

麦门冬汤加减联合顺铂对 A549 细胞化疗增敏的作用机制

方芳^{1,2}, 谢伶俐¹, 宁雪坚², 范先基², 吴万垠^{1,3*}

(1. 广州中医药大学 第二临床医学院, 广州 510006;

2. 广西壮族自治区柳州市中医医院, 广西 柳州 545000; 3. 广东省中医院, 广州 510370)

[摘要] 目的:通过体外实验观察麦门冬汤加减(modified Maimendong Tang)联合顺铂(cisplatin)对人肺腺癌 A549 细胞增殖,凋亡及侵袭转移能力及对半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3),表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)的蛋白表达量的影响,探讨麦门冬汤加减化疗增敏的作用并研究其相关机制。方法:分别用麦门冬汤加减(15 g·L⁻¹),顺铂(9 mg·L⁻¹),联合药物干预肺腺癌 A549 细胞,实验分为空白组、麦门冬汤加减组、顺铂组、麦门冬汤加减+顺铂组。利用噻唑蓝(MTT)比色法检测不同质量浓度(0,5,10,15,20,25 g·L⁻¹)麦门冬汤加减和不同质量浓度(0,3,6,9,12,15 mg·L⁻¹)顺铂干预 A549 细胞 24,48,72 h 后的增殖能力,检测各组 A549 细胞的增殖能力;流式细胞术分析各组的凋亡程度及周期的变化;划痕实验和 transwell 小室实验检测各组的侵袭转移能力;蛋白免疫印迹法检测各组 Caspase-3,EGFR 蛋白表达的变化情况。结果:与空白组比较,麦门冬汤加减,顺铂干预 A549 细胞后呈浓度依赖性、时间依赖性抑制细胞的增殖($P < 0.05$);各药物组均能抑制 A549 细胞增殖能力,减弱划痕愈合能力,减少穿过 transwell 小室的细胞,促进细胞凋亡,下调 Caspase-3,EGFR 蛋白表达($P < 0.05$)。与单独给药组比较,麦门冬汤加减与顺铂联合应用后更能明显抑制肺腺癌 A549 细胞增殖能力和更能诱导 A549 细胞的凋亡, G_0/G_1 期的细胞增多更明显,S 期的细胞明显减少($P < 0.05$);联合用药后,细胞划痕愈合能力明显减弱,穿过 transwell 小室的细胞明显减少,Caspase-3,EGFR 的蛋白表达量下降更明显($P < 0.05$)。结论:麦门冬汤加减与顺铂合用后抑制肺癌细胞 A549 增殖及侵袭转移能力,诱导细胞凋亡,两者存在协同增敏作用,其相关机制可能与下调 Caspase-3,EGFR 的蛋白表达相关。

[关键词] 麦门冬汤加减; 顺铂; 肺癌细胞; 细胞凋亡; 细胞侵袭转移

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R289;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)04-0049-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20190217

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181024.1552.007.html>

[网络出版时间] 2018-10-26 09:33

Mechanism of Modified Maimendong Tang Combined with Cisplatin in Enhancing Chemosensitivity on Human Lung Adenocarcinoma A549 Cells

FANG Fang^{1,2}, XIE Ling-li¹, NING Xue-jian², FAN Xian-ji², WU Wan-yin^{1,3*}

(1. Second Clinical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Guangxi Zhuang Autonomous Region Liuzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine (TCM), Liuzhou 545000, China;

3. Guangdong Province Hospital of TCM, Guangzhou 510370, China)

[Abstract] **Objective:** To observe effect of modified Maimendong Tang combined with cisplatin on the cell proliferation, apoptosis, invasion and metastasis and the protein expressions of Caspase-3, epidermal growth factor receptor (EGFR) of human lung adenocarcinoma A549 cells *in vitro*, so as to investigate their relevant

[收稿日期] 20180604(006)

[基金项目] 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,在读博士,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,E-mail: wwanyin@126.com

mechanisms in inhibiting cells proliferation, invasion and metastasis and inducing apoptosis of A549 cells. **Method:** The lung cancer cells A549 were respectively treated with modified Maimendong Tang ($15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), cisplatin ($9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), and combined drugs. Afterwards, they were divided into control group, modified Maimendong Tang group, cisplatin group and modified Maimendong Tang combined with cisplatin group. Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assay was used to evaluate the proliferation of A549 cells treated with different concentrations of modified Maimendong Tang (0, 5, 10, 15, 20, 25 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) and cisplatin (0, 3, 6, 9, 12, 15 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) for 24, 48, 72 h. The proliferation of A549 cells in each group was detected by MTT assay; flow cytometry was used to detect the degree of apoptosis and cycle in the above four groups of cells; scratch test and transwell migration test were performed to observe the abilities of invasion and metastasis of each group; Western blot was used to detect Caspase-3 and EGFR protein expression. **Result:** The concentration of modified Maimendong Tang and cisplatin and the time of intervention were negatively correlated with the proliferative capacity of A549 cells ($P < 0.05$); compared with control group, modified Maimendong Tang could reduce the expressions of Caspase-3 and EGFR obviously ($P < 0.05$); compared with cisplatin group and modified Maimendong Tang group, the modified Maimendong Tang combined with cisplatin group significantly inhibited the proliferation of lung cancer cell and induced its apoptosis, the number of cells in G_0/G_1 phase increased apparently, and the cells in S phase decreased significantly ($P < 0.05$); compared with other groups, A549 cells treated with the combined drug showed the poorest ability of scar healing, the number of them passing through the transwell chamber significantly reduced, and the protein expressions of Caspase-3 and EGFR down-regulated ($P < 0.05$). **Conclusion:** Modified Maimendong Tang combined with cisplatin can inhibit the proliferation, invasion and metastasis and induce the apoptosis of lung cancer cells. Modified Maimendong Tang can synergistically enhance the action of cisplatin. The mechanism may be related to the down-regulation of Caspase-3 and EGFR protein expressions.

