

抑制 AMPK 观察清燥救肺汤对肺癌细胞自噬启动 相关蛋白表达的影响

张汗顺, 余功, 刘成, 谢斌*
(江西中医药大学, 南昌 330004)

[摘要] 目的:观察应用腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)抑制剂(compound C)后,清燥救肺汤对肺癌细胞自噬启动相关蛋白 AMPK,哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR),UNC-51样激酶1(ULK1)表达的影响。方法:雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为模型组,环磷酰胺(CTX)组(50 mg·kg⁻¹),清燥救肺汤组(11 g·kg⁻¹),AMPK 抑制剂组(10 mg·kg⁻¹),清燥救肺汤加 AMPK 抑制剂组(清燥加抑制剂组)(11 g·kg⁻¹+10 mg·kg⁻¹)。小鼠右腋下注射 Lewis 肺癌细胞构建肺癌荷瘤模型。造模 24 h 后,CTX 组腹腔注射给药,隔日 1 次,共 7 次,AMPK 抑制剂组与清燥加抑制剂组腹腔注射 compound C,每日 1 次,共 14 d。清燥救肺汤组和清燥加抑制剂组,造模前后 14 d 均以中药设定剂量灌胃给药。实验结束后处死各组小鼠并取荷瘤组织,统计各组瘤质量;透射电镜(TEM)观察各组肺癌组织自噬溶酶体的生成情况;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 AMPK,磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶(p-AMPK),mTOR,磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR),ULK1,磷酸化 UNC-51 样激酶 1(p-ULK1),微管相关蛋白 1 轻链 3B(LC3B)和 p62 蛋白的表达;苏木素-伊红(HE)染色观察各组肺癌组织病理学变化。结果:与模型组比较,清燥救肺汤组瘤质量降低($P<0.01$),电镜下发现自噬溶酶体生成,p-AMPK,p-ULK1,LC3B,LC3B-II 蛋白表达和 p-AMPK/AMPK,p-ULK1/ULK1,LC3B-II/LC3B-I 均升高($P<0.05$, $P<0.01$),p-mTOR,p62 蛋白表达和 p-mTOR/mTOR 均降低($P<0.05$)。与清燥救肺汤组比较,清燥加抑制剂组电镜下未见自噬溶酶体生成,p-AMPK,p-ULK1,LC3B,LC3B-II 蛋白表达和 p-AMPK/AMPK,p-ULK1/ULK1,LC3B-II/LC3B-I 均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),p62 蛋白表达升高($P<0.05$)。HE 染色结果显示,各给药组肺癌组织与模型组比较,病理有明显改善。结论:清燥救肺汤能促进自噬发生标志蛋白 LC3B-II 升高及 p62 蛋白表达降低从而诱导自噬发生,其自噬启动机制可能不是调控 AMPK/mTOR/ULK1 通路介导,而是通过 AMPK/ULK1 通路实现的。

[关键词] 腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK);清燥救肺汤;肺癌;自噬启动相关蛋白

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)05-0025-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220427

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211210.2217.007.html>

[网络出版日期] 2021-12-14 14:16

Effect of Qingzao Jiufeitang on Protein Expression Related to Autophagy Initiation in Lung Cancer Cells Through AMPK inhibition

ZHANG Han-shun, YU Gong, LIU Cheng, XIE Bin*
(Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Qingzao Jiufeitang on the expression of adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK), mammalian target of rapamycin (mTOR), and UNC-51-like kinase 1 (ULK1) in lung cancer cells after the application of AMPK inhibitor (compound C). **Method:** Male C57BL/6J mice were randomly divided into a model group, a cyclophosphamide (CTX) group (50 mg·kg⁻¹), a Qingzao Jiufeitang group (11 g·kg⁻¹), an AMPK inhibitor group (10 mg·kg⁻¹), and a Qingzao

[收稿日期] 20211021(023)

[基金项目] 江西省自然科学基金项目(20202BAB206075);江西省教育厅科技项目(GJJ201202);江西省中医药管理局中医药科技计划(2020A0325);江西中医药大学校级研究生创新专项(JZYC21S64)

