

# 六君子汤调控 STAT3/泛素蛋白酶体途径防治肺癌恶病质小鼠肌肉萎缩的机制

张艳<sup>1</sup>, 桑亚洲<sup>1</sup>, 彭梦薇<sup>1</sup>, 陈玉龙<sup>1</sup>, 刘燕<sup>1</sup>, 张彩丽<sup>1</sup>, 吴耀松<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 河南中医药大学 中医药科学院, 河南省中医方证信号传导重点实验室/

河南省中医方证信号传导国际联合重点实验室, 郑州 450046;

2. 河南省中西医结合防治脑认知疾病工程技术研究中心, 郑州 450046;

3. 郑州市中西医结合防治脑认知疾病重点实验室, 郑州 450046)

**[摘要]** 目的:基于信号传导及转录激活因子3(STAT3)/泛素蛋白酶体途径,体内探讨六君子汤防治肺癌恶病质小鼠肌肉萎缩的作用机制。方法:6周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 40 只,随机分为空白组,模型组,六君子汤组,抑制剂组,六君子汤联合 static 组(联合用药组),每组 8 只。除空白组外,其余各组采用小鼠肺癌细胞(Lewis 细胞)右前腋下皮下接种的方法建立肺癌恶病质肌肉萎缩小鼠移植瘤模型,在造模第 8 天,六君子汤组给予六君子汤灌胃( $9.56 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )和抑制剂组腹腔注射抑制剂 [ $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot (2 \text{ d})^{-1}$ ] 治疗。药物干预 3 周后取材,称量小鼠体质量、腓肠肌质量;苏木素-伊红(HE)染色观察小鼠腓肠肌肌纤维病理变化及横截面积的改变;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠腓肠肌中磷酸化-STAT3(p-STAT3),STAT3,肌肉萎缩盒 F 基因(MAFbx),肌肉环状指基因 1(MuRF1)蛋白表达,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测小鼠腓肠肌中 STAT3,MAFbx, MuRF1 mRNA 的表达情况。结果:与空白组比较,模型组小鼠体质量及腓肠肌质量明显减轻,腓肠肌肌纤维横截面积明显减小,腓肠肌中 p-STAT3, STAT3, MAFbx, MuRF1 蛋白表达及 STAT3, MuRF1, MAFbx mRNA 的表达明显增加 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,六君子汤组小鼠体质量、腓肠肌质量、肌纤维横截面积明显增加 ( $P < 0.05$ ),腓肠肌 p-STAT3, STAT3, MuRF1, MAFbx 蛋白表达及 STAT3, MAFbx mRNA 的表达均下降 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,抑制剂组小鼠体质量及腓肠肌肌纤维横截面积增加 ( $P < 0.05$ ),抑制剂组腓肠肌 p-STAT3, STAT3, MuRF1, MAFbx 蛋白表达及 STAT3, MAFbx mRNA 表达均下降 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,联合用药组小鼠体质量及腓肠肌质量增加 ( $P < 0.05$ );腓肠肌 p-STAT3, STAT3, MuRF1 蛋白表达及 STAT3, MAFbx mRNA 表达均下降 ( $P < 0.05$ );与六君子汤组比较,抑制剂组、联合用药组腓肠肌中 p-STAT3 蛋白表达下降 ( $P < 0.05$ )。结论:六君子汤可以防治肺癌恶病质小鼠肌肉萎缩,其机制可能与调控 STAT3 信号介导的泛素蛋白酶体途径相关蛋白和基因的表达有关。

**[关键词]** 肺癌恶病质; 肌肉萎缩; 六君子汤; 信号传导及转录激活因子 3; 泛素蛋白酶体

**[中图分类号]** R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)05-0008-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220430

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211213.0839.001.html>

**[网络出版日期]** 2021-12-13 17:31

## Mechanism of Liu Junzitang in Treatment of Muscle Atrophy in Mice with Lung Cancer Cachexia Through Regulating STAT3/Ubiquitin Proteasome Pathway

ZHANG Yan<sup>1</sup>, SANG Ya-zhou<sup>1</sup>, PENG Meng-wei<sup>1</sup>, CHEN Yu-long<sup>1</sup>, LIU Yan<sup>1</sup>,

ZHANG Cai-li<sup>1</sup>, WU Yao-song<sup>1,2,3\*</sup>

(1. Henan Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine (TCM) Syndrome and Prescription in Signaling, Henan International Joint Laboratory of TCM Syndrome and Prescription in Signaling,

**[收稿日期]** 20211011(029)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(82074313, 81503490);河南省科技攻关项目(192102310160);河南省高等学校重点科研项目(19A360014);

**[第一作者]** 张艳, 硕士, 从事分子生物学与中医肿瘤方证基础研究, E-mail: 1293828441@qq.com

**[通信作者]** \* 吴耀松, 硕士, 教授, 从事分子生物学与中医肿瘤方证基础研究, E-mail: linawys@163.com

Academy of Chinese Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;  
2. Henan Engineering Technology Research Center for Prevention and Treatment of Brain Cognitive Diseases with Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Zhengzhou 450046, China;  
3. Zhengzhou Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Treatment of Brain Cognitive Diseases, Zhengzhou 450046, China)

