

# 乏氧环境下益气养精方对肺癌细胞 apelin分子表达的影响\*

卢文峰<sup>1</sup>, 杨茜雯<sup>1</sup>, 董 昀<sup>1</sup>, 崔 清<sup>1</sup>, 蔡霄月<sup>1</sup>,  
汪宇涵<sup>1</sup>, 张 铭<sup>1\*\*</sup>, 邓海滨<sup>2</sup>, 徐振晔<sup>2</sup>

(1. 上海交通大学附属胸科医院中西医结合科 上海 200030;

2. 上海中医药大学附属龙华医院肿瘤科 上海 200032)

**摘要:**目的 观察益气养精方对乏氧微环境下肺癌细胞中具有促进细胞增殖侵袭及血管形成的apelin/APJ信号通路的影响。方法 CoCl<sub>2</sub>加入培养基模拟乏氧微环境,实验分组为乏氧组、常氧益气养精方组、乏氧益气养精方组及空白对照组,分别作用于人肺癌细胞株A549和H1975。采用CCK-8法和Transwell实验观察各组细胞的增殖、侵袭能力,RT-qPCR、Western Blot方法观察apelin/APJ信号通路相关因子VEGF、HIF-1 $\alpha$ 、PI3K等在各组干预细胞中的mRNA和蛋白表达。结果 CCK-8实验测得,缺氧环境能促进肺癌细胞增殖,益气养精方作用于A549、H1975的IC<sub>50</sub>分别为1 mg·mL<sup>-1</sup>和0.5 mg·mL<sup>-1</sup>,且在常氧和缺氧微环境中均能抑制肺癌细胞增殖。Transwell实验结果显示,益气养精方组下室面细胞数量明显少于对照组( $P < 0.01$ ),乏氧微环境中下室面细胞数明显多于对照组( $P < 0.01$ ),加入益气养精方后亦可见减少。RT-qPCR结果显示,益气养精方在乏氧微环境中能不同程度下调血管生成相关因子HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、APJ及Apelin的表达( $P < 0.05$ )。Western Blot检测发现,益气养精方在乏氧环境中能使相关因子(VEGF、PI3K、APJ)的表达量明显下调,具有统计学意义。结论 益气养精方在乏氧微环境中能抑制肺癌细胞的增殖和侵袭,同时能通过Apelin/APJ通路对血管生成相关因子VEGF、HIF-1 $\alpha$ 、PI3K等起到一定的下调作用。

**关键词:** 中医药 非小细胞肺癌 Apelin/APJ 血管生成

doi: 10.11842/wst.20181017001 中图分类号: R2-031 文献标识码: A

肺癌目前是全球癌症得病率、死亡率最高的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>,肿瘤侵袭转移是肺癌患者救治失败的主要原因。新生血管能为肿瘤的生长繁殖提供丰富的生长条件<sup>[2]</sup>,血管生成是肿瘤的增殖和转移的关键环节<sup>[3]</sup>,是肿瘤生长、原位侵袭和远端转移的必要过程<sup>[4]</sup>。因此,近些年在血管生成方面的研究是国内学者的重点方向。目前多通过血管生成相关因子的定量分析来评估肿瘤血管生成<sup>[5]</sup>。血管内皮生长因子(VEGF)、缺氧诱导因子(HIF)等与肿瘤血管生成有

直接或间接的联系<sup>[6,7]</sup>。

近年研究发现,apelin/APJ系统在细胞迁移、增殖以及血管形成上发挥了重要的作用,能加速体内肿瘤发育的启动过程,激活肿瘤新生血管的发生。Apelin (APJendogenousligand)是Tatemoto<sup>[8]</sup>于1998年从牛胃中分离提出发现的生物活性多肽,是G蛋白偶联受体-血管紧张素II 1型受体相关蛋白(APJ)<sup>[9]</sup>的内源性配体,二者相互结合发挥重要生物学功能<sup>[10]</sup>。在血管功能调节方面的研究发现,apelin/APJ系统在血管内

收稿日期:2019-09-11

修回日期:2019-10-12

\* 国家自然科学基金委员会面上项目(81573893):从apelin/APJ系统探讨益气养精方抑制肺癌血管生成及侵袭转移的机制,负责人:张铭;上海市教育委员会科研创新计划重大项目(2017-01-07-00-10-E00064):源于精气理论的肺岩宁方抗肿瘤生长与转移作用机制的研究,负责人:邓海滨。

