

金福安汤对人肺腺癌 A549 细胞生物学行为的影响

曹 洋^{1*} 陈文华² 周京旭¹ 周健洪² 吴玉生¹ 李 雁²

(1. 广州中医药大学第一附属医院, 广东省广州市机场路 16 号, 514005; 2. 广州中医药大学)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30901903); 广东省自然科学基金

资助项目(8451040701000464); 广东省中医药局课题(2007317)

* 通讯作者: doctorcaoyang@yahoo.com.cn, (020)36591351

[摘要] 目的 观察金福安汤对人肺腺癌 A549 细胞增殖、p120ctn 磷酸化、细胞黏附及迁移的影响并探讨其治疗肺癌的作用机制。方法 培养 A549 细胞, 分为空白对照组、金福安汤低、中、高剂量组、环磷酰胺组, 分别给予含空白血清和含药血清培养液干预。检测各组 A549 细胞 OD 值并计算抑瘤率; 刺激 A549 细胞 p120ctn 磷酸化后, 检测各组 A549 细胞 p120ctn 灰度值; 并观察各组 p120ctn 磷酸化的 A549 细胞黏附和迁移。结果 金福安汤高、中、低剂量组 A549 细胞 OD 值与空白对照组比较差异有统计学意义, 且呈剂量相关性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 金福安汤中剂量组 A549 细胞 p120ctn 磷酸化程度较空白对照组显著降低($P < 0.05$); 金福安汤中、高剂量组 A549 细胞的黏附能力较空白对照组高($P < 0.05$), 金福安汤各剂量组 A549 细胞的迁移能力较空白对照组下降($P < 0.05$)。结论 金福安汤具有抑制 A549 细胞增殖及其 p120ctn 磷酸化、促进细胞黏附和抑制迁移的作用。

[关键词] 金福安汤; 肺癌; 细胞增殖; A549 细胞; p120ctn

Effect of Jinfu'an Decoction on the Malignant Features of A549 Human Lung Adenocarcinoma Cells

CAO Yang¹, CHEN Wenhua², ZHOU Jingxu¹, ZHOU Jianhong², WU Yusheng¹, LI Yan²

(1. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangdong Province 514005; 2. Guangzhou University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To observe the inhibition of Jinfu'an Decoction on A549 human lung adenocarcinoma cells (A549 cells) and explore its mechanism for lung cancer. **Methods** A549 cells were cultured and randomized into blank control group, Jinfu'an Decoction small-dose, middle-dose and large-dose groups and cyclophosphamide group. The blank serum-containing or drug serum-containing culture medium was given to each group respectively. The inhibition of Jinfu'an Decoction on A549 cells was detected with MTT assay. A549 cells were stimulated to make p120ctn tyrosine phosphorylation and p120ctn was detected with immunoprecipitation and western blot. The adhesion and migration of A549 cells were observed. **Results** Jinfu'an Decoction had an obvious dose-dependent inhibitory effect on A549 cells. Comparing with the blank control group, p120ctn tyrosine phosphorylation of A549 cells was significantly decreased in the Jinfu'an Decoction middle-dose group ($P < 0.05$). Comparing with the blank control group, the adhesion ability of A549 cells was significantly increased in the Jinfu'an Decoction middle-dose and large-dose groups ($P < 0.05$). Comparing with the blank control group, the migration ability of A549 cells in the Jinfu'an Decoction groups was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Jinfu'an Decoction can inhibit the proliferation of A549 cells and p120ctn tyrosine phosphorylation, decrease the malignancy of A549 cells and cure lung cancer.

Keywords p120ctn; Jinfu'an Decoction; lung cancer; serum pharmacology

p120ctn 是位于细胞间连接处和细胞核内的连环素, 与钙黏蛋白高度保守的近膜区(JMD)相互作用, 从而参与钙黏蛋白介导的信号转导和黏附过程, 与癌细胞黏附、浸润、转移密切相关。金福安汤是邓铁涛教授治疗肺癌的经验方, 具有化痰祛瘀的功效, 能够减少肺癌的转移, 延缓肿瘤的发展进程^[1]。在本研究中, 我们观察金福安汤对人肺腺癌 A549 细胞 p120ctn 磷酸化及细胞生物学行为的作用, 进一步揭示金福安汤治疗肺癌的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物及细胞

