

引用:胡玉田,潘博,傅剑锋,潘敏求.基于Wnt/ β -catenin信号通路探讨加味肺复方对肺腺癌A549细胞荷瘤裸鼠的影响[J].中医导报,2025,31(12):8-13,74.

基于Wnt/ β -catenin信号通路探讨加味肺复方对肺腺癌A549细胞荷瘤裸鼠的影响*

胡玉田¹,潘博²,傅剑锋²,潘敏求²

(1.湖南中医药大学第一附属医院,湖南 长沙 410007;

2.湖南省中西医结合医院,湖南 长沙 410006)

[摘要] 目的:探讨加味肺复方对肺腺癌A549细胞荷瘤裸鼠瘤体及Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin)信号通路的影响。方法:从65只BALB/c-nu裸鼠中随机抽取10只作为空白对照组,剩余55只裸鼠右前肢腋下接种人肺腺癌系A549细胞,建立荷瘤小鼠模型。将50只荷瘤小鼠模型随机分为模型组(蒸馏水)、加味肺复方低剂量组、加味肺复方中剂量组、加味肺复方高剂量组及阳性组(顺铂),每组10只。测量瘤体体积和瘤体质量。采用蛋白质印迹法(Western blotting)检测裸鼠瘤体组织 β -catenin表达水平;采用实时荧光定量PCR(qPCR)检测裸鼠瘤体组织髓细胞增生原癌基因(c-Myc) mRNA、c-jun mRNA、细胞周期素D1(CyclinD1) mRNA表达水平。结果:加味肺复方中剂量组、加味肺复方高剂量组及阳性组裸鼠瘤体体积及瘤体质量均低于模型组($P<0.01$ 或 $P<0.05$);加味肺复方低剂量组裸鼠瘤体体积及瘤体质量与模型组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。加味肺复方高剂量组、阳性组裸鼠瘤体组织c-Myc mRNA、c-jun mRNA、Cyclin D1 mRNA相对表达量均低于模型组($P<0.01$ 或 $P<0.05$);加味肺复方中、低剂量组裸鼠瘤体组织c-Myc mRNA、c-jun mRNA、Cyclin D1 mRNA相对表达量与模型组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。加味肺复方低剂量组、加味肺复方中剂量组、加味肺复方高剂量组及阳性组裸鼠 β -catenin蛋白相对表达量均低于模型组($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结论:加味肺复方可抑制肺腺癌A549细胞荷瘤裸鼠瘤体生长,且抑瘤效果具有浓度依赖性,其机制可能与调节Wnt/ β -catenin信号通路有关。

[关键词] 肺腺癌;加味肺复方;A549细胞;Wnt/ β -catenin信号通路;裸鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2025)12-0008-06

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.12.002

Exploring the Effects of Jiawei Feifu Formula (加味肺复方) on Nude Mice Bearing Lung Adenocarcinoma A549 Cells Based on the Wnt/ β -catenin Signaling Pathway

HU Yutian¹, PAN Bo², FU Jianfeng², PAN Minqiu²

(1.The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan 410007, China;

2.Hunan Provincial Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Changsha Hunan 410006, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effects of Jiawei Feifu formula on tumor growth and the Wnt/ β -catenin signaling pathway in nude mice bearing lung adenocarcinoma A549 cells. Methods: Totally 65 BALB/c-nu nude mice were used in the study, and 10 mice were randomly selected as the blank control group. The remaining 55 mice were inoculated with the human lung adenocarcinoma A549 cells subcutaneously in the right axillary fossa to establish the tumor-bearing mouse model. The 50 BALB/c-nu mice were divided into model group (distilled water), Jiawei Feifu formula low dose group, Jiawei Feifu formula medium dose group, Jiawei Feifu formula high dose group, and positive control group (cisplatin), 10 mice in each. The tumor volume and weight were assessed. Western blotting (WB) was employed to detect the expression levels of β -catenin nuclear protein. Quantitative real-time PCR (qPCR) was used to detect the expression levels of c-Myc mRNA, c-jun mRNA, and CyclinD1 mRNA. Results: The Jiawei Feifu formula medium dose group, Jiawei Feifu formula high dose group, and positive control group showed lower tumor volume and tumor weight than model group ($P<0.01$

*基金项目:国家中医药管理局第四届国医大师潘敏求传承工作室(国中医药办人教函[2022]245号)

通信作者:潘博,男,主任医师,研究方向为中西医结合防治肺癌、乳腺癌、肝癌、胃癌、肠癌、前列腺癌等恶性肿瘤

or $P<0.05$). No statistically significant difference was observed in tumor volume or tumor mass between the Jiawei Feifu formula low dose group and model group in nude mice ($P>0.05$). The Jiawei Feifu formula high dose group, and positive control group showed lower relative expression levels of c-Myc mRNA, c-jun mRNA and Cyclin D1 mRNA than model group ($P<0.01$ or $P<0.05$). Compared with the model group, there were no statistically significant differences in the relative expression levels of c-Myc mRNA, c-jun mRNA and Cyclin D1 mRNA in the Jiawei Feifu formula low dose group, and Jiawei Feifu formula medium dose group ($P>0.05$). The Jiawei Feifu formula low dose group, Jiawei Feifu formula medium dose group, Jiawei Feifu formula high dose group, and positive control group showed lower relative expression levels of β -catenin than model group ($P<0.01$ or $P<0.05$). Conclusion: Jiawei Feifu formula can inhibit tumor growth in mice bearing lung adenocarcinoma A549 cells, and the tumor-inhibiting effect is concentration-dependent. Its mechanism may be related to the regulation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway.