[第一作者] 张汗顺,在读硕士,从事中医药抗肿瘤研究,E-mail:495299217@qq.com

[通信作者] * 谢斌,博士,教授,从事中医药抗肿瘤研究,E-mail:331080826@qq.com

Jiufeitang combined with AMPK inhibitor group (combination group) ($11 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} + 10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Lewis lung cancer cells were subcutaneously injected into the right axilla to induce a tumor-bearing model. 24 hours after modeling, the mice in the CTX group were intraperitoneally injected once every other day for seven times in total. The mice in the AMPK inhibitor group and the combination group received intraperitoneal injection of compound C, once a day for 14 days. The mice in the Qingzao Jiufeitang group and the combination group were administered orally at the set dose for 14 days before and after modeling. At the end of the experiment, the mice in each group were sacrificed. The tumor-bearing tissues were collected, and the tumor weight of each group was counted. Transmission electron microscopy (TEM) was used to observe the formation of autolysosomes in lung cancer tissues of each group. Western blot was used to detect the protein expression of AMPK, phosphorylated AMPK (p-AMPK), mTOR, phosphorylated mTOR (p-mTOR), ULK1, phosphorylated ULK1 (p-ULK1), microtubule-associated protein 1 light chain 3B (LC3B), and p62. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of lung cancer in each group. **Result:** Compared with the model group, the Qingzao Jiufeitang group showed decreased tumor weight ($P < 0.01$), the formation of autolysosomes under the electron microscope, increased protein expression of p-AMPK, p-ULK1, LC3B, LC3B- II, and p-AMPK/AMPK, p-ULK1/ULK1, and LC3B- II/LC3B- I ratios ($P < 0.01$, $P < 0.05$), and reduced protein expression of p-mTOR, p62, and p-mTOR/mTOR ratio ($P < 0.05$). Compared with the Qingzao Jiufeitang group, the combination group showed no autolysosomes formation under the electron microscope, decreased protein expression of p-AMPK, p-ULK1, LC3B, LC3B- II, and p-AMPK/AMPK, p-ULK1/ULK1, LC3B- II/LC3B- I ratios ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and increased p62 protein expression ($P < 0.05$). HE staining results showed that the pathological changes of lung cancer tissues in the groups with drug intervention were improved compared with those in the model group. **Conclusion:** Qingzao Jiufeitang can promote the elevation of LC3B- II and decrease the expression of p62 protein, thus inducing autophagy. The mechanism of autophagy initiation may be achieved by the AMPK/ULK1 pathway instead of the mediation by the AMPK/mTOR/ULK1 pathway.

[Keywords] adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK); Qingzao Jiufeitang; lung cancer; proteins related to autophagy initiation

2020年癌症发病率与死亡率统计数据显示,肺癌发病率位居世界第2位,死亡率高居首位^[1]。中医药配合手术,放化疗及其他治疗方法可减轻不良反应、增强疗效,具有独特优势,在当前防治肺癌综合模式中,占有着越来越重要的地位^[2]。但其减毒增效的作用机制并不十分清楚。清燥救肺汤具有清热润燥、养阴益气之功效,作用于肺癌放化疗后气阴两虚型患者,可有效提高机体免疫状态及改善患者燥热咳嗽症状,为肺癌治疗常用方^[3]。课题组前期研究表明清燥救肺汤能有效抑制肺癌细胞增殖,通过抑制肺癌细胞糖酵解、磷酸戊糖、三羧酸循环、氧化磷酸化代谢途径限速酶活性,减少癌细胞利用糖原、脂类和核苷酸等原料,阻止癌细胞能量获取、生物膜及核酸合成^[4-7]。同时发现该方能抑制细胞色素C氧化酶亚单位IV(COX IV)蛋白表达和三磷酸腺苷(ATP)生成,升高一磷酸腺苷(AMP)与ATP比值^[8],并且前期预实验中观察该方作用于肺癌细胞,发现自噬溶酶体的生成,由此推测清燥救

肺汤诱导肺癌细胞自噬,其机制可能与该方抑制ATP生成,升高AMP/ATP,激活AMPK有关。细胞自噬能有效增强患者对放化疗的耐受和改善其预后状况^[9],自噬的产生调控由多条信号通路介导,其中腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)/UNC-51样激酶1(ULK1)通路是调控自噬的经典信号通路之一^[10]。本研究拟构建荷Lewis小鼠肺癌模型,通过比较清燥救肺汤加入AMPK抑制剂前后,自噬溶酶体的形成及自噬启动相关蛋白AMPK,mTOR和ULK1表达的变化,探索该方诱导肺癌细胞自噬的启动机制,以期为后续探讨清燥救肺汤诱导肺癌细胞自噬的分子生物学机制提供基础,同时也为该方临床应用推广提供依据。

1 材料

1.1 动物和瘤株 SPF级雄性C57BL/6J小鼠50只,体质量(20 ± 2)g,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司,合格证号SCXK(鲁)2019-0003,本实验

经由江西中医药大学实验动物伦理委员会审查批准,批准文号JZLLSC20210014。

1.2 药物及制备 清燥救肺汤药物制备:霜桑叶 9 g,炙甘草 3 g,枇杷叶 9 g,苦杏仁 9 g,党参 12 g,生石膏 12 g,阿胶 9 g,麦冬 10 g,以上药物均购于江西省中医院,有江西中医药大学国家工程中心冯育林教授鉴定均为正品,根据文献[4]方法制备该方药液,取10倍上述药材量的水,浸泡1 h,其中生石膏先煎30 min,而后一起煎煮,水沸后调小火再煎40 min,过滤;第2次加8倍量的水,煎煮方法如前,合并2次滤液,恒温箱60℃烘干,最终得到粉末27.62 g(1 g含杂质0.28 g),故干粉实际有效成分质量为 $27.62 \times 0.72 = 19.9$ g,得率27.26%。密封,4℃保存。环磷酰胺(CTX,中国江苏恒瑞医药公司,进口药品注册证号H20160467,批号9L351A,0.2 g/瓶)。AMPK抑制剂(compound C)溶剂为含0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)的生理盐水。

