

平肺复方对人肺腺癌 A549 细胞 PPAR- γ 信号通路的影响

王玥姣 贾立群 朱世杰

【摘要】 目的 研究平肺复方对人肺腺癌 A549 细胞增殖及过氧化物酶体增长因子活化受体 (peroxisome proliferators-activated receptor, PPAR)- γ 信号通路的影响。方法 运用细胞计数试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) 比色法检测平肺复方对人肺腺癌 A549 细胞增殖的影响,并添加 PPAR- γ 特异性阻断剂 GW9662,观察 PPAR- γ 通路阻断后平肺复方对 A549 细胞生长的影响。结果 平肺复方生药 5 mg/ml 和 10 mg/ml 在作用 24 小时、48 小时和 72 小时表现出对 A549 细胞增殖的抑制作用 ($P < 0.05$);单纯加入 GW9662 对细胞的生长并未产生影响;加入 GW9662 的平肺复方仍可对细胞生长产生抑制作用 ($P < 0.05$),但这种抑制作用明显弱于平肺复方 ($P < 0.05$)。结论 平肺复方的抗肿瘤作用机制可能部分涉及到 PPAR- γ 信号通路,但并不完全是通过这一条信号通路在发挥作用。

【关键词】 平肺复方; PPAR- γ 信号通路; 人肺腺癌 A549 细胞

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2014.10.002

Effect on PPAR- γ signal pathway induced by Pingfei compound in human lung adenocarcinoma cell line A549 WANG Yue-jiao, JIA Li-Qun, ZHU Shi-jie. Graduate School of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Corresponding author: JIA Li-Qun, E-mail: liqun-jia@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the growth effect on human lung adenocarcinoma cell line A549 by Pingfei Compound, and the effect on PPAR- γ Signal Pathway induced by it. **Methods** Proliferation of A549 cells after exposure to the apozem was measured by CCK-8 assay. The PPAR- γ specificity blocker GW9662 was added. Observe if the Pingfei Compound could influence the growth of the A549 cells or not. **Results** The 5 mg/mL and 10 mg/mL groups presented inhibitive effect on A549 growth at 24h, 48h and 72h time points ($P < 0.05$). GW9662 did not make any difference on cell growth, while the Pingfei Compound supplemented with GW9662 showed inhibitory effect on cell growth ($P < 0.05$). **Conclusion** The mechanism of anti-tumor effect of Pingfei Compound may partly involved in the PPAR- γ signal pathway. But other signal pathways may meanwhile function in the anti-tumor process.

【Keywords】 Pingfei compound; PPAR- γ signal pathway; Human lung adenocarcinoma A549 cells

目前,肺癌已成为全国和全世界最常见、发病率及死亡率最高的恶性肿瘤。虽然检查手段和治疗方式正在不断进步,但流行病学及临床研究数据

显示肺癌疗效仍无法得到显著提高,其主要原因是许多肺癌病人在明确诊断时常常已处于晚期,已失去最佳治疗时期。晚期肺癌患者症状表现各有不同,病情虚实夹杂,中医辨证较为复杂。中日友好医院中西医结合肿瘤内科首席专家李佩文教授根据多年临床经验,以养阴清肺、解毒散结为治法,自拟平肺复方,临床多用于中晚期非小细胞肺癌患者毒热内盛、阴津亏虚的治疗。前期临床及实验研究中发现平肺复方可抑制肿瘤细胞增殖、减少肿瘤新生血管形成、调节机体免疫平衡及代谢状态,是延

基金项目:国家自然科学基金(30973853)

作者单位:100029 北京中医药大学研究生院[王玥姣(博士研究生)];中日友好医院中西医结合肿瘤内科(贾立群、朱世杰)

作者简介:王玥姣(1986-),女,2011级在读博士研究生。研究方向:肺癌的中西医结合治疗。E-mail:yuejiao_wang@126.com

通讯作者:贾立群(1962-),博士,教授,主任医师,博士生导师。研究方向:癌症的中西医结合诊治。E-mail:liqun-jia@hotmail.com

长肺癌患者生存期的独立预后因素之一,但目前对于该复方的作用机理和药物靶标尚无相关研究。

1 材料与方法

1.1 细胞株

人肺腺癌 A549 细胞株,购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库(批号:TCHu150),常规复苏、传代,细胞处于对数生长期开始用于实验。

1.2 药品与试剂

平肺复方处方源于中日友好医院中西医结合肿瘤内科首席专家李佩文教授,由中日友好医院药理学部制备,生药含量 2 g/ml。平肺复方的药物组成:沙参 10 g、党参 10 g、百合 10 g、麦冬 10 g、五味子 10 g、桑白皮 10 g、贝母 10 g、全瓜蒌 10 g、白芨 10 g、鱼腥草 10 g、白花蛇舌草 20 g。实验前经定性滤纸粗滤,0.22 μm 滤膜过滤后分装,-80℃ 冻存,避免反复冻融。0.25% 胰酶溶液,进口胎牛血清,DMEM 高糖培养基,CCK-8 细胞增殖-毒性检测试剂盒(日本同仁化学研究所)。PPAR-γ 特异性阻断剂 GW9662(美国 Sigma-Aldrich 公司)。

