DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.03.031

补中益气汤通过Nrf2/ROS通路调控内质网应激改善A549细胞、A549/DDP细胞顺铂耐药的分子机制

于丹,牟琪瑞,高原
(辽宁中医药大学病理学教研室,辽宁 沈阳 110847)

摘要:目的 通过对补中益气汤调控Nrf2/ROS通路对A549细胞、A549/DDP细胞内质网应激的影响,探讨补中益气汤改善非小细胞肺癌顺铂耐药的分子机制。方法 制备补中益气汤含药血清并培养A549细胞、A549/DDP细胞,并进行随机分组为A组(A549细胞)、B组(A549细胞+20 μg/mL顺铂)、C组(A549细胞+20 μg/mL顺铂+10%补中益气汤含药血清)、D组(A549/DDP细胞)、E组(A549/DDP细胞+20 μg/mL顺铂)、F组(A549/DDP细胞+20 μg/mL顺铂+10%补中益气汤含药血清),应用CCK-8法检测各组细胞顺铂半数抑制浓度(IC50)值,DCFH-DA荧光探针法检测各组活性氧(ROS)含量,Western blot法检测各组细胞Nrf2、P-Nrf2、PERK、P-PERK、eIF2α、P-eIF2α、IRE1、XBP1的蛋白表达量。结果 在A549细胞和A549/DDP细胞中,补中益气汤均可以显著下调其对顺铂的IC50值($P<0.05$);两株细胞中,顺铂均可以上调Nrf2、P-Nrf2的蛋白表达,在补中益气汤干预后,二者表达量下调($P<0.05$),且二者在A549/DDP细胞中表达较A549细胞更高($P<0.05$);与空白组比较,顺铂可以上调两株细胞的ROS表达量($P<0.05$),在联合了补中益气汤后ROS表达量进一步上调($P<0.05$),且A549细胞的ROS表达量要显著高于A549/DDP细胞($P<0.05$);PERK、eIF2α在各组细胞中表达无显著差异($P>0.05$),在两株细胞中,顺铂能显著上调P-PERK、P-eIF2α、IRE1、XBP1、蛋白表达,在补中益气汤干预后表达再次上调($P<0.05$),且A549细胞的内质网应激蛋白表达高于A549/DDP细胞($P<0.05$)。结论 补中益气汤可能通过Nrf2/ROS通路调控内质网应激改善A549细胞、A549/DDP细胞顺铂耐药。

关键词:补中益气汤;非小细胞肺癌;Nrf2/ROS;内质网应激;顺铂耐药
中图分类号:R289.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-7717(2025)03-0170-06

基金项目:国家自然科学基金项目(81973735);辽宁省自然科学基金项目(2023-MS-232);辽宁中医药大学中西医结合学院"岐济"人才支撑计划项目(2023QJ01001)

作者简介:于丹(1983-),女,辽宁沈阳人,副教授,博士,研究方向:中医调节肿瘤转移机制。
通讯作者:高原(1980-),女,辽宁锦州人,教授,硕士研究生导师,研究方向:中医药治疗肿瘤机制。E-mail:gaoyuan.laury@163.com。

[12] 万军,包奇昌. 去氢吴茱萸碱对实验性胃溃疡大鼠胃黏膜的保护作用及机制研究[J]. 中草药,2020,51(18):4698-4703.
[13] 郭丽,路青瑜,李娇,等. 基于高内涵筛选技术的吴茱萸次碱肝毒性研究[J]. 中国药理学通报,2022,38(10):1548-1558.
[14] 魏舒婷. 吴茱萸致肝损伤的"量-时-毒"关系及物质基础探索[D]. 北京:中国医药工业研究总院,2022.
[15] 陈路,冯世鑫,蒋妮,等. 不同炮制方法对吴茱萸生物碱类有效成分含量的影响[J]. 中国药业,2021,30(17):57-60.
[16] 可嘉. 奇效良方[M]. 北京:中国中医药出版社,1998:147-148.
[17] 蒋守福,张锐,杨成松. 新版安徽省中药饮片炮制规范发布[N]. 中国医药报,2019-11-19.
[18] 仲学辂. 本草崇原集说[M]. 北京:人民卫生出版社,1997:120-121.
[19] 董文杰,轩辕欢,李伟,等. 市售制吴茱萸中甘草汁成分质量标准研究[J]. 中国药业,2020,29(3):60-63.
[20] 吴梅青,罗栩强,唐海飞,等. 不同炮制方法对吴茱萸指标成分含量的影响与评价[J]. 中国现代中药,2020,22(7):1108-1112.
[21] HE Y,YAO P F,CHEN S B,et al. Synthesis and evaluation of 7,8-dehydrorutaecarpine derivatives as potential multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease[J]. Eur J Med Chem,2013,63:299-312.
[22] YUAN S M,GAO K,WANG D M,et al. Evodiamine improves congnitive abilities in SAMP8 and APP(swe)/PS1(DeltaE9) transgenic mouse models of Alzheimer´s disease[J]. Acta Pharmacol Sin,2011,32(3):295-302.
[23] KAN S F,YU C H,PU H F,et al. Anti-proliferative effects of evodiamine on human prostate cancer cell lines DU145 and PC3[J]. Journal of Cellular Biochemistry,2007,101(1):44-56.
[24] CHOI Y H,SHIN E M,KIM Y S,et al. Anti-inflammatory principles from the fruits of *Evodia rutaecarpa* and their cellular action mechanisms[J]. Archives of Pharmacal Research,2006,29(4):293-297.
[25] 邢菊玲,罗宇琴,吴文平,等. 不同基原吴茱萸药材中质量标志物预测分析:基于网络药理学和指纹图谱[J]. 亚太传统医药,2023,19(6):147-154.
[26] 倪晶,许异川,朱凌宇,等. 基于"量效关系"探讨不同比例黄连-吴茱萸药对的作用[J]. 中医药学报,2023,51(11):63-68.

