

## 基于PI3K/Akt信号通路探讨黄芪多糖对肺腺癌 A549/DDP细胞移植瘤EMT进程的影响

张颖<sup>1</sup>, 王淳<sup>2</sup>, 于丹<sup>2</sup>, 高原<sup>2</sup>, 井欢<sup>2</sup>, 王莹<sup>2</sup>, 刘春英<sup>2\*</sup>

(1. 济宁医学院, 山东 济宁 272000;

2. 辽宁中医药大学, 沈阳 110032)

**[摘要]** 目的:探讨黄芪多糖(APS)对转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )诱导的肺腺癌A549/DDP细胞移植瘤上皮间质转化(EMT)进程的影响及其潜在分子机制。方法:BALB/c裸鼠随机分为空载组(TGF- $\beta_1$ 空载A549/DDP细胞),模型组,顺铂组,联合组(TGF- $\beta_1$ 过表达A549/DDP细胞)。联合组灌胃APS( $0.3\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ )+腹腔注射顺铂( $0.003\text{ 5 g}\cdot\text{kg}^{-1}$ );顺铂组腹腔注射顺铂( $0.003\text{ 5 g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )。药物干预后,处死裸鼠,取移植瘤和肺。称量瘤质量,计算抑瘤率;镜下计数肿瘤肺转移数;苏木素-伊红(HE)染色观察肿瘤病理和肿瘤组织肺转移情况;免疫组化,蛋白免疫印迹法(Western blot),实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测移植瘤中EMT分子标志物E-钙黏蛋白(E-cadherin),波形蛋白(Vimentin), $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)和磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)的蛋白和mRNA的表达。结果:与空载组比较,模型组瘤质量、肺转移结节数增加( $P<0.05$ ),肿瘤细胞连接稀疏,细胞长梭样,肺部有大面积肿瘤结节,E-cadherin蛋白和mRNA表达降低,Vimentin, $\alpha$ -SMA蛋白和mRNA表达升高,磷酸化(p)-PI3K,p-Akt蛋白表达升高( $P<0.05$ )。与模型组、顺铂组比较,联合组瘤质量、肺转移结节数减少( $P<0.05$ );肿瘤细胞连接紧密,细胞圆形或椭圆形,无明显肺转移,E-cadherin蛋白和mRNA表达升高( $P<0.05$ ),Vimentin, $\alpha$ -SMA蛋白和mRNA表达降低( $P<0.05$ ),p-PI3K,p-Akt蛋白表达降低( $P<0.05$ )。各组间PI3K,Akt蛋白表达差异无统计学意义。结论:APS对肺腺癌A549/DDP细胞EMT有抑制作用,这一作用可能与其抑制活化的PI3K/Akt蛋白表达有关。

**[关键词]** 黄芪多糖; 上皮间质转化(EMT); 磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt); 肺腺癌; 移植瘤

**[中图分类号]** R22;R273;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)23-0051-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20212323

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211014.1534.005.html>

**[网络出版日期]** 2021-10-14 18:50

### Effect of Astragalus Polysaccharide on EMT of A549/DDP Lung Adenocarcinoma Xenograft: An Exploration Based on PI3K/Akt Signaling Pathway

ZHANG Ying<sup>1</sup>, WANG Chun<sup>2</sup>, YU Dan<sup>2</sup>, GAO Yuan<sup>2</sup>, JING Huan<sup>2</sup>, WANG Ying<sup>2</sup>, LIU Chun-ying<sup>2\*</sup>

(1. Jining Medical University, Jining 272000, China;

2. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Astragalus polysaccharide (APS) on transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ )-induced epithelial mesenchymal transition (EMT) of A549/DDP lung adenocarcinoma xenograft and its potential molecular mechanism. **Method:** BALB/c nude mice were randomly divided into the non-loading group (A549/DDP cells not loaded with TGF- $\beta_1$ ), model group, cisplatin group, and combined group (A549/DDP cells overexpressing TGF- $\beta_1$ ). Mice in the combined group were treated with intragastric administration of APS ( $0.3\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) and intraperitoneal injection of cisplatin ( $0.003\text{ 5 g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), while those in the cisplatin group only received intraperitoneal injection of cisplatin ( $0.003\text{ 5 g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). After drug

