

· 基础研究 ·

# 益肺逐积方联合环磷酰胺对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤组织 CD151、整合素 $\alpha_3$ 及 $\beta_1$ mRNA 表达水平的影响

张 娜<sup>1</sup> 刘学芳<sup>2</sup> 蒋时红<sup>1</sup> 潘晓丽<sup>1</sup>

**摘要** 目的 研究益肺逐积方联合环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤组织 CD151、整合素(integrin, ITG) $\alpha_3$ 及 ITG  $\beta_1$  mRNA 表达水平的影响。方法 C<sub>57</sub>BL/6 小鼠右前肢腋窝皮下接种 Lewis 细胞建立肺癌小鼠模型,随机分为模型组、CTX 组、益肺逐积方组、联合用药组,每组 10 只,造模次日益肺逐积方组和模型组分别给予益肺逐积方(14.95 g/kg)和等体积生理盐水灌胃,1 次/d;CTX 组在造模后 72 h 和 10 d 腹腔注射 CTX(40 mg/kg);联合用药组在 CTX 组基础上灌胃益肺逐积方。给药期间观察小鼠状态及成瘤情况,给药 14 d 后测量体重、瘤体积计算抑瘤率;常规石蜡切片检测肿瘤组织病理变化;荧光定量 PCR 检测肿瘤组织 CD151、ITG  $\alpha_3$ 及 ITG  $\beta_1$  mRNA 表达。结果 与模型组比较,益肺逐积方组与联合用药组肿瘤体积减小( $P < 0.05$ );抑瘤率由高到低依次为:联合用药组、益肺逐积方组、CTX 组。病理学检测结果显示肿瘤组织呈实片状排列并向骨骼肌浸润,肿瘤细胞沿细支气管壁及肺泡壁弥漫性生长。与模型组比较,益肺逐积方组、CTX 组及联合用药组 CD151 mRNA 表达降低( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ),联合用药组 ITG  $\alpha_3$  mRNA 表达量降低( $P < 0.05$ )。与 CTX 组比较,益肺逐积方组 ITG  $\beta_1$  mRNA 的表达量降低( $P < 0.05$ )。结论 益肺逐积方与 CTX 联合用药可更有效抑制 Lewis 肺癌小鼠肿瘤生长,益肺逐积方可通过下调肿瘤组织 CD151 和 ITG  $\alpha_3$ 及 ITG  $\beta_1$  mRNA 表达水平,达到治疗肺癌的功效。

**关键词** 益肺逐积方;环磷酰胺;Lewis 肺癌小鼠模型;CD151 基因;整合素  $\alpha_3$ ;整合素  $\beta_1$

Effect of Yifei Zhuji Formula Combined with Cyclophosphamide on CD151, ITG  $\alpha_3$  and ITG  $\beta_1$  mRNA Expression in Tumor of Mice with Lewis Lung Cancer ZHANG Na<sup>1</sup>, LIU Xue-fang<sup>2</sup>, JIANG Shi-hong<sup>1</sup>, and PAN Xiao-li<sup>1</sup> 1 College of Basic Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou (450046); 2 Scientific Research Center, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou(450046)

**ABSTRACT** Objective To explore the effect of Yifei Zhuji Formula(YFZJF) combined with Cyclophosphamide(CTX) on CD151 and integrin (ITG)  $\alpha_3$  and ITG  $\beta_1$  mRNA expression in tumor tissue of mice with Lewis lung cancer. Methods After the mice model of lung cancer was established by subcutaneous inoculation of Lewis cells in the right forelimb, the C<sub>57</sub>BL/6 mice were randomly divided into 4 groups, i.e., model group, CTX group, YFZJF group and combination group, 10 in each group. The mice in YFZJF group and model group were given YFZJF (14.95 g/kg) or normal saline respectively by gavage once a day. CTX group mice received CTX (40 mg/kg) at 72 h and the 10th day after inoculation by intraperitoneal injection. Combination group were given CTX combined with YFZJF (14.95 g/kg). The status of mice and tumor formation was observed. The mice were sacrificed after treatment for 14 days, the body mass and tumor volume were measured as well as the tumor inhibition rate was calculated. Tumor tissue pathological changes were observed by routine paraffin section technique. The expression of CD151, ITG  $\alpha_3$  and ITG  $\beta_1$  mRNA were determined by Real-time PCR. Results Compared with model group, the tumor

基金项目:河南省科技厅基础与前沿技术研究项目(No. 152300410109);郑州市科技局科技攻关项目(No. 20150307)

