

## 二冬膏抗 NF- $\kappa$ B 抑制介导的人肺癌细胞效应探讨

江闰德\*, 宋春丽, 邓飞

(南方医科大学深圳医院, 广东深圳 518101)

**[摘要]** **目的:**探讨二冬膏的抗肿瘤效应,并研究核转录因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)在二冬膏抗肿瘤效应中的作用。**方法:**用四甲基偶氮唑盐比色法(MTT法)检测二冬膏对 A549 细胞的增殖抑制效应(量效和时效关系);逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法检测二冬膏对 A549 细胞 p65 mRNA 表达的影响;采用免疫印迹法(Western blot)检测二冬膏对 A549 细胞 p65 蛋白表达的影响。**结果:**不同剂量组二冬膏含药血清均具有对肺腺癌 A549 细胞的明显增殖抑制作用( $P < 0.05$ ),且各自表现出一定时间和剂量相关性,给药干预 24 h 后细胞增殖均出现抑制,其中以二冬膏中剂量组( $3.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , bid)干预 48 h 后对细胞增殖的抑制作用最明显。二冬膏中剂量组( $3.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , bid)干预 A549 细胞 24 h 后明显抑制 p65 mRNA 的表达;中剂量组( $3.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , bid)干预 A549 细胞后 48 h 对 p65 蛋白有显著抑制效应。**结论:**二冬膏可显著抑制人肺腺癌细胞系 A549 的增殖,通过对 NF- $\kappa$ B 的抑制介导其抗肿瘤活性。

**[关键词]** 二冬膏;人肺腺癌 A549 细胞;核转录因子  $\kappa$ B

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)08-0133-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016080133

### Inhibition Effect of Erdong Gao Mediated by Nuclear Factor- $\kappa$ B Against Human Lung Cancer Cells

JIANG Run-de\*, SONG Chun-li, DENG Fei

(Shenzhen Hospital of Southern Medical University, Shenzhen 518101, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the anti-tumor effect of Erdong Gao and study the effect of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) in Erdong Gao. **Method:** The dose-and time-related inhibitory effect of Erdong Gao in proliferation of A549 cells was determined by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. Effect of Erdong Gao on the p65 mRNA expression and protein expression in A549 cells were detected by reverse transcription-PCR (RT-PCR) and Western blot respectively. **Result:** The MTT test indicated that the proliferation of A549 cells can be significantly inhibited by the drug serum of different concentrations of Erdong Gao ( $P < 0.05$ ), showing certain dose-dependence and time-dependence respectively. The cell proliferation was inhibited after 24 hours of drug intervention. The most obvious inhibitory effect was detected in Erdong Gao middle-dose group ( $3.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , bid) after intervention for 48 hours. The p65 mRNA expression and p65 protein expression in A549 cells were obviously inhibited in Erdong Gao middle-dose group after intervention for 24 hours and 48 hours respectively. **Conclusion:** Erdong Gao can significantly inhibit the proliferation of A549 cells in human lung adenocarcinoma cells, and its anti-tumor effect might be mediated by inhibiting NF- $\kappa$ B.

**[Key words]** Erdong Gao; human lung adenocarcinoma A549 cells; nuclear factor- $\kappa$ B

肺癌是一种临床发病率较高的恶性肿瘤,近年来肺癌在临床上的致死率不断提高,跃居恶性肿瘤

**[收稿日期]** 20150817(011)

**[基金项目]** 江西省教育厅项目(GJJ14604)

**[通讯作者]** \*江闰德,博士,副教授,从事肿瘤综合治疗研究,Tel:0755-23360487, E-mail:xunbo08@126.com

致死率的首位。现阶段,肺癌的有效治疗方案仍为在早期发病阶段进行切除手术,但此种治疗方案 5 年存活率不超过 30%。引起术后死亡的主要原因通常是由于残留癌细胞的转移进而导致癌症再次发作<sup>[1]</sup>。针对肺癌细胞的转移机制进行相关研究对于肺癌手术后治疗至关重要。近年来中医药界针对癌症细胞的转移抑制,结合不同层次与靶点开展了非常多的研究,并取得了很大的进步<sup>[2-4]</sup>。传统中医药学“阴虚癌瘤相关”及“扶正祛邪”理论为肺癌研究提供了一些新的思路和方向。本课题组从“阴虚癌瘤相关”假说做了大量的滋阴药对肿瘤发生发展作用的研究<sup>[5-10]</sup>,并从体内的角度证实滋阴法治疗药物六味地黄丸、二冬汤等具有癌细胞增殖抑制的作用,进而为“阴虚癌瘤相关”假说提供一定的科研依据。基于此,本课题组主要针对二冬膏对人肺腺癌细胞株 A549 细胞,重点研究其对于癌细胞增殖的抑制作用,同时对癌细胞核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)进行探讨。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 人肺腺癌细胞系(A549 细胞)购于北京协和医学院基础医学细胞中心细胞库,由江西中医药大学重点实验室传代培养。

