

消岩汤对肺腺癌 A549 实体荷瘤小鼠肿瘤细胞凋亡干预机制的研究

张 欣^{1,2}, 贾英杰^{2*}, 杨佩颖²

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 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 Survivin siRNA 对肺腺癌 A549 实体荷瘤小鼠肿瘤细胞凋亡的影响。方法 以人肺腺癌 A549 实体移植瘤裸鼠模型为研究对象, 将消岩汤含药血清及 siRNA 转染后的 A549 细胞分别进行瘤内注射, 通过流式细胞术观察小鼠体内细胞凋亡情况; 免疫细胞化学法检测 Survivin 蛋白表达。结果 siRNA 转染组对 Survivin 蛋白表达的抑制率明显高于消岩汤组, 但显著低于消岩汤+siRNA 转染组。siRNA 转染组和消岩汤组均可诱导细胞凋亡, 且 siRNA 转染组的诱导作用强于消岩汤组, 消岩汤+siRNA 转染组可协同增强诱导细胞凋亡作用。结论 消岩汤联合 Survivin siRNA 可协同增强诱导细胞凋亡作用。

关键词: 消岩汤; Survivin siRNA; A549; 肺腺癌; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)11-2261-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.11.018

Research on intervention mechanism of Xiaoyan Decoction on apoptosis of lung adenocarcinoma A549 cells in tumor-burdened mice

ZHANG Xin^{1,2}, JIA Ying-jie², YANG Pei-ying²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicines, Tianjin 300193, China

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

Abstract: **Objective** To analyze the elimination of Xiaoyan Decoction intervened survivin siRNA in lung adenocarcinoma A549 cells tumor-burdened mice tumor cell apoptosis. **Methods** Human lung adenocarcinoma A549 entity nude mouse transplantation tumor model was studied as the research object. Xiaoyan Decoction medicated serum and siRNA cells after transfection group was injected within the tumor respectively by flow cytometry to observe apoptosis and cell cycle distribution in mice; Survivin protein expression was detected by immunocytochemistry method. **Results** Transfection group's inhibition of the expression of survivin protein was obviously higher than that of Xiaoyan Decoction group, but significantly lower than Xiaoyan Decoction and siRNA group. Transfection group and Xiaoyan Decoction both could induce cell apoptosis, and induction effect of transfection group was stronger than Xiaoyan Decoction group, Xiaoyan Decoction combined with transfection group could enhance the induction of cell apoptosis. **Conclusion** Xiaoyan Decoction combined with Survivin apoptosis induced by siRNA can synergy to enhance its role.

Key words: Xiaoyan Decoction; Survivin siRNA; A549; adenocarcinoma of lung; 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 1 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, 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]。Survivin 是新近发现的凋亡抑制蛋白, 它选择性地表达于恶性肿瘤组织中。RNA 干扰 (siRNA) 是一种新的基因阻断技术, 有类似于基因敲除的效果。靶向 Survivin 的 RNA 干扰可以阻断 Survivin 基因表达, 显著抑制肿瘤细胞的生长。目前普遍认为中医药在

收稿日期: 2016-10-18

基金项目: 天津市科技计划项目——天津市中医内科临床医学研究中心 (15ZXLCYSY00020); 国家自然科学基金资助项目 (81273937)

作者简介: 张 欣 (1981—), 女, 在职博士生, 副主任医师, 主要从事中医及中西医结合肿瘤临床及基础工作研究。

*通信作者 贾英杰 jiayingjie1616@sina.com

预防肿瘤、增强患者的免疫功能、对放化疗的解毒增效、抗复发转移及延长患者的生存期、改善生活质量等方面均有其独特优势。多年来,大量临床研究表明^[2-4],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。本实验以人肺腺癌 A549 实体移植瘤裸鼠模型为研究对象,将消岩汤含药血清及 siRNA (small interfering RNA) 转染后的 A549 细胞分别进行瘤内注射,通过流式细胞术观察小鼠体内肿瘤细胞凋亡情况;免疫细胞化学法检测肿瘤组织中 Survivin 蛋白表达量,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

