

# 从 PTEN-PI3K-AKT 信号通路探讨补肾疏肝方含药血清抑制人肺腺癌 A549 细胞增殖和转移的机制

尚亚丽<sup>1</sup>, 王淑玲<sup>2\*</sup>

(1. 郑州大学第一附属医院, 郑州 450052; 2. 郑州大学基础医学中西医结合研究所, 郑州 450052)

**[摘要]** 目的:通过研究补肾疏肝方含药血清对 PTEN-PI3K-AKT 信号通路的影响,探讨补肾疏肝方抑制肺腺癌细胞增殖和转移作用机制。方法:大鼠 60 只,随机分为 6 组,每组 10 只,分别为生理盐水组(NS 为 2 mL),顺铂组(8 mg·kg<sup>-1</sup>),补肾疏肝方低剂量组(15 g·kg<sup>-1</sup>),补肾疏肝方高剂量组(30 g·kg<sup>-1</sup>),联合顺铂低剂量组(15 g·kg<sup>-1</sup> + 8 mg·kg<sup>-1</sup>),联合顺铂高剂量组(30 g·kg<sup>-1</sup> + 8 mg·kg<sup>-1</sup>),每只大鼠 ig,2 mL,每天 2 次,共 5 d。制备药物血清:经药物作用后的大鼠,经腹主动取血,分离血清,灭活,过滤,冻存。MTT 法检测补肾疏肝方含药血清对 A549 细胞增殖的影响。三维细胞培养观察并计数各组细胞形成管状结构数量。RT-PCR 检测含药血清对 A549 肺腺癌细胞 AKT-1, CyclinD1, NF- $\kappa$ B mRNA 水平的表达,Western blot 检测含药血清对 PTEN, p-PI3K, p-AKT 蛋白水平的表达。结果:低剂量补肾疏肝方含药血清对 A549 细胞有抑制作用,低剂量中药与顺铂联用有协同作用且以时间依赖方式,即补肾疏肝方低剂量组与联合顺铂低剂量组在 48, 72, 96 h 的抑制率均高于其他组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );补肾疏肝方低剂量组与联合顺铂低剂量组拟态血管数目均低于其他组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );补肾疏肝方低剂量组与联合顺铂低剂量组 PTEN 蛋白表达均高于其他组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),补肾疏肝方低剂量组与联合顺铂低剂量组 p-PI3K, p-AKT 蛋白, Akt1, CyclinD1, NF- $\kappa$ B 的 mRNA 表达均低于其他组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结论:补肾疏肝方含药血清可通过 PTEN-PI3K-AKT 信号通路抑制人肺腺癌 A549 细胞增殖和转移。

**[关键词]** 补肾疏肝方; A549p; PTEN-PI3K-AKT 信号通路

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)10-0153-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015100153

**Inhibiting Effect and Mechanism of Drug-contained Serum of Bushen Shugan Formula on A549 Cells Proliferation and Metastasis by PTEN-PI3K-AKT Pathway** SHANG Ya-li<sup>1</sup>, WANG Shu-ling<sup>2\*</sup> (1. *The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China*; 2. *Department of Integrative Medicine, Basic Medical of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China*)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the inhibiting effect and mechanism of Bushen Shugan formula on A549 cells proliferation and metastasis by PTEN-PI3K-AKT pathway. **Method:** Sixty rats were randomly divided into 6 groups: the normal saline group (2 mL), the cisplatin group (8 mg·kg<sup>-1</sup>), the low-, high-dose Bushen Shugan formula groups (15, 30 g·kg<sup>-1</sup>), and the low-dose Bushen Shugan formula plus cisplatin group (15 g·kg<sup>-1</sup> + 8 mg·kg<sup>-1</sup>), the high-dose Bushen Shugan formula plus cisplatin group (30 g·kg<sup>-1</sup> + 8 mg·kg<sup>-1</sup>) of 10 rats each. The corresponding medicines were intragastrically administered to rats twice daily for 5 days and the drug serums were prepared. The cell proliferation ability of each group was evaluated by MTT. The capillary structure in each group was observed by three-dimensional cell culture and the number was counted. The mRNA expressions of AKT-1, CyclinD1 and NF- $\kappa$ B were detected by using RT-PCR. The protein expressions of PTEN, p-PI3K and p-AKT were detected by using Western blot. **Result:** Low-dose drug-contained serum of Bushen Shugan formula could inhibit the proliferation of A549 in a time-dependent manner. The inhibiting rates were lower after 48, 72 and 96 h culturing, the numbers of tuber-shaped structure were lower, the protein expression of PTEN was higher, the protein expressions

