

- [8] Ou Y, Li W, Li X, et al. Sinomenine reduces invasion and migration ability in fibroblast-like synoviocytes cells co-cultured with activated human monocytic THP-1 cells by inhibiting the expression of MMP-2, MMP-9, CD147[J]. Rheumatol Int. 2011, 31(11): 1479-1485.
- [9] yamanishi, Y, and Firestein, G.S. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: the role of synovioytes [J]. Rheum Dis Clin NorthAm, 2001, 27(2): 355-371.
- [10] Iwanaga, T., Shikiehi, M., Kitamura, H., et al. Morphology and functional roles of synovioytes in the joint [J]. Arch Histol Cytol, 2000, 63(1): 17-31.
- [11] Firestein, GS. Invasive fibroblast-like synovioytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors [J]. Arthritis Rheum, 1996, 39(11): 1781-1790.
- [12] 贾颖. 尼古丁乙酰胆碱受体在烟草相关癌症中的研究进展[J]. 中国肿瘤临床, 2013, 40(4): 236-238.
- [13] Warren GW, Singh AK. Nicotine and lung cancer [J]. Journal of Carcinogenesis, 2013, 12(1): 1477-1511.
- [14] Wang H., Liao H., Oehani M., et al. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis [J]. NatMed, 2004, 10(11): 1216-1221.
- [15] Wang, H., Yu, M., Oehani, M., et al. Nicotine acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation [J]. Nature, 2003, 421(6921): 384-388.
- [16] Williams ME, Burton B, Urrutia A, et al. Ric-3 promotes functional expression of the nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit in mammalian cells[J]. J Biol Chem, 2005, 280 (2): 1257-1263.
- [17] van Maanen MA, Stoof SP, Larosa GJ, et al. Role of the cholinergic nervous system in rheumatoid arthritis: aggravation of arthritis in nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit gene knockout mice [J]. Ann Rheum Dis, 2010, 69(9): 1717-1723.
- [18] van Maanen MA, Stoof SP, van der Zanden EP, et al. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor on fibroblast-like synoviocytes and in synovial tissue from rheumatoid arthritis patients: a possible role for a key neurotransmitter in synovial inflammation [J]. Arthritis Rheum. 2009, 60(5): 1272-1281.
- [19] Zhang HC, Liu MX, Wang EP, et al. Effect of sinomenine on the expression of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes MyD88 and TRAF6[J]. Genet Mol Res, 2015, 14(4): 18928-18935.
- [20] Kim TH, Kim SJ, Lee SM. Stimulation of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor protects against sepsis by inhibiting Toll-like receptor via phosphoinositide 3-kinase activation [J]. J Infect Dis, 2014, 209(10): 1668-1677.
- [21] Hamano R, Takahashi HK, Iwagaki H, et al. Stimulation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor inhibits CD14 and the toll-like receptor 4 expression in human monocytes [J]. Shock, 2006, 26 (4): 358-364.
- [22] Wang Y, Cai J, Zeng X, et al. Downregulation of toll-like receptor 4 induces suppressive effects on hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma via ERK1/2 signaling[J]. BMC Cancer, 2015, 15: 821.
- [23] Wang N, An D, Li Q, et al. Effect of Toll-like receptor 4 signaling activation on the biological behavior of gastric cancer cell lines [J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2015, 95(26): 2104-2108.
- [24] Komai-Koma M, Li D, Wang E, et al. Anti-Toll-like receptor 2 and 4 antibodies suppress inflammatory response in mice [J]. Immunology, 2014, 143(3): 354-362.
- [24] Mu H, Yao RB, Zhao LJ, et al. Sinomenine decreases MyD88 expression and improves inflammation-induced joint damage progression and symptoms in rat adjuvant-induced arthritis [J]. Inflammation, 2013, 36(5): 1136-1144.
- [25] Sack U, Hirth A, Funke B, et al. A novel model of fibroblast mediated cartilage destruction [J]. Scand J Immunol, 2005, 61 (1): 18-28.
- [26] 肖楚吟, 潘云峰, 郭兴华, 等. 滑膜成纤维细胞的原代培养及生物特性[J]. 中国医学工程, 2010, 18(2): 1-4.

