

· 药理 ·

## 肺岩宁方调控EMT逆转非小细胞肺癌顺铂耐药

夏尽力, 蔡玥娇, 吴新鸿, 王中奇, 邓海滨\*  
(上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032)

**[摘要]** 目的:观察肺岩宁方(肺岩宁)对非小细胞肺癌顺铂耐药的影响,并探究其可能存在的机制。方法:细胞增殖与活性检测(CCK-8)法观察顺铂(0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mg·L<sup>-1</sup>)对A549和A549/DDP(顺铂耐药)细胞增殖能力的影响,肺岩宁(0、100、200、300、400、500、600 mg·L<sup>-1</sup>)对A549/DDP细胞增殖能力影响;免疫荧光染色、蛋白免疫印迹法(WB)观察A549和A549/DDP组上皮间质转化(EMT)相关蛋白表达;将A549/DDP细胞分为空白组、肺岩宁组(200 mg·L<sup>-1</sup>)、顺铂组(6.0 mg·L<sup>-1</sup>)和联合用药组[肺岩宁(200 mg·L<sup>-1</sup>)+顺铂(6.0 mg·L<sup>-1</sup>)],并进行相应处理,侵袭小室(transwell)实验比较各组侵袭能力;WB检测各组EMT相关蛋白表达;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和免疫荧光染色分别检测各组耐药因子mRNA和蛋白表达。结果:与A549组比较,A549/DDP组对顺铂耐药性显著增高( $P<0.01$ );E-钙黏蛋白(E-cadherin)蛋白表达降低,波形蛋白(Vimentin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、锌指转录因子(Snail)蛋白表达升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。经肺岩宁、顺铂处理后,与空白组比较,肺岩宁可浓度依赖性抑制A549/DDP细胞增殖( $P<0.01$ );肺岩宁组、顺铂组、联合用药组侵袭能力降低( $P<0.01$ );与顺铂组比较,联合用药组侵袭能力显著降低( $P<0.01$ )。与空白组比较,肺岩宁组E-cadherin蛋白表达升高,N-cadherin、Vimentin、Snail蛋白表达降低( $P<0.01$ ),顺铂组E-cadherin、N-cadherin、Vimentin蛋白表达降低,Snail蛋白表达升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );联合用药组E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Snail蛋白表达降低( $P<0.01$ );与顺铂组比较,联合用药组E-cadherin蛋白表达升高,N-cadherin、Vimentin、Snail蛋白表达降低( $P<0.01$ )。与空白组比较,肺岩宁组肺耐药相关蛋白(LRP)、多药耐药因子1(MDR1)蛋白和mRNA表达降低,拓扑异构酶Ⅱα(TOPOⅡα)蛋白和mRNA表达升高( $P<0.01$ );顺铂组LRP、MDR1、TOPOⅡα蛋白和mRNA表达升高( $P<0.01$ );联合用药组LRP蛋白和mRNA表达无明显改变,MDR1、TOPOⅡα蛋白和mRNA表达升高( $P<0.01$ );与顺铂组比较,肺岩宁组、联合用药组LRP、MDR1蛋白和mRNA表达降低,TOPOⅡα蛋白和mRNA表达升高( $P<0.01$ );与肺岩宁组比较,联合用药组LRP、MDR1、TOPOⅡα蛋白和mRNA表达升高( $P<0.01$ )。结论:肺岩宁方能够逆转非小细胞肺癌顺铂耐药,其机制可能与调控EMT进程相关。

**[关键词]** 肺岩宁; 非小细胞肺癌; 耐药; 上皮间质转化; 顺铂

**[中图分类号]** R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)04-0043-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2022002024

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220817.1025.004.html>

**[网络出版日期]** 2022-08-17 16:16:25

## Chinese Herbal Medicine Feiyaning Prescription Regulates EMT to Reverse Cisplatin Resistance in Non-small Cell Lung Cancer

XIA Jinli, CAI Yuejiao, WU Xinhong, WANG Zhongqi, DENG Haibin\*

(Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of Feiyaning prescription (FYN) on cisplatin (DDP) resistance in non-small cell lung cancer (NSCLC) and explore the underlying mechanism. **Method:** Cell counting kit-8 (CCK-8) assay was used to detect the proliferation of A549 and A549/DDP (DDP-resistant) cells

**[收稿日期]** 2022-03-01

**[基金项目]** 上海市教育委员会科研创新计划重大项目(2017-01-07-00-10-E00064);上海市中医药领军人才培养计划项目(ZY(2018-2020)-RCPY-10010)

**[第一作者]** 夏尽力, 硕士, 从事中医及中西医结合治疗恶性肿瘤的临床及实验研究, E-mail: xiajinli@163.com

**[通信作者]** \* 邓海滨, 博士, 主任医师, 从事中医及中西医结合治疗恶性肿瘤的临床及实验研究, E-mail: 13661578200@139.com

treated by DDP (0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mg·L<sup>-1</sup>) and the proliferation of A549/DDP cells treated by FYN (0, 100, 200, 300, 400, 500, 600 mg·L<sup>-1</sup>). Based on immunofluorescence staining and Western blot (WB), the expression of epithelial mesenchymal transition (EMT)-related proteins in A549 and A549/DDP groups was observed. A549/DDP cells were classified into control group, FYN group (200 mg·L<sup>-1</sup>), DDP group (6.0 mg·L<sup>-1</sup>), and combination group [FYN (200 mg·L<sup>-1</sup>) + DDP (6.0 mg·L<sup>-1</sup>)] and respectively treated with corresponding drugs. Then, invasion ability of each group was examined by transwell assay, and the expression of EMT-related proteins in each group by WB. Moreover, real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and immunofluorescence staining were separately applied to detect the mRNA and protein expression of drug resistance-related factors in each group, respectively. **Result:** Compared with A549 group, A549/DDP group showed high resistance to DDP ( $P<0.01$ ), low expression of E-cadherin, and high protein expression of Vimentin, N-cadherin, and Snail ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). As compared with the control group, FYN inhibited the proliferation of A549/DDP cells in a concentration-dependent manner ( $P<0.01$ ), and the FYN group, DDP group, and combination group demonstrated low invasion ability ( $P<0.01$ ). In addition, the invasion ability in the combination group was particularly lower than that in the DDP group ( $P<0.01$ ). The expression of E-cadherin protein was higher and the protein expression of N-cadherin, Vimentin, and Snail was lower in the FYN group than in the control group ( $P<0.01$ ). The protein expression of E-cadherin, N-cadherin, and Vimentin was lower and the expression of Snail was higher in the DDP group than in the control group ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). The protein expression of E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, and Snail in the combination group decreased as compared with that in the control group ( $P<0.01$ ). Compared with the DDP alone, the combination raised the expression of E-cadherin and lowered the protein expression of N-cadherin, Vimentin, and Snail ( $P<0.01$ ). The protein and mRNA expression of lung resistance-related protein (LRP) and multidrug resistance 1 (MDR1) was lower and the protein and mRNA expression of topoisomerase II  $\alpha$  (TOPO II  $\alpha$ ) was higher in the FYN group than in the control group ( $P<0.01$ ). The protein and mRNA expression of LRP, MDR1, and TOPO II  $\alpha$  was higher in the DDP group than in the control group ( $P<0.01$ ). The expression of LRP protein and mRNA showed no significant variation, but the protein and mRNA expression of MDR1 and TOPO II  $\alpha$  increased in the combination group compared with those in the control group ( $P<0.01$ ). Compared with the DDP group, FYN group and combination group showed low protein and mRNA expression of LRP and MDR1 and high protein and mRNA expression of TOPO II  $\alpha$  ( $P<0.01$ ). Compared with FYN, the combination elevated the protein and mRNA expression of LRP, MDR1, and TOPO II  $\alpha$  ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** FYN prescription can reverse the DDP resistance of NSCLC by modulating EMT.