[Keywords] lung adenocarcinoma; Jiawei Feifu formula; A549 cells; Wnt/ β -catenin; signaling pathway; nude mice

癌症是人类死亡的首要病因,而肺癌的发病率和致死率在所有癌症中均居首位^[1]。根据我国2022年公布数据,肺癌新发病例106.06万例,死亡病例73.33万例,肺癌已成为我国死亡的主要原因之一^[2]。近年来,随着医疗技术的不断发展,肺癌的5年生存率有所提升,但其死亡率仍旧居高不下。肺癌患病人数日益增长,已严重影响我国居民的身体健康,加之早期诊断的不足,其临床治愈率不足20%^[3]。因此,提高其临床治愈率为肺癌治疗的重中之重。

目前分子靶向治疗在肺腺癌的治疗中具有较好前景,Notch、Hedgehog、Wnt等与非小细胞肺癌(non-small cell lung cancers, NSCLC)相关的信号通路为目前研究热点^[4]。Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin)信号通路的活化在NSCLC的发生发展过程中起着至关重要的调控作用,该通路与肿瘤组织的生长、代谢、增殖、侵袭和转移息息相关^[5]。其大致机理为某些肺腺癌相关因素激活机体Wnt/ β -catenin信号通路的相关配体,导致机体发生一系列生化反应。细胞内 β -catenin无法降解而不断累积后进入细胞核中与相关细胞因子结合,激活髓细胞增生原癌基因(cellular myelocytomatosis, c-Myc)、c-jun、细胞周期素D1(Cyclin D1)等相关靶基因,从而促进肿瘤细胞的无限增殖。

加味肺复方是潘博在潘敏求教授肺复方的基础上结合多年的临床经验拟定的复方。该方在肺复方的基础上加强了清热解毒、活血散瘀、消肿散结之力,进一步提升了治疗肺腺癌的临床疗效。中药复方治疗肿瘤机制复杂,揭示其治疗肿瘤的机制具有重要意义。加味肺复方可消减肺腺癌实体瘤,延长肺腺癌患者生存期、提高其生存质量。本研究拟从体内实验水平探讨加味肺复方对肺腺癌A549细胞荷瘤裸鼠瘤体及Wnt/ β -catenin信号通路的影响。

1 材料与方法

1.1 实验细胞 人肺腺癌A549细胞由中国科学院干细胞库提供,目录号:TCHu150。

1.2 实验动物 65只SPF级裸鼠,6~8周龄,雄性,体质量(20 ± 2)g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。实验动物生产许可证号:SYXK(湘)2015-0016;实验动物质量合格证号:430726201100347381。实验过程中所有裸鼠均于湖南省中医

药研究院实验动物房饲养,温度(25 ± 1)℃,相对湿度(50 ± 5)%,室内定期进行紫外线照射,于人工光照周期、自由进食条件下适应性饲养1周。本实验经湖南省中医药研究院实验动物伦理委员会批准(伦理审查编号:IACUCC47011)。

1.3 药物与试剂 加味肺复方组成:西洋参6 g,茯苓10 g,白术10 g,黄芪30 g,陈皮10 g,桔梗10 g,枸杞子10 g,麦冬10 g,鸡内金5 g,莪术9 g,全蝎3 g,白花蛇舌草50 g,半枝莲50 g,石见穿50 g,甘草5 g。中药饮片均购于湖南省中医药研究院附属医院中药房,经田其学主任药师鉴定为正品。质量标准符合2020年版《中华人民共和国药典》相关要求。取适量蒸馏水浸泡药材1 h后用纱布过滤,一煎加入400 mL蒸馏水,武火加热至沸腾,转文火煎煮40 min后过滤。药渣冷却二煎加入400 mL蒸馏水,重复上述方法再煎煮1次。将2次煎煮药液充分混合过滤,减压蒸发浓缩成质量浓度为3.48 g/mL的药液,放于4℃冰箱内保存待用。灌胃前预热药液至室温。

BCA蛋白定量检测试剂盒(批号:CR2006149-1)、RIPA裂解液(批号:CR200603S)、RNA提取液(批号:CR2011013)、Servicebio®逆转录第一链cDNA合成试剂盒(批号:CR2004001)、2×SYBR Green qPCR Master Mix(none ROX)(批号:MPC2010006)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司; β -catenin鼠单抗(批号:YM3404)、 β -actin鼠单抗(批号:YM3028)、组蛋白H3(Histone H3)鼠单抗(批号:YM3418)均购自美国Immunoway公司。

1.4 主要仪器 病理切片机(上海徕卡仪器有限公司,型号:RM-2016);酶标检测仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司,型号:Rt-2100c);冷冻离心机(力康生物医疗科技有限公司,型号:Neofuge 13R);掌上离心机(型号:D1008E)、涡旋混合器(型号:MX-F)、磁力搅拌器(型号:MS-PB)及脱色摇床(型号:TSY-B)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;电泳仪(北京六一生物科技有限公司,型号:DYY-6C);暗匣(广东粤华医疗器械厂有限公司,型号:AX-II);扫描仪(精工爱普生公司,型号:V300);荧光定量PCR仪(美国Bio-Rad Laboratories,型号:CFX)。

