

· 基础研究 ·

金复康口服液联合吉非替尼对 H1975 肺癌裸鼠移植瘤生长及有氧糖酵解的影响

张 轶 王秋月 贾 方 崔文静 王菊勇

摘要 **目的** 观察金复康口服液联合吉非替尼对肺癌 H1975 细胞裸鼠移植瘤生长及有氧糖酵解的影响。**方法** 采用生物信息学分析 HK2、PFKP、PKM2、LDHA 在肺腺癌中的表达及对诊断和预后的影响;建立人肺腺癌 H1975 细胞荷瘤裸鼠模型后随机分为模型组、吉非替尼组 (38 mg/kg)、金复康口服液组 (25 g/kg 生药) 和联合用药组 (38 mg/kg 吉非替尼 + 25 g/kg 金复康口服液生药), 每组 6 只。每周测量移植瘤体积及裸鼠体质量 2 次, 给药 21 日后取肿瘤组织称重并计算相对肿瘤增殖率及抑瘤率;采用 RT-PCR、Western Blot 法检测各组移植瘤组织 HK2、PFKP、PKM2、LDHA 的 mRNA 及蛋白表达;微量法检测糖酵解酶活性、ATP 及乳酸含量。**结果** 生物信息学分析显示 PFKP、PKM2 和 LDHA 在肺腺癌中高表达, 对肺腺癌的诊断和预后判断具有一定参考意义。与模型组及单药组比较, 联合用药组肿瘤体积及肿瘤质量降低 ($P<0.01$), 抑瘤率提高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 联合用药组 HK2、PFKP 及 PKM2 的 mRNA 及蛋白表达下调 ($P<0.01$), LDHA 蛋白表达无明显变化, 移植瘤内 HK、PFK 活性下调, ATP 和乳酸含量降低 ($P<0.01$)。**结论** 复康口服液能增强耐药 H1975 细胞荷瘤裸鼠对吉非替尼的敏感性延缓肿瘤生长, 其机制可能是通过下调 HK2、PFKP 和 PKM2 水平, 减少 ATP 及乳酸生成, 抑制有氧糖酵解实现的。

关键词 金复康口服液; 吉非替尼; 肺癌; 有氧糖酵解; 中成药

Effect of Jinfukang Oral Liquid Combined with Gefitinib on the Growth and Aerobic Glycolysis of H1975 Lung Cancer Xenografts in Nude Mice ZHANG Yi, WANG Qiu-yue, JIA Fang, CUI Wen-jing, and WANG Ju-yong *Department of GCP Office, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (200032)*

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Jinfukang Oral Liquid combined with gefitinib on the growth and aerobic glycolysis in nude mice xenografts model of H1975 lung cancer. **Methods** Bioinformatics was used to analyze the expressions of HK2, PFKP, PKM2, and LDHA in lung adenocarcinoma and their effects on diagnosis and prognosis. After the establishment of human lung adenocarcinoma H1975 cells tumor-bearing nude mice model, they were randomly divided into model group, gefitinib group (38 mg/kg), Jinfukang Oral Liquid group (25 g/kg crude drugs) and combination group (38 mg/kg gefitinib and 25 g/kg Jinfukang Oral Liquid crude drugs), with 6 nude mice in each group. Tumor volume and body mass of nude mice were measured twice a week, and tumor tissues were weighed and the relative tumor proliferation rate and tumor suppression rate were calculated after 21 days of drug administration. RT-PCR and Western Blot were used to detect the mRNA and protein expression of HK2, PFKP, PKM2 and LDHA in the transplanted tumor tissues. The glycolytic enzyme activity, ATP and lactic acid contents were detected by micromethod. **Results** Bioinformatics analysis showed that PFKP, PKM2 and LDHA were highly expressed in lung adenocarcinoma, which had certain reference significance for the diagnosis and prognosis of lung adenocarcinoma. Compared with the model group and single drug group, the

基金项目: 十三五“重大新药创制”科技重大专项 (No.2017ZX09304001); 龙华医院科技创新项目 (No.CX201838)

作者单位: 上海中医药大学附属龙华医院 GCP 办公室 (上海 200032)

通讯作者: 王菊勇, Tel: 021-64385700, E-mail: wangjuyong1@126.com

DOI: 10.7611 / cjim.20211229.193

tumor volume and mass of the combined group were decreased ($P<0.01$), and the tumor inhibition rate was increased ($P<0.01$). The mRNA and protein expression of HK2, PFKP and PKM2 in the combination group were significantly down-regulated compared with those in the model group ($P<0.01$), while the protein expression of LDHA was not significantly changed. The activities of HK, PFK and the contents of ATP and lactic acid in the combined group were significantly lower than those in the model group ($P<0.01$). **Conclusion** Jinfukang Oral Liquid can enhance the sensitivity of drug-resistant H1975 cell bearing nude mice to gefitinib and inhibit tumor growth, which may be achieved by down-regulating the expression of HK2, PFKP and PKM2, reducing ATP and lactic acid production, and inhibiting aerobic glycolysis.

