

扶正抗癌方联合吉非替尼对肺癌 A549 细胞的影响及机制

杨小兵 陈 晓 吴万垠 龙顺钦 陈世敏 韩守威

摘要 目的 观察扶正抗癌方联合吉非替尼对肺癌 A549 细胞生长、凋亡的影响,探讨其协同抗肿瘤的可能机制。**方法** 应用 MTT 法检测扶正抗癌方(0.211、0.316、0.474、0.711、1.067、1.6、2.4、3.6 mg/mL)和吉非替尼(3.95、5.92、8.18、13.33、20、30、45、67.5 $\mu\text{mol/L}$)对 A549 细胞增殖的影响;用流式细胞术观察对照组(完全培养液组)、中药组(扶正抗癌方,1.6 mg/mL)、西药组(吉非替尼,45 $\mu\text{mol/L}$)、联合组(扶正抗癌方 1.6 mg/mL + 吉非替尼 45 $\mu\text{mol/L}$)A549 细胞凋亡;用 Western blot 检测各组 EGFR、p-EGFR、EZH2、PPAR- γ 及 P53 蛋白表达。**结果** 扶正抗癌方及吉非替尼均有抑制肿瘤细胞增殖作用。扶正抗癌方联合吉非替尼干预后细胞凋亡率为(12.6 $\pm$ 4.5)%,明显高于扶正抗癌方(4.6 $\pm$ 0.7)%及吉非替尼(7.8 $\pm$ 2.7)%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组比较,联合组 p-EGFR、EZH2 下调($P < 0.05$),PPAR- γ 及 P53 蛋白上调($P < 0.05$),西药组及中药组 EZH2 下调($P < 0.05$),中药组 PPAR- γ 上调($P < 0.05$);与西药组比较,联合组 p-EGFR 下调($P < 0.05$),PPAR- γ 上调($P < 0.05$);与中药组比较,联合组 p-EGFR 下调($P < 0.05$)。**结论** 扶正抗癌方联合吉非替尼能显著抑制 A549 细胞的增殖生长,促使肿瘤细胞凋亡;其协同抗肿瘤活性的机制可能与下调 p-EGFR、EZH2 及上调 PPAR- γ 、P53 蛋白有关。

关键词 扶正抗癌方;吉非替尼;肺癌;协同作用

Effect of Fuzheng Kang'ai Recipe Combined Gefitinib on Lung Cancer A549 Cells and Its Mechanism Research YANG Xiao-bing, CHEN Xiao, WU Wan-yin, LONG Shun-qin, CHEN Shi-min, and HAN Shou-wei Department of Oncology, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou (510120)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Fuzheng Kang'ai Recipe (FKR) combined gefitinib on the proliferation and apoptosis of lung cancer A549 cells, and to study its potential synergistic mechanism with gefitinib. **Methods** The effects of FKR (0.211, 0.316, 0.474, 0.711, 1.067, 1.600, 2.400, 3.600 mg/mL) combined gefitinib (3.95, 5.92, 8.18, 13.33, 20.00, 30.00, 45.00, 67.50 $\mu\text{mol/L}$) on the proliferation of A549 cells were detected by MTT assay. The apoptosis of A549 cells in the control group (complete culture medium), FKR (1.6 mg/mL), gefitinib (45 $\mu\text{mol/L}$), and FKR plus gefitinib (1.6 mg/mL + 45 $\mu\text{mol/L}$) were detected by flow cytometry (FCM). Their expressions of epidermal growth factor receptor (EGFR), phosphorylating epidermal growth factor receptor (p-EGFR), enhancer of zeste homolog 2 (EZH2), peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ), and P53 protein in A549 cells were detected by Western blot. **Results** Both FKR and gefitinib could inhibit the proliferation of A549 cells. The apoptotic rate was 12.6% $\pm$ 4.5% in the FKR combined gefitinib group, obviously higher than that of the FKR group (4.6% $\pm$ 0.7%) and the gefitinib group (7.8% $\pm$ 2.7%), showing statistical difference ($P < 0.05$). Compared with the control group, the expressions of p-EGFR and EZH2 were significantly down-regulated ($P < 0.05$), the expressions of PPAR- γ and P53 protein were up-regulated in the FKR combined gefitinib group ($P < 0.05$); the expression of EZH2 was down-regulated in the gefitinib

