

金复康口服液对吉非替尼耐药人肺腺癌 PC9/R 的增敏作用和机制研究

黄晓明^{1,2}, 孙建立^{1*}, 侯爱画², 洪碧玲¹

1. 上海中医药大学附属龙华医院 肿瘤六科, 上海 200030

2. 山东省烟台市中医医院 肿瘤一科, 山东 烟台 264000

摘要: 目的 研究金复康口服液对人肺腺癌 PC9 细胞及耐药 PC9/R 细胞的吉非替尼增敏作用及机制。方法 金复康口服液 20 mg/mL 联合不同浓度的吉非替尼 (40、20、10、5、2 $\mu\text{mol/L}$) 作用于 PC9/R 细胞, CCK-8 法检测细胞增殖; 培养 PC9、PC9/R 细胞, 分为对照组、金复康口服液组、吉非替尼组、联合用药组, 流式细胞术检测 PC9、PC9/R 细胞周期和凋亡。在 BALB/c 裸鼠右前肢腋窝皮下接种 PC9/R 细胞建立裸鼠移植瘤模型, 观察金复康口服液联合吉非替尼的体内抑瘤作用; 对 AKT、p-AKT、PTEN、PDCD4 蛋白表达的影响和对 miRNA-21 表达的影响。结果 与吉非替尼 (2、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 组比较, 吉非替尼 (2、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) + 金复康口服液 (20 mg/mL) 组的 PC9/R 细胞抑制率显著增加 ($P < 0.01$); 与吉非替尼组比较, 联合用药可以通过显著增加早期凋亡细胞比例诱导 PC9 及 PC9/R 细胞凋亡, 并使 PC9、PC9/R 细胞停滞在 DNA 合成前期, 从而抑制细胞增殖, 差异均具有统计学意义。体内实验表明, 与吉非替尼组比较, 联合用药显著抑制裸鼠 PC9/R 移植瘤的生长 ($P < 0.05$), 且能显著降低裸鼠 PC9/R 组织 p-AKT 表达 ($P < 0.05$), 增强 PTEN、PDCD4 的表达 ($P < 0.05$), 联合用药组裸鼠 PC9/R 瘤组织 miRNA-21 的表达显著降低 ($P < 0.05$)。结论 金复康口服液能提高人肺腺癌 PC9/R 细胞对吉非替尼的敏感性, 其作用的可能机制为通过降低 miRNA-21 的表达从而增强 PTEN、PDCD4 的表达以抑制 AKT 通路活性。

关键词: 非小细胞肺癌; 吉非替尼; 耐药; 金复康口服液; 增敏作用; AKT 通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376 (2020) 04-0676-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.04.016

Effect and mechanism of Jinfukang Oral Liquid in increasing sensitivity of human lung adenocarcinoma PC9/R cells to gefitinib

HUANG Xiaoming^{1,2}, SUN Jianli¹, HOU Aihua², HONG Biling¹

1. No. 6 Department of Oncology, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200030, China

2. No.1 Department of Oncology, Yantai Hospital of Traditional Chinese Medicine in Shandong Province, Yantai 264000, China

Abstract: **Objective** To study investigate the mechanism of Jinfukang Oral Liquid in increasing the sensitivity of human lung adenocarcinoma PC9/R cells to gefitinib. **Methods** The proliferation of PC9/R cells was detected by CCK-8 method, after Jinfukang Oral Liquid 20 mg/mL combined with different concentrations of gefitinib (40, 20, 10, 5, 2 $\mu\text{mol/L}$) treating on PC9/R cells. Flow cytometry was used to detect the effects of each group on cell cycle and apoptosis of PC9 and PC9/R cells. PC9/R nude mice model was established by subcutaneous inoculation of PC9/R cells into the axilla of right forelimb of BALB/c nude mice. To observe the effect of Jinfukang oral liquid on the anti-tumor activity of gefitinib, the expression of AKT, p-AKT, PTEN and PDCD4 and the expression of microRNA-21 in nude mice xenografted with PC9/R cells. **Results** Compared with gefitinib (2, 5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$) group, the inhibition rate of PC9/R cells in gefitinib (2, 5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$) + Jinfukang Oral Liquid (20 mg/mL) group increased significantly ($P < 0.01$). The combination of Jinfukang oral liquid and gefitinib could induce PC9 and PC9/R cell apoptosis by increasing the proportion of early apoptotic cells and arrest PC9 and PC9/R cells in the early stage of DNA synthesis, thus inhibiting cell proliferation. *In vivo*, the combination of PC9/R could inhibit the growth of PC9/R xenografts in nude mice more effectively and significantly by reducing the expression of p-AKT in PC9/R tissues of nude mice ($P < 0.05$), enhancing the expression of PTEN and PDCD4 ($P < 0.05$). Notably, PC9/R inhibited

