

益肺消瘤颗粒诱导肺癌细胞衰老的机制研究

魏冬梅^{1*}, 陈宏^{1,2#}, 孙玺媛¹, 姜梅¹, 陈沫岚¹, 刘玲玲¹, 张杰¹, 周旭东¹, 苏悦¹

¹齐齐哈尔市第一医院, 黑龙江 齐齐哈尔

²黑龙江省中医科学院, 黑龙江 哈尔滨

收稿日期: 2023年3月6日; 录用日期: 2023年5月15日; 发布日期: 2023年5月25日

摘要

目的: 探讨益肺消瘤颗粒诱导肺癌细胞衰老的机制。方法: 应用血清药理学方法, β -半乳糖苷酶染色试剂盒检测药物干预后的人肺腺癌A549细胞发生衰老; 免疫荧光法检测人肺腺癌A549细胞的PCNA表达; West-blot、RT-PCR检测p16、p21、RB及p-RB的蛋白及mRNA表达。结果: 与空白(血清)对照组比较, 益肺消瘤颗粒组衰老细胞的比率为6.85%, 有统计学差异($P < 0.05$); 与空白血清组(18.7%)比较, 益肺消瘤颗粒组PCNA (6.6%)的表达显著下降, 有统计学差异($P < 0.001$); 与空白(血清)对照组比较, 益肺消瘤颗粒组的p16、p21的蛋白表达高于空白(血清)对照组($P < 0.001$), RB、p-RB的蛋白表达低于空白(血清)对照组($P < 0.01$), 有统计学差异; 与空白(血清)对照组比较, 益肺消瘤颗粒组的p16、p21的mRNA表达高于空白(血清)对照组($P < 0.001$), RB的mRNA表达低于空白(血清)对照组($P < 0.01$), 有统计学差异。结论: 益肺消瘤颗粒通过抑制PCNA的表达、上调p16、p21的蛋白及mRNA的表达, 下调RB及p-RB的蛋白及mRNA的表达诱导肺癌细胞衰老。

关键词

中医药, 衰老, 肺癌

Experimental Study on Mechanism of Senescence Induced by Yifeixiaoliu Granules in Lung Cancer Cells

Dongmei Wei^{1*}, Hong Chen^{1,2#}, Xiyuan Sun¹, Mei Jiang¹, Molan Chen¹, Lingling Liu¹, Jie Zhang¹, Xudong Zhou¹, Yue Su¹

¹The First Hospital of Qiqihar, Qiqihar Heilongjiang

²Heilongjiang Academy of Chinese Medical Sciences, Harbin Heilongjiang

Received: Mar. 6th, 2023; accepted: May 15th, 2023; published: May 25th, 2023

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 魏冬梅, 陈宏, 孙玺媛, 姜梅, 陈沫岚, 刘玲玲, 张杰, 周旭东, 苏悦. 益肺消瘤颗粒诱导肺癌细胞衰老的机制研究[J]. 中医学, 2023, 12(5): 1036-1043. DOI: 10.12677/tcm.2023.125157

Abstract

Objective: To investigate the mechanism of senescence induced by Yifeixiaoliu granules in lung cancer cells. **Methods:** By serum pharmacology, β -galactosidase staining kits were used to detect the senescence of human lung adenocarcinoma A549 cells after drug intervention. The expression of PCNA in human lung adenocarcinoma A549 cells was detected by immunofluorescence. The protein and mRNA expressions of p16, p21, RB and p-RB were detected by West-blot and RT-PCR. **Results:** Compared with blank (serum) control group, the ratio of senescent cells in Yifeixiaoliu Granules group was 6.85%, with statistical difference ($P < 0.05$); Compared with blank serum group (18.7%), the expression of PCNA in Yifeixiaoliu granules group (6.6%) was significantly decreased, and the difference was statistically significant ($P < 0.001$); Compared with blank (serum) control group, the protein expressions of p16 and p21 in Yifeixiaoliu granules group were higher than those in blank (serum) control group ($P < 0.001$), and the protein expressions of RB and p-Rb were lower than those in blank (serum) control group ($P < 0.01$), and the difference was statistically significant; Compared with the blank (serum) control group, the mRNA expression of p16 and p21 in Yifeixiaoliu granules group was higher than that in the blank (serum) control group ($P < 0.001$), and the mRNA expression of RB was lower than that in the blank (serum) control group ($P < 0.01$), and the difference was statistically significant. **Conclusion:** Yifeixiaoma granules can induce senescence of lung cancer cells by inhibiting the expression of PCNA, up-regulating the expression of protein and mRNA of p16 and p21, and down-regulating the expression of protein and mRNA of RB and p-RB.

