

# 芪玉三龙汤调节 mTOR/Beclin1/LC3 信号轴相关分子的表达 诱导肺癌 A549 细胞自噬

高雅婷<sup>1,2,3</sup>, 王心恒<sup>1,2,3</sup>, 王小乐<sup>1,2,3</sup>, 程建超<sup>1,2,3</sup>, 张星星<sup>2,3,4</sup>, 童佳兵<sup>2,3,4</sup>, 李泽庚<sup>2,3,4\*</sup>

(1. 安徽中医药大学 研究生院, 合肥 230038;

2. 安徽省中医药科学院 中医呼吸病防治研究所, 合肥 230031;

3. 安徽省教育厅重点实验室 中医药防治肺系重大疾病重点实验室, 合肥 230031;

4. 安徽中医药大学 第一附属医院, 合肥 230031)

**[摘要]** 目的:从细胞水平探讨芪玉三龙汤干预肺癌 A549 细胞对哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)/自噬关键分子酵母 Atg6 同系物(Beclin1)/微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)信号轴关键分子表达的影响。方法:选择肺癌人 A549 细胞作为研究对象,采用细胞增殖检测试剂盒(CCK-8)法检测芪玉三龙汤含药血清对 A549 细胞活性的影响;原位末端标记法(TUNEL),透射电镜(TEM)及实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR),蛋白免疫印迹法(WB)分别检测芪玉三龙汤对 A549 细胞凋亡、自噬体形成及自噬标记分子表达的影响。结果:芪玉三龙汤血清能以浓度依赖性的方式抑制细胞活性;与空白血清组比较,芪玉三龙汤血清组 A549 细胞的凋亡数量显著增多( $P<0.01$ ),自噬体形成增加;与空白血清组比较,芪玉三龙汤血清组 A549 细胞的 mTOR mRNA 和蛋白表达显著降低( $P<0.01$ ),Beclin1,自噬相关基因 5(Atg5),自噬相关基因 13(Atg13) mRNA 和蛋白表达水平平均显著升高( $P<0.01$ )。结论:芪玉三龙汤能够诱导肺癌 A549 细胞发生自噬,其具体作用机制可能与其下调 mTOR 的表达,上调 Beclin1,Atg5,Atg13,LC3 的表达,促进 LC3 I 转化为 LC3 II 有关。

**[关键词]** 芪玉三龙汤; A549 细胞; 细胞自噬; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR); 自噬关键分子酵母 Atg6 同系物(Beclin1); 微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)

**[中图分类号]** R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)01-0098-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20202225

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200903.0806.002.html>

**[网络出版日期]** 2020-9-3 11:01

## Effect of Qiyu Sanlong Decoction in Inducing Autophagy of A549 Cells by Regulating Molecular Expression Related to Signal Axis of mTOR-Beclin1-LC3

GAO Ya-ting<sup>1,2,3</sup>, WANG Xin-heng<sup>1,2,3</sup>, WANG Xiao-le<sup>1,2,3</sup>, CHENG Jian-chao<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Xing-xing<sup>2,3,4</sup>,  
TONG Jia-bing<sup>2,3,4</sup>, LI Ze-geng<sup>2,3,4\*</sup>

(1. Graduate School, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China;

2. Institute of Respiratory Disease Prevention and Control, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei

230031, China; 3. Key Laboratory of Chinese Medicine for Prevention and Control of Major Diseases in  
Pulmonary System, Key Laboratory of Anhui Provincial Education Department, Hefei 230031, China;

4. The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of Qiyu Sanlong decoction (QYSL) on the expressions of key molecules in signal axis of mammalian rapamycin target protein (mTOR)/yeast Atg6 homologous

