

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.003420

补中益气汤协同 Si β -catenin 调控 Wnt/ β -catenin 信号通路 干预肺腺癌顺铂耐药性的分子机制研究

李 贺,牟琪瑞,王 哲,王 莹,于 丹,高 原

(辽宁中医药大学中西医结合学院病理教研室,沈阳 110847)

【摘要】目的:探讨补中益气汤含药血清协同 Si β -catenin 调控 Wnt/ β -catenin 信号通路干预 A549/DDP 细胞顺铂耐药性的分子机制研究。**方法:**采用 siRNA 干扰沉默 β -catenin 的表达,Western blot 检测正常血清组、顺铂组、siCTNNB1-235 组、siCTNNB1-510 组、siCTNNB1-547 组 A549/DDP 细胞的 β -catenin 蛋白的相对表达量;干扰 β -catenin 后,Western blot 检测各组 A549/DDP 细胞 β -catenin 和 Survivin 的蛋白表达量,MTT 法检测各组 A549/DDP 细胞对顺铂的 IC₅₀,Annexin V/PI 染色法检测各组 A549/DDP 细胞顺铂诱导的凋亡率。**结果:**相较于正常血清组(1.00),siCTNNB1-235 组(0.323 ± 0.021)对 β -catenin 表达抑制率达 67% ($P=0.000$)。RNAi 技术沉默 β -catenin 后,与正常血清组(1.00)相比,补中益气汤联合顺铂组的 Survivin(0.247 ± 0.015)和 β -catenin(0.257 ± 0.015)蛋白的表达下调更为明显($P=0.000, P=0.000$)。IC₅₀ 和正常血清组(28.330 ± 1.029) μ mol/L 相比,单独补中益气汤含药血清(20.350 ± 1.155) μ mol/L 或单独瞬时转染 siCTNNB1-235 组(15.577 ± 1.535) μ mol/L 均可降低 A549/DDP 细胞顺铂的 IC₅₀($P=0.000, P=0.000$),2 者联合(10.453 ± 0.999) μ mol/L 使用可进一步降低顺铂的 IC₅₀($P=0.000$)。与正常血清组(9.130 ± 0.384)% 相比,瞬时转染 siCTNNB1-235 联合顺铂组(64.393 ± 0.244)% 和补中益气汤联合顺铂组(70.120 ± 0.400)% 的总凋亡率均升高($P=0.000, P=0.000$)。**结论:**补中益气汤含药血清和瞬时转染 si β -catenin 在抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路改善肺腺癌顺铂耐药性方面具有协同效应,且补中益气汤具有 si β -catenin 瞬时转染样效应。

【关键词】 β -catenin; Survivin; RNAi; 肺癌耐药; 补中益气汤

【中图分类号】R285.5;R734.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2023-03-24

Molecular mechanism of Buzhong Yiqi Decoction in coordination with Si β -catenin in intervention against cisplatin resistance in lung adenocarcinoma by regulating the Wnt/ β -catenin signaling pathway

Li He, Mu Qirui, Wang Zhe, Wang Ying, Yu Dan, Gao Yuan

(Department of Pathology, College of Integrative Medicine, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine)

【Abstract】**Objective:** To investigate the molecular mechanism of Buzhong Yiqi Decoction in coordination with Si β -catenin in intervention against cisplatin resistance in A549/DDP cells by regulating the Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Methods:** The expression of β -catenin was silenced by siRNA interference, and Western blot was used to measure the relative protein expression of β -catenin in A549/DDP cells in the normal serum group, the cisplatin group, the siCTNNB1-235 group, the siCTNNB1-510 group, and the siCTNNB1-547 group. After β -catenin interference, Western blot was used to measure the protein expression levels of β -catenin and Survivin in A549/DDP cells of each group; MTT assay was used to determine the IC₅₀ of cisplatin in A549/DDP cells of each group; Annexin V/PI staining was used to measure the cisplatin-induced apoptosis rate of A549/DDP cells in each group. **Results:** Compared with the normal serum group(1.00), the siCTNNB1-235 group(0.323 ± 0.021) had an inhibition rate of 67% on β -catenin expression ($P=0.000$). After β -catenin was silenced by RNAi technique, compared with the normal serum group(1.00), the Buzhong Yiqi Decoction+cisplatin group had significantly greater reductions in the protein expression of Survivin(0.247 ± 0.015) and β -catenin(0.257 ± 0.015)($P=0.000, P=0.000$). As for the IC₅₀ of cisplatin in A549/DDP cells, compared with the normal serum group(28.330 ± 1.029) μ mol/L, serum containing Buzhong Yiqi decoction alone(20.350 ± 1.155) μ mol/L or siCTNNB1-235 transient transfection alone(15.577 ± 1.535) μ mol/L reduced the IC₅₀ of cisplatin in A549/DDP cells($P=0.000, P=0.000$), and the combination of the two methods(10.453 ± 0.999) μ mol/L further reduced the IC₅₀ of cisplatin($P=0.000$). Compared with the normal serum group(9.130 ± 0.384)%,

