

- [15] Lebeaupin C, Blanc M, Vallée D, et al. Bax inhibitor-1: between stress and survival [J]. *FEBS J*, 2020, 287 (9): 1722-1736.
- [16] Keithley E M. Pathology and mechanisms of cochlear aging [J]. *J Neurosci Res*, 2020, 98 (9): 1674-1684.
- [17] Xu F, Na L X, Li Y F, et al. Roles of the PI3K/Akt/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours [J]. *Cell Biosci*, 2020, 10 (1): 54.
- [18] Bilanges B, Posor Y, Vanhaesebroeck B. PI3K isoforms in cell signalling and vesicle trafficking [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20 (9): 515-534.
- [19] Liu G Y, Sabatini D M. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21 (4): 183-203.
- [20] Uko N E, Güner O F, Matesic D F, et al. Akt pathway inhibitors [J]. *Curr Top Med Chem*, 2020, 20 (10): 883-900.

复方丹皮酚纳米乳对 A549 裸鼠移植瘤生长的影响

刘瑾¹, 杨宗统¹, 隋在云^{1*}, 李晓晶¹, 杨青¹, 姜伟洲², 李克明¹

(1. 山东省中医药研究院, 山东济南 250014; 2. 潍坊市中医院, 山东潍坊 261041)

摘要: 目的 研究复方丹皮酚纳米乳对人肺腺癌 A549 细胞裸鼠移植瘤生长的影响。方法 建立 A549 细胞裸鼠移植瘤模型, 将小鼠随机分为模型组, 康莱特注射液组 (1 400 mg/kg), 复方丹皮酚纳米乳低、中、高剂量组 (48、96、192 mg/kg)。从给药当天开始, 每 5 d 测量移植瘤最长径和最短径, 计算肿瘤体积, 绘制生长曲线。给药结束后取肿瘤组织, HE 染色观察其细胞形态变化, 免疫组化法检测 Bax、Bcl-2、COX-2 蛋白表达。结果 与模型组比较, 复方丹皮酚纳米乳高剂量组能抑制肿瘤体积的增长; 中、高剂量组肿瘤细胞核分裂相减少, 细胞坏死和凋亡增多, Bax 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), Bcl-2、COX-2 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 复方丹皮酚纳米乳能促进 A549 裸鼠移植瘤细胞坏死和凋亡, 抑制细胞生长, 其作用机制可能是促进 Bax 蛋白表达, 抑制 COX-2、Bcl-2 蛋白表达。

关键词: 复方丹皮酚纳米乳; 人肺腺癌 A549 细胞; 移植瘤; Bax; Bcl-2; COX-2

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)03-0935-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.03.042

据报道, 2018 年全球新增癌症患者 1 810 万, 有 960 万人因癌症死亡, 其中肺癌发病人数和死亡人数均居恶性肿瘤首位^[1]。因肺癌早期症状不典型, 大部分肺癌患者首诊时已处于中晚期^[2]。目前, 放、化疗仍为肺癌的主要治疗手段, 但通常会产生严重的副作用, 近年来出现的新型靶向药物因价格昂贵而大大限制了其在临床的推广应用。现代研究表明中医药在治疗肺癌方面具有多环节、多靶点的作用特点, 可有效改善患者的临床症状, 提高患者的生活质量, 延长生存期^[3-5]。