1.5 造模与分组 将液氮罐中冻存的人肺腺癌A549细胞解冻、离心,取细胞沉淀制成细胞混悬液置于37℃,5%CO₂培养

箱中进行培养。当细胞扩增至54瓶T75培养瓶时,进行细胞的收集与计数。将收集的细胞混悬液离心完毕后,根据细胞计数结果,加入磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)调整细胞浓度至 4×10^7 个/mL,轻轻吹打均匀成细胞混悬液备用。从65只裸鼠中随机抽取10只小鼠作为空白对照组,其余55只裸鼠右前肢腋下接种人肺腺癌系A549细胞。取制备的细胞混悬液0.1 mL(约 4×10^6 个瘤细胞),注射入裸鼠右前肢腋下,14 d后,随机抽取5只小鼠,用10%水合氯醛麻醉后解剖,完整剥离瘤体组织制成石蜡切片后,进行显微镜镜检,采集图像分析。荷瘤小鼠模型建立成功标准:(1)小鼠右前肢腋下可触及皮下瘤体。(2)镜下观察剥离瘤体可见肿瘤细胞^[6]。

将50只荷瘤裸鼠随机分为模型组、加味肺复方低剂量组、加味肺复方中剂量组、加味肺复方高剂量组、阳性组,每组10只,常规饲养。

1.6 实验给药 药物剂量换算参照《动物实验方法学》^[7]体表面积换算法:裸鼠剂量=系数(9.1)×成人药量/人体质量,以70 kg成人每天服用剂量折算成裸鼠等效剂量作为灌胃剂量;加味肺复方中剂量组按成人用药量与体表面积换算后的剂量给药,即34.84 g/kg,给药体积为0.4 mL。加味肺复方低、中、高剂量组剂量比为1:2:4。

空白对照组裸鼠自由进食;阳性组裸鼠予顺铂4.00 mg/kg(0.4 mg/mL)腹腔注射,0.2 mL/次,每3 d给药1次,共4次;模型组裸鼠予以蒸馏水灌胃,加味肺复方低、中、高剂量组分别予低剂量(17.42 g/kg)、中剂量(34.84 g/kg)、高剂量(69.68 g/kg)加味肺复方灌胃,0.2 mL/次,2次/d,共14 d。

1.7 观察指标

1.7.1 瘤体体积和瘤体质量 末次给药2 h后用10%水合氯醛麻醉后将裸鼠脱颈处死,解剖裸鼠后将右前肢腋下肿瘤组织完整剥离,测量瘤体体积和瘤体质量。

1.7.2 瘤体组织c-Myc mRNA、c-jun mRNA、Cyclin D1 mRNA表达水平 采用qPCR检测瘤体组织c-Myc mRNA、c-jun mRNA、Cyclin D1 mRNA表达水平。研磨消化离心瘤体组织,按照TRIzol法提取瘤体组织的总RNA,在测定RNA浓度后,按试剂盒说明书操作,使用逆转录试剂盒生成cDNA后进行扩增。反应体系为:2×qPCR Mix、目标基因的上下游引物及逆转录产物。PCR程序为:95℃预变性3 min,进行40个循环(95℃ 15 s, 60℃ 60 s)。GAPDH用于内参对照, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算各基因相对表达量。引物序列见表1。

表 1 引物序列

目的基因	引物序列(5'-3')	扩增产物片段长度/bp
c-Myc	上游引物:GTCTTTCCTACCCGCTCAA	231
	下游引物:TTGCTCTTCTCCACAGACACC	
c-jun	上游引物:ATGGGCACATCACCCTACACC	276
	下游引物:TGAAGTTGCTGAGGTTGGCGTA	
Cyclin D1	上游引物:GCCCTTGAAGAAGACCCGC	327
	下游引物:GAGGCTGGGTTGGAAATGAA	
GAPDH	上游引物:CCTCGTCCCGTAGACAAATG	133
	下游引物:TGAGTCAATGAAGGGTCCT	

1.7.3 瘤体组织β-catenin蛋白表达水平 采用Western blotting检测瘤体组织β-catenin蛋白表达水平。将瘤体组织洗净后剪成细小碎片,将细胞浆蛋白抽提试剂A和B按20:1的比例混合加入1 mmol/L的苯甲磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride or phenylmethylsulfonyl fluorid,PMSF),配制组织匀浆液,4℃条件下,在玻璃匀浆器中按照每60 mg组织加入200 μL组织匀浆液的比例混合后充分匀浆。将匀浆液冰浴放置15 min,4℃,1 200 r/min(离心半径10 cm)离心3 min,移出上清液。将沉淀按照每20 μL细胞沉淀加入200 μL添加了PMSF的细胞浆蛋白抽提试剂A。震荡冰浴后加入10 μL细胞浆蛋白抽提试剂B,再次冰浴、震荡,在4℃条件下15 000×g离心5 min,完全吸尽上清液,加入50 μL添加了PMSF的细胞核蛋白抽提试剂。以最高速剧烈震荡使细胞沉淀完全悬浮并分散开。冰浴,每隔1~2 min再高速剧烈震荡15~30 s,共30 min预冷离心管,在4℃条件下16 000×g离心10 min。立即吸取上清液至离心管中,即为抽提得到的细胞核蛋白。

取96孔板,配制BCA工作液[V(试剂A):V(试剂B)=50:1]。将BSA标准品及上述备用蛋白样品稀释后各取15 μL分别加入至标记好的孔板微孔中。然后在各孔中加入150 μL上述配置好的BCA工作液,使其充分混合均匀。在37℃条件下放置30 min。使用酶标仪测定在570 nm处的OD值,同时计算上述蛋白样品的蛋白浓度。继而按Western blotting操作步骤进行电泳、转膜、封闭、洗膜及一抗、二抗孵育等过程,最后使用ECL液对膜带进行化学发光检测。

