

本文引用:孙银辉,何晓,李涵宇,窦娴,陈晟,彭慧婷,杨晓,刘华,李菁,王理槐.扶正口服液对诱导性癌症恶病质裸鼠骨骼肌中ERAD/ERSIA通路的影响[J].湖南中医药大学学报,2022,42(11):1816-1822.

扶正口服液对诱导性癌症恶病质裸鼠骨骼肌中 ERAD/ERSIA 通路的影响

孙银辉¹,何晓¹,李涵宇¹,窦娴¹,陈晟¹,彭慧婷¹,杨晓²,刘华²,李菁²,王理槐^{2*}
(1.湖南中医药大学,湖南长沙410208;2.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙410007)

[摘要] 目的 探究扶正口服液对癌症恶病质(cancer cachexia, CC)裸鼠骨骼肌内质网应激相关性降解(ER-associated degradation, ERAD)/内质网应激性凋亡(endoplasmic reticulum stress induced apoptosis, ERSIA)信号通路的影响。方法 选取36只6~7周龄BALB/c-nu SPF级裸鼠建立脾虚证模型,随机抽取12只均分成A组(正常裸鼠生理盐水灌胃56d)、B组(正常裸鼠扶正口服液灌胃56d);剩余24只进行CC造模,分为C组(CC后生理盐水灌胃14d)、D组(CC后扶正口服液灌胃14d)、E组(CC后生理盐水灌胃28d)、F组(CC后扶正口服液灌胃28d)。比较各组裸鼠的体质量、摄食量、肿瘤体积、骨骼肌病理变化。通过Western blot、RT-PCR检测扶正口服液对不同CC阶段裸鼠骨骼肌中ERSIA通路中CCAAT增强子结合蛋白同源蛋白(CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein, CHOP)、c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)表达水平;ERAD通路中X盒结合蛋白1(X-box binding protein-1, XBP1)、内质网跨膜蛋白激酶1(inositol requiring enzyme-1, IRE1)、内质网相关降解蛋白1(Derlin-1)、滑膜细胞凋亡抑制物1(synovial apoptosis inhibitor-1, SYVN1)表达水平。结果 与A、B组比较,C、D、E、F组摄食量均下降($P<0.05$);与C组比较,D组摄食量增加,E、F组摄食量下降($P<0.05$);与D组比较,E、F组摄食量下降($P<0.05$);与E组比较,F组摄食量增加($P<0.05$)。与A、B组比较,第6周C、D组体质量下降($P<0.05$),第8周E、F组体质量下降($P<0.05$);与C组比较,第6周D组体质量增加($P<0.05$);与E组比较,第8周F组体质量增加($P<0.05$)。与C组比较,D组肿瘤体积减小($P<0.05$),E组肿瘤体积增大($P<0.05$);与E组比较,F组肿瘤体积减小($P<0.05$)。与A、B组比较,C、E组裸鼠肌肉组织萎缩,其间隙增大,而D、F组间隙明显缩小,组织萎缩缓解。与A组比较,B组CHOP mRNA,CHOP、p-JNK蛋白表达下降($P<0.05$);与B组比较,C组CHOP mRNA,CHOP、p-JNK蛋白表达升高($P<0.05$);与C组比较,D组CHOP mRNA,CHOP、p-JNK蛋白表达下降($P<0.05$);与E组比较,F组CHOP mRNA,CHOP、p-JNK蛋白表达下降($P<0.05$)。与A组比较,B组XBP1、IRE1、Derlin-1、SYVN1蛋白及mRNA表达升高($P<0.05$);与B组比较,C组XBP1、Derlin-1、SYVN1蛋白及mRNA表达下降($P<0.05$),IRE1 mRNA及蛋白表达升高($P<0.05$);与C组比较,D组XBP1、Derlin-1、SYVN1 mRNA及蛋白表达升高($P<0.05$),IRE1 mRNA及蛋白表达下降($P<0.05$);与E组比较,F组XBP1、IRE1、Derlin-1、SYVN1蛋白及mRNA表达升高($P<0.05$)。结论 扶正口服液可通过上调骨骼肌中ERAD相关蛋白表达,抑制ERSIA凋亡蛋白表达,以逆转ERAD-ERSIA信号稳态失衡。其改善CC的机制可能与提高肌细胞对ERS的耐受能力并保护肌细胞免于凋亡有关。

[关键词] 癌症恶病质;扶正口服液;ERAD/ERSIA通路;裸鼠;骨骼肌

[中图分类号]R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.11.008

Effects of Fuzheng Oral Liquid on ERAD/ERSIA pathway in skeletal muscle of induced cancer cachexia nude mice

SUN Yin-hui¹, HE Xiao¹, LI Han-yu¹, DOU Xian¹, CHEN Sheng¹, PENG Hui-ting¹, YANG Xiao², LIU Hua², LI Jing², WANG Lihui^{2*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Hospital of

Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

[收稿日期]2022-09-01

[基金项目]湖南省中医肿瘤临床研究中心平台项目(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]孙银辉,女,硕士,讲师,研究方向:肿瘤临床基础。

