DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.04.028

肉豆蔻醚通过调控蛋白 EEPD1 抑制肺鳞癌细胞增殖、迁移和侵袭并促进凋亡的机制研究

么艺涵,崔逸爽,张梦诗,戈艳蕾,甘俊清,金叶,孙国贵
(华北理工大学附属医院,河北 唐山 063000)

摘要:目的 旨在探讨肉豆蔻醚(myristicin)通过调控核酸内切酶/核酸外切酶/磷酸酶家族结构域包含蛋白1(endonuclease/exonuclease/phosphatase family domain containing 1,EEPD1)表达,进而对肺鳞状细胞癌的增殖、迁移、侵袭及凋亡过程的影响。方法 采用分子对接技术分析了 myristicin 和目标蛋白 EEPD1 之间的相互作用;采用免疫组化技术检测组织芯片中肺鳞癌和邻近癌旁组织内 EEPD1 蛋白水平;通过实时荧光定量聚合酶链式反应(real-timk quantitative polymerase chain reaction,qRT-PCR)评估了该基因在细胞系中的表达活性,细胞计数盒(cell counting kit-8,CCK-8)检测 myristicin 对肺鳞癌细胞 KNS-62、NCI-H226 增殖的影响;划痕实验和细胞迁移侵袭实验(Transwell)被用来检测 myristicin 对肺鳞癌细胞迁移和侵袭能力的影响;流式细胞术用来检测 myristicin 对肺鳞癌细胞凋亡的影响;蛋白印记法(Western blot,WB)用来检测肺鳞癌细胞的 EEPD1 蛋白表达情况。结果 研究发现 myristicin 能够与蛋白 EEPD1 形成特异性结合;相比于癌旁组织对照区,肺鳞癌组织样本中观察到了更高的 EEPD1 阳性信号强度;CCK-8 测定表明 myristicin 可显著抑制肺鳞癌细胞增殖;划痕愈合速度减慢表明 myristicin 能够抑制肺鳞癌细胞迁移;Transwell 实验结果同样证明 myristicin 能够抑制肺鳞癌细胞迁移和侵袭;流式细胞术数据显示 myristicin 促进了肺鳞癌细胞的凋亡;WB 分析结果显示 myristicin 降低了蛋白 EEPD1 的表达量。结论 体外实验证据支持 myristicin 能够通过下调蛋白 EEPD1 表达来发挥其抗癌功效,具体表现为抑制肺鳞状细胞癌的增殖、迁移和侵袭,并促进细胞凋亡。

关键词:肉豆蔻醚;EEPD1 蛋白;肺鳞癌;细胞迁移;细胞侵袭;细胞增殖
中图分类号:R285.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2026)04-0130-10

Mechanism of Myristicin Inhibiting Proliferation, Migration and Invasion of Lung Squamous Carcinoma Cells and Promoting Apoptosis by Regulating Protein EEPD1

YAO Yihan, CUI Yishuang, ZHANG Mengshi, GE Yanlei, GAN Junqing, JIN Ye, SUN Guogui
(North China University of Science and Technology Affiliated Hospital, Tangshan 063000, Hebei, China)

Abstract: *Objective* The aim of this study was to investigate the effects of myristicin on the regulation of endonuclease/exonuclease/phosphatase family domain containing 1 (EEPD1) expression and its subsequent impact on the proliferation, migration, invasion and apoptosis of pulmonary squamous cell carcinoma. *Method* Molecular docking techniques were employed to analyze the interaction between myristicin and the target protein EEPD1. Immunohistochemistry method was used to assess the levels of EEPD1 protein in lung squamous carcinoma and adjacent paracancerous tissues on tissue chips. The gene expression activity in cell lines was evaluated using real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR), while the effect of myristicin on the proliferation of lung squamous carcinoma cells KNS-62 and NCI-H226 was assessed with Cell Counting Kit-8 (CCK-8). Scratch assay and Transwell migration and invasion experiments were conducted to examine the impact of myristicin on the migration and invasion capabilities of lung squamous carcinoma cells. Flow cytometry method was utilized to determine the influence of myristicin on the apoptosis of lung squamous carcinoma cells, and Western blot (WB) was employed to analyze the expression of EEPD1 protein in these cells. *Results* Myristicin could form specific binding with the EEPD1 protein. Higher EEPD1 positive signal intensity was observed in lung squamous carcinoma tissue samples compared to adjacent paracancerous tissue control areas. CCK-8 assay results demonstrated that myristicin significantly inhibited the proliferation of lung squamous carcinoma cells. A slower scratch healing rate suggested that myristicin could inhibit the migration of lung squamous carcinoma cells. Transwell assay results similarly showed that myristicin could inhibit the migration and invasion of lung squamous carcinoma cells. Flow cytometry data revealed that myristicin promoted the apoptosis of lung squamous carcinoma cells, while WB analysis indicated that

基金项目:国家自然科学基金面上项目(82172658);河北省自然科学基金项目(H2023209083);河北省创新能力提升计划项目(235A2403D);河北省教育厅河北实验教学及教学实验室建设项目(冀教高函〔2024〕8号);河北省医学适用技术跟踪项目(GZ2021057);河北省政府资助临床医学优秀人才培养项目(ZF2024193);华北理工大学公共卫生学院高水平科研创新团队建设计划项目(KYTD202309);唐山市市级科技计划项目(24150218C)
作者简介:么艺涵(1997-),男,河北唐山人,硕士在读,研究方向:肿瘤学。
通讯作者:孙国贵(1980-),男,河北唐山人,主任医师,博士,研究方向:胸腔肿瘤学。E-mail:guogui_sun2021@sina.com。

myristicin reduced the expression level of EEPD1 protein. *Conclusion* In vitro experimental evidence supports that myristicin exerts its anticancer effects by down-regulating the expression of EEPD1 protein, specifically manifested in inhibiting the proliferation, migration and invasion of pulmonary squamous cell carcinoma and promoting cell apoptosis.

Keywords: myristicin; EEPD1 protein; lung squamous cell carcinoma; cell migration; cell invasion; cell proliferation

原发性支气管肺癌(简称肺癌)是临床实践中一种常见的恶性肿瘤,具有较高的发病率和致死率[1]。由于吸烟、环境污染等多种因素的影响,近年来我国及全球范围内的肺癌患者数量持续上升,其中非小细胞肺癌占据了绝大多数病例,占比超过85%。然而,多数患者的预后并不理想,仅有大约20%的个体能够存活5年以上[2-4]。早期肺癌往往症状隐匿且缺乏特异性标志,加之癌细胞可通过血液循环迅速扩散至身体其他部位,如脑部或骨骼,导致许多患者在确诊时已经存在远处转移的情况,这也是影响其生存期的一个重要因素[5-6]。尽管医学界在肺癌诊断与治疗方面取得了显著进展,但对于肺鳞状细胞癌的具体发病机制及其治疗方法的研究仍显不足。因此,加强对该类型癌症生物学行为的理解对于开发更为有效的干预措施至关重要。某些特定分子或蛋白质表达水平的变化与肺鳞癌细胞的生长、迁移、侵袭以及凋亡过程密切相关,深入探讨这些生物标志物的功能有助于识别潜在的新药靶点[7-8]。肉豆蔻作为一种传统药材,在对抗包括肺癌在内的多种癌症方面显示出一定的抗癌活性。特别是其中的一种成分——肉豆蔻醚(myristicin),被认为是发挥这种抗肿瘤作用的关键物质[9-10]。基于现有研究成果,本项目旨在探索 myristicin 如何通过调节 EEPD1 蛋白来抑制肺鳞癌细胞的增殖、迁移和侵袭,并促进其凋亡,以期为肺鳞癌的治疗提供新的策略和手段。