收稿日期: 2019-08-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81573890); 国家中医药管理局中医临床研究基地业务建设科研专项课题(JDZX2015069); 刘嘉湘国医大师传承工作室建设项目(DSGZS-2017002); 龙华医院科技创新项目(KY2017.KY1739); 上海中医药大学附属龙华医院中青年名中医培养项目

第一作者: 黄晓明(1988—), 男, 汉族, 山东烟台人, 医师, 硕士学位, 主要从事中医药防治恶性肿瘤的临床和实验研究。

***通信作者:** 孙建立(1966—), 男, 博士, 主任医师, 研究方向为中西医结合治疗肿瘤的基础与临床。 E-mail: 1721679167@qq.com

the expression of microRNA-21 in the tumor tissues of nude mice ($P < 0.05$). **Conclusion** Jinfukang Oral Liquid can enhance the sensitivity of human lung adenocarcinoma PC9/R cells to gefitinib, and its possible mechanism is to enhance the expression of PTEN and PDCD4 by reducing the expression of microRNA-21, thus inhibiting the activity of AKT pathway.

Key words: NSCLC; gefitinib; drug resistance; Jinfukang Oral Liquid; sensibilization; AKT pathway

吉非替尼是一种靶向基因内皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的口服活性酪氨酸激酶抑制剂(Tyrosine Kinase Inhibitor, TKI),2003年问世,2005年获国家食品药品监督管理局批准正式在中国上市,对于EGFR基因突变的肺癌治疗有效率高达78%^[1],成为晚期肺癌的主要治疗方法。与传统化疗相比,吉非替尼疗效明显提高,并具有耐受性良好、毒副作用小及生活质量高等优点。但是多项大型国际多中心临床研究表明,二线 and 一线EGFR-TKI治疗非小细胞肺癌的中位无疾病进展生存期仅有10个月左右,耐药问题成为制约吉非替尼靶向治疗肺癌进一步提高疗效的关键,如何延缓靶向治疗耐药的产生、提高治疗效果成为肺癌靶向治疗研究的热点和难点。

中医治疗肺癌的优势在于具有多层次、多靶点综合调节的作用特点,而EGFR-TKI治疗肺癌的特点是针对性强,对局部病灶的控制具有较好疗效,但因作用靶点单一,容易产生耐药而最终导致治疗的失败。因此,研究中药结合靶向治疗,提高耐药株的敏感性,延缓耐药的产生,将中医治癌与靶向治疗的优势互补,弥补中医药在病灶控制方面的不足,符合WHO将肿瘤作为慢性病治疗的概念,是肿瘤治疗模式和理念的革新。

中医治疗疾病的特点是辨证论治,课题组在中医结合EGFR-TKI治疗肺癌的临床中,发现中医辨证结合靶向治疗有一定的增效作用^[2],通过对EGFR-TKI治疗后中医证候变化规律的研究,发现气阴两虚证依然是肺癌患者EGFR-TKI治疗后的主要证型之一^[3]。金复康口服液是治疗肺癌气阴两虚型的代表药物,因此我们开展对金复康口服液延缓吉非替尼耐药进行临床观察和实验研究。本课题在前期研究的基础上,采用体内外相结合的方法,选择吉非替尼敏感细胞株PC9和耐药细胞株PC9/R细胞株,深入研究金复康口服液延缓吉非替尼耐药的作用和可能机制,为金复康口服液在延缓吉非替尼耐药中的应用提供科学的实验依据。

1 材料

1.1 细胞

人非小细胞肺癌吉非替尼敏感细胞株PC9、吉

非替尼耐药细胞株PC9/R,均由同济大学附属肺科医院肿瘤研究所周彩存教授惠赠。

1.2 动物

SPF级BALB/c裸鼠,24只,雌性,5~6周龄,体重18~23 g,由上海中医药大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号SYXK(沪)2010-0095,饲养于上海中医药大学实验动物中心SPF级动物房,恒温20~26℃,恒湿50%~56%。实验经大学动物实验伦理委员会批准。

1.3 药物及主要试剂

金复康口服液,生产批号180301,由吉林三九金复康药业有限公司提供。吉非替尼,由英国AstraZeneca公司生产,上海阿斯利康公司提供,生产批号MK631;AnnexinV凋亡检测试剂盒,购于BD公司;P-Akt(4060)、Akt抗体(4691)及GAPDH(5174)抗体,购于CST公司;PTEN(ab32199)、PDCD4(ab51495)抗体,购于Abcam公司;CCK-8试剂盒、羊抗兔HRP标记二抗及羊抗鼠HRP标记二抗,购于碧云天生物有限公司。

