DOI：10.12287/j.issn.2096-8965.20240412

柠檬苦素通过靶向Skp2蛋白抑制非小细胞肺癌细胞增殖

朱嘉贤[1,2]，张梦婷[1,2]，李盛青[1]，刘永强[1,2,3]*

（1.广州中医药大学中药学院，中药资源科学与工程研究中心，广东 广州 510006；
2.广州中医药大学，岭南中药资源教育部重点实验室，广东 广州 510006；
3.东莞广州中医药大学研究院，广东 东莞 523808）

【摘要】目的 探讨柠檬苦素抑制非小细胞肺癌（NSCLC）细胞增殖能力及其分子作用机制。**方法** 首先通过MTT实验检测柠檬苦素对NSCLC细胞活性抑制能力；随后分别采用流式细胞技术检测细胞周期与凋亡、平板克隆形成实验检测低密度细胞增殖、细胞基质胶3D成球实验评价干细胞特性。接着通过Western blotting分析柠檬苦素抑制NSCLC细胞增殖的分子机制；通过细胞热位移测定（CETSA）证明柠檬苦素与靶蛋白结合能力；通过分子对接实验模拟柠檬苦素与靶蛋白相互作用位点。最后，通过小分子干扰RNA（siRNA）与S期激酶相关蛋白2（Skp2）过表达细胞株构建，验证柠檬苦素通过作用Skp2发挥抑制NSCLC增殖的分子机制。**结果** 柠檬苦素通过诱导细胞周期G0/G1期阻滞以剂量依赖性方式抑制NSCLC细胞增殖，同时显著减弱NSCLC干细胞样特性。柠檬苦素结合Skp2蛋白并下调其蛋白水平，从而促进Skp2底物p27累积。*Skp2*特异siRNA干扰其表达后显著增强柠檬苦素抑制NSCLC细胞活性能力，而*Skp2*过表达拮抗柠檬苦素对NSCLC细胞活性抑制能力，进一步验证了柠檬苦素通过靶向Skp2抑制NSCLC细胞增殖的分子机制。**结论** 柠檬苦素通过靶向Skp2升高抑癌蛋白p27水平，从而抑制NSCLC细胞增殖，为柠檬苦素作为抗肿瘤药物研发提供了重要的理论依据。

【关键词】柠檬苦素；非小细胞肺癌；S期激酶相关蛋白2；细胞增殖

中图分类号：R734.2；R285.5　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**2096-8965（2024）04-0096-10

Inhibitory effects of limonin on the proliferation of non-small cell lung cancer cells via targeting S-phase kinase-associated protein 2

Zhu Jiaxian[1,2], Zhang Mengting[1,2], Li Shengqing[1], Liu Yongqiang[1,2,3]*

[1.Research Center of Chinese Herbal Resource Science and Engineering, School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, Guangdong, China;
2. Key Laboratory of Chinese Medicinal Resource of Lingnan (Guangzhou University of Chinese Medicine), Ministry of Education, Guangzhou 510006, Guangdong, China;
3. Dongguan Institute of Guangzhou University of Chinese Medicine, Dongguan 523808, Guangdong, China]

【Abstract】Objective Aims to investigate the inhibitory effects of limonin on the proliferation of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells and its molecular mechanisms. **Methods** To investigate the inhibitory effects of limonin on NSCLC cell activity, the MTT assay was employed. Then, flow cytometry was used to detect the cell

收稿日期：2024-05-30；**修回日期：**2024-08-28

基金项目：广东省基础与应用基础研究基金项目（2022A1515011881；2021B1515140052）

通信作者：刘永强（1984-），男，山东泰安人，副研究员，主要从事中草药治疗肿瘤分子机理与有效成分方面的研究，E-mail：liuyq@gzucm.edu.cn

cycle and apoptosis, while colony formation assay assessed the low-density proliferation ability of NSCLC cells. The matrigel 3D pelletization assay was performed to evaluate stem cell properties. Further, Western blotting was used to analyze the underlying molecular mechanisms of limonin inhibiting NSCLC cell proliferation. Cell thermal shift assay (CETSA) was used to demonstrate the binding capability of limonin with target proteins, and molecular docking was employed to predict the interaction sites between limonin and target proteins. Finally, the study utilized small interfering RNA (siRNA) and S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2) overexpressing cell lines to validate the molecular mechanisms of limonin inhibiting NSCLC cell proliferation. **Results** Limonin inhibited NSCLC cell proliferation in a dose-dependent manner by inducing cell cycle G0/G1 phase arrest while significantly attenuating NSCLC stem cell-like properties. Mechanistically, limonin was bound to the Skp2 protein and induced its downregulation, thus promoting the accumulation of its substrate protein p27. *Skp2* knockdown by using *Skp2*-specific siRNA markedly enhanced the inhibitory effects of limonin on NSCLC cell activity. At the same time, *Skp2* overexpression attenuated the capability of limonin to inhibit NSCLC cell activity, further validating the underlying molecular mechanisms of limonin inhibiting NSCLC cell proliferation by targeting Skp2. **Conclusion** Limonin inhibits NSCLC cell proliferation by targeting Skp2 protein to increase the level of the tumor suppressor protein p27, providing crucial theoretical support for the development of limonin as an antitumor drug.

【Keywords】Limonin; Non-small cell lung cancer; S-phase kinase-associated protein 2; Cell proliferation

国家癌症中心最新统计数据显示，肺癌发病率和死亡率在中国所有癌症中排名均居榜首，是中国第一大癌症[1]。肺癌分为2个主要病理类型：非小细胞肺癌（Non-Small Cell Lung Cancer，NSCLC）占所有肺癌的84%；小细胞肺癌（Small Cell Lung Cancer，SCLC）占所有肺癌的13%[2]。NSCLC发病机制复杂，导致目前仍缺乏有效的治疗方法。中药作为一种传统治疗手段，在癌症综合治疗体系中逐渐占据重要地位并发挥积极的作用。目前，中药已被广泛应用于肺癌治疗，中药辅助治疗可显著提高肺癌患者的总生存期[3]。中药单体、中药复方制剂，以及多种中药提取物都已应用于临床抗癌治疗[4]。

柑橘（*Citrus reticulata Blanco*）是芸香科柑橘属小乔木植物，是橘、柑、橙、金柑、柚、枳等的总称。柑橘类果实含有丰富的生物活性物质，如类黄酮、香豆素和生物碱等，具有抗氧化、抗炎、抗菌和抗癌等多种生物活性。柑橘具有多种药用价值，常被用于缓解或治疗咳嗽、痰多、消化不良和炎症等问题。目前，中药化橘红因其具有优良的止咳化痰、抗血栓、缓解肝酒精中毒、调节血脂等功效而广受关注[5-8]。