作者介绍:李 贺,Email:1197386342@qq.com,

研究方向:“以脾论治”肺癌顺铂耐药分子机制。

通信作者:高 原,Email:gao yuan.laury@163.com。

基金项目:辽宁省教育厅科学研究面上资助项目(编号:LJKZ0901)。

优先出版:<https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20240206.1102.004>
(2024-02-09)

μ mol/L, serum containing Buzhong Yiqi decoction alone(20.350 ± 1.155) μ mol/L or siCTNNB1-235 transient transfection alone(15.577 ± 1.535) μ mol/L reduced the IC₅₀ of cisplatin in A549/DDP cells($P=0.000, P=0.000$), and the combination of the two methods(10.453 ± 0.999) μ mol/L further reduced the IC₅₀ of cisplatin($P=0.000$). Compared with the normal serum group(9.130 ± 0.384)%,

the siCTNNB1-235 transient transfection+cisplatin group ($64.393 \pm 0.244\%$) and the Buzhong Yiqi Decoction+cisplatin group ($70.120 \pm 0.400\%$) had a significant increase in overall apoptosis rate ($P=0.000, P=0.000$). **Conclusion:** Serum containing Buzhong Yiqi Decoction and si β -catenin transient transfection have a synergistic effect on inhibiting the Wnt/ β -catenin signaling pathway and improving cisplatin resistance in lung adenocarcinoma, and Buzhong Yiqi Decoction has a si β -catenin transient transfection-like effect.

[Key words] β -catenin; Survivin; RNAi; lung cancer drug resistance; Buzhong Yiqi Decoction

肺癌发病率和死亡率排世界首位,其中约三分之二的新发病例和死亡病例来自中国^[1]。目前,以顺铂为基础的联合化疗是晚期肺癌患者的最佳治疗方案,而化疗耐药极大地降低治疗的成功率,因此全面了解肺癌化疗耐药是亟待解决的问题^[2]。

前期研究发现,干扰糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK3 β)可以活化 Wnt/ β -catenin 信号通路,在 Wnt/ β -catenin 信号通路被激活的情况下,使用补中益气汤干预 A549/DDP 细胞仍可以改善 A549/DDP 细胞顺铂耐药^[3]。因此,推测补中益气汤可以抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路改善 A549/DDP 细胞顺铂耐药,即补中益气汤具有沉默连环蛋白 β 1(β -catenin)的同等效应。本研究利用 siRNA 技术干扰 β -catenin,抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路,检测 A549/DDP 细胞的 Survivin 表达、顺铂 IC₅₀ 及顺铂诱导的总凋亡率,探讨补中益气汤含药血清和瞬时转染 Si β -catenin 在抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路改善肺腺癌顺铂耐药性方面是否具有协同效应,证实补中益气汤具有 si β -catenin 瞬时转染样效应。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物及细胞株 SPF 级 SD 大鼠,供自辽宁中医药大学动物实验中心(合格证号 SCXK(辽)2020-0001),已获得辽宁中医药大学医学与动物伦理审查委员会审查批准(批准号:210726221100791635),体质量 170~210 g。A549/DDP 细胞株购自中国医科院肿瘤研究中心细胞库。

1.1.2 主要试剂 本实验中所用 siRNA 采购于吉玛基因公司;LipofectamineTM2000 转染试剂(产品批号:11668)供自 invitrogen 公司(美国); β -catenin 一抗、全蛋白提取试剂盒、Survivin 一抗、BCA 蛋白浓度测定试剂盒以及 ECL 发光液、 β -actin 一抗、AnnexinV-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(产品批号:WL01456、WLA001c、WLA003、WL01684、WL0961a、WLA019、WL0002、WLA020)均供自沈阳万类生物科技有限公司;RIPA 裂解液、羊抗兔 IgG-HRP 以及胰酶(产品批号:P0013B、A0208、C0203),均供于碧云天生物科技有限公司;

顺铂(产品批号:MB1055)购于大连美仑生物技术有限公司;DMSO 以及 MTT 检测试剂盒(产品批号:M-2128、D-5879)均购于 Sigma 公司(美国);胎牛血清(产品批号:SH30084.03)Hyclone 公司(美国)产品;PBS(产品批号:P10033)由双螺旋公司生产。

