

基于 RNA 干扰技术探讨消岩汤对肺腺癌 A549 细胞凋亡的影响

张欣, 张莹, 杨佩颖, 张蕴超

天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193

摘要: **目的** 分析消岩汤干预下 sh-survivin 对人肺腺癌 A549 细胞增殖及凋亡的影响。**方法** 选择人肺腺癌 A549 细胞, 采用中药复方进行干预及 shRNA 进行转染, 将转染后的细胞分组, 通过 MTT 法观察消岩汤对 A549 细胞生长的影响, 免疫组化法检测 survivin 蛋白的表达, 流式细胞仪检测细胞凋亡率。**结果** 消岩汤能有效地抑制人肺腺癌 A549 的细胞增殖, 运用消岩汤作用细胞 24 h 后, 侵袭的细胞数明显减少, 该方作用 48 h 后可以诱导肿瘤细胞凋亡; 消岩汤中剂量组与转染 sh-survivin 组抑制率相当, 不同剂量的消岩汤均可协同 sh-survivin 使肺癌细胞凋亡率增加。**结论** 消岩汤可以通过干预肿瘤细胞凋亡抑制蛋白的表达而有效抑制肿瘤的发展。

关键词: 肺腺癌; A549 细胞; 消岩汤; RNA 干扰; 细胞凋亡

中图分类号: R 965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 6376 (2015) 03 - 0288 - 04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.03.012

Investigation on influence of Xiaoyan Decoction on lung adenocarcinoma cancer cell A549 apoptosis based on siRNA interference

ZHANG Xin, ZHANG Ying, YANG Pei-ying, ZHANG Yun-chao

First Teaching Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To analyze the effect of Xiaoyan Decoction intervened sh-survivin human lung adenocarcinoma A549 cell proliferation and apoptosis. **Methods** Selecting the human lung adenocarcinoma A549 cells, using the interence of compound Chinese materia medica and shRNA transfection, after transfection cells wre grouped, the effect of Xiaoyan Decoction on the proliferation of human lung adenocarcinoma A549 cell was determined by MTT method, the Survivin protein expression was detected by immunohistochemical method, and the cell apoptosis rate was detected by flow cytometry instrument. **Results** Xiaoyan Decoction could effectively inhibit the cell proliferation of human lung adenocarcinoma A549; Using Xiaoyan Decoction on cells after 24 h, the number of cells was significantly decreased, the tumor cell apoptosis was induced after 48 h of the administration of Xiaoyan Decoction. The inhibitory rate of Xiaoyan Decoction in treatment dose group and transfection group was equal, the Xiaoyan Decoction at different dosage can be coordinated with sh-survivin to increase rate of lung cancer cell apoptosis. **Conclusion** Xiaoyan Decoction can inhibit the tumor development by intervening tumor cell apoptosis and depressing the protein expression.

Key words: lung adenocarcinoma cancer; A549 cell; Xiaoyan Decoction; siRNA interference; apoptosis

肺癌是当今世界上发生率和死亡率最高的恶性肿瘤之一,且呈上升趋势,目前全球范围内新发肺癌患者每年已经超过 100 万例,其死亡率在男性和女性患者中均占恶性肿瘤死亡率的第一位。另有国外资料显示肺癌的病理学类型发生了明显变化:肺腺癌发病率迅速增加,目前已取代肺鳞癌的发生率,已成为最常见的肺癌病理类型。尽管采用了手术、放疗和化疗等综合治疗措施,由于转移和多药耐药等原

因,非小细胞肺癌 5 年生存率仍低于 10%。近年来,新兴的肿瘤分子靶向治疗意在针对肿瘤内特异的分子治疗靶点,利用一定的分子技术阻断分子的生物学功能,进而从分子水平逆转肿瘤细胞的恶性生物学行为,达到抑制肿瘤生长的目的^[1]。中医药作为肿瘤综合治疗的手段之一被临床广泛应用。目前普遍认为中医药在预防肿瘤,增强患者的免疫功能,对放化疗的减毒增效,抗复发转移及延长患者的生存期,

