

DOI:10.16305/j.1007-1334.2025.z20240620002

木防己汤对裸鼠非小细胞肺癌 A549 皮下移植瘤细胞自噬及 ERK 信号通路的影响

唐 蕾¹, 刘晓碟¹, 浦匀舟¹, 张欣欣², 陈红宇², 杨 柳², 季 青¹

1. 上海中医药大学附属曙光医院肿瘤科/肿瘤研究室(上海 201203); 2. 上海中医药大学附属宝山医院肿瘤科(上海 201999)

【摘要】 目的 探讨木防己汤对非小细胞肺癌(NSCLC)肿瘤生长的抑制作用及其潜在机制。**方法** 将人 NSCLC A549 细胞接种于裸鼠腋下,建立肺癌异种皮下移植瘤裸鼠模型。25 只裸鼠随机分为模型组(0.2 mL 0.9% 氯化钠溶液)、顺铂组[阳性对照, 2 mg/(kg·d)]及木防己汤低剂量组[3 g/(kg·d)]、中剂量组[6 g/(kg·d)]、高剂量组[12 g/(kg·d)](n=5)。模型组及木防己汤低、中、高剂量组每天灌胃给予相应药物,顺铂组予顺铂腹腔注射(每周 2 次),干预 49 d。给药期间,观察木防己汤对裸鼠皮下移植瘤生长的影响。通过免疫组织化学法(IHC)、免疫荧光染色法(IF)及 Western blot 法(WB)检测皮下移植瘤中微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)表达;WB 检测皮下移植瘤中泛素结合蛋白 P62(P62)及 Bcl-2 同源结构域蛋白(Beclin-1)表达;IHC 和 WB 检测皮下移植瘤中胞外信号调节激酶(ERK)、磷酸化 ERK(p-ERK)的表达。**结果** 在裸鼠 A549 皮下移植瘤模型中,与模型组相比,木防己汤低、中、高剂量组瘤体体积及质量均明显减小($P<0.05$),呈现剂量依赖性,并且木防己汤高剂量组与顺铂组药效相当。IF、IHC、WB 结果显示,木防己汤能上调肿瘤组织中 LC3 的表达水平($P<0.05$)。WB 结果显示,木防己汤能上调肿瘤组织中 Beclin-1 蛋白表达水平($P<0.05$),下调 P62 蛋白的表达水平($P<0.05$)。WB 和 IHC 结果显示,木防己汤下调了 p-ERK 的表达水平($P<0.05$)。**结论** 木防己汤能通过促进肿瘤自噬发挥抗非小细胞肺癌的作用,其作用机制可能与抑制 ERK 信号通路激活相关。

【关键词】 非小细胞肺癌;木防己汤;自噬;裸鼠模型;经典名方;作用机制

Effects of Mufangji Decoction on autophagy and ERK signaling pathway in A549 subcutaneous xenograft of non-small cell lung cancer in nude mice

TANG Lei¹, LIU Xiaodie¹, PU Yunzhou¹, ZHANG Xinxin², CHEN Hongyu², YANG Liu², JI Qing¹

1. Department of Oncology/Cancer Laboratory, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Department of Oncology, Baoshan Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201999, China

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of Mufangji Decoction (MFJD) on tumor growth in non-small cell lung cancer (NSCLC) and its underlying mechanisms. **Methods** A subcutaneous xenograft model of NSCLC was established by inoculating human A549 cells into the armpit of nude mice. Twenty-five nude mice were randomly divided into model group (0.2 mL 0.9% NaCl), cisplatin group (positive control, 2 mg/kg), MFJD low-dose group [3 g/(kg·d)], MFJD medium-dose group [6 g/(kg·d)] and MFJD high-dose group [12 g/(kg·d)] (n=5). The model and MFJD groups received intragastric administration with corresponding drugs everyday, while cisplatin group was intraperitoneally injected with cisplatin twice a week. Treatments lasted for 49 d. During administration, the effect of MFJD on the growth of subcutaneous transplanted tumor in nude mice was observed. Immunohistochemistry (IHC), immunofluorescence (IF) and Western blot (WB) were performed to detect the expression of microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) in the subcutaneous tumors. WB was used to detect the expression of ubiquitin-binding protein P62

(P62) and Bcl-2 homeodomain protein (Beclin-1) in the subcutaneous tumors. IHC and WB were employed to measure the expression extracellular signal-regulated kinase (ERK) and phosphorylated-ERK (p-ERK) in the subcutaneous tumors. **Results** In the A549 subcutaneous allograft tumor model of nude mice, compared with the model group, the tumor volume and weight in the low, medium, and high doses of MFJD groups were significantly reduced ($P<0.05$), showing a dose-dependent effect, while the high-

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82274338);上海市科委科技计划项目(21Y11922200)

[作者简介] 唐蕾,女,硕士研究生,主要从事中西医结合防治肿瘤的基础研究工作

[通信作者] 杨柳,副主任医师,硕士研究生导师;E-mail: bsyykyc@shutcm.edu.cn. 季青,研究员,博士研究生导师;E-mail: tt99118@hotmail.com

dose group was comparable to the cisplatin group in therapeutic efficacy. Moreover, IF, IHC and WB results revealed that MFJD could up-regulate LC3 expression level in tumor tissues ($P<0.05$). WB results showed that MFJD could up-regulate the expression level of Beclin-1 protein in tumor tissues ($P<0.05$) and down-regulate the expression level of P62 protein ($P<0.05$) in tumor tissues. Additionally, both WB and IHC indicated that MFJD down-regulated the expression level of p-ERK ($P<0.05$). **Conclusions** MFJD can exert an anti-NSCLC effect by promoting tumor autophagy, and its mechanism of action may be related with the inhibition of ERK signaling pathway activation.

