

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.19.013

益肺散结丸联合顺铂对 Lewis 肺癌瘤源小鼠血浆外泌体微小核糖核酸的影响

孙玲玲¹, 蔡向军², 李晏龙², 胡磊颖², 林丽珠¹✉

1. 广州中医药大学第一附属医院, 广东省广州市机场路 16 号, 510405; 2. 广州中医药大学第一临床医学院

[摘要] **目的** 探究益肺散结丸治疗肺癌的抑瘤效果及作用机制。**方法** 构建 Lewis 肺癌瘤源小鼠, 并将其分为模型对照组、顺铂组、顺铂+益肺散结低剂量组以及顺铂+益肺散结高剂量组各 12 只, 分别进行相应干预 14 天, 给药第 0 天、第 3 天、第 7 天、第 10 天、第 14 天测量瘤体体积, 评价瘤体生长情况, 第 15 天留取小鼠血浆、瘤体组织。选取模型对照组、顺铂组、顺铂+益肺散结高剂量组的小鼠, 提取血浆外泌体, 采用二代测序技术检测分析各组间血浆外泌体微小核糖核酸 (miRNA) 的表达差异, 并通过主成分分析、生物功能富集分析、miRNA-靶基因调控网络分析探究益肺散结丸的潜在作用机制。采用实时荧光定量 PCR 检测肿瘤组织中 miRNA-615-3p 的表达, 利用 Kaplan-Meier plotter (kmplot.com) 数据库分析 miRNA-615-3p 与肺癌总生存期的关系。**结果** 与模型对照组比较, 顺铂组第 10 天、顺铂+益肺散结低剂量组以及顺铂+益肺散结高剂量组第 7 天、第 10 天、第 14 天肿瘤体积均明显缩小 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与顺铂组比较, 顺铂+益肺散结低剂量组以及顺铂+益肺散结高剂量组第 10 天、第 14 天肿瘤体积均明显缩小 ($P<0.05$)。miRNA 表达谱主成分分析表明, 不同干预组间 miRNA 的表达有明显差异, 模型对照组与顺铂组之间共有 21 个差异表达的 miRNA, 模型对照组与顺铂+益肺散结高剂量组之间共有 50 个差异表达的 miRNA, 顺铂组与顺铂+益肺散结高剂量组之间共有 6 个差异表达的 miRNA。生物功能富集分析表明, 差异表达的 miRNA 主要参与调控与细胞增殖、分化、自噬等生物活动相关的信号通路。miRNA-靶基因调控网络展示了被靶次数前 20 的基因, 其中既包含已被证实的与肺癌相关 miRNA 及基因, 亦存在值得深入挖掘功能的 miRNA。与模型对照组比较, 顺铂组及顺铂+益肺散结高剂量组瘤体组织中 miRNA-615-3p 的相对表达量明显下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。miRNA-615-3p 的表达水平与肺癌患者的总生存呈负相关 ($P<0.05$)。**结论** 顺铂联合益肺散结丸可有效抑制 Lewis 肺癌肿瘤增殖, 其抑瘤效果与调节多种 miRNA, 特别是下调 miRNA-615-3p 的表达有关。

[关键词] 肺癌; 微小核糖核酸; 益肺散结丸; 顺铂; miRNA-615-3p

据《2020 年全球癌症统计》数据显示, 2020 年全球肺癌新发病例 2 206 771 例, 占癌症发病总数的 11.4% 而位列第二; 死亡病例 1 796 144 例, 占癌症死亡总数的 18.0% 而位居第一^[1]。目前我国肺癌的发病率和死亡率均位于所有恶性肿瘤的首位^[2], 以手术、放疗、化疗、靶向以及免疫治疗为

基础联合中医药干预的肺癌诊疗模式是我国治疗肺癌的主要手段^[2]。

益肺散结丸具有益气除痰之效, 是由广州中医药大学第一附属医院的经验方益气除痰方采用传统工艺制备而成作为院内制剂使用。前期研究表明, 益气除痰方对肺癌的临床疗效显著, 该方可以通过多种作用机制调控肺癌细胞的生长, 改善靶向药物、化疗药物的耐药性^[3-5], 或可作为晚期非小细胞肺癌体力状况较弱者的维持治疗方案^[6]。

微小核糖核酸 (micro-ribonucleic acid, miRNA) 是一种长度为 21 到 25 个核苷酸的非编码核糖核酸,

基金项目: 国家自然科学基金 (81973775); 广东省自然科学基金 (2020A1515011176); 国家重点研发计划 (2022YFC3500203); 广东省基础与应用基础研究基金 (2022B1515230003); 广州市科技计划 (2023A03J0300, 2023B01J1016); 广州中医药大学中医学学科中医基础理论研究“揭榜挂帅”项目 [2022-07]

✉ 通讯作者: linlizhu@gzucm.edu.cn

在调控基因表达、细胞周期、生物发育时序等方面起重要作用,并在多种肿瘤相关生物学过程中发挥重要作用^[7]。本课题组前期通过对接受益气除痰方治疗的肺癌患者血清进行定量聚合酶链反应分析,表明益气除痰方可能对 miRNA 进行调节,但需要进一步研究证实^[8]。本研究旨在探究顺铂联合益肺散结丸对 Lewis 肺癌的疗效及其对血浆外泌体 miRNA 的影响,以求更深入地阐明益肺散结丸治疗肺癌的作用机制,从而为其临床应用提供实验证据。本研究已通过广州中医药大学动物伦理委员会审查批准,批件号:20200510002。

1 材料

1.1 动物和细胞

SPF 级雌性 C57BL/6J 小鼠 70 只,购自广东省医学实验动物中心,生产许可证编号:SCXK(粤)2018-0002,动物 49~62 日龄,体质量 16~22 g 且个体动物初始体质量不超出性别平均体质量的 $\pm 20\%$ 。所有小鼠均饲养于室温 20~26℃、相对湿度 40%~70%、照明 12 h/12 h 明暗交替、通风换气次数 ≥ 15 次/h 的环境,并自由摄食,自由饮用纯净水。

