

消岩汤对肺癌干细胞 TGF- β /Smad3/MMP-9 信号通路的影响

李小江¹, 张莹¹, 杨佩颖¹, 孙彬栩¹, 朱津丽¹, 贺斌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 探讨消岩汤影响非小细胞肺癌转移的可能作用机制。方法 通过 Western blotting 检测方法定量 PCR (RT-PCR) 检测方法检测消岩汤干预下肺癌干细胞中多种炎症蛋白及因子表达的变化, 探索消岩汤影响非小细胞肺癌转移的可能作用机制。结果 Western blotting 检测方法检测显示实验组较对照组白细胞介素-6 (IL-6)、转化生长因子- β (TGF- β)、磷酸化白细胞抑制因子-3 (p-Smad3)、基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 蛋白的表达均有明显的降低 ($P < 0.05$), 差异具有统计学意义; RT-PCR 检测显示实验组较对照组 IL-6、TGF- β 、TNF- α 、MMP-2、MMP-9 基因表达均有明显降低 ($P < 0.05$), 差异具有统计学意义。结论 消岩汤主要通过抑制肺癌炎症微环境中的 TGF- β /Smad3 信号通路的传导来影响非小细胞肺癌的转移。

关键词: 消岩汤; 肺癌干细胞; TGF- β /Smad3 信号通路; 炎症微环境; 白细胞介素-6; 转化生长因子- β

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)05-1110-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.05.019

Effects of Xiaoyan Decoction on TGF- β /Smad3/MMP-9 signaling pathway in SP cells

LI Xiao-jiang¹, ZHANG Ying¹, YANG Pei-ying¹, SUN Bin-xu¹, ZHU Jin-li¹, HE Bin¹, 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 investigate the specific mechanism of Xiaoyan Decoction in the metastasis of non-small cell lung cancer. **Methods** The detection method of Western blotting method and quantitative PCR Xiaoyan Decoction intervention expression of many inflammatory proteins and cytokines in the lower lung cancer stem Xiaoyan Decoction explore the possible mechanism of effect of non small cell lung cancer metastasis. **Results** Western blotting detection showed that the expression of IL-6, TGF- β , p-Smad3, and MMP-9 protein in both experimental group and control group decreased significantly ($P < 0.05$), the difference was statistically significant; RT-PCR showed that the experimental group compared with the control group IL-6, TGF- β , TNF- α , MMP-2, alpha beta MMP-9 gene expression decreased significantly ($P < 0.05$), the difference was statistically significant. **Conclusion** Xiaoyan Decoction mainly affects the metastasis of non-small cell lung cancer by inhibiting the transmission of TGF- β /Smad3 signaling pathway in the inflammatory microenvironment of lung cancer.

Key words: Xiaoyan Decoction; lung cancer stem cells; TGF- β /Smad3 signal pathway; inflammatory microenvironment; IL-6; TGF- β

肺癌是目前恶性肿瘤中发病率及死亡率均居榜首的癌种, 严重威胁着人类的生命健康, 高转移率更加剧了患者的病情, 因此, 对于转移灶的防治刻不容缓, 需要引起足够的重视。中医药在防治恶性

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放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”(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: zxqlovelxj@126.com

肿瘤中的优势作用日益凸显,消岩汤是天津中医药大学第一附属医院贾英杰教授的经验方,在临床应用中效果显著,李小江等^[1-2]通过实验研究发现消岩汤及其各拆方组均能有效抑制肺腺癌 A549 细胞的生长,其中清热解毒类中药对肿瘤细胞的抑制作用较其他拆方组更强,消岩汤具体的抑瘤作用机制尚需进一步探索研究。本研究从微环境出发,探讨消岩汤全方抑制肺癌肿瘤生长、转移的具体作用机制。

