

益气通络解毒方和吉非替尼含药血清 对 H1975 细胞增殖和凋亡的影响

马峰, 李平*, 张梅, 孙鑫, 苏丽

(安徽医科大学附属省立医院中西医结合肿瘤科, 合肥 230001)

[摘要] **目的:**探讨不同剂量益气通络解毒方联合吉非替尼(gefitinib)含药血清对人非小细胞肺癌 H1975 细胞株的增殖抑制和凋亡作用。**方法:**应用中药血清药理学方法制备益气通络解毒方低、中、高剂量(15.75, 31.5, 63 g·kg⁻¹)及益气通络解毒方低、中、高剂量(15.75, 31.5, 63 g·kg⁻¹)联合吉 gefitinib(22.5 mg·kg⁻¹); gefitinib(22.5 mg·kg⁻¹), 0.9% 氯化钠溶液(NS)含药血清; H1975 细胞 6 × 10⁴/mL 单细胞悬液每孔 100 μL 接种于 96 孔板; H1975 细胞 1 × 10⁵/mL 单细胞悬液每孔 2 mL 分别接种于 6 孔板及 6 孔板内盖玻片上, 细胞贴壁后加入含有 10% 上述含药血清的 RPMI-1640 培养液分别干预 24, 48, 72 h, CCK-8 法检测各组含药血清作用不同时间后对细胞增殖的影响; 流式细胞仪检测各组含药血清作用不同时间后对细胞凋亡的影响; 免疫组化法检测不同时间凋亡细胞半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)的表达。**结果:**除 NS 组外, 各组含药血清对 H1975 细胞均有抑制增殖作用, 益气通络解毒方高剂量含药血清作用 72 h 抑制率为 23.81%, 益气通络解毒方高剂量联合 gefitinib 含药血清抑制率最高为 42.86%; 与 NS 对照组比较, 各组含药血清对 H1975 细胞均有诱导其凋亡作用, 益气通络解毒方高剂量及其联合 gefitinib 含药血清作用 72 h, H1975 细胞凋亡率分别为 10.29%, 25.77%; 凋亡蛋白 Caspase-3 表达与药物剂量、作用时间呈正相关, 益气通络解毒方高剂量联合 gefitinib 含药血清的作用最强。**结论:**益气通络解毒方联合 gefitinib 可有效的抑制肺腺癌 H1975 细胞增殖并诱导其凋亡, 增加 Caspase-3 蛋白表达可能是其促进 H1975 细胞凋亡的机制之一。

[关键词] 益气通络解毒方; 吉非替尼; 含药血清; H1975 细胞; 增殖; 凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)07-0156-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfix.2014070156

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfix.000017.html>

[网络出版时间] 2014-01-21 9:15

Effect of Yiqi Tongluo Jiedu Recipe and Gefitinib Medicated Serum on Proliferation and Apoptosis of Lung Cancer H1975 Cells *in vitro*

MA Feng, LI Ping*, ZHANG Mei, SUN Xin, SU Li

(Department of Chinese Medicine Tumor, the Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001, China)

[Abstract] **Objective:** To discuss the influence of serum containing Yiqi Tongluo Jiedu recipe and gefitinib on proliferation and apoptosis of lung cancer H1975 cells *in vitro*. **Method:** The medicated serum was prepared by the serum pharmacology method and divided into the low, medium, and high dose Yiqi Tongluo Jiedu recipe groups (15.75, 31.5, 63 g·kg⁻¹), the gefitinib group (22.5 mg·kg⁻¹), the gefitinib (22.5 mg·kg⁻¹) combined with low, medium, and high dose Yiqi Tongluo Jiedu recipe groups, and 0.9% NaCl solution group. 6 × 10⁴/mL the single cell suspension was planted into 96-well microplates, 100 μL/well, 1 × 10⁵/mL the single cell suspension was added to 6-well microplates and cover glasses in 6-well microplates, 2 mL/well. RPMI-

