·实验研究·

化瘀解毒方通过JAK/STAT通路抑制肺癌增殖的机制研究

郑芮[1]，魏征[2,3,4]，张俊萍[2]，晁瑞[1]，蔡小平[2*]

（1. 河南中医药大学第二临床医学院，河南 郑州 450046；2. 河南省中西医结合医院，河南 郑州 450004；3. 河南中医药大学，河南 郑州 450046；4. 河南中医药大学第一附属医院，河南 郑州 450099）

摘要　目的：基于JAK/STAT信号通路探讨化瘀解毒方抑制肺癌增殖的作用机制。方法：将32只C57BL/6J小鼠按随机数字表法分为4组，溶剂对照组、化瘀解毒方高剂量组、化瘀解毒方中剂量组和环磷酰胺组，每组8只。于小鼠右前肢腋下皮下注射0.5 mL（含细胞数1×10^7个/mL）Lewis细胞悬液复制肺癌动物模型。化瘀解毒方中、高剂量组分别按照15 g·kg^{-1}·d^{-1}、30 g·kg^{-1}·d^{-1}剂量口服灌胃化瘀解毒方水煎剂，1次/d，环磷酰胺组按5 mg/mL腹腔注射环磷酰胺溶液，2次/周。各组均连续治疗8 d。第8天称量小鼠体质量、测量小鼠移植瘤体积后处死小鼠，并取出瘤体称重，计算相对肿瘤体积（RIV）、相对肿瘤增殖率（TIC）和肿瘤抑制百分率（IR）并进行统计学检验。实时荧光定量聚合酶链式反应（RT-PCR）法检测小鼠肿瘤组织中Janus蛋白酪氨酸激酶2（JAK2）、信号转导及转录激活因子3（STAT3）、信号转导及转录激活因子5（STAT5）和细胞凋亡调节因子（Bax）mRNA表达水平；免疫组化法（IHC）、蛋白免疫印迹法（Western blot）检测瘤体组织中JAK2、P-JAK2、STAT3、P-STAT3、STAT5、P-STAT5和Bax蛋白含量。结果：通过对荷瘤小鼠体质量的观察发现，与溶剂对照组相比，化瘀解毒方对小鼠体质量无影响（$P>0.05$），而环磷酰胺组显著降低小鼠体质量（$P<0.05$），说明化瘀解毒方提取物存在较低的毒性；化瘀解毒方各剂量组小鼠肿瘤体积、肿瘤质量下降（$P<0.05$）；根据RT-qPCR结果显示，化瘀解毒方不影响JAK2、STAT3、STAT5和Bax的mRNA水平（$P>0.05$）；免疫组织化学（IHC）和蛋白免疫印迹法（Western blot）检测结果发现，与溶剂对照组相比，化瘀解毒方不同剂量组可以抑制P-JAK2、P-STAT3、P-STAT5的表达（$P<0.05$，$P<0.01$），并促进Bax蛋白的表达（$P<0.05$，$P<0.01$），从而促进肺癌细胞的凋亡。结论：化瘀解毒方可能通过下调JAK-STAT信号通路相关蛋白磷酸化水平，从而抑制肺癌细胞的增殖。

关键词　化瘀解毒方；肺癌；抗肿瘤；JAK-STAT信号通路；荷瘤小鼠模型

中图分类号：R285.5　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1002-2392（2025）06-0012-09

DOI：10.19664/j.cnki.1002-2392.250111

2024年美国癌症学会最新数据显示，肺癌是目前发病率最高的恶性肿瘤[1]。其中，非小细胞肺癌（NSCLC）占80%～85%[2]，肺腺癌是最常见的NSCLC类型，具有肿瘤倍增时间短，转移出现早，生存率低的特点[3]。由于本病临床症状不明显，就诊时多为晚期，对于不能手术及晚期肺癌患者，铂类化疗为一线治疗[4]，然而，铂类药物具有广泛的肝肾毒性、胃肠的反应以及神经毒性[5]，化疗反应率也仅在15%～30%，故晚期肺癌患者的生存率很低，25%～30%的患者生存期少于3个月[6]。随着化疗药物的不断深入研究，临床上使用靶向药物时间久的患者，耐药与毒副反应更加明显，降低了患者的生存质量。有研究证明，中药

收稿日期：2024-05-20　　**修回日期**：2024-12-03

基金项目：国家自然科学基金项目（82305349）；河南省中医药科学研究专项课题（20-21ZYZD19&31）；河南省中医药管理局拔尖人才项目（2022ZYBJ27）；国家中医药管理局第七批全国老中医药专家学术经验继承工作项目（国中医药人教函〔2022〕76号）

作者简介：郑芮（1996-），女，硕士研究生，从事中医药防治恶性肿瘤的临床和基础研究。

*通信作者：蔡小平（1964-），男，硕士，主任医师，硕士生导师，从事中医药防治恶性肿瘤的临床和基础研究。

或复方辅助放化疗治疗 NSCLC 具有协同增效、增强患者放化疗耐受等作用[7]。

Janus 蛋白酪氨酸激酶(JAK)/信号转导及转录激活因子(STAT)信号通路广泛存在于多种组织和细胞中,参与细胞生长、凋亡,并参与调节免疫和炎症反应[8-9]。研究表明[10],JAK/STAT 信号通路过度激活会促进炎症性疾病、淋巴瘤、白血病及实体肿瘤的发生发展,JAK2 /STAT3 信号通路属于细胞间信号传导通路 JAK/STAT 家族,JAK2 是一种非跨膜型、非受体型蛋白酪氨酸激酶,是两面神激酶(Janus kinase,JAK)中的一种,其功能具有两面性,能催化与其相连的细胞因子受体发生酪氨酸磷酸化,还能催化 STATs 蛋白磷酸化并使其激活[11-12]。STAT 是一组 DNA 结合蛋白,研究显示,STAT3、STAT5 在多种肿瘤组织中异常表达,与肿瘤细胞的形成和发展等密切相关[13-14]。

