

扶正抗癌方联合吉非替尼对 A549 细胞的协同抗癌作用及机制

方芳¹, 石玮¹, 金晓炜³, 吴万垠^{2*}

(1. 广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530000;

2. 广东省中医院芳村分院, 广州 510370; 3. 云南省肿瘤医院, 昆明 650018)

[摘要] **目的:** 通过体外体内实验观察扶正抗癌(FZKA)方联合吉非替尼(Gefitinib)对人肺腺癌 A549 细胞增殖, 凋亡及侵袭转移能力的影响, 并探讨研究其相关作用机制。**方法:** 采用噻唑蓝(MTT)比色法检测空白组, FZKA 方组(0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 g·L⁻¹), Gefitinib 组(10, 20, 40, 60, 80, 100 μmol·L⁻¹)的干预 A549 细胞 24, 48, 72 h 及 FZKA 方(2 g·L⁻¹)联合 Gefitinib(40 μmol·L⁻¹)组干预 A549 细胞 24 h 的增殖能力; 流式细胞术分析检测联合用药组细胞凋亡及周期的变化; 划痕实验和 transwell 小室实验检测联合用药组的侵袭转移能力变化; 蛋白免疫印迹法检测细胞联合用药组活化的半胱氨酸蛋白酶-3 (cleaved-Caspase-3), B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2), B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白(Bax), F-盒和含蛋白 7 的 WD 重复结构域(FBW7)及髓样细胞白血病-1(MCL-1)蛋白表达的变化情况。**结果:** 与空白组比较, FZKA 方, Gefitinib 呈剂量依赖性、时间依赖性显著抑制 A549 细胞的增殖($P < 0.05$); 与空白组比较, FZKA 方组, Gefitinib 组均能减弱细胞划痕愈合能力和侵袭能力, 促进细胞凋亡($P < 0.05$), 均能上调 Bax, Caspase-3, FBW7 蛋白表达, 下调 Bcl-2, MCL-1 蛋白表达($P < 0.05$); 与 Gefitinib 单独给药比较, FZKA 方联合 Gefitinib 抑制 A549 细胞增殖能力和诱导细胞凋亡更明显($P < 0.05$); 细胞划痕愈合能力与侵袭能力明显减弱($P < 0.05$); 上调 Bax, Caspase-3, FBW7 蛋白表达, 下调 Bcl-2, MCL-1 蛋白表达效果明显($P < 0.05$)。**结论:** FZKA 方与 Gefitinib 合用后比单用 Gefitinib 更能诱导 A549 细胞凋亡, 抑制其增殖及侵袭转移能力更强, 两者具有协同抗癌作用, 其机制可能与调控 FBW7/MCL-1 通路相关。

[关键词] 扶正抗癌方; 吉非替尼; 协同作用; F-盒和含蛋白 7 的 WD 重复结构域(FBW7)/髓样细胞白血病-1(MCL-1)

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)04-0095-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20192221

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190802.1245.008.html>

[网络出版时间] 2019-08-02 13:40

Synergistic Anti-cancer Effect and Mechanism of FZKA Decoction Combined with Gefitinib on A549 Cells

FANG Fang¹, SHI Wei¹, JIN Xiao-wei³, WU Wan-yin^{2*}

(1. First Clinical College, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanjing 530000, China;

2. Fangcun Branch of Guangdong Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510370, China;

3. Yunnan Cancer Hospital, Kunming 650018, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Fuzheng Kangai (FZKA) decoction combined with gefitinib on the cells proliferation, apoptosis, invasion and metastasis of human lung adenocarcinoma A549 cells *in vitro* and *in vivo*, and relevant mechanisms. **Method:** The A549 cell proliferation of the control group, FZKA decoction groups (0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 g·L⁻¹), Gefitinib groups (10, 20, 40, 60, 80, 100 μmol·L⁻¹)

[收稿日期] 20190217(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81803919); 广西壮族自治区卫生厅中医药科技专项(GZPT13-49); 广西中医药大学自然科学研究课题项目(2017QN030)

