

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.11.012

实验研究

理肺消积丸对肺癌模型小鼠肿瘤组织 Warburg 效应及 USP47/BACH1 通路的影响

刘素晓¹, 赵瑞丽², 谷雨², 丁锦泵², 陈悦冰², 冯素香³, 李素云³, 李亚^{1,3}✉

1. 河南中医药大学第一附属医院实验中心, 河南省郑州市金水区人民路 19 号, 450000; 2. 河南中医药大学第一临床医学院;
3. 河南中医药大学呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心/河南省中医药防治呼吸病重点实验室

[摘要] 目的 基于 Warburg 效应及 USP47/BACH1 通路探讨理肺消积丸治疗非小细胞肺癌的可能作用机制。方法 50 只 C57BL/6 小鼠随机分为模型组、理肺消积组、抑制剂组、理肺消积+抑制剂组、顺铂组, 每组 10 只。各组小鼠采用皮下接种 Lewis 细胞建立肺癌小鼠模型, 接种次日开始模型组小鼠每天给予 0.2 ml 生理盐水灌胃, 理肺消积组每天给予理肺消积丸溶液 240 mg/(kg·d) 灌胃, 抑制剂组每天给予 P22077 10 mg/(kg·d) 腹腔注射, 理肺消积+抑制剂组每天给予理肺消积丸灌胃+P22077 腹腔注射(剂量同上), 顺铂组每隔 1 天腹腔注射顺铂 0.5 mg/(kg·d), 各组均给药 14 天。最后一次给药次日, 测量各组小鼠肿瘤重量和肿瘤体积, HE 染色观察肿瘤组织病理形态, TUNEL 染色检测肿瘤组织凋亡情况, 免疫组化法检测肿瘤组织增殖细胞核抗原(PCNA)蛋白水平, 检测肿瘤组织 Warburg 效应指标[包括葡萄糖浓度、乳酸含量及三磷酸腺苷(ATP)产量], Western Blot 法和 qRT-PCR 法分别检测泛素特异性肽酶 47 (USP47)、BTB 和 CNC 同源体 1 (BACH1)、己糖激酶 2 (HK2)、甘油醛 3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 蛋白和 mRNA 表达水平。结果 与模型组比较, 各药物干预组小鼠肿瘤重量和肿瘤体积减小, 肿瘤组织病理改善, PCNA 阳性率降低, 肿瘤组织凋亡率升高, USP47、BACH1、HK2 蛋白及 mRNA 表达水平均降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 除顺铂组乳酸含量外, 其余各药物干预组小鼠肿瘤组织葡萄糖浓度升高, 且乳酸含量、ATP 产量降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与理肺消积组比较, 理肺消积+抑制剂组上述各指标改善更明显 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与顺铂组比较, 理肺消积+抑制剂组 HK2、GAPDH mRNA 表达降低, USP47、HK2 蛋白水平降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与抑制剂组比较, 顺铂组 HK2 蛋白水平升高, 理肺消积+抑制剂组 BACH1、HK2、GAPDH mRNA 表达降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 理肺消积丸可以显著抑制肺癌小鼠肿瘤生长, 其作用机制可能与通过 USP47/BACH1 通路抑制 Warburg 效应有关。

[关键词] 肺癌; Warburg 效应; 泛素特异性肽酶 47; BTB 和 CNC 同源体 1; 能量代谢; 理肺消积丸

肺癌是一种高发病率和死亡率的疾病, 其中非小细胞肺癌 (non small cell lung cancer, NSCLC) 约占 80%^[1]。中医药辅助治疗 NSCLC 优势显著^[2-3], 近年来受到了广泛关注。理肺消积丸是本课题组根据“积气致癌”假说^[4]拟定的方剂, 具有扶正祛邪、消痰化痞、化癥消积之功。前期临床初步观察显示, 该方可以显著提高中晚期 NSCLC 患者免疫

功能, 延长无进展生存期, 减轻放疗、化疗毒副反应。基础研究结果^[5-6]显示, 该方可抑制肺癌细胞增殖和迁移, 缩小瘤体。

Warburg 效应是指肿瘤细胞即使在有氧条件下, 仍倾向于利用糖酵解途径产生能量, 是肿瘤恶变过程中最基础的代谢改变, 可为肿瘤细胞快速增殖和迁移提供能量, 促进肿瘤的迅速发展^[7]。有研究^[8]显示, 泛素特异性肽酶 47 (USP47)/BTB 和 CNC 同源体 1 (BACH1) 通路在 NSCLC 进展过程中具有重要作用, USP47 通过刺激己糖激酶 2 (HK2)

基金项目: 河南省二〇二三年科技发展计划 (232300420272); 河南省中医药科学研究专项 (2022ZY1022, 2024ZY1004, 2022JDZX099); 河南省医学科技攻关计划项目 (LHGJ20230691)

✉ 通讯作者: yuanfengcm@126.com

和甘油醛 3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 的转录来稳定 BACH1, 促进 Warburg 效应和 NSCLC 的发展。基于此, 本研究从 USP47/BACH1 通路和 Warburg 效应角度, 探讨理肺消积丸抑制肺癌小鼠肿瘤生长的可能作用机制, 为其临床应用提供依据。本研究经河南中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会批准 (伦理批准号: YFYDW2023031)。