**[Abstract] Objective:** To explore the mechanism of Liu Junzitang in preventing and treating muscle atrophy in mice with lung cancer cachexia based on the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)/ubiquitin proteasome pathway *in vivo*. **Method:** Forty C57BL/6 mice aged six weeks were randomly divided into a blank group, a model group, a Liu Junzitang group, an inhibitor group (stattic group), and a Liu Junzitang + inhibitor group (combination group), with eight mice in each group. The cachectic muscle atrophy model was induced by subcutaneous inoculation of Lewis lung cancer cell line under the right anterior armpit in mice except those in the blank group. On the 8<sup>th</sup> day after subcutaneous inoculation, the mice in the corresponding groups received Liu Junzitang (9.56 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) by gavage and intraperitoneal injection of stattic [25 mg·kg<sup>-1</sup>·(2 d)<sup>-1</sup>]. After three weeks of drug intervention, the body weight and gastrocnemius muscle weight were recorded. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes and cross-sectional area of gastrocnemius muscle fibers in mice. Western blot was used to detect the expression of phosphorylated-STAT3 (p-STAT3), STAT3, muscle atrophy F-box (MAFbx), and muscle RING finger protein 1 (MuRF1) in the gastrocnemius muscle. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to detect the mRNA expression of STAT3, MAFbx, and MuRF1 in the gastrocnemius muscle. **Result:** Compared with the blank group, the model group showed lightened body and the gastrocnemius muscle, reduced cross-sectional area of gastrocnemius muscle fibers, and increased protein expression of p-STAT3, STAT3, MAFbx, and MuRF1 and mRNA expression of STAT3, MuRF1, and MAFbx in the gastrocnemius muscle ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, the Liu Junzitang group showed increased body weight, gastrocnemius muscle weight, and cross-sectional area of gastrocnemius muscle fibers ( $P<0.05$ ), and decreased protein expression of p-STAT3, STAT3, MuRF1, MAFbx, and mRNA expression of STAT3 and MAFbx in gastrocnemius muscle ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, the inhibitor group showed increased body weight and cross-sectional area of gastrocnemius muscle fibers ( $P<0.05$ ), and reduced protein expression of p-STAT3, STAT3, MuRF1, MAFbx, and mRNA expression of STAT3 and MAFbx in gastrocnemius muscle ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, the combination group showed increased body weight and gastrocnemius muscle weight ( $P<0.05$ ), and decreased protein expression of p-STAT3, STAT3, MuRF1, and mRNA expression of STAT3 and MAFbx in the gastrocnemius muscle ( $P<0.05$ ). Compared with the Liu Junzitang group, the stattic group and the combination group showed reduced expression of p-STAT3 protein in the gastrocnemius muscle ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Liu Junzitang can prevent and treat muscle atrophy in mice with lung cancer cachexia, and its mechanism may be associated with the protein and mRNA expression related to the STAT3-mediated ubiquitin proteasome pathway.

**[Keywords]** lung cancer cachexia; muscle atrophy; Liu Junzitang; signal transducer and activator of transcription 3(STAT3); ubiquitin proteasome

近年来,肿瘤的发病率和死亡人数呈逐年上升的趋势。研究表明,2020年中国新发癌症患病人数约457万例,死亡人数约300万,新发癌症人数和死亡人数位居全球第一。肿瘤恶病质是肿瘤疾病中复杂的一种代谢紊乱综合征,其发病机制尚未完全

阐明,一般是由厌食导致的骨骼肌代谢、脂肪代谢、肌肉代谢、线粒体能量代谢紊乱造成的<sup>[1-2]</sup>,肌肉萎缩是临床最常见的症状,目前尚缺乏有效的治疗药物及手段,多以手术、放化疗、食欲刺激药为主<sup>[3]</sup>。信号传导及转录激活因子3(STAT3)是一种信号

传导与转录激活因子,研究表明STAT3的异常活化可激活泛素蛋白酶体途径(UPS),该途径是骨骼肌蛋白质异常分解代谢的主要方式之一,也是导致肿瘤恶病质肌肉萎缩的关键因素<sup>[4]</sup>。中医药在治疗肿瘤恶病质方面凸显出越来越重要的地位,具有较小的不良反应、减轻患者的身心负担、提高患者的免疫力及耐受度、延长患者生存期等优势<sup>[5]</sup>。

肿瘤恶病质属于中医学“虚劳”范畴,中医学认为五脏六腑、阴阳气血、形体肌肉的亏损都可称之为虚劳。《黄帝内经·素问·玉机真脏论》中“大骨枯槁,大肉陷下,胸中气满,喘息不便,其气动形。”的描述,符合临床肿瘤晚期恶病质患者形体消瘦、肌肉萎缩的症状<sup>[6]</sup>。六君子汤出自《医学正传》,由人参、白术、茯苓、甘草、陈皮、半夏组成,具有益气健脾,燥湿化痰的功效。本课题组前期相关的体外实验研究发现,六君子汤可以通过干预白细胞介素-6(IL-6)/STAT3信号通路,改善食管癌细胞的微环境,激活免疫机制,抑制人食管癌细胞(EC9706细胞)的增殖<sup>[7-8]</sup>;六君子汤能够抑制肺癌Lewis细胞(LLC)与小鼠成肌细胞(C2C12细胞)共培养条件下IL-6的分泌,抑制肿瘤细胞STAT3的激活和表达,改善肿瘤恶病质肌肉萎缩<sup>[9-10]</sup>。因此本实验在体内从STAT3信号通路介导的UPS角度探讨六君子汤防治肺癌恶病质小鼠肌肉萎缩的作用机制,为肿瘤恶病质的中医药防治研究提供思路。