1 材料

1.1 试剂与药物

DMEM 培养基、胎牛血清 (FBS, Gibco BRL 公司);胰蛋白酶 (Orange Scientific 公司);脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP, Thermo Forma 公司);M-MLV 逆转录酶 (Olympus 公司);溴化乙锭 (EB, 北京鼎国生物技术公司);正常熔点的琼脂糖凝胶、低熔点的琼脂糖凝胶(Gibco 公司);SYBR Premix Ex Taq 试剂盒 (TaKaRa);白细胞介素-6 (IL-6) 一抗、信号传导及转录激活因子 (STAT3) 一抗 (Proteintech 公司);p-STAT3 一抗 (Cell Signaling Technology 公司);白细胞抑制因子-3 (Smad3) 一抗 (天津赛尔生物技术有限公司);p-Smad3 一抗 (Cell Signaling Technology 公司);核因子- κ B (NF- κ B) 一抗 (Proteintech 公司);转化生长因子- β (TGF- β) 一抗 (天津赛尔生物技术有限公司);肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 一抗 (Proteintech 公司);基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 一抗 (天津赛尔生物技术有限公司);基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 一抗 (Proteintech 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、白花蛇舌草 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,其终质量浓度为含生药 30 mg/mL。

1.2 细胞

肺癌干细胞 (SP) 由天津赛尔生物技术有限公司提供。

1.3 仪器

BioTrace[®] NT 硝酸纤维素膜 (Millipore 公司); Western Lightning[™] Chemiluminescence Reagent (PerkinElmer 公司); SuperRX 感光胶片 (FUJIFILM 公司); DYCP-31BM 型水平电泳装置 (北京市六一仪器厂); LabWorks[™] 凝胶成像及分析系统

(UVP); TS-1 型脱色摇床 (江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司); HQ-350XT 型显影、定影设备 (苏州虎丘影像设备有限公司); VE-386 型转移电泳槽 (北京原平皓生物技术有限公司); DNP-9082 电热恒温孵育箱 (上海精宏试验设备有限公司); DHG-9246A 干燥消毒烤箱 (上海精宏试验设备有限公司); iQ5 Real-Time PCR 扩增仪 (Applied Biosystems 公司); CO₂ 恒温培养箱 (Thermo Forma 公司); 6 孔培养板 (Orange Scientific 公司); 超净工作台 (苏州净化设备有限公司); 倒置显微镜 (Olympus); 荧光显微镜 (SONY 公司); Lab Works[™] 凝胶成像及分析系统 (UVP 公司); GloMax 96 微孔板发光检测仪 (Promega 公司); 5415D 型离心机 (Eppendorf 公司); DYCZ-24DN 型垂直电泳装置 (北京市六一仪器厂)。

2 方法

2.1 实验分组

选取生长状态良好且处于对数期的 SP 细胞,以每孔 1×10^5 个细胞加入 6 孔板中,置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱培养过夜,待细胞汇合至 80% 左右,对照组加入新的正常培养基,实验组加入含有 30 mg/mL 消岩汤^[3]的培养基处理细胞,继续 37 °C、5% CO₂ 培养 48 h 后,弃净培养基, PBS 洗 1 遍并弃净,然后收集细胞于 1.5 mL EP 管中。

2.2 Western blotting 检测 TGF- β /Smad3/MMP-9 信号通路相关蛋白表达

取收集好的细胞用 500 μ L RIPA 裂解液重悬,冰上作用 30 min,其间不时摇动,然后吹打细胞,收集裂解后的细胞碎片及释放出的蛋白, -80 °C 保存。配制分离胶为 10% 的 SDS-PAGE 凝胶 (下层分离胶,单面),混匀后,迅速灌胶至玻璃板总高度的约 2/3 位置,而后在凝胶上方加入水饱和正丁醇 1 mL 以保证凝胶上层的平整,静置待胶凝固。配制 SDS 变性 5% 聚丙烯酰胺凝胶 (上层积层胶,单面)。混匀后,迅速灌胶至填满玻璃板,插入梳子,静置待胶凝固。电泳前拔去梳子,将凝胶置于 $1 \times$ Tris-甘氨酸电泳缓冲液中,并用注射器针头吹净上样孔。将蛋白样品与 $5 \times$ 上样缓冲液 (含 β -巯基乙醇) 混合后,煮沸变性 5 min,冰浴 5 min。取 30 μ g 蛋白样品上样,进行 SDS 变性 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE),直至目的蛋白有效分离后停止电泳。电泳分离后的蛋白电转至硝酸纤维素膜上 (Millipore 公司), 100 mA, 90 min。将硝酸纤维素

