

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2021.05.015

清燥救肺汤对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肺癌组织氧化磷酸化能量代谢的影响

李佳萍, 余功, 谢斌✉

江西中医药大学, 江西省南昌市湾里区兴湾大道 818 号, 330004

[摘要] **目的** 探讨清燥救肺汤治疗肺癌的可能作用机制。 **方法** 50 只 C57BL/6J 小鼠随机分为模型组, 环磷酰胺 (CTX) 组, 清燥救肺汤高、中、低剂量组, 每组 10 只。各组小鼠分别接种 Lewis 肺癌细胞建立肺癌荷瘤小鼠模型。24 h 后, 模型组每日给予 0.2 ml 生理盐水灌胃, 每日 2 次; CTX 组隔日 1 次以 50 mg/kg CTX 腹腔注射; 清燥救肺汤高、中、低剂量组分别以 11、5.5、2.75 g/(kg·d) 清燥救肺汤灌胃, 每日 2 次。清燥救肺汤各剂量组在接种前后 14 天均灌胃, 其余各组在接种细胞 24 h 后继续给药 14 天。Real-time PCR 法检测肺癌组织中三磷酸腺苷合酶 β 亚基 (ATP 5B) mRNA 表达, 蛋白免疫印迹法检测细胞色素 C 氧化酶亚单位 IV (COX IV) 蛋白表达, 高效液相色谱法检测一磷酸腺苷 (AMP)、二磷酸腺苷 (ADP)、三磷酸腺苷 (ATP) 的含量; JC-1 法检测线粒体膜电位 (MMP) 变化。 **结果** 与模型组比较, CTX 组及清燥救肺汤高、中剂量组 ATP 5B mRNA, COX IV 蛋白表达、ATP 含量和线粒体膜电位显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与 CTX 组比较, 清燥救肺汤高、中、低剂量组 ATP 5B mRNA、COX IV 蛋白表达升高, 清燥救肺汤中、低剂量组 ATP 含量、MMP 水平, 清燥救肺汤高剂量组 AMP/ATP 显著升高, 清燥救肺汤中、低剂量组 AMP/ATP 及清燥救肺汤低剂量组 ADP/ATP 显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与清燥救肺汤高剂量组比较, 清燥救肺汤中、低剂量组 ATP 5B mRNA、COX IV 蛋白表达、ATP 含量升高, AMP/ATP 值、ADP/ATP 值显著降低, 清燥救肺汤低剂量组 MMP 水平明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与清燥救肺汤中剂量组比较, 清燥救肺汤低剂量组 ATP 5B mRNA、COX IV 蛋白表达、ATP 含量上调 ($P < 0.01$)。 **结论** 清燥救肺汤能抑制肺癌细胞增殖, 其机制可能与抑制氧化磷酸化能量代谢途径关键限速酶 COX IV 蛋白表达, 降低线粒体膜电位, 抑制 ATP 5B 活性, 减少 ATP 生成及升高 AMP/ATP 值有关。

[关键词] 肺癌; 清燥救肺汤; 氧化磷酸化; 能量代谢

肺癌是当前全球最常见的恶性肿瘤之一, 近年来肺癌治疗取得了较大进展, 但死亡率仍高居恶性肿瘤首位^[1]。肿瘤细胞具有不断增殖的特性, 且肿瘤细胞的增殖需要大量能量。氧化磷酸化是细胞能量代谢的主要途径之一^[2], 能生成大量三磷酸腺苷 (adenosine triphosphates, ATP), 可为肿瘤细胞的持续生长提供能量^[3]。因此, 抑制肿瘤细胞的能量生成, 可有效抑制肿瘤细胞增殖。三磷酸腺苷合酶 β 亚基 (ATP 5B) 和细胞色素 C 氧化酶亚单位 IV (COX IV) 是氧化磷酸化能量代谢的两个关键酶, 抑制其酶的活性可降低肿瘤细胞的能量代

