

· 药理 ·

# 扶正抗癌方通过 PTEN/PI3K/Bad 通路调控肺癌 A549 细胞增殖与凋亡

黎金华<sup>1</sup>, 吴万垠<sup>2\*</sup>, 杨小兵<sup>2</sup>

(1. 广州中医药大学第二临床医学院, 广州 510006; 2. 广东省中医院, 广州 510370)

**[摘要]** 目的:观察扶正抗癌(FZKA)方对肺癌细胞 A549 增殖的调控作用,探讨其作用的分子机制。方法:以非小细胞肺癌细胞 A549 为研究对象,以 FAKA 方 0.8,1.2,1.6,2.0,2.4,2.8,3.2 g·L<sup>-1</sup> 干预,空白组,分别孵育 24,48,72 h 后,设立采用噻唑蓝(MTT)比色法检测 FZKA 方对 A549 细胞活力的影响;以 FAKA 方 1.2,1.6,2.0 g·L<sup>-1</sup> 干预,设立空白组,培养 24 h 后,采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测 FZKA 方对 A549 细胞人第 10 号染色体同源丢失性磷酸酶-张力蛋白(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten,PTEN)mRNA 水平的影响;孵育 24 h 后,采用蛋白质免疫印迹法(Western blot)分析 FZKA 方对 PTEN,磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase,PI3K),磷酸化的促凋亡蛋白 Bad(Phospho-Bad,p-Bad)表达的影响并探讨其相关性。结果:与空白组比较,FZKA 方能明显抑制 A549 细胞增殖,处理 24 h 后,FZKA 从 0.8 g·L<sup>-1</sup> 开始,处理 48,72 h 后,FZKA 方从 0.4 g·L<sup>-1</sup> 开始,细胞存活率明显降低( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ );与空白组比较,处理 24 h 后,FZKA 方从 0.8 g·L<sup>-1</sup> 开始以浓度依赖性上调 PTEN mRNA 和蛋白的表达( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ ),FZKA 方从 1.6 g·L<sup>-1</sup> 开始以浓度依赖性下调 PI3K 蛋白表达( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ ),从 2 h 开始以时间依赖性上调 p-Bad 蛋白的表达( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ )。结论:FZKA 方可通过上调 PTEN 来调控下游 PI3K/Akt/Bad 通路相关蛋白的表达进而抑制 A549 的增殖,促进肺癌细胞凋亡。

**[关键词]** 扶正抗癌方;细胞增殖;人第 10 号染色体同源丢失性磷酸酶-张力蛋白;磷脂酰肌醇 3-激酶;促凋亡蛋白

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)21-0098-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017210098

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170809.1125.028.html>

**[网络出版时间]** 2017-08-09 11:25

## Effect of FZKA Decoction in Regulating A549 Proliferation and Apoptosis Via PTEN/PI3K/Bad

LI Jin-hua<sup>1</sup>, WU Wan-yin<sup>2\*</sup>, YANG Xiao-bing<sup>2</sup>

(1. Second Clinical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510370, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of Fuzheng Kangai (FZKA) decoction on the proliferation and apoptosis, in order to discuss the molecular mechanism of apoptosis induced by FZKA decoction in A549 cells.

**Method:** Non-small lung cancer cells (A549 cells) were taken as the research objects and treated for 24, 48, 72 h with 0 (blank group), 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8, 3.2 g·L<sup>-1</sup> FAKA decoction. Then, methyl-thiazolyl-

**[收稿日期]** 20170203(001)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81503507,81273965);广东省自然科学基金项目(2015A030310245);广东省建设中医药强省科研课题项目(20141104)

