

本文引用: 李 阳, 张洽淳, 陈 蕾, 莫潘艳, 黄国栋, 王济国, 曾 超. 基于 MAPK 通路探讨三虫通络散结方对 Lewis 肺癌小鼠的抑瘤作用[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(12): 2164-2171.

## 基于 MAPK 通路探讨三虫通络散结方对 Lewis 肺癌小鼠的抑瘤作用

李 阳\*, 张洽淳, 陈 蕾, 莫潘艳, 黄国栋, 王济国, 曾 超

广州中医药大学第七临床医学院, 广东 深圳 518100

**[摘要]** 目的 研究三虫通络散结方对 Lewis 肺癌小鼠的抑瘤作用及对丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路的调控作用。方法 选取 C57BL/6 小鼠 48 只, 随机挑选 6 只作为空白组; 42 只 C57BL/6 小鼠构建 Lewis 肺癌荷瘤小鼠模型, 随机分为模型组(生理盐水)、阳性对照组(顺铂注射液 2 mg/kg)、散剂低剂量组(三虫通络散结方散剂 0.45 g/kg)、散剂高剂量组(三虫通络散结方散剂 1.8 g/kg)、散剂低剂量+顺铂组(三虫通络散结方散剂 0.45 g/kg+顺铂注射液 2 mg/kg)、汤剂低剂量组(三虫通络散结方汤剂 3.9 g/kg)、汤剂高剂量组(三虫通络散结方汤剂 15.6 g/kg), 每组 6 只, 给药 14 d 后取材。计算抑瘤率和去瘤体质量; HE 染色观察皮下移植瘤体、肺组织、肝组织的病理变化; qPCR 检测皮下移植瘤细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, Erk)、缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )、p38、血管内皮生长因子 A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)、基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2) mRNA 的表达量; Western blot 检测皮下移植瘤 Erk、HIF-1 $\alpha$ 、p38、VEGFA、JNK、MMP-2 蛋白表达情况。结果 (1)与模型组相比, 阳性对照组、散剂低剂量+顺铂组、散剂高剂量组瘤体质量降低( $P<0.05$ )。与散剂低剂量组相比, 散剂高剂量组瘤体质量降低( $P<0.05$ )。与阳性对照组相比, 各中药单药组及模型组去瘤体质量升高( $P<0.05$ )。(2)各组小鼠肺组织 HE 染色结果显示, 散剂低剂量+顺铂组见较多肿瘤细胞坏死; 各中药组细胞均少见核分裂, 肿瘤转移灶较模型组少。各组小鼠肝组织 HE 染色结果显示, 散剂低剂量+顺铂组、阳性对照组未见明显肿瘤病灶形成; 散剂高剂量组、汤剂高剂量组的肿瘤转移灶体积相对较小。(3)与模型组相比, 其余各荷瘤组皮下移植瘤组织中 Erk、p38 mRNA 表达下降( $P<0.05$ ), 散剂低剂量+顺铂组、散剂低剂量组、汤剂低剂量组、汤剂高剂量组 JNK mRNA 表达下降( $P<0.05$ ); 与阳性对照组相比, 散剂低剂量+顺铂组及各中药组皮下移植瘤组织中 JNK mRNA 表达下降( $P<0.05$ )。(4)与模型组相比, 阳性对照组、散剂低剂量组、汤剂高剂量组 Erk 蛋白表达水平降低( $P<0.05$ ), 阳性对照组、散剂低剂量+顺铂组、散剂低剂量组、散剂高剂量组、汤剂高剂量组 p38、HIF-1 $\alpha$  蛋白表达水平降低( $P<0.05$ ), 其余各荷瘤组 JNK 蛋白表达水平均降低( $P<0.05$ )。结论 三虫通络散结方对 Lewis 肺癌小鼠有一定的抑瘤作用, 以散剂高剂量组抑瘤效果较优, 其机制可能是与抑制 MAPK 信号通路相关。

**[关键词]** Lewis 肺癌细胞; 三虫通络散结方; 肺癌; MAPK 信号通路; 抑瘤作用

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.12.004

## Tumor inhibitory effects of Sanchong Tongluo Sanjie Formula on Lewis lung cancer mice based on MAPK pathway

LI Yang\*, ZHANG Qiachun, CHEN Lei, MO Panyan, HUANG Guodong, WANG Jigou, ZENG Chao

The Seventh Clinical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen, Guangdong 518100, China

[收稿日期] 2024-06-06

[基金项目] 广东省中医药管理局项目(20231294); 深圳市宝安区科创局项目(2021JD145); 深圳市宝安区引进高层次医学团队项目资助项目(202403); 深圳市宝安区 2024 年度区属公立医院高质量发展研究项目(BAGZL2024119)。

