

补中益气汤含药血清联合 siRNA 对肺腺癌 A549/DDP 细胞的 LRP 表达影响

李璐璐¹, 迟寿军², 王莹¹, 井欢³, 刘春英¹

(辽宁中医药大学 1. 基础医学院病理教研室; 2. 基础医学院中医基础教研室;

3. 重大科研平台显微形态实验中心, 沈阳 110032)

【摘要】目的:运用小干扰 RNA 片段(small interfering RNA, siRNA)的方法特异性沉默肺耐药蛋白(lung resistance protein, LRP)基因, 观测该方法同补中益气汤含药血清联合应用逆转人肺腺癌耐药细胞 A549/DDP 的效果。**方法:**设计并合成针对 LRP 基因对应序列的 siRNA, 采用转染试剂对细胞进行转染。实验分组为: 空白对照组、补中益气汤含药血清组、siRNA 组及补中益气汤含药血清+siRNA 组, 利用逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测对该基因的抑制作用, Western blot 及免疫细胞化学法检测蛋白质表达。**结果:**参照空白对照组, 补中益气汤含药血清组、siRNA 组及补中益气汤含药血清+siRNA 组 mRNA 及 LRP 蛋白表达均减少, 差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**补中益气汤含药血清和 siRNA 均能降低 A549/DDP 的 LRP 蛋白表达, 并且 2 种因素之间存在交互作用。

【关键词】补中益气汤; 小干扰 RNA 片段; A549/DDP 细胞; 肺耐药蛋白

【中图分类号】R734.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-07-19

Effect of Center-Supplementing and Qi-Boosting Decoction combined siRNA on LRP expression of A549/DDP cell

Li Lulu¹, Chi Shoujun², Wang Ying¹, Jing Huan³, Liu Chunying¹

(1. Teaching and Research Section of Pathology, School of Basic Medicine; 2. Teaching and Research Section of Traditional Chinese Medicine, School of Basic Medicine; 3. Morphology Experimental Center, Major Research Platform, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine)

【Abstract】Objective: To discuss the effect of concomitant application of small interfering RNA (siRNA) after targeted resection of lung resistance protein (LRP) and Buzhongyiqitang serum on the human lung adenocarcinoma drug-resistant cell-line A549/DDP. **Methods:** The siRNAs which had the same sequences of LRP gene were designed and synthesized, then the human lung adenocarcinoma drug-resistant cell-line A549/DDP was transected with transfection reagent. The experimental cells were grouped into control group, Buzhongyiqitang serum group, siRNA-processed group and Buzhongyiqitang plus siRNA-processed group. RT-PCR was applied to determine the mRNA expression of LRP. Western blot and immunocytochemical method were adopted to determine the protein expression of LRP. **Results:** Protein and mRNA expression of LRP in Buzhongyiqitang serum group, siRNA group and Buzhongyiqitang plus siRNA-processed group was decreased significantly compared with that in control group ($P<0.05$). **Conclusion:** Both Buzhongyiqitang serum and siRNA serve effectively in decreasing protein expression of LRP, and Buzhongyiqitang serum combined siRNA show synergistic effect.

【Key words】Buzhongyiqitang; siRNA; A549/DDP cell; lung resistance protein

肺癌是当前威胁人类健康的恶性肿瘤之一, 其发病率和死亡率呈逐年上升的趋势一直居高不下,

作者介绍: 李璐璐, Email: 1278950096@qq.com,

研究方向: 中药抗肿瘤作用及其机制研究。

通信作者: 刘春英, Email: chunying99@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81072743); 辽宁省自然基金资助项目(编号: 20102145)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000225.html>

由于手术切除率低, 应用顺铂进行化疗成为常用治疗方案, 但存在有效率不高的问题, 主要原因与肿瘤细胞产生耐药性有关^[1-2]。因此, 研究耐药相关基因及其逆转机制成为亟待解决的问题。研究表明, 肺耐药蛋白(lung resistance protein, LRP)基因在肺癌组织中的表达与肺癌多药耐药的形成具有一定相关性^[3]。补中益气汤则可对抗化疗引起的胃肠道