小鼠 Lewis 肺癌细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司,培养于 DMEM 培养基,5% 二氧化碳,37℃ 环境下。

1.2 药物

益肺散结丸购自广州中医药大学第一附属医院(生产批号 20200401),组成:猫爪草、炒僵蚕、肿节风、山慈菇、浙贝母、法半夏、灵芝、西洋参。

1.3 主要试剂与仪器

顺铂冻干粉(DDP)(批号:9M0646B02,齐鲁制药有限公司);Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)培养基(批号:8120013, Gibco);胎牛血清(批号:7-3401-A, 齐氏生物科技公司);miRcute miRNA 提取分离试剂盒(批号:DP501), miRcute 增强型 miRNA cDNA 第一链合成试剂盒(批号:KR211), miRcute 增强型 miRNA 荧光定量检测试剂盒(批号:FP411),北京天根生化科技有限公司;青霉素、链霉素双抗(批号:PB180120, 武汉 Procell 公司)。

主要仪器包括细胞培养箱(型号:Thermo 3111)、微量分光光度计(型号:NanoDrop2000)、实时荧光定量 PCR(型号:QuantStudio 3),美国 ThermoFisher Scientific 公司;细胞自动计数仪(型号:TC20, 美国 Bio-rad 公司);高通量测序仪(型

号:HiSeqTM 2500, 美国 Illumina 公司);生物分析仪(型号:2200 TapeStation, 美国 Agilent Technologies 公司);千分之一电子天平(型号:BS223S, 赛多利斯科学仪器有限公司);百分之一电子天平[型号:TP1102, 丹佛仪器(北京)有限公司];安全工作台(型号:ESCO, 新加坡 ESCO);自动高压灭菌锅(型号:HVE-50, 日本 HIRAYAMA 公司);-80℃超低温冰箱(型号:DW-86L726J, 海尔公司);冷冻离心机(Universal 32R, 德国 Hettich)。

2 方法

2.1 模型制备

Lewis 肺癌细胞传代培养至一定数量,收获处于对数生长期的 Lewis 肺癌细胞,用生理盐水将细胞浓度调整到 $5.0 \times 10^7/\text{ml}$ 。取 10 只 C57BL/6J 小鼠右侧腋窝皮下注射 Lewis 肺癌细胞 0.2 ml,制备成荷瘤小鼠。待荷瘤小鼠瘤体生长到 $1 \sim 1.5 \text{ cm}^3$ 时,处死小鼠并剥离肿瘤组织,将其浸入含有青霉素、链霉素 100 U/ml 的生理盐水中。剔除肿瘤周围结缔组织和坏死组织,取肿瘤生长旺盛组织,研磨成匀浆并按肿瘤质量(g)与生理盐水(ml)1:4 比例制成肿瘤细胞悬液。将制备的肿瘤细胞悬液注射至其余 60 只 C57BL/6J 小鼠右侧腋窝皮下。每日记录小鼠状态,接种后 5~9 天触诊小鼠接种部位,如出现明显肿瘤结节即可判断为造模成功^[9]。60 只小鼠均造模成功,去掉瘤体体积 $> 150 \text{ mm}^3$ 、瘤体体积 $< 50 \text{ mm}^3$ 及状态较差的小鼠,留取 48 只荷瘤小鼠进行后续实验。

2.2 益肺散结丸药液配置

益肺散结丸给药剂量按照人和动物体表面积折算出小鼠每日等效剂量为 7.2 g/kg/d ^[10],0.5 倍等效剂量为 $3.6 \text{ g} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 。将益肺散结丸碾碎成粉末,分别称取 4.4 g 及 2.2 g,取纯净水配置成 220 mg/ml 及 110 mg/ml 的高、低剂量组益肺散结药液。

2.3 分组与干预措施

将造模成功的 48 只小鼠分为模型对照组、顺铂组、顺铂+益肺散结低剂量组、顺铂+益肺散结高剂量组,使用分层随机法(按瘤体大小对小鼠进行分层,共分 12 层,每层 4 只小鼠,然后将每层小鼠随机分配到各组)进行分组,每组 12 只。益肺散结丸组采用灌胃给药,给药体积为每次 $0.33 \text{ ml} \cdot 20 \text{ g}^{-1}$ ($7.2 \text{ g/kg} \cdot \text{d}$),每日 2 次,连续 14 天;DDP 采用腹腔注射给药,给药体积为 $0.2 \text{ ml} \cdot 20 \text{ g}^{-1}$ ($6 \text{ mg/kg} \cdot \text{d}$),于实验第 1 天和第 8 天分别给药,共 2 次。

2.4 肿瘤生长情况观察

于给药第 0 天（分组当天）、第 3 天、第 7 天、第 10 天、第 14 天测量各组小鼠肿瘤短径及长径，计算肿瘤体积。

2.5 miRNA 测序以及生物信息学分析

于第 15 天选取模型对照组、顺铂组以及顺铂+益肺散结高剂量组（根据前期研究，选取临床等效剂量组）小鼠取外周血进行 miRNA 测序分析。提取小鼠血浆中的 miRNA，使用 Agilent 2200 生物分析仪评估 RNA 的完整性。根据操作规范，每份样品量总 RNA 需 ≥ 200 ng、样品浓度 ≥ 1 ng/ μ l，提取样品的总 RNA 或纯化后的 sRNA 片段，先后连接 3' 端和 5' 的接头，反转录成 cDNA，再进行 PCR 扩增，随后切胶回收目的片段文库进行测序。miRNA 的表达谱数据由 Illumina HiSeq™ 2500 平台测序获得，测序工作委托锐博生物科技有限公司完成。

使用主成分分析（PCA）查看不同干预组的 miRNA 表达数据分布。DESeq2 包用于差异 miRNA 分析，将差异倍数 $[\log_2(\text{FoldChange})]$ 的阈值设定为 1 以及显著水平 $[-\log_{10}(\text{Qvalue})]$ 的阈值设定为 1.3，筛选不同干预组之间的差异 miRNA。差异表达的 miRNA 靶基因由 TargetScan、miRDB、miRTarBase 以及 miRWalk 进行预测，以 miRTarBase 预测结果或者同时被 miRDB、miRWalk、TargetScan 三个软件预测的结果作为 miRNA 的候选靶基因，绘制 miRNA-靶基因调控网络。并将候选靶基因进行京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG）生物通路富集分析及基因本体（Gene Ontology, GO）功能富集分析。

