

· 经典名方 ·

补中益气汤联合顺铂调控PDK1/Akt信号通路抑制糖酵解影响肺腺癌细胞增殖

李贺¹, 白思嘉², 刘文俊³, 王建光¹, 吕佳璐¹, 王淳^{1*}

(1. 辽宁中医药大学基础医学院, 沈阳 110847; 2. 北部战区总医院, 沈阳 110016;
3. 辽宁中医药大学教学实验中心, 沈阳 110847)

【摘要】 目的:探讨补中益气汤联合顺铂通过调控丙酮酸脱氢酶激酶1(PDK1)/蛋白激酶B(Akt)信号通路影响糖酵解对人肺腺癌(A549)细胞的增殖影响。**方法:**转录组测序技术(RNA-seq)对比A549细胞与人肺腺癌顺铂耐药(A549/DDP)细胞糖代谢相关基因表达差异;小干扰RNA(siRNA)敲低PDK1,用蛋白免疫印迹法(Western blot)和实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测PDK1敲低效率;细胞增殖与活性检测(CCK-8)法检测siRNA转染阴性+顺铂组(128、64、32、16、8、4、0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、siPDK1+顺铂(128、64、32、16、8、4、0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、siPDK1+顺铂(128、64、32、16、8、4、0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)+补中益气汤(10%)含药血清对A549细胞生存活力的影响;计算得到siRNA转染阴性+顺铂组的20%抑制浓度(IC_{20})(7.832 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)作为后续实验顺铂的浓度;克隆形成实验检测A549细胞增殖;乳酸、三磷酸腺苷(ATP)试剂盒检测乳酸、ATP生成量;羧花青类荧光探针(JC-1)检测线粒体膜电位;Western blot检测PDK1、磷酸化(p)-Akt、Akt、丙酮酸激酶M2亚型(PKM2)、葡萄糖转运蛋白1(GLUT1)、丙酮酸脱氢酶(PDH)、乳酸脱氢酶A(LDHA);共聚焦免疫荧光检测PDK1、p-Akt。**结果:**RNA-seq测序结果得到PDK1为A549细胞与A549/DDP细胞糖代谢高表达差异基因,且在肿瘤细胞中高表达;基因集富集分析(GSEA)图展示了糖酵解和糖异生中上调和下调的基因;Western blot和Real-time PCR检测PDK1转染效率实验发现,PDK1-si-2组转染效率最高,PDK1敲低率>60%;CCK-8法检测各组细胞半数抑制浓度(IC_{50})值分别为(30.698 $\pm$ 5.348)、(16.372 $\pm$ 3.562)、(13.237 $\pm$ 1.573) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,siRNA转染阴性组A549细胞对顺铂的 IC_{20} 值为(7.832 $\pm$ 0.672) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。与siRNA转染阴性组比较,siRNA阴性对照+顺铂组A549细胞克隆形成率降低,乳酸生成量减少,线粒体膜电位降低,p-Akt、GLUT1、PDK1、PDH、LDHA蛋白表达量明显下降,PDK1荧光表达强度明显降低($P<0.05$);siPDK1组A549细胞克隆形成率降低,乳酸生成量减少,ATP生成量增多,线粒体膜电位降低,p-Akt、GLUT1、PDK1、PDH、LDHA蛋白表达量明显下降,PDK1、p-Akt荧光表达强度明显降低($P<0.05$)。与siPDK1组比较,siPDK1+补中益气汤组A549细胞克隆形成率降低,乳酸生成量减少,PKM2、GLUT1、PDK1蛋白表达量明显下降,PDK1荧光表达强度明显降低($P<0.05$);siPDK1+顺铂组A549细胞克隆形成率降低,乳酸生成量减少,ATP生成量增多,线粒体膜电位降低,PKM2、GLUT1、PDK1、PDH蛋白表达量明显下降,PDK1、p-Akt荧光表达强度明显降低($P<0.05$);siPDK1+顺铂+补中益气汤组A549细胞克隆形成率降低,乳酸生成量减少,ATP生成量增多,线粒体膜电位降低,p-Akt、PKM2、GLUT1、PDK1、PDH、LDHA蛋白表达量明显下降,PDK1、p-Akt荧光表达强度明显降低($P<0.05$)。与siPDK1+补中益气汤组比较,siPDK1+顺铂组A549细胞克隆形成率降低,p-Akt、PDH蛋白表达量明显下降,PDK1、p-Akt荧光表达强度明显降低($P<0.05$);siPDK1+顺铂+补中益气汤组A549细胞克隆形成率降低,乳酸生成量减少,ATP生成量增多,线粒体膜电位降低,p-Akt、GLUT1、PDH、LDHA蛋白表达量下降,PDK1、p-Akt荧光表达强度明显降低($P<0.05$)。与siPDK1+顺铂组比较,siPDK1+顺铂+补中益气汤组A549细胞克隆形成率明显降低,ATP生成量增多,p-Akt、PKM2、LDHA蛋白表达量明显下降($P<0.05$)。**结论:**补中益气汤联合顺铂可通过PDK1/Akt信号通路调控糖酵解水平抑制肺腺癌细胞增殖。

【关键词】 补中益气汤; 顺铂; 糖酵解; 丙酮酸脱氢酶激酶1(PDK1)/蛋白激酶B(Akt); 小干扰RNA(siRNA)

【中图分类号】 R256;R242;R285 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2026)19-0001-12

【doi】 10.13422/j.cnki.syfjx.20251925

【网络出版地址】 <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20250911.1346.007>

【网络出版日期】 2025-09-11 14:35:59 **【增强出版附件】** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



【收稿日期】 2025-06-22

【基金项目】 国家自然科学基金项目(82174254);辽宁中医药大学中医药科技创新多学科交叉团队项目(2025-Dxkjc-15-02);辽宁省教育厅科技创新团队项目(LJ222510162018);辽宁中医药大学中西医结合学院“岐济”人才支撑计划项目(2023QJ01001);辽宁中医药大学“中医脏象理论及应用教育部重点实验室”2022年度开放基金项目(zyzx2204)

【第一作者】 李贺,博士,从事中医药抗肿瘤分子机制研究,E-mail:1197386342@qq.com

【通信作者】 *王淳,博士,教授,从事中医药抗肿瘤分子机制研究,E-mail:1205055348@qq.com

Buzhong Yiqitang Combined with Cisplatin Inhibits Lung Adenocarcinoma Cell Proliferation by Suppressing PDK1/Akt Signaling Pathway and Regulating Glycolysis

LI He¹, BAI Sijia², LIU Wenjun³, WANG Jianguang¹, LYU Jialu¹, WANG Chun^{1*}

(1. School of Basic Medical Sciences, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM),
Shenyang 110847, China;

