

消岩汤对肺癌 A549 细胞及肺癌干细胞迁移及侵袭的影响

李小江¹, 张莹¹, 杨佩颖¹, 孙彬栩¹, 易丹¹, 孙月红², 姜珊³, 贾英杰^{1*}

1. 天津中医药大学第一附属医院 肿瘤科, 天津 300193

2. 沧州中西医结合医院 放疗科, 河北 沧州 061000

3. 天津中医药大学, 天津 300193

摘要: 目的 探讨消岩汤对非小细胞肺癌转移的作用机制。方法 通过划痕实验, 观察消岩汤对肺腺癌 A549 细胞的迁移能力的影响; 通过侵袭实验, 观察消岩汤对肺癌干细胞 (SP 细胞) 侵袭能力的影响。结果 划痕实验中消岩汤组肺腺癌 A549 细胞在 24、48、72 h 的迁移距离明显短于各时刻对照组细胞 ($P < 0.05$); 侵袭实验中消岩汤干预下的 SP 细胞穿出 Transwell 小室的细胞数明显少于对照组 ($P < 0.05$)。结论 消岩汤可有效抑制肺腺癌 A549 细胞的迁移及 SP 细胞的侵袭。

关键词: 消岩汤; A549 细胞; 肺癌干细胞; 迁移; 侵袭; 非小细胞肺癌转移

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)04-0870-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.04.019

Effect of Xiaoyan Decoction on migration and invasion of A549 cells and SP cells in lung cancer

LI Xiao-jiang¹, ZHANG Ying¹, YANG Pei-ying¹, SUN Bin-xu¹, YI Dan¹, SUN Yue-hong², JIANG Shan³, JIA Ying-jie¹

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

2. Cangzhou Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Cangzhou 061000, China

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

Abstract: Objective To study the effect of Xiaoyan Decoction on metastasis of non-small cell lung cancer by experimental study.

Methods Through the scratch test, the effect of Xiaoyan Decoction on the migration ability of lung adenocarcinoma A549 cells was observed. The transwell migration assay was used to test the role of Xiaoyan Decoction in lung cancer stem cells migration. **Results** In the scratch test, the migration distance of lung adenocarcinoma A549 cells in 24, 48, and 72 h was significantly shorter than that of the control group at the time of the scratch test ($P < 0.05$). In the invasive experiment, the number of lung cancer stem cells passing through the transwell unit in Xiaoyan Decoction group was significantly less than that of the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Xiaoyan Decoction can effectively inhibit the invasion ability of lung cancer stem cells, and then affect their metastatic ability.

Key words: Xiaoyan Decoction; A549 cell; SP cell; migration; invasion; metastasis of non-small cell lung cancer

肺癌发病率及死亡率日趋升高, 严重威胁着人类的生命健康, 其治疗现状仍不容乐观, 复发转移的发生, 使其预后极差, 增加了疾病的致死率, 防治肺癌转移刻不容缓。消岩汤为天津中医药大学第一附属医院肿瘤科贾英杰教授根据多年临床经验所

拟的经验方, 临床联合化疗应用疗效显著^[1], 前期实验研究证实消岩汤可通过调控 survivin 及 caspase-3 基因的表达从而促进肺癌细胞凋亡^[2-4], 本实验在前期研究基础上进一步延伸, 通过划痕及侵袭实验观察消岩汤对肺腺癌 A549 细胞迁移及对肺癌干细胞

收稿日期: 2017-10-01

基金项目: 天津市科技计划项目“扶正解毒祛瘀法方药联合甲磺酸阿帕替尼治疗晚期胃癌化疗失败患者的临床研究”(17ZXMFYSY00190); 天津市科技计划项目“天津市中医内科临床研究中心”(15ZXLCYSY00020); 天津市卫生和计划生育委员会“基于 LAPTM4B-35-PI3K/AKT 信号通路探讨消岩汤在非小细胞肺癌中抗肿瘤作用及其机制研究”(2017003); 天津市卫生和计划生育委员会“从‘同病异治’探讨消岩汤联合阿帕替尼对 NSCLC 的临床研究”(2017119); 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); 天津市应用基础与前沿技术研究计划重点项目“消岩汤对肺腺癌 A549 细胞凋亡生成素基因表达的影响; 消岩汤调控肺腺癌 A549 细胞株 SP 细胞 Wnt 信号通路的研究”(14JCZDJC36900)