Buzhong Yiqi Decoction(补中益气汤) Regulates Endoplasmic Reticulum Stress through Nrf2/ROS Pathway to Improve Molecular Mechanism of Cisplatin Resistance in A549 Cells and A549/DDP Cells

YU Dan, MOU Qirui, GAO Yuan
(Department of Pathology, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, Liaoning, China)

Abstract: *Objective* By studying the effect of Buzhong Yiqi Decoction(补中益气汤) on the endoplasmic reticulum stress of A549 cells and A549/DDP cells through Nrf2/ROS pathway, the molecular mechanism of Buzhong Yiqi Decoction improving cisplatin resistance in non-small cell lung cancer was investigated. *Method* The serum containing Buzhong Yiqi Decoction was prepared and A549 cells and A549/DDP cells were cultured. They were randomly divided into group A (A549 cells), Group B (A549 cells +20 μg/mL cisplatin), group C (A549 cells +20 μg/mL cisplatin +10% Buzhong Yiqi Decoction-containing serum), group D (A549/DDP cells), group E (A549/DDP cells +20 μg/mL cisplatin) and group F (A549/DDP cells +20 μg/mL cisplatin +10% Buzhong Yiqi Decoction-containing serum). Half inhibitory concentration of cisplatin (IC_{50}) was detected by CCK-8 method, and reactive oxygen species (ROS) were detected by DCFH-DA fluorescent probe method. The protein expression levels of Nrf2, P-Nrf2, PERK, P-PERK, eIF2α, P-eIF2α, IRE1 and XBP1 were detected by Western blot. *Result* In both A549 cells and A549/DDP cells, Buzhong Yiqi Decoction significantly decreased the IC_{50} value of cisplatin ($P<0.05$). In both cells, cisplatin could up-regulate the protein expressions of Nrf2 and P-Nrf2, and after the intervention of Buzhong Yiqi Decoction, the expression levels of both were down-regulated ($P<0.05$) in A549/DDP cells compared with those in A549 cells ($P<0.05$). Compared with the blank group, cisplatin could up-regulate the ROS expression of the two cells ($P<0.05$), the ROS expression was further up-regulated after combined with Buzhong Yiqi Decoction ($P<0.05$), and the ROS expression level of A549 cells was significantly higher than that of A549/DDP cells ($P<0.05$). There were no significant differences in the expressions of PERK and eIF2α among all groups ($P>0.05$). Cisplatin significantly up-regulated the protein expressions of P-PERK, P-eIF2α, IRE1 and XBP1 in the two cell lines, and the expression was up-regulated again after the intervention of Buzhong Yiqi Decoction ($P<0.05$), and the expression of ER stress protein in A549 cells was higher than that in A549/DDP cells ($P<0.05$). *Conclusion* Buzhong Yiqi Decoction may improve cisplatin resistance of A549 cells and A549/DDP cells by regulating ERS through Nrf2/ROS signal pathway.

Keywords: Buzhong Yiqi Decoction(补中益气汤); non-small cell lung cancer; Nrf2/ROS; endoplasmic reticulum stress; cisplatin resistance

恶性肿瘤全球发病率极高,其中肺癌的死亡率居恶性肿瘤首位[1],其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)可占总发病率的近 80%[2]。因其早期几乎无症状,多在中晚期发现并易发生转移,手术治疗难度较大、预后较差,因此以铂类药物为主的化疗成为其最主要的疗法[3]。但长期化疗易导致患者出现耐药性,并出现恶心、呕吐、食欲减退等消化道症状,化疗效果受限,患者生存质量不佳[4],因此改善 NSCLC 的化疗耐药性具有重要的研究意义。

