

参芪扶正注射液对结肠癌小鼠恶液质后骨骼肌线粒体功能的影响

郭 苇¹, 肖 敏², 左 谦¹, 肖 茜¹, 郑心婷³, 罗嘉敏¹, 林丽珠^{3*}

1. 广州中医药大学, 广东 广州 510000

2. 深圳市中医院 风湿科, 广东 深圳 518000

3. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510000

摘要: **目的** 探讨结肠癌恶液质小鼠骨骼肌中线粒体功能变化及参芪扶正注射液干预后的影响。**方法** 将 40 只雌性 BLAB/c 裸鼠随机分为对照组、模型组及参芪扶正注射液低、高剂量组, 每组 10 只。除对照组外, 其余各组均 ip 人结肠癌 Lovo 细胞, 并饲养至肿瘤广泛转移, 制备癌症恶液质动物模型; 根据消瘦程度和体质量变化监测各组小鼠癌症恶液质状态, ip 给予参芪扶正注射液低、高剂量, 每 3 天给药 1 次, 连续给药 7 次。21 d 后观察小鼠体质量变化, 检测腓肠肌中三磷酸腺苷 (ATP)、丙二醛 (MDA) 水平; Western blotting 法检测小鼠腓肠肌中线粒体相关蛋白 4-羟基壬烯酸 (4HNE)、PPAR γ 共激活因子-1 (PGC-1)、电压依赖型阴离子孔道蛋白 (VDAC1) 的表达情况。**结果** 与对照组比较, 模型组与参芪扶正注射液干预组小鼠均出现癌症恶液质状态; 与对照组比较, 模型组小鼠腓肠肌 ATP 水平下降, MDA 合成增多, 腓肠肌线粒体相关蛋白 4HNE 和 PGC-1 表达水平平均升高 ($P < 0.05$), VDAC1 表达无明显差异; 与模型组比较, 参芪扶正注射液组小鼠腓肠肌 ATP 水平升高, MDA 合成减少, 腓肠肌线粒体相关蛋白 4HNE 和 PGC-1 表达水平平均降低 ($P < 0.05$), VDAC1 表达亦无明显差异。**结论** 参芪扶正注射液可以明显改善结肠癌腹腔转移小鼠的恶液质状态, 可能与调节腓肠肌中线粒体功能、减轻线粒体氧化损伤有关。

关键词: 参芪扶正注射液; 结肠癌; 癌症恶液质; 线粒体功能; 4-羟基壬烯酸; PPAR γ 共激活因子-1; 电压依赖型阴离子孔道蛋白

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)24-6059-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.24.021

Effects of Shenqi Fuzheng Injection on function and dynamics of skeletal muscle mitochondria in mice after colon cancer-cachexia

GUO Wei¹, XIAO Min², ZUO Qian¹, XIAO Qian¹, ZHENG Xin-ting³, LUO Jia-min¹, LIN Li-zhu³

1. Traditional Chinese Medicine University of Guangzhou, Guangzhou 510000, China

2. Shenzhen Central Hospital, Rheumatology Department, Shenzhen 518000, China

3. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510000, China

Abstract: Objective To study the changes of mitochondria function and dynamics in colon cancer-cachexia mice and the effects of Shenqi Fuzheng Injection on these changes. **Methods** A total of 40 female BLAB/c nu mice were randomly divided into control group, model group, low dose and high does of Shenqi Fuzheng Injection group, ten mice in every group. Except the control group, the mice of other groups were intraperitoneal injected with the Lovo cell line to establish the model of abdominal metastasis of colon cancer, then induced cancer cachexia. Marasmus and weight change were monitored the status of cancer cachexia in all groups. Shenqi Fuzheng Injection groups received intraperitoneal injection with 1.5 mL (2 times dose) and 3 mL (4 times dose) of drugs for every three days, seven consecutive times. After 21 days treatment, the mitochondrial related protein PGC-1, 4HNE and VDAC1 in the skeletal muscle were measured. The levels of adenosine triphosphate (ATP) and malondialdehyde (MDA) in the skeletal were detected. **Results** Compared to the control group, the mice in the model group and Shenqi Fuzheng group suffered from cancer cachexia. Compared with the control group, the level of ATP in the skeletal muscle was lower in model group; The protein expression level of PGC-1 and 4HNE were remarkably increased ($P < 0.05$); There was no significant difference in the protein expression of