柠檬苦素（Limonin）是柑橘类果实中有效生物活性成分之一，属于高度氧化的四环三萜类次生代谢产物[9]。生物活性测试结果表明，柠檬苦素对结直肠癌、肝癌、胃癌、乳腺癌、卵巢瘤、黑色素瘤和神经母细胞瘤等多种癌细胞均具有显著增殖抑制功效[10]。研究[11]表明，柠檬苦素在化橘红乙醇提取物中含量丰富，且具有相对较强的抑制肺癌细胞活性能力。同时，化橘红乙醇提取物能够通过作用S期激酶相关蛋白2（S-phase kinase-associated protein 2，Skp2）蛋白抑制NSCLC细胞增殖。因此，推测柠檬苦素是化橘红醇提物发挥抗肺癌作用机制的关键成分之一。

细胞内蛋白质泛素化过程由E1泛素激活酶、E2泛素结合酶和E3泛素连接酶协同完成，此过程的失调已被证实与多种人类癌症的发生发展密切相关。尤其是E3泛素连接酶在底物蛋白的特异性识别和泛素化降解中发挥决定性作用，其作为抗癌靶点具有极大的潜力和研究价值。在E3泛素连接酶家族中，SCF E3连接酶复合物（含Skp1、Cullin1、Rbx1/Roc1和F-box蛋白）尤其引人关注。F-box蛋白中的Skp2是促癌蛋白，在多种癌组织中均表现为过表达，与癌细胞增殖、侵袭和转移等多种生物学过程相关[12]。Skp2可以特异性识别抑癌蛋白p27，并促进底物经泛素蛋白酶体途径降解，从而调控细胞周期进程与干细胞活性等生物学过程[13]。因此，靶向Skp2蛋白可以为癌症治疗提供新的思路。

目前，柠檬苦素在多项体外和体内研究中被证明具有抗肿瘤活性，但其抗肿瘤作用机制尚未完全阐明。因此，本研究将进一步探究柠檬苦素是否通过影响Skp2/p27信号通路来发挥抑制NSCLC细胞增殖作用。这一研究不仅有助于阐明柠檬苦素的抗肿瘤机制，还将为柑橘类果实中抗肿瘤有效成分的开发与应用提供新的思路。

1 资料

1.1 实验材料

柠檬苦素（麦克林生化科技股份有限公司，

中国）；人肺腺癌细胞A549［American Type Culture Collection（ATCC），美国］；肺腺癌细胞H1299［American Type Culture Collection（ATCC），美国］。

1.2 实验试剂及仪器

DMEM高糖基础培养基（PM150210，普诺赛生命科技有限公司，中国）；RPMI-1640基础培养基（PM150110，普诺赛生命科技有限公司，中国武汉）；胎牛血清（164210，普诺赛生命科技有限公司，中国）；青霉素链霉素溶液（15140122，Gibco，美国）；磷酸盐缓冲液（Phosphate Buffer Solution，PBS）（PB180327A，普诺赛生命科技有限公司，中国）；噻唑蓝MTT（M8180，赛国生物科技有限公司，中国）；二甲基亚砜（D2650，Sigma，美国）；0.1%结晶紫水溶液（DZ0055，雷根生物技术有限公司，中国）；基质胶（356231，Invitrogen，美国）；Western及IP细胞裂解液（P0013，碧云天生物技术有限公司，中国）；Skp2兔多克隆抗体（15010-1-AP，Proteintech Group武汉三鹰生物技术有限公司，中国）；p27兔多克隆抗体（25614-1-AP，Proteintech Group武汉三鹰生物技术有限公司，中国）；GAPDH兔多克隆抗体（10494-1-AP，Bioworld Technology南京巴傲得生物科技有限公司，中国）；HRP标记山羊抗兔IgG二抗（S0001，Affinity Biosciences江苏亲科生物研究中心有限公司，中国）；增强型ECL化学发光检测试剂盒（E432，诺唯赞生物科技股份有限公司，中国）。

BSC-1600ⅡA2生物安全柜（苏州安泰空气技术有限公司，中国）；HERAcell 150i细胞恒温培养箱（Thermo Fisher，美国）；CF1524R高速冷冻离心机（SCILOGEX，美国）；SIM-F140制冰机（SANYO，日本）；EPOCH2全波长酶标仪（BioTek，美国）；eBlot™ L1快速湿转仪（金斯瑞生物科技有限公司，Genscript，中国）；1.5 mm 15孔电泳梳（BIO-RAD，美国）；Mini-PROTEAN® Tera电泳槽（BIO-RAD，美国）；化学发光成像系统（GelView 6000ProⅡ，广州博鹭腾生物科技有限公司，中国）。

2 方法

2.1 细胞培养

-80℃冰箱中取出先前冻存的A549和H1299细胞系，经过标准的细胞复苏程序后，置于37℃恒温、5% CO_2的细胞培养箱中培养。观察待细胞进入对数生长期且细胞密度达到80%~90%时，进行细胞传代操作，以确保细胞活力与实验质量。

在符合生物安全标准的操作柜中，精确配置两种完全培养基：向445 mL的RPMI-1640基础培养基中加入50 mL的胎牛血清和5 mL的青霉素链霉素溶液，同样向445 mL的DMEM高糖基础培养基中加入50 mL的FBS和5 mL的双抗溶液，以制备含有10% FBS和1%双抗的完全培养基。配置完成后，通过充分摇匀确保各组分均匀混合，并分装至50 mL的离心管中，于4℃下储存备用。H1299细胞采用1640完全培养基，A549细胞选用DMEM完全培养基进行培养。2种细胞均在37℃、含5% CO_2的细胞培养箱中培养。

2.2 细胞存活率检测（MTT实验）

MTT工作液（5 mg/mL）制备：称取0.25 g MTT粉置于紫外消毒生物安全柜中，避光加入50 mL PBS，涡旋溶解。经0.22 μm滤膜除菌后分装至15 mL无菌离心管中，4℃短期或-20℃长期保存。收集处于对数生长期的细胞，并以精确的细胞密度接种于96孔板中，A549细胞以每孔5 000细胞/100 μL，H1299细胞以每孔3 500细胞/100 μL的完全培养基接种。为了确保实验结果的可靠性，每个药物浓度均设置了3个复孔，并设置了空白组和对照组作为参照。

待细胞贴壁后，使用一系列不同浓度的柠檬苦素（10 μmol/L、25 μmol/L、50 μmol/L、100 μmol/L、125 μmol/L、150 μmol/L、175 μmol/L、200 μmol/L、300 μmol/L、400 μmol/L）对细胞进行处理，持续时间为72 h。随后，每孔加入10 μL质量浓度为5 mg/mL的MTT工作液，并在37℃、5% CO_2细胞培养箱中继续培养4 h。完成培养后，利用全波长酶标仪测量每个孔的吸光度，波长设定为490 nm，吸光度用OD表示。

