

# 益肺逐积方诱导人肺腺癌 A549 细胞凋亡机制

蒋时红<sup>1\*</sup>, 吴耀松<sup>1</sup>, 孙超龙<sup>2</sup>, 贾乐乐<sup>1</sup>

(1. 河南中医药大学基础医学院, 郑州 450008; 2. 河南省中医药研究院附属医院, 郑州 450004)

**[摘要]** 目的:通过体外实验观察益肺逐积方对人肺腺癌 A549 细胞活性、细胞凋亡以及表皮生长因子受体(EGFR), G 蛋白偶联受体 30(GPR30)蛋白表达的影响,探讨中药复方益肺逐积方抑制肺癌细胞活性,诱导肺癌细胞凋亡的作用机制。方法:将人肺腺癌 A549 细胞培养至对数生长期,益肺逐积方高、低质量浓度组分别加入  $2, 1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  益肺逐积方培养液, 5-氟尿嘧啶(5-FU)组加入  $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  5-FU 培养液,溶剂组加入含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,分别作用 24, 48 h 后,采用噻唑蓝(MTT)比色法检测益肺逐积方对人肺腺癌 A549 细胞活性的影响;吖啶橙/溴乙啶(AO/EB)荧光染色观察益肺逐积方作用不同时间后人肺腺癌 A549 细胞的凋亡形态学变化;流式细胞术(FCM)测定益肺逐积方作用下人肺腺癌 A549 细胞的凋亡率;利用倒置显微镜观察益肺逐积方作用 24, 48 h 后 A549 细胞的形态学改变,蛋白质免疫印迹法(Western blot)测定人肺腺癌 A549 凋亡细胞 EGFR, GPR30 蛋白的表达。结果:与溶剂组比较,  $1.5, 2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  益肺逐积方均能抑制人肺腺癌 A549 细胞活性( $P < 0.05$ ), 诱导 A549 细胞发生不同程度的凋亡形态学改变;流式细胞术检测显示,益肺逐积方作用 24, 48 h 后,可使人肺腺癌 A549 细胞其发生晚期凋亡( $P < 0.05$ );Western blot 结果显示,益肺逐积方可以不同程度地下调人肺腺癌 A549 细胞 GPR30, EGFR 蛋白的表达( $P < 0.05$ )。结论:益肺逐积方可抑制人肺腺癌 A549 细胞活性、诱导其发生晚期凋亡,并使其发生凋亡形态学改变,这可能与下调 EGFR, GPR30 蛋白表达有关。

**[关键词]** 益肺逐积方; A549 细胞; 凋亡; 表皮生长因子受体; G 蛋白偶联受体 30

**[中图分类号]** R273; R22; R223.1; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)05-0131-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2018050131

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171113.1516.014.html>

**[网络出版时间]** 2017-11-13 15:16

## Mechanism of Yifei Zhuji Prescription on Inducing Human Lung Adenocarcinoma A549 Cells Apoptosis

JIANG Shi-hong<sup>1\*</sup>, WU Yao-song<sup>1</sup>, SUN Chao-long<sup>2</sup>, JIA Le-le<sup>1</sup>

(1. College of Basic Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;  
2. Affiliated Hospital of Henan Province Chinese Medicine Research Institute, Zhengzhou 450004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of Yifei Zhuji prescription on cells activity, apoptosis, and the protein expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and G protein-coupled receptor 30 (GPR30) of human lung adenocarcinoma A549 cells, investigate its mechanism on inhibiting the activity of lung cancer cells and inducing apoptosis of lung cancer cells. **Method:** Human lung adenocarcinoma A549 cells were cultured to a logarithmic phase;  $2, 1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  drug culture medium was added in Yifei Zhuji prescription high and low dose groups;  $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  5-FU drug culture medium was added in blank group; RPMI 1640 culture medium containing 10% fetal bovine serum was added in solvent group. After treatment for 24, 48 h, 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay was used to detect the effect of Yifei Zhuji prescription on the activity of human lung adenocarcinoma A549 cells. Acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) was used to observe the morphological changes of apoptosis of human lung adenocarcinoma A549 cells. Flow cytometry (FCM)

