

基于 EGFR/PI3K/Akt 信号通路探讨紫龙金片联合埃克替尼对 Lewis 荷瘤小鼠的抑瘤作用及机制

李 朕^{1,2}, 姜 坤^{1#}, 张洪亮³, 李 琦^{1*}, 杨百京^{1,2*}

1. 石河子大学第一附属医院, 新疆 石河子 832000

2. 石河子大学附属中医医院, 新疆 石河子 832000

3. 新疆医科大学附属中医医院 肿瘤二科, 新疆 乌鲁木齐 830000

摘 要: 目的 探讨紫龙金片联合埃克替尼通过表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)/磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 通路对荷瘤小鼠的抑瘤作用及细胞凋亡的机制。方法 建立 Lewis 肺癌荷瘤小鼠模型, 随机分为模型组、紫龙金片 (375 mg/kg) 组、埃克替尼 (5 mg/kg) 组、紫龙金片 (375 mg/kg) + 埃克替尼 (5 mg/kg) 联合治疗组, 每组 10 只。各给药组 ig 相应药物 (10 mL/kg), 模型组 ig 等量生理盐水, 2 次/d, 间隔 12 h, 持续 14 d。末次给药后切除移植瘤, 观察肿瘤质量、肿瘤体积, 计算肿瘤生长抑制率; 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察小鼠瘤体病理形态学变化; 末端脱氧核苷酸转移酶介导的缺口末端标记 (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL) 法测定肿瘤细胞凋亡率; 蛋白免疫印迹 (Western blotting, WB) 法检测瘤组织中 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax)、B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9 (cystein-aspartate protease-9, Caspase-9) 及 EGFR/PI3K/Akt 通路相关蛋白的表达情况。结果 与模型组比较, 紫龙金片组、埃克替尼组及联合治疗组小鼠的移植瘤质量及肿瘤生长抑制率显著降低 ($P < 0.05$); 与单独给药比较, 联合治疗组的肿瘤生长抑制率显著降低 ($P < 0.05$)。HE 染色结果显示, 各给药组肿瘤组织中均出现不同程度的坏死, 其中联合治疗组的坏死区域最为明显。TUNEL 检测结果显示, 与模型组比较, 各给药组的肿瘤细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001); 与单独给药组比较, 联合治疗组的肿瘤细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01)。WB 结果显示, 与模型组比较, 紫龙金片组、埃克替尼组及联合治疗组的瘤组织中 Bax、Caspase-9 表达显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), Bcl-2 表达显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001); 与单独给药组比较, 联合治疗组的变化最为明显 ($P < 0.05$ 、0.01)。与模型组比较, 各给药组的磷酸化-EGFR (phosphorylated-EGFR, p-EGFR)、p-PI3K、p-Akt 和 p-mTOR 蛋白的表达均显著降低 ($P < 0.05$); 与单独给药比较, 联合治疗组的下降幅度最大 ($P < 0.05$)。结论 紫龙金片联合埃克替尼能够显著抑制荷瘤小鼠肿瘤的生长, 促进肿瘤细胞凋亡, 其机制可能是通过调控 EGFR/PI3K/Akt 信号通路的关键靶点, 上调促凋亡蛋白 Bax 和 Caspase-9 的表达, 下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 从而协同发挥抑瘤作用。

关键词: EGFR/PI3K/Akt 信号通路; 紫龙金片; 埃克替尼; Lewis 荷瘤小鼠; 抗肿瘤

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)02-0529-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.02.016

Exploring tumour-suppressive effect and mechanism of action of Zilongjin Tablets combined with icotinib in Lewis tumor-bearing mice based on EGFR/PI3K/Akt signalling pathway

LI Zhen^{1,2}, JIANG Kun¹, ZHANG Hongliang³, LI Qi¹, YANG Baijing^{1,2}

1. The First Affiliated Hospital of Shihezi University, Shihezi 832000, China

2. Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine of Shihezi University, Shihezi 832000, China

3. Department of Oncology II, Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine of Xinjiang Medical University, Urumqi, 830000, China

收稿日期: 2024-08-20

基金项目: 第四届国医大师传承工作室和第二届全国名中医传承工作室建设项目 [国中医药人教函 (2022) 75 号]; 石河子大学自然科学项目 (ZZC201945A)

