

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.15.015

养阴解毒方对肺癌 A549 细胞增殖、凋亡及 H3K27Me3 修饰变化的影响

杨文笑¹, 焦丽静¹, 姚嘉麟¹, 赵小东², 许玲^{*k}

(1. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院, 上海市虹口区甘河路 110 号, 200437; 2. 上海交通大学系统生物医学研究院)

摘要 目的 探讨养阴解毒方治疗肺癌的可能作用机制。方法 将 A549 细胞分别加入梯度浓度为 0、62.5、125、250、500、1000 $\mu\text{g/ml}$ 的养阴解毒方, 分别于 24、48、72 h 检测不同浓度的养阴解毒方对肺癌细胞系 A549 增殖能力的影响, 依据细胞存活率计算最佳半数抑制浓度 (IC_{50})。将 A549 细胞分为对照组及中药低、高剂量组。对照组为未加入养阴解毒方的培养基, 中药高剂量组加 IC_{50} 浓度的养阴解毒方干预 48 h, 中药低剂量组加 $1/2 \text{IC}_{50}$ 浓度的养阴解毒方干预 48 h。检测各组细胞周期、细胞凋亡情况; ChIP-Seq 技术分析 IC_{50} 浓度的养阴解毒方干预 A549 细胞 48 h 后 H3K27Me3 全基因组修饰变化, 并进行 GO 功能富集分析。结果 养阴解毒方可以明显抑制肺癌细胞 A549 的增殖, 并呈剂量、时间依赖性 ($P < 0.05$), 其 48 h 时 IC_{50} 为 $63 \mu\text{g/ml}$ 。中药低、高剂量组均可将 A549 细胞阻滞在 G2/M 期, 诱导细胞凋亡, 且中药高剂量组阻滞效果及诱导晚期凋亡和总凋亡优于中药低剂量组 ($P < 0.05$); ChIP-Seq 结果显示, 共有 1058 个基因 H3K27Me3 修饰程度发生改变, 其中修饰程度增加的有 601 个基因, 修饰程度降低的有 457 个基因。GO 分析结果显示, 上调基因与 G 蛋白偶联受体信号通路、凋亡过程的负调节等生物学功能有关, 下调基因与 RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调节、神经系统发育等生物功能有关。结论 $63 \mu\text{g/ml}$ 养阴解毒方可以明显抑制 A549 细胞增殖, 使细胞阻滞在 G2/M 期, 诱导细胞凋亡, 其机制可能与改变 H3K27Me3 表观遗传修饰谱有关。

关键词 肺癌; 养阴解毒方; 细胞增殖; 细胞凋亡; H3K27Me3; 表观遗传学

肺癌是世界上死亡率最高的恶性肿瘤^[1]。手术、放疗、化疗、生物靶向治疗等多种治疗手段组成的综合治疗仍然无法改变肺癌患者五年生存率徘徊在 20% 左右的局面^[2]。我国传统中医药在抗肿瘤方面具有多靶点、多层次、多通路的特点, 具有其他医学不可替代的优势。为了进一步优化中药复方, 使其成为组分合理、抗肿瘤机理清晰、疗效确切的新型中药, 我们选用肺癌常用的金复康口服液, 以其不同组合作用于肺癌细胞株 A549, 从抑制肺癌细胞增殖方面进行金复康组方配伍优化, 形成含有 5 味中药 (黄芪、麦冬、女贞子、绞股蓝

和重楼) 的养阴解毒方^[3]。该方不仅保留益气养阴、解毒散结的功效, 同时已被证实具有抑制肿瘤细胞增殖、诱导肺癌细胞阻滞在 G2/M 期, 促进肿瘤细胞衰老的作用^[4]。本研究从全基因组表观遗传的修饰变化角度, 探讨养阴解毒方抗肺癌细胞增殖的作用及可能机制, 为今后的临床应用提供依据。

