

基于PI3K/Akt信号通路探讨固本解毒方含药血清对肺癌A549细胞EMT的影响

朱冬菊¹, 朴炳奎², 秦腾腾¹, 杨晨¹, 白建琦¹, 朱宏伟¹, 张平^{1*}

(1. 中国中医科学院望京医院, 北京 100102; 2. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053)

[摘要] 目的:观察固本解毒方对肺癌A549细胞上皮间质转化(EMT)的影响,从磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路探讨其作用机制。方法:制备固本解毒方含药血清,噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞存活率并筛选固本解毒方浓度用于后续实验。分为空白组、固本解毒方组(2.5%、5%、10%含药血清)、PI3K/Akt通路激活剂(SC79)组、固本解毒方+SC79组。划痕实验检测细胞迁移力,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、蛋白激酶B(Akt)、磷酸化(p)-Akt、糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)、p-GSK-3 β 蛋白表达,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测N-cadherin、Vimentin mRNA表达。结果:与空白组比较,固本解毒方组含药血清(2.5%、5%、10%、20%、40%)A549细胞活力降低($P<0.05$),选择固本解毒方含药血清10%、5%、2.5%作为高、中、低浓度进行后续实验。与空白组比较,固本解毒方组A549细胞迁移力降低。Real-time PCR结果显示,与空白组比较,固本解毒方组A549细胞N-cadherin、Vimentin mRNA表达显著降低($P<0.01$)。Western blot结果显示,与空白组比较,固本解毒方组(含药血清5%、10%)A549细胞E-cadherin蛋白表达显著升高($P<0.01$),固本解毒方组N-cadherin、Vimentin、p-Akt、p-GSK-3 β 蛋白表达显著降低($P<0.01$),p-Akt/Akt、p-GSK-3 β /GSK-3 β 表达明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。与SC79组比较,固本解毒方组(含药血清10%)E-cadherin蛋白表达显著升高($P<0.01$),N-cadherin、Vimentin、p-Akt、p-GSK-3 β 、p-Akt/Akt、p-GSK-3 β /GSK-3 β 表达显著降低($P<0.01$)。与固本解毒方组(含药血清10%)比较,固本解毒方+SC79组(含药血清10%)E-cadherin蛋白表达显著降低($P<0.01$),N-cadherin、Vimentin、p-Akt、p-GSK-3 β 、p-Akt/Akt、p-GSK-3 β /GSK-3 β 蛋白表达显著升高($P<0.01$)。结论:固本解毒方可抑制肺癌A549细胞迁移和EMT,其机制与调控PI3K/Akt信号通路有关。

[关键词] 肺癌; 固本解毒方; 磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路; A549细胞; 上皮间质转化(EMT)

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)22-0093-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221329

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220429.0926.001.html>

[网络出版日期] 2022-04-29 17:27

Effect of Guben Jiedu Prescription-medicated Serum on Epithelial-mesenchymal Transition of Lung Cancer A549 Cells: Based on PI3K/Akt Signaling Pathway

ZHU Dongju¹, PIAO Bingkuai², QIN Tengting¹, YANG Chen¹, BAI Jianqi¹, ZHU Hongwei¹, ZHANG Ping^{1*}

(1. Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China;

2. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Guben Jiedu prescription (GBJ) on the epithelial-mesenchymal transition (EMT) of lung cancer A549 cells and to explore the mechanism based on phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway. **Method:** The GBJ-medicated serum was prepared. Cell viability was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay to screen the optimal doses of GBJ-medicated serum for further experiment. A549 cells were classified into normal serum

[收稿日期] 2022-01-26

[基金项目] 中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021A01818);中国中医科学院望京医院院级科研课题项目(WJYY2020-19)

