

三虫通络散结方含药血清对Lewis肺癌细胞增殖和凋亡的影响及机制^Δ

李阳^{1*}, 陈蕾², 张洽淳³, 张晶¹, 冯婧宇¹, 梁奇^{4#} (1. 广州中医药大学第七临床医学院肿瘤科, 广东深圳 518133; 2. 广州中医药大学第七临床医学院病理科, 广东深圳 518133; 3. 广州中医药大学第七临床医学院急诊科, 广东深圳 518133; 4. 广州中医药大学第七临床医学院药学部, 广东深圳 518133)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)04-0440-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.04.09



摘要 目的 研究三虫通络散结方对Lewis肺癌细胞增殖和凋亡的影响及机制。方法 将三虫通络散结方散剂[0.946 g/(kg·d)]、三虫通络散结方汤剂[2.730 g/(kg·d)]和生理盐水灌胃大鼠,将顺铂注射液(4.2 mg/kg)腹腔注射大鼠,以制备散剂血清、汤剂血清、阳性对照血清和阴性对照血清。将Lewis肺癌细胞分为阴性对照血清组、阳性对照血清组及不同浓度(5%、10%、20%)散剂血清组和汤剂血清组,检测干预24、48、72 h时的细胞增殖抑制率,筛选散剂血清和汤剂血清的最佳干预浓度;检测阴性对照血清组、阳性对照血清组、20%散剂血清组、20%汤剂血清组细胞的侵袭能力、迁移能力和凋亡率,以及细胞中血管内皮生长因子(VEGF)、缺氧诱导因子1 α (HIF-1 α)、脯氨酰羟化酶2(PHD2)、基质金属蛋白酶2(MMP-2)、胞外信号调节激酶(ERK)、c-Jun氨基端激酶(JNK)、p38调控丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)蛋白的表达水平。结果 20%散剂血清组和20%汤剂血清组干预48 h时细胞的增殖抑制率均不低于50%。与阴性对照血清组比较,20%散剂血清组和20%汤剂血清组细胞的侵袭数量和迁移距离均显著减少,凋亡率均显著升高($P<0.05$),且20%散剂血清组细胞凋亡率显著高于20%汤剂血清组($P<0.05$);20%散剂血清组细胞中PHD2、p38 MAPK蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$),20%汤剂血清组细胞中HIF-1 α 蛋白表达显著降低($P<0.05$)。结论 三虫通络散结方可抑制Lewis肺癌细胞的增殖、侵袭和迁移,促进其凋亡,作用机制可能与调控PHD2/HIF-1 α 信号通路相关;且散剂效果优于汤剂,二者可能存在不同的作用机制。

关键词 三虫通络散结方; Lewis肺癌细胞; 增殖; 侵袭; 转移; 凋亡; PHD2/HIF-1 α 通路

Effects of serum containing Sanchong tongluo sanjie formula on the proliferation and apoptosis of Lewis lung cancer cells and its mechanism

LI Yang¹, CHEN Lei², ZHANG Qiachun³, ZHANG Jing¹, FENG Jingyu¹, LIANG Qi⁴ (1. Dept. of Oncology, the Seventh Clinical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangdong Shenzhen 518133, China; 2. Dept. of Pathology, the Seventh Clinical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangdong Shenzhen 518133, China; 3. Dept. of Emergency, the Seventh Clinical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangdong Shenzhen 518133, China; 4. Dept. of Pharmacy, the Seventh Clinical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangdong Shenzhen 518133, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To study the effects of Sanchong tongluo sanjie formula on the proliferation and apoptosis of Lewis lung cancer cells. **METHODS** The rats were given Sanchong tongluo sanjie formula powder [0.946 g/(kg·d)], Sanchong tongluo sanjie formula decoction [2.730 g/(kg·d)], and normal saline intragastrically, and injected with Cisplatin injection (4.2 mg/kg) intra-peritoneally to prepare powder-containing serum, decoction-containing serum, positive control serum and negative control

serum. Lewis lung cancer cells were divided into negative control serum group, positive control serum group, and 5%, 10%, 20% drug-containing serum groups. The cell proliferation inhibition rates at 24, 48, and 72 hours post-intervention were measured to screen the optimal intervention concentrations of powder-containing serum and decoction-

^Δ 基金项目 广东省中医药局中医药科研项目(No.20231294);深圳“医疗卫生三名工程”(No.SZZYSM202206005);深圳市宝安区引进高层次医学团队项目(No.202403)