**[第一作者]** 黎金华,博士,从事中医药对分子靶向药物治疗肺癌的增敏研究,Tel:13828482575,E-mail:shellyflyinsky@qq.com

**[通讯作者]** \* 吴万垠,博士,教授,博士生导师,从事中医药对分子靶向药物治疗肺癌的增敏研究,Tel:020-81499399,E-mail:wwanyin@126.com

tetrazolium (MTT) assay was used to detect the effect of FZKA decoction on the cell proliferation and apoptosis. A549 cells were treated for 24 h with 0 (blank group), 1.2, 1.6, 2.0  $g \cdot L^{-1}$ . Then, quantitative Real-time PCR was used to detect the effect of FZKA decoction on PTEN mRNA expression. A549 cells were treated for 24 h with 0 (blank group), 0.8, 1.2, 1.6, 2.0  $g \cdot L^{-1}$ . Then, Western blot assay was used to detect the expressions of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN), phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) and phospho-Bad (p-Bad), and discuss the relationship between them. **Result:** Compared with blank group, the proliferation of A549 cells were inhibited by FZKA decoction in concentration-dependent and time-dependent manners ( $P < 0.01$ ). Compared with blank group, mRNA and protein expressions of PTEN were up-regulated in a concentration-dependent manner ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Compared with blank group, the protein expression of PI3K was down-regulated in a concentration-dependent manner ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and p-Bad was down-regulated in a time-dependent manner ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Apoptosis is induced by FZKA decoction by up-regulating PTEN and regulating PI3K/Akt/Bad pass way in A549 cells.

**[Key words]** FZKA decoction; proliferation; phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten; phosphatidylinositol-3-kinase; pro-apoptotic protein

2017 美国癌症报告显示,肺癌仍然是死亡率(男性和女性分别为 27% 和 25%)最高的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>,在我国也面临着同样的情况,甚至更严重<sup>[2]</sup>。研究显示,人第 10 号染色体同源丢失磷酸酶-张力蛋白基因(phosphatase and tensin homology deleted on chromosome 10, PTEN),是一种抑癌基因,位于人染色体 10q23.3,在细胞的增殖方面起着重要的负调控作用,但在肺癌等多种恶性肿瘤中表达比正常组织低<sup>[3]</sup>。磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB, Akt)信号通路的持续活化,在肺癌细胞的增殖和凋亡中起至关重要的作用,PI3K/Akt 通路受到 PTEN 的负调节<sup>[3-4]</sup>。因此,通过上调 PTEN 的表达以抑制 PI3K/Akt 的活化成为了调控肺癌细胞增殖、凋亡的又一选择途径。扶正抗癌(FZKA)方为广东省中医院肿瘤科吴万垠教授总结 10 余年的经验方。前期研究已表明,临床上, FZKA 方能显著延长了患者生存时间,同时提高了患者生存质量;基础研究上, FZKA 方可通过扶正抗癌方激活半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3)/B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2)家族相关 X 蛋白(Bax),信号转导子及转录激活子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)/波形蛋白(Vimentin)/神经钙黏素(N-cadherin)/基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9),磷酸腺苷活化蛋白激酶 $\alpha$ (adenosine monophosphate activated protein kinase  $\alpha$ , AMPK $\alpha$ )/结合蛋白(IGFBP1)/叉头蛋白 O3a(FOXO3a), PI3K/Akt/黏蛋白 1(Mucin1)等通路有效抑制肺癌细胞增殖、并诱导凋亡,并能对相关非小细胞肺癌裸鼠移植瘤具

有抑制作用<sup>[5-13]</sup>。FZKA 方从抑癌基因 PTEN 作为切入点进行调控肺癌细胞增殖的研究未见相关文献报道。因此,本研究通过观察 FZKA 方对人肺腺癌细胞 A549 相关蛋白的影响,上调抑癌基因 PTEN 表达的角度探讨 FZKA 方与肺癌细胞增殖的关系。

