

芪玉三龙方抑制 A549 肺癌细胞对 miRNA21“成瘾”的机制

张星星¹, 高雅婷^{1,2}, 王小乐^{1,2}, 杨勤军^{1,2}, 刘桐^{1,2}, 童佳兵¹, 李泽庚^{1,2*}

(1. 安徽中医药大学第一附属医院, 安徽省教育厅中医药防治肺系重大疾病重点实验室, 安徽省中医药科学院中医呼吸病防治研究所, 合肥 230031; 2. 安徽中医药大学, 合肥 230012)

[摘要] 目的:探讨芪玉三龙方(QYSL)抑制 A549 肺癌细胞对微小 RNA21(miRNA21)“成瘾”的分子机制。方法:选择人 A549 肺癌细胞,常规传代培养,分别设置为空白组,空白血清组,含药血清组,干扰小 RNA(siRNA)组。制备 QYSL 含药血清,以前期研究筛选的最佳药物浓度和作用时间进行干预。蛋白免疫印迹法(Western blot)检测及实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR) miRNA21 及其靶向信号通路第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源物(PTEN)/磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)相关分子的蛋白及 mRNA 的表达。结果:与空白血清组比较,含药血清组和 siRNA 组的 miRNA21 mRNA 表达显著降低,PTEN mRNA 的表达显著升高,差异具有统计学意义($P<0.01$)。与空白血清组比较,含药血清组和 siRNA 组的 PI3K,雷帕霉素靶蛋白(mTOR) mRNA 表达显著降低,差异具有统计学意义($P<0.01$),但含药血清组蛋白激酶 B(Akt) mRNA 的表达无明显差异。与空白血清组比较,含药血清组和 siRNA 组的 PTEN 蛋白表达明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$);含药血清组磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt),磷酸化雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR)蛋白表达明显降低($P<0.05$),总蛋白 Akt, mTOR 表达无明显降低,PI3K 蛋白的表达降低,但差异无统计学意义。结论:QYSL 可抑制 miRNA21 的转录,使 PTEN 表达有所上升,下调 PI3K/Akt/mTOR 信号通路关键分子表达,从而温和抑制肺癌细胞对致癌基因的“成瘾”现象,阻断肺癌细胞增殖。

[关键词] 芪玉三龙方; A549 肺癌细胞; 微小 RNA21(miRNA21); 第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源物(PTEN)/磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)信号通路

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)11-0035-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211193

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210327.1452.005.html>

[网络出版日期] 2021-3-29 15:09

Mechanism of Qiyu Sanlong Prescription in Inhibiting "Addiction" of Lung Cancer A549 Cells to miRNA21

ZHANG Xing-xing¹, GAO Ya-ting^{1,2}, WANG Xiao-le^{1,2}, YANG Qin-jun^{1,2}, LIU Tong^{1,2},
TONG Jia-bing¹, LI Ze-geng^{1,2*}

(1. First Affiliated Hospital of Anhui University of Tradition Chinese Medicine (TCM), Key Laboratory of TCM Prevention and Treatment of Pulmonary Diseases of Anhui Provincial Education Department, Institute of Research Institute of Respiratory Disease of TCM, Hefei 230031, China;
2. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the molecular mechanism of Qiyu Sanlong prescription (QYSL) in inhibiting the "addiction" of lung cancer A549 cells to miRNA21. **Method:** The human lung cancer A549 cells were routinely passaged and divided into the blank group, blank serum group, QYSL-containing serum group, and siRNA group. The prepared QYSL-containing serum was used for intervention, with the optimal

[收稿日期] 20201215(018)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81874431);国家自然科学基金青年科学基金项目(81804039);安徽省自然科学基金青年项目(1808085QH256)