Keywords: non-small cell lung cancer; Mufangji Decoction; autophagy; nude mouse model; classic famous formula; action mechanism

肺癌是全球所有癌症病例中死亡率及发病率最高的癌症类型^[1]。非小细胞肺癌(non-small cell lung carcinoma, NSCLC)占肺癌病例总数的85%~90%^[2]。目前临床上对NSCLC治疗的效果仍然不尽如人意^[3]。因此,迫切需要寻找可有效抑制NSCLC的新型治疗药物。木防己汤是《金匮要略》中记载的经典名方,在临床中应用多年^[4]。研究^[5-8]表明,其用于治疗咳嗽、哮喘、癌性胸水均有良好的治疗效果。本研究团队长期聚焦木防己汤抗NSCLC的临床转化研究,近期完成的前瞻性随机对照临床试验(RCT)初步证实木防己汤在NSCLC治疗中具有不错的疗效,可以延长晚期NSCLC患者生存期,提高其生活质量,但其疗效机制尚不明确。

细胞自噬(autophagy)主要分为3种类型:巨自噬(macroautophagy)、小自噬(microautophagy)和分子伴侣介导的自噬(chaperone-mediated autophagy)。本研究中的“自噬”特指巨自噬,即依赖自噬体形成的大分子物质降解过程,这是一种在细胞生物学中普遍存在且高度保守的细胞自我消化与再利用机制^[9]。其主要过程为通过形成具有双层膜结构的自噬体(autophagosome)包裹胞内物质,随后,自噬体与溶酶体相融合,形成自噬溶酶体,胞内物质在其中被降解并回收利用^[10]。自噬相关基因(ATGs)编码的自噬机制的30多个关键基因在此过程的不同步骤中起作用^[11],多个分子执行自噬各个阶段的关键过程。作为自噬的关键标志物,Bcl-2同源结构域(Beclin-1)蛋白参与自噬体起始和组装,微管相关蛋白1轻链3(LC3)主要参与自噬体的延伸,泛素结合蛋白P62(P62/SQSTM1)则主要参与自噬的选择性降解过程^[12]。越来越多的研究^[13-15]表明,自噬在NSCLC的各个阶段都起着重要作用。鉴于自噬在肿瘤生物学中的重要作用,调节自噬过程已成为一种具有潜力的癌症治疗策略,为NSCLC的治疗提供了新的视角。

其中,胞外信号调节激酶(ERK)通路作为自噬调节的关键信号通路之一,在癌症治疗中扮演着复杂而关键的角色。ERK通路是丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路的关键环节,它通过磷酸化多种底物来调控细胞的生长、分化、凋亡以及自噬等过程。多项研究^[16-19]表明,ERK信号通路的分子机制及其在自噬

中的作用是临床前和临床研究中的热点。研究者们正积极地筛选并开发具有潜力的小分子化合物和天然产物,用于抑制ERK激活,旨在通过调控自噬过程来开发新的癌症治疗策略。

因此,本研究采用人NSCLC A549细胞构建裸鼠皮下移植瘤模型,观察木防己汤对皮下移植瘤生长的影响及其对自噬和ERK通路的调控作用,以期初步阐释木防己汤抑制NSCLC生长的潜在作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人NSCLC A549细胞系购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。细胞培养于含体积分数10%胎牛血清及体积分数1%青霉素/链霉素的RPMI-1640培养基,置于37℃、体积分数5%的CO₂培养箱中传代培养。取对数生长期细胞用于后续实验。

1.1.2 动物 SPF级雄性BALB/c裸鼠25只,4~6周龄,体质量16~18 g,购自上海吉辉实验动物有限公司,动物生产许可证号:SCXK(沪)2022-0009;动物使用许可证号:SYXK(沪)2020-0009。动物饲养于上海中医药大学实验动物中心,12 h明/12 h暗光照周期,自由饮水进食。本动物研究方案经上海中医药大学实验动物伦理委员会审批(伦理审批号:PZSHUTCM2401180006),所有操作及实验均符合伦理要求。

1.1.3 药物与试剂 木防己汤由粉防己9 g、石膏12 g、桂枝6 g、人参12 g组成(批号分别为230610、230813、20231130-1、231209),上述药材由上海中医药大学附属曙光医院提供。药材浸泡60 min后,以8倍水量首煎,继以6倍水量复煎。石膏先行煎煮15 min至30 min,人参另煎。首煎持续60 min,复煎30 min,合并药液后过滤并浓缩至生药量2 g/mL,除菌后冷却备用。阳性药顺铂(批号:020823),购自沪慧(上海)生物科技有限公司。

LC3、磷酸化ERK1/2(p-ERK1/2, Thr202/Tyr204)、ERK1/2、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(批号分别为12741t、4376s、12741t、97166s),美国Cell Signaling Technology公司;P62、Beclin-1抗体(批号分别为HA721171、HA721216),杭州华安生物技术有限公司;山羊抗小鼠二抗、山羊抗兔二抗(批号分别为M21001、

M21002), 艾比玛特医药科技(上海)有限公司;二辛可酸(BCA)蛋白定量检测试剂盒(批号:SB-WB013), 上海圣尔生物科技有限公司。

1.1.4 主要仪器 细胞计数仪(型号:TC20), 美国 Bio-Rad 公司;CO₂恒温培养箱(型号:Hera Cell 240), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司;生物洁净安全柜(型号:BHC-1300IIA/B2), 苏州净化设备有限公司;数显恒温水浴锅(型号:HH-4), 常州国华电器有限公司;冷冻离心机(型号:5702R), 德国 Eppendorf 公司;电泳仪(型号:Power Pac HV), 美国 Bio-Rad 公司;转膜仪(型号:VE-186), 上海天能生命科学有限公司;化学发光成像系统(型号:ChemiScope 6100), 上海勤翔科学仪器有限公司。

1.2 人肺癌裸鼠皮下移植瘤模型的建立 雄性 BALB/c 裸鼠适应性喂养 1 周后, 将 A549 细胞消化后制成 2×10^7 个/mL 的细胞悬液, 冰上保存。每只裸鼠予 0.1 mL 的细胞悬液接种于腋下, 建立人肺癌裸鼠皮下移植瘤模型。

1.3 分组与干预 注射后第 4 天开始监测肿瘤体积, (12 ± 4) d 时肿瘤体积达 $50 \sim 100 \text{ mm}^3$ 。随后将荷瘤裸鼠随机分为 5 组, 即模型组、顺铂组及木防己汤低、中、高剂量组, 每组 5 只。模型组予 0.9% 氯化钠溶液灌胃;顺铂组予 $2 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 顺铂腹腔注射, 每周 2 次;参考《药理实验方法学》^[20] 人与动物间体表面积折算等效剂量比值表, 对木防己汤的临床等效剂量进行换算, 木防己汤低、中、高剂量分别予 3 、 6 、 $12 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 木防己汤灌胃。模型组和木防己汤各剂量组小鼠均每天灌胃 1 次, 每次 0.2 mL。干预 49 d。