1 材料

1.1 药物

养阴解毒方组成: 黄芪 29.2 g, 麦冬 9.8 g, 女贞子 9.8 g, 绞股蓝 9.8 g, 重楼 14.6 g, 均购自上海华宇药业有限公司。养阴解毒方冻干粉制备方法: 将组方中药物共 100 g 粉碎后, 加入 5 倍体积的 70% 乙醇, 在超声波清洗器 45℃ 条件下, 40 kHz 超声频率下, 提取 3 次, 60 min/次, 取上清, 使用旋转蒸发仪回收乙醇, 置于 -80℃ 冰箱, 次日使用冷冻干燥剂制成冻干粉。将养阴解毒方粉末溶解于 RPMI-1640 培养基中, 配置成浓度为

基金项目: 国家自然科学基金 (81704035); 中华中医药学会 (2017 - 2019 年度) 青年人才托举工程项目 (CACM-2017-QNRC2-C15); 上海市科学技术委员会科研计划 (16401970700); 上海市卫生和计划生育委员会中医药科技创新项目 (ZYKC201601020); 上海市促进市级医院临床技能与临床创新能力三年行动计划 (16CR1036B)

* 通讯作者: Xulq67@aliyun.com, (021) 80195240

300 mg/ml 的母液分装保存于 -20°C 。

1.2 细胞株

人肺腺癌 A549 细胞株 (货号: TCHu150) 购于中国科学院上海细胞库。

1.3 主要试剂

RPMI-1640 培养基 (美国康宁公司, 批号 21517002); 胎牛血清 (美国 Gibco 公司, 批号 42G4084K); CCK-8 试剂盒 (批号 EA24FC0256)、Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒 (批号 EB14FA0001)、氯化锂 (LiCl, 批号 H1205C010)、甘氨酸 (批号 EA30BA0005), 均为上海生工生物工程股份有限公司产品; H3K27Me3 抗体 (批号 2318778)、Protein A + G 磁珠 (批号 2653149), 均为美国 Millipore 公司产品; NEBNext® Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina® (美国 NEB 公司, 批号 0081801); PI 染料 (批号 1524934)、RNase A (批号 00653341)、蛋白酶 K (批号 1206024)、EDTA (批号: 00642716), 均为美国赛默飞世尔科技公司产品; Agencourt® AMPure® XP 磁珠 (美国 Beckman 公司, 批号 14669100); SDS (批号 SLBF6436V)、Trizma® hydrochloride (TRIS-HCl, 批号 WXBC3925V), 均为美国 Sigma 公司。

1.4 主要仪器

二氧化碳恒温培养箱 (美国赛默飞世尔科技公司, 型号 3111), 超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司, 型号 SW-CJ-1F), 电热恒温水浴锅 (上海博迅实业有限公司, 型号 HHS-11-1), 多功能酶标仪 (美国 Biotek 公司, 型号 EPOCH), PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司, 型号 T100), 流式细胞分析仪 (美国 BD 公司, 型号 LSRFortessa), 高通量二代测序仪 (美国 Illumina 公司, 型号 NexSeq500), 离心机 (美国赛默飞世尔科技公司, 型号 Heraeus MultifugeX1R), 超声波细胞破碎仪 (美国 BRANSON 公司, 型号 DIGITALSONIFIER450), 生物分析仪 (美国安捷伦公司, 型号 G2939BA2100)。

2 方法

2.1 养阴解毒方最佳半数抑制浓度 (IC_{50}) 测定

将对数生长期的 A549 细胞以 5000 个/孔的密度种植于 96 孔板, 24 h 贴壁后加入梯度浓度的养阴解毒方 (0、62.5、125、250、500、1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 每个浓度 5 个复孔, 每孔 100 μl , 分别于 24、48、72 h 后更换培养液, 加入 10 μl /孔的 CCK-8, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育 1 h 后在多功能酶标仪上检测 450 nm 波

长的吸光度值 (OD 值), 计算细胞存活率。细胞存活率 = 加药组 OD 值 / 对照组 OD 值 $\times 100\%$ 。细胞存活率为 50% 时, 对应养阴解毒方 IC_{50} 。

