

扶肺煎抑制肺癌增殖和转移的体内外研究

陈观平, 汪一帆, 应栩华

(浙江省立同德医院中西医结合肿瘤研究所, 浙江杭州 310012)

摘要:【目的】观察扶肺煎对肺癌增殖和转移的抑制作用。【方法】(1)体外研究:制备扶肺煎含药血清,以信号转导与转录激活因子(STAT3)抑制剂AG490、顺铂为阳性对照药,培养人肺癌A549、SPC-A1细胞,采用细胞计数试剂盒8(CCK8)法测定细胞增殖情况,细胞划痕实验观察细胞迁移能力,Transwell实验观察细胞体外侵袭能力,蛋白免疫印迹法检测细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)、细胞周期蛋白依赖性激酶4(CDK4)、STAT3、磷酸化STAT3(p-STAT3)蛋白的表达。(2)体内研究:取48只SPF级雄性C57BL/6小鼠,建立Lewis肺癌移植瘤模型,给予不同剂量扶肺煎、顺铂(阳性对照药)灌胃,第15天处死小鼠并剥离肺脏观察转移灶情况,将移植瘤称质量,计算抑瘤率及肺转移抑制率,并采用免疫组织化学法检测移植瘤组织Cyclin D1、CDK4、p-STAT3表达。【结果】扶肺煎组的A549、SPC-A1细胞增殖能力、迁移及侵袭能力均低于空白对照组,接近AG490及顺铂处理水平。在体内,扶肺煎高剂量组、顺铂组的抑瘤率分别为26.67%、52.53%,肺转移抑制率分别达到了28.76%、33.82%,且各给药组p-STAT3、Cyclin D1、CDK4表达水平均有所下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。【结论】扶肺煎可通过抑制STAT3蛋白的活化,降低Cyclin D1、CDK4的表达,起到控制肿瘤细胞生长及分化的作用,从而干预肺癌转移的形成。

关键词:扶肺煎;肺癌;侵袭;转移;STAT3信号通路;A549细胞;SPC-A1细胞;Lewis荷瘤小鼠

中图分类号:R285.5

文献标志码:A

文章编号:1007-3213(2021)05-1009-09

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.05.027

In vivo and In vitro Study on Fufei Jian Inhibiting Proliferation and Metastasis of Lung Carcinoma

CHEN Guan-Ping, WANG Yi-Fan, YING Xu-Hua

(Cancer Institute of Integrated Chinese and Western Medicine, Zhejiang Provincial Litongde Hospital, Hangzhou 310012 Zhejiang, China)

Abstract: Objective To observe the inhibiting effects of *Fufei Jian* on proliferation and metastasis of lung carcinoma. **Methods** (1) *In vitro*: *Fufei Jian*-containing serum was prepared for culturing lung cancer A549 and SPC-A1 cells, with signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) inhibitor AG490 and DDP as positive control drug. Cell count kit 8 (CCK-8) assay was used to detect the survival ability of A549 and SPC-A1 cells. Scratch assay and Transwell cell invasion assay were used to observe the migration and invasion abilities, respectively. Western blotting assay was used to detect the expression levels of Cyclin D1, cyclin-dependent kinase 4 (CDK4), STAT3 and phosphorylated STAT3 (p-STAT3). (2) *In vivo*: Lewis lung cancer model was established in 48 male C57BL/6 mice. After intragastric administration of *Fufei Jian* and DDP (as positive control drug), respectively, on day 15 all the mice were sacrificed by cervical luxation to observe lung metastatic foci. And then the Xenograft tumors mass was weighed, the inhibiting tumor growth rate and pulmonary metastasis inhibition rate were calculated, the expression levels of Cyclin D1, CDK4 and p-STAT3 were determined by immunohistochemical method. **Results** The proliferation, migration and invasion abilities of A549 and SPC-A1 cells in *Fufei Jian* group were lower than those in the blank control group, near to the levels of AG490 and DDP treatment groups. *In vivo*, the inhibiting tumor growth rate in high-dose *Fufei Jian* group and DDP group was

收稿日期: 2020-07-06

作者简介: 陈观平(1982-), 硕士, 副研究员, E-mail: beyond_cgp@163.com

通讯作者: 应栩华(1961-), 学士, 研究员, E-mail: xuhuaying668@sina.com

基金项目: 浙江省基础公益研究计划项目(编号: LGF18H290003); 浙江省中医药科技计划资助项目(编号: 2017ZB017); 浙江省中医药科技计划项目(编号: 2019ZB028)

26.67%, 52.53%, respectively, and the pulmonary metastasis inhibition rate arrived to 28.76%, 33.82%, respectively. The expression levels of p-STAT3, Cyclin D1 and CDK4 in various groups were decreased *in vitro* and *in vivo* ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** *Fufei Jian* plays a role in controlling tumor cells growth and differentiation through inhibiting activation of STAT3 protein to reduce the expression of Cyclin D1 and CDK4, and thus attenuates metastasis of lung cancer.

Keywords: *Fufei Jian*; lung cancer; invasion; metastasis; STAT3 signaling pathway; A549 cells; SPC-A1 cells; Lewis tumor-bearing mice

肺癌的高转移性是造成患者高病死率的主要因素,一旦发生远处转移,严重影响患者的临床疗效及生存时间^[1]。肿瘤转移是一个非常复杂的过程^[2],深入研究肺癌的临床治疗及其远处转移的防治,使之更好地指导临床应用,对降低肺癌病死率,改善临床预后有重要意义。扶肺煎为我院多年使用的抗肺癌临床具有效验方,前期的研究表明,扶肺煎不仅能改善肺癌患者免疫功能、减轻临床症状,还可促进抑癌基因、肿瘤转移抑制基因的表达^[3];扶肺煎可降低C57BL/6小鼠Lewis肺癌移植瘤Bcl-2基因的表达,提高Bax基因的表达,起到控制细胞生长及分化、抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡的作用^[4]。而Bcl-2、Bax为信号转导与转录激活因子(STAT3)下游靶基因^[5]。为进一步探讨扶肺煎抑制肺癌细胞增殖、迁移的作用机制,本研究通过体内外实验观察扶肺煎对肺癌细胞STAT3信号传导通路的影响,以期扶肺煎临床治疗肺癌提供理论依据,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞及培养 人肺癌细胞株A549、SPC-A1购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。人肺癌细胞株A549、SPC-A1培养于37℃、体积分数5%CO₂的细胞培养箱,以含体积分数10%胎牛血清的1640培养基培养,每2d传代1次,维持细胞密度为80%左右。