1 材料与方法

1.1 动物与细胞

SPF 级 C57BL/6 小鼠 50 只, 6~8 周龄, 体质量 18~22 g, 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 实验动物合格证号: 110324231105080713。饲养于河南中医药大学第一附属医院屏障动物房, 温度维持在 20~26 °C, 湿度 30%~70%, 换气次数 ≥ 15 次/h, 12 h 光照与黑暗交替。小鼠 Lewis 肺癌细胞株 (目录号: SCSP-5252), 由中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库提供。

1.2 药物

理肺消积丸组成: 人参 10 g, 制川乌 7 g, 大黄 7 g, 甘草 4 g, 紫菀 3 g, 前胡 3 g, 细辛 3 g 等。药材购自安徽普仁中药饮片有限公司, 由河南中医药大学药学院制剂实验室制备成小蜜丸 (约 0.45 g/10 丸, 每 30 丸相当于临床 1 剂药量)。注射用顺铂 (批号: EA1A9004B), 购自齐鲁制药有限公司; USP47 抑制剂 P22077 (货号: HY-13865), 购自 MCE 公司。

1.3 主要试剂与仪器

增殖细胞核抗原 (PCNA) 抗体 (货号: 10205-2-AP)、BACH1 抗体 (货号: 14018-1-AP)、HK2 抗体 (货号: 22029-1-AP)、GAPDH 抗体 (货号: 10494-1-AP), 武汉三鹰生物科技有限公司; USP47 抗体 (货号: A15461), Abclonal 公司; HE 染色液 (货号: G1005)、超敏 ECL 化学发光试剂盒 (货号: G2020), 武汉赛维尔生物科技有限公司; TUNEL 试剂盒 (货号: G001-1-1)、葡萄糖试剂盒 (货号: A154-1-1), 南京建成生物工程研究所; 乳酸含量比色试剂盒 (货号: E-BC-K044-M)、三磷酸腺苷 (ATP) 含量比色试剂盒 (货号: E-BC-K157-M), Elabscience 公司; HiScript® II 1st Strand cDNA Synthesis 试剂盒 (货号: 4348814)、AceQ® qPCR SYBR®Green Master Mix 试剂盒 (货号: A25742), Thermo 公司。

石蜡切片机 (Leica 公司, 型号: RM2245);

梯度 PCR 仪 (Applied Biosystems 公司, 型号: Veriti); 分析天平 (赛多利斯公司, 型号: BCE822I-1CCN); 显微镜 (奥林巴斯公司, 型号: BX41); 荧光定量 PCR 仪 (Roche 公司, 型号: LightCycler 480); 化学发光成像分析系统 (伯乐公司, 型号: Chemidoc XRS+)。

1.4 模型制备

采用皮下接种法建立 Lewis 肺癌小鼠模型^[9]: 将培养于 DMEM 高糖培养基 (含 10% 胎牛血清) 中的 Lewis 细胞以胰蛋白酶消化、计数, 生理盐水制备为 1×10^7 个/ml 的细胞悬液。将上述悬液接种于 C57BL/6 小鼠右腋部皮下, 接种量为 0.2 ml/只, 接种后将小鼠放回饲养笼继续饲养。若小鼠出现肉眼可见的实体瘤, 则证明造模成功。

1.5 分组与处理

按随机数字表法将 50 只造模小鼠分为模型组、理肺消积组、顺铂组、抑制剂组、理肺消积+抑制剂组, 每组 10 只。为观察药物对肿瘤微病灶的预防潜力及治疗效应, 并符合动物伦理要求, 故本研究接种次日, 模型组小鼠每天给予 0.2 ml 生理盐水灌胃; 根据人体与动物体表面积等效剂量系数折算法^[10]计算, 理肺消积组每天给予理肺消积丸溶液 240 mg/(kg·d) 灌胃; 抑制剂组每天给予 P22077 腹腔注射 10 mg/(kg·d); 理肺消积+抑制剂组每天给予理肺消积丸灌胃+P22077 腹腔注射, 剂量同上; 顺铂组每隔 1 天腹腔注射顺铂 0.5 mg/kg, 共注射 7 次。各组均观察 14 天。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 测定肿瘤生长情况 最后一次给药次日, 摘取各组小鼠肿瘤组织, 使用分析天平称量各小鼠肿瘤重量; 使用游标卡尺测量肿瘤长径、短径, 计算肿瘤体积, 瘤体积=长径 $\times$ 短径 $^2 \times 0.52$ 。测定完成后采用随机数字表法每组选取 6 只小鼠肿瘤组织分别进行 HE 染色、TUNEL 染色、免疫组化检测及 Warburg 效应评价。各组剩余小鼠肿瘤组织再采用随机数字表法选取 3 只小鼠肿瘤组织进行 qRT-PCR 法检测和 Western Blot 法检测。

1.6.2 HE 染色观察肿瘤组织病理形态 肿瘤组织经 4% 多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋, 并制备 4 μ m 厚的切片, HE 染色, 显微镜下观察肺癌组织病理改变情况。

1.6.3 TUNEL 染色检测肿瘤组织凋亡情况 肿瘤组织常规制备石蜡切片, 脱蜡、水合、PBS 洗涤、加入 TUNEL 染色液、封片处理, 光学显微镜下观

察细胞计数，并拍照。计算细胞凋亡指数，凋亡指数=凋亡细胞数/总细胞数×100%。

1.6.4 免疫组化法检测肿瘤组织 PCNA 蛋白水平 肿瘤组织约 1 cm × 1 cm × 0.2 cm 大小，石蜡包埋，并制备 4 μm 厚的切片，采用免疫组化法对细胞增殖蛋白 PCNA 的表达情况进行检测，显微镜下观察组织阳性染色情况，棕色代表免疫组化染色阳性细胞，蓝色代表阴性细胞，并采用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析光密度值。