(编辑: 宋威)

白英总碱通过 VEGF 相关信号通路调控 A549 细胞的凋亡与周期

韩林, 孙彩霞, 王建农 (中国中医科学院西苑医院基础医学研究所, 中药药理北京市重点实验室, 北京 100091)

摘要: 目的 基于 VEGF 相关信号通路探讨白英总碱对 A549 细胞的凋亡与周期的影响。方法 设立对照组和给药组, 通过流式细胞术检测细胞凋亡及周期分布情况, Western blot 法检测 PI3K、Akt、Ras、MAP2、VEGF 蛋白的表达。结果 流式细胞术检测白英总碱将该细胞周期阻滞于 G₂ 期, 呈现剂量依赖性的诱导 A549 细胞的

收稿日期: 2016-01-22

作者简介: 韩林, 女, 博士研究生, 研究方向: 中药药效物质基础研究。Email: hanlin_med@163.com。通信作者: 王建农, 男, 研究员, 研究方向: 中药质量标准控制。Email: wangjiannong2008@sina.com。

基金项目: 北京市自然科学基金(7102137); 国家重大新药创制(2009ZX09103-402); G20 工程支撑保障(Z151100003815026)。

凋亡,尤其是早期凋亡细胞。Western blot 结果显示,白英总碱均可下调 PI3K、Akt、Ras、MAP2、VEGF 蛋白的表达,中高剂量组各蛋白的相对表达量与对照组比均有极显著差异($P < 0.01$)。**结论** 白英总碱可通过调控 VEGF 相关信号通路诱导 A549 细胞的凋亡,阻滞细胞周期于 G₂ 期。

关键词: 白英总碱; A549 细胞; VEGF; 凋亡; 周期

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2016)04-0474-0

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2016.04.0

Total alkaloids from *Solanum lyratum* regulates apoptosis and cycle of A549 cells through VEGF related pathways

HAN Lin, SUN Cai-xia, WANG Jian-nong*

(Beijing Key Laboratory of Chinese Materia Pharmacology, Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091)

Abstract: Objective To investigate the effect of total alkaloids from *Solanum lyratum* on apoptosis and cycle of A549 cells based on VEGF related signal pathways. Methods Control group and three experimental groups were seted up, cell cycle and apoptosis were tested by flow cytometry, protein levels of PI3K, Akt, Ras, MAP2, VEGF were examined by Western blot. Results The result of flow cytometry showed that, total alkaloids from *Solanum lyratum* arrested the cell cycle at G₂ phase, and induced A549 cells apoptosis in a dose-dependent manner, especially early apoptotic cells. The result of flow cytometry showed that, total alkaloids from *Solanum lyratum* both down-regulated protein levels of PI3K, Akt, Ras, MAP2, VEGF, and relative protein expressions in middle and high dose groups were extremely significant differences compared with control group ($P < 0.01$). Conclusion Total alkaloids from *Solanum lyratum* could induce A549 cells apoptosis, and cell cycle arrest at G₂/M phase through VEGF related signal pathways.

Key words: total alkaloids from *Solanum lyratum*; A549 cells; VEGF; apoptosis; cycle

传统中药白英,为茄科植物白英(*Solanum lyratum* Thunb.)的干燥全草,早见于《神农本草经》,被列为上品,具有清热解毒、利湿消肿之功效。性平,微苦,归肝、肾二经,是临床上常用的抗癌中草药。药理研究^[1-3]显示,白英在抗肿瘤方面具有较好的活性。但现有文献中对于白英抗肿瘤的研究,多以白英提取物作为研究对象,无法准确定位其作用的有效部位,抗肿瘤机制更是少之又少。研究^[4]表明,肿瘤细胞的生长凋亡多涉及血管新生,因此,本文拟从 VEGF 点出发,探讨与其密切相关的信号通路,揭示白英有效部位抗肿瘤的机制。本课题组在前期实验中筛选出总碱成分为白英抑瘤作用的主要部位,同时,亦进行了细胞及动物水平的药效学验证^[5-7]。本文将继续探讨白英总碱对肿瘤细胞的凋亡与周期以及 PI3K、Akt、Ras、MAP2、VEGF 蛋白表达的影响,为白英更深入的机理探讨奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株 A549 人非小细胞肺癌细胞株,购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心(目录号 TCHu150)。

