

# 益肺汤对人肺腺癌耐顺铂细胞株移植瘤裸鼠 P-gp 基因表达和免疫功能影响的实验研究

凌仕良, 栾智宇, 张小玲, 山广志, 刘帆

宁波市中医院, 浙江 宁波 315000

**[摘要]** 目的: 通过观察益肺汤对人肺腺癌耐顺铂细胞株 (A549/DDP) 移植瘤裸鼠脾脏指数和肺癌多药耐药 P-糖蛋白 (P-gp) 基因表达的影响, 探讨益肺汤对裸鼠免疫功能的影响和逆转肺癌多药耐药的作用机制。方法: 建立 A549/DDP 裸鼠移植瘤模型, 随机分为对照组、顺铂组、益肺汤低剂量组、益肺汤中剂量组、益肺汤高剂量组、益肺汤中剂量+顺铂组, 共 6 组, 每组 10 只, 分别给与相应的药物干预。给药 21 天后, 处死小鼠取瘤组织和脾脏, 称脾重, 计算各组脾脏指数; 检测瘤组织基因 P-gp 的表达情况。结果: 与对照组比较, 顺铂组的脾脏指数显著降低, 益肺汤中、高剂量组的脾脏指数有所提高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与顺铂组比较, 益肺汤低、中、高各剂量组及益肺汤中剂量+顺铂组的脾脏指数均显著提高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。益肺汤低、中、高各剂量组及益肺汤中剂量+顺铂组的 P-gp 基因的表达量均低于对照组, 而顺铂组的表达量高于对照组, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论: 益肺汤能提高裸鼠的免疫功能, 逆转非小细胞肺癌多药耐药, 其逆转机制是通过下调多药耐药基因 P-gp 的表达来实现的。

**[关键词]** 益肺汤; 逆转多药耐药; 脾脏指数; P-糖蛋白 (P-gp) 基因; 人肺腺癌耐顺铂细胞株 (A549/DDP); 裸鼠; 细胞培养; 动物实验

**[中图分类号]** R285 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2016) 11-0215-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2016.11.092

## Experiment Study of Yifei Tang on Expression of P-gp Genes and Immune Function of Nude Rats with Human Lung Adenocarcinoma Cisplatin Cell Line Transplantation Tumor

LING Shiliang, LUAN Zhiyu, ZHANG Xiaoling, SHAN Guangzhi, LIU Fan

**Abstract:** Objective: To observe the effect of Yifei tang on the spleen index and expression of lung cancer multidrug resistance P-glycoprotein (P-gp) genes of nude rats with human lung adenocarcinoma cell line (A549/DDP) transplantation tumor, and to discuss preliminarily the effect of Yifei tang on the immune function of nude rats and the mechanism of reversing lung cancer multidrug resistance. Methods: Established A549/DDP nude rats model of transplantation tumor, and divided them into the control group, cisplatin group, Yifei tang low dosage group, Yifei tang middle dosage group, Yifei tang high dosage group and Yifei tang middle dosage combined with cisplatin group randomly, six groups in total and 10 cases in each group. Each group was given corresponding medicine respectively. After 21 days, the rats were sacrificed, and the tissues and spleens were weighed to calculate the spleen index of each group. Detected the expression of cancer tissue P-gp genes. Results: Compared with control group, the spleen index of cisplatin group was reduced significantly, that of Yifei tang high dosage group was increased, there being significant difference ( $P < 0.05$ ). The spleen index of Yifei tang low, middle and high dosage groups as well as Yifei tang middle dosage combined with cisplatin group, comparing with that of cisplatin group, were all increased obviously ( $P < 0.05$ ). The expression levels of P-gp genes in Yifei tang low, middle and high dosage groups and Yifei Tang middle dosage combined with cisplatin group were lower than those of the control group, while the expression levels of cisplatin group was higher than those of the control group ( $P < 0.05$ ). Conclusion: Yifei tang can improve the immune function of nude rats and reverse non-small cell lung cancer multidrug resistance. The reversing mechanism is achieved by down-regulating the expression of multidrug resistance P-gp genes.

