

实验研究

DOI:10.16305/j.1007-1334.2016.08.022

金复康“扶助正气、清透伏毒”预防肺癌转移的细胞学机制研究

阙祖俊^{1*}, 罗 斌^{2*}, 周之毅³, 王 青¹, 金 郁⁴, 赵小东⁵, 李和根³, 施奇惠^{5△}, 田建辉^{1,3,6△} 指导: 刘嘉湘³

1. 上海市中医药研究院中医肿瘤研究所(上海 200032); 2. 上海中医药大学研究生院(上海 201203); 3. 上海中医药大学附属龙华医院肿瘤科(上海 200032); 4. 华东理工大学药学院(上海 200237); 5. 上海交通大学系统生物医学研究中心(上海 200240); 6. 中国中医科学院中医内科学博士后流动站(北京 100700)

【摘要】 目的 观察金复康冻干粉(JFK)对非小细胞肺癌(NSCLC)患者的“伏毒”——循环肿瘤细胞(CTC)的清除作用,并验证金复康干预 CTC 预防转移的假说。**方法** 从肺癌患者外周血中富集并培养 CTC 细胞系,然后以金复康干预 CTC 细胞,采用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法检测细胞增殖,并检测克隆形成,以流式细胞术和激光共聚焦技术检测细胞凋亡与周期。**结果** 金复康能够显著以时间和浓度依赖性抑制 CTC 细胞增殖($P < 0.05$);金复康可剂量依赖性显著抑制 CTC 细胞克隆形成($P < 0.05$);金复康能够有效诱导 CTC 细胞发生凋亡($P < 0.01$);高浓度组的金复康能够显著将 CTC 细胞增殖阻滞在 S 期($P < 0.05$)。**结论** 金复康对 NSCLC 患者体内 CTC 具有显著的抑制作用,干预 CTC 可能是 JFK 防治 NSCLC 复发与转移的机制。

【关键词】 金复康口服液;循环肿瘤细胞;非小细胞肺癌;伏毒

The cytologic mechanism of JinFuKang Decoction on preventing lung cancer metastasis by clearing hidden pathogen

QUE Zu-jun¹, LUO Bin², ZHOU Zhi-yi³, WANG Qing¹, JIN Yu⁴, ZHAO Xiao-dong⁵, LI He-gen³, SHI Qi-hui⁵, TIAN Jian-hui^{1,3,6} Instructor: LIU Jia-xiang³

1. Oncology Research Institute of TCM Affiliated to Shanghai Academy of TCM, Shanghai, 200032; 2. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 201203; 3. Department of Oncology, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 200032; 4. School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai, 200237; 5. Systematic Biomedical Research Center of Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200240; 6. Postdoctoral Mobile Station Department of Internal Medicine of TCM, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100700

Abstract: Objective To observe the effect of JinFuKang Decoction(JFK) on clearing the “hidden pathogen”——circulating tumor cells(CTC) in patients with non-small cell lung cancer(NSCLC) and verify the hypothesis that JFK prevent metastasis through intervening CTC. **Methods** The CTC cell line from peripheral blood in patients with NSCLC were enriched and cultivated, then the CTC cells were intervened by JFK. The Cell proliferation and clone formation were detected by cell counting kit-8(CCK-8). The Cell apoptosis and cycle were detected by flow cytometry and confocal laser scanning technique. **Results** The CTC cell proliferation was significantly inhibited by JFK in time-dependent and concentration-dependent manner. The clone formation of CTC cell was significantly inhibited by JFK in a dose-dependent manner($P < 0.05$). JFK effectively induced the apoptosis of CTC cells($P < 0.01$); the CTC cell proliferation was blocked in the S phase in JFK group with high concentration($P < 0.05$). **Conclusion** JFK could inhibit the CTC in patients with NSCLC, which indicated that intervening CTC may be the mechanism of JFK on prevention and treatment of the recurrence and metastasis in NSCLC.