1 实验材料

本研究中采用的肺鳞状细胞癌细胞系 KNS-62、NCI-H226 及 SK-MES-1,以及用于对照实验的肺上皮细胞系 BEAS-2B 分别来源于武汉普诺赛生命科技有限公司和北京中生奥邦生物科技有限公司;为了进一步验证实验结果,从上海芯超生物科技有限公司采购了肺鳞癌组织芯片。实验过程中所需的基础培养基 RPMI DMEM 与 RPIM 1640 均来自美国 Gibco 公司;胎牛血清由美国 Corning 公司提供;苏州新赛美公司则提供了包括冻存液在内的细胞处理试剂如 0.25% 胰蛋白酶等。对于基因操作相关材料,选择了北京码因科技有限公司生产的 NEOFECT 转染试剂及美国 Invitrogen 公司的 Lipofectamine 2000 作为载体;日本 Takara 公司提供的荧光定量 PCR 检测试剂盒用于后续检测工作。在特定化合物方面,选择了上海源叶生物科技有限公司供应的肉豆蔻醚。针对 EEPD1 基因的研究工具,包括过表达质粒(北京西贝宏程生物科技有限公司)、特异性引物(广州市锐博生物科技有限公司)以及小干扰 RNA(si-EEPD1,生工生物工程股份有限公司),还有用于蛋白质水平检测的 EEPD1 多克隆抗体(湖北艾普蒂生物工程有限公司)。为评估细胞活力所必需的 CCK-8 试剂购自北京中生奥邦生物科技有限公司。

2 实验方法

2.1 *分子对接* 从 https://www1.rcsb.org/网站下载蛋白 EEPD1 结构文件,从 https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5365872 下载小分子 myristicin 结构文件,使用 Pymol 打开下载好的蛋白 EEPD1 结构文件并将蛋白文件保存为新的 PDB 文件,打开 OpenBabel 软件,将下载的小分子 myristicin 的 sdf 格式文件转换为 PDB 格式文件,打开 AutoDock Tools 进行分子对接,最后将对接结果可视化并导出对接结构。

2.2 *免疫组化* 本研究通过免疫组织化学技术来评估蛋白 EEPD1 在肺鳞状细胞癌及其邻近正常组织中的表达水平。实验步骤包括标准的石蜡切片脱蜡处理,随后采用柠檬酸缓冲液进行抗原修复,并用 PBS 溶液清洗 3 次,每次 5 min。之后,样品被置于 3% 过氧化氢中孵育 10 min 以消除内源性过氧化物酶活性。接着,将 EEPD1 特异性抗体(稀释比例为 1∶100)滴加于样本上,在 4 ℃条件下过夜培养。再次使用 PBS 进行 3 轮清洗后,加入二级抗体。最后,利用 DAB 作为显色剂,流水冲洗终止反应,再经过苏木精复染、脱水及封片等步骤完成制备。所有过程结束后,对结果进行了摄影记录。

2.3 *细胞培养* 在含有 20% 胎牛血清及 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基中,对肺鳞癌细胞 KNS-62 进行培养;而 NCI-H226 细胞则置于含 10% 胎牛血清和相同浓度抗生素的 RPMI 1640 培养基内。上述两种细胞均需在设定为 37 ℃且 CO_2 浓度为 5% 的恒温培养箱中生长,直至其密度超过 80%,随后可用于传代、冷冻保存以及其他后续实验操作。

2.4 *细胞转染和分组* 选取处于对数生长期且已接种于 6 孔板上的 KNS-62 与 NCI-H226 细胞,依据 Lipofectamine2000 的使用指南,将 si-NC 和 si-EEPD1 分别引入细胞内,从而形成 si-NC 对照组和 si-EEPD1 实验组。此外,还利用二甲基亚砜(DMSO)以及 myristicin 处理上述细胞,进一步划分为仅接受 DMSO 处理的对照组和施加了 myristicin 的实验组。另外,在部分细胞中导入 EEPD1 过表达质粒,并同时给予 myristicin 或 DMSO 处理,以此构建出 4 个不同的实验条件组合:EEPD1+DMSO、EEPD1+myristicin、puro+DMSO 以及 puro+myristicin。所有处理完成后,细胞继续培养 24 h 以备后续分析。

2.5 *qRT-PCR 检测 EEPD1 表达* 提取细胞总 RNA,将总 RNA 逆转录为 cDNA,上机检测 EEPD1 的表达。GAPDH 正向引物序列:5'-GAACGGGAAGCTCACTGG-3',下游引物序列:5'-GCCTGCTTCACCACCTTCT-3';EEPD1 上游引物序列:5'-AGCCTGTAACTTCAGCAACATTC-3',下游引物序列:5'-TTCTTGAAGCCACCGATATACTC-3'。以 GADPH 为内参,检测 EEPD1 的表达。

2.6 *CCK-8 法检测细胞增殖活性* 按分组对细胞进行处理,培养 24 h 后将细胞消化离心并计数,按 2×10^3 个/孔的细胞量接种于 96 孔板(100 μL/孔),每组设置 5 个复孔,在培养箱中培养并分别于 24、48、72、96 h 予对应组的每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,2 h 后用酶标仪于 450 nm 波长处测吸光度值。

2.7 *Transwell 实验检测细胞侵袭迁移* 细胞分组处理后消化、离心,用空白培养基重悬计数。提前将 50 μL 稀释后的 Matrigel 胶(Matrigel 胶:双无培养基=1∶8)加入小室的上室,取 150 μL 含 8×10^4 个细胞的细胞悬液加入上室(200 μL/孔),下室加入 600 μL 高血清(含 30% 胎牛血清)培养基,培养 24 h,先用甲醇固定 10 min,再用 0.1% 的结晶紫进行染色,在倒置光学显微镜下拍照。迁移实验除不使用 Matrigel 胶,其余步骤与侵袭实验步骤相同。

2.8 *划痕实验检测细胞迁移* 细胞分组处理后铺于 6 孔板内培养,待细胞密度达到 80% 时用 20 μL 的枪头在孔板底部垂直划出一条直线,用生理盐水清洗干净划痕,加入低血清培养

基(含2%血清),分别于0 h和24 h置于显微镜下拍照。使用Image J测量迁移面积,计算迁移率。

2.9 流式细胞术检测细胞凋亡 完成细胞分组处理后,进行消化并离心去除上清液。随后,在各组的细胞沉淀中添加1×Binding buffer,并充分混合均匀。从每组取100 μL混合物转移至EP管内,然后在避光条件下分别加入5 μL FITC Annexin V溶液与5 μL PI溶液。接着,再向每个样本中加入400 μL 1×Binding buffer以进一步混匀,最后使用流式细胞仪进行检测。

2.10 Western blot检测蛋白表达 细胞分组处理24 h后收集细胞,对细胞进行裂解并提取蛋白。取30 μg蛋白在电泳池中电泳分离,将分离的蛋白在电转池中电转至PVDF膜上,用5%脱脂牛奶封闭2 h,用TBST溶液洗膜10 min,然后将膜在稀释的一抗溶液中4 ℃孵育过夜,用TBST溶液洗膜3×10 min,将膜在二抗中室温孵育1 h,用TBST溶液清洗膜3×10 min,用ECL显影试剂进行可视化,获得的条带用Image J软件计算相对蛋白表达水平。用GADPH作为内参。

3 统计学方法

用GraphPad Prism 9.0统计分析软件对所得数据进行分析及图像绘制,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用独立样本t检验和单因素方差分析。$P<0.05$被认为差异有统计学意义。

4 结果

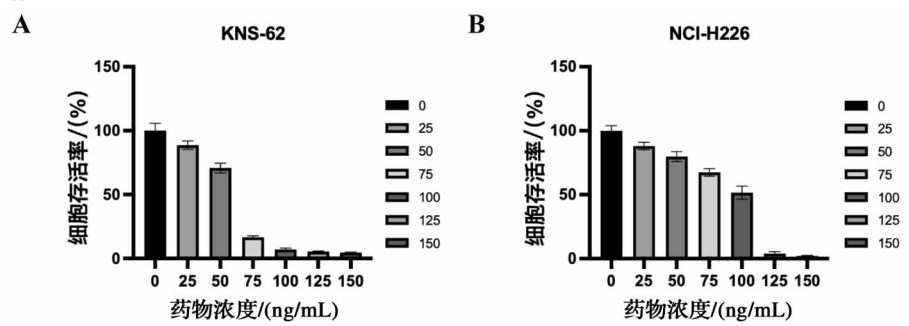
4.1 myristicin干预肺鳞癌细胞KNS-62和NCI-H226的IC_{50}浓度 不同浓度的myristicin(0、25、50、75、100、125、150 ng/mL)处理KNS-62和NCI-H226细胞24 h后,用CCK-8实验测细胞存活率(图1),结果显示,myristicin以剂量依赖性抑制KNS-62和NCI-H226细胞的细胞存活能力(均$P<0.05$)。myristicin干预KNS-62的IC_{50}值为59.13 ng/mL,NCI-H226的IC_{50}值为104.50 ng/mL,在后续实验中用对应IC_{50}值浓度的myristicin对KNS-62和NCI-H226进行处理。