收稿日期: 2015-03-06

作者简介: 张欣,女,硕士,主治医师,主要从事中西医结合防治肿瘤的科研与临床工作。

改善生活质量等方面均有其独特作用。多年来,大量临床研究结果表明^[2-6],以消岩汤为基础的中医药对非小细胞肺癌具有明显的抑瘤及减毒增效作用,本实验以 RNA 干扰技术为切入点,从基因角度探讨消岩汤对肺腺癌 A549 细胞 survivin 蛋白表达的影响,明确消岩汤抗肿瘤作用靶点及作用机制,为消岩汤在临床抗肿瘤治疗中提供有力的理论依据。

1 材料

人肺腺癌 A549 细胞、RPMI1640 培养基、新生牛血清、MTT (四甲基偶氮唑盐)、二甲基亚砷 (DMSO)、免疫组化试剂盒、survivin 抗体均购自天津科瑞杰生物技术开发有限公司。

2 方法

2.1 消岩汤的制备

消岩汤是天津中医药大学第一附属医院院内制剂,制剂号 40019,严格按照院内制剂标准进行制备。消岩汤由生黄芪 30 g、太子参 15 g、夏枯草 10 g、姜黄 15 g、郁金 10 g、白花蛇舌草 15 g 组成,选取标准中药饮片,煎前先用凉水浸泡 30 min,用水量为生药量的 8 倍,武火煎沸后,文火煎 30 min,滤出药液;再加 6 倍量水煎沸后文火煎 20 min,滤出药液,合并 2 次煎液,置 70~80 °C 水浴中浓缩至 100 mL,相当于生药 0.42 g/mL,放置 4 °C 冰箱中保存。

2.2 分组

实验分为对照组,转染组,消岩汤低、中、高剂量组及转染+消岩汤低、中、高剂量组。对照组为空白细胞,不做任何处理;转染组转染 sh-survivin 干扰序列;消岩汤低、中、高剂量组分别加入终质量浓度为 10、15、25 mg/mL 的消岩汤;转染+消岩汤低、中、高剂量组在转染 sh-survivin 干扰序列后分别加入终质量浓度为 10、15、25 mg/mL 的消岩汤。

2.3 方法

2.3.1 MTT 法检测消岩汤对 A549 细胞生长的影响 分别检测不同浓度消岩汤 (0、10、15、20 mg/mL) 处理不同时间 (24、48 h) 对 A549 细胞增殖的影响。取对数生长期,调整细胞浓度为 1×10^5 /mL,种于 24 孔板中,加入不同浓度的中药分别处理不同时间后,弃上清。每孔加入 MTT (10 mg/mL),培养 4 h,弃上清,避光加入 DMSO 150 μ L,震荡,用酶标仪检测吸光度 (A) 值,计算细胞生长抑制率。

抑制率 = $1 - \frac{\text{加药组 } A \text{ 值}}{\text{对照组 } A \text{ 值}}$

2.3.2 免疫组织化学法检测 survivin 蛋白的表达

采用细胞盖玻片爬片法, survivin 蛋白检测采用 SABC 法,具体操作步骤按试剂盒说明书进行,一抗为兔抗人 survivin 单克隆抗体,工作浓度为 1:100。免疫组化结果判定以阳性细胞百分率及着色强度综合计分作半定量分析,并利用 HPIAS21000 彩色病理图文报告系统测定积分吸光度 (IA) 值进行蛋白表达强度的定量分析。

2.3.3 流式细胞仪检测细胞凋亡率 把对数生长期的人肺腺癌 A549 细胞以 1×10^5 个/mL 的浓度接种于六孔板中,置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h 后,弃上清,分别予以不同处理,24 h 后收集各组细胞,300 目尼龙网过滤细胞悬液,采用 Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测方法,上流式细胞仪检测,计数 10 000 个细胞,测定细胞凋亡数量。

3 结果

3.1 MTT 法检测消岩汤对 A549 细胞生长的影响

结果可见,作用 24 h 各组细胞的药物毒性不明显,作用 48 h 后各组细胞的药物毒性作用比较明显。加入终质量浓度 15 mg/mL 的消岩汤与转染组二者的抑制率无明显差异,均显著高于终质量浓度 10 mg/mL 和终质量浓度 25 mg/mL 的消岩汤组;但转染组联合消岩汤组的抑制率显著高于单纯转染组及单纯中药组。见表 1。