谢速率^[4-5]。ATP、二磷酸腺苷 (ADP) 和一磷酸腺苷 (AMP) 的浓度可直接反映机体能量代谢水平的高低, 线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 的正常是维持线粒体进行氧化磷酸化的先决条件^[6-7]。中医学认为, 燥热伤肺是肺癌的重要病机^[8]。清燥救肺汤能清热润燥, 主治燥热伤肺重症, 与肺癌燥热病机相符^[9]。合理运用清燥救肺汤不仅可以保护肺功能, 减少并发症, 还能降低放疗所致肺损伤的发生率^[10], 故常用于肺癌中医临床治疗^[11-12]。前期研究发现, 清燥救肺汤能显著降低 Lewis 肺癌小鼠的瘤重, 抑制其肺癌细胞活性^[13], 且能减少癌细胞葡萄糖的摄取, 显著降低肺癌细胞糖酵解乳酸的形成, 抑制糖酵解等能量代谢途径关键限速酶活性^[14]。本文在前期

基金项目: 国家自然科学基金 (81660729); 江西省研究生创新专项 (YC2019-S360); 江西省自然科学基金 (20202BAB206075)

✉ 通讯作者: 331080826@qq.com, (0791) 87144970

研究的基础上,拟建立荷 Lewis 肺癌小鼠模型,从氧化磷酸化能量代谢角度进一步探讨清燥救肺汤治疗肺癌的作用机制。本实验方案经江西中医药大学实验动物伦理委员会审查批准(编号 JZLLSC: 2017-0030)。

1 材料及方法

1.1 动物和瘤株

SPF 级 C57BL/6J 小鼠 50 只,雄性,体质量(20 ± 2) g,购自常州卡文斯实验动物有限公司,实验动物合格证号 SCXK(苏) 2016-0003; 小鼠 Lewis 肺癌细胞,编号 36470TM,购于 ATCC 公司。

1.2 药物

清燥救肺汤组成:桑叶 9 g,生石膏 12 g,阿胶 9 g,炙甘草 3 g,枇杷叶 9 g,党参 12 g,麦冬 10 g,苦杏仁 9 g,购于江西省中医院中药房。环磷酰胺(CTX,批号 16092525,规格 0.2 g/瓶),江苏恒瑞医药股份有限公司。

1.3 主要试剂及仪器

Trizol(批号 15596026),Thermo Fisher 公司; 反转录试剂盒(批号 RR047A)、实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(批号 RR820A),日本 Takara 公司; RIPA 细胞裂解液(批号 C1053),北京普利莱基因技术有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒(批号 CW0014S),北京康为世纪生物科技有限公司; COX IV 一抗(批号 ab202554),美国 Abcam 公司; 辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔 IgG 二抗(批号 ZB-2301)、内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗(批号 TA-08)、HRP 标记山羊抗鼠 IgG 二抗(批号 ZB-2305),北京中杉金桥有限公司; ATP(批号 A2383)、ADP(批号 A2754)、AMP(批号 A1752)试剂,美国 Sigma 公司; 组织线粒体分离试剂盒(批号 C3606)、线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1,批号 C2006),上海碧云天生物技术有限公司。

冷冻离心机(GTR16-2 型,北京时代北利离心机有限公司);紫外分光光度计(UV752 型,上海佑科仪器仪表有限公司);倒置显微镜(DMI3000B 型,德国 Leica 公司);LongGeneRNA 逆转录仪(XW-80A 型,上海青浦沪西仪器厂);荧光定量 PCR 仪(AFD9600 型,杭州安杰思有限公司);恒温摇床(TC-400B 型,上海领成生物科技有限公司);高效液相色谱仪(E2695-2489 型,

美国 Waters 公司);流式细胞仪(NovoCyte 型,杭州艾森生物有限公司);超高灵敏度化学发光成像系统(Chemi DocTM XRS+型,上海伯乐生命医学产品有限公司)。

1.4 Lewis 肺癌细胞培养及造模

Lewis 肺癌细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养,置于 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养 14 d。取生长状态最佳的细胞,用生理盐水调节其密度为 5×10^6 个/ml,以每只 0.2 ml 的标准在小鼠右腋下接种^[14]。接种 7 天后,造模小鼠右腋下可触及瘤块,即 Lewis 肺癌小鼠模型建立成功^[15]。