1.1 实验动物

BalB/C 裸鼠 40 只, SPF 级, 雄性, 体质量 (19.6 ± 2.3) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 生产许可证 SCXK (京) 2012-0001, 经中国医学科学院放射医学研究所配制的动物标准颗粒饲料适应性饲养 1 周后进行实验。

1.2 瘤株

天津医科大学附属肿瘤医院中心实验室提供人肺癌 A549 细胞系, 传代培养于 Hyclone 公司的 RPMI 1640 培养液中, 37 °C、5% CO₂ 条件下, 饱和湿度, 贴壁生长。

1.3 药物与试剂

消岩汤组方药材为黄芪 30 g、太子参 15 g、郁金 10 g、姜黄 10 g、夏枯草 15 g、白花蛇舌草 15 g、生牡蛎 30 g、蜂房 15 g, 消岩汤各组方药材均由天津中医药大学第一附属医院药房提供。消岩汤水煎液自制, 生药共计 140 g 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, 浓缩至 300 mL, 生药量为 0.42 g/mL。氯化钠注射液 (生理盐水), 250 mL, 中国大冢制药有限公司; 二甲基亚砜 (DMSO, 分析纯)、RPMI 1640 培养基 (批号 1285082)、免疫组化试剂盒、Survivin 抗体, 均由天津科瑞杰生物技术开发有限公司提供。Lipofectamine 2000 转染试剂购自 Promega 公司, siRNA 片段由上海生工生物工程股份有限公司合成提供。

1.4 仪器

LD4-2 台式离心机, 北京医用离心机厂; EA2004 电子天平, 上海天平仪器厂; 超净工作台,

苏州净化设备公司; 倒置显微镜, 日本 Nikon; 恒温水浴箱, 北京医疗设备厂; 722 紫外可见分光光度计, 上海分析仪器厂; C-2021CO₂ 孵育箱, TyTe 公司; yxQG02 内热蒸汽消毒器, 山东新华医疗器械厂; M200 酶标仪, TECAN 公司 (芬兰); 96 孔板, Greinerbio-one 公司; 流式细胞仪, 美国 BECKMAN-COULTER (贝克曼-库尔特) 公司。

2 方法

2.1 消岩汤含药血清的制备

健康 BalB/C 小鼠, 分为 2 组, 每组 20 只, 分为对照组和消岩汤组, 消岩汤的剂量均以生药量计, 根据前期进行的急性毒性实验结果, 消岩汤的最大给药剂量为 304 g/kg, 相当于成人临床推荐日用量的 130 倍, 未出现明显毒副作用。前期研究表明, 消岩汤按 40 g/kg (为临床成人日用量的 20 倍) ig 给药对顺铂诱导的 A549/DDP 耐药细胞的凋亡具有显著的增强作用^[2]。故本研究以消岩汤按 40 g/kg (为临床成人日用量的 20 倍) ig 给药; 对照组 ig 0.4 mL 生理盐水。每次给药间隔 24 h, 连续 14 d。末次给药后禁食、禁水 12 h, 眼眶取血法采血, 无菌分离血清, 经 56 °C, 30 min 灭活处理后, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过除菌, 置 -20 °C 保存空白血清和消岩汤含药血清。

2.2 siRNA 转染 A549 细胞的制备

在 Invitrogen 公司的网上设计系统 (<http://www.invitrogen.com>) 中设计的靶向 Survivin 基因的 siRNA 序列: 正向引物 CTGAGAACGAGCCAG-ACTT, 反向引物 AAGTCTGGCTCGTTCTCAG。按照说明书稀释退火形成双链 dsRNA, 所涉及序列经 BLAST 查询, 排除其他基因同源性。将对数生长期的 A549 细胞接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁生长至 80% 融合时, 磷酸盐缓冲溶液清洗 1 次, 更换无血清培养基, 按照 Lipofectamine 2000 转染试剂说明书进行转染 48 h^[5]。

2.3 实验动物分组

通过 SAS 软件得出随机数字, 按 1:1:1:1, 将小鼠分为模型组、消岩汤组、siRNA 转染组、消岩汤+siRNA 转染组, 共 4 组, 每组 10 只裸鼠, 饲养在 SPF 级屏障系统内设 IVC 环境内, 5 只动物同一塑料盒中, 给予 SPF 级动物专用料块, 自由饮用蒸馏水。饲养室温度 (20±5) °C、日温差≤3 °C, 相对湿度 40%~60%、光照 12 h 明暗交替, 空气洁净度为 100 级, 氨质量浓度≤14 mg/m³, 噪声≤60 分