2 方法

2.1 中药浓缩液制备方法

金复康口服液,每毫升相当于2.1 g生药,量取100 mL,加热浓缩后真空干燥,得浸膏粉41.4 g,相当于生药210 g,则每克干膏粉相当于5.072 g生药,干燥保存,用时用DMSO溶解,制成母液,0.22 μm过滤器除菌,培养液稀释使用。

2.2 细胞增殖抑制检测

选择处于对数生长期的PC9和PC9/R细胞,细胞密度为 1×10^5 /mL,每孔100 μL接种于96孔板,以不同浓度的吉非替尼作用于PC9、PC9/R细胞进行预实验,48 h后CCK-8法检测细胞增殖情况,经计算,吉非替尼作用于PC9细胞的 IC_{50} 值为 $(0.27 \pm 0.56) \mu\text{mol/L}$,作用PC9/R细胞的 IC_{50} 值为 $(15.8 \pm 1.11) \mu\text{mol/L}$ 。经预实验,选择金复康口服液20 mg/mL联合不同浓度的吉非替尼(40、20、10、5、2 μmol/L)作用于PC9/R细胞进行正式实验,观察金复康口服液对吉非替尼的增敏作用。实验设置对照组、吉非替尼(40、20、10、5、2 μmol/L)组、吉非替尼(40、20、10、5、2 μmol/L)+金复康口服液(20 mg/mL)组,每

个浓度设置3个平行孔。采用CCK-8法,用酶标仪测定在450 nm处的吸光度(A)值,计算抑制率。

抑制率=(对照组 A 值-实验组 A 值)/对照组 A 值

2.3 细胞凋亡和周期的检测

选择处于对数生长期的PC9和PC9/R细胞,细胞密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$,每孔2 mL接种于6孔板中。吉非替尼 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 和金复康口服液 20 mg/mL 分别作用于PC9细胞;吉非替尼 $8 \mu\text{mol/L}$ 和金复康 20 mg/mL 分别作用于PC9/R细胞。药物处理72 h,对细胞进行胰蛋白酶消化,用70%乙醇固定4 h,孵育30 min后用碘化丙啶($400 \mu\text{L}$)染色。使用Annexin V凋亡细胞检测试剂盒检测细胞凋亡。用流式细胞仪进行细胞DNA含量的测定,确定细胞在各细胞周期所占比例。每个实验重复3次。

2.4 动物模型的建立、分组及给药

将PC9/R细胞制成 $5 \times 10^7/\text{mL}$ 细胞悬液,将细胞悬液注入裸鼠右侧腋窝处,每只裸鼠皮下接种1点,每点0.2 mL。当裸鼠移植瘤直径达到2 mm左右,挑选24只裸鼠进行后续实验。

参考《药理实验方法学》,并结合预实验有效剂量确定裸鼠ig剂量。24只裸鼠随机分成4组,每组

6只,分别为模型组、吉非替尼(45 mg/kg)组、金复康口服液(生药 52.5 g/kg)组、联合用药(45 mg/kg 吉非替尼+生药 52.5 g/kg 金复康口服液)组,每天给药1次,连续给药14 d。给药结束后将所有裸鼠处死(脱颈椎法),摘取裸鼠移植瘤,测量肿瘤最长径(a)和最短径(b),根据公式计算瘤体积。

肿瘤体积= $a \times b^2/2$

2.5 Western blotting检测AKT、p-AKT及PTEN、PDCD4的表达

取适量的组织迅速研磨成粉末,将研磨好的粉末转移到含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的裂解液的离心管中, 4°C 的条件下 $12\,000 \text{ r/min}$ 离心15 min,取上清液,进行蛋白质定量,根据目的蛋白的分子量选择不同的浓度凝胶电泳,电泳结束后转膜,孵育相应抗体,显影。以GAPDH作为内参,以p-AKT、PTEN、PDCD4与GAPDH条带灰度值比值作为其蛋白表达水平。

2.6 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测miRNA-21的表达

称取各组肿瘤组织100 mg,提取总mRNA,反转录合成cDNA,将制备好的cDNA进行PCR扩增。引物序列见表1。

表1 引物

Table 1 primers

基因	引物序列
hsa-mir-21	F:5'ACACTCCAGCTGGGCAACACCAGTCGATG3' R:5'CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGACAGCC3'
反向TRP	5'TGGTGTCGTGGAGTCG3'
U6	F:5'CTCGCTTCGCGCAGCAC3' R:5'AACGCTTCACGAATTTGCG3'