[通信作者]*王理槐,男,博士研究生,副主任医师,硕士研究生导师,E-mail:510236274@qq.com。

[Abstract] Objective To investigate the effects of Fuzheng Oral Liquid on ER-associated degradation (ERAD)/endoplasmic reticulum stress induced apoptosis (ERSIA) signaling pathway in skeletal muscle of nude mice with cancer cachexia (CC). **Methods** A total of 36 BALB/c-nu SPF nude mice aged 6–7 weeks were selected to establish spleen deficiency syndrome model and 12 nude mice were randomly divided into group A (normal nude mice were administered with normal saline by gavage for 56 d), group B (normal nude mice were given Fuzheng Oral Liquid for 56 d); the remaining 24 were used for CC modeling, which were equally divided into group C (mice were administered with normal saline by gavage for 14 d after CC), group D (mice were treated with Fuzheng Oral Liquid for 14 d after CC), and group E (mice were treated with normal saline by gavage for 28 d after CC), group F (mice were treated with Fuzheng Oral Liquid for 28 d after CC). The body weight, food intake, tumor volume and pathological changes of skeletal muscle for each group were compared. Western blot and RT-PCR were used to detect the expression levels of CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein (CHOP) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) in ERSIA pathway, and the expression levels of X-box binding protein-1 (XBP1), inositol requiring enzyme-1 (IRE1), Derlin-1, synovial apoptosis inhibitor-1 (SYVN1) in ERAD pathway in skeletal muscle of nude mice at different stages of CC. **Results** Compared with groups A and B, the food intake of nude mice in groups C, D, E and F decreased ($P<0.05$); compared with group C, the food intake of group D increased, and the food intake of groups E and F decreased ($P<0.05$); compared with group D, the food intake of groups E and F decreased ($P<0.05$); compared with group E, the food intake of group F increased ($P<0.05$). Compared with groups A and B, the body weight of groups C and D decreased at 6th week ($P<0.05$), the body weight of groups E and F decreased at 8th week ($P<0.05$); compared with group C, the body weight of group D increased at 6th week ($P<0.05$); compared with group E, the body weight in group F increased at 8th week ($P<0.05$). Compared with group C, the tumor volume in group D decreased ($P<0.05$), and the tumor volume in group E significantly increased ($P<0.05$); compared with group E, the tumor volume in group F decreased ($P<0.05$). Compared with groups A and B, the muscle tissue of nude mice in groups C and E was atrophic and the gap increased, while the gap was significantly reduced and the tissue atrophy was alleviated in groups D and F. Compared with group A, the expression levels of CHOP mRNA, CHOP and p-JNK protein in group B decreased ($P<0.05$); compared with group B, CHOP mRNA, CHOP and p-JNK protein of group C significantly increased ($P<0.05$); compared with group C, the expression levels of CHOP mRNA, CHOP and p-JNK protein of group D decreased ($P<0.05$); compared with group E, the expression levels of CHOP mRNA, CHOP and p-JNK protein in group F decreased ($P<0.05$). Compared with group A, the protein and mRNA expression levels of XBP1, IRE1, Derlin-1, SYVN1 in group B increased ($P<0.05$); compared with group B, the protein and mRNA expression levels of XBP1, Derlin-1 and SYVN1 in group C decreased ($P<0.05$), while the mRNA and protein expression of IRE1 increased ($P<0.05$); compared with group C, the mRNA and protein expression levels of XBP1, Derlin-1 and SYVN1 in group D increased ($P<0.05$), while the mRNA and protein expression of IRE1 decreased ($P<0.05$); compared with group E, the protein and mRNA expression levels of XBP1, IRE1, Derlin-1 and SYVN1 of group F significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion** Fuzheng Oral Liquid could reverse the homeostasis imbalance of ERAD-ERSIA signaling by up-regulating the expression of ERAD-related proteins in skeletal muscle and inhibiting the expression of ERSIA apoptotic proteins. The mechanism of improving CC may be related to improving the tolerance of myocytes to ERS and protecting myocytes from apoptosis.

[Keywords] cancer; cachexia; Fuzheng Oral Liquid; ERAD/ERSIA pathways; nude mice; skeletal muscle

癌症恶病质(cancer cachexia, CC)是一组常见于恶性肿瘤晚期消耗性症状的总称,是肿瘤患者死亡的原因之一,但其发病机制及有效治疗策略尚待探索。内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)介导的内质网应激相关性降解(ER-associated degradation, ERAD)-内质网应激性凋亡(endoplasmic reticulum stress induced apoptosis, ERSIA)途径是机体细胞内蛋白质稳态和质量控制的关键机制,ERAD-ERSIA 稳态失衡在 CC 骨骼肌消耗过程中扮演重要角色^[1],多项研究^[2-3]证实,上调 ERAD 途径蛋白表达抗凋亡对细胞具有保护作用。然而如何通过 ERAD 途径影响 CC 肌肉代谢的抗凋亡机制则缺乏研究。课题组基于“脾在体合肉,主四肢,肾在体