1.2 药物及主要试剂 白英药材,购于江苏沛县,经中国中医科学院中药研究所何希荣(职称)鉴定为茄科茄属植物白英,拉丁学名为 *Solanum Lyratum* Thunb; 胰蛋白酶、PBS、细胞周期检测试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、全蛋白抽提试剂盒、Bradford 蛋白含量检测试剂盒、ECL 检测试剂盒、兔抗人 β -actin 多抗、HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体,江苏凯基生物科技股份有限公司,批号分别为: KGY001、KGB500、KGA511、KGA105、KGP250、KGA801、KGP1123、KGAA001、KGAA57; RPMI-1640,美国 GIBCO 公司,批号: 31800-105; 小牛血清(CS),杭州四季青生物工程材料有限公司,

批号: 090817; PVDF 膜, 美国PALL 公司, 批号: 65421; 兔抗人 Ras, MAP2, Akt, VEGF, PI3K 单克隆抗体, 美国 Santa cruz 公司, 批号分别为: Sc-30、Sc-12012、Sc-7126、Sc-507、Sc-39129; SDS、过硫酸胺等常规化学试剂, 均为国产分析纯或进口分装。

1.3 仪器 XD-101 型 CO₂ 培养箱, 日本 SANYO 公司; IX51 型生物倒置显微镜, 日本 OLYMPUS 公司; 2.5, 10, 200, 1 000 μ L 移液器, 德国 Eppendorf 公司; FACS Calibur 型流式细胞仪, 美国 Becton-Dickinson 公司; UV-2540 型分光光度计, 日本 SHIMADZU 公司; 164-5051 型 Western 电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司。

1.4 白英总碱样品的制备 取白英干燥全草适量, 置回流瓶中, 加 8 倍生药量 70 %乙醇、100 $^{\circ}$ C 回流提取 3 次、每次提取 2 h。对提取液采用项目前期申请的国家专利工艺^[8], 即 D151 离子交换大孔吸附树脂富集, AB-8 大孔树脂脱盐的精制工艺进行精制, 即得白英总碱样品, 通过紫外分光光度法检测样品中总碱的含量为 51.18 %。通过培养基溶解为 80 mg $\cdot$ mL⁻¹ 的母液, 直径 0.22 μ m 微孔滤器过滤, 4 $^{\circ}$ C 避光保存备用。

1.5 细胞培养及处理 A549 细胞用含 10 %CS、1 % 抗菌药物 (青霉素 100 U $\cdot$ mL⁻¹, 链霉素 100 mg $\cdot$ L⁻¹ 的 RPMI-1640 培养液, 于 37 $^{\circ}$ C、含 5 % CO₂、饱和湿度条件下的细胞培养箱中常规培养。实验共分 4 组, 即对照组 (实验全程以完全培养液培养), 白英总碱低、中、高剂量组 (白英总碱 50, 100, 200 mg $\cdot$ L⁻¹), 通过本课题组前期 MTT 实验结果, 白英总碱样品对 A549 细胞的 IC₅₀ 约为 100 mg $\cdot$ L⁻¹, 因此, 将此浓度定为样品中剂量浓度。

取对数生长期细胞, 消化接种到培养瓶中, 次日, 待细胞贴壁后, 根据组别设置加入相应的含药培养基或完全培养基, 培养箱中继续常规培养 72 h, 随即进行相应实验。

1.6 流式细胞术检测细胞周期 前期处理同 1.5 项下, 培养结束后, 0.25 %胰酶 (不含 EDTA) 消化细胞, 预冷的 PBS 洗涤 2 次, 收集并调整细胞浓度为 1×10^6 个 $\cdot$ mL⁻¹。重悬于 1 mL 预冷的 70 %乙醇中, 4 $^{\circ}$ C 过夜固定。离心弃上清, 预冷的 PBS 洗去固定液。依次加入 10 g $\cdot$ L⁻¹ 核糖核酸酶 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min; 10 g $\cdot$ L⁻¹ 碘化丙啶 400 μ L 染色混匀, 4 $^{\circ}$ C 避光 30 min。流式细胞仪检测, 记录激发波长 488 nm 处红色荧光。计算各时相分布百分比, 并以增殖指数

