

补中益气汤含药血清对 A549/DDP 中 p-Akt 和 P-gp 表达的影响

易佳丽, 井欢, 王莹, 刘亚莉, 刘春英*

(辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110847)

[摘要] 目的:研究补中益气汤含药血清逆转人肺癌顺铂耐药细胞株(A549/DDP)耐顺铂(DDP)作用及其对磷酸化丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(p-Akt)和 P-糖蛋白(P-gp)表达的影响。方法:采用血清药理学方法制备含药血清,随机对照法将 24 只 SD 大鼠分为空白对照组(给生理盐水 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),补中益气汤高、中、低剂量组($11.34, 5.67, 2.84 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),每日 ig 给药 1 次,连续 7 d 后提取血清。将 A549/DDP 分为空白血清组,补中益气汤高、中、低剂量含药血清组,阻滞剂组,高剂量含药血清联合阻滞剂(LY294002)组,MTT 法检测各组细胞对 DDP 的 IC50,并计算耐药逆转倍数。免疫细胞化学法检测各组细胞中 p-Akt 和 P-gp 蛋白的表达;逆转录-多聚合酶链式反应(RT-PCR)法检测各组细胞中 Akt 和 P-gp 的 mRNA 表达。结果:与空白血清组比较,补中益气汤中剂量以上的含药血清可明显降低 A549/DDP 对 DDP 的 IC50 ($P < 0.05$),并呈浓度依赖效应,与阻滞剂联合效果最佳 ($P < 0.05$);与 A549/DDP 空白血清组相比,补中益气汤中、高剂量含药血清组,阻滞剂组和高剂量联合阻滞剂组的 p-Akt 和 P-gp 的表达显著下降 ($P < 0.01, P < 0.05$),其中以高剂量联合阻滞剂组下降最多 ($P < 0.01$);与 A549/DDP 空白血清组相比,中、高剂量含药血清组,阻滞剂组和高剂量联合阻滞剂组的 P-gp 的 mRNA 表达量都显著减少 ($P < 0.01, P < 0.05$),中、高剂量含药血清组,高剂量联合阻滞剂组的 p-Akt 的 mRNA 表达量也显著减少 ($P < 0.05$)。结论:补中益气汤含药血清可逆转 A549/DDP 细胞的顺铂耐药,与 LY294002 联合应用效果更佳,其逆转机制可能与减少细胞内 p-Akt 和 P-gp 的表达,增强 A549/DDP 对 DDP 的敏感性有关。

[关键词] A549/DDP 细胞株;磷酸化丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶;P-糖蛋白;补中益气汤;多药耐药;

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0229-06

[doi] 10.11653/syjf2013170229

[收稿日期] 20120502(014)

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

[第一作者] 易佳丽,硕士研究生, Tel:18604917931, E-mail:7812303@qq.com

[通讯作者] *刘春英,教授,博士生导师,从事中西医结合基础教学及科研工作, Tel:024-31207061, E-mail:chunying99@163.com

- [6] Stieger B, Fattinger K, Madon J, et al. Drug-and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver [J]. *Gastroenterology*, 2000, 118(2):422.
- [7] 时青云, 孔北华, 张向丽, 等. 熊去氧胆酸对雌激素诱导的肝内胆汁淤积孕鼠血生化指标 肝脏病理及肝细胞膜 ATP 酶的影响 [J]. *实用妇产科杂志*, 2004, 20(2):110.
- [8] Pauli-Magnus C, Meier P J, Stieger B. Genetic determinants of drug-induced cholestasis and intrahepatic cholestasis of pregnancy [J]. *Semin Liver Dis*, 2010, 30(2):147.
- [9] Diao L, Li N, Brayman T G, et al. Regulation of MRP2/ABCC2 and BSEP/ABCB11 expression in sandwich cultured human and rat hepatocytes exposed to inflammatory cytokines TNF- α , IL-6, and IL-1 β [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(41):31185.
- [10] 刘学华, 赵翠英, 陆茵. 茵黄合剂治疗妊娠肝内胆汁淤积症的实验研究 [J]. *江苏中医*, 2000, 21(7):39.
- [11] 侯莉莉, 夏卫军. 茵黄合剂对雌激素诱导肝内胆汁淤积大鼠血生化的影响 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2009, 11(12):165.
- [12] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志杨, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9):1069.

