

黄芪多糖抑制肺腺癌 A549/DDP 细胞移植瘤裸鼠 EMT 改善 顺铂耐药的机制

张颖¹, 王淳², 于丹², 高原², 井欢², 王莹², 刘春英^{2*}

(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)抑制转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)诱导的肺腺癌耐顺铂细胞株 A549/顺铂细胞移植瘤裸鼠上皮-间质转化(EMT)进程和改善顺铂耐药的分子机制。方法: BALB/c 裸鼠随机分为空载组、模型组、顺铂组、联合组(顺铂与黄芪多糖联合应用)。将 TGF- β_1 基因过表达慢病毒载体及阴性对照组感染 A549/顺铂细胞,感染成功的细胞进行裸鼠皮下接种。除 TGF- β_1 组 A549/顺铂细胞接种至空载组外,其他组均接种 TGF- β_1 基因稳定过表达的 A549/顺铂细胞。细胞接种 8 d 后,开始进行药物干预。联合组灌胃 APS (0.3 g·kg⁻¹·d⁻¹),腹腔注射顺铂(0.003 5g·kg⁻¹);顺铂组腹腔注射顺铂(0.003 5 g·kg⁻¹)。细胞接种 32 d 后,处死裸鼠,取肿瘤组织、肺。称量瘤质量,计算抑瘤率;显微镜下计数整张玻片肺肿瘤转移结节数;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)检测肿瘤 EMT 标志物 α -连环蛋白(α -catenin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)和肿瘤耐药标志物人肺耐药蛋白(LRP)、多药耐药相关蛋白(MRP)、P-糖蛋白(P-gp)蛋白和 mRNA 表达情况。结果:与空载组比较,模型组瘤质量增加,肺肿瘤转移结节增多($P < 0.05$), α -catenin 蛋白和 mRNA 表达降低($P < 0.05$),N-cadherin、LRP、MRP、P-gp 蛋白和 mRNA 表达升高($P < 0.05$)。与模型组、顺铂组比较,联合组瘤质量减轻,肺肿瘤转移结节减少($P < 0.05$); α -catenin 蛋白和 mRNA 表达升高($P < 0.05$),N-cadherin、LRP、MRP、P-gp 蛋白和 mRNA 表达降低($P < 0.05$)。结论:黄芪多糖可抑制肺腺癌移植瘤生长和转移,改善顺铂耐药,这一作用可能与其抑制肿瘤细胞 EMT 进程相关。

[关键词] 黄芪多糖; 上皮-间质转化(EMT); 顺铂耐药; 肺腺癌

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5;R273 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)06-0079-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220527

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211227.1301.001.html>

[网络出版日期] 2021-12-27 17:04

Astragalus Polysaccharides Improve Cisplatin Resistance by Inhibiting EMT of Lung Adenocarcinoma A549/DDP Cells Transplanted into Nude Mice

ZHANG Ying¹, WANG Chun², YU Dan², GAO Yuan², JING Huan², WANG Ying², LIU Chun-ying^{2*}

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

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

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effect of Astragalus polysaccharide (APS) on epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced by transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) in cisplatin (DDP)-resistant lung adenocarcinoma cell line A549/DDP cells transplanted into nude mice and the molecular mechanism in improving DDP resistance. **Method:** BALB/c nude mice were randomly divided into a blank group, a model group, a DDP group, and a combination group (APS combined with DDP). A549/DDP cells were infected with TGF- β_1 -overexpressed lentiviral vector and the negative control. The infected cells were

[收稿日期] 2021-10-28

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81973735,81774184);济医院字[2019]18号中西医结合治疗脾胃病创新团队

