

- dependent[J]. J Natl Cancer Inst, 1990, 82: 4-6.
- [10] Ottinetti A, Sapino A. Morphometric evaluation of microvessels surrounding hyperplastic and neoplastic mammary lesions[J]. Breast Cancer Res Treat, 1988, 11: 241-248.
- [11] Fregene TA, Kellog C, Pienta KJ. Microvessel quantitation as a measure of angiogenic activity in benign breast tissues lesions: a marker for precancerous disease[J]. Int J Oncol 1994, 4: 1199-1202.
- [12] Guidi A, Fischer L, Harris J, et al. Microvessel density and distribution in ductal carcinomas in situ of the breast[J]. J Natl Cancer Inst, 1994, 86: 614-619.
- [13] Engels K, Fox SB, Whitehouse RM, et al. Up-regulation of thymidine phosphorylase expression is associated with high-grade in situ ductal carcinomas of the breast[J]. J Pathol, 1997, 181: 207-212.

(编辑: 梁进权)

益气除痰方对缺氧微环境下 A549 细胞上皮间质转化及 P4HB 表达的影响

孙玲玲, 林丽珠(广州中医药大学第一附属医院肿瘤科, 广东 广州 510405)

摘要: 目的 研究益气除痰方对缺氧条件下 A549 细胞上皮间质转化的影响并初步探讨其与脯氨酸 4-羟化酶 β 亚基(P4HB)、波形蛋白(Vimentin)表达的相关性。方法 将 A549 细胞分为 3 组培养: 常氧对照组(常规培养), 缺氧模型组(加入 CoCl_2 培养模拟缺氧微环境诱导 A549 细胞上皮间质转化), 益气除痰方含药血清组(在 CoCl_2 培养基础上加入益气除痰方含药血清培养)。相差显微镜下观察 3 组 A549 细胞形态的变化; RT-PCR 检测 3 组 A549 细胞 P4HB、Vimentin mRNA 的表达含量。结果 相差显微镜下常规培养的 A549 细胞呈不典型上皮细胞形态, 经 CoCl_2 刺激后, 大部分细胞形态明显拉长, 呈现明显的间质细胞形态。益气除痰方含药血清组与常氧对照组比较间质细胞形态的细胞增多, 较缺氧模型组间质细胞形态的细胞明显减少。缺氧模型组 A549 细胞 P4HB、Vimentin mRNA 的表达量较常氧对照组明显上调, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 益气除痰方含药血清组 P4HB、Vimentin mRNA 的表达量较缺氧模型组明显下调, 差异有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结论 益气除痰方可抑制缺氧诱导的上皮间质转化, 可能与其下调 P4HB mRNA 表达相关。

关键词: 益气除痰方; 脯氨酸 4-羟化酶 β 亚基; 上皮间质转化; 缺氧微环境

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2013)05-0454-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.05.006

Effects of *Yiqi Huata* Decoction on Epithelial-mesenchymal Transition and P4HB Expression in A549 Cells Under Hypoxia Microenvironment

SUN Lingling, LIN Lizhu (Oncology Department of the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of *Yiqi Huata* Decoction (YHD), a herbal recipe with the actions of invigorating qi and removing phlegm, on epithelial-mesenchymal transition (EMT) of A549 cells under the microenvironment of hypoxia, and to explore the correlation of EMT with prolyl 4-hydroxylase beta polypeptide (P4HB) expression. **Methods** Serum containing YHD was prepared. A549 cells were cultured under normal condition (normal group), or co-cultured with CoCl_2 to induce EMT (hypoxia model group), or co-cultured with CoCl_2 and serum containing YHD (medication group). Phase contrast microscopy was applied to observe the morphological change of A549 before and after medication. P4HB and Vimentin mRNA expression in A549 cells was detected by RT-PCR. **Results** Under phase contrast microscope, untreated A549 cells showed atypical features of epithelial cells, and after

