

芪玉三龙汤调节 Beclin1, Atg5, LC3B 表达 以抑制肺癌肿瘤生长机制

程建超¹, 童佳兵², 朱洁^{1,2}, 张星星², 高雅婷¹, 陈杨¹, 李泽庚^{1,2,*}, 郑莉莉²

(1. 安徽中医药大学, 安徽省教育厅中医药防治肺系重大疾病重点实验室, 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)

[摘要] **目的:** 研究芪玉三龙汤对肺癌小鼠皮下移植瘤生长及对自噬关键分子酵母 Atg6 同系物(Beclin1), 自噬相关基因 5 (autophagy related genes, Atg5) 及微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein1 light chain3, LC3B) 表达的影响。**方法:** 采用 Lewis 肺癌细胞 (Lewis lung cancer cell, LLC) 构建肺癌移植瘤小鼠模型, 造模成功后随机分为模型组、芪玉三龙汤组、顺铂组及联合组, 每组 18 只移植瘤小鼠。模型组每日按照生理盐水 20 mL·kg⁻¹ 灌胃; 芪玉三龙汤组每日按照 80.48 g·kg⁻¹ 灌胃; 顺铂组在第 1, 3, 5 天腹腔注射顺铂溶液 (DDP) 0.4 mL; 联合组每日按 80.48 g·kg⁻¹ 灌胃给药, 并分别在第 1, 3, 5 天腹腔注射顺铂溶液 0.4 mL; 连续治疗 21 d 剥离瘤组织, 称取瘤重, 计算抑瘤率。苏木素-伊红 (HE) 染色观察肿瘤组织形态学改变。免疫组化检测肿瘤组织中 Beclin1, LC3B 蛋白表达和定位。蛋白免疫印迹法 (Western blot) 测定 Beclin1, Atg5, 微管相关蛋白 1 轻链 3-I (LC3B-I) 及微管相关蛋白 1 轻链 3-II (LC3B-II) 蛋白表达, 并计算 LC3B-II/LC3B-I。实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 检测肿瘤组织 Beclin1, Atg5 mRNA 转录水平。**结果:** 芪玉三龙汤具有温和的移植瘤抑制作用, 抑瘤率为 31.2%; 镜下观察芪玉三龙汤组肿瘤组织可见片状坏死的肿瘤细胞; 免疫组化及 Western blot 实验表明, 与模型组比较, 芪玉三龙汤能够上调 Beclin1, Atg5, LC3B 蛋白的表达 ($P < 0.01$), 并且能促进 LC3B-I 转化为 LC3B-II; Real-time PCR 结果表明, 与模型组比较, 芪玉三龙汤能够促进 Beclin1, Atg5 mRNA 的转录 ($P < 0.01$)。**结论:** 芪玉三龙汤对肺肿瘤生长具有温和地抑制作用, 其作用机制可能与上调自噬关键分子 Beclin1, Atg5, LC3B 表达, 促进 LC3B-I 向 LC3B-II 转化有关。

[关键词] 芪玉三龙汤; 肺癌; 自噬; 自噬关键分子酵母 Atg6 同系物 (Beclin1); 自噬相关基因 5 (Atg5); 微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3B)

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)09-0029-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200621

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191206.1107.004.html>

[网络出版时间] 2019-12-06 16:28

Effect of Qiyu Sanlong Decoction in Inhibiting Growth of Lung Cancer by Regulating Expressions of Beclin1, Atg5 and LC3B

CHENG Jian-chao¹, TONG Jia-bing², ZHU Jie^{1,2}, ZHANG Xing-xing², GAO Ya-ting¹,
CHEN Yang¹, LI Ze-geng^{1,2,*}, ZHENG Li-li²

(1. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine (TCM) Prevention and Treatment of Pulmonary Diseases of Anhui Provincial Education Department, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China;

2. Research Institute of Respiratory Diseases of TCM, Anhui Academy of TCM, Hefei 230031, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Qiyu Sanlong decoction on the growth of subcutaneous tumor

[收稿日期] 20191024(010)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (81874431); 国家自然科学基金青年基金项目 (81804039); 安徽省自然科学基金项目 (1808085QH256); 安徽中医药大学科研项目 (2018zrzd19)

[第一作者] 程建超, 在读硕士, 从事中医药防治呼吸系统疾病的临床研究, Tel: 0551-62850171, E-mail: 1139190821@qq.com