膜做标记以区分正反面及左右侧, 浸入 Blotto 封闭液中, 室温摇床上轻轻摇动 2 h。将膜置于含对应一抗的 Blotto 中在摇床上 4 °C 轻轻摇动过夜。在 1×TBST 中摇动浸洗 3 次×5 min, 洗去非特异结合的一抗。将膜浸入含相应二抗的 Blotto 中, 室温轻轻摇动 2 h。在 1×TBST 中摇动浸洗 3 次×5 min, 洗去非特异结合的二抗。最后用 Western Lightning®-ECL, Enhanced Chemiluminescence Substrate (Perkin Elmer, NEL100001EA) 检测, 显影。立即将膜置于曝光盒中, 并在暗室中对感光胶片进行曝光, 而后进行显影、定影处理。胶片用 Lab Works™ 凝胶成像及分析系统进行摄像, 分析各组 IL-6、STAT3、p-STAT3、Smad3、p-Smad3、NF-κB、TGF-β、TNF-α、MMP-2、MMP-9 条带的亮度值。方法为计算每个样品的 IL-6、STAT3、p-STAT3、Smad3、p-Smad3、NF-κB、TGF-β、TNF-α、MMP-2、MMP-9 条带亮度值与对应 β-tubulin (内参照) 条带亮度值的比值, 得到校正后的 IL-6、STAT3、p-STAT3、Smad3、p-Smad3、NF-κB、TGF-β、TNF-α、MMP-2、MMP-9 条带亮度值。比较各组间校正后的 IL-6、STAT3、p-STAT3、Smad3、p-Smad3、NF-κB、TGF-β、TNF-α、MMP-2、MMP-9 条带亮度值的关系, 并以对照组为标准值 1, 计算其他组 IL-6、STAT3、p-STAT3、Smad3、p-Smad3、NF-κB、TGF-β、TNF-α、MMP-2、MMP-9 条带亮度的相对值并绘制柱状图。

2.3 RT-PCR 检测 TGF-β/Smad3/MMP-9 信号通路相关基因表达的影响

取收集好的细胞, 细胞中加 500 μL Trizol, 冰板上水平放置, 晃动使细胞面充分接触 Trizol, 作用 15 min, 期间摇动 2~3 次。彻底吹打, 然后将裂解液转至新 1.5 mL EP 管中, 500 μL Trizol 加入 100 μL 预冷氯仿, 用力颠倒充分混匀, 冰置 5 min。4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 小心吸出上清液至新的 EP 管中 (注意一定不要接触中间蛋白层)。上清中加入预冷的无水乙醇 1 mL (1:5), 混匀, -80 °C 放置 30 min 以上。4 °C 12 000 r/min, 离心 30 min, 沉淀 RNA。小心弃去上清液 (RNA 应成半透明状的沉淀物, 量少时并不明显, 最好用吸头吸去), 加入 1 mL 预冷的 75% 的乙醇, 轻轻弹起沉淀, 12 000 r/min、4 °C 离心 10 min。彻底弃尽上清, 敞开盖, 室温静置 5 min (不可过干, 否则 RNA 不易溶解), 每管加入 20 μL DEPC 水溶解 15 min。混

匀, 分别留取 1 μL 用于定量和电泳, 其余 RNA 置 -80 °C 保存。RT 制备 Cdna, OligodT 引物: 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'; 配制以下反应体系: 总 RNA 3.0 μL, 引物 (100 pmol/μL) 1.0 μL, DEPC 水 9.5 μL, 总体积 13.5 μL。65 °C 变性 10 min, 冰浴 2 min。补加以下试剂: 5×buffer 4.0 μL、dNTPs (10 mmol/L) 1.0 μL、RNasin (40 U/μL) 0.5 μL、M-MLV (200 U/μL) 1.0 μL, 总体积 20 μL。42 °C 延伸 1 h, 70 °C 灭活 10 min, 产物保存于 -20 °C。PCR 扩增 IL-6、Smad3、NF-κB、TGF-β、TNF-α、MMP-2、MMP-9 和 β-actin。各基因引物序列见表 1。反应体系为 2×SYBR Premix Ex Taq 10.0 μL, PCR 正向引物 (5 pmol/μL) 1.0 μL, PCR 反向引物 (5 pmol/μL) 1.0 μL, 模板 (RT 产物 cDNA) 1.0 μL, DDW 7.0 μL, 总体积 20 μL。循环温度为 94 °C、4 min, 94 °C、30 s、56 °C、30 s、72 °C、30 s, 40 个循环。然后 PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 观察条带并拍照。