(PI)表示细胞增殖率, $PI = (S + G_2/M) / (G_0/G_1 + S + G_2/M) \times 100 \%$ 。

1.7 流式细胞术检测细胞凋亡 前期处理同 1.5 项下, 培养结束后, 0.25 %胰酶 (不含 EDTA) 消化细胞, 并用预冷的 PBS 洗涤 2 次, 收集 5×10^5 个细胞, 重悬于 500 μ L Binding buffer 中, 加入 Annexin V-FITC 和碘化丙啶各 5 μ L, 轻轻混匀, 避光室温孵育 5 ~ 15 min, 流式细胞仪检测 (激发波长 Ex=488 nm, 发射波长 Em=530 nm) 细胞凋亡的情况, 其中, Annexin V 阳性, PI 阴性代表早期凋亡细胞, Annexin V 阳性, PI 阳性代表晚期凋亡细胞。计算细胞凋亡率, 即 Q2 与 Q4 两象限细胞所占比例之和。

1.8 Western Blot 法检测 PI3K, Akt, Ras, MAP2, VEGF 蛋白表达 前期处理同 1.5 项下, 培养结束后, 总蛋白提取试剂盒提取细胞总蛋白样品, 按照蛋白浓度测定试剂盒检测各组样品的蛋白浓度, 以 70 μ g 蛋白样品为各组上样量进行 SDS-PAGE 凝胶电泳 (10 %分离胶、5 %浓缩胶)。湿法将蛋白转移至 PVDF 膜, 膜于含 5 % 脱脂奶粉的 TBST 封闭液中封闭 (4 $^{\circ}$ C, 过夜)。封闭结束后, 按约 0.1 mL $\cdot$ cm⁻² 的量加入封闭液和适量一抗 PI3K (稀释比例 1 : 200)、Akt (稀释比例 1 : 200)、Ras (稀释比例 1 : 400)、MAP2 (稀释比例 1 : 400)、VEGF (稀释比例 1 : 400)。摇床摇荡孵育 (4 $^{\circ}$ C, 过夜)。PBST 漂洗滤膜 4 次, 每次 10 min。将膜与 HRP 结合的二抗 (二抗用封闭液稀释, 稀释比例 1 : 5000) 室温下摇荡孵育 2 h, 然后, 用 PBST 充分洗膜, 漂洗 4 次, 每次 10 min。按 0.1 mL $\cdot$ cm⁻² 显影液计算用量, 将显影液加于 PVDF 膜上, 室温放置 1 min。用保鲜膜将膜包好。暗室中迅速将膜蛋白贴在 X 光胶片上曝光, 洗片机中显影、洗像。调整曝光时间, 直至出现最佳条带。

1.9 统计学处理 数据以 " $\bar{x} \pm s$ " 表示, 采用 SPSS 17.0 统计学软件对实验数据进行处理, 组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 白英总碱对 A549 细胞周期的影响 白英总碱的加入使 A549 细胞的 G₁ 期细胞降低, G₂ 期细胞增加, 且呈现剂量依赖性, 其中, 白英总碱高剂量组 G₂ 期细胞量最高, 与同期的对照组比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); S 期细胞数量则相对稳定。见表 1 和图 1。

2.2 白英总碱对 A549 细胞凋亡率的影响 由流式细胞术检测数据可以看出白英总碱可致 A549 细胞凋亡

表 1 白英总碱对 A549 细胞周期的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Effects of total alkaloids from Solanum lyratum on cell cycle of A549 cells

组别	剂量 /mg·L ⁻¹	G ₁ 期 /%	S 期 /%	G ₂ 期 /%
对照组	—	76.25 ± 8.91	20.17 ± 2.01	3.58 ± 0.40
白英总碱低剂量组	50	64.09 ± 8.35	23.03 ± 2.77	12.88 ± 1.38*
白英总碱中剂量组	100	42.34 ± 3.97**	26.07 ± 2.63*	31.59 ± 3.94**
白英总碱高剂量组	200	24.38 ± 3.22**	18.78 ± 1.83	56.84 ± 6.09**

