

· 药理 ·

## 基于内质网应激探讨扶正解毒方联合5-Fu对胃癌荷瘤小鼠术后复发及转移的影响

冯颖<sup>1,2</sup>, 吴喆<sup>1</sup>, 李杰<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053;

2. 南京医科大学姑苏学院, 南京医科大学附属苏州医院, 苏州市立医院, 苏州 215000)

**[摘要]** 目的: 研究扶正解毒方联合5-氟尿嘧啶(5-Fu)对胃癌荷瘤小鼠术后复发转移的抑制作用, 并通过肿瘤微环境中CD4<sup>+</sup>T细胞, CD8<sup>+</sup>T细胞, 调节性T(Treg)细胞含量的改变, 内质网应激途径及磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路, 探讨其可能的分子机制。方法: 40只615小鼠随机分为模型组, 扶正解毒方(25 g·kg<sup>-1</sup>)组, 5-Fu(25 mg·kg<sup>-1</sup>)组, 联合组(扶正解毒方25 g·kg<sup>-1</sup>+5-Fu 25 mg·kg<sup>-1</sup>), 每组各10只, 将小鼠前胃癌细胞(MFC细胞)接种于左后肢内侧爪垫下, 通过手术切除移植瘤建立术后复发模型。苏木素-伊红(HE)染色法观察术后复发胃癌荷瘤小鼠肺转移病理形态的改变; 流式细胞术检测复发瘤中CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T值及脾脏中Treg细胞[CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, 叉头框蛋白P3(FOXP3)<sup>+</sup>细胞]的含量; 蛋白免疫印迹法(Western blot)及免疫组化法(IHC)检测内质网应激相关蛋白[葡萄糖调节蛋白78(GRP78), 肌醇需求酶1 $\alpha$ (IRE1 $\alpha$ ), 激活转录因子6(ATF6), 蛋白激酶R样内质网激酶(PERK)]含量, 以及PI3K/Akt/mTOR通路相关蛋白表达。结果: 与模型组比较, 联合组复发抑制率明显升高( $P<0.05$ ); 各治疗组复发瘤重均明显降低( $P<0.05$ ); 各治疗组肺转移数均降低, 转移率均有所降低, 联合组肺转移总数最少, 转移率最低, 但差异无统计学意义; 扶正解毒方组、联合组CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T值明显升高( $P<0.05$ ), Treg细胞含量明显降低( $P<0.05$ ); 5-Fu组Treg细胞含量明显升高( $P<0.05$ )。IHC结果显示, 与模型组比较, 各治疗组ATF6蛋白表达明显下降( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), IRE1 $\alpha$ 表达明显下降( $P<0.05$ ), Akt表达显著下降( $P<0.01$ ); 5-Fu组及联合组mTOR表达明显下降( $P<0.05$ )。Western blot结果显示, 与模型组比较5-Fu组GRP78表达明显下降( $P<0.05$ ), 5-Fu组及联合组PI3K, 磷酸化Akt(p-Akt), mTOR表达明显下降( $P<0.05$ )。结论: 扶正解毒方联合5-Fu可以抑制荷瘤小鼠术后复发转移, 机制可能与抑制PI3K/Akt/mTOR的信号通路, 下调内质网应激, 改善肿瘤免疫抑制微环境有关。

**[关键词]** 扶正解毒方; 5-氟尿嘧啶; 胃癌; 内质网应激; 肿瘤免疫微环境

**[中图分类号]** R22; R242; R285.5; R2-031; R979.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)16-0075-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20211699

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20210628.1528.003.html>

**[网络出版日期]** 2021-06-28 16:31

### Effect of Fuzheng Jiedu Prescription Combined with 5-Fu Against Postoperative Recurrence and Metastasis of Gastric Cancer in Mice: An Exploration Based on Endoplasmic Reticulum Stress

FENG Ying<sup>1,2</sup>, WU Zhe<sup>1</sup>, LI Jie<sup>1\*</sup>

(1. Guang'anmen Hospital Affiliated to China Academy of Chinese Medicine Sciences, Beijing 100053, China;

2. The Affiliated Suzhou Hospital of Nanjing Medical University, Suzhou Municipal Hospital, Gusu school, Nanjing Medical University, Suzhou 215000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the inhibitory effect of Fuzheng Jiedu prescription (FZJDP)

