

· 药理 ·

西黄丸对炎症微环境下肺癌 A549 荷瘤小鼠 NLRP3 炎症小体及其产物和肿瘤增殖的影响

蒋锐沅¹, 莫春梅², 满婷婷¹, 王同彪², 洪晓华¹, 覃艳春¹, 荣震^{2*}

(1. 广西中医药大学 研究生学院, 南宁 530200; 2. 广西中医药大学 第一附属医院, 南宁 530200)

[摘要] 目的: 研究并探讨西黄丸对炎症微环境下的肺癌 A549 荷瘤小鼠的抑瘤作用, 并探讨西黄丸对肺癌 A549 荷瘤小鼠的血清及肿瘤组织中的核苷酸寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3) 炎症小体及其产物表达的影响作用。方法: 采用肺癌 A549 荷瘤小鼠模型, 肺癌 A549 细胞采用培养基中加入脂多糖(LPS)+三磷酸腺苷(ATP)的办法造炎症微环境下的肺癌 A549 细胞模型。造模成功后随机分为空白组(等体积生理盐水), MCC950 组(MCC950 溶液, 0.79 g·kg⁻¹), 西黄丸低、中、高剂量组(0.39, 0.78, 1.95 g·kg⁻¹), 采用口服给药的方式进行, 每天给药 1 次, 连续给药 21 d, 处死小鼠并剥离肿瘤组织测量肿瘤体积及质量, 免疫组织化学法检测肿瘤组织 NLRP3 表达, 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测丙二醛(MDA), 白细胞介素-1 β (IL-1 β), 白细胞介素-18(IL-18), NLRP3 炎症小体蛋白表达, 眼底静脉取血以酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清 IL-1 β , IL-18, MDA 表达水平。结果: 与空白组比较, MCC950 组, 西黄丸低、中、高剂量组的抑瘤率分别为 39.21%, 31.72%, 42.24%, 55.68%; ELISA 检测发现, 西黄丸高剂量组能明显下调小鼠血清中的 MDA, IL-1 β , IL-18 表达水平($P < 0.05$); Western blot 结果显示, 与空白组比较, 西黄丸高剂量组能够有效降低小鼠肿瘤组织中的 MDA, IL-1 β , IL-18, NLRP3 的蛋白表达水平($P < 0.05$); 免疫组织化学法结果显示, 与空白组比较, MCC950 组与西黄丸各剂量组均能降低小鼠肿瘤组织中的 NLRP3 炎症小体表达阳性率($P < 0.05$), 且 MCC950 组和高剂量西黄丸组抑制效果最好($P < 0.05$)。结论: 西黄丸可以抑制荷肺癌 A549 细胞小鼠的肿瘤组织生长, 其机制可能是通过抑 NLRP3 炎症小体及 IL-1 β , IL-18, MDA 的表达水平, 进而抑制肿瘤细胞的炎症微环境达到抑制肿瘤细胞生长的结果。

[关键词] 西黄丸; A549 肺癌荷瘤小鼠; 核苷酸寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3); 炎症微环境; 增殖抑制

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)17-0020-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201722

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200706.1354.001.html>

[网络出版日期] 2020-7-6 14:28

Effect of Xihuangwan on NLRP3 Inflammatory Bodies and Their Products and Tumor Proliferation of Lung Cancer A549 Bearing Nude Mice in Inflammatory Microenvironment

JIANG Rui-yuan¹, MO Chun-mei², MAN Ting-ting¹, WANG Tong-biao², HONG Xiao-hua¹,
QIN Yan-chun¹, RONG Zhen^{2*}

(1. Graduate School, Guangxi University of Chinese Medical, Nanning 530200, China;

2. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medical, Nanning 530200, China)

[Abstract] **Objective:** To study the antitumor effect of Xihuangwan on A549 lung cancer nude mice in inflammatory microenvironment, and explore the effect of Xihuangwan on the expressions of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammatory bodies and their products in serum and tumor tissue of A549 lung cancer nude mice. **Method:** The lung cancer A549 cell model was established in nude

[收稿日期] 20200627(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81660774); 广西中医药管理局广西壮瑶药制剂提升工程项目(GZZJ16004); 广西壮族自治区科技计划项目重点研发计划项目(桂科 AB17195067)

[第一作者] 蒋锐沅, 在读硕士, 住院医师, 从事中医药防治恶性肿瘤研究, E-mail: 745183530@qq.com

[通信作者] * 荣震, 硕士, 主任医师, 广西名中医, 从事中医药防治恶性肿瘤研究, Tel: 0771-5362531, E-mail: rongzhenw@163.com

mice with lung cancer, and the lung cancer A549 cell model was established in inflammatory microenvironment by adding lipopolysaccharide (LPS) + adenosine triphosphate (ATP) to the culture medium. After modeling, the rats were randomly divided into blank group (equal volume of normal saline), positive drug control group (MCC950 solution, $0.79 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and low, medium, high-dose Xihuangwan groups ($0.39, 0.78, 1.95 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). The rats were administered orally once a day for 21 days, and then sacrificed. The tumor tissues were stripped to measure the tumor body. The expressions of NLRP3, malondialdehyde(MDA), interleukin (IL)- 1β , IL-18 and NLRP3 were detected by Western blot, and the levels of IL- 1β , IL-18 and MDA were detected by enzyme linked immunosorbent assay(ELISA). **Result:** Compared with the blank group, the tumor inhibition rates in the positive drug control group and the low, medium and high dose Xihuangwan group were 39.21%, 31.72%, 42.24% and 55.68%. ELISA showed that the high-dose Xihuangwan group could significantly reduce the expressions of MDA, IL- 1β and IL-18 in the serum of nude mice ($P < 0.05$). Western blot showed that the high-dose Xihuangwan group could effectively reduce the protein expressions of MDA, IL- 1β , IL-18 and NLRP3 in tumor of nude mice ($P < 0.05$), the results of immunohistochemistry showed that the expression rate of NLRP3 in the tumor tissues of nude mice was reduced in the positive drug group and each dose of Xihuangwan group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Xihuangwan can inhibit the growth of tumor tissue of A549 cells bearing lung cancer in nude mice. The mechanism may be that it can inhibit the growth of tumor cells by inhibiting the expression of NLRP3 inflammatory bodies, IL- 1β , IL-18, MDA tables, and then inhibiting the inflammatory microenvironment of tumor cells.