2. General Hospital of Northern Theater Command, Shenyang 110016, China;

3. Teaching and Experimental Center, Liaoning University of TCM, Shenyang 110847, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the impact of Buzhong Yiqitang combined with cisplatin on the proliferation of human lung adenocarcinoma (A549) cells through regulation of the pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1)/protein kinase B (Akt) signaling pathway and influence on glycolysis. **Methods:** Transcriptome sequencing (RNA-seq) was employed to compare the expression of glycolysis-related genes between A549 cells and cisplatin-resistant human lung adenocarcinoma cells (A549/DDP). Small interfering RNA (siRNA) was employed to knock down PDK1, and the knockdown efficiency was verified by Western blot and Real-time PCR. The cell counting kit-8 (CCK-8) assay was used to assess the survival and viability of A549 cells under the following conditions: siRNA negative control+cisplatin (128, 64, 32, 16, 8, 4, 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), siPDK1+cisplatin (128, 64, 32, 16, 8, 4, 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), and siPDK1+cisplatin (128, 64, 32, 16, 8, 4, 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) +Buzhong Yiqitang (10%)-containing serum. The 20% inhibitory concentration (IC_{20}) of the siRNA negative control+cisplatin group (7.832 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) was calculated and used as the subsequent cisplatin concentration. Colony formation assay was performed to evaluate the proliferation of A549 cells. Lactate and adenosine triphosphate (ATP) assay kits were used to measure lactate and ATP production. The mitochondrial membrane potential was detected with the fluorescent probe JC-1. Western blotting was conducted to examine the expression levels of PDK1, phosphorylated (p)-Akt, Akt, pyruvate kinase M2 (PKM2), glucose transporter 1 (GLUT1), pyruvate dehydrogenase (PDH), and lactate dehydrogenase A (LDHA). Confocal immunofluorescence was employed to detect PDK1 and p-Akt. **Results:** RNA-seq results identified PDK1 as a highly expressed differential gene in glycolysis metabolism between A549 cells and A549/DDP cells, and it was highly expressed in tumor cells. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) revealed upregulated and downregulated genes in glycolysis and gluconeogenesis pathways. Western blot and RT-qPCR confirmed that PDK1-si-2 had the highest transfection efficiency, with a PDK1 knockdown rate exceeding 60%. CCK-8 assay determined the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values for each group as (30.698 $\pm$ 5.348), (16.372 $\pm$ 3.562), (13.237 $\pm$ 1.573) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, while the IC_{20} of cisplatin in siRNA negative control-transfected A549 cells was (7.832 $\pm$ 0.672) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Compared with the siRNA negative control group, the siRNA negative control+cisplatin group showed decreased colony formation rate, reduced lactate production, lowered mitochondrial membrane potential, downregulated protein levels of p-Akt, GLUT1, PDK1, PDH, and LDHA, and reduced PDK1 fluorescence intensity ($P<0.05$). The siPDK1 group exhibited decreased colony formation rate, reduced lactate production, increased ATP production, lowered mitochondrial membrane potential, downregulated protein levels of p-Akt, PKM2, GLUT1, PDK1, PDH, and LDHA, and reduced PDK1 and p-Akt fluorescence intensity ($P<0.05$). Compared with the siPDK1 group, the siPDK1+Buzhong Yiqitang group showed decreased colony formation rate, reduced lactate production, downregulated protein levels of PKM2, GLUT1, and PDK1, and reduced PDK1 fluorescence intensity ($P<0.05$). The siPDK1+cisplatin group exhibited decreased colony formation rate, reduced lactate production, increased ATP production, lowered mitochondrial membrane potential, downregulated protein levels of p-Akt, PKM2, GLUT1, PDK1, PDH, and LDHA, and reduced PDK1 and p-Akt fluorescence intensity ($P<0.05$). The siPDK1+cisplatin+Buzhong Yiqitang group demonstrated decreased colony formation rate, reduced lactate production, increased ATP production, lowered mitochondrial membrane potential, downregulated protein levels of p-Akt, PKM2, GLUT1, PDK1, PDH, and LDHA, and reduced PDK1 and p-Akt fluorescence intensity ($P<0.05$). Compared with the siPDK1+Buzhong Yiqitang group, the siPDK1+cisplatin group showed decreased colony formation rate, downregulated protein levels of p-Akt and PDH, and reduced PDK1 and p-Akt fluorescence intensity ($P<0.05$). The siPDK1+cisplatin+Buzhong Yiqitang group exhibited decreased colony formation rate, reduced lactate production, increased ATP production, lowered mitochondrial membrane potential, downregulated protein levels of p-Akt, GLUT1, PDH, and LDHA, and reduced PDK1 and p-Akt fluorescence intensity ($P<0.05$). Compared with the siPDK1+cisplatin group, the siPDK1+cisplatin+Buzhong Yiqitang group showed decreased colony formation rate, increased ATP production, and downregulated protein levels of p-Akt, PKM2, and LDHA ($P<0.05$). **Conclusion:** Buzhong Yiqitang combined with cisplatin can suppress lung adenocarcinoma cell proliferation by modulating glycolysis through the PDK1/Akt signaling pathway.

[Keywords] Buzhong Yiqitang; cisplatin; glycolysis; pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1)/protein kinase B (Akt); small interfering RNA (siRNA)

据2024年数据,肺癌发病率和死亡率均居所有癌症之首^[1]。肺癌主要分为小细胞肺癌(SCLC)和非小细胞肺癌(NSCLC),其中NSCLC约占所有病例的85%,包括腺癌、鳞癌和大细胞癌^[2]。早期肺癌可通过手术治疗,晚期治疗以铂类药物化疗和放疗为主^[3]。然而,放化疗具有严重的不良反应,导致患者预后不良、生活质量差。因此,迫切需要开发简单、安全、成本有效的治疗方法。不受控制的增殖能量及有氧糖酵解的代谢特征是恶性肿瘤细胞的两大特征^[4-5],高水平的糖酵解为细胞增殖提供了大量的能量和生物大分子原料^[6-7]。研究显示,胆管癌组织中与糖酵解和蛋白激酶B(Akt)信号通路相关的基因转录水平升高^[8],而丙酮酸脱氢酶激酶1(PDK1)是肿瘤细胞迁移和侵袭的信号中枢^[9],也是瓦伯格效应的重要靶点^[10]。PDK1是Akt激酶的上游激活剂,Akt的苏氨酸308(Thr308)为PDK1的磷酸化位点。有研究发现,PDK1可促进肿瘤细胞血管生长、细胞增殖和迁移^[11]。

补中益气汤出自李东垣的《脾胃论》,由黄芪、甘草、人参、当归、橘皮、升麻、柴胡、白术组成,有“补中益气,升阳举陷”之功,可补气健脾、补益肺气。课题组前期研究发现,补中益气汤可抑制肺腺癌(A549)细胞的增殖^[12],且可以调控磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/Akt信号通路的表达^[13]。而补中益气汤是否可以通过PDK1/Akt信号通路调控肿瘤细胞糖酵解水平抑制细胞增殖尚未有研究报道。本研究通过体外实验,探讨补中益气汤联合顺铂通过PDK1/Akt信号调控糖酵解水平,对肺腺癌A549细胞的生长抑制作用。

1 材料

1.1 细胞株及动物 A549细胞株购自中国医科院肿瘤医院研究中心细胞库(编号PUMC000519),传至15代。SPF级SD大鼠雄性,供自辽宁长生生物技术股份有限公司[合格证号SCXK(辽)2020-0001],体质量170~210 g,共60只。

1.2 伦理 已获得辽宁中医药大学医学与动物伦理审查委员会审查批准(批准号210726221100791635)。

1.3 试剂 顺铂(德国Sigma公司,货号232120,规格25 mg);胎牛血清(美国Clark Bioscience公司,货号FB25015);胰酶、双抗(美国Gibco公司,货号分别为2661765、2585644);细胞增殖与活性检测(CCK-8)溶液、兔抗 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(安徽兰杰柯科技有限公司,货号分别为BS350A、

BOAR-D0001-A);结晶紫染色液、曲拉通(Triton X)-100、赫斯特染料(Hoechst)33342、放射免疫沉淀法(RIPA)细胞裂解液、聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)蛋白定量试剂盒、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为G1062、T8200、C0031、R0020、PC0020、P1200);牛血清白蛋白(BSA)(大连美仑生物技术有限公司,货号MB4219-2);三磷酸腺苷(ATP)检测试剂盒、L-乳酸检测试剂盒(WST-8法)(上海碧云天生物技术有限公司,货号分别为S0026、S0208S);PDK1小干扰RNA(siRNA)转染质粒[吉满生物科技(上海)有限公司];脂质转染相关试剂(Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent)(美国Thermo Fisher Scientific公司,货号L3000008);增强化学(ECL)发光检测试剂(上海天能生命科学有限公司,货号180-506);RNA提取试剂(日本Takara Bio公司,货号9109);反转录-扩增一步法试剂盒(北京全式金生物技术有限公司,货号AQ211-01);Akt抗体、磷酸化(p)-Akt抗体、PDK1抗体、葡萄糖转运蛋白1(GLUT1)抗体、乳酸脱氢酶A(LDHA)抗体、丙酮酸脱氢酶(PDH)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号分别为10176-2-AP、66444-4-Ig、18262-1-AP、21829-1-AP、21799-1-AP、18068-1-AP);丙酮酸激酶M2亚型(PKM2)抗体(美国CST公司,货号4053);无蛋白快速封闭液、电泳缓冲液、10×免冰浴快速转膜缓冲液(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号分别为G2052-500ML、G2027-1L、G2154-1L)。

1.4 含药血清的制备 根据最新全国高等中医药院校规划教材《方剂学》(第十版),补中益气汤配方及用量为黄芪18 g(批号2312011)、甘草片9 g(批号2404281)、人参片6 g(批号2404041)、当归3 g(批号2309262)、陈皮6 g(批号2403243)、升麻6 g(批号2404121)、北柴胡6 g(批号2403153)、白术9 g(批号2204192),药材购自辽宁中医药大学附属医院药房,安徽普仁中药饮片公司,并由辽宁中医药大学方剂教研室任艳玲教授鉴定均为正品,前期实验中^[14],补中益气汤分为低、中、高3个剂量,低剂量为成人(60 kg)常规用药量的1/2、中剂量为常规用药量、高剂量为常规用药量的2倍。补中益气汤全方每付含生药63 g,按照“动物与人体的每千克体质量剂量折算系数表”,人与大鼠之间的折算系数为 $W=6.25$,因此,中剂量补中益气汤含生药量为 $63/60 \times 6.25 \approx 6.57 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,则低、高剂量分别为3.29、