2.6 实时荧光定量 PCR 检测肿瘤组织中 mmu-miR-615-3p 的表达差异

于第 15 天从模型对照组、顺铂组以及顺铂+益肺散结高剂量组各随机选择 3 只小鼠取瘤体组织进行 miRNA 表达差异分析。mmu-miR-615-3p 引物序列由生物工程（上海）股份有限公司合成（miR-615-3p，正向：ACACTCCAGCTGGGTCCGAGCCTGGTCTC，30 bp，反向：TGCTGTCGTGGACTCG，16 bp；内参采用 U6，正向：CTCGCTTCGGCAGCACATATACT，23 bp，反向：ACGCTTCACGAATTGCGTGTC，22 bp）。采用 miRcute miRNA 提取分离试剂盒提取细胞 RNA，按照试剂盒说明书操作，得到的 RNA 用微量分光光度计测定各样品 RNA 浓度及纯度，RNA 样品需放入 -80 °C 冰箱中保存。采用 miRcute 增强型 miRNA cDNA 第一链合成试剂盒

生成 miRNA 对应的 cDNA 第一链。采用 miRcute 增强型 miRNA 荧光定量检测试剂盒进行 miRNA 荧光定量检测。变性：95 °C，15 min；富集低丰度目标 miRNA：94 °C 20 s，63 °C 30 sec，72 °C 34 sec，共 5 循环；PCR 循环中模板变性：94 °C，20 sec，40 循环；退火，延伸：60 °C 34 sec，共 40 循环。在反应结束后，验证 qPCR 的扩增曲线和溶解曲线，依据目标基因的荧光信号 Ct 值，使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量数据分析方法来计算目标基因的相对表达水平。

2.7 利用 Kaplan-Meier plotter (kmplot.com) 数据库分析 miRNA-615-3p 与肺癌总生存期的关系

利用 Kaplan-Meier plotter (kmplot.com) 数据库，以 miR-615 的表达量为自变量，以总生存期 (overall survival, OS) 为因变量分析肺癌组织中 miR-615-3p 表达与肺癌患者生存的关系，在基因 (gene) 栏依次输入 miR-615，表达量 (expression) 项选择自动划分最佳截断值 (Auto select best cut-off)，生存 (survival) 项选择 OS，病理类型 (pathology) 项依次选择肺鳞癌、肺腺癌，分析方法 (analysis) 项选择 Cox 多因素回归分析。

2.8 统计学方法

采用 SPSS 22.0 进行统计分析，瘤体体积、miR-615-3p 的相对表达量以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，使用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 检验组间总体差异，随后进行 Dunnett's 多重比较检验来比较各实验组与模型对照组的差异；miR-615-3p 的表达与生存的相关性分析采用 Cox 多因素回归分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠肿瘤体积比较

各组间小鼠肿瘤体积总体差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。表 1 示，与模型对照组同时间比较，顺铂组第 10 天、顺铂+益肺散结低剂量组以及顺铂+益肺散结高剂量组第 7 天、第 10 天、第 14 天肿瘤体积均明显缩小 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)；与顺铂组同时间比较，顺铂+益肺散结低剂量组以及顺铂+益肺散结高剂量组第 10 天、第 14 天肿瘤体积均明显缩小 ($P < 0.05$)。提示益肺散结低剂量、高剂量均能增强顺铂的疗效。

3.2 miRNA 表达谱的主成分分析结果

图 1 示，模型对照组、顺铂组与顺铂+益肺散结高剂量组间较为明显地被区分为 3 簇，提示 3 种

表 1 各组小鼠不同时间肿瘤体积比较

Table 1 Comparison of tumor volume of mice in each group at different time points (mm ³ , $\bar{x}\pm s$)						
组别	鼠数	第 0 天	第 3 天	第 7 天	第 10 天	第 14 天
模型对照组	12	97. 2±27. 1	317. 3±72. 4	1033. 7±483. 3	1744. 1±400. 4	3042. 3±858. 5
顺铂组	12	100. 4±26. 4	261. 2±141. 9	541. 7±354. 6	782. 0±728. 5 ^{a)}	1329. 2±1346. 3
顺铂+益肺散结低剂量组	12	107. 1±32. 1	221. 8±122. 3	423. 9±116. 0 ^{a)}	408. 4±167. 8 ^{b)} ^{c)}	647. 8±389. 0 ^{a)} ^{c)}
顺铂+益肺散结高剂量组	12	92. 4±27. 7	258. 9±51. 0	257. 5±165. 6 ^{b)}	323. 9±134. 1 ^{b)} ^{c)}	470. 0±229. 2 ^{b)} ^{c)}

注：a) 与模型对照组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型对照组比较， $P<0.01$ ；c) 与顺铂组比较， $P<0.05$ 。

不同的干预措施对 Lewis 肺癌小鼠外泌体的表达产生了不同的影响。

3.3 miRNA 的差异表达分析结果

在模型对照组、顺铂组以及顺铂+益肺散结高剂量组之间两两对比进行 miRNA 的差异表达分析。结果显示，顺铂组与模型对照组比较，共有 21 个差异表达的 miRNA，包括 13 个 miRNA (mmu-miR-98-5p、mmu-miR-467e-5p、mmu-miR-7653-5p、mmu-miR-9769-3p、mmu-miR-193b-5p、mmu-miR-672-5p、mmu-miR-204-3p、mmu-miR-344d-3p、mmu-miR-365-1-5p、mmu-miR-3473h-5p、mmu-miR-7213-5p、mmu-miR-363-5p、mmu-miR-541-5p) 表达上调和 8 个 miRNA (mmu-miR-3969、mmu-miR-130a-3p、mmu-miR-1971、mmu-miR-324-5p、mmu-miR-425-5p、mmu-miR-361-5p、mmu-miR-6970-5p、mmu-miR-3102-3p) 表达下