[通信作者] * 李泽庚, 硕士, 教授, 博士生导师, 从事中医药防治呼吸系统疾病的临床研究, Tel: 0551-62850171, E-mail: Li6609@126.com

in lung cancer mice and the expressions of key autophagy molecule, yeast Atg6 homologous (Beclin1), autophagy related genes5 (Atg5), and microtubule-associated protein1 light chain3 (LC3B). **Method:** Lewis lung carcinoma cells (LLC) were used to reproduce the lung cancer mice transplanted model. After the modeling, the mice were randomly divided into model group, Qiyu Sanlong decoction group, chemotherapy group and combination group, with 18 transplanted mice in each group. In model group, mice were fed with 0.9% saline 20 mL·kg⁻¹ daily. In Qiyu Sanlong decoction group, mice were fed with Qiyu Sanlong decoction 80.48 g·kg⁻¹ daily. The chemotherapy group was intraperitoneally injected with 0.4 mL cisplatin solution (DDP) at the 1st, 3rd and 5th day. The combination group was orally given the drugs at the concentration of 80.48 g·kg⁻¹, and 0.4 mL DDP solution was intraperitoneally injected at the 1st, 3rd and 5th day. After 21 days of continuous treatment, tumor tissue was exfoliated and weighed, and the tumor inhibition rate was calculated. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the histological changes of tumor. The expressions and localizations of Beclin1 and LC3B in tumor tissues were detected by immunohistochemical staining. Protein expressions of Beclin1, Atg5, LC3B- I and LC3B- II were determined by Western blot, and the ratio of LC3B- II/LC3B- I was calculated. The transcription levels of Beclin1, Atg5 mRNA in tumor tissues were detected by Real-time PCR. **Result:** Qiyu Sanlong decoction had a mild inhibitory effect on transplanted tumor, with an inhibitory rate of 31.2%. Under microscope, patchy necrotic tumor cells were observed in the tumor tissues of Qiyu Sanlong decoction group. Immunohistochemical staining and Western blot analysis showed that Qiyu Sanlong decoction could up-regulate the expressions of Beclin1, Atg5 and LC3B protein ($P < 0.01$), and promote the conversion from LC3B- I into LC3B- II compared with the model group. Real-time PCR results showed that Qiyu Sanlong decoction could promote the transcription of Beclin1 mRNA and Atg5 mRNA compared with the model group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Qiyu Sanlong decoction has a mild inhibitory effect on lung tumors, and its mechanism may be related to up-regulating the expressions of autophagy key proteins Beclin1, Atg5 and LC3B, and promoting the conversion from LC3B- I to LC3B- II.

[**Key words**] Qiyu Sanlong decoction; lung cancer; autophagy; Beclin1; autophagy related genes 5 (Atg5); microtubule-associated protein1 light chain3 (LC3B)

肺癌是呼吸系统最常见恶性肿瘤,其中以非小细胞肺癌(NSCLC)最常见,约占 85%^[1]。中国癌症统计数据显示过去 10 余年中国的肺癌发病率男性占第 1 位,女性居第 2 位,而死亡率无论是男性还是女性均占首位,其发病率、死亡率逐年升高,现已成为我国癌症死亡的首要原因^[2]。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,但毒性反应较大。中医药以其毒性作用小,耐受性好,在肺癌治疗中占有重要优势。芪玉三龙汤是临床治疗肺癌的有效验方,前期研究发现其对中晚期 NSCLC 患者瘤体稳定具有一定作用,对患者的生存质量具有一定的改善作用^[3],但目前芪玉三龙汤抗 NSCLC 的具体机制尚不十分明确。近年研究表明,自噬具有对抗细胞癌变的作用,诱导癌细胞发生自噬性死亡,成为临床抗肿瘤研究的一个新的靶点^[4],诸多研究也进一步证实自噬与肺癌关系密切^[5-6]。前期研究发现,芪玉三龙汤可温和抑制肺部肿瘤生长,其能下调自噬经典通路磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

(PI3K/Akt/mTOR)途径中哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)表达^[7]。提示芪玉三龙汤的抗癌作用可能与诱导肺癌的自噬行为相关。而酵母 Atg6 同系物(Beclin1),自噬相关基因 5 (Atg5)及微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3B)作为 mTOR 的下游分子,在自噬途径中起着重要的作用^[8-11]。因此,本研究通过构建肺癌移植瘤小鼠模型,进一步研究芪玉三龙汤对自噬关键分子表达的影响,揭示其作用机制与调节肿瘤细胞自噬有关,为 NSCLC 的治疗提供新的方向。

1 材料

1.1 实验癌株及动物 Lewis 肺癌细胞,购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库;C57BL/6 小鼠,72 只,鼠龄 6~8 周,雄性,体质量(20±2)g,购自常州卡文斯实验动物有限公司,合格证号 SCXK(苏)2011-0003。本研究由安徽中医药大学动物伦理委员会授权(批准号 A-16-038)。