[通信作者]\* 李 阳, 女, 博士, 副主任中医师, E-mail: liyang2001@126.com。

**[Abstract] Objective** To study the tumor inhibitory effects of Sanchong Tongluo Sanjie Formula (SCTLSJF) on Lewis lung cancer mice and its regulatory effects on the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway. **Methods** A total of 48 C57BL/6 mice were selected, and six of them were randomly assigned to the blank group. The remaining 42 C57BL/6 mice were used to establish the Lewis lung cancer-bearing mouse model, and were then randomized into model group (normal saline), positive control group (Cisplatin Injection 2 mg/kg), low-dose powder group (SCTLSJF powder 0.45g/kg), high-dose powder group (SCTLSJF powder 1.8 g/kg), low-dose powder+cisplatin group (SCTLSJF powder 0.45 g/kg+Cisplatin Injection 2 mg/kg), low-dose decoction group (SCTLSJF decoction 3.9 g/kg), and high-dose decoction group (SCTLSJF decoction 15.6 g/kg), with six mice in each group. Samples were collected 14 days after administration. The tumor suppression rate and tumor-free body mass were calculated. HE staining was used to observe the pathological changes of the subcutaneous xenograft tumor, lung tissues, and liver tissues; qPCR was employed to determine the mRNA expressions of extracellular regulated protein kinases (Erk), hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), p38 protein (p38), vascular endothelial growth factor A (VEGFA), c-Jun N-terminal kinase (JNK), and matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) in the subcutaneous xenograft tumor, while Western blot to examine the protein expressions of them. **Results** (1) Compared with the model group, the xenograft tumor mass in the positive control, low-dose powder+cisplatin, and high-dose powder groups was lower ( $P<0.05$ ). Compared with the low-dose powder group, the xenograft tumor mass was lower in the high-dose powder group ( $P<0.05$ ). Compared with the positive control group, the tumor-free body mass was higher in all pure Chinese medicine groups and model group ( $P<0.05$ ). (2) The HE staining of lung tissues showed that the low-dose powder+cisplatin group exhibited a higher degree of tumor cell necrosis; in all pure Chinese medicine groups, nuclear division was rarely observed, and the number of tumor metastases was lower compared to the model group. The HE staining of liver tissues showed that no significant tumor lesions were observed in the low-dose powder+cisplatin and positive control groups; the tumor metastasis foci in the high-dose powder and high-dose decoction groups were relatively small in volume. (3) Compared with the model group, the mRNA expressions of Erk and p38 in the subcutaneous xenograft tumor tissues in the other cancer-bearing groups decreased ( $P<0.05$ ). The expression of JNK mRNA also decreased in the low-dose powder+cisplatin, low-dose powder, low-dose decoction, and high-dose decoction groups ( $P<0.05$ ). Compared with the positive control group, the low-dose powder+cisplatin group and all pure Chinese medicine groups showed a decrease in JNK mRNA expression in the subcutaneous xenograft tumor tissues ( $P<0.05$ ). (4) Compared with the model group, the protein expression level of Erk decreased in the positive control, low-dose powder, and high-dose decoction groups ( $P<0.05$ ), the protein expression levels of p38 and HIF-1 $\alpha$  decreased in the positive control, low-dose powder+cisplatin, low-dose powder, high-dose powder, and high-dose decoction groups ( $P<0.05$ ), and the protein expression level of JNK decreased in the other cancer-bearing groups ( $P<0.05$ ). **Conclusion** SCTLSJF has certain inhibitory effects on Lewis lung cancer in mice, with the high-dose powder group showing the superior tumor inhibitory efficacy. The mechanism may be related to the inhibition of MAPK signaling pathway.

**[Keywords]** Lewis lung cancer cells; Sanchong Tongluo Sanjie Formula; lung cancer; mitogen-activated protein kinase signaling pathway; tumor inhibitory effects

肺癌是我国发病率、死亡率最高的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>,许多患者确诊时已处于中晚期<sup>[2]</sup>。以顺铂注射液为基础的联合用药是目前治疗肺癌的一线治疗方案<sup>[3]</sup>,但存在毒副作用、化疗耐药性、依从性差等临床问题。中医药具有高效、低毒、受众面广等特点,与放化疗联合在肿瘤康复阶段具有独特优势,能发挥改善生活质量,延缓肿瘤复发转移的作用<sup>[4-7]</sup>。三虫通络散结方是在中医理论指导下,总结名家经验并经我院长期临床实践总结而成的协定处方,该方由蜈蚣、全蝎和壁虎组成。本研究通过构建Lewis肺癌荷瘤小

鼠模型,探讨三虫通络散结方对Lewis肺癌小鼠的抑瘤作用及对MAPK信号通路的调控作用,以期三虫通络散结方在肺癌临床治疗中的应用提供一定的理论依据及实验基础。

## 1 材料

### 1.1 动物及细胞株

48只SPF级雄性C57BL/6小鼠,鼠龄4~6周,体质量(16 $\pm$ 2)g,购自广东省锐格生物科技有限公司,许可证号:SCXK(粤)2021-0059。动物实验通

过锐格生物实验动物伦理委员会审查(批准号:20221228001)。Lewis 肺癌细胞株购自武汉普诺赛生命科技有限公司,货号:CL-0140。

## 1.2 药物

三虫通络散结方组成:全蝎,壁虎,蜈蚣。散剂由我院药物临床应用中心提供成方胶囊制剂,规格:0.5 g/粒。汤剂由上述饮片按固定比例组成进行煎煮。顺铂注射液(江苏豪森药业集团有限公司,批号:601220104,规格:6 mL:30 mg)。

## 1.3 主要试剂

DMEM 高糖培养基、10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素溶液(双抗)、0.25%胰蛋白酶溶液、磷酸盐缓冲液(武汉普诺赛生命科技有限公司,批号:WHB823P171、WHB823P171、WH0622U051、WH1023 N161、WH0023C101)。miRNeasy Mini 试剂盒[凯杰企业管理(上海)有限公司,批号:148979541];细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases,Erk)兔抗、缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ ,HIF-1 $\alpha$ )兔抗、p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase,p38 MAPK)兔抗、血管内皮生长因子 A(vascular endothelial growth factor A,VEGFA)兔抗、c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase,JNK)兔抗、基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2,MMP-2)兔抗(江苏亲科生物研究中心有限公司,批号:22h9958、80h4847、10y0837、83m8093、51n7087、85i1921)。

## 1.4 主要仪器

生物安全柜(苏州安泰空气技术有限公司,型号:BSC-130 II B2);低速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,型号:L530R);CO<sub>2</sub> 培养箱[益世科(上海)企业发展有限公司,型号:CLM-170B-8-NF];恒温水浴锅(天津恒高电气科技有限公司,型号:HWT-63);倒置荧光显微镜(日本东京OLYMPUS 公司,型号:CKX53)。

## 2 方法

### 2.1 Lewis 肺癌模型小鼠的建立

复苏培养 Lewis 肺癌细胞株,使用含 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素溶液(双抗)的 DMEM 高糖培养基,在 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 条件下培养。将细胞传代培养,当细胞生长状态良好并处于对数生长期时收集细胞,使用磷酸盐缓冲液配制成浓度为 2 $\times$ 10<sup>6</sup> 个/mL

的细胞悬液,接种于 C57BL/6 小鼠右腋下(0.2 mL/只),建立 Lewis 肺癌荷瘤小鼠模型<sup>[8]</sup>。接种成功后观察肿瘤生长状况,2 周内于小鼠右腋下可触及肿块为造模成功<sup>[8]</sup>。