[第一作者] 张星星,博士,主治医师,从事中医药防治肺病研究,E-mail:415377615@qq.com

[通信作者] *李泽庚,教授,主任医师,博士生导师,从事中医药防治肺病研究,Tel:0551-62850171,E-mail:Li6609@126.com

concentration and action time determined in previous studies. The protein and mRNA expression levels of miRNA21 and related molecules in its target phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN)/phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling pathway were detected by real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot assay. **Result:** The comparison with the blank serum group revealed that the mRNA expression levels of miRNA21 in the QYSL-containing serum group and the siRNA group were decreased, while the PTEN mRNA expression in the QYSL-containing serum group was increased, showing significant differences ($P<0.01$). Compared with the blank serum, the QYSL-containing serum and siRNA significantly down-regulated PI3K and mammalian target of rapamycin (mTOR) mRNA expression ($P<0.01$), whereas the QYSL-containing serum did not change the mRNA expression of protein kinase B (Akt). The protein expression levels of PTEN in the QYSL-containing serum group and the siRNA group were obviously elevated in contrast to that in the blank serum group ($P<0.05$). Meanwhile, the protein expression levels of phosphorylated Akt (p-Akt) and phosphorylated mTOR (p-mTOR) evidently declined in the QYSL-containing serum group ($P<0.05$), but there was no significant reduction in total Akt and mTOR protein expression. The PI3K protein expression was slightly down-regulated, with no statistical significance. **Conclusion:** QYSL inhibits the transcription of miRNA21, increases the expression of PTEN, and reduces the expression of key molecules in PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, thus mildly inhibiting the "addiction" of lung cancer cells to oncogenes and blocking their proliferation.

[Key words] Qiyu Sanlong prescription (QYSL); lung cancer A549 cells; miRNA21; phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN)/phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling pathway

肺癌仍是世界范围内导致癌症死亡的最常见原因,在男性癌症死亡中占首位,女性癌症死亡中占第2位^[1]。全国肿瘤登记中心最新数据,2018年全球癌症调查显示,全球新发癌症发病率及死亡率最高的均为肺癌,分别为11.6%和18.4%,而肺癌同样是中国发病率及死亡率最高的癌症^[2]。其中,非小细胞肺癌(NSCLC)仍是其最主要病理类型,约占83%^[3]。肺癌严重危害人类健康,疾病负担重,5年生存率低。微小RNA(miRNA)是单链小分子RNA,可调节多种基因表达,与人类多种癌症关系密切,其中miRNA21是其家族重要成员之一,有学者研究发现肿瘤细胞在发育增长过程中可对其产生过度依赖及成瘾现象^[4]。第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源物(PTEN)被研究证明在肺癌组织中普遍下调或缺失^[5]。同时学者已证实PTEN为miRNA的靶基因^[6]。磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/雷帕霉素靶蛋白(mTOR)是细胞中关键的生存信号通路,参与调节细胞的增殖、分化、凋亡等活动,是癌症中最常见的调节失控信号通路之一^[7]。而PTEN可使该信号通路中的3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇(PIP3)去磷酸化为4,5-二磷酸磷脂酰肌醇(PIP2),从而负向调控该通路的活化,阻断肺癌细胞增殖^[8]。芪玉三龙方(QYSL)是

韩明向教授治疗肺癌的经验方,临床上化裁用于肺癌患者取得良好效果,可提高肺癌患者的生存质量^[9]。前期动物研究表明,该方可改善肺癌小鼠免疫功能^[10];下调miRNA21转录,上调PTEN基因表达,诱导肺癌细胞凋亡^[11]。基于前期基础,进一步开展体外实验,验证前期研究结果及深入探讨该方治疗肺癌的分子机制。

1 材料

1.1 肺癌细胞株 A549人肺癌细胞株,购自武汉普诺赛生命科技有限公司,货号CL-0016。培养于DMEM培养基(含有10%胎牛血清,100 U·mL⁻¹青霉素,100 U·mL⁻¹链霉素),37℃ 5%CO₂饱和湿度培养箱。当细胞生长至90%用胰酶消化,加入完全培养基终止消化,吹打悬浮进行传代培养,用处于对数生长期的细胞进行后续实验。

1.2 动物 SPF级雄性SD大鼠40只,体质量200~250 g,购自安徽医科大学,合格证号SCXK(皖)2017-001。饲养于安徽中医药大学科研试验中心动物房。实验方案经安徽中医药大学动物实验伦理审查委员会认证(伦理编号AHUCM-mouse-2019013)。

