

麦门冬汤对非小细胞肺癌 A549 细胞凋亡、周期、表皮生长因子受体及 STAT3 基因表达的影响

孙超龙¹, 张文娴¹, 刘燕², 蒋时红^{1*}

(1. 河南中医学院基础医学院, 郑州 450008; 2. 湖北中医药大学, 武汉 430065)

[摘要] 目的:通过体外实验观察麦门冬汤对非小细胞肺癌 A549 细胞凋亡、细胞周期以及表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、信号转导子和转录激活子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)基因表达的影响,探索中药复方麦门冬汤抑制非小细胞肺癌的作用靶点。方法:选取对数生长期 A549 细胞(2×10^4 个/mL),倒置显微镜下观察麦门冬汤(0.25, 2.5, 25 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)作用 24, 48, 72 h 后 A549 细胞的形态学变化;4, 6-二脒基吡啶(DAPI)荧光染色观察麦门冬汤(2.5, 25 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)作用 48 h 后 A549 细胞的凋亡;流式细胞术结合 PI 染色法分析麦门冬汤(2.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)作用 48 h 后 A549 细胞的周期;实时荧光定量 RT-PCR 技术对 A549 凋亡细胞 EGFR, STAT3 基因表达进行半定量。结果:0.25, 2.5, 25 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 麦门冬汤均可抑制 A549 细胞生长,使其发生不同程度的形态学改变;0.25, 2.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 麦门冬汤作用 A549 细胞 48 h 后,荧光显微镜下可见细胞核变形,染色质聚集、边缘化等凋亡形态学特征,流式检测显示细胞被抑制于 G_0/G_1 , G_2/M 期,RT-PCR 结果提示细胞中 EGFR, STAT3 基因的表达量明显降低($P < 0.01$)。结论:麦门冬汤可抑制非小细胞肺癌 A549 细胞生长,诱导其凋亡,并将其阻滞于 G_0/G_1 , G_2/M 期,这可能与麦门冬汤下调 EGFR, STAT3 基因表达有关。

[关键词] 麦门冬汤; 肺癌 A549 细胞株; 细胞凋亡; 细胞周期; 表皮生长因子受体; 信号转导子和转录激活子 3

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)11-0110-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014110110

[收稿日期] 20140126(001)

[基金项目] 河南省基础与前沿技术研究项目(112300410030);河南省教育厅科学技术研究重点项目(14A360019);河南中医学院创新团队支持计划(院政字 2013-113 号)

[第一作者] 孙超龙,在读硕士,从事肿瘤方药作用机制及应用研究, Tel:13849194862, E-mail:chaolong17981314@163.com

[通讯作者] * 蒋时红,医学硕士,教授,从事方剂学肿瘤方药作用机制及应用研究, Tel:13803710365, E-mail:jsh0418@126.com

- [4] 吴晏,韩静,黄黎明,等. 2 型糖尿病模型大鼠表征及其证候动态演变[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(11):2533.
- [5] 潘秋,赵慧辉,陈建新,等. 2 型糖尿病实验大鼠表征及其证候特征研究[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(4):683.
- [6] 方肇勤. 实验中医学[M]. 2 版. 上海:上海科学技术出版社, 2000.
- [7] 方肇勤,潘志强,付晓伶,等. 小鼠四诊采集项目标准的建议[J]. 中国中医基础医学杂志, 2005, 11(9):692.
- [8] 方肇勤,潘志强,陈晓,等. 实验小鼠四诊方法学的创建和意义[J]. 上海中医药杂志, 2006, 40(7):1.
- [9] 赵林华,姬航宇,冀博文,等. 葛根芩连汤治疗糖尿病理论探讨[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(2):280.
- [10] 滕健. 葛根芩连汤方证研究[D]. 北京:北京中医药大学基础医学院, 2012.
- [11] 潘竞镛,韩超,刘惠纯,等. 葛根芩连汤降血糖作用的实验研究[J]. 中国新药杂志, 2000, 9(3):167.
- [12] 周艳,谭海荣,潘竞镛,等. 葛根芩连汤对 2 型糖尿病大鼠的降血糖抗氧化作用[J]. 中国新医学, 2003, 2(6):17.
- [13] 李颖萌,范雪梅,王义明,等. 葛根芩连汤对 2 型糖尿病大鼠的治疗作用及其机制探讨[J]. 药学学报, 2013, 48(9):1415.
- [14] 赵锡艳,王松,周强,等. 全小林教授应用葛根芩连汤治疗 2 型糖尿病辨治思路[J]. 环球中医药, 2012, 5(12):918.
- [15] 杨连柱. 葛根芩连汤临证应用体会[J]. 北京中医药大学学报:中医临床版, 2003, 10(4):46.

