

消岩汤剂拆方配伍对肺腺癌 A549 细胞 survivin 和 caspase-3 表达的影响

李小江¹, 贾英杰^{1*}, 于建春¹, 张小青¹, 杜晓玲², 朱津丽¹, 孟 醒³

1. 天津中医药大学第一附属医院 肿瘤科, 天津 300193

2. 南开大学生命科学学院, 天津 300071

3. 天津中医药大学, 天津 300193

摘要: 目的 探讨消岩汤及其各拆方组分对人肺腺癌 A549 细胞株凋亡的影响及其机制。方法 将消岩汤按照功效进行拆方, 分为清热解毒组、活血化瘀组、益气扶正组。以 CCK-8 法检测各拆方对 A549 细胞的最有效抑制浓度, 采用 Western blotting 法测定 Survivin、Caspase-3 蛋白表达, RT-PCR 法检测 survivin 与 caspase-3 基因表达。结果 消岩汤及其各拆方组分均有明显的抑制 A549 细胞生长作用, 消岩汤及其各拆方组分具有诱导 A549 细胞凋亡的作用, 其机制与下调 survivin 基因和蛋白表达有关, 对 caspase-3 基因和蛋白表达影响不显著。结论 消岩汤及其各拆方组分体外均有明显的抑制 A549 细胞生长作用, 消岩汤及其各拆方组分可通过下调 survivin 的表达诱导肿瘤细胞凋亡, 清热解毒组方中药是其抗肿瘤作用主要组分。

关键词: 消岩汤; A549 细胞; 细胞凋亡; survivin; caspase-3

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)23-3436-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.23.015

Influence of Xiaoyan Decoction and decomposed recipe on expression of survivin and caspase-3 in lung cancer A549 cells

LI Xiao-jiang¹, JIA Ying-jie¹, YU Jian-chun¹, ZHANG Xiao-qing¹, DU Xiao-ling², ZHU Jin-li¹, MENG Xing³

1. Department of Oncology, First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China

3. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: **Objective** To investigate the inhibition of Xiaoyan Decoction and its decomposed recipe on apoptosis of pulmonary carcinosis A549 cells. **Methods** According to the effect, Xiaoyan Decoction is divided into three groups: Qingre Jiedu (clearing away heat-evil and expelling superficial evils) group, Huoxue Huayu group, and Yiqi Fuzheng group. Using CCK 8 method to detect the proliferation activity of lung adenocarcinoma cancer A549 cells. The Western blotting was adopted to observe the influence on protein expression of survivin and caspase-3 of pulmonary carcinosis A549 cells. And the RT-PCR was adopted to observe the influence on survivin and caspase-3 gene expression of pulmonary carcinosis A549 cells. The inhibition of Xiaoyan Decoction and its decomposed recipe on the apoptosis of pulmonary carcinosis A549 cells was investigated. **Results** There were obvious inhibitory effects of cancer cell activity in the three groups. Xiaoyan Decoction in the three groups could induce the apoptosis of lung cancer A549 cell line. Its mechanism was the down regulation of survivin expression. And the related with the elevation of caspase-3 expression is not intimate. **Conclusion** Xiaoyan Decoction has the antitumor effect by inducing tumor cell apoptosis through the down regulation of survivin expression.

Key words: Xiaoyan Decoction; lung adenocarcinoma cancer A549 cell; apoptosis; survivin; caspase-3

消岩汤系天津中医药大学第一附属医院肿瘤科贾英杰教授结合多年临证经验总结拟成治疗恶性肿瘤之精方。根据功效将全方拆分为3组: 清热解毒组(夏枯草、生牡蛎、白花蛇舌草)以清热解毒、

软坚散结; 益气扶正组(黄芪、太子参)以滋阴益气、扶正抗癌; 活血祛瘀组(姜黄、郁金)以行气散结、活血祛瘀; 诸药合用, 共奏益气滋阴、活血祛瘀、清热解毒、扶正驱邪之功^[1-2]。消岩汤能有效

收稿日期: 2014-07-30

基金项目: 天津市教委课题“消岩汤对肺腺癌 A549 细胞凋亡生成素基因表达的影响”(20120216)

作者简介: 李小江(1980—), 女, 医学博士, 副主任医师, 研究方向为中西医结合肿瘤学。

*通信作者 贾英杰(1960—), 男, 医学博士, 主任医师。Tel: 13820639756 E-mail: zxqlvelxj@126.com

地辅助化疗治疗中晚期非小细胞肺癌,并对化疗患者有增效减毒作用^[3]。本实验选用人肺腺癌 A549 细胞,采用 Western blotting 和 RT-PCR 方法分别检测消岩汤全方及其各拆方组人肺腺癌 A549 细胞 survivin、caspase-3 蛋白及基因的表达情况,探讨消岩汤全方及其各拆方组合中药对人肺腺癌 A549 细胞凋亡的影响及其机制。