**[收稿日期]** 20200512(020)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81874431,81804039)

**[第一作者]** 高雅婷,博士,从事中医药防治肺系病研究,E-mail:gyt0309@stu.ahtcm.edu.cn

**[通信作者]** \*李泽庚,硕士,教授,从事中医药防治肺系病研究,Tel:0551-62850171,E-mail:li6609@126.com

(Beclin1)/microtubule-associated protein1 light chain3 (LC3) in A549 cells. **Method:** With A549 cells as the research object, the effect of QYSL medicated serum on cell viability of A549 cells were detected by cell counting kit-8 (CCK-8) method. The effect of QYSL decoction on A549 cell apoptosis, autophagosome formation and the expression of autophagy markers were detected by Terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling (TUNEL) method, transmission electron microscope (TEM), Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot. **Result:** QYSL medicated serum could inhibit the viability of A549 cells in a concentration-dependent manner. Compared with the blank serum group, the number of apoptotic A549 cells in the QYSL medicated serum group was significantly increased ( $P<0.01$ ), and the formation of autophagosome was significantly increased. Compared with the blank serum group, the mRNA and protein expressions of mTOR in A549 cells in the QYSL serum group were significantly decreased ( $P<0.01$ ), while mRNA and protein expressions of Beclin-1, autophagy related genes 5 (ATG5), autophagy related genes 13 (ATG13) were significantly increased ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** QYSL decoction can induce autophagy in A549 cells, and its specific mechanism may be related to the down-regulation of mTOR expression, the up-regulation of Beclin1, ATG5, ATG13 and LC3 expression, and the promotion of LC3 I conversion to LC3 II.

**[Key words]** Qiyu Sanlong decoction; A549 cells; autophagy; mammalian rapamycin target protein (mTOR); yeast Atg6 homologous (Beclin1); microtubule-associated protein1 light chain3 (LC3)

肺癌是呼吸系统最常见的恶性肿瘤,是全球癌症引起死亡的主要原因<sup>[1]</sup>,其中85%以上为非小细胞肺癌(NSCLC)<sup>[2]</sup>。目前,含铂一线化疗方案仍是现代医学挽救无法手术NSCLC患者的主要治疗手段,但毒副反应较大,中医药以其毒副作用小,耐受性好,在肺癌治疗中占有优势<sup>[3]</sup>。芪玉三龙汤是临床治疗肺癌的有效验方<sup>[4]</sup>,前期研究发现,其对中晚期NSCLC患者瘤体稳定和改善患者生活质量有一定作用<sup>[5]</sup>。前期动物实验研究发现,其能温和地抑制肺部肿瘤的生长,降低自噬经典通路磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路中的关键蛋白mTOR的表达水平,提示其抗癌作用可能与肺癌引起的自噬行为有关<sup>[6]</sup>。最新研究表明自噬诱导癌细胞发生凋亡已成为临床抗肿瘤研究的一个新的靶点<sup>[7]</sup>。而mTOR,自噬关键分子酵母Atg6同系物(Beclin1),微管相关蛋白1轻链3(LC3)三者处于不同自噬阶段,在自噬过程中发挥重要作用。mTOR是自噬启动的关键调节因子,其负性调控自噬小体形成的早期阶段的关键步骤蛋白Beclin1,进一步影响Beclin1下游自噬后期关键分子LC3 I和LC3 II的功能,从而抑制自噬的发生。为进一步探索芪玉三龙汤调控mTOR干预自噬发生的机制,本次研究从细胞水平,观察芪玉三龙汤干预A549肺癌细胞对mTOR/Beclin1/LC3信号轴相关分子的调控关系,研究其治疗肺癌的内在分子机制。

## 1 材料

**1.1 动物与细胞** SPF级雄性SD大鼠40只,体重200~250 g,购自安徽医科大学,合格证号SXCK(皖)2017-001。于安徽中医药大学科研试验中心饲养,常规照明,自由饮食、饮水。实验方案经安徽中医药大学动物实验伦理审查委员会认证(伦理编号AHUCM-mouse-2019013)。A549细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司,货号CL-0016。

**1.2 药物与试剂** 芪玉三龙汤,药物组成:黄芪、龙葵、天龙、地龙、泽漆、白花蛇舌草、莪术、薏苡仁、玉竹、川贝,购自安徽中医药大学第一附属医院,中药饮片由该院韩燕全教授鉴定均为正品。Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)高糖培养基(美国HyClone公司,批号SH30022.01B);胎牛血清(美国Gibco公司,批号10270-106);胰酶消化液,青霉素-链霉素溶液,DAPI染色液(上海碧云天公司,批号分别为C0201, C0222, C1006);细胞增殖检测(CCK-8)试剂盒(日本同仁公司,批号CK04);EZ-10总RNA小量提取试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号B618583-0050];RevertAid™第一链cDNA合成试剂盒,PageRuler预染蛋白Marker(美国Thermo Fisher公司,批号分别为K1622, 26616);脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)试剂盒和荧光定量试剂盒(瑞士Roche公司,批号为11684817910, 04913914001);BCA蛋白定量检测试剂,SDS-PAGE凝胶制备试剂盒(中国武汉赛维尔公司,批号分别为G2026,

G2003);Beclin1,自噬相关基因5(Atg5)抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab20761,ab108327);自噬相关基因13(Atg13),mTOR,LC3, $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(美国CST公司,批号分别为13468T,2983T,3868S,8457S)。