作者单位:1.河南中医药大学基础医学院(郑州 450046);2.河南中医药大学科研实验中心(郑州 450046)

通讯作者:蒋时红, Tel: 0371-65962987, E-mail: 616621312@qq.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20180324.013

volume was decreased significantly in YFZJF group and combination group ( $P < 0.05$ ), and the inhibitory rate order from high to low were combination group, YFZJF group, CTX group. Pathology results showed that tumor tissue arranged in flake shape and infiltrated into skeletal muscle, the tumor cells appeared the diffuse growth along the wall of bronchioles and alveolar. The expressions of CD151 mRNA in YFZJF, CTX and combination groups were decreased significantly compared with model group ( $P < 0.01, P < 0.05$ ), and ITG  $\alpha_3$  mRNA in combination group was also decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with CTX group, the expression of ITG  $\beta_1$  mRNA in YFZJF group was decreased ( $P < 0.05$ ). Conclusion YFZJF combined with CTX treatments can suppress the growth of Lewis lung cancer effectively, and the effect of YFZJF may be involved in down-regulating the expression of CD<sub>151</sub>, ITG  $\alpha_3$  and ITG  $\beta_1$  mRNA in tumor tissue.

**KEYWORDS** Yifei Zhuji Formula; Cyclophosphamide; Lewis lung cancer mice; CD151; ITG  $\alpha_3$ ; ITG  $\beta_1$

2016 年收集全国各肿瘤登记地区的统计数据显示, 全国恶性肿瘤发病第一位的是肺癌, 每年新发病例约 73.3 万<sup>[1]</sup>, 肺癌在我国的发病率和死亡率一直居高不下, 这是由于肺癌易于转移的特性导致的<sup>[2]</sup>, 目前许多与肺癌侵袭、转移相关分子, 以及相关途径的研究成为肺癌研究的热点, CD151 和整合素 (integrin, ITG)  $\alpha_3$  及 TIG  $\beta_1$  分别为四跨膜素家族 (transmembrane 4 super family, TM4SF) 和整合素家族中的重要成员, 与肿瘤的生长、迁移及血管生成作用密切相关<sup>[3]</sup>。

益肺逐积方系河南省中医药研究院附属医院在临床治疗肺癌过程中确立的有效方药, 临床疗效确切<sup>[4]</sup>, 为深入讨论该方治疗肺癌的作用机制, 本文选用 Lewis 肺癌小鼠模型, 对益肺逐积方单独使用和联合化疗药使用进行疗效观察, 通过检测肿瘤体积, 病理学观察, 肿瘤组织 CD151、ITG  $\alpha_3$  及 TIG  $\beta_1$  mRNA 的表达情况检测, 探讨该方治疗肺癌的可能存在的作用机制。

## 材料与方法

1 动物及细胞株 C<sub>57</sub>BL/6 雄性小鼠, 5 周龄, 体重 (20 ± 2) g, 北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物质量合格证: SCXK (京) 2012 - 0001。动物实验通过河南中医药大学实验动物伦理委员会审核, No. DWLL17010044。于河南中医药大学动物实验中心饲养, 环境温度 (20 ± 2) °C, 相对湿度 40%。细胞株: 小鼠 Lewis 肺癌细胞株 (Lewis lung cancer cell line, LLC) 由中国科学院生命科学研究院细胞库提供 (上海), 细胞目录号: TCM 7。

2 药物及试剂 益肺逐积方 (由露蜂房 15 g、蛤蚧粉 15 g、半枝莲 30 g、生半夏 10 g、三七粉 10 g、西洋参 10 g、百合 15 g、川贝 10 g) 饮片购自

河南中医药大学第三附属医院, 其中露蜂房、蛤蚧粉、半枝莲购自河南千方药业有限公司 (批号: 160401QF、160201QF、150701QF), 生半夏购自安徽德昌药业有限公司 (批号: 160507), 三七粉购自河南瑞龙国药有限公司 (批号: 16030202), 西洋参、川贝购自安徽三义堂药业有限公司 (批号: 160401、141202、160301), 所购生药均由该院中药房鉴定和质量控制, 由该院制剂科制成浓度为 0.92 g/mL 的水煎液; 环磷酰胺, 江苏盛迪医药有限公司 (批号: 15101425)。RNA 抽提试剂盒, 北京索博莱科技有限公司 (批号: 40267142); HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit, 南京诺唯赞生物科技有限公司 (批号: 7E010F6); AceQ qPCR SYBR Green Master Mix, 南京诺唯赞生物科技有限公司 (批号: 7E040G6)。