**[收稿日期]** 20210312(023)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81774289, 82074402)

**[第一作者]** 冯颖, 在读博士, 从事中西医结合防治肿瘤复发转移研究, E-mail: fengying91521@yeah.net

**[通信作者]** \*李杰, 博士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 从事中西医结合防治肿瘤复发转移研究, E-mail: drjieli2007@126.com

combined with 5-fluorouracil (5-Fu) against postoperative recurrence and metastasis in gastric cancer-bearing mice and explore the possible mechanism based on changes in CD4<sup>+</sup> T cells, CD8<sup>+</sup> T cells, and regulatory T (Treg) cells of tumor microenvironment, endoplasmic reticulum stress (ERS) and phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. **Method:** Forty 615 mice were randomly divided into the model group, FZJDP (25 g·kg<sup>-1</sup>) group, 5-Fu(25 mg·kg<sup>-1</sup>) group, and combined (25 g·kg<sup>-1</sup> FZJDP + 25 mg·kg<sup>-1</sup> 5-Fu) group, with 10 mice in each group. Mouse forestomach carcinoma (MFC) cells were implanted into the inner side of footpad of the left hind paw and the transplanted tumor was then surgically excised to establish a postoperative recurrence model. Hematoxylin-eosin(HE) staining was conducted to observe the pathological changes in mice with gastric cancer recurrence and lung metastasis. The CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T cell ratio in recurrent tumor and the percentages of Treg cells [CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, and forkhead box protein P3 (FOXP3)<sup>+</sup> cells] in spleen were detected by flow cytometry. The contents of ERS-related proteins [78-kDa glucose-regulated protein (GRP78), inositol-requiring enzyme 1 alpha (IRE1α), activating transcription factor 6 (ATF6), and protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)] and the expression of related proteins in the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway were determined by Western blot and immunohistochemistry (IHC). **Result:** Compared with the model group, the combined group significantly increased the recurrent inhibition rate ( $P<0.05$ ). The recurrent tumor weight was significantly decreased in each treatment group ( $P<0.05$ ). The number of lung metastases and metastasis rate declined in each treatment group, and the lowest values were observed in the combined group, without any statistical significance. The CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T cell ratios in the FZJDP group and combined group were significantly elevated ( $P<0.05$ ), while the percentages of Treg cells were reduced ( $P<0.05$ ). However, 5-Fu resulted in a significant increase in Treg cell percentage ( $P<0.05$ ). IHC results showed that the protein expression levels of ATF6 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), IRE1α ( $P<0.05$ ), and Akt ( $P<0.01$ ) in each treatment group were significantly down-regulated as compared with those in the model group. As revealed by Western blot, the GRP78 expression level in the 5-Fu group was lower than that in the model group ( $P<0.05$ ), and the expression levels of PI3K, phosphorylated Akt (p-Akt), and mTOR were significantly decreased in the 5-Fu group and the combined group ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** FZJDP combined with 5-Fu reduces postoperative recurrence and metastasis in tumor-bearing mice possibly by inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, diminishing ERS, and improving tumor immune microenvironment.

**[Keywords]** Fuzheng Jiedu prescription; 5-fluorouracil (5-Fu); gastric cancer; endoplasmic reticulum stress (ERS); tumor immune microenvironment

胃癌是我国发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一,由于缺乏早期筛查、诊疗等方面原因,我国大部分胃癌患者就诊时已处于进展期<sup>[1]</sup>。手术是可切除进展期胃癌的首要治疗方法,然而术后复发率高达60%~80%<sup>[2]</sup>,5年生存率不足25%<sup>[3]</sup>。因此,防治胃癌的术后复发转移对于改善患者的远期预后具有重要意义。

癌细胞所处的肿瘤微环境(TME)具有乏氧、营养匮乏、低pH等特征,同时伴随手术、药物、放疗等外部干预手段的刺激,会导致癌细胞中的未折叠或错误折叠的蛋白在内质网中累积,引起内质网应激(ERS),诱发非折叠蛋白反应(UPR),以维持肿瘤内环境稳态,持续或强烈的ERS能够促进肿瘤细胞生长、存活、分化和蛋白质稳态<sup>[4]</sup>。UPR激活依赖于

3个关键蛋白,分别为蛋白激酶R样内质网激酶(PERK),肌醇需求酶1α(IRE1α)和激活转录因子6(ATF6)<sup>[5]</sup>。生理条件下,这些蛋白均与伴侣蛋白葡萄糖调节蛋白78(GRP78)结合而处于失活状态,而当发生ERS后与GRP78解离并结合未折叠或错误折叠蛋白从而激活UPR,将信号传递给下游多条通路。

研究表明ERS能够促进肿瘤细胞增殖、侵袭、转移、耐药及免疫逃逸<sup>[4]</sup>。如UPR的下游磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路被报道在胃癌中高表达,能够增强癌细胞的抗凋亡、侵袭及迁移能力,有利于肿瘤的复发转移<sup>[6]</sup>。癌细胞还可凭借ERS维持TME的免疫抑制特性,如降低肿瘤相关树突状细胞

(tDC)抗原提呈能力<sup>[7]</sup>,阻止CD8<sup>+</sup>T细胞增殖<sup>[8]</sup>,募集髓源抑制细胞(MDSC)促进免疫逃逸<sup>[9]</sup>。而在TME中的免疫抑制微环境是胃癌转移复发的重要条件<sup>[10]</sup>,因此抑制ERS及下游通路,重塑肿瘤免疫微环境对于防治肿瘤的复发转移具有积极作用。

中医药是我国防治肿瘤的特色疗法,扶正解毒方是中国中医科学院广安门医院治疗胃癌的有效方剂。前期临床研究表明该方结合化疗能够延长胃癌患者术后的生存期,降低复发转移率<sup>[11]</sup>,基础研究表明该方能够通过重塑TME,改善免疫抑制状态发挥抗肿瘤作用,延长荷瘤小鼠生存期<sup>[12-13]</sup>,但其具体作用机制仍需进一步阐明。本研究通过构建胃癌荷瘤小鼠术后复发转移模型,探讨扶正解毒方对肿瘤及外周(脾脏)免疫微环境,ERS及下游PI3K/Akt/mTOR通路的影响,以期中医药抗肿瘤提供新的实验依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级615小鼠40只,雄性,6~8周龄,体质量(20±2)g,购自天津血液病研究所,合格证号SCXK(津)2020-0001。饲养于中国中医科学院广安门医院屏障环境动物房,动物实验开展取得中国中医科学院广安门医院伦理委员会同意,编号IACUC-GAMH-2020-006。

**1.2 瘤株** 小鼠前胃癌细胞(MFC细胞)由中国医学科学院基础医学研究所提供,编号1101MOU-PUMC000143。

**1.3 药物** 扶正解毒方组成为黄芪、党参、生白术、制何首乌、枸杞子、重楼、猕猴桃根、土茯苓。按2:1:1:1:1:1:1:1比例称取总质量324g,1000mL蒸馏水提取2次,后浓缩至100mL,膏方和生药之比为1:3.24,由中国中医科学院广安门医院制剂室提供(批号JZ20190102),张萱主任药师鉴定为正品,符合2015年版《中华人民共和国药典》标准。扶正解毒方剂量依据人和小鼠间体表面积换算的等效剂量比值为0.0026,计算小鼠的临床等效给药剂量,使用纯水配置成药物质量浓度为1.25g·mL<sup>-1</sup>的溶液,放于4℃冰箱保存备用,灌胃剂量为25g·kg<sup>-1</sup>。5-Fu注射液购自天津金耀氨基酸有限公司(批号118010409),规格为10mL(0.25g)/支,小鼠腹腔注射剂量为25mg·kg<sup>-1</sup>。

