

丹参-人参组分配伍对肺癌 A549 细胞侵袭迁移及 ERK1/2 磷酸化水平的影响

毕蕾, 颜晓静, 杨焯, 邱爽, 陈卫平* (南京中医药大学基础医学院, 江苏 南京 210023)

摘要:目的 研究丹参-人参组分配伍对肺癌 A549 细胞侵袭迁移以及 ERK1/2 磷酸化水平的影响。方法 采用细胞划痕实验和高内涵细胞成像系统分析丹参-人参组分配伍对肺癌 A549 细胞迁移的影响;应用实时细胞传感电阻仪 Transwell 实验动态检测丹参-人参组分配伍对肺癌 A549 细胞侵袭的影响;通过纳米级超微量蛋白质分析系统检测丹参-人参组分配伍对肺癌 A549 细胞 ERK1/2 磷酸化水平的影响。结果 丹参-人参组分配伍可显著增加划痕空白区域的距离($P < 0.01$),且呈一定的时间依赖性;显著降低细胞迁移的面积($P < 0.01$),且呈一定的剂量依赖性;对 A549 细胞侵袭有抑制作用($P < 0.01$),且呈一定的时间依赖性;能够显著降低肺癌 A549 细胞 ERK1/2 磷酸化水平($P < 0.01$)。结论 丹参-人参组分配伍能显著降低肺癌 A549 细胞迁移侵袭的能力,其作用机制可能与降低肺癌 A549 细胞 ERK1/2 磷酸化水平有关。

关键词:丹参-人参组分配伍;细胞迁移;细胞侵袭;ERK1/2 磷酸化

中图分类号:R285.5 文献标志码:A 文章编号:1672-0482(2016)02-0153-04

DOI:10.14148/j.issn.1672-0482.2016.0153

Effects of Component Formula of *Salviae Miltiorrhizae Radix Et Rhizome* and *Ginseng Panax Et Rhizome* on Cell Migration, Invasion and Phosphorylation of ERK1/2 in Lung Cancer A549 Cells

BI Lei, YAN Xiao-jing, YANG Ye, QIU Shuang, CHEN Wei-ping*

(The Basic Medical College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of component formula of *Salviae miltiorrhizae radix et rhizome* and *Ginseng panax et rhizome* on cell migration, invasion and phosphorylation of ERK1/2 in lung cancer A549 cells. **METHODS** The scratch wound healing assay and high content screening were used to analyze the effects of component formula of *Salviae Miltiorrhizae Radix Et Rhizoma* and *Ginseng Radix Et Rhizome* on A549 cell migration. The Real-time cell analysis was adapted to detect the effects of component formula on A549 cell invasion. The phosphorylation of ERK1/2 in lung cancer A549 cells was measured by nanoscale ultramicro protein analysis system. **RESULTS** Component formula treatment significantly increased the distance of scratch blank area in time-dependent manner($P < 0.01$), compared with control group; decreased A549 cells migration area($P < 0.01$) in a dose-dependent pattern; significantly inhibited A549 cells invasion($P < 0.01$) in time-dependent manner; and decreased the phosphorylation of ERK1/2($P < 0.01$) in A549 cells. **CONCLUSION** The component formula of *Salviae Miltiorrhizae Radix Et Rhizome* and *Ginseng Panax Et Rhizome* can inhibit A549 cells migration and invasion, which may be related to the decreased phosphorylation level of ERK1/2.

KEY WORDS: component formula of *Salviae miltiorrhizae radix et rhizome* and *Ginseng panax et rhizome*; cell migration; cell invasion; phosphorylation of ERK1/2

WHO 国际癌症研究中心(IARC)发布的 2014 年全球癌症报告显示,肺癌的发病率和死亡人数仍然位于恶性肿瘤首位。目前,肿瘤转移仍是恶性肿瘤治疗失败和患者死亡的主要原因,据报道有 80% 以上癌症患者死于肿瘤转移^[1]。本文在前期正交设