收稿日期: 2013-06-20

作者简介: 孙玲玲, 女, 医师, 硕士, 研究方向: 中西医结合抗肿瘤基础及临床。Email: 1257173024@qq.com。通讯作者: 林丽珠, 教授, 博士生导师, 研究方向: 恶性肿瘤中西医结合临床和基础研究。Email: lizhulin903@21cn.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81273963); 广东省自然科学基金重点项目(S2012020010886); 广东省自然科学基金(101510407010000021)。

stimulation with CoCl_2 , most A549 cells became longer, showing obvious interstitial cell morphology. In medication group, cells with interstitial cell morphology were increased ($P > 0.05$ compared with the normal group), while were decreased significantly in comparison of hypoxia model group ($P < 0.05$). The results of RT-PCR showed that P4HB and vimentin mRNA expression levels in hypoxia model group were 2.06 ± 0.08 and 1.37 ± 0.17 , respectively, higher than 1.35 ± 0.19 and 0.56 ± 0.10 in normal group ($P < 0.01$). The expression level of P4HB was 0.87 ± 0.10 , and that of Vimentin mRNA was 0.96 ± 0.17 in the medication group, lower than those in the hypoxia model group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusion** YHD shows inhibitory effect on hypoxia-induced EMT of A549 cells, which is probably related to the down-regulation of P4HB expression.

Keywords: *Yiqi Huata* Decoction; Prolyl 4-hydroxylase beta polypeptide(P4HB); Epithelial-mesenchymal transition (EMT); Microenvironment of hypoxia

肺癌是目前世界上发病率及死亡率最高的恶性肿瘤,有研究表明^[1-2],肺癌 5 年生存率仅为 13%,有区域性播散者为 17%,有远处转移者仅为 1.7%。因此,肺癌的复发和转移是影响临床疗效的重要因素,也是治疗失败和患者死亡的主要原因。益气除痰方是我院肿瘤科治疗肺癌的经验方,具有良好的临床疗效。基础研究^[3]表明益气除痰方可能抑制 LEWIS 肺癌小鼠肿瘤肺转移并可抑制基质金属蛋白酶的分泌。本研究从上皮间质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)的角度,进一步探讨益气除痰方抗肺癌转移的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物及分组 SPF 级 SD 大鼠 20 只,雌性,体重 150~220 g,广州中医药大学实验动物中心提供生产许可证号:SCXK(粤)2008-002,使用许可证号:SYXK(粤)2008-0092。将大鼠随机分为益气除痰方组和空白对照组,各组 10 只。于每天早、晚各 1 次分别灌胃益气除痰方汤剂或生理盐水 $42 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,连续 5 d,第 4 天晚上开始禁食不禁水,末次给药后 1 h 从心脏取血,4℃静置过夜,低速离心分离血清,56℃灭活 30 min,滤膜除菌,分装于 -30℃保存备用。

1.2 益气除痰方药物制备 实验所用中药材均购自广州中医药大学第一附属医院,均为《中国药典》(一部)2010 年版收载品种。按益气除痰方的组成剂量(法夏 15 g、枳实 15 g、人参 15 g、白术 15 g、茯苓 15 g、露蜂房 10 g)准确称取,粉碎后过 30 目筛,经煎药机煎煮成汤剂(按机器规程操作),并经 60℃浓缩成含生药 $2.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 药液,分装密闭于 -20℃保存。

1.3 相差显微镜观察 A549 细胞形态 人肺腺癌细胞 A549 由南方医科大学分子生物实验室惠赠,并分为 3 组进行培养。常氧对照组: A549 培养于含体积分

数为 10%新生牛血清 RPMI-1640 培养液中,置 37℃、体积分数 5% CO_2 、60%湿度的培养箱内培养 10 d。缺氧模型组:用 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CoCl_2 加入 RPMI-1640 培养基处理 A549 细胞,模拟缺氧微环境,置于体积分数 5% CO_2 、60%湿度、37℃培养箱内培养 10 d。益气除痰方含药血清组:用 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CoCl_2 处理 A549 细胞,置于体积分数 5% CO_2 、湿度 60%、37℃培养箱内培养,培养 3 d 后,加 20%益气除痰方含药血清培养 7 d。按上述分组培养,相差显微镜下观察 A549 形态的变化。