1.5 动物分组及给药

50 只小鼠按体重采用区组随机法用随机数字表分为模型组,CTX 组,清燥救肺汤高、中、低剂量组,每组 10 只。各组小鼠分别接种 Lewis 肺癌细胞 24 h 后,模型组以 0.2 ml 生理盐水灌胃,每日 2 次;CTX 组隔日 1 次以 50 mg/kg 剂量腹腔注射;根据前期研究^[14]结果及《中药药理研究方法学》^[16]确定清燥救肺汤给药剂量,清燥救肺汤高、中、低剂量组分别以 11、5.5、2.75 g/(kg·d)剂量灌胃,其中 11 g/(kg·d)剂量为人与小鼠的等效剂量,每日 2 次。清燥救肺汤各剂量组在接种前后 14 天均灌胃,其余各组仅在接种细胞 24 h 后给药 14 天。接种 14 天后,处死小鼠取瘤组织,-80℃ 保存备用。

1.6 Real-time PCR 法检测肺癌组织中 ATP 5B mRNA 表达

取冰冻肿瘤组织 50 mg 放入研钵中,用液氮将其研磨成粉,加入 1 ml Trizol 重悬,室温振荡裂解后,以 4℃、12000 r/min(离心半径 6.2 cm)离心 10 min 沉淀组织细胞碎片和杂质,上清液转移到新的离心管中,加入 0.2 ml 氯仿,用涡旋仪剧烈震荡混匀 30 s 后,室温静置 3 min 后,于 4℃、12000 r/min(离心半径 6.2 cm)离心 15 min,离心后液体会分成 3 层,上层透明液体含有 RNA。将上层透明液体转移到新的离心管中,加入 0.5 ml 异丙醇,颠倒混匀,室温静置 10 min 使 RNA 充分析出,于 4℃、12000 r/min(离心半径 6.2 cm)离心 10 min 沉淀 RNA。小心吸去上清,加入 1 ml 75% 乙醇清洗杂质,轻微混匀后,4℃、7500 r/min(离心半径 6.2 cm)离心 5 min,小心吸去上清,沉淀于室温干燥 5 min。RNA 沉淀用无核酶水溶解,用移液器反复吹打充分溶解提取总 RNA, RNA 浓度及纯度用微量紫外分光光度计测定。将

提取的总 RNA 按试剂盒说明进行逆转录及 Real-time PCR, RT-PCR 反应条件为 95 ℃ 预变性 15 s, 扩增, 95 ℃ 变性 5 s, 60 ℃ 退火 15 s, 2 ℃ 延伸 30 s, 共 40 个循环; 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min, 95 ℃ 15 s 绘制溶解度曲线。以相对表达量 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 表示目的基因 mRNA 的表达水平, β -肌动蛋白 (β -actin) 为内参。引物序列由南昌乐悠生物科技有限公司设计合成, 引物序列: β -actin: 上游 AA-CAGTCCGCTAGAAGCAC, 下游 CGTTGACATCCG-TAAAGACC, 产物大小 198 bp; ATP 5B: 上游 GG-GATTACCACCCATCCTAAAT, 下游 TACTTTCTG-GCCTCTAACCAAG, 产物大小 389 bp。

1.7 Western blot 法检测肺癌组织中 COX IV 蛋白表达

取肺癌组织, 充分研磨后加入 RIPA 细胞裂解液, 冰上裂解 30 min, 4 ℃、12 000 r/min (离心半径 6.2 cm) 离心 15 min, 提取总蛋白上清液, 用 BCA 法测蛋白浓度, 以 GAPDH 为上样内参对照。将各组蛋白调至等浓度后进行 SDS-PAGE 电泳, 转到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭, TBST 洗膜 3 次后, 加入一抗 (1: 2000), 4 ℃ 孵育过夜; 洗膜, 加二抗 (1: 2000), 显影, 曝光。采用 Alpha view SA (3.3.0.0) 图像分析软件分析蛋白条带灰度值。

1.8 高效液相色谱法 (HPLC) 检测肺癌组织中 ATP、ADP 和 AMP 含量

Lewis 肺癌组织称重, 加入 0.4 mol/L 冰预冷的高氯酸 (肺癌组织: 高氯酸为 1: 5), 用超声细胞粉碎机粉碎、匀浆; 4 ℃、10 000 r/min (离心半径 6.2 cm) 离心 10 min, 取上清液 100 μ l, 加入 1 mol/L 碳酸钾与甲醇混合液 (体积比 4: 1) 中和高氯酸 50 μ l, 4 ℃、10 000 r/min (离心半径 6.2 cm) 离心 10 min, 取上清 100 μ l 加水 100 μ l 稀释, HPLC 检测。色谱柱: Phenomenex Luna C18 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 进样量 20 μ l, 柱温: 室温, 样品温度: 4 ℃, 检测波长 254 nm, 流动相 A 磷酸二氢钠溶液, 流动相 B 甲醇。