[收稿日期] 20130910(009)

[基金项目] 国家中医药管理局中医肿瘤病学重点学科项目(国中医药发[2009]30号)

[第一作者] 马峰, 硕士, 主治医师, 从事中西医结合治疗老年恶性肿瘤的研究, Tel: 0551-62283003, E-mail: mafeng2000@sina.cn

[通讯作者] *李平, 博士, 主任医师, 从事中西医结合治疗老年恶性肿瘤的研究, Tel: 0551-62283003, E-mail: liping64@sina.com

1640 culture solution containing 10% the medicated serum was added to each well for 24, 48, 72 h behind cell adherent. The proliferation of H1975 cells was measured by CCK-8 method. The cell apoptosis was measured by flow cytometry (FCM) and Annexin V-FITC/PI. Immunohistochemistry was used to measure the expression levels of Caspase-3. **Result:** The inhibition effects of different dose of the medicated serum on lung cancer H1975 cells was found. The inhibiting rate was 23.81% and 42.86% in high dose Yiqi Tongluo Jiedu recipe and high dose Yiqi Tongluo Jiedu recipe combined with gefitinib at 72 h. The inhibitory effect was increased with the increased drug doses. Compared with NS group, each group containing drug serum could induce apoptosis of H1975 cells. The apoptosis rate was 10.29%, 25.77% in high dose Yiqi Tongluo Jiedu recipe and high dose Yiqi Tongluo Jiedu recipe combined with gefitinib at 72 h. The apoptosis protein Caspase-3 expression was positively correlated with drug dose and action time, the high dose Yiqi Tongluo Jiedu recipe combined with gefitinib was the strongest. **Conclusion:** Yiqi Tongluo Jiedu recipe can inhibit proliferation and induce apoptosis of H1975 cells. The promotion of Caspase-3 protein expression may be one of the mechanisms of inducing apoptosis of H1975 cells.

[**Key words**] Yiqi Tongluo Jiedu recipe; gefitinib; medicated serum; lung cancer H1975 cell lines; proliferation; apoptosis

肺癌是我国发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一,其中非小细胞肺癌(NSCLC)占有肺癌病例的80%~85%^[1]。近年来抑制表皮生长因子受体(EGFR)酪氨酸激酶(TK)区的小分子药物吉非替尼(gefitinib)已成为治疗 NSCLC 的常用药物,但是临床上患者最终都会产生对 gefitinib 耐药,如何能增强 gefitinib 的抗肿瘤效果并延缓耐药发生时间是目前研究的热点。我院中医肿瘤科采用益气通络解毒方联合 gefitinib 治疗晚期 NSCLC,取得了增效减毒及延缓耐药发生时间的良好效果。本研究采用传统血清药理学方法,进一步探讨益气通络解毒方单独和联合 gefitinib 在体外对人肺腺癌 H1975 细胞的增殖抑制作用及诱导其凋亡的作用机制。

1 材料

1.1 药物 益气通络解毒方(YQTLJD,黄芪、白术、茯苓、鸡内金、蜈蚣、全蝎、老鹳草等),生药由安徽省立医院药剂科提供并进行品种鉴定,gefitinib 片(批号 1205013,英国阿斯利康公司惠赠)。

1.2 试剂 RPMI-1640 培养液(Hyclone,美国,批号 NYC0819);胎牛血清(杭州四季青生物制品有限公司,批号 121214);胰消化酶(碧云天生物技术研究,编号 C0201);DMSO(Sigma,批号 2012110 3663);CCK-8(批号 BB130041)及 AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(批号 BB130042)均购于 Bestbio 公司。

1.3 动物与细胞株 健康雄性 SD 大鼠,SPF 级,质量(200±20)g,购自安徽医科大学实验动物中心,许可证号 SCXK(皖)2011-002。人肺腺癌 H1975 细胞株,由北京生命科学研究陈良实验室惠赠。

