

本文引用:王理槐,窦 娴,陈 晟,彭慧婷,何 晓,李涵予,杨 晓,刘 华,孙银辉. 扶正口服液通过内质网应激途径改善癌症恶病质肌肉萎缩的机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(11): 1809-1815.

## 扶正口服液通过内质网应激途径改善癌症恶病质肌肉萎缩的机制研究

王理槐<sup>1</sup>, 窦 娴<sup>2</sup>, 陈 晟<sup>2</sup>, 彭慧婷<sup>2</sup>, 何 晓<sup>2</sup>, 李涵予<sup>2</sup>, 杨 晓<sup>1</sup>, 刘 华<sup>1</sup>, 孙银辉<sup>2\*</sup>

(1.湖南中医药大学第一附属医院,湖南 长沙 410007;2.湖南中医药大学,湖南 长沙 410208)

**[摘要]** **目的** 从内质网应激途径探究扶正口服液改善癌症恶病质肌肉萎缩的机制。**方法** 体外共培养小鼠成肌细胞(C2C12)、小鼠结肠癌细胞(CT26),用携带内质网相关降解蛋白1(Derlin-1)干扰序列 siRNA 的慢病毒转染 C2C12 细胞,沉默 Derlin-1 基因后,采用 CT26 诱导萎缩以及扶正口服液含药血清干预进行实验,将经过不同处理的 C2C12 分为空载体组(A组)、沉默组(B组)、恶病质+空载体+对照血清组(C组)、恶病质+空载体+含药血清组(D组)、恶病质+沉默+含药血清组(E组),采用 Western blot、RT-PCR 检测干预前后 C2C12 细胞 Derlin-1、c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)、CCAAT 增强子结合蛋白同源蛋白(CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein, CHOP)、X 盒结合蛋白1(X-box binding protein-1, XBP1)、滑膜细胞凋亡抑制物1(synovial apoptosis inhibitor-1, SYVN1)蛋白及 mRNA 的表达水平。**结果** (1)Derlin-1 mRNA 及其蛋白表达:与 A 组比较,B、C、D 组下降( $P<0.05$ ),E 组表达升高( $P<0.05$ );与 B 组比较,C 组表达下降( $P<0.05$ ),D、E 组升高( $P<0.05$ );与 C 组比较,D、E 组表达升高( $P<0.05$ );与 D 组比,E 组表达升高( $P<0.05$ )。(2)凋亡检测结果:与 A 组比较,B、C、D、E 组凋亡率明显上升( $P<0.05$ );与 B 组比较,C、D、E 组凋亡率下降( $P<0.05$ );与 C 组比较,D、E 组凋亡率下降( $P<0.05$ );与 D 组比较,E 组凋亡率下降( $P<0.05$ )。(3)CHOP mRNA 及其蛋白、p-JNK 蛋白表达:与 A 组比较,B、C、D、E 组表达升高( $P<0.05$ );与 B 组比较,C 组表达升高( $P<0.05$ ),D、E 组表达下降( $P<0.05$ );与 C 组比较,D、E 组表达下降( $P<0.05$ );与 D 组比较,E 组表达下降( $P<0.05$ )。(4)XBP1、SYVN1 mRNA 及其蛋白表达:与 A 组比较,B 组表达下降( $P<0.05$ ),C、D、E 组表达升高( $P<0.05$ );与 B 组比较,C、D、E 组表达升高( $P<0.05$ );与 C 组比较,D、E 组表达升高( $P<0.05$ );与 D 组比较,E 组表达升高( $P<0.05$ )。**结论** Derlin-1 表达可以减轻 CT26 诱导的 C2C12 萎缩凋亡,这可能与 Derlin-1 参与调控内质网应激信号通路有关,扶正口服液可能通过上调内质网应激相关性降解核心蛋白 Derlin-1 的表达干预癌症恶病质。

**[关键词]** 癌症;恶病质;Derlin-1;扶正口服液;内质网应激;肌肉萎缩

**[中图分类号]**R273

**[文献标志码]**A

**[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.11.007

### Mechanism of Fuzheng Oral Liquid in improving muscle atrophy of cancer cachexia through endoplasmic reticulum stress pathway

WANG Lihuai<sup>1</sup>, DOU Xian<sup>2</sup>, CHNE Sheng<sup>2</sup>, PENG Huiting<sup>2</sup>, HE Xiao<sup>2</sup>, LI Hanyu<sup>2</sup>, YANG Xiao<sup>1</sup>, LIU Hua<sup>1</sup>, SUN Yinhui<sup>2\*</sup>

(1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China;

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China )

**[Abstract]** **Objective** To explore the mechanism of Fuzheng Oral Liquid in improving muscle atrophy of cancer cachexia through endoplasmic reticulum stress pathway. **Methods** Mice myoblasts (C2C12) and mice colon cancer cells (CT26) were co-cultured

