

补中益气汤对裸鼠肺腺癌移植瘤 PI3K/AKT 信号通路作用的研究

刘亚莉^{1,2}, 唐莹¹, 易佳丽¹, 井欢¹, 刘春英^{1*}

(1. 辽宁中医药大学, 沈阳 110032; 2. 辽宁卫生职业技术学院(辽宁省基础医学研究所), 沈阳 110101)

[摘要] **目的:**探讨补中益气汤对裸鼠肺腺癌移植瘤生长抑制作用及对磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, AKT)信号通路的影响。**方法:**50 只裸鼠随机分为①正常对照组,②荷瘤对照组,③顺铂组,④顺铂联合补中益气汤组,⑤补中益气汤组。分别给予相应干预后,处死小鼠,计算抑瘤率;应用免疫组化方法、实时定量 PCR(real time PCR, RT-PCR)检测移植瘤组织中 PI3K, AKT 的表达水平。**结果:**顺铂联合补中益气汤组对移植瘤的抑制率最强,与其他各组比较有显著差异($P < 0.05$),顺铂和补中益气汤协同作用的 q 值 1.201;移植瘤中 PI3K, AKT 蛋白和 mRNA 基因的表达在顺铂联合补中益气汤组显著降低($P < 0.05$)。**结论:**补中益气汤联合顺铂对耐顺铂肿瘤有协同抑制作用;补中益气汤能通过干预 PI3K, AKT 基因和蛋白的表达而增加顺铂对耐顺铂肿瘤的敏感性。

[关键词] 补中益气汤; 肺腺癌; 移植瘤; 磷脂酰肌醇 3 激酶; 蛋白激酶 B

[中图分类号] R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0232-04

[doi] 10.11653/syfy2013220232

Experimental Research on PI3K/AKT Expression Mechanisms of Buzhong Yiqi Decoction in Nude Mice Lung Adenocarcinoma Transplantation Tumor

LIU Ya-li^{1,2}, TANG Ying¹, YI Jia-li¹, JING Huan¹, LIU Chun-ying^{1*}

[1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China;

2. Liaoning College of Health Vocational Technology

(Liaoning Preclinical Medical Institute), Shenyang 110101, China]

[Abstract] **Objective:** To discuss the effect on lung adenocarcinoma transplantation tumor in nude mice and the influence of phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) signaling pathway of Buzhong Yiqi decoction. **Method:** 50 nude mice were randomly divided into 5 groups, intervened respectively after 14 days, put to death and calculating tumor inhibition rate and used immunohistochemical method and real time PCR (RT-PCR) detecting the expression level of PI3K, AKT in transplantation tumor tissue. **Result:** Combined group was the strongest inhibition rate of transplanted tumor, compared with other groups, there are statistically significant ($P < 0.05$). The q value of synergistic effect of cisplatin and Buzhong Yiqi decoction was 1.201. PI3K and AKT protein and gene mRNA expression in combined group were decreased. There are statistically difference among other groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** The Buzhong Yiqi decoction combined with cisplatin has synergistic inhibitory effect in Cisplatin resistance tumor. The Buzhong Yiqi decoction can increase cisplatin resistance mechanism through regulating the gene and protein expression of PI3K and AKT.

[Key words] Buzhong Yiqi decoction; lung adenocarcinoma; transplantation tumor; PI3K; AKT

[收稿日期] 20130718(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072743);辽宁省教育厅资助项目(L2010355)

[第一作者] 刘亚莉,博士研究生在读, Tel: 13604062018, E-mail: 1243618563@qq.com

[通讯作者] *刘春英,医学博士,教授,博士研究生导师,从事中药抗肿瘤机制的研究, Tel: 024-89800910, E-mail: chunyingqq@163.com

