

· 药理 ·

补中益气汤对肺腺癌荷瘤裸鼠 A549/DDP 细胞顺铂耐药的影响

张颖, 高原, 刘春英*
(辽宁中医药大学, 沈阳 110032)

[摘要] **目的:** 探讨补中益气汤对肺腺癌荷瘤裸鼠肿瘤细胞 A549/DDP 顺铂耐药的影响, 并确定最佳用药浓度。**方法:** 36 只 BALB/C 裸鼠随机分为空载组, 模型组, 顺铂组, 补中益气汤低、中、高剂量 (1.46, 2.92, 5.84 g·kg⁻¹) 组。空载组接种转化生长因子-β₁ (transforming growth factor-β₁, TGF-β₁) 空载慢病毒转染的 A549/DDP 细胞, 余接种 TGF-β₁ 稳定过表达的 A549/DDP 细胞。药物干预后处死裸鼠。称量小鼠瘤重, 计算抑瘤率; 镜下计数肿瘤肝、脾、肺转移情况; 病理观察肺组织形态学改变; 免疫组化、蛋白免疫印迹法 (Western blot), 实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 检测移植瘤中肺耐药相关蛋白 (lung resistance-related protein, LRP), 多药耐药相关蛋白 (multidrug resistance-related protein, MRP), P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 表达情况。**结果:** 与模型组比较, 补中益气汤组瘤重降低, 肺转移结节数量减少, 随着补中益气汤剂量增加, 瘤重逐渐减小, 抑瘤率上升, 高剂量组效果最为明显 ($P < 0.05$)。肝、脾未见明显转移结节。病理切片显示, 模型组肺部结构紊乱, 出现明显肺损伤, 补中益气汤组肺泡、肺泡囊、肺间隔形态逐渐恢复, 高剂量组效果最好。与空载组比较, 模型组 LRP, MRP, P-gp 蛋白和 mRNA 表达均明显上调 ($P < 0.05$); 与模型组和顺铂组比较, 补中益气汤中、高剂量组 LRP, MRP, P-gp 蛋白和 mRNA 表达明显下调 ($P < 0.05$); 高剂量组下调效果最为明显。**结论:** 补中益气汤能抑制肺腺癌移植瘤生长及转移, 减轻肺损伤, 改善 A549/DDP 顺铂耐药, 该作用有一定的量效关系, 高剂量 (5.84 g·kg⁻¹) 为最佳裸鼠体内用药浓度。

[关键词] 补中益气汤; 顺铂耐药; 肺腺癌; 移植瘤

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)23-0073-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191822

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190604.1040.004.html>

[网络出版时间] 2019-06-05 9:55

Effect of Buzhong Yiqi Tang on Cisplatin Resistance A549/DDP Cells in Nude Mice with Lung Adenocarcinoma

ZHANG Ying, GAO Yuan, LIU Chun-ying*
(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Buzhong Yiqi Tang on cisplatin resistance tumor cells A549/DDP in nude mice with lung adenocarcinoma, and determine the optimal concentration. **Method:** The 36 BALB/C nude mice were randomly divided into no-load group, model group, cisplatin group, low-dose Buzhong Yiqi Tang group (1.46 g·kg⁻¹), medium-dose Buzhong Yiqi Tang group (2.92 g·kg⁻¹) and high-dose Buzhong Yiqi Tang group (5.84 g·kg⁻¹). The no-load group was inoculated with A549/DDP cells transfected by uninfected lentiviral transforming growth factor-β₁ (TGF-β₁), and the other groups were inoculated with TGF-β₁ over-expression A549/DDP cells. After the intervention, the nude mice were put to death. The tumors of mice were weighed, and the inhibition rate was calculated, liver, spleen and lung metastases of tumors were counted under microscope, and pathological observation was made for lung histomorphological changes. Immunohistochemistry,

[收稿日期] 20190108(009)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (81473569, 81774184)