KEYWORDS Jinfukang Oral Liquid; gefitinib; lung cancer; aerobic glycolysis; Chinese patent medicine

原发性肺癌是目前最常见的恶性肿瘤, 非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 占肺癌的 80%~85% 左右, 经手术、放疗和化疗等综合治疗后晚期生存率仍不足 17%^[1]。以吉非替尼为代表的表皮生长因子受体-酪氨酸激酶抑制剂 (epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors, EGFR-TKIs) 具有低毒性、靶向性、耐受性良好等优势, 但其耐药性的出现严重影响治疗效果^[2]。研究发现肿瘤耐药的同时内源性代谢谱发生了显著改变, 有氧糖酵解即 Warburg 效应, 表现为肿瘤细胞即使在氧气充足的条件下仍以糖酵解途径产生大量能量及乳酸^[3]。己糖激酶 2 (hexokinase II, HK2)、P 型磷酸果糖激酶 (phosphofructokinase P, PFKP)、M2 型丙酮酸激酶 (M2 pyruvate kinase, PKM2) 和乳酸脱氢酶 A (lactate dehydrogenase A, LDHA) 是调节糖酵解途径的主要限速酶, 已证实与肺癌靶向耐药有关。

中医药能通过干预 Warburg 效应抑制肺癌细胞的能量代谢发挥抗癌作用^[4,5], 金复康口服液是由国医大师刘嘉湘教授在 30 多年临床实践基础上, 以“扶正治癌”学术思想为理论依据研制的抗肺癌专用方, 具有益气养阴、清热解毒之功效。临床和实验研究表明, 金复康口服液能通过抑制耐药相关蛋白的表达延缓肿瘤多药耐药^[6-8], 本课题组前期研究发现金复康口服液可通过调控低氧诱导因子 1 (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 干预肺癌糖代谢过程, 增加肺癌对吉非替尼的敏感性, 但其在机体内调节有氧糖酵解影响肺癌耐药性的研究鲜有报道。本研究采用生物信息学方法分析糖酵解途径关键酶对肺癌诊断和预后判断的潜在影响, 通过观察金复康口服液联合吉非替尼对 H1975 肺癌裸鼠移植瘤生长抑制的作用及其对糖酵解关键酶表达与活性、三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 和乳酸生成的影响, 探讨金复康口服液延缓 EGFR-TKIs 耐药的可能机制。

材料与方法

1 动物及细胞株 SPF 级健康雄性 BALB/c (nu/nu) 裸鼠 24 只, 4~6 周龄, 体质量 (20 ± 2) g, 购自上海斯莱克实验动物有限公司, 动物许可证号: SCXK (沪) 2017-0005, 饲养于上海中医药大学动物实验中心, 实验动物伦理编号: PZSHUTCM190614001。人肺腺癌 H1975 细胞株 (EGFR-T790M/L858R 突变) 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库 (目录号: SCSP-597)。

2 药物 金复康口服液由黄芪、北沙参、石上柏、石见穿、重楼、淫羊藿、女贞子、麦冬、天冬、葫芦巴、山茱萸和绞股蓝按 6:6:6:6:3:2:2:2:2:2:2:2 比例组成^[9], 购自吉林三九金复康药液有限公司, 批号: 180302, 每毫升含生药 1 g, 置于 -80 °C 冰箱中冻存过夜后放入冷冻干燥机, 36 h 后收取冻干粉并称量, 每毫升金复康口服液获取冻干粉 0.244 g, 使用时生理盐水溶解后 0.22 μ m 过滤器除菌, 保存于 4 °C 冰箱。吉非替尼购自 Adamas 公司, 批号: P1442087。

3 主要试剂及仪器 组织总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、荧光定量试剂盒 (货号: EZB-RN4、EZB-RT2GQ、A0012-R1, 上海海方生物技术有限公司); HK2、PKM2 单克隆鼠抗体 (货号: SC-374091, SC-365684, 美国 Santa Cruz 公司); PFKP、LDHA 多克隆兔抗体 (货号: D121851, D164055, 上海生工生物工程有限公司); GAPDH 抗体 (货号: 60004-1-Ig, 美国 Proteintech 公司); 山羊抗鼠 IgG (HRP)、山羊抗兔 IgG (HRP) 抗体 (货号: ARG65350、ARG65351, 美国 Arigo 公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒、RIPA 裂解液、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、超敏 ECL 化学发光试剂盒、ATP 检测试剂盒 (货号: P0010、P0013B、P0015L、P0018S、S0027, 上海碧云天生物技术有

限公司);HK、PFK、PK、LDH 活性检测试剂盒(货号:BC0745、BC0535、BC0545、BC0685,北京索莱宝科技有限公司);乳酸检测试剂盒(货号:A019-2-1,南京建成生物工程研究所)。CO₂培养箱(型号:MCO-18AIC,日本SANYO公司),高速冷冻离心机(型号:5430R,德国Eppendorf公司),冷冻干燥机(型号:FD-1,北京博医康实验仪器有限公司),组织研磨仪(型号:SKSI,上海必横生物科技有限公司),紫外分光光度计(型号:Nano Drop 2000C,美国Thermo Fisher公司);荧光定量PCR仪(型号:StepOnePlus,美国Applied Biosystems公司);蛋白垂直电泳系统(型号:Mini-PROTEAN,美国Bio-Rad公司),化学发光成像系统(型号:EC3 410,瑞士Tecan公司),全波长酶标仪(型号:Softmax M5,美国Molecular Devices公司)。