细胞活力计算公式为：

细胞活力（%）=（给药组OD−空白组OD）/（对照组OD−空白组OD）×100%。

2.3 平板克隆形成实验

通过平板克隆形成实验评估柠檬苦素对人NSCLC细胞A549和H1299低密度增殖能力的影响。首先，收集对数生长期的A549和H1299细胞，并以每孔1 000个细胞/2 mL完全培养基的密度接种于6孔板中。待细胞贴壁后，更换为含不同浓度柠檬苦素（100 μmol/L、200 μmol/L、300 μmol/L）的新鲜培养基。细胞培养7 d，期间每日用显微镜观察细胞克隆生长情况。

当形成肉眼可见的细胞克隆集落后，终止培养，并使用PBS清洗细胞3次。用4%多聚甲醛固定细胞15 min，再次用PBS清洗细胞后，加入

0.1%结晶紫水溶液对细胞染色15 min，使细胞克隆清晰可见。流水冲洗掉多余的结晶紫溶液，并在室温下晾干。最后，对每孔的细胞克隆拍照，并统计柠檬苦素对细胞克隆形成的影响。

2.4 细胞基质胶3D成球实验

将肿瘤细胞H1299和A549消化计数后，用不含血清的培养基将细胞重悬成1×10^5/mL，吸取50 uL细胞悬液与50 uL基质胶混匀（细胞悬液体积：基质胶体积=1：1）。将细胞混悬液轻轻加入到12孔板边缘，保持细胞均匀悬浮，避免在基质胶中形成气泡；在细胞培养箱中放置45 min后，在孔板中间加1 mL含柠檬苦素的培养基。每2~3 d更换含柠檬苦素的新鲜培养基，更换过程中轻柔地从孔中心抽吸培养基，以免扰乱基质。培养7 d后观察肿瘤球成球状况，光学显微镜下拍照并观察肿瘤球的数目，分析柠檬苦素对肺癌细胞成球能力的影响。

2.5 细胞周期与凋亡实验

收集对数生长期的A549与H1299细胞，以每孔2×10^5细胞的密度接种至6孔板中，内含2 mL完全培养基。培养过夜后细胞融合度达50%~60%，更换为含柠檬苦素（质量浓度分别为100 μmol/mL、200 μmol/mL、300 μmol/mL）的新鲜培养基，继续培养24 h后，使用PBS润洗细胞，用胰酶消化并将细胞离心收集至无菌离心管中，如果培养基上清有细胞也要一并离心收集。

细胞周期实验中，细胞重悬于预冷的PBS中，再转移至1.5 mL离心管离心后去上清，以75%乙醇固定18~24 h。固定后，细胞经PBS洗涤并离心，随后按照细胞周期检测试剂盒（MA0334，大连美仑生物）说明书进行碘化丙啶（PI）染色，同时用RNase A 37℃避光孵育30 min，再经300目滤网过滤后上机检测。细胞凋亡实验中，将细胞重悬于预冷PBS中，按照细胞凋亡检测试剂盒（A211，南京诺唯赞生物科技股份有限公司）说明书进行AnnexinV-FITC与PI共同孵育染色，常温避光染色10 min，经滤网过滤后上机检测。利用流式细胞仪结合FlowJo_v10.8.1软件分析细胞周期及细胞凋亡情况。

2.6 蛋白质免疫印迹（Western Blotting）实验

将H1299细胞和A549细胞分别以每皿100万个接种到10 cm培养皿中。待细胞长满至80%~90%时，24 h后给予不同浓度梯度的柠檬苦素（100 μmol/L、150 μmol/L、200 μmol/L）处理NSCLC细胞24 h。取出培养皿置于冰上，使用预冷PBS润洗细胞3次，加入含有1%蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液；使用细胞刮收集细胞裂解液到离心管中，冰上裂解30 min。4℃条件下12 000 r/min离心10 min；收集上清液到新的离心管。吸取10 μL总蛋白上清液用BCA试剂盒测定总蛋白浓度，随后加入裂解液1/4体积的5×SDS上样缓冲液，在100℃条件下煮沸10 min。将等量的蛋白样品加入SDS-PAGE蛋白胶中电泳分离。然后使用Genscript快速湿转仪转膜18 min，PVDF膜用5%脱脂牛奶封闭2 h；TBST清洗膜3次，每次5 min。一抗4℃孵育过夜；TBST清洗膜3次，每次10 min；二抗室温条件下孵育2 h；TBST洗膜3次，每次10 min。膜上滴加ECL化学发光液（A液体积:B液体积=1：1）；最后通过化学发光成像系统检测Skp2与p27蛋白表达量，GAPDH作为总蛋白内参。

2.7 细胞热位移测定（Cell Thermal Shift Assay，CETSA）实验

将H1299细胞分别以每皿100万个细胞（8~10 mL培养基）接种到2个10 cm培养皿中。待细胞长满至80%~90%时，加入柠檬苦素（150 μmol/L）处理细胞4 h后，取出培养皿置于冰上。通过预冷的PBS润洗3次，随后使用胰酶消化细胞，800 rmp/min离心5 min收集细胞，再次使用预冷的PBS润洗细胞1次，离心并收集细胞。随后，加入600 μL预冷的PBS重悬细胞沉淀，将细胞悬液依次取100 μL均分到6个PCR管中，其中1管作为室温对照。在热循环PCR仪上，除室温对照外，其他PCR管分别在不同温度（42℃、46℃、50℃、54℃、58℃）上加热3 min；随后将PCR管置于液氮中速冻1 min，室温融化，重复上述操作3次。通过12 000 r/min、4℃离心30 min，小心吸取上清液至新的1.5 mL的EP管中。最后，加入5×SDS上样缓冲液，金属浴中100℃加热10 min进行蛋白变性处理，蛋白样品保存于-20℃，以备后续用于Western blotting检测。

2.8 柠檬苦素与Skp2蛋白分子对接分析

为了研究柠檬苦素（CAS号1180-71-8）与Skp2受体蛋白之间的相互作用机制。首先，从PubChem Compound官网http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov下载柠檬苦素3D结构，利用GaussView 6.0.16软件对柠檬苦素进行结构处理，同时利用ChemDraw Ultra 14.0和Chem3D Ultra进行3D模型确认及能量最小化处理，确保其结构准确性及稳定性。随后，通过RCSB PDB官网获取Skp2（PDB号：2AST）蛋白晶体结构[14]，并下载PDB格式文件。使用Pymol 2.50软件对PDB文件进行精细处理[15]，去除多余部分和水分子以适用于对接实验。采用Autodock 4.2.6软件对柠檬苦素与Skp2受体蛋白进行半柔性分子对接[16]，并筛选出结合亲和能低

