

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.11.015

益气除痰方对肺癌移植瘤小鼠内质网应激蛋白 GRP78/BIP、caspase-12 的影响

李元滨¹, 杨建猛¹, 方若鸣¹, 陈文卿¹, 林丽珠^{2*}

(1. 广州中医药大学第一临床医学院, 广东省广州市机场路 12 号, 510405; 2. 广州中医药大学第一附属医院)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81273963); 广东省教育厅高层次人才项目 (2010-79)

摘要 目的 探讨益气除痰方治疗肺癌的可能作用机制。方法 15 只 BALB/c 小鼠采用人肺腺癌细胞 A549 建立人肺癌小鼠皮下移植瘤模型, 随机分为模型组和益气除痰方低、高剂量组, 每组 5 只。益气除痰方低、高剂量组分别予益气除痰方生药量 27.3 g/(kg·d)、54.6 g/(kg·d), 造模后第 8 天开始灌胃, 每天 1 次, 连续 2 周; 模型组予同体积生理盐水。采用常规 HE 染色法、透射电镜观察各组小鼠移植瘤组织形态学改变; 应用免疫组织化学法、免疫蛋白印迹法检测 GRP78/BIP、caspase-12 蛋白的表达。HE 染色观察各组小鼠主要脏器病理学改变。结果 益气除痰方治疗后移植瘤细胞呈现凋亡形态学改变, 以高剂量较典型。与模型组比较, 益气除痰方低、高剂量组 GRP78/BIP 表达下降, caspase-12、cleaved caspase-12 表达升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且益气除痰方高剂量组优于益气除痰方低剂量组 ($P < 0.01$)。各组小鼠主要脏器无明显病理学改变。结论 益气除痰方诱导肺癌细胞发生凋亡具有剂量依赖性, 其机制可能与内质网应激凋亡特异性蛋白 caspase-12 活化, 启动内质网应激凋亡通路有关。

关键词 肺癌; 益气除痰方; 内质网应激; 细胞凋亡

肺癌居我国恶性肿瘤发病率及死亡率首位, 由于其起病隐匿, 患者确诊时多至中晚期, 治疗上多采取以化疗为主的综合治疗, 但化疗药物的毒副作用限制了其广泛应用。中医药在减轻西药的副作用、辅助放疗、化疗方面显示了一定优势, 并能使一部分患者达到长期“带瘤生存”的理想疗效^[1]。前期研究发现, 益气除痰法可使Ⅲ、Ⅳ期非小细胞肺癌患者的中位生存期达到 9 个月, 其中脾虚痰湿型患者中位生存期达到 13 个月^[2], 证明益气除痰法是治疗晚期非小细胞肺癌的一种有效治法^[3]。本实验拟在课题组前期研究^[4]基础上, 观察益气除痰方对肺癌移植瘤组织中 GRP78/BIP、caspase-12 蛋白的影响, 探讨益气除痰方抗癌的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞及动物

人肺腺癌细胞 A549 购自中国医学科学院肿瘤细胞库, 将 A549 细胞置于含 10% 胎牛血清的 RP-

M1640 培养液中, 37℃、5% CO₂ 条件下培养, 常规传代培养, 取对数生长期的细胞备用。BALB/c 小鼠 15 只, 其中雌性 8 只、雄性 7 只, 4~5 周龄, 体重 12~15 g, 购自广东省医学实验动物中心, 实验动物许可证号: SCXK (粤) 2008-0002。

1.2 药物

益气除痰方由西洋参 5 g、生半夏 6 g、山慈菇 10 g 等药物组成, 方中所用中药材均购于广州中医药大学第一附属医院中药房, 中药常规水煎、浓缩, 真空干燥为粉, 每克相当于 6.06 g 生药, 临用前调至所需中药浓度。

1.3 主要试剂与仪器

胎牛血清 (批号 1227693, Gibco 公司); GRP78/BIP 一抗 (批号 C50B12, CST 公司); caspase-12 一抗 (批号 ab62484, Abcam 公司); SABC 法试剂盒 (批号 08911C, 北京康为世纪生物科技有限公司)。光学显微镜 (BX41, 日本 Olympus 公司); 透射电子显微镜 (Tecnai G2 Spirit Twin, 美国 FEI 公司); 电泳仪 (BG-Power 600i, 北京百晶生物技术有限公司)。