\*\* 通讯作者:张铭,硕士研究生导师,主任医师,主要研究方向:中西医结合防治胸部肿瘤的临床与基础研究。

皮细胞(ECs)、血管平滑肌细胞(VSMCs)和心肌细胞中高表达,并参与血管功能的调控和维持<sup>[11,12]</sup>。Apelin不仅具有抗动脉粥样硬化的作用<sup>[13]</sup>,还能够通过促进血管生成对心脏起到保护作用<sup>[14]</sup>,在心衰心肌重塑过程中起到了重要作用<sup>[15]</sup>。研究发现 apelin 可以通过上调 VEGF 激活 P70S6K 来刺激血管新生<sup>[16]</sup>。而在肺癌细胞中,apelin 通过介导细胞外信号调节激酶(ERK)来诱导肺癌细胞 A549 的自噬和增殖<sup>[17]</sup>。Apelin 在 1/3 的人类肿瘤中的表达明显上调<sup>[18]</sup>,对包括肺癌、胃肠道肿瘤、乳腺癌、前列腺癌和妇科肿瘤在内的肿瘤患者研究发现,肿瘤患者 apelin 血清含量明显高于健康人群<sup>[19]</sup>,并且 apelin 的含量与肿瘤的分期和有无转移密切相关。这些证据表明 apelin/APJ 系统与肿瘤之间存在一定的相关性,在肿瘤细胞迁徙、增殖及血管形成上有重要作用<sup>[20]</sup>,参与了肿瘤的发生、发展<sup>[21]</sup>。与肺癌相关的研究发现,apelin 在非小细胞肺癌组织中的表达水平显著高于正常组织<sup>[22]</sup>,APJ 在肺腺癌组织中表达明显高于癌旁支气管黏膜下组织,血浆中 apelin 的表达在肺癌患者中显著增高,提示 apelin/APJ 系统与肺腺癌存在相关性<sup>[17]</sup>。另有研究发现,apelin-13 可以通过增加 ERK 的磷酸化,进而诱导 A549 细胞的增殖,且呈剂量和时间依赖性<sup>[23]</sup>,表明 apelin/APJ 系统可能通过 ERK 信号通路介导了肺腺癌细胞的增殖和自噬。而且有研究显示,apelin 可促进内皮细胞增殖、细胞间聚集、调节血管直径<sup>[24]</sup>及血管生成,是人非小细胞肺癌细胞中新的血管生成因子<sup>[22]</sup>。外源性和内源性的 apelin 都具有促进血管发生的作用,并且用 apelin 或 APJ 抑制剂阻断 apelin/APJ 系统后,能有效的抑制血管发生<sup>[25]</sup>。

缺氧诱导基因表达的主要调节因子是缺氧诱导因子家族,PI3K/Akt 信号转导通路可通过多种途径上调 HIF-1 $\alpha$  的表达<sup>[26]</sup>,在缺氧条件下,HIF-1 $\alpha$  可以诱导数种促血管发生分子的表达,apelin 是其中之一<sup>[27]</sup>。在斑马鱼背鳍再生模型中,缺氧诱导 apelin 表达是必要条件<sup>[28]</sup>。在 VEGFA-VEGFR2 通路的下游,apelin/APJ 系统传递信号功能,且能在鼠和人类肿瘤的内皮细胞中检测到 APJ<sup>[21,29]</sup>。因为 apelin 表达由缺氧和 VEGF 信号激活,有学者<sup>[30]</sup>利用 Apln-CreER 转基因小鼠,成功示踪了组织损伤修复以及肿瘤生长过程中的血管新生,并利用该工具小鼠阻断血管新生和 VEGFA-VEGFR2 信号通路,达到一定的抑制肿瘤生长作用。同时发现,apelin 特异性地表达于肿瘤新生血管顶端

的细胞,而该群细胞靠近肿瘤最缺氧的位置,这与以往的研究认为 apelin 受到缺氧诱导因子调控的结论一致。综上所述,apelin/APJ 系统与肿瘤临床进展密切相关,apelin/APJ 系统在肿瘤血管发生和肿瘤侵袭转移中扮演着十分重要的角色,通过抑制 apelin/APJ 系统可以有效的抑制肿瘤血管和淋巴管的生成,从而达到靶向治疗肿瘤的目的。

中医扶正祛邪、调节阴阳平衡的理论治疗肿瘤,促进恢复机体阴阳平衡,维持机体功能的协调,抑制肿瘤血管生成,对防治肿瘤侵袭和转移具有重要意义。由于中药复方的组分较为复杂,其抗肿瘤的、抗血管生成的作用是多靶点和多通道的<sup>[31]</sup>。我们临床以益气养精法配伍的主方治疗非小细胞肺癌,君用黄芪、黄精以益气健脾、补养肺卫之精气,臣以白术、女贞子、仙灵脾,补益脾肾之气以增强益气养精之功,佐七叶一枝花、干蟾皮等清热解毒、化痰散结。临床研究表明该方能够稳定晚期肺癌瘤体、抑制肿瘤侵袭和转移、提高患者的生存质量、长生存期,在抗肺癌转移方面确有良好疗效<sup>[32]</sup>,ELISA 检测表明该方能够显著降低患者血清 VEGF 水平<sup>[33]</sup>。动物实验研究也表明,经中药益气养精方处理的 Lewis 肺癌荷瘤鼠小鼠,其肿瘤 MVD、VEGF 表达水平均明显低于对照组和化疗组,表明该方可减少 VEGF 表达和降低肿瘤 MVD 以抑制肿瘤血管生成<sup>[33-34]</sup>。该方具有一定的抑制血管生成、抗肿瘤侵袭转移的作用。

如前所述,缺氧能够调控 apelin/APJ 系统,而 apelin 可以增强 PI3K/Akt 信号通路,通过激活 Smad3 蛋白起到促进内皮细胞增殖和血管生成的作用,从而促进肿瘤细胞生长和侵袭转移。益气养精方前期工作也表明,该方具有抑制肺癌血管生成及侵袭转移的作用,这与目前已了解到的 apelin/APJ 系统信号作用具有相似性,且益气养精方对该通路中相关细胞因子(VEGF、HIF-1 $\alpha$  等)及通路(PI3K/Akt)有一定的调节作用。因而我们推测益气养精方可能通过调控 apelin/APJ 信号通路,起到抑制肿瘤血管生成、调节肿瘤侵袭转移的作用,特进行如下实验。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 细胞株