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

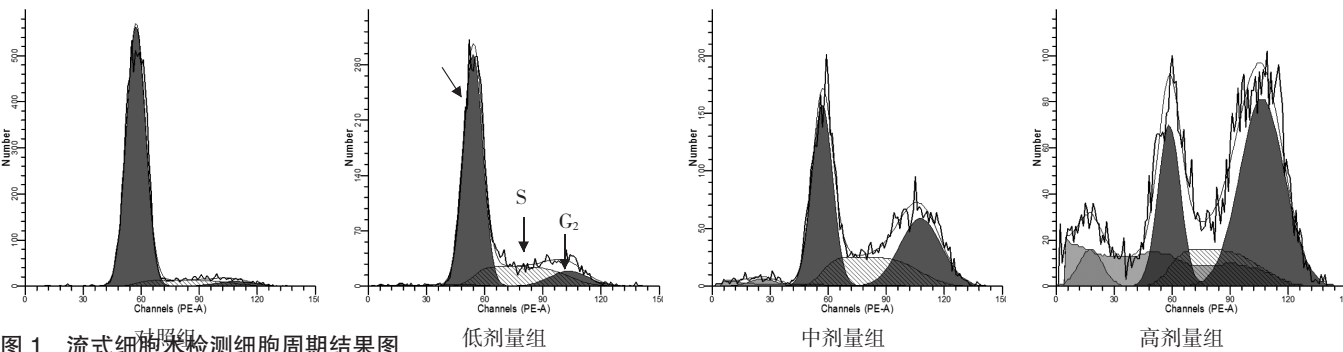


Figure 1 The result of cell cycle by flow cytometry

表 2 白英总碱对 A549 细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Effects of total alkaloids from Solanum lyratum on apoptosis of A549 cells

组别	剂量 /mg·L ⁻¹	正常细胞(Q3)/%	细胞死亡率(Q1)/%	晚期细胞凋亡率(Q2)/%	早期细胞凋亡率(Q4)/%	总凋亡率(Q2+Q4)/%
对照组	—	96.1 ± 10.0	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1	2.6 ± 0.3	3.2 ± 0.2
白英总碱低剂量组	50	73.7 ± 9.1**	2.0 ± 0.2**	11.0 ± 0.9**	13.3 ± 1.8**	24.3 ± 2.1**
白英总碱中剂量组	100	51.6 ± 5.9**	5.1 ± 0.6**	14.1 ± 1.7**	29.2 ± 1.9**	43.3 ± 4.9**
白英总碱高剂量组	200	31.6 ± 4.0**	4.6 ± 0.4**	17.3 ± 1.3**	46.5 ± 5.0**	63.8 ± 7.5**