Keywords: JinFuKang; circulating tumor cell; non-small cell lung cancer; hidden pathogen

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373621); 国家中医药管理局第一批全国中医药传承博士后项目(135818); 国家中医药管理局临床研究基地建设专项(JDZX2012125)

[作者简介] 阙祖俊,男,硕士,实习研究员,主要从事中医药防治恶性肿瘤的基础研究。*为共同第一作者

[通讯作者] 田建辉,博士,主任医师,博士生导师。E-mail: hawk7150@hotmail.com. △为共同通讯作者

肺癌在中国的发病率与致死率均占首位,而在美国肺癌的发病率虽居第二,但其 5 年生存率仍低于 20%^[1-2]。远处转移的有效干预是改善肺癌患者整体预后的关键。循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTC)与 NSCLC 的转移具有十分密切的关系,在 NSCLC 的预后、临床分期及疗效评价等方面具有重要意

义^[3-5]。前期研究发现金复康口服液具有延长 NSCLC 患者生存期,预防转移的作用^[6];循环肿瘤细胞(CTC)与肺癌预后相关,Wang 等^[7]的 Meta 分析表明,CTC 存在的 NSCLC 患者预后较差;而且 CTC 计数与 NSCLC 的临床分期及预后评估也密切相关^[8-9]。在前期研究基础上,结合循环肿瘤细胞的生物学特点,田建辉等提出“CTC 类属于早期肺癌术后患者的伏毒,而金复康冻干粉(JFK)通过扶助正气、清透伏毒达到预防转移发生”的假说^[8]。

本研究拟从 CTC 干预的角度揭示 JFK 干预肺癌复发转移、延长患者生存期的机制,从而验证金复康“清透伏毒”的作用,继而丰富刘嘉湘“扶正治癌”的学术思想体系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 循环肿瘤细胞(CTC),由田建辉研究组与上海交通大学施奇惠教授联合培养建系^[10]。

1.1.2 药物与试剂 金复康冻干粉(JFK),华东理工大学金郁老师课题组制备;F12K 培养基,胎牛血清 FBS,美国 Gibco 公司;细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8),东仁化学科技(上海)有限公司;细胞周期检测试剂盒,上海碧迪公司;细胞凋亡检测试剂盒,上海碧迪公司。

1.1.3 仪器 多功能酶标仪(SpectraMax M5),美国 MD 公司;CO₂ 培养箱(MCO-18AIC),日本三洋公司;全自动多色分析流式细胞仪系统(FACSVerse),美国 BD 公司;荧光倒置显微镜(DMI3000B),德国莱卡公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 CTC 细胞置于含 10% 胎牛血清的 F12K 完全培养基中,在 37 ℃、5% CO₂、70% 湿度的恒温细胞培养箱中培养、传代,取对数生长期的细胞用于后续实验。

1.2.2 CTC 增殖曲线的绘制 ①将对数生长期的 CTC 细胞(1×10^4 cell/ml)接种于 96 孔培养板,每孔 0.2 ml,每组 5 复孔;②置 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中培养,每隔 24 h 在每孔中加入 10 μl 的 CCK-8 溶液;③继续培养 2 h 后,震荡混匀,在 450 nm 波长下用酶标仪进行检测。

1.2.3 CCK-8 检测 CTC 的增殖活性 ①将对数生长期的 CTC 细胞(3×10^4 cell/ml)接种于 96 孔板中,每孔 0.1 ml,每组 3 个复孔;②24 h 后用不同药物浓度的金复康(0、125、250、500、1 000 mg/L)进行干预;③每隔 24 h,取出一块 96 孔板,每孔中加入 10 μl 的 CCK-8 溶

液;④继续培养 2 h 后,震荡混匀,在 450 nm 波长下用酶标仪进行检测。

1.2.4 克隆形成实验 ①取对数生长期的 CTC 细胞,计数后以 300 个细胞每孔的量铺到 6 孔板内,每组 3 个复孔;②加药组分别用 350 mg/L 和 700 mg/L 的金复康进行干预;③置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中连续培养 10 天,每隔 5 天换液;④培养结束后,弃去培养基,用 4% 的多聚甲醛室温固定 1 h;⑤弃去固定液,用吉姆萨染液染色 30 min;⑥弃去吉姆萨染液后,在清水中洗净吉姆萨染液,晾干;⑦扫描染好的 6 孔板,并进行克隆计数。

