

睿臻对肺癌的抑制作用及其机制

黄璐璐¹ 杜倩倩¹ 闫辰¹ 刘春霞¹ 李芋润² 高林³ 李燕¹ 赵青⁴

(1 中国医学科学院,北京协和医学院药物研究所,北京,100050; 2 青海省第四人民医院,西宁,810000; 3 青海睿元药物研究所有限责任公司,西宁,810003; 4 中国医学科学院、北京协和医学院基础医学研究所,北京,100730)

摘要 目的:初步探讨由山楂、沙棘和枸杞三味中药为主,并添加虫草素、虫草多糖、 β -葡聚糖和番茄红素等制备而成的天然药物组方睿臻的体内外抗肺癌活性及其机制。方法:采用 MTT 法检测睿臻体外抗肿瘤活性,小鼠 Lewis 移植瘤模型观察单独使用睿臻及联合紫素的抗肺癌活性及对荷瘤小鼠生存时间的影响。FCM 实验检测其对肿瘤细胞凋亡的影响,重组基质膜侵袭实验观察对肿瘤细胞侵袭能力的影响,Western blot 方法初步探讨该化合物的作用机制。结果:睿臻对肺癌细胞具有较好的增殖抑制活性,其作用于 A549 细胞株、NCI-H460 细胞株和 NCI-H1975 细胞株 120 h 后的 IC_{50} 值分别为 98.42 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、60.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 60.41 $\mu\text{g}/\text{mL}$;睿臻也可显著抑制小鼠 Lewis 肺癌的生长,9.0 g/kg 睿臻对小鼠 Lewis 肺癌的生长抑制率达 70.0%,且可在增强紫素的抗肿瘤活性的同时升高胸腺指数及外周血中红细胞数量和血红蛋白水平。睿臻可延长 Lewis 肺癌小鼠的生存时间。睿臻可诱导肺癌细胞 A549 和 NCI-H460 发生凋亡。在 96.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 192.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量下,可显著抑制肺癌细胞穿过重组基底膜的数量。Western blot 结果显示睿臻可抑制 Raf/MEK/ERK、FAK/p38 等信号通路。结论:睿臻在体内外均具有一定的抗肺癌活性,其作用机制可能与阻断 Raf/MEK/ERK 信号转导通路有关,有望开发成为肺癌治疗的天然药物制剂。

关键词 睿臻;肺癌;增殖;凋亡;侵袭;增效减毒;Raf/MEK/ERK;FAK/p38

Anti-tumor Activity and Molecular Mechanisms of Rui Zhen in Lung Cancer

Huang Lulu¹, Du Qianqian¹, Yan Chen¹, Liu Chunxia¹, Li Yurun², Gao Lin³, Li Yan¹, Zhao Qin⁴

(1 Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2 The Fourth People's Hospital of Qinghai Province, Xining 810000, China; 3 Qinghai Ruiyuan Pharmaceutical Research Institute Co. Ltd., Xining 810003, China; 4 Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100730, China)

Abstract Objective: To investigate the anti-tumor effect and mechanisms of Rui Zhen which contains hawthorn, hippophae, medlar, cordycepin, cordyceps polysaccharide, β -glucan and lycopene. **Methods:** MTT assay was used to analyze anti-proliferation activity of Rui Zhen in vitro. Anti-tumor activity and the effect of survival time were observed by mouse Lewis xenograft model in vivo. The effect of Rui Zhen on apoptosis was measured by FCM analysis. Western blot was performed to investigate the expression level of proteins in tumor tissues treated with Rui Zhen. **Results:** Rui Zhen has a good proliferation inhibitory activity on lung cancer cells. The IC_{50} values of A549 cell line, NCI-H460 cell line and NCI-H1975 cell line after 120 h were 98.42 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 60.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 60.41 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively. Rui Zhen can also significantly inhibit the growth of Lewis lung cancer in mice, and the growth inhibition rate of 9.0 g/kg ruthenium on Lewis lung cancer in mice was 70.0%, and it can enhance the purple pigment. The anti-tumor activity increased both the thymus index and the number of red blood cells and hemoglobin in the peripheral blood. Rui Zhen can prolong the survival time of Lewis lung cancer mice. Rui Zhen can induce apoptosis of lung cancer cells A549 and NCI-H460. At 96.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 192.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the number of lung cancer cells passing through the reconstituted basement membrane was significantly inhibited. Western blot results showed that ruthenium can inhibit Raf/MEK/ERK, FAK/p38 and other signaling pathways. **Conclusion:** Rui Zhen has certain anti-lung cancer activity in vitro and in vivo, and its mechanism may be related to blocking Raf/MEK/ERK signal transduction pathway. It is expected to develop into a natural pharmaceutical preparation for lung cancer treatment.

Key Words Rui Zhen; Lung cancer; Proliferation; Apoptosis; Invading; Efficacy enhancing and toxicity reducing; Raf/MEK/ERK; FAK/p38

中图分类号:R284;R734.2 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.06.049

基金项目:中国医学科学院医学与健康科技创新工程-重大协同创新项目(2016-I2M-1-008)

作者简介:黄璐璐(1994.03—),女,研究生在读,研究方向:肿瘤药理学,E-mail:huanglulu@imm.ac.cn

通信作者:李燕(1971.07—),女,研究生,副研究员,研究方向:肿瘤药理学,E-mail:liyanxiao@imm.ac.cn;赵青(1972.11—),女,研究生,副高级,研究方向:免疫学,E-mail:zzhao0282@163.com