**[收稿日期]**2022-09-01

**[基金项目]**湖南省中医肿瘤临床研究中心项目(2021SK4023);湖南省自然科学基金项目(2021JJ30525);湖南省教育厅优秀青年项目(19B419);湖南省中医药科研计划项目(2021214);湖南省卫生健康委员会科研计划项目(C2019092)。

**[第一作者]**王理槐,男,副主任医师,硕士研究生导师,研究方向:中西医结合防治恶性肿瘤。

**[通信作者]**\*孙银辉,女,副教授,E-mail:510236274@qq.com。

in vitro; C2C12 cells were transfected by lentivirus carrying endoplasmic reticulum-associated degradation protein 1 (Derlin-1) interference sequence siRNA. After silencing Derlin-1 gene, CT26 was used to induce atrophy, and Fuzheng Oral Liquid containing serum was used for intervention to conduct experiment. C2C12 treated with different treatments were divided into unloaded group (group A), silent group (group B), cachexia+unloaded carrier+control serum group (group C), cachexia+empty carrier+medicated serum group (group D) and cachexia+silent+medicated serum group (group E). Western blot and RT-PCR were used to detect the expression levels of Derlin-1, c-Jun N-terminal kinase (JNK), CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein (CHOP), X-box binding protein-1 (XBP1), synovial apoptosis inhibitor-1 (SYVN1) protein and mRNA in endoplasmic reticulum of C2C12 cells before and after the intervention. **Results** (1) Expression levels of Derlin-1 mRNA and the protein: compared with group A, the expression of groups B, C and D decreased ( $P<0.05$ ), and the expression of group E increased ( $P<0.05$ ); compared with group B, the expression of group C decreased ( $P<0.05$ ), and the expression levels of groups D and E increased ( $P<0.05$ ); compared with group C, the expression levels of groups D and E increased ( $P<0.05$ ); compared with group D, the expression of group E increased ( $P<0.05$ ). (2) Apoptosis detection results: compared with group A, the apoptosis rates of groups B, C, D and E significantly increased ( $P<0.05$ ); compared with group B, the apoptosis rates of groups C, D and E decreased ( $P<0.05$ ); compared with group C, the apoptosis rates of groups D and E decreased ( $P<0.05$ ); compared with group D, the apoptosis rate of group E decreased ( $P<0.05$ ). (3) The expression levels of CHOP mRNA and the protein and p-JNK protein: compared with group A, the expression levels of groups B, C, D and E increased ( $P<0.05$ ); compared with group B, the expression of group C increased ( $P<0.05$ ), and the expression levels of groups D and E decreased ( $P<0.05$ ); compared with group C, the expression levels of groups D and E decreased ( $P<0.05$ ); compared with group D, the expression of group E decreased ( $P<0.05$ ). (4) The expression levels of XBP1 and SYVN1 mRNA and the protein: compared with group A, the expression of group B decreased ( $P<0.05$ ), and the expression levels of groups C, D and E increased ( $P<0.05$ ); compared with group B, the expression levels of group C, D and E increased ( $P<0.05$ ); compared with group C, the expression levels of groups D and E increased ( $P<0.05$ ); compared with group D, the expression of group E increased ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Expression of Derlin-1 can relieve the atrophy and apoptosis of C2C12 myocytes induced by CT26, which may be related to the involvement of Derlin-1 in regulating endoplasmic reticulum stress signaling pathway. Fuzheng Oral Liquid may intervene cancer cachexia by up-regulating the expression of Derlin-1, the endoplasmic reticulum stress-related degradation core protein.

[**Keywords**] cancer; cachexia; Derlin-1; Fuzheng Oral Liquid; endoplasmic reticulum stress; muscle atrophy

流行病学调查数据显示,恶性肿瘤目前已是危害我国人民健康的最主要影响因素之一<sup>[1-2]</sup>。在恶性肿瘤进展过程中,癌症恶病质(cancer cachexia, CC)成为恶性肿瘤中晚期的常见并发症,发病率为60%~80%,死亡率则高达80%,已成为晚期癌症患者的直接死因之一<sup>[3-4]</sup>。现代医学营养支持只能在一定程度上缓解CC,总体疗效欠佳。目前,有研究认为内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)与CC骨骼肌萎缩密切相关<sup>[5]</sup>。适度的ERS时,内质网应激相关性降解(endoplasmic reticulum associated degradation, ERAD)通路被激活,有利于细胞恢复内环境稳态和维持存活,但持续或高强度的ERS将激活内质网应激性凋亡(endoplasmic reticulum stress induced apoptosis, ERSIA)途径导致细胞凋亡<sup>[6]</sup>。越来越多的实验证明,内质网相关降解蛋白1(Derlin-1)的表达与ERS关系密切,是调控细胞ERSIA的关键点<sup>[7-11]</sup>。CC属于中医学“虚劳”范畴,久病导致气血阴阳俱