等不良反应,降低化疗药物毒副反应,改善肺癌耐药,有效降低药物毒副反应^[4]。本实验采用小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 技术靶向抑制 LRP 基因,检测干扰前后对 A549/DDP 细胞株的 LRP 蛋白表达影响,并创新联合使用祖国医学中的补中益气汤含药血清,检测相关指标,从而进一步探讨该复方药逆转多药耐药相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料

MTT, Sigma 产品 (M2128); MSO, Sigma 产品 (D2650); PMRI1640 培养基, 鼎国产品 (CC0031); 胎牛血清, Hyclone 产品 (SH30084.03); Anti-MVP, Abcam 产品 (AB38309)。siRNA 由北京鼎国公司设计合成; 脂质体转染试剂及反转录试剂均购于北京鼎国公司。电转仪, Bio-Rad 产品; 紫外分光光度计, Quwell 产品 (Q-5000); 凝胶成像分析仪, Bio-Rad 产品; 双稳数显电泳仪, 北京六一 (DYY-8C); 荧光定量 PCR 仪 (ABI9700)。

1.2 细胞系及细胞培养

人肺腺癌耐顺铂 A549/DDP 细胞购自中国科学院肿瘤医院中心细胞库 (北京), 10% 胎牛血清培养, 放置在含 5% CO₂, 37 °C 饱和湿度的培养箱中保存, 胰蛋白酶消化, 传代培养。含药血清组在细胞生长至 70% 时更换含 10% 补中益气汤含药血清的完全培养基, 继续培养 24 h 后用于后续实验, 实验用细胞均处于对数生长期。

1.3 动物及含药血清提取

SPF 级 SD 大鼠, 体质量 (200 ± 20) g, 由辽宁中医药大学动物部提供 (动物许可证号: 2012-0012 号)。根据《药典》中规定补中益气汤的用药剂量 (黄芪 18 g, 白术 9 g, 柴胡 6 g, 甘草 9 g, 人参 6 g, 当归 3 g, 人参 6 g, 橘皮 6 g, 升麻 6 g, 柴胡 6 g, 白术 9 g), 计算出大鼠等效剂量, 以 0.576 g/ml 常规煎煮。大鼠灌胃给药每日 1 次, 连续 3 d, 末次给药 1 h 后, 动物麻醉状态下, 腹主动脉采血, 置无菌管, 静置 30 min 后, 离心, 取上清, 56 °C 水浴灭活, 于超净台上过滤除菌, 分装, -20 °C 冰箱冻存备用。

1.4 针对 LRP 的 siRNA 设计合成及转染

根据 siRNA 设计原则及 LRP 基因在 GenBank 中的序列合成 3 对特异 siRNA1、siRNA2、siRNA3 分别对应 LRP mRNA 的 3 个不同部位, 引物序列为 LRP1 上游引物: 5'-GATCCGCAACTGAAGAGTTCATCATCAAGAGATGATGAACTCTTCAGTTGCTTTTTTA-3', LRP1 下游引物: 5'-AGCTTAAAAAGCAACTGAAGAGTTCATCATCTTGAATGATGAACTCTTCAGTTGCG-3'; LRP2 上游引物: 5'-GATCCGCAGGACAATGAGAGGGTATTCAAGAGATACCCTCTCATTGTCCTGCTTTTTTA-3', LRP2 下游引物: 5'-AGCTTAAAAAGCAGGACAATGAGAGGGTATCTCTTGAATACCCTCTCATTGTCCTGCG-3'; LRP3 上游引物: 5'-GATCCGGAGGTCGTGGAGA-