2.4 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 *t* 检验。

表 1 引物序列
Table 1 Sequence of primer

基因	引物序列 (5'→3')
IL-6	正向: TAGTGAGGAACAAGCCAGAG 反向: GCTACATTTGCCGAAGAG
STAT3	正向: CTCCAGCAACACTCTTCA 反向: GTAGGTAAGCAACCCACG
Smad3	正向: CATTGAGACAGATAACTATT 反向: GTCAATGTTCTATTCCCC
NF-κB	正向: CCCCAACTTTGTGGATGT 反向: CAAACGCTGGTGTAGGC
TGF-β	正向: AAGGCACAGGGGACCAG 反向: TTCTTCACTATCCCCAC
TNF-α	正向: AGACTTCCTTGAGACACGG 反向: AAACCTTATTCTCGCC
MMP-2	正向: CACTGGATGGAGGAAAACC 反向: TTCCAGCAGACACCATC
MMP-9	正向: AGTGCCATGTAAATCCC 反向: AACAAAGGTGAGAAGAGAGG
β-actin	正向: CGTGACATTAAGGAGAAGCTG 反向: TAGAAGCATTTGLIFCGGTGGAC

3 结果

3.1 Western blotting 检测结果

通过 Western blotting 方法检测各蛋白表达情况,发现实验组较对照组蛋白表达明显降低的指标有 IL-6、p-Smad3、TGF- β 、MMP-9, 差异显著 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001); 实验组 STAT3、MMP-2 蛋白表达较对照组有下调趋势, 但差异不显著, 结果见表 2 和图 1。

3.2 RT-PCR 检测结果

通过 RT-PCR 检测方法, 得出消岩汤干预下 SP

细胞中 IL-6、STAT3、TGF- β 、TNF- α 、MMP-2、MMP-9 的 mRNA 的表达水平均有不同程度的降低, 其中 IL-6、TGF- β 、TNF- α 、MMP-9 表达水平的降低具有统计学差异 ($P < 0.05$)。RT-PCR 检测半定量分析结果见表 3。

通过检测相关指标发现炎症因子 IL-6、TNF- α 、TGF- β 的表达受到明显抑制, 同时 p-Smad3、MMP-9 蛋白的表达也显著地被抑制, 可见消岩汤可通过抑制 TGF- β /Smad3/MMP-9 信号通路的传导, 发挥抗非小细胞肺癌转移的作用。

表 2 两组 SP 细胞中 TGF- β /Smad3/MMP-9 蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Expression of related protein of TGF- β /Smad3/MMP-9 pathway in SP cells of two groups ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	IL-6	p-Smad3	TGF- β	MMP-9	NF- κ B
对照	234.70 $\pm$ 19.22	316.82 $\pm$ 50.86	718.70 $\pm$ 6.87	171.87 $\pm$ 11.91	221.95 $\pm$ 11.07
实验	115.22 $\pm$ 18.70**	142.04 $\pm$ 13.69*	136.71 $\pm$ 10.58***	76.19 $\pm$ 10.04**	434.76 $\pm$ 56.94*

组别	STAT3	p-STAT3	Smad3	MMP-2
对照	251.54 $\pm$ 24.96	137.13 $\pm$ 5.26	382.25 $\pm$ 49.25	185.74 $\pm$ 12.24
实验	228.54 $\pm$ 27.42	165.27 $\pm$ 10.95*	482.61 $\pm$ 62.26	146.03 $\pm$ 24.21

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group, same as below

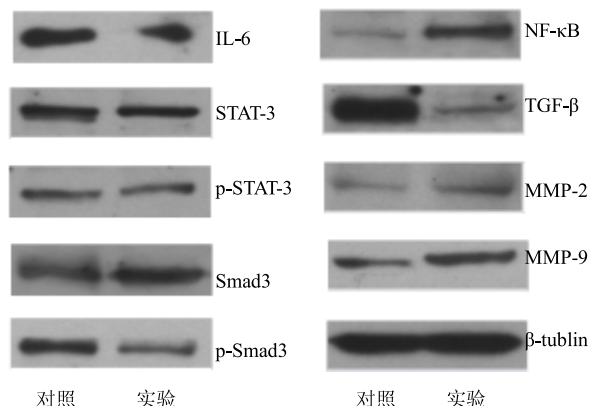


图 1 两组 SP 细胞中 TGF- β /Smad3/MMP-9 相关蛋白的 Western blotting 检测结果

Fig. 1 Results of Western blotting of related protein of TGF- β /Smad3/MMP-9 pathway in SP cells of two groups