注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

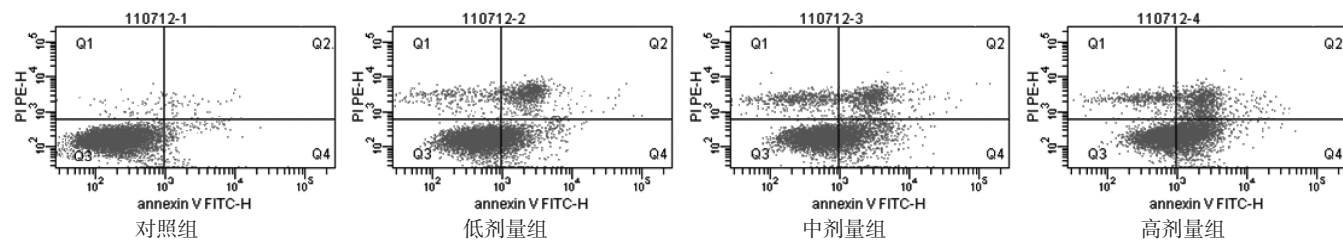


Figure 2 The result of cell apoptosis by flow cytometry

量组 Akt 蛋白的相对表达量由 1.85 降至 1.11, 与对照组比较, 差异具有统计学意义, $P < 0.01$, 见图 3。

3 讨论

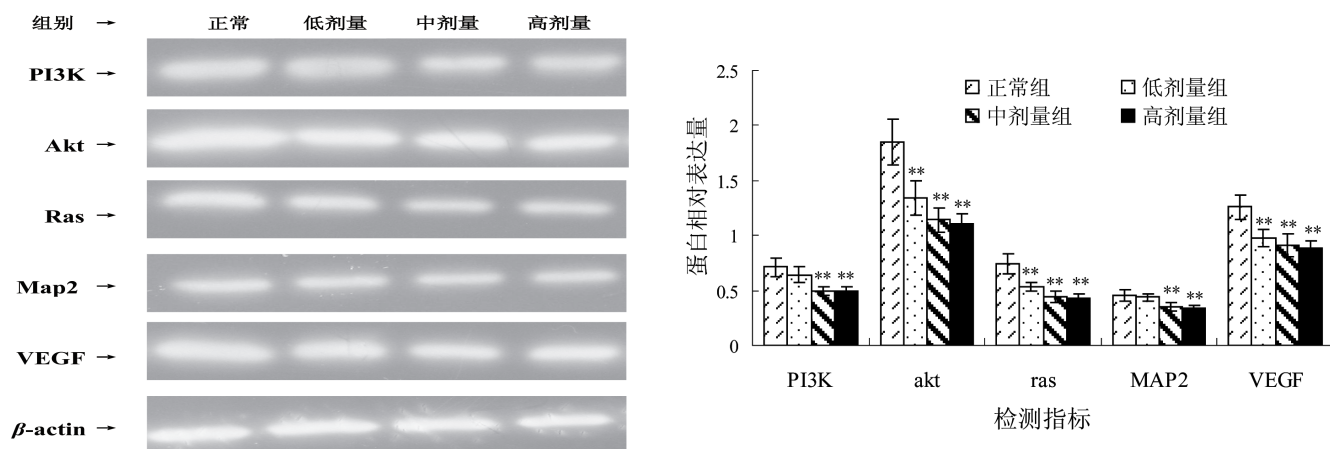
作为我国传统中药, 白英已有 2000 多年的临床应用历史, 且价格低廉、疗效确切, 用于治疗多种类型肿瘤, 尤其是对肺癌、子宫颈癌等呼吸、消化、生殖系统的恶性肿瘤疗效显著^[9]。但相比于其他传统中药, 关于白英抗肿瘤的现代药理研究则相对缺乏, 对

数量明显增加, 与对照组比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 同样呈现剂量依赖性, 尤其是早期凋亡细胞, 白英总碱高剂量组早期细胞凋亡率升高明显, 见表 2 和图 2。

2.3 白英总碱对 A549 细胞 PI3K, Akt, Ras, MAP2, VEGF 蛋白表达的影响 由 Western Blot 结果可以看出, 白英总碱的加入使 PI3K、Akt、Ras、MAP2、VEGF 蛋白的表达均有所下调, 尤其是高剂

抗瘤有效部位白英总碱的机理探讨则更少之又少, 对于中药白英亟待进行更深层次的研究。

细胞增殖是通过细胞周期来实现的^[10], 肿瘤细胞亦同, 细胞沿着 $G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2 \rightarrow M \rightarrow G_1$ 做周期性运转, 任意期的阻滞即可影响到整个细胞增殖周期的进程^[11], 从而可能导致细胞的凋亡。本研究通过流式细胞术观察到白英总碱的加入将 A549 细胞细胞周期阻滞于 G_2 期(与对照组比, $P < 0.05$, 或 $P < 0.01$), 凋



A. 蛋白印记条带; B. 各蛋白相对表达灰度分析柱状图

图3 白英总碱对 A549 细胞 PI3K, Akt, Ras, MAP2, VEGF 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 3 Effects of total alkaloids from Solanum lyratum on PI3K, Akt, Ras, MAP2, VEGF protein expression of A549 cells