1.2.5 细胞凋亡实验

(1)流式细胞术检测凋亡 ①将 CTC 细胞以 30% 的密度铺 6 孔板,第 2 天用金复康进行干预;②作用 48 h 后,收集培养上清,胰酶消化收集细胞;③1 500 r/min 离心 5 min,弃去上清;④用 Binding buffer 洗涤细胞沉淀一次;⑤加入 200 μl 的 Binding buffer 重悬细胞;⑥加入 5 μl annexin V-APC 染色 15 min;⑦1 500 r/min 离心 3 min,弃去上清,用 100 μl 的 Binding buffer 重悬细胞;⑧加入 5 μl PI 染液染色 5 min,用 Binding buffer 补足上机体系至 300 μl;转移至流式上机管中,上机检测。

(2)激光共聚焦显微镜观察 CTC 细胞核形态变化

①将无菌的盖玻片放入 6 孔板内,用 CTC 细胞进行铺板,细胞密度为 30%;②培养 24 h 后,用金复康进行干预;③金复康干预 48 h 后,弃去培养基,用 4% 的多聚甲醛固定 20 min;④弃去多聚甲醛,用 PBS 洗 2 遍,每遍 5 min;⑤加入 DAPI 染色 10 min;⑥用 PBS 洗 2 遍,每遍 5 min;⑦将盖玻片倒扣在载玻片上,并固定封片,激光共聚焦显微镜下观察细胞核形态。

1.2.6 细胞周期实验 ①将 CTC 细胞以 30% 的密度铺 6 孔板,第 2 天用金复康进行干预;②作用 48 h 后,胰酶消化收集细胞;③1 500 r/min 离心 5 min,弃去上清;④用 PBS 重悬,1 500 r/min 离心 5 min,弃去上清;⑤加入 1 ml 的 70% 乙醇固定 1 h;⑥1 500 r/min 离心 5 min,弃去上清;⑦用 PBS 重悬,1 500 r/min 离心 5 min,弃去上清;⑧加入 400 μl 的 PI 染液和 RNA 酶,室温下染色 1 min;⑨将染液转移至流式上样管中上机检测。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析。结果采用 GraphPad Prism5 软件进行作图分析。

2 结果

2.1 CTC 细胞的增殖活性检测 CCK-8 检测结果显示,CTC 细胞具有较强的增殖能力,当培养至第 5 天时,其增殖倍数大于 5 倍。见图 1。

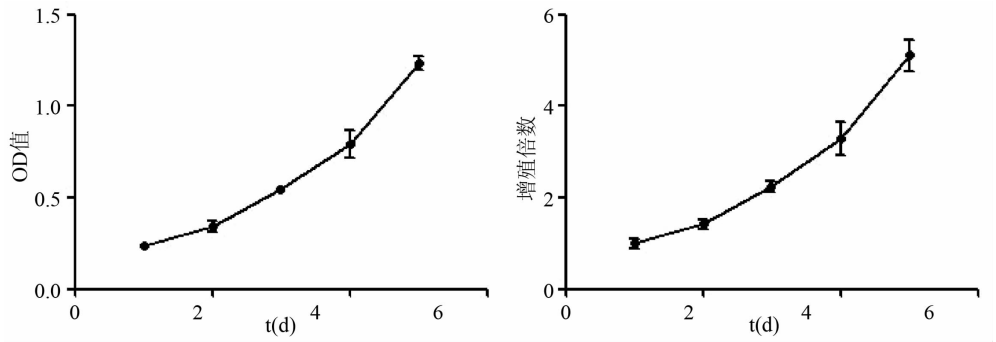


图 1 CTC 细胞的增殖曲线

2.2 对 CTC 细胞增殖活性的影响 CCK-8 检测结果显示,金复康能够显著呈时间和浓度依赖性抑制 CTC 细胞增殖;当作用时间为 48 h 时,其 IC_{50} 值为 728.8 mg/L。见图 2。