[第一作者] 方芳, 博士, 主治医师, 从事中医药对分子靶向药物治疗肺癌的增敏研究, E-mail: 844760092@qq.com

[通信作者] * 吴万垠, 博士生导师, 主任医师, 从事中医药对分子靶向药物治疗肺癌的增敏研究, E-mail: wwan-yin@126.com

for 24, 48, 72 hours, and FZKA decoction ($2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) combined with Gefitinib ($10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) groups for 24 hours was detected by methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay. The changes of cell apoptosis, invasion and metastasis abilities of A549 cells were analyzed by flow cytometry, Wound Healing, transwell invasion assay. Western blot assay was used to examine the protein expressions of cleaved Caspase-3, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), B-cell lymphoma-2 associated X (Bax), F-box and WD repeat domain-containing (FBW7) and myeloid cell leukemia-1 (MCL-1) *in vitro*. **Result:** Compared with control group, FZKA decoction group and Gefitinib group inhibited the cell proliferation, cell apoptosis, cell invasion and metastasis abilities in a dose-dependent and time-dependent manner, and improve the protein expressions of Bax, Caspase-3, FBW7, but decreased the protein expressions of Bcl-2, MCL-1 ($P < 0.05$). Compared with treatment with Gefitinib alone, FZKA combined with Gefitinib inhibited the proliferation of A549 cells, and induced apoptosis more significantly ($P < 0.05$). Compared with treatment with Gefitinib alone, the cell scratch healing and invasion abilities were significantly reduced after combined treatment ($P < 0.05$). FZKA decoction combined with Gefitinib up-regulated Bax, Caspase-3 and FBW7 protein expressions, and down-regulated Bcl-2 and MCL-1 protein expressions compared with treatment with Gefitinib alone ($P < 0.05$). **Conclusion:** FZKA decoction combined with Gefitinib can inhibit the proliferation, invasion and metastasis, and induce apoptosis on A549 cells. The mechanism may be associated with the FBW7/MCL-1 pathway.

[**Key words**] Fuzheng Kangai decoction; Gefitinib; synergistic effect; F-box and WD repeat domain-containing (FBW7)/myeloid cell leukemia-1 (MCL-1)

当今,肺癌的发生率和死亡率仍占据全球癌症的一个主导地位,预计在 2018 年将新增 210 万例肺癌患者,和 180 万肺癌死亡病例,约占据全球癌症死亡病例的 18.4%。大部分男性肺癌死亡患者分布在东欧、西亚、非洲北部,特别是在东亚(中国)和亚洲东南部^[1]。肺癌根据病理类型可分为小细胞肺癌和非小细胞肺癌(NSCLC),其中 NSCLC 约占 85%~90%,大部分在临床确诊时属于中晚期,且整体 5 年生存率仍低于 20%^[2]。近年来,分子靶向药物表皮生长因子受体酪氨酸酶抑制剂(EGFR-TKIs)对表皮生长因子受体(EGFR)基因突变的晚期非小细胞肺癌患者,其疗效优于化疗,其中代表药物为吉非替尼(Gefitinib)。但是,大部分有效患者在服用 Gefitinib 10~16 个月时出现获得性耐药^[3]。所以,寻找克服耐药的方法成为了分子靶向治疗亟需解决的问题之一。Gefitinib 耐药的主要机制是 EGFR 基因 Exon20 的二次突变,T790M 基因突变,间质上皮转化因子(MET)扩增,肝细胞生长因子(HGF)过表达等^[4-8],这些机制最终都要通过胞内磷脂酰肌醇激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)或者甲基乙基酮(MEK)/细胞外调节蛋白激酶(ERK)通路影响细胞增殖和细胞生存。据相关研究报告,F-盒和含蛋白 7 的 WD 重复结构域(FBW7)/及髓样细胞白血病-1(MCL-1)非依赖胞 PI3K/Akt 和 MEK/ERK 通路介导 EGFR-TKIs 获得性耐药^[9]。

扶正抗癌(FZKA)方为广东省中医院肿瘤科吴万垠主任的经验方,在临床应用中疗效确切。前期临床也表明,FZKA 方能延长晚期非小细胞肺癌患者的生存时间,提高患者的生存质量^[10],基础研究显示,其机制可能为 FZKA 方激活半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)/B 淋巴细胞瘤-2 相关 X(Bax),信号转导子与转录激活子(STAT3)/胰岛素样生长因子结合蛋白 1(IGFBP1)/波形蛋白(Vimentin)/N-钙黏蛋白(N-cadherin)/基质金属蛋白酶-9(MMP-9),腺苷酸活化蛋白激酶 α (AMPK α)/Akt/叉头蛋白 O3a(FOXO3a),PI3K/附膜蛋白 1(Muc1),MET/PI3K 等通路从而有效诱导肺癌细胞凋亡和抑制肺癌细胞增殖及侵袭转移能力^[11-15]。

目前研究 FZKA 方促进 Gefitinib 药敏性的潜在机制的研究有限,本研究拟通过探索 FZKA 方联合 Gefitinib 应用后对人肺腺癌 A549 细胞增殖凋亡、侵袭转移的影响,从 FBW7/MCL-1 通路探讨 FZKA 方联合 Gefitinib 对 A549 细胞协同抗癌作用的机制。

1 材料

1.1 细胞株 人肺腺癌 A549 细胞,由广东省中医药科学院提供。

1.2 药物和试剂 FZKA 方颗粒由黄芪 30 g,太子参 30 g,白术 15 g,甘草片 10 g,炒薏苡仁 30 g,山慈菇 30 g,白花蛇舌草 30 g,龙葵 30 g,石见穿 30 g,八月札 30 g,蛇泡筋 30 g,莪术 15 g 炮制而成,由广东