**1.4 试剂** RPMI 1640培养基,胎牛血清(北京协和试剂资源中心,批号分别为CCCM019,CCCM017);磷酸盐缓冲液(PBS),0.25%胰蛋白酶溶液(美国Thermo Scientific公司,批号分别为

AM9624,15400054);苏木素-伊红(HE)染色试剂(珠海贝索生物技术有限公司,批号719021);抗鼠CD4抗体,抗鼠CD8a抗体,抗鼠CD3e抗体,鼠抗兔CD25抗体,抗鼠叉头框蛋白P3(FOXP3)抗体,Transcription Factor Buffer Set(美国BioLegend公司,批号分别为100431,100707,368507,100311,101909,424401);β-肌动蛋白(β-actin,13E5)兔单克隆抗体,PI3K p85抗体,Akt兔单克隆抗体,免疫球蛋白重链结合蛋白(BIP)抗体(GRP78)(美国CST公司,批号分别为4292,9614,13879,3183);mTOR抗体,PERK抗体,ATF6抗体(美国Abcam公司,批号分别为ab2732,ab115617,ab37149);IRE1α抗体(北京安诺伦生物科技有限公司,批号sc-20790);小鼠超敏二步法免疫组化(IHC)检测试剂(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号PV-9005);DAB显色液(北京雷根生物技术有限公司,PW0073);辣根过氧化物酶(HRP)山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(H+L)二抗(美国Thermo Fisher公司,批号31460)。

**1.5 仪器** CJT-09型超净工作台(北京长城空气净化工程公司);MC0-18AIC型CO<sub>2</sub>细胞培养箱(日本Sanyo公司);TSI00型光学倒置显微镜(日本尼康公司);5810R型离心机(德国Eppendorf公司);FACS Canto II型流式细胞仪(美国BD公司);Bio-Rad ChemiDoc XRS型凝胶成像系统,1703930型电泳转移槽,1645050型电泳仪,1658001型电泳槽(美国Bio-Rad公司);TE200U型倒置显微镜(日本尼康公司)。

## 2 方法

### 2.1 造模、分组、给药及取材

**2.1.1 造模** 局部复发转移模型参考课题组既往的文献<sup>[12]</sup>:从液氮中取出MFC细胞,复苏传代培养至3~4代时,调整细胞密度为1×10<sup>8</sup>个/mL,每只615小鼠接种0.05mL,接种于左侧后肢爪垫内皮下,接种时先用75%乙醇消毒。10d后观察接种处有明显的肿瘤生长,瘤重0.5~1g,肿瘤部分包裹完整,没有坏死组织和糜烂,且手术后予以药物干预2周无死亡。手术方法是先予10%水合氯醛以3.5mL·kg<sup>-1</sup>剂量麻醉小鼠,再用6号手术线在小鼠原发瘤上端部分结扎,再用手术剪沿结扎线切除原发瘤,模拟临床中原发瘤切除术后局部仍有残存瘤细胞。术后切口处用棉球蘸取抗生素涂抹,以防止过多流血及感染,10d后可观察到手术部位有肿块形成,即模型成功建立。

**2.1.2 分组及给药** 接种MFC细胞后10~12d,测

量肿瘤体积为 $1.5\text{ cm}^3$ 时予切除原发瘤,按体质量采取随机数字表法将小鼠随机分为4组,每组10只,分别为模型组,扶正解毒方组,5-Fu组,联合组,并在24 h内给予灌胃。

模型组分别给予纯水灌胃( $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ )及腹腔注射生理盐水( $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ );扶正解毒方组分别给予中药灌胃,生理盐水腹腔注射( $25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,  $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ );5-Fu组分别给予纯水灌胃,腹腔注射氟尿嘧啶( $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,  $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ );联合组分别给予中药灌胃+腹腔注射5-Fu( $25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,  $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),连续14 d,每日1次灌胃,腹腔注射为每日1次连续5 d,停2 d,共2周。

**2.1.3 取材** 局部复发瘤:连续给药14 d后,剥离复发瘤,计算局部复发率。复发瘤重抑制率= $[1-(\text{治疗组平均复发瘤重}/\text{模型组平均复发瘤重})]\times 100\%$ ,复发抑制率= $[1-(\text{治疗组复发率}/\text{模型组复发率})]\times 100\%$ 。

肺组织:眼眶放血,保证肺部组织干净。取出双肺组织,称质量,投入10%甲醛中固定24 h,观察表面有无白色隆起为转移灶。本研究采用的转移灶大小分级为I级,直径 $<0.5\text{ mm}$ ;II级, $0.5\text{ mm}\leq$ 直径 $<1\text{ mm}$ ;III级, $1\text{ mm}\leq$ 直径 $<2\text{ mm}$ ;IV级,直径 $\geq 2\text{ mm}$ 。肺转移灶总转移数计算公式为总转移数=I级结节个数 $\times 1$ +II级结节个数 $\times 2$ +III级结节个数 $\times 3$ +IV级结节个数 $\times 4$ 。组织学观察肿瘤转移情况和转移分级,计算肺转移率,转移抑制率= $[\text{模型组转移灶个数}-\text{治疗组转移灶个数}]/\text{模型组转移灶个数}\times 100\%$ 。

新鲜脾组织:从小鼠体内剥离脾组织后,用PBS冲洗,放于冰上备用。

**2.2 HE染色观察肺转移情况** 10%甲醛固定各组小鼠肺组织,石蜡包埋切片, $75\text{ }^\circ\text{C}$ 烤片30 min,二甲苯脱蜡,梯度乙醇浸泡,苏木素溶液浸泡5 min,分化返蓝后,伊红染色3 min。显微镜下观察并拍照。