**[收稿日期]** 20170829(021)

**[基金项目]** 河南省教育厅高校重点科研计划项目(14A360019)

**[通信作者]** \* 蒋时红, 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

was used to detect the apoptosis rate of A549 cells, and the morphological changes of A549 cells were observed by inverted microscope. In addition, Western blot was used to determine the apoptosis-related protein expression of EGFR and GPR30. **Result:** Compared with solvent group, both 1.5 and 2 g·L<sup>-1</sup> Yifei Zhuji prescription could inhibit the activity of A549 cells ( $P < 0.05$ ), and induce the apoptosis morphological changes of A549 cells; FCM results showed that A549 cells were induced to have late stage apoptosis after Yifei Zhuji prescription treatment for 24 h and 48 h ( $P < 0.05$ ). Western blot results showed that Yifei Zhuji prescription could down-regulate the apoptosis-related protein expression of EGFR and GPR30 to different degrees ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Yifei Zhuji prescription could inhibit the activity of A549 cells, induce the apoptosis of A549 cells and induce the apoptosis morphological changes. The mechanism might be associated with down-regulating the protein expression of EGFR and GPR30.

[**Key words**] Yifei Zhuji prescription; A549 cell; apoptosis; epidermal growth factor receptor (EGFR); G protein-coupled receptor 30 (GPR30)

肺癌是肿瘤疾病中的常见病和多发病,其发病率和死亡率高居我国癌症的首位,对人类健康造成了严重威胁<sup>[1-2]</sup>。在中医典籍中,尚无肺癌这一病名,中医学根据肺癌的临床变现,可将其归属于“肺岩”、“肺积”、“胸痛”、“痞癖”、“咳嗽”、“咯血”等范畴<sup>[3]</sup>。目前,肺癌的病因病机尚无定论,国内的主流观点认为该病乃“内外相合”而生,肺癌的发病早期以热毒炽盛,痰浊瘀血凝滞为主,迁延日久则正气亏损,气阴两虚,采用补气养阴、化痰逐瘀类中药对肺癌患者进行辨证论治,有确切疗效<sup>[4-5]</sup>。益肺逐积方系河南省中医药研究院附属医院在临床治疗肺癌过程中确立,该方遴选出一些针对肺脏生理特性和癌肿病理产物的中药,辅以补气养阴药,共奏益肺逐积之效,临床疗效确切,方中半枝莲清热解毒,半夏、川贝母化痰散结,三七活血化瘀,蛤蜊、百合养阴润燥,露蜂房散结解毒,西洋参、三七补气养阴<sup>[6]</sup>。中药复方制剂在肺癌的防治中具有独特的优势,探索中药复方制剂干预肺癌细胞的机制对抗肿瘤复方新药的研发具有一定的意义。

细胞凋亡是肿瘤发生发展的重要机制之一,目前细胞凋亡机制涉及到死亡受体、线粒体、内质网等通路,此外,表皮生长因子受体(EGFR),G蛋白偶联受体 30(GPR30)信号通路也能参与肿瘤细胞凋亡的调节,在肺癌细胞中呈高表达,是中药防治肺癌的两个重要靶点,中药复方制剂可以通过作用于 EGFR 这一靶点抑制人肺腺癌 A549 细胞的生长,促进其凋亡<sup>[7-10]</sup>。本实验采用体外实验研究益肺逐积方对人肺腺癌 A549 细胞凋亡的影响,探讨益肺逐积方诱导 A549 细胞凋亡的相关机制,以期为本方的应用提供实验室依据。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 人肺腺癌 A549 细胞株由中国医学科学院基础医学研究所提供,由河南中医药大学分子实验中心实验室传代培养。

**1.2 药物** 益肺逐积方由露蜂房、半枝莲、三七、百合、半夏、川贝母、蛤蜊(粉)、西洋参组成,饮片由河南中医药大学第三附属医院提供,经本校中药鉴定与生药学学科代丽萍教授鉴定为正品。益肺逐积方制剂由河南中医药大学分子实验中心实验室经水煎、醇沉、过滤灭菌,制备成含 10% 胎牛血清的 2 g·L<sup>-1</sup> 药物培养液。5-氟尿嘧啶(5-FU,上海旭东海普药业有限公司,国药准字 H20041742)配成含 10% 胎牛血清的 2.5 g·L<sup>-1</sup> 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 20150512);RPMI 1640 培养液(Solarbio 公司,批号 20150526);噻唑蓝(MTT,Sigma 公司,批号 M-2128);细胞凋亡吖啶橙(AO)染色检测试剂盒,细胞凋亡溴化乙锭(EB)染色试剂盒,Annexin V-FITC/碘化丙啶(PI)细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物公司,批号分别为 20150525,20150624,20150228);RIPA 裂解液,考马斯亮蓝蛋白定量试剂盒,彩色预染超高分子蛋白质 marker, $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)兔单克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为 AR0105-30,AR0145,AR1118,BA2305);抗 EGFR 兔单克隆抗体(博奥森公司,批号为 bs-10007R);抗 GPR30 兔单克隆抗体(Abcam 公司,批号为 AB12564);HRP-羊抗兔 IgG 酶标二抗(北京康为世纪有限公司,批号 CW0102)。