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

(SP 细胞) 侵袭能力的影响。

1 材料

1.1 试剂与药物

DMEM-F12 培养基、胎牛血清 (FBS, Gibco BRL 公司); 胰蛋白酶、DMEM 培养基、F12、B27 (Gibco 公司), 表皮生长因子 (EGF)、成纤维细胞生长因子 (bFGF, Sigma 公司); Transwell 小室 (Corning 公司)。消岩汤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 105 g, 包括生黄芪 30 g、太子参 15 g、郁金 10 g、姜黄 15 g、夏枯草 10 g、生牡蛎 15 g、白花蛇草 10 g, 消岩汤水煎液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, 其终质量浓度为生药 30 mg/mL。

1.2 细胞

人肺腺癌 A549 细胞及 SP (CD133⁺) 细胞, 均由天津赛尔生物技术有限公司提供。

1.3 仪器

6 孔、24 孔培养板 (Orange Scientific, 比利时); CO₂ 恒温培养箱 (Thermo Forma, 美国); 超净工作台 (苏州净化设备有限公司); 倒置显微镜 (Olympus, 日本)。

2 方法

2.1 划痕实验检测肺腺癌 A549 细胞迁移能力

A549 细胞用含 10% 血清、1% 双抗的 DMEM 培养液, 置 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。培养板接种细胞之前先用 marker 笔在 12 孔板背面画横线标记 (方便拍照时定位同一个视野)。细胞消化后接入 6 孔板, 数量以贴壁后铺满板底为宜 (数量少时可培养一段时间至铺满板底)。细胞铺满板底后, 用 200 μL 枪头垂直于孔板制造细胞划痕, 尽量保证各个划痕宽度一致。吸去细胞培养液, 用 PBS 冲洗孔板 3 次, 洗去划痕产生的细胞碎片。用 PBS 洗细胞 3 次,

去除划下的细胞, 加入含有 2% FBS 的 DMEM 培养液 (对照组) 或 2% FBS 的 DMEM 培养液+消岩汤 30 mg/mL^[2] (消岩汤组)。放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养, 分别于 0、24、48、72 h 取样, 拍照。

2.2 侵袭实验检测 SP 细胞侵袭能力

取生长状态良好的 SP 细胞, 2 000 r/min 离心 5 min, 彻底弃净培养液, PBS 浸洗细胞, 干细胞培养基吹打混匀细胞, 进行 Transwell 实验。每个 Transwell 小室底面涂 10 μL 纤维连接蛋白 (0.5 mg/mL), 在超净台内风干, 使纤维连接蛋白固化于膜底面。取 1×10⁵ 个细胞置于 1.5 mL EP 管中, 2 000 r/min 离心 5 min, 去上清, 对照组加入 100 μL 无血清培养基 (同培养基不加血清) 重悬细胞, 实验组加入 100 μL 含 30 mg/mL 消岩汤的无血清培养基重悬细胞, 然后加入 Transwell 小室中。下层小室加入细胞完全培养基 600 μL, 放入 37 °C 孵箱中培养 24 h。取出 Transwell 小室, 用棉签擦除里面的细胞, 并用 PBS 轻轻洗掉上室剩余细胞。用甲醇、冰醋酸按照 3 : 1 配制成混合液, 固定 Transwell 小室反面的细胞 15 min。放入结晶紫染液中染色 15 min。用滤纸吸干残留的液体, 放在通风橱中风干 1 min。手术刀片沿小室边缘将膜割下, 底面朝上放在载玻片上。立即滴二甲苯约 15 μL 于膜上, 倾斜载玻片, 用滤纸吸走多余的二甲苯, 滴中性树脂约 15 μL 于膜上, 排除气泡。显微镜下取 3 个随机视野进行拍照。