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81273965,81503507);广东省自然科学基金-博士启动项目(No. 2015A030310245);广东省建设中医药强省科研课题(No. 201411104)

作者单位:广东省中医院肿瘤科(广州,510120)

通讯作者:吴万垠, Tel:020-81499399 转 8642, E-mail:wwanyin@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2016.11.1340

group and the FKR group ($P < 0.05$); the expression of PPAR- γ was up-regulated in the FKR group ($P < 0.05$). Compared with the gefitinib group, the expression of p-EGFR was down-regulated, and the expression of PPAR- γ was up-regulated in the FKR combined gefitinib group (both $P < 0.05$). Compared with the FKR group, the expression of p-EGFR was down-regulated in the FKR combined gefitinib group ($P < 0.05$). Conclusions Combination of FKR and gefitinib could significantly inhibit the proliferation and growth of A549 cells, and induce cell apoptosis. Its potential synergistic mechanism of anti-tumor activities might be associated with down-regulating mRNA expressions of p-EGFR and EZH2, and up-regulating protein expressions of PPAR- γ and P53.

KEYWORDS Fuzheng Kang'ai Recipe; gefitinib; lung cancer; synergistic effect

吉非替尼是表皮生长因子酪氨酸激酶生长因子受体抑制剂(epidermal growth factor receptor tyrosine kinases inhibitor, EGFR-TKI)。对于 EGFR 基因突变患者,其疗效约为 71.2%,优于化疗;而对于基因未突变者,其疗效仅为 1.1%^[1]。前期在临床发现,对于非优势人群,抗癌扶正方对吉非替尼可能有一定的增敏作用^[2]。为进一步了解其机制,本研究通过观察扶正抗癌方联合吉非替尼对肺癌 A549 细胞增殖、凋亡的影响,探索其协同作用机制。

材料与方法

1 肿瘤细胞株 A549 细胞购自上海生命科学院细胞库,由广东省中医科学院中心实验室传代培养。

2 药物 吉非替尼购自英国阿斯利康公司, DMSO 溶解至 500 mmol/L,保存于 -20°C 冰箱中备用。扶正抗癌方组成:太子参 30 g 白术 15 g 黄芪 30 g 炒薏苡仁 30 g 甘草 10 g 山慈菇 30 g 白花蛇舌草 30 g 龙葵 30 g 石见穿 30 g 八月札 30 g 蛇泡筋 30 g 莪术 15 g,饮片购自广州康美药业,将扶正抗癌方加水 750 mL,煎煮 1 h,后将药液外送制剂室制备冻干粉。将冻干粉用精确电子天平称取 2.5 g,溶解于 50 mL PBS,水温 80°C ,水浴 30 min,每隔 10 min 振荡,振荡至完全溶解,肉眼观察无颗粒;3000 r/min 离心 10 min,将上清 0.22 μm 滤器过滤除菌,分装至 1.5 mL EP 管,浓缩后混合,BCA 方法测上清提取物蛋白浓度,后分装保存于 -80°C 。

3 主要试剂及仪器 RPMI-1640 细胞培养液(No.NWJ0477)、0.25% EDTA 胰酶(No.25200-072)以及不含 EDTA 胰酶(No.25200-056)购自美国 GIBCO 公司,胎牛血清(No.SH20084.03)及细胞培养用 PBS 溶液(No.SH30809.018)购自美国 Hyclone 公司。MTT 粉剂(No.0793)购自美国 Amersco 公司,DMSO(No.D8370-50)购自上海索来宝公司。细胞周期及凋亡检测试剂盒(No.C34557)购自杭州联科