[第一作者] 张颖, 在读博士, 副教授, 从事中医药抗肿瘤的作用机制研究, E-mail: 155322401@qq.com

[通信作者] *刘春英, 博士, 教授, 从事中医药抗肿瘤的作用机制研究, E-mail: chunying99@163.com

Western blot and Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) were used to detect the expressions of lung resistance-related protein (LRP), multidrug resistance-related protein (MRP), P-glycoprotein (P-gp) in transplantation tumor. **Result:** Compared with the model group, the weight of tumors and the number of pulmonary metastatic nodules decreased in the Buzhong Yiqi Tang intervention group. With the increase of the dosage of Buzhong Yiqi Tang, the weight of tumors gradually decreased, while the inhibition rate increased. The effect of the high-dose group was the most significant ($P < 0.05$). No obvious metastatic nodule was found in liver and spleen. Pathological sections showed that the structure of lungs in the model group was disordered with obvious lung injury. The morphology of alveoli, alveolar sac and pulmonary septum gradually recovered in the Buzhong Yiqi Tang group, and the effect of the high-dose group was the most obvious. Compared with the no-load group, the expressions of LRP, MRP, P-gp protein and mRNA in the model group was up-regulated ($P < 0.05$). compared with the model group and the cisplatin group, the expressions of LRP, MRP, P-gp protein and mRNA in middle-dose and high-dose Buzhong Yiqi Tang groups were down-regulated significantly ($P < 0.05$), effect of the high-dose group was the most significant. **Conclusion:** Buzhong Yiqi Tang can inhibit the growth and metastasis of transplanted tumors, alleviate lung injury and improve the drug resistance of A549/DDP to cisplatin, with a certain dose-effect relationship. High-dose concentration ($5.84 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) was the best concentration in nude mice.

[**Key words**] Buzhong Yiqi Tang; cisplatin resistance; lung adenocarcinoma; transplantation tumor

肺癌是对人类健康与生命危害最大的恶性肿瘤之一^[1]。近年的流行病学调查结果显示,肺腺癌已成为肺癌最常见的病理类型,且呈逐年上升趋势^[2-3]。除手术外,化疗仍是目前治疗进展期肺癌、预防术后复发、提高远期生存率的有效方法之一^[4]。而肿瘤患者的耐药却是化疗过程中的棘手问题,耐药的肿瘤细胞可以不断生长并向远处转移,导致化疗效果差,甚至化疗失败^[5]。因此,寻找肺腺癌化疗耐药逆转剂成为肿瘤领域的研究热点。有文献报道,在肿瘤的临床治疗中,培土生金法补脾益肺,有改善肺癌晚期患者消化系统不适症状,促进肿瘤细胞凋亡,纠正肿瘤细胞耐药等作用^[6]。课题组选取培土生金代表方剂补中益气汤进行相关研究,前期体外实验证实,补中益气汤含药血清干预肺腺癌 A549 和 A549/DDP 后,肺耐药相关蛋白 (lung resistance-related protein, LRP), 多药耐药相关蛋白 (multidrug resistance-related protein, MRP), P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 等表达下调^[7-9],起到改善顺铂耐药的作用。为进一步阐释培土生金法干预肺腺癌顺铂耐药的分子机制,课题组将体外实验与在体实验进行有机结合,从不同角度分析药物的作用和机制,起到相互补充,相互印证的效果。为验证补中益气汤对机体的实际疗效和确定最佳治疗浓度,本实验以基因工程技术制备转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1) 稳定过表达的 A549/DDP 细胞,诱导裸鼠肺腺癌移植瘤发生耐药,以耐药移植瘤为研究对象,观察补中益气汤(《内外

伤辨惑论》)对体内肿瘤耐药细胞的干预效果,以完善补中益气汤干预肺癌顺铂耐药的分子机制。

1 材料

1.1 动物和细胞株 SPF 级雄性 BALB/C 裸鼠 36 只,6 周龄,体质量 (20 ± 2) g,由北京华阜康生物科技有限公司提供,合格证号 SCXK(京)2014-0004,饲养于辽宁中医药大学实验动物中心,温度 (22 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,湿度 (45 ± 5)%。动物使用许可证号 SYXK(辽)2013-0009,本实验研究所有动物均符合辽宁中医药大学伦理委员会要求。肺腺癌耐顺铂细胞株 A549/DDP 购于江苏齐氏生物科技有限公司; TGF- β_1 基因过表达慢病毒载体购于沈阳万类生物科技有限公司。

