

基于PI3K/AKT信号通路探讨清肺消积颗粒对Lewis肺癌小鼠肿瘤细胞凋亡的影响

张格松¹, 程建通¹, 张灏¹, 张蕊¹, 沈晓倩¹, 赵艺涵², 蒋士卿^{2*}

¹太仓市中医医院老年病科, 苏州 215499; ²河南中医药大学第一附属医院血液肿瘤科, 郑州 450099

摘要: 研究清肺消积颗粒 (Qingfeixiaoji granules, QFXJ) 对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤生长的抑制作用及对肿瘤细胞凋亡的影响, 选取 45 只雄性 C57BL/6J 小鼠, 建立 Lewis 肺癌小鼠模型, 随机分为模型组 (model group, Mod)、顺铂组 (cisplatin group, DDP)、QFXJ 低剂量组 (low dose QFXJ group, QFXJ-L)、QFXJ 中剂量组 (middle dose QFXJ group, QFXJ-M)、QFXJ 高剂量组 (high dose QFXJ group, QFXJ-H), 每组 9 只, 另选 9 只 C57BL/6J 小鼠设为空白组 (control group, Con)。DDP 腹腔注射 0.2 mL 顺铂 (剂量为 2 mg/kg), 2 d/次, QFXJ-L、QFXJ-M、QFXJ-H 灌胃 0.4 mL QFXJ (剂量依次为 12、24、48 g/kg), 1 d/次, 连续给药 14 d 后剥离肿瘤组织并收集血液, 计算抑瘤率; 苏木精-伊红染色法 (hematoxylin-eosin, HE) 观察肿瘤组织病理情况; 酶联免疫吸附 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 法测定血清中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 的含量; 蛋白质免疫印迹 (Western blot, WB) 法测定肿瘤组织中磷脂酰肌 3-激酶 (phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)、磷酸化蛋白激酶 B (phosphorylated protein kinase B, p-AKT)、B 细胞淋巴瘤-2 (B cell lymphocyte tumor 2, Bcl-2)、B 细胞淋巴瘤-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax)、半胱天冬酶 3 (cysteiny aspartate specific proteinase-3, Caspase-3) 的表达水平; 原位末端转移酶标记 (TdT-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL) 技术观察肿瘤组织中细胞的凋亡情况。结果发现, 与 Mod 相比, QFXJ-M、QFXJ-H 与 DDP 瘤重均显著降低 ($P < 0.05$); 肿瘤组织病理结果显示, QFXJ-L、QFXJ-M、QFXJ-H 肿瘤细胞密度均有不同程度降低, 坏死细胞密度增加; QFXJ-M、QFXJ-H 与 DDP 血清中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 表达量均显著降低 ($P < 0.05$); QFXJ-H 与 DDP 肿瘤组织中 PI3K、p-AKT、Bcl-2 蛋白表达水平降低, Bax、Caspase-3 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$); TUNEL 荧光结果显示, 各给药组阳性细胞数量较模型组均有不同程度增多。得出结论, QFXJ 可能通过调控 PI3K/AKT 信号通路相关靶点, 上调促凋亡蛋白 Bax、Caspase-3 的表达, 下调抑凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 从而促进肺癌细胞凋亡, 抑制肺癌组织生长。

关键词: 清肺消积颗粒; 肺癌; PI3K/AKT 通路; 凋亡

中图分类号: R273

文献标识码: A

Effect of Qingfeixiaoji granules on apoptosis of Lewis lung cancer mice based on PI3K/AKT pathway

ZHANG Ge-song¹, CHENG Jian-tong¹,

ZHANG Hao¹, ZHANG Rui¹, SHEN Xiao-qian¹, ZHAO Yi-han², JIANG Shi-qing^{2*}

¹Taicang Hospital of Traditional Chinese Medicine Geriatrics Department, Suzhou 215499, China;

²The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450099, China

Abstract: To study the inhibition effects of Qingfeixiaoji granules (QFXJ) on Lewis lung cancer mice and the apoptosis of tumor cells, 45 male C57BL/6J mice were selected to build the Lewis lung cancer mouse model. They were randomly divided into model group (Mod), cisplatin group (DDP), low dose QFXJ group (QFXJ-L), middle dose QFXJ group (QFXJ-M), and high dose QFXJ group (QFXJ-H), with nine mice in each group. Other nine C57BL/6J mice were selected as the control group (Con). DDP was intraperitoneally injected with 0.2 mL cisplatin (according to 2 mg/kg) once every two days, and QFXJ-L, QFXJ-M, and QFXJ-H groups were intragastrically injected with 0.4 mL QFXJ in sequence (according to 12, 24, and 48 g/kg, respectively) once a day. After 14 days of continuous administration, the tumor inhibition rate was calculated by stripping the tumor tissues and collecting blood. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological status of tumor tissues. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was applied to determine the contents of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 β (IL-1 β). The expression levels of phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K), phosphorylated protein kinase B (p-AKT), B cell lymphocyte tumor 2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), and cysteinyl aspartate specific proteinase-3 (Caspase-3) in tumor tissues were determined with Western blot (WB). Cell apoptosis in tumor tissues was observed with TdT-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) technology. The results showed that the tumor weight of QFXJ-M, QFXJ-H, and DDP was significantly decreased compared with Mod ($P < 0.05$). The tumor histopathological results suggested that the density of tumor cells in QFXJ-L, QFXJ-M, and QFXJ-H decreased to varying degrees, and the density of necrotic cells increased. The expressions of TNF- α , IL-6, and IL-1 β in the serum of QFXJ-M, QFXJ-H, and DDP were significantly decreased ($P < 0.05$). The protein expression levels of PI3K, p-AKT, and Bcl-2 were decreased in tumor tissues of QFXJ-H and DDP, while the expression levels of Bax and Caspase-3 were significantly increased ($P < 0.05$). TUNEL fluorescence results showed that the number of positive cells in each drug administration group was higher than that in the model group. In conclusion, QFXJ may regulate the relevant targets of PI3K/AKT signaling pathway, up-regulating the expressions of pro-apoptotic proteins Bax and Caspase-3, and down-regulating the expressions of anti-apoptotic protein Bcl-2, and thus promote the apoptosis of lung cancer cells and inhibit the growth of lung cancer tissues.