补中益气汤是培土生金法的代表方剂,在现代肿瘤治疗中取得了较好的疗效[5],如补中益气汤可以通过下调蛋白激酶 B(AKT)抑制磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)/AKT 信号通路,从而改善肺癌顺铂耐药性[6]。Kelch 样 ECH 相关蛋白 1(Keap1)/核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)/抗氧化反应元件(ARE)信号通路以 Nrf2 分子为核心,有较强的抗氧化应激作用,有研究表明该通路能够参与多种肿瘤化疗耐药性的改善[7]。糖原合成酶激酶-3β(GSK-3β)是 PI3K/AKT 通路主要下游分子,与 NSCLC 的顺铂耐药密切相关,GSK-3β 通过将 Nrf2 的 ser338 磷酸化,促进 Nrf2 泛素化降解,从而参与调控 Nrf2[8-9]。既然 PI3K/AKT/GSK-3β 信号通路对 NSCLC 耐药有显著调控作用,Nrf2 又处于 PI3K/AKT/GSK-3β 信号通路的下游并受其调控,且补中益气汤对于 PI3K/AKT/GSK-3β 信号通路有明显的干预作用,基于此,本研究假设补中益气汤可能通过调控 Nrf2 改善 NSCLC 顺铂耐药性。

1 材料

1.1 *细胞株及动物* 健康雄性 SD 大鼠 30 只,SPF 级,体质量 190~230 g,由辽宁中医药大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(辽)2020-0001,已获得辽宁中医药大学医学与动物伦理审查委员会审查批准(批准号 No. 210726221100791635)。人肺腺癌细胞 A549 细胞、人肺腺癌顺铂耐药细胞 A549/DDP 细胞株均购自中国医科院肿瘤研究中心细胞库。

1.2 *试剂* 胎牛血清(美国 CLARK 公司,批号 FB15015);细胞增殖与活性检测法(CCK-8)试剂盒、特超敏 ECL 发光试剂盒(Biosharp 公司,批号分别为 BS350B、BL520A);SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒(上海雅酶公司,批号 PG110);全蛋白提

取试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒、山羊抗兔 IgG - HRP(沈阳万类生物科技有限公司,批号分别为 WLA013、WLA019、WLA023);DMEM F12 培养液、磷酸盐缓冲液(PBS)、活性氧(ROS)检测试剂盒(大连美仑公司,批号分别为 MA0214、MA0015、MA0219);Nrf2 一抗、P - Nrf2 一抗、PERK 一抗、P - PERK 一抗、eIF2α 一抗、P - eIF2α 一抗、IRE1 一抗、XBP1 一抗、GAPDH 一抗(美国 Affinity 公司,批号分别为 AF0639、DF7519、AF5304、DF7576、AF6087、AF3087、DF7709、AF5110、AF7021)。

1.3 仪器 Multiskan FC 型酶标仪、HERA CELL 150i 型 CO2 培养箱(美国 THERMO 公司);DFC450 型倒置生物显微镜(德国 Leica 公司);EPS600 型电泳仪、5200 型凝胶成像系统(上海天能公司);1658001 型垂直电泳槽、170 - 3932 型转移电泳槽(美国 Bio - Rad 公司);Observer. A1 型倒置荧光显微镜(德国 ZEISS 公司)。

2 方法

2.1 含药血清的制备 补中益气汤由下述药物组成:黄芪 18 g(货号 2111251),甘草 9 g(货号 2102261),人参 6 g(货号 2111091),当归 3 g(货号 2201072),橘皮 6 g(货号 2111203),升麻 6 g(货号 2011091),柴胡 6 g(货号 2110093),白术 9 g(货号 2110122),购自辽宁中医药大学附属医院药房,饮片由辽宁中医药大学中药教研室任艳玲教授鉴定为正品,按照"人和动物之间按体表面积折算的等效剂量比值表"计算等效剂量,人与大鼠之间的折算系数为 W = 6.25,根据课题组前期实验成果选择成人正常日用量为最佳剂量,常规煎药并煎煮浓缩为 1.313 g/mL,室温冷却后置于 4 ℃保存。大鼠灌胃补中益气汤 1 mL/d,每天灌胃 1 次,连续灌胃 7 d,末次灌胃 1 h 后,麻醉大鼠于腹主动脉采血,无菌管静置 30 min 后 2000 r/min 速率离心 10 min,取上清,56 ℃恒温水浴箱静置 30 min 以灭活,0.22 μm 微孔滤器滤过除菌,-20 ℃冰箱保存备用。

2.2 细胞培养 取处于对数生长期 A549 细胞、A549/DDP 细胞,常规培养,消化时弃培养液并 PBS 洗涤 1 ~ 2 次,加入 0.25% 胰酶 1 mL,消化 2 ~ 3 min(肉眼可见针孔样缝隙,光学显微镜下见细胞钝圆或有流动感),即可终止消化。加入完全培养基 5 mL(含 10% 胎牛血清),轻轻吹打使其完全离壁并均匀悬浮,分装入 2 个培养瓶,传代继续培养。将培养的 A549 细胞、A549/DDP 细胞按后续实验需求随机分组。