Keywords

Traditional Chinese Medicine, Senescence, Lung Cancer

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

伴随着经济的发展、生活方式的改变、人口老龄化,恶性肿瘤的发病率和死亡率逐年上升,在2020年全世界新发癌症病例有1929万,中国457万(约占23.7%)全球癌症死亡病例96例,中国300万(约占30%),肺癌是最常见肿瘤和导致死亡的主要原因之一[1]。“细胞衰老”(cellular senescence)一词由Hayflick团队首次提出,他们观察到正常的二倍体细胞在有限次数的分裂后停止增殖,现象类似于机体衰老,将其命名为“细胞衰老”[2]。肿瘤细胞在多种治疗手段的干预下可诱发衰老,如拓扑异构酶抑制剂、烷化剂、铂类、抗代谢剂、微管抑制剂、激素类药物、靶向药物、免疫检查点抑制剂及PARP抑制剂、放射线等,这些药物不但诱导肿瘤细胞衰老,还能抑制肿瘤细胞的增殖,消除肿瘤细胞。益肺消瘤颗粒(原名养阴扶正方)是临床经验总结方,研究表明该药能够改善非小细胞肺癌患者的临床症状、稳定瘤灶、改善生活质量[3],抑制肿瘤血管的生成[4],提高机体的免疫功能及调控PD-1/PD-L1通路逆转T细胞耗竭[5],对化疗药物具有减毒增效作用[6],诱导肺癌细胞凋亡、抑制肺癌细胞的有氧糖酵解[7],本项目在益肺消瘤颗粒有效地抑制肺癌生长的基础上,研究了益肺消瘤颗粒诱导肺癌细胞衰老的机制。

2. 材料与方法

2.1. 动物、细胞株、药物、试剂

动物: 6~8 周龄 SPF 级 SD 大鼠 6 只, 购自上海杰思捷实验动物有限公司, 动物合格证号: SCXK(沪) 2018-0004。本实验通过《齐齐哈尔市第一医院实验动物管理办法(试行)》伦理审核, 伦理编号为 NO.2018-01。动物饲养于 40%~60% 湿度, 21℃~26℃ 环境中, 自由饮食饮水。

细胞株: 人肺腺癌 A549 细胞由中国医学科学院肿瘤研究所提供。

药物: 益肺消瘤颗粒: 黄芪、党参、沙参、天冬、麦冬、生白术、山药、白花蛇舌草、拳参、绞股蓝、茯苓、莪术组成, 齐齐哈尔市第一医院中草药局提供。

试剂: 细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒、RIPA 裂解液、Western 一抗稀释液 RIPA 裂解液、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (H + L)、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠(碧云天生物有限公司), 0.25% Trypsin-EDTA (25200-072, Gibco), PageRuler 预染蛋白 Ladder (26619, Thermo), PCNA 抗体(ab29, abcam), PrimeScript™ RT reagent Kit(for real time) (RR037A, TAKARA 公司), SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (RR420A, TAKARA 公司), DEPC (40718, Sigma 公司), TRIzol Reagent (15596026, Ambion 公司)。