1.4 RT-PCR 检测 P4HB、Vimentin mRNA 的表达

上述 3 组细胞,按 Trizol 法提取 RNA,并进行含量和纯度测定。按 RT-PCR 试剂盒(Ferments 公司)说明书进行 RT-PCR 操作。P4HB 上游:5'-GGCAAAATCAAGCCCCACCTG-3',下游:5'-CGTGCGTTCCCCGTGTGAATC-3'。Vimentin 上游:5'-CCCAGATTCAGGAACAGCA-3',下游:5'-AGAGAAGTGACTCCAGGTTAG-3'。GAPDH 上游:5'-ATCACTGCCACCCAGAAGACT-3',下游:5'-CATGCCAGAGGTTCGGTTCGTTT-3'(上海博尚生物公司)。逆转录条件:42℃ 60 min,25℃ 5 min,70℃ 5 min。PCR 条件:94℃起始变性 4 min,94℃变性 30 s,56~58℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,28 个循环后,72℃延伸 5 min。PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像电泳分析系统扫描并照相。以 GAPDH 为内参,采用 Image J 图像分析软件对各电泳条带进行灰度扫描,以各电泳条带灰度扫描面积代表信号强度,分别计算各电泳条带的灰度值。各基因的表达值分别采用各电泳条带的灰度值与内参 GAPDH 的灰度值的比值表示。

1.5 统计学处理方法 采用 SPSS13.0 统计软件。计量资料采用单因素方差分析,组间比较采用 Dunnett

检验。

2 结果

2.1 相差显微镜观察 A549 形态学变化 见图 1。常规培养的 A549 细胞呈不典型上皮细胞形态, 经 CoCl_2 刺激后, 大部分细胞形态明显拉长, 呈现明显的间质细胞形态。益气除痰方含药血清组与常氧对照组比较, 间质细胞形态的细胞增多; 与缺氧模型组比较, 间质细胞形态的细胞明显减少。

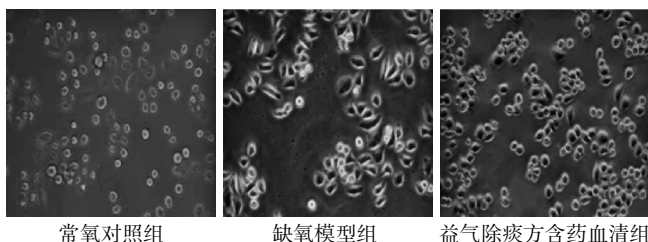


图 1 各组 A549 细胞形态

Figure 1 A549 cell morphology in various groups

2.2 RT-PCR 检测益气除痰方对 A549 细胞 P4HB、Vimentin mRNA 表达的影响 见表 1、图 2。缺氧模型组 A549 细胞 P4HB、Vimentin mRNA 的表达量较常氧对照组明显上调($P < 0.01$); 益气除痰方含药血清组 P4HB、Vimentin mRNA 的表达量较缺氧模型组明显下调($P < 0.01$, $P < 0.05$), 提示益气除痰方含药血清可抑制缺氧诱导的 P4HB、Vimentin 表达。

表 1 各组对 A549 细胞 P4HB、vimentin mRNA 的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Effect of A549 cells on expression of P4HB and Vimentin mRNA

组别	P4HB	Vimentin
常氧对照组	1.35 ± 0.19	0.56 ± 0.10
缺氧模型组	$2.06 \pm 0.08^{**}$	$1.37 \pm 0.17^{**}$
益气除痰方含药血清组	$0.87 \pm 0.10^{##}$	$0.96 \pm 0.17^{\#}$

注: 常氧对照组比较, $^{**}P < 0.01$; 与缺氧模型组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$ 。

3 讨论

上皮间质转化是一个多步骤的动态变化过程, 肿瘤细胞同质型黏附降低, 与细胞外基质发生异质型黏附增加, 使得从原发灶脱离; 立方上皮细胞转变为纺锤形纤维细胞形态并表现出侵袭性; 促进细胞分泌蛋白降解酶类降解细胞外基质成分, 形成肿瘤细胞移动的通道, 并以此为诱导血管生成的基础^[4]。上皮间质转化在促进肿瘤转移中发挥重要作用。缺氧是实体瘤微环境的基本特征之一。研究发现^[5], 缺氧条件下内质网应激激活是诱导上皮间质转化发生的重要机制。