人肺癌细胞 A549 和 H1975 细胞株,购置于中国科

表1 引物序列

| 基因                              | 上游引物(5'-3')           | 下游引物(5'-3')           |
|---------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| <i>HIF-1<math>\alpha</math></i> | TCACCTCTTGGTCGCTTCG   | CATGGTGAATCGGTCGCCG   |
| <i>VEGF</i>                     | AAGGAGGAGGGCAGAATCAT  | ATTCGCATGGTGATGTTGGA  |
| <i>Smad3</i>                    | CTCTTCTCTTCGCCGTGGGA  | CCCAAACCTCGCCTCAACTC  |
| <i>Apelin</i>                   | CTGCTCTGGCTCTCCTTGAC  | GAATTTCTCCGACCTCCCTG  |
| <i>APJ</i>                      | TCTGGGCCACCTACACCTAT  | ACGCTGGCGTACATGTTG    |
| <i>Actin</i>                    | CATGTACGTTGCTATCCAGGC | CTCCTTAATGTCACGCACGAT |

学院上海生命科学研究院细胞资源中心,完全培养基由1640培养液中加入10%胎牛血清(FBS)配制而成。

### 1.1.2 益气养精方

方药组成:生黄芪、白术、七叶一枝花、干蟾皮、女贞子、黄精、仙灵脾等组成,于中国科学院药物研究所用乙醇提炼浓缩制备成复方冻干粉。

### 1.1.3 试剂

CoCl<sub>2</sub>工作液制(生工生物工程(上海)公司);RMPI-1640培养液(HyClone公司);PBS缓冲液(HyClone公司);FBS(Gibco公司);CCK-8试剂盒(凯基公司);Matrigel基质胶(BD公司);反转录试剂盒(诺唯赞公司)。

### 1.1.4 抗体

Anti-apelin antibody(ab59469)、Anti-APJ receptor antibody(ab214369)、Anti-PI3K antibody(ab151549)、Anti-Akt-A antibody(Ab8805)、Anti-Smad3-A antibody(ab40854)、Anti-VEGF-A antibody(ab46154)、Anti-GAPDH-A antibody(ab8245)购置于Abcam。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 细胞增殖试验

取对数生长期的细胞,调整细胞浓度为 $5 \times 10^4$ 个·mL<sup>-1</sup>,每孔100  $\mu$ L接种于96孔板;第2 d缺氧组加入CoCl<sub>2</sub>工作液制造乏氧微环境,终浓度为200  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>;第3 d加入益气养精方,设置浓度梯度,每梯度3复孔;空白对照组为等体积的完全培养基。24 h后加入CCK-8,2 h后用酶标仪测定各孔在450 nm处的OD值,观察各干预组对细胞增殖的影响,并计算常氧环境下的半数致死率(IC<sub>50</sub>)。

### 1.2.2 细胞侵袭实验

选取对数生长期的肺癌细胞,接种于Transwell小室的上室中,分组同前,每组上室加入对应等体积液体。培养箱孵育24 h后用棉签擦去上室面的细胞,下室面的细胞在倒置显微镜下随机读取5个视野,计数下室面的细胞数,即为穿过小室的细胞数,实验共重

复3次,取其平均数。

### 1.2.3 RT-PCR检测各组的相关基因表达

选取对数生长期的细胞,接种于6孔板,融合度达60-70%时,加药处理。实验分组设置同前,设3复孔。加药处理过程同划痕实验,于24 h后收集细胞。裂解细胞后收集到离心管中,再加三氯甲烷,充分震荡后静置5 min,4 $^{\circ}$ C、12000 rpm,离心10 min,小心吸取上清到新的离心管中,加入等体积异丙醇,-20 $^{\circ}$ C放置1 h。4 $^{\circ}$ C,12000 rpm离心10 min,得到RNA沉淀,用DEPC水溶解沉淀。用反转录试剂盒将RNA反转录成cDNA。

RT-qPCR检测apelin、APJ、VEGF-A、HIF-1 $\alpha$ 及Smad3的表达。内参为Actin。引物序列见表1。

### 1.2.4 Western blot实验检测各组相关蛋白的表达

取对数期细胞种植于6孔板,实验分组同前,融合度达60-70%进行干预,方法同前。24 h后,消化细胞收集于离心管,冰上裂解细胞,离心后收集上清液,BCA法测定蛋白浓度,计算上样量,沸水变性。配胶,依次加入样本、上样缓冲液及内参,电泳。激活PVDF膜,按正负极顺序置入转移装置中,水浴转膜。取出PVDF膜,TBST缓冲液冲洗后,加入5%脱脂牛奶封闭1 h,再加入稀释的一抗,4 $^{\circ}$ C摇床孵育过夜。过夜后用TBST洗去未结合一抗,加入二抗稀释液,室温孵育2 h。将PVDF膜吸附蛋白的面朝上平铺至暗盒,滴加适量发光试剂,铺上保鲜膜,于暗室中压片,进行灰度分析。

## 1.3 统计学方法

应用采用SPSS 20.0统计软件进行数据分析。两组间比较使用t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有显著统计学意义。