虚,以脾肾不足为主,本着“虚则补之、损则益之”的治则,CC的治疗当着重脾肾双补、气血同调<sup>[12-13]</sup>。本课题组运用湖南中医药大学第一附属医院院内制剂扶正口服液治疗CC,疗效满意并对其机制进行了初步探索。本研究以Derlin-1介导的ERAD-ERSIA通路为研究切入点,通过体外培养小鼠成肌细胞(C2C12)并使用小鼠结肠癌细胞(CT26)代谢液制备C2C12萎缩模型,给予扶正口服液含药血清干预,从细胞、分子水平,初步探究扶正口服液改善CC的可能作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞及动物

C2C12(品系:C3H,批号:CL-0044)细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司;CT26(品系:BALB/c;批号:CL-0071)细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司;BALB/C小鼠40只购自长沙市天勤生物技术有

限公司,雄性,许可证号 SCXK(湘)1019-0014,体质量 25~30 g,鼠龄 8 周。

## 1.2 主要试剂与仪器

1.2.1 主要试剂 总 RNA 提取试剂盒(批号:R1200)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号:PC0020)、30%制胶液(批号:A1010)均来自索莱宝生物技术有限公司;通用逆转录试剂盒(批号:11141ES60)、RT-PCR 荧光定量试剂盒(批号:11201ES08)均来自翊圣生物科技有限公司;TEMED(批号:Amresc00761)来自卡迈舒(上海)生物科技有限公司;蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物(批号:P1045)来自碧云天生物技术研究所;SYVN1(批号:DF12235)、IRE1(批号:DF7709)、XBP1(批号:AF5110)、DDIT3(批号:DF6025)、p-JNK(批号:AF3318)均来自江苏亲科生物研究中心有限公司;Derlin-1(批号:Ab176732)来自艾博抗(上海)贸易有限公司;羊抗兔-HRP(批号:bs-0295G-HRP)来自北京博奥森生物技术有限公司;扶正口服液(批号:20210518)来自湖南中医药大学第一附属医院药剂科。

1.2.2 主要仪器 电泳仪[安诺伦(北京)生物技术有限公司,型号:1645070];电转仪[安诺伦(北京)生物技术有限公司,型号:BE6085];pH 计[梅特勒托利多科技(上海)有限公司,型号:LP115];酶标仪(美国博腾仪器有限公司,型号:800TS);全自动化学发光图像分析系统(上海医疗器械,型号:5200);台式低速离心机(上海医疗器械,型号:80-2);RT-PCR 仪(苏州雅睿生物技术股份有限公司,型号:MA-6000);核酸检测仪(杭州遂真生物技术有限公司,型号:F-1100)。

## 1.3 方法

1.3.1 细胞培养 按照细胞培养方法(84%DMEM 培养基、15%胎牛血清及 1%青-链霉素)进行培养传代,并于 37 °C、5%CO<sub>2</sub>、95%湿度的细胞培养箱中培养 C2C12 细胞、CT26 细胞,完全培养基成分配比为 89%RPMI-1640 培养基+10%胎牛血清+1%PB 双抗,将细胞置于细胞培养箱(37 °C、5%CO<sub>2</sub>、95%湿度)中培养,隔 1 天换液 1 次。细胞长满培养瓶底约 90%时,PBS 冲洗后胰酶消化进行细胞传代,取对数生长期的细胞进行实验研究。

1.3.2 肌细胞萎缩模型建立 利用 CT26 诱导 C2C12 细胞萎缩<sup>[1]</sup>,用源 CT26 细胞的培养液处理 C2C12 细胞,收集 CT26 细胞的代谢液备用。弃 C2C12 细胞上清液,用 PBS 清洗 1 次,加入 70%

CT26 细胞滤后代代谢液+30%C2C12 完全培养基,48 h 后于倒置显微镜观察并记录细胞形态,可观察到肌管细胞萎缩现象,提示模型制备成功。

1.3.3 细胞转染 用于敲除 Derlin-1 的靶序列(表 1),针对 Derlin-1 和阴性对照干扰 RNA(siRNA)委托吉凯基因化学技术有限公司提供。转染前 1 天,将 C2C12 细胞传入 24 孔板,5×10<sup>4</sup> 个/孔,加入完全培养基,50 μL/孔,待转染时细胞融合达到 30%~50%时进行慢病毒感染。稀释病毒,稀释浓度为 1×10<sup>8</sup> 个/mL。病毒悬液加完全培养基进行稀释,稀释病毒悬液、完全培养基、感染 A 液配制成完全液感染病毒,按照每孔 20 μL 加入 24 孔板中,按同样的方法同时进行阴性对照组的感染,感染 24 h 后更换完全培养基,继续培养 48 h,收集细胞后行 Western blot 和 RT-PCR 检测 Derlin-1 蛋白及其 mRNA 表达。