[第一作者] 朱冬菊,在读博士,从事中西医结合治疗肿瘤的基础与临床研究,E-mail:1969631601@qq.com

[通信作者] *张平,博士,主任医师,从事中西医结合治疗肿瘤的基础与临床研究,E-mail:pinglele@sina.com

group, low-, medium-, and high-dose GBJ-mediated serum groups (2.5%, 5%, and 10% GBJ-mediated serum), PI3K/Akt pathway activator SC79 group, and high-dose GBJ-mediated serum + SC79 group. Cell migration ability was measured by wound-healing assay. The protein expression of E-cadherin, N-cadherin, vimentin, Akt, phosphorylated Akt (p-Akt), glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), and phosphorylated GSK-3 β (p-GSK-3 β) was detected by Western blotting, and the mRNA expression of N-cadherin and vimentin by Real-time PCR. **Result:** Compared with the normal serum, GBJ-mediated serum (2.5%, 5%, 10%, 20%, 40%) decreased the viability of A549 cells ($P<0.05$), and 10%, 5%, 2.5% GBJ-mediated serum was respectively selected for the follow-up experiment. The migration ability of cells in the high-, medium-, and low-dose GBJ-mediated serum groups was lower than that in the normal serum group. The expression of N-cadherin mRNA and Vimentin mRNA in A549 cells in the three GBJ-mediated serum groups was significantly lower than that in the normal serum group ($P<0.01$). The protein expression of E-cadherin was higher in the high- and medium-dose GBJ-mediated serum groups than in the normal serum group ($P<0.01$). The three GBJ-mediated serum groups showed lower protein expression of N-cadherin, vimentin, p-Akt, and p-GSK-3 β ($P<0.01$) and lower expression of p-Akt/Akt, p-GSK-3 β /GSK-3 β ($P<0.05$, $P<0.01$) than normal serum group. Compared with the SC79 group, the high-dose GBJ-mediated serum group demonstrated high protein expression of E-cadherin ($P<0.01$) and low expression of N-cadherin, vimentin, p-Akt, p-GSK-3 β , and p-Akt/Akt, p-GSK-3 β /GSK-3 β ($P<0.01$). Compared with the high-dose GBJ-mediated serum group, high-dose GBJ-mediated serum + SC79 group showed low protein expression of E-cadherin ($P<0.01$) and high protein expression of N-cadherin, vimentin, p-Akt, p-GSK-3 β , p-Akt/Akt, and p-GSK-3 β /GSK-3 β ($P<0.01$). **Conclusion:** GBJ can inhibit the migration and EMT of lung cancer A549 cells by regulating the PI3K/Akt signaling pathway.

[Keywords] lung cancer; Guben Jiedu prescription; phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway; A549 cells; epithelial-mesenchymal transition (EMT)

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一,已成为全球范围内恶性肿瘤致死的首要原因^[1]。非小细胞肺癌(NSCLC)约占所有肺癌病例的85%^[2],超过一半的NSCLC患者在最初诊断时即显示出局部或远处转移,其中位生存期仅为22.5个月^[3]。尽管手术、化疗、放疗、靶向治疗、免疫治疗等多种治疗方法不断发展,NSCLC患者的总体5年生存率仍低至25%^[4],伴有远处器官转移仅接受化疗的患者总体5年生存率为6%^[5]。中医药通过调控遗传学、表观遗传学、肿瘤微环境、上皮间质转化(EMT)和癌症干细胞等方面发挥抗癌活性,包括抗增殖,促凋亡,抗转移,抗血管生成作用,并调节自噬,逆转多药耐药性,平衡免疫力并增强化疗作用^[6-7]。固本解毒方是中国中医科学院广安门医院朴炳奎教授经过长期临床实践自拟的经验方,该方能有效抑制肺癌转移,延长患者生存时间。研究发现,方中诸药通过扶正祛邪发挥抗肿瘤作用^[8-10]。前期细胞实验发现,固本解毒方可以抑制肺癌A549细胞增殖、迁移,动物预实验表明,固本解毒方对白细胞介素-2受体 γ 链缺失的NSG小鼠肺内转移和骨转移具有抑制作用,同时,网络药理学研究发现,固本解毒方可能通过磷

脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路干预肺癌增殖、凋亡、转移。本研究采用血清药理学方法观察固本解毒方对肺癌A549细胞迁移、EMT的影响,探讨固本解毒方治疗肺癌的作用机制。

1 材料

1.1 细胞和动物 人肺腺癌A549细胞,由美国克利夫兰州立大学Aimin Zhou实验室赠送,传至15~20代。SPF级雄性SD大鼠24只,体质量200~250 g,购自中国食品药品检定研究院,动物使用许可证号SCXK(京)2017-0005,饲养于北京隆安实验动物养殖中心,实验均经北京隆安实验动物养殖中心伦理委员会批准,编号BJLA2020-08,温度21~25℃,相对湿度40%~60%,自由摄食饮水。

1.2 药物和试剂 固本解毒方由北沙参20 g、桔梗9 g、生黄芪30 g、当归10 g、续断10 g、骨碎补10 g、怀牛膝10 g、补骨脂10 g、太子参15 g、半枝莲20 g、土茯苓20 g、白花蛇舌草15 g、甘草6 g组成,饮片购自中国中医科学院望京医院中药房,经王景红主任药师鉴定均为正品。0.25%胰蛋白酶、胎牛血清(美国Hyclone公司,批号分别为SH30042.01、SH30070.03),噻唑蓝(MTT)检测试剂盒(中国北京

