



安徽医科大学学报

Acta Universitatis Medicinalis Anhui

ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

## 《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目：低氧环境对抗肿瘤药物培美曲塞介导的肿瘤细胞凋亡的影响  
作者：周文静，葛若木，王子涵，江小丽，钟健，何清雅，张胜权，张素梅  
收稿日期：2026-03-24  
网络首发日期：2026-05-14  
引用格式：周文静，葛若木，王子涵，江小丽，钟健，何清雅，张胜权，张素梅. 低氧环境对抗肿瘤药物培美曲塞介导的肿瘤细胞凋亡的影响[J/OL]. 安徽医科大学学报. <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20260513.1147.006>



**网络首发：**在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认：**纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

## 低氧环境对抗肿瘤药物培美曲塞介导的肿瘤细胞凋亡的影响

周文静, 葛若木, 王子涵, 江小丽, 钟 健, 何清雅, 张胜权, 张素梅

(安徽医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室, 合肥 230032)

2026-03-24 接收

基金项目: 安徽省高校自然科学基金项目(编号: 2023AH050564)

作者简介: 周文静, 女, 硕士研究生;

张素梅, 女, 副教授, 硕士生导师, 通信作者, E-mail:379236778@qq.com

**摘要** **目的** 研究低氧环境对培美曲塞(PE)介导的非小细胞肺癌细胞凋亡的影响。**方法** 将 A549 细胞置于 21% O<sub>2</sub>或 1% O<sub>2</sub>中, 给予 8 μmol/LPE 处理 48 h, 分为常氧对照组、常氧溶剂组、常氧加药组、低氧对照组、低氧溶剂组、低氧加药组。台盼蓝染色法检测低氧环境与常氧环境下的细胞给予 PE 处理后的死亡情况; 流式细胞术检测 PE 作用后常氧和低氧环境下细胞的凋亡率; 细胞划痕实验检测 PE 作用后常氧和低氧环境下细胞的迁移距离; Western blot 检测 MRP-1、Cleaved Caspase-3、E-Cadherin、N-Cadherin 表达。**结果** 台盼蓝染色结果显示, 与常氧加药组相比, 低氧环境下 PE 作用后的细胞死亡率下降 ( $P<0.001$ )。流式细胞术结果显示, 低氧和常氧环境下 PE 均导致细胞凋亡, 但常氧加药组凋亡率显著高于低氧加药组 ( $P<0.0001$ )。细胞划痕结果显示, 常氧和低氧环境下 PE 处理 24 h 和 48 h 后, A549 细胞的迁移距离均小于对照组细胞 ( $P<0.05$ ), 但常氧加药组和低氧加药组细胞的迁移距离无显著性差异。Western blot 结果显示, 低氧环境下 PE 处理的细胞中 MRP-1 表达明显高于常氧环境下 PE 处理的细胞 ( $P<0.0001$ )。与对照组比较, 常氧条件下, PE 作用于 A549 细胞后, Cleaved Caspase-3 的表达上升 ( $P<0.05$ ), 但低氧条件下, PE 处理的细胞中 Cleaved Caspase-3 表达无明显变化。低氧和常氧环境下, PE 处理的细胞中 E-Cadherin 表达下降 ( $P<0.0001$ ,  $P<0.001$ ), N-Cadherin 表达降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.0001$ ), 但低氧加药处理的细胞中 E-Cadherin 和 N-Cadherin 表达明显低于常氧加药组 ( $P<0.0001$ )。**结论** 低氧可显著削弱 PE 对 A549 细胞的促凋亡效应, 并阻断 Cleaved Caspase-3 激活; 其机制可能与低氧诱导 MRP-1 高表达、减少药物蓄积有关。干预 MRP-1 或恢复凋亡通路活性可能成为克服低氧耐药的新策略。

**关键词** A549 细胞; 培美曲塞; 低氧; 凋亡; MRP-1; Cleaved Caspase-3

中国分类号 R 34

## Effect of hypoxic environment on tumor cell apoptosis mediated by the antitumor drug pemetrexed

**Abstract Objective** To investigate the effect of hypoxia on pemetrexed (PE)-mediated apoptosis in non-small cell lung cancer cells. **Methods** A549 cells were cultured under 21% O<sub>2</sub> (normoxia) or 1% O<sub>2</sub> (hypoxia), and treated with 8 μmol/L PE for 48 h. The cells were divided into normoxic control group, normoxic vehicle group, normoxic drug-treated group, hypoxic control group, hypoxic vehicle group and hypoxic drug-treated group. Trypan blue staining was used to observe cell death after PE intervention under normoxia and hypoxia. Flow cytometry was adopted to detect cell apoptosis rate. Wound healing assay was used to assess cell migration. Western blot was performed to detect the protein levels of MRP-1, Cleaved Caspase-3, E-Cadherin and N-Cadherin. **Results** Trypan blue staining results showed that the cell death rate was reduced in PE-treated cells under hypoxia compared with the normoxic PE group ( $P<0.001$ ). Flow cytometry results indicated that PE induced cell apoptosis under both normoxic and hypoxic conditions. However, the apoptosis rate of the normoxic PE group was significantly higher than that of the hypoxic PE group ( $P<0.0001$ ). Wound healing assay showed that the migration distance of A549 cells decreased after PE treatment for 24 h and 48 h under normoxia and hypoxia when compared with the control group ( $P<0.05$ ), while no significant difference was found between the normoxic PE group and the hypoxic PE group. Western blot results revealed that MRP-1 expression was markedly higher in hypoxic PE-treated cells than in normoxic PE-treated cells ( $P<0.0001$ ). Compared with the control group, Cleaved Caspase-3 expression was upregulated in A549 cells following PE intervention under normoxia ( $P<0.05$ ), whereas no obvious alteration in Cleaved Caspase-3 expression was detected in hypoxic PE-treated cells. Under both normoxic and hypoxic conditions, PE treatment downregulated the expression of E-Cadherin ( $P<0.0001$ ,  $P<0.001$ ) and N-Cadherin ( $P<0.05$ ,  $P<0.0001$ ). In addition, the expression levels of E-Cadherin and N-Cadherin in the hypoxic PE group were significantly lower than those in the normoxic PE group ( $P<0.0001$ ). **Conclusion** Hypoxia significantly attenuates the pro-apoptotic effect of PE on A549 cells and blocks Cleaved Caspase-3 activation. This mechanism may be related to hypoxia-induced MRP-1 overexpression and reduced drug accumulation. Interfering with MRP-1 or restoring the activity of the apoptosis pathway may serve as a novel strategy to overcome hypoxia-induced drug resistance.