[责任编辑 聂淑琴]

Effect of Serum Containing Buzhong Yiqi Decoction on p-Akt and P-gp of Human Lung Adenocarcinoma Cells A549/DDP

YI Jia-li, JING Huan, WANG Ying, LIU Ya-li, LIU Chun-ying*

(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

[Abstract] **Objective:** To analyse the reversal effect of serum containing Buzhong Yiqi decoction on multidrug resistance of human adenocarcinoma of lung cell line A549/DDP, and observe the impacts on expression of phosphorylation of serine threonine protein kinase (p-Akt) and P-glycoprotein (P-gp). **Method:** The serum containing Buzhong Yiqi decoction was prepared by adopting the method of serum pharmacology. 24 rats were divided into the blank group (normal saline, $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), high ($1.314 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), middle ($5.76 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and low ($2.84 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) dose groups of Buzhong Yiqi decoction. At the end of the 7th day serum was obtained. A549/DDP was divided into blank serum group, high, middle and low dose groups of serum drug-containing. LY294002 group, high dose combined with LY294002 group, IC_{50} was observed by MTT assay, and the reversal fold was computed. Immunohistochemical (IHC) was used to assay the protein expression of p-Akt and P-gp, RT-PCR was used to determine the content of mRNA of Akt and P-gp. **Result:** Compared with blank serum group, IC_{50} in middle and high dose group was decreased ($P < 0.05$), and it was observed to exert a concentration-dependent inhibition on the proliferation of A549/DDP cell line, the largest decline was in high dosage combined with LY294002 group ($P < 0.01$). The protein expression of p-Akt and P-gp was significantly decreased in middle and high group, LY294002 group combined with high dose LY294002 group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). The mRNA expression of P-gp and Akt was significantly decreased in middle and high dose group, LY294002 group combined with high dose group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusion:** The serum containing Buzhong Yiqi decoction could moderately reverse the multidrug resistance of A549/DDP cells through reducing the expression of p-Akt and P-gp and increasing the sensitivity of A549/DDP to DDP.

[Key words] A549/DDP cell; p-Akt; P-gp; Buzhong Yiqi decoction; multidrug resistance

顺铂 (DDP) 是肺癌常用的化疗药物, 但顺铂极易形成耐药, 严重影响其临床疗效^[1-2]。肿瘤的顺铂耐药是其多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 的主要表现之一, 多药耐药涉及多种生化改变, 在肺癌耐药的众多机制中, 磷酸化丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (p-Akt) 是处于磷脂酰肌醇激酶 (PI3K)/丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (Akt) 信号通路核心部位的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (Akt) 磷酸化后的产物, 它可以激活该通路的下游信号因子, 调节多种细胞功能, 如增殖、凋亡等^[3-6]。多药耐药基因 (MDR1) 编码的 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 是一种跨膜蛋白, 同肿瘤的侵袭性和对化疗的抵抗密切相关^[7]。既往研究表明培土生金中药补中益气汤有治疗肺癌所需的补虚扶正、培本固元、益气补血、健脾补肾等作用, 可达到“扶正驱邪”的目的^[8-9], 能减轻顺铂化疗引起的毒副反应, 并提高化疗的临床疗效^[10-11], 但补中益气汤可否帮助逆转肺癌耐药及其机制尚不清楚。本

研究将通过体外实验来探讨补中益气汤含药血清对人肺腺癌耐顺铂细胞 A549/DDP 及其亲本细胞株 A549 中 p-Akt 和 P-gp 表达的影响, 并进一步研究二者表达的相关性, 为补中益气汤在肺癌顺铂耐药逆转的临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 动物与细胞 人肺腺癌耐顺铂耐药细胞株 A549/DDP 及其亲本细胞株 A549 由中国医科院肿瘤医院研究中心细胞库提供。SD 大鼠 (200 ± 20) g, 清洁级, 辽宁中医药大学动物部提供。动物许可证号辽实动质 (字) (2012-0012 号)。