**1.3 仪器** NU-5820E型CO<sub>2</sub>细胞培养箱(美国NuAire公司);IC1000型全自动细胞计数仪(美国Countstar公司);SW-CJ型超净工作台(苏州苏净安泰公司);ECLIPSE C1型正置荧光显微镜,DS-U3型成像系统(日本Nikon公司);CX53型倒置荧光显微镜(日本Olympus公司);UC7型超薄切片机(德国Leica公司);HT7700型透射电子显微镜(日本Hitachi公司);7300型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国ABI公司);ChemStudio 515型化学发光仪(德国Analytik Jena公司);Epoch 2型酶标仪(美国BioTek公司);5430R型台式高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司);EPS300型电泳仪,VE-186型转膜仪,VE-180型电泳槽(上海天能科技有限公司)。

## 2 方法

**2.1 芪玉三龙汤** 芪玉三龙汤中药材,常规水提,水浴浓缩至生药质量分数为1.396 g·mL<sup>-1</sup>,0.22  $\mu$ m过滤膜过滤除菌,分装,4℃冰箱保存备用,其具体煎煮方法参照前期研究基础<sup>[1]</sup>。

**2.2 含药血清制备** 40只雄性SD大鼠分为空白血清组(20只)和芪玉三龙汤含药血清组(20只)。芪玉三龙汤血清组按照临床等效剂量(根据人和动物按表面积折算的等效剂量比率表计算<sup>[8]</sup>),相当于60 kg成年人134 g·d<sup>-1</sup>等效量,即13.96 g·kg<sup>-1</sup>进行灌胃;正常血清组按大鼠体质量灌胃等容积的生理盐水灌胃。2次/日,连续5 d。末次灌药后1 h,腹注3.5%戊巴比妥钠麻醉(10 mL·kg<sup>-1</sup>),于无菌状态下腹主动脉采血,1 500 r·min<sup>-1</sup>离心5 min分离血清,56℃水浴灭活30 min,用滤膜过滤除菌,分装,分别标记为空白血清和芪玉三龙汤血清,于-80℃冰箱贮藏备用。

**2.3 细胞培养及传代** A549细胞用含有100 U·mL<sup>-1</sup>青霉素,100 U·mL<sup>-1</sup>链霉素,10%FBS的DMEM在37℃5%CO<sub>2</sub>的条件下培养。当细胞生长至70%~80%用0.25%胰蛋白酶进行消化,加入完全培养基终止消化,吹打细胞至细胞悬浮进行传代和扩大培养,细胞至第3代,用处于对数生长期的A549细胞进行实验。

**2.4 CCK-8法测定细胞活性** 通过CCK-8法分析

空白血清和芪玉三龙汤血清对A549细胞增殖的抑制作用。将A549细胞以5×10<sup>3</sup>个/mL接种于96孔板,每孔100  $\mu$ L。培养过夜,带细胞贴壁后实验组分别加入10%,15%,20%,25%,30%的芪玉三龙汤血清,在37℃5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中分别培养12,24,48 h。然后吸出培养基,每孔加入CCK-8溶液10  $\mu$ L,轻震混匀后在37℃继续培养1 h。用酶标仪以450 nm波长读取吸光度A。实验重复3次。计算细胞活力=(A<sub>加药</sub>-A<sub>空白</sub>)/(A<sub>0加药</sub>-A<sub>空白</sub>)×100%。

**2.5 TUNEL检测细胞凋亡** 将A549细胞接种到放有爬片的六孔板中,培养过夜细胞贴壁后,根据2.4项下筛选出来的最佳浓度和给药时间分别予以正常培养,20%空白血清和20%芪玉三龙汤血清,分别记为空白组,空白血清组和芪玉三龙汤血清组。分组给药后培养24 h,用4%多聚甲醛室温下固定25 min,无菌磷酸盐缓冲液(PBS)浸洗。取出爬片稍甩干后用组化笔在盖玻片中间细胞分布均匀的位置画圈,加破膜工作液100  $\mu$ L,室温下孵育20 min。将TUNEL试剂盒中的试剂1(TdT)和试剂2(dUTP)按1:9混合,滴加到圈内覆盖细胞,37℃孵育2 h,PBS清洗后在圈内加DAPI染液避光室温孵育10 min,进行封片,切片置于荧光显微镜下观察并采集图像,进行分析。

