

加味生脉饮含药血清对非小细胞肺癌细胞增殖及迁移的影响

陈惠, 姜森, 辛丽丽, 渠景连, 苏垠旭, 徐慕鸽, 龚婕宁*
(南京中医药大学, 南京 210046)

[摘要] **目的:**研究加味生脉饮含药血清对非小细胞肺癌 H460 细胞增殖、细胞周期及其迁移的影响,并探讨其分子机制。**方法:**以生药量 $18\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ *ig* 家兔,制备加味生脉饮含药血清,同容积生理盐水 *ig* 制备空白血清,并视血清浓度为 100%。体外培养 H460 细胞,收集对数期生长的细胞,设置 10% 空白血清组,2.5%,5%,10% 含药血清组,1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ DDP 组,共 5 组,调整细胞密度至 3 000 个/mL,血清作用 24,48 h 后,采用四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法测定细胞增殖抑制率;调整细胞密度至 5×10^5 个/mL,加入上述浓度血清作用 24 h 后,分别采用流式细胞仪检测细胞周期,划痕实验观察细胞迁移的情况,Western blot 法检测 E 钙连蛋白 (E-cad) 及波形蛋白 (Vimentin) 蛋白表达的变化。**结果:**与空白血清组相比,加味生脉饮含药血清作用 H460 细胞 24 h 后,细胞增殖抑制率上升 ($P < 0.01$),S 期细胞百分率增高 ($P < 0.01$),划痕距离较长,E-cad 蛋白含量升高 ($P < 0.01$),Vimentin 蛋白含量降低 ($P < 0.01$)。**结论:**加味生脉饮对 H460 细胞增殖有一定抑制作用,主要途径为 S 期阻滞。加味生脉饮可以抑制 H460 细胞的转移,其机制可能与干预 H460 细胞上皮间质转化有关。

[关键词] 加味生脉饮; 非小细胞肺癌; H460 细胞; 增殖; 周期; 迁移

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)19-0106-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015190106

Effect of Drug-containing Serum with Modified Shengmai Decoction on Proliferation and Migration of Non Small Cell Lung Carcinoma Cells CHEN Hui, JIANG Miao, XIN Li-li, QU Jing-lian, SU Yin-xu, XU Mu-ge, GONG Jie-ning* (Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of drug-containing serum with modified Shengmai decoction on cell proliferation, cell cycle and migration of non small cell lung carcinoma (NSCLC) H460 cells, and investigate its molecular mechanisms. **Method:** Drug-containing serum with modified Shengmai decoction was prepared by administering the rabbits with $18\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ crude drug *ig*, and blank control serum was prepared with the same volume of normal saline (NS) *ig*. Both serum was regarded as a concentration of 100%. H460 cells were cultured *in vitro* and cells in logarithmic growth phase were collected. 10% control serum group, 2.5%, 5%, 10% drug-containing serum groups and 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ DDP group were established. Cell density was adjusted to 3 000 cells/mL. After serum action for 24, 48 hours, four methyl azo blue (MTT) method was used to measure the proliferation inhibition rate. Cell density was then adjusted to 5×10^5 cells/mL, and after serum action for 24 hours, flow cytometry was used to test cell cycle, scratch assay was taken to observe cell migration, and Western blot method was used to measure the expression changes of E-cadherin (E-cad) and Vimentin. **Result:** Compared with the blank control group, drug-containing serum with modified Shengmai decoction had higher cell proliferation inhibition rate ($P < 0.01$), higher cells percentage in S phase ($P < 0.01$), longer wound scratch distance, higher protein content of E-cad and lower Vimentin ($P < 0.01$) after serum action for 24 hours. **Conclusion:** Modified Shengmai decoction has an inhibition effect on cell H460 mainly by inhibiting cells in phase S. Modified Shengmai decoction can inhibit the metastasis of H460, whose mechanism may be associated with intervening the epithelial-mesenchymal transformation.

