

· 配伍 ·

黄芪-白花蛇舌草抑制肺癌 A549 细胞增殖机制

孙海鹏¹, 马山², 庄贺², 赵粤³, 孙平一², 刘思远^{2*}

(1. 山东中医药大学附属医院, 济南 250014;

2. 山东中医药大学, 济南 250355;

3. 山东中医药大学第二附属医院, 济南 250001)

[摘要] 目的:从细胞水平观察黄芪-白花蛇舌草对人肺腺癌 A549 细胞增殖及白细胞介素-6(IL-6), 磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K), 蛋白激酶 B(Akt), 磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt), 雷帕霉素靶蛋白(mTOR), 缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α), 细胞周期蛋白 D₁(Cyclin D₁)表达量的影响,并探讨其作用的分子机制。方法:设立空白组(完全培养基),黄芪-白花蛇舌草低、中、高质量浓度组(20, 40, 60 mg·L⁻¹),顺铂低、中、高质量浓度组(5, 10, 20 mg·L⁻¹),采用噻唑蓝(MTT)比色法检测黄芪-白花蛇舌草(0, 20, 40, 60 mg·L⁻¹)和顺铂(0, 5, 10, 20 mg·L⁻¹)干预 A549 细胞 24, 48, 72 h 后的细胞活性,计算各组细胞增殖能力,筛选出各药物组最佳浓度;分别用完全培养基,黄芪-白花蛇舌草(40 mg·L⁻¹),顺铂(10 mg·L⁻¹),联合药物(40 mg·L⁻¹+10 mg·L⁻¹)干预肺腺癌 A549 细胞,设置为空白组、黄芪-白花蛇舌草组、顺铂组、联合组,计算各组在 24, 48, 72 h 后对 A549 细胞增殖抑制影响;采用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测各组 72 h 后细胞培养上清中 IL-6 的水平;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测 HIF-1 α , Cyclin D₁ mRNA 水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组蛋白 PI3K, Akt, p-Akt, mTOR, HIF-1 α , Cyclin D₁ 表达的变化情况。结果:在作用细胞 24 h 后,各黄芪-白花蛇舌草组对细胞增殖未表现出明显抑制,作用 48 h,与空白组比较,黄芪-白花蛇舌草组对肿瘤细胞有明显增殖抑制作用($P<0.05$),表现出时间依赖性,在作用细胞 72 h,黄芪-白花蛇舌草各浓度组未表现出明显差异,故选用 40 mg·L⁻¹ 为中药最佳浓度组,用于后续实验。与空白组比较,经过不同浓度顺铂干预后,细胞增殖均受到不同程度抑制($P<0.05$),表现出明显的时间依赖性,基于细胞存活率考虑,选用顺铂 10 mg·L⁻¹ 为最佳浓度。与空白组比较,黄芪-白花蛇舌草与顺铂联合应用明显抑制肺腺癌 A549 细胞增殖,增殖抑制率表现出明显的时间依赖性($P<0.05$),且药物作用 72 h,联合组与其他两组比较差异更加显著($P<0.01$);与空白组比较,各用药组细胞培养液 IL-6 分泌显著降低($P<0.01$),以联合组下降更加突出。与空白组比较,黄芪-白花蛇舌草、顺铂均能降低 HIF-1 α , Cyclin D₁ mRNA 水平($P<0.05$, $P<0.01$),且联合用药降低幅度更加明显;各用药组 PI3K, p-Akt, mTOR, HIF-1 α , Cyclin D₁ 蛋白均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),且联合组各蛋白表达量明显低于顺铂组($P<0.01$)。结论:黄芪-白花蛇舌草对肺癌 A549 细胞增殖具有抑制作用,潜在机制可能与其抑制 IL-6/PI3K/Akt/mTOR-HIF-1 α 轴的表达与分泌有关。

[关键词] 黄芪-白花蛇舌草; A549 肺癌细胞; 白细胞介素-6(IL-6); 缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α); 增殖

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)19-0028-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211922

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210730.1054.003.html>

[网络出版日期] 2021-07-30 16:02

Mechanism of Scutellariae Radix-Hedyotis Herba Against Proliferation of Lung Adenocarcinoma A549 Cells

SUN Hai-peng¹, MA Shan², ZHUANG He², ZHAO Yue³, SUN Ping-yi², LIU Si-yuan^{2*}

(1. *Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Jinan 250014,*

China; 2. Shandong University of TCM, Jinan 250355, China;

3. Second Clinical College, Shandong University of TCM, Jinan 250001, China)

[收稿日期] 20210617(006)