**[Keywords]** Feiyanning (FYN); non-small cell lung cancer (NSCLC); drug resistance; epithelial mesenchymal transition (EMT); cisplatin (DDP)

2020年,全球报告了近1 000万癌症死亡病例,其中180万例死于肺癌,在癌症死亡率中排名第一,远远超过其他类型的癌症。肺癌发病率与死亡率居我国首位,远高于其他类型癌症,极大威胁人类健康<sup>[1]</sup>。顺铂(DDP)是临床最常用的化疗药物之一,但耐药性的产生是其应用主要障碍<sup>[2]</sup>。DDP耐药机制复杂,包括药物外排增加、肿瘤干细胞持续存在、上皮间质转化(EMT)、肿瘤缺氧等<sup>[3-5]</sup>。近年来,EMT在肿瘤化疗耐药中的作用受到越来越多的关注<sup>[6]</sup>,EMT是一个上皮细胞获得间充质表型的基本形态发生过程,表现为上皮标志物E-钙黏蛋白

(E-cadherin)的丢失,以及间充质标志物波形蛋白(Vimentin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)和锌指转录因子(Snail)表达增加<sup>[7]</sup>。通过经历EMT,肿瘤细胞获得了更具迁移和侵袭的能力<sup>[8]</sup>,EMT是顺铂耐药原因之一<sup>[9]</sup>。肺耐药相关蛋白(LRP)表达增高能够阻止顺铂杀伤肿瘤细胞,通过检测LRP表达情况可预测非小细胞肺癌(NSCLC)的耐药性<sup>[10]</sup>,多药耐药1(MDR1)在NSCLC肿瘤组织中呈现高表达,其高表达是出现多药耐药情况的重要特征<sup>[11-12]</sup>,拓扑异构酶II(TOPO II)表达降低可出现在多种化疗药物耐药时,其表达降低可作为NSCLC多药耐药现象的

依据<sup>[13-14]</sup>。

肺岩宁方(肺岩宁)是上海市名中医徐振晔教授经过长期临床实践自拟的经验方,全方蕴含徐老治疗肿瘤“益气养精,解毒散结”思路,旨在防治非小细胞肺癌,已应用于临床20多年。前期临床研究表明,肺岩宁与化疗药联合使用,不仅可以减少化疗的不良反应,提高患者的生存质量,还可以延长患者生存期<sup>[15-16]</sup>。前期实验研究也证明,肺岩宁可以增加上皮标志物表达,降低间充质标志物表达<sup>[17]</sup>。因此,利用中药复方肺岩宁方部分恢复顺铂化疗的敏感性是一种很有前景的中医药肿瘤治疗策略。本研究拟证明A549/DDP顺铂耐药细胞发生EMT,推测EMT是A549/DDP细胞发生顺铂耐药的重要原因,以肺岩宁、顺铂为干预手段,观察肺岩宁、顺铂对EMT和耐药因子的影响,探讨肺岩宁方逆转非小细胞肺癌顺铂耐药可能作用机制,为肺岩宁方的临床应用提供一份理论支撑。

## 1 材料

**1.1 细胞** 人肺腺癌A549细胞购自中国科学院上海细胞库,目录号SCSP-503,人肺腺癌A549/DDP(顺铂耐药)细胞购自Procell生命科技有限公司(中国武汉),货号CL-0519,均传至第8代。

**1.2 药物** 肺岩宁由黄芪40 g、黄精30 g、灵芝30 g、山茱萸15 g、淫羊藿15 g、白术9 g、山慈菇15 g、石见穿30 g、重楼15 g、蜂房9 g、干蟾皮9 g组成,饮片均购自上海中医药大学附属龙华医院中药房(批号分别为91018、91067、95065、92067、93058、91025、91127、93047、91152、96040、96018),经上海市名中医徐振晔教授鉴定均为正品。按比例称取上述药材,浸泡30 min,用8倍体积的纯水煎煮1 h,去除不溶性成分和细菌,浓缩至含生药2.0 g·mL<sup>-1</sup>,低温保存备用。肺岩宁的主要成分还通过超高效液相色谱结合四极杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS)进行分析<sup>[18]</sup>。顺铂注射液:药物标准规格20 mg,由上海中医药大学附属龙华医院中心西药房采购于齐鲁制药有限公司,药品国药准字H20023461,批号1F0374B03,细胞实验过程中,用磷酸盐缓冲液(PBS)配制溶液,0.22 μm过滤器过滤除菌后使用。

**1.3 试剂** F-12K培养基(上海语纯生物科技有限公司,批号YC-3036);胎牛血清(FBS,上海达科为生物技术有限公司,批号6021031);胰蛋白酶、青霉素和链霉素(美国Gibco公司,批号分别为25200-056、15140-122);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒、

结晶紫染液(上海Beyotime公司,批号分别为C0039、C0121);E-cadherin、Vimentin、N-cadherin、锌指转录因子(Snail)、MDR1、TOPO II α、β-肌动蛋白(β-actin)抗体(美国CST公司,批号分别为3879、3195、13116、5741、13342、12286、8457);LRP抗体(美国Santa Cruz Biotechnology公司,批号sc-23916);mRNA提取试剂盒(美国Thermo Fisher Scientific公司,批号K157002);逆转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(中国艾克瑞生物公司,批号分别为AG11705、AG11701)。