1.2 药物 补中益气汤由黄芪 18 g,白术 9 g,人参片 6 g,升麻 6 g,橘皮 6 g,北柴胡 6 g,当归 3 g,甘草片 9 g 组成,以上饮片均购于辽宁中医药大学附属医院,由该院中医药实验中心副主任中药师于艳鉴定均为正品。依据“人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值表”计算裸鼠的等效剂量,按成人日推荐量的 1/2,1,2 倍分为低 ($1.46 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),中 ($2.92 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),高 ($5.84 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 剂量组^[10],常规煎煮,水浴蒸发至 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 生药,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,备用。

1.3 试剂 顺铂 (Sigma 公司,批号 MKBZ0848V); 苏木素-伊红 (HE) 染色试剂盒 (碧云天生物技术有限公司,批号 C0105); LRP, P-gp, MRP 一抗 (Abcam 公司,批号分别为 ab92544, ab129450, ab233383); 山羊抗兔免疫球蛋白 (Ig) G,辣根酶标记链霉亲和素

(Beyotime 公司,批号分别为 A0277, A0303); DAB 显色试剂盒 (Solarbio 公司,批号 DA1010); 全蛋白提取试剂盒, BCA 蛋白浓度测定试剂盒, SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒, ECL 检测试剂盒, β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体 (沈阳万类生物科技有限公司,批号分别为 WLA019, WLA004, WLA013, WLA003, WL01845); PVDF 膜 (美国 Millipore 公司,批号 IPVH00010); Super M-MLV 反转录酶, TRIpure, RNase inhibitor, Power Taq PCR MasterMix (北京百泰克生物技术有限公司,批号分别为 PR6502, PR1001, PR5602, PR1702)。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

1.4 仪器 DM IL LED 型普通光学显微镜 (德国 Leica 公司); DH36001B 型电热恒温培养箱 (天津泰斯特公司); ST16R 型冷冻高速离心机 (美国 Thermo 公司); DYCZ-24DN 型双垂直蛋白电泳仪, imark 型酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司); DYCZ-40D 型转移槽 (北京六一生物公司); Bio Spec-nano 型紫外-可见分光光度计 (日本岛津公司); Exicycler96 型荧光定量 PCR 仪 (韩国 Bioneer 公司)。

2 方法

2.1 细胞转染 A549/DDP 细胞复苏后, 37 °C 5% CO₂ 培养箱内培养, 细胞生长至对数生长期, 进行胰酶消化, 按实验分组将细胞接种于 6 孔板中, 细胞生长至密度 70% 时, 将病毒液 (感染指数 20) 加入培养基, 37 °C 5% CO₂ 培养箱孵育过夜, 24 h 后更换成正常培养液, 继续培养, 感染成功的细胞进行接种。

2.2 移植瘤模型的制备与动物实验 36 只裸鼠随机分为 6 组。空载 A549/DDP 细胞、过表达 A549/DDP 细胞, 分别制备细胞悬液, 各取 100 μ L (约含 1×10^7 个细胞) 分别接种于裸鼠左侧腋窝皮下^[11]。空载组接种 TGF- β_1 空载慢病毒转染的 A549/DDP 细胞, 余组接种 TGF- β_1 稳定过表达的 A549/DDP 细胞。自接种之日起每天观察裸鼠状态及成瘤时间。6 组裸鼠一般状况良好, 均在接种后 8 d 观察到 2 ~ 3 mm 肿瘤结节, 病理诊断符合肺腺癌组织学特征^[12], 各组致瘤率均达到 100%。细胞接种 8 d, 顺铂组腹腔注射顺铂, 0.003 5 g \cdot kg⁻¹, 2 次/周, 灌胃生理盐水, 1 mL/次, 2 次/d; 补中益气汤组分别灌胃低、中、高剂量补中益气汤, 1 mL/次, 2 次/d, 联合腹腔注射顺铂, 0.003 5 g \cdot kg⁻¹, 2 次/周。空载组和模型组腹腔注射、灌胃等体积生理盐水。细胞接种 32 d, 处死裸鼠, 取肿瘤组织固定、冻存, 取肝、脾、肺组织固定。

2.3 指标检测

2.3.1 各组小鼠皮下肿瘤质量及器官转移结节数 处死裸鼠, 取移植瘤并电子称质量, 计算抑瘤率, 抑瘤率 = 模型组瘤重 - 药物组瘤重 / 模型组瘤重 \times 100%。显微镜下检测肝、脾、肺表面转移结节, 计数。

