

天佛参口服液对 A549 细胞体内外增殖的影响及机制研究

张丹丹, 翟云良[#], 季芳, 张亚云, 夏扬, 李全, 王恒斌*

雷允上药业集团有限公司, 江苏 苏州 215009

摘要: 目的 探究天佛参口服液对人非小细胞肺癌 A549 细胞与裸鼠移植瘤增殖的作用以及相关作用机制。方法 采用 Cell Titer-Glo 发光法检测天佛参口服液对 9 种不同基因突变表型的肺癌细胞系增殖的抑制作用; 采用流式细胞术检测天佛参口服液对 A549 细胞周期及凋亡的影响; 采用 Western blotting 法考察天佛参口服液对 A549 细胞增殖相关蛋白表达的影响。裸鼠 sc A549 细胞建立裸鼠移植瘤模型, 考察天佛参口服液对小鼠皮下移植瘤生长的影响。结果 天佛参口服液抑制 A549 细胞增殖, 呈剂量相关性; 天佛参口服液阻滞 A549 细胞周期于 G₀/G₁ 期和 G₂/M 期 ($P < 0.05$ 、 0.01), 并且 1% 天佛参口服液可以显著诱导 A549 细胞凋亡 ($P < 0.01$); 天佛参口服液显著抑制表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、Raf、丝裂原细胞外信号调节激酶 (mitogen extracellular signal-regulated kinase, MEK) 以及细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinase, ERK) 蛋白的磷酸化水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 呈剂量相关性。体内实验结果显示, 2.25 mL/kg 天佛参口服液对裸鼠移植瘤模型的肿瘤体内生长具有显著抑制作用 ($P < 0.05$)。结论 天佛参口服液对 A549 细胞的体内外生长具有显著抑制作用, 其作用机制可能与抑制 EGFR 活性和下调 Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路表达有关。

关键词: 天佛参口服液; 肺癌; A549 细胞; 增殖; 裸鼠移植瘤模型; 抗肿瘤

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)21-6568-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.21.015

Effect and mechanism of Tianfoshen Oral Liquid on proliferation of A549 cells *in vitro* and *in vivo*

ZHANG Dan-dan, ZHAI Yun-liang, JI Fang, ZHANG Ya-yun, XIA Yang, LI Quan, WANG Heng-bin

Lei Yun Shang Pharmaceutical Group Co., Ltd., Suzhou 215009, China

Abstract: Objective To investigate the effect and related mechanism of Tianfoshen Oral Liquid (天佛参口服液) on cell proliferation in A549 cells and lung cancer mice transplantable tumor in model animals. **Methods** Cell Titer-Glo assay was used to detect the inhibitory effect of Tianfoshen Oral Liquid on proliferation of nine different gene mutation phenotypes of lung cancer cell lines; Flow cytometry was applied to determine the effect of Tianfoshen Oral Liquid on cell cycle and apoptosis of A549 cells; Western blotting was used to explore the effect of Tianfoshen Oral Liquid on expression of proliferation-related proteins in A549 cells. Nude mice were sc A549 cells to establish nude mice xenograft tumor model, the effect of Tianfoshen Oral Liquid on growth of subcutaneous xenograft tumors in mice was investigated. **Results** Tianfoshen Oral Liquid inhibited the proliferation of A549 cells, with dose-dependent; Tianfoshen Oral Liquid blocked the A549 cell cycle in G₀/G₁ and G₂/M phases ($P < 0.05$, 0.01), and 1% Tianfoshen Oral Liquid significantly induced apoptosis of A549 cells ($P < 0.01$); Tianfoshen Oral Liquid significantly inhibited epidermal growth factor receptor (EGFR), Raf, mitogen extracellular signal-regulated kinase (MEK) and extracellular regulated protein kinase (ERK) protein phosphorylation levels ($P < 0.05$, 0.01), showing a dose-dependent. The results of *in vivo* experiments showed that 2.25 mL/kg Tianfoshen Oral Liquid had a significant inhibitory effect on tumor growth in nude mice transplanted tumor models ($P < 0.05$). **Conclusion** Tianfoshen Oral Liquid has a significant inhibitory effect on growth of A549 cells *in vivo* and *in vitro*, and its mechanism may be related to the inhibition of EGFR activity and down-regulation of Ras/Raf/MEK/ERK signal pathway expression.

Key words: Tianfoshen Oral Liquid; lung cancer; A549 cells; proliferation; nude-mice transplanted tumor model; anti-cancer