4 生物信息学分析方法 通过Ualcan网站(<http://ualcan.path.uab.edu/analysis.html>)下载癌症基因组图谱计划(The Cancer Genome Atlas, TCGA)肺腺癌数据集中59例正常肺组织与515例肺腺癌组织的基因数据,分析糖酵解途径关键酶的基因表达差异。获取人类蛋白质表达图谱HPA数据库(<https://www.proteinatlas.org/>)肺腺癌组织中HK2、PFKP、PKM和LDHA的免疫组织化学染色结果,比较抗体染色程度和蛋白表达量。利用R(3.6.3)软件pROC包和ggplot2包对TCGA肺腺癌项目中的临床数据进行分析,并绘制受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线。Kaplan-Meier Plotter平台(<http://kmplot.com/analysis/>)分析HK2、PFKP、PKM和LDHA表达对肺腺癌病理分期及总生存期(overall survival, OS)的影响。

5 动物模型制备及给药方法 BALB/c裸鼠适应性饲养1周后,收集对数生长期的H1975细胞,用无血清RPMI-1640培养基制成 2×10^7 /mL细胞悬液,在裸鼠右侧前肢腋下近背部消毒后皮下注射0.1 mL,形成肉眼可见的皮丘后抽出注射器,棉球按压针孔位置片刻。接种后每日使用游标卡尺测量肿瘤直径,待肿瘤直径>3 mm时造模成功^[10]。本实验造模成功率

为100%。将荷瘤裸鼠随机分为4组,每组6只。根据“人和动物体表面积折算的等效剂量比率表”和参考文献[11],结合预实验确定裸鼠灌胃剂量,给予模型组(生理盐水)、吉非替尼组(38 mg/kg,相当于临床用药剂量)、金复康口服液组(生药25 g/kg,相当于临床用药剂量2倍)和联合用药组(吉非替尼38 mg/kg灌胃1 h后金复康口服液生药25 g/kg)相应药物灌胃,每日1次,每次0.1 mL,连续给药21天。

6 检测指标及方法

6.1 肿瘤体积、相对肿瘤增殖率及抑瘤率测定 灌胃期间,每周测量皮下肿瘤的长径(a)和短径(b)两次并记录体质量。根据肿瘤体积计算公式 $V(\text{mm}^3)=0.52 \times ab^2$ 计算移植瘤体积。计算相对肿瘤体积(relative tumor volume, RTV) $=V_t/V_0$, V_0 为分组给药前肿瘤体积, V_t 为每次测量时肿瘤体积,以相对肿瘤增殖率(T/C)作为抗肿瘤活性评价指标, $T/C(\%)=TRTV/CRTV \times 100\%$, TRTV为治疗组的RTV, CRTV为模型组的RTV, $T/C>60\%$ 为无效, $T/C \leq 60\%$ 为有效^[12]。实验终点后麻醉裸鼠脱颈处死,剥离皮下肿瘤组织并称重,按照肿瘤生长抑制率 $(\%)=(\text{模型组平均瘤重}-\text{治疗组平均瘤重})/\text{模型组平均瘤重} \times 100\%$ 计算抑瘤率。

6.2 RT-PCR法检测HK2、PFKP、PKM2和LDHA mRNA表达 按照试剂盒说明提取移植瘤组织总RNA,逆转录合成cDNA模板,反应条件为42℃、15 min, 95℃、30 s, 1个循环。取模型组肿瘤组织样本为对照,以GAPDH为内参基因,引物由上海生工生物技术有限公司设计合成,序列见表1。PCR扩增反应条件为95℃、5 min, 95℃、10 s, 60℃、30 s, 循环40次;95℃、15 s, 60℃、1 min, 95℃、30 s, 循环1次,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析各组mRNA相对表达量。

6.3 Western Blot检测HK2、PFKP、PKM2和LDHA蛋白表达 将肿瘤组织充分剪碎后加入裂解液,放入组织研磨仪65 Hz研磨60 s, 15 000 r/min、4℃离心15 min抽取上清,BCA法蛋白定量后100℃煮沸10 min使蛋白变性。每孔总蛋白上样量

表1 各基因引物序列表

基因名称	上游引物	下游引物	引物大小(bp)
HK2	5'-CAAAGTGACAGTGGGTGTGG-3'	5'-GCCAGGTCCTTCACGTCTC-3'	179
PFKP	5'-TCGGTCTCTCCAAGTTTGTGC-3'	5'-TTCCGTTGTCCACCAATCTGA-3'	127
PKM	5'-CCACTTGCAATTATTTGAGGAA-3'	5'-GTGAGCAGACCTGCCAGACT-3'	146
LDHA	5'-ATGGCAACTCTAAAGGATCAGC-3'	5'-CCAACCCCAACAACCTGTAATCT-3'	188
GAPDH	5'-AATCCCATCACCATCTTCCA-3'	5'-CCTGCTTACCACCTTCTTG-3'	252

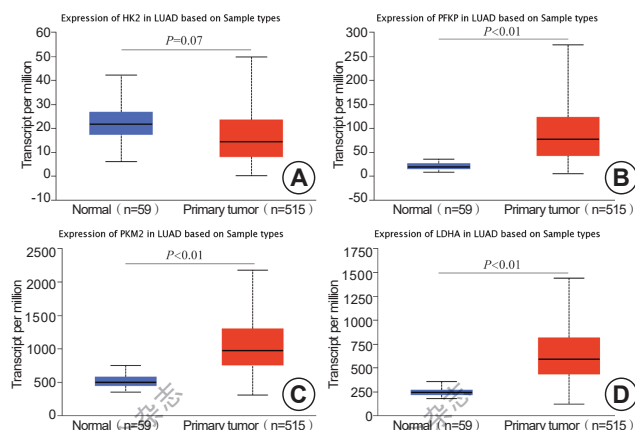
30 μ g, 行 SDS-PAGE 分离后转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶常温封闭 2 h, 4 $^{\circ}$ C 孵育一抗过夜后 TBST 洗膜 3 次, 室温孵育二抗 1 h, 洗膜后进行 ECL 底物发光, 用 Image J 软件分析各条带灰度值。