## 1 材料

**1.1 药物** FZKA 方组方:黄芪 30 g,太子参 15 g,白术 15 g,甘草 10 g,炒薏苡仁 30 g,山慈菇 30 g,白花蛇舌草 30 g,龙葵 30 g,石见穿 30 g,八月札 30 g,蛇泡筋 30 g,莪术 15 g,购自广东省中医院中药房,中药饮片经广东省中医药科学院冯怡副教授鉴定为正品。生药量总量为 295 g,取全量处方药材,12 倍量水浸泡 30 min。加热至沸煎煮 2 h 后,分离煎液,药渣继续加水煎煮 2 次,每次加 8 倍量水煎煮 1 h,合并煎液,3 000  $r \cdot \min^{-1}$ 离心 10 min,取上清,煎液回旋冷凝浓缩,收集浓缩液,总浓缩液为 225 mL,故储存液质量浓度为 1 310  $g \cdot L^{-1}$ , -80  $^{\circ}C$  保存。实验中药液配置:取 FZKA 方储存液 1 mL 加入无血清 DMEM 培养基 12.1 mL,稀释成 100  $g \cdot L^{-1}$ ,充分震荡超声直至完全溶解,3 000  $r \cdot \min^{-1}$ 离心 10 min,取上清 0.22  $\mu m$  滤器过滤,4  $^{\circ}C$  保存,使用期限不超过 7 d。

**1.2 试剂与仪器** 噻唑蓝(MTT,上海碧云天生物技术有限公司,批号 102227);DMEM Basic 培养基,胎牛血清,胰酶(Gibco 公司,批号分别为 C11995500CP,1600044,25200072);磷酸盐缓冲液(PBS,HyClone 公司,批号 SH30256.01);prestained protein ladder,BCA 蛋白检测试剂盒(Thermo 公司,批号分别为 26616,23225);PTEN antibody,PI3K p85

antibody, phospho-Bad antibody, Bad antibody, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) rabbit antibody,  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) antibody (CST 公司, 货号分别为 9188, 4257, 4366, 9268, 2118, 4790); 发光液 (Millipore 公司, 批号 WBKLSO500); 逆转录试剂盒, 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 试剂盒 (罗氏公司, 批号分别为 04379012001, 4913850001)。引物序列由生工生物工程 (上海) 股份有限公司设计、合成, PTEN 上游 5'-AGACCATAACCCACCACAGC-3' (20 bp), 下游 5'-ACCAGTTCGTCCCTTTCCA-3' (19 bp); GAPDH 上游 5'-CTATAAATTGAGCCCGCAGCC-3' (21 bp), 下游 5'-ACCAAATCCGTTGACTCCGA-3' (20 bp)。

Countstar 型全自动细胞计数仪 (美国 Inno-Alliance Biotech 公司); LD5-10B 型离心机 (京立离心机有限公司); VITOR X5 型多功能酶标仪 (美国 Perkin Elmer 公司); 5430R 型冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); TS-1000 型脱色摇床 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司); Bio-Rad ChemiDoc XRS + 型化学发光成像仪, Mini-PROTEAN Tetra 型电泳槽, Mini Trans-blot 转印槽, ChemiDoc 成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); Vii7 型荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司)。

## 2 方法

### 2.1 细胞株与细胞培养

人肺腺癌细胞株 A549 购自上海生命科学院细胞库。A549 为贴壁细胞, 培养于含 10% 胎牛血清和  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  链霉素,  $100 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$  青霉素的 DMEM 基础培养基, 培养条件为  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$ 。当细胞融合达到 80% ~ 90% 时, 进行传代或铺板。细胞传代或铺板: 先将培养皿中的旧培养基弃去, 用 PBS 冲洗 2 ~ 3 次, 吸去 PBS 后, 加入 0.25% 胰酶/EDTA 1 mL 润洗 1 遍, 弃去胰酶, 放回培养箱消化约 1 min, 取出加入完全培养基 4 mL 终止消化, 轻轻吹打成单细胞悬液, 1:3 ~ 1:4 传代至新的培养基中继续培养, 或按一定密度进行铺板。细胞冻存: 按上述过程消化细胞后  $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min, 加入稍早配好的冻存液 (70% DMEM basic + 20% 胎牛血清 + 10% DMSO) 1.5 mL, 轻轻吹打混匀成细胞悬液, 转移至冻存管中, 封口膜密封, 标记好名称、日期, 放到程序降温冻存盒内,  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  过夜后置于液氮罐长期保存。