2.2. 主要仪器

CO₂ 恒温培养箱(MCO-15AC, Sanyo 公司), 离心机(L-500, 湘仪公司), 倒置显微镜(CKX41, Olympus 公司), HH·W21·600S 电热恒温水箱(DK-S420, 上海申贤恒温设备厂), 超净工作台(Baker 公司), 激光共聚焦显微镜(Leica 公司), 电泳仪(EPS 300, 上海天能科技有限公司)、微型垂直电泳槽、垂直电泳槽(上海天能科技有限公司), 恒温孵育箱(DNP9082, 精宏有限公司), 低温高速离心机(MIKRO 220 R, Hettich), 荧光定量 PCR 仪(LightCycler® 96, 罗氏公司),

2.3. 含益肺消瘤颗粒药物血清的制备

SD 大鼠, 随机分 4 组: 益肺消瘤颗粒组低剂量组(YFXKL 组, 13 g/kg/d)、益肺消瘤颗粒组中剂量组(YFXLM 组, 26 g/kg/d)、益肺消瘤颗粒组高剂量组(YFXH 组, 52 g/kg/d), 正常血清组(YFXLK 组, 等体积生理盐水灌胃), 灌胃前禁食 12 小时, 每日早晚 2 次灌胃, 连续给药 3 天。于末次灌药 1 小时后, 麻醉和无菌条件下腹主动脉采血, 无菌分离血清(离心 2000 rpm, 10 分钟), 同一条件下动物血清混匀, 56℃, 30 分钟灭活抗体, 0.22 μ m 滤器除菌后分装, -80℃ 冰箱保存备用。

2.4. 细胞培养传代

人肺腺癌 A549 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基培养于 37℃, 湿度 95%, 5% CO₂ 培养箱中, 每隔两天换液一次。待细胞长至 80%~90% 的密度进行细胞传代, 用 0.25% 的胰酶于 37℃ 进行消化, 待细胞开始变圆后加两倍以上培养基终止消化, 将细胞吹打后 1000 r/min 离心 5 min 将细胞离心后去上清, 细胞用新培养基重悬后传代于培养皿中。细胞 3 天左右传一代。

2.5. 益肺消瘤颗粒诱导人肺腺癌 A549 细胞衰老作用

取对数生长期的 A549 细胞, 以 3×10^5 个/孔的密度接种 6 孔板内, 实验分为为空白(血清)对照组、益肺消瘤颗粒组, 每组设 3 复孔。24 h 后加入相应的药物血清进行处理; 药物作用 48 h 后采用衰老相关 β -半乳糖苷酶染色试剂盒检测人肺腺癌 A549 细胞发生衰老的情况, 检测流程参阅试剂盒提供的操作说明书。最终, 在倒置光学显微镜下观察并计数 β -半乳糖苷酶阳性染色的衰老细胞数。

2.6. 益肺消瘤颗粒对人肺腺癌 A549 细胞的 PCNA 表达的作用

取对数生长期的 A549 细胞, 以 2×10^5 个/孔的密度接种于激光共聚焦显微镜配套的培养皿内, 实验分为空白(血清)对照组、益肺消瘤颗粒组, 24 h 后加入相应的药物血清处理, 每组 3 个复孔; 药物作用 48 h 后, 收集细胞, 用 4% 多聚甲醛溶液固定细胞; 用 0.3% TritonX-100 对细胞进行破膜; 加入含 5% 牛血清白蛋白的封闭液进行封闭处理; 加入一抗兔抗人 PCNA 单克隆抗体, 4℃ 孵育; 加入二抗荧光 Alexa Fluor® 488 标记的山羊抗兔 IgG 进行孵育; 加入 DAPI 进行细胞核染色, 在激光共聚焦显微镜下观察荧光染色情况并扫描检测结果。