* 通讯作者: lizhulin903@21cn.com, (020) 36591039

1.4 移植瘤模型建立及给药

参照文献 [6] 并结合预实验结果,将对数生长期 A549 细胞悬液 (1×10^7 /ml) 接种于 BALB/c 小鼠右前腋皮下, 0.2 ml/只。造模后 7 天皮下可明显扪及肿瘤。按随机数字表法将荷瘤裸鼠分为模型组和益气除痰方低、高剂量组, 每组 5 只。益气除痰方低、高剂量分别予益气除痰方生药量 27.3 g/(kg·d)、54.6 g/(kg·d), 即人体临床用药量的 3、6 倍, 造模后第 8 天开始给药, 每天 1 次灌胃, 连续 2 周; 模型组予同体积生理盐水灌胃。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 移植瘤组织形态学观察 停药第 2 天处死小鼠, 取瘤组织, 肉眼观察生长情况。10% 甲醛固定, 石蜡包埋, 常规切片。HE 染色光镜下观察移植瘤组织形态学改变。另每组切取移植瘤的新鲜组织, 大小 1 mm × 1 mm × 1 mm, 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双固定, 常规脱水、包埋、超薄切片及染色, 透射电镜观察瘤体细胞的超微结构。

1.5.2 免疫组织化学染色法检测 GRP78/BIP 蛋白表达 组织切片进行常规脱蜡及抗原修复后, 按 SABC 法试剂盒说明书逐步进行。二氨基联苯胺 (DAB) 显色; 苏木素轻度复染; 酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片。显微镜下观察各组阳性反应的着色程度。兔抗 GRP78 (1:200) 稀释, 以 PBS 代替一抗作阴性对照。结果判读: GRP78/BIP 蛋白阳性反应为淡黄色至棕褐色, 在 200 倍显微镜下拍照, 通过 Image-Pro Plus 6.0 彩色图像分析系统, 准确分割阳性区域, 测得该区域累积光密度值 (IOD)。

1.5.3 免疫蛋白印迹法检测 GRP78/BIP、caspase-12 蛋白表达 将各组肿瘤组织加入组织裂解液, 超声匀浆, 4℃ 12000 r/min 离心 20 min, 吸取上清, BCA 法测定蛋白水平, 取样品 (50 μg) 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 转入硝酸纤维素膜 (PVDF), 封闭, 兔抗 GRP78、caspase-12 抗体均以 1:1000 比例稀释杂交过夜, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 (1:10000 稀释) 37℃ 反应 1 h, 采用化学发光法进行显色, 计算机灰度扫描处理。GAPDH 作为内参校正上样量, caspase-12 在内质网应激途径凋亡启动时形成裂解片段 cleaved caspase-12。

1.5.4 主要脏器形态学观察 将摘除瘤体后的小鼠解剖, 分别取出心、肺、肝、肾, 10% 甲醛固定, 石蜡包埋, 常规切片 HE 染色, 光镜下观察各脏器组织形态学改变。

1.6 统计学方法

应用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理, 计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 One-way ANOVA 分析。

2 结果

2.1 各组小鼠移植瘤生长及形态学观察

本实验 15 只小鼠均存活, 成瘤率 100%。肉眼观察: 各组小鼠移植瘤呈结节状生长, 表面欠光滑, 与周围组织粘连, 活动度差; 外观呈淡粉色, 表面有血管分布, 部分瘤体中央区有变性、坏死、出血, 以益气除痰方高剂量组明显。光镜观察: 各组移植瘤细胞均呈现中低分化腺癌的特征, 模型组小鼠移植瘤细胞多呈大小不等、形态不规则的腺管状结构, 核大深染, 核分裂象增多, 排列不整齐, 核仁明显; 益气除痰方低、高剂量组可见移植瘤部分细胞变性、坏死、细胞核固缩, 其中以益气除痰方高剂量组明显。透射电镜观察: 模型组细胞膜结构完整, 核圆, 染色质分布均匀; 益气除痰方低、高剂量组可见早期胞核内染色质高度凝集, 出现空泡结构, 晚期出现细胞核边聚, 胞核碎裂等典型细胞凋亡形态学特征, 其中以益气除痰方高剂量组较明显。

