

网络出版时间:2025-11-13 12:03:10 网络出版地址:<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20251202.1334.017>

## MDM2 在双氢青蒿素抑制肺腺癌细胞增殖和迁移中的作用

凌惠娟<sup>1</sup>, 刘宇<sup>1</sup>, 朱亚玉<sup>1</sup>, 牛可<sup>1</sup>, 唐静<sup>1</sup>, 陈礼文<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> 安徽医科大学第二临床医学院临床检验诊断学教研室, 合肥 230601;

<sup>2</sup> 安徽医科大学第二附属医院输血科, 合肥 230601)

**摘要** 目的 探究双微体同源基因 2(MDM2)在双氢青蒿素(DHA)抑制肺腺癌细胞增殖和迁移中的作用。方法 采用 CCK8 法检测 DHA 浓度梯度(0、5、10、25、50 和 100 μmol/L)及时间梯度(0、24、48 和 72 h)对肺腺癌 A549 和 PC9 细胞增殖的抑制作用, 分别计算半数抑制浓度( $IC_{50}$ ) ;集落形成实验和划痕实验检测 DHA 对 A549 和 PC9 细胞集落形成和迁移能力的抑制作用; Western blot 检测 DHA 对 MDM2 表达以及上皮 - 间质转化(EMT)相关蛋白 E-cadherin 和 N-cadherin 的抑制作用, 以及小干扰 RNA 敲减 MDM2(si-MDM2)后验证 MDM2 分子对肺腺癌细胞增殖、迁移和 EMT 的促进作用; 过表达 MDM2 质粒转染 A549 和 PC9 细胞, DHA 处理后观察过表达 MDM2 对 DHA 抑制 A549 和 PC9 细胞增殖和迁移的逆转作用。结果 DHA 以浓度和时间依赖性方式抑制 A549 和 PC9 细胞增殖,  $IC_{50}$  分别为 30.57 和 78.61 μmol/L。与 Control 组相比, DHA 处理的 A549 和 PC9 细胞集落形成数和迁移能力均显著下降(均  $P < 0.01$ )。同时, DHA 显著抑制 A549 和 PC9 细胞 MDM2 和 N-cadherin 蛋白表达水平, 并上调 E-cadherin 蛋白的表达(均  $P < 0.05$ )。与 si-Control 相比, si-MDM2 显著抑制 A549 和 PC9 细胞 N-cadherin 蛋白表达水平, 上调 E-cadherin 蛋白的表达, 并且显著抑制肺腺癌细胞增殖和迁移能力(均  $P < 0.01$ )。A549 和 PC9 细胞转染过表达 MDM2 后, 增殖和迁移能力显著增强(均  $P < 0.05$ ), 并且部分逆转 DHA 对增殖和迁移的抑制作用(均  $P < 0.05$ )。结论 DHA 能有效抑制肺腺癌细胞的增殖和迁移, 其机制与 DHA 抑制 MDM2 有关。

**关键词** 肺腺癌; MDM2; 双氢青蒿素; 增殖; 迁移; 上皮 - 间质转化

**中图分类号** R 392.11

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2025)12-2316-10

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.12.015

肺癌是中国乃至全球肿瘤发病率和病死率最高的肿瘤之一, 肺腺癌是肺癌最常见的病理分型, 约占肺癌总病例的 40%。近几十年来, 包括靶向治疗、免疫治疗在内的多种策略在肺腺癌治疗上取得了显著进展, 但患者的 5 年总生存率仍较低, 约为 18%<sup>[1]</sup>。传统中药在治疗包括肺癌在内的肿瘤中具有独特优势<sup>[2]</sup>, 其中青蒿素类的抗疟中药近年来成为抗肿瘤研究的热点。双氢青蒿素(dihydroartemisinin, DHA)是青蒿素的半合成衍生物, 具有更好的水溶性和更强的抗疟活性, 且毒性更低<sup>[3]</sup>。DHA 已被证明在体外和体内均具有强大的抗肿瘤作用, 但具体机制不明<sup>[4]</sup>。双微体同源基因 2(murine double minute 2, MDM2)是从小鼠胚胎成纤维细胞(BALB/3T3DM 细胞)中克隆出来的一个癌基因, 在

人类多种肿瘤中都有扩增和(或)过表达, 且与恶性肿瘤的浸润、转移及不良预后有关<sup>[5]</sup>。该研究旨在探讨 MDM2 在 DHA 抑制肺腺癌细胞增殖和迁移中的作用, 以期为临床治疗肺腺癌提供新的思路。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

**1.1.1 细胞来源** 肺腺癌 A549 细胞购自上海富恒生物技术有限公司, 肺腺癌 PC9 细胞购自北京沃比森科技有限公司。

**1.1.2 主要试剂** RPMI 1640 培养基(货号:L210KJ)购自南京生航生物技术有限公司; 10% SDS-PAGE 凝胶(货号:PG112)购自上海雅酶生物医药科技有限公司; 青 - 链霉素、RIPA 裂解液和 BCA 试剂盒(货号:ST488S、P0013B、P0012S)购自上海碧云天生物技术股份有限公司; DHA(货号:D7439, 纯度 > 97%)购自美国 Selleck 公司; 胎牛血清(货号:086-150)购自南京维森特生物技术有限公司; MDM2(货号:ab259265)购自英国 Abcam 公司; E-cadherin(货号:3195T)购自美国 CST 公司; N-cadherin、GAPDH、山羊抗兔(H + L)HRP 和山羊抗小

2025-08-19 接收

基金项目:安徽省高校自然科学研究重点项目(编号:2023AH053170);

安徽省临床医学研究转化项目(编号:202304295107020019)

作者简介:凌惠娟,女,硕士研究生;

陈礼文,男,教授,主任技师,博士生导师,通信作者, E-mail:chenliwen@ahmu.edu.cn

鼠 (H + L) HRP (货号: AF5239、T0004、S0001、S0002) 购自美国 Affinity 公司, 聚偏氟乙烯膜 (货号: IPFL00005) 购自美国 Millipore 公司。小干扰 RNA si-MDM2 购自上海吉玛制药技术有限公司; 过表达 MDM2 质粒购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 转染试剂 (货号: 101000046) 购自法国 Polyplus-transfection 公司; CCK8 试剂 (货号: BMU106) 购自武汉亚科因生物技术有限公司; 4% 多聚甲醛通用型组织固定液 (货号: P0099) 购自北京兰杰柯科技有限公司; 1% 结晶紫水溶液 (货号: BP-DL133) 购自南京森贝咖生物科技有限公司。

**1.1.3 主要仪器**  $\text{CO}_2$  培养箱、生物安全柜 (型号: HF240、HFsafe1200LC) 购自上海力申科学仪器有限公司; 显影仪 (型号: JS-1070P) 购自上海培清科技有限公司; 酶标仪 (型号: ST-960) 购自上海科华实验系统有限公司; 倒置显微镜 (型号: CKX31) 购自日本 Olympus 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 将 A549 和 PC9 细胞分别置于完全培养基 (90% RPMI 1640 + 10% 胎牛血清 + 1% 青 - 链霉素) 中, 放置于 37 °C 含 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养, 2 ~ 3 d 传代 1 次。