Key words: Qingfeixiaoji granules; lung cancer; PI3K/AKT pathway; apoptosis

全球癌症数据统计显示：2020 年全球近 180 万因肺癌死亡的病例，其死亡人数在恶性肿瘤中居于首位且远高于其他癌症；肺癌新发病人数近 221 万例，占全部恶性肿瘤新发病例数的 11.4%^[1]。在中国肺癌的发生率与死亡率均居首位，且均有持续上升的趋势，肺癌已经严重威胁到中国居民的健康，成为阻碍国家经济发展的重大公共卫生问题^[2]。中医药在肺癌的治疗上具

有提高患者生活质量、提升人体免疫力、增强放化疗疗效且减轻放化疗毒副反应等优势，可以一定程度地延长患者的生存期，近年来众多学者与医家在中医辨证施治、专方专药等领域采用多中心、大样本等方法，为中医药治疗肺癌提供了高质量的数据支持，使中医药在肺癌防治上的优势日益显著^[3,4]。

清肺消积颗粒（Qingfeixiaoji granules, QFXJ）是蒋士卿教授基于肺癌“正虚为本，痰瘀为标”的病机理论结合多年临床经验所创^[5]，具有化痰散结、清肺益气之功，临床疗效显著。本研究运用清肺消积颗粒对 Lewis 肺癌小鼠进行干预，观察 QFXJ 对肺癌小鼠肿瘤细胞凋亡及 PI3K/AKT 信号通路的影响，探讨 QFXJ 治疗肺癌的部分作用机制，为清肺消积颗粒的临床运用提供一定的实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6J 小鼠，8 周龄，体重 22 ± 2 g，54 只，购买于斯贝福（北京）生物科技有限公司，许可证号：SCXK（京）2019-0010。实验动物按 SPF 级标准饲养于河南中医药大学动物实验中心，动物实验中心许可证号：SYXK（豫）2020-0004，所有实验动物适应性饲养 7 d 后开始实验。本实验过程中对小鼠的操作均参照中国科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》相关规定进行，本实验方案通过了河南中医药大学动物保护委员会的批准。

1.2 细胞株

Lewis 肺癌小鼠肿瘤细胞（Lewis lung cancer cell, LLC）细胞株由河南中医药大学分子生物实验中心提供。

1.3 药品与试剂

清肺消积颗粒由河南中医药大学第一附属医院药剂科提供中药免煎配方颗粒，主要由金荞麦 30 g、炒芥子 30 g、黄芪 50 g、黄芩 15 g、薏苡仁 30 g 等中药组成。注射用顺铂（批号：FA1Y3004B，齐鲁制药（海南）有限公司）。白细胞介素-6（interleukin-6, IL-6）、白细胞介素-1 β （interleukin-1 β , IL-1 β ）、肿瘤坏死因子- α （tumor necrosis factor- α , TNF- α ）ELISA 试剂盒（批号分别为：GEM0001-48T、GEM0003-48T、GEM0004-48T，武汉塞维尔生物技术有限公司）；兔源磷酸化蛋白激酶 B（phosphorylated protein kinase B, p-AKT）、磷脂酰肌 3-激酶（phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K）、B 细胞淋巴瘤-2（B cell lymphocyte tumor 2, Bcl-2）、B 细胞淋巴瘤-2 相关 X 蛋白（Bcl-2 associated X protein, Bax）、半胱天冬酶 3（cysteinyl aspartate specific proteinase3, Caspase-3）抗体（批号分别为：AF0832、GB11525、GB11690、GB124830、GB11767C，武汉三鹰生物技术有限公司）；磷酸盐缓冲液、DMEM（Dulbecco's

modified eagle medium) 高糖培养基、胰蛋白酶消化液、BCA (bicinchoninic acid) 蛋白浓度测定试剂盒 (批号分别为: P1023、12100、T1338、PC0020, 北京索莱宝生物技术有限公司)。

1.4 主要试剂与仪器

SpectraMaxM3 型多功能酶标仪 (美国 MD 公司); TDZ4-WS 型离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); JB-P5 型包埋机 (武汉俊杰电子有限公司); UCT/UC6 型超薄切片机 (德国 Leica 公司); BOXChemiXR5 型凝胶成像系统 (英国 Syngene 公司); DM3000 型倒置荧光显微镜 (德国 Leica 公司); Trans-blotTurbo 全能型蛋白转印系统、Power Pac TW 型电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.5 模型制备