**[收稿日期]** 20141011 (fj20141011015)

**[基金项目]** 河南省科技厅重点攻关项目(311700531510)

**[第一作者]** 尚亚丽, 硕士, 从事中西医结合肺癌防治研究, Tel:15838087861, E-mail: shangyali21@163.com

**[通讯作者]** \*王淑玲, 博士, 硕士生导师, 从事中西医结合呼吸系统疾病研究, Tel:13598085869, E-mail: wsl5869@163.com

of p-PI3K and p-AKT were lower, and the mRNA expressions of Akt1, CyclinD1, NF- $\kappa$ B were lower in the Bushen Shugan formula plus cisplatin groups than the other group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). There were certain synergies between Bushen Shugan formula and cisplatin. **Conclusion:** Drug-contained serum of Bushen Shugan formula could inhibit the cell proliferation and metastasis of A549 cells by PTEN-PI3K-AKT signaling pathway.

[**Key words**] Bushen Shugan formula; A549; PTEN-PI3K-AKT signaling pathway

肺癌目前是世界上发病率、死亡率最高的恶性肿瘤之一,其中 85% 为非小细胞肺癌,其死亡的主要原因是肿瘤细胞的浸润和转移,细胞的浸润和转移是世界共同研究的难题;而在肺癌辅助治疗方案中,中医药始终发挥着不可忽视的重要作用,能够提高疗效、减轻毒副作用,提高生活质量。补肾疏肝方(BSSGF)是王淑玲教授的经验用方,常用于晚期非小细胞患者和无意愿放化疗的患者,补肾疏肝方由逍遥散加五子衍宗丸基础方剂上加减组合。它在减轻疾病和提高病人生活质量上有重要作用,如降低恶性胸水和减轻骨转移。其临床效果作用机制还不明确,既往研究该方含药血清可通过上调 p53,下调 Bcl-2 促进 A549 细胞凋亡<sup>[1]</sup>。

本实验主要通过血管生成拟态、应用 Western blot 实验检测 PTEN-PI3K-AKT 信号通路上的 PTEN, PI3K, AKT 蛋白表达,及 RT-PCR 下游信号 AKT-1, CyclinD1, NF- $\kappa$ B 的 mRNA 的表达,来探讨补肾疏肝方的抑制肺腺癌细胞增殖和转移的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物和细胞系** SD 雄性大鼠 60 只,280 ~ 300 g,动物合格证号 SCXK(豫)2013-0006,购于河南省实验动物中心。A549 细胞由郑州大学肿瘤研究中心提供。

**1.2 药物及试剂** 补肾疏肝方(柴胡 6 g,当归 6 g,赤白芍各 6 g,枸杞子 10 g,菟丝子 9 g,车前子 15 g,北五味子 6 g,覆盆子 9 g,黄芪 18 g,淫羊藿 9 g,鱼腥草 15 g,瓜蒌 12 g,薤白 9 g,夏枯草 9 g,女贞子 9 g,生薏苡仁 15 g,猪苓 9 g,龙胆草 2 g,蜈蚣 1 条。中草药购买于张仲景大药房(批号 20130708)。胎牛血清(鼎国生物技术有限公司,批号 141104),聚山梨醇-20(美国 Sigma 公司,批号 H10246),Matrigel™ 基底膜基质胶(美国 BD 公司,批号 10CM199),发光试剂盒(ECL)和 BCA 试剂盒(武汉博士德公司,货号分别为 AR1171, AR0146A),SuperRT Reverse Transcriptase SuperRT 逆转录酶、DNA marker(康为世纪公司,货号分别为 CW0740A, CW2569-25, CW2190A),光谱蛋白 Marker(武汉博