4.2 myristicin对肺鳞癌细胞表达EEPD1的影响 分别用DMSO和对应IC_{50}值浓度的myristicin对肺鳞癌细胞KNS-62和NCI-H226处理并命名为DMSO组及myristicin组,24 h后用qRT-PCR实验检测KNS-62和NCI-H226的EEPD1表达情况,结果显示KNS-62和NCI-H226细胞DMSO组EEPD1的表达水平显著高于myristicin组($P<0.001$,$P<0.01$)。见图2A。WB结果显示,myristicin处理后肺鳞癌细胞KNS-62和NCI-H226中EEPD1的相对表达水平明显低于DMSO组($P<0.001$,$P<0.0001$)。见图2B。

4.3 myristicin对肺鳞癌细胞增殖凋亡能力的影响 CCK-8结果显示,经myristicin处理并培养24、48、72、96 h后,KNS-62和NCI-H226细胞的细胞活力均显著低于DMSO组(均$P<0.05$)。见插页XX图3A。流式细胞术结果显示,DMSO组KNS-62及NCI-H226细胞的凋亡率均显著低于myristicin组(均$P<0.0001$)。见插页XX图3B。

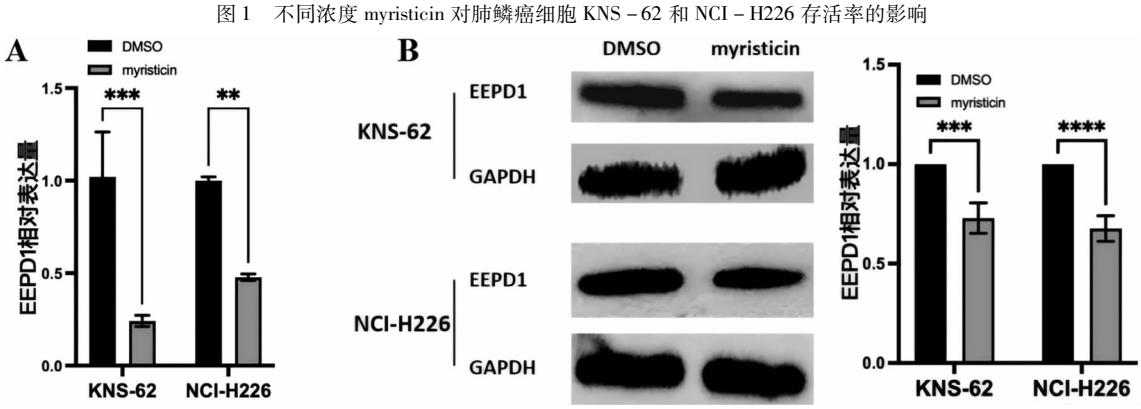
4.4 myristicin对肺鳞癌细胞侵袭迁移能力的影响 Transwell结果显示,DMSO组KNS-62和NCI-H226细胞的侵袭数均显著高于myristicin组($P<0.001$,$P<0.0001$),见插页XX图4A。DMSO组KNS-62和NCI-H226细胞的迁移数均显著高于myristicin组($P<0.01$,$P<0.0001$),见插页XX图4B。划痕试验结果显示,myristicin组KNS-62和NCI-H226细胞的迁移率均明显低于DMSO组(均$P<0.0001$)。见插页XX图4C。

4.5 EEPD1与myristicin的分子对接 EEPD1与myristicin分子对接结果表明,myristicin能够稳定嵌入EEPD1的结合口袋,并与关键氨基酸残基形成特异性相互作用。结构分析显示,该配体主要通过氢键作用与SER-243形成直接相互作用,氢键距离约为2.2 Å,这有助于增强配体在结合位点的稳定性。此



注:与myristicin(0 ng/mL)组相比,均$P<0.05$。

图1 不同浓度myristicin对肺鳞癌细胞KNS-62和NCI-H226存活率的影响



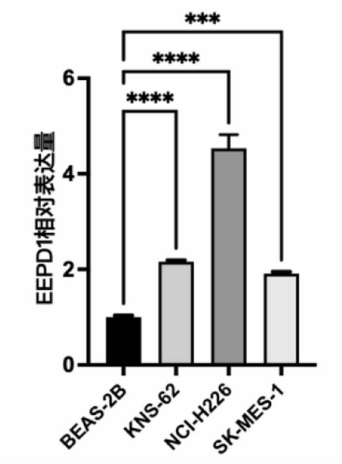
注:**$P<0.01$,***$P<0.001$,****$P<0.0001$。

图2 myristicin处理后降低肺鳞癌细胞的EEPD1的表达量

外，分子对接计算得出的结合自由能为 -5.12 kcal/mol，表明 myristicin 在该靶点上具有较强的结合能力，能够与 EEPD1 形成稳定复合物。同时，配体效率值为 -0.37，进一步支持该对接构象的合理性，表明其在较小分子量的情况下仍能维持较优的结合能力。图像分析进一步可视化展示了配体的结合方式：左侧图显示了 EEPD1 的整体结构，并突出标识了 myristicin 结合的具体区域；中间的放大视图详细解析了氢键作用，揭示了 myristicin 在结合口袋内的取向及其与关键残基的空间关系；右侧的表面填充模型清晰展现了配体 myristicin（玫红色）嵌入 EEPD1（绿色）的结合口袋，进一步确认了其较好的空间适配性（插页ⅩⅨ图5）。

4.6 EEPD1 在肺鳞癌组织的表达情况 免疫组化结果显示，肺鳞癌患者组织芯片中，癌组织中的 EEPD1 相对表达水平显著比癌旁组织高（$P<0.01$）。见插页ⅩⅨ图6。

4.7 EEPD1 在肺鳞癌细胞系中的表达 qRT-PCR 实验结果显示，相对于正常肺上皮细胞 BEAS-2B 中 EEPD1 mRNA 的表达水平，肺鳞癌细胞 KNS-62 和 NCI-H226 中 EEPD1 mRNA 的表达水平均呈现出高表达趋势（$P<0.001$，$P<0.000\ 1$）。见图7。



注：***$P<0.001$，****$P<0.000\ 1$。

图7 EEPD1 在肺鳞癌细胞中的表达

4.8 敲降 EEPD1 对肺鳞癌细胞表达 EEPD1 的影响 将 si-EEPD1（si-1524、si-2334 和 si-1901）和 si-NC 分别转染至肺鳞癌细胞 KNS-62 和 NCI-H226 中，命名为 si-1524 组、si-2334 组、si-1901 组和 si-NC 组。用 qRT-PCR 技术检测 si-NC 和 si-EEPD1 的转染效率，结果显示 KNS-62 细胞的 si-1524 组、si-2334 组及 si-1901 组的 EEPD1 mRNA 表达水平均低于 si-NC 组，其中 si-1524 组的 EEPD1 mRNA 表达水平显著低于 si-NC 组（$P<0.05$，$P<0.01$），见图8A；NCI-H226 细胞的si-1524 组、si-2334 组及 si-1901 组的 EEPD1 mRNA 表达水平均低于 si-NC 组，其中 si-2334 组的 EEPD1 表达水平显著低于 si-NC 组（$P<0.05$），见图8A。WB 结果显示，敲降 EEPD1 处理后肺鳞癌细胞 KNS-62 及 NCI-H226 中 EEPD1 的相对表达水平均显著低于 si-NC 组（$P<0.01$，$P<0.001$），见图8B。

4.9 敲降 EEPD1 对肺鳞癌细胞增殖和凋亡能力的影响 CCK-8 实验结果显示，敲降 EEPD1 后 KNS-62 和 NCI-H226 的细胞活力显著比 si-NC 组更低（均$P<0.01$）。见插页ⅩⅩ图9A。流式细胞术结果显示，si-EEPD1 组 KNS-62 及 NCI-H226 细胞凋亡率均显著高于 si-NC 组（$P<0.001$，$P<0.000\ 1$）。见插页ⅩⅩ图9B。

4.10 敲降 EEPD1 对肺鳞癌细胞侵袭迁移能力的影响 Transwell 实验结果显示，si-EEPD1 组 KNS-62 及 NCI-H226 细胞的侵袭数均显著低于 si-NC 组（均$P<0.000\ 1$），见插页ⅩⅪ图10A；si-EEPD1 组 KNS-62 及 NCI-H226 细胞的迁移数均显著低于 si-NC 组（$P<0.01$，$P<0.000\ 1$），见插页ⅩⅪ图10B。细胞划痕实验结果显示，si-NC 组 KNS-62 及 NCI-H226 细胞的迁移率均显著高于敲降组细胞（$P<0.05$，$P<0.01$）。见插页ⅩⅪ图10C。

