

- [11] Li L, Han R, Xiao H, *et al.* Metformin sensitizes EGFR-TKI-resistant human lung cancer cells *in vitro* and *in vivo* through inhibition of IL-6 signaling and EMT reversal [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(10): 2714-2726.
- [12] 程 樱, 张 立. 中药抗肿瘤机制及药物研究进展 [J]. 中国药业, 2013, 22(17): 103-104.
- [13] 黄自丽, 黄修燕, 郑 起. 中药抗肿瘤作用及其作用机制研究进展 [J]. 医学综述, 2010, 16(3): 386-389.
- [14] Li X, Lin Z, Zhang B, *et al.* β -elemene sensitizes hepatocellular carcinoma cells to oxaliplatin by preventing oxaliplatin-induced degradation of copper transporter 1 [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 21010.
- [15] Wellner U, Schubert J, Burk U C, *et al.* The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs [J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(12): 1487-1495.
- [16] Wellner U, Brabletz T, Keck T. ZEB1 in Pancreatic Cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2010, 2(3): 1617-1628.

补肺化痰汤对气虚血瘀证 Lewis 肺癌小鼠的影响

冯原¹, 江颖², 周颖³, 刘锐⁴, 谢有科⁵, 李健哲⁶, 朱林¹, 林伟楠¹, 宋盛娥¹, 韦璐璐¹

(1. 广西中医药大学附属瑞康医院呼吸内科, 广西南宁 530011; 2. 广西中医药大学附属瑞康医院神经内科, 广西南宁 530011; 3. 广西中医药大学附属瑞康医院肿瘤放疗科, 广西南宁 530011; 4. 广西中医药大学附属瑞康医院老年病科, 广西南宁 530011; 5. 广西中医药大学附属瑞康肿瘤内科, 广西南宁 530011; 6. 广西中医药大学附属瑞康医院药学部, 广西南宁 530011)

摘要: 目的 研究补肺化痰汤对气虚血瘀证 Lewis 肺癌小鼠的影响。方法 采用多因素刺激, 通过疲劳、惊恐、高脂饮食等刺激方法建立气虚血瘀证, 小鼠随机分为对照组、气虚血瘀组及补肺化痰汤低、中、高剂量组 (0.7、1.4、2.8 g/kg), 灌胃给药 15 d, 1 次/d, 检测气虚血瘀证小鼠血液流变学指标。原位接种 Lewis 肺癌细胞于气虚血瘀证小鼠腋下建立气虚血瘀证小鼠 Lewis 肺癌模型, 分为模型组、阳性药对照组 (1 mg/kg 顺铂) 及补肺化痰汤低、中、高剂量组 (0.7、1.4、2.8 g/kg), 灌胃给药 15 d, 1 次/d, 记录 Lewis 肺癌气虚血瘀证小鼠体质量、肿瘤体积、肿瘤重量、脏器指数, TUNEL 染色考察肿瘤组织凋亡, Western Blot 检测肿瘤组织中凋亡蛋白。结果 补肺化痰汤能显著改善气虚血瘀证小鼠血液流变指标 (血液黏度、血浆粘度、凝血功能) ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。补肺化痰汤能显著减小气虚血瘀证 Lewis 肺癌小鼠肿瘤重量、体积 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 诱导肿瘤组织凋亡, 显著抑制 Bcl-2 蛋白表达 ($P < 0.01$), 促进 cleaved-caspase-3、cleaved-caspase-9、Bax 蛋白表达 ($P < 0.01$)。结论 补肺化痰汤抑制 Lewis 肺癌气虚血瘀证小鼠肿瘤生长, 其机制可能与诱导肿瘤组织凋亡有关。

关键词: 补肺化痰汤; 气虚血瘀证; Lewis 肺癌; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2019)11-2625-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.11.014

Effects of Bufei Huayu Decoction on mice with Lewis lung cancer of Qi-Deficiency and Blood-Stasis Pattern

FENG Yuan¹, JIANG Ying², ZHOU Ying³, LIU Rui⁴, XIE You-ke⁵, LI Jian-zhe⁶, ZHU Lin¹, LIN Wei-nan¹, SONG Sheng-e¹, WEI Lu-lu¹

(1. Department of Respiratory Medicine, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China; 2. Department of Neurology, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China; 3. Department of Radiotherapy, Ruikang

收稿日期: 2018-09-28

基金项目: 2016 年广西教育厅中青年骨干教师基础能力提升项目 (KY2016YB216); 广西中医药大学 2018 年广西一流学科建设项目重点课题 (2018XK087)

作者简介: 冯原 (1980—), 男, 硕士, 副主任医师, 研究方向为中西医结合防治肺恶性肿瘤。Tel: 13006914616, E-mail: fengyuan14616@163.com

Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China; 4. Department of Geriatrics, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China; 5. Department of Oncology, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China; 6. Department of Pharmacy, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China)

KEY WORDS: Bufei Huayu Decoction; Qi-Deficiency and Blood-Stasis Pattern; Lewis non-small-cell-lung cancer; apoptosis

肺癌主要分为小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 和非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 两大类, 其中 NSCLC 约占肺癌的 85%^[1-3]。在全球范围内, 肺癌是目前威胁人类生命健康的重大疾病之一, 是肿瘤中发病率和死亡率最高的疾病^[4]。我国肺癌的发病率呈持续上升的趋势, 并且城市的发病率远远高于农村。由于环境污染、吸烟、人口基础庞大等因素, 我国将成为世界第一肺癌大国^[5]。因此, 采取积极有效的措施防治肺癌成为当务之急。

气虚血瘀证是指气虚运血无力, 血行瘀滞而表现的症候^[6-7]。常由病久气虚, 渐致瘀血内停而引起。临床常表现为面色淡白或晦滞、身倦乏力、气少懒言、疼痛如刺、常见于胸胁、痛处不移、拒按、舌淡暗或有紫斑、脉沉涩^[8-9]。此外, 气虚血瘀证是晚期非小细胞肺癌的一个重要证型, 血液高凝状态及免疫功能低下是该证的重要病理基础^[10-11]。目前, 中医药已经成为肺癌治疗的重要组成部分。中医药在诸多方面, 如稳定瘤灶、延长生存期、增强机体免疫功能、改善临床症状、提高生活质量、减轻放化疗毒副作用等均显示出一定的疗效和优势。因此, 依据中医药的基本理论, 针对气虚血瘀证采取有效的治疗将有可能成为治疗肺癌的有效手段。

因此, 本研究将考察补肺化痰汤是否可以抑制气虚血瘀证小鼠 Lewis 肺癌的增殖, 并探讨补肺化痰汤的抗肿瘤作用机制。

1 材料

1.1 药物 补肺化痰汤的配方主要党参、黄芪、生地、鳖甲、白花蛇舌草、半枝莲、生地、赤芍、丹参、莪术、三棱、川芎、紫苑、前胡、杏仁、甘草组成, 药材购于北京同仁堂, 并经河北省沧州中西医结合医院药剂科闫国强主任药师鉴定为正品, 均符合 2015 年版《中国药典》规范。

1.2 动物及细胞株 Lewis 肺癌细胞购于中国科学院上海生命科学生物化学与细胞生物学研究所。C57BL/6 小鼠购于北京华阜康科技股份有限公司

[生产许可证 SCXK (京) 2019-0008], 饲养在恒温、恒湿动物房内, 饲料、饮水等均经高压蒸汽灭菌。

1.3 试剂 RPMI1640 培养基购于美国 Gibco 公司 (批号 090817); 优级胎牛血清 (FBS, 批号 0928427) 购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司; 青霉素-链霉素 (批号 01234127)、TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (批号 01923) 均购自上海碧云天生物技术有限公司; 羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES, 批号 02427)、胰蛋白酶 (Trypsin, 1:250, 批号 09283) 均购买于美国 Sigma Chemical 公司; 一抗 caspase-3、caspase-9、Bax、Bcl-2、 β -actin 购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司 (批号分别为 sc-7272、sc-24528、sc-4239、sc-509、sc-8432)。

1.4 仪器 全自动血流变仪购自河南世辉医疗器械有限公司 (批号 0124); Western blot 电泳仪及转膜仪器购自 Bio-rad 公司 (批号 034124)。

2 方法

2.1 补肺化痰汤有效成分提取 补肺化痰汤组方为党参 20 g、黄芪 15 g、生地 10 g、鳖甲 10 g、白花蛇舌草 15 g、半枝莲 15 g、生地 10 g、赤芍 15 g、丹参 10 g、莪术 10 g、三棱 10 g、川芎 10 g、紫苑 10 g、前胡 10 g、杏仁 10 g、甘草 6 g。用蒸馏水煎成补肺化痰汤药液, 浓缩配制成含生药量 2 g/mL, 过滤, 分装, 4℃ 保存。

2.2 建立气虚血瘀证小鼠模型 60 只 C57BL/6 小鼠, 5 周龄, SPF 级, 雄性, 体质量 20~22 g。随机取 10 只小鼠作为空白对照组, 在正常环境下饲养, 其余 50 只参照文献采用多因素刺激制作气虚血瘀证模型^[8]。高脂高糖饮食, 84.5% 基础饲料加入 5% 蛋黄粉、0.5% 胆固醇、5% 猪油、5% 蔗糖。睡眠剥夺, 采用不可预知的慢性睡眠剥夺方法进行刺激, 包括按常相光照 (8:00 至 20:00 光照, 20:00 至 8:00 黑暗)、反相光照 (8:00 至 20:00 黑暗, 20:00 至 8:00 光照)、持续光照及持续黑暗 4 个过程 (4 个过程为 1 个阶段), 每个阶段