[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,E-mail:chunying99@163.com

inoculated subcutaneously in nude mice. The A549/DDP cells with TGF- β_1 gene overexpression were inoculated into all groups except the control group with negative TGF- β_1 gene overexpression. The drug intervention was performed eight days after cell inoculation. The mice in the combination group received intragastric administration of APS ($0.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) and intraperitoneal injection of cisplatin ($0.0035 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and those in the cisplatin group received intraperitoneal injection of cisplatin ($0.0035 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). After 32 days of cell inoculation, the nude mice were killed and the tumor tissues and lungs were collected. The tumor weight was recorded and the inhibition rate was calculated. The number of metastatic nodules of the lung tumor on the whole slide was counted under the microscope. Immunohistochemistry, Western blot, and real-time fluorescence-based quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) were used to detect the protein and gene expression of EMT molecular markers α -catenin and N-cadherin, and tumor drug resistance markers human lung resistance protein (LRP), multidrug resistance-associated protein (MRP), and P-glycoprotein (P-gp) in the transplanted tumor. **Result:** Compared with the blank group, the model group showed increased tumor weight and metastatic nodules of the lung tumor ($P < 0.05$), decreased protein and mRNA expression of α -catenin ($P < 0.05$), and elevated protein and mRNA expression of N-cadherin, LRP, MRP, and P-gp ($P < 0.05$). Compared with the model group and the cisplatin group, the combination group showed reduced tumor weight and metastatic nodules of the lung tumor ($P < 0.05$), increased protein and mRNA expression of α -catenin ($P < 0.05$), and decreased protein and mRNA expression of N-cadherin, LRP, MRP, and P-gp ($P < 0.05$). **Conclusion:** APS can inhibit the growth and metastasis of the transplanted tumor of lung adenocarcinoma and improve cisplatin resistance, which may be related to the inhibition of EMT of tumor cells.

[Keywords] Astragalus polysaccharide; epithelial mesenchymal transformation (EMT); cisplatin resistance; lung adenocarcinoma

肺腺癌是肺癌最主要的病理类型,约占肺癌发病率和死亡率的半数左右,且呈现逐年上升趋势^[1]。以顺铂为基础的联合化疗方案是肺腺癌的主要临床干预策略,而先天性或获得性顺铂耐药却导致肺腺癌化疗预后效果不佳^[2]。导致肺癌耐药的机制有多种,而肿瘤细胞在增殖过程中发生上皮-间质转化(EMT)起到了至关重要的作用^[3]。EMT是上皮细胞向间质细胞转化的过程,研究发现间质化改变的上皮细胞具有更强的迁移、侵袭、抗凋亡等间质表型,这也是上皮来源的肿瘤细胞发生浸润、转移、耐药的主要原因之一;而具有原发或继发性耐药的肿瘤细胞也具有间质化的特性,如细胞极性消失、细胞连接稀疏、甚至出现伪足,EMT上皮分子标志物表达降低而间质标志物表达升高等^[4]。因此,探索EMT和顺铂耐药干扰剂成为提高肺腺癌化疗效果的热点^[5]。

笔者前期研究证实,培土生金方剂补中益气汤能够通过抑制肺腺癌荷瘤裸鼠A549/顺铂细胞EMT改善顺铂耐药^[6]。通过网络药理学分析发现,黄芪多糖作为补中益气汤中君药黄芪内提取的大分子化学成分,可能在该方药的肿瘤干预效果中发挥了重要作用^[7]。体外研究证实,黄芪多糖联合化疗药

物在多种肿瘤细胞中具有促凋亡、逆转耐药等作用^[8-9],且具低毒高效、简便价廉的优势^[10]。为证实黄芪多糖在体内的抗肿瘤疗效,本实验引入基因工程技术,将转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)过表达的慢病毒感染A549/顺铂细胞植入裸鼠皮下,构建稳定的EMT移植瘤模型,以裸鼠A549/顺铂细胞肺腺癌移植瘤为研究对象,观察黄芪多糖对体内肺腺癌细胞的EMT分子标志物 α -连环蛋白(α -catenin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)和耐药相关蛋白人肺耐药蛋白(LRP)、多药耐药相关蛋白(MRP)、P-糖蛋白(P-gp)的干预情况,以期完善黄芪多糖干预肺腺癌顺铂耐药的分子机制,为黄芪多糖治疗肺癌的临床应用提供理论依据和支持。