将 LLC 细胞复苏传代, 取对数生长期的 LLC 细胞制成单细胞浓度为 1×10^7 个/mL 的悬液, 将制备好的细胞悬液以 0.2 mL/只接种于 C57BL/6J 小鼠右侧腋下至肋骨部皮下, 接种一周后, 接种部位可见 50 mm³ 大小肿块且小鼠一般状态良好, 说明 Lewis 肺癌小鼠造模成功。

1.6 分组给药

将造模成功后的 45 只 Lewis 肺癌小鼠随机分为 5 组, 分别为: 模型组 (model group, Mod)、顺铂组 (cisplatin group, DDP)、QFXJ 低剂量组 (low dose QFXJ group, QFXJ-L)、QFXJ 中剂量组 (middle dose QFXJ group, QFXJ-M)、QFXJ 高剂量组 (high dose QFXJ group, QFXJ-H), 每组 9 只; 未进行造模普通饲养的 9 只 C57BL/6J 小鼠为空白组 (control group, Con)。根据人与小鼠体表面积折算等效剂量比例计算给药量, 即 QFXJ-L、QFXJ-M、QFXJ-H 分别根据小鼠体重按: 12、24、48 g/kg 进行灌胃, 每日灌胃 0.4 mL 中药悬液, 并两日一次腹腔注射 0.2 mL 0.9%氯化钠注射液; DDP 小鼠根据体重按 2 mg/kg 剂量进行腹腔注射顺铂, 两日一次, 并每日灌胃 0.4 mL 双蒸水; Mod 小鼠, 每日灌胃 0.4 mL 双蒸水, 并两日一次腹腔注射 0.2 mL 0.9%氯化钠注射液; 各组连续干预 14 d。Con 小鼠, 正常饲养, 不做特殊干预。

1.7 小鼠体重、瘤重与抑瘤率测定

实验期间小鼠体重每两天称量一次, 绘制体重变化曲线图。每天使用游标卡尺测量肿瘤组织的最长径与最短径, 计算肿瘤组织的体积, 绘制肿瘤体积变化曲线图; 末次给药后次日处死小鼠, 剥离肿瘤组织, 称重, 计算各组抑瘤率。肿瘤体积 = $1/2 \times a \times b^2$ (a 为肿瘤组织的最长径, mm; b 为肿瘤组织的最短径, mm); 抑瘤率 = (模型组瘤体重量 - 实验组瘤体重量) / 模型组瘤体重量 $\times 100\%$ 。

1.8 HE 染色法观察肿瘤组织变化

采用苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色法观察肿瘤组织变化, 将剥离好的肿瘤组织经脱水、透明、透蜡后置于包埋机中进行包埋, 包埋后的组织蜡块置于切片机上切片; 制备好的石蜡切片进行脱

蜡、脱水，之后将切片浸泡于苏木素溶液中 10 min，清洗，置于 1%盐酸酒精中提洗 1 次，蒸馏水清洗 15 min，使组织蓝化；切片变蓝后，在伊红染色液中浸泡 3 min，蒸馏水洗涤，染色完成；将切片进行脱水、透明与封片。将切片置于显微镜下，观察各组肿瘤组织的病理变化，并用计算机采集图像。

1.9 ELISA 法检测各组小鼠血清中炎症相关细胞因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的表达水平

根据酶联免疫吸附（enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）法检测试剂盒说明书进行待测血清样本的稀释与标准品的配制；设置样本孔和标准品孔进行加样，封板后置于 37 °C 的恒温水浴锅中孵育 1 h，洗板；各孔中加抗体，封板 37 °C 的恒温水浴锅中孵育 1 h，洗板；各孔中加酶结合物，封板 37 °C 的恒温水浴锅中孵育 0.5 h，洗板；各孔中加入 TMB 底物溶液显色，20 min 后加入 2 mol/L 硫酸，终止反应；置于酶标仪上，于 450 nm 处进行调零后测各孔 OD 值，计算 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的含量。

1.10 WB 法检测肺癌组织中 PI3K、p-AKT、Bcl-2、Bax、Bax 和 Caspase-3 的表达水平

采用蛋白质免疫印迹（Western blot, WB）法检测肺癌组织中蛋白的表达水平，先将小块肿瘤组织装入预冷过的匀浆管内，再向匀浆管中加入裂解液进行研磨，研磨后裂解时间为 0.5 h，裂解后置于离心机中转速 12 000 r/min，离心 15 min，上清液为总蛋白溶液；采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度，后将蛋白溶液置于沸水浴 15 min 使蛋白变形；取 3 μ L 样本进行聚丙烯酰胺凝胶，转膜，加入 5% 的脱脂奶粉，室温条件下封闭 15 min，一抗 4 °C 过夜，室温下孵育二抗 1 h，加入 ECL 显影剂，放入化学发光仪中曝光，记录、拍照、保存原始图，使用 Image J 软件分析目的条带灰度值，并计算目的蛋白相对表达水平。