**2.6 透射电镜观察A549细胞超微结构** 按2.5项下方法分组给药,将细胞培养瓶中的培养液弃掉,迅速加入电镜固定液,4℃固定2 h,低速离心收集到离心管底可见细胞团块状沉淀至绿豆大小,1%琼脂糖包裹,PBS漂洗,1%锇酸0.1 mol·L<sup>-1</sup> PBS室温下固定2 h,进行梯度脱水。经渗透、包埋后,用超薄切片机切片,经铀铅双染色后,在透射电子显微镜下观察并采集图像。

**2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测mTOR,Atg13,Beclin1,Atg5,LC3蛋白表达** 按2.5项下方法分组给药,使用RIPA裂解液(加入蛋白酶抑制剂)提供A549细胞总蛋白,用BCA蛋白定量检测试剂盒测定蛋白浓度。制备浓缩胶,分离胶,插梳,加足够的电泳液后经SDS-PAGE凝胶上样电泳,转移到PVDF膜,用5%的脱脂牛奶室温封闭2 h。一抗孵育,mTOR抗体,Atg5,Atg13,Beclin1,LC3, $\beta$ -actin(1:1 000),4℃孵育过夜。TBST室温下在脱色摇床上洗3次,每次5 min。经二抗孵育后,洗膜,用化学发光法观察蛋白的表达情况,用Image J对结果进行分析。

**2.8 Real-time PCR检测mTOR,Atg13,Beclin1,**

Atg5 mRNA表达水平 按2.5项下方法分组给药后,根据说明书用EZ-10总RNA小量提取试剂盒提取总RNA,对RNA浓度及纯度进行检测。用RevertAid™第一链cDNA合成试剂盒将RNA反转录成cDNA。引物由武汉赛维尔生物科技有限公司进行合成,见表1。以反转录后的cDNA为模板, $\beta$ -actin为内参,在PCR仪上使用FastStart Universal SYBR Green Master(Rox)试剂盒对各基因进行PCR扩增,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算mRNA的相对表达量。

表1 引物序列

Table1 Sequence primers

引物	序列	长度 /bp
$\beta$ -actin	上游 5'-CACCCAGCACAATGAAGATCAAGAT-3' 下游 5'-CCAGTTTTTAAATCTGAGTCAAGC-3'	317
mTOR	上游 5'-TCACATTACCCCTTACCAGT-3' 下游 5'-ATCAGCGAGTCTTGCTATTCT-3'	231
Atg13	上游 5'-ATCAAACAGCAGTGAGGGACG-3' 下游 5'-AGCAAACATGGCAAAGGGTAT-3'	139
Atg5	上游 5'-AGTTTTGGGCCATCAATCGG-3' 下游 5'-CAGCCACAGGACGAAACAGC-3'	132
Beclin1	上游 5'-GAGCCATTATTGAAACTCCTCG-3' 下游 5'-CCCAGTGACCTTCAGTCTTCG-3'	162

2.9 统计学方法 采用SPSS 23.0软件进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较用单因素方差分析,两组之间比较用两独立样本t检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

### 3 结果

3.1 芪玉三龙汤血清以浓度依赖性的方式抑制A549细胞活性 芪玉三龙汤血清能以浓度依赖性的方式抑制细胞活性,且与空白血清组比较,不同浓度的芪玉三龙汤血清的抑制率均升高。为进一步筛选芪玉三龙汤血清干预A549细胞的最佳浓度和效果时间,进一步分析了不同时间半数抑制浓度( $IC_{50}$ ),结果显示在24 h芪玉三龙汤血清可以较低浓度达到 $IC_{50}$ ,故分别选择了20%芪玉三龙汤血清和24 h作为进一步研究的最佳浓度和效果时间。见表2,3。