1.3.4 制备含药血清 将 40 只 BALB/C 小鼠,随机分成空白血清组和含药血清组,每组 20 只。含药血清组以扶正口服液灌胃,60 kg 给药量为 30 mL/d,根据人和小鼠的等效计量比[小鼠作用用剂量=30×9.1×(30 mL/60 kg)],小鼠给药量为 136.5 mL/(kg·d);空白血清组以同等剂量生理盐水灌胃。灌胃 1 次/d,持续 7 d,第 7 天灌胃 1 h 后,眼眶静脉丛采血,采集的各组血液保存于 4 °C 冰箱,24 h 内以 4 °C、3000 r/min、半径 8 cm 离心 15 min,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,无菌试管分装并标记组别及日期,放置于-20 °C 冰箱内保存。

1.3.5 分组干预 将含有 Derlin-1 慢病毒稳定感染的 C2C12 传代细胞和空载细胞以 5×10<sup>4</sup> 个/cm<sup>2</sup> 的密度接种在 6 孔板,分为空载组(A 组)、沉默组(B 组)、恶病质+空载体+对照血清组(C 组)、恶病质+空载体+含药血清组(D 组)、恶病质+沉默+含药血清组(E 组)。24 h 后 PBS 洗涤 3 次后,A、B 组加入普通培养基,在 C、D、E 组分加入含有 CT26 细胞条件培养基,培养 96 h 即可构建恶病质细胞萎缩模型。96 h 换液后在 A、B、C 组加入 8%空白血清培养基,D、E 组加入 8%含药血清培养基,每组 3 个复孔,在加药后 36 h 收取细胞,用于指标测定。

## 1.4 指标检测

1.4.1 RT-PCR 检测 mRNA 表达 用 TRIzol 试剂提取组织或细胞中的 RNA,用 Bio-Rad 的 ScriptcD-NAsynthesis 试剂盒行逆转录制备 cDNA。

mRNA 定量使用 Qiagen 公司的 QuantiTect SYBR

Green PCR 试剂盒,循环条件为:95 °C 15 min 进行 45 个循环,每个再进行 94 °C 15 s,57.5 °C 20 s,72 °C 20 s。测定结果分析使用 Phaff 方法,计算基因表达的相对拷贝数。引物设计见表1。

表1 引物列表

基因	引物序列(5'-3')	长度/bp
CHOP	正向:ACCTTCACTACTCTTGACCCTG	81
	反向:GATGTGCGTGTGACCTCTGT	
Derlin-1	正向:ACAGAGACCTGATCGTGTGCT	187
	反向:TTGAATCCAAGGATAACCCAAGG	
XBP1	正向:AGTGATTGATCCAGACAAGCG	168
	反向:GCGGGGTCATACCAAAACAGTA	
GAPDH	正向:AGAAGCTGCTGAAGCAGGCATCT	84
	反向:CGGCATCGAAGGTGAAGACTG	

**1.4.2 Western blot 检测蛋白相对表达** 在RIPA裂解缓冲液中提取来自细胞的总蛋白,并使用 Bradford 方法进行定量。通过 SDS-PAGE 分离蛋白质样品并转移到 PVDF 膜,并在 4 °C 下与用 1% BSA 封闭液稀释相应的一抗,使 PVDF 膜浸泡于一抗孵育液中,4 °C 孵育过夜。稀释倍数如下:GAPDH 1:10 000 稀释、Derlin-1 1:2000 稀释、p-JNK 1:2000 稀释、CHOP 1:500 稀释、XBP1 1:1000 稀释、SYVN1 1:2000 稀释,用封闭液稀释 HRP 标记二抗 1:5000 稀释与过氧化物酶偶联的二抗在 37 °C 温育 2 h。使用 ECL 试剂盒显现 PVDF 膜上的靶蛋白,曝光结果使用 Image J 软件分析灰度值。

**1.4.3 流式细胞术检测细胞凋亡** 细胞接种于 6 孔板,待细胞长至 70% 融合后分别加入空载 siRNA 和

Derlin-1 siRNA 转染细胞。转染后 48 h,C、D、E 组加入 70% CT26 细胞滤后代谢液+30% C2C12 完全培养基,5% CO<sub>2</sub> 培养箱内 37 °C 培养 24 h 后,C 组加入对照血清,D、E 组加入含药血清,24 h 后不用含 EDTA 的胰酶消化收集细胞,PBS 离心洗涤 2 次,用 400 μL Binding Buffer 悬浮,加 5 μL Annexin V-FITC,混匀,加 5 μL 碘化丙啶混匀,室温避光 10 min,用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

### 1.5 统计学处理

采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,计量资料数据用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。若符合参数检验条件,组间比较采用单因素方差分析,两两比较用 SNK-*q* 检验;若不符合参数检验条件,两独立样本采用近似 *t* 检验,两两比较用秩和检验法。均以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 C2C12 细胞中慢病毒转染后 Derlin-1 表达

与 A 组比较,B 组荧光表达减弱( $P < 0.05$ )(图 1A);与 A 组比较,B 组 Derlin-1 蛋白及其 mRNA 表达亦降低( $P < 0.05$ )(图 1B、1C)。