1.11 TUNEL 技术检测肿瘤组织中的细胞凋亡情况

采用原位末端转移酶标记（TdT-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL）技术检测肿瘤组织中的细胞凋亡情况，将制备好的石蜡切片进行脱蜡、脱水，向切片滴加蛋白酶 K，室温下反应 15 min，清洗；加 TUNEL 反应混合液于标本上，避光反应 1 h，清洗；加使用 PBS 稀释后的 streptavidin HRP 工作液反应 30 min，清洗；加 DAB 显色液反应 10 min 左右，清洗；置于苏木素染色液中 5 s，清洗后封片，荧光显微镜下观察并拍摄。运用 Image J 软件对凋亡细胞和正常细胞进行计数，计算细胞凋亡率（细胞凋亡率 = 凋亡细胞数/总细胞数 \times 100 %）。

1.12 统计分析

采用 SPSS25.0 统计学软件进行统计分析，计量资料以均数 \pm 标准差表示，重复测量数据采用重复测量方差分析和混合效应模型分析；组间比较计量资料采用 *t* 检验，方差不齐采用 *t* 检验或秩和检验；以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。采用 GraphPad Prism 8.00 软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤体积、瘤体重量与抑瘤率的影响

各组 Lewis 肺癌小鼠的肿瘤体积呈不同趋势地增长（见图 1），其中 Mod 小鼠肿瘤体积增长最快，QFXJ-L 肿瘤体积增长速度次之，QFXJ-M 肿瘤体积增长速度居于第三位，QFXJ-H 肿瘤体积增长速度居于第四位，DDP 小鼠肿瘤体积增长速度最慢。实验第 8 d，DDP 小鼠肿瘤体积与 Mod 相比，已经出现明显差异，且具有统计学意义（ $P < 0.05$ ）；实验第 10 d，QFXJ-H 小鼠肿瘤体积与 Mod 相比也出现了显著差异，且具有统计学意义（ $P < 0.05$ ）；实验第 14 d，QFXJ-M 小鼠肿瘤体积也明显小于 Mod 小鼠肿瘤体积，且具有统计学意义（ $P < 0.05$ ）（见表 1）。

剥离出的各组 Lewis 肺癌小鼠肿瘤组织大小之间存在差异，部分肿瘤组织大体上可见明显的坏死部分（见图 2）；去除肿瘤组织表面的血渍与脂肪，对肿瘤进行称重，结果发现，QFXJ-M、QFXJ-H、DDP 瘤体重量显著低于 Mod，且具有统计学意义（ $P < 0.05$ ）（见图 3）；抑瘤率结果显示：QFXJ-L、QFXJ-M、QFXJ-H 的抑瘤率随着中药浓度升高而增加（见表 2）。各组小鼠肿瘤体积增长情况可以说明，QFXJ 对肺癌组织的生长具有抑制作用，且抑制作用与中药浓度呈正相关。

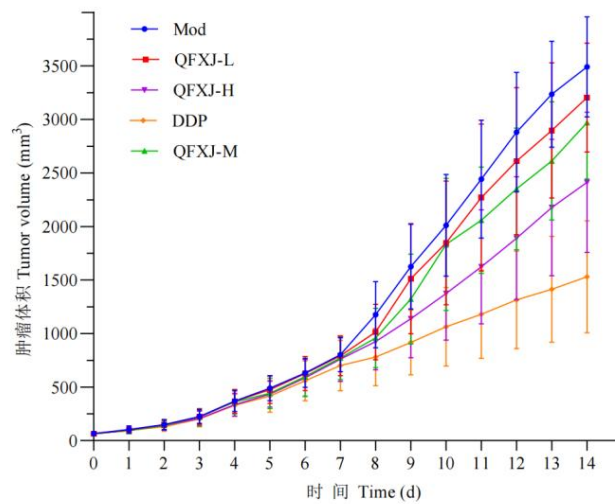


图 1 各组小鼠肿瘤体积变化曲线图

Fig.1 Tumor volume change curves of mice in each group

表 1 各组小鼠肿瘤体积变化情况（ $\bar{x} \pm s, n = 9$ ）

Table 1 Changes in tumor volume in each group of mice ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别 Group	肿瘤体积 Tumor volume (mm ³)			
	1 d	8 d	10 d	14 d
Mod	65.64 ± 12.43	1 175.67 ± 308.14	2 011.07 ± 475.08	3 490.17 ± 466.64
QFXJ-L	64.54 ± 13.11	1 013.09 ± 260.03	1 845.86 ± 577.83	3 203.36 ± 508.27
QFXJ-M	64.33 ± 13.22	958.64 ± 277.79	1 831.88 ± 619.10	2 969.42 ± 527.76*

QFXJ-H	63.73 ± 11.77	924.76 ± 263.72	1 374.04 ± 435.90*	2 412.04 ± 655.17*
DDP	62.57 ± 11.69	779.91 ± 267.31*	1 063.94 ± 365.73*	1 530.29 ± 522.64*

注：与 Mod 组相比，* $P < 0.05$ ，下同。Note: Compared with Mod group, * $P < 0.05$, the same below.