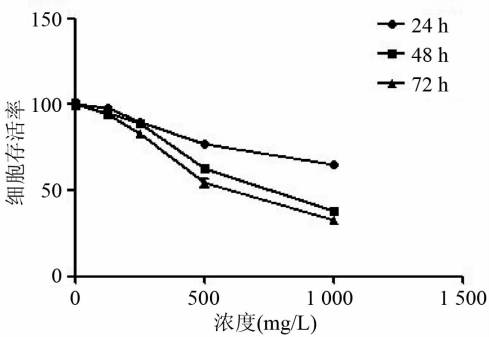


图 2 不同浓度金复康干预 CTC 细胞 24、48、72 h 后 CCK-8 检测

2.3 对 CTC 细胞克隆形成的影响 克隆形成实验研究表明,对照组、350 mg/L 金复康组和 700 mg/L 金复康组的细胞克隆数分别为 (92 ± 8.9) 个、 (70 ± 9.3) 个和 (58 ± 7.2) 个,350 mg/L 和 700 mg/L 金复康组与对照组相比,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 3。

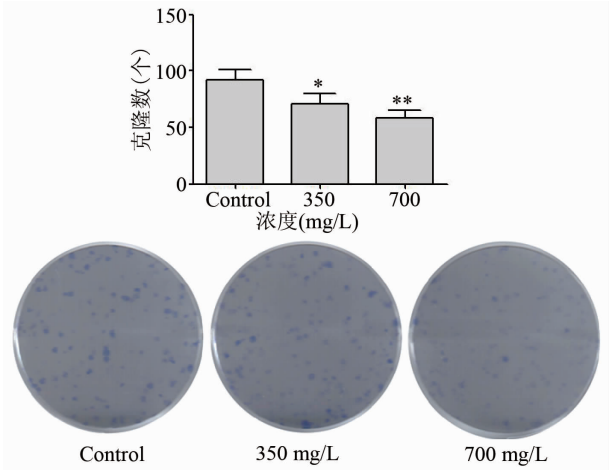
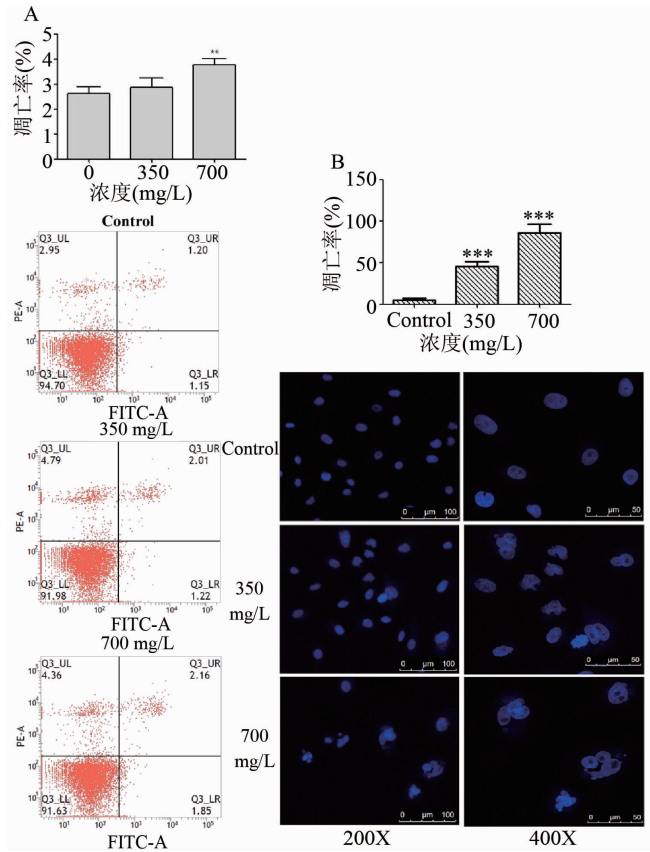