亡率与未经白英总碱处理的细胞比较,高中低剂量组均显著升高(与对照组比, $P < 0.01$),且呈现剂量依赖性。

凋亡广泛参与多种疾病的病理机制,具有广泛的生理病理意义,常被作为抗肿瘤的研究思路。常用抗肿瘤药物通过诱导细胞周期阻滞和凋亡达到抑制肿瘤生长,而血管内皮生长因子 VEGF 则是其中重要的诱导因子,在诱导和调节肿瘤血管形成中起有关键性作用。VEGF 在许多恶性肿瘤组织中高水平表达,处于低氧环境的肿瘤细胞引发新血管生成,VEGF 及其他许多促血管生成因子会在低氧条件下表达升高,从而促进肿瘤新血管的生成。大量新血管的形成使肿瘤细胞提升了获取氧气及养料的能力,进而促进其存活和增殖,推动肿瘤病情的进展。而 VEGF 下调后,则会显著增加了细胞的凋亡率^[12-13]。由 Western Blot 结果可看出,白英总碱的加入下调了细胞中 VEGF 蛋白的表达,(与对照组比, $P < 0.01$),表明凋亡确与 VEGF 蛋白的表达相关,亦表明白英总碱通过此条通路发挥了其抗肿瘤的作用。

为了明确此结论,同时检验了 VEGF 通路上其他信号点,包括 PI3K、Akt、Ras、MAP2。Ras/MAPK 通路和 PI3K/Akt 通路是膜受体信号向细胞内转导的重要途径,与 VEGF 为上下游关系,参与细胞的增殖、凋亡和分化等过程,在肿瘤的发生发展中起着重要的作用,抑制 PI3K/Akt 途径的活化可诱导细胞程序性死亡和抑制肿瘤的生长^[14]。在不同的细胞类型、不同的细胞分化时期、不同的实验条件下,它们之间的相互作用会十分明显地表现的不同阶段,这些为肿瘤的新治疗方案提供了重要的理论依据。以 A549 为

研究对象,白英总碱的加入使 PI3K、Akt、Ras、MAP2 蛋白的表达同 VEGF 相同,均呈现下调的趋势。反映在 A549 细胞中这些与 VEGF 相关的信号通路点,白英总碱均发挥了一定调控作用,抑制细胞中 VEGF、PI3K、Akt、Ras、MAP2 的活化,从而抑制生长因子诱导的血管生成,从而促进肿瘤细胞的凋亡与周期阻滞。

目前对于白英的研究尚缺乏,与之显著的抗肿瘤临床疗效实为不符。在本研究中,白英总碱可诱导 A549 细胞的凋亡及周期阻滞,其作用机制可能与抑制包括 PI3K、Akt、Ras、MAP2 等信号点在内的 VEGF 信号通路的活化有关。但仍需进行体内相关试验验证,以及更深层次的机理探讨,为白英进一步的研究和开发新的抗肿瘤药物奠定理论基础。

参考文献:

- [1] 余乐涵, 许宝华, 吴剑, 等. 白英水提物对胃癌 SGC-7901 细胞凋亡与基因 bcl-xl/bid 表达的影响[J]. 中成药, 2008, 30(12): 1744-1748.
- [2] 浦洪琴, 韦鹏涯, 韦星, 等. 白英提取物诱导人胃癌 SGC-7901 细胞凋亡及其对凋亡相关蛋白表达的影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(7): 137-138.
- [3] Guan Y, Zhao H, Yan X, et al. A study on anti-tumour effect of Solanum lyratum Thunb Extract in S180 tumourbearing mice[J]. Afr J Tradit Complement Altern Med, 2013, 10(5): 345.
- [4] 李妍. TR3/Nur77 诱导血管新生的结构、功能研究[D]. 山东大学, 2015.(学位论文)
- [5] 王建农, 臧雅丽, 顾士萍, 等. 白英甾体总生物碱对人肺癌细胞 A549 裸鼠异种移植瘤的药效研究[J]. 中药新药与临床药理, 2013, 24(5): 469-472.
- [6] 卜璟, 王建农, 臧雅丽, 等. 白英甾体总生物碱抑制小鼠肝癌细胞