作者简介: 李 朕, 女, 副主任医师, 从事中西医结合防治肿瘤研究。E-mail: 36333627@qq.com

#共同第一作者: 姜 坤, 男, 硕士研究生, 从事组织工程研究。E-mail: jkun233@outlook.com

*通信作者: 李 琦, 女, 副主任医师, 副教授, 从事组织工程研究。E-mail: liqi236@hsc.pku.edu.cn

杨百京, 男, 主任医师, 教授, 从事中西医结合防治肿瘤研究。E-mail: 252656854@qq.com

Abstract: Objective To investigate the mechanism of tumour-suppressive effect and apoptosis of Zilongjin Tablets combined with icotinib through epidermal growth factor receptor (EGFR)/phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) pathway in tumor-bearing mice. **Methods** Lewis lung cancer mouse model was established, and ten mice were randomly divided into model group, Zilongjin Tablets (375 mg/kg) group, icotinib (5 mg/kg) group, and Zilongjin Tablets (375 mg/kg) + icotinib (5 mg/kg) combination treatment group, with ten mice in each group. Each administration group received the corresponding drug (10 mL/kg), and the model group received an equal amount of saline, twice/d, at an interval of 12 h for 14 d. The transplanted tumor was resected after the last administration of the drug, and the tumor mass and tumor volume were observed, and the tumor growth inhibition rate was calculated, the hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological and morphological changes of the tumors in mice, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL) method was used to determine the apoptosis rate of the tumor cells. Western blotting (WB) was used to detect Bcl-2-associated X protein (Bax), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), cysteine-aspartate protease-9 (Caspase-9), and EGFR/PI3K/Akt pathway related protein expression. **Results** Compared with the model group, the transplanted tumor mass and tumor growth inhibition rate of mice in the Zilongjin Tablets group, the icotinib group and the combined treatment group were significantly reduced ($P < 0.05$), compared with the drug alone, the tumor growth inhibition rate of the combined treatment group was significantly reduced ($P < 0.05$). HE results showed that necrosis of varying degrees was observed in tumor tissues of the various groups of the drug administration, with the most pronounced necrotic areas in the combined treatment group. TUNEL assay results showed that the apoptosis rate of tumor cells in each administration group was significantly higher compared with that in the model group ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and the apoptosis rate of tumor cells in the combination therapy group was significantly higher compared with that in the drug alone administration group ($P < 0.05, 0.01$). WB results showed that the expression of Bax and Caspase-9 was significantly higher in tumor tissues of the Zilongjin Tablets group, the icotinib group and the combination therapy group compared with that in the model group ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and Bcl-2 expression was significantly lower ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), the most obvious changes were observed in the combination therapy group compared with the drug alone administration group ($P < 0.05$), compared with the administration of the drug alone, the combined treatment group showed the greatest decrease ($P < 0.05$). **Conclusion** Zilongjin Tablets combined with icotinib can significantly inhibit the growth of tumors and promote apoptosis of tumor cells in tumor-bearing mice, and the mechanism may be to synergistically exert a tumor-suppressive effect by regulating the key targets of the EGFR/PI3K/Akt signalling pathway, up-regulating the expression of pro-apoptotic proteins Bax and Caspase-9, and down-regulating the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2.

Key words: EGFR/PI3K/Akt signalling pathway; Zilongjin Tablets; icotinib; Lewis tumor-bearing mice; antitumor

肺癌是最常见且致命的恶性肿瘤之一,2022 年全球新发肺癌病例为 248 万,死亡病例为 181 万^[1]。在我国,肺癌的发病率和死亡率位居所有恶性肿瘤之首,并呈逐年增加的趋势^[2],已成为亟需有效治疗的重大公共卫生问题。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是肺癌中最常见的亚型,占绝大多数病例^[3]。特别是在晚期阶段,由于肿瘤快速进展和远处转移,患者的治疗选择十分有限,生存率极低。目前,肺癌的主要治疗方法包括手术、放疗、化疗和靶向治疗。然而,这些手段在临床实践中存在明显局限性,手术仅适用于早期患者,对晚期患者疗效有限;放疗和化疗虽可一定程度控制肿瘤进展,但往往伴随严重的不良反应,显著降低患者的生活质量,同时易导致耐药性及疗效递减。此外,靶向治疗虽然具有一定的选择性和疗效,但耐药性的出现及相关副作用限制了其广泛应用^[1-2]。因此,寻找安全有效的治疗方案

已成为肺癌研究的核心目标。

近年来,中西医结合治疗因其多靶点、多通路的整体调控特性,在抑制肿瘤生长和缓解治疗相关不良反应方面展现出独特优势,备受关注。紫龙金片是一种传统中药复方,主要由黄芪、当归、白英、龙葵、丹参、半枝莲、蛇莓和郁金组成。其中,黄芪和当归作为君药,具有益气补血的作用;丹参、白英、龙葵和半枝莲作为臣药,发挥清热解毒、活血化瘀的功效;蛇莓和郁金作为佐药,能够化痰祛瘀,调理气血,减少痰瘀生成,从而延缓肿瘤的发生和发展。紫龙金片广泛应用于以气血两虚为主症的原发性肺癌患者,其主要功效为益气养血、清热解毒、理气化痰。既往临床研究表明,紫龙金片在单药维持治疗、联合手术、放化疗及靶向治疗中均表现出良好的疗效,并能显著改善肺癌患者的症状,增强免疫力,抑制肿瘤细胞生长,延长患者的