2.7 统计方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计分析用SPSS 19.0软件进行。对各组实验数据先进行正态性检验,再进行方差齐性分析,若符合正态分布且具有方差齐性,则选用多重组间两两比较 t 检验来进行数据的统计分析。若不符合正态分布,则进行非参数多重秩和检来进行数据的统计分析。

3 结果

3.1 各组细胞的增殖抑制比较

与吉非替尼(2.5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)组比较,吉非替尼(2.5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)+金复康口服液(20 mg/mL)组的细胞抑制率显著增加($P < 0.01$)。结果见表2。

3.2 各组细胞的周期和凋亡比较

3.2.1 对PC9细胞凋亡的影响 与吉非替尼组比较,联合用药组正常细胞比例减少,早期凋亡细胞

表2 金复康口服液联合不同浓度吉非替尼对PC9/R细胞的生长抑制率($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Growth inhibition rate of Jinfukang combined with gefitinib in different concentrations on PC9/R cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	吉非替尼剂量/ $(\mu\text{mol/L})$	抑制率/%
吉非替尼	2	3.03 $\pm$ 0.40
	5	9.30 $\pm$ 0.60
	10	41.0 $\pm$ 0.87
	20	56.8 $\pm$ 0.50
	40	85.3 $\pm$ 1.02
吉非替尼+金复康口服液(20 mg/mL)	2	35.2 $\pm$ 0.79**
	5	43.8 $\pm$ 0.52**
	10	79.3 $\pm$ 0.83**
	20	82.4 $\pm$ 0.61**
	40	88.5 $\pm$ 1.00

与同浓度吉非替尼组比较:** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs gefitinib group of same concentration

比例增大,有显著性差异($P<0.05$),晚期凋亡和死亡的细胞则无差异。结果显示,联合用药可以通过增加早期凋亡细胞比例诱导PC9细胞凋亡。结果见图1、表3。

3.2.2 对PC9/R细胞凋亡的影响 与吉非替尼组比较,联合用药组正常细胞比例减少,早期凋亡细胞比例增大,有显著性差异($P<0.05$),晚期凋亡和死亡的细胞比例则无差异。结果显示,联合用药可以通过增加早期凋亡细胞比例诱导PC9/R细胞凋亡。结果见图2、表4。

3.2.3 对PC9细胞周期的影响 如图3、表5所示,与吉非替尼组比较,联合用药组S期细胞比例减少,G1期细胞比例增多,有显著性差异($P<0.05$),G2期细胞比例则无差异。结果显示,联合用药可以使PC9细胞停滞在DNA合成前期,从而抑制细胞增殖。

3.2.4 对PC9/R细胞周期的影响 如图4、表6所示,与吉非替尼组比较,联合用药组S期细胞比例减少,G1期细胞比例增多,有显著性差异($P<0.05$),G2期细胞比例则无显著差异。结果显示,联合用药

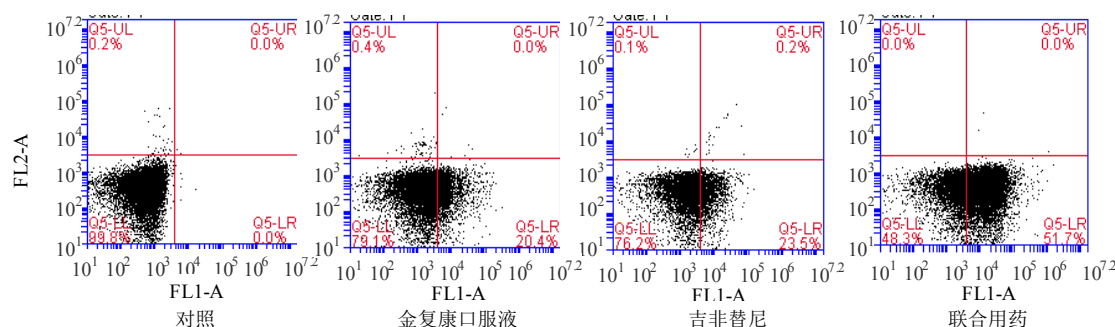


图1 金复康口服液结合吉非替尼对PC9细胞凋亡的影响

Fig. 1 Effect of Jinfukang Oral Liquid combined with gefitinib on apoptosis of pC9 cells

表3 金复康口服液结合吉非替尼对PC9细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Jinfukang Oral Liquid combined with gefitinib on apoptosis of PC9 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量	正常细胞/%	早期凋亡/%	晚期凋亡/%	坏死/%
对照	—	100	0	0	0
金复康口服液	20.0 mg·mL ⁻¹	79.6±0.9	20.0±0.8	0	0.3±0.1
吉非替尼	0.1 μmol·L ⁻¹	76.8±0.7	22.9±0.7	0.1±0.1	0.1±0.1
联合用药	20.0 mg·mL ⁻¹ +0.1 μmol·L ⁻¹	49.7±1.2*	50.3±1.2*	0	0

