

基于PTEN/PI3K/Akt信号通路探讨参芪抑瘤方联合顺铂对H22肝癌荷瘤小鼠的抑瘤作用

冯鑫^{1,2}, 段永强^{3*}, 白敏^{1,2}, 杨玉萍^{1,2}, 曹力仁¹, 虎峻瑞³, 司燕华³,
陈静³, 巩子汉⁴, 马兰⁵

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000;
2. 甘肃省实验动物行业技术中心, 兰州 730000;
3. 宁夏医科大学 中医学院, 银川 750004;
4. 中国中医科学院 中医基础理论研究所, 北京 100700;
5. 宁夏医科大学 总医院, 银川 750004)

[摘要] 目的:探讨参芪抑瘤方联合顺铂在磷酸酶及张力蛋白同源物(PTEN)/磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)通路中对H22肝癌荷瘤小鼠的抑瘤作用。方法:建立H22肝癌荷瘤小鼠模型,随机分为模型组、顺铂组、参芪抑瘤方高、中、低剂量联合顺铂组,10只/组,另随机筛选10只健康小鼠作为正常组;干预组小鼠灌胃给予参芪抑瘤方高、中、低剂量(54.06、27.03、13.515 g·kg⁻¹·d⁻¹),腹腔注射用顺铂(2.5 mg·kg⁻¹),1周2次,正常组、模型组给予生理盐水,连续治疗13 d后处死小鼠计算抑瘤率;苏木素-伊红(HE)染色观察小鼠瘤体病理形态学变化;酶联免疫吸附测定法(ELISA)和免疫荧光法检测小鼠瘤组织中细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1A(p21),细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1B(p27)含量;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测瘤组织中PTEN、PI3K、磷酸化蛋白激酶B(p-Akt)蛋白含量。结果:与模型组比较,顺铂组和参芪抑瘤方高、中、低剂量联合顺铂组移植瘤质量明显降低($P<0.05$),参芪抑瘤方高剂量联合顺铂组抑瘤作用更明显;各组肿瘤组织中出现不同程度的坏死,参芪抑瘤方高剂量联合顺铂组最为明显。与模型组比较,顺铂联合参芪抑瘤方高、中、低剂量及顺铂组p21、p27、PTEN表达均明显升高($P<0.05$);PI3K、p-Akt蛋白相对表达量降低($P<0.05$),其中参芪抑瘤方高剂量联合顺铂组最为明显。结论:参芪抑瘤方可能通过调控PTEN/PI3K/Akt信号通路中关键分子表达,从而上调下游抑增殖蛋白p21、p27蛋白表达,进而发挥对H22肝癌小鼠的显著抑瘤作用,并且增强化疗效果。

[关键词] 参芪抑瘤方; 顺铂; 磷酸酶及张力蛋白同源物(PTEN)/磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路; 增殖

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2023)03-0096-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221721

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220621.0929.003.html>

[网络出版日期] 2022-06-22 09:37:54

Effect of Shenqi Yiliu Prescription Combined with Cisplatin on Tumor in Hepatoma H22-bearing Mice Based on PTEN/PI3K/Akt Signaling Pathway

FENG Xin^{1,2}, DUAN Yongqiang^{3*}, BAI Min^{1,2}, YANG Yuping^{1,2}, CAO Liren¹, HU Junrui³,
SI Yanhua³, CHEN Jing³, GONG Zihan⁴, MA Lan⁵

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;
2. Gansu Province Laboratory Animal Industry Technology Center, Lanzhou 730000, China;
3. College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China;
4. Institute of Basic Theory of TCM, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing

[收稿日期] 2022-03-31

[基金项目] 2015年人才创新创业项目扶持资金项目(2015-RC-24);甘肃省发改委2013年第十一批建设项目计划项目(2305142201)

[第一作者] 冯鑫,硕士,从事老年病及相关肿瘤疾病中医药防治,E-mail:814774549@qq.com

[通信作者] *段永强,教授,博士生导师,从事中医老年病、脾胃病和敦煌古医方的研究,E-mail:dyqgs2008@163.com

100700, China; 5. General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

[Abstract] Objective: To investigate the tumor-suppressing effect of Shenqi Yiliu prescription combined with cisplatin in hepatoma H22-bearing mice based on the phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN)/phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) pathway. **Method:** H22-bearing mice were prepared and randomized into model group, cisplatin group, and cisplatin combined with high-, medium-, and low-dose Shenqi Yiliu prescription groups, with 10 mice in each group. Another 10 healthy mice were randomly selected as normal group. Shenqi Yiliu prescription was given by gavage with the high, medium, low dose of 54.06, 27.03, 13.515 g·kg⁻¹·d⁻¹, respectively, and cisplatin (2.5 mg·kg⁻¹) was administered by intraperitoneal injection, twice a week. Normal group and model group received normal saline. After 13 days of treatment, mice were killed and the tumor inhibition rate was calculated. The pathomorphological changes of tumor were observed based on hematoxylin-eosin (HE) staining, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunofluorescence method were used to detect the content of cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21) and cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27) in tumor tissue of mice. The levels of PTEN, PI3K and phosphorylated protein kinase B (p-Akt) in tumor tissue were measured by Western blot. **Result:** Compared with the model group, cisplatin alone and cisplatin in combination with the high-, medium-, and low-dose Shenqi Yiliu prescription decreased tumor mass ($P<0.05$), particularly the cisplatin in combination with the high-dose Shenqi Yiliu prescription. Necrosis of the tumor tissue was observed in each group, especially the cisplatin combined with high-dose Shenqi Yiliu prescription group. As compared with the model group, cisplatin alone and cisplatin in combination with the high-, medium-, and low-dose Shenqi Yiliu prescription raised the expression of p21, p27, and PTEN ($P<0.05$) and lowered the expression of PI3K and p-Akt ($P<0.05$), particularly the cisplatin in combination with high-dose Shenqi Yiliu prescription. **Conclusion:** Shenqi Yiliu prescription may regulate the expression of key molecules in PTEN/PI3K/Akt signaling pathway, thereby upregulating the expression of downstream proliferation inhibitors p21 and p27, further suppressing the tumor in H22-bearing mice, and enhancing the effect of chemotherapy.