1.1.3 含药血清的制备 根据最新全国高等中医药院校规划教材《方剂学》(第十版),补中益气汤配方及用量为:黄芪 18 g(根部,货号 2111251,产地甘肃),甘草片 9 g(根茎,货号 2102261,产地内蒙古),人参片 6 g(根部,货号 2111091,产地吉林),当归 3 g(根部,货号 2201072,产地甘肃),橘皮 6 g(干燥成熟果皮,货号 2111203,产地浙江),升麻 6 g(根茎,货号 2011091,产地黑龙江),北柴胡 6 g(根部,货号 2110093,产地陕西),白术 9 g(根茎,货号 2110122,产地安徽),药材购自辽宁中医药大学附属医院药房,产自安徽普仁中药饮片公司,并由辽宁中医药大学药理实验室鉴定均为正品,本次实验沿用课题组前期实验补中益气汤的处方剂量^[3-5],计算出大鼠的等效剂量,实验大鼠给予灌胃处理,每日 1 次(1.314 g/mL,2 mL),持续 7 d,末次灌胃处理 1 h 后腹主动脉取血,制备补中益气汤含药血清备用,放置在无菌管中,随后在 37 °C 水浴环境下静置时长 30 min,低速离心 10 min 后取上清液,再重复离心 2 次,56 °C 水浴灭活 30 min,0.22 μ m 滤器滤过除菌,−20 °C 冻存备用。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 镜下观察 A549/DDP 细胞,当细胞长到 80%,将培养液弃用,使用 0.25% 浓度胰酶 1 mL,将细胞消化 2 min 左右,显微镜下观察到细胞形态卷缩变圆后,加入 2 mL 培养基终止消化。在培养瓶中加入 5 mL 10% 浓度的含有胎牛血清的 RPMI-1640 培养液将细胞吹打均匀。随机分装入新的培养瓶中,继续传代培养。将所需的 A549/DDP 细胞随机分组,用于后续实验。

1.2.2 siRNA 干扰 按常规方法在 6 孔板之中(3×10^5 个/孔)接种细胞,过 24 h 进行转染,保证细胞密度在转染时占 50%~80%,转染后 DDP(20 μ mol/L) 处理 48 h。将 β -catenin siRNA 和阴性对照 siRNA 经 LipofectamineTM2000 转染试剂分别转入 A549/DDP 细胞中。随机分 5 组:正常血清组、顺铂组、siCTNNB1-235 组、siCTNNB1-510 组、siCTNNB1-547 组。参照 siRNA 的设计原则,CTNNB1-235 的干扰序列正义链为 5'−GUAGCUGAUUUGAUGGACTT−3',反义链为 5'−GUCC AUCAAUAUCAGCUACTT−3';CTNNB1-510 的干扰序列正义链为 5'−GGCUGGCAGUAUAGGUCCAUU−3',反义链为 5'−

CUUAGAUGGACCAUAACUGCAGCCTT-3'; CTNNB1-547 的干扰序列正义链为 5'-GCUUCCAGACACGCUAUCATT-3', 反义链为 5'-UGAUAGCGUGUCUGGAAGCTT-3'。

1.2.3 实验分组及给药方法 将 β -catenin 表达受抑后的 A549/DDP 细胞进行随机分组, 实验所需的补中益气汤含药血清按上述操作制备, 实验中所需顺铂的药物浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$, 随机分 6 组: A549/DDP+ 正常 SD 大鼠血清组 (10% 正常血清处理)、A549/DDP 细胞+siCTNNB1+正常 SD 大鼠血清组、A549/DDP 细胞+含药血清组、A549/DDP 细胞+siCTNNB1+顺铂+正常 SD 大鼠血清组 (20 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂与 10% 正常血清共同处理)、A549/DDP 细胞+顺铂+siCTNNB1+含药血清组 (20 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂与 10% 补中益气汤含药血清共同处理)、A549/DDP 细胞+siCTNNB1+含药血清组。

1.2.4 蛋白质印迹检测 β -catenin 干扰后蛋白表达量 将 A549/DDP 细胞收集至洁净 EP 管中, 用 RIPA 裂解液 (0.1% SDS; 1% NP40; 0.1 mmol/L PMSF; 1× PBS) 于冰上裂解 30 min, BCA 法测定蛋白浓度, 配置分离胶并将其灌入玻璃板下 2/3 的位置, 再将浓缩胶灌入玻璃板上 1/3 的位置, 待浓缩胶凝固后将梳子拔掉, 并加样, 电泳后, 转膜至 PVDF 膜, 配置 5% 的脱脂奶粉, 将膜封闭处理, 并放在脱色摇床上摇动 2 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min, 一抗 (将 Survivin、 β -catenin 稀释至 1:500 浓度), 4 ℃冰箱冷藏下孵育过夜, 用 TBST 洗膜 5 min, 洗 3 次, 二抗 (羊抗兔 IgG-HRP 按照 1:5 000 浓度比例稀释) 室温状态下温浴 2 h, 在暗室用 DAB 试剂盒显色试剂发光, 将胶片扫描或拍照, 得到目标图像。得到目的蛋白条带和内参条带图像, 从而测得蛋白质表达水平。