与吉非替尼组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs gefitinib group

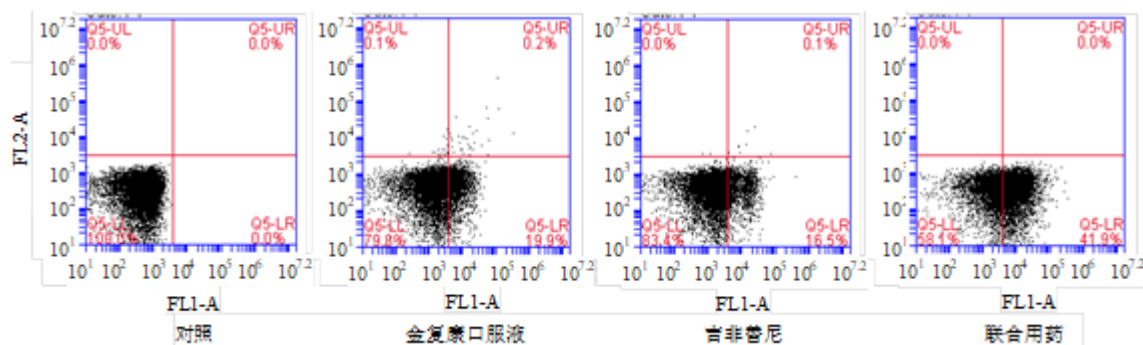


图2 金复康口服液结合吉非替尼对PC9/R细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effect of Jinfukang Oral Liquid combined with gefitinib on apoptosis of PC9/R cells

表4 金复康及其结合吉非替尼对PC9/R细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of Jinfukang Oral Liquid and its combination with gefitinib on apoptosis of PC9/R cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量	正常细胞/%	早期凋亡/%	晚期凋亡/%	坏死/%
对照	—	100	0	0	0
金复康口服液	20 mg·mL ⁻¹	79.7±0.2	19.7±0.3	0.3±0.1	0.3±0.3
吉非替尼	8 μmol·L ⁻¹	83.6±0.3	16.3±0.4	0.1±0.0	0.1±0.1
联合用药	20 mg·mL ⁻¹ +8 μmol·L ⁻¹	58.7±0.7*	41.3±0.7*	0	0

与吉非替尼组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs gefitinib group

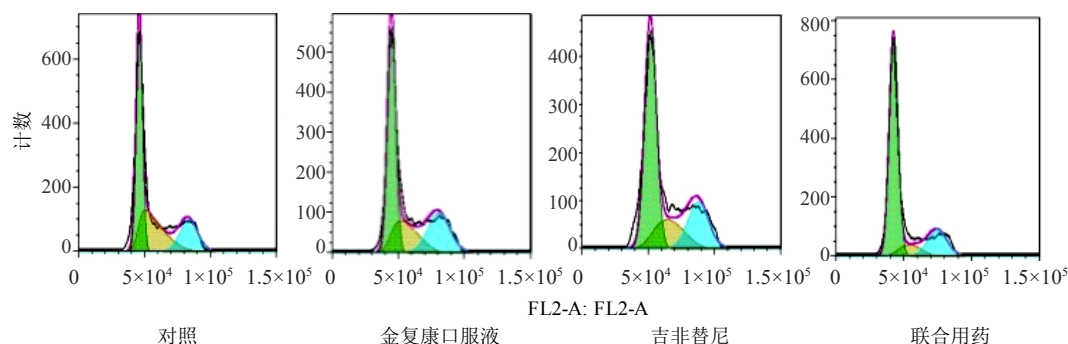


图3 金复康及其结合吉非替尼对PC9细胞周期的影响

Fig. 3 Effect of Jinfukang and its combination with gefitinib on cell cycle of PC9

表5 金复康口服液及其结合吉非替尼对PC9细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 5 Effects of Jinfukang Oral Liquid and its combination with gefitinib on cell cycle of PC9 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量	G1期/%	S期/%	G2期/%
对照	—	45.6±0.8	26.3±3.9	22.7±2.3
金复康口服液	20.0 mg·mL ⁻¹	50.1±0.2	23.7±3.4	23.2±2.2
吉非替尼	0.1 μmol·L ⁻¹	54.8±0.1	16.8±5.7	23.7±4.7
联合用药	20.0 mg·mL ⁻¹ + 0.1 μmol·L ⁻¹	70.2±0.5*	11.8±2.9*	18.3±0.8