清洁级 T739 近交系小鼠, 4~6 周龄, 40 只, 体重 18~22 g, 雌雄各半, 由广东省医学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(粤)2008-0002。人肺腺癌 A549 细胞株, 广州中医药大学第一附属医院肿瘤研究室提供。

1.2 药物

金福安汤(药物组成: 胆南星 10 g、半夏 10 g、浙

贝母 15 g、芫荽 30 g、薏苡仁 30 g、太子参 30 g、壁虎 5 g、山慈菇 10 g、丹参 15 g、桃仁 10 g) 购自广州中医药大学第一附属医院中药房, 常规煎煮 2 次, 混合过滤, 恒温水浴分别浓缩至含生药 1. 0725 g/ml、5. 3625 g/ml、10. 7250 g/ml。注射用环磷酰胺, 由江苏恒瑞医药股份有限公司生产, 批号: 10051725。

1. 3 主要试剂和仪器

胰蛋白酶(Trypsin)购自 Serva 公司; 四甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、Anti- γ -Tubulin 和 Anti-Mouse IgG(HRP)购自 Sigma 公司; PVDF 膜购自 Bio-Rad 公司; 表皮生长因子(EGF)购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司; RPMI-1640 培养基、胎牛血清、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)和 Protein G-Agarose 购自 Gibco 公司; BSA fraction V 购自 Roche 公司; Anti-p120 购自 BD 公司。BB16UV 型二氧化碳培养箱(德国 HEREUS 公司产品); XDS-1B 型生物倒置显微镜(重庆光学仪器厂产品); 680 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司产品); DYY-2C 型电泳仪、DYCP-40C 型转膜仪(北京六一仪器厂产品)。

1. 4 含药血清制备

将小鼠采用随机数字表法分为空白对照组、环磷酰胺组、金福安汤低剂量组、金福安汤中剂量组、金福安汤高剂量组, 每组 8 只。金福安汤低、中、高剂量组每只小鼠灌胃剂量分别为 0. 429、2. 145 g、4. 29 g 生药/天, 根据人和小鼠体表面积折算分别相当于人的等效剂量 1 倍、5 倍、10 倍; 环磷酰胺组腹腔注射环磷酰胺 0. 2 ml, 给药剂量为 20 mg/(kg · d); 空白对照组以等量生理盐水灌胃, 每天 1 次, 共 10 天。于末次给药后, 小鼠吸入麻醉, 腹主动脉取血, 室温下静置 30 min, 3000 r/min 离心 15 min, 取血清, 无菌滤器过滤除菌, 置于 -20℃ 保存备用。

1. 5 细胞培养

人肺腺癌 A549 细胞株用含 15% 胎牛血清(FCS, 经 56℃、30 min 灭活)的 RPMI-1640 培养液调整细胞浓度为 1×10^5 /ml, 接种于培养皿。以含 15% FCS 的 RPMI-1640 培养液于 37℃、5% CO₂、饱和湿度下培养, 传代至对数生长期。经 0. 4% 台盼蓝鉴定其活性在 98% 以上。

1. 6 检测指标

1. 6. 1 细胞增殖检测 取对数生长期细胞, 用培养液(含 10% 新生牛血清)稀释成 2.5×10^5 /ml 的细胞悬液, 接种于 96 孔板, 每孔 200 μ l, 培养 24 h, 弃

去培养液, 分为空白对照组, 金福安汤低、中、高剂量组, 环磷酰胺组, 分别给予含空白血清和相应给药小鼠含药血清培养液(含 10% 小鼠血清)180 μ l, 培养 44 h, 然后每孔加入 20 μ l MTT(终浓度 5 mg/ml), 培养 4 h, 弃去培养液, 每孔加入 DMSO 150 μ l, 待甲臍完全溶解, 用酶标仪在波长 570 nm 测 OD 值。每组设 10 个复孔, 计算抑瘤率: 抑瘤率 = $1 - (\text{含药血清孔 OD 值} / \text{空白血清孔 OD 值}) \times 100\%$ 。