3 主要仪器 超净工作台 SW-VJ-2F 型 (苏州苏洁净华有限公司); 实时荧光定量 PCR 仪 7500 型 (美国 ABI applied Biosystems 公司), 核酸蛋白定量检测仪 (NanoVue 型, 美国 GE 公司), 常规 PCR 仪 Veriti 96 Well Thermal Cycler 型 (美国 ABI applied Biosystems 公司), 组织匀浆破碎仪 Tissue Lyser 型 (德国 Qiagen 公司), 离心机 Micro 17R 型 (美国 Thermo 公司)。

4 细胞培养 从液氮中取出冻存管, 立即投入 37 °C 水浴箱中水浴, 摇晃至冻存液完全融化, 复苏 LLC 肺癌细胞, 使用含 100 mL/L FBS 的 DMEM 培养基吹散转移至培养瓶中, 在 37 °C CO<sub>2</sub> 培养箱中进行培养, 至对数生长期时, 2.5 g/L 胰酶消化, 制成 2 × 10<sup>4</sup> 个/mL 的细胞悬液, 接种备用。

5 小鼠 Lewis 肺癌模型建立 参照参考文献 [5, 6]。在无菌条件下, 将上述制备的细胞悬液, 以每只 0.2 mL 接种于小鼠右前肢腋窝皮下, 制备 Lew-

is 肺癌瘤源小鼠。第 14 天在无菌条件下,小鼠脱颈处死,选取生长良好的 Lewis 肺癌组织,从腋下剥取瘤体组织,剪碎、匀浆、研磨,按肿瘤质量(g)与生理盐水(mL)1:3 比例制成浓度为  $1 \times 10^7$  个/mL 的瘤细胞悬液。接种于 C<sub>57</sub>BL/6 实验小鼠右前肢腋窝皮下 0.2 mL。传代 2 次,方法同上。

6 分组及给药 将 40 只 C<sub>57</sub>BL/6 小鼠采用随机数字表法分为 4 组,模型组、CTX 组、益肺逐积方组(YFZJF 组)、联合用药组,每组 10 只。YFZJF 组每日灌胃中药液 0.33 mL(给药剂量参考临床用药量,按人与小鼠体表面积换算公式<sup>[7]</sup>换算成等效剂量,给药剂量为 14.95 g/kg,药物浓度 0.92 g/mL);CTX 组在接种后 72 h 和 10 d,腹腔注射 CTX 0.2 mL(给药剂量为 40 mg/kg,药物浓度为 4 mg/mL);联合用药组在 CTX 组用药基础上每日灌胃中药液 0.33 mL(给药剂量及药物浓度同 YFZJF 组);模型组每日灌胃等体积生理盐水 0.33 mL;上述各组均于造模第 2 d 起开始用药,用药周期 14 d,颈椎脱臼处死动物。

7 动物一般状态及瘤体大小观察 每日观察小鼠的精神状态、毛色、进食及死亡情况,接种后 7 d 触诊模型组,如接种部位皮下有明显硬块长出,即可判断为造模成功,实验结束时游标卡尺测量小鼠肿瘤长径(L)和短径(W),计算瘤体积( $L \times W^2/2$ )<sup>[8]</sup>。抑瘤率 =  $(1 - \text{实验组平均瘤体积}/\text{模型对照组平均瘤体积}) \times 100\%$ <sup>[9]</sup>。

8 小鼠肿瘤模型瘤体及肺组织病理学观察 小鼠脱颈椎处死后快速分离瘤体与肺脏,冲洗血污,放入 4% 多聚甲醛固定。石蜡包埋,切片 5 μm,HE 染色观察肿瘤与肺脏病理学变化。

9 荧光定量 PCR 技术检测肿瘤组织 CD151、ITG α<sub>3</sub> 及 ITG β<sub>1</sub> mRNA 的表达

9.1 引物设计合成 根据 Gene Bank 基因库中 CD151、ITGα<sub>3</sub> 及 ITG β<sub>1</sub> 的碱基序列,通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI),在线软件设计引物(PRIMER),由南京金斯瑞生物科技有限公司合成引物(表 1)。