**Keywords** A549 cells; pemetrexed; hypoxia; apoptosis; MRP-1; Cleaved Caspase-3

**Fund program** Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. 2023AH050564)

**Corresponding author** Zhang Sumei, E-mail: 379236778@qq.com

在全球范围内，肺癌仍居癌症死亡首位，2022 年预计新发约 250 万例，死亡约 180 万例；非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer, NSCLC）占 80%~85%<sup>[1]</sup>，其难治性常与肿瘤微环境缺氧密切相关。培美曲塞（pemetrexed, PE）是一种多靶点抗叶酸制剂，结构上以吡咯嘧啶为核心，可竞争性抑制胸苷酸合成酶、二氢叶酸还原酶和甘氨酸核糖核苷酸甲酰转移酶等至少 3 种叶酸依赖酶，从而阻断嘌呤与嘧啶的再合成，破坏 DNA 复制并诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[2]</sup>。然而，肿瘤内缺氧微环境可下调胸苷酸合成酶活性并减少药物摄取，从而削弱 PE 对 DNA 合成的阻断，最终导致残余病灶耐受和早期复发<sup>[3]</sup>。然而，目前关于缺氧削弱 PE 疗效的分子环节仍缺少系统内外证据。基于此，该研究以人 NSCLC 的 A549 细胞为模型，在 1% O<sub>2</sub>缺氧与 21% O<sub>2</sub>常氧条件下对比 PE 的增殖抑制、凋亡诱导及迁移变化，并重点检测多药耐药相关蛋白（multidrug resistance-associated protein 1, MRP-1）介导的药物泵出和 Caspase-3 剪切状态，旨在阐明缺氧诱导 PE 耐药的具体途径，为克服 NSCLC 核心区耐受提供新的实验依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞

人类非小细胞肺癌细胞系（A549）购自美国 ATCC 细胞库，冻存于安徽医科大学基础医学院生物化学与分子生物学实验室液氮罐中。

#### 1.1.2 主要试剂

PE（货号：BA3581，美国 APEX BIO 公司）；胎牛血清（货号：E600051，上海生工生物工程技术服务有限公司）；RPMI 1640 [货号：12633020，赛默飞世尔科技（中国）有限公司]；台盼蓝染液试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、一抗稀释液（货号：C1313S、C1062S、P0023A，上海碧云天生物技术有限公司）；一抗 GAPDH、E-Cadherin [货号：ab181602、ab40772，稀释比 1：500，艾博抗（上海）贸易有限公司]；一抗 N-Cadherin、Cleaved Caspase-3（货号：22018-1-AP、82707-13-RR，稀释比 1：500，武汉三鹰生物技术有限公司）；MRP-1 [货号：PA5-30594，稀释比 1：500，赛默飞世尔科技（中国）有限公司]。二抗辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)（货号：A0216、A0208，稀释比 1：50000，上海碧云天生物技术有限公司）。

#### 1.1.3 主要仪器

酶标仪(型号: Thermo MultiskanGO, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 低温离心机(型号: Sorvall Legend Micro 21R, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 电泳仪 (型号: DYY-6C, 北京六一生物科技有限公司);  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱(型号: MDF-U73V, 日本 Sanyo 公司);  $\text{CO}_2$  细胞培养箱(型号: MCO-20AIC, 日本 Panasonic 公司); 超净工作台(型号: SW-CJ-1F 型, 苏州净化设备有限公司); 正置显微镜(型号: DM4000B, 德国 Leica 公司); 电子天平(型号: DC120AS, 南京苏测计量仪器有限公司); 摇床(ZD-9556 型, 常州无有实验仪器有限公司); 全自动数码凝胶成像系统(型号: ChemiQ4600, 上海欧翔科学仪器有限公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 PE 配制

实验前, 称取适量 PE 粉末, 用少量无菌 DMSO 溶解, 配制成  $10\text{ mmol/L}$  的母液, 并分装至多个无菌 EP 管中, 于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱避光保存, 避免反复冻融。使用时, 根据实验需要将母液用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养基稀释至所需工作浓度 ( $8\text{ }\mu\text{mol/L}$ ), 轻轻混匀并过滤除菌 ( $0.22\text{ }\mu\text{m}$  滤膜), 现配现用。

### 1.2.2 细胞培养

复苏 A549 细胞, 用含有 10%FBS、1% 青-链霉素混合液的 RPMI1640 培养基, 在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养。待细胞完全贴壁后, 传代 3 次后细胞状态仍然良好可用于接下的实验。

### 1.2.3 细胞分组

将 A549 细胞分为 6 组: 常氧对照组, 细胞常规培养未做任何处理; 常氧溶剂组, 细胞培养基中加入 DMSO 后在常氧培养箱培养; 常氧加药组, 在完全培养基中加入配制成  $8\text{ }\mu\text{mol/L}$  PE 溶液, 将细胞置于常氧培养箱中培养; 低氧对照组, 细胞置于低氧培养箱培养中; 低氧溶剂组, 细胞培养基中加入 DMSO 后置于低氧培养箱培养; 低氧加药组, 在完全培养基中加入配制成  $8\text{ }\mu\text{mol/L}$  PE 溶液, 并将细胞置于低氧培养箱中培养。常氧培养箱设置条件:  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、21%  $\text{O}_2$ ; 低氧培养箱设置条件:  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、1%  $\text{O}_2$ 。