1.6.5 Warburg 效应评价 肿瘤组织 50 mg 匀浆后，分别采用葡萄糖测定试剂盒检测葡萄糖浓度，乳酸含量比色试剂盒检测乳酸产量，ATP 含量比色试剂盒检测 ATP 含量。

1.6.6 qRT-PCR 法检测 *USP47*、*BACH1*、*HK2*、*GAPDH* mRNA 表达 肿瘤组织 50 mg，提取组织中总 RNA，检测 RNA 浓度，反转录为 cDNA，按照 qPCR 试剂盒说明书进行实时荧光定量 PCR 反应，反应结束后，以 β -actin 基因为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算肿瘤组织中 *USP47*、*BACH1*、*HK2*、*GAPDH* mRNA 表达水平。引物信息见表 1，引物序列由郑州点睛生物科技公司合成设计。

表 1 肿瘤组织中 *USP47*、*BACH1*、*HK2*、*GAPDH* 的 RT-qPCR 引物序列

Table 1 RT-qPCR primer sequences of *USP47*, *BACH1*, *HK2* and *GAPDH* in tumor tissues

引物	序列	长度/bp
<i>BACH1</i>	上游 TGAGTGAGAGTGGGTATTTCG	197
	下游 GTCAGTCTGGCCTACGATTCT	
<i>HK2</i>	上游 TGATCGCCTGCTTATTCACGG	112
	下游 AACCCGCTAGAAATCTCCAGA	
<i>USP47</i>	上游 GATGTGATTCCCTTGGATTGCT	101
	下游 AACCCATTGGTGTATCTTCTTC	
<i>GAPDH</i>	上游 GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	138
	下游 TGGTGAAGACGCCAGTGGA	
β -actin	上游 AGCCATGTACGTAGCCATCC	150
	下游 GACTCCATCACAAATGCCAGT	

注：*BACH1*，BTB 和 CNC 同源体 1；*HK2*，己糖激酶 2；*USP47*，泛素特异性肽酶 47；*GAPDH*，甘油醛 3-磷酸脱氢酶； β -actin， β -肌动蛋白。

1.6.7 Western Blot 法检测 *USP47*、*BACH1*、*HK2*、*GAPDH* 蛋白水平 肿瘤组织 50 mg，提取组织总蛋白并检测浓度，取 30 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳，后经转膜、封闭，*USP47*、*BACH1*、*HK2*、*GAPDH* 一抗（稀释比例分别为 1：1000、1：1000、1：2000、1：2500）孵育，HRP 标记的二抗（稀释

比例 1：2000）孵育、ECL 发光液显色，扫描后分析条带，以目的蛋白灰度与内参 β 微管蛋白（ β -Tubulin）灰度的比值代表蛋白的相对表达量。

1.7 统计学方法

采用 Graphpad prism 9.0 软件进行统计分析。计量资料均符合正态分布以均数±标准差（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，方差齐时多组间比较使用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD 法；方差不齐时选择 Kruskal-Wallis 检验，两两比较采用 Bonferroni 法。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠肿瘤生长情况比较

表 2 示，与模型组比较，各药物干预组小鼠肿瘤重量显著降低，肿瘤体积显著缩小（ $P<0.01$ ）；理肺消积+抑制剂组对肿瘤重量的抑制作用强于理肺消积组和抑制剂组（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ），对肿瘤体积的抑制作用强于理肺消积组（ $P<0.05$ ）。

表 2 各组小鼠肿瘤组织重量和体积比较

Table 2 Comparison of tumor weight and volume in mice of each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	肿瘤重量/g	肿瘤体积/mm ³
模型组	6	1.17±0.24	1631.80±303.78
理肺消积组	6	0.77±0.09 ^{a) b)}	1066.83±143.96 ^{a) c)}
抑制剂组	6	0.74±0.13 ^{a) c)}	932.81±211.46 ^{a)}
理肺消积+抑制剂组	6	0.41±0.18 ^{a)}	642.22±203.45 ^{a)}
顺铂组	6	0.78±0.12 ^{a)}	971.20±173.56 ^{a)}

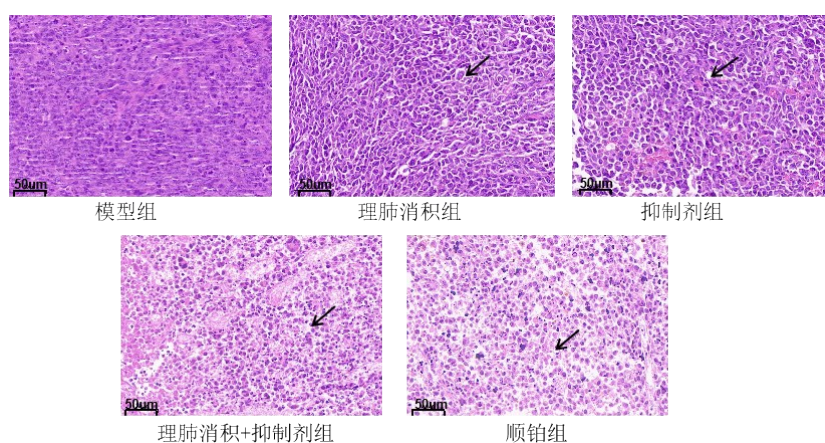
注：a) 与模型组比较， $P<0.01$ ；b) 与理肺消积+抑制剂组比较， $P<0.01$ ；c) 与理肺消积+抑制剂组比较， $P<0.05$ 。