2.2 免疫组织化学染色法检测各组小鼠移植瘤组织 GRP78/BIP 蛋白比较

GRP78/BIP 蛋白定位于肺腺癌细胞胞质区, 细胞形态呈圆形或椭圆形, 各组均见表达, 模型组、益气除痰方低剂量组着色呈棕褐色—棕色, 呈现强阳性—阳性表达, 益气除痰方高剂量组表达较弱, 呈棕黄色淡染。表 1 示, 益气除痰方低、高剂量组 GRP78/BIP 蛋白表达较模型组下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 并且益气除痰方高剂量组 GRP78/BIP 蛋白表达较益气除痰方低剂量组明显下降 ($P < 0.01$)。

表 1 各组小鼠移植瘤组织 GRP78/BIP 蛋白表达比较 (IOD, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	GRP78/BIP
模型组	5	71274.15 ± 2966.83
益气除痰方低剂量组	5	56191.05 ± 6026.23*
益气除痰方高剂量组	5	35227.53 ± 4577.61*△

注: 与模型组比较, * $P < 0.01$; 与益气除痰方低剂量组比较, △ $P < 0.01$

2.3 免疫蛋白印迹法检测各组小鼠移植瘤组织 GRP78/BIP、caspase-12 蛋白比较

表 2 示, 益气除痰方低、高剂量组小鼠移植瘤

表 2 各组小鼠移植瘤组织 GRP78/BIP、caspase-12 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	GRP78/BIP	caspase-12	cleaved caspase-12
模型组	3	0.47 ± 0.05	0.08 ± 0.01	0.003 ± 0.002
益气除痰方低剂量组	3	0.29 ± 0.03 [*]	0.20 ± 0.01 ^{**}	0.021 ± 0.004 ^{**}
益气除痰方高剂量组	3	0.08 ± 0.01 ^{**△}	0.39 ± 0.04 ^{**△}	0.078 ± 0.012 ^{**△}

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与益气除痰方低剂量组比较, △ $P < 0.01$

组织 GRP78/BIP 蛋白表达较模型组下降, caspase-12 和 cleaved caspase-12 蛋白表达较模型组上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 并且益气除痰方高剂量组 GRP78/BIP 蛋白表达较益气除痰方低剂量组明显降低, caspase-12 和 cleaved caspase-12 蛋白表达明显升高 ($P < 0.01$)。

2.4 各组小鼠主要脏器形态学观察

①心脏: 心肌细胞浆红染, 心肌纹理清晰, 未见变性或坏死; 心肌细胞间闰盘隐约可见; 心肌间质内无水肿、未见炎性细胞浸润, 为正常心肌结构。②肝脏: 肝中央静脉淤血, 肝小叶结构清晰, 肝细胞索排列整齐, 无变性、硬化; 汇管区结构清晰, 未见炎细胞浸润; 胆管未见破坏。③肾脏: 肾皮质、髓质结构清晰; 肾小球未见增生或萎缩、毛细血管袢未见坏死, 肾小球毛细血管未见扩张充血、管壁未见增厚。④肺脏: 肺泡管及肺泡结构清晰, 肺泡腔未见扩张, 肺泡壁毛细血管未见充血、炎性细胞浸润; 肺泡壁及肺泡腔未见炎症改变, 肺泡上皮未见损伤。各组小鼠心脏、肝脏、肾脏、肺脏未见明显形态学异常, 说明模型组移植瘤短期内未发生远处转移; 益气除痰方低、高剂量作用期间未对机体主要脏器产生明显毒性作用。