TCATTTTCAAGAGAAATGATCTCCACGACCTCCTTTTTTA-3', LRP3 下游引物: 5'-AGCTTAAAAAGGAGGTCTGTGGAGATCATTTCTCTTGAAAATGATCTCCACGACCTCCG-3'。并用 NCBI 网站的 BLAST 序列进行对比, 排除同源性。当 A549/DDP 细胞处于对数生长期时, 在 6 孔板中按试剂盒说明进行转染实验, 实验分组: 空白对照组 (不转染)、siRNA1 组、siRNA2 组、siRNA3 组, 补中益气汤含药血清+siRNA 组。每组 3 个复孔, 每个实验均重复 3 次。

1.5 筛选具有较好沉默效果的 siRNA

细胞转染 24 h 后, 按照 Trizol 一步法分别提取各组细胞的总 RNA, 逆转录成 cDNA, PCR 扩增出 LRP、内参片段。引物序列为 LRP 上游引物: 5'-GACACTTTGCCAAGGCTCTC-3', LRP 下游引物: 5'-ATAGGTGCCCCCTGGAGTTG-3'; β-actin 上游引物: 5'-ATCATGTTTGAGACCTCAACA-3', β-actin 下游引物: 5'-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3'。按试剂盒说明进行 PCR 反应, 反应结束后, 将 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳后, 于紫外透射仪上观察结果, 以 β-actin 为内参照, 用反应产物的吸光度与内参的比值表示 LRP 基因的表达强度。实验分组为: 空白对照组, siRNA1 组, siRNA2 组, siRNA3 组, 实验重复 3 次, 按照如下公式计算沉默率: 沉默率 (%) = [1 - (平均 siRNA 组 mRNA 表达值 / 空白对照组 mRNA 表达值)] × 100%, 选取最优沉默效率的 siRNA 组用于实验 1.6、1.7、1.8。

1.6 RT-PCR 检测 LRP mRNA 的表达

按 Trizol 一步法分别提取各组细胞的总 RNA, 逆转录成 cDNA, 实验方法同 1.5。实验分组为: 空白对照组、补中益气汤含药血清组、siRNA 组 (1.5 中选取最优组)、补中益气汤含药血清+siRNA 组。实验重复 3 次。

1.7 免疫细胞化学法检测 LRP 蛋白表达

取对数生长期的 A549/DDP 细胞, 0.25% 胰酶消化后, 接种于置有盖玻片的 24 孔板中, 实验分组为: 空白对照组, 补中益气汤含药血清组, siRNA 组 (1.5 中选取最优组), 补中益气汤含药血清+siRNA 组, 阴性对照组。细胞贴壁后, 空白对照组加入含有 10% 的空白血清的培养基; 补中益气汤含药血清组加入含有 10% 补中益气汤含药血清作为培养基; siRNA 组将细胞进行转染后, 使用空白血清作为培养基; 补中益气汤含药血清+siRNA 组, 将细胞进行转染后, 使用 10% 含药血清作为培养基; 阴性对照组培养同空白对照组。培养 48 h 后取出盖玻片, 4% 多聚甲醛固定, 3% H₂O₂ 孵育 20 min, 山羊血清封闭 30 min, 滴加一抗 4 °C 在湿盒中孵育过夜。生物素标记二抗, 作用 30 min 后, DAB 显色剂显色, 苏木精复染, 常规处理后, 封片; 阴性对照以 PBS 代替一抗。用 Quantity One 图像分析软件进行分析, 以细胞质/膜或核中出现粗细一致的棕黄色颗粒作为阳性, 随机取 5 个视野, 在 400 倍高倍镜下, 计数细胞, 测出阳性反应细胞的总面积和吸光度, 求出平均吸光度 AOD (average optical density, AOD)。实验重复 3 次。

1.8 Western blot 检测细胞中 LRP 蛋白表达

分别将收集空白对照组、补中益气汤含药血清组、siRNA

组(1.5 中选取最优组)、补中益气汤含药血清+siRNA 组 4 组细胞,提取总蛋白,灌制 10%SDS-聚丙烯酰胺凝胶,常规电泳,转膜,封闭,一抗(1:1 000),4 ℃孵育过夜,二抗(1:2 000),室温孵育 2 h,在暗室发光,扫描图像后,用 Quantity One 软件测定各条带的吸光度分析结果,采用所测的 LRP 条带与 β -actin 吸光度值的比值表示该蛋白的表达强度。