士德公司,货号 AR1114),PTEN, PI3K, AKT 兔抗人抗体(博奥森公司,货号分别为 bs-0748R, bs-01280, bs-0115R),GAPDH 兔抗人抗体、鼠抗兔二次抗体(武汉博士德公司,货号分别为 PB0141, BA1058)。AKT1, cyclinD1 和 NF- $\kappa$ B 的引物序列是由上海生工生物技术合成有限公司合成。

**1.3 仪器** GENESYS 10SKJ 型紫外分光光度仪(美国 Thermo 公司),DP-88 型 PCR 扩增仪(美国 SensoQuest LabCycler 公司),JY-ZY5 型 Western blot 电泳电转移(美国 BD 公司)。

## 2 方法

**2.1 制备药物血清** 大鼠 60 只,随机分为 6 组,每组 10,大鼠平均体重为 250 g,各组体重方差齐。分别为生理盐水组(A 组,2 mL),顺铂组(B 组,8 mg·kg<sup>-1</sup>),补肾疏肝方低剂量组(C 组,15 g·kg<sup>-1</sup>),补肾疏肝方高剂量组(D 组,30 g·kg<sup>-1</sup>),联合顺铂低剂量组(E 组,15 g·kg<sup>-1</sup> + 8 mg·kg<sup>-1</sup>),联合顺铂高剂量组(F 组,30 g·kg<sup>-1</sup> + 8 mg·kg<sup>-1</sup>)。低剂量和高剂量补肾疏肝方分别为常规得到补肾疏肝方剂量的 5 倍和 10 倍的浓缩,每只大鼠 *ig* 2 mL,每天 2 次,共 5 d。A 组予同等量的生理盐水。B 组,联合顺铂低剂量组和联合顺铂高剂量组老鼠在第 1, 3, 5 天予 *ip* 4 mL(浓度为 0.5 g·L<sup>-1</sup>)的顺铂,末次 *ig* 2 h 后水合氯醛腹腔注射麻醉,无菌条件下腹主动脉采血,分离血清,56 °C 灭活 30 min,经 0.22 μm 过滤除菌, -20 °C 保存。细胞培养过程中,培养液是药物血清与 1640 培养基以 1:10 体积配比。

**2.2 MTT 法检测细胞增殖** 200 μL 密度为 3 500 个/孔 A549 细胞接种于 96 孔板,细胞贴壁后加入含药血清培养基培养 24, 48, 72, 96 h。20 μL 5 mg·mL<sup>-1</sup> MTT 试剂加到每个孔后在 5% CO<sub>2</sub> 和 37 °C 孵育 4 h。加入 DMSO 150 μL 后摇床 10 min,然后测在 490 nm 测定吸光度(A)。计算细胞生长抑制率。

$$\text{生长抑制率}(\%) = \frac{(A_{\text{生理盐水组}} - A_{\text{实验组}})}{A_{\text{生理盐水组}}} \times 100\%$$

在相同的条件下,实验重复 3 次。

**2.3 体外细胞三维培养观察细胞形成拟态血管的能力** 在 24 孔培养板,每孔加 300 μL 基质胶溶液

后 30 min 37 °C 凝固。200 μL 密度为  $5 \times 10^5$  /mL 药物处理后的细胞加入 24 孔板,在 5% CO<sub>2</sub>,37 °C 培养箱孵育 14 h。最后,在显微镜下观察上,下,左,右,中心 5 个视野拟态血管的数目,计算平均值。在相同的条件下,重复试验 3 次。