1 材料

1.1 细胞株与动物 肺腺癌A549/顺铂细胞株(江苏齐氏生物科技有限公司,批号7-1146),置于 37°C ,5% CO_2 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,批件号2019YS(DW)-004-01。TGF- β_1 基因过

表达慢病毒载体及阴性对照定于沈阳万类生物科技有限公司。

1.2 药物及试剂 黄芪多糖注射液[山西省芮城科龙兽药有限公司,批准文号040192711,以葡萄糖 $C_6H_{12}O_6$ 计 $10\text{ mL}\cdot(0.1\text{ g})^{-1}$],顺铂(美国Sigma公司,批号MKBZ0848V),N-cadherin、LRP、MRP、P-gp一抗(沈阳万类生物科技有限公司,批号分别为WL01047、WL03211、WL01027、WL02395), α -catenin一抗(美国CST公司,批号#3240);羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(Beyotime公司,批号A0277),DAB显色试剂盒(Solarbio公司,批号DA1010),全蛋白提取试剂盒、ECL检测试剂盒、内参 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(沈阳万类生物科技有限公司,批号分别为WLA019、WLA003、WL01372),Super M-MLV反转录酶、 $2\times$ Power Taq PCR Master Mix、TRIpure (Bioteke公司,批号分别为PR6502、PR1702、PR1001)。

1.3 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、DYCZ-40D型转移槽(北京六一生物公司),Bio Spec-nano型紫外可见分光光度计(日本岛津公司),Exicycler96型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/顺铂细胞生长至70%时,将TGF- β_1 过表达慢病毒液和阴性对照(病毒数与细胞数比值为20:1)分别加入培养基孵育过夜,培养24 h,更换成正常培养液,继续培养,感染成功的细胞进行接种。

2.2 移植瘤模型的制备^[11]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,于裸鼠左侧腋窝皮下进行细胞接种,空载组接种TGF- β_1 阴性对照A549/顺铂细胞,其余组均接种TGF- β_1 过表达A549/顺铂细胞。细胞接种8 d,观察到裸鼠接种部位皮下出现2~3 mm肿瘤结节。联合组灌胃黄芪多糖注射液($0.3\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),腹腔注射顺铂($0.0035\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,2次/周);顺铂组腹腔注射顺铂($0.0035\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,2次/周)^[12-13]。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 抑瘤率与肺肿瘤转移结节 抑瘤率=(模型组瘤质量-各给药组瘤质量)/模型组瘤质量 $\times 100\%$ 。显微镜下计数整张玻片肺肿瘤转移结节数。

2.3.2 免疫组化检测移植瘤中 α -catenin、N-cadherin、LRP、MRP及P-gp蛋白表达水平 标本固定,石蜡包埋,切片,常规脱蜡至水,抗原修复, H_2O_2 室温孵育15 min,正常山羊血清封闭孵育15 min。磷酸盐缓冲液(PBS)稀释一抗(α -catenin、N-cadherin 1:200,LRP、MRP、P-gp 1:100),湿盒内 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜。PBS稀释二抗(1:200),湿盒内 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育30 min。滴加PBS稀释辣根酶标记链酶亲合素, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育30 min。DAB显色试剂A、B等量混合,滴加 $100\text{ }\mu\text{L}$ 。浸入苏木素中复染3 min,盐酸-乙醇分化,流水返蓝20 min。依次浸入不同浓度乙醇、二甲苯中,脱水、透明,滴加中性树胶,封片,室温晾干。拍照,记录。