为7 d,连续重复6周,在每个阶段中4个过程随机安排,每个阶段对小鼠进行48 h睡眠剥夺,发现小鼠进入睡眠时,低电压刺激促使小鼠保持清醒,使小鼠无法进入睡眠状态。小鼠分为对照组、气虚血瘀组及补肺化痰汤低、中、高剂量组(0.7、1.4、2.8 g/kg)。按照相当于人等效剂量的5倍、10倍、20倍得到补肺化痰汤低、中、高剂量,灌胃给药,1次/d,连续给药15 d。

实验期间观察记录小鼠行为表现、症状体征。实验期间取血测定血液流变指标,以验证气虚血瘀证动物模型成功。

2.3 建立气虚血瘀证 Lewis 肺癌小鼠模型 取对数生长期的 Lewis 肺癌细胞,消化、离心、计数后,重悬制备成浓度为 1×10^7 /mL 细胞悬液,0.2 mL/只接种于气虚血瘀小鼠右后肢皮下。根据瘤体积,将50只小鼠分成模型组、阳性药对照组(1 mg/kg 顺铂)及补肺化痰汤低、中、高剂量组(0.7、1.4、2.8 g/kg),每组10只。按照相当于人等效剂量的5倍、10倍、20倍得到补肺化痰汤低、中、高剂量,灌胃给药,1次/d;模型组给予等体积生理盐水灌胃、正常喂养;阳性药对照组按1 mg/kg 剂量,腹腔注射顺铂,1次/d,连续给药15 d。

隔天观察小鼠的活动状态和精神状态等,称量并记录小鼠的体质量,取各组的平均值,绘制体质量变化曲线。游标卡尺测量荷瘤小鼠肿瘤的长短径,a代表肿瘤最短径,b代表肿瘤最长径,肿瘤体积 = $1/2 \times a^2 \times b$,绘制肿瘤生长曲线。肿瘤生长抑制率 = $[(\text{模型组平均瘤重} - \text{给药组平均瘤重}) / \text{模型组平均瘤重}] \times 100\%$ 。剥离各组小鼠的心脏、脾脏、双肺、肾脏、肝脏等组织称定质量,脏器指数(mg/g) = 脏器重(mg) / 体质量(g)。

2.4 TUNEL 染色 石蜡切片二甲苯浸洗2次 \times 5 min脱蜡,递减梯度酒精(100%、95%、90%、85%、70%)水化,3 min/次,PBS漂洗2次,5 min/次,滴加新配制蛋白酶K工作溶液,室温下静置15 min,制备TUNEL反应混合液,实验组用50 μ L TdT+450 μ L 荧光素酶标记的dUTP液混匀,取50 μ L混合液加在玻片上,阴性对照组只加50 μ L荧光素酶标记的dUTP液,于暗湿盒中37 $^{\circ}$ C孵育1 h,PBS漂洗3次,5 min/次,玻片干后加50 μ L converter-POD于标本上,加盖玻片或封口膜在暗湿盒中37 $^{\circ}$ C反应30 min,PBS漂洗3次,5 min/次,在组织处加50 μ L DAB底物,室温孵育

5 min,PBS漂洗3次,5 min/次,苏木素复染3 s后,立即用自来水冲洗,梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树胶封片。于光学显微镜下观察凋亡细胞并拍照。

2.5 Western blot 取出荷瘤鼠肿瘤组织置于研钵中,液氮条件下用研磨棒研磨,将组织转移至EP管中,加入适量RIPA裂解液及PMSF蛋白酶抑制剂,超声波粉碎30 s,冰上裂解30 min后,4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min离心30 min沉淀组织碎片,取上清,BCA法进行蛋白定量。SDS-PAGE凝胶,常规电泳,转膜,5%脱脂奶粉封闭,一抗(1:1 000)4 $^{\circ}$ C孵育过夜,二抗(1:5 000)室温孵育2 h,ECL显色。采用Image J2图像分析软件对蛋白灰度值进行分析。