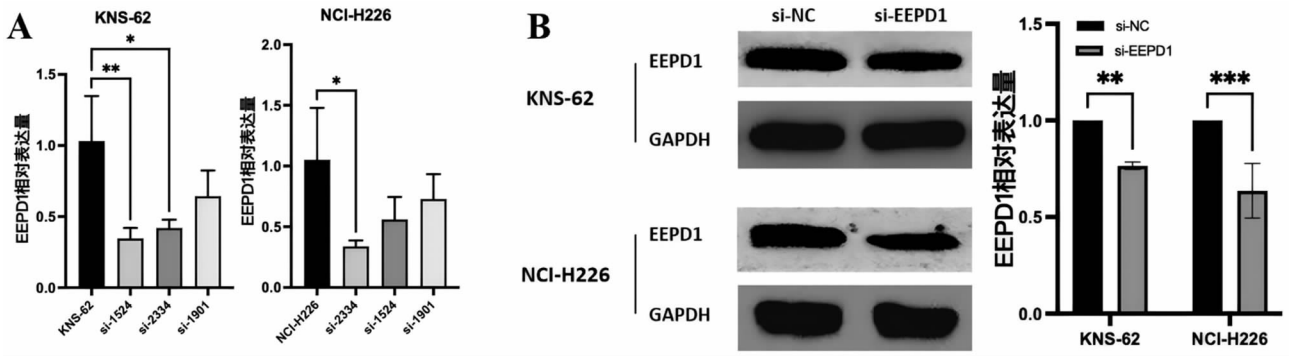
4.11 myristicin 抑制 NCI-H226 和 KNS-62 的 EEPD1 表达 将过表达 EEPD1 质粒 cDNA-puro 和 cDNA-EEPD1 分别转染至肺鳞癌细胞 KNS-62 和 NCI-H226 中，各分成两组分别用 DMSO 和对应 IC_{50} 浓度的 myristicin 处理，并命名为 EEPD1+DMSO 组、EEPD1+myristicin 组、puro+DMSO 组及 puro+myristicin 组。WB 实验结果显示，EEPD1+DMSO 组 KNS-62 及 NCI-H226 细胞的 EEPD1 表达水平均高于 EEPD1+myristicin 组；puro+DMSO 组 KNS-62 及 NCI-H226 细胞的 EEPD1 相对表达水平均显著高于 puro+myristicin 组（$P<0.05$，$P<0.01$，$P<0.001$）。见图11。

4.12 myristicin 在体外抑制 NCI-H226 和 KNS-62 细胞增殖并促进凋亡 CCK-8 实验结果显示，培养 24、48、72、96 h 后，EEPD1+DMSO 组 KNS-62 及 NCI-H226 细胞的活力均显著高于 EEPD1+myristicin 组；puro+DMSO 组的细胞活力均显著高于 puro+myristicin 组（均$P<0.05$），见插页ⅩⅫ图12。流式细胞术结果显示，EEPD1+DMSO 组 KNS-62 及 NCI-H226 细胞的细胞凋亡率均显著低于 EEPD1+myristicin 组；puro+DMSO 组 KNS-62 及 NCI-H226 细胞的细胞凋亡率均显著低于 puro+myristicin 组（$P<0.01$，$P<0.000\ 1$），见图13。

4.13 myristicin 抑制肺鳞癌细胞 NCI-H226 和 KNS-62 迁移和侵袭 Transwell 实验显示，EEPD1+DMSO 组 KNS-62 及 NCI-H226 细胞的细胞侵袭数均显著高于 EEPD1+myristicin 组；puro+DMSO 组 KNS-62 及 NCI-H226 细胞的细胞侵袭数均显著高于 puro+myristicin 组，即 myristicin 能够有效抑制肺鳞癌细胞的侵袭（均$P<0.000\ 1$），见插页ⅩⅫ图14A。EEPD1+DMSO 组 KNS-62 及 NCI-H226 细胞的细胞迁移数均显著高于 EEPD1+myristicin 组；puro+DMSO 组 KNS-62 及 NCI-H226 细胞的细胞迁移数均显著高于 puro+myristicin 组，即 myristicin 能够有效抑制肺鳞癌细胞的迁移（均$P<0.000\ 1$），见插页ⅩⅫ图14B。划痕试验结果显示，EEPD1+DMSO 组 KNS-62 及 NCI-H226 细胞的迁移率显著高于 EEPD1+myristicin 组；puro+DMSO 组 KNS-62 及 NCI-H226 细胞的迁移率均显著高于 puro+myristicin 组，即 myristicin 作用于 NCI-H226 和 KNS-62 细胞能抑制细胞的迁移（$P<0.01$，$P<0.000\ 1$），见插页ⅩⅫ图14C。

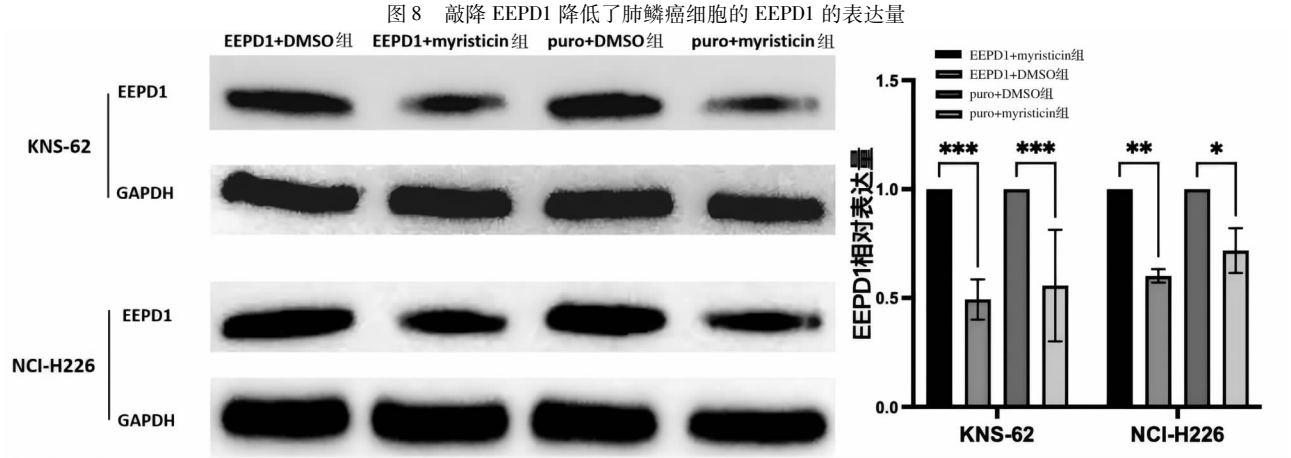
5 讨论

肺癌作为一种在临床实践中频繁出现的恶性肿瘤，在我国导致了大量病例及死亡，其影响程度在各类恶性肿瘤中居首。非小细胞肺癌中的肺鳞状细胞癌属于较为普遍的一种亚型，治疗上多依赖于化学疗法等保守手段，但这类方法容易促使患者产生抗药性，并且可能削弱疗效。研究指出，某些特定蛋白质在调控肿瘤细胞增殖、扩散、侵袭行为以及诱导化疗抵抗等方面扮演着至关重要的角色[11-12]。肿瘤的迁移与转移机制极为复杂，涵盖多个阶段和步骤，其中上皮-间充质转变（EMT）被认为是启动这一过程的关键因素之一[13]。除了参与癌症的发展之外，EMT 还与胚胎发育及器官纤维化现象紧密相关[14]。当发生EMT时，E-cadherin蛋白水平显著降低，而该蛋白主