癌症是当前世界对人类健康和生命威胁最严重的疾病之一,其发病率和死亡率已跃居各类疾病的前列。肺癌为我国癌症发病率、死亡率第1位,2017中国癌症最新数据显示,我国平均每分钟就有7个人患癌症^[1]。2013年我国肺癌发病人数占全球恶性肿瘤死亡人数的35.78%,死亡人数占全球的37.55%^[2]。化学治疗仍是肺癌患者常用的治疗方式,虽然目前有针对EGFR、ALK等靶点的化疗药物用于肺癌治疗,但由于其耐药和不良反应的产生,化疗药物对肺癌的临床治疗效果不理想。在中医药治疗肿瘤方面,中药可以通过多途径、多靶点发挥抗肿瘤作用,同时具有不良反应少、机体耐受性好等优势。我国采用中药联合化学药物治疗晚期恶性肿瘤具有悠久的临床历史,目前该治疗方式已成为临床常用的方法^[3-4]。天然药物中存在许多具有抗癌活性的物质。睿臻是以山楂、沙棘和枸杞三味中药为主,并添加虫草素、虫草多糖、 β -葡聚糖和番茄红素等制备而成的天然药物组方,此复方的抗肿瘤作用未见报道。本研究主要利用肿瘤细胞及小鼠移植瘤模型评价睿臻的体内外抗肿瘤活性,并对其生物学功效及作用机制进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人乳腺癌细胞株 MCF-7,人髓母细胞瘤 Daoy,人肺癌细胞株 A549、NCI-H460 和 NCI-H1975,人胰腺癌细胞株 BxPC3 和人胶质母细胞瘤细胞株 U-87 MG 购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心;人肾癌细胞株 Caki-1 由 Teh Bin Tean(DUKE-NUS Medical School Singapore)馈赠;人胶质母细胞瘤细胞株 T98G 购自上海复祥生物科技有限公司。

1.1.2 动物 雄性 C57BL/6 小鼠,体重 16.0 ~ 18.0 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司(合格证号:SCXK(京)2014-0004)。

1.1.3 药物 睿臻为棕黄色粉末,由青海睿元药物研究所有限责任公司提供;紫素(Taxol,北京协和药厂,批号:151107);顺铂(Cisplatin,DDP,上海伊卡生物技术有限公司,批号:15663-27-1);索拉非尼(Sorafenib,上海禧琅生物科技有限公司,批号:284461-73-0);吉西他滨(Gemcitabine,武汉东康源科技有限公司,批号:95058-81-4);吉非替尼(Iressa)由中国医学科学院药物研究所冯志强研究员课题组提供。

1.1.4 试剂与仪器 青霉素钠盐及硫酸链霉素由华北制药股份有限公司生产。DMEM 培养基和

MEM 培养基均购自 Gibco 公司,RPMI-1640 培养基购自北京钮因华信科技发展有限公司,胰蛋白酶购自北京莱博生物实验材料研究所,胎牛血清购自北京元亨圣马生物技术研究。牛血清白蛋白第五组分(BSA)购自美国 Amresco 公司。十二烷基磺酸钠(SDS)、过硫酸铵、聚丙烯酰胺、焦碳酸二乙酯、琼脂糖、甘氨酸均购自美国 Sigma 公司。Transwell 小室购置美国 Corning 公司。苏木精-伊红(HE)染色液购自北京益利精细化学品有限公司。乙二胺四乙酸钠(EDTA)、二甲基亚砷(DMSO)、无水甲醇、异丙醇由北京化工厂生产。溴化四氮唑蓝(MTT)、RIPA 组织/细胞裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、Tween-20 及溴酚兰由北京索莱宝科技有限公司提供。甲叉双丙烯酰胺(N,N'-Methylen-bis-Acrylamide)购自 Fluka 公司。ECL 超敏显色剂购自北京普利莱公司。抗体均购于美国 Cell Signaling Technology 公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔和山羊抗小鼠二抗购自中杉金桥生物技术有限公司。体外实验均用二甲基亚砷(DMSO)配制,并用 DMSO 作为溶剂对照,终浓度不超过 0.1%。体内实验睿臻用双蒸水溶解,阳性药(Taxol 和 DDP)用生理盐水配制。MEK-6318K 血球计数仪购自北京瑞博赛工贸有限公司;C6 流式细胞仪购自 ACCURI 公司;BioTek 96 孔单功能发光检测器购自美国 PROMEGA 公司,IX70 倒置显微镜购自 OLYMPUS 公司,生物分子成像仪 LAS4000 购自美国 GE 公司。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 无菌条件下,剥离传代于小鼠腋下的 Lewis 肺癌肿瘤,去除筋膜,剪碎,研磨,用无菌生理盐水按 1:3 比例稀释后制成浓度为 5×10^7 个/mL 的肿瘤细胞悬液,每只小鼠腋下接种 0.2 mL 瘤液。接种后次日动物随机分组,称重^[6]。在小鼠 Lewis 肺癌移植瘤实验中,动物共分 8 组,分别为正常对照组(未荷瘤)和溶剂对照组,阳性药 Taxol 给药组,睿臻给药组 3 个(2.25 g/kg、4.5 g/kg 和 9.0 g/kg),联合给药组 2 个,2.25 g/kg、4.5 g/kg 睿臻分别与 15.0 mg/kg Taxol 联合。

在小鼠 Lewis 肺癌生命延长实验中,实验动物共分 5 组,分别为溶剂对照组,阳性药组,DDP(5 mg/kg) + Taxol(20 mg/kg),睿臻 3 个剂量组,2.25 g/kg、4.5 g/kg 和 9.0 g/kg。

1.2.2 给药方法 1) 在小鼠 Lewis 肺癌移植瘤实验中,正常对照组(未荷瘤)和溶剂对照组,每天灌胃双蒸水,0.4 mL/20 g,2 次/d;阳性药 Taxol 给药

组, 15.0 mg/kg, 腹腔注射, 0.2 mL/20 g, 1 次/3 d, 共给药 3 次; 睿臻给药组 3 个 (2.25 g/kg、4.5 g/kg 和 9.0 g/kg) 灌胃, 0.4 mL/20 g, 2 次/d; 联合给药组 2 个, 2.25 g/kg、4.5 g/kg 睿臻分别与 15.0 mg/kg Taxol 联合; 睿臻接种前给药 5 d, 接种后给药 9 d。

在小鼠 Lewis 肺癌生命延长实验中, 溶剂对照组, 0.4 mL/20 g, 2 次/d, 灌胃; 阳性药组, DDP (5 mg/kg) + Taxol (20 mg/kg), 腹腔注射, 0.2 mL/20 g, 1 次/周, 共给药 4 次; 睿臻 3 个剂量组, 2.25 g/kg、4.5 g/kg 和 9.0 g/kg, 灌胃, 0.4 mL/20 g, 2 次/d, 共给药 29 d; 溶剂对照组给予等体积蒸馏水。