13.13 g·kg⁻¹。本实验中选择中剂量作为最佳剂量,剂量为6.57 g·kg⁻¹。将所有药材加入10倍水量浸泡30 min后煎煮60 min,倒出初煎液后加入8倍水量继续煎煮1 h(共煎煮2次),合并煎液浓缩药液成1.313 g·mL⁻¹。将大鼠分为空白组、含药血清组。含药血清灌胃补中益气汤2 mL/只/次,2次/d,持续7 d;空白组大鼠灌胃相应的生理盐水。末次给药后1 h,腹主动脉取血,置于无菌管中,37℃水浴环境下静置30 min,室温下以3 000 r·min⁻¹离心10 min(离心半径17 cm),取上清,56℃水浴灭活0.5 h,0.22 μm滤器过滤除菌,-80℃冻存备用。

1.5 仪器 MD sepectraMax i3型全波长酶标仪、HERA CELL 150i型CO₂培养箱(美国Thermo公司);EPS600型电泳仪、5200型凝胶成像系统(上海天能生命科学有限公司);1658001型垂直电泳槽、170-3932型转移电泳槽、CFX Opus 96型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Bio Rad公司);FV10i型激光扫描共聚焦显微镜(日本Olympus公司);Nanodrop 2000型超微量紫外分光光度计(美国赛默飞世尔科技公司)。

2 方法

2.1 分组 siRNA转染实验分组为siRNA转染阴性组、PDK1-si-1组、PDK1-si-2组、PDK1-si-3组。将转染效果最佳的组别命名为siPDK1用于后续实验。CCK-8法实验分组为siRNA转染阴性+顺铂组、siPDK1+顺铂组、siPDK1+顺铂+补中益气汤组。其余实验分组为siRNA阴性对照组、siRNA阴性对照+顺铂(7.832 μmol·L⁻¹)组、siPDK1组、siPDK1+补中益气汤(10%)组、siPDK1+顺铂(7.832 μmol·L⁻¹)组、siPDK1+顺铂(7.832 μmol·L⁻¹)+补中益气汤(10%)组,其中顺铂浓度为IC₂₀值。

2.2 RNA提取和RNA质量分析 A549和A549/DDP细胞的总RNA用RNAiso Plus试剂,通过NanoDrop ND-1000分光光度计。然后将RNA样品送到康辰生物技术有限公司进行微阵列实验和数据分析。

2.3 RNA文库构建和转录组测序(RNA-Seq)测定 每个样品中的总RNA含量范围为1~2 mg,并且使用NEB Next[®] Poly(A)mRNA磁性分离模块试剂盒。然后使用KAPA Stranded RNA-Seq Library Prep Kit构建文库用0.1 mol·L⁻¹ NaOH变性后,将单链DNA稀释至8 pmol·L⁻¹,然后用TruSeqSR Cluster Kit v3-cBot-HS。所得片段的末端在Illumina HiSeq 4000测序仪上测序150个循环。

2.4 小干扰RNA(siRNA)转染实验敲低PDK1 取密度为80%以上的细胞,胰酶1 mL消化细胞2 min左右,将细胞调整至密度为(10~15)×10⁴个/mL,6孔板每孔加细胞悬液1 mL。细胞过夜贴壁后配置转染复合物,Opti-MEM 1 mL加入siRNA 5 μL配成siRNA稀释液,用移液枪吹打混匀。再取Opti-MEM 1 mL加入Lipofectamine 3000转染试剂4 μL,室温静置5 min。将混合转染试剂和siRNA稀释液混匀,室温孵育20 min。细胞置于37℃、5%CO₂培养箱中培养18~48 h,转染4~6 h后可更换新鲜培养基,转染完成后48 h检测siRNA沉默效果。转染质粒购自上海吉满生物公司,合成序列为PDK1-si-1:上游引物5'-CGAACUAGAACUUGAAGAATT-3',下游引物5'-UUCUUCAAGUUCUAGUUCGTT-3';PDK1-si-2:上游引物5'-CAAUUAGAAUGUUACUCAATT-3',下游引物5'-UUGAGUAAACAUUCUAAUUGTT-3';PDK1-si-3:上游引物5'-UCUGUCAACAGACUCAAUATT-3',下游引物5'-UAUUGAGUCUGUUGACAGATT-3',序列长度均为21 bp。

2.5 Real-time PCR检测PDK1敲低效率 经转染处理后的A549细胞,胰酶消化90 s,终止消化制成细胞悬液,细胞稀释至密度为2×10⁵个/mL,将细胞悬液接种到6孔板中。隔夜贴壁后,药物干预48 h后,提取总RNA,用TransScript Green One-Step qRT-PCR SuperMix试剂盒进行反转录,到qPCR全部反应。反应体系为20 μL,RNA 1 μL,正向引物、反向引物各0.4 μL,2×PerfectStart Green One-Step qPCR SuperMix 10 μL,TransScript Green One-Step RT/RI Enzyme Mix 0.4 μL,DEPC水7.8 μL。反应条件:45℃升温5 min,94℃变性30 s,94℃退火5 s,60℃退火30 s,后2个过程循环45个过程。以β-actin作为内参基因,使用2^{-ΔΔC_t}法计算目标基因的相对表达水平。相关引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列信息见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
PDK1	上游 CCTAGAGGGTTACGGGACAGATG	23
	下游 TCGTGGTTGGTGTGTAATGCTTC	24
β-actin	上游 CCTGGCACCCAGCACAAT	18
	下游 GGGCCGGACTCGTCATAC	18

2.6 CCK-8法检测A549细胞半数抑制浓度(IC₅₀) 经转染处理后,取对数生长期的细胞,胰酶

1 mL消化细胞2 min左右,将细胞调整至密度为 8×10^4 个/mL,96孔板每孔加100 μ L细胞悬液。用无双抗培养基将顺铂浓度调整为128、64、32、16、8、4、0 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$,加入对应的孔中反应24 h,按每孔CCK-8溶液10 μ L与杜氏改良伊格尔培养基(DMEM)溶液100 μ L加液,锡纸包裹避光孵育30 min,将酶标仪置于450 nm波长下检测吸光度 A ,计算出各组A549/DDP细胞 IC_{50} 。

2.7 平板克隆形成实验检测A549细胞增殖 将转染处理后的每组A549细胞以 1×10^3 个/孔的密度均匀铺于6孔板中。药物处理后,隔72 h更换含药培养基,加药后14 d弃去培养基,用磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)洗去残留培养基。细胞在室温下用4%多聚甲醛固定15 min,并用PBS洗涤。加入结晶紫染色液(0.1%),在室温下染色1 h,用PBS洗3次,平板干燥后拍照。

2.8 ATP试剂盒检测A549细胞ATP生成情况 将转染处理后的每组A549细胞以 2×10^5 个/孔的密度均匀铺于6孔板中。药物处理48 h后,吸除培养液,按照6孔板每孔加入裂解液200 μ L,用移液枪反复吹打裂解充分,裂解后,4 $^{\circ}$ C、12 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心5 min(离心半径17 cm),取上清,用于后续的测定。把ATP标准溶液用ATP检测裂解液稀释成0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$ 浓度梯度。按照1:9配制检测工作液,每个样品或标准品加入ATP检测工作液100 μ L。ATP检测工作液加到检测孔内。室温放置3~5 min,以降低本底。在检测孔内加入20 μ L样品或标准品,迅速用移液枪混匀,至少间隔2 s后,用化学发光仪测量结果。

2.9 L-乳酸试剂盒检测A549细胞乳酸生成情况 将转染处理后的每组A549细胞以 2×10^5 个/孔的密度均匀铺于6孔板中。药物处理48 h后,直接吸取培养液上清用于后续的测定。按照每个检测反应50 μ L的体积配制适量的显色工作液。均匀混合Lactate Assay Buffer 44 μ L、Enzyme Solution 2 μ L、Substrate 2 μ L, WST-8 2 μ L,即可配制成WST-8显色工作液50 μ L。取100 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ L-Lactate Standard 1 μ L,加入BeyoLysis[™] Buffer A for Metabolic Assay 199 μ L,配制成浓度为0.5 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ L-Lactate Standard 200 μ L。分别取0.5 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ 的L-Lactate Standard 0、2、5、10、20、50 μ L加入96孔板的标准品孔中,并用对应的BeyoLysis[™] Buffer A for Metabolic Assay补足至50 μ L。取50 μ L样本上清液至96孔板样品孔中,

同时设置仅含BeyoLysis[™] Buffer A for Metabolic Assay的孔为空白对照孔。各孔加入WST-8显色工作液50 μ L,混匀。37 $^{\circ}$ C避光孵育30 min,在450 nm测定 A 。