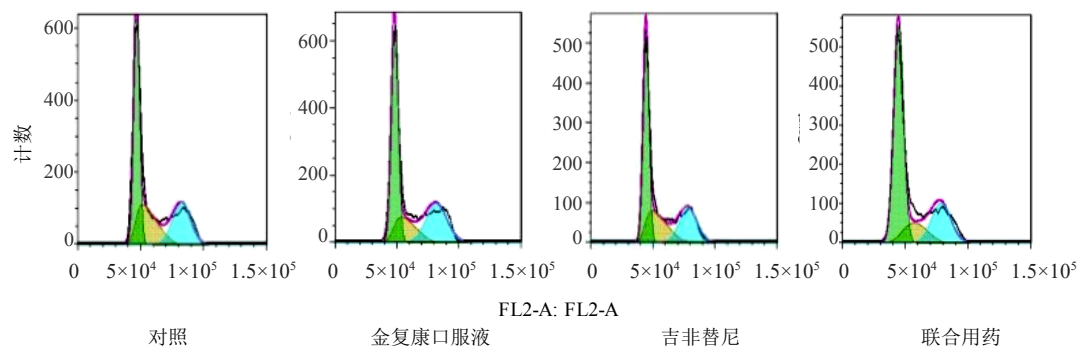
与吉非替尼组比较: * $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs gefitinib group

图4 金复康口服液及其结合吉非替尼对PC9/R细胞周期的影响

Fig. 4 Effect of Jinfukang Oral Liquid and its combination with gefitinib on PC9/R cell cycle

表6 金复康及其结合吉非替尼对PC9/R细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 6 Effects of Jinfukang and its combination with gefitinib on PC9/R cell cycle ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量	G1期/%	S期/%	G2期/%
对照	—	44.8±0.4	29.7±2.7	23±2.6
金复康口服液	20 mg·mL ⁻¹	50.7±0.2	20.9±2.6	27.6±2.1
吉非替尼	8 μmol·L ⁻¹	49.2±1.4	23.8±3.3	27.3±1.8
联合用药	20 mg·mL ⁻¹ + 8 μmol·L ⁻¹	60.3±1.2*	14.3±1.4*	24.6±1.6

与吉非替尼组比较: * $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs gefitinib group

可以使PC9/R细胞停滞在DNA合成前期,从而抑制细胞增殖。

3.3 对裸鼠PC9/R移植瘤的作用

与模型组比较,联合用药组肿瘤体积显著减小($P < 0.05$),肿瘤抑制率为31.9%。结果表明,联合用药能更有效的抑制PC9/R细胞抑制瘤的生长。见表7。

3.4 对裸鼠PC9/R移植瘤AKT、p-AKT、PTEN、PDCD4表达的影响

各组总AKT表达无明显差异;联合用药组与模型组比较,p-AKT表达水平明显降低,有显著性差异($P < 0.05$),PTEN、PDCD4的表达显著增加($P < 0.05$)。见表8、图5。

表7 不同组对裸鼠PC9/R移植瘤移植瘤($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 7 Transplanted tumor of PC9/R in nude mice in different groups ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	瘤体体积/mm ³	瘤体抑制率/%
模型	—	677.69±64.7	—
金复康口服液	52.5	648.66±77.1	4.28
吉非替尼	0.045	663.11±99.4	2.15
联合用药	52.5+0.045	461.33±59.8*	31.93

与模型组比较: * $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs model group

表8 不同处理组 AKT、p-AKT、PTEN、PDCD4 表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 8 Expression of Akt, p-Akt, PTEN and PDCD4 in different treatment groups ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	总 AKT/ β -actin	P-AKT/ β -actin	PTEN/ β -actin	PDCD4/ β -actin
模型	—	0.72±0.23	1.01±0.25	0.70±0.16	0.75±0.21
吉非替尼	0.045	0.69±0.15	1.09±0.16	0.46±0.12	0.76±0.23
金复康口服液	52.5	0.51±0.27	0.84±0.15	0.64±0.15	0.69±0.22
联合用药	52.5+0.045	0.78±0.28	0.60±0.07*	1.31±0.19*	1.35±0.30*

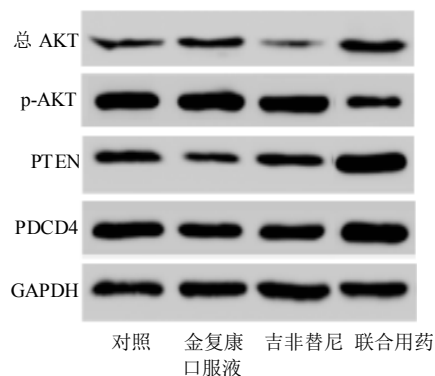
与模型组比较: * $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs model group