1.4 仪器 SW-CJ-1FD 型超净工作台(苏州净化设备有限公司);CO₂ 培养箱(HERA cell 150,美国);倒置显微镜(Olympus,日本);ELx800 型酶标仪(Bio Tek 公司);Epics XL 型流式细胞仪(Beckman Coulter)。

2 方法

2.1 含药血清的制备^[2] 大鼠 24 只,随机分为 8 组,分别为 NS 对照组、中药低、中、高剂量组,gefitinib 组、中药低、中、高剂量联合 gefitinib 组,每组 3 只。中药低、中、高剂量依次为 15.75,31.5,63 g·kg⁻¹(70 kg 成人临床用量的 1,2,4 倍,根据“种属间等效剂量的折算表^[3]”计算),水煎浓缩至含生药 0.79,1.58,3.16 g·mL⁻¹的药液 ig,每次 2 mL,每日 2 次;gefitinib 用量为 22.5 mg·kg⁻¹(与 70 kg 成人临床用量的 1 倍等效)ig;每日 1 次;对照组给予 NS,每次 2 mL,每日 2 次。各组连续用药 5 d,末次给药后 2 h,10%水合氯醛 ip 麻醉,无菌条件下腹主动脉取血,4℃静置 3 h,3 000 r·min⁻¹×20 min 分离血清,同组血清合并,56℃水浴灭活 30 min 后 0.22 μm 针头过滤器过滤除菌,1 mL 无菌 EP 管分装,-20℃保存备用。

2.2 细胞培养液的配制 配制含 10%胎牛血清、10%中药低、中、高剂量,gefitinib,中药联合 gefitinib,NS 血清的 RPMI-1640 完全培养液,4℃冰箱保存备用。

2.3 细胞培养 常规复苏 H1975 细胞,接种于含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中,置于饱和湿度 37℃5%CO₂ 培养箱中培养,每 2~3 d 换液 1 次,待细胞贴壁生长达瓶底的 80%~90%时,常规

消化、传代或冻存。

2.4 检测中药单独及联合 gefitinib 对 H1975 细胞增殖抑制作用 取对数生长期细胞,调整细胞密度为 $6 \times 10^4/\text{mL}$,以每孔 $100 \mu\text{L}$ 的细胞悬液接种于 96 孔板中,共 8 组,每组 5 个复孔,置于 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中孵育 24 h,细胞贴壁后吸除原培养液,依次加入含有上述各组含药血清的 RPMI-1640 培养液,每孔 $100 \mu\text{L}$,置于 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中分别孵育 24, 48, 72 h,每孔加入 $10 \mu\text{L}$ CCK-8 溶液,继续孵育 1 h,酶联免疫检测仪 450 nm 处测量每孔的吸光度(A),根据各孔的吸光度计算各组细胞的增殖抑制率。

增殖抑制率 = (对照组 A - 实验组 A) / 对照组 A $\times 100\%$

2.5 检测不同剂量含药血清作用于 H1975 细胞株的凋亡情况 根据 CCK-8 实验结果,依次分为 NS 对照组、益气通络解毒方高剂量组、gefitinib 组、不同剂量的中药联合 gefitinib 组 ($n = 6$)。取对数生长期细胞,调整细胞密度至 $1 \times 10^5/\text{mL}$,每孔 2 mL 细胞悬液接种于 6 孔板中,置于 $5\% \text{CO}_2$ 的培养箱内培养,细胞完全贴壁后吸除原培养液,分别加入含有 10% 的 NS、益气通络解毒方高剂量、Gefitinib、益气通络解毒方低、中、高剂量联合 Gefitinib 药物血清的 RPMI-1640 培养液作用 24, 48, 72 h,胰酶消化, $2\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1} \times 5 \text{ min}$ 离心,预冷 PBS 洗涤细胞 2 次, $400 \mu\text{L}$ $1 \times \text{Annexin V}$ 结合液悬浮细胞,制成细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 单细胞悬液,在细胞悬液中加入 $5 \mu\text{L}$ Annexin V-FITC 染色液,轻轻混匀后 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光孵育 15 min,加入 $10 \mu\text{L}$ PI 染色液,轻轻混匀 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光孵育 5 min,立即用流式细胞仪检测。