1. 6. 2 细胞 p120ctn 磷酸化检测 参照文献[2]方法, 细胞达到 80% 融合, EGF 刺激 A549 细胞使 p120ctn 磷酸化。细胞分为空白对照组, 金福安汤低、中、高剂量组, 环磷酰胺组, 每组设 4 个复孔, 分别在给予 EGF 前 48 h 预先给予含空白血清和相应含药血清培养液(含 10% 小鼠血清)。收集、裂解细胞, 旋涡混匀, 冰上 20 min, 4℃ 14000 r/min 离心 10 min, 取上清, 用 Bradford 法测定蛋白含量。各样品取 500 μ g 蛋白, 加入 5 μ g Anti-p120 单抗, 加入 buffer 定溶至 500 μ l, 4℃ 振荡 1 h, 加入 50 μ l 50% protein G-Agarose 混悬液, 4℃ 振荡过夜。4℃ 3500 r/min 离心 10 min, 去上清, 反复洗涤 4 次。样本加入 50 μ l buffer 重悬沉淀, 水浴中煮沸 5 min, 冰浴 5 min, 10000 r/min 离心 5 min。取上清 30 μ l 上样, 进行蛋白电泳, 把蛋白转到 PVDF 膜, 置于封闭液中, 室温 1 h。与 Anti-p120 在室温反应 2 h, 洗膜 3 次, 每次 10 min。与 HRP 于室温振摇 1 h, 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入 ECL 化学发光工作液, X 线胶片曝光, 自动洗片机洗片。

1. 6. 3 细胞黏附试验 参照文献[3]方法将生长达到 80% 融合的细胞换无血清培养液, 分为空白对照组, 金福安汤低、中、高剂量组和环磷酰胺组, 分别给予含空白血清和相应含药血清培养液(含 10% 小鼠血清), 再给予 EGF 处理。细胞在 EDTA 消化后转到纤维连接蛋白包被的 96 孔培养板, 每孔加入经处理的细胞悬液 100 μ l(10000 个细胞)后, 置 37℃, 5% CO₂、饱和湿度下培养 4 h, 取出用 RPMI-1640 培养液洗去未黏附的细胞, 加 0. 4% EDTA/PBS 37℃ 下孵育 20 min, 解离去黏附的细胞, 收集于培养板中, 用改良牛鲍氏计数板计数; 每组设 8 个复孔, 黏附细胞计数取 8 孔均值。黏附率计算方法为: 黏附率 = 黏附细胞数 / 加入细胞总数 $\times 100\%$ 。

1. 6. 4 细胞迁移试验 待包被纤维连接蛋白的 6 孔培养板长满细胞, 用 200 μ l 枪头轻轻擦过孔底, 作一“井”字, 用 PBS 漂洗培养板, 加入培养液继续培

养 24 h; 显微镜下观察划痕中细胞迁移情况, 并计数细胞迁移数量, 每组设 6 个复孔, 计数取 6 孔均值。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 分类资料比较用 χ^2 检验, 两组间比较用 t 检验, 多组均数比较用 ANOVA(方差分析)。

2 结果

2.1 各组 A549 细胞 OD 值及抑瘤率比较

表 1 示, 与空白对照组比较, 其他各组 OD 值均显著降低($P < 0.01$); 与环磷酰胺组比较, 金福安汤高、中、低剂量组 OD 值差异均有统计学意义($P < 0.01$); 金福安汤高、中、低剂量组之间 OD 值差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 呈剂量相关性。金福安汤低、中、高剂量组及环磷酰胺组的抑瘤率分别是 56.1%、65.0%、67.8%、75.1%, 金福安汤低、中、高剂量组抑瘤率呈剂量相关性。

表 1 各组 A549 细胞 OD 值及抑瘤率比较

组别	样本数	OD 值($\bar{x} \pm s$)	抑瘤率(%)
空白对照组	10	0.658±0.02	—
金福安汤低剂量组	10	0.289±0.01**	56.1
金福安汤中剂量组	10	0.250±0.02*▲	62.0
金福安汤高剂量组	10	0.212±0.01*▲▲△	67.8
环磷酰胺组	10	0.164±0.02*▲▲△△●	75.1

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与金福安汤低剂量组比较, ▲ $P < 0.05$; ▲▲ $P < 0.01$; 与金福安汤中剂量组比较, △ $P < 0.05$; △△ $P < 0.01$; 与金福安汤高剂量组比较, ● $P < 0.01$

2.2 各组 A549 细胞 p120ctn 灰度值比较

表 2 示, 金福安汤中剂量组 A549 细胞 p120ctn 灰度值较空白对照组显著降低($P < 0.05$)。

表 2 各组 A549 细胞 p120ctn 灰度值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	灰度值
空白对照组	4	0.419±0.001
金福安汤低剂量组	4	0.317±0.006
金福安汤中剂量组	4	0.215±0.110*
金福安汤高剂量组	4	0.240±0.066
环磷酰胺组	4	0.360±0.032