1.3 主要器材及设备

倒置显微镜(日本 OLYMPUS IX51),CO₂ 培养箱(美国 Thermo Forma,3111),离心机(德国 Heraeus,Labofuge 400R),酶标仪(美国 Thermo, MULTISKAN MK3)。

1.4 分组

1.4.1 观察不同浓度平肺复方对 A549 细胞增殖影响的分组 空白对照组:完全培养基(含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM)常规培养;平肺 1 组:完全培养基中含平肺复方,生药终浓度 1 mg/ml;平肺 2 组:完全培养基中含平肺复方,生药终浓度 5 mg/ml;平肺 3 组:完全培养基中含平肺复方,生药终浓度 10 mg/ml。

1.4.2 观察 PPAR-γ 通路特异性阻断剂 GW9662 对平肺复方作用的影响 空白对照组:完全培养基(含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM);平肺组:完全培养基中含平肺复方生药,生药终浓度 10 mg/ml。GW 组:完全培养基中含 GW9662 10 μM。平肺 + GW 组:完全培养基中含平肺复方生药,生药终浓度 10 mg/ml,并加入 GW9662 10 μM。

每组设 3 个复孔,每次实验重复 3 次以上。接种 A549 细胞于 96 孔板中。

1.5 细胞计数试剂盒法检测细胞的增殖情况

将 A549 细胞以每孔 7×10^4 /ml 接种于 96 孔培

养板。孵育 24 小时,细胞贴壁,弃上清,按上述分组添加完全培养基或含不同浓度平肺复方生药的培养基。

分别培养 24 小时、48 小时、72 小时,细胞计数试剂盒(cell counting kit-8,CCK-8)检测细胞存活率:弃上清,每孔加入含 10% CCK-8 试剂的培养基,孵育 2 小时,检测前振荡 10 秒,于酶标仪 450 nm 处测定各孔的吸光度(A)值,参考波长 630 nm。

计算细胞存活率:各组细胞存活率(%)=(实验组平均 A 值/对照组平均 A 值)×100%。

1.6 统计分析

数据录入 Excel 软件进行保存,使用 SPSS 17.0 软件进行分析。计量资料以均数±标准误($\bar{x} \pm s$)表示,多个样本均数的比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度平肺复方对 A549 细胞增殖影响

应用 CCK-8 法检测人肺腺癌 A549 细胞的增殖显示,平肺复方生药 1 mg/ml 在体外作用 72 小时内对细胞生长没有明显影响($P = 0.07084 > 0.05$),平肺复方生药 5 mg/ml 和 10 mg/ml 在作用 24 小时、48 小时和 72 小时表现出对 A549 细胞增殖的抑制作用,结果经 *t* 检验显示与空白对照组相比存在统计学差异($P < 0.05$)。

表 1 不同浓度平肺复方对 A549 细胞存活率的影响
[$\bar{x} \pm s$, 存活率(%), $n = 4$]

分组	作用 24 小时	作用 48 小时	作用 72 小时
空白对照组	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
平肺 1 组	90.39 ± 2.13	93.54 ± 5.85	98.22 ± 1.81
平肺 2 组	73.42 ± 6.79 ^b	74.20 ± 4.19 ^a	69.87 ± 3.61 ^b
平肺 3 组	68.20 ± 4.16 ^b	51.96 ± 6.74 ^b	47.51 ± 7.14 ^b

注:与空白对照组相比^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

2.2 PPAR-γ 通路特异性阻断剂 GW9662 对平肺复方作用的影响

以生药终浓度为 10 mg/ml 的平肺复方生药和 PPAR-γ 特异性阻断剂 GW9662 处理人肺腺癌 A549 细胞,平肺组在体外作用 24 小时后即显现对 A549 细胞的生长抑制作用,这种抑制作用随时间的延长而增强,*t* 检验显示与对照组相比具有明显差异($P < 0.01$);单纯加入 GW9662 对细胞的生长并未产生影响($P = 0.08564 > 0.05$);平肺 + GW 组在培养至

24 小时、48 小时、72 小时均对细胞生长产生抑制作用,与对照组相比具有统计学差异($P < 0.05$),但这种抑制作用较平肺组弱($P < 0.05$)。结果显示 GW9662 可部分逆转平肺复方对 A549 细胞的增殖抑制作用,但平肺复方的 PPAR- γ 通路被 GW9662 阻断后,仍可表现出对 A549 细胞的增殖抑制作用。

表 2 GW9662、平肺复方对细胞存活率的影响
[$\bar{x} \pm s$, 存活率(%), $n = 4$]