2.3.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测移植瘤中 α -catenin、N-cadherin、LRP、MRP及P-gp的蛋白表达水平 将裂解液置于室温环境下融化,备用。研磨肿瘤组织,分离上清获取蛋白质抽提物。BCA反应测定蛋白浓度。制备聚丙烯酰胺凝胶后开始上样,SDS-PAGE恒压80 V电泳2.5 h。制备“三明治”,转印。转印结束后封闭。孵育一抗(α -catenin、LRP、MRP 1:1 000、N-cadherin、P-gp 1:500), $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜。孵育二抗(1:5 000) $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育45 min。孵育二抗后的PVDF膜均匀的洒上ECL发光液,静置,在暗室进行曝光。扫描胶片,凝胶图象处理系统分析结果。

2.3.4 Real-time PCR检测移植瘤中 α -catenin、N-cadherin、LRP、MRP及P-gp mRNA表达水平 取各组肿瘤组织研碎,加入TRIpure裂解液1 mL获取细胞总RNA,测定样本纯度,根据上述RNA样本进行反转录合成相应的cDNA。PCR扩增的反应条件为 $94\text{ }^\circ\text{C}$ 预变性5 min,1个循环; $94\text{ }^\circ\text{C}$ 变性10 s, $60\text{ }^\circ\text{C}$ 退火20 s, $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸30 s,40个循环; $72\text{ }^\circ\text{C}$ 终延伸150 s, $40\text{ }^\circ\text{C}$,90 s, $60\sim 94\text{ }^\circ\text{C}$,每秒 $1\text{ }^\circ\text{C}$, $25\text{ }^\circ\text{C}$,1~2 min,1个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对统计数据结果进行分析。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,见表1。

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。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
α-catenin	上游 TCCTACGTCGCCTCTACC	159
	下游 CTTCTGAGATGCCCGTTT	
N-cadherin	上游 GGACCATCACTCGGCTTA	154
	下游 CACTGGCAAACCTTCACG	
LRP	上游 GGACGCCGTCATCCTTAC	152
	下游 CCTCCTCGTGGACATCTGG	
MRP	上游 CCTTCGCTGAGTTCTCTGC	103
	下游 TGCTTTGCTTCCTCCCT	
P-gp	上游 AATGCGACAGGAGATAGG	131
	下游 TTGCCATTGACTGAAAGA	
β-actin	上游 CACTGTGCCCATCTACGAGG	155
	下游 TAATGTCACGCACGATTCC	

3 结果

3.1 黄芪多糖对抑瘤率及肺转移结节的影响 模型组瘤质量最大。与空载组比较,模型组瘤质量明显增加($P<0.05$);与模型组、顺铂组比较,联合组瘤质量明显降低($P<0.05$)。显微镜下显示,各组裸鼠均出现肺部转移结节,模型组数量最多。与模型组、顺铂组比较,联合组肺转移结节数量明显降低

($P<0.05$)。见表2。

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

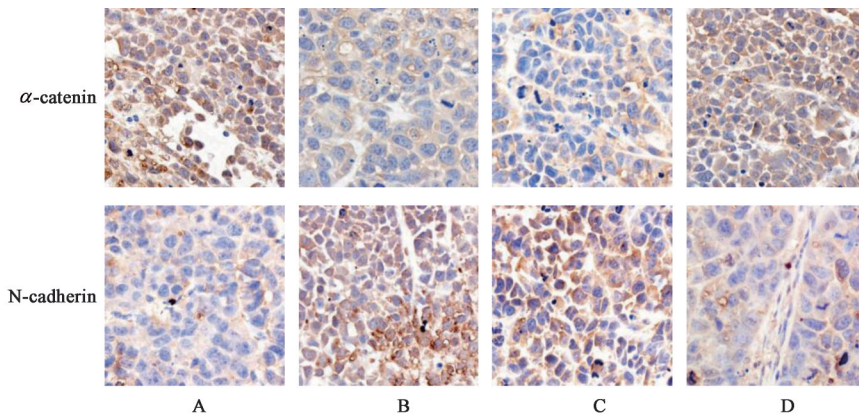
Table 2 Effect of APS on tumor suppression rate and pulmonary metastatic nodules ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	瘤质量/g	抑瘤率/%	肺转移结节数/个
空载组		0.22±0.02	-	8.40±1.52
模型组		0.30±0.04 ¹⁾	-	13.20±3.27 ¹⁾
顺铂组	0.003 5	0.27±0.04	10.00	12.20±1.79
联合组	0.3	0.19±0.02 ^{2,3)}	36.67	9.20±1.64 ^{2,3)}