1.4 检测指标与方法

1.4.1 瘤体积及体质量测量 开始给药后, 每隔 4 d 使用游标卡尺测量裸鼠皮下移植瘤的长径和短径。计算瘤体积: 瘤体积(mm^3) = $0.52 \times \text{长径} \times \text{短径} \times \text{短径}$ 。绘制肿瘤生长曲线, 同时测量瘤体质量, 并绘制体质量曲线。经过 49 d 的给药周期, 到达给药终点。

1.4.2 裸鼠皮下移植瘤抑瘤率及药物安全性 将小鼠进行安乐死处理, 并迅速剥离肿瘤组织, 去除表面脂肪组织, 称取瘤质量及各脏器质量。抑瘤率(%) = $(\text{模型组平均瘤体质量} - \text{各给药组平均瘤体质量}) / \text{模型组平均瘤体质量} \times 100\%$; 脏器系数(%) = $(\text{脏器质量} / \text{体质量}) \times 100\%$ 。并对各脏器进行包埋固定, 进行苏木精-伊红(HE)染色, 初步评价药物的安全性。

1.4.3 免疫组织化学法检测肿瘤组织中 LC3、p-ERK、ERK 表达 取部分瘤体, 置于质量分数 4% 多聚甲醛固定液中, 制成石蜡标本进行切片。进行常规脱蜡复水后, 加入枸橼酸盐缓冲液进行抗原修复, 加入山羊血清室温封闭 1 h, 磷酸盐缓冲液(PBS)清洗后, 分别滴加 LC3、p-ERK、ERK 一抗($1:200$), 4°C 孵育过夜。清洗后

加入山羊抗兔二抗($1:500$), 3,3'-二氨基联苯胺显色法(DBA)显色, 苏木精染核, 脱水, 封片, 全景数字切片扫描显微镜扫描成像, 使用 ImageJ 软件分析表达情况。

1.4.4 Western blot 法检测肿瘤组织中 LC3、Beclin-1、P62、p-ERK、ERK 表达 称取裸鼠皮下瘤肿瘤组织 50 mg, 冰上匀浆后, 冰上充分裂解提取蛋白。采用 BCA 法进行蛋白定量, 加入上样缓冲液加热 10 min 进行蛋白变性。蛋白样品依次进行电泳、转膜、封闭, 加入一抗兔抗 LC3($1:2000$)、p-ERK1/2(Thr202/Tyr204)($1:600$)、ERK1/2($1:600$)、P62($1:10000$)、Beclin-1($1:800$)及一抗鼠抗 GAPDH($1:10000$), 4°C 孵育过夜。洗膜后加入对应种属二抗($1:10000$), 常温孵育 2 h。充分洗涤后, 浸泡于增强化学发光法(ECL)发光液中, 置于显影仪中拍照成像, 使用 ImageJ 软件对灰度值进行统计分析。

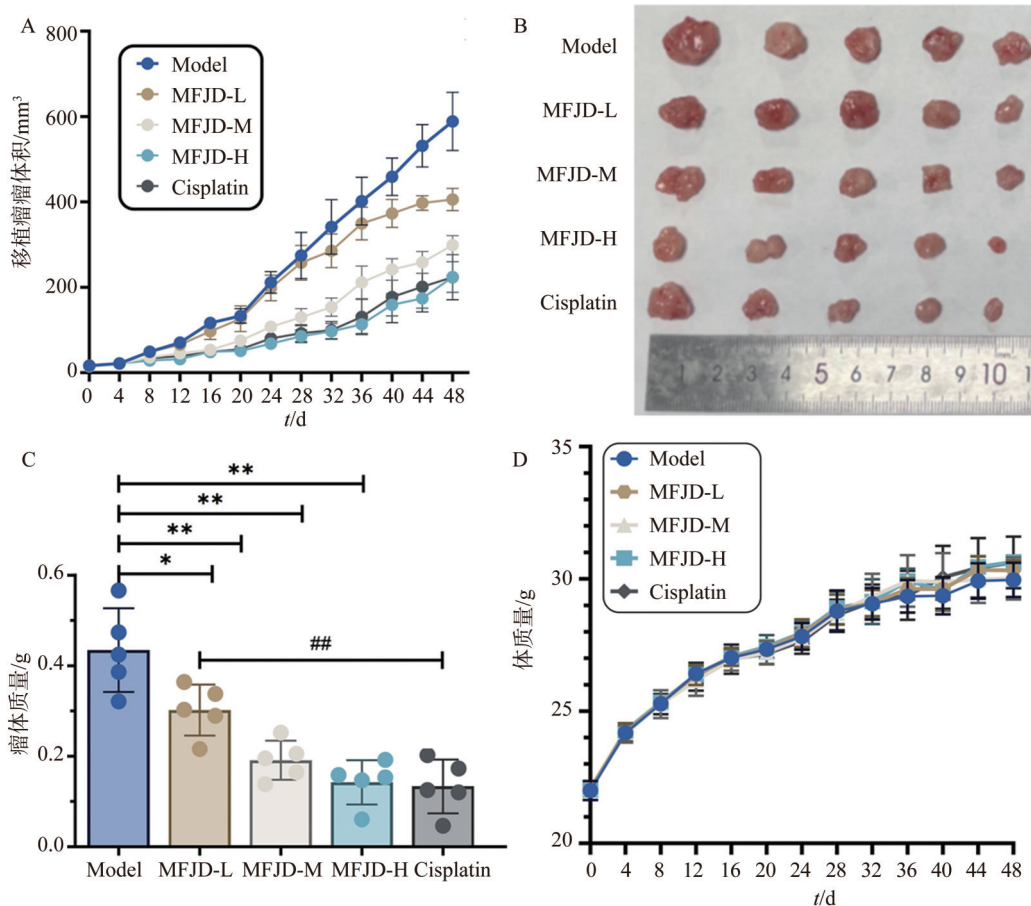
1.4.5 免疫荧光法检测肿瘤组织中 LC3 表达 肿瘤组织经质量分数 4% 多聚甲醛固定后, 石蜡包埋制备 $4 \mu\text{m}$ 切片。石蜡切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化后, 使用预热的柠檬酸钠缓冲液(pH 6.0)进行热介导抗原修复(98°C , 20 min)。使用含质量分数 5% 的牛血清白蛋白及体积分数 0.3% 的曲拉通 X-100(Triton X-100)的 PBS 进行封闭, 室温封闭 1 h。加入一抗 LC3($1:200$) 4°C 孵育过夜, 加入荧光标记的二抗 Alexa Fluor 488($1:500$) 避光室温孵育 2 h, 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)复染细胞核 5 min。封片后通过显微镜采集图像, ImageJ 软件分析蛋白表达与定位。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 24.0 软件进行统计分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。满足正态分布且方差齐性时, 采用单因素方差分析, 组间比较用最小显著性差异法(LSD)检验; 不满足正态分布和方差齐性时, 采用非参数检验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 对裸鼠肺癌皮下移植瘤抑瘤率及体质量的影响 与模型组比较, 各给药组裸鼠瘤体体积、瘤体质量均明显降低($P < 0.05$), 且呈一定的剂量依赖性; 木防己汤低剂量组瘤体体积及质量虽较模型组降低($P < 0.05$), 但与阳性药物顺铂组对比有显著统计学差异($P < 0.05$); 木防己汤中、高剂量组与顺铂组比较, 瘤体体积及瘤体质量无明显差异($P > 0.05$), 见图 1A-C 及表 1。其中, 木防己汤低、中、高剂量组抑瘤率分别为 30.233%、55.814%、67.442%, 顺铂组抑瘤率为 69.767%, 可见木防己汤高剂量组的抑瘤率与顺铂组相当, 见表 1。