**1.2.2 细胞转染 si-MDM2 与过表达 MDM2** 将生长状态良好的 A549 和 PC9 细胞接种于 6 孔板中, 分别进行 MDM2 基因的敲减与过表达处理。敲减实验中, 设置阴性对照组 (si-Control 组) 和小干扰 RNA 组 (si-MDM2 组); 过表达实验中, 设置空白对照组 (pcDNA3.1-NC 组) 和 MDM2 过表达组 (pcDNA3.1-MDM2 组)。转染体系配比按照 200  $\mu\text{L}$  buffer + 3  $\mu\text{L}$  小干扰 RNA 或过表达质粒 + 4  $\mu\text{L}$  转染试剂 (reagent); 静置 10 min; 6 孔板换液后, 均匀滴加, 培养 48 h, 用以后续实验。

**1.2.3 CCK8 实验** 将消化后的 A549 和 PC9 细胞以每孔 5 000 个细胞的密度接种于 96 孔板中, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液, 置于培养箱中贴壁培养过夜。根据不同实验目的, 分为以下三部分进行处理。

① DHA 处理: 按照 0、5、10、25、50 和 100  $\mu\text{mol/L}$  加 DHA 处理 A549 和 PC9 细胞 24 h, 分别计算 DHA 对 A549 和 PC9 细胞的半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentrate,  $\text{IC}_{50}$ ), 并以计算所得  $\text{IC}_{50}$  浓度分别处理 A549 和 PC9 细胞 0、24、48 和 72 h。根据  $\text{IC}_{50}$  值, 将实验分为 Control 组和 DHA 组, 用以后续实验; ② MDM2 敲减: si-MDM2 组和 si-Control 组的 A549 和 PC9 细胞铺入 96 孔板中, 分别于 0、24、48

和 72 h 检测细胞增殖情况。③ MDM2 过表达联合 DHA 处理: pcDNA3.1-NC 组、pcDNA3.1-MDM2 组、pcDNA3.1-NC + DHA 组和 pcDNA3.1-MDM2 + DHA 组, 将处理过的 A549 和 PC9 细胞铺入 96 孔板中培养, 分别于 0、24、48 和 72 h 检测细胞增殖情况。检测时每孔加入 10  $\mu\text{L}$  的 CCK8 试剂, 细胞培养箱内继续孵育 1 h, 使用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度值 (optical density, OD), 以评估细胞增殖水平。

**1.2.4 Western blot 实验** 使用 RIPA 裂解液从处理过的 A549 和 PC9 细胞中提取蛋白质, 用 BCA 法对提取的蛋白质进行蛋白浓度测定, 加入蛋白缓冲液, 煮沸 10 min。用 10% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质, 转移到聚偏氟乙烯膜上, 封闭 30 min, 洗涤 3 次, 一抗 MDM2 (1 : 1 000)、E-cadherin (1 : 1 000)、N-cadherin (1 : 1 000)、GAPDH (1 : 5 000) 4 °C 孵育过夜, 洗涤 3 次, 二抗孵育 (1 : 5 000) 90 min, 洗涤 3 次, 显影。

**1.2.5 集落形成实验** 将 DHA 处理 24 h 的 A549 和 PC9 细胞从 6 孔板中消化下来, 在每孔 2 mL 培养基中添加含 1 000 个细胞的细胞悬液, 培养 7 ~ 10 d, 从显微镜中观察到形成细胞集落 (50 个细胞及以上作为 1 个集落) 即可, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗 3 遍, 用 4% 多聚甲醛通用型组织固定液固定 30 min, PBS 洗 3 遍, 1% 结晶紫水溶液染色 15 min, 观察结果并拍照。

**1.2.6 划痕实验** 提前在 6 孔板板底划线, 将处理过的 A549 和 PC9 细胞用 200  $\mu\text{L}$  的移液枪枪头进行划痕, PBS 洗 3 遍去除悬浮细胞和死细胞, 在 0、24 和 48 h 观察细胞迁移的情况并进行拍照记录。

**1.3 统计学处理** 采用 ImageJ 1.8.0 软件对实验结果图进行量化分析, GraphPad Prism 9.5.1 软件进行数据统计分析和图形绘制, 每组实验重复 3 次, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 DHA 对 A549 和 PC9 细胞增殖和集落形成的影响** 浓度梯度 DHA (0、5、10、25、50 和 100  $\mu\text{mol/L}$ ) 分别处理 A549 和 PC9 细胞, 结果显示 DHA 以浓度依赖性方式抑制 A549 和 PC9 细胞增殖 (A549:  $F = 3.984.00, P < 0.01$ ; PC9:  $F = 163.90, P < 0.05$ ), A549 和 PC9 细胞的  $\text{IC}_{50}$  分别为 30.57、78.61  $\mu\text{mol/L}$ , 故后续实验 A549 和 PC9 细胞分别使用 30、80  $\mu\text{mol/L}$  的 DHA, 见图 1A、1B。用 DHA 分别处理

A549 和 PC9 细胞 0、24、48 和 72 h, 结果显示 DHA 以时间依赖性方式抑制 A549 和 PC9 细胞增殖 (A549:  $F = 1\ 512.00, P < 0.01$ ; PC9:  $F = 2\ 850.00, P < 0.05$ ), 见图 1C、1D。集落形成实验结果显示 DHA 显著抑制 A549 和 PC9 细胞集落形成能力 (A549:  $t = 8.61, P < 0.01$ ; PC9:  $t = 14.27, P < 0.001$ ), 见图 1E、1F。以上结果表明 DHA 抑制肺腺癌细胞增殖和集落形成能力。

## 2.2 DHA 对 A549 和 PC9 细胞迁移和 EMT 相关蛋白表达的影响

用 DHA 处理 A549 和 PC9 细胞

24 h, 划痕实验检测 DHA 对 A549 和 PC9 细胞迁移的作用。结果显示, A549 细胞中, Control 组 24、48 h 迁移率分别为 ( $33.670 \pm 3.736$ )%、( $47.540 \pm 1.065$ )%, DHA 组 24、48 h 迁移率分别为 ( $8.862 \pm 2.553$ )%、( $22.480 \pm 4.965$ )%; PC9 细胞 Control 组 24、48 h 迁移率分别为 ( $34.110 \pm 2.791$ )%、( $64.630 \pm 2.488$ )%, DHA 组 24、48 h 迁移率分别为 ( $16.020 \pm 1.321$ )%、( $33.390 \pm 0.892$ )%, DHA 显著抑制 A549 和 PC9 细胞迁移能力 (A549<sub>24 h</sub>:  $t = 9.50, P < 0.01$ ; A549<sub>48 h</sub>:  $t = 8.55, P < 0.01$ ;