[Keywords] Shenqi Yiliu prescription; cisplatin; phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN)/phosphatidylinositol3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway; proliferation

肝癌是全球最常见的癌症死亡原因,是五大致命癌症之一,且发病率有增加趋势^[1],发展中国家的肝癌发病率更高^[2]。我国是肝癌的高发地区,在我国肝癌的发病率居全部恶性肿瘤的第4位,死亡率居第2位^[3]。其风险因素包括乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、脂肪肝、酒精相关肝硬化、吸烟、肥胖、糖尿病和各种饮食暴露^[4]。由于肝癌起病隐匿,早期临床症状多不明显,造成早期发现及诊断的难度较大,确诊时大多属晚期,影响晚期肝癌综合疗效^[5]。因此,探索肝癌发生发展的作用机制,寻找新的治疗方法具有重要的临床意义。恶性肿瘤最突出的特征是细胞的异常增殖,磷脂酰肌醇-3激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路作为经典的信号通路之一,在调节细胞存活、生长、增殖、血管生成、转录、翻译和代谢方面发挥重要作用^[6]。PI3K/Akt信号通

路的激活受到负性调节器的严格调节,负性调节器通过确保及时抑制该通路和防止过度生长而起作用,级联反应的一个关键上游成员是肿瘤抑制磷酸酶和磷酸酶及张力蛋白同源物(PTEN),这是一种双特异性脂质和蛋白质磷酸酶,可有效地使磷脂酰肌醇三磷酸脂(PIP3)的3'基团去磷酸化,从而终止信号向Akt和其他PIP3效应靶点的传播^[7]。PTEN能够介导PI3K/Akt信号通路,从而介导下游调节细胞周期的负调控因子细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1A(p21)和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1B(p27)的表达而促进G₁期进展,调节细胞增殖与分化,从而影响肿瘤的发生发展^[8-10]。

中医药学在肿瘤治疗领域运用广泛,是最重要的补充替代治疗^[11],多用于与手术、放疗、化疗联合或随后的辅助治疗,以减少不良反应和肿瘤治疗毒

性,并且能起一定的增效作用,从而延长患者生存期,改善患者生活质量^[12-13]。参芪抑瘤方是由东汉张仲景《金匮要略》中“当归贝母苦参丸”加减而成,原方具有活血解毒,清热化痰,补血散结的功效以治疗妊娠小便难为主,符合肿瘤机体正气不足,毒邪侵袭,痰浊瘀血的发病机制。甘肃省名中医吴红彦教授根据肿瘤的发病特点,在当归贝母苦参丸基础上加入黄芪、山慈菇等药,组成参芪抑瘤方,是吴教授前期的研究成果和临床经验的总结。全方共奏扶正祛邪、补气养血、活血解毒、化痰散结之效,其整体功效符合肝癌邪盛正衰的发病特点。并且在前期研究中发现参芪抑瘤方能够有效抑制肝癌的发生发展^[14-17],且联合辅助化疗可改善患者免疫功能,降低肿瘤转移发生率,提高患者存活率^[18-22]。

1 材料

1.1 细胞株 小鼠H22肝癌细胞株,购自于武汉普诺赛生命科技有限公司,细胞目录号BRF1A0KT3Q,原代细胞。

1.2 小鼠 60只SPF级10周龄雄性昆明小鼠购自甘肃中医药大学动物实验中心,许可证号SYXK(甘)2020-0009,本研究所涉及的实验均符合甘肃中医药大学动物伦理委员会的相关要求,伦理审查批准号2021-205。实验前,将小鼠维持在SPF环境中,每12h进行1次标准啮齿动物食物、水和明暗循环,室温恒定。

1.3 药物 参芪抑瘤方中药饮片均购自甘肃中医药大学附属医院,经甘肃中医药大学李越峰教授鉴定均为正品。方药组成:黄芪30g、当归20g、山慈菇10g、土贝母10g、苦参15g、八月扎30g、莪术10g、半枝莲20g、白术18g、枳壳12g、人参15g。注射用顺铂(齐鲁制药有限公司,批号OKO554B03)。