* 第一作者 副主任中医师,博士。研究方向:中晚期恶性肿瘤的中西医结合治疗。E-mail:liyang2001@126.com

通信作者 主任药师,硕士生导师。研究方向:中药药理与中药制剂。E-mail:liangqi70@gzucm.edu.cn

containing serum. The cell invasion ability, metastasis ability and apoptotic rate were detected in the negative control serum group, positive control serum group, 20% powder-containing serum group, and 20% decoction-containing serum group. Protein expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF), hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), prolyl hydroxylase-2 (PHD2), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), extracellular regulated protein kinases (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) were detected. **RESULTS** The cell proliferation inhibition rates for both the 20% powder-containing serum group and the 20% decoction-containing serum group, when intervened for 48 hours, were not less than 50%. Compared with negative control serum group, the number of invasive Lewis lung cancer cells and migration distance were decreased significantly, while the apoptotic rate was increased significantly ($P<0.05$); the apoptotic rate in the 20% powder-containing serum group was significantly higher than 20% decoction-containing serum group ($P<0.05$). The protein expressions of PHD2 and p38 MAPK were increased significantly in the 20% powder-containing serum group ($P<0.05$), while the protein expression of HIF-1 α was decreased significantly in the 20% decoction-containing serum group ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Sanchong tongluo sanjie formula can inhibit the proliferation, invasion and metastasis of Lewis lung cancer cells while promoting their apoptosis. The mechanism of action may be related to regulating the PHD2/HIF-1 α signaling pathway. Furthermore, the powder demonstrates superior efficacy compared to the decoction, suggesting that they may possess different mechanisms of action. **KEYWORDS** Sanchong tongluo sanjie formula; Lewis lung cancer cells; proliferation; invasion; metastasis; apoptosis; PHD2/HIF-1 α pathway

肺癌是全球较常见的癌症之一,也是导致癌症相关死亡的主要原因。据统计,每年约有200万新发肺癌患者,因肺癌导致死亡的患者约176万例^[1]。肺癌可分为非小细胞肺癌和小细胞肺癌两大类,其中非小细胞肺癌是肺癌的主要类型,占有原发性肺癌的80%~85%^[2]。在我国,肺癌是发病率、死亡率均最高的恶性肿瘤^[3]。晚期非小细胞肺癌的临床治疗主要包括靶向治疗、化疗、免疫治疗及抗血管生成治疗,但靶向药物只对特定的靶点突变人群有效,且不可避免会出现耐药;化疗毒副作用大,缓解期短;单药免疫治疗对整体人群有效率低;新近的热点抗体耦联药物数据尚不成熟,还处于研发阶段^[4-5]。因此,亟待寻找更加有效的肺癌治疗方法。

中医药具有高效、低毒、副作用小、受众面广等特点,在肿瘤治疗中具有独特优势。有研究发现,中药能通过调控丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)/胞外信号调节激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)、c-Jun氨基端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)、磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白等信号通路中关键分子的表达,来降低肿瘤细胞活性,抑制肿瘤细胞增殖、侵袭与转移,促进肿瘤细胞凋亡,同时减轻放疗对免疫功能的损伤,增强化疗药物效果并减弱其毒性,改善骨髓抑制^[6-8]。三虫通络散结方是在中医理论指导下,总结名家经验并经广州中医药大学第七临床医学院(简称“我院”)长期临床实践拟定的协定处方,该方由全蝎、壁虎和蜈蚣组成,主要用于晚期肺癌的辅助治疗。笔者在前期临床实践中发现,三虫通络散结方有延长晚期肺癌患

者生存期、延长疾病无进展生存期的优势,但是否可抑制Lewis肺癌细胞增殖和凋亡尚未明确。基于此,本研究考察了三虫通络散结方对Lewis肺癌细胞增殖和凋亡的影响及可能的作用机制,以进一步明确该方对肺癌的治疗作用,旨在为肺癌的临床治疗提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括Multiskan MK3型酶标仪[赛默飞世尔(上海)仪器有限公司]、CIB-191C型CO₂培养箱(美国CTI公司)、WSF-1600型倒置荧光显微镜(广州微域光学仪器有限公司)、L500型台式低速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)、CKX41型显微镜[奥林巴斯(中国)有限公司]、BG-Power 600i型电泳仪(北京百晶生物技术有限公司)、FACSCanto型流式细胞仪(美国BD公司)等。

1.2 主要药品与试剂

全蝎、壁虎、蜈蚣饮片(批号分别为Q333212、B5473113、2303083)均由广州中医药大学附属宝安中医院提供,经该院药学部梅全喜主任药师鉴定均为真品;三虫通络散结胶囊由我院药物临床应用中心制备,内容为全蝎、壁虎、蜈蚣饮片按制剂工艺打碎研磨后的混合物,每粒0.5 g(以生药量计,下同)。

顺铂注射液(批号601220104,规格6 mL:30 mg)购自江苏豪森药业集团有限公司;胎牛血清、胰酶(批号分别为F8318-500ML、25200072)均购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;CCK-8试剂盒(批号CK04)购自上海经科化学科技有限公司;4%多聚甲醛固定液(批号