蔡小平教授是第七批全国老中医药专家学术经验继承工作指导老师,从事临床工作 40 余年,有着丰富的临床经验,擅长使用中医药治疗恶性肿瘤,并提出“瘀毒理论”[15]。化瘀解毒法为蔡小平教授“瘀毒理论”发展而来的临床治疗方法,蔡师认为应以解毒散结作为癌症治疗过程的总治则。化瘀解毒方(Huayu-Jiedu Formula,HJF)由全蝎、壁虎、三七、半枝莲、广木香 5 种药材组成,在多年的临床实践中证明具有良好的抗肿瘤疗效。课题组前期实验证明[16],化瘀解毒方含药血清对肺癌细胞存活具有抑制作用,并且呈一定的浓度依赖性。同时化瘀解毒方含药血清可以抑制肺癌细胞的侵袭和转移。通过对晚期非小细胞肺癌的临床治疗观察发现,使用化瘀解毒方的患者相较于化疗组,其不良反应明显较小,临床症状得到了显著改善,表明化瘀解毒方作为辅助手段,在患者的治疗过程中起到减毒增效的作用[17]。在此基础上,本研究以 Lewis 肺癌小鼠为模型,观察其治疗肺癌的疗效,探讨 HJF 通过调节 JAK-STAT 信号通路的相关蛋白表达,对肺癌荷瘤小鼠瘤体组织进行检测,明确其作用机制,以期为 HJF 治疗非小细胞肺癌的基础研究及临床防治提供实验依据。

1 材料

1.1 动物和细胞

SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠 32 只,6~8 周龄,体质量(23±2)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司湖北分公司,实验动物生产许可证号:SCXK(鄂)2022-0030。所有小鼠饲养于河南省中西医结合医院实验动物中心,许可证号:SYXK(豫)2019-0001,在室温(23±2)℃,湿度 40%~70%,12 h 光照和 12 h 黑暗标准光照周期中常规喂养。Lewis 小鼠肺癌细胞购自中科院上海细胞库。

1.2 药物

化瘀解毒方药物组方:全蝎 6 g,壁虎 6 g,三七 20 g,半枝莲 32 g,广木香 15 g,中药配方颗粒购自河南聚仁中药饮片有限公司。经鉴定,符合 2020 年版《中华人民共和国药典》相关要求。中药配方颗粒加 8 倍量水进行回流提取,提取 2 次,合并提取液,旋转蒸发仪浓缩,烘箱烘干至浸膏状,冷冻干燥机进行冻干处理,得粉末,上述粉末粉碎过 100 目筛,细粉称重。

1.3 主要试剂

环磷酰胺(德国 Baxter Oncology GmbH);RNA 提取试剂盒(德国 Qiagen 公司,批号 74204);逆转录试剂盒(Takara);JAK2 抗体(Cell Signaling,批号:3230);P-JAK2 抗体、STAT3 抗体、P-STAT3 抗体、STAT5 抗体、P-STAT5 抗体和 Bax 抗体(abcam,批号分别为 ab32101、ab68153、ab76315、ab194898、ab32364、ab196495);HiScript II Q RT SuperMix for qPCR 预混液、ChamQ™ SYBR Color Qpcr Master Mix 预混液(南京诺唯赞公司);4×Tris-HCl(1.5 mol/L,pH 8.8,上海生工生物工程有限公司);BCA 蛋白定量试剂盒(Thermo);SDS(Bio-Rad 公司)。

1.4 主要仪器

实时定量 PCR 扩增仪(ABI);数码相机(佳能 505D);SC-DC-1200AS 电子天平(南京苏测);电子数显卡尺(无锡凯保鼎工具有限公司);涡旋振荡仪(海门市其林贝尔仪器制造公司,型号:QL-861);移液器(德国 Eppendorf);台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验仪器公司,型号:H1650R);台式低速离心机(湖南凯达实业公司,型号:TD-5A);蛋白电泳仪、转膜仪(美国 Bio-Rad 公司,型号:164-5070、Mini Trans-Blot 17);酶标仪(美国赛默飞公司,型号:MuLTISKAN FC)。

2 方法

2.1 药物配置

将化瘀解毒方用蒸馏水配制成含生药浓度 1 g·mL^{-1}的溶液,现配现用;环磷酰胺用生理盐水配置成浓度为 5 mg·mL^{-1}注射液,存放于 4 ℃冰箱备用。

2.2 细胞培养

采用 DMEM 完全培养基(含 100 U·mL^{-1}青霉素、100 μg·mL^{-1}链霉素、10% 胎牛血清)在细胞培养箱中培养(培养条件为 5% CO_2、37 ℃)。Lewis 细胞每 3 d 传代 1 次,所有实验均选择对数生长期的细胞进行。

2.3 模型制备

32 只小鼠适应性喂养 2 周，Lewis 细胞消化重悬后制备成浓度为 1×10^7 个/mL 的单细胞悬液，在超净台内分别对 32 只小鼠右前肢腋下注射 0.5 mL 单细胞悬液，构建 Lewis 肺癌小鼠模型。接种 7 d 后，待皮下移植瘤体积达 100 ~ 200 mm^3 时，视为造模成功。

2.4 动物分组及给药方案

于接种 Lewis 细胞后第 8 天给药，给药剂量参照《药理实验方法学》，小鼠用药量(g/kg) = 临床用药量(g)/60 kg × 9.01(小鼠与人的等效剂量比值)。造模成功后，按照随机数字表法将 32 只小鼠随机分为 4 组，溶剂对照组、化瘀解毒方高剂量组、化瘀解毒方中剂量组、环磷酰胺组，每组 8 只。化瘀解毒方中、高剂量组分别按照 15 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$、30 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 剂量口服灌胃化瘀解毒方水煎剂，溶剂对照组给予相同剂量的生理盐水灌胃，1 次/d，环磷酰胺组给予腹腔注射 5 mg/mL环磷酰胺溶液，2 次/周。用药至第 8 天(D8)称量小鼠体质量、测量小鼠移植瘤体积后处死小鼠。

2.5 观察指标

2.5.1 一般情况观察

给药期间第 1、4、7 天用游标卡尺测量各组小鼠移植瘤的最大横径(b)和最大直径(a)，按照公式 $V = ab^2/2$ 计算肿瘤体积，第 8 天(D8)称量小鼠体质量、测量小鼠移植瘤体积后处死小鼠，并取出瘤体称重，并计算相对肿瘤体积(RTV)、相对肿瘤增殖率(T/C)和肿瘤抑制百分率(IR)，做统计学检测。计算公式如下：