2.7. 益肺消瘤颗粒对人肺腺癌细胞的 p16、p21、RB 及 p-RB 的蛋白及 mRNA 表达的作用

1、Western blot 法: 取瘤组织匀浆, 抽提组织蛋白, BCA 法测定蛋白含量, 加入蛋白上样缓冲液, 混匀, 100℃ 煮沸 5 min, 每个样分别取 25 μg 上样, 4%~10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 转印至 PVDF 膜 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱脂奶粉室温封闭 1 h 后加入相应一抗, 4℃ 孵育过夜, PBS-T 洗涤 3 次, 每次 5 min, 分别加入羊抗兔或羊抗鼠二抗室温孵育 2 h, PBS-T 洗涤 3 次, 每次 10 min, ECL 显影, 以目的蛋白与内参蛋白 β -actin 光密度的比值表示目的蛋白的相对表达量。

2、1) 提取样本总 RNA。2) 紫外吸收测定法检测浓度和纯度, RNA 的纯度在 1.8~2.2。3) 逆转录合 cDNA。4) 将所有 cDNA 样品分别配置 Realtime PCR 反应体系。体系配置如下: $2 \times$ MasterMix 10 uL, 10 umol/L 的 PCR 特异引物 F0.5 μL, 引物信息见表 1, 10 uL 的 PCR 特异引物 R0.5 uL, 加水至总体积 18 uL, 轻弹管底将溶液混合, 5000 r/min 短暂离心。5) 加样: a) 将 18 uL 混合液加到 96-PCR 板对应的每个孔中。b) 再加入对应的 2 uL cDNA。c) 小心粘上 Sealing Film 封口膜, 并短暂离心混合。d) 在设置 PCR 程序前将准备好的 PCR 板放在冰上。6) 将上述 96-PCR 板置于 Realtime PCR 仪上进行 PCR 反应。按以下程序进行: 95℃, 30s; 40 个 PCR 循环[95℃, 5 s; 60℃, 40 s (收集荧光)]。为了建立 PCR 产物的熔解曲线, 扩增反应结束后, 按 95℃, 10 s; 60℃, 60 s; 95℃, 15 s; 并从 60℃ 缓慢加热到 99℃ (仪器自动进行-Ramp Rate 为 0.05℃/s)。7) 各样品的目的基因和内参分别进行 RealtimePCR 反应, 每个样本检测 3 个复孔。数据采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法进行分析。

Table 1. Primer information

表 1. 引物信息

引物名称	序列
P16-F	CAGGTCATGATGATGGGCAG
P16-R	GATGGCCCAGCTCCTCAG
P21-F	CACCACTGGAGGGTGACTTC
P21-R	ATCTGTCATGCTGGTCTGCC
Rb-F	GAATCCCTTGCATGGCTCTC
Rb-R	GAGGTTGCTTGTGTCTCTGC
GAPDH-F	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT
GAPDH-R	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG

3. 统计分析

采用 SPSS18.0 统计软件, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 t 检验, 等级资料采用非参数检验。

4. 结果

4.1. 益肺消瘤颗粒诱导人肺腺癌 A549 细胞衰老

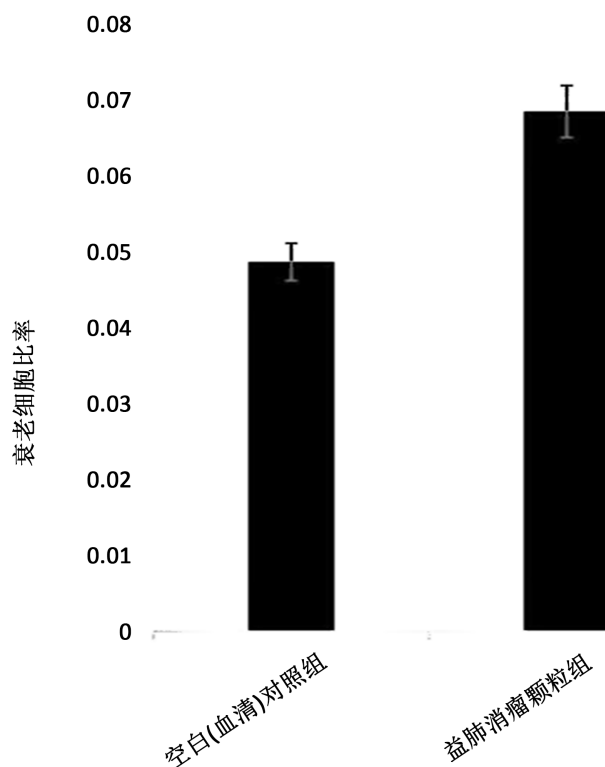


Figure 1. Ratio of senescent cells of human lung adenocarcinoma A549 induced by Yifeixiaoma granules