图5 不同处理组 AKT、p-AKT、PTEN、PDCD4 表达

Fig. 5 Expression of Akt, p-Akt, PTEN and PDCD4 in different treatment groups

3.5 对裸鼠 PC9/R 移植瘤 miRNA-21 表达的影响

联合用药与模型组比较, miRNA-21 的表达显著降低($P < 0.05$)。结果见表 9。

表9 miRNA-21 表达 ($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 9 miRNA-21 expression ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	miRNA-21/U6
模型	—	1±0.00
金复康口服液	52.5	1.06±0.28
吉非替尼	0.045	0.89±0.41
联合用药	52.5+0.045	0.52±0.12*

与模型组比较: * $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs model group

4 讨论

金复康口服液是国医大师刘嘉湘结合多年中医辨证治疗肺癌的临床实践研制的中药新药, 精选黄芪、北沙参、麦冬、女贞子(酒制)、山茱萸、绞股蓝、淫羊藿、葫芦巴(盐水炒)、石上柏、石见穿、重楼、天冬等, 具有益气养阴, 清热解毒之功。上市 20 余年来取得较好的疗效^[4], 多中心、随机对照前瞻性研究治疗非小细胞肺癌结果表明, 金复康口服液治疗后部分缓解(PR)11%, 部分缓解+稳定率(PR+NC)为 83%; 化疗组为 PR23.33%, PR+NC 为 78.88%; 化

疗加金复康口服液组 PR 达 42%, PR+NC 达 95%, 明显高于单纯化疗组 and 中药组。实验研究显示^[5-6], 金复康口服液对人肺腺癌 LAX-83 裸小鼠模型有明显的增殖抑制作用, 抑瘤率为 45.59%, 能够诱导裸鼠人肺腺癌 LAX-83 移植瘤细胞凋亡, 其机理与降低 Bcl-2 基因蛋白表达, 增加 Bax 和 Fas 基因蛋白表达相关。体外实验显示^[7-8], 金复康口服液能够逆转人肺腺癌吉非替尼获得性耐药细胞株 PC9R 对吉非替尼的凋亡抵抗。本课题在国家自然科学基金的资助下进一步采用体内外结合的方法, 深入探讨金复康口服液对人肺腺癌 PC9 细胞及 PC9/R 细胞的吉非替尼增敏作用及机制。研究发现, 金复康口服液联合不同浓度的吉非替尼体外作用 PC9/R 细胞后, 比吉非替尼单药更能有效的抑制 PC9/R 细胞增殖; 与吉非替尼单药比较, 联合用药组正常细胞比例减少, 早期凋亡细胞比例增大, 联合用药可以通过增加早期凋亡细胞比例诱导 PC9/R 细胞凋亡, 联合用药组 S 期细胞比例减少, G1 期细胞比例增多, 联合用药可以使 PC9/R 细胞停滞在 DNA 合成前期, 从而抑制细胞增殖。裸鼠人肺癌 PC9/R 细胞皮下移植瘤模型体内抑瘤实验, 金复康口服液联合吉非替尼抑瘤率为 31.9%。说明金复康口服液联合吉非替尼体内外对人肺腺癌耐药细胞都有一定的抑制作用。

近年来, 随着对 EGFR-TKI 的耐药机制的研究深入, miRNA 在靶向治疗耐药中的作用成为研究热点^[9]。同济大学附属肺科医院周彩存教授的团队在国内率先建立吉非替尼获得性耐药的肺腺癌细胞株 PC9/R^[10], 进一步比较了耐药细胞株和原代细胞株中 miRNA 的表达差异^[11], 发现其中 36 个 miRNA (包括 miR-21、miR-214、miR-99a、miR-210 和 miR-7 等) 表达上调。并研究了 miRNA-21 在非小细胞肺癌 PC9/R 细胞株吉非替尼耐药的可能机制^[12]。文献报道, miR-21 的靶基因为 PTEN 和 PDCD4, PTEN 和 PDCD4 可调节 PI3K/Akt 通路, 与多种肿瘤的转移有关, PTEN 基因是一个具有双特

异磷酸酶活性的抑癌基因^[13],是PI3K/Akt信号级联通路的主要负调节蛋白,PTEN功能的缺失导致Akt通路的过度活化,而PI3K/Akt通路的持续活化在对EGFR抑制剂耐药的过程中起着重要的作用。PDCD4基因是一个肿瘤抑制基因,PDCD4在多种肿瘤中都会出现表达抑制,从而导致肿瘤细胞无法凋亡。近年来有多篇文献报道mi-R21与PDCD4表达的关系,PDCD4是miR-21的直接靶点^[14],过表达的miR-21不仅下调PDCD4,也可以调节和影响细胞凋亡的其他蛋白质的表达^[15]。