(1) RTV(relative tumor volume) = V_t/V_0，其中 V_0 为分组给药时(即 D1)所测得的肿瘤体积，V_t 为每一次测量时的肿瘤体积；

(2) T/C(%) = $T_{RTV}/C_{RTV} \times 100\%$，其中 T_{RTV} 为治疗组的 RTV，C_{RTV} 为溶剂对照组的 RTV；

(3) IR(%) = $(1 - TW_t/TW_c) \times 100\%$，其中 TW_t 为治疗组的瘤重，TW_c 为溶剂对照组的瘤重。

2.5.2 RT - PCR 法检测各指标的 mRNA 表达水平

RT - PCR 法检测肿瘤组织中 Bax、JAK2、STAT3 及 STAT5 mRNA 表达情况。取适量大小的组织块，加 TRIzol(1 mL)提取总 RNA，并测定各组提取 RNA 的纯度及浓度，按照试剂盒说明分别加入引物和 5 × Hiscript Ⅱ qRT SuperMix(50 ℃，15 min、85 ℃，5 s)进行逆转录反应合成 cDNA，以 cDNA 作为模板，再进行 PCR，反应程序为：95 ℃、30 s，95 ℃、10 s，55.7 ℃、30 s，45 循环。qPCR 仪器检测各组小鼠肿瘤组织中 Bcl - 2、JAK2、STAT3 及 STAT5 的 mRNA 表达，采用 GAPDH 为内参。数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析。序列见表 1。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列(5′—3′)	产物长度/bp
Mus - Bax - F	GAACTGGGGGAGGATTGTGG	194
Mus - Bax - R	GCATGCTGGGGCCATATAGT	
Mus - JAK2 - F	GAGGCAACCTCCACATCTCC	123
Mus - JAK2 - R	TCCTTCAGCTTGCCCAAGAG	
Mus - STAT3 - F	AACGACCTGCAGCAATACCA	135
Mus - STAT3 - R	TCCATGTCAAACGTGAGCGA	
Mus - STAT5 - F	CGGACCGAAACCTCTGGAAT	195
Mus - STAT5 - R	GCTTGATCTGTGGCTTCACG	
Mus - GAPDH - F	CACTGAGCAAGAGAGGCCCTAT	144
Mus - GAPDH - R	GCAGCGAACTTTATTGATGGTATT	

2.5.3 免疫组化(IHC)法检测各指标的蛋白表达

免疫组化(IHC)检测各组肿瘤组织 JAK2、P - JAK2、STAT3、P - STAT3、STAT5、P - STAT5 及 Bcl - 2 蛋白表达情况。将收集的小鼠肿瘤运用甲醛溶液固定，之后进行修块、脱水、透明、浸蜡、包埋、切片，再将瘤体组织切片脱蜡复水，3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶；枸橼酸缓冲液水煮修复，分别滴加适量一抗：JAK2(1∶1 000)、P - JAK2(1∶1 000)、STAT3(1∶1 000)、P - STAT3(1∶1 000)、STAT5(1∶1 000)、P - STAT5(1∶1 000)及 Bax(1∶200)，4 ℃孵育过夜，滴加二抗，37 ℃恒温箱中孵育 30 min，DAB 显色(避光)、蒸馏水冲洗，苏木素复染，逐级脱水，二甲苯透明，中性树胶封片。显微镜下观察蛋白表达情况。采用 Image - Pro Plus 软件，定量分析 JAK2、P - JAK2、STAT3、P - STAT3 和 Bax 蛋白的表达，最终结果以平均值 ± 方差($\bar{x} \pm s$)表示。

2.5.4 Western Blot 法检测各蛋白表达水平

Western blot 法检测肿瘤组织中 JAK2、P - JAK2、STAT3、P - STAT3、STAT5、P - STAT5 和 Bax 蛋白的表达情况，随机称取 0.1 mg 肿瘤组织，加入适量裂解混合液，匀浆机匀浆，经 4 ℃，11 000 r/min 离心 20 min 后转移上清，BCA 试剂盒测定蛋白浓度。配相应浓缩胶和分离胶，上样、电泳、转膜、封闭后，分别加入 JAK2、P - JAK2、STAT3、P - STAT3、STAT5、P - STAT5 和 Bax 抗体，4 ℃孵育过夜，TBST 洗涤 3 次，每次 10 min，加入相对应的二抗室温孵育 2 h 后，TBST 洗涤 3 次，每次 10 min，ECL 曝光，用 Image Lab 软件分析蛋白相对表达量。扫描计算条带积分光密度灰度值。

2.6 统计学分析

运用 SPSS 21.0、Graphpad Prism8.0 软件对数据

进行统计分析及作图，对实验数据进行正态和方差齐性检验，若满足，则用 One - way ANOVA（单因素方差分析）比较各组间的差异，结果用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示；若不满足，则采用非参数检验。$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 化瘀解毒方对 Lewis 小鼠一般指标的影响

3.1.1 化瘀解毒方对 Lewis 小鼠体质量的影响

给药期间，各组小鼠均未发生异常。用药结束后，与溶剂对照组相比，环磷酰胺组体质量明显下降（$P < 0.05$），其余各组体质量均无明显变化（$P > 0.05$），提示荷瘤小鼠对受试药物能很好耐受，结果见表 2。

表 2 化瘀解毒方对 Lewis 小鼠体质量的影响（$\bar{x} \pm s$，g）

组别	n	D1	D8
溶剂对照组	8	24.14 ± 0.41	26.21 ± 0.36
化瘀解毒方高剂量组	8	24.56 ± 0.44	26.01 ± 0.46
化瘀解毒方中剂量组	8	25.26 ± 0.45	27.23 ± 0.47
环磷酰胺组	8	23.22 ± 0.46	24.38 ± 0.48 *