## 2 试验结果

### 2.1 药物浓度试验结果

CCK-8法检测结果提示,益气养精方作用于

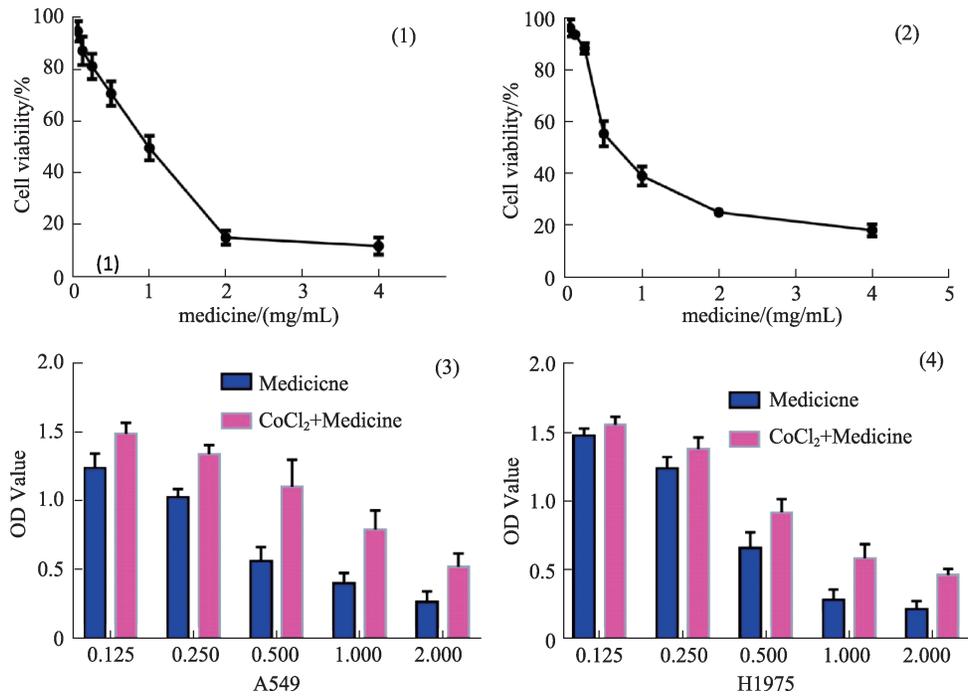


图1 乏氧微环境下不同浓度的益气养精方对两株细胞存活率的影响

图1(1)、(2)分别将100ul浓度为 $5 \times 10^4$ 个 $\cdot$ mL<sup>-1</sup>的A549细胞株和H1975细胞株种植于96孔板中,24 h后每孔加入100 ul培养基,24 h后分别加入不同浓度(4 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup>、2 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup>、1 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup>、0.5 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup>、0.25 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup>、0.125 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup>、0.0625 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup>)的益气养精方,24 h后加入CCK-8检测液,2 h后用酶标仪测定各孔在450 nm处的OD值。图1(3)、(4)分别将100 ul浓度为 $5 \times 10^4$ 个 $\cdot$ mL<sup>-1</sup>的A549细胞株和H1975细胞株种植于96孔板中,24 h后蓝色图形组每孔加入100 ul培养基、红色图形组每孔加入100 ul CoCl<sub>2</sub>工作液,24 h后分别加入不同浓度(2 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup>、1 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup>、0.5 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup>、0.25 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup>、0.125 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup>)的益气养精方,24 h后加入CCK-8检测液,2 h后用酶标仪测定各孔在450 nm处的OD值。

A549、H1975两种细胞株的IC<sub>50</sub>分别为1 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup>和0.5 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup>(图1(1)、1(2)),相同浓度益气养精方干预后,乏氧较常氧微环境肿瘤细胞增殖更多(图1(3)、1(4)),且随着益气养精方浓度的增加,对两个细胞株的增殖抑制作用越明显,在一定浓度范围内,细胞存活率随药物浓度增加而逐渐降低。

## 2.2 细胞侵袭试验结果

两株细胞的侵袭实验中,乏氧组下室面细胞数量均明显多于空白对照组,结果提示有显著差异,常氧益气养精方组下室面细胞数量明显少于空白组,结果提示有显著差异(\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01)(图2)。且同样在乏氧环境下,虽然未见统计学差异,但可看出益气养精方干预后的下室面细胞数略少于单纯乏氧环境下的细胞数量。

## 2.3 RT-qPCR检测结果

以Actin作为内参进行标准化,乏氧组可见血管生成相关因子HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、Smad3、Apelin及APJ较对照组均见不同程度高表达,多数有显著差异;无论在常氧或乏氧微环境下,益气养精干预后,各相关因

子可见不同程度的表达下调,多数有显著差异(\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01)(图3)。

## 2.4 Western blot检测

### 2.4.1 A549细胞株相关表达可见

常氧益气养精方组,VEGF、PI3K、Akt、Apelin及APJ的表达量均明显下降,Smad3的表达明显上升;乏氧组,VEGF、PI3K及APJ的表达量明显上调,Apelin的表达无明显变化,而Smad3和Akt的表达量明显下降;乏氧益气养精方组中,Akt、Apelin的表达未见明显差异,Smad3、PI3K表达量下降,VEGF、APJ的表达量增高(图4)。

### 2.4.2 H1975细胞株相关表达可见

常氧益气养精方组中,VEGF、Smad3、PI3K、Akt及Apelin的表达量均明显下降,而APJ表达量升高;乏氧组,VEGF、Smad3、PI3K、Apelin及APJ的表达量明显上调,而Akt的表达量明显下降。乏氧益气养精方组,VEGF、Smad3、PI3K、Akt及Apelin表达量下降,APJ的表达量增高(图5)。