**[收稿日期]** 20210810(003)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81973735,81774184)

**[第一作者]** 张颖,博士,副教授,从事中医药抗肿瘤的作用机制研究,E-mail:155322401@qq.com

**[通信作者]** \*刘春英,博士,教授,从事中医药抗肿瘤的作用机制研究,Tel:024-31207092,E-mail:chunying99@163.com

intervention, the nude mice were sacrificed and the xenograft and lung were harvested, followed by the weighing of tumor and the calculation of the inhibition rate. The number of tumors metastasizing to the lung was counted under the microscope. The pathological features of tumors and their metastasis to the lung tumor were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The protein and mRNA expression levels of EMT molecular markers E-cadherin, Vimentin,  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), and phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) in the xenograft were detected by immunohistochemistry, Western blot, and Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** Compared with the non-loading group, the model group exhibited increased tumor weight and pulmonary metastatic nodules ( $P<0.05$ ), sparse tumor cell junctions, long spindle cells, massive metastatic nodules in the lung, down-regulated E-cadherin protein and mRNA expression, and up-regulated Vimentin and  $\alpha$ -SMA protein and mRNA expression and p-PI3K and p-Akt protein expression ( $P<0.05$ ). Compared with the model group and cisplatin group, the combined group displayed decreased tumor weight and pulmonary metastatic nodules ( $P<0.05$ ), tight tumor cell junctions, round or oval cells, no obvious lung metastasis, up-regulated E-cadherin protein and mRNA expression ( $P<0.05$ ), and down-regulated Vimentin and  $\alpha$ -SMA protein and mRNA expression ( $P<0.05$ ) and p-PI3K and p-Akt protein expression ( $P<0.05$ ). There was no significant difference in PI3K or Akt protein expression among groups. **Conclusion:** APS has a certain inhibitory effect against EMT in lung adenocarcinoma A549/DDP cells, which may be related to the inhibition of activated PI3K/Akt protein expression.

**[Keywords]** Astragalus polysaccharide (APS); epithelial mesenchymal transition (EMT); phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt); lung adenocarcinoma; xenograft

肺腺癌是主要起源于支气管黏膜上皮组织的非小细胞肺癌<sup>[1]</sup>。研究证实,肺腺癌的发生发展、侵袭转移、耐药等特性均与肿瘤细胞的上皮间质转化(EMT)进程有密切关联<sup>[2]</sup>,EMT化的肿瘤细胞主要发生 E-钙黏蛋白(E-cadherin),波形蛋白(Vimentin), $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)等标志物定位或定量的异常改变。采取多种方式联合应用的协同治疗手段干预肺腺癌,可以达到提高患者生存率,改善患者预后的目的<sup>[3]</sup>。近些年来,天然药物及其提取物以低毒、高效、多靶点等优势在恶性肿瘤的治疗中被广泛关注<sup>[4]</sup>。黄芪多糖(APS)是具有甘温补气效果的植物药黄芪的主要活性成分,具有抗氧化、抗病毒、降血糖、增强免疫系统功能等多重功效,与化疗药物联合使用在抑制多种肿瘤细胞增殖、转移、改善耐药等方面具有协同效果<sup>[5-6]</sup>。研究证实,转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )是触发肿瘤细胞发生EMT转化的关键诱导因素之一<sup>[7]</sup>,TGF- $\beta_1$ 诱导肿瘤细胞EMT化的过程与磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路的激活具有密切关联<sup>[8]</sup>。笔者前期已证实,将TGF- $\beta_1$ 基因过表达的慢病毒感染A549/DDP细胞植入裸鼠皮下后,可构建稳定的EMT移植瘤模型<sup>[9]</sup>。本实验以裸鼠肺腺癌A549/DDP细胞移植瘤为研究对象,采用TGF- $\beta_1$ 基因过表达慢病毒感染技术诱导其发生EMT,探究APS对

A549/DDP细胞EMT的影响及与PI3K/Akt信号通路的关联性,为APS在治疗肺腺癌的临床应用方面提供理论支撑。

## 1 材料

**1.1 细胞株与动物** 肺腺癌A549/DDP细胞株(江苏齐氏生物科技有限公司,批号7-1146),置于37℃,5%CO<sub>2</sub>孵箱培养,传至10代。SPF级BALB/c雄性裸鼠20只,6周龄,体质量(20±2)g,购于北京华阜康生物科技有限公司,合格证号SCXK(京)2014-0004。动物使用许可证号SYXK(辽)2013-0009,本实验经由辽宁中医药大学伦理委员会审核批准,批号2019YS(DW)-004-01。

**1.2 药物** APS注射液(芮城科龙公司,货号040192711);顺铂(美国Sigma公司,批号MKBZ0848V)。

**1.3 试剂** 苏木素-伊红(HE)染色试剂盒,山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为C0105, A0277); E-cadherin, Vimentin,  $\alpha$ -SMA, PI3K, Akt, 磷酸化(p)-Akt,  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)一抗,全蛋白提取试剂盒, ECL检测试剂盒(沈阳万类生物科技有限公司,批号分别为WL01482, WL01960, WL02510, WL02240, WL0003b, WLP001a, WL01372, WLA019, WLA003); p-PI3K抗体(英国Abcam公司,批号

ab182651);DAB显色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号DA1010);Super M-MLV反转录酶,2×Power Taq PCR MasterMix,TRIpure(北京百泰克生物技术有限公司,批号分别为PR6502,PR1702,PR1001)。

**1.4 仪器** DM IL LED型普通光学显微镜(德国Leica公司);NW10LVF型超纯水系统(香港Heal Force公司);SHZ-88型水浴恒温振荡器(其林贝尔仪器制造有限公司);T16R型冷冻高速离心机(美国Thermo公司);imark型酶标仪(美国Bio-Rad公司);DYCZ-24DN型双垂直蛋白电泳仪,DYDZ-40D型转移槽(北京六一生物科技有限公司);Bio Specnano型紫外可见分光光度计(日本岛津公司);Exicycler96型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(韩国Bioneer公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞感染** A549/DDP细胞按感染指数20:1进行孵育,分选出感染成功的细胞进行接种。