2.6 统计学分析 应用SPSS 22.0统计学软件。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较采用One-Way ANOVA分析,多重比较在方差齐性时用Bonferroni方法,方差不齐性时用Dunnett T3方法。 $P < 0.05$ 差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 气虚血瘀证小鼠模型的建立及表征观测 通过疲劳、惊恐、高脂饮食等刺激方法,造模组小鼠出现不同程度的气虚血瘀证表型,具体表现为倦怠嗜睡,精神萎靡,活动性较差,运动时间短,体质下降,过劳后气短喘息,毛发稀疏且容易脱落,舌质颜色暗淡,尾部出现不同程度的皮下瘀紫或青斑;而对照组小鼠则活动灵活,毛色洁白光泽,未见尾部青斑,体质量正常,未见其他异常表现。详细记录对照及模型组小鼠的体质量、运动(游泳)时间及运动后的排便量,如表1所示,与对照组比较,气虚血瘀模型组小鼠的体质量和游泳时间明显减少,而游泳后的排便量明显增加($P < 0.01$),表明气虚血瘀小鼠的气虚体弱、乏力及便溏症状。

表1 气虚血瘀证小鼠相关指标评定($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Evaluation of relevant indicators for identification of Qi-Deficiency and Blood-Stasis Pattern in mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物/只	体质量/g	运动后排便量/粒	游泳时间/s
对照组	10	20.5 \pm 0.8	2.5 \pm 1.3	50.4 \pm 5.2
气虚血瘀组	50	18.5 \pm 0.6*	5.6 \pm 1.5*	30.1 \pm 4.6**

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

3.2 补肺化痰汤对气虚血瘀证小鼠血液流变学指标的影响 与对照组比较,气虚血瘀组的高、中、低切变率,血浆黏度显著地升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),血浆凝血酶原时间(PT)、活化的部分凝

血活酶时间 (APTT)、血浆纤维蛋白原 (FIB) 水能显著逆转气虚血瘀组血液流变学指标 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 而补肺化痰汤组 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 补肺化痰汤对气虚血瘀证小鼠血液流变学指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 2 Effects of Bufei Huayu Decoction on hemorheological parameters in mice of Qi-Deficiency and Blood-Stasis Pattern ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	全血黏度 / (mPa·s)				血浆黏度 / (mPa·s) 50 s ⁻¹	PT/s	APTT/s	FIB / (g·L ⁻¹)
	200 s ⁻¹	100 s ⁻¹	50 s ⁻¹	1 s ⁻¹				
对照组	4.01±0.15	5.38±0.23	5.22±0.37	20.22±1.87	1.56±0.17	15.78±2.91	19.11±1.99	2.59±0.50
气虚血瘀组	4.81±0.32 ^{△△}	5.87±0.51 [△]	5.93±1.07 [△]	28.45±0.65 ^{△△}	2.46±0.41 ^{△△}	13.11±0.54 [△]	16.23±0.66 ^{△△}	1.89±0.61 [△]
补肺化痰汤低剂量组	4.45±0.11 [▲]	5.34±0.24 [▲]	5.71±0.23 [▲]	26.37±0.43 [▲]	2.12±0.35 [▲]	14.21±0.61 [▲]	17.88±0.42 [▲]	1.99±0.34 [▲]
补肺化痰汤中剂量组	4.31±0.17 ^{▲▲}	5.57±0.11 [▲]	5.53±0.18 ^{▲▲}	24.83±0.46 ^{▲▲}	2.03±0.34 [▲]	14.88±0.71 [▲]	18.31±0.45 [▲]	2.33±0.44 [▲]
补肺化痰汤高剂量组	4.12±0.24 ^{▲▲}	5.14±0.32 ^{▲▲}	5.38±0.21 ^{▲▲}	21.31±0.74 ^{▲▲}	1.76±0.64 ^{▲▲}	15.44±1.42 ^{▲▲}	18.99±0.78 ^{▲▲}	2.49±0.43 ^{▲▲}

注: 与对照组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$; 与气虚血瘀组比较, [▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.01$

3.3 气虚血瘀 Lewis 肺癌小鼠模型的建立 将处于生长对数期的 Lewis 肺癌细胞悬液接种至气虚血瘀模型小鼠的右后肢皮下, 接种 1 周后成瘤, 见图 1。