省中医院制剂室提供,批号 J1503001,饮片经柳州市中医医院药剂科梁学政主任鉴定为正品;Gefitinib 溶液(英国阿斯利康公司,国药准字 J20100014);DMEM 培养基,胎牛血清,胰酶,磷酸盐缓冲液(美国 Gibco 公司,批号分别为 8118240, 1671329, 957208, 8118127);噻唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司,批号#MKBX0151V);BCA 蛋白检测试剂盒,5 × 上样缓冲液(美国 Thermo 公司,批号分别为 #QK224833, P0015);Annexin V FITC/碘化丙啶(PI) apoptosis kit, cell cycle kit(南京凯基生物公司,批号分别为 KGA105-KGA108, KGA511-KGA512);兔抗 Caspase-3, Bcl-2, Bax, β -肌动蛋白(β -actin)多克隆抗体,HRP-羊抗兔酶标抗二抗(美国 CST 公司,批号分别为 9662S, 3498S, 2772S, 4970S-15, 7074S-27);兔抗 FBW7, MCL-1 多克隆抗体(美国 Abcam 公司,批号分别为 AR104057-9, AR226223-40);transwell 小室, matrigel(美国 Corning 公司,批号分别为 06118026, 8113007);结晶紫染色液(南京碧云天公司,批号 C0255)。

1.3 仪器 ME215S 型电子天平(美国 Sartorius 公司);IC-1000 型全自动细胞计数仪(上海 Count Star 公司);IX71 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);VICTOR X5 型多功能酶标仪(美国 PerkinElmer 公司);IKA MS3 型圆周振荡摇床(德国 IKA 公司);5702 型冷冻离心机, 5418R 小型离心机(德国 Eppendorf 公司);FC500/MCL 型 Gallios 型流式细胞仪(美国 Beckman 公司);MP-4 型蛋白印迹垂直电泳槽和转膜槽, 170-8265 型化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基作为细胞培养液,将细胞放在 37 °C 5% CO₂ 条件下的无菌细胞培养箱中培养,取对数生长期的细胞待用。

2.2 药物制备 称取适量的 FZKA,加入 DMEM 培养基,充分振荡并使用超声助溶,使其完全溶解,3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清用 0.22 μ m 滤器过滤后,呈混悬状态,于 4 °C 冰箱保存待用,用时充分摇匀。

2.3 MTT 比色法检测细胞活力 取对数生长期的 A549 细胞,经胰酶消化吹打成细胞悬液后,经计数仪技术后,以 3×10^3 个/孔接种于 96 孔板,置于细胞培养箱中培养 24 h。待第 2 天细胞贴壁后,用 5 mL 注射器轻轻吸走旧培养液,加入 FZKA 方(0.2,

0.4, 0.8, 1.6, 3.2 g·L⁻¹)及吉非替尼(5, 10, 15, 20, 40 mg·L⁻¹),同时分别设空白组,使每孔最终的培养液总体积为 100 μ L,每个浓度设 3 个平行复孔,分别培养 24, 48, 72 h,吸走旧液。每孔加入 0.5 g·L⁻¹ MTT 溶液 15 μ L,继续在培养箱中培育 4 h 后倒出液体,并用滤纸吸干液体,每孔加入 DMSO 150 μ L,震荡 10 min,在酶标仪中检测波长为 490 nm 的吸光度 *A*,设空白组细胞存活率为 100%,细胞增殖抑制率 = $(1 - A_{\text{药物组}}/A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

2.4 细胞划痕实验检测细胞迁移 取对数生长的细胞,以 5×10^5 个/孔接种在六孔板里,培养 24 h,细胞铺满六孔板底面,用 200 μ L 的枪头均匀垂直板,以约 45° 斜角划痕,保证划痕边缘整和平整。弃去培养液,用 PBS 轻轻地清洗漂浮的细胞。根据细胞增殖结果,选取 FZKA 方组(2 g·L⁻¹), Gefitinib 组(10 mg·L⁻¹),联合给药组取 FZKA 方(2 g·L⁻¹), Gefitinib(10 mg·L⁻¹),干预 A549 细胞 24 h,分别在 0, 24 h 时,光学显微镜下选取适当的视野拍照,记录每个孔细胞的迁移情况,并用 Image J 软件测量划痕的距离的变化。

2.5 Transwell 实验检测细胞增殖 实验前 1 d,将细胞培养在无血清的培养基中饥饿 12 h。第 2 天,取出小室放在 24 孔板上,用 1:8 稀释的 matrigel 胶 200 μ L 包被 Transwell 小室底部膜的上室面,细胞培养箱孵育 30 min 后,吸出小室中残余液体,每孔加入 5×10^5 个 A549 细胞 100 μ L 均匀铺在小室内。另外,在 24 孔板里加入含 10% 胎牛血清的培养液 500 μ L,将小室放在其上面,放在培养箱里培养 24 h。最后用棉签把小室内的细胞轻轻刮除,用 4% 的多聚甲醛固定下室细胞 30 min,后用 PBS 洗 3 次,每次 10 min,再在 24 孔板中加入结晶紫染色液 500 μ L,将小室置于其中,使膜浸没在结晶紫染色液中,孵育 15 ~ 30 min 取出, PBS 洗 3 次,每次 15 min。在光学显微镜下观察并拍照,并统计细胞数目。