1.8 统计学方法 用SPSS 25.0统计软件及R语言软件进行统计学分析。计量资料符合正态分布且方差齐,计量资料采用“均数±标准差”($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析(one-way ANOVA),若不符合正态分布,采用Kruskal-Wallis H检验,若检验结果具有统计学意义,进行Bonferroni校正成对Mann-Whitney U检验;重复测量计量资料若符合正态分布、方差齐性、球对称性,采用重复测量资料的方差分析,若计量资料符合正态分布、方差齐性,但不满足球对称性时,采用重复测量资料的方差分析并获取自由度校正结果(格林豪斯-盖斯勒,Greenhouse-Geisser),同时采用R语言软件混合线性模型进行校验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 A549荷瘤小鼠模型的建立 皮下注射肺腺癌A549细胞悬液14 d后,随机抽取5只小鼠判断是否成功建立模型。5只小鼠右前肢腋下可触及皮下瘤体,完整剥离小鼠右前肢腋下瘤体。HE染色显示,瘤体组织中肿瘤细胞胞核异型、核质比高,核仁不明显,多见核分裂相(黑色箭头);组织边缘可见少量炎症细胞浸润(蓝色箭头),与周围组织融合形成无结构的嗜酸性物(红色箭头)(见图1)。肺腺癌A549细胞荷瘤小鼠模型建立成功。

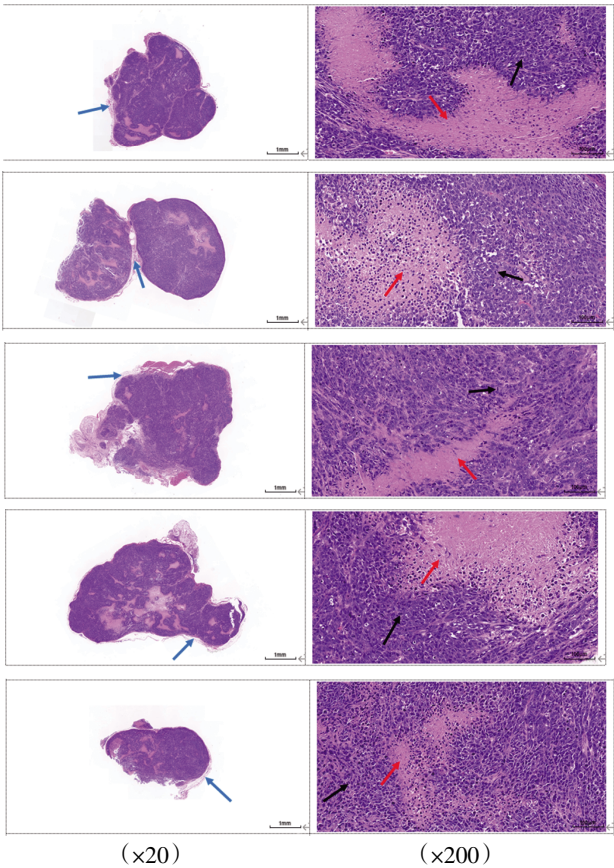


图1 病理切片 (HE)

2.2 各组裸鼠瘤体体积和瘤体质量比较 所有裸鼠瘤体体积不同时间节点比较,差异有统计学意义($P<0.01$),即存在时间效应,各组均如此。模型组、加味肺复方低剂量组、加味肺复方中剂量组、加味肺复方高剂量组裸鼠瘤体体积均呈逐渐增加的趋势;阳性组裸鼠瘤体体积呈先缩小后逐渐增加的趋势,其中第4天裸鼠瘤体体积最小。5组裸鼠瘤体体积总体比较,差异有统计学意义($P<0.01$),即存在分组效应。同一时间节点,5组裸鼠瘤体体积比较,差异均有统计学意义($P<0.01$)。第4、7天,加味肺复方低剂量组裸鼠瘤体体积小于模型组($P<0.05$);第7、10、14天,加味肺复方中剂量组裸鼠瘤体体积小于模型组($P<0.05$);第4、7、10、14天,加味肺复方高剂量组与阳性组裸鼠瘤体体积小于模型组($P<0.05$);时间与分组因素存在交互效应($P<0.05$),即各组裸鼠瘤体体积增加幅度不

一致。(见表2、图2)

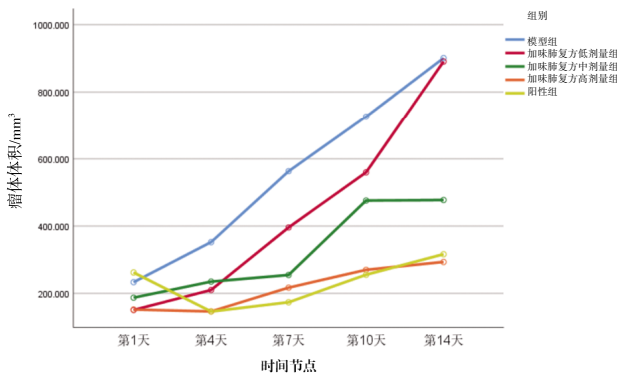


图2 各组裸鼠瘤体体积交互效应轮廓图

加味肺复方中剂量组、加味肺复方高剂量组、阳性组裸鼠瘤体质量均低于模型组,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$);加味肺复方低剂量组裸鼠瘤体质量与模型组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。(见表3)