2.2 养阴解毒方对 A549 细胞周期的影响

将对数生长期的 A549 细胞以 1×10^5 个/孔接种于 6 cm 皿中, 每孔 3 ml 培养液, 分为对照组及中药低、高剂量组, 放入培养箱中培养 24 h 贴壁后, 对照组为未加入养阴解毒方的培养基, 中药低、高剂量组分别加浓度为 $1/2 \text{IC}_{50}$ 、 IC_{50} 时养阴解毒方溶液, 每组 3 个复孔。48 h 后使用胰酶消化后 1200 r/min 常温离心 (离心半径 8.5 cm) 收集细胞, 用 PBS 洗 1 遍, 加入预冷的 75% 乙醇重悬细胞, 放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱固定过夜, 次日 1200 r/min 常温离心 (离心半径 8.5 cm) 去上清, 用 PBS 洗 2 遍, 加入 6 μl RNase A 和 20 μl PI 染液, 避光 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 后通过流式细胞仪进行检测, 每组重复 3 次, 利用 Flowjo7.6 软件进行分析, 得出 G1/G0 期、S 期、G2/M 期的百分比。

2.3 养阴解毒方对细胞凋亡的影响

将对数生长期 A549 细胞以 1×10^5 个/孔接种于 6 cm 皿中, 每孔 2 ml 培养液, 分组及干预方法同 2.2。干预 48 h 后消化, 1600 r/min 常温离心 (离心半径 8.5 cm), 收集细胞, PBS 洗 2 遍, 加入 100 μl Binding 缓冲液, 10 μl PI 染料, 5 μl FITC 染料, 避光冰上孵育 20 min, 流式细胞仪检测, 结果用 Flowjo7.6 软件进行分析。

2.4 养阴解毒方诱导 A549 细胞 H3K27Me3 修饰变化

用养阴解毒方 63 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理 A549 细胞 48 h 后, 以 5×10^6 个 A549 细胞为实验起始量, 在培养皿中将细胞用终浓度为 1% 的甲醛进行固定, 随后使用终浓度为 125 nmol/L 的甘氨酸中和, 并使用细胞刮收取细胞样本。对得到的细胞样本通过超声破碎的方式将基因组 DNA 打断至 100 ~ 300 bp 的片段大小后取部分样本作为背景 DNA, 同时将 H3K27Me3 抗体和 Protein A + G 磁珠进行 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育, 随后加入经过超声破碎的剩余样本进行 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育。依次使用配制的 0.1% SDS 缓冲液、高盐缓冲液, LiCl 缓冲液、EDTA 缓冲液和洗脱缓冲液 (缓冲液均为自制) 对磁珠进行洗脱, 并使用蛋白酶 K 进行解交联, 最终得到 ChIP DNA。对获得的背景 DNA 和 ChIP DNA 使用 NEBNext® Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina® 进行标准建库并使用 Agencourt® AMPure® XP 磁珠进行纯化, 构建

好的文库通过生物分析仪进行质检,质检合格的文库使用测序仪进行上机测序。

2.5 生物信息学分析

所有 ChIP-Seq 原始数据首先通过 Bowtie (1.0.1) 软件将测序结果比对至 hg19 参考基因组^[9]。随后使用 MACS (1.4.2) 软件结合 ChIP 文库和背景文库进行 ChIP 富集区域分析^[10],软件参数设置为 $-\text{nomodel} = \text{T}$, $-\text{shiftsize} = 75$,其余均为默认参数。对得到的富集区域峰值通过 PeakAnalyzer (1.4) 软件进行峰值相关的基因注释^[11]。GO 功能富集分析通过 DAVID 数据库进行^[12]。

2.6 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行分析。计量数据符合正态分布用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 养阴解毒方 IC_{50} 测定结果