**1.2 实验动物** SPF 级雄性 Wistar 大鼠,体重(200 ± 20) g,江西中医药大学实验动物科技中心提供,合格证号 SCXK(赣)2005-0001。

**1.3 药物与试剂** 天冬和麦冬颗粒(广东一方制药有限公司,批号分别为 120826,120639),噻唑蓝(MTT)(美国 Sigma 公司,批号 0793),Trizol Reagent(美国 Life Technologies 公司,批号 15596-026),逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒(天根生化科技有限公司,批号 K1622),p65 和 GAPDH 抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号分别为 F02033,xy2188R),抗小鼠 IgG(武汉博士德公司,批号 SB-0071)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 条件下采用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养传代 A549 癌细胞,待其增殖至对数生长期取用。

**2.2 样品制备** 二冬膏水溶液配制:取天冬颗粒,麦冬颗粒各 5 g 溶于 100 mL 蒸馏水中,制成 50 g·L<sup>-1</sup>的二冬膏水溶液。二冬膏成人口服正常用量为 15 g *bid*,大鼠等效剂量为 1.6 g·kg<sup>-1</sup> *bid*。32 只 Wistar 大鼠随机分成 5 组:空白(生理盐水)组,二冬膏含药血清低、中、高剂量(1.6,3.2,6.4 g·kg<sup>-1</sup>)组,环磷酰胺(1.6 g·kg<sup>-1</sup>)组,各 8 只。

**2.3 含药血清制备** 大鼠进行适应性喂养 24 h 后,以 10 mL·kg<sup>-1</sup> *ig* 给药,连续 3 d,*bid*。第 4 天给药 1 次,1 h 后进行腹主动脉取血。每只大鼠采血量 4~6 mL,离心所得血清量约为 2~3 mL。

**2.4 MTT 检测细胞活力** 取对数生长期 A549 癌细胞(1.5 × 10<sup>4</sup> 个/mL)接种入 96 孔板,200 μL/孔;标准培养条件下培养至细胞单层贴壁。吸取细胞培养液,生理盐水冲洗 3 次,每孔分别加入无血清 RPMI 1640 培养基 180 μL。设空白组,二冬膏低、中、高剂量组,环磷酰胺组,每组设 8 个复孔。标准培养状态下培养 1,2,3 d 后加入 MTT 溶液 20 μL,继续培养 4 h。吸取细胞培养液,每孔滴加二甲基亚砷 150 μL,低速震荡至结晶溶剂后,使用紫外-可见分光光度计在 490 nm 处测量吸光度 A,进而确定不同组样品对癌细胞的抑制程度。

**2.5 RT-PCR 检测 NF- $\kappa$ B 亚基 p65 mRNA** 收集最佳作用二冬膏组,环磷酰胺组 A549 细胞,应用 Trizol 试剂盒提取总 RNA。采用 TIANScript cDNA 第一链合成试剂盒逆转录成 cDNA,采用 TIANScript M-MLV 试剂盒检测 p65 mRNA。p65(204 bp)引物:5'-GGGAAGGAACGCTGTCAGAG-3', 5'-TAGCCTCAGGGTACTCCATCA-3';肌动蛋白( $\beta$ -actin,275 bp)引物:5'-GCATGGAGTCCTGTGGCAT-3', 5'-CTAGAAGCATTTCGGGTGG-3'。反应体系 25 μL,扩增条件:94 °C 下预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 45 s,25 个循环,72 °C 终延伸 10 min。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,电泳条带通过凝胶成像系统照相并进行分析,计算各组相对表达量。