R20479)购自上海源叶生物科技有限公司;DMEM培养基(批号8123233)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;聚偏二氟乙烯膜(批号IPVH00010)购自密里博中国有限公司;Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(批号556547)购自美国BD公司;磷酸酶抑制剂、二辛可酸法蛋白含量检测试剂盒、RIPA裂解液(批号分别为P1045、P0011、P0013)均购自上海碧云天生物技术有限公司;ECL显色液(批号FP302)购自安迪福诺生物科技(武汉)有限公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠、山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(批号分别为BA1050、BA1054)均购自武汉博士德生物工程有限公司;兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(批号BF0198)购自江苏亲科生物研究中心有限公司;兔源血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、缺氧诱导因子1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)、脯氨酰羟化酶2(prolyl hydroxylase-2, PHD2)、基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)抗体(批号分别为ab214424、ab179483、ab226890、ab181286)均购自艾博抗(上海)贸易有限公司;兔源ERK、JNK、p38 MAPK抗体(批号分别为#4695、#9252、#8690)均购自赛信通(上海)生物试剂有限公司。

1.3 实验动物和细胞

雄性SD大鼠44只,清洁级,体重(200 $\pm$ 20)g,购自广东省医学实验动物中心,实验动物生产许可证号为SCXK(粤)2022-0002。所有大鼠均饲养于广东至远生物医药科技有限公司,饲养室温度25 $^{\circ}$ C、相对湿度40%,大鼠自由摄食及饮水。小鼠Lewis肺癌细胞株(批号20221123)购自上海安为生物科技有限公司。本研究方案经广州迈尔斯生物科技有限公司动物伦理委员会审批通过,批件号为20230014。

2 方法

2.1 药液的制备

三虫通络散结方由全蝎10 g、壁虎10 g、蜈蚣6 g组成。取上述饮片,加入清水300 mL,煎煮出药液123 mL,药液质量浓度为0.21 g/mL,于4 $^{\circ}$ C储存备用,即得汤剂组药液。取三虫通络散结胶囊内容物,以生理盐水为溶剂溶解稀释成相应浓度药液,即得散剂组药液。

2.2 血清的制备

取44只SD大鼠,随机分为散剂组、汤剂组、阳性对照组和阴性对照组,每组11只。根据人的使用剂量,按照体表面积折算法^[9]换算大鼠的等效剂量,即散剂组大鼠按0.946 g/(kg $\cdot$ d)灌胃相应药液,汤剂组大鼠按2.730

g/(kg $\cdot$ d)灌胃相应药液,阴性对照组大鼠灌胃等体积生理盐水,每天灌胃2次,连续给药5 d。按照相关文献^[10-12]折算出大鼠的顺铂使用剂量进行预实验,根据预实验结果设置阳性对照组大鼠的给药剂量,即阳性对照组大鼠按4.2 mg/kg腹腔注射顺铂注射液,隔日1次,即第1、3、5天给药。末次给药后1~2 h,腹腔注射三溴乙醇麻醉各组大鼠,经腹主动脉取血,分离血清;合并同组血清,灭活,滤过,除菌,制得散剂血清、汤剂血清、阳性对照血清和阴性对照血清,均于-20 $^{\circ}$ C冻存备用。

2.3 细胞分组与干预

2.3.1 三虫通络散结方含药血清的最佳干预浓度筛选

取对数生长期的Lewis肺癌细胞,以胰酶消化,将细胞浓度调整至1 $\times$ 10⁵个/mL,以每孔100 μ L细胞悬液接种于96孔板。细胞分为8组,分别为阴性对照血清组、阳性对照血清组、5%散剂血清组、10%散剂血清组、20%散剂血清组、5%汤剂血清组、10%汤剂血清组、20%汤剂血清组,每组设3个复孔。各组分别给予“2.2”项下10%阴性对照血清、10%阳性对照血清和相应浓度含药血清干预,于干预前及干预24、48、72 h后,每孔加入10% CCK-8溶液100 μ L,于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂细胞培养箱内孵育2 h,用酶标仪检测450 nm波长处的吸光度,计算增殖抑制率:增殖抑制率=(1-药物组吸光度/阴性对照血清组吸光度) $\times$ 100%。根据增殖抑制率筛选三虫通络散结方含药血清的最佳干预浓度。

2.3.2 药物干预

取对数生长期的Lewis肺癌细胞,以胰酶消化,将细胞浓度调整至1 $\times$ 10⁵个/mL,以每孔100 μ L细胞悬液接种于96孔板。根据“3.1”项下含药血清浓度的筛选结果,将细胞分为阴性对照血清组、阳性对照血清组、20%散剂血清组和20%汤剂血清组,每组设3个复孔。各组分别给予10%阴性对照血清、10%阳性对照血清和相应浓度含药血清干预,于干预前及干预24、48 h(根据“3.1”项下结果设置)后,收集细胞,进行后续指标检测。