2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡率 细胞分组及培养同 2.4 项,收集细胞,用 PBS 洗涤细胞 2 次,加入 Binding Buffer 500 μ L 重悬细胞,每管加入 Annexin V-FITC 5 μ L 和 PI 5 μ L,室温避光孵育 5 min,采用流式细胞仪激发波长 488 nm 处检测样品凋亡情况,实验重复 3 次。

2.7 流式细胞仪检测细胞周期 细胞分组及培养同 2.4 项,收集细胞,用 PBS 洗涤细胞 2 次,离心,加入预冷 70% 乙醇 500 μ L,4 °C 固定过夜。后用 PBS 洗去固定液,每孔加入 RNase A 50 μ L 和 PI 10 μ L,

室温避光孵育 30 min,采用流式细胞仪激发波长 488 nm 处检测样品周期情况,实验重复 3 次。

2.8 蛋白质免疫印迹法检测蛋白表达 细胞分组及培养同 2.4 项,收集细胞,提取蛋白。制备蛋白样品,用 PBS 轻轻清洗细胞 2 遍,用 ripa 强裂解液冰上裂解细胞 30 min,细胞刮将细胞刮下并移至 1.5 mL 的离心管内,4 ℃,12 000 r·min⁻¹ 离心 20 min 后,转移上清至新离心管。BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度,用 5×蛋白上样缓冲液按比例混合样品,100 ℃,10 min 变性,存于 -20 ℃ 冰箱。取蛋白样品上样,跑电泳,转膜,封闭,一抗(1:1 000)室温孵育 20 min,4 ℃ 冰箱孵育过夜后, TBST 液 10 min,洗膜 3 次,二抗(1:5 000)孵育 1 h,洗膜。在化学发光成像系统免疫发光仪器中,用 Image Lab 显影成像。实验重复 3 次,Image J 软件统计条带灰度值。

2.9 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件处理结果,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布和方差齐时,采用单因素方差分析;方差不齐时,采用秩和检验;组间两两比较,采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 FZKA 方,Gefitinib 对 A549 细胞的增殖能力的影响 与空白组比较,FZKA 方,Gefitinib 作用于 A549 细胞后,随着给药浓度的增加,细胞抑制率呈递增趋势($P < 0.05$);与 24 h 比较,随着药物作用时间的增加,细胞抑制率呈递增趋势。见表 1,2。

表 1 Gefitinib 方对 A549 细胞的增殖能力的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of Gefitinib decoction on proliferation of A549 cell ($\bar{x} \pm s, n = 3$) %

组别	浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	24 h 细胞抑制率	48 h 细胞抑制率	72 h 细胞抑制率
Gefitinib	10	12.27 ± 3.56 ¹⁾	19.13 ± 3.51 ¹⁾	26.30 ± 4.89 ¹⁾
	20	17.88 ± 6.34 ¹⁾	25.27 ± 2.40 ¹⁾	30.33 ± 11.62 ¹⁾
	40	22.78 ± 3.07 ¹⁾	40.79 ± 1.51 ¹⁾	47.80 ± 3.44 ¹⁾
	60	37.64 ± 1.50 ¹⁾	53.01 ± 10.17 ¹⁾	63.86 ± 5.63 ¹⁾
	80	44.74 ± 6.48 ¹⁾	61.84 ± 5.98 ¹⁾	70.43 ± 3.40 ¹⁾
	100	57.62 ± 6.12 ¹⁾	68.37 ± 10.33 ¹⁾	79.21 ± 1.70 ¹⁾

注:设空白组抑制率为 0;与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与 FZKA 方组比较²⁾ $P < 0.05$;与 Gefitinib 组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 2~9 同)。

3.2 FZKA 方联合 Gefitinib 对 A549 细胞增殖能力的影响 FZKA 方,Gefitinib 联合作用于 A549 细胞后,与空白组比较,均有效地抑制 A549 细胞的增殖

表 2 FZKA 对 A549 细胞的增殖能力的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of FZKA on proliferation of A549 cells($\bar{x} \pm s, n = 3$) %