图 3 不同浓度的金复康对 CTC 细胞克隆形成的影响

2.4 对 CTC 细胞凋亡的影响 流式细胞术检测结果显示,与对照组相比,350 mg/L 金复康组对 CTC 细胞

的凋亡并无显著作用 ($P = 0.405$),而 700 mg/L 金复康组能显著诱导 CTC 细胞发生凋亡,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 4A。

激光共聚焦显微镜观察 CTC 细胞核形态变化结果显示,金复康干预 CTC 细胞后其细胞核形态发生显著的皱缩并呈无规则形态,即金复康能显著诱导 CTC 细胞发生凋亡,差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。见图 4B。



注:A. 不同浓度金复康干预 CTC 细胞后流式凋亡检测;B. 激光共聚焦显微镜观察不同浓度金复康干预 CTC 后细胞核形态变化

图 4 各组 CTC 细胞凋亡情况

2.5 对 CTC 细胞周期的影响 细胞周期实验结果显示,与对照组相比,700 mg/L 金复康组能明显将 CTC 细胞的分裂周期阻滞在 S 期,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 5。

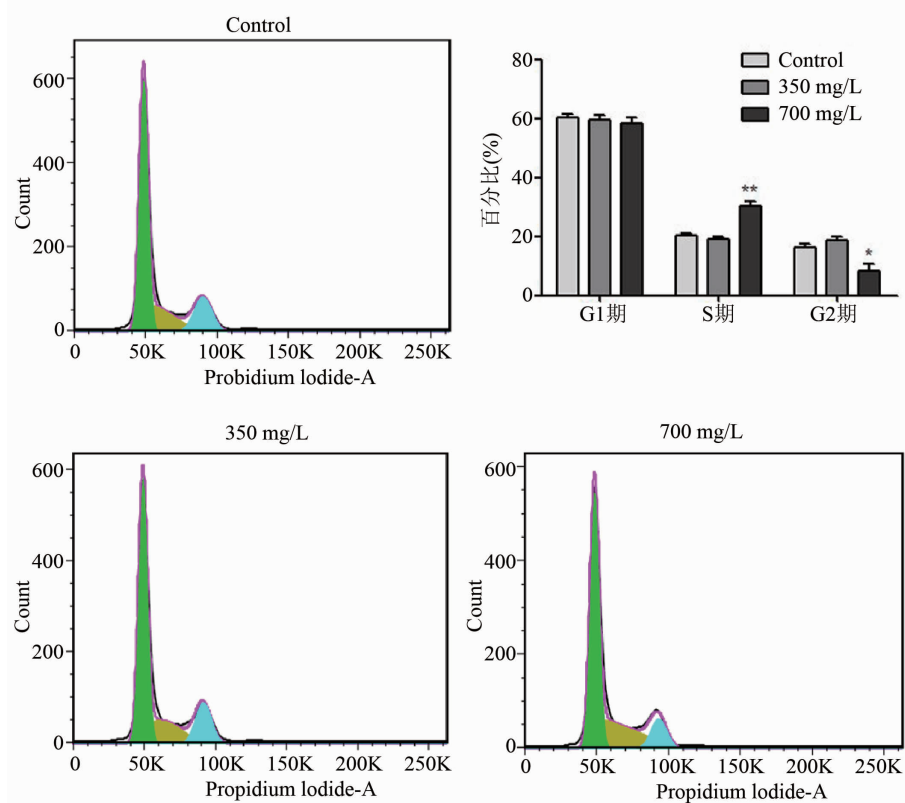


图5 不同浓度的金复康干预 CTC 细胞后流式细胞仪周期检测

3 讨论

刘嘉湘教授以“扶正治癌”思想指导开发的肺癌治疗专药金复康口服液(JFK)对晚期肺癌的疗效达到国际领先水平^[11];对 III 期患者具有预防转移发生的作用^[12];从扶正角度研究证实,提高免疫监视^[13]、逆转免疫逃逸^[14]、防治免疫衰老^[15]、干预肺癌干细胞增殖^[16]是 JFK 作用的免疫机制。学者们也已经相继从抑制肺癌细胞的增殖、诱导人肺腺癌细胞凋亡、免疫调节等角度探讨金复康口服液的作用机制。研究发现,金复康口服液(益肺抗癌饮)治疗后 S 期细胞数减少, G2 + M 期细胞增多,可抑制 LAX-8、Lewis 肺癌和 SPC-A-1 细胞进入增殖期,显著抑制肺癌细胞的增殖;具有诱导 LAX-83 人肺腺癌细胞凋亡的作用,其分子机制可能与降低 Bcl-2 基因蛋白表达,增加 Bax 和 Fas 基因蛋白表达密切相关^[17-18]。为证实金复康冻干粉是否对 CTC 具有干预作用从而预防复发转移的发生,课题组首先从肺癌患者外周血中提取到 CTC,采用微流控免疫磁珠分离技术一步法进行分离,体外培养后成功建立 CTC 细胞系^[10,19]。