[Key words] Xihuangwan; A549 lung cancer bearing nude mice; nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3); inflammatory microenvironment; proliferation inhibition

原发性支气管肺癌作为我国发病率和死亡率均排名首位的恶性肿瘤,接近癌症死亡人数的1/5(18.4%),在部分地区(如中国)其发病率更高,在全球各地有逐年增高的趋势,严重影响着人类的身心健康^[1]。同时大约85%的肺癌是非小细胞肺癌,诊断为非小细胞肺癌的大多数患者被发现时已进展到了晚期^[2]。因此如何有效地防治肺癌的发生和发展已成为各学科研究的重点。炎症作为恶性肿瘤的七大特征之一^[3],长期处于炎症微环境里的细胞发生肿瘤的风险更大。实验室和临床研究发现,发生恶性肿瘤的患者及小鼠,其肿瘤组织及外周循环系统中的相关炎症产物都处于高表达状态^[4]。而且在各类相关炎症物质中,核苷酸寡聚化结构域样受体蛋白3(NLRP3)相关蛋白尤为突出,目前在众多肿瘤组织中均可发现NLRP3炎症小体处于高表达状态,目前已被证实与肿瘤的发展密切相关^[5]。NLRP3炎症小体被激活后,引起炎症级联反应,导致白细胞介素(IL)- 1β , IL-18, IL-22, 肿瘤坏死因子(TNF)- α 等促炎因子的释放及核转录因子(NF)- κB 等炎症-肿瘤信号通路的激活,形成肿瘤微环境,促进肿瘤细胞生长,最终导致肿瘤的发生和恶化^[6]。肿瘤细胞的炎症微环境能够通过不断诱导正常细胞分化成为肿瘤细胞,并促使肿瘤细胞继续增殖和

转移,而肿瘤细胞又可以通过诱导和分泌多种炎症相关物质的表达来维持肿瘤细胞生长的炎性微环境^[7]。肿瘤细胞与其炎症微环境不断相互促进,进而导致肿瘤的不断进展和转移,引起疾病的加重,并不断恶性循环。

西黄丸由清代著名医家王洪旭在著名医书《外科证治全生集》所创立,具有清热解毒、消肿止痛、软坚散结之功效,由牛黄、麝香、乳香和没药4味中药组成^[8]。临床中,西黄丸被广泛运用于各种恶性肿瘤及各部位炎性相关性疾病的治疗,并获得了十分良好的效果。目前对西黄丸的实验研究发现其能够抑制多种肿瘤细胞的增殖并促进其凋亡^[9-10]。目前研究发现,其主要的机制可能是通过抑制相关肿瘤细胞及肿瘤干细胞的生长,抑制肿瘤组织的侵袭和肿瘤相关新生血管的生成,调节肿瘤微环境等方面达到抑制肿瘤分化、增殖和侵袭转移的效果^[11]。前期临床研究发现,通过对中晚期肺癌患者加用西黄丸后发现,西黄丸能够有效改善肺癌患者肿瘤组织周围的炎症程度,并能一定程度抑制肺癌相关炎症的出现^[12]。但目前西黄丸具体的抗炎机制尚未明确。因此,本文在西黄丸能够有效改善肺癌患者肿瘤组织周围炎症的基础上,探讨西黄丸能否通过抑制NLRP3炎症小体及其产物丙二醛

(MDA), IL-1 β , IL-18的表达水平,从而改善肺癌组织及循环系统中的炎症微环境,进而达到抑制肺癌细胞生长的目的。这为阐明西黄丸有效治疗原发性肺癌的作用机制,合理运用西黄丸治疗原发性肺癌患者及解释西黄丸的有效药理效果,探索中药复方治疗恶性肿瘤的科学性提高有效依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级5~6周龄的BALB/cA-nu雌鼠30只,体质量18~22 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号SCXK(湘)2016-0002。小鼠饲养于SPF条件下饲养,温度25~27℃,相对湿度45%~55%,保证空气流动正常,广西中医药大学科学实验中心,许可证号SYXK(桂)2019-0001;饲料为标准固体混合无菌饲料,饮水为高压灭菌蒸馏水。每日光照/黑暗时间各12 h,动物分笼饲养,每笼6只,可自由摄食饮水。本课题经过广西中医药大学动物伦理委员会批准(动物伦理审查号2019021)。

1.2 细胞 非小细胞系肺癌细胞A549购自购自博士德生物公司(货号CX0022)。细胞于DEM培养基中培养,培养基中含有15%胎牛血清,200 mL·L⁻¹青-链霉素混合液,以0.1%EDTA消化,于37℃5%CO₂培养箱中培养,培养3 d后进行传代,取对数生长周期细胞用于造模。

1.3 药物 西黄丸(浙江天一堂药业有限公司,批号1920004);MCC950 sodium salt(美国R&D Systems公司,货号HY-12815)。

1.4 试剂 DEM培养基、胎牛血清、青-链霉素混合液(美国Gibco公司,批号分别为12100046,10099,12800017);IL-18, IL-1 β , MDA酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(武汉Cusabio公司,货号分别为CSB-E04609m, CSB-E08054m, CSB-E08559m);IL-18抗体, IL-1 β 抗体, NLRP3抗体, MDA抗体, RIPA裂解液, β -肌动蛋白(β -actin)抗体, 山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G, 山羊抗鼠IgG(英国Abcam公司,批号分别为ab191860, ab156791, ab264468, ab27642, ab156014, ab179467, ab150077, ab6808);SDS-PAGE上样缓冲液, BCA蛋白浓度测定试剂盒, SDS-PAGE凝胶配制试剂盒, ECL发光液(中国碧云天上海生物技术有限公司,批号分别为P0015A, P0012, P0012A, P0017FM);脱脂牛奶(光明乳业,批号080922 DN7)。