### 1.2.4 台盼蓝染色

用完全培养基培养 A549 细胞至对数生长期, PBS 洗涤后, 胰蛋白酶消化并计数, 种入 6 孔细胞培养板中, 共种 2 块细胞培养板。当 6 孔板中的细胞生长密度达到 40%~50%时, PBS 洗涤后, 前 2 个孔中分别加入 2 mL 完全培养基, 中间 2 个孔加入 2 mL 含有 DMSO 溶剂的完全培养基, 最后 2 个孔种加入 2 mLPE 浓度为  $8\text{ }\mu\text{mol/L}$  的完全培养基。加药处理后的两块 6 孔

板分别放置于低氧和常氧培养箱中培养 48 h 后取出, PBS 洗涤后, 胰酶消化后收集细胞以 1500 r/min 低速离心 1 min 后弃上清液, 然后加入 1 mL 完全培养基重悬细胞。将 100  $\mu$ L 细胞重悬液加到 1.5 mL EP 管中, 再加入 100  $\mu$ L 台盼蓝染色液 (2 $\times$ ), 混匀, 染 3 min。吸取少量经过染色的细胞, 用计数板进行细胞计数。每个细胞组的样品至少要数 500 个, 数出蓝色细胞和总的细胞数。细胞死亡率=蓝色细胞数/细胞总数 $\times$ 100%。

### 1.2.5 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测

用完全培养基培养 A549 细胞至对数生长期, PBS 洗涤后, 胰蛋白酶消化并计数, 种入 6 孔细胞培养板中, 共计种 2 块细胞培养板。当 6 孔板中的细胞生长密度达到 40%~50%时, PBS 洗涤后, 加药处理后的 2 块 6 孔板分别放置于低氧和常氧培养箱中培养 48 h 后取出, PBS 洗涤后, 胰酶消化后收集的细胞以 1500 r/min 低速离心 5 min 后弃上清液。然后用 1 $\times$ 结合缓冲液重悬细胞, 细胞密度约为  $1 \times 10^6$  个/mL。转移 100  $\mu$ L 的细胞重悬液( $1 \times 10^5$  个细胞)到 5 mL 的流式管中。加入 5  $\mu$ L 的 FITC Annexin V 和 5  $\mu$ L 的 PI, 轻摇细胞, 室温(25  $^{\circ}$ C)避光孵育 15 min。然后在每根流式管中加入 400  $\mu$ L 的 1 $\times$ 结合缓冲液, 1h 内上机分析。

### 1.2.6 划痕实验

取一瓶生长密度 80%以上的 A549 细胞, 胰酶消化后, 均匀分散种入 6 孔细胞培养板中, 然后置于常氧培养箱中培养。当细胞铺满整个孔底部时, 用黄色枪头, 借助无菌尺子, 在铺满细胞的孔底划出“十”字型划痕。加药处理组与之前相同, 加药处理后立即放置于倒置显微镜下拍摄划痕位置, 记为 0 h。划痕并加药处理后的 6 孔板分别放置于低氧和常氧环境中培养 48 h。划痕并加药处理后 24 h 和 48 h 后, 在与 0 h 时同一拍摄位置再次拍摄, 记为 24 h 和 48 h。导出图片进行分析。

### 1.2.7 Western blot 检测

A549 细胞在 6 孔板内生长密度达 80%以上后, PBS 洗 3 次, 将长满 A549 细胞的 6 孔板放在冰上, 每孔加 200  $\mu$ L 含蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液, 冰上裂解 30 min 后, 用细胞刮轻轻将贴壁的细胞刮下来。再用枪头吸取孔内蛋白裂解液于 EP 管中, EP 管要做好标记, 在 -20  $^{\circ}$ C 和 4  $^{\circ}$ C 冰箱之间反复冻融 3 次, 使细胞充分裂解。4  $^{\circ}$ C、14 000 r/min 离心 30 min, 离心后取上清液放入另一标记好的洁净 EP 管中, BCA 法测定蛋白浓度。根据测出的蛋白浓度数值, 将不同分组的细胞, 加上蛋白上样缓冲液, 混匀, 然后煮沸使蛋白变性, -80  $^{\circ}$ C 保存。取 15  $\mu$ g 蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转移到 PVDF 膜上, 用 5%的脱脂牛奶封闭 2 h, 一抗 4  $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜, 二抗室温孵育 2 h 后显影。用 ImageJ 软件分析各条带的灰度值。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS 18.0 软件进行数据分析，实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间差异比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)，若总体差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )，进一步采用 Dunnett 法进行事后两两比较 (以同氧环境对照组为参照)。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 A549 细胞于 PE 作用后在低氧环境与常氧环境下细胞的死亡情况

台盼蓝染色结果显示，在常氧条件下，常氧对照组和加药组死亡细胞百分比分别为 4.94% 和 30.70%；在低氧条件下，低氧对照组和加药组死亡细胞百分比分别为 5.36% 和 10.44%。结果表明，常氧条件下，PE 可诱导 A549 细胞死亡 ( $P < 0.001$ )。而在低氧条件下，其促死亡效应明显减弱 ( $P < 0.05$ )。与常氧加药组相比，低氧加药组细胞死亡率明显降低 ( $P < 0.001$ )，提示低氧环境降低了 PE 对 A549 细胞死亡的诱导能力。见表 1。

表 1 台盼蓝染色法检测细胞死亡情况 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab.1 Trypan blue staining was used to detect cell death ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Group	Non-blue stained cell count	Blue-stained cell number	Dead cell percentage (%)
Normoxia control	$4.25 \times 10^5$	$2.10 \times 10^4$	4.94
Normoxia vehicle	$5.60 \times 10^5$	$2.85 \times 10^4$	5.09
Normoxia drug-treated	$4.56 \times 10^5$	$1.40 \times 10^5$	30.70 <sup>***</sup>
Hypoxia control	$4.10 \times 10^5$	$2.20 \times 10^4$	5.36
Hypoxia vehicle	$4.45 \times 10^5$	$2.35 \times 10^4$	5.28
Hypoxia drug-treated	$4.98 \times 10^5$	$5.20 \times 10^4$	10.44 <sup>###</sup>

注: <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$  vs Normoxia control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs Hypoxia control group; <sup>###</sup> $P < 0.001$  vs Normoxia drug-treated group.

