

四逆汤协同壮观霉素 B1 诱导 PTEN 与 SUMO1 解离治疗肺癌的研究

闫玉兰¹, 张春艳^{2#}, 刘凤婷³, 李 玥², 成睿珍², 李丽丽³, 刘晓智⁴, 盛 凤^{5*}

1. 天津市第五中心医院 血液肿瘤科, 天津 300450
2. 天津市滨海新区中医医院 药学科, 天津 300450
3. 天津市肿瘤医院 骨与软组织肿瘤科, 天津 300060
4. 天津市第五中心医院 中心实验室, 天津 300450
5. 天津市第五中心医院 中医科, 天津 300450

摘要: 目的 从蛋白质类泛素化修饰角度解析温里剂四逆汤协同壮观霉素 B1 抑制肺癌细胞增殖、迁移和促进细胞凋亡的作用机制。方法 实验分对照组、壮观霉素 B1 组、四逆汤组和联合药物组, 于人非小细胞肺癌 A549 细胞株作用 48 h 后, 采用 Western blotting 法检测小泛素相关修饰蛋白-1 (SUMO1)、10 号染色体缺失磷酸酶和张力蛋白同源物基因 (PTEN)、磷酸化 Akt (p-AKT) 和 Caspase-9 的蛋白表达水平; MTT 实验绘制细胞增殖曲线; 流式细胞术检测细胞凋亡; 细胞划痕和 Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭。结果 壮观霉素 B1 和四逆汤均能够降低 A549 细胞共价态 SUMO1 和 p-Akt 水平, 增加 PTEN 和活化 Caspase-9 的蛋白水平, 抑制细胞增殖、迁移和侵袭, 促进细胞凋亡, 壮观霉素 B1 和四逆汤联合药物组对细胞的抑制作用显著强于各单独给药组。结论 四逆汤能够协同壮观霉素 B1 诱导 PTEN 与 SUMO1 解离, 进而抑制肺癌细胞增殖、转移和促进细胞凋亡。

关键词: 四逆汤; 壮观霉素 B1; 肺癌; 小泛素相关修饰蛋白; 10 号染色体缺失磷酸酶和张力蛋白同源物基因

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)09-2127-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.09.017

Sini Decoction combined with spectinomycin B1 induced dissociation of PTEN and SUMO1 to treat lung cancer

YAN Yu-lan¹, ZHANG Chun-yan², LIU Feng-ting³, LI Yue², CHENG Rui-zhen², LI Li-li³, LIU Xiao-zhi⁴, SHENG Feng⁵

1. Department of Hematology Oncology, The Fifth Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300450, China
2. Department of Pharmacy, Tianjin Binhai New Area Hospital of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300450, China
3. Department of Bone and Soft Tissue Tumors, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin 300060, China
4. Central Laboratory, The Fifth Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300450, China
5. Department of Traditional Chinese Medicine, The Fifth Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300450, China

Abstract: Objective To analyze the mechanism of the inhibition of proliferation, metastasis and the promotion of apoptosis of lung cancer cells by Sini Decoction combined with spectinomycin B1 from the perspective of protein SUMOylation modification. **Methods** The experiment was divided into control group, spectinomycin B1 group, Sini Decoction group, and combined treatment group. Human non-small cell lung cancer cell line A549 was treated for 48 h and Western blotting was used to detect the protein expression of small ubiquitin-related modified protein-1 (SUMO1), gene of phosphate and tension homology deleted on chromosome ten (PTEN), and phosphorylated Akt (p-Akt) and Caspase-9. Cell proliferation curves were drawn by MTT assay, and cell apoptosis was detected by flow cytometry; Cell migration and cell invasion were detected by cell scratch and Transwell assay. **Results** Both spectinomycin B1 and Sini Decoction an reduce the levels of covalent SUMO1 and p-Akt, increase the protein levels of PTEN and

收稿日期: 2018-12-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81471175); 天津市卫生和计划生育委员会中医中西医结合科研课题 (2017169); 天津市滨海新区卫生和计划生育委员会科技项目 (2016BWKY026)