1.2.3 检测指标与方法

1) MTT 法测定肿瘤细胞存活率: 取对数生长期的细胞用胰酶消化后配制成浓度为 1.5×10^4 细胞/mL 的细胞悬液, 按 1 500 个/孔接种于 96 孔板, 每孔 100 μ L。次日加入不同浓度睿臻及相应溶剂对照的新鲜培养基, 每孔加入 100 μ L (DMSO 终浓度 < 0.1%)。样品设 3~6 个剂量组, 每组设 3 个平行孔。于 37 $^{\circ}$ C 培养箱继续培养 120 h 后, 弃上清液, 每孔加入新鲜配制的含 0.5 mg/mL MTT 的无血清培养基 100 μ L, 继续培养 4 h 后弃上清液, 每孔加入 200 μ L DMSO 溶解甲臞沉淀, 微型振荡器振荡混匀后, 检测波长 570 nm 条件下测定吸光度值 (A_{570})^[5], 以溶剂处理的肿瘤细胞为溶剂对照组, 按下列公式计算药物对肿瘤细胞的抑制率, 并按照中效方程计算 IC_{50} 。抑制率 (%) = (A_{570} 溶剂对照组 - A_{570} 给药组) / A_{570} 溶剂对照组 $\times 100\%$ 。以上实验重复 3 次。

2) 小鼠 Lewis 肺癌移植瘤实验: 实验结束, 眼眶取血检测血细胞个数, 处死动物, 称体重, 剥取胸腺及肿瘤组织、称重。根据重量计算胸腺指数, 肿瘤抑制率 (%), 用均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 并进行各给药组与阴性对照组之间的 t 检验。小鼠 Lewis 肺癌移植瘤部分肿瘤组织于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存用于后续机制研究。

在小鼠 Lewis 肺癌生命延长实验中, 每周称 2 次体重及肿瘤体积, 每天记录动物存活只数, 根据肿瘤体积计算肿瘤抑制率 (%), 用均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 并进行各给药组与阴性对照组之间的 t 检验。

3) 重组基质膜侵袭运动实验: 在 Transwell 小室的聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜外表面涂 10 μ L Fibronectin (0.5 μ g/ μ L), 置超净台内风干。在膜的內面涂 10 μ L Matrigel (0.5 μ g/ μ L), 超净台内吹干备用。在 24 孔培养板内加入 10% FBS-DMEM, 每孔 600 μ L。

用 1 mmol/L EDTA 收集对数生长期的肿瘤细胞, 悬浮于含 0.1% BSA-DMEM 培养基中, 终浓度为 2×10^6 个/mL。将细胞悬液加到 Transwell 细胞培养小室中, 每小室 200 μ L。将小室浸于 24 孔板的条件培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 温箱内孵育 18 h。将 Transwell 取出, 滤膜用甲醇固定 10 min, 苏木精-伊红 (HE) 染色, 水洗, 用棉签擦掉未穿过膜的细胞, 用二甲苯透明后将膜封于载玻片上, 于 400 倍显微镜下计数侵袭细胞数, 每膜计数上中下左右 5 个不同视野的透过细胞数, 计算平均值, 每组平行设 3 孔。以侵袭细胞的相对数目表示肿瘤细胞的侵袭能力。抑制率 (%) = (对照组侵袭细胞数 - 给药组侵袭细胞数) / 对照组侵袭细胞数 $\times 100\%$ 。

4) 流式细胞术分析细胞周期分布及凋亡情况: 睿臻处理肺癌细胞 72 h 后, 将细胞用磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 洗 2 遍, 胰蛋白酶-EDTA 消化, 以含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基终止消化。4 $^{\circ}$ C, 800 r/min 离心 5 min 收集细胞, 以 PBS 重悬, 镜下计数后, 取 2×10^6 个细胞, 将其置于 70% 乙醇中于 -20 $^{\circ}$ C 冻存 24 h 以上, 之后于 4 $^{\circ}$ C, 800 r/min 离心 5 min, 彻底去除乙醇。PBS 洗 2 遍并悬浮之, 加入 PI 染液 (0.1 mg/mL PI, 0.02 mg/mL RNaseA, 1 mg/mL 柠檬酸钠和 0.3% Triton X-100), 摇匀后于 37 $^{\circ}$ C 避光放置 0.5 h, 经 300 目筛过滤, 在 ACCURI C6 流式细胞仪上计数 10 000 个细胞, 分析细胞凋亡情况。

5) Western Blot 检测分析蛋白表达: 取小鼠 Lewis 肺癌移植瘤实验中 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存的 3 组 (荷瘤溶剂对照组, 睿臻 4.5 g/kg、9.0 g/kg) 瘤组织, 每组 3 只研磨, 组织裂解液冰上裂解 1 h, 12 000 r/min 离心 30 min, 提取总蛋白, 于 -80 $^{\circ}$ C 储存备用。采用 BCA 法, 以一定浓度梯度的 BSA 溶液为标准, 于 570 nm 处测定吸光度值, 绘制标准曲线, 同时测定样品的吸光度值, 计算蛋白水平, 之后用组织裂解液将各样品调至相同浓度。进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及蛋白电转移实验^[5]。将 PVDF 膜以含有 5% 脱脂奶粉的 TTBS (0.1% Tween-20, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl) 室温封闭非特异结合位点 2 h。将膜与稀释的指定的一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TTBS 液洗膜 3 次。将膜移入二抗工作液 (用 TTBS 液按 1:5 000 稀释 HRP 标记的二抗), 室温反应 1 h。TTBS 液洗膜 3 次, 加入化学发光底物反应液, ECL 照相系统照相^[5-6]。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 18.0 统计软件对实验数据进行分析, 计量资料用均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$)