### 2.2 检测指标及方法

#### 2.2.1 MTT 比色法检测 A549 细胞活力

收集处于对数生长期的 A549 细胞, 加入胰酶进行消化制

成单细胞悬液, 计数, 调整细胞密度, 按  $5 \times 10^3$  个/孔接种于 96 孔细胞板中, 培养 24 h 待细胞贴壁后, 吸去培养液, 分别加入 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8, 3.2  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  FZKA 方药液 100  $\mu\text{L}$ , 每个质量浓度 6 个复孔, 继续常规培养 24, 47, 72 h。药物作用时间足够后, 吸去培养液, 避光每孔加入  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  MTT 溶液 100  $\mu\text{L}$ , 放回培养箱继续培养 4 h 后, 吸去 MTT, 每孔加入 DMSO 150  $\mu\text{L}$  溶解, 除了已接种细胞的孔外, 每个药物浓度多加 1 个仅含 DMSO 的空白孔, 将 96 孔板置于多微孔板振荡器震荡 10 min, 然后用酶标仪在 490 nm 波长下检测吸光度  $A$ , 按照以下细胞存活率 =  $(A_{\text{加药组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{溶剂组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$  计算细胞活力, 并绘制 A549 细胞在不同浓度 FZKA 方作用 24, 48, 72 h 后的生长曲线。独立重复实验 3 次。

#### 2.2.2 Real-time PCR 法检测 A549 细胞 PTEN mRNA 表达

对数生长期的 A549 细胞, 按  $2 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁后, 加入 FZKA 方 (0.8, 1.2, 1.6, 2.0  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 药液, 干预 24 h 后弃去培养基, 用预冷 PBS 冲洗细胞 2 次, 每孔加入 trizol 1 mL 提取 total RNA, 使用紫外分光光度法测定 RNA 浓度和纯度, 一般认为, 单峰且  $A_{260}/A_{280}$  在 1.8 ~ 2.0, RNA 纯度符合实验要求。根据罗氏 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书, 取总 RNA 1  $\mu\text{g}$  逆转录合成 cDNA, 以相应的 cDNA 为模板, 加入相应引物, 扩增目的基因片段, 按照罗氏 Fast Start Universal SYBR Green Master 试剂盒说明书,  $2 \times \text{SYBR Green I Master}$  10  $\mu\text{L}$ , PCR Forward/Reverse Primer ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 各 0.5  $\mu\text{L}$ , cDNA 模板 2  $\mu\text{L}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  7  $\mu\text{L}$ , 总反应体系为 20  $\mu\text{L}$ 。按扩增试剂盒参照设置 PCR 启动程序,  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  激活酶活性 10 min;  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  变性 5 s;  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  退火、延伸 30 s, 40 个循环, 以 GAPDH 为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算 mRNA 相对表达量。

#### 2.2.3 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 PTEN, PI3K, Bad 蛋白表达

将对数生长的 A549, PC9 细胞以  $2 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板, 24 h 后弃去培养液, 分别加入用 DMEM 培养基稀释成的不同质量浓度 FZKA 方药液 (0.8, 1.2, 1.6, 2.0  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 干预 24 h 后, 或 FZKA (2.0  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 干预 2, 4, 8, 24 h 后, 收集细胞, 涡旋震荡离心, 取上清, 以 Thermo BCA protein assay Kit 测定总蛋白浓度, 蛋白变性, 离心, 置于  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱保存。每组样品取总蛋白 25  $\mu\text{g}$ , 以 Thermo prestained protein ladder 作为预染 marker,