2.2 各组小鼠肿瘤组织病理形态学比较

图 1 示，经 HE 染色后，模型组小鼠肿瘤组织细胞核深染，排列紧密，形态异常，坏死区少见；各药物干预组肿瘤细胞排列相对稀疏，少量空泡状散在，部分区域排列紊乱，可见较多坏死区；其中理肺消积+抑制剂组和顺铂组可见大片弥漫的坏死灶，周边肿瘤细胞核着色较浅，细胞稀疏、紊乱。

2.3 各组小鼠肿瘤组织 PCNA 阳性率及凋亡率比较

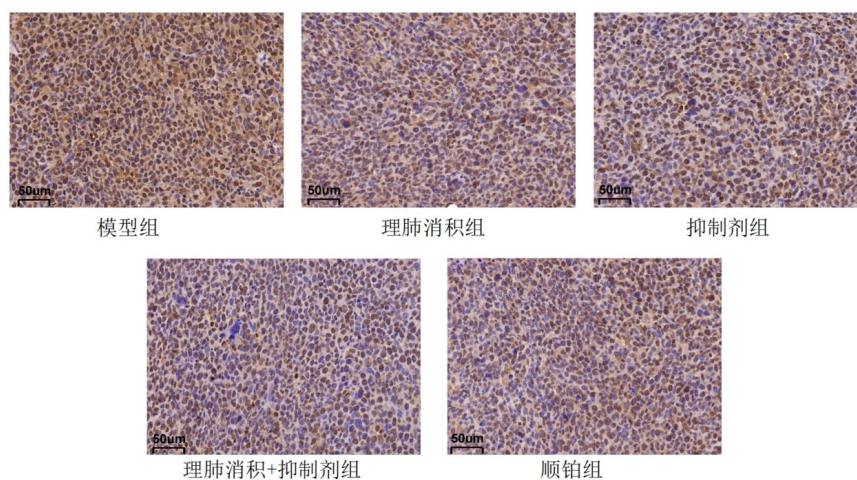
各组小鼠肿瘤组织 PCNA 免疫组化染色结果见图 2。各组小鼠肿瘤组织 TUNEL 染色结果见图 3。表 3 示，与模型组比较，各药物干预组小鼠肿瘤组织 PCNA 阳性率均降低，凋亡率升高（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ）。理肺消积+抑制剂组小鼠肿瘤组织 PCNA 阳性率低于理肺消积丸组和抑制剂组（ $P<0.05$ ）。理肺消积+抑制剂组肿瘤组织凋亡率高于理肺消积组、抑制剂组和顺铂组（ $P<0.05$ ）。



注：黑色箭头指示为肿瘤细胞空泡、坏死状态。

图1 各组小鼠肿瘤组织病理学形态 (HE 染色, ×200)

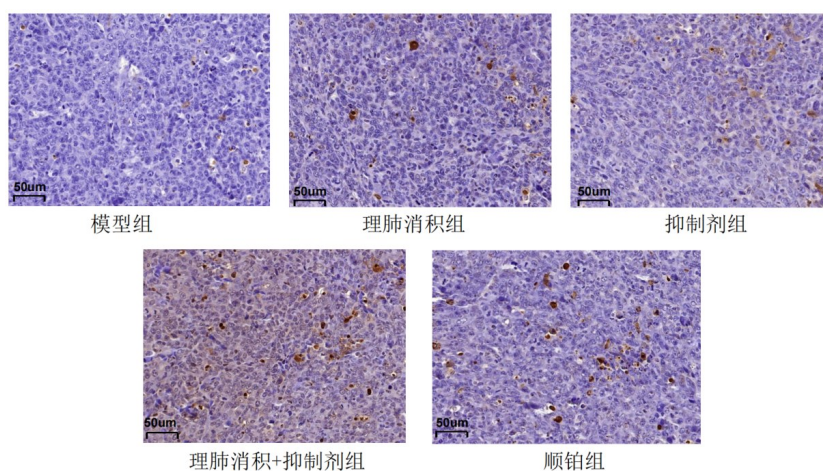
Figure 1 Pathological changes of tumor tissues in mice of each group



注：PCNA，增殖细胞核抗原；图中棕色颗粒为 PCNA 阳性细胞。

图2 各组小鼠肿瘤组织 PCNA 表达情况 (免疫组化, ×200)

Figure 2 PCNA expression in tumor tissues of mice in each group (Immunohistochemistry, ×200)



注：棕色颗粒代表 TUNEL 染色阳性细胞。

图3 各组小鼠肿瘤组织凋亡情况 (TUNEL 染色, ×200)

Figure 3 Apoptosis in tumor tissues of mice in each group

表3 各组小鼠肿瘤组织PCNA阳性率、凋亡率比较
Table 3 Comparison of PCNA positive rate and apoptosis rate in tumor tissues of mice in each group (% , $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	PCNA阳性率	凋亡率
模型组	6	81.45±4.81	0.88±0.33
理肺消积组	6	57.74±9.97 ^{a)} c)	2.88±1.01 ^{b)} c)
抑制剂组	6	55.61±10.13 ^{a)} c)	3.49±0.87 ^{b)} c)
理肺消积+抑制剂组	6	31.95±3.90 ^{b)}	5.34±0.96 ^{b)}
顺铂组	6	47.30±10.19 ^{b)}	3.74±0.93 ^{b)} c)