1.2.5 MTT 法检测顺铂的 IC_{50} 贴壁生长的细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化, 吹打制成细胞悬液, 用含 10% 胎牛血清的培养液调整细胞浓度为 $10^5/\text{mL}$, 于 96 孔板中每孔加入 100 μL , 培养 24 h 不同浓度顺铂进行处理。一般培养条件下培养细胞 48 h, 在每孔中加入 20 μL 、5 mg/mL 的 MTT 溶液, 孵育 4 h 后, 弃去液体培养基, 加入 150 μL DMSO, 在摇床上通过 10 min 的振荡, 使结晶物溶解充分, 将酶标仪置于 570 nm 波长下测得光吸收值 (A 值)。

1.2.6 Annexin V/PI 染色法检测凋亡率 贴壁生长的细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化 1 min 左右, 低速离心后弃上清, PBS 洗涤细胞 2 次, 取 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 的细胞待检测, 加入 250 μL 结合缓冲液, 使其成为浓度 $(2\sim 5) \times 10^5/\text{mL}$ 的细胞悬液。取 195 μL 细胞悬液加入 Binding Buffer 和 FITC 标记的 Annexin V-FITC 5 μL 以及浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 碘化丙啶 (PI) 溶液 10 μL , 室温避光处理 30 min, 再加入 300 μL 的结合缓冲液, 轻轻混匀, 2 min 后于流式细胞仪上 (激发光波长 488 nm) 进行结果检测分析。

1.3 统计学方法

使用 SPSS 17.0 软件对数据进行分析统计, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD- t 法, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 沉默 β -catenin 对各组 β -catenin 蛋白表达量影响

Western blot 结果: 由蛋白 marker 显示, 各组均在 92 kD 处显示条带, 则各组 β -catenin 均有表达。以相对分子质量为 43 kD 的 β -actin 作为内参, 应用 Image J 软件定量分析 β -catenin 蛋白表达水平。正常血清组、顺铂组、siCTNNB1-235 组、siCTNNB1-510 组、siCTNNB1-547 组分别为: 1.00、 0.977 ± 0.015 、 0.323 ± 0.021 、 0.570 ± 0.020 、 0.723 ± 0.025 。方差分析 5 组 β -catenin 蛋白表达的差异, 差异有统计学意义 ($F=714.980, P=0.000$)。如图 1、图 2 结果显示, 与顺铂组比较, 瞬时转染 CTNNB1-235 特异性 siRNA 组总 β -catenin 表达强度明显降低 ($t=43.830, P=0.000$)。以正常血清 A549/DDP 组蛋白表达量为基准, 特异性 β -catenin siRNA 对 β -catenin 表达抑制率达 67%。而瞬时转染阴性对照 siRNA(顺铂)组细胞 β -catenin 蛋白表达量变化不明显 ($t=2.646, P=0.152$)。此结果进一步说明本实验设置的对于 β -catenin siRNA 有较强特异性, 且阻抑效果显著。

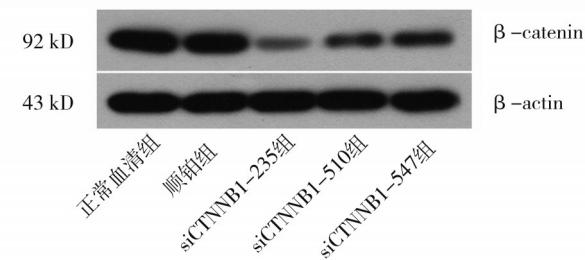
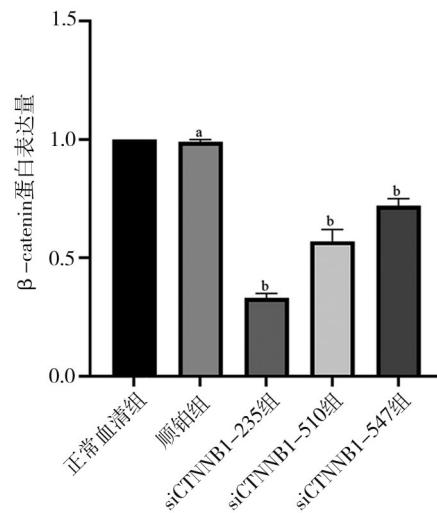


图 1 转染 siRNA 后 A549/DDP 细胞中 β -catenin 蛋白检测结果



注:a, 与正常血清组比较, $P=0.152$; b, 与顺铂组比较, $P=0.000$
图 2 干扰 β -catenin 后各组 A549/DDP 细胞中 β -catenin 蛋白的相对表达量