**1.4 仪器** 3111 型二氧化碳培养箱,1510 型全波长酶标仪(美国 Thermo 公司),H1850 型台式高速离心机(湘仪离心机仪器有限公司),XSZ-D2 型双目

倒置显微镜(重庆光学仪器厂),N-1200B 型旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司),U-LH100 HG 型荧光显微镜(日本 Olympus 公司),FACS Calibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司),Biomate 3s 型微量紫外分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司),DYY-2C 型电泳仪(北京六一仪器厂),EPS601 型湿转膜电源和设备(美国 GE Healthcare Bio-sciences AB 公司),Universal Hood II 型凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞株体外培养与分组** 将 A549 细胞在 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,细胞生长至对数生长期时开始实验。将细胞随机分为溶剂组,5-FU 组,益肺逐积方高、低质量浓度组,溶剂组加入含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,5-FU 组加入 2.5 g·L<sup>-1</sup> 5-FU 含药培养液,益肺逐积方高、低质量浓度组分别加入 2,1.5 g·L<sup>-1</sup> 含药培养液。

**2.2 药物培养液制备** 露蜂房 15 g,半枝莲 30 g,三七 10 g,百合 15 g,半夏 10 g,川贝母 10 g,蛤蚧 15 g,西洋参 10 g,常规水煎并浓缩,向浓缩液中加入等体积的 95% 乙醇,静置于 4 °C 冰箱 24 h,收集上清液进行过滤,将滤液置于旋转蒸发器上回收乙醇,当药液呈黏稠状时,置于真空干燥箱内干燥,以 RPMI 1640 基础培养液溶解干燥药粉,以 0.22 μm 孔径的针头滤器过滤除菌,以无支原体胎牛血清和 RPMI 1640 培养基将药物培养液质量浓度调整为至含生药 2 g·L<sup>-1</sup> (高剂量),加含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液稀释药物培养液至含生药 1.5 g·L<sup>-1</sup> (低剂量),放于 4 °C 冰箱内保存备用。

**2.3 MTT 比色法检测细胞活性** 取对数生长期 A549 细胞,调整细胞密度为 2 × 10<sup>4</sup> 个/mL,接种于 96 孔板,培养至细胞贴壁后弃上清,按照实验分组加入相应的试剂和药物,继续培养 24,48 h,加入 MTT 溶液,孵育后加二甲基亚砷。酶标仪上以 490 nm 的波长检测各孔吸光度 A,计算抑制率,细胞增殖抑制率 = (1 - A<sub>药物组</sub> / A<sub>溶剂组</sub>) × 100%。

**2.4 AO/EB 染色观察细胞形态学变化** 将对数生

长期 A549 细胞按照分组加入相应的试剂和药物,继续培养 24,48 h。收集细胞后加入 AO/EB 染色剂,混匀后将悬液滴加于载玻片上,室温避光染色 15 min 后,加盖玻片,滤光片 515 nm 荧光显微镜下观察并拍照。

**2.5 流式细胞术检测 A549 细胞凋亡率** 按照分组加入相应的试剂和药物,使其分别作用于 A549 细胞 24,48 h。收集细胞悬液于标记过的流式管内。离心后去上清,加入微量试剂 Annexin-FITC 和 PI。避光反应 10 min 后上流式细胞仪检测,计算凋亡率。