2.3 统计学方法

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, 组间比较采用 χ^2 检验。

3 结果

3.1 消岩汤对肺腺癌 A549 细胞迁移的影响

对照组和消岩汤组细胞 200 倍镜下在不同时间的迁移情况见图 1。两组细胞不同时间的迁移距离

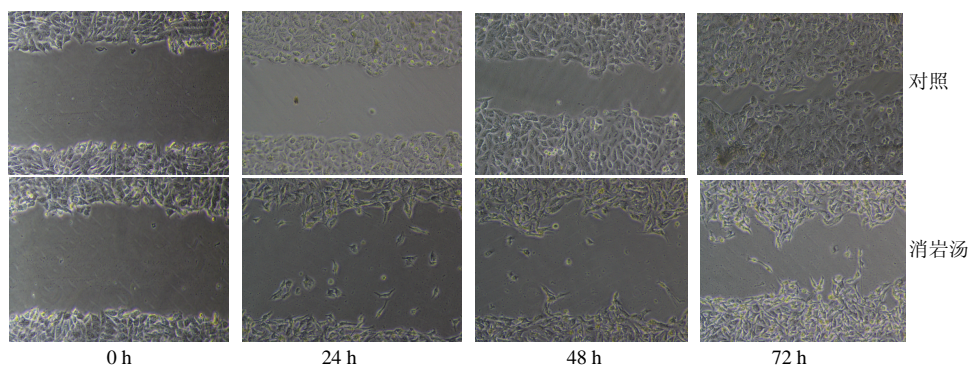


图 1 各组 A549 细胞迁移情况

Fig. 1 Migration of A549 cells in each group

见表 1。结果表明消岩汤组细胞在 24、48、72 h 的迁移距离较对照组明显缩短 ($P < 0.001$), 说明消岩汤能够抑制肺腺癌 A549 细胞的迁移。

3.2 消岩汤对 SP 细胞侵袭能力的影响

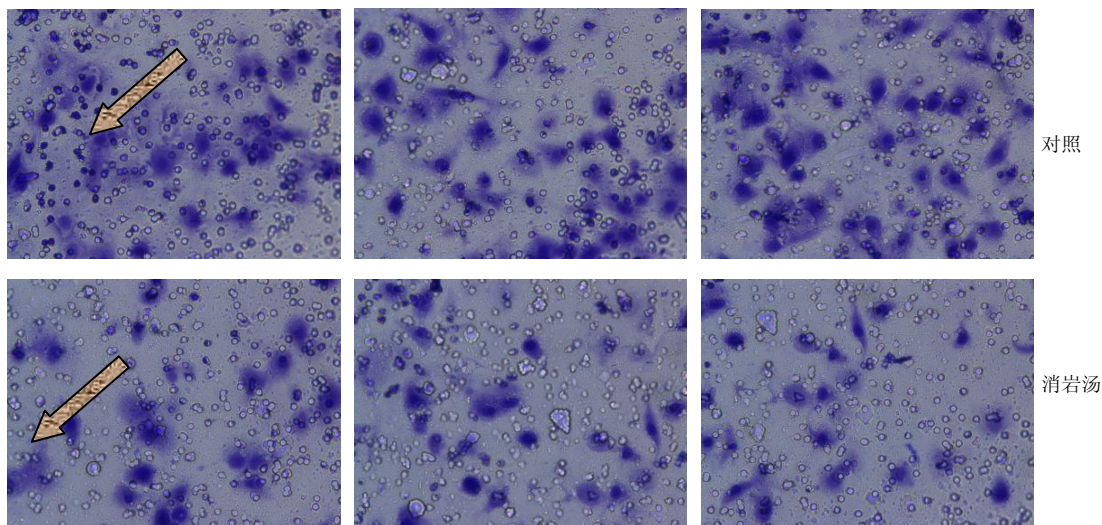
消岩汤组与对照组各随机选取 3 个 200 倍镜下视野细胞观察, 结果见图 2。实验组 SP 细胞穿出 Transwell 小室的细胞计数为 30.67 ± 1.35 , 对照组镜下细胞数为 73.00 ± 2.00 , 两组间比较差异显著 ($P < 0.05$)。