作者简介: 闫玉兰, 副主任医师, 硕士, 从事肿瘤内科治疗。Tel: 13920380171 E-mail: zjh112275@163.com

*通信作者 盛 凤 Tel: (022)65665880 E-mail: jijj654@sina.com

#并列第一作者 张春艳

activate Caspase-9, inhibit cell proliferation, migration and invasion, and promote cell apoptosis. Combined treatment group can further enhance the above changes. **Conclusion** Sini Decoction can synergize with spectinomycin B1 to induce the dissociation of PTEN and SUMO1, thereby inhibiting the proliferation, metastasis and promoting apoptosis of lung cancer cells.

Key words: Sini Decoction; spectinomycin B1; lung cancer; small ubiquitin-related modified protein; gene of phosphate and tension homology deleted on chromosome ten

肺癌是多因素、多基因、多通路共同参与的恶性演变产物^[1], 其中 10 号染色体缺失磷酸酶和张力蛋白同源物基因 (gene of phosphate and tension homology deleted on chromosome ten, PTEN) 作为抑癌基因主要通过抑制磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 通路发挥肿瘤生长抑制作用^[2]。新近研究表明, PTEN 能够被小泛素相关修饰蛋白 (small ubiquitin-related modifier, SUMO) -1 共价修饰, 从而加速 PTEN 降解, 解除其对 PI3K/Akt 癌变通路的抑制作用, 加速肿瘤进展^[3]。Hirohama 等^[4]报道 SUMO 通路中唯一的 E2 结合酶 Ubc9 能够被壮观霉素 B1 抑制, 从而抑制靶蛋白的 SUMO 修饰过程。但是作为机体内几乎所有类型细胞都必需的蛋白, 抑制 Ubc9 无疑将对正常机体产生严重不良反应^[5]。因此筛选副作用更小的抑制 SUMO 化修饰的新物质或寻找能够协同壮观霉素 B1 共同抑制靶蛋白 SUMO 化修饰从而减少壮观霉素 B1 用药剂量将是肿瘤治疗的新课题。

现代中医肿瘤学的研究认为, 阳虚毒结是肿瘤发生发展过程中的一个重要机制。四逆汤作为温阳剂的代表方, 由附子、干姜、炙甘草组成, 具有一定的抗肿瘤作用, 尤其对肺癌和肝癌细胞有明显的抑制作用^[6-7]。本研究从传统中医药中发现四逆汤具有诱导蛋白质去 SUMO 化及协同壮观霉素 B1 共同抑制靶蛋白 SUMO 修饰的作用, 为未来肺癌的治疗提供新的借鉴和参考。

1 材料

1.1 药品与试剂

四逆汤组方中淡附片、干姜、炙甘草均购于天津市中药饮片厂, 经天津市滨海新区中医医院药学科刘海副主任中药师鉴定, 药材均符合《中国药典》2015 年版规定; 壮观霉素 B1 (批号 1125A052) 购自北京索莱宝科技有限公司; 胎牛血清、DMEM 培养基、胰蛋白酶均购自美国 Gibco 公司; SUMO1、p-Akt (phospho S473)、Caspase-3 和 β -actin 抗体均购自美国 Abcam 公司; MTT 试剂盒购自北京鼎国公司, Transwell 培养板购自美国 HyClone 公司。

1.2 细胞

人非小细胞肺癌 A549 细胞株购自美国模式培养物集存库 (American type culture collection, ATCC)。

2 方法

2.1 四逆汤水煎液冻干粉的制备

四逆汤水煎液由天津市滨海新区中医医院药学科调剂、煎煮, 按照《中国药典》2015 年版中处方量称取淡附片 300 g、干姜 200 g、炙甘草 300 g, 加入 12 倍量水, 浸泡 30 min 后, 煎煮 30 min, 趁热滤过, 药渣再加 10 倍量水, 煎煮 30 min, 合并 2 次滤液, 浓缩至生药质量浓度 1 g/mL。14 000 r/min 离心 10 min, 然后经冷冻干燥机干燥, 得四逆汤水煎液冻干粉 (16.8 g), 用适量培养基溶解、稀释至给药浓度, 在无菌条件下用 0.22 μ m 滤膜滤过, 即得^[8]。