[责任编辑 聂淑琴]

Effect of Maimendong Decoction on Apoptosis, Cell Cycle and Expression of EGFR and STAT3 Genes of a Non-small Cell Lung Cancer A549 Cell Line

SUN Chao-long¹, ZHANG Wen-xian¹, LIU Yan², JIANG Shi-hong^{1*}

(1. College of Basic Medicine Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;

2. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Maimendong decoction on apoptosis, cell cycle and expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) genes of lung a cancer cell A549 by experiments *in vitro*. **Method:** A549 cells in the logarithmic phase (2×10^4 /mL) were selected to observe their morphological changes by inverted microscope after Maimendong decoction (0.25, 2.5, 25 g·L⁻¹) effecting for 24, 48, 72 hours; to observe apoptosis of A549 cells effected by Maimendong decoction (2.5, 25 g·L⁻¹) for 48 hours after adding 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining fluid; to analyze cycles of A549 cells effected by Maimendong decoction (2.5 g·L⁻¹) for 48 hours; to relatively quantify expression of EGFR and STAT3 genes of apoptotic cells by Real-time fluorescent quantitative (RT)-PCR technique. **Result:** 0.25, 2.5, 25 g·L⁻¹ Maimendong decoction all could inhibit the growth of A549 cell, change its appearance in different levers. After 0.25, 2.5 g·L⁻¹ Maimendong decoction impacting A549 for 48 hours, we can find that nucleus's appearance has changed, and its chromatins have gathered and been marginalized and so on, results from flow cytometer display that cells were inhibited in G₀/G₁ and G₂/M phase, and result from RT-PCR suggest that the expression of EGFR and STAT3 genes has obviously reduced. **Conclusion:** Maimendong decoction can restrain the growth of a non-small cell lung cancer A549 cell line, induce its apoptosis, stagnate it in G₀/G₁ and G₂/M phase, which may be related to reducing the expression of EGFR and STAT3 genes.

[Key words] Maimendong decoction; lung cancer A549 cell line; apoptosis; cell cycle; epidermal growth factor receptor; signal transducer and activator of transcription 3

随着环境污染的加重,肺癌已占据我国所有癌症死因的首位,严重威胁着人类的健康,对于肺癌尤其是非小细胞肺癌的预防和治疗成为肿瘤药物研发的新方向^[1-2]。在中医药现代化的进程中,中药复方制剂对肺癌的防治具有独特的优势,经方麦门冬汤以其滋养肺胃、清热降逆之功在临床上被用于肺癌阴虚燥热证的治疗^[3-4]。现代研究表明,麦门冬汤加减能改善化疗患者的免疫功能,提高其生存质量,麦门冬汤合金苇茎汤提取部位可有效抑制肺癌细胞生长^[5-6]。本实验对麦门冬汤作用 A549 细胞的机制进行研究,以探讨麦门冬汤作用于非小细胞肺癌的分子靶点。

1 材料

1.1 细胞株 非小细胞肺癌 A549 细胞株由河南省生物工程技术研究中心细胞实验室提供,本实验室传代培养。

1.2 药物 麦门冬汤方药组成:麦门冬 42 g,制半

夏 6 g,人参 9 g,甘草 6 g,粳米 3 g,大枣 4 枚。方中生药由河南中医学院第三附属医院提供,经本校中药鉴定学科鉴定皆为正品。麦门冬汤制剂由河南中医学院基础医学院药理实验室经水煎、醇沉制备,过滤灭菌后配成 25 g·L⁻¹ 含 10% 胎牛血清的麦门冬汤药物培养液。异环磷酰胺(广东岭南制药有限公司生产,批号为 H20057626)配成 2.5 g·L⁻¹ 含 10% 胎牛血清的药物培养液。