图 1. 益肺消瘤颗粒诱导人肺腺癌 A549 衰老细胞的比率

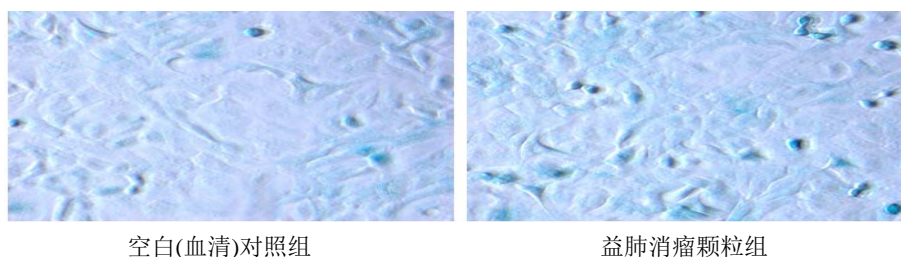


Figure 2. Morphological changes of senescent cells of human lung adenocarcinoma A549 induced by Yifeixiaoma granules ($\times 200$)

图 2. 益肺消瘤颗粒诱导人肺腺癌 A549 衰老细胞形态学改变($\times 200$)

图 1 显示，空白(血清)对照组衰老细胞的比率为 5.54%，益肺消瘤颗粒组衰老细胞的比率为 6.85%，两组比较有统计学差异($P < 0.05$)；图 2 显示益肺消瘤颗粒组人肺腺癌 A549 显著大于空白(血清)对照组，表明益肺消瘤颗粒组人肺腺癌 A549 细胞存在衰老。

4.2. 益肺消瘤颗粒对人肺腺癌 A549 细胞的 PCNA 表达的作用

图 3、图 4 显示，与空白血清组(18.7%)比较，益肺消瘤颗粒组 PCNA (6.6%)的表达显著下降，有统计学差异($P < 0.001$)。

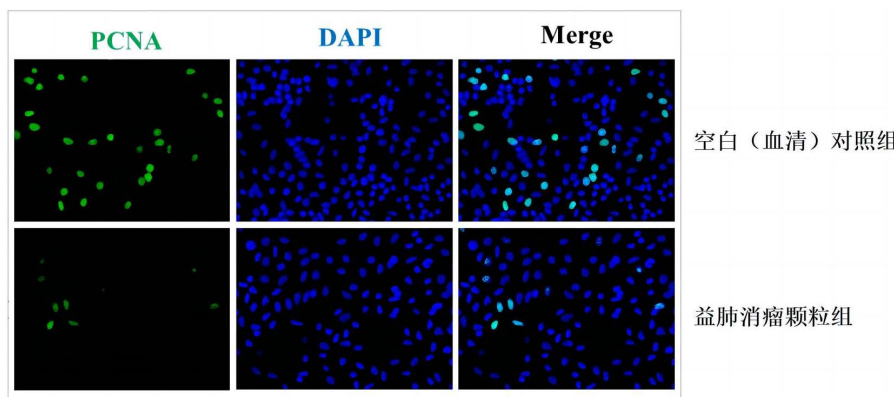
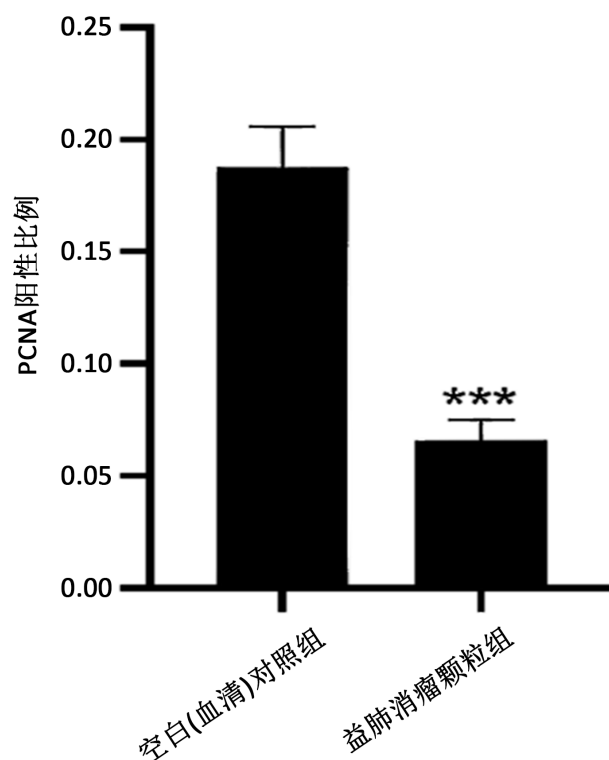