经 Bio-Rad Fast Cast Acrylamide Kit 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离(恒压 250 V),电转移(湿转 2 h)至 PVDF 膜。含 5% 脱脂奶粉制成的封闭液,封闭 60 min,弃去封闭液,加入相应浓度一抗(1:1 000),室温摇床孵育 30 min 后,4 ℃ 孵育过夜,以 1 × TBST 缓冲液 10 min/次,洗涤 3 次后,加入二抗(1:3 000)孵育 1 h。洗膜后,平放于分子影像化学发光系统成像槽内,滴入 Immobilon Western 化学发光液,使用 Image Lab 显影成像,用 Image J 进行数据分析。

**2.4 统计学方法** 所有实验均至少重复 3 次,采用

SPSS 23.0 进行正态性及方差齐性检验,计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,当满足正态性及方差齐性时,采用单因素方差分析;若不满足正态性或方差齐性时,采用非参数检验。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 FZKA 方对 A549 细胞增殖抑制的影响** 与空白组比较,随着给药浓度和给药时间的增加,细胞存活率逐渐降低,FZKA 药液处理 24 h 后,FZKA 方从  $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  开始,处理 48,72 h 后,FZKA 方从  $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  开始,细胞存活率明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),且随浓度的增大而逐渐降低。见表 1。

表 1 FZKA 方对 A549 细胞活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h	48 h	72 h
空白	-	100	100	100
FZKA	0.4	93.85 ± 2.37	79.66 ± 5.36 <sup>1)</sup>	83.70 ± 5.76 <sup>1)</sup>
	0.8	86.98 ± 0.63 <sup>1,3)</sup>	70.42 ± 2.10 <sup>1,3)</sup>	70.69 ± 6.38 <sup>1,2)</sup>
	1.2	85.13 ± 1.01 <sup>1,3)</sup>	63.44 ± 0.82 <sup>1,3,4)</sup>	60.20 ± 6.56 <sup>1,3,5)</sup>
	1.6	74.79 ± 1.89 <sup>1,3,5,7)</sup>	57.00 ± 4.59 <sup>1,3,5,6)</sup>	29.70 ± 6.35 <sup>1,3,5,7)</sup>
	2.0	50.80 ± 3.82 <sup>1,3,5,7,9)</sup>	50.87 ± 2.32 <sup>1,3,5,7)</sup>	19.75 ± 7.90 <sup>1,3,5,7)</sup>
	2.4	24.85 ± 1.20 <sup>1,3,5,7,9,10)</sup>	47.42 ± 2.03 <sup>1,3,5,7,8)</sup>	15.58 ± 5.73 <sup>1,3,5,7)</sup>
	2.8	15.00 ± 3.24 <sup>1,3,5,7,9,10)</sup>	25.00 ± 5.79 <sup>1,3,5,7,9,10)</sup>	14.54 ± 2.15 <sup>1,3,5,7)</sup>
	3.2	11.59 ± 0.60 <sup>1,3,5,7,9,10)</sup>	11.09 ± 4.70 <sup>1,3,5,7,9,10)</sup>	10.99 ± 2.69 <sup>1,3,5,7,8)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与 FZKA  $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup> $P < 0.01$ ;与 FZKA  $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  组比较<sup>4)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>5)</sup> $P < 0.01$ ;与 FZKA  $1.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  组比较<sup>6)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>7)</sup> $P < 0.01$ ;与 FZKA  $1.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  组比较<sup>8)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>9)</sup> $P < 0.01$ ;与 FZKA  $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  组比较<sup>10)</sup> $P < 0.01$ 。

**3.2 FZKA 方对 A549 细胞中 PTEN mRNA 表达水平的影响** 给予不同质量浓度的 FZKA 药液处理 A549 细胞 24 h 后,与空白组比较,随着给药质量浓度的增加,从  $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  开始,PTEN mRNA 表达逐渐上调 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),呈浓度依赖性。见表 2。