1.3 试剂 compound C, CMC-Na(美国MCE公司,批号分别为79767,66038);戊二醛(中国国药化学试剂有限公司,批号T20100825);硝酸铅(中国西陇化工股份有限公司,批号HGT3470-2000);全蛋白抽提试剂盒,BCA蛋白含量检测试剂盒,预染蛋白分子量,兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH),辣根过氧化物酶标记的羊抗兔免疫球蛋白G(IgG-HRP),苏木素-伊红(HE)染液试剂盒,免疫组化笔(江苏凯基生物技术股份有限公司,批号分别为20210111, 20210126, 20210115, 20210121, 20210115, 20210114, 20210222);兔抗AMPK,磷酸化(p)-AMPK, mTOR, p-mTOR, ULK1, p-ULK1(美国CST公司,批号分别为19,13,4,2,7,5);兔抗微管相关蛋白轻链3B(LC3B)(英国Abcam公司,批号GR321382);兔抗p62(武汉三鹰生物技术有限公司,批号00082587)。

1.4 仪器 Tecnai Spirit型透射电子显微镜(美国Fei公司);ULTRACUT UCT/UC6型超薄切片机(德国Leica公司);Power Pac TW型电泳仪,Trans-blot Turbo全能型蛋白转印系统(美国Bio-Rad公司);G:BOXChemixR5型凝胶成像系统(英国Syngene公司);SpectraMaxM3型多功能酶标仪(美国MD公司)。

2 方法

2.1 造模 Lewis肺癌细胞用含10%胎牛血清的DMEM培养基培养,培养环境为室温,5%CO₂。取最佳生长状态的Lewis肺癌细胞,于小鼠右腋皮下

无菌接种,密度为 1×10^6 个/只^[9]。

2.2 小鼠分组和给药方法 50只小鼠随机分为模型组,CTX组,清燥救肺汤组,AMPK抑制剂组,清燥加抑制剂组,每组10只。清燥救肺汤组和清燥加抑制剂组需在造模前14 d开始灌胃清燥救肺汤($11 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),其余各小鼠正常饲养,清燥救肺汤给药剂量依据前期研究结果^[4,8]及《中药药理研究方法论》^[11],22,11,5.5,2.75 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 清燥救肺汤分别作用于小鼠,清燥救肺汤22 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组没有抑制肿瘤细胞的作用,反而会促进肿瘤细胞增殖,清燥救肺汤11,5.5,2.75 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组有较明显的抑制肿瘤细胞增殖的作用,其中清燥救肺汤11 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组为人临床剂量换算成小鼠的剂量,该剂量下抑瘤率最高,故本实验以清燥救肺汤11 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 为给药剂量。造模后,模型组以等体积生理盐水灌胃,CTX组以CTX 50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 隔日腹腔注射1次,AMPK抑制剂组和清燥加抑制剂组均腹腔注射compound C(10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),清燥救肺汤组与清燥加抑制剂组中药继续按造模前设定的剂量给药,给药时间均为14 d。

2.3 电镜观察各组自噬溶酶体的生成 取适量肺癌组织,2.5%戊二醛固定,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗2次,1%锇酸固定2~3 h,经过PBS漂洗和乙醇脱水后包埋过夜,切片机超薄切片,厚度50~60 nm,3%乙酸铀-枸橼酸铅双染色,透射电镜拍片。

2.4 Western blot检测肺癌组织自噬启动相关蛋白表达 取适量肺癌组织,加入蛋白裂解液,冰上匀浆,离心取上清,BCA法测定蛋白浓度。SDS-PAGE电泳分离蛋白后转移至PVDF膜,5%脱脂奶粉封闭总蛋白,5%BSA封闭磷酸化蛋白,加入一抗(1:1 000),4℃孵育过夜,洗膜后加入二抗(1:8 000),室温下孵育2 h,显影。采用Image J分析蛋白条带灰度值。

2.5 HE染色观察各组肺癌组织病理变化 肺癌组织经脱水、包埋后制成石蜡切片,脱蜡、水化后置入苏木素溶液及伊红染液中染色,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,封片。

2.6 统计学分析 采用SPSS 22.0软件进行统计分析,检测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对荷Lewis小鼠瘤质量的影响 与模型组比较,CTX组,清燥救肺汤组,AMPK抑制剂组和清燥加抑制剂组瘤质量显著降低($P < 0.01$);与CTX组比