Figure 3. PCNA of Yifeixiaoma granules on human lung adenocarcinoma A549 cells
图 3. 益肺消瘤颗粒对人肺腺癌 A549 细胞的 PCNA



***与空白血清组比较 $P < 0.001$

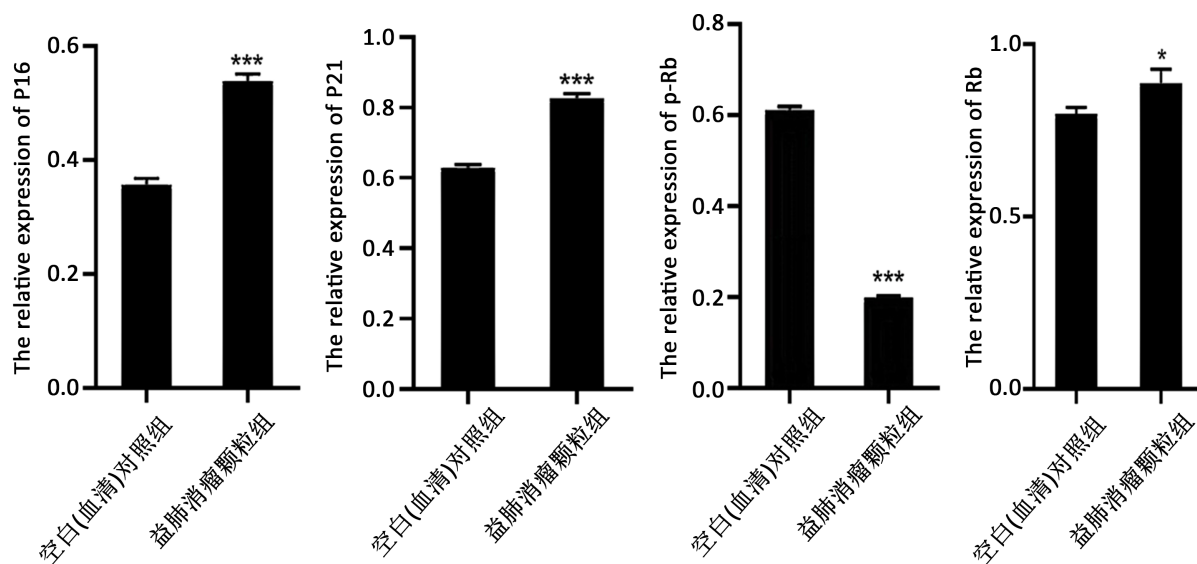
Figure 4. Effect of Yifeixiaoma granules on PCNA expression in human lung adenocarcinoma A549 cells