6.4 HK、PFK、PK 和 LDH 活性、ATP 及乳酸含量检测 按照试剂盒操作方法称取组织后加入提取液, 冰浴匀浆后 4 $^{\circ}$ C 8 000 $\times g$ 离心 10 min 取上清, 严格按照检测试剂盒操作说明书进行相应反应后, 计算 HK、PFK、PK 和 LDH 酶活性、ATP 及乳酸含量。

7 统计学方法 所有数据均采用 SPSS 25.0 软件进行分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用配对 t 检验进行配对样本的组间比较, 非配对样品的组间比较采用单因素方差分析或秩和检验; 以 ROC 曲线下面积 (area under curve, AUC) 作为肺腺癌诊断预测价值的评价指标, AUC<0.5 为无诊断价值, AUC>0.9 为高诊断价值; 采用 Kaplan-Meier 模型和 Log-rank 检验评估糖酵解酶表达与肺腺癌患者 OS 的关系, 以双侧 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

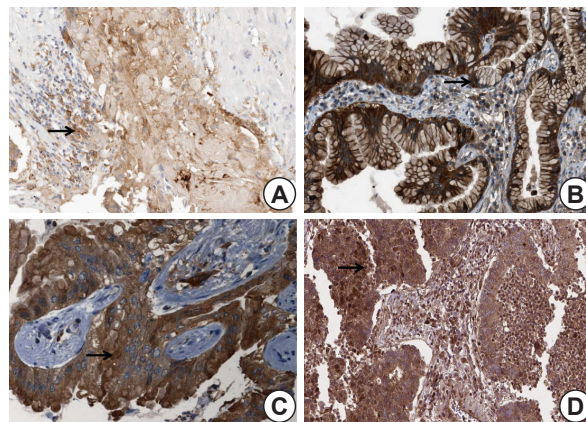
结 果

1 糖酵解途径关键酶在肺腺癌中的表达差异及临床预后分析 (图 1~4, 表 2) TCGA 数据库中肺腺癌基因芯片数据分析显示, 与正常肺组织比较, 肺腺癌中 PFKP、PKM2 和 LDHA 的 mRNA 表达上调 ($P<0.01$), HK2 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P=0.07$)。HPA 数据库免疫组化染色结果表明, HK2 呈中等强度染色, PFKP、PKM2 和 LDHA 均呈强染色, 与 mRNA 表达基本一致, 其高表达可能促使肺腺癌发生。ROC 曲线分析结果显示, 四种糖酵解关键酶的 AUC 均 >0.5, 对肺腺癌诊断均有一定预测价值,



注: A 为 HK2 表达; B 为 PFKP 表达; C 为 PKM2 表达; D 为 LDHA 表达

图 1 正常肺组织与肺腺癌组织中 HK2、PFKP、PKM2 和 LDHA mRNA 表达比较



注: A 为 HK2 表达; B 为 PFKP 表达; C 为 PKM2 表达; D 为 LDHA 表达; 箭头所指为相应表达

图 2 肺腺癌组织中 HK2、PFKP、PKM2 和 LDHA 表达比较 (免疫组化, $\times 200$)

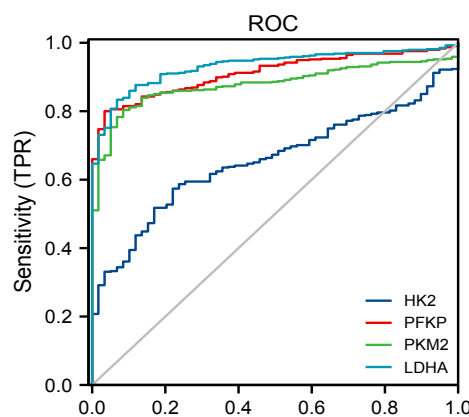


图 3 HK2、PFKP、PKM2 和 LDHA 对肺腺癌诊断预测的 ROC 曲线

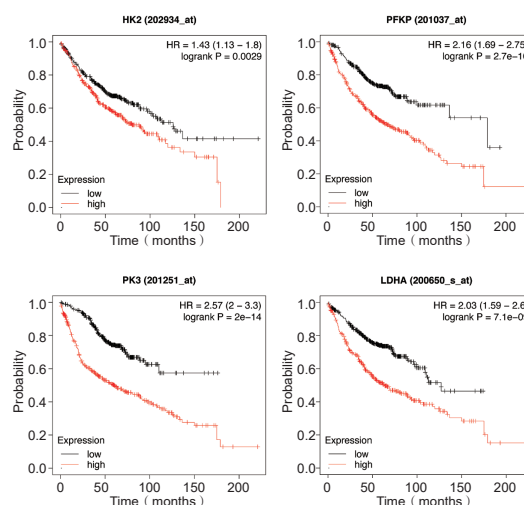


图 4 HK2、PFKP、PKM2 和 LDHA 对肺腺癌患者总生存期的影响

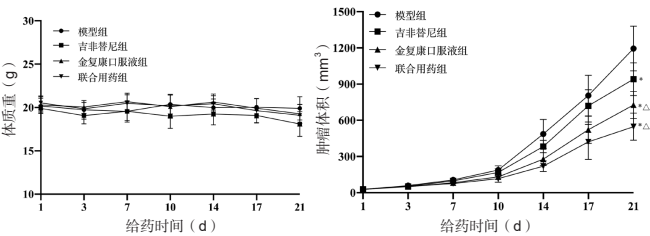
其中以 LDHA 的诊断准确性最高。生存分析显示 HK2、PFKP、PKM2 和 LDHA 是肺腺癌预后的不良因素, 其高表达与患者较短的 OS 显著相关 ($P<0.01$)。