表示,进行单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 睿臻对肿瘤细胞的生长抑制作用 采用 MTT 法检测睿臻对肿瘤细胞作用 120 h 后的增殖抑制作用。睿臻的 MTT 结果显示,睿臻对体外培养的肺癌细胞株、肾癌细胞株、乳腺癌细胞株、胶质母细胞瘤细胞株的增殖均有一定的抑制作用。其中,睿臻对肺癌细胞株的生长抑制作用最为明显,对 A549 细胞株、NCI-H460 细胞株和 NCI-H1975 细胞株的 IC_{50} 值分别为 $(98.42 \pm 1.21) \mu\text{g/mL}$ 、 $(60.02 \pm 1.77) \mu\text{g/mL}$ 和 $(60.41 \pm 2.56) \mu\text{g/mL}$,在后续研究中选择肺癌继续进行生物学功能的研究及机制探讨。见表 1。

2.2 睿臻对小鼠移植瘤 Lewis 肺癌的生长及中位生存期的影响 采用小鼠 Lewis 肺癌移植瘤模型进一步考察睿臻的体内抗肿瘤作用。睿臻可剂量依赖性抑制小鼠 Lewis 肺癌移植瘤的生长,与溶剂对照组比较,睿臻 2.25 g/kg、4.5 g/kg 和 9.0 g/kg 3 个剂量的抑制率分别为 33.8%、39.9% 和 70.00% ($P < 0.001$)。睿臻不仅可以抑制小鼠 Lewis 肺癌的生长,还可延长 Lewis 肺癌荷瘤小鼠的中位生存期。如表 3 所示,与溶剂对照组比较,阳性药组对降低荷瘤小鼠的中位生存期,为 21 d;而睿臻 4.5 g/kg 和 9.0 g/kg 剂量组均可明显延长荷瘤鼠的中位生存期,其分别为 26 d 和 27 d,而溶剂对照组中位生存期为 24.7 d。在本实验中,溶剂对照组荷瘤小鼠在接种第 10 天,肿瘤体积为 $(1\,998.71 \pm 356.30) \text{mm}^3$;而在睿臻 9.0 g/kg 剂量组中,肿瘤体积为 $(749.35 \pm 355.05) \text{mm}^3$,抑制率达到 62.51% ($P < 0.001$),提示睿臻在抑制小鼠肺癌生长的同时可延长荷瘤小鼠的生存时间。见表 2,图 1。

在小鼠 Lewis 肺癌移植瘤模型中,睿臻不仅对

肿瘤生长具有较强的抑制作用,还可增强 Taxol 的抗肿瘤活性。与溶剂对照组比较,15.0 mg/kg Taxol 对小鼠 Lewis 肺癌生长的抑制率为 43.4% ($P < 0.001$);灌胃给予 2.5 g/kg、4.5 g/kg 睿臻对小鼠 Lewis 肺癌的生长抑制率分别为 33.8% 和 39.9% ($P < 0.001$),而当与 15.0 mg/kg Taxol 联合应用时抑制率可分别达到 55.8% ($P > 0.05$,与单独使用 Taxol 组比较)和 58.0% ($P < 0.05$,与单独使用 Taxol 组比较),提示睿臻与 Taxol 具有协同效应。见表 2,图 1。

胸腺是 T 细胞分化、发育、成熟的场所,其功能与免疫紧密相关,胸腺指数可在一定程度上反映机体免疫功能的强弱。本研究通过比较各组动物间的胸腺指数以考察睿臻对荷瘤小鼠免疫系统的影响。与正常小鼠比较,荷瘤小鼠的胸腺指数明显降低 ($P < 0.05$);与溶剂对照组比较,睿臻在 4.5 g/kg 和 9.0 g/kg 剂量下,可升高荷瘤小鼠的胸腺指数。阳性药 Taxol 给药组可引起荷瘤小鼠胸腺指数的进一步降低 ($P < 0.05$,与溶剂对照组比较)。当 4.5 g/kg 睿臻与 Taxol 联合使用时,与阳性药 Taxol 给药组比较,荷瘤小鼠的胸腺指数明显升高 ($P < 0.05$)。因此推测睿臻可以改善 Taxol 对荷瘤小鼠所造成的免疫功能抑制。见图 2。

为了初步观察睿臻在治疗中的不良反应,本研究观察了单独使用睿臻及与 Taxol 联合使用时对 Lewis 肺癌小鼠外周血计数的影响。与正常小鼠比较,荷瘤小鼠外周血中的白细胞数量显著升高 ($P < 0.001$),而红细胞数量及血红蛋白水平显著降低 ($P < 0.001$);阳性药 Taxol 可降低荷瘤小鼠外周血中的血红蛋白水平,对红细胞数量无明显影响 ($P > 0.05$)。与溶剂对照组比较,睿臻各剂量组均可升高外周血中的红细胞数量及血红蛋白水平;此结果提示,睿臻对荷瘤小鼠外周血无明显的不良反应,且可升高化疗后的红细胞及血红蛋白数量。见表 4。

表 1 睿臻对肿瘤细胞增殖活性的影响

	IC_{50}				
	肺癌			肾癌	乳腺癌
	A549	NCI-H460	NCI-H1975	Caki-1	MCF-7
睿臻	98.42 ± 1.21	60.02 ± 1.77	60.41 ± 2.56	144.68 ± 15.85	170.73 ± 26.30
阳性药	$(2.34 \pm 0.14) \times 10^{-9}$	$(1.18 \pm 1.62) \times 10^{-9}$	$(1.85 \pm 1.45) \times 10^{-9}$	$(1.34 \pm 0.29) \times 10^{-5}$	$(1.06 \pm 0.81) \times 10^{-8}$

	IC_{50}			
	脑瘤		胰腺癌	
	U87 MG	T98G	Daoy	BxPC3
睿臻	189.48 ± 3.22	187.12 ± 2.94	179.08 ± 26.51	336.16 ± 39.00
阳性药	$(8.25 \pm 2.52) \times 10^{-6}$	$(7.89 \pm 3.97) \times 10^{-6}$	$(8.12 \pm 7.00) \times 10^{-6}$	$(2.51 \pm 0.74) \times 10^{-6}$

注:睿臻和阳性药浓度单位分别为: $\mu\text{g/mL}$, mol/L;肺癌和乳腺癌的阳性药是 Taxol,肾癌的阳性药是 Sorafenib,脑瘤的阳性药为 Iressa,胰腺癌的阳性药为 Gemcitabine