1.2 药物 芪玉三龙汤由黄芪 30 g,玉竹 10 g,天龙 6 g,地龙 6 g,龙葵 20 g,白花蛇舌草 20 g,薏苡仁

20 g, 泽漆 6 g, 莪术 10 g, 川贝母 6 g 组成, 中药饮片来源于安徽中医药大学第一附属医院中药房。由该院韩燕全教授鉴定均为正品。其制备方法参照前期研究基础^[7,12-13], 在蒸馏水 1.34 L 中浸泡 1 h, 大火煮沸后, 慢火煎煮 90 min。将提取液通过四层纱布过滤, 残渣浸泡于蒸馏水 1.072 L 中, 大火煮沸后, 慢火煎煮 40 min, 通过四层纱布再次过滤。合并 2 次煎煮液, 浓缩至含生药 4.024 g·mL⁻¹, 制得芪玉三龙汤水煎液。4 ℃ 冰箱保存备用, 保存期限 1 周。注射用顺铂 (DDP, 齐鲁制药有限公司国药准字 H37021357, 20 mg/瓶), 用 0.9% 氯化钠溶液稀释至 0.367 g·L⁻¹。

1.3 试剂和仪器 苏木素、伊红染色液 (Baso 公司, 批号分别为 718034, 718011); 免疫组化 Beclin1, LC3B 一抗 (Abcam 公司, 批号分别为 GR3201455-1, GR3204186-1); 通用型二抗试剂盒, DAB 显色试剂盒 (Zsbio 公司, 批号分别是 18G48D07, 108038A08); PVDF 膜 (Millipore 公司, 批号 R7SA9081E); 预染蛋白 Marker, ECL 超敏发光试剂盒 (Hermo 公司, 批号分别为 0050578, QE218149); β -肌动蛋白 (β -actin) 一抗, 山羊抗小鼠免疫球蛋白 (Ig) G, 山羊抗兔 IgG (Zs-Bio 公司, 批号分别为 18AV0406, 133499, 133599); 蛋白免疫印迹法 (Western blot) Beclin1 单克隆抗体 (Abcam 公司, 批号 GR3204186-1); LC3B 单克隆抗体 (CST 公司, 批号 13); Atg5 单克隆抗体 (Proteintech 公司, 批号 00054450); RevertAid™ first Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific 公司, 批号 00592451); trizol (Life Technologies 公司, 批号 204403)。

ZT-12M 型生物组织自动脱水机, YB-7LF 型生物组织包埋机 (湖北亚光公司); CX43 型显微镜 (日本 Olympus 公司); LX300 型低速迷你离心机 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司); JW-3021HR 型高速台式冷冻离心机 (安徽嘉文仪器装备有限公司); EPS300 型电泳仪, VE-180 型电泳槽, VE-186 型转膜仪 (上海天能科技有限公司); TS-1000 型水平摇床 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司); JJ-79-1 型磁力加热搅拌器 (常州市人和仪器厂); JS-1070P 型自动曝光仪 (上海培清科技有限公司); K960 型普通 PCR 仪 (杭州晶格科学仪器有限公司); PIKOREAL96 型实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 仪 (美国 Thermo Scientific 公司)。

2 方法

2.1 构建肺癌移植瘤动物模型 取对数生长期

细胞, 胰酶消化后 1 800 r·min⁻¹ 离心 5 min 收集细胞, 无血清 DMEM 培养基重悬并调整细胞密度为 1 × 10⁷ 个/mL, 用 1 mL 注射器吸取细胞悬液 0.2 mL, 采用皮下注射法接种于小鼠右前肢建立 LLC 小鼠皮下移植瘤模型^[12], 观察 30 min, 小鼠无异常表现, 无死亡, 说明接种成功。接种 10 d 后, 以皮下摸到 3 ~ 5 mm³ 的米粒样硬物, 待其长至 1 cm³ 左右, 每组剥取 1 只移植瘤行病理检测均为癌细胞, 造模成功。