2.4 指标检测

2.4.1 细胞侵袭能力检测

采用Transwell实验检测。取对数生长期的Lewis肺癌细胞,按“2.3.2”项下方法分组、处理。培养48 h后,将3 $\times$ 10⁴个细胞接种到涂有Matrigel基质胶的小室上层,用200 μ L无血清培养基重悬;在下室中加入完全培养基700 μ L,于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱孵育48 h。孵育结束后,取出小室,吸弃上室培养基后,先将小室转移至加有多聚甲醛的24孔板中,固定15 min,然后用棉签擦去上室细胞,以磷酸盐缓冲液洗涤3次,再用4%多聚甲醛

固定 20 min,以磷酸盐缓冲液洗涤 3 次,最后用结晶紫染色 10 min。使用显微镜观察细胞侵袭数量并拍照,细胞侵袭数量越多说明侵袭能力越强。

2.4.2 细胞迁移能力检测

采用细胞划痕实验检测。将消化生长状态良好的细胞接种到 6 孔板中,细胞数量为确保常规培养第 2 天刚好铺满板底。将细胞按“2.3.2”项下方法分组、处理,在 6 孔板上方放置无菌的尺子,用移液枪取 200 μL ,枪头垂直于孔板,沿着尺子划痕,划痕完毕,吸弃旧培养基,用磷酸盐缓冲液洗涤 3 次,去除划下的细胞,使留下的划痕间隙肉眼可见,然后更换新鲜无血清培养基,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养 24 h。使用显微镜观察划痕区宽度并拍照,计算细胞迁移距离:细胞迁移距离=0 h 划痕区域宽度-24 h 划痕区域宽度。

2.4.3 细胞凋亡情况检测

采用流式细胞术检测。取对数生长期的 Lewis 肺癌细胞,按“2.3.2”项下方法分组、处理。细胞培养 48 h 后,以胰酶消化,离心收集细胞,加入磷酸盐缓冲液 300 μL 重悬细胞,再次离心,弃上清液,加入 Binding Buffer 50 μL ,混匀,加入 Annexin V-FITC 和 PI 各 2.5 μL ,室温避光孵育 15 min,离心,弃上清液,加入 Binding Buffer 300 μL 。使用流式细胞仪检测细胞凋亡情况,并计算细胞凋亡率:细胞凋亡率=(早期凋亡细胞数+晚期凋亡细胞数)/总细胞数 $\times 100\%$ 。

2.4.4 细胞中 VEGF、HIF-1 α 、PHD2、MMP-2、ERK、JNK、p38 MAPK 蛋白表达检测

采用 Western Blot 法检测。取对数生长期的 Lewis 肺癌细胞,按“2.3.2”项下方法分组、处理。培养 48 h 后,裂解细胞并提取蛋白,采用二辛可酸法测定蛋白浓度。蛋白加热变性后,电泳分离并转至聚偏二氟乙烯膜上,经脱脂粉封闭,加入 GAPDH、VEGF、HIF-1 α 、PHD2、MMP-2、ERK、JNK、p38 MAPK 一抗(稀释比例均为 1:1 000),于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;加入相应二抗(稀释比例均为 1:1 000),室温孵育 1 h,洗膜后加入 ECL 显色液曝光,扫描。应用 Image J 软件分析电泳条带的灰度值,以目的蛋白与内参蛋白(GAPDH)的灰度值比值表示目的蛋白的表达水平。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计分析。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD- t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 三虫通络散结方含药血清的最佳干预浓度筛选结果

如图 1 所示,与干预前比较,5% 散剂血清组和 5% 汤剂血清组细胞干预 24、48、72 h 时的细胞增殖抑制率呈先升高后降低的趋势,以干预 48 h 时的细胞增殖抑制率最高;阳性对照血清组、10% 散剂血清组、20% 散剂血清组、10% 汤剂血清组和 20% 汤剂血清组细胞干预 24、48、72 h 时的细胞增殖抑制率均明显升高,且与作用时间呈正相关,其中干预 48 h 时,20% 散剂血清组和 20% 汤剂血清组细胞的细胞增殖抑制率均不低于 50%。故选取散剂血清和汤剂血清的最佳干预浓度均为 20%。

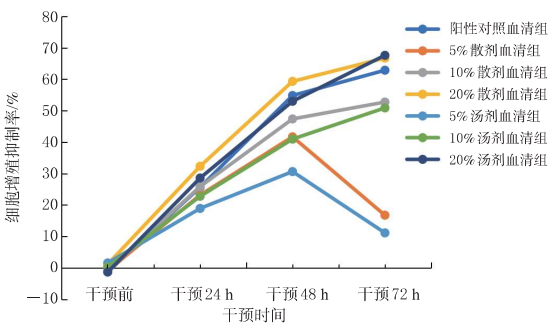


图 1 含药血清对 Lewis 肺癌细胞增殖的影响($n=3$)