2.3 分组及给药 将 A549 细胞和 A549/DDP 细胞各随机分为 3 组:A 组(A549 细胞)、B 组(A549 细胞 + 20 μg/mL 顺铂)、C 组(A549 细胞 + 20 μg/mL 顺铂 + 10% 补中益气汤含药血清)、D 组(A549/DDP 细胞)、E 组(A549/DDP 细胞 + 20 μg/mL 顺铂)、F 组(A549/DDP 细胞 + 20 μg/mL 顺铂 + 10% 补中益气汤含药血清)。

2.4 CCK - 8 法检测 IC50 调节细胞密度为 5×10^4 个/mL,每组设置 5 个复孔。加药后孵育 48 h,去除原培养基,按照每 100 μL 培养条件体积加入 CCK - 8 溶液 10 μL,避光孵育 1 ~ 4 h,用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度 A,计算 A549/DDP 细胞的半数抑制浓度(IC50)。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组 Nrf2、P - Nrf2、内质网应激相关蛋白表达 取各组细胞,弃去原培养基后用 4 ℃预冷的 PBS 洗涤细胞 3 次,将 Lysis Buffer - PMSF 按照 100 ∶ 1 混匀,置于冰上裂解 30 min,期间多次刮动细胞。BCA 试剂盒测定蛋白浓度,制备蛋白质电泳样品,并上样。经 SDS - PAGE 凝胶电泳、转膜、5% 的脱脂奶粉封闭 1.5 h 后,加入 Nrf2、P - Nrf2、PERK、P - PERK、eIF2α、P - eIF2α、IRE1、XBP1、GAPDH 一抗(1 ∶ 1000);4 ℃摇床孵育过夜,TBST 洗涤后加入山羊抗兔 IgG - HRP(1 ∶ 5000),室温摇床孵育 2 h,洗涤条带后于暗室内滴加 ECL 发光液,测定条带灰度值。

2.6 DCFH - DA 荧光探针法检测各组 ROS 表达 5×10^4 个细胞接种于 6 孔板中,给药 48 h,按照 1 ∶ 1000 的比例用无血清培养液稀释 DCFH - DA 荧光探针,使其终浓度为 10 μmol · L^{-1},每孔加入工作液 1 mL,避光孵育 20 ~ 30 min,用无血清的培养液洗涤细胞,加入抗荧光淬灭封片剂防淬灭,倒置荧光显微镜观察并拍照。

2.7 统计学分析 使用 SPSS 26.0 统计学软件对实验数据进行分析,以"均数 ± 标准差"表示各个计量资料,经方差齐性检验,采用单因素方差分析进行多组间比较,若方差齐,组间两两比较采用最小显著性差异法(LSD)检验,若方差不齐则采用 Dunnett T3 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 补中益气汤对各组细胞顺铂 IC50 值的影响 如表 1 所示,在 A549 细胞与 A549/DDP 细胞中,补中益气汤含药血清均能显著下调细胞对顺铂的 IC50 值($P < 0.05$),在两株细胞之间,A549/DDP 细胞的顺铂 IC50 值在补中益气汤含药血清干预前后均显著高于 A549 细胞($P < 0.05$)。

表 1 补中益气汤对各组细胞顺铂 IC50 值的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IC50/(μg/mL)
A 组(A549 细胞 + 顺铂)	3	13.97 ± 0.64
B 组(A549 细胞 + 顺铂 + 补中益气汤)	3	9.63 ± 0.81 *
C 组(A549/DDP 细胞 + 顺铂)	3	18.03 ± 0.40 *
D 组(A549/DDP 细胞 + 顺铂 + 补中益气汤)	3	13.39 ± 1.91 #&

注:* 与 A 组比较,$P < 0.05$;# 与 B 组比较,$P < 0.05$;& 与 C 组比较,$P < 0.05$。

3.2 补中益气汤对各组细胞 Nrf2、P - Nrf2 表达的影响 如表 2、图 1 所示,在 A549 细胞与 A549/DDP 细胞中,顺铂可以显著上调两株细胞的 Nrf2、P - Nrf2 蛋白表达($P < 0.05$),在补中益气汤干预之后,两株细胞的 Nrf2、P - Nrf2 蛋白表达均显著下调($P < 0.05$),其中 A549/DDP 细胞的 Nrf2、P - Nrf2 蛋白表达在同样干预因素下均高于 A549 细胞的 Nrf2、P - Nrf2 蛋白表达($P < 0.05$)。

3.3 补中益气汤对各组细胞 ROS 表达量的影响 如表 3、插页 XXXIV 图 2 所示,在 A549 细胞和 A549/DDP 细胞中,ROS 表达量在顺铂和补中益气汤干预下均显著上调,以顺铂联合补中益气汤组效果最为显著($P < 0.05$)。在两株细胞之间,顺铂和补中益气汤干预前后,A549 细胞的 ROS 表达量均要显著高于 A549/DDP 的 ROS 表达量($P < 0.05$)。