表3 各组裸鼠瘤体质量比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	给药剂量	瘤体质量/g
模型组	10		0.904±0.345
加味肺复方低剂量组	10	17.42 g/kg	0.614±0.290
加味肺复方中剂量组	10	34.84 g/kg	0.490±0.415 ^a
加味肺复方高剂量组	10	69.68 g/kg	0.400±0.504 ^a
阳性组	10	4.00 mg/kg	0.250±0.655 ^b
F			4.924
P			0.005

注:与模型组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。

2.3 各组裸鼠瘤体组织c-Myc mRNA、c-jun mRNA、Cyclin D1 mRNA相对表达量比较 加味肺复方高剂量组、阳性组裸鼠瘤体组织c-Myc mRNA、c-jun mRNA、Cyclin D1 mRNA相对表达量均低于模型组,差异均有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$);加味肺复方中、低剂量组裸鼠瘤体组织c-Myc mRNA、c-jun mRNA、Cyclin D1 mRNA相对表达量与模型组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。(见表4)

2.4 各组裸鼠瘤体组织β-catenin蛋白相对表达量比较 加味肺复方低剂量组、加味肺复方中剂量组、加味肺复方高剂量组、阳性组裸鼠瘤体组织β-catenin蛋白相对表达量均低于模型组,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。(见图3、表5)

表2 各组裸鼠瘤体体积比较 ($\bar{x}\pm s$, mm³)

组别	n	给药剂量	第1天	第4天	第7天	第10天	第14天	F	P
模型组	10		233.252±64.015	352.256±83.325	563.032±124.960	726.343±166.017	900.867±203.207	118.634	0.000
加味肺复方低剂量组	10	17.42 g/kg	150.668±73.075	210.058±85.025 ^a	395.908±115.669 ^a	559.698±76.966	890.628±342.115	32.960	0.000
加味肺复方中剂量组	10	34.84 g/kg	187.260±72.394	234.958±146.735	254.637±145.142 ^a	475.838±204.522 ^a	477.432±238.537 ^{ab}	6.808	0.004
加味肺复方高剂量组	10	69.68 g/kg	151.951±80.720	146.354±47.549 ^a	216.947±107.848 ^{ab}	270.017±126.266 ^{abc}	293.354±171.388 ^{ab}	5.501	0.003
阳性组	10	4.00 mg/kg	262.061±32.823 ^{bd}	146.111±74.876 ^a	173.648±85.868 ^{ab}	255.488±106.63 ^{abc}	316.297±101.743 ^{ab}	6.130	0.001
F			5.510	8.227	18.304	19.368	17.727		
P			0.001	0.000	0.000	0.000	0.000		

注: F_{时间主效应}=82.835, P_{时间主效应}=0.000; F_{分组主效应}=29.167, P_{分组主效应}=.0010; F_{交互效应}=9.716, P_{交互效应}=0.000;与模型组比较,^a $P<0.05$;与加味肺复方低剂量组比较,^b $P<0.05$;与加味肺复方中剂量组比较,^c $P<0.05$;与加味肺复方高剂量组比较,^d $P<0.05$ 。

表 4 各组裸鼠瘤体组织 c-Myc mRNA、c-jun mRNA、Cyclin D1 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	给药剂量	c-Myc mRNA	c-jun mRNA	Cyclin D1 mRNA
模型组	10		1.037 ± 0.006	1.130 ± 0.100	1.103 ± 0.090
加味肺复方低剂量组	10	17.42 g/kg	1.030 ± 0.006	1.093 ± 0.036	1.090 ± 0.133
加味肺复方中剂量组	10	34.84 g/kg	1.027 ± 0.010	1.100 ± 0.030	1.013 ± 0.009
加味肺复方高剂量组	10	69.68 g/kg	0.706 ± 0.330 ^a	0.746 ± 0.383 ^b	0.353 ± 0.089 ^a
阳性组	10	4.00 mg/kg	0.573 ± 0.463 ^b	0.460 ± 0.670 ^b	0.510 ± 0.089 ^b
H			10.452	10.894	11.220
P			0.033	0.028	0.024

注：与模型组，^aP<0.05，^bP<0.01。

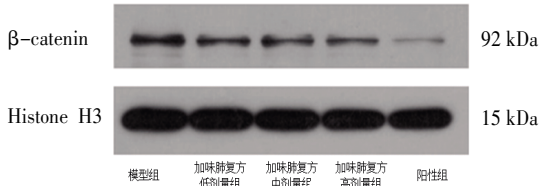


图 3 各组裸鼠瘤体组织 β-catenin 蛋白表达

Western blotting 图

表 5 各组裸鼠瘤体组织 β-catenin 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	给药剂量	β-catenin
模型组	10		0.379±0.035
加味肺复方低剂量组	10	17.42 g/kg	0.258±0.121 ^a
加味肺复方中剂量组	10	34.84 g/kg	0.227±0.152 ^b
加味肺复方高剂量组	10	69.68 g/kg	0.177±0.202 ^b
阳性组	10	4.00 mg/kg	0.061±0.318 ^b
H			13.057
P			0.011