2.6 检测凋亡 H1975 细胞 Caspase-3 的表达 取对数生长期细胞,调整细胞密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$,接种于 6 孔板内盖玻片上,加入 RPMI-1640 培养液,置于 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中孵育 24 h,细胞贴壁后弃去原培养

液,按 **2.5** 分别加入含有 10% 的 NS 或药物血清的 RPMI-1640 培养液分别干预 24, 48, 72 h 取出盖玻片, PBS 冲洗, 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, PBS 漂洗, $0.5\% \text{TritonX-100}$ 室温处理 30 min, PBS 冲洗, $3\% \text{H}_2\text{O}_2$ 封闭 10 min, PBS 冲洗, 10% 山羊血清常温封闭 10 min,加 Caspase-3 抗体 ($1:100$) $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜, PBS 冲洗,加二抗,常温孵育 1 h, PBS 冲洗,滴加 DAB 显色液,镜下观察待细胞质和(或)细胞膜呈棕黄色时自来水冲洗终止反应、水化、封片。检测结果:每组选取 3 个典型视野 ($\times 400$ 倍)拍照,细胞膜或胞浆中呈棕黄色着染且背景清晰的细胞为阳性判断标准,未呈棕黄色者为阴性。应用 Image Pro-plus 6.0 病理图片处理软件对图像进行分析,测定积分吸光度(IA)。

2.7 统计学处理 数据采用统计软件 SPSS 17.0 进行分析,所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对 H1975 细胞增殖的影响 由表 1 可知,各组含药血清作用 24 h 后,除中药高剂量组和联合高剂量组外,其他各组含药血清对 H1975 细胞株无明显的增殖抑制作用;48 h 后,中药组和中药联合 gefitinib 组对 H1975 细胞株的增殖抑制作用较 NS 对照组和 gefitinib 组明显增强,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);72 h 后,中药组及中药联合 gefitinib 组呈现出明显的增殖抑制作用,其中中药联合 gefitinib 组优于单纯中药组和 gefitinib 组,其中 gefitinib 组在 24, 48, 72 h 对 H1975 细胞株的增殖抑制作用较差。由此可见 gefitinib 对 H1975 细胞基本无效,联合 gefitinib 组含药血清对 H1975 细胞株的增殖抑制作用呈时间及剂量依赖性,72 h 时联合高剂量组抑制作用最强。此结果作为后续实验的依据。

表 1 不同组别 10% 含药血清对 H1975 细胞的增殖抑制率 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

| 组别 | 剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | 24 h | | 48 h | | 72 h | |
|-----------|-------------------------------------|-------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | A | IR/% | A | IR/% | A | IR/% |
| NS 对照 | - | 1.53 ± 0.02 | - | 1.49 ± 0.05 | - | 1.47 ± 0.02 | - |
| gefitinib | 22.5×10^{-3} | 1.48 ± 0.03 | 3.26 | 1.44 ± 0.03 | 3.36 | 1.39 ± 0.06 | 5.44 |
| YQTLJD | 15.75 | $1.46 \pm 0.03^{1,2)}$ | 4.58 | $1.36 \pm 0.02^{1,2)}$ | 8.72 | $1.29 \pm 0.04^{1,2)}$ | 12.24 |
| | 31.50 | $1.44 \pm 0.04^{1,2)}$ | 5.88 | $1.29 \pm 0.03^{1,2)}$ | 13.42 | $1.20 \pm 0.03^{1,2)}$ | 18.36 |
| | 63.00 | $1.34 \pm 0.03^{1,2)}$ | 12.41 | $1.23 \pm 0.02^{1,2)}$ | 17.44 | $1.12 \pm 0.04^{1,2)}$ | 23.81 |
| | YQTLJD + gefitinib | $15.75 + 22.5 \times 10^{-3}$ | $1.43 \pm 0.03^{1,2)}$ | 6.54 | $1.16 \pm 0.05^{1,2)}$ | 22.15 | $1.03 \pm 0.04^{1,2)}$ |
| | $31.50 + 22.5 \times 10^{-3}$ | $1.41 \pm 0.04^{1,2)}$ | 7.84 | $1.11 \pm 0.03^{1,2)}$ | 25.50 | $0.93 \pm 0.07^{1,2)}$ | 36.73 |
| | $63.00 + 22.5 \times 10^{-3}$ | $1.29 \pm 0.05^{1,2)}$ | 15.69 | $1.05 \pm 0.03^{1,2)}$ | 29.53 | $0.84 \pm 0.07^{1,2)}$ | 42.86 |