**2.2 移植瘤模型的制备及动物实验** 20只裸鼠随机分为4组(5只/组),即空载组、模型组、顺铂组、联合组。适应性饲养1周后,于裸鼠左侧腋窝皮下进行细胞接种,空载组接种空载A549/DDP细胞,余组接种过表达A549/DDP细胞。细胞接种8 d后,观察到接种部位皮下出现2~3 mm肿瘤结节。联合组灌胃APS注射液(0.3 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),腹腔注射顺铂(0.003 5 g·kg<sup>-1</sup>,2次/周);顺铂组腹腔注射顺铂(0.003 5 g·kg<sup>-1</sup>,2次/周)<sup>[10-11]</sup>。细胞接种32 d后,处死裸鼠,取肿瘤、肺,4%多聚甲醛固定,备用。

### 2.3 指标检测

**2.3.1 抑瘤率及肺转移结节** 抑瘤率=(模型组瘤重-各给药组瘤重)/模型组瘤重×100%。显微镜下计数肺转移结节。

**2.3.2 HE染色观察肿瘤组织病理和肺转移** 标本包埋,切片,按HE染色试剂盒步骤常规染色,200倍显微镜下观察,拍照。

**2.3.3 免疫组化检测** 移植瘤中E-cadherin, Vimentin,  $\alpha$ -SMA及PI3K/Akt信号通路的蛋白表达水平 将切片脱蜡,抗原修复后,3% $H_2O_2$ 室温孵育15 min,加山羊血清封闭。分别滴加一抗(E-cadherin, Akt, p-Akt 1: 100, Vimentin, PI3K, p-PI3K 1: 200,  $\alpha$ -SMA 1: 300),二抗,辣根过氧化物酶标记亲和素,进行DAB显色,苏木素复染,梯度乙醇脱水,透明,中性树胶封片,晾干。400倍镜下观察,拍照。

**2.3.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测** 移植瘤中E-cadherin, Vimentin,  $\alpha$ -SMA及PI3K/Akt信号通路蛋白表达水平 提取总蛋白,加上样液,电泳分离,转到PVDF膜。加入一抗(Vimentin,  $\alpha$ -SMA, PI3K, Akt 1: 500, E-cadherin, p-PI3K, p-Akt 1: 1 000),4 °C孵育过夜。加入二抗,37 °C孵育45 min。将ECL发光液均匀洒到PVDF膜上,暗室曝光,扫描。用凝胶成像分析系统分析条带的灰度值,  $\beta$ -actin为内参获得相对表达量。

**2.3.5 Real-time PCR检测** 移植瘤中E-cadherin, Vimentin,  $\alpha$ -SMA mRNA表达水平 提取总RNA,检测RNA浓度和纯度,RNA样本反转录合成相应的cDNA,反应条件为70 °C加热5 min,冷却2 min,25 °C温浴10 min,42 °C温浴50 min,80 °C加热10 min,1个循环。PCR扩增反应条件为94 °C预变性5 min,1个循环;94 °C变性10 s,60 °C退火20 s,72 °C延伸30 s,40个循环;72 °C终延伸2 min 30 s,40 °C 1 min 30 s,60~94 °C,每秒1 °C,25 °C 1~2 min,1个循环。采用2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup> 方法对统计数据结果进行分析。PCR引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
E-cadherin	上游 GAACGCATTGCCACATACAC	244
	下游 TGGTGTAAGCGATGGCGGCA	
Vimentin	上游 TTGAACGCAAAGTGGAATC	136
	下游 AGGTCAGGCTTGAAACA	
$\alpha$ -SMA	上游 TCCCTTGAGAAGAGTTACGAGTT	146
	下游 ATGATGCTGTTGTAGGTGGTT	
$\beta$ -actin	上游 CACTGTGCCCATCTACGAGG	155
	下游 TAATGTCACGCACGATTTC	

**2.4 统计学处理** 采用SPSS 22.0软件对实验数据进行描述性统计分析,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间比较采用One-way ANOVA,两两比较采用最小显著性差异法(LSD), $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 APS对抑瘤率及肺转移结节的影响** 模型组肿瘤质量最大。与模型组、顺铂组比较,联合组肿瘤重量降低( $P<0.05$ )。镜下观察结果显示,各组裸鼠肺部均有转移结节出现,模型组肺部结节数量最多。与模型组、顺铂组比较,联合组肺转移结节数量降低( $P<0.05$ )。见表2。

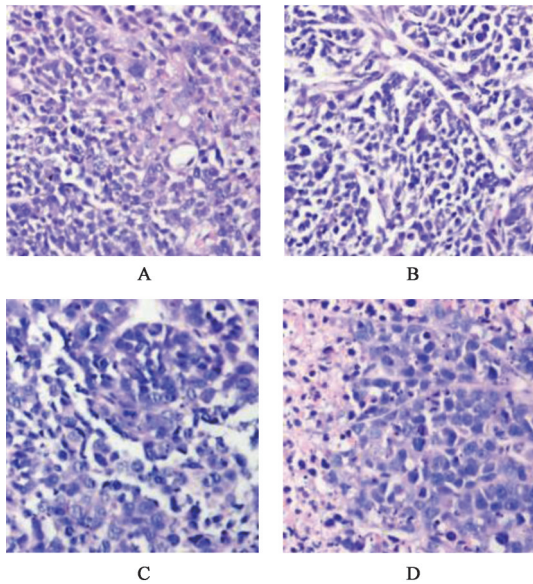
表2 APS对抑瘤率及肺转移结节的影响( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 2 Effect of APS on tumor suppression rate and pulmonary metastatic nodules ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	瘤重/g	抑瘤率/%	肺转移结节数/个
空载		0.22±0.02	-	8.40±1.52
模型		0.30±0.04 <sup>1)</sup>	-	13.20±3.27 <sup>1)</sup>
顺铂	0.003 5	0.27±0.04	10.00	12.20±1.79
联合	0.3+0.003 5	0.19±0.02 <sup>2,3)</sup>	36.67	9.20±1.64 <sup>2,3)</sup>