2.2 细胞培养与实验分组

A549 细胞培养于含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 中, 培养条件为 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂, 饱和湿度。每 2~3 天按 1:3 比例细胞传代。取对数生长期的 A549 细胞, 以密度为 1×10^5 个/mL 接种于 6 孔板, 实验分 4 组: 对照组, 不加任何干预; 壮观霉素 B1 组, 在常规细胞培养基中加入终浓度为 20 μ mol/L (根据预试验结果确定的最佳有效浓度) 的壮观霉素 B1 干预; 四逆汤组, 在常规细胞培养基中加入终质量浓度为 50 mg/mL (根据预试验结果确定的最佳有效浓度) 四逆汤干预; 联合药物组, 在常规细胞培养基中加入终浓度为 20 μ mol/L 的壮观霉素 B1 及 50 mg/mL 四逆汤干预。

2.3 Western blotting 实验

提取药物处理 48 h 的各组细胞总蛋白, 经 Bradford 法定量后, 以 8%分离胶进行电泳, 冰浴下 80 V 转膜 60 min, 脱脂奶粉封闭 60 min, 然后加入 SUMO1 (1:2 000)、p-AKT (1:1 000)、Caspase-9 (1:2 000) 和 β -actin (1:2 000) 抗体, 4 $^{\circ}$ C 水平摇床孵育过夜, 次日使用 1:2 000 稀释二抗孵育 1 h 后用超信号蛋白检测试剂盒检测蛋白表达, 凝胶成像系统扫描吸光度值, Image J 1.8.0 软

件进行定量分析。

2.4 MTT 实验

以 1×10^4 个细胞/孔在 96 孔板中进行细胞接种, 按照“2.2”项实验分组, 分别加入相应药物后置于细胞培养箱中培养, 于培养第 1、2、3、4、5、6 天行 MTT 实验, 在酶标仪上测定各孔波长 490 nm 处的吸光度 (A) 值, 根据实验结果绘制细胞生长曲线; 设 3 个平行孔。

2.5 流式细胞术检测细胞凋亡

按照“2.2”项实验分组将药物处理 48 h 的 A549 细胞进行流式细胞术检测。胰酶消化结合机械性吹吸获得单细胞悬液, 经漂洗、固定后送检, 流式细胞凋亡检测由国家纳米技术与工程研究院协助完成。所有实验在细胞固定后 2 h 内完成。

2.6 细胞划痕实验

将处于对数生长期的 A549 细胞均匀接种于 6 孔板, 待细胞密度达到至少 95% 融合度时以 10 μ L 枪头进行细胞划痕, 记录划痕两侧初始距离, 记作 S_0 , 然后按照“2.2”项分组给予不同方式的药物处理, 96 h 后终止实验, 测量划痕两侧终末距离, 记作 S_1 , S_0 与 S_1 的差值即为细胞实际迁移距离。

2.7 Transwell 细胞侵袭实验

在 Transwell 上室预先铺置 2 mm 厚的鼠尾胶, 细胞培养箱中充分平衡后接种 A549 细胞, 上室细胞培养基为含 1% 胎牛血清 + 不同分组药物的 DMEM 培养基 (对照组仅为含 1% 胎牛血清的 DMEM); 下室为含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。

72 h 后终止实验, 取出 Transwell 上室, 小心拭去鼠尾胶, 以结晶紫进行细胞染色, 计数进入 Transwell 小孔的细胞数, 计算细胞侵袭率。

2.8 统计学方法

应用 SPSS 13.0 统计软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量资料采用方差分析, 计数资料采用 χ^2 检验。