合骨”的生理特性及明代李中梓“脾肾互赞”学说,提出了“健脾益肾法干预 CC 骨骼肌消耗”的治疗思路,并创湖南中医药大学第一附属医院院内制剂扶正口服液(主要由茯苓、党参、太子参、熟地黄、黄精、女贞子、淫羊藿等组成)。前期^[4-8]研究证实,扶正口服液可通过降低肿瘤微环境中炎症因子的表达改善 CC,但其机制有待深入研究。基于此,本研究拟使用扶正口服液干预不同阶段的 CC 模型裸鼠,观察不同时间段肿瘤体积、裸鼠摄食量、体质量变化,检测 ERAD 通路调控蛋白 X 盒结合蛋白 1(X-box binding protein1, XBP1)、内质网跨膜蛋白激酶 1(inositol requiring enzyme 1, IRE1)、内质网相关降解蛋白 1(Derlin-1)、滑膜细胞凋亡抑制物 1(synovial apopto-

sis inhibitor 1, SYVN1) 表达和ERSIA 信号通路CCAAT 增强子结合蛋白同源蛋白 (CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein, CHOP)、c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK) 蛋白表达情况, 探讨扶正口服液对 CC 的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

BALB/c-nu 裸鼠 36 只, 雄性, 购自湖南安生美药物研究院有限公司, 许可证号: SCXK(湘)2019-0004, 鼠龄 4~5 周。分笼喂养, 自由采食, 温度为(24±3) °C, 湿度为 40%~60%。实验全程完成于湖南中医药大学动物实验中心。研究经湖南中医药大学动物实验伦理委员会审批(审批号: LL2020052601), 对动物的各种处理均遵循中华人民共和国科技部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》的相关规定。

1.2 实验药品、试剂及器材

扶正口服液(湖南中医药大学第一附属医院, 批号: 20210518); SYVN1、IRE1、XBP1、CHOP、p-JNK(江苏亲科生物研究中心有限公司, 批号: DF12235、DF7709、AF5110、DF6025、AF3318); Derlin-1[艾博抗(上海)贸易有限公司, 批号: Ab176732]; 羊抗兔-HRP(北京博奥森生物技术有限公司, 批号: bs-0295G-HRP); 30%制胶液(索莱宝生物技术有限公司, 批号: A1010)。YLS-Q6 型裸鼠灌胃器(淮北正华生物仪器设备有限公司); Leica Dm LB2 型显微镜(美嘉仪器股份有限公司); HXT/C 型低温解剖操作台(上海优浦科学仪器有限公司); H2050R-1 型低温高速离心机(上海华岩设备有限公司); ACS-3 型电子计价秤(上海台衡仪器仪表有限公司)。

1.3 CC 模型建立^[9-11]及分组干预

选取 36 只 6~7 周龄 BALB/c-nu SPF 级裸鼠, 依据前期研究基础及相关文献^[9-10]造模, 采用苦寒泻下、饥饿失常、力竭运动三因素诱导法诱导 14 d, 建立脾虚证裸鼠模型, 随机取 12 只分为 A 组(正常裸鼠生理盐水灌胃)、B 组(正常裸鼠扶正口服液灌胃)。剩余 24 只脾虚证裸鼠右前腋下接种 CT26 结肠癌细胞, 接种剂量 0.1 mL/只, 接种过程在 1 h 完成。接种后同时采用苦寒泻下、饥饿失常两因素诱导法, 继续诱导 14 d, 致瘤后体质量显著下降, 裸鼠右侧腋下扪及肿块, 精神萎靡, 无明显自主活动, 同时出现摄食量下降、体质量下降、毛发干枯及活动减少等症状时, 提示 CC 模型已建立。成功建立脾虚证裸

鼠 CC 模型的 24 只裸鼠随机分成 A、B、C、D 组, 每组 6 只。

A 组: 生理盐水 40 mL/kg 灌胃, 连续 56 d; B 组: 按人-小鼠等效剂量换算, 灌胃扶正口服液(40 mL/kg), 连续 56 d; C 组: 生理盐水(40 mL/kg)于 CC 后灌胃 14 d; D 组: CC 后扶正口服液(40 mL/kg)灌胃 14 d; E 组: 生理盐水(40 mL/kg)于 CC 后灌胃 28 d; F 组: CC 后连续灌胃扶正口服液(40 mL/kg)28 d。

1.4 观察指标

1.4.1 体质量测定 分别在 0、14、28、42、56 d 解剖取材前各称重 1 次, 精确到 0.01 g, 称重时间选在 14:00~16:00, 最后以颈椎脱臼法处死各组实验裸鼠, 剥离出整个瘤体, 测量比对其最大直径, 肿瘤组织经 10% 中性甲醛固定, 以备组织切片及免疫组化分析使用; 肌腱无损失分离双侧后肢骨骼肌备用。

1.4.2 摄食量观察 裸鼠同笼喂养, 提供同一饲料, 每日 14:00~16:00 记录每组裸鼠摄食总量。摄食量=前一日饲料量-次日剩余饲料量, 测第 14、28、42、56 天的摄食量。

1.4.3 肿瘤体积测定 颈椎脱臼法处死各组实验裸鼠, 剥离瘤体, 开始用游标卡尺测定肿瘤的长、短径, 按以下公式计算肿瘤体积: 肿瘤体积(V)= $1/2 \times a \times b^2$, 其中 a、b 分别代表肿瘤的长径(mm)、短径(mm)。