2.3.2 HE 染色观察肺组织病理改变 将标本固定, 石蜡包埋, 切片, 脱蜡至水, 苏木素染色, 盐酸-乙醇分化, 自来水返蓝, 伊红染色, 脱水, 透明, 封片。镜检。

2.3.3 免疫组化检测肿瘤组织耐药相关蛋白表达情况 切片, 常规脱蜡至水。抗原修复, 山羊血清封闭。一抗孵育 (LRP 1:100; MRP, P-gp 1:400), 二抗孵育。滴加 HRP 标记亲和素, DAB 显色, 苏木素复染。脱水、透明、中性树胶封片。200 倍镜下拍照, 记录。

2.3.4 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测肿瘤组织耐药相关蛋白表达情况 取肿瘤组织匀浆并超声粉碎, 15 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min, 分离上清, 提取总蛋白, 弃沉淀。各组蛋白溶液 20 μ g 每孔上样, 加入上样液, 电泳分离, 转到 PVDF 膜, 将 PVDF 膜浸入脱脂奶粉溶液中, 摇床缓慢摇动 1 h。加入一抗 (LRP, P-gp 1:500, MRP 1:1 000), 4 °C 孵育过夜。加入二抗, 37 °C 孵育 45 min。ECL 底物发光。扫描胶片, 用凝胶图像处理系统 (Gel-Pro-Analyzer 软件) 分析目标条带灰度值, β -actin 内参为对照。

2.3.5 实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 检测肿瘤组织耐药相关蛋白 mRNA 表达 PCR 引物采用 Primer 5.0 软件设计引物序列 (表 1)。取各组样本, 分别提取细胞总 RNA, 检测样本纯度, RNA 样本反转录合成相应的 cDNA, 反应条件: 70 °C 加热 5 min 后迅速冰上冷却 2 min, 25 °C 温浴 10 min, 42 °C 温浴 50 min, 80 °C 加热 10 min, 1 个循环。PCR 扩增反应条件: 94 °C 5 min, 1 个循环; 94 °C 10 s, 60 °C 20 s, 72 °C 30 s, 40 个循环; 72 °C 2.5 min, 40 °C 1.5 min, 60 ~ 94 °C 1 °C \cdot s⁻¹, 25 °C 1 ~ 2 min, 1 个循环。分析方法用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 。

2.4 统计学处理 实验数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行处理, 计量资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析, 两两比较用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对各组小鼠瘤重、抑瘤率及转移结节的影响 与空载组比较, 模型组瘤重、肺转移结节数明显升高 ($P < 0.05$), 与模型组比较, 补中益气汤各组瘤重、

表 1 引物序列及扩增产物长度

Table 1 Primer sequence and amplified product length

引物	序列(5'-3')	产物长度/bp
LRP	上游 GGACGCCGTCATCCTTAC	152
	下游 CCTCCTCGTGACATCTGG	
MRP	上游 CCTTCGCTGAGTTCCTGC	103
	下游 TGCTTTGCTTCCCTCCCT	
P-gp	上游 AATGCGACAGGAGATAGG	131
	下游 TTGCCATTGACTGAAAGA	
β -actin	上游 CACTGTGCCCATCTACGAGG	155
	下游 TAATGTCACGCACGATTTC	

肺转移结节数均明显降低 ($P < 0.05$), 高剂量组下降最明显, 呈量效关系。与顺铂组比较, 补中益气汤中、高剂量补中益气汤组转移结节数量明显减少 ($P < 0.05$), 高剂量组效果最明显。见表 2。

3.2 对肺组织形态学的影响 空载组肺泡及肺泡囊形态正常, 结构清晰, 肺间隔轻微充血。模型组结构紊乱, 肺间隔显著增宽, 小毛细血管明显增多、充血, 肺泡腔和肺泡囊变窄甚至消失, 可见大量长梭