[基金项目] 济南市科技计划项目(201805093);山东中医药大学中医传统功法康复青年科研探索团队项目

[第一作者] 孙海鹏, 硕士, 从事肺癌、膀胱癌中西医结合诊疗, E-mail: 675357159@qq.com

[通信作者] * 刘思远, 博士, 讲师, 从事肺癌及肺纤维化的中西医结合诊断与治疗, E-mail: happysiyuan1@163.com

[Abstract] Objective: To observe the effects of *Scutellariae Radix-Hedyotis Herba* on the proliferation of human lung adenocarcinoma A549 cells and the expression of interleukin-6 (IL-6), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), protein kinase B (Akt), p-protein kinase B (p-Akt), mechanistic target of rapamycin (mTOR), hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), and Cyclin D₁ at the cellular level, and to explore their molecular mechanism. **Method:** Following the set-up of the blank group (complete medium), low-, moderate-, and high-dose (20, 40, and 60 mg·L⁻¹) *Scutellariae Radix-Hedyotis Herba* groups, and low-, moderate-, and high-dose (5, 10, and 20 mg·L⁻¹) cisplatin groups, the cell were treated with the corresponding drugs for 24, 48, and 72 h for detecting their viability by tetrazolium bromide (MTT) colorimetry. A549 cells were then divided into the blank group, *Scutellariae Radix-Hedyotis Herba* group, cisplatin group, and combined medication group and intervened with the complete medium, 40 mg·L⁻¹ *Scutellariae Radix-Hedyotis Herba*, 10 mg·L⁻¹ cisplatin, and 40 mg·L⁻¹ *Scutellariae Radix-Hedyotis Herba* + 10 mg·L⁻¹ cisplatin, respectively, for 24, 48 and 72 h, followed by the measurement of inhibitory effects against the proliferation of A549 cells in each experimental group. The level of IL-6 in cell culture supernatant was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) after 72 h. The mRNA expression levels of HIF-1 α and Cyclin D₁ in each group were assayed by real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR), and the protein expression levels of PI3K, Akt, p-Akt, mTOR, HIF-1 α , and Cyclin D₁ by Western blot. **Result:** After 24 h intervention, *Scutellariae Radix-Hedyotis Herba* did not significantly inhibit the proliferation of A549 cells. However, 48 h later, the inhibitory effect in *Scutellariae Radix-Hedyotis Herba* groups were significantly enhanced in comparison with that in the blank group ($P<0.05$), exhibiting a time-dependent response. After 72 h of action, no significant change was present in the inhibitory effect of each *Scutellariae Radix-Hedyotis Herba* group, so the optimal concentration of *Scutellariae Radix-Hedyotis Herba* was set at 40 mg·L⁻¹ for follow-up experiments. As demonstrated by the comparison with the blank group, cisplatin at each concentration inhibited the cell proliferation in a time-dependent manner ($P<0.05$). Considering the cell survival rate, the best concentration of cisplatin was set at 10 mg·L⁻¹. Compared with the blank group, *Scutellariae Radix-Hedyotis Herba* combined with cisplatin remarkably inhibited the proliferation of A549 cells in a time-dependent manner ($P<0.05$), and the differences between the combined medication group and the other two groups became more significant after 72 h of medication ($P<0.01$). The IL-6 level in each experimental group, especially in the combined medication group, significantly declined in contrast to that in the blank group ($P<0.01$). The mRNA expression levels of HIF-1 α and Cyclin D₁ in all experimental groups were obviously lower than those in the blank group, with the most significant changes observed in the combined medication group ($P<0.05$, $P<0.01$). The protein expression levels of PI3K, p-Akt, mTOR, HIF-1 α , and Cyclin D₁ in each experimental group was significantly down-regulated ($P<0.05$, $P<0.01$), and the levels in the combined medication group were even lower than those in the cisplatin group ($P<0.01$). **Conclusion:** *Scutellariae Radix-Hedyotis Herba* has an inhibitory effect on the proliferation of A549 cells, which may be related to its inhibition against the expression and secretion of IL-6/PI3K/Akt/mTOR-HIF-1 α axis.

[Keywords] *Scutellariae Radix-Hedyotis Herba*; lung adenocarcinoma A549 cells; interleukin-6 (IL-6); hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α); proliferation

肺癌又称原发性支气管癌,是全球最常见的恶性肿瘤之一^[1],每年全球超过100万人死于肺癌^[2],根据美国癌症协会最新统计显示,2021年美国新发病例数预计高达23.5万,死亡病例数13万,发病率逐年升高,形势日益严峻^[3]。在我国每年约有78万人罹患此病,其发病率与死亡率位居癌症首位^[4],严

重危害人类健康。非小细胞肺癌(NSCLC)是其临床最常见病理类型,占有肺癌80%~85%^[5]。目前手术治疗联合化疗是早期肺癌最主要治疗手段,但NSCLC患者5年生存率依然较低,I期患者经手术治疗后出现复发转移率仍为15%~20%^[6],且70%患者确诊时已发展为晚期^[7],失去早期手术机

会。以铂类为基础的化疗是治疗晚期 NSCLC 患者常见方案,但其耐药性及不良反应显著降低药物疗效,5 年生存率只有 16%^[8],严重影响患者生活质量。因此寻求更加有效安全的治疗方案,迫在眉睫。