2.2 分组及给药 前期研究基础^[13-14] 筛选出最佳药物剂量, 即相当于临床剂量的 4 倍, 所以芪玉三龙汤组采用 4 倍给药, 即 80.48 g·kg⁻¹。将 72 只模型小鼠随机分为模型组、顺铂组、芪玉三龙汤组和联合组, 每组 18 只。模型组按照 0.2 mL·(10 g)⁻¹ 生理盐水灌胃, 每日 1 次; 芪玉三龙汤组 80.48 g·kg⁻¹ 芪玉三龙汤水煎液灌胃, 每日 1 次; 联合组 80.48 g·kg⁻¹ 芪玉三龙汤水煎液灌胃, 每日 1 次, 同时分别于第 1, 3, 5 天腹腔注射顺铂溶液 0.4 mL。顺铂组第 1, 3, 5 天腹腔注射顺铂溶液 0.4 mL; 各组连续给药 21 d。

2.3 称取瘤重计算抑瘤率 停药 24 h 后, 称体质量, 脱颈处死, 置于冰盒上取材, 完整剥离瘤体, 称取瘤重, 抑瘤率 = (模型组平均瘤重 - 药物组平均瘤重) / 模型组平均瘤重 × 100%。

2.4 苏木素-伊红 (HE) 染色观察肿瘤组织病理形态学变化 实验各组停药后 24 h 处死小鼠, 完整剥离瘤体, 置于 4% 多聚甲醛溶液固定。常规脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋, 连续 4 μ m 切片。HE 染色, 封片。光镜下观察肿瘤组织病理形态学。

2.5 免疫组化检测肿瘤组织中 Beclin1, LC3B 蛋白表达水平 常规固定、包埋、切片, 一抗孵育 (LC3B 1:500; Beclin1 1:100), 二抗孵育, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗, DAB 溶液显色, 终止显色, 冲洗充分后衬染, 苏木素染色 3 min 后入 1% 盐酸-乙醇分化, 冲洗后蓝化, 中性树脂胶封片, 电脑采集图像。检测肿瘤组织自噬系统 Beclin1, LC3B 蛋白表达。

2.6 Western blot 检测肿瘤组织中 Beclin1, Atg5, LC3B-I, LC3B-II 蛋白表达水平 组织总蛋白的提取, 各组经预冷 PBS 漂洗 2 次; 加预冷的 RIPA 裂解液, 至预冷的离心管中, 冰上裂解 30 min; 超声粉碎 30 s; 4 ℃, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min; 吸取上清, -20 ℃ 保存备用。制备浓缩胶、分离胶, 插梳, 上样, 电泳, 转膜, 一抗孵育 (Beclin1, LC3B, Atg5 1:1 000), 二抗孵育 (LC3B 1:1 万; Beclin1, Atg5

1:2 万), 室温封闭 2 h, 加入 PBST 洗涤液, 每次洗涤 10 min, 共洗涤 3 次; ECL 显色后胶片曝光, 并采用 Image J 软件分析结果, 实验重复 3 次。分别检测 Beclin1, Atg5, LC3B-I, LC3B-II 蛋白相对表达量, 并计算 LC3B-II/LC3B-I。

2.7 Real-time PCR 检测肿瘤组织 Beclin1, Atg5 mRNA 转录水平 称取肿瘤组织 0.1 g, 液氮研磨, 加入 trizol 1 mL 提取总 RNA。根据 RevertAid™ first Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒逆转录成 cDNA, 以此 cDNA 作为荧光定量模板, 按照特定的反应体系和反应条件进行扩增, PCR 扩增条件: 95 °C 预变性 1 min, 1 个循环, 95 °C 变性 20 s, 60 °C 退火 1 min, 40 个循环。以 β -actin 作为内参, Relative Quantification Study 为分析方法, 最终计算取 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。引物序列由 Sangon Biotech 公司合成, 见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列	长度/bp
β -actin	上游 5'-AGTGTGACGTTGACATCCGT-3'	120
	下游 5'-TGCTAGGAGCCAGAGCAGTA-3'	
Beclin1	上游 5'-GCACCATGCAGGTGAGCTTC-3'	131
	下游 5'-TTTCGCCTGGGCTGTGTTAA-3'	
Atg5	上游 5'-AGTCAACTTCAGTGGAGGCA-3'	130
	下游 5'-AGTGGTCTGTGTCTCAG-3'	

2.8 统计学方法 采用 SPSS 21.0 统计软件分析, 计数资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。经分析发现所有研究数据均呈正态分布, 并且绝大多数研究数据满足方差齐性。组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用最小显著法 (LSD) 法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 芪玉三龙汤对小鼠瘤重与抑瘤率的影响 模型组、芪玉三龙汤组、联合组及顺铂组进行单因素方差分析, 各组间差异有统计学意义 [$F_{(18,71)} = 1571.051, P < 0.01$]。与模型组相比, 芪玉三龙汤组、联合组及顺铂组平均瘤重显著降低 ($P < 0.01$)。其中, 芪玉三龙汤组抑瘤率达 31.02%, 具有温和的移植瘤抑制作用, 见表 2。