生物科技有限公司。Western blot 用抗体:磷酸化 EGFR(p-EGFR, tyr1068, No. 3777)、EGFR(No. 2085)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ , PPAR- γ , No. 2435)、P53(No. 2527)、磷酸化细胞外调节蛋白激酶(phospho-extracellular regulated protein kinases, p-ERK, No. 4370)、p-P38(No. 2527)、P38(No. 2527)均购自 cell signaling technology 公司(USA),内参 GAPDH(No. 2118S)和兔抗人二抗(No. 7074S)购自广州聚研生物科技有限公司。抗体洗脱液(No. P0023C)购自碧云天生物公司。曝光用胶片购自柯达公司。HEPA3111 细胞培养箱(赛默飞世尔科技有限公司,上海),METTLE TOLEDO 精确电子天平(型号:AB104-L,上海甄明科学仪器有限公司),NIKON TE300 倒置显微镜[尼康仪器(上海)有限公司,上海],Leica DMI3000 荧光倒置显微镜(Leica 公司,德国),酶标仪(北京普朗生物技术有限公司),贝克曼库尔特流式细胞检测仪(型号:FC500,美国贝克曼库尔特有限公司),ESCO 超净工作台(型号:AVC-6A1,新加坡艺思高科技有限公司,中国上海)。

4 检测指标及方法

4.1 MTT 染色法测定肿瘤细胞增殖 取对数生长长期的 A549 细胞,消化,1 000 r/min 离心去上清,调整细胞浓度至 1 000、2 000、3 000、4 000、5 000、6 000、7 000 个/100 μL 细胞悬液 100 μL 到 96 孔板,每个浓度设 6 个复孔。细胞在 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养。待细胞完全贴壁后,将扶正抗癌方(0.211、0.316、0.474、0.711、1.067、1.6、2.4、3.6 mg/mL)和吉非替尼(3.95、5.92、8.18、13.33、20、30、45、67.5 $\mu\text{mol/L}$)按终浓度配置并加入 96 孔板,设置 8 个浓度,每个浓度设 6 个复孔,培养 24、48、72 h 后加入 RPMI-1640 细胞培养液和 MTT 混合液(100:10),在细胞培养箱继续培养。4 h 后去上清,加入 150 μL DMSO 溶解,振荡混匀后酶标仪检测吸光度(OD 值)。

细胞存活率(%) = (给药组 OD 均值 - 调零孔 OD 值) / (对照组 OD 均值 - 调零孔 OD 值) × 100%。

4.2 流式细胞术检测细胞凋亡 取对数生长期的 A549 细胞,接种于六孔板。常规培养 24 h 后分组:对照组(完全培养液组)、中药组(扶正抗癌方, 1.6 mg/mL)、西药组(吉非替尼, 45 μmol/L)、联合组(扶正抗癌方 1.6 mg/mL + 吉非替尼 45 μmol/L)。加药干预 48 h 后弃去培养液,用不含 EDTA 的胰酶消化, 2 000 r/min 离心 5 min,去上清,PBS 洗涤 2 遍去上清。加入结合缓冲液 500 μL, 10 μL PI 及 5 μL AnnexinV-FITC,轻轻混匀细胞,避光孵育 5 min,用流式细胞仪测细胞凋亡,细胞凋亡率(%) = 凋亡细胞计数/所有细胞计数 × 100%。

4.3 Western blot 法检测 EGFR、zeste 基因增强子同源物 2 (Enhancer of zeste homolog 2, EZH2)、PPAR-γ 及 P53 信号通路相关蛋白表达 应用 Western blot 法检测 A549 细胞的 EGFR、p-EGFR、EZH2、PPAR-γ 及 P53 相关蛋白表达。将 A549 细胞接种于六孔板中,常规培养 24 h,分组同 4.2。加入药物干预 24 h 后弃上清,用预冷的 PBS 冲洗 3 次,加入蛋白裂解液,冰上裂解 1 h, 4 °C 12 000 r/min 离