肿瘤发生、发展是多基因、多因素、多阶段、多环境共同调控的结果,炎症被认为是极其重要的原因之一,炎症为“癌症的第七大特征”^[9],炎症因子作为一种危险因素,在癌症的发生、发展过程中发挥重要作用。因此针对肺癌治疗,从细胞本身逐渐向炎性微环境发展,或许为肺癌诊疗提供新的思路^[10]。白细胞介素-6(IL-6)是目前已知的癌症相关多效能促炎因子,直接刺激肿瘤细胞增殖、转移与侵袭,是衔接炎症与癌症的最核心因子^[11],在肺癌组织及患者血清中均明显升高^[12],且与患者不良预后密切相关^[13]。肿瘤细胞快速增殖,其需氧量不断增加,肿瘤细胞长期处于低氧微环境中^[14],低氧是肿瘤微环境的显著特征之一^[15],作为肿瘤细胞低氧时高表达分子,缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)是肿瘤细胞对缺氧适应反应的中心环节^[16],HIF-1 α 升高与肿瘤增殖密切相关^[17]。

研究证明,中医药在恶性肿瘤治疗中发挥积极作用,扶正祛邪,调整气血、平衡阴阳,与西医治疗互为补充^[18],中药作为天然产物,结构功能丰富多样,具有较强的潜在应用前景^[19]。前期研究证实肺抑瘤合剂联合 AP 化疗方案更有效地改善 NSCLC 患者生活质量、改善临床症状,稳定实体瘤大小,降低临床不良事件发生^[10]。为更清晰从分子层面阐述中药精确靶点,选取该方主要作用药对黄芪-白花蛇舌草进行深入探究,探讨该药对对 A549 细胞增殖影响及可能抑瘤机制,为中医药治疗肿瘤提供更为科学精准佐证。

1 材料

1.1 细胞 人肺癌细胞株 A549 购于中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。镜下观察细胞形态正常,生长良好,处于指数生长期,无细菌污染等不良现象。细胞传至第 5 代时应用于本实验。

1.2 药物和试剂 黄芪、白花蛇舌草饮片均购自华润山东医药有限公司,由山东中医药大学第二附属医院王爱华主任鉴定为正品,黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* 的干燥根,白花蛇舌草为茜草科植物白花蛇舌草 *Hedyotis diffusa* 的干燥全草;顺铂(山东齐鲁制药有限公司,国药准字

H20023461);达氏修正依氏培养基(DMEM)培养液,胎牛血清,胰酶(美国 Gibco 公司,批号分别为 42G6287K,10099141,25200071);兔来源一抗磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K),磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt),雷帕霉素靶蛋白(mTOR)(美国 CST 公司,批号分别为 4257S,4060S,2983S);鼠抗人 HIF-1 α 抗体,兔抗人蛋白激酶 B(Akt),细胞周期蛋白 D₁(Cyclin D₁)抗体,鼠抗人 β -肌动蛋白(β -actin)抗体,二抗辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔,RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为 AH339,AA326,AF0126,AF0003,A0216,A0208,P0013B);氯化钴六水合物($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,美国 Sigma 公司,批号 SLBP9948Z);BCA 蛋白定量检测试剂,SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(中国武汉赛维公司,批号分别为 G2026,G2003);噻唑蓝(MTT,广州威佳科技有限公司,批号 M8180);cDNA 反转录试剂盒(美国 Thermo 公司,批号 00221108);实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(日本 Takara 公司,批号 AIE0427A);IL-6 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司,批号 E-EL-H0102c)。

1.3 仪器 NU-5820E 型 CO₂ 细胞培养箱(美国 NuAire 公司);SW-CJ-2D 型超净工作台(苏州净化设备有限公司);IX37 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);5702 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);Mx3000P 型 Real-time PCR 仪(美国 Agilent 公司);164-5050 型电泳仪及转膜仪(美国 Bio-Rad 公司);Quantimet Q500 图像分析系统(德国 Leica 公司);LB940 型多功能酶标仪(德国 Berthold 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养与缺氧处理 肺腺癌 A549 细胞贴壁生长培养,置于装有 4 mL DMEM 培养基(10% 胎牛血清 + 1% 青-链霉素)25 cm² 培养瓶内,于 37 °C,5%CO₂ 饱和湿度条件下,镜下取对数生长期细胞用于实验。待细胞长至 70%~80% 融合时,各组加入 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钴(CoCl_2)^[20],继续培养 24 h。

2.2 不同浓度黄芪-白花蛇舌草配制 参考本研究组前期研究^[10],精密称取中药黄芪 18 g,白花蛇舌草 30 g,剪碎,置不锈钢煮锅中,加水 3 L,小火微沸,提取 3 次,共提取 1 h,合并提取液,过滤,浓缩,干燥成粉末,计算得率为 31.41%。完全培养基溶解,0.22 μm 滤膜过滤除菌,分别稀释到药液质量浓度为 20,40,60 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3 MTT 比色法检测细胞增殖抑制 收集对数生

长的人肺腺癌 A549 细胞,调整密度为 5×10^4 个/mL,以每孔 100 μL 接种于 96 孔板,于 $37\text{ }^\circ\text{C}$, $5\% \text{CO}_2$ 细胞培养箱中培养,24 h 后待细胞贴壁弃去培养液, PBS 冲洗。设置空白组(完全培养基),黄芪-白花蛇舌草低、中、高质量浓度组 ($20, 40, 60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 顺铂低、中、高质量浓度组 ($5, 10, 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 每个质量浓度设 5 个平行复孔,分别培养 24, 48, 72 h, 吸弃旧液,每孔加入 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT 溶液 100 μL , $37\text{ }^\circ\text{C}$ 继续培育 4 h, 弃上清,于各孔内分别加入二甲基亚砷 (DMSO) 150 μL 振荡溶解后,酶标仪中读取各孔细胞在 570 nm 波长的吸光度 A , 计算细胞增殖抑制率。