1.5 仪器 BBS-H1500型超净工作台(中国山东博科生物产业有限公司);DMi1型倒置生物显微镜

(德国Leica公司);Multiskan FC型酶标仪(美国Thermo公司);CL10型离心机(美国Thermo公司);CDS900型台式动物麻醉机(美国Harvard公司);MCO175M型CO₂细胞培养箱(日本Sanyo公司);164-5050型基础电泳仪, 170-4158型转膜仪(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 分组 选30只SPF级5~6周龄的BALB/cA-nu雌鼠30只,随机分为5组,空白组, MCC950组, 西黄丸低、中、高剂量组,每组大鼠均建立炎性微环境下肺癌A549荷瘤模型。

2.2 造模 参照KONG等^[13]建立高NLRP3表达炎症模型的办法,取对数生长周期的肺癌A549细胞,加入LPS+ATP溶液10 mL进行共培养,活化NLRP3炎症小体,促进炎症的发生。以0.25%胰酶消化后,将细胞浓度,调至1 \times 10⁷个/mL的细胞悬液,接种于小鼠左侧腋部皮下,每只0.3 mL,待瘤块直径约3 mm,每只小鼠尾尖取血0.1 mL,采用ELISA尾尖取血检测血清中IL-18, IL-1 β 水平,确定每只小鼠血清IL-18, IL-1 β >20.00 ng·L⁻¹,即为造模成功。

2.3 给药剂量 参考文献[14],西黄丸低、中、高剂量组给予西黄丸0.39, 0.78, 1.95 g·kg⁻¹;MCC950组给予MCC950稀释液0.79 g·kg⁻¹;空白组给予等体积生理盐水。于造模成果后的第2天开始灌胃给药(3次/d),每次0.2 mL,连续给药21 d。

2.4 观察指标

2.4.1 肿瘤体积及抑瘤率 并在造模后的第7天(小鼠腋下出现明显的、可测量的肿瘤结节)开始,使用游标卡尺每3 d测量1次肿瘤的最长径和最短径,应用游标卡尺(精度为0.1 mm)测量并记录小鼠皮下瘤结节大小,计算肿瘤体积, $V(\text{cm}^3)=ab^2 \cdot 2^{-1}$ (a 为瘤体最长径, b 为最短径),并绘制各组小鼠瘤体生长曲线。末次给药当晚给小鼠禁食,于第28天采用脱颈法处死小鼠,眼底静脉缺血,无菌剥离小鼠腋下肿瘤组织,称重,计算抑瘤率,抑制率=(空白组平均瘤质量-药物组平均瘤质量)/空白组平均瘤质量 \times 100%。

2.4.2 ELISA检测小鼠血清IL-1 β , IL-18, MDA表达水平 分别吸取5组小鼠血清,将ELISA试剂盒于室温中平衡1 h。将待查血清液每孔加入100 μ L,分别加入生物素标记抗体、辣根过氧化物酶标记亲和素、底物溶液及中止液进行充分反应。反应完成后于5 min内在450 nm波长酶标仪中检测吸光度 A ,并按照标准曲线拟合程度计算样品浓度

平均值。

2.4.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠肿瘤组织 IL-1 β , IL-18, MDA, NLRP 蛋白表达 肿瘤组织研磨至匀浆状,取上清进行BCA蛋白定量。进行电泳分离,再将分离后的蛋白以300 mA,2 h的转膜条件转膜至PVDF膜。TBS漂洗3次,将膜在室温条件下用5%脱脂奶粉封闭1 h, TBST洗涤5 min。加入一抗(1:300),4 $^{\circ}$ C孵育过夜, TBST洗涤3次,每次5 min。加入二抗(1:400),于避光的环境中室温孵育1 h, TBST洗涤3次,每次5 min,将膜置于双色红外激光发光显色仪中进行发光检测,用Image J软件测量各蛋白条带灰度值,以 β -actin为内参,比较各组间IL-1 β , IL-18, MDA, NLRP蛋白相对表达水平。

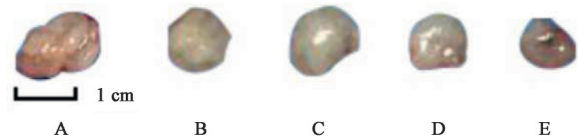
2.4.4 免疫组织化学检测 NLRP3 表达水平 无菌剥离肿瘤组织,以4%多聚甲醛中固定,以不同体积分数乙醇进行脱水,在二甲苯 I, II 溶液中透明,将瘤块浸入蜡槽中浸蜡,将肿瘤组织包埋在石蜡中,置于冰面上,使石蜡凝固变硬,将蜡块固定于切片机上,以4 μ m厚度切片。展片,烤片。将石蜡切片经二甲苯 I, II 脱蜡,经梯度乙醇水化,以蒸馏水充分水洗,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗2~3次,免疫组化笔画圈,过氧化物酶封闭10 min,逐步加入一抗(1:300),二抗(1:400),滴加现配DAB显色液,待显

微镜下看到组织特异性显色而背景干净时,将切片置入蒸馏水中终止DAB显色。滴加苏木素染核进行复染,梯度乙醇脱水,滴加适量中性树胶(覆盖组织),盖上盖玻片,室温静置,树胶干后于显微镜下观察切片。