聚合美生物科技有限公司,批号MF837-01),十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶制备试剂盒、蛋白定量法(BCA)蛋白浓度测定试剂盒、蛋白预染 Marker(北京康为世纪生物科技股份有限公司,批号分别为CW0022S、CW0014S、CW2841S),辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G二抗(北京索莱宝科技有限公司,批号SE134),PVDF膜(德国Merck Millipore公司),PI3K/Akt通路激活剂SC79(中国上海Selleck公司,批号S7863),E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、蛋白激酶B(Akt)、磷酸化(p)-Akt、糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)、p-GSK-3 β 、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为3195T、13116T、5741T、4691T、4060T、12456T、9323T、2118S),RNA Easy Fast动物组织/细胞总RNA提取试剂盒、FastKing一步法除基因组cDNA第一链合成预混试剂、Talent荧光定量检测试剂盒(SYBR Green)[天根生化科技(北京)有限公司,批号分别为DP451、KR118-02、FP209-02]。

1.3 仪器 Heraeus型二氧化碳细胞培养箱、Nanodrop型高精度核算分光光度计(美国赛默飞世尔科技公司),680型酶标仪(美国Bio-Rad公司),TE2000S型倒置显微镜(日本Nikon公司),DYY-7C型电泳仪、DYCZ-40型电转仪、DYY-6C型电泳仪电源(北京六一仪器厂),Light Cycler480 II型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Roche公司)。

2 方法

2.1 含药血清制备 根据人与动物体表面积换算比值^[11]计算大鼠每日生药剂量为20 g·kg⁻¹,常规水煎浓缩至含生药1.25 g·mL⁻¹,于4℃冰箱保存。大鼠随机分为给药组和正常组,给药组给予固本解毒方灌胃,正常组给予等量生理盐水,每日2次,连续5 d。末次灌胃1 h后麻醉,腹主动脉取血,静置2 h,3 500 r·min⁻¹离心10 min(离心半径13.5 cm),分离血清,56℃水浴灭活30 min,使用微孔滤过膜过滤除菌,分装后置于-20℃冰箱保存备用。

2.2 细胞培养分组 A549细胞用含10%胎牛血清、1%青-链霉素RPMI 1640培养基,置于37℃、5% CO₂中培养,取对数生长期细胞进行实验。

2.3 MTT比色法检测A549细胞存活率 收集生长良好的A549细胞,调整细胞密度1×10⁵个/mL,每孔100 μ L,接种于96孔板。置于37℃、5%CO₂培养

箱中培养24 h。分为空白组和固本解毒方组,分别加入10%正常血清和固本解毒方含药血清(2.5%、5%、10%、20%、40%),培养24 h。吸弃上清液,加入培养液90 μ L,5 g·L⁻¹ MTT溶液10 μ L,培养4 h。吸弃上清液,每孔加入甲臜溶解液110 μ L,置摇床振荡10 min,在酶标仪490 nm处测量各孔吸光度A。

2.4 划痕实验检测细胞迁移力 A549细胞均匀接种于6孔板,每孔约5×10⁴个细胞,细胞铺满板底,用200 μ L枪头沿中线垂直于孔板划痕,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗3次。分为空白组和固本解毒方组,分别加入10%正常血清和固本解毒方含药血清(2.5%、5%、10%)继续培养,0、24 h分别选取3个视野显微镜下拍照,用Image J软件测量划痕宽度,评价细胞迁移能力。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测蛋白表达

实验分为空白组(10%正常血清)、SC79组(10 μ mol·L⁻¹)、固本解毒方组(含药血清2.5%、5%、10%)、固本解毒方+SC79组(10%固本解毒方含药血清+10 μ mol·L⁻¹SC79)。各组细胞分别给予相应处理,培养24、48 h,提取总蛋白,测定蛋白浓度,电泳,转膜,5%脱脂牛奶封闭2 h,加入一抗(1:1 000)4℃孵育过夜,TBST冲洗3次,每次5 min,加入二抗(1:5 000),室温摇床孵育2 h,TBST冲洗3次,每次5 min,显影,凝胶成像系统扫描各条带灰度值,用Image J软件进行处理,计算目的蛋白相对表达量。