**2.6 Western blot 检测 NF- $\kappa$ B 亚基 p65 蛋白表达** 收集最佳作用二冬膏组,环磷酰胺组 A549 细胞,加入细胞裂解液 100 μL 裂解细胞,冰上超声 30 s,4 °C,12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min,6 × SDS buffer 煮沸 5 min。蛋白样品 120 V 恒压电泳,转膜。5% BSA 封闭 1 h,加入鼠抗人 NF- $\kappa$ B-p65,GAPDH 一抗(1:1 000,1:4 000),4 °C 封闭过夜。洗膜,二抗孵育(1:1 000)2 h,洗膜,DAB 辣根过氧化物酶显色试剂盒显色,曝光,用凝胶成像系统分析,计算各组蛋白相对表达量。

**2.7 统计学分析** 采用 SPSS 17.0 统计软件进行处理,计量资料使用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 二冬膏对 A549 细胞增殖抑制作用** 二冬膏

含药血清对 A549 细胞 24, 48, 72 h 增殖能力的抑制作用均优于空白组 ( $P < 0.05$ ), 二冬膏中剂量组

( $3.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 干预 48 h 后的抑制作用最强, 但较环磷酰胺组 48 h 时弱。见表 1。

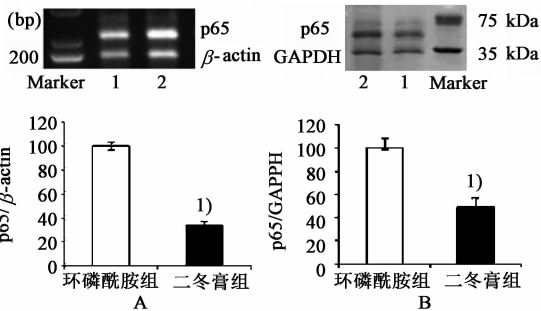
表 1 不同剂量二冬膏含药血清对 A549 细胞增殖抑制率作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	浓度/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	24 h	48 h	72 h
空白	-	-	-	-
二冬膏	1.6	$0.696 \pm 0.017^{1)}$	$0.209 \pm 0.021^{1)}$	$0.171 \pm 0.013^{1)}$
	3.2	$0.168 \pm 0.014^{1, 2)}$	$0.235 \pm 0.015^{1)}$	$0.181 \pm 0.024^{1)}$
	6.4	$0.119 \pm 0.025^{1, 2, 3)}$	$0.197 \pm 0.004^{1)}$	$0.203 \pm 0.015^{1)}$
环磷酰胺	1.6	$0.170 \pm 0.012^{1, 2, 4)}$	$0.456 \pm 0.039^{1, 2, 3, 4)}$	$0.179 \pm 0.027^{1)}$

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与低剂量组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ; 与中剂量组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ; 与高剂量组比较<sup>4)</sup>  $P < 0.05$ 。

**3.2 二冬膏对 A549 细胞 NF- $\kappa$ B 亚基 p65 mRNA 和蛋白表达的影响** 二冬膏中剂量 ( $3.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 作用 A549 细胞 24 h 后 p65 mRNA 明显低于环磷酰胺组 ( $P < 0.05$ ); 二冬膏中剂量 ( $3.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 作用 A549 细胞 48 h 后 p65 蛋白表达明显低于环磷酰胺组 ( $P < 0.05$ )。见图 1。

的二冬汤血清对肺癌细胞 A549 的抑制效应, 测得中剂量组给药 5, 10 d, 末次给药 2 h 的含药血清与细胞培养 48 h 后的抑制作用最明显, 郭慧君等<sup>[15]</sup> 通过注射乌拉坦制作小鼠肺肿瘤模型后, 用二冬膏 *ig*, 给药 100 d 后观察二冬膏对小鼠肺肿瘤发生发展的影响; 结果显示, 与环磷酰胺组比较, 二冬膏给药组小鼠肺肿瘤诱发率明显降低; 脾指数, 巨噬细胞活性明显增高, 小鼠血清中肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 含量明显降低。说明二冬膏能通过提高小鼠的抗肿瘤免疫功能和减少炎症因子产生, 延缓乌拉坦诱发肺肿瘤的发生发展。本研究采用不同剂量的二冬膏作用于 A549 细胞, 表明二冬膏含药血清能够明显抑制肺腺癌 A549 细胞增殖, 其抑制效果在 48 h 时达到最大值, 但相比于环磷酰胺, 二冬膏对肺腺癌 A549 细胞增殖抑制作用明显较差, 足以说明其并不具有实际的抑制肿瘤临床使用价值。抑制效果在 72 h 后, 癌细胞增殖抑制效果明显降低, 可能同血药成分中药效成分含量有关。二冬膏能通过提高小鼠的抗肿瘤免疫功能和减少炎症因子产生来延缓乌拉坦诱发肺肿瘤的发生发展<sup>[16]</sup>。