2.5 统计学分析 应用SPSS 23.0软件进行统计学分析,所有结果均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,计量资料采用 t 检验,评估两组资料差异性,当自变量中有两组以上时,采用单因素方差分析检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 西黄丸对 A549 荷瘤小鼠的肿瘤体积及质量的影响 与空白组比较, MCC950组及西黄丸各剂量组瘤体体积及瘤质量均有明显降低($P<0.05$);与MCC950组比较,西黄丸中、高剂量组瘤体体积及瘤质量均有明显降低($P<0.05$),西黄丸高剂量组抑瘤率有明显提升($P<0.05$)。见图1,表1。



A. 空白组; B. MCC950组; C~E. 西黄丸低、中、高剂量组(图2, 3同)

图1 小鼠肿瘤组织

Fig. 1 Tumor of mouse

表1 西黄丸对荷瘤小鼠的肿瘤体积及质量的影响

Table 1 Effect of Xihuangwan on tumor weight and tumor inhibition rate in serum of mice

组别	剂量/g \cdot kg $^{-1}$	肿瘤体积($\bar{x}\pm s, n=6$)/cm 3	瘤质量($\bar{x}\pm s, n=6$)/mg	肿瘤抑制率/%
空白	-	1 305.36 \pm 156.30	1 420.08 \pm 101.99	-
MCC950	0.79	990.89 \pm 128.77 ¹⁾	1 012.52 \pm 128.7 ¹⁾	39.21
西黄丸	0.39	1 082.42 \pm 108.39 ¹⁾	1 137.38 \pm 152.25 ¹⁾	31.72
	0.78	940.56 \pm 263.09 ^{1,2,3)}	962.20 \pm 263.09 ^{1,2,3)}	42.24
	1.95	683.28 \pm 121.62 ^{1,2,3,4)}	738.25 \pm 179.33 ^{1,2,3,4)}	55.68 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$;与MCC950组比较²⁾ $P<0.05$;与西黄丸低剂量组比较³⁾ $P<0.05$;与西黄丸中剂量组比较⁴⁾ $P<0.05$ (表2~4同)。

3.2 西黄丸对 A549 荷瘤小鼠血清 IL-1 β , IL-18, MDA 水平影响 与空白组比较, MCC950组及西黄丸各剂量组均能有效降低小鼠外周血血清IL-18, MDA水平($P<0.05$), MCC950组及西黄丸中、高剂量组均能有效降低小鼠外周血血清IL-1 β 水平($P<0.05$),西黄丸低剂量组血清IL-1 β 水平明显升高($P<0.05$);与MCC950组比较,西黄丸中、高剂量组能够有效降低小鼠血清MDA水平($P<0.05$),西黄丸高剂量组小鼠血清中的IL-18表达水平明显降低($P<0.05$)。见表2。

3.3 西黄丸对小鼠肿瘤组织 IL-1 β , IL-18, MDA,

NLRP 蛋白表达的影响 与空白组比较,西黄丸各剂量组明显下调MDA蛋白表达($P<0.05$), MCC950组、西黄丸低、中剂量组IL-1 β 蛋白表达均有明显上升($P<0.05$);西黄丸高剂量组IL-1 β 蛋白表达明显降低($P<0.05$);MCC950组及西黄丸各剂量组能明显下调IL-18蛋白表达($P<0.05$);西黄丸高剂量组NLRP3蛋白表达明显下调($P<0.05$)。与MCC950组比较,西黄丸各剂量组IL-18蛋白表达明显下调($P<0.05$)。与西黄丸低、中剂量组比较,西黄丸高剂量组MDA, IL-18蛋白表达明显下调($P<0.05$)。见表3,图2。

表 2 西黄丸对荷瘤小鼠的血清 IL-1 β , IL-18, MDA 表达水平影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of Xihuangwan on MDA, IL-1 β , IL-18 in serum of mice($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	MDA/mol·L ⁻¹	IL-1 β /ng·L ⁻¹	IL-18/ng·L ⁻¹
空白	-	5.68±0.68	61.12±13.45	75.81±9.89
MCC950	0.79	4.65±1.54 ¹⁾	37.25±4.15	47.59±9.13 ^{1,3,4)}
西黄丸	0.39	4.63±1.29 ¹⁾	85.90±6.52 ¹⁾	66.47±8.86 ¹⁾
	0.78	4.45±1.09 ^{1,2,3)}	52.76±7.51 ^{1,3)}	70.56±13.06 ¹⁾
	1.95	3.49±0.47 ^{1,2,3,4)}	36.41±11.43 ^{1,3,4)}	37.66±7.88 ^{1,2,3,4)}

表 3 西黄丸对小鼠肿瘤组织 IL-1 β , IL-18, MDA, NLRP 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Xihuangwan on NLRP3, IL-1 β , IL-18 protein in serum of mice($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	MDA/ β -actin	IL-1 β / β -actin	IL-18/ β -actin	NLRP3/ β -actin
空白	-	0.783 3±0.071 7	0.241 6 ±0.022 8	0.440 7±0.020 6	0.481 4±0.027 7
MCC950	0.79	0.759 2±0.102 7	0.417 8±0.052 4 ¹⁾	0.417 8±0.052 4 ¹⁾	0.523 3±0.076 3
西黄丸	0.39	0.347 4±0.060 5 ^{1,2)}	0.300 4±0.015 1 ^{1,2)}	0.300 4±0.015 1 ^{1,2)}	0.625 8±0.083 0
	0.78	0.129 1±0.022 9 ^{1,2,3)}	0.281 1±0.020 5 ^{1,2,3)}	0.231 1±0.020 5 ^{1,2,3)}	0.552 0±0.043 0
	1.95	0.108 4±0.022 9 ^{1,2,3,4)}	0.210 0±0.016 7 ^{1,2,3,4)}	0.270 0±0.016 7 ^{1,2,3,4)}	0.286 0±0.056 4 ^{1,2,3,4)}