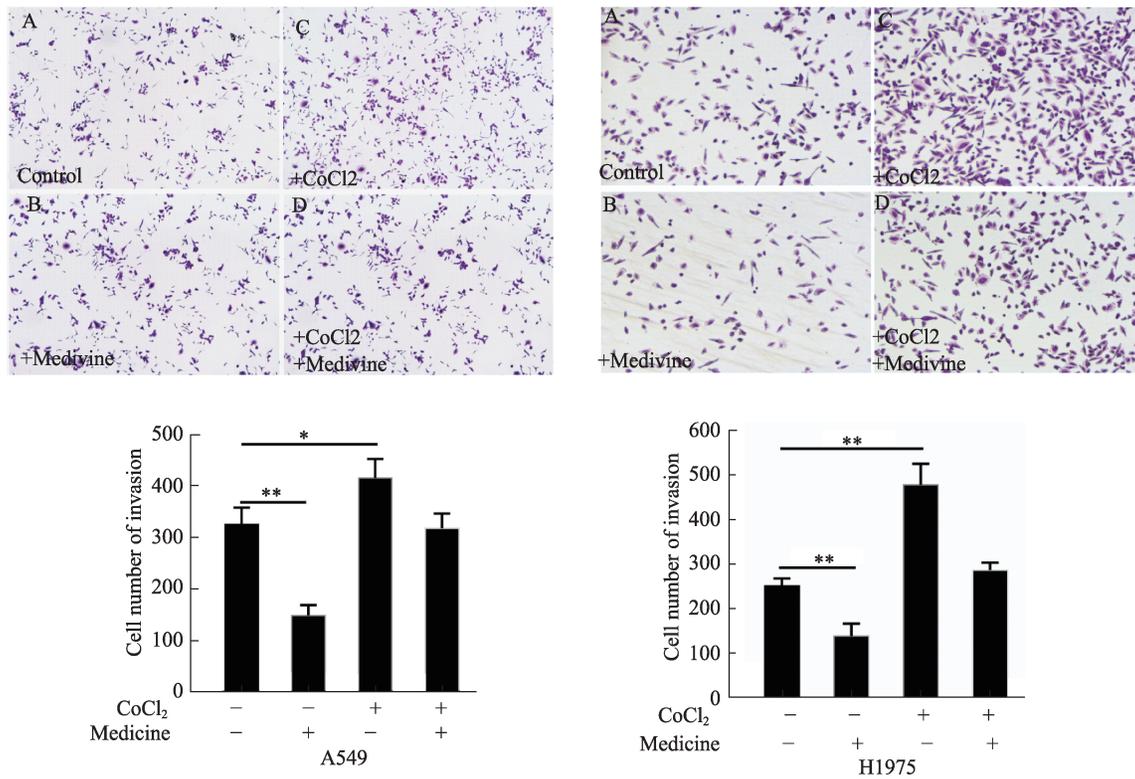


图2 各干预组作用于两株细胞24h后的侵袭转移结晶紫染色结果(40×)

图2分别将200 ul浓度为 $5 \times 10^4$ 个· $\text{mL}^{-1}$ 的A549细胞株和H1975细胞株种植于Transwell小室的上室中,Control组200 ul培养基、Medicine组加入100 ul培养基和100 ul对应浓度益气养精方(A549的益气养精方终浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,H1975终浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、CoCl<sub>2</sub>组加入200 ul CoCl<sub>2</sub>工作液、CoCl<sub>2</sub>Medicine组加入100 ul Medicine同浓度的益气养精方和100 ul浓度加倍的CoCl<sub>2</sub>工作液,24 h后用棉签擦去上室面的细胞进行观察。

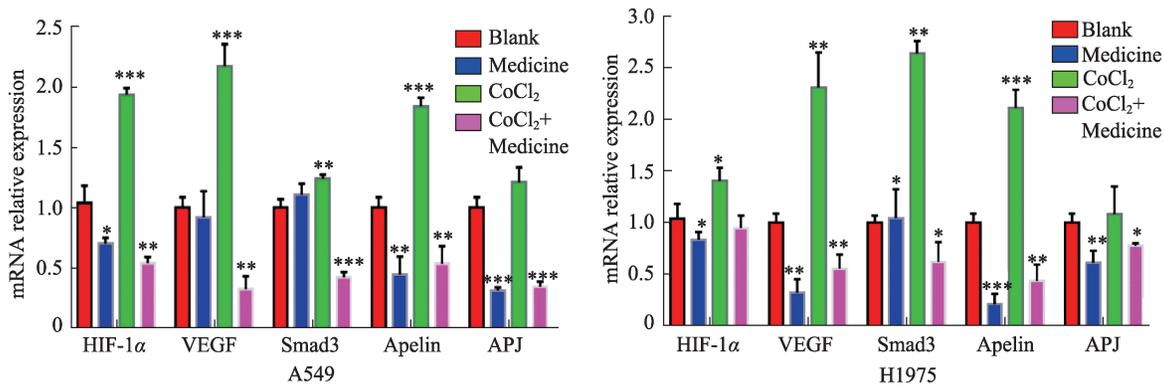


图3 不同实验组干预A549、H1975细胞株24h后相关因子HIF-1α、VEGF、Smad3、Apelin及APJ的表达

图3分别将浓度为 $5 \times 10^4$ 个· $\text{mL}^{-1}$ 的A549细胞株和H1975细胞株种植于6孔板中,待融合度达60-70%时,按照划痕实验的分组浓度进行相应处理,于24 h后收集细胞进行PCR检测。