收稿日期: 2019-04-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573780)

作者简介: 郭 苇, 广州中医药大学中西医结合临床学在读博士, 研究方向为中西医结合防治恶性肿瘤。Tel: (020)36596356 E-mail: 844608579@qq.com

*通信作者 林丽珠, 博士生导师。Tel: (020)36596356 E-mail: 13501505588@139.com

VDAC1 ($P > 0.05$); The level of MDA was significantly increased ($P < 0.05$). After the treatment, compared with model group, the level of ATP in the skeletal muscle was higher; The protein expression levels of PGC-1 and 4HNE were significantly decreased ($P < 0.05$); There was no significant difference in the protein expression of VDAC1 ($P > 0.05$); The level of MDA was lower ($P < 0.05$).

Conclusion Shenqi Fuzheng Injection can significantly improve the status of colon cancer cachexia in mice, which may be related to the improvement of the mitochondrial function and the relieving of the mitochondrial oxidative damage.

Key words: Shenqi Fuzheng Injection; colon cancer; cancer cachexia; mitochondrial function; 4HNE; PGC-1; VDAC1

癌症恶液质 (cancer cachexia) 是以持续性的骨骼肌消耗为特征, 伴或不伴有脂肪组织减少, 且常规营养支持治疗不能完全缓解, 逐步导致功能损伤的多因素综合征^[1], 临床表现复杂, 包括食欲减退、体质量下降, 虚弱、低蛋白血症等, 严重地影响了患者的生活质量和生存时间。有研究表明, 癌症恶液质在消化道肿瘤中的发生率最高, 达 80% 以上^[2]。但其发病机制尚未完全明确, 一般认为是由肿瘤因素、集体因素及肿瘤和机体的相互作用等多因素共同作用的结果^[3]。其中最大摄氧量的降低^[4]、三磷酸腺苷 (ATP) 代谢异常等参与了恶液质引起的骨骼肌消耗和萎缩。线粒体是能量代谢和有氧呼吸的重要场所, 参与 ATP 的合成、氧化应激和细胞凋亡等过程, 与恶液质引起的骨骼肌消耗和萎缩有着密切的关系。对于癌症恶液质的药物治疗, 主要包括抑制炎症药物、孕激素类药物和类固醇类药物等, 而关于中成药改善癌症恶液质的临床研究报道尚不多见, 赵凡尘等^[5]研究表明, 丙氨酰-谷氨酰胺联合参芪扶正注射液能改善恶性肿瘤恶液质患者的营养状态, 相对缓和患者的恶液质状态, 但参芪扶正注射液单独使用是否能够改善癌症恶液质仍有待探讨。本实验将通过制备小鼠结肠癌腹腔转移恶液质动物模型, 探索结肠癌腹腔转移小鼠恶液质后骨骼肌中线粒体功能及参芪扶正注射液的保护机制, 为癌症恶液质干预提供新的思路, 同时也为中成药治疗癌症恶液质提供理论依据。

1 材料

1.1 药品

参芪扶正注射液, 丽珠医药集团股份有限公司, 规格 250 mL, 批号 180817。

1.2 实验动物和细胞

3~4 周龄 SPF 级雌性 BLAB/c 裸鼠 40 只, 购自南京大学-南京生物医药研究院, 许可证号 SCXK (苏) 2015-0001。人源结肠癌 Lovo 细胞由广州中医药大学基础医学院提供。

1.3 试剂和仪器

高速冷冻离心机 (Eppendorf 公司); -80 °C 超

低温冰箱 (Thermo 公司); 全自动酶标仪和电泳仪 (Bio-Rad 公司); 倒置式相差显微镜 (Olympus 公司); 丙二醛 (MDA) 检测试剂盒、ATP 含量测定试剂盒 (南京建成生物功能研究所); mtDNA 提取试剂盒 (江苏凯基生物有限公司); 4-羟基壬烯酸 (4HNE)、PPAR γ 共激活因子-1 (PGC-1)、电压依赖型阴离子孔道蛋白 (VDAC1) 抗体 (英国 Abcam 公司); GAPDH 抗体 (北京中杉金桥生物技术有限公司); 高糖 DMEM 培养液、胎牛血清 (美国 Gibico 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