3.2 芪玉三龙汤对小鼠肿瘤组织形态学的影响 模型组小鼠肿瘤细胞核质比大, 核深染, 可见较多核分裂象, 周围无坏死。芪玉三龙汤组可见片状坏死肿瘤细胞, 细胞核碎裂溶解。联合组亦可见大片状坏死肿瘤细胞, 胞核碎裂溶解, 较多肿瘤细胞胞质内

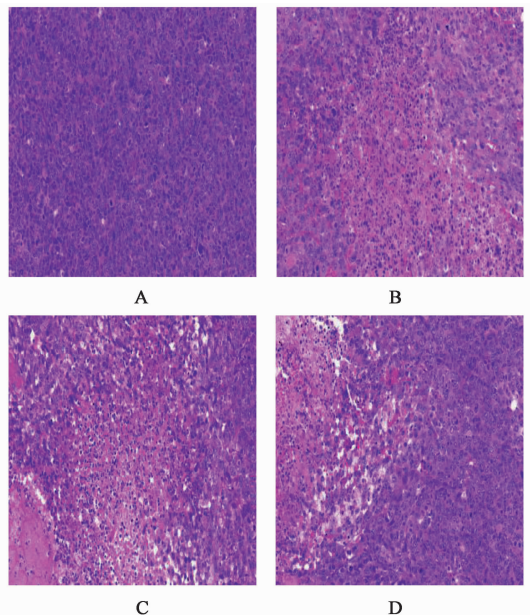
表 2 芪玉三龙汤对小鼠瘤重与抑瘤率的影响

Table 2 Effect of Qiyu Sanlong decoction on tumor quality and tumor inhibition rate in mice

组别	剂量	瘤重 ($\bar{x} \pm s, n = 18$)/g	抑瘤率 /%
模型	-	5.61 \pm 0.25	-
芪玉三龙汤	80.48 g·kg ⁻¹	3.87 \pm 0.24 ¹⁾	31.02
联合	80.48 g·kg ⁻¹ + 0.367 g·L ⁻¹	1.63 \pm 0.10 ¹⁾	70.94
顺铂	0.367 g·L ⁻¹	2.13 \pm 0.13 ¹⁾	62.03

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

可见小空泡。顺铂组可见片状坏死肿瘤细胞, 胞核碎裂溶解, 部分肿瘤细胞胞质可见小空泡。说明芪玉三龙汤能够促进肿瘤细胞坏死。见图 1。



A. 模型组; B. 芪玉三龙汤组; C. 联合组; D. 顺铂组 (图 2, 3 同)

图 1 芪玉三龙汤对小鼠肿瘤组织形态学的影响 (HE, $\times 400$)

Fig. 1 Effect of Qiyu Sanlong decoction on tumor histomorphology in mice (HE, $\times 400$)

3.3 芪玉三龙汤对小鼠肿瘤组织 Beclin1, LC3B 蛋白表达的影响 肿瘤细胞 Beclin1, LC3B 蛋白的阳性着色为棕黄色颗粒, 主要定位于细胞浆中。与模型组相比, 芪玉三龙汤组、联合组及顺铂组 Beclin1, LC3B 蛋白表达显著上调 ($P < 0.01$), 与顺铂组相比, 芪玉三龙汤组和联合组 Beclin1, LC3B 蛋白表达显著上调 ($P < 0.01$)。见图 2, 表 3。

3.4 芪玉三龙汤对肿瘤组织中 Beclin1, Atg5, LC3B-I 及 LC3B-II 蛋白表达水平的影响 与模型组相比, 芪玉三龙汤组、联合组及顺铂组 Beclin1, Atg5, LC3B-I, LC3B-II 蛋白表达水平及 LC3B-II/LC3B-I 显著上调 ($P < 0.01$)。与顺铂组