## 2.2 Annexin V-FITC 细胞凋亡试剂盒检测常氧和低氧培养 48 h 后细胞的凋亡率

细胞流式结果显示，在常氧条件下，常氧对照组与常氧溶剂组的细胞凋亡率分别为 3.91% 和 5.01%，而常氧加药组的凋亡率升高至 32.59%，显著高于常氧对照组 ( $P < 0.0001$ )，表明常氧加药组明显促进了细胞凋亡。相比之下，在低氧条件下，低氧对照组和低氧溶剂组的凋亡率分别为 5.98% 和 7.33%，低氧加药组则为 9.78%，虽略高于对照组 ( $P < 0.05$ )，但明显低于常氧加药组 ( $P < 0.0001$ )。通过对比低氧加药组与常氧加药组的凋亡率，进一步证实低氧环境削弱了 PE 对 A549 细胞的促凋亡效应。见图 1。

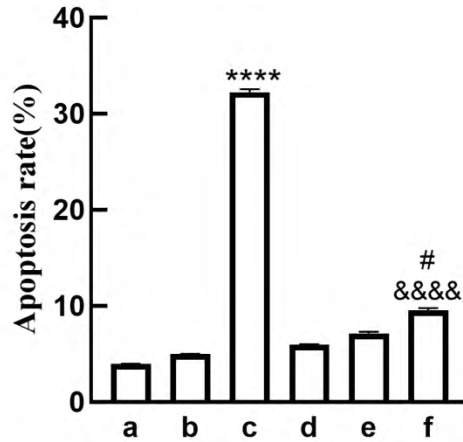
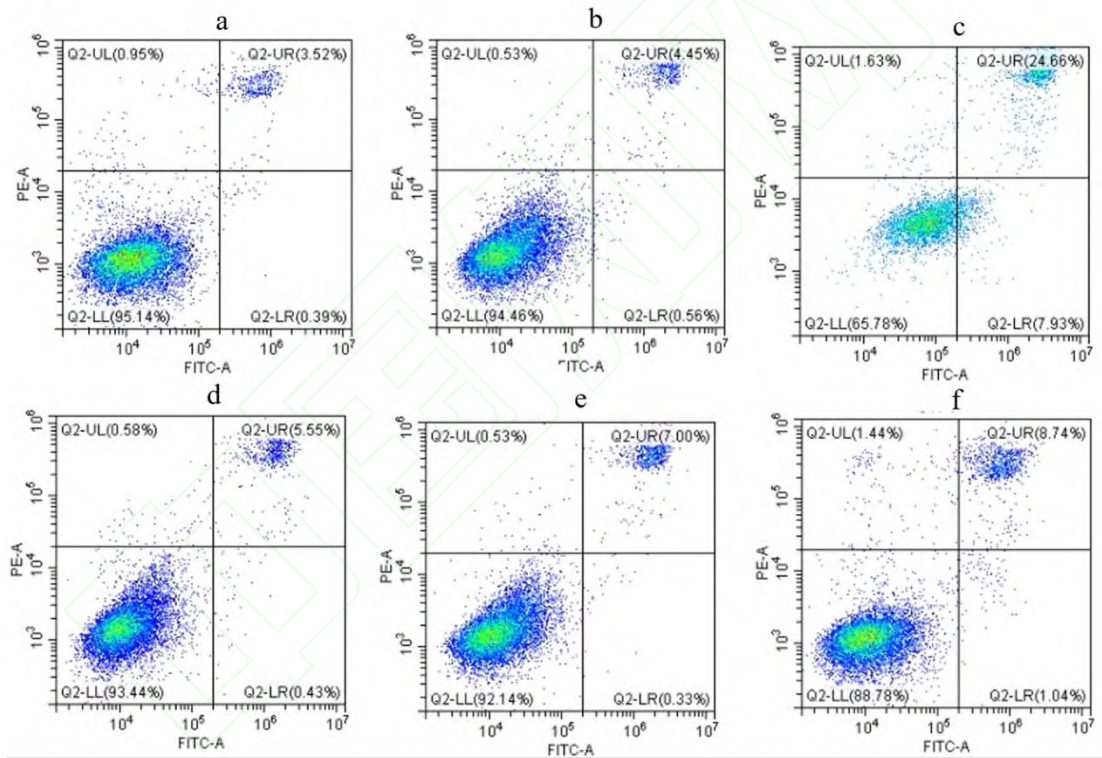


图 1 PE 作用于 A549 细胞后在常氧和低氧环境中培养 48 h 后细胞的凋亡率

**Fig.1 Apoptosis rate of A549 cells cultured in normoxia and hypoxia incubator for 48 hours after PE treatment**

注: a: Normoxia control group; b: Normoxia vehicle group; c: Normoxia drug-treated group; d: Hypoxia control group; e: Hypoxia vehicle group; f: Hypoxia drug-treated group; \*\*\*\* $P < 0.0001$  vs Normoxia control group; # $P < 0.05$  vs Hypoxia control group; &&&& $P < 0.0001$  vs Normoxia drug-treated group.

