



DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2022.05.04

文章编号: 2095-1264(2022)05-0577-07

甲基莲心碱通过 p62 抑制肺腺癌 A549 细胞 侵袭、转移的机制[★]

李 慧¹, 杨 硕^{2*}, 陈雪莲¹, 唐文芳¹, 汤渝玲¹, 宋小云^{1*}, 刘 萍^{1*}

(¹长沙市第一医院呼吸内科, 湖南长沙, 410005; ²湖南省肿瘤医院 骨软组织肿瘤科, 湖南长沙, 410013)

摘要: **目的** 阐明甲基莲心碱(Nef)抑制肺腺癌 A549 细胞侵袭和转移的可能机制, 为今后临床应用 Nef 防治肺腺癌转移提供理论基础。 **方法** 常规培养肺腺癌 A549 细胞, 加入不同浓度的 Nef 进行干预, CCK-8 检测细胞活力; 将 A549 细胞分为三组: 空白组不做任何处理, TGF- β 组采用 TGF- β 1 干预, TGF- β +Nef 组采用 TGF- β 1 和 Nef 干预, 显微镜下观察细胞形态; Transwell 和 Wound healing 法检测各组细胞的侵袭和迁移能力; PCR、Western blotting 检测各组细胞上皮间质转化(EMT)相关基因和蛋白的表达, 电镜下验证细胞自噬, p62 基因沉默进一步明确作用机制。 **结果** Nef 可明显抑制 TGF- β 1 诱导的 A549 细胞 EMT, 并可能通过抑制 Twist1 自噬降解抑制 A549 细胞的侵袭和迁移。 **结论** Nef 可抑制肺腺癌 A549 细胞的侵袭和转移, 其机制可能与促进 p62 介导的 Twist1 选择性自噬降解有关。

关键词: 甲基莲心碱; p62; Twist1; 上皮间质转化; 肿瘤转移

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A

The mechanisms of neferine in inhibiting the invasion and metastasis of lung adenocarcinoma A549 cells via p62[★]

LI Hui¹, YANG Shuo^{2*}, CHEN Xuelian¹, TANG Wenfang¹, TANG Yuling¹, SONG Xiaoyun^{1*}, LIU Ping^{1*}

(¹Department of Respiratory Medicine, the First Hospital of Changsha, Changsha, 410005, Hunan, China;

²Department of Bone and Soft Tissue Oncology, Hunan Cancer Hospital, Changsha, 410013, Hunan, China)

Abstract: Objective To elucidate the possible mechanism of neferine (Nef) in inhibiting the invasion and metastasis of lung adenocarcinoma A549 cells and to provide theoretical basis for the clinical application of Nef in the prevention and treatment of lung adenocarcinoma metastasis. **Methods** The lung adenocarcinoma A549 cells were cultured routinely and treated with different concentrations of Nef. The proliferation of A549 cells was detected by CCK-8. A549 cells were divided into three groups: blank group without any treatment, TGF- β group with TGF- β 1 intervention, TGF- β +Nef group with TGF- β and Nef intervention. The morphology of A549 cells was observed under microscopes, and the invasion and migration ability of A549 cells in each group were detected by Transwell and scratch assay. The expressions of epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related proteins and genes were detected by Western blotting and PCR. Electron microscopy confirmed the existence of autophagy. p62 gene knockout further clarified the mechanism. **Results** Nef significantly inhibited the EMT of A549 cells induced by TGF- β 1. Nef may inhibit the invasion and metastasis of A549 cells by suppressing the autophagy degradation of Twist1. **Conclusion** Nef can inhibit the invasion and metastasis of lung adenocarcinoma and its

[★]基金项目:长沙市科技计划资助项目(kq1907013);湖南省卫健委资助项目(202103020384);湖南省自然科学基金科药联合项目(2021JJ8008)。

作者简介:李慧,女,医学博士,副主任医师,研究方向:肺癌。

[#]并列第一作者:杨硕,男,医学博士,主治医师,研究方向:骨恶性肿瘤。

^{*}通信作者:宋小云,女,医学硕士,副主任医师,研究方向:肺癌;刘萍,女,医学硕士,副主任医师,研究方向:肺癌。

mechanism may be related to the promotion of p62-mediated selective autophagy degradation of Twist1.