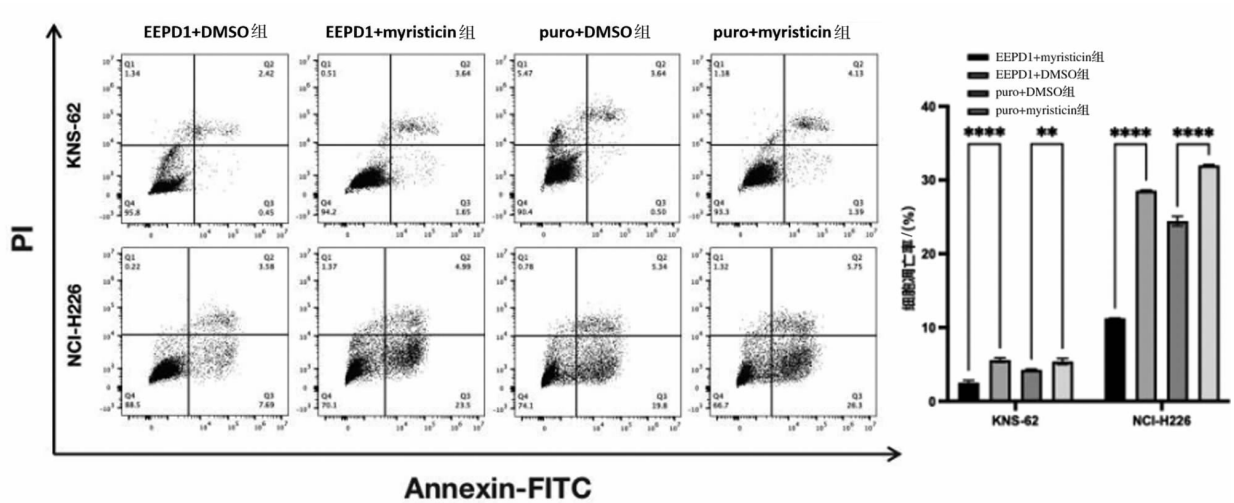
注：$*P<0.05$，$**P<0.01$，$***P<0.001$。

图8 敲降 EEPD1 降低了肺鳞癌细胞的 EEPD1 的表达量



注：$*P<0.05$，$**P<0.01$，$***P<0.001$。

图11 myristicin 逆转过表达 EEPD1 对肺鳞癌细胞 EEPD1 的表达量的影响



注：$**P<0.01$，$****P<0.0001$。

图13 myristicin 逆转过表达 EEPD1 对肺鳞癌细胞凋亡能力的影响

要负责保持细胞间的紧密结合[15]。随着 E－cadherin 表达量减少，细胞之间的黏附力减弱甚至消失，原本具有上皮特征的癌细胞逐渐丧失其固有的连接性和极性，变得更为松散，从而获得了更强的移动性和侵袭能力[16]。

同源重组修复是一种机制，它通过在5端切除受损 DNA，形成3单链 DNA，并利用其他姐妹染色单体上的同源序列进行修复[17]。这一过程对于维持基因组稳定性至关重要，特别是在细胞快速复制过程中可能导致的基因组不稳定情况下[18]。EEPD1 通过促进同源重组修复来支持基因组稳定性的维护。研究发现，在多种肿瘤中，与同源重组修复相关的基因如 BRCA1、RAD51 及 ERCC1 等呈现出高表达水平[19]。作为一种新近被识别的 DNA 末端5端核酸内切酶，EEPD1 能够对 DNA 末端实施切割，参与到 DNA 同源重组修复之中，有助于缓解人类 DNA 损伤期间的压力，尤其是在快速复制过程中产生的损伤，并且与癌症的发生存在关联[20-21]。值得注意的是，EEPD1 还能通过抑制经典非同源末端连接以及微量同源介导末端连接参与 DNA 损伤修复[22]。由于肿瘤细胞往往表现出代谢异常和检查点缺陷，它们面临着持续复制带来的压力。已有研究

表明,上调 EEPD1 在肿瘤细胞中的表达可帮助这些细胞在面对持续复制造成的损害时存活下来[23]。此外,EEPD1 还被认为能够调节胆固醇外排、肝脏脂肪酸合成以及脂质沉积,表明其在机体脂质代谢调控中扮演着角色[24]。另有研究指出,在结直肠癌样本中观察到了 EEPD1 表达显著增加的现象[25]。随着针对肿瘤精准治疗领域的不断深入探索,对肿瘤细胞基因调控及其生物学行为的研究变得尤为重要,因此进一步探究 EEPD1 与癌症之间的联系显得尤为关键。本研究发现,myristicin 处理 NCI-H226 和 KNS-62 细胞后能抑制其增殖。划痕实验显示,myristicin 作用于这两种细胞时可以抑制其迁移能力;Transwell 实验则表明,该化合物能够有效阻止肺鳞状细胞癌细胞的迁移与侵袭。流式细胞术分析结果显示,在 myristicin 作用下,NCI-H226 和 KNS-62 细胞中活细胞的比例减少而凋亡细胞比例增加,提示 myristicin 具有诱导这两种细胞凋亡的作用。此前的研究已经证明,EEPD1 蛋白在结直肠癌中表达升高,并在此类癌症的发展过程中发挥重要作用[24,26],这与当前研究的结果相吻合。

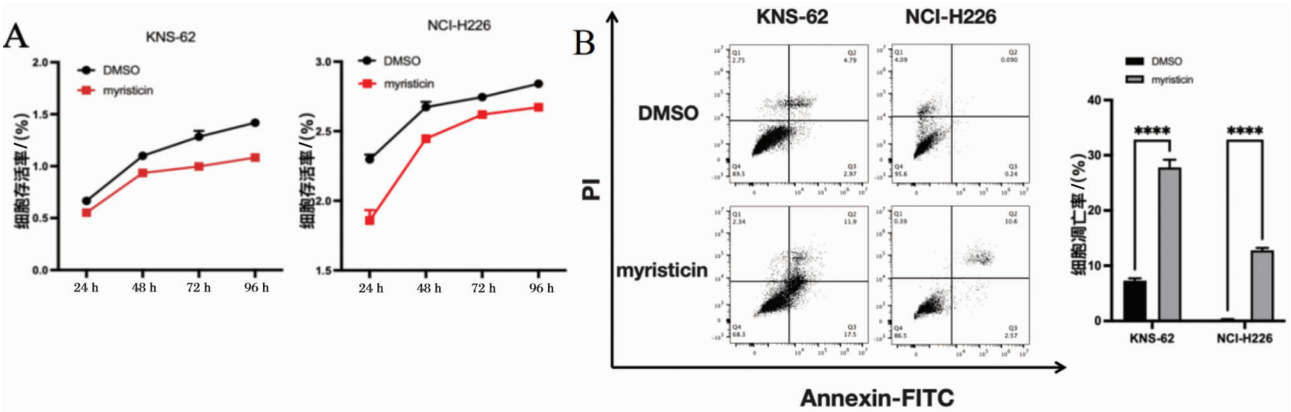
中医药在肿瘤治疗领域扮演着不可或缺的角色,尤其是在抑制肿瘤细胞增长及调节机体免疫功能方面作用显著[27]。近年来,关于中医药对抗癌症机制的研究日益丰富。肉豆蔻作为源自肉豆蔻科植物的干燥成熟种子,是一种兼具食用与药用价值的传统药材,其功效包括调理脾胃、燥湿化痰、温中散寒以及止泻等;此外,现代医学研究还揭示了肉豆蔻具备改善消化系统机能、抗癌、抗炎、抗菌、抗氧化和镇静安神等多种生物活性[28-29]。该药材含有 myristicin、榄香素、丁香酚等一系列有效成分。其中,myristicin 被认为具有潜在的抗癌特性。一项研究表明,myristicin 能够减缓荷瘤小鼠体内肿瘤的发展,并且可以有效地调整这些实验动物的免疫反应[30]。这一发现与本研究结论相符。综上所述,myristicin 能够在体外条件下抑制肺鳞状细胞癌的增长、迁移与侵袭行为,并促使此类癌细胞凋亡,因此 EEPD1 可能成为未来针对肺鳞癌治疗的一个新靶标。