**2.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 测定细胞凋亡相关蛋白表达** 显微镜下观察益肺逐积方作用 24,48 h 后的 A549 细胞活性变化;收集细胞,RIPA 细胞裂解液裂解细胞,提取蛋白;采用 BCA 法测蛋白浓度;灌制 8% 分离胶和 5% 浓缩胶进行 SDS-PAGE 电泳,转膜,4 °C 封闭过夜,分别加入抗 β-actin,EGFR,GPR30 兔单克隆抗体(1:1 000),于脱色摇床上孵育 2 h,TBST 液洗膜 3 次,10 min/次,加入 HRP-羊抗兔 IgG 酶标二抗(1:1 000)孵育 1 h,TBST 液洗膜 3 次,10 min/次,加入发光剂反应 4 min,去除多余液体,在暗室中用 X 胶片感光,显影,定影;采用凝胶成像仪扫描胶片,用 Image-Pro Plus 软件分析各条带的灰度值,将各组 EGFR,STAT3 与其 β-actin 灰度值比值作为蛋白相对表达量。

**2.7 统计方法** 采用 SPSS 20.0 统计软件对结果进行处理,本实验的数据均为计量资料,各数据以  $\bar{x} \pm s$  进行统计描述,组间比较,采用单因素方差分析,方差不齐时,采用秩和检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 益肺逐积方对 A549 细胞活性影响** 与溶剂组比较,A549 细胞培养 24,48 h 后,益肺逐积方(2.0,1.5 g·L<sup>-1</sup>) 组 A 均降低( $P < 0.05$ );与 5-FU 组比较,A549 细胞培养 24,48 h 后,益肺逐积方高、低剂量组 A 均升高( $P < 0.05$ )。见表 1。

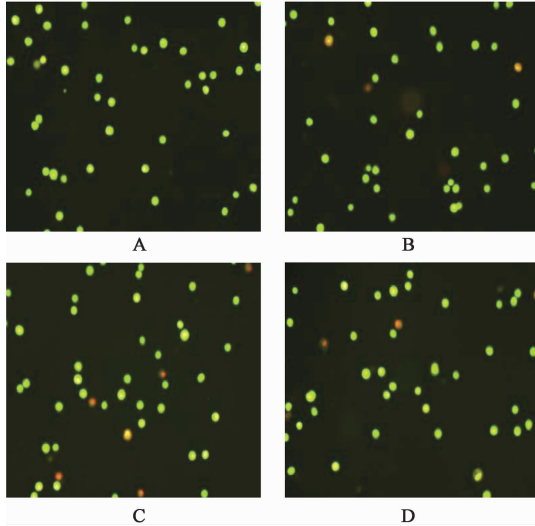
表 1 益肺逐积方对 A549 细胞活性的影响

Table 1 Effect of Yifei Zhuji prescription on activity of A549 cells

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	24 h		48 h	
		A( $\bar{x} \pm s, n=6$ )	抑制率/%	A( $\bar{x} \pm s, n=6$ )	抑制率/%
溶剂	-	0.803 ± 0.031	-	0.813 ± 0.032	-
益肺逐积方	1.5	0.760 ± 0.022 <sup>1,2)</sup>	5.36	0.690 ± 0.034 <sup>1,2)</sup>	15.20
	2.0	0.525 ± 0.017 <sup>1,2)</sup>	34.59	0.406 ± 0.015 <sup>1,2)</sup>	50.13
5-FU	2.5	0.104 ± 0.005 <sup>1)</sup>	87.03	0.042 ± 0.021 <sup>1)</sup>	94.78

注:与溶剂组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与 5-FU 组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ (表 2~4 同)。

**3.2 益肺逐积方对 A549 细胞凋亡形态的影响** 与溶剂组比较,在作用于 A549 细胞 24,48 h 后,益肺逐积方(2.0,1.5 g·L<sup>-1</sup>)组 A549 细胞出现大量橘红色、固缩状的凋亡细胞,且随着药物浓度的增加,凋亡细胞的数量有所增加。见图 1,2。



A. 溶剂组;B. 益肺逐积方(1.5 g·L<sup>-1</sup>)组;C. 益肺逐积方(2.0 g·L<sup>-1</sup>)组;D. 5-FU 组(图 2~6 同)

图 1 益肺逐积方作用 24 h 后对 A549 细胞凋亡形态的影响(AO/EB, ×200)

Fig. 1 Effect of Yifei Zhuji prescription on apoptotic morphology of A549 cells after 24 h(AO/EB, ×200)