1.2 实验动物 雄性健康SPF级3~4周龄C57BL/6小鼠,体质量(18±2)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物许可证号:SCXK(京)2015-0001。雄性健康SPF级6~7周龄SD大鼠,体质量(180±10)g,购自浙江维通利华实验动物技术有限公司,动物质量合格证号:Abzz0619067637。所有动物均饲养于浙江省中医药研究院SPF级实验

动物中心,饲养温度为20~25℃,湿度为40%~70%。

1.3 药物及制备 扶肺煎方药组成:生晒参10g,北沙参12g,炙黄芪30g,枸杞子12g,天葵子12g,猫爪草20g,紫花地丁20g,蜈蚣3条。上述中药材均购自杭州华东中药饮片有限公司,经浙江中医药研究院浦锦宝教授鉴定为道地药材。于浙江省立同德医院制剂室煎制,方法:称取复方中各药材后,加入10倍药量的水,煎煮2次(分别为2、1.5h),收集、合并2次滤液,减压浓缩至适当体积,最终成2g/mL的药液,于4℃保存备用。

1.4 试剂与仪器 RPMI-1640培养基(美国Hyclone公司);胎牛血清(美国Gibco公司);细胞计数试剂盒8(CCK-8)、放射免疫沉淀分析(RIPA)裂解液、二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);兔抗人细胞周期蛋白依赖性激酶4(CDK4)、细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)、STAT3、磷酸化STAT3(p-STAT3)单克隆抗体(美国CST公司);多聚体抗兔免疫球蛋白G(IgG)-辣根过氧化物酶(HRP)(武汉博士德公司,货号:SV0002)。蛋白电泳仪(美国Bio-Rad公司);CO₂培养箱(美国Thermo Fisher公司);PCR仪(美国ABI公司);倒置显微镜(日本Olympus公司);多功能酶标仪(美国MD公司)。

1.5 体外研究

1.5.1 含药血清的制备 按照中药血清药理学及前期研究基础^[6-7],将大鼠随机分为空白对照组(15只)、扶肺煎高剂量组(5只)、扶肺煎低剂量组(5只)。扶肺煎高剂量组按生药30g·kg⁻¹·d⁻¹灌胃、扶肺煎低剂量组按生药15g·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,空白对照组灌胃等体积生理盐水,连续灌胃7d,末次灌胃1h后无菌条件下取血并分离血清过滤除菌。

1.5.2 细胞分组 分为5组。空白对照组:10%

空白对照血清+RPMI-1640培养基;扶肺煎低剂量组:10%低剂量组含药血清+RPMI-1640培养基;扶肺煎高剂量组:10%高剂量组含药血清+RPMI-1640培养基;AG490组(阳性对照1):10%空白对照血清+1640培养基+10 μmol/L AG490;顺铂组(阳性对照2):10%空白对照血清+1640培养基+1 μmol/L 顺铂。

1.5.3 CCK8法测定细胞增殖情况 取对数生长期的A549、SPC-A1细胞,接种于96孔板,5×10³个/孔,每孔100 μL,培养箱中培养24 h后弃上清。按“1.5.2”项方法处理,每组设4个复孔,24、48、72 h后终止培养。按CCK-8试剂盒说明书进行操作,应用酶标仪于450 nm波长处检测各孔光密度(OD)值,计算细胞生长抑制率。细胞生长抑制率(%)=[(OD_{空白血清}-OD_{含药血清})/(OD_{空白血清}-OD_{空白})]×100%。

1.5.4 细胞划痕实验观察细胞迁移能力 取处于对数生长期状态良好的A549、SPC-A1细胞,接种于6孔板,待细胞长至80%左右,按“1.5.2”项方法处理。24 h后,在每孔板中间用1 mL枪头划痕,使各孔的细胞划痕宽度一致,磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗去除细胞碎片。每孔换成含相应血清及药物的培养基2 mL,继续培养24 h,观察细胞迁移情况,并拍照记录。

1.5.5 Transwell侵袭实验观察细胞侵袭能力 将对数生长期状态的A549、SPC-A1细胞调整密度为5×10⁵个/mL,种于6孔板,每孔2 mL,按“1.5.2”项方法处理。24 h后消化收集细胞,加入仅含RPMI-1640的培养基重悬细胞,各组细胞均调整密度为1×10⁶个/mL,分别取100 μL上述细胞悬液加入含Matrigel基质胶的Transwell 24孔板小室上室。下室加入600 μL含10%胎牛血清培养液,培养箱培养24 h。弃去Transwell小室中培养液,用棉签轻轻擦掉上层未迁移细胞,PBS洗涤,40 g/L多聚甲醛固定,结晶紫染色后拍照并统计穿过小孔的细胞。

1.5.6 蛋白免疫印迹法观察细胞Cyclin D1、CDK4、STAT3、p-STAT3蛋白的表达 按“1.5.2”项方法处理A549、SPC-A1细胞,48 h后裂解细胞并提取蛋白,BCA法测定蛋白浓度。十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分离蛋白,将蛋白转至PVDF膜,经脱脂奶粉封闭,一抗

Cyclin D1(1:1 000稀释)4℃孵育过夜,二抗IgG-HRP(1:5 000稀释)孵育1 h,电化学发光(ECL)显色,成像,最后应用ImageJ软件分析电泳条带的灰度值,以GAPDH为内参计算各组目的蛋白含量。CDK4(1:1 000)、STAT3(1:2 000)、p-STAT3(1:1 000)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)(1:1 000)等抗体的检测方法同上。