生存期, 且具有较高的安全性。

埃克替尼为表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 抑制剂, 是一种靶向治疗药物, 在非小细胞肺癌的治疗中广泛应用并取得了良好疗效^[4]。研究表明, 紫龙金片联合埃克替尼治疗晚期非小细胞肺癌患者, 有延长无进展生存期的趋势, 并能改善患者的临床症状和提高生活质量^[5-6]。然而, 紫龙金片与埃克替尼在肺癌治疗中的协同作用机制尚不明确。

根据前期网络药理学和生物信息学分析结果, 紫龙金片联合埃克替尼可能调控多靶点、多通路, 尤其是 EGFR 和磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 通路发挥协同抗肿瘤作用, 对 NSCLC 产生显著的治疗效果^[7]。据此, 本研究基于 EGFR/PI3K/Akt 信号通路探讨紫龙金片联合埃克替尼对荷瘤小鼠的抑瘤作用及其潜在的协同机制, 以期对 NSCLC 的联合治疗提供理论依据。

1 材料

1.1 动物与细胞株

SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠, 50 只, 4~6 周龄, 体质量 18~22 g, 购自上海西普尔必凯实验动物有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (沪) 2020-0016。所有小鼠在无菌环境中饲养, 保持恒温 25 °C, 12 h/12 h 昼夜循环, 饲养期间提供充足的食物和水。本研究动物实验经石河子大学第一附属医院实验动物伦理委员会批准 (批准号 A2023-069-01)。

小鼠 Lewis 肺癌细胞 (批号 GD-C9819889) 购自上海冠导生物工程有限公司。

1.2 药品与试剂

紫龙金片 (国药准字 Z20010064, 批号 GA35791) 购自天津中新药业集团股份有限公司隆顺榕制药厂; 盐酸埃克替尼片 (国药准字 H20110061, 批号 A230619) 购自贝达药业股份有限公司; DMEM 培养基 (批号 3-2010) 购自美国 CHI Scientific 公司; 胰酶 (批号 YT00044) 购自北京伊塔生物科技有限公司; 无菌生理盐水 (批号 FS-P0178) 购自上海抚生实业有限公司; RIPA 裂解液 (LG-PS0013) 上海羽朵生物科技有限公司批号; 苯甲基磺酰氟 (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) 蛋白酶抑制剂 (批号 MBS355475-E) 购自美国 MyBioSource 公司; 苏木素-伊红

(hematoxylin-eosin, HE) 染色试剂盒 (批号 C0105S) 购自上海碧云天公司; TUNEL 染色试剂盒 (批号 P-CA-301) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司; EGFR 抗体及磷酸化-EGFR 抗体 (phosphorylated EGFR, p-EGFR, 批号 B9701、B8601) 购自美国 ImmunoWay 公司; p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 及 p-mTOR 抗体 (批号 17366、4257、4060、9272、2983、5536) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司; β -肌动蛋白抗体 (β -actin, 批号 66009-1-Ig)、B 细胞淋巴瘤-2 抗体 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2, 批号 68103-1-Ig)、Bcl-2 关联 X 蛋白单克隆抗体 (monoclonal antibody to Bcl-2-associated X protein, Bax, 批号 50599-2-Ig) 均购自武汉三鹰生物技术有限公司; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9 (cystein-aspartate protease-9, Caspase-9, 批号 GTX112888) 抗体购自美国 GeneTex 公司。

1.3 仪器

1704150 型 Trans-Blot Turbo 全能型蛋白转印系统、12003154 型 ChemiDoc MP 全能型成像系统、1658004 型垂直电泳槽及电泳仪 (美国 BIO-RAD 公司); Synergy H1 型酶标仪 (美国 BioTek 公司); UMC 800TFL 型生物荧光显微镜 (广州科适特科学仪器公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药