1.2 仪器与试剂 酶标仪 (美国伯乐), PCR 仪 (杭州朗基科学仪器有限公司), 凝胶成像仪 (Kodak digital science 1D), P-Akt 和 P-gp 单克隆抗体 (PTGLAB 公司), PI3K-Akt 通路特异性抑制剂 LY294002 (Sigma 公司), RT-PCR 试剂盒 (Thermo Scientific ABgene Ltd. AGent house), PCR 引物由大

连宝生物公司合成, Trizol 试剂 (Invitrogen), 胎牛血清 (FBS)、高糖 DMEM 培养基 (Hyclone 公司), 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) (北京鼎国生物技术有限公司)。

1.3 药物 顺铂注射液 (DDP, 生产批号 2030132DB, 山东齐鲁医药有限公司), 补中益气方 (黄芪, 甘草, 人参, 当归, 橘皮, 升麻, 柴胡, 白术) 购于辽宁中医院, 经辽宁中医药大学药学院药理教研室鉴定合格。

2 方法

2.1 含药血清制备 补中益气汤根据《方剂学》新世纪版中规定补中益气汤的用药剂量 (黄芪 18 g, 甘草 9 g, 人参 6 g, 当归 3 g, 橘皮 6 g, 升麻 6 g, 柴胡 6 g, 白术 9 g), 以及临床常用剂量并通过“人和动物之间按体表面积折算的等效剂量比值表”计算出大鼠等效剂量, 并分别设高、中、低剂量按生药量计质量浓度为 1.314, 0.576, 0.284 g·mL⁻¹。(13.14, 5.76, 2.84 g·kg⁻¹, 10 mL·kg⁻¹), 每日 ig 给药 1 次, 连续 7 d 后提取血清。大鼠 24 只随机分成 4 组: 空白对照组 (给生理盐水 10 mL·kg⁻¹), 补中益气汤高、中、低剂量组 (11.34, 5.76, 2.84 g·kg⁻¹, 10 mL·kg⁻¹), 每日 ig 给药 1 次, 连续 7 d, 末次给药 1 h 后, 腹主动脉采血, 置无菌管, 3 500 r·min⁻¹ 离心 15 min, 吸取上清, 将收集到的血清于 56 °C 水浴锅中灭 30 min, 操净台内 0.22 μm 滤器滤过除菌并分装后, 置 -20 °C 冰箱冻存备用。

2.2 细胞培养 A549 和 A549/DDP 细胞株培养在含 10% 胎牛血清, 含青霉素和链霉素各 100 U·mL⁻¹ 的高糖 DMEM 培养液中, 37 °C, 95% 湿度, 5% CO₂ 条件下培养, 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 每 2 d 换液 1 次, 每 3 d 传代 1 次。

2.3 实验分组 将 A549/DDP 两细胞株以 2 × 10⁶/瓶接种于 25 cm² 培养瓶, 分组为: A549 空白血清组, A549/DDP 补中益气汤含药血清高、中、低剂量组, A549/DDP 空白血清组, A549/DDP 阻滞剂组, A549/DDP 补中益气汤含药血清高剂量联合阻滞剂组。A549/DDP 补中益气汤高、中、低剂量含药血清组和 A549/DDP 含药血清高剂量联合阻滞剂组中分别加入含有 10% 相应被测试样品血清的高糖 DMEM 培养液; A549 空白血清组、A549/DDP 空白血清组和 A549/DDP 阻滞剂组加入含有 10% 空白血清的高糖 DMEM 培养液; A549/DDP 阻滞剂组和 A549/DDP 含药血清高剂量联合阻滞剂组加入终浓度为 25 mL·L⁻¹ 的特异性阻滞剂 LY294002, 各组培养瓶终体积为 5 mL。