分组	作用 24 小时	作用 48 小时	作用 72 小时
空白对照组	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00
平肺组	59.2 \pm 5.24 ^b	49.84 \pm 4.72 ^b	45.65 \pm 5.61 ^b
GW 组	98.75 \pm 4.47	96.04 \pm 4.60	96.71 \pm 7.82
平肺 + GW 组	74.33 \pm 5.68 ^{ac}	74.49 \pm 5.20 ^{ac}	68.63 \pm 4.63 ^{ac}

注:与空白对照组相比^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与平肺组相比^c $P < 0.05$ 。

3 讨论

肺癌的发病根本在于正气虚弱、脏腑功能失调。脏腑亏虚是肺癌发病的先决条件,痰、湿、气、瘀、热、毒相互搏结,兼见为患,导致了肺癌的进一步发展。肺癌早期的患者辨证多为肺阴不足;肺癌中期的患者辨证多为气阴两虚;晚期病人由于久病伤阴,肺脏的阴虚症状更加严重^[1]。肺阴亏虚贯穿了肺癌发生发展的各个阶段,阴虚内热是肺癌常见的临床证型,与之相对应的养阴清肺法亦是肺癌治疗的常用方法。平肺复方是李佩文教授根据多年临床经验,以养阴清肺、解毒散结为治法的自拟方剂。方中选用沙参、党参、百合、麦冬、五味子滋养肺阴,生津润燥,清上焦虚火;桑白皮、浙贝母、全瓜蒌清热润肺,涤痰散结,宽胸利膈,导痰浊下行;白芨凉血止血,清血分之热;鱼腥草、白花蛇舌草清热解毒,消痈散结。纵观全方,扶正与祛邪并行,临床多用于中晚期肺癌患者毒热内盛、阴津亏虚的治疗。

近年来,针对恶性肿瘤自身及其治疗方法的机制研究在分子生物学和细胞生物学领域获得了迅速发展,许多新的药物靶标被发现,多种新药相继问世。PPAR 属于核内受体超家族^[2],于 1990 年由英国学者 Issemam 等^[3]首次在大鼠中发现。PPAR- γ 作为 PPAR 亚型中研究的最为广泛的一种,目前在临床和实验室研究方面都获得了巨大关注。有诸多相关报道显示 PPAR- γ 在肺癌、结直肠癌、乳腺癌、肾

癌、子宫内膜癌等多种肿瘤组织中存在高表达,并且与临床分期、淋巴结转移、分化程度等肿瘤相关预后因素密切相关。通过 PPAR- γ 分子信号通路,可对肿瘤细胞产生增殖抑制和促进凋亡的作用^[4];还可影响肿瘤相关的巨噬细胞和肿瘤的血管生成,甚至延缓肿瘤的发展进程^[5]。PPAR- γ 信号通路是可以从多个角度发挥抗肿瘤作用的上游通路,其激活物也许可以通过对肿瘤及其微环境通路的改变,成为肿瘤的新生疗法^[6]。

GW9662 作为人工合成的 PPAR- γ 特异性拮抗剂,具有不可逆转的特性。本研究在实验体系中添加 GW9662 作为对照,可以揭示中药复方调控 PPAR- γ 信号通路的特异性。中药复方具有多途径、多种组分活性的特点,其作用机制和途径更是具有多向性、多层面和多靶点的特点。在 PPAR- γ 通路被特异性拮抗剂阻断后,平肺复方仍可抑制 A549 细胞的增殖,提示平肺复方的抗肿瘤作用机制可能部分涉及到 PPAR- γ 信号通路,其中的某些有效成分可能具有 PPAR- γ 激活物的作用,通过 PPAR- γ 通路发挥抗肿瘤作用,但并不完全是通过这一条信号通路在发挥作用。中药复方的抗肿瘤机制仍有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 蔡光蓉,王雪玉. 李佩文滋阴润肺法在肺癌治疗中的应用[J]. 中国中西医结合外科杂志,2001,7(3):179.
- [2] Boitier E, Gautier JC, Roberts R. Advances in understanding the regulation of apoptosis and mitosis by peroxisome-proliferator activated receptors in pre-clinical models;relevance for human health and disease[J]. comp Hepatol,2003,2(1):3.
- [3] Issemam I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators [J]. Nature,1990,347(6294):645-650.
- [4] Feige JN, Gelman L, Michalik L, et al. From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclearreceptors at the crossroads of key cellular functions [J]. Prog Lipid Res,2006,45(2): 120-159.
- [5] Margeli A, Kouraklis G, Theocharis S. Peroxisome proliferator activated receptor-gamma (PPAR-gamma) ligands and angi-ogenesis[J]. Angiogenesis,2003,6(3):165-169.
- [6] Panigrahy D, Huang S, Kieran MW, et al. PPAR gamma as a therapeutic target for tumor angiogenesis and metastasis [J]. Cancer Biol Ther,2005,4(7):687-693.

(收稿日期:2014-04-28)

(本文编辑:蒲晓田)