表 2 睿臻与 Taxol 联合使用对小鼠 Lewis 肺癌的生长抑制作用

组别	剂量(g·kg)	给药时程	动物数(n) 开始/结束	体重(g)		瘤重 结束(g)	抑制率 (%)
				开始	结束		
溶剂对照组			10/10	17.0±0.4	23.7±2.2	3.75±0.86	
Taxol	0.015	7,10,13	10/10	16.7±0.5	23.9±1.6	2.12±0.6***	43.4
睿臻	2.25	1-5,7-16	10/10	17.3±0.4	22.8±2.5	2.48±0.7***	33.8
	4.5	1-5,7-16	10/10	17.2±0.6	21.7±2.6	2.25±1.07***	39.9
	9.0	1-5,7-16	10/10	17.0±0.4	20.8±1.8	1.13±0.42***	70.0
睿臻 + Taxol	2.25 + 0.015	1-5,7-16;7,10,13	10/10	16.7±0.3	21.7±2.2	1.66±0.55***	55.8
	4.5 + 0.015	1-5,7-16;7,10,13	10/10	17.0±0.8	22.3±2.1	1.57±0.55*** [△]	58.0

注:与溶剂对照组比较,***P<0.001;与单独使用 Taxol 组比较,[△]P<0.05

表 3 睿臻对小鼠 Lewis 肺癌的生长及存活时间的影响

组别	剂量(g·kg)	给药时程	体重 开始(g)	接种第 10 天		生存时间 (d)	中位生存 期(d)
				肿瘤体积(mm ³)	抑制率(%)		
溶剂对照组			16.79±0.49	1998.71±356.30		21.9±5.7	24.7
Taxol + DDP	0.02 + 0.005	7,14,21,28	16.87±0.42	288.87±182.66***	85.55	20.6±4.7	21.0
睿臻	2.25	1-29	16.58±0.67	1794.63±684.85	10.21	25.3±3.0	25.0
	4.5	1-29	16.88±0.69	1577.58±583.47	21.07	26.1±2.5*	26.0
	9.0	1-29	16.85±0.52	749.35±355.05***	62.51	26.9±2.8*	27.0

注:与溶剂对照组比较,*P<0.05,***P<0.001

表 4 睿臻与 Taxol 联合使用对 Lewis 肺癌小鼠外周血计数的影响

组别	剂量(g·kg)	动物数(n) 开始/结束	外周血计数		
			WBC(×10 ⁹ /L)	RBC(×10 ¹² /L)	HGB(g·L)
正常对照组		10/10	4.63±0.81	8.87±0.64	148.83±10.57
溶剂对照组		10/10	21.45±3.65 ^{△△△}	3.66±0.53 ^{△△△}	72.00±6.55 ^{△△△}
Taxol	0.015	10/10	12.85±7.9**	3.68±1.21	65.1±20.05
睿臻	2.25	10/10	14.71±2.49***	4.91±1.03**	91.40±13.18***
	4.5	10/10	14.8±3.03***	4.77±1.43*	85.10±18.85
	9.0	10/10	17.43±6.23	5.32±1.47**	95.50±16.30***
睿臻 + Taxol	2.25 + 0.015	10/10	10.36±5.91***	4.74±1.16*	81.60±17.56
	4.5 + 0.015	10/10	15.93±8.24***	4.30±1.76	75.10±28.59

注:与溶剂对照组比较,*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001;与正常对照组比较,^{△△△}P<0.001;WBC:白细胞计数,RBC:红细胞计数,HGB:血红蛋白

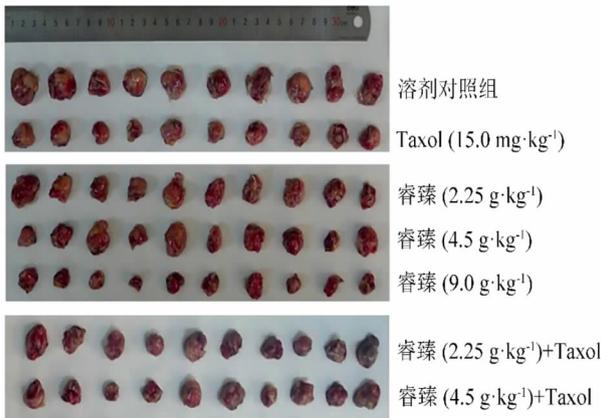


图 1 睿臻与 Taxol 联合使用对小鼠 Lewis 肺癌的生长抑制作用

2.3 睿臻对肺癌细胞凋亡的影响 为了进一步验证睿臻对肺癌细胞的作用,本文采用流式细胞术检测睿臻对肺癌细胞凋亡的影响。睿臻处理 A549 和

NCI-H460 细胞 72 h 后,凋亡细胞数剂量依赖性增加。在 A549 细胞中,在 48.0 μg/mL 和 96.0 μg/mL 剂量下,凋亡细胞所占比例分别为(20.37 ± 4.40)%和(31.17 ± 2.25)%,而溶剂对照组凋亡细胞比例为(12.93 ± 2.00)%。在 NCI-H460 细胞中,当睿臻剂量为 60.0 μg/mL,120.0 μg/mL 时,可分别引起(14.00 ± 2.69)%和(31.27 ± 8.83)%的细胞凋亡,对照组凋亡率仅为(7.23 ± 2.31)%。上述结果表明,睿臻可有效地诱导肺癌细胞发生凋亡。见图 3。

2.4 睿臻对 A549 和 NCI-H460 细胞侵袭能力的影响 采用重组基质膜侵袭实验观察对肺癌细胞侵袭能力的影响,在 96.0 μg/mL 和 192.0 μg/mL 剂量下,睿臻可显著减少 A549 细胞和 NCI-H460 细胞穿过重组基底膜的数量。在 A549 细胞中,对肿瘤细胞侵袭的抑制率分别为(66.0 ± 1.54)%和(80.2 ±

3.59)% ; 在 NCI-H460 细胞中,抑制率分别为 (70.54 ± 1.68)% 和 (83.5 ± 6.08)%。在 250.0 μg/mL 剂量下,睿臻作用 18 h 对 A549 和 NCI-H460 细胞的生长抑制率仅为 (13.00 ± 2.22)% 和 (11.89 ± 14.60)% ,而侵袭实验中选用最大浓度为 192.0 μg/mL,说明睿臻抑制 A549 和 NCI-H460 细胞侵袭的活性可能不是由抑制细胞生长造成的。见图 4。