1.3 试剂 胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司,批号 130823); RPMI 1640 培养基(含双抗, Solarbio,批号 20130726); 4,6-二脒基吲哚(DAPI)细胞凋亡染色试剂盒(凯基生物,批号 KGA215-50); 细胞周期检测试剂盒(凯基生物,批号 KGA512); 引物 β -actin, EGFR, STAT3(上海生工生物工程有限公司设计合成); 两步法荧光定量 PCR 试剂盒(北京全式金生物技术有限公司,批号 AQ301)。

1.4 仪器 3111 型 CO₂ 培养箱 (Thermo Scientific), XSZ-D2 型双目倒置显微镜 (重庆光学仪器厂), CX41-32RFL 型荧光显微镜 (日本 Olympus, JAPAN), FACS Calibur 型流式细胞仪 (BD Biosciences), K5500 型超微量紫外分光光度计 (北京凯奥科技发展有限公司), WD-9403C 型紫外仪 (上海圣科仪器设备有限公司), JM250 型数显电泳仪及水平电泳装置 (大连竞迈生物科技有限公司), BIK33 型实时荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems)。

2 方法

2.1 细胞株的体外培养 A549 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液进行培养、传代, 二氧化碳培养箱内温度为 37 °C, 5% CO₂, 当细胞生长至对数生长期时进行传代培养。

2.2 形态学观察 取对数生长期的 A549 细胞以 6×10^4 个/孔接种于 6 孔板中, 24 h 后弃去陈旧培养液, 实验组加入 0.25, 2.5, 25 g·L⁻¹ 麦门冬汤药物培养液 3 mL/孔, 阳性对照和阴性对照组分别加入相同体积 2.5 g·L⁻¹ 异环磷酰胺药物培养液和含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 每组设 3 个复孔, 于培养箱中孵育 24, 48, 72 h 后取出, 以倒置显微镜观察 A549 细胞形态变化。根据各药物组细胞的形态变化程度, 筛选出用于检测细胞凋亡、周期和基因表达的药物浓度和作用时间。

2.3 观察细胞凋亡 将对数生长期的 A549 细胞置于 0.25, 2.5 g·L⁻¹ 麦门冬汤药物培养液中, 阴性对照组加入含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 于培养箱中培养 48 h, 常规消化、收集细胞于 1.5 mL 离心管内, 用 PBS 洗涤 2 遍后以 DAPI 染液 500 μL 重悬细胞, 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清, 加入 500 μL DAPI 染液重悬细胞后置于 37 °C 水浴中孵育 15 min, 再次离心弃上清, 加入 50 μL Buffer A 重悬细胞, 取 10 μL 细胞悬液滴在洁净载玻片上, 用荧光显微镜观察细胞。

2.4 测细胞周期 采用流式细胞仪和 PI 染色法检测细胞周期。将对数生长期 A549 均分至 6 孔板中, 培养 24 h, 弃去陈旧培养液, 加入 2.5 g·L⁻¹ 麦门冬汤药物培养液 3 mL/孔, 设阴性对照组, 每组 3 个平行孔, 作用 48 h 后以 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 每孔收集细胞 1×10^6 个, 离心后加入 70% 冷乙醇固定过夜; 以 PBS 洗涤 2 遍, 加入 100 μL RNase A, 置于 37 °C 水浴中 30 min 后再加 PI 染色 400 μL, 混匀后避光反应 30 min, 在流式细胞仪 488 nm 处测定细胞周期。