1.5 HE 染色观察骨骼肌组织病理学变化

将裸鼠肌肉组织放于标记编号的包埋盒中, 脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、烤片, 再进行 HE 染色, 在 100 倍、400 倍视野进行采集。将切片置于显微镜下, 选取每块肌肉横截面内 300~400 条肌纤维进行测量, 在每块肌肉横截面切片图像上, 随机选择一个不位于图像边缘的方格作为起点, 有规律地间隔若干个方格, 分别计数各选定方格内的肌纤维(通过调整方格大小, 保证最终能采集到足够的肌纤维总数), 在计数每个方格内的肌纤维数目时, 方格上方及左侧边框上的肌纤维不作计数和测量。采集到足够数量的肌纤维, 并采用 Image-Pro Plus 6.0 医学图像分析软件分析, 计算每块肌肉的肌纤维横截面积。

1.6 RT-PCR 检测 ERAD/ERSIA 信号通路激活情况

各组裸鼠取材后提取 RNA, 经多功能酶标仪检查浓度后, 去除残留基因组 DNA, 逆转录制备 cDNA, 设置逆转录程序, 逆转录后得到 cDNA, 稀释 10 倍, -20 °C 保存备用。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法(Livak 法)进行定量分析, 再用校准样本的 ΔCt 值归一试验样本的 ΔCt 值, 最后计算表达水平比率。引物序列见表 1。

1.7 Western blot 检测 ERAD/ERSIA 信号通路激活

表1 RT-PCR引物序列

基因	引物序列(5'-3')	长度/bp
CHOP	正向 ACCTTCACTACTCTTGACCCTG	81
	反向 GATGTGCGTGTGACCTCTGT	
Derlin-1	正向 ACAGAGACCTGATCGTGTCCGT	187
	反向 TTGAATCCAAGGATAACCCAAGG	
XBP1	正向 AGTGATTGATCCAGACAAGCG	168
	反向 GCGGGGTCATACCAAACAGTA	
GAPDH	正向 AGAAGGTGCTGAAGCAGGCATCT	84
	反向 CGGCATCGAAGGTGGAAGAGTG	

情况

从冰箱中取出冻存的样本,称取适量的组织按照 1:9 的比例加入含有蛋白酶抑制剂的裂解液,在 4 °C 的条件下震荡至组织块全部破碎,置于冰上裂解 20 min,4 °C,12 000 r/min 离心 20 min,离心半径 8 cm,吸取上清。采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白质浓度,根据测定结果对蛋白浓度进行调整,保证不同组别之间蛋白浓度一致,根据实际情况计算样本最终上样量,与适量 loading buffer 混匀,95 °C 煮 5 min,冰浴冷却后于 -80 °C 保存。制备电泳胶,上样,电泳,转膜,免疫印迹显色,将每个指标与内参 GAPDH 进行灰度值比较,计算出每个指标的相对灰度值,使用 Graphpad prism(6.01) 软件进行绘图。

1.8 统计学方法

数据分析采用 SPSS 18.0 统计软件完成,计量资料用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,正态分布计量资料用单因素方差分析(One-Way ANOVA)进行比较,偏态分布计量资料采用秩和检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组裸鼠一般情况比较

实验过程中,A、B 组裸鼠一直保持体格大小正常,体质量波动小,肤色红润等健康体征,未见异常;C、E 组肿瘤体积随时间增长而增大,体格逐渐消瘦,裸鼠活动性差,肤色苍白,皮褶度变大,CC 体征逐渐加重;D 组与 C 组相比略显红润,稍活跃;F 组与 E 组相比体征有略微的改善。图 1a 为裸鼠处死前的拍照。

2.2 各组裸鼠肿瘤体积比较

实验末期剖取瘤体拍照,测量计算肿瘤长短径估算体积并对比。与 C 组比较,D 组肿瘤体积减小($P < 0.05$),E 组肿瘤体积明显增大($P < 0.05$);与 E 组比较,F 组肿瘤体积减小($P < 0.05$)。详见图 1b、图 1c。

2.3 各组裸鼠摄食量、体质量比较

与 A、B 组比较,C、D 组摄食量均下降($P < 0.05$);与 C 组比较,D 组摄食量增加,E、F 组摄食量下降($P < 0.05$);与 D 组比较,E、F 组摄食量下降($P < 0.05$);与 E 组比较,F 组摄食量增加($P < 0.05$)。与 A、B 组比较,在第 6 周 C、D 组体质量下降($P < 0.05$),在第 8 周 E、F 组体质量下降($P < 0.05$);与 C 组比较,第 6 周 D 组体质量增加($P < 0.05$);与 E 组比较,第 8 周 F 组体质量增加($P < 0.05$)。详见图 2。

2.4 各组裸鼠骨骼肌组织病理变化

A、B 组骨骼肌组织肌纤维排列规则整齐,可见线粒体分布于相邻的肌原纤维之间,C、D、E、F 组骨骼肌组织肌纤维肿胀,结构紊乱,排列不齐,肌横纹不清晰,局部肌膜不完整,肌核分布不均,出现核聚