### 2.2 分组与给药

从 48 只 C57BL/6 小鼠中随机取 6 只小鼠作为空白组,不予任何药物处理,其余小鼠建立 Lewis 肺癌荷瘤小鼠模型。将 42 只 Lewis 肺癌荷瘤小鼠随机分为 7 组,每组 6 只。模型组灌胃生理盐水,灌胃体积为 0.2 mL/只;散剂组予三虫通络散结方胶囊,将胶囊内容物溶解于生理盐水中灌胃给药,0.2 mL/只;根据人的使用剂量(3 g/60 kg),按照体表面积折算法<sup>[9]</sup>进行人和小鼠等效剂量换算,将小鼠低剂量代替人临床剂量,散剂低剂量组为 0.45 g/kg、散剂高剂量组为 1.8 g/kg,2 mL/只,1 次/d;汤剂组予传统中药饮片煎煮后浓缩至所需浓度,根据人的使用剂量(26 g/60 kg),按照体表面积折算法进行人和小鼠等效剂量换算,将小鼠低剂量代替人临床剂量,汤剂低剂量组为 3.9 g/kg、汤剂高剂量组为 15.6 g/kg,20 g 小鼠灌药体积为 1 mL/次,1 次/d;阳性对照组给予顺铂注射液腹腔注射给药,按顺铂注射液 2 mg/kg 给药,顺铂注射液配制:取顺铂注射液 30 mg(即 6 mL),加至生理盐水 144 mL 中,配制成浓度为 0.2 mg/mL,20 g 小鼠腹腔注射 0.2 mL/次,第 1、3、5、7 天给药;散剂低剂量+顺铂组灌胃给予三虫通络散结方散剂低剂量(药物配制、给药方法、剂量同散剂低剂量组)和腹腔注射顺铂注射液(方法及剂量同阳性对照组)。各组均连续干预 14 d。

### 2.3 指标检测

2.3.1 观察小鼠一般情况 每日观察小鼠精神状态、活动度,隔 2 天测体质量、肿瘤体积及饮食、饮水量,记录小鼠死亡情况,并分析其死亡原因。

2.3.2 小鼠瘤体质量、抑瘤率及去瘤体质量检测 给药 14 d 后,脱颈处死小鼠,剥离右腋下移植瘤组织并称量。抑瘤率(%)=(模型组平均瘤重-治疗组平均瘤重)/模型组平均瘤重 $\times$ 100%。

2.3.3 HE 染色观察皮下移植瘤体、肺组织、肝组织的病理变化 将新鲜小鼠右腋下移植瘤组织、肺组织及肝组织分别进行剥离、固定、脱水、浸蜡、包埋,连续 4  $\mu$ m 切片,进行 HE 染色。具体染色步骤如下:石蜡切片脱蜡后,冰冻切片复温固定,按 HE 染色套装使用说明先予苏木素染色,然后予伊红染色,

中性树胶封片。在显微镜下检查,采集图像后进行分析。

2.3.4 qPCR 检测 Erk、p38、JNK、MMP-2、HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA mRNA 的表达量 提取小鼠皮下移植瘤于匀浆器中,加入 QIAzol 裂解液试剂提取总 RNA,按逆转录试剂盒说明书要求,将提取的总 RNA 反转录成 cDNA,然后再进行扩增,以 GAPDH 为内参,采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法计算目的基因的相对表达量。引物序列见表1。

表1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

基因名称	引物序列(5'-3')	引物长度/bp
Erk	Erk 正向: TGCTGAAGCGCCATTCAAGT	20
	Erk 反向: CTTACACCATCTCTCCCTTGCT	22
p38	p38 正向: GCATCATGGCTGAGCTGTTG	20
	p38 反向: GAGATAAGCAGGGGTGTCC	20
JNK	JNK 正向: CAGCCGTCTCTTTAGCACA	20
	JNK 反向: TGTATCCGAGCCAAAGTCCG	20
	JNK 正向 2: CTTCAGAAGCAGAAGCCCCA	20
MMP-2	JNK 反向 2: TGTGCTAAAGGAGACGGCTG	20
	MMP-2 正向: AACGCTCGGAATACAGCAG	20
HIF-1 $\alpha$	MMP-2 反向: GTAAACAAGGCTTCATGGGGG	21
	HIF-1 $\alpha$ 正向: CGCCTCTGGACTTGTCTCTT	20
	HIF-1 $\alpha$ 反向: TCGACGTCAGAACTCATCCT	21
	HIF-1 $\alpha$ 正向 2: TGGACTTGTCTCTTTCTCCGC	21
VEGFA	HIF-1 $\alpha$ 反向 2: TTCGACGTCAGAACTCATCCT	22
	VEGFA 正向: TCGAGGAGCACTTTGGGTC	19
	VEGFA 反向: CTTGGCGATTAGCAGCAGA	20

2.3.5 Western blot 检测 Erk、p38、JNK、MMP-2、HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA 蛋白表达情况 取小鼠皮下移植瘤组织匀浆后提取总蛋白,加入 SDS-PAGE 后进行电泳,分离后进行转膜,用 BSA 封闭 PVDF 膜 1 h,然后洗脱 5 min,加入 Erk、p38、JNK、MMP-2、HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA 一抗(稀释比例:1:2 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000),4℃孵育过夜。洗膜后加入二抗孵育,再次洗涤,进行化学发光反应,然后浸入显影液中显色,最后凝胶成像,采用 Image Lab Software 测定光密度,以目标蛋白与内参条带比值表示蛋白相对表达量。

## 2.4 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件进行数据处理,符合正态分布的计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,多组间比较采用单因素方差分析,以  $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 各组小鼠一般情况

除空白组外,造模后第 10~14 天,于 Lewis 肺癌荷瘤小鼠右腋下均可触及硬结瘤块,造模过程无小鼠死亡。与空白组相比,模型小鼠精神状态变差,食欲减退,活动量减少,瘤体逐渐增大。给药第 11 天,散剂高剂量组小鼠因灌胃操作不当死亡 1 只;给药第 13 天,阳性对照组死亡 1 只,散剂低剂量组+顺铂组死亡 1 只,散剂低剂量组死亡 2 只,散剂高剂量组死亡 1 只;给药第 14 天,阳性对照组、汤剂低剂量组各死亡 1 只。小鼠死亡前精神差,活动减少,肿瘤增大、破溃,进食情况差。