贝,工作照度为150~300 lx,动物照度为100~200 lx。

2.4 A549 荷瘤小鼠模型的制备

取接种肿瘤7~10 d状态良好的荷瘤(腹水型)动物,常规消毒后抽取少量腹水,推片瑞氏染色细胞分类证实肿瘤细胞数不少于75%后将腹水抽出,以腹水与生理盐水按1:4比例稀释,制备成接种用的肿瘤细胞混悬液。肿瘤细胞混悬液的制备均在无菌条件下(超净工作台)完成。吸取上述制备的肿瘤细胞混悬液0.2 mL接种于小鼠右侧腋窝皮下,从取出肿瘤腹水至肿瘤接种完毕在60 min内完成。观察7 d,肿瘤直径约1 cm,造模成功率为100%^[6]。

2.5 给药方案

模型组、消岩汤组、siRNA转染组、消岩汤+siRNA转染组造模成功的小鼠分别瘤内注射生理盐水、消岩汤含药血清、Survivin siRNA转染的A549细胞,注射体积50 μ L,隔天注射1次。连续给药2周^[7]。

2.6 观察指标

2.6.1 一般状态 每天观察并记录各组小鼠的体质、精神状态、进食及活动情况。

2.6.2 肿瘤生长情况 于末次注射给药后24 h,处死动物,剥取肿瘤组织,称瘤质量,计算抑瘤率。

抑瘤率=1-给药组瘤质量/模型组瘤质量

2.6.3 肿瘤组织学检查 取出各组裸鼠的肿瘤组织,称质量,用刀片沿肿瘤组织正中间剖开,剥离坏死部分,制备肿瘤组织标本(约1 cm $\times$ 1 cm $\times$ 1 cm)以4%多聚甲醛固定,置于4 $^{\circ}$ C冷藏备用,在60 $^{\circ}$ C以下环境内经脱水、透明、浸蜡及包埋制成蜡块。

2.6.4 免疫组化法检测 Survivin 蛋白表达 免疫组化指标检测组织切片常规脱蜡、水化后,按相关试剂盒说明检测 Survivin 蛋白表达。其中, Survivin 采用微波修复,抗体稀释度为1:30。结果判断: Survivin 蛋白阳性反应为棕黄色或棕褐色颗粒, Survivin 主要定位于胞核或胞浆。采取染色强度和肿瘤细胞阳性率综合评价染色指数(IA),着色强度计分:无染色计0分,淡黄色染色为1分,黄色染色为2分,棕黄色染色为3分;阳性细胞率计分标准:0分为阳性细胞<5%,1分为阳性细胞比例5%~24%,2分阳性细胞比例为25%~49%,3分阳性细胞比例为50%~74%,4分阳性细胞比例为 $\geq$ 75%。IA为两项评分之和。

2.6.5 细胞凋亡情况 采用常规胰酶消化、收集肿瘤组织细胞 $1\times 10^6\sim 5\times 10^6$ /mL,500~1 000 r/min离心5 min,弃去培养液,3 mL PBS洗涤1次;离

心去PBS,加入冰预冷的70%乙醇固定,4 $^{\circ}$ C,1~2 h。离心弃去固定液,3 mL PBS重悬5 min,400目的筛网滤过1次,500~1 000 r/min离心5 min,弃去PBS。用1 mL PI染液染色,4 $^{\circ}$ C避光30 min。流式细胞仪检测:PI用氩离子激发荧光,激光光波波长为488 nm,发射光波波长大于630 nm,产生红色荧光分析PI荧光强度的直方图,也可分析前散射光对侧散射光的散点图。

2.7 统计学处理

数据为计量资料,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,在确定正态分布、方差齐的前提下组间比较采用 t 检验,如非正态分布,组间比较用非参数检验。使用SPSS 17.0统计软件包进行统计处理。

