

• 实验研究 •

参慈胶囊影响人肺腺癌 A549/DDP 裸鼠体内 多药耐药 DNA 损伤修复的研究*

梁 昆, 徐立群[△], 薛兴阳, 邬晓东, 于礼建, 吴 迪, 邹 莹

(广州医科大学附属肿瘤医院, 广东 广州 510095)

摘要:目的 探讨参慈胶囊对人肺腺癌 A549/DDP 裸鼠体内多药耐药的影响。方法 将 40 只 C57BL/6 小鼠接种人肺腺癌 A549/DDP 细胞悬液建立实体瘤模型, 随机分为参慈胶囊组、参慈胶囊+顺铂组、顺铂组、对照组。对照组予等量生理盐水, 其余各组荷瘤小鼠均用药 21d, 采用 FQ-PCR 技术检测人肺腺癌 A549/DDP 肺癌组织 ERCC1mRNA、RRM1mRNA、hMLH1mRNA、BRCA1mRNA 的表达情况。结果 参慈胶囊能够降低 ERCC1、RRM1、BRCA1 基因的表达, 且能够增加 hMLH1mRNA 基因的表达。结论 通过多基因调节以改善人肺腺癌 A549/DDP 裸鼠体内顺铂耐药状态, 可能是参慈胶囊逆转肺癌多药耐药的途径之一。

关键词: 肺癌; 参慈胶囊; 顺铂耐药; DNA 损伤修复

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2016)03-0001-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2016.03.001

癌症在我国的发病率逐年升高, 其中肺癌的发病率及死亡率最高。据统计, 每 4 例癌症死亡患者中就有 1 例死于肺癌, 而 80% 以上的肺癌病人在确诊时已经发展至中晚期, 失去手术根治的机会。非小细胞肺癌 (non small-cell lung cancer, NSCLC) 约占肺癌患者的 80%~85%。化学治疗在 NSCLC 治疗中占据重要地位, 而多药耐药 (multi drug resistance, MDR) 是化疗效果欠佳甚至失效的主要原因之一。在调节细胞对化疗的反应过程中起着主导作用的是 DNA 的修复基因, 化疗药物影响 DNA 的损伤修复异常是导致多药耐药的一个重要原因。

参慈胶囊由名方仙鱼汤化裁而来, 前期的临床^[1]及实验^[2-3]研究证实对非小细胞肺癌具有较好的疗效, 配合化疗具有减毒增效的作用, 由此推测对非小细胞肺癌化疗所产生的多药耐药 (MDR) 具有一定的逆转作用。因此本研究根据参考文献[4], 从与 DNA 损伤修复相关基因出发, 探讨参慈胶囊对人肺腺癌 A549/DDP 裸鼠体内多药耐药的影响。

1 材料与方法

1.1 实验药物

①参慈胶囊组成: 仙鹤草 15g, 猫爪草 30g, 鱼腥草 30g, 山海螺 30g, 党参 25g, 山慈菇 10g, 田七片 10g, 浙贝 15g, 守宫 5g, 天冬 15g, 炙甘草 5g。由广州一方制药集团提供免煎颗粒, 经浓煎、水提、乙醇沉淀, 并进一步浓缩而成, 每毫升含生药 11g, 冷却后保存。②顺铂 (DDP), 批号: 151102, 江苏豪森药业股份有限公司, 由本院药房提供。

1.2 实验动物

4~6 周龄 BALB/C 裸鼠购自广东省医学实验动物中心, SPF 级别, 动物合格证号: 44007200010919。共 55 只, 其中 50 只雌雄各半, 体质量 (20±2)g, 5 只用于培养细胞。

1.3 细胞来源

人肺腺癌耐药细胞 A549/DDP 由广东省医学实验动物中心提供。

1.4 主要试剂和仪器

PE7000 全自动荧光定量 PCR 仪等。

1.5 引物设计

以 Genbank 人类各目的基因 cDNA 序列作为引物序列。引物设计由广州华银医学检验中心有限

* 基金项目: 广州市卫生局中医药科技项目 (20132A011035)