图 4. 益肺消瘤颗粒对人肺腺癌 A549 细胞 PCNA 表达的影响

4.3. 益肺消瘤颗粒对人肺腺癌细胞的 p16、p21、RB 及 p-RB 的蛋白及 mRNA 表达的作用

图 5 显示, 与空白(血清)对照组比较, 益肺消瘤颗粒组的 p16、p21 的蛋白表达高于空白(血清)对照组 ($P < 0.001$), RB、p-RB 的蛋白表达低于空白(血清)对照组 ($P < 0.01$), 有统计学差异。

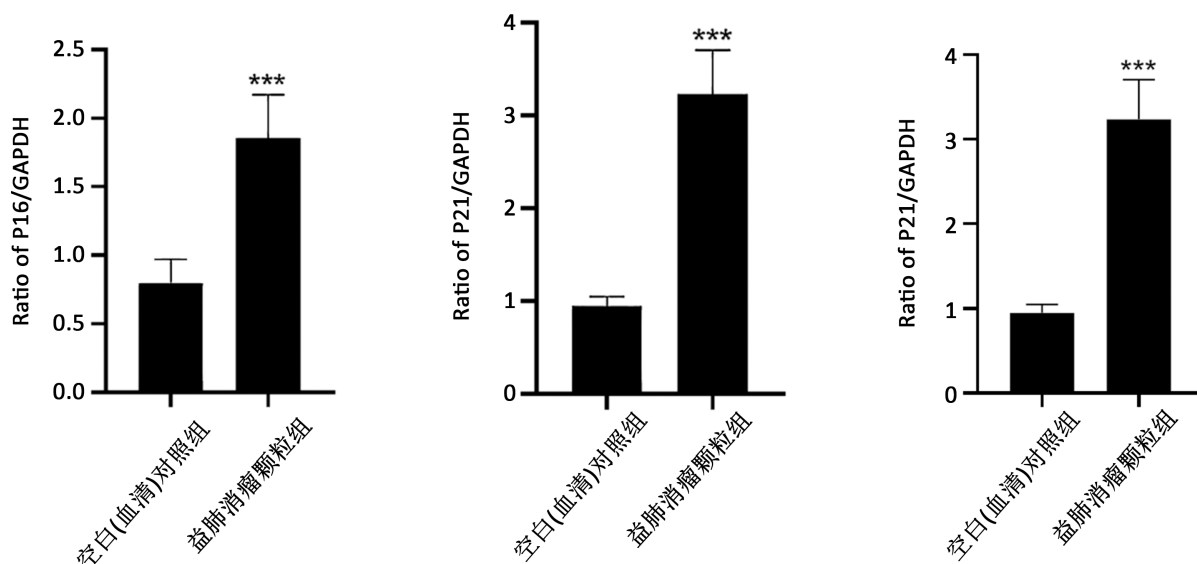
图 6 显示, 与空白(血清)对照组比较, 益肺消瘤颗粒组的 p16、p21 的 mRNA 表达高于空白(血清)对照组 ($P < 0.001$), RB 的 mRNA 表达低于空白(血清)对照组 ($P < 0.01$), 有统计学差异。



***与空白血清组比较 $P < 0.001$, *与空白血清对照组比较, $P < 0.01$

Figure 5. Effect of YifeiXiaoma granules on protein expression of p16, p21, RB and p-RB in human lung adenocarcinoma cells

图 5. 益肺消瘤颗粒对人肺腺癌细胞的 p16、p21、RB 及 p-RB 的蛋白表达的影响



***与空白血清组比较 $P < 0.001$, *与空白血清对照组比较, $P < 0.01$

Figure 6. Effect of YifeiXiaoma granules on mRNA expression of p16, p21 and RB in human lung adenocarcinoma cells