注：与模型组比较，^aP<0.05，^bP<0.01。

3 讨 论

肺腺癌为常见的肺癌类型，其发病具有隐匿性，多数患者在初次就诊时已处于疾病晚期^[9]。目前肺腺癌的主流治疗手段包括手术切除、放疗、化疗等方式，但具有易复发、副反应大和耐药等缺陷，严重影响疗效^[9]。目前，随着分子靶向技术的不断发展，大量的实验及临床数据表明分子靶向治疗已成为肺腺癌的最佳治疗方案之一。然而，靶向药物随着药物作用时间的延长，耐药性的出现不可避免。表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI)耐药的原因包括T790M突变、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)扩增、间质表皮转化因子(mesenchymal-epithelial transition factor, MET)扩增、磷脂酰肌醇4,5-二磷酸3-激酶催化亚基α(phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha, PIK3CA)突变、丝氨酸/苏氨酸激酶(serine/threonine kinase proteins, BRAF)突变、小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)转换。耐药性可导致肿瘤进展，且部分患者治疗过程中可能出现皮肤黏膜损伤、间质性肺炎、间质纤维化及肝损伤等情况^[10]，严重者甚至会危及生命。中药作为天然产物，对机体副作用小，且目前研究表明中药联合其他治

疗方案可以明显提高临床疗效，在减轻其他治疗手段带来的毒副作用、延长患者生存期、提高患者的生存质量方面有着独特的优势。随着现代医学对中医药的研究越来越深入，许多中药成分在逆转肿瘤耐药问题上显示出增效减毒的功效^[11]。中医药治疗肿瘤的疗效越来越显著，这也为肺癌的治疗开辟新路径提供了思路^[12]。

肺癌在中医学中属“肺积”“息贲”等范畴。古代医家认为本病病因为正气虚衰和癌毒累积，应以扶正祛邪为基本治则^[13]。脾为生痰之源，肺为储痰之器。痰湿内生，无力运化，积聚于肺中，更损肺气。肺肾金水相生，肺之阴阳虚损可累及肾之阴阳。肺损及肾，反之肾之阴阳虚损亦可进一步造成肺之虚损。肺为气之主，肾为气之根。肺肾虚损，阴阳不交，则呼吸不和。《黄帝内经》云：“邪之所凑，其气必虚。”潘博教授认为，肺癌的主要病机为气阴两虚，邪毒蕴肺。机体正气虚弱，感受外来邪毒。邪毒入体积聚于肺，阻滞肺气，导致肺宣降失司，津液输布失常，结聚为痰。痰邪互结，日久成瘀，聚集于肺中而形成肿块。痰瘀日久，进一步损伤正气。正气虚损，无力与邪毒抗争，导致邪毒逐渐向肺外蔓延。金水相生，肺气虚损累及肾阴、肾阳。脾为后天之本，主运化，为气血生化之源，故该病治疗应以补益脾肾为主，顾护正气，同时辅以解毒散结、活血祛瘀之法以攻癌毒。加味肺复方中西洋参、黄芪、枸杞子、麦冬养护肺肾之阴，补益脾胃之气，一方面匡扶正气祛除邪毒，另一方面防祛邪克敌之时碍正气；茯苓、白术益气健脾燥湿；鸡内金健胃消食，使后天之精化生有源；莪术、全蝎、白花蛇舌草、半枝莲、石见穿软坚散结，活血祛瘀，清热解毒，以攻克癌结；陈皮行气，一方面助活血祛瘀之效，另一方面防补益之品滋腻生邪；桔梗入肺经，引诸药之力达肺；甘草调和诸药。潘博教授临床上通过逐步增加药物剂量，在加大祛除癌毒力度的同时降低了因骤然攻邪之品药力过猛而出现机体不耐受的情况。全方攻补兼施，祛邪不伤正，补益不助邪。

Wnt信号通路在细胞稳态、发育、再生过程具有重要作用^[14]。其根据传递方式的不同分为Wnt/β-catenin经典通路、Wnt/Ca²⁺通路和Wnt/PCP通路^[15]。其中Wnt/β-catenin经典通路与非小细胞肺癌^[16]、乳腺癌^[17]、肝癌^[18]等多种人类恶性肿瘤的发生发展密切相关，在细胞增殖周期、免疫周期及细胞的昼夜节律3个循环过程中起着核心作用^[9]。机体细胞处于正常状态时，Wnt/β-catenin通路处于静息状态或者未激活状态。机体受到某种刺激时，Wnt1、Wnt2及Wnt3等配体激活，产生的Wnt蛋白能与低密度脂蛋白受体相关蛋白5/6和卷曲蛋白相结合。三者形成多元复合物，激活蓬乱蛋白，并在蓬乱蛋白的作用下促使糖原合成激酶(glycogen synthase kinase-3, GSK-3β)磷酸化，破坏由酪蛋白激酶(casein kinase, CK1)、GSK-3β、结直肠腺瘤息肉蛋白(adenomatous polyposis coli, APC)及支架蛋白(scaffold protein, Axin)结合形成的复合物，使β-catenin无法磷酸化从而不能被泛素-蛋白酶体系(Proteasome)降解。这些非磷酸化β-catenin在细胞中累积后，胞质中浓度增高的β-catenin随即进入细胞核并与淋巴样增强因子和T细胞因子复合物结合，进而激活c-Myc、c-jun、Cyclin D1等靶基因的表达^[20-23]，诱导癌细胞转化，激活癌细胞的自我更新，促进肿瘤细胞的