表 1 示,与 0 浓度同时间点比较,其余各浓度养阴解毒方干预下 A549 细胞存活率均明显下降 ($P < 0.01$);与本浓度 24 h 比较,除 0 浓度外,各浓度养阴解毒方作用 48 h、72 h A549 细胞存活率均明显下降 ($P < 0.05$);与本浓度 48 h 比较,除 0、62.5 浓度外,各浓度养阴解毒方作用 72 h A549 细胞存活率明显下降 ($P < 0.05$)。提示养阴解毒方对 A549 细胞的增殖有明显的抑制作用,且随着养阴解毒方浓度的增加和干预时间的延长,呈现剂量和时间依赖关系。养阴解毒方作用 48 h,肺癌细胞的 IC_{50} 为 $63 \mu\text{g}/\text{ml}$,故以下实验中中药低剂量组干预浓度为 $31.5 \mu\text{g}/\text{ml}$,中药高剂量组干预浓度为 $63 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。

表 1 不同浓度养阴解毒方干预下 A549 细胞存活率比较 ($\bar{x} \pm s$)

浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	孔数	24 h	48 h	72 h
0	5	100.00 $\pm$ 1.59	99.99 $\pm$ 0.37	99.99 $\pm$ 0.53
62.5	5	65.20 $\pm$ 0.39*	48.04 $\pm$ 0.53* Δ	47.06 $\pm$ 2.13* Δ
125	5	48.89 $\pm$ 0.82*	41.40 $\pm$ 0.07* Δ	33.94 $\pm$ 0.68* Δ ▲
250	5	25.73 $\pm$ 0.61*	19.61 $\pm$ 0.62* Δ	14.17 $\pm$ 0.25* Δ ▲
500	5	19.53 $\pm$ 0.47*	13.35 $\pm$ 0.86* Δ	11.83 $\pm$ 1.11* Δ ▲
1000	5	13.06 $\pm$ 0.10*	11.32 $\pm$ 0.23* Δ	8.93 $\pm$ 0.22* Δ ▲

注:与 0 浓度同时间点比较, * $P < 0.01$;与本浓度 24 h 比较, $\Delta P < 0.05$;与本浓度 48 h 比较, ▲ $P < 0.05$

3.2 各组 A549 细胞不同细胞周期比例比较

表 2 示,与对照组同期比较, G1/G0 期中药低剂量组 A549 细胞比例明显升高,中药高剂量组

明显降低; S 期中药高、低剂量组 A549 细胞比例均明显下降; G2/M 期中药高、低剂量组 A549 细胞比例均明显升高 ($P < 0.05$)。与中药低剂量组同周期比较,中药高剂量组 G1/G0 期、S 期细胞比例降低,而 G2/M 期细胞比例升高 ($P < 0.05$)。说明随着养阴解毒方作用浓度的增加,周期阻滞作用增强,并且高剂量养阴解毒方可将 A549 细胞阻滞在 G2/M 期。

表 2 各组 A549 细胞不同细胞周期比例比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	G1/G0	S	G2/M
对照组	3	66.06 $\pm$ 0.93	31.41 $\pm$ 0.68	2.52 $\pm$ 0.55
中药低剂量组	3	70.63 $\pm$ 2.01*	21.37 $\pm$ 2.01*	8.00 $\pm$ 0.00*
中药高剂量组	3	0.91 $\pm$ 0.29* Δ	16.9 $\pm$ 1.60* Δ	82.13 $\pm$ 1.39* Δ

注:与对照组比较, * $P < 0.05$;与中药低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$

3.3 各组 A549 细胞凋亡情况比较

表 3 示,与对照组比较,中药高、低剂量组 A549 细胞早期凋亡、晚期凋亡和总凋亡比例均明显升高 ($P < 0.05$);与中药低剂量组比较,中药高剂量组晚期凋亡和总凋亡比例明显升高 ($P < 0.05$)。提示养阴解毒方对 A549 细胞有明显的凋亡诱导作用,并随着养阴解毒方作用浓度的增加诱导凋亡作用增强。