表 2 HK2、PFKP、PKM2 和 LDHA 对诊断肺腺癌的

ROC 曲线分析结果

指标	AUC	灵敏度	特异度	约登指数	截断值	95%CI
HK2	0.656	0.574	0.780	1.353	5.345	0.603-0.709
PFKP	0.911	0.800	0.966	1.766	5.366	0.886-0.936
PKM2	0.878	0.804	0.915	1.719	8.282	0.848-0.908
LDHA	0.931	0.834	0.932	1.766	7.807	0.908-0.954

2 金复康口服液联合吉非替尼对肺癌 H1975 细胞裸鼠移植瘤的影响 (图 5, 表 3) 给药期间, 各组小鼠体质量变化差异无统计学意义 ($P>0.05$), 给药 21 天后金复康口服液组和联合用药组的肿瘤体积较模型组降低 ($P<0.01$)。金复康口服液组和联合用药组的相对肿瘤增殖率分别为 55.37% 和 49.95%, 均 $<60\%$, 提示抗肿瘤效果有效。与模型组比较, 吉非替尼组瘤重差异无统计学意义 ($P>0.05$), 金复康口服液组和联合用药组瘤重降低 ($P<0.01$), 肿瘤抑制率分别为 35.29% ($P<0.01$) 和 49.02% ($P<0.01$); 与吉非替尼组比较, 联合用药组瘤重降低 ($P<0.01$), 抑瘤率升高 ($P<0.01$)。



注: 与模型组比较, $*P<0.01$; 与吉非替尼组比较, $\Delta P<0.01$

图 5 各组裸鼠体质量及肿瘤体积变化曲线

表 3 各组裸鼠相对肿瘤增殖率、移植瘤质量及抑瘤率比较

组别	n	相对肿瘤增殖率 (%)	肿瘤质量 (g, $\bar{x} \pm s$)	抑瘤率 (%)
模型	6	100.00	1.02 ± 0.21	0
吉非替尼	6	76.63	0.83 ± 0.19	18.63
金复康口服液	6	55.37	$0.66 \pm 0.12^*$	35.29*
联合用药	6	49.95	$0.52 \pm 0.11^{*\Delta}$	49.02* Δ

注: 与模型组比较, $*P<0.01$; 与吉非替尼组比较, $\Delta P<0.01$

3 各组移植瘤组织中 HK2、PFKP、PKM2 和 LDHA mRNA 表达比较 (表 4) 与模型组比较, 吉非替尼组移植瘤组织中 PFKP 和 LDHA mRNA 水平下调 ($P<0.01$), 金复康口服液组及联合用药组 HK2、PFKP、PKM2 和 LDHA mRNA 水平下调 ($P<0.01$)。与吉非替尼组比较, 金复康口服液组和联合用药组 HK2、PFKP 和 PKM2 mRNA 下调 ($P<0.01$)。

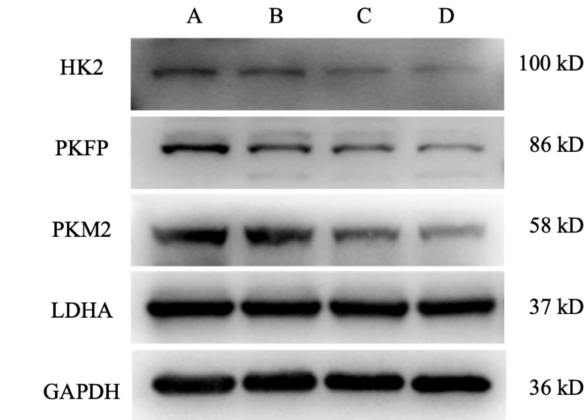
表 4 各组移植瘤组织中 HK2、PFKP、PKM2、LDHA

mRNA 表达比较 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	HK2	PFKP	PKM2	LDHA
模型	6	1.00 ± 0.02	1.03 ± 0.02	1.01 ± 0.01	0.98 ± 0.01
吉非替尼	6	0.93 ± 0.04	$0.55 \pm 0.08^*$	0.98 ± 0.02	$0.47 \pm 0.06^*$
金复康口服液	6	$0.54 \pm 0.02^{*\Delta}$	$0.27 \pm 0.04^{*\Delta}$	$0.81 \pm 0.03^{*\Delta}$	$0.61 \pm 0.14^*$
联合用药	6	$0.22 \pm 0.08^{*\Delta}$	$0.22 \pm 0.04^{*\Delta}$	$0.65 \pm 0.03^{*\Delta}$	$0.39 \pm 0.04^*$

注: 与模型组比较, $*P<0.01$; 与吉非替尼组比较, $\Delta P<0.01$

4 各组移植瘤组织中 HK2、PFKP、PKM2 和 LDHA 蛋白表达比较 (图 6, 表 5) 与模型组和吉非替尼组比较, 金复康口服液组和联合用药组 HK2 和 PFKP 蛋白表达下调 ($P<0.01$), 联合用药组 PKM2 蛋白表达下调 ($P<0.01$)。