3 结果

3.1 Western blotting 实验结果

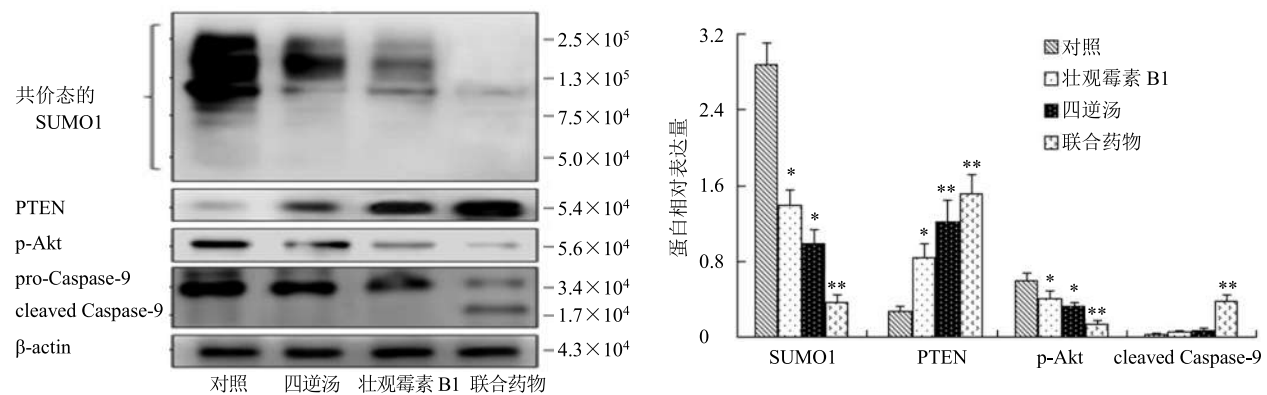
对照组中的 A549 细胞表达高水平的共价态 SUMO1、p-Akt, 但低表达 PTEN 和活化状态的 Caspase-9; 但在四逆汤和壮观霉素 B1 单用组及联合药物组共价态 SUMO1 和 p-Akt 的蛋白水平均明显降低 ($P < 0.05, 0.01$), 而 PTEN 和活化状态的 Caspase-9 蛋白水平明显升高 ($P < 0.05, 0.01$); 联合药物组中 A549 细胞表达的共价态 SUMO1 和 p-Akt 的蛋白水平较药物单用组进一步下降, 而 PTEN 和活化状态的 Caspase-9 蛋白水平进一步升高, 结果见图 1。

3.2 MTT 实验结果

结果显示, 对照组的 A549 细胞增殖旺盛, 呈现对数生长趋势; 但四逆汤组和壮观霉素 B1 组的 A549 细胞生长速度明显低于对照组 ($P < 0.05$); 与其他 3 组比较, 联合药物组的 A549 细胞增殖速度最慢 ($P < 0.01$), 结果见图 2。

3.3 流式细胞术检测结果

流式细胞术检测结果显示, 对照组中的 A549 细胞仅有较低比例细胞出现凋亡, 凋亡率为 (9.13 \pm 1.66) %, 但在四逆汤组和壮观霉素 B1 组的 A549



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as below

图 1 各组 A549 细胞中目标蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Expression of target protein of A549 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

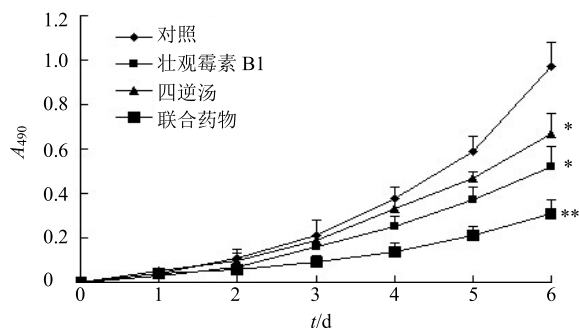


图 2 各组细胞的增殖速度比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Comparison of proliferation rate of A549 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