### 3 讨论

通过细胞增殖实验发现益气养精方无论在常氧或是缺氧环境中,对于肺癌细胞A549和H1975的增殖均有抑制作用。细胞侵袭试验发现,益气养精方无论在常氧或乏氧微环境中,对两株细胞的侵袭能力均有一定抑制作用。在分子检测中发现,乏氧环境下,这

两株细胞的血管生成相关因子HIF-1α、VEGF、Smad3、Apelin及APJ在RNA水平的表达,均较常氧环境的表达量高,而益气养精方无论在常氧或乏氧环境中,对HIF-1α、VEGF、Apelin及APJ的表达均有一定的抑制作用,提示益气养精方可能通过apelin/APJ系统对肿瘤细胞的血管生成起到了一定的抑制作用。从蛋白水平上的表达来看,益气养精方对该信号途径

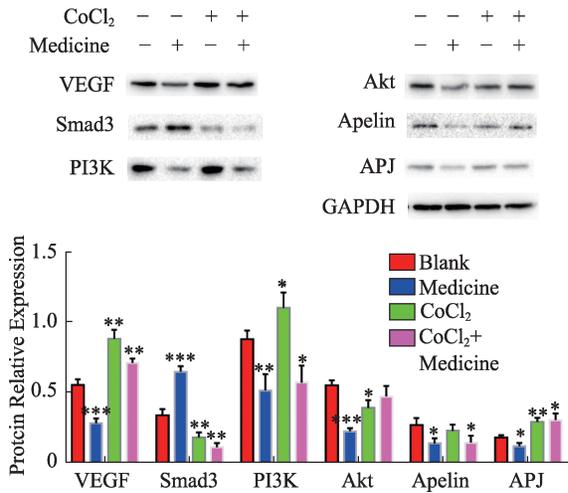


图4 不同氧环境下益气养精方对A549血管生成相关因子的蛋白表达作用

图4分别将浓度为 $5 \times 10^4$ 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的A549细胞株种植于6孔板中,待融合度达60-70%时,按照划痕实验的分组浓度进行相应处理,于24 h后收集细胞进行Western Blot检测,各组与对照组比较多数均有统计学差异(\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.01$ ).

中的相关因子VEGF、PI3K、Akt及Apelin的表达也具有一定的抑制作用,对于A549细胞的Smad3蛋白水平表达有促进作用,H1975细胞的APJ蛋白水平也呈现出了高表达。在乏氧环境中,可以看到益气养精方仍能发挥抑制相关因子表达的作用。因此通过两种水平的不同分子表达的比较,以及分子间的上下游关系<sup>[35]</sup>,推测益气养精方可以通过抑制Apelin的影响,对PI3K/Akt信号通路产生影响。

值得说明的是,实验中发现,益气养精方于RNA水平下调了APJ的表达量,但是在蛋白水平上出现了上调的情况,而对于Smad3的表达调控,在RNA水平上与蛋白水平上的实验结果并未一致,在蛋白水平上的表达较实验预期一致,这可能与不同细胞来源的个体差异相关,这些情况可能在转录后翻译出现了某种

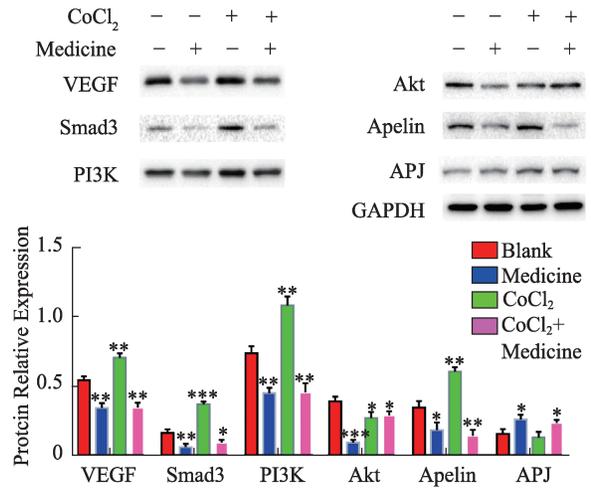


图5 不同氧环境下益气养精方对H1975血管生成相关因子的蛋白表达作用

图5分别将浓度为 $5 \times 10^4$ 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的H1975细胞株种植于6孔板中,待融合度达60-70%时,按照划痕实验的分组浓度进行相应处理,于24 h后收集细胞进行Western Blot检测,各组与对照组比较多数均有统计学差异(\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.01$ ).