注: A 为模型组; B 为吉非替尼组; C 为金复康口服液组; D 为联合用药组

图 6 各组移植瘤组织中 HK2、PFKP、PKM2 和 LDHA 蛋白表达电泳图

5 各组移植瘤组织中糖酵解关键限速酶活性比较 (表 6) 与模型组比较, 吉非替尼组移植瘤组织内 PFK 和 PK 活性降低 ($P<0.05$), 金复康口服液组 HK 和 PFK 活性降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 联合用药组 HK、PFK、PK 活性降低 ($P<0.01$)。与吉非替尼组比较, 金复康口服液组 HK 活性降低 ($P<0.05$), 联合用药组 HK、PFK 活性降低 ($P<0.01$)。

6 各组移植瘤组织中 ATP 和乳酸含量比较 (表 7) 与模型组比较, 各给药组 ATP 及乳酸含量均降低 ($P<0.01$, $P<0.05$)。与吉非替尼组比较, 联合用药组 ATP 及乳酸含量下调 ($P<0.01$, $P<0.05$)。

讨论

《杂病源流犀烛》云:“邪积胸中, 阻塞气道, 气不宜通, 为痰, 为食, 为血, 皆得与正相搏, 邪既胜, 正不得而制之, 遂结成形而有块。”^[13] 国医大师刘嘉

表 5 各组移植瘤组织中 HK2、PFKP、PKM2 和 LDHA 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HK2	PFKP	PKM2	LDHA
模型	6	1.18 ± 0.05	0.88 ± 0.05	1.05 ± 0.07	0.99 ± 0.07
吉非替尼	6	1.08 ± 0.09	0.77 ± 0.05	0.97 ± 0.10	0.95 ± 0.13
金复康口服液	6	0.76 ± 0.03 ^{*△}	0.57 ± 0.04 ^{*△}	0.87 ± 0.04	0.97 ± 0.01
联合用药	6	0.49 ± 0.02 ^{*△}	0.21 ± 0.04 ^{*△}	0.37 ± 0.11 ^{*△}	0.95 ± 0.07

注: 与模型组比较, * $P < 0.01$; 与吉非替尼组比较, $\Delta P < 0.01$

表 6 各组移植瘤组织中 HK、PFK、PK 及 LDH 活性比较 (U/mg prot, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	HK 活性	PFK 活性	PK 活性	LDH 活性
模型	6	75.31 ± 16.50	89.65 ± 10.62	166.06 ± 29.59	659.27 ± 139.71
吉非替尼	6	72.21 ± 8.97	63.33 ± 10.74 [*]	109.34 ± 15.12 [*]	645.52 ± 164.60
金复康口服液	6	40.93 ± 2.94 ^{*△}	48.97 ± 5.62 ^{**}	123.70 ± 12.16	621.41 ± 87.94
联合用药	6	30.35 ± 13.10 ^{**△△}	33.50 ± 5.50 ^{**△△}	89.38 ± 20.30 ^{**}	628.93 ± 125.43

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与吉非替尼组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表 7 各组移植瘤组织中 ATP 和乳酸含量比较

($\mu\text{mol/mg prot}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	ATP 含量	乳酸含量
模型	6	5.95 ± 0.47	7.96 ± 0.44
吉非替尼	6	4.85 ± 0.33 [*]	5.31 ± 0.66 ^{**}
金复康口服液	6	5.09 ± 0.27 [*]	5.57 ± 0.60 ^{**}
联合用药	6	3.54 ± 0.34 ^{**△△}	3.86 ± 0.16 ^{**△△}

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与吉非替尼组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

湘教授认为肺癌是以全身为虚、局部为实的疾病, 其治疗多选用补益虚损的中药培植本元, 调节人体阴阳气血和脏腑经络以增强机体内在抗病能力, 从而抑制癌症发展祛除病邪^[14]。金复康口服液中黄芪为补气之要药, 合女贞子滋阴补肾, 益精填髓; 北沙参、麦冬、天冬养阴润燥、清肺止咳, 增强益胃生津之效; 淫羊藿、山茱萸、葫芦巴温肾助阳, 以阳中求阴; 石见穿、石上柏入肺经, 均能清热解毒, 软坚散结, 加重抗癌解毒, 绞股蓝清热补虚, 共奏益气养阴、补肾培本、清热解毒之功。临床研究表明, 金复康口服液在稳定和缩小原发性 NSCLC、减轻化疗不良反应、提高生活质量和生存期的同时, 对缓解肿瘤多药耐药具有显著疗效^[7]。体外研究已证实金复康口服液能通过增强 PTEN、PDCD4 的表达以抑制 AKT 通路活性, 提高人肺腺癌 PC-9R 细胞对吉非替尼的敏感性^[8]。

有氧糖酵解是肿瘤“代谢重编程”的重要特征, 对维持肿瘤细胞快速生长起重要作用, 其发生机制与糖酵解酶活性改变或表达失调有关, 进而导致 ATP 及乳酸的不断累积。HK2、PFKP 和 PKM2 是糖酵解通路中介导 3 个不可逆反应的限速酶, LDHA 通过调节乳酸生成量维持糖酵解过程的稳定^[15]。本研究通

