·论　著·

木蝴蝶苷 B 在非小细胞肺癌顺铂耐药细胞系中的作用机制研究

陈建，孟礼飞，汪俊，李晨蔚，胡文涛

【摘要】目的　探讨木蝴蝶苷 B（OB）在顺铂耐药的非小细胞肺癌细胞系中的抗癌作用及其可能的分子机制。**方法**　以非小细胞肺癌细胞系 A549 和 H1299 为研究对象，通过增加顺铂剂量，持续暴露细胞，建立稳定的顺铂耐药细胞系 A549/DDP 和 H1299/DDP。分别用 OB（30 μmol/L）及二甲基亚砜（DMSO，对照组）对 A549/DDP 和 H1299/DDP 进行处理。通过细胞计数试剂盒-8（CCK-8）实验检测细胞生存能力。采用 Western blot 检测非小细胞肺癌细胞中的凋亡蛋白的相关表达。通过克隆形成实验检测顺铂耐药非小细胞肺癌细胞系的增殖能力。**结果**　OB 表现出低剂量的细胞毒性。OB 能抑制顺铂耐药细胞系 A549/DDP 和 H1299/DDP 的生存能力。Western blot 结果显示 OB 能提高顺铂耐药细胞系 A549/DDP 和 H1299/DDP 中 B 淋巴细胞瘤-2 基因（Bcl-2）相关蛋白 X（Bax）、cleaved-caspase 3 及 cleaved-caspase 9 的蛋白表达，降低 Bcl-2、caspase 9 及 caspase 3 的蛋白表达（均 $P < 0.05$）。克隆形成实验结果显示 OB 可以明显抑制顺铂耐药细胞系中的细胞增殖能力。**结论**　OB 对肺癌细胞仅有低剂量细胞毒性，但能过促进耐药肺癌细胞的凋亡和抑制耐药细胞的增殖能力，增强肺癌细胞对顺铂的敏感性。

【关键词】　木蝴蝶苷 B；非小细胞肺癌；耐药；凋亡蛋白

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2025.02.004

【中图分类号】　R734.2　　**【文献标志码】**　A　　**【文章编号】**　1671-0800(2025)02-0125-04

The mechanism of Oroxin B in cisplatin-resistant non-small cell lung cancer cell lines

CHEN Jian, MENG Lifei, WANG Jun, LI Chenwei, HU Wentao (The First Affiliated Hospital of Ningbo University, Ningbo 315010, Zhejiang, China)

【Abstract】Objective　To explore the anti-cancer effect of Oroxin B (OB) in cisplatin-resistant non-small cell lung cancer cell lines and its possible molecular mechanisms. **Methods**　Non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines A549 and H1299 were used as the research objects. Stable cisplatin-resistant cell lines A549/DDP and H1299/DDP were established by increasing the dose of cisplatin and continuously exposing the cells. A549/DDP and H1299/DDP were treated with OB (30 μmol/L) and DMSO (control group), respectively. The cell viability was detected by the cell counting kit-8 (CCK- 8) assay. Western blot was used to detect the related expression of apoptotic proteins in NSCLC cells. The proliferation ability of cisplatin-resistant NSCLC cell lines was detected by the colony formation assay. **Results**　OB showed low-dose cytotoxicity. OB could inhibit the viability of cisplatin-resistant cell lines A549/DDP and H1299/DDP. Western blot showed that OB could increase the protein expressions of B-cell lymphoma-2 gene (Bcl-2)-associated X protein (Bax), cleaved-caspase 3 and cleaved-caspase 9 in cisplatin-resistant cell lines A549/DDP and H1299/DDP, and decrease the protein expressions of Bcl-2, caspase 9 and caspase 3 (all $P < 0.05$). The colony formation assay showed that OB could inhibit the cell proliferation ability in cisplatin-resistant cell lines significantly. **Conclusions**　OB has low-dose cytotoxicity against lung cancer cells, but can promotes the apoptosis of drug-resistant lung cancer cells and inhibits the proliferation ability of drug-resistant cells, thereby enhancing the sensitivity of lung cancer cells to cisplatin.