### 2.2 各组 Derlin-1 表达及 C2C12 细胞凋亡比较

与 A 组比较,B、C、D 组 Derlin-1 mRNA 及其蛋白表达下降( $P < 0.05$ ),E 组 Derlin-1 mRNA 及其蛋白表达升高( $P < 0.05$ );与 B 组比较,C 组 Derlin-1 mRNA 及其蛋白表达下降( $P < 0.05$ ),D、E 组 Derlin-1 mRNA 及其蛋白表达升高( $P < 0.05$ );与 C 组比较,D、E 组 Derlin-1 mRNA 及其蛋白表达升高( $P < 0.05$ );与

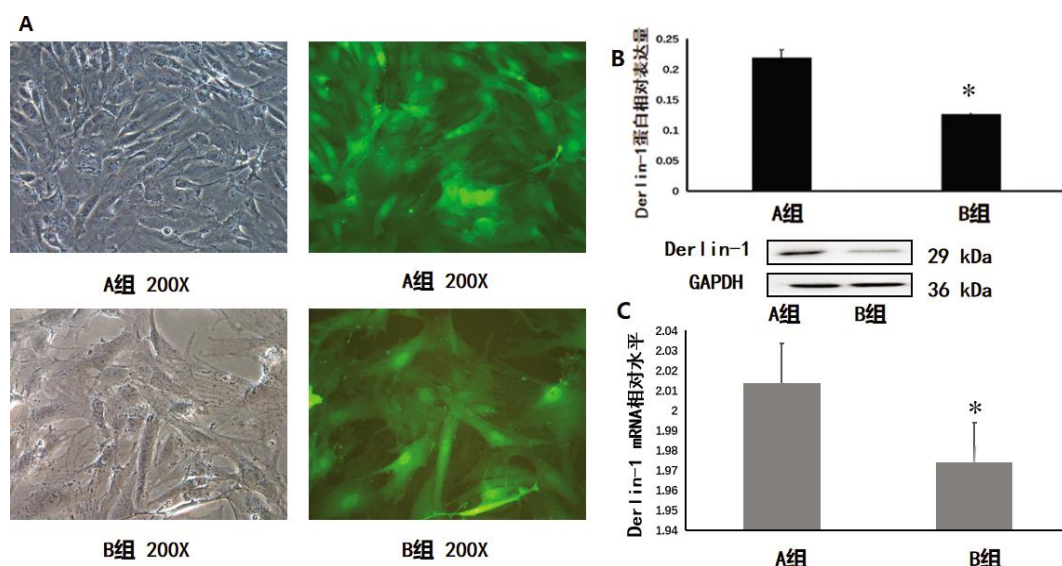


图1 荧光显微镜下 C2C12 细胞形态学变化、Derlin-1 蛋白及其 mRNA 表达比较

注:与 A 组比较,\* $P < 0.05$ 。

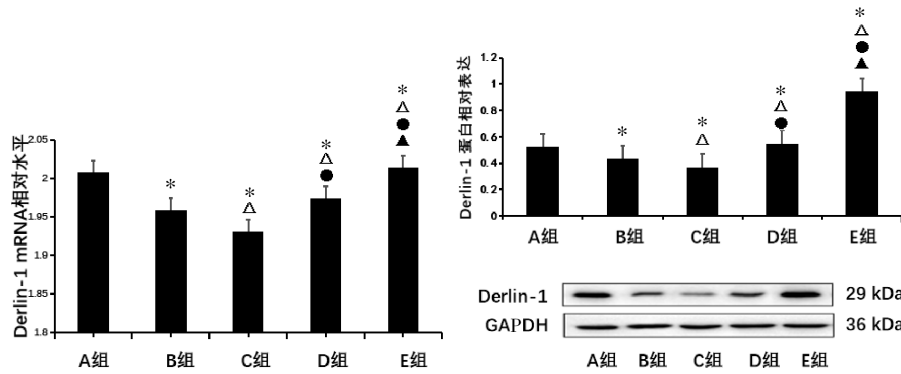


图2 C2C12细胞各组中Derlin-1 mRNA及其蛋白表达比较

注:与A组比较,\* $P < 0.05$ ;与B组比较, $\Delta P < 0.05$ ;与C组比较, $\bullet P < 0.05$ ;与D组比较, $\blacktriangle P < 0.05$ 。

D组比较,E组 Derlin-1 mRNA 及其蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ )。详见图2。

与A组比较,B、C、D、E组凋亡率明显上升 ( $P < 0.05$ );与B组比较,C、D、E组凋亡率下降 ( $P < 0.05$ );与C组比较,D、E组凋亡率下降 ( $P < 0.05$ );与D组比较,E组凋亡率下降 ( $P < 0.05$ )。详见图3。

### 2.3 各组细胞中CHOP mRNA及其蛋白、p-JNK蛋白表达比较

与A组比较,B、C、D、E组CHOP mRNA及其蛋白、p-JNK蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ );与B组比较,C组CHOP mRNA及其蛋白、p-JNK蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ ),D、E组CHOP mRNA及其蛋白、p-JNK蛋白