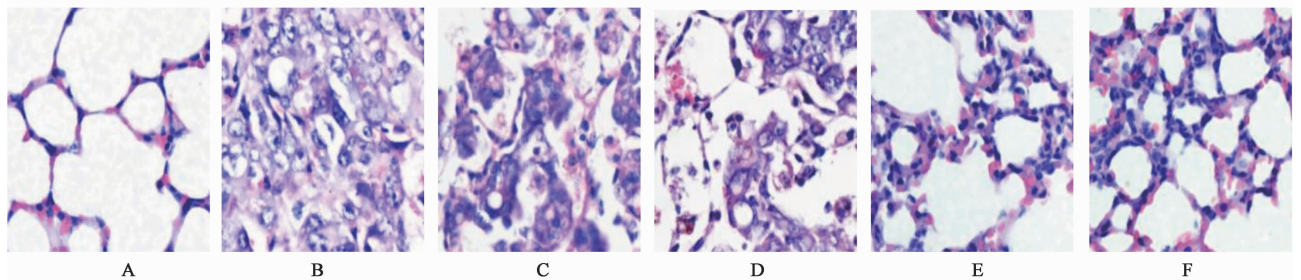
表 2 补中益气汤对各组小鼠瘤重、抑瘤率及肺转移结节的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of Buzhong Yiqi Tang on tumor weight, tumor suppression rate and pulmonary metastatic nodules in mice of different groups ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	瘤重 /g	抑瘤率 /%	肺转移结节数 /个
空载	-	0.22 ± 0.01	-	8.00 ± 1.67
模型	-	0.29 ± 0.02 ¹⁾	-	14.17 ± 3.06 ¹⁾
顺铂	0.003 5	0.26 ± 0.05	10.34	12.17 ± 1.60
补中益气汤	1.46	0.14 ± 0.00 ^{2,3)}	51.72	9.83 ± 2.14 ²⁾
	2.92	0.13 ± 0.02 ^{2,3)}	55.17	8.50 ± 2.17 ^{2,3)}
	5.84	0.08 ± 0.01 ^{2,3)}	72.41	5.00 ± 1.41 ^{2,3)}

注: 与空载组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$; 与顺铂组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 3, 4 同)。

形上皮细胞。各治疗组结构逐渐趋向正常, 顺铂组和补中益气汤低剂量组肺泡和肺泡囊隐约可见, 补中益气汤中、高剂量组肺泡、肺泡囊形态恢复较好, 高剂量组效果最明显, 但肺间隔毛细血管充血依然显著。见图 1。



A. 空载组; B. 模型组; C. 顺铂组; D ~ F. 补中益气汤低、中、高剂量组 (图 2, 3 同)

图 1 补中益气汤对肺组织形态学的影响 (HE, ×200)

Fig. 1 Effect of Buzhong Yiqi Tang on histomorphology of lung (HE, ×200)

3.3 对移植瘤中 LRP, MRP, P-gp 蛋白表达的影响 肿瘤细胞 LRP, MRP, P-gp 蛋白的阳性着色均为深染的棕黄色颗粒, 主要表达于细胞浆和细胞膜, 各组均有表达。镜下结果显示, 各治疗组 LRP, MRP, P-gp 蛋白表达均有不同程度下调, 联合应用补中益气汤比单独使用顺铂效果更佳, 且补中益气汤浓度越高, 效果越显著, 具有一定的剂量依赖性。见图 2。

3.4 对移植瘤中 LRP, MRP, P-gp 蛋白表达的影响 与空载组比较, 模型组 LRP, MRP, P-gp 蛋白表达明显增多 ($P < 0.05$)。与模型组、顺铂组比较, 补中益气汤中、高剂量组 LRP, MRP, P-gp 蛋白表达均有下调 ($P < 0.05$), 高剂量组下调最明显。见图 3, 表 3。

3.5 对移植瘤中 LRP, MRP, P-gp mRNA 表达的影响 与空载组比较, 模型组 LRP, MRP, P-gp mRNA 的表达明显上调 ($P < 0.05$)。与模型组、顺铂组比较, 补中益气汤中、高剂量组 LRP, MRP, P-gp mRNA 表达均明显下降 ($P < 0.05$), 补中益气汤高剂量组效果更明显。见表 4。

4 讨论

随着现代医学技术的进步, 人们认识到肿瘤治疗过程中最大的难题在于对化疗药物的耐受。目前研究认为, 肿瘤细胞耐药的发生与多种因素有关, 如 LRP, MRP 表达增加, 多药耐药基因编码的 P-gp 介导的耐药等^[13]。LRP 属于人穹隆主蛋白 (major vault protein, MVP), 分布广泛, 几乎所有类型的肿瘤均有过表达。LRP 既可阻止以胞核为靶点的药物