根据参考文献方法^[8-9], 构建 Lewis 肺癌荷瘤小鼠模型。从液氮中取出 Lewis 肺癌细胞株, 在 37 °C 恒温水浴中解冻, 采用 DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养至对数生长期。用胰酶消化细胞, 调整至 5×10^6 个/mL 的细胞悬液。将 10 只小鼠右前肢腋窝 sc 0.2 mL 细胞悬液, 建立 Lewis 肺癌荷瘤小鼠模型。在无菌条件下饲养 14 d 后, 脱颈椎处死小鼠, 剥离、剪碎、匀浆瘤体组织, 制备成 1×10^7 个/mL 的 Lewis 肿瘤细胞悬液。将 40 只小鼠右前肢腋窝 sc 0.2 mL Lewis 肿瘤细胞悬液。以 7 d 后在接种部位触摸到约黄豆大小的结节状肿块作为造模成功标准^[10]。将造模成功的 40 只小鼠随机分为模型组、紫龙金片 (375 mg/kg) 组、埃克替尼 (5 mg/kg)^[11]组、紫龙金片 (375 mg/kg) + 埃克替尼 (5 mg/kg) 组, 每组 10 只。紫龙金片研磨后溶解于 0.5% 羧甲基纤维素水溶液, 紫龙金片给药剂量

根据临床等效剂量和体表面积折算法确定^[12]。各给药组 ig 相应药物 (10 mL/kg), 模型组 ig 等量生理盐水, 2 次/d, 间隔 12 h, 持续 14 d。末次给药后禁食 24 h, 眼眶静脉采血、处死小鼠、收集肿瘤组织。

2.2 肿瘤体积及肿瘤生长抑制率检测

给药治疗期间, 测量小鼠腋下肿瘤的最长径和最短径, 计算肿瘤体积。末次给药后, 脱颈处死小鼠, 剖取肿瘤组织称定质量, 计算肿瘤生长抑制率。用游标卡尺测定肿瘤最长径 (a) 和最短径 (b), 计算移植瘤体积。

$$\text{肿瘤体积} = ab^2/2$$

$$\text{肿瘤生长抑制率} = (\text{模型组平均肿瘤质量} - \text{给药组平均肿瘤质量}) / \text{模型组平均肿瘤质量}$$

2.3 HE 染色法观察 Lewis 肺癌小鼠肿瘤组织病理形态学变化

取各组小鼠的肿瘤组织, 放入 10% 甲醛水溶液中固定 48 h 后, 进行组织包埋, 切成 3 μm 的连续切片。切片依次经过二甲苯脱蜡、乙醇梯度脱水、清水漂洗。将切片浸入苏木素染液中染色 3~5 min, 清水洗涤, 使用分化液分化, 再次洗涤后, 返蓝, 流水冲洗后脱水, 再将切片浸入伊红染液中染色 5 min。最后, 将切片依次放入无水乙醇、二甲苯进行脱水透明, 并用中性树胶封片。于显微镜下观察并拍照, 观察肿瘤组织的病理形态学变化。

2.4 TUNEL 法检测移植瘤细胞凋亡率

将移植瘤组织固定包埋并切片, 切片依次依次经过二甲苯脱蜡、乙醇梯度脱水, 随后用蒸馏水洗涤。加入蛋白酶 K 工作液, 在 37 °C 温箱中

孵育 22 min 后, 用 PBS 溶液洗涤 3 次, 每次 5 min。晾干后, 滴加 0.1% Triton 溶液, 常温孵育 20 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。切片稍甩干后, 滴加 buffer 溶液, 在常温下孵育 10 min。晾干后, 滴加反应液 37 °C 孵育 2 h。洗涤 3 次后, 滴加 DAPI 染液, 避光室温孵育 10 min。PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 晾干后, 滴加抗荧光淬灭封片剂封片。在荧光显微镜下观察并拍照, 计算细胞凋亡率。

$$\text{细胞凋亡率} = \text{TUNEL 阳性细胞数} / \text{总细胞数}$$

2.5 Western blotting 法检测肿瘤组织中 EGFR/PI3K/Akt/mTOR 信号通路及凋亡因子蛋白表达

取适量肿瘤组织提取蛋白, 使用 BCA 法检测蛋白浓度, 在 100 °C 水中煮沸 5 min 使其变性, 蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 使用 5% 脱脂奶粉溶液封闭 2 h, 分别滴加一抗, 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜后, 滴加二抗 (1:5000), 室温孵育 2 h。使用 ECL 发光液显影, 并采用 Image-J 软件分析蛋白条带。

2.6 统计学分析

使用 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析, 所有数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组比较采用单因素方差分析, 两两比较则使用 q 检验。

3 结果

3.1 对 Lewis 荷瘤小鼠肿瘤生长抑制作用的影响

与模型组比较, 紫龙金片组、埃克替尼组及联合治疗组小鼠的肿瘤质量、肿瘤体积均显著降低 ($P < 0.05$); 与单独给药组比较, 联合治疗组小鼠肿瘤质量、肿瘤体积显著降低 ($P < 0.05$)、肿瘤生长抑制率显著升高 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 紫龙金片联合埃克替尼对肿瘤体积、质量和肿瘤生长抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Zilongjin Tablets combined with icotinib on tumor volume, weight, and tumor growth inhibition rate