2.5 实时荧光定量 RT-PCR 技术检测 EGFR 与 STAT3 基因表达 内参 β-actin、凋亡基因 EGFR、STAT3 引物由上海生工设计。β-actin 上游引物: 5'-AGCGAGCATCCCCAAAGTT-3', 下游引物: 5'-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3'; EGFR 上游引物: 5'-CGCAAAGTGTGTAACGGAATAG-3', 下游引物: 5'-CCAGAGGAGGAGTATGTGTGAA-3'; STAT3 上游引物: 5'-CTACAGTGACAGCTTCCCAATG-3', 下游引物: 5'-TTGGCTTCTCAAGATACCTGCT-3'。0.25, 2.5 g·L⁻¹ 麦门冬汤作用 A549 细胞 48 h 后, 收集细胞并用 PBS 洗涤 2 遍, 以 1 mL Trizol 室温裂解细胞 5 min 后, 加入 200 μL 三氯甲烷混匀, 12 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 转上层水至另一 1.5 mL EP 管中, 加入等体积异丙醇, 混匀后以 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 吸弃上清, 用 75% 冰乙醇洗涤 1 遍后将 EP 管倒扣, 干燥 5 min, 以 20 μL DEPC 水溶解 RNA, 并取出 1 μL 用超微量紫外分光光度计定量。采用反转录试剂盒进行反转录, 取 1 μL 反转录产物加入 8 联管中作为实时荧光定量 RT-PCR 模板, 再加入上、下游引物各 0.2 μL, 2 × Trans Taq Super Mix 10 μL, SYBRGreen 0.6 μL, DEPC 处理水 8 μL, 使反应体系为 20 μL。以 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火, 延伸 60 s, 进行 40 个循环。保存数据, 根据自动生成的 Ct 值采用相对 Delta-delta Ct 法求出各药物组 EGFR 和 STAT3 基因的 2^{-ΔΔCt} 值, 对基因表达进行相对定量。根据实时荧光定量 RT-PCR 仪自动生成的 Ct 值, 采用相对 Delta-delta Ct 法对麦门冬汤药物组细胞的目标基因 EGFR, STAT3 进行相对定量, 假设目标基因与内参基因扩增效率相等, 设定阴性对照组细胞的目标基因倍数变化为 1, 各药物组细胞目标基因的倍数用 2^{-ΔΔCt} 值表示, 若 2^{-ΔΔCt} 值 > 1, 说明药物使基因 EGFR, STAT3 的表达量降低, 反之, 则使目标基因的表达量升高。

2.6 数据分析 采用 IBM SPSS 19.0 统计软件, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示数量变值, 不同实验组间的比较采用完全随机设计的方差分析和 t 检验, 以 P < 0.05 为有统计意义。

3 结果

3.1 细胞形态学观察 镜下 (×200) 观察 (图 1) 可以看出, 与阴性对照组相比, 0.25, 2.5, 25 g·L⁻¹ 麦门冬汤作用于 A549 细胞 24, 48, 72 h 后, 均可使细胞形态发生不同程度的改变, 具体表现为细胞数量减少, 细胞间隔增宽, 胞体缩小或变圆, 折光性减弱, 其中以作用 72 h 后最为明显; 相同剂量的麦

门冬汤与 A549 细胞共同培养 24,48,72 h 后,培养时间越长,细胞数量越少,形态的改变也越明显;2.5 g·L⁻¹ 麦门冬汤作用于 A549 细胞 24,48,72 h 后,对细胞形态的影响介于 0.25,25 g·L⁻¹ 麦门冬

汤之间,且和阳性对照组接近。根据各药物组细胞的形态改变程度,将 0.25,2.5 g·L⁻¹ 麦门冬汤作用于 A549 细胞 48 h 用于检测细胞凋亡、周期、基因表达。