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$;不同时间段之间比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

3.2 对 H1975 细胞凋亡率的影响 24,48,72 h 时 gefitinib 含药血清组细胞凋亡率与 NS 对照组相当,其余各组含药血清在不同时间段均具有促进 H1975 细胞凋亡的作用,其中益气通络解毒方联合 gefitinib 组对 H1975 细胞的凋亡诱导效应分别优于 NS 对照组、gefitinib 组和益气通络解毒方高剂量组;与 gefitinib 组比较,中药联合 gefitinib 组诱导 H1975 细胞凋亡的作用显著,具有统计学意义 ($P < 0.05$),提

示益气通络解毒方联合 gefitinib 对诱导 H1975 细胞凋亡具有协同促进作用,与药物剂量和作用时间呈正相关。见表 2。

3.3 H1975 细胞 Caspase-3 表达 除 NS 对照组外,其他各组细胞 Caspase-3 蛋白表达均呈阳性,细胞膜和(或)细胞质深染呈棕黄色,且随药物剂量增加和作用时间的延长,Caspase-3 蛋白表达增加,高剂量联合 gefitinib 组含药血清表达最强。见表 3,图 1。

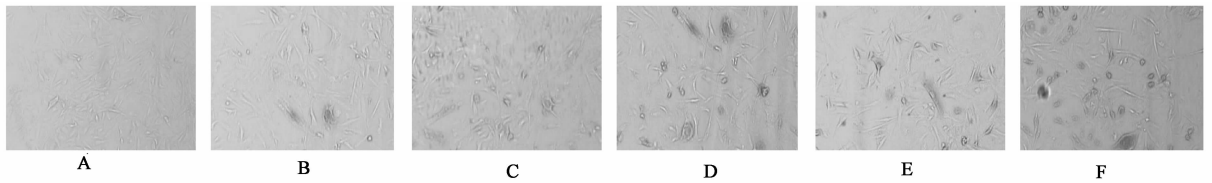
表 2 不同组别含药血清对 H1975 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

| 组别 | 剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | 凋亡率 | | |
|--------------------|-------------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | 24 h | 48 h | 72 h |
| NS 对照 | - | 5.16 ± 0.46 | 5.15 ± 0.44 | 5.72 ± 0.09 |
| gefitinib | 22.5 × 10 ⁻³ | 5.52 ± 0.57 | 6.19 ± 0.59 | 6.37 ± 0.53 |
| YQTLJD | 63.0 | 7.06 ± 0.48 ^{1,2)} | 8.47 ± 0.62 ^{1,2)} | 10.29 ± 0.61 ^{1,2)} |
| YQTLJD + gefitinib | 15.75 + 22.5 × 10 ⁻³ | 9.75 ± 0.51 ^{1,2)} | 12.53 ± 1.46 ¹⁾ | 13.60 ± 2.65 ¹⁾ |
| | 31.5 + 22.5 × 10 ⁻³ | 11.23 ± 1.14 ^{1,2)} | 14.77 ± 1.32 ^{1,2)} | 17.97 ± 1.97 ^{1,2)} |
| | 63.0 + 22.5 × 10 ⁻³ | 17.43 ± 1.16 ^{1,2)} | 20.11 ± 1.57 ^{1,2)} | 25.77 ± 0.81 ^{1,2)} |