2.2 β -catenin 表达受抑对各组 A549/DDP 细胞 β -catenin、Survivin 蛋白表达的影响

图 3、5 结果显示,正常血清组、siCTNNB1+正常血清组、含药血清组、siCTNNB1+顺铂+正常血清组、siCTNNB1+顺铂+含药血清组和 siCTNNB1+含药血清组 β -catenin 蛋白表达水平分别为:1.00、 0.453 ± 0.021 、 0.458 ± 0.020 、 0.387 ± 0.015 、 0.247 ± 0.015 、 0.323 ± 0.252 。方差分析 6 组 β -catenin 蛋白表达的差异,差异有统计学意义($F=838.916, P=0.000$)。与正常血清组比较,siCTNNB1+正常血清组和含药血清组均能降低 β -catenin 蛋白表达量($t=45.490, P=0.000; t=46.430, P=0.000$),而 siCTNNB1+正常血清组和含药血清组两组间无明显差异($t=0.299, P=0.709$)。与 siCTNNB1+正常血清组比较,siCTNNB1+顺铂+正常血清组和 siCTNNB1+含药血清组 β -catenin 蛋白表达水平降低($t=4.472, P=0.000; t=13.860, P=0.000$)。与 siCTNNB1+顺铂+正常血清组相比,siCTNNB1+顺铂+含药血清组 β -catenin 蛋白表达量也降低($t=11.220, P=0.000$)。

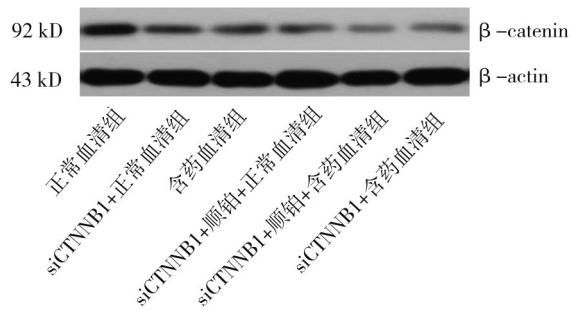


图 3 干扰 β -catenin 后各组 A549/DDP 细胞 β -catenin 蛋白表达量

图 4、5 结果显示,正常血清组、siCTNNB1+正常血清组、含药血清组、siCTNNB1+顺铂+正常血清组、siCTNNB1+顺铂+含药血清组和 siCTNNB1+含药血清组 Survivin 蛋白表达水平分别为:1.00、 0.523 ± 0.015 、 0.503 ± 0.015 、 0.356 ± 0.005 、

0.257 ± 0.015 、 0.313 ± 0.015 。方差分析 6 组 Survivin 蛋白表达的差异,差异有统计学意义($F=1369.468, P=0.000$)。与正常血清组比较,siCTNNB1+正常血清组和含药血清组均能降低 Survivin 蛋白表达量($t=54.050, P=0.000; t=56.320, P=0.000$),而 siCTNNB1+正常血清组和含药血清组两组间无明显差异($t=0.184, P=0.077$)。与 siCTNNB1+正常血清组比较,siCTNNB1+顺铂+正常血清组和 siCTNNB1+含药血清组 Survivin 蛋白表达水平降低($t=18.020, P=0.000; t=21.380, P=0.000$)。与 siCTNNB1+顺铂+正常血清组相比,siCTNNB1+顺铂+含药血清组 Survivin 蛋白表达量也降低($t=10.640, P=0.000$)。

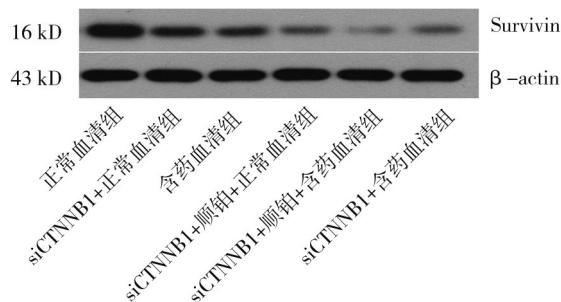
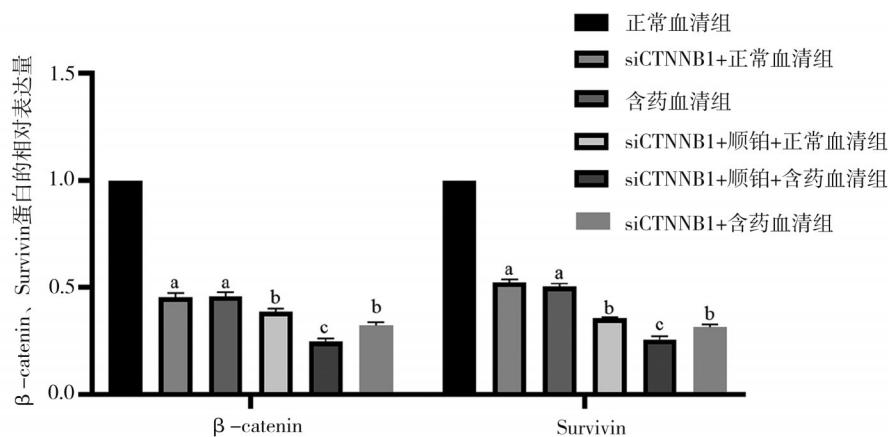