1.1 试剂与药物

CCK-8 试剂盒(武汉博士德生物有限公司);PVDF 膜(Millipore 公司);辣根酶标记二抗(北京中杉金桥公司);ECL 发光剂(Santa Cruz 公司);Ultrapure RNA Kit (CWbio. Co. Ltd.), Platinum[®] SYBR[®] Green q PCR Super Mix-UDG (Life Technologies 公司), RPMI 1640 培养液(Gibco 公司),胎牛血清(Amresco 公司),青-链霉素(南京凯基生物科技有限公司)。消岩汤各组分中药由天津中医药大学第一附属医院药房提供。中药的浓缩液为棕黄色液体,剂量以原方为准,全方共 140 g,包括生黄芪 30 g、太子参 15 g、郁金 10 g、姜黄 10 g、夏枯草、生牡蛎、白花蛇舌草共 60 g 等,消岩汤及其拆方(清热解毒组、益气扶正组、活血祛瘀组)水煎液均由天津中医药大学中药提取室严格按回流提取法进行提取,其终质量浓度分别为含生药 2、1、1、1 g/mL。

1.2 细胞

人肺腺癌细胞株 A549,由南开大学生命科学学院提供。

1.3 仪器

Bio-tek Synergy2 多功能酶标仪(美国伯腾仪器有限公司),电泳电源(Bio-Rad 公司),FluorChem FC2 成像系统(Alpha Innotech 公司),Epgadients PCR 仪(Eppendorf 公司),荧光定量 PCR 仪(ABI7500 fast)。

2 方法

2.1 A549 细胞的培养

A549 细胞置于含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养液中,置于 5% CO₂ 培养箱,恒温 37 ℃培养。使用 0.05% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 常规消化传代,4 g/L 台盼蓝染色后计算细胞数和存活率(>98%),取对数生长期的细胞进行实验。

2.2 样品的制备

消岩汤及各组拆方浓缩液以 10 000 r/min 离心

5 min,取上清用 0.22 μm 过滤器除菌,用培养基稀释成梯度质量浓度的溶液。

2.3 CCK-8法筛选消岩汤及其拆方配伍对A549细胞生长的最有效抑制浓度

选取处于对数生长期的细胞进行常规消化,调整细胞浓度至以 5×10^4 /L 接种于 96 孔板中,每孔 80 μL。待贴壁后,加入 RPMI 1640、10%胎牛血清培养基同步化 24 h。设立空白对照孔(只加入细胞培养液)、实验孔、调零孔(未加 CCK-8 试剂)、阴性对照孔(加细胞未加中药)。实验组分别加入不同质量浓度的中药,4 组中药用培养基稀释成梯度质量浓度的溶液(经过预试验筛选,消岩汤全方组、清热解毒组、活血化瘀组、益气扶正组以 10、20、30、40、50、60、70、80、90 mg/mL 进行实验,各组方均相同质量浓度梯度)加入 96 孔板,每孔 200 μL,每个质量浓度重复 6 孔,培养 48 h;48 h 后,加入 20 μL CCK-8 溶液,37 ℃孵育 4 h。在酶标仪上($\lambda=450$ nm)测各孔吸光度(A)值,实验重复 3 次。计算药物对细胞的生长抑制率。

抑制率 = $1 - (\text{实验孔 } A \text{ 值} - \text{调零孔 } A \text{ 值}) / (\text{阴性对照孔 } A \text{ 值} - \text{调零孔 } A \text{ 值})$

2.4 Western blotting法测定Survivin和Caspase-3蛋白表达

取对数生长期 A549 细胞,以 5×10^5 /mL 接种于培养瓶中培养,通过 CCK-8 筛选出的对 A549 细胞最有效抑制浓度的各组中药作用 48 h 后,以培养基为对照,加适量预冷的蛋白裂解液 RIPA,匀浆,14 000 r/min 离心 15 min,上清转入新管,BCA 法测定蛋白的量,用 PBS 调至等浓度,加 6×SDS 上样缓冲液,沸水浴 5 min 备用。以 β-tublin 为内参,8%的 SDS-PAGE 电泳分离后,电转至 PVDF 膜上。PVDF 膜经封闭液封闭 1 h 后,分别加入小鼠抗人 Survivin、Caspase-3 单克隆抗体作一抗,室温结合 2 h。用辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠作为二抗,室温结合 1 h。TBET 缓冲液洗涤后,加入化学发光剂,ECL 发光法检测蛋白表达,采用 AlphaView 图像分析系统进行灰度分析。