心 15 min,取上清,应用 BCA 分析试剂盒测定蛋白浓度,50 μg 蛋白质在 SDS-PAGE 电泳分离,半干法转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,一抗 4 °C 过夜,TBST 洗膜 3 次,加入二抗室温孵育 2 h,TBST 洗膜 3 次,加入 ECL 发光液暗室中 X 线显影,图像扫描,以 GAPDH 蛋白的表达为内参照,应用凝胶图像分析软件分析目标条带灰度值。

5 统计学方法 应用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 扶正抗癌方及吉非替尼对 A549 细胞增殖抑制作用比较(图 1) 不同浓度扶正抗癌方对 A549 细胞在不同时间点(24、48 及 72 h)均有抑制作用,随着浓度的增加,其对 A549 细胞生长抑制作用不断增强,半数抑制浓度(IC₅₀)为 1.51 mg/mL。不同浓度吉非替尼对 A549 细胞均有抑制作用,其抑制作用随着浓度的增加而增强,IC₅₀为 50.35 μmol/L。

2 扶正抗癌方及吉非替尼对 A549 细胞凋亡影响比较 流式细胞术检测凋亡结果显示,对照组、扶正

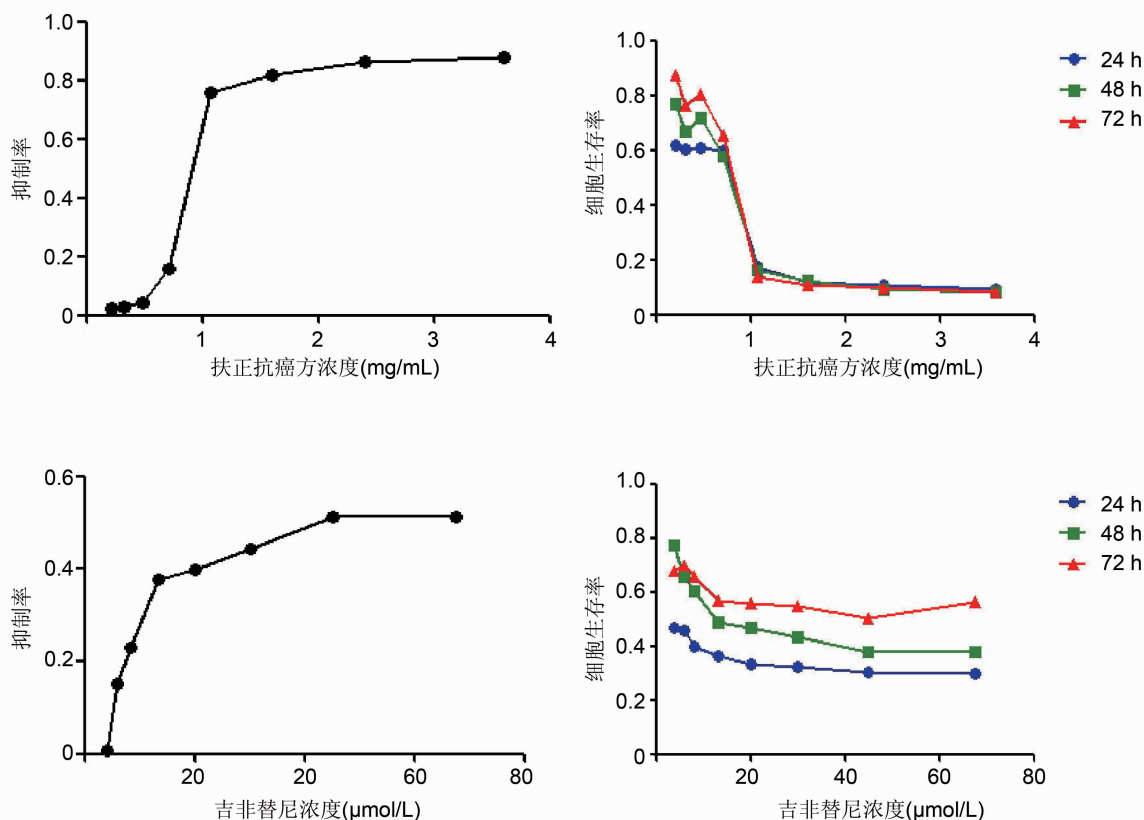


图 1 扶正抗癌方、吉非替尼对 A549 细胞增殖抑制作用比较

抗癌方、吉非替尼及扶正抗癌方联合吉非替尼处理 48 h 后凋亡率分别为 $(3.1 \pm 0.3)\%$ 、 $(4.6 \pm 0.7)\%$ 、 $(7.8 \pm 2.7)\%$ 及 $(12.6 \pm 4.5)\%$ ，与对照组、西药组及中药组比较，联合组细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$)。