[Key words] modified Shengmai decoction; non-small-cell lung cancer; H460 cell; proliferation; cellcycle; migration

[收稿日期] 20150207(009)

[基金项目] 江苏高校中西医结合优势学科建设工程项目(zxy201100);国家自然科学基金项目(81373603)

[第一作者] 陈惠,在读硕士,从事温病治则治法机制研究,Tel:13218061958,E-mail:1060138599@qq.com

[通讯作者] * 龚婕宁,教授,博士生导师,Tel:025-85811533,E-mail:wbgongjiening@163.com

在我国,非小细胞肺癌患者约占所有肺癌患者的80%~85%^[1]。肿瘤细胞增殖、迁移与病情转化密切相关,抑制肿瘤细胞增殖分裂及预防控制转移是肿瘤治疗的两大基本策略。益气养阴、活血通络是临床治疗肺癌的常用方法,刘嘉湘等^[2]曾对310例原发性肺癌的中医证型进行统计分析,发现气阴两虚证和阴虚内热证占全部病例的80%;王笑民^[3]将108例非小细胞肺癌患者的中医证型进行分析,结果显示气虚血瘀证占60.2%。生脉饮出自《备急千金要方》,由人参、麦冬、五味子组成,本研究在此基础上加入蜂房、地龙组成加味生脉饮,全方具有益气养阴通络解毒的作用,并基于血清药理学方法观察加味生脉饮含药血清对非小细胞肺癌H460细胞增殖、周期及迁移的影响,以期为临床治疗提供实验依据。

1 材料

1.1 药物及试剂 加味生脉饮由生晒参、麦冬、五味子、蜂房、地龙分别以3:6:2:2:3组成,购自南京中医药大学国医堂门诊部,经鉴定属正品。RPMI-1640培养基干粉(美国Gibco,批号1371024),胎牛血清(美国Gibco,批号1027810),胰蛋白酶(Solarbio,批号T8150),顺铂(南京制药厂有限公司,批号20130103),RIPA裂解液(碧云天,批号P0013B),SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(碧云天,批号P0015L),E-cadherin兔单抗(Cell Signaling,批号3195P),Vimentin兔单抗(Cell Signaling,批号5742P), β -actin单抗(麦约尔生物技术有限公司,批号A7147100),碱性磷酸酶标记二抗(羊抗兔,紫杉金桥生物技术公司,批号V0703)。

1.2 动物与细胞株 健康新西兰兔10只,雌雄不限,体重2.5~3.0 kg,由南京中医药大学实验动物中心提供,合格证号SCXK(苏)2012-0008。非小细胞肺癌H460细胞,由上海生物细胞研究所提供。培养于含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中,常规传代培养。

1.3 仪器 SW-CJ-1FD型超净工作台(上海净化设备厂),XD-101型CO₂细胞培养箱(日本Sanyo公司),FC500 MPL型流式细胞仪(美国贝克曼库尔特有限公司),DG5033A型酶标仪(南京华东电子集团医疗装备有限责任公司),IX51型光学显微镜(日本Olympus公司),164-5051型电泳仪(美国Biorad公司)。

2 方法

2.1 加味生脉饮含药血清制备 生晒参、麦冬、五

味子、蜂房、地龙按比例称取,常法煎煮,滤液浓缩至生药量3 000 g·L⁻¹,4℃保存备用。健康新西兰兔随机分为含药血清组和空白血清组,按照通法方案^[4],含药血清组以生药量18 g·kg⁻¹ ig,每天2次,连续给药3 d。第3天ig 1次,给足1 d剂量(给药前禁食12 h)。末次给药1 h后颈动脉采血,取血清,56℃水浴灭活,过滤除菌,-20℃保存备用。空白血清:以生理盐水同比例ig,相同方法采血制备空白血清。