组别	质量浓度 / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	24 h 细胞抑制率	48 h 细胞抑制率	72 h 细胞抑制率
FZKA 方	0.2	0.98 ± 1.47 ¹⁾	1.61 ± 0.64 ¹⁾	5.20 ± 0.56 ¹⁾
	0.4	3.98 ± 4.11 ¹⁾	4.98 ± 3.14 ¹⁾	9.99 ± 6.67 ¹⁾
	0.8	9.13 ± 4.60 ¹⁾	9.43 ± 3.69 ¹⁾	19.83 ± 1.76 ¹⁾
	1.6	11.71 ± 4.86 ¹⁾	17.19 ± 4.30 ¹⁾	26.23 ± 4.36 ¹⁾
	3.2	16.25 ± 4.91 ¹⁾	23.46 ± 3.16 ¹⁾	32.07 ± 1.525 ¹⁾
	4.6	21.64 ± 3.59 ¹⁾	32.35 ± 5.33 ¹⁾	45.79 ± 4.06 ¹⁾

($P < 0.05$);与单独 FZKA 方,Gefitinib 给药组比较,细胞抑制率更明显($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 FZKA 方和 Gefitinib 联合对 A549 细胞增殖能力的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of FZKA decoction combined with Gefitinib on proliferation of A549 cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度	细胞抑制率/%
FZKA 方	2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	16.90 ± 4.88 ¹⁾
Gefitinib	40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	26.42 ± 4.58 ¹⁾
FZKA 方 + Gefitinib	2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ + 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	44.15 ± 1.93 ^{1,2,3)}

3.3 FZKA 方联合 Gefitinib 对 A549 细胞凋亡率的影响 与空白组比较,各用药组凋亡率明显增加($P < 0.05$);联合用药组细胞凋亡率较单独使用 FZKA 方,Gefitinib 的细胞凋亡率增加更明显($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 FZKA 方联合 Gefitinib 对 A549 细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of FZKA decoction combined with Gefitinib on apoptosis rate of A549 cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度	细胞凋亡率/%
空白	-	0.28 ± 0.06
FZKA 方	2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	3.25 ± 0.34 ¹⁾
Gefitinib	40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	4.02 ± 0.54 ¹⁾
FZKA 方 + Gefitinib	2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ + 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	10.67 ± 1.51 ^{1,2,3)}

3.4 FZKA 方联合 Gefitinib 对 A549 细胞周期分布的影响 与空白组比较,各用药组 G₀/G₁ 期细胞的比例明显增多,S 期细胞的比例明显减少($P < 0.05$);与 FZKA 方,Gefitinib 组比较,联合用药组较细胞 G₀/G₁ 期细胞的比例明显增加,S 期细胞的比例明显减少($P < 0.05$)。见表 5。

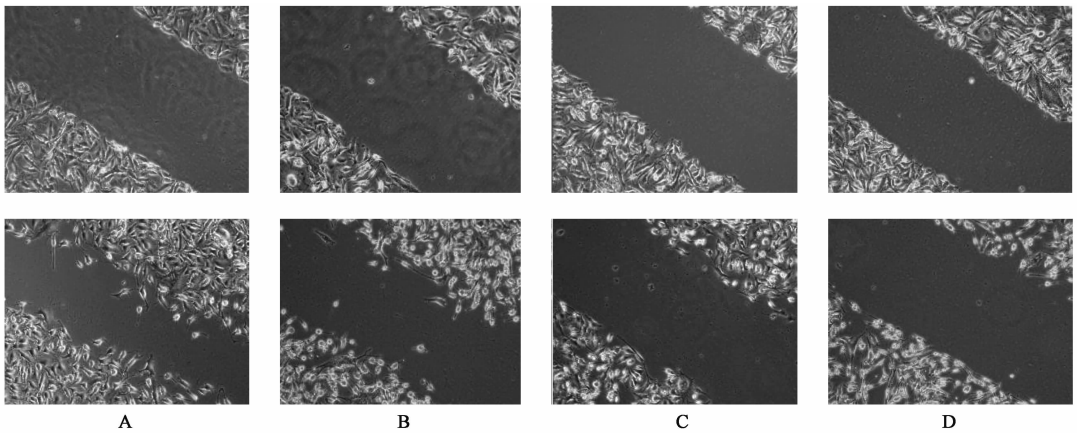
表 5 FZKA 方联合 Gefitinib 对细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of FZKA decoction combined with Gefitinib on cell cycle of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度	G ₀ /G ₁ 期	G ₂ /M 期	S 期
空白	-	30.52 ± 1.42	18.85 ± 0.91	50.64 ± 2.13
FZKA 方	2 g·L ⁻¹	41.95 ± 1.73 ¹⁾	21.23 ± 3.21 ¹⁾	36.83 ± 1.62 ¹⁾
Gefitinib	40 μmol·L ⁻¹	47.07 ± 2.23 ¹⁾	12.75 ± 5.00 ¹⁾	40.18 ± 3.42 ¹⁾
FZKA 方 + Gefitinib	2 g·L ⁻¹ + 40 μmol·L ⁻¹	55.20 ± 4.00 ^{1,2,3)}	16.73 ± 4.00 ^{1,2,3)}	28.03 ± 2.08 ^{1,2,3)}