较,清燥救肺汤组,AMPK抑制剂组,清燥加抑制剂组瘤质量升高($P<0.01$);与AMPK抑制剂组比较,清燥加抑制剂组瘤质量降低($P<0.05$)。见表1。

表1 清燥救肺汤对荷Lewis小鼠瘤质量的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)
Table 1 Effect of Qingzao Jiufeitang on tumor quality of Lewis loaded mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	瘤质量/g
模型		1.309±0.287
CTX	0.025	0.202±0.061 ¹⁾
清燥救肺汤	11	0.613±0.202 ^{1,2)}
AMPK抑制剂	0.01	0.773±0.250 ^{1,2)}
清燥加抑制剂	11+0.01	0.587±0.130 ^{1,2,3)}

注:与模型组比较¹⁾ $P<0.01$;与CTX组比较²⁾ $P<0.01$;与AMPK抑制剂组比较³⁾ $P<0.05$ 。

3.2 对荷Lewis小鼠肺癌组织病理变化的影响 模型组肺癌组织质地紧密,未见明显炎细胞浸润和出

血。CTX组、清燥救肺汤组,AMPK抑制剂组和清燥加抑制剂组肺癌组织质地较为疏松,均见坏死灶与炎细胞浸润。见图1。

3.3 对荷Lewis小鼠肺癌组织自噬溶酶体的生成的影响 模型组细胞结构紊乱,细胞核肿胀、萎缩或畸形,核质比例失常,细胞质中部分线粒体出现肿胀、嵴断裂,溶酶体出现,未见明显自噬溶酶体结构;CTX组细胞结构紊乱,细胞核肿胀、萎缩或畸形,核质比例失常,溶酶体和自噬溶酶体数量明显增多;清燥救肺汤组细胞结构紊乱,细胞核肿胀、萎缩或畸形,核质比例失常,细胞质中镜下可见自噬溶酶体结构;AMPK抑制剂组细胞结构紊乱,细胞核肿胀、萎缩或畸形,核质比例失常,细胞质中可见大量空泡,未见明显自噬体结构;清燥加抑制剂组细胞结构紊乱,细胞核肿胀、萎缩或畸形,核质比例失常,细胞质中可见大量溶酶体,但未见明显自噬溶酶体体结构。见图2。

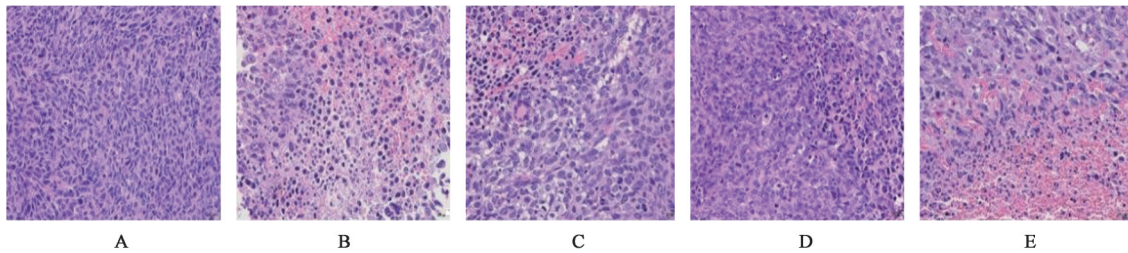
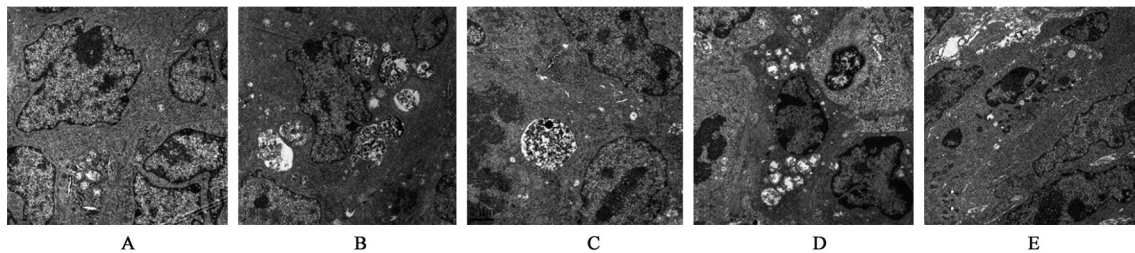


图1 清燥救肺汤对荷Lewis小鼠肺癌组织病理变化的影响(HE,×200)

Fig. 1 Effect of Qingzao Jiufeitang on pathological changes of lung cancer tissues in Lewis mice (HE,×200)



A. 模型组;B. CTX组;C. 清燥救肺汤组;D. AMPK抑制剂组;E. 清燥加抑制剂组(图2~5同)

图2 清燥救肺汤对荷Lewis小鼠肺癌组织自噬溶酶体生成的影响(透射电镜,×2 550)

Fig. 2 Effect of Qingzao Jiufeitang on autophagolysosome formation in lung cancer tissues of Lewis mice (TEM,×2 550)