2.2 分组设置 将加味生脉饮含药血清分为10%含药血清组(高),5%含药血清组(中),2.5%含药血清组(低),同时设置10%空白血清组和1 mg·L⁻¹顺铂(DDP)组。5%,2.5%含药血清组用空白血清稀释,临用前将各组药物血清加入RPMI-1640培养液,并使培养液中血清终体积分数为10%。用RPMI-1640培养液将20 g·L⁻¹的DDP稀释至1 mg·L⁻¹。

2.3 细胞生长抑制率测定 消化收集对数生长期的H460细胞,计数并调整细胞密度,按每孔3 000个细胞接种于96孔板内,每孔加入100 μ L,板四周每孔加200 μ L PBS,于37℃,5%CO₂培养箱培养。24 h后弃去培养液,按含药血清分组设置分别加入150 μ L相应含药血清培养液和1 mg·L⁻¹ DDP培养液,每组均设5个平行孔,培养箱继续培养。24, 48 h后,每孔加入MTT 20 μ L(10 g·L⁻¹),操作尽量避免,置培养箱继续培养。4 h后取出96孔板,弃培养液,每孔加入150 μ L DMSO溶解液,低速振荡15 min,酶标仪于490 nm波长处检测吸光度A,计算细胞生长抑制率。

$$\text{细胞生长抑制率} = (1 - \text{实验组} A / \text{空白组} A) \times 100\%$$

2.4 细胞周期检测 消化收集对数生长期的H460细胞并计数,调整细胞密度为 5×10^5 个/mL,以每孔1 500 μ L接种于6孔板上,培养箱培养。24 h后吸弃培养液,按含药血清分组设置分别加入1 500 μ L含药血清培养液和1 mg·L⁻¹ DDP培养液,每组设置5个平行孔,继续培养。24,48 h后,消化收集细胞,1 500 r·min⁻¹离心5 min,弃上清,加入PBS 2 mL,轻轻吹打混匀,继续离心,重复2次,最后加1 mL 70%冰乙醇,吹打均匀制备成单细胞悬液,-20℃固定24 h以上,保存备用。检测时取出各组细胞,1 000 r·min⁻¹离心5 min,弃上清,沉淀加PBS清洗混匀,过滤用300目尼龙网过滤至检测管,离心并用PBS清洗2次,沉淀加入PI 300 μ L,混匀,避光、室温反应20 min,流式细胞仪检测细胞各期DNA含量。

2.5 测定细胞迁移距离 消化收集对数生长期的 H460 细胞,调整密度为 5×10^5 个/mL,以每孔 1 500 μL 均匀种于 6 孔板,培养箱培养。细胞贴壁后,弃去培养基,划痕,PBS 沿壁轻轻冲洗细胞,弃 PBS,按含药血清分组设置分别加入 1 500 μL 含药血清培养液,每个分组设置 3 个平行孔,继续培养。24 h 后取出培养板,弃去培养基,PBS 清洗去除漂浮细胞。倒置显微镜任意选取 5 个不同视野拍照,测量划痕的距离,计算平均值与标准差。实验重复 3 次。

2.6 检测 E-cad, Vimentin 蛋白表达 收集不同血清组处理 24 h 的 H460 细胞,加 RIPA 裂解液和 PMSF 蛋白酶抑制剂,冰上吹打均匀,超声破碎后,用考马斯亮蓝染色,经标准曲线测蛋白浓度,加入 Loading Buffer,混匀,煮沸 5 min,保存于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 待用。SDS-PAGE 凝胶电泳分离总蛋白,每个孔以总蛋白 20 μg 上样,体积不足 30 μL 的用 $1 \times$ Loading Buffer 补齐,蛋白预染 Marker (fermantas) 5 μL ; 将蛋白通过电转仪印迹转至硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上,含 5% 脱脂奶粉的 PBST 中室温轻摇封闭 1 h; 一抗 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min; 加入用封闭液稀释的碱性磷酸酶标记的二抗,室温轻摇 1 h,用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min; 避光条件下,将 NC 膜置于含有 NBT/BCIP 的缓冲液中显色