丹皮酚是毛茛科植物牡丹根皮和蓼科植物徐长卿干燥根或全草的主要活性成分, 可有效对抗各种消化道恶性肿瘤^[6], 并在体外抑制肺癌细胞增殖, 诱导肺癌细胞凋

亡^[7]。灵芝多糖是多孔菌科灵芝属真菌菌丝体的次生代谢产物, 具有抗肿瘤和免疫调节作用^[8-10], 可有效抑制非小细胞肺癌 A549 和 NCI-H1299 细胞的增殖、迁移和侵袭能力。目前丹皮酚在临床应用的制剂主要为丹皮酚片、丹皮酚乳膏和丹皮酚注射剂, 但是丹皮酚为脂溶性药物, 口服给药生物利用度低, 而注射剂稳定性差且用药剂量大。课题组前期将脂溶性丹皮酚和水溶性灵芝多糖作为有效成分, 制成复方丹皮酚纳米乳, 发现此乳剂药物含量高、稳定性好、分散均匀、生物利用度高。药效学实验显示, 复方丹皮酚纳米乳对人源肺癌 A549 细胞裸鼠移植瘤具有一定的抑制作用^[11], 体外可抑制 A549 细胞的增殖, 诱导细胞周期阻滞和细胞凋亡^[12]。但是, 复方丹皮酚纳米乳对肿瘤相

收稿日期: 2021-05-26

基金项目: 山东省重大科技创新工程项目 (2018CXGC1301); 山东省重点研发计划项目 (2015GSF119030, 2015GSF119029); 山东省中医药科技项目 (2020M141); 齐鲁医派中医学术流派传承项目 (2020)

作者简介: 刘瑾 (1973—), 女, 硕士, 研究员, 从事中药复方药效物质基础和作用机理研究。Tel: (0531) 82949836, E-mail: jinanlj56@163.com

* 通信作者: 隋在云 (1964—), 女, 研究员, 硕士生导师, 从事中药复方药效物质基础和作用机理研究。Tel: (0531) 82949836, E-mail: zy_505@163.com

网络出版日期: 2022-01-20

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20220119.1713.008.html>

关癌基因与抑癌基因的表达是否有影响还需要进一步探讨。本研究以人非小细胞肺腺癌 A549 细胞裸鼠移植瘤为研究对象, 探讨复方丹皮酚纳米乳对促凋亡因子 Bax、抗凋亡因子 Bcl-2 和潜在癌基因 COX-2 蛋白表达的影响, 以期为相关抗肿瘤新药研发提供实验依据。

1 材料

1.1 试剂与药物 复方丹皮酚纳米乳(由山东省中医药研究院制剂室提供, 含丹皮酚 7.612 mg/mL、灵芝多糖 6.127 mg/mL)。康莱特注射液(浙江康莱特药业有限公司, 批号 1706247-2, 0.1 g/mL)。高浓度基底膜基质胶(BD Matrigel 基质胶, 美国康宁公司); RPMI-1640 培养液(美国 HyClone 公司); 胎牛血清(杭州四季青生物工程材料公司); 四甲基偶氮唑蓝(美国 Amresco 公司); 兔抗小鼠 Bax、Bcl-2、COX-2 单克隆抗体、SABC 试剂盒、DAB 显色试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司)。

1.2 动物与细胞株 BALB/c Nude 裸鼠 50 只, 4 周龄, 体质量 10~16 g, 雌雄各半, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK(京)2016-0006。人非小细胞肺癌细胞株(A549 细胞), 国家实验细胞资源共享平台提供。所有涉及动物的实验程序均经山东省中医药研究院实验动物福利与伦理委员会批准, 伦理号 SDZYY20160617003。

1.3 仪器 SW-CJ-2FD 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); BDS200-PH 倒置显微镜(重庆奥特光学仪器有限责任公司); IL-16CI 二氧化碳培养箱(美国 STIK 公司); 细胞计数板(上海光学仪器厂); FA1204B 电子天平(上海精科天美科学仪器有限公司); P70D20P-N-(wo) 微波炉(广东格兰仕微波生活电器制造有限公司); 莱卡 RM2235 病理石蜡切片机(德国 Leica 公司); Excelsior AS 病理全自动组织脱水机、CTM6 全自动封片机、Gemini AS 全自动染色机、Histostar 包埋机、PrintMate 150 包埋盒打号机、SlideMate 玻片打号机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 生物组织摊烤片机(孝感市亚光医用电子技术有限公司); CX31 生物显微镜(日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 模型制备 参考文献[11]报道方法, 将 A549 细胞传代培养至对数生长期, 用生理盐水调整细胞密度为 $2 \times 10^7/\text{mL}$, 加入 BD Matrigel 基质胶(1:1), 每只裸鼠右侧腋窝皮下注射 0.2 mL。接种后, 每天观察移植瘤生长情况, 采用游标卡尺测量其最长直径(a)、最短直径(b), 计算肿瘤体积(V), 公式为 $V = a \times b^2 / 2^{[13]}$ 。