[**Key words**] modified Maimendong Tang; cisplatin; A549 cells; apoptosis; cell invasion and metastasis

随着世界人口的增长,人口老龄化的趋势,诸如吸烟、超重、缺乏身体活动以及与城市化和经济发展相关的生殖模式变化等既定风险因素的普遍存在,癌症的发生率逐年增加。其中,2012 年有 180 万新发肺癌病例,约占癌症诊断总数的 13%。肺癌是最常见的癌症和男性癌症死亡的主要原因。在女性中,肺癌是较发达国家癌症死亡的主要原因,也是欠发达国家癌症死亡的第二大原因^[1]。在我国,肺癌的发病率及死亡率居所有恶性肿瘤的首位,男性发病率和死亡率居第 1 位,女性发病率居第 2 位,死亡率居第 1 位^[2]。目前,西医治疗肺癌以手术,放疗,化疗为主。顺铂是非小细胞肺癌(NSCLC)晚期化疗的重要药物,是一种细胞周期非特异性药物,疗效与剂量相关,但剂量大时,毒副作用也相应增加,给患者增加了不少痛苦。中医中药从整体观念和辨证论治观点出发,根据患病脏腑的生理病理特性,驱邪同时兼顾正气,增强化疗的敏感性,降低化疗的毒副作用,因此,中药联合化疗治疗肺癌是常用治疗方案。寻找增效低毒的中医药也成了现今肿瘤治疗的研究新方向。

麦门冬汤出自《金匱要略·肺痿肺癰咳嗽上气病脉证治第七》,在此基础上立方,此方在柳州市中医院肿瘤科应用多年,并取得良好疗效,在前期临床研究中也证实了麦门冬汤加减联合化疗治疗气阴两虚痰浊泛肺型非小细胞肺癌患者,提高疾病无进展率,改善患者生活质量^[3]。但麦门冬汤加减联合顺铂对人肺腺癌细胞的增殖凋亡,转移侵袭的作用和机制尚未清楚。半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3)是细胞凋亡相关蛋白,表皮生长因子受体(EGFR)是肿瘤细胞生长的蛋白,麦门冬汤加减联合顺铂是否通过抑制 Caspase-3 和 EGFR 作用,尚未见相关报道。本研究以人肺腺癌细胞 A549 为实验对象,通过体外实验探讨麦门冬汤加减联合顺铂对非小细胞肺癌细胞增殖、凋亡,转移的作用及相关机制,为本方的应用提供实验室依据。

1 材料

1.1 细胞株 细胞 A549,由广东省中医药科学院提供,细胞传至第 5 代时应用在本实验。

1.2 药物和试剂 麦门冬汤加减由人参片、生地黄、海浮石、麦冬、百合、白英、瓜蒌皮、玄参、法半夏、

鳖甲、牡蛎、炙甘草、炮山甲^碎、灵芝组成,购自康美药业股份有限公司,经柳州市中医医院药剂科梁学政主任鉴定均为正品;顺铂(山东齐鲁制药有限公司,国药准字 H20023461);1640 培养基,胎牛血清,胰酶(美国 Gibco 公司,批号分别为 8118023,10099-141,25200071);磷酸盐缓冲液(PBS,美国 HyClone 公司,批号 AC13716274);噻唑蓝(MTT,广州威佳科技有限公司,批号 M8180);5 × loading buffer(美国 Thermo 公司,批号 P0015);Annexin V FITC/碘化丙啶(PI)apoptosis and cell cycle kit(杭州联科生物公司,批号 70-APCC101-60);抗 Caspase-3 兔多克隆抗体(美国 Abcam 公司,批号 ab32351);抗 EGFR,β-肌动蛋白(β-actin)兔多克隆抗体,HRP-羊抗兔酶标二抗(美国 CST 公司,批号分别为#7707S-6,4970S-15,7074S-27)。