2.4 各组 A549/DDP 细胞对 DDP 的敏感性 取对数生长期的 A549/DDP 制成单细胞悬液 10⁵/mL, 接种于 96 孔板中, 细胞数为 0.2 × 10⁵/孔, 细胞贴壁后, 分别加入受试物, 每组设 4 个复孔, 继续培养 48 h, 加入 5 g·L⁻¹ 的 MTT 20 μL 作用 4 h, 弃上清, 加入 DMSO 150 μL, 置摇床混匀 10 min, 酶标仪在波长 490 nm 处测每孔的吸光度 (A), 取平均值。分组为: 空白血清 + DDP 组, 阻滞剂 + DDP 组, 补中益气汤高剂量含药血清 + DDP 组, 中剂量含药血清 + DDP 组, 低剂量含药血清 + DDP 组和补中益气汤含药血清中剂量联合阻滞剂 + DDP 组, DDP 终浓度为 6, 12, 25, 50, 100, 200, 400 μmol·L⁻¹, 终体积为 200 μL, 根据公式计算细胞抑制率 (IR) = [1 - (试验组 A - 空白对照组 A) / (10% 胎牛组 A - 空白对照组 A)] × 100%, 再用 SPSS 17.0 软件计算出各组的 50% 抑制浓度 (IC₅₀), 以及逆转倍数 (RF), RF = 药物 IC₅₀ (不加逆转剂) / 药物 IC₅₀ (加逆转剂)。以上实验重复 3 次。

2.5 各组细胞内 p-Akt 和 P-gp 的表达 将各组细胞以相同密度爬片, 经受试因素处理 48 h 后, 取出玻片, PBS 洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定, 3% H₂O₂ 孵育 20 min, 10% 山羊血清封闭 30 min, 分别滴加 p-Akt 和 P-gp 一抗, 设阴性对照组 (以 PBS 代替一抗), 34 °C 过夜, 取出后, 二抗作用 30 min 后, DAB 显色, 苏木素复染, 封片。采用美国 Medcybernetic 公司的 Image Pro Plus 医学图像分析系统进行图像分析, 在 400 倍高倍镜下, 随机取 5 个视野, 每个视野为 2 592 × 1 944 像素点, 分别测出阳性反应细胞的总面积 (Area) 和积分吸光度 (IA)。

2.6 各组细胞株中 Akt 和 P-gp 的 mRNA 的表达 引物序列由大连宝生生物公司合成。Akt 上游引物序列: 5'-TTGCTGCTGTACCTCCACC-3', 下游引物序列: 5'-AATGCTTTCTCCGCTCTG-3'; P-gp 上游引物序列: 5'-AGAAGCCGCTGCCCTCACTG-3', 下游引物序列: 5'-AATGCCTTCGGAACGGACTTGAC-3'; β-actin 引物上游序列: 5'-TTGTCACATGCCCTGCCAGGTC-3', 下游引物序列: 5'-GCTCCTTATGTACAGCAGATTC-3'。取各组细胞, 用 Trizol 试剂提取总 RNA, 752-C 紫外分光光度计测定其纯度及含量。将总 RNA 逆转录成 cDNA, 再取 5 μL 反转录产物进行 PCR。循环参数为预变性 95 °C 2 min, 变性 95 °C 30 s, 退火 54 °C 30 s, 延伸 72 °C 1 min, 共 35 个循环, 终延伸 72 °C 10 min 后 4 °C 保存。取各组 PCR 扩增产物 5 μL, 加 1 μL Loading Buffer 混匀, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 15

min,用凝胶成像分析系统观察并拍摄电泳图象,定量分析各组基因表达强度,目的片断与 β -actin 吸光度比值作为目的片断 mRNA 的相对含量。每个样品至少重复 3 次。

2.7 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计学软件对数据进行处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组 A549/DDP 细胞对 DDP 的敏感性 补中益气汤含药血清的高、中、低剂量与 DDP 存在协同作用,并且对 A549/DDP 细胞的抑制作用呈浓度依赖性,随着含药血清浓度的升高 IC_{50} 不断的降低,与空白血清组相比,补中益气汤含药血清中、高剂量组,阻滞剂组,补中益气汤含药血清高剂量联合阻滞剂组都可以显著的降低 A549/DDP 对 DDP 的 IC_{50} ,并提高 A549/DDP 对 DDP 的耐药逆转倍数,其差异

有统计学意义($P < 0.05$),其中以补中益气汤含药血清高剂量联合阻滞剂组的效果最为明显。提示补中益气汤含药血清单独作用可部分逆转 A549/DDP 对 DDP 的耐药,与 PI3K/Akt 通路的特异性阻滞剂 LY294002 合用可显著逆转 A549/DDP 对 DDP 的耐药,见表 1。