调；顺铂+益肺散结高剂量组与模型对照组比较，共有 50 个 miRNA 差异表达，包括 36 个 miRNA (mmu-miR-142a-3p、mmu-miR-3473h-5p、mmu-miR-9769-3p、mmu-miR-1968-3p、mmu-miR-144-3p、mmu-miR-3061-3p、mmu-miR-193b-3p、mmu-miR-144-5p、mmu-miR-374c-5p、mmu-miR-499-5p、mmu-miR-5123、mmu-miR-3473-3p、mmu-miR-8118、mmu-miR-363-3p、mmu-miR-363-5p、mmu-miR-200-5p、mmu-miR-1895、mmu-miR-6897-5p、mmu-let-7d-5p、mmu-let-7a-5p、mmu-let-7c-5p、mmu-miR-7683-5p、mmu-let-7f-5p、mmu-miR-98-5p、mmu-miR-26b-5p、mmu-miR-106a-5p、mmu-miR-193b-5p、mmu-miR-3474、mmu-miR-3444-3p、mmu-miR-467e-5p、mmu-miR-3473b、mmu-miR-467e-3p、mmu-miR-204-3p、mmu-miR-467c-5p、mmu-miR-669m-5p、mmu-miR-466m-5p) 表达上调，

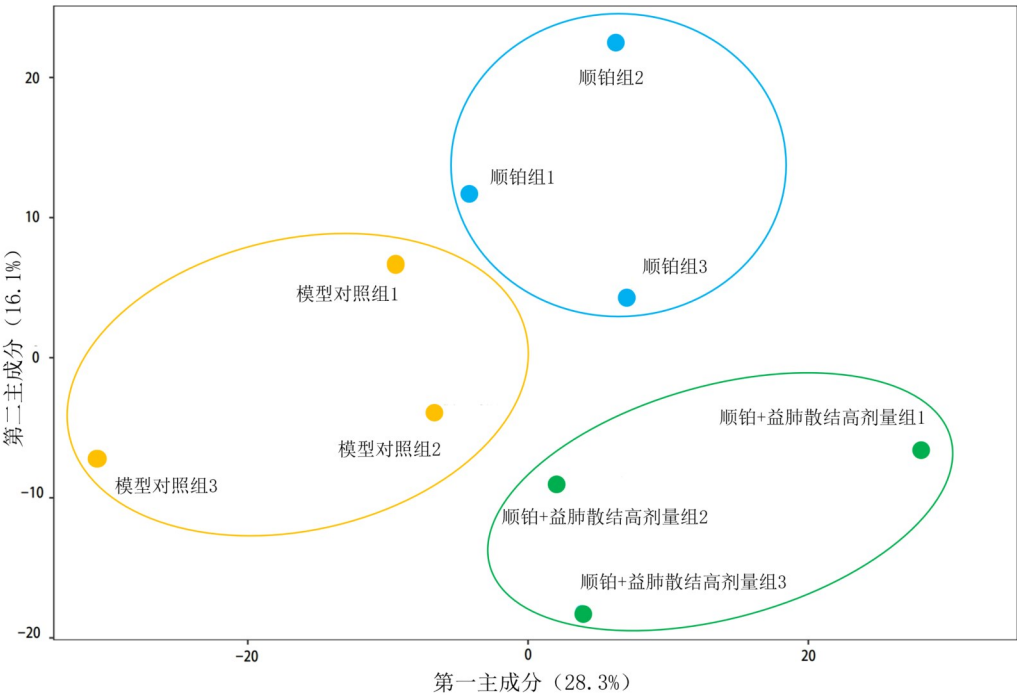


图 1 模型对照组、顺铂组与顺铂+益肺散结高剂量组微小核糖核酸表达谱的主成分分析结果

Figure 1 Principal component analysis results of microRNA expression profiles in the model control group, cisplatin group, and cisplatin + YSP high-dose group

14 个 miRNA (mmu-miR-146b-5p、mmu-miR-1943-3p、mmu-miR-3102-3p、mmu-miR-7655-3p、mmu-miR-877-3p、mmu-miR-5104、mmu-miR-1943-5p、mmu-miR-615-3p、mmu-miR-6933-5p、mmu-miR-10b-5p、mmu-miR-425-5p、mmu-miR-669h-5p、mmu-miR-3102-3p、2-3p、mmu-miR-6970-5p) 表达下调; 顺铂+益肺散结高剂量组与顺铂组对比, 共有 6 个差异表达的 miRNA, 包括 4 个 miRNA (mmu-miR-106a-5p、mmu-miR-466i-5p、mmu-miR-5099、mmu-miR-3470a) 表达上调, 2 个 miRNA (mmu-miR-615-3p、mmu-miR-455-5p) 表达下调。

3.4 生物功能富集分析结果

3.4.1 KEGG 通路富集分析 KEGG 通路富集分析了前 30 条 miRNA 靶基因显著富集的信号通路。结果显示, 与顺铂组比较, 顺铂+益肺散结高剂量组调控的差异 miRNA 靶基因显著富集在 14 条与肺癌相关的通路, 包括 RIG-I 样受体信号通路、Wnt 信号通路、癌症中的转录调控通路、C 型凝集素受体信号通路、脂肪酸代谢通路、MAPK 信号通路、Th17 细胞分化、鞘脂代谢通路、AGE-RAGE 信号通路、cGMP-PKG 信号通路、Apelin 通路、癌症相关 PD-L1 表达和 PD-1 检查点通路、血小板活化通路、癌症中的蛋白聚糖调节通路。

与模型组对比, 顺铂组调节的 miRNA 靶基因显著富集在 10 条与肺癌相关的通路, 包括非小细胞肺癌相关通路、黏附连接相关通路、TGF- β 信号通路、mTOR 信号通路、Ras 信号通路、Wnt 信号通路、癌症中的蛋白聚糖相关通路、Hippo 信号通路、cAMP 信号通路、Hippo 信号通路。另外, 顺铂组调节的 miRNA 靶基因还显著富集在子宫内膜癌、肝细胞癌、结直肠癌、基底细胞癌、肾细胞癌 5 种癌症密切相关的通路上。