### 2.3 A549 细胞于 PE 作用后在低氧环境与常氧环境下细胞的迁移情况

本课题采用细胞划痕实验方法对 PE 作用于 A549 细胞后在常氧和低氧环境下细胞的迁移情况进行了双因素方差分析研究。采用 Dunnett 法进行事后两两比较(以同氧环境对照组为参照)分析 4 组数据,结果如图 2 所示,常氧加药组的 24 h 和 48 h 的细胞迁移距离要小于常氧对照组的细胞迁移距离( $P < 0.01$ );低氧加药组的 24 h 和 48 h 的细胞迁移距也小于低氧对照组的细胞迁移距离( $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ )。但常氧和低氧对照组的迁移距离相近,常氧和低氧加药组的迁移距离也相近,而常氧对照组与低氧对照组、常氧加药组与低氧加药组的迁移距离无显著差异( $F(3,16)=2.590$ ,  $P > 0.05$ )。通过比较这 4 组的数据,表明低氧环境对 A549 细胞的迁移能力影响不大。

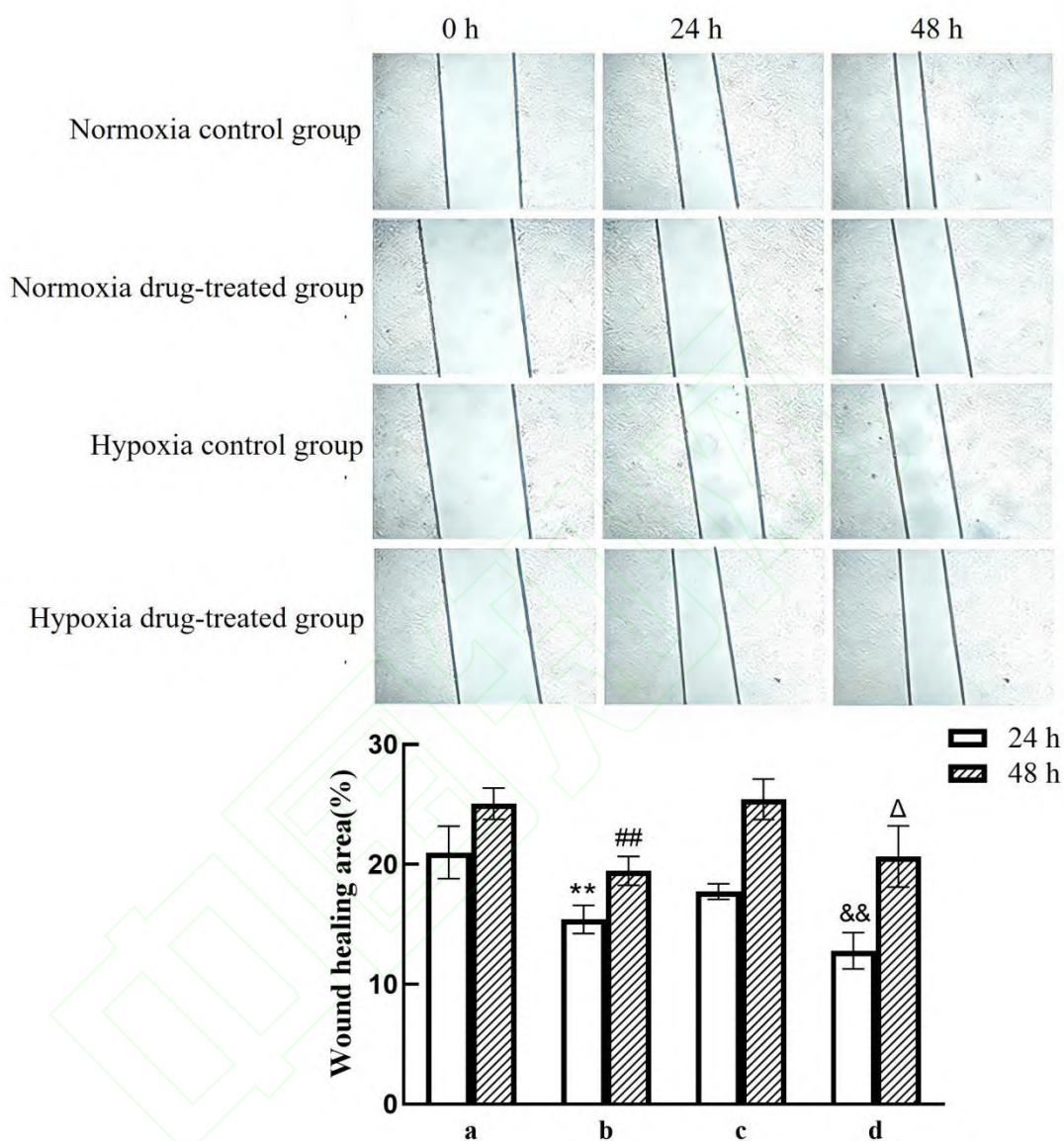


图 2 PE 作用于 A549 细胞后在常氧和低氧培养箱培养 24h 和 48 h 后细胞的迁移距离

**Fig.2 The migration distance of A549 cells after treatment with PE, followed by culture under normoxic and hypoxic conditions for 24 h and 48 h.**

注: a: Normoxia control group; b: Normoxia drug-treated group; c: Hypoxia control group; d: Hypoxia drug-treated group; \*\* $P < 0.01$  vs 24 h Normoxia control group; ## $P < 0.01$  vs 48 h Normoxia control group; && $P < 0.01$  vs 24 h Hypoxia control group; <sup>Δ</sup> $P < 0.05$  vs 48 h Hypoxia control group.

## 2.4 低氧环境中，加入 PE 后，A549 细胞中多耐药相关蛋白 MRP-1 表达量变化

常氧环境下，PE 处理 A549 细胞后，MRP-1 蛋白表达量上升 ( $P<0.01$ )。低氧环境下，溶剂组和 PE 处理细胞后 MRP-1 蛋白表达均显著上升 ( $P<0.0001$ ,  $P<0.0001$ )，且低氧加药组的 MRP-1 蛋白表达量明显高于常氧加药组，差异有统计学意义 ( $P<0.0001$ )。见图 3。