【Key words】　Oroxin B; Non-small cell lung cancer; Resistance; Apoptosis proteins

[Modern Practical Medicine,2025,37(2):125-128]

作者单位：　315010 宁波，宁波大学附属第一医院

通信作者：　胡文涛，Email：ningbohwt@163.com

非小细胞肺癌（NSCLC）是肺癌最常见的病理类型[1]。顺铂（DDP）是肺癌常用的化疗药物，可与DNA链间及链内交链，形成DDP-DNA复合物，干扰DNA复制，通过抑制DNA复制和RNA转录，促使肿瘤细胞凋亡[2]。但DDP治疗一段时间后，不可避免地会出现化疗药物耐受，为了改变这一局面，国内外学者也开展了铂类化疗药联合其他药物治疗模式的探索。

木蝴蝶苷B（Oroxin B，OB）是一种从中草药木荷中分离出来的活性黄酮类成分[3-4]。已有文献报道OB及其化学成分如白杨素和黄芩素具有多种药理活性，包括抗菌、抗炎、抗关节炎、止泻、抗结肠炎和抗氧化等[5]。而在抗肿瘤方面，Li等[6]发现，OB可以作为特定的肿瘤抑制内质网应激诱导剂，选择性地诱导恶性B淋巴瘤细胞的肿瘤抑制内质网应激。在肝癌细胞中，OB通过下调miR-221的表达来负调控PTEN基因，从而下调COX-2、血管内皮生长因子（VEGF）、PI3K/p-AKT信号通路，对肝癌细胞具有明显的抑制作用，诱导癌细胞早期凋亡[7]。

然而OB在联合化疗药方面的抗肿瘤效应研究未见明显报道。因此，本研究旨在探索OB在肺癌领域的抗癌作用及其可能的分子机制，为恶性肿瘤细胞制剂的开发和应用提供新的实验依据。

1 资料与方法

1.1 细胞培养和处理 在NSCLC细胞系A549、H1299（ATCC，Manassas，VA，美国）中添加10%胎牛血清（FBS，Gibco，美国）和1%青霉素-链霉素（Gibco，美国）的DMEM培养基（Gibco，美国）。取对数期生长的A549和H1299细胞暴露于浓度从0.5～8 μg/ml的DDP（MCE，中国）培养2个月，建立稳定的耐药细胞系A549/DDP和H1299/DDP。将肺癌细胞和耐药细胞暴露于不同药物浓度OB（MCE，中国）（0～40 μmol/L）下或二甲基亚砜（DMSO，MCE，中国）中（对照组），检测OB对顺铂耐药肺癌细胞生长的影响。

1.2 细胞活力测定 细胞悬液（2 000个细胞/100 μl）接种于96孔板。37℃、5% CO_2 细胞培养箱孵育24 h。采用OB（0、5、10、20、30、40 μmol/L）合并半数致死浓度的DDP或单独的DDP（0、4、8、12、16、20、24 μg/ml）处理细胞24 h。将10 μl CCK-8（Beyotime，中国）反应液添加进每个培养皿中反应2 h。使用分光光度计（上海仪电分析仪器有限公司，中国）在波长450 nm处检测吸光度。计算细胞生长抑制率=（1−药物组OD值/对照组OD值）×100%，并计算 IC_{50} 值。

1.3 免疫印迹 用RIPA缓冲液（J63306）联合蛋白酶抑制剂（C600387）、苯基甲基磺酰氟（PMSF）裂解提取经过处理的A549、H1299细胞及肺癌耐药细胞系中的总蛋白，并采用BCA进行浓度测定。20 μl裂解物转移到聚偏氟乙烯（PVDF）膜上，行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）电泳，上述试剂均购自碧云天。室温下5%脱脂牛奶封闭2 h，加一抗在4 ℃下孵育过夜，然后加二抗在室温下进一步培养1 h。TBST洗涤三次，增强化学发光和western blotting底物显色。使用Azure Imager c300化学发光仪进行曝光，并使用Image J计算灰度值。一抗均为针对Bcl-2、cleaved-caspase 9、cleaved-caspase 3和内参GAPDH（ab18160，1∶2 000，Abcam，UK）的抗体，二抗为辣根过氧化物酶（HRP）偶联山羊抗兔IgG H&L抗体（65-6120，1∶1 000，Invitrogen，美国）。

1.4 克隆形成测定 取 1×10^3 个细胞培养于六孔板中，37 ℃孵育至70%合度。将A549/DDP和H1299/DDP细胞各1 000个培养于10% FBS和2 μg/ml DDP的培养基中。培养两周后，细胞在4%多聚甲醛中固定15 min，并用0.1%结晶紫染色，计算可见菌落的相对数量。