收稿日期: 2021-04-14

作者简介: 张丹丹 (1988—), 女, 博士, 主要从事中药药理毒理基础研究。E-mail: zhangdandan@lys.cn

*通信作者: 王恒斌 (1972—), 男, 高级工程师, 主要从事中药新药开发及上市后研究。E-mail: wanghengbin@lys.cn

[#]共同第一作者: 翟云良 (1988—), 男, 硕士, 主要从事中药药理及临床研究。E-mail: zhaiyunliang@lys.cn

肺癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一，发病率和死亡率位居恶性肿瘤之首。近年来我国肺癌发病率呈逐渐上升趋势，非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer, NSCLC）约占所有肺癌的 80%~85%^[1-2]，其中 30%~70% 的患者确诊时已处于晚期，5 年生存率仅为 17.7%^[3]。因此大部分肺癌患者在确诊时已经失去最佳手术时机，化疗成为临床晚期肺癌患者的主要治疗手段，而晚期肺癌患者由于化疗药物的各种不良反应及继发的耐药情况极易导致化疗失败。天佛参口服液是一种已被批准生产的抗癌中成药，由西洋参、蟾酥、天冬、倒卵叶五加、猕猴桃根、沙棘、土贝母、佛手 8 味中药制成，具有扶正祛邪、养阴益气、清热解毒、消核散结的功效，主治恶性肿瘤所致的气阴两虚型及气滞、血瘀、痰凝、毒聚等兼见症候。临床研究表明，天佛参口服液联合化疗药治疗 NSCLC 疗效明显，可以降低化疗药的不良反应，并提升晚期肺癌患者的生活质量，延长患者生存期^[4-7]。本研究以人非小细胞肺癌 A549 细胞作为研究对象，探究天佛参口服液对其体内外增殖的作用及作用机制，以期为天佛参口服液用于治疗/辅助治疗肺癌及其抗肿瘤活性提供新的科学依据。

1 材料

1.1 细胞株

人非小细胞肺癌 NCI-H2228 细胞、人大细胞肺癌 NCI-H1299 细胞、A549 细胞、人大细胞肺癌 NCI-H460 细胞、人非小细胞肺癌 NCI-H23 细胞、人肺癌腺癌 NCI-H1792 细胞和人肺退行性癌 Calu-6 细胞购自美国 ATCC；人肺腺癌 NCI-H1975 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院；人非小细胞肺癌 NCI-H157 细胞购自北京银紫晶生物医药技术有限公司。

1.2 动物

SPF 级雄性 BALB/c 裸鼠，6~8 周龄，体质量 18~20 g，购自北京大学医学部实验动物中心，动物许可证号 SCXK（京）2016-0010。动物饲养于 SPF 动物房中，温度 20~24 °C，湿度 40%~60%，照明 12 h/d。动物实验经中国中医科学院中药研究所动物实验控制与监督委员会批准（批准号 2018-027）。

1.3 试剂

天佛参口服液（体外实验生产批号 1404281、体内实验生产批号 1805031）由常熟雷允上制药有

限公司生产，本品含西洋参不得少于 0.35 mg/mL [以人参皂苷 Rb₁ (C₅₄H₉₂O₂₃) 计]；DMEM 培养基、RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco 公司；胎牛血清、胰酶购自美国 Hyclone 公司；Cell Titer-Glo® 发光法细胞活力检测试剂盒购自美国 Promega 公司；磷酸化表皮生长因子受体（phosphorylated epidermal growth factor receptor, p-EGFR）抗体、EGFR 抗体、p-b-Raf 抗体、b-Raf 抗体、磷酸化丝裂原细胞外信号调节激酶（phosphorylated mitogen extracellular signal-regulated kinase, p-MEK）抗体、MEK 抗体、磷酸化细胞外调节蛋白激酶（phosphorylated extracellular regulated protein kinases, p-ERK）抗体、ERK 抗体、β-actin 抗体、二抗均购自美国 CST 公司；PE-Annexin V 凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司；PBS 溶液、RNase A 溶液（不含 DNase）购自北京索莱宝科技有限公司；碘化丙啶（PI）购自美国 Sigma 公司。

1.4 仪器

1300 系列 A2 生物安全柜（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；Optec 倒置显微镜（重庆奥特光学仪器有限公司）；Envision 多功能酶标仪（美国 PerkinElmer 公司）；Guava EasyCyte 流式细胞仪（美国 Millipore 公司）。

2 方法

2.1 药物配制

体外实验以天佛参口服液作为原液（浓度视为 100%），每次使用前用无菌的 3% 蔗糖水溶液稀释成需要的浓度，再经培养基稀释成终浓度分别为 10.000 00%、3.330 00%、1.110 00%、0.370 00%、0.123 00%、0.041 20%、0.013 70%、0.004 57% 8 个浓度梯度进行细胞干预；动物实验中，用蒸馏水将天佛参口服液原液稀释成 4.44、2.22 倍的浓度分别用于低、高剂量组的动物给药，现配现用。

2.2 细胞培养

各细胞株用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 mg/L 链霉素，于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养，待细胞融合度为 70% 时，进行传代，取对数期、生长状态良好的细胞进行实验。

2.3 Cell Titer-Glo 法检测 9 种不同基因突变表型的肺癌细胞系活力

取处于对数生长期的细胞，经胰酶消化后接种于 96 孔板中，180 μL/孔，其中 A549 细胞接种密度为 1×10³/孔，NCI-H2228 细胞接种密度为 4×10³/孔，