9.2 总 RNA 提取 称取各组肿瘤组织 0.1 g,按照超纯 RNA 提取试剂盒说明书抽提总 mRNA,DEPC 水 2 μL 调零,取 RNA 样品 2 μL,采用核酸蛋白定量检测仪测定波长在 260、280 nm 处的 OD 值,根据检测仪读数记录每组样品 RNA 浓度(ng/μL)。

9.3 逆转录合成 cDNA 按照 HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 逆转录试剂盒说明书进行逆转录合成 cDNA,4 × g DNA wiper Mix 2 μL,

表 1 荧光定量 PCR 引物序列表

基因	引物序列(5'~3')	扩增长度(bp)
CD151	F: TGTGGCAGCAACAACCTCTCA	164
	R: GTGATACAGCCACCCCTCCAC	
ITG α <sub>3</sub>	F: GGGCACACTGGTTCTAGGTC	81
	R: ATGGTGATCTCCGTGGGGTA	
ITG β <sub>1</sub>	F: AACTTGTGGTCAGCAACGC	99
	R: AGCCAATCAGCGATCCACAA	
β-actin	F: GAGACCTTCAACACCCCGAGC	263
	R: ATGTCACGCACGATTTCCC	

5 × HiScript II qRT SuperMix II 2 μL,模板 RNA 50 ~ 100 ng,RNase free ddH<sub>2</sub>O 加至 10 μL,混匀,25 °C 10 min,50 °C 30 min,85 °C 5 min。

9.4 荧光定量 PCR 反应检测 根据 AceQ qPCR SYBR Green Master Mix 试剂说明书配制荧光定量 PCR 反应液,AceQ qPCR SYBR Green Master Mix 10 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 0.4 μL,ROX Reference Dye 2 0.4 μL,模板 DNA 2.0 μL,灭菌蒸馏水加至 20 μL,95 °C 预变性 5 min,95 °C 15 s,60 °C 1 min,共 40 个循环,全部反应结束后,用比较模板的域值循环数 CT(threshold value)值,相对定量法研究不同药物作用后小鼠肿瘤组织中 CD151、ITGα<sub>3</sub> 及 ITG β<sub>1</sub> 的基因表达。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算基因相对表达量, $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{待测组目的基因平均值}} - Ct_{\text{待测组内参基因平均值}}) - (Ct_{\text{空白组目的基因平均值}} - Ct_{\text{空白组内参基因平均值}})$ 。

10 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件统计,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 One-way ANOVA 比较,组间差异采用 q 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1 各组小鼠一般状态比较(表 2) 实验期间各组小鼠未出现死亡,接种 7 d 后,模型组小鼠右腋下接种部位均可触及黄豆大小结节状肿块。之后 7 d,模型组肿块迅速生长,使小鼠活动受到影响,但精神状态良好,毛色光滑,能正常进水饮水;CTX 组小鼠出现精神萎靡沉郁、扎推、毛色干枯、饮食饮水下降现象;YFZJF 组小鼠精神状态良好、能够正常活动和饮食;联合用药组小

表 2 各组小鼠给药前后体重比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	给药剂量(g/kg)	n	给药前体重(g)	给药后体重(g)
模型	—	10	19.7 ± 0.5	22.1 ± 1.2
CTX	CTX(0.04)	10	19.8 ± 0.5	21.7 ± 1.1
YFZJF	YFZJF(14.95)	10	19.7 ± 0.4	21.9 ± 1.1
联合用药	CTX(0.04) + YFZJF(14.95)	10	19.9 ± 0.4	21.6 ± 1.0

鼠毛色较 CTX 组光滑,精神状态正常,饮食饮水略下降。给药前后各组小鼠体重差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

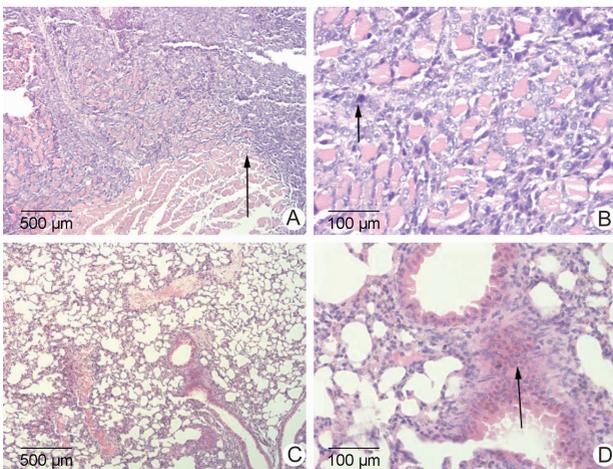
2 各组小鼠肿瘤体积及抑瘤率比较(表 3) 用药 14 d 后,各组肿瘤体积变化差异明显,与模型组比较, YFZJF 组与联合用药组减小 ( $P = 0.03, P = 0.00$ )。与 CTX 组比较, YFZJF 组及联合用药组肿瘤体积减小,差异无统计学意义 ( $P = 0.67, P = 0.15$ )。抑瘤率由高至低依次为联合用药组、YFZJF 组、CTX 组。