与模型对照组对比, 顺铂+益肺散结高剂量组调节的 miRNA 靶基因显著富集在 13 条与肺癌相关的通路上, 包括癌症中的蛋白聚糖调节通路、mTOR 通路、Hippo 通路、Wnt 通路、JAK-STAT 通路、cAMP 通路、MicroRNAs 调节通路、MAPK 信号通路、非小细胞肺癌/癌症中的转录调控通路、Ras 信号通路、Hedgehog 信号通路、HIF-1 信号通路、调节干细胞多能性的信号通路。另外, 顺铂+益肺散结高剂量组调节的 miRNA 靶基因还显著富集在胰腺癌、前列腺癌、乳腺癌、子宫内膜癌、基底细胞癌、胃癌、肝细胞癌、结直肠癌、肾细胞癌 9 种癌症密切相关的通路上。

与模型对照组比较, 顺铂组及顺铂+益肺散结高剂量组共同调节的与肺癌相关的通路有 10 条, 包括非小细胞肺癌相关通路、黏附连接相关通路、TGF- β 信号通路、mTOR 信号通路、Ras 信号通路、Wnt 信号通路、癌症中的蛋白聚糖通路、Hippo 信号通路、cAMP 信号通路和 Hippo 信号通路。顺铂+益肺散结高剂量组特异性调节的与肺癌相关的通路有 7 条, 包括 JAK-STAT 通路、MicroRNAs 调节通路、MAPK 信号通路、癌症中的转录调控通路、Hedgehog 信号通路、HIF-1 信号通路和调节干细胞多能性的信号通路。

3.4.2 GO 生物功能富集分析 差异表达的 miRNA 靶基因进行 GO 生物富集分析, 包含显著程度前 10 的生物过程, 细胞组分以及分子功能。结果显示, 顺铂组与顺铂+益肺散结高剂量组间的差异 miRNA 靶基因显著富集在上皮细胞增殖调控、粘着连接、细胞因子受体活性等生物过程。模型对照组与顺铂组间的差异 miRNA 靶基因显著富集在树突细胞发育、金属离子跨膜转运蛋白活性等生物过程。模型对照组与顺铂+益肺散结高剂量组间的差异 miRNA 靶基因显著富集在肌肉组织发育、DNA 结合转录激活酶活性, RNA 聚合酶 II 特异性等生物过程。

3.5 miRNA-靶基因调控网络

miRNA-靶基因调控网络用于反应 miRNA 与靶基因之间的交互调控关系, 仅有被靶次数前 20 的基因被纳入网络。

结果显示, 顺铂组与顺铂+益肺散结高剂量组间的差异 miRNA 调控网络中共包含 5 个 miRNA, 分别是 mmu-miR-3470a、mmu-miR-466i-5p、mmu-miR-106a-5p、mmu-miR-615-3p、mmu-miR-5099, Arid4b 连接了以 mmu-miR-3470a 和 mmu-miR-106a-5p 为核心的两个 miRNA 调控网络 (附图 1, 扫描本文二维码获取)。

模型对照组与顺铂组之间的差异 miRNA 调控网络中重要的调控基因为 2810474019Rik、Abce1、Acdb5、Acvr1b、Ahcy12、Amigo1、Ank2、Atp2b2、Cts8, 连接了以 mmu-miR-363-5p、mmu-miR-541-5p、mmu-miR-98-5p、mmu-miR-344d-3p、mmu-miR-425-5p、mmu-miR-132-3p 为核心的 6 个 miRNA 调控网络 (附图 2, 扫描本文二维码获取)。

模型对照组与顺铂+益肺散结高剂量组间的差异 miRNA 调控网络中重要的调控基因为 Cts8、Aco1、Ccde127、C5ar2、4930519G04Rik、2810474019Rik, 连接了以 mmu-miR-363-5p、mmu-miR-10b-5p、

mmu-let-7f-5p、mmu-let-7d-5p、mmu-miR-98-5p、mmu-let-7c-5p、mmu-let-7a-5p 为核心的 7 个 miRNA 调控网络（附图 3，扫描本文二维码获取）。

3.6 miRNA-615-3p 的表达及与预后的关系分析

采用实时荧光定量 PCR 检测肿瘤组织中 miRNA-615-3p 的表达。各组间肿瘤组织中 miRNA-615-3p 的表达含量总体上差异有统计学意义 ($P<0.01$)。表 2 示，与模型对照组比较，顺铂、顺铂+益肺散结高剂量组瘤体组织中 miRNA-615-3p 的相对表达量均明显下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，提示 miRNA-615-3p 可能是益肺散结丸作用的主要 miRNA。

Cox 多因素回归分析结果显示，miRNA-615-3p 与肺腺癌、肺鳞癌的总生存均呈负相关。根据 miRNA-615-3p 表达量的中间值做二分类，在肺腺癌中，与 miRNA-615-3p 低表达比较，miRNA-615-3p 高表达的 HR 为 1.34、 $P=0.048$ ；在肺鳞癌中，与 miRNA-615-3p 低表达比较，miRNA-615-3p 高表达的 HR 为 1.38、 $P=0.037$ 。提示 miRNA-615-3p 可能是导致肺癌进展恶化的关键靶点。

表 2 模型对照组、顺铂组、顺铂+益肺散结高剂量组 miRNA-615-3p 相对表达量比较

Table 2 Comparison of relative expression of miRNA-615-3p in model control group, cisplatin group, and cisplatin + YSP high-dose group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	相对表达量
模型对照组	12	1.000±0.036
顺铂组	12	0.647±0.065 ^{a)}
顺铂+益肺散结高剂量组	12	0.388±0.202 ^{b)}

注：a) 与模型对照组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型对照组比较， $P<0.01$ 。