1.3 仪器 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 Perkin Elmer 公司);5702 型高速冷冻离心机,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);Mini-PROTEAN Tetra 小型垂直电泳槽、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 A549 细胞使用含 10% 胎牛血清的 1640 培养基,于 37 °C 5% CO₂ 条件下的细胞培养箱中培养,取对数生长期细胞待用。

2.2 MTT 比色法细胞检测活力 取对数生长期的 A549 细胞,制成细胞悬液后,以 3 × 10³ 个/孔接种于 96 孔板,置于培养箱培育 24 h,待细胞贴壁后,吸弃旧培养基,加入不同质量浓度麦门冬汤加减(0,5,10,15,20,25 g · L⁻¹)及顺铂(0,3,6,9,12,15 mg · L⁻¹)100 μL,每个浓度设 6 个平行复孔,分别培养 24,48,72 h 后,吸弃旧液,每孔加入 0.5 g · L⁻¹ MTT 溶液 110 μL,继续培育 4 h 后吸出旧液,每孔加入二甲基亚砷(DMSO)150 μL,震荡 10 min,在酶标仪中检测波长为 570 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_{药物组} / A_{空白组}) × 100%。

2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡率 取对数生长期的 A549 细胞,制成细胞悬液,以 3 × 10⁵ 个/孔接种于 6 孔板,在培养箱培育 24 h 待细胞贴壁后,吸出旧培养液,予空白组,麦门冬汤加减组(15 g · L⁻¹),顺铂组(9 mg · L⁻¹),麦门冬汤加减 + 顺铂(15 g · L⁻¹ +

9 mg · L⁻¹)组处理,置于培养箱中培育 24 h 后用不含 EDTA 的胰酶收集细胞,用 PBS 洗涤细胞 2 次,离心,重悬细胞,每管加入 Annexin V-FITC 5 μL 和 PI 10 μL,避光孵育 5 min,采用流式细胞仪检测细胞凋亡,实验重复 3 次。

2.4 流式细胞仪检测细胞周期 取对数生长期的 A549 细胞,制成细胞悬液,以 3 × 10⁵ 个/孔接种于 6 孔板,在培养箱培育 24 h 待细胞贴壁后,吸弃旧培养液,分组及加药同 2.3 项,置于培养箱中培育 24 h 后用 0.25% 胰酶收集细胞,用 PBS 洗涤细胞 2 次,离心,每孔加入 DNA Staining solution 1 mL 和 Permeabilization solution 10 μL,涡旋振荡 10 s,避光孵育 30 min,采用流式细胞仪检测细胞周期,实验重复 3 次。

2.5 细胞划痕实验检测细胞愈合能力 先用记号笔在 12 孔板背面,用直尺均匀地划一横线。在孔中加入约 2 × 10⁵ 个细胞,待 A549 细胞生长铺满 80% 以上,用枪头比着直尺,尽量垂直于背后的横线划痕,枪头垂直,不能倾斜。用 PBS 洗细胞 2 次,去除划下的细胞,加入无血清培养基,分组及加药同 2.3 项。放入 37 °C 5% CO₂ 培养箱,培养。按 0,24 h 取样,拍照。

2.6 细胞侵袭实验检测细胞侵袭 transwell 孔板上室中加入基质胶,37 °C 孵育 transwell 0.5 h;上室加细胞悬液 200 μL,细胞数为 5 × 10⁵ 个,细胞分组及加药同 2.3 项。培养基含 2% FBS;下室加入 600 μL 细胞培养基,含 20% FBS;细胞培养箱中孵育 24 h;取出小室,晾干,用 4% 多聚甲醛固定 30 min;结晶紫染色,24 孔板中加入 0.1% 结晶紫 500 μL,将小室置于其中,使膜浸没在结晶紫中,孵育 15 ~ 30 min 后取出,PBS 清洗;显微镜下照相,并计数。

2.7 蛋白免疫印迹法检测 Caspase-3,EGFR 蛋白表达 取对数生长期的 A549 细胞,以 3 × 10⁵ 个/孔接种于 6 孔板,分组及加药同 2.3 项,给药 24 h 处理细胞,于冰上操作,PBS 清洗细胞,用蛋白裂解液裂解细胞,细胞刮刮下细胞,振荡,离心,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 × 蛋白上样缓冲液混合样品,煮沸变性,离心,存于 -80 °C。取蛋白样品上样,跑电泳,转膜,封闭,一抗(1:1 000)室温孵育 3 h,4 °C 冰箱孵育过夜后洗膜,二抗(1:5 000)孵育 1 h 后,洗膜。于化学发光成像系统免疫发光,用 Image Lab 显影成像。实验至少重复 3 次,Image J 软件统计条带灰度值。

2.8 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件处理

数据,以 $\bar{x} \pm s$ 进行统计描述,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 麦门冬汤加减、顺铂对 A549 细胞增殖能力的影响