## 1 材料

**1.1 细胞** LLC细胞,购于中国科学院典型培养物保藏委员会昆明细胞库,37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱中常规培养。

**1.2 动物** SPF级雄性C57BL/6J小鼠,6周龄,购于河南华兴实验动物养殖场,合格证号SCXK(豫)2019-0002,动物实验已通过河南中医药大学实验动物伦理委员会批准,编号DWLL202003220。

**1.3 试剂** 抑制剂stattic(北京百奥莱博科技有限公司,批号M00248);高效组织细胞裂解液,蛋白酶抑制剂,ECL超敏发光液(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为R0010,P0100,PE0010-A);预染蛋白分子量标准(美国CST公司,批号12949);BCA蛋白浓度测定试剂盒,兔抗人磷酸化信号传导及转录激活因子-3(p-STAT3)抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为AR0146,BA1709);兔抗人STAT3,兔抗人肌肉特异性环指蛋白1(MuRF1),兔抗人肌肉萎缩盒F基因(MAFbx)(英国Abcam公司,批号分别为ab76315,ab172479,ab168372);甘

油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国Proteintech公司,批号60004-1-Ig);2×Universal SYBR Green Fast实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR) Mix(武汉爱博泰克生物科技有限公司,批号RK21203);TRIzol,逆转录试剂盒(美国赛默飞公司,批号分别为15596026,K1622),二抗山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G辣根过氧化物酶(HRP)标记(美国CST公司,批号7074S);苏木素-伊红(HE)染色液(珠海贝索生物技术有限公司,批号BA-4041,BA-4024)。

**1.4 仪器** SW-CJ-1FD型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);Primovert型倒置显微镜(德国Zeiss公司);CHEMIDOCXRS+型高灵敏度化学发光成像系统,PowerPac1000型电泳仪和转膜仪(美国Bio-Rad公司);371型CO<sub>2</sub>培养箱,Multifuge X1R型低温离心机,QuantStudio 6 Flex型实时荧光定量PCR仪(美国Thermo-Fisher Scientific公司)。

**1.5 六君子汤溶液的制备** 参照《医学正传》组方,药物剂量比例为人参-白术-茯苓-甘草-陈皮-半夏2:3:2:2:2:3。六君子汤由人参9g,白术13.5g,茯苓9g,甘草9g,陈皮9g,半夏13.5g组成,中药材由河南中医药大学第一附属医院中药房提供,由河南中医药大学中药分析学科冯素香教授鉴定均为正品,符合2020年版《中华人民共和国药典》。所有药材纯水浸泡2h,煎煮40min后过滤药液保存,滤渣再次加纯水煎煮30min后,过滤药液,与第1次混合,2次煎煮滤液合并后,文火浓缩至生药含量为2g·mL<sup>-1</sup>,4℃保存冷藏备用。根据《中药药理研究方法学》,按照动物体表面积比率换算等效剂量法计算小鼠给药量,小鼠用药剂量(g·kg<sup>-1</sup>)=人原生药用量(g)/(60kg)×9.1,故六君子汤组小鼠每日灌胃剂量为9.56g·kg<sup>-1</sup>。

## 2 方法

**2.1 模型制备与评价标准** 取对数生长期的LLC细胞,调整细胞密度为1×10<sup>7</sup>个/mL。实验分为空白组、模型组、六君子汤组、抑制剂组、联合用药组(六君子汤+stattic),每组8只。空白组每只小鼠右前腋下注射生理盐水0.2mL,其余各组每只小鼠右前腋下注射LLC细胞悬液0.2mL,复制肿瘤恶病质动物模型<sup>[11]</sup>。观察小鼠状态,每周记录小鼠的瘤体体积和体质量变化。注射第8天,测量肿瘤长径(a),短径(b),计算瘤体体积(V=a×b<sup>2</sup>/2)。

LLC细胞接种第8天,除空白组外,模型组小鼠右前腋下可触及圆形或扁圆形肿块,瘤体>0.5mm<sup>3</sup>,

且模型组较空白组小鼠腓肠肌质量减轻,肌纤维横截面面积变小,视为造模成功。

**2.2 分组与给药** 分为空白组(灌胃超纯水、腹腔注射等体积生理盐水),模型组(灌胃超纯水、腹腔注射等体积生理盐水),六君子汤组[灌胃六君子汤剂量  $9.56 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,腹腔注射等体积生理盐水)、抑制剂组(腹腔注射 static 剂量  $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot (2 \text{ d})^{-1}$ ,灌胃等体积生理盐水)<sup>[12]</sup>、联合用药组[腹腔注射 static 剂量  $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot (2 \text{ d})^{-1}$ 灌胃六君子汤],灌胃每天1次,腹腔注射2 d/次,3周后,采用10%水合氯醛对小鼠按体质量( $3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ )进行麻醉,眼球取血,并取双后肢腓肠肌称重,部分腓肠肌固定保存进行HE染色,剩余组织 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冷冻保存用于相关蛋白和基因的检测。