1.4 试剂 RIPA裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为R0010、PC0020、P1200);PTEN抗体(Abcam公司,批号ab31392);PI3K、磷酸化(p)-Akt抗体(Cell Signaling公司,批号分别为4257S、4060S);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、羊抗兔二抗(Immuno Way公司,批号分别为YM3215、RS0002);p21、p27抗体、苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为GB11153、GB11154、G1003),p21、p27酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(江苏菲亚生物科技有限公司,批号分别为MM-45655M1、MM-46248M1)。

1.5 仪器 SpectraMax i3X型酶标仪(美国Molecular Devices公司);ICX41型倒置荧光显微镜(中国/舜宇SOPTOP公司);VE-180型电泳仪及垂直板电泳装置(美国Bio-Rad公司);GelView 6000plus型凝胶成像系统(中国广州博鹭腾生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 药物制备 将中药加入中药总药量10倍量纯水浸泡后煎煮40min,用过滤筛滤出药液,第2次煎煮药材时加6倍量纯水煎煮40min。将2次煎液过滤混匀加热浓缩至药液含生药量5、2.5、1.25g·mL⁻¹储藏备用。

2.2 模型制备与给药 复苏H22肝癌细胞,将H22肝癌细胞(1×10⁷个细胞)注射小鼠腹腔,待5~7d后抽取澄清腹水传代3次,抽取第3代澄清腹水用磷酸盐缓冲液(PBS)或生理盐水将细胞洗涤2~3次,将细胞调整至密度为3×10⁶个/mL的细胞悬液,皮下注射到小鼠右侧腋下,每只0.1mL。除10只小鼠作为正常组外,其余小鼠均制备肿瘤模型造模^[23],皮下注射细胞悬液,待模型制备成功^[24]即右侧腋下肉眼可见黄豆粒大小肿块时开始分组给药干预,将模型小鼠随机分为5组:模型组、顺铂组、参芪抑瘤方高、中、低剂量联合顺铂组,每组10只。

正常组和模型组灌胃生理盐水0.2mL·d⁻¹;顺铂组给予顺铂0.25g·L⁻¹,每只0.2mL腹腔注射,1周给药2次;本实验的中药按成人(60kg)药物剂量为180g,通过体质量折算^[25],小鼠的等效剂量约为27.03g·kg⁻¹,即参芪抑瘤方中剂量组;按照等比级数分组确定参芪抑瘤方高、低剂量组的给药剂量分别为54.06、13.515g·kg⁻¹,并1周2次腹腔注射顺铂(2.5mg·kg⁻¹),共给药治疗13d后戊巴比妥钠(每只0.2mL)麻醉处死小鼠,手术剥取肿瘤组织待检。

2.3 抑瘤率 观察小鼠一般状况,包含大小便、神态、饮食、活动等一般状况,治疗13d后完整剥离出小鼠瘤组织,用吸水纸吸干组织表明多余水分,并在电子天平秤上称取其质量,在实验记录本上记录好数据,最后计算出抑瘤率(IR),IR=(模型组平均瘤质量-用药组平均瘤质量)/模型组平均瘤质量×100%^[26]。

2.4 HE染色 观察小鼠肿瘤组织病理形态学变化 取各组小鼠部分瘤组织,4%多聚甲醛固定后,进行石蜡包埋,切片脱蜡,再用HE染色,脱水封片,400倍光镜下观察瘤组织形态。

2.5 ELISA 检测 各组小鼠肿瘤组织内 p21、p27 含量 将肿瘤组织制备为 10% 组织匀浆，离心机 3 000 r·min⁻¹ 离心 20 min 后取上清液。在酶标包被上标准品加样 50 μL，待测样品孔加入的样品稀释液 40 μL 和组织上清液 10 μL，胶纸封闭反应孔，37 °C 孵育 30 min，洗板 5 次，加入酶标试剂 50 μL（空白孔除外），37 °C 孵育 30 min，洗板 5 次，每孔加入显色 A、B 液各 50 μL，37 °C 避光孵育 10 min，最后加入终止液，混匀后检测吸光度 $A_{450\text{nm}}$ 。

2.6 免疫荧光检测 各组小鼠肿瘤组织内 p21、p27 蛋白表达情况 OCT 包埋肿瘤组织后液氮冰冻，切 6 μm 组织切片，丙酮固定 3 min，PBS 泡洗 5 min，晾干后加封闭液 50~100 μL 覆盖组织，室温避光封闭 2~3 h，甩干，加入一抗 p21、p27 (1:1 000)，避光，4 °C 过夜，PBS 泡洗 3 次，15 min/次，加二抗室温孵育 2 h，抗荧光淬灭剂封片，共聚焦显微镜下观察并拍照。

2.7 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 各组小鼠肿瘤组织内 PTEN、PI3K、p-Akt 蛋白含量 液氮研磨肿瘤组织，提取上清液，蛋白定量后上样转膜，室温封闭 2 h，加入一抗 PTEN (1:1 000)、PI3K (1:1 000)、p-Akt (1:2 000) 后 4 °C 孵育过夜。加入羊抗兔二抗，2 h 后暗室曝光并扫描胶片分析灰度值。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 26.0 统计软件对实验数据进行分析处理，数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间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 对小鼠 IR 的影响 与模型组比较，顺铂组与参芪抑瘤方高、中、低剂量联合顺铂组瘤质量明显降低 ($P < 0.05$)；与顺铂组比较，参芪抑瘤方高剂量联合顺铂组效果最好 ($P < 0.05$)，IR 较高；联合用药组中，随着参芪抑瘤方浓度的增加，IR 增强。见表 1。