至条带清晰,用蒸馏水冲洗终止反应;显色完成的硝酸纤维素膜经成像分析仪采集后,用 Image J 系统软件分析条带的吸光度,以 β -actin 作为内参照,结果以目的条带和内参照的吸光度 A 比值来呈现。

2.7 统计学分析 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学分析,组间比较用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对 H460 细胞增殖的影响 加味生脉饮含药血清高、中、低剂量组在 24 h 范围内对 H460 细胞增殖均有一定抑制作用,经统计学处理,与空白血清组比较有显著性差异 ($P < 0.01$), 5%, 10% 含药血清组略优于阳性对照顺铂组,但 48 h 时各组含药血清几乎无抑制细胞增殖作用,而顺铂抑制率高达 65.3%。见表 1。

3.2 对 H460 细胞周期的影响 流式细胞术检测结果表明,与空白血清组相比,不同浓度含药血清作用 H460 细胞 24 h 后, S 期细胞百分率增高 ($P < 0.01$), 且存在一定浓度-效应关系, 10% 含药血清 S 期比例高达 61.1%, 和阳性对照顺铂 (DDP) 59.4% 相当; 48 h 后含药血清处理组细胞主要集中在 G_0 - G_1 期, 而 DDP 继续集中在 S 期。见表 2。

表 1 加味生脉饮含药血清对 H460 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Effect of serum containing Jiawei Shengmai Yin on proliferation of non small cell lung cancer cell H460 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	血清体积分数 /%	24 h		48 h	
		细胞增殖/A	抑制率/%	细胞增殖/A	抑制率/%
空白血清	10	0.617 \pm 0.021	-	0.986 \pm 0.016	-
加味生脉饮含药血清	2.5	0.549 \pm 0.013 ²⁾	11.02	0.969 \pm 0.018	1.72
	5	0.532 \pm 0.025 ²⁾	13.78	0.986 \pm 0.013	-
	10	0.539 \pm 0.013 ²⁾	12.64	0.986 \pm 0.027	-
DDP ³⁾	1	0.540 \pm 0.000 ²⁾	12.48	0.342 \pm 0.006 ²⁾	65.31

注:与空白血清组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; ³⁾ DDP 单位为“ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ”(表 2~4 同)。

表 2 加味生脉饮含药血清对非小细胞肺癌 H460 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of Serum Containing Jiawei Shengmai Yin on cell cycle of non small cell lung cancer cell H460 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	血清体积分数 /%	24 h 细胞周期/%			48 h 细胞周期/%		
		G_0 - G_1	S	G_2 -M	G_0 - G_1	S	G_2 -M
空白血清	10	50.5 \pm 1.7	42.2 \pm 4.7	5.9 \pm 0.8	63.9 \pm 1.7	15.0 \pm 2.0	21.1 \pm 0.3
加味生脉饮含药血清	2.5	48.6 \pm 1.2	46.7 \pm 0.8	4.7 \pm 0.5	71.2 \pm 0.7 ²⁾	16.7 \pm 1.2	12.1 \pm 1.2 ²⁾
	5	47.4 \pm 1.7	50.9 \pm 1.6 ²⁾	1.7 \pm 0.2 ¹⁾	74.4 \pm 1.0 ²⁾	15.2 \pm 0.5	10.3 \pm 0.8 ²⁾
	10	28.3 \pm 5.6 ¹⁾	61.1 \pm 2.3 ²⁾	7.4 \pm 0.6 ¹⁾	78.3 \pm 0.5 ²⁾	11.8 \pm 1.1	9.9 \pm 1.0 ²⁾
DDP ³⁾	1	31.7 \pm 5.0 ¹⁾	59.4 \pm 1.7 ²⁾	6.5 \pm 2.6	14.0 \pm 1.5 ²⁾	61.6 \pm 2.5 ²⁾	24.3 \pm 2.8 ²⁾