A. p65 mRNA; B. p65 蛋白; 1. 环磷酰胺组; 2. 二冬膏  $3.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组; 与环磷酰胺组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$

图 1 二冬膏对 A549 细胞 p65 mRNA 和蛋白表达的影响  
Fig. 1 Effect of Erdong Gao on the p65 mRNA and protein expression in A549 cells

#### 4 讨论

二冬膏最早出自于明朝的洪基《摄生秘剖》<sup>[11]</sup>, 并由清朝的张璐收入《张氏医通》<sup>[12]</sup>。药典方二冬膏由天冬、麦冬两种药材组成, 经水煎和浓缩后与炼蜜混匀, 最终成棕黄色稠厚的半流体煎膏剂, 其功能可以养阴润肺, 治疗燥咳痰少, 痰中带血, 鼻干咽痛有效。经研究二冬膏具有抗炎和增强免疫的作用<sup>[13]</sup>。

最近一些研究显示, 二冬膏可促进肿瘤细胞凋亡, 提高小鼠的抗肿瘤免疫功能并减少炎症因子的产生, 从而达到延缓乌拉坦诱发肺肿瘤的发生发展等抗肿瘤效应。赵益等<sup>[14]</sup> 采用 MTT 法, 观察不同给药天数, 不同剂量, 不同采血时间, 不同培养时间

在对肺癌和炎症的研究中发现, 炎症的微环境下具有非常多的信号传导通路, 这些通路中对肺癌发展影响较大的为 NF- $\kappa$ B 和信号转导子和转录激活子 (STAT3) 通路。NF- $\kappa$ B 因子最早由 Sen 和 Baltimore 在 1986 年提出<sup>[17]</sup>, 由于其能同免疫球蛋白的  $\kappa$  链基因相结合, 所以被称之为细胞核因子或  $\kappa$  基因结合核因子。癌细胞转移的过程, 炎症微环境多种因子可以使 NF- $\kappa$ B 活化, 进而通过活化转录因子诱导上皮间质转化 (EMT) 促进癌症细胞的转移。Tang 等<sup>[18]</sup> 通过对 394 例肺癌患者的免疫组化性质进行研究, 结果显示 NF- $\kappa$ B 亚基 p65 在癌细胞转移的过程中的表达明显高于环磷酰胺组, 且具有

显著的增加趋势。同时肺癌中晚期患者体内 NF- $\kappa$ B p65 的表达程度较之早期具有显著加强。除此之外,非小细胞肺癌患者体内的 NF- $\kappa$ B p65 的表达,可能由于肺癌细胞分化的影响也明显加强。Kleemann 等<sup>[19]</sup>发现肝癌和肺癌细胞在药物刺激后,会通过激活 NF- $\kappa$ B 的抑制因子进而降低其活性,以此起到抑制癌症发展的作用。另有学者提出 NF- $\kappa$ B 的活性提高,同肿瘤的整体发展与治疗过程有着极为紧密的联系<sup>[20-21]</sup>。本研究采用 RT-PCR, Western blot 检测二冬膏对 A549 p65 mRNA 和蛋白表达影响,发现二冬膏可以抑制 A549 细胞的 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 和蛋白表达,推测二冬膏抗肿瘤活性与其对 NF- $\kappa$ B 的抑制有关。

综上所述,二冬膏在对人肺癌 A549 细胞的增殖过程表现出明显的抑制作用,同时还可显著降低癌细胞内 p65 mRNA 蛋白表达。本研究对二冬膏的抗肿瘤活性及相关机制进行阐述,为其抗肿瘤临床应用提供科学依据。下一步将结合癌细胞 NF- $\kappa$ B 相关信号通路的分子机制展开更深入的研究。

[参考文献]

[ 1 ] Brekken R A, Thorpe P E. Vascular endothelial growth factor and vascular targeting of solid Tumors [ J ]. *Anticancer Res*, 2001, 21( 6B ): 4221-4229.

[ 2 ] 包素珍, 郑小伟, 宋红, 等. 黄芪建中汤对脾气虚证肺癌转移小鼠 TIMP-1 基因转录的影响 [ J ]. *中华中医药学刊*, 2012, 30( 4 ): 686-688.