1.3 药物 QYSL中药饮片(由黄芪、玉竹、壁虎、地龙、龙葵、白花蛇舌草、薏苡仁、泽漆、莪术、川贝

母组成),购自安徽省中医院,经安徽省中医院韩燕全主任药师鉴定所有饮片均符合2015年版《中华人民共和国药典》要求。中药饮片常规水提,加10倍量的水,浸渍1 h,武火煮沸后文火慢煎1.5 h,滤过,滤渣再加8倍量的水,武火煮沸后文火慢煎40 min,合并2次煎煮液,水浴浓缩至生药质量分数为 $1.396\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,除菌,分装, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.4 试剂和仪器 细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(日本Dojindo公司,批号CK04),DMEM培养基(美国Gibco公司,批号8120284);PTEN抗体,PI3K抗体,Akt抗体,磷酸化蛋白激酶B(p-Akt)抗体(美国Proteintech公司,批号分别为9100026016,9211621865,9399765210,9654390765);mTOR抗体,磷酸化雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR)抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为2,9);山羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G/辣根过氧化物酶(HRP),山羊抗兔IgG/HRP(北京Zsbio公司,批号分别为17699,138905);RIPA裂解液(上海Beyotime公司,批号P0013B);miRNA第一链cDNA合成(加尾法)试剂盒,十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)试剂盒,EZ-10 Total RNA Mini-Preps试剂盒(上海Sangon公司,批号分别为F712KA2423,C831100-0200,D215SD2142);聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号P0012S);TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)试剂盒,RNAiso Blood试剂(日本Takara公司,批号分别为AK8902,AF4218);ABScript II RT Master Mix试剂盒(武汉ABclonal公司,批号9619030419); β -肌动蛋白(β -actin,德尔谱生物设计合成,批号20191220);siRNA冻干粉(miRNA-21 siRNA序列为UCAACAUCAGUCUGAUAAAGCUA,由德尔谱生物公司合成,批号20191210)。

QP-160型二氧化碳培养箱,BSC-1100IIA2-X型生物安全柜(山东Biobase公司);ECLIPSE C1型正置荧光显微镜(日本Nikon公司);CX53型倒置荧光显微镜(日本Olympus公司);L420型医用离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);MDF-U3386S型医用低温冰箱(日本Panasonic公司);Light Cycler480 II型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Roche公司);BioTek Epoch 2型多功能酶标仪(美国BioTek公司);VE-180型免疫印迹系统(上海天能公司)。

2 方法

2.1 含药血清制备 健康雄性SD大鼠40只,适应性饲养1周,随机分为2组,分别为空白血清组、含药血清组。动物实验前禁食12 h,保持空腹状态进行实验。空白血清组按大鼠体质量灌胃等容积生理盐水灌胃;含药血清组QYSL药液灌胃,按照临床等效剂量,根据人和动物按表面积折算的等效剂量比率表计算,相当于60 kg成年人 $134\text{ g}\cdot\text{d}^{-1}$ 等效量,即 $13.96\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 进行灌胃,每日早晚各1次,连续5 d。末次灌药后1 h,腹注3.5%水合氯醛麻醉($10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$),于无菌状态下腹主动脉采血, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置1 h后, $1\ 500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,离心5 min(离心半径7 cm),分离血清, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴灭活30 min,分装,分别标记为空白血清和含药血清,于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱贮藏备用。

2.2 含药血清浓度筛选 采用CCK-8法测定,含药血清能以浓度依赖性的方式抑制细胞活性,通过不同时间半数抑制浓度(IC_{50})分析得出,24 h含药血清可以较低浓度达到 IC_{50} ,故分别选择了20%浓度的QYSL含药血清和24 h作为后续研究的最佳浓度和最佳作用时间。具体参照前期研究基础^[12]。

2.3 分组及给药 将肺癌细胞以 1.2×10^6 个/孔接种到6孔细胞培养板中,培养过夜细胞贴壁后,根据前期筛选出的最佳作用浓度和最佳作用时间作为实验条件,设置为空白组(A549细胞),空白血清组(正常小鼠血清),含药血清组(20%QYSL),siRNA组($75\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ siRNA)。

2.4 Real-time PCR检测 miRNA21 及其靶向信号通路 PTEN/PI3K 分子 mRNA 表达 提取6孔板各组细胞总RNA,测定RNA的浓度及纯度;使用ABScript II RT Master Mix进行反转录,TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)试剂盒进行Real-time PCR上机反应,以 β -actin作为内参基因。检测miRNA21的反转录使用miRNA First Strand cDNA Synthesis(Tailing Reaction)试剂盒,采用Poly(A)加尾反应和cDNA合成反应同步进行的方法;使用TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)试剂盒进行Real-time PCR上机反应,以U6为内参基因,根据 $2^{-\Delta\Delta\text{C}_t}$ 方法计算各组miRNA相对表达量。反应条件为,预变性 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s,1个循环,定量分析 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s,40个循环。引物由德尔谱生物公司合成,引物序列见表1。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 PTEN/PI3K 信号通路相关分子蛋白表达 RIPA裂解液提取6孔板各组细胞蛋白质,BCA试剂盒测定蛋白浓