表 2 补中益气汤对各组细胞 Nrf2、P－Nrf2 蛋白相对表达量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Nrf2 相对表达量	P－Nrf2 相对表达量
A 组(A549 细胞)	3	1.00	1.00
B 组(A549 细胞＋顺铂)	3	2.57±0.22*	3.82±0.20*
C 组(A549 细胞＋顺铂＋补中益气汤)	3	1.71±0.16*#	2.44±0.07*#
D 组(A549/DDP 细胞)	3	2.10±0.09*	2.50±0.07*
E 组(A549/DDP 细胞＋顺铂)	3	6.44±0.21#&	6.88±0.21#&
F 组(A549/DDP 细胞＋顺铂＋补中益气汤)	3	4.63±0.08%△	2.93±0.13%△

注：* 与 A 组比较，$P<0.05$；# 与 B 组比较，$P<0.05$；% 与 C 组比较，$P<0.05$；& 与 D 组比较，$P<0.05$；△ 与 E 组比较，$P<0.05$。

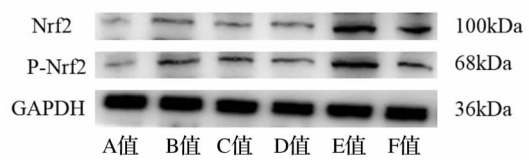


图 1 各组细胞 Nrf2、P－Nrf2 表达量

表 3 补中益气汤对各组细胞 ROS 表达水平的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ROS 水平/荧光强度
A 组(A549 细胞)	3	4.25±0.03
B 组(A549 细胞＋顺铂)	3	29.24±0.43*
C 组(A549 细胞＋顺铂＋补中益气汤)	3	56.67±2.45*#
D 组(A549/DDP 细胞)	3	2.30±0.19*
E 组(A549/DDP 细胞＋顺铂)	3	24.17±1.10#&
F 组(A549/DDP 细胞＋顺铂＋补中益气汤)	3	34.62±0.55%△

注：* 与 A 组比较，$P<0.05$；# 与 B 组比较，$P<0.05$；% 与 C 组比较，$P<0.05$；& 与 D 组比较，$P<0.05$；△ 与 E 组比较，$P<0.05$。

3.4 补中益气汤对各组细胞内质网应激蛋白表达的影响 如表 4、图 3 所示，在 A549 细胞和 A549/DDP 细胞中，PERK、eIF2α 的蛋白表达无显著变化($P>0.05$)，但其磷酸化后变化明显。在两株细胞中，顺铂能显著上调 P－PERK、P－eIF2α、IRE1、XBP1 的蛋白表达，在补中益气汤干预后表达再次上调($P<0.05$)，其中 A549 细胞的内质网应激蛋白表达要显著高于 A549/DDP 细胞($P<0.05$)。

4 讨论

肺癌化疗患者常出现咳嗽、咯血、面色萎黄、恶心呕吐、乏力等症状[10]，此属肺脾气虚之证，宜采用补脾益肺、培土生金之法。补中益气汤出自李东垣所著《内外伤辨惑论》，为培土生金法的代表方剂，方中黄芪有补中益气之效，人参、白术、炙甘草补气健脾，当归养血和营，陈皮理气和胃，柴胡、升麻入肺经，升举清阳为使。多药齐用，共奏补中益气、升阳举陷之效。

Nrf2 是机体经典的抗氧化应激元件，与肿瘤细胞耐药有着密切的关系[11－12]。Nrf2 的活化依赖于上游 Keap1 分子的调控，Keap1 与 E3 泛素连接酶共同维持 Nrf2 的基础稳定水平，当细胞受到氧化应激等刺激之时，Nrf2 与 Keap1 发生解离并转位到细胞核，与 ARE 结合，进而活化下游一系列抗氧化酶的表达[13]。ROS 是氧的正常代谢的天然副产物，并被证实参与多种恶性肿瘤的发生发展[14]，当 ROS 过量产生、蓄积时，机体的氧化还原稳态被破坏，从而诱发细胞死亡[15]，作为抗氧化反应的主要调节器，活化的 Nrf2 可以激活下游抗氧化酶从而降低细胞内的 ROS 水平，这便是 Nrf2/ROS 通路。