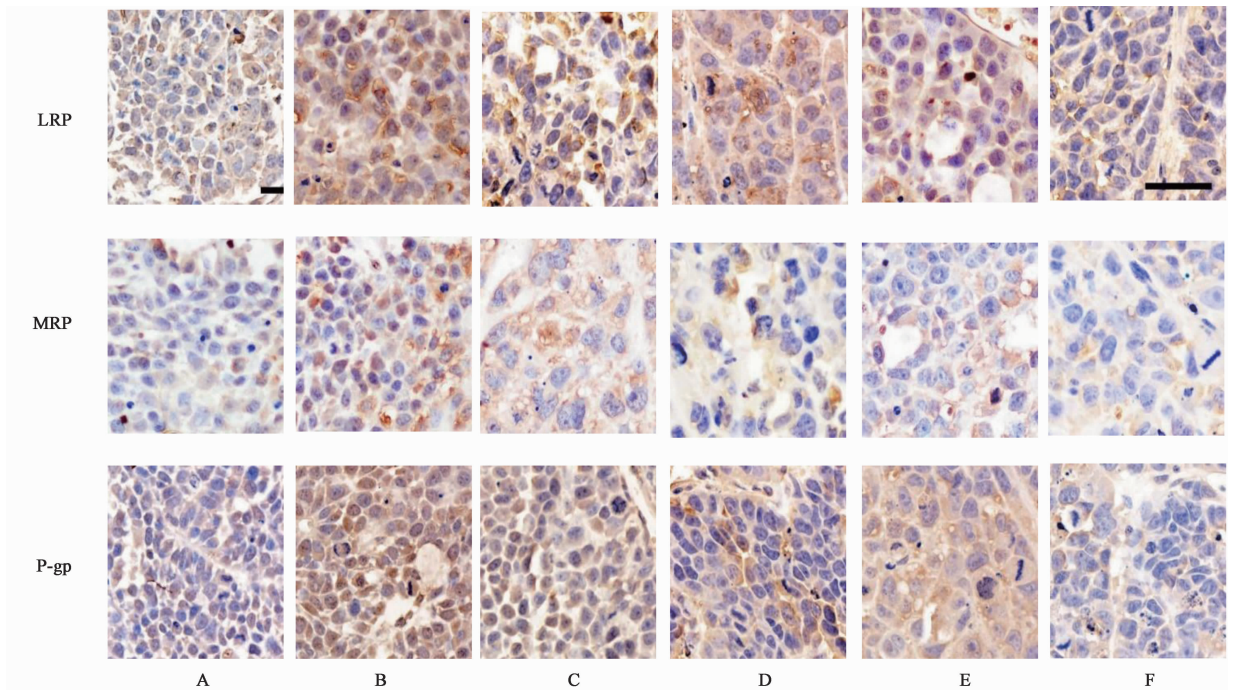


图 2 补中益气汤对移植瘤中 LRP,MRP,P-gp 蛋白表达的影响 (IHC, ×400)

Fig.2 Effect of Buzhong Yiqi Tang on LRP,MRP and P-gp protein expression in transplanted tumors by immunohistochemical detection (IHC, ×400)

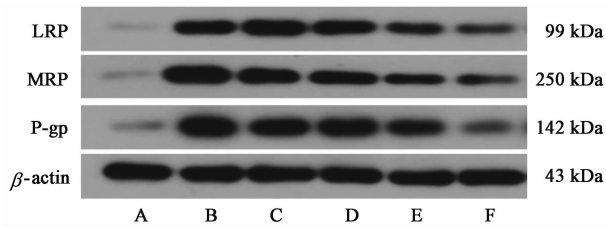


图 3 补中益气汤作用移植瘤中 LRP,MRP,P-gp 蛋白表达电泳

Fig.3 Electrophoresis of Buzhong Yiqi Tang on LRP,MRP and P-gp protein expression in transplanted tumors detected by Western blot