1.5 统计方法 采用SPSS 26.0统计软件进行统计分析。计量资料以均数±标准差表示，采用单因素方差分析和 t 检验。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 建立NSCLC细胞系A549和H1299对顺铂耐药的细胞系 通过增加顺铂剂量，持续暴露细胞，建立稳定的顺铂耐药细胞系A549/DDP和H1299/DDP。CCK-8法测定A549/DDP和H1299/DDP细胞的 IC_{50} 值，结果显示，致耐药细胞系半数死亡的顺铂浓度明显高于普通细胞系，表明A549/DDP和

H1299/DDP 细胞系构建成功，见图 1。

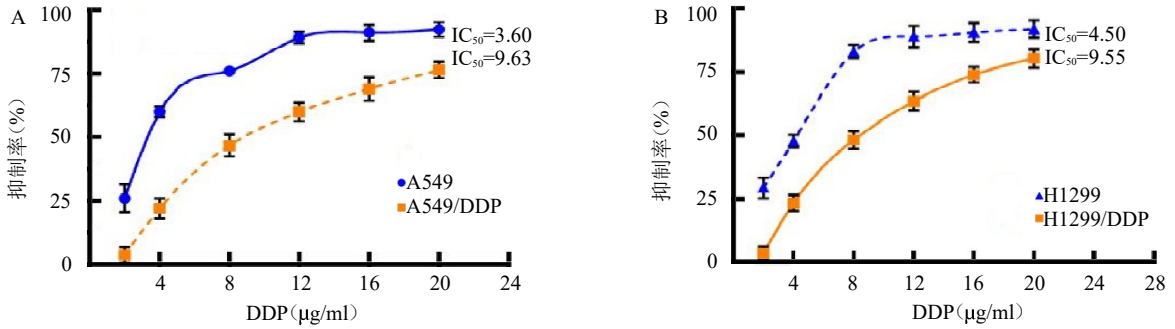
2.2　OB 对 A549 和 H1299 的细胞生存能力影响　随着 OB 剂量的增加，A549 和 H1299 细胞的增殖能力受到轻微抑制。CCK-8 结果显示 OB 对 A549 和 H1299 细胞的 IC_{50} ＞ 500 μmol/L，见图 2。

2.3　OB 对耐药细胞系 A549/DDP 和 H1299/DDP 的生存能力影响　随着 OB 剂量的增加，耐药细胞系 A549/DDP 和 H1299/DDP 均受到抑制，图 3A ～ B。Western blot 显示 OB 能抑制 Bcl-2 蛋白表达，促进 Bax、cleaved-caspase 9、cleaved-caspase 3 的蛋白表达（均 P ＜ 0.05），图 3C ～ D。克隆形成实验显示 OB 可以抑制顺铂耐药细胞系 A549/DDP 和 H1299/DDP 的细胞增殖，图 3E ～ F。