**2.4 RT-PCR 实验** A549 细胞接种于 6 孔板培养,经药物处理 72 h 后,进行 RNA 提取,反转录试剂盒合成 cDNA。最后,目的基因片段经 PCR 扩增仪扩增。反应条件如下:94 °C 预变性 2 min,94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,65 °C 延伸 30 s,共 35 个循环,反应产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后,观察其凝胶成像。图像由 ImageJ2x 软件分析。PCR 引物分别为:AKT1 引物上游 5'-AAGAAGGAAGTCATCGTG-3',下游 5'-GGACAGGTGGAAGAACAGC-3',扩增产物为 177 bp; CyclinD1 引物上游 5'-AGAAGCTGTG-CATCTACACCCGACA-3',下游 5'-TGGAGGGCGGAT-TGGAAATGAACT-3',扩增产物 240 bp;NF-κB 引物上游 5'-GGACCAGCAAAGGTTATTGTTTC-3',下游 5'-TTATACACGCCTCTGTCATTCG-3',扩增产物 217 bp, GAPDH 引物上游 5'-TGATTCCACCCATG-GCAAATTCC-3',下游 5'-ACAGCCTTGGCAGCGC-CAGTAGA-3',扩增产物 504 bp。

**2.5 免疫印迹法** 细胞接种于 6 孔板培养 4 h。加入药物血清培养基培养 72 h,蛋白磷酸化提取蛋白并,BCA 试剂盒测定蛋白浓度。蛋白质是由 5% 个浓缩胶和 10% 或 8% 的分离胶电泳,然后电转移至 0.45 μm 硝酸纤维素滤膜(NC)上。NC 膜在封闭液封闭 1 h,4 °C 冰箱一抗孵育过夜。第 2 天,TBST 洗膜 2 次和 TBS 洗 1 次,二抗孵育 2 h,然后 ECL 发光液显影。一抗兔抗人抗体稀释:PTEN 抗体,AKT1 抗体和 PI3K 抗体按 1:1 000 稀释。辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗以 1:5 000 稀释。图像由 ImageJ2X 分析。

**2.6 统计学分析** 采用 SPSS 18.0 进行数据分析,实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组定量资料采用方差分析,多个样本均数的两两比较采用 LST-t 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 MTT 法检测补肾疏肝方含药血清对不同时间点 A549 细胞的影响** 补肾疏肝方低剂量组以时间依赖方式抑制 A549 细胞增殖,但补肾疏肝方高剂量组无此依赖方式,低剂量补肾疏肝方与顺铂联用有协同增效且以时间依赖的方式,而高剂量补肾疏肝方则无此协同作用。在第 24,48,72,96 小时,联

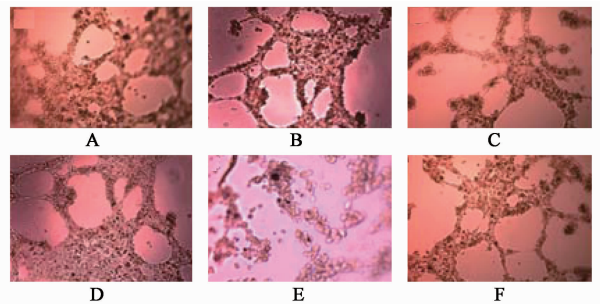
合顺铂低剂量组与其他组比较抑制率有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),而补肾疏肝方低剂量组与其他组比较在 72 h 和 96 h 均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。然而,顺铂组、高剂量组、联合顺铂高剂量组在第 24,48,72,96 小时两两比较均无差异。见表 1。

表 1 补肾疏肝方含药血清对不同时间点 A549 细胞的影响  
Table 1 Effects of drug-contained serum of Bushen Shugan formula on A549 cell in different groups and different time