3 讨论

内质网是一个复杂的膜网络结构, 负责分泌蛋白与膜蛋白的合成、折叠和翻译后修饰; 内质网产生蛋白质能力受限和/或未折叠或错误折叠蛋白质在内质网腔积累, 均可致内质网应激; 内质网应激与包括肿瘤在内的多种疾病密切相关^[6]。肿瘤细胞的高代谢使其处于低糖、低氧、酸中毒的应激环境之中, 导致未折叠和错误折叠蛋白在内质网腔积累, 引发未折叠蛋白反应 (UPR) 使肿瘤细胞得以存活^[6-7]。高表达 GRP78 被认为是 UPR 与内质网应激启动的标志^[8-9]。GRP78 属于热休克蛋白 70 的蛋白家族, 在大多数成熟器官如脑、肺、心呈低水平表达, 但在肿瘤中却呈现高表达^[10], 与肿瘤细胞增殖、抗凋亡、免疫逃逸、血管生成和转移密切相关^[11-12]。高表达的 GRP78/BIP 除通过增强内质网蛋白质折叠能力, 尚与 caspase-7、

caspase-12 或促凋亡蛋白 Bik 和 Bax 结合抑制细胞凋亡^[6], 从而促进肿瘤细胞适应应激的微环境得以生存。

根据肺癌正虚痰阻、余毒未清之病机特点, 我们拟定具有益气除痰、解毒散结的益气除痰方治疗肺癌^[2,13]。方中西洋参益肺气; 生半夏燥湿化痰; 山慈菇解毒消肿、软坚散结。诸药配伍, 攻补兼施, 共奏益气化痰、解毒散结之功。现代药理研究亦证实西洋参^[14]、生半夏^[15]、山慈菇^[16]等多种有效成分具有良好的抑制肿瘤生长、诱导细胞凋亡的作用。本研究结果显示, 益气除痰方作用 A549 荷瘤小鼠后, GRP78/BIP 蛋白表达水平下降, 且呈浓度依赖性。

caspase-12 是半胱氨酸蛋白酶家族成员, 被认为是诱发内质网应激凋亡的关键分子^[17-18]。与大多数其他 caspase 家族成员一样, caspase-12 需要被裂解活化后才具备促凋亡作用。本实验结果显示, 移植瘤组织中 caspase-12 与 cleaved caspase-12 蛋白表达随益气除痰方剂量增加而增加, 透射电镜亦显示益气除痰方高剂量组呈现典型的细胞凋亡形态学改变。结合小鼠主要脏器形态学观察结果, 可以明确高剂量益气除痰方 (临床用药量的 6 倍) 发挥诱导肺癌移植瘤细胞凋亡作用的同时并未对机体其他脏器产生明显毒性作用, 证明其是安全有效的。

综上, 益气除痰方诱导细胞凋亡具有剂量依赖性, 其机理可能是通过下调 GRP78/BIP 表达, 降低肿瘤细胞适应应激微环境的能力, 促进 caspase-12 活化, 使肿瘤细胞从生存转向凋亡, 启动内质网应激凋亡通路而发挥抗癌作用。

参考文献

- [1] 王淑美, 林丽珠, 张文亮, 等. 中医标本理论在癌症姑息治疗中的应用及价值 [J]. 中医杂志, 2011, 52(12): 997-999.
- [2] 周岱翰, 林丽珠, 周宜强, 等. 益气除痰法延长非小细胞肺癌中位生存期的作用 [J]. 中医杂志, 2005, 16(8): 600-602.
- [3] 林丽珠, 周岱翰, 郑心婷. 中医药提高晚期非小细胞肺癌患者生存质量的临床观察 [J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(5): 389-393.