2.2 木防己汤安全性初步评价 实验期间裸鼠生存率为 100%, 未观察到腹泻、食欲减退等明显毒性反应。各组裸鼠体质量均随时间逐渐增加, 且组间无明显统



注:Model为模型组, MFJD-L、M、H分别为木防己汤低、中、高剂量组, Cisplatin为顺铂组。A为裸鼠移植瘤生长曲线图, B为裸鼠瘤体图, C为瘤体质量统计图, D为裸鼠体重曲线图。与Model组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与顺铂组比较, ## $P<0.01$ 。 $n=5, \bar{x}\pm s$ 。

图1 各组裸鼠皮下移植瘤生长及体质量情况

表1 各组裸鼠皮下移植瘤生长情况统计表($n=5, \bar{x}\pm s$)

组别	瘤体体积/mm ³	瘤体质量/g	抑瘤率/%
Model	588.626±68.328	0.434±0.041	/
MFJD-L	405.546±26.151**	0.302±0.025**	30.233
MFJD-M	298.866±21.984**	0.191±0.019**	55.814
MFJD-H	224.054±35.741**	0.142±0.022**	67.442
Cisplatin	223.648±52.913**	0.133±0.027**	69.767

注:Model为模型组, MFJD-L、M、H分别为木防己汤低、中、高剂量组, Cisplatin为顺铂组。“/”表示作为模型组为基线数据无抑瘤率。与Model组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。与顺铂组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

表2 各组裸鼠体质量及各脏器系数等一般情况比较($n=5, \bar{x}\pm s$)

组别	体质量/g	心脏系数	肝脏系数	脾脏系数	肺脏系数	肾脏系数
Model	29.960±0.645	0.654±0.026	6.359±0.251	0.519±0.049	0.607±0.021	2.002±0.068
MFJD-L	30.320±0.385	0.641±0.025	6.305±0.253	0.521±0.028	0.614±0.025	1.963±0.058
MFJD-M	30.020±0.804	0.628±0.033	6.216±0.166	0.502±0.029	0.625±0.026	1.984±0.057
MFJD-H	30.640±0.218	0.647±0.038	6.472±0.222	0.538±0.049	0.608±0.191	1.947±0.043
Cisplatin	30.620±0.975	0.635±0.023	6.134±0.184	0.514±0.028	0.616±0.015	1.872±0.083

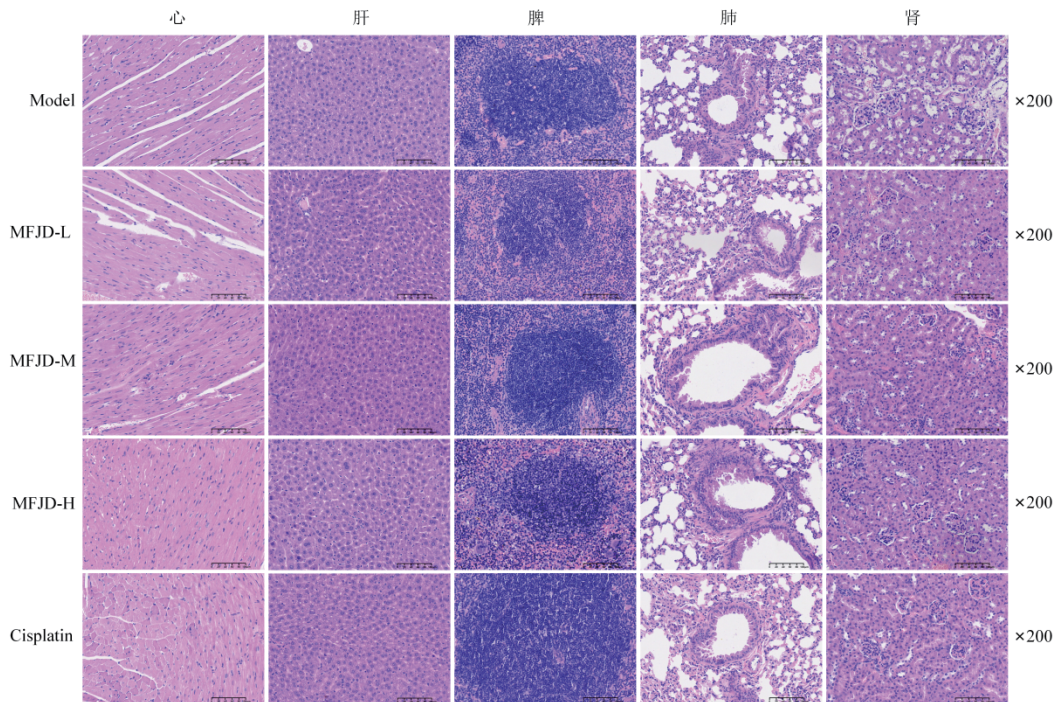
注:Model为模型组, MFJD-L、M、H分别为木防己汤低、中、高剂量组, Cisplatin为顺铂组。