**Keywords:** Yifei tang; Multidrug resistance; Spleen index; P-glycoprotein (P-gp) genes; Human lung adenocarcinoma cell line (A549/DDP); Nude mouse; Cell culture; Animal experiment

**[收稿日期]** 2016-05-06

**[基金项目]** 宁波市医学科技计划项目 (2010A11)

**[作者简介]** 凌仕良 (1983-), 男, 主治医师, 研究方向: 中西医结合肿瘤疾病研究。

近50年来,肺癌是发病率和死亡率增长最快的对人类健康和生命威胁很大的恶性肿瘤之一。根据我国20世纪80年代末以来的10余年的抽样调查结果显示,肺癌的发病率逐年递增,年均增长率达到1.6%,目前在我国所有恶性肿瘤的发病率及死亡率的排名中,肺癌已居首位<sup>[1-2]</sup>。肺癌主要分为两类,小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)和非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC),而NSCLC约占所有肺癌的85%左右<sup>[3]</sup>。化疗是NSCLC(尤其是中晚期患者)的主要治疗方法之一,虽然新的化疗药物以及新的化疗方案层出不穷,但目前现有的化疗药物临床治疗效果并不理想,临床治愈率和五年生存率仍然比较低,其中多药耐药(multidrug resistance, MDR)是化疗失败的主要原因之一<sup>[4]</sup>。开发高效安全的MDR逆转剂已成为当前肿瘤领域研究的热点及难点,充分发挥中医药资源丰富、多靶点作用,针对MDR复杂的产生机制进行研究。本实验通过建立人肺腺癌耐顺铂细胞株(A549/DDP)的裸鼠移植瘤模型,观察益肺汤对裸鼠脾指数及肺癌多药耐药基因P-糖蛋白(P-gp)基因表达的影响,探讨益肺汤对裸鼠免疫功能的影响和逆转NSCLC多药耐药的作用机制,并为临床运用此方提供一定的理论依据。

## 1 材料与方

1.1 细胞与动物 人肺腺癌耐顺铂细胞株A549/DDP细胞(浙江大学基础医学院提供);BALB/c-nu/nu裸鼠80只(上海西普尔-必凯实验动物有限公司,生产许可证号:SCXK(沪)2013-0016),5~6周龄,雌性,在水平式空气层流净化室内(SPF级)繁殖饲养,室温保持 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度40%~60%,由浙江中医药大学动物实验中心协助饲养。

1.2 主要药物及试剂 益肺汤组成:红豆杉8g,白术、半夏各15g,茯苓、党参各20g,陈皮、甘草各6g,所有中药由宁波市中医院中药制剂室提供并制备相应浓度汤液。顺铂注射液(江苏豪森药业股份有限公司);高糖DMEM培养液、胎牛血清及胰蛋白酶(美国GIBCO公司);台盼蓝(上海化学试剂总厂);RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒及荧光定量PCR试剂盒(TaKaRa公司)。

1.3 细胞培养 A549/DDP细胞以高糖DMEM完全培养基(含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 mg/mL链霉素)于 $37^{\circ}\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$ 培养箱传代培养。

1.4 建立移植瘤模型 参考文献[5]。收集对数生长期的细胞,用胰蛋白酶分解消化,用PBS磷酸盐缓冲液清洗3次,加入生理盐水重新悬置细胞,再以台盼兰染色法计数活细胞率,确保活细胞率大于95%,调整细胞浓度至 $5\times 10^7/\text{mL}$ ,细胞悬液放置于冰上,将此细胞悬液接种于BALB/c-nu/nu裸鼠的颈背部皮下,每只接种0.2 mL细胞悬液造模。整个操作在SPF级条件下进行,接种过程在细胞悬液制备后1 h内完成。

1.5 分组及给药 将造模成功的60只裸鼠编号,用随机区组

分组法分为对照组、顺铂组、益肺汤低剂量组、益肺汤中剂量组、益肺汤高剂量组、益肺汤中剂量+顺铂组,共6组,每组10只,各组间小鼠体重及瘤体积无显著性差异。然后按下方法开始分组给药:对照组:生理盐水灌胃0.4 mL/(次·天);顺铂组:将顺铂注射液配制成0.1 mg/mL的稀释液,按2 mg/kg给药,腹腔注射顺铂稀释液0.4 mL/次,隔天1次;益肺汤低、中、高各剂量组:中药浸泡1.5 h左右,煎煮2次,合并煎液,再浓缩使低、中、高各剂量组的生药含量分别为0.7 g/mL、1.4 g/mL、2.8 g/mL,分别灌胃0.4 mL/(次·天);益肺汤中剂量+顺铂组:中剂量浓度益肺汤煎剂灌胃0.4 mL/(次·天),同时腹腔注射顺铂稀释液0.4 mL/次,隔天1次。共给药21天。