Keywords: Neferine; p62; Twist1; Epithelial-mesenchymal transition; Tumor metastasis

前言

肺腺癌是肺癌中最常见的组织学类型,约占 50%^[1],临床常采用手术、化疗、放疗、分子靶向治疗等综合治疗手段,但患者 5 年平均生存率仅 18% 左右^[2]。侵袭和转移是导致肺腺癌难治及患者死亡的主要原因。因此,探索可有效遏制肺腺癌转移的新型药物成为亟待解决的重要问题。近年来,一向以毒副作用小而受到关注的中药单体甲基莲心碱(neferine, Nef)引起了研究者的极大兴趣。Nef是从睡莲中提取的一种双苄基异喹啉类生物碱,作为中药单体,具有靶点多、药物副作用小等优点,应用前景广泛,近年来更因其显著的抗肿瘤作用而获得广泛关注。转录因子 Twist1 是编码碱性螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)结构的转录因子超家族成员,是促进肿瘤上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的重要转录因子。研究者在肺癌、宫颈癌、乳腺癌、卵巢癌等多种肿瘤细胞中均检测到了 Twist1 的表达,且高表达细胞发生 EMT 的典型形态变化,细胞迁移、侵袭能力亦明显增强^[3-5]。因此, Twist1 可作为抑制肿瘤侵袭和转移的重要靶点。近年来,自噬接头蛋白 p62 在肿瘤侵袭、转移中的作用受到了学术界的广泛关注^[6]。发表在 *Cell* 的报道称, p62 是一个重要的信号枢纽蛋白,不仅参与自噬过程,也是重要的促癌因子^[7]。在自噬过程中, p62 可与多泛素蛋白堆积物结合,并将其募集至自噬体膜上与 LC3 结合,最终与溶酶体融合,形成自噬溶酶体并被降解^[8]。

为此,本实验以肺腺癌 A549 细胞系为研究对象,探讨 Nef 在肺腺癌细胞侵袭、转移中的作用及机制,以期临床应用 Nef 防治肺腺癌转移提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

肺腺癌细胞系 A549(中国科学院上海分院),细胞培养箱(ThermoFisher Scientific, 美国),细胞培养超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司, 中国),直电泳仪和电转槽(Bio-Rad, 美国),倒置显微镜和成像系统(Olympus, 日本),凝胶成像仪(Bio-Rad, 美国),

透射电子显微镜(日立 HT7700), 常温和低温高速离心机、高温加热板(ThermoFisher Scientific, 美国), 自动细胞计数仪、甲基莲心碱(成都植标化纯生物技术有限公司), 重组人 TGF- β 1(Peprotech), 胎牛血清(四季青), RPMI 1640、青霉素-链霉素双抗溶液、0.25% 胰蛋白酶(Gibco), EMT 抗体套装试剂盒(包括 E-cadherin, N-cadherin, vimentin, Anti-rabbit IgG 等)(CST 公司), 荧光二抗、BSA(Peprotech), BCA 试剂盒、DAPI、RIPA 强效细胞裂解液(碧云天), ECL 显影液、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(联科生物), 山羊血清封闭液(北京索莱宝科技有限公司), CCK-8(日本同仁), 蛋白 Marker(ThermoFisher Scientific, 美国), TRIzol 试剂(Invitrogen), cDNATM Kit(日本大津 TaKaRa Bio Inc.), qRT-PCR(加利福尼亚州卡尔斯巴德公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞复苏、培养和传代 将 A549 细胞置于 37 °C 水浴锅中使其快速溶解, 800 r·min⁻¹ 离心 3~5 min, 弃上清, 用完全培养基重悬细胞, 转移至细胞培养箱。细胞传代时, 用 PBS 洗涤 3 次, 在培养瓶中加入 0.5 mL 胰酶, 待显微镜下可见脱落细胞时, 用完全培养基终止消化, 800 r·min⁻¹ 离心 3~5 min, 弃上清, 用完全培养基重悬细胞, 转移至其他无菌培养瓶中继续培养。

1.2.2 Western blotting 检测蛋白表达 在 80 V 的条件下进行 8% SDS-PAGE 凝胶电泳, 100 V 下使用 0.45 μ m PVDF 膜转膜 100 min, 封闭 2 h, TBST 漂洗 2 次, 一抗 4 °C 摇床孵育过夜, TBST 漂洗 3 次, 二抗孵育 2 h, TBST 漂洗 3 次, 显影。

1.2.3 CCK-8 检测细胞增殖 取对数生长期 A549 细胞, 以 5×10^4 mL⁻¹ 的密度接种于 96 孔板, 每孔 100 μ L, 待细胞融合度达到 60% 后, 用不同终浓度 (0 μ mol·L⁻¹, 5 μ mol·L⁻¹, 10 μ mol·L⁻¹, 20 μ mol·L⁻¹, 40 μ mol·L⁻¹, 80 μ mol·L⁻¹) 的 Nef 分别干预 24、48、72 h, 加入 10 μ L CCK-8 和 100 μ L RPMI 1640 的混合液, 孵育 2 h, 测吸光度值。

1.2.4 免疫荧光实验 将 100 μ L A549 细胞以 5×10^4 mL⁻¹ 的密度接种于 96 孔板, 过夜后分为未干预组、TGF- β 1 干预组、TGF- β 1+Nef 干预组, 48 h 后 PBS 清洗 2 次, 4% 多聚甲醛室温固定 20 min, 0.5% Tri-

ton X-100 打孔,山羊血清室温下封闭 1 h,一抗 4 °C 孵育过夜,置于摇床上用 PBST 清洗 3 次。二抗室温下避光孵育 1 h,DAPI 室温下孵育 3 ~ 5 min,置于摇床上,避光条件下用 PBST 清洗 3 次,每次 15 min。每孔加入 100 μ L PBS, High Content Screening System 检测荧光强度。