其余细胞接种密度为 2×10^3 /孔, 培养 24 h。由于天佛参口服液的溶剂为 3% 蔗糖, 因此用 3% 蔗糖水溶液将天佛参口服液进行稀释, 最高浓度取天佛参口服液原液的 10%, 并进行 3 倍梯度稀释, 每个浓度取 20 μ L 加入到受试细胞中, 3% 蔗糖水溶液处理组为对照孔。处理 72 h 后, 弃去培养基, 加入 25 μ L Cell Titer-Glo[®] 试剂, 室温振荡混匀 2 min, 静止 10 min 后, 采用酶标仪读取 Luminescence 荧光信号, 使用 GraphPad Prism 5.0 软件计算天佛参口服液对细胞增殖抑制的半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC_{50}) 值。

2.4 流式细胞仪测定 A549 细胞周期分布

将 A549 细胞以 2.5×10^5 /孔接种于 6 孔板中, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。加入终浓度分别为 0.030%、0.060%、0.125%、0.250%、0.500% 的天佛参口服液, 对照组加入 3% 蔗糖水溶液, 处理 24 h 后用胰酶消化并收集细胞。收集的细胞样品用预冷的 PBS 溶液洗涤 2 遍, 用 70% 乙醇-PBS 溶液吹散细胞, 4 $^{\circ}$ C 固定过夜; 用预冷的 PBS 溶液洗涤 2 遍, 尽量去除残留的乙醇; 样品用含 50 μ g/mL RNase-A 和 PI 的染液进行染色, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, 采用流式细胞仪检测细胞周期, 通过 FlowJo 3.0 软件进行数据分析。

2.5 流式细胞仪测定 A549 细胞凋亡情况

取对数生长期的 A549 细胞, 以 2.5×10^5 /孔接种于 6 孔板中, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。加入终浓度分别为 0.01%、0.10%、1.00% 的天佛参口服液, 对照组加入 3% 蔗糖水溶液, 处理 24 h 后用胰酶消化并收集细胞。收集的细胞样品用预冷的 PBS 溶液洗涤 2 遍, 重悬于 50 μ L 结合液中, 每管加入 2.5 μ L PE-Annexin V 试剂和 2.5 μ L 7-AAD 试剂; 对照组加入 200 μ L 结合液, 均分成 4 等份: 1 份不加任何染料, 1 份加入 2.5 μ L PE-Annexin V 试剂, 1 份加入 2.5 μ L 7-AAD 试剂, 另 1 份加入 2.5 μ L PE-Annexin V 试剂和 2.5 μ L 7-AAD 试剂。温和混匀, 避光室温孵育 15 min, 每份样品加入 150 μ L 结合液混匀, 1 h 内采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.6 Western blotting 法检测 A549 细胞 p-EGFR、EGFR、p-b-Raf、b-Raf、p-MEK、MEK、p-ERK 和 ERK 蛋白表达情况

取对数生长期的 A549 细胞, 以 5×10^5 /孔接种于 6 孔板中, 每组样品设 3 个复孔, 培养 24 h。加入终浓度分别为 0.001%、0.010%、0.100% 的天佛参

口服液, 对照组加入 3% 蔗糖水溶液, 分别处理 0、10、20、30、45、60、90、120、240 min, 用胰酶消化并收集细胞, 收集的细胞样品用预冷的 PBS 溶液清洗 1 次, 加入细胞裂解液 (1% NP-40、20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0、137 mmol/L NaCl、10% 甘油、磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂), 冰上裂解 15 min; 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质量浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 5% 脱脂奶粉封闭, 分别加入 p-EGFR、EGFR、p-b-Raf、b-Raf、p-MEK、MEK、p-ERK、ERK 和 β -actin 抗体, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; TBST 洗膜后, 加入二抗, 室温孵育 1 h, TBST 清洗后, X 光曝光显影, 采用 Image J 灰度分析软件进行定量分析。

2.7 裸鼠移植瘤模型

BALB/c 裸鼠适应性喂养 7 d 后, 随机分为模型组和天佛参口服液高、低剂量 (4.50、2.25 mL/kg, 分别相当于临床剂量的 1/2、1/4 倍) 组, 每组 6 只。造模当天取对数生长期的 A549 细胞胰酶消化, 细胞计数后以预冷的 0.9% 的氯化钠溶液制备成 5×10^6 /mL 细胞悬液备用。BALB/c 裸鼠用 75% 乙醇消毒右侧腋下皮肤, 每只裸鼠右腋 sc 0.2 mL A549 细胞悬液^[19], 造模后 24 h 开始给药。以给药当天为第 1 天, 各给药组 ig 相应药物 (10 mL/kg), 模型组 ig 等体积的蒸馏水, 1 次/d, 连续 48 d。第 10 天肿瘤开始陆续出现, 于接种第 20 天 (即给药第 19 天) 开始使用游标卡尺测量肿瘤长径 (mm) 和短径 (mm), 并计算肿瘤体积。每 2~4 天测 1 次, 保持 1 周测 2 次。动物给药第 48 天进行安乐死, 剥离肿瘤称定质量, 计算抑瘤率。

$$\text{肿瘤体积} = 1/2 \times \text{肿瘤长径} \times \text{肿瘤短径}^2$$

$$\text{抑瘤率} = (\text{模型组平均瘤质量} - \text{给药组平均瘤质量}) / \text{模型组平均瘤质量}$$

2.8 统计学分析

用 SPSS 17.0 软件对数据进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间均数比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 天佛参口服液对不同肺癌细胞系增殖的抑制作用