1.6 脾脏指数的测定 给药21天后,称量小鼠体重后脱颈法处死所有小鼠,解剖并取出脾脏,称重,计算脾脏指数。脾脏指数(% )<sup>[6]</sup>=脾重(mg)/体重(g) $\times 100\%$ 。

1.7 实时荧光定量PCR检测P-gp基因的表达 提取瘤组织总RNA,然后进行逆转录反应,合成cDNA。采用实时荧光定量PCR检测相关目的基因P-gp的表达。目的基因P-gp的引物序列为:上游引物:F5'-CAGCAGTCAGTGTGCTTCAA-3',下游引物:R5'-ATGGCTCTTTATCGGCCTCA-3'。按照实时荧光定量PCR试剂盒的说明书构建反应体系,检测P-gp基因的表达。

1.8 统计学方法 实验数据采用SPSS 17.0软件进行统计分析,计量资料数据用 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,采用单因素方差分析比较多组间均数差异,并用LSD检验;率的比较采用 $\chi^2$ 检验。

## 2 结果

2.1 各组脾脏指数结果比较 见表1。与对照组比较,顺铂组的脾脏指数显著降低,益肺汤中、高剂量组的脾脏指数有所提高,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );与顺铂组比较,益肺汤低、中、高剂量组及益肺汤中剂量+顺铂组的脾脏指数均显著提高,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。

表1 各组脾脏指数结果比较 $(\bar{x}\pm s)$

组别	样本数(n)	脾脏指数(%)
对照组	10	10.03 $\pm$ 3.25
顺铂组	10	6.43 $\pm$ 2.10
益肺汤低剂量组	10	11.59 $\pm$ 2.64
益肺汤中剂量组	10	15.58 $\pm$ 2.73
益肺汤高剂量组	10	13.13 $\pm$ 2.14
益肺汤中剂量+顺铂组	10	9.42 $\pm$ 2.14

与对照组比较,① $P<0.05$ ;与顺铂组比较,② $P<0.05$

2.2 各组P-gp基因表达结果比较 见表2。益肺汤低、中、高各剂量组及益肺汤中剂量+顺铂组的P-gp基因的表达量均低于对照组,而顺铂组的表达量高于对照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。

表2 各组 P-gp 基因表达结果比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数(n)	P-gp 基因表达量
对照组	10	0.0159 ± 0.00166
顺铂组	10	0.0199 ± 0.00419
益肺汤低剂量组	10	0.0129 ± 0.00157
益肺汤中剂量组	10	0.0098 ± 0.00312
益肺汤高剂量组	10	0.0105 ± 0.00146
益肺汤中剂量 + 顺铂组	10	0.0105 ± 0.00146

与对照组比较, ① $P < 0.05$ , ② $P < 0.01$

### 3 讨论

中医学的痰有狭义和广义之分, 狭义的痰指咳嗽咯出的痰液(外痰), 广义的痰还包括体内无形之痰(内痰)。内痰是肿瘤致病及其进展的因素之一, 具有易聚性(黏滞易阻塞成块, 形成临床肿瘤病灶)、易行性(痰随气血无处不到, 易出现转移浸润)、顽固性(痰邪阴柔, 病势缠绵, 不易速去, 出现耐药现象)等病理特点<sup>[7]</sup>。益肺汤正是基于“顽痰多痰”的学术思想, 根据肺癌正虚内虚、痰瘀交结的病机特点, 参考现代药理研究总结出来的经验方, 长期的临床经验表明<sup>[8-9]</sup>, 该方对非小细胞肺癌化疗的耐药逆转具有一定的疗效。

肿瘤的发生和发展与免疫功能有着密切的关系, 并且机体免疫功能的状况对肿瘤治疗的效果和预后评估也有参考价值<sup>[10-11]</sup>。因 BALB/c-nu/nu 裸鼠没有胸腺, 所以造成其 T 细胞免疫缺陷, 可提高移植瘤造模的成功率。BALB/c-nu/nu 裸鼠有脾脏, 故其有一定的体液免疫功能, 其免疫功能的评价指标可用脾指数来反映。与对照组比较, 顺铂组的脾脏指数显著降低( $P < 0.05$ ), 益肺汤中、高剂量组的脾脏指数有所提高( $P < 0.05$ ), 其中益肺汤中剂量组为最高; 与顺铂组比较, 益肺汤低、中、高各剂量组及益肺汤中剂量 + 顺铂组的脾脏指数均显著提高( $P < 0.05$ )。这说明顺铂对裸鼠的免疫功能具有抑制作用, 益肺汤能保护裸鼠的免疫器官, 提高裸鼠的免疫功能。