($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	肿瘤体积/mm ³	肿瘤质量/g	肿瘤生长抑制率/%
模型	—	323.76 ± 12.25	7.25 ± 1.29	—
紫龙金片	375	148.77 ± 10.53*	4.77 ± 0.46*	31.73 ± 16.85
埃克替尼	5	146.16 ± 12.01*	4.53 ± 0.68*	36.90 ± 6.99
紫龙金片+埃克替尼	375+5	62.89 ± 11.22* ^{△▲}	3.12 ± 0.40* ^{△▲}	55.31 ± 11.41 ^{△▲}

与模型组比较: * $P < 0.05$; 与紫龙金片组比较: [△] $P < 0.05$; 与埃克替尼组比较: [▲] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs model group; [△] $P < 0.05$ vs Zilongjin Tablets group; [▲] $P < 0.05$ vs icotinib group.

3.2 对 Lewis 荷瘤小鼠肿瘤组织病理形态学变化的影响

如图 1 所示, 模型组的肿瘤细胞呈现高度密集状态, 细胞大小和形状不规则, 细胞核深染且致密,

间质中淋巴细胞浸润较少。紫龙金片组、埃克替尼组及联合治疗组的肿瘤细胞排列较为稀疏, 细胞核缩小且染色减淡, 坏死区及核碎裂现象明显增多, 其中, 联合治疗组的肿瘤细胞密度最低。

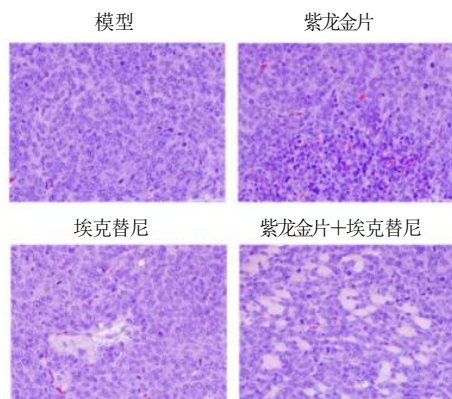


图 1 紫龙金片联合埃克替尼对肿瘤组织病理形态学的影响 (HE, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of Zilongjin Tablets combined with icotinib on pathological morphology of tumor tissue (HE, $\times 200$)

3.3 对 Lewis 荷瘤小鼠肿瘤组织细胞凋亡情况的影响

如图 2、3 所示, 模型组显示少量散在的凋亡细胞, 与模型组比较, 紫龙金片、埃克替尼及联合治疗组的肿瘤组织中细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001); 与单独给药组比较, 联合治疗组的细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.4 对 EGFR/PI3K/Akt/mTOR 信号通路及凋亡蛋白表达的影响

如图 4 所示, 与模型组比较, 紫龙金片、埃克替尼及联合治疗组均显著显著下调 EGFR、p-EGFR、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR 的表达 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 上调促凋亡蛋白 Caspase-9 和 Bax 的表达 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 同时下调了抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。埃克替尼和紫龙金片组对以上蛋白的调节作用趋势一致, 但埃克替尼组稍优于紫龙金片组, 而联合治疗组在调节这些蛋白表达上的效果显著优于单独治疗组 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

4 讨论

靶向治疗是 NSCLC 个体化治疗的重要方向, 特别是针对 EGFR 突变患者的精准治疗。埃克替尼作为一种靶向 EGFR 的特异性药物, 通过竞争性结合 EGFR 的 ATP 结合位点, 抑制酪氨酸激酶活性, 从而阻断下游信号传导, 显著抑制肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移^[13]。凭借显著疗效, 埃克替尼已成为 EGFR 突变患者的一线治疗药物^[14]。然而, 由于肿瘤异质性及治疗过程中耐药性的出现, 单一靶向

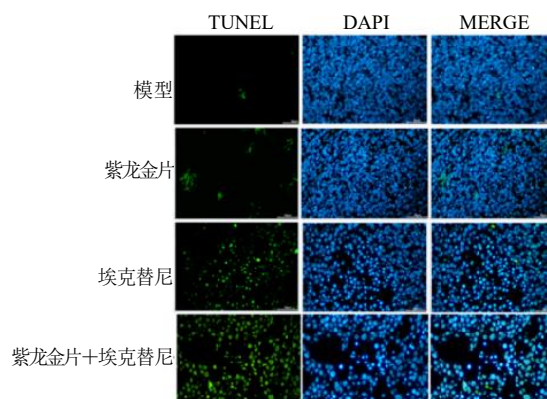
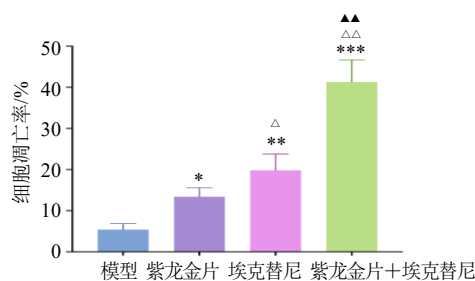