4 讨论

炎症微环境已被证实对肺癌的转移具有促进作用, 干预炎症微环境从而影响肺癌的转移是目前研究的热点。消岩汤作为天津中医药大学第一附属医院贾英杰教授的经验方, 在临床应用中效果显著, 其主要以白花蛇舌草、夏枯草、生牡蛎为君药, 起到清热解毒、软坚散结之功; 郁金和姜黄为臣药, 发挥活血化瘀之效; 黄芪与太子参共为佐药, 以益气扶正以抗癌之功见长。TGF- β 作为炎症因子可促进肺癌的侵袭和转移, 消岩汤中白花蛇舌草抑制肿瘤的作用确切, 因其成分复杂, 考虑其抑瘤作用与多种分子机制有关^[4-7]。白花蛇舌草乙醇提取物可部分干预甚至逆转由 TGF- β 诱导的肺腺癌上皮细胞间质转化过程^[8], TGF- β 可通过诱导 Smad3 的磷酸

表 3 PCR 检测指标实验组与对照组相对值

Table 3 PCR relative values between experimental group and control group

组别	IL-6	STAT3	TGF- β	TNF- α	MMP-9	Smad3	NF- κ B	MMP-2
对照	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
实验	0.559*	0.579	0.476*	0.468*	0.351*	1.525	2.017	0.637

化,促进炎性信号通路的传导,进而促进 EMT 的发生。本实验结果显示消岩汤可通过抑制 TGF- β ,影响 Smad3 的传导,抑制转移的发生。Smad3 可由 TGF- β 诱导发生磷酸化,形成 p-Smad3 进入细胞核,与相应的靶点结合,诱发信号通路的发生。本研究中消岩汤对 p-Smad3 的抑制作用也是其作用机制中的一部分。有学者通过实验研究发现姜黄素能够抑制肺癌组织的生长,其主要是通过上调 Smad7 蛋白、下调 Smad3 蛋白的表达发挥作用^[9]。MMP-9 是基质金属蛋白水解酶类的一员,其在血管的形成、肿瘤的浸润方面起着重要的作用。有研究^[10]发现当肺癌细胞发生侵袭、转移时,MMP-9 的表达增强,当药物作用时,肺癌细胞的侵袭、转移受到抑制,同时 MMP-9 的表达也降低。本研究中消岩汤对于 MMP-9 的表达有抑制作用,可见这是消岩汤作用机制之一。

本研究初步阐明了消岩汤抑制肿瘤转移的作用机制,主要是通过抑制 TGF- β /Smad3/MMP-9 信号通路的传导,从而发挥抗非小细胞肺癌转移的作用,为中药复方治疗肺癌的临床应用提供了重要的实验依据。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 李小江,张莹,杨佩颖,等. 消岩汤对肺癌 A549 细胞及肺癌干细胞迁移及侵袭的影响. [J]. 中草药, 2018, 49(4): 870-873.
- [4] 李文婷,戴紫函,程海波,等. 白花蛇舌草活性成分及其协同抗肿瘤机制研究进展 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2015, 17(3): 670-674.
- [5] 毛宇,徐芳,徐小娟,等. 白花蛇舌草抗肿瘤成分及其作用机理研究进展 [J]. 现代预防医学, 2015, 42(17): 3128-3132.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 吕昕,周林水,杨莉,等. 白花蛇舌草乙醇提取物对 TGF- β 1 诱导的人肺腺癌细胞 H358 上皮间质化的干预作用 [J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(7): 590-594.
- [9] 杨维泓,姚庆华,徐玉芬,等. 姜黄素对 Lewis 肺癌小鼠 TGF- β 1、Smad3、Smad7 表达的影响 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2012, 22(4): 259-261.
- [10] 刘源,倪渐凤,王淑玲. 补肾疏肝方对小鼠 Lewis 肺癌的抑制作用及相关机制研究 [J]. 中医学报, 2016, 31(12): 1836-1840.