细胞传代及培养 24 h, 弃上清, 根据测得的各项物组最佳质量浓度设置空白组(完全培养基), 黄芪-白花蛇舌草组 ($40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 顺铂组 ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 联合组(黄芪-白花蛇舌草 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 顺铂 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 每组设 5 个平行复孔, 分别培养 24, 48, 72 h, 吸弃旧液, 每孔加入 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT 溶液 100 μL , $37\text{ }^\circ\text{C}$ 继续培育 4 h, 弃上清, 于各孔内分别加入 DMSO 150 μL 振荡溶解, 酶标仪中读取 570 nm 波长各孔细胞 A , 计算细胞增殖抑制率。设空白组细胞存活率为 100%, 细胞增殖抑制率 = $(1 - A_{\text{药物组}} / A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

2.4 ELISA 检测 A549 细胞培养上清液中 IL-6 含量

按试剂盒说明书配置并充分混匀, 建立标准曲线; 加样, 每待测品孔加入一定稀释的待检样品和待检稀释液 100 μL , 并加入空白(孔)样品。轻轻振荡使

其混匀, 盖上封板膜 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 2 h; 洗板, 小心揭掉封板膜, 加入洗涤缓冲液, 停留 1 min, 去液, 反复 5 次, 每次均在滤纸上扣干; 加检测抗体, 在每孔中加入稀释后的第一抗体工作液, 将反应板充分混匀后置 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 1 h, 洗板; 加酶标抗体, 各反应孔中, 加入新鲜稀释的酶标抗体(二抗) 100 μL , $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h, 洗板; 加底物液显色, 于各反应孔中加入底物显色溶液 100 μL , $37\text{ }^\circ\text{C}$, 20 min; 终止反应, 于各反应孔中加入 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸 50 μL ; 读板, 终止后 10 min 内, 以空白孔调零, 酶标仪上于 450 nm 测量读取各孔吸光度 A 。用计算机软件, 根据标准品的浓度及对应的 A 列出标准曲线的直线回归方程, 将样品的 A 代入方程式求出样品浓度。实验重复 5 次。

2.5 Real-time PCR 检测 HIF-1 α , Cyclin D₁ mRNA 水平

取对数生长期 A549 细胞, 以 6×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 设空白组、黄芪-白花蛇舌草组、顺铂组、联合组, 分别加入相应药物, 空白组给予同体积的培养基, 置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$, $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中培养 24 h, 每组 5 个复孔。用细胞 RNA 快速提取试剂盒总 RNA 并测定其浓度, 使用逆转录试剂盒得到 cDNA, 再进行 PCR 反应, 检测 HIF-1 α 和 Cyclin D₁ 表达水平。PCR 反应条件为预变性 $95\text{ }^\circ\text{C}$ 1 min; 变性 $95\text{ }^\circ\text{C}$ 10 s, 退火 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, 延伸 $72\text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, 40 个循环, 以 β -actin 为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 HIF-1 α , Cyclin D₁ mRNA 表达差异, 引物由武汉塞维尔生物科技有限公司进行合成, 见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Sequence primers

引物	序列	长度/bp
HIF-1 α	5'-GTCGGACAGCCTCACCAAACAGAGC-3'	472
	5'-GTAACTTGATCCAAAGCTCTGAG-3'	
Cyclin D ₁	5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3'	196
	5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'	
β -actin	5'-GTCCACCGCAAATGCTTCTA-3'	190
	5'-TGCTGTACACCTTACCGTTC-3'	

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 A549 肺癌细胞中 PI3K, Akt, p-Akt, mTOR, HIF-1 α , Cyclin D₁ 蛋白表达 收集细胞, 加入含 PMSF 的裂解液 400 μL , 于冰上裂解 30 min, $4\text{ }^\circ\text{C}$, $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 离心半径 8 cm, 取上清, BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 制备成上样蛋白。聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 将蛋白转移至 PVDF 膜上。用 5% 脱脂奶粉室温封闭 PVDF 膜 1 h, 一抗孵育 (1:1 000), $4\text{ }^\circ\text{C}$

摇床摇晃过夜, TBST 洗膜。加入二抗 (1:1 000) 孵育 1~2 h, 显影。进行 ECL 底物化学发光, 采集图像, Image J 软件分析各蛋白和内参 β -actin 的灰度值, 计算其相对表达量。

2.7 统计学处理 采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析, 计量资料表示为 $\bar{x} \pm s$, 多个样本均数采用单因素方差分析进行组间比较, 方差不齐时, 采用秩和检验, 组间两两比较, 采用最小显著差数法 (LSD) 检

验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 黄芪-白花蛇舌草联合顺铂对 A549 肺癌细胞增殖抑制率的影响 与空白组比较, 细胞作用 24, 48, 72 h, 顺铂组和联合组细胞增殖抑制率明显增高