**1.4 仪器** MCO-18AIC型CO<sub>2</sub>恒温培养箱(日本Sanyo公司);ECLIPSE C1型正置荧光显微镜、DS-U3型成像系统(日本尼康公司);infinite F200型多功能酶标仪(瑞士Tecan公司);Mini-PROTEAN® Tetra型电泳转印系统、734BR3604型蛋白显影仪、ABI 2720型基因扩增仪、ABI 7500型Real-time PCR仪(美国Bio-Rad公司)。

## 2 方法

**2.1 分组** 选用A549与A549/DDP(顺铂耐药)细胞,分为A549组与A549/DDP组;经肺岩宁、顺铂处理A549/DDP细胞,分为空白组、肺岩宁组(200 mg·L<sup>-1</sup>)、顺铂组(6 mg·L<sup>-1</sup>)、联合用药组(肺岩宁200 mg·L<sup>-1</sup>+顺铂6 mg·L<sup>-1</sup>)。

**2.2 细胞培养** A549细胞在加入10% FBS、1%青-链霉素的F-12K培养基培养,A549/DDP细胞在加入10% FBS、1%青-链霉素及2 mg·L<sup>-1</sup>顺铂的F-12K培养基培养,均放入37 °C、5% CO<sub>2</sub>的加湿培养箱中培养。

**2.3 CCK-8法检测细胞增殖** 将细胞A549和A549/DDP以4.0×10<sup>4</sup>个/孔接种在96孔板中,培养24 h。观察细胞是否已经贴壁,在细胞生长状态跟较好的条件下进行药物干预操作,用不同质量浓度顺铂(0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mg·L<sup>-1</sup>)处理A549细胞和A549/DDP细胞,用不同质量浓度肺岩宁(0、100、200、300、400、500、600 mg·L<sup>-1</sup>)处理A549/DDP细胞24、48、72 h。在不同时间点(24、48、72 h)评估细胞活力,用酶标仪在450检测每孔吸光度A,计算细胞存活率,细胞存活率=(A<sub>药物组</sub>-A<sub>溶剂组</sub>)/(A<sub>空白组</sub>-A<sub>溶剂组</sub>)×100%。

**2.4 Transwell侵袭实验** 将Matrigel胶置于4 °C冰箱过夜冻融,次日用无血清培养基稀释基质胶。稀释的基质胶均匀平铺于Transwell上室,基质胶凝固后取无血清培养基至于Transwell小室上室,放入培

养箱中水化基底膜30 min。取对数生长期的A549/DDP细胞,胰酶消化后,用无血清F-12K培养基混匀,将A549/DDP细胞以 $5 \times 10^4$ 个/孔的数量接种于对各组小室上室溶液中,干预24 h,洗板、固定、结晶紫染色,显微镜拍照。

**2.5 蛋白免疫印迹法检测蛋白表达** 使用RIPA裂解液提取总蛋白,并通过BCA测定试剂盒定量蛋白浓度。上样结束后开始电泳,电泳结束后湿转法转膜,5%脱脂牛奶封闭2 h,孵育一抗(1:1 000)后在4 °C冰箱过夜,洗膜后二抗(1:5 000)孵育1 h,根据说明书配制ECL工作液,打开成像仪,进行拍照和图像采集。

**2.6 免疫荧光检测蛋白表达** 4%多聚甲醛固定细胞,破膜工作液室温孵育20 min,磷酸盐缓冲液(PBS)洗3次,3% BSA室温封闭30 min,在细胞孔板里滴加一抗(1:1 500),细胞培养板平放于湿盒内4 °C孵育过夜,洗片后滴加二抗(1:5 000)孵育1 h,洗片后滴加DAPI染液,避光室温孵育10 min,玻片稍甩干后用抗荧光淬灭封片剂封片,玻片于荧光显微镜下观察并采集图像。

**2.7 Real-time PCR检测耐药因子mRNA表达水平** 提取总RNA,检测RNA纯度,将RNA逆转录成cDNA,反应条件:37 °C逆转录反应15 min,85 °C灭活逆转录酶5 s,取适量cDNA SYBER Green法进行PCR反应,反应条件:95 °C预变性30 s,1个循环;94 °C变性10 s,56 °C退火30 s,72 °C延伸30 s,共40个循环。以 $\beta$ -actin为内参分析基因的表达量,结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算mRNA相对表达,引物由铂尚生物技术(上海)有限公司设计合成,见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
LRP	TGAGGTGGAGGTGAAGAAGTT	21
	GGCTGTGTTGAAGAGGTTGAT	
MDR1	ACAGAGGGGATGGTCAGTGT	20
	TCACGGCCATAGCGAATGTT	
TOPO II $\alpha$	GGACCAACCTTCAACTATCTTCTT	24
	TCAACAGCTCCAATCTTCAAT	
$\beta$ -actin	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	23
	CTCCTTAATGTCACGCACGAT	

**2.8 统计学分析** 采用SPSS 25.0进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,独立样本t检验来确定组间的统计学意义,并使用单因素ANOVA分析多组间

比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对细胞增殖的影响** 顺铂干预A549、A549/DDP细胞后,在 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 顺铂干预24 h时,A549组、A549/DDP组细胞增殖抑制差异无统计学意义;其余相同时间和相同浓度下与A549组比较,顺铂对A549组增殖抑制作用更为明显,A549/DDP组对顺铂耐药性更高( $P < 0.01$ )。见表2。肺岩宁干预A549/DDP细胞后,与空白组比较,肺岩宁对A549/DDP细胞增殖抑制具有浓度和时间依赖关系( $P < 0.01$ )。见表3。根据CCK-8结果, $6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 顺铂和 $2.0 \times 10^2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 肺岩宁处理A549/DDP细胞48 h时增殖抑制率约为20%,对细胞增殖抑制作用较低,此浓度用于后续实验。

表2 顺铂对A549和A549/DDP细胞存活率的影响( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

Table 2 Effect of cisplatin on proliferation of A549 and A549/DDP cells ( $\bar{x} \pm s, n=9$ ) %