1.9 JC-1 法检测肺癌组织 MMP

组织线粒体的分离及 JC-1 染色工作液的配制均按照试剂盒说明书操作。将配置好的 JC-1 染色工作液用 JC-1 染色缓冲液 (1 $\times$) 稀释 5 倍, 在稀释后的 JC-1 染色工作液中加入纯化的线粒体。JC-1 单体激发波长 490 nm, 发射波长 530 nm; JC-1 聚合物激发波长 525 nm, 发射波长 590 nm。在 MMP 较高时, 产生红色荧光, JC-1 为聚合物; MMP 较

低时, 产生绿色荧光, JC-1 为单体, 可以通过荧光颜色的转变来检测 MMP 变化。采用流式细胞仪分别测定单体和聚合物的值, 以聚合物与单体的比值表示 MMP 水平。

1.10 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 由于线粒体膜电位数据方差不齐, 故采用 Kruskal-Wallis H 检验进行平均秩多重比较, 其他数据采用单因素方差分析, 用 LSD 法进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠肺癌组织 ATP 5B mRNA 表达比较

表 1 示, 与模型组比较, CTX 组和清燥救肺汤高、中剂量组 ATP 5B mRNA 降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与 CTX 组比较, 清燥救肺汤高、中、低剂量组 ATP 5B mRNA 升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与清燥救肺汤高剂量组比较, 清燥救肺汤中、低剂量组 ATP 5B mRNA 升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 各组小鼠肺癌组织 ATP 5B mRNA、COX IV 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ATP 5B mRNA $/2^{-\Delta\Delta Ct}$	COX IV 蛋白/ GAPDH ⁻¹
模型组	10	1.003 $\pm$ 0.094	1.800 $\pm$ 0.151
CTX 组	10	0.363 $\pm$ 0.055 ^{b)}	0.203 $\pm$ 0.117 ^{b)}
清燥救肺汤高剂量	10	0.577 $\pm$ 0.080 ^{b) c)}	0.686 $\pm$ 0.313 ^{b) d)}
清燥救肺汤中剂量	10	0.767 $\pm$ 0.114 ^{a) d) e)}	1.142 $\pm$ 0.183 ^{b) d) f)}
清燥救肺汤低剂量	10	0.933 $\pm$ 0.156 ^{d) f)}	1.471 $\pm$ 0.292 ^{b) d) f) g)}

注: ATP 5B, ATP 合酶 β 亚基; COX IV, 细胞色素 C 氧化酶亚单位 IV。

a) 与模型组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.01$; c) 与 CTX 组比较, $P < 0.05$; d) 与 CTX 组比较, $P < 0.01$; e) 与清燥救肺汤高剂量组比较, $P < 0.05$; f) 与清燥救肺汤高剂量组比较, $P < 0.01$; g) 与清燥救肺汤中剂量组比较, $P < 0.01$ 。

2.2 各组小鼠肺癌组织 COX IV 蛋白表达比较

表 1、图 1 示, 与模型组比较, CTX 组和清燥救肺汤高、中、低剂量组蛋白表达下调 ($P < 0.01$); 与 CTX 组比较, 清燥救肺汤高、中、低剂量组 COX IV 蛋白表达上调 ($P < 0.01$); 与清燥救肺汤高剂量组比较, 清燥救肺汤中、低剂量组 COX IV 蛋白表达上调 ($P < 0.01$); 与清燥救肺汤中剂量组相比, 清燥救肺汤低剂量组 COX IV 蛋白表达上调 ($P < 0.01$)。