4 讨论

本课题组前期已进行了益气除痰方治疗肺癌的临床^[6]及基础研究^[9-13]，为其开发和临床应用提供了基础。益肺散结丸是根据益气除痰方的药物组成并结合传统工艺制成的中成药制剂，方中猫爪草化痰散结，解毒消肿，为君药。炒僵蚕辛咸入肺，化痰散结消肿，消皮里膜外之坚积；肿节风、山慈菇清热解毒，消肿散结；浙贝母清热化痰，散结消肿。以上四味共为臣药。法半夏助化痰散结之力，为佐药。西洋参益肺阴，清虚火，生津止渴；灵芝补气安神，止咳平喘。二者共为使药。全方化痰散结以治其标，补益肺肾以治其本，标本兼顾，共奏宣肺化痰，解毒散结，止咳平喘之效。

本研究结果显示，与模型对照组比较，顺铂+

益肺散结高、低剂量组均可以显著抑制肿瘤体积的增长；与顺铂组比较，顺铂+益肺散结高、低剂量组的肿瘤抑制效应更佳。在前期的一项对益气除痰方的 Lewis 肺癌小鼠抑瘤实验中发现，单纯使用益肺散结丸同样可以抑制肿瘤体积及肿瘤质量的增长^[9]，因此，益肺散结丸联合顺铂可以发挥更好的抑瘤疗效。

以顺铂为基础的化疗方案在肺癌的治疗中占据重要地位，但顺铂的耐药是临床亟需解决的难题之一。前期研究表明，益气除痰方或可通过抑制 Akt/FoxO 信号转导从而激活内源性凋亡通路，导致肿瘤细胞凋亡，从而逆转肺癌细胞 DPP 耐药^[14]。本研究 miRNA 的差异表达分析显示，顺铂+益肺散结高剂量组与模型对照组间的差异表达 miRNA 的靶基因显著富集在 Akt 所在的 mTOR 通路，顺铂+益肺散结高剂量组与顺铂组之间的差异表达 miRNA 的靶基因显著富集在细胞凋亡通路，这表明通过 Akt 信号通路实现逆转顺铂耐药的过程可能同样受到 miRNA 的调控，为后续研究提供了思路。

顺铂+益肺散结高剂量组与模型对照组间共有 50 个差异 miRNA，而顺铂组与模型对照组间仅 21 个差异 miRNA，提示与顺铂组比较，顺铂联合益肺散结丸拥有更广泛的 miRNA 调节作用。并且，顺铂与顺铂+益肺散结丸调节着许多共同的生物功能，例如 Hippo 通路、Wnt 通路、Ras 通路等，这些信号通路均被证实与肿瘤的发生发展密切相关。失活的 Hippo 信号通路可导致 YAP/TAZ（转录辅激活因子）易位到细胞核中，与转录增强因子（TEAD/TEF）家族的转录因子结合，进而促进细胞生长和增殖^[15]。Wnt 蛋白是细胞发育过程中必不可少的蛋白，Wnt 信号通路与细胞增殖、运动、分化和死亡等密切相关^[16]。Ras 蛋白是一种 GTP 酶，参与到调节细胞增殖、存活、生长、迁移、分化或细胞骨架动态的过程之中^[17]。研究表明，在肺癌中这些信号通路均可以通过 miRNA 途径进行调节^[18-20]。microRNAs 调节相关通路在顺铂+益肺散结高剂量组中也显著富集，而 MicroRNAs 调节相关通路囊括了小细胞肺癌以及非小细胞肺癌在内的 9 种肿瘤的 miRNA 调控路径^[21]。此外，顺铂组及顺铂+益肺散结高剂量组间的差异 miRNA 靶基因还富集在 PD-L1 表达与 PD-1 免疫检查点信号通路，提示益肺散结丸或可增强免疫治疗效果^[22]。

在顺铂组与顺铂+益肺散结高剂量组之间的差异 miRNA 形成的调控网络中，miR-466i-5p 曾被证

实在双黄升白颗粒干预的肺癌荷瘤小鼠中呈显著高表达并经过 qRT-PCR 验证,表明通过增强 miR-466i-5p 的表达可能是抑瘤途径之一^[23]。mmu-miR-106a-5p 被证实能够促进肺腺癌细胞的增殖和转移,并与肺癌细胞的顺铂耐药有关^[24-25]。ARID4B 是一个蛋白编码基因,可作为一种转录因子参与到细胞的增殖、分化、凋亡、肿瘤发生等过程,亦被认定为一种广泛的人类恶性肿瘤分子标志物^[26]。

在模型对照组与顺铂组之间的差异 miRNA 形成的调控网络中,miRNA-425-5p 过表达被证实能够通过 PTEN/PI3K/AKT 信号轴增强肺癌 A549 和 NCI-H1299 细胞系的生长^[27]。与之相反,过表达的 miR-98-5p 被证实能够负调控转化生长因子受体 1 (TGFR1) 的表达,进而抑制肺癌 A549 细胞系的生长^[28]。然而在本研究的调控网络中二者之间并无直接共同调控基因。生物信息学分析表明,miR-130a-3p 是一种与非小细胞肺癌预后相关的标志物,血清 miR-130a-3p 水平是非小细胞肺癌不良预后的预测因素^[29],但其内在机制有待进一步研究。ACVR1B 基因的编码产物 activin A type IB 受体属于转化生长因子- β (TGF- β) 超家族的结构相关信号蛋白,受到 miR-98-5p 与 miR-541-5p 的共同调节,而目前 miR-541-5p 对肺癌的调控机制尚有待研究。在模型对照组与顺铂+益肺散结高剂量组之间的差异 miRNA 形成的调控网络中,miR-10b-5p 在高通量测序试验中被证实是一种潜在的早期非小细胞肺癌的诊断标记物,在与 miR-15b-5p、miR-320b 共同构成的肺鳞癌诊断模型中其 AUC 值高达 0.911^[30]。miR-363-5p 在调控网络位于枢纽地位,是一种与乳腺癌预后相关的生物标记物,但在肺癌中的作用值得进一步探究。miR-106a-5p 与促进肺腺癌细胞增殖和迁移,抑制自噬有关,而本课题组前期研究表明,对自噬的调节是益气除痰方重要的起效机制之一^[31]。

miRNA-615-3p 通过与目标 mRNA 的 3'非翻译区 (3'-UTR) 结合参与调控基因表达,包括蛋白质的翻译抑制和 mRNA 的降解^[32]。miRNA-615-3p 的具体功能及其在细胞生物学过程中的作用尚不完全清楚,但研究表明其可能与促进肿瘤发展有关^[32]。在肺癌患者中 miR-615-3p 与肺腺癌、肺鳞癌的总生存均呈现负相关,miR-615-3p 表达越高,生存越短^[33]。在乳腺癌的研究中,miR-615-3p 被发现在上皮-间质转化 (EMT) 过程中表达上调,通过调节 EMT 相关蛋白的表达,可能参与乳腺癌