3 各组 EGFR、p-EGFR、EZH2、PPAR- γ 及 P53 蛋白表达比较 (图 2) 与对照组比较，联合组 p-EGFR、EZH2 下调 ($P < 0.05$)，PPAR- γ 及 P53 蛋白上调 ($P < 0.05$)，西药组及中药组 EZH2 下调 ($P < 0.05$)，中药组 PPAR- γ 上调 ($P < 0.05$)；与西药组比较，联合组 p-EGFR 下调 ($P < 0.05$)，PPAR- γ 上调 ($P < 0.05$)；与中药组比较，联合组 p-EGFR 下调 ($P < 0.05$)。

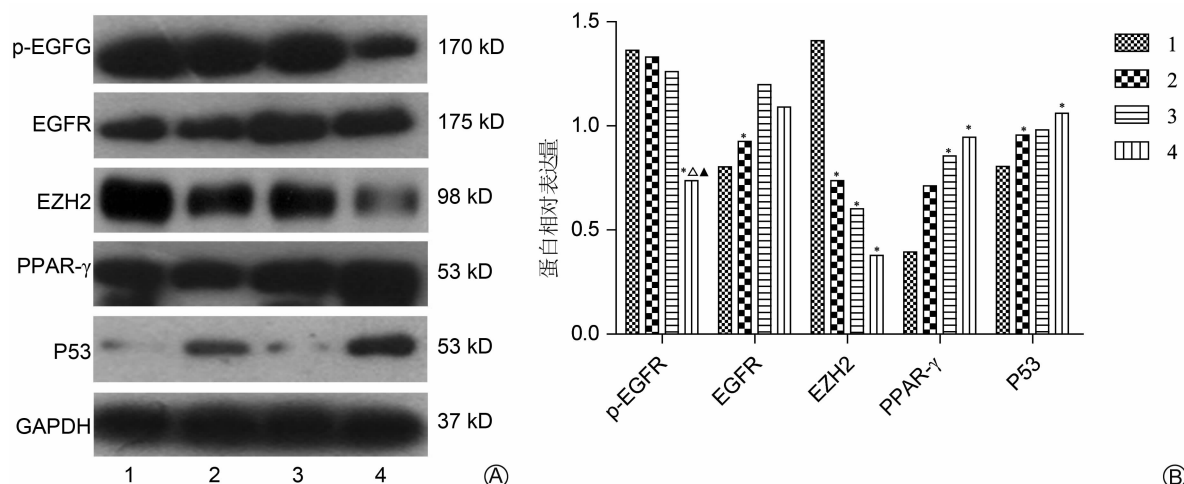
讨 论

肺癌为目前人类因癌症死亡的主要原因之一，其中非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 约占 85% ~ 90%，大部分在临床确诊时属于中晚期。目前以铂类为基础的联合化疗仍是晚期 NSCLC 的标准治疗方案，但总体疗效不尽如人意，中位生存时间多为 6.9 ~ 11.3 个月^[3]，且毒副反应大。分子靶向药物 (代表药吉非替尼) 主要通过作用于 EGFR 受体而抑制下游 ERK 及 PI3K 等信号转导通路从而达到抑制肿瘤细胞迁移、增殖、血管生成以及促进凋亡作用。EGFR 基因是否突变是决定吉非替尼疗效的重要因素，对于 EGFR 基因突变的晚期 NSCLC 患者^[4,5]，吉非替尼组的疾病无进展生存时间明显长于铂类为基础的双药方案化疗，但目前存在的问题是 EGFR 突变率不高，在中国其突变率约为 30%^[6]，在