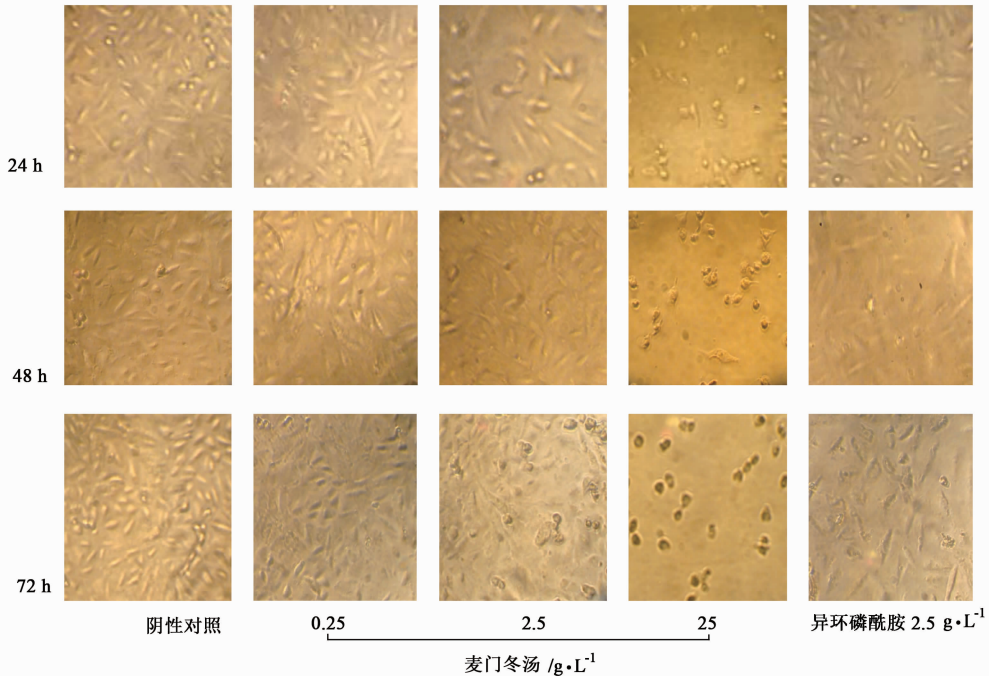


图 1 不同质量浓度麦门冬汤作用 24 h,48 h,72 h 后 A549 细胞形态学改变(×200)

3.2 细胞凋亡观察 DAPI 荧光染色结果提示,0.25,2.5 g·L⁻¹ 麦门冬汤作用 48 h 后,A549 细胞的亮度增强,细胞核形态发生改变,染色质出

现聚集、边缘化,随着药物浓度的增大,A549 凋亡细胞的数量有所增加,见图 2。

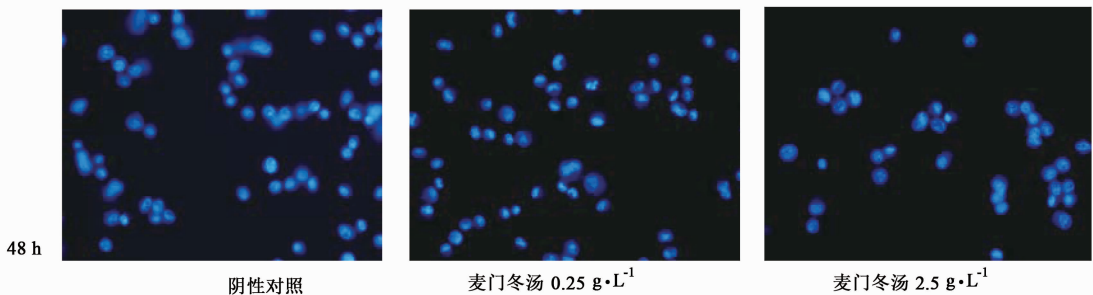


图 2 不同浓度麦门冬汤对 A549 细胞凋亡的影响(DAPI 染色,×400)

3.3 细胞周期检测 根据流式细胞仪自动生成的结果,将麦门冬汤组 A549 细胞在各期的百分率与阴性对照组进行比较,结果发现,2.5 g·L⁻¹ 麦门冬汤作用 48 h 后,A549 细胞在 G₀/G₁,G₂/M 期的百分率明显高于阴性对照组(P<0.01),说明麦门冬汤可以影响 A549 细胞周期,将其阻滞在 G₀/G₁,G₂/M 期,见表 1。

3.4 EGFR 与 STAT3 基因表达 0.25 2.5 g·L⁻¹ 麦门冬汤均可以降低 A549 细胞 EGFR,STAT3 基因的

表 1 麦门冬汤对 A549 细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$) %

组别	剂量 /g·L ⁻¹	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
阴性对照	-	80.93 ± 0.27	13.67 ± 0.50	5.48 ± 0.22
麦门冬汤	2.5	82.33 ± 0.24 ¹⁾	13.14 ± 0.15	4.58 ± 0.15 ¹⁾

注:与阴性对照组比较¹⁾P<0.01。

表达量,且这 2 种浓度之间存在显著差异(P<0.01)。见表 2。

表 2 麦门冬汤对 A549 细胞 EGFR, STAT3 基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	EGFR/2 ^{-$\Delta\Delta Ct$}	STAT3/2 ^{-$\Delta\Delta Ct$}
阴性对照	-	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
麦门冬汤	0.25	44.75 \pm 0.78 ^{1,2)}	106.75 \pm 1.53 ^{1,2)}
	2.5	55.19 \pm 1.12 ¹⁾	202.20 \pm 4.90 ¹⁾

注:与阴性对照比较¹⁾ $P < 0.01$;与麦门冬汤 2.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 比较²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