细胞的迁移和侵袭^[32]。miR-615-3p 还可能通过影响 TGF- β 信号通路来调节细胞行为^[33]。除此之外,miR-615-3p 还直接靶向内质网应激凋亡蛋白 CHOP,通过影响 CHOP 的表达水平来调控细胞凋亡^[33]。前期已有多项研究证实了益气除痰方 (益肺散结丸) 可以通过调控 CHOP 诱导细胞内质网应激凋亡,抑制上皮间质转化^[12,34]。因此,益肺散结丸可能主要通过 miRNA-615-3p 调控内质网应激凋亡及 TGF- β 通路发挥增敏顺铂、抑制肺癌进展的作用。

本研究探究了顺铂联合益肺散结丸对 Lewis 肺癌瘤源小鼠的抑瘤效果并构建了相应的 miRNA 表达库。本研究结果表明,顺铂与益肺散结丸的组合有助于提高抑瘤率,具有显著的临床运用潜力。miRNA 的表达谱及生物信息学分析表明,顺铂联合益肺散结丸的抑瘤效果是通过调控多种 miRNA 实现的,其中 miRNA-615-3p 可能是其主要调控的 miRNA。未来研究可在临床层面分析肿瘤组织 miRNA-615-3p 表达变化与益肺散结丸联合顺铂治疗效果的相关性。

参考文献

- [1]SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3):209-249.
- [2]GOSS PE, STRASSER-WEIPL K, LEE-BYCHKOVSKY BL, et al. Challenges to effective cancer control in China, India, and Russia[J]. Lancet Oncol, 2014, 15(5):489-538.
- [3]李元滨,林丽珠,王超,等. 益气除痰方联合顺铂对肺癌耐药皮下移植瘤生长及 Bax、Bcl-2 表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(2):755-758.
- [4]张珏. 益气除痰方干预肺癌 EGFR-TKIs 获得性耐药机制的研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2019.
- [5]李元滨,林丽珠,陈昌明,等. 益气除痰方通过 caspase-4 途径诱导人肺腺癌 A549 细胞凋亡[J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(9):1972-1976.
- [6]孙玲玲. 益气除痰方维持治疗中晚期非小细胞肺癌的疗效观察及抗转移机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2019.
- [7]SHIN VY, CHU KM. MiRNA as potential biomarkers and therapeutic targets for gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(30):10432-10439.
- [8]孙玲玲,乔靖,伍家鸣,等. miR-21、miR-182、miR-382 在非小细胞肺癌中的临床意义及益气除痰法的干预作用[J]. 广州中医药大学学报, 2021, 38(3):548-555.
- [9]孙玲玲,林丽珠. 益气除痰方对 Lewis 肺癌小鼠种植瘤