过生物信息学分析发现 PFKP、PKM2 和 LDHA 在肺腺癌组织中高表达, 并与患者 OS 呈负相关, 提示上述糖酵解酶对肺腺癌的诊断和预后判断具有一定参考价值。现代药理学研究证实女贞子、石见穿的主要成分齐墩果酸能通过降低 HK2 和 PFK1 的表达抑制肿瘤细胞有氧糖酵解, 熊果酸可激活线粒体能量代谢、氧化应激和 p53 介导线粒体依赖的信号传导途径发挥抗癌活性^[16, 17]; 北沙参的活性成分佛手柑内酯能降低葡萄糖 6-磷酸脱氢酶活性, 下调氧化磷酸化复合物的表达和 ATP 的产生抑制糖酵解^[18]。网络药理学分析显示金复康口服液能靶向 HIF-1 α 信号通路调节肿瘤细胞能量代谢过程治疗 NSCLC^[19]。

近年来, 吉非替尼作为治疗 EGFR 突变 NSCLC 的一线用药显著延长了患者的无进展生存期, 但由于第 20 号外显子 T790M 错义突变引起的位阻效应在增加 EGFR 与 ATP 亲和力的同时阻碍了 TIKs 与 EGFR 结合, 无法有效抑制下游信号通路引发耐药^[20, 21]。研究表明, 糖酵解关键酶的表达紊乱或活性增强与 NSCLC 的 EGFR-TIKs 耐药有关^[22]。Kim SM 等^[23]证实阿法替尼能抑制 H1975 细胞 HK2 活性并降低 ATP 产量, 进而增加其对 H1975 细胞的杀伤作用。EGFR 下游通路激活可导致 PFKP 磷酸化, 介导 PI3K/AKT 途径正反馈调节影响 PFK1 的表达并促进 Warburg 效应发生^[24, 25]。PKM2 抑制剂紫草素可通过降低 PKM2 磷酸化水平阻断 PKM2/STAT3/cyclinD1 信号通路, 增加吉非替尼对 EGFR 野生型 NSCLC 的抗肿瘤作用^[26]。本研究通过建立具有 EGFR-T790M 耐药突变的肺癌 H1975 细胞荷瘤裸鼠模型, 证实金复康口服液联合吉非替尼能下调 HK2、PFKP 和 PKM2 的 mRNA 和蛋白水平, 抑制糖酵解

酶活性,减少 ATP 产生,可能通过调节有氧糖酵解增加耐药细胞对吉非替尼的敏感性。

EGFR-TKIs 治疗下 NSCLC 细胞中乳酸生成增加,抑制 LDHA 活性或表达能减少乳酸产生,有助于克服靶向治疗后肿瘤酸性微环境介导的继发性耐药^[27]。Li XM 等^[28]证实降低 LDHA 活性可再激活线粒体功能,明显抑制 A549 和 H1975 细胞生长。本研究表明,金复康口服液联合吉非替尼可下调移植瘤内 LDHA 的 mRNA 水平及乳酸含量,但对 LDHA 蛋白表达及活性无明显影响。乳酸减少可能由于 HK2、PFK1、PKM2 表达抑制从而降低了生成乳酸的前体物质,亦或通过调节单羧酸转运蛋白介导乳酸跨膜外排所导致^[29],有待进一步验证。

综上所述,本研究结果显示金复康口服液能够增加耐药 H1975 细胞荷瘤裸鼠对吉非替尼的敏感性,抑制肿瘤生长,其机制可能是通过下调糖酵解通路关键限速酶 HK2、PFKP 和 PKM2 的活性和表达水平,减少 ATP 及乳酸含量,抑制肿瘤细胞有氧糖酵解过程实现的。关于金复康口服液缓解肿瘤靶向耐药的药效物质基础和临床疗效尚待进一步深入探索。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019 [J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69 (1): 7-34.
- [2] Wu SG, Shih JY. Management of acquired resistance to EGFR TKI-targeted therapy in advanced non-small cell lung cancer [J]. Mol Cancer, 2018, 17 (1): 38.
- [3] Bonatelli M, Silva ECA, Cárcano FM, et al. The warburg effect is associated with tumor aggressiveness in testicular germ cell tumors [J]. Front Endocrinol, 2019, 10: 417.
- [4] 余功, 陈江涛, 胡桥, 等. 清燥救肺汤对荷 Lewis 小鼠肺癌细胞糖酵解关键限速酶 HK2, PFK2, PKM2 的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26 (4): 54-58.
- [5] 汪宇涵, 张铭, 崔清, 等. 益气养精方对人肺癌 A549 细胞糖酵解通路中 HIF-1 α 和 PFKFB3 蛋白的调节作用 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37 (9): 2155-2158.
- [6] 徐蔚杰, 李春杰, 刘嘉湘, 等. 金复康口服液抑制 Lewis 肺癌 Sca-1⁺ 干细胞亚群增殖的研究 [J]. 上海中医药杂志, 2015, 49 (1): 69-71, 86.
- [7] 孙玺媛, 姜梅, 张伟, 等. 金复康口服液对非小细胞肺癌吉非替尼获得性耐药的影响 [J]. 中药材, 2014, 37 (7): 1254-1258.
- [8] 黄晓明, 孙建立, 侯爱画, 等. 金复康口服液对吉非替尼耐药人肺癌 PC9/R 的增敏作用和机制研究 [J]. 药物评价研究, 2020, 43 (4): 676-682.
- [9] 陈健, 康亚妮, 沈挺挺, 等. 中药复方“金复康”抑制肺癌细胞生长机制的研究 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2016, 18 (10): 1813-1818.
- [10] 康小红, 王立芳, 王中奇, 等. 肺岩宁方联合吉非替尼抑制肺癌裸鼠移植瘤细胞 H1975 生长及其作用机制 [J]. 肿瘤防治研究, 2014, 41 (1): 1-4.
- [11] 孙玺媛, 孙建立, 刘嘉湘. 金复康口服液对 Lewis 肺癌荷瘤鼠脾细胞分泌 Th1/Th2 类细胞因子的影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10 (9): 160-162.
- [12] 韩淑燕, 郑文献, 何曦冉, 等. 消癌平注射液联合吉非替尼对耐药非小细胞肺癌 H460 和 H1975 裸鼠移植瘤的抑制作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2016, 30 (1): 44-52.
- [13] 清·沈金鳌撰. 李占永, 李晓林校注. 杂病源流犀烛 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 1994: 215.
- [14] 刘嘉湘. 扶正治癌 融汇中西 继承创新 [J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39 (1): 10-12.
- [15] Woodford MR, Chen VZ, Backe SJ, et al. Structural and functional regulation of lactate dehydrogenase-A in cancer [J]. Future Med Chem, 2020, 12 (5): 439-455.
- [16] Li Y, Xu Q, Yang W, et al. Oleanolic acid reduces aerobic glycolysis-associated proliferation by inhibiting yes-associated protein in gastric cancer cells [J]. Gene, 2019, 712: 143956.
- [17] 向润清, 范源. 熊果酸及其衍生物抗肿瘤作用的研究进展 [J]. 药学研究, 2019, 38 (2): 63-69.
- [18] Santoro M, Guido C, Amicis FD, et al. Bergapten induces metabolic reprogramming in breast cancer cells [J]. Oncol Rep, 2016, 35 (1): 568-576.
- [19] 陈石秀, 陈佳蕾, 谢瑞芳, 等. 基于网络药理学的金复康口服液治疗非小细胞肺癌机制 [J]. 中成药, 2019, 41 (7): 1547-1555.
- [20] Saldaña-Rivera L, Bello M, Méndez-Luna D. Structural insight into the binding mechanism of ATP to EGFR and L858R, and T790M and L858R/T790 mutants [J]. J Biomol Struct Dyn, 2019, 37 (17): 4671-4684.