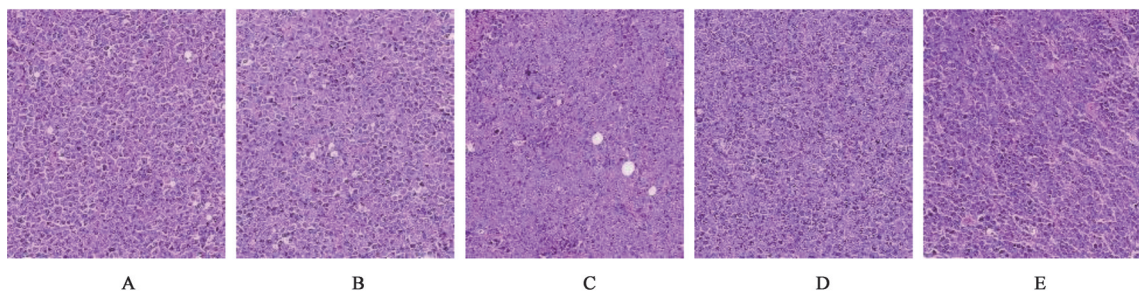
表 1 参芪抑瘤方对 H22 肝癌荷瘤小鼠瘤质量的影响

Table 1 Effect of Shenqi Yiliu prescription on tumor mass of H22 liver cancer tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	瘤质量($\bar{x} \pm s$)/g	IR/%
模型组		4.68±1.81	
顺铂组	0.002 5	2.98±1.38 ¹⁾	36.36
参芪抑瘤方高剂量联合顺铂组	54.06+0.002 5	1.73±0.98 ^{1,2)}	62.84
参芪抑瘤方中剂量联合顺铂组	27.03+0.002 5	2.03±1.16 ¹⁾	56.60
参芪抑瘤方低剂量联合顺铂组	13.515+0.002 5	2.51±1.05 ¹⁾	46.43

注：与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ ；与顺铂组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2-表 4 同)

3.2 对小鼠瘤体组织病理学的影响 HE 染色发现，模型组肿瘤细胞排列紧密，出血坏死较少；与模型组比较，顺铂组多数肿瘤细胞破裂，出现大片染红的肿瘤细胞，参芪抑瘤方低、中、高剂量联合顺铂组均出现肿瘤细胞破裂坏死，且呈剂量依赖性变化，其中，参芪抑瘤方高剂量联合顺铂组最为明显。见图 1。



注：A. 模型组；B. 顺铂组；C-E. 参芪抑瘤方高、中、低剂量联合顺铂组(图 2-图 4 同)

图 1 参芪抑瘤方对 H22 肝癌荷瘤小鼠肿瘤组织病理学的影响 (HE, ×400)

Fig. 1 Effect of Shenqi Yiliu prescription on tumor tissues from H22 hepatocellular carcinoma-bearing mice (HE, ×400)

3.3 对小鼠肿瘤组织内 p21、p27 含量的影响 与模型组比较，参芪抑瘤方高、中、低剂量联合顺铂组 p21、p27 表达水平均明显增加 ($P < 0.05$)，其中参芪抑瘤方高剂量联合顺铂组最为明显。见表 2。

3.4 对小鼠肿瘤组织内 p21、p27 蛋白表达水平的影响 平均荧光强度值与蛋白表达水平呈正比，与

模型组比较，顺铂组与参芪抑瘤方高、中、低剂量联合顺铂组 p21、p27 平均荧光强度明显增强 ($P < 0.05$)，其中参芪抑瘤方高剂量联合顺铂组最为明显。见图 2、图 3、表 3。

3.5 对各组小鼠肿瘤组织内 PTEN、PI3K、p-Akt 蛋白含量的影响 与模型组比较，顺铂组与参芪抑瘤

表2 参芪抑瘤方对H22荷瘤小鼠瘤组织中p21、p27含量的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p21	p27
模型组		2 325.24±849.81	2 526.44±534.03
顺铂组	0.002 5	3 318.89±797.42 ¹⁾	3 232.62±810.00
参芪抑瘤方高剂量联合顺铂组	54.06+0.002 5	3 718.94±1 043.87 ¹⁾	3 754.92±734.25 ¹⁾
参芪抑瘤方中剂量联合顺铂组	27.03+0.002 5	3 512.42±740.08 ¹⁾	3 578.87±671.13 ¹⁾
参芪抑瘤方低剂量联合顺铂组	13.515+0.002 5	3 483.53±608.63 ¹⁾	3 432.15±849.29 ¹⁾