### 3.2 各荷瘤组小鼠瘤体质量及去瘤体质量比较

与模型组相比,阳性对照组、散剂低剂量+顺铂组、散剂高剂量组瘤体质量降低( $P<0.05$ );与阳性对照组相比,散剂低剂量组、汤剂低剂量组、汤剂高剂量组瘤体质量升高( $P<0.05$ );与散剂低剂量+顺铂组相比,散剂低剂量组、汤剂低剂量组、汤剂高剂量组瘤体质量升高( $P<0.05$ );与散剂低剂量组相比,散剂高剂量组瘤体质量降低( $P<0.05$ )。抑瘤率由高到低前 4 依次为阳性对照组、散剂低剂量+顺铂组、散剂高剂量组、汤剂高剂量组,分别是 64.57%、58.02%、34.40%、19.51%。与模型组相比,阳性对照组去瘤体质量下降( $P<0.05$ );与阳性对照组相比,散剂低剂量组、散剂高剂量组、汤剂低剂量组、汤剂高剂量组去瘤体质量升高( $P<0.05$ )。各中药组组间去瘤体质量比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。详见表 2。

表2 模型小鼠皮下移植瘤体质量、抑瘤率及去瘤体质量比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 2 Comparison of subcutaneous xenograft tumor mass, tumor suppression rates, and tumor-free body mass among various groups ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	瘤体质量/g	抑瘤率/%	去瘤体质量/g
模型组	6	7.79 $\pm$ 2.43	—	20.40 $\pm$ 2.00
阳性对照组	4	2.76 $\pm$ 0.92 <sup>▲</sup>	64.57	17.17 $\pm$ 2.92 <sup>▲</sup>
散剂低剂量+顺铂组	5	3.27 $\pm$ 0.93 <sup>▲</sup>	58.02	19.01 $\pm$ 1.30
散剂低剂量组	4	8.02 $\pm$ 1.87 <sup>▲*</sup>	-2.96	21.23 $\pm$ 1.88 <sup>△</sup>
散剂高剂量组	4	5.11 $\pm$ 1.51 <sup>▲*</sup>	34.40	20.24 $\pm$ 0.52 <sup>△</sup>
汤剂低剂量组	5	7.35 $\pm$ 2.40 <sup>▲*</sup>	5.65	20.64 $\pm$ 2.88 <sup>△</sup>
汤剂高剂量组	6	6.28 $\pm$ 1.94 <sup>▲*</sup>	19.51	21.34 $\pm$ 1.67 <sup>△</sup>

注:与模型组相比,▲ $P<0.05$ ;与阳性对照组相比,△ $P<0.05$ ;与散剂低剂量+顺铂组相比,\* $P<0.05$ ;与散剂低剂量组相比,<sup>\*</sup> $P<0.05$ 。

### 3.3 各组小鼠皮下移植瘤体、肺组织、肝组织形态学变化

3.3.1 各荷瘤组小鼠右腋皮下移植瘤的形态学变化 各组均见成团胞核较大、异形及核质比高的肿瘤转移灶。详见图 1。

3.3.2 各组小鼠肺组织的形态学变化 空白组未见肿瘤病灶;模型组肺组织见细胞核较大、异形及核质比高的肿瘤转移灶;散剂低剂量+顺铂组见较多肿瘤细胞坏死;汤剂低剂量组、汤剂高剂量组、散剂高剂量组、散剂低剂量组细胞均少见核分裂,肿瘤转移灶较模型组少,但比散剂低剂量+顺铂组多;阳性对照组未见明显肿瘤病灶形成。详见图 2。

3.3.3 各组小鼠肝组织的形态学变化 空白组未见肿瘤病灶;模型组肝组织见较大体积的成团细胞核、

异形及核质比高的肿瘤转移灶;散剂低剂量+顺铂组、阳性对照组未见明显肿瘤病灶形成;汤剂低剂量组、汤剂高剂量组、散剂低剂量组、散剂高剂量组均可见细胞核增大、异形及核质比高的肿瘤转移灶,但散剂低剂量组的肿瘤转移灶数量较多,体积较大,散剂高剂量组、汤剂高剂量组的肿瘤转移灶体积相对较小。详见图 3。

### 3.4 各荷瘤组小鼠皮下移植瘤组织 Erk、p38、JNK、MMP-2、HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA mRNA 的 mRNA 表达量比较

与模型组相比,其余荷瘤组 Erk、p38 mRNA 表达下降( $P<0.05$ );散剂低剂量+顺铂组、散剂低剂量组、汤剂低剂量组、汤剂高剂量组 JNK mRNA 表达下降( $P<0.05$ );散剂低剂量组、散剂高剂量组、汤剂

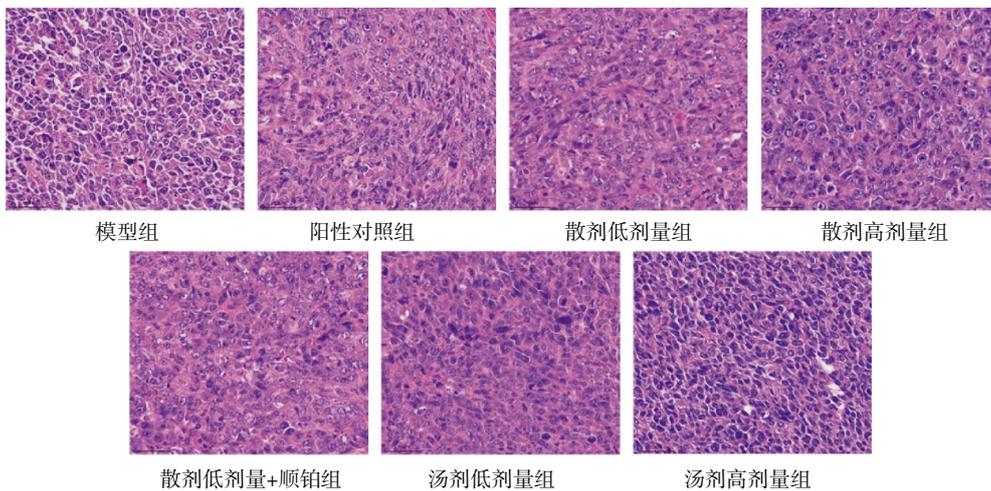


图 1 各荷瘤组小鼠右腋皮下移植瘤组织病理形态学比较(HE,×400)