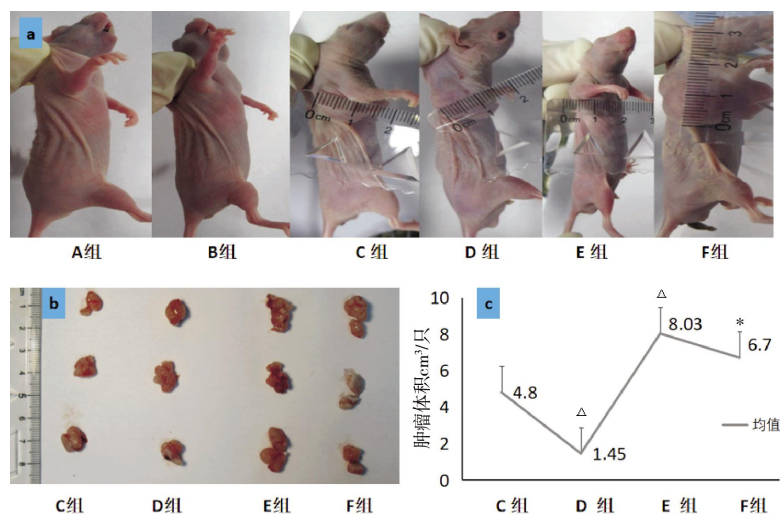


图1 各组裸鼠一般情况及肿瘤体积变化情况

注:a.各组裸鼠处死前照片;b.各组裸鼠分离瘤体;c.各组裸鼠肿瘤体积生长曲线。与 C 组比较, $\Delta P < 0.05$;与 E 组比较, $* P < 0.05$ 。

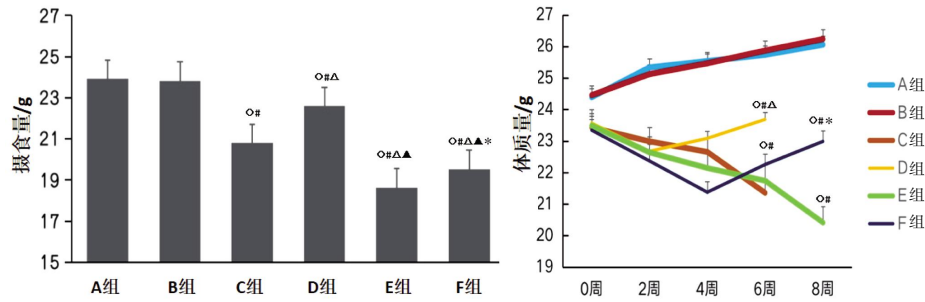


图 2 各组裸鼠摄食量、体质量变化情况

注:与 A 组比较, [○] $P<0.05$;与 B 组比较, [#] $P<0.05$;与 C 组比较, [△] $P<0.05$;与 D 组比较, [▲] $P<0.05$;与 E 组比较, ^{*} $P<0.05$ 。

集或部分肌细胞核消失,肌间隙严重消失;D、F 组较 C、E 组肌纤维排列整齐,条理较清晰,只有少部分肌纤维肿胀,肌细胞核较均匀分布在肌膜下,无增生和肿胀或固缩,肌纤维间隙尚正常,且 F 组较 D 组改善更明显。详见图 3。

2.5 各组裸鼠骨骼肌组织中 CHOP mRNA 及 CHOP、p-JNK 蛋白表达比较

与 A 组比较,B、C、D、E、F 组 CHOP mRNA 及 CHOP 蛋白表达下降($P<0.05$),C、D、E 组 p-JNK 蛋白表达升高($P<0.05$),B、F 组 p-JNK 蛋白表达下降($P<0.05$)。与 B 组比较,C 组 CHOP mRNA 及 CHOP、p-JNK 蛋白表达升高($P<0.05$),D、E、F 组 CHOP mRNA 表达下降($P<0.05$),D、E 组 CHOP、p-JNK 蛋白表达升高($P<0.05$),F 组 CHOP、p-JNK 蛋白表达下降($P<0.05$)。与 C 组比较,D、E、F 组 CHOP mRNA 及蛋白表达下降($P<0.05$),D、F 组 p-JNK 蛋白表达下降($P<0.05$),E 组 p-JNK 蛋白表达升高($P<0.05$)。与 D 组比较,F 组 CHOP mRNA 表达下降($P<0.05$),E 组 CHOP、p-JNK 蛋白表达升高 ($P<0.05$),F 组 CHOP、p-JNK 蛋白表达下降($P<0.05$)。与 E 组比较,F 组 CHOP mRNA 及 CHOP、p-JNK 蛋白表达下降($P<0.05$)。详见图 4。