参考文献

[1] 李欣,高国贞,冯佩玉,等. 肺癌患者免疫检查点抑制剂相关性肺炎发病率及危险因素的 Meta 分析[J]. 中国临床研究,2024,37(1):46-51.
[2] 张景暄,付庭吕,李宁,等.《肺癌的全球负担:当前状态和未来趋势》要点解读[J]. 中国胸心血管外科临床杂志,2024,31(1):17-23.
[3] 郭肖利,陈琼,徐慧芳,等. 2019 年河南省肺癌流行特征及 2010—2019 年变化趋势分析[J]. 中国肿瘤,2024,33(5):358-365.
[4] 黄振秋,黄子硕,张孟齐,等. 中国女性肺癌发病率的空间分布特征分析[J]. 中国农村卫生事业管理,2024,44(5):375-380.
[5] 王俊鹏,魏红,孙凯. 七氟醚对肺癌细胞生物学行为及对小鼠肺癌细胞肺转移的影响及可能作用机制[J]. 实用癌症杂志,2023,38(10):1567-1573.
[6] 明海霞,申明,陈彦文,等. 荧光素酶标记的 Lewis 肺癌细胞转移前微环境小鼠模型建立与评价[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2023,39(12):1083-1088.
[7] 汤舒,陈永刚,邹吉利. circLAMP1 靶向 miR-1193 调控肺癌细胞顺铂耐药性及机制[J]. 中国老年学杂志,2023,43(23):5851-5857.
[8] 周金玲,甘日植,王燕雪,等. 裂果薯皂苷Ⅰ抑制人肺癌细胞生长、迁移和侵袭的机制初探[J]. 广西医科大学学报,2023,40(12):1978-1984.
[9] 马可,南星梅,赵婧,等. 肉豆蔻的药理和毒理作用研究进展[J]. 中药药理与临床,2022,38(1):218-224.
[10] 姜美子,宗堪堪,李莉,等. 肉豆蔻提取物对慢性缺血缺氧模型大鼠脑膜及脑组织结构损伤的影响研究[J]. 中华中医药学刊,2020,38(4):56-58,262-264.
[11] 周方,王猛,程世钊,等. circFOXK2 靶向 miR-409-3p 调控肺癌细胞的增殖、迁移及侵袭[J]. 华中科技大学学报(医学版),2024,53(1):13-18.
[12] 李燕,刘杰,耿良,等. lncRNA SNHG16 靶向 PAR1 调控肺癌发生、发展的机制研究[J]. 重庆医学,2024,53(10):1454-1459,1466.
[13] 仇友政,宋政,杨利杰,等. M2 型肿瘤相关巨噬细胞通过调控肺癌细胞能量代谢重编程促进癌细胞的增殖、侵袭和迁移[J]. 现代肿瘤医学,2024,32(7):1215-1221.
[14] 韩齐齐,叶梦然,金齐力. 去甲泽拉木醛通过抑制 AKT/CREB 信号通路抑制非小细胞肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭[J]. 南方医科大学学报,2024,44(2):280-288.
[15] 王巍,王志武,于镓锐,等. lncR FOXD2-AS1 调控 miR-145-5p 对非小细胞肺癌细胞生物学特性的影响[J]. 山东医药,2024,64(10):45-48.
[16] 周薇,李金权,马文卓,等. 肺癌细胞外泌体诱导 M2 型巨噬细胞的极化促进肺癌细胞迁移和侵袭作用及其机制研究[J]. 中国免疫学杂志,2025,41(2):362-366,373.
[17] Enzymes and Coenzymes - Esterases. Researchers at indiana university school of medicine have reported new data on esterases(endonuclease eepd1 is a gatekeeper for repair of stressed replication forks)[J]. Chemicals Chemistry,2017,2017:3918.
[18] HROMAS R,KIM H S,SIDHU G,et al. The endonuclease EEPD1 mediates synthetic lethality in RAD52-depleted BRCA1 mutant breast cancer cells[J]. Breast Cancer Res,2017,19(1):122.
[19] 吴俊静,陈南琦,刘晓哲,等. 猪 EEPD1 基因变异筛选鉴定及其对猪肌内脂肪含量性状的影响[J]. 中国畜牧杂志,2022,58(8):147-152.
[20] 路晓梅. 血脂易感基因 EEPD1 及其相关 miR-320b 对脂质代谢和动脉粥样硬化的影响及机制研究[D]. 北京:北京协和医学院,2021.
[21] 刘庆伟,张辉,刘金光. EEPD1 在结直肠癌组织中的表达及临床意义[J]. 中国现代普通外科进展,2020,23(11):855-859.
[22] 陈微微. 全基因组关联研究 meta 分析搜寻中国人银屑病的易感基因[D]. 合肥:安徽医科大学,2021.
[23] 侯文彬. SPNS2 在 Borrmann 4 型胃癌中的调控作用及分子机制探究[D]. 沈阳:中国医科大学,2019.
[24] GUO Y,LI S J,SHI Z,et al. EEPD1 is identified as a predictor of prognosis and immune microenvironment through pan-cancer analysis and related to progression of colorectal cancer[J]. Heliyon,2024,10(7):e29285.
[25] 段春燕,何娜娜,朱蕾,等. 肉豆蔻醚抑制结肠癌细胞增殖、迁移和侵袭的作用及机制研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2020,22(4):907-913.
[26] EICHNER A,STAHLBERG S,SONNENBERGER S,et al. Influence of the penetration enhancer isopropyl myristate on stratum corneum lipid model membranes revealed by neutron diffraction and 2H NMR experiments[J]. Biochim Biophys Acta BBA Biomembr,2017,1859(5):745-755.
[27] 崔逸爽,刘雪静,洪紫谦,等. 基于生物信息学技术分析肺鳞癌预后风险模型及中药预测研究[J]. 中华中医药学刊,2023,41(10):64-69,268-272.
[28] 刘润润,孙爱清,于小钧,等. 肉豆蔻化学成分和药理作用研究进展及其质量标志物(Q-Marker)预测分析[J]. 中草药,2023,54(14):4682-4700.
[29] AL-RAWI S S,IBRAHIM A H,AHMED H J,et al. Therapeutic,and pharmacological prospects of nutmeg seed:a comprehensive review for novel drug potential insights[J]. Saudi Pharm J,2024,32(6):102067.
[30] 何乌云嘎,王秀兰,阿润. 肉豆蔻在中、蒙医药中的应用及药理作用概况[J]. 北方药学,2023,20(7):193-196.

肉豆蔻醚通过调控蛋白 EEPD1 抑制肺鳞癌细胞增殖、迁移和侵袭并促进凋亡的机制研究

(正文见 130 – 135 页)



注：＊＊＊＊$P<0.0001$。

图 3　myristicin 可以抑制肺鳞癌细胞 KNS – 62 和 NCI – H226 细胞增殖(A)并促进凋亡(B)