Fig.1 Histopathological comparison of the subcutaneous xenograft tumor tissues in the mouse right axilla among various tumour-bearing groups (HE staining,×400)

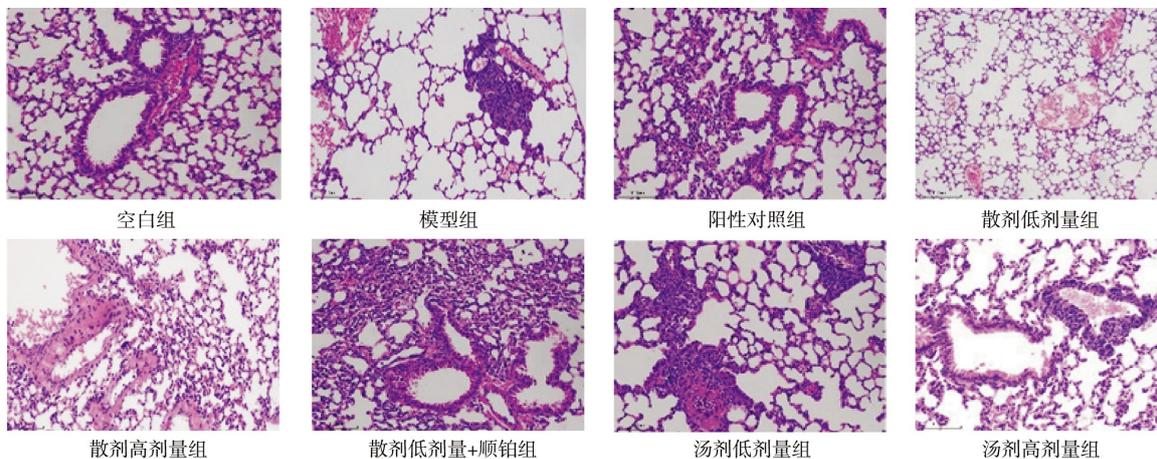


图 2 各组小鼠肺组织病理形态学比较(HE,×200)

Fig.2 Histopathological comparison of mouse lung tissues among various groups (HE staining, ×200)

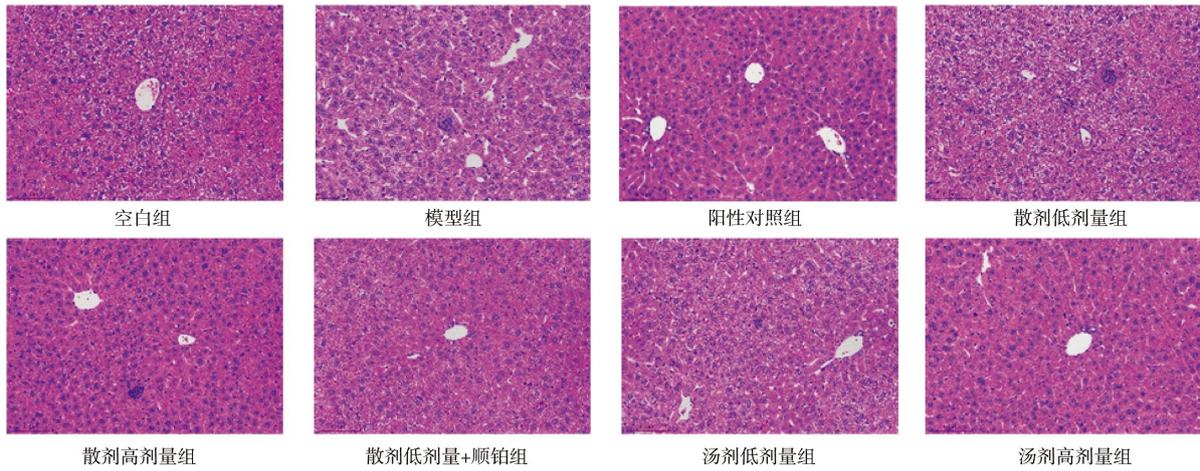


图3 各组小鼠肝组织病理形态学比较(HE,×200)

Fig.3 Histopathological comparison of mouse liver tissues among various groups (HE staining, ×200)

低剂量组 HIF-1 $\alpha$  mRNA 表达下降( $P<0.05$ );散剂低剂量组 VEGFA mRNA 表达升高( $P<0.05$ )。与阳性对照组相比,散剂低剂量+顺铂组、散剂低剂量组、散剂高剂量组、汤剂低剂量组、汤剂高剂量组 JNK mRNA 表达下降( $P<0.05$ );散剂高剂量组、汤剂低剂量组、汤剂高剂量组 MMP-2 mRNA 表达下降( $P<0.05$ );散剂低剂量组 VEGFA mRNA 表达升高( $P<0.05$ )。与散剂低剂量+顺铂组相比,散剂低剂量组 VEGFA mRNA 表达升高( $P<0.05$ )。与散剂低剂量组相比,散剂高剂量组、汤剂低剂量组、汤剂高剂量组 VEGFA mRNA 表达下降( $P<0.05$ )。与散剂高剂量组相比,汤剂低剂量组 JNK mRNA 表达下降( $P<0.05$ )。详见表 3。