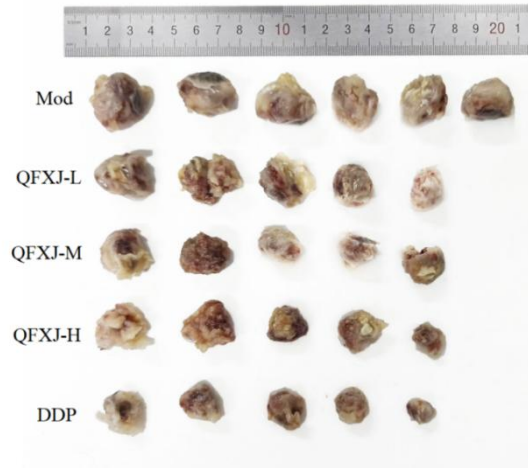


图 2 各组小鼠肿瘤组织实体照

Fig.2 Photos of tumor tissues in each group of mice

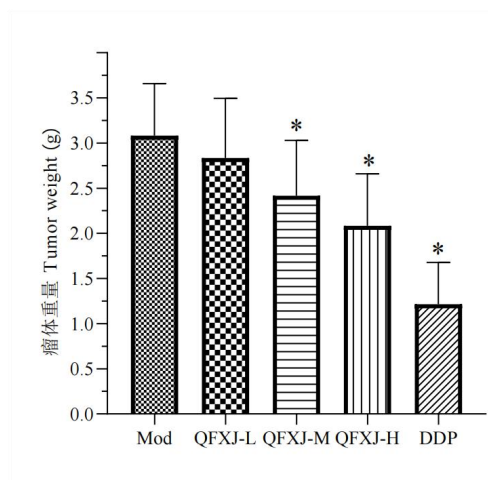


图 3 各组小鼠瘤重

Fig.3 Tumor weight of mice in each group

表 2 各组小鼠肿瘤重量情况 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 2 Tumor weight of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	瘤重	抑瘤率
Group	Tumor weight (g)	Tumor inhibition rate (%)
Mod	3.08 ± 0.58	-
QFXJ-L	2.83 ± 0.66	8.12
QFXJ-M	2.42 ± 0.61*	21.43

QFXJ-H	2.08 ± 0.58*	32.47
DDP	1.21 ± 0.46*	60.71

2.2 对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤组织病理的影响

Mod 小鼠的肿瘤组织可见大量肿瘤细胞，细胞形态各异，大小不一，排列紧凑，肿瘤细胞生长良好；QFXJ-L 病理切片仍可见大量肿瘤细胞，但肿瘤细胞密度较 Mod 相比稍有降低；QFXJ-M 病理切片显示肿瘤细胞的密度进一步下降，可见成片的坏死部分；QFXJ-H 病理切片可观察到大片区域出现坏死细胞，肿瘤细胞的密度显著降低，细胞形态的多样性较 Mod 相比也显著减少；DDP 病理切片可观察到大片的坏死细胞或模糊不清，肿瘤细胞密度也显著降低，病理性核分裂较 Mod 相比也明显减少（见图 4）。病理结果说明，QFXJ 对肺癌细胞的增殖、分化具有抑制作用，并对肺癌细胞的凋亡、坏死具有促进作用。

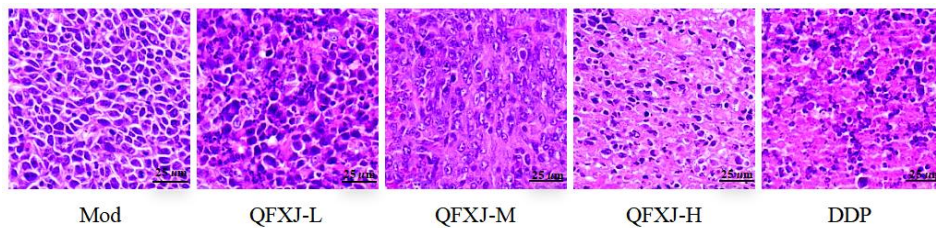


图 4 各组 Lewis 肺癌小鼠肿瘤组织病理 HE 染色图像 (×400)

Fig.4 Pathological HE staining images of Lewis lung cancer mouse tumor tissues in each group (×400)

2.3 对小鼠血清中炎症因子的影响

与 Mod 相比，QFXJ-M、QFXJ-H、DDP 小鼠血清中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 表达量均显著降低，且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)；QFXJ-L 小鼠血清中 IL-1 β 表达量也明显降低，且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)（见表 3）。各组小鼠炎症因子表达情况可以说明，QFXJ 可以降低机体血清中炎症相关细胞因子的表达，抑制机体的炎症反应。

表 3 各组小鼠炎症因子表达情况 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 3 Expression of inflammatory factors in each group of mice ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别 Group	TNF- α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)
Con	57.55 ± 7.46	40.01 ± 0.56	47.56 ± 2.95
Mod	122.71 ± 6.61 [#]	95.46 ± 2.11 [#]	97.62 ± 3.53 [#]
DDP	64.15 ± 4.50*	52.20 ± 4.19*	72.15 ± 2.50 ^{#*}
QFXJ-L	97.85 ± 14.10 [#]	90.43 ± 2.91 [#]	76.35 ± 3.02 ^{#*}
QFXJ-M	82.71 ± 2.68 ^{**}	77.72 ± 0.95 ^{**}	73.75 ± 1.80 ^{#*}
QFXJ-H	71.47 ± 3.41 ^{**}	61.47 ± 3.57 ^{**}	59.35 ± 9.05*

注：与 Mod 组相比，* $P < 0.05$ ；与 Con 组相比，[#] $P < 0.05$ 。

Note: Compared with Mod group, * $P < 0.05$; Compared with Con group, [#] $P < 0.05$.