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h	48 h	72 h
空白组		100.00 $\pm$ 3.49	100.00 $\pm$ 0.81	100.00 $\pm$ 2.56
A549组	2.0	98.40 $\pm$ 2.31	88.82 $\pm$ 1.75	76.62 $\pm$ 5.05
	4.0	88.39 $\pm$ 2.21	61.20 $\pm$ 2.15	44.79 $\pm$ 4.80
	6.0	69.99 $\pm$ 2.40	26.90 $\pm$ 1.39	16.47 $\pm$ 1.78
	8.0	51.64 $\pm$ 2.11	15.17 $\pm$ 1.33	8.26 $\pm$ 0.52
	10.0	37.63 $\pm$ 0.52	11.12 $\pm$ 0.74	1.43 $\pm$ 1.87
空白组		100.00 $\pm$ 3.55	100.00 $\pm$ 0.77	100.00 $\pm$ 1.00
A549/DDP组	2.0	99.48 $\pm$ 1.56	97.75 $\pm$ 2.85 <sup>1)</sup>	92.12 $\pm$ 1.11 <sup>1)</sup>
	4.0	96.98 $\pm$ 1.63 <sup>1)</sup>	83.73 $\pm$ 1.42 <sup>1)</sup>	80.22 $\pm$ 1.82 <sup>1)</sup>
	6.0	96.12 $\pm$ 2.52 <sup>1)</sup>	78.54 $\pm$ 1.66 <sup>1)</sup>	78.52 $\pm$ 1.02 <sup>1)</sup>
	8.0	92.52 $\pm$ 1.66 <sup>1)</sup>	71.61 $\pm$ 3.75 <sup>1)</sup>	68.74 $\pm$ 0.86 <sup>1)</sup>
	10.0	91.63 $\pm$ 0.65 <sup>1)</sup>	58.98 $\pm$ 2.66 <sup>1)</sup>	53.26 $\pm$ 1.64 <sup>1)</sup>

注:与A549同质量浓度组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$

表3 肺岩宁对A549/DDP细胞存活率的影响( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

Table 3 Effect of Feiyaning on proliferation of A549/DDP cells ( $\bar{x} \pm s, n=9$ ) %

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h	48 h	72 h
空白组		100.00 $\pm$ 1.84	100.00 $\pm$ 0.57	100.00 $\pm$ 0.93
A549/DDP组	100	93.85 $\pm$ 0.14 <sup>1)</sup>	92.07 $\pm$ 1.92 <sup>1)</sup>	89.26 $\pm$ 2.42 <sup>1)</sup>
	200	80.77 $\pm$ 0.59 <sup>1)</sup>	79.14 $\pm$ 1.00 <sup>1)</sup>	77.48 $\pm$ 0.97 <sup>1)</sup>
	300	72.24 $\pm$ 1.56 <sup>1)</sup>	65.79 $\pm$ 0.03 <sup>1)</sup>	64.89 $\pm$ 1.16 <sup>1)</sup>
	400	63.29 $\pm$ 0.35 <sup>1)</sup>	56.87 $\pm$ 0.18 <sup>1)</sup>	51.52 $\pm$ 1.12 <sup>1)</sup>
	500	58.45 $\pm$ 0.56 <sup>1)</sup>	43.84 $\pm$ 0.50 <sup>1)</sup>	42.25 $\pm$ 0.38 <sup>1)</sup>
	600	50.96 $\pm$ 0.46 <sup>1)</sup>	33.72 $\pm$ 0.89 <sup>1)</sup>	26.67 $\pm$ 0.85 <sup>1)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$

**3.2 对细胞 EMT 的影响** 与 A549 组比较, A549/DDP 组 E-cadherin 蛋白表达降低, 是发生 EMT 标志, 见图 1。进一步验证发现, 与 A549 组比较, A549/DDP 组 E-cadherin 蛋白表达显著降低 ( $P <$

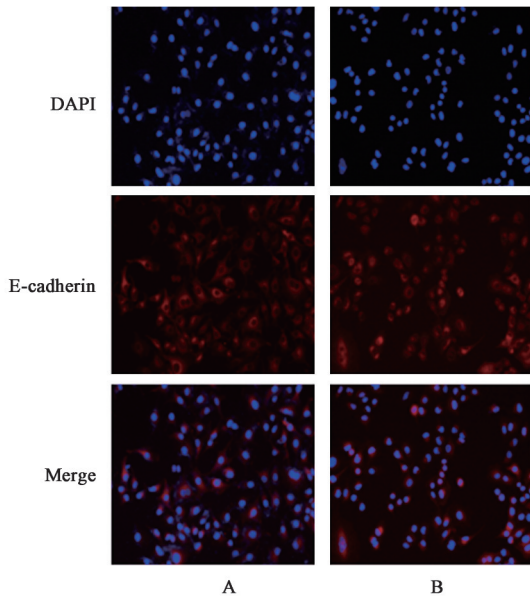
0.01), N-cadherin、Vimentin、Snail 蛋白表达明显升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 4、图 2。综上, 与 A549 组比较, A549/DDP 组发生 EMT, 推测 EMT 是 A549/DDP 细胞产生顺铂耐药的重要原因。

表 4 肺岩宁对细胞 EMT 相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of Feiyanning on EMT-related protein expression in cell ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	E-cadherin/ $\beta$ -actin	N-cadherin/ $\beta$ -actin	Vimentin/ $\beta$ -actin	Snail/ $\beta$ -actin
A549组	6.0	1.028 $\pm$ 0.032	0.719 $\pm$ 0.038	0.866 $\pm$ 0.063	0.731 $\pm$ 0.047
A549/DDP组	2.0 $\times$ 10 <sup>2</sup>	0.746 $\pm$ 0.035 <sup>2)</sup>	1.036 $\pm$ 0.021 <sup>2)</sup>	1.037 $\pm$ 0.069 <sup>1)</sup>	0.962 $\pm$ 0.02 <sup>2)</sup>

注: 与 A549 组比较 <sup>1)</sup> $P < 0.05, ^{2)}$  $P < 0.01$



注: A. A549 组; B. A549/DDP 组 (图 2 同)

图 1 肺岩宁对细胞 E-cadherin 蛋白表达的影响 (免疫荧光,  $\times 200$ )

Fig. 1 Effect of Feiyanning on E-cadherin in cell (immunofluorescence,  $\times 200$ )