3.5 FZKA 方联合 Gefitinib 对 A549 细胞转移侵袭能力的影响 与空白组比较,各用药组划痕愈合能力减弱 ($P < 0.05$);与 FZKA 方, Gefitinib 比较, FZKA 方联合 Gefitinib 组划痕愈合能力减弱 ($P < 0.05$)。与

空白组比较,各用药组穿过 transwell 小室的细胞数目均减少 ($P < 0.05$),与 FZKA 方组, Gefitinib 组比较, FZKA 方联合 Gefitinib 组穿过 transwell 小室的细胞数目减少更明显 ($P < 0.05$)。见图 1, 2 和表 6, 7。



A. 空白组; B. FZKA 方组; C. Gefitinib 组; D 联合用药组 (图 2~4 同)

图 1 FZKA 方联合 Gefitinib 对 A549 细胞划痕愈合能力的影响 (倒置显微镜, ×100)

Fig. 1 Effect of FZKA decoction combined with Gefitinib on scratch healing ability of A549 cells (inverted microscope, ×100)

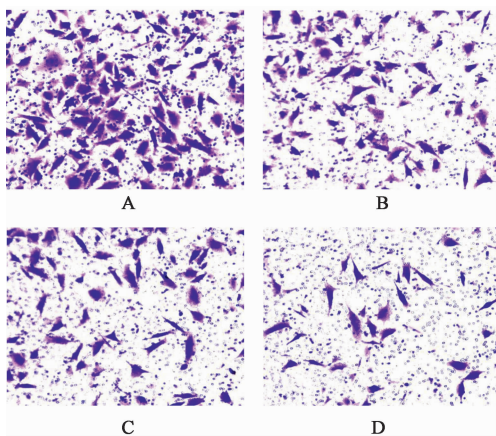


图 2 FZKA 方联合 Gefitinib 组对 A549 细胞侵袭能力的影响 (结晶紫染色, ×200)

Fig. 2 Effect of FZKA decoction combined with Gefitinib on invasive ability of A549 cells (crystal violet staining, ×200)

3.6 FZKA 方联合 Gefitinib 对凋亡相关蛋白表达的影响 与空白组比较,各用药组 Bcl-2 蛋白表达明显下降, cleaved-Caspase-3, Bax 蛋白表达明显上调 ($P <$

表 6 FZKA 方联合 Gefitinib 能减弱划痕愈合能力 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effect of FZKA decoction combined with Gefitinib in reducing scratch healing ability of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度	24 h 划痕长度的变化率/%
FZKA 方	2 g·L ⁻¹	54.53 ± 0.52 ¹⁾
Gefitinib	40 μmol·L ⁻¹	47.34 ± 3.06 ¹⁾
FZKA 方 + Gefitinib	2 g·L ⁻¹ + 40 μmol·L ⁻¹	3.28 ± 0.12 ^{1,2,3)}

注: 设空白组 24 h 划痕长度变化率为 100%。

表 7 FZKA 方联合 Gefitinib 对细胞侵袭能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Effect of FZKA decoction combined with Gefitinib on invasive ability of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度	穿过基质膜的细胞数/个
空白	-	374.00 ± 17.35
FZKA 方	2 g·L ⁻¹	274.00 ± 22.72 ¹⁾
Gefitinib	40 μmol·L ⁻¹	269.00 ± 39.89 ¹⁾
FZKA 方 + Gefitinib	2 g·L ⁻¹ + 40 μmol·L ⁻¹	183.00 ± 16.04 ^{1,2,3)}

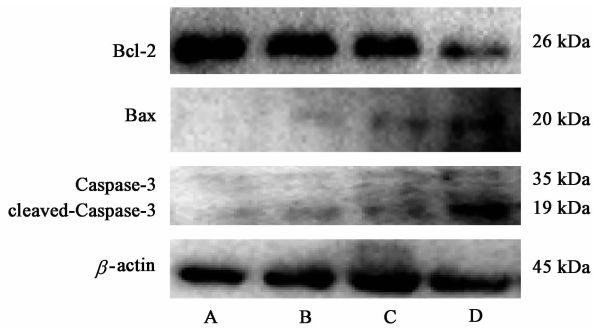


图 3 FZKA 方联合 Gefitinib 用药 A549 细胞 Bcl-2, Bax, Caspase-3 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of Bcl-2, Bax and Caspase-3 protein expressions of A549 cells after FZKA decoction combined with Gefitinib

表 8 FZKA 方联合 Gefitinib 对 A549 细胞 Bcl-2, Bax, cleaved-Caspase-3 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Effect of FZKA decoction combined with Gefitinib on Bcl-2, Bax, cleaved-Caspase-3 expressions of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度	Bcl-2/ β -actin	Bax/ β -actin	Caspase-3/ β -actin
FZKA 方	$2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	$0.60 \pm 0.01^{1)}$	$3.06 \pm 0.01^{1)}$	$1.33 \pm 0.04^{1)}$
Gefitinib	$40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$0.39 \pm 0.03^{1)}$	$5.40 \pm 0.04^{1)}$	$2.98 \pm 0.57^{1)}$
FZKA 方 + Gefitinib	$2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + 40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$0.23 \pm 0.04^{1,2,3)}$	$8.82 \pm 0.04^{1,2,3)}$	$4.10 \pm 0.51^{1,2,3)}$