表 3 各组小鼠肿瘤体积及抑瘤率比较

组别	给药剂量 (g/kg)	n	肿瘤体积 (mm <sup>3</sup> , $\bar{x} \pm s$ )	抑瘤率 (%)
模型	—	10	844 ± 549	
CTX	CTX(0.04)	10	591 ± 184	30.00
YFZJF	YFZJF (14.95)	10	529 ± 232 *	37.33
联合用药	CTX(0.04) + YFZJF (14.95)	10	233 ± 90 **	72.45

注:与模型组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

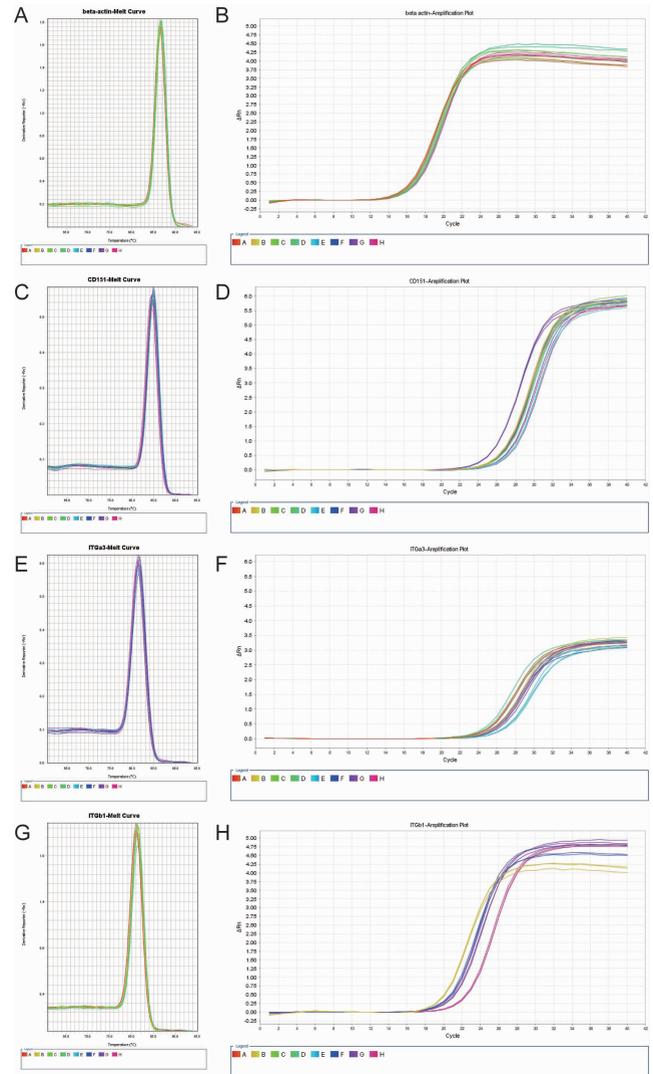
3 小鼠肿瘤模型瘤体及肺组织病理学观察(图 1) 低倍镜下可见,肿瘤组织呈实片状生长,浸润、累积、破坏骨骼肌(图 1A);高倍镜下可见,肿瘤细胞浸润骨骼肌,肿瘤细胞呈圆形、卵圆形,核浆比增大,胞核染色质不均匀,可见核仁及病理性核分裂象(图 1B);肺脏低倍镜下可见,肿瘤组织沿细支气管管壁及肺泡壁弥漫性生长(图 1C),高倍镜下可见,肿瘤细胞沿细支气管管壁及肺泡壁呈单层或多层生长、扩展,肺泡间隔未破坏,保留肺泡轮廓(图 1D)。



注:图 A 箭头所示为肿瘤组织浸润骨骼肌( $\times 100$ );图 B 箭头所示为肿瘤细胞病理性核分裂象( $\times 400$ );图 C 箭头所示为沿支气管管壁弥漫性生长的肿瘤组织;图 D 箭头所示为沿细支气管管壁多层生长的肿瘤细胞( $\times 400$ )