注：与溶剂对照组比较，* $P < 0.05$。

3.1.2 化瘀解毒方对 Lewis 小鼠瘤体体积和增殖率的影响

与溶剂对照组相比，化瘀解毒方不同剂量组及环磷酰胺组肿瘤体积缩小（$P < 0.05$），相对肿瘤体积（RTV）缩小（$P < 0.05$），相对肿瘤增殖率（T/C）降低，且呈剂量依赖性，以上结果表明，化瘀解毒方可以抑制 Lewis 小鼠肿瘤的增殖，降低瘤体的体积，且呈剂量依赖性，见表 3 和图 1。

3.1.3 化瘀解毒方对 Lewis 小鼠瘤体重量及抑瘤率的影响

与溶剂对照组瘤体重量相比，化瘀解毒方不同剂量组和环磷酰胺组的瘤体重量均下降（$P < 0.05$），肿瘤抑制百分率升高，且呈剂量依赖性，见表 4。

表 3 化瘀解毒方对 Lewis 小鼠皮下移植瘤的疗效（$\bar{x} \pm s$，$n = 8$）

组别	肿瘤体积/（mm^3）		RTV	T/C/%
	D1	D8		
溶剂对照组	150.39 ± 1.95	1 333.16 ± 3.69	9.17 ± 0.49	–
化瘀解毒方高剂量组	152.66 ± 1.88	777.87 ± 4.88 *	5.18 ± 0.42 *	56.45
化瘀解毒方中剂量组	154.78 ± 2.10	974.06 ± 5.56 *	6.36 ± 0.37 *	69.38
环磷酰胺组	151.48 ± 1.95	922.35 ± 6.78 *	6.05 ± 0.49 *	65.95

注：与溶剂对照组比较，* $P < 0.05$。

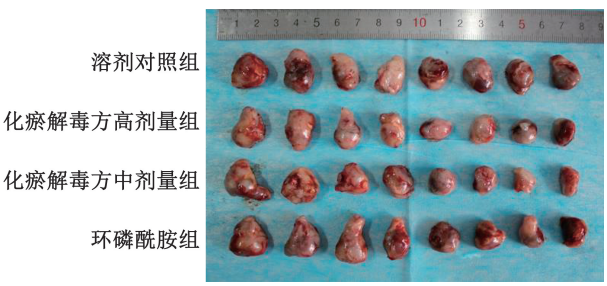


图 1 各组小鼠瘤体情况

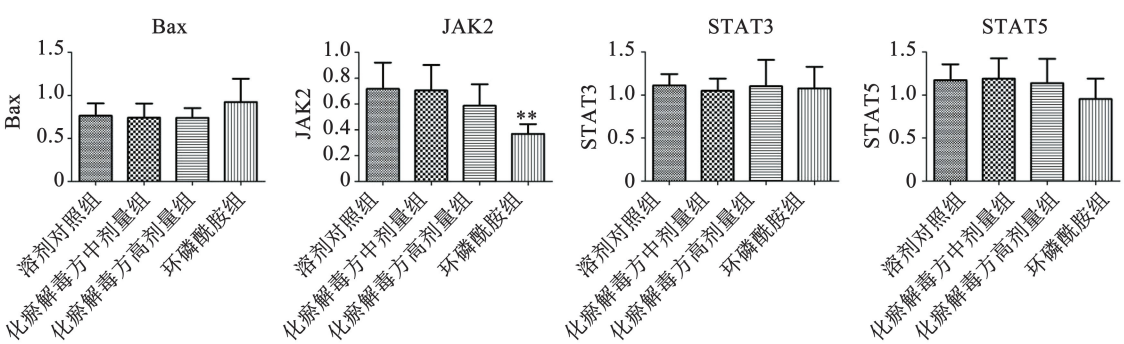
表 4 化瘀解毒方对 Lewis 小鼠移植瘤重量的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 8$）

组别	肿瘤重量/g	肿瘤抑制百分率 IR/%
溶剂对照组	2.200 3 ± 0.208 4	–
化瘀解毒方高剂量组	1.267 5 ± 0.282 2 *	42.40
化瘀解毒方中剂量组	1.591 6 ± 0.258 1 *	27.66
环磷酰胺组	1.312 4 ± 0.233 6 *	40.35

注：与溶剂对照组比较，* $P < 0.05$。

3.2 化瘀解毒方对 Lewis 小鼠瘤体相关 mRNA 表达的影响

与溶剂对照组相比，化瘀解毒方中剂量和高剂量组 Bax、JAK2、STAT3 和 STAT5 mRNA 表达无明显差异（$P > 0.05$），环磷酰胺组 JAK2 mRNA 表达显著降低（$P < 0.01$），如图 2。



注：与溶剂对照组比较，* * $P < 0.01$。

图 2 各组小鼠肿瘤组织中 Bax、JAK2、STAT3 和 STAT5 mRNA 表达水平

3.3　免疫组化(IHC)法检测化瘀解毒方对 Lewis 小鼠瘤体中相关蛋白表达的影响

用免疫组化法检测各组织 JAK2、P－JAK2、STAT3、P－STAT3、STAT5、P－STAT5 的表达，结果显示，溶剂对照组 JAK2、P－JAK2、STAT3、P－STAT3、STAT5、P－STAT5 在瘤体组织中可见明显棕黄色染色颗粒，黄染较深，表明 JAK2、P－JAK2、STAT3、P－STAT3、STAT5、P－STAT5 在溶剂对照组小鼠中表达较多；与溶剂对照组相比，化瘀解毒方不同剂量组和环磷酰胺组小鼠肿瘤组织中棕黄色染色颗粒明显减少，而在化瘀解毒方不同剂量组小鼠的肿瘤组织中黄色染色颗粒均有不同程度减少，提示化瘀解毒方可以抑制 Lewis 小鼠 JAK－STAT 信号通路相关蛋白表达。且与溶剂对照组相比，化瘀解毒方不同溶剂组与环磷酰胺组小鼠肿瘤组织中棕黄色染色颗粒明显增多；光密度值结果表明，与溶剂对照组比较，化瘀解毒方不同剂量组及环磷酰胺组小鼠瘤体组织中 Bax 蛋白表达水平显著增高($P<0.01$)，JAK2、P－JAK2、STAT3、P－STAT3、STAT5 和 P－STAT5 蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$，$P<0.01$)，提示化瘀解毒法方药可以显著促进肺癌凋亡相关蛋白 Bax 的表达，继而促进肺癌细胞的凋亡。见图 3、4 所示。

