung cancer cell metastasis by activating VAV3 and repressing BTG2 expression[J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13 (1): 7.
- [23] LI H, HUANG N, ZHU W, et al. Modulation the crosstalk between tumor-associated macrophages and non-small cell lung cancer to inhibit tumor migration and invasion by ginsenoside Rh2 [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18 (1): 579.
- [24] 陈晓锋, 顾振纶, 杨海华, 等. 金荞麦 Fr4 对小鼠 lewis 肺癌细胞 MMP-9、TIMP-1 蛋白表达的影响[J]. *苏州大学学报(医学版)*, 2005, 25 (3): 383.
- [25] 李秋平. 半枝莲提取物对肺癌 A549 细胞增殖、凋亡的影响及与内质网应激的关系[D]. 衡阳:南华大学,2020.
- [26] 刘文虎, 袁江北, 张帆, 等. 姜黄素通过 Wnt3a/ $\beta$ -catenin/EMT 信号通路抑制胃癌细胞的增殖、迁移及侵袭[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44 (14): 3107.
- [27] LIU Z, DING Y, YE N, et al. Direct activation of Bax protein for cancer therapy[J]. *Med Res Rev*, 2016, 36 (2): 313.
- [28] HANAHAN D, WEINBERG R A. The hallmarks of cancer[J]. *Cell*, 2000, 100 (1): 57.
- [29] LAMBERT A W, WEINBERG R A. Linking EMT programmes to normal and neoplastic epithelial stem cells[J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21 (5): 325.
- [30] LUO T, WANG L, WU P, et al. Downregulated vimentin and upregulated E-cadherin in T1 stage non-small-cell lung cancer: does it suggest a mesenchymal-epithelial transition? [J]. *Neoplasma*, 2017, 64 (5): 693.
- [31] HAJRA K M, CHEN D Y, FEARON E R. The slug zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2002, 62 (6): 1613.
- [32] YAN H, ZHU C, ZHANG L. Kinesin family member 18B: a contributor and facilitator in the proliferation and metastasis of cutaneous melanoma [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2019, 33 (12): e22409.
- [33] FERRARI-AMOROTTI G, FRAGLIASSO V, ESTEKI R, et al. Inhibiting interactions of lysine demethylase LSD1 with snail/slugs blocks cancer cell invasion[J]. *Cancer Res*, 2013, 73 (1): 235.
- [34] AMBROSIO S, SACCÀ C D, MAJELLO B. Epigenetic regulation of epithelial to mesenchymal transition by the lysine-specific demethylase LSD1/KDM1A [J]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2017, 1860 (9): 905.

[责任编辑 陈玲]