肺腺癌属于非小细胞癌,此病理类型肿瘤发病年龄小,恶性程度较高,进展快,易转移,但对化疗药物的敏感性较高,因此,化疗是治疗肺腺癌的一种重要的治疗方法。顺铂作为肺癌化疗的一线药物,副作用大且易产生耐药性,严重的影响了其疗效。因此,寻找一种既能够干预顺铂耐药,又能减轻患者化疗后脾胃虚弱,气血不足的药物凸显重要。中医认为,“脾为生痰之源,肺为贮痰之器”。脾主运化,属土;肺司呼吸,属金,两者相辅相成,彼此影响。培土则生金,若脾气虚弱,运化失常,则致肺气不足,引起气短、喘息、咳嗽、咳痰等症状。本课题组前期研究发现,用培土生金理论代表中药补中益气汤能够干预肺腺癌 A549 耐顺铂细胞株(A549/DDP)的耐顺铂作用,含药血清干预 A549/DDP 细胞后,磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K),蛋白激酶 B(AKT)蛋白的表达减少;既往研究表明,培土生金中药能提高肺癌患者机体的免疫力,增强化疗药物的疗效,减轻化疗引起的毒副作用及提高患者的生存质量^[1],但具体机制尚不清楚。本实验以裸鼠肺腺癌移植瘤为研究对象,观察补中益气汤对移植瘤 PI3K/AKT 信号通路的抑制作用,探讨其干预顺铂耐药及可能的机制。

1 材料

1.1 动物及细胞株 50 只小鼠购自北京维通利华动物实验技术中心,5 周龄,雌雄各半,体质量(20±2)g,动物许可证号 SCXK(京)2012-0001;A549/DDP 细胞购自中国医科院肿瘤研究中心细胞库。

1.2 药物及制备 顺铂(DDP,齐鲁制药厂,生产批号 2030132DB)。补中益气汤根据《方剂学》新世纪版中规定用药及临床常用剂量(黄芪 18 g,甘草 9 g,人参 6 g,当归 4 g,橘皮 6 g,升麻 6 g,柴胡 6 g,白术 9 g),全部药材购于辽宁中医药大学附属医院药房,并通过辽宁中医药大学药理实验室的鉴定后,按成人推荐日用量常规煎煮,过滤、水浴蒸发至含生药 1.970 g·mL⁻¹,冷却后 4℃ 保存。

1.3 试剂 DMEM 培养液、胎牛血清(美国 Hyclone 公司,批号分别为 SH30022.01,SV30087.02);PI3K,AKT 抗体购于南京凯基生物技术有限公司(批号 KGAA24);Trioazol Reagent 购于美国 Invitrogen Life technologies 公司(批号 50175111);PI3K、AKT 荧光定量 PCR 试剂盒购于宝生物工程(大连)有限公司(批号 DRR420A);引物合成由北京华大基因公司提供。

2 方法

2.1 细胞培养 使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,37℃,5% CO₂ 条件下培养,观察细胞生长状态,2 d 换液 1 次,4~6 d 传代。收集细胞,以 PBS 调整细胞密度为 5×10⁶/mL,制备成瘤细胞悬液。

2.2 小鼠移植瘤模型的制备与用药 50 只小鼠适应性喂养 2 周,按随机数字表法分为①正常对照组,②荷瘤对照组,③顺铂组,④顺铂联合补中益气汤组,⑤补中益气汤组,共 5 组。①组裸鼠于后肢腹股沟皮下注射生理盐水,0.09 g·kg⁻¹,②~⑤组在相同位置皮下注射 A549/DDP 细胞悬液 5×10⁷·kg⁻¹,观察各组成瘤情况。各组成瘤的裸鼠给予如下干预:①~③组生理盐水 0.225 g·kg⁻¹ ig,1 次/日,其中③组同时给予顺铂 1×10⁻⁴g·kg⁻¹ ip;④~⑤组给予补中益气汤 50 g·kg⁻¹ ig,1 次/日,④组同时给予顺铂 1×10⁻⁴g·kg⁻¹ ip。观察裸鼠一般状态,测量体质量 1 次/周,测量皮下移植瘤的最大长径(a)和横径(b),计算肿瘤体积:肿瘤体积 = a×b²/2。14 d 后,无菌剥取移植瘤称重,计算各组药物的抑瘤率。

$$\text{抑瘤率} = (\text{对照组瘤质量} - \text{药物组瘤质量}) / \text{对照组瘤质量} \times 100\%$$

采用协同作用 q 值判断补中益气汤和顺铂联用的性质。

q 值的计算公式为

$$q = E_{AB} / (E_A + E_B - E_A \times E_B)$$

式中 E_A 和 E_B 为各药单用抑制率, E_{AB} 为两药合用抑制率。 $q > 1.15$ 为协同作用, $0.85 \leq q \leq 1.15$ 为相加作用, $q < 0.85$ 为拮抗作用^[2]。剥离的瘤体一部分用 10% 甲醛固定后,经脱水、透明、浸蜡,包埋,4℃ 冰箱保存。另一部分置 -70℃ 冰箱保存。