- [21] Nagano T, Tachihara M, Nishimura Y. Mechanism of resistance to epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors and a potential treatment strategy [J]. Cells, 2018, 7 (11): 212.
- [22] Kunimasa K, Nagano T, Shimono Y, et al. Glucose metabolism-targeted therapy and withaferin A are effective for epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor-induced drug-tolerant persisters [J]. Cancer Sci, 2017, 108 (7): 1368–1377.
- [23] Kim SM, Yun MR, Hong YK, et al. Glycolysis inhibition sensitizes non-small cell lung cancer with T790M mutation to irreversible EGFR inhibitors via translational suppression of Mcl-1 by AMPK activation [J]. Mol Cancer Ther, 2013, 12 (10): 2145–2156.
- [24] Shen J, Jin Z, Lv H, et al. PFKFB3 is highly expressed in lung cancer and regulates glucose metabolism [J]. Cell Oncol (Dordr), 2020, 43 (4): 617–629.
- [25] Lee JH, Liu R, Li J, et al. EGFR-phosphorylated platelet isoform of phosphofructokinase 1 promotes PI3K activation [J]. Mol Cell, 2018, 70 (2): 197–210.
- [26] Tang JC, Ren YG, Zhao J, et al. Shikonin enhances sensitization of gefitinib against wild-type EGFR non-small cell lung cancer via inhibition PKM2/stat3/cyclinD1 signal pathway [J]. Life Sci, 2018, 204: 71–77.
- [27] Apicella M, Giannoni E, Fiore S, et al. Increased lactate secretion by cancer cells sustains non-cell-autonomous adaptive resistance to MET and EGFR targeted therapies [J]. Cell Metab, 2018, 28 (6): 848–865.
- [28] Li XM, Xiao WH, Zhao HX. Discovery of potent human lactate dehydrogenase A (LDHA) inhibitors with antiproliferative activity against lung cancer cells: virtual screening and biological evaluation [J]. MedChemComm, 2017, 8 (3): 599–605.
- [29] 汪婷婷, 何永文. 单羧酸转运蛋白家族介导乳酸转运在肿瘤发生发展中的作用 [J]. 中国肿瘤临床, 2020, 47 (7): 354–358.

(收稿: 2021-03-03 在线: 2022-01-29)

责任编辑: 赵芳芳

中国中医药研究促进会妇产科与辅助生育分会二届四次会议征文通知

中国中医药研究促进会妇产科与辅助生育分会二届四次会暨中西医结合生殖医学及辅助生殖技术学习班将于 2022 年 5 月在山东省济南市举行。会议本着前沿、精良、实用的原则, 邀请国内外相关领域著名学者、资深专家围绕“妇产科疑难病、女性生育力保护、高龄生育难点、出生缺陷防控”等生殖临床热点问题, 聚焦中西医结合妇产科临床、生殖医学、生殖内分泌、生殖微创外科、妇产科教育研究等方面进行专题讨论。征文通知如下。

征文内容: 中西医结合妇产科、不孕不育、围产期、优生遗传与辅助生殖技术诊治。

征文要求: 未公开发表的论文, 以摘要形式投稿。摘要包含题目、作者、单位及地址、邮编、目的、方法、结果、结论, 字数 800~1 200 字, 不含图表。务必在文末标注作者地址、电子邮箱及联系电话。投稿邮箱: f48818@163.com, 注明“会议投稿”。

截稿时间: 2022 年 3 月 31 日。