计优选丹参-人参抗肿瘤有效组分配伍^[2-3]的基础上,进一步研究其对肺癌 A549 细胞侵袭转移的影响及其作用机制。

1 材料

1.1 试剂

收稿日期:2015-11-25;修稿日期:2016-01-15

基金项目:国家自然科学基金(81273638, 81503486);江苏省高校自然科学基金项目(14KJD360004);江苏省中医药局科技重点项目(ZD201502);江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(KYLX15_0997)

作者简介:毕蕾(1984-),女,江苏南京人,南京中医药大学讲师,主治医师。*通信作者:wp2002123@163.com

DMEM(Gibco,批号:11995-065),Ham's F12(Gibco,批号:11095-080),澳洲进口胎牛血清(Gibco,批号:16000-044),青-链霉素(Gibco,批号:15140-122),0.25%胰蛋白酶(Gibco,批号:25200-056),细胞迁移试剂盒(Thermo Scientific,批号:OE187113),Matrigel 基质胶(BD 公司,批号:2342761),ERK1/2 抗体(CST 公司,批号:S0306),Nanopro 试剂盒(Proteinsimple 公司,批号:S0306)。

1.2 细胞株与药物

人肺癌细胞株 A549 购于中国科学院上海生命科学研究所细胞资源中心。丹参总酚酸(80%,批号:ZL20130112)、人参总皂苷(80%,批号:ZL20130211)和人参总多糖(60%,批号:ZL20130203)均购于南京泽朗医药科技有限公司。组分配伍:丹参总酚酸、人参总皂苷和人参多糖的配伍剂量分别是 5、10、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.3 仪器

高内涵细胞成像系统(VTI700,美国 Thermo Scientific 公司);实时细胞分析仪(3×16 ,美国 Roche 公司);Nanopro 纳米级超微量蛋白质分析系统(Nanopro 1000,美国 PS 公司);超净工作台(SW-CJ-1FD,苏州净化设备有限公司);CO₂恒温培养箱(NU4950E,美国 NUAIRE 公司);倒置相差显微镜(DFC-259,德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 细胞迁移划痕实验

取培养至对数期的 A549 细胞,用 0.25%胰酶消化,用滴管吹打至单细胞悬液,调整细胞密度为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,接种于 6 孔板上,每孔 1 mL,置于 37 $^{\circ}\text{C}$,5%CO₂及饱和湿度条件下细胞培养箱中培养 24 h 至细胞基本融合。用 100 μL 微量移液头在 6 孔板内垂直划痕,PBS 液冲洗 2 次后加入组分配伍溶液,每孔 1 mL,阴性对照组加入等体积的细胞培养液。将培养板置入 37 $^{\circ}\text{C}$,5%CO₂培养箱中培养 24 h 和 48 h,分别用倒置相差显微镜观察并拍照,采用 Image J 软件随机选取 3 个并计算 100 \times 视野内划痕空白区域的距离。

2.2 高内涵细胞成像系统细胞迁移实验

取蓝色荧光微球混悬液到 96 孔板中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 h。用 200 μL 1 \times Wash Buffer 清洗 5 次,将细胞消化悬浮于不含血清的培养液中,吹打均匀调整细胞密度为 $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$,接种每孔 50 μL

细胞悬液,然后置于 37 $^{\circ}\text{C}$,5%CO₂及饱和湿度条件下细胞培养箱中培养 24 h 后给药,阴性对照组加入等体积的细胞培养液,给药组根据前期实验结果^[2-3],分别加入组分配伍 0.5 倍、1 倍及 2 倍浓度的供试品溶液,设为低、中、高 3 个浓度组别,每孔 100 μL ,每组设 3 个复孔。将培养板置入 37 $^{\circ}\text{C}$,5%CO₂培养箱中培养 48 h。取培养 48 h 的 96 孔板,弃去细胞培养上清,每孔加入 200 μL 的 5.5%预热的固定液,于室温孵育 60 min,然后加入穿透液室温孵育 30 min,清洗后加入罗丹明-鬼笔环肽染色液,室温孵育 30 min 后清洗 3 遍,于高内涵细胞成像系统检测。

2.3 实时细胞传感电阻仪 Transwell 实验

在 CIM-plate 细胞迁移浸润检测板上室中加入 1 层 Matrigel 凝胶,下室加入含胎牛血清的培养液 600 μL 。然后在上室中加入细胞悬液,调整细胞密度为 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$,每孔 200 μL ,置于 37 $^{\circ}\text{C}$,5%CO₂及饱和湿度条件下细胞培养箱中培养 24 h。设组分配伍组和阴性对照组,每组 3 个复孔,在细胞传感电阻仪动态检测 48 h。