注：PCNA，增殖细胞核抗原。
a) 与模型组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；
c) 与理肺消积+抑制剂组比较， $P<0.05$ 。

2.4 各组小鼠肿瘤组织葡萄糖浓度、乳酸含量、ATP产量比较

表4示，与模型组比较，除顺铂组乳酸含量外，其余各药物干预组小鼠肿瘤组织葡萄糖浓度升高，且乳酸含量、ATP产量降低（ $P<0.05$ 或 $P<$

表4 各组小鼠肿瘤组织葡萄糖浓度、乳酸含量、ATP产量比较
Table 4 Comparison of glucose concentration, lactate content, and ATP production in tumor tissues of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	葡萄糖/mmol·g prot ⁻¹	乳酸/mmol·g prot ⁻¹	ATP/mmol·kg ⁻¹
模型组	6	0.12±0.01	4.81±0.41	3.49±0.10
理肺消积组	6	0.22±0.03 ^{a)} c)	3.53±0.44 ^{b)} d)	2.27±0.22 ^{b)} c)
抑制剂组	6	0.25±0.05 ^{b)} d)	3.41±0.09 ^{b)}	2.09±0.27 ^{b)} c)
理肺消积+抑制剂组	6	0.35±0.02 ^{b)}	2.53±0.41 ^{b)}	1.30±0.32 ^{b)}
顺铂组	6	0.23±0.05 ^{a)}	3.68±0.20 ^{d)}	1.72±0.12 ^{b)}

注：a) 与模型组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与理肺消积+抑制剂组比较， $P<0.01$ ；d) 与理肺消积+抑制剂组比较， $P<0.05$ 。

0.01)。与理肺消积+抑制剂组比较，理肺消积组和抑制剂组葡萄糖浓度降低、ATP产量升高，理肺消积组和顺铂组乳酸含量升高（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ）。

2.5 各组小鼠肿瘤组织 USP47、BACH1、HK2、GAPDH mRNA 表达比较

表5示，与模型组比较，除理肺消积组 GAPDH mRNA 表达外，其余各药物干预组小鼠肿瘤组织中 USP47、BACH1、HK2、GAPDH mRNA 表达均降低（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ）。与理肺消积组比较，抑制剂组、理肺消积+抑制剂组、顺铂组 USP47、HK2 mRNA 表达降低，理肺消积+抑制剂组 BACH1、GAPDH mRNA 表达降低（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ）；与抑制剂组比较，理肺消积+抑制剂组 BACH1、HK2、GAPDH mRNA 表达降低（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ）；与理肺消积+抑制剂组比较，顺铂组 HK2、GAPDH mRNA 表达升高（ $P<0.05$ ）。

2.6 各组小鼠肿瘤组织 USP47、BACH1、HK2、GAPDH 蛋白水平比较

表6示，与模型组比较，各药物干预组 USP47、BACH1、HK2、GAPDH 蛋白水平均降低（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ）。与理肺消积组比较，抑制剂组、理肺消积+抑制剂组 USP47、HK2、GAPDH 蛋白水平降低，理肺消积+抑制剂组 BACH1 蛋白水平降低，顺铂组 GAPDH 蛋白水平降低（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ）；与抑制剂组比较，顺铂组 HK2 蛋白水平升高（ $P<0.05$ ）；与理肺消积+抑制剂组比较，顺铂组 USP47、HK2 蛋白水平升高（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ）。各组小鼠肿瘤组织 USP47、BACH1、HK2、GAPDH 蛋白条带图见图4。

表5 各组小鼠肿瘤组织 USP47、BACH1、HK2、GAPDH mRNA 表达比较
Table 5 Comparison of USP47, BACH1, HK2 and GAPDH mRNA expression levels in tumor tissues of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	USP47	BACH1	HK2	GAPDH
模型组	3	1.00±0.08	1.00±0.16	1.00±0.10	1.00±0.23
理肺消积组	3	0.65±0.05 ^{a)}	0.60±0.04 ^{a)}	0.66±0.02 ^{b)}	0.75±0.03
抑制剂组	3	0.39±0.04 ^{a)} c)	0.55±0.01 ^{a)}	0.50±0.06 ^{a)} c)	0.69±0.05 ^{b)}
理肺消积+抑制剂组	3	0.30±0.06 ^{a)} c)	0.31±0.05 ^{a)} d) e)	0.33±0.01 ^{a)} c) e)	0.23±0.01 ^{a)} c) f)
顺铂组	3	0.44±0.08 ^{a)} d)	0.40±0.07 ^{a)}	0.49±0.06 ^{a)} c) g)	0.53±0.04 ^{a)} g)

注：USP47，泛素特异性肽酶47；BACH1，BTB和CNC同源体1；HK2，己糖激酶2；GAPDH，甘油醛3-磷酸脱氢酶。
a) 与模型组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与理肺消积组比较， $P<0.01$ ；d) 与理肺消积组比较， $P<0.05$ ；e) 与抑制剂组比较， $P<0.05$ ；f) 与抑制剂组比较， $P<0.05$ ；g) 与理肺消积+抑制剂组比较， $P<0.05$ 。