如图 1 和表 1 所示, 天佛参口服液对 9 种不同基因突变表型的肺癌细胞系均存在不同程度的抑制作用, 其中以 N-Ras 突变的 NCI-H1299 细胞和 K-Ras 突变的 A549 细胞对天佛参口服液最敏感,

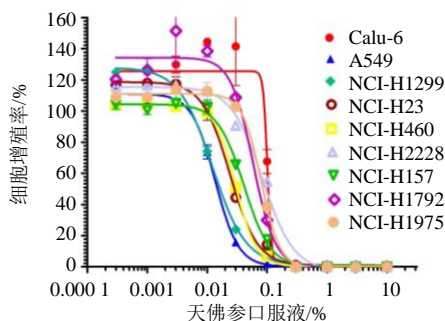


图1 天佛参口服液对不同肺癌细胞增殖的抑制作用

Fig. 1 Inhibitory effect of Tianfoshen Oral Liquid on proliferation of different lung cancer cell lines

IC₅₀ 分别为 0.012% 和 0.013%，并且浓度超过 0.3% 的天佛参口服液能够完全抑制并杀死 9 种不同基因突变表型的肺癌细胞系。

3.2 天佛参口服液对 A549 细胞周期的影响

细胞增殖抑制与细胞周期分布密切相关。根据细胞增殖实验结果，进一步检测不同浓度天佛参口服液对其敏感细胞株 A549 的细胞周期分布影响，结果如图 2 和表 2 所示，A549 细胞经不同浓度天佛参口服液处理 24 h 后，与对照组比较，0.030% 天佛参口服液组 G₀/G₁ 期细胞显著增加 (P<0.01)，而

表 1 天佛参口服液对不同肺癌细胞增殖的抑制作用 (n = 2)

Table 1 Inhibitory effect of Tianfoshen Oral Liquid on proliferation of different lung cancer cell lines (n = 2)

细胞株	基因型	IC ₅₀ /%
Calu-6	p16INK4 缺失	0.107
A549	K-Ras 突变	0.013
NCI-H1299	N-Ras 突变	0.012
NCI-H23	K-Ras 突变	0.024
NCI-H460	K-Ras 突变	0.030
NCI-H2228	EML4-ALK 融合	0.084
NCI-H157	P53 突变	0.041
NCI-H1792	K-Ras 突变	0.062
NCI-H1975	EGFR (T790M, L858R)	0.079

0.060%、0.125%、0.250%、0.500% 天佛参口服液组 G₂/M 期细胞显著增加 (P<0.01)，表明低浓度的天佛参口服液能够使 A549 细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期，而浓度超过 0.06% 的天佛参口服液能够明显阻滞 A549 细胞于 G₂/M 期，并成剂量相关性。

3.3 天佛参口服液对 A549 细胞凋亡的影响

细胞凋亡指为维持内环境稳定，由基因控制的细胞自主的有序的死亡。与对照组相比，肿瘤细胞存在明显的抗凋亡现象。如图 3 和表 3 所示，0.10%、1.00% 天佛参口服液显著诱导 A549 细胞发生晚期

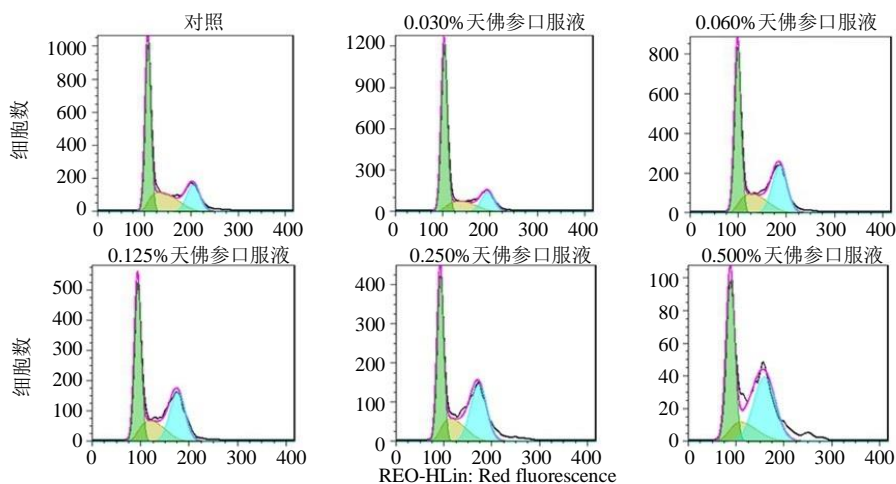


图 2 天佛参口服液对 A549 细胞周期的影响

Fig. 2 Effect of Tianfoshen Oral Liquid on cell cycle of A549 cells

表 2 天佛参口服液对 A549 细胞周期分布的影响 (x̄ ± s, n = 3)