2.4 纳米级超微量蛋白质分析系统检测 ERK1/2 磷酸化

将细胞消化悬浮培养液中,吹打均匀接种到培养皿中培养 24 h,分为阴性对照组和组分配伍组,阴性对照组加入等体积的细胞培养液,给药加入组分配伍供试品溶液,作用 12 h 后去除培养上清,用 5 mL Wash Buffer 清洗细胞 3 次,每孔加入 100 μL 的裂解液(含蛋白磷酸酶和磷酸酶抑制剂),用细胞刮破碎细胞裂解 30 min,收集裂解液置于 1.5 mL 离心管中,于 12 000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min,收集裂解上清,定量后按照 Nanopro 试剂盒说明书操作,用 Nanopro 1 000 纳米级超微量蛋白质分析系统检测 ERK1/2 磷酸化。

2.5 数据分析

实验数据采用 SPSS 15.0 软件进行统计分析,各组定量检测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差(one-way ANOVA)分析,组间比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 组分配伍对肺癌 A549 细胞划痕实验的影响

组分配伍对肺癌 A549 细胞划痕实验结果见图 1~2 所示,与阴性对照组比较,组分配伍显著增加

划痕空白区域的距离 ($P < 0.01$), 提示组分配伍能够显著抑制肺癌 A549 的迁移, 且呈一定的时间依赖性。

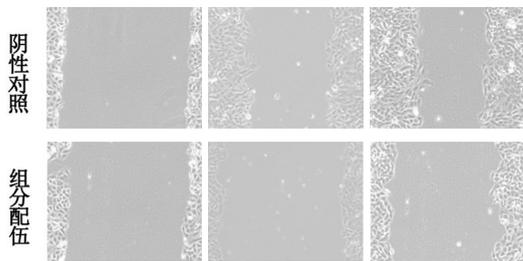
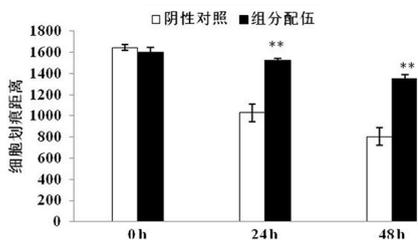


图 1 组分配伍对肺癌 A549 细胞划痕实验的影响 ($\times 100$)



注:与阴性对照组比较, $** P < 0.01$ 。

图 2 组分配伍对肺癌 A549 细胞划痕距离的影响 ($n = 3$)

3.2 组分配伍对肺癌 A549 细胞迁移的影响

组分配伍对肺癌 A549 细胞迁移实验结果见图 3~4 所示, 与阴性对照组比较, 组分配伍显著降低细胞迁移的面积 ($P < 0.01$), 提示组分配伍能够显著抑制肺癌 A549 的迁移, 且呈一定的剂量依赖性。

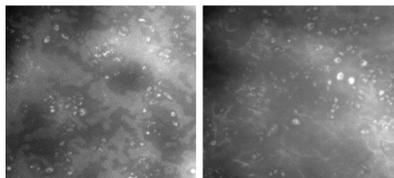
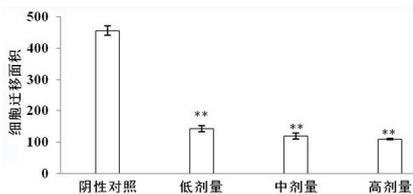


图 3 组分配伍对肺癌 A549 细胞迁移实验的影响 ($\times 5$)



注:与阴性对照组比较, $** P < 0.01$ 。

图 4 组分配伍对肺癌 A549 细胞迁移面积的影响 ($n = 3$)

3.3 组分配伍对肺癌 A549 细胞侵袭的影响

组分配伍对肺癌 A549 细胞侵袭实验结果见图 5~6 所示, 与阴性对照组比较, 组分配伍显著降低细胞侵袭的数目 ($P < 0.01$), 提示组分配伍能够显著抑制肺癌 A549 的侵袭, 且呈一定的时间依赖性。