表 3 补中益气汤对移植瘤中 LRP,MRP,P-gp 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of Buzhong Yiqi Tang on LRP,MRP and P-gp protein expression in transplanted tumors($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	LRP /β-actin	MRP /β-actin	P-gp /β-actin
空载	-	1.04 ± 0.14	1.00 ± 0.07	1.04 ± 0.14
模型	-	4.15 ± 0.36 ¹⁾	4.36 ± 0.43 ¹⁾	4.93 ± 0.25 ¹⁾
顺铂	0.003 5	4.44 ± 0.22	3.92 ± 0.22 ²⁾	4.49 ± 0.36 ²⁾
补中益气汤	1.46	4.22 ± 0.27	3.56 ± 0.32 ^{2,3)}	4.46 ± 0.31 ²⁾
	2.92	3.01 ± 0.22 ^{2,3)}	2.63 ± 0.31 ^{2,3)}	3.93 ± 0.23 ^{2,3)}
	5.84	2.22 ± 0.34 ^{2,3)}	2.26 ± 0.27 ^{2,3)}	2.66 ± 0.29 ^{2,3)}

到达作用部位,又能以胞吐形式将胞质内药物移出细胞,最终产生耐药,LRP 的表达可独立作为检测化疗敏感性的指标之一^[14]。P-gp 相对分子质量不超过 200 kDa,是目前研究最为清楚的一类具有“药泵”功

表 4 补中益气汤对移植瘤中 LRP,MRP,P-gp mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effect of Buzhong Yiqi Tang on LRP,MRP and P-gp mRNA expression in transplanted tumors($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	LRP	MRP	P-gp
空载	-	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.09
模型	-	5.27 ± 0.44 ¹⁾	2.93 ± 0.16 ¹⁾	3.47 ± 0.22 ¹⁾
顺铂	0.003 5	4.25 ± 0.29 ²⁾	2.77 ± 0.21	3.54 ± 0.33
补中益气汤	1.46	4.21 ± 0.40 ²⁾	2.75 ± 0.25	2.91 ± 0.14 ^{2,3)}
	2.92	3.66 ± 0.09 ^{2,3)}	2.46 ± 0.06 ^{2,3)}	2.71 ± 0.09 ^{2,3)}
	5.84	2.15 ± 0.06 ^{2,3)}	1.72 ± 0.12 ^{2,3)}	2.35 ± 0.09 ^{2,3)}

能的跨膜糖蛋白。可以与细胞内药物结合后将其泵到细胞外,减低细胞内的药物浓度,使细胞耐药^[15]。MRP 与 P-gp 介导的耐药机制相似,一可作为转运泵将抗肿瘤化学药物泵出细胞外,直接参与耐药;二可隔离细胞内药物,使药物不能与靶点结合,导致间接耐药^[16]。耐药的研究是肿瘤治疗领域的热点,多角度、多靶点综合治疗,逆转耐药,在预防肿瘤复发和转移,提高远期生存率和生活质量方面显得尤为重要。

近些年来,中医药与手术、放疗、化疗结合治疗肺癌,受到广泛关注。术后及放化疗患者,具有“正虚邪衰”的特点,重在提高机体免疫力,这与中医认为的肺癌属本虚标实之证,治当“扶正治本为主”不谋而合。目前大多应用于临床的具有免疫调节和

抗肿瘤作用的中药为补益类,补中益气汤作为经典补益剂,有促进气血生化,运化痰浊,扶助正气,兼以祛邪的作用。现代医学研究证实,补中益气汤成分复杂,主要包括多糖、皂苷、黄酮、生物碱、氨基酸、挥发油等,在肿瘤治疗方面有着广泛的应用。临床上,补中益气汤能减轻化疗的消化道反应,提高机体免疫力,促进术后机体恢复,改善营养状况等^[17];动物实验中,补中益气汤含药血清能增加耐顺铂肿瘤细胞株对顺铂的敏感性,改善肺腺癌细胞顺铂耐药^[7-9]。