($P < 0.05$), 呈浓度和时间依赖性。与本组培养 24 h 比较, 细胞作用 48, 72 h, 黄芪-白花蛇舌草组增殖抑制率增加 ($P < 0.01$), 呈时间和浓度依赖性。基于此, 选用黄芪-白花蛇舌草 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 顺铂 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 细胞干预 72 h 进行后续实验。见表 2。

表 2 黄芪-白花蛇舌草联合顺铂对 A549 肺癌细胞增殖抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h	48 h	72 h	%
黄芪-白花蛇舌	20	5.17±1.25	14.33±3.21 ²⁾	24.11±3.61 ²⁾	
	40	11.07±2.72	25.13±4.46 ²⁾	42.37±4.90 ²⁾	
	60	16.33±5.69	33.03±4.60 ²⁾	46.03±5.33 ²⁾	
顺铂	5	13.59±3.90 ¹⁾	28.67±3.55 ¹⁾	43.81±2.97 ¹⁾	
	10	15.86±2.25 ¹⁾	31.96±4.72 ¹⁾	54.03±2.64 ¹⁾	
	20	18.36±2.89 ¹⁾	37.78±2.71 ¹⁾	64.18±3.01 ¹⁾	
联合	40+10	21.43±3.41 ¹⁾	47.43±2.70 ¹⁾	70.03±1.25 ^{1,3,4)}	

注: 空白组细胞增殖抑制率为 0; 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与同组 24 h 比较²⁾ $P < 0.05$; 与同时间黄芪-白花蛇舌草组比较³⁾ $P < 0.01$; 与同时间顺铂组比较⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 黄芪-白花蛇舌草联合顺铂对 A549 肺癌细胞培养液中 IL-6 表达水平的影响 与空白组比较, 各用药组 IL-6 水平显著下降 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 黄芪-白花蛇舌草联合顺铂对 A549 肺癌细胞培养液中 IL-6 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 3 Effect of Scutellariae Radix-Hedyotis Herba combined with cisplatin on expression of IL-6 in A549 cell culture medium ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	IL-6/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
空白		125.57±6.32
黄芪-白花蛇舌	40	102.04±5.67 ¹⁾
顺铂	10	83.32±4.97 ¹⁾
联合	40+10	64.43±5.02 ¹⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 黄芪-白花蛇舌草联合顺铂对 A549 肺癌细胞 HIF-1 α , Cyclin D₁ mRNA 表达水平的影响 与空白组比较, 各用药组 HIF-1 α mRNA 水平明显降低 ($P < 0.05$), Cyclin D₁ mRNA 水平显著降低 ($P < 0.01$)。与顺铂组比较, 联合组 Cyclin D₁ mRNA 水平显著降低 ($P < 0.01$)。见表 4。

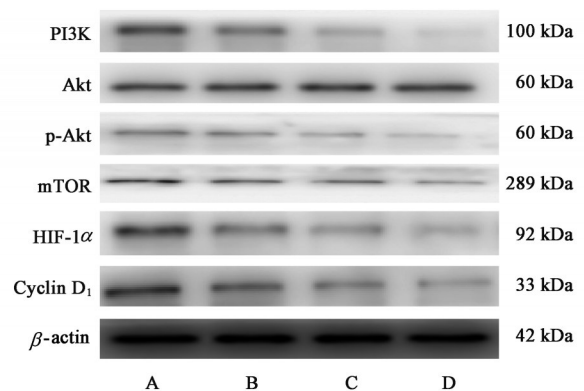
3.4 黄芪-白花蛇舌草联合顺铂对 A549 肺癌细胞蛋白表达水平的影响 与空白组比较, 各用药组 PI3K, p-Akt, mTOR, HIF-1 α , Cyclin D₁ 蛋白表达均明显降低 ($P < 0.05$)。与顺铂组比较, 联合组 PI3K, p-Akt, mTOR, HIF-1 α 与 Cyclin D₁ 蛋白均显著降低 ($P < 0.01$)。见图 1, 表 5。

表 4 黄芪-白花蛇舌草联合顺铂对 A549 肺癌细胞 HIF-1 α , Cyclin D₁ mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 4 Effect of Scutellariae Radix-Hedyotis Herba combined with cisplatin on mRNA expression of HIF-1 α and Cyclin D₁ in A549 cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	HIF-1 α	Cyclin D ₁
空白		0.72±0.04	0.98±0.12
黄芪-白花蛇舌	40	0.45±0.03 ¹⁾	0.64±0.10 ²⁾
顺铂	10	0.31±0.03 ¹⁾	0.40±0.08 ²⁾
联合	40+10	0.29±0.02 ¹⁾	0.18±0.07 ^{2,3)}

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与顺铂组比较³⁾ $P < 0.05$ 。



A. 空白组; B. 黄芪-白花蛇舌草组; C. 顺铂组; D. 联合组

图 1 各组 A549 肺癌细胞 PI3K, Akt, p-Akt, mTOR, HIF-1 α , Cyclin D₁ 蛋白表达电泳

Fig 1 Electrophoresis of protein expression of PI3K, Akt, p-Akt, mTOR, HIF-1 α , and Cyclin D₁ in A549 cells