3.2 对各组细胞 p-Akt, P-gp 蛋白表达的影响 (免疫细胞化学法) 结果显示: A549 空白血清组中 p-Akt, P-gp 蛋白在细胞膜和细胞浆中均有表达, A549/DDP 空白血清组中出现大量较大的棕黄色颗粒,与 A549 空白血清组相比,两种蛋白的表达显著增加($P < 0.05$),随着补中益气汤含药血清浓度的升高,两种蛋白的表达逐渐减少,与 A549/DDP 空白血清组相比,补中益气汤含药血清高剂量组,阻滞剂组和高剂量联合阻滞剂组的 p-Akt, P-gp 蛋白表达明显减少($P < 0.05$),其中以高剂量联合阻滞剂组的效果最为明显。见表 2,图 1,图 2。

表 1 补中益气汤含药血清对 A549/DDP 细胞对 DDP 的敏感性的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	DDP $IC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	RF
10% 空白血清 + DDP	210.57 \pm 1.02	-
10% 补中益气汤含药血清(2.84 g·kg ⁻¹) + DDP	182.95 \pm 8.27	1.15
10% 补中益气汤含药血清(5.67 g·kg ⁻¹) + DDP	85.51 \pm 1.54 ¹⁾	2.46
10% 补中益气汤含药血清(11.34 g·kg ⁻¹) + DDP	75.51 \pm 10.49 ¹⁾	2.79
10% 阻滞剂(25 mL·L ⁻¹) + DDP	52.64 \pm 4.08 ¹⁾	4.00
10% 补中益气汤含药血清(11.34 g·kg ⁻¹)联合阻滞剂(25 mL·L ⁻¹) + DDP	49.30 \pm 7.54 ¹⁾	4.27

注:与空白血清 + DDP 组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

表 2 补中益气汤含药血清对 A549/DDP 细胞 p-Akt 和 P-gp 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

IA

组别	p-Akt	P-gp
A549 10% 空白血清	96 636 \pm 116	153 640 \pm 115
A549/DDP 补中益气汤 10% 空白血清	22 1537 \pm 968 ¹⁾	395 724 \pm 236 ¹⁾
A549/DDP 补中益气汤 10% 含药血清(2.84 g·kg ⁻¹)	206 518 \pm 939	379 655 \pm 785
A549/DDP 补中益气汤 10% 含药血清(5.67 g·kg ⁻¹)	120 892 \pm 65 ²⁾	200 966 \pm 716 ²⁾
A549/DDP 补中益气汤 10% 含药血清(11.34 g·kg ⁻¹)	111 104 \pm 294 ²⁾	197 845 \pm 844 ²⁾
A549/DDP 阻滞剂(25 mL·L ⁻¹)	75 311 \pm 233 ³⁾	123 830 \pm 738 ²⁾
A549/DDP 补中益气汤 10% 含药血清(11.34 g·kg ⁻¹)联合阻滞剂(25 mL·L ⁻¹)	50 530 \pm 102 ³⁾	97 920 \pm 844 ²⁾