2.6 Real-time PCR检测mRNA表达 分为空白组和固本解毒方组,分别加入10%正常血清和固本解毒方含药血清(2.5%、5%、10%),收集细胞,PBS充分清洗,提取总RNA,Nanodrop检测RNA浓度和纯度。逆转录条件为42℃、15 min,95℃、3 min;扩增条件为95℃3 min,1个循环;95℃变性5 s,60℃退火/延伸15 s,40个循环。每组设置3个复孔,以GAPDH为内参,以相对定量2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算mRNA相对表达量。引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
N-cadherin	上游 TCAGGCGTCTGTAGAGGCTT	94
	下游 ATGCACATCCTTCGATAAGACTG	
Vimentin	上游 AGTCCACTGAGTACCGGAGAC	98
	下游 CATTTCACGCATCTGGCGTTC	
GAPDH	上游 AAGGTCATCCAGAGCTGAA	85
	下游 CTGCTTACCACCTTCTTGA	

2.7 统计学方法 使用GraphPad Prism 6.0软件进行数据分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用One-way ANOVA分析,多组间两两比较采用Dunnnett-*t*法。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 固本解毒方含药血清对A549细胞存活率的影响 与空白组比较,固本解毒方组(2.5%、5%、10%、20%、40%)细胞存活率明显降低($P < 0.05$),见表2。为排除固本解毒方含药血清对细胞的影响,选择固本解毒方含药血清10%、5%、2.5%进行后续实验。

3.2 固本解毒方含药血清对A549细胞迁移力的影响 与空白组比较,固本解毒方组细胞迁移率明显

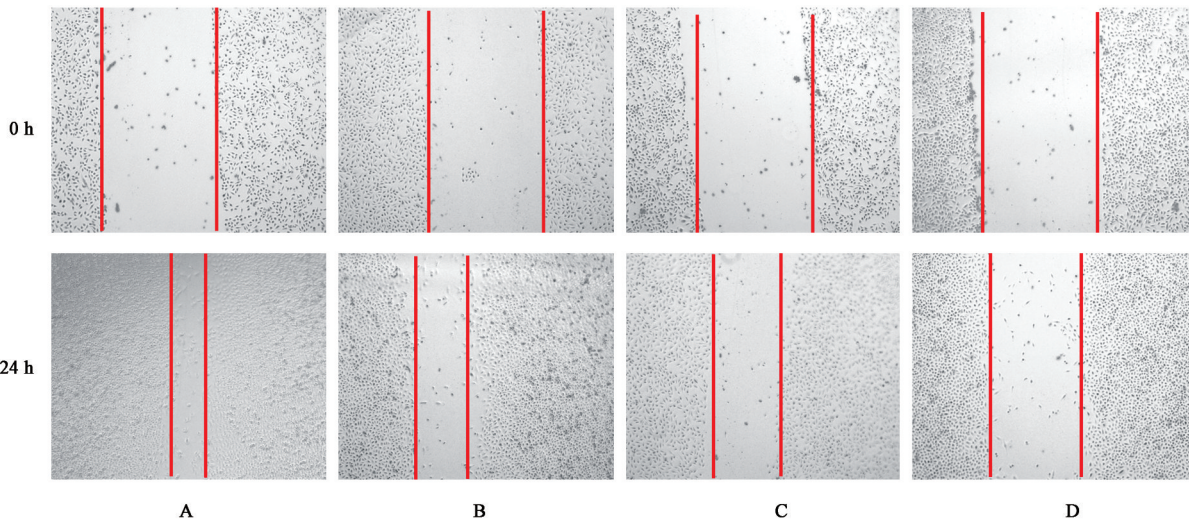
表2 固本解毒方含药血清对A549细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of Guben Jiedu prescription medicated serum on cell survival rate of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	存活率/%
空白组		100±13
固本解毒方组	2.5	91±9 ¹⁾
	5	79±9 ¹⁾
	10	77±16 ¹⁾
	20	76±9 ¹⁾
	40	75±9 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$

下降($P < 0.05$)。见图1。



注:A.空白组;B-D.固本解毒方组(含药血清2.5%、5%、10%)(图2、图3同)

图1 固本解毒方含药血清对A549细胞迁移力的影响(倒置显微镜,×40)

Fig. 1 Effect of Guben Jiedu prescription medicated serum on migration of A549 cells (inverted microscope, ×40)

3.3 固本解毒方含药血清对A549细胞中EMT相关蛋白表达的影响 与空白组比较,固本解毒方组A549细胞N-cadherin、Vimentin蛋白表达显著降低($P < 0.01$),固本解毒方组(含药血清5%、10%)E-cadherin蛋白表达显著升高($P < 0.01$),表明固本解毒方抑制A549细胞EMT。见表3、图2。