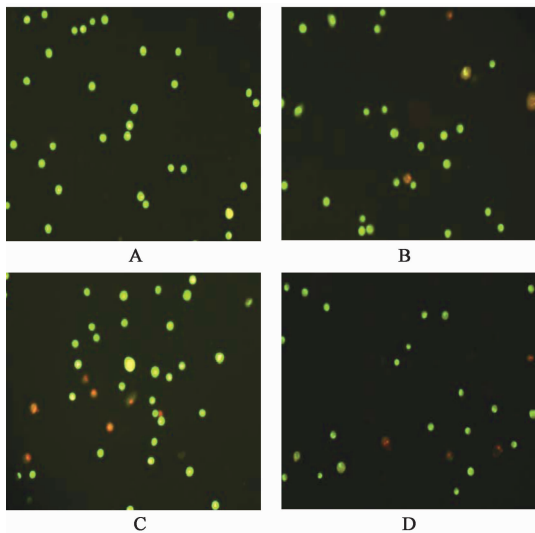


图 2 益肺逐积方作用 48 h 后对 A549 细胞凋亡形态的影响(AO/EB, ×200)

Fig. 2 Effect of Yifei Zhuji prescription on apoptotic morphology of A549 cells after 48 h(AO/EB, ×200)

**3.3 益肺逐积方对 A549 细胞凋亡率的影响** 与溶剂组比较,在作用于 A549 细胞 48 h 后,益肺逐积

方(2.0,1.5 g·L<sup>-1</sup>)组的 A549 细胞晚期凋亡率均升高( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 益肺逐积方对 A549 细胞凋亡率的影响( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

Table 2 Effect of Yifei Zhuji prescription on apoptosis rate of A549 cells( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	早期凋亡率	晚期凋亡率
溶剂	-	29.96 ± 0.26	8.09 ± 0.10
益肺逐积方	1.5	33.27 ± 0.32	13.32 ± 0.07 <sup>1,2)</sup>
	2.0	32.84 ± 0.27	28.81 ± 0.14 <sup>1,2)</sup>
5-FU	2.5	34.12 ± 0.19 <sup>1)</sup>	7.94 ± 0.12

**3.4 益肺逐积方对 A549 细胞凋亡相关蛋白表达的影响** 与溶剂组比较,在作用于 A549 细胞 24,48 h 后,益肺逐积方(2.0,1.5 g·L<sup>-1</sup>)组 A549 细胞活性均发生不同程度的改变,见图 3,4;与溶剂组比较,在作用于 A549 细胞 24,48 h 后,益肺逐积方(2.0,1.5 g·L<sup>-1</sup>)组 A549 细胞凋亡相关蛋白 EGFR,GPR30 表达水平均出现不同程度下降( $P < 0.05$ ),下降程度与药物浓度呈正相关。见表 3,4,图 5,6。

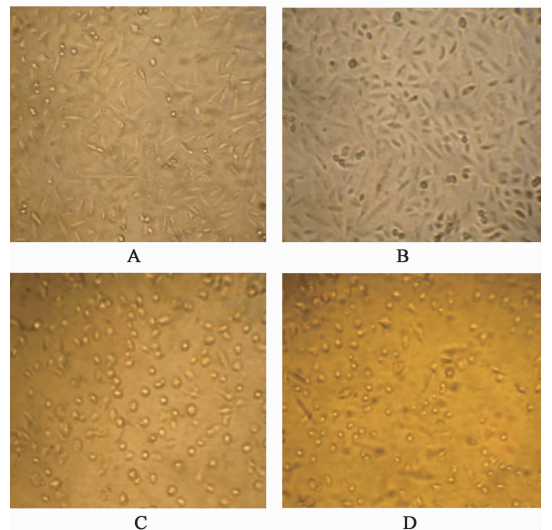


图 3 益肺逐积方作用 24 h 后 A549 细胞的形态学改变(Annexin-FITC/PI, ×200)

Fig. 3 Morphological changes after Yifei Zhuji prescription treatment on A549 cells for 24 h(Annexin-FITC/PI, ×200)

#### 4 讨论

随着肺癌的高病死率和中医药现代化进程,中药复方制剂防治肺癌的机制越来越被人们所关注,中药复方制剂干预肺癌细胞的机制涉及到细胞凋亡、蛋白表达、信号传导通路等方面<sup>[5]</sup>。细胞凋亡即程序性细胞死亡,是指机体为了维持内环境稳定,由基因控制的一种自主、有序性细胞死亡形