注: 设空白组蛋白相对表达为 1 (表 9 同)。

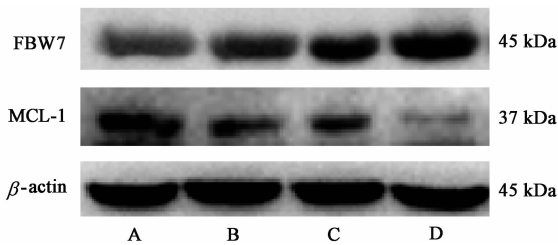


图 4 ZKA 方联合 Gefitinib 用药 A549 细胞 FBW7, MCL-1 蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of FBW7, MCL-1 protein expressions of A549 cells after FZKA decoction combined with Gefitinib

表 9 FZKA 方联合 Gefitinib A549 细胞 FBW7, MCL-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 Effect of FZKA decoction combined with Gefitinib on FBW7, MCL-1 expression of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度	FBW7/ β -actin	MCL-1/ β -actin
FZKA 方	$2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	$1.47 \pm 0.01^{1)}$	$0.56 \pm 0.01^{1)}$
Gefitinib	$40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$1.52 \pm 0.01^{1)}$	$0.40 \pm 0.03^{1)}$
FZKA 方 + Gefitinib	$2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + 40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$2.09 \pm 0.04^{1,2,3)}$	$0.23 \pm 0.01^{1,2,3)}$

固表、托毒排脓,炒薏苡仁健脾利湿,甘草片益气补中、调和诸药,五药共用健脾益气、补肺化痰,以扶正为主;白花蛇舌草、龙葵清热解毒,山慈姑清热解毒、消肿散结,八月札活血理气、散结消肿,石见穿活血化瘀,莪术破血行气消积,蛇泡筋清热散瘀,七药共用清热散结活血,以驱邪为主。全方从辨证论治、整体观念出发,标本同治,病证结合,共奏扶正抗癌之效^[17]。

0.05);与单独 FZKA 方, Gefitinib 组比较,联合用药组的 Bcl-2 蛋白表达量下调更明显,cleaved-Caspase-3、Bax 蛋白上调更明显 ($P < 0.05$)。见图 3,表 8。

3.7 FZKA 方联合 Gefitinib 对 FBW7/MCL-1 蛋白表达的影响 与空白组比较,各给药组 MCL-1 蛋白表达明显下降,FBW7 蛋白表达明显上调 ($P < 0.05$);与单独 FZKA 方, Gefitinib 组比较,联合用药组的 MCL-1 蛋白表达下调更明显,FBW7 蛋白上调更明显 ($P < 0.05$)。见图 4,表 9。

4 讨论

肺癌在中国医学中属于“肺痈”“肺积”“息贲”及“息积”等范畴,多因痰瘀毒互结,日久发为肿块。

病理特点是本虚标实,因虚而致实,虚实夹杂^[16]。随着肺癌靶向药的广泛应用,患者对靶向药耐药,且靶向药副作用大。中医药的地位越来越重要,靶向药联合应用中医药,能增强靶向药的疗效,减轻副作用。

扶正抗癌方是广东省中医院肿瘤科吴万垠主任根据多年的临床经验,系统分析肺癌的常见证型,辨证与辨病结合、中医与西医结合拟定的方药。全方以四君子汤为基础方,方中太子参益气健脾,生津润肺,白术健脾益气、燥湿化痰,黄芪补气升阳、益卫

扶正抗癌方单独应用可以调控肺癌细胞的增殖与凋亡^[18],本研究旨在明确扶正抗癌方与吉非替尼联合应用后是否有协同增效的作用及其作用机制。

本研究发现, FZKA 方联合 Gefitinib 在抑制人肺腺癌细胞 A549 上明显优于单独应用 Gefitinib,其可能通过 FBW7/MCL-1 通路对 A549 细胞增强抗癌作用。本研究选取 FZKA 方对细胞抑制不明显的