欧美人群更低。此外，大部分患者会出现获得性耐药，从而导致治疗失败，其机制与 T790M 及 c-MET 扩增等有关^[7,8]。吉非替尼治疗基因未突变的 NSCLC 疗效差，故其总体疗效仍有待提高。中医药对化疗有一定的增效作用已在临床上被证实，中医药对靶向药物是否也有增效作用是很多学者关注的问题。

广东省中医院对 217 例晚期 NSCLC 进行回顾性分析发现，晚期 (ⅢB 及Ⅳ期) 非小细胞肺癌中医证型以 (肺脾) 气虚痰湿型为主^[9]，吴万垠教授根据肺癌的证型分布，采用“辨证 + 辨病”的中医治疗肿瘤原则，辨证以太子参、黄芪、白术、甘草以健脾益气、化湿祛瘀，意在补益后天之本，有培土生金之效，以扶正抗癌。辨病以炒薏苡仁、山慈菇、白花蛇舌草、龙葵、石见穿、八月扎、蛇泡筋、莪术以清热解毒、祛瘀散结抗癌。全方扶正与祛邪相结合，辨病与辨证相结合^[10]。扶正则重视补益脾肺之气，祛邪则以清热解毒、祛瘀散结抑瘤为主，上药合用共奏扶正抗癌之功。本课题组前期临床使用扶正抗癌方联合吉非替尼治疗晚期 NSCLC 取得一定的疗效，扶正抗癌方联合吉非替尼的总体疗效优于以往文献报道^[2,11]，因此笔者推测，扶正抗癌方可能通过抑制 EGFR 或其下游信号通路蛋白而增加吉非替尼的疗效。本研究选取 A549 细胞为研究对象，A549 细胞无 EGFR 基因相关突变，对吉非替尼治疗敏感度低。

MTT 结果显示，不同浓度的扶正抗癌方及吉非替尼对 A549 细胞在不同时间点均有抑制作用，随着浓度的增加，其对 A549 细胞生长抑制作用不断增强。流式细胞术结果示扶正抗癌方及吉非替尼对 A549 细



注: A 为蛋白表达; B 为各组蛋白表达比较; 1 为对照组; 2 为西药组; 3 为中药组; 4 为联合组; 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与西药组比较, $\Delta P < 0.05$; 与中药组比较, $\Delta P < 0.05$

图 2 各组 EGFR、p-EGFR、EZH2、PPAR- γ 及 P53 蛋白表达比较

胞凋亡有促进作用,二者联合后细胞凋亡率明显增加。为探索扶正抗癌方联合吉非替尼协同抗肿瘤作用的可能机制,采用 Western blot 检测 EGFR、p-EGFR、EZH2、PPAR- γ 及 P53 蛋白表达。结果提示扶正抗癌方联合吉非替尼对 EGFR 蛋白无明显影响,但能明显下调 A549 细胞 p-EGFR 及 EZH2 蛋白表达,并上调 PPAR- γ 及 P53 蛋白表达。EGFR 属于受体酪氨酸激酶家族,其激活促进肿瘤细胞增殖、迁移及血管生成;EZH2 是组蛋白 H3K27 的甲基转移酶,通过染色体重塑、核小体修饰以及与其他转录因子相互作用等对靶基因转录的后生性调节起重要作用,EZH2 具有致癌基因特性,EZH2 过表达会增强癌细胞分化和侵袭能力并促进肿瘤形成^[12],敲除 EZH2 则明显减少癌细胞增殖,促进凋亡并能在活体内抑制肿瘤转移,EZH2 被证实在包括肺癌在内的多种恶性肿瘤中均高表达,与肿瘤转移和预后不佳相关^[13]。本研究发现扶正抗癌方联合吉非替尼能明显下调 p-EGFR 及 EZH2,说明扶正抗癌方能协同吉非替尼抑制 EGFR 信号通路,增强吉非替尼疗效;二者联合能通过抑制 EZH2 激酶而降低肿瘤侵袭性。PPAR- γ 激活后通过多种途径调控癌基因和抑癌基因,抑癌基因 PTEN 有可能参与此途径^[14],PPAR- γ 激动剂具有抑制肿瘤细胞生长,诱导肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤血管生成,降低肿瘤侵袭力等作用^[15];本研究发现扶正抗癌方联合吉非替尼较吉非替尼单药能明显上调 PPAR- γ ,PPAR- γ 上调后能抑制肿瘤血管生成、降低肿瘤侵袭力,提示联合用药能通过上调 PPAR- γ 而协同抗肿瘤。P53 作为抑癌基因,能抑制肿瘤生长^[16]。本研究发现扶正抗癌方联合吉非替尼能上调 P53 表达,说明扶正抗癌方联合吉非替尼能通过上调抑癌基因的表达而控制肿瘤生长。