### 3.5 各荷瘤组小鼠皮下移植瘤组织 Erk、p38、JNK、MMP-2、HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA 的蛋白表达水平比较

与模型组相比,阳性对照组、散剂低剂量组和汤

剂高剂量组 Erk 蛋白表达降低( $P<0.05$ ),汤剂低剂量组 Erk 蛋白表达升高( $P<0.05$ );除汤剂低剂量组外的其余各荷瘤组 p38、HIF-1 $\alpha$  蛋白表达下降( $P<0.05$ );阳性对照组、散剂低剂量组、汤剂高剂量组 MMP-2 蛋白表达升高( $P<0.05$ );其余各荷瘤组 JNK 蛋白表达均下降( $P<0.05$ );阳性对照组、散剂低剂量组和散剂高剂量组 VEGFA 蛋白表达下降( $P<0.05$ )。与阳性对照组相比,散剂低剂量+顺铂组 Erk、JNK 蛋白表达水平升高( $P<0.05$ ),MMP-2、HIF-1 $\alpha$  蛋白表达水平下降( $P<0.05$ );散剂低剂量组 MMP-2 蛋白表达水平升高( $P<0.05$ );散剂高剂量组 Erk、p38、JNK 蛋白表达水平升高( $P<0.05$ ),MMP-2 蛋白表达水平下降( $P<0.05$ );汤剂低剂量组 Erk、p38、JNK、HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA 蛋白表达水平升高( $P<0.05$ ),MMP-2 蛋白表达水平下降( $P<0.05$ );汤剂高剂量组 Erk、p38、JNK、VEGFA 蛋白表达水平升高( $P<0.05$ )。与散剂低剂量+顺铂组相比,

表 3 各荷瘤组小鼠皮下移植瘤组织 Erk、p38、JNK、MMP-2、HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA mRNA 表达量比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 3 Comparison of mRNA expression levels of Erk, p38, JNK, MMP-2, HIF-1 $\alpha$ , and VEGFA in the subcutaneous xenograft tumor tissues among various tumor-bearing groups ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	Erk/GAPDH	p38/GAPDH	JNK/GAPDH	MMP-2/GAPDH	HIF-1 $\alpha$ /GAPDH	VEGFA/GAPDH
模型组	6	2.04 $\pm$ 0.97	1.75 $\pm$ 0.80	0.70 $\pm$ 0.16	2.20 $\pm$ 1.38	2.00 $\pm$ 1.04	0.78 $\pm$ 0.57
阳性对照组	4	1.09 $\pm$ 0.07 <sup>▲</sup>	0.96 $\pm$ 0.04 <sup>▲</sup>	0.82 $\pm$ 0.13	3.13 $\pm$ 3.72	1.38 $\pm$ 0.30	0.88 $\pm$ 0.21
散剂低剂量+顺铂组	5	1.17 $\pm$ 0.28 <sup>▲</sup>	0.85 $\pm$ 0.14 <sup>▲</sup>	0.31 $\pm$ 0.12 <sup>▲△</sup>	1.87 $\pm$ 0.95	1.49 $\pm$ 0.23	0.88 $\pm$ 0.22
散剂低剂量组	4	1.27 $\pm$ 0.17 <sup>▲</sup>	0.68 $\pm$ 0.13 <sup>▲</sup>	0.37 $\pm$ 0.07 <sup>▲△</sup>	1.32 $\pm$ 0.51	1.09 $\pm$ 0.11 <sup>▲</sup>	1.41 $\pm$ 0.33 <sup>▲△*</sup>
散剂高剂量组	4	1.04 $\pm$ 0.14 <sup>▲</sup>	0.77 $\pm$ 0.21 <sup>▲</sup>	0.51 $\pm$ 0.31 <sup>△</sup>	0.60 $\pm$ 0.31 <sup>△</sup>	1.10 $\pm$ 0.31 <sup>▲</sup>	0.73 $\pm$ 0.10 <sup>*</sup>
汤剂低剂量组	5	1.21 $\pm$ 0.10 <sup>▲</sup>	0.70 $\pm$ 0.19 <sup>▲</sup>	0.27 $\pm$ 0.08 <sup>▲△■</sup>	1.05 $\pm$ 0.23 <sup>△</sup>	0.92 $\pm$ 0.17 <sup>▲</sup>	0.71 $\pm$ 0.26 <sup>*</sup>
汤剂高剂量组	6	1.35 $\pm$ 0.36 <sup>▲</sup>	0.84 $\pm$ 0.15 <sup>▲</sup>	0.42 $\pm$ 0.05 <sup>▲△</sup>	1.13 $\pm$ 0.73 <sup>△</sup>	1.53 $\pm$ 0.68	0.70 $\pm$ 0.23 <sup>*</sup>

注:与模型组相比,▲ $P<0.05$ ;与阳性对照组相比,△ $P<0.05$ ;与散剂低剂量+顺铂组相比,\* $P<0.05$ ;与散剂低剂量组相比,\* $P<0.05$ ;与散剂高剂量组相比,■ $P<0.05$ 。

表 4 各荷瘤组小鼠皮下移植瘤组织 Erk、p38、JNK、MMP-2、HIF-1 $\alpha$  和 VEGFA 蛋白表达水平比较( $\bar{x}\pm s$ )Table 4 Comparison of protein expression levels of Erk, p38, JNK, MMP-2, HIF-1 $\alpha$ , and VEGFA in the subcutaneous xenograft tumor tissues among various tumor-bearing groups ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	Erk/ $\beta$ -actin	p38/ $\beta$ -actin	JNK/ $\beta$ -actin	MMP-2/ $\beta$ -actin	HIF-1 $\alpha$ / $\beta$ -actin	VEGFA/ $\beta$ -actin
模型组	6	1.01 $\pm$ 0.05	1.84 $\pm$ 0.11	0.38 $\pm$ 0.01	0.30 $\pm$ 0.03	0.65 $\pm$ 0.04	0.83 $\pm$ 0.19
阳性对照组	4	0.83 $\pm$ 0.08 <sup>▲</sup>	0.94 $\pm$ 0.10 <sup>▲</sup>	0.22 $\pm$ 0.02 <sup>▲</sup>	0.46 $\pm$ 0.05 <sup>▲</sup>	0.51 $\pm$ 0.04 <sup>▲</sup>	0.27 $\pm$ 0.21 <sup>▲</sup>
散剂低剂量+顺铂组	5	0.98 $\pm$ 0.07 <sup>△</sup>	1.07 $\pm$ 0.09 <sup>▲</sup>	0.33 $\pm$ 0.01 <sup>▲△</sup>	0.33 $\pm$ 0.04 <sup>△</sup>	0.42 $\pm$ 0.03 <sup>▲△</sup>	0.55 $\pm$ 0.17
散剂低剂量组	4	0.80 $\pm$ 0.04 <sup>▲*</sup>	0.83 $\pm$ 0.10 <sup>▲*</sup>	0.23 $\pm$ 0.01 <sup>▲*</sup>	0.68 $\pm$ 0.06 <sup>▲△*</sup>	0.46 $\pm$ 0.04 <sup>▲</sup>	0.22 $\pm$ 0.21 <sup>▲*</sup>
散剂高剂量组	4	0.98 $\pm$ 0.04 <sup>△*</sup>	1.44 $\pm$ 0.10 <sup>▲△**</sup>	0.27 $\pm$ 0.01 <sup>▲△**</sup>	0.34 $\pm$ 0.05 <sup>△*</sup>	0.48 $\pm$ 0.03 <sup>▲*</sup>	0.37 $\pm$ 0.16 <sup>▲</sup>
汤剂低剂量组	5	1.14 $\pm$ 0.07 <sup>▲△**■</sup>	1.68 $\pm$ 0.14 <sup>▲△**■</sup>	0.27 $\pm$ 0.01 <sup>▲△**</sup>	0.30 $\pm$ 0.04 <sup>△*</sup>	0.61 $\pm$ 0.04 <sup>▲△**■</sup>	0.70 $\pm$ 0.18 <sup>▲△**■</sup>
汤剂高剂量组	6	0.88 $\pm$ 0.04 <sup>▲△*</sup>	1.50 $\pm$ 0.11 <sup>▲△**</sup>	0.32 $\pm$ 0.01 <sup>▲△**■</sup>	0.53 $\pm$ 0.08 <sup>▲△**■</sup>	0.54 $\pm$ 0.03 <sup>▲△**</sup>	0.67 $\pm$ 0.17 <sup>△*</sup>