于-5 kJ/mol的对接结果。最后，利用Pymol 2.50软件可视化分析，展示药物与受体的结合模式、相互作用位点及结合能[17]。

2.9 siRNA敲低*Skp2*实验

*Skp2*特异性siRNA由苏州泓迅生物科技有限公司设计合成，两条siRNA序列si-*Skp2*-1和si-*Skp2*-2序列分别为：5'-UCAAAUUUAGUGCGACUUATT-3'；5'-UCUAAGCCUGGAAGGCCUGTT-3'。si*Skp2*和siNC（阴性对照siRNA）转染采用Lipomaster 3000转染试剂盒（TL301，南京诺唯赞生物科技有限公司，中国）转染至A549细胞中。具体操作：将合成的siRNA（siSkp1-1，siSkp1-2，siNC）瞬时离心，分别加入DEPC水125 μL稀释至20 μmol/L。取对数生长期A549细胞以每孔20万个细胞接种到6孔板中。细胞密度至40%时转染，转染前需提前6~12 h低血清饥饿。首先冰浴条件下在A管中加入Opti-MEM（145 μL）与siRNA（5 μL），B管中加入Opti-MEM（145 μL）与Lipomaster 3000（5 μL）。轻柔吹匀或轻弹混匀，室温孵育5 min。将A、B管混合，低速涡旋混匀，瞬时离心后室温孵育20 min。细胞培养板换成新鲜的含血清无双抗的完全培养基（1.2 mL），均匀滴加孵育好的siRNA-Lipomaster 3000 Reagent混合液（0.3 mL）。转染后48 h后提取细胞蛋白，采用Western blotting实验检测*Skp2*表达情况。对于细胞活性检测试验，在A549细胞转染24 h内传代，将siNC与si-*Skp2*组细胞分别铺到96孔板中，用柠檬苦素处理48 h后进行MTT细胞活性检测。

2.10 *Skp2*过表达稳定细胞系的构建

利用*Skp2*基因过表达慢病毒与空载病毒（广州派真生物技术有限公司合成）感染A549细胞。将A549细胞按每孔2×10^5个细胞密度接种至6孔板，并添加2 mL完全培养基。待细胞密度融合至50%~60%，按照慢病毒推荐滴度加入上述慢病毒混悬液，继续培养48 h。然后用含有0.5 μg/mL嘌呤霉素的培养基筛选2~3 d以获得*Skp2*稳定过表达细胞。通过Western blotting检测Skp2蛋白表达确认细胞系构建成功。最后，将Skp2慢病毒与空载病毒组细胞分别传代，开展MTT与Western blotting实验，评估*Skp2*过表达是否影响NSCLC细胞对柠檬苦素的药物敏感性。

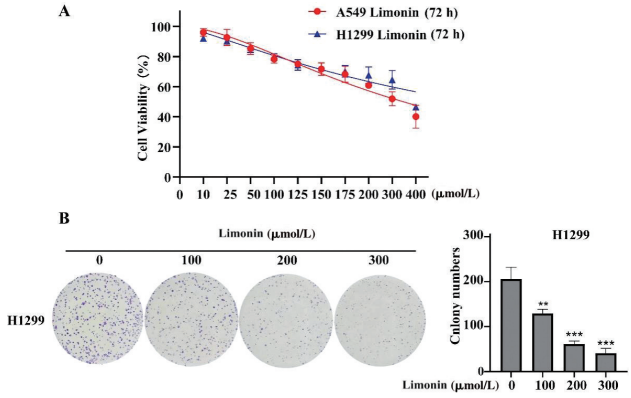
2.11 统计学方法

采用GraphPad Prism 8.3.0进行统计分析。实验数据采用平均数±标准差表示，数据符合正态性分布；两组间数据比较采用*t*检验；多组间数据比较采用单因素方差分析；$P<0.05$为差异具有统计学意义。蛋白免疫印迹条带光密度利用ImageJ软件计算，所有数据通过GraphPad Prism 8.3.0软件进行绘图。

3 结果

3.1 柠檬苦素抑制NSCLC细胞增殖

采用MTT实验评估柠檬苦素对肺癌细胞H1299和A549生存活力的影响，发现柠檬苦素对这两种NSCLC细胞的活性均表现出显著的抑制效果（见图1）。柠檬苦素在抑制肺癌细胞A549增殖方面的效果尤为突出，其作用于A549细胞72 h的半数抑制浓度（IC_{50}）为312.3 μmol/L，而作用于H1299细胞的IC_{50}为465.5 μmol/L（见图1A）。为了更深入探究柠檬苦素对肺癌细胞增殖的影响，进一步选用相对较低浓度的柠檬苦素（100 μmol/L、200 μmol/L和300 μmol/L）进行低密度细胞克隆形成实验。柠檬苦素能够显著抑制NSCLC细胞的低密度增殖能力。表明柠檬苦素具有抑制肺癌细胞增殖的作用（见图1B）。



A：柠檬苦素对肺癌细胞H1299和A549细胞生存活力的影响；B：柠檬苦素对肺癌细胞H1299克隆形成能力的影响。与对照组比较：**$P<0.01$和***$P<0.001$。

图1 柠檬苦素抑制H1299和A549细胞增殖

Figure 1 Inhibition of H1299 and A549 cell proliferation by limonin

3.2 柠檬苦素诱导NSCLC细胞周期G0/G1期阻滞

为了进一步探究柠檬苦素抑制NSCLC细胞增殖的作用机制，继续使用流式细胞仪检测柠檬苦素对NSCLC细胞的周期分布影响。结果显示，柠檬苦素以剂量依赖性的方式显著提高了NSCLC细胞在G0/G1期分布（见图2A），给药剂量在200 μmol/mL与300 μmol/mL质量浓度下诱导G0/G1期周期阻滞效果较为突出。接着，通过流式细胞仪探索柠檬苦素是否直接诱导NSCLC细胞凋亡。柠檬苦素在100~300 μmol/mL浓度下对A549细胞凋亡无明显影响（见图2B）。表明柠檬苦素主