2.3 各组小鼠肺癌组织 ATP 含量及 ADP/ATP、AMP/ATP 值比较

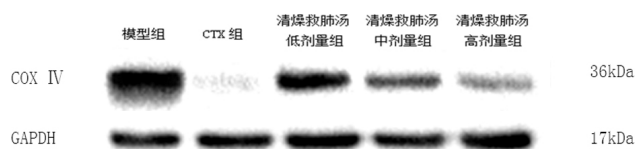
表 2 示, 与模型组比较, CTX 组和清燥救肺汤

表 2 各组小鼠肺癌组织 ATP 含量、ADP/ATP 及 AMP/ATP 值比较

($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ATP 含量/ng · mg ⁻¹	ADP/ATP	AMP/ATP
模型组	10	125.49 ± 35.38	2.79 ± 0.75	2.48 ± 0.82
CTX 组	10	54.82 ± 13.75 ^{a)}	6.56 ± 1.34 ^{a)}	5.08 ± 1.11 ^{b)}
清燥救肺汤高剂量	10	60.19 ± 11.65 ^{a)}	6.78 ± 2.07 ^{a)}	6.12 ± 0.76 ^{b) c)}
清燥救肺汤中剂量	10	81.61 ± 21.38 ^{a) c) e)}	5.26 ± 1.66 ^{a) e)}	3.60 ± 1.04 ^{b) d) f)}
清燥救肺汤低剂量	10	103.33 ± 25.50 ^{b) d) f) g)}	4.33 ± 1.38 ^{b) d) f)}	3.17 ± 0.81 ^{d) f)}

注: ATP, 三磷酸腺苷; ADP, 二磷酸腺苷; AMP, 一磷酸腺苷。

a) 与模型组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.01$; c) 与 CTX 组比较, $P < 0.05$; d) 与 CTX 组比较, $P < 0.01$; e) 与清燥救肺汤高剂量组比较, $P < 0.05$; f) 与清燥救肺汤高剂量组比较, $P < 0.01$; g) 与清燥救肺汤中剂量组比较, $P < 0.01$ 。

注: COX IV, 细胞色素 C 氧化酶亚单位 IV。

图 1 各组小鼠肺癌组织 COX IV 蛋白电泳图

高、中、低剂量组 ATP 含量显著降低, ADP/ATP 值及 CTX 组, 清燥救肺汤高、中剂量组 AMP/ATP 值显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与 CTX 组比较, 清燥救肺汤中、低剂量组 ATP 含量, 清燥救肺汤高剂量组 AMP/ATP 值显著升高, 清燥救肺汤中、低剂量组 AMP/ATP 值及清燥救肺汤低剂量组 ADP/ATP 值显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与清燥救肺汤高剂量组比较, 清燥救肺汤中、低剂量组 ATP 含量显著升高, AMP/ATP、ADP/ATP 值显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与清燥救肺汤中剂量组比较, 清燥救肺汤低剂量组 ATP 含量显著升高 ($P < 0.05$)。

2.4 各组小鼠肺癌组织 MMP 水平比较

表 3 示, 各组 MMP 的总体水平差异有统计学意义 ($H = 47.06$, $P < 0.001$)。其中, 与模型组比较, CTX 组和清燥救肺汤高、中剂量组 MMP 明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与 CTX 组比较, 清燥救肺汤中、低剂量组 MMP 均升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与清燥救肺汤高剂量组比较, 清燥救肺汤低剂量组 MMP 明显升高 ($P < 0.05$)。

表 3 各组小鼠肺癌组织 MMP 水平比较 [$M(P_{25}, P_{75})$]

组别	鼠数	MMP
模型组	10	430.09 (376.82, 672.83)
CTX 组	10	27.28 (17.63, 33.85) ^{b)}
清燥救肺汤高剂组	10	58.75 (51.02, 70.01) ^{b)}
清燥救肺汤中剂组	10	96.09 (82.17, 107.46) ^{a) c)}
清燥救肺汤低剂组	10	139.73 (129.94, 183.79) ^{d) e)}

注: MMP, 线粒体膜电位。

a) 与模型组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.01$; c) 与 CTX 组比较, $P < 0.05$; d) 与 CTX 组比较, $P < 0.01$; e) 与清燥救肺汤高剂量组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