注:与模型组相比,▲ $P$ <0.05;与阳性对照组相比,△ $P$ <0.05;与散剂低剂量+顺铂组相比,\* $P$ <0.05;与散剂低剂量组相比,△ $P$ <0.05;与散剂高剂量组相比,■ $P$ <0.05。

散剂低剂量组 Erk、p38、JNK、VEGFA 蛋白表达水平降低( $P$ <0.05),MMP-2 蛋白表达水平升高( $P$ <0.05);散剂高剂量组 p38、HIF-1 $\alpha$  蛋白表达水平升高( $P$ <0.05),JNK 蛋白表达水平降低( $P$ <0.05);汤剂低剂量组 Erk、p38、HIF-1 $\alpha$  蛋白表达水平升高( $P$ <0.05),JNK 蛋白表达水平降低( $P$ <0.05);汤剂高剂量组 p38、MMP-2、HIF-1 $\alpha$  蛋白表达水平升高( $P$ <0.05),Erk 蛋白表达水平降低( $P$ <0.05)。与散剂低剂量组相比,散剂高剂量组、汤剂低剂量组、汤剂高剂量组 Erk、p38、JNK 及汤剂低剂量组、汤剂高剂量组的 HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA 蛋白表达水平升高( $P$ <0.05),散剂高剂量组、汤剂低剂量组、汤剂高剂量组 MMP-2 蛋白表达水平下降( $P$ <0.05)。与散剂高剂量组相比,汤剂低剂量组 Erk、p38、HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA 蛋白表达水平升高( $P$ <0.05),汤剂高剂量组 JNK、MMP-2 蛋白表达水平升高( $P$ <0.05)。详见表 4、图 4。

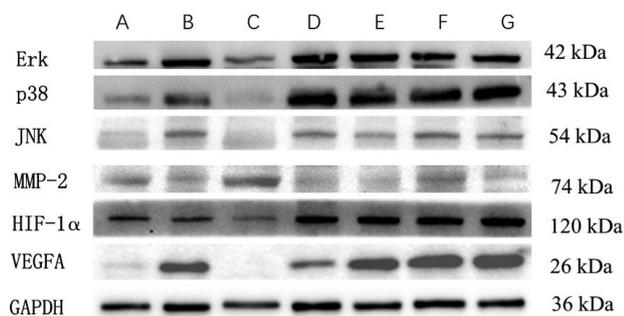


图 4 各荷瘤组小鼠皮下移植瘤组织 Erk、p38、JNK、MMP-2、HIF-1 $\alpha$  和 VEGFA 蛋白表达条带图

Fig.4 Representative blots of Erk, p38, JNK, MMP-2, HIF-1 $\alpha$ , and VEGFA protein expressions in the subcutaneous xenograft tumor tissues in each tumor-bearing group

注:A.阳性对照组;B.散剂低剂量+顺铂组;C.散剂低剂量组;D.散剂高剂量组;E.汤剂低剂量组;F.汤剂高剂量组;G.模型组。

## 4 讨论

中医学认为肺癌的发病因素主要为痰、瘀、毒、虚<sup>[10]</sup>,以扶正祛邪为治则。虫类药物属血肉有情之品,具有“无微不入、无坚不破”的特性<sup>[11]</sup>,既能扶正,又善搜剔攻毒、消瘀散结。医家张锡纯、周岱翰等治疗恶性肿瘤善用虫类药物,全蝎、蜈蚣、壁虎是治疗肺癌的常用药物<sup>[12-14]</sup>。从全蝎毒素中分离出的几种化合物被证实对不同的癌症细胞具有抑制作用<sup>[15]</sup>。全蝎与蜈蚣是抗肿瘤治疗的常用药对<sup>[12]</sup>,两者联用可能通过调控 COX-2/Akt/MDM2/p53 信号通路抑制非小细胞肺癌细胞 A549 的增殖<sup>[16]</sup>。壁虎抗肿瘤疗效确切,其作用机制可能与抑制肿瘤细胞增殖分化、诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤部位血管新生等有关<sup>[17]</sup>。

汤剂是临床最为常用的中药剂型,具有配方灵活的特点<sup>[18]</sup>,但煎煮过程繁琐。将气味特殊的虫类药物粉碎过筛制成散剂,填充于空心硬质胶囊中制成胶囊剂<sup>[19]</sup>,既保留了原有的药性,又能掩盖不良气味,方便携带及服用。不同中药剂型在应用中各有优缺点,本实验过程中使用了中药汤剂及散剂以探索其在作用的差异。