2.6 各组裸鼠骨骼肌组织中 XBP1、IRE1、Derlin-1、

SYVN1 mRNA 及蛋白表达比较

与 A 组比较,B 组 XBP1、IRE1、Derlin-1、SYVN1 蛋白及 mRNA 表达升高($P<0.05$);C 组 XBP1、Derlin-1、SYVN1 mRNA 表达下降($P<0.05$),IRE1 mRNA 表达升高($P<0.05$),XBP1、IRE1、SYVN1 蛋白表达升高 ($P<0.05$),Derlin-1 蛋白表达下降 ($P<0.05$);D 组 XBP1 mRNA 表达下降($P<0.05$),Derlin-1、SYVN1 mRNA 表达升高($P<0.05$),XBP1、Derlin-1、SYVN1 蛋白表达升高($P<0.05$),IRE1 蛋白表达下降($P<0.05$);E 组 XBP1、Derlin-1、SYVN1 mRNA 表达下降($P<0.05$),IRE1 mRNA 表达升高($P<0.05$),XBP1、IRE1、Derlin-1、SYVN1 蛋白表达下降($P<0.05$);F 组 XBP1、Derlin-1、SYVN1 mRNA 表达下降($P<0.05$),IRE1 mRNA 表达升高 ($P<0.05$),XBP1、Derlin-1 蛋白表达下降 ($P<0.05$),IRE1、SYVN1 蛋白表达升高 ($P<0.05$)。与 B 组比较,C 组 XBP1、Derlin-1、SYVN1 蛋白及 mRNA 表达下降($P<0.05$),IRE1 mRNA 及蛋白表达升高 ($P<0.05$);D 组 XBP1、DREL1、SYVN1、IRE1 mRNA 表达下降 ($P<0.05$),XBP1、Derlin-1、SYVN1 蛋白表达升高($P<0.05$),IRE1 蛋白表达下降($P<0.05$);E 组 XBP1、Derlin-1、SYVN1、mRNA 表达下降($P<0.05$),IRE1 mRNA 表达升高 ($P<0.05$),XBP1、Derlin-1、SYVN1、IRE1 蛋白表达下降 ($P<0.05$);F 组 XBP1、

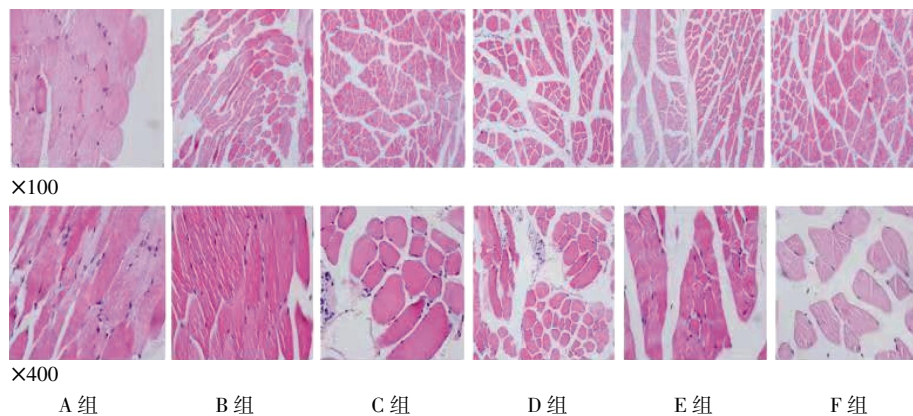


图 3 各组裸鼠骨骼肌组织 HE 染色

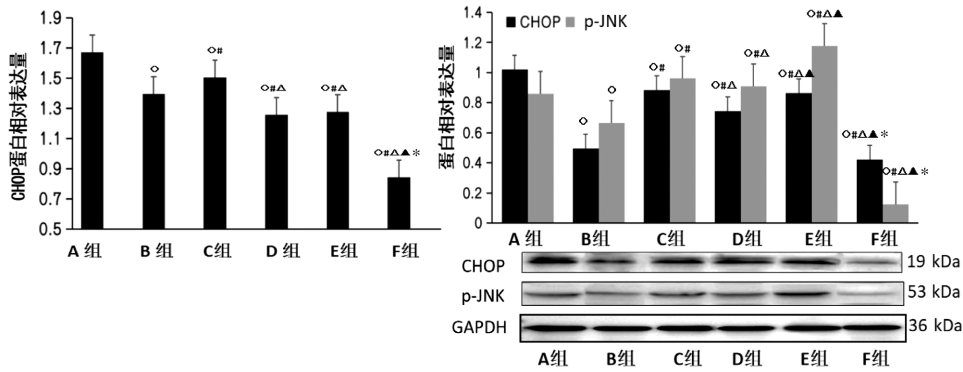


图4 各组裸鼠骨骼肌组织 CHOP mRNA 及 CHOP、p-JNK 蛋白相对表达量比较

注:与 A 组比较, $^{\circ}P<0.05$;与 B 组比较, $^{\#}P<0.05$;与 C 组比较, $^{\Delta}P<0.05$;与 D 组比较, $^{\blacktriangle}P<0.05$;与 E 组比较, $^{\ast}P<0.05$ 。

Derlin-1、SYVN1 mRNA 表达下降($P<0.05$),IRE1 mRNA 表达升高($P<0.05$),XBP1、SYVN1 蛋白表达升高($P<0.05$),IRE1、Derlin-1 蛋白表达下降($P<0.05$)。与 C 组比较,D 组 XBP1、Derlin-1、SYVN1 mRNA 及蛋白表达升高($P<0.05$),IRE1 mRNA 及蛋白表达下降($P<0.05$);E 组 XBP1、IRE1、Derlin-1、SYVN1 mRNA 及蛋白表达下降($P<0.05$);F 组 IRE1 mRNA 表达下降($P<0.05$),XBP1、SYVN1 蛋白表达升高($P<0.05$),IRE1、Derlin-1 蛋白表达下降($P<0.05$)。与 D 组比较,E 组 XBP1、Derlin-1、SYVN1 mRNA 表达下降($P<0.05$),IRE1 mRNA 表达升高($P<0.05$),XBP1、IRE1、Derlin-1、SYVN 蛋白表达下降($P<0.05$);F 组 IRE1 mRNA 表达升高($P<0.05$),Derlin-1、SYVN1 mRNA 表达下降($P<0.05$),XBP1、Derlin-1、SYVN 蛋白表达下降($P<0.05$),IRE1 蛋白表达升高($P<0.05$)。与 E 组比,F 组 XBP1、IRE1、Derlin-1、SYVN1 蛋白及 mRNA 表达均升高($P<0.05$)。详见图 5。