肺癌常有干咳少痰、痰中带血、声音嘶哑等燥热伤肺表现, 放化疗后更为明显。中医古文献中无“肺癌”这一病名, 但其症状及体征散见于诸多文献, 如《素问·奇病论篇》称“息积”, 《难经》称“息贲”。从其症状描述来看, 更似《金匱要略》所述“肺痿”, 症见咳血、吐痰, 上气喘满, 口干舌燥, 形体消瘦, 咽喉嘶哑, 心烦胸痛, 特别是该文提到“重亡津液, 故得之”, 对肺癌燥热病机研究有重大启示。现代中医学认为, 肺为娇脏, 喜润恶燥, 且肺与外界直接相通, 易受邪侵。如长期吸烟、工业废气、汽车尾气、石棉、矿石粉尘、煤焦烟炱、放射性物质等, 尤其是肺癌的首要病因吸烟导致热毒灼津, 炼液为痰, 日久耗伤正气, 正不能抗邪, 痰瘀胶结于肺, 形成积块。因此, 诸多医家提出燥热伤肺是肺癌的重要病机^[8]。

清燥救肺汤为清代名医喻嘉言治疗燥热伤肺重症代表方, 该方重用霜桑叶为君药, 清透肺金燥热; 臣以生石膏辛甘而寒, 清泄肺热, 麦冬养阴润肺。君臣相伍, 宣中有清, 清中有润。党参益气生津, 合炙甘草以培土生金; 苦杏仁、枇杷叶苦降肺气而止咳; 阿胶助麦冬养阴润肺, 肺得滋润, 则治节有权, 共为佐药。炙甘草清热解毒, 调和诸药, 为使。全方轻宣清透合以凉润, 与肺癌燥热病机相符, 能较好地缓解燥热伤肺症状。

COX IV 是线粒体氧化呼吸的关键酶, 对线粒体氧化磷酸化具有重要作用, 能参与 ATP 的合成, 为细胞各项生命活动提供能量^[17], 其酶活性的高低直接影响线粒体的结构和功能^[18]。本研究实验结果显示, 清燥救肺汤各剂量组均能下调 COX IV 蛋白表达水平, 从而影响细胞能量代谢, 减少为机体供能。

线粒体是由双层膜包被的囊状结构, 外膜有较大内部通道, 内膜通透性低, 但这种不通透性对

ATP 的生成和 MMP 的维持起重要作用。MMP 是线粒体在氧化呼吸过程中内膜两侧离子浓度不同所产生的跨膜电位差,膜电位的正常是维持线粒体进行氧化磷酸化、产生 ATP 的先决条件。MMP 的稳定有利于维持细胞的正常生理功能,MMP 异常导致线粒体膜的功能和状态发生改变,从而影响线粒体进行氧化磷酸化,导致细胞能量代谢异常^[19]。本研究结果显示,清燥救肺汤能降低线粒体膜电位。线粒体膜电位降低,则膜电位的电势能降低,若兼有 ATP 5B 活性减弱,则 ATP 合成减少。

ATP 合酶位于线粒体内膜,是能量代谢的关键酶。其利用线粒体内膜两侧质子差形成的势能,通过结合变构机理旋转合成 ATP^[20],达到高效的能量转化。ATP 5B 是 ATP 合酶 F1 结构域的 β 亚基,为细胞线粒体能量代谢的重要亚基,能在跨膜质子梯度存在下将 ADP 转化为 ATP^[21],亦是氧化磷酸化的关键限速酶。Formentini 等^[22]研究显示,ATP 5B 的表达率影响肿瘤的侵袭力。ATP 5B 表达的高低直接影响 ATP 合酶的功能,其表达的增加或减少,可调节氧化磷酸化的水平^[23]。ATP 5B 的高表达会促进肿瘤细胞的增殖和侵袭。本研究结果显示,清燥救肺汤中高剂量能下调 ATP 5B mRNA 表达,影响氧化磷酸化水平,导致肿瘤细胞能量代谢途径受阻,ATP 生成减少。

ATP 是生物机体的能量来源,在细胞代谢活动中占重要地位。研究发现,ATP 含量与能量代谢密切相关,ADP/ATP 值与 AMP/ATP 值能反应能量代谢状态^[24]。ADP 和 AMP 是 ATP 的代谢产物,ATP、ADP、AMP 的浓度是描述细胞代谢的主要参数,直接反应机体能量代谢水平的高低^[6]。线粒体通过氧化磷酸化合成 ATP,为细胞内多种化学反应和功能提供能量。本研究结果显示,清燥救肺汤各剂量均能降低 ATP 的含量,ATP 合成减少则机体能量代谢水平减弱,肿瘤细胞获能减少。