注:与空载组比较<sup>1)</sup>P<0.05;与模型组比较<sup>2)</sup>P<0.05;与顺铂组比较<sup>3)</sup>P<0.05(表3~5同)。

**3.2 APS对肿瘤组织病理的影响** 空载组细胞间隙小,细胞连接紧密,细胞多见椭圆形或圆形;模型组、顺铂组细胞间隙增大,细胞连接稀疏,细胞可见长梭或不规则样改变;联合组细胞间隙减小,细胞形态由长梭向圆形转化。见图1。



A. 空载组;B. 模型组;C. 顺铂组;D. 联合组(图2~6同)

图1 APS对肿瘤组织病理的影响(HE, ×200)

Fig. 1 Effect of APS on histomorphology of lung (HE, ×200)

**3.3 APS对肿瘤组织肺转移的影响** 空载组肺泡、肺泡囊等肺组织结构基本正常;模型组肺组织结构基本消失,可见满视野大面积肿瘤细胞,为肺转移部位;顺铂组肺转移面积变小,个别区域可略见肺组织结构;联合组肺组织结构趋向正常,无明显肺转移现象,有清晰的肺泡和肺间隔,但肺间隔充血仍较明显。见图2。

**3.4 APS对移植瘤中E-cadherin, Vimentin,  $\alpha$ -SMA的影响**

**3.4.1 APS对移植瘤中E-cadherin, Vimentin,  $\alpha$ -SMA蛋白表达的影响** 棕黄(褐)色颗粒为

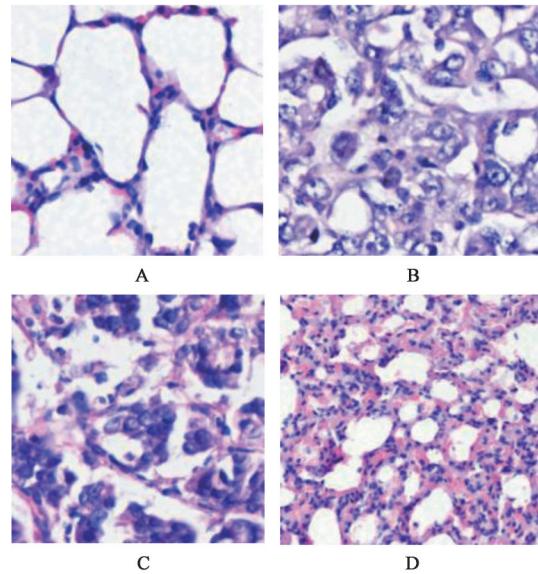


图2 APS对肿瘤组织肺转移的影响(HE, ×200)

Fig. 2 Effect of APS on lung metastasis of tumor tissue (HE, ×200)

E-cadherin, Vimentin,  $\alpha$ -SMA蛋白的阳性着色,常位于细胞膜和细胞质,各组均有不同程度表达。与空载组比较,模型组E-cadherin蛋白表达降低, Vimentin,  $\alpha$ -SMA蛋白表达升高;与模型组、顺铂组比较,联合组E-cadherin蛋白表达升高, Vimentin,  $\alpha$ -SMA蛋白表达降低。见图3。

**3.4.2 APS对移植瘤中E-cadherin, Vimentin,  $\alpha$ -SMA蛋白表达的影响** 与空载组比较,模型组E-cadherin蛋白表达降低, Vimentin,  $\alpha$ -SMA蛋白表达升高( $P<0.05$ );与模型组、顺铂组比较,联合组E-cadherin蛋白表达升高, Vimentin,  $\alpha$ -SMA蛋白表达降低( $P<0.05$ )。见图4,表3。

**3.4.3 APS对移植瘤中E-cadherin, Vimentin,  $\alpha$ -SMA mRNA表达的影响** 与空载组比较,模型组E-cadherin mRNA表达降低, Vimentin,  $\alpha$ -SMA mRNA表达升高( $P<0.05$ );与模型组、顺铂组比较,联合组E-cadherin表达升高, Vimentin,  $\alpha$ -SMA mRNA表达降低( $P<0.05$ )。见表4。

**3.5 APS对移植瘤中PI3K/Akt通路的影响**

**3.5.1 APS对移植瘤中PI3K, Akt蛋白表达的影响**

棕黄或棕褐色颗粒为PI3K和Akt蛋白阳性着色;PI3K蛋白主要位于细胞质和细胞膜, Akt蛋白主要位于细胞质和细胞核。与空载组比较,模型组p-PI3K, p-Akt蛋白阳性表达升高;与模型组、顺铂组比较,联合组p-PI3K, p-Akt蛋白阳性表达降低。见图5。