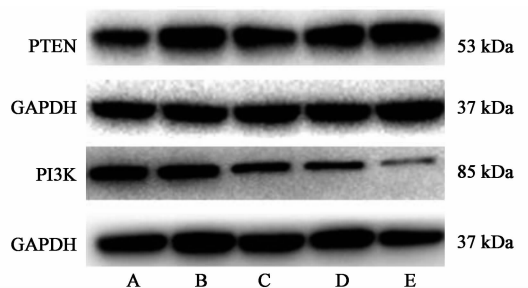
表 2 FZKA 对 PTEN mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	PTEN
空白	0	1.00
FZKA	0.8	1.540 ± 0.122 <sup>1)</sup>
	1.2	1.439 ± 0.171 <sup>1)</sup>
	1.6	1.347 ± 0.083 <sup>1)</sup>
	2.0	1.624 ± 0.012 <sup>2,3,4)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与 FZKA  $1.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ;与 FZKA  $1.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  组比较<sup>4)</sup> $P < 0.01$ 。

**3.3 FZKA 方对 A549 细胞中 PTEN, PI3K 蛋白**

表达水平的影响 给药干预 24 h 后,与空白组比较,FZKA 从  $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  开始,随着 FZKA 质量浓度的增大,PTEN 蛋白表达逐渐升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ );同时,FZKA 从  $1.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  开始,随着 FZKA 质量浓度的增大,PI3K 蛋白表达逐渐降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。表明 FZKA 方以浓度依赖性上调 PTEN 蛋白表达的同时下调 PI3K 蛋白的表达。见图 1,表 3。



A. 空白组;B~E. FZKA ( $0.8, 1.2, 1.6, 2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 组

图 1 A549 细胞 PTEN, PI3K 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of PTEN and PI3K proteins in A549 cell

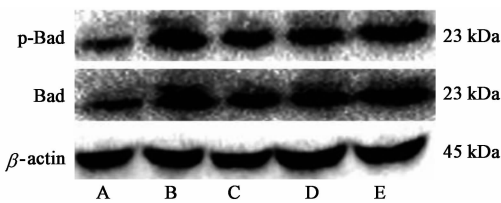
表 3 FZKA 方对 PTEN,PI3K 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Table 3 Effect of FZKA decoction on protein expressions of PTEN and PI3K( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	PTEN/GAPDH	PI3K/GAPDH
空白	-	1.00	1.00
FZKA	0.8	1.54 ± 0.12 <sup>2)</sup>	1.04 ± 0.06
	1.2	1.43 ± 0.17 <sup>1)</sup>	0.80 ± 0.13
	1.6	1.39 ± 0.01 <sup>1,3)</sup>	0.68 ± 0.09 <sup>1,3)</sup>
	2.0	1.62 ± 0.01 <sup>2,4,5,6)</sup>	0.24 ± 0.12 <sup>2,4,6)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与 FZKA 0.8 g·L<sup>-1</sup> 比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup>  $P < 0.01$ ;与 FZKA 1.2 g·L<sup>-1</sup> 组比较<sup>5)</sup>  $P < 0.01$ ;与 FZKA 1.6 g·L<sup>-1</sup> 组比较<sup>6)</sup>  $P < 0.01$ 。

3.4 FZKA 方对 A549 细胞中 Bad 蛋白磷酸化水平的影响 与空白组比较,从给药 2 h 开始,FZKA 方可以呈时间依赖性上调 p-Bad 蛋白的表达( $P < 0.05$ )。见图 2,表 4。



A. 空白组;B~E. FZKA(2.0 g·L<sup>-1</sup>) 给药 2,4,8,24 h 组

图 2 A549 细胞 p-Bad 蛋白表达电泳

Fig.2 Electrophoresis of p-Bad protein in A549 cell

表 4 FZKA 方对 p-Bad 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of FZKA decoction on protein expression of p-Bad ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	时间/h	p-Bad/ $\beta$ -actin	Bad/ $\beta$ -actin
空白	-	1.00	100
FZKA	2	2.33 ± 0.07 <sup>1)</sup>	2.23 ± 0.32 <sup>1)</sup>
	4	1.76 ± 0.20 <sup>1)</sup>	1.83 ± 0.09 <sup>1)</sup>
	8	2.12 ± 0.37 <sup>1)</sup>	1.85 ± 0.45 <sup>1)</sup>
	24	2.31 ± 0.10 <sup>1,2)</sup>	2.16 ± 0.17 <sup>1)</sup>