表 3 各组 A549 细胞凋亡情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	早期凋亡	晚期凋亡	总凋亡
对照组	3	2.72 $\pm$ 0.02	0.90 $\pm$ 0.01	3.62 $\pm$ 0.03
中药低剂量组	3	3.96 $\pm$ 0.07*	9.45 $\pm$ 0.23*	13.42 $\pm$ 0.16*
中药高剂量组	3	7.21 $\pm$ 1.23*	13.57 $\pm$ 0.86* Δ	20.78 $\pm$ 0.39* Δ

注:与对照组比较, * $P < 0.05$;与中药低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$

3.4 养阴解毒方诱导 A549 细胞 H3K27Me3 修饰变化 ChIP-Seq 序列比对结果

在养阴解毒方处理 48 h 后的 A549 细胞中共有 1058 个基因启动子区域 H3K27Me3 修饰程度发生明显变化,其中修饰程度增加的有 601 个基因,降低的有 457 个基因,由此表明在养阴解毒方处理 48 h 后, A549 细胞中多个基因的转录起始区域的 H3K27Me3 修饰状态明显改变。养阴解毒方诱导 A549 细胞 H3K27Me3 修饰变化 ChIP-Seq 序列对比结果详见表 4。

3.5 养阴解毒方诱导 A549 细胞 H3K27Me3 修饰变化基因的 GO 分析结果

为了进一步理解差异基因的功能分类,我们分别将 H3K27Me3 修饰程度上调和下调的差异基因

列表上传至 DAVID 数据库进行分析。其中差异基因前 10 个 GO 条目如表 5、表 6 所示。从结果中可以看到, 养阴解毒方可以下调化学突触传递、神经系统发育、RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调节等相关基因的转录起始区域 H3K27Me3 修饰状态; 养阴解毒方可以上调 G 蛋白偶联受体信号通路、凋亡过程的负调节等相关基因的转录起始区域的 H3K27Me3 修饰状态。以上结果表明养阴解毒方抑制肺癌的作用可能归因于这些基因的转录起始区域的 H3K27Me3 修饰状态改变。

表 4 养阴解毒方诱导 A549 细胞 H3K27Me3 修饰变化 ChIP-Seq 序列比对结果

样本	总测序 片断数	唯一比对 测序片断数	比对率 (%)	测序质量 (Q30)
A549_ YYJD_ ChIP	45485063	30201844	66.40	0.9777
A549_ YYJD_ Input	74921370	57811356	77.16	0.9751
A549_ untreated_ ChIP	37450045	24681270	65.90	0.9767
A549_ untreated_ Input	130071274	104633700	80.44	0.9767

表 5 养阴解毒方诱导 A549 细胞 H3K27Me3 修饰上调基因 GO 聚类分析

GO 条目	条目	基因数	P 值
0007186	G 蛋白偶联受体信号通路	34	<0.001
0043066	凋亡过程的负调节	17	0.011
0007268	化学突触传递	15	<0.001
0007608	嗅觉感知	9	0.010
0071805	钾离子跨膜转运	8	0.007
0006805	异生素代谢过程	7	0.003
2000117	半胱氨酸型内肽酶活性的负调节	5	<0.001
0045671	破骨细胞分化的负调节	4	0.010
0031018	胰腺发育	4	0.012
0070234	T 细胞凋亡过程的正调节	3	0.011

表 6 养阴解毒方诱导 A549 细胞 H3K27Me3 修饰下调基因 GO 聚类分析

GO 条目	条目	基因数	P 值
0045944	RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调节	30	<0.001
0007399	神经系统发育	20	<0.001
0007268	化学突触传递	13	<0.001
0001501	骨骼系统发展	11	<0.001
0007417	中枢神经系统发育	9	<0.001
0009887	器官发育	7	0.003
0001502	软骨凝结	6	<0.001
0045165	细胞定型	6	<0.001
0043401	类固醇激素介导的信号通路	6	0.002
0048671	侧枝萌芽生长负向调控	4	<0.001