1.2.5 Transwell 侵袭实验 从 -20 °C 冰箱中取出 Transwell 板中带基质胶的上室,在生物安全柜中放置于普通无菌 24 孔板中。向上室加入 500 μ L RPMI 1640,置于培养箱培养 2 h,弃去 RPMI 1640,加入 500 μ L 约含 4×10^4 个细胞的细胞悬液,向下室加入 750 μ L 5% 完全培养基。分为未干预组、TGF- β 1 干预组、TGF- β 1+Nef 干预组,置于细胞培养箱中培养 48 h,弃去培养基,用棉签轻轻擦去上室内未侵袭的细胞,PBS 清洗 2 次,无水甲醇固定 15 min,将小室翻转晾干,1% 结晶紫染色 20 min,PBS 清洗 2 次。将小室置于加入 PBS 的 24 孔板中,倒置显微镜(100 $\times$)观察并拍照。

1.2.6 划痕实验 将 A549 细胞以每孔 2×10^5 个接种于 6 孔板,待细胞融合度达到 90% ~ 100% 后,用 200 μ L 无菌移液管尖端在各孔中间和两侧轻轻划 3 条线,PBS 清洗 3 次。分为未干预组、TGF- β 1 干预组、TGF- β 1+Nef 干预组,分别于 0 h 和 24 h 在倒置显微镜下随机选取 5 个视野观察划痕愈合情况并拍照。实验至少重复 3 次。

1.2.7 透射电镜超微结构观察 取约 1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 3 mm 大小的组织块,加入用磷酸盐缓冲液配制的 2.5% 戊二醛固定 2 h 以上;0.1 mol $\cdot$ L⁻¹ 磷酸盐漂洗液漂洗 3 次,每次 10 ~ 15 min;1% 锇酸固定液固定 1 ~ 2 h;0.1 mol $\cdot$ L⁻¹ 磷酸盐漂洗液漂洗 3 次,每次 10 ~ 15 min;50% 丙酮 10 ~ 15 min $\times$ 1 次,70% 丙酮 10 ~

15 min $\times$ 1 次,90% 丙酮 10 ~ 15 min $\times$ 2 次,100% 丙酮 15 ~ 20 min $\times$ 2 次。浸泡、包埋:纯丙酮+包埋液(1:1) 37 °C 处理 12 h,纯包埋液 37 °C 处理 10 ~ 12 h。37 °C 烤箱内过夜,60 °C 烤箱内放置 12 ~ 24 h。使用超薄切片机以 50 ~ 100 nm 的厚度切片,3% 醋酸铀及硝酸铅双染色,透射电镜下观察并拍照。

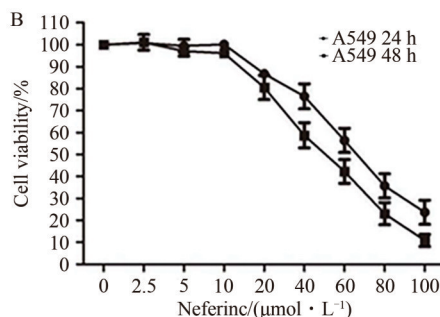
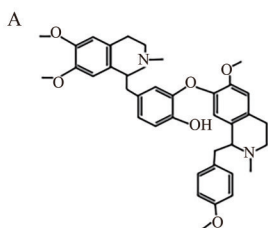
1.2.8 Realtime-PCR 使用 TRIzol 试剂分离 RNA, PrimeScript 合成 cDNA™ Kit。按照使用说明书,在 ViiATM7 RT-PCR 系统中采用 SYBR 绿色荧光分析法,在硅酸盐中进行 qRT-PCR。引物序列:Snail:正向 5'-CACTATGCCGCGCTCTTTC-3',反向 5'-GCTG-GAAGGTAAACTCI'GGATTAGA-3';Slug:正向 5'-GGGCTCAGTTCGTAAAGG-3',反向 5'-GAGGAG-GTGTGAGATGGA-3';Twist:正向 5'-TTTACATCC-GATTTACTGC-3',反向 5'-CCTAATGCTTTCCCT-CAT-3';Zeb1:正向 5'-AAGTGGCGGTAGATGGTA-3',反向 5'-TTGTAGCGACTGGATTTT-3';GAPDH:正向 5'-GTCGGAGTCAACGGATT-3';反向 5'-AAGCTTCCC-GTTCTCAG-3'。反应体系为 10 μ L,每组重复 3 次。扩增反应条件:95 °C 预变性 15 min,95 °C 变性 10 s,56 °C 退火 32 s,72 °C 1 min,72 °C 总延伸 10 min。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计学软件进行数据分析,实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Nef 对 A549 细胞活力的影响 Nef 可以浓度或时间依赖性抑制 A549 细胞的活力,10 μ mol $\cdot$ L⁻¹ Nef 干预 24 h 或 48 h 对 A549 细胞活力几乎无影响(图 1),因此本研究选择 10 μ mol $\cdot$ L⁻¹ Nef 进行后续实验。