2.3 对裸鼠肿瘤组织自噬相关蛋白 LC3、Beclin-1、P62 表达的影响 免疫组织化学法及免疫荧光染色法结果显示,与模型组比较,各给药组裸鼠皮下瘤组织中 LC3

计学差异($P>0.05$),见图 1D。各组脏器系数无明显统计学差异($P>0.05$),见表 2。

对各组主要脏器进行 HE 染色,结果显示,木防己汤低、中、高剂量组均未发现明显的形态学变化或病变,表明木防己汤具有良好的生物安全性;顺铂组见轻微肾脏病理损伤,具体表现为肾小管上皮增生,间质内个别(少量)炎症细胞浸润。与模型组比较,各组肾脏系数无明显统计学差异($P>0.05$),且其他脏器系数($P>0.05$)及病理形态均未见明显异常。见表 2、图 2。

的阳性率增加($P<0.05$),且木防己汤高剂量组与顺铂组自噬相关指标 LC3 的表达无明显统计学差异($P>0.05$),见图 3A-D。Western blot 法结果显示,与模型组比较,



注:Model为模型组,MFJD-L、M、H分别为木防己汤低、中、高剂量组,Cisplatin为顺铂组。

图2 各组裸鼠主要脏器病理形态(苏木精-伊红染色法)

各给药组裸鼠皮下瘤组织中 LC3、Beclin-1 的阳性率增加 ($P<0.05$), P62 的阳性率降低 ($P<0.05$), 见图 3E-F。通过多项指标衡量自噬发生的整个过程, 与 LC3 的免疫组化及免疫荧光结果互相印证, 提示木防己汤和顺铂均可提高瘤体内的自噬水平, 二者疗效相近, 表明木防己汤及顺铂对肿瘤生长的抑制作用可能与自噬相关。

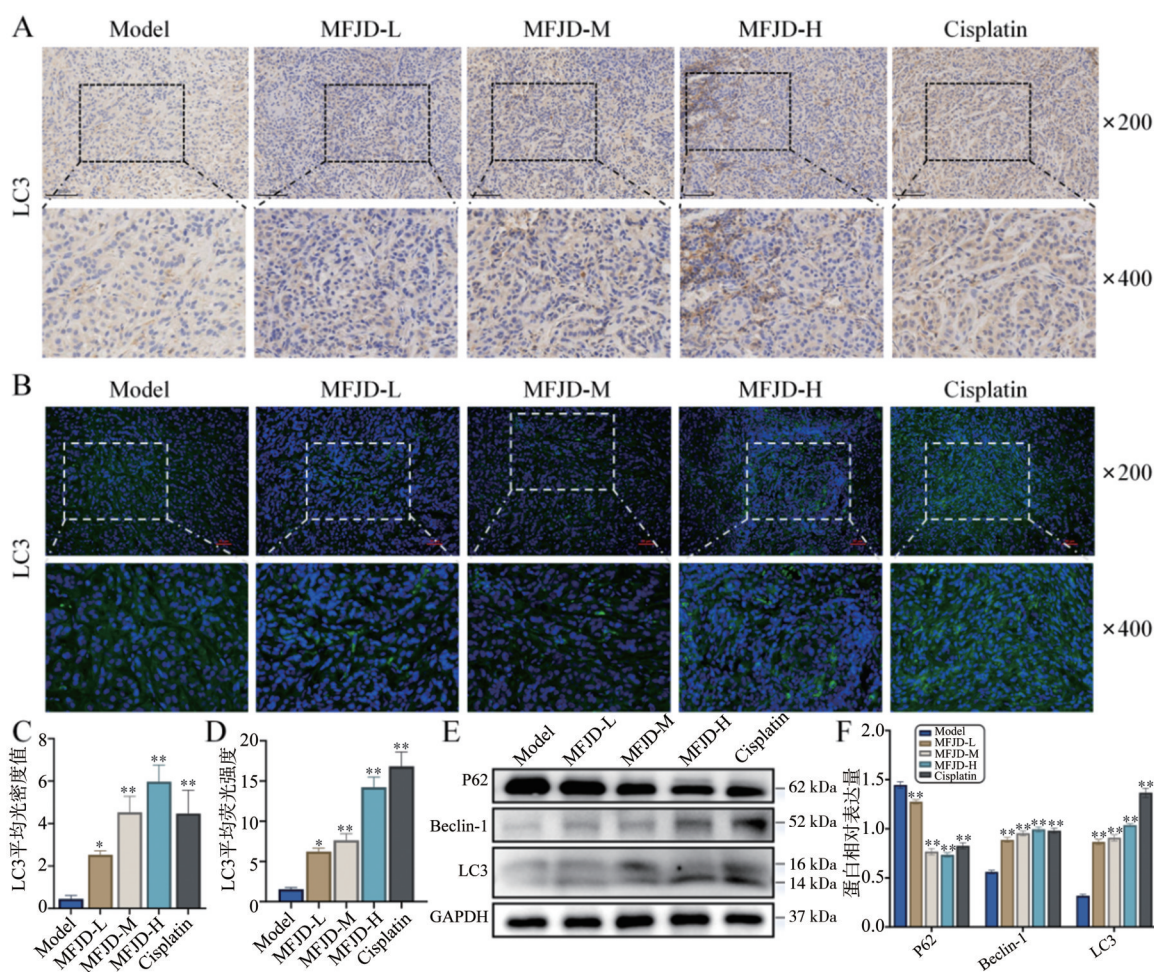
2.4 对裸鼠肿瘤组织 ERK 信号通路的影响 Western blot 法及免疫组织化学法结果显示, 与模型组比较, 各给药组裸鼠肿瘤组织内总 ERK 的表达水平无明显统计学差异 ($P>0.05$), 但 p-ERK 水平明显降低 ($P<0.05$), 且呈剂量依赖性, 见图 4。上述结果提示木防己汤可能通过抑制 p-ERK 的生成, 影响 ERK 通路的激活, 且根据自噬相关指标的检测, 瘤体内自噬的发生可能与 p-ERK 表达水平降低相关, 从而抑制 NSCLC 皮下瘤的生长。