随着肺癌病死率的提高和中医药现代化进程的深入,中药防治肺癌的机制研究越来越被人们所关注^[7],可用于肺癌防治药物的分子靶点也与日俱增,当前涉及到的靶点主要包括细胞凋亡、细胞周期调节、信号转导通路、免疫机制调节等方面,其中表皮生长因子受体(EGFR)信号通路是肺癌细胞的重要靶点,在非小细胞肺癌中呈过量表达,它能选择性地激活 STAT3 信号通路,促进恶性肿瘤细胞生长^[8-9]。在肺癌的预防和临床治疗中,我国传统经典方剂具有配伍科学、辨证施治等优势。本实验选取非小细胞肺癌 A549 细胞为研究对象,对麦门冬汤作用肺癌细胞的凋亡、周期调控和信号通道等靶点进行的研究,以期开展肺癌的中药多靶点联合治疗提供一定的理论支持。

本实验研究结果表明,不同浓度麦门冬汤可抑制 A549 细胞的生长,使其发生形态学改变,且药物的浓度越高,细胞形态改变越明显。该结果以体外实验的方式印证了麦门冬汤在临床上防治非小细胞肺癌的有效性,并表明药物剂量的改变会在一定程度上影响其疗效。根据倒置显微镜和 DAPI 荧光染色的观察结果可知,0.25, 2.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 麦门冬汤在作用 A549 细胞 48 h 后,使细胞的凋亡形态和周期均发生了改变,说明细胞凋亡和细胞周期调节是麦门冬汤防治非小细胞癌的两个靶点,根据这一结论,可对细胞周期和凋亡相关的信号通道进行更深入的研究,进一步揭示麦门冬汤的抑癌机制。相关研究表明,EGFR 信号通路在肺癌的发生、转移和治疗中发挥着重要的作用,以其为靶点进行治疗的抗癌药物可通过阻断 EGFR-STAT3 信号通路发挥明显的抑癌作用^[9]。本研究采用实时荧光定量 RT-PCR 技术对 A549 细胞中 EGFR, STAT3 基因的表达进行半定

量,结果发现 0.25, 2.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 麦门冬汤能下调 EGFR, STAT3 基因表达,且不同浓度药物组之间出现类似于细胞凋亡和周期调控的显著差异 ($P < 0.01$),这表明 EGFR, STAT3 信号通路也是麦门冬汤防治肺癌的靶点之一,并且该靶点可能与 A549 细胞凋亡、周期调控这两个靶点相关。

综合以上结果发现,细胞凋亡、细胞周期调节和信号转导通路均是麦门冬汤防治非小细胞肺癌的作用靶点,麦门冬汤可能通过作用于 EGFR, STAT3 信号通路这一靶点抑制非小细胞肺癌细胞的生长,促进其凋亡,使其周期阻滞于 G₀/G₁, G₂/M 期。至于麦门冬汤是否通过阻断 EGFR-STAT3 信号转导通道发挥作用及其通过哪些受体启动凋亡和周期相关因子仍需进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 孙超龙,谢慧珺. 中药复方和复方制剂治疗肺癌作用机制的实验研究进展[J]. 中医研究, 2013, 26(11):78.
- [2] 刘光敏,贾晓斌,王恒斌,等. 中药防治肺癌分子作用靶点研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(8):1268.
- [3] 宋亚君,范焕芳,霍丙杰. 刘亚娟教授活用麦门冬汤治疗癌症的经验介绍[J]. 陕西中医学院学报, 2013, 36(2):25.
- [4] 李炜,唐于平,高浩学,等. 麦门冬合金钱苇茎汤效应部位的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(18):78.
- [5] 郑璐玉,熊飞,詹臻,等. 麦门冬汤合金钱苇茎汤提取部位对非小细胞肺癌 H460 细胞毒作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(3):60.
- [6] 肖寒,方乃青,申小苏. 加减麦门冬汤联合化疗治疗 III, IV 期非小细胞肺癌[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(24):203.
- [7] 田晓英,刘良. 口服中药治疗肺癌的作用与优势[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(21):2795.
- [8] 王辉,邢惠芝,林雪清,等. 研究表皮生长因子受体(EGFR)与非小细胞肺癌的相关性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(11):77.
- [9] 王俊瑞,博晓真. JAK-STAT3 与 EGFR-STAT3 信号通路在非小细胞肺癌演进中的作用[J]. 内蒙古医学院学报, 2007, 29(2):140.

[责任编辑 聂淑琴]