**2.3 指标检测**

**2.3.1 HE染色观察腓肠肌肌纤维病理变化** 将固定(4%多聚甲醛)的腓肠肌肌肉组织用梯度乙醇及二甲苯脱水,石蜡包埋后切 $5 \text{ }\mu\text{m}$ 薄片后进行HE染色,中性树胶封片,镜下观察。使用Image pro plus6.0图像采集系统分析,计算出肌纤维横截面的平均值和标准差。

**2.3.2 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测腓肠肌 p-STAT3, STAT3, MAFbx, MuRF1 蛋白表达** 取小鼠腓肠肌组织匀浆, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , $14\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min(离心半径12 cm),取上清用BCA法检测蛋白浓度。取蛋白样品 $50 \text{ }\mu\text{g}$ 与上样缓冲液按比例混匀, $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 加热变性8 min。十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转膜,5%的封闭缓冲液封闭后加一抗(1:2 000) $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜,次日洗涤后加入相应二抗(1:1 000)室温孵育1 h,用ECL化学发光法显色,收集图像,使用Image Lab软件进行数据整理。

**2.3.3 Real-time PCR检测腓肠肌 p-STAT3, STAT3, MAFbx, MuRF1 mRNA表达** 取腓肠肌组

织称重,研磨,裂解后应用TRIzol法提取组织RNA,测量RNA浓度和纯度,逆转录反应条件为 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,30 min, $75 \text{ }^\circ\text{C}$ ,5 min,RNA逆转录为cDNA,再进行PCR扩增。反应体系为 $10 \text{ }\mu\text{L}$ ,扩增条件: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性3 min,共1个循环; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 循环反应5 s,共40个循环。以GAPDH为内参基因,目的基因的相对表达倍数改变采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算。引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成,见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列	长度/bp
MuRF1	上游 5'-TGCCTACTTGCTCCTTGTGC-3'	101
	下游 5'-CACCAGCATGGAGATGCAGT-3'	
MAFbx	上游 5'-ACGTCGCAGCCAAGAAGAG-3'	104
	下游 5'-ATGGCGCTCCTTCGTACTTC-3'	
STAT3	上游 5'-TGGCACCTTGATTGAGAGT-3'	109
	下游 5'-TGCTGATAGAGGACATTGGACT-3'	
GAPDH	上游 5'-TGGTCGTATTGGGCGCCTGGT-3'	150
	下游 5'-TCGCTCCTGGAAGAGGTGA-3'	

**2.4 统计分析** 采用SPSS 22.0统计软件进行分析,数据结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用One-Way ANOVA进行组间数据比较,两组间比较采用最小显著性差异法LSD检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

**3 结果**

**3.1 对肺癌恶病质小鼠的瘤体生长和一般情况的影响** 与空白组比较,模型组小鼠皮下注射LLC细胞8 d时可在右前腋下触及到明显的肿块,形状多为圆形或扁圆形,且模型组小鼠明显表现出毛发光泽暗淡,活动减少,四肢无力,形体消瘦,体质量降低,饮食量减少等症状,随后肿瘤体积迅速增长,具备明显的恶病质症状;与模型组比较,六君子汤组、抑制剂组及联合用药组肿瘤体积明显减小,但差异无统计学意义。各用药组之间小鼠瘤体比较差异无统计学意义。见表2。

表2 六君子汤对肺癌恶病质小鼠瘤体的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 2 Effect of Liu Junzitang on tumor volume of lung cancer cachexia mice ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	肿瘤长径/cm	肿瘤短径/cm	肿瘤体积/ $\text{cm}^3$
模型		$2.37 \pm 1.21$	$1.97 \pm 0.76$	$6.07 \pm 5.16$
六君子汤	9.56	$1.73 \pm 0.71$	$1.58 \pm 0.66$	$2.94 \pm 3.23$
抑制剂	$25 \times 10^{-3}$	$1.80 \pm 0.69$	$1.43 \pm 0.64$	$2.46 \pm 1.91$
联合用药	$9.56 + 25 \times 10^{-3}$	$1.30 \pm 0.17$	$1.17 \pm 0.11$	$0.91 \pm 0.31$

注:空白组肿瘤长径、肿瘤短径、肿瘤体积均为0。

**3.2 对肺癌恶病质小鼠体重、腓肠肌质量及横截面积的影响** 与空白组比较,模型组小鼠体质量及腓肠肌质量明显减轻,腓肠肌肌纤维横截面积明显减小( $P<0.05$ );与模型组比较,六君子汤组小鼠体质量

量、腓肠肌质量、肌纤维横截面积明显增加( $P<0.05$ ),抑制剂组小鼠体质量及腓肠肌肌纤维横截面积增加( $P<0.05$ ),联合用药组小鼠体质量及腓肠肌质量增加( $P<0.05$ )。见表3。