2.10 羰花青类荧光探针(JC-1)检测A549细胞线粒体膜电位 各组细胞经转染后加药处理,按照每JC-1(200 $\times$)5 μ L加入JC-1染色缓冲液1 mL的比例稀释JC-1配成JC-1工作液,共聚焦小皿所需JC-1染色工作液的量为1 mL。吸除培养液,用PBS清洗细胞,加入细胞培养液1 mL和JC-1工作液1 mL,37 $^{\circ}$ C孵育20 min,吸除上清,用JC-1(1 $\times$)缓冲液清洗2次。加入细胞固定液固定15 min,滴一滴抗荧光衰减封片剂(含DAPI),用共聚焦荧光显微镜观察线粒体膜电位。

2.11 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测A549细胞p-Akt、Akt、PKM2、GLUT1、PDK1、PDH、LDHA蛋白表达 各组细胞经转染及加药处理后,加入RIPA蛋白裂解液于冰上裂解30 min,BCA法测定蛋白浓度,SDS-PAGE凝胶电泳后,转膜至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,封闭液封闭1 h,一抗(1:1 000)4 $^{\circ}$ C摇床孵育过夜,次日用TBST洗膜10 min,洗3次,二抗(1:5 000)室温孵育1 h,TBST洗3次,每次10 min,用ECL试剂盒曝光,用Image J软件分析结果。

2.12 共聚焦免疫荧光检测A549细胞PDK1、p-Akt平均荧光表达强度 细胞经转染处理后,将细胞悬液密度调整为 6×10^4 个/mL,共聚焦小皿中加入1 mL细胞悬液。加药处理48 h后,弃去培养基,PBS洗涤后,用多聚甲醛固定细胞15 min,PBS洗3次,用0.3% Triton X-100通透10 min,PBS洗3次,5% BSA封闭1 h,加入一抗(1:300)4 $^{\circ}$ C摇床孵育过夜,用PBS洗涤,异硫氰酸荧光素(FITC)荧光二抗(1:150)室温孵育1 h,加入Hoechst 33342染色液室温孵育5 min,用PBS洗涤,加入抗荧光衰减封片剂,用共聚焦荧光显微镜拍照,用Image J软件分析结果。

2.13 统计学分析 本研究采用SPSS 26.0软件进行数据分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较,方差齐时采用最小显著差异 t 检验(LSD- t)法,方差不齐采用邓尼特 T_3 方法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 A549与A549/DDP细胞差异表达基因 将肺腺癌A549细胞与肺腺癌耐药A549/DDP细胞进行

RNA-seq 测序^[15],结果显示,A549/DDP 细胞中葡萄糖代谢相关基因高表达,PDK1 排在差异表达基因的首位;GSEA 图展示了 A549 细胞与 A549/DDP 细胞的糖酵解和糖异生上调、下调基因。A549 细胞与 A549/DDP 细胞糖代谢差异表达基因热图、基因集富集分析图见增强出版附加材料。

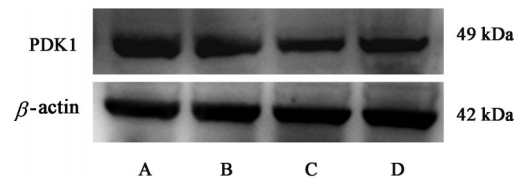
3.2 siRNA 转染实验敲低 PDK1 效率 与 siRNA 阴性对照组比较,PDK1 蛋白表达量均显著下降,PDK1-si-2 组 PDK1 蛋白表达量最低($P<0.01$),转染效率 $>60\%$ 。见表 2、图 1。后续实验中用 PDK1-si-2 组质粒进行转染。

表 2 各组细胞 siRNA 转染敲低 PDK1 蛋白及 mRNA 表达 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 MRNA expression of siRNA knockdown of PDK1 in each group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	siRNA 剂量/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	PDK1/ β -actin	PDK1 mRNA
siRNA 阴性对照组	20	1.00 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.06
PDK1-si-1 组	20	0.55 $\pm$ 0.06 ¹⁾	0.73 $\pm$ 0.04 ¹⁾
PDK1-si-2 组	20	0.38 $\pm$ 0.04 ¹⁾	0.36 $\pm$ 0.04 ¹⁾
PDK1-si-3 组	20	0.52 $\pm$ 0.03 ¹⁾	0.65 $\pm$ 0.05 ¹⁾

注:与 siRNA 阴性对照组比较¹⁾ $P<0.01$ (表 2、表 3 同)



注:A. siRNA 阴性对照组;B. PDK1-si-1 组;C. PDK1-si-2 组;D. PDK1-si-3 组

图 1 各组细胞 siRNA 转染敲低 PDK1 蛋白电泳

Fig. 1 Electrophoresis of PDK1 protein after siRNA transfection in each group of cells

3.3 补中益气汤联合顺铂对 A549 细胞活力的影响 siRNA 阴性对照组+顺铂组 A549 细胞对顺铂的

表 4 补中益气汤联合顺铂对 A549 细胞克隆形成的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Buzhong Yiqitang combined with cisplatin on A549 cell clonal formation ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度	克隆形成率/%
siRNA 阴性对照组		100 $\pm$ 0.00
siRNA 阴性对照+顺铂组	7.832 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	82.36 $\pm$ 4.52 ¹⁾
siPDK1 组		79.44 $\pm$ 3.76 ¹⁾
siPDK1+补中益气汤组	10% 含药血清	52.37 $\pm$ 3.24 ²⁾
siPDK1+顺铂组	7.832 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	22.18 $\pm$ 1.67 ^{2,3)}
siPDK1+顺铂+补中益气汤组	7.832 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +10% 含药血清	19.32 $\pm$ 1.46 ^{2,3,4)}

注:与 siRNA 阴性对照组比较¹⁾ $P<0.01$;与 siPDK1 组比较²⁾ $P<0.01$;与 siPDK1+补中益气汤组比较³⁾ $P<0.01$;与 siPDK1+顺铂组比较⁴⁾ $P<0.01$

IC₅₀ 值为 (30.698 $\pm$ 5.348) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;siPDK1+顺铂组对顺铂的 IC₅₀ 值为 (16.372 $\pm$ 3.562) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;siPDK1+顺铂+补中益气汤组对顺铂的 IC₅₀ 值为 (13.237 $\pm$ 1.573) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。说明顺铂和补中益气汤均能降低 A549 细胞对顺铂的 IC₅₀ 值。后续实验顺铂浓度均按 siRNA NC+顺铂组 IC₂₀ 值 7.832 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 加药处理。见表 3。

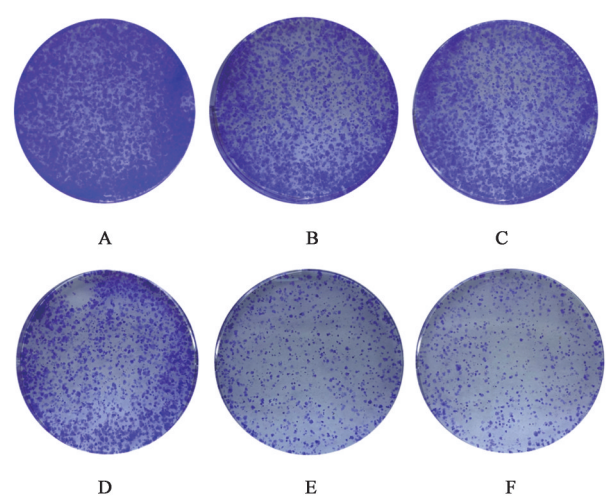
表 3 补中益气汤联合顺铂对 A549 细胞活力的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 3 Effect of Buzhong Yiqitang combined with cisplatin on cell viability in each group ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	siRNA 阴性对照组+顺铂组	siPDK1+顺铂组	siPDK1+顺铂+补中益气汤组
空白组		100.00 $\pm$ 6.50	100.00 $\pm$ 2.05	100.00 $\pm$ 5.86
顺铂组	4	91.59 $\pm$ 7.31	86.30 $\pm$ 8.01 ¹⁾	78.03 $\pm$ 6.41 ¹⁾
	8	82.42 $\pm$ 6.77 ¹⁾	64.32 $\pm$ 2.57 ¹⁾	66.40 $\pm$ 2.60 ¹⁾
	16	66.99 $\pm$ 2.77 ¹⁾	40.27 $\pm$ 5.10 ¹⁾	31.37 $\pm$ 1.70 ¹⁾
	32	46.58 $\pm$ 3.19 ¹⁾	28.98 $\pm$ 3.13 ¹⁾	28.08 $\pm$ 4.18 ¹⁾
	64	35.22 $\pm$ 3.68 ¹⁾	23.38 $\pm$ 1.14 ¹⁾	21.10 $\pm$ 4.36 ¹⁾
	128	17.44 $\pm$ 3.81 ¹⁾	19.20 $\pm$ 2.84 ¹⁾	14.51 $\pm$ 1.88 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$