3.4　Western blot 法检测化瘀解毒方对 Lewis 小鼠瘤体中相关蛋白表达的影响

Westren blot 结果显示，与溶剂对照组相比，化瘀解毒方高剂量组小鼠瘤体组织中的 P－JAK2、P－STAT3 和 P－STAT5 蛋白表达显著降低，差异有统计学意义($P<0.05$)，化瘀解毒方中、高剂量组小鼠瘤体组织中的 Bax 蛋白表达显著升高，差异有统计学意义($P<0.05$)。表明化瘀解毒方可以显著抑制肺癌细胞中 P－JAK2、P－STAT3 和 P－STAT5 的表达，抑制 JAK2、STAT3 和 STAT5 的磷酸化水平，同时对 STAT5 总蛋白的水平也有一定的抑制作用。此外，化瘀解毒方可以显著促进肺癌凋亡相关蛋白 Bax 的表达，说明化瘀解毒方可以促进肺癌细胞的凋亡，见图 5 所示。

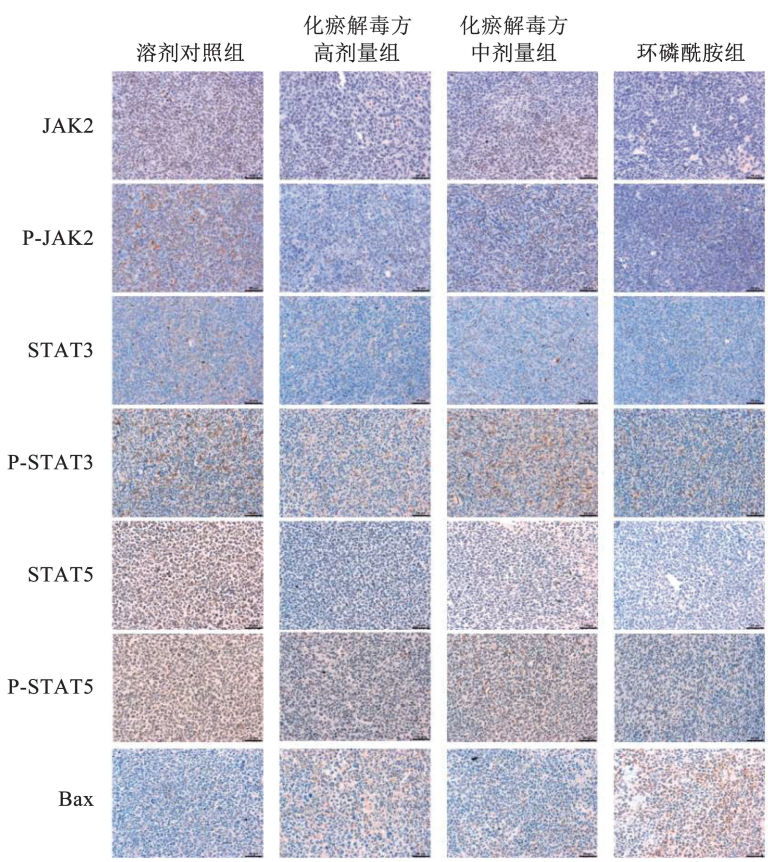
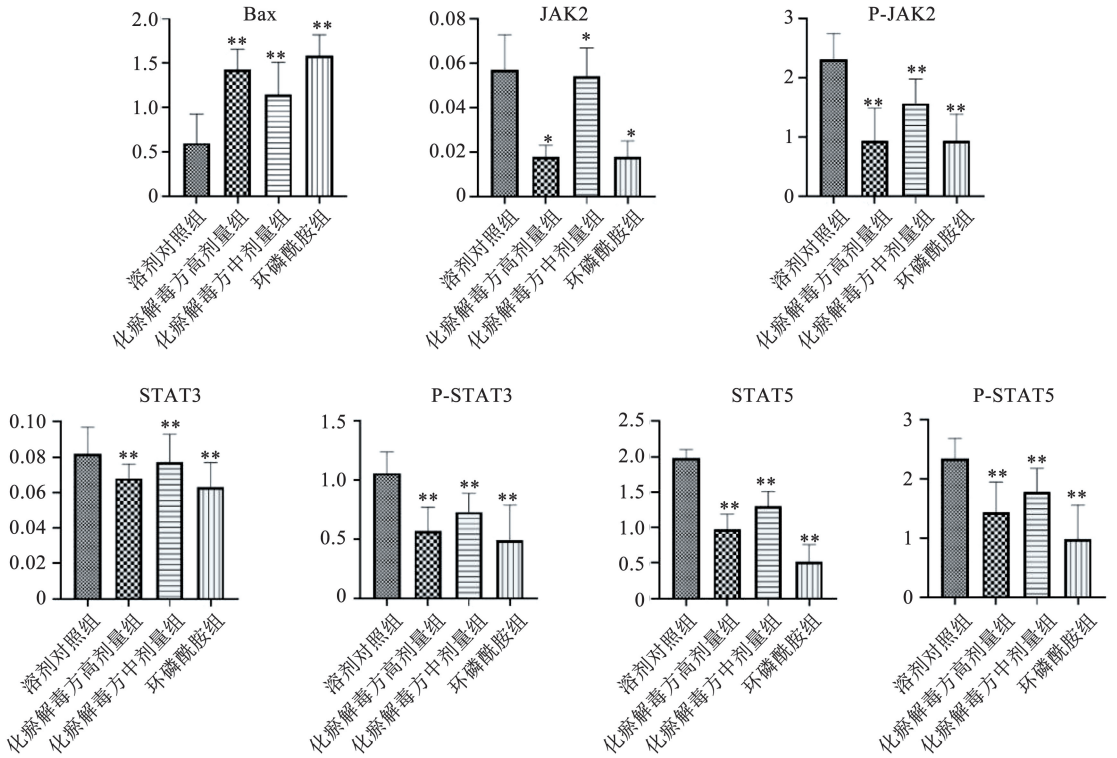
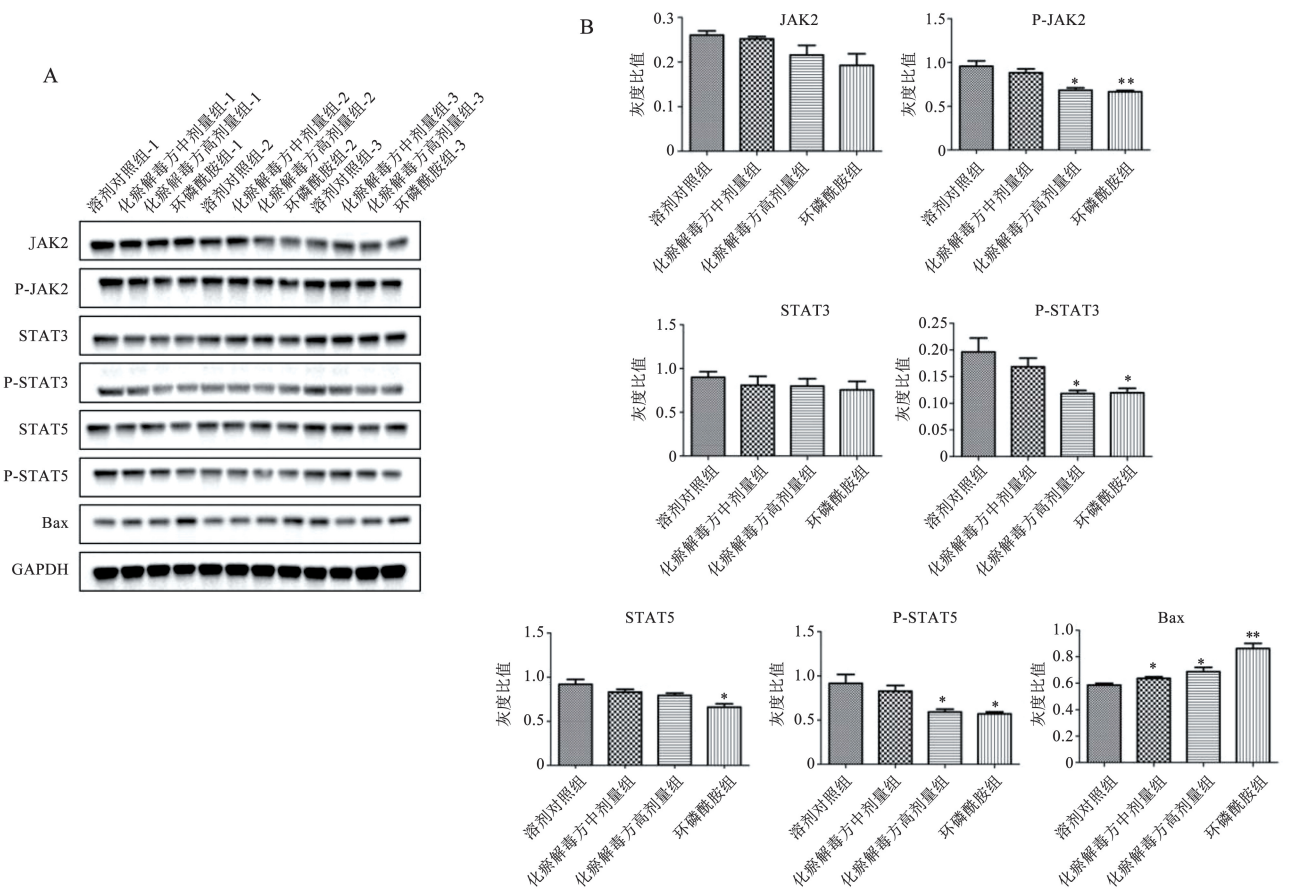