Lovo 细胞培养于完全培养基中 (高糖 DMEM 培养液 + 10% 胎牛血清, pH 7.4), 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 3 d 换液 1 次, 细胞至 70%~80% 融合时, 以 0.25% 胰酶消化细胞, 进行传代。

2.2 分组、模型制备与给药

通过 SAS 9.2 软件产生随机数字, 将 40 只小鼠随机分为对照组、模型组及参芪扶正注射液低、高剂量组, 每组 10 只。除对照组外, 其余各组小鼠适应性喂养 5 d 后, 制备结肠癌腹腔转移模型。将培养的 Lovo 细胞消化离心, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 调整密度约 1×10^7 个/mL, 消毒裸鼠右下腹皮肤, 取 0.2 mL (约 1×10^6 个细胞) 接种于腹腔。小鼠接种肿瘤起为实验第 1 天, 后各组小鼠正常饲养至第 14 天, 小鼠开始出现全身皮肤粗糙, 活动迟缓, 消瘦, 摄食、饮食减少, 依据相关文献, 考虑结肠癌腹腔转移模型小鼠进入恶病质状态。

造模成功后从第 15 天开始对照组和模型组小鼠每日 ip 0.75 mL 生理盐水。按《药理实验方法学》第 4 版中人 (70 kg) 与小鼠 (0.020 kg) 按体表面积折算的等效剂量比值为 0.002 6, 按换算公式 (临床剂量 $\times 70 \text{ kg} \times 0.002 6 / 20 \text{ g}$), 计算出参芪扶正注射液小鼠给药的低、高剂量分别为 6、12 g/kg (1.5、3.0 mL/d), 每 3 天 ip 给药 1 次, 连续给药 7 次。

2.3 组织病理学观察

末次给药结束后 24 h, 处死小鼠, 将各组小鼠

腹腔内肉眼可见结节切除后置于 10% 甲醛溶液中固定, 制作石蜡切片, 进行 HE 染色, 显微镜下观察病理学改变。

2.4 腓肠肌中 ATP、MDA 的检测

末次给药结束后 24 h, 处死小鼠, 取腓肠肌组织在离心管内制备成组织匀浆, 放入沸水浴箱中 10 min, 取上清液。按照 Elisa 试剂盒的使用说明操作, 测定腓肠肌组织内 ATP、MDA 水平。

2.5 Western blotting 检测腓肠肌线粒体蛋白 VDAC1、4HNE、PGC-1

用 BCA 法测组织匀浆后上清液中的蛋白浓度, 于 10% SDS-PAGE 上电泳分离, 上样量为 60 μ g, 电泳结束后用 300 mA, 1.5 h 转印至 PVDF 膜上, 用脱脂奶粉室温封闭 2 h, 然后分别用一抗 VDAC1 (1:1 000)、4HNE (1:1 000) 和 PGC-1 一抗 (1:1 000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 充分洗膜, 然后用 IgG 二抗 (1:2 500) 室温孵育 2 h; TBST 充分洗膜; 用增强型 ECL 化学液发光, 凝胶成像系统曝光。用 Image J 软件求出 VDAC1、4HNE、PGC-1 灰度值, 以反映腓肠肌线粒体蛋白 VDAC1、4HNE、PGC-1 的表达水平。

2.6 统计学分析

应用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析, 计量指

标采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 LSD-*t* 检验。

3 结果

3.1 小鼠结肠癌腹腔转移恶液质模型一般观察

瘤株移植后 40 只裸鼠全部存活, 常规喂养 14 d 后, 部分小鼠开始出现全身皮肤粗糙、活动迟缓、消瘦、黄疸; 摄食、饮食减少, 麻醉处死解剖后, 发现肠道肿大淋巴结数十个, 肝叶下肿大结节、肉眼肝脏转移、腹壁转移、肾上腺转移、胃壁浸润, 考虑结肠癌腹腔转移模型小鼠进入恶病质状态。

3.2 腹腔转移肿瘤病理检测结果

腹腔转移瘤病理 HE 染色 (图 1) 显示, 模型组小鼠肠壁可见明显的肿瘤细胞团块, 肿瘤细胞核分裂像易见 (黑色箭头), 交界处可见肿瘤细胞浸润至肠肌层 (红色箭头); 肠道结节全部为肿瘤组织, 易见核分裂像 (黑色箭头), 外层可见明显包膜, 肿瘤组织周围脂肪在这种可见大量的淋巴细胞浸润 (红色箭头); 股壁可见明显的肿瘤细胞团块, 肿瘤细胞核分裂像易见 (黑色箭头), 交界处可见肿瘤细胞浸润至肌层 (红色箭头); 肠系膜结节疑似系膜淋巴结, 核分裂像不明显, 成分多为淋巴细胞。病理结果进一步说明, 腹腔转移肿瘤构建成功。