内质网是蛋白质合成、折叠、加工的重要场所，蛋白质折叠和分泌受损导致的未折叠或错误折叠蛋白在内质网内积累，称为内质网应激(ERS)。内质网跨膜蛋白肌醇需求酶 1(IRE1)、蛋白激酶 R 样内质网激酶(PERK)和活化转录因子 6(ATF6)所分别介导的三条通路在缓解 ERS、维持细胞稳态中起到了重要作用[16－17]。其中 IRE1 活化后可靶向下游蛋白 XBP1，PERK 则可靶向 eIF2α，与 ATF6 同样激活下游 CHOP 的表达[18－20]。此三种反应元件在通常情况下通过与葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)结合保持非激活状态，但肿瘤细胞中往往有大量的未折叠蛋白和错误折叠蛋白积累，从而激活这三条通路，但当过度激活的 ERS 会超过肿瘤细胞的防御能力，诱导肿瘤细胞死亡，从而参与肿瘤耐药性的调控[21－22]。而内质网的正常生理功能受到细胞氧化还原状态的调节，当细胞内 ROS 过量蓄积，超过细胞的抗氧化系统的防御能力则会刺激 ERS 的发生[23－24]。Nrf2 是重要的抗氧化应激分子，其活化可抑制 ROS 的生成，反之则 ROS 蓄积，进而攻击内质网，使得 ERS 发生，Ca^{2+} 释放入胞浆之中，刺激线粒体产生更多的 ROS[25－26]。基于此，若 Nrf2 受抑，ROS 蓄积，则 ERS 发生，持续过量的 ERS 则会导致细胞死亡，则肿瘤耐药性改善。

在本研究中，在 A549 细胞和 A549/DDP 细胞中，其对顺铂的 IC50 值均在补中益气汤的影响下显著下调，说明补中益气汤可以改善两株细胞对顺铂的耐药性。对 Nrf2、P－Nrf2 的检测结果显示，与空白组比较，顺铂可以上调两株细胞的 Nrf2、P－Nrf2 蛋白表达量，这可能与顺铂刺激了细胞的抗氧化应激能力相关，在联合了补中益气汤之后，Nrf2、P－Nrf2 蛋白表达量显著下调，且在各种干预条件下，A549/DDP 细胞的 Nrf2、P－Nrf2 蛋白表达量要显著高于 A549 细胞，这可能是耐药细胞株具有更强的抗氧化应激能力。ROS 的检测结果显示，在两株细胞中，顺铂组 ROS 表达量均较空白组升高，在补中益气汤干预之后，ROS表达量进一步升高，且A549细胞的ROS表

表 4 补中益气汤对各组细胞内质网应激蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PERK	P－PERK	eIF2α	P－eIF2α	IRE1	XBP1
A 组(A549 细胞)	3	1	1	1	1	1	1
B 组(A549 细胞＋顺铂)	3	0.98±0.01	2.94±0.05*	0.85±0.04	2.38±0.12*	1.48±0.05*	1.50±0.13*
C 组(A549 细胞＋顺铂＋补中益气汤)	3	1.05±0.02	5.64±0.21*#	0.85±0.01	7.06±0.31*#	2.55±0.18*#	3.17±0.21*#
D 组(A549/DDP 细胞)	3	0.99±0.05	0.56±0.06*	0.83±0.02	0.63±0.03*	0.26±0.01*	0.44±0.05*
E 组(A549/DDP 细胞＋顺铂)	3	1.07±0.04	0.86±0.07#&	0.92±0.03	1.21±0.04#&	0.79±0.02#&	1.24±0.10#&
F 组(A549/DDP 细胞＋顺铂＋补中益气汤)	3	1.15±0.06	2.29±0.04%△	0.98±0.02	3.13±0.14%△	1.56±0.06%△	2.02±0.22%△

注：* 与 A 组比较，$P<0.05$；# 与 B 组比较，$P<0.05$；% 与 C 组比较，$P<0.05$；& 与 D 组比较，$P<0.05$；△ 与 E 组比较，$P<0.05$。

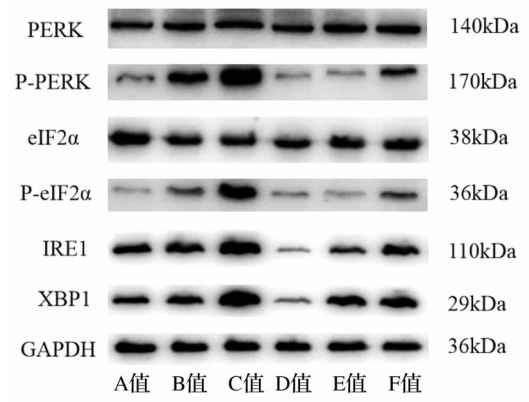


图 3 各组细胞内质网应激蛋白表达

达量要显著高于 A549/DDP 细胞。对内质网应激相关蛋白的检测结果显示,顺铂均可以显著上调内质网应激指标 P-PERK、P-eIF2α、IRE1、XBP1 的表达,在联合了补中益气汤之后,内质网应激指标进一步上调,且 A549 细胞的内质网应激蛋白表达量要高于 A549/DDP 细胞,但 PERK、eIF2α 的蛋白表达量在各组之间无显著变化,这可能与 PERK、eIF2α 的活化具有可逆性相关。

综上所述,补中益气汤可以通过抑制 Nrf2/ROS 通路,刺激内质网应激的发生,从而改善 NSCLC 的顺铂耐药性。但其在内质网应激发生后,细胞是否发生凋亡及自噬等改变,本实验并未阐明,其相关机制仍值得进一步研究,这将为培土生金法改善 NSCLC 顺铂耐药提供更有力的实验支持。

参考文献

[1] 许靖,余欣,马洪涛,等. 2006—2020 年中国肺癌死亡趋势分析——基于年龄-时期-队列模型[J]. 肿瘤防治研究,2023,50(8):788-793.