3.4 固本解毒方含药血清对A549细胞中EMT mRNA表达的影响 与空白组比较,固本解毒方组A549细胞N-cadherin mRNA表达显著降低($P < 0.01$),固本解毒方组(含药血清5%、10%)Vimentin mRNA表达显著降低($P < 0.01$)。见表4。

3.5 固本解毒方含药血清对A549细胞中p-Akt、p-GSK-3β蛋白表达的影响 与空白组比较,固本解毒方组p-Akt、p-GSK-3β蛋白表达均显著降低($P < 0.01$),固本解毒方组p-Akt/Akt、p-GSK-3β/GSK-3β表达均明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)。见表5、图3。

表3 固本解毒方含药血清对EMT相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Guben Jiedu prescription medicated serum on EMT related proteins ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	E-cadherin /GAPDH	N-cadherin /GAPDH	Vimentin /GAPDH
空白组		0.59±0.03	1.17±0.08	1.48±0.12
固本解毒方组	2.5	0.68±0.05	0.65±0.04 ¹⁾	1.14±0.10 ¹⁾
	5	0.77±0.04 ¹⁾	0.63±0.04 ¹⁾	0.86±0.07 ¹⁾
	10	0.92±0.06 ¹⁾	0.35±0.02 ¹⁾	0.46±0.03 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$ (表4同)

3.6 SC79和固本解毒方含药血清对A549细胞中EMT相关蛋白表达的影响 与空白组及SC79组比较,固本解毒方组(含药血清10%)N-cadherin、Vimentin蛋白表达显著降低($P < 0.01$),固本解毒方组(含药血清10%)E-cadherin蛋白表达明显升高

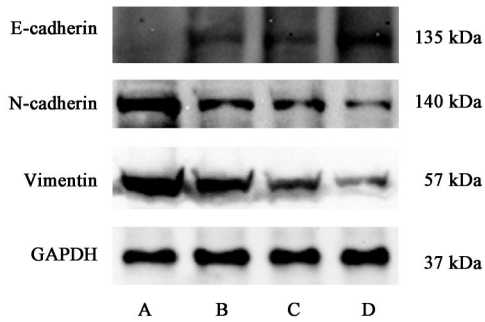


图2 各组A549细胞EMT相关蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of EMT related proteins in A549 cells

表4 固本解毒方含药血清对EMT相关mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Guben Jiedu prescription medicated serum on EMT related mRNA ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	N-cadherin	Vimentin
空白组		0.035±0.002	1.418±0.100
固本解毒方组	2.5	0.031±0.001 ¹⁾	1.201±0.015
	5	0.027±0.002 ¹⁾	1.217±0.004 ¹⁾
	10	0.024±0.001 ¹⁾	1.075±0.058 ¹⁾

($P<0.05, P<0.01$);与固本解毒方组(含药血清10%)比较,固本解毒方+SC79组N-cadherin、Vimentin蛋白表达显著升高($P<0.01$),固本解毒方+SC79组E-cadherin蛋白表达显著降低($P<0.01$),说明加入PI3K/Akt通路激活剂后,减弱了固本解毒方对EMT的抑制作用。见表6、图4。

3.7 SC79和固本解毒方含药血清对A549细胞中p-Akt、p-GSK-3 β 蛋白表达的影响

表5 固本解毒方含药血清对p-Akt、p-GSK-3 β 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Guben Jiedu prescription medicated serum on protein expressions of p-Akt、p-GSK-3 β ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	Akt /GAPDH	p-Akt /GAPDH	GSK-3 β /GAPDH	p-GSK-3 β /GAPDH	p-Akt /Akt	p-GSK-3 β /GSK-3 β
空白组		1.14±0.01	1.62±0.06	1.13±0.13	1.43±0.22	1.42±0.04	1.26±0.06
固本解毒方组	2.5	1.05±0.04	1.35±0.08 ²⁾	0.89±0.14	0.94±0.16 ²⁾	1.28±0.04 ¹⁾	1.06±0.03 ¹⁾
	5	1.10±0.01	1.29±0.08 ²⁾	1.21±0.12	0.67±0.13 ²⁾	1.18±0.08 ²⁾	0.55±0.07 ²⁾
	10	1.08±0.02	1.18±0.05 ²⁾	1.45±0.13	0.61±0.14 ²⁾	1.09±0.04 ²⁾	0.42±0.08 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05, ^2)$ $P<0.01$