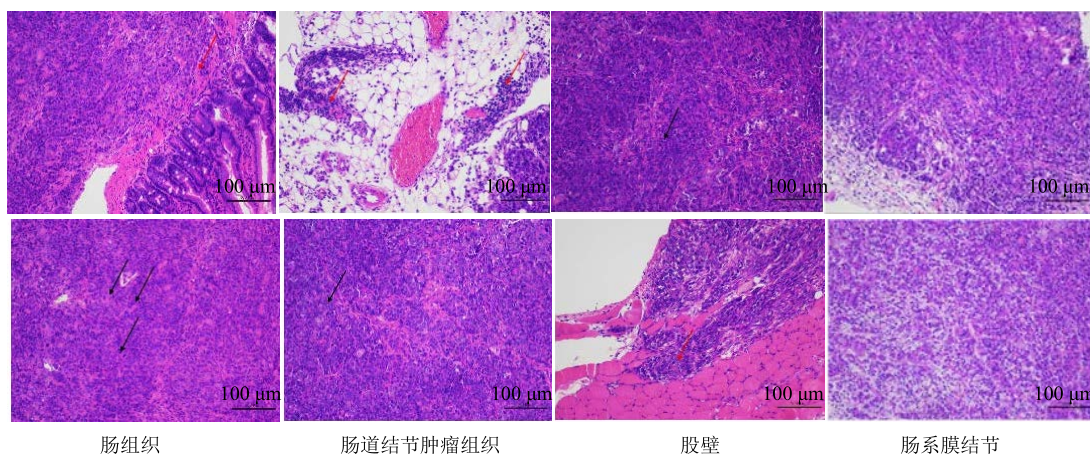


图 1 腹腔转移瘤 HE 染色 ($\times 200$)

Fig. 1 Pathological of abdominal metastases ($\times 200$)

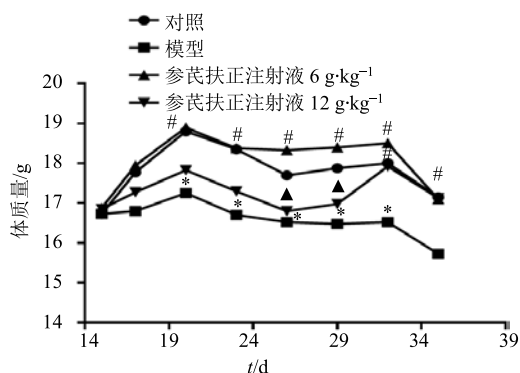
3.3 参芪扶正注射液对恶液质模型小鼠体质量的影响

造模初期, 各组小鼠体质量均无明显差异。随着恶液质小鼠模型的制备成功, 与对照组比较, 模型组小鼠从实验第 22 天开始体质量明显下降 ($P < 0.05$), 与模型组比较, 参芪扶正注射液干预组小鼠体质量均有不同程度增加。参芪扶正注射液低、高

剂量组间比较, 从第 26 天开始, 低剂量组小鼠体质量有明显增加 ($P < 0.05$), 至第 32 天后, 体质量无明显差异, 见图 2。

3.4 参芪扶正注射液对恶液质模型小鼠腓肠肌线粒体蛋白 VDAC1、4HNE 和 PGC-1 表达的影响

与对照组比较, 模型组小鼠腓肠肌 PGC-1 和 4HNE 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$)。与模型组比



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与参芪扶正注射液低剂量组比较: ▲ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; ▲ $P < 0.05$ vs low dose group of Shenqi Fuzheng Injection

图 2 各组小鼠体质量变化 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 Weight curve of each group of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

较, 参芪扶正注射液干预后, 各剂量组小鼠腓肠肌的 PGC-1 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$), 高剂量组 4HNE 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$)。但 VDAC1 的表达在对照组、模型组及参芪扶正注射液干预组间均无显著差异, 见图 3 和表 1。