2.3 移植瘤组织中 PI3K,AKT 的表达检测 将每个蜡块连续切片 3 张,厚约 4~5 μm,切片经脱蜡,水洗,高压热修复,内源性过氧化物酶阻断,PBS 清洗,加一抗,37℃ 孵育 1 h,PBS 清洗,加二抗,37℃ 孵育 45 min,PBS 清洗,DAB 显色,透明后封片。以 PBS 代替一抗作为阴性对照组。用 Image,ProPlus 6.0 专业图像分析软件对图片进行定量分析,在 400 倍高倍镜下,随机取 5 个视野,每个视野为 2592×1944 像素点,分别测出阳性细胞的总面积和积分吸光度,求出平均吸光度。

2.4 移植瘤细胞中 PI3K,AKT 的 mRNA 的表达检测 利用 Primer Premier 5.0 软件设计 PCR 引物,PCR 引物见表 1。提取总 RNA,逆转录合成 cDNA 及 PCR 扩增均按试剂盒说明进行操作。PI3K,AKT

mRNA 的表达水平以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值表示。

表 1 PCR 引物序列

基因	序列(5'3')	长度/bp
GAPDH	F: 5'-CAATGACCCCTTCATTGACC-3'	135
	R: 5'-TGGAAGATGGTGATGGGATT-3'	
PI3k	F: 5'-CACCGCATTGTGCGT-3'	225
	R: 5'-CTCCCACTTCTACGC-3'	
Akt	F: 5'-GGGACAGAGGAGCAAGGT-3'	208
	R: 5'-CGACAGCGGAAAGGTTAA-3'	

2.5 统计学处理 运用 SPSS 16.0 软件对数据进行统计学分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组数据符合正态分布, 方差齐时, 采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK 法, 不符合参数检验者, 采用多组计量资料秩和检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

表 2 各组裸鼠移植瘤模型生长一般状况 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	样本数/ n		体质量增加量/ g	瘤体积/ cm^3	抑瘤率/%
		荷瘤前	荷瘤后			
正常对照	-	10	10	6.98 ± 0.23	-	-
荷瘤对照	-	10	8	5.1 ± 0.36	0.621 ± 0.071	-
顺铂	1×10^{-4}	10	10	6.8 ± 0.34	$0.411 \pm 0.043^{(1)}$	33.82
顺铂 + 补中益气汤	$1 \times 10^{-4} + 50$	10	9	6.7 ± 0.59	$0.302 \pm 0.012^{(1,2)}$	51.36
补中益气汤	50	10	8	5.6 ± 0.27	0.537 ± 0.068	13.52

注: 与荷瘤对照组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与顺铂组, 补中益气汤组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 3~4 同)。

3.2 各组移植瘤组织中 PI3K, AKT 蛋白表达变化

PI3K 和 AKT 在各组表达强弱不一, 见图 1~2。顺铂联合补中益气汤组表达明显减少, 与荷瘤对照组、顺铂组和补中益气汤组比较, 有显著统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 免疫组化方法检测各组移植瘤中 PI3K, AKT 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)

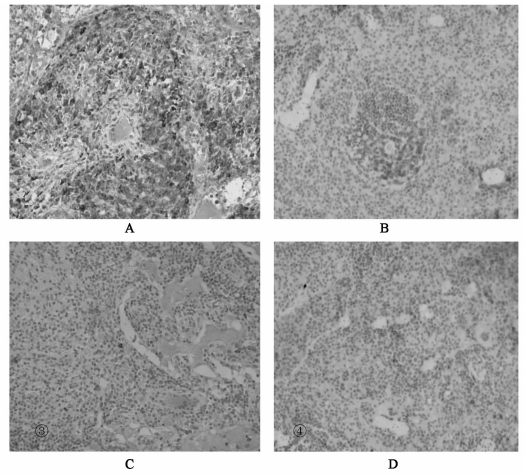
组别	n	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	PI3K	AKT
荷瘤对照	8	-	188.48 ± 13.56	84.35 ± 12.04
顺铂	10	1×10^{-4}	$148.21 \pm 0.97^{(1)}$	$67.35 \pm 3.75^{(1)}$
顺铂 + 补中益气汤	8	$1 \times 10^{-4} + 50$	$34.27 \pm 2.96^{(1,2)}$	$25.31 \pm 8.54^{(1,2)}$
补中益气汤	9	50	$129.69 \pm 6.47^{(1)}$	$57.58 \pm 4.12^{(1)}$