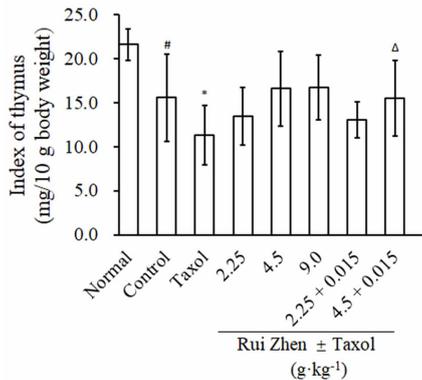


图2 睿臻与 Taxol 联合使用对 Lewis 肺癌小鼠胸腺指数的影响

注:Normal 为正常对照组,Control 为溶剂对照组,Rui Zhen 为睿臻给药组;Taxol 的给药剂量为 0.015 g/kg;与正常对照组比较, # $P < 0.05$;与溶剂对照组比较, * $P < 0.05$;与单独使用 Taxol 组比较, $\Delta P < 0.05$

PARP 等凋亡相关蛋白表达的影响^[12-15]。本研究结果显示,睿臻可显著上调 p53、c-caspase3 和 c-PARP 的水平。提示睿臻可能通过阻滞 Raf/MEK/ERK 信号通路,促进凋亡相关蛋白的表达,诱导肿瘤细胞发生凋亡,从而抑制肺癌细胞增殖。见图 5。

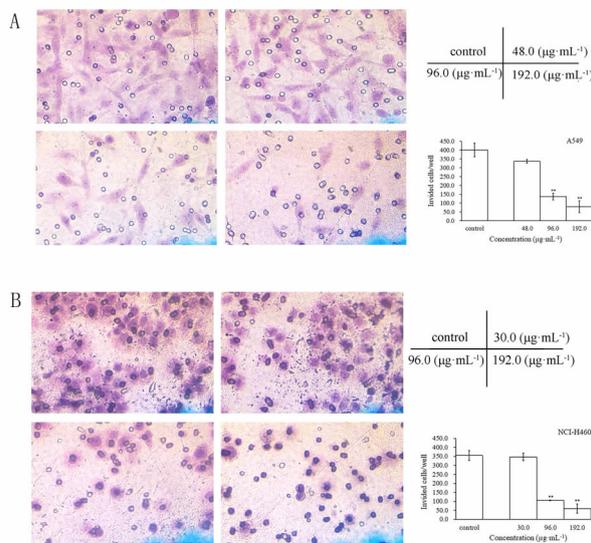


图4 睿臻对 A549 和 NCI-H460 细胞侵袭能力的影响

注:A 和 B 分别表示睿臻对 A549 和 NCI-H460 细胞侵袭能力的影响;与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

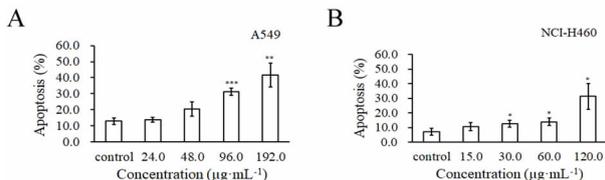


图3 睿臻对 A549 和 NCI-H460 细胞凋亡的影响

注:A 和 B 分别表示睿臻对 A549 和 NCI-H460 细胞凋亡的影响;与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2.5 睿臻对小鼠 Lewis 肺癌组织内蛋白表达水平的影响 细胞增殖的失控和细胞凋亡的抑制是肿瘤发生发展的重要基础。这两者共同引起体内细胞动态平衡的破坏^[7]。上述研究结果表明,睿臻可明显抑制肺癌细胞增殖、侵袭转移,诱导肺癌细胞凋亡,为探讨其作用机制,采用 Western Blot 方法检测药物对相关蛋白表达水平的影响。文献报道,c-Raf 介导的信号转导通路能抑制肿瘤细胞凋亡、促进增殖和存活,且在肺癌的发生发展过程中具有重要的作用^[8-11],因此我们首先检测了睿臻对 c-Raf 相关蛋白活性的影响。睿臻可显著抑制 Lewis 肺癌组织内 p-c-Raf(Ser289)、p-MEK 和 p-ERK1/2 的蛋白表达,在 4.5 g/kg 剂量下对 MEK 和 ERK 的总水平并无显著影响,但在 9.0 g/kg 剂量下略降低两者的表达。进一步检测睿臻对肺癌组织内 p53、c-caspase3 和 c-

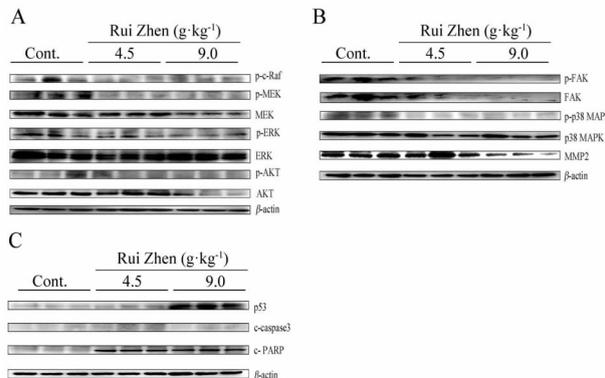


图5 睿臻对小鼠 Lewis 肺癌肿瘤组织内蛋白表达水平的影响

注:Cont. 为溶剂对照组,Rui Zhen 为睿臻给药组;A 为 c-Raf 介导的信号转导通路,B 为 FAK/MAPK 信号转导通路,C 为凋亡相关蛋白

FAK/p38 信号通路与细胞的侵袭转移能力密切相关^[16-17],为此进一步检测了睿臻作用后肺癌组织内 FAK/p38 信号通路相关蛋白表达情况。结果表明,睿臻能显著降低 p-FAK (Tyr397)、p-p38 MAPK 和 MMP2 的表达,但在 9.0 g/kg 剂量下,对 FAK 的总水平有明显的抑制作用,而对 p38 MAPK 的总水平无显著影响。因此,我们初步推测睿臻抑制肺癌细胞的侵袭转移能力可能与其对 FAK/p38