表 1 PCR 序列引物

Table 1 Primers for related gene sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
miRNA21 上游	ACTTAGCTTATCAGACTGATGTTGA	
	下游, 公司专利	
PTEN 上游	CCTTTTGTGTTCTGTCACCA	121
	下游 TCGGAAACCTCTCTAGCC	
PI3K 上游	AGTACCTTGTTCCAATCCCA	131
	下游 GTTCTCTTTAGCACCTTTC	
Akt 上游	TGTGAAGGAGGGTTGGCT	158
	下游 GCGCCACAGAGAAGTTGTT	
mTOR 上游	GTTGGCCCTCACCTCAC	142
	下游 CTTGGCAGCTCTCTCAC	
β -actin 上游	GCCGAGGACTTTGATTGC	147
	下游 CCTGTGTGGACTTGGGAGA	

度。SDS-PAGE 分离蛋白组份, 转印 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 加入一抗 (PTEN 稀释比 1:2 000, PI3K 稀释比 1:2 000, mTOR 稀释比 1:1 000, p-mTOR 稀释比 1:1 000, Akt 稀释比 1:2 000, p-Akt 稀释比 1:2 000), 4 °C 孵育过夜, 对应加入 HRP 标记的二抗 (稀释比 1:1 万), 室温封闭 2 h, 充分洗涤 3 次, 增强化学发光法 (ECL) 显色, 胶片曝光, Image J 软件分析。

2.6 统计学方法 使用 SPSS 23.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

表 3 QYSL 含药血清对 A549 细胞 PI3K, Akt, mTOR mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of QYSL on PI3K, Akt, mTOR mRNA in A549 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度	PI3K	Akt	mTOR
空白		1.028±0.264	1.034±0.283	1.010±0.150
空白血清	20%	1.032±0.183	0.948±0.148	0.946±0.068
含药血清	20%	0.412±0.163 ²⁾	0.718±0.199	0.394±0.192 ²⁾
siRNA	75 nmol·L ⁻¹	0.313±0.119 ²⁾	0.466±0.100 ^{1,3)}	0.378±0.092 ²⁾

3.3 对信号通路 PTEN/PI3K 相关分子蛋白表达影响 与空白血清组比较, 含药血清组和 siRNA 组的 PTEN 蛋白表达明显升高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 含药血清组 p-Akt, p-mTOR 蛋白表达明显降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 总蛋白 Akt, mTOR 表达无明显降低, PI3K 蛋白的表达降低, 但差异无统计学意义。见表 4, 图 1。

4 讨论

肺癌是肺系最常见恶性肿瘤, 属于中医学“肺

3 结果

3.1 对 miRNA21 及其靶基因 PTEN mRNA 表达的影响 与空白组比较, 空白血清组相关 mRNA 表达差异无统计学意义, 可以排除空白血清组对细胞表达分子的干扰, 方可进行后续组间比较 (下同)。与空白血清组比较, 含药血清组和 siRNA 组的 miRNA21 mRNA 表达显著降低, 而 PTEN mRNA 的表达显著上升, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 QYSL 含药血清对 A549 细胞 miRNA21, PTEN mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of QYSL on miRNA21 and PTEN mRNA in A549 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度	miRNA21	PTEN
空白		1.023±0.240	1.025±0.246
空白血清	20%	0.953±0.143	0.958±0.111
含药血清	20%	0.557±0.055 ²⁾	1.956±0.165 ²⁾
siRNA	75 nmol·L ⁻¹	0.353±0.040 ^{2,4)}	1.721±0.410 ²⁾

注: 与空白血清组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与含药血清组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3, 4 同)。

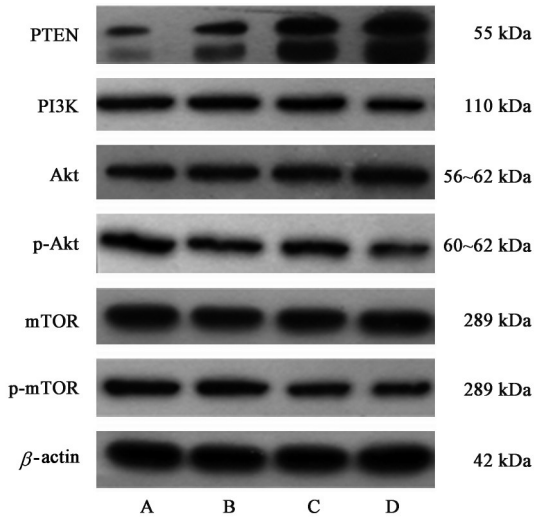
3.2 对 PI3K/Akt 信号通路相关分子 mRNA 表达影响 与空白血清组比较, 含药血清组和 siRNA 组的 PI3K, mTOR mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$); siRNA 组的 Akt mRNA 表达明显降低 ($P < 0.05$), 但含药血清组 Akt mRNA 的表达差异无统计学意义。见表 3。