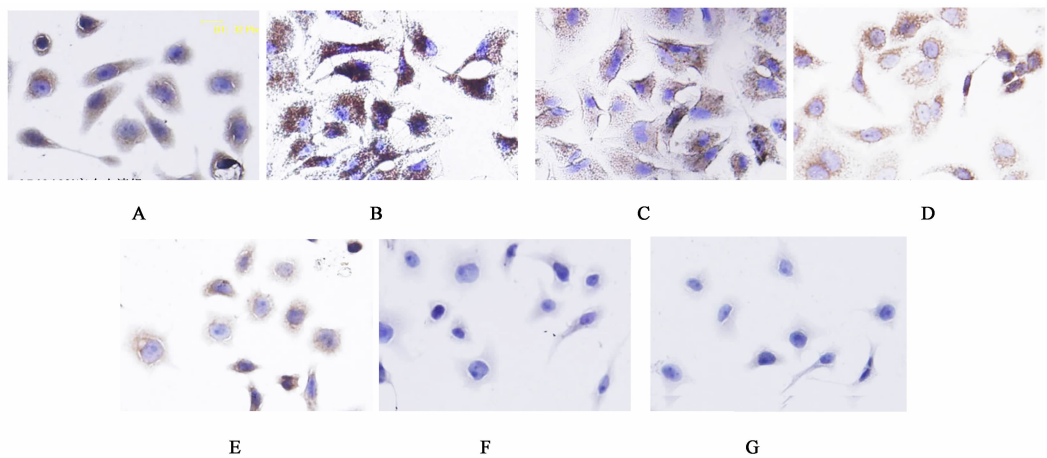
注:与 A549 空白血清组比较¹⁾ $P < 0.05$;与 A549/DDP 空白血清组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 对各组细胞 Akt, P-gp mRNA 表达的影响 (PT-PCR 法) 各组细胞 Akt, P-gp mRNA 的表达,以 β -actin 作为内参。结果见图 3,与 A549 空白血清组相比, A549/DDP 空白血清组 p-Akt, P-gp mRNA 的表达量显著增加($P < 0.05$);经补中益气汤含药血清的作用后, p-Akt, P-gp mRNA 的表达随着中药浓度的增高而减少,中、高剂量组,高剂量联合阻滞剂组中 p-Akt, P-gp mRNA 的表达与 A549/DDP 空白血清组的差异有统计学意义($P < 0.01, P < 0.05$);而在阻滞剂组, p-Akt mRNA 的表达与 A549/DDP 空白血

清组无明显差异, P-gp mRNA 的表达与 A549/DDP 空白血清组的差异有统计学意义($P < 0.05$)。

4 讨论

肺腺癌属于非小细胞癌,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。研究表明, PI3K/Akt 通路和肺癌顺铂耐药有关,在细胞水平上, Akt 作为蛋白激酶,必须由 PI3K 催化其磷酸化之后,即 p-Akt 才能具有活性, p-Akt 过表达的人肺癌细胞对顺铂出现耐药,而在顺铂耐



A. A549 10% 空白血清组补中益气汤; B. A549/DDP 10% 空白血清组; C. A549/DDP 补中益气汤 10% 低剂量含药血清 ($2.84 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组; D. A549/DDP 10% 补中益气汤 中剂量含药血清 ($5.6 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组; E. A549/DDP 补中益气汤 10% 高剂量含药血清 ($11.34 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组; F. A549/DDP 阻滞剂 ($25 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$) 组; G. A549/DDP 补中益气汤 10% 高剂量含药血清 ($11.34 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 联合阻滞剂 ($25 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$) 组(图 2 同)

图 1 各组细胞中 p-Akt 的表达(免疫细胞化学法, $\times 200$)

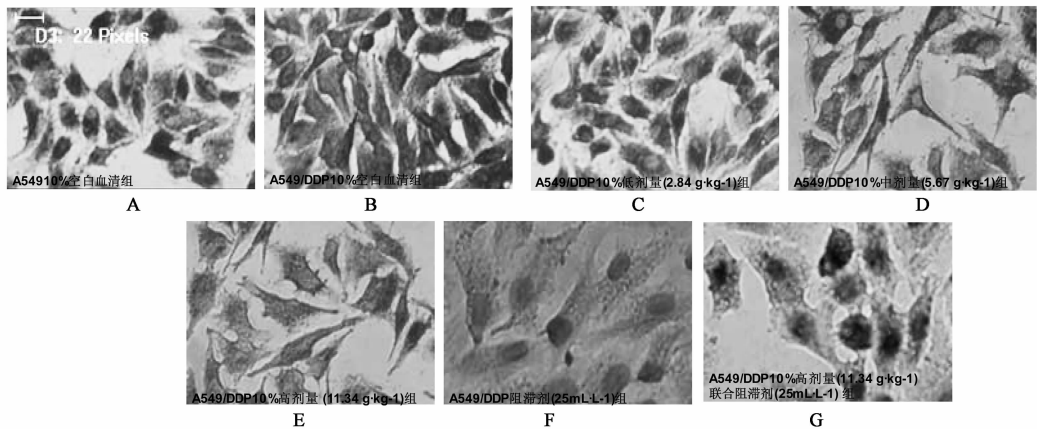
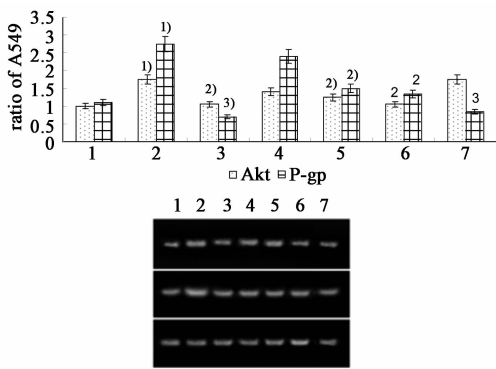