注:FZKA 质量浓度 2.0 g·L<sup>-1</sup>;与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与 FZKA 4 h 组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ 。

#### 4 讨论

PTEN 是继 p53 后又一种重要的抑癌基因,在细胞的生长发育、凋亡、迁移、信号传递等方面起着重要的调控作用,而且在肿瘤发生发展过程中起到抑制作用,在多种恶性肿瘤中发生突变、表达下调甚至缺失。PI3K/Akt 通路的过度活化在肿瘤细胞的增殖、凋亡、黏附、侵袭、转移扩散等多方面均有重要作用。PI3K 的活化产物是磷脂酰肌醇(3,4,5)-三

磷酸 [ phosphatidylinositol ( 3, 4, 5 )-trisphosphate, PIP3],能介导 Akt 的活化,而活化的 Akt 则能通过磷酸化作用抑制下游促凋亡蛋白 Bad 磷酸化而抗凋亡。PTEN 是 PI3K/Akt 通路上重要的负调控因子,通过使 PIP3 脱磷酸以保持 PIP3 的低水平,从而抑制 PI3K/Akt 通路的活化以达到抑制肿瘤细胞生长,促进肿瘤细胞凋亡的目的<sup>[3,4]</sup>。促凋亡蛋白 Bad 是 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)家族成员之一,其通过与促生存蛋白 Bcl-2 和(或)Bcl-xl 相结合并抑制其促生存的作用,从而促使细胞发生凋亡。持续活化的 Akt 可使 Bad 的 ser136 位点磷酸化使之与 Bcl-2 分离,游离的 Bcl-2 起抗凋亡作用<sup>[14]</sup>。故上调 Bad 蛋白的表达,能促进细胞凋亡。

关于肿瘤的发生机制,中医学强调的是“正虚邪实”,肿瘤发病的基础在于内虚,正虚贯穿于肿瘤发生、发展的始终,患者的体质总体为“瘤部为实,整体为虚”,本虚标实,肺癌亦然<sup>[15]</sup>。吴万垠教授认为,肺癌的病机以肺脾气虚,痰瘀互结为主,证型以气虚痰瘀型为多见<sup>[16]</sup>,在治疗上主张“辨证 + 辨病”相结合,培土生金以扶正,清热化痰散结以抗癌,拟 FZKA 方。方中辨证以四君子汤(太子参、黄芪、白术、炒薏苡仁、甘草)为基础健脾益气、补肺化痰,用黄芪、炒薏苡仁代替茯苓以补气升阳、健脾渗湿,使“气液宣通”,增强顾护中土之气的力量;辨病予白花蛇舌草、龙葵清热解毒,石见穿活血化瘀、清热散结,八月札活血理气,蛇泡筋清热散瘀,莪术破血行气消积,山慈菇清热解毒、消痈散结;四君子汤中甘草尚行调和诸药、缓和全方药性、降低方中其余药物毒性之效。全方从整体观念出发,辨证与辨病相结合。扶正则重视补益脾肺之气,祛邪则以清热解毒、祛瘀散结为主,上药合用共奏扶正抗癌之功。前期研究显示,临床上,FZKA 方联合吉非替尼治疗晚期非小细胞肺癌时,与吉非替尼单药比较,显著延长了患者生存时间,提高了患者生活质量。体内实验发现,FZKA 方联合吉非替尼对相关非小细胞肺癌细胞裸鼠移植瘤有抑制作用。同时体外实验显示,FZKA 方能可通过 AMPK $\alpha$ /IGFBP1/FOXO3a, PI3K/Akt/MUC1 等通路有效抑制肺癌细胞增殖,并诱导凋亡<sup>[5-13]</sup>。本实验表明,在细胞毒性研究上,与空白组比较,FZKA 组 A549 细胞的活力明显下降并呈浓度和时间依赖性,由此可见,FZKA 方可有效抑制肺癌细胞增殖;从抑癌基因 PTEN 的转录、翻译及 PI3K 的翻译,与空白组比较,随着给药浓度的增加,PTEN mRNA 和蛋白表达逐渐上调,PI3K 的蛋白表