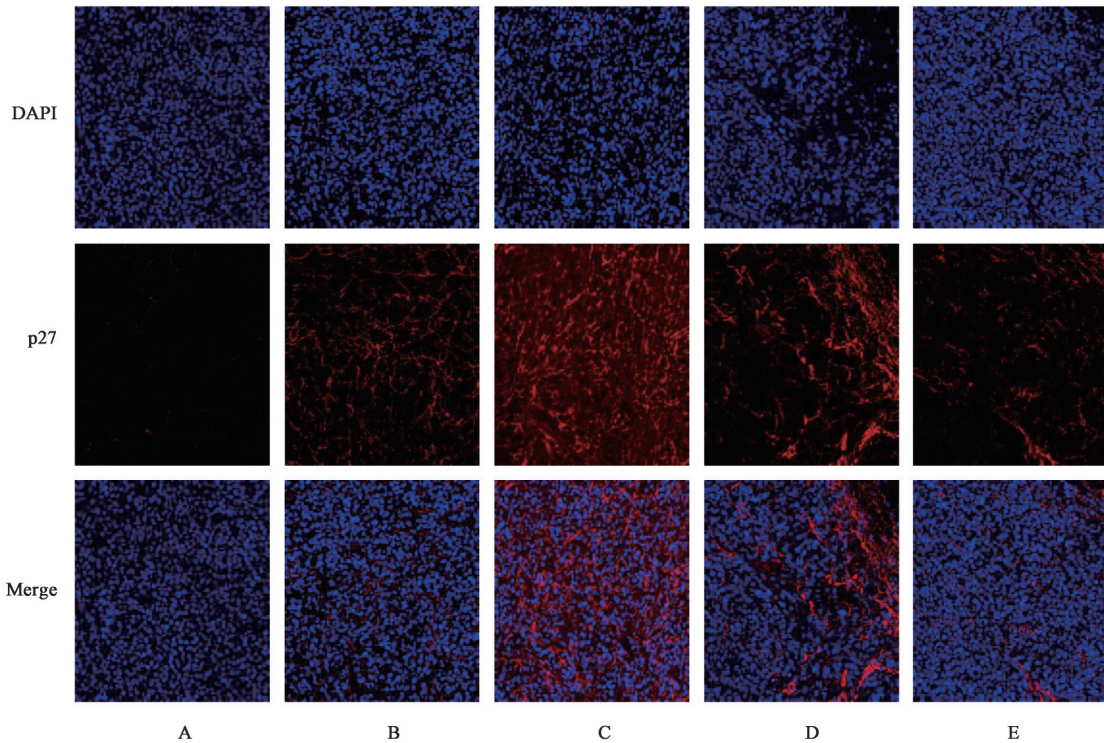


图2 参芪抑瘤方联合顺铂对H22肝癌荷瘤小鼠p21蛋白表达水平的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 2 Effect of Shenqi Yiliu prescription combined with cisplatin on p21 protein expression in H22 hepatoma bearing mice(IF,×400)

方高、中、低剂量联合顺铂组小鼠PI3K、p-Akt蛋白含量降低,PTEN蛋白含量增高($P<0.05$);与顺铂组比较,参芪抑瘤方中、高剂量联合顺铂组PI3K、p-Akt蛋白含量降低,PTEN蛋白含量增高($P<0.05$)。见表4、图4。

4 讨论

中医并无“肝癌”病名,而将其纳入“肝积”“伏梁”“臌胀”等范畴。临床症状主要有面黄消瘦、乏力、肝区隐痛或刺痛,腹部胀满、纳差、甚至呕血及黑便等,体征主要为肝脾肿大、肝掌、蜘蛛痣、黄疸、腹水、双下肢水肿等。其中秦汉时期《黄帝内经》最早记载了肝癌病症,如《黄帝内经·灵枢·胀论》:“鼓胀何如?岐伯曰:腹胀身皆大,大与腹胀等也。色苍黄,腹筋起,此其候也”。在手术、放疗、化疗、肝动脉栓塞等疗法的基础上,辨证和辨病相结合运用

参芪抑瘤方可以显著改善肝癌相关症状,提高患者生活质量的同时显著延长生存期^[18-22],但其抗肿瘤机制尚未明确有待于进一步的研究阐明。

中医认为,肝癌的病因与正气亏虚、情志不畅、饮食失调、外感六淫等有关,参芪抑瘤方是根据肿瘤的发病特点,在当归贝母苦参丸基础上加减而成,全方有黄芪、当归、浙贝母、苦参、山慈菇、八月扎、莪术、半枝莲、白术、枳壳、人参等药。其中黄芪味甘性温,补气健脾,培补本虚之正气;当归甘辛性温,补血活血,通血之瘀滞;浙贝母味苦性寒,清热化痰,开郁散结;山慈菇味甘微辛,性凉,清热解毒,化痰散结;苦参味苦性寒,清热燥湿,三药合用,行气滞,清热毒,化痰浊;八月扎有软坚散结,活血止痛之功;莪术能够破血行气,消积止痛;半枝莲味辛苦性寒,清热解毒,化痰利尿;枳壳苦辛酸微寒,行