表 1 各不同处理组作用于 A549 细胞后的抑制率

Table 1 Inhibitory rate of A549 cells in different treatment groups

分组	剂量/(mg·mL ⁻¹)	A	抑制率/%
对照	—	0.695	—
转染	—	0.226	0.675
消岩汤	10	0.316	0.545
	15	0.212	0.695
	25	0.308	0.557
转染+消岩汤	10	0.092	0.868
	15	0.074	0.894
	25	0.089	0.872

3.2 免疫组织化学法检测 Survivin 蛋白的表达

结果可见转染组对 Survivin 蛋白表达的抑制率明显高于单纯中药组,但显著低于转染组联合中药组。见表 2。

3.3 流式细胞仪检测细胞凋亡率

在流式细胞术双参数散点图上,左下象限显示活细胞,右下象限为早期凋亡细胞,右上象限为晚

表2 Survivin 蛋白表达抑制率

Table 2 Inhibitory rate of survivin protein expression

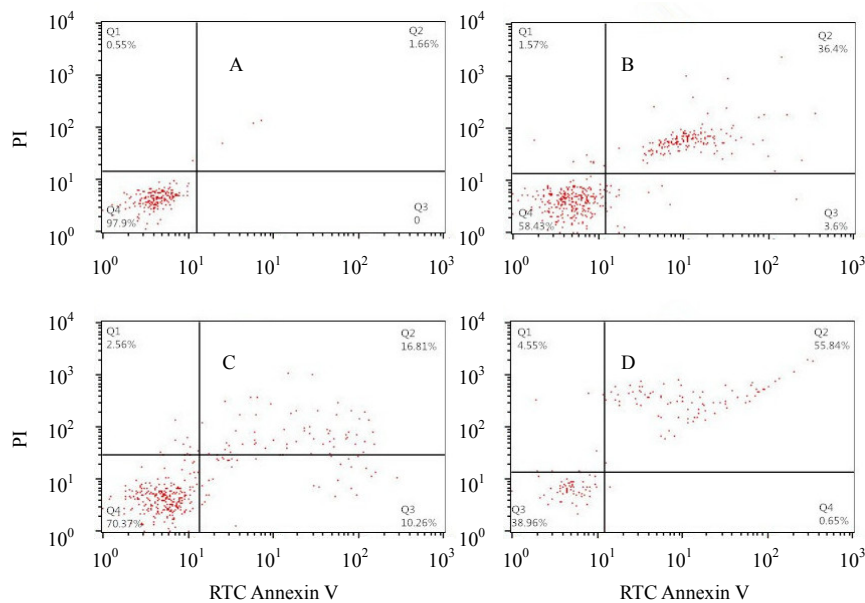
分组	剂量/(mg·mL ⁻¹)	IA	抑制率/%
对照	—	0.389	—
转染	—	0.142	0.635
消岩汤	10	0.267	0.314
	15	0.217	0.442
	25	0.209	0.463
转染+消岩汤	10	0.124	0.681
	15	0.101	0.741
	25	0.109	0.720

期凋亡细胞，左上象限是非活细胞，即坏死细胞。

从图1中可看出，与对照组凋亡率1.66%相比较，转染组、消岩汤15 mg/mL组、消岩汤15 mg/mL联合转染组细胞凋亡率分别为40.0%、27.07%、56.49%。

4 讨论

消岩汤是贾英杰教授根据多年肿瘤临床经验并结合现代医学理论概括出肿瘤发病病机：正气内虚，邪留毒聚，瘀毒并存，久病入络，并且这一病机贯穿肿瘤的发生、发展，直至死亡整个过程，而现代医学的手术、放化疗又会加深此病机发展，从而提



A-空白细胞；B-转染 sh-survivin 干扰序列；C-加入终质量浓度 15 mg/mL 的消岩汤；D-转染 sh-survivin 干扰序列后加入终质量浓度 15 mg/mL 的消岩汤

图1 流式细胞仪 Annexin V-TITC/PI 双染检测 A549 细胞凋亡

Fig. 1 Annexin V-TITC/PI double dye detection of apoptosis of A549 cells by flow cytometry instrument

出“祛瘀解毒，扶正抗癌”肿瘤中医治则。在此基础上依据中药功效及现代药理研究拟定“扶正解毒祛瘀”为大法的中药汤剂（院内制剂号为40019），其中黄芪、太子参滋阴益气，扶正抗癌；夏枯草、生牡蛎、白花蛇舌草清热解毒、软坚散结；姜黄、郁金行气散结、活血祛瘀；蜂房搜剔络脉中之瘀毒。全方祛邪而不伤正，全面调节身体内环境的平衡。本课题组进行了大量的前期研究成功地证实消岩汤具有良好的抗肺癌新生血管的作用，能够提高化疗的NSCLC患者的近期疗效，改善生活质量。