表6 SC79对EMT相关蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of SC79 on EMT related proteins ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量	E-cadherin/GAPDH	N-cadherin/GAPDH	Vimentin/GAPDH
空白组		0.40±0.01	0.30±0.01	0.77±0.02
SC79组	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.15±0.01	0.34±0.01	0.90±0.02
固本解毒方组	10%	0.43±0.01 ^{1,3)}	0.22±0.01 ^{2,3)}	0.58±0.01 ^{2,3)}
固本解毒方+SC79组	10%+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.25±0.01 ⁴⁾	0.33±0.01 ⁴⁾	0.83±0.01 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05, ^2)$ $P<0.01$;与SC79组比较³⁾ $P<0.01$;与固本解毒方组比较⁴⁾ $P<0.01$ (表7同)

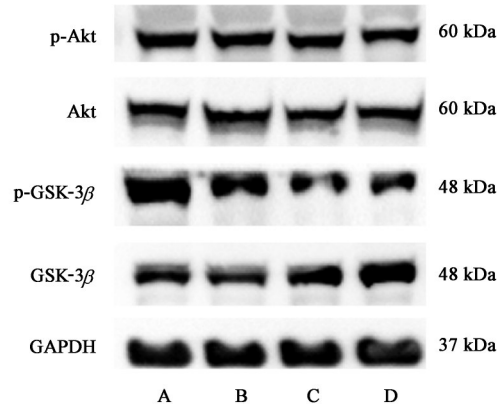
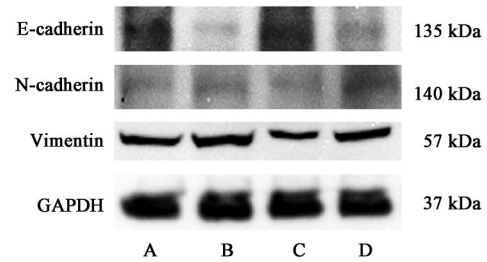


图3 各组A549细胞p-Akt、p-GSK-3 β 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of protein expressions of p-Akt、p-GSK-3 β in A549 cells



注:A.空白组;B.SC79组;C.固本解毒方组;D.固本解毒方+SC79组(图5同)

图4 各组A549细胞EMT相关蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of EMT related proteins in A549 cells

SC79组比较,固本解毒方组p-Akt、p-GSK-3 β 蛋白表达明显降低($P<0.05, P<0.01$),固本解毒方组p-Akt/Akt、p-GSK-3 β /GSK-3 β 表达显著降低($P<0.01$);与固本解毒方组比较,固本解毒方+SC79组

p-Akt、p-GSK-3 β 蛋白表达显著升高($P<0.01$),固本解毒方+SC79组 p-Akt/Akt、p-GSK-3 β /GSK-3 β 表达

显著升高($P<0.01$),提示 PI3K/Akt 通路是固本解毒方抑制 A549 细胞 EMT 的作用途径。见表 7、图 5。

表 7 SC79 对 p-Akt、p-GSK-3 β 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of SC79 on expression of p-Akt, p-GSK-3 β proteins ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量	Akt /GAPDH	p-Akt /GAPDH	GSK-3 β /GAPDH	p-GSK-3 β /GAPDH	p-Akt /Akt	p-GSK-3 β /GSK-3 β
空白组		0.76 \pm 0.06	0.71 \pm 0.06	0.83 \pm 0.05	0.54 \pm 0.03	0.94 \pm 0.02	0.66 \pm 0.04
SC79 组	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.84 \pm 0.04	0.93 \pm 0.01	0.77 \pm 0.05	0.94 \pm 0.03	1.11 \pm 0.04 ¹⁾	1.22 \pm 0.08 ¹⁾
固本解毒方组	10%	0.86 \pm 0.01	0.67 \pm 0.01 ^{1,3)}	0.99 \pm 0.06	0.18 \pm 0.01 ^{2,3)}	0.77 \pm 0.09 ^{2,3)}	0.18 \pm 0.01 ^{2,3)}
固本解毒方+SC79 组	10%+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.90 \pm 0.01	0.81 \pm 0.01 ⁴⁾	1.00 \pm 0.06	0.56 \pm 0.02 ⁴⁾	0.89 \pm 0.01 ⁴⁾	0.56 \pm 0.03 ⁴⁾