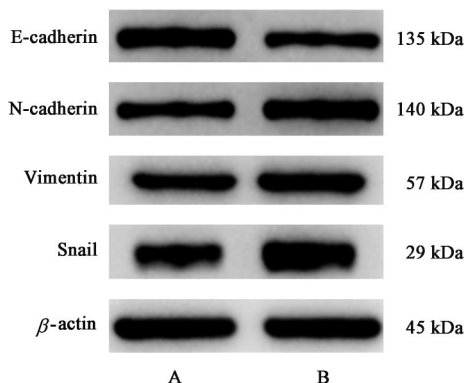
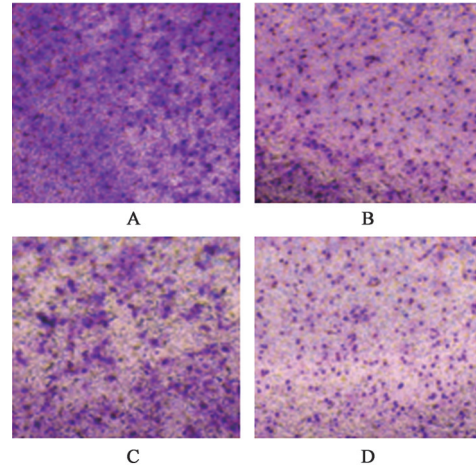


图 2 A549 与 A549/DDP 组 EMT 相关蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis in EMT-related protein expression between A549 and A549/DDP group

**3.3 肺岩宁方对 A549/DDP 细胞 EMT 进程影响** 与空白组比较, 肺岩宁组、顺铂组、联合用药组 A549/DDP 细胞侵袭能力显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与顺

铂组比较, 联合用药组 A549/DDP 细胞侵袭能力显著降低 ( $P < 0.01$ )。见图 3、表 5。与空白组比较, 肺岩宁组 E-cadherin 蛋白表达显著升高, N-cadherin、Vimentin、Snail 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.01$ ); 顺铂组 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 蛋白表达明显降低, Snail 蛋白表达明显升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 联合用药组 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Snail 蛋白表达降低 ( $P < 0.01$ ); 与顺铂组比较, 联合用药组 E-cadherin 蛋白表达升高, N-cadherin、Vimentin、Snail 蛋白表达降低 ( $P < 0.01$ )。见图 4、表 6。



注: A: 空白组; B: 肺岩宁组; C: 顺铂组; D: 联合用药组 (图 4-图 7 同)

图 3 肺岩宁、顺铂对 A549/DDP 细胞侵袭能力影响 (结晶紫,  $\times 200$ )

Fig. 3 Effect of Feiyanning and DDP on invasion ability of A549/DDP cells (crystal violet,  $\times 200$ )

**3.4 肺岩宁方对 A549/DDP 细胞耐药因子表达影响** 免疫荧光染色结果显示, 与空白组比较, 肺岩宁组 LRP、MDR1 蛋白表达降低; 顺铂组 LRP、MDR1 蛋白表达升高; 联合用药组 LRP 蛋白表达无明显改变, MDR1 蛋白表达升高; 肺岩宁组、顺铂组、联合用药组 TOPO II  $\alpha$  蛋白表达升高; 与顺铂组比较, 联合用药组 LRP、MDR1 蛋白表达明显降低,

表5 肺岩宁、顺铂对A549/DDP细胞侵袭能力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 5 Comparison of invasive ability of A549/DDP cells in each group after medication ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	细胞侵袭率/%
空白组		100.00±1.31
肺岩宁组	200	61.81±0.98 <sup>1)</sup>
顺铂组	6.0	74.01±1.70 <sup>1)</sup>
联合用药组	200+6.0	50.04±2.27 <sup>1,2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>P<0.01;与顺铂组比较<sup>2)</sup>P<0.01

TOPO II α蛋白表达明显升高。见图5-图7。PCR结果显示,与空白组比较,肺岩宁组LRP、MDR1 mRNA表达显著降低,TOPO II α mRNA表达显著升高(P<0.01),顺铂组LRP、MDR1、TOPO II α mRNA表达显著升高(P<0.01),联合用药组LRP mRNA表达无明显改变,MDR1、TOPO II α mRNA表达显著升高(P<0.01);与肺岩宁组比较,顺铂组LRP、MDR1 mRNA表达升高,TOPO II α mRNA表达降低(P<0.01);联合用药组LRP、MDR1、TOPO II α mRNA表达显著升高(P<0.01);与顺铂组比较,

表6 肺岩宁、顺铂对A549/DDP细胞EMT相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 6 Effect of Feiyanning and DDP on EMT related protein expression of A549/DDP cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	E-cadherin/β-actin	N-cadherin/β-actin	Vimentin/β-actin	Snail/β-actin
空白组		0.883±0.032	1.077±0.030	0.853±0.029	0.875±0.027
肺岩宁组	200	1.129±0.006 <sup>2)</sup>	0.665±0.006 <sup>2)</sup>	0.696±0.002 <sup>2)</sup>	0.530±0.068 <sup>2)</sup>
顺铂组	6.0	0.500±0.023 <sup>2)</sup>	0.791±0.021 <sup>2)</sup>	0.782±0.017 <sup>1)</sup>	0.968±0.023 <sup>1)</sup>
联合用药组	200+6.0	0.740±0.017 <sup>2,3)</sup>	0.599±0.061 <sup>2,3)</sup>	0.565±0.024 <sup>2,3)</sup>	0.621±0.051 <sup>2,3)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>P<0.05,<sup>2)</sup>P<0.01;与顺铂组比较<sup>3)</sup>P<0.01

表7 肺岩宁、顺铂对A549/DDP细胞耐药因子mRNA表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 7 Effect of Feiyanning and DDP on mRNA expression levels of drug resistance factors in A549/DDP cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	LRP	MDR1	TOPO II α
空白组		0.80±0.18	0.90±0.12	0.99±0.06
肺岩宁组	200	0.30±0.02 <sup>1)</sup>	0.55±0.07 <sup>1)</sup>	2.33±0.09 <sup>1)</sup>
顺铂组	6.0	1.37±0.04 <sup>1,2)</sup>	1.64±0.12 <sup>1,2)</sup>	1.37±0.10 <sup>1,2)</sup>
联合用药组	200+6.0	0.89±0.13 <sup>2,3)</sup>	1.24±0.08 <sup>1,2,3)</sup>	2.69±0.09 <sup>1,2,3)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>P<0.01;与肺岩宁组比较<sup>2)</sup>P<0.01;与顺铂组比较<sup>3)</sup>P<0.01

#### 4 讨论

传统的化疗药物与现今的分子靶向药物都极大的提高了肿瘤治疗率,但无论是哪种治疗方法,经过数个疗程的进一步治疗,都可能产生疗效逐渐降低和治疗不敏感的现象。获得性肿瘤耐药依然是肿瘤