2.2 分组与给药 以裸鼠移植瘤体积长至 100 mm^3 以上为造模成功, 将其随机分为模型组, 康莱特注射液组(1 400 mg/kg), 复方丹皮酚纳米乳低、中、高剂量组(48、96、192 mg/kg), 每组 8 只, 康莱特注射液组、复方丹皮酚纳米乳各剂量组裸鼠腹腔注射给予相应药物 14 mL/kg, 模型组裸鼠腹腔注射等体积生理盐水, 每天 1 次, 连续 15 d。

2.3 指标检测

2.3.1 肿瘤生长情况 从给药当天开始, 每 5 d 称定裸鼠体质量, 按“2.1”项下方法计算肿瘤体积, 绘制生长曲线。

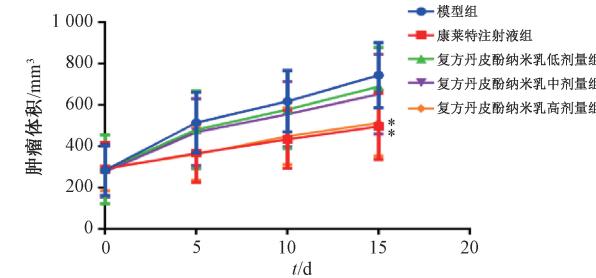
2.3.2 病理组织学 处死裸鼠, 完整剥离肿瘤组织, 生理盐水清洗表面, 滤纸吸干水分, 10% 中性福尔马林固定, 常规石蜡包埋制片, HE 染色, 在光学显微镜下观察肿瘤组织形态学变化并拍照。

2.3.3 肿瘤组织 Bax、Bcl-2、COX-2 蛋白表达 将裸鼠肿瘤组织切片脱蜡、水化, 使用血清封闭, 加一抗 4 ℃ 孵育过夜, 复温, 加二抗常温下孵育, 加入链霉亲和素-生物素复合物, DAB 法显色, 苏木精复染, 脱水, 封片进行免疫组化染色, 采用 Olympus cellSens ver. 1.18 成像分析系统, 在高倍镜下随机选取 5 个视野, 计算阳性细胞面积占总视野面积的百分比, 测定 Bax、Bcl-2、COX-2 蛋白表达。

2.4 统计学分析 通过 SPSS 13.0 软件进行处理, 数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 复方丹皮酚纳米乳对裸鼠肿瘤体积的影响 实验期间, 各组裸鼠移植瘤体积均有不同程度的增加, 其中模型组生长迅速, 而复方丹皮酚纳米乳各剂量组、康莱特注射液组相对缓慢。给药第 15 天, 与模型组比较, 复方丹皮酚纳米乳高剂量组、康莱特注射液组裸鼠肿瘤体积减小($P < 0.05$), 见图 1~2。



注: 与模型组比较, * $P < 0.05$ 。

图 1 复方丹皮酚纳米乳对裸鼠肿瘤体积的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

3.2 复方丹皮酚纳米乳对裸鼠肿瘤组织形态学的影响 模型组裸鼠肿瘤细胞体积大, 形态多样, 呈圆形、椭圆形或不规则形状, 细胞排列紊乱紧密, 片块状弥散分布, 细胞胞浆丰富, 细胞核增大、深染, 核分裂相多见; 康莱特注射液组裸鼠肿瘤细胞体积缩小, 细胞分布较疏松, 核分裂相少于模型组, 肿瘤组织可见片状坏死区; 复方丹皮酚纳米乳低剂量组裸鼠肿瘤细胞体积较大, 形态多样, 细胞排列较紧密, 核膜完整, 胞浆丰富, 核分裂相较多见, 偶见个别坏死区; 复方丹皮酚纳米乳中剂量组裸鼠肿瘤细胞体积缩小, 肿瘤细胞界限模糊, 核固缩, 核分裂少于模型组, 肿瘤组织可见片状坏死区; 复方丹皮酚纳米乳高剂量组裸鼠肿瘤细胞体积减小, 细胞间隙增大, 核固缩, 核浆比例缩小, 肿瘤细胞核分裂很少, 肿瘤组织可见大片坏死区域, 见图 3。