Table 2 Effect of Tianfoshen Oral Liquid on cell cycle distribution of A549 cells (x̄ ± s, n = 3)

组别	剂量/%	G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期
对照	—	52.08 ± 1.04	27.67 ± 1.01	20.25 ± 1.98
天佛参口服液	0.030	65.55 ± 1.25**	17.77 ± 0.96**	16.69 ± 0.57*
	0.060	46.86 ± 1.97*	21.92 ± 0.70**	31.21 ± 1.27**
	0.125	45.04 ± 1.44**	21.71 ± 0.57**	33.25 ± 0.87**
	0.250	41.89 ± 1.78**	20.49 ± 0.77**	37.62 ± 1.03**
	0.500	41.05 ± 1.23**	15.75 ± 0.65**	43.21 ± 0.58**

与对照组比较: *P<0.05 **P<0.01, 表 3 同

*P < 0.05 **P < 0.01 vs control group, same as table 3

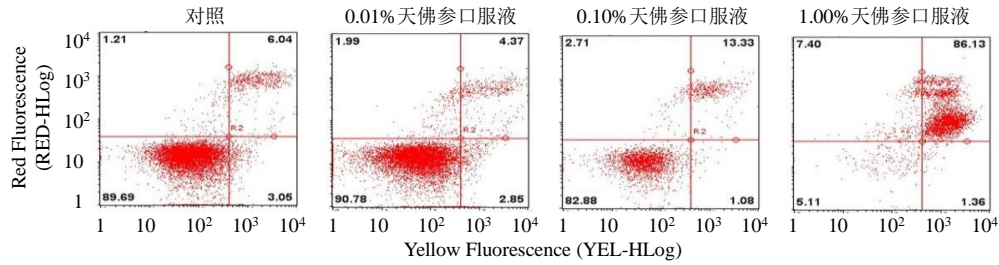


图3 天佛参口服液对 A549 细胞凋亡的影响

Fig. 3 Effect of Tianfoshen Oral Liquid on cell apoptosis of A549 cells

表3 天佛参口服液对 A549 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of Tianfoshen Oral Liquid on cell apoptosis of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

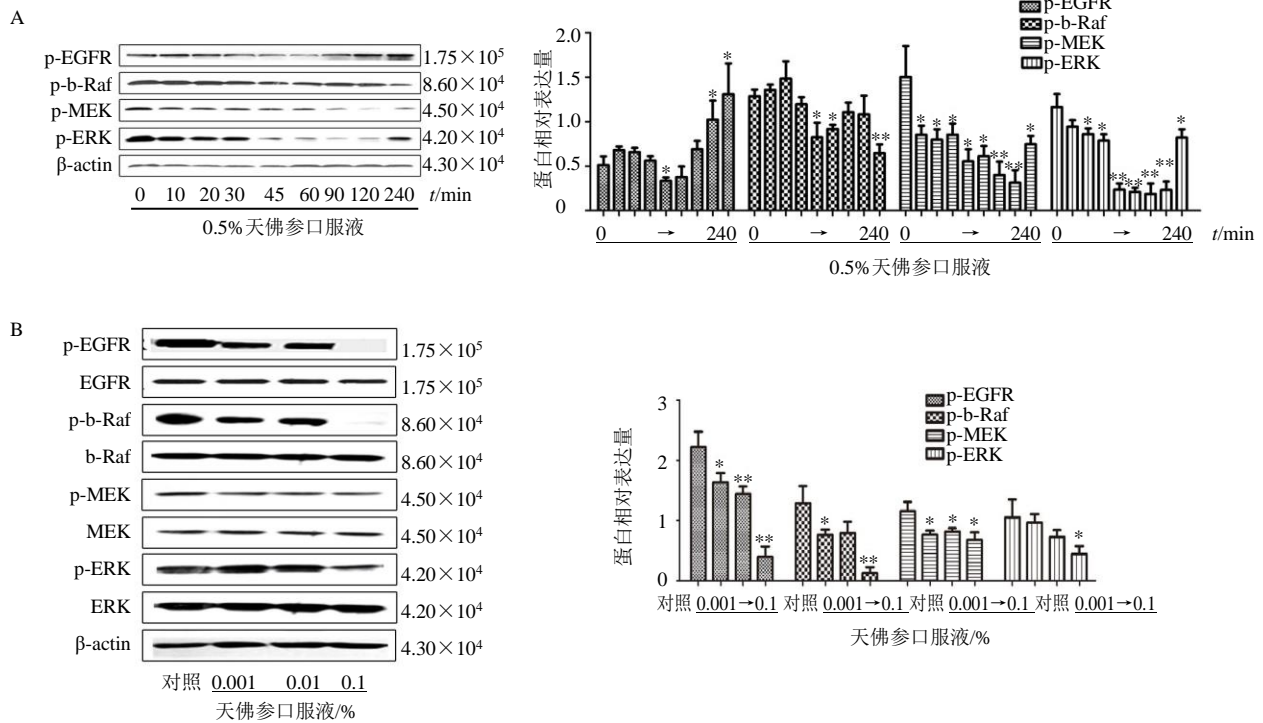
组别	剂量/%	早期凋亡/%	晚期凋亡/%	总凋亡率/%
对照	—	2.95 ± 0.65	5.96 ± 0.97	8.91 ± 0.36
天佛参口服液	0.01	2.88 ± 0.59	4.63 ± 0.59	7.51 ± 1.16
	0.10	1.97 ± 1.74	13.86 ± 1.61**	15.83 ± 3.34*
	1.00	1.57 ± 1.12	85.59 ± 2.23**	87.17 ± 1.12**