表达下降 ( $P < 0.05$ );与C组比较,D、E组CHOP mRNA及其蛋白、p-JNK蛋白表达下降 ( $P < 0.05$ );与D组比较,E组p-JNK蛋白表达下降 ( $P < 0.05$ )。详见图4。

### 2.4 各组细胞中SYVN1、XBP1 mRNA及其蛋白表达比较

与A组比较,B组XBP1、SYVN1 mRNA及其蛋白表达下降 ( $P < 0.05$ ),C、D、E组XBP1、SYVN1 mRNA及其蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ );与B组比较,C、D、E组XBP1、SYVN1 mRNA及其蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ );与C组比较,D、E组XBP1、SYVN1 mRNA及其蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ );与D组比较,E组XBP1、SYVN1 mRNA及其蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ )。详见图5。

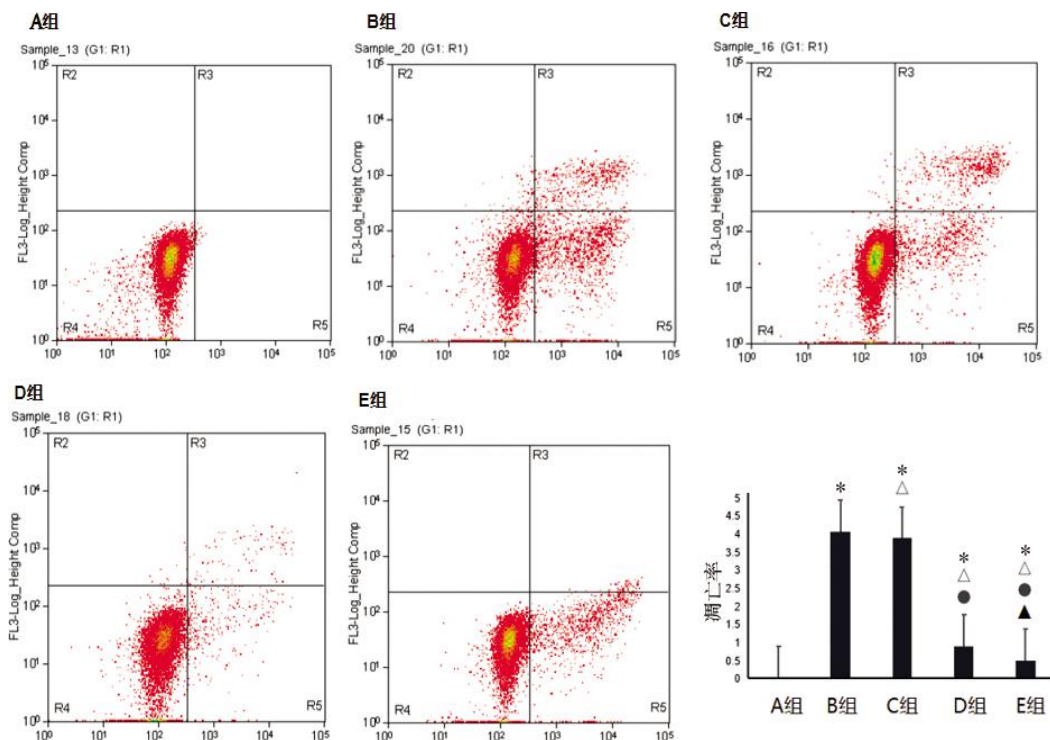


图3 各组C2C12细胞凋亡率比较

注:R2.早期凋亡细胞,R3.晚期凋亡细胞,R4.活细胞,R5.死亡细胞;与A组比较,\* $P < 0.05$ ;与B组比较, $\Delta P < 0.05$ ;与C组比较, $\bullet P < 0.05$ ;与D组比较, $\blacktriangle P < 0.05$ 。

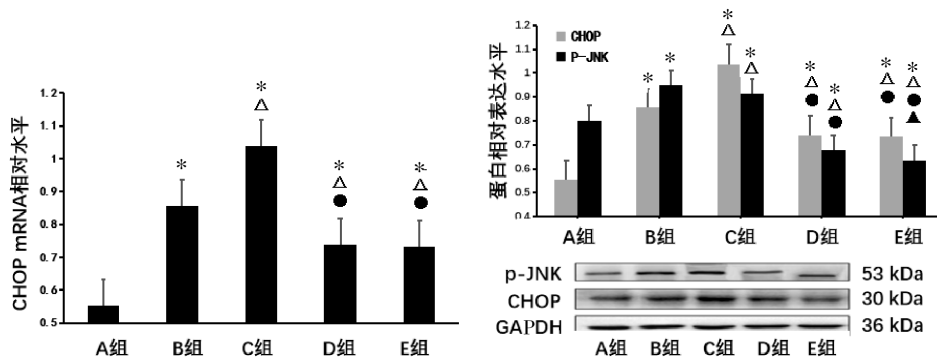


图4 各组 C2C12 细胞中 CHOP、p-JNK mRNA 及其蛋白表达比较

注:与 A 组比较,\* $P < 0.05$ ;与 B 组比较, $\Delta P < 0.05$ ;与 C 组比较, $\bullet P < 0.05$ ;与 D 组比较, $\blacktriangle P < 0.05$ 。