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	抑制率/%			
		24 h	48 h	72 h	96 h
生理盐水	-	-	-	-	-
顺铂	0.008	13.2	18.1	21.0	19.7
补肾疏肝方	15	17.4	21.2	27.9 <sup>2)</sup>	32.6 <sup>2)</sup>
	30	14.2	17.8	17.8	14.9
联合顺铂	15 + 0.008	19.3 <sup>1)</sup>	27.9 <sup>2)</sup>	37.2 <sup>2)</sup>	41.3 <sup>2)</sup>
	30 + 0.008	15.5	19.9	20.4	14.1

注:与顺铂组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

**3.2 对 A549 细胞形成拟态血管的影响** 各组管道数目分别为生理盐水组 ( $19.73 \pm 2.49$ ) 个,顺铂组 ( $13.56 \pm 2.34$ ) 个,补肾疏肝方低剂量组 ( $7.30 \pm 1.80$ ) 个,补肾疏肝方高剂量组 ( $12.49 \pm 2.58$ ) 个,联合顺铂低剂量组 ( $3.57 \pm 1.82$ ) 个,联合顺铂高剂量组 ( $12.95 \pm 2.79$ ) 个,LST-t 统计结果,顺铂组的拟态血管管道形成数与补肾疏肝方高剂量组和联合顺铂高剂量组的数目两两比较均无统计学意义。其余组管道形成数两两比较有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),补肾疏肝方低剂量组、联合顺铂低剂量组拟态形成血管的数目明显低于其他组的数目 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见图 1。



A. 生理盐水组;B. 顺铂组;C 补肾疏肝方 15 g·kg<sup>-1</sup> 组;D. 补肾疏肝方 30 g·kg<sup>-1</sup> 组;E 联合顺铂 (15 + 0.008) g·kg<sup>-1</sup> 组;F. 联合顺铂 (30 + 0.008) g·kg<sup>-1</sup> 组 (图 2~3 同)

图 1 肾疏肝方含药血清对 A549 细胞形成拟态血管的影响 (×100)  
Fig.1 Effects of drug-contained serum of Bushen Shugan formula on forming mimircy angiogenesis tubular structure in A549 cells (×100)

**3.3 对 AKT-1, CyclinD1, NF-κB mRNA 相对表达的影响** 与生理盐水组比较,补肾疏肝方低剂量组、联

合顺铂低剂量组药物血清 AKT-1, CyclinD1, NF- $\kappa$ B mRNA 的相对表达均低于其他组 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 顺铂组、补肾疏肝方药物高剂量组和联合顺铂高剂量组 3 组的 AKT-1, CyclinD1, NF- $\kappa$ B mRNA 的相对表达比较均无统计学意义, 但与生理盐水组的比较均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 2, 表 2。

