

# 四君子汤联合吉非替尼对非小细胞肺癌 PC9 细胞的协同作用及中效原理评价<sup>Δ</sup>

王致红\*, 王施元, 曹 波, 张铭予, 李泰峰, 李春雨<sup>#1</sup>, 李国辉<sup>#2</sup> (国家癌症中心, 国家肿瘤临床医学研究中心, 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院药剂科, 北京 100021)

中图分类号 R932;R979.1 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2022)02-0129-05

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2022.02.001

**摘 要** 目的:利用中效原理评价四君子汤与吉非替尼联合应用对非小细胞肺癌 PC9 细胞的协同抑制作用,并探讨其对细胞凋亡和细胞周期的影响。方法:采用 CellTiter-Glo 法检测四君子汤和吉非替尼对 PC9 细胞增殖的影响;根据中效原理使用 Calcsyn 软件评价两药是否具有协同作用;使用流式细胞仪检测两药对细胞凋亡和细胞周期的影响。结果:四君子汤和吉非替尼抑制 PC9 细胞增殖均呈剂量依赖性。两药联合作用于 PC9 细胞,  $IC_{50}$  由  $(0.75 \pm 0.26) \mu\text{g/L}$  降至  $(0.10 \pm 0.02) \mu\text{g/L}$ , 与吉非替尼组相比, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。流式细胞术检测结果表明, 联合用药能够通过促进细胞凋亡抑制细胞增殖, 且联合用药能促进细胞的早期凋亡, 处于  $G_2/M$  期细胞的比例与单独给药时相比, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论:四君子汤联合吉非替尼对非小细胞肺癌 PC9 细胞具有协同抑制作用, 其协同机制可能与诱导细胞凋亡及  $G_2/M$  期阻滞相关。

**关键词** 四君子汤; 吉非替尼; 协同效应; 中效原理; 细胞凋亡; 细胞周期

## Synergistic Effects of Sijunzi Decoction Combined with Gefitinib on Non-Small Cell Lung Cancer PC9 Cells and Evaluation for Principle of Intermediate Effects<sup>Δ</sup>

WANG Zhihong, WANG Shiyuan, CAO Bo, ZHANG Mingyu, LI Taifeng, LI Chunyu, LI Guohui (Dept. of Pharmacy, National Cancer Center/National Clinical Research Center for Cancer/Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To evaluate the synergistic inhibitory effects of Sijunzi decoction combined with gefitinib on non-small cell lung cancer PC9 cells by using the principle of intermediate effects, and to explore its effects on cell apoptosis and cell cycle. **METHODS:** CellTiter-Glo method was used to detect the effects of Sijunzi decoction and gefitinib on the proliferation of PC9 cells. Calcsyn software was used to evaluate the synergistic effects of the two drugs according to the principle of intermediate effects. The flow cytometry was used to detect the effects of the two drugs on apoptosis and cell cycle. **RESULTS:** Sijunzi decoction and gefitinib inhibited the proliferation of PC9 cells in a dose-dependent manner. When the two drugs were used in combination on PC9 cells, the  $IC_{50}$  decreased from  $(0.75 \pm 0.26) \mu\text{g/L}$  to  $(0.10 \pm 0.02) \mu\text{g/L}$ , the difference was statistically significant compared with gefitinib alone ( $P < 0.05$ ). The results of flow cytometry showed that after the combination of two drugs, the proportion of apoptosis increased significantly, and the percentage of cells in the  $G_2/M$  phase was significantly different from that of the single drug ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSIONS:** Sijunzi decoction combined with gefitinib have synergistic inhibitory effect on non-small cell lung cancer PC9 cells, and the synergistic mechanism may be related to the induction of apoptosis and  $G_2/M$  phase block.