与空白组比较,麦门冬汤加减、顺铂作用于

A549 细胞后,随着给药浓度的增加, A 呈递减趋势,抑制率呈递增趋势 ($P < 0.05$);随着麦门冬汤加减、顺铂作用时间的增加, A 呈递减趋势,抑制率呈递增趋势 ($P < 0.05$)。故选择顺铂 $9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,麦门冬汤加减 $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为后续实验质量浓度选择。见表 1。

表 1 麦门冬汤加减、顺铂对 A549 细胞的增殖能力的影响

Table 1 Effect of modified Maimendong Tang and cisplatin on proliferation of A549 cells

组别	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h		48 h		72 h	
		$A(\bar{x} \pm s, n = 3)$	细胞抑制率/%	$A(\bar{x} \pm s, n = 3)$	细胞抑制率/%	$A(\bar{x} \pm s, n = 3)$	细胞抑制率/%
空白	-	1	-	1	-	1	-
顺铂	3	$0.946 \pm 0.097^{1)}$	5.42	$0.900 \pm 0.027^{1,2)}$	9.99	$0.848 \pm 0.035^{1,2)}$	15.20
	6	$0.828 \pm 0.040^{1)}$	17.20	$0.735 \pm 0.050^{1,2)}$	26.50	$0.693 \pm 0.036^{1,2)}$	30.66
	9	$0.649 \pm 0.057^{1)}$	35.16	$0.586 \pm 0.026^{1,2)}$	41.38	$0.481 \pm 0.015^{1,2)}$	51.80
	12	$0.527 \pm 0.057^{1)}$	47.26	$0.412 \pm 0.021^{1,2)}$	58.81	$0.238 \pm 0.038^{1,2)}$	76.24
	15	$0.424 \pm 0.033^{1)}$	57.62	$0.325 \pm 0.040^{1,2)}$	67.47	$0.155 \pm 0.039^{1,2)}$	84.50
麦门冬汤加减	5	$0.756 \pm 0.005^{1)}$	24.35	$0.794 \pm 0.015^{1,2)}$	20.58	$0.815 \pm 0.017^{1,2)}$	18.45
	10	$0.624 \pm 0.014^{1)}$	37.58	$0.621 \pm 0.020^{1,2)}$	37.84	$0.607 \pm 0.026^{1,2)}$	39.30
	15	$0.562 \pm 0.013^{1)}$	43.84	$0.514 \pm 0.021^{1,2)}$	48.59	$0.436 \pm 0.022^{1,2)}$	56.38
	20	$0.488 \pm 0.024^{1)}$	51.13	$0.405 \pm 0.024^{1,2)}$	59.43	$0.320 \pm 0.035^{1,2)}$	67.94
	25	$0.452 \pm 0.017^{1)}$	54.79	$0.333 \pm 0.030^{1,2)}$	66.65	$0.248 \pm 0.023^{1,2)}$	75.10

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与相同干预浓度的 24 h 组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 麦门冬汤加减联合顺铂对 A549 细胞增殖能力的影响

与空白组比较,麦门冬汤加减、顺铂、联合用药作用于 A549 细胞 24 h 后,各组 A 明显下降,均有效地抑制 A549 细胞的增殖 ($P < 0.05$);与单独使用麦门冬汤、顺铂组比较,麦门冬汤加减联合顺铂作用于 A549 细胞 A 下降更明显,细胞抑制率明显升高 ($P < 0.05$)。见表 2。

与空白组比较,麦门冬汤加减、顺铂作用于 A549 细胞 24 h 后,各组凋亡率明显增加 ($P < 0.05$);麦门冬汤加减 + 顺铂组细胞凋亡率较单独使用麦门冬汤加减、顺铂组的细胞凋亡率明显增加 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 2 麦门冬汤加减联合顺铂对 A549 细胞后增殖能力的影响

Table 2 Effect of modified Maimendong Tang combined cisplatin on proliferation of A549 cells

组别	质量浓度	$A(\bar{x} \pm s, n = 3)$	细胞抑制率/%
空白	-	1	-
麦门冬汤加减	$15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	$0.550 \pm 0.053^{1)}$	45.04
顺铂	$9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$0.635 \pm 0.077^{1)}$	36.47
麦门冬汤加减 + 顺铂	$15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + 9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$0.340 \pm 0.032^{1,2,3)}$	66.01

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与麦门冬汤加减组比较²⁾ $P < 0.05$;与顺铂组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 3 ~ 6, 8 同)。

表 3 麦门冬汤加减联合顺铂组对 A549 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of modified Maimendong Tang combined cisplatin on apoptosis rate of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度	凋亡率/%
空白	-	0.76 ± 0.15
麦门冬汤加减	$15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	$5.57 \pm 0.074^{1)}$
顺铂	$9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$7.93 \pm 3.07^{1)}$
麦门冬汤加减 + 顺铂	$15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + 9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$25.47 \pm 2.87^{1,2,3)}$