3 讨论

CC 状态下,骨骼肌细胞内质网应激介导的未折叠蛋白反应通过减少错误折叠蛋白的生成缓解内质网压力,不能被重新折叠的错误折叠蛋白通过

ERAD 途径予以降解以促进骨骼肌细胞生存。若持续的 ERAD 都不能恢复肌细胞内质网正常功能,则细胞启动 ERSIA 促进细胞死亡。因此,“ERAD-ERSIA 稳态失衡”在 CC 骨骼肌消耗过程中扮演重要角色^[11],促进恢复“ERAD-ERSIA 稳态”是治疗 CC 的潜在策略。

研究表明,内质网应激、线粒体通路、死亡受体通路及氧化应激等均参与了细胞凋亡,其中 ERS 是目前的研究热点^[12]。研究发现,ERS 包括未折叠蛋白反应、内质网相关性死亡和整合应激反应是 3 个相互联系的动态过程,其中最主要是未折叠蛋白反应^[13]。研究证实,ERS 表达过强或者持续时间过长均会引发细胞凋亡,ERS 是引发细胞凋亡的重要途径^[14]。ERS 主要通过 CHOP、JNK、Caspase-12 途径诱导凋亡,其中 CHOP 介导的细胞凋亡信号通路是 ERSIA 的主要形式^[15]。同时,ERAD 的大致过程为羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶降解蛋白 1(hydroxymethylglutaryl-goA reductase degradation protein 1, Hrd1)通过一种目前尚未知的机制识别并结合错误折叠蛋白,接着由 Derlin-1、硒蛋白(VCP/P97-interacting membrane protein, VIMP)、E3 泛素连接酶和 p97 组成的复合物也加入其中,最终形成一个更大的转位复

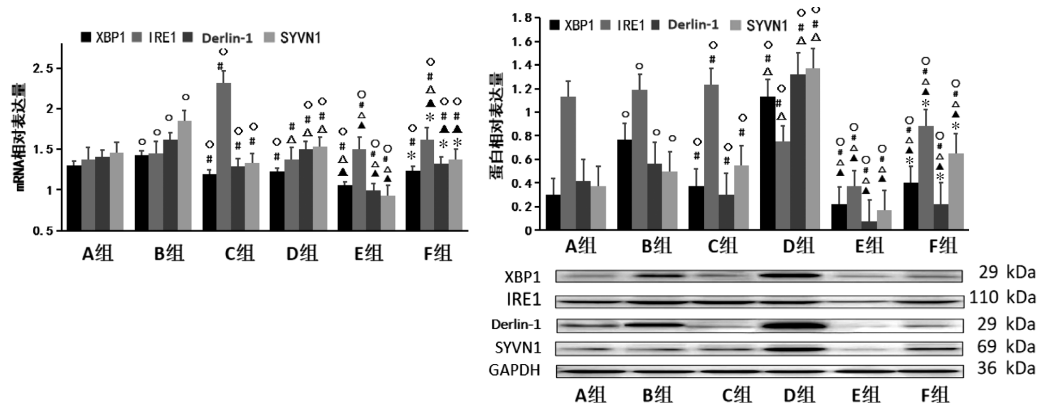


图5 各组裸鼠骨骼肌组织中 XBP1、IRE1、Derlin-1、SYVN1 mRNA 及蛋白相对表达量比较

注:与 A 组比较, $^{\circ}P<0.05$;与 B 组比较, $^{\#}P<0.05$;与 C 组比较, $^{\Delta}P<0.05$;与 D 组比较, $^{\blacktriangle}P<0.05$;与 E 组比较, $^{\ast}P<0.05$ 。

合物。错误折叠蛋白经泛素化修饰后,通过跨膜通道转运至细胞质蛋白酶体中降解,XBP1、IRE1、SYVN1也被证实 ERAD 途径中有重要作用^[6]。

本研究显示,随着肿瘤的增长,C、D、E、F组裸鼠的体质量逐渐下降,第6周发现,在扶正口服液的作用下D组裸鼠体质量较C组有升高的趋势,第8周发现,在扶正口服液的作用下F组裸鼠体质量较E组有升高的趋势,缓解了CC。同时,D、F组裸鼠的摄食量较未给药的裸鼠有所提升。CC病程中肿瘤体积会逐渐增大,但D、F组较同期C、E组肿瘤体积减小,提示扶正口服液可能通过减小肿瘤体积缓解CC。通过RT-PCR、Western blot法检测组织蛋白、mRNA的表达发现:ERSIA主要通路蛋白CHOP、p-JNK在D组较C组表达下降,在F组较E组表达下降;ERAD途径的主要通路蛋白XBP-1、Derlin-1、SYVN1则在D组较C组表达升高,XBP1、IRE1、Derlin-1、SYVN1蛋白在F组较E组表达升高。上述结果提示在CC过程中,扶正口服液可能通过抑制ERSIA的促骨骼肌凋亡途径和促进ERAD的骨骼肌细胞抗凋亡途径,纠正“ERAD-ERSIA失衡”而改善CC状态。