表6 各组小鼠肿瘤组织 USP47、BACH1、HK2、GAPDH 蛋白水平比较

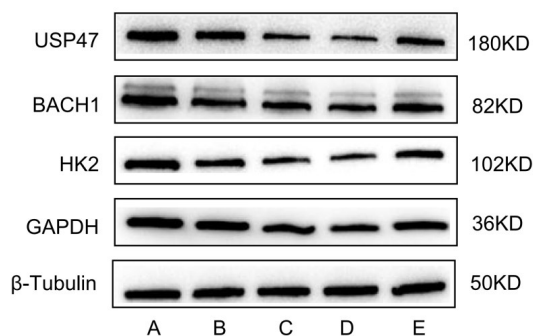
Table 6 Comparison of USP47, BACH1, HK2, and GAPDH protein levels in tumor tissues of mice in each group

(/ β -Tubulin, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	USP47	BACH1	HK2	GAPDH
模型组	3	1.26 $\pm$ 0.11	1.32 $\pm$ 0.13	1.09 $\pm$ 0.09	1.31 $\pm$ 0.11
理肺消积组	3	0.80 $\pm$ 0.21 ^{a)}	0.66 $\pm$ 0.15 ^{b)}	0.65 $\pm$ 0.06 ^{b)}	0.97 $\pm$ 0.03 ^{a)}
抑制剂组	3	0.37 $\pm$ 0.14 ^{b) c)}	0.33 $\pm$ 0.14 ^{b)}	0.35 $\pm$ 0.07 ^{b) c)}	0.55 $\pm$ 0.07 ^{b) c)}
理肺消积+抑制剂组	3	0.16 $\pm$ 0.06 ^{b) d)}	0.24 $\pm$ 0.10 ^{b) c)}	0.19 $\pm$ 0.08 ^{b) d)}	0.31 $\pm$ 0.10 ^{b) d)}
顺铂组	3	0.62 $\pm$ 0.15 ^{b) f)}	0.51 $\pm$ 0.20 ^{b)}	0.65 $\pm$ 0.18 ^{b) c) g)}	0.57 $\pm$ 0.27 ^{b) c)}

注：USP47，泛素特异性肽酶47；BACH1，BTB和CNC同源体1；HK2，己糖激酶2；GAPDH，甘油醛3-磷酸脱氢酶。

a) 与模型组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与理肺消积组比较， $P<0.05$ ；d) 与理肺消积组比较， $P<0.01$ ；e) 与抑制剂组比较， $P<0.05$ ；f) 与理肺消积+抑制剂组比较， $P<0.05$ ；g) 与理肺消积+抑制剂组比较， $P<0.01$ 。



注：USP47，泛素特异性肽酶47；BACH1，BTB和CNC同源体1；HK2，己糖激酶2；GAPDH，甘油醛3-磷酸脱氢酶； β -Tubulin， β 微管蛋白；A，模型组；B，理肺消积组；C，抑制剂组；D，理肺消积+抑制剂组；E，顺铂组。

图4 各组小鼠肿瘤组织 USP47、BACH1、HK2、GAPDH 蛋白条带图

Figure 4 Protein band diagrams of USP47, BACH1, HK2 and GAPDH in the tumor tissues of mice in each group

3 讨论

肺癌依据其临床症状可归属中医学“肺积”“息贲”“息积”等范畴。因肺主一身之气，故将积气列于肺脏，多因正气亏损，脏腑失和，酿生热、痰、瘀，诸邪壅结，酿生癌毒，胶结成块，而成肺积^[4]。理肺消积丸该方中人参扶正祛邪，川乌通阳散寒，大黄泄浊破积，前胡、紫菀化痰止咳，细辛散寒止痛，全方以寒温配伍相制、攻补兼施之法，达扶正培本、化痰消癥、解毒散结之效。顺铂作为 NSCLC 一线化疗药物，通过干扰 DNA 合成与修复抑制肿瘤细胞增殖^[1]，故在本研究中作为阳性对照。结果表明，各药物干预组能够显著抑制 Lewis 肺癌小鼠的肿瘤重量和肿瘤体积，改善肿瘤组织病理形态，降低肿瘤组织中 PCNA 蛋白水平，而 PCNA 蛋白通常与肿瘤细胞增殖活性呈正相关^[12]；同时可显著提高肿瘤细胞的凋亡率。此外，理肺消积+抑制剂组的抑瘤效应呈现协同增效趋势，提示

理肺消积丸可能与 USP47 抑制剂协同作用发挥抗肿瘤作用。

细胞生长的能量主要来源于糖代谢，其中氧化磷酸化和糖酵解是葡萄糖在体内氧化分解的两种主要途径。正常分化的组织细胞在有氧条件下主要通过在线粒体内氧化磷酸化产生 ATP，而在缺氧条件下则主要通过糖酵解产生乳酸和 ATP^[12]。当细胞发生癌变时，即使在氧气充足的条件下也主要通过糖酵解途径进行糖代谢快速产生 ATP，以促进肿瘤细胞增殖、侵袭，此代谢改变称为 Warburg 效应，是肿瘤恶变过程中的基础现象^[13-14]。基于此，靶向抑制 Warburg 效应已成为逆转肿瘤代谢异常的重要治疗策略。本研究通过检测葡萄糖浓度、乳酸产量和 ATP 产量评估 Warburg 效应活性。其中组织蛋白标准化后，葡萄糖残余浓度和其摄取率呈负相关，而乳酸与 ATP 产量则与 Warburg 的通量和代谢水平呈正相关^[15]。本研究结果表明，与模型组比较，各药物干预组均能够显著升高 Lewis 肺癌小鼠肿瘤中的葡萄糖浓度、降低乳酸堆积及 ATP 产量，表明药物干预可有效抑制肿瘤细胞的 Warburg 效应进程。值得注意的是，理肺消积丸联合 USP47 抑制剂对上述代谢指标的调控幅度显著优于二者单独作用，提示二者可协同作用靶向调控与 Warburg 效应相关的关键节点。