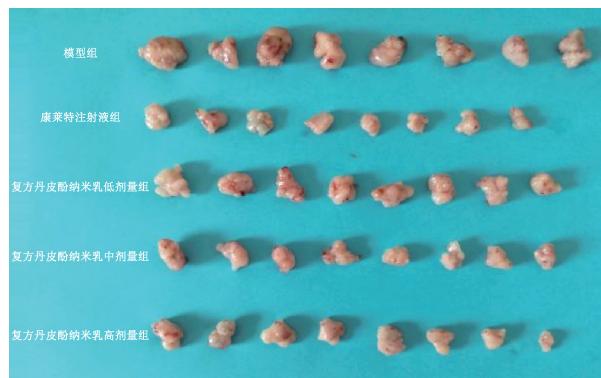


图2 各组裸鼠肿瘤体积

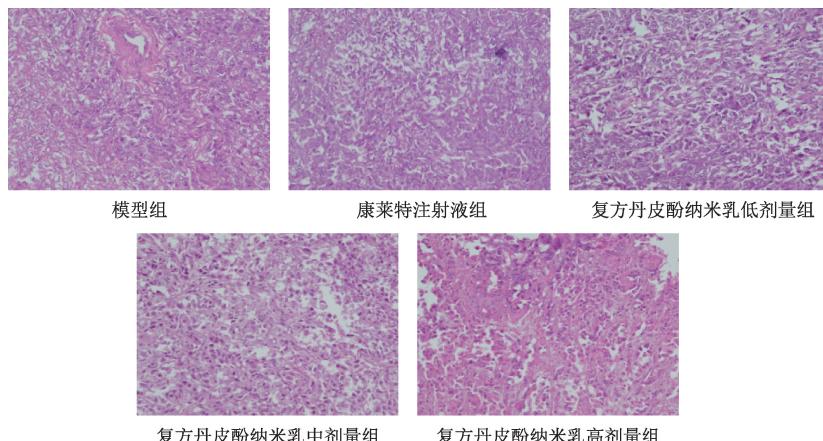


图3 各组裸鼠肿瘤细胞形态学 (×400)

3.3 复方丹皮酚纳米乳对裸鼠肿瘤组织 Bax、Bcl-2、COX-2 蛋白表达的影响 与模型组比较, 复方丹皮酚纳米乳中、高剂量组和康莱特注射液组裸鼠肿瘤组织 Bax 蛋白表达、Bax/Bcl-2 比值升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), Bcl-2、COX-2 蛋

白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$) ; 与复方丹皮酚纳米乳低剂量组比较, 康莱特注射液组、复方丹皮酚纳米乳高剂量组裸鼠 Bax 蛋白表达、Bax/Bcl-2 比值升高 ($P<0.01$), Bcl-2、COX-2 蛋白表达降低 ($P<0.01$), 见表 1、图 4~6。

表1 复方丹皮酚纳米乳对裸鼠肿瘤组织 Bax、Bcl-2、COX-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	阳性率/%			Bax/Bcl-2
		Bax	Bcl-2	COX-2	
模型组	—	32.4±8.1	67.2±13.7	57.3±14.9	0.52±0.23
康莱特注射液组	1 400	80.5±9.6 ** △△	39.5±11.4 **	31.2±7.1 ** △△	2.20±0.60 ** △△
复方丹皮酚纳米乳低剂量组	48	37.3±9.4	52.5±17.7	49.4±15.2	0.82±0.44
复方丹皮酚纳米乳中剂量组	96	44.6±13.1 *	48.7±15.7 *	41.3±11.5 *	1.07±0.62 *
复方丹皮酚纳米乳高剂量组	192	53.7±10.3 ** △△	25.3±9.8 ** △△	20.7±11.2 ** △△	2.38±0.86 ** △△