3 结果

3.1 A549 荷瘤小鼠一般状况观察

接种A549瘤株后大约8 d,小鼠右前肢腋下长出肿瘤结节。自7 d后各组小鼠均逐渐出现行动迟缓、倦怠,喜群居,毛色晦暗,竖毛,进食减少情况,但各组小鼠一般状况并无明显差异。处死全部小鼠后,肉眼可观察肿瘤生长于小鼠右前肢腋下,呈灰白色结节,大部分包膜完整,少部分肿瘤结节包膜不完整,有浸润现象。

3.2 对 A549 荷瘤小鼠体质量及肿瘤生长的影响

与模型组比较,各给药组荷瘤小鼠体质量均有明显减轻($P<0.01$)。各治疗组之间对比,小鼠体质量未见明显差异($P>0.05$)。见表1。与模型组相比,各给药组瘤质量均显著降低($P<0.01$),但各给药组间瘤质量差异不显著($P>0.05$)。各给药组抑瘤率均在80%以上,见表1。

3.3 对 A549 荷瘤小鼠肿瘤组织中 Survivin 蛋白表达的影响

与模型组比较,各给药组荷瘤小鼠肿瘤组织中 Survivin 蛋白表达显著减少($P<0.01$),siRNA转染组对 Survivin 蛋白表达的抑制率明显高于消岩汤组,但显著低于消岩汤+siRNA转染组。见图1和表2。

3.4 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,右上象限为晚期凋亡细胞,左上象限是非活细胞,即坏死细胞。从图2中可看出,与模型组凋亡率9.46%相比较,siRNA转染组、消岩汤组、消岩汤+siRNA转染组细胞凋亡率分别为48.2%、39.79%、56.9%。与模型组相比,其余各组凋亡率从高至低依次为消岩

表 1 用药前后各组 A549 荷瘤小鼠体质量和瘤质量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison on body weight and tumor weight of A549 tumor-bearing mice in each group contrast before and after treatment ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数/只		体质量/g		瘤质量/g	抑瘤率/%
	开始	结束	开始	结束		
模型	10	8	18.00±1.05	24.31±5.57	3.80±0.84	—
siRNA 转染	10	10	18.20±1.14	22.00±3.14**	0.50±0.13**	86.84
消岩汤	10	9	18.20±1.14	23.22±2.60**	0.45±0.09**	88.16
消岩汤+siRNA 转染	10	9	18.20±1.14	23.22±2.51**	0.49±0.16**	87.10

与模型组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs model group

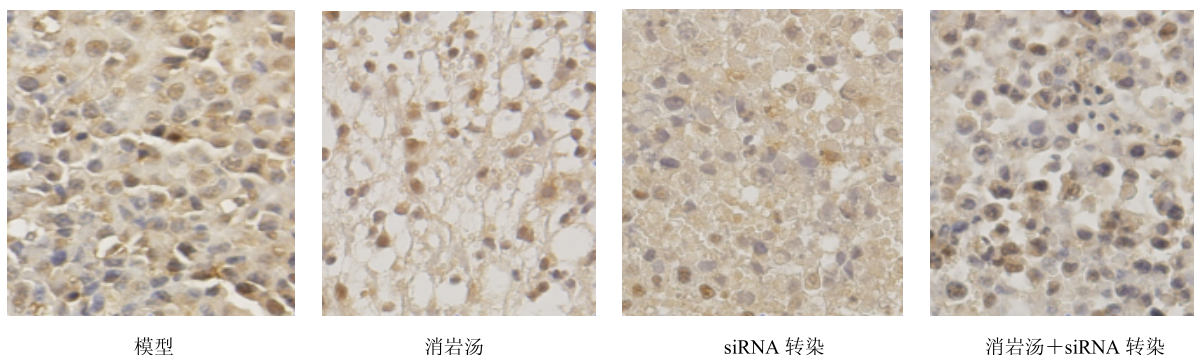


图 1 各组荷瘤小鼠肿瘤组织中 Survivin 蛋白表达

Fig 1 Protein expression of Survivin in tumor tissue of A549 tumor-bearing mice in each group

表 2 各组 A549 荷瘤小鼠肿瘤组织中 Survivin 蛋白表达水平比较

Table 2 Comparison on protein expression of Survivin in tumor tissue of A549 tumor-bearing mice in each group