**2.3 流式细胞术检测扶正解毒方联合5-Fu对肿瘤及外周(脾脏)免疫微环境的影响**

**2.3.1 流式细胞术检测复发瘤中 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$  T细胞的情况** 将各组小鼠复发瘤组织裂解成单细胞悬液,分别加入CD3,CD4,CD8抗体各 $2\text{ }\mu\text{L}$ , $4\text{ }^\circ\text{C}$ 避光孵育30 min。PBS洗涤2遍,将细胞重悬于 $100\text{ }\mu\text{L}$ 的PBS中,过滤,1 h内上流式细胞仪检测。圈门策略为在FSC,SSC中选中单核淋巴细胞群,在该群细胞中, $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$ 为 $\text{CD4}^+$  T细胞, $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ 为 $\text{CD8}^+$  T细胞。

**2.3.2 流式细胞术检测荷瘤小鼠脾组织中调节性T(Treg)细胞的含量** 新鲜脾脏研磨后收集细胞,调整至密度为 $1\times 10^6$ 个/mL。取悬液 $100\text{ }\mu\text{L}$ ,分别加入抗小鼠CD4,CD25抗体, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 避光孵育30 min。用PBS洗涤细胞后加入固定/破膜工作液,旋涡混匀, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 避光破膜1 h。用破膜缓冲工作液洗涤细胞,并弃去上清液,加入FOXP3抗体, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 避光孵育45 min。加入 $2\text{ }\mu\text{L}$ 破膜缓冲工作液, $350\times g$ 离心5 min,洗涤2次,弃去上清液,将细胞重悬于 $100\text{ }\mu\text{L}$ 的1%多聚甲醛中,过滤,1 h内上流式细胞仪检测。圈门策略为在FSC,SSC中选中单核淋巴细胞群,并用 $\text{CD4}^+$ 选中T细胞群,在该群细胞中, $\text{CD25}^+$ , $\text{FOXP3}^+$ 为Treg细胞。

**2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测复发瘤中UPR及PI3K/Akt/mTOR通路相关蛋白的表达** 从液氮中取出肿瘤组织,振荡破碎,RIPA裂解液 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 反应40 min, $12\text{ }000\times g$ 离心15 min,取上清,二奎琳甲酸(BCA)法测定蛋白质浓度。取蛋白质 $20\text{ }\mu\text{g}/\text{孔}$ ,进行10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,将蛋白转至聚偏二氟乙烯膜上,5%脱脂奶粉室温封闭2 h,一抗(1:1 000) $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜。洗膜缓冲液(TBST)洗膜,二抗(1:5 000)室温孵育2 h,TBST洗膜,双激光红外成像仪扫描图像,分析UPR及PI3K/Akt/mTOR通路相关蛋白表达量。

**2.5 IHC观察复发瘤中UPR及PI3K/Akt/mTOR通路相关蛋白表达** 对瘤组织切片进行二甲苯脱蜡、乙醇水合,蒸馏水清洗。放入盛有抗原修复液的高压锅内高压修复3 min,待室温冷却后滴加一抗(1:500), $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育2 h,PBS浸洗3次。滴加二抗(1:5 000), $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育30 min,PBS浸洗3次,DAB溶液显色,显微镜下观察染色深浅,及时终止显色反应。苏木素复染,分化返蓝,用梯度乙醇脱水,二甲苯透明封片,显微镜下观察,拍照保存。使用Image Pro Plus 6.0软件分析相关蛋白表达。

**2.6 统计学方法** 采用SPSS 21.0软件进行统计学处理,计数资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 $t$ 检验,多组间比较运用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 对肿瘤复发及肺转移的影响

**3.1.1 对肿瘤复发情况的影响** 与模型组比较,联合组复发抑制率明显较高( $P<0.05$ )。与模型组比较,各治疗组复发瘤重均明显降低( $P<0.05$ );与5-Fu组比较,

扶正解毒方组和联合组复发瘤重均明显降低( $P<0.05$ );  
与扶正解毒方组比较,联合组复发瘤重均明显降低

( $P<0.05$ )。与模型组比较,各治疗符复发率和复发瘤  
重抑制率差异无统计学意义。见表1。

表1 扶正解毒方联合5-Fu对胃癌复发转移小鼠肿瘤复发情况的影响( $n=10$ )

Table 1 Effect of Fuzheng Jiedu prescription combined with 5-Fu on inhibiting tumor recurrence of mice with recurrent or metastatic gastric cancer ( $n=10$ )

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	复发率/%	复发抑制率/%	复发瘤重( $\bar{x}\pm s$ )/g	复发瘤重抑制率/%
模型		77.13	-	1.05±0.06	-
扶正解毒方	25	41.12	46.61	0.30±0.13 <sup>1)</sup>	71.41
5-Fu	0.025	35.20	54.32	0.60±0.19 <sup>1,2)</sup>	42.82
联合	25+0.025	29.41	61.80 <sup>1)</sup>	0.19±0.07 <sup>1,2,3)</sup>	81.91

注:与模型组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ;与扶正解毒方组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ ;与5-Fu组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ 。

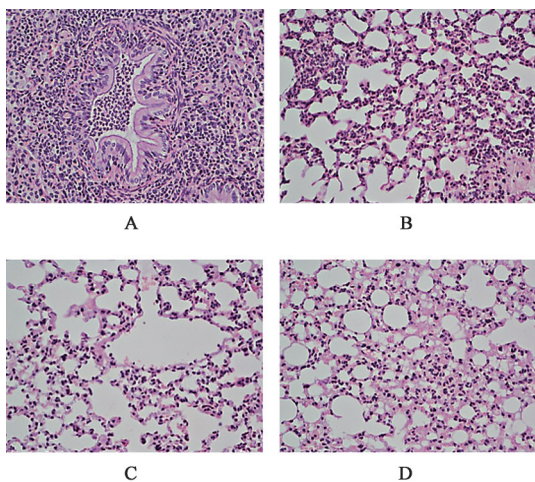
3.1.2 对肺转移的影响 与模型组比较,各治疗组  
肺转移数均降低,转移率均有所降低,联合组肺转  
移总数最少,转移率最低,但差异无统计学意义。  
HE染色结果显示,模型组的转移灶成团状增生,转  
移灶直径多为IV级,其他各组转移灶直径多为