图 1 小鼠肿瘤模型瘤体及肺组织病理学观察 (HE)

4 各组肿瘤组织 CD151、ITG $\alpha_3$  及 ITG $\beta_1$  mRNA 表达比较(图 2,表 4) 溶解曲线无杂峰,平均溶解温度一致,具有特异性。与模型组比较,CTX 组、YFZJF 组、



注: A 所示为  $\beta$ -actin 溶解曲线; B 为  $\beta$ -actin 扩增曲线; C 所示为 CD151 溶解曲线; D 所示为 CD151 扩增曲线; E 所示为 ITG  $\alpha_3$  溶解曲线; F 所示为 ITG  $\alpha_3$  扩增曲线; G 所示为 ITG  $\beta_1$  溶解曲线; H 所示为 ITG  $\beta_1$  扩增曲线

图 2 各组肿瘤组织中  $\beta$ -actin、CD151 及 ITG  $\alpha_3$  和 ITG  $\beta_1$  溶解曲线与扩增曲线图

表 4 各组肿瘤组织 CD151、ITG $\alpha_3$ 、ITG $\beta_1$  mRNA 表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	CD151	ITG $\alpha_3$	ITG $\beta_1$
模型	8	1.00 ± 0.25	1.00 ± 0.38	1.00 ± 0.39
CTX	8	0.74 ± 0.11 **	0.84 ± 0.21	1.08 ± 0.28
YFZJF	8	0.79 ± 0.21 *	0.65 ± 0.12	0.75 ± 0.27 $\Delta$
联合用药	8	0.65 ± 0.14 **	0.62 ± 0.13 *	0.96 ± 0.21

注:与模型组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ;与 CTX 组比较,  $\Delta P < 0.05$

联合用药组 CD151 mRNA 表达量降低 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。联合用药组 ITG  $\alpha_3$  mRNA 表达降低 ( $P = 0.02$ )。与 CTX 组比较, YFZJF 方组 ITG  $\beta_1$  mRNA 表达降低 ( $P = 0.04$ )。

## 讨 论

中医学认为肺癌是由于正气虚损, 阴阳失衡, 邪毒乘虚入肺, 邪滞于肺, 导致肺脏功能失调, 痰凝气滞, 瘀阻脉络, 瘀毒胶结, 日久形成肺部积块<sup>[10]</sup>。肺癌早期以毒热炽盛、痰浊淤血凝滞为主, 迁延日久则正气亏损、气阴两虚, 针对肺癌病机拟定益肺逐积方, 君以半枝莲清热解毒, 西洋参滋阴补气; 臣以三七活血化瘀, 生半夏除湿化痰, 川贝止咳化痰; 佐以由露蜂房散结解毒; 使以百合, 蛤蜊清凉滋润, 缓和药性, 诸药合用共达补气养阴、化痰逐瘀、却邪扶正之功。本方重用半枝莲, 半枝莲归肺、肝、肾经, 功能清热解毒, 化痰利尿, 其味苦性大寒, 药力峻猛, 直折热邪, 散毒瘤于扫荡之间, 是重要的清热解毒药物, 其所含的半枝莲素等成分在动物实验和临床试验中都显示抑制肿瘤细胞活性的功效<sup>[11,12]</sup>; 西洋参可改善晚期肺癌患者气虚症状, 稳定病情, 西洋参、川贝、蛤蜊均有滋阴作用, 而以西洋参甘凉、气津同补, 在补气同时自动恢复津液代谢, 而由阴虚生的热也因壮水之主而阳光自伏; 生半夏为除湿化痰要药, 治痞结、水饮、痰气, 取生品化痰力量更强, 针对肺癌瘤体以毒攻毒, 性猛力峻; 川贝入肺经、胃经, 化痰为主; 三七, 性温, 味甘、微苦, 散瘀止血, 消肿定痛, 是止血活血力量极强的药物。方中取此三味药物针对肿瘤实邪的两个主要方面: 痰浊和瘀血。露蜂房有通络之功, 针对肿瘤的久“阴积”有梳理之功, 露蜂房化学成分复杂, 以蜂蜡、蜂胶和蜂房油为主, 此外还含有有机酸、昆虫激素等微量成分, 其本身具有抗肿瘤作用; 百合甘凉清润, 主入肺心, 长于清肺润燥止咳, 改善阴虚热证和咳嗽等证, 辅助肿瘤治疗; 蛤蜊性味咸寒, 具有滋阴润燥、利尿消肿、软坚散结之功。两药作用缓和, 清凉滋润, 在大剂量苦寒药攻邪和补气同时力缓而柔和, 改善病本同时缓解症状, 增强肿瘤耐受力。