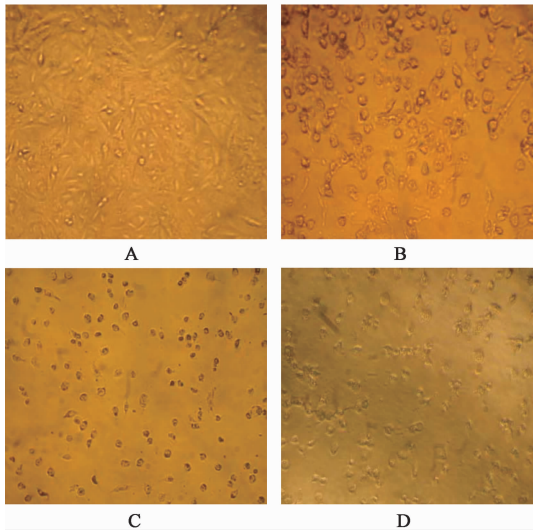


图 4 益肺逐积方作用 48 h 后 A549 细胞的形态学改变 (Annexin-FITC/PI,  $\times 200$ )

Fig. 4 Morphological changes after Yifei Zhuji prescription treatment on A549 cells for 48 h (Annexin-FITC/PI,  $\times 200$ )

表 3 益肺逐积方作用 24 h 后对 A549 细胞 EGFR, GPR30 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

Table 3 Effect of Yifei Zhuji prescription on protein expression of EGFR and GPR30 of A549 cells after 24 h ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

组别	质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	EGFR/ $\beta$ -actin	GPR30/ $\beta$ -actin
溶剂	-	1.96 $\pm$ 0.09	0.68 $\pm$ 0.03
益肺逐积方	1.5	1.44 $\pm$ 0.06 <sup>1,2)</sup>	0.61 $\pm$ 0.02 <sup>1)</sup>
	2.0	0.37 $\pm$ 0.04 <sup>1,2)</sup>	0.10 $\pm$ 0.03 <sup>1,2)</sup>
5-FU	2.5	0.43 $\pm$ 0.04 <sup>1)</sup>	0.64 $\pm$ 0.04

表 4 益肺逐积方作用 48 h 后对 A549 细胞 EGFR, GPR30 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

Table 4 Effect of Yifei Zhuji prescription on protein expression of EGFR and GPR30 of A549 cells after 48 h ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

组别	质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	EGFR/ $\beta$ -actin	GPR30/ $\beta$ -actin
溶剂	-	1.22 $\pm$ 0.08	1.65 $\pm$ 0.07
益肺逐积方	1.5	0.82 $\pm$ 0.05 <sup>1,2)</sup>	0.91 $\pm$ 0.06 <sup>1,2)</sup>
	2.0	0.71 $\pm$ 0.04 <sup>1,2)</sup>	0.42 $\pm$ 0.05 <sup>1,2)</sup>
5-FU	2.5	0.20 $\pm$ 0.01 <sup>1)</sup>	0.25 $\pm$ 0.05 <sup>1)</sup>

式<sup>[11]</sup>。现代研究表明,许多疾病的发生与细胞凋亡信号传导系统异常密切相关,且细胞凋亡在肿瘤治疗以及抗肿瘤药物疗效评估中也具有重要意义,因此,研发以诱导细胞凋亡为主的治疗药物已成为肿瘤治疗的一个重要途径<sup>[12]</sup>。相关研究认为,肺癌细胞凋亡过程是由多条信号传导通路共同完成的,通路的启动由信号蛋白实现,EGFR 是一种分布于细胞膜表面的跨膜蛋白,EGFR 信号通路激活后可

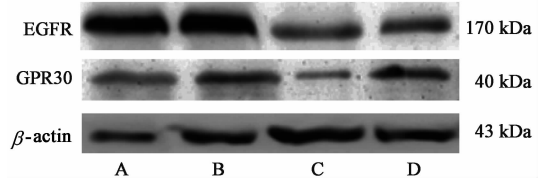


图 5 益肺逐积方作用 A549 细胞 24 h 后 EGFR, GPR30 蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of EGFR, GPR30 expression after Yifei Zhuji prescription treatment on A549 for 24 h

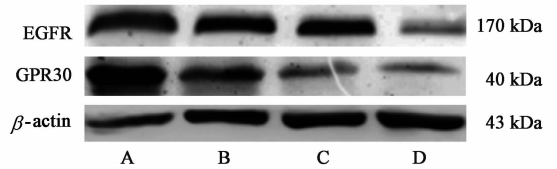


图 6 益肺逐积方作用 A549 细胞 48 h 后 EGFR, GPR30 蛋白表达电泳

Fig. 6 Electrophoresis of EGFR, GPR30 expression after Yifei Zhuji prescription treatment on A549 for 24 h