表3 六君子汤对肺癌恶病质小鼠体质量、腓肠肌质量及横截面积的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

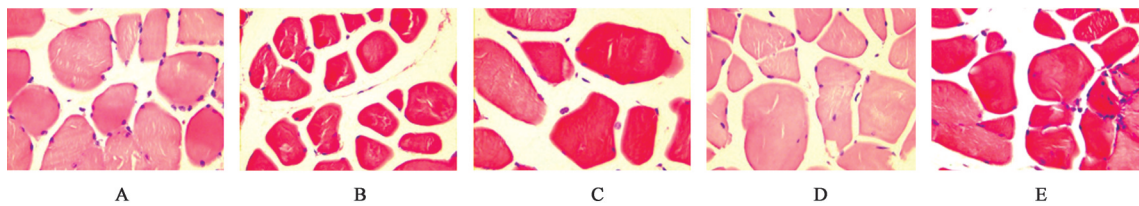
Table 3 Effect of Liu Junzitang on body weight, gastrocnemius muscle weight and cross-sectional area of lung cancer cachexia mice ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	体质量/g	腓肠肌质量/mg	肌纤维横截面积/ $\mu m^2$
空白		33.70±2.48	0.13±0.01	228 697.31±41 444.54
模型		19.90±4.47 <sup>1)</sup>	0.08±0.02 <sup>1)</sup>	88 628.14±13 446.55 <sup>1)</sup>
六君子汤	9.56	29.40±4.77 <sup>2)</sup>	0.13±0.03 <sup>2)</sup>	207 436.27±17 253.87 <sup>2)</sup>
抑制剂	$25\times 10^{-3}$	33.10±2.19 <sup>2)</sup>	0.11±0.01	205 169.00±14 790.75 <sup>2)</sup>
联合用药	$9.56+25\times 10^{-3}$	28.70±2.19 <sup>2)</sup>	0.13±0.02 <sup>2)</sup>	126 509.42±27 047.06

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ (表5同)。

**3.3 对肺癌恶病质小鼠腓肠肌病理形态的影响** 与空白组比较,模型组腓肠肌肌纤维横截面积变小,细胞萎缩,包浆颜色深染,细胞核减少,相

邻细胞间隙增宽;与模型组比较,各用药组腓肠肌肌纤维病理状态均有所改善,可见肌肉纤维横截面积增加,细胞核增多,细胞间隙变窄等。见图1。



A. 空白组;B. 模型组;C. 六君子汤组;D. 抑制剂组;E. 联合用药组(图2同)

图1 六君子汤对腓肠肌肌纤维横截面积的影响(HE,  $\times 400$ )

Fig. 1 Effect of Liu Junzitang on cross-sectional area of gastrocnemius muscle fiber (HE,  $\times 400$ )

**3.4 对肺癌恶病质小鼠腓肠肌 STAT3 和 UPS 途径关键蛋白表达的影响** 与空白组比较,模型组小鼠腓肠肌中 p-STAT3, STAT3, MAFbx, MuRF1 蛋白表达明显增加( $P<0.05$ );与模型组比较,六君子汤组、抑制剂组小鼠腓肠肌 p-STAT3, STAT3, MuRF1, MAFbx 蛋白表达降低( $P<0.05$ ),联合用药组小鼠腓肠肌 p-STAT3, STAT3, MuRF1 蛋白表达降低( $P<0.05$ );与六君子汤组比较,抑制剂组、联合用药组腓肠肌中 p-STAT3 蛋白表达明显下降( $P<0.05$ )。见图2,表4。

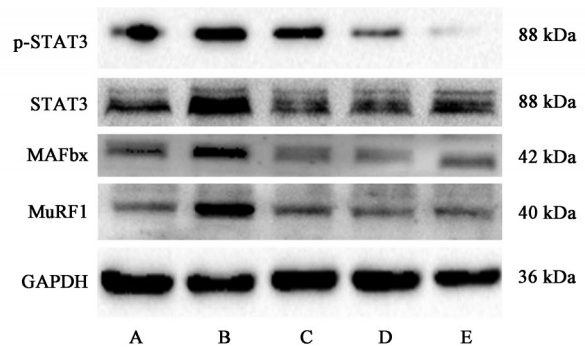


图2 六君子汤作用后 STAT3 和 UPS 途径关键蛋白表达的电泳

Fig. 2 Electrophoresis of Liu Junzitang on expression of key proteins in STAT3 and UPS pathway

**3.5 对肺癌恶病质小鼠 STAT3 和 UPS 途径关键基因 mRNA 表达的影响** 与空白组比较,模型组腓肠肌 STAT3, MuRF1, MAFbx mRNA 表达明显增加( $P<0.05$ );与模型组比较,六君子汤组、抑制剂组、联合用药组腓肠肌 STAT3, MAFbx mRNA 表达均明显下降( $P<0.05$ )。见表5。