3.4 补中益气汤联合顺铂对 A549 细胞克隆形成的影响 克隆形成实验检测细胞增殖,与 siRNA 阴性对照组比较,siRNA 阴性对照+顺铂组和 siPDK1 组 A549 细胞的克隆形成率显著下降($P<0.01$);与 siPDK1 组比较,siPDK1+补中益气汤组、siPDK1+顺铂组、siPDK1+顺铂+补中益气汤组 A549 细胞克隆形成率显著下降($P<0.01$);与 siPDK1+补中益气汤组比较,siPDK1+顺铂组和 siPDK1+顺铂+补中益气汤组 A549 细胞克隆形成率显著下降($P<0.01$);与 siPDK1+顺铂组比较,siPDK1+顺铂+补中益气汤组 A549 细胞克隆形成率显著下降($P<0.01$)。见表 4、图 2。



注：A. siRNA 阴性对照组；B. siRNA 阴性对照组+顺铂组；C. siPDK1 组；D. siPDK1+补中益气汤组；E. siPDK1+顺铂组；F. siPDK1+顺铂+补中益气汤组(图3-图6同)

图2 补中益气汤联合顺铂对细胞克隆形成的影响(结晶紫)
Fig. 2 Effect of Buzhong Yiqitang combined with cisplatin on cell clonal formation in each group (crystal violet)

3.5 补中益气汤联合顺铂对 A549 细胞 ATP、乳酸生成量的影响 与 siRNA 阴性对照组比较, siRNA 阴性对照+顺铂组、siPDK1 组 A549 细胞乳酸生成量显著减少 ($P<0.01$); 与 siPDK1 组比较, siPDK1+补中益气汤组、siPDK1+顺铂组、siPDK1+顺铂+补中益气汤组 A549 细胞乳酸生成量明显减少 ($P<0.05$); 与 siPDK1+补中益气汤组比较, siPDK1+顺铂+补中益气汤组 A549 细胞乳酸生成量明显减少 ($P<0.05$)。与 siRNA 阴性对照组比较, siPDK1 组 A549 细胞 ATP 生成量显著增多 ($P<0.01$); 与 siPDK1 组比较, siPDK1+补中益气汤组、siPDK1+顺铂组、siPDK1+顺铂+补中益气汤组 A549 细胞 ATP 生成量明显增多, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$); 与 siPDK1+补中益气汤组比较, siPDK1+顺铂+补中益气汤组 A549 细胞 ATP 生成量明显增多 ($P<0.05$); 与 siPDK1+顺铂组比较, siPDK1+顺铂+补中益气汤组 A549 细胞 ATP 生成量显著增多 ($P<0.01$)。见表 5。

表 5 补中益气汤联合顺铂对 A549 细胞 ATP、乳酸生成量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Buzhong Yiqitang combined with cisplatin on ATP and lactate production in A549 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度	乳酸/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	ATP/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
siRNA 阴性对照组		5.241 $\pm$ 0.243	7.476 $\pm$ 0.342
siRNA 阴性对照+顺铂组	7.832 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	4.367 $\pm$ 0.361 ¹⁾	8.552 $\pm$ 0.338
siPDK1 组		3.902 $\pm$ 0.258 ¹⁾	9.167 $\pm$ 0.457 ¹⁾
siPDK1+补中益气汤组	10% 含药血清	2.423 $\pm$ 0.235 ²⁾	10.704 $\pm$ 0.448 ²⁾
siPDK1+顺铂组	7.832 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	2.227 $\pm$ 0.164 ²⁾	10.857 $\pm$ 0.526 ²⁾
siPDK1+顺铂+补中益气汤组	7.832 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +10% 含药血清	1.651 $\pm$ 0.097 ^{2,3)}	12.701 $\pm$ 0.513 ^{2,3,4)}

注：与 siRNA 阴性对照组比较¹⁾ $P<0.01$; 与 siPDK1 组比较²⁾ $P<0.05$; 与 siPDK1+补中益气汤组比较³⁾ $P<0.05$; 与 siPDK1+顺铂组比较⁴⁾ $P<0.01$

3.6 补中益气汤联合顺铂对 A549 细胞线粒体膜电位的影响 与 siRNA 阴性对照组比较, siRNA 阴性对照+顺铂组和 siPDK1 组 A549 细胞 JC-1 聚合物(红色)/单体(绿色)荧光强度比显著下降 ($P<0.01$), 线粒体膜电位下降; 与 siPDK1 组比较, siPDK1+顺铂组、siPDK1+顺铂+补中益气汤组 A549 细胞 JC-1

聚合物(红色)/单体(绿色)荧光强度比显著增强 ($P<0.01$), 线粒体膜电位下降; 与 siPDK1+补中益气汤组比较, siPDK1+顺铂组、siPDK1+顺铂+补中益气汤组 A549 细胞 JC-1 聚合物(红色)/单体(绿色)荧光强度比明显降低 ($P<0.05$), 线粒体膜电位明显下降 ($P<0.05$)。见表 6、图 3。

表 6 补中益气汤联合顺铂对 A549 细胞线粒体膜电位的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of Buzhong Yiqitang combined with cisplatin on mitochondrial membrane potential of A549 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度	JC-1 聚合物(红色)/单体(绿色)荧光强度
siRNA 阴性对照组		1.00 $\pm$ 0.02
siRNA 阴性对照+顺铂组	7.832 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.87 $\pm$ 0.04 ¹⁾
siPDK1 组		0.61 $\pm$ 0.03 ¹⁾
siPDK1+补中益气汤组	10% 含药血清	0.53 $\pm$ 0.03
siPDK1+顺铂组	7.832 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.41 $\pm$ 0.02 ^{2,3)}
siPDK1+顺铂+补中益气汤组	7.832 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +10% 含药血清	0.32 $\pm$ 0.06 ^{2,3)}

注：与 siRNA 阴性对照组比较¹⁾ $P<0.01$; 与 siPDK1 组比较²⁾ $P<0.01$; 与 siPDK1+补中益气汤组比较³⁾ $P<0.05$

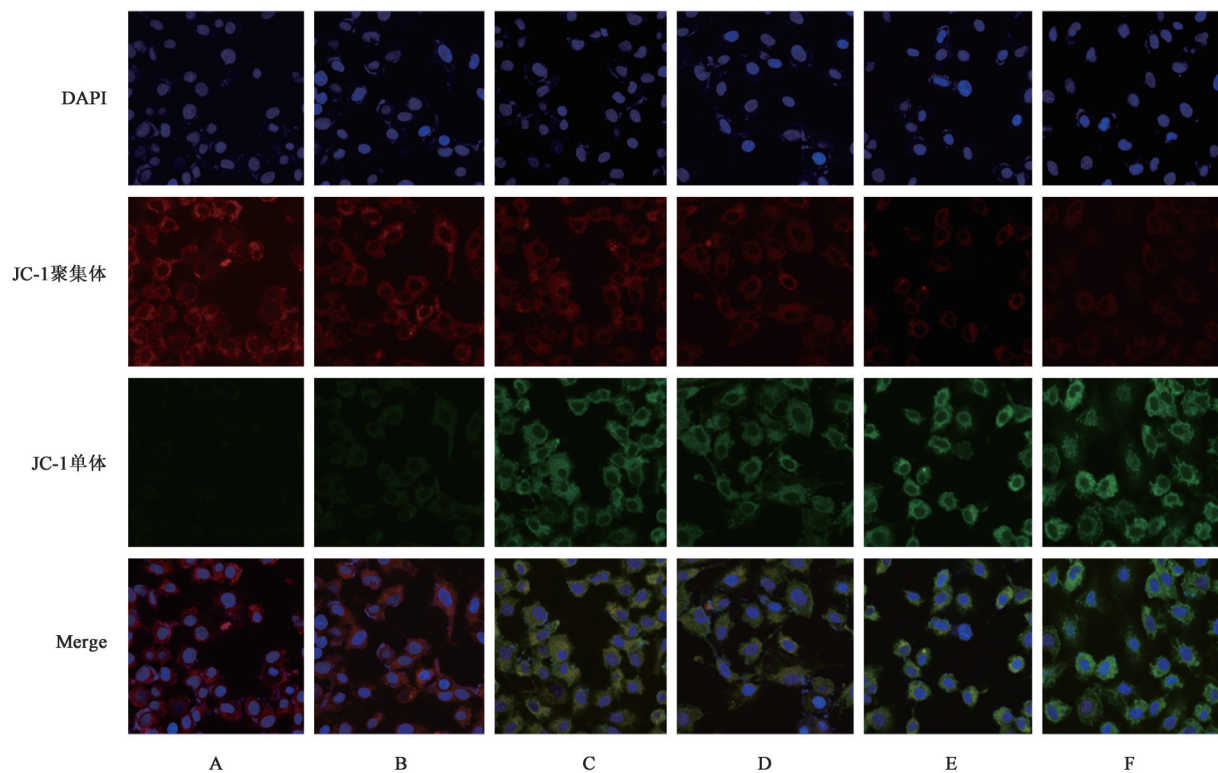


图3 补中益气汤联合顺铂对 A549 细胞线粒体膜电位的影响 (JC-1,×600)