1.6 体内研究

1.6.1 造模、分组与干预方法 取对数生长期的Lewis肺癌细胞,消化、离心后,调细胞混悬液浓度为1.0×10⁷个/mL。于每只小鼠皮下接种细胞混悬液0.2 mL,建立Lewis肺癌小鼠模型。24 h后,随机分为4组,即模型组、扶肺煎低剂量组、扶肺煎高剂量组、顺铂组,每组12只,分笼饲养。根据成人的临床用药剂量换算成相应小鼠用药剂量,其中,高剂量组相当于成人等效剂量的20倍给药,低剂量组相当于成人等效剂量的10倍给药。扶肺煎低、高剂量组,分别给予扶肺煎30、60 g·kg⁻¹灌胃,每日1次;顺铂组,给予顺铂2 mg/kg腹腔注射,隔日1次;模型对照组,给予0.5 mL生理盐水灌胃。连续14 d。

1.6.2 肿瘤转移情况与抑瘤率 末次给药后24 h颈椎脱臼法处死小鼠,取肺,肉眼观察肺转移灶,计算肺部转移结节个数,计算肺转移抑制率,肺转移抑制率(%)=(模型组平均转移结节个数-治疗组平均转移结节个数)/模型组平均转移结节个数×100%。同时剥瘤并称质量,计算抑瘤率。抑瘤率(%)=(对照组平均瘤质量-治疗组平均瘤质量)/对照组平均瘤质量×100%。

1.6.3 免疫组织化学法检测移植瘤组织Cyclin D1、CDK4、p-STAT3表达 将剥离的移植瘤固定12 h后,常规石蜡包埋切片。清除内源性过氧化酶后热修复抗原。滴加单抗p-STAT3(1:200稀释)37℃孵育,DAB显色,苏木精复染后镜检。阳性表达胞浆呈棕黄色颗粒状染色,每张片子随机抽取5个高倍镜视野(×200)采集图像,用Image Pro Plus 6.0软件分析测定每个视野积分光密度(IOD)。Cyclin D1(1:250)、CDK4(1:800)检测方法同上。

1.7 统计方法 采用SPSS 17.0统计软件进行数据分析,计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素分析,两两比较采用*t*检验。以*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 扶肺煎含药血清对 A549、SPC-A1 细胞增殖的影响 表1结果显示: 干预 A549 细胞 48 h 后, 扶肺煎低、高剂量组, AG490 组, 顺铂组的 OD 值较空白对照组降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 干预 A549 细胞 72 h 后, 扶肺煎高剂量组、AG490 组、顺铂组的 OD 值较空白对照组降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。表2结果显示: 干预 SPC-A1 细胞 48 h 后,

扶肺煎高剂量组、AG490 组的 OD 值较空白对照组降低 ($P < 0.05$); 干预 SPC-A1 细胞 72 h 后, AG490 组、顺铂组的 OD 值较空白对照组降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。表明扶肺煎可抑制 A549、SPC-A1 细胞的增殖, 抑制 A549 细胞的效果优于 SPC-A1 细胞, 且随扶肺煎含药血清处理时间的延长, 干预作用逐渐减弱, 48 h 作用效果较好。

表1 扶肺煎含药血清对 A549 细胞增殖的影响

Table 1 Effect of *Fufei Jian*-containing serum on proliferation of A549 cells ($\bar{x} \pm s$)

组别	干预 24 h		干预 48 h		干预 72 h	
	OD 值	抑制率 (%)	OD 值	抑制率 (%)	OD 值	抑制率 (%)
空白对照组	1.02 ± 0.02	0	1.59 ± 0.03	0	2.24 ± 0.06	0
扶肺煎低剂量组	0.97 ± 0.02	5.29 ± 0.04	1.34 ± 0.05 ^①	15.8 ± 0.02	1.97 ± 0.08	12.3 ± 0.01
扶肺煎高剂量组	0.91 ± 0.04	10.6 ± 0.01	1.25 ± 0.04 ^①	21.3 ± 0.01	1.82 ± 0.00 ^①	18.6 ± 0.04
AG490 组	0.88 ± 0.02	13.9 ± 0.03	1.19 ± 0.06 ^②	25.4 ± 0.04	1.67 ± 0.06 ^②	25.0 ± 0.07
顺铂组	0.87 ± 0.03	14.9 ± 0.02	1.21 ± 0.05 ^①	23.3 ± 0.03	1.61 ± 0.05 ^②	27.9 ± 0.06

① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$, 与空白对照组比较

表2 扶肺煎含药血清对 SPC-A1 细胞增殖的影响

Table 2 Effect of *Fufei Jian*-containing serum on proliferation of SPC-A1 cells ($\bar{x} \pm s$)

组别	干预 24 h		干预 48 h		干预 72 h	
	OD 值	抑制率 (%)	OD 值	抑制率 (%)	OD 值	抑制率 (%)
空白对照组	0.85 ± 0.03	0	1.46 ± 0.04	0	2.07 ± 0.06	0
扶肺煎低剂量组	0.80 ± 0.02	5.1 ± 0.03	1.28 ± 0.03	12.0 ± 0.02	1.94 ± 0.04	0.06 ± 0.06
扶肺煎高剂量组	0.73 ± 0.03	13.0 ± 0.03	1.14 ± 0.04 ^①	21.8 ± 0.01	1.84 ± 0.05	11.1 ± 0.01
AG490 组	0.70 ± 0.01	16.9 ± 0.02	1.15 ± 0.06 ^①	21.0 ± 0.04	1.55 ± 0.04 ^②	25.4 ± 0.03
顺铂组	0.71 ± 0.02	15.5 ± 0.03	1.24 ± 0.03	15.0 ± 0.03	1.60 ± 0.06 ^①	22.7 ± 0.04

① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$, 与空白对照组比较

2.2 扶肺煎含药血清对 A549、SPC-A1 细胞迁移的影响 图1结果显示: 扶肺煎高剂量组、AG490 组、顺铂组处理 A549、SPC-A1 细胞划痕 24 h 后划痕依旧明显, 宽度变化不明显, 而空白对照组划痕区变窄。A549 细胞, 与空白对照组比较, 扶肺煎低、高剂量组, AG490 组、顺铂组细胞迁移距离明显缩短, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); SPC-A1 细胞, 与空白对照组比较, 扶肺煎高剂量组、AG490 组、顺铂组的细胞迁移距离均明显缩短, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。表明扶肺煎均可抑制 A549、SPC-A1 细胞的迁移。