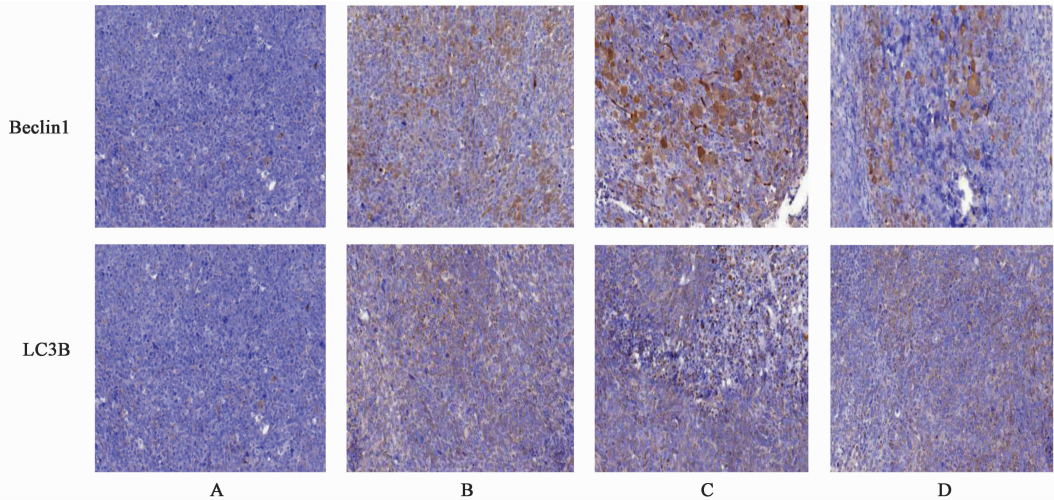


图 2 芪玉三龙汤对小鼠肿瘤组织 Beclin1, LC3B 蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 2 Effect of Qiyu Sanlong decoction on expressions of Beclin1 and LC3B in mouse tumor tissues(IHC, ×400)

表 3 芪玉三龙汤对小鼠肿瘤组织 Beclin1, LC3B 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 18$)

Table 3 Effect of Qiyu Sanlong decoction on expressions of Beclin1 and LC3B in mouse tumor tissues ($\bar{x} \pm s, n = 18$)

组别	剂量	Beclin1	LC3B
模型	-	0.17 ± 0.01	0.20 ± 0.03
芪玉三龙汤	80.48 g·kg ⁻¹	0.46 ± 0.01 ^{1,3)}	0.59 ± 0.02 ^{1,3)}
联合	80.48 g·kg ⁻¹ + 0.367 g·L ⁻¹	0.52 ± 0.01 ^{1,3)}	0.65 ± 0.01 ^{1,3)}
顺铂	0.367 g·L ⁻¹	0.39 ± 0.01 ¹⁾	0.43 ± 0.08 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$;与顺铂组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 4,5 同)。

相比,联合组上述指标均显著上调($P < 0.01$),芪玉

表 4 芪玉三龙汤对 Beclin1, Atg5, LC3B- I 及 LC3B- II 蛋白相对表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of Qiyu Sanlong decoction on protein expression levels of Beclin1, Atg5, LC3B- I and LC3B- II ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量	Beclin 1/ β -actin	Atg5/ β -actin	LC3B- I / β -actin	LC3B- II / β -actin	LC3B- II / LC3B- I
模型	-	0.42 ± 0.03	0.44 ± 0.01	0.58 ± 0.04	0.25 ± 0.04	0.43 ± 0.05
芪玉三龙汤	80.48 g·kg ⁻¹	1.18 ± 0.04 ^{1,3)}	0.97 ± 0.01 ^{1,3)}	0.82 ± 0.04 ^{1,2)}	0.61 ± 0.01 ^{1,2)}	0.74 ± 0.02 ¹⁾
联合	80.48 g·kg ⁻¹ + 0.367 g·L ⁻¹	1.36 ± 0.05 ^{1,3)}	1.07 ± 0.04 ^{1,3)}	1.05 ± 0.06 ^{1,3)}	0.91 ± 0.04 ^{1,3)}	0.87 ± 0.01 ^{1,3)}
顺铂	0.367 g·L ⁻¹	1.02 ± 0.03 ¹⁾	0.85 ± 0.02 ¹⁾	0.74 ± 0.01 ¹⁾	0.53 ± 0.02 ¹⁾	0.72 ± 0.03 ¹⁾

3.5 芪玉三龙汤对肿瘤组织中 Beclin1, Atg5 mRNA 转录水平的影响 与模型组相比,芪玉三龙汤组,联合组及顺铂组 Beclin1, Atg5 mRNA 转录水平显著上调($P < 0.01$)。与顺铂组比较,芪玉三龙汤组及联合组 Beclin1, Atg5 mRNA 转录水平亦显著上调($P < 0.01$),见表 5。

三龙汤组 Beclin1, Atg5, LC3B- I, LC3B- II 蛋白表达水平均上调($P < 0.05, P < 0.01$), LC3B- II / LC3B- I 差异无统计学意义。见图 3,表 4。