3.2 细胞侵袭能力比较

与阴性对照血清组比较,阳性对照血清组、20% 散剂血清组和 20% 汤剂血清组细胞的侵袭数量均显著减少($P<0.05$)。结果见图 2 和表 1。

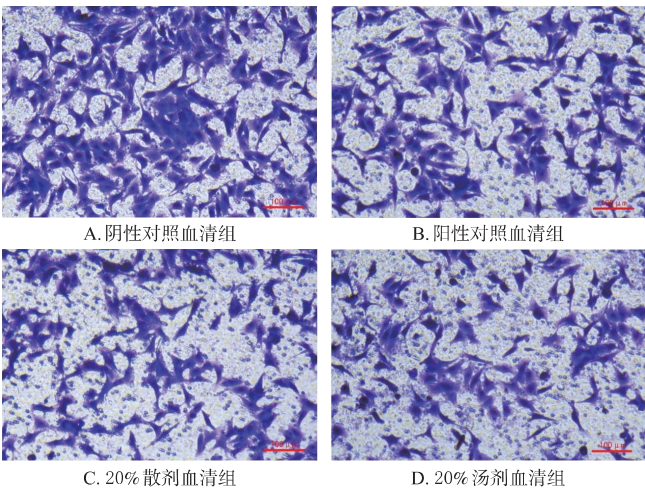


图 2 各组细胞 Transwell 侵袭实验的显微图(结晶紫染色,标尺=100 μm)

3.3 细胞迁移能力比较

如图 3 所示,与干预前比较,干预 24 h 时阳性对照血清组、20% 散剂血清组和 20% 汤剂血清组细胞的划痕区

表1 各组细胞的侵袭数量、迁移距离、凋亡率比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	侵袭数量/个	迁移距离	凋亡率/%
阴性对照血清组	230.33±15.01	11.40±0.91	2.66±0.29
阳性对照血清组	150.33±13.05 ^a	4.10±0.60 ^a	4.57±0.41 ^a
20%散剂血清组	136.00±7.55 ^a	7.10±0.75 ^{ab}	11.42±0.92 ^{ab}
20%汤剂血清组	156.33±15.57 ^a	7.28±0.94 ^{ab}	5.92±0.27 ^{abc}

a: 与阴性对照血清组比较, $P<0.05$; b: 与阳性对照血清组比较, $P<0.05$; c: 与20%散剂血清组比较, $P<0.05$ 。

依旧明显,而阴性对照血清组细胞的划痕区变窄。与阴性对照血清组比较,阳性对照血清组、20%散剂血清组和20%汤剂血清组细胞的迁移距离均显著减小($P<0.05$);与阳性对照血清组比较,20%散剂血清组和20%汤剂血清组细胞的迁移距离均显著增加($P<0.05$)。结果见表1。

3.4 细胞凋亡率比较

与阴性对照血清组比较,阳性对照血清组、20%散剂血清组和20%汤剂血清组细胞的凋亡率均显著升高($P<0.05$);与阳性对照血清组比较,20%散剂血清组和20%汤剂血清组细胞的凋亡率均显著升高($P<0.05$);与20%散剂血清组比较,20%汤剂血清组细胞凋亡率显著降低($P<0.05$)。结果见图4、表1。

3.5 细胞中蛋白表达水平比较

与阴性对照血清组比较,阳性对照血清组和20%散剂血清组细胞中PHD2、p38 MAPK 蛋白表达水平均显

著升高($P<0.05$),20%汤剂血清组细胞中HIF-1 α 蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。与阳性对照血清组比较,20%汤剂血清组细胞中VEGF、HIF-1 α 、MMP-2、p38 MAPK 蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$)。与20%散剂血清组比较,20%汤剂血清组细胞中HIF-1 α 、JNK、p38 MAPK 蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$)。结果见图5和表2。

4 讨论

大多数肺癌患者确诊时已属晚期,化疗、靶向治疗和免疫治疗等虽能改善肺癌患者的生存质量,延长其生存期,但仍存在药物毒性累积、药物耐药、价格昂贵等缺陷^[4-5]。三虫通络散结方中全蝎、蜈蚣、壁虎均是治疗肺癌的常用中药,此方已在我院肺癌的治疗中取得了良好的疗效。方中壁虎咸寒,散结、祛风、解毒,为君药;全蝎辛平,通络止痛、解毒散结,为臣药;蜈蚣辛温,能中和壁虎的寒性,息风、通络止痛、攻毒散结,为佐药。三药合用,共奏扶正祛邪、通络散结、祛风、解毒的作用,然而其作用机制尚未阐明。本研究结果显示,与阴性对照血清比较,三虫通络散结方散剂血清及其汤剂血清培养的Lewis肺癌细胞侵袭数量和迁移距离均显著减少,凋亡率均显著升高,表明三虫通络散结方可抑制Lewis肺癌细胞的侵袭和迁移,促进其凋亡。