3 讨论

肺癌是一种具有高发病率和高病死率的恶性实体瘤, 其所有恶性肿瘤中的发病率和病死率均位居全球首位^[1]。根据病理特征角度分型, 肺癌可分为 NSCLC 和小细胞肺癌, 其中 NSCLC 约占所有肺癌病例的 80%~90%。目前肺癌的主要治疗手段包括化学疗法(化疗)、放射治疗(放疗)、靶向治疗及免疫治疗等。但由于缺乏有效的早期肺癌诊断和筛查方法, 超过 70% 的患者在确诊时已经处于局部晚期或晚期, 预后不佳, 五年相对生存率不超过 22%^[21-22]。传统的化疗方法在对肿瘤细胞的精准打击上面临巨大挑战, 疗效统

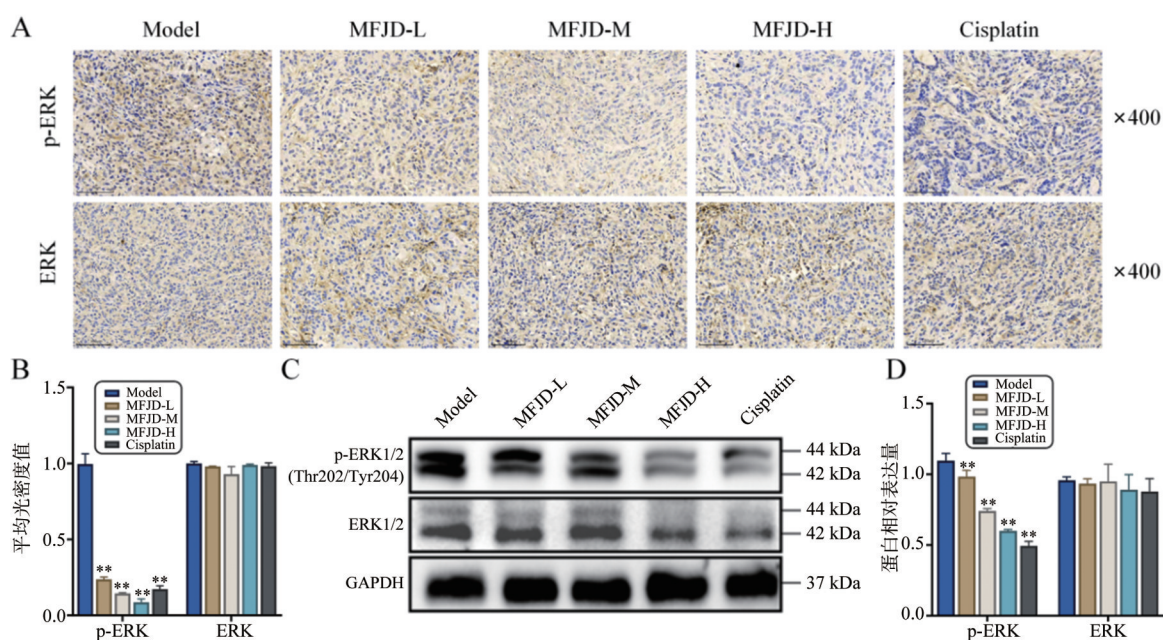
计显示其响应率仅为 20%~30%, 且往往伴随着严重的毒副作用。这种治疗策略在意图消灭肿瘤细胞的过程中, 不可避免地会对周围的健康细胞造成影响, 从而导致各种不良反应, 严重影响患者的生活质量^[23-24]。因此, 对于中晚期 NSCLC 患者, 探寻安全且有效的药物以实现疾病进展的延缓、生存期的延长, 以及生活质量的提升, 是当前 NSCLC 治疗领域亟需攻克的重大挑战。

长期的临床实践证实, 中医药在缓解肿瘤患者化疗所引发的副作用、提高治疗的整体有效率、延长患者生存期以及降低疾病复发率等方面, 展现出了独特的治疗优势^[25-26]。其不仅丰富了肿瘤治疗的手段, 也为患者提供了更为全面和个体化的治疗方案。肺癌属于中医学的“咳嗽”“肺积”“肺岩”等范畴, 古代医学文献对肺癌的症状有详尽的描述。例如, 如《素问·咳论》中提到:“肺咳之状, 咳而喘息有音, 甚则唾血。”这反映了肺癌患者常见的咳嗽、气喘以及严重时的咯血症状。而《素问·玉机真藏论》中的“大骨枯槁, 大肉陷下, 胸中气满, 喘息不便, 其气动形, 期六月死, 真藏脉见, 乃予之期日”等内容, 则描述了肺癌患者可能会出现消瘦、肌肉萎缩、胸闷以及呼吸困难等症状。这些经典文献记载深刻地反映了中医学对肺癌症状的洞察, 为后世的医学实践者提供了丰富的诊疗经验和理论支撑。经典文献中对肺癌症状的描述, 不仅有助于深刻理解肺癌的病理机制, 还展现了中医在治疗肺癌方面的独特优势。这些经典文献奠定了研究的基础, 促进了对中医药在 NSCLC 治疗中潜在价值的深入探索和应用。



注: Model为模型组, MFJD-L、M、H分别为木防己汤低、中、高剂量组, Cisplatin为顺铂组。A、C为免疫组织化学法(IHC)检测肿瘤组织微管相关蛋白1轻链3(LC3)实验和统计图, B、D为免疫荧光法检测LC3的实验与统计图, E、F为Western blot法检测LC3、泛素结合蛋白P62(P62/SQSTM1)、Beclin-1同源结构域蛋白(Beclin-1)的实验与统计图。与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$ 。

图3 各组裸鼠皮下移植瘤自噬相关蛋白LC3、Beclin-1、P62表达情况



注: Model为模型组, MFJD-L、M、H分别为木防己汤低、中、高剂量组, Cisplatin为顺铂组。ERK为胞外信号调节激酶, p-ERK为磷酸化ERK。A、B为免疫组织化学法实验与统计图, C、D为Western blot法实验与统计图。与模型组比较, ** $P < 0.01$; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$ 。