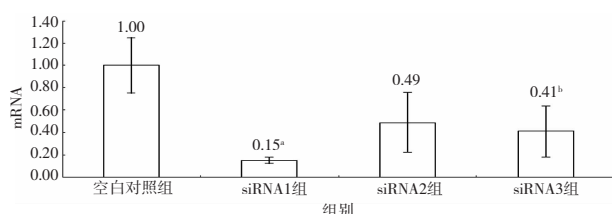
1.9 统计学处理

数据结果使用 Excel 2007 软件建立数据库,采用 SPSS 19.0 统计软件分析,筛选具有较好沉默效果的 siRNA 数据采用单因素方差分析,余采用 2×2 析因设计方差分析,计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 筛选具有较好沉默效果的 siRNA

定义空白对照组 mRNA 表达为 1,将 3 组 siRNA 作用后转染细胞中 mRNA 表达同该组比较,强度均有降低,沉默率分别为 85.5%,50.7%和 59.2%,其中 siRNA1 的 mRNA 同空白对照组比较,差异具有统计学意义($F=8.655, P=0.001$),故后选取该组 siRNA 进行后续实验,结果参见图 1。



a, 与空白对照组相比, $P<0.01$; b, 与空白对照组, $P<0.05$

图 1 转染后 LRP mRNA 的表达

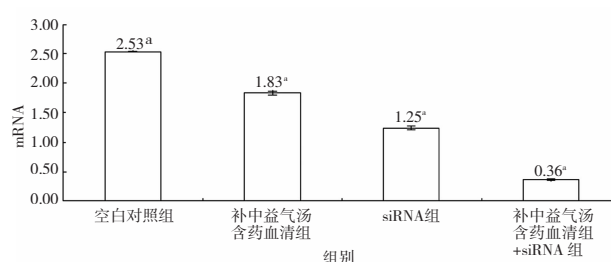
Fig. 1 mRNA expression of LRP after transfection

2.2 RT-PCR 检测 LRP mRNA 的表达

将 RT-PCR 检测结果进行 2×2 析因设计方差分析,空白对照组、补中益气汤含药血清组、siRNA 组及补中益气汤含药血清+siRNA 组比较,差异均有统计学意义($P=0.000$),参照空白对照组,其余 3 组 mRNA 表达强度均减少,说明补中益气汤含药血清及 siRNA 2 种因素都可以抑制 mRNA 表达,并且 2 种因素之间存在交互作用。其中,补中益气汤含药血清作用 A549/DDP 细胞后同空白对照组相比表达强度降低至 72.3%,siRNA 组同空白对照组相比表达强度降低至 49.4%,补中益气汤含药血清+siRNA 组同空白对照组相比表达强度降低至 14.2%,结果参见图 2。

2.3 免疫细胞化学法检测 LRP 蛋白表达情况

LRP 蛋白于细胞膜和细胞质中表达较多,A549/DDP 空白血清组中胞质呈棕黄色,深染,有大量棕黄色颗粒,表达为强阳性;其余 3 组仅局部细胞胞质呈棕黄色,表达明显降低且差异有统计学意义($F=368.605, F=119.852, F=39.791, F=5.975, P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$)。具体 AOD 数值及蛋白表达情况参见表 1、图 3。



a: $P<0.01$

图 2 RT-PCR 检测 LRP mRNA 的表达

Fig. 2 mRNA expression of LRP detected by RT-PCR

表 1 LRP 蛋白在各组中表达 AOD 值的比较

Tab.1 Comparison on AOD value of LRP expression in each group

组别	AOD	F 值	P 值
空白对照组	308.00 $\pm$ 46.33 ^a	76 138.767	0.000
补中益气汤含药血清组	169.40 $\pm$ 53.60 ^a	16 294.204	0.000
siRNA 组	95.92 $\pm$ 18.37 ^a	5 368.407	0.000
补中益气汤含药血清+siRNA 组	34.74 $\pm$ 25.68 ^a	72.684	0.000