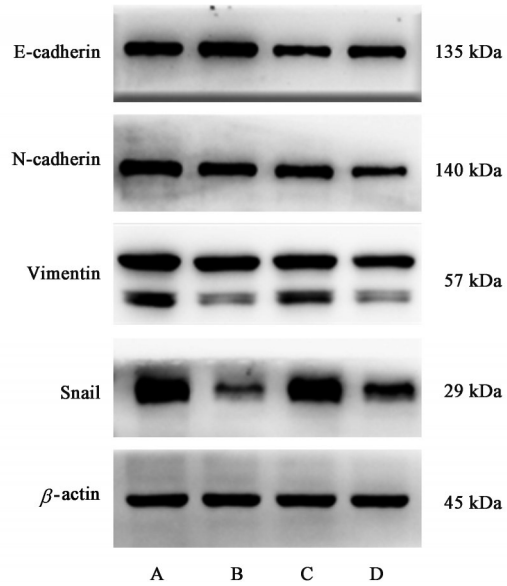


图4 肺岩宁、顺铂对A549/DDP细胞EMT相关蛋白电泳

Fig. 4 Electrophoresis of Feiyanning and DDP on expression of EMT-related protein in A549/DDP cells

联合用药组LRP、MDR1 mRNA表达显著降低,TOPO II α mRNA表达升高(P<0.01)。见表7。

治疗的重大难题,寻求全新治疗手段或克服药物耐药性是肿瘤治疗领域需解决的关键问题之一<sup>[19]</sup>。

肺岩宁方具有益气养精、解毒散结作用,前期实验证明,肺岩宁方治疗肺癌具有提高患者免疫力,改善患者生活质量和临床症状,延长患者中位生存期等临床疗效<sup>[20-22]</sup>。生黄芪为补气要药,具有补气升阳、生津养血作用,与补气健脾的白术合用,共补肺脾肾之虚,黄芪多糖作为黄芪主要成分之一,药理研究证明能够下调MDR1、LRP表达,逆转非小细胞肺癌顺铂耐药<sup>[23]</sup>。黄精滋补肺脾肾之阴,与山茱萸、淫羊藿同用,寓“阴中求阳、阳中求阴”之义,阴阳并补,黄精多糖作为黄精的主要成分,药理研究证明具有增强机体的免疫功能,抗肿瘤作用<sup>[24]</sup>。灵芝具有补气安神,止咳平喘作用,研究证明从灵芝中分离出的灵芝三萜能够抑制多药耐药蛋白转运功能,逆转肿瘤多药耐药作用<sup>[25]</sup>。山慈

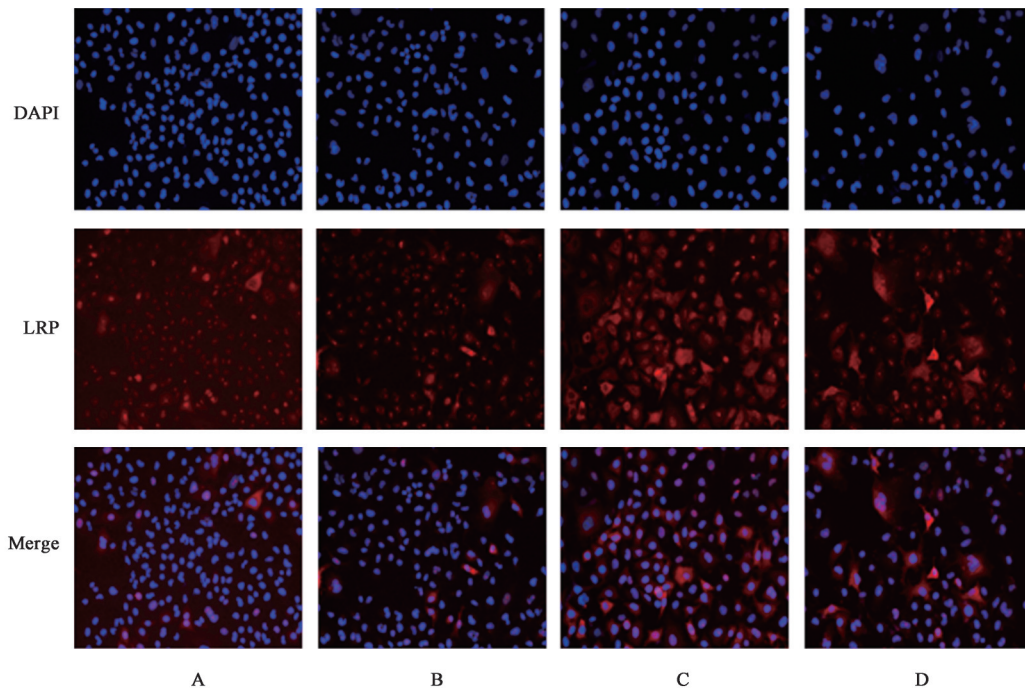


图5 肺岩宁、顺铂对A549/DDP细胞LRP蛋白表达的影响(免疫荧光,×200)

Fig. 5 Effect of Feiyanning and DDP on LRP in A549/DDP cells (immunofluorescence, ×200)