**3.5.2 APS对移植瘤PI3K, Akt蛋白的影响** 与空载组比较,模型组p-PI3K, p-Akt蛋白表达升高( $P<$

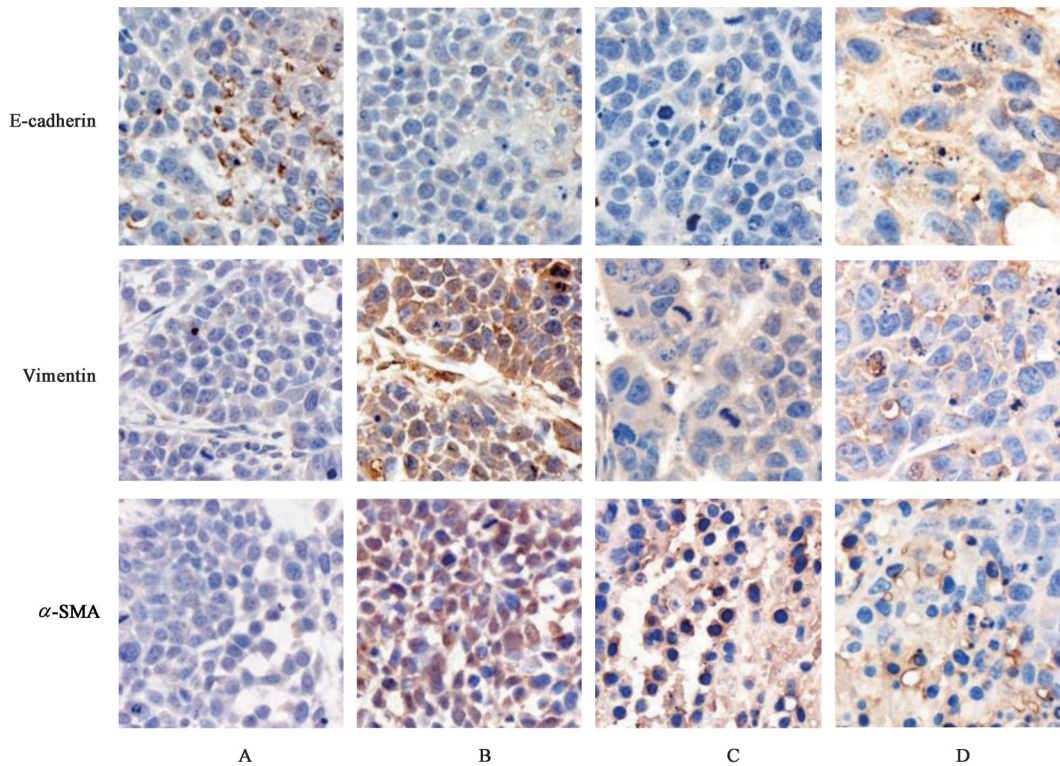


图3 APS对移植瘤中E-cadherin, Vimentin, α-SMA蛋白表达的影响 (IHC, ×400)

Fig. 3 Effect of APS on E-cadherin, Vimentin and α-SMA protein expression in transplanted tumors (IHC, ×400)

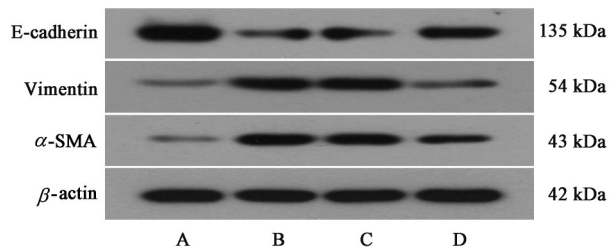


图4 APS对移植瘤中E-cadherin, Vimentin, α-SMA蛋白表达电泳  
Fig. 4 Electrophoresis of APS on E-cadherin, Vimentin and α-SMA protein expression in transplanted tumors

表3 APS对移植瘤中E-cadherin, Vimentin, α-SMA蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 3 Effect of APS on E-cadherin, Vimentin and α-SMA protein expression in transplanted tumors ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	E-cadherin /β-actin	Vimentin /β-actin	α-SMA /β-actin
空载		0.97±0.03	1.00±0.14	0.99±0.06
模型		0.39±0.02 <sup>1)</sup>	5.62±0.54 <sup>1)</sup>	4.72±0.08 <sup>1)</sup>
顺铂	0.003 5	0.41±0.05	5.55±0.29	4.58±0.30
联合	0.3+0.003 5	0.70±0.07 <sup>2,3)</sup>	1.42±0.23 <sup>2,3)</sup>	3.08±0.17 <sup>2,3)</sup>

0.05);与模型组、顺铂组比较,联合组p-PI3K, p-Akt蛋白表达降低( $P<0.05$ )。各组间PI3K, Akt蛋白表达差异无统计学意义。见图6,表5。

#### 4 讨论

EMT参与了肺腺癌肿瘤的侵袭、转移和播散的

表4 APS对移植瘤中E-cadherin, Vimentin, α-SMA mRNA表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 4 Effect of APS on E-cadherin, Vimentin and α-SMA mRNA expression in transplanted tumors ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	E-cadherin	Vimentin	α-SMA
空载		1.02±0.21	1.01±0.15	1.00±0.08
模型		0.48±0.05 <sup>1)</sup>	4.51±0.38 <sup>1)</sup>	3.59±0.18 <sup>1)</sup>
顺铂	0.003 5	0.40±0.02	4.09±0.45	3.68±0.41
联合	0.3+0.003 5	0.72±0.06 <sup>2,3)</sup>	1.95±0.22 <sup>2,3)</sup>	1.94±0.18 <sup>2,3)</sup>