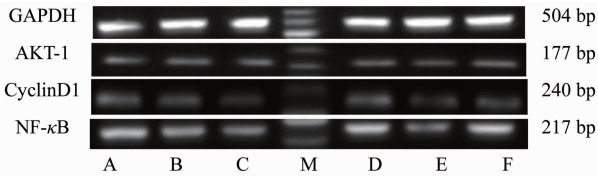


图 2 AKT-1, CyclinD1, NF- $\kappa$ B mRNA 的表达

Fig. 2 Expressions of AKT-1, CyclinD1, NF- $\kappa$ B mRNA

表 2 补肾疏肝方含药血清对 A549 细胞对 AKT-1, CyclinD1, NF- $\kappa$ B mRNA 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Effects of drug-contained serum of Bushen Shugan formula on AKT-1, CyclinD1, NF- $\kappa$ B mRNA levels ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	Akt-1/ GAPDH	CyclinD1/ GAPDH	NF- $\kappa$ B/ GAPDH
生理盐水	-	0.99 ± 0.09	1.21 ± 0.12	0.95 ± 0.10
顺铂	0.008	0.89 ± 0.09 <sup>1)</sup>	0.79 ± 0.08 <sup>2)</sup>	0.77 ± 0.09 <sup>2)</sup>
补肾疏肝方	15	0.76 ± 0.07 <sup>2)</sup>	0.74 ± 0.07 <sup>2)</sup>	0.65 ± 0.07 <sup>2)</sup>
	30	0.86 ± 0.09 <sup>1)</sup>	0.89 ± 0.09 <sup>1)</sup>	0.87 ± 0.09 <sup>1)</sup>
联合顺铂	15 + 0.008	0.52 ± 0.06 <sup>2)</sup>	0.49 ± 0.05 <sup>2)</sup>	0.44 ± 0.05 <sup>2)</sup>
	30 + 0.008	0.88 ± 0.09 <sup>1)</sup>	0.79 ± 0.08 <sup>2)</sup>	0.76 ± 0.07 <sup>2)</sup>

注:与生理盐水组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ (表 3 同)。

### 3.4 对 PTEN, p-PI3K, p-AKT 蛋白相对表达的影响

与生理盐水组比较, 补肾疏肝方低剂量组和联合顺铂低剂量组药物血清 PTEN 蛋白的相对表达均高于其他组 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 与生理盐水组比较, 补肾疏肝方低剂量组和联合顺铂低剂量组药物血清 p-PI3K, p-AKT 蛋白的相对表达均低于其他组 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 顺铂组与补肾疏肝方高剂量组、联合顺铂高剂量组两组的 PTEN, p-PI3K, p-AKT 相对蛋白比较均无统计学意义, 但与生理盐水组的比较均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 3, 表 3。

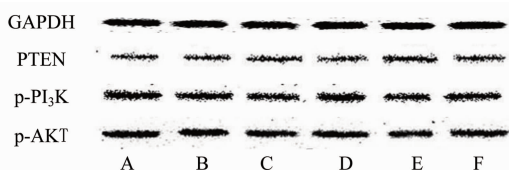


图 3 PTEN, p-PI3K, p-AKT 蛋白的表达

Fig. 3 Expressions of PTEN, p-PI3K, p-AKT protein

表 3 补肾疏肝方含药血清对 A549 细胞 PTEN, p-PI3K, p-AKT 蛋白相对水平表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Effects of drug-contained serum of Bushen Shugan formula on PTEN, PI3K, AKT protein levels ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	PTEN /GAPDH	p-PI3K /GAPDH	p-AKT /GAPDH
生理盐水	-	0.52 ± 0.04	0.94 ± 0.10	0.98 ± 0.12
顺铂	0.008	0.58 ± 0.03 <sup>1)</sup>	0.84 ± 0.08 <sup>1)</sup>	0.87 ± 0.10 <sup>1)</sup>
补肾疏肝方	15	0.71 ± 0.06 <sup>2)</sup>	0.72 ± 0.06 <sup>2)</sup>	0.80 ± 0.05 <sup>2)</sup>
	30	0.58 ± 0.04 <sup>1)</sup>	0.79 ± 0.05 <sup>1)</sup>	0.88 ± 0.08 <sup>1)</sup>
联合顺铂	15 + 0.008	0.86 ± 0.04 <sup>2)</sup>	0.65 ± 0.03 <sup>2)</sup>	0.70 ± 0.04 <sup>2)</sup>
	30 + 0.008	0.61 ± 0.04 <sup>1)</sup>	0.76 ± 0.06 <sup>2)</sup>	0.87 ± 0.08 <sup>1)</sup>