注:(A) Nef 的化学结构式;(B) 不同浓度 Nef 对 A549 细胞活力的影响。

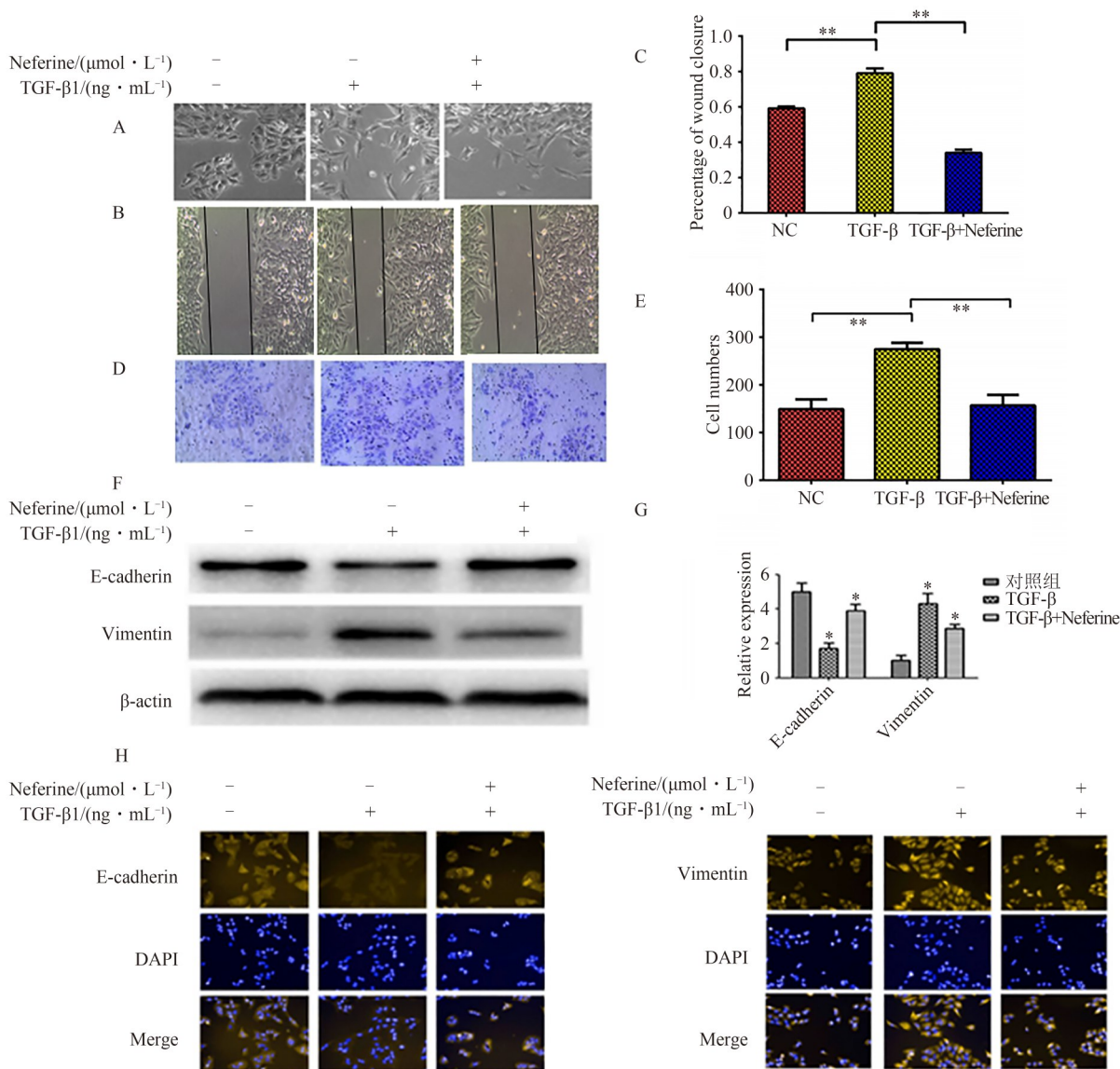
Note: (A) The chemical structural formula of Nef; (B) The effects of different concentrations of Nef on the viability of A549 cells.