2.4 对 Lewis 肺癌小鼠 PI3K/AKT 通路蛋白及凋亡相关蛋白表达水平的影响

与 Mod 相比, QFXJ-H、DDP PI3K 蛋白表达量显著降低, 且具有统计学意义 ($P < 0.05$); QFXJ-L、QFXJ-M、QFXJ-H、DDP p-AKT 蛋白表达量显著降低, 且具有统计学意义 ($P < 0.05$); QFXJ-M、QFXJ-H、DDP 抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达量显著降低, 且具有统计学意义 ($P < 0.05$); QFXJ-H、DDP 小鼠的促凋亡蛋白 Bax 表达量显著升高, 且具有统计学意义 ($P < 0.05$); QFXJ-L、QFXJ-M、QFXJ-H、DDP 小鼠的凋亡蛋白 Caspase-3 表达量显著升高, 且具有统计学意义 ($P < 0.05$) (见表 4、图 5)。WB 结果说明, QFXJ 可以抑制 Lewis 肺癌小鼠 PI3K/AKT 通路的表达, 同时上调促凋亡蛋白 Bax、Caspase-3 并下调抑凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 从而促进肺癌细胞凋亡。

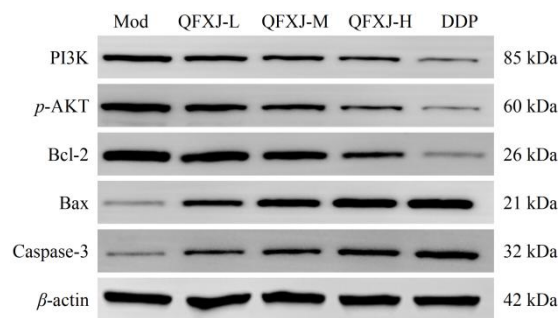


图 5 各组小鼠通路及凋亡相关蛋白表达的印迹条带

Fig. 5 Western blot bands of pathway and apoptosis related protein expression in each group of mice

表 4 各组小鼠 PI3K/AKT 通路蛋白及凋亡相关蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 4 Expression of PI3K/AKT pathway proteins and apoptosis related proteins in each group of mice ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别 Group	PI3K	p-AKT	Bcl-2	Bax	Caspase-3
QFXJ-L	0.74 ± 0.30	0.58 ± 0.17*	0.94 ± 0.22	0.87 ± 0.21	0.49 ± 0.12*
QFXJ-M	0.50 ± 0.24	0.52 ± 0.12*	0.61 ± 0.28*	1.22 ± 0.31	0.76 ± 0.29*
QFXJ-H	0.26 ± 0.16*	0.38 ± 0.10*	0.38 ± 0.16*	1.29 ± 0.20*	0.80 ± 0.21*
DDP	0.21 ± 0.11*	0.16 ± 0.04*	0.14 ± 0.04*	1.67 ± 0.41*	1.12 ± 0.34*
Mod	1.16 ± 0.49	0.91 ± 0.07	1.19 ± 0.15	0.70 ± 0.16	0.18 ± 0.05

2.5 对 TUNEL 荧光染色结果及细胞凋亡率的影响

与 Mod 相比 QFXJ-L、QFXJ-M、QFXJ-H 各组的阳性细胞数量均有不同程度增多, DDP 的阳性细胞数量也显著增多 (见图 6)。各组细胞凋亡率比较结果显示, QFXJ-L、QFXJ-M、QFXJ-H、DDP 的细胞凋亡率均高于模型组, 且具有统计学意义 ($P < 0.05$) (见表 5)。TUNEL 荧光染色结果说明, QFXJ 可以促进细胞凋亡, 且促进作用可能与给药浓度呈正相关。

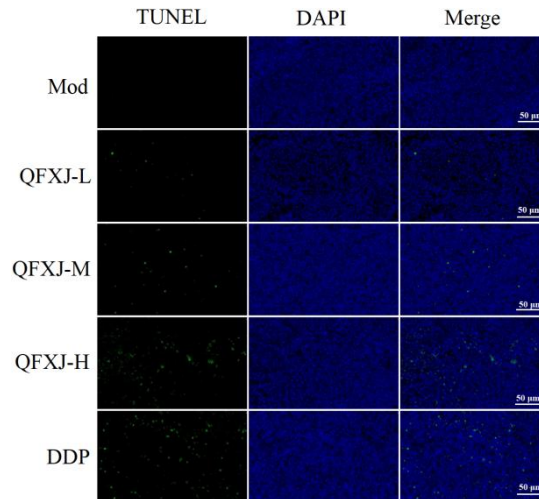


图 6 TUNEL 荧光检测各组 Lewis 肺癌小鼠肿瘤细胞凋亡情况 ($\times 200$)

Fig.6 TUNEL fluorescence detection of apoptosis in Lewis lung cancer mice in each group ($\times 200$)

表 5 各组 Lewis 肺癌小鼠肿瘤细胞凋亡率情况 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 5 Apoptosis rate of tumor cells in Lewis lung cancer mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	细胞凋亡率
Group	Cell apoptosis rate (%)
Mod	2.58 ± 0.65
QFXJ-L	$5.57 \pm 1.34^*$
QFXJ-M	$12.76 \pm 5.45^*$
QFXJ-H	$27.51 \pm 6.01^*$
DDP	$34.15 \pm 13.38^*$