MAPK 信号传导通路在非小细胞肺癌的发生、发展、转移和侵袭等阶段均发挥重要作用,Erk、p38、JNK 是其中的重要亚族。研究表明,中药通过降低 MAPK 通路中关键蛋白 Erk、p38、JNK 的磷酸化水平,抑制肺癌细胞 MAPK 信号传导通路的活化,能促进肺癌细胞凋亡,抑制肺癌细胞的体内体外增殖<sup>[20-22]</sup>。HIF 有 HIF-1、HIF-2 及 HIF-3 三种亚型,均由  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基构成, $\alpha$  亚基是活性亚基<sup>[23]</sup>。在肺癌等恶性肿瘤中,HIF-1 $\alpha$  的表达量增加,HIF-1 能促进肿瘤血

管生成、上调并激活基质金属蛋白酶及赖氨酸氧化酶等细胞因子及信号通路,调节包括 VEGF 在内的多种血管生长因子表达的编码基因,参与肿瘤细胞的增殖、侵袭、转移等相关生物学行为。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<sup>[24]</sup>。

本研究结果显示,三虫通络散结方能抑制 Lewis 肺癌皮下移植瘤生长,并且在稳定体质量上较顺铂注射液有优势。三虫通络散结方有抑制肿瘤肺转移、肝转移的作用;高剂量组(散剂和汤剂)较低剂量组有更好的抑制肝转移作用。三虫通络散结方可下调 Erk、p38、JNK、HIF-1 $\alpha$  mRNA 表达的效果,高剂量组(散剂、汤剂)三虫通络散结方可下调 VEGFA mRNA 表达。三虫通络散结方可以下调 Erk、p38、JNK、HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA 蛋白表达,不同剂量、不同剂型的三虫通络散结方对各蛋白表达上的影响有差异,呈现的趋势是在同级别剂量组中,散剂组抑制 p38、JNK、HIF-1 $\alpha$  和 VEGFA 蛋白表达优于汤剂组;剂量增减对散剂作用的影响似乎较汤剂明显,散剂高剂量组抑制 MMP-2 蛋白表达优于散剂低剂量组。

综上所述,三虫通络散结方可抑制 Lewis 肺癌小鼠移植瘤的生长,有抑制肿瘤肺转移、肝转移的作用,推测其机制可能与下调 Erk、p38、JNK mRNA 表达,下调 Erk、p38、JNK 蛋白表达,抑制 MAPK 信号通路有关。三虫通络散结方不同剂量及不同剂型在抑瘤作用上有差异,高剂量组抑制移植瘤体、抑制肝转移作用更佳,以散剂高剂量抑瘤作用更佳。本研究为三虫通络散结方在肺癌临床治疗中的应用提供了新的实验基础,其药理学、毒理学等方面有待后续研究探讨。

## 参考文献

- [1] 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.
- [2] 陈函,王柯,胡志强,等. 基于 Nr2 信号通路探讨艾迪注射液联合 GP 化疗干预 Lewis 肺癌小鼠的作用研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(5): 755-761.
- [3] 王霖,黄紫弦,黄益玲,等. 肺癌化疗中的顺铂耐药机制[J]. 生命的化学, 2021, 41(5): 989-995.
- [4] 胡晓炜,骆莹滨. 中医药治疗非小细胞肺癌研究进展[J]. 光明中医, 2024, 39(10): 2108-2110.
- [5] 王鲁娇,司文涛. 中医药干预 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路调控肿瘤

- 作用机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(21): 262-270.
- [6] 仇园园,宋炜,刘金林,等. 中医“治未病”思想对肿瘤患者康复的指导作用探析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2018, 25(S1): 181-183.
- [7] 王河宝,杨菲,孙悦,等. 中医“治未病”思想在恶性肿瘤全程防治中的作用研究[J]. 江西中医药大学学报, 2018, 30(2): 18-19, 58.
- [8] 方肇勤. 大鼠/小鼠辨证论治实验方法学[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 132-139.
- [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.
- [10] 徐竞一,张淑芮,王晓群,等. “黜浊培本”理论指导长夏季节治癌思路[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(8): 1495-1499.
- [11] 黄裕芳,张恩欣. 国医大师周岱翰治癌运用虫类药物经验[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(10): 4620-4622.
- [12] 雷书浚. 常用虫类药物在恶性肿瘤中的临床应用[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2023.
- [13] 潘磊. 治疗肺癌方剂中药药的配伍规律研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2019.
- [14] 陈群伟,孔燕妮,赵琦琦,等. 基于数据挖掘探讨含天龙中药处方治疗恶性肿瘤的用药规律[J]. 浙江中西医结合杂志, 2020, 30(7): 595-598.
- [15] DUEÑAS-CUELLAR R A, SANTANA C J C, MAGALHÃES A C M, et al. Scorpion toxins and ion channels: Potential applications in cancer therapy[J]. Toxins, 2020, 12(5): 326.
- [16] 张红,张豪健,朱纪焯,等. 全蝎、蜈蚣调控非小细胞肺癌细胞增殖的机制研究[J]. 生物技术, 2021, 31(6): 561-566.
- [17] 陈林伟,戴培培,江勇,等. 中药壁虎抗肿瘤的研究现状及展望[J]. 南京中医药大学学报, 2022, 38(10): 892-897.
- [18] 马宁. 关于医疗机构中药制剂的进展[J]. 中国医药指南, 2024, 22(18): 55-58.
- [19] 汪云伟,侯东,王兴灵,等. 医疗机构中药临方制剂的研究现状及展望[J]. 亚太传统医药, 2022, 18(6): 235-239.
- [20] 郭洪梅,赵丹,曹琳,等. 白花蛇舌草水提物通过抑制 MAPK 通路致肺癌细胞的凋亡[J]. 药学与临床研究, 2019, 27(1): 5-9.
- [21] 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.
- [22] 熊秋迎,朱金华,孙昊鑫,等. 清燥救肺汤对乌拉坦诱导肺癌模型鼠 TGF- $\beta$ 1、Smad2 和 p38MAPK 的影响[J]. 中药药理与临床, 2018, 34(3): 14-18.
- [23] 张璐,方岳,牛继国,等. 缺氧诱导因子-1 与恶性肿瘤关系的研究进展[J]. 医学综述, 2021, 27(5): 924-930.
- [24] 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.

(本文编辑 周旦)