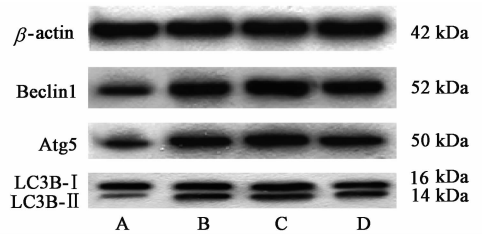


图 3 芪玉三龙汤对肿瘤组织中 Beclin1, Atg5, LC3B- I 及 LC3B- II 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of Qiyu Sanlong decoction on protein expression levels of Beclin1, Atg5, LC3B- I and LC3B- II in tumor tissues

4 讨论

肺癌在中医学中属于“肺积”“积聚”“息贲”等范畴,《黄帝内经》指出“温气不行,凝血蕴里而不散,津液涩渗,著而不去,而积皆成矣。”《外证医案》云:“正气虚则成岩。”正虚邪聚是肺癌发病基础。《丹溪心法》云:“人上中下有结块者,多属痰。”中医

表 5 芪玉三龙汤对肿瘤组织中 Beclin1, Atg5 mRNA 转录水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 5 Effect of Qiyu Sanlong decoction on transcriptional levels of Beclin1 and Atg5 mRNA in tumor tissues ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量	Beclin1	Atg5
模型	-	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.09
芪玉三龙汤	80.48 g·kg ⁻¹	2.61 ± 0.11 ^{1,3)}	1.62 ± 0.04 ^{1,3)}
联合	80.48 g·kg ⁻¹ + 0.367 g·L ⁻¹	2.64 ± 0.75 ^{1,3)}	1.69 ± 0.10 ^{1,3)}
顺铂	0.367 g·L ⁻¹	2.09 ± 0.12 ¹⁾	1.50 ± 0.10 ¹⁾

学很早认识到痰瘀与肿瘤发生的关系。另外,“癌毒”是肺癌发病的另一重要因素。所以认为正气亏虚,痰瘀毒是肺癌中医的病理基础^[15],课题组通过前期文献研究也证实^[16],肺癌发病不外乎正气虚损、实邪内聚共同作用的结果。国家名老中医韩明向教授杏林耕耘 60 年,以中医经典理论为指导,密切联系临床,形成治疗肺癌的有效验方芪玉三龙汤。方中黄芪健脾补肺,龙葵解毒消癌肿,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,莪术破血行气、消积止痛,薏苡仁培土生金,玉竹养阴润燥,共为佐药,川贝化痰润肺、消肿散结为使。全方共奏益气养阴、化痰祛瘀、解毒抗癌之功。

Beclin1 基因是哺乳动物中首个被发现的具有调节细胞自噬作用的特异性基因,定位于人染色体 17q21,由 BH3,中央螺旋区(CCD)和进化保守区(ECD)3 个结构域组成,这些结构域是 Beclin1 与其他分子相互作用的部位^[17]。Beclin1 参与自噬小体的组成,是介导其他自噬蛋白定位于前自噬小体的关键基因,是启动自噬过程的标志,是首个确认的在自噬途径中起肿瘤抑制作用的基因^[18-20]。当自噬未发生时,细胞内的 LC3B 经加工成为表达于胞浆的可溶性 LC3B-I,当自噬发生时,可溶性 LC3B-I 被 Atg7,Atg3 等活化,与磷脂酰乙醇胺结合后形成 LC3B-II,从而促进自噬体的成熟,参与自噬体形成。LC3B-II 含量多少与自噬泡数量多少成正比,因此自噬程度与 LC3B-II 表达呈正相关,所以可以通过检测细胞内 LC3B-II/LC3B-I 来判断细胞是否发生了自噬现象^[21-23]。另外,Atg5 通过形成 Atg12-Atg5-Atg16 复合物主要定位于吞噬泡的外侧,在自噬体形成期间驱动膜片的扩展和/或弯曲,是参与调控自噬的重要基因^[24]。

本次研究证实芪玉三龙汤具有温和的移植瘤抑制作用,并且芪玉三龙汤组可见片状坏死肿瘤细胞,

细胞核碎裂,而模型组镜下未见坏死肿瘤细胞,且肿瘤细胞核质比大,可见较多核分裂象。说明芪玉三龙汤具有抗肿瘤功效。免疫组化表明,Beclin1 和 LC3B 蛋白主要分布于细胞质中,且芪玉三龙汤组中 Beclin1 和 LC3B 蛋白的阳性检出率明显高于模型组。Western blot 结果进一步证实,与模型组相比,芪玉三龙汤能够上调 Beclin1, Atg5, LC3B-I 及 LC3B-II 蛋白表达,并且能够促进 LC3B-I 向 LC3B-II 的转化,Real-time PCR 也表明该复方能够促进 Beclin1, Atg5 mRNA 的转录。说明芪玉三龙汤的抗肿瘤作用可能与上调自噬关键分子 Beclin1, Atg5, LC3B 表达,促进 LC3B-I 向 LC3B-II 转化有关。