3 讨论与结论

PI3K/AKT 信号通路可被多种类型的细胞刺激或毒性损伤激活，具有调节细胞增殖、凋亡、分化等基本细胞功能。当细胞受到外界刺激时，生长因子可以与酪氨酸激酶受体 (receptor tyrosine kinase, RTK) 或 G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptor, GPCR) 结合从而激活 PI3K^[6]。活化的 PI3K 可催化细胞膜上磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP₂) 磷酸化产生磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸 (phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate, PIP₃)，PIP₃ 作为第二信使活化 AKT^[7]。而活化的 AKT，进一步磷酸化激活其下游的因子，如哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR)、Bcl-2 家族和叉头转录因子 (forkhead transcription factors of the O class, FOXO) 等，从而发挥对细胞增殖、凋亡、分化等的调节作用^[8]。研究发现，解除对 PI3K/AKT 信号转导通路的调控能促进肺癌的发生和发展，而应用 PI3K 抑制剂如 LY294002 能促进 NSCLC 细胞凋亡^[9]。突变基因可直接激活 PI3K/AKT 信号通路，尤以磷脂酰肌醇激酶-3-催化亚基 α (phosphatidylinositol kinase-3-catalytic subunit α ,

PIK3CA) 的突变激活和 PI3K 抑制基因 PTEN 缺失这两种情况最常见, 在 51% 的 NSCLC 患者中发现 PIK3CA 突变和扩增, 44% 的 NSCLC 标本中显示 PTEN 表达完全丧失^[10]。Malanga 等^[11]采用免疫组化方法分析 NSCLC 标本发现有 51% 的标本存在 p-AKT 过表达的现象。这些研究结果均说明, PI3K/AKT 信号通路在肺癌的发生、发展过程中发挥着重要作用。

细胞凋亡是一种程序性死亡, 对机体的组织分化、器官发育和稳态维持有着重要的意义, 细胞凋亡受抑也是引起肿瘤发生的重要原因之一^[12]。目前, 研究最广泛的凋亡蛋白有 Caspase 家族和 Bcl-2 家族。其中促凋亡蛋白 Bad 需要与 Bcl-2 或 Bcl-XL 结合, 形成复合体从而表现促凋亡活性; 而活化的 AKT 是强有力的 Bad 磷酸化激酶, 磷酸化的 Bad 能与伴侣蛋白 14-3-3 蛋白结合, 从而阻断 Bad 与 Bcl-2 或 Bcl-XL 形成复合体, 导致游离的 Bcl-2 或 Bcl-XL 发挥抗凋亡作用^[13]。AKT 也可使 Bax 的 Ser184 残基磷酸化而失活, 从而抑制其促进细胞凋亡的功能^[14]。活化的 AKT 还可以磷酸化 Caspase-9、Caspase-3 的 Ser196 位点, 使其失活, 从而抑制 Caspase 导致的细胞凋亡^[15]。综上所述, PI3K/AKT 通路的异常活化可以打破抑凋亡 Bcl-2 蛋白和促凋亡 Bax 蛋白之间的平衡和抑制凋亡启动蛋白 Caspase-9、凋亡执行蛋白 Caspase-3 的表达, 使细胞凋亡受抑, 促进肿瘤的发生。

《黄帝内经》言“正气存内, 邪不可干”、“邪之所凑, 其气必虚”; 《外证医案》云: “正气虚则成岩”; 《诸病源候论》又谓: “积聚者, 由阴阳不和, 脏腑虚弱, 受于风邪, 搏于腑藏之气所为也”。历代医家均认为, 癌病之发生当先有正气虚损。正气不足从而导致脏腑功能衰弱和气血阴阳虚损, 致使气血津液运行失常, 产生气滞、血瘀、痰凝等病理产物, 相互搏结, 暗耗正气, 邪毒趁虚而入, 凝于肺脏, 久而为积, 肺癌乃成。蒋士卿教授^[5]提出肺癌的发生多以正虚为本, 痰瘀为标。国医大师周仲瑛教授^[16]提出“癌毒”学说, 认为癌毒与痰、瘀、湿等因素相互交结、互为因果、共同为病, 是肺癌发生的主要病机。综各家所言, 肺癌的中医病因病机主要从正气虚损、邪毒侵肺、痰瘀凝结三个方面论述^[17]。

QFXJ 由金荞麦、炒芥子、黄芪、黄芩、薏苡仁等药组成。方中金荞麦辛凉入肺, 清热解毒、化痰祛瘀, 炒芥子辛温入肺, 利气豁痰, 此二药一温一凉, 可清肺经痰邪, 化肺中瘀毒, 共为君药; 黄芪甘温, 归肺脾经, 既益脾气, 又补肺气, 扶正固本, 为臣药; 肺中痰邪由脾而生, 治肺不治脾, 非其治也, 苡仁甘寒, 健脾利湿, 解毒散结, 黄芩苦寒, 清热燥湿, 此两味药皆归肺脾经, 一燥一利, 宣畅肺脾气机, 燥湿健脾散结, 以消除积聚之源, 共为佐药; 甘草、生姜、大枣调和营卫, 补益脾胃, 调和诸药, 共为使药。全方攻补共施, 寒温并用, 诸药共奏化痰散结、清肺益气之功。本方既顾及了肺癌以正气亏虚为本的疾病特点, 又可兼顾痰、热、瘀、毒各个病理环节, 紧扣肺癌病机, 临床疗效显著。