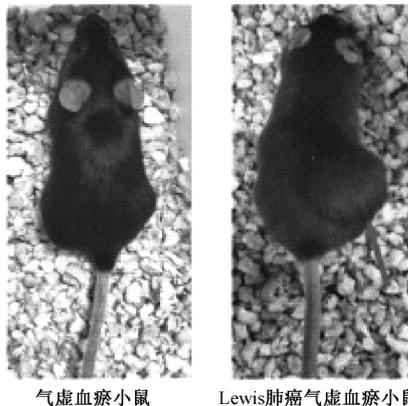


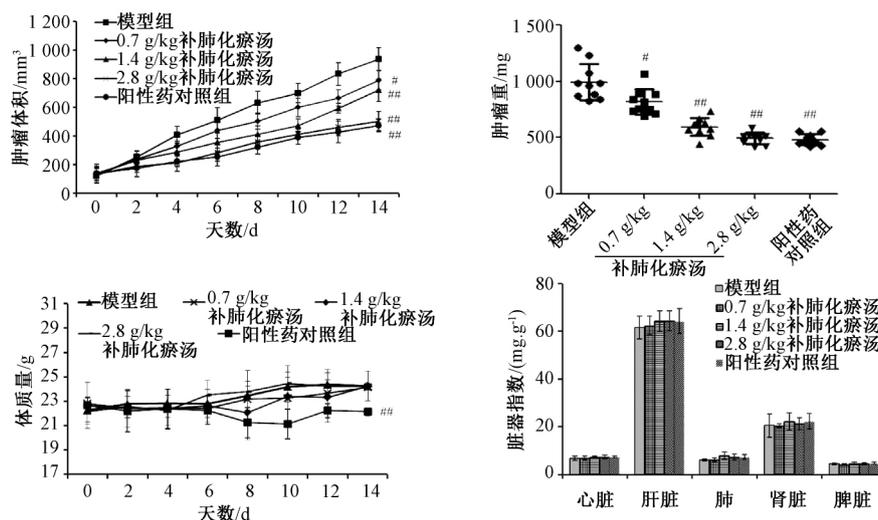
图 1 气虚血瘀证 Lewis 肺癌小鼠模型的建立

Fig. 1 Establishment of mouse models with Lewis lung cancer of Qi-Deficiency and Blood-Stasis Pattern

3.4 补肺化痰汤对气虚血瘀证 Lewis 肺癌小鼠肿瘤生长、脏器指数及体质量的影响 补肺化痰汤组、阳性药对照组肿瘤体积、肿瘤重均显著低于模型组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且呈浓度依赖性地抑制肿瘤生长。顺铂阳性药对照组抑瘤率为 59.15%, 补肺化痰汤低剂量为 17.98%, 补肺化痰汤中剂量为 40.06%, 补肺化痰汤高剂量为 51.41%。

观察发现各组小鼠均精神状态良好, 补肺化痰汤各治疗组的体质量均与模型组无显著差异, 平稳缓慢增长; 而阳性药对照组小鼠体质量明显低于模型组 ($P < 0.01$), 治疗结束时, 小鼠体质量轻微下降。补肺化痰汤组、阳性药对照组的肝脏、脾脏、肺及肾脏指数与模型组比较均无显著性差异。

3.5 补肺化痰汤对 Lewis 肺癌气虚血瘀证小鼠肿瘤组织凋亡的影响 如图 3 TUNEL 染色所示, 模型组肿瘤细胞大小不等, 表明其增殖迅速, 且不稳



注: 与模型组比较, [#] $P < 0.05$, ^{###} $P < 0.01$

图 2 补肺化痰汤对气虚血瘀证 Lewis 肺癌小鼠肿瘤生长、脏器指数及体质量的影响

Fig. 2 Effects of Bufei Huayu Decoction on tumor growth, organ index and body mass of mice with Lewis lung cancer of Qi-Deficiency and Blood-Stasis Pattern

定; 而补肺化痰汤高、中剂量组及阳性药对照组中的肿瘤细胞胀大, 且凋亡细胞百分比显著增加。这说明了不同浓度的补肺化痰汤可以诱导肿瘤组织发生不同程度的凋亡。

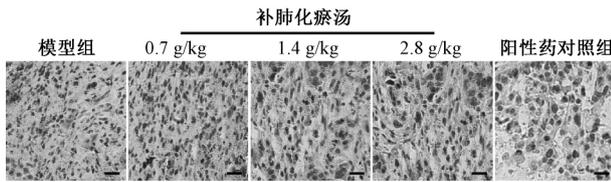
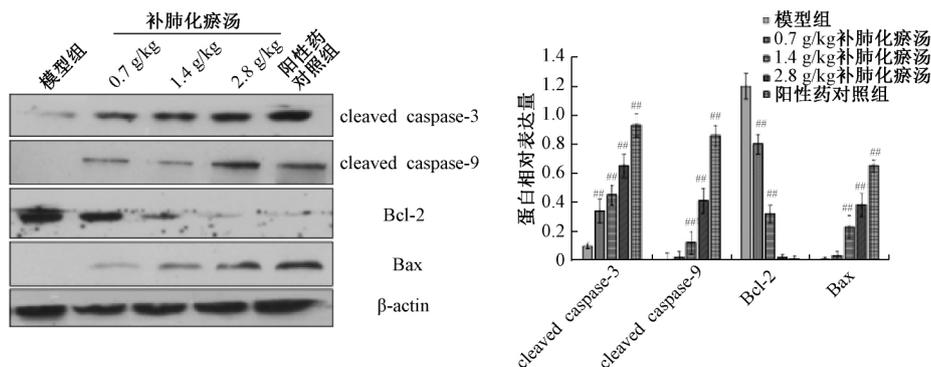