收稿日期: 2016-04-27

作者简介: 梁昆 (1979-), 男, 广东番禺人, 主治医师, 研究方向: 中西医结合临床肿瘤。

[△]通信作者: 徐立群, E-mail: liangkunys@126.com

公司合成。引物设计如下。

ERCC1: 上游引物:AAGAACTTCGCCCTTCGT-GT,下游引物:GGCACAGTGATACCCGTGAT,扩增片段大小 232bp。RRM1: 上游引物:GCCGAGA-GAGGTGCTTTTCAT, 下游引物 TCCCAGGCCCT-GATTTTCTC,扩增偏大大小 213bp。hMLH1:上游引物:GCCTCTTGCCATTCTGGTCT, 下游引物:TTGACGTCCACGTTCTGAGG,扩增片段大小 269BP。BRCA1: 上游引物:ACACGGAATGCAGCTTACA, 下游引物:TCTTTCGAGGTGGGTCTGC, 扩增片段大小 237bp。 β -actin: 上游引物:CTTCCTTCTTGG-GTATGGAATCC, 下游引物:GGAGCAATGATCTT-GATCTTCATG,扩增片段大小 205bp。

1.6 造模

在无菌条件下,用 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 浓度,每次 0.2mL 的人肺腺癌细胞 A549/DDP 悬液接种到 5 只 BALB/C 裸鼠双侧前腋窝皮下,1 个月后瘤块长成约黄豆大小,至此荷瘤裸鼠制成。同型号 BALB/C 裸鼠 50 只。饲养 2d 后,进行肿瘤组织块移植。在无菌条件下取下荷瘤鼠瘤块,切成约 $1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 1\text{mm}$,通过穿刺针刺入裸鼠的右前腋下,进行造模。

1.7 分组与处理

接种 1 周后剔除瘤块未生成的和过大的瘤块移植瘤裸鼠,随机分成 4 组(对照组、参慈胶囊组、顺铂组、参慈胶囊+顺铂组),每组 10 只。对照组予以 0.2mL 生理盐水灌胃;参慈胶囊组单纯予中药药液 0.2mL (110g/kg)灌胃;顺铂组单纯予顺铂 1mg/kg 腹腔注射;参慈胶囊+顺铂组以中药药液 0.2mL 灌胃,同时予顺铂 1mg/kg 腹腔注射。上述各组每天给药 1 次,连续用药 21d,从给药开始观察 5 周后予脱颈处死。分离肿瘤组织后做病理鉴定。

1.8 检测基因表达情况

利用 FQ-PCR 技术予检测各组裸鼠肿瘤组织中 ERCC1mRNA、RRM1mRNA、hMLH1mRNA、BRCA1mRNA 的表达情况。

取 A549/DDP 裸鼠肺癌组织,置于冷冻管中,保存于液氮,至实验室利用 PE7000 全自动荧光定量 PCR 仪对目的基因进行相关检测。检测结束后,由电脑自动分析并计算结果。计算每一样品和其内参对照的相对含量,以每 μL cDNA 所含的基因的拷贝数与每 μL cDNA 所含 β -actin 的拷贝数的比值进行定量比较。

1.9 数据的收集与处理

利用 SPSS 15.0 统计软件进行数据统计处理,计量数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 参慈胶囊联合顺铂能够降低 A549/DDP 肺癌组织 ERCC1mRNA 的表达

从表 1 看出,参慈胶囊联合顺铂能够降低 A549/DDP 肺癌组织 ERCC1mRNA 的表达。

表 1 各组对 A549/DDP 肺癌组织 ERCC1mRNA 的表达

组别	鼠数/n	ERCC1mRNA/ β -actin
对照组	10	3.30 $\pm$ 0.61
参慈胶囊组	10	2.13 $\pm$ 0.19**
顺铂组	10	2.23 $\pm$ 0.29**
参慈胶囊+顺铂组	10	1.12 $\pm$ 0.15*