综上所述,清燥救肺汤高、中剂量均可不同程度降低 COX IV 蛋白表达、ATP 5B mRNA 表达、线粒体膜电位及 ATP 含量,提示清燥救肺汤能降低肿瘤细胞氧化磷酸化能量代谢水平,发挥抗肿瘤细胞增殖的功效,其中清燥救肺汤高剂量疗效更佳。此研究结果将有助于建立靶向氧化磷酸化能量代谢的肺癌治疗新策略,也为后续从升高 AMP/ATP 值诱导自噬角度进一步探索清燥救肺汤抗肺癌作用研究奠定基础。

参考文献

[1] LEE VHF, MOK TSK, GOTO Y, et al. Differences

between the east and the west in managing advanced-stage non-small cell lung cancer [J]. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2020,32(1): e1-e9.

[2] 王子恒,杜宥呈,陈璐璐,等.肿瘤微环境对肿瘤细胞能量代谢调节的研究进展[J].交通医学,2020,34(2): 155-158.

[3] EYENGA P, ROUSSEL D, MOREL J, et al. Time course of liver mitochondrial function and intrinsic changes in oxidative phosphorylation in a rat model of sepsis [J]. Intensive Care Med Exp, 2018,6(1): 31-47.

[4] 魏翔,何崇武,盛励,等. ATP5B 蛋白在乳腺癌中的表达及其功能的初步探究[J]. 实验与检验医学, 2019,37(5): 774-778,805.

[5] 刘路,张立德,曲怡,等. 电针“足三里”穴对脾气虚模型大鼠肌肉组织 COX4 表达的影响[J]. 中华中医药学刊, 2019,37(6): 1327-1330.

[6] 吴燕川,李尧华,谢胜男,等. 液相色谱法测定小鼠脑组织中 ATP、ADP 及 AMP 含量[J]. 首都医科大学学报, 2011,32(4): 534-537.

[7] 胡齐,孙莹,宋雅芳,等. 四君子汤对脾虚大鼠线粒体氧化损伤及能量代谢的影响[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(8): 1972-1976.

[8] 徐彬智,谢斌,翟莹莹,等. 肺癌干咳嗽病机分析[J]. 江西中医药大学学报, 2018,30(3): 1-2.

[9] 徐彬智,余功,谢斌. 肺癌的病机分析及方剂应用探索[J]. 辽宁中医杂志, 2018,45(2): 270-272.

[10] 沈伟生,夏德洪,奚蕾,等. 清燥救肺汤对胸部肿瘤患者放射治疗 3 年后肺功能影响临床观察[J]. 新中医, 2014,46(5): 176-179.

[11] 顾格波,王逊,何立丽,等. 孙桂芝教授治疗肺癌常用方剂浅析[J]. 世界中西医结合杂志, 2013,8(2): 187-189.

[12] 朱新瑜,张天成,倪广生,等. 放射性肺损伤的肺癌患者采用清燥救肺汤治疗的临床效果[J]. 中国地方病防治杂志, 2017, 32(3): 312-313.

[13] 谢雄,谢斌,饶斌,等. 清燥救肺汤对 Lewis 肺癌小鼠 EGFR, NF- κ B, ICAM-1 表达及 JAK1, STAT1 蛋白磷酸化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016,22(24): 140-144.

[14] 陈江涛,徐彬智,余功,等. 清燥救肺汤对荷 Lewis 小鼠肺癌细胞增殖相关糖酵解乳酸生成的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018,24(15): 120-124.

[15] 赵雪峰,范娟,杨玲麟,等. Abraxane 对 Lewis 肺癌小鼠 Per2 基因及 SIRT1 因子表达的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2018,28(29): 13-48.

[16] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 445.