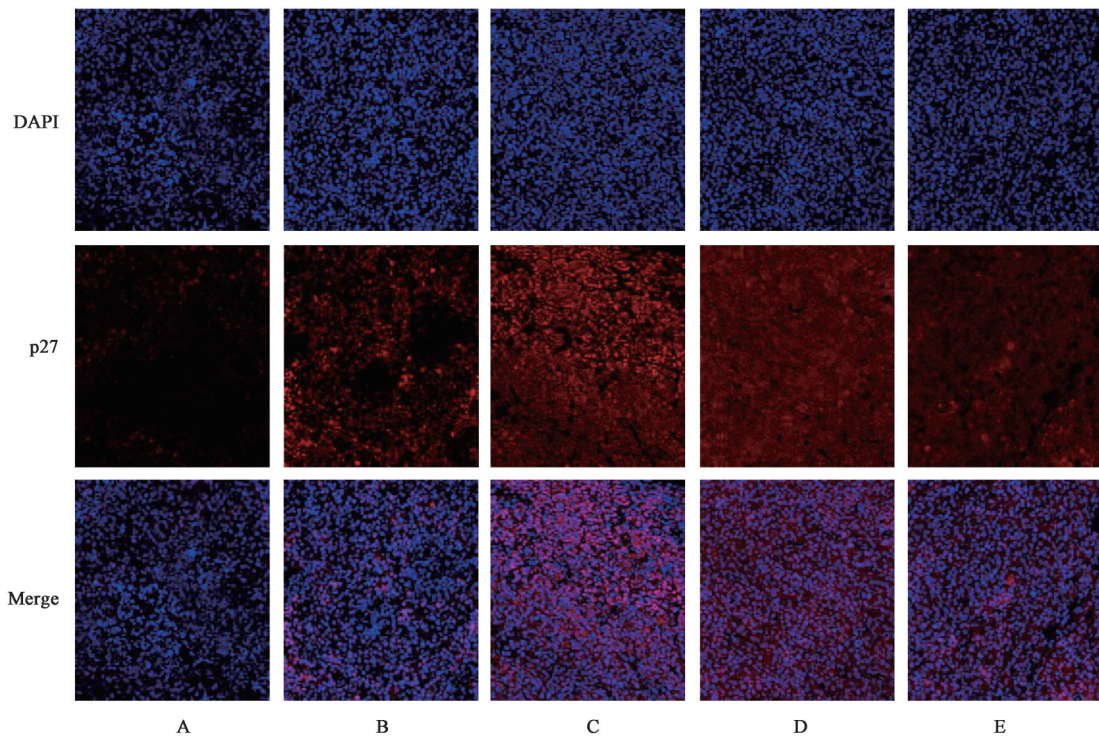


图3 参芪抑瘤方联合顺铂对H22肝癌荷瘤小鼠p27蛋白表达水平的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 3 Effect of Shenqi Yiliu prescription combined with cisplatin on p27 protein expression in H22 hepatoma bearing mice(IF, ×400)

表3 参芪抑瘤方联合顺铂对H22肝癌荷瘤小鼠肿瘤组织内p21、p27蛋白表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Shenqi Yiliu prescription combined with cisplatin on proteins expression of p21 and p27 in H22 hepatoma bearing mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p21	p27
模型组		0.46±0.08	4.28±0.64
顺铂组	0.002 5	2.77±1.82 ¹⁾	13.61±4.68 ¹⁾
参芪抑瘤方高剂量联合顺铂组	54.06+0.002 5	10.77±0.73 ^{1,2)}	35.96±11.32 ^{1,2)}
参芪抑瘤方中剂量联合顺铂组	27.03+0.002 5	7.62±3.15 ¹⁾	21.25±10.40 ¹⁾
参芪抑瘤方低剂量联合顺铂组	13.515+0.002 5	3.82±1.19 ¹⁾	18.24±6.75 ¹⁾

表4 参芪抑瘤方对瘤组织中PTEN、PI3K、p-Akt蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Shenqi Yiliu prescription on expression of PTEN, PI3K and p-Akt proteins in tumor tissues ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PTEN/GAPDH	PI3K/GAPDH	p-Akt/GAPDH
模型组		1.731±0.129	4.113±0.259	3.318±0.349
顺铂组	0.002 5	2.569±0.226 ¹⁾	3.056±0.083 ¹⁾	2.520±0.188 ¹⁾
参芪抑瘤方高剂量联合顺铂组	54.06+0.002 5	4.232±0.397 ^{1,2)}	1.861±0.036 ^{1,2)}	1.079±0.162 ^{1,2)}
参芪抑瘤方中剂量联合顺铂组	27.03+0.002 5	3.412±0.287 ^{1,2)}	2.684±0.073 ^{1,2)}	1.660±0.215 ^{1,2)}
参芪抑瘤方低剂量联合顺铂组	13.515+0.002 5	2.791±0.414 ¹⁾	3.227±0.275 ¹⁾	1.884±0.328 ^{1,2)}

气宽中;白术性温味甘苦,健脾益气,燥湿利水;人参性温味甘微苦大补元气、复脉固脱、补脾益肺、生津安神,具有益气扶正,通瘀解毒,化痰散结之效。前期临床研究表明参芪抑瘤方联合辅助化疗能够改善患者免疫功能,降低肿瘤转移发生率,提高患者存活率^[18-22]。现代药理学实验研究表明当归能够

增加肝癌小鼠白细胞介素-12(IL-12)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和 γ 干扰素(IFN- γ)的表达,增强免疫作用^[27];浙贝母对肝癌、卵巢癌和肺癌细胞均具有明显的细胞毒性,并能诱导G₀/G₁期阻滞,增加细胞凋亡,具有良好的抗肿瘤作用^[28];苦参促进肿瘤细胞凋亡,增强化疗药物的抗癌能力,苦参碱联合顺