积”“积聚”等范畴, 其本质乃本虚标实之证, 韩明向教授临床治疗肺癌用药以益气养阴、解毒消积、活血祛瘀立法, 临证多以 QYSL 为基础方化裁运用。该方由黄芪, 玉竹, 壁虎, 地龙, 龙葵, 白花蛇舌草, 薏苡仁, 泽漆, 莪术, 川贝母组成。方中黄芪补肺益气, 龙葵解毒抗癌, 共为君药; 壁虎、地龙、泽漆解毒消积、活血散结, 与黄芪、龙葵相须为臣; 白花蛇舌草清热解毒、活血化瘀, 莪术破血行气、消积止痛, 薏苡仁补益肺脾, 玉竹养阴生津, 共为佐药, 川贝母

表 4 QYSL 含药血清 A549 细胞 PTEN, PI3K, Akt, mTOR 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of QYSL on PTEN, PI3K, Akt and mTOR protein expression in A549 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度	PTEN/ β -actin	PI3K/ β -actin	Akt/ β -actin	p-Akt/ β -actin	mTOR/ β -actin	p-mTOR/ β -actin
空白		0.428 \pm 0.043	0.758 \pm 0.090	0.504 \pm 0.045	0.640 \pm 0.073	0.716 \pm 0.027	0.630 \pm 0.030
空白血清	20%	0.482 \pm 0.027	0.727 \pm 0.021	0.479 \pm 0.013	0.617 \pm 0.069	0.717 \pm 0.023	0.576 \pm 0.038
含药血清	20%	0.714 \pm 0.048 ¹⁾	0.582 \pm 0.061	0.483 \pm 0.026	0.366 \pm 0.019 ¹⁾	0.711 \pm 0.021	0.362 \pm 0.058 ¹⁾
siRNA	75 nmol·L ⁻¹	0.814 \pm 0.065 ¹⁾	0.409 \pm 0.050 ^{2,3)}	0.507 \pm 0.034	0.352 \pm 0.017 ¹⁾	0.706 \pm 0.016	0.285 \pm 0.062 ¹⁾



A. 空白组; B. 空白血清组; C. 含药血清组; D. siRNA 组
图 1 各组信号通路 PTEN/PI3K 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of PTEN/PI3K related molecules protein expression in each group

化痰润肺、消肿散结为使。以上诸药合用,共奏益气养阴、解毒消积、活血祛瘀之功。前期研究发现, QYSL 可缓解肺癌患者的临床症状,改善其生存质量。在体动物实验表明,该方可抑制 miRNA21 基因水平,上调 PTEN 分子表达,并能下调 PI3K/ Akt/ mTOR 信号通路关键分子表达,温和抑制肺肿瘤生长^[13],镜下观察芪玉三龙汤组肿瘤组织可见片状坏死^[14]。基于前期基础,本研究进一步开展体外细胞实验,验证前期研究结果及深入探讨该方治疗肺癌的分子机制。

miRNA 是一类长度为 21~25 个核苷酸组成的单链小分子 RNA,可抑制 mRNA 的翻译,是重要的基因调节因子^[15]。miRNA 在人类多种疾病尤其是在人类癌症中发挥着重要作用,改变 miRNA 的表达模式对癌症的诊断和预测患者的预后以及判断对治疗的反应起着关键作用^[16]。在癌症患者的体液、组织和血液中可检测到的 miRNAs 具有高度稳定性,是研究癌症的潜在生物标志物的丰富来源^[17]。miRNA 可调控癌症的不同过程,如通过调控靶基因