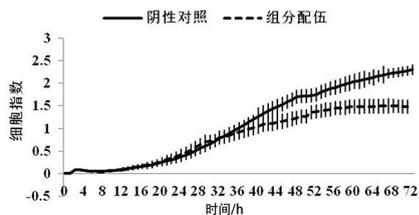
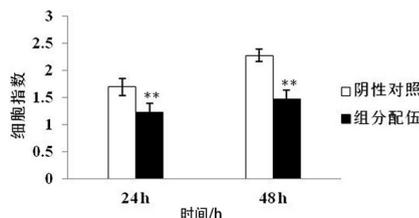


图 5 组分配伍对肺癌 A549 细胞侵袭实验的影响



注:与阴性对照组比较, $** P < 0.01$ 。

图 6 组分配伍对肺癌 A549 细胞侵袭实验的影响 ($n = 3$)

3.4 组分配伍对肺癌 A549 细胞 ERK1/2 磷酸化水平的影响

组分配伍对肺癌 A549 细胞 ERK1/2 磷酸化的影响结果见图 7~8 所示, 与阴性对照组比较, 组分配伍显著降低 A549 细胞 pp-ERK1、p-ERK1、pp-ERK2 和 p-ERK2 的峰面积 ($P < 0.01$), 并且显著增加非磷酸化 ERK1 和 ERK2 的峰面积 ($P < 0.01$), 提示组分配伍能够显著降低肺癌 A549 细胞 ERK1/2 磷酸化水平。

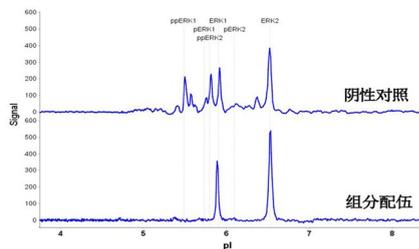
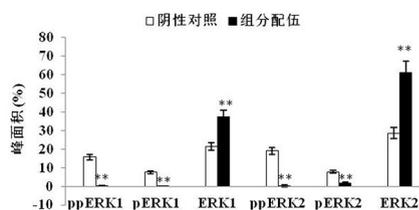


图 7 组分配伍对肺癌 A549 细胞 p-ERK1/2 和 ERK1/2

蛋白表达的影响



注:与阴性对照组比较, $** P < 0.01$ 。

图 8 组分配伍对肺癌 A549 细胞 ERK1/2

磷酸化的影响 ($n = 3$)

4 讨论

中医药治疗恶性肿瘤的疗效和安全性现已得到广泛认同, 根据辨证论治, 审证求因的立法原则, 活血化瘀、扶正培本法作为肿瘤治疗基本大法在临床

被广泛运用^[4],而作为活血化瘀代表药的丹参和补气药之首的人参自然倍受青睐。近年来,方剂的组分配伍抗肿瘤研究为治疗恶性肿瘤提供了新的契机^[5-6]。

本文以前期实验筛选出的丹参-人参组分有效配伍为研究对象,探讨其对肺癌细胞侵袭迁移的影响以及可能的作用机制。细胞划痕实验和高内涵细胞迁移实验结果中,组分配伍组显著增加细胞划痕的距离和显著降低细胞迁移面积,说明组分配伍能显著降低肺癌 A549 细胞的迁移能力,且具有时间依赖性和剂量依赖性。进一步采用实时无标记细胞分析仪检测肺癌 A549 细胞 transwell 侵袭能力,该仪器可以实时动态检测肺癌侵袭的细胞数目^[7-8],结果显示组分配伍组显著降低细胞侵袭的数目,说明组分配伍能显著降低肺癌 A549 细胞的侵袭能力,且具有时间依赖性。纳米级超微量蛋白质分析系统利用毛细管分离以及化学发光检测原理进行纳米级自动化检测蛋白磷酸化水平^[9-10],优势在于能够检测蛋白构象改变引起的等电点极细微的变化。ERK 是一类传递丝裂原信号的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是 MAPK 家族成员,ERK 活化后进入细胞核内,调控一系列转录因子,调节着肿瘤细胞的增殖、分化、凋亡和侵袭转移^[11-12]。本实验通过纳米级超微量蛋白质分析系统检测组分配伍对肺癌 A549 细胞 ERK1/2 磷酸化水平,结果显示其能显著降低 ERK1 和 ERK2 的单磷酸化和双磷酸化水平,提示调节 ERK1/2 磷酸化水平可能是其抑制肺癌 A549 细胞迁移侵袭的机制之一。