图 2 各组细胞中 P-gp 的表达(免疫细胞化学法, $\times 200$)

药人肺癌细胞株中,抑制 p-Akt 的表达会增加对顺铂的敏感性^[12]。而 PI3K/Akt 通路的特异性阻滞剂 LY294002 可抑制 PI3K 对 Akt 的磷酸化,即 p-Akt 的生成,进而发挥促进细胞凋亡、减少化疗耐受的作用。P-gp 是引起多药耐药(MDR)的主要分子,P-gp 由 *mdr1* 基因编码,属于转运蛋白超家族,即 ABC (ATP binding cassette family) 家族,其自身具有 ATP 酶活性,结合的 ATP 可以被它水解,并借助由此产生的能量将底物转运。抗肿瘤药物如顺铂在进入细胞时与嵌入细胞膜脂质双层的 P-gp 的特殊位点结合,依靠 ATP 水解释放的能量被运出靶细胞外,使肿瘤细胞内化疗药物的蓄积浓度降低而不能有效杀死肿瘤细胞,于是作用到靶位细胞内的药物浓度就会相对降低,因而产生 MDR^[13]。最近已有研究证实,在前列腺癌细胞中,PI3K/Akt 通路的激活,会导致 P-gp 的表达增加^[14];在鼠淋巴瘤 L1210 细胞中,P-gp 基因的转录会随着 PI3K/Akt 通路的阻断

而被抑制^[15]。PI3K/Akt 通路可通过调节 P-gp 的表达来影响肿瘤细胞的多药耐药。

本实验以肺癌细胞 A549 和其耐顺铂细胞 A549/DDP 为研究对象,研究补中益气汤含药血清对两细胞株的生长抑制情况,并检测含药血清对 p-Akt 和 P-gp 基因、蛋白表达的影响,实验中发现,补中益气汤含药血清可降低 A549/DDP 对 DDP 的 IC_{50} ,并呈浓度依赖效应,可部分逆转 A549/DDP 对顺铂的耐药作用,而补中益气汤含药血清联合 LY294002 作用,效果更佳。除此之外,中剂量浓度以上的补中益气汤含药血清可有效的减少 p-Akt 和 P-gp 蛋白的表达,应用 LY294002 之后,p-Akt 蛋白的表达有效的被阻断,P-gp 蛋白的表达也随之进一步下降;在基因检测方面,中剂量浓度以上的补中益气汤含药血清能下调 Akt 和 P-gp 的 mRNA 的表达,应用 LY294002 之后,Akt 的 mRNA 的表达没有明显改变,推测其原因为 LY294002 只阻断了 Akt 蛋白的



1) $P < 0.05$ 与 A549 空白血清组比较; 2) $P < 0.05$, 3) $P < 0.01$ 与 A549/DDP 空白血清组比较

1. A549 10% 空白血清组; 2. A549/DDP 10% 空白血清组; 3. A549/DDP 补中益气汤 10% 高剂量 ($11.34 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 含药血清联合阻滞剂 ($2.5 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$) 组; 4. A549/DDP 补中益气汤 10% 低剂量 ($2.84 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 含药血清组; 5. A549/DDP 补中益气汤 10% 中剂量 ($5.67 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 含药血清组; 6. A549/DDP 10% 高剂量 ($11.34 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组; 7. A549/DDP 阻滞剂 ($25 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$) 组

图 3 各组细胞中 p-Akt 和 P-gp mRNA 的表达 (PT-PCR 法)