表 1 两组 A549 细胞迁移距离比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 1 Comparison of migration distance of A549 cells between two groups ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	迁移距离/ μm		
	24 h	48 h	72 h
对照	164.00 ± 15.09	286.00 ± 28.35	434.70 ± 11.54
消岩汤	$8.00 \pm 2.00^{***}$	$68.00 \pm 14.00^{***}$	$216.00 \pm 26.90^{***}$

与对照组比较: $^{***}P < 0.001$

$^{***}P < 0.001$ vs control group



箭头所指细胞即 SP 细胞
The arrowhead cells were the SP cells

图 2 两组 Transwell 小室实验结果 ($\times 200$)
Fig. 2 Transwell test results of two groups ($\times 200$)

4 讨论

中医学认为, 癌病的发生是因机体脏腑阴阳的偏盛偏衰, 气血功能紊乱, 治不得法或失于调理, 病邪久羁, 正气损伤, 或者正气本虚, 无力祛邪, 加重了气、血、痰、湿等病理产物凝结阻滞于体内, 壅结成块。中医以扶正固本、解毒散结等标本兼治之法对机体进行多层次调整其阴阳失调的内环境, 使机体功能归于“阴阳平复”, 达到“阴平阳秘”之效。现代研究已证实炎症反应是影响肺癌生长、侵袭、转移的重要因素, 在临床中也多有体现, 其病机主要考虑为正气亏虚、癌毒蕴结, 本研究的消岩汤, 由清热解毒类中药如夏枯草、白花蛇舌草, 活血化瘀类中药郁金、姜黄, 益气扶正类中药黄芪、太子参组成, 全方共奏解毒祛瘀、扶正抗癌之功。

贾英杰教授^[5]在临床治疗肺癌过程中, 运用消岩汤加减取得了良好的效果, 其中对药的应用, 在临床中屡试不爽。夏枯草与生牡蛎: 夏枯草, 性辛

苦寒, 归肝胆经, 辛能散结消肿, 苦寒能泄热, 且能明目, 临床常用于肝郁化火, 痰火凝聚之证; 牡蛎, 味咸性寒, 归肝胆肾经, 功能重镇安神, 潜阳补阴, 软坚散结, 其可治疗痰火郁结所致的癥瘕积聚; 两者配伍能增强软坚散结之功效, 贾英杰教授常用量为夏枯草 15 g, 生牡蛎 30 g, 用以治疗甲状腺癌、乳腺癌、恶性淋巴瘤等, 疗效较好。但需注意, 两者均属寒凉之品, 若患者脾胃虚弱, 应慎用。

陈海滔等^[6]通过研究发现, 姜黄素可通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路, 抑制肿瘤细胞上皮间质转化, 进而抑制肿瘤发生转移。李小江等^[7]进行了动物实验研究, 发现姜黄素可有效抑制肿瘤的生长, 考虑可能与其抑制核转录因子- κB (NF- κB) 的表达, 下调 Notch1 mRNA 含量, 阻断 Notch 信号通路, 抑制肿瘤组织中血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达有关。

前期研究中已发现, 消岩汤可抑制肺腺癌 A549

细胞的生长,抑制作用强度为全方组最强,其次为清热解毒类中药,其主要是通过下调 Survivin 的表达,促进肺癌 A549 细胞的凋亡^[7-9],发现消岩汤不仅能够抑制 A549 细胞的生长,同时对 SP 细胞的生长、侵袭也具有抑制作用,且药物质量浓度不同,抑制作用强度也有差异,当消岩汤质量浓度为 30 mg/mL 时抑制作用最强。本研究通过划痕及侵袭实验证实消岩汤可有效抑制肺癌 A549 细胞及肺癌干细胞 SP 的侵袭能力,进而影响非小细胞肺癌的转移能力,进一步解释了临床应用消岩汤治疗非小细胞肺癌病人的疗效,但其抑制侵袭及转移能力的机制尚不明确,有待进一步研究。

参考文献

[1] 贾英杰,李小江,杨佩颖,等. 消岩汤对减轻气虚毒瘀型非小细胞肺癌化疗毒副反应时效关系的临床研究 [J]. 天津中医药大学学报, 2010, 29(4): 183-185.
 [2] 李小江,贾英杰,于建春,等. 消岩汤剂拆方配伍对肺癌 A549 细胞 survivin 和 caspase-3 表达的影响 [J].