肿瘤体积及抑瘤率检测结果显示, 益肺逐积方单独使用即可有效抑制肿瘤生长, 抑瘤率为 37.33%, 效果略优于 CTX, 当益肺逐积方与 CTX 联合使用时, 可更加有效的控制肿瘤生长, 抑瘤率高达 72.45%, 该结果提示在临床使用中益肺逐积方配合化疗药使用, 可增强化疗药物抑瘤效果。病理学观察结果显示 Lewis 肺癌是一种侵袭性较强的肿瘤, 在光镜下可见大量肿瘤细胞侵袭骨骼肌纤维, 并且向肺脏转移, 形成典型的

肺腺癌病变。CD151、ITG  $\alpha_3$  及 ITG  $\beta_1$  是与肿瘤侵袭、转移密切相关的因子, 其中 CD151 是 TM4SF 家族重要成员之一, TM4SF 可以与自身或其他膜蛋白如 ITG、EGFR 和 c-Met 等酪氨酸激酶受体等结合形成四跨膜网络, 在肿瘤的生长、迁移及血管生成中起重要作用, 其中 CD151-IGT 复合物是 CD151 参与肿瘤侵袭与转移所必需步骤, 参与细胞内的多种酶的级联反应。CD151 在多种人类肿瘤中广泛表达, 且与肿瘤的恶性进展、表达以及预后等有密切的关系。Kwon MJ 等<sup>[13]</sup>研究认为在非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 中 CD151 的高表达比率约为 28.7%, 其中肺腺癌的比率高达 42.9%, 建议将 CD151 作为肺腺癌的一项重要的预后指标, 并作为 NSCLC 治疗的分子靶点。本研究结果显示, 益肺逐积方单独用药及联合 CTX 用药均可以使肿瘤组织 CD151 mRNA 的表达量下降, 其中以联合用药下调效果最强。

ITG 属于细胞黏附分子家族, IGT 所介导的肿瘤细胞与细胞外基质间的相互作用影响肿瘤的发生、增殖、侵袭和转移<sup>[14]</sup>。ITG 是由  $\alpha$ 、 $\beta$  两个亚基以 1:1 通过非共价键连接而构成的异二聚体, 目前包括至少 18 个  $\alpha$  亚基和 8 个  $\beta$  亚基<sup>[15]</sup>。其中 ITG  $\alpha_3$  及 ITG  $\beta_1$  对肺癌细胞的高侵袭特性发挥重要作用, 可通过结合尿激酶型纤溶酶原激活物受体与玻连蛋白结合, 激活细胞外纤溶酶原, 导致细胞外基质降解, 从而实现肺癌细胞向远处器官的转移。蒋芳<sup>[16]</sup>采用免疫组化 SP 法检测 ITG  $\alpha_3$  及 ITG  $\beta_1$  蛋白在 NSCLC 和良性肺病变组织中的表达水平, 结果 ITG  $\alpha_3$  及 ITG  $\beta_1$  蛋白在 NSCLC 中的阳性表达率均高于肺良性病变组织。Shirakihara T 等<sup>[17]</sup>研究认为在恶性肿瘤中, ITG  $\alpha_3$  通过上调肿瘤细胞上皮间质化进程, 增强肿瘤细胞的侵袭力。Chang MH 等<sup>[18]</sup>发现 ITG  $\beta_1$  可以调节肿瘤细胞与细胞外基质的粘附作用, 在小细胞肺癌中与肿瘤的高侵袭性和高转移性的生物学行为密切相关。有报道显示当肺癌细胞 A549 中 ITG  $\beta_1$  基因沉默时, 可导致该细胞的增殖、转移、侵袭能力受损, 并对顺铂及吉非替尼敏感<sup>[19]</sup>。所以检测用药各组对肿瘤组织 ITG  $\alpha_3$  及 ITG  $\beta_1$  mRNA 的表达量的影响对判断该药在肺癌治疗中的作用具有重要意义。本研究显示, 肿瘤组织 ITG  $\alpha_3$  mRNA 的表达量在益肺逐积方组及联合用药组均有下降, 并且联合用药下调 ITG  $\alpha_3$  mRNA 表达量效果最显著; ITG  $\beta_1$  mRNA 表达量的检测结果显示, 与 CTX 的作用效果比较, 益肺逐积方可以显著下调 ITG  $\beta_1$  mRNA 表达量, 综上所述, 益肺逐积方可有效降低肿瘤组织