表5 黄芪-白花蛇舌草联合顺铂对A549肺癌细胞PI3K, Akt, p-Akt, mTOR, HIF-1 α , Cyclin D₁蛋白表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 5 Effect of Scutellariae Radix-Hedyotis Herba combined with cisplatin on protein expression of PI3K, Akt, p-Akt, mTOR, HIF-1 α , and Cyclin D₁ in A549 cells ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	质量浓度/ mg·L ⁻¹	PI3K/ β -actin	Akt/ β -actin	p-Akt/ β -actin	mTOR/ β -actin	HIF-1 α / β -actin	Cyclin D ₁ / β -actin
空白		1.80±0.17	2.41±0.10	2.60±0.09	0.92±0.08	0.68±0.07	1.02±0.06
黄芪-白花蛇舌	40	1.34±0.14 ¹⁾	2.38±0.09	1.74±0.04 ¹⁾	0.74±0.08 ¹⁾	0.46±0.07 ¹⁾	0.63±0.05 ¹⁾
顺铂	10	0.92±0.13 ¹⁾	2.43±0.09	1.16±0.05 ¹⁾	0.48±0.07 ¹⁾	0.31±0.05 ¹⁾	0.42±0.05 ¹⁾
联合	40+10	0.68±0.14 ^{1,2)}	2.40±0.07	0.73±0.06 ^{1,2)}	0.31±0.05 ^{1,2)}	0.18±0.04 ^{1,2)}	0.28±0.03 ^{1,2)}

注:与空白组比较¹⁾P<0.05;与顺铂组比较²⁾P<0.01。

4 讨论

肺癌是全球最常见的恶性肿瘤之一^[1],在我国发病率与死亡率位居癌症首位^[4],炎症为“癌症的第七大特征”^[9],某些肿瘤细胞在肿瘤微环境介导下通过自分泌或旁分泌炎症因子,进一步促进肿瘤增殖及转移^[21]。IL-6是目前已知的癌症相关多效能促炎因子,是衔接炎症与癌症的最核心因子^[11],在肺癌^[22]等肿瘤组织及患者血清中均明显升高^[12],与患者不良预后密切相关^[13],在肿瘤干细胞自我更新、细胞周期调控、血管生成等过程中发挥重要作用,参与肿瘤发生发展^[23]。由T、B细胞及肿瘤细胞等分泌,与受体结合后发挥其生物活性^[24]。本文作者前期研究发现花青素或成为理想的肿瘤基因预防因子,与降低IL-6水平,阻断其信号通路所级联的相关通路有关^[25],NI等^[26]研究证明,IL-6与细胞有丝分裂相关信号通路有关,是NSCLC增殖及预后的关键,可经PI3K/Akt等肿瘤信号通路,发挥生物学效应^[27]。韩睿等^[28]探究IL-6诱导NSCLC对表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂吉非替尼耐药机制,发现其与活化p-mTOR蛋白有关。前期临床试验发现,NSCLC患者血清中IL-6表达水平显著高于健康人群,且肺抑瘤合剂明显改善患者临床症状、生活质量及实体瘤大小,其机制与下调恶病质相关细胞因子IL-6水平有关^[10]。毫无疑问,IL-6可作为NSCLC发生发展的重要生物标记物之一。有研究表明,乏氧是肿瘤增殖的重要微环境因素^[29],是实体肿瘤的基本特征之一^[15]。HIF-1 α 是HIF-1的活性亚基,低氧条件下,HIF-1 α 通过其N端核定位信号进入细胞核,与HIF-1 β 结合,形成稳定异源二聚体,与环磷酸腺苷效应元件结合蛋白(CREB)结合蛋白/腺病毒E1A相关蛋白p300形成复合物,结合缺氧反应元件(HRE),激活靶基因转录,调控肿瘤细胞增殖、血管生成、糖酵解、侵袭与转移^[30]。研究发现,genistein可作为一种新型化疗药物,与抑制PI3K/

Akt/HIF-1 α 信号通路,减弱A549肺癌细胞增殖有关^[31]。临床研究也证实,HIF-1 α 在肺癌等多种原发性癌症患者体内表达水平显著升高^[32],其过度表达是导致不良预后的重要因素^[33]。毫无疑问,HIF-1 α 过度表达与肿瘤密切相关。

Cyclin D₁为细胞周期蛋白,参与G₁/S期转换的调控,是细胞周期重要的正性调控因子^[34],其基因启动子序列存在HRE,HIF-1 α 的上调可促进其转录表达,以肺癌等多种肿瘤细胞最为多见^[35],研究表明,Cyclin D₁的过度表达是诱导肿瘤细胞异常增殖的重要因素^[36]。

中医学认为,肺癌多归古籍“肺积”“咳嗽”“咯血”“虚劳”等范畴。《外证医案》曰:“正气虚则成岩。”《黄帝内经·素问·五脏生成》谓:“诸气者,皆属于肺”。肺脏清虚娇嫩,不耐邪侵,肺气虚是肺系疾病的病理基础^[37]。《杂病源流犀烛》云:“邪积胸中,阻塞气道,气不宣通,为痰,为血,邪既胜,正不得而制之,遂结成块而有块。”肺主宣降,通调水道,即肺为“水上之源”。肺失宣降,痰浊内生,易形成肿瘤等有形之邪。由此可见肺气亏虚,邪毒于内,热毒、湿聚、痰凝等壅滞体内,相互搏击,日久积聚而成肺癌。扶正祛邪、益气化痰、解毒清热为肺癌治疗大法。