- [4] Wang S, Lin L, Zhou J, et al. Effects of yiqi chutan tang on the proteome in Lewis lung cancer in mice [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2011, 12 (7): 1665 - 1669.
- [5] 陶黎阳, 龙捷. 肺癌 A549 裸鼠移植瘤模型高效建立方法的应用 [J]. 现代医药卫生, 2011, 27 (9): 1281-1283.
- [6] Healy SJ, Gorman AM, Mousavi-Shafaei P, et al. Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy [J]. Eur J Pharmacol, 2009, 625 (1-3): 234-246.
- [7] Pyrko P, Schönthal AH, Hofman FM, et al. The unfolded protein response regulator GRP78/BiP as a novel target for increasing chemosensitivity in malignant gliomas [J]. Cancer Res, 2007, 67 (20): 9809-9816.
- [8] Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program [J]. Cell Death Differ, 2004, 11 (4): 372-380.
- [9] Li X, Zhang K, Li Z. Unfolded protein response in cancer: the Physician's perspective [J]. J Hematol Oncol, 2011, 4: 8. doi: 10.1186/1756-8722-4-8.
- [10] Dong D, Dubeau L, Bading J, et al. Spontaneous and controllable activation of suicide gene expression driven by the stress-inducible grp78 promoter resulting in eradication of sizable human tumors [J]. Hum Gene Ther, 2004, 15 (6): 553-661.
- [11] Luo B, Lee AS. The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anticancer therapies [J]. Oncogene, 2013, 32 (7): 805-818.
- [12] Ling YH, Li T, Perez-Soler R, et al. Activation of ER stress and inhibition of EGFR N-glycosylation by tunicamycin enhances susceptibility of human non-small cell lung cancer cells to erlotinib [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2009, 64 (3): 539-548.
- [13] 张恩欣. 益气除痰法提高晚期非小细胞肺癌患者生存质量的临床研究 [J]. 中医药学报, 2006, 34 (5): 20-21.
- [14] Gao JL, Lv GY, He BC, et al. Ginseng saponin metabolite 20(S)-protopanaxadiol inhibits tumor growth by targeting multiple cancer signaling pathways [J]. Oncol Rep, 2013, 30 (1): 292-298.
- [15] Li GL, Jiang W, Xia Q, et al. HPV E6 down-regulation and apoptosis induction of human cervical cancer cells by a novel lipid-soluble extract (PE) from Pinellia pedatisecta Schott in vitro [J]. J Ethnopharmacol, 2010, 132 (1): 56-64.
- [16] 张正海, 李爱民, 魏盼盼. 山慈菇应用现状及研究方向 [J]. 特产研究, 2009, 31 (4): 74-77.
- [17] Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta [J]. Nature, 2000, 403 (6765): 98-103.
- [18] Szegezdi E, Fitzgerald U, Samali A. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far [J]. Ann N Y Acad Sci, 2003, 1010: 186-194.

Effects of Qi-Benefiting Phlegm-Eliminating Formula on GRP78/BIP and Caspase-12 in Lung Cancer Xenografts Model Mice

LI Yuanbin¹, YANG Jianmeng¹, FANG Ruoming¹, CHEN Wenqing¹, LIN Lizhu²

(1. First Clinical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangdong Province 510405; 2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To research the possible mechanism of Qi-Benefiting Phlegm-Eliminating Formula (QBPEF) for lung cancer. **Methods** Fifteen BALB/c mice were selected to establish lung cancer xenografts models with human lung adenocarcinoma cell A549, and the mice were randomized into model group, QBPEF low-dose group and QBPEF high-dose groups, with 5 in each. The QBPEF low-dose and high-dose groups were given 27.3 g/ (kg · d) or 54.6 g/ (kg · d) crude drug of QBPEF each day respectively from the 8th day after modeling for 2 consecutive weeks. The model group was given the same volume of normal saline. The morphological changes in transplanted tumor tissue were observed with HE staining and transmission electron microscopy. The expressions of GRP78/BIP and caspase-12 were detected with immunohistochemistry and Western blotting. The pathological changes in major organs were observed with HE staining. **Results** The transplanted tumor cells showed a morphological change of apoptosis in QBPEF groups after treatment, especially in the QBPEF high-dose group. Comparing with the model group, the expression of GRP78/BIP was significantly decreased but the expressions of caspase-12 and cleaved caspase-12 were significantly increased in QBPEF groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), especially in the QBPEF high-dose group ($P < 0.01$). There was no obvious morphological change in major organs. **Conclusion** QBPEF can induce apoptosis in lung cancer cells with a dose-dependent manner, which may be related to activating caspase-12 and starting the endoplasmic reticulum stress apoptosis pathway.

Keywords lung cancer; Qi-Benefiting Phlegm-Eliminating Formula; endoplasmic reticulum stress; apoptosis

(收稿日期: 2013-09-25; 修回日期: 2013-12-24)

编辑: 邓 媛