- H22 移植瘤生长药效学研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(7): 1593-1595.
- [7] 韩林, 卓越, 孙彩霞, 等. 白英总碱对小鼠Lewis 肺癌细胞移植瘤生长的抑制作用[J]. 中药新药与临床药理, 2015, 26 (5): 573-576.
- [8] 王建农. 一种白英提取物以及包括其的抗癌药物: 中国, 201110276477. 9[P]. 2012-01-18.
- [9] 岳喜典, 姚芳, 张雷, 等. 白英中的倍半萜类化合物[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(3): 453-456.
- [10] Weiger TM, Hermann A. Cell proliferation, potassium channels, polyamines and their interactions: a mini review [J]. Amino Acids, 2014, 46(3): 681-688.
- [11] 顾娟, 陈晓萍. 神经发育中的细胞周期时程[J]. 遗传, 2011, 33 (11): 1185-1190.
- [12] 邢晓静, 谷小虎, 马天飞. Biglycan 及 VEGF 对结肠癌细胞增殖、凋亡能力的影响及分子机制[J]. 肿瘤学杂志, 2014, 20(6): 471-476.
- [13] 李传贵. HIF-1 α 和 VEGF 在非小细胞肺癌中表达及临床意义[D]. 河北医科大学, 2015. (学位论文)
- [14] 费洪荣, 许广群, 朱永平, 等. PI3K /Akt 抑制剂 CCT128930 抑制人脐静脉血管内皮细胞增殖与血管生成的实验研究[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(10): 1413-1416.
- (编辑:)

益气除痰方对 BALB/c-nu 裸小鼠 A549 肺癌转移的抑制作用及其机制探索

陈昌明, 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** 研究益气除痰方对对 BALB/c-nu 裸小鼠 A549 肺癌肿瘤生长及转移的抑制作用并初步探索其具体的作用机制。**方法** 构建裸鼠 A549 肺癌移植瘤模型, 随机分为空白对照组和益气除痰方组(15.5 g·kg⁻¹·d⁻¹), 连续灌胃给药 21 d, 期间每 3 天测体重和瘤体体积; 21 天后脱颈处死小鼠, 剥取瘤体测瘤重, 计算抑瘤率; 摘取肺组织, 固定后观察肺表面转移灶个数, 计算肺转移抑制率; 采用免疫组化法检测瘤体组织 EMT 标志物及相关信号蛋白表达。**结果** 益气除痰方组的瘤体体积小于对照组($P < 0.05$), 益气除痰方组小鼠的瘤重明显小于对照组($P < 0.05$), 益气除痰方组的抑瘤率为 27.6 %, 提示益气除痰方对肿瘤的生长有一定抑制作用。益气除痰方组小鼠肺转移结节明显少于对照组 ($P < 0.05$), 其转移抑制率为 39.6 %, 提示益气除痰方在体内可抑制肺癌的转移。免疫组化结果显示, 益气除痰方组瘤体组织的上皮标志蛋白 E-cadherin 较对照组升高($P < 0.05$), 而 EMT 关键标志蛋白 vimentin 和 fibronectin 明显下降($P < 0.05$), 提示益气除痰方可抑制 EMT 的发生, 从而降低肿瘤细胞的侵袭转移能力。免疫组化结果还显示, 益气除痰方组的 GRP78、smad2/3、SRC、P38、ERK、JNK 的表达及其磷酸化激活程度均较对照组下降($P < 0.05$), 提示益气除痰方抑制肿瘤生长及其抑制 EMT 的作用可能与其多靶点抑制 GRP78、smad2/3、SRC、P38、ERK、JNK 等信号蛋白有关。**结论** 益气除痰方可抑制肺癌肿瘤细胞的生长并抑制肺癌的转移, 其抑制肿瘤转移的机制与其抑制细胞 EMT 的发生有关。益气除痰方可能通过多靶点的抑制 GRP78、smad2/3、SRC、MAPK 等信号通路来实现对 EMT 的逆转作用。

关键词: 益气除痰方; A549 细胞; 肺癌转移; 上皮间质转化

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2016)03-

doi: 10.19378/j. issn. 1003-9783. 2016. 04. 0

Effects of YiQiChuTan Fang on inhibiting BALB/c-nu nude mice-A549 lung cancer metastasis and mechanism research
CHEN Chang-ming, SUN Ling-ling, LIN Li-zhu

Department of Oncology, First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou

收稿日期: 2016-01-14

作者简介: 陈昌明, 男, 博士研究生, 研究方向: 肿瘤的临床与基础研究。Email: 237759950@qq.com。通讯作者: 林丽珠, 女, 博士, 教授, 研究方向: 肿瘤的临床与基础研究。Email: lizhulin903@139.com。

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