图 4 干扰 β -catenin 后各组 A549/DDP 细胞 Survivin 蛋白表达量

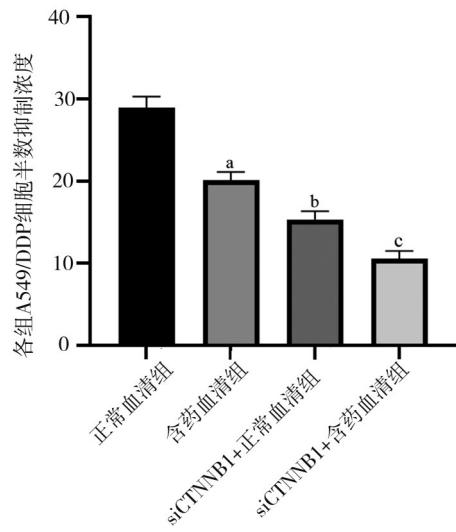
2.3 β -catenin 表达受抑对各组 A549/DDP 细胞 IC₅₀ 的影响

图 6 中 MTT 结果显示,正常血清组、含药血清组、siCTNNB1+正常血清组、siCTNNB1+含药血清组的 IC₅₀ 分别为:(28.330 ± 1.029) $\mu\text{mol/L}$ 、(20.350 ± 1.155) $\mu\text{mol/L}$ 、(15.577 ± 1.535) $\mu\text{mol/L}$ 、(10.453 ± 0.999) $\mu\text{mol/L}$, 4 组比较差异有统计学意义($F=120.493, P=0.000$)。与正常血清组比较,补中益气汤含药血清可降低 A549/DDP 细胞顺铂的 IC₅₀($t=8.932, P=0.000$)。与含药血清组或 siCTNNB1+正常血清组比较,siCTNNB1+含药血清组 A549/DDP 细胞顺铂的 IC₅₀ 显著降低($t=11.220, P=0.001; t=4.844, P=0.000$)。



注:a,与正常血清组比较, $P=0.000$;b,与 siCTNNB1+正常血清组比较, $P=0.000$;c,与 siCTNNB1+顺铂+正常血清组比较, $P=0.000$

图 5 干扰 β -catenin 后各组 A549/DDP 细胞 β -catenin、Survivin 蛋白表达量

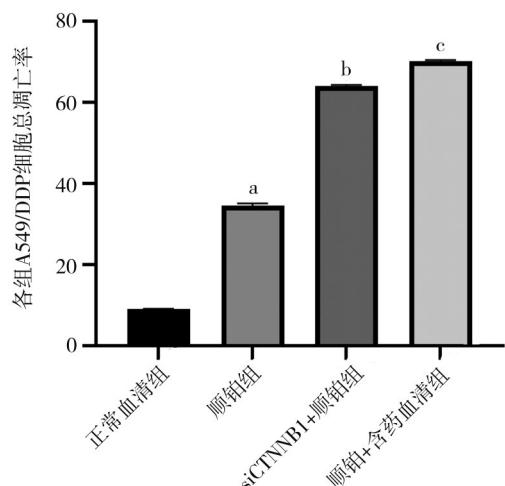


注:a,与正常血清组比较, $P=0.000$;b,与含药血清组比较, $P=0.001$;
c,与siCTNNB1+正常血清组比较, $P=0.001$

图 6 干扰 β -catenin 后各组 A549/DDP 细胞中细胞生长的 IC₅₀

2.4 β -catenin 表达受抑对各组 A549/DDP 细胞凋亡的影响

由图 7、8 的 Annexin V/PI 染色法的流式细胞术结果显示,正常血清组、顺铂组、siCTNNB1+顺铂组、顺铂+含药血清组的总凋亡率分别为:(9.130 ± 0.384)%、(34.367 ± 0.631)%、(64.393 ± 0.244)%、(70.120 ± 0.400)%,差异具有统计学意义($F=12.563.734, P=0.000$)。单独使用顺铂时,A549/DDP 细胞的顺铂诱导总凋亡率明显增加($t=59.140, P=0.000$);瞬时转染 CTNNB1-235 联合顺铂,A549/DDP 细胞的顺铂诱导总凋亡率进一步增加($t=210.200, P=0.000$);补中益气汤联合顺铂后 A549/DDP 细胞顺铂诱导总凋亡率增加最明显($t=190.400, P=0.000$)。