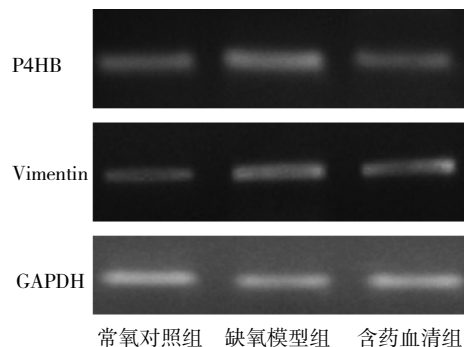


图 2 各组 A549 细胞 P4HB、vimentin mRNA 凝胶电泳图

Figure 2 Gel electrophoregrams of P4HB and vimentin mRNA expression in A549 cells

因此, 药物干预缺氧微环境下, 内质网应激反应信号通路逆转上皮间质转化对肿瘤的治疗具有重要意义。

立方上皮细胞转变为纺锤形纤维细胞形态表现出侵袭性是上皮间质转化中的重要步骤。因此本研究首先以 CoCl_2 构建人非小细胞肺癌 A549 细胞缺氧诱导模型, 利用正常氧条件下, Co^{2+} 通过细胞内离子置换使亚铁螯合酶失活, 抑制细胞氧化反应, 从而达到模拟细胞缺氧的目的^[6]。本研究采用 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CoCl_2 模拟缺氧微环境培养 A549 细胞后, 可见到大部分细胞形态明显拉长, 呈现明显的间质细胞形态。波形蛋白 Vimentin 在上皮间质转化后期细胞呈间质细胞形态时表达明显增高, 具有维持细胞形态作用, 因此被视为上皮细胞间质转化的标志物^[7]。本研究观察到, CoCl_2 模拟缺氧微环境培养 A549 细胞后, A549 细胞 vimentin mRNA 表达明显上调。

既往研究显示, 20 %益气除痰方含药血清作用于 A549 细胞疗效最佳^[8], 因此, 本研究采用 20 %含药血清进行研究。结果表明, 经 20 %益气除痰方含药血清干预后较缺氧模型组呈间质细胞形态的细胞数明显减少, Vimentin mRNA 表达下调, 提示益气除痰方可抑制缺氧条件下 EMT 发生; 脯氨酸 4-羟化酶 β 亚基 (prolyl4-hydroxylase beta polypeptide, P4HB) 是脯氨酸羟化酶 (prolyl hydroxylase, PHD) 的一个 β 亚基。研究表明, 缺氧等引起细胞内质网应激反应可上调 P4HB 表达^[9]。而 P4HB 在促进上皮间质转化并促进肿瘤转移方面具有重要作用。研究发现, P4HB 可能通过促进细胞与细胞外基质异质性黏附及上皮细胞转分化为纺锤形纤维细胞形态等过程调控上皮间质转化。Honma M 等^[10]研究表明, P4HB、Vimentin 在心肌成纤维细胞、皮肤成纤维细胞、肺成纤维细胞中高表达, P4HB 与 Vimentin 可视为成纤维细胞的标志物。Ohtsubo R 等^[11]研究认为, P4HB 在脂肪肉瘤离体

培养时对维持细胞形态起关键作用。以上研究提示 P4HB 可能具有维持间质细胞形态作用。还有研究提示 P4HB 可促进细胞与细胞外基质的异质性黏附；位于细胞表面的 P4HB 可调节整合素 integrin、纤连蛋白介导的细胞与细胞外基质黏附。纤连蛋白能与 P4HB 联合形成一种难溶的二硫化物交连基质并支配二硫化物异构酶(P4HB)活性。使用 P4HB 抑制剂能明显减少纤连蛋白联合成难溶的二硫化物基质，抑制 integrin 介导的细胞黏附^[12]。临床研究亦提示，P4HB 的高表达与转移密切相关，如 Jokilehto 等^[13]观察到头颈部肿瘤中细胞核中 PHD1 表达与纤维化病灶数量呈正相关，PHD2 与淋巴结转移状态及纤维化病灶数量呈正相关。Goplen 等^[14]通过对胶质瘤肿瘤组织进行免疫组化分析发现在某些发生远处转移的胶质瘤病灶边缘高表达，并且转移灶的 P4HB 表达强度较原发灶增强。纤维化病灶是上皮间质转化的结果，肿瘤病灶边缘易发生上皮间质转化促进转移，提示 P4HB 在转移中具有重要作用。