组别	动物数/只	IA	抑制率/%
模型	8	9.12±1.32	—
siRNA 转染	10	4.89±0.78	55.6
消岩汤	9	3.87±0.63	44.5
消岩汤+siRNA 转染	9	7.12±0.96	77.8

汤+siRNA 转染组、siRNA 转染组、消岩汤组, 且各组间差异均有统计学意义。提示 siRNA 转染组和消岩汤组均可诱导细胞凋亡, 且 siRNA 转染组的诱导作用强于消岩汤组, 消岩汤+siRNA 转染组可协同诱导细胞凋亡作用。

4 讨论

与其他许多恶性肿瘤一样, 肺癌的发生、发展以及侵袭、转移是多基因参与、多步骤发生的过程, 与一系列的基因表达失衡有关, 其中凋亡抑制基因的过度表达导致细胞凋亡不足和增生过度是肺癌发

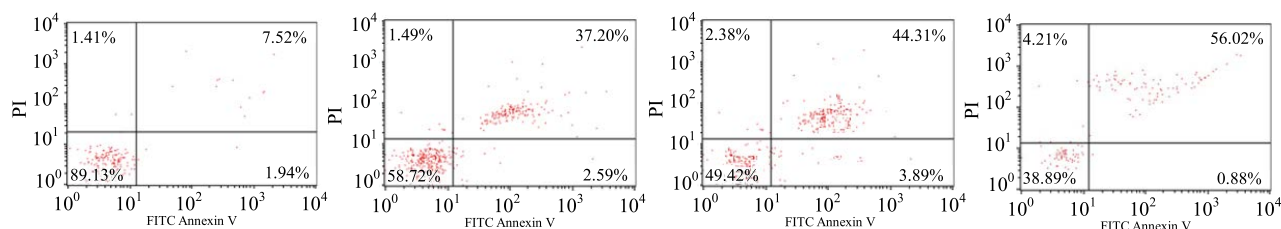


图 2 各组 A549 荷瘤小鼠细胞凋亡率比较

Fig. 2 Comparison on apoptosis rate of tumor cells of A549 tumor-bearing mice in each group

生的重要原因。

凋亡抑制蛋白 (inhibitor of apoptosis protein, IAP)^[8]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。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质量最小、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。在非小细胞肺癌中 Survivin mRNA 的阳性表达率越高,细胞分化程度越低,抑制细胞凋亡的作用越强,肿瘤细胞的浸润性越强,预后越差。提示在肺癌的发生、进展中起重要作用。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。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^[9]。

目前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,对放化疗的解毒增效,抗复发转移及延长患者的生存期,改善生活质量等方面均有其独特优势。多年来,大量临床研究结果表明,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^[10-11],本研究以 RNA 干扰技术为切入点,研究结果显示消岩汤可协同 Survivin siRNA 使肺癌细胞凋亡率增加,揭示消岩汤对肺腺癌的治疗作用,从基因水平为中药复方抗肿瘤作用机制提供理论依据。

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, 14(1): 70-89.
- [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] 张欣,贾英杰,杨佩颖,等. 消岩汤含药血清介导下 Survivin siRNA 对人肺腺癌 A549 细胞增殖及凋亡的影响 [J]. *天津中医药*, 2017, 34(2): 113-116.
- [6] 胡丽丽,阮永华. 移植性肺癌动物模型的建立和研究进展 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2012, 28(8): 906-908.
- [7] 张欣,杨佩颖,李蕊洁,等. 靶向 survivin 基因高效 RNA 干扰序列的筛选 [J]. *诊断病理学杂志*, 2016, 23(7): 557-558.
- [8] 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.
- [9] Trabulo S, Cardoso A M, Santos-Ferreira T, *et al.* Survivin silencing as a promising strategy to enhance the sensitivity of cancer cells to chemotherapeutic agents [J]. *Mol Pharm*, 2011, 8(4): 1120-1131.
- [10] 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.
- [11] 杨佩颖,李小江,孔凡铭,等. 消岩汤对 Lewis 肺癌小鼠化疗后骨髓抑制的影响 [J]. *中草药*, 2016, 47(9): 1567-1571.