注:与空载组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$;与顺铂组比较³⁾ $P<0.05$ (表3-表6同)

3.2 黄芪多糖对各组移植瘤 EMT 分子标志物 α-catenin、N-cadherin 表达的影响

3.2.1 黄芪多糖对 α-catenin、N-cadherin 蛋白表达的影响 深染的棕黄(褐)色颗粒为 α-catenin, N-cadherin 蛋白的阳性表达区,各组细胞膜和细胞质均有不同程度的表达,细胞核可见少量非特异性着色。与空载组比较,模型组细胞中 α-catenin 蛋白相对表达降低, N-cadherin 蛋白相对表达升高;与模型组、顺铂组比较,联合组细胞中 α-catenin 蛋白相对表达升高, N-cadherin 蛋白相对表达降低。见图1。



注:A.空载组;B.模型组;C.顺铂组;D.联合组(图2-图4同)

图1 黄芪多糖对 α-catenin、N-cadherin 蛋白表达的影响 (IHC, ×400)

Fig. 1 Effect of Astragalus polysaccharide on α-catenin and N-cadherin protein expression (IHC, ×400)

3.2.2 黄芪多糖对 α-catenin、N-cadherin 蛋白表达的影响 与空载组比较,模型组 α-catenin 灰度表达降低, N-cadherin 蛋白表达明显升高($P<0.05$);与模型组、顺铂组比较,联合组 α-catenin 蛋白表达升高, N-cadherin 蛋白表达明显降低($P<0.05$)。见图2和表3。

3.2.3 黄芪多糖对 α-catenin、N-cadherin mRNA 表达的影响 与空载组比较,模型组 α-catenin mRNA

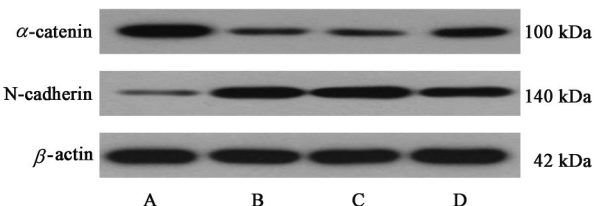


图2 黄芪多糖作用后 α-catenin、N-cadherin 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of Astragalus polysaccharide on α-catenin and N-cadherin protein expression

表3 黄芪多糖对 α -catenin、N-cadherin蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Table 3 Effect of Astragalus polysaccharide on α -catenin and N-cadherin protein expression ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	α -catenin/ β -actin	N-cadherin/ β -actin
空载组		1.04 \pm 0.13	1.09 \pm 0.15
模型组		0.25 \pm 0.04 ¹⁾	5.92 \pm 0.41 ¹⁾
顺铂组	0.003 5	0.24 \pm 0.03	6.07 \pm 0.45
联合组	0.3	0.50 \pm 0.07 ^{2,3)}	3.92 \pm 0.18 ^{2,3)}

表达降低,N-cadherin mRNA表达升高($P<0.05$);与模型组、顺铂组比较,联合组 α -catenin mRNA表达升高,N-cadherin mRNA表达降低($P<0.05$)。见表4。