注:与对照组进行比较,* $P < 0.01$;与参慈胶囊+顺铂组进行比较,** $P < 0.01$

2.2 参慈胶囊联合顺铂能够降低 A549/DDP 肺癌组织 RRM1mRNA 的表达

从表 2 看出,参慈胶囊联合顺铂能够降低 A549/DDP 肺癌组织 RRM1mRNA 的表达。

表 2 各组对 A549/DDP 肺癌组织 RRM1mRNA 的表达

组别	鼠数/n	RRM1/ β -actin
对照组	10	3.56 $\pm$ 0.51
参慈胶囊组	10	2.07 $\pm$ 0.32**
顺铂组	10	2.19 $\pm$ 0.34**
参慈胶囊+顺铂组	10	1.25 $\pm$ 0.38*

注:与对照组进行比较,* $P < 0.01$;与参慈胶囊+顺铂组进行比较,** $P < 0.01$

2.3 参慈胶囊联合顺铂能够增加 A549/DDP 肺癌组织 hMLH1mRNA 的表达

从表 3 看出,参慈胶囊联合顺铂能够增加 A549/DDP 肺癌组织 hMLH1mRNA 的表达。

表 3 各组对 A549/DDP 肺癌组织 hMLH1mRNA 的表达

组别	鼠数/n	hMLH1mRNA/ β -actin
对照组	10	1.21 $\pm$ 0.13
参慈胶囊组	10	2.16 $\pm$ 0.32**
顺铂组	10	1.95 $\pm$ 0.33**
参慈胶囊+顺铂组	10	3.25 $\pm$ 0.70*

注:与对照组进行比较,* $P < 0.01$;与参慈胶囊+顺铂组进行比较,** $P < 0.01$

2.4 参慈胶囊联合顺铂能够降低 A549/DDP 肺癌组织 BRCA1mRNA 的表达

从表 4 看出,参慈胶囊联合顺铂能够降低 A549/DDP 肺癌组织 BRCA1mRNA 的表达。

表 4 各组对 A549/DDP 肺癌组织 BRCA1mRNA 的表达

组别	鼠数/n	BRCA1/ β -actin
对照组	10	2.15 $\pm$ 0.75
参慈胶囊组	10	2.04 $\pm$ 0.35 ^{##}
顺铂组	10	2.30 $\pm$ 0.29 ^{##}
参慈胶囊+顺铂组	10	1.20 $\pm$ 0.11 [*]

注:与对照组进行比较,^{*} $P<0.01$;与参慈胶囊+顺铂组进行比较,^{##} $P<0.01$

综上,本次实验结果显示,参慈胶囊+顺铂组较其它各组能够明显降低 ERCC1mRNA、RRM1mRNA 以及 BRCA1mRNA 的表达,差异具有统计学意义($P<0.01$)。另外参慈胶囊+顺铂组亦能够显著增加 hMLH1,其差异具有统计学意义($P<0.01$)。

3 讨论

目前用于 NSCLC 的化疗药物众多,但以铂类,尤其是以顺铂(CDDP)为基础的方案仍然为主流,作为一线基础药物是有效并广泛应用的,但是由于耐药问题的存在,使其疗效不尽如人意^[5]。近年来,随着培美曲塞、紫杉醇脂质体以及厄洛替尼等一系列新药的出现,使晚期 NSCLC 患者的药物治疗看到了新的希望。除却高昂的药物费用外,药物的耐药性仍然是肿瘤药物治疗路上不可避免的一堵高墙。如何利用中药减少、延缓肿瘤对药物耐药性的出现,值得广大中医肿瘤学者的深入研究。

肺癌可归属于“肺积”、“咳嗽”等范畴,临证多考虑邪毒损伤脾肺,肺失宣降,痰浊内生。化疗后更进一步损伤脾胃,气虚血瘀,出现恶心呕吐等不适^[6]。仙鱼汤为广州中医药大学陈锐深教授的经验方,其主要药物由仙鹤草、鱼腥草、党参、守宫、山慈姑、山海螺等组成,有健脾益肺、祛瘀化痰散结之功,经多年临床实践证明对肺癌的治疗有不错的疗效。