I~II级,联合组转移灶在肺脏边缘,肺炎性细胞较  
少,肺结构清晰。扶正解毒方组转移灶有血管聚集  
倾向,肺结构较清晰。5-Fu组肺组织结构欠清晰,  
炎性增生明显,出现大量的纤维增生,从病理形态  
上看,5-Fu组小鼠肺功能较差。见表2,图1。

表2 扶正解毒方联合5-Fu对胃癌复发转移小鼠肺转移的影响( $n=10$ )

Table 2 Effect of Fuzheng Jiedu prescription combined with 5-Fu on lung metastasis of mice with recurrent or metastatic gastric cancer ( $n=10$ )

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	肺转移分级/个				肺转移总数/个	转移率/%	转移抑制率/%
		I	II	III	IV			
模型		3	1	0	7	33	88.23	-
扶正解毒方	25	9	1	0	0	11	58.01	66.67
5-Fu	0.025	7	2	1	0	14	65.42	57.58
联合	25+0.025	8	1	0	0	10	43.50	69.70



A. 模型组;B. 扶正解毒方组;C. 5-Fu组;D. 联合组(图2~5同)

图1 扶正解毒方联合5-Fu对胃癌复发转移小鼠肺转移病理形态的影响(HE,  $\times 200$ )

Fig. 1 Effect of Fuzheng Jiedu prescription combined with 5-Fu on pathological morphology of lung metastasis of mice with recurrent or metastatic gastric cancer (HE,  $\times 200$ )

3.2 对复发瘤组织CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T值及脾组织中Treg  
细胞的影响 研究结果显示,各治疗组肿瘤组织  
CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T细胞比例均偏低,推测与术后复发模型  
有关,但与模型组比较,扶正解毒方组、联合组  
CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T值明显升高( $P<0.05$ ),5-Fu组有升高  
趋势,但差异无统计学意义。与模型组比较,扶正  
解毒方组、联合组中脾组织Treg细胞含量明显降低  
( $P<0.05$ ),5-Fu组脾组织Treg细胞含量明显升高  
( $P<0.05$ ),推测与单纯化疗药物的毒性作用造成免  
疫抑制有关。见表3。

3.3 对复发肿瘤组织中UPR相关蛋白表达的影响

IHC结果显示,模型组肿瘤组织UPR相关蛋白  
PERK, ATF-6, IRE1 $\alpha$ 蛋白表达含量较高,黄棕色区  
域偏大,颜色较深。与模型组比较,PERK蛋白表达  
各治疗组均有下降趋势,但差异无统计学意义。与  
模型组比较,各治疗组ATF6蛋白表达明显下降  
( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),IRE1 $\alpha$ 表达明显下降( $P<0.05$ )。

表3 扶正解毒方联合5-Fu对胃癌复发转移小鼠复发瘤组织CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T值及脾组织Treg的影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 3 Effect of Fuzheng Jiedu prescription combined with 5-Fu on regulating CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> in recurrent tumor tissue and Treg cells in spleen tissue of mice with recurrent or metastatic gastric cancer ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Treg细胞含量/%	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> T值
模型		0.60±0.10	0.39±0.09
扶正解毒方	25	0.38±0.10 <sup>1)</sup>	0.77±0.08 <sup>1)</sup>
5-Fu	0.025	0.79±0.17 <sup>1)</sup>	0.43±0.06
联合	25+0.025	0.36±0.19 <sup>1)</sup>	0.98±0.08 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>P<0.05,<sup>2)</sup>P<0.01(表4~7同)。

见表4,图2。Western blot结果显示,与模型组比较,5-Fu组GRP78表达明显下降(P<0.05),联合组也有降低趋势,但差异无统计学意义。见表5,图3。

表4 扶正解毒方联合5-Fu对胃癌复发转移小鼠PERK, ATF6, IRE1α蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of Fuzheng Jiedu prescription combined with 5-Fu on protein expression of PERK, ATF6, IRE1α of mice with recurrent or metastatic gastric cancer ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	PERK	ATF6	IRE1α
模型		0.10±0.01	0.13±0.02	0.08±0.01
扶正解毒方	25	0.07±0.01	0.06±0.01 <sup>2)</sup>	0.06±0.05 <sup>1)</sup>
5-Fu	0.025	0.09±0.03	0.08±0.01 <sup>1)</sup>	0.06±0.00 <sup>1)</sup>
联合	25+0.025	0.08±0.02	0.04±0.01 <sup>2)</sup>	0.06±0.05 <sup>1)</sup>

### 3.4 对复发肿瘤组织中PI3K/Akt/mTOR通路相关蛋白表达的影响

IHC结果显示,与模型组比较,各

表5 扶正解毒方联合5-Fu对胃癌复发转移小鼠GRP78蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 5 Effect of Fuzheng Jiedu prescription combined with 5-Fu on protein expression of GRP78 of mice with recurrent or metastatic gastric cancer ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	GRP78/β-actin
模型		2.26±0.06
扶正解毒方	25	2.63±0.19
5-Fu	0.025	0.94±0.02 <sup>1)</sup>
联合	25+0.025	1.40±0.24

治疗组Akt表达均显著下降(P<0.01);5-Fu组及联合组mTOR表达明显下降(P<0.05),扶正解毒方组差异无统计学意义。见表6,图4。Western blot结果显示,与模型组比较,5-Fu组及联合组PI3K,磷酸化Akt(p-Akt),mTOR表达明显下降(P<0.05),扶正解毒方组差异无统计学意义。见表7,图5。

## 4 讨论

近年来中医药在胃癌治疗上的优势逐渐凸显,在逆转癌前病变,降低术后转移复发率,改善围手术期患者症状,延长晚期患者生存期等方面显示出了一定的优势,但具体机制有待深入探讨<sup>[14-15]</sup>。中医理论认为胃癌发生的根本病机为“正气虚弱,邪毒凝聚”,因此扶正解毒是其主要治法。扶正解毒方在临床多年的应用中效果值得肯定,方中黄芪、党参、白术健脾益气,制何首乌、枸杞子补益肝肾,扶正培本,佐以重楼、土茯苓、猕猴桃根解毒抗癌,共奏起到健脾益气、补肾生血、清热解毒抗癌