图 1 Nef 对 A549 细胞活力的影响

Fig. 1 Effects of Nef on the viability of A549 cells

2.2 Nef抑制A549细胞的侵袭和迁移 TGF- β 1 干预 A549 细胞 48 h 后,细胞出现明显的 EMT 形态变化,包括细胞的分散和拉长,但用 Nef 干预后这一形态改变明显被抑制。TGF- β 1 干预后,A549 细胞的迁移能力明显增强且速度加快,而同时加入 Nef 时,这一效果被明显抑制。采用 Nef+TGF- β 1 同时干预

时,穿过基质膜的细胞数目明显减少。TGF- β 1 干预 24 h 后,A549 细胞中上皮标志物 E-cadherin 蛋白表达水平明显下调($P<0.05$),间质标志物 Vimentin 表达水平明显上调($P<0.05$),但同时加入 Nef 时,上述蛋白表达水平被明显逆转,免疫荧光实验进一步证实了这一结果(图 2)。



注:(A) Nef对TGF- β 1诱导的A549细胞形态学改变的影响;(B、C) Nef明显抑制A549细胞的迁移能力;(D、E) Nef明显抑制A549细胞的侵袭能力;(F、G) Nef明显抑制Vimentin的表达,增强E-cadherin的表达;(H)免疫荧光进一步证实Nef可抑制A549细胞发生EMT。与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

Note: (A) The effects of Nef on morphological changes of TGF- β 1-induced A549 cells; (B, C) Nef significantly inhibited the migration of A549 cells; (D, E) Nef significantly inhibited the invasion of A549 cells; (F, G) Nef significantly inhibited the expression of vimentin and enhanced the expression of E-cadherin; (H) The results of immunofluorescence further confirmed that Nef could inhibit the occurrence of EMT in A549 cells. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图2 Nef对A549细胞侵袭和迁移的影响
 Fig. 2 Effects of Nef on the invasion and metastasis of A549 cells

2.3 Nef 对 EMT 转录因子的影响 Nef 干预后, Twist1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 而 mRNA 表达水平无明显变化 ($P > 0.05$) (图 3)。

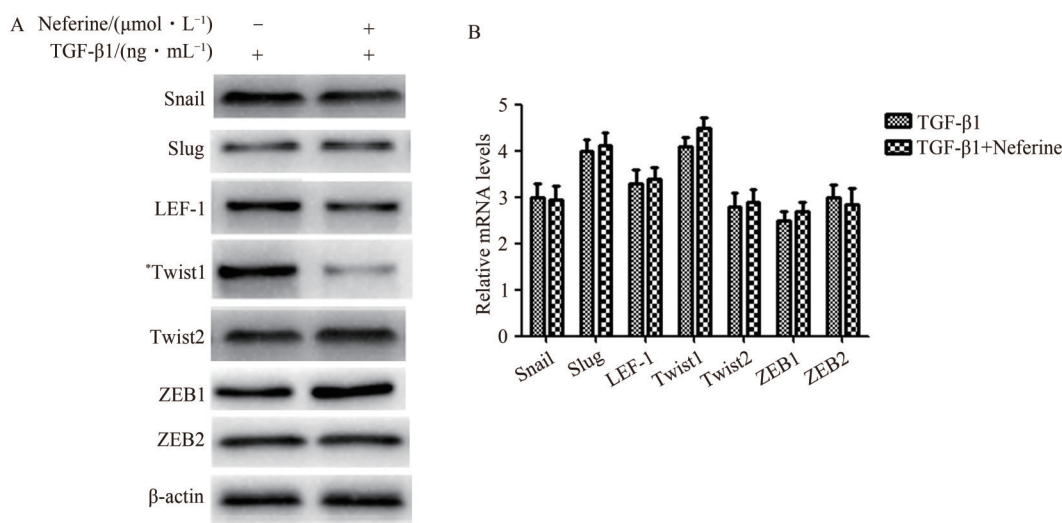
2.4 Nef 通过自噬影响 A549 细胞的 Twist1 表达 加入氯喹后, Twist1 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 加入 Nef 后, A549 细胞自噬增强, LC3 II 表达水平显著升高, 而 p62、Twist1 蛋白表达水平显著降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 而干扰 p62 后, Nef 对 Twist1 的表达水平无明显影响 ($P > 0.05$) (图 4)。

3 讨论

有研究证实, Nef 在肺癌^[9-12]、卵巢癌^[13]、肝癌^[14] 等肿瘤中均具有明显的抗肿瘤作用, 其作用机制主要包括促进细胞凋亡、阻滞细胞周期、逆转耐药。本研究结果显示, Nef 可明显抑制 TGF- β 诱导的肺腺癌细胞的侵袭和转移, 且可明显上调 E-cadherin 的 mRNA 和蛋白表达水平, 提示 Nef 具有抑制肺腺癌转移的作用。关于 Nef 是否可通过调控 Twist1 蛋白表达实现其抗肺腺癌侵袭转移的作用, 本研究为此提供了重要线索: Nef 可明显抑制 TGF- β 诱导的 Twist1 蛋白表达, 提示 Nef 可通过下调 Twist1 蛋白表达抑制肺腺癌细胞的转移。进一步研究发现, 尽管 Nef 可下调 Twist1 蛋白的表达, 但 Twist1 mRNA 的表达无明显变化, 转录因子 Snail、Slug 的 mRNA 和蛋白