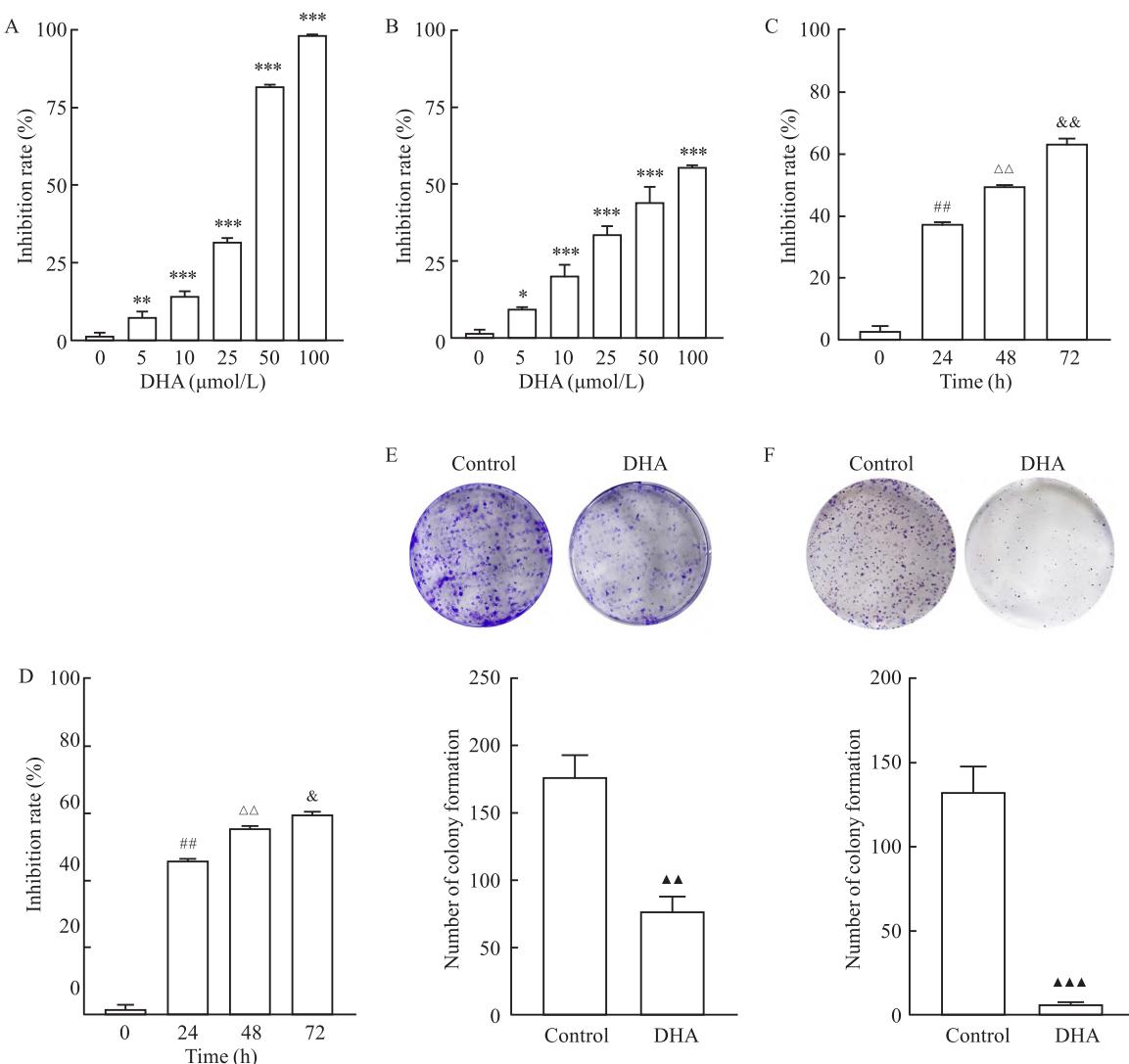


图 1 DHA 对 A549 和 PC9 细胞增殖和集落形成的影响

Fig. 1 The effects of DHA on the proliferation and colony formation of A549 and PC9 cells

A: The inhibition rate of A549 cells treated with various concentrations of DHA; B: The inhibition rate of PC9 cells treated with various concentrations of DHA; C: The inhibitory rate of DHA on A549 cells at different time points; D: The inhibition rate of DHA on PC9 cells at different time points; E: The number of Colony formed by A549 cells treated with DHA; F: The number of Colony formed by PC9 cells treated with DHA; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs 0  $\mu\text{mol/L}$  DHA group; #  $P < 0.01$  vs 0 h group; △△  $P < 0.01$  vs 24 h group; &  $P < 0.05$ , &&  $P < 0.01$  vs 48 h group; ▲▲  $P < 0.01$ , ▲▲▲  $P < 0.001$  vs Control group.

$\text{PC9}_{24\text{ h}}: t = 10.14, P < 0.01$ ;  $\text{PC9}_{48\text{ h}}: t = 20.47, P < 0.001$ ),见图2A、2B。DHA处理后通过Western blot实验检测A549和PC9细胞EMT相关蛋白E-cadherin和N-cadherin的表达。结果显示与Control组相比,DHA组A549和PC9细胞E-cadherin蛋白表达水平上升( $\text{A549}: t = 4.70, P < 0.01$ ;  $\text{PC9}: t = 4.09, P < 0.05$ ),同时N-cadherin蛋白表达水平下降( $\text{A549}: t = 9.59, P < 0.001$ ;  $\text{PC9}: t = 3.49, P < 0.05$ ),见图2C、2D。以上结果表明DHA抑制肺腺

癌细胞迁移和EMT。

**2.3 DHA对A549和PC9细胞MDM2蛋白表达的影响** DHA处理后通过Western blot实验检测MDM2蛋白表达。结果显示与Control相比,DHA组A549和PC9细胞MDM2的表达水平显著降低( $\text{A549}: t = 3.21, P < 0.05$ ;  $\text{PC9}: t = 12.04, P < 0.01$ ),见图3。以上结果表明DHA可能通过调控MDM2发挥抗肿瘤作用。