## 4 讨论

研究表明失活突变的 PTEN 基因以及活化突变 PI3KCA (编码 p110 $\alpha$ PI3K 的催化亚基基因) 是在肿瘤细胞中很常见的事件, 这表明 PIP3 水平升高对癌细胞生存有一个强大的优势<sup>[2]</sup>。因为而持续增加的 PIP3 水平的可致细胞增殖、存活和运动增强; 水平的增高的 PIP3 有致瘤性。在一些恶性肿瘤中, PTEN 基因常出现缺失、突变或者表达异常<sup>[3]</sup>。PTEN 通过抑制 PI3KCA 信号通路产生肿瘤抑制作用, 它能抑制细胞生长, 促进细胞凋亡, 调节细胞黏附、迁移、扩散和分化。PTEN 和 PI3KCA 之间的平衡决定的 PI(3,4,5)P3 水平和细胞存活<sup>[4]</sup>。PTEN 是一种肿瘤抑制基因和 PI3K 信号通路的拮抗剂。PIP3 可介导激活 Akt, PIP3 去磷酸化从而负调节 PI3K-Akt-mTOR 通路, 导致 G<sub>1</sub> 细胞周期阻滞和细胞凋亡与细胞周期素 D 的表达 (包括 CyclinD1)。本实验表明, 补肾疏肝方低剂量组、联合顺铂低剂量组的 p-PI3KCA, p-Akt 蛋白表达明显低于其他组, PTEN 蛋白明显高于其他组。此外, PI3K-AKT 下游的信号 NF- $\kappa$ B mRNA 和 CyclinD1 mRNA, 也受此信号通路的影响, 明显低于其他组。至于补肾疏肝方高剂量组和联合顺铂高剂量组抑制率反而小于补肾疏肝方低剂量组和联合顺铂低剂量组的, 笔者推测可能是高浓度中药对 SD 大鼠产生副作用较强引起的。

多项临床研究提示血管生成拟态的存在与肿瘤早期血行转移和不良预后密切相关<sup>[5]</sup>。研究表明 PI3K/Akt 与血管生成拟态密切相关并且参与肿瘤细胞迁移<sup>[6]</sup>。血管生成拟态是恶性肿瘤适应缺血缺氧微环境一种的生长方式<sup>[7]</sup>。本实验表明联合顺铂低剂量组组和 L 组的血管生成拟态能力明显较 S 组低。此外, 该两组的 p-PI3K 和 p-Akt 蛋白表达明显较 S 组低, 且 PTEN 蛋白明显增加。因此, 笔

者推断 PTEN-PI3K-Akt 信号通路参与了抑制 A549 细胞的转移。

女性比男性更易得肺腺癌,肺癌的这种性别差异表明性激素在肺癌发生发展中发挥重要作用;同样,临床激素替代疗法的试验表明,雌孕激素结合治疗增加绝经后妇女的肺癌发生率和死亡率<sup>[8]</sup>;雌激素信号通路在肺癌尤其是肺腺癌的发生中起了重要作用<sup>[9]</sup>;ER $\beta$ -1, ER $\beta$ -2 和 ER $\beta$ -5 是过度表达在 NSCLC 组织中<sup>[10]</sup>;ER 与肺腺癌转移发生的时间和预后紧密相关的<sup>[11]</sup>。在 NSCLC 细胞中,孕激素和雌激素刺激血管内皮生长因子的分泌<sup>[12]</sup>;抗雌激素药物氟维司群增强 EGFR 抑制剂的作用<sup>[13]</sup>。ER 与 VEGFR 或 EGFR 信号通路,PI3K-Akt 信号通路存在交互作用,这种交互作用增加 NSCLC 的发病风险。另外,肺癌组织中 AR 的阳性表达与肺肿瘤的进展和淋巴结转移相关联。根据中医理论,“肾藏精主生长发育和生殖”。肺属金,肾属水,金生水,故将肺肾关系称之为“金水相生”。“肾”可以通过性激素及其受体对肺进行调节<sup>[14-16]</sup>。“正气存内,邪不可干”,“邪之所凑,其气必虚。王教授认为肾虚是导致肺癌的内因之一。中医关于肺癌转移的认识为:《素问·痹论》云:“五脏皆有合,病久而不去者,内舍于其合也”。肾藏精,主骨生髓,髓聚为脑;故肺腺癌常转移于骨与脑。气机郁滞尤其肝郁气滞常见于肿瘤患者。此方以“补肾”为主,以疏肝理气、化痰散结为辅。笔者推断,该方剂抑制作用可能主要通过调节激素受体与 PI3K-AKT 信号通路的交互作用实现的。虽然笔者在研究补肾疏肝方作用机理有所发现,但由于方剂中所含物质复杂性还需要进一步的实验研究。