同时,本研究团队发现扶正口服液干预晚期CC优于早期CC。中医认为,肿瘤初期,正气未虚,瘀毒邪气内盛,此时当以驱邪为主^[17-19]。若此时重用健脾益肾法为主的扶正口服液,则闭门留寇,邪毒更甚,故早期使用扶正口服液干预CC无明显疗效优势;肿瘤晚期时,机体邪正俱虚,但正虚更甚,难以驱邪外出^[20-22]。此时使用扶正口服液以扶正祛邪,用药切合病机,故晚期扶正口服液干预CC的疗效明显。

综上所述,本研究证实扶正口服液的抗CC作用及其优势作用时间,初步揭示了ERAD-ERSIA通路在CC中的作用。扶正口服液通过上调骨骼肌XBP1、IRE1、Derlin-1、SYVN1蛋白表达激活ERAD通路,下调CHOP、p-JNK蛋白表达抑制ERSIA通路,纠正“ERAD-ERSIA稳态失衡”是其抗CC的机制之一。这为扶正口服液临床用于改善肿瘤晚期CC提供了支撑,后续将继续对该制剂的药理机制做深入探索。

参考文献

[1] 陈文馨,孙圣荣.癌症恶病质相关肌肉萎缩发病机制的研究进展[J].中华实用诊断与治疗杂志,2022,36(1):106-108.
[2] SIFF T, PARAJULI P, RAZZAQUE M S, et al. Cancer-mediated muscle Cachexia: Etiology and clinical management[J]. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2021, 32(6): 382-402.
[3] 罗敏,杜英杰,姜燕诗,等.基于内质网应激PERK信号通路探讨

芍药汤对UC大鼠的作用机制[J].湖南中医药大学学报,2021,41(11):1663-1668.
[4] 何林巧,曾柏荣.扶正口服液治疗癌症恶病质的临床观察[J].中医药导报,2017,23(6):57-59.
[5] 缪莉娟,刘华.中医药改善晚期癌症患者生活质量的研究进展[J].光明中医,2013,28(5):1084-1086.
[6] 孙银辉,王理槐.扶正口服液治疗肺癌化疗因性疲乏临床研究[J].临床医学教育,2018,10(42):33-34.
[7] 曾柏荣,王理槐,孙银辉.扶正口服液对气阴两虚型Ⅲ-Ⅳ期肺癌患者化疗毒副反应的影响[J].中国中医药信息杂志,2013,20(12):73-74.
[8] 刘华,李杏瑶,王理槐.扶正口服液防治伽玛刀治疗原发性肝癌毒副反应临床观察[J].中国中医药信息杂志,2013,20(10):65-66.
[9] 肖春红,徐迎新,张再重,等.癌性恶病质小鼠模型的建立及其自然发展过程研究[J].解放军医学院学报,2016,37(11):1177-1182.
[10] 张万里.脾虚证肿瘤恶病质模型的建立[D].上海:华东师范大学,2018:35-40.
[11] PARK B, YOU S, CHO W C S, et al. A systematic review of herbal medicines for the treatment of cancer Cachexia in animal models[J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2019, 20(1): 9-22.
[12] GUPTA R, AMBASTA R K, PRAVIR KUMAR. Autophagy and apoptosis cascade: which is more prominent in neuronal death[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2021, 78(24): 8001-8047.
[13] XU C, BAILY-MAITRE B, REED J C. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions[J]. Journal of Clinical Investigation, 2005, 115(10): 2656-2664.
[14] MENNERICH D, KELLOKUMPU S, KIETZMANN T. Hypoxia and reactive oxygen species as modulators of endoplasmic Reticulum and Golgi homeostasis[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2019, 30(1): 113-137.
[15] CHEN X, CUBILLOS-RUIZ J R. Endoplasmic Reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment[J]. Nature Reviews Cancer, 2021, 21(2): 71-88.
[16] OAKES S A. Endoplasmic Reticulum stress signaling in cancer cells[J]. The American Journal of Pathology, 2020, 190(5): 934-946.
[17] 徐凯,王珏,张卫平.脾肾双补法中药对IV期非小细胞肺癌伴恶病质患者细胞因子和营养状态的影响[J].中国现代医生,2019,57(32):75-80.
[18] 郭秋均,张兴,刘瑞,等.中医肿瘤理论传承发展历程:“扶正培本”到“调气解毒”[J].世界中医药,2022,17(11):1497-1501.
[19] 张梦雪,邹玺,吴坚,等.刘沈林教授治疗癌症恶病质经验[J].湖南中医药大学学报,2022,42(7):1199-1202.
[20] 张公正.扶正抗癌方联合化疗对晚期非小细胞肺癌患者血清肿瘤标志物的影响[J].陕西中医,2017,38(7):885-886.
[21] 曾万.基于“脾肾互赞”理论的健脾益肾剂改善癌症恶病质的临床研究[D].长沙:湖南中医药大学,2020.
[22] 周竞峥,付玲,罗玲,等.癌症恶病质的中西医诊治现状[J].中医肿瘤学杂志,2019,1(5):82-85,77.