4 讨论

中医学认为, 肺为娇脏, 不耐寒热, 其主要生理特性为喜润恶燥, 易受燥邪侵犯。因此, 烟毒之

品犯肺, 首伤肺阴; 加之肺与外界相连通, 雾霾、沙尘等首先犯肺, 耗伤气阴, 因此, 气虚和阴虚是肺癌常见证型^[8]。研究显示, 通过对 310 例肺癌患者辨证分型发现肺癌患者中气虚和阴虚证占 80%^[10], 益气养阴法被认为是行之有效的抗肺癌的治疗方法^[11]。研究证实, 益气养阴类中药复方可以通过抑制肺癌细胞增殖、诱导肺癌细胞周期阻滞^[12-13], 进而抑制肿瘤生长。养阴解毒方中黄芪补脾肺气, 麦冬润肺阴, 女贞子补肝肾阴, 绞股蓝健脾气兼能清热解毒, 重楼清热解毒祛邪, 全方益气养阴, 清热解毒。前期研究^[3-4]发现, 养阴解毒方可以抑制肺癌细胞增殖、复制, 降低肺癌细胞活性, 阻滞肺癌细胞在 G2/M 期, 诱导细胞衰老, 可以抑制裸小鼠肺癌皮下移植瘤的生长, 且安全性佳。

本研究结果显示, 养阴解毒方可以显著诱导 A549 细胞周期阻滞, 且高剂量 (63 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的养阴解毒方作用效果更佳, 与前期结果^[4]一致。养阴解毒方干预 48 h 后, 可以明显引起 A549 细胞发生早期凋亡和晚期凋亡, 其中晚期凋亡率与总凋亡亦为 63 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的养阴解毒方效果更好。

表观遗传修饰的改变在肿瘤的发生发展中发挥重要作用^[14], 而组蛋白修饰是在表观遗传学中调节染色质结构和基因表达的重要方式之一^[15]。H3K27Me3 是一种经典的甲基化修饰状态, H3K27Me3 在基因转录子区域修饰程度增加时, 该基因转录活性将会受到抑制^[16]。H3K27Me3 已被证实在肿瘤的发生过程中发挥着重要作用^[17]。本研究结果发现, 总共有 1058 个基因的 H3K27Me3 修饰状态发生变化。GO 基因聚类分析表明, 上调基因与 G 蛋白偶联受体信号通路、凋亡过程的负调节等生物学功能有关。下调基因与 RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调节、神经系统发育等生物学功能有关。G 蛋白偶联受体是细胞膜表面最大的受体家族, 与多种肿瘤的发生发展密切相关, G 蛋白偶联受体的激活可以促进肿瘤的生长^[18]。以上结果提示养阴解毒方可能通过增加 G 蛋白偶联受体信号通路相关基因的 H3K27Me3 修饰程度进而抑制相关基因的表达, 达到抑制细胞增殖的目的。

综上所述, 养阴解毒方可以明显抑制 A549 细胞增殖, 阻滞细胞在 G2/M 周期, 诱导细胞凋亡, 其机制可能通过改变 H3K27Me3 表观遗传修饰谱有关。