2.3 扶肺煎含药血清对 A549、SPC-A1 细胞侵袭能力的影响 图2结果显示: A549 细胞, 与空白对照组比较, 扶肺煎低、高剂量组, AG490 组、顺铂组细胞迁移数量明显减少, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); SPC-A1 细胞, 与空白对照组比较, 扶肺煎高剂量组、AG490 组、顺铂组的细胞迁移数量均明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。表明扶肺煎均可抑制 A549、SPC-A1 细胞的侵袭转移。

2.4 扶肺煎含药血清对 A549、SPC-A1 细胞 Cyclin D1、CDK4 蛋白表达的影响 图3结果显

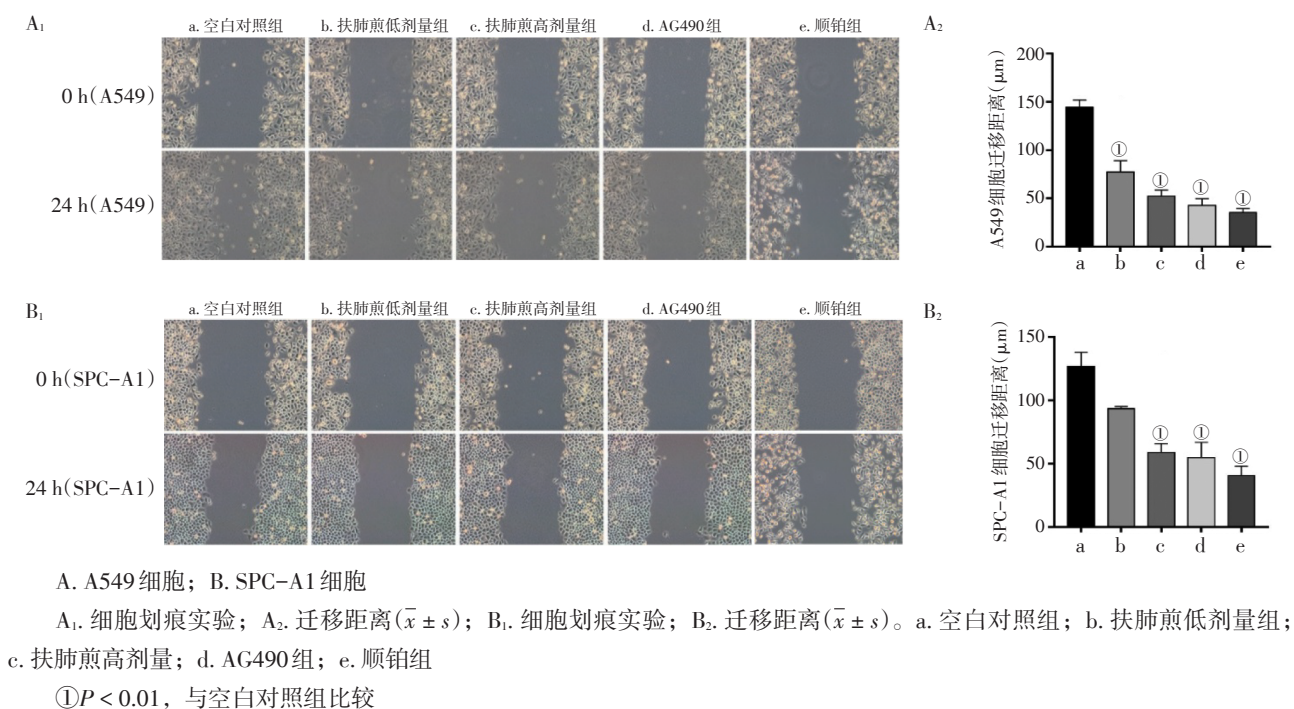


图1 扶肺煎含药血清对A549、SPC-A1细胞迁移的影响

Figure 1 Effect of *Fufei Jian*-containing serum on migration of A549 and SPC-A1 cells