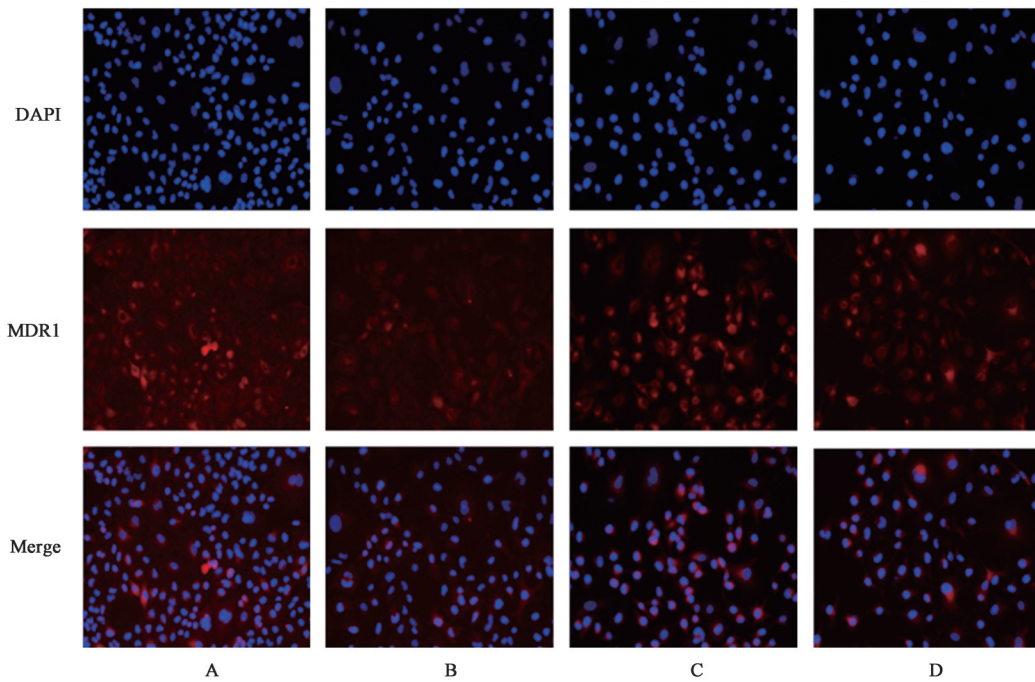


图6 肺岩宁、顺铂对A549/DDP细胞MDR1的影响(免疫荧光,×200)

Fig. 6 Effect of Feiyanning and DDP on MDR1 in A549/DDP cells (immunofluorescence, ×200)

菇、石见穿、蜂房、重楼、干蟾皮清热解毒、攻毒消肿、散结抗癌,均为临床抗肿瘤常用中药。综上所述,肺岩宁方具有增强机体免疫功能,抗肿瘤,逆转化疗药物耐药作用。

EMT与肿瘤获得性耐药之间的关系虽然被研究了很久,但其具体的机制仍不清楚,其可能与促进肿瘤干细胞生成,下调药物诱导的癌细胞凋亡等

有关<sup>[26-27]</sup>。近年越来越多的研究证明,顺铂、紫杉醇等耐药细胞中大多会发生EMT改变<sup>[28-29]</sup>,与上皮细胞相比,间充质细胞往往对多种抗癌药物具备更强的耐药性<sup>[30]</sup>,获得性耐药与EMT相关性极大,通过调控EMT进程能够部分逆转癌细胞耐药性<sup>[31]</sup>。

本研究发现与A549亲本细胞比较,A549/DDP顺铂耐药细胞对顺铂耐药性更高并且发生EMT,推

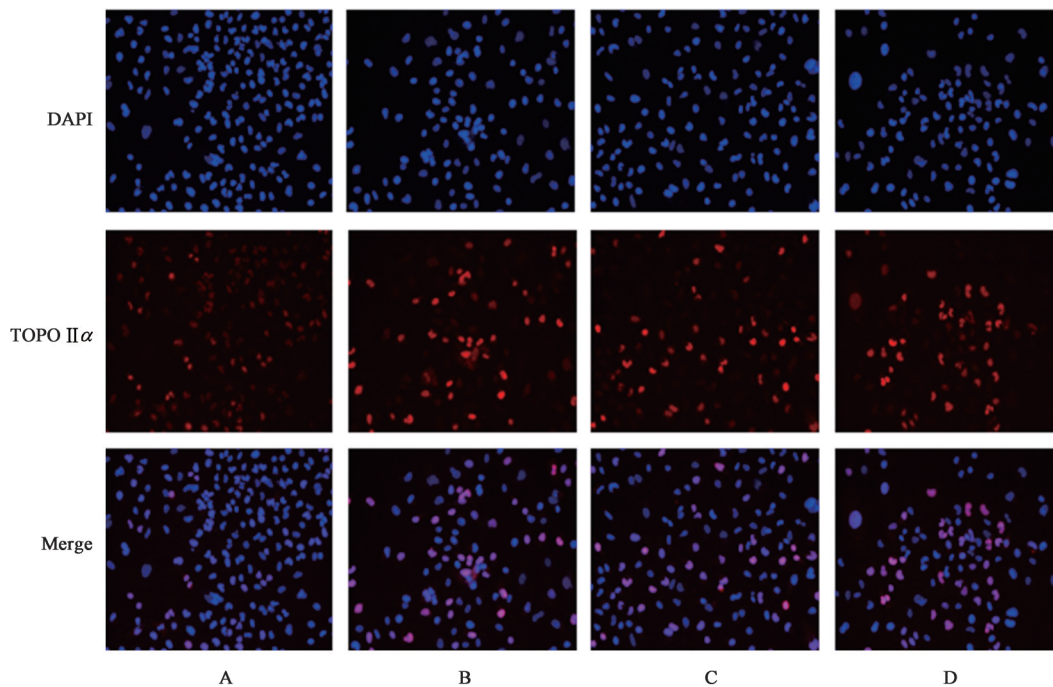


图7 肺岩宁、顺铂对A549/DDP细胞TOPO II $\alpha$ 的影响(免疫荧光,  $\times 200$ )

Fig. 7 Effect of Feiyanning and DDP on TOPO II $\alpha$  in A549/DDP cells (immunofluorescence,  $\times 200$ )

测EMT是导致A549/DDP细胞产生顺铂耐药的重要原因。后续发现肺岩宁方联合顺铂抑制A549/DDP细胞侵袭能力更佳,说明肺岩宁方有增强顺铂疗效作用。肺岩宁方上调A549/DDP细胞E-cadherin蛋白表达,下调N-cadherin、Vimentin、Snai蛋白表达,提示肺岩宁方能够调控EMT进程;顺铂下调E-cadherin蛋白表达,上调Snai蛋白表达,提示顺铂干预有推动EMT进程作用。经顺铂干预后A549/DDP细胞LRP、MDR1表达上调,TOPO II $\alpha$ 表达下调,说明顺铂的持续使用会诱导A549/DDP细胞顺铂获得性耐药进一步发展,肺岩宁方干预后发现A549/DDP细胞中LRP、MDR1表达下调,TOPO II $\alpha$ 表达上调,证明肺岩宁方能够改善A549/DDP细胞顺铂耐药情况;肺岩宁与顺铂联合用药能够逆转因顺铂持续使用导致的获得性耐药。

综上所述,肺岩宁方能够调控EMT,逆转A549/DDP细胞顺铂耐药,与顺铂联合应用调控EMT进程,逆转顺铂持续使用导致的A549/DDP细胞获得性耐药进一步发展,提示肺岩宁方逆转NSCLC顺铂耐药作用可能与调控EMT进程有关,为肺岩宁方临床应用增添一份理论支撑。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] REBECCA L S, KIMBERLY M D, AHMEDIN J.

Cancer statistics, 2020[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(1): 7-30.

[2] MAKOVEC T. Cisplatin and beyond: Molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy[J]. Radiol oncol, 2019, 53(2): 148-158.