图3 补肺化痰汤对气虚血瘀证 Lewis 肺癌小鼠组织凋亡的影响

Fig. 3 Effects of Bufei Huatan Decoction on tissue apoptosis of mice with Lewis lung cancer of Qi-Deficiency and Blood-Stasis Pattern

3.6 补肺化痰汤对气虚血瘀证 Lewis 肺癌小鼠肿瘤组织凋亡蛋白的影响 半胱氨酸蛋白酶



注: 与模型组比较, ## $P < 0.01$

图4 补肺化痰汤对气虚血瘀证 Lewis 肺癌小鼠组织凋亡蛋白的影响

Fig. 4 Effects of Bufei Huatan Decoction on apoptosis protein of mice with Lewis lung cancer of Qi-Deficiency and Blood-Stasis Pattern

4 讨论

气虚血瘀证是临床诸多疾病常见的中医证候之一^[6-7]。由于气虚运血无力、血行瘀滞而表现的症候, 常由病久气虚、渐致瘀血内停而引起。此外, 气虚血瘀证是晚期非小细胞肺癌的一个重要证型^[16-17]。近年来, 随着生活方式的转变加上工作节奏的加快, 气虚血瘀证在临床上多见, 并成为非小细胞肺癌的一个重要的标记及诱因^[10-11, 18]。非小细胞肺癌是严重威胁着人类生命健康的恶性肿瘤。目前, 临床上治疗非小细胞肺癌通常使用细胞毒类抗肿瘤药物, 但是由于细胞毒类抗肿瘤药物的选择性较差, 常引起危害患者健康的毒副作用。因此, 寻找新的、高选择性、无毒副作用的抗肿瘤药物迫在眉睫。中药复方是多成分混合体, 作为外源性物

(caspase) 家族是一种胞浆蛋白水解酶, 在细胞凋亡的过程中发挥着至关重要的作用^[12]。凋亡是 caspase 家族成员介导的蛋白酶级联反应的过程, 其中 caspase-3 是多种凋亡途径的共同下游效应分子, 也是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶, 被称为死亡执行蛋白酶^[13-14]。caspase-9 是线粒体凋亡途径的效应蛋白, 线粒体凋亡途径被激活, 细胞质中的 caspase-9 前体发生剪切, 使其活化启动 caspase 级联反应^[15]。Bcl-2 家族蛋白包括抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白 Bax, 与线粒体膜通透性及线粒体膜电位的维持密切相关, 在线粒体凋亡途径中扮演着重要角色^[15]。如图 4 所示, 与模型组比较, 补肺化痰汤能显著促进 cleaved caspase-3、cleaved caspase-9、Bax 蛋白表达 ($P < 0.01$); 抑制 Bcl-2 蛋白表达 ($P < 0.01$)。

质进入机体必然对内环境产生扰动, 具有整体性和互助性原则。中医认为“气为血帅、血为气母”“气行则血行、气滞则血瘀”, 气血之间相互依存、相互促进, 在气虚血瘀型中互为因果, 补肺化痰汤既有补气的功效, 又可活血, 对气虚血瘀证的高“浓、黏、凝、聚”状态有显著改善, 因此补肺化痰汤将有可能成为治疗非小细胞肺癌的一种新的治疗药物^[9, 17, 19-21]。

在本研究中, 通过疲劳、惊恐、高脂饮食等刺激的小鼠出现倦怠嗜睡, 精神萎靡, 四肢蜷缩, 活动性较差; 毛发稀疏且易脱落, 干燥枯黄且失去原有光泽; 大部分小鼠出现了不同程度的腹泻; 尾部出现不同程度的皮下瘀紫或青斑不同程度的气虚血瘀证表型。统计气虚血瘀小鼠和对照小鼠的体质

量、运动时间及运动后排便量,发现气虚血瘀证小鼠的体质量和运动时间均明显低于对照小鼠,而运动后排变量却显著增加,这些症状分别对应了气虚血瘀的消瘦、懒动和便溏症状。于此同时,临床研究发现,气虚血瘀证患者的血液均表现出“浓、黏、凝、聚”等改变,故将凝血指标的异常、血液流变学列为气虚血瘀证的实验室诊断标准^[17,21-22]。通过疲劳、惊恐、高脂饮食等刺激方法,造模小鼠的高、中、低切变率,血浆黏度显著地升高,而凝血功能(PT、APTT和FIB)降低,表现出不同程度的“浓、黏、凝、聚”等气虚血瘀证表型。灌胃给予不同剂量补肺化痰汤后,造模小鼠的状态随着药物浓度的增加逐渐恢复,精神状态良好。此外,补肺化痰汤呈浓度依赖性地降低造模小鼠的高、中、低切变率,血浆黏度。这表明了,补肺化痰汤可以有效地逆转通过疲劳、惊恐、高脂饮食等刺激方法引起的小鼠气虚血瘀证表型。