3.3 对 H460 细胞迁移的影响 不同浓度含药血清处理 H460 细胞 24 h 后,含药血清各组划痕距离的改变均较空白血清组降低 ($P < 0.05$),说

明含药血清抑制了细胞的迁移,且含药血清浓度越高,抑制 H460 细胞迁移的作用越明显。见表 3。

表 3 加味生脉饮含药血清对 H460 细胞划痕距离的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Effect of Serum Containing Jiawei Shengmai Yin on drawing distance of non small cell lung cancer cell H460 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	血清体积分数 /%	划痕距离/cm		
		0 h	24 h	48 h
空白血清	10	7.46 ± 0.23	6.20 ± 0.21	5.72 ± 0.22
加味生脉饮含药血清	2.5	7.72 ± 0.22	6.54 ± 0.15 ¹⁾	5.88 ± 0.18
	5	7.70 ± 0.47	6.82 ± 0.20 ²⁾	6.46 ± 0.23 ²⁾
	10	7.50 ± 0.19	7.16 ± 0.17 ²⁾	6.58 ± 0.22 ²⁾

3.4 对 H460 细胞 E-cad 及 Vimentin 蛋白表达的影响 随着含药血清浓度的升高,E-cad 蛋白含量升高,Vimentin 蛋白含量降低,与空白血清对照组比较均有显著性差异 ($P < 0.01$),且呈现浓度相关性,10% 含药血清 E-cad 含量最高,Vimentin 含量最低。见表 4。

子。生脉饮用于临床肺癌的治疗疗效显著^[5-6],露蜂房、地龙攻毒消肿散结、祛风通络,现代药理研究认为有抗肿瘤作用^[7-9]。实验结果发现含药血清作用 H460 细胞 24 h 后,和空白血清组相比,含药血清组细胞抑制率显著增高 ($P < 0.05$),同时细胞周期结果显示 S 期细胞比例明显升高,且有浓度相关性;48 h 后含药血清无抑制增殖作用,同时细胞集中于 G₀-G₁ 期,S 期细胞比例回落。可以得出加味生脉饮对 H460 细胞在 24 h 的时间内通过 S 期阻滞来抑制肿瘤细胞的增殖,48 h 后丧失抑制作用。故后续实验选用 24 h 作为最佳药物作用时间。

表 4 加味生脉饮含药血清对 H460 细胞 E-cad 及 Vimentin 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of serum containing Jiawei Shengmai Yin on E-cad and Vimentin protein express of non small cell lung cancer cell H460 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	血清体积分数/%	蛋白表达	
		E-cad / β -actin	Vimentin / β -actin
空白血清	10	0.557 ± 0.017	2.167 ± 0.025
加味生脉饮含药血清	2.5	0.968 ± 0.017 ²⁾	1.980 ± 0.031 ²⁾
	5	1.173 ± 0.034 ²⁾	1.992 ± 0.012 ²⁾
	10	1.120 ± 0.012 ²⁾	1.322 ± 0.029 ²⁾

划痕实验发现,含药血清浓度越高,细胞迁移距离越短,由于划痕实验可以初步反映药物对肿瘤细胞迁移的抑制作用,故说明加味生脉饮含药血清对 H460 细胞有一定的抑制迁移作用。肿瘤细胞迁移能力的大小是转移的基础,实验进一步探讨含药血清是否有抑制 H460 细胞转移的作用,通过检测上皮细胞标志物 E-cad 和间质细胞标志物 Vimentin 蛋白表达的变化反映上皮间质转化(EMT)是否发生,进而反映含药血清抗转移的能力。