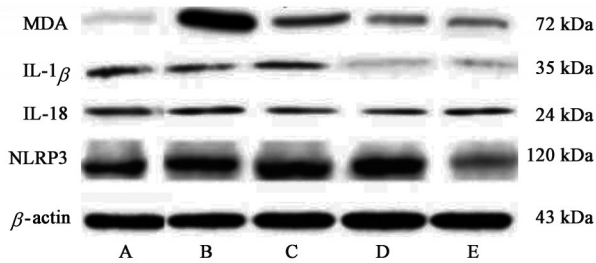


图 2 肿瘤组织 MDA, NLRP3, IL-1 β , IL-18 蛋白表达电泳

Fig. 2 Expression electrophoresis of MDA, NLRP3, IL-1 β , IL-18 protein in tumor tissue

3.4 西黄丸对小鼠肿瘤组织 NLRP3 蛋白表达的影响 与空白组比较, MCC950 组及西黄丸各剂量组肿瘤组织 NLRP3 阳性表达面积率均有所下降($P <$

0.05)。与西黄丸低、中剂量组比较, 西黄丸高剂量组 NLRP3 阳性表达面积率明显下调($P < 0.05$)。见表 4, 图 3。

表 4 西黄丸对肿瘤组织 NLRP3 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of Xihuangwan on positive index of NLRP3 in serum of mice($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	NLRP3 表达面积率/%
空白	-	30.71±3.22
MCC950	0.79	15.16±2.31 ¹⁾
西黄丸	0.39	22.67±4.71 ¹⁾
	0.78	18.69±4.27 ¹⁾
	1.95	12.03±2.89 ^{1,3,4)}

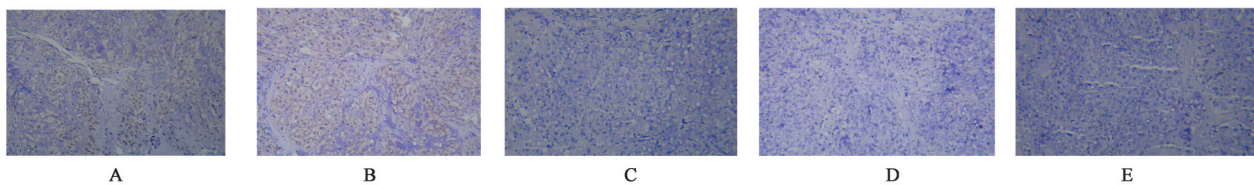


图 3 西黄丸对肺癌肿瘤组织 NLRP3 蛋白表达的影响(IHC, ×200)

Fig. 3 Effect of Xihuangwan on immunohistochemical results of NLRP3 in lung cancer tissue(IHC, ×200)

4 讨论

原发性支气管肺癌, 作为我国发病率和死亡率均排名首位的恶性肿瘤, 其防治问题一直是我国肿瘤防治问题的重点和难点问题。炎症作为恶性肿瘤的七大特征之一, 其与原发性肺癌发生发展关系十分密切。而 NLRP3 炎症小体作为炎症微环境的核心组合部分, 能够包括肿瘤细胞在内的多种刺激

物激活, NLRP3 炎症小体激活后能够不断分泌出 IL-1 β 前体 (pro-IL-1 β) 和 IL-18 前体 (pro-IL-18), 并通过凋亡相关斑点样蛋白和半胱氨酸蛋白酶募集 (CARD) 结构域招募无活性的酶原形式 (pro-Caspase-1) 的切割和修饰作用, 促进 IL-1 β 和 IL-18 的成熟及分泌, 从而调节细胞信号通路^[15], NLRP3 炎症小体激活后, 即使是在静息环境下也不能产生

自身抑制,始终保持激活状态,因而能持续产生IL-1 β , IL-18,对炎症和肿瘤疾病造成长期的影响^[16]。根据实验结果,抑制炎症微环境下的NLRP3炎症小体及其产物表达后,能够有效抑制肺癌A549细胞的增殖。因此,通过抑制肺癌相关炎症微环境中的NLRP3炎症小体及其产物IL-1 β , IL-18和MDA水平对于抑制肺癌肿瘤细胞的增殖具有重大影响。目前,Canakinumab单抗^[17]已经证实了靶向抑制IL-1 β 能够降低肺癌相关的炎症反应并减少免疫抑制,表现出较高的抗肿瘤活性,具有治疗肺癌的潜能。而中医药通过抗炎作用治疗恶性肿瘤是目前中医药防治恶性肿瘤研究的热点问题,能够一定程度通过抑制炎症微环境中的主要成分达到抑制肿瘤细胞增殖的目的。西黄丸在前期临床研究中已经发现能够有效降低肺炎患者的炎症因子表达水平,并能调节乳腺癌细胞相关的炎症微环境^[18],改善肺癌患者肿瘤相关炎症水平及临床症状。因此推测,西黄丸治疗原发性肺癌的机制是通过抑制NLRP3炎症小体及其产物,改善肺癌相关肿瘤炎症微环境达到治疗目的。这也为探讨西黄丸治疗原发性肺癌的具体作用机制,改善原发性肺癌相关炎症微环境等相关研究具有十分重要的意义,也能为开发治疗原发性肺癌及其炎症微环境的新方法、新处方创造十分广阔的前景。