Fig. 3 Effect of Buzhong Yiqitang combined with cisplatin on mitochondrial membrane potential of A549 cells (JC-1,×600)

3.7 补中益气汤联合顺铂对 A549 细胞 p-Akt、PKM2、GLUT1、PDK1、PDH、LDHA 蛋白活性的影响
与 siRNA 阴性对照组比较, siRNA 阴性对照+顺铂组 p-Akt、GLUT1、PDK1、PDH、LDHA 蛋白表达量明显下降 ($P<0.05$), siPDK1 组 p-Akt、PKM2、GLUT1、PDK1、PDH、LDHA 蛋白表达量明显下降 ($P<0.05$); 与 siPDK1 组比较, siPDK1+补中益气汤组 PKM2、

GLUT1、PDK1 蛋白表达量显著下降 ($P<0.01$); 与 siPDK1+补中益气汤组比较, siPDK1+顺铂组 p-Akt、PDH 蛋白表达量明显下降 ($P<0.05$), siPDK1+顺铂+补中益气汤组 p-Akt、GLUT1、PDH、LDHA 蛋白表达量明显下降 ($P<0.05$); 与 siPDK1+顺铂组比较, siPDK1+顺铂+补中益气汤组 p-Akt、PKM2、LDHA 蛋白表达量明显下降 ($P<0.05$)。见表 7、图 4。

表 7 补中益气汤联合顺铂对各组细胞 p-Akt、PKM2、GLUT1、PDK1、PDH、LDHA 蛋白活性的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of Buzhong Yiqitang combined with cisplatin on activity of p-Akt, PKM2, GLUT1, PDK1, PDH and LDHA in various groups of cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度	p-Akt/Akt	PKM2/ β -actin	GLUT1/ β -actin	PDK1/ β -actin	PDH/ β -actin	LDHA/ β -actin
siRNA 阴性对照组		1.000 $\pm$ 0.027	1.000 $\pm$ 0.044	1.000 $\pm$ 0.037	1.000 $\pm$ 0.056	1.000 $\pm$ 0.061	1.000 $\pm$ 0.068
siRNA 阴性对照+顺铂组	7.832 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.893 $\pm$ 0.031 ¹⁾	0.952 $\pm$ 0.304	0.885 $\pm$ 0.045 ¹⁾	0.658 $\pm$ 0.043 ¹⁾	0.862 $\pm$ 0.047 ¹⁾	0.876 $\pm$ 0.041 ¹⁾
siPDK1 组		0.736 $\pm$ 0.047 ¹⁾	0.852 $\pm$ 0.027 ¹⁾	0.542 $\pm$ 0.033 ¹⁾	0.439 $\pm$ 0.034 ¹⁾	0.674 $\pm$ 0.034 ¹⁾	0.563 $\pm$ 0.025 ¹⁾
siPDK1+补中益气汤组	10% 含药血清	0.807 $\pm$ 0.052	0.593 $\pm$ 0.032 ²⁾	0.289 $\pm$ 0.026 ²⁾	0.287 $\pm$ 0.025 ²⁾	0.621 $\pm$ 0.053	0.519 $\pm$ 0.043
siPDK1+顺铂组	7.832 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.648 $\pm$ 0.035 ³⁾	0.621 $\pm$ 0.041 ²⁾	0.277 $\pm$ 0.034 ²⁾	0.253 $\pm$ 0.041 ²⁾	0.368 $\pm$ 0.038 ^{2,3)}	0.488 $\pm$ 0.027
siPDK1+顺铂+补中益气汤组	7.832 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +10% 含药血清	0.446 $\pm$ 0.033 ^{2,3,4)}	0.506 $\pm$ 0.026 ^{2,4)}	0.192 $\pm$ 0.027 ^{2,3)}	0.236 $\pm$ 0.027 ²⁾	0.352 $\pm$ 0.047 ^{2,3)}	0.197 $\pm$ 0.051 ^{2,3,4)}

注:与 siRNA 阴性对照组比较¹⁾ $P<0.05$;与 siPDK1 组比较²⁾ $P<0.01$;与 siPDK1+补中益气汤组比较³⁾ $P<0.05$;与 siPDK1+顺铂组比较⁴⁾ $P<0.05$

3.8 补中益气汤联合顺铂对 A549 细胞 PDK1、p-Akt 荧光表达强度的影响
与 siRNA 阴性对照组

比较, siRNA 阴性对照+顺铂组 PDK1 荧光表达强度显著降低 ($P<0.01$), siPDK1 组 PDK1、p-Akt 荧光表

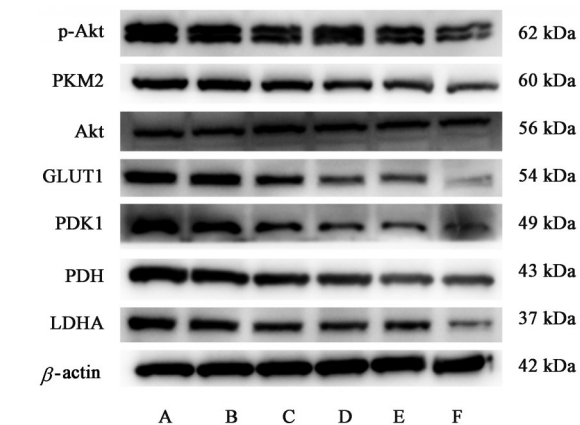


图4 补中益气汤联合顺铂对各组细胞 p-Akt、Akt、PKM2、GLUT1、PDK1、PDH、LDHA 蛋白电泳

Fig. 4 Electrophoresis of Buzhong Yiqitang combined with cisplatin on activity of p-Akt, Akt, PKM2, GLUT1, PDK1, PDH and LDHA in each group of cells

达强度显著降低 ($P<0.01$) ; 与 siPDK1 组比较 , siPDK1+补中益气汤组 PDK1 荧光表达强度显著降

低 ($P<0.01$) , siPDK1+顺铂组、siPDK1+顺铂+补中益气汤组 PDK1、p-Akt 荧光表达强度显著降低 ($P<0.01$) ; 与 siPDK1+补中益气汤组比较 , siPDK1+顺铂组、siPDK1+顺铂+补中益气汤组 PDK1、p-Akt 荧光表达强度明显降低 ($P<0.05$) 。见表 8、图 5、图 6。

4 讨论

2024 年数据显示 , 肺癌发病率和死亡率均居首位^[1]。截至 2020 年 , 有 220 万例肺癌新发病例和 180 万例死亡病例^[16]。肺癌主要有 2 种类型 : 约 85% 的患者患非 NSCLC、约 15% 的患者患小细胞肺癌 (SCLC)。NSCLC 有 3 种主要亚型 : 鳞状细胞癌 (约占 25%)、腺癌 (约占 40%) 和大细胞癌 (约占 10%) ; 其他类型的 NSCLC 包括神经内分泌肿瘤和具有多形性、肉瘤样或肉瘤成分的癌^[17]。肺癌目前最常用的治疗策略包括手术、铂类药物化疗、放疗及上述疗法联合治疗。铂类药物化疗和放疗耐药的发展

表 8 补中益气汤联合顺铂对 A549 细胞 PDK1、p-Akt 荧光表达强度的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 8 Effect of Buzhong Yiqitang combined with cisplatin on fluorescence expression intensity of PDK1 and p-Akt in A549 cell ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度	PDK1 荧光表达强度	p-Akt 荧光表达强度
siRNA 阴性对照组		1.000±0.024	1.000±0.026
siRNA 阴性对照+顺铂组	7.832 μmol·L ⁻¹	0.786±0.035 ¹⁾	0.928±0.035
siPDK1 组		0.643±0.038 ¹⁾	0.745±0.042 ¹⁾
siPDK1+补中益气汤组	10% 含药血清	0.473±0.046 ²⁾	0.691±0.033
siPDK1+顺铂组	7.832 μmol·L ⁻¹	0.357±0.032 ^{2,3)}	0.351±0.028 ^{2,3)}
siPDK1+顺铂+补中益气汤组	7.832 μmol·L ⁻¹ +10% 含药血清	0.269±0.031 ^{2,3)}	0.312±0.024 ^{2,3)}