3　讨论

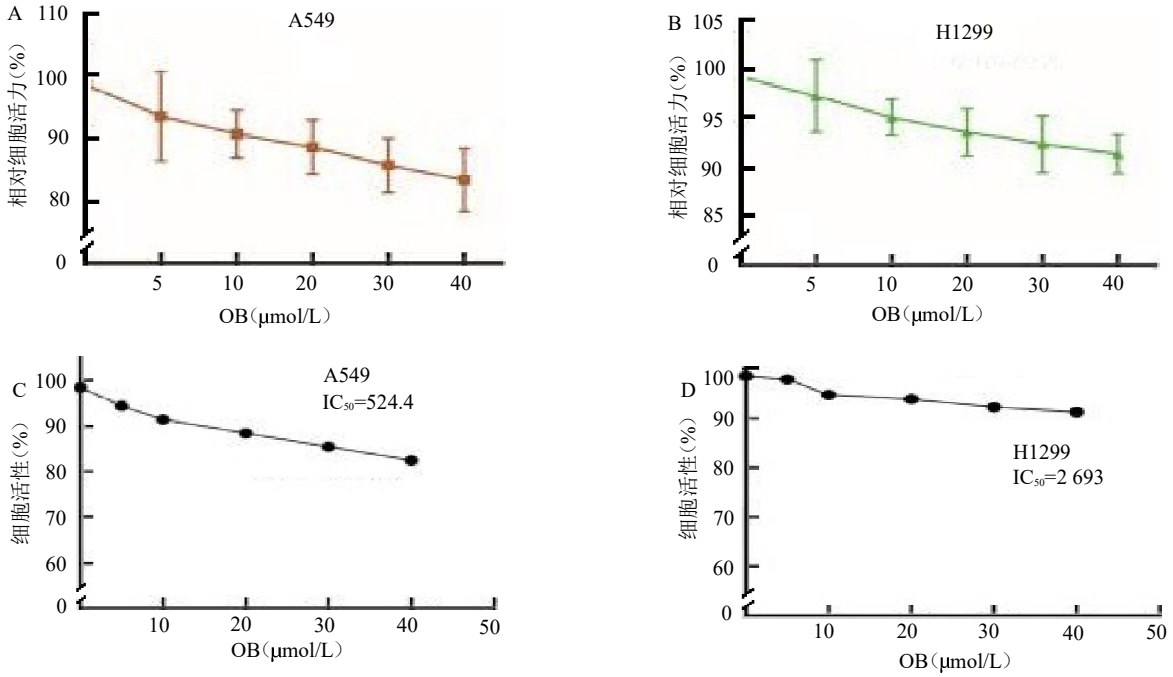
OB 是一种从中草药木荷中分离出来的活性黄酮类成分，具有明显的抗癌活性，且无明显的细胞毒性[8]，并可能联合化疗药在抗肿瘤中展现出一定效果。

本研究建立了对顺铂耐药的 NSCLC 细胞系，包括 A549/DDP 和 H1299/DDP 细胞，并计算了顺铂的 IC_{50} 值。结果显示 A549/DDP 和 H1299/DDP 细胞的 IC_{50} 值均显著高于亲代细胞；加入不同剂量 OB 后，随着剂量的增加，NSCLC 细胞系 A549 和 H1299 细胞生存能力不受药物剂量影响，表明 OroxinB 对



