

# 槐耳清膏对人肺腺癌A2细胞生物学行为影响及相关机制研究

程万宏, 杨争秒

(大连大学附属新华医院, 辽宁 大连 116022)

**摘要:**目的: 研究槐耳清膏对人肺腺癌A2细胞的增殖抑制作用及凋亡促进作用, 并探讨其分子机制。方法: MTT法检测槐耳清膏对细胞增殖的抑制作用; 流式细胞仪检测对细胞凋亡的影响; Western blotting测定Wnt-1和Survivin蛋白表达的变化。结果: 槐耳清膏能显著抑制人肺腺癌A2细胞增殖、促进凋亡,  $P < 0.05$ ; 下调靶基因蛋白表达水平。结论: 槐耳清膏可抑制人肺腺癌A2细胞增殖、促进细胞凋亡, 其机制可能与下调Wnt-1和Survivin表达有关。

**关键词:** 人肺腺癌细胞株A2; Wnt-1蛋白; Survivin蛋白; 槐耳清膏

**中图分类号:** R730.261, R734.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-842X(2016)03-0029-03

## Study on Effects of Extract of Fungi of *Huaier* on Biological Behavior of Human Lung Adenocarcinoma Cell line A2 and Its Molecular Mechanisms

CHENG Wanhong, YANG Zhengmiao

(Xinhua Affiliated Hospital of Dalian University, Dalian 116022, Liaoning, China)

**Abstract:** *Objective:* To evaluate the effects of Extract of Fungi of *Huaier* on the proliferation and apoptosis in human lung adenocarcinoma cell line A2 and its mechanisms. *Methods:* MTT was used to detect the inhibition of cells growth. Flowcytometry method was used to detect the apoptosis. The changes of the expression of Wnt-1 and Survivin protein were analyzed by western blot. *Results:* Compared with control group, Extract of Fungi of *Huaier* could inhibit the proliferation and induce the apoptosis of A2 cells, significantly ( $P < 0.05$ ). *Huaier* could down-regulate the expression of Wnt-1 and Survivin protein. *Conclusion:* Extract of Fungi of *Huaier* could suppress the proliferation and induce the apoptosis in human lung adenocarcinoma cell line A2. Its mechanisms may be through down-regulating the expression of Wnt-1 and Survivin.

**Keywords:** A2 cell; Wnt-1 protein; Survivin protein; Extract of Fungi of *Huaier*

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一,同时也是最主要的癌症致死原因之一。近年来肺癌发病率增长迅速,而其中又以肺腺癌的增长为最高。有文献报道,其在肺癌各类型中所占比例已超过鳞癌,现居第一位<sup>[1]</sup>。尽管联合应用手术、放疗、化疗、基因靶向治疗等各种手段,肺癌患者的生存率并无大幅度提高,且毒副作用较大。因此,利用中草药天然、无毒等独到优势,以延长患者生存时间、提高生存质量,就显得尤为重要。中药槐栓菌,俗称槐耳,是近年来应用较广泛的真菌抗癌药物,槐栓菌菌质发酵后的热水提取物为槐耳清膏,包含糖类、氨基酸、水等,其主要的活性成分是多糖蛋白(PS-T),由杂多糖和氨基酸等相结合构成。大量的临床实践和基础实验证实,槐耳是良好的恶性肿瘤术后辅助用药。为此,我们研究了槐耳清膏对人肺腺癌细胞株A2增殖和凋亡的影响,以及相关基因表达的变化,探讨其抗肿瘤作用的可能机制。

### 1 资料与方法

#### 1.1 实验细胞株和试剂

人肺腺癌细胞株A2为中国医科大学肿瘤研究所保存。槐耳清膏由江苏启东盖天力药业有限公

司提供。胎牛血清(FBS)、RPMI-1640培养液和胰酶购自美国Hyclone公司。0.22  $\mu$  M滤膜购自美国CORNING公司。Wnt-1羊抗兔一抗和马抗小鼠二抗为北京中山公司产品。Survivin鼠抗人一抗和兔抗人二抗为美国Sigma公司产品。鼠抗 $\beta$ -actin、碘化丙啶(PI)、细胞凋亡试剂盒、噻唑蓝(MTT)和二甲基亚砜(DMSO)为美国Sigma公司产品。

#### 1.2 方法

##### 1.2.1 细胞培养

采用RPMI-1640(含10%灭活胎牛血清)在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>孵箱内培养A2细胞,细胞达到90%覆盖率时进行细胞传代。

##### 1.2.2 MTT法检测槐耳清膏对A2细胞增殖的影响

取对数生长期A2细胞接种培养24 h后,用RPMI-1640无血清培养基洗2遍,胰酶消化收集细胞,PBS重悬后,按 $5 \times 10^5$ 个/孔接种于6孔板,加入无血清RPMI-1640,于37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养过夜使细胞贴壁。10 g槐耳清膏溶于100 mL PBS,0.22  $\mu$  m滤器过滤,-20 $^{\circ}$ C保存备用。分别用终浓度0(对照组)、2、4、6、8 mg/mL作用于A2细胞,分别于作用24、48、72 h后收集细胞,PBS洗2