本研究采用Western blotting检测金复康口服液及其结合吉非替尼对PC9/R裸鼠体内移植瘤总AKT、p-Akt表达的影响,结果显示,联合用药组与模型组比较,p-AKT活化水平较低,显示金复康口服液对PC9/R细胞吉非替尼增敏的作用机制与抑制AKT通路激活有关。随后,通过Western blotting检测金复康口服液及其结合吉非替尼对PC9/R裸鼠体内移植瘤PI3K/Akt信号通路调控基因PTEN、PDCD4表达的影响,表明金复康口服液能增强PC9/R细胞抑癌基因PTEN、PDCD4的表达。通过RT-qPCR检测金复康口服液及其结合吉非替尼对PC9/R裸鼠体内移植瘤miRNA-21表达,研究结果显示金复康口服液可以有效地降低miRNA-21表达。

金复康口服液能通过上调PC9/R细胞裸鼠皮下移植瘤PTEN、PDCD4蛋白的表达,抑制PI3K/AKT通路活化的信号,并降低miRNA-21的表达从而对非小细胞肺癌吉非替尼耐药PC9/R细胞起到增敏作用。中药作用复方成分复杂,作用靶点多,作用机制复杂,这只是作用机制之一,有待进一步分析中药有效的组分,或中药作用的其他靶点,进一步阐释中药逆转靶向耐药的机制。

参考文献

- [1] Maemondo M, Akira I, Kunihiro K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR [J]. N Engl J Med, 2010, 362(25): 2380-2388.
- [2] 许海柱,孙建立. EGFR-TKIs结合中医药治疗晚期非小细胞肺癌的多因素分析 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(9): 2156-2158.
- [3] 许海柱,孙建立,张璇. EGFR-TKI治疗后非小细胞肺癌中医证候研究 [J]. 中西医结合杂志, 2017, 37(9): 1054-1058.
- [4] 刘嘉湘,潘敏求,黎月恒,等. 金复康口服液治疗原发性非小细胞肺癌临床研究 [J]. 肿瘤, 2001, 21(6): 463-465.
- [5] 许玲,刘嘉湘. 益肺抗癌饮(金复康口服液)抑制肺癌细胞增殖的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 1996, 16(8): 486-488.
- [6] 孙建立,刘嘉湘. 金复康口服液对裸鼠人肺腺癌移植瘤细胞凋亡相关基因表达的影响 [J]. 上海中医药杂志, 2007, 41(10): 69-71.
- [7] 孙玺媛,姜梅,张伟,等. 金复康口服液对非小细胞人肺腺癌吉非替尼获得性耐药的影响 [J]. 中药材, 2014, 37(7): 1254-1258.
- [8] 孙玺媛,姜梅,张忠太,等. 金复康口服液对人肺腺癌耐吉非替尼PC-9R细胞凋亡的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(10): 2229-2232.
- [9] 张婷,许海柱,孙建立. 吉非替尼在非小细胞肺癌治疗中耐药机制的进展 [J]. 中国肿瘤临床与康复, 2013, 20(2): 137-139.
- [10] 鞠立霞,周彩存,唐亮,等. 吉非替尼获得性耐药的非小细胞肺癌细胞株PC9/AB2相关耐药机制研究 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2010, 33(5): 354-358.
- [11] 王永生,张颀,陈墨,等. 人肺腺癌吉非替尼耐药细胞株中微小RNA的表达谱 [J]. 肿瘤, 2012, 32(1): 16-20.
- [12] Li B, Ren S, Li X, et al. MiR-21 overexpression is associated with acquired resistance of EGFR-TKI in non-small cell lung cancer [J]. Lung Cancer, 2014, 83(2): 146-153.
- [13] Kokubo Y, Cemama A, Norori R, et al. Reduction of PTEN protein and loss of epidermal growth factor receptor gene mutation in lung cancer with natural resistance to Gefitinib (IRESSA) [J]. Br J Cancer, 2005, 92(9): 1711-1719.
- [14] Yang Y, Meng H, Peng Q, et al. Down regulation of microRNA-21 expression restrains non small cell lung cancer cell proliferation and migration through upregulation of programmed cell death 4 [J]. Cancer Gene Ther, 2015, 22(1): 23-29.
- [15] Sourvinou A, Markou L, Kaklamanis, et al. MicroRNA-21 expression levels are accompanied by respective alterations in PDCD4 protein levels in non-small cell lung cancer [J]. Eur J Cancer, 2010, 46(7): 198.