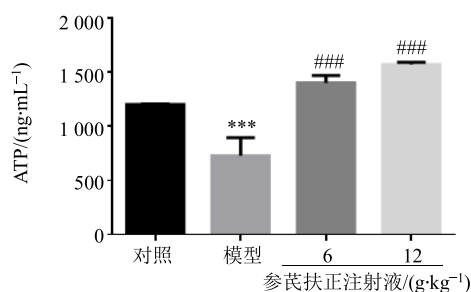
表 1 参芪扶正注射液对恶液质模型小鼠腓肠肌线粒体蛋白 VDAC1、4HNE 和 PGC-1 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Shenqi Fuzheng Injection on protein expression of VDAC1, 4HNE, and PGC-1 in gastrocnemius of model mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	4HNE	PGC-1	VDAC1
对照	—	0.08 ± 0.03	0.17 ± 0.03	0.51 ± 0.03
模型	—	0.19 ± 0.04*	0.23 ± 0.05*	0.60 ± 0.03
参芪扶正注射液	6	0.18 ± 0.04▲	0.08 ± 0.02#	0.54 ± 0.03
	12	0.08 ± 0.03#	0.12 ± 0.02#	0.56 ± 0.03

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与参芪扶正注射液低剂量组比较: ▲ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; ▲ $P < 0.05$ vs low dose group of Shenqi Fuzheng Injection



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ### $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs model group

图 4 参芪扶正注射液对恶液质模型小鼠腓肠肌 ATP 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 4 Effect of Shenqi Fuzheng Injection on level of ATP in sural muscle of cachexia model mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

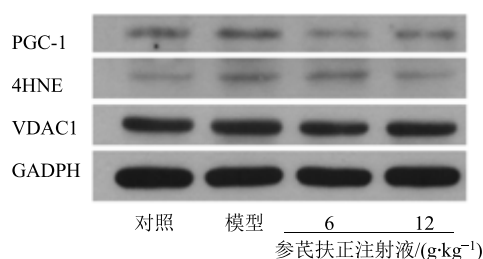


图 3 参芪扶正注射液对恶液质模型小鼠腓肠肌线粒体蛋白 VDAC1、4HNE 和 PGC-1 表达水平的影响

Fig. 3 Effect of Shenqi Fuzheng Injection on protein expression of VDAC1, 4HNE, and PGC-1 in gastrocnemius of model mice

3.5 参芪扶正注射液对恶液质模型小鼠腓肠肌 ATP 水平的影响

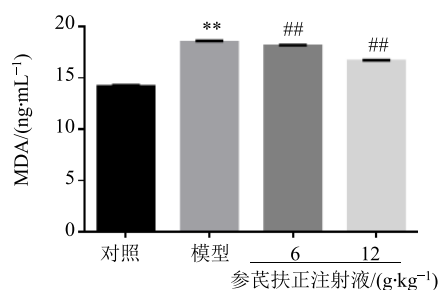
与对照组比较, 模型组小鼠腓肠肌 ATP 水平显著降低 ($P < 0.001$)。与模型组比较, 参芪扶正注射液干预后, 小鼠腓肠肌 ATP 水平显著升高 ($P < 0.001$), 但参芪扶正注射液低、高剂量之间并无明显差异, 考虑参芪扶正注射液升高腓肠肌 ATP 水平无剂量依赖性, 见图 4。

3.6 参芪扶正注射液对恶液质模型小鼠腓肠肌 MDA 水平的影响

与对照组比较, 模型组小鼠腓肠肌 MDA 水平显著升高 ($P < 0.01$), 参芪扶正注射液干预后, 高剂量组小鼠腓肠肌 MDA 水平显著降低 ($P < 0.01$), 且与低剂量组比较亦显著降低 ($P < 0.01$), 见图 5。

4 讨论

恶液质是癌症患者常见的并发症之一, 严重影响着放化疗的治疗效果和疾病预后, 已成为降低患者生存质量, 导致死亡的主要原因之一。有研究表明癌症恶液质的发生机制与能量代谢循环破坏和线粒体功能障碍有关^[6]。有研究发现 Lweis 肺癌小鼠



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$
 ** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group

图 5 参芪扶正注射液对恶液质模型小鼠腓肠肌 MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 5 Effect of Shenqi Fuzheng Injection on level of MDA in gastrocnemius muscle of model mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