要通过诱导G0/G1期阻滞抑制NSCLC细胞增殖。

3.3 柠檬苦素降低NSCLC细胞基质胶3D成球能力

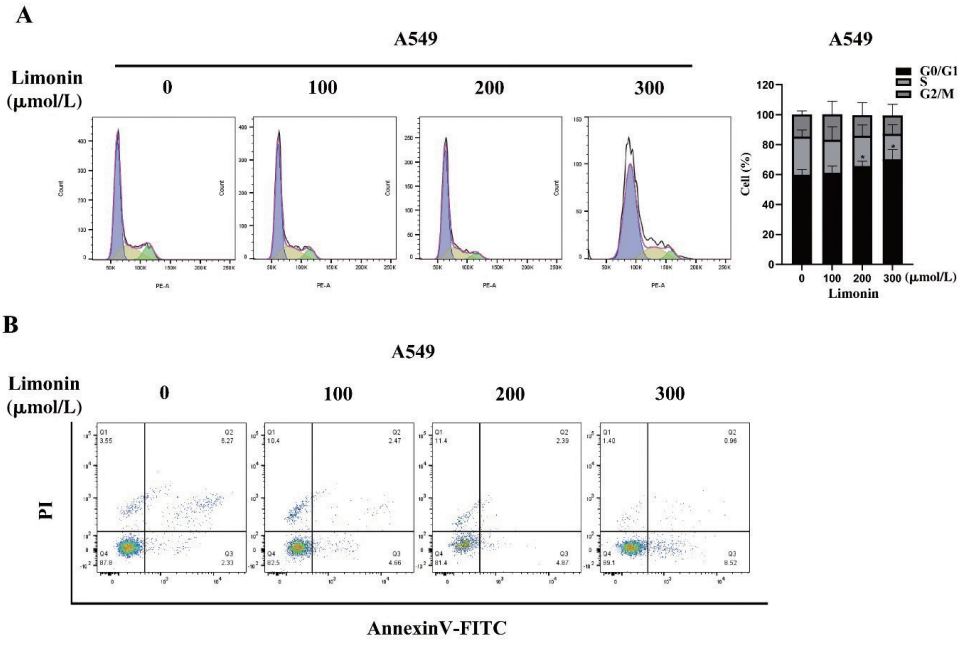
进一步利用细胞基质胶3D成球实验评估柠檬苦素对肺癌细胞干细胞活性抑制能力。A549和H1299细胞在非贴壁三维基质胶培养条件下，经过7 d不同质量浓度柠檬苦素处理后，NSCLC细胞形成肿瘤球数量显著减少（见图3A，3B）。因此，柠檬苦素同样具有调控癌症干细胞活性的潜在作用。

3.4 柠檬苦素在NSCLC细胞中能够通过下调Skp2升高p27蛋白水平

p27蛋白是细胞周期蛋白激酶抑制因子，p27表达升高可以抑制细胞周期从G1期向S期过渡。研究[10]发现，化橘红醇提物通过作用Skp2/p27发挥抗肿瘤作用，而柠檬苦素是化橘红乙醇提取物的主要成分之一；因此，推测柠檬苦素通过作用Skp2/p27通路诱导NSCLC细胞G0/G1期阻滞。柠檬苦素以剂量依赖方式显著抑制了A549和H1299细胞中Skp2蛋白的表达，并相应地促进了其底物p27的蛋白累积（见图4）。提示柠檬苦素可能通过抑制Skp2-SCF E3连接酶活性，减少p27蛋白的泛素化降解途径，从而提升p27的稳定性与表达量。提示柠檬苦素是通过下调Skp2并升高p27蛋白表达诱导NSCLC细胞G0/G1期阻滞。

3.5 柠檬苦素具有结合Skp2蛋白潜能

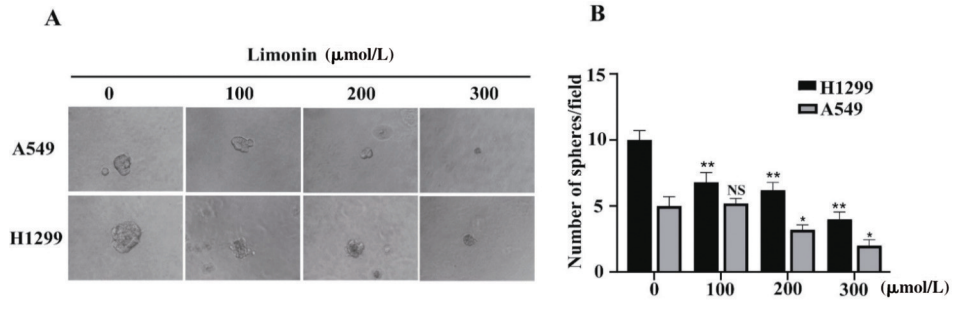
CETSA是一种能够检测药物与目标蛋白相互结合的有效方法。在加热过程中，蛋白质易发生变性和沉淀，而与药物结合的蛋白则能够在较高的温度下保持其热稳定性。CETSA实验结果显示，随着温度的升高，尤其在50℃与54℃较高温度下，



A：流式分析柠檬苦素对肺癌细胞A549细胞周期影响；B：流式分析柠檬苦素对A549细胞凋亡的影响。与对照组比较：*P<0.05。

图2 柠檬苦素（Limonin）诱导NSCLC细胞G0/G1期阻滞

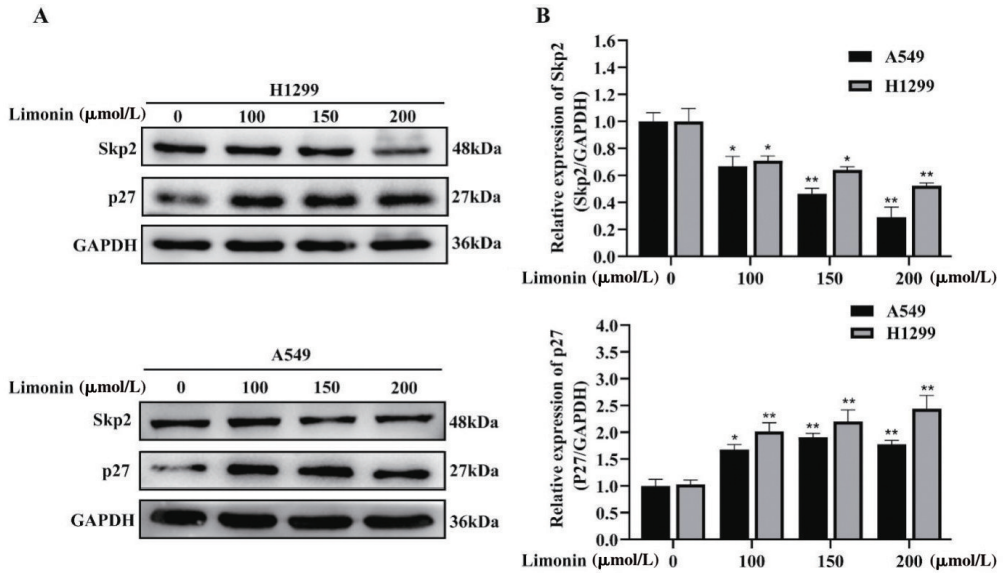
Figure 2 Induction of G0/G1 phase arrest in NSCLC cells by limonin



A：在三维基质胶中培养NSCLC细胞基质胶3D成球实验表明，在不同质量浓度的Limonin处理7 d后可显著抑制A549和H1299细胞成球能力（40×镜）；B：肿瘤细胞基质胶3D成球实验统计分析，与对照组比较，*P<0.05；**P<0.01；NS为无显著性差异。