图 2 TUNEL 法检测各组肿瘤细胞凋亡情况 ($\times 200$)
Fig. 2 TUNEL assay was used to detect apoptosis of tumor cells in each group ($\times 200$)



与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与紫龙金片组比较: ^ $P < 0.05$ ^^ $P < 0.01$; 与埃克替尼组比较: ^ $P < 0.05$ ^^ $P < 0.01$, 图 4 同。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group, ^ $P < 0.05$ ^^ $P < 0.01$ vs Zilongjin Tablets group; ^ $P < 0.05$ ^^ $P < 0.01$ vs icotinib group, same as figure 4.

图 3 紫龙金片联合埃克替尼对肿瘤组织细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 3 Effect of Zilongjin Tablets combined with icotinib on apoptosis rate of tumor tissue ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

药物的疗效逐渐减弱, 这促使联合治疗策略成为提高疗效和延缓耐药性的重要方向。

课题组前期通过网络药理学分析发现, 紫龙金片的主要活性成分, 如槲皮素、木犀草素、山柰酚和丹酚酸 B 等, 能够通过多靶点调控与肿瘤发生和发展相关的信号通路, 包括 EGFR、PI3K/Akt、HIF-1 和 JAK-STAT 等^[15], 从而抑制肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭, 并促进细胞凋亡; 结合生物信息学方法研究紫龙金片联合埃克替尼治疗 NSCLC 的潜在作用机制, 发现紫龙金片与埃克替尼联合使用能够通过多靶点、多通路来治疗 NSCLC, 其机制主要涉及 EGFR 和 PI3K/Akt 信号通路的调控^[16]。