[3] MONISH R M, ALOK R, VANI T, et al. Cancer stem cells: Road to therapeutic resistance and strategies to overcome resistance[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2020, 18(66): 33-39.

[4] BOWEN D, SUP S J. Targeting epithelial-mesenchymal transition (EMT) to overcome drug resistance in cancer[J]. Molecules, 2016, 21(7): 960-965.

[5] DEVARAJAN N, MANJUNATHAN R, GANESAN S K. Tumor hypoxia: The major culprit behind cisplatin resistance in cancer patients[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2021, 162: 103327.

[6] ASHRAFIZADEH M, MIRZAEI S, HASHEMI F, et al. New insight towards development of paclitaxel and docetaxel resistance in cancer cells: EMT as a novel molecular mechanism and therapeutic possibilities[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 141: 111824.

[7] WANG Y F, DONG C F, ZHOU B H. Metabolic reprogram associated with epithelial-mesenchymal transition in tumor progression and metastasis[J]. Genes Dis, 2020, 7(2): 172-184.

[8] WU Y P, LIN L J, WANG X, et al. Over expression

- of Krüppel-like factor 4 suppresses migration and invasion of non-small cell lung cancer through c-Jun-NH2-terminal kinase/epithelial-mesenchymal transition signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10(1): 151-152.
- [9] JIANG G B, FANG H Y, TAO D Y, et al. COX-2 potentiates cisplatin resistance of non-small cell lung cancer cells by promoting emt in an Akt signaling pathway-dependent manner [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(9): 3838-3846.
- [10] BERGER W, ELBLING L, MICKSCHE M. Expression of the major vault protein LRP in human non-small-cell lung cancer cells: Activation by shortterm exposure to antineoplastic drugs [J]. *Int J Cancer*, 2000, 88(2): 293-300.
- [11] ZAWADZKA I, JELEŃ A, PIETRZAK J, et al. The impact of ABCB1 gene polymorphism and its expression on non-small-cell lung cancer development, progression and therapy - preliminary report [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 61-88.
- [12] SUN Y, ZHANG J, ZHOU J, et al. Synergistic effect of cucurbitacin B in combination with curcumin via enhancing apoptosis induction and reversing multidrug resistance in human hepatoma cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 76(8): 28-40.
- [13] 王煜霞, 王雷, 常海敏. Topo- II 蛋白与 p53 蛋白在非小细胞肺癌耐药性中的表达 [J]. *新乡医学院学报*, 2012, 29(01): 36-39.
- [14] 郭亚楠, 蒋兵, 郭红云, 等. 非小细胞肺癌耐药机制及其逆转耐药的研究进展 [J]. *甘肃医药*, 2020, 39(10): 871-875.
- [15] GONG Y B, XU Z Y, JIN C J, et al. Treatment of advanced non-small-cell lung cancer with Qi-nourishing essence-replenishing chinese herbal medicine combined with chemotherapy [J]. *Biol Proced Online*, 2018, 20(1): 74-79.
- [16] XU Z Y, JIN C J, ZHOU C C, et al. Treatment of advanced non-small-cell lung cancer with Chinese herbal medicine by stages combined with chemotherapy [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137(7): 1117-1122.
- [17] ZHAO X Z, WU Z H, XU Z Y, et al. Effects of Feiyanning on the expression of epithelial-mesenchymal factors in highly metastatic lung cancer cells 95-D [J]. *Chin J Lung Cancer*, 2011, 14(6): 467-471.
- [18] ZHENG Z, MA Y, WANG L F, et al. Chinese herbal medicine Feiyanning cooperates with cisplatin to enhance cytotoxicity to non-small-cell lung cancer by inhibiting protective autophagy [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 27(6): 11419-11426.
- [19] 李冬云, 许晶, 侯丽等. 中医药抗肿瘤多药耐药领域的守正创新研究 [J]. *医学研究杂志*, 2021, 50(11): 1-4, 15.
- [20] 张铭, 徐振晔, 姜唯洁. 肺岩宁方对晚期非小细胞肺癌患者血清调节性 T 细胞 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 的影响 [J]. *辽宁中医杂志*, 2006, 33(8): 916-917.
- [21] 张铭, 项怡, 徐振晔. 益气养精法结合化疗治疗中晚期老年非小细胞肺癌的临床疗效观察及生存期影响因素分析 [J]. *上海中医药杂志*, 2013, 47(1): 35-38.
- [22] 殷红梅, 王磊, 龚伟珏, 等. 中药肺岩宁颗粒调节晚期肺癌患者 Th17/Treg 失衡的作用 [J]. *中医药导报*, 2017, 23(1): 34-38.
- [23] 张颖, 王淳, 于丹, 等. 黄芪多糖抑制肺腺癌 A549/DDP 细胞移植瘤裸鼠 EMT 改善顺铂耐药的机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(6): 79-85.
- [24] 周忠光, 宫铭海, 王晓慧, 等. 黄精多糖药理作用及机制研究进展 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2021, 23(12): 1-4.
- [25] 梁慧超, 唐晖, 魏莲. 灵芝三萜对卵巢癌多耐药蛋白表达的影响 [J]. *广东医学*, 2013, 34(12): 1829-1831.
- [26] SHIBUE T, WEINBERG R A. EMT, CSCs and drug resistance, the mechanistic link and clinical implications [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14(10): 611-629.
- [27] URAMOTO H, IWATA T, ONITSUKA T, et al. Epithelial-mesenchymal transition in EGFR-TKI acquired resistant lung adenocarcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(7): 2513-2517.
- [28] 王红艳, 张雅洁. 顺铂间歇性干预对 A549 中干细胞及 EMT 相关基因表达的影响 [J]. *现代肿瘤医学*, 2015, 23(2): 162-165.
- [29] 冯征, 祖超, 张天翼, 等. EMT 参与人非小细胞肺癌 A549 细胞多西紫杉醇耐药性的发生 [J]. *现代肿瘤医学*, 2015, 23(23): 3371-3376.
- [30] CATHERINE W, KATRINA N, DAISY B et al. Overcoming EMT-associated resistance to anti-cancer drugs via Src/FAK pathway inhibition [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(17): 7328-7341.
- [31] 陆怡, 张鑫杰, 张闰哲, 等. 姜黄素体内外逆转结肠癌的 5-氟尿嘧啶耐药研究及机制探讨 [J]. *中国现代应用药学*, 2020, 37(15): 1793-1800.

[责任编辑 张丰丰]