3.4 对荷Lewis小鼠肺癌组织AMPK, p-AMPK, mTOR和p-mTOR蛋白表达的影响 与模型组比较,CTX组和清燥救肺汤组p-AMPK蛋白表达和p-AMPK/AMPK均明显升高($P<0.05, P<0.01$), p-mTOR蛋白表达和p-mTOR/mTOR均明显降低($P<0.05, P<0.01$),AMPK抑制剂组p-AMPK蛋白表达降低($P<0.05$),清燥加抑制剂组p-mTOR/mTOR明显降低($P<0.05$);与CTX组比较,清燥救肺汤组,AMPK抑制剂组和清燥加抑制剂组p-AMPK蛋白

表达和p-AMPK/AMPK均显著降低($P<0.05, P<0.01$),AMPK抑制剂组p-mTOR蛋白表达和p-mTOR/mTOR均显著升高($P<0.01$),清燥加抑制剂组p-mTOR/mTOR显著升高($P<0.05$);与清燥救肺汤组比较,AMPK抑制剂组和清燥加抑制剂组p-AMPK蛋白表达和p-AMPK/AMPK均显著降低($P<0.01$),AMPK抑制剂组p-mTOR蛋白表达和p-mTOR/mTOR均明显升高($P<0.05$)。见表2,图3。

表2 清燥救肺汤对荷Lewis小鼠肺癌组织AMPK, p-AMPK, mTOR, p-mTOR蛋白表达及p-mTOR/mTOR, p-AMPK/AMPK的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of Qingzao Jiufeitang on AMPK, p-AMPK, mTOR, p-mTOR protein expression and p-mTOR/mTOR, p-AMPK/AMPK ratio in lung cancer tissues of Lewis mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	AMPK/GAPDH	p-AMPK/GAPDH	p-AMPK/AMPK	mTOR/GAPDH	p-mTOR/GAPDH	p-mTOR/mTOR
模型		1.164±0.300	0.234±0.066	0.206±0.054	0.863±0.161	0.739±0.054	0.869±0.103
CTX	0.025	1.102±0.307	0.652±0.103 ²⁾	0.629±0.214 ²⁾	0.822±0.122	0.326±0.046 ²⁾	0.402±0.076 ²⁾
清燥救肺汤	11	1.137±0.116	0.461±0.048 ^{2,4)}	0.411±0.087 ^{1,3)}	0.906±0.100	0.407±0.088 ¹⁾	0.454±0.123 ²⁾
AMPK抑制剂	0.01	1.257±0.426	0.114±0.023 ^{1,4,6)}	0.093±0.011 ^{4,6)}	0.936±0.128	0.756±0.233 ^{4,5)}	0.800±0.195 ^{4,5)}
清燥加抑制剂	11+0.01	1.277±0.427	0.197±0.055 ^{4,6)}	0.158±0.028 ^{4,5)}	0.819±0.107	0.528±0.121	0.640±0.073 ^{1,3)}

注:与模型组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与CTX组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01;与清燥救肺汤组比较⁵⁾P<0.05,⁶⁾P<0.01。

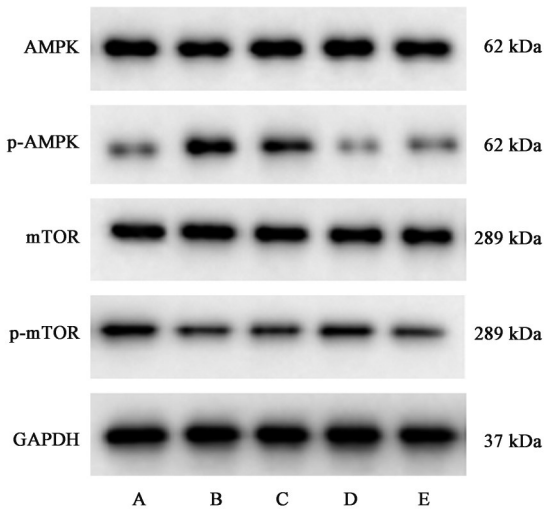


图3 清燥救肺汤作用荷Lewis小鼠肺癌组织AMPK, p-AMPK, mTOR, p-mTOR蛋白电泳

Fig. 3 Electrophoresis of Qingzao Jiufeitang on AMPK, p-AMPK, mTOR and p-mTOR protein in lung cancer tissues of Lewis mice

3.5 对荷Lewis小鼠肺癌组织ULK1和p-ULK1蛋白表达的影响

与模型组比较,CTX组,清燥救肺

汤组小鼠p-ULK1蛋白表达和p-ULK1/ULK1均显著升高($P<0.01$);与CTX组比较,AMPK抑制剂组和清燥加抑制剂组p-ULK1蛋白表达和p-ULK1/ULK1均显著降低($P<0.01$),清燥救肺汤组p-ULK1/ULK1降低($P<0.05$);与清燥救肺汤组比较,AMPK抑制剂组和清燥加抑制剂组p-ULK1蛋白表达和p-ULK1/ULK1均明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见图4,表3。