注:a, $P<0.01$

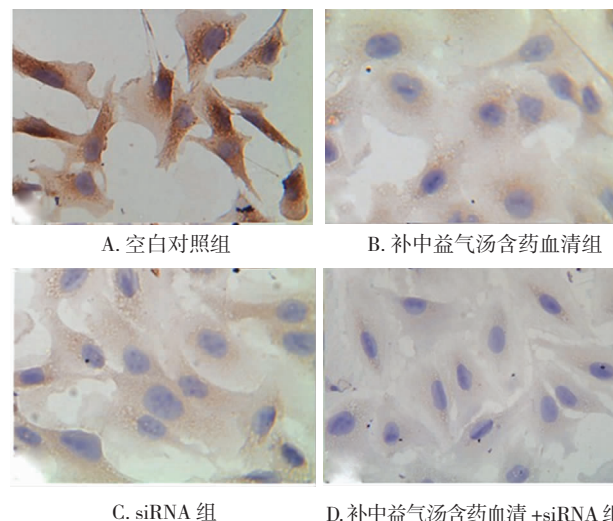
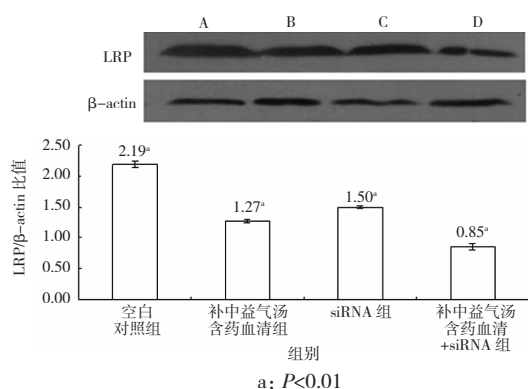


图 3 免疫组织化学法检测 LRP 蛋白的表达 (400 $\times$)

Fig.3 Expression of LRP detected by immunohistochemical method (400 $\times$)

2.4 Western blot 检测细胞中 LRP 蛋白表达情况

将 Western blot 检测结果进行 2×2 析因设计方差分析,空白对照组、补中益气汤含药血清组、siRNA 组及补中益气汤含药血清+siRNA 组比较,差异均有统计学意义($F=29 268.124, F=1 056.015, F=2 123.814, F=64.891, P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$),说明补中益气汤含药血清及 siRNA 2 种因素存在交互作用。通过比较可知补中益气汤含药血清组、siRNA 组和补中益气汤含药血清+siRNA 组中 LRP 的表达同空白对照组相比均明显降低。具体条带及数值参见图 4。



A. 空白对照组; B. 补中益气汤含药血清组; C. siRNA 组;
D. 补中益气汤含药血清 + siRNA 组

图 4 Western blot 技术检测含药血清干预各组细胞中 LRP 蛋白的表达

Fig.4 Expression of LRP in each group detected by Western blot

3 讨论

肺癌作为威胁人类健康的主要元凶之一,其发病率和死亡率一直居高不下。由于手术切除率低,应用顺铂进行化疗成为常用治疗方案,但存在有效率不高的问题,主要原因与肿瘤细胞对所应用药物产生耐药有关^[5-6]。因此,克服耐药和耐药逆转成为研究的热点问题。研究表明,耐药相关蛋白 LRP 具有调节核质同囊泡的药物转运功能,过度表达可使大量药物存储于囊泡中,使药物的核/质比值减少,同肿瘤细胞耐药具有密切关系^[7]。新兴的 siRNA 技术可从基因层面,降解同源的 mRNA,靶向切除 LRP 基因,达到抑制蛋白表达的目的,成为研究抗肿瘤耐药的新手段。但是,由于基因功能的不唯一性,靶向切除某基因,可能导致正常组织失去应有的功能,因此 siRNA 具有在动物体内使用可操作性不强之缺点。