凋亡 ($P < 0.05$), 表明高浓度的天佛参口服液能够诱导 A549 细胞凋亡, 并呈剂量相关性。

3.4 天佛参口服液对 A549 细胞增殖相关蛋白表达的影响

为了进一步阐明 TFS 抗肿瘤的作用机制, 检测

了天佛参口服液对增殖信号通路 Ras/Raf/MEK/ERK 磷酸化水平的调节作用。首先观察了 0.5% 天佛参口服液处理 A549 细胞不同时间点对该细胞信号转导通路中 EGFR、Raf、MEK、ERK 蛋白磷酸化的作用, 结果如图 4-A 所示, 0.5% 天佛参口服液



A-0.5% 天佛参口服液作用不同时间对 A549 细胞增殖相关蛋白表达的影响 B-不同剂量天佛参口服液对 A549 细胞增殖相关蛋白表达的影响 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

A-effect of 0.5% Tianfoshen Oral Liquid on expressions of proliferation-related protein in A549 cells at different time B-effect of different doses of Tianfoshen Oral Liquid on expressions of proliferation-related protein A549 cells * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

图4 天佛参口服液对 A549 细胞增殖相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of Tianfoshen Oral Liquid on cell proliferation related protein expression in A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

处理细胞 A549 10 min 时, MEK 和 ERK 蛋白磷酸化水平开始降低; 处理 30 min 时 EGFR 和 b-Raf 蛋白磷酸化水平开始降低, 并于 45 min 时降低最明显, 天佛参口服液对 Raf、MEK 及 ERK 蛋白磷酸化的抑制作用一直持续 2 h 左右, 随后作用缓慢减弱, 于作用 4 h 时 MER 和 ERK 的磷酸化水平开始上调。随后观察了不同浓度天佛参口服液处理 A549 细胞 2 h 对该细胞信号转导通路的作用, 结果如图 4-B 所示, 与对照组比较, 不同浓度天佛参口服液作用 2 h 后均能够不同程度地下调 A549 细胞中 EGFR、Raf、MEK 及 ERK 激酶结构域的磷酸化水平, 并且存在一定的剂量相关性, 且 0.1% 天佛参口服液抑制作用最显著

($P < 0.05$ 、 0.01), 表明天佛参口服液抑制 A549 细胞增殖的作用机制可能与调控 EGFR 活性及其下游信号通路 Ras/Raf/MEK/ERK 有关。

3.5 天佛参口服液对裸鼠移植瘤模型体内肿瘤生长的影响

如图 5 和表 4 所示, 给药 48 d 期间, 与模型组比较, 天佛参口服液高、低剂量 (4.50 、 2.25 mL/kg) 对小鼠体质量均没有明显影响; 天佛参口服液高、低剂量对裸鼠移植瘤模型肿瘤生长均具有一定的抑制作用, 抑瘤率分别达到 27.7% 、 36.7% ; 与模型组比较, 天佛参口服液低剂量组小鼠瘤质量显著降低 ($P < 0.05$)。