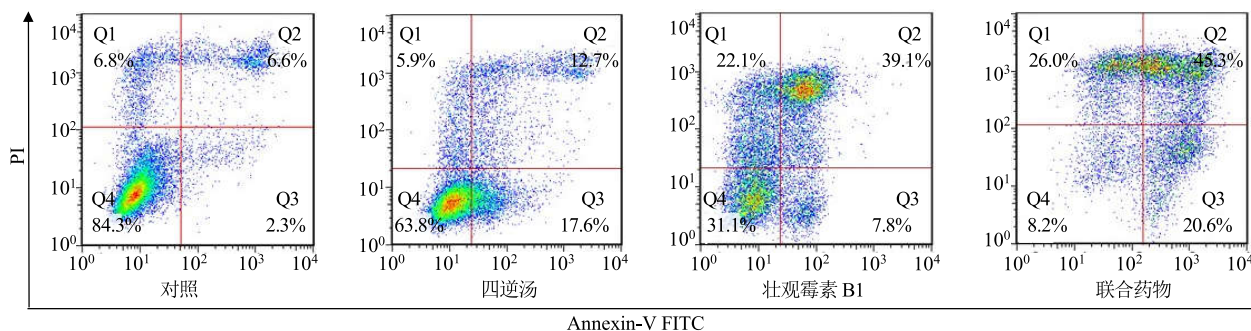


图 3 流式细胞术检测各组细胞的凋亡情况

Fig. 3 Apoptosis of A549 cells in different groups detected by flow cytometry

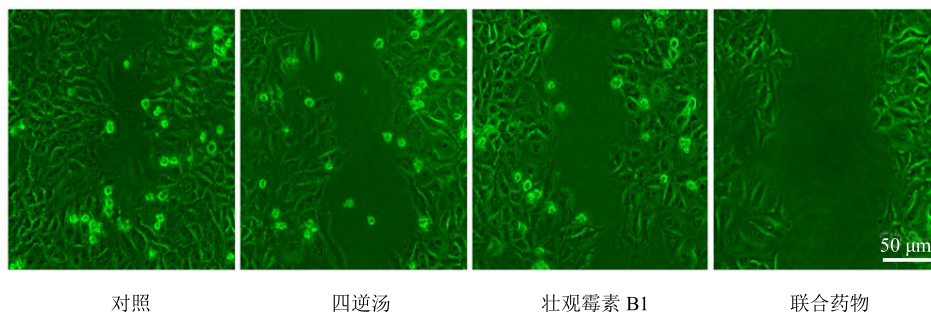


图 4 细胞划痕实验检测各组细胞的迁移能力 ($\times 200$)

Fig. 4 Migration of A549 cells in each group examined by scratch test ($\times 200$)

3.5 Transwell 实验结果

对照组中的 A549 细胞向 Transwell 下室迁移的细胞比例为 (76.21 ± 8.44) %; 四逆汤组和壮观霉素 B1 组的 A549 细胞向下室迁移的细胞比例分别为 (51.59 ± 5.42) % 和 (46.08 ± 4.95) %, 联合药物组的 A549 细胞向下室迁移的细胞比例为 (17.24 ± 3.46) %; 各组间比较差异显著 ($P < 0.05$), 结果见图 5。

4 讨论

吸烟及大气污染等持续致病因子可致肺上皮细胞发生单个或多个基因的序惯性改变^[9]。从基因

细胞凋亡率分别为 (29.14 ± 3.61) % 和 (45.07 ± 4.67) %, 联合药物组的 A549 细胞凋亡率最高, 为 (65.75 ± 5.91) %; 各组间比较差异显著 ($P < 0.01$), 结果见图 3。

3.4 细胞划痕实验结果

对照组中的 A549 细胞迁移距离最长, 为 (74.11 ± 7.49) μm; 四逆汤组和壮观霉素 B1 组的 A549 细胞迁移距离分别为 (59.52 ± 5.67)、(44.63 ± 4.69) μm, 联合药物组的 A549 细胞迁移距离最短, 为 (25.54 ± 4.02) μm; 各组间比较差异显著 ($P < 0.05$), 结果见图 4。