导致恶性肿瘤细胞增殖,促进肿瘤血管生成,加速肺癌扩散并抑制细胞凋亡;GPR30 是一种新型特异性的雌激素受体,广泛表达于多种恶性肿瘤内,可以和 EGFR 共同交叉对话调控相关信号转导途径,在抑制肺癌细胞凋亡及促进血管生成方面都起着重要作用<sup>[13-15]</sup>。本实验以人肺腺癌 A549 细胞为研究对象,观察益肺逐积汤对肺癌细胞凋亡和凋亡相关蛋白 EGFR, GPR30 的影响,探讨中药复方制剂的抗肺癌机制,以期为肺癌的中药多靶点治疗提供一定的理论依据。

本次实验结果表明,不同质量浓度的益肺逐积方均可抑制人肺腺癌 A549 细胞的活性,诱导其发生细胞凋亡,且药物的浓度越高,人肺腺癌 A549 细胞活性越差,细胞凋亡形态改变越明显。这一结果通过体外实验印证了益肺逐积方在临床上治疗肺癌的有效性,并提示药物浓度的改变可能对其疗效具有一定的影响。根据流式细胞术检测结果可知,益肺逐积方 1.5, 2.0  $g \cdot L^{-1}$  作用 48 h 后, A549 的细胞晚期凋亡率升高,提示益肺逐积方可诱导 A549 细胞发生晚期凋亡。Western blot 检测结果表明,1.5, 2.0  $g \cdot L^{-1}$  益肺逐积方可使 A549 细胞凋亡相关蛋白 EGFR, GPR30 的表达水平均出现不同程度地下降,且下降程度与药物浓度呈正相关,说明 EGFR, GPR30 是益肺逐积方干预肺癌细胞的靶点,并且该靶点可能与 A549 细胞活性、细胞凋亡这两个靶点相关。

综合以上结果发现,细胞凋亡,EGFR,GPR30均是益肺逐积方防治肺癌的作用靶点,益肺逐积方可能通过作用于EGFR,GPR30信号通路抑制人肺腺癌A549细胞的活性,诱导其发生晚期凋亡。至于益肺逐积方是否通过阻断EGFR/GPR30信号转导通路发挥作用,及其通过哪些受体启动凋亡相关因子仍需进一步深入研究。

[参考文献]

[1] 郝捷,陈万清. 2015年中国肿瘤登记年报[M]. 北京:军事医学科学出版社,2015:100-101.

[2] CHEN W Q, ZHENG R S, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA: Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132.

[3] 孙超龙. 基于EGFR、STAT3信号通路探讨苇茎汤及其拆方诱导人肺腺癌A549细胞凋亡的作用机制[D]. 郑州:河南中医学院,2014.

[4] 苏志新. 桃红四物汤加味配合化疗治疗气滞血瘀型中晚期非小细胞肺癌的临床观察[J]. 中国社区医师, 2016, 32(6):122-123.

[5] 孙超龙,谢慧琚. 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):77-79.

[6] 高学敏. 中药学[M]. 北京:中国中医药出版社,2010:287-563.

[7] 张璐,郭伟,舒琦瑾. 肺癌中医证型与其相关肿瘤标志物关系[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(1):206-208.

[8] 刘光敏,贾晓斌,王恒斌. 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):1268-1270.

[9] 孙超龙,张文娟,刘燕,等. 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[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(11):110-114.

[10] 罗浩军,杨光伦,涂刚. 雌激素受体GPR30研究进展[J]. 中国癌症杂志, 2009, 19(11):881-886.

[11] 成军. 现代细胞凋亡分子生物学[M]. 2版. 北京:科学出版社,2012:1-52.

[12] 喻晓静,邵晓梅,方剑乔. 细胞凋亡信号传导通路研究进展[J]. 实用中医药杂志, 2011, 27(1):71-72.

[13] 张志红,于敏,倪琛琛,等. EGFR在非小细胞肺癌组织中的表达及其初步临床意义[J]. 临床肺科杂志, 2010, 15(8):1079-1081.

[14] 段泽星. VEGF在肿瘤生长和血管生成中的作用[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(27):2894-2900.

[15] 朱其舟,舒宽勇. 雌激素膜性受体GPR30/GPER的研究现状[J]. 国际妇产科学杂志, 2010, 37(1):34-38.

[责任编辑 张丰丰]