表达水平亦无明显变化, 提示 Nef 抑制 Twist1 表达的原因可能并非抑制 Twist1 基因的转录与翻译, 而是促进 Twist1 蛋白降解。

自噬是细胞将自身的细胞质、细胞器或蛋白质等包裹在自噬小体中, 通过溶酶体使其在细胞内降解的过程。越来越多的研究表明, 自噬功能失调是人类恶性肿瘤的一个新特征^[15]。自噬在肿瘤 EMT 过程中具有“双刃剑”的作用: 一方面, 在已发生恶性转化的肿瘤细胞中, 自噬可通过再循环作用为其生存提供营养物质, 并促进其增殖、侵袭和转移^[16-17]; 另一方面, 在肿瘤转移的起始阶段, 激活自噬可逆转 EMT^[18-21]。自噬介导的转录因子降解成为近年来备受研究者关注的热点^[22-25]。那么, Nef 是否可通过自噬途径降解 Twist1 呢? 我们的另一项研究证实, Nef 可通过促进自噬流减轻顺铂的肾毒性^[26]。目前的研究认为, Nef 属于强效自噬诱导剂^[13, 27-28]。更为重要的是, 本研究前期预实验发现, Nef 干预后, Twist1 蛋白的表达水平随着时间的延长逐渐下降, 而加入自噬抑制剂氯喹后, Twist1 蛋白的降解被明显抑制, 故认为 Nef 可通过自噬降解途径抑制 Twist1 的表达。令人兴奋的是, 本研究前期实验发现, Nef 干预后, 肺腺癌 A549 细胞中自噬小体增多, 自噬流明显增加, 表现为 LC3 II 表达水平升高, p62 表达水平降低; 而沉默 p62 后, Nef 不能下调

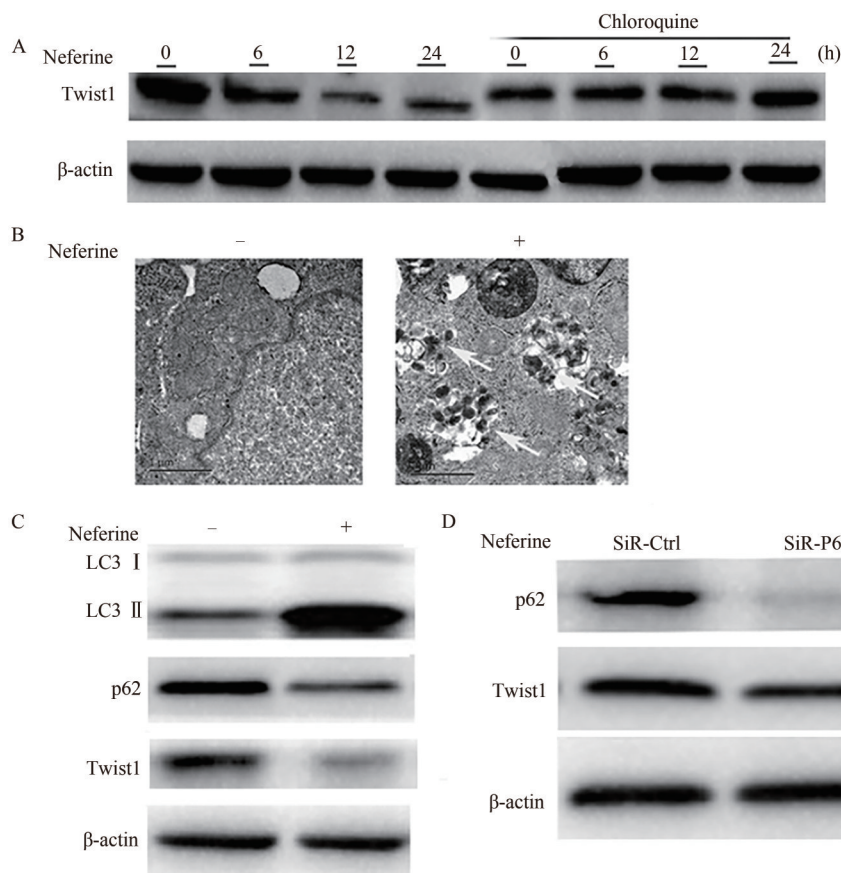


注: (A) Nef 明显抑制转录因子 Twist1 的蛋白表达, 而对其他转录因子无明显影响; (B) Nef 对 EMT 转录因子的 mRNA 表达均无明显影响。

Note: (A) Nef significantly inhibited the protein expression of transcription factor Twist1, but had no significant effects on other transcription factors; (B) Nef had no significant effects on the mRNA expression of EMT transcription factors.