3.3 PI3K, AKT mRNA 表达水平的变化

RT-PCR 检测 PI3K, AKT 的 DNA 扩增产物, 显示溶解曲线无杂峰, 平均溶解温度一致, 具有特异性。与荷瘤对照组比较, 顺铂组、顺铂联合补中益气汤组、补中益气汤组 PI3K, AKT mRNA 表达率降低, 有统计学意义 ($P < 0.05$)。顺铂联合补中益气汤组与顺铂组和补中益气汤组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4。

3 结果

3.1 各组小鼠移植瘤模型生长一般状况 皮下注射 A549DDP 细胞荷瘤后, 荷瘤对照组和补中益气汤 2 只, 顺铂联合补中益气汤组有 1 只, 未看到瘤组织的生长, 在样本例数中予以剔除。各组裸鼠一般状况无明显变化。各组裸鼠的体质量在荷瘤前、荷瘤后的增加量, 各组间无统计学差异; 各组瘤体积顺铂组和顺铂联合补中益气汤组缩小最明显, 与荷瘤对照组比较, 有统计学差异 ($P < 0.05$), 顺铂联合补中益气汤组对肿瘤组织的抑制率最强, 与顺铂组和补中益气汤组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。利用公式计算协同作用的 q 值为 $1.201 > 1.15$, 说明补中益气汤和顺铂对移植瘤具有协同抑制作用。



A. 荷瘤对照组; B. 顺铂 $1 \times 10^{-4} g \cdot kg^{-1}$ 组;
C. 顺铂 $1 \times 10^{-4} g \cdot kg^{-1}$ 联合补中益气汤 ($50 g \cdot kg^{-1}$) 组;
D. 补中益气汤 $50 g \cdot kg^{-1}$ 组 (图 2 同)

图 1 顺铂联合补中益气汤对 PI3K 在裸鼠移植瘤中表达的影响 (免疫组化, $\times 200$)

4 讨论

补中益气汤主要由黄芪、甘草、人参、当归、橘皮、升麻、柴胡、白术组成。现代药理学研究表明其

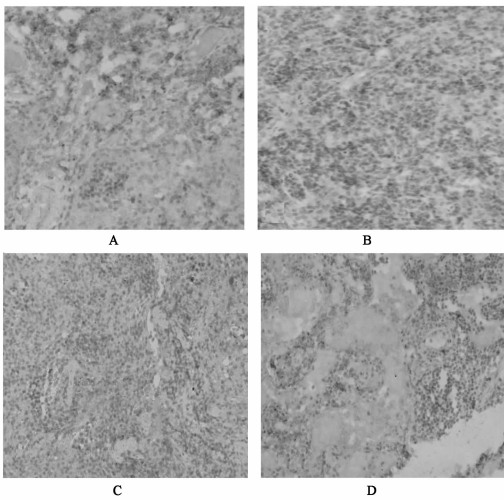


图2 顺铂联合补中益气汤对 AKT 在裸鼠移植瘤中表达的影响(免疫组化, ×200)

表4 各组移植瘤 PI3K, AKT mRNA 相对表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	PI3K/GAPDH	Akt/GAPDH
荷瘤对照	8	-	1.258 ± 0.317	1.672 ± 0.336
顺铂	10	-	0.937 ± 0.233 ²⁾	1.256 ± 0.469 ²⁾
顺铂 + 补中益气汤	8	1 × 10 ⁻⁴ + 50	0.508 ± 0.142 ^{1,2)}	0.530 ± 0.303 ^{1,2)}
补中益气汤	9	50	0.834 ± 0.162 ²⁾	1.031 ± 0.310 ²⁾