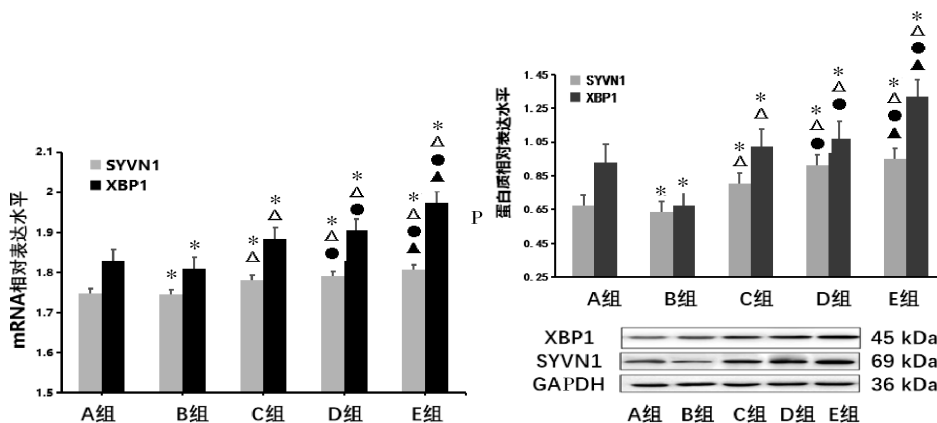


图5 各组 c2c12 细胞中 SYVN1、XBP1 mRNA 及其蛋白表达比较

注:与 A 组比较,\* $P < 0.05$ ;与 B 组比较, $\Delta P < 0.05$ ;与 C 组比较, $\bullet P < 0.05$ ;与 D 组比较, $\blacktriangle P < 0.05$ 。

### 3 讨论

CC 是一种破坏性、多因素且通常不可逆的综合征,根据肿瘤类型的不同,它会影响 50%~80%的癌症患者,导致大量患者的体质量减轻,影响后续抗癌治疗的依从性。迄今为止,尚无有效的干预措施完全逆转恶病质。因此,探索 CC 潜在的分子机制寻求有效的干预策略有重要意义<sup>[14]</sup>。骨骼肌萎缩被认为是 CC 发生发展的重要原因之一,因此,探索改善癌性肌肉萎缩的线粒体机制,寻求干预肌肉萎缩作用靶点的有效药物得以引起研究者的重视。目前的研究提示,中医药可通过促进线粒体生成和改善线粒体氧化磷酸化功能改善癌因性肌肉萎缩<sup>[15]</sup>。

《素问·至真要大论》中有“诸湿肿满,皆属于脾”,在癌症后期,脏腑功能受损,水谷精微生成运化功能失常,对肌肉供养不足,痰、饮、湿、瘀等病理产物停聚,再作为病理因素作用于机体,形成恶性循环,正所谓“百病皆由脾胃衰而生”。夏孟蛟等<sup>[16]</sup>认为 CC 的关键病机是“寒湿入营”,大病后期,脾肾阳气均虚,阴寒内生,湿阻经络,深入探究了阳气在 CC 发生发展过程中的关键地位,强调化气温阳是治疗

的重要治则。张媛等<sup>[17]</sup>认为癌症后期正虚邪实并存,不忘阴虚合并血瘀这一特殊证型,强调以养阴填精、活血化瘀为主的治法,破除阴虚与血瘀互为因果的恶性循环,改善患者生活质量。因此,中医治疗 CC 的关键在于固护正气、健脾补肾、补气养血。在此指导下,本科室运用院内制剂扶正口服液在临床上干预 CC 获得了一定疗效,本次细胞实验结果也表明,在 CT26 细胞诱导的 C2C12 肌细胞萎缩模型中,经扶正口服液的干预,能够明显减缓 C2C12 细胞的萎缩。

近年来研究发现,Derlin-1 的表达异常与肿瘤等多种疾病相关,肺癌中的研究也提示 Derlin-1 可在 61.86%的非小细胞肺癌中表达,并与肿瘤的淋巴转移及肿瘤的 TNM 分期有关,Derlin-1 的高度表达与癌症患者的预后呈负相关<sup>[18]</sup>。DONG 等<sup>[19]</sup>注意到 Derlin-1 在非小细胞肺癌中过表达,免疫沉淀证实 Derlin-1 通过 EGFR-ERK 介导的 MMP-2 和 MMP-9 上调促进侵袭,进一步的分析提示 Derlin-1 过表达诱导 EGFR 磷酸化。目前,研究已表明内质网应激反应与 Derlin-1 的确存在一定的联系,又有研究发现,Derlin-1 在过表达后,UPR 激活的程度降低,Bip 表达降低,XBP1 拼接形式(XBP1s)减少和XBP1 非拼接