图 3　IHC 检测小鼠肿瘤组织 JAK2、P－JAK2、STAT3、P－STAT3、STAT5、P－STAT5 和 Bax 蛋白的表达水平(×200)



注：与溶剂对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

图 4 各组小鼠肿瘤组织 Bax、JAK2、P－JAK2、STAT3、P－STAT3、STAT5 和 P－STAT5 蛋白光密度值



注：A 为蛋白条带图，B 为蛋白灰度比值图，与溶剂对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

图 5 各组小鼠组织 JAK2、P－JAK2、STAT3、P－STAT3、STAT5、P－STAT5 及 Bax 蛋白表达

4 讨论

肺癌早期症状不明显,临床表现为咳嗽、咳痰伴痰中带血、声音嘶哑、胸闷和发热等症状,部分患者可能无任何不适,近年来患病率和病死率均稳居世界第一,是一种严重威胁人类身体健康的疾病[18]。治疗的主要方法为手术治疗及放化疗,化疗药物抗肿瘤效果显著,但伴随严重的毒副反应,且极易产生耐药性,从而影响治疗效果。目前中医药治疗肿瘤、减轻化疗毒副作用、调节免疫平衡、预防复发转移方面优势凸显[19]。

肺癌属于中医学中“肺积”“痞癖”“咳嗽”“咯血”“胸痛”等范畴。蔡小平认为肺癌发病原因是痰毒瘀结,具有正气亏虚,瘀毒为标的特点[20]。化瘀解毒方由蔡小平教授根据多年治疗肺癌的经验提出,具有解毒散结、消肿止痛的功效,用于毒瘀互结,痈疽疮疡,阴疽肿痛者。化瘀解毒方中全蝎、壁虎活血解毒为君;辅以三七活血化痰、软坚散结;佐以半枝莲解毒抗癌,使以广木香理气和胃、疏畅气血。诸药合用,共奏活血解毒、软坚散结、扶正抗癌之功,切中肺癌的病机[21]。药理学研究显示,全蝎[22]可以通过抗凝血作用、直接抑制肿瘤细胞的生长与增殖、促进细胞凋亡等机制发挥抗肿瘤的作用;壁虎[23]能熄风止痉、化痞散结止痛,用之能切中肿瘤邪毒内聚、气滞血瘀为主的病机,在治疗多种恶性肿瘤取得了良好疗效;三七有活血化痰、软坚散结之功,人参皂苷和三七皂苷 R1, R2 等是三七的主要有效成分,最新研究[24]表明三七总皂苷可以从多个途径起到抗肿瘤的作用,如抑制肿瘤生长、防止肿瘤转移、逆转肿瘤多药耐药等;半枝莲能解毒抗癌,研究表明半枝莲对胃癌、原发性肝癌、肺癌、宫颈癌等多种恶性肿瘤均表现出良好的治疗作用,在抑制肿瘤增殖,迁移等多方面发挥作用;广木香[25]有理气和胃、疏畅气血之效,成分木香烃内酯可降低血糖,能抑制机体对酒精的吸收,有抗炎、抑制微生物活性和抗肿瘤等多种药理学功能,且能显著抑制人非小细胞肺癌 A549 细胞增殖,并促进该细胞凋亡,其机制可能是通过降低 Bcl-2 表达,升高 Bax 表达,从而抑制肺癌细胞增殖的[26]。本研究结果显示,化瘀解毒方能够减小 Lewis 小鼠瘤体的质量和体积,有效抑制 Lewis 肺癌的进展。