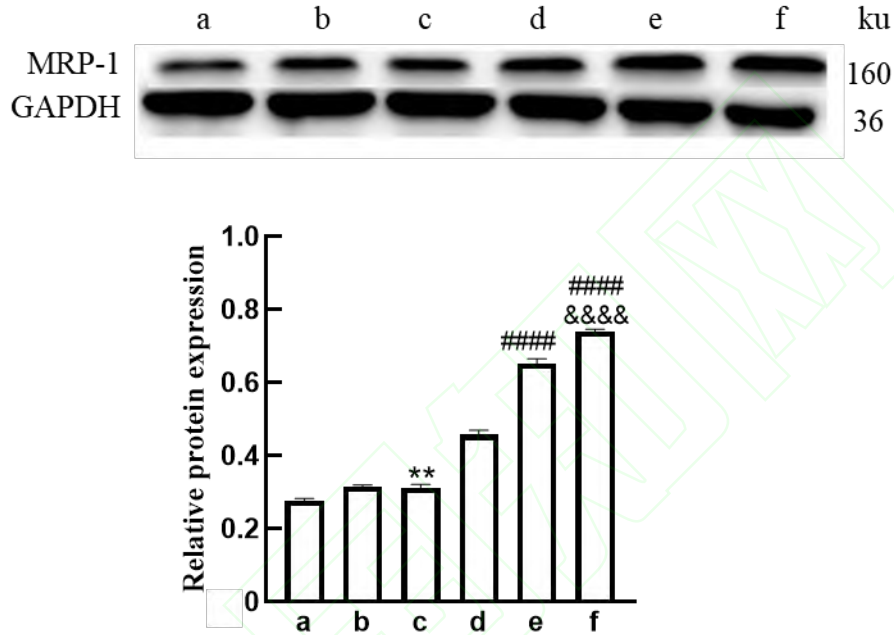


图 3 PE 作用于 A549 细胞 48 h 后，在常氧和低氧环境下 MRP-1 蛋白表达量

Fig.3 MRP-1 protein expression levels in A549 cells cultured in normoxia and hypoxia incubator for 48 hours after PE treatment

注：a: Normoxia control group; b: Normoxia vehicle group; c: Normoxia drug-treated group; d: Hypoxia control group; e: Hypoxia vehicle group; f: Hypoxia drug-treated group; \*\* $P<0.01$  vs Normoxia control group; #### $P<0.0001$  vs Hypoxia control group; &&&& $P<0.0001$  vs Normoxia drug-treated group.

## 2.5 低氧环境中，加入 PE 后，A549 细胞中凋亡相关蛋白表达量变化

在常氧环境下，PE 处理的 A549 细胞中凋亡相关蛋白 Cleaved Caspase-3 表达升高 ( $P<0.05$ )，而低氧化境下 PE 处理对 Cleaved Caspase-3 的表达无明显影响，但常氧加药组中 Cleaved Caspase-3 表达显著高于低氧加药组，差异有统计学意义 ( $P<0.0001$ )。见图 4。

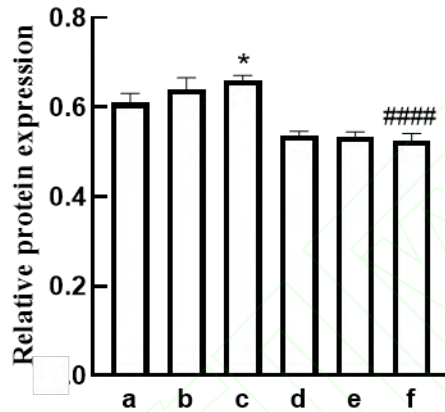
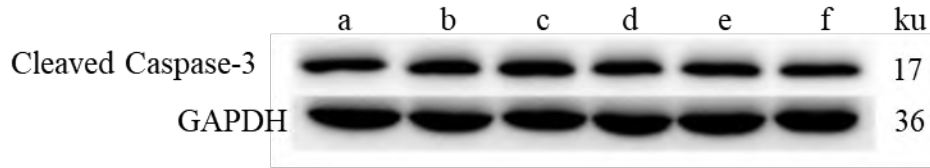


图 4 PE 作用于 A549 细胞 48 h 后，在常氧和低氧环境下 Cleaved Caspase-3 蛋白表达量

Fig.4: Cleaved Caspase-3 protein expression levels in A549 cells cultured in normoxia and hypoxia incubator for 48 hours after PE treatment

注: a: Normoxia control group; b: Normoxia vehicle group; c: Normoxia drug-treated group; d: Hypoxia control group; e: Hypoxia vehicle group; f: Hypoxia drug-treated group; \* $P < 0.05$  vs Normoxia control group; #### $P < 0.0001$  vs Normoxia drug-treated group.

## 2.6 低氧环境下，PE 作用于 A549 细胞后，E-Cadherin 和 N-Cadherin 表达量变化

不论是常氧环境还是低氧环境，与对应对照组相比，加药组的 E-Cadherin 的表达量明显下降 ( $P < 0.0001$ ,  $P < 0.001$ )，N-Cadherin 的表达也明显下降 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.0001$ )。并且与常氧加药组相比，低氧加药组的 E-Cadherin 和 N-Cadherin 的表达量明显下降 ( $P < 0.0001$ ,  $P < 0.0001$ )。见图 5。