注:a,与正常血清组比较, $P=0.000$;b,与顺铂组比较, $P=0.000$;c,与 siCTNNB1+顺铂组比较, $P=0.000$

图 7 干扰 β -catenin 后各组 A549/DDP 细胞的凋亡率

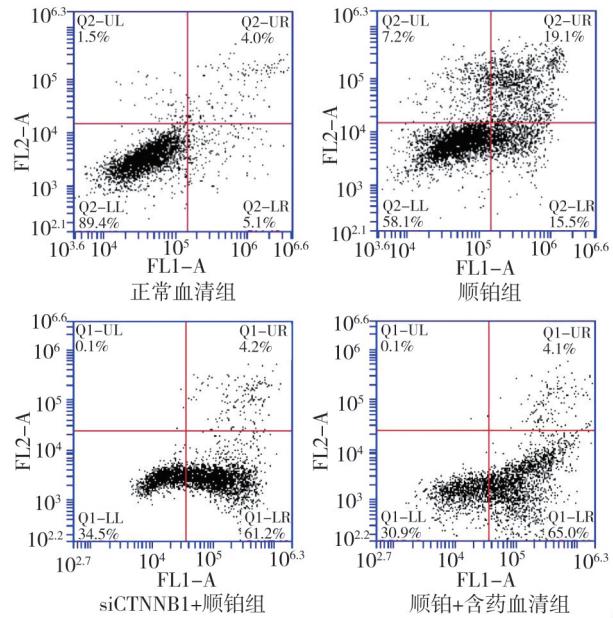


图 8 干扰 β -catenin 后各组 A549/DDP 细胞的凋亡率

3 讨 论

中医认为,肿瘤长居体内,会不断吸收五脏精微,则亏损五脏之精,导致精不足以化气而气虚^[6]。因此治则需益气健脾,扶助正气^[7]。根据中医五行相生理论“培土生金”法,选择代表方剂补中益气汤治疗肺癌耐药得到良好的疗效^[3-5]。前期研究也显示,补中益气汤可以明显改善肿瘤对顺铂的耐药性,提高肿瘤细胞对顺铂的药物敏感性^[8],有利于化疗的继续治疗,延长肺癌患者寿命、提高生存质量,为中医药治疗或缓解癌症症状提供新的思路。

Wnt/ β -catenin 信号通路与肿瘤发生、发展、转移及耐药关系十分密切^[9]。 β -catenin 是一种多功能蛋白质,在内环境稳定中起着核心作用。 β -catenin 过高表达会导致各种疾病,包括癌症^[10]。当 Wnt/ β -catenin 信号通路被激活, β -catenin 从细胞质向细胞核转移,使得细胞增殖加快、产生凋亡抵抗,也提高 A549/DDP 细胞对顺铂的耐药性^[11]。Survivin 是 Wnt/ β -catenin 信号通路下游的靶基因,是最强的凋亡抑制蛋白之一,只在肿瘤细胞和胚胎组织中表达,并与肿瘤治疗抵抗相关^[12]。当 Wnt/ β -catenin 信号通路被抑制,能显著降低 A549/DDP 对顺铂的耐药性,同时也能下调 Survivin 蛋白表达^[3]。这些研究不仅支持本研究的结果,而且可能解释 Survivin 诱导途径的中断导致细胞凋亡增加和肿瘤生长抑制

的分子机制^[13]。本研究发现补中益气汤干预或干扰 β -catenin 均能下调 β -catenin、Survivin 蛋白表达,降低顺铂的 IC_{50} ,并提高顺铂诱导的总凋亡率,且补中益气汤干预和干扰 β -catenin 2 组之间无明显差异。以上结果证明,补中益气汤干预与干扰 β -catenin 具有类似的作用,均可通过抑制抗凋亡蛋白 Survivin 的表达而促进细胞凋亡的发生,进而降低顺铂的半数抑制浓度,增加耐药细胞对顺铂的敏感性,改善顺铂耐药的发生。而当补中益气汤联合干扰 β -catenin 时, β -catenin、Survivin 蛋白的表达下调、顺铂的 IC_{50} 降低及顺铂诱导总凋亡率的提高均比补中益气汤联合顺铂干预或干扰 β -catenin 时更加明显,证明补中益气汤干预和干扰 β -catenin 在改善顺铂耐药方面具有协同效应。本研究进一步证实补中益气汤可以通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路而干预肺癌的顺铂耐药性。 β -catenin 作为 Wnt/ β -catenin 通路的核心信号分子,是肿瘤耐药的重要干预靶点之一,本研究证实补中益气汤具有 β -catenin 干扰作用,并与其存在协同效应,为临床寻求中医药改善肺癌顺铂耐药的有效靶点提供可参考的实验依据。综上所述,补中益气汤通过抑制 A549/DDP 细胞 β -catenin 及下游靶基因 Survivin 的表达、降低顺铂的 IC_{50} 数值、增加顺铂诱导的总凋亡率,从而发挥改善肺腺癌顺铂耐药的作用。补中益气汤含药血清联合顺铂和干扰 β -catenin 在抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路改善肺腺癌顺铂耐药性方面具有协同效应,且补中益气汤具有干扰 β -catenin 样效应。本研究为将来拓展肺癌顺铂耐药提供新的思路与方法。