参考文献

- [1] SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics, 2018 [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30.
- [2] ALLEMANI C, MATSUDA T, DI CARLO V, et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37513025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries [J]. Lancet (London, England), 2018. doi: 10.1016/S0140-6736(17)33326-3.
- [3] 郑婷婷, 杨铭, 阙祖俊, 等. 基于随机森林回归模型的中药复方金复康对肺癌细胞增殖作用的组方优化 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(4): 177-182.
- [4] ZHENG T, QUE Z, JIAO L, et al. Herbal formula YYJD inhibits tumor growth by inducing cell cycle arrest and senescence in lung cancer [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 4984. doi: 10.1038/s41598-017-05146-x.
- [5] LANGMEAD B, TRAPNELL C, POP M, et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome [J]. Genome Biol, 2009, 10(3): R25.
- [6] ZHANG Y, LIU T, MEYER CA, et al. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS) [J]. Genome Biol, 2008, 9(9): R137.
- [7] SALMON-DIVON M, DVINGE H, TAMMOJA K, et al. PeakAnalyzer: genome-wide annotation of chromatin binding and modification loci [J]. BMC Bioinformatics, 2010, 11:415. doi: 10.1186/1471-2105-11-415.
- [8] HUANG DA W, SHERMAN BT, LEMPICKI RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources [J]. Nat Protoc, 2009, 4(1): 44-57.
- [9] 夏宁俊, 彭海燕, 章永红. 益气养阴法在肺癌治疗中的应用 [J]. 浙江中医药大学学报, 2013, 37(12): 1457-1460.
- [10] 刘嘉湘. 辨证治疗原发性肺癌 310 例疗效分析 [J]. 上海中医药杂志, 1985(10): 3-6.
- [1] SHEN S, JIANG S. Chinese herbal medicines of supplementing Qi and nourishing Yin combined with chemotherapy for non-small cell lung cancer: A meta-analysis and systematic review [J]. J Cell Biochem, 2019. doi: 10.1002/jcb.28192.
- [2] LU J, CHEN J, XU N, et al. Activation of AIFM2 enhances apoptosis of human lung cancer cells undergoing toxicological stress [J]. Toxicol Lett, 2016, 258: 227-236. doi: 10.1016/j.toxlet.2016.07.002.
- [3] LU J, ZHANG X, SHEN T, et al. Epigenetic profiling of H3K4Me3 reveals herbal medicine jinfukang-induced epigenetic alteration is involved in anti-lung cancer activity [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016: 7276161. doi:10.1155/2016/7276161.
- [4] ZHU K, DENG Y, WENG G, et al. Analysis of H3K27me3 expression and DNA methylation at CCGG sites in smoking and non-smoking patients with non-small cell lung cancer and their clinical significance [J]. Oncol Lett, 2018, 15(5): 6179-6188.
- [5] BENNETT RL, LICHT JD. Targeting epigenetics in cancer [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2018, 58: 187-207. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010716-105106.
- [6] 邓玉洁, 陈刚, 朱伟峰, 等. H3K27 的三甲基化蛋白在初治弥漫大 B 细胞淋巴瘤的表达及对预后的影响 [J]. 中国实验血液学杂志, 2016, 24(5): 1379-1385.
- [7] WATANABE K, AMANO Y, ISHIKAWA R, et al. Histone methylation-mediated silencing of miR-139 enhances invasion of non-small-cell lung cancer [J]. Cancer Med, 2015, 4(10): 1573-1582.
- [8] O'HAYRE M, DEGESE MS, GUTKIND JS. Novel insights into G protein and G protein-coupled receptor signaling in cancer [J]. Curr Opin Cell Biol, 2014, 27: 126-135. doi: 10.1016/j.ceb.2014.01.005.

Effects of Yangyin Jiedu Decoction (养阴解毒方) on Proliferation, Apoptosis and H3K27Me3 Modification of Lung Cancer A549 Cells

YANG Wenxiao¹, JIAO Lijing¹, YAO Jialin¹, ZHAO Xiaodong², XU Ling¹

(1. Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437; 2. Shanghai Center for Systems Biomedicine, Shanghai Jiaotong University)

ABSTRACT Objective To explore the possible action mechanism of Yangyin Jiedu Decoction (养阴解毒方) in the treatment of lung cancer. **Methods** Yangyin Jiedu Decoction with gradient concentrations of 0, 62.5, 125, 250, 500 and 1000 $\mu\text{g/ml}$ were added to A549 cells. The effects of different concentrations of Yangyin Jiedu Decoction at 24, 48 and 72 h on the proliferation of lung cancer cell line A549 were detected. Half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was calculated based on cell survival rate, and A549 cells were divided into a control group and low-dose and high-dose groups of Chinese medicine. The control group used medium without Yangyin Jiedu Decoction. The