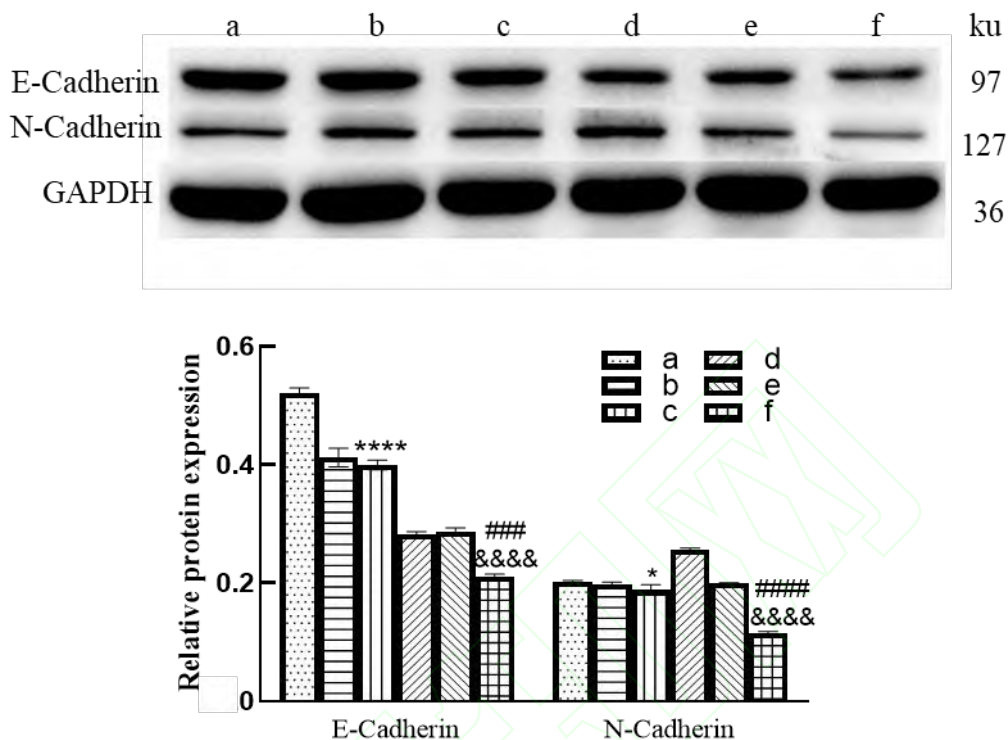


图 5 PE 作用于 A549 细胞后，在常氧和低氧环境下 E-Cadherin 和 N-Cadherin 蛋白表达量

**Fig.5 Expression levels of E-Cadherin and N-Cadherin proteins in A549 cells cultured in normoxia and hypoxia incubator for 48 hours after PE treatment**

注：a: Normoxia control group; b: Normoxia vehicle group; c: Normoxia drug-treated group; d: Hypoxia control group; e: Hypoxia vehicle group; f: Hypoxia drug-treated group; \* $P < 0.05$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  vs Normoxia control group; ### $P < 0.001$ , ##### $P < 0.0001$  vs Hypoxia control group; &&&& $P < 0.0001$  vs Normoxia drug-treated group.

### 3 讨论

NSCLC 肿瘤内普遍存在的 1%~2%  $O_2$  的低氧微环境。低氧微环境可上调 MRP-1 的表达，增强肿瘤细胞药物外排能力，降低肿瘤细胞药物敏感性<sup>[4-5]</sup>。PE 作为叶酸拮抗剂，主要通过抑制胸苷酸合酶、诱导 DNA 损伤杀伤肿瘤细胞，而低氧可进一步促进药物外排并抑制细胞凋亡，从双重层面削弱 PE 的抗肿瘤效应，进而诱导 NSCLC 细胞产生化疗耐药<sup>[6]</sup>。基于此，深入探究低氧通过调控药物外排与凋亡失衡介导 PE 耐药的分子机制，可为阐明 NSCLC 化疗耐药机制提供理论依据。

台盼蓝为带负电的活性染料，无法穿透结构完整的细胞膜。细胞发生损伤或凋亡后细胞膜破

损，台盼蓝可进入胞内将死细胞染色为淡蓝色；活细胞膜结构完整因而保持无色透明<sup>[7]</sup>。本研究表明虽然在低氧环境下，PE 使得 A549 细胞死亡率升高，但其增幅显著小于常氧组，这说明低氧能够削弱 PE 的细胞杀伤作用。

基因突变与表观遗传异常可破坏 G<sub>1</sub>/S、G<sub>2</sub>/M 关键检查点，持续驱动细胞生长与 DNA 复制，赋予肿瘤无限增殖能力<sup>[8]</sup>。同时，促凋亡基因受抑制、抗凋亡基因异常激活，导致凋亡通路失衡，进一步促进肿瘤恶性进展<sup>[9-10]</sup>。本研究通过流式细胞术检测常氧与低氧条件下 PE 干预后的 A549 细胞凋亡水平。结果显示，低氧组细胞凋亡虽有小幅上升，但显著低于常氧加药组，证实低氧可明显削弱 PE 诱导肺癌细胞凋亡的作用。

癌症预后主要取决于肿瘤是否转移<sup>[11]</sup>。临床上转移性癌症治愈率低，占癌症死亡 90%以上<sup>[12]</sup>。本研究通过划痕实验检测常氧与低氧条件下 PE 对 A549 细胞迁移的影响。结果表明，两种环境中 PE 均可显著抑制细胞迁移，但抑制效果无明显差异。提示低氧本身不影响 A549 细胞迁移，也不会干扰 PE 的抗迁移作用。

为探讨低氧环境下肺癌细胞 A549 对 PE 药物敏感性改变的潜在机制，本研究检测了 MRP-1 表达。该蛋白定位于细胞膜与胞内膜系统，依靠 ATP 供能，主动外排化疗药物及其代谢偶联物，降低胞内药物浓度，使得肿瘤对多种化疗药物产生耐药<sup>[13]</sup>。已有研究证实，MRP-1 在多种实体瘤中高表达，与化疗耐受及不良预后密切相关<sup>[14]</sup>。本实验检测结果显示，低氧可上调 A549 细胞 MRP-1 表达，且低氧联合 PE 处理后其表达水平最高，显著高于常氧环境，进一步证实低氧会削弱肺癌细胞对 PE 的药物敏感性。

细胞凋亡是细胞在基因调控下、按自身程序主动走向死亡的一种生理性自杀过程<sup>[15]</sup>。Caspase 家族中 Caspase-3 在细胞凋亡中起着不可替代的作用，是凋亡的重要执行者<sup>[16-17]</sup>。本实验检测了在低氧和常氧环境下，PE 作用于 A549 细胞后 Cleaved Caspase-3 的表达情况。结果显示，常氧条件下 PE 可显著上调 Cleaved Caspase-3 表达，低氧环境中则无明显变化。提示低氧环境降低了 PE 对 A549 细胞的促凋亡能力，该结论与流式凋亡检测结果一致。

E-Cadherin 与 N-Cadherin 除调控细胞黏附外，还可通过膜信号通路参与凋亡调控。E-Cadherin 可锚定膜上  $\beta$ -catenin，阻止其入核激活抗凋亡基因<sup>[18]</sup>；N-Cadherin 结合 FGFR-1 后，可激活 PI3K-AKT、ERK 通路，抑制线粒体凋亡进程<sup>[19]</sup>。本研究发现，无论是常氧还是低氧条件下，PE 处理均显著降低 A549 细胞中 E-Cadherin 和 N-Cadherin 的表达水平。对比分析显示，相较于常氧加药组，低氧加药组中两种 EMT 标志物的下调程度更为明显，表明低氧可进一步增强 PE 对 EMT 相关蛋白表达的抑制作用。