本研究基于 EGFR/PI3K/Akt 信号通路, 深入探

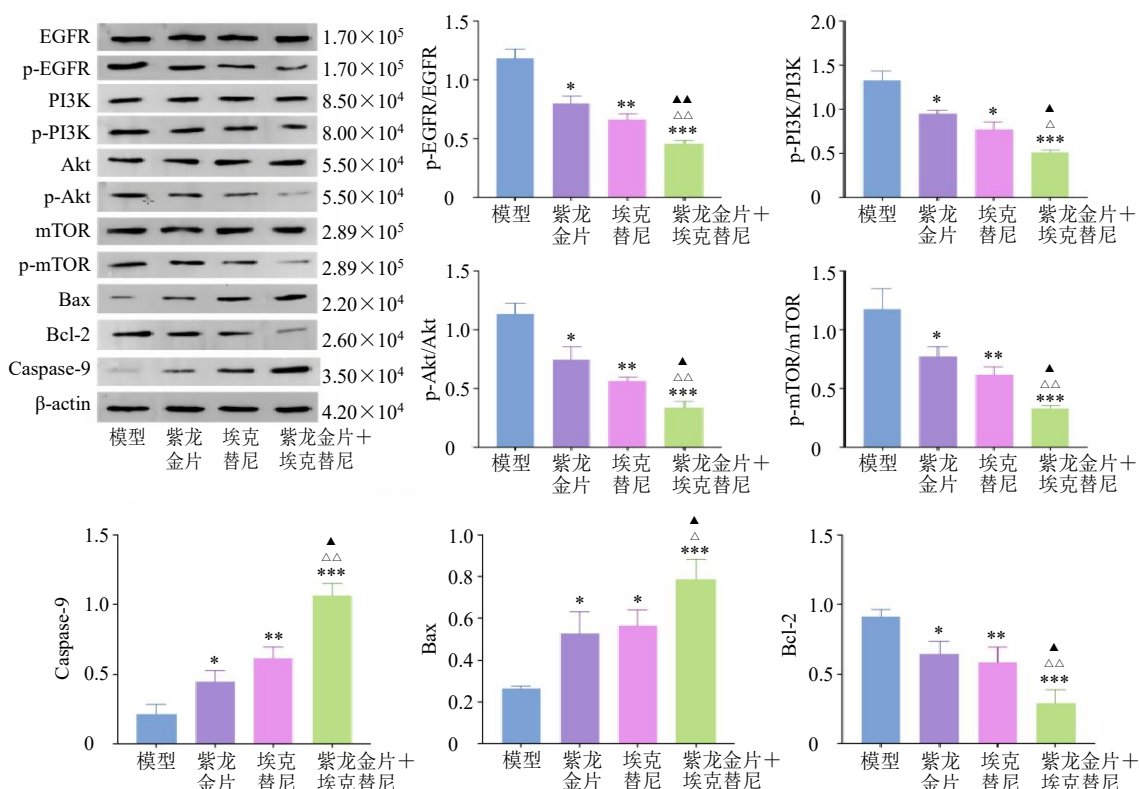


图 4 紫龙金片联合埃克替尼对肿瘤组织中凋亡蛋白及 EGFR/PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 4 Effects of Zilongjin Tablets combined with icotinib on expression of apoptotic proteins and EGFR/PI3K/Akt/mTOR signaling pathway related proteins in tumor tissues ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

讨论了紫龙金片联合埃克替尼对 Lewis 荷瘤小鼠的抑瘤作用及其机制。研究结果表明,联合治疗组在抑制肿瘤生长方面显著优于单药组,具体表现为肿瘤体积显著缩小,肿瘤质量显著降低,且肿瘤生长抑制率明显提高。组织学检测进一步揭示了联合用药的作用机制。HE 染色显示,联合治疗显著扩大了肿瘤坏死区域,同时显著降低了细胞密度,提示联合治疗不仅有效抑制了肿瘤细胞的增殖,还可能通过改变肿瘤微环境削弱其存活条件。TUNEL 检测显示,细胞凋亡率的显著增加表明,联合治疗不仅能够有效抑制肿瘤细胞的存活能力,还可能通过启动或增强内源性凋亡途径,使肿瘤细胞更易发生程序性死亡。这一作用显然优于单药治疗,说明 2 种药物在作用机制上形成了优势互补,进一步验证了联合用药的协同效应。此外,深入的分子机制研究显示,紫龙金片与埃克替尼联合治疗在调控关键信号通路方面具有显著优势。

EGFR/PI3K/Akt 信号通路作为非小细胞肺癌增殖与存活的核心调控轴,其异常激活不仅促进肿瘤细胞的增殖与侵袭,还与治疗耐药性密切相关。

EGFR 通过与配体结合诱导二聚化,激活下游 PI3K 和 Akt,从而调控细胞增殖、代谢和凋亡等生物学过程。Akt 作为该通路的核心节点,可通过磷酸化作用激活 mTOR,进一步调控细胞生长、自噬及代谢^[17-19]。研究表明,埃克替尼通过抑制 EGFR 的磷酸化显著降低下游信号蛋白的活性,但其单药疗效受限于 EGFR 突变或旁路信号的激活。紫龙金片的多靶点作用补充了埃克替尼在信号抑制上的不足,显著增强了对 EGFR/PI3K/Akt 通路的整体抑制效果,尤其是对 p-PI3K 和 p-Akt 的抑制更为显著。此外,细胞凋亡是抗肿瘤治疗的重要机制之一。凋亡通路可分为外源性途径和内源性途径,后者通过线粒体信号通路发挥关键作用。Caspase-9、Bax 和 Bcl-2 是内源性凋亡途径的重要调节分子,其中 Caspase-9 为促凋亡效应蛋白,Bax 作为促凋亡因子增强凋亡信号,而 Bcl-2 作为抗凋亡因子则通过抑制线粒体外膜通透性抑制凋亡^[20-22]。本研究中,紫龙金片与埃克替尼联合治疗显著上调了 Caspase-9 和 Bax 的表达,同时下调了 Bcl-2 的表达,提示联合治疗通

过增强线粒体介导的凋亡途径进一步促进了肿瘤细胞的凋亡。这一结果表明,联合用药不仅在信号通路调控上展现协同作用,同时通过上下游分子的联合调控对肿瘤细胞生存与凋亡形成多层次干预。

尽管本研究揭示了紫龙金片与埃克替尼联合治疗的显著抗肿瘤效应,但仍存在一定局限性。首先,关于紫龙金片多活性成分的具体作用靶点及相互作用机制尚需进一步明确。其次,联合治疗的剂量优化及给药时程设计需通过更大规模的动物实验及临床研究加以验证。此外,EGFR 以外的其他旁路信号通路是否参与联合治疗的抗肿瘤效应也需进一步探讨。未来研究应聚焦于优化联合治疗方案,并探讨其在不同基因型 NSCLC 患者中的适用性。同时,联合治疗与免疫检查点抑制剂等新兴治疗手段的联合应用也值得深入研究。