3.4 麦门冬汤加减联合顺铂对 A549 细胞周期分布的影响

与空白组比较,麦门冬汤加减、顺铂作用于 A549 细胞 24 h 各组 G_0/G_1 期细胞的比例明显增多, S 期细胞的比例明显减少 ($P < 0.05$);与单独使用麦门冬汤加减、顺铂组比较,麦门冬汤加减 + 顺铂

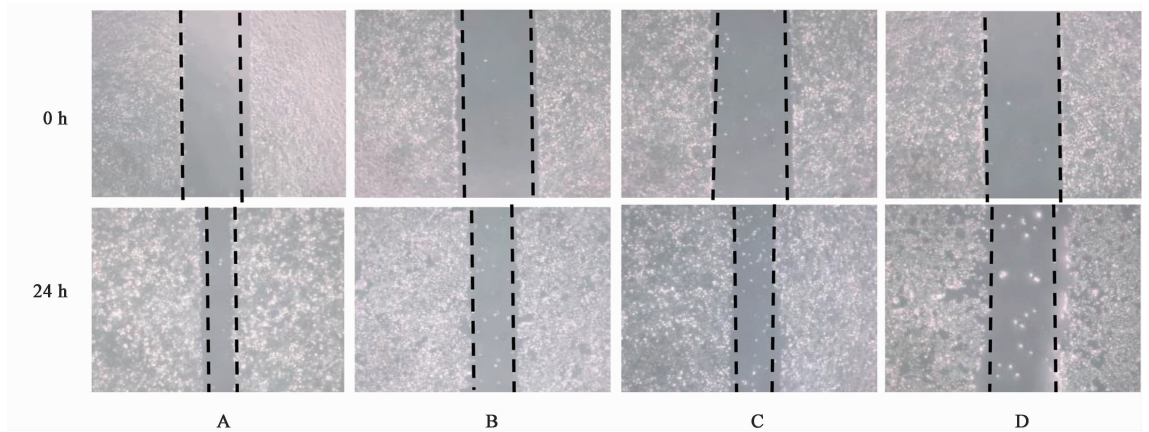
组较细胞 G₀/G₁ 期细胞的比例明显增加, S 期细胞的比例明显减少($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 麦门冬汤加减联合顺铂组对细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度	G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期
空白	-	58.34 ± 1.12	33.36 ± 1.46	8.30 ± 1.05
麦门冬汤加减	15 g·L ⁻¹	64.16 ± 1.26 ¹⁾	27.79 ± 0.05 ¹⁾	8.05 ± 1.30
顺铂	9 mg·L ⁻¹	66.22 ± 1.07 ¹⁾	26.65 ± 0.31 ¹⁾	7.13 ± 0.90
麦门冬汤加减 + 顺铂	15 g·L ⁻¹ + 9 mg·L ⁻¹	75.73 ± 0.098 ^{1,2,3)}	16.88 ± 0.72 ^{1,2,3)}	7.39 ± 0.81

3.5 麦门冬汤加减联合顺铂对 A549 细胞转移侵袭能力的影响 与空白组比较,麦门冬汤加减、顺铂作用于 A549 细胞 24 h, 各组划痕愈合能力减弱($P < 0.05$);与麦门冬汤加减组、顺铂组比较,麦门冬汤加减 + 顺铂组划痕愈合能力明显减弱

($P < 0.05$)。与空白组比较,麦门冬汤加减、顺铂作用于 A549 细胞 24 h, 各组穿过 transwell 小室的细胞数目均明显减少($P < 0.05$),与麦门冬汤加减组、顺铂组比较,麦门冬汤加减 + 顺铂组穿过 transwell 小室的细胞数目减少($P < 0.05$)。见图 1,2,表 5,6。



A. 空白组;B. 麦门冬汤加减组;C. 顺铂组;D. 麦门冬汤加减 + 顺铂组(图 2,4 同)

图 1 麦门冬汤加减联合顺铂对 A549 细胞划痕愈合能力的影响(倒置显微镜, ×100)

Fig.1 Effect of modified Maimendong Tang combined cisplatin on scratch healing ability of A549 cells(inverted microscope, ×100)

表 5 麦门冬汤加减联合顺铂对 A549 细胞划痕愈合能力的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of modified Maimendong Tang combined cisplatin on scratch healing ability of A549 cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度	24 h 划痕长度的变化/%
空白	-	1
麦门冬汤加减	15 g·L ⁻¹	1.30 ± 0.19 ¹⁾
顺铂	9 mg·L ⁻¹	1.19 ± 0.10 ¹⁾
麦门冬汤加减 + 顺铂	15 g·L ⁻¹ + 9 mg·L ⁻¹	2.02 ± 0.27 ^{1,2,3)}

3.6 麦门冬汤加减对细胞 EGFR, Caspase-3 蛋白表达的影响 与空白组比较,麦门冬汤加减作用于 A549 细胞后,随着麦门冬汤加减作用质量浓度的增加, Caspase-3, EGFR 蛋白表达明显降低($P < 0.05$),呈量效关系。见图 3,表 7。