综上所述, 1% O<sub>2</sub>低氧微环境可降低 A549 细胞对 PE 的药物敏感性, 上调 MRP-1 表达、抑制 Cleaved Caspase-3 活化, 减弱 PE 增殖抑制与凋亡诱导作用, 进而诱导 NSCLC 细胞产生化疗耐药。低氧虽可促进肿瘤细胞迁移, 但不影响 PE 的迁移抑制效果。本研究证实低氧通过增强药物外排、阻滞凋亡进程共同介导 PE 耐药, 可为 NSCLC 个体化治疗与耐药逆转提供实验支撑, 以 MRP-1 与 Cleaved Caspase-3 为标志物, 亦能指导临床化疗方案优化, 为中晚期肺癌耐药干预提供新的作用靶点与研究方向。

## 参考文献

- [1] 陈万青, 梁智恒, 岑惠珊, 等. 中国肿瘤登记现状及发展[J/OL]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2016, 8(7). doi:10.3969/j.issn.1674-7372.2016.07.001.
- [1] Chen W Q, Liang Z H, Cen H S, et al. Current status and development of cancer registration in China[J/OL]. Chin J Front Med Sci Electron Version, 2016, 8(7). doi:10.3969/j.issn.1674-7372.2016.07.001.
- [2] Adjei A A. Pharmacology and mechanism of action of pemetrexed[J]. Clin Lung Cancer, 2004, 5: S51-5. doi:10.3816/CLC.2004.s.003.
- [3] Petri G L, El Hassouni B, Sciarrillo R, et al. Impact of hypoxia on chemoresistance of mesothelioma mediated by the proton-coupled folate transporter, and preclinical activity of new anti-LDH-a compounds[J]. Br J Cancer, 2020, 123(4): 644-56. doi:10.1038/s41416-020-0912-9.
- [4] 郭 洋, 吴密璐, 赵君慧, 等. 肺癌低氧微环境与化疗耐药相关性研究进展[J]. 中国肺癌杂志, 2014, 17(3): 265-8. doi: 10.3779/j.issn.1009-3419.2014.03.14.
- [4] Guo Y, Wu M L, Zhao J H, et al. Advances in hypoxia microenvironment and chemotherapy-resistant of lung cancer[J]. Chin J Lung Cancer, 2014, 17(3): 265-8. doi: 10.3779/j.issn.1009-3419.2014.03.14.
- [5] 葛若木, 魏 翔, 孙晓梅, 等. 低氧降低肺癌 A549 细胞对培美曲塞的药物敏感性[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(6): 866-870. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.06.006.
- [5] Ge R M, Wei X, Sun X M, et al. The reduced sensitivity of pemetrexed on lung cancer cells A549 under hypoxic condition[J]. Acta Univ Med Anhui, 2021, 56(6): 866-870. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.06.006.
- [6] Weeks L D, Zentner G E, Scacheri P C, et al. Uracil DNA glycosylase (UNG) loss enhances DNA double strand break formation in human cancer cells exposed to pemetrexed[J]. Cell Death Dis, 2014, 5(2): e1045. doi:10.1038/cddis.2013.477.

- [7] Chen Y, Zhang C, Jin S, et al. Pemetrexed induces ROS generation and cellular senescence by attenuating TS-mediated thymidylate metabolism to reverse gefitinib resistance in NSCLC[J]. *J Cell Mol Med*, 2023, 27(14): 2032-44. doi:10.1111/jcmm.17799.
- [8] Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [9] Vier J, Häcker G, Kirschnek S. Contribution of A1 to macrophage survival in cooperation with MCL-1 and BCL-X<sub>L</sub> in a murine cell model of myeloid differentiation[J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15(9): 677. doi:10.1038/s41419-024-07064-z.
- [10] Fulda S. Targeting apoptosis for anticancer therapy[J]. *Semin Cancer Biol*, 2015, 31: 84-8. doi:10.1016/j.semcancer.2014.05.002.
- [11] Chaffer C L, Weinberg R A. A perspective on cancer cell metastasis[J]. *Science*, 2011, 331(6024): 1559-64. doi:10.1126/science.1203543.
- [12] Gupta G P, Massagué J. Cancer metastasis: building a framework[J]. *Cell*, 2006, 127(4): 679-95. doi:10.1016/j.cell.2006.11.001.
- [13] Sodani K, Patel A, Kathawala R J, et al. Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance[J]. *Chin J Cancer*, 2012, 31(2): 58-72. doi:10.5732/cjc.011.10329.
- [14] Kathawala R J, Gupta P, Ashby C R, et al. The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: a review of the past decade[J]. *Drug Resist Updat*, 2015, 18: 1-17. doi:10.1016/j.drug.2014.11.002.
- [15] Wang W, Li T, Wu K. Cell death in tumor microenvironment: an insight for exploiting novel therapeutic approaches[J]. *Cell Death Discov*, 2025, 11(1): 93. doi:10.1038/s41420-025-02376-1.
- [16] Carneiro B A, El-Deiry W S. Targeting apoptosis in cancer therapy[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17(7): 395-417. doi:10.1038/s41571-020-0341-y.
- [17] Jiang M, Qi L, Li L, et al. The caspase-3/GSDME signal pathway as a switch between apoptosis and pyroptosis in cancer[J]. *Cell Death Discov*, 2020, 6: 112. doi:10.1038/s41420-020-00349-0.
- [18] Liu L, Li H X, Lv X Q. The mechanism and significance of E-cadherin, anti-apoptosis B-cell lymphoma-2 protein and sE-cadherin roles in cancer[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2014, 28(4): 683-91.
- [19] Suyama K, Shapiro I, Guttman M, et al. A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor[J]. *Cancer Cell*, 2002, 2(4): 301-14. doi:10.1016/s1535-6108(02)00150-2.