- 细胞周期调控相关因子的影响[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(6): 1846-1848.
- [10]孙玲玲, 方若鸣, 张景涛, 等. 益气除痰方调控内质网应激反应抑制 H1650 肺癌生长的研究[J]. 广州中医药大学学报, 2014, 31(4): 573-577.
- [11]周京旭, 吕文姣, 欧阳明子, 等. 益气除痰方干预 TGF- β 信号途径逆转 A549 细胞上皮间质转化研究[J]. 中药材, 2016, 39(7): 1643-1646.
- [12]陈昌明, 孙玲玲, 林丽珠. 益气除痰方对 BALB/c-nu 裸小鼠 A549 肺癌转移的抑制作用及其机制探索[J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27(4): 513-519.
- [13]李佳殷. 益气除痰方调控肿瘤免疫微环境与血管新生抑制肺癌的机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2023.
- [14]张荣芹, 魏品康. 益气除痰方联合顺铂治疗肺癌疗效及对患者生存质量、Akt/FoxO 信号通路的影响[J]. 陕西中医, 2018, 39(12): 1698-1701.
- [15]ZHAO B, LI L, LEI Q, et al. The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version[J]. *Genes Dev*, 2010, 24(9): 862-874.
- [16]HATSELL S, ROWLANDS T, HIREMATH M, et al. Beta-catenin and Tcfs in mammary development and cancer[J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2003, 8(2): 145-158.
- [17]KARNOUB AE, WEINBERG RA. Ras oncogenes: split personalities[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(7): 517-531.
- [18]HU S, YUAN Y, SONG Z, et al. Expression profiles of microRNAs in drug-resistant non-small cell lung cancer cell lines using microRNA sequencing[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 51(6): 2509-2522.
- [19]REN T, FAN X X, WANG MF, et al. miR-20b promotes growth of non-small cell lung cancer through a positive feedback loop of the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Int J Oncol*, 2020, 56(2): 470-479.
- [20]HU Z, XIAO D, QIU T, et al. MicroRNA-103a curtails the stemness of non-small cell lung cancer cells by binding OTUB1 via the Hippo signaling pathway[J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2020, 19: 1-12. doi: 10.1177/1533033820971643.
- [21]WANG Q, WANG S, WANG H, et al. MicroRNAs: novel biomarkers for lung cancer diagnosis, prediction and treatment[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2012, 237(3): 227-235.
- [22]WANG Y, WANG H, YAO H, et al. Regulation of PD-L1: emerging routes for targeting tumor immune evasion[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9(536): 1-17.
- [23]WANG S, XU Z, WANG L. Shuanghuang Shengbai granule cures myelosuppression and suppresses lung cancer progression: mechanism and therapeutic targets from the aspect of microRNAs[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(37): 62154-62166.
- [24]WANG Q, CHEN M, TANG X. Luteolin inhibits lung cancer cell migration by negatively regulating TWIST1 and MMP2 through upregulation of miR-106a-5p [J]. *Integr Cancer Ther*. 2024, 23: 1-12. doi: 10.1177/15347354241247223.
- [25]GE X, JIANG Y, HU X, et al. MicroRNA-106a-5p alleviated the resistance of cisplatin in lung cancer cells by targeting Jumonji domain containing 6 [J]. *Transpl Immunol*, 2021, 69: 101478. doi: 10.1016/j.trim. 2021.101478.
- [26]FLEISCHER TC, YUN UJ, AYER DE. Identification and characterization of three new components of the mSin3A corepressor complex[J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(10): 3456-3467.
- [27]ZHOU JS, YANG ZS, CHENG SY, et al. miRNA-425-5p enhances lung cancer growth via the PTEN/PI3K/AKT signaling axis [J]. *BMC Pulm Med*, 2020, 20(1): 223-230.
- [28]JIANG F, YU Q, CHU Y, et al. MicroRNA-98-5p inhibits proliferation and metastasis in non-small cell lung cancer by targeting TGFBR1 [J]. *Int J Oncol*, 2019, 54(1): 128-138.
- [29]XUE WX, ZHANG MY, RUI L, et al. Serum miR-1228-3p and miR-181a-5p as noninvasive biomarkers for non-small cell lung cancer diagnosis and prognosis [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020(9601876): 1-13.
- [30]JIN X, CHEN Y, CHEN H, et al. Evaluation of tumor-derived exosomal miRNA as potential diagnostic biomarkers for early-stage non-small cell lung cancer using next-generation sequencing [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(17): 5311-5319.
- [31]ZHANG J, SUN L, CUI J, et al. Yiqi Chutan Tang reduces gefitinib-induced drug resistance in non-small-cell lung cancer by targeting apoptosis and autophagy [J]. *Cytometry A*, 2020, 97(1): 70-77.
- [32]MIYAMOTO Y, MAUER AS, KUMAR S, et al. Mmu-miR-615-3p regulates lipoapoptosis by inhibiting C/EBP homologous protein[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e109637.
- [33]LEI B, WANG D, ZHANG M, et al. miR-615-3p promotes the epithelial-mesenchymal transition and metastasis of breast cancer by targeting PICK1/TGFBRI axis[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 71-85.
- [34]孙玲玲, 杜海燕, 张志权, 等. 益气除痰方调控内质网应激反应相关蛋白对肺癌细胞上皮间质转化的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2022, 49(10): 168-173.

Effect of *Yifei Sanjie Pills* (益肺散结丸) Combined with Cisplatin on Plasma Exosomal miRNAs in Lewis Lung Cancer Tumor-derived Mice

SUN Lingling¹, QI Xiangjun², LI Yanlong², HU Leihao², LIN Lizhu¹

1. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese medicine, Guangzhou, 510405; 2. The First Clinical Medical School of Guangzhou University of Chinese medicine

ABSTRACT **Objective** To investigate the tumor inhibition effect and mechanism of *Yifei Sanjie Pills* (益肺散结丸, YSP) on lung cancer. **Methods** Lewis lung cancer tumor-derived mice were established and divided into four groups including model control group, cisplatin group, cisplatin + YSP low-dose group and cisplatin + YSP high-dose group, with 12 mice in each group. The corresponding interventions were given for 14 days. The tumor volume was measured on the 0th, 3rd, 7th, 10th and 14th days of administration to evaluate the tumor growth. The plasma and tumor tissue were collected on the 15th day. Plasma from the model group, the cisplatin group and the cisplatin+YSP high-dose group were selected, and plasma exosomes were extracted; the differences in miRNA expression among the groups were detected and analyzed by second-generation sequencing technology, and the potential mechanism of action of YSP was investigated by principal component analysis, biofunctional enrichment analysis and miRNA-target gene regulatory network analysis. Quantitative real-time PCR was used to detect the expression of miRNA-615-3p in tumor tissues, and the relationship between miRNA-615-3p and overall survival of lung cancer were analyzed using the Kaplan-Meier plotter (kmplot. com) database. **Results** Compared to that of the model control group, the tumor volume of the cisplatin group on day 10, and the cisplatin + YSP low- and high-dose groups on day 7, 10, and 14 were significantly reduced ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to that of the cisplatin group, the tumor volume of the cisplatin + YSP low- and high-dose groups on day 10 and 14 was significantly reduced ($P < 0.05$). The principal component analysis of miRNA expression profiles showed significant differences in miRNA expression between different intervention groups. There were 21 differentially expressed miRNAs between the model control group and the cisplatin group, 50 differentially expressed miRNAs between the model control group and the cisplatin+ YSP high-dose group, and 6 differentially expressed miRNAs between the cisplatin group and the cisplatin+ YSP high-dose group. Biological function enrichment analysis showed that the differentially expressed miRNAs were mainly involved in the regulation of signaling pathways related to cell growth, proliferation, differentiation, autophagy and other biological activities. The miRNA-target gene regulatory network showed the top 20 genes that were targeted, among which there were proven miRNAs and genes related to lung cancer, and miRNAs that needed further investigation. The expression of miRNA-615-3p in tumor tissues decreased significantly in the cisplatin group and cisplatin+YSP high-dose group compared to that of the model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The miRNA-615-3p was negatively correlated with the survival prognosis of lung cancer ($P < 0.05$). **Conclusion** Cisplatin combined with YSP can effectively inhibit the proliferation of Lewis lung cancer tumors, and the tumor-suppressive effect is related to the regulation of multiple miRNAs, especially the downregulation of miRNA-615-3p expression.

Keywords lung cancer; microRNA; *Yifei Sanjie Pills* (益肺散结丸); cisplatin; MiRNA-615-3p

(收稿日期: 2023-11-28; 修回日期: 2024-07-15)

[编辑: 叶 晨]