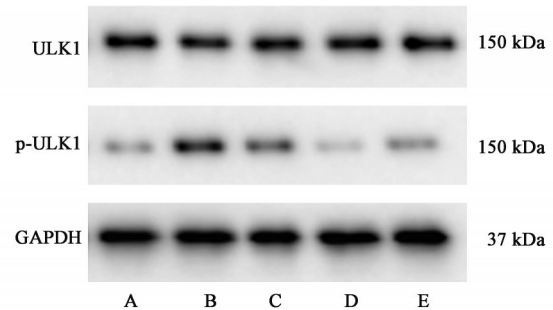


图4 清燥救肺汤作用荷Lewis小鼠肺癌组织ULK1和p-ULK1蛋白电泳

Fig. 4 Electrophoresis of Qingzao Jiufeitang on ULK1 and p-ULK1 protein in lung cancer tissues of Lewis mice

表3 清燥救肺汤对荷Lewis小鼠肺癌组织ULK1和p-ULK1蛋白表达及p-ULK1/ULK1的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Qingzao Jiufeitang on ULK1, p-ULK1 protein expression and p-ULK1/ULK1 in lung cancer tissues of Lewis mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ULK1/GAPDH	p-ULK1/GAPDH	p-ULK1/ULK1
模型		0.530±0.106	0.091±0.024	0.171±0.021
CTX	0.025	0.519±0.121	0.285±0.072 ¹⁾	0.556±0.115 ¹⁾
清燥救肺汤	11	0.553±0.071	0.213±0.043 ¹⁾	0.395±0.121 ^{1,2)}
AMPK抑制剂	0.01	0.555±0.100	0.073±0.013 ^{3,5)}	0.138±0.046 ^{3,5)}
清燥加抑制剂	11+0.01	0.584±0.074	0.108±0.033 ^{3,5)}	0.182±0.034 ^{3,5)}

注:与模型组比较¹⁾P<0.01;与CTX组比较²⁾P<0.05,³⁾P<0.01;与清燥救肺汤组比较⁴⁾P<0.05,⁵⁾P<0.01。

3.6 对荷Lewis小鼠肺癌组织LC3B-I, LC3B-II, LC3B和p62蛋白表达的影响

与模型组比较,CTX组

和清燥救肺汤组LC3B-II, LC3B蛋白表达及LC3B-II/LC3B-I均升高($P<0.05, P<0.01$), p62蛋白表达降低($P<0.01$), AMPK抑制剂组LC3B-I蛋白表达降低($P<0.05$),清燥加抑制剂组LC3B-II/

LC3B- I 升高($P<0.01$);与 CTX 组比较,AMPK 抑制剂组和清燥加抑制剂组 LC3B- I, LC3B- II, LC3B 蛋白表达降低($P<0.01$),AMPK 抑制剂组 p62 蛋白表达升高($P<0.01$),LC3B- II/LC3B- I 降低($P<0.05$);与清燥救肺汤组比较,AMPK 抑制剂组和清燥加抑制剂组 LC3B- II, LC3B 蛋白表达均降低($P<$

$0.05, P<0.01$), p62 蛋白表达升高($P<0.05, P<0.01$), AMPK 抑制剂组 LC3B- I 蛋白表达和 LC3B- II/LC3B- I 均降低($P<0.05$);与 AMPK 抑制剂组比较,清燥加抑制剂组 LC3B- II 蛋白表达及 LC3B- II/LC3B- I 均升高($P<0.05$), p62 蛋白表达降低($P<0.05$)。见表 4, 图 5。

表 4 清燥救肺汤对荷 Lewis 小鼠肺癌组织 LC3B- I, LC3B- II, LC3B 和 p62 蛋白表达及 LC3B- II/LC3B- I 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Qingzao Jiufeitang on LC3B- I, LC3B- II, LC3B and p62 protein expression and LC3B- II/LC3B- I in lung cancer tissues of Lewis mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	LC3B- I /GAPDH	LC3B- II /GAPDH	LC3B/GAPDH	LC3B- II/LC3B- I	p62/GAPDH
模型		0.076±0.018	0.041±0.009	0.117±0.019	0.561±0.168	0.439±0.103
CTX	0.025	0.097±0.017	0.129±0.025 ²⁾	0.226±0.035 ²⁾	1.350±0.296 ²⁾	0.151±0.053 ²⁾
清燥救肺汤	11	0.073±0.012	0.105±0.021 ²⁾	0.179±0.029 ^{1,3)}	1.432±0.229 ²⁾	0.130±0.051 ²⁾
AMPK 抑制剂	0.01	0.045±0.008 ^{1,4,5)}	0.038±0.007 ^{4,6)}	0.083±0.009 ^{4,6)}	0.848±0.219 ^{3,5)}	0.458±0.120 ^{4,6)}
清燥加抑制剂	11+0.01	0.052±0.010 ⁴⁾	0.068±0.013 ^{4,5,7)}	0.120±0.019 ^{4,5)}	1.322±0.268 ^{2,7)}	0.284±0.072 ^{5,7)}