实验结果表明:丹参-人参组分配伍能显著降低肺癌 A549 细胞迁移侵袭的能力,其作用机制可能与降低肺癌 A549 细胞 ERK1/2 磷酸化水平有关。对于 ERK 信号传导通路的上游蛋白及各激酶的级联激活机制与组分配伍抑制肺癌细胞迁移侵袭的关系我们进一步研究探讨。

参考文献:

- [1] Jemal A, Tiwari RC, Murray T, et al. Cancer statistics, 2004 [J]. CA Cancer J Clin, 2004, 54(1): 8-29.
- [2] 颜晓静,杨焯,毕蕾,等.丹参-人参组分配伍对肺癌 A549 增殖、凋亡和骨架的影响[J].中国中药杂志,2014, 39(22):4436-4441. Yan XJ, Yang Y, Bi L, et al. Effects of component formula of *Salvia Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* and *Ginseng Radix et*

Rhizoma on cell proliferation, apoptosis and skeleton in lung cancer A549 cells[J]. China J Chin Mater Med, 2014, 39(22): 4436-4441.

- [3] 杨焯,颜晓静,毕蕾,等.正交设计优选丹参-人参活性组分抗乳腺癌有效配伍[J].中国药理学通报,2014, 30(11):1605-1610, 1611. Yang Y, Yan XJ, Bi L, et al. Optimization of effective component formula from active ingredients of *Salvia Miltiorrhiza* and *Panax Ginseng* through orthogonal design method to resist breast cancer[J]. Chin Pharmacol Bull, 2014, 30(11): 1605-1610, 1611.
- [4] 尹刚,唐德才,尚尔鑫,等.中医肿瘤方配伍规律初探[J].南京中医药大学学报,2013, 29(2):111-113. Yin G, Tang DC, Shang EX, et al. Exploration on compatibility of formula treating on tumor[J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2013, 29(2): 111-113.
- [5] 张伯礼,王永炎.方剂关键科学问题的基础研究——以组分配伍研制现代中药[J].中国天然药物,2005, 3(5):258-261. Zhang BL, Wang YY. The fundamental study on critical scientific problem of prescriptions[J]. Chin J Nat Med, 2005, 3(5): 258-261.
- [6] 王阶,王永炎,郭丽丽.基于病证结合的中药组方模式研究[J].中国中药杂志,2009, 34(1):2-5. Wang J, Wang YY, Guo LL. Study of means of formulating prescription based on combination disease with syndrome[J]. China J Chin Mater Med, 2009, 34(1): 2-5.
- [7] Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines[J]. Cell, 2002, 110(6): 673-687.
- [8] Duxbury MS, Ito H, Ashley SW, et al. c-Src-dependent cross-talk between CEACAM6 and alphavbeta 3 integrin enhances pancreatic adenocarcinoma cell adhesion to extracellular matrix components[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 317(1): 133-141.
- [9] Fabien LG, Raphaelle G, Philippos M, et al. Six1 regulates stem cell repair potential and self-renewal during skeletal muscle regeneration[J]. J Cell Biol, 2012, 198(5): 815-832.
- [10] Klamer SE, Kuijk CG, Hordijk PL, et al. BIGH3 modulates adhesion and migration of hematopoietic stem and progenitor cells[J]. Cell Adh Migr, 2013, 7(5): 434-449.
- [11] Kolkova K, Novitskaya V, Pedersen N, et al. Neural cell adhesion molecule-stimulated neurite outgrowth depends on activation of protein kinase C and the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway[J]. J Neurosci, 2000, 20(6): 2238-2246.
- [12] Force T, Bonventre JV. Growth factors and mitogen-activated protein kinases[J]. Hypertension, 1998, 31(1 Pt 2):152-161.

(编辑:董宇 杨巍敏)