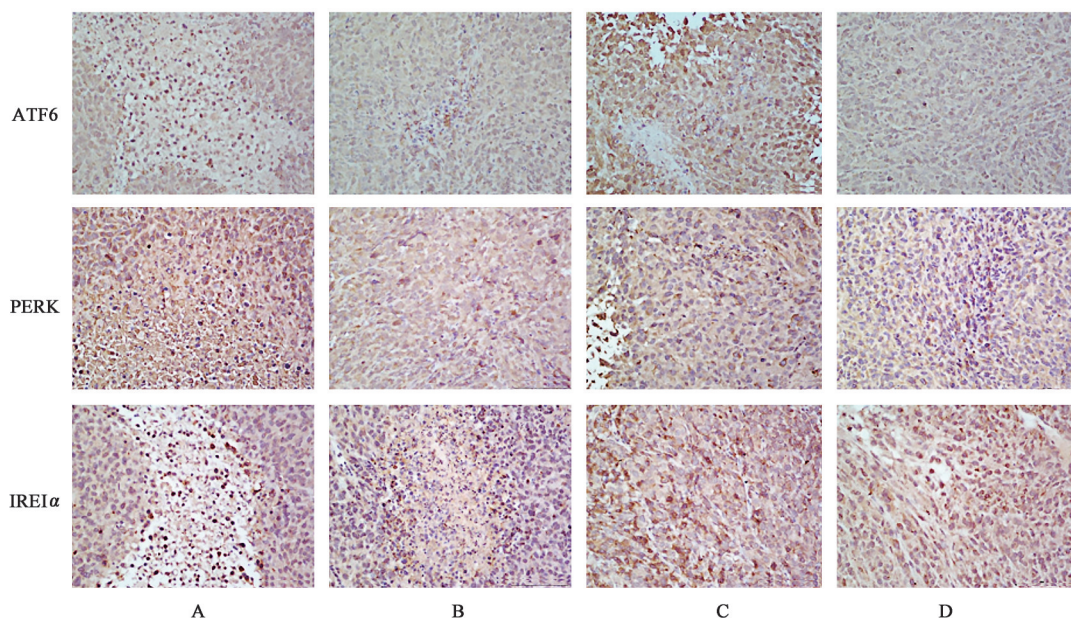


图2 扶正解毒方联合5-Fu对PERK, ATF6, IRE1α蛋白表达的影响(IHC, ×200)

Fig. 2 Effect of Fuzheng Jiedu prescription combined with 5-Fu on protein expression of PERK, ATF6, IRE1α (IHC, ×200)

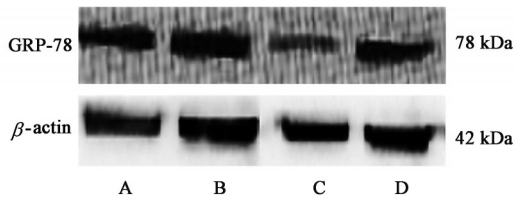


图3 胃癌复发转移小鼠复发肿瘤组织 GRP78 蛋白表达电泳  
Fig. 3 Electrophoresis of GRP78 in recurrent cancer tissues of mice with recurrent or metastatic gastric cancer

表6 扶正解毒方联合 5-Fu 对胃癌复发转移小鼠肿瘤组织中 Akt, mTOR 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 6 Effect of Fuzheng Jiedu prescription combined with 5-Fu on protein expression of Akt, mTOR of mice with recurrent or metastatic gastric cancer ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	Akt	mTOR
模型		0.52±0.12	0.10±0.01
扶正解毒方	25	0.16±0.01 <sup>2)</sup>	0.10±0.02
5-Fu	0.025	0.14±0.01 <sup>2)</sup>	0.08±0.02 <sup>1)</sup>
联合	25+0.025	0.24±0.02 <sup>2)</sup>	0.06±0.01 <sup>1)</sup>

之功<sup>[11]</sup>。

ERS 对肿瘤的生存、转移及免疫逃逸均有重要的影响<sup>[16-17]</sup>。本研究中通过构建术后复发转移的荷

瘤小鼠模型发现:扶正解毒方联合 5-Fu 较两者单独用药在抑制肿瘤复发以及转移方面均具有优势,说明扶正解毒方与 5-Fu 具有协同作用,能够提高其治疗效果,且可以缓解单用 5-Fu 对肺正常组织造成的损伤。通过 Western blot 及 IHC 分析发现联合组 GRP78 蛋白及 ERS 关键蛋白 PERK, IRE1 $\alpha$ , ATF6 均有不同程度的下降,说明扶正解毒方联合 5-Fu 降低胃癌复发转移与一定程度上改善癌细胞内 ERS 有关。

PI3K/Akt/mTOR 信号通路在肿瘤细胞的生长、分化、增殖等过程中发挥重要作用,为 ERS 主要下游通路之一<sup>[18]</sup>。郭文文<sup>[6]</sup>发现 ERS 可以激活 PI3K/Akt 通路促进胃癌细胞的侵袭和迁移。舍雅莉等<sup>[19]</sup>发现具有温中散寒,活血化瘀,解毒散结的敦煌平胃丸可以通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路抑制胃癌生长。扶正解毒方中含有黄酮类中药,而韦燕飞等<sup>[20]</sup>论述了黄酮类中药单体通过 PI3K/Akt 信号通路抑制肿瘤发生和发展。本研究我们发现扶正解毒方联合 5-Fu 能够不同程度下调该通路相关蛋白 PI3K, Akt, p-Akt 及 mTOR 表达,其机制可能与抑