侵袭和转移^[24-25]。正常情况下机体不存在Wnt蛋白,低密度脂蛋白受体相关蛋白5/6和卷曲蛋白无法与Wnt蛋白相结合形成多元复合物。 β -catenin与由GSK-3 β 、APC及Axin组成的破坏复合物结合后,GSK-3 β 使 β -catenin磷酸化,从而引发其被蛋白酶体降解,使得胞质内 β -catenin浓度降低,导致 β -catenin无法进入细胞核内而启动靶基因转录^[26]。有研究发现,c-Myc基因在肺腺癌中表达上调,其高表达与肺腺癌的进展及患者预后不良密切相关^[27]。 β -catenin蛋白为激活靶基因的关键蛋白,c-Myc、c-jun、Cyclin D1为激活靶基因的下游靶基因。为了进一步探讨加味肺复方治疗肺腺癌的机制,本研究基于 β -catenin信号通路,检测了 β -catenin蛋白及c-Myc、c-jun、Cyclin D1基因的表达式。结果显示加味肺复方可以抑制瘤体生长,降低 β -catenin蛋白的表达,且其效果具有浓度依赖性。加味肺复方可以下调c-Myc mRNA、c-jun mRNA、Cyclin D1 mRNA表达。加味肺复方治疗肺腺癌的机制可能与降低 β -catenin蛋白表达,下调靶基因c-Myc、c-jun、CyclinD1的表达,进而抑制瘤体生长有关。

综上所述,加味肺复方能抑制肺腺癌A549细胞荷瘤裸鼠瘤体生长,降低 β -catenin蛋白表达,下调c-Myc mRNA、c-jun mRNA、CyclinD1 mRNA表达。

参考文献

- [1] 温晓梨,蔡芳燕,刘凌,等.中药调控代谢重编程治疗肺癌的研究进展[J/OL].中国实验方剂学杂志,2024;1-16(2024-12-19). <https://link.cnki.net/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.20250326>.
- [2] 郑荣寿,陈茹,韩冰峰,等.2022年中国恶性肿瘤流行情况分析[J].中华肿瘤杂志,2024,46(3):221-231.
- [3] 李仪,赵洁,王俊斌.长非编码RNA调控信号通路影响非小细胞肺癌的研究进展[J].齐齐哈尔医学院学报,2020,41(12):1517-1520.
- [4] 张兴宇,王见之.经典Wnt信号通路与非小细胞肺癌潜在治疗靶点的研究新进展[J].生命科学,2017,29(8):758-762.
- [5] NUSSE R, CLEVERS H. Wnt/ β -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities[J]. Cell,2017,169(6):985-999.
- [6] JAKUBOWSKA M, SNIEGOCKA M, PODGÓRSKA E, et al. Pulmonary metastases of the A549-derived lung adenocarcinoma tumors growing in nude mice. A multiple case study[J]. Acta Biochim Pol,2013,60(3):323-330.
- [7] 孙敬方.动物实验方法学[M].北京:人民卫生出版社,2001.
- [8] 陈璐,李长天,刘艳丽,等.肺腺癌分子生物标志物的研究进展[J].河北医药,2024,46(24):3795-3800.
- [9] KAST R E, HALATSCH M E, ROSELL R. OPALS: A new osimertinib adjunctive treatment of lung adenocarcinoma or glioblastoma using five repurposed drugs [J]. Cells,2021,10(5):1148.
- [10] 方晶,胡丽丽,常冬妹,等.螺旋断层调强根治性放疗联合靶向治疗对IV期非小细胞肺癌疗效的初步分析[J].肿瘤研究与临床,2016,28(3):158-161.
- [11] 郝忠慧,赵辰辰,罗洋.非小细胞肺癌顺铂化疗耐药机制及最新进展[J].中国实验诊断学,2025,29(6):736-745.
- [12] 宋会颖,张虹.中医药治疗原发性支气管肺癌概况[J].河北中医,2018,40(10):1586-1590,1595.
- [13] 张志芸,葛倩,董国敏,等.参芪扶正注射液辅助治疗非小细胞肺癌的研究进展[J].生命的化学,2025,45(6):975-983.
- [14] MANKUZY P, DHARMARAJAN A, PERUMALSAMY L R, et al. The role of Wnt signaling in mesenchymal stromal cell-driven angiogenesis[J]. Tissue Cell,2023,85:102240.
- [15] SUN W M, TAO W, LI J C, et al. microRNA-296 functions as a tumor suppressor in breast cancer by targeting FGFR1 and regulating the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2019,23(23):10422-10432.
- [16] WANG Z X, ZHAO Y, YU Y, et al. Effects of lncRNA SNHG20 on proliferation and apoptosis of non-small cell lung cancer cells through Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2020,24(1):230-237.
- [17] SUN WM, TAO W, LI J C, et al. Micro RNA-296 functions as a tumor suppressor in breast cancer by targeting FGFR1 and regulating the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2019,23(23):10422-10432.
- [18] JIA Y, YANG Y S, LIU S, et al. SOX17 antagonizes WNT/ β -catenin signaling pathway in hepatocellular carcinoma[J]. Epigenetics,2010,5(8):743-749.
- [19] LECARPENTIER Y, SCHUSSLER O, HÉBERT J L, et al. Multiple targets of the canonical WNT/ β -catenin signaling in cancers[J]. Front Oncol,2019,9:1248.
- [20] TAO Z, ZHANG Y, ZHU S J, et al. Knockdown of PDRG1 could inhibit the Wnt signaling pathway in esophageal cancer cells[J]. Ann Clin Lab Sci,2019,49(6):794-803.
- [21] CHEN Z, WU W J, HUANG Y S, et al. RCC2 promotes breast cancer progression through regulation of Wnt signaling and inducing EMT[J]. J Cancer,2019,10(27):6837-6847.
- [22] LI H X, LI J M, HAN R B, et al. Deletion of tetraspanin CD151 alters the Wnt oncogene-induced mammary tumorigenesis: A cell type-linked function and signaling[J]. Neoplasia,2019,21(12):1151-1163.
- [23] DOUMPAS N, LAMPART F, ROBINSON M D, et al. TCF/LEF dependent and independent transcriptional regulation of Wnt/ β -catenin target genes[J]. EMBO J,2019,38(2):e98873.