本研究使用的 Lewis 细胞具有易成瘤的特点[27],所需细胞数量少,提高了实验的可操作性,广泛用于在体肺癌的药物实验中。在本研究中,Lewis 小鼠在细胞接种 8 d 后表现出体质量、瘤体体积增加,表明模型建立成功,化瘀解毒方不同剂量组均不影响 Lewis 小鼠体质量。

JAK/ STAT 信号通路是促进肿瘤增殖、侵袭和转移的关键通路[28]。研究发现该通路的激活与肺癌的发生与进展密切相关。JAK 能催化与其相连的细胞因子受体发生酪氨酸磷酸化,还能催化 STATs 蛋白磷酸化并使其激活,进而调节癌细胞代谢过程,导致癌细胞的异常增殖和恶性转移[29]。有研究[30]表明,抑制 JAK2/STAT3 信号通路能减少肺部炎症。研究[31]发现 JAK2 过度表达会增强肿瘤细胞增殖、转移和侵袭,研究[32]发现大约 55% 的肺癌患者中存在 STAT3 异常激活,且 STAT3 表达水平的升高与肺癌的预后不良有关。在本研究中,化瘀解毒方不同剂量组和环磷酰胺组对 JAK2、STAT3 蛋白表达的影响较小,而对 JAK2、STAT3 蛋白磷酸化水平的影响较大,说明化瘀解毒方是通过影响 JAK2 和 STAT3 的磷酸化水平来达到抑癌效果的。

本研究中,化瘀解毒方降低了 Lewis 小鼠的瘤体质量和体积,抑制了肿瘤的进展,化瘀解毒方可能通过调节 JAK/STAT 信号通路相关蛋白的磷酸化来抑制癌细胞的增殖,以起到抑癌作用。本研究在动物实验层面证明了化瘀解毒方具有抑癌的潜力,缺乏多层面验证,可以进一步研究其在细胞层面是否具有同样效果,为化瘀解毒方治疗非小细胞肺癌的基础研究及临床防治提供实验证据。

参考文献:

[1] ALEXANDER M, KIM S Y, CHENG H Y. Update 2020: management of non - small cell lung cancer[J]. Lung, 2020, 198(6): 897 - 907.

[2] 杨倩, 王淑美, 冯诗函, 等. 香砂六君子汤合除痰解毒中药对 Lewis 肺癌小鼠免疫逃逸的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(7): 78 - 86.

[3] 邵楚楚, 王婉莹, 任胜祥. CSCO 非小细胞肺癌诊疗指南(2021 版)解读[J]. 同济大学学报(医学版), 2022, 43(1): 1 - 9.

[4] QI L Y, LUO Q, ZHANG Y Y, et al. Advances in toxicological research of the anticancer drug cisplatin[J]. Chem Res Toxicol, 2019, 32(8): 1469 - 1486.

[5] MALHOTRA J, JABBOUR S K, AISNER J. Current state of immunotherapy for non - small cell lung cancer[J]. Transl Lung Cancer Res, 2017, 6(2): 196 - 211.

[6] XIAO W K, XU Y X, BAAK J P, et al. Network module analysis and molecular docking - based study on the mechanism of astragali radix against non - small cell lung cancer[J]. BMC Complement Med Ther, 2023, 23(1): 345.