综上,本研究围绕 EGFR/PI3K/Akt 信号通路,探讨紫龙金片联合埃克替尼在非小细胞肺癌治疗中的潜力。结果表明,联合用药在抑制肿瘤生长和促进细胞凋亡方面具有协同作用。紫龙金片通过增强 EGFR 信号通路的抑制效果,并调控凋亡相关分子实现多层次干预,为 NSCLC 治疗提供了新的思路。未来优化联合治疗方案并深入机制研究,将有助于拓展其临床应用价值。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 曹梦迪,陈万青. GLOBOCAN 2022 全球癌症统计数据解读 [J]. 中国医学前沿杂志: 电子版, 2024, 16(6): 1-5.
- [2] 王培宇,黄祺,王少东,等. 《全球癌症统计数据 2022》要点解读 [J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2024, 31(7): 933-954.
- [3] Kong F, Wang C, Zhao L, *et al.* Traditional Chinese medicines for non-small cell lung cancer: Therapies and mechanisms [J]. *Chin Herb Med*, 2023, 15(4): 509-515.
- [4] 王实慧,汤姝. 埃克替尼联合吉西他滨、顺铂化疗对晚期非小细胞肺癌患者血管新生和治疗获益的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2024, 44(11): 1317-1321.
- [5] 滕华,孙宁宁,张利,等. 紫龙金联合埃克替尼治疗表皮生长因子受体突变阳性晚期肺腺癌的疗效分析 [J]. 中草药, 2021, 52(18): 5643-5648.
- [6] 于法明,姜东亮. 紫龙金片联合 GP 方案治疗非小细胞肺癌的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(5): 1184-1188.
- [7] 谢远平,田宁,宁华,等. 基于网络药理学和分子对接

的紫龙金片治疗肺癌的作用机制研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2023, 50(7): 179-183.

- [8] 李宁,张晓晔,蒋中秀,等. 小鼠 Lewis 肺癌原位模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2014(5): 79-83.
- [9] 王锋,田小丽,马诗静,等. 绿色荧光蛋白标记的 Lewis 肺癌小鼠原位模型的建立及鉴定 [J]. 武汉大学学报: 医学版, 2018, 39(5): 689-692.
- [10] 孙玲玲,綦向军,李晏龙,等. 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 [J]. 中医杂志, 2024, 65(19): 2032-2040.
- [11] 彭渊,沈丽,陶艳艳,等. 埃克替尼对二甲基亚硝胺诱导肝纤维化大鼠的作用 [J]. 中国新药与临床杂志, 2015, 34(5): 346-350.
- [12] 于昕,王天. 药理学实验与新药评价基础 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2023: 26-27.
- [13] 吴婷婷,任春霞,朱李飞,等. 埃克替尼治疗非小细胞肺癌的研究进展 [J]. 中国新药与临床杂志, 2021, 40(8): 550-555.
- [14] 罗国庆,卢潇,李定慧,等. 2024 年第 5 版《NCCN 肿瘤临床实践指南: 非小细胞肺癌》更新解读 [J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2024, 31(7): 955-961.
- [15] 宋从宽,李东航,卢子龙,等. 基于网络药理学和分子对接探究紫龙金片主要成分治疗非小细胞肺癌的作用机制 [J]. 武汉大学学报: 医学版, 2023, 44(9): 1078-1085.
- [16] 韩雪. 网络药理学联合分子对接探讨紫龙金片延缓晚期肺腺癌 EGFR-TKI 耐药机制 [D]. 咸阳: 陕西中医药大学, 2024.
- [17] Messeha S S, Noel S, Zarmouh N O, *et al.* Involvement of AKT/PI3K pathway in sanguinarine's induced apoptosis and cell cycle arrest in triple-negative breast cancer cells [J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2023, 20(4): 323-342.
- [18] Yu L, Wei J, Liu P D. Attacking the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway for targeted therapeutic treatment in human cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 85: 69-94.
- [19] Li D, Ni S, Miao K S, *et al.* PI3K/Akt and caspase pathways mediate oxidative stress-induced chondrocyte apoptosis [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2019, 24(1): 195-202.
- [20] 姜西子,金艾琳,马琳,等. 非小细胞肺癌中 PHF20 与凋亡相关蛋白 Bax 的表达及相关性 [J]. 中国医科大学学报, 2017, 46(10): 887-890.
- [21] 陈骢,郝健淇,彭皓宁,等. Bcl-2 家族凋亡调控作用及其介导的抗肿瘤药物治疗后耐药的研究进展 [J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2023, 30(1): 140-148.
- [22] 李云飞,刘代顺,刘振峰. Caspase-9、XIAP 与非小细胞肺癌的相关性 [J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(20): 4403-4406.

[责任编辑 罗 曦]