(下转第74页)

- 肌细胞氧化应激损伤的影响[J].中国中医药信息杂志, 2025,32(6):86-92.
- [10] 黄淑敏,廖晓倩,范星宇,等.基于HMGB1/TLR4/NF- κ B信号通路探讨参附注射液对慢性心力衰竭大鼠的保护作用[J].中国中药杂志,2022,47(20):5556-5563.
- [11] LIAO M R, XIE Q, ZHAO Y Q, et al. Main active components of Si-Miao-Yong-An decoction (SMYAD) attenuate autophagy and apoptosis via the PDE5A-AKT and TLR4-NOX4 pathways in isoproterenol (ISO)-induced heart failure models[J]. Pharmacol Res,2022,176:106077.
- [12] 钟森杰,熊霞军,张倩,等.基于“方证对应”理论探讨主动脉弓缩窄致心力衰竭大鼠模型的中医证型与代谢标志物[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(16):130-139.
- [13] MAHENTHIRAN A, WILCOX J, WILSON TANG W H. Heart failure: A punch from the gut[J]. Curr Heart Fail Rep,2024,21(2):73-80.
- [14] KUO W T, ODENWALD M A, TURNER J R, et al. Tight junction proteins occludin and ZO-1 as regulators of epithelial proliferation and survival[J]. Ann N Y Acad Sci,2022,1514(1):21-33.
- [15] LEWIS C V, TAYLOR W R. Intestinal barrier dysfunction as a therapeutic target for cardiovascular disease[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2020,319(6): H1227-H1233.
- [16] ULLUWISHEWA D, ANDERSON R C, MCNABB W C, et al. Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components[J]. J Nutr,2011, 141(5):769-776.
- [17] WU Y Q, JHA R, LI A, et al. Probiotics (Lactobacillus plantarum HNU082) supplementation relieves ulcerative colitis by affecting intestinal barrier functions, immunity-related gene expression, gut microbiota, and metabolic pathways in mice[J]. Microbiol Spectr, 2022, 10 (6): e0165122.
- [18] KANG Y B, KANG X, YANG H, et al. Lactobacillus acidophilus ameliorates obesity in mice through modulation of gut microbiota dysbiosis and intestinal permeability[J]. Pharmacol Res,2022,175:106020.
- [19] WANG J, JI H F, WANG S X, et al. Probiotic Lactobacillus plantarum promotes intestinal barrier function by strengthening the epithelium and modulating gut microbiota[J]. Front Microbiol,2018,9:1953.
- [20] ZHAO X, ZHONG X Q, LIU X, et al. Therapeutic and improving function of lactobacilli in the prevention and treatment of cardiovascular-related diseases: A novel perspective from gut microbiota[J]. Front Nutr, 2021,8:693412.
- [21] ZHAO L B, XING C Y, SUN W Q, et al. Lactobacillus supplementation prevents cisplatin-induced cardiotoxicity possibly by inflammation inhibition[J]. Cancer Chemother Pharmacol,2018,82(6):999-1008.
- [22] WANG Y B, XIE Q H, SUN S, et al. Probiotics-fermented Massa Medicata Fermentata ameliorates weaning stress in piglets related to improving intestinal homeostasis[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102(24): 10713-10727.
- [23] WANG Y, XU L, LIU J H, et al. A high grain diet dynamically shifted the composition of mucosa-associated microbiota and induced mucosal injuries in the colon of sheep[J]. Front Microbiol,2017,8:2080.
- [24] PENA E, BRITO J, EL ALAM S, et al. Oxidative stress, kinase activity and inflammatory implications in right ventricular hypertrophy and heart failure under hypobaric hypoxia[J]. Int J Mol Sci,2020,21(17):6421.
- [25] KOETH R A, WANG Z N, LEVISON B S, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis[J]. Nat Med,2013, 19(5):576-585.
- [26] JARMUKHANOV Z, MUKHANBETZHANOV N, KOZHAKHMETOV S, et al. The association between the gut microbiota metabolite trimethylamine N-oxide and heart failure[J]. Front Microbiol,2024,15:1440241.
- (收稿日期:2025-07-02 编辑:蒋凯彪)

(上接第13页)

- [24] 郭贺华,曾玉兰,聂雅兰,等.红景天苷通过Wnt/ β -catenin信号通路对肺腺癌A549细胞的影响[J].世界中西医结合杂志,2024,19(5):927-932.
- [25] 王芝玉,周立霞.非小细胞肺癌中ncRNAs对Wnt/ β -catenin信号通路调控的研究进展[J].遵义医科大学学报,2024, 47(8):829-836.
- [26] 彭明,王亚红,宋泽庆,等.四跨膜蛋白超家族在Wnt/ β -catenin信号通路中的作用及机制研究进展[J].现代医院,2020,20(5):730-734,740.
- [27] FAN G C, XU P, TU P. miR-1827 functions as a tumor suppressor in lung adenocarcinoma by targeting MYC and FAM83F[J]. J Cell Biochem, 2020, 121(2): 1675-1689.
- (收稿日期:2025-05-06 编辑:蒋凯彪)