注:与模型组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与 CTX 组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$;与清燥救肺汤组比较⁵⁾ $P<0.05$,⁶⁾ $P<0.01$;与 AMPK 抑制剂组比较⁷⁾ $P<0.05$ 。

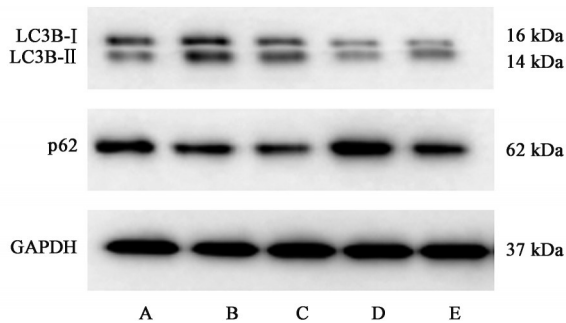


图 5 清燥救肺汤作用荷 Lewis 小鼠肺癌组织 LC3B- I, LC3B- II 和 p62 蛋白电泳

Fig. 5 Electrophoresis of Qingzao Jiufeitang on LC3B- I, LC3B- II and p62 protein in lung cancer tissues of Lewis mice

4 讨论

清燥救肺汤出自清代名医喻昌《医门法律》,常用于肺癌临床并为名老中医推崇。该方可明显减轻放疗副反应并增强其疗效,还可调节机体免疫力,促进术后恢复,改善患者的生存质量,延长生存期^[12],疗效确切是应用优势,机制不明是应用瓶颈。

分析该方组方配伍,霜桑叶为君,与臣药石膏配伍,清泄肺热,佐以麦冬、党参和阿胶补气养阴,杏仁和枇杷叶宣肺止咳,炙甘草调和诸药为使。诸药合用,发挥清热润燥、养阴益气之功,能有效缓解肺癌燥热表现。现代关于清燥救肺汤化学成分研究发现,测定其含芝麻素、甘草素、异槲皮苷等成分,此外,发现该方具有抗氧化活性^[13]。

课题组从能量代谢角度分析该方抗肺癌机制,证实清燥救肺汤能有效抑制氧化磷酸化代谢限速

酶活性,降低线粒体膜电位,减少 ATP 生成^[8]。ATP 生成减少,AMP 堆积增多,升高 AMP/ATP,有可能激活 AMPK 能量感受器,诱导自噬的启动^[14]。

在最初的研究中,自噬可抑制肿瘤的发生^[15]。随着研究的深入,研究者发现随着肿瘤的生长,肿瘤细胞为了适应缺氧、营养缺乏等环境或抵抗化疗药物时,可通过增强自噬来维持自身代谢,保护自身^[16],这提示自噬可在肿瘤的生长中起促进的作用。相关研究也证实自噬可通过回收利用降解物,在肺癌的发展中起保护作用,使癌细胞在恶劣的环境中生存^[17]。由此可见,自噬是一把双刃剑^[18],既是细胞“自己吞噬自己”^[19],又降解回收物质以循环再用^[20],对肿瘤具有抑制和促进的双重功效^[21]。在肿瘤不同的类型及在发生发展的不同阶段中,自噬也起着不同的作用。

细胞自噬启动相关靶点蛋白调控机制中,AMPK 被激活,可抑制 mTOR 活化,阻断其对 ULK1 蛋白磷酸化抑制作用,诱导细胞自噬启动^[22]。ULK1 是自噬启动和进展的重要调控因子,最近的研究表明 AMPK 也可直接活化 ULK1,诱导自噬的发生^[23]。LC3B 为哺乳动物自噬发生的标志蛋白,有 LC3B- I 和 LC3B- II 两种存在形式,检测 LC3B- II/LC3B- I 转化是判定自噬流顺逆检测的金指标,同时 LC3B- II 蛋白与 p62 蛋白结合可形成复合物,并在自噬溶酶体中降解,自噬活性上升时,LC3B- II 上升,p62 下降;当自噬活性受阻时,LC3B- II 和 p62 表达与前者相反^[24]。

本实验研究显示,清燥救肺汤能有效促进荷Lewis小鼠肺癌细胞自噬,加入AMPK抑制剂后,自噬水平明显减弱。实验数据分析,与模型组比较,清燥救肺汤组电镜下可见自噬溶酶体生成,p-AMPK, p-ULK1, LC3B, LC3B- II 蛋白表达和 p-AMPK/AMPK, p-ULK1/ULK1, LC3B- II /LC3B- I 均明显升高, p-mTOR, p62 蛋白表达和 p-mTOR/mTOR 均明显降低。清燥救肺汤加入 AMPK 抑制剂后,电镜下未见自噬溶酶体生成, p-AMPK, p-ULK1, LC3B, LC3B- II 蛋白表达和 p-AMPK/AMPK, p-ULK1/ULK1, LC3B- II /LC3B- I 均明显降低, p62 蛋白升高。