表达水平干预癌基因表达或促进抑癌基因的表达均是可选择的治疗方案^[10]。PTEN 是表皮生长因子受体/PI3K/Akt 通路的重要抑制基因, 诱导 PTEN 过表达常被用作靶向肿瘤治疗^[11]。近年来有报道 SUMO 化修饰参与 PTEN 蛋白在细胞中的动态平衡。一般认为, PTEN 蛋白的过度 SUMO 化修饰可致其被蛋白水解酶降解的程度加重, 进而降低 PTEN 蛋白在肿瘤细胞中的积累, 使其对 PI3K/Akt 下游通路的抑制作用减弱甚至消除, 促进癌症进展^[3]。因此诱导 PTEN 蛋白去 SUMO 化修饰, 恢复 PTEN 在细胞中的含量, 还原其对 PI3K/Akt 下游通路的抑制

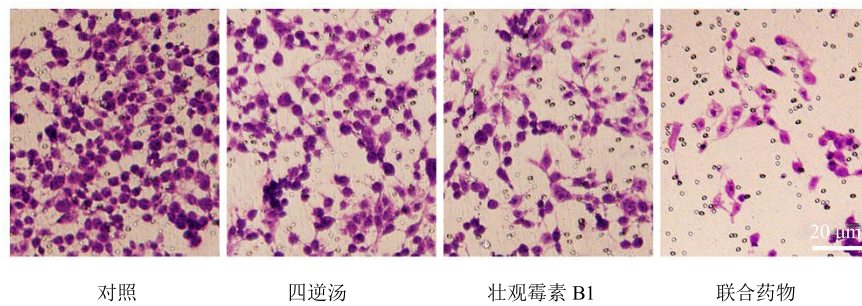


图 5 Transwell 实验检测各组细胞的侵袭能力 (×200)

Fig. 5 Invasive ability of A549 cells in each group detected by Transwell migration assay (× 200)

作用是肿瘤治疗的潜在方向。Hirohama 等^[4]报道壮观霉素 B1 能够有效抑制 SUMO 通路中唯一的 E2 结合酶 Ubc9 功能, 因此发挥其去 SUMO 化作用, 调节细胞机能。但是作为机体细胞的正常所需, 蛋白质的 SUMO 化修饰过程参与众多生理活动, 全面抑制蛋白质 SUMO 化修饰无疑将给机体带来巨大副作用。因此寻找壮观霉素 B1 的替代品或者通过其他途径降低壮观霉素 B1 的用药剂量, 减轻副反应发生程度是新的治疗方案选择。

近年来国家大力推广传统中医药的开发和利用, 力求从分子水平科学认识中医药的药物作用机制, 为中医药专业或中西医结合专业发展奠定基础。通过筛选发现温里剂四逆汤能够有效诱导蛋白质去 SUMO 化, 并发挥一定的肿瘤抑制作用。但是单纯由四逆汤诱导的蛋白质去 SUMO 化程度及肿瘤生长抑制程度均很有限, 难以达到最大化抑制或消除肿瘤的作用, 因此推测将四逆汤与壮观霉素 B1 联合应用可能发挥协同作用, 降低各自用量, 有效发挥肿瘤抑制作用的同时降低药物副作用。

本研究首先以 Western blotting 方法检测了不同处理方式下 A549 细胞中的蛋白表达情况。结果显示 A549 细胞中存在较高水平的共价结合状态的 SUMO1 蛋白表达, 加入四逆汤和壮观霉素 B1 均能够有效降低共价态 SUMO1 蛋白水平, 其中壮观霉素 B1 组的去 SUMO 化效果强于四逆汤组。该结果表明壮观霉素 B1 的去 SUMO 化修饰作用强烈, 而四逆汤的去 SUMO 化修饰作用相对温和, 提示传统中药四逆汤作为诱导蛋白质去 SUMO 化的治疗药物可能存在更小的治疗副作用。进一步的结果发现, 随着共价态 SUMO1 蛋白水平的下降, PTEN 的蛋白表达水平反向升高, 提示四逆汤和壮观霉素 B1 可能通过诱导 PTEN 蛋白的去 SUMO 化修饰机