祖国医学认为虚、毒、瘀是原发性肺癌发生发展的主要病因。即正气内虚,病理性产物气滞、血瘀、痰结、湿聚、热毒等相互瘀结,造成邪留毒聚,气血阻止,瘀毒并存。而目前临床中清热解毒、活血祛瘀是原发性肺癌治疗中比较常用的治法。西黄丸全方中,牛黄味苦性寒、通窍散结,为主药;麝香辛香走窜、活血散结、辟邪除秽,为辅药;君二药合用相得益彰,佐以乳香、没药活血祛瘀,消肿定痛。全方以清热解毒与豁痰散结为主,活血祛瘀药为辅,诸药合用,既能益气扶正,解毒散结,又能活血祛瘀,消肿散坚,从而实现邪去而不伤正的治疗目的^[19]。研究显示,此方具有通过多途径抑制肿瘤细胞,能够抑制肿瘤细胞和肿瘤干细胞生长,阻止肿瘤细胞侵袭和血管生成,调节肿瘤微环境的作用^[20]。实验研究表明,西黄丸可以下调荷瘤小鼠B淋巴细胞瘤-2表达,诱导H22细胞(小鼠肝癌细胞株)和Bel-7402细胞(人肝癌细胞株)凋亡^[21]。西黄丸可以抑制肿瘤细胞的上皮-间质转化和细胞外机制(ECM)降解^[22],能够通过调节锌指E-盒结合同源异形盒1-极性脚手架蛋白循环,升高E-钙黏素的

mRNA水平,抑制神经钙黏素在结肠癌LoVo细胞中的表达,并且降低了基质金属蛋白酶-2和基质金属蛋白酶-9的表达,抑制了肿瘤细胞的侵袭、迁徙和转移。而另一项西黄丸调节肿瘤微环境的研究中发现^[23],西黄丸能够有效增强抗肿瘤免疫、逆转免疫抑制作用,并能通过降低骨髓来源的抑制细胞表达水平,增强免疫系统促进因子IL-2和干扰素- γ 的表达水平,减少炎症因子相关的IL-10的表达水平,进而调节肿瘤的免疫微环境和炎症微环境。方中多味中药及其有效成分在抑制炎症因子,抑制炎症相关信号通路方面具有十分出众的疗效。乳香中的有效成分乳香挥发油能够通过抑制IL-1 β 介导的兔视网膜色素上皮细胞迁移、增殖,必能降低NF- κ B信号通路表达水平,达到抗炎作用^[24]。麝香提取物对肺腺癌细胞株GLC-82细胞增殖水平具有抑制作用,并能诱导肺腺癌细胞凋亡^[25]。麝香有效成分麝香酮能明显抑制血瘀证裸鼠模型中乳腺癌细胞MDA231形成的肿瘤组织内新生血管内皮细胞生长因子和碱性成纤维细胞生长因子的表达,进而抑制肿瘤新生血管生成^[26]。此外,麝香酮可通过增加细胞膜流动性来促进抗癌药物代谢和吸收达到杀伤肿瘤细胞作用,达到增强疗效的目的。没药有效成分没药呋喃型倍半萜能够明显下调细胞周期蛋白D₁和细胞周期分裂蛋白,并上调细胞周期,调节蛋白依赖激酶抑制因子p21WAF/CIP1和p27的表达,使细胞停滞于G₀/G₁期,实现对肿瘤细胞的增殖抑制^[27]。牛黄主要化学成分之一熊去氧胆酸可通过降低蛋白激酶C活性促使卵巢巢瘤A2780细胞凋亡,达到治疗肿瘤的目的^[28]。

文献报道,在发生肿瘤炎症微环境时,肿瘤组织及外周循环系统血液中均存在不同程度的炎症反应,各类炎症因子会不断刺激肿瘤细胞发生上皮-间质转化和间质-上皮转化,促进肿瘤细胞的侵袭、迁徙和转移,导致更高表达水平的炎症因子(IL-1 β , IL-18等)^[29]。目前,NLRP3炎症小体与IL-1 β , IL-18等IL相关研究较多,而与MDA等糖代谢相关研究较少。新近研究指明NLRP3炎症小体的活化与糖类代谢疾病的病理过程密切相关^[30],抑制NLRP3炎症小体,同时能够抑制MDA表达量,使肿瘤的能量代谢恢复正常水平,进而抑制肿瘤细胞的异常增殖水平。NLRP3炎症小体是炎性体的一种,也是NOD样受体(NLRs)蛋白家族中的一个典型代表,为促进IL-1 β 和IL-18产生的主要炎症小体。目前,NLRP3炎症小体的各组成部分分布相当广泛,能够

分布于巨噬细胞、血管内皮细胞、平滑肌细胞等多种细胞中。NLRP3炎症小体对IL-1 β 和IL-18促进成熟和释放,极有可能导致线粒体和内皮功能紊乱。NLRP3炎症小体被激活后,引起炎症级联反应,导致IL-1,IL-18,IL-22,TNF- α 等促炎因子的释放及NF- κ B等炎症-肿瘤信号通路的激活,形成肿瘤微环境,促进肿瘤细胞生长,最终导致肿瘤的发生和恶化。胃癌、结肠癌的发生和发展中,炎症小体均已被表征^[31]。IL-1 β 是NLRP3炎症小体的重要产物,有研究表明,特异性表达IL-1 β 的转基因小鼠因能在早期募集大量的髓源性抑制细胞,更容易产生自发性胃炎及胃癌。而封闭IL-1 β 信号通路能很好的抑制胃癌前的发展及髓源性抑制细胞的活化^[32]。但亦有研究显示,在肠炎模型中还发现,NLRP3炎症小体的激活对于肠炎具有保护作用^[33],同时发现NLRP3炎症小体还能抑制肠炎相关性肿瘤的发生^[34]。TAS等^[35]研究显示,过表达的IL-18将会促进胃癌的发生,影响患者的预后,血清中IL-18水平有可能成为诊断胃癌的指标。乳腺癌的进展亦与NLRP3炎症小体有关,NLRP3基因缺乏乳腺癌小鼠模型的转移性更低^[36]。KONG等^[13]选取了多种肺癌细胞及组织,发现与正常肺细胞及肺癌周围正常组织比较,NLRP3炎症小体及其产物(IL-1 β ,IL-18)的水平均明显增高。他们在随后的研究中用LPS+ATP激活NLRP3炎症小体,发现非小细胞系肺癌细胞A549的增殖和转移活性均有所增强,表明NLRP3炎症小体极有可能是治疗肺癌的潜在靶点。OKAMOTO等^[37]的研究表明,在人黑色素瘤留细胞中,激活NLRP3炎症小体能够增加IL-1 β 的产生,IL-1 β 介导的自身炎症对人黑色素瘤的发展和恶化具有促进作用,抑制炎症小体信号通路或减少IL-1的激活对黑色素瘤患者是一种很好的治疗选择。总体来说,NLRP3炎症小体在众多肿瘤中均起促进作用,而NLRP3炎症小体及其产物是抗肿瘤药物的潜在靶点,有效NLRP3炎症小体及其产物抑制IL-1 β 和IL-18等炎症因子的水平,有改善肿瘤相关的炎症微环境,实现抑制肿瘤细胞的增殖的目的。