劳”“癆瘵”,认为本病的发生与脾胃虚弱有关,其治疗应多从调理脾胃入手<sup>[13]</sup>,中医药在治疗肿瘤恶病质上具有显著优势,可延长患者生存期、提高患者生活质量、减少靶向药物的胃肠道反应。

#### 4 讨论

六君子汤是健脾和胃的代表方剂,具有益气健脾,燥湿化痰之功,在临床上应用广泛<sup>[14]</sup>。大量的现代研究证实,健脾和胃类方药在本病的临床治疗

中医认为,肿瘤恶病质属于中医学“虚劳”范畴,张锡纯在《医学衷中参西录》中把本病称为“虚

表4 六君子汤对肺癌恶病质小鼠腓肠肌STAT3和UPS途径关键蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 4 Effect of Liu Junzitang on expression of key proteins of STAT3 and UPS pathway in gastrocnemius muscle of mice with lung cancer cachexia ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	p-STAT3/GAPDH	STAT3/GAPDH	MAFbx/GAPDH	MuRF1/GAPDH
空白		0.48±0.04	0.25±0.07	0.36±0.01	0.23±0.14
模型		0.66±0.07 <sup>1)</sup>	0.50±0.19 <sup>1)</sup>	0.56±0.03 <sup>1)</sup>	0.51±0.12 <sup>1)</sup>
六君子汤	9.56	0.49±0.03 <sup>2)</sup>	0.23±0.09 <sup>2)</sup>	0.24±0.01 <sup>2)</sup>	0.18±0.04 <sup>2)</sup>
抑制剂	25×10 <sup>-3</sup>	0.20±0.01 <sup>2,3)</sup>	0.26±0.04 <sup>2)</sup>	0.19±0.02 <sup>2)</sup>	0.14±0.04 <sup>2)</sup>
联合用药	9.56+25×10 <sup>-3</sup>	0.02±0.00 <sup>2,3)</sup>	0.34±0.14 <sup>2)</sup>	0.44±0.01	0.26±0.22 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>P<0.05;与模型组比较<sup>2)</sup>P<0.05;与六君子汤组比较<sup>3)</sup>P<0.05。

表5 六君子汤对肺癌恶病质小鼠腓肠肌STAT3和UPS途径关键基因表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 5 Effect of Liu Junzitang on expression of key genes of STAT3 and UPS pathway in gastrocnemius muscle of mice with lung cancer cachexia ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	STAT3	MuRF1	MAFbx
模型		7.15±0.20 <sup>1)</sup>	1.80±0.26 <sup>1)</sup>	4.73±0.10 <sup>1)</sup>
六君子汤	9.56	2.03±0.04 <sup>2)</sup>	1.76±0.30	2.79±0.43 <sup>2)</sup>
抑制剂	25×10 <sup>-3</sup>	1.73±0.07 <sup>2)</sup>	1.68±0.28	1.59±0.49 <sup>2)</sup>
联合用药	9.56+25×10 <sup>-3</sup>	1.58±0.07 <sup>2)</sup>	1.33±0.15	2.57±0.08 <sup>2)</sup>

注:空白组STAT3, MuRF1, MAFbx mRNA相对表达为1。

和实验研究中显示出了较好的疗效,如香砂六君子汤联合甲羟孕酮能有效改善肿瘤患者生存质量,延长患者寿命<sup>[15]</sup>;四君子汤能改善肿瘤小鼠由恶病质引起的体质量减轻的现象,并提高生存质量<sup>[16]</sup>;本团队前期的课题研究发现,六君子汤能抑制裸鼠移植瘤的生长<sup>[17]</sup>,增强顺铂对食管癌EC9706细胞线粒体膜电位的影响,调节线粒体呼吸能力<sup>[18]</sup>,能改善食管癌小鼠生存质量,保护脏器、减少组织病理损伤<sup>[19]</sup>。中医认为“脾主肌肉”,脾为“仓禀之官”,脾在体合肉,主四肢,脾胃健运可充养脏腑,气血化生则濡养肌肉,故健脾和胃法治疗肺癌、食管癌等肿瘤恶病质肌肉萎缩的机制研究具有前瞻性的参考价值。

骨骼肌的动态平衡主要通过分解代谢和合成代谢实现,当蛋白质降解速度超过蛋白质合成速度时,易发生肌肉萎缩,并可能在多疾病状态下引起肌肉萎缩,包括肿瘤恶病质、厌食症、心力衰竭和衰老,代谢紊乱主要通过UPS途径的激活来促进蛋白质降解导致骨骼肌质量损失<sup>[20-21]</sup>。研究表明JAK/STAT3信号通路可以激活UPS途径加剧蛋白降解,最终导致骨骼肌萎缩,其中STAT3信号通路和UPS中关键蛋白和基因的高表达是造成肿瘤恶病质肌肉萎缩的重要因素<sup>[22]</sup>。研究发现,在肿瘤微环境中,受到炎症因子的影响,STAT3被磷酸化成同源或异源二聚体,当STAT3被磷酸化后,E3泛素连接酶