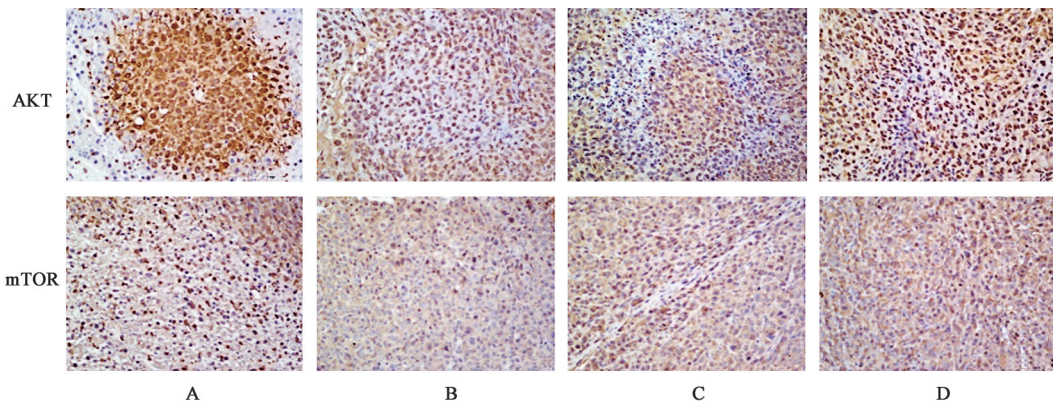


图4 扶正解毒方联合 5-Fu 对胃癌复发转移小鼠肿瘤组织中 Akt, mTOR 蛋白表达的影响(IHC, ×200)

Fig. 4 Effect of Fuzheng Jiedu prescription combined with 5-Fu on on protein expression of Akt, mTOR of mice with recurrent or metastatic gastric cancer (IHC, ×200)

表7 扶正解毒方联合 5-Fu 对胃癌复发转移小鼠肿瘤组织中 PI3K, p-Akt, mTOR 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 7 Effect of Fuzheng Jiedu prescription combined with 5-Fu on protein expression of PI3K, p-Akt, mTOR of mice with recurrent or metastatic gastric cancer ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	PI3K/ $\beta$ -actin	p-Akt/ $\beta$ -actin	mTOR/ $\beta$ -actin
模型		0.83±0.16	2.43±0.16	0.41±0.09
扶正解毒方	25	0.73±0.09	2.82±0.18	0.48±0.02
5-Fu	0.025	0.33±0.04 <sup>1)</sup>	2.04±0.08 <sup>1)</sup>	0.24±0.01 <sup>1)</sup>
联合	25+0.025	0.61±0.12 <sup>1)</sup>	1.57±0.05 <sup>1)</sup>	0.14±0.01 <sup>1)</sup>

制 ERS 有关。

免疫抑制是 TME 的重要特征,癌细胞与肿瘤中浸润的免疫细胞相互作用是介导免疫抑制的关键,而在 ERS 下的肿瘤细胞通过转移 ERS (TERS) 改变免疫细胞功能促进肿瘤转移则是其重要实现手段<sup>[21]</sup>。TERS 的概念由 MAHADEVAN 等<sup>[21]</sup>提出,他们将巨噬细胞与正处于 ERS 状态的小鼠肿瘤细胞共培养,发现巨噬细胞中的 GRP78 蛋白明显上调,激活下游剪接型 X-盒结合蛋白 1 (XBP1) 通路,上调 C/EBP 同源蛋白 (CHOP) 基因表达,同时分泌包括

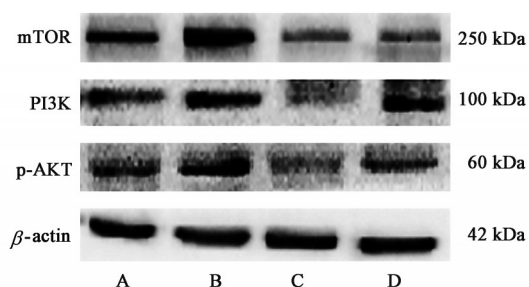


图5 胃癌荷瘤小鼠术后复发肿瘤组织PI3K, p-Akt, mTOR蛋白电泳

Fig. 5 Electrophoresis of PI3K, p-Akt, mTOR in recurrent cancer tissues of mice with recurrent or metastatic gastric cancer

白细胞介素-6(IL-6), IL-23, 肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), CD86, 巨噬细胞炎性蛋白-1(MIP-1)和精氨酸等在内的多种促炎因子,而这些促炎因子参与T细胞的分化,最终促进肿瘤进展。在tDC中,ERS能够激活IRE1 $\alpha$ /XBP1信号通路,引起脂质积累,降低tDC的抗原提呈能力<sup>[7]</sup>,削弱CD8<sup>+</sup>T细胞杀伤肿瘤细胞的能力<sup>[8]</sup>。在MDSC中,ERS通过激活PERK/ATF4信号上调CHOP基因表达,从而抑制T细胞的功能<sup>[9]</sup>。作为ERS的关键蛋白GRP78据报道在多种癌症中均被上调,并且被认为是肿瘤糖酵解与肿瘤免疫逃逸之间的关键环节<sup>[22]</sup>,过表达GRP78可以诱导免疫抑制因子的分泌,介导肿瘤免疫逃逸,且与乳腺癌,肝癌,前列腺癌,结肠癌和胃癌的较高病理分级,复发风险和较短的生存率成正比<sup>[23]</sup>,提示GRP78是连接ERS和TME变化的关键节点。既往的研究也证明GRP78的过表达可导致PI3K/Akt/mTOR,丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路的激活,促进肿瘤细胞的转移和侵袭<sup>[23]</sup>。肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)是TME的一个重要组成部分,尤其是T淋巴细胞在肿瘤进展及免疫逃逸中发挥重要作用,炎性细胞浸润进入肿瘤后也获得“肿瘤特征”<sup>[24]</sup>,CD4<sup>+</sup>辅助性T细胞可以为CD8<sup>+</sup>细胞毒性T细胞的增殖和活化提供细胞因子,CD8<sup>+</sup>T细胞是主要的抗肿瘤免疫效应性细胞,通常CD8<sup>+</sup>T细胞高表达预示胃癌患者的良好预后,但是TIL中Treg细胞可以通过分泌腺苷,IL-10, TGF- $\beta$ 免疫抑制因子介导抗肿瘤效应性T细胞的凋亡,从而促进肿瘤免疫逃逸,且肿瘤浸润性Treg细胞在胃癌中是预后不良的指标,可以促进肿瘤生长、增殖和积累<sup>[25]</sup>,但目前关于ERS与TIL之间的研究较少。在本研究中通过流式细胞术发现扶正解毒方联合5-Fu能够下调TME中Treg比例,增加CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T的值,这与GRP78表达下调趋势相符。