主要含有皂苷类、多糖类、黄酮类、生物碱、氨基酸及挥发油等。对小鼠 S180, L615, Lewis 肿瘤均有不同程度的抑制作用;有调节免疫功能,促进蛋白质合成,耐缺氧、抑菌消炎等综合作用^[3]。还能减轻化疗引起的毒副作用,有效改善肺癌耐药,提高肺癌临床疗效^[1,4]。课题组前期研究表明补中益气汤含药血清能够抑制 A549/DDP 生长,降低 A549/DDP 细胞中 PI3K, AKT 蛋白和基因的表达,提示补中益气汤可能通过 PI3K/AKT 信号通路发挥作用。

本实验以裸鼠为研究对象,其为先天性缺乏胸腺的小鼠,对异体肿瘤组织排斥力差,成瘤率高,是常用的、稳定的实验肿瘤动物模型,实验各组成瘤率均在 80% 以上,保证了实验样本数。A549/DDP 是耐顺铂细胞株,提示以 A549/DDP 细胞株建立的瘤组织对顺铂仍有一定耐顺铂作用,结果显示,补中益气汤和顺铂单药对肺癌组织都有抑制作用,而二者联用则有协同抑制移植瘤作用(q 值为 1.201 > 1.15),与单用相比差异有显著性。其机制可能是因为二药联用改善了顺铂对瘤组织的顺铂耐药作用,从而协同影响了肿瘤细胞的存活。

PI3K/Akt 通路是影响细胞凋亡的诸多因素激发胞内信号的汇聚点,激活的 PI3K 使下游 AKT 磷酸化,继而激活或抑制其下游靶蛋白 Bad、Caspase9、

NF- κ B、GSK-3、FKHR、p21Cip1 和 p27 Kip1 等,进而发挥促进细胞增殖、抗凋亡、化疗耐受等作用^[5],顺铂的耐药作用与肿瘤细胞的凋亡抑制^[6-10]有关,因此研究顺铂耐药多以 PI3K-AKT 信号通路作为切入点。本实验免疫组化和 Real time-PCR 结果显示,补中益气汤和顺铂单独及联合对 PI3K、AKT 蛋白和基因的表达均降低,联合组尤其显著。因此,补中益气汤联合顺铂提高顺铂对耐药瘤的化疗作用,是从基因和蛋白层面减少 PI3K、AKT 的表达,使可能的耐药细胞恢复对顺铂的敏感性,加强了顺铂的促凋亡作用,缩小瘤体积。

[参考文献]

[1] 刘朝阳,王德昌,付招娣,等. 参芪金康胶囊抗肿瘤作用的实验研究[J]. 癌症,2006,25(8):983.
 [2] 陈逢生,崔彦芝,罗荣城,等. 索拉非尼联合顺铂对肝癌 HepG2 细胞的抑制作用[J]. 南方医科大学学报,2008,28(9):1684.
 [3] 季宇彬. 中药复方化学与药理[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:315.
 [4] 郑春燕,肖伟. 肺癌患者外周血单个核细胞 Th1/Th2 反应状态及黄芪的调节作用[J]. 中国免疫学杂志,2002,18(7):502.
 [5] 孙晓杰,黄常志. PI3K-Akt 信号通路与肿瘤[J]. 世界华人消化杂志,2006,14(3):306.
 [6] Zhou Yongxin, Zhen Huiling, Mei Yunqing, et al. PI3K/AKT mediated P53 down-regulation participates in CpG DNA inhibition of spontaneous B cell apoptosis [J]. Cell Mol Immunol,2009,6(3):175.
 [7] Bertrand F E, Spengemen J D, Shelton J G, et al. Inhibition of PI3K, mTOR and MEK signaling pathways promotes rapid apoptosis in B-lineage ALL in the presence of stromal cell support[J]. Leukemia,2005,19(1):98.
 [8] Matthew R Janes, Jose J Limon, Lomon So, et al. Effective and selective targeting of leukemia cells using a TORC1/2 kinase inhibitor[J]. Nature Medicine,2010,16, 205.
 [9] Li L, Zhang J, Liu Z, et al. Downregulation of Bim by brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB protects neuroblastoma cells from paclitaxel but not etoposide or cisplatin-induced cell death and differentiation [J]. Cell Death Differ, 2007, 14(2):318.
 [10] S Srivastava, B Ramdass, S Nagarajan, et al. Notch1 regulates the functional contribution of RhoC to cervical carcinoma progression[J]. Bri J Cancer,2010,102(1):196.

[责任编辑 聂淑琴]