祖国传统医学认为肺癌相当于中医“肺积”、“痞癖”,多由脾气不足、正气亏虚所致,明·张景岳云:“脾胃不足,虚弱失调之人,多有积聚之病”,故可采用“培土生金”大法进行治疗,从健脾益气着手,达到扶正固本之目的。既往研究表明补中益气汤及其药物成分能减轻化疗引起的恶心呕吐、面色萎黄等毒副反应,改善耐药,提高疗效^[8]。

为了提高实际应用性,本研究创新使用临床反应较小的补中益气汤作为研究对象,为了真实地反映该复方药物在体内的作用情况,按照日本 Iwama 等^[9]提出的含药血清制备法,制备含药血清,检测相关指标,并联合使用,探求作用机制。研究结果显

示,在基因层面上,补中益气汤含药血清组、siRNA 组和补中益气汤含药血清+siRNA 组中 LRP 的表达同空白对照组相比明显降低,分别达到 72.3%、49.4% 和 14.2%,说明补中益气汤含药血清及 siRNA 2 种因素都可以抑制 mRNA 表达,并且 2 种因素之间存在交互作用。在蛋白层面上,免疫组化法和 Western blot 法检测具有一致性,同 RT-PCR 结论相吻合。说明耐药细胞经过补中益气汤含药血清作用后能有效降低 LRP mRNA 的表达,从而导致蛋白表达减少,该效果同 siRNA 处理后效果类似,补中益气汤含药血清及 siRNA 2 种因素存在交互作用,同时使用表现出协同作用。由此可见,补中益气汤含药血清的作用机制可能与沉默 LRP 后,降低了核质同囊泡的药物转运功能有关。本研究结果可为临床逆转肺腺癌多药耐药,制定合理的治疗方案提供理论参考,具体机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Friboulet L, Olausson KA, Pignon JP, et al. ERCC1 isoform expression and DNA repair and in non-small-cell lung cancer[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(12): 1101-1110.
- [2] Haeussler GM, Mechinaud F, Daley AJ, et al. Antibiotic-resistant gram-negative bacteremia in pediatric oncology patients—risk factors and outcomes[J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2013, 32(7): 723-726.
- [3] De Moraes AC, Maranhão CK, Rauber GS, et al. Importance of detecting multidrug resistance proteins in acute leukemia prognosis and therapy[J]. *Clin Lab Anal*, 2013, 27(1): 62-71.
- [4] 胡强, 汪宏云, 杨勇刚. 补中益气汤防治晚期肺癌化疗毒副反应临床观察[J]. *实用中医药杂志*, 2008, 25(5): 271-272.
- [5] Chen PR, Tan SY. The treatment outcomes of 21 cases of rapidly growing mycobacteria related pulmonary disease[J]. *Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 2013, 36(3): 182-185.
- [6] Horváth G. New drugs for the treatment of chronic hepatitis B and interdisciplinary aspects of chronic hepatitis B virus infection[J]. *Orv Hetil*, 2013, 154(29): 1142-1150.
- [7] Zhang KG, Qin CY, Wang HQ, et al. The effect of TRAIL on the expression of multidrug resistant genes MDR1, LRP and GST- π in drug-resistant gastric cancer cell SGC7901/VCR[J]. *Hepatogastroenterology*, 2012, 59(120): 2672-2676.
- [8] Guo L, Bai SP, Zhao L, et al. Astragalus polysaccharide injection integrated with vinorelbine and cisplatin for patients with advanced non-small cell lung cancer: effects on quality of life and survival[J]. *Med Oncol*, 2012, 29(3): 1656-1662.
- [9] Iwama H, Amagaya S, Ogihaia Y. Effect of shoshaikoto, a Japanese and Chinese traditional herbal medicinal mixture on the mitogenic activity of lipopolysaccharide: a new pharmacological testing method[J]. *Ethnopharmacology*, 1987, 21(1): 45-53.

(责任编辑: 关蕴良)