收稿日期: 2015-09-10

基金项目: 大连市卫生局科研立项基金资助项目(WSJ/KJC-013-JL-56)

作者简介: 程万宏(1973-),男,辽宁抚顺人,副主任医师,博士,研究方向: 肺癌综合治疗。



微信公众号: lnzyydx (或扫左侧二维码关注)

投稿平台: <http://lzx.cbpt.cnki.net>

遍。加入 80  $\mu$ L 新鲜 RPMI-1640 培养液,再加入 20  $\mu$ L MTT 溶液(5 mg/mL),继续培养 4 h。吸掉上清,每孔加入 100  $\mu$ L 二甲基亚砷,在酶联免疫检测仪 570 nm 处测量各孔的吸光值。同时设置调零孔,每组设定 4 个复孔。研究槐耳对肺腺癌细胞增殖活性的影响。生长抑制率 = (1 - 实验组 OD / 对照组 OD)  $\times$  100%。

### 1.2.3 PI 一步染色法检测槐耳清膏对 A2 细胞凋亡的影响

A2 细胞按  $5 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板,培养 24 h 后,分别用终浓度 0、2、4、6、8 mg/mL 的槐耳浓缩液处理细胞。分别于处理后 24、48、72 h 收集细胞,用预冷 PBS 洗涤细胞 2 遍,于离心管中 1000 r/min 离心 5 min,弃上清。加入 70% 的冷乙醇固定,4  $^{\circ}$ C 过夜。400 目的筛网过滤 1 次,加 PI 染色液 1 mL,置 4  $^{\circ}$ C 冰箱中避光染色 30 min 后上机分析。

### 1.2.4 Western Blotting 检测 Wnt-1、Survivin 蛋白表达的变化

取 0 mg/mL 和 8 mg/mL 的槐耳浓缩液处理 A2

表 1 槐耳清膏对人肺腺癌 A2 细胞株增殖的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	质量浓度 (mg/mL)	24 h		48 h		72 h	
		A 值	抑制率(%)	A 值	抑制率(%)	A 值	抑制率(%)
对照组	0	0.181 $\pm$ 0.011	-	0.278 $\pm$ 0.012	-	0.313 $\pm$ 0.014	-
槐耳组	2	0.154 $\pm$ 0.017*	14.92	0.232 $\pm$ 0.017*	16.55	0.253 $\pm$ 0.016*	19.17
	4	0.123 $\pm$ 0.009*	32.04	0.180 $\pm$ 0.064*	35.25	0.192 $\pm$ 0.012*	38.66
	6	0.075 $\pm$ 0.003*	58.56	0.106 $\pm$ 0.008*	61.87	0.125 $\pm$ 0.013*	60.06
	8	0.065 $\pm$ 0.025*	64.08	0.091 $\pm$ 0.010*	63.67	0.099 $\pm$ 0.013*	68.37

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ 。

### 2.2 槐耳清膏对人肺腺癌细胞株 A2 凋亡的影响

质量浓度为 2~8 mg/mL 的槐耳清膏作用于人肺腺癌 A2 细胞后,对细胞凋亡有显著促进作用,与对照组比较,均  $P < 0.05$ 。随着槐耳清膏质量浓度的增加,作用时间的延长,细胞凋亡显著升高(表 2)。

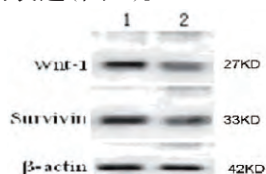
表 2 槐耳清膏对人肺腺癌 A2 细胞株凋亡的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	药物质量浓度 (mg/mL)	凋亡率(%)		
		24 h	48 h	72 h
对照组	0	1.83 $\pm$ 0.54	2.47 $\pm$ 0.78	2.77 $\pm$ 0.25
槐耳组	2	6.32 $\pm$ 0.46*	8.58 $\pm$ 0.54*	15.16 $\pm$ 0.03*
	4	17.83 $\pm$ 0.60*	22.59 $\pm$ 0.37*	26.28 $\pm$ 0.32*
	6	32.54 $\pm$ 0.14*	38.63 $\pm$ 0.22*	40.67 $\pm$ 0.28*
	8	41.52 $\pm$ 0.24*	43.64 $\pm$ 0.45*	48.37 $\pm$ 0.07*