**KEYWORDS** Sijunzi decoction; Gefitinib; Synergistic effects; Principle of intermediate effects; Cell apoptosis; Cell cycle

<sup>Δ</sup> 基金项目:北京市科技计划项目 (No. Z181100001618003)

\* 硕士研究生。研究方向:中药逆转肿瘤耐药。E-mail: 15561890618@163.com

# 通信作者 1: 副主任药师。研究方向:中药逆转肿瘤耐药。E-mail: chunyu\_li@126.com

# 通信作者 2: 主任药师, 硕士生导师。研究方向:临床药学与药事管理。E-mail: lgh0603@126.com

根据 Chen 等<sup>[1]</sup> 发布的统计数据, 肺癌整体的发病率和死亡率在我国恶性肿瘤中均居首位, 不仅有碍于我国人民的身体健康, 并且对于经济发展和社会可持续发展极为不利。吉非替尼在我国被广泛用于治疗肺癌, 但是, 使用吉非替尼治疗的患者的无进展生存期仅约 1 年, 其继发性耐药会导致致命的疾病进展<sup>[2]</sup>。因此, 肿瘤用药如何达到预防、逆转肿瘤患者

耐药是肿瘤治疗亟待解决的关键问题。从中医角度讲,四君子汤能够扶正培本,多项研究结果显示,四君子汤及其加减方在治疗肺癌、肠癌和胃癌等恶性肿瘤方面有显著疗效,在抑制肿瘤复发、转移等方面的优势也极为突出<sup>[3]</sup>。本研究主要考察四君子汤联合吉非替尼对非小细胞肺癌 PC9 细胞的协同抑制作用以及对细胞凋亡、细胞周期的影响,以期为中医经典名方逆转分子靶向药物的耐药研究及中西药联合治疗肺癌提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 肺癌细胞株

非小细胞肺癌细胞株 PC9 细胞购于湖南丰晖生物科技有限公司。PC9 细胞培养于含新鲜 DMEM 培养液的培养基中,DMEM 培养液内含青霉素( $1 \times 10^5$  U/L)、链霉素(100 mg/L)和 10%胎牛血浆,将其放置于 5%CO<sub>2</sub>、37 °C 恒温全湿培养箱中常规培养,每隔 24 h 换液或传代。

### 1.2 仪器

SA8 型涡旋混合器(比比科技亚洲有限公司);GloMax® Discover 微孔板阅读器(美国 Promega 公司);777-7A 型超净工作台(北京长城空气净化工程公司);CO<sub>2</sub> 培养箱(芬兰 Thermo 公司);Centrifuge 5427R 型台式冷冻离心机(德国 Eppendorf 有限公司)。

### 1.3 药品与试剂

四君子汤由人参(6 g)、茯苓(6 g)、白术(6 g)、甘草(4 g)组成,以上药物均购自北京华邈药业有限公司,经鉴定皆为合格药材。吉非替尼(批号为 Lot#5-SXG-56-1,加拿大 Toronto Research Chemicals 公司);DMEM 培养基、胎牛血清 FBS(美国 Gibco 公司);CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay 试剂盒(美国 Promega 公司);100×青霉素/链霉素混合液及 0.05% EDTA-胰酶(美国 Invitrogen 公司);Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(美国 BD 公司);细胞周期检测试剂盒(中国碧云天生物技术研究所)。

### 1.4 CellTiter-Glo (CTG) 发光法检测药物对细胞增殖作用的影响

取处于对数生长期的 PC9 细胞进行消化、离心、混匀后再计数,根据所需体积,调整细胞浓度为  $1 \times 10^5$ /mL,混匀,然后按照每孔 100 μL 接种于 96 孔板继续培养 24 h,观察到细胞贴壁后按照实验分组(空白组、对照组、四君子汤组、吉非替尼组和两药联合给药组),加入含有不同药物浓度的培养基,给药 48 h 后将 96 孔板中的液体吸净,在每孔中加入 60 μL 配置好的 CellTiter-Glo® 试剂,在 37 °C 条件下继续孵育 30 min,确保药物与细胞完全反应,然后将 96 孔板中液体全部转移至 96 孔白板中,期间不要产生气泡,之后利用 GloMax® Discover 微孔板阅读器上机检测各组药物在波长为 450 nm 处的吸光度值(A),重复上述实验过程 3 次,按照公式抑制率 =  $[(A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})] \times 100\%$  进行分析。公式中,“A<sub>对照</sub>”表示对照组(含有细胞和 CTG 溶液)的吸光度值;“A<sub>实验</sub>”表示加药组(含有细胞、药物和 CTG 溶液)的吸光度值;“A<sub>空白</sub>”表示空白组(只加 CTG 溶液)的吸光度值。