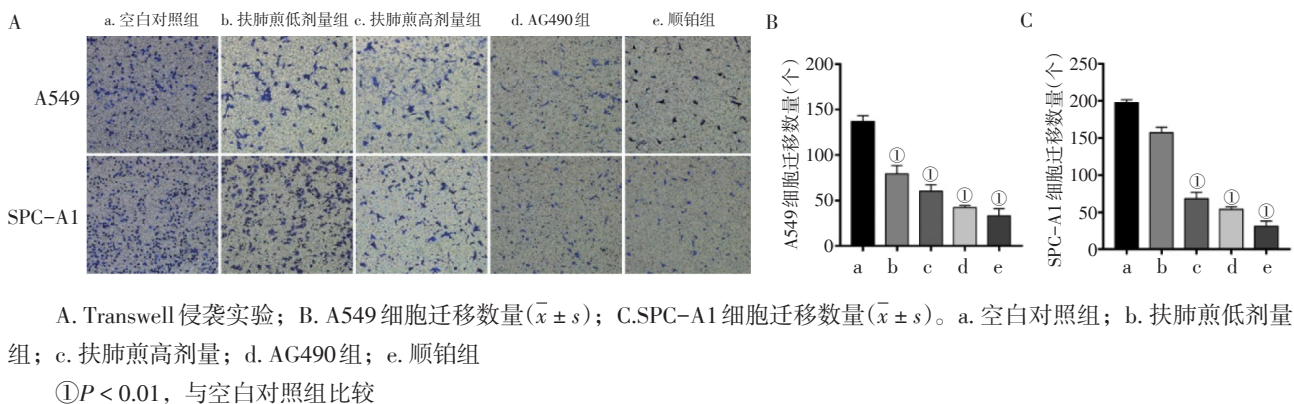


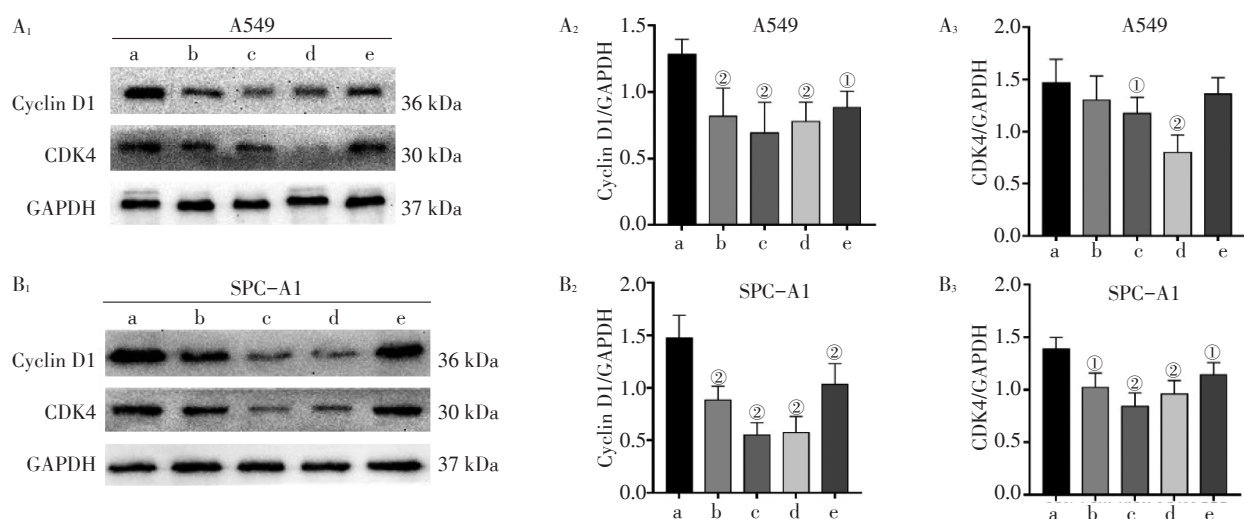
图2 扶肺煎含药血清对A549、SPC-A1细胞侵袭的影响

Figure 2 Effect of *Fufei Jian*-containing serum on invasion of A549 and SPC-A1 cells

示: A549细胞, 与空白对照组比较, 扶肺煎低、高剂量组, AG490组, 顺铂组的Cyclin D1蛋白表达水平明显降低, 扶肺煎高剂量组及AG490组的CDK4蛋白表达水平明显降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); SPC-A1细胞, 与空白对照组比较, 扶肺煎低、高剂量组, AG490组、顺铂组的Cyclin D1、CDK4蛋白表达水平均明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。表明扶肺煎可能通过抑制Cyclin D1、CDK4的表达, 抑制A549、SPC-A1细胞的侵袭转移。

2.5 扶肺煎含药血清对A549、SPC-A1细胞STAT3、

p-STAT3的影响 图4结果显示: A549、SPC-A1细胞各组STAT3表达水平比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。A549细胞, 扶肺煎高剂量组、AG490组、顺铂组的p-STAT3表达水平较空白对照组明显降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); SPC-A1细胞, 扶肺煎高剂量组、AG490组、顺铂组的p-STAT3表达水平较空白对照组明显降低, 但扶肺煎高剂量组差异无统计学意义($P > 0.05$)。表明扶肺煎可能通过抑制STAT3磷酸化, 减轻A549、SPC-A1细胞的侵袭转移能力, 对A549细胞的抑制作用更强。



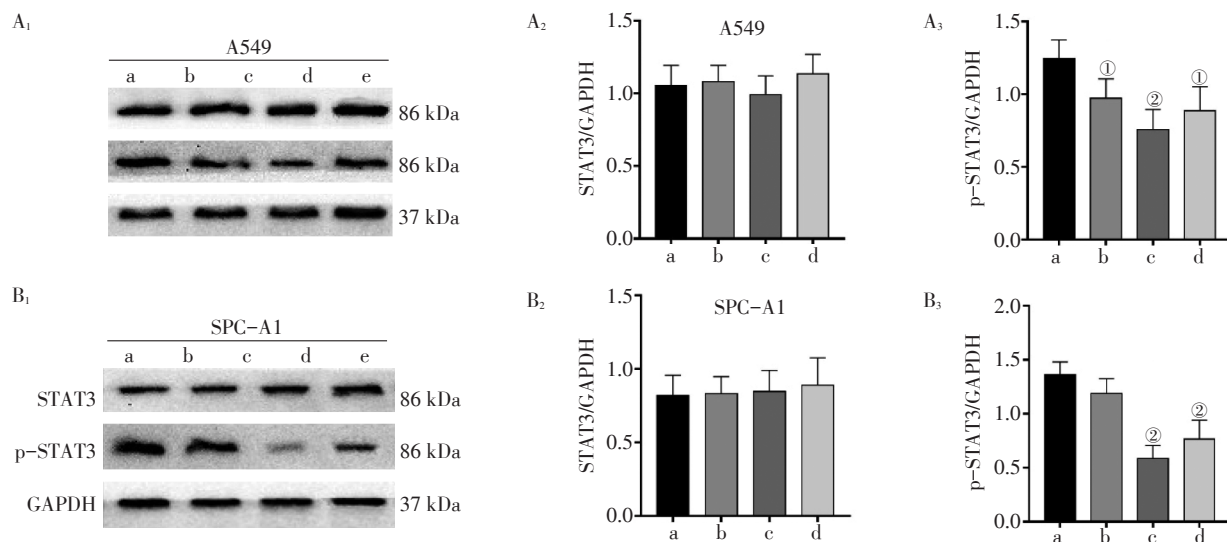
A. A549细胞; B.SPC-A1细胞

A₁. 蛋白电泳条带; A₂. Cyclin D1 相对表达量($\bar{x} \pm s$); A₃. CDK4 相对表达量($\bar{x} \pm s$)。B₁. 蛋白电泳条带; B₂. Cyclin D1 相对表达量($\bar{x} \pm s$); B₃. CDK4 相对表达量($\bar{x} \pm s$)。a. 空白对照组; b. 扶肺煎低剂量组; c. 扶肺煎高剂量; d. AG490组; e. 顺铂组

①P < 0.05, ②P < 0.01, 与空白对照组比较

图3 扶肺煎含药血清对A549、SPC-A1细胞Cyclin D1、CDK4蛋白表达的影响

Figure 3 Effect of *Fufei Jian*-containing serum on protein expression levels of Cyclin D1 and CDK4 in A549 and SPC-A1 cells