变化,可能存在着某种转录后的修饰,使得蛋白水平表达受阻<sup>[36]</sup>,也有可能跟其上下游的生物学分子有一定的关联。另外,在A549细胞实验中,在常氧环境中,益气养精方作用后Smad3在RNA水平上的表达上调,乏氧环境中,Smad3亦表达上调,而乏氧环境中益气养精方作用后,Smad3的表达量却明显相对下调,可能是二者之间存在着某种反应,进而影响了Smad3的表达。这些都可以在今后的实验中进一步深入的探究,为后续实验提供了新的思路。

通过本实验我们可以大致推导出,益气养精方可以通过抑制Apelin的表达,进而对PI3K/Akt信号通路产生影响,促使肺腺癌细胞的血管生成相关因子表达下调,从而对非小细胞肺癌的血管生成产生影响,抑制肿瘤细胞的增殖侵袭及转移。

## 参考文献

- Pan Q, Wang Y, Chen J, *et al.* Investigation of the epidermal growth factor receptor mutation rate in non-small cell lung cancer patients and the analysis of associated risk factors using logistic regression. *Oncol Lett*, 2014, 8(2):813-818.
- Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, 144(5):646-674.
- 陈小东. 非小细胞肺癌靶向治疗药物的研究进展及其临床应用. *世界临床药物*, 2010, 31(11):691-697.
- 王金爽, 韩正祥. 抗血管生成靶向药物治疗肿瘤引起高血压的机制及研究进展. *现代肿瘤医学*, 2018(5):800-804.
- 赵改霞, 郑心. 肺抑瘤膏联合吉非替尼对Lewis 荷瘤小鼠模型的抗肿瘤血管生成作用研究. *临床和实验医学杂志*, 2018(4):337-340.
- Lin B, Song X, Yang D, *et al.* Anlotinib inhibits angiogenesis via suppressing the activation of VEGFR2, PDGFRbeta and FGFR1. *Gene*, 2018, 654:77-86.
- Wilhelm S M, Dumas J, Adnane L, *et al.* Regorafenib (BAY 73-4506):

- a new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. *Int J Cancer*, 2011, 129(1):245–255.
- 8 Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, *et al.* Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 251(2):471–476.
  - 9 O’Dowd B F, Heiber M, Chan A, *et al.* A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene*, 1993, 136(1–2):355–60.
  - 10 Langelaan D N, Reddy T, Banks A W, *et al.* Structural features of the apelin receptor N-terminal tail and first transmembrane segment implicated in ligand binding and receptor trafficking. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1828(6):1471–1483.
  - 11 Kostopoulos C G, Spiroglou S G, Varakis J N, *et al.* Adiponectin/T-cadherin and apelin/APJ expression in human arteries and periadventitial fat: implication of local adipokine signaling in atherosclerosis?. *Cardiovasc Pathol*, 2014, 23(3):131–138.
  - 12 Luo X, Liu J, Zhou H, *et al.* Apelin/APJ system: A critical regulator of vascular smooth muscle cell. *J Cell Physiol*, 2017, 233(7):5180–5188.
  - 13 Liu X Y, Lu Q, Ouyang X P, *et al.* Apelin-13 increases expression of ATP-binding cassette transporter A1 via activating protein kinase C alpha signaling in THP-1 macrophage-derived foam cells. *Atherosclerosis*, 2013, 226(2):398–407.
  - 14 Zhang B H, Guo C X, Wang H X, *et al.* Cardioprotective effects of adipokine apelin on myocardial infarction. *Heart Vessels*, 2014, 29(5):679–689.
  - 15 Kocher A A, Schuster M D, Szabolcs M J, *et al.* Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*, 2001, 7(4):430–436.
  - 16 Masri B, Morin N, Cornu M, *et al.* Apelin (65–77) activates p70 S6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells. *Faseb J*, 2004, 18(15):1909–1911.
  - 17 Yang L, Su T, Lv D, *et al.* ERK1/2 mediates lung adenocarcinoma cell proliferation and autophagy induced by apelin-13. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2014, 46(2):100–111.
  - 18 Sorli S C, Le Gonidec S, Knibiehler B, *et al.* Apelin is a potent activator of tumour neoangiogenesis. *Oncogene*, 2007, 26(55):7692–7699.
  - 19 Lacquaniti A, Altavilla G, Picone A, *et al.* Apelin beyond kidney failure and hyponatremia: a useful biomarker for cancer disease progression evaluation. *Clin Exp Med*, 2015, 15(1):97–105.
  - 20 Chen T, Liu N, Xu G M, *et al.* Apelin13/APJ promotes proliferation of colon carcinoma by activating Notch3 signaling pathway. *Oncotarget*, 2017, 8(60):101697–101706.
  - 21 Kalin R E, Kretz M P, Meyer A M, *et al.* Paracrine and autocrine mechanisms of apelin signaling govern embryonic and tumor angiogenesis. *Dev Biol*, 2007, 305(2):599–614.
  - 22 Berta J, Kenessey I, Dobos J, *et al.* Apelin expression in human non-small cell lung cancer: role in angiogenesis and prognosis. *J Thorac Oncol*, 2010, 5(8):1120–1129.
  - 23 付俊, 尚海旭, 贾弘褪, 等. Beclin1 与自噬及肿瘤的关系. *生理科学进展*, 2012(2):155–158.
  - 24 Takakura N, Kidoya H. Maturation of blood vessels by haematopoietic stem cells and progenitor cells: involvement of apelin/APJ and angiopoietin/Tie2 interactions in vessel caliber size regulation. *Thromb Haemost*, 2009, 101(6):999–1005.
  - 25 Lv D, Li H, Chen L. Apelin and APJ, a novel critical factor and therapeutic target for atherosclerosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2013, 45(7):527–533.
  - 26 Agani F, Jiang BH. Oxygen-independent regulation of HIF-1: novel involvement of PI3K/AKT/mTOR pathway in cancer. *Curr Cancer Drug Targets*, 2013, 13(3):245–251.
  - 27 Sheikh A Y, Chun H J, Glassford A J, *et al.* In vivo genetic profiling and cellular localization of apelin reveals a hypoxia-sensitive, endothelial-centered pathway activated in ischemic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 294(1):H88–98.
  - 28 Eyries M, Siegfried G, Ciomas M, *et al.* Hypoxia-induced apelin expression regulates endothelial cell proliferation and regenerative angiogenesis. *Circ Res*, 2008, 103(4):432–440.
  - 29 Kidoya H, Kunii N, Naito H, *et al.* The apelin/APJ system induces maturation of the tumor vasculature and improves the efficiency of immune therapy. *Oncogene*, 2012, 31(27):3254–3264.
  - 30 Liu Q, Hu T, He L, *et al.* Genetic targeting of sprouting angiogenesis using Apln-CreER. *Nat Commun*, 2015, 6:6020.
  - 31 张铭, 徐振晔, 王中奇, 等. 肺岩宁方及其不同组分对小鼠 Lewis 肺癌移植瘤 VEGF、bFGF 表达及血管生成的影响. *中国中医基础医学杂志*, 2011(3):332–334.
  - 32 徐振晔, 金长娟, 沈德义, 等. 中医药分阶段结合化疗治疗晚期非小细胞肺癌的临床研究. *中国中西医结合杂志*, 2007(10):874–878.
  - 33 徐振晔, 王中奇, 朱晏伟, 等. 肺岩宁方抗晚期非小细胞肺癌侵袭转移和对血清 VEGF 水平影响的研究. 第九届全国中西医结合肿瘤学术研讨会, 2002.
  - 34 王中奇, 徐振晔, 邓海滨, 等. 肺岩宁方抗 C57 小鼠 Lewis 肿瘤血管生成的实验研究. *上海中医药杂志*, 2006(7):66–67.
  - 35 Li L, Li F, Li F, *et al.* NOX4-derived reactive oxygen species drive apelin-13-induced vascular smooth muscle cell proliferation via the ERK pathway. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2011, 17(4):307.
  - 36 Li X, Xu L, Zhou W, *et al.* Chronic exposure to microcystin-LR affected mitochondrial DNA maintenance and caused pathological changes of lung tissue in mice. *Environ Pollut*, 2016, 210:48–56.