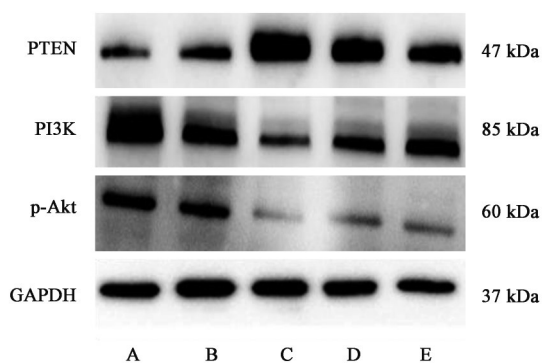


图4 参芪抑瘤方对H22肝癌荷瘤小鼠肿瘤组织PTEN、PI3K、p-Akt蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of Shenqi Yiliu prescription on PTEN, PI3K and p-Akt protein expression in tumor tissues of H22 hepatoma-bearing mice and histogram

铂能通过激活含胱天蛋白酶(Caspase)凋亡通路和抑制存活素(survivin)相关的Caspase-9抑制而促进肝癌细胞凋亡^[29];黄芪可促进IL-2、IL-12和TNF- α 的分泌,降低血清IL-10水平,效抑制H22肝癌实体瘤的生长;山慈菇能够抑制肝癌细胞增殖,上调E-钙黏蛋白(E-cadherin)蛋白表达水平,下调N-钙黏蛋白(N-cadherin)和波形蛋白(Vimentin)蛋白表达水平,调控上皮间质转化,抑制HepG2细胞的侵袭能力^[30]。在中医药理论指导下,在调补正气、扶正固本的基础上加强解毒抗癌、祛瘀散结的作用以增强参芪抑瘤方的抑瘤活性,临床常用于参芪抑瘤方的加减验方对癌症患者的辅助治疗。

PI3K/Akt信号通路在调节细胞存活、生长、增殖、血管生成、转录、翻译和代谢方面发挥重要作用^[6]。PI3K/Akt信号通路的激活受到负性调节器的严格调节,负性调节器通过确保及时抑制该通路和防止过度生长而起作用,PTEN可有效地终止信号向Akt和其他PIP3效应靶点的传播^[7]。恶性肿瘤最突出的特征是细胞的异常增殖,PI3K/Akt信号转导通路对肿瘤细胞增殖的调节作用,主要发生在G₁/S期^[31],但也有些文献表明PI3K/Akt通路可能参与调控G₂/M期转变^[32-33]。PTEN能够介导PI3K/Akt通过进一步调节细胞周期的负调控因子p21和p27的表达,从而影响肿瘤的发生发展^[8-10]。

本研究显示,顺铂组和参芪抑瘤方高、中、低剂量联合顺铂组均具有明显的抗肿瘤活性,且其抑瘤作用从强到弱依次为联合高剂量>联合中剂量>联合低剂量>顺铂组,可有效抑制肝癌移植瘤的生长增殖;通过HE染色对肿瘤组织的细胞进行观察分析,研究结果显示,模型组细胞核清晰且排列紧密,

肿瘤细胞凋亡较少,各给药组的细胞核都有不同程度的核破裂,出现坏死区域。以上结果都表明参芪抑瘤方的抑瘤活性有一定的剂量依赖性。本研究经ELISA和Western blot检测结果发现,各干预组PTEN、p21、p27相对表达量较模型组均明显升高,其中参芪抑瘤方高剂量联合顺铂组最高;而PI3K、p-Akt蛋白相对表达量较低,其中参芪抑瘤方高剂量联合顺铂组最低,研究结果与上述文献报道一致。初步认为,参芪抑瘤方可能通过调控PTEN/PI3K/Akt信号通路进一步上调下游p21、p27的蛋白表达,从而抑制肿瘤细胞增殖。

综上所述,参芪抑瘤方对H22肝癌荷瘤小鼠有显著抑瘤作用,且能增强化疗效果,可能通过促进PTEN/PI3K/Akt信号通路中PTEN蛋白表达,抑制PI3K蛋白表达,抑制Akt磷酸化,上调p21、p27蛋白表达有关,为参芪抑瘤方用于肝癌辅助治疗提供理论参考。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] SIRGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019 [J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34.
- [2] STARLEY B Q, CALCAGNO C J, HARRISON S A. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: A weighty connection [J]. Hepatology, 2010, 51(5): 1820-1832.
- [3] 林丽珠,肖志伟,黄学武,等. 原发性肝癌中西医结合诊疗实践回眸[J]. 中医肿瘤学杂志, 2020, 2(1): 5-9.
- [4] CENTER M M, JEMAL A. International trends in liver cancer incidence rates [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2011, 20(11): 2362-2368.
- [5] JIAN Y, ZHI Z W, TENG L, et al. Effectiveness of surgical resection for complicated liver cancer and its influencing factors: A retrospective study [J]. World J Clin Cases, 2020, 8(4): 736-742.
- [6] EDIRIWEERA M K, TENNEKOON K H, SAMARAKOON S R. Role of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in ovarian cancer: Biological and therapeutic significance [J]. Semin Cancer Biol, 2019, 59: 147-160.
- [7] LEE Y R, CHEN M, PANDOLFI P P. The functions and regulation of the PTEN tumor suppressor: New modes and prospects [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018, 19, 547-562.
- [8] QIN S, LI Q, GU S, et al. Apatinib as second-line or