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$

2.3 各组 p120ctn 磷酸化 A549 细胞黏附和迁移比较

表 3 示, 金福安汤中、高剂量组和环磷酰胺组 A549 细胞的黏附能力较空白对照组高($P < 0.05$)。表 4 示, 金福安汤低、中、高剂量组及环磷酰胺组迁移的细胞数目明显少于空白对照组($P < 0.05$)。

表 3 各组 p120ctn 磷酸化 A549 细胞黏附率比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	黏附率(%)
空白对照组	8	6.84±1.09
金福安汤低剂量组	8	7.59±1.35
金福安汤中剂量组	8	8.91±1.79*
金福安汤高剂量组	8	9.25±0.97*
环磷酰胺组	8	8.91±1.74*

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$

表 4 各组 p120ctn 磷酸化 A549 细胞迁移比较(个, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	迁移细胞
空白对照组	6	61.17±11.72
金福安汤低剂量组	6	44.50±8.26*
金福安汤中剂量组	6	42.33±8.33*
金福安汤高剂量组	6	39.35±9.54*
环磷酰胺组	6	31.25±7.57*

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$

3 讨论

p120ctn 是与肿瘤的转移过程密切相关的连环蛋白^[4]。在越来越多的人类肿瘤中发现了 p120ctn 的改变或缺失^[5-7], 而且在许多病例中, p120ctn 的缺失似乎是肿瘤进展的早期改变^[8]。近年来 p120ctn 与肺癌的相关研究发现, p120ctn 与局部侵袭、肿瘤分化程度、TNM 分期和淋巴结转移相关, 并且与非小细胞肺癌患者不良预后相关, 认为 p120ctn 在肺癌组织的异常表达, 可以做为评估预后的辅助指标^[9-12]。因此针对 p120ctn 这个新靶点找到特定药物进行干预, 将对防治肺癌转移产生重大影响。

中医学认为, 痰瘀是与肿瘤侵袭和转移关系最为密切的病因病机^[13]。血瘀对机体血液流变学以及肿瘤转移的影响早已得到公认, 瘀血内阻是癌复发、转移的重要因素, 而活血化瘀类的药物, 可改善患者微循环及高凝状态, 从而达到抑瘤和抑制肿瘤转移的作用。目前越来越多的学者还发现痰证和肿瘤的发生、转移也有密切的关系, 研究显示^[14], 肺癌痰证患者有较突出的血液流变学改变, 具体表现为血浆流动性降低, 聚集性增高和成分异常, 体现了中医关于痰饮理论的唯物观和痰的物质性。现代药理研究发现^[15], 化痰药物可以影响癌细胞表面细胞黏附因子的表达, 从而减少肿瘤的生长和侵袭转移。总之, 痰瘀阻滞既是肺癌的致病因素, 也是肿瘤发生侵袭和转移的重要病机, 是影响肺癌的预后及转归

的重要病理因素。从痰瘀角度入手来研究肺癌转移具有较好的中医药理论基础、临床基础和实验基础^[16]。

邓铁涛教授提出了“痰瘀相关”见解,认为痰是瘀的初级阶段,瘀是痰浊的进一步发展,并拟定了治疗肺癌的经验方金福安汤,方中胆南星、半夏燥湿化痰,消肿散结,桃仁活血化瘀,攻坚消积共为君药;苇茎甘寒轻浮,善清肺热,薏苡仁甘淡微寒,浙贝母苦寒,三药配伍,能清肺化痰,解毒消肿散结;壁虎、山慈菇两药配伍胆南星、半夏加强化痰散结,解毒消肿之功,丹参配伍桃仁加强活血祛瘀攻积之功,上药共为臣药;太子参健脾益气养阴,使祛邪不伤正,为佐药。全方诸药合用,共奏化痰祛瘀,消癥散结之功效。本研究显示,金福安汤具有较强的抑瘤作用,呈药物剂量相关性,金福安汤对 EGF 刺激引起的 p120ctn 磷酸化有一定的抑制作用,能有效地干预 p120ctn 磷酸化。从金福安汤处理后细胞的黏附能力和迁移能力结果来看,抑制 p120ctn 磷酸化后确实有助于细胞聚集,而在一定程度上抑制了的迁移。