全过程,肿瘤细胞不同的EMT状态与其侵袭、转移和播散能力呈正相关<sup>[12]</sup>。研究证实,发生了EMT的肿瘤细胞侵袭能力增强,其主要机制与PI3K/Akt信号通路活化引起的细胞黏附能力下降密切相关<sup>[13]</sup>。引起细胞间黏附力改变的关键环节包括两方面:①上皮标记蛋白的表达异常减少,如E-cadherin等;②间质标记蛋白的表达异常增多,如Vimentin, α-SMA等。E-cadherin蛋白起到跨膜连接相邻细胞的侧面、稳定上皮细胞极性的作用,其表达减少会引起细胞失去接触性抑制而发生EMT<sup>[14]</sup>。Vimentin是一种存在于间质细胞胞质中的纤维蛋白,与微丝、微管一起起到连接细胞膜和细胞核的作用,正常上皮细胞中Vimentin较少表达,当上皮细胞中Vimentin异常表达时,细胞紧密连接被破

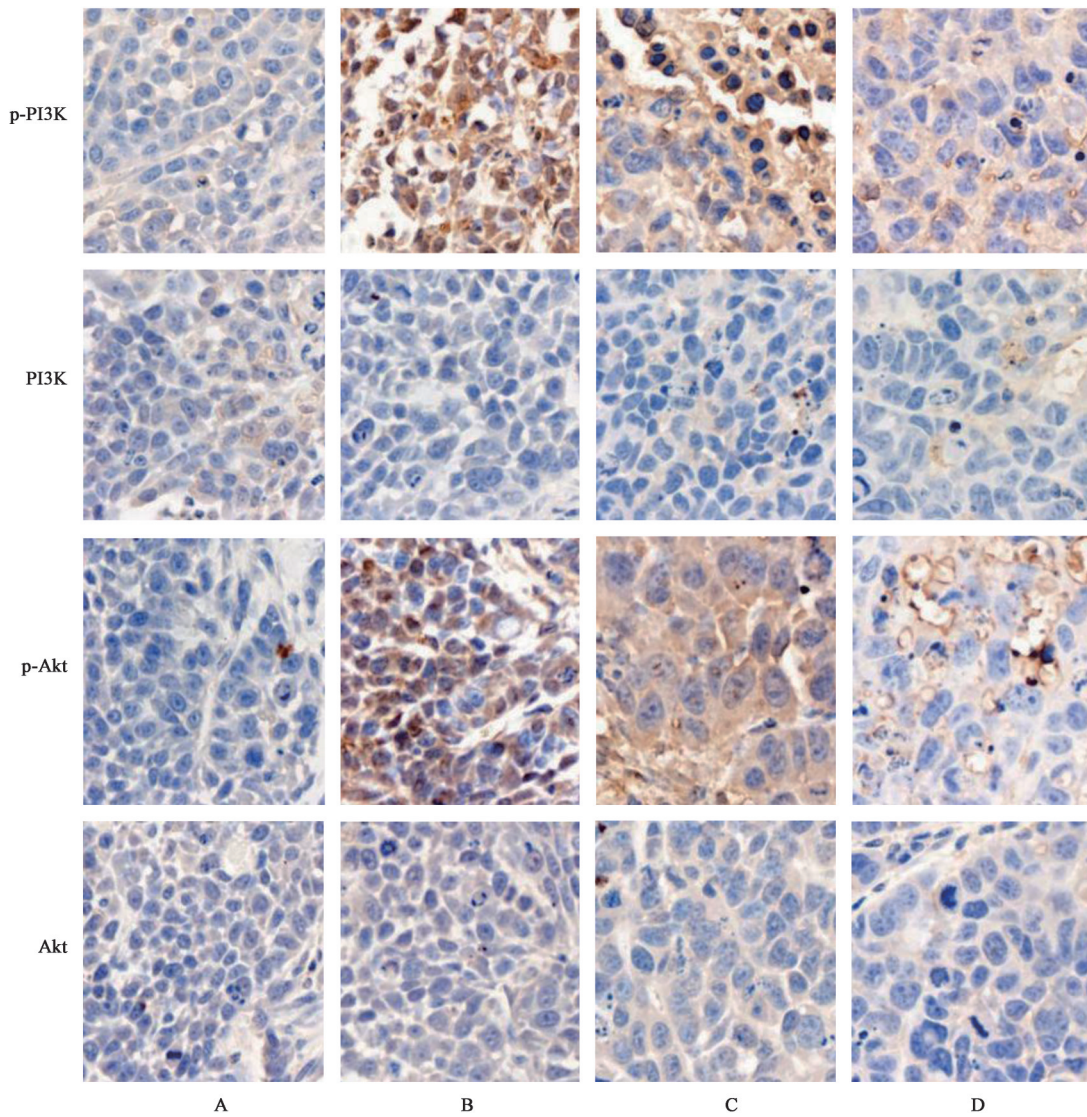


图5 APS对移植瘤中PI3K, Akt蛋白表达的影响 (IHC, ×400)

Fig. 5 Effect of APS on PI3K and Akt protein expression in transplanted tumors (IHC, ×400)