图3 基质胶3D成球实验检测柠檬苦素抑制NSCLC细胞成球能力

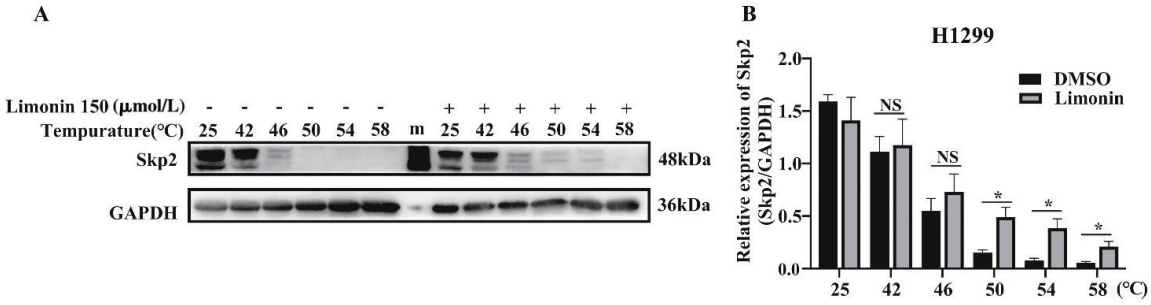
Figure 3 Assessment of limonin's inhibitory effect on spheroid ability of NSCLC cells by Matrigel 3D spheroid assay



A：蛋白免疫印迹检测不同质量浓度柠檬苦素（Limonin）处理对A549和H1299细胞Skp2和p27蛋白的表达水平影响；B：对蛋白质免疫印迹法条带的光密度统计分析，与对照组比较，*P<0.05；**P<0.01。

图4　柠檬苦素（Limonin）调控NSCLC细胞中Skp2/p27通路蛋白表达

Figure 4　Regulation of Skp2/p27 pathway protein expression in NSCLC cells by limonin



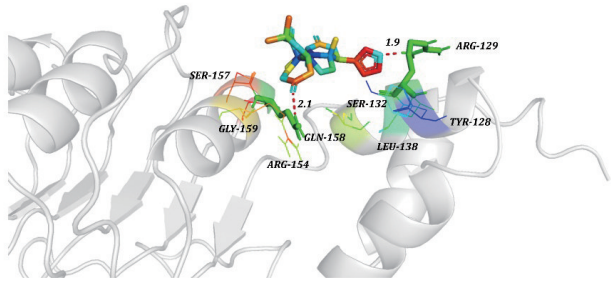
A：蛋白质免疫印迹法检测不同温度下Skp2蛋白稳定性，m为蛋白marker泳道；B：对热稳定转移试验的Skp2条带光密度统计分析，与对照组比较，*P<0.05；NS为差异无统计学意义。

图5　柠檬苦素（Limonin）提高Skp2蛋白热稳定性

Figure 5　Enhancement of the thermostability of Skp2 protein by limonin

柠檬苦素给药组的Skp2蛋白水平显著高于DMSO对照组（见图5A，5B）。这一结果表明，柠檬苦素具有与Skp2蛋白结合的潜能。

进一步通过分子对接预测柠檬苦素与Skp2蛋白相互作用位点。PDB数据库中的Skp2蛋白晶体结构（2AST）常用于分子对接分析。结果显示，柠檬苦素与Skp2蛋白上的两个关键氨基酸残基（ARG-129和GLN-158）形成了稳定的氢键，这两个氢键的键长分别为1.9 Å和2.1 Å（见图6），结合能为-6.13 kJ/mol，表明柠檬苦素与Skp2之间存在较强的相互作用力。从而揭示了柠檬苦素对Skp2蛋白的潜在抑制作用机制。



Skp2和柠檬苦素分别显示为卡通图和棒状图。

图6　分子对接预测柠檬苦素与Skp2蛋白结合位点

Figure 6　Prediction of the interaction sites between limonin and Skp2 protein by molecular docking

3.6　通过敲低 *Skp2* 及 *Skp2* 过表达验证柠檬苦素作用Skp2抑制NSCLC细胞增殖

为了验证柠檬苦素通过靶向Skp2发挥抑制NSCLC细胞增殖作用，首先用siRNA干扰*Skp2*后检测药物作用效果。与siNC对照组相比，si*Skp2*干扰组A549细胞中*Skp2*蛋白表达显著降低，表明si*Skp2*-1和si*Skp2*-2两条SiRNA可以成功敲低细胞中*Skp2*基因，且si*Skp2*-2效果更为显著（见图

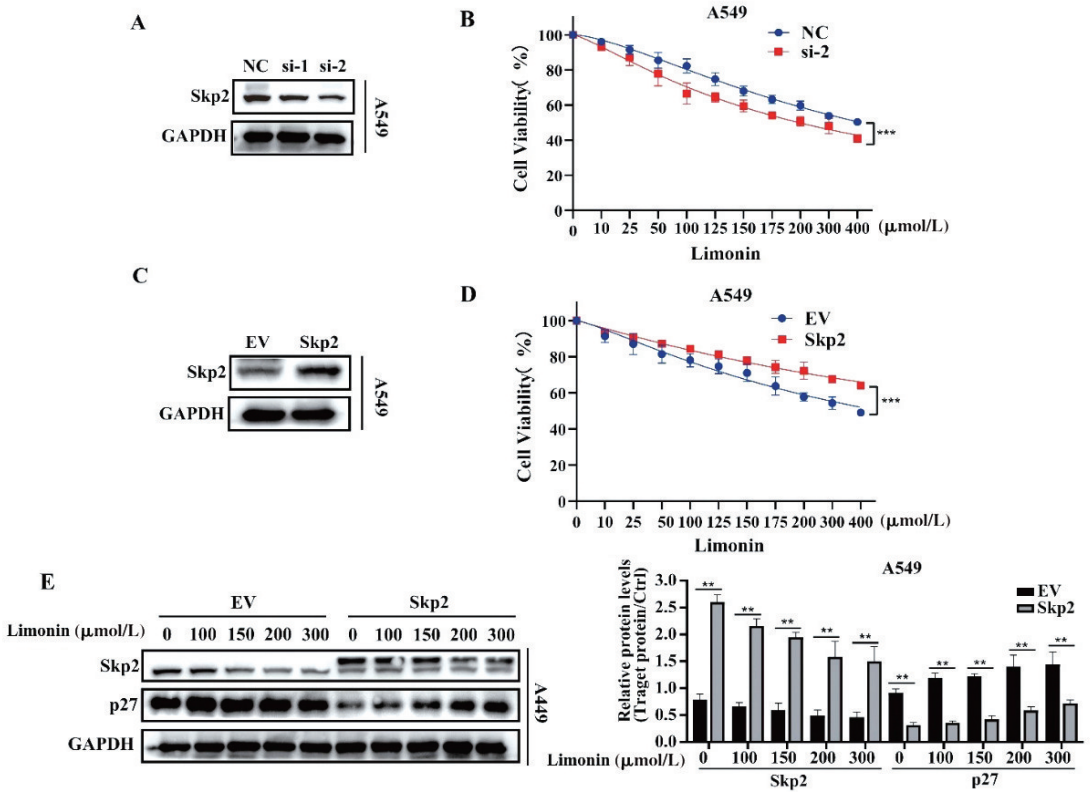
7A）。于是，选用si*Skp2*-2开展MTT实验，分析敲低*Skp2*对柠檬苦素抑制肺癌细胞增殖活力的影响。结果表明，柠檬苦素处理肺癌细胞后，si*Skp2*-2组细胞活性明显低于siNC组细胞（见图7B），证明敲低*Skp2*可以明显增强柠檬苦素抑制肺癌细胞的增殖作用。