综上,扶正抗癌方联合吉非替尼能显著抑制 A549 细胞的增殖生长,促使肿瘤细胞凋亡;扶正抗癌方增强吉非替尼抗肿瘤作用的机制可能与下调 p-EGFR 信号通路有关。此外,扶正抗癌方联合吉非替尼能通过下调 EZH2 蛋白及上调 PPAR- γ 、P53 而协同抗肿瘤。

参 考 文 献

- [1] Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or Carboplatin-Paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma[J]. Lancet, 2009, 361(10): 947-957.
- [2] 吴万垠, 杨小兵, 龙顺钦, 等. 扶正抗癌方联合吉非替尼治疗晚期非小细胞肺癌优势人群[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(9): 2152-2154.
- [3] Kubota K, Kawahara M, Ogawara M, et al. Vi-

norelbine plus Gemcitabine followed by Docetaxel versus Carboplatin plus paclitaxel in patients with advanced non-small-cell lung cancer: a randomized, open-label, phase III study [J]. Lancet, 2008, 9(12): 1135-1142.

- [4] Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, et al. Gefitinib versus Cisplatin plus Docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial[J]. Lancet Oncol, 2010, 11(2): 121-128.
- [5] Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR [J]. N Engl J Med, 2010, 362(25): 2380-2388.
- [6] 钟文昭. 中国 NSCLC 人群 EGFR-TKI 治疗预测因子及 EGFR 下游信号通路机制研究 [D]. 广州: 中山大学, 2007.
- [7] Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, et al. EGFR mutation and resistance of non small-cell lung cancer to Gefitinib [J]. N Engl J Med, 2005, 352(8): 786-792.
- [8] Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. MET amplification leads to Gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling [J]. Science, 2007, 316(5827): 1039-1043.
- [9] 杨小兵, 龙顺钦, 邓宏, 等. 207 例晚期非小细胞肺癌中医证型分布特点 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(3): 188-190.
- [10] 吴万垠. 中医药在恶性肿瘤治疗中的“替代”与“补充”作用 [J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(1): 111-114.
- [11] Yang XB, Wu WY, Long SQ, et al. Effect of Gefitinib plus Chinese herbal medicine (CHM) in patients with advanced non-small-cell lung cancer: a retrospective case control study [J]. Complement Ther Med, 2014, 22(6): 1010-1018.
- [12] Simon JA, Lange CA. Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics [J]. Mutant Res, 2008, 647(1-2): 21-29.
- [13] Collett K, Eide GE, Arnes J, et al. Expression of enhancer of zeste homologue 2 is significantly associated with increased tumor cell proliferation and is a marker of aggressive breast cancer [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(4): 1168-1174.
- [14] Han SW, Roman J. Rosiglitazone suppresses human lung carcinoma cell growth through PPAR- γ -dependent and PPAR- γ -independent signal pathways [J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(2): 430-437.
- [15] 周彦明, 殷正丰, 杨甲梅. PPAR- γ 激动剂抗肿瘤作用的研究进展 [J]. 第二军医大学学报, 2005, 26(11): 1290-1292.
- [16] Stieve T. The p53 family in differentiation and tumorigenesis [J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(3): 165-168.

(收稿: 2014-07-16 修回: 2016-08-01)