3.7 麦门冬汤加减联合顺铂对细胞 EGFR, Caspase-3 蛋白表达的影响 与空白组比较,麦门冬汤加减、顺铂作用于 A549 细胞 24 h 后, 各组 Caspase-3, EGFR 蛋白的表达明显下降($P < 0.05$);与单独使用麦门冬汤加减、顺铂组比较,麦门冬汤加减 + 顺铂组的 Caspase-3, EGFR 蛋白的表达下调更明显($P < 0.05$)。见图 4,表 8。

4 讨论

以铂类为基础的化疗已是治疗晚期 NSCLC 患者的常见方案,但是,大部分化疗患者的生存期不超过 1 年^[4],并且化疗所致毒副作用给患者带来巨大的痛苦和沉重的经济负担。在古代,对中医治疗肿瘤已经也有不同程度的认识,现代中西医结合治疗肿瘤的地位日益重要^[5]。研究证明,中医药在恶性肿瘤的治疗中,能通过扶正祛邪,改善症状,提高

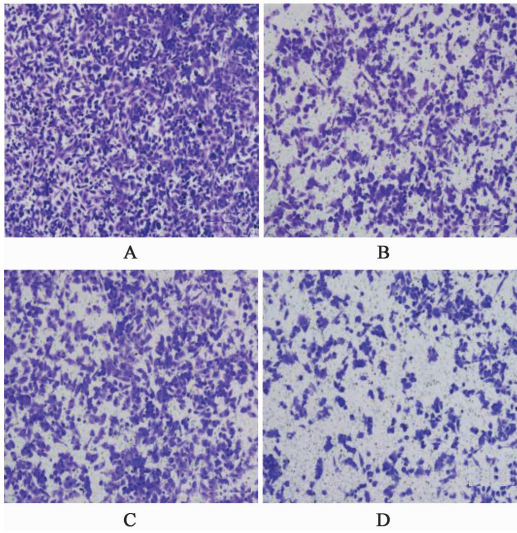


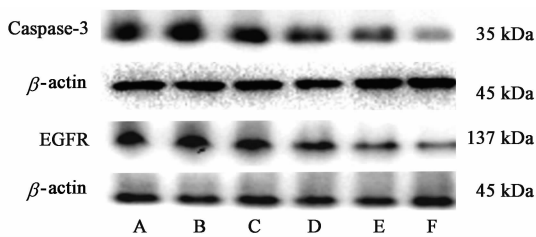
图 2 麦门冬汤加减联合顺铂组对 A549 细胞侵袭能力的影响(结晶紫, ×100)

Fig.2 Effect of modified Maimendong Tang combined cisplatin on invasive ability of A549 cells(crystal violet, ×100)

表 6 麦门冬汤加减联合顺铂组对 A549 细胞侵袭能力的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effect of modified Maimendong Tang combined cisplatin on invasive ability of A549 cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度	穿过基质的细胞数比例/%
空白	-	1
麦门冬汤加减	15 g·L ⁻¹	0.47 ± 0.05 ¹⁾
顺铂	9 mg·L ⁻¹	0.56 ± 0.05 ¹⁾
麦门冬汤加减 + 顺铂	15 g·L ⁻¹ + 9 mg·L ⁻¹	0.20 ± 0.05 ^{1,2,3)}



A. 空白组; B ~ F. 麦门冬汤加减 5, 10, 15, 20, 25 g·L⁻¹ 组
图 3 麦门冬汤加减作用于 A549 细胞后 Caspase-3, EGFR 蛋白的表达

Fig.3 Effect of modified Maimendong Tang on Caspase-3 and EGFR expressions of A549 cells

患者生活质量, 延长患者生存期, 对西医治疗起替代及补充作用^[6-7]。中西医结合治疗不仅能提高化疗的疗效, 而且能减轻化疗的副作用, 对化疗起到减毒增效作用。临床上, 化疗药和中药联合用药, 可以提高疗效, 减轻副作用和延缓耐药等。有研究表明, 莪

表 7 麦门冬汤加减对 A549 细胞的 Caspase-3, EGFR 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Effect of modified Maimendong Tang on Caspase-3 and EGFR expressions of A549 cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	Caspase-3 /β-actin	EGFR /β-actin
空白	-	1	1
麦门冬汤加减	5	1.00 ± 0.14 ¹⁾	1.09 ± 0.06 ¹⁾
	10	0.83 ± 0.16 ¹⁾	0.97 ± 0.12 ¹⁾
	15	0.54 ± 0.15 ¹⁾	0.69 ± 0.13 ¹⁾
	20	0.52 ± 0.10 ¹⁾	0.60 ± 0.15 ¹⁾
	25	0.45 ± 0.12 ¹⁾	0.48 ± 0.11 ¹⁾