[参考文献]

[1] 苗学红,王淑玲,古兆森,等. 补肾疏肝方对肺腺癌 A549 细胞的抑制及凋亡相关因子研究[J]. 中华中医药杂志,2014,29(8):2661-2663.

[2] Parsons Ramon. Human cancer, PTEN and the PI3 kinase pathway [J]. Semin Cell Dev Biol,2004,15(2):171-176.

[3] Chow Lionel M L, Baker Suzanne J. PTEN function in normal and neoplastic growth [J]. Cancer Lett,2006,241(2):184-196.

[4] Rizvi M M, Alam M S, Ali A, et al. Aberrant promoter methylation and inactivation of PTEN gene in cervical carcinoma from Indian population[J]. J Cancer Res Clin

Oncol,2011,137(8):1255-1262.

[5] Cao Z, Bao M, Miele L, et al. Tumour vasculogenic mimicry is associated with poor prognosis of human cancer patients: a systemic review and meta-analysis [J]. Eur J Cancer,2013,49(18):3914-3923.

[6] Sun Baocun, Zhang Dan Fang, Zhang Shi Wu, et al. Hypoxia influences vasculogenic mimicry channel formation and tumor invasion - related protein expression in melanoma [J]. Cancer Lett, 2007, 249 (2): 188-197.

[7] Liao Debbie, Johnson Randall S. Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer [J]. Cancer Metastasis Rev,2007,26(2):281-290.

[8] Slatore C, Chien J, Au D, et al. Lung cancer and hormone replacement therapy: association in the vitamins and lifestyle study [J]. J Clin Oncol,2010,28(9):1540-1546.

[9] Mah V, Seligson D B, Li A, et al. Goodglick, aromatase expression predicts survival in women with early-stage non-small cell lung cancer [J]. Cancer Res, 2007,67(21):10484-10490.

[10] Zhao Guo, Liao Yong De, Tang He Xiao, et al. The expression of estrogen receptors beta 2, 5 identifies and is associated with Prognosis in non-small cell lung cancer [J]. Endocrine,2013,44(2):517-524.

[11] Liu Hairong, Yu Jinming, Li Yan. Study of the relationship between ER, PR, C-erbB-2 and bone metastasis of lung adenocarcinoma [J]. J Shandong Univ (Health Sci),2012,50(4):91-95.

[12] Liang Y, Hyder S M. Proliferation of endothelial and tumor epithelial cells by progestin-induced vascular endothelial growth factor from human breast cancer cells: paracrine and autocrine effects [J]. Endocrinology,2005,146(8):3632-3641.

[13] Garon Edward B, Pietras Richard J, Finn Richard J, et al. Antiestrogen fulvestrant enhances the antiproliferative effects of epidermal Growth factor receptor inhibitors in human non-small-cell lung cancer [J]. J Thorac Oncol, 2013,8(3):270-278.

[14] 闫明,陈小兵,王淑玲,等. 雌激素和雄激素受体在肺癌中的表达 [J]. 中国肺癌杂志,2008,11(1):126-129.

[15] 王淑玲. “肺肾相关”的物质基础 [J]. 中国中医基础医学杂志,2002,8(4):9-18.

[16] 王淑玲,宗全和. 中西医结合探讨“肺肾相关” [J]. 中国医药学报,2002,17(4):221-223.

[责任编辑 周冰冰]