综上所述,芪玉三龙汤可一定程度抑制肺癌生长,促进肿瘤细胞坏死,其机制可能与调控自噬关键分子表达有关。此次实验为进一步研究芪玉三龙汤的抗肿瘤作用和机制奠定基础。

[参考文献]

[1] MILLER K D, NOGUEIRA L, MARITTO A B, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019 [J]. CA Cancer J Clin 2019, 11(6): 1-23.

[2] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.

[3] 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.

[4] 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): 1-7.

[5] NAZIM U M D, MOON J H, LEE Y J, et al. Glipizide sensitizes lung cancer cells to TRAIL-induced apoptosis via Akt/mTOR/autophagy pathways [J]. Oncotarget, 2017, 8(59): 100021.

[6] XU L Y, WANG Y, LIU Q, et al. Role of Autophagy in the radiosensitivity of human lung adenocarcinoma A549 cells [J]. Chin J Cancer, 2016, 19(12): 799-804.

[7] 张星星, 李泽庚. 芪玉三龙汤对荷瘤小鼠肿瘤组织 PI3K/Akt/mTOR 通路分子表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(12): 5358-5361.

[8] DU H, CHE J, SHI M, et al. Beclin1 expression is associated with the occurrence and development of esophageal squamous cell carcinoma [J]. Oncol Lett,

- 2017, 14 (6) :6823-6828.
- [9] YU Z, MA J, LI X, et al. Autophagy defects and related genetic variations in renal cell carcinoma with eosinophilic cytoplasmic inclusions[J]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1) :9972-9984.
- [10] LIU L, LIAO J Z, HE X X. The role of autophagy in hepatocellular carcinoma; friend or foe[J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (34) :57707-57722.
- [11] MASUDA GO, YASHIRO M, KITAYAMA K, et al. Clinicopathological correlations of autophagy-related proteins LC3, beclin1 and p62 in gastric cancer[J]. *Anticancer Res*, 2016, 36 (1) :129-136.
- [12] 张星星,李泽庚,曾时杰,等. 芪玉三龙汤对 Wnt 信号通路拮抗基因 SFRP-2 的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(7) :127-132.
- [13] 童佳兵,张星星,韩明向,等. 芪玉三龙方调节 Wnt/ β -catenin 通路下游靶基因表达抑制荷瘤小鼠肺癌生长[J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(5) :2014-2017.
- [14] 张星星,童佳兵,杨程,等. 芪玉三龙汤平衡肺癌小鼠 Th1/Th2 漂移相关机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(11) :131-136.
- [15] 朱金凤,唐艳芬,尤菊松. 肺癌的中西医结合辨治思维与方法探析[J]. *中华中医药杂志*, 2010, 25(9) :1418-1421.
- [16] 张星星,李泽庚. 肺癌中医病因病机探讨[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(10) :3447-3449.
- [17] 李思漫,张金秀,朱晔,等. 结直肠癌组织中 Tricellulin、LC3 和 Beclin1 的表达及意义[J]. *山东医药*, 2018, 58(41) :1-5.
- [18] 李芳,徐萍,高婷婷,等. 肝癌组织中自噬相关蛋白 Beclin1、LC3、mTOR 的表达及意义[J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(16) :3890-3892.
- [19] LADDHA S V, GANESAN S, CHAN C S, et al. Mutational landscape of the essential autophagy gene BECN1 in human cancers[J]. *Mol Cancer Res*, 2014, 12(4) :485-490.
- [20] QU X, YU J, BHAGAT G, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene[J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(12) :1809-1820.
- [21] 王路遥,李宁,宋瑞瑞,等. PI3KC3/Beclin1 复合物对染矽尘 NR8383 细胞自噬的调控作用[J]. *环境与职业医学*, 2018, 35(9) :801-808.
- [22] 何聪,陈清勇,王剑,等. 姜黄素下调 mTOR 诱导人肺癌 A549 细胞自噬的研究[J]. *肿瘤学杂志*, 2014, 20(5) :363-368.
- [23] 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.
- [24] 饶春梅,成细华,任婷,等. 加味丹参饮含药血清预处理对缺氧/复氧 H9C2 心肌细胞自噬相关基因 Atg5 和 Beclin1 mRNA 表达的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(8) :1821-1824.

[责任编辑 张丰丰]