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ 。

### 2.3 槐耳清膏对细胞 Wnt-1 和 Survivin 蛋白表达的影响

0 mg/mL 槐耳作用细胞 72 h 后,检测可见 Wnt-1 与 Survivin 条带清晰;而 8 mg/mL 的槐耳作用细胞 72 h 后,各条带明显减弱。各组内对照  $\beta$ -actin 条带一致,说明槐耳清膏能显著下调 Wnt-1 和 Survivin 蛋白表达(图 1)。



注:1.对照组,2.槐耳组。

图 1 Western blot 检测槐耳清膏作用 72 h 后肺腺癌细胞株 A2 中 Wnt-1 和 Survivin 蛋白表达

### 3 讨论

我国肺癌发病率增长迅速,随着我国工业化

速度的加快和吸烟率上升等多种原因,流行病学显示自 1991 年以来,其死亡率平均每年上升 4.8%,从 1996 年开始,已上升为中国人群众瘤的第 1 位死因,并且近二三十年内其发病率都不会有显著下降<sup>[2]</sup>。因此,传统中药因为较小的毒副作用和其防癌、治癌一体的独特功效,关注度正逐渐提高。

### 1.3 统计学分析

所有实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 17.0 统计软件包进行统计学分析。两组间采用  $t$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 槐耳清膏对人肺腺癌细胞株 A2 增殖的抑制作用

质量浓度为 2~8 mg/mL 的槐耳清膏各组与对照组比较均对人肺腺癌 A2 细胞增殖有明显抑制作用,且随着质量浓度的升高抑制作用增强( $P < 0.05$ );随着药物作用时间延长,细胞生长抑制率随之增加,不同浓度组均在 72 h 达高峰(表 1)。

速度的加快和吸烟率上升等多种原因,流行病学显示自 1991 年以来,其死亡率平均每年上升 4.8%,从 1996 年开始,已上升为中国人群众瘤的第 1 位死因,并且近二三十年内其发病率都不会有显著下降<sup>[2]</sup>。因此,传统中药因为较小的毒副作用和其防癌、治癌一体的独特功效,关注度正逐渐提高。

槐耳入药已有 1600 年历史,最早见于《唐本草》。槐耳清膏是药用真菌槐耳的热水提取物,含有多种有机成分和十余种矿物质元素,其主要抗癌活性成分为蛋白多糖,其抗癌谱广、抑瘤率高、药效稳定性高,无明显毒副作用,既能单独使用又可作为联合用药,能明显提高生活质量及延长病人的生存期<sup>[3]</sup>。然而,关于槐耳的临床作用机制研究近些年才开展,其抗肿瘤作用机理尚不清楚。本研究结果显示,质量浓度为 2~8 mg/mL 的槐耳清膏各组与对照组比较均能明显抑制人肺腺癌 A2 细胞的增殖,促进的细胞凋亡。随着槐耳清膏质量浓度的增加,作用时间的延长,抑制细胞增殖和促进凋亡的作用明显加强,8 mg/mL 的槐耳清膏作用 A2 细胞 72 h,药物的抑制作用最强,呈显著的剂量-时间依赖性。

与果蝇 wg 基因相同源的 Wnt 基因可以通过其经典的 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路和非经典的 Wnt/ $Ca^{2+}$  通路及 Wnt/JNK 通路,参与肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移等一系列生物学行为过程<sup>[4]</sup>。目前,关于槐耳清膏对肿瘤 Wnt 通路影响的研究多数集中于 Wnt 信号系统成员 E-cadherin、 $\beta$ -catenin、APC 和 Axin 等<sup>[5]</sup>,而 Wnt 基因本身表达异常,尤其是与肿瘤发生发展关系最为密切的 Wnt-1 基因与肿瘤生物学行为改变之间的研究则未见报道。本研究结果显示,槐耳清膏能显著抑制 Wnt-1 基因表达,其抑制肺癌增殖、侵袭

# 不同大孔树脂处理土鳖虫酶解液抗血栓作用研究

徐莉, 窦家聪, 尹雷, 代龙

(山东中医药大学, 山东 济南 250355)

**摘要:**目的: 研究不同大孔树脂处理后的土鳖虫酶解液的抗血栓作用。方法: 以吸附率、得膏率和体外纤溶活性测定范围、血液黏度为指标, 利用静态吸附试验对3种大孔树脂进行筛选。结果: DA201-C大孔树脂的吸附率最高, 所处理的土鳖虫酶解液得膏率最低, 体外纤溶活性测定范围最大, 血液黏度最小。结论: 采用DA201-C型大孔树脂对土鳖虫酶解液进行纯化处理, 方法简便易行, 抗血栓作用显著, 可以达到预期目的。

**关键词:** 土鳖虫; 大孔树脂; 吸附率; 抗血栓

**中图分类号:** R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-842X(2016)03-0031-03

## Antithrombotic Mechanism of Eupolyphaga Enzymatic Hydrolyzate with Different Macroporous Resin

XU Li, DOU Jiacong, YIN Lei, DAI Long

(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, Shandong, China)