信号通路的抑制作用有关。

3 讨论

肺癌具有发病率高、死亡率高,易转移 3 大特点,且临床治疗难度大^[18]。目前,化学治疗仍然是治疗晚期肺癌常用的治疗手段,但由于化疗易引起机体耐药及较严重的不良反应^[3,4,19-21],因此寻找安全有效治疗肺癌的方法和药物是各国科学家研究的热点和重点。中药具有多靶标的特点,在治疗上通常会产生药效叠加,毒性分散的效果^[3,16,19],所以预期中药复方会对癌症起到较好的治疗及辅助治疗的作用。山楂中含有山楂酸、果皮多酚及果肉多酚等多种抗癌物质^[22-23]。沙棘不但在免疫调节方面发挥着重要的作用,同时还在抗癌抑瘤方面疗效显著^[24]。枸杞多糖是枸杞中的主要成分,能够抑制多种肿瘤的生长,提高机体免疫力^[25-26]。虫草素对肺癌、肝癌、结肠癌等多种肿瘤细胞生长增殖均具有抑制作用^[27]。因此研究以上述成分为主的天然药物组方——睿臻的抗肺癌作用及其机制研究具有重要的意义,且该组方的抗肺癌作用国内外未见报道。

本研究中发现睿臻对 A549、NCI-H460 和 NCI-H1975 肺癌细胞株具有较好的体外抑制活性,进一步体内研究结果表明其可抑制小鼠 Lewis 肺癌的生长,延长荷瘤鼠的中位生存期。目前,Taxol 为主要的肺癌化疗药物,睿臻可增加 Taxol 的抗肿瘤活性,同时可升高荷瘤小鼠的胸腺指数,升高 Taxol 降低的胸腺指数,推测睿臻可通过调节荷瘤鼠的免疫功能进而发挥其抗肿瘤作用,且睿臻可能对 Taxol 造成的免疫抑制有一定的缓解作用。睿臻对荷瘤小鼠的外周血无明显不良影响,与化疗药物 Taxol 联合使用可以增加荷瘤鼠外周血中红细胞和血红蛋白的数量,提示睿臻有可能对化疗药物造成的造血功能损伤起到一定的缓解作用,因此睿臻与化疗药 Taxol 联用具有增效减毒的作用,为临床应用提供一定的依据。

睿臻可降低 Lewis 肺癌组织内 c-Raf 的磷酸化水平,导致 MEK 磷酸化及下游信号通路的显著抑制,表现为 ERK 磷酸化水平的明显下降,进而促进 p53、c-caspase3 和 c-PARP 的表达。Raf/MEK/ERK 信号转导通路可促进细胞增殖,调控肿瘤细胞增殖及凋亡;在 Raf/MEK/ERK 信号通路的作用下,细胞内 c-caspase-3、c-PARP 表达水平降低,肿瘤细胞凋亡受到抑制。因此,睿臻可能是通过抑制肺癌组织内 c-Raf 的磷酸化水平,进而抑制 Raf/MEK/ERK 信号通路相关蛋白的表达,从而上调细胞凋亡蛋白的

表达,发挥抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡的作用。睿臻可降低肺癌组织内 p-FAK (Tyr397) 的水平,进而抑制 p38 MAPK 磷酸化及下游信号通路蛋白 MMP2 等的表达。转移是肺癌致死的主要原因,这是临床上治疗肺癌的难点,也是肺癌研究的热点^[21,28]。已有研究表明 FAK/p38 信号通路参与细胞的侵袭转移过程^[16-17],因此推测睿臻抑制肺癌细胞的转移的作用有可能与抑制 FAK/p38 MAPK 信号通路相关。

本研究结果初步证明,睿臻可通过阻滞 Raf/MEK/ERK 和 FAK/p38 信号通路,发挥诱导细胞凋亡,抑制肿瘤细胞增殖及侵袭的作用。在显著抑制肿瘤生长的同时,睿臻对荷瘤小鼠的免疫功能及造血功能亦有一定的保护作用。睿臻在抑制肺癌的发生发展方面表现出较好的效果和广阔的应用前景,其抗肿瘤及免疫调节机制有待进一步研究,期望经过我们的努力,睿臻能够开发成为抗肿瘤的复方制剂,造福广大肿瘤患者。

参考文献

- [1]本刊编辑部. 2017 年中国最新癌症数据[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2017, 24(5): 574-574.
- [2]Gouveinhas C, De Mello RA, Oliveira D, et al. Lung cancer: a brief review of epidemiology and screening[J]. Future Oncol, 2018, 14(6): 567-575.
- [3]陈一天, 封冰. 小细胞肺癌化疗耐药研究进展[J]. 医学研究生学报, 2012, 25(5): 515-519.
- [4]陈瑜容, 王文忠. 艾迪注射液联合 GP 方案治疗晚期非小细胞肺癌的效果分析[J]. 中国当代医药, 2014, 21(15): 84-85, 91.
- [5]周璇琪, 张莉婧, 杨瀚泽, 等. Aurora 激酶抑制剂 ZLJ213 抗人结肠癌的作用[J]. 药理学学报, 2015, 50(7): 854-860.
- [6]Li Y, Tang K, Zhang L, et al. The molecular mechanisms of a novel multi-kinase inhibitor ZLJ33 in suppressing pancreatic cancer growth[J]. Cancer Lett, 2015, 356(2 Pt B): 392-403.
- [7]Torchia EC, Zhang L, Huebner AJ, et al. Aurora kinase-A deficiency during skin development impairs cell division and stratification[J]. J Invest Dermatol, 2013, 133(1): 78-86.
- [8]Powell CA, Halmos B, Nana-Sinkam SP. Update in lung cancer and mesothelioma 2012[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2013, 188(2): 157-166.
- [9]Antón I, Molina E, Luis-Ravelo D, et al. Receptor of activated protein C promotes metastasis and correlates with clinical outcome in lung adenocarcinoma[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2012, 186(1): 96-105.
- [10]Wang ZL, Fan ZQ, Jiang HD, et al. Selective Cox-2 inhibitor celecoxib induces epithelial-mesenchymal transition in human lung cancer cells via activating MEK-ERK signaling[J]. Carcinogenesis, 2013, 34(3): 638-646.
- [11]Cai Z, Yang F, Yu L, et al. Activated T cell exosomes promote tumor invasion via Fas signaling pathway[J]. J Immunol, 2012, 188(12): 5954-5961.