的线粒体氧化功能损伤和 ATP 含量下降在癌症恶液质引起的肌肉萎缩前即出现, 表明了肌肉线粒体的功能变性、ATP 代谢异常直接参与了癌症恶液质的产生^[7]。线粒体作为细胞的“能量工厂”, 是细胞能量生成的核心, 同时也参与调控许多中间代谢产物的去向、钙缓冲及细胞凋亡等进程。其中, PGC-1 是线粒体调节葡萄糖和脂肪酸代谢的关键分子, 4HNE 作为膜脂质损伤的结构蛋白, 代表着线粒体氧化应激损伤的早期事件^[8]。本研究发现, 癌症恶液质小鼠模型的腓肠肌 PGC-1 和 4HNE 的表达水平明显升高, 这表明癌症恶液质状态下, 肿瘤快速发展, 营养剥夺及氧化损伤加重, 进一步破坏了线粒体能量代谢的功能; 而参芪扶正注射液降低了腓肠肌 PGC-1 和 4HNE 的表达, 表明其具有保护线粒体能量代谢、减轻氧化应激水平的功效, 但具体的作用机制有待进一步研究。

线粒体的氧化功能正常是产生 ATP 的必要条件, 一旦正常的氧化功能损伤, 能量代谢失衡, 则导致细胞不能合成足够的 ATP 而无法完成正常的生命活动。恶液质状态下, 肿瘤的快速进展, 引起氧化损伤加重, 进一步导致线粒体氧化功能的紊乱, 而 MDA 作为生物膜系统脂质过氧化损伤反应的一种产物, 是反映机体氧化损伤程度的最经典指标^[9]。本实验结果发现, 癌症恶液质小鼠腓肠肌的 ATP 合成明显降低, 而 MDA 的合成增多, 这表明癌症恶液质的产生可能与腓肠肌中线粒体氧化损伤及线粒

体功能障碍有关。参芪扶正注射液干预后的恶液质小鼠体质量明显增加, 肌肉丢失减少, ATP 的合成增加, 而 MDA 水平明显降低, 表明了参芪扶正注射液可以改善癌症恶液质状态, 其中减少肌肉丢失可能与减轻腓肠肌的线粒体的氧化损伤、保护线粒体功能有关。

综上所述, 线粒体能量代谢可能参与了癌症恶液质的产生, 参芪扶正注射液可以明显改善癌症恶液质状态, 其机制可能与调节腓肠肌中线粒体功能、减轻线粒体氧化损伤有关。本研究提示线粒体功能及能量代谢可能是改善癌症恶液质状态的重要靶点, 为中药保护线粒体功能、改善癌症恶液质机制的研究提供了重要的线索。

参考文献

- [1] 骆衍新. 欧洲癌症恶液质临床指南解读 [J]. 肿瘤代谢与营养电子杂志, 2014, 1(1): 33-35.
- [2] Argiles J M, Busquets S, Stemmler B, et al. Cancer cachexia: Understanding the molecular basis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(11): 754-762.
- [3] 刘汇泉, 于世英. 肿瘤恶病质发病机制和临床诊疗的研究进展 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2018, 23(7): 648-654.
- [4] Xiao C, Beitler J J, Higgins K A, et al. Differential regulation of NF- κ B and IRF target genes as they relate to fatigue in patients with head and neck cancer [J]. *Brain Behav Immun*, 2018, doi: 10.1016/j.bbi.2018.09.013.
- [5] 赵凡尘, 李雁徐, 夏婷, 等. 丙氨酰-谷氨酰胺营养支持联合参芪扶正注射液对恶性肿瘤恶液质患者白蛋白的影响 [J]. 吉林中医药, 2014, 34(8): 807-809.
- [6] 曹露, 漆正堂, 丁树哲. 有氧糖酵解与肿瘤恶病质的运动防御作用及机制 [J]. 体育科学, 2019, 39(2): 73-81.
- [7] Sandri M. Protein breakdown in cancer cachexia [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2016, doi: 10.1016/j.semcdb.2015.11.002.
- [8] 李勇, 梁亚州, 丁永丽, 等. PTD4-Cu/Zn SOD 融合蛋白对缺氧复氧损伤模型大鼠心肌细胞 H9C2 心肌线粒体功能的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2018, 16(11): 1497-1501.
- [9] 何源源, 徐锦江. 有氧运动对乳腺癌大鼠癌因性疲乏后骨骼肌中线粒体动力学与功能的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2018, 33(8): 885-890.