笔者前期已证实,成功包装构建的重组慢病毒载体能有效介导 TGF- β_1 的过表达,转染肺腺癌细胞后,能激活细胞上皮-间质转化、诱导细胞耐药并稳定传代。本实验旨在通过在体实验进一步证实补中益气汤在肺腺癌化疗过程中有改善顺铂耐药的作用,故将转染后 A549/DDP 植入裸鼠皮下,构建稳定耐药移植瘤模型。结果显示,补中益气汤联合顺铂治疗肺腺癌,随着补中益气汤剂量的逐渐增加,移植瘤质量逐渐减轻,肺转移结节数目逐渐减少,肺组织损伤逐渐减轻,说明补中益气汤可改善 A549/DDP 细胞耐药移植瘤对顺铂的敏感性,并存在明显的剂量依赖性。本实验结果显示,与空载组比较,模型组 LRP,MRP, P-gp 蛋白和 mRNA 表达均上调,证实 TGF- β_1 过表达 A549/DDP 细胞具有耐药性并稳定传代;与模型组比较,顺铂组 LRP 蛋白表达和 MRP, P-gp mRNA 表达无统计学差异,证实耐药机体对单独使用顺铂化疗敏感性较差;补中益气汤联合顺铂使用后,LRP,MRP, P-gp 蛋白和 mRNA 均有不同程度下降,尤其是中、高剂量组效果更加明显,说明补中益气汤中、高剂量可提高耐药细胞对顺铂的敏感性,改善耐药机体的耐药性,高剂量组效果最好,则提示该改善作用具有一定的量效关系。5.84 g·kg⁻¹ 生药为最佳浓度,为进一步实验提供了数据参考。

肿瘤耐药是肿瘤治疗过程中的一项难题,虽然围绕肿瘤耐药的研究取得了部分进展,但是肿瘤耐药途径多,机制复杂,仍有诸多问题尚未解决。本实验以肺腺癌移植瘤为研究对象,从形态学和蛋白及分子水平证实了补中益气汤能有效改善顺铂耐药,尤其在高剂量条件下作用更为明显,与前期体外实验起到相互补充、相互印证的效果,有望为临床解决肺腺癌耐药问题提供新思路。

【参考文献】

[1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I. 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] Nakamura H, Saji H. A worldwide trend of increasing primary adenocarcinoma of the lung[J]. Surg Today, 2014, 44(6):1004-1012.

[3] WANG Q S, LIN X P. Lung cancer epidemiology in mainland China[J]. Chin J Clin Oncol, 2006,3(4):244-253.

[4] Mok T S, WU Y L, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma[J]. N Engl J Med, 2009,361(10):947-957.

[5] 刘小菊,刘红云,王海娟,等.肺腺癌 A549/DDP 细胞多药耐药机制及中药逆转剂的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(21):227-230.

[6] 葛玲玲,曹芳.补中益气汤治疗肿瘤的现代应用[J].山东中医药大学学报,2018,42(4):367-369.

[7] 史妍婷,井欢,王莹,等.补中益气汤含药血清逆转 A549/DDP 的顺铂耐药及对 mTOR 表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(9):215-219.

[8] 唐莹,郭倩,于宁,等.补中益气汤含药血清对 TGF- β_1 介导的 A549 细胞中 Twist1 表达的影响[J].中华中医药学刊,2017,35(6):1451-1453.

[9] 井欢,唐莹,于丹,等.补中益气汤含药血清同 siRNA 对 A549/DDP 细胞 MRP 表达影响的比较[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(8):150-153.

[10] 高原,王莹,陈奇,等.补中益气汤对肺腺癌荷瘤裸鼠移植瘤的抑瘤作用及 MRP 蛋白表达影响的研究[J].时珍国医国药,2016,27(8):1796-1799.

[11] Nasarre P, Gemmill R M, Potiron V A, et al. Neupilin-2 is upregulated in lung cancer cells during TGF- β_1 induced epithelial-mesenchymal transition[J]. Cancer Res, 2013, 73(23):7111-7121.

[12] 钟文昭,董嵩,李磊,等.国际肺癌研究协会/美国胸科学会/欧洲呼吸学会肺腺癌的国际多学科分类[J].循证医学,2011,11(4):193-225.

[13] 郑莉莉.补中益气汤逆转非小细胞肺癌多药耐药机制研究[J].云南中医学院学报,2017,40(2):98-102.

[14] 李杰,龚民,崔永,等.肺耐药蛋白 LRP 在肺癌中的表达及意义[J].现代肿瘤医学,2014,22(12):2875-2879.

[15] FANG Q, REN G G, HAN Y T, et al. Multidrug resistance in primary tumors and metastases in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. Pathol Oncol Res, 2013, 19(4):641-648.

[16] 段梅梅,付佳佳.外周血检测 MRP 与基质金属酶-9 对肺癌患者化疗疗效的评估价值[J].现代医院,2018,18(10):1548-1550.

[17] 刘凯,王本军,马恒,等.补中益气汤对胃癌术后气虚血瘀证胃肠功能恢复和营养状况的影响[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(24):152-156.

【责任编辑 张丰丰】