表 3 不同组别 H1975 细胞 Caspase-3 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

| 组别 | 剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | Caspase-3 | | |
|--------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | 24 h | 48 h | 72 h |
| gefitinib | 22.5 × 10 ⁻³ | 0.36 ± 0.04 | 0.43 ± 0.05 | 0.52 ± 0.05 |
| YQTLJD | 63.00 | 0.56 ± 0.06 ^{1,2)} | 0.80 ± 0.03 ^{1,2)} | 0.94 ± 0.07 ^{1,2)} |
| YQTLJD + gefitinib | 15.75 + 22.5 × 10 ⁻³ | 0.83 ± 0.07 ^{1,2)} | 1.14 ± 0.07 ^{1,2)} | 1.45 ± 0.11 ^{1,2)} |
| | 31.5 + 22.5 × 10 ⁻³ | 2.19 ± 0.05 ^{1,2)} | 2.84 ± 0.08 ^{1,2)} | 3.84 ± 0.11 ^{1,2)} |
| | 63.0 + 22.5 × 10 ⁻³ | 2.84 ± 0.08 ^{1,2)} | 3.68 ± 0.15 ^{1,2)} | 4.72 ± 0.46 ^{1,2)} |

注:和 gefitinib 组比较¹⁾ $P < 0.05$;不同时间段之间比较²⁾ $P < 0.05$ 。



A. NS 对照组;B. gefitinib 0.022 5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 10% 含药血清组;C. YQTLJD 63.0 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 10% 含药血清;

D. YQTLJD 15.75 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ + gefitinib 22.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 10% 含药血清 E. YQTLJD 31.5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ + gefitinib 22.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 10% 含药血清;

F. YQTLJD 63.0 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ + gefitinib 22.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 10% 含药血清

图 1 不同组别含药血清对 H1975 细胞 Caspase-3 表达的影响(细胞免疫组织化学法, × 400)

4 讨论

肺癌是我国发病率及死亡率最高的恶性肿瘤之一。分子靶向药物 gefitinib 的出现把含有 EGFR 突变型肺癌的治疗推向了一个新的阶段,但是临床上患者最终会出现对 gefitinib 耐药,在 50% ~ 70% 的病例中,是因为继发性的发生了 T790M 二次突变或

Met 癌基因的扩增^[4]。现代医学研究证明,部分中药具有从多种途径逆转肿瘤细胞耐药,提高肿瘤细胞对抗癌药物的敏感性的作用^[5]。

本实验选择对 gefitinib 耐药且含有 EGFR 20 号外显子发生 T790M 突变的 H1975 细胞株为研究对象,采用中药血清药理学方法观察不同剂量的益气

通络解毒方联合 gefitinib 含药血清对 H1975 细胞的增殖抑制和凋亡是否具有促进作用。

现代药理学研究证明,方中白术提取物^[6]、黄芪多糖^[7-8]、茯苓多糖^[9]不仅能够增强机体免疫力,还具有抑制和(或)杀伤肿瘤细胞及有效诱导肿瘤细胞凋亡的作用。黄芩中的汉黄芩素对肺癌细胞有明显的促进凋亡作用^[10]。白术挥发油、北沙参多糖、老鹳草中的老鹳草素及槲皮素^[11]能显著抑制多种肿瘤细胞的生长和增殖,蜈蚣、全蝎^[12]及厚朴中的和厚朴酚除具有调节机体免疫功能,抑制肿瘤细胞增殖,诱导肿瘤细胞凋亡的作用外,还可以抑制肿瘤新生血管的形成。方中诸药从多角度,多途径起到抑制肿瘤细胞增殖,诱导肿瘤细胞凋亡的作用。