图4 各组裸鼠皮下移植瘤ERK信号通路蛋白表达情况

木防己汤首载于东汉张仲景《金匮要略·痰饮咳嗽病脉证并治》，原文载：“膈间支饮，其人喘满，心下痞坚，面色黧黑，其脉沉紧，得之数十日，医吐下之不愈，木防己汤主之。”其组方特色体现为：粉防己（木防己已禁用）性寒，味苦、辛，归膀胱、肺、脾经，主司利水除湿，尤善清泄膈间痰饮；石膏性大寒，味辛、甘，归肺、胃经，功专泻火透邪，助痰饮从下焦而解；桂枝性温，味辛、甘，归心、肺、膀胱经，以通阳化气、平冲降逆见长，与粉防己构成“辛开苦降”之势，调畅三焦气机，其温通之性既制石膏寒凝之弊，又防饮邪冰伏之虞；人参性温，味甘、苦，归脾、肺经，功在益气扶正、固护中焦，既应肺癌“久病必虚”之病机，又防祛邪伤正之变，此配伍原则正契刘嘉湘教授“扶正治癌”的学术理念。全方寒温相济，攻补兼施：粉防己配石膏苦寒清热逐饮，桂枝合人参温通补益扶正，其中粉防己利水、桂枝通阳、人参补气，三焦气化得行，水饮代谢有序，故对肺癌所致咳嗽、胸腔积液、呼吸困难等症疗效显著。根据课题组临床初期研究结果，木防己汤已被证实为一种对 NSCLC 具有显著抑制效果的潜在候选药物。但是，其确切的作用机制，目前仍然缺乏深入了解和明确解释。

巨自噬是一种细胞内部的降解和循环过程，通过形成双层膜结构的自噬体封装受损的细胞器和蛋白质，并将这些物质运输至溶酶体进行降解和循环利用^[10]。这一过程对于维持细胞内环境的稳定、清除损伤的细胞器、调节细胞代谢以及应对各种应激条件至关重要。在肿瘤的发生和发展中，自噬扮演着复杂的角色，呈现出典型的双刃剑特征。一方面，自噬有助于清除癌变细胞内的损伤细胞器和致癌物质，从而抑制肿瘤的形成。另一方面，自噬也能为肿瘤细胞提供必需的能量和营养物质，促进其生长和增殖。在自噬过程中，Beclin-1 蛋白起到了自噬体形成和组装的启动作用^[27]。它作为磷脂酰肌醇 3-激酶催化亚基 3 型 (VPS34/PIK3C3) 复合物的关键组成部分，协助细胞在营养不足等刺激下形成吞噬泡。LC3 则在自噬体的延伸阶段发挥作用，LC3-I 在自噬作用下转化为与自噬体膜结合的 LC3-II，参与自噬体膜的形成和扩张^[28]。而 P62 蛋白主要参与自噬的选择性降解过程^[29]。P62 能够识别并结合泛素化蛋白，将底物运送到自噬溶酶体中进行降解^[30]。这些蛋白质是衡量自噬水平动态变化的重要指标，它们为理解自噬在 NSCLC 中的作用机制和动态过程提供了关键信息。

ERK 通路在自噬过程中的重要作用已经被人们所熟知。p-ERK 水平降低有助于通过多种机制促进肿瘤细胞自噬。①抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路：ERK 是 MAPK/ERK 信号通路的关键成员，其磷酸化激活可以促进肿瘤细胞的增殖和存活；p-ERK

水平的降低可能导致 mTOR 信号通路的抑制，mTOR 是自噬的负调节因子，其抑制会促进自噬的启动。②激活自噬相关基因：p-ERK 水平的降低可以促进自噬相关基因的表达，这些基因在自噬泡的形成和成熟过程中起着至关重要的作用。③促进自噬泡的形成：在 p-ERK 水平降低的情况下，细胞内可能发生一系列信号变化，促进自噬泡的起始和扩展，从而加速受损蛋白质和细胞器的降解。④增强自噬流：p-ERK 水平的降低不仅可以促进自噬泡的形成，还可以增强自噬泡与溶酶体的融合，提高自噬流的效率。

根据上述背景结合本研究结果分析，木防己汤各剂量组裸鼠肿瘤组织中自噬标志蛋白 LC3-II 和 Beclin-1 表达上调，而 P62 蛋白水平下降（均呈剂量依赖性）。LC3-II 作为自噬体膜结构关键组分，其积累提示自噬体形成增加；Beclin-1 作为自噬启动因子参与自噬泡成核；P62 作为选择性自噬接头蛋白，其降解表明自噬流完整激活。三者的协同变化证实木防己汤可有效诱导肿瘤细胞自噬进程。

值得注意的是，木防己汤降低了 p-ERK 蛋白表达水平。ERK 信号通路作为 MAPK 通路关键分支，其磷酸化激活可促进肿瘤细胞增殖和存活。本研究发现，木防己汤可能通过抑制 ERK 磷酸化触发下游自噬调控网络：ERK 活性抑制可直接解除其对雷帕霉素机制靶标复合物 1 (mTORC1) 的激活作用 (mTOR 是自噬核心负调控因子)，从而解除 Unc-51 样自噬激活激酶 1 (ULK1) 复合体抑制，启动自噬体形成；同时，ERK 信号衰减可能通过上调 ATG 基因表达增强自噬活性。这一发现与近期研究报道的 ERK/mTOR/自噬轴在肿瘤治疗中的作用机制高度吻合^[31]。

综上所述，尽管自噬在肿瘤中具有双重作用，本研究通过系统检测自噬关键指标证实，木防己汤诱导的是功能性自噬激活。在本模型体系中，自噬激活更倾向于抑制肿瘤增殖。这一现象可能与 ERK 通路抑制引发的代谢应激增强有关，即 ERK 信号抑制导致肿瘤细胞无法通过常规增殖通路维持稳态，在此过程中自噬激活虽短期提供生存支持，但长期加剧了细胞内物质耗竭。

本研究为 NSCLC 的治疗提供了新的思路，木防己汤在临床中展现出成为有效治疗手段的潜力。其具有两个鲜明的优点：首先，作为复方制剂，其多成分协同作用可能通过多靶点调控避免了单通路抑制剂的耐药性问题；其次，在基础研究中显示出良好抑瘤效果的同时未表现明显毒性，并且在我们现阶段的临床研究及使用中也未见明显不良事件。尽管如此，本研究仍存在一定的局限性：尚未明确木防己汤中具体活性成分，且 ERK 通路抑制与自噬激活的因果关系及相关信号通