#### 2.4 MDM2对A549和PC9细胞增殖、迁移及

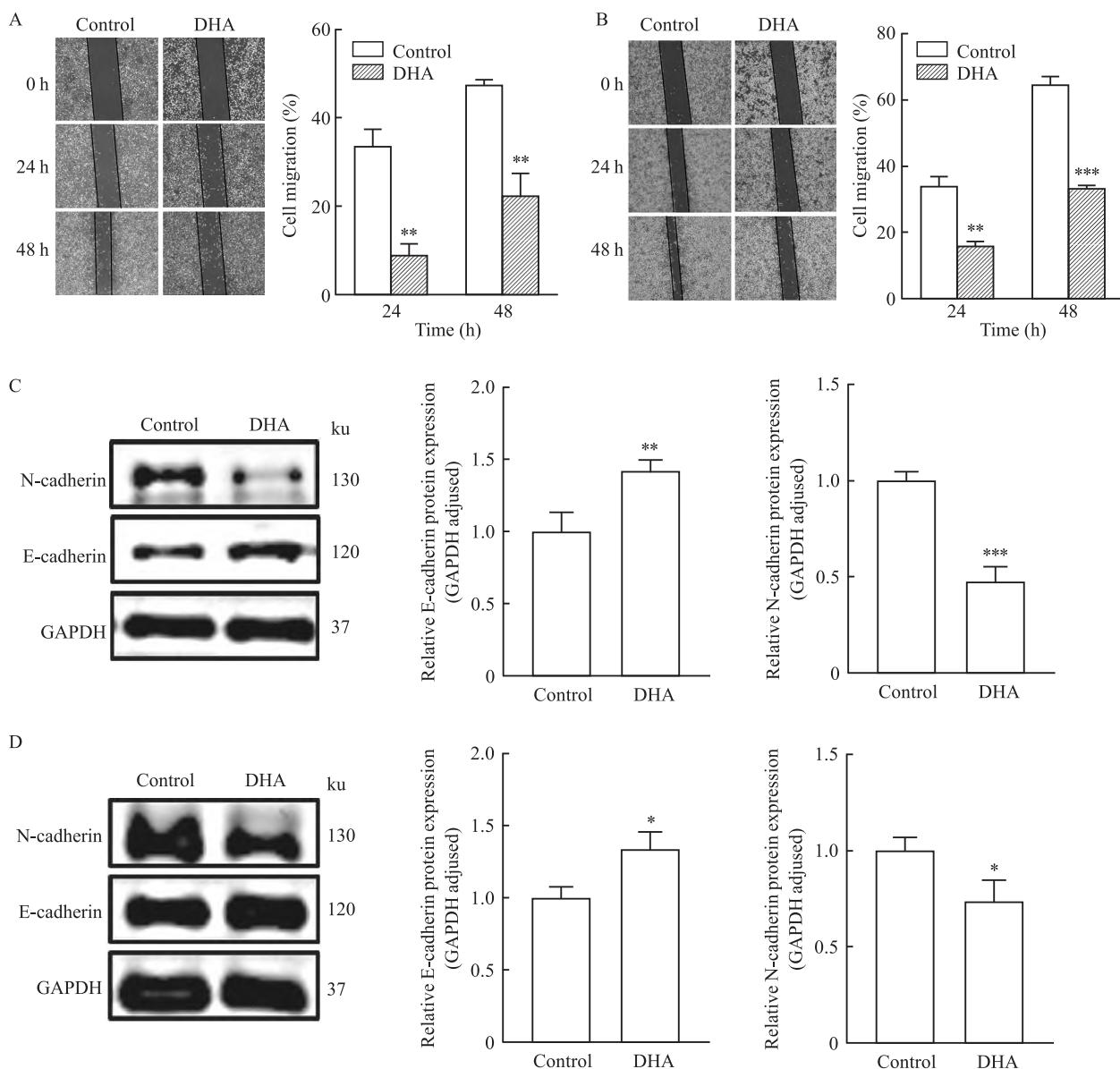


图2 DHA对A549和PC9细胞迁移和EMT相关蛋白表达的影响

Fig. 2 The influence of DHA on the migration and expression of EMT-related proteins of A549 and PC9 cell

A: To compare the migration ability of A549 cells after DHA treatment  $\times 40$ ; B: To compare the migration ability of PC9 cells after DHA treatment  $\times 40$ ; C: EMT protein expression levels in A549 cells was assessed by Western blot; D: EMT protein expression levels in PC9 cells was assessed by Western blot; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs Control group.

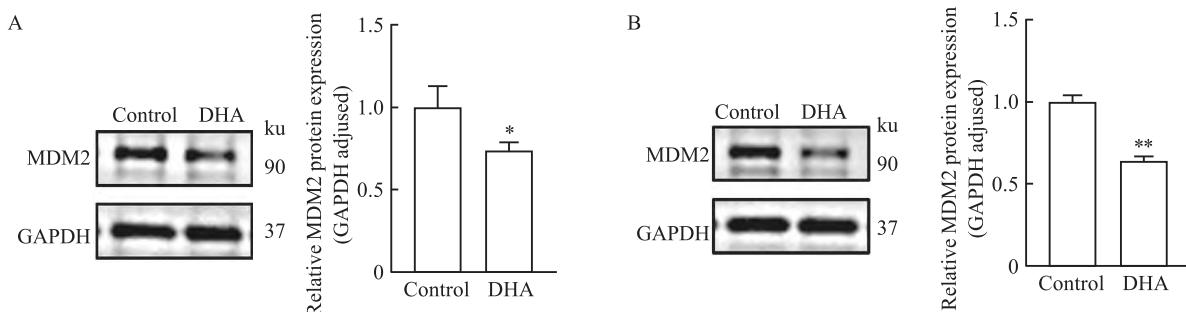


图 3 DHA 对 A549 和 PC9 细胞 MDM2 蛋白表达的影响

Fig. 3 The effects of DHA on MDM2 protein expression in A549 and PC9 cells

A: MDM2 expression in DHA-treated A549 cells was assessed by Western blot; B: MDM2 expression in DHA-treated PC9 cells was assessed by Western blot; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs Control group.

**EMT 的影响** MDM2 小干扰 RNA 处理 A549 和 PC9 细胞 48 h 后, Western blot 结果表明 si-MDM2 组显著抑制 MDM2 的表达 (A549:  $t = 14.58, P < 0.001$ ; PC9:  $t = 7.65, P < 0.01$ ), 见图 4A、4B。CCK8 实验通过双因素方差分析比较 si-Control 组和 si-MDM2 组在不同时间点对 A549 及 PC9 细胞增殖的影响,结果显示,在 A549 细胞中,与 si-Control 组相比,si-MDM2 组 24 h ( $P < 0.01$ )、48 h ( $P < 0.001$ ) 和 72 h ( $P < 0.001$ ) 对细胞增殖均表现出显著的抑制;在 PC9 细胞中,si-MDM2 组细胞增殖在 48 h ( $P < 0.01$ ) 和 72 h ( $P < 0.01$ ) 具有显著抑制,见图 4C、4D。划痕实验结果显示,A549 细胞 si-Control 组和 si-MDM2 组 24 h 迁移率分别是 ( $27.350 \pm 3.186\%$  )、( $3.810 \pm 1.118\%$  ), 48 h 迁移率分别是 ( $39.710 \pm 2.587\%$  )、( $12.800 \pm 2.261\%$  ); PC9 细胞 si-Control 组和 si-MDM2 组 24 h 迁移率分别是 ( $20.360 \pm 0.400\%$  )、( $8.117 \pm 0.360\%$  ), 48 h 迁移率分别是 ( $47.170 \pm 2.023\%$  )、( $26.410 \pm 0.469\%$  ), 与 si-Control 组相比,si-MDM2 组 A549 和 PC9 细胞迁移率显著下降 (A549<sub>24 h</sub>:  $t = 9.50, P < 0.001$ ; A549<sub>48 h</sub>:  $t = 8.55, P < 0.001$ ; PC9<sub>24 h</sub>:  $t = 10.14, P < 0.01$ ; PC9<sub>48 h</sub>:  $t = 20.47, P < 0.001$ ), 见图 4E、4F。Western blot 检测 A549 和 PC9 细胞 EMT 相关蛋白表达,结果显示,si-MDM2 组 A549 和 PC9 细胞中 E-cadherin 蛋白表达水平上升 (A549:  $t = 10.75, P < 0.01$ ; PC9:  $t = 2.46, P < 0.05$ ), 且 N-cadherin 蛋白表达水平下降 (A549:  $t = 7.97, P < 0.01$ ; PC9:  $t = 3.98, P < 0.05$ ), 见图 4G、4H。以上结果表明 MDM2 促进肺腺癌细胞增殖、迁移和 EMT。