3.2 芪玉三龙汤血清对A549细胞凋亡的影响 与空白血清组比较,芪玉三龙汤血清组凋亡细胞数量显著增加( $P < 0.01$ )。见图1,表4。

3.3 芪玉三龙汤血清干预对A549细胞超微结构的影响 空白血清组与空白组A549细胞表面有短小

表2 空白血清和芪玉三龙汤血清对A549细胞活力的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

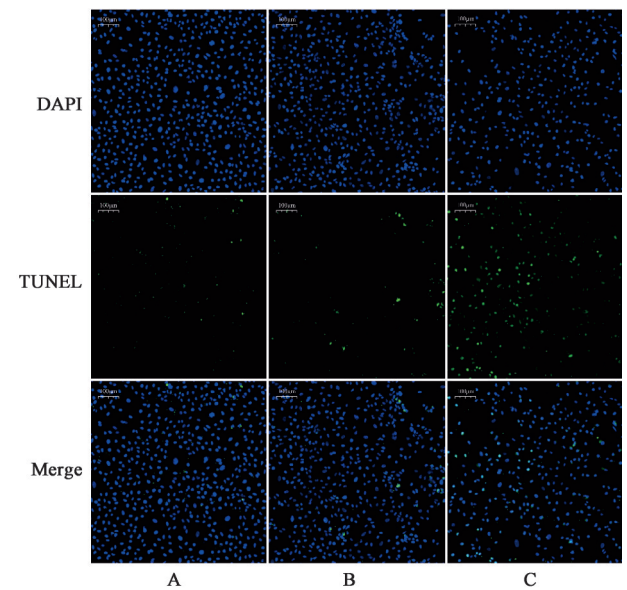
Table 2 Effect of Qiyu Sanlong decoction(QYSL) medicated serum on cell viability of A549 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ ) %

组别	体积分 数/%	细胞活性		
		12 h	24 h	48 h
空白血清	20	98.63±0.80	98.47±0.98	98.58±0.65
芪玉三龙汤血清	10	90.86±4.18	80.85±2.86	89.66±2.68
	15	86.19±5.36	65.01±11.44	81.66±5.62
	20	80.87±6.51	43.04±1.17	79.59±6.48
	25	67.55±7.29	40.09±4.13	69.08±3.43
	30	53.09±7.16	37.59±4.99	59.87±4.28

表3 不同时间20%芪玉三龙汤血清的 $IC_{50}$ 的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of QYSL medicated serum on  $IC_{50}$  values at different time points ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

时间	$IC_{50}/\%$
12 h	35.59±2.13
24 h	20.78±1.35
48 h	41.85±3.10



A.空白组;B.空白血清组;C.芪玉三龙汤血清组(图2,3同)

图1 芪玉三龙汤血清对A549细胞凋亡的影响(TUNEL, ×100)

Fig. 1 Effect of QYSL medicated serum on cell apoptosis (TUNEL, ×100)

微绒毛;细胞核大,核形不规则,可见极不规则核;细胞质丰富;线粒体在细胞中呈极性分布;板层小体内部有呈螺旋状排列的板状结构;微囊的腔面见微绒毛,腔内有分泌物;局部区域内质网、高尔基复合体结构完整;可见少量自噬小体。芪玉三龙汤血清组A549细胞内自噬标志性结构双层膜自噬小体

表4 芪玉三龙汤血清对A549细胞凋亡率的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of QYSL medicated serum on cell apoptosis ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	体积分数/%	细胞凋亡率/%
空白		2.34±0.462
空白血清	20	12.76±3.474 <sup>1)</sup>
芪玉三龙汤血清	20	56.55±2.335 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与空白血清组比较<sup>2)</sup> $P<0.01$ (表6同)。

和自噬小泡增多,可见自噬溶酶体,有单位膜包裹,其内含有残余细胞器。见图2。

### 3.4 芪玉三龙汤血清对A549细胞 mTOR, Atg13, Beclin1, Atg5 mRNA 表达的影响

与空白组比较,

表5 芪玉三龙汤血清对A549细胞 mTOR, Atg13, Beclin1, Atg5 mRNA 表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 5 Effect of QYSL medicated serum on mRNA expressions of mTOR, Atg13, Beclin1, Atg5 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	体积分数/%	mTOR	Atg13	Beclin1	Atg5
空白		0.990±0.017	1.016±0.014	1.049±0.035	0.99±0.017
空白血清	20	0.758±0.094 <sup>1)</sup>	1.035±0.067	1.275±0.013	1.094±0.032
芪玉三龙汤血清	20	0.307±0.049 <sup>2)</sup>	1.669±0.102 <sup>2)</sup>	1.611±0.023 <sup>2)</sup>	1.545±0.272 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ;与空白血清组比较<sup>2)</sup> $P<0.01$ 。

### 3.5 芪玉三龙汤血清对A549细胞 mTOR, Atg13, Beclin1, Atg5, LC3蛋白水平表达的影响

与空白血清组比较,芪玉三龙汤血清组 mTOR 蛋白表达显

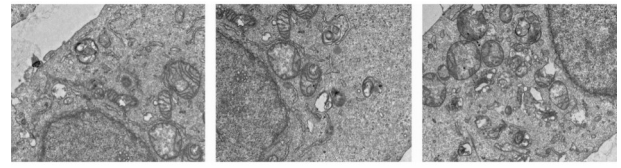


图2 观察芪玉三龙汤对A549细胞超微结构的影响(电镜, ×5 000)

Fig. 2 Effect of QYSL on ultrastructure of A549 cells (TEM, ×5 000)