中 ITG  $\alpha_3$  及 ITG  $\beta_1$  mRNA 的表达量。

本研究在动物模型上证实了益肺逐积方抑制肺癌肿瘤生长的作用效果,分析其治疗肺癌的作用机制与下调肿瘤组织中 CD151 和 ITG  $\alpha_3$  及 ITG  $\beta_1$  mRNA 的表达量相关,建议在临床中配合化疗药物 CTX 协同使用,以增强抗肿瘤效果,抑制肿瘤转移。

利益冲突:无。

### 参 考 文 献

- [1] 陈万青, 郑荣寿, 张思维, 等. 2013 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2017, 26(1): 1-7.
- [2] Shi Y, Sun Y, Yu J, et al. China experts consensus on the diagnosis and treatment of advanced stage primary lung cancer (2016 version)[J]. Asia Pac J Clin Oncol, 2017, 13(1): 87-103.
- [3] 黄华艺. 四跨膜蛋白 CD151 与肿瘤发生发展的关系及其分子机制[J]. 中华病理学杂志, 2015, 44(6): 437-440.
- [4] 蒋时红, 吴耀松, 孙超龙, 等. 益肺逐积方诱导人肺腺癌 A549 细胞凋亡机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(5): 131-136.
- [5] 马雪曼, 于明薇, 张甘霖, 等. 小鼠 Lewis 肺癌不同部位皮下移植瘤模型比较[J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(4): 386-390.
- [6] 李斐斐, 吴皓, 陈璐, 等. 益肺清化颗粒对 Lewis 肺癌小鼠 VEGF、bFGF、Angiostatin、Endostatin 影响的研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(8): 1086-1092.
- [7] 温瑞兴, 肖向茜主编. 药理学实验教程[M]. 北京: 北京工业大学出版社, 2014: 396-397.
- [8] 王绍辉, 刘同祥. 苏铁总黄酮对 Lewis 肺癌模型小鼠的抑制作用及免疫功能的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(11): 1598-1602.
- [9] 张恩欣, 周岱翰, 侯超. 益气除痰方抑制肿瘤相关巨噬细胞的抗肿瘤免疫功能研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2016, 23(10): 627-630.
- [10] 李娟, 唐东昕, 杨柱, 等. 肺癌的中医药治疗与研究现状[J]. 贵阳中医学院学报, 2017, 39(3): 98-100.
- [11] 刘钢. 半枝莲抗肿瘤临床应用概述[J]. 海峡药学, 2017, 29(6): 132-134.
- [12] 石梦星, 卢小路, 熊思会, 等. 半枝莲抗肿瘤药理研究进展[J]. 世界中医药, 2016, 11(4): 741-743.
- [13] Kwon MJ, Seo J, Kim YJ, et al. Prognostic significance of CD151 overexpression in non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2013, 81(1): 109-116.
- [14] Ata R, Antonescu CN. Integrins and Cell Metabolism: An Intimate Relationship Impacting Cancer[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(1): 189.
- [15] Bianconi D, Unseld M, Prager G W. Integrins in the Spotlight of Cancer[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(12): 2037.
- [16] 蒋芳. CD<sub>151</sub> 和整合素  $\alpha_3\beta_1$  蛋白对非小细胞肺癌患者预后的影响[J]. 实用癌症杂志, 2015, 30(3): 323-325.
- [17] Shirakihara T, Kawasaki T, Fukagawa A, et al. Identification of integrin  $\alpha_3$  as a molecular marker of cells undergoing epithelial-mesenchymal transition and of cancer cells with aggressive phenotypes[J]. Cancer Sci, 2013, 104(9): 1189-1197.
- [18] Chang MH, Lee K, Lee KY, et al. Prognostic role of integrin  $\beta_1$ , E-cadherin, and rac1 expression in small cell lung cancer[J]. APMIS, 2012, 120(1): 28-38.
- [19] Morello V, Cabodi S, Sigismund S, et al.  $\beta_1$  integrin controls EGFR signaling and tumorigenic properties of lung cancer cells[J]. Oncogene, 2011, 30(39): 4087-4096.

(收稿: 2017-05-10 在线: 2018-05-03)

责任编辑: 赵芳芳