3.3 黄芪多糖对各组移植瘤对移植瘤中LRP、MRP、P-gp表达的影响

3.3.1 黄芪多糖对LRP、MRP、P-gp蛋白表达的影响

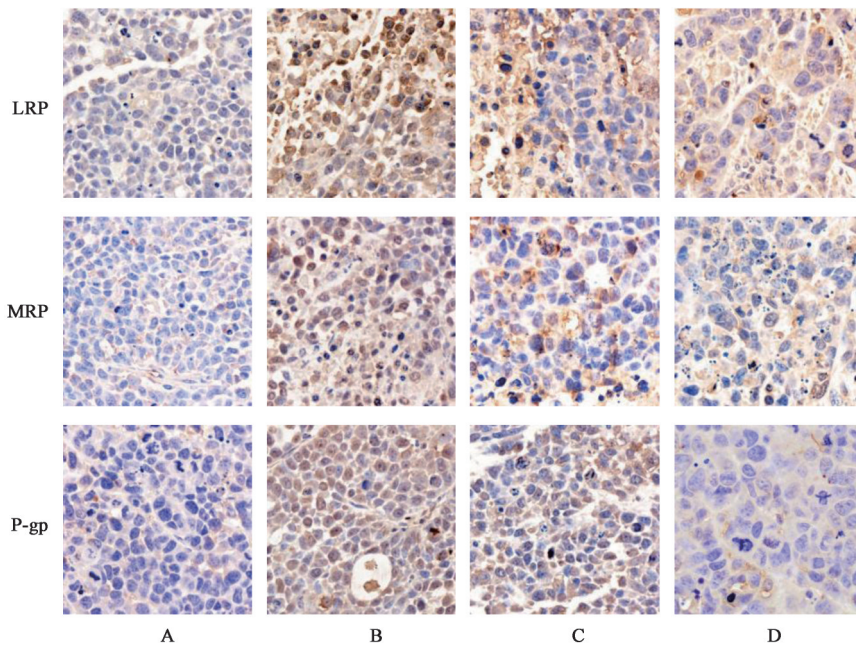


图3 黄芪多糖对LRP、MRP、P-gp蛋白表达的影响(IHC, $\times 400$)

Fig. 3 Effect of Astragalus polysaccharide on LRP, MRP and P-gp protein expression (IHC, $\times 400$)

与空载组比较,模型组LRP、MRP、P-gp蛋白表达增多($P<0.05$);与模型组、顺铂组比较,联合组LRP、MRP、P-gp蛋白表达减少($P<0.05$)。见图4和表5。

与空载组比较,模型组LRP、MRP、P-gp mRNA表达均上调($P<0.05$);与模型组、顺铂组比较,联合组LRP、MRP、P-gp mRNA表达均下调($P<0.05$)。见表6。

表4 黄芪多糖对 α -catenin、N-cadherin mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Table 4 Effect of Astragalus polysaccharide on α -catenin and N-cadherin mRNA expression ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	α -catenin	N-cadherin
空载组		1.03 \pm 0.07	1.01 \pm 0.03
模型组		0.39 \pm 0.03 ¹⁾	5.81 \pm 0.68 ¹⁾
顺铂组	0.003 5	0.33 \pm 0.05	5.60 \pm 0.38
联合组	0.3	0.63 \pm 0.04 ^{2,3)}	2.44 \pm 0.17 ^{2,3)}

响 LRP、MRP、P-gp蛋白阳性着色均为棕黄(褐色)颗粒,主要表达于细胞浆,细胞膜有少量表达,细胞核可见少量非特异性染色。与空载组比较,模型组LRP、MRP、P-gp蛋白表达均增多;与模型组、顺铂组比较,联合组LRP、MRP、P-gp蛋白表达均减少。见图3。

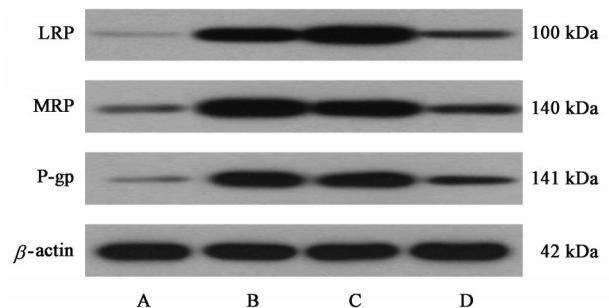


图4 黄芪多糖作用后LRP、MRP、P-gp蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of Astragalus polysaccharide on LRP, MRP and P-gp protein expression