参考文献

- [1] 吴玉生,赵媛媛,曹洋,等.金福安汤治疗中晚期非小细胞肺癌的临床研究[J].中成方,2010,32(4):547-550.
- [2] 农少云,农朝赞,潘莉莉,等.芒果甙对连环蛋白 P120 磷酸化及肝癌细胞生物学行为的影响[J].广西医科大学学报,2005,22(4):495-497.
- [3] Chen S, Guttridge DC, You Z, et al. Wnt-1 signaling inhibits apoptosis by activating beta-catenin/T cell factor-mediated transcription[J]. J Cell Biol, 2001, 152(1): 87-96.
- [4] Castano J, Solanas G, Casagolda D, et al. Specific phosphorylation of p120-catenin regulatory domain differently modulates its binding to RhoA[J]. Mol Cell Biol. 2007, 27(5): 1745-1757.
- [5] 吴颖. p120 在肿瘤中的作用[J]. 肿瘤防治研究, 2006, 33(3): 207-209.
- [6] 周兰兰. p120 与恶性肿瘤[J]. 现代医药卫生, 2006, 22(23): 3387-3389.
- [7] 苗原, 刘洋, 王妍, 等. p120ctn 亚型在肺鳞癌、腺癌中表达及意义[J]. 中国肺癌杂志, 2008, 11(2): 189-194.
- [8] 吴颖. p120ctn 在肿瘤中的作用[J]. 肿瘤防治研究, 2006, 33(3): 207-209.
- [9] Bremnes RM, Veve R, Gabrielson E, et al. High-throughput tissue microarray analysis used to evaluate biology and prognostic significance of the E-cadherin pathway in non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2002, 20(10): 2417-2428.
- [10] 谢成耀, 王亮, 刘洋, 等. p120ctn 在非小细胞肺癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中华病理学杂志, 2005, 34(4): 206-210.
- [11] 刘洋, 徐洪涛, 刘楠, 等. 非小细胞肺癌组织中 p120ctn 与 RhoA 和 Cdc42 表达的相关性及意义[J]. 中国肺癌杂志, 2005, 8(4): 304-308.
- [12] Anastasiadis PZ, Reynolds AB. Regulation of Rho GTPases by p120-catenin[J]. Curr Opin Cell Biol, 2001, 13(5): 604-610.
- [13] 杨早. 肿瘤转移中的黏附分子与痰瘀因素[J]. 辽宁中医杂志, 2005, 32(4): 280-281.
- [14] 柴可群, 王德玉. 化痰祛瘀解毒在肺癌治疗中的运用[J]. 辽宁中医杂志, 2000, 27(3): 110-112.
- [15] 孙宏新, 朴炳奎. 流式细胞仪检测益肺清化膏对荷瘤小鼠瘤组织 E-cad, CD44V6 表达水平的影响[J]. 中医药学刊, 2005, 23(6): 1010-1016.
- [16] 胡小勤, 陈利国. 肺癌转移的痰瘀病机探讨[J]. 辽宁中医杂志, 2006, 33(12): 1555-1556.

(收稿日期: 2012-04-06; 修回日期: 2012-08-20)

[编辑: 洪 涛]

寻求疑难杂症验方合作

您有效果神奇、应用已久、无毒副作用且功效显著的民间验方吗? 您希望它产业化吗? 您期盼它为更多人解除病痛吗? 这样的事情您自己完成有困难吗? 我们来合作好吗? 权健国际自然医学集团集科研、生产、销售为一体, 服务网点遍及全国, 旗下的天津权健自然医学科技发展有限公司致力于民间神奇验方的收集整理使之产业化服务人民大众。期待与您的真诚合作, 共同造福人类。

公司: 权健自然医学科技发展有限公司, 地址: 天津市武清区豆张庄乡权健道 1 号, 邮编: 301707, 电话: 022-22169102, 传真: 022-22160596, 联系人: 李小姐

公司网址: www.ziranyixue.com。

合作流程: 来电咨询确认→提供临床试用品 10 份→试验治愈率 70% 为成功→洽谈合作事宜(一般为购买验方)。

欢迎邮购《中医杂志》光盘合订本

1951-1986 年(4 张光盘)480 元; 1987-1994 年(1 张光盘)260 元; 1995-2004 年(1 张光盘)280 元。光盘合订本为计算机用数据光盘, 收入了同期出版的全部《中医杂志》的内容, 可对所有文章进行任意字检索, 方便实用。

汇款地址: 北京东直门内南小街 16 号中医杂志北京医海林音像书店, 邮政编码: 100700, 电话: (010) 64035632。网址: http://www.jtcm.net.cn。