## 2.5 过表达 MDM2 对 DHA 抑制 A549 和 PC9 细胞增殖和迁移的影响

pcDNA3.1 空载体和 pcDNA3.1-MDM2 过表达质粒转染 A549 和 PC9 细胞后 DHA 处理,验证 MDM2 在 DHA 发挥抗肿瘤效应中的作用。Western blot 结果显示,与 pcDNA3.1-NC 组相比,MDM2 在 A549 和 PC9 细胞中均过表达,此外,与 pcDNA3.1-NC + DHA 组相比,过表达 MDM2 部分抵消 DHA 对 MDM2 的显著抑制 (A549:  $F = 83.10, P < 0.01$ ; PC9:  $F = 53.45, P < 0.01$ ), 见图 5A、5B。进一步增殖实验显示,过表达 MDM2 显著促进 A549 和 PC9 细胞增殖,与 pcDNA3.1-NC + DHA 组相比,过表达 MDM2 部分抵消 DHA 对 A549 和 PC9 细胞增殖抑制作用 ( $P < 0.05$ ), 见图 5C、5D。24 h 划痕结果显示,DHA 显著抑制 A549 和 PC9 细胞迁移,过表达 MDM2 对细胞迁移能力无明显差异,但过表达 MDM2 处理 48 h 显著促进 A549 和 PC9 细胞的迁移能力;与 pcDNA3.1-NC + DHA 组相比,过表达 MDM2 部分抵消 DHA 对 A549 和 PC9 细胞迁移能力显著抑制 (A549:  $F = 283.40, P < 0.01$ ; PC9:  $F = 141.30, P < 0.01$ ), 见图 5E、5F。以上结果表明 DHA 通过抑制 MDM2 抑制肺腺癌细胞增殖和迁移。

## 3 讨论

本研究采用 CCK8 检测 DHA 浓度梯度及时间梯度对肺腺癌 A549 和 PC9 细胞增殖的作用,实验显示 DHA 以浓度和时间依赖性方式抑制 A549 和 PC9 细胞增殖;后续集落形成实验和划痕实验显示 DHA 显著抑制 A549 和 PC9 细胞的集落形成和迁移能力。本课题组前期研究<sup>[6]</sup>表明 DHA 抑制非小细胞肺癌细胞增殖、集落形成和迁移。本研究进一步在肺腺癌细胞中证实了 DHA 的抑癌作用。EMT 的标志变化是失去上皮标志物(如 E-cadherin)以及获

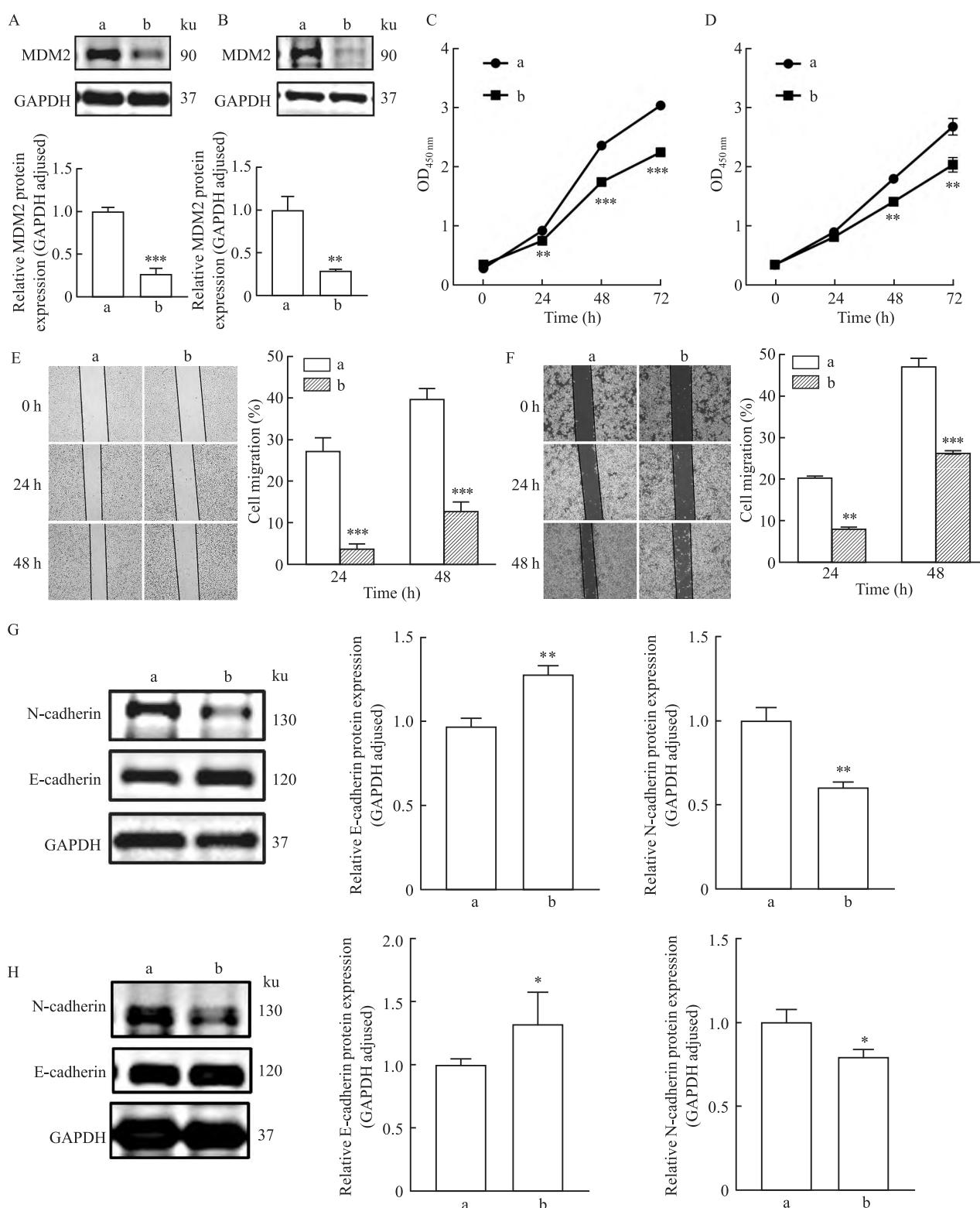


图 4 MDM2 对 A549 和 PC9 细胞增殖、迁移及 EMT 的影响

Fig. 4 The effects of MDM2 on the proliferation, migration and EMT of A549 and PC9 cells

A: MDM2 protein expression levels in A549 cells was assessed by Western blot; B: MDM2 protein expression levels in PC9 cells was assessed by Western blot; C: CCK8 was used to detect A549 cells proliferation ability; D: CCK8 was used to detect PC9 cells proliferation ability; E: To compare the migration ability of A549 after the treatment of si-MDM2  $\times 40$ ; F: To compare the migration ability of PC9 after the treatment of si-MDM2  $\times 40$ ; G: The expression levels of EMT-related proteins in A549 cells was assessed by Western blot; H: The expression levels of EMT-related proteins in PC9 cells was assessed by Western blot; a: si-Control group; b: si-MDM2 group; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs si-Control group.