注 : 与 siRNA 阴性对照组比较 ¹⁾ $P<0.01$; 与 siPDK1 组比较 ²⁾ $P<0.01$; 与 siPDK1+补中益气汤组比较 ³⁾ $P<0.05$

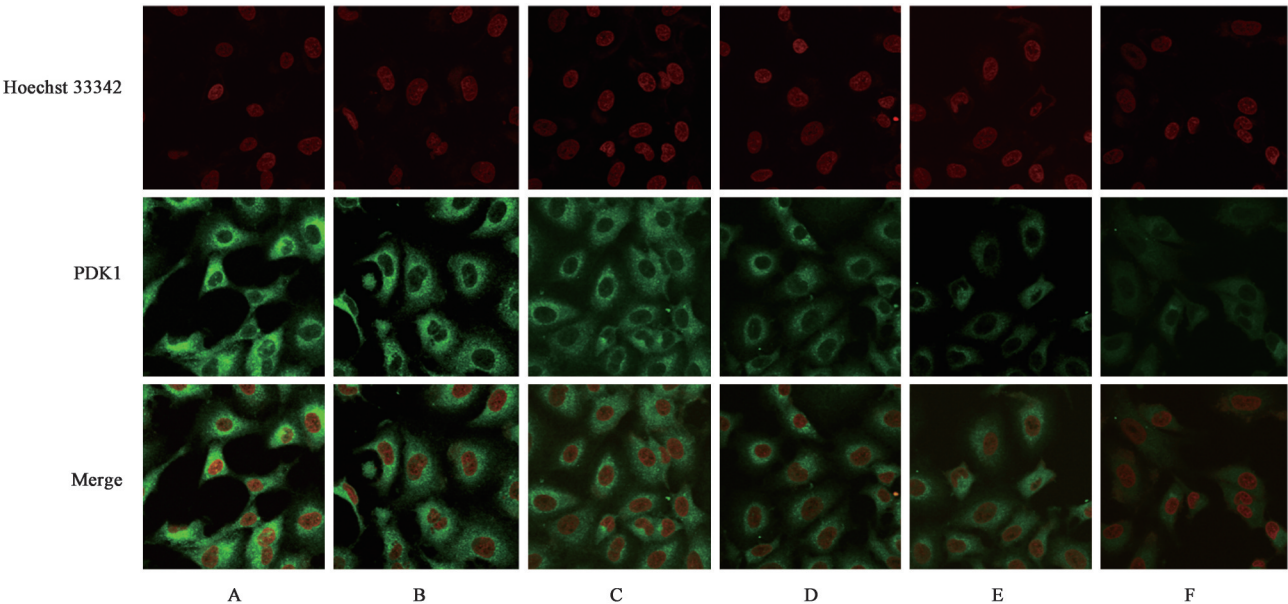


图5 补中益气汤联合顺铂对 A549 细胞 PDK1 荧光表达强度的影响 (免疫荧光, ×600)

Fig. 5 Effect of Buzhong Yiqitang combined with cisplatin on PDK1 fluorescence expression intensity in A549 cells (IF, ×600)

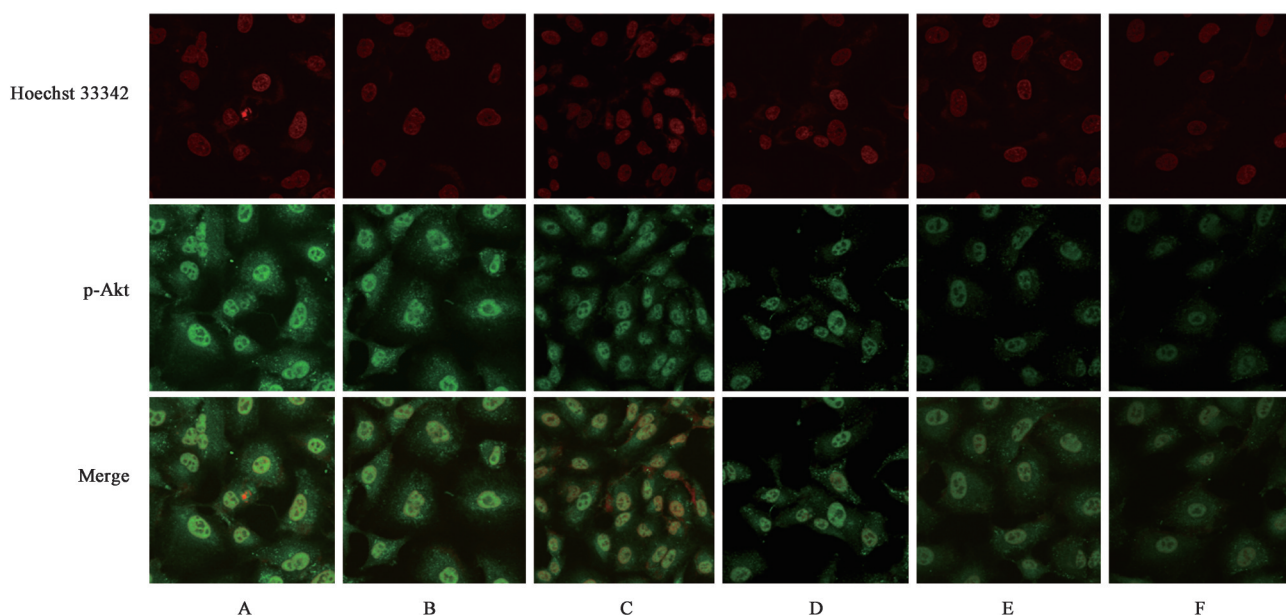


图6 补中益气汤联合顺铂对A549细胞p-Akt荧光表达强度的影响(免疫荧光,×600)

Fig. 6 Effect of Buzhong Yiqitang combined with cisplatin on p-Akt fluorescence expression intensity in A549 cells (IF, ×600)

是肺癌进展中的关键问题。因此,在大多数国家,肺癌患者的5年生存率仅为10%~20%^[16]。

在中医临床中,肺癌以正虚为主,气阴两虚占多数^[18]。临床表现为面色萎黄、神疲乏力、恶心呕吐、食少消瘦等。故选择补中益气汤,以发挥“升阳、滋阴”之效。补中益气汤全方组成:黄芪为君药,人参、炙甘草、白术为臣药,佐以陈皮、当归,升麻、柴胡为引。升麻、柴胡具有轻清升散的功效,与君药黄芪配伍,有益气升阳之功,柴胡和解少阳,陈皮理气健脾,白术补气健脾,当归补血活血。全方用药柔和,君臣佐使,制用配合,以达补气健脾、补益肺气之功^[19]。前期实验发现补中益气汤可抑制A549细胞增殖、改善A549细胞耐药,本实验延续前期基础^[12-14]。

癌细胞通常表现出改变的代谢特征,即使在常氧条件下也利用有氧糖酵解而不是线粒体氧化磷酸化(OXPHOS),这种现象称为瓦伯格效应^[6]。有研究证明,在缺氧状态下,会促进活性Akt向肿瘤细胞线粒体的募集,线粒体Akt磷酸化PDK1的Thr346位点,导致丙酮酸脱氢酶复合物(PDC)中激酶活性增加及其下游底物丙酮酸脱氢酶(PDH)E1 α 磷酸化,从而抑制通过三羧酸(TCA)循环的丙酮酸代谢,增强糖酵解。PDK1/Akt信号通路可以改善肿瘤适应性,刺激糖酵解,对抗自噬和细胞凋亡,抑制氧化应激,并使细胞在体内严重缺氧的情况下能够继续增殖^[20]。糖酵解通量的增加需要编码由缺氧诱导因子-1(HIF-1)和/或HIF-2介导的葡萄糖转运

蛋白和糖酵解酶的基因的转录激活^[21]。葡萄糖是所有生物体中碳和能量的基本来源。葡萄糖转运蛋白(GLUTs)家族促进葡萄糖摄取到细胞中^[22],Akt可以通过磷酸化促进GLUT1向质膜的易位,从而抑制硫氧还蛋白相互作用蛋白(TXNIP),后者介导GLUT1内吞作用并阻断葡萄糖摄取,导致糖酵解通量增加。PKM2作为关键的糖酵解酶之一,催化糖酵解中最后一个生理上不可逆的步骤,即通过将磷酸基团转移至二磷酸腺苷(ADP)将磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)转化为丙酮酸,PKM2高表达会增加糖酵解通量^[23]。LDHA是葡萄糖发酵的主要效应物,将丙酮酸转化为乳酸,其高表达也会促进肿瘤细胞糖酵解。