4 讨论

Western blot 实验结果发现随着含药血清浓度的升高,E-cad 表达升高,Vimentin 表达降低,且呈浓度相关性,和空白血清组相比,差异性显著 ($P < 0.01$)。EMT 是恶性肿瘤浸润、转移的重要机制,是指具有极性的上皮细胞转换成具有活动能力、能够在细胞基质间自由移动的间质细胞的过程,它以上皮细胞极性的丧失及间质特性的获得为重要特征^[10],这种表型的转换使得细胞间黏附降低,细胞更容易获得迁移能力。本实验中,E-cad 表达升高,其主要介导的细胞间黏附连接增强^[11],保持细胞的上皮细胞特性;同时间质型标志物 Vimentin 表达的下降,降低了细胞的活动能力^[12],细胞难以转移,共

恶性肿瘤最基本的生物学特性是细胞的正常生长失去控制,表现为无限增殖,转移是恶性肿瘤发生和演变中最危险的阶段,是恶性肿瘤患者死亡的首要原因。本实验即探讨加味生脉饮含药血清对 H460 细胞增殖周期及迁移转移的影响。选用 MTT 法检测细胞抑制率、流式细胞术检测细胞周期,以观察加味生脉饮含药血清对增殖周期的影响;选用划痕实验观察细胞迁移距离,Western blot 检测 E-cad 及 Vimentin 蛋白含量的表达,以观察含药血清对迁移转移的影响。

加味生脉饮由生脉饮合露蜂房、地龙组成。生脉饮为益气养阴经典方,其组成为人参、麦冬、五味

同说明加味生脉饮可以抑制 H460 细胞 EMT 的发生,进而抑制肿瘤的转移。

本实验是加味生脉饮对非小细胞肺癌 H460 细胞增殖周期、迁移转移影响的初步探讨,发现加味生脉饮对 H460 细胞有抑制增殖、阻滞生长周期、抑制迁移及转移的作用,其主要通过 S 期阻滞及抑制 EMT 的发生来防治肿瘤。但增殖周期及转移的具体机制尚不明确,下一步可从体内、体外两方面实验完善基础研究,如黏附实验,Transwell 实验,RT-pCR 技术等,探讨加味生脉饮对 H460 细胞的具体作用机制;同时可以扩大肺癌细胞的范围,探讨加味生脉饮对 A549,SPC-A-1,H446 等肺癌细胞的影响。

[参考文献]

[1] 杨学宁,廖日强,吴一龙,等. NCCN 非小细胞肺癌临床指引 2004/2005 版更新[J]. 循证医学, 2004, 4(4):252-256.
[2] 刘嘉湘. 辨证治疗原发性肺癌 310 例疗效分析[J]. 上海中医药杂志, 1985(10):3-6.
[3] 王笑民,郁仁存,王禹堂,等. 晚期非小细胞肺癌患者气虚血瘀证的研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1994, 14(12):724-726.

[4] 李仪奎. 中药血清药理学实验方法的若干问题[J]. 中药新药与临床药理, 1999, 10(2):31-34.
[5] 陆焯,王晨洁,余蓉. 生脉饮加味联合化疗治疗晚期非小细胞肺癌临床研究[J]. 中医学报, 2014, 29(10):1400-1402.
[6] 李艳秋,冯艳,王育强,等. 生脉注射液对中晚期肺癌化疗患者免疫功能调节作用研究[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(2):268-269.
[7] 张坤. 蜂房提取物的体外抗肿瘤作用研究[D]. 沈阳:中国医科大学, 2010.
[8] 刘文雅,王曙东. 地龙药理作用研究进展[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(2):282-285.
[9] 毛承飞,崔永安,左小东. 地龙抗肿瘤研究进展[J]. 中医药学报, 2006, 34(5):50-52.
[10] 惠起源,魏晓萍. 上皮间质转化在肿瘤发生发展中的作用[J]. 中国肿瘤, 2013, 22(3):219-222.
[11] Nagar B, Overduin M, Ikura M, et al. Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization[J]. Nature, 1996, 380(6572):360-364.
[12] Nieminen M, Henttinen T, Merinen M, et al. Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration[J]. Nat Cell Biol, 2006, 8(2):156-162.

[责任编辑 聂淑琴]