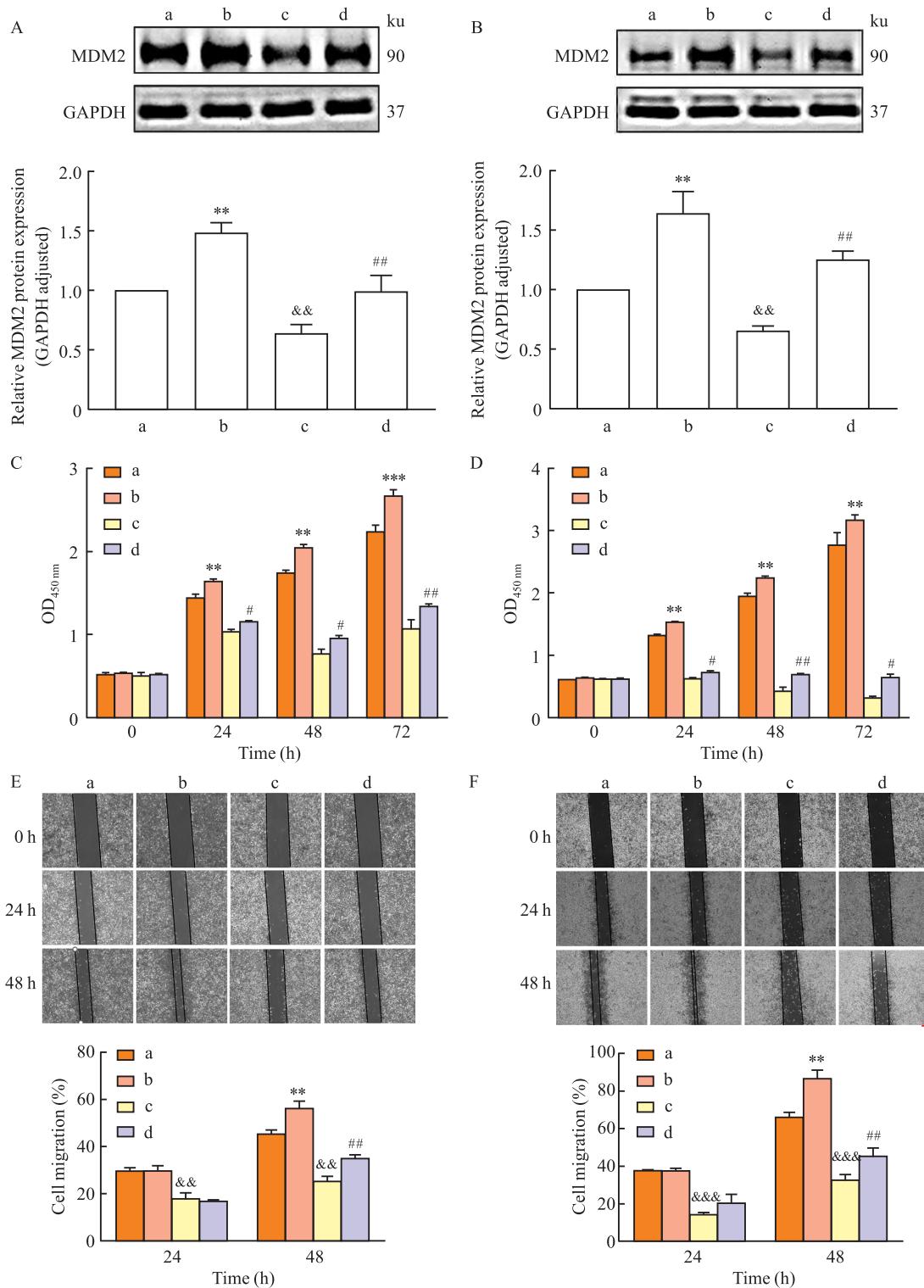


图5 过表达 MDM2 对 DHA 抑制 A549 和 PC9 细胞增殖和迁移的影响

Fig. 5 The effects of MDM2 overexpression on DHA - induced inhibition of the proliferation and migration of A549 and PC9 cells

A: MDM2 protein expression in A549 cells was assessed by Western blot; B: MDM2 protein expression in PC9 cells was assessed by Western blot; C: CCK8 was used to detect the proliferation ability of A549 cells; D: CCK8 was used to detect the proliferation ability of PC9 cells; E: To compare the migration ability of A549 cells  $\times 40$ ; F: To compare the migration ability of PC9 cells  $\times 40$ ; a: pcDNA3.1-NC group; b: pcDNA3.1-MDM2 group; c: pcDNA3.1-NC + DHA group; d: pcDNA3.1-MDM2 + DHA group; \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs pcDNA3.1-NC group; &&  $P < 0.01$ , &&&  $P < 0.001$  vs pcDNA3.1-MDM2 group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs pcDNA3.1-NC + DHA group.

得间充质标志物(如 N-cadherin)。本研究中 Western blot 实验显示 DHA 能显著增强 E-cadherin 的蛋白水平表达,抑制 N-cadherin 蛋白水平表达,表明 DHA 能够抑制肺腺癌细胞 EMT。Ma et al<sup>[7]</sup> 表明 DHA 抑制胃癌 AGS 和 HGC27 细胞增殖、迁移和 EMT,且该团队研究表明 DHA 通过下调 Snail 和 PI3K/AKT 信号通路抑制胃癌细胞转移。本研究结果与之一致,证实了 DHA 在肺腺癌中抑制细胞增殖、集落形成、迁移和 EMT。研究<sup>[8]</sup>表明,在非小细胞肺癌中,DHA 通过抑制 Wnt/β-catenin 信号通路抑制非小细胞肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力。但是 DHA 在肺腺癌中是否通过 Wnt/β-catenin 信号通路抑制细胞增殖和迁移还有待进一步阐明。

本研究通过 Western blot 实验检测 A549 和 PC9 细胞 MDM2 蛋白表达水平,结果表明,DHA 显著抑制 A549 和 PC9 细胞 MDM2 的蛋白表达。Hou et al<sup>[9]</sup>在人肝癌细胞中已表明青蒿素及其衍生物 DHA 通过抑制 MDM2 的表达来促进肝癌细胞的凋亡。本研究结果与之一致,即 DHA 可以抑制肺腺癌细胞 MDM2 的表达。MDM2 具有 E3 泛素连接酶 RING 结构,它通过 E3 泛素连接酶将 p53 泛素化,进而促使 p53 被蛋白酶体降解<sup>[10]</sup>,维持 p53 在正常细胞内低水平,防止过度激活损伤细胞。DHA 已经被证实在胃癌<sup>[11]</sup>和神经胶质瘤<sup>[12]</sup>等多种肿瘤中通过调节 p53 抑制肿瘤的发生和侵袭。鉴于 MDM2 与 p53 之间的密切关系,本研究推测在肺腺癌中,DHA 抑制 MDM2 的表达可能是其发挥抗肿瘤效应的重要途径之一。