前期RNA-Seq实验中发现PDK1在A549和A549/DDP细胞中高表达,且有文献称其为糖酵解“守门员”,在肿瘤细胞代谢重编程中起着重要作用^[24],因此选择PDK1作为主要干预靶点。通过转染实验敲低PDK1,用Western blot和Real-time PCR分别检测PDK1的蛋白和mRNA表达水平,发现,PDK1-si-2组敲低效果最明显,且敲低效率>60%,因此将其作为后续实验的PDK1敲低组别。当PDK1敲低后,A549细胞对顺铂的IC₅₀值也降低,加入补中益气汤观察PDK1敲低后A549细胞对顺铂的IC₅₀,此时A549细胞对顺铂的IC₅₀值进一步降低。说明敲低PDK1和使用补中益气汤均可增加A549细胞对顺铂的敏感性。在细胞克隆形成实验中,敲低PDK1、补中益气汤联合顺铂,A549细胞的克隆

形成率下降,说明补中益气汤可通过干预PDK1抑制A549细胞增殖。因为肿瘤细胞的快速增殖是糖酵解的标志,补中益气汤联合顺铂抑制A549细胞的增殖是否通过减少糖酵解通量实现,后续实验进行了乳酸和ATP生成量的检测,敲低PDK1、补中益气汤联合顺铂可使A549细胞减少乳酸生成、增加ATP生成,另外,JC-1发现在敲低PDK1后,补中益气汤联合顺铂可降低线粒体膜电位,说明A549细胞糖酵解水平降低。由于本实验未检测到细胞外酸化率(ECAR)和耗氧率(OCR),因此是否氧化磷酸化水平升高目前未知,后续实验将进行探索。因为线粒体Akt磷酸化PDK1的Thr346位点,因此先用Western blot实验检测了PDK1/Akt信号通路,发现在PDK1敲低、补中益气汤联合顺铂时可降低PDK1/Akt信号通路的表达水平,说明补中益气汤是通过调控PDK1/Akt信号通路抑制A549细胞的增殖。GLUT1、PDH、LDHA、PKM2作为糖酵解途径关键酶,其表达水平代表糖酵解通量的高低。Western blot实验发现敲低PDK1、补中益气汤联合顺铂可以下调糖酵解途径关键酶的活性,说明糖酵解水平下降。在共聚焦免疫荧光实验验证PDK1和p-Akt的荧光表达强度中也得到同样的结果,敲低PDK1的同时,补中益气汤联合顺铂会减少PDK1、p-Akt的荧光表达强度。

综上所述,补中益气汤联合顺铂可以通过PDK1/Akt信号通路调控糖酵解抑制A549细胞增殖。然而,本实验只使用A549细胞系进行研究,缺少动物和人体实验。未来的研究将进一步深入探讨补中益气汤通过调控糖酵解的途径抑制肿瘤细胞增殖的作用机制,为中西医结合防治肺癌提供更加有效的靶点和治疗策略。

[利益冲突] 王淳是本刊编委,本文遵循期刊标准流程处理,其同行评审工作独立于编委会成员及其研究团队之外,本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] SIEGEL R L, GIAQUINTO A N, JEMAL A. Cancer statistics, 2024[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(1):12-49.
- [2] HENDRIKS L E L, REMON J, FAIVRE-FINN C, et al. Non-small-cell lung cancer [J]. Nat Rev Dis Primers, 2024, 10(1):71.
- [3] HIRSCH F R, SCAGLIOTTI G V, MULSHINE J L, et al. Lung cancer: Current therapies and new targeted treatments [J]. Lancet, 2017, 389(10066):299-311.
- [4] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: The next generation[J]. Cell, 2011, 144(5):646-674.

- [5] JOSEPH J, ROUDIER M P, NARAYANAN P L, et al. Proliferation tumour marker network (PTM-NET) for the identification of tumour region in Ki67 stained breast cancer whole slide images[J]. Sci Rep, 2019, 9(1):12845.
- [6] WARBURG O, WIND F, NEGELEIN E. The metabolism of tumors in the body[J]. J Gen Physiol, 1927, 8(6):519-530.
- [7] ZHU J, THOMPSON C B. Metabolic regulation of cell growth and proliferation[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(7):436-450.
- [8] AOKI S, INOUE K, KLEIN S, et al. Placental growth factor promotes tumour desmoplasia and treatment resistance in intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. Gut, 2022, 71(1):185-193.
- [9] GAGLIARDI P A, DI BLASIO L, PRIMO L. PDK1: A signaling hub for cell migration and tumor invasion [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1856(2):178-188.
- [10] WEI Y, ZHANG D, SHI H, et al. PDK1 promotes breast cancer progression by enhancing the stability and transcriptional activity of HIF-1 α [J]. Genes Dis, 2023, 11(4):101041.
- [11] LIU T, YIN H. PDK1 promotes tumor cell proliferation and migration by enhancing the Warburg effect in non-small cell lung cancer[J]. Oncol Rep, 2017, 37(1):193-200.
- [12] 牟琪瑞,李贺,刘玥彤,等.补中益气汤通过Nrf2/ROS通路调控线粒体途径细胞凋亡改善A549/DDP细胞顺铂耐药的分子机制[J].中国实验方剂学杂志,2024,30(1):95-102.
MU Q R, LI H, LIU Y T, et al. Buzhong Yiqi decoction improves cisplatin resistance in A549/DDP cells by regulating mitochondrial pathway apoptosis via the Nrf₂/ROS signaling pathway [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2024, 30(1):95-102.
- [13] 刘亚莉,唐莹,易佳丽,等.补中益气汤对裸鼠肺腺癌移植瘤PI3K/Akt信号通路作用的研究[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(22):232-235.
LIU Y L, TANG Y, YI J L, et al. Effect of Buzhong Yiqi decoction on PI3K/Akt signaling pathway in lung adenocarcinoma xenografts in nude mice [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2013, 19(22):232-235.
- [14] 李贺,于丹,牟琪瑞,等.补中益气汤含药血清联合顺铂对人肺腺癌A549/DDP细胞Nrf₂、PRX1、SOD、GPX4的影响[J].国际中医中药杂志,2024,46(5):607-613.
LI H, YU D, MU Q R, et al. Effects of Buzhong Yiqi decoction-containing serum combined with cisplatin on Nrf₂, PRX1, SOD, and GPX4 in human lung adenocarcinoma A549/DDP cells[J]. Int J Tradit Chin Med, 2024, 46(5):607-613.
- [15] SUN Y, LIU W, ZHAO Q, et al. Down-regulating the expression of miRNA-21 inhibits the glucose metabolism of A549/DDP cells and promotes cell death through the PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 α pathway [J]. Front Oncol, 2021, doi:10.3389/fonc.2021.653596.
- [16] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, 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(3):209-249.
- [17] TRAVIS W D, BRAMBILLA E, NICHOLSON A G, et al. The 2015 World Health Organization classification of lung tumors: Impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification[J]. *J Thorac Oncol*, 2015, 10(9):1243-1260.
- [18] 王院春. 基于“癌毒”病机理论的复肺解毒方治疗非小细胞肺癌临床及代谢组学研究[D]. 南京:南京中医药大学, 2022.
- WANG Y C. Clinical and metabolomics study of Fujiedu Jiedu recipe in the treatment of non-small cell lung cancer based on the "cancer toxin" pathogenesis theory[D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2022.
- [19] 钱佳南,孙博云,胡鸿毅. 补中益气汤治疗恶性肿瘤疾病的临床及基础研究进展[J]. *河北中医医药学报*, 2021, 36(5):59-64.
- QIAN J N, SUN B Y, HU H Y. Advances in clinical and basic research on Buzhong Yiqi decoction in the treatment of malignant tumors[J]. *Hebei J Tradit Chin Med*, 2021, 36(5): 59-64.
- [20] CHAE Y C, VAIRA V, CAINO M C, et al. Mitochondrial Akt regulation of hypoxic tumor reprogramming[J]. *Cancer Cell*, 2016, 30(2):257-272.
- [21] IYER N V, KOTCH L E, AGANI F, et al. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha[J]. *Genes Dev*, 1998, 12(2):149-62.
- [22] ANCEY P B, CONTAT C, MEYLAN E. Glucose transporters in cancer-from tumor cells to the tumor microenvironment[J]. *FEBS J*, 2018, 285(16):2926-2943.
- [23] JURICA M S, MESECAR A, HEATH P J, et al. The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1, 6-bisphosphate[J]. *Structure*, 1998, 6(2):195-210.
- [24] PENG F, WANG J H, FAN W J, et al. Glycolysis gatekeeper PDK1 reprograms breast cancer stem cells under hypoxia[J]. *Oncogene*, 2018, 37(8):1119.
- [责任编辑 张丰丰]