硫化氢与肿瘤进展相关,HIF-1 α 受硫化氢调控,是血管生成的重要组成部分^[13],在肺癌的生成、转移中具

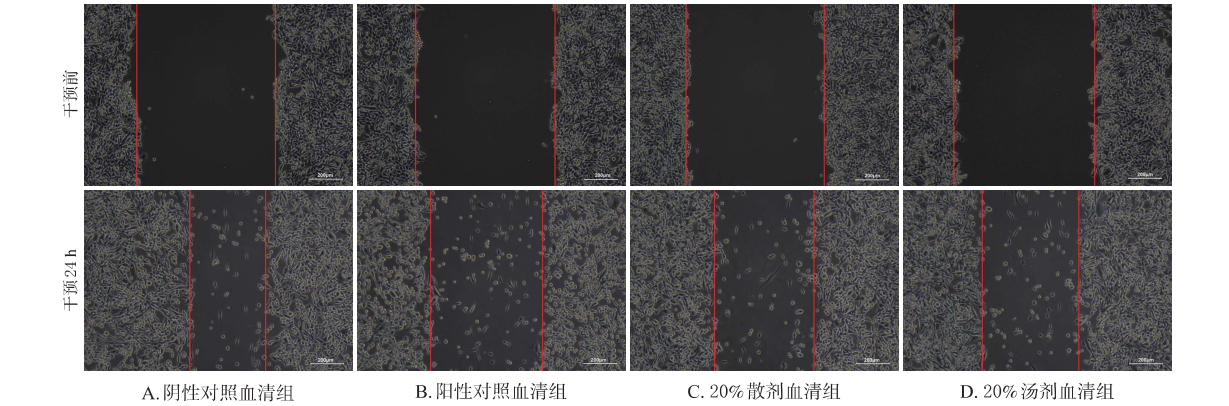


图3 各组细胞划痕实验的显微图(标尺=200 μm)