本实验通过 CCK-8 法检测益气通络解毒方含药血清对 H1975 细胞的增殖抑制作用,发现除 NS 对照组和 gefitinib 组外,其他各组中药含药血清均具有抑制 H1975 细胞生长的作用,具有剂量和时间依赖性,随剂量的增加和作用时间的延长,其抑制作用逐渐增强,本研究结果表明益气通络解毒方联合 gefitinib 含药血清对抑制 H1975 细胞增殖有协同增效作用。

本研究采用流式细胞仪定量检测益气通络解毒方联合 gefitinib 含药血清对 H1975 细胞凋亡作用的影响,结果表明益气通络解毒方联合 gefitinib 含药血清具有诱导 H1975 细胞凋亡的作用,诱导作用分别优于对照组、gefitinib 组和中药高剂量组,差异显著,具有统计学意义。提示两药联合对促进 H1975 细胞的凋亡具有协同作用。

本实验通过细胞免疫组化技术检测 Caspase-3 蛋白的表达,结果表明益气通络解毒方联合吉非替尼含药血清能够诱导 H1975 细胞 Caspase-3 蛋白表达的增加,提示益气通络解毒方可通过诱导 H1975 细胞 Caspase-3 蛋白表达的增加而促进细胞凋亡。

综上所述,本实验从细胞学方面证明了益气通络解毒方联合 gefitinib 对 H1975 细胞的增殖抑制和凋亡具有协同促进作用,联合用药效果明显优于两药单独使用,初步证实该复方药物通过诱导细胞

凋亡蛋白 Caspase-3 表达的增加是其体外促进肿瘤细胞凋亡的可能机制之一。在将来 NSCLC 的治疗中,中药联合分子靶向药物可能成为 NSCLC 靶向治疗的新策略,值得进一步研究。

[参考文献]

- [1] Hamamoto Yasushi, Kataoka Masaaki, Nogami Naoyuki, et al. Factors affecting survival time after recurrence of non-small-cell lung cancer treated with concurrent chemoradiotherapy [J]. Japanese J Radiology, 2012, 30 (3):249.
- [2] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 2 版. 上海:上海科学技术出版社,2006:51.
- [3] 魏伟,吴希美,李元建. 药理实验方法学[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社. 2010:1698.
- [4] Jeffrey A Engelman, Kreshnik Zejnullahu, Tetsuya Mitsudomi, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling [J]. Science, 2007,316(5287):1039.
- [5] 姚丽华,张洁,金仲品. 中药制剂逆转肿瘤多药耐药的研究概况[J]. 中国实用医药,2010,5(13):251.
- [6] 涂硕,韦星,赵小曼,等. 白英提取液对人肺癌 A549 细胞凋亡及 Fas/FasL 基因表达的影响[J]. 时珍国医国药,2008,19(3):603.
- [7] 任美萍,刘明华,李蓉,等. 黄芪多糖抗肿瘤活性研究[J]. 中国新药杂志,2010(3):221.
- [8] 陈卓,于卫江. 注射用黄芪多糖对非小细胞肺癌放疗的作用及对机体免疫的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(6):309.
- [9] 李庆云,张艳军. 茯苓多糖抗肿瘤机理研究[J]. 吉林中医药,2010,30(4):345.
- [10] 李现东. 汉黄芩素对肺癌细胞株 A549 的体外作用研究[J]. 重庆医科大学学报,2011,36(7):790.
- [11] 张明波,李莉,孙艳涛,等. 基于分子反向对接方法的槲皮素抗肿瘤机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(23):145.
- [12] 王晶娟,张贵君,吴明侠,等. 全蝎蛋白药效组分对 Bel7402 肿瘤细胞凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(12):112.

[责任编辑 聂淑琴]