2.5 荧光定量 PCR 法检测 survivin 与 caspase-3 基因表达

培养 A549 细胞,制备悬液,平均分瓶继续培养,待细胞长满贴壁后按实验分组干预,采用对 A549 细胞最有效抑制浓度的各组中药作用 A549 细胞,继续培养 24 h,制备细胞悬液,分装入离心管

离心收集细胞,用 Trizol 试剂提取总 RNA;用 All-in-One™ First-Strand cDNA Synthesis Kit (Gene Copoeia) 进行反转录,RT-PCR 反应条件:37 ℃、1 h;85 ℃、5 min。产物于 4 ℃备用,-20 ℃冻存。用 Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG 进行扩增,退火温度为 60 ℃,反应体系由 survivin 上游引物 5'-CACCGATCTCTACATTCAA-3',下游引物 5'-CACTTTCTTCGCAGTTTCCT-3'各 1.0 μL; caspase-3 上游引物 5'-TTCAGAGGGGATCGT-TGTAGAAGTC-3',下游引物 5'-CAAGCTTGTCG-GCATACTGTTTCAG-3'各 1.0 μL;2×Super Mix 10 μL、cDNA 模板 1.0 μL 组成。

2.6 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 19.0 统计学软件进行数据方差分析。

3 结果

3.1 消岩汤全方及各拆方组药物对 A549 细胞生长的抑制作用

消岩汤全方及各拆方组药物均对 A549 细胞有一定的抑制作用。其中消岩汤全方组当质量浓度达到 50 mg/mL 时达到最大抑制率 85.60%;活血祛瘀组药物质量浓度达到 60 mg/mL 时达到最大抑制率 82.47%;清热解毒组药物质量浓度达到 70 mg/mL 时达到最大抑制率 81.54%;益气扶正组药物质量浓度达到 80 mg/mL 时达到最大抑制率 85.85%。提示消岩汤及其拆方配伍对 A549 细胞的生长有明显的抑制作用。见图 1。

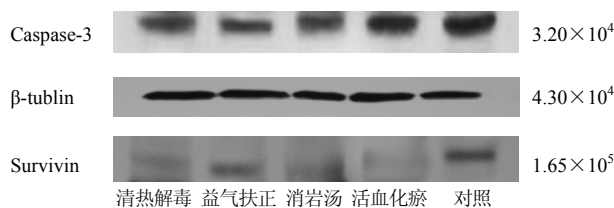


图2 各组中药对 A549 细胞 Survivin 和 Caspase-3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effects of decoction in each group on expression of survivin and caspase-3 proteins of pulmonary carcinosis A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 消岩汤全方及各拆方组药物对 A549 细胞 survivin 与 caspase-3 基因表达的影响

消岩汤及各组分中药可以抑制 survivin 基因的表达而起到诱导 A549 细胞凋亡的作用,其中清热解毒组效果最为明显;但各组分在促进 caspase-3 基因的表达方面未见明显效果。提示消岩汤剂主要

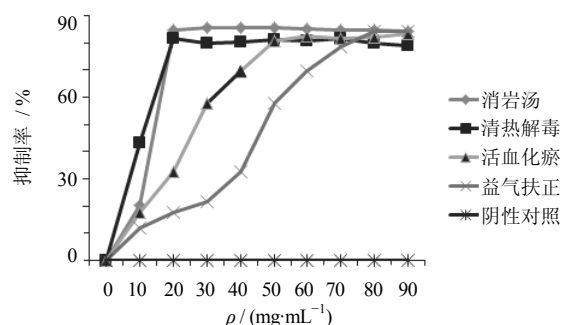
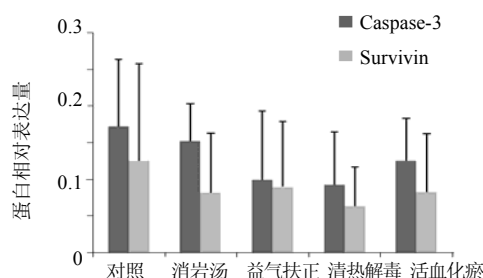


图1 各组药物体外对 A549 细胞生长的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Inhibitory rate of decoction in each group on *in vitro* growth of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.2 消岩汤全方及各拆方组药物对 A549 细胞 Survivin 和 Caspase-3 蛋白表达的影响