表5 黄芪多糖对LRP、MRP、P-gp蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 5 Effect of Astragalus polysaccharide on LRP, MRP and P-gp protein expression ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	LRP/ β -actin	MRP/ β -actin	P-gp/ β -actin
空载组		1.07±0.04	1.00±0.12	0.97±0.11
模型组		5.96±0.20 ¹⁾	4.71±0.25 ¹⁾	5.55±0.13 ¹⁾
顺铂组	0.003 5	6.17±0.21	4.45±0.15	5.35±0.23
联合组	0.3	2.14±0.15 ^{2,3)}	1.54±0.07 ^{2,3)}	2.51±0.17 ^{2,3)}

表6 黄芪多糖对LRP、MRP、P-gp mRNA表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 6 Effect of Astragalus polysaccharide on LRP, MRP and P-gp mRNA expression ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	LRP	MRP	P-gp
空载组		1.00±0.03	1.00±0.07	1.00±0.04
模型组		4.81±0.70 ¹⁾	2.93±0.10 ¹⁾	3.17±0.48 ¹⁾
顺铂组	0.003 5	4.30±0.26	2.74±0.11	3.32±0.15
联合组	0.3	2.11±0.29 ^{2,3)}	1.87±0.09 ^{2,3)}	2.02±0.28 ^{2,3)}

4 讨论

中医古籍中虽没有肺癌之名,但就其症状而言,与“肺积”“息贲”等认识和记载相类似。如《难经》云“肺之积,名曰息贲,在右肋下”^[14]。就其病因病机而言,《医宗必读·积聚》曰:“积之成也,正气不足,而后邪气踞之”,强调肺癌属于正虚邪实之证,正虚为本,邪实为标^[15]。就其治则治法而言,《活法机要》指出“治积者,当先养正则积自除”,明确补益正气为积聚之病的首要治则^[16]。因此,补益类天然药物以其扶正低毒、多途径多靶点的优势成为近些年抗肿瘤药物开发的研究热门领域^[17]。笔者在前期实验中已证实了经典补益方剂补中益气汤在肺癌的治疗中具有抑制肺腺癌移植瘤生长,改善肿瘤耐药等作用。但中药方剂药物组成繁多,理化性质复杂,药物在体内需要经过消化系统、循环系统等多重代谢才能到达靶点,为进一步明确补中益气汤中药物成分的抗肿瘤活性,笔者查阅文献并结合网络药理学,选取补中益气汤的君药黄芪加以深入探索。现代药理研究发现黄芪所包含的多糖、生物碱等活性成分均具有提高机体免疫力和抗肿瘤的疗效,其中关于黄芪多糖的研究报道为最多^[18]。研究证实,黄芪多糖在黄芪有效成分中含量最多、活性最强,是黄芪发挥抗肿瘤作用的最主要成分,在肝癌、肺腺癌、结直肠癌等多种肿瘤细胞中具有促凋亡、逆转耐药等作用^[19]。