图 6. 益肺消瘤颗粒对人肺腺癌细胞的 p16、p21、RB 的 mRNA 表达的影响

5. 讨论

细胞衰老以永久性的增殖停滞为特征,细胞内信号通路在 DNA 损伤与修复、线粒体的能量代谢异常等相关基因调控下,导致可增殖细胞不可逆地脱离细胞周期的调控,进入一种相对稳定状态。细胞衰老主要涉及 p16/RB 途径和 p53/p21 信号通路,衰老诱导治疗(therapy-induced senescence, TIS)成为治疗肿瘤的策略之一。本研究在益肺消瘤颗粒抑制肺癌细胞增殖的基础上,从 PCNA、p16、p21、RB 及 p-RB 探讨益肺消瘤颗粒诱导肺癌细胞衰老的机制,结果表明益肺消瘤颗粒可抑制 PCNA 的表达、上调 p16、p21

的蛋白及 mRNA 的表达, 下调 RB 及 p-RB 的蛋白及 mRNA 的表达, 是益肺消瘤颗粒诱导肺癌细胞衰老的机制。但是在肿瘤细胞中, 细胞衰老的警报反应可被强制“中断”, 衰老细胞可重新进入细胞周期, 且获得特殊的生物活性, 这些“重生”细胞往往具有多倍体[8]、细胞干性和高侵袭性[9], 经益肺消瘤颗粒诱导衰老的肺癌细胞是否能够获得“重生”有待于进一步研究, 华盛顿大学研究证明: H1299 肺癌细胞系可以“逃逸”喜树碱诱导后的细胞衰老并恢复增殖能力, 而这种恢复能力与肿瘤细胞表达细胞分裂周期蛋白的能力之间存在正相关性, 肿瘤细胞诱导衰老治疗后获得重生的机制更为复杂, 因此益肺消瘤颗粒诱导肺癌细胞的机制仍需要进一步深入研究[10]。

基金项目

黑龙江省自然科学基金联合项目 LH2020H138。

参考文献

- [1] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., *et al.* (2021) Global Cancer Statistics 2020: Globocan Estimates of Incidence and Mortality Worldwide 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **71**, 209. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- [2] Hayflick, L. and Moorhead, P.S. (1961) The Serial Cultivation of Human Diploid Cell Strains. *Experimental Cell Research*, **25**, 585-621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)
- [3] 陈宏. 《养阴扶正汤调控肿瘤 PI3K-AKT 信号通路防止肺癌转移到机制研究》结题鉴定材料[Z]. 2013.
- [4] 魏冬梅, 尹钢, 陈禹含, 田林晓, 费洪新, 陈宏. 养阴扶正汤调控肿瘤细胞黏附蛋白因子抗肺癌的机制研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(9): 378-380.
- [5] 陈宏, 孙玺媛, 魏冬梅, 等. 养阴扶正方调控 PD-1/PD-L1 通路逆 T 细胞耗竭的机制研究[J]. 中国中医药科技, 2022, 29(2): 190-194.
- [6] Wei, D.M., Wang, L., *et al.* (2018) Yangyin Fuzheng Fuzheng Decoction Enhances Anti-Tumor Efficacy of Cisplatin on Lung Cancer. *Journal of Cancer*, **9**, 1568-1574. <https://doi.org/10.7150/jca.24525>
- [7] 陈宏, 孙玺媛, 魏冬梅, 姜梅, 陈禹含, 尹钢, 刘锐. A549、MRC-5 的有氧糖酵解及养阴扶正汤对 A549 有氧糖酵解的干预[J]. 世界肿瘤研究, 2019, 9(1): 6-12.
- [8] Rengaswami, R., Duane, G., Murali, R., *et al.* (2006) Stem Cells, Senescence, Neosis and Self Renewal in Cancer. *Cancer Cell International*, **6**, 25-26. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-6-25>
- [9] Maja, M., Fan Dorothy, N.Y., Dimitri, B., *et al.* (2018) Senescence-Associated Reprogramming Promotes Cancer Stemness. *Nature*, **553**, 96-100. <https://doi.org/10.1038/nature25167>
- [10] 张瑞新, 宁方玲. 肿瘤细胞衰老及相关治疗的研究进展[J]. 中国医药科学, 2022, 15(9): 62-64.