而抑制癌细胞的侵袭、增殖或迁移^[18],或者通过影响肿瘤微环境控制肿瘤生长^[19]。其中,miRNA21 是 miRNA 家族中的重要一员,既往学者研究显示淋巴瘤在发育过程中对 miRNA21 的极度“上瘾”现象,被称为“Oncogene Addiction”^[4],说明了 miRNA21 是 miRNA 中的一个关键致癌基因。PTEN 是由 LI 等^[20]于 1997 年从人类第 10q23.3 染色体位点分离并得到并命名,作为首个同时兼具脂质和蛋白双特异性磷酸酶活性的抑癌基因,该基因的表达下调或缺失在 NSCLC 患者中非常常见^[5]。并在 NSCLC 中已经证实 PTEN 为 miRNA21 的靶基因,同时在肺癌细胞株中,干扰 miRNA21 表达,则 PTEN 表达增加,而过表达 miRNA21, PTEN 表达则降低^[6]。说明 PTEN 与 miRNA 在肿瘤生长中呈现负相关性。

PI3K/Akt/mTOR 被证明是重要的激酶,可被多种细胞刺激激活,控制细胞的增殖、转录、翻译、存活等基本功能,其调控的改变可导致多种人类癌症的发生^[21]。因此,它是发现潜在抗肿瘤药物的重要治疗靶点^[22]。当细胞受到各种生长因子刺激后,细胞内 PI3K 被激活,其激活可使细胞膜上的 PIP2 转化成 PIP3, PIP3 与细胞内 Akt 的结构域绑定,招募 Akt 从细胞质移位到细胞膜上,并与 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1 (PDK1) 结合,通过 PDK1 磷酸化 Akt 蛋白的 Thr308 位点,并借助 PDK2 磷酸化其 Ser473 位点,最终使 Akt 被完全活化^[23-24]。活化的 PI3K/Akt 进一步激活其下游分子 mTOR,活化的 mTOR 会通过磷酸化蛋白合成体系来调节并启动蛋白质的翻译过程^[25]。而作为首个同时兼具脂质和蛋白双特异性磷酸酶活性的抑癌基因 PTEN,可使该信号通路中的 PIP3 去磷酸化为 PIP2,从而负向调控该通路的活化^[26]。具体模式见图 2。

本次研究的结果发现, QYSL 方含药血清可以显著降低 miRNA21 的表达,并使 PTEN 的表达有所升高,可降低 PI3K, p-Akt, p-mTOR 分子水平。由此得出, QYSL 可以通过下调 miRNA21 基因水平,促进 PTEN 活化,进一步阻断 PI3K/Akt/mTOR 信号通

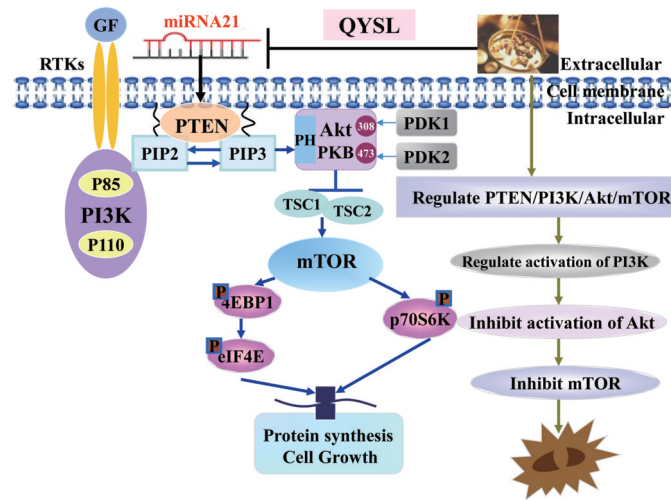


图2 miRNA21调控PTEN/PI3K/Akt信号通路及QYSL干预模式

Fig. 2 miRNA21 regulates PTEN/PI3K/Akt signal axis and intervention pattern of QYSL

路的传导,从而温和地抑制肺癌细胞对致癌基因的“成癌”现象,阻断肺癌生长和增殖。下一步课题组拟借助网络药理学研究,将继续从基因干扰、外源基因表达等方面深度挖掘该方治疗肺癌的分子机制。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] NASIM F, SABATH B F, EAPEN G A. Lung cancer [J]. Med Clin North Am, 2019, 103(3):463-473.
[2] 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, 2020, 70(4):313.
[3] RODRIGUEZ-CANALES J, PARRA-CUENTAS E, WISTUBA I I. Diagnosis and molecular classification of lung cancer[J]. Cancer Treat Res, 2016, 170:25-46.
[4] MEDINA P P, NOLDE M, SLACK F J. OncomiR addiction in an *in vivo* model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma [J]. Nature, 2010, 467 (7311) : 86-90.
[5] SUN J, LI T, ZHAO Y, et al. USP10 inhibits lung cancer cell growth and invasion by upregulating PTEN [J]. Mol Cell Biochem, 2018, 441(1/2):1-7.
[6] LIU Z L, WANG H, LIU J, et al. MicroRNA-21 (miR-21) expression promotes growth, metastasis, and chemo-or radioresistance in non-small cell lung cancer cells by targeting PTEN[J]. Mol Cell Biochem, 2013, 372(1/2):35-45.
[7] XU F, NA L, LI Y, et al. Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours[J]. Cell Biosci, 2020, 10:54.
[8] PÉREZ-RAMÍREZ C, CAÑADAS-GARRE M,