[7] 兰央草, 夏骏, 王恬, 等. 中医药辅助化疗治疗晚期非小细胞肺癌

的研究进展[J]. 中国医学创新,2021,18(36):184 - 188.
[8] ZUNDLER S, NEURATH M F. Integrating immunologic signaling networks: the JAK/STAT pathway in colitis and colitis - associated cancer[J]. Vaccines, 2016, 4(1): 5.
[9] MULLEN M, GONZALEZ - PEREZ R R. Leptin - induced JAK/STAT signaling and cancer growth[J]. Vaccines, 2016, 4(3): 26.
[10] TAO J L, MARIANI L, EDDY S, et al. JAK - STAT signaling is activated in the kidney and peripheral blood cells of patients with focal segmental glomerulosclerosis[J]. Kidney Int, 2018, 94(4): 795 - 808.
[11] LI R, REZK A, MIYAZAKI Y, et al. Proinflammatory GM - CSF - producing B cells in multiple sclerosis and B cell depletion therapy[J]. Sci Transl Med, 2015, 7(310): 26491076.
[12] QIN J Z, ZHANG C L, KAMARASHEV J, et al. Interleukin - 7 and interleukin - 15 regulate the expression of the bcl - 2 and c - myb genes in cutaneous T - cell lymphoma cells[J]. Blood, 2001, 98(9): 2778 - 2783.
[13] 崔照琼,张以芳. JAK - STAT 信号转导通路阻断剂 AG490 对肝癌 SMMC - 7721 细胞移植瘤生长的影响[J]. 肿瘤,2016,36(12):1291 - 1297.
[14] 林萌. STAT5 对乳腺癌分化和转移的影响及其机制[D]. 长春:吉林大学,2023.
[15] 蔡小平,魏征. 恶性肿瘤中医证治新理论——瘀毒论[J]. 辽宁中医杂志,2013,40(3):465 - 466.
[16] 魏征,徐立然,徐江雁,等. 化瘀解毒方含药血清通过 JAK2/STAT3 通路抑制人肺癌 H1299 细胞侵袭迁移[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(8):74 - 80.
[17] 马淑芳,赵一,魏征,等. 化瘀解毒方配合化疗治疗晚期非小细胞肺癌临床观察[J]. 新中医,2017,49(3):109 - 111.
[18] HERBST R S, MORGENSZTERN D, BOSHOFF C. The biology and management of non - small cell lung cancer[J]. Nature, 2018, 553(7689): 446 - 454.
[19] 连云峰,杨慧彤,孙颖,等. 中医药调控肿瘤相关巨噬细胞抗肺癌研究进展[J]. 中国中药杂志,2023,48(8):2000 - 2009.
[20] 何小鹤,赵一,蔡小平. 蔡小平教授治疗肺癌经验总结[J]. 亚太传统医药,2017,13(7):80 - 81.
[21] 张俊萍,魏征. 化瘀解毒方含药血清体外抑制 A549 肿瘤细胞作用及其机制[J]. 中国老年学杂志,2018,38(16):3990 - 3993.
[22] 张红,张豪健,朱纪烨,等. 全蝎、蜈蚣调控非小细胞肺癌细胞增殖的机制研究[J]. 生物技术,2021,31(6):561 - 566.
[23] 蒋桂香,王春梅,赓迪. 壁虎抗肿瘤活性物质的发现及作用机制研究进展[J]. 中华中医药杂志,2013,28(4):1037 - 1040.
[24] 王婷,杨策尧,申丽娟. 三七总皂苷对肿瘤耐药逆转作用的研究进展[J]. 临床医学,2011,31(3):109 - 111.
[25] 罗雪,彭建明,江秀玲. 木香烃内酯对肺癌细胞 A549 的凋亡作用及其机制[J]. 现代医药卫生,2018,34(22):3473 - 3475.
[26] YAN L, SUNDARAM S, RUST B M, et al. Metabolomes of Lewis lung carcinoma metastases and normal lung tissue from mice fed different diets[J]. J Nutr Biochem, 2022, 107: 109051.
[27] SHAO F, PANG X N, BAEG G H. Targeting the JAK/STAT signaling pathway for breast cancer[J]. Curr Med Chem, 2021, 28(25): 5137 - 5151.
[28] CAO L M, REN Y H, GUO X R, et al. Downregulation of SETD7 promotes migration and invasion of lung cancer cells via JAK2/STAT3 pathway[J]. Int J Mol Med, 2020, 45(5): 1616 - 1626.
[29] GONCHEVA M I, GIBSON R M, SHOULDICE A C, et al. The *Staphylococcus aureus* protein IsdA increases SARS CoV - 2 replication by modulating JAK - STAT signaling[J]. iScience, 2023, 26(2): 105975.
[30] XU Y J, JIN J, XU J W, et al. JAK2 variations and functions in lung adenocarcinoma[J]. Tumour Biol, 2017, 39(6): 1010428317711140.
[31] YU H, JOVE R. The STATs of cancer—new molecular targets come of age[J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(2): 97 - 105.
[32] WU P, WU D, ZHAO L F, et al. Prognostic role of STAT3 in solid tumors: a systematic review and meta - analysis[J]. Oncotarget, 2016, 7(15): 19863 - 19883.

Mechanism of Huayu Jiedu Formula in Inhibiting Lung Cancer Proliferation via the JAK/STAT Pathway

ZHENG Rui[1], WEI Zheng[2,3,4], ZHANG Junping[2], CHAO Rui[1], CAI Xiaoping[2]
(1. *The Second Clinical College, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou* 450046, *China*;
2. *Henan Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Zhengzhou* 450004, *China*;
3. *Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou* 450046, *China*;
4. *The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou* 450099, *China*)

Abstract Objective: To investigate the mechanism by which the Huayu Jiedu Formula inhibits lung cancer proliferation based on the JAK/STAT signaling pathway. Methods: Thirty - two C57BL/6J mice were randomly divided into four groups: solvent control group, high - dose Huayu Jiedu Formula group, medium - dose Huayu Jiedu Formula group, and cyclophosphamide group, with 8 mice in each group. A lung cancer mouse model was established by subcutaneously injecting 0.5 mL (1×10^7 cells/mL) of Lewis cell suspension into the right forelimb axilla. The medium - and high - dose Huayu Jiedu Formula groups were administered oral gavage at 15 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ and 30 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$,

respectively, once daily. The cyclophosphamide group received intraperitoneal injections of 5 mg/mL cyclophosphamide solution twice weekly. All groups were treated for 8 consecutive days. Body weight was measured three times a week. On the 8th day, body weight, tumor volume, and tumor weight were measured to calculate the relative tumor volume (RIV), relative tumor proliferation rate (TIC), and tumor inhibition rate (IR). Real-time quantitative PCR (RT-PCR) was used to detect mRNA expression of Janus kinase 2 (JAK2), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), STAT5, and apoptosis regulatory factor (Bax) in tumor tissues. Immunohistochemistry (IHC) and Western blot were employed to detect protein levels of JAK2, P-JAK2, STAT3, P-STAT3, STAT5, P-STAT5, and Bax in tumor tissues. Results: Observation of tumor-bearing mice revealed that compared to the solvent control group, the Huayu Jiedu Formula had no significant effect on body weight, while the cyclophosphamide group significantly reduced body weight ($P<0.05$), indicating the lower toxicity of the Huayu Jiedu Formula. Tumor volume and tumor weight were significantly reduced in the Huayu Jiedu Formula groups ($P<0.05$). RT-qPCR results showed that the Huayu Jiedu Formula did not affect JAK2, STAT3, STAT5, or Bax mRNA levels. IHC and Western blot results indicated that the Huayu Jiedu Formula inhibited the expression of P-JAK2, P-STAT3, and P-STAT5 ($P<0.05$, $P<0.01$) and promoted Bax protein expression ($P<0.05$, $P<0.01$), thereby promoting apoptosis of lung cancer cells. Conclusion: The Huayu Jiedu Formula may inhibit lung cancer cell proliferation by downregulating phosphorylation levels of JAK-STAT signaling pathway-related proteins.

Key words Huayu Jiedu Formula; Lung cancer; Antitumor; JAK-STAT signaling pathway; Tumor-bearing mouse model