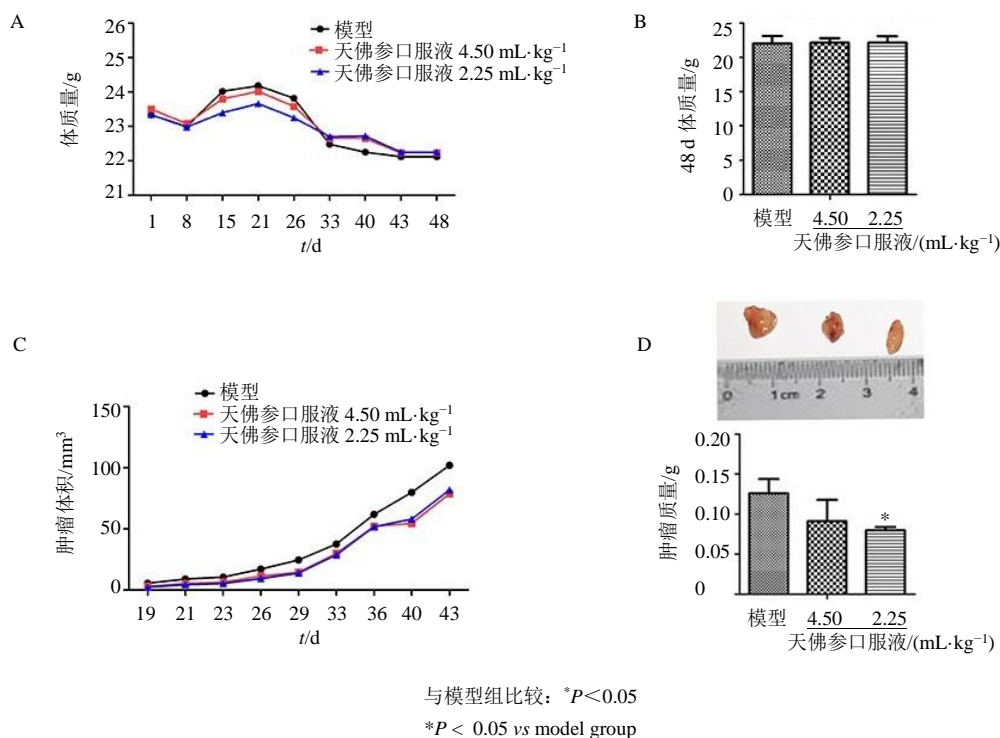


图 5 天佛参口服液对裸鼠移植瘤模型体质量 (A, B)、肿瘤体积 (C) 和肿瘤质量 (D) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Effect of Tianfoshen Oral Liquid on body weight (A, B), tumor volume (C) and tumor weight (D) in nude mice transplanted tumor mode ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 4 天佛参口服液对裸鼠移植瘤模型肿瘤抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effect of Tianfoshen Oral Liquid on tumor inhibition rate in nude mice transplanted tumor mode ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mL·kg ⁻¹)	瘤质量/g	抑瘤率/%
模型	—	0.13 ± 0.02	—
天佛参口服液	4.50	0.09 ± 0.03	27.71
	2.25	0.08 ± 0.01*	36.70

与模型组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs model group

4 讨论

天佛参口服液源于关中名医李新民教授经过长期的临床实践, 反复论证而总结出的抗癌经验方。近年来, 诸多药理研究和临床研究表明天佛参口服液对喉癌^[8]、胃癌、肝癌、宫颈癌^[9]等多种肿瘤细胞均具有良好的抑制作用, 尤其临床用于肺癌的治疗起到很好的效果, 能够提高患者免疫功能, 改善晚期肺癌患者的临床症状和生活质量。此外, 天佛参口服液与化疗药联用可以减轻化疗引起的不良反

应, 达到增效减毒效应, 经临床实践证明为安全有效的治疗非小细胞肺癌的中成药^[10], 但是其抑癌机制尚未阐明。本研究首先通过体外增殖实验全面地观察天佛参口服液对 9 种不同基因突变来源的肺癌细胞系 (Calu-6、A549、NCI-H1299、NCI-H23、NCI-H460、NCI-H2228、NCI-H157、NCI-H1792、NCI-H1975) 的生长抑制作用, 筛选出天佛参口服液的敏感肺癌细胞系为 A549 和 NCI-H1299 细胞。合理的细胞有丝分裂及增殖是生物生存的基础, 而细胞周期失控导致细胞恶性增殖成为肿瘤, 选取 A549 细胞进一步进行细胞周期和细胞凋亡检测, 发现低浓度的天佛参口服液 (0.03%) 能够将 A549 细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期, 高浓度的天佛参口服液 (0.06%~0.50%) 可以阻滞其细胞周期于 G₂/M 期, 此外浓度超过 0.1% 的天佛参口服液可以明显诱导 A549 细胞出现晚期凋亡, 提示天佛参口服液可能通过阻滞细胞周期和诱导细胞凋亡达到抗肺癌作用。

EGFR 是一种具有酪氨酸酶活性的膜表面受体, 在 NSCLC 中常发生突变, 其突变后导致的酪氨酸激酶域过度激活是肺肿瘤发生的原因^[11], EGFR 也是目前 NSCLC 靶向治疗中最重要的靶点之一, EGFR 能够介导细胞的生长和凋亡, 其主要机制是通过 EGFR 配体本身同源二聚化或异源二聚化启动信号通路, 从而引起机体内部的级联反应。Ras/Raf/MEK/ERK-MAPK 通路为 EGFR 介导的下游信号通路中最重要的且作用最广泛的通路^[12], 其主要涉及细胞的生长、增殖、分化、凋亡和转移等生物学过程^[13]。当 Ras 激活时, 细胞质膜大量分泌并活化下游分子 Raf 激酶, 并激发了一系列蛋白激酶激活和磷酸化, 磷酸化的 Raf 和活化 MEK 可进一步激活 ERK, 活化的 ERK 从 Ras-Raf-MEK-ERK 复合体上分离, 并转移至细胞核内, 在此发生磷酸化并激活细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1)、下调 p27 基因从而导致肿瘤细胞增殖, 同时增强抗凋亡蛋白 B 淋巴细胞瘤 2 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2) 和髓细胞白血病-1 (myeloid cell leukemia-1, Mcl-1) 活性, 减少肿瘤细胞的凋亡^[14]。因此该通路的过度激活在 NSCLC 的发生、发展中发挥重要的作用^[15]。Western blotting 结果显示, 天佛参口服液能够抑制 EGFR 活性, 并下调其下游信号通路中 Raf、MEK 以及 ERK 蛋白的磷酸化水平, 且处理细胞 45 min 时作用最强。由此推断天佛参口服液中的有效成分能够通过抑制 EGFR 活性, 降低 Ras/Raf/MEK/ERK 信号通