路网络需通过实验进一步验证。因此,后续的研究应聚焦于两个核心领域,以进一步挖掘木防己汤在 NSCLC 治疗中的潜在价值:首先,开展大样本量的临床研究至关重要;其次,深入的实验研究不可或缺。通过这些研究,不仅可以增强木防己汤的临床转化潜力,为 NSCLC 患者提供更多治疗选择,而且可能为中医药在肺癌治疗中的应用开辟新方向,推动中医药现代化和国际化进程。

参考文献:

- [1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229-263.
- [2] THAI A A, SOLOMON B J, SEQUIST L V, et al. Lung cancer [J]. *Lancet*, 2021, 398(10299): 535-554.
- [3] SHU C A, GAINOR J F, AWAD M M, et al. Neoadjuvant atezolizumab and chemotherapy in patients with resectable non-small-cell lung cancer: an open-label, multicentre, single-arm, phase 2 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2020, 21(6): 786-795.
- [4] 杜业勤,张星平.经方治疗痼症举隅[J].上海中医药杂志, 2004, 38(9): 20-21.
- [5] 叶需智,冯利,秦子舒,等.木防己汤加减治疗癌性胸腔积液[J].中医杂志, 2018, 59(3): 251-253.
- [6] 刘华,张轩琦,郭忠聪.木防己汤合葶苈大枣泻肺汤联合博来霉素治疗恶性胸腔积液的临床观察[J].中医药导报, 2015, 21(11): 39-41.
- [7] GAO F, NIU Y, SUN L, et al. Integrating network pharmacology and transcriptomic validation to investigate the efficacy and mechanism of Mufangji decoction preventing lung cancer [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 298: 115573.
- [8] 石岩,赵昕,齐文升.经方治疗肺癌合并胸腔积液 1 例[J].北京中医药, 2020, 39(1): 88-89.
- [9] ARHATTE M, GUNARATNE G S, EL BOUSTANY C, et al. TMEM33 regulates intracellular calcium homeostasis in renal tubular epithelial cells [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2024.
- [10] TAKAHASHI Y, HE H, TANG Z, et al. An autophagy assay reveals the ESCRT-III component CHMP2A as a regulator of phagophore closure [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2855.
- [11] METCALF M G, HIGUCHI-SANABRIA R, GARCIA G, et al. Beyond the cell factory: Homeostatic regulation of and by the UPRER [J]. *Sci Adv*, 2020, 6(29): eabb9614.
- [12] ZENG Z, LIANG J, WU L, et al. Exercise-induced autophagy suppresses sarcopenia through Akt/mTOR and Akt/FoxO3a signal pathways and AMPK-mediated mitochondrial quality control [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 583478.
- [13] LI S, WANG A, WU Y, et al. Targeted therapy for non-small-cell lung cancer: New insights into regulated cell death combined with immunotherapy [J]. *Immunol Rev*, 2024, 321(1): 300-334.
- [14] LIU G, PEI F, YANG F, et al. Role of autophagy and apoptosis in non-small-cell lung cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(2): 367.
- [15] WANG X R, JIANG Z B, XU C, et al. Andrographolide suppresses non-small-cell lung cancer progression through induction of autophagy and antitumor immune response [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 179: 106198.
- [16] SONG Y, BI Z, LIU Y, et al. Targeting RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway in human cancer: current status in clinical trials [J]. *Genes Dis*, 2023, 10(1): 76-88.
- [17] BAHAR M E, KIM H J, KIM D R. Targeting the RAS/RAF/MAPK pathway for cancer therapy: from mechanism to clinical studies [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 455.
- [18] YUAN Y, DING D, ZHANG N, et al. TNF- α induces autophagy through ERK1/2 pathway to regulate apoptosis in neonatal necrotizing enterocolitis model cells IEC-6 [J]. *Cell Cycle*, 2018, 17(11): 1390-1402.
- [19] ALI E S, AKTER S, RAMPROSHAD S, et al. Targeting Ras-ERK cascade by bioactive natural products for potential treatment of cancer: an updated overview [J]. *Cancer Cell Int*, 2022, 22(1): 246.
- [20] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].北京:人民卫生出版社, 1982: 140-142.
- [21] KAMANGAR F, DORES G M, ANDERSON W F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world [J]. *J Clin Oncol*, 2023, 41(34): 5209-5224.
- [22] LOZANO M D, ECHEVESTE J I, ABENGOZAR M, et al. Cytology smears in the era of molecular biomarkers in non-small cell lung cancer: doing more with less [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2018, 142(3): 291-298.
- [23] 王启鸣.精准医学背景下肺癌化疗的新角度和新思考[J].医学研究生学报, 2017, 30(11): 1151-1154.
- [24] LEWIS J, GILLASPIE E A, OSMUNDSON E C, et al. Before or after: evolving neoadjuvant approaches to locally advanced non-small cell lung cancer [J]. *Front Oncol*, 2018, 8: 5.
- [25] 张博,周奕阳,张敏峰,等.扶正祛邪方对肺癌患者无进展生存期的影响[J].上海中医药杂志, 2024, 58(12): 114-118.
- [26] 王衍鸿,田建辉,罗斌,等.中医药调控自然杀伤细胞防治肺癌转移的研究进展[J].上海中医药杂志, 2024, 58(12): 170-178.
- [27] YE J, ZHANG J, ZHU Y, et al. Targeting autophagy and beyond: deconvoluting the complexity of Beclin-1 from biological function to cancer therapy [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13(12): 4688-4714.
- [28] YE Y, TYNDALL E R, BUI V, et al. Multifaceted membrane interactions of human Atg3 promote LC3-phosphatidylethanolamine conjugation during autophagy [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 5503.
- [29] VARGAS J N S, HAMASAKI M, KAWABATA T, et al. The mechanisms and roles of selective autophagy in mammals [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24(3): 167-185.
- [30] KOCAC M, EZAZI ERDI S, JORBA G, et al. Targeting autophagy in disease: established and new strategies [J]. *Autophagy*, 2022, 18(3): 473-495.
- [31] ASHRAF R, KUMAR S. Mfn2-mediated mitochondrial fusion promotes autophagy and suppresses ovarian cancer progression by reducing ROS through AMPK/mTOR/ERK signaling [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(11): 573.

编辑:杨铁舜

收稿日期:2024-10-14