参 考 文 献

- [1] Wang ZJ, Wu L, Li BL, et al. Toripalimab plus chemotherapy for patients with treatment-naïve advanced non-small-cell lung cancer: a multicenter randomized phase III trial (CHOICE-01)[J]. J Clin Oncol, 2023,41(3):651–663.
- [2] Wang DL, Zhao CS, Xu F, et al. Cisplatin-resistant NSCLC cells induced by hypoxia transmit resistance to sensitive cells through exosomal PKM2[J]. Theranostics, 2021,11(6):2860–2875.
- [3] 牟琪瑞,付权泽,刘春英,等.补中益气汤含药血清干预 A549/DDP 细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路改善顺铂耐药的机制研究[J].时珍国医国药,2021,32(8):1818–1821.
- Mu QR, Fu QZ, Liu CY, et al. Mechanism of serum containing Buzhong Yiqi Decoction on Wnt/ β -catenin signaling pathway in A549/DDP cells to improve cisplatin resistance[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2021, 32(8):1818–1821.
- [4] 张 颖,高 原,刘春英.补中益气汤对肺腺癌荷瘤裸鼠 A549/DDP 细胞顺铂耐药的影响[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(23):73–78.
- Zhang Y, Gao Y, Liu CY. Effect of Buzhong Yiqi Tang on cisplatin resistance A549/DDP cells in nude mice with lung adenocarcinoma[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2019,25(23):73–78.
- [5] 高 原,王 莹,陈 奇,等.补中益气汤对肺腺癌荷瘤裸鼠移植瘤的抑瘤作用及 MRP 蛋白表达影响的研究[J].时珍国医国药,2016,27(8):1796–1799.
- Gao Y, Wang Y, Chen Q, et al. Study on the inhibitory effect of Buzhong Yiqi Decoction on lung adenocarcinoma transplanted tumor in nude mice and the effect of MRP protein expression[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2016,27(8):1796–1799.
- [6] 钱佳南,孙博云,胡鸿毅.补中益气汤治疗恶性肿瘤疾病的临床及基础研究进展[J].河北中医药学报,2021,36(5):59–64.
- Qian JN, Sun BY, Hu HY. Clinical and basic research progress of Buzhong Yiqi Decoction in treatment of malignant tumor diseases[J]. J Hebei Tradit Chin Med Pharmacol, 2021,36(5):59–64.
- [7] 徐国品.补中益气汤改善肺脾气虚型晚期非小细胞肺癌患者生活质量的临床研究[D].合肥:安徽中医药大学,2019.
- Xu GP. Clinical research of the efficacy of buzhongyiqi Tang in treating lung-spleen qi deficiency advanced non-small cell lung cancer[D]. Hefei: Anhui University of Chinese Medicine, 2019.
- [8] 周 琳,于 丹,刘春英.补中益气汤含药血清干预上皮间质转化对 A549/DDP 细胞凋亡的影响[J].中华中医药杂志,2017,32(4):1473–1477.
- Zhou L, Yu D, Liu CY. Effects of Buzhong Yiqi Decoction medicate serum-induced epithelial–mesenchymal transition on apoptosis of A549/DDP cells[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2017, 32 (4) : 1473–1477.
- [9] Liu JQ, Xiao Q, Xiao JN, et al. Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities[J]. Signal Transduct Target Ther, 2022,7(1):3.
- [10] Shang S, Hua F, Hu ZW. The regulation of β -catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities[J]. Oncotarget, 2017, 8 (20):33972–33989.
- [11] Li JZ, Xu SJ, Dong H, et al. Altered Wnt5a expression affects radiosensitivity of non-small cell lung cancer via the Wnt/ β -catenin pathway[J]. Exp Ther Med, 2022, 23(1):5.
- [12] Grossman D, McNiff JM, Li F, et al. Expression and targeting of the apoptosis inhibitor, survivin, in human melanoma[J]. J Invest Dermatol, 1999, 113(6):1076–1081.
- [13] Sah NK, Khan Z, Khan GJ, et al. Structural, functional and therapeutic biology of survivin[J]. Cancer Lett, 2006, 244(2):164–171.

(责任编辑:李青颖)