[2] SUNG H,FERLAY J, SIEGEL R L,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.

[3] 徐京燕,毛丽斯,王国洪,等. 沙参麦冬汤加减对中晚期气阴两虚证非小细胞肺癌化疗患者免疫功能及生存质量的影响[J]. 中国中医药科技,2023,30(6):1131-1133.

[4] 闫相涛,王慧娟,李鹏,等. 老年晚期非小细胞肺癌患者二线铂类联合方案和单药方案疗效的对比研究[J]. 中华老年医学杂志,2019,38(3):242-245.

[5] 热娜古丽·艾则孜,付艳丽,何娜娜,等. 补中益气汤对中晚期恶性肿瘤患者化疗后不良反应的影响[J]. 河南中医,2023,43(2):238-241.

[6] 刘亚莉,易佳丽,王莹,等. 补中益气汤含药血清对 A549/DDP 细胞 PI3K/AKT 信号转导通路影响的实验研究[J]. 中国医科大学学报,2014,43(1):14-18.

[7] 胡舒宁,邹心如,方译萱,等. Nrf2 与铁死亡在肿瘤耐药中的研究进展[J]. 中国肺癌杂志,2023,26(10):765-773.

[8] 穆春青,周磊,赵楠,等. 二甲双胍通过 PI3K/AKT/GSK3β 信号通路对肺癌 A549 细胞增殖的影响[J]. 吉林大学学报(医学版),2021,47(3):637-643.

[9] DUAN J,CUI J,YANG Z,et al. Neuroprotective effect of Apelin 13 on ischemic stroke by activating AMPK/GSK-3β/Nrf2 signaling[J]. J Neuroinflammation,2019,16(1):24-29.

[10] 刘峥,孟德瑜. 加味贞芪扶正方辅治气阴两虚型晚期肺癌化疗后癌因性疲乏临床观察[J]. 实用中医药杂志,2023,39(7):1361-1364.

[11] 孙颖,王文淼,谭文彬,等. Nrf2/ARE 通路与肿瘤耐药性的研究进展[J]. 肿瘤,2019,39(7):582-588.

[12] 肖若曦,王莎莎,丁爱萍,等. Nrf2 在肿瘤发生发展中的"双刃剑"作用[J]. 现代肿瘤医学,2021,29(18):3308-3311.

[13] LIU S, PI J, ZHANG Q. Signal amplification in the KEAP1-NRF2-ARE antioxidant response pathway[J]. Redox Biol,2022,54:102389.

[14] 梁润森,严逸非,陈家辉,等. 活性氧的抗肿瘤作用机制及其在肿瘤治疗中的应用[J]. 生命的化学,2023,43(4):501-509.

[15] 赵冰洁,车虹,胡琏,等. β-谷甾醇通过诱导 ROS 累积造成氧化应激抑制 K562/ADR 细胞增殖并促进凋亡和分化[J]. 现代肿瘤医学,2024,32(4):641-645.

[16] LIU J T,FAN L L,YU H Q,et al. Endoplasmic reticulum stress causes liver cancer cells to release exosomal miR-23a-3p and up-regulate programmed death ligand 1 expression in macrophages[J]. Hepatology,2019,70(1):241-258.

[17] EUGENE S P,REDDY V S,TRINATH J. Endoplasmic reticulum stress and intestinal inflammation: a perilous union[J]. Front Immunol,2020,11:543022.

[18] BAREZ S R,ATAR A M,AGHAEI M. Mechanism of inositol-requiring enzyme 1-alpha inhibition in endoplasmic reticulum stress and apoptosis in ovarian cancer cells[J]. J Cell Commun Signal,2020,14(4):403-415.

[19] 娄莹莹,李佃贵,杨倩,等. 基于 PERK/eIF2α/ATF4/CHOP 信号通路探讨化浊解毒消痈方对溃疡性结肠炎小鼠结肠黏膜的保护作用[J]. 中成药,2023,45(10):3415-3419.

[20] BU L J,YU H Q,FAN L L,et al. Melatonin,a novel selective ATF-6 inhibitor,induces human hepatoma cell apoptosis through COX-2 downregulation[J]. World J Gastroentero,2017,23(6):986-998.

[21] 王安琪,孙国平. 内质网应激在抗肿瘤治疗中的作用及研究进展[J]. 中国药理学通报,2021,37(12):1643-1647.

[22] 颜媛媛,何苗,魏敏杰. 内质网应激与肿瘤细胞耐药的相关机制[J]. 中国药理学通报,2015,31(4):461-464.

[23] ZHOU Y,SHU F,LIANG X,et al. Ampelopsin induces cell growth inhibition and apoptosis in breast cancer cells through ROS generation and endoplasmic reticulum stress pathway[J]. Plos One,2014,9(2):e89021.