### 1.5 利用中效原理评价药物联合应用效应

根据“1.4”项下各药单独给药和联合给药后对药物的抑

制率,应用中效原理(Chou-Talalay 联合指数法)评价四君子汤和吉非替尼之间的相互作用,使用 Calcsyn 1.0 软件计算出抑制率-联合指数(Fa-CI)并绘制 CI 曲线, $CI = D_1/DX_1 + D_2/DX_2 + \alpha D_1 D_2 / DX_1 DX_2$ ,其中 DX<sub>1</sub>、DX<sub>2</sub> 为产生 X 效应时两药单独使用所需的各自浓度,D<sub>1</sub> 和 D<sub>2</sub> 为产生 X 效应时两药合用所需的各自浓度。两种药物相互排斥时  $\alpha = 0$ ,反之  $\alpha = 1$ 。根据上述公式计算两药联合使用时的 CI 值,CI < 1.0,协同效应;CI = 1.0,相加效应;CI > 1.0,拮抗效应<sup>[4]</sup>。

### 1.6 流式细胞仪检测细胞凋亡

将处于对数生长期且生长状态正常的 PC9 细胞取出,消化、离心、混匀后再计数。根据所用细胞体积,稀释细胞浓度至合适的体积,将调整好的细胞悬液按照每孔 1 mL ( $2 \times 10^5$ /mL)接种于六孔板中,以交叉交叉法混匀细胞,24 h 后待细胞贴壁后,根据“1.4”项下的实验分组进行单独或联合用药处理,48 h 后用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化制成单细胞悬液进行收集。细胞凋亡检测步骤参照细胞凋亡试剂盒说明书,将 Binding Buffer 稀释成 1×重新混悬细胞,向每组细胞都加入 Annexin V-FITC 和 PI 染色,混匀后,将其置于暗处进行避光 15 min,最好保证于 1 h 内完成上机检测。

### 1.7 流式细胞仪检测细胞周期

细胞前期处理过程同“1.6”项下细胞凋亡的处理。细胞周期步骤检测参照说明书,将提前预冷的 70%乙醇 1 mL 加入至前期处理好的各组细胞内,置于 4 °C 冰箱中固定过夜,PBS 重新润洗,碘化丙啶染色,室温(25 °C)条件下避光孵育 30 min,1 h 内上机进行检测。

### 1.8 统计学方法

运用 Graphpad Primer 8.0 统计软件进行统计分析,采用 t-test 检验,限定 P < 0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 药物对 PC9 细胞增殖的影响

用 CTG 法检测药物对 PC9 细胞的抑制作用,结果见图 1—3。由图可见,四君子汤浓度为 0.398 75 mg/mL 时,其对 PC9 细胞基本无抑制作用,呈浓度依赖性。吉非替尼浓度为 0.000 892 μg/L 时,其对 PC9 细胞基本无抑制作用,吉非替尼单独使用对 PC9 细胞的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为(0.75 ± 0.26) μg/L。因此,选择固定四君子汤基本无毒浓度(0.398 75 mg/mL)与吉非替尼一系列浓度梯度进行联合给药,使用 CTG 法观察对细胞的抑制作用,结果显示,联合给药对 PC9 细胞的 IC<sub>50</sub> 为(0.10 ± 0.02) μg/L,与吉非替尼组的差异有统计学意义(P < 0.05)。上述结果表明,四君子汤和吉非替尼单独或联合给药对 PC9 细胞皆具有抑制作用,且呈浓度依赖性,与单独给药相比,四君子汤与吉非替尼联合给药对 PC9 细胞的抑制效果更明显。

### 2.2 利用中效原理评价两药联合应用效应

根据 CTG 实验所得的结果,基于中效原理绘制不同效应 Fa 下的 CI 关系曲线,见图 4。两药联合作用于 PC9 细胞,Calcsyn 分析结果显示,四君子汤浓度为 0.398 75 mg/mL 时,联合不同浓度吉非替尼均有协同作用,CI < 1。