药对是方剂的最小特色单位,药对成分相对简单,易于检测操作,不失中药配伍之妙,更能从中药分子层面,精准提纯,精确靶点,靶向干预、消除过多中药难以调控,难辨其明确机制之感,为中医药治疗肿瘤提供更为科学佐证。前期研究发现肺抑瘤合剂明显改善肺癌患者生活质量,减轻临床症状及不良反应,稳定体内实体瘤,提高患者生存期^[38],与实验中该方显著抑制肺癌裸鼠种植瘤相吻合。黄芪、白花蛇舌草为该方主要药物。黄芪味甘性微温,补气升阳,固表止汗,生津养血,托毒生肌;白花蛇舌草味微苦甘性寒,清热解毒,利湿通淋,散结消

肿。该药对益气升阳以补正虚,化痰解毒以祛毒聚,两药合用,共奏扶正解毒抗癌之功。

结果显示,经黄芪-白花蛇舌草、顺铂及联合药物处理后,A549细胞在不同时间内增殖均受到不同程度影响,表现出明显的时间依赖性,且药物作用72 h,联合组与其他两组相比差异更加明显;各组IL-6水平较空白组明显下降,顺铂组IL-6水平明显低于黄芪-白花蛇舌草组,且联合组细胞培养液中IL-6水平下降更加突出;与空白组比较,黄芪-白花蛇舌草组、顺铂组均能降低HIF-1 α , Cyclin D₁ mRNA水平,且联合用药降低幅度更加明显。各用药组IL-6, PI3K, p-Akt, mTOR, HIF-1 α , Cyclin D₁蛋白均明显降低,联合组与顺铂组降低水平更加显著,且联合组表达量明显低于顺铂组。

基于肺腺癌发展的复杂性,本实验将炎症肿瘤微环境和缺氧肿瘤微环境联系在一起,主要观察黄芪-白花蛇舌草对A549细胞增殖及炎症因子IL-6,缺氧诱导因子HIF-1 α 表达的影响。发现该药对明显抑制A549细胞增殖,降低IL-6, PI3K, p-Akt, mTOR, HIF-1 α , Cyclin D₁表达,且以联合组用药抑制效果更为明显。猜想该药对抑制A549细胞增殖机制可能与抑制IL-6/PI3K/Akt/mTOR-HIF-1 α 轴的表达与分泌有关。但该信号轴是否在肿瘤微环境中普遍存在,或黄芪-白花蛇舌草抑瘤机制是否由于该信号轴过分激活,或IL-6是否为该药对发挥抗肿瘤作用的直接靶点;或是该药对通过化疗增敏或减弱化疗耐药而增效?这一系列问题,仍需开展进一步实验对具体分子机制进行深入研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] LIN L Y, CHENG K L, HE Z, et al. A polysaccharide from *Hedyotis diffusa* interrupts metastatic potential of lung Adenocarcinoma A549 cells by inhibiting EMT via EGFR/Akt/ERK signaling pathways [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 129 (2019): 706-714.

[2] PEI X D, XIAO J S, WEI G J, et al. Oenothien B inhibits human non-small cell lung cancer A549 cell proliferation by ROS-mediated PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway [J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 298 (2019): 112-120.

[3] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71 (1): 7-33.

[4] WANG Z, LI S, WU L, et al. Effect of acupuncture on lung cancer-related fatigue: study protocol for a multi-center randomized controlled trial [J]. *Trials*, 2019, 20 (1): 625-633.

[5] ZOU B, ZHOU X L, LAI S Q, et al. Notch signaling and non-small cell lung cancer [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15 (3): 3415-3421.

[6] 包曙光,王宇飞,郭占林. HIF-1在非小细胞肺癌中的研究进展 [J]. *内蒙古医学杂志*, 2020, 52(1): 17-22.

[7] WANG J J, WANG Y L, GE X X, et al. Prognostic values of platelet-associated indicators in resectable lung cancers [J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2019, 18 (2019): 1533033819837261.

[8] JEMAL A, SIEGEL R, WARD E, et al. Cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2007, 57(1): 43-66.

[9] MANTOVANI A, ALLAVENA P, SICA A, et al. Cancer-related inflammation [J]. *Nature*, 2008, 454 (7203): 436-444.

[10] 刘思远,李志鹏,郑心. 肺抑瘤合剂联合AP化疗方案治疗非小细胞肺癌临床疗效观察 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(3): 185-190.

[11] 李馥延,霍达,栾诗佳,等. IL-6/JAK2/STAT3信号通路在肿瘤中的作用 [J]. *生命的化学*, 2021, 41(3): 535-540.

[12] 尹超. P-选择素、TPO、IL-6及血小板与非小细胞肺癌的相关性研究 [D]. 贵阳: 贵州医科大学, 2017.

[13] 崔东,许广辉,贾忠伟,等. NLR、VEGF、IL-6、TNF- α 水平与非小细胞肺癌预后相关性 [J]. *现代肿瘤医学*, 2019, 27(14): 2514-2518.