制而使 PTEN 蛋白免于被蛋白水解酶降解, 从而稳定在较高的水平, 进而抑制 PI3K/Akt 下游通路, 发挥肿瘤生长抑制作用。为验证此推论, 进一步检测了 p-Akt 水平和活化 Caspase-9 的蛋白表达水平。结果显示壮观霉素 B1 和四逆汤均能够降低 p-Akt 水平, 并增加活化 Caspase-9 的蛋白水平。这些结果表明壮观霉素 B1 和四逆汤均能够通过降低蛋白质 SUMO 化修饰水平, 提高抑癌基因 PTEN 的表达, 进而抑制 Akt 磷酸化, 并同时活化凋亡相关基因 Caspase-9, 诱导细胞产生凋亡。这也被接下来的体外细胞培养实验所证实。体外实验结果显示, 壮观霉素 B1 和四逆汤均能够抑制 A549 细胞的增殖、迁移和侵袭, 同时促进细胞凋亡。

为进一步观察壮观霉素 B1 和四逆汤是否对肺癌细胞的生长具有协同抑制作用, 对体外培养的 A549 细胞进行了壮观霉素 B1 和四逆汤的联合治疗。结果显示壮观霉素 B1 和四逆汤的联合使用能够明显进一步降低共价态 SUMO1 和 p-Akt 表达水平, 升高 PTEN 和活化 Caspase-9 水平。其对体外培养的 A549 细胞的生长抑制作用, 迁移和侵袭的抑制作用, 以及促进细胞凋亡作用均强于单纯壮观霉素 B1 或四逆汤治疗。提示二者联合应用对靶蛋白的去 SUMO 化修饰作用和肿瘤治疗效果明显优于单一药物治疗。

总之, 本研究首次将传统中药四逆汤与化学药壮观霉素 B1 联合应用, 发现二者联合应用能够高效诱导肺癌细胞中的蛋白质去 SUMO 化修饰水平, 更好地抑制肺癌增殖、转移和侵袭, 增加癌细胞凋亡。这些结果提示四逆汤与壮观霉素 B1 在药物作用机制上可能存在相互协同作用, 在增强药物疗效的同时可能减少相互用药剂量, 特别是壮观霉素 B1 的剂量, 从而降低副反应程度。其联合作用在体内

的效果还需要进一步探索和验证。

参考文献

- [1] Herbst R S, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer [J]. *Nature*, 2018, 553(7689): 446-454.
- [2] Lee Y R, Chen M, Pandolfi P P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: New modes and prospects [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(9): 547-562.
- [3] Bawa-Khalife T, Yang F M, Ritho J, et al. SENP1 regulates PTEN stability to dictate prostate cancer development [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(11): 17651-17664.
- [4] Hirohama M, Kumar A, Fukuda I, et al. Spectomycin B1 as a novel SUMOylation inhibitor that directly binds to SUMO E2 [J]. *ACS Chem Biol*, 2013, 8(12): 2635-2642.
- [5] Lin C H, Liu S Y, Lee E H. SUMO modification of Akt regulates global SUMOylation and substrate SUMOylation specificity through Akt phosphorylation of Ubc9 and SUMO1 [J]. *Oncogene*, 2016, 35(5): 595-607.
- [6] 高静东, 陈嘉璐, 李湧健, 等. 四逆汤组成药物不同配伍对 Lewis 肺癌小鼠血清血管内皮生长因子表达的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2012, 35(7): 470-474.
- [7] 陈嘉璐, 李湧健, 张晓迪, 等. 四逆汤上调 p53 蛋白表达诱导肝癌细胞凋亡研究 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(2): 548-551.
- [8] 王倩. 四逆汤诱导肺腺癌 A549 细胞凋亡及对 MAPK 信号通路影响研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2017.
- [9] Rotow J, Bivona T G. Understanding and targeting resistance mechanisms in NSCLC [J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(11): 637-658.
- [10] Gazdar A F, Bunn P A, Minna J D. Small-cell lung cancer: What we know, what we need to know and the path forward [J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(12): 725-737.
- [11] Song M S, Salmena L, Pandolfi P P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(5): 283-296.