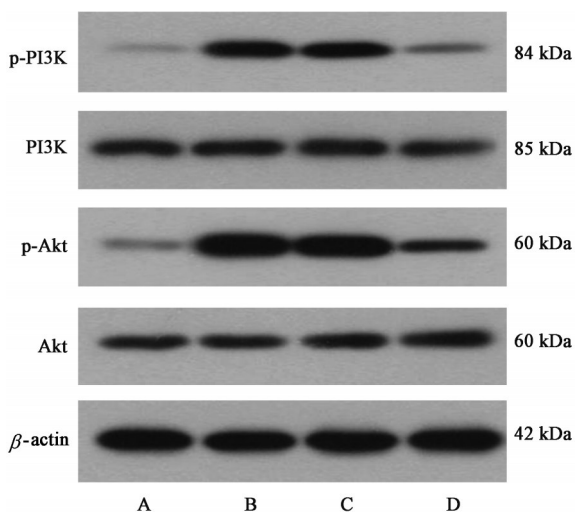


图6 APS对移植瘤中PI3K, Akt蛋白表达电泳

Fig. 6 Electrophoresis of APS on PI3K, Akt protein expression in transplanted tumors

坏,细胞游走和侵袭能力增强<sup>[15]</sup>。 $\alpha$ -SMA是受细胞增殖调控的高度保守的蛋白质,其主要功能在于控制细胞骨架结构和运动, $\alpha$ -SMA表达增加,将会导致细胞游走和迁移<sup>[16]</sup>。Vimentin, $\alpha$ -SMA均与肿瘤是否发生转移、侵袭呈正相关。因此,探索肿瘤细胞侵袭的分子机制并及时干预对肺腺癌的诊断和治疗具有重大意义。

近些年来,中医药及其提取物在肺腺癌治疗中因疗效显著、成本低、不良反用小等优势颇受关注,尤其是兼具免疫调节和抗肿瘤作用的中药,既补益正气、提高机体免疫力,又祛邪运浊、抑制肿瘤生长<sup>[17]</sup>。黄芪是补益类中药的典型代表,其所包含的多糖、皂苷、生物碱、挥发油等活性成分均具有免疫调节和肿瘤治疗方面的功效,其中以对APS的研究报道为多<sup>[18]</sup>。研究证实,APS在黄芪有效成分中含

表5 APS对移植瘤中PI3K, Akt蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 5 Effect of APS on PI3K and Akt protein expression in transplanted tumors ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	p-PI3K/ $\beta$ -actin	PI3K/ $\beta$ -actin	p-Akt/ $\beta$ -actin	Akt/ $\beta$ -actin
空载		1.05±0.11	1.00±0.05	1.00±0.10	1.02±0.04
模型		5.12±0.33 <sup>1)</sup>	0.99±0.08	6.29±0.25 <sup>1)</sup>	1.05±0.05
顺铂	0.003 5	4.92±0.23	1.00±0.08	6.04±0.19	1.04±0.06
联合	0.3+0.003 5	1.42±0.26 <sup>2,3)</sup>	1.05±0.07	2.44±0.20 <sup>2,3)</sup>	1.05±0.03

量最多、活性最强,是黄芪发挥抗肿瘤作用的最主要成分,在乳腺癌、肝癌、肺腺癌、结直肠癌、食管癌等多种肿瘤细胞的促进凋亡、逆转耐药等方面发挥重要作用<sup>[19-20]</sup>。本实验旨在通过在体实验验证APS在肺腺癌化疗过程中具有抑制肿瘤细胞EMT的作用,结果显示,APS联合顺铂治疗肺腺癌,与模型组和顺铂组比较,联合组瘤重降低,肺转移结节数量减少,证实APS具有抑制肿瘤生长和转移的作用。HE染色切片显示,模型组细胞连接稀疏,细胞间隙变大,细胞多见长梭形,联合组细胞间隙狭小,细胞多见圆形或椭圆形,证实APS在肿瘤细胞EMT过程中具有抑制其迁移的作用。结果显示,与空载组比较,模型组E-cadherin蛋白和mRNA表达均下调,Vimentin,  $\alpha$ -SMA蛋白和mRNA表达均上调,证实A549/DDP细胞经TGF- $\beta_1$ 诱导发生了EMT;与模型组比较,顺铂组E-cadherin, Vimentin,  $\alpha$ -SMA蛋白和mRNA表达差异无统计学意义,证实单独使用顺铂化疗对干预肿瘤细胞EMT效果较差;而联合APS使用后,E-cadherin蛋白和mRNA表达增多,Vimentin,  $\alpha$ -SMA蛋白和mRNA均减少,证实APS可增强细胞间黏附力而抑制肺腺癌细胞EMT进程,其分子机制可能与上调上皮标记蛋白并下调间质标记蛋白密切相关。

介导TGF- $\beta_1$ 诱导的肿瘤细胞EMT的信号通路众多,其中PI3K/Akt信号通路直接关系到肿瘤细胞的活化增殖、迁徙转移等进程<sup>[21]</sup>。PI3K激活后,将触发磷脂酰肌醇-3, 4, 5联结(PIP3)与信号蛋白Akt, 磷酸肌醇依赖激酶1(PDK1)结合,引起Akt蛋白的活化,磷酸化的Akt再次激活下游靶蛋白而调控肿瘤细胞的生长、增殖、抗凋亡<sup>[22]</sup>。检测PI3K/Akt蛋白及其磷酸化后的表达,结果显示,与空载组比较,模型组p-PI3K和p-Akt蛋白表达水平均升高;与模型组和顺铂组比较,联合组p-PI3K, p-Akt蛋白表达水平均有降低,证实APS可通过下调PI3K磷酸化水平来抑制Akt的活化。各组PI3K, Akt蛋白表达差异无统计学意义,证实APS主要影响的是