凋亡抑制蛋白（inhibitor of apoptosis protein, IAP）是继 Bcl-2 家族后发现的又一类凋亡调控蛋白

家族，是凋亡抑制蛋白基因表达的产物，因抑制细胞凋亡和参与肿瘤的发生成为近年来研究的热门靶点^[7]。Survivin 是近年新发现的 IAP 家族成员，是该家族中迄今为止发现的相对分子量最小、抗凋亡作用最强者，它选择性地表达于恶性肿瘤组织中，而在除胸腺和生殖腺外的正常成人组织中不表达，这种特点使其成为目前恶性肿瘤诊断和治疗的新靶点。

RNA 干扰技术是基因沉默的有力手段，宿主通过 RNA 干扰抑制病毒等外源核苷酸的表达，从而维护自身基因组的稳定性，通过人工导入一段与目的基因同源的双链 RNA 序列使其 mRNA 降解，表

达缺失, 实现基因敲除。目前实验室进行 RNA 干扰常用的小干扰 RNA (siRNA) 片段来源主要有两种, 一是细胞外合成, 二是细胞内合成, 包括以质粒为载体的细胞内合成和以病毒为载体的细胞内合成。经改造的质粒和病毒为载体的 siRNA 片段可较长时间在真核细胞内表达, 为肿瘤的基因治疗开辟了新的途径。以 RNA 干扰技术作用肺癌细胞, 细胞的 Survivin mRNA 表达下降, 凋亡率增高, 且细胞的增殖和恶性侵袭能力被明显抑制。

本实验以人肺腺癌 A549 细胞为载体, 开展了消岩汤对肺癌细胞凋亡作用的研究。实验结果显示, 消岩汤能有效地抑制人肺腺癌 A549 的细胞增殖, 运用消岩汤作用细胞 24 h 后, 侵袭的细胞数明显减少, 该方作用 48 h 后可以诱导肿瘤细胞凋亡; 消岩汤中剂量组与转染 sh-survivin 组抑制率相当, 不同剂量的消岩汤均可协同 sh-survivin 使肺癌细胞凋亡率增加。

在此基础上, 本课题组还将从体内实验对该方的诱导肿瘤细胞凋亡及信号转导通路方面开展进一步的实验研究, 从细胞-分子-基因等多水平阐明消岩汤抗肺癌作用机制, 为中药复方抗肿瘤提供有力的实验依据。

参考文献

- [1] Krystyna K, Christopher S, Allison Y, *et al.* Correlation between the levels of survivin and survivin promoter-driven gene expression in cancer and non-cancer cells [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2009: 141.
- [2] 张莹, 贾英杰, 杨洁, 等. 消岩汤药物血清对 A549/DDP 细胞凋亡的诱导作用 [J]. *中医研究*, 2011, 24(5): 19-22.
- [3] 贾英杰, 张蕴超, 李小江, 等. 消岩汤联合 125I 粒子及热疗治疗中晚期肺癌疗效观察 [J]. *中医杂志*, 2011, 52(9): 755-760.
- [4] 杨佩颖, 贾英杰, 陈军, 等. 消岩汤不同时段给药联合化疗对气虚毒瘀证非小细胞肺癌免疫功能影响的临床研究 [J]. *新中医*, 2011, 43(4): 64-66.
- [5] 张莹, 贾英杰, 李小江, 等. 消岩汤对耐顺铂人肺腺癌 A549/DDP 细胞多药耐药基因调控作用的研究 [J]. *药物评价研究*, 2014, 37(6): 507-510.
- [6] 李小江, 贾英杰, 于建春, 等. 消岩汤剂拆方配伍对肺腺癌 A549 细胞 survivin 和 caspase-3 表达的影响 [J]. *中草药*, 2014, 45(23): 3436-3439.
- [7] Tanaka T, Delong P A, Amin K, *et al.* Treatment of lung cancer using clinically relevant oral doses of the cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib potential value as adjuvant the rapy after surgery [J]. *Ann Surg*, 2005, 241(1): 168-178.