**Abstract:** *Objective:* Research of the antithrombotic mechanism of the eupolyphaga enzymatic hydrolyzate with different type macroporous resins. *Methods:* Using adsorption rate, solids rate, vitro fibrinolytic activities and blood viscosity as the index, evaluate three different macroporous resin through the static adsorption experiment. *Results:* DA201-C type macroporous resin has the highest adsorption, eupolyphaga enzymatic hydrolyzate using this resin handle has the lowest solids rate, the vitro fibrinolytic activities strongest and the minimum blood viscosity. *Conclusion:* Using DA201-C macroporous resin to purificate for the eupolyphaga enzymolysis liquid, the method is simple, easy. It can achieve the expected purpose.

**Keywords:** eupolyphaga; macroporous resins; adsorption rate; antithrombotic

和转移的作用可能是通过下调Wnt-1基因表达来控制Wnt/ $\beta$ -catenin通路下游基因表达实现的。

凋亡抑制因子生存素(Survivin)是1997年Altieri发现,属于IAP基因家族成员,定位于染色体17C25区,是迄今为止发现的最强凋亡抑制因子<sup>[6]</sup>。研究表明Survivin基因表达与肺癌的预后关系密切, Kehara等<sup>[7]</sup>研究了79例小肺腺癌(直径<2 cm)患者肿瘤组织中Survivin的表达与患者预后的关系,结果发现Survivin表达阳性组其肿瘤静脉侵犯率明显大于对照组, Survivin表达阳性组患者生存数亦明显低于对照组,表明Survivin是小肺腺癌患者一个预后不良因素;在Kren等<sup>[8]</sup>的研究中Survivin表达与较短生存期的NSCLC患者及鳞癌患者有相关性;陶琳等<sup>[9]</sup>的研究显示在非小细胞肺癌中Survivin mRNA的阳性表达率越高,细胞分化程度越低,抑制细胞凋亡的作用越强,肿瘤细胞的浸润性越强,预后越差。本研究结果显示,槐耳清膏能显著下调Survivin蛋白表达,其介导的促进肿瘤细胞凋亡作用,可能是通过抑制Survivin基因表达实现的。

综上所述,槐耳清膏可能通过下调肺腺癌细胞Wnt-1基因和Survivin基因表达来抑制肿瘤细胞增

殖和促进凋亡,其抗肿瘤作用呈显著的剂量-时间依赖性,为临床用药的给药方式和给药剂量提供了参考。◆

### 参考文献

- [1] Siegel R, Naishadbam D, Jemal A. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(1): 10-29.
- [2] 支修益, 陈东红. 非小细胞肺癌外科治疗现状和进展[J]. 首都医科大学学报, 2009, 30(3): 298-305.
- [3] 李思维, 邹立勇, 尹宜文. 槐耳颗粒在肿瘤临床中的应用[J]. 中国肿瘤临床, 2006, 14(10): 698-700.
- [4] Iwao Mikami, Liang You, Bia He, et al. Efficacy of Wnt-1 monoclonal antibody in sarcoma cells[J]. Cancer, 2005, 5(53): 1012-1017.
- [5] 张光军, 郑超, 袁周, 等. 槐耳清膏体外诱导人肝癌细胞MHcc97H凋亡[J]. 肿瘤学杂志, 2010, 16(4): 281-284.
- [6] Emnuela, Felley-Bosco Rolf, Stahel. Hippo/YAP pathway for targeted therapy[J]. Translational lung cancer research, 2014, 3(2): 75-83.
- [7] Kehara M, Oshita F, Kameda Y, et al. Expression of survivin eor-related with vessel invasion is nmlarker of poor prognosis in small adenocarcinoma of the lung[J]. Oncol Rep, 2002, 9: 835-838.
- [8] Kzen L, Brazdil J, Heramnova M, et al. Prognostic significance of anti-apoptosis proteins survivin and bcl-2 in non-8small cell lung carcinomas: n clinicopathologic study of 102 cases[J]. Appt Immunohistochem Mol Morphol, 2004, 12: 44-49.
- [9] 陶琳, 姚峰, 李华, 等. Survivin基因表达与非小细胞肺癌发生发展的关系[J]. 中国肺癌杂志, 2003, 6(4): 275-277.

收稿日期: 2015-09-04

基金项目: “十二五”国家重大新药创制项目(2013ZX09103002-021)

作者简介: 徐莉(1990-),女,山东章丘人,硕士研究生,研究方向: 中药新剂型与新药开发研究。

通讯作者: 代龙(1964-),男,山东德州人,教授,硕士,研究方向: 中药新剂型与新药开发研究。E-mail: shouyaodruglab@163.com。



微信公众号: lnzyydxhb (或扫左侧二维码关注)

投稿平台: <http://lzx.cbpt.cnki.net>