研究发现,西黄丸能够有效抑制炎症微环境下的荷肺癌A549裸鼠的肿瘤增殖水平,推测其可能是通过抑制NLRP3炎症小体及其产物,改善肿瘤炎症微环境实现抑制原发性肺癌细胞增殖的。随着荷肺癌A549细胞小鼠的肿瘤体积及瘤体肿瘤不断增加,小鼠的NLRP3炎症小体及其产物IL-1 β ,IL-18及MDA水平均不断提高,肿瘤组织在炎症微

环境下能够不断刺激肿瘤细胞增殖,促使肿瘤细胞通过糖酵解获取养分。实验结果证实,西黄丸组干预后,小鼠肿瘤体积及瘤体质量均明显降低,抑瘤率明显升高,其结果与MCC950药物干预后结果具有显著差异,证实了优于MCC950药物的疗效。经过西黄丸干预后,西黄丸高剂量组的外周血血清IL-1 β ,IL-18,MDA水平明显减低,其结果优于MCC950组,证明西黄丸能够改善全身循环系统中的高炎症状态,改善外周血中的炎症微环境,进而抑制原发性肺癌的转移。药物干预期结果后,小鼠肿瘤组织中的NLRP3炎症小体蛋白及其产物IL-1 β ,IL-18及MDA的蛋白表达水平均明显降低,说明西黄丸对小鼠肿瘤组织中的炎症微环境起到有效的改善作用,并能改善小鼠肿瘤组织中的氧化应激状态,改变肿瘤以糖酵解为主的供能方式,使其恢复以有氧氧化为主的能量获取方式。通过免疫组织化学法发现,经过高剂量的西黄丸干预后,肿瘤组织中的NLRP3炎症小体表达阳性率有明显降低,说明西黄丸能够通过直接抑制小鼠肿瘤组织中的NLRP3炎症小体,进而抑制其产物IL-1 β ,IL-18水平,改善肿瘤组织的炎症微环境。

研究发现,NLRP3炎症小体与MDA水平关系密切,说明肿瘤炎症微环境能影响肿瘤细胞的能量代谢方式。NLRP3炎症小体通过分泌和合成大量的IL-1 β ,IL-18,导致局部肿瘤组织富集过多的炎症细胞和肿瘤细胞,使局部空间细胞数量大量超过供氧能力,使得与糖酵解相关的MDA表达水平过高,加重肿瘤的糖酵解,使肿瘤细胞获得大量繁殖所需的氧分。在西黄丸的干预下,NLRP3炎症小体表达明显下调,其产物IL-1 β ,IL-18表达也明显下调,导致肿瘤细胞局部炎症微环境得到改善,促使肿瘤细胞恢复正常的以有氧氧化为主的能量代谢方式,也从能量代谢的层面抑制了肿瘤细胞的增殖。可见NLRP3炎症小体在原发性肺癌的肿瘤细胞增殖过程中起到十分重要的作用,这也证实了炎症微环境能够促进肿瘤细胞的不断增殖,使原发性肺癌不断进展和恶化^[38]。

本次实验通过西黄丸对LPS+ATP刺激下的炎症微环境中的原发性肺癌小鼠的治疗作用,并对其抑制作用机制展开探讨。研究发现,西黄丸治疗原发性肺癌的机制可能是通过抑制炎症微环境下的NLRP3炎症小体及其产物IL-1 β ,IL-18和MDA表达水平,进而抑制肿瘤细胞增殖,转变其异常的能量代谢方式有关,也明确了西黄丸能够有效抑制肺

癌细胞增殖,肯定了西黄丸有效防治原发性肺癌的作用。为了进一步明确西黄丸抑制NLRP3炎症小体的具体路径,探寻西黄丸防治原发性肺癌中的具体有效成分,课题组下一步将展开深入研究,为西黄丸防治原发性肺癌提供更多的科学依据和思路。

[参考文献]