注: 与空白组比较¹⁾ P < 0.05。

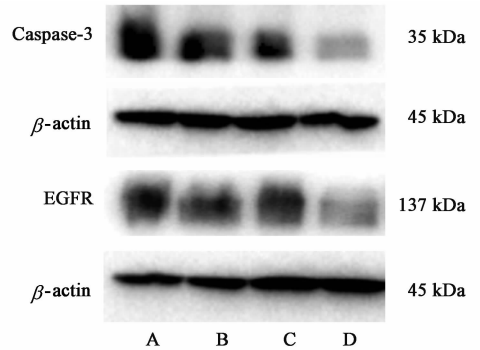


图 4 联合用药后对 A549 细胞 Caspase 3, EGFR 蛋白表达的影响
Fig.4 Effect of combined drug on Caspase-3 and EGFR expressions of A549 cells

表 8 联合用药后对 A549 细胞 Caspase-3, EGFR 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Effect of combined drug on Caspase-3 and EGFR expressions of A549 cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度	Caspase-3/β-actin	EGFR/β-actin
空白	-	1	1
麦门冬汤加减	15 g·L ⁻¹	0.60 ± 0.06 ¹⁾	0.74 ± 0.04 ¹⁾
顺铂	9 mg·L ⁻¹	0.54 ± 0.13 ¹⁾	0.65 ± 0.09 ¹⁾
麦门冬汤 加减 + 顺铂	15 g·L ⁻¹ + 9 mg·L ⁻¹	0.32 ± 0.09 ^{1,2,3)}	0.37 ± 0.07 ^{1,2,3)}

术醇联合 5-氟尿嘧啶能抑制大肠癌细胞增殖和促进癌细胞凋亡^[8]; 参苓白术散能协同 L-OHP 抑制人结肠癌 HCT116 细胞增殖及凋亡^[9]。所以积极地运用中医药与化疗相结合治疗 NSCLC, 也是进一步提高临床疗效的重要途径^[10]。

肺主水, 有“通调水道, 下输膀胱”的作用, 主气之宣发肃降。临床上, 肺失宣降, 不能通调水道,

或虚火上炎,灼津成痰,均易导致痰浊内停等病证,易形成肿瘤等有形之物。肺为娇脏,喜润恶燥,虚火上炎,耗气伤阴,易出现气阴两虚之证。有研究证明,以补益气阴为主药的方药,联合化疗药,治疗晚期 NSCLC 患者,不仅能增加化疗效果,还能减轻患者化疗副作用^[11]。

《金匱要略》云:“火逆上气,咽喉不利,止逆下气,麦门冬汤主之。”麦门冬汤治疗肺胃阴伤,肺失濡润,虚火上炎,灼津成痰,形成有形之物。麦门冬汤具有清养肺胃,降逆下气的功效。有报道表明,加减麦门冬汤配合化疗治疗比较单纯化疗,在治疗气阴两虚型晚期非小细胞肺癌患者时,能改善生活质量,降低化疗毒副反应^[12]。麦门冬汤可诱导 A549 细胞凋亡,其作用机制可能与下调 EGFR 等蛋白表达相关^[13],麦门冬汤可通过下调 EGFR 等基因表达抑制非小细胞肺癌 A549 细胞生长^[14]。本研究中麦门冬汤加减由人参片、生地黄、海浮石、麦冬、百合、白英、瓜蒌皮、玄参、法半夏、鳖甲、牡蛎、炙甘草、炮山甲^碎、灵芝组成。方中最典型的对药是麦冬与半夏。麦冬滋阴润肺兼清虚火,半夏燥湿化痰兼以散结,两药合用,麦冬使半夏不燥,半夏使麦冬不腻,共奏润肺散结,燥湿化痰之功;人参片、灵芝、生地黄、百合补气养阴;海浮石、白英、瓜蒌皮、玄参、鳖甲、牡蛎、穿山甲祛痰散结,甘草调和诸药,全方以润肺散结,燥湿化痰,宣降肺气为法,治疗有形之物客于肺。

本研究采用麦门冬汤加减(15 g·L⁻¹),顺铂(9 mg·L⁻¹)联合作用于肺腺癌 A549 细胞,与单独用药比较,能有效地抑制 A549 细胞的增殖及转移侵袭能力,诱导 A549 细胞凋亡,这说明了麦门冬汤加减与顺铂药效之间存在着协同增敏作用。

Caspase 家族是一组与细胞因子成熟和细胞凋亡有关的蛋白酶,其成员之间以线性方式互相调节,是直接导致凋亡细胞的蛋白酶系统,是各种凋亡通路的集会点,执行凋亡的最终途径,其中 Caspase-3 执行细胞凋亡。大量资料显示,在许多肿瘤细胞的凋亡中都有 Caspase 的活化^[15-17],本研究利用蛋白免疫印迹法证明了,麦门冬汤加减能直接影响 Caspase-3 的表达,顺铂联用麦门冬汤加减后,与单独应用麦门冬汤加减、顺铂比较,Caspase-3 下调更明显。更进一步证明了麦门冬汤加减能促进 A549 细胞凋亡。EGFR 家族 4 个成员,人表皮生长因子受体 2 (HER2,也称为 erbB2)及其亲属 HER1,HER3 和 HER4^[18]。每一个成员在正常发育,体内平衡和多种病理生理条件下都起着关键作用。在过