顺铂又称顺氨氯铂,属于细胞周期的非特异性药物,通过与细胞核内 DNA 的碱基结合,破坏 DNA 的复制和转录过程,诱导肿瘤细胞凋亡^[7]。因此, DNA 损伤修复功能的异常是顺铂耐药的主要机制之一。DNA 损伤修复系统功能的增强会导致癌细胞对化疗药物产生拮抗或者耐药,其中核苷酸切除修

复(nucleotide excision repair,NER)、DNA 错配修复基因(DNA mismatch repair gene,MMR)、DNA 双链断裂损伤修复(repair of DNA double-strand breaks,DSBs)是常见的 DNA 的损伤修复方式。

①切除修复交叉互补基因 1 (excision repair cross-complementing group 1,ERCC1)以及核糖核苷酸还原酶 M1(ribonucleotide reductase M1,RRM1)是参与 NER 的常见基因。

ERCC1 与 DNA 修复酶缺乏互补基因 F(XPF)可形成的紧密的异二聚体(ERCC1-XPF)^[8],具有切除 5'端和损伤识别的双重作用。通过检测 ERCC1 活性的高低,可间接反映出整个 NER 的活性水平^[9]。RRM1 是 DNA 合成通路中的限速酶,执行分裂沟填充的功能,是肿瘤抑制基因^[10],其表达水平可作为对化疗疗效的预测因素^[11]。参慈胶囊可抑制 ERCC1 和 RRM1 水平,推测其可进而抑制 NER 途径,逆转顺铂耐药,抑制肿瘤细胞增殖。

②错配基因 hMLH1 是继 hMSH2 基因之后,MMR 家族中的又一个重要组成部分。hMLH1 基因沉默能导致 MMR 缺陷,癌基因在体内快速聚集,肿瘤细胞增殖,继而导致肿瘤对化疗药物的固有性或获得性耐药^[12-13]。参慈胶囊可增加 hMLH1 基因水平,改善上述情况的发生,从而逆转肺癌细胞铂类耐药。

③BRCA1 (breast cancer susceptibility gene 1)与 MRN(MRE1,RAD50,NBS1)复合物通过非同源末端连接(non-homologous end joining,NHEJ)及同源介导的双链 DNA 修复(homology directed repair,HDR)等方式共同参与 DSBs^[14]。早年研究亦发现 BRCA1 通过 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase,JNK)通路参与对细胞周期的调控与凋亡^[15],如果能中断该通路,理论上可增加顺铂的敏感性^[16]。参慈胶囊能抑制 BRCA1 基因的表达,推测其能抑制或者阻断 DSBs,继而逆转多铂类耐药。

综上所述,癌细胞对顺铂产生拮抗或者耐药, DNA 损伤修复系统功能的增强是其中重要的原因。参慈胶囊通过影响 DNA 损伤修复系统,抑制 ERCC1、RRM1、BRCA1 基因的表达,或同时增加 hMLH1m 基因的表达,通过多基因调节以改善人肺腺癌 A549/DDP 裸鼠体内铂类耐药的状态,可能是参慈胶囊逆转肺癌铂类耐药的途径之一,为进一步研发利用参慈胶囊提供依据。

参考文献:

- [1] 徐立群,徐萌,陈锐深,等. 仙鱼汤配合 TP 方案治疗Ⅲb 及Ⅳ期非小细胞肺癌的近期疗效观察 [J]. 新中医, 2011,43(10):72-74.
- [2] 徐立群,张荣华,薛兴阳,等. 参慈胶囊联合顺铂抑制小鼠 Lewis 肺癌组织的血管生成机制研究[J]. 中国病理生理学杂志,2010,26(12):2347-2350.
- [3] 徐立群,薛兴阳,邹晓东,等. 参慈胶囊联合顺铂对小鼠 Lewis 肺癌组织 survivin、livin 表达的影响 [J]. 中药材, 2013,36(2):294-297.
- [4] 吴广洲,沈振亚,刘国峰,等. 三氧化二砷对人肺腺癌细胞 A549/DDP 裸鼠体内多药耐药逆转作用[J]. 苏州大学学报(医学版),2011,31(1):79-83.
- [5] 唐春兰,杨和平,周向东. DNA 损伤修复与肺癌顺铂耐药机制的研究进展 [J]. 中国肺癌杂志,2012,14(12):960-964.
- [6] 杨君,殷东风. 辨证分型防治恶性肿瘤化疗迟发性呕吐研究简况[J]. 实用中医内科杂志,2015,29(10):178-180.
- [7] 汤钊猷. 现代肿瘤学 [M]. 3 版. 上海: 复旦大学出版社, 2011:1869.
- [8] Fadda E. Role of the XPA protein in the NER pathway: a perspective on the function of structural disorder in macromolecular assembly [J]. Comput Struct Biotechnol J, 2015,14:78-85.
- [9] Manandhar M, Boulware KS, Wood RD. The ERCC1 and ERCC4(XPF) genes and gene products[J]. Gene, 2015,569(2):153-161.
- [10] Coskunpinar E, Yildiz P, Aynaci E, et al. Investigation of some DNA repair genes association in non small cell lung cancer [J]. Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France), 2015,61(8):57-62.
- [11] Mlak R, Krawczyk P, Ciesielka M, et al. The relationship between RRM1 gene polymorphisms and effectiveness of gemcitabine-based first-line chemotherapy in advanced NSCLC patient[J]. Clin Transl Oncol, 2015.
- [12] Vageli DP, Zaravinos A, Daniil Z, et al. hMSH2 and hMLH1 gene expression patterns differ between lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma: correlation with patient survival and response to adjuvant chemotherapy treatment [J]. Int J Biol Markers, 2013,27(4):e400-404.
- [13] 韩婧,李江. DNA 修复相关基因启动子甲基化和肿瘤化疗耐药的进展[J]. 上海交通大学学报(医学版),2011,31(1):95-98.
- [14] Aparicio T, Baer R, Gottesman M, et al. MRN, CtIP, and BRCA1 mediate repair of topoisomerase II-DNA adducts [J]. J Cell Biol, 2016,212(4):399-408.
- [15] Muraoka-Cook RS, Caskey LS, Sandahl MA, et al. Heregulin-dependent delay in mitotic progression requires HER4 and BRCA1 [J]. Molecular and Cellular Biology, 2006,26(17):6412-6424.
- [16] De Luca P, De Siervi A. Critical role for BRCA1 expression as a marker of chemosensitivity response and prognosis[J]. Frontiers in Bioscience, 2016,8:72-83.

(编辑:徐建平)

Study on the Influence of Shenci Capsule on Lung Adenocarcinoma A549/DDP Multidrug Resistance and the Repair of DNA Damage in Nude Mice

LIANG Kun, XU Liqun, XUE Xingyang, WU Xiaodong, YU Lijian, WU Di, ZOU Ying
(Cancer Center of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510095, China)

ABSTRACT: **Objective** To explore the influence of Shenci capsule on lung adenocarcinoma A549/DDP multidrug resistance in nude mice. **Methods** Vaccinate 40 C57BL/6 mice with lung adenocarcinoma A549/DDP cell suspension and establish solid tumor model, randomly dividing into Shenci capsule team, Shenci capsule+cisplatin group, cisplatin group and comparison team. Control groups are given same amount of physiological saline and other groups of tumor-bearing mice offered medication 21d, adopt FQ-PCR technology to examine expressions of lung adenocarcinoma A549/DDP lung cancer tissues ERCC1 mRNA, RRM1mRNA, hMLH1mRNA, BRCA1mRNA. **Results** The results could reduce the expression of ERCC1, RRM1 and BRCA1 genes, and increase the expression of hMLH1mRNA gene. **Conclusion** Using multi-gene regulation to improve the cisplatin resistance state of lung adenocarcinoma A549/DDP in nude mice, it may be one of the methods of Shenci capsule reversing lung cancer multidrug resistance.

KEY WORDS: lung cancer; Shenci capsule; cisplatin resistance; DNA damage repair