大量文献均表明,放、化疗是通过诱导细胞凋亡发挥抗肿瘤作用的^[23-25]。为了考察补肺化痰汤是否具有抗非小细胞肺癌的作用,建立了具有气虚血瘀证的Lewis肺癌小鼠,并通过TUNEL染色考察补肺化痰汤是否可以诱导肿瘤组织细胞发生凋亡。研究表明,补肺化痰汤可以呈浓度依赖性地增加肿瘤组织中TUNEL阳性细胞的百分比。此外,细胞凋亡是caspase家族成员介导的蛋白酶级联反应的过程,即在凋亡诱导信号的刺激下,启动型的caspases先被激活,发挥水解蛋白的作用,进而激活下游的效应型caspases,大范围地降解细胞内蛋白,最终使细胞走向死亡^[26-28]。蛋白免疫印迹检测结果均表明,补肺化痰汤能激活caspase级联反应的最终效应分子caspase-3。补肺化痰汤是通过引起Lewis肺癌小鼠肿瘤组织的凋亡而发挥抗肿瘤作用的。此外,在凋亡过程中,细胞内caspase激活主要通过三条途径:线粒体途径、死亡受体途径和内质网应激途径,这三条途径都会激活caspase-3^[24,28,30]。其中,线粒体途径是凋亡的主要途径,主要表现为线粒体受损,促使Cyto c释放到胞浆中,进而启动caspase激活,引起细胞凋亡的发生^[24-25]。此外,在线粒体凋亡途径激活中,Bcl-2家族成员扮演着重要的调节作用。其中,Bcl-2作为抗凋亡蛋白,Bax作为促凋亡蛋白,可拮抗Bcl-2的抗凋亡作用,两者的比值决定细胞走向生存还是死亡的命运^[29-30]。本实验结果显示,补肺化痰汤可以呈浓度依赖性地引起小鼠移植瘤组织中促凋亡

蛋白Bax的显著增加,抗凋亡蛋白Bcl-2的显著下降。与此同时,补肺化痰汤浓度依赖性地引起线粒体凋亡途径的效应蛋白caspase-9的增加。综上所述,补肺化痰汤促Lewis肺癌细胞凋亡作用是通过线粒体凋亡途径得以实现的。

综上所述,补肺化痰汤具有抗气虚血瘀证小鼠的Lewis肺癌作用,其机制是通过诱导肿瘤细胞通过线粒体凋亡途径发生凋亡而实现的。本实验不仅为补肺化痰汤抗气虚血瘀证小鼠的Lewis肺癌的抗肿瘤机制提供了实验依据,也为补肺化痰汤早日应用于临床治疗非小细胞肺癌提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Sigismund S, Avanzato D, Lanzetti L. Emerging functions of the EGFR in cancer[J]. *Mol Oncol*, 2018, 12(1): 3-20.
- [2] Isobe H, Mori K, Minato K, et al. Real-world practice patterns for patients with advanced non-small cell lung cancer: multicenter retrospective cohort study in Japan[J]. *Lung Cancer (Auckl)*, 2017, 8: 191-206.
- [3] Gazdar A F, Bunn P A, Minna J D. Small-cell lung cancer: what we know, what we need to know and the path forward[J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(12): 765.
- [4] Consonni D, De Matteis S. Cancer and work: world's impact estimates[J]. *Epidemiol Prev*, 2017, 41(5-6): 308-309.
- [5] Liao Y, Xu L, Lin X, et al. Temporal trend in lung cancer burden attributed to ambient fine particulate matter in Guangzhou, China[J]. *Biomed Environ Sci*, 2017, 30(10): 708-717.
- [6] 范丽萌,张凤霞,孙西庆. 中风病气虚血瘀证研究进展[J]. *世界中医药*, 2014, 9(2): 257-260.
- [7] 熊丽辉,苏朋朋,王忠. 基于古籍整理的气虚血瘀证病证方药研究[J]. *中医杂志*, 2015, 56(19): 1645-1647.
- [8] 李莹,王磊沙,刘建勋,等. 脑梗死气虚血瘀证大鼠模型表征及病理生理变化研究[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(4): 786-793.
- [9] 赵颖. 舒张性心衰气虚血瘀证超声心动相关指标研究及益气泻肺汤干预的临床观察[D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.
- [10] 罗晓琴,徐咏梅,唐勇,等. 从肿瘤转移相关因子探讨非小细胞肺癌气虚血瘀证的病理基础[J]. *中国中西医结合杂志*, 2009, 29(10): 886-888.
- [11] 罗晓琴,杨国旺,徐咏梅,等. 非小细胞肺癌气虚血瘀证患者血清血管内皮生长因子及内皮抑素的表达及意义[J]. *首都医科大学学报*, 2009, 30(4): 445-448.
- [12] Gao H, Gao M Q, Peng J J, et al. Hispidulin mediates apoptosis in human renal cell carcinoma by inducing ceramide accumulation[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38(12): 1618-1631.
- [13] De Araújo R F, Pessoa J B, Cruz L J, et al. Apoptosis in human liver carcinoma caused by gold nanoparticles in combination with carvedilol is mediated via modulation of MAPK/Akt/mTOR