由此可见,清燥救肺汤促进自噬发生标志蛋白 LC3B- II 升高及 p62 蛋白表达降低从而诱导自噬发生,其启动机制可能不是通过激活 AMPK,间接抑制 mTOR 活化,阻断其对 ULK1 的抑制,而是通过激活 AMPK 直接磷酸化 ULK1 蛋白实现的。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 刘宗超,李哲轩,张阳,等. 2020全球癌症统计报告解读[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志,2021,7(2):1-14.

[2] 郑佳彬,袁嘉萌,刘益华,等. 中医药联合化疗治疗晚期非小细胞肺癌临床疗效的研究进展[J]. 中华中医药杂志,2018,33(11):5026-5030.

[3] 付啸峰,高海利,谢壁元. 清燥救肺汤加减治疗气阴两虚型非小细胞肺癌慢性咳嗽的效果[J]. 中国医学创新,2021,18(20):97-101.

[4] 陈江涛,徐彬智,余功,等. 清燥救肺汤对荷Lewis小鼠肺癌细胞增殖相关糖酵解乳酸生成的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(15):120-124.

[5] 余功,陈江涛,胡桥,等. 清燥救肺汤对荷Lewis小鼠肺癌细胞糖酵解关键限速酶HK2,PFK2,PKM2的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(4):54-58.

[6] 陈江涛,余功,谢斌. 清燥救肺汤对肺癌磷酸戊糖能量代谢途径的关键酶G6PD活性及其调控因子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(4):59-63.

[7] 胡桥,余功,饶斌,等. 清燥救肺汤对荷Lewis小鼠肺癌细胞中ACO1与ACL和FFA及CHO的影响[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2020,22(7):2572-2577.

[8] 李佳萍,余功,谢斌. 清燥救肺汤对Lewis肺癌荷瘤小鼠肺癌组织氧化磷酸化能量代谢的影响[J]. 中医杂志,2021,62(5):439-444.

[9] 杨晨,李萍,梁廷明. 细胞自噬与肿瘤的关系研究进展[J]. 生命科学,2015,27(2):151-160.

[10] 张升,吴友苹,顾利强,等. 细胞自噬进程的分子信号

通路研究进展[J]. 生命的化学,2018,38(2):213-223.

[11] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社,2006:445.

[12] 朱新瑜,张天成,倪广生,等. 采用该对放射性肺损伤的肺癌患者采用清燥救肺汤治疗的临床效果[J]. 中国地方病防治杂志,2017,32(3):312-313.

[13] 李华,刘梓晗,孟欣,等. 经典名方清燥救肺汤的多成分含量测定方法和抗氧化活性研究[J/OL]. 药学学报,(2021-10-30)[2021-10-30]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2163.R.20211015.0351.004.html>.

[14] SANDERS M J, GRONDIN P O, HEGARTY B D, et al. Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade [J]. Biochem J,2007,403(1):139-148.

[15] 范修琦,陈玉龙,吴耀松,等. 中医药调控自噬防治肺癌[J]. 中医学报,2019,34(12):2542-2548.

[16] HE J, YU J J, XU Q, et al. Downregulation of ATG14 by EGR1-MIR152 sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin-induced apoptosis by inhibiting cytoprotective autophagy [J]. Autophagy, 2015, 11 (2) : 373-384.

[17] 董庭君,温居一. 自噬在非小细胞肺癌治疗中的研究进展[J]. 转化医学杂志,2020,9(4):254-257.

[18] 宋园远,姜晓峰,梁红艳. 细胞自噬在肿瘤治疗中的研究进展[J]. 医学综述,2019,25(24):4887-4891.

[19] 高利昆,袁静萍,洪莉. 细胞自噬与肿瘤治疗的研究进展[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,2020,29(2):183-187.

[20] FENG Y C, BACKUES S K, BABA M, et al. Phosphorylation of Atg9 regulates movement to the phagophore assembly site and the rate of autophagosome formation [J]. Autophagy, 2016, 12 (4):648-658.

[21] 张秀莉,周海红,张永东,等. 自噬作为分子靶点用于肿瘤治疗的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报,2020,42(6):1091-1097.

[22] SHACKELFORD D B, SHAW R J. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression[J]. Nat Rev Cancer,2009,9(8):563-575.

[23] KIM J, KUNDU M, VIOLLET B, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of ULK1 [J]. Nat Cell Biol, 2011, 13 (2):132-141.

[24] LIN X L, LI S, ZHAO Y, et al. Interaction domains of p62: a bridge between p62 and selective autophagy[J]. DNA Cell Biol,2013,32(5):220-227.

[责任编辑 张丰丰]