high-dose group of Chinese medicine added the IC_{50} concentration of *Yangyin Jiedu Decoction* for 48 h's intervention. The low-dose group of Chinese medicine added 1/2 IC_{50} concentration of *Yangyin Jiedu Decoction* for 48 h's intervention. Cell cycle and apoptosis of each group were detected. ChIP-Seq technique was used to analyze the changes of whole genome modification of A549 cells treated with *Yangyin Jiedu Decoction* IC_{50} concentration after 48 h's intervention, and GO enrichment analysis was conducted. **Results** *Yangyin Jiedu Decoction* can significantly inhibit the proliferation of lung cancer cell A549 in a dose-dependent and time-dependent manner ($P < 0.05$), and its IC_{50} at 48 h was 63 $\mu\text{g/ml}$. Low and high dose Chinese medicine group can block A549 cells in G2/M phase and induce the cell apoptosis, and the high dose Chinese medicine group was better than low dose Chinese medicine group in blocking and inducing advanced apoptosis and total apoptosis ($P < 0.05$); ChIP-Seq results showed that there were a total of 1058 genes H3K27Me3 modification changed, and 601 genes were increased in degree of modification, and 457 were reduced in degree of modification. GO analysis showed that the up-regulated genes were involved in biological functions such as G-protein coupled receptor signaling pathway and negative regulation of apoptosis process. Down-regulated genes were involved in the positive regulation of RNA polymerase II promoter transcription and neurological development. **Conclusion** 63 $\mu\text{g/ml}$ *Yangyin Jiedu Decoction* can significantly inhibit the proliferation of A549 cells, keeping cell arrest in G2/M stage and induce apoptosis. The mechanism may be related to the alteration of H3K27Me3 epigenetic modification spectrum.

Keywords lung cancer; *Yangyin Jiedu Decoction* (养阴解毒方); proliferation; apoptosis; H3K27Me3; epigenetics
(收稿日期: 2018-09-06; 修回日期: 2019-03-05)

编辑: 王利芬

(上接第 1298 页)

Traditional Chinese Medicine for Myasthenia Gravis: A Reevaluation on Systematic Review/Meta-analysis

HUANG Chunhua¹, LIU Liting², RAO Wangfu¹

(1. Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006; 2. Graduate School, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To conduct a reevaluation study on systematic review/Meta-analysis of traditional Chinese medicine (TCM) treatment of myasthenia gravis (MG), in order to evaluate the bias and the reliability of the conclusion. **Methods** We comprehensively searched China National Knowledge Infrastructure (CNKI), VIP database, WanFang database, Chinese Biology Medicine (CBM), PubMed, Embase, The Cochrane Library for literature on systematic review/Meta-analysis of TCM treatment of MG from the establishment time of databases to September 30th, 2018. The literature were evaluated in terms of methodological quality evaluation, outcome index evidence quality grading. Descriptive analysis was conducted to primary outcome index. **Results** A total of 7 SRs/Meta-analysis were included with 28 outcomes index. 6 papers compared the efficacy of TCM combined with western medicine between western medicine alone in treating MG. One systematic review compared the efficacy of TCM alone and western medicine alone. The AMSTAR scale score showed that there were 3 papers with a total score of 11-16, which was of medium quality. 4 papers with a total score was between 17 and 22 points, which was of high quality. GRADE grading results showed that evidences of 23 outcome index were of low or extremely low quality, and only 5 outcomes were of intermediate quality, mainly reflected in the recurrence rate, TCM syndrome scores, adverse reactions. Descriptive analysis showed that TCM treatment of MG can improve the total effective rate, reduce the clinical absolute score, clinical relative score, reduce the recurrence rate, the incidence of adverse reactions ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The systematic review/Meta-analysis of methodological quality of TCM treatment of MG is medium to high, but the evidence strength of the conclusion is low. The available evidence indicates that TCM combined with western medicine may have synergistic effects in the treatment of MG.

Keywords traditional Chinese medicine therapy; myasthenia gravis; systematic review; AMSTAR tool; GRADE grading

(收稿日期: 2018-11-05; 修回日期: 2019-02-21)

编辑: 柴倩云