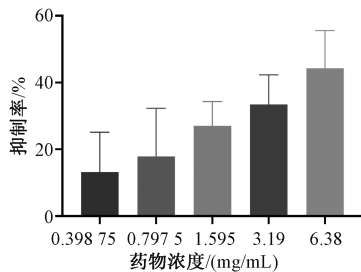


图1 四君子汤对PC9细胞的抑制作用

Fig 1 Inhibitory effects of Sijunzi decoction on PC9 Cells

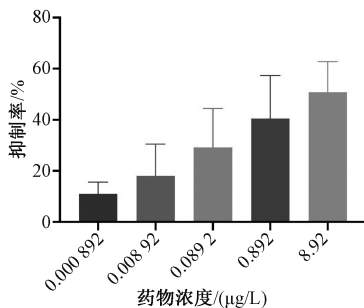
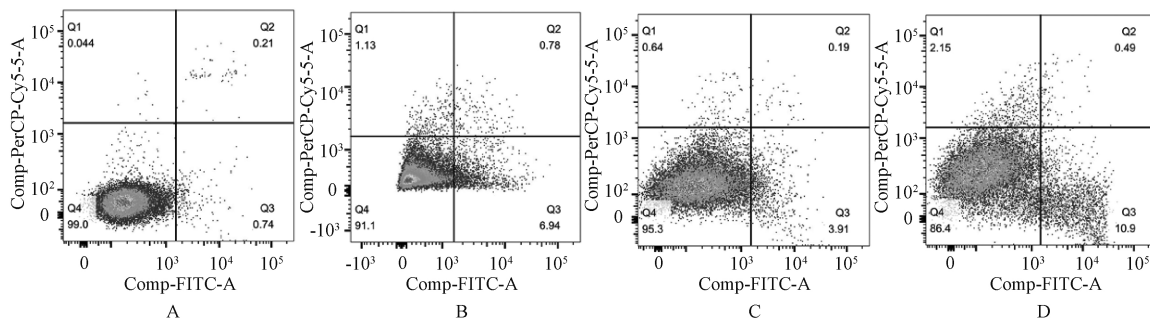


图2 吉非替尼对PC9细胞的抑制作用

Fig 2 Inhibitory effects of gefitinib on PC9 cells

### 2.3 凋亡作用分析

根据CTG法和Calculusyn的结果,本研究最终选择了基本对PC9细胞无抑制作用的四君子汤浓度(0.398 75 mg/mL)和吉非替尼浓度(0.000 892 μg/L)进行细胞凋亡和细胞周期测定。PC9细胞经过选定的各组药物作用48 h后,进行AnnexinV-FITC/PI染色,利用流式细胞仪分析细胞凋亡,结果见图5,图中Q1、Q2、Q3和Q4分别代表坏死细胞、晚期细胞、早期细胞和活细胞的凋亡比率。各组的凋亡率见表1,分



A. 对照组;B. 四君子汤组;C. 吉非替尼组;D. 联合给药组

A. control group; B. Sijunzi decoction group; C. gefitinib group; D. combined group

图5 对照组、四君子汤组、吉非替尼组及联合给药组作用48 h后PC9细胞凋亡情况

Fig 5 Apoptosis of PC9 cells in the control group, Sijunzi decoction group, gefitinib group and the combined group after 48 h of treatment

### 2.4 细胞周期作用分析

采用与细胞凋亡相同的给药方案,进行单药或联合用药对PC9细胞作用48 h后利用流式细胞仪分析细胞周期,结果见图6、表2。结果显示,联合给药组处于G<sub>2</sub>/M期细胞的百分比与单独给药组相比,差异有统计学意义(P<0.05)。

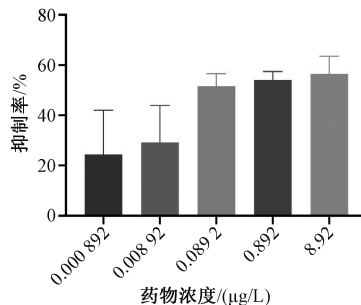


图3 四君子汤联合不同浓度吉非替尼对PC9细胞的抑制率  
Fig 3 Inhibitory effects of Sijunzi decoction combined with different concentration of gefitinib on PC9 cells

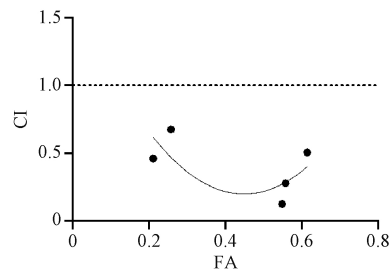


图4 四君子汤和吉非替尼联合给药的CI作用图  
Fig 4 Combined index effect of Sijunzi decoction combined with gefitinib