达逐渐下调,且呈剂量依赖性,由此证明,FZKA方可通过上调PTEN来抑制PI3K/Akt通路活性;在对促凋亡蛋白Bad磷酸化水平p-Bad的作用上,与空白组比较,随着给药时间延长,p-Bad蛋白表达逐渐上调,可见,FZKA方可以呈时间依赖性上调p-Bad蛋白的表达,从而促进肺癌细胞凋亡。

综上所述,FZKA方可通过上调PTEN来调控下游PI3K/Akt/Bad通路相关蛋白的表达,进而抑制A549的增殖,促进肺癌细胞凋亡。

[参考文献]

[1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2017[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(1):7-30.

[2] 姚晓军, 刘伦旭. 肺癌的流行病学及治疗现状[J]. 现代肿瘤医学, 2014, 22(8):1982-1986.

[3] Marsit C J, ZHENG S C, Aldape K, et al. PTEN expression in non-small-cell lung cancer: evaluating its relation to tumor characteristics, allelic loss, and epigenetic alteration[J]. Hum Pathol, 2005, 36(7):768-776.

[4] LI H, Schmid-Bindert G, WANG D, et al. Blocking the PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways can overcome Gefitinib-resistance in non-small cell lung cancer cell lines[J]. Med Sci, 2011, 56(2):275-284.

[5] 杨昌卫. 扶正抗癌方联合吉非替尼治疗晚期非小细胞肺癌的临床研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2011.

[6] 吴万垠, 杨小兵, 龙顺钦, 等. 扶正抗癌方联合吉非替尼治疗晚期非小细胞肺癌优势人群与非优势人群的比较[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(9):2152-2154.

[7] 杨小兵. 扶正抗癌方对吉非替尼治疗晚期非小细胞肺癌的增效研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.

[8] YANG X B, WU W Y, LONG S Q, et al. Effect of gefitinib plus Chinese herbal medicine(CHM) in patients with advanced non-small-cell lung cancer; a retrospective

case-control study[J]. Complement Ther Med, 2014, 22(6):1010-1018.

[9] 李龙妹, 吴万垠, 王苏美, 等. 扶正抗癌方诱导H1650细胞凋亡的分子机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(14):106-110.

[10] 李龙妹, 吴万垠, 龙顺钦, 等. 扶正抗癌方抑制PC9细胞转移的分子机制[J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(10):2021-2025, 2237.

[11] 李龙妹, 吴万垠. 扶正抗癌方抑制A549转移的分子机制[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(11):4759-4762.

[12] LI L M, WANG S W, ZHENG F, et al. Chinese herbal medicine Fuzheng Kang-ai decoction sensitized the effect of gefitinib on inhibition of human lung cancer cells through inactivating PI3-K/Akt-mediated suppressing MUC1 expression[J]. J Ethnopharmacol, 2016(194):918-929.

[13] ZHENG F, WU J J, LI X, et al. Chinese herbal medicine Fuzheng Kang-ai decoction inhibited lung cancer cell growth through AMPK  $\alpha$ -mediated induction and interplay of IGFBP1 and FOXO3a[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016, doi: 10.1155/2016/5060757.

[14] Datta S R, Dudek H, TAO X, Masters S, et al. Akt phosphorylation of Bad couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery[J]. Cell, 1997, 91(2):231-241.

[15] 黎金华, 田菲, 邱崇笙, 等. 扶正散结方调控Lewis肺癌小鼠TAMs免疫重塑作用的相关研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(6):1161-1165.

[16] 龙顺钦, 欧阳育树, 杨小兵. 吴万垠教授治疗肺癌经验介绍[J]. 新中医, 2012, 44(8):223-224.

[责任编辑 张丰丰]