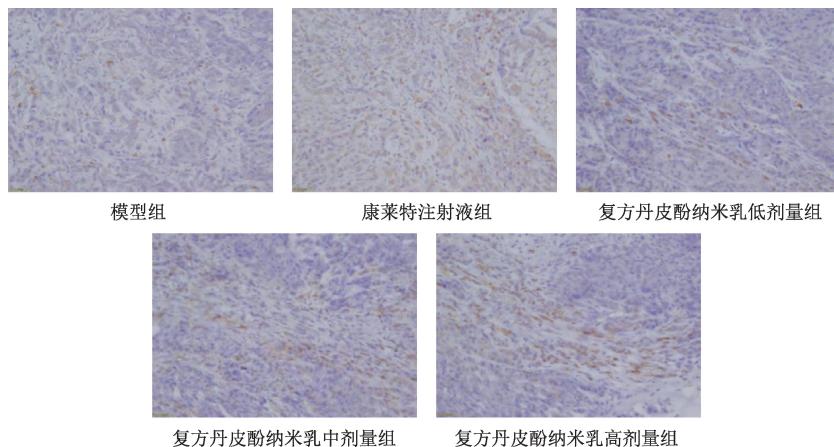
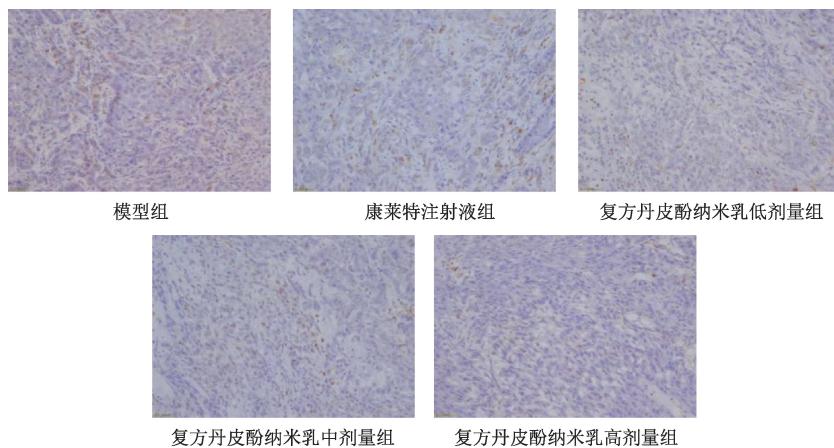
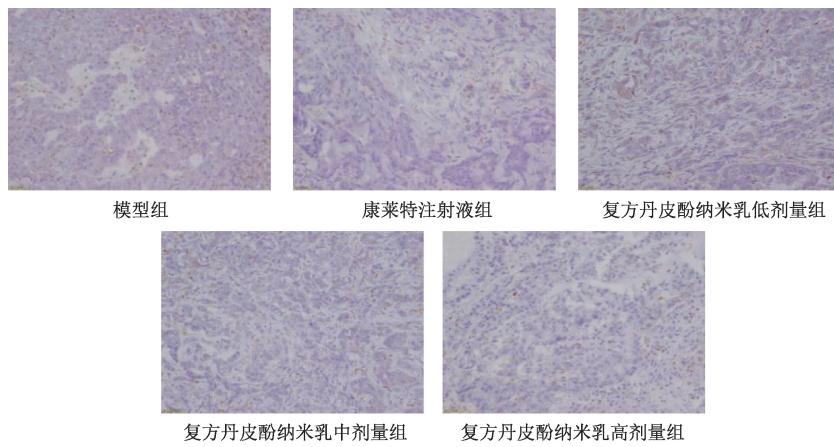
注: 与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与复方丹皮酚纳米乳低剂量组比较, △△ $P<0.01$ 。