路中相关蛋白的磷酸化水平, 诱导细胞周期阻滞和细胞凋亡, 从而发挥抑癌效果。

目前, 裸鼠移植瘤模型已被广泛应用于抗肺癌、乳腺癌、前列腺癌、肝癌、胃癌和结肠癌等肿瘤药物的筛选中^[16-19]。课题组前期在 Lewis 肺癌小鼠移植瘤模型上, 发现天佛参口服液剂量在 2.25~4.50 mL/kg 时抑癌效果较好, 为了避免雌性小鼠性周期对造模和药效的影响, 本研究采用雄性 BALB/c 裸鼠皮下接种 A549 细胞建立裸鼠移植瘤模型来评估天佛参口服液 (2.25、4.50 mL/kg) 对 A549 细胞的体内抗肿瘤活性, 结果显示低剂量 (2.25 mL/kg) 的天佛参口服液能够抑制 A549 细胞移植瘤模型的肿瘤体内生长。

综上, 体内外实验表明天佛参口服液对 A549 细胞具有抗肿瘤活性, 可能通过诱导细胞周期阻滞和细胞凋亡来抑制 A549 细胞增殖, 作用机制主要与抑制 EGFR 的活性、下调 Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路表达有关。本研究为天佛参口服液临床用于抗肿瘤治疗或辅助治疗提供了理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade P D, *et al.* Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(1): 7-30.
- [3] Vijayvergia N, Mehra R. Clinical challenges in targeting anaplastic lymphoma kinase in advanced non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2014, 74(3): 437-446.
- [4] 于宏杰, 梁芳, 方萍, 等. 天佛参口服液联合化疗治疗气阴两虚非小细胞肺癌随机平行对照研究 [J]. *实用中医内科杂志*, 2016, 30(6): 59-61.
- [5] 张善兰, 姚红玉, 姜觉如, 等. 天佛参治疗气阴两虚型晚期非小细胞肺癌疗效观察 [J]. *现代肿瘤医学*, 2017, 25(16): 2592-2594.
- [6] 余敏, 田应选, 唐春卉, 等. 天佛参口服液治疗非小细胞肺癌气阴两虚证的临床研究 [J]. *中国肿瘤临床与康复*, 2018, 25(3): 257-261.
- [7] 刘畅, 李枫, 王莉, 等. 天佛参口服液联合 GP 方案治疗老年晚期非小细胞肺癌的近期疗效观察 [J]. *癌症进展*, 2017, 15(3): 294-296.
- [8] 李新民, 党琦. 天佛参口服液(TFS)诱导人喉癌细胞 Hep-2 凋亡及机理探讨 [J]. *中国中西医结合肿瘤杂志*, 2011, 1(1): 11-15.
- [9] 杜秀平, 李新民, 杨峰. 天佛参口服液对体外人癌细胞

- 抑制效应及其对细胞动力学影响的实验研究 [J]. 癌症, 1991, 10(3): 190-192.
- [10] 孔平孝, 陈光伟, 王希胜, 等. 天佛参口服液治疗中晚期恶性肿瘤的临床与实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2001, 21(6): 427-430.
- [11] 张锦锦, 唐慧. 表皮生长因子受体在肿瘤发生、发展中的研究进展 [J]. 中国生物制品学杂志, 2018, 31(4): 425-430.
- [12] 传锋彬, 王雯, 王立宏. EGFR 介导的信号通路影响肺癌细胞增殖与转移的机制 [J]. 实用癌症杂志, 2020, 35(9): 1429-1432.
- [13] Degirmenci U, Wang M, Hu J C. Targeting aberrant RAS/RAF/MEK/ERK signaling for cancer therapy [J]. *Cells*, 2020, 9(1): E198.
- [14] 陈子, 王莹. MEK 抑制剂治疗非小细胞肺癌的研究进展 [J]. 国际呼吸杂志, 2014, 34(4): 269-273.
- [15] 王瑞娟. 非小细胞肺癌 EGFR 信号通路相关 microRNAs 的表达及意义 [D]. 北京: 解放军总医院, 2016.
- [16] Walsh N C, Kenney L L, Jangalwe S, *et al.* Humanized mouse models of clinical disease [J]. *Annu Rev Pathol*, 2017, 12: 187-215.
- [17] Duan Z G, Wei B, Deng J J, *et al.* The anti-tumor effect of ginsenoside Rh4 in MCF-7 breast cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 499(3): 482-487.
- [18] Wu Y W, Hsu K C, Lee H Y, *et al.* A novel dual HDAC6 and tubulin inhibitor, MPT0B451, displays anti-tumor ability in human cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 205.
- [19] 张惠兰, 张珍祥, 徐永健. 环格列酮抑制人肺癌 A549 细胞增殖活性的实验研究 [J]. 中华肿瘤杂志, 2004, 26(9): 531-534.

[责任编辑 李亚楠]