A. A549细胞; B. SPC-A1细胞

A₁. 蛋白电泳条带; A₂. STAT3 相对表达量($\bar{x} \pm s$); A₃. p-STAT3 相对表达量($\bar{x} \pm s$)。B₁. 蛋白电泳条带; B₂. STAT3 相对表达量($\bar{x} \pm s$); B₃. p-STAT3 相对表达量($\bar{x} \pm s$)。a. 空白对照组; b. 扶肺煎高剂量组; c. AG490组; d. 顺铂组

①P < 0.05, ②P < 0.01, 与空白对照组比较

图4 扶肺煎含药血清对A549、SPC-A1细胞STAT3、p-STAT3的影响

Figure 4 Effect of *Fufei Jian*-containing serum on the protein expression levels of STAT3 and p-STAT3 in A549 and SPC-A1 cells

2.6 扶肺煎对Lewis荷瘤小鼠移植瘤生长、肺转移情况的影响 图5、表3结果显示:扶肺煎低、高剂量组及顺铂组Lewis荷瘤小鼠瘤质量较模型组明

显减小(P < 0.01), 抑瘤率分别为46.81%、78.72%、76.60%;扶肺煎高剂量组、顺铂组的肺转移结节数量较模型组明显减少(P < 0.01), 肺转移抑制率

分别为0.82%、28.76%、33.82%。表明扶肺煎可抑制Lewis荷瘤小鼠移植瘤生长与肺转移。

2.7 扶肺煎对Lewis荷瘤小鼠肺脏病理形态学的影响 图6结果显示: 模型组Lewis荷瘤小鼠肺泡壁存在损伤、断裂, 且细胞浸润增加; 肺泡间隙中性粒细胞增多, 肺部存在肿瘤转移小结节; 转移的肿瘤由长梭形或短梭形细胞形成, 呈编织状排列; 细胞核椭圆形, 色深, 核仁不明显, 胞浆丰富。扶肺煎高剂量组上述情况相对较好。表明Lewis荷瘤小鼠存在肺转移, 扶肺煎可减轻Lewis荷瘤小鼠的肺转移。

2.8 扶肺煎对Lewis荷瘤小鼠移植瘤组织Cyclin D1、CDK4蛋白表达的影响 图7结果显示: 与模型组比较, 扶肺煎高剂量组及顺铂组移植瘤组织

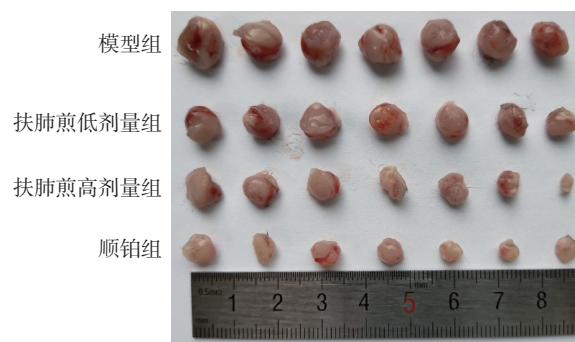


图5 各组Lewis荷瘤小鼠移植瘤大小比较

Figure 5 Comparison of the Xenograft tumors size in Lewis tumor-bearing mice of various groups

Cyclin D1、CDK4蛋白表达水平均降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 表明扶肺煎可抑制Lewis荷瘤小鼠移植瘤细胞增殖。

表3 各组Lewis荷瘤小鼠移植瘤生长、肺转移情况比较

Table 3 Comparison of the Xenograft tumors growth and lung metastasis in Lewis tumor-bearing mice of various groups

组别	瘤质量(g)	抑瘤率(%)	肺转移结节(个)	肺转移抑制率(%)
模型组	0.47 ± 0.07	—	6.12 ± 1.06	—
扶肺煎低剂量组	0.25 ± 0.05 ^①	46.81	6.07 ± 0.35	0.82
扶肺煎高剂量组	0.10 ± 0.04 ^①	78.72	4.36 ± 0.57 ^①	28.76
顺铂组	0.11 ± 0.06 ^①	76.60	4.05 ± 0.76 ^①	33.82