著降低( $P<0.01$ ), Atg13, Beclin1, Atg5 mRNA 表达水平均显著升高( $P<0.01$ )。见表5。

著降低( $P<0.01$ ), Atg13, Beclin1, Atg5, LC3 II /LC3 I 蛋白表达水平均显著升高( $P<0.01$ )。见表6,图3。

表6 芪玉三龙汤血清对A549细胞 mTOR, Atg13, Beclin1, Atg5, LC3 蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 6 Effect of QYSL medicated serum on expressions of mTOR, Atg13, Beclin1, Atg5 and LC3 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	体积分数/%	mTOR/ $\beta$ -actin	Atg13/ $\beta$ -actin	Beclin1/ $\beta$ -actin	Atg5/ $\beta$ -actin	LC3 II /LC3 I
空白		1.017±0.017	0.369±0.008	0.598±0.001	0.136±0.006	0.923±0.015
空白血清	20	0.822±0.007	0.426±0.003	0.633±0.013	0.240±0.012	1.174±0.016
芪玉三龙汤血清	20	0.637±0.003 <sup>2)</sup>	0.591±0.006 <sup>2)</sup>	0.802±0.015 <sup>2)</sup>	0.401±0.021 <sup>2)</sup>	3.809±0.042 <sup>2)</sup>

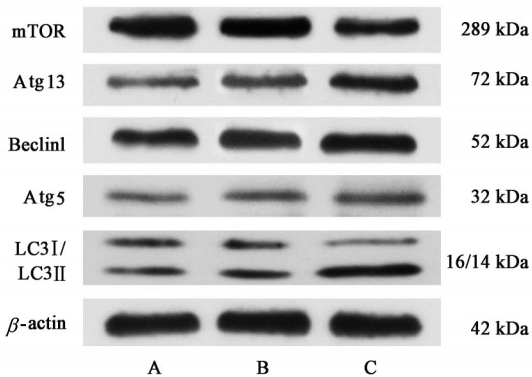


图3 芪玉三龙汤血清作用A549细胞 mTOR, Atg13, Beclin1, Atg5, LC3蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of QYSL medicated serum on expressions of mTOR, Atg13, Beclin1, Atg5 and LC3

## 4 讨论

肺癌在古代被称为“肺积”“咯血”“积聚”等范畴。如《难经》曰:“肺之积,名曰息贲……喘咳,发肺壅。”《外证医案》亦云“正气虚则成岩。”说明古人很早就了解到正气亏虚在肺癌发生、发展中的作用。肺脏清虚娇嫩,不耐寒热燥湿诸邪入侵,故肺气虚是肺系疾病发病的基础<sup>[9]</sup>。《丹溪心法》云:“人上中下有结块者,多属痰。”《杂病源流犀烛》也曾提到:“邪积胸中,阻塞气道,气不宣通,为痰,为血,邪既胜,正不得而制之,遂结成块而有块”。由此可见祖国医学很早就认识到肺癌的发生发展与痰瘀关系密切。另外,“癌毒”亦是肺癌发病的重要因素。陈滨海等<sup>[10]</sup>亦认为正虚邪实是肺癌发病的基本病

机,正虚有气血阴阳之虚,邪实有“痰”“瘀”和“毒”之实。进一步的阐述了肺中积块的产生与正气亏虚,邪毒侵袭,气机不畅,痰血胶结有关。针对肺癌病机拟定芪玉三龙汤,方中黄芪补肺益气,龙葵解毒抗癌,共为君药;天龙、地龙、泽漆解毒消积、活血散结,俱为臣药;白花蛇舌草清热解毒、活血化瘀,莪术破血行气、消积止痛,薏苡仁补益肺脾,玉竹养阴生津,共为佐药,川贝化痰润肺、消肿散结为使。该方益气养阴以补正虚,化痰祛瘀、解毒抗癌以祛毒聚,诸药合用,共奏扶正解毒抗癌之功。前期临床研究证实芪玉三龙汤能够改善患者临床症状,对中晚期 NSCLC 瘤体稳定有一定作用,并且与干预时间成正比<sup>[5]</sup>。因此,进一步完善芪玉三龙汤抗肿瘤的基础研究,明确其作用机制十分重要。

前期动物实验表明芪玉三龙汤具有温和的移植瘤抑制作用<sup>[11]</sup>,为进一步验证芪玉三龙汤的抗癌效果,本研究通过体外实验证实中药复方能够使 A549 细胞的凋亡数显著增加,通过对肿瘤细胞微观结构的观察,研究发现芪玉三龙汤血清组 A549 细胞内可见较多的自噬小体及其内容物,说明芪玉三龙汤能够诱导 A549 细胞发生自噬。因此,此次实验旨在从细胞水平研究芪玉三龙汤干预 A549 细胞后对 mTOR/Beclin1/LC3 信号轴关键分子表达的影响,明确其诱导肺癌细胞发生自噬的具体分子机制。