本研究通过 CCK8 实验和划痕实验表明,敲减 MDM2 能显著抑制 A549 和 PC9 细胞的增殖与迁移能力。此外,敲减 MDM2 促进 E-cadherin 蛋白表达,同时抑制 N-cadherin 蛋白的表达。研究<sup>[13]</sup>指出,MDM2 促进肝细胞癌、肺腺癌和卵巢癌等多种癌症的增殖和 EMT。例如,MDM2 作为 miR-590-3p 的直接靶点促进肝细胞癌 EMT<sup>[14]</sup>,并在肺腺癌中通过激活 Smad2/3 信号通路诱导 EMT<sup>[15]</sup>。本研究结果与之一致,进一步证实了 MDM2 在肺腺癌 A549 和 PC9 细胞系中的促癌作用,A549 和 PC9 细胞中 MDM2 的表达促进肺腺癌细胞增殖和迁移。多种 MDM2 小分子抑制剂已进入临床试验环节,但是由于 MDM2-p53 的相互作用是正常细胞生理活动的不可或缺性,导致 MDM2 小分子抑制剂在临床试验环节并不顺利。因此,本研究显示 DHA 可以抑制 MDM2,可能为肺腺癌治疗提供一个新的思路。

本研究继续采用 Western blot 实验、CCK8 实验和划痕实验过表达 MDM2 验证 MDM2 在 DHA 抗肿瘤效应中的作用。Western blot 显示 MDM2 过表达部分抵消了 DHA 对 MDM2 的显著抑制;CCK8 实验和划痕实验显示 MDM2 过表达显著促进了 A549 和 PC9 细胞的增殖和迁移能力,并且部分逆转 DHA 对 A549 和 PC9 细胞的增殖和迁移能力的影响,证实了过表达 MDM2 可以部分逆转 DHA 对 A549 和 PC9 细胞增殖和迁移的抑制作用。DHA 不仅临幊上被广泛用于治疗疟疾,而且已被证实能通过多种分子机制展现其抗癌功效,这些机制包括但不限于抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡、阻碍肿瘤转移和血管生成、促进免疫功能、以及诱导自噬和内质网应激等<sup>[4]</sup>。本研究的结果与这些发现相契合,进一步揭示了 DHA 能够通过 MDM2 相关途径有效抑制肺腺癌细胞的增殖与迁移。

综上所述,本研究通过体外实验揭示了 MDM2 在 DHA 抑制肺腺癌细胞增殖和迁移中的关键作用。研究结果表明,DHA 抑制 MDM2 的表达,进而抑制肺腺癌细胞的增殖、迁移。本研究为 DHA 的抗肿瘤机制提供了新的见解,但 DHA 如何抑制 MDM2 的分子机制仍需进一步深入探究。

## 参考文献

- [1] Fang H, Sun Q, Zhou J, et al. m6A methylation reader IGF2BP2 activates endothelial cells to promote angiogenesis and metastasis of lung adenocarcinoma[J]. Mol Cancer, 2023, 22(1): 99. doi: 10.1186/s12943 - 023 - 01791 - 1.
- [2] Wan L Q, Tan Y, Jiang M, et al. The prognostic impact of traditional Chinese medicine monomers on tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer[J]. Chin J Nat Med, 2019, 17(10): 729 - 37. doi: 10.1016/S1875 - 5364(19)30089 - 5.
- [3] Li Y, Sun H, Bai C, et al. Dihydroartemisinin inhibits tumor progress via blocking ROR1-induced STAT3-activation in non-small cell lung cancer[J]. Int Immunopharmacol, 2024, 133: 112157. doi: 10.1016/j.intimp.2024.112157.
- [4] Dai X, Zhang X, Chen W, et al. Dihydroartemisinin: a potential natural anticancer drug[J]. Int J Biol Sci, 2021, 17(2): 603 - 22. doi: 10.7150/ijbs.50364.
- [5] Liu T, Gu L, Mui A, et al. An MDM2 degrader shows potent cytotoxicity to MDM2-overexpressing acute lymphoblastic leukemia cells with minimal toxicity to normal cells/tissues [J]. Cancer Lett, 2024, 598: 217126. doi: 10.1016/j.canlet.2024.217126.
- [6] 胡冰琪,周静,黄俊峰,等.双氢青蒿素抑制非小细胞肺癌细胞迁移侵袭和血管生成拟态的初步研究[J].安徽医科大学学报,2023,58(5):766 - 71. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2023.05.011.
- [6] Hu B Q, Zhou J, Huang J F, et al. A preliminary study of di-

- hydroartemisinin inhibiting migration invasion and vasculogenic mimicry of non-small cell lung cancer cells [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2023, 58(5): 766–71. doi:10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2023.05.011.
- [7] Ma Y, Zhang P, Zhang Q, et al. Dihydroartemisinin suppresses proliferation, migration, the Wnt/β-catenin pathway and EMT via TNKS in gastric cancer [J]. *Oncol Lett*, 2021, 22(4): 688. doi:10.3892/ol.2021.12949.
- [8] Tong Y, Liu Y, Zheng H, et al. Artemisinin and its derivatives can significantly inhibit lung tumorigenesis and tumor metastasis through Wnt/β-catenin signaling [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(21): 31413–28. doi:10.18632/oncotarget.8920.
- [9] Hou J, Wang D, Zhang R, et al. Experimental therapy of hepatoma with artemisinin and its derivatives: *in vitro* and *in vivo* activity, chemosensitization, and mechanisms of action [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(17): 5519–30. doi:10.1158/1078–0432.CCR–08–0197.
- [10] 王 楠, 吴文涌, 吴正升. 鞣向 MDM2-p53 相互作用的抗癌治疗研究进展 [J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(7): 1149–54. doi:10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2018.07.035.
- [10] Wang Y, Wu W Y, Wu Z S. Research progress of anti-cancer therapy targeting MDM2-p53 interaction [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2018, 53(7): 1149–54. doi:10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2018.07.035.
- [11] Liang R, Chen W, Chen X Y, et al. Dihydroartemisinin inhibits the tumorigenesis and invasion of gastric cancer by regulating STAT1/KDR/MMP9 and P53/BCL2L1/CASP3/7 pathways [J]. *Pathol Res Pract*, 2021, 218: 153318. doi:10.1016/j.prp.2020.153318.
- [12] Que Z, Wang P, Hu Y, et al. Dihydroartemisinin inhibits glioma invasiveness via a ROS to P53 to β-catenin signaling [J]. *Pharmacol Res*, 2017, 119: 72–88. doi:10.1016/j.phrs.2017.01.014.
- [13] Chen Y, Wang D D, Wu Y P, et al. MDM2 promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of ovarian cancer SKOV3 cells [J]. *Br J Cancer*, 2017, 117(8): 1192–201. doi:10.1038/bjc.2017.265.
- [14] Youssef A I, Khaled G M, Amleh A. Functional role and epithelial to mesenchymal transition of the miR-590-3p/MDM2 axis in hepatocellular carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2023, 23(1): 396. doi:10.1186/s12885–023–10861–y.
- [15] Tang Y, Xuan Y, Qiao G, et al. MDM2 promotes epithelial-mesenchymal transition through activation of Smad2/3 signaling pathway in lung adenocarcinoma [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 2247–58. doi:10.2147/OTT.S185076.