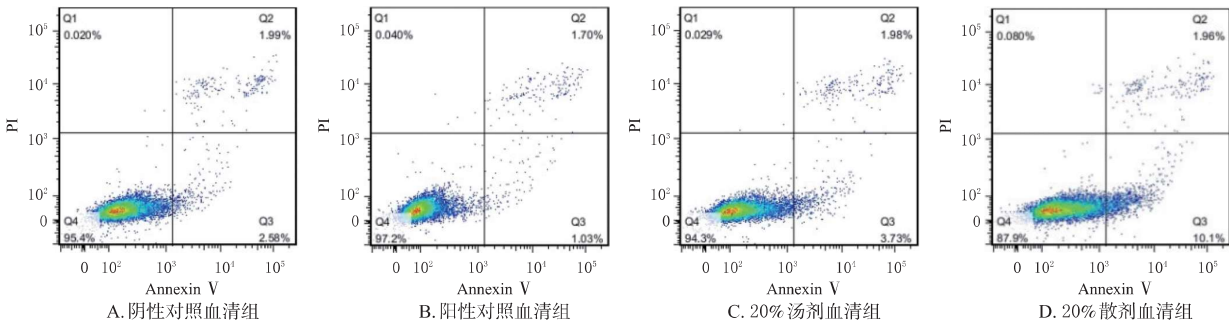


图4 各组细胞凋亡的流式图

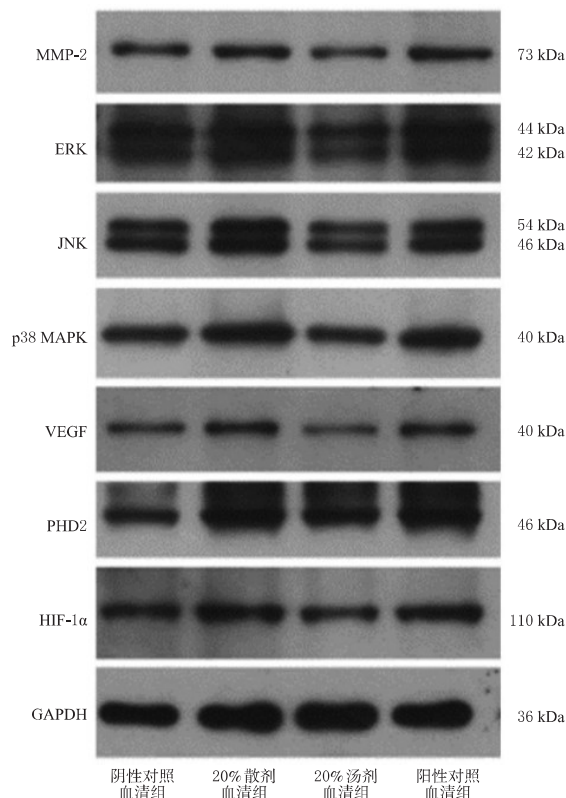


图5 各组细胞中蛋白表达的电泳图

表2 各组细胞中蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	VEGF	HIF-1 α	PHD2	MMP-2	ERK	JNK	p38 MAPK
阴性对照血清组	0.28 $\pm$ 0.15	0.70 $\pm$ 0.12	0.53 $\pm$ 0.05	0.42 $\pm$ 0.09	1.24 $\pm$ 0.75	0.97 $\pm$ 0.24	0.51 $\pm$ 0.09
阳性对照血清组	0.42 $\pm$ 0.07	0.77 $\pm$ 0.06	0.95 $\pm$ 0.15 ^a	0.52 $\pm$ 0.10	1.64 $\pm$ 0.46	0.88 $\pm$ 0.16	0.76 $\pm$ 0.05 ^a
20% 散剂血清组	0.36 $\pm$ 0.06	0.76 $\pm$ 0.06	0.92 $\pm$ 0.15 ^a	0.41 $\pm$ 0.09	1.35 $\pm$ 0.37	1.07 $\pm$ 0.10	0.76 $\pm$ 0.10 ^a
20% 汤剂血清组	0.13 $\pm$ 0.11 ^b	0.44 $\pm$ 0.12 ^{bc}	0.71 $\pm$ 0.12	0.24 $\pm$ 0.23 ^b	0.86 $\pm$ 0.31	0.57 $\pm$ 0.13 ^c	0.37 $\pm$ 0.03 ^{bc}

a: 阴性对照血清组比较, $P < 0.05$; b: 与阳性对照血清组比较, $P < 0.05$; c: 与20%散剂血清组比较, $P < 0.05$ 。

有重要作用^[14]。PHD2被认为是关键的氧传感器,且更倾向于调节HIF-1 α ,能够调节其活性和稳定性,是降解HIF-1 α 的关键酶^[15]。VEGF和MMP-2是促进肿瘤微血管生长的细胞因子,可通过使毛细血管增生、新生血管形成等,促进肿瘤生长和扩散^[16]。PHD2低表达会引起HIF-1 α 降解途径中断,导致HIF-1 α 聚积,从而引起下游靶基因(如VEGF、MMP-2)的转录活性增强、表达上调,最终诱导肿瘤血管增生;肿瘤细胞通过新生的血管获得充足的养分,并由血循环流向靶器官,实现肿瘤的侵袭转移^[15]。本研究结果显示,与阴性对照血清比较,三虫通络散结方散剂血清培养的Lewis肺癌细胞中PHD2蛋白表达水平显著升高,汤剂血清培养的Lewis肺癌细胞中HIF-1 α 蛋白表达水平显著降低,表明三虫通络散结方可能通过激活PHD2蛋白表达,增加HIF-1 α 降解,来抑制肿瘤细胞的侵袭和迁移。根据研究结果推测,PHD2/HIF-1 α 信号通路的下调可能部分介导了三虫通络散结

方的抗肿瘤作用。

本研究还发现,虽然三虫通络散结方散剂血清及其汤剂血清均能诱导Lewis肺癌细胞凋亡,但两者比较,散剂血清诱导细胞凋亡能力更强;此外,散剂血清和汤剂血清细胞中VEGF、HIF-1 α 、PHD2、MMP-2、ERK、JNK、p38 MAPK蛋白表达情况并不一致,提示三虫通络散结方散剂及其汤剂可能存在不同的作用机制及效应。既往也有研究发现,中药的不同剂型在成分、效应等方面存在区别,如魏华民等^[17]研究发现,中药散剂和传统汤剂在肿瘤学常规实验中有较大差别,指出双参颗粒醇提产物较传统汤剂对肿瘤细胞有更明显的抑制增殖、迁移和促进凋亡的作用,但两者在抑制肺转移方面无差别。

综上所述,三虫通络散结方可抑制Lewis肺癌细胞增殖、侵袭和迁移,促进其凋亡,作用机制可能与调控PHD2/HIF-1 α 信号通路相关;且散剂效果优于汤剂,二者可能存在不同的作用机制。

参考文献

- [1] THAI A A, SOLOMON B J, SEQUIST L V, et al. Lung cancer[J]. Lancet, 2021, 398(10299): 535-554.
- [2] NOORELDEEN R, BACH H. Current and future development in lung cancer diagnosis[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(16): 8661.
- [3] 中华医学会肿瘤学分会, 韩宝惠, 王洁, 等. 中华医学会肺癌临床诊疗指南: 2024版[J]. 中华肿瘤杂志, 2024, 46(9): 805-843.
- [4] 郑荣寿, 陈茹, 韩冰峰, 等. 2022年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2024, 46(3): 221-231.
- [5] ZHENG R S, CHEN R, HAN B F, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022[J]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 2024, 46(3): 221-231.
- [6] 曾天星, 田婵婵, 赵明栋, 等. 抗体偶联药物在非小细胞肺癌中的研究进展[J]. 临床肺科杂志, 2024, 29(5): 785-791.
- [7] ZENG T X, TIAN C C, ZHAO M D, et al. Research progress of antibody-coupled drugs in non-small cell lung cancer[J]. J Clin Pulm Med, 2024, 29(5): 785-791.
- [8] 李倩, 刘颖, 郭君兰. 红景天苷对人肺癌A549细胞裸鼠移植瘤生长的影响及对MAPK/ERK1/2信号通路的调控作用[J]. 中医学报, 2020, 35(7): 1469-1476.
- [9] LI Q, LIU Y, GUO J L. Effect of salidroside on growth of