[14] SONI S, PADWAD Y S. HIF-1 in cancer therapy: Two decade long story of a transcription factor [J]. *Acta Oncol*, 2017, 56(4): 503-515.

[15] VAUPEL P, MAYER A. Hypoxia in tumors: pathogenesis-related classification, characterization of hypoxia subtypes, and associated biological and clinical implications [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 812 (2014): 19-24.

[16] 吴裕丹,倪嘉延,陈耀庭,等. 沉默HIF-1 α 基因表达大鼠肝癌细胞增殖的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(7): 1207-1212.

[17] 史新萌,刘玉萍,瞿鼎,等. 抑制HIF-1 α 表达的中药抗肿瘤活性成分研究进展 [J]. *药学报*, 2021, doi: org/10.16438/j.0513-4870.2021-0167.

[18] 李春波,田菲. 基于扶正祛邪治法论恶性肿瘤的中西医结合治疗 [J]. *内蒙古中医药*, 2020, 39(7): 149-151.

[19] LIN W F, LU J Y, CHENG B B, et al. Progress in research on the effects of traditional Chinese medicine

- on the tumor microenvironment [J]. *J Integr Med*, 2017, 15(4):282-287.
- [20] 汪宇涵,张铭,崔清,等. 益气养精方对人肺癌 A549 细胞糖酵解通路中 HIF-1 α 和 PFKFB3 蛋白的调节作用[J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(9):2155-2158, 2315.
- [21] 李卫东,花宝金. 肿瘤微环境中的炎症机制与肿瘤转移[J]. *国际肿瘤学杂志*, 2011(12):911-913.
- [22] 刘苗苗,王亚豪,马威. CCL-18、IL-6、TNF- α 在肺癌患者外周血和组织 mRNA 中表达情况及意义[J]. *右江医学*, 2020, 48(2):115-118.
- [23] 陈惟. 白细胞介素 6 与消化道肿瘤关系的研究进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(10):1457-1462.
- [24] NISHIMOTO N, KISHIMOTO T. Interleukin 6: from bench to bedside[J]. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2006, 2(11):619-626.
- [25] 刘思远,李志鹏,彭召云,等. 花青素对肺癌细胞相关炎症因子信号转导通路作用的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(14):219-225.
- [26] NI M, LIU X, WU J, et al. Identification of candidate biomarkers correlated with the pathogenesis and prognosis of non-small cell lung cancer via integrated bioinformatics analysis [J]. *Front Genet*, 2018 (9): 1-14.
- [27] 王丹,陈晓,徐葳,等. 自分泌 IL-6 经 Ras/MEK/ERK、PI3K/Akt 通路促进卵巢癌细胞黏附和侵袭功能的研究[J]. *免疫学杂志*, 2016, 32(4):294-298.
- [28] 韩睿,李力,林采余,等. IL-6 诱导非小细胞肺癌 Gefitinib 耐药的作用和机制[J]. *重庆医学*, 2014, 43(15):1825-1828.
- [29] 张璐,方岳,牛继国,等. 缺氧诱导因子-1 与恶性肿瘤关系的研究进展[J]. *医学综述*, 2021, 27(5): 924-930.
- [30] MASOUD G N, LI W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5(5): 378-389.
- [31] ZHANG J, SU H Z, LI Q F, et al. Genistein decreases A549 cell viability via inhibition of the PI3K/Akt/HIF1 α /VEGF and NF- κ B/COX2 signaling pathways[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(4):2296-2302.
- [32] TERZUOLI E, PUPPO M, RAPISARDA A, et al. Aminoflavone, a ligand of the aryl hydrocarbon receptor, inhibits HIF-1 α expression in an AhR-independent fashion[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(17): 6837-6848.
- [33] NALINI D, SELVARAJ J, KUMAR G S. Herbal nutraceuticals: safe and potent therapeutics to battle tumor hypoxia [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2020, 146(1):1-18.
- [34] FENG Z, CHEN J, WEI H, et al. The risk factor of gallbladder cancer: hyperplasia of mucous epithelium caused by gallstones associates with p16/CyclinD₁/CDK4 pathway [J]. *Exp Mol Pathol*, 2011, 91(2): 569-577.
- [35] ZHANG W Q, XIONG Z G, WEI T Q, et al. Nuclear factor 90 promotes angiogenesis by regulating HIF-1 α /VEGF-A expression through the PI3K/Akt signaling pathway in human cervical cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3):276.
- [36] ZHANG B, LI Y L, ZHAO J L, et al. Hypoxia-inducible factor-1 promotes cancer progression through activating Akt/Cyclin D₁ signaling pathway in osteosarcoma [J]. *Biomedecine Pharmacother*, 2018, 105(2018):1-9.
- [37] 彭波,李泽庚,孙志广. 肺气虚证的认识及内涵[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2008, 10(8):36-38.
- [38] 刘思远. 基于 IL-6/PI3K/Akt/mTOR 通路探究肺抑瘤合剂抑制肺腺癌的临床与机制研究[D]. 济南:山东中医药大学, 2019.

[责任编辑 张丰丰]