目前研究发现,肿瘤耐药是导致肿瘤化疗失败的最主要原因。肿瘤耐药的机制复杂,主要包括上

皮来源的肿瘤细胞发生EMT^[20],如上皮分子标志物 α -catenin和间质标志物N-cadherin等表达异常,导致肿瘤细胞具有更强的侵袭和迁移能力;具有转运功能的蛋白活性增强引起的化疗药物外排^[21],如LRP、MRP、P-gp表达异常增加等,引起细胞内化疗药物浓度下降,等。本实验以黄芪多糖联合顺铂干预TGF- β_1 过表达的A549/顺铂细胞移植瘤,旨在从形态学和蛋白及分子水平证实黄芪多糖有抑制肺腺癌细胞EMT,改善顺铂耐药的作用。实验结果显示,与模型组、顺铂组比较,联合组移植瘤质量减轻,肺转移结节数量减少,说明黄芪多糖具有改善A549/顺铂细胞耐药移植瘤对顺铂的敏感性,抑制肿瘤生长和转移的作用。与空载组比较,模型组上皮分子标志物 α -catenin蛋白和mRNA表达下调,间质标志物N-cadherin蛋白和mRNA表达上调,LRP、MRP、P-gp蛋白和mRNA表达上调,证实TGF- β_1 过表达A549/顺铂细胞发生了EMT改变,并具有显著的耐药性,造模成功;与模型组比较,顺铂组 α -catenin、N-cadherin、LRP、MRP、P-gp蛋白和mRNA表达差异无统计学意义,证实对于耐顺铂肺腺癌肿瘤细胞A549/顺铂而言,单独使用顺铂化疗对其EMT和耐药干预效果均较差;而顺铂联合黄芪多糖使用后,与模型组、顺铂组比较,联合组 α -catenin蛋白和mRNA表达上调,间质标志物N-cadherin蛋白和mRNA表达下调,LRP、MRP、P-gp蛋白和mRNA表达下调,证实黄芪多糖可通过抑制TGF- β_1 过表达介导的肺腺癌肿瘤细胞EMT进程,干预肿瘤细胞EMT状态,提高耐顺铂细胞对顺铂的敏感性,改善肺腺癌顺铂耐药,提示通过靶向EMT改善肿瘤耐药有望为临床解决肺腺癌耐药问题提供新思路。

肿瘤耐药途径多样、机制复杂,多角度、多靶点综合治疗,逆转耐药,在提高肿瘤患者远期生存率、提高生活质量等方面具有重大意义。本研究使用中药提取物进行动物体内实验,比体外实验更能模拟代谢环境,比中药复方更具靶向性。但动物实验与人体临床应用存在着固有差异,需在实践中进一步摸索。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65 (2): 87-108.

- [2] HUANG C Y, JU D T, CHANG C F, et al. A review on the effects of current chemotherapy drugs and natural agents in treating non-small cell lung cancer [J]. *Biomedicine*, 2017, 7(4): 12-23.
- [3] 李小江, 邬明歆, 孔凡铭, 等. 中药有效成分抗肿瘤活性及作用机制研究进展[J]. *中草药*, 2020, 51(9): 2587-2592.
- [4] 彭凯丽, 陈宏辉. 上皮间质细胞转化在肿瘤侵袭转移及化疗耐药中的作用[J]. *实用医药杂志*, 2018, 35(1): 85-87.
- [5] 杨亚冰, 陈俊以, 佟巍, 等. 非小细胞肺癌靶向治疗耐药及对策的研究进展[J]. *癌症进展*, 2020, 18(16): 1625-1627, 1667.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] ZHAO H, WANG J, KONG X, et al. CD47 promotes tumor invasion and metastasis in non-small cell lung cancer[J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 29719.
- [12] 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.
- [13] WANG P, CHEN D, MA H, 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.
- [14] 林圣乐, 朱佳. 朱佳教授治疗肺结节经验[J]. *四川中医*, 2018, 36(8): 5-8.
- [15] 刘继法, 陈宪海. 肺部结节的中医认识[J]. *中医学报*, 2021, 36(7): 1392-1395.
- [16] 徐佳仪. 肺部小结节患者中医体质分布规律探析[D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2019.
- [17] 张炫化, 丁一. 黄芪多糖降低 A549/DDP 肺腺癌细胞顺铂耐药机制研究[J]. *现代肿瘤医学*, 2020, 28(13): 2225-2228.
- [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] 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): 69-72, 34.
- [20] TRIPATHI V, SHIN J H, STUELLEN C H, et al. TGF- β -induced alternative splicing of TAK1 promotes EMT and drug resistance [J]. *Oncogene*, 2019, 38(17): 3185-3200.
- [21] 王雷, 王煜霞, 陈丽平, 等. P-gp, MRP, LRP 和 GST- π 等多药耐药蛋白在肝癌中的协同表达研究[J]. *河南师范大学学报: 自然科学版*, 2015, 43(4): 134-137.

[责任编辑 张丰丰]