human lung cancer A549 cell transplanted tumor in nude mice and its regulation on MAPK/ERK1/2 signaling pathway[J]. Acta Chin Med, 2020, 35(7): 1469-1476.

- [7] 石亚楠. 二陈汤通过 JNK 信号通路干预非小细胞肺癌多药耐药的研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.

SHI Y N. Effect of Erchen decoction on multidrug resistance of non-small cell lung cancer through JNK signaling pathway[D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2019.

- [8] 肖孟勇, 骆亚莉, 齐晓风, 等. 敦煌方大补肺汤联合顺铂对 Lewis 肺腺癌荷瘤小鼠的干预作用及分子机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(17): 95-104.

XIAO M Y, LUO Y L, QI X F, et al. Intervention effect and molecular mechanism of Dabufei decoction in Dunhuang formula combined with cisplatin on Lewis lung adenocarcinoma in mice[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2024, 30(17): 95-104.

- [9] 霍勇, 陈明. 心血管病实验动物学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 25-27.

HUO Y, CHEN M. Laboratory animal science of cardiovascular disease[M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2011: 25-27.

- [10] 李洪霖, 董良, 郝昱檀, 等. 温阳散结汤含药血清通过 NF- κ B 通路调控肿瘤相关巨噬细胞极化对 Lewis 肺癌的影响[J]. 现代肿瘤医学, 2022, 30(18): 3257-3264.

LI H L, DONG L, XI Y T, et al. Effect of Wenyang sanjie decoction medicated serum of Lewis lung cancer by regulating the polarization of tumor-associated macrophages through the NF- κ B pathway[J]. J Mod Oncol, 2022, 30(18): 3257-3264.

- [11] 汪一帆, 柴可群, 应栩华, 等. 中药抑肺饮对 Lewis 肺癌移植瘤生长及细胞 EMT 的影响[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(8): 1940-1942.

WANG Y F, CHAI K Q, YING X H, et al. Effect of traditional Chinese medicine formula Yifei yin on the growth of Lewis lung cancer xenografts and the regulation of

EMT in lung cancer cells[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2017, 35(8): 1940-1942.

- [12] 汪一帆, 应栩华, 陈观平, 等. 抑肺饮调控巨噬细胞表型干预肺癌转移的作用研究[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(3): 1389-1394.

WANG Y F, YING X H, CHEN G P, et al. Effects of Yifei yin on inhibiting lung cancer metastasis by regulating macrophage phenotype[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2022, 37(3): 1389-1394.

- [13] WANG M Q, YAN J Q, CAO X Y, et al. Hydrogen sulfide modulates epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis in non-small cell lung cancer via HIF-1 α activation[J]. Biochem Pharmacol, 2020, 172: 113775.

- [14] XU S G, YING K J. Association between HIF-1 α gene polymorphisms and lung cancer: a meta-analysis[J]. Medicine(Baltimore), 2020, 99(24): e20610.

- [15] 山倩. 蜈蚣、全蝎调控 PHD2/HIF-1 α 通路干预肺腺癌侵袭转移效应研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2019.

SHAN Q. Effect of centipede and scorpion regulating PHD2/HIF-1 α pathway on invasion and metastasis of lung adenocarcinoma[D]. Chengdu: Chengdu University of TCM, 2019.

- [16] 史琳, 张宁, 赵磊, 等. 中性粒细胞分泌 MMP-2 和 MMP-9 发挥促肿瘤作用[J]. 免疫学杂志, 2018, 34(3): 214-219.

SHI L, ZHANG N, ZHAO L, et al. Neutrophils act as tumor-promoting cells by secreting MMP-2 and MMP-9[J]. Immunol J, 2018, 34(3): 214-219.

- [17] 魏华民, 花宝金. 中药散剂在抗肿瘤转移实验中的研究[J]. 世界中医药, 2017, 12(2): 394-397.

WEI H M, HUA B J. Study of Chinese medicine power in anti-tumor metastasis experiment[J]. World Chin Med, 2017, 12(2): 394-397.

(收稿日期: 2024-08-19 修回日期: 2025-01-18)

(编辑: 邹丽娟)