① $P < 0.01$, 与模型组比较

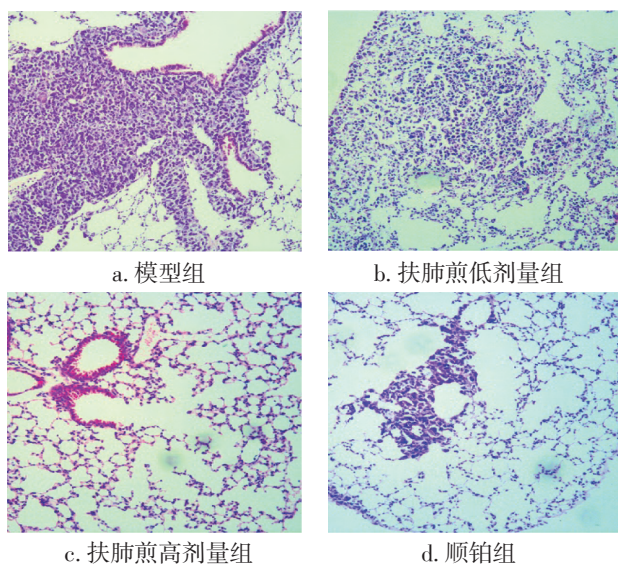


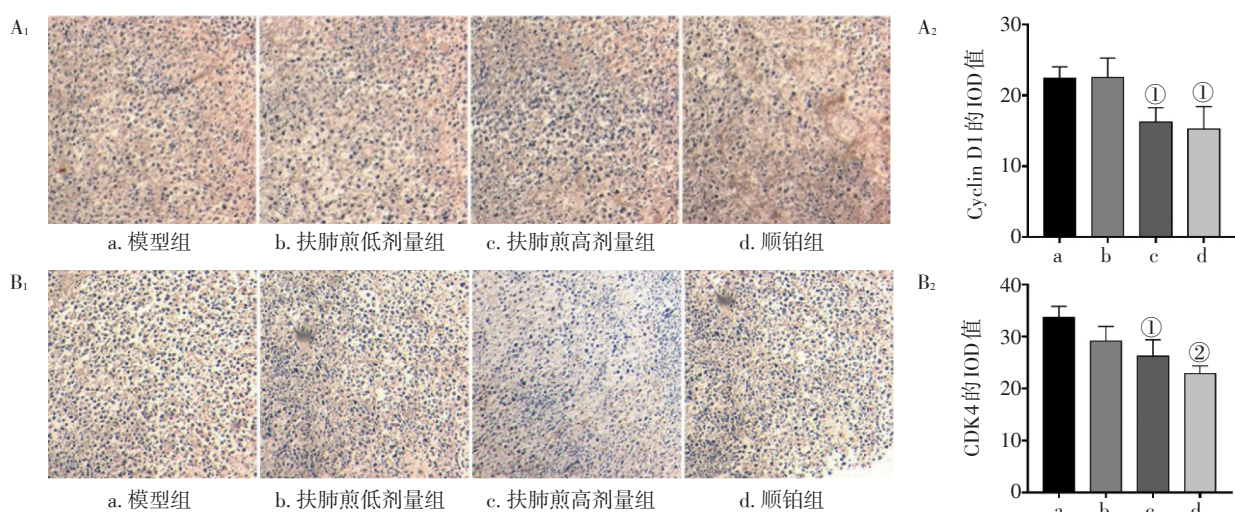
图6 扶肺煎对Lewis荷瘤小鼠肺脏病理形态学的影响 (HE染色, ×100)

Figure 6 Effect of Fufei Jian on the pathological features of lung tissue in Lewis tumor-bearing mice of various groups (HE staining, ×100)

2.9 扶肺煎对Lewis荷瘤小鼠移植瘤组织p-STAT3表达的影响 图8结果显示: 与模型组比较, 扶肺煎低、高剂量组及顺铂组移植瘤组织p-STAT3蛋白表达水平均降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 表明扶肺煎可能通过抑制STAT3蛋白的活化发挥抑制肿瘤增殖、转移的作用。

3 讨论

扶肺煎为本院效验多年的抗肺癌验方。方中: 生晒参益气补正, 北沙参养阴生津, 并为君药; 黄芪助生晒参补气, 枸杞子助北沙参养阴, 猫爪草祛肺毒, 俱为臣药; 复以蜈蚣清热, 紫花地丁散结, 天葵子散瘀, 兼具解毒之效, 均系佐药。诸药伍用, 共收扶正补虚、养阴解毒之功。由于A549细胞具有较高的增殖、侵袭迁移能力^[8], 而SPC-A1侵袭迁移能力相对较弱^[9], 故本研究选择A549、SPC-A1细胞株为研究对象观察扶肺煎对其抑制作用, 对扶肺煎抗肿瘤的药理学机制

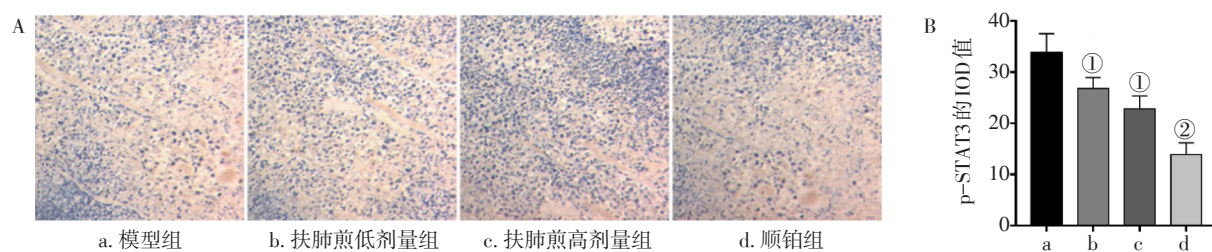


A₁. Cyclin D1 阳性细胞分布(免疫组织化学, ×200); A₂. Cyclin D1 的 IOD 值($\bar{x} \pm s$); B₁. CDK4 阳性细胞分布(免疫组织化学, ×200); B₂. CDK4 的 IOD 值($\bar{x} \pm s$)。a. 模型组; b. 扶肺煎低剂量组; c. 扶肺煎高剂量组; d. 顺铂组

① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$, 与模型组比较

图7 各组 Lewis 小鼠肺癌移植瘤组织 Cyclin D1、CDK4 蛋白表达比较

Figure 7 Effect of *Fufei Jian* on the protein expression levels of Cyclin D1 and CDK4 in Xenograft tumor tissue from Lewis tumor-bearing mice



A. p-STAT3 阳性细胞分布(免疫组织化学, ×200); B. p-STAT3 的 IOD 值($\bar{x} \pm s$)。a. 模型组; b. 扶肺煎低剂量组; c. 扶肺煎高剂量组; d. 顺铂组

① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$, 与模型组比较

图8 扶肺煎对 Lewis 荷瘤小鼠移植瘤组织 p-STAT3 表达的影响

Figure 8 Effect of *Fufei Jian* on the protein expression level of p-STAT3 in Xenograft tumor tissue from Lewis tumor-bearing mice

进行评价。本研究结果表明,扶肺煎可抑制 A549、SPC-A1 细胞的增殖,抑制 A549 细胞的效果优于抑制 SPC-A1 细胞的效果,且可抑制 2 种细胞的迁移、侵袭,提示扶肺煎可能对 A549 细胞更为敏感。

Lewis 肺癌模型广泛应用于癌转移机制及抗肿瘤药物的筛选与干预研究,是理想的动物实验模型。本研究结果显示:在 Lewis 肺癌移植瘤小鼠中,扶肺煎高剂量组及顺铂组具有较高的抑瘤率及肺转移抑制率;各组小鼠肺部均存在肿瘤细胞转移的现象,其中,模型组肺泡壁存在损伤、断裂,且细胞浸润增加,扶肺煎高剂量组情况相对较好。表明扶肺煎对 Lewis 肺癌移植瘤具有一定的