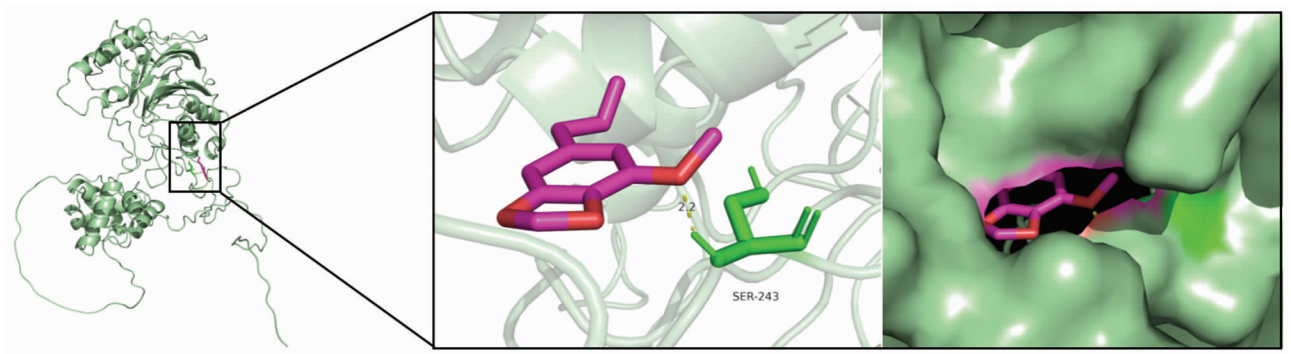


图 5　EEPD1 与 myristicin 的分子对接模式

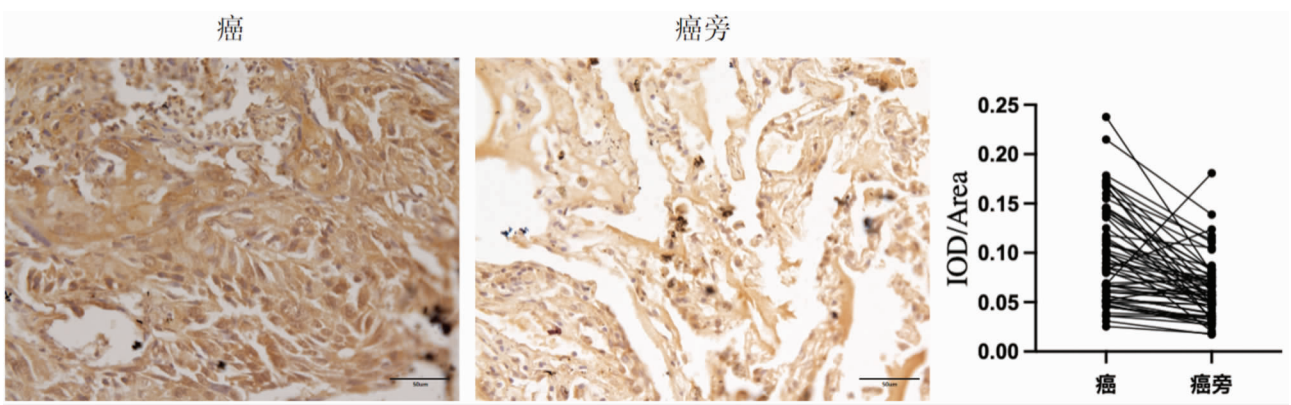
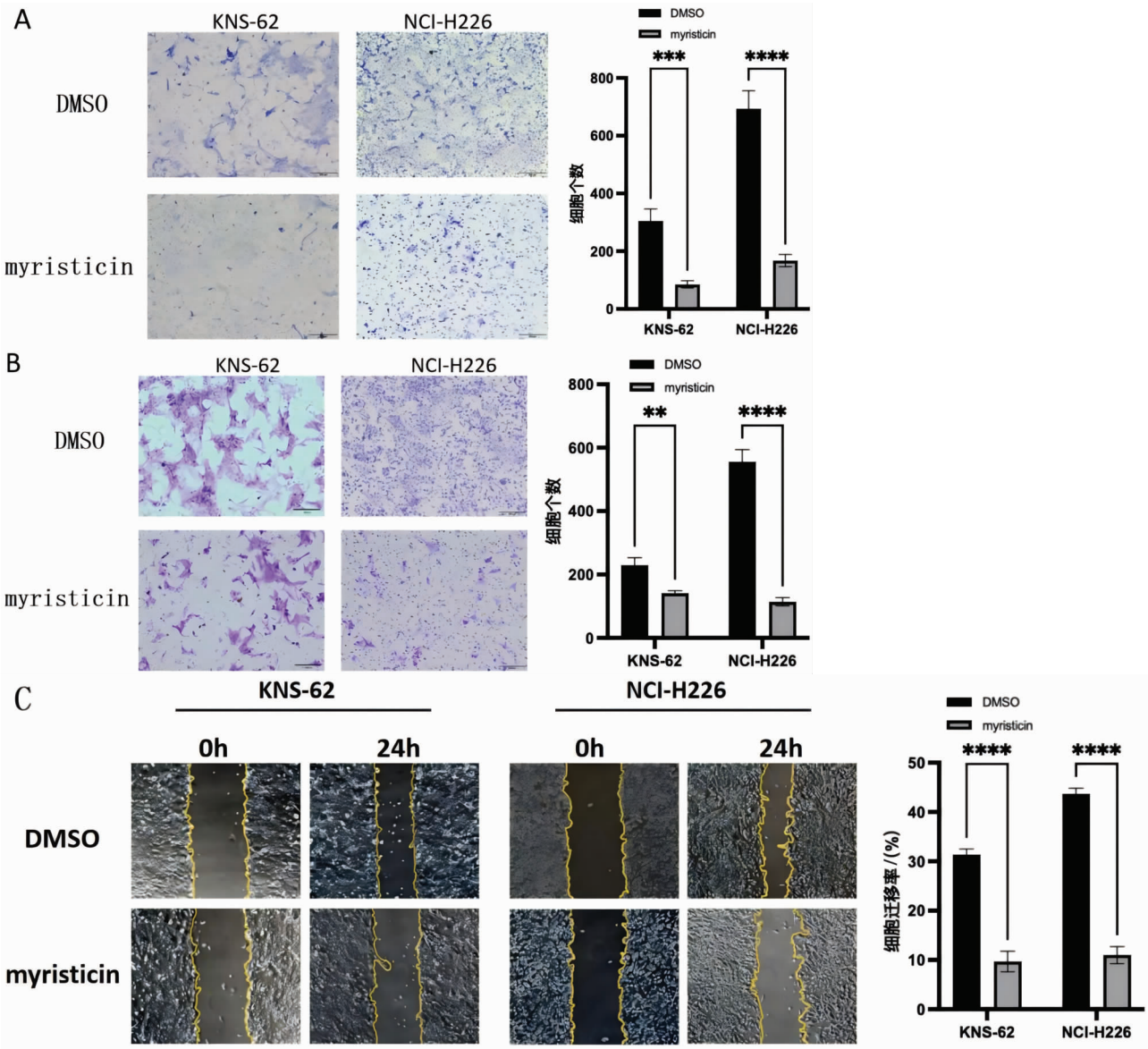
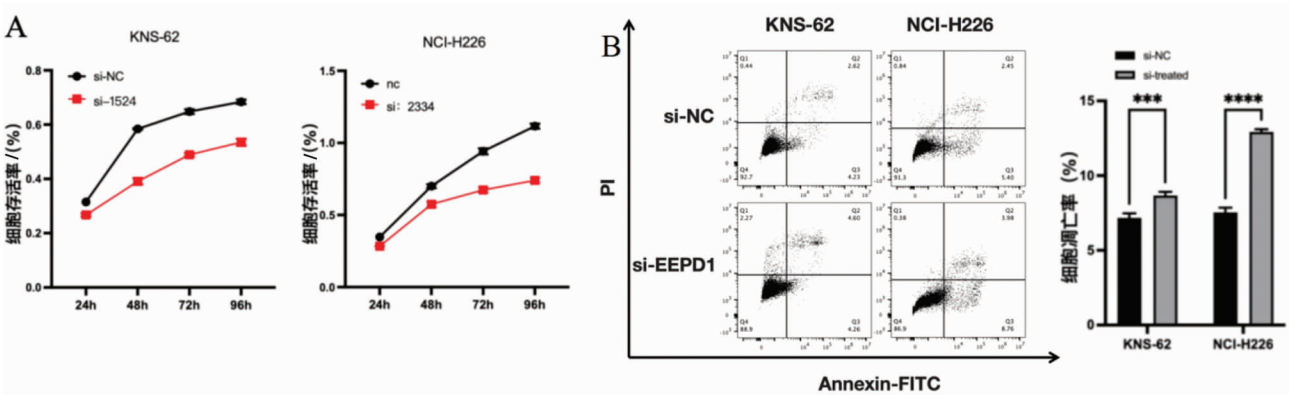