[24] 王晓燕,张曦文,李卫东,等. 基于 PI3K/AKT/mTOR 信号通路探讨中医药通过活性氧介导的内质网应激调控细胞自噬和凋亡抑制结肠癌转移的研究概况[J]. 中华中医药学刊,2019,37(1):40-44.

[25] 王筠,刘畅,姜丁文,等. 氧化应激和内质网应激在高糖诱导大鼠心肌细胞凋亡中的关系[J]. 中国医学工程,2011,19(1):37-38.

[26] 张岩,龙泓竹,王曦鹏,等. 黄芪桂枝五物汤加减对糖尿病大鼠坐骨神经内质网应激 IRE1α/CHOP 通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2023,29(16):43-51.

补中益气汤通过 Nrf2/ROS 通路调控内质网应激改善 A549 细胞、A549/DDP 细胞顺铂耐药的分子机制

（正文见 170－174 页）

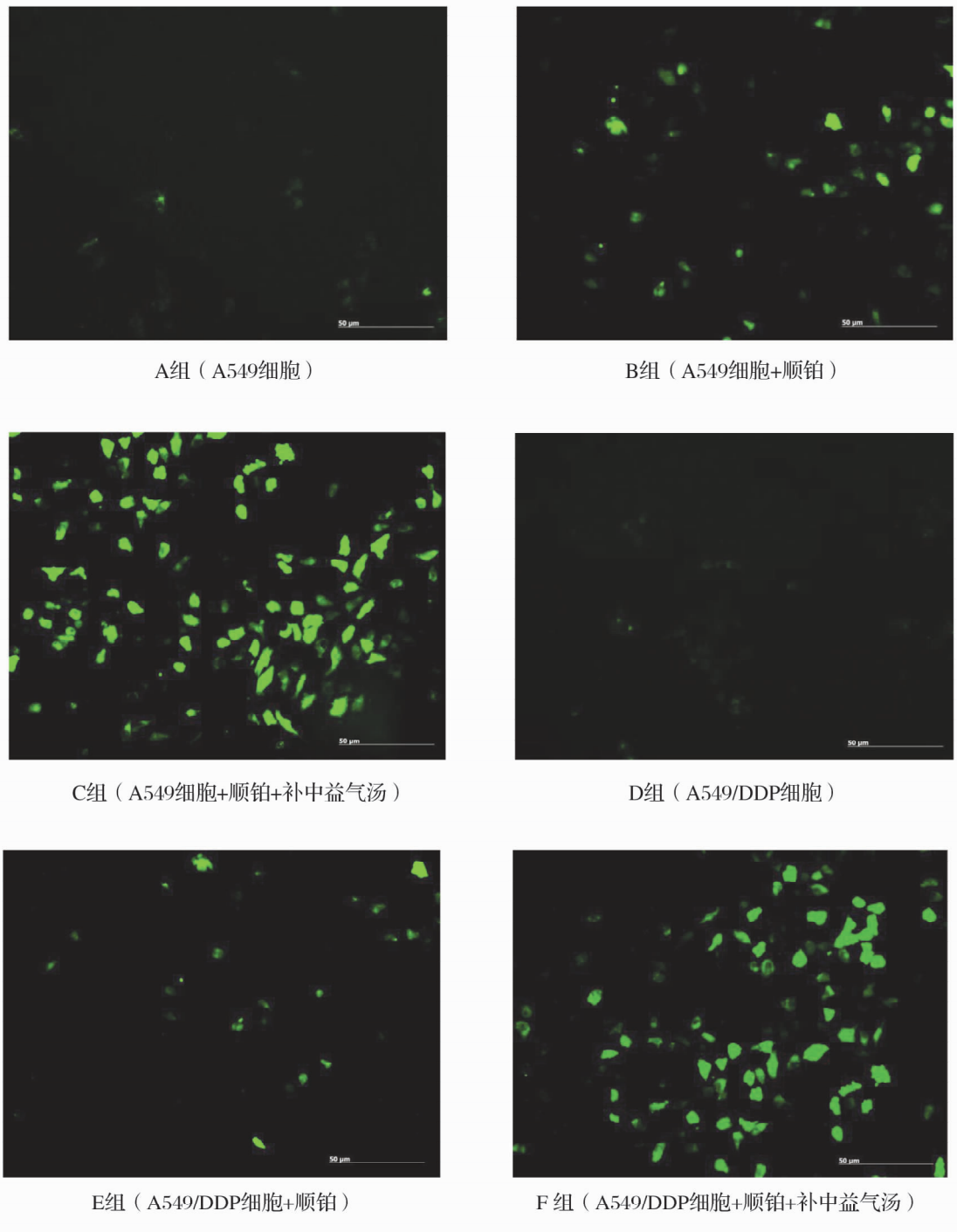


图 2　补中益气汤各组细胞 ROS 表达情况影响