MOLINA M Á, et al. PTEN and PI3K/AKT in non-small-cell lung cancer [J]. Pharmacogenomics, 2015, 16(16):1843-1862.

[9] 童佳兵,高雅婷,范春雷,等. 芪玉三龙汤治疗中晚期非小细胞肺癌临床观察[J]. 新中医, 2018, 50(4):146-150.
[10] 张星星,童佳兵,杨程,等. 芪玉三龙汤平衡肺癌小鼠 Th1/Th2 漂移相关机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(11):131-136.
[11] 童佳兵,张星星,李泽庚. 芪玉三龙汤调节 microRNA21 及 PTEN 的表达抑制肺癌肿瘤生长[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(5):1585-1589.
[12] 高雅婷,王心恒,王小乐,等. 芪玉三龙汤调节 mTOR/Beclin1/LC3 信号轴相关分子的表达诱导肺癌 A549 细胞自噬 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20202225.
[13] 张星星,李泽庚. 芪玉三龙汤对荷瘤小鼠肿瘤组织 PI3K/Akt/mTOR 通路分子表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(12):5358-5361.
[14] 程建超,童佳兵,朱洁,等. 芪玉三龙汤调节 Beclin1, Atg5, LC3B 表达以抑制肺癌肿瘤生长机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(9):29-35.
[15] LI Y, YIN Z, FAN J, et al. The roles of exosomal miRNAs and lncRNAs in lung diseases [J]. Signal Transduct Target Ther, 2019, 4:47.
[16] SALIMINEJAD K, KHORRAM K H R, SOLEYMANI FARD S, et al. An overview of microRNAs: biology, functions, therapeutics, and analysis methods [J]. J Cell Physiol, 2019, 234 (5) : 5451-5465.
[17] LAN H, LU H, WANG X, et al. MicroRNAs as potential biomarkers in cancer: opportunities and challenges [J]. Biomed Res Int, 2015, 2015:125094.

- [18] QADIR M I, FAHEEM A. miRNA: a diagnostic and therapeutic tool for pancreatic cancer [J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2017, 27(3): 197-204.
- [19] SANDIFORD O A, MOORE C A, DU J, et al. Human aging and cancer: role of miRNA in tumor microenvironment [J]. Adv Exp Med Biol, 2018, 1056: 137-152.
- [20] LI J, YEN C, LIAW D, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer [J]. Science, 1997, 275(5308): 1943-1947.
- [21] TEWARI D, PATNI P, BISHAYEE A, et al. Natural products targeting the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway in cancer: a novel therapeutic strategy [J]. Semin Cancer Biol, 2019, doi: 10.1016/j.semcancer.
- [22] DUAN Y, HAYBAECK J, YANG Z. Therapeutic potential of PI3K/Akt/mTOR pathway in gastrointestinal stromal tumors: rationale and progress [J]. Cancers (Basel), 2020, 12(10): 2972.
- [23] ROBBINS H L, HAGUE A. The PI3K/Akt pathway in tumors of endocrine tissues [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2015, 6: 188.
- [24] SONG G, OUYANG G, BAO S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival [J]. J Cell Mol Med, 2005, 9(1): 59-71.
- [25] XIA P, XU X Y. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in cancer stem cells: from basic research to clinical application [J]. Am J Cancer Res, 2015, 5(5): 1602-1609.
- [26] PAPA A, PANDOLFI P P. The PTEN-PI3K axis in cancer [J]. Biomolecules, 2019, 9(4): 153.
- [责任编辑 王鑫]

·书讯·

卵巢癌CT及超声影像特征与术后病理检查结果的对比 ——评《病理学实习指南》(第2版)