中草药, 2014, 45(23): 3436-3439.

[3] 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.
 [4] 张欣,贾英杰,杨佩颖. 消岩汤对肺腺癌 A549 实体瘤小鼠肿瘤细胞凋亡干预机制的研究 [J]. 中草药, 2017, 48(11): 2261-2265.
 [5] 于晓宇,贾英杰. 贾英杰教授巧用对药治疗肿瘤经验举隅 [J]. 医疗装备, 2016, 29(3): 107-108.
 [6] 陈海滔,徐超,姚庆华. 姜黄素通过调节 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制结肠癌细胞上皮间质转化 [J]. 肿瘤学杂志, 2017, 23(1): 35-39.
 [7] 李小江,贾英杰,张文治,等. 姜黄素对 A549 细胞亚群 SP 和 NON-SP 的 NF- κ B、VEGF 及 Notch 通路的影响 [J]. 天津中医药, 2016, 33(3): 164-168.
 [8] 张欣,张莹,杨佩颖,等. 基于 RNA 干扰技术探讨消岩汤对肺腺癌 A549 细胞凋亡的影响 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(3): 288-291.
 [9] 李小江,贾英杰,于建春,等. 消岩汤剂拆方配伍对 A549 肺腺癌细胞体外生长抑制作用研究 [J]. 天津中医药, 2015, 32(7): 424-427.

(上接第 869 页)

不同给药次数和时间^[12]对小肠蠕动的促进作用效果也不同,本研究分别采用 1、2、3 次,每次间隔 1 h 来区分各剂量组的实验方案,结果表明大黄甘草汤胶囊剂有明显的泻下作用,与传统汤剂的临床效果相符,能够有效促进胃肠的蠕动。

参考文献

[1] 王悦. 大黄甘草汤联合针刺治疗糖尿病胃轻瘫临床研究 [J]. 中医学报, 2016, 12(36): 1893-1896.
 [2] Smolarz H D, Swatko-ossor M, Ginalska G, et al. Antimycobacterial effect of extract and its components from *Rheum rhaponticum* [J]. *J AOAC Int*, 2013, 6(1): 155-160.
 [3] 钱丽梅,朱潇,冉杨慧,等. 中药复方三棱颗粒的研制及成型工艺优化 [J]. 中国医院药学, 2017, 37(9): 814-818.
 [4] 张铁军,朱月信,刘素香,等. 疏风解毒胶囊的系统质量标准提升研究 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2027-2033.
 [5] 任虹,傅超美,任波,等. 大黄煮散颗粒与传统饮片的药效学比较研究 [J]. 中药药理与临床, 2014,

30(3): 114-115.

[6] 张乐林,葛秀允,孙立立,等. 醋制对京大戟毒性和药效的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(19): 276-279.
 [7] 李品,王琦,彭莉,等. 痔血胶囊水提物和醇提取物对大鼠肝毒性的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(8): 154-159.
 [8] 王宇光,马增春,梁乾德,等. 中药毒性研究的思路与方法 [J]. 中草药, 2012, 43(10): 1875-1879.
 [9] 仲云熙,孙建国,王广基,等. 桂枝茯苓胶囊药理作用与临床应用研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(17): 3115-3120.
 [10] 王伽伯,马永刚,张萍,等. 炮制对大黄化学成分和肝肾毒性的影响及其典型相关分析 [J]. 药学学报, 2009, 44(8): 885-890.
 [11] 李爱萍,于洪波,戴林,等. 芍药甘草汤对慢传输型便秘大鼠肠道运动及血浆胃肠激素的实验研究 [J]. 临床军医杂志, 2013, 10(41): 993-995.
 [12] 祝婷婷,刘晓,汪小莉,等. 大黄不同方法炮制后药理作用及化学成分变化研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2016, 8(25): 883-887.