P-糖蛋白是由多药耐药基因(Multidrug Resistance Gene, MDR)编码的跨膜糖蛋白, 其相对分子量为 170 KD, 具有能量依赖性“药泵”功能<sup>[12]</sup>。P-糖蛋白属于 ABC(ATP-binding cassette)转运蛋白超家族成员, 能利用 ATP 水解所释放出的能量将肿瘤细胞内的化疗药物逆浓度梯度泵至细胞外, 使肿瘤细胞内的化疗药物达不到最低有效作用浓度而使化疗失败, 它们不但能使肿瘤细胞对某一两种化疗药物产生抗药性, 对其他结构不同、作用机制也不同的药物也产生抗药性, 从而导致肿瘤多药耐药性的产生<sup>[13]</sup>。与对照组比较, 益肺汤低、中、高剂量组及联合组的 P-gp 基因的表达量显著降低( $P < 0.05$ ), 其中以益肺汤高剂量组为最; 而顺铂组 P-gp 基因的表达量有所提高( $P < 0.05$ )。这说明益肺汤对 A549/DDP 移植瘤细胞的 P-gp 基因的表达产生了抑制作用, 而顺铂却刺激了二者的高表达。通过综合分析实验结果可以得出, 益肺汤可以提高裸鼠的免疫功能, 能逆转非小细胞肺癌的多药耐药, 其逆

转机制是通过下调 P-gp 基因的表达来实现的。

### [参考文献]

- [1] 陈万青, 张思维, 邹小农. 中国肺癌发病死亡的估计和流行趋势研究[J]. 中国肺癌杂志, 2010, 13(5): 488-493.
- [2] 陈万青, 张思维, 郑荣寿, 等. 中国肿瘤登记地区 2007 年肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2011, 20(3): 162-169.
- [3] Herbs IRS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer[J]. N Engl J med, 2008, 359(13): 1367-1380.
- [4] 揭惠, 酉明巧, 刘辉, 等. 肿瘤多药耐药的发生机制及逆转策略[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(7): 1686-1690.
- [5] 陶黎阳, 黎渐英. 肺癌 A549 耐药裸鼠移植瘤模型的建立[J]. 中国医药指南, 2011, 9(7): 5, 14.
- [6] 唐学敏, 吴仲鑫. 灵芝合剂的体内外抗肿瘤作用研究[J]. 中医杂志, 2013, 54(15): 1323-1326.
- [7] 何水勇, 魏品康. 肿瘤从痰论治的研究集要[J]. 实用中医内科学, 2004, 18(6): 486-487.
- [8] 刘智勤, 朱惠学, 陈鹤汀, 等. 六君子汤对化疗荷瘤小鼠增效减毒作用的实验研究[J]. 北京中医药大学学报, 2008, 31(11): 767-769.
- [9] Ozols RF. USA update on paclitaxel in ovarian cancer[J]. Ann Med, 1995, 27(1): 127-130.
- [10] Kastelan Z, Lukac J, Derezić D, et al. Lymphocyte subsets, lymphocyte reactivity to mitogens, NK cell activity and neutrophil and monocyte phagocytic functions in patients with bladder carcinoma [J]. Anticancer Res, 2003, 23(6D): 5185-5189.
- [11] Van Sandic JW, Boemeester MA, Gisbertz S, et al. Lymphocyte subsets and T(h)1/T(h)2 immune responses in patients with adenocarcinoma of the oesophagus or oesophagogastric junction: relation to PTNM stage and clinical outcome [J]. Cancer Immunol Immunother, 2003, 52(10): 617-624.
- [12] Takara K, Sakaeda T, Okumura K. An update on overcoming MDR1-mediated multidrug resistance in cancer chemotherapy [J]. Curr Pharm Des, 2006, 12(3): 273-286.
- [13] Zhu L, Lang JH. P-glycoprotein and multidrug resistance [J]. Chin J Obstet Gynecol, 1998, 33(6): 381-383.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)