PI3K/Akt通路活化的过程。

肿瘤细胞EMT影响因素复杂,通路繁多。本实验从形态学和蛋白分子角度证实APS与顺铂协同作用可抑制肺腺癌细胞增殖和EMT,其分子机制可能与其抑制PI3K/Akt信号通路活化有关,为中医药及有效成分干预肿瘤细胞EMT提供了新思路。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 钟文昭,董嵩,李磊,等. 国际肺癌研究协会/美国胸科学会/欧洲呼吸学会肺腺癌的国际多学科分类[J]. 循证医学, 2011, 11(4): 193-225.
- [2] MATSUBARA T, TAGAWA T, TAKADA K, et al. Clinical and prognostic significance of the epithelial-mesenchymal transition in stage IA lung adenocarcinoma: a propensity score-matched analysis [J]. Clin Lung Cancer, 2019, 20(4): 504-513.
- [3] 黄弦歌. 中医药为主的多学科综合治疗晚期非小细胞肺癌的生存优势分析[D]. 上海:上海中医药大学, 2019.
- [4] 周若宇,孙曼婷,刘静,等. 中药有效成分在抗衰老与抗肿瘤作用机制中的研究进展[J]. 药学学报, 2021, 56(7): 1856-1864.
- [5] 石丽霞,李科,秦雪梅. 黄芪多糖双向抗肿瘤作用机制的研究进展[J]. 山西中医药大学学报, 2021, 22(2): 145-149.
- [6] 张树聪,蔡治祥,王学涛,等. 黄芪多糖对人鼻咽癌CNE-1细胞的放疗增敏及上皮间质转化的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(20): 59-66.
- [7] MISHRA D K, SRIVASTAVA P, SHARMA A, et al. Translationally controlled tumor protein (TCTP) is required for TGF- $\beta_1$  induced epithelial to mesenchymal transition and influences cytoskeletal reorganization [J]. Biochim Biophys Acta, 2018, 1865(1): 67-75.
- [8] 谭松红. 经TGF- $\beta_1$ 介导PI3K/Akt信号通路诱导宫颈癌Hela细胞发生EMT机制的探讨[D]. 衡阳:南华大学, 2017.
- [9] 张颖. 补中益气汤干预肺腺癌荷瘤裸鼠A549/DDP细胞EMT改善顺铂耐药的研究[D]. 沈阳:辽宁中医

- 药大学, 2019.
- [10] WU C Y, KE Y, ZENG Y F, et al. Anticancer activity of Astragalus polysaccharide in human non-small cell lung cancer cells[J]. *Cancer Cell Int*, 2017, 17(1):115.
- [11] WANG P, CHEN D, MA H B, et al. LncRNA SNHG12 contributes to multidrug resistance through activating the MAPK/Slug pathway by sponging miR-181a in non-small cell lung cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(48): 84086-84101.
- [12] WANG S J, TONG X, LI C, et al. Quaking 5 suppresses TGF- $\beta$ -induced EMT and cell invasion in lung adenocarcinoma [J]. *EMBO Reports*, 2021, 22(6):52079.
- [13] TANG Z Y, DING Y, SHEN Q, et al. KIAA1199 promotes invasion and migration in non-small-cell lung cancer (NSCLC) via PI3K-Akt mediated EMT [J]. *J Mol Med*, 2019, 97(1): 127-140.
- [14] 程云,高巍,彭景贤,等. c-Met通过E-cadherin介导的EMT与宫颈癌进展的相关性研究[J]. *包头医学院学报*, 2020, 36(7):55-60, 113.
- [15] HUANG X T, XIANG L Y, WANG B Y, et al. CMTM6 promotes migration, invasion, and EMT by interacting with and stabilizing Vimentin in hepatocellular carcinoma cells[J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1):120.
- [16] 卓飞,孙晋,王志东,等. SOCS3对人肝癌MHCC97-H细胞上皮间质转化的影响[J]. *现代肿瘤医学*, 2019, 27(10):1680-1683.
- [17] 徐静,方媛,许荣忠,等. 中药对肺癌免疫调节机制的影响[J]. *中医学报*, 2021, 36(6): 1210-1216.
- [18] 彭清,孙柳,苗雪圆,等. 天然产物化合物作为肿瘤免疫调节剂的研究进展[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2021, 27(1):136-140.
- [19] 胡妮娜,张晓娟. 黄芪的化学成分及药理作用研究进展[J]. *中医药信息*, 2021, 38(1): 76-82.
- [20] 毛倩倩,林久茂. 黄芪多糖抗肿瘤作用的研究进展[J]. *中医药通报*, 2020, 19(4): 34, 69-72.
- [21] 李洁玘,秦垠,邹玺,等. 桂皮醛通过PI3K/Akt信号通路抑制TGF- $\beta$ <sub>1</sub>诱导的结肠癌细胞LoVo上皮间质转化[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(18):105-111.
- [22] LIAO Y, HUNG M C. Physiological regulation of Akt activity and stability[J]. *Am J Transl Res*, 2010, 2(1): 19-42.

[责任编辑 张丰丰]