卵巢癌属于妇科高发恶性肿瘤,它发生于女性生殖器官,发病率在子宫颈癌、宫体癌之后,分别包含了皮癌和恶性生殖细胞肿瘤,死亡率位居妇科肿瘤首位,对女性生命安全威胁极大。卵巢癌早期难以发现且缺乏典型症状,这主要是因为女性卵巢深居盆腔,体积相对较小,单纯的卵巢皮癌不易引发患者注意。目前临床上能够治疗卵巢癌的主要方法是手术联合化疗,主要目标是切除肿瘤,缓解患者临床症状,延长患者寿命。诊断过程中,就采用了CT检查配合超声影像学技术方法,利用二者拍摄影像特征检查女性患者卵巢癌病变情况。其中超声技术可动态监测患者肿瘤病灶,它不具有放射性,操作也相对简单,可实现重复操作,费用成本非常低;CT检查技术具有较高分辨率,在显示患者肿瘤内部结构方面更清晰,两种技术方法各有优势。在临床治疗过程中,可考虑将卵巢癌CT、超声影像特征与患者术后的病理检查结果相关联,为患者选择更好的临床诊断方法。

《病理学实习指南》(第2版)由田新霞,柳剑英主编,北京大学医学出版社有限公司2017年3月出版。该书是病理学领域中重要的实习指南图书,它按照高等医学院校病理学教科书及教学大纲要求进行编写,适用于当前不同层次的医学生、教师,教学、学习、参考使用。全书收集图片200余幅,书中资料均来自北京大学医学部基础医学院病理学系,代表了学系百年以来积累的临床外检与尸检材料与经验,凝聚了学系几代病理学研究人员与工作者的心血。全书共有十二章,其中对人体细胞与组织适应、损伤、血液循环障碍、炎症、肿瘤、心血管系统疾病等多种疾病内容进行了病理学分析,提出各种疾病的病理学检查案例。第四章“肿瘤”,围绕各种肿瘤疾病展开分析,它包括女性常见恶性肿瘤疾病——卵巢癌。卵巢癌的患者年龄范围大,一般从30~74岁均有患病可能。患者下腹出现肿块、附件压痛,且伴有阴道流血、月经紊乱及进行性消瘦等症状。一般来说,针对患者的前期诊断主要采用彩色多普勒超声诊断仪,对患者盆腔内进行探头检查,探头频率控制在5~9 MHz,腹部探头频率控制在2~4 MHz。患者需提前禁食8小时,且要在清晨憋尿,膀胱充盈的情况下进行检查,检查姿势为仰卧位。在腹部探查过程中,要排空膀胱,对膀胱结石位进行阴道超声造影检查,配合彩色多普勒血流显像观察患者肿块周边与内部血流形态及分布特征等。书中谈到了CT检查,可采用排螺旋CT仪,在患者倡导准备完毕后采用取仰卧位进行检查,配合平扫与增强两种扫描方式,尽量扩大扫描范围,扫描进床速度控制在24 mm/s左右。平扫结束后,对患者进行对比剂静脉注射,再对患者动脉与静脉进行延迟期扫描。最后书中谈到了针对卵巢癌患者的术后病理检查,对患者病理组织进行固定、脱水和包埋处理,处理后快速实施HE染色,如此可确定患者的病理类型。如患者患有多种卵巢癌病变,可分析提取较大病变作为患者首要病因实施针对性统计。在术后病理结果分析过程中,可针对不同患者进行确诊,例如分析、归纳出不同卵巢癌患者的病变情况与病变类型,其中就涵盖了黏液性囊性癌、低分化腺癌、透明细胞癌等。

该书针对卵巢癌患者的分析相当深入,在围绕术后病理检查结果进行CT与超声影像特征的对比分析中发现,超声影像技术在声像图检查方面存在明显的重叠现象,容易出现误诊可能性。而CT检查在空间与密度方面表现出了较高的分辨率水平,在显示肿瘤外形特征与内部结果方面表现较好。CT检查影像中会发现卵巢癌经常表现为囊实性肿块,乳头结节明显,也能发现部分病灶的钙化现象。所以,CT检查针对卵巢癌的诊断效率更高,无论是在准确度、灵敏度、阳性/阴性预测值方面都表现良好,检查效率与效果都高于超声影像检查。书中认为CT检查及超声检查均能作为当前针对卵巢癌患者的基础诊断方案,但CT检查在显示患者卵巢肿块组织特征方面表现更好,诊断价值更高,对于患者疾病的最终正确诊断更理想,建议使用CT检查方法。

(作者赵振亚,王博,齐蕾,姚冬颖,许欣,邢台市人民医院,河北 邢台 054031)