(MuRF1, MAFbx)的表达被激活,导致蛋白降解加剧,出现肌肉萎缩,而抑制STAT3的激活可有效减少蛋白降解<sup>[23]</sup>。有研究表明,STAT3的抑制剂如舒尼替尼,泮托拉唑, C188-9(STAT3的小分子抑制剂),均可以通过抑制STAT3和UPS信号通路的过度激活,有效减缓肿瘤恶病质期间肌肉蛋白质分解代谢进程,增加肿瘤小鼠体质量<sup>[24-25]</sup>。

LLC移植瘤动物常被作为恶病质模型,研究发现,LLC植入小鼠体内2周后,当肿瘤负荷约占体质量6%时,可导致小鼠体质量迅速下降,蛋白质分解速率加快<sup>[26]</sup>。因此,本研究复制了LLC恶病质小鼠模型,在Lewis细胞株植入C57BL/6J小鼠右腋下皮下第8天时,可在小鼠腋下观察到明显的肿瘤,还表现出皮毛发暗,精神萎靡,活跃度降低,体质量减轻,表面模型小鼠已出现了肿瘤恶病质的症状;肿瘤体积随着时间的延长逐渐变大,模型小鼠体质量进一步下降,腓肠肌质量减少,腓肠肌肌纤维横截面积变小,病理切片分析表明,模型组腓肠肌肌纤维横截面积变小、相邻肌纤维间隙增宽,细胞核减少。以上结果表明本实验成功复制了肺癌恶病质肌肉萎缩模型。此时开始用药,一方面是对肿瘤恶病质小鼠进行治疗,同时也预防其肌肉萎缩的进一步恶化。实验结果显示,六君子汤组、抑制剂组、联合用药组动物体质量较模型组均显著上升,六君子汤组、联合用药组腓肠肌质量明显增加,六君子汤

组、抑制剂组小鼠腓肠肌肌纤维横截面积明显增加,相邻肌纤维间隙变窄,提示六君子汤可以增加Lewis肺癌恶病质小鼠的体质量、腓肠肌质量,对维持腓肠肌肌纤维中细胞器的形态均有显著的改善和调节作用。为了进一步研究六君子汤改善肿瘤恶病质模型动物的肌肉萎缩机制,结合通路抑制剂对STAT3信号通路相关分子mRNA和蛋白表达进行了检测。结果显示,与空白组比较,模型组小鼠p-STAT3蛋白,STAT3 mRNA及蛋白表达均增加,提示造模后STAT3信号通路被激活,本实验模型组中STAT3的高表达与相关研究报道的恶病质患者中STAT3异常活化结果一致<sup>[27]</sup>。使用六君子汤干预后,与模型组比较,六君子汤组、抑制剂组、联合用药组的p-STAT3蛋白,STAT3 mRNA及蛋白表达均下降,表明六君子汤对STAT3信号通路具有抑制作用,可通过下调p-STAT3,STAT3蛋白的表达有效改善肺癌恶病质小鼠肌肉萎缩。这与CHEN等<sup>[28]</sup>报道的通过抑制STAT3表达进而抑制泛素蛋白酶体途径相关分子表达改善肺癌恶病质肌肉萎缩的结果相一致。本研究还观察了参与泛素化的两种关键的泛素连接酶MAFbx, MuRF1的蛋白及mRNA表达量,发现与空白组比较,模型组小鼠MAFbx, MuRF1蛋白及mRNA表达均增加,而STAT3抑制剂组以上两分子蛋白及mRNA表达均降低,提示造模后UPS途径被激活,其介导的蛋白水解异常增加可能是诱发肌肉萎缩的关键因素,并与STAT3被激活有关,这与GUO等<sup>[25]</sup>的研究结果相一致。六君子汤干预后,与模型组比较,MAFbx蛋白及mRNA, MuRF1蛋白表达均下降,表明六君子汤对于UPS途径具有抑制作用,而联合抑制剂组与六君子汤组之间MAFbx蛋白及mRNA, MuRF1蛋白表达没有差异,说明六君子汤是通过抑制STAT3相关通路,从而介导降低UPS途径改善肺癌恶病质肌肉萎缩。

综上,六君子汤可以改善肺癌恶病质小鼠体质量减轻,缓解肺癌恶病质小鼠腓肠肌质量丢失,增加肺癌恶病质小鼠腓肠肌中肌纤维的横截面积,减缓恶病质小鼠的肌肉萎缩进程,其机制可能是通过抑制STAT3/泛素蛋白酶体途径相关蛋白和基因的表达,可为临床中医药治疗肿瘤恶病质肌肉萎缩提供借鉴意义。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] PETRUZZELLI M, WAGNER E F. Mechanisms of

metabolic dysfunction in cancer-associated cachexia [J]. *Genes Dev*, 2016, 30(5): 489-501.

[2] PORPORATO P E. Understanding cachexia as a cancer metabolism syndrome[J]. *Oncogenesis*, 2016, 5(2): e200.

[3] AOYAGI T, TERRACINA KP, RAZA A, et al. Cancer cachexia, mechanism and treatment[J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2015, 7(4): 179.