- later therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma (AHELP): A multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2021, 6(7): 559-568.
- [9] QIN S K, BAI Y X, LIM H Y, et al. Randomized, multicenter, open label study of oxaliplatin plus fluorouracil/leucovorin versus doxorubicin as palliative chemotherapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma from Asia [J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(28): 3501-3508.
- [10] QIN S K, CHENG Y, LIANG J, et al. Efficacy and safety of the FOLFOX4 regimen versus doxorubicin in Chinese patients with advanced hepatocellular carcinoma: A subgroup analysis of the EACH study [J]. *The oncologist*, 2014, 19(11): 1169-1178.
- [11] 吴万垠. 中医药在恶性肿瘤治疗中的“替代”与“补充”作用[J]. *中国中西医结合杂志*, 2011, 31(1): 111-114.
- [12] 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.
- [13] 袁选举, 邓守恒. 中医药在治疗恶性肿瘤中的研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2019, 30(9): 2232-2234.
- [14] 荣倩倩. 参芪抑瘤方对荷瘤小鼠 H(22) 肝癌的抑制作用及抗血管生成机制研究[D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2015.
- [15] 陈杰, 吴红彦, 李海龙, 等. 参芪抑瘤方对 H22 荷瘤小鼠瘤组织 VEGF 及 TGF 基因表达的影响[J]. *时珍国医国药*, 2015, 26(12): 2899-2901.
- [16] 曾庆涛. 参芪抑瘤方对荷瘤小鼠 H22 肝癌侵袭转移及作用机制研究[D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2018.
- [17] 曾庆涛, 马春林, 李海龙, 等. 参芪抑瘤方联合顺铂对 H22 荷瘤小鼠的肿瘤抑制作用及其对小鼠免疫功能的影响[J]. *甘肃科技*, 2018, 34(6): 127-130.
- [18] 李红亮. 参芪抑瘤方联合顺铂对 MFC 荷瘤小鼠的抑瘤作用及其机制研究[D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2017.
- [19] 朱凯敏, 马春林, 李红亮, 等. 参芪抑瘤方联合顺铂对 MFC 荷瘤小鼠瘤组织 XIAP、PTEN 表达的影响[J]. *辽宁中医杂志*, 2019, 46(2): 418-421, 450.
- [20] 朱凯敏. 参芪抑瘤方对 H22 肝癌荷瘤小鼠免疫功能及细胞凋亡相关因子作用机制的研究[D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2019.
- [21] 朱凯敏, 吴红彦, 马春林, 等. 基于中医学理论概述参芪抑瘤方防治胃癌的研究进展[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(16): 88-89, 91.
- [22] 黄春兰, 刘华之. 参芪抑瘤方联合新辅助化疗对中晚期宫颈癌患者免疫功能及预后的影响[J]. *当代医学*, 2021, 27(17): 139-140.
- [23] 魏敏. 阿克替昔通过 p38 MAPK 信号通路对 H22 肝癌荷瘤小鼠的抑瘤作用[D]. 兰州: 兰州大学, 2021.
- [24] WEI D, WANG L, CHEN Y, et al. Yangyin Fuzheng decoction enhances anti-tumor efficacy of cisplatin on lung cancer [J]. *J Cancer*. 2018 12, 9(9): 1568-1574.
- [25] 施新猷. 现代医学实验动物学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000: 335.
- [26] SANCEAU J, POUPON M F, DELATTRE O, et al. Strong inhibition of ewing tumor xenograft growth by combination of human interferon- α or interferon- β with ifosfamide [J]. *Oncogene*, 2002, 21(50): 77000-7709.
- [27] GUO C, HOU X, LIU Y, et al. Novel Chinese angelica polysaccharide biomimetic nanomedicine to curcumin delivery for hepatocellular carcinoma treatment and immunomodulatory effect [J]. *Phytomedicine*, 2021, 80: 153356.
- [28] WANG D, JIANG Y, WU K, et al. Evaluation of antitumor property of extracts and steroidal alkaloids from the cultivated *Bulbus Fritillariae ussuriensis* and preliminary investigation of its mechanism of action [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 15: 29.
- [29] HU G, CAO C, DENG Z, et al. Effects of matrine in combination with cisplatin on liver cancer [J]. *Oncol Lett*, 2021, 21(1): 66.
- [30] 程清波, 杨艳萍, 王滢, 等. 山慈菇对肝癌细胞凋亡和上皮间质转化的影响[J]. *中医学报*, 2021, 36(10): 2202-2207.
- [31] JOSHI J, FERNANDEZ P J, GALVEZ A, et al. Par-4 inhibits Akt and suppresses Ras-induced lung tumorigenesis [J]. *EMBO J*, 2008, 20(8): 2181-2193.
- [32] WEE K B, AGUDA B D. Akt versus p53 in a network of oncogenes and tumor suppressor genes regulating cell survival and death [J]. *J Phys Chem B*, 2006, 91(3): 857-865.
- [33] LEE C S, KIM Y J, JANG E R, et al. Akt inhibitor enhances apoptotic effect of carboplatin on human epithelial ovarian carcinoma cell lines [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 632(1/3): 7-13.

[责任编辑 张丰丰]