抑制作用。

肿瘤转移是一个非常复杂的过程。肿瘤细胞会侵入周围的细胞,破坏正常组织的抗癌机制,经过突变、激增等过程之后最终扩散至各个健康组织。有研究表明,在肿瘤转移过程中, Cyclin D1 扮演着重要角色^[10]。Cyclin D1 蛋白是由原癌基因 CCND1 编码的细胞周期调控蛋白,癌基因 STAT3 等可诱导癌细胞 Cyclin D1 蛋白的表达,与 CDK4、CDK6 形成复合物 Cyclin D1/CDK4、CDK6,使 Rb 蛋白磷酸化,驱动细胞从 G1 期进入 S 期^[11]。本研究结果显示,无论体外还是体内实验,扶肺煎均可降低 Cyclin D1、CDK4 蛋白的表达水平,表明其

对肿瘤细胞周期调控蛋白具有较好的抑制效果。

STAT3在恶性肿瘤的发生、发展和浸润、转移中起着重要的调控作用。正常生理情况下, STAT3的表达是一个瞬时过程, 一般呈微弱表达^[12]。而STAT3的持续高表达往往引起正常细胞的恶性转化^[13], STAT3磷酸化并被激活后转移到细胞核内, 通过SH2结构域与Cyclin D1启动子上的STAT3位点结合而启动Cyclin D1基因的表达^[14], 同时也促进抗凋亡基因Bcl-2、Bcl-xL^[15-17]等表达, 抑制肿瘤细胞凋亡, 促进细胞周期进展, 使弱转移肿瘤细胞转变为高转移癌细胞, 并增加其在体内的癌转移。而AG490作为STAT3的抑制剂, 可通过抑制STAT3的活化从而抑制肿瘤增殖^[18]。本研究结果显示, 扶肺煎可下调磷酸化STAT3的体内外表达水平, 效果接近STAT3的抑制剂AG490。提示扶肺煎在体内可能通过抑制STAT3的磷酸化水平, 从而起到抑制肿瘤细胞增殖及迁移的作用。

综上所述, 肺癌是目前人类发病率和死亡率最高的恶性肿瘤, 侵袭和转移是肺癌患者死亡的重要原因。STAT3信号通路、细胞周期蛋白表达的变化是非小细胞肺癌研究的一项重要内容。本研究结果表明, 扶肺煎能够通过抑制STAT3蛋白的活化, 降低Cyclin D1、CDK4的表达, 起到控制肿瘤细胞生长及分化的作用, 从而干预肿瘤转移的形成, 结合其临床应用价值, 值得进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 周斯悦, 段勇. 外泌体在肺癌发病机制及诊疗中的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(23): 2912-2916.
- [2] 王婉婉, 宋景双, 李佳乐, 等. 微泡在恶性肿瘤转移中的研究进展[J]. 癌症进展, 2019, 17(13): 1509-1511.
- [3] 许继平, 裘维焰, 应栩华, 等. 扶肺煎对原发性肺癌抗转移的临床研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2000(8): 40-41.
- [4] 陈观平, 王刚, 汪一帆, 等. 扶肺煎对Lewis肺癌移植瘤的抑制作用及机制研究[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(12): 2935-2937.
- [5] AVALLE L, CAMPOREALE A, CAMPERI A, et al. STAT3 in cancer: a double edged sword[J]. Cytokine, 2017, 98(1): 42-50.
- [6] 李若飞, 于春萍, 兰丁璇, 等. 中药血清药理学实验方法与相

- 关问题探讨[J]. 全科口腔医学电子杂志, 2019, 6(31): 125-136.
- [7] 汪一帆, 柴可群, 应栩华, 等. 健脾1号方对人结肠癌细胞作用及其机制研究[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(2): 283-285.
- [8] 金焰, 阎承慧, 吴焱, 等. 高转移肺腺癌细胞系A2和A549中p16表达的研究[J]. 中国肿瘤, 2000(12): 47-49.
- [9] 李静, 林河春, 张方淋, 等. 肺癌高转移和低转移细胞株中差异基因的分析[J]. 肿瘤, 2012, 32(3): 164-169.
- [10] LI Z P, WANG C G, PRENDERGAST G C, et al. Cyclin D1 functions in cell migration [J]. Cell Cycle, 2006, 5(21): 2440-2442.
- [11] DAI M, AL-ODAINI A A, FILS- AIMÉ N, et al. Cyclin D1 cooperates with p21 to regulate TGFβ-mediated breast cancer cell migration and tumor local invasion [J]. Breast Cancer Res, 2013, 15(3): 1-14.
- [12] FAGARD R, METELEV V, SOUSSI I, et al. STAT3 inhibitors for cancer therapy: have all roads been explored? [J]. JAKSTAT, 2013, 2(1): e22882.
- [13] ALEXANDROW M G, SONG L J, ALTIOK S, et al. Curcumin: a novel Stat3 pathway inhibitor for chemoprevention of lung cancer[J]. Eur J Cancer Prev, 2012, 21(5): 407-412.
- [14] YANG C L, LIU Y Y, MA Y G, et al. Curcumin blocks small cell lung cancer cells migration, invasion, angiogenesis, cell cycle and neoplasia through Janus kinase- STAT3 signalling pathway[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e37960.
- [15] LI W, YANG Y, OUYANG Z, et al. Xiao-Ai-Ping, a TCM injection, enhances the antigrowth effects of Cisplatin on Lewis lung cancer cells through promoting the infiltration and function of CD8(+) T lymphocytes[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, doi: 10.1155/2013/879512.
- [16] WANG M, CHEN G Y, SONG H T, et al. Significance of CXCR4, phosphorylated STAT3 and VEGF- A expression in resected non-small cell lung cancer[J]. Exp Ther Med, 2011, 2(3): 517-522.
- [17] ZHAO M, GAO F H, WANG J Y, et al. JAK2/STAT3 signaling pathway activation mediates tumor angiogenesis by upregulation of VEGF and bFGF in non-small-cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2011, 73(3): 366-374.
- [18] DOWLATI A, NETHERY D, KERN J A. Combined inhibition of epidermal growth factor receptor and JAK/STAT pathways results in greater growth inhibition *in vitro* than single agent therapy[J]. Mol Cancer Ther, 2004, 3(4): 459-463.

【责任编辑: 侯丽颖】