构建*Skp2*稳定过表达A549细胞株，再次验证柠檬苦素是否通过Skp2/p27信号轴抑制NSCLC细胞增殖。与携带空载体（Empty Vector，EV）的对照组A549细胞相比，*Skp2*过表达的A549细胞中Skp2蛋白水平显著升高，从而证实了*Skp2*过表达稳定细胞株构建成功（见图7C）。随后，MTT实验评估*Skp2*过表达对柠檬苦素抑制NSCLC细胞增殖活力的影响。当柠檬苦素作用于NSCLC细胞时，*Skp2*过表达组细胞比EV对照组展现出更高的细胞活力，表明*Skp2*的过表达能够显著削弱柠檬苦素对A549细胞增殖的抑制作用（见图7D）。采用Western blotting实验进一步探究了*Skp2*过表达对柠檬苦素调控Skp2/p27信号轴的具体影响。在柠檬苦素处理后的*Skp2*过表达A549细胞中，柠檬苦素对Skp2蛋白的下调作用及诱导p27蛋白上升的作用均被明显减弱（P<0.01，见图7E）。这一结果支持了*Skp2*过表达能够削弱柠檬苦素通过Skp2/p27信号轴发挥的NSCLC细胞增殖抑制效应，进一步验证了柠檬苦素是通过调控Skp2/p27信号轴来实现其抗NSCLC效果的作用机制。

4 讨论

肺癌发病率与死亡率居高不下，新型抗肺癌药物研究尤为迫切。由于中药表现出多靶点、低毒性和低成本的优越性，其一直处于抗肿瘤药物研究领域的焦点。

Skp2蛋白作为一种关键的促癌因子，在细胞周期的调控、肿瘤干细胞的活性以及多种癌症进展等方面具有重要作用，因此，Skp2已成为抗肿瘤研究的理想靶点。在正常细胞中，Skp2的半衰期相对较短，主要在细胞周期的G1早期通过泛素化途径降解。然而，在癌细胞中，Skp2蛋白往往过度表达，这一异常现象导致细胞更容易从G1期进入S期，进而促进了癌细胞增殖与转移。此外，Skp2还参与调节p53非依赖的细胞衰老和Akt介导的有氧糖酵解过程，对癌症干细胞的特性产生显著



A：Western blotting实验验证A549细胞中siRNA干扰*Skp2*效果；B：MTT实验检测敲除*Skp2*后柠檬苦素对A549细胞活力影响，与对照组比较，***P<0.001；C：Western blotting实验验证*Skp2*过表达A549细胞中*Skp2*蛋白水平；D：MTT实验检测柠檬苦素对A549/EV和A549/*Skp2*细胞生存活力的影响，EV，空载体；与对照组比较，***P<0.001；E：Western blotting实验检测柠檬苦素对空载体组与*Skp2*过表达组Skp2与p27蛋白表达影响；与EV对照组比较，**P<0.01。

图7 Skp2过表达及敲低影响柠檬苦素（Limonin）对NSCLC细胞增殖抑制

Figure 7 Impact of Skp2 overexpression and knockdown on the inhibitory effects of limonin on NSCLC cell proliferation

影响。本研究表明，Skp2的表达降低或失活能够减少癌症干细胞的自我更新能力，并提高其对化疗药物的敏感性。因此，靶向Skp2可以为NSCLC治疗提供理想的策略。

柠檬苦素为柑橘类果实的有效成分之一，植物资源丰富。例如，广东南药化橘红，其味辛苦性温，入肺经，善理气化痰，已广泛用于呼吸道疾病治疗，其药理活性广泛，涵盖止咳化痰、抗炎、抗氧化、抗肿瘤、免疫调节及护肝等。研究[20]表明，柠檬苦素具备一定的抗肿瘤特性[19]，对人结肠癌、肝癌、乳腺癌、宫颈癌、肺癌等多种癌症均显示出一定的抗癌效果。例如，柠檬苦素对人结肠癌（Caco-2）细胞具有一定的细胞毒性[21]。柠檬苦素可以抑制肝癌细胞的糖酵解，从而诱导细胞凋亡[22]。柠檬苦素具有抗乳腺癌作用，研究[23]发现，柠檬苦素可以通过诱导核因子κB（NF-κB）通路的ser 468磷酸化刺激凋亡基因的表达，从而诱导乳腺癌细胞MDA-MB-231的凋亡，并认为其对接受化疗的乳腺癌患者有益。柠檬苦素还可以抑制宫颈癌HeLa细胞的生长以及迁移[24]。柠檬苦素主要通过抑制Wnt5/β-catenin通路诱导IOMM-Lee和CH157MN脑膜瘤细胞凋亡[25]。

本研究聚焦于柠檬苦素这一源自柑橘类果实的天然化合物，旨在揭示其潜在的抗肿瘤机制，特别是与关键促癌因子Skp2蛋白的相互作用。较多文献及在线数据库（如kmplot和prognoscan）[16-17]分析显示，NSCLC组织中*Skp2*的高表达与患者预后不良显著相关。通过系统性回顾与分析，进一步确认了*Skp2* mRNA表达水平与NSCLC患者总生存率呈显著负相关关系，与文献[18]报道一致，Skp2可以作为NSCLC预后评估的关键生物标志物。因此，本研究基于柠檬苦素能够诱导NSCLC细胞发生G0/G1期阻滞以及对肺癌细胞干细胞活性的抑制能力，推测其可能作用于Skp2通路。CETSA实验可用于检测药物是否能够直接与细胞内的目标蛋白相互作用[26-28]。随后，CETSA实验进一步确认了柠檬苦素具有与Skp2蛋白直接相互作用的潜能。分子对接实验进一步分析了柠檬苦素与Skp2的结合潜力和可能的结合位点，为两者的相互作用提供了理论支持。最后，通过*Skp2*过表达和敲除实验，系统地研究了*Skp2*表达水平变化对柠檬苦素抑制肺癌细胞增殖效果的影响。实验结果表明，*Skp2*的敲除显著增强了柠檬苦素的抗NSCLC效果，而过表达*Skp2*则部分抵消了柠檬苦素对NSCLC细胞增殖的抑制作用。这一发现不仅证实了柠檬苦素通过靶向Skp2发挥抗肿瘤作用，还揭示了Skp2在柠檬苦素抗肿瘤机制中的核心地位。

5 结论

本研究揭示了柠檬苦素发挥抗NSCLC的分子作用机制。通过一系列实验，确认柠檬苦素通过靶向Skp2蛋白，促进抑癌蛋白p27积累，并诱导NSCLC细胞G0/G1期阻滞，发挥抑制NSCLC细胞增殖及干细胞活性的功效。本研究不仅丰富了柠檬苦素的抗肿瘤机制，也为柑橘类中药小分子的临床前抗肿瘤药物研发提供了新的理论基础。

参考文献

[1] HOY H, LYNCH T, BECK M. Surgical treatment of lung cancer[J]. Critical Care Nursing Clinics of North America, 2019, 31(3): 303-313.