形式(XBP1u)表达增加<sup>[20]</sup>。

本研究结果显示,沉默 C2C12 中 Derlin-1 基因后,肌细胞萎缩明显,且细胞中 CHOP、p-JNK 表达升高,XBP1、SYVN1 表达降低,而采用扶正口服液含药血清干预后,C2C12 细胞中 CHOP、p-JNK 蛋白表达降低,XBP1、SYVN1 表达升高。以上结果提示 Derlin-1 可通过下调肌细胞中 CHOP、p-JNK,上调 XBP1、SYVN1 而减轻 CT26 诱导的 C2C12 肌细胞萎缩凋亡,这可能与 Derlin-1 参与调控 ERS 信号通路有关。扶正口服液可能是通过上调 ERAD 核心蛋白 Derlin-1 的表达而发挥干预 CC 的作用,为“固护正气、健脾补肾、补气养血”的扶正口服液治疗 CC 的功效提供现代科学依据,为临床上治疗 CC 提供新的思路。

### 参考文献

- [1] KIM A, IM M, MA J Y. A novel herbal formula, SGE, induces endoplasmic reticulum stress-mediated cancer cell death and alleviates cachexia symptoms induced by colon-26 adenocarcinoma[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(23): 16284-16296.
- [2] VON HAEHLING S, ANKER S D. Prevalence, incidence and clinical impact of cachexia: Facts and numbers-update 2014[J]. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 2014, 5 (4): 261-263.
- [3] DEV R. Measuring cachexia-diagnostic criteria[J]. *Annals of Palliative Medicine*, 2019, 8(1): 24-32.
- [4] PATEL H J, PATEL B M. TNF- $\alpha$  and cancer cachexia: Molecular insights and clinical implications[J]. *Life Sciences*, 2017, 170: 56-63.
- [5] KELSEN S G. Respiratory epithelial cell responses to cigarette smoke: The unfolded protein response[J]. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 2012, 25(6): 447-452.
- [6] CHRISTIANSON J C, YE Y H. Cleaning up in the endoplasmic reticulum: Ubiquitin in charge[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2014, 21(4): 325-335.
- [7] MEHNERT M, SOMMER T, JAROSCH E. Der1 promotes movement of misfolded proteins through the endoplasmic reticulum membrane[J]. *Nature Cell Biology*, 2014, 16(1): 77-86.
- [8] IIDA Y, FUJIMORI T, OKAWA K, et al. SEL1L protein critically determines the stability of the HRD1-SEL1L endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) complex to optimize the degradation kinetics of ERAD substrates[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(19): 16929-16939.
- [9] TAN X M, HE X L, JIANG Z H, et al. Derlin-1 is overexpressed in human colon cancer and promotes cancer cell proliferation[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2015, 408(1/2): 205-213.
- [10] WANG J, HUA H, RAN Y L, et al. Derlin-1 is overexpressed in human breast carcinoma and protects cancer cells from endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis[J]. *Breast Cancer Research*, 2008, 10(1): R7.
- [11] 苏雅,祝永福,夏黎明.中医辨证治疗癌症恶病质临床疗效观察[J]. *中医药临床杂志*, 2015, 27(9): 1251-1254.
- [12] 王鹏,邹玺,刘沈林.香砂六君子汤加减为主治疗癌症食欲不振/恶病质综合征的临床疗效观察[J]. *中国中西医结合杂志*, 2018, 34(7): 5-7.
- [13] ARGILÉS J M, BUSQUETS S, STEMLER B, et al. Cancer cachexia: Understanding the molecular basis[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2014, 14(11): 754-762.
- [14] BARACOS V E, MARTIN L, KORC M, et al. Cancer-associated cachexia[J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2018, 4(1): 1-18.
- [15] 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.
- [16] 夏孟蛟,金钊,郑川,等.“寒湿入营”与肿瘤恶病质[J]. *时珍国医国药*, 2018, 29(3): 646-648.
- [17] 张媛,罗玲,陶劲.养阴填精化痰剂对癌症恶病质患者的临床疗效观察[J]. *南京中医药大学学报*, 2018, 34(6): 561-564.
- [18] ZENG J S, TIAN Q H, ZENG Z M, et al. Derlin-1 exhibits oncogenic activities and indicates an unfavorable prognosis in breast cancer[J]. *Cell Biology International*, 2020, 44(2): 593-602.
- [19] DONG Q Z, WANG Y, TANG Z P, et al. Derlin-1 is overexpressed in non-small cell lung cancer and promotes cancer cell invasion via EGFR-ERK-mediated up-regulation of MMP-2 and MMP-9[J]. *The American Journal of Pathology*, 2013, 182(3): 954-964.
- [20] KADOWAKI H, SATRIMAFITRAH P, TAKAMI Y, et al. Molecular mechanism of ER stress-induced pre-emptive quality control involving association of the translocon, Derlin-1, and HRD1[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 7317.

(本文编辑 匡静之)