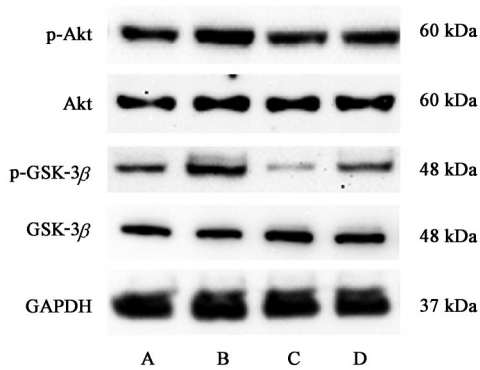


图 5 各组 A549 细胞 p-Akt、p-GSK-3 β 蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of protein expressions of p-Akt, p-GSK-3 β in A549 cells

4 讨论

肺癌是威胁人类生命的常见恶性肿瘤之一,发病率高,死亡率高。根据组织病理学特征,肺癌主要分为 NSCLC 和小细胞肺癌。NSCLC 占肺癌的 80%~85%。肺癌转移是临床患者治疗失败的主要原因。最常见的转移部位是脑、骨、淋巴结和肝脏^[12-13]。

《黄帝内经·素问·评热病论》所说:“邪之所凑,其气必虚”,肺癌的发生和正虚关系密切,外受毒邪,毒损肺络可谓肺癌形成的病理基础,同时也是导致病情演变的重要因素。全国名中医、中国科学院首席研究员朴炳奎教授认为肺癌病机为正虚为本,邪毒为标,其病位虽在肺,与脾、肾等诸脏器关系密切,因此,在治疗中以补肺为主,兼顾脾胃,同时祛瘀解毒散结,标本兼顾^[14-15]。固本解毒方中黄芪、太子参补肺脾气,当归、怀牛膝补血活血,北沙参、桔梗清肺化痰,白花蛇舌草、半枝莲、土茯苓抗癌清热解毒,补骨脂、续断、骨碎补肾阳,甘草调和诸药。全方配伍补中有行,补中有清,扶正为主,祛邪为辅,标本兼顾。

肺癌转移是在一系列复杂的细胞生物学过程

完成后形成的——统称为侵袭-转移级联反应,原发肿瘤细胞通过周围的细胞外基质(ECM)和基质细胞层局部侵袭;渗入血管腔;在脉管系统的运输中存活;避免失巢凋亡;在远处器官部位停滞;渗出到远处组织的实质中;在外来微环境中存活以形成微转移;以及在转移部位重新启动其增殖程序,从而产生肉眼可见的、临床上可检测到的肿瘤生长(该步骤通常称为“转移定植”)^[16]。

EMT 是肿瘤细胞侵袭转移的初始步骤,是上皮细胞转化为具有间质表型细胞的生物学过程^[17]。在此过程中,肿瘤细胞出现 E-cadherin 功能的丧失, N-cadherin、Vimentin 表达水平上调,EMT 相关转录因子碱性螺旋-环-螺旋转录因子 Twist、锌指蛋白 Snail 及 E 盒结合锌指蛋白 Zeb 家族的异常高表达,负调节 E-cadherin 转录促进 EMT 进而介导肿瘤细胞的侵袭转移^[18]。多项研究证实,靶向 EMT 过程可以抑制肿瘤转移^[19-20]。PI3K/Akt 通路是诱导 EMT 的常见信号传导通路之一。许多生长因子、细胞因子通过结合其同源受体酪氨酸激酶(RTK)、细胞因子受体或 G 蛋白偶联受体(GPCR),以及触发 PI3K 的活化来激活 Akt,被激活的 Akt 磷酸化下游 GSK-3 β 介导信号传递促进 EMT^[21-22]。

本研究结果显示,固本解毒方处理后,A549 细胞迁移能力下降,E-cadherin 蛋白表达升高, N-cadherin、Vimentin 蛋白表达降低,表明固本解毒方抑制 EMT 过程从而抑制肺癌细胞迁移。进一步探讨固本解毒方抑制 EMT 的作用机制,结果表明,固本解毒方处理后,A549 细胞 p-Akt/Akt、p-GSK-3 β /GSK-3 β 表达降低,且在固本解毒方(含药血清 10%)处理基础上,给予 A549 细胞 PI3K/Akt 通路激活剂 SC79 后,逆转了固本解毒方对 EMT 的作用,E-cadherin 蛋白表达降低, N-cadherin、Vimentin、p-Akt/Akt、p-GSK-3 β /GSK-3 β 表达升高,表明 PI3K/

Akt通路参与介导固本解毒方调控EMT抑制肺癌细胞转移的过程。

综上所述,固本解毒方可能通过抑制PI3K/Akt信号通路抑制EMT,从而抑制肺癌细胞转移。此外,转移前生态位(PMN)是EMT引发的肿瘤细胞存活和发育的先决条件,PMN始于转移前炎性或免疫微环境^[23]。因此,固本解毒方影响肿瘤转移前微环境的研究值得今后进一步探索。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] THE L. Lung cancer: Some progress, but still a lot more to do[J]. *Lancet*, 2019, 394(10212): 1880.