图 3 Nef 对 EMT 转录因子的影响

Fig. 3 Effects of Nef on EMT transcription factors



注: (A) Nef 干预后 A549 细胞中 Twist1 蛋白表达水平随时间延长逐渐下降, 而自噬抑制剂氯喹和 Nef 共同干预后 Twist1 蛋白表达无明显变化; (B) Nef 干预后, A549 细胞中自噬小体明显增多; (C) Nef 干预后 A549 细胞中 LC3 II 表达水平升高, p62、Twist1 蛋白表达水平降低; (D) 在 A549 细胞中转染 siRNA p62 质粒后, Nef 不能下调 Twist1 的表达。

Note: (A) After Nef intervention, the expression of Twist1 protein in A549 cells gradually decreased with time, but there was no significant change in the expression of Twist1 protein after the joint intervention of autophagy inhibitor chloroquine and Nef; (B) After Nef intervention, autophagy bodies in A549 cells increased significantly; (C) After Nef intervention, the expression level of LC3II increased and the expression levels of p62 and Twist1 proteins decreased in A549 cells; (D) After transfection of siRNA p62 plasmid in A549 cells, Nef could not down-regulate the expression of Twist1.

图 4 Nef 对 A549 细胞中 Twist1 表达的影响

Fig. 4 Effects of Nef on the Twist1 expression of A549 cells

Twist1 的表达, 据此推测, Nef 可能通过调控 p62 促进 Twist1 蛋白的自噬降解, 从而抑制肺腺癌的侵袭、转移。

综上所述, Nef 可抑制肺腺癌的侵袭和转移, 其作用机制可能与促进 p62 介导的 Twist1 选择性自噬降解有关。

参考文献

[1] SARDENBERG R A S, MELLO E S, YOUNES R N. The lung adenocarcinoma guidelines: what to be considered by surgeons [J]. *J Thorac Dis*, 2014, 6(Suppl 5): S561-S567. DOI: 10.3978/j.issn.2072-1439.2014.08.25.
 [2] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(1): 5-29. DOI: 10.3322/caac.21254.

[3] YOON N A, JO H G, LEE U H, et al. Tristetraprolin suppresses the EMT through the down-regulation of Twist1 and Snail1 in cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(8): 8931-8943. DOI: 10.18632/oncotarget.7094.
 [4] ZHU X, SHEN H, YIN X, et al. miR-186 regulation of Twist1 and ovarian cancer sensitivity to cisplatin [J]. *Oncogene*, 2016, 35(3): 323-332. DOI: 10.1038/ncr.2015.84.
 [5] CHO M S, RUPAIMOOLE R, CHOI H J, et al. Complement component 3 is regulated by TWIST1 and mediates epithelial-mesenchymal transition [J]. *J Immunol*, 2016, 196(3): 1412-1418. DOI: 10.4049/jimmunol.1501886.
 [6] GALAVOTTI S, BARTESAGHI S, FACCENDA D, et al. The autophagy-associated factors DRAM1 and p62 regulate cell migration and invasion in glioblastoma stem cells [J]. *Oncogene*, 2013, 32(6): 699-712. DOI: 10.1038/ncr.2012.111.
 [7] MOSCAT J, KARIN M, DIAZ-MECO M T. p62 in cancer: signaling adaptor beyond autophagy [J]. *Cell*, 2016, 167(3):