本研究结果表明，缺氧微环境中 P4HB mRNA 表达明显升高，而益气除痰方含药血清组较缺氧模型组 P4HB mRNA 表达降低，提示其可抑制缺氧条件下内质网应激诱导的 P4HB 表达。我们推测益气除痰方可能通过抑制 P4HB 表达拮抗上皮间质转化，尚需进一步深入研究。

参考文献：

- [1] Parkin DM, Bray FB, Pisani P. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2005, 55(2): 74-108.
- [2] 邹小农. 中国肺癌流行病学[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2007, 14(6): 881-883.
- [3] 王淑美, 林丽珠, 熊绍权, 等. 益气除痰方对肺癌系列基质金属蛋白酶的影响[J]. *中药新药与临床药理*, 2011, 22(2): 135-138.
- [4] 高彦, 马秀梅. 上皮间质转化与肿瘤干细胞[J]. *国际肿瘤学杂志*, 2011, 38(11): 809-813.
- [5] 张百红. 缺氧导致肿瘤发生的机制[J]. *国际肿瘤学杂志*, 2012, 39(2): 108-110.
- [6] 仇容, 司马军, 沈香娣, 等. 缺氧诱导对人非小细胞肺癌 A549 凋亡及 Survivin 基因表达的影响[J]. *癌变·畸变·突变*, 2009, 21(1): 24-26.
- [7] Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions[J]. *Clin Invest*, 2009, 119(6): 1429-1437.
- [8] 孙玲玲, 林丽珠. 益气除痰方对 A549 细胞凋亡及凋亡相关基因表达的影响[J]. *广州中医药大学学报*, 2012, 29(1): 49-52.
- [9] G-H Fong, K Takeda. Role and regulation of prolyl hydroxylase domain Proteins[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2008, 15: 635-641.
- [10] Honma M, Koizumi F, Wakaki K, et al. Co-expression of fibroblastic, histiocytic and smooth muscle cell phenotypes on cultured adherent cells derived from human palatine tonsils: a morphological and immunocytochemical study[J]. *Pathol Int*, 1995, 45(12): 903-913.
- [11] Ohtsubo R, Matsui M, Horiguchi H, et al. Characterization of a human cell line derived from liposarcoma tissue: is the beta subunit of prolyl 4-hydroxylase specific for a fibroblastic phenotype in culture cells[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2000, 36(4): 217-221.
- [12] Weston BS, Wahab NA, Roberts T, et al. Bacitracin inhibits fibronectin matrix assembly by mesangial cells in high glucose [J]. *Kidney Int*, 2001, 60(5): 1756-1764.
- [13] Jokilehto T, Rantanen K, Luukkkaa M, et al. Overexpression and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase PHD2 in head and neck squamous cell carcinoma is associated with tumor aggressiveness[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12: 1080-1087.
- [14] Goplen D, Wang J, Enger P, et al. Protein disulfide isomerase expression is related to the invasive properties of malignant glioma[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(20): 9895-9902.

(编辑：邓响潮)

三子养亲汤、桃红四物汤单用及联用治疗哮喘大鼠作用的比较

黄 丰¹, 吴赛春¹, 李满萍¹, 涂苑青¹, 曾 静¹, 童晓云², 李 晓² (1. 暨南大学药学院中药药理教研室, 广东 广州 510632; 2. 云南中医学院第一附属医院老年病科一病区, 云南 昆明 650021)

摘要：目的 比较三子养亲汤、桃红四物汤单用及联用对哮喘大鼠的作用效果。方法 SD 大鼠以卵清白蛋白(OVA)致敏激发复制模型，并予药物进行干预。采用 ELISA 法检测肺泡灌洗液(BALF)中 γ 干扰素(IFN- γ)、白介素 4(IL-4)含量，并用 Western Blot 法检测肺组织中磷酸化 p38 蛋白激酶(p38 MAPK)的表达水平。结果

收稿日期：2013-02-01

作者简介：黄丰，男，副教授，博士，研究方向：中药免疫药理研究。Email: hftxyy@gmail.com。

基金项目：国家自然科学基金资助项目(81073129)。