研究显示，转录因子 BACH1 作为响应细胞内和细胞外信号的代谢调节因子，在癌症细胞能量代谢中发挥着重要作用^[16]。BACH1 及其靶基因的转录与肺癌患者的低生存率、临床分期和转移密切相关^[17]；BACH1 通过激活糖酵解过程关键酶 HK2 和 GAPDH 的转录，参与 Warburg 效应，进而促进 NSCLC 的增殖与转移^[18]。BACH1 在体内的降解主要依靠蛋白酶-泛素化途径，泛素-蛋白酶体系统的异常可导致包括癌症在内的多种疾病的发生发展^[19-20]。

USP47 是去泛素化家族成员, USP47 广泛参与轴突生长、细胞黏附、上皮间质转化、DNA 损伤修复等过程, 促进肿瘤的发展、转移及耐药性^[21-22]。因此, 抑制 USP47/BACH1 通路可能成为抑制 Warburg 效应和抗肿瘤治疗靶点。P22077 是泛素特异性肽酶 7 (USP7) /USP47 的特异性抑制剂, 可抑制 USP7/USP47 通路中去泛素化酶活性^[23]。本研究结果表明, 与模型组比较, 除理肺消积组 *GAPDH* mRNA 外, 其余各药物干预组均能抑制肺癌小鼠肿瘤组织 USP47、BACH1、HK2、GAPDH 蛋白和 mRNA 表达水平, 其中理肺消积+抑制剂组的抑制效果优于二者单独作用组, 且二者联用对 USP47 和 HK2 蛋白表达水平的抑制作用强于化疗药顺铂, 提示 USP47 可能是理肺消积丸抑制 Warburg 效应的作用靶点。

综上, 理肺消积丸可抑制 Lewis 肺癌模型小鼠肿瘤生长, 其作用机制可能与其通过 USP47/BACH1 通路抑制 Warburg 效应有关。然而本研究尚存一定局限性, 对 Warburg 效应的评价方法还不充分, 未来会考虑检测更多 Warburg 效应相关指标, 以更深入地阐释理肺消积丸调控 Warburg 效应的具体机制。

参考文献

- [1] LAZZARI C, SPAGNOLO CC, CIAPPINA G, et al. Immunotherapy in early-stage non-small cell lung cancer (NSCLC): current evidence and perspectives [J]. *Curr Oncol*, 2023, 30(4): 3684-3696.
- [2] 王学谦, 侯伟, 郑佳彬, 等. 中医综合治疗方案维持治疗晚期非小细胞肺癌的多中心、大样本、前瞻性队列研究 [J]. *中医杂志*, 2020, 61(8): 690-694.
- [3] 辛晓丽, 姜怡, 沈丽萍, 等. 中医药辅助治疗 600 例老年非小细胞肺癌患者的生存分析 [J]. *中医杂志*, 2019, 60(1): 31-35, 46.
- [4] 贾瑞, 刘素晓, 李亚. 基于《千金方》“肺脏·积气”篇的“积气致癌”理论探讨 [J]. *中医研究*, 2021, 34(3): 13-16.
- [5] 刘素晓, 张丛丛, 孔德琪, 等. 基于 Hedgehog 通路探讨理肺消积丸对 NSCLC A549 细胞周期、增殖和迁移的影响 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2024, 26(2): 320-327.
- [6] 刘素晓, 何慧慧, 贾瑞, 等. 理肺消积丸对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤生长的抑制作用 [J]. *中医研究*, 2021, 34(4): 45-49.
- [7] JING YY, CAI FF, ZHANG L, et al. Epigenetic regulation of the Warburg effect by H2B monoubiquitination [J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27(5): 1660-1676.
- [8] PENG J, LI W, TAN N, et al. USP47 stabilizes BACH1 to promote the Warburg effect and non-small cell lung cancer development via stimulating Hk2 and Gapdh transcription [J]. *Am J Cancer Res*, 2022, 12(1): 91-107.
- [9] 马雪曼, 王笑民, 于明薇, 等. 小鼠 lewis 肺癌原位移植瘤和异位皮下移植瘤模型的对比研究 [J]. *实用癌症杂志*, 2018, 33(4): 523-526.
- [10] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 1103.
- [11] GONZÁLEZ-MAGAÑA A, BLANCO FJ. Human PCNA structure, function and interactions [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(4): 570.
- [12] 刘戈, 宋关斌. 肿瘤细胞的糖代谢调控与肿瘤治疗 [J]. *生物医学工程学杂志*, 2019, 36(4): 691-695.
- [13] LI XB, GU JD, ZHOU QH. Review of aerobic glycolysis and its key enzymes- new targets for lung cancer therapy [J]. *Thorac Cancer*, 2015, 6(1): 17-24.
- [14] LI J, HE Y, TAN Z, et al. Wild-type IDH2 promotes the Warburg effect and tumor growth through HIF1alpha in lung cancer [J]. *Theranostics*, 2018, 8(15): 4050-4061.
- [15] BI YH, HAN WQ, LI RF, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 promotes the Warburg effect possibly by inducing pyruvate kinase M2 phosphorylation in liver precancerous lesions [J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(16): 1936-1949.
- [16] SATO M, MATSUMOTO M, SAIKI Y, et al. BACH1 promotes pancreatic cancer metastasis by repressing epithelial genes and enhancing epithelial-mesenchymal transition [J]. *Cancer Res*, 2020, 80(6): 1279-1292.
- [17] LIGNITTO L, LEBOEUF SE, HOMER H, et al. Nrf2 activation promotes lung cancer metastasis by inhibiting the degradation of Bach1 [J]. *Cell*, 2019, 178(2): 316-329.
- [18] WIEL C, LE GAL K, IBRAHIM MX, et al. BACH1 stabilization by antioxidants stimulates lung cancer metastasis [J]. *Cell*, 2019, 178(2): 330-345.
- [19] BIJLMAKERS MJ. Ubiquitination and the proteasome as drug targets in trypanosomatid diseases [J]. *Front Chem*, 2021, 8: 630888. doi: 10.3389/fchem.2020.630888.
- [20] FHU CW, ALI A. Dysregulation of the Ubiquitin proteasome system in human malignancies: a window for therapeutic intervention [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(7): 1513.
- [21] PAN K, FU J, XU W. Role of ubiquitin-specific peptidase 47 in cancers and other diseases [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 726632. doi: 10.3389/fcell.2021.726632.