自噬是细胞受到各种压力后的自我保护过程,可以及时包裹和分解受损的生物大分子或细胞器,产生用于细胞循环的新能源物质,从而保持细胞本身的稳定性<sup>[12]</sup>。自噬与各种类型的癌症有关,如肺癌<sup>[13]</sup>,乳腺癌<sup>[14]</sup>,结肠癌<sup>[15]</sup>,卵巢癌<sup>[16]</sup>等。自噬在癌症的发生、进展和耐药性治疗中均起着关键作用,因此,自噬已经成为已成为一个潜在的抗癌靶点<sup>[17-18]</sup>。自噬与肿瘤具有双重关系,一方面在正常细胞中,自噬可以抑制恶性转化,另一方面,一旦发生恶性转化,自噬可促进肿瘤进展和治疗耐药。越来越多研究表明,自噬在肺癌的发病机制中起着一定的作用。mTOR 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,作为调节细胞生长、增殖和自噬的上游信号通路的汇合点<sup>[19-20]</sup>,是自噬启动阶段的关键调节因子,可负性调控自噬的发生<sup>[21]</sup>,可通过 Atg13 实现对自噬的负向调节,从而抑制自噬的发生<sup>[22]</sup>。本次研究发现,芪玉三龙汤在 RNA 和蛋白水平均可下调 mTOR 的表达,上调 Atg13 表达,提示 mTOR 可能是芪玉三龙汤的一个抑制靶点,可能通过下调 mTOR 的表

达,促进 Atg13 的表达,促进 A549 细胞自噬的发生。

同时,研究观察芪玉三龙汤对 Atg13 下游分子的影响。Atg13 通过促进 Beclin1 复合物形成及吞噬泡的启动,而吞噬泡延伸受 LC3-PE 连接蛋白和 Atg 蛋白的调控。Atg5 参与自噬体形成,与 Atg12 形成复合物,复合物与自噬泡膜的结合,可促进自噬泡中 LC3 的募集<sup>[23]</sup>。LC3 是控制自噬膜的形成和自噬体与溶酶体的融合的关键蛋白,在自噬体膜的延伸和成熟中发挥关键作用,其分为 LC3 I 型和 LC3 II 型,自噬发生时,可溶性 LC3 I 被活化,并修饰形成 LC3 II 通过融合蛋白转位至自噬体膜,从而促进自噬体的成熟,参与自噬体形成<sup>[24-26]</sup>。LC3 II 含量的多少与自噬泡数量的多少成正比,因此自噬程度与 LC3 II 表达呈正相关,LC3 II 是自噬体的标志分子<sup>[24]</sup>。通过投射电镜观察到自噬小体以及自噬小泡的相互验证来判断自噬的发生。本次研究发现,芪玉三龙汤干预 A549 细胞后,透射电镜下明显可见到更多的自噬小体以及自噬小泡,且 Beclin1, Atg5 的表达均上调,LC3 II /LC3 I 升高,提示其可能通过上调 Beclin1 的表达,促进 Beclin1 复合物的形成,同时调节关键蛋白酶 LC3 的表达,诱导 A549 细胞自噬的发生,促进细胞的凋亡。

本研究表明,芪玉三龙汤能够诱导肺癌细胞发生自噬,其具体作用机制可能与其下调 mTOR 蛋白表达,上调 Beclin1, Atg5, Atg13, LC3 蛋白表达,促进 LC3 I 转化为 LC3 II 有关,但仍需开展进一步实验对具体的分子机制进行深入研究。

#### [参考文献]

- [1] MPH L S R, MPH D M K, PHD J D A. Cancer statistics, 2020[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(1): 7-30.
- [2] Nsclc Meta-Analysis Collaborative Group. Preoperative chemotherapy for non-small-cell lung cancer: a systematic review and Meta-analysis of individual participant data [J]. Lancet, 2014, 383(9928): 1561-1571.
- [3] YANG J, ZHU X, YUAN P, et al. Efficacy of traditional Chinese medicine combined with chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC): a Meta-analysis of randomized clinical trials [J]. Support Care Cancer, 2020, 28(4): 3571-3579.
- [4] TONG J B, ZHANG X X, WANG X H, et al. Qiyu Sanlong decoction suppresses lung cancer in mice via