[2] YUEH H L, CHIA I L, CHENG C L, et al. Traditional Chinese medicine as adjunctive therapy improves the long-term survival of lung cancer patients[J]. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2017, 143 (12): 2425-2435.

[3] 熊庆, 严志宏, 向汝群, 等. 中药有效成分治疗肺癌作用机制研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25 (10): 79-86.

[4] 陈美桢, 王娟. 化橘红的药用和保健功能的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2023, 34 (12): 252-264.

[5] PENG Y, HU M, LU Q, et al. Flavonoids derived from exocarpium citri grandis inhibit LPS-induced inflammatory response via suppressing MAPK and NF-κB signalling pathways[J]. Food and Agricultural Immunology, 2019, 30 (1): 564-580.

[6] ZHAO Y, KAO C, WU K, et al. Chemical compositions, chromatographic fingerprints and antioxidant activities of andrographis herba[J]. Molecules, 2014, 19 (11): 332-350.

[7] 张刊, 张双双, 张百霞. 化橘红黄酮类化学成分研究进展[J]. 医学研究与教育, 2017, 34 (5): 60-65.

[8] JUN L, YUN P S, QIURONG L, et al. Research progress of meliaceous limonoids from 2011 to 2021[J]. Natural Product Reports, 2022, 39 (6): 1325-1365.

[9] 张文琦, 纪宏秀, 吴倩, 等. 柠檬苦素类化合物生物活性研究进展[J]. 安徽农学通报, 2024, 30 (1): 21-26.

[10] 黄达. 化橘红提取物调控*Skp2*/*p27*信号轴抑制非小细胞肺癌增殖作用机制研究[D]. 下册: 广州中医药大学, 2023.

[11] CHAN C H, MORROW J K, LI C F, et al. Pharmacological inactivation of Skp2 SCF ubiquitin ligase restricts cancer stem cell traits and cancer progression[J]. Cell, 2013, 154 (3): 556-568.

[12] CHAN C H, MORROW J K, ZHANG S, et al. Skp2: A dream target in the coming age of cancer therapy[J]. Cell Cycle, 2014, 13(5): 679-680.
[13] ÁDÁM N, GYÖNGYI M, BALÁZS G. Pancancer survival analysis of cancer hallmark genes[J]. Scientific Reports, 2021, 11 (1): 6047.
[14] TROTT O, OLSON A J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading[J]. Journal of Computational Chemistry, 2010, 31(2): 455-461.
[15] SANNER M F. Python: A programming language for software integration and development[J]. Journal of Molecular Graphics & Modelling, 1999, 17(1): 57-61.
[16] HU L, LI Z, CHENG J, et al. Crystal structure of TET2-DNA complex: Insight into TET-mediated 5mC oxidation [J]. Cell, 2013, 155(7):1545-1555.
[17] HAO B, ZHENG N, SCHULMAN A B, et al. Structural basis of the Cks1-dependent recognition of p27 Kip1 by the SCF *Skp2* ubiquitin ligase[J]. Molecular Cell, 2005, 20 (1): 9-19.
[18] 曾艳, 朱润庆, 马华玲, 等. Skp2蛋白在非小细胞肺癌中的表达及其与p27~(kip1)蛋白表达的关系[J]. 现代肿瘤医学, 2006, 14(2): 156-158.
[19] GU L, XU F, ZHANG X, et al. Baicalein inhibits the SMYD2/RPS7 signaling pathway to inhibit the occurrence and metastasis of lung cancer[J]. Journal of Oncology, 2022 (2022): 3796218.
[20] JIN R C, WONG H X, DONG F C, et al. Potential role of traditional Chinese medicines by Wnt/β-Catenin pathway compared with targeted small molecules in colorectal cancer therapy[J]. Frontiers in Pharmacology, 2021 (12): 690501.
[21] DAN Y C, XIAN B M, JING J Z, et al. Pectin based hydrogel with covalent coupled doxorubicin and Limonin loading for lung tumor therapy[J]. Colloids and Surfaces, Biointerfaces, 2023(234): 113670.
[22] FAN S, ZHANG C, LUO T, et al. Limonin: A review of its pharmacology, toxicity, and pharmacokinetics[J]. Molecules, 2019, 24 (20): 3679.
[23] PING Q, HONG W J, XIU W Y. New limonoids from coptidis rhizoma-euodiae fructus couple[J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2014, 16 (4): 333-344.
[24] JUN L Y, JING T L, WEN S Z. By blocking hexokinase-2 phosphorylation, Limonin suppresses tumor glycolysis and induces cell apoptosis in hepatocellular carcinoma[J]. OncoTargets and Therapy, 2018 (11): 3793-3803.
[25] SOMASUNDARAM S, PRICE J, PEARCE K, et al. Citrus Limonin lacks the antichemotherapeutic effect in human models of breast cancer[J]. Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics, 2012, 5(2): 106-114.
[26] BI J, LI Y, WANG H. The mechanism of Hela cell proliferation and apoptosis induced by bitter substances in citrus[J]. Food Sci, 2019, 1-11.
[27] DAS A, MILLE R, LEE P, et al. A novel component from citrus, ginger, and mushroom family exhibits antitumor activity on human meningioma cells through suppressing the Wnt/beta-catenin signaling pathway[J]. Tumour Biology, 2015, 36 (9): 7027-7034.
[28] ROZBEH J, HELENA A, HANNAA, et al. The cellular thermal shift assay for evaluating drug target interactions in cells[J]. Nature Protocols, 2014, 9 (9): 2100-2122.

·作者与读者·

封面故事

封面以悬崖上的葫芦为视觉焦点，被火焰炙烤，象征着脓毒症患者体内炎症因子风暴和外源性损伤对各脏器的侵袭。蔓延的火焰象征着细菌、病毒，以及炎症因子的肆虐，而烤焦的藤蔓则代表着受损的大循环血管。葫芦上的裂痕和熏烤痕迹暗示着脏器的煎熬，特别是微循环、肝、肠道、大脑、肺、肾和心脏。其中，心脏的葫芦摔落并破碎，凸显了脓毒症对心脏功能的严重损害。心脏的损伤细节，如线粒体应激和内质网损伤，与本期专题中一篇关于脓毒症心肌病的重要综述相呼应。整个悬崖被阴沉的天空所笼罩，画面以冷色调为主，反映了脓毒症患者体内环境的恶劣。