浓度联合低浓度的 Gefitinib 作用于 A549 细胞,结果显示,与 Gefitinib 单独用药比较,FZKA 方联合 Gefitinib 能明显抑制 A549 的增殖和侵袭转移,诱导其凋亡,并能调控凋亡相关蛋白 Bcl-2, Bax, Caspase-3,说明 FZKA 方能增强 Gefitinib 对 A549 细胞的敏感性。FBW7 是 E3 泛素连接酶的底物结合单位,是一种肿瘤抑制蛋白,其活性对维持 EGFR-TKIs 敏感性是必需的,可调节原癌基因(C-myc),细胞周期素 E(Cyclin E),氨基端激酶(c-Jun)和 MCL-1。MCL-1 是凋亡家族 Bcl-2 成员,其作用是抑制该家族的促凋亡因子 Bax 从而对凋亡起到负向调控。相关研究表明,FBW7 失活导致的 MCL-1 水平上调使结肠癌及卵巢癌细胞对抗微管药物紫杉醇及长春新碱耐药,而在 FBW7 敲除的细胞中利用 RNA 干扰抑制 MCL-1 水平则使细胞凋亡显著增加,从而恢复对药物的敏感性^[19]。本研究发现 FZKA 方联合 Gefitinib 后,FBW7 明显上调,MCL-1 明显下调,所以认为,FZKA 方联合 Gefitinib 可能通过 FBW7/MCL-1 通路增强对 A549 细胞抗癌作用。

综上,FZKA 方联合 Gefitinib 后可能通过 FBW7/MCL-1 增强对人肺腺癌细胞 A549 抗癌作用,抑制肺癌细胞增殖、侵袭转移能力,诱导其凋亡。本研究为中医经方联合西医靶向药治疗肺癌的思想提供了必要的实验依据,具有重要的临床意义。

[参考文献]

[1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA: Cancer J Clin, 2018,68(6):394-424.

[2] Orgenztern D, Waqar S, Subramanian J, et al. Prognostic impact of malignant pleural effusion at presentation in patients with metastatic non-small-cell lung cancer [J]. J Thorac Oncol, 2012, 7 (10): 1485-1489.

[3] Costa D B, Nguyen K S, Cho B C, et al. Effects of erlotinib in EGFR mutated non-small cell lung cancers with resistance to Gefitinib[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(21):7060-7067.

[4] Bell D W, Gore I, Okimoto R A, et al. Inherited susceptibility to lung cancer may be associated with the T790M drug resistance mutation in EGFR [J]. Nat Genet, 2005,37(12):1315-1316.

[5] Kobayashi S, Boggon T J, Dayaram T, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib[J]. N Engl J Med, 2005,352(8):786-792.

[6] Inukai M, Toyooka S, Ito S, et al. Presence of epidermal growth factor receptor gene T790M mutation as a minor clone in non-small cell lung cancer [J]. Cancer Res, 2006,66(16):7854-7858.

[7] Engelman J A, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling[J]. Science, 2007,316(5827):1039-1043.

[8] Suda K, Murakami I, Katayama T, et al. Reciprocal and complementary role of MET amplification and EGFR T790M mutation in acquired resistance to kinase inhibitors in lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(22):5489-5498.

[9] YE M, ZHANG Y, ZHANG X, et al. Targeting FBW7 as a strategy to overcome resistance to targeted therapy in non-small cell lung cancer[J]. Cancer Res, 2017,77(13):3527-3539.

[10] 吴万垠, 杨小兵, 龙顺钦, 等. 扶正抗癌方联合吉非替尼治疗晚期非小细胞肺癌优势人群与非优势人群的比较 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24 (9): 2152-2154.

[11] 李龙妹, 吴万垠, 王苏美, 等. 扶正抗癌方诱导 H1650 细胞凋亡的分子机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016,22(14):106-110.

[12] 李龙妹, 吴万垠, 龙顺钦, 等. 扶正抗癌方抑制 PC9 细胞转移的分子机制 [J]. 辽宁中医杂志, 2016 (10):2021-2025,2237.

[13] 李龙妹, 杨小兵, 吴万垠. 扶正抗癌方通过 SAPK/JNK-Sp1 通路对 H1650 细胞增殖的影响 [J]. 广东医学, 2016,37(14):2069-2072.

[14] 杨小兵, 陈晓, 吴万垠, 等. 扶正抗癌方联合吉非替尼对肺癌 A549 细胞的影响及机制 [J]. 中国中西医结合杂志, 2016,36(11):1340-1344.

[15] 李龙妹, 吴万垠. 扶正抗癌方抑制 A549 转移的分子机制 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31 (11): 4759-4762.

[16] 杨小兵, 龙顺钦, 邓宏, 等. 207 例晚期非小细胞肺癌中医证型分布特点 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2013,15(3):188-190.

[17] 杨小兵, 庄媛媛, 龙顺钦, 等. 扶正抗癌方对吉非替尼在肺癌 H1650、A549 细胞上的增效作用 [J]. 广东医学, 2018,39(20):3002-3009.

[18] 黎金华, 吴万垠, 杨小兵. 扶正抗癌方通过 PTEN/PI3K/Bad 通路调控肺癌 A549 细胞增殖与凋亡 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017,23(21):98-103.

[19] Wertz I E, Kusam S, Lam C, et al. Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7[J]. Nature, 2011,471(7336):110-114.

[责任编辑 张丰丰]