图 6　EEPD1 在肺鳞癌癌组织和癌旁组织中的表达



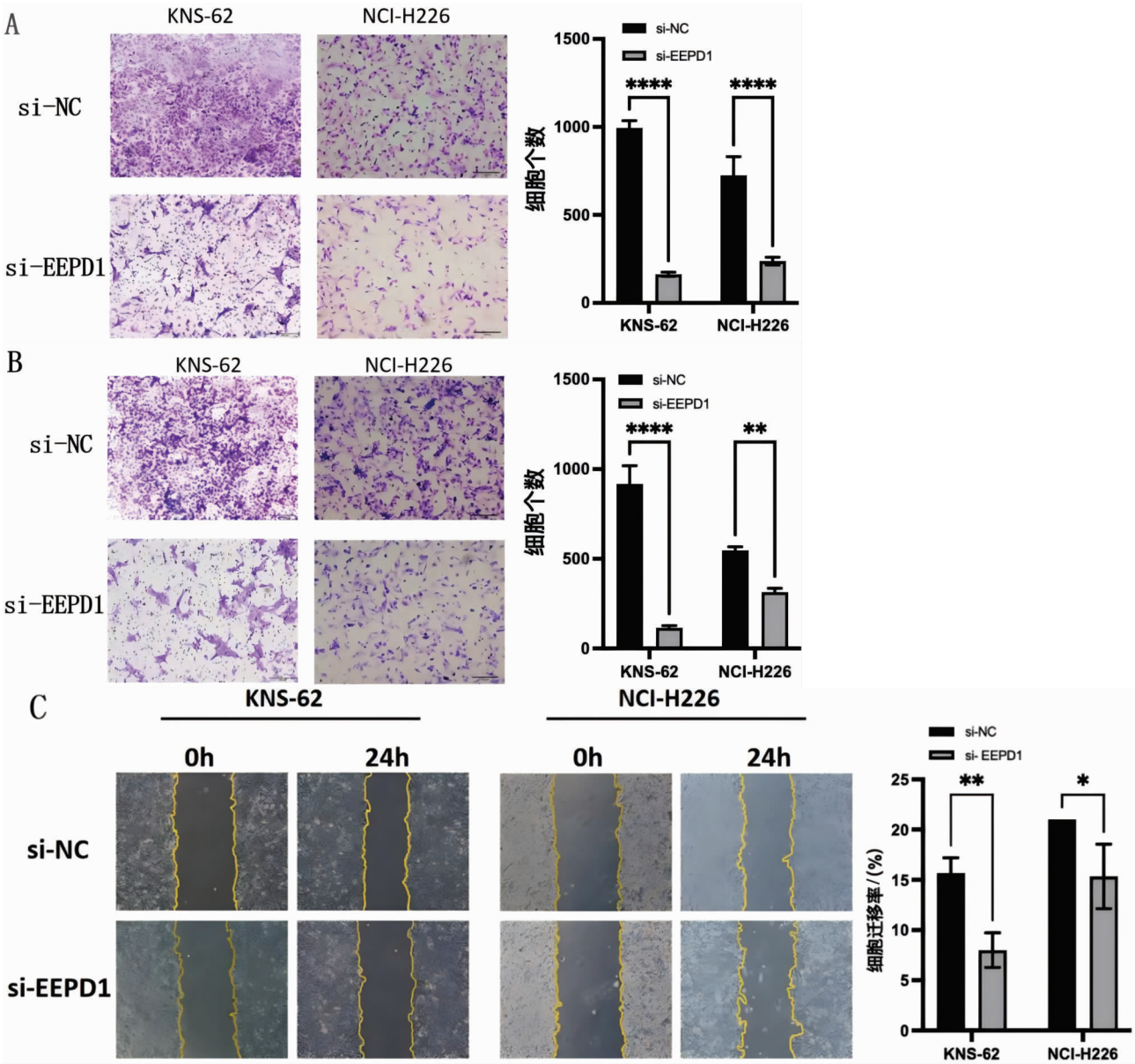
注：＊＊$P<0.01$，＊＊＊$P<0.001$，＊＊＊＊$P<0.0001$。

图 4　myristicin 抑制肺鳞癌细胞侵袭（A：结晶紫染色 ×100）迁移（B：结晶紫染色 ×100、C：×40）能力



注：＊＊＊$P<0.001$，＊＊＊＊$P<0.0001$。

图 9　敲降 EEPD1 抑制肺鳞癌细胞的增殖（A）并促进凋亡（B）



注：＊$P<0.05$，＊＊$P<0.01$，＊＊＊＊$P<0.0001$。

图 10　敲降 EEPD1 抑制肺鳞癌细胞侵袭（A：结晶紫染色×100）迁移（B：结晶紫染色×100、C：×40）能力

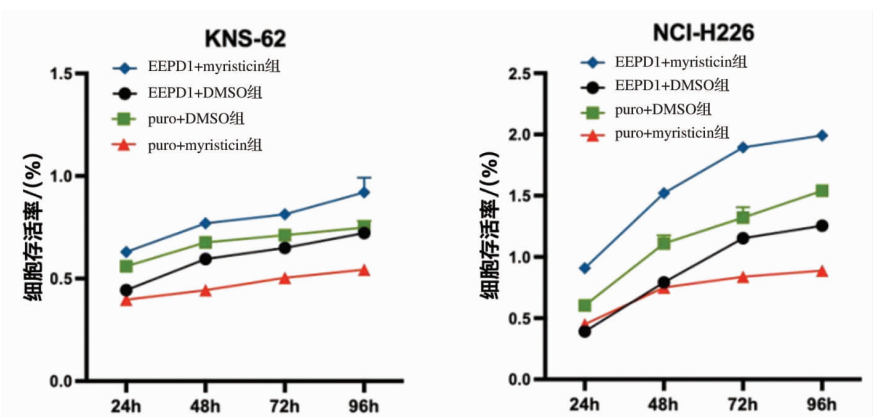
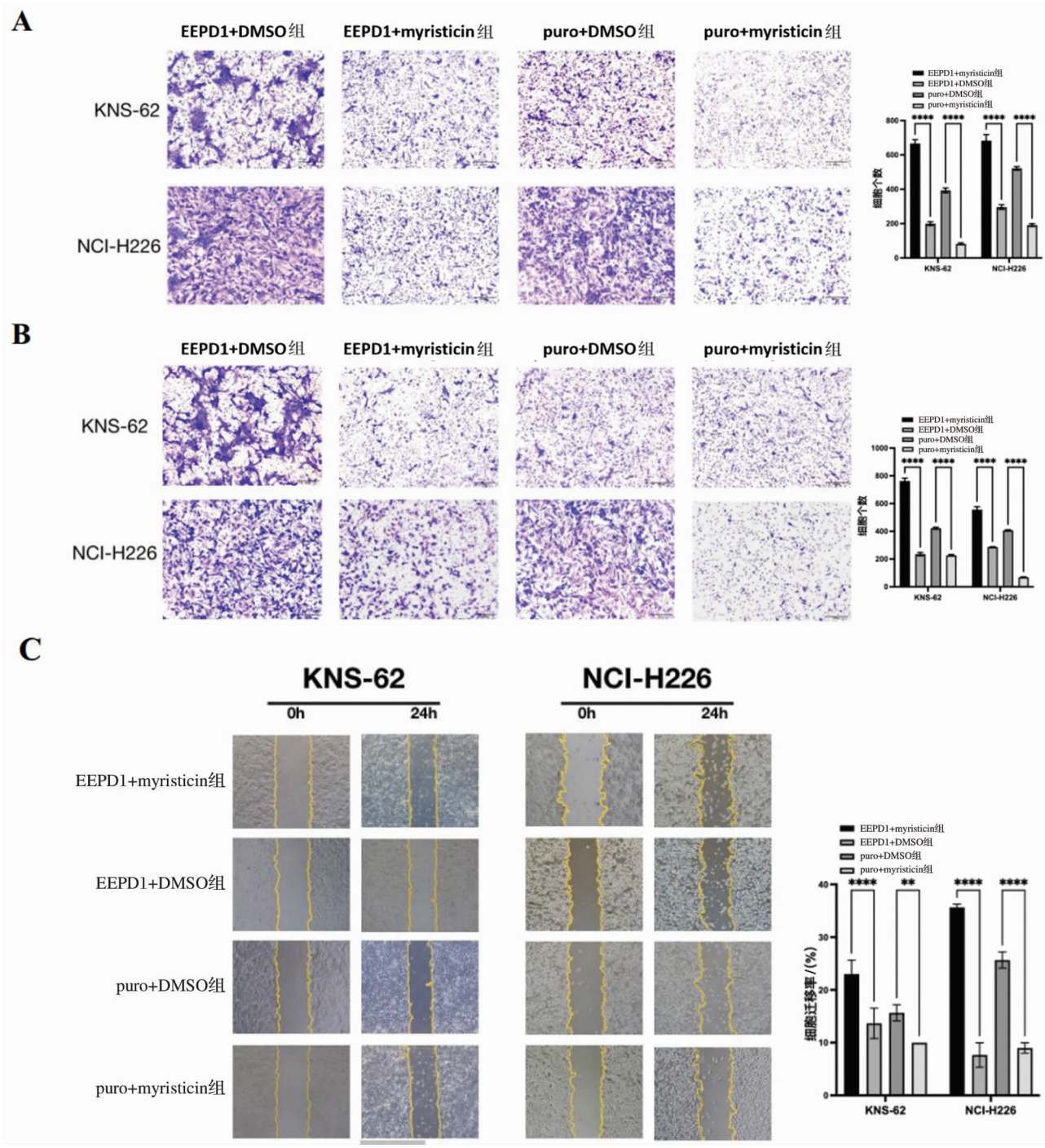


图 12　myristicin 逆转过表达 EEPD1 对肺鳞癌细胞增殖能力的影响



注：＊＊$P<0.01$，＊＊＊＊$P<0.000\ 1$。

图 14 myristicin 逆转过表达 EEPD1 对肺鳞癌细胞侵袭（A：结晶紫染色×100）迁移（B：结晶紫染色×100、C：×40）能力的影响