磷酸化,并不影响其基因的表达,而 P-gp 的 mRNA 的表达量有一定程度的下降,推测其原因为 LY294002 使 PI3K/Akt 通路的活性受到抑制,减少了 p-Akt 的生成,进而抑制了 P-gp 的表达。本研究表明,中剂量浓度以上补中益气汤含药血清可在蛋白和基因两方面抑制 p-Akt 和 P-gp 的表达,并通过此途径逆转 A549/DDP 的耐 DDP 作用,若与 PI3K/Akt 通路的特异性阻滞剂 ly294002 合用,效果更佳。

目前,对于中医药改善肿瘤耐药已有大量的实验研究,如一些实验发现,抗癌扶正方可降低肝癌细胞中 p-Akt 的表达,诱导细胞发生凋亡^[16];黄连可增强大鼠肠黏膜 P-gp 的活性,而黄芩发挥的却是抑制作用^[17]等。本研究结果可为临床逆转多药耐药、制定合理的治疗方案提供理论参考。但补中益气汤含药血清对 A549/DDP 耐药逆转的具体机制还需进一步研究。

[参考文献]

[1] 岳文涛,王小敏,王玥. PI3K/Akt/mTOR 信号转导途径与非小细胞肺癌的关系[J]. 中国肺癌杂志,2009, 12(4):312.
 [2] 郭其森. 非小细胞肺癌内科治疗的现状[J]. 中华肿瘤防治杂志,2009,16(10):721.
 [3] Kim C S, Vasko V V, Kato Y, et al. AKT activation promotes metastasis in a mouse model of follicular thyroid carcinoma [J]. Endocrinology, 2005, 146 (10):4456.
 [4] Lin H L, Yang M H, Wu C W, et al.

22Methoxyestradiol attenuates phosphatidylinositol 3kinase/Akt pathway mediated metastasis of gastric cancer[J]. Int J Cancer,2007,121(11):2547.
 [5] Lane D, Robert V, Grondin R, et al. Malignant ascites protect against TRAIL induced apoptosis by activating the PI3 K/Akt pathway in human ovarian carcinoma cells [J]. Int J Cancer,2007,121(6):1227.
 [6] Lim W T, Zhang W H, Miller C R, et al. PTEN and phosphorylated AKT expression and prognosis in early and late stage non-small cell lung cancer [J]. Oncol Rep,2007,17(4):853.
 [7] Hiroyasu Yasuda, Kat sutoshi Nakayama, Mika Watanabe, et al. Nitroglycerin treatment may enhance chemosensitivity to docetaxel and carboplatin in patients with lung adenocarcinoma I clin cancer res [J]. Sharom FJ1 Shedding Light, 2006,12(2):6748.
 [8] 霍杰,吕莉. 中医药治疗肺癌的临床研究进展[J]. 中国医药信息, 2003, 20(3):7.
 [9] 季宇彬,江蔚新,张秀娟. 补中益气汤对环磷酰胺抗癌活性和毒性的影响[J]. 中国中药杂志,1989,14 (03):48.
 [10] 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.
 [11] 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.
 [12] Liu L Z, Zhou X D, Qian G. AKT1 amplification regulates cisplatin resistance in human lung cancer cells through the mammalian target of rapamycin/p70S6K1 pathway[J]. Cancer Res, 2007,67(13):6325.
 [13] Sauna Z E, Ambudkar S V. Evidence for a requirement for ATP hydrolysis at two distinct steps during a single turnover of the catalytic of human P-glycoprotein [J]. Proc Natl Acad Sci USA,2000,97:2515.
 [14] Lee J T Jr, Steelman I S, McCubrey J A. Phosphatidylinositol 3-kinase activation leads to multidrug resistance protein-1 expression and subsequent chemoresistance in advanced prostate cancer cells [J]. Cancer Res,2004,64(22):8397.
 [15] Choi B H, Kim C G, Lim Y, et al. Curcumin down-regulates the multidrug-resistance mdr1b gene by inhibiting the PI3K/Akt/NF kappa B pathway [J]. Cancer Lett,2008,259(1):111.
 [16] 赵冬耕,孙佳,王明艳. 抗癌扶正方对人肝癌细胞 SMMC-7721 PI3K/AKT 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(11):136.
 [17] 韦灵玉,李静. 黄连黄芩配伍对大鼠肠黏膜 P-gp 活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(8):141.

[责任编辑 聂淑琴]