[17] 吕林,王凤云,唐旭东,等. 脾虚一号方对脾虚型功能性消化不良大鼠胃组织线粒体呼吸链复合物 IV 亚单位

- 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(7): 102-108.
- [18] 刘路, 张立德, 曲怡, 等. 电针“足三里”穴对脾气虚模型大鼠肌肉组织 COX4 表达的影响[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(6): 1327-1330.
- [19] HE X, BI XY, LU XZ, et al. Reduction of mitochondria-endoplasmic reticulum interactions by acetylcholine protects human umbilical vein endothelial cells from hypoxia/reoxygenation injury [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(7): 1623-1634.
- [20] 柳昭明, 冯红. ATP 合酶的研究进展[J]. 天津科技, 2016, 43(5): 34-39.
- [21] GARCÍA J. The calcium channel $\alpha 2/\delta 1$ subunit interacts with ATP5b in the plasmamembrane of developing muscle cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2011, 301(1): C44-C52.
- [22] FORMENTINI L, MARTINEZ-REYES I, CUEZVA JM. The mitochondrial bioenergetic capacity of carcinomas [J]. *IUBMB Life*, 2010, 62(7): 554-560.
- [23] BARBATO S, SGARBI G, GORINI G, et al. The inhibitor protein (IF1) of the F1F0-ATPase modulates human osteosarcoma cell bioenergetics [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(10): 6338-6348.
- [24] DERAMCHIA K, MORAND P, BIRAN M, et al. Contribution of pyruvate phosphate dikinase in the maintenance of the glycosomal ATP/ADP balance in the trypanosoma brucei procyclic form [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(25): 17365-17378.

Effect of *Qingzao Jiufei Decoction* (清燥救肺汤) on Energy Metabolism of Oxidative Phosphorylation in Lung Carcinoma Tissue of Lewis Tumor-Bearing Mice

LI Jiaping, YU Gong, XIE Bin

Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang, 330004

ABSTRACT Objective To explore the underlying mechanism of *Qingzao Jiufei Decoction* (清燥救肺汤, QZJFD) in the treatment of lung carcinoma. **Methods** Fifty C57BL/6J male mice were randomly divided into five groups, with 10 mice in each group. The groups included a model group, a cyclophosphamide (CTX) group, and QZJFD high, medium and low dose group. Lewis lung carcinoma cells were used to establish the mice tumor-bearing models of lung carcinoma. Twenty-four hours later, the model group was administered with 0.2 ml normal saline by gavage, twice daily; CTX group was injected intraperitoneally with 50 mg/kg cyclophosphamide, once every other day; the high, medium and low dose QZJFD group received 11, 5.5 and 2.75 g/(kg·d) *Qingzao Jiufei Decoction* by gavage respectively, twice daily. QZJFD groups were given intragastric administration 14 days before and after the modelling, while other groups only received treatment 24 hours after the modelling for 14 days. The mRNA expression of adenosine triphosphate synthase β subunit (ATP 5B) in lung carcinoma tissues was detected by real-time PCR; the protein expression of cytochrome c oxidase subunit IV (COX IV) was detected by western blotting; the adenosine monophosphate (AMP), adenosine diphosphate (ADP), and adenosine triphosphate (ATP) were detected by high performance liquid chromatography. JC-1 method was used to detect the changes of mitochondrial membrane potential (MMP). **Results** The expression of ATP 5B mRNA, COX IV protein, ATP, and MMP significantly reduced in CTX group and QZJFD high and medium dose group compared to those in model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to those in CTX group, the expression of ATP 5B mRNA and COX IV protein in all QZJFD groups, ATP and MMP levels in QZJFD medium and low dose group, as well as AMP/ATP in QZJFD high dose group significantly increased, while AMP/ATP in QZJFD medium and low dose group, and ADP/ATP in QZJFD low dose group significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to QZJFD high dose group, both the medium and low dose group had higher expression of ATP 5B mRNA and COX IV protein, higher ATP level, and lower levels of AMP/ATP and ADP/ATP, and the low dose group also had significantly higher MMP level ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). A statistically significant increase was seen in QZJFD low dose group when compared to the medium dose group in terms of ATP 5B mRNA and COX IV protein expression, and the ATP level ($P < 0.01$). **Conclusion** QZJFD may inhibit the proliferation of lung carcinoma cells, by inhibiting the protein expression of COX IV, the key rate-limiting enzyme of oxidative phosphorylation energy metabolism, reducing mitochondrial membrane potential, inhibiting ATP 5B activity, reducing ATP production, and increasing the ratio of AMP/ATP.

Keywords lung carcinoma; *Qingzao Jiufei Decoction* (清燥救肺汤); oxidative phosphorylation; energy metabolism

(收稿日期: 2020-04-29; 修回日期: 2020-08-28)

[编辑: 王利芬]