度表达的情况下,它们与其他的 ERB 受体形成一个单一的或异二聚体,导致信号通路的激活,从而导致肿瘤的生长^[19]。据报道,高达 47.9% 的亚洲 NSCLC 患者存在 EGFR 突变^[20]。在本研究中显示,麦门冬汤加减能下调 EGFR,且联合顺铂后,与单独应用麦门冬汤加减、顺铂比较,EGFR 的表达下调更明显,说明麦门冬汤加减能通过下调 Caspase-3,EGFR 蛋白表达量增强顺铂化疗敏感性,促进 A549 细胞凋亡。

综上,麦门冬汤加减对人肺腺癌细胞化疗具有增敏作用,其增敏作用可能是通过下调 Caspase-3,EGFR 来实现的。本实验为中药多靶点治疗和经方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] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015,65(2):87-108.
- [2] 陈万青,张思维,郑荣寿,等. 中国肿瘤登记地区 2007 年肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤,2011,20(3):162-169.
- [3] 杨琴琴,王三虎,冯献斌,等. 润肺散结汤治疗气阴两虚痰浊泛肺型晚期肺鳞癌临床研究[J]. 河南中医,2010,30(7):661-663.
- [4] Sacher A G, Le L W, Lau A, et al. Real-world chemotherapy treatment patterns in metastatic non-small cell lung cancer: are patients undertreated? [J]. Cancer, 2015,121(15):2562-2569.
- [5] 李杰,林洪生,侯炜,等. 中医药治疗肿瘤理念及策略[J]. 中国肿瘤,2010,19(11):735-738.
- [6] MA J, LIU H, WANG X, et al. Effect of ginseng polysaccharides and dendritic cells on the balance of Th1/Th2 T helper cells in patients with non-small cell lung cancer. [J]. J Tradit Chin Med, 2014,34(6):641-645.
- [7] WU C H, CHEN A Z, YEN G C, et al. Protective effects of glycyrrhizic acid and 18β-glycyrrhetic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity in BALB/c mice [J]. J Agric Food Chem, 2015,63(4):1200-1209.
- [8] 刘皓威,王娟,秦建莉,等. 莜术醇联合 5-氟尿嘧啶对大肠癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(18):130-133.
- [9] 余文燕,王桦影,王国娟,等. 参苓白术散协同奥沙利铂对人结肠癌细胞增殖及凋亡的作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(18):118-123.
- [10] 谢劲松,汪建飞,奚肇庆. 中医药对肺癌患者生活质

- 量和生存期的影响[J]. 中医学报, 2015, 30(11): 1563-1565.
- [11] 肖寒, 方乃青, 申小苏. 加减沙参麦冬汤联合化疗治疗Ⅲ,Ⅳ期非小细胞肺癌[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(24): 203-207.
- [12] 王妍. 加减麦门冬汤配合化疗治疗气阴两虚型晚期非小细胞肺癌的临床研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2005.
- [13] 蒋时红, 孙超龙, 刘燕, 等. 麦门冬汤诱导人肺腺癌 A549 细胞凋亡作用及其机制[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(4): 1236-1238.
- [14] 孙超龙, 张文娟, 刘燕, 等. 麦门冬汤对非小细胞肺癌 A549 细胞凋亡、周期、表皮生长因子受体及 STAT3 基因表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(11): 110-114.
- [15] YANG C S, Matsuura K, HUANG N J, et al. Fatty acid synthase inhibition engages a novel Caspase-2 regulatory mechanism to induce ovarian cancer cell death [J]. *Oncogene*, 2015, 34(25): 3264-3272.
- [16] ZHANG J, LAI Z, HUANG W, et al. Apicidin inhibited proliferation and invasion and induced apoptosis via mitochondrial pathway in non-small cell lung cancer GLC-82 cells [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2017, 17(10): 1374-1382.
- [17] 伍振辉, 孟娴, 丁永芳, 等. 白首乌 C-21 甾体总苷对人肝癌 HepG2 细胞增殖、侵袭与凋亡的影响[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(9): 1915-1921.
- [18] Ajani O O, Obafemi C A, Nwinyi O C, et al. Microwave assisted synthesis and antimicrobial activity of 2-quinoxalinone-3-hydrazone derivatives [J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18(1): 214-221.
- [19] Reid A, Vidal L, Shaw H, et al. Dual inhibition of ErbB1 (EGFR/HER1) and ErbB2 (HER2/neu) [J]. *Eur J Cancer*, 2007, 43(3): 481-489.
- [20] Dearden S, Stevens J, WU Y L, et al. Mutation incidence and coincidence in non small-cell lung cancer: Meta-analyses by ethnicity and histology (mutMap) [J]. *Ann Oncol*, 2013, 24(9): 2371-2376.

[责任编辑 张丰丰]