该细胞系具有野生型的 EGFR,以及一个 KRAS 错义突变,这与原发肿瘤的突变情况一致。为此,我们采用金复康冻干粉进行体外干预,观察其对 CTC 增殖的作用特点。本研究结果表明,金复康冻干粉可以直接抑制 CTC 细胞系的增殖,金复康冻干粉可以调控 CTC 的周期及促进 CTC 凋亡,从而表明金

复康冻干粉干预肺癌转移的细胞水平的关键作用点可能是诱导循环肿瘤细胞的凋亡。从细胞学角度支持了金复康冻干粉具有清透“伏毒”的作用。

中医认为,“伏毒”治疗的要点在于“扶正”与“清透”的结合^[20-21]。金复康冻干粉扶正的机制研究已经从免疫监视、免疫逃逸、免疫衰老角度进行了系统研究。方中生黄芪、北沙参、天冬、麦冬、女贞子、淫羊藿、山茱萸、黄精、葫芦巴、绞股蓝等具有明确的免疫调控作用和抑制肿瘤增殖作用;石上柏、石见穿、重楼(七叶一枝花)等性味苦寒,具有清热解毒作用。刘嘉湘教授临床喜重用生黄芪以托毒外出。因此扶助正气、清透伏毒可使金复康冻干粉达到提高肺癌患者免疫监视、增强清除能力或抑制循环肿瘤细胞的目的,从而起到预防转移的作用。

根据早期肺癌的临床病理特点,结合前期研究结果,田建辉等提出“正虚伏毒”的学术观点。其中正虚主要指人体免疫功能失调为代表的全身抗癌能力下降,不能制约各种毒邪(资料待发表);而“伏毒(邪)”指术后仍潜藏在体内的各种致癌因素,包括肺癌干细胞、循环肿瘤细胞、残留病灶、免疫抑制因素等。临床上肺癌术后患者表现为影像学检测不到明确病灶,临床上无明显症状,西医治疗往往按照经验予以化疗,但疗效有限,而按照常规的中医临证思路则难以对其病机进行精确识别,进而影响疗效,而且患者也会逐渐出

现转移。研究组前期对 CTC 的临床表达特点进行研究,发现早期肺癌患者的表达水平显著高于晚期患者。目前的临床分期是按照 TNM 系统进行,没有可检测到的病灶则归属于较早期,但实际上从 CTC 的角度认识则会发现人体一旦患癌,整个机体内环境已发生了变化,即使进行了手术切除局部病灶,而对遍布人体循环系统等内环境中的致癌因素仍无能为力。据此,正虚伏毒观点的提出,对于丰富肺癌的病因学认识具有重要意义。

田建辉提出伏毒具有“毒自内生,深伏血道脏腑,流注全身,伺机为患,正盛则伏而不发,正虚则出而为病”的特征。而伏毒是否发病的关键取决于机体正气的强弱。在临床上即使没有明显的临床症状也要考虑不断扶助正气以达清透伏毒于外而防治其发病的目的;从现代医学的角度理解则是调控免疫功能,逆转免疫逃逸,促进 CTC 的清除,进而预防转移发生。

参考文献:

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, *et al.* Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA; Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016 [J]. CA; Cancer J Clin, 2016, 66(1): 7-30.
- [3] Plaks V, Koopman CD, Werb Z. Circulating tumor cells [J]. Science, 2013, 341(6151): 1186-1188.
- [4] Cheng M, Liu L, Yang HS, *et al.* Circulating tumor cells are associated with bone metastasis of lung cancer [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(15): 6369-6374.
- [5] Isobe K, Hata Y, Kobayashi K, *et al.* Clinical significance of circulating tumor cells and free DNA in non-small cell lung cancer [J]. Anticancer Res, 2012, 32(8): 3339-3344.
- [6] 刘嘉湘. 金复康口服液治疗肺癌的研究 [C]//国际中西医肿瘤研究论坛论文专辑. 上海: 国际中西医肿瘤研究论坛, 2008.
- [7] Wang J, Wang K, Xu J, *et al.* Prognostic significance of circulating tumor cells in non-small-cell lung cancer patients: a meta-analysis [J]. PLoS One, 2013, 8(11): e78070.

- [8] 田建辉, 罗斌, 毕凌, 等. 非小细胞肺癌循环肿瘤细胞表达规律及其与“伏邪”致病关系研究 [J]. 上海中医药杂志, 2016, 50(1): 15-19.
- [9] Ross K, Pailler E, Faugeron V, *et al.* The potential diagnostic power of circulating tumor cell analysis for non-small-cell lung cancer [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2015, 15(12): 1605-1629.
- [10] Zhang Y, Tang Y, Sun S, *et al.* Single-cell codetection of metabolic activity, intracellular functional proteins, and genetic mutations from rare circulating tumor cells [J]. Anal Chem, 2015, 87(19): 9761-9768.
- [11] 刘嘉湘, 施志明, 徐振晔, 等. 滋阴生津益气温阳法治晚期原发性肺腺癌的临床研究 [J]. 中医杂志, 1995(3): 155-158.
- [12] 刘嘉湘, 潘敏求, 黎月恒, 等. 金复康口服液治疗原发性非小细胞肺癌临床研究 [J]. 肿瘤, 2001, 21(6): 463-465.
- [13] 刘嘉湘, 施志明, 李和根, 等. 益肺抗癌饮治疗 271 例非小细胞肺癌临床观察 [J]. 上海中医药杂志, 2001, 35(2): 4-6.
- [14] 毕凌, 金莎, 郑展, 等. 肺积方对 IDO 诱导 Lewis 肺癌小鼠模型免疫逃逸的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(1): 69-74.
- [15] 田建辉, 杨晓霞, 毕凌, 等. 金复康对免疫衰老小鼠肺癌移植瘤的防治作用 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2016, 23(1): 39-46.
- [16] 徐蔚杰, 李春杰, 刘嘉湘, 等. 金复康口服液抑制 Lewis 肺癌 Sca-1 + 干细胞亚群增殖的研究 [J]. 上海中医药杂志, 2015, 49(1): 69-71.
- [17] 韩明权, 刘嘉湘, 高虹, 等. 益肺抗癌饮对实验性肺癌细胞周期及核酸和蛋白质合成的影响 [J]. 中西医结合学报, 2003, 1(3): 205-208.
- [18] 孙建立, 刘嘉湘. 金复康口服液对裸鼠人肺腺癌细胞凋亡相关基因表达的影响 [J]. 上海中医药杂志, 2007, 41(10): 69-71.
- [19] Wang Z, Wu W, Wang Z, *et al.* Ex vivo expansion of circulating lung tumor cells based on one-step microfluidics-based immunomagnetic isolation [J]. Analyst, 2016. DOI: 10.1039/c5an02554k.
- [20] 叶吉晃. 周仲瑛教授“伏毒”学说初探 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2006, 4(10): 4-7.
- [21] 赵明芬, 安冬青, 汪建萍. 试论伏邪理论的源流及发展 [J]. 中医杂志, 2016, 57(3): 189-192.

编辑: 季春来

收稿日期: 2016-03-23