## The roles of MDM2 in mediating the inhibitory effects of dihydroartemisinin on proliferation and migration of lung adenocarcinoma cells

Ling Huijuan<sup>1</sup>, Liu Yu<sup>1</sup>, Zhu Yayu<sup>1</sup>, Niu Ke<sup>1</sup>, Tang Jing<sup>1</sup>, Chen Liwen<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>*Dept of Clinical Laboratory Diagnostics, The Second Clinical Medical College of Anhui Medical University, Hefei 230601;* <sup>2</sup>*Dept of Blood Transfusion, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601*)

**Abstract Objective** To investigate the role of murine double minute 2 (MDM2) in dihydroartemisinin's (DHA) inhibition of lung adenocarcinoma cell proliferation and migration. **Methods** CCK8 assay was used to detect the inhibitory effect of gradient concentrations of DHA (0, 5, 10, 25, 50 and 100 μmol/L) and time gradients (0, 24, 48, and 72 h) on the proliferation of lung adenocarcinoma A549 and PC9 cells, and the half maximal inhibitory concentrate ( $IC_{50}$ ) were calculated respectively. Colony formation and scratch assays were used to detect the inhibitory effects of DHA on colony formation and migration of A549 and PC9 cells. Western blot was used to detect the inhibitory effects of DHA on MDM2 expression and epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related proteins E-cadherin and N-cadherin. The promoting effects of MDM2 on proliferation, migration and EMT of lung adenocarcinoma cells were verified by small interfering RNA-mediated knockdown of MDM2 (si-MDM2). The reversal effects of MDM2 overexpression on DHA's inhibition on the proliferation and migration of A549 and PC9 cells were observed. **Results** DHA inhibited the proliferation of A549 and PC9 cells in a dose- and time-dependent manner, with  $IC_{50}$  values of 30.57 and 78.61 μmol/L, respectively. Compared with the Control group, A549 and PC9 cells had significantly decreased colony formation (both  $P < 0.01$ ) and migration (both  $P < 0.01$ ) upon treatment with DHA. Moreover, DHA significantly inhibited the protein expression levels of MDM2 and N-cadherin in A549 and PC9 cells, and upregulated the expression of E-cadherin protein (both  $P < 0.05$ ). Compared with si-Control,

网络出版时间:2025-11-13 12:10:46 网络出版地址:<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20251202.1523.030>

## 肿瘤坏死因子- $\alpha$ 在利什曼原虫脾脏感染中的作用

甄二娜<sup>1</sup>,吴余玲<sup>1</sup>,胡姗姗<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>安徽医科大学药学院临床药理研究所、抗炎免疫药物教育部重点实验室,合肥 230032;

<sup>2</sup>中国科学技术大学附属第一医院检验科,合肥 230036)

**摘要** 目的 探究肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )在小鼠利什曼原虫脾脏感染中的作用。方法 在小鼠的右侧后足皮下注射利什曼原虫的前鞭毛体建立感染模型。测量小鼠足垫厚度和体质量监测感染;通过HE染色观察感染后脾脏病理学变化;流式细胞术检测脾脏内淋巴细胞和巨噬细胞的改变;间接免疫荧光法检测脾脏内精氨酸酶1(Arg-1)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的表达水平;体外调控TNF- $\alpha$ 观察对巨噬细胞感染利什曼原虫的影响。结果 与B6.WT小鼠相比,B6.TNF<sup>-/-</sup>小鼠感染后42 d脾脏明显肿大,结构紊乱,各种细胞浸润并分散在整个脾脏中。流式结果显示,感染利什曼原虫后,小鼠脾脏中T细胞和B细胞比例未发生明显改变,而CD11b单核细胞明显增加;免疫荧光结果显示,M2型单核/巨噬细胞的标志物Arg-1在B6.TNF<sup>-/-</sup>小鼠脾脏中高表达( $P < 0.05$ );B6.WT小鼠的脾脏中iNOS表达相对较强( $P < 0.05$ );体外研究显示,TNF- $\alpha$ 缺失或抑制TNF- $\alpha$ 后,腹腔巨噬细胞感染利什曼原虫明显增加( $P < 0.01$ ),而加入TNF- $\alpha$ 后显著抑制了该细胞的感染( $P < 0.01$ )。结论 B6.TNF<sup>-/-</sup>小鼠后足垫皮下接种利什曼原虫后发生脾脏感染,可能与TNF- $\alpha$ 的缺失导致巨噬细胞发生M2型分化和一氧化氮产生减少有关。

**关键词** 利什曼原虫;肿瘤坏死因子- $\alpha$ ;脾脏;巨噬细胞;流式分析;免疫反应

**中图分类号** R 531.6

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2025)12-2325-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.12.016

利什曼病是由利什曼原生动物寄生虫引起的重大全球健康问题,每年影响全球约100万人。利什曼感染的临床表现包含可自愈的皮肤病以及致命性的内脏感染(脾脏、肝脏和骨骼)<sup>[1]</sup>。在实验室环境中,C57BL(B6.WT)或BALB/c小鼠感染巨大利什曼原虫(*Leishmania*, *L. major*)是1个用于研究感染

反应中细胞因子的作用以及辅助性T细胞(Th1/Th2)反应遗传二象性的经典动物模型<sup>[2]</sup>。*L. major*抵抗型B6.WT小鼠在感染后可通过产生干扰素- $\gamma$ (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )以及一氧化氮(nitric oxide, NO)实现自愈。而易感的BALB/c小鼠在感染后主要产生Th2型细胞因子,无法清除寄生虫最终死于感染<sup>[3-4]</sup>。

肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )是一种多效性细胞因子,主要由巨噬细胞、树突状细胞和T淋巴细胞等免疫细胞产生。既往研究<sup>[5]</sup>表明,TNF- $\alpha$ 缺失会导致*L. major*抵抗型小鼠

2025-08-24 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81703524)

作者简介:甄二娜,女,硕士研究生;

胡姗姗,女,讲师,硕士生导师,通信作者,E-mail: shanshanhu@ustc.edu.cn

si-MDM2 significantly inhibited the protein levels of MDM2 and N-cadherin in A549 and PC9 cells, and upregulated the expression of E-cadherin protein, and significantly inhibited the proliferation (both  $P < 0.01$ ) and migration (both  $P < 0.01$ ) of both cells. After overexpression of MDM2 in A549 and PC9 cells, the proliferation and migration ability were significantly enhanced (both  $P < 0.05$ ), and the inhibitory effects of DHA were partially reversed by MDM2 overexpression (both  $P < 0.05$ ). **Conclusion** DHA effectively inhibits the proliferation and migration of lung adenocarcinoma cells, and its mechanism is associated with the suppression of MDM2.

**Key words** lung adenocarcinoma; MDM2; dihydroartemisinin; proliferation; migration; epithelial-mesenchymal transition

**Fund programs** Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. 2023AH053170); Clinical Medical Research Translational Project of Anhui Province (No. 202304295107020019)

**Corresponding author** Chen Liwen, E-mail: chenliwen@ahmu.edu.cn