## Effects of Enhancing Qi and Nourishing Essence Formula on the Expression of Apelin in Lung Adenocarcinoma Cells under Hypoxic Condition

Lu Wenfeng<sup>1</sup>, Yang Xiwen<sup>1</sup>, Dong Yun<sup>1</sup>, Cui Qing<sup>1</sup>, Cai Xiaoyue<sup>1</sup>,  
Wang Yuhan<sup>1</sup>, Zhang Ming<sup>1</sup>, Deng Haibin<sup>2</sup>, Xu Zhenye<sup>2</sup>

(1. Department of Integrated TCM and Western Medicine, Shanghai Chest Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China; 2. Department of Oncology, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

**Abstract:** Objective To observe the effect of enhancing qi and nourishing essence formula on cell proliferation, invasion and angiogenesis of lung adenocarcinoma cells under hypoxic condition via Apelin/APJ signaling pathway. Methods CoCl<sub>2</sub> working fluid was used to produce hypoxic microenvironment. Human lung cancer cell lines A549 and H1975 were treated with hypoxic, enhancing qi and nourishing essence formula, hypoxia enhancing qi and nourishing essence formula and control group respectively. The effect of each group on cell proliferation and invasion was observed by CCK-8 assay and Transwell assay. The expression of angiogenesis-related factors, such as VEGF, HIF-1 $\alpha$  and PI3K, was observed by RT-qPCR experiment and Western Blotting assay. Results CCK-8 assay showed that hypoxic environment could promote the proliferation of lung cancer cells. The IC<sub>50</sub> of Enhance Qi Nourish Jing formula was determined to be about 1 mg/ml for A549 cells, and 0.5 mg/ml for H1975 cells. The formula can inhibit the proliferation of lung cancer cells in no matter normal or hypoxic microenvironment. Transwell results showed that the number of cells in the lower chamber of the enhancing qi and nourishing essence formula group was significantly lower than that in the control group ( $P < 0.01$ ), and the number of cells in the hypoxic microenvironment was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.01$ ), the reduction can also been observed after treated with the formula. The results of RT-qPCR showed that enhancing qi and nourishing essence formula could down-regulate the expression of angiogenesis-related factors HIF-1 $\alpha$ , VEGF, APJ and Apelin in the hypoxic microenvironment ( $P < 0.05$ ). Western Blot analysis showed that enhancing qi and nourishing essence formula can significantly down-regulate the expression of related factors (VEGF, PI3K, APJ) in a hypoxic environment, with statistically significant. Conclusion Enhancing qi and nourishing essence formula can inhibit the proliferation and invasion of lung cancer cells in hypoxic microenvironment. At the same time, it can down-regulate the angiogenesis-related factors VEGF, HIF-1 $\alpha$  and PI3K through Apelin/APJ pathway.

**Keywords:** Traditional Chinese medicine, Non-small lung cancer, Apelin/APJ, Angiogenesis.

(责任编辑: 周阿剑, 责任译审: 邹建华)