- [12] Rathore S, Datta G, Kaur I, et al. Disruption of cellular homeostasis induces organelle stress and triggers apoptosis like cell-death pathways in malaria parasite[J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6:e1803.
- [13] Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, et al. Old, new and emerging functions of caspases[J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22(4):526-539.
- [14] Walters J, Pop C, Scott FL, et al. A constitutively active and uninhibitable caspase-3 zymogen efficiently induces apoptosis[J]. *Biochem J*, 2009, 424(3):335-345.
- [15] Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, et al. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes[J]. *J Med Genet*, 2009, 46(8):497-510.
- [16] Liu YZ, Yang CM, Chen JY, et al. Alpha-carotene inhibits metastasis in Lewis lung carcinoma in vitro, and suppresses lung metastasis and tumor growth in combination with taxol in tumor xenografted C57BL/6 mice[J]. *J Nutr Biochem*, 2015, 26(6):607-615.
- [17] Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(8):537-549.
- [18] 邹小农, 贾漫漫, 王鑫, 等. 中国肺癌和烟草流行及控烟现状[J]. *中国肺癌杂志*, 2017, 20(8):505-510.
- [19] Zhen YZ, Hu G, Zhao YF, et al. Synergy of Taxol and rhein lysinate associated with the downregulation of ERK activation in lung carcinoma cells[J]. *Oncol Lett*, 2013, 6(2):525-528.
- [20] 祝冰晶, 周向东. PI3K/AKT 通路在肺癌转移和耐药中的研究[J]. *中国肺癌杂志*, 2011, 14(8):689-694.
- [21] Nichols L, Saunders R, Knollmann FD. Causes of death of patients with lung cancer[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2012, 136(12):1552-1557.
- [22] Jia L, Popovich D G, Hao J. Hawthorn Flavonoid Extract: Antioxidant Activity and Growth Inhibition Effect on Cancer Cells[J]. *Food Science*, 2010, 31(3):220-223.
- [23] 李婷. 山楂果皮、果肉多酚抑制 MCF-7 细胞的活性及促进 NO₂-还原释放 NO 的作用[D]. 西安: 陕西师范大学, 2014.
- [24] 郑玉, 张宏方, 于东波, 等. 沙棘抗肿瘤及相关免疫研究进展[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2016, 14(17):150, 封3-封4.
- [25] 杨毅, 蒋兰. 枸杞多糖抗肿瘤作用及机制研究进展[J]. *亚太传统医药*, 2017, 13(22):79-82.
- [26] 郭培培. 枸杞多糖的抗肿瘤作用及其机理研究现状[J]. *北京联合大学学报*, 2011, 25(4):26-29, 40.
- [27] Tian X, Li Y, Shen Y, et al. Apoptosis and inhibition of proliferation of cancer cells induced by cordycepin[J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(2):595-599.
- [28] Talmadge JE, Fidler IJ. AACR centennial series; the biology of cancer metastasis: historical perspective[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(14):5649-5669.

(2018-03-28 收稿 责任编辑: 杨觉雄)

(上接第 1509 页)

- [6] 丁杰. 慢性束缚应激对大鼠行为和 中枢 AMPA 受体的影响及 逍遥散的调节作用[D]. 北京: 北京中医药大学, 2007:35.
- [7] 王跃春. 大鼠 Y-型迷宫测试法的筛选与优化[J]. *中国行为医学科学*, 2005, 14(1):50-52.
- [8] 瞿礼萍, 曾南, 卢陆飞, 等. 逍遥散对小鼠学习记忆能力的影响[J]. *中药药理与临床*, 2008, 24(6):1-3.
- [9] 徐志伟, 敖海清, 严灿. 逍遥散对慢性心理应激大鼠空间学习记忆能力的影响[J]. *中国行为医学科学*, 2004, 13(5):484-485.
- [10] 郭晓玲, 张轶芳, 刘玥芸, 等. 精制逍遥散对抑郁症大鼠行为学及海马区 P450_{sec} 蛋白表达的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2013, 28(5):1253-1258.
- [11] 刘玥芸, 郭晓玲, 赵宏波, 等. 逍遥散提取物对肝郁脾虚证模型大鼠疗效的行为学评价[J]. *中华中医药杂志*, 2013, 28(7):2138-2141.
- [12] 严灿, 徐志伟, 李艳, 等. 调肝、补肾、健脾方药对慢性心理应激大鼠单胺类神经递质影响的比较研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2002, 22(12):925-928.
- [13] 郭德玉, 陈铁玉, 李斌, 等. 不同年龄大鼠学习记忆能力及旷场行为比较[J]. *中国实验动物学报*, 1998, 6(1):19-23.
- [14] 王宇红, 李波, 蔡光先, 等. 逍遥方 3 种制剂的疏肝健脾比较研究[J]. *中国中药杂志*, 2013, 37(19):2951.
- [15] 黄娜娜, 孙晓倩, 杨倩, 等. 大鼠急性肝损伤(肝郁脾虚证)病证结合模型的研究[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(23):4400-4407.
- [16] Xiaohong Li, Jiayu Chen, Guangxin Yue, et al. Gene Expression Profile of the Hippocampus of Rats Subjected to Chronic Immobilization Stress[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3):e57621.
- [17] Ohl F, Fuchs E. Differential effects of chronic stress on memory processes in the tree shrew[J]. *Brain Res Cogn Brain Res*, 1999, 7:379-387.
- [18] 马强, 王静. 慢性应激对大鼠学习记忆能力和海马 LTP 的影响[J]. *中国应用生理学杂志*, 2000, 16(4):318-320.
- [19] Kempermann G, Kronenberg G. Depressed new neurons—adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression[J]. *Biol Psychiatry*, 2003, 54:499-503.

(2018-04-19 收稿 责任编辑: 徐颖)