[2] TRAVIS W D, BRAMBILLA E, NICHOLSON A G, et al. The 2015 World health organization classification of lung tumors: Impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification [J]. *J Thorac Oncol*, 2015, 10(9): 1243-1260.

[3] DAVID E A, CLARK J M, COOKE D T, et al. The role of thoracic surgery in the therapeutic management of metastatic non-small cell lung cancer[J]. *J Thorac Oncol*, 2017, 12(11): 1636-1645.

[4] ETTINGER D S, WOOD D E, AISNER D L, et al. Non-small cell lung cancer, version 5.2017, NCCN clinical practice guidelines in oncology [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2017, 15(4): 504-535.

[5] ETTINGER D S, WOOD D E, AGGARWAL C, et al. NCCN guidelines insights: Non-small cell lung cancer, version 1.2020 [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2019, 17(12): 1464-1472.

[6] XIANG Y, GUO Z, ZHU P, et al. Traditional Chinese medicine as a cancer treatment: Modern perspectives of ancient but advanced science [J]. *Cancer Med*, 2019, 8(5): 1958-1975.

[7] LUO H, VONG C T, CHEN H, et al. Naturally occurring anti-cancer compounds: shining from Chinese herbal medicine [J]. *Chin Med*, 2019, doi: 10.1186/s13020-019-0270-9.

[8] 张曦文,朴炳奎,花宝金,等. 基于信息挖掘技术分析朴炳奎肺癌对症治疗用药与处方规律[J]. *世界中西医结合杂志*, 2020, 15(6): 1002-1008.

[9] 周雍明,朴炳奎,郑红刚,等. 肺瘤平膏及其拆方含药血清对人外周血树突状细胞迁移功能影响及机制研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(6): 152-155.

[10] 蒋士卿,孙宏新,朴炳奎. 益肺清化膏对荷瘤小鼠瘤

组织CD44、CD44v6、E-cad等mRNA表达水平的影响[J]. *中医学报*, 2010, 25(1): 17-20.

[11] NAIR A B, JACOB S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human [J]. *J Basic Clin Pharm*, 2016, 7(2): 27-31.

[12] TAMURA T, KURISHIMA K, NAKAZAWA K, et al. Specific organ metastases and survival in metastatic non-small-cell lung cancer [J]. *Mol Clin Oncol*, 2015, 3(1): 217-221.

[13] ZHOU Q, ZU L, LI L, et al. Screening and establishment of human lung cancer cell lines with organ-specific metastasis potential [J]. *Chin J Lung Cancer*, 2014, 17(3): 175-182.

[14] 郑红刚,花宝金,朴炳奎. 朴炳奎辨治肺癌学术思想与经验探析[J]. *中医杂志*, 2010, 51(4): 304-306.

[15] 李黎,周雍明,朴炳奎. 朴炳奎治疗恶性肿瘤“和其不和”学术思想探究[J]. *中国中医药图书情报杂志*, 2018, 42(3): 67-69.

[16] STEEG P S. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges [J]. *Nat Med*, 2006, 12(8): 895-904.

[17] LAMOUILLE S, XU J, DERYNCK R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(3): 178-196.

[18] MICALIZZI D S, FARABAUGH S M, FORD H L. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression [J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2010, 15(2): 117-134.

[19] 李龙妹,廖桂雅,吴万垠. 扶正抗癌方通过M2型巨噬细胞来源的外泌体途径抑制95D细胞转移的作用机制研究[J]. *中国中医药信息杂志*, 2021, 28(12): 50-55.

[20] 钟晓丹,文彬,孙海涛,等. 鳖甲煎丸通过NF- κ B信号通路抑制肝癌细胞上皮间质转化的作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(1): 24-32.

[21] ZHANG J, TIAN X J, XING J. Signal transduction pathways of EMT induced by TGF- β , SHH, and WNT and their crosstalks [J]. *J Clin Med*, 2016, 5(4): 41

[22] MANNING B D, TOKER A. Akt/PKB signaling: Navigating the Network [J]. *Cell*, 2017, 169(3): 381-405.

[23] BARCELLOS-HOFF M H, LYDEN D, WANG T C. The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(7): 511-518.

[责任编辑 张丰丰]