[22]NAGHAVI L, SCHWALBE M, GHANEM A, et al. Deubiquitinylase USP47 promotes RelA phosphorylation and survival in gastric cancer cells [J]. Biomedicines, 2018, 6(2): 62.

[23]XIANG M, LIANG L, KUANG X, et al. Pharmacological inhibition of USP7 suppresses growth and metastasis of melanoma cells in vitro and in vivo [J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(19): 9228–9240.

Effect of *Lifei Xiaoji Pill* (理肺消积丸) on the Warburg Effect and USP47/BACH1 Pathway in Tumor Tissues of Lung Cancer Model Mice

LIU Suxiao¹, ZHAO Ruili², GU Yu², DING Jinbeng², CHEN Yuebing², FENG Suxiang³, LI Suyun³, LI Ya^{1,3}

1. Laboratory Center, The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou, 450000; 2. The First Clinical Medical College of Henan University of Chinese Medicine; 3. Co-construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases by Henan Province and Education Ministry of P. R. China/Henan Provincial Key Laboratory of Chinese Medicine for Respiratory Disease Prevention and Treatment

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of action of *Lifei Xiaoji Pill* (理肺消积丸, LXP) in the treatment of non small cell lung cancer based on the Warburg effect and the USP47/BACH1 pathway. **Methods** Fifty C57BL/6 mice were randomly divided into five groups, model group, LXP group, inhibitor group, LXP + inhibitor group, and cisplatin group, with 10 mice in each group. A lung cancer mouse model was established by subcutaneously injecting Lewis cells. On the next day, the model group mice were given 0.2 ml of saline by gavage daily, the LXP group given 240 mg/(kg·d) of LXP solution once a day by gavage, the inhibitor group intraperitoneally injected with P22077 at a dose of 10 mg/(kg·d) every day, the LXP + inhibitor group given both LXP by gavage and P22077 by intraperitoneal injection once a day, and the cisplatin group received 0.5 mg/(kg·d) cisplatin intraperitoneally every other day. All treatments lasted for 14 days. On the day after the last dose, tumor weight and volume were measured, tumor histopathology was examined by HE staining, apoptosis in tumor tissues was detected by TUNEL staining, and proliferation cell nuclear antigen (PCNA) protein levels were detected by immunohistochemistry. Warburg effect indicators, including glucose concentration, lactate content, and adenosine triphosphate (ATP) production in tumor tissues, were measured. Western Blot and qRT-PCR were used to detect the protein and mRNA expression levels of USP47, BACH1, hexokinase 2 (HK2), and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). **Results**

Compared with the model group, all drug intervention groups showed reduced tumor weight and volume, improved tumor pathology, decreased PCNA positive rate, increased apoptosis rate, and reduced expression levels of USP47, BACH1, and HK2 proteins and mRNA ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Except for lactate content in the cisplatin group, the glucose concentration in tumor tissues of other drug intervention groups increased, while lactate content and ATP production decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the LXP group, the LXP + inhibitor group showed more significant improvements in these indicators ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the cisplatin group, the LXP + inhibitor group had lower mRNA expression of HK2 and GAPDH, and lower protein levels of USP47 and HK2 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the inhibitor group, the cisplatin group had higher HK2 protein levels, while the LXP + inhibitor group showed lower mRNA expression of BACH1, HK2, and GAPDH ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** LXP significantly inhibits tumor growth in lung cancer mice, and its mechanism of action may be related to inhibiting the Warburg effect via the USP47/BACH1 pathway.

Keywords lung cancer; Warburg effect; USP47; BACH1; energy metabolism; *Lifei Xiaoji Pill* (理肺消积丸)

(收稿日期: 2024-12-10; 修回日期: 2025-02-28)

[编辑: 邓媛]