分别用消岩汤全方(50 mg/mL)、活血祛瘀药物(60 mg/mL)、清热解毒药物(70 mg/mL)、益气扶正药物(80 mg/mL)作用 A549 细胞 48 h 后收集细胞,经定量提取蛋白后进行 Western blotting 检测。结果显示实验组 Survivin 蛋白的表达均低于对照组,且清热解毒组 Survivin 蛋白的表达最低;提示消岩汤剂通过抑制 Survivin 蛋白表达的途径起到抗肿瘤的作用,其中清热解毒组是全方抗肿瘤的主要组成部分。消岩汤及各拆方组中 Caspase-3 蛋白表达均低于对照组,提示消岩汤的抗肿瘤作用可能并非通过调控 Caspase-3 蛋白表达起作用。见图 2。



是通过抑制 survivin 基因表达的途径起到抗肿瘤的作用,其中清热解毒组是全方抗肿瘤的主要组成部分。结果见图 3。

4 讨论

肺癌是全球发病率最高的恶性肿瘤,已成为人类因癌症死亡的主要原因^[4]。Survivin 是新近发现

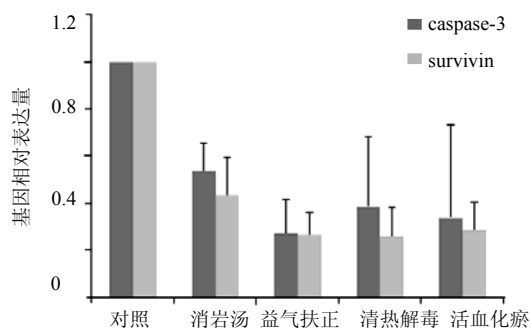


图 3 各组中药对 A549 细胞 survivin 及 caspase-3 基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of decoction in each group on expression of survivin and caspase-3 gene in tumor cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

的凋亡蛋白抑制因子 (inhibitor of apoptosis protein, IAP) 家族的一名新成员, 是作用很强的凋亡抑制因子。在肺癌和其他恶性肿瘤中 Survivin 表达水平上调是一个不良预后指标^[5-7]。Caspase-3 则为一组选择性地剪切蛋白质, 其功能的丧失或结构变化, 可促进细胞凋亡。

消岩汤基于肿瘤病机“正气内虚、毒瘀并存”, 以“扶正固本、解毒祛瘀”为治法, 结合多年临证经验总结拟成。本实验通过检测 survivin 及 caspase-3 基因及蛋白表达, 从抑制细胞凋亡及促进细胞凋亡 2 个不同的角度考察消岩汤剂及其各组分对人肺腺癌 A549 细胞的影响。发现不同组分中药均对 A549 细胞生长具有不同程度的抑制作用, 且

清热解毒组中药为全方体外抑瘤作用的最重要组分。Western blotting 及荧光定量 PCR 法结果均提示消岩汤剂主要通过抑制 A549 细胞中 survivin 基因的表达及蛋白合成而发挥诱导细胞凋亡的作用, 其中仍以清热解毒组分中药作用显著; 对于调节 caspase-3 基因的表达效果并不明显。本研究初步阐明了消岩汤体外抗肿瘤作用及部分机制, 为中药复方治疗肺癌的临床应用提供了重要的实验依据, 但其体内抗肿瘤作用及相关机制仍有待深入研究。

参考文献

- [1] 贾英杰, 于建春, 杨佩颖, 等. 扶正解毒祛瘀法防治化疗后骨髓抑制的探讨 [J]. 中医杂志, 2014, 55(3): 198-201.
- [2] 贾英杰. 试论癌瘤“正气内虚, 毒瘀并存”的病机观点 [J]. 新中医, 2013, 45(6): 9-11.
- [3] 彭卫卫, 贾英杰. NP 方案联合解毒祛瘀法治疗中晚期非小细胞肺癌的临床观察 [J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(7): 1303-1304.
- [4] Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014 [J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(2): 104-117.
- [5] Salz W, Eisenberg D, Plescia J, et al. A Survivin gene signature predicts aggressive tumor behavior [J]. Cancer Res, 2005, 65(9): 3531-3534.
- [6] 李奕璇, 陈全, 朱大冕. Survivin 启动子调控 sea 基因真核表达质粒的构建及其在肺癌细胞中的特异性表达 [J]. 中国生物制品学杂志, 2009, 22(2): 147-149.
- [7] 李姝君, 杨志雄, 田鲜艳, 等. Survivin 在肺癌中表达意义及其与 Fas/FasL 表达的关系 [J]. 中国医药导报, 2011, 8(20): 17-19.