- pathway and EGFR/FAAD proteins[J]. *Int J Oncol* ,2018 , 52 (1) : 189-200.
- [14] Huang L ,Cao J ,Cao L , *et al.* Puerarin induces cell apoptosis in human chondrosarcoma cell line SW1353 via inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Oncol Lett* ,2017 , 14(5) : 5585-5590.
- [15] Liu W ,Deng J ,Dong F , *et al.* Apoptosis induced by chrysothole from Sichuan Xinkang via ROS/JNK pathway in A549 cells [J]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* ,2017 , 33(9) : 1217-1222.
- [16] 唐艳梅. 基于流行病学调查冠心病稳定型心绞痛气虚血瘀证生存质量研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2012.
- [17] 李小茜, 何建成, 黄品贤, 等. 基于临床流行病学调查的充血性心力衰竭气虚血瘀证诊断标准[J]. *中国老年学杂志* ,2016 , 36(2) : 308-311.
- [18] 王笑民, 郁仁存, 王禹堂, 等. 晚期非小细胞肺癌患者气虚血瘀证的研究[J]. *中国中西医结合杂志* ,1994 (12) : 724-726.
- [19] 曾 靖. 七消饮加味配合中药漏渍治疗肝硬化腹水 (气虚血瘀证) 的临床观察[D]. 长春: 长春中医药大学, 2016.
- [20] 闵 婕, 毛 兵, 蒋红丽, 等. “益气活血”法治疗慢性阻塞性肺疾病稳定期 (气虚血瘀证) 的临床研究[J]. *四川大学学报 (医学版)* ,2014 , 45(4) : 601-605.
- [21] 黄飞翔, 严 萍, 叶 盈, 等. 中西医结合治疗气虚血瘀证慢性心衰临床研究[J]. *中国中医急症* ,2014 , 23(4) : 592-593.
- [22] 刘艳婷, 胡小勤. 气虚血瘀证组学研究进展[J]. *医学研究与教育* ,2014 , 31(6) : 75-79.
- [23] Saha B , Patro B S , Koli M , *et al.* *Trans-4 , 4'-dihydroxystilbene* (DHS) inhibits human neuroblastoma tumor growth and induces mitochondrial and lysosomal damages in neuroblastoma cell lines [J]. *Oncotarget* , 2017 , 8 (43) : 73905-73924.
- [24] Jiang Q , Liu G , Wang X , *et al.* Mitochondrial pathway is involved in the protective effects of α -ketoglutarate on hydrogen peroxide induced damage to intestinal cells [J]. *Oncotarget* , 2017 , 8: 74820-74835.
- [25] Ghasemnejad-Berenji M , Ghazi-Khansari M , Yazdani I , *et al.* Rapamycin protects testes against germ cell apoptosis and oxidative stress induced by testicular ischemia-reperfusion [J]. *Iran J Basic Med Sci* ,2017 , 20(8) : 905-911.
- [26] Liu C M , Ma J Q , Sun J M , *et al.* Association of changes in ER stress-mediated signaling pathway with lead-induced insulin resistance and apoptosis in rats and their prevention by A-type dimeric epigallocatechin-3-gallate [J]. *Food Chem Toxicol* ,2017 , 110: 325-332.
- [27] Ryu H W , Shin D H , Lee D H , *et al.* A potent hydroxamic acid-based , small-molecule inhibitor A452 preferentially inhibits HDAC6 activity and induces cytotoxicity toward cancer cells irrespective of p53 status [J]. *Carcinogenesis* ,2018 , 39 (1) : 72-83.
- [28] Baena-Lopez L A , Arthurton L , Xu D C , *et al.* Non-apoptotic caspase regulation of stem cell properties [J]. *Semin Cell Dev Biol* ,2018 , 82: 118-126.
- [29] N B , K R C. Tetrandrine and cancer—An overview on the molecular approach [J]. *Biomed Pharmacother* ,2018 , 97: 624-632.
- [30] An S , Lu W , Zhang Y , *et al.* Pharmacological basis for use of *Armillaria mellea* polysaccharides in Alzheimer's disease: anti-apoptosis and antioxidation [J]. *Oxid Med Cell Longev* ,2017 , 2017: 4184562.