- Wnt/ $\beta$ -catenin pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(4):5320-5327.
- [ 5 ] 童佳兵,高雅婷,范春雷,等. 芪玉三龙汤治疗中晚期非小细胞肺癌临床观察[J]. *新中医*, 2018, 50(4): 146-150.
- [ 6 ] 张星星,童佳兵,杨程,等. 芪玉三龙汤对肺癌移植瘤小鼠PI3K/Akt/mTOR通路PI3K、Akt、mTOR表达的影响[J]. *安徽中医药大学学报*, 2016, 35(1): 73-77.
- [ 7 ] NOMAN M Z, BERCHEM G, JANJI B. Targeting autophagy blocks melanoma growth by bringing natural killer cells to the tumor battlefield [J]. *Autophagy*, 2018, 14(4):730-732.
- [ 8 ] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004(9): 1069-1072.
- [ 9 ] 彭波,李泽庚,孙志广. 肺气虚证的认识及内涵[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2008, 10(8): 36-38.
- [ 10 ] 陈滨海,张光霁. 肺癌的“痰毒瘀”微观模型初探[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(1): 50-54.
- [ 11 ] 程建超,张星星,童佳兵,等. 芪玉三龙汤对肺癌小鼠肿瘤组织TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B通路分子表达的影响[J]. *中药药理与临床*, 2019, 35(5): 101-106.
- [ 12 ] NAKAMURA S, YOSHIMORI T. Autophagy and longevity[J]. *Mol Cells*, 2018, 41(1):65-72.
- [ 13 ] YU J J, ZHOU D D, CUI B, et al. Disruption of the EGFR-SQSTM1 interaction by a stapled peptide suppresses lung cancer via activating autophagy and inhibiting EGFR signaling [J]. *Cancer Lett*, 2020, 474:23-35.
- [ 14 ] MARSH T, DEBNATH J. Autophagy suppresses breast cancer metastasis by degrading NBR1 [J]. *Autophagy*, 2020, 16(6):1164-1165.
- [ 15 ] CHEN Y, CHEN Y, ZHANG J, et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes metastasis in colorectal cancer by activating autophagy signaling via the upregulation of CARD3 expression [J]. *Theranostics*, 2020, 10(1): 323-339.
- [ 16 ] GAN X, ZHU H, JIANG X, et al. CircMUC16 promotes autophagy of epithelial ovarian cancer via interaction with Atg13 and miR-199a [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(2):69-90.
- [ 17 ] SANTANA-CODINA N, MANCIAS J D, KIMMELMAN A C. The role of autophagy in cancer [J]. *Annu Rev Cancer Biol*, 2017, 1: 19-39.
- [ 18 ] LI L, LIU W L, SU L, et al. The role of autophagy in cancer radiotherapy [J]. *Curr Mol Pharmacol*, 2020, 13(1): 31-40.
- [ 19 ] GLICK D, BARTH S, MACLEOD K F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms [J]. *J Pathol*, 2010, 221(1): 3-12.
- [ 20 ] YU L, CHEN Y, TOOZE S A. Autophagy pathway: cellular and molecular mechanisms [J]. *Autophagy*, 2018, 14(2): 207-215.
- [ 21 ] UGOLINO J, JI Y J, CONCHINA K, et al. Loss of C9orf72 enhances autophagic activity via deregulated mTOR and TFEB signaling [J]. *PLoS Genet*, 2016, 12(11): e1006443.
- [ 22 ] JUNG C H, JUN C B, RO S H, et al. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery [J]. *Mol Biol Cell*, 2009, 20(7): 1992-2003.
- [ 23 ] 周立江. 肺积宁方对Lewis肺癌抗肿瘤作用及自噬效应的实验研究[D]. 沈阳:辽宁中医药大学, 2016.
- [ 24 ] KUMA A, MATSUI M, MIZUSHIMA N. LC3, an autophagosome marker, can be incorporated into protein aggregates independent of autophagy: caution in the interpretation of LC3 localization [J]. *Autophagy*, 2007, 3(4): 323-328.
- [ 25 ] LI W, ZOU W, YANG Y, et al. Autophagy genes function sequentially to promote apoptotic cell corpse degradation in the engulfing cell [J]. *J Cell Biol*, 2012, 197(1): 27-35.
- [ 26 ] BU T, WANG C, JIN H, et al. Organic anion transporters and PI3K-Akt-mTOR pathway mediate the synergistic anticancer effect of pemetrexed and rhein [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(4): 3309-3319.

[责任编辑 张丰丰]