[ 3 ] 赵连梅, 孙佳伟, 颜晰, 等. 中药升陷汤抑制肺癌 A549 细胞增殖和侵袭转移作用研究 [ J ]. *中华中医药杂志*, 2011, 26( 9 ): 2147-2150.

[ 4 ] 胡春萍, 蔡雪婷, 胡婷婷, 等. 木犀草素诱导非小细胞肺癌细胞株 A549 凋亡和 G2 周期阻滞 [ J ]. *中国中药杂志*, 2012, 37( 9 ): 1259-1264.

[ 5 ] 郑里翔, 刘红宁, 乔玉丹, 等. 六味地黄丸对自发乳腺癌小鼠瘤块中血管内皮生长因子和周期蛋白 D3 基因表达的影响 [ J ]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16( 11 ): 117-119.

[ 6 ] 郑里翔, 王萍, 邓佳卉, 等. 阴虚, 阳虚体质血清对肺癌细胞 NF- $\kappa$ B, p16 基因表达的影响 [ J ]. *中华中医药杂志*, 2013, 28( 9 ): 2563-2566.

[ 7 ] 郑里翔, 刘红宁, 舒洋, 等. 不同体质血清对 A549 肺癌细胞周期蛋白表达的影响 [ J ]. *中华中医药杂志*,

2012, 27( 2 ): 324-327.

[ 8 ] 郑里翔, 林栋美, 刘红宁, 等. 滋阴经方经 TGF- $\beta$  途径抑制小鼠自发乳腺癌生长的机理 [ J ]. *中成药*, 2011, 33( 10 ): 1793-1795.

[ 9 ] 郑里翔, 张玉仁, 邓科穗, 等. 二至汤对阴虚阳虚荷瘤小鼠肿瘤生长的影响 [ J ]. *陕西中医*, 2008, 29( 12 ): 1678-1680.

[ 10 ] 张玉仁, 郑里翔, 朱卫丰, 等. 二至丸对阴虚荷瘤小鼠抑瘤作用的研究 [ J ]. *江西中医学院学报*, 2007, 19( 6 ): 58-59.

[ 11 ] 卫生部中医研究院中药研究所. 中药成药制剂手册 [ M ]. 北京: 人民卫生出版社, 1965: 432.

[ 12 ] 陈馥馨. 新编中成药手册 [ M ]. 北京: 中国中医药科技出版社, 1991: 3.

[ 13 ] 高建平, 许旭, 吴耀平, 等. 二冬膏祛痰、抗炎及免疫作用的研究 [ J ]. *中成药*, 2003, 25( 9 ): 762-763.

[ 14 ] 赵益, 罗蓉, 尚广彬, 等. 二冬汤含药血清对肺癌细胞 A549 的作用研究 [ J ]. *新中医*, 2012, 44( 9 ): 113-115.

[ 15 ] 郭慧君, 朱金华, 刘春花, 等. 不同滋阴中药对小鼠诱发性肺肿瘤发生及抗肿瘤免疫功能的影响 [ J ]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18( 13 ): 226-229.

[ 16 ] 孙昊鑫, 朱金华, 郭慧君, 等. 二冬膏对小鼠诱发性肺肿瘤发生 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, Foxp3 的影响 [ J ]. *中药药理与临床*, 2013, 29( 6 ): 1-3.

[ 17 ] Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF- $\kappa$ B by a posttranslational mechanism [ J ]. *Cell*, 1986, 47( 6 ): 921-928.

[ 18 ] Tang X, Liu D, Shishodia S, et al. Nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) is frequently expressed in lung cancer and preneoplastic lesions [ J ]. *Cancer*, 2006, 107( 11 ): 2637-2646.

[ 19 ] Kleemann R, Verschuren L, de Rooij B J, et al. Evidence for anti-inflammatory activity of statins and PPAR alpha activators in human C-reactive protein transgenic mice *in vivo* and in cultured human hepatocytes *in vitro* [ J ]. *Blood*, 2004, 103( 11 ): 4188-4194.

[ 20 ] Sethi G, Sung B, Aggarwal B B. Nuclear factor-kappa B activation: from bench to bedside [ J ]. *Exp Biol Med ( Maywood )*, 2008, 233( 1 ): 21-23.

[ 21 ] Hayden M S, Ghosh S. Shared principles in NF-kappa B signaling [ J ]. *Cell*, 2008, 132( 3 ): 344-362.

[责任编辑 张丰丰]