注：A 为 A549 及耐药细胞系，B 为 H1299 及耐药细胞系，DDP 为顺铂

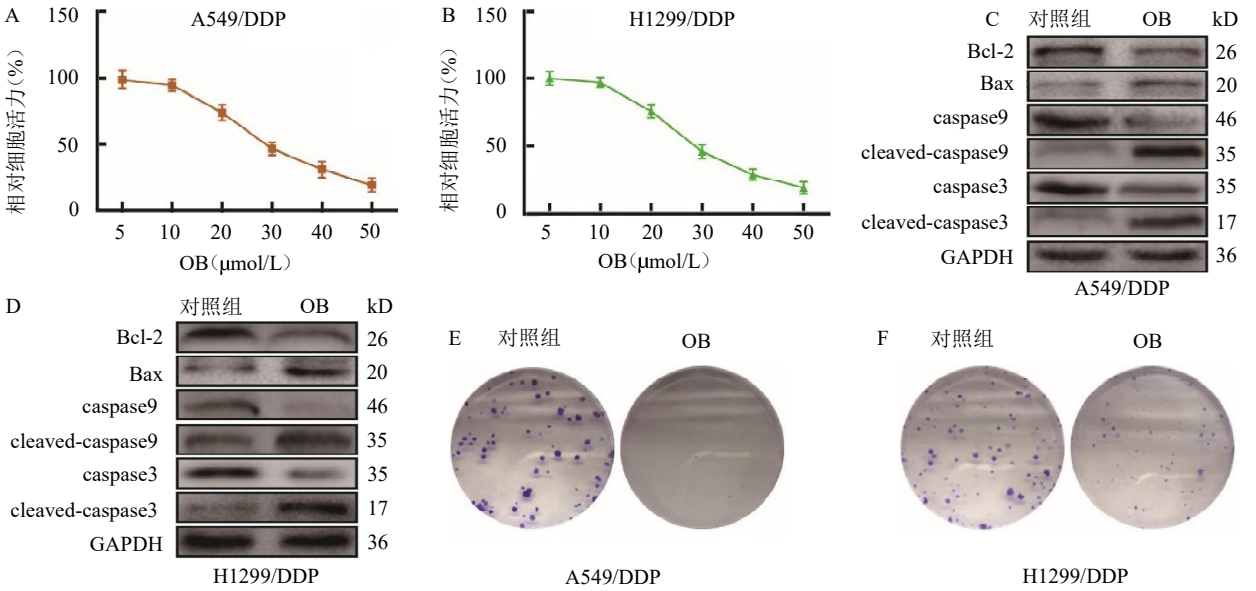
图 1　建立非小细胞肺癌细胞系 A549 和 H1299 对顺铂耐药的耐药株



注：A ～ B 为 OB 对 A549 和 H1299 细胞生存能力的影响。C ～ D 为 OB 对肺癌细胞系的 IC_{50}。OB 为木蝴蝶苷 B

图 2　OB 对非小细胞肺癌细胞系 A549 和 H1299 的细胞生存能力的影响

Modern Practical Medicine, February 2025, Vol. 37, No. 2



注：A ～ B 为 OB 对顺铂耐药的 NSCLC 细胞系 A549/DDP 和 H1299/DDP 的细胞活性影响。C ～ D 为 Western blot 测定凋亡蛋白标志物蛋白表达情况，OB 处理浓度为 30 μmol/L。E ～ F 为克隆形成实验检测 OB 对耐药细胞系 A549/DDP 和 H1299/DD 的细胞增殖能力影响

图 3 对耐药细胞系 A549/DDP 和 H1299/DDP 的生存能力影响

NSCLC 的细胞系 A549 和 H1299 表现出低剂量的细胞毒性。而在顺铂耐药的细胞系中，随着 OB 药物剂量的增加，OB 显著抑制顺铂耐药的 NSCLC 细胞系的细胞活性。同时，Western blot 显示 OB 能抑制 Bcl-2 蛋白表达，促进 Bax、cleaved-caspase 9、cleaved-caspase 3 的蛋白表达（均 $P < 0.05$），这说明 OB 促进了 A549/DDP 和 H1299/DDP 耐药细胞系的细胞凋亡。克隆形成实验证明了 OB 可以抑制顺铂耐药细胞系 A549/DDP 和 H1299/DDP 的细胞增殖。

综上所述，本研究发现 OB 对肺癌细胞仅有低剂量细胞毒性，但能增强肺癌细胞对顺铂的敏感性。推测可能的机制为促进耐药肺癌细胞的细胞凋亡，同时抑制了耐药肺癌细胞的细胞增殖。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 陈建：数据整理、论文撰写；孟礼飞、汪俊：实验操作；李晨蔚、胡文涛：统计分析、研究指导、经费支持

参 考 文 献

[1] MINNA J D, ROTH J A, GAZDAR A F. Focus on lung cancer[J]. Cancer Cell, 2002, 1(1): 49-52.

[2] XIAO L, LAN X, SHI X, et al. Cytoplasmic RAP1 mediates cisplatin resistance of non-small cell lung cancer[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(5): e2803.

[3] LIU M M, MA R H, NI Z J, et al. Apigenin 7-O-glucoside promotes cell apoptosis through the PTEN/PI3K/AKT pathway and inhibits cell migration in cervical cancer HeLa cells[J]. Food Chem Toxicol, 2020, 146: 111843.

[4] LU R, HE Z, ZHANG W, et al. Oroxin B alleviates osteoarthritis through anti-inflammation and inhibition of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway and enhancement of autophagy[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2022, 13: 1060721.

[5] LI N N, MENG X S, BAO Y R, et al. Evidence for the involvement of COX-2/VEGF and PTEN/PI3K/AKT pathway the mechanism of oroxin B treated liver cancer[J]. Pharmacogn Mag, 2018, 14(54): 207-213.

[6] LI N, MEN W, ZHENG Y, et al. Oroxin B induces apoptosis by down-regulating microRNA-221 resulting in the inactivation of the PTEN/PI3K/AKT pathway in liver cancer[J]. Molecules, 2019, 24(23): E4384.

[7] YANG P, FU S L, CAO Z F, et al. Oroxin B selectively induces tumor-suppressive ER stress and concurrently inhibits tumor-adaptive ER stress in B-lymphoma cells for effective anti-lymphoma therapy[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2015, 288(2): 269-279.

[8] BAILLY C, WARING M J. Pharmacological effectors of GRP78 chaperone in cancers[J]. Biochem Pharmacol, 2019, 163: 269-278.

收稿日期：2024-09-21

（本文编辑：吴迪汉）