析发现,联合给药组早期凋亡率和总凋亡率与对照组、吉非替尼组相比,差异均有统计学意义(P<0.05);联合给药组晚期凋亡率只与对照组的差异有统计学意义(P<0.05)。由此可见,联合用药能够通过促进细胞凋亡抑制细胞增殖,且能促进细胞的早期凋亡,从诱导细胞凋亡角度证实了协同效应的存在。

### 3 讨论

吉非替尼治疗表皮生长因子受体(EGFR)突变的非小细胞肺癌患者的效果很好<sup>[5]</sup>;但野生型EGFR患者和Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因(KRAS)突变对表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI)不敏感,且绝大部分患者使用吉非替

表1 对照组、四君子汤组、吉非替尼组及联合给药组作用48 h后PC9细胞凋亡率比较( $\bar{x}\pm s, \%$ )

Tab 1 Apoptosis of PC9 cells in the control group, Sijunzi decoction group, gefitinib group and combined group after 48 h of treatment ( $\bar{x}\pm s, \%$ )

组别	早期凋亡率	晚期凋亡率	总凋亡率
对照组	0.54±0.18	0.64±0.53	1.18±0.48
四君子汤组	3.62±3.38	0.74±0.49	4.37±3.68
吉非替尼组	2.74±1.68	0.86±0.84	3.60±1.99
联合组	12.33±2.40* <sup>#</sup>	2.66±1.92*	14.99±3.52* <sup>#</sup>

注:与对照组比较,\* $P<0.05$ ;与吉非替尼组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$

Note: vs. the control group, \* $P<0.05$ ; vs. the Gefitinib group, <sup>#</sup> $P<0.05$

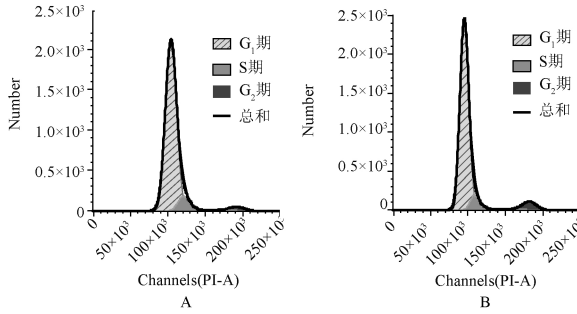


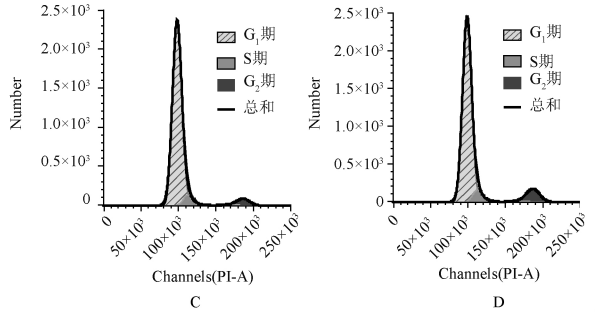
表2 对照组、四君子汤组、吉非替尼组及联合给药组作用48 h后PC9细胞周期百分比比较( $\bar{x}\pm s, \%$ )

Tab 2 Percentage of cell cycle of PC9 cells in the control group, Sijunzi decoction group, gefitinib group and combined group after 48 h of treatment ( $\bar{x}\pm s, \%$ )

组别	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> 期	S期	G <sub>2</sub> /M期
对照组	64.53±19.66	10.58±9.58	14.48±9.45
四君子汤组	71.80±7.45	12.61±5.12	7.12±4.72
吉非替尼组	69.86±11.33	15.30±10.23	6.03±4.89
联合组	68.50±7.35	8.33±6.37	18.32±2.10 <sup>△#</sup>

注:与四君子汤组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ ;与吉非替尼组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$

Note: vs. the Sijunzi decoction group, <sup>△</sup> $P<0.05$ ; vs. the Gefitinib group, <sup>#</sup> $P<0.05$