- [1] SIEGEL R, NAISHADHAM D, JEMAL A. Cancer Statistics[J]. CA Cancer J, 2013, 63(1): 11-30.
- [2] WANG J, ZOU Z H, XIA H L, et al. Strengths and weaknesses of immunotherapy for advanced non-small cell lung cancer: a Meta-analysis of 12 randomized controlled trials[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e32695.
- [3] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.
- [4] KOLB R, LIU G H, JANOWSKI A M, et al. Inflammasomes in cancer: a double-edged sword[J]. Protein Cell, 2014, 5(1): 12-20.
- [5] ALLEN I C, TEKIPPE E M, WOODFORD R M T, et al. The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer[J]. J Exp Med, 2010, 207(5): 1045-1056.
- [6] TU S, BHAGAT G, CUI G, et al. Overexpression of interleukin-1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid derived suppressor cells in mice[J]. Cancer Cell, 2008, 14(5): 408-419.
- [7] LAMKANFI M, MALIREDDI R K, KANNEGANTI T D, et al. Fungal zymosan and mannan activate the cryopyrin inflammasome[J]. J Biol Chem, 2009, 284(31): 20574-20581.
- [8] 马杰,杨伟,关硕,等.西黄丸乙酸乙酯提取物抗肿瘤活性研究[J].医药导报,2014,33(3):303-306.
- [9] 王留晏,李皓帆,俎青,等.西黄丸配合CHOP化疗方案治疗非霍奇金淋巴瘤60例[J].山东中医药大学学报,2012,36(4):313-315.
- [10] 金沈锐,祝彼得,秦旭华,等.西黄丸对人肝癌细胞SMMC7721及小鼠宫颈癌细胞U14周期的影响[J].时珍国医国药,2007,18(11):2782-2783.
- [11] 李新叶,苏亮,徐钰,等.西黄丸调节肿瘤微环境中Treg细胞PI3K/Akt通路的抗肿瘤作用机制研究[J].世界科学技术—中医药现代化,2018,20(1):49-54.
- [12] 许慧芹,张临泉.西黄胶囊辅助调强放疗对食管癌再程放疗的近期疗效观察[J].实用肿瘤杂志,2018,33(1):61-65.
- [13] KONG H, WANG Y, ZENG X, et al. Differential expression of inflammasomes in lung cancer cell lines and tissues[J]. Tumour Biol, 2015, 36(10): 7501-7513.
- [14] 江一鸣,苏亮,徐钰,等.西黄丸调节MEKK1/SEK1通路抑制小鼠乳腺癌生长机制研究[J].现代中药研究与实践,2019,33(1):24-29.
- [15] 杜旦锋,郭丽,盛丽娜,等.西黄丸抗肿瘤转移作用及其机制研究[J].中药材,2018,41(8):1995-1998.
- [16] LAMKANFI M, DIXIT M. Mechanisms and functions of inflammasomes[J]. Cell, 2014, 157(5): 1013-1022.
- [17] RIDKER P M, MACFADYEN J G, THUREN T, et al. Effect of interleukin-1 β inhibition with canakinumab on incident lung cancer in patients with atherosclerosis: exploratory results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial[J]. Lancet, 2017, 390(10105): 1833-1842.
- [18] 任瑶,江一鸣,项蓉蓉,等.西黄丸组中药调节肿瘤微环境中Treg细胞PI3K/Akt通路的抗肿瘤作用机制研究[J].药物评价研究,2019,42(3):437-443.
- [19] 胡俊霞,关硕,杨伟,等.西黄丸抗肿瘤与免疫调节作用研究进展[J].医药导报,2013,32(8):1061-1063.
- [20] 何丽娟,靳冉,李晋生,等.西黄丸含药血清干预人乳腺癌细胞增殖的药效强度及其与采血时间的关系[J].中医杂志,2019,60(14):1232-1236.
- [21] 许涛,李萍,曾召琼,等.犀黄丸提取液对MDA-MB-231乳腺癌细胞功能的影响[J].中医学报,2019,34(6):1226-1230.
- [22] 邵萌,周大成,殷志新,等.西黄丸的抗肿瘤作用及临床应用研究进展[J].国际药学研究杂志,2017,44(6):504-509.
- [23] 李莉芳,陈如山,刘新民,等.犀黄丸诱导人肝癌细胞凋亡及其机制的研究[J].中医药学刊,2004,22(1):125-126.
- [24] 赵芳芳.乳香挥发油及地塞米松对IL-1 β 介导的兔视网膜色素上皮细胞迁移、增殖及NF- κ B信号通路的影响[D].银川:宁夏医科大学,2019.
- [25] 马伟.麝香促进肺腺癌细胞增殖及凋亡效果的体外实验研究[J].四川中医,2016,34(11):48-51.
- [26] 郭少贤,刘永惠,常靖,等.麝香酮干预血瘀证乳腺癌组织血管生成相关因子表达研究[J].河北中医药学报,2011,26(2):40-41.
- [27] SHIRAKI K, ITO T, SUFIMOTO K, et al. Different effects of bile acids, ursodeoxycholic acid and deoxycholic acid, on cell growth and cell death in human colonic adenocarcinoma cells[J]. Int J Mol Med, 2005, 16(4): 729-733.
- [28] 蔡红娇,汪世元,刘烈刚,等.体外培育牛黄耐缺氧和清除自由基作用的研究[J].中药药理与临床,2003,

- 19(6):20-22.
- [29] ZHOU R, YAZDI A S, MENU P, et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation [J]. *Nature*, 2011, 475(7354):122-122.
- [30] 朱军民,陈刚,秦俊杰,等.糖代谢异常和炎症对胃癌的影响[J].*兰州大学学报:医学版*,2018,44(1):83-88.
- [31] LUO Y P, JIANG L, KANG K, et al. Hemin inhibits NLRP3 inflammasome activation in sepsis-induced acute lung injury, involving heme oxygenase-1 [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 20(1): 24-32.
- [32] ISAKOV E, EISMAN-SHOMER P, BENHAR M. Suppression of the pro-inflammatory NLRP3/interleukin-1 β pathway in macrophages by the thioredoxin reductase inhibitor auranofin [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840(10): 3153-3161.
- [33] ZAKI M H, BOYD K L, VOGEL P, et al. The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis [J]. *Immunity*, 2010, 32(3):379-391.
- [34] JULIANA C, FERNANDES-ALNEMRI T, WU J, et al. Anti-inflammatory compounds parthenolide and bay 11-7082 are direct inhibitors of the inflammasome [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(13): 9792-9802.
- [35] TAS F, TILGEN YASAEVER C, KARABULUT S, et al. Clinical significance of serum interleukin-18 (IL-18) levels in patients with gastric cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, 70(13):19-23.
- [36] CHOW M T, SCENEAY J, PAGET C, et al. NLRP3 suppresses NK cell-mediated responses to carcinogen-induced tumors and metastases [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(22): 5721-5732.
- [37] OKAMOTO M, LIU W, LUO Y, et al. Constitutively active inflammasome in human melanoma cells mediating autoinflammation via caspase-1 processing and secretion of interleukin-1 β [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(9): 6477-6488.
- [38] 姜华,闫宜青,江维,等.NLRP3炎症小体活化、调控机制及相关疾病机制[J].*中国科学:生命科学*,2017,47(1):125-131.

[责任编辑 张丰丰]