综上所述,扶正解毒方联合5-Fu能够抑制ERS,UPR相关蛋白及下游PI3K/Akt/mTOR通路蛋白表达,改善肿瘤免疫抑制状态,揭示了中医药协同化疗新的科学内涵,为防止肿瘤复发转移提供了新的思路和策略。未来有待进一步研究阐明中医药对ERS,UPR及TME的干预作用。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] ZHANG S, SUN K, ZHENG R, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2015 [J]. *J Nat Cancer Cent*, 2020, doi:10.1016/j.jncc.2020.12.001.
- [2] 陈国明,赵百伟,周志伟. 术后单纯化疗与术后放疗在新辅助化疗后可切除胃癌患者中应用的比较研究——一项国际、非盲、随机化三期临床试验(CRITICS研究)[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2018, 21(10):1190.
- [3] 曹毛毛,陈万青. 中国恶性肿瘤流行情况及防控现状[J]. *中国肿瘤临床*, 2019, 46(3):145-149.
- [4] CHEN X, CUBILOS-RUIZ J R. Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment [J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(2):71-88.
- [5] OAKES S A, PAPA F R. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology [J]. *Annu Rev Pathol*, 2015, 10:173-194.
- [6] 郭文文. 内质网应激激活PI3K/AKT通路促进胃癌细胞的迁移和侵袭[D]. 河南:郑州大学,2017.
- [7] CUBILLOS-RUIZ J R, BETTIGOLE S E, GLIMCHER L H. Molecular pathways: immunosuppressive roles of IRE1 $\alpha$ -XBP1 signaling in dendritic cells of the tumor microenvironment [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(9):2121-2126.
- [8] MAHADEVAN N R, ANUFREICHIK V, RODVOLD J J, et al. Cell-extrinsic effects of tumor ER stress imprint myeloid dendritic cells and impair CD8<sup>+</sup>T cell priming [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12):e51845.
- [9] THEVENOT P T, SIERRA R A, RABER P L, et al. The stress-response sensor chop regulates the function and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in tumors [J]. *Immunity*, 2014, 41(3):389-401.
- [10] YUN S, KOH J, NAM S K, et al. Immunoscore is a strong predictor of survival in the prognosis of stage II/III gastric cancer patients following 5-FU-based adjuvant chemotherapy [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2020, doi:10.1007/s00262-020-02694-6.
- [11] 孙桂芝,王桂绵,陈长怀,等. 扶正防癌口服液合并化

- 疗治疗晚期胃癌临床和实验研究[J]. 中国中西医结合外科杂志, 1995, 1(5): 266-270.
- [12] 贾程辉, 李杰. 扶正解毒方对小鼠移植性前胃癌术后复发肺淋巴结转移及生存期的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(11): 2473-2476.
- [13] 贾程辉, 李枋霏, 何莉莎, 等. 扶正解毒方对前胃癌荷瘤小鼠术后复发模型肿瘤相关巨噬细胞及相关细胞因子的干预研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2014, 20(6): 748-751.
- [14] 马佳乐, 李慧臻, 赵双梅, 等. 中医药通过调控自噬治疗胃癌及癌前病变的研究现状[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(4): 233-239.
- [15] 张成晶, 朱许丽, 张颖慧, 等. 基于寒热错杂病机中医药在胃癌各阶段防治中的研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2018, 24(4): 510-512, 532.
- [16] 周景峰, 周琴, 陈纯, 等. 内质网应激与肿瘤转移[J]. 四川大学学报: 医学版, 2021, 52(1): 11-15.
- [17] 周刚, 方亮, 陈丽华. 非折叠蛋白反应在肿瘤免疫中的作用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(12): 1330-1332.
- [18] 秦玉萍, 高迎新, 马熙萌, 等. SATB1通过PI3K/Akt信号通路在哌立福新对胃癌失巢凋亡抵抗细胞作用机制中的研究[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(3): 273-281.
- [19] 舍雅莉, 赵晓文, 李俊杰, 等. 敦煌平胃丸及其拆方对SCG-7901胃癌荷瘤小鼠的抑瘤作用及对PI3K/Akt/mTOR信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(5): 70-76.
- [20] 韦燕飞, 刘莎莎, 金丽杰, 等. 黄酮类中药单体通过PI3K/Akt信号通路抑制肿瘤的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2021, doi: 21. 1546. R, 20210205. 1609. 012.
- [21] MAHADEVAN N R, RODVOLD J, SEPULVEDA H, et al. Transmission of endoplasmic reticulum stress and pro-inflammation from tumor cells to myeloid cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(16): 6561-6566.
- [22] MADHAVAN S, NAGARAJAN S. GRP78 and next generation cancer hallmarks: an underexplored molecular target in cancer chemoprevention research [J]. Biochimie, 2020, 175: 69-76.
- [23] 刘蓉, 唐方, 凌海慧, 等. 中医药调节内质网应激防治疾病的研究进展[J]. 天津中医药, 2020, 37(1): 116-120.
- [24] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.
- [25] URBANO P C M, HE X, VAN HEESWIJK B, et al. TNF $\alpha$ -signaling modulates the kinase activity of human effector Treg and regulates IL-17A expression [J]. Front Immunol, 2020, 10: 3047.

[责任编辑 王鑫]