4 讨论

近年来研究表明, 诱导肿瘤细胞凋亡是肿瘤治疗重要的途径之一, 内源性线粒体介导和外源性死亡受体介导的细胞凋亡是 2 个较为清楚和研究较多的细胞凋亡途径^[14]。线粒体途径中, 细胞凋亡途径受 B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 基因家族的调控, 其家族中抗凋亡基因 Bcl-2 和促凋亡基因 Bax 是关键的调节因子, 两者的比值决定了细胞走向生存还是死亡的命运^[15-18], Bcl-2/Bax 比值下降可使线粒体膜的通透性升高, 从而促进细胞色素 C 的释放, 诱导凋亡体复合物形成^[19]。前期体外实验表明, 应用复方丹皮酚纳米乳处理 A549 细胞后, G₀/G₁ 期所占百分比逐渐增多, 细胞凋亡

率升高^[12]; 体内抑瘤实验表明, 复方丹皮酚纳米乳对人肺腺癌 A549 细胞裸鼠移植瘤生长具有抑制作用, 可以促进裸鼠肿瘤组织促凋亡蛋白 Bax 表达, 抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达, 升高 Bax/Bcl-2 比值, 提示复方丹皮酚纳米乳可使 A549 细胞周期阻滞和细胞凋亡, 其诱导肿瘤细胞凋亡的机制与促进肿瘤组织 Bax 蛋白表达, 抑制 Bcl-2 蛋白表达有关。

COX-2 是体内花生四烯酸合成和释放前列腺素过程中的重要限速酶, 具有调控肿瘤细胞增殖、凋亡, 诱导肿瘤新生血管形成, 介导细胞之间粘附作用以及促进肿瘤细胞免疫逃逸等多种生物学功能, 在增强肿瘤细胞周围组织浸

图4 各组裸鼠肿瘤组织 Bax 蛋白表达 ($\times 400$)图5 各组裸鼠肿瘤组织 Bcl-2 表达 ($\times 400$)图6 各组裸鼠肿瘤组织 COX-2 表达 ($\times 400$)

润、远处脏器组织转移等方面起关键作用^[20]。近年来,许多研究发现 COX-2 在癌前组织、肺癌组织中均有表达,靶向敲除 COX-2 基因,可抑制非小细胞肺癌生长,并诱导癌细胞生长周期停滞^[21-22],而联合 COX-2 抑制剂治疗肺癌可以消除内源性 COX-2,抑制体外 A549 肺癌细胞的增殖、转移和扩散^[23],提示 COX-2 基因可能是潜在的癌基因,与肺癌的发生发展密切相关。本实验结果表明,复方丹皮酚纳米乳可降低 A549 细胞裸鼠肿瘤组织 COX-2 蛋白表达,提示

抑制肿瘤组织 COX-2 蛋白表达可能是复方丹皮酚纳米乳发挥抑瘤作用的机制之一。

复方丹皮酚纳米乳可抑制人肺腺癌 A549 细胞裸鼠移植瘤体积增长,减少肿瘤细胞核分裂相,使肿瘤细胞坏死和凋亡增多,肿瘤组织 Bax 蛋白表达升高, Bcl-2、COX-2 蛋白表达降低,提示复方丹皮酚纳米乳可能通过促进促凋亡因子 Bax 蛋白表达,抑制 COX-2 蛋白和抗凋亡因子 Bcl-2 蛋白表达而发挥抗肺癌作用,为相关抗肿瘤新药研发提供参考。

参考文献:

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] Siegel R, Ma J M, Zou Z H, et al. Cancer statistics, 2014 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2014, 64(1): 9-29.
- [3] 王其美, 蒋益兰. 扶正祛邪法联合化疗治疗非小细胞肺癌 38 例临床观察[J]. 新中医, 2015, 47(11): 171-173.
- [4] 张培彤, 于明薇, 杨宗艳, 等. 中晚期非小细胞肺癌中西医疗效评价方法比较研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(7): 702-705.
- [5] 朱元章, 张贵彪, 朱国福. 中药复方抗肿瘤机制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(16): 227-234.
- [6] He C N, Peng Y, Zhang Y C, et al. Phytochemical and biological studies of paeoniaceae[J]. *Chem Biodivers*, 2010, 7(4): 805-838.
- [7] 丁文秋, 徐华娥, 李晓林, 等. 丹皮酚对肺癌细胞增殖与凋亡的影响 [J]. 江苏医药, 2014, 40(12): 1371-1374; 1360.
- [8] 李志强, 何玉霞. 灵芝多糖对人肺癌 A549 细胞增殖凋亡的作用[J]. 现代食品科技, 2021, 37(5): 38-42.
- [9] 肖小龙, 莫观, 廉云, 等. 大分子灵芝多糖对非小细胞肺癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的抑制作用[J]. 上海中医药大学学报, 2018, 32(6): 56-60.
- [10] 徐静, 方媛, 许荣忠, 等. 中药对肺癌免疫调剂制剂的影响[J]. 中医学报, 2021, 36(6): 1210-1216.
- [11] 刘瑾, 杨宗统, 隋在云, 等. 复方丹皮酚纳米乳对裸鼠体内人源肺癌 A549 的影响[J]. 药学研究, 2021, 40(2): 71-73; 93.
- [12] 杨青, 隋在云. 复方丹皮酚纳米乳对人肺癌 A549 细胞增殖、周期及凋亡作用的研究[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(9): 2136-2139.
- [13] 丁圆平, 刘靖怡, 田洋, 等. 艾叶挥发油对 A549 细胞的抑制作用[J]. 中成药, 2019, 41(9): 2063-2068.
- [14] Li X T, Xie H Q, Chen Y J, et al. Silkworm pupa protein hydrolysate induces mitochondria-dependent apoptosis and S phase cell cycle arrest in human gastric cancer SGC-7901 cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(4): 1013-1020.
- [15] Bhagya N, Chandrashekhar K R. Tetrindrine and cancer—An overview on the molecular approach[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 624-632.
- [16] An S S, Lu W Q, Zhang Y F, et al. Pharmacological basis for use of *Armillaria mellea* polysaccharides in Alzheimer's disease: Antiapoptosis and antioxidation [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017(5): 4184562.
- [17] 冯原, 江颖, 周颖, 等. 补肺化瘀汤对气虚血瘀证 Lewis 肺癌小鼠的影响[J]. 中成药, 2019, 41(11): 2625-2631.
- [18] 陈艳华, 陆洪艳, 史雯雪, 等. 朝天罐总酚对人肺癌细胞增殖抑制及诱导凋亡作用的研究[J]. 中药材, 2021, 44(6): 1481-1485.
- [19] Hardwick J M, Soane L. Multiple functions of BCL-2 family proteins [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 5(2): a008722.
- [20] 陈廷玉, 卢春风, 苗智, 等. 宫颈癌组织中 PTEN 和 COX-2 的表达与侵袭转移的关系[J]. 解剖学研究, 2014, 36(6): 430-432.
- [21] Liu L, Zhou F, Ren S X, et al. Prognostic value of cyclooxygenase-2 gene polymorphisms in advanced non-small cell lung cancer patients treated with first-line platinum-based chemotherapy [J]. *Asia Pac J Clin Oncol*, 2016, 12(2): e339-e346.
- [22] 丁姝婷, 杨菁华, 韩强. 环氧合酶-2在肺癌及癌旁组织中的表达及与临床病理、预后的关系分析[J]. 中国继续医学教育, 2020, 12(20): 112-114.
- [23] Xia M, Duan M L, Tong J H, et al. MiR-26b suppresses tumor cell proliferation, migration and invasion by directly targeting COX-2 in lung cancer [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19(24): 4728-4737.