[4] SCHCOLNIK-CABRERA A, CHAVEZ-BLANCO A, DOMINGUEZ-GOMEZ G, et al. Understanding tumor anabolism and patient catabolism in cancer-associated cachexia [J]. *Am J Cancer Res*, 2017, 7(5): 1107-1135.

[5] FUJITSUKA N, ASAKAWA A, UEZONO Y, et al. Potentiation of ghrelin signaling attenuates cancer anorexia-cachexia and prolongs survival [J]. *Transl Psychiatry*, 2011, 1(7): e23.

[6] 桑亚洲,张艳,刘燕,等. 肿瘤恶病质发病机制及中医药防治研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(1): 203-213.

[7] 吴耀松,尹素改,任闪闪,等. 六君子汤对食管癌EC-9706细胞株树突状细胞成熟的影响[J]. *中医杂志*, 2018, 59(6): 508-512.

[8] 吴耀松,金华彬,陈玉龙,等. 健脾和胃法通过IL-6/STAT3信号通路对食管癌细胞株EC9706生长的干预作用[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(3): 1198-1201.

[9] 刘冬静. 基于IL-6/STAT3信号通路研究六君子汤对肿瘤环境下C2C12细胞分化影响的机制[D]. 郑州:河南中医药大学, 2020.

[10] 贺倩文. 基于IL-6/STAT3信号介导细胞自噬研究健脾和胃法干预肿瘤恶病质肌肉萎缩的分子机制[D]. 郑州:河南中医药大学, 2021.

[11] KIR S, WHITE J, KLEINER S, et al. Tumour-derived PTH-related protein triggers adipose tissue browning and cancer cachexia [J]. *Nature*, 2014, 513(7516): 100-104.

[12] 金华彬. 健脾和胃法通过STAT3信号通路对食管癌细胞株EC9706生长的干预作用[D]. 郑州:河南中医药大学, 2017.

[13] 刘杰,罗莉,苗翠影,等. 浅析张锡纯治“虚劳”思路在肿瘤恶病质治疗中的应用[J]. *中医肿瘤学杂志*, 2019, 1(3): 18-20.

[14] 孟丹华,李晨旭,尚艺婉,等. 六君子汤治疗恶性肿瘤的研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2020, 31(1): 172-174.

[15] 王鹂,邹玺,刘沈林. 香砂六君汤加减联合甲羟孕酮治疗肿瘤食欲不振—恶病质综合征临床研究[J]. 中

- 国中西医结合杂志, 2018, 38(8): 927-931.
- [16] 徐玲, 张学进, 杨国良. 四君子汤对癌性恶病质小鼠血清细胞因子的影响[J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(4): 907-910.
- [17] 吴耀松, 金华彬, 陈玉龙, 等. 健脾和胃法对食管癌细胞株EC9706移植瘤生长的抑制作用[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(8): 1836-1839.
- [18] 尚艺婉, 孟丹华, 罗文昭, 等. 健脾和胃法六君子汤通过影响细胞能量代谢增强顺铂对EC9706活性抑制作用[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(2): 7-12.
- [19] 吕翠田, 董志斌, 陈玉龙. 六君子汤对4-硝基喹啉-1-氧化物诱导食管癌小鼠免疫调节的影响[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(7): 2831-2834.
- [20] SCHIAFFINO S, DYAR K A, CICILIOT S, et al. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy[J]. *Febs J*, 2013, 280(17): 4294-4314.
- [21] BODINE S C, BAEHR L M. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2014, 307(6): E469-E484.
- [22] HU W, RU Z, ZHOU Y, et al. Lung cancer-derived extracellular vesicles induced myotube atrophy and adipocyte lipolysis via the extracellular IL-6-mediated STAT3 pathway[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2019, 1864(8): 1091-1102.
- [23] KANG R, TANG D, LOTZE M T, et al. AGER/RAGE-mediated autophagy promotes pancreatic tumorigenesis and bioenergetics through the IL-6/pSTAT3 pathway [J]. *Autophagy*, 2012, 8(6): 989-991.
- [24] PRETTO F, GHILARDI C, MOSCHETTA M, et al. Sunitinib prevents cachexia and prolongs survival of mice bearing renal cancer by restraining STAT3 and MuRF-1 activation in muscle[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(5): 3043-3054.
- [25] GUO D, WANG C, WANG Q, et al. Pantoprazole blocks the JAK2/STAT3 pathway to alleviate skeletal muscle wasting in cancer cachexia by inhibiting inflammatory response[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(24): 39640-39648.
- [26] CHEN J A, SPLENSER A, GUILLORY B, et al. Ghrelin prevents tumour- and cisplatin-induced muscle wasting: characterization of multiple mechanisms involved[J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2015, 6(2): 132-143.
- [27] ESKILER G G, BEZDEGUMELI E, OZMAN Z, et al. IL-6 mediated JAK/STAT3 signaling pathway in cancer patients with cachexia [J]. *Bratisl Lek Listy*, 2019, 66(11): 819-826.
- [28] CHEN L, YANG Q, ZHANG H, et al. Cryptotanshinone prevents muscle wasting in CT26-induced cancer cachexia through inhibiting STAT3 signaling pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, doi: 10.1016/j.jep.2020.113066.

[责任编辑 张丰丰]