- 606–609. DOI: 10.1016/j.cell.2016.09.030.
- [8] LIM J, LACHENMAYER M L, WU S, et al. Proteotoxic stress induces phosphorylation of p62/SQSTM1 by ULK1 to regulate selective autophagic clearance of protein aggregates [J]. *PLoS Genet*, 2015, 11(2): e1004987. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004987.
 - [9] POORNIMA P, WENG C F, PADMA V V. Neferine from *Nelumbo nucifera* induces autophagy through the inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway and ROS hyper generation in A549 cells [J]. *Food Chem*, 2013, 141(4): 3598–3605. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.05.138.
 - [10] POORNIMA P, WENG C F, PADMA V V. Neferine, an alkaloid from *Lotus seed embryo*, inhibits human lung cancer cell growth by MAPK activation and cell cycle arrest [J]. *Biofactors*, 2014, 40(1): 121–131. DOI: 10.1002/biof.1115.
 - [11] POORNIMA P, KUMAR V B, WENG C F, et al. Doxorubicin induced apoptosis was potentiated by neferine in human lung adenocarcinoma, A549 cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 68: 87–98. DOI: 10.1016/j.fct.2014.03.008.
 - [12] KALAI SELVI S, VINOTH A, VARADHARAJAN T, et al. Neferine augments therapeutic efficacy of cisplatin through ROS-mediated non-canonical autophagy in human lung adenocarcinoma (A549 cells) [J]. *Food Chem Toxicol*, 2017, 103: 28–40. DOI: 10.1016/j.fct.2017.02.020.
 - [13] XU L M, ZHANG X Y, LI Y N, et al. Neferine induces autophagy of human ovarian cancer cells via p38 MAPK/JNK activation [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(7): 8721–8729. DOI: 10.1007/s13277-015-4737-8.
 - [14] YOON J S, KIM H M, YADUNANDAM A K, et al. Neferine isolated from *Nelumbo nucifera* enhances anti-cancer activities in Hep3B cells: molecular mechanisms of cell cycle arrest, ER stress induced apoptosis and anti-angiogenic response [J]. *Phytomedicine*, 2013, 20(11): 1013–1022. DOI: 10.1016/j.phymed.2013.03.024.
 - [15] FENG Y C, HE D, YAO Z Y, et al. The machinery of macroautophagy [J]. *Cell Res*, 2014, 24(1): 24–41. DOI: 10.1038/cr.2013.168.
 - [16] THORBURN A, THAMM D H, GUSTAFSON D L. Autophagy and cancer therapy [J]. *Mol Pharmacol*, 2014, 85(6): 830–838. DOI: 10.1124/mol.114.091850.
 - [17] AVIVAR-VALDERAS A, BOBROVNIKOVA-MARJON E, ALAN DIEHL J, et al. Regulation of autophagy during ECM detachment is linked to a selective inhibition of mTORC1 by PERK [J]. *Oncogene*, 2013, 32(41): 4932–4940. DOI: 10.1038/onc.2012.512.
 - [18] CATALANO M, D’ALESSANDRO G, LEPORE F, et al. Autophagy induction impairs migration and invasion by reversing EMT in glioblastoma cells [J]. *Mol Oncol*, 2015, 9(8): 1612–1625. DOI: 10.1016/j.molonc.2015.04.016.
 - [19] GUGNONI M, SANCISI V, GANDOLFI G, et al. Cadherin-6 promotes EMT and cancer metastasis by restraining autophagy [J]. *Oncogene*, 2017, 36(5): 667–677. DOI: 10.1038/onc.2016.237.
 - [20] SUBRAMANI R, GONZALEZ E, ARUMUGAM A, et al. Nimbolide inhibits pancreatic cancer growth and metastasis through ROS-mediated apoptosis and inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 19819. DOI: 10.1038/srep19819.
 - [21] ZI D, ZHOU Z W, YANG Y J, et al. Danusertib induces apoptosis, cell cycle arrest, and autophagy but inhibits epithelial to mesenchymal transition involving PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in human ovarian cancer cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(11): 27228–27251. DOI: 10.3390/ijms161126018.
 - [22] LV Q, WANG W, XUE J F, et al. DEDD interacts with PI3KC3 to activate autophagy and attenuate epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(13): 3238–3250. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3832.
 - [23] QIANG L, ZHAO B Z, MING M, et al. Regulation of cell proliferation and migration by p62 through stabilization of Twist1 [J]. *PNAS*, 2014, 111(25): 9241–9246. DOI: 10.1073/pnas.1322913111.
 - [24] QIANG L, HE Y Y. Autophagy deficiency stabilizes TWIST1 to promote epithelial-mesenchymal transition [J]. *Autophagy*, 2014, 10(10): 1864–1865. DOI: 10.4161/auto.32171.
 - [25] GRASSI G, DI CAPRIO G, SANTANGELO L, et al. Autophagy regulates hepatocyte identity and epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions promoting Snail degradation [J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6(9): e1880. DOI: 10.1038/cddis.2015.249.
 - [26] LI H, TANG Y L, WEN L, et al. Neferine reduces cisplatin-induced nephrotoxicity by enhancing autophagy via the AMPK/mTOR signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 484(3): 694–701. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.01.180.
 - [27] KHAN A, BAI H L, KHAN A, et al. Neferine prevents ultraviolet radiation-induced skin photoaging [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(5): 3189–3196. DOI: 10.3892/etm.2020.8587.
 - [28] WONG V K W, WU A G, WANG J R, et al. Neferine attenuates the protein level and toxicity of mutant huntingtin in PC-12 cells via induction of autophagy [J]. *Molecules*, 2015, 20(3): 3496–3514. DOI: 10.3390/molecules20033496.

收稿日期: 2021-06-18 校稿: 李征 于静

本文引用格式: 李慧, 杨硕, 陈雪莲, 等. 甲基莲心碱通过 p62 抑制肺腺癌 A549 细胞侵袭、转移的机制 [J]. *肿瘤药*, 2022, 12(5): 577–583. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2022.05.04.

Cite this article as: Li Hui, YANG Shuo, CHEN Xuelian, et al. The mechanisms of neferine in inhibiting the invasion and metastasis of lung adenocarcinoma A549 cells via p62 [J]. *Anti-tumor Pharmacy*, 2022, 12(5): 577–583. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2022.05.04.