A. 对照组; B. 四君子汤组; C. 吉非替尼组; D. 联合给药组

A. control group; B. Sijunzi decoction group; C. gefitinib group; D. combined group

图6 对照组、四君子汤组、吉非替尼组及联合给药组作用48 h后PC9细胞周期情况

Fig 6 Cell cycle of PC9 cells in the control group, Sijunzi decoction group, gefitinib group and combined group after 48 h of treatment

尼约1年会出现获得性耐药<sup>[6-7]</sup>。吉非替尼耐药机制包括经过/不经过EGFR通路、激活下游信号通路相关靶标等,各机制间也会相互影响,更增加了改善吉非替尼耐药的复杂性<sup>[8-12]</sup>。因此,如何解决绝大部分肿瘤患者使用一段时间吉非替尼后就会出现耐药性的问题,成为目前肿瘤用药的一大难题。近年来,中医药在降低肺癌放化疗的不良反应、调整机体免疫功能和稳定瘤灶等方面发挥了独到的优势及疗效,并能改善患者生活质量<sup>[13]</sup>。中药多复方用药,且中药单药本身就含有多个成分,因此具有作用多个靶点的优势。中药与EGFR-TKI联合治疗,不仅可减轻EGFR-TKI的不良反应,还可以产生协同作用以提高疗效,经过长期临床实践,中药用于逆转目前所知的EGFR-TKI耐药的效应逐渐得到肯定<sup>[14]</sup>。

为明确四君子汤与吉非替尼是否具有协同增效作用,本研究使用CTG法测定了四君子汤和吉非替尼单独或联合应用对PC9细胞的抑制效果。结果显示,两药单独或联合应用均能抑制PC9细胞增殖,且具有浓度依赖性。根据CTG结果,固定了四君子汤浓度(0.39875 mg/mL)与一系列浓度梯度吉非替尼联合给药,利用中效原理研究两药的相互作用,经Calculusyn软件分析,该浓度的四君子汤与不同浓度吉非替尼均有协同作用。最后选择对PC9基本无抑制作用的四君子汤浓度和吉非替尼浓度进行细胞凋亡和细胞周期实验,结果显示,联合给药组早期凋亡率和总凋亡率均较对照组、吉非替尼组明显升高,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),且绝大多数细胞属于早期凋亡;两药联合应用可将绝大部分细胞的细胞周期阻滞在G<sub>2</sub>/M期,但仍需进一步研究以确定具体机制。四君子汤对胃癌、肝

癌和结直肠癌均有治疗效果<sup>[15-16]</sup>。四君子汤能够诱导肝癌细胞凋亡,并调控细胞周期以及抑制血管内皮生长因子表达<sup>[17]</sup>;其能够逆转胃癌细胞的上皮间质转化,进而抑制胃癌的侵袭和迁移<sup>[15]</sup>。本课题组前期研究<sup>[18]</sup>结果表明,四君子汤与吉非替尼在Lewis细胞构建小鼠肺癌转移模型上给药,在抑制肿瘤生长方面具有协同作用,并能改善恶性肿瘤细胞向肺部转移,且两药联合应用效果更强。

目前的研究结果表明,四君子汤与吉非替尼联合应用可对非小细胞肺癌细胞发挥协同抑制作用,并有望成为一种新的肺癌治疗策略。重要的是,吉非替尼和四君子汤常用于临床,且有较好的治疗效果。通过本研究,希望为临床医师提供一种新的用药策略,从而提高患者对吉非替尼的敏感性,降低吉非替尼耐药性,延长患者生存期。

### 参考文献

- [1] CHEN W Q, ZHENG R S, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] LU X Y, YU L, ZHANG Z, et al. Targeting EGFR<sup>L858R/T790M</sup> and EGFR<sup>L858R/T790M/C797S</sup> resistance mutations in NSCLC: current developments in medicinal chemistry[J]. Med Res Rev, 2018, 38(5): 1550-1581.
- [3] 禹雯琦, 孙珏, 周谔, 等. 四君子汤及加味方治疗恶性肿瘤的临床及基础研究进展[J]. 上海中医药大学学报, 2017, 31(5): 95-101.
- [4] 毛佳蕾, 胡静, 钱晓萍, 等. 利用中效原理评价蛇床子素与5-FU相互作用[J]. 癌症进展, 2014, 12(3): 278-284.

(下转第136页)