本研究主要采用 WB 法测定各组 Lewis 肺癌小鼠肿瘤组织中 PI3K/AKT 通路关键蛋白与凋亡相关蛋白的表达, 结果表明 QFXJ 可以降低通路关键蛋白 PI3K、p-AKT 的表达, 可以提高促凋亡蛋白 Bax 与

Caspase-3 的表达,降低抑凋亡蛋白 Bcl-2 的表达;用 TUNEL 检测法观察细胞凋亡情况,发现 QFXJ 可以增加肿瘤细胞的凋亡;各组小鼠肿瘤组织的病理差异也说明,QFXJ 可以促进肿瘤细胞凋亡,降低肿瘤细胞密度;同时各组肺癌小鼠肿瘤的体积、瘤重与抑瘤率结果也证明,QFXJ 对肿瘤组织的生长具有抑制作用,且 QFXJ 中剂量与高剂量组抑制作用比较明显。综上所述,QFXJ 可能通过抑制 PI3K/AKT 通路的活化,上调促凋亡蛋白 Bax、Caspase-3 的表达,下调抑凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,从而促进肺癌细胞凋亡。

参考文献:

- 1 Sung H,Ferlay J,Siegel RL,et al.Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J].CA Cancer J Clin,2021,71:209-249.
- 2 Zhang X,Liu S,Liu Y,et al.Economic burden for lung cancer survivors in urban China[J].Int J Environ Res Public Health,2017,14:300-308.
- 3 Zhang Y,Hou W,Lin HS.Clinical research results and reflections on the treatment of malignant tumors with traditional Chinese medicine[J].J Tradit Chin Med(中医杂志),2014,55:523-525.
- 4 Wang XQ,Hou W,Zheng JB,et al.Comprehensive traditional Chinese medicine therapeutic scheme in maintenance treatment for advanced non-small cell lung cancer:a multicenter,large-sample and prospective cohort study[J].J Tradit Chin Med(中医杂志),2020,61:690-694.
- 5 Du RX,Zhang MZ,Jiang SQ,et al.Medical experience of professor Jiang Shiqing in treating lung cancer from the deficiency of healthy qi and phlegm and blood stasis[J].Acta Chin Med(中医学报),2017,32:2294-2296.
- 6 Nürnberg B,Beer-Hammer S.Function,regulation and biological roles of PI3K γ variants[J].Biomolecules,2019,9: 417-427.
- 7 Yu JS,Cui W.Proliferation,survival and metabolism: the role of PI3K/Akt/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination[J].Development,2016,143:3050-3060.
- 8 Zhong JL,Zheng L,He H,et al.Research progress of biological regulatory mechanism related to PI3K/Akt signal pathway[J].Genomics App Biol(基因组学与应用生物学),2019,38:143-147.
- 9 Pisick E,Jagadeesh S,Salgia R.Receptor tyrosine kinases and inhibitors in lung cancer[J].Sci Wor J,2004,4:589-604.
- 10 Tan AC.Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in non-small cell lung cancer (NSCLC)[J].Thorac Cancer,2020,11: 511-518.
- 11 Malanga D,Scrima M,De Marco C,et al.Activating E17K mutation in the gene encoding the protein kinase AKT1 in a subset of squamous cell carcinoma of the lung[J].Cell Cycle,2008,7:665-669.
- 12 Tong X,Tang R,Xiao M,et al.Targeting cell death pathways for cancer therapy: recent developments in necroptosis, pyroptosis, ferroptosis, and cuproptosis research[J].J Hematol Oncol,2022,15:174.

- 13 Shah MA,Kang JB,Kim MO,et al.Chlorogenic acid alleviates the reduction of Akt and Bad phosphorylation and of phospho-Bad and 14-3-3 binding in an animal model of stroke[J].J Vet Sci,2022,23:e84.
- 14 Simonyan L,Gonin M,Hanks J,et al.Non-phosphorylatable mutants of Ser184 lead to incomplete activation of Bax[J].Front Oncol,2023,12:1068994.
- 15 Huang XL,Cui GH,Zhou KY.Correlation of PI3K-Akt signal pathway to apoptosis of tumor cells[J].Chin J Cancer(癌症),2008:331-336.
- 16 Wang JY,Cheng HB.Analyses on the pathogenesis theory of cancer toxin and consolidating bodyresistance and clearing the source theory[J].Chin J Tradit Chin Med(中华中医药杂志),2019,34:4687-4690.
- 17 Zhang XX,Li ZG.Discussion on TCM etiology and pathogenesis of lung cancer[J].Chin J Tradit Chin Med(中华中医药杂志),2015,30:3447-3449.

收稿日期: 2024-08-19 接受日期: xxxx-xx-xx

基金项目:河南省自然科学基金项目(232300420055),张仲景传承与创新专项课题(GZY-KJS-2022-038-2),河南省中医药文化与管理研究项目(TCM2022002)

*通信作者: Tel: 13607640006; E-mail: Jiangshiqing66@126.com