

# 基于核转录因子- $\kappa$ B 信号通路研究小青龙汤对肺癌 H292 细胞分泌黏蛋白 5AC 的调控机制

蒋时红 贺倩文 张培旭 桑亚洲 刘冬静 刘燕 陈玉龙 吴耀松

河南中医药大学, 河南郑州 450046

通信作者: 吴耀松, Email: linawys@163.com

**【摘要】** 目的 探讨小青龙汤对人肺癌 H292 细胞活性及分泌黏蛋白 5AC (MUC5AC) 的影响, 研究小青龙汤治疗肺癌的分子机制。方法 选用对数分裂期的 H292 细胞, 实验分为空白对照组、炎症模型组、核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 通路抑制剂组 [吡咯烷二硫代氨基甲酸酯 (PDTC) 100  $\mu$ mol/L]、小青龙汤高、中、低剂量组 (1 000、500、250 mg/L)。采用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 法检测各剂量组小青龙汤对 H292 细胞活性的影响; 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 诱导的 H292 细胞分泌 MUC5AC 的量以及高、中剂量小青龙汤对炎症模型细胞分泌 MUC5AC、白细胞介素-8 (IL-8)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的影响; 采用蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测小青龙汤对炎症模型细胞 NF- $\kappa$ B 信号通路及其抑制蛋白 (I $\kappa$ B) 和 P65 蛋白表达的影响。结果 与空白对照组比较, 小青龙汤作用于细胞 24 h 和 48 h 后其吸光度值 (A 值) 均明显降低, 并呈现剂量依赖性, 其中小青龙汤 1 000 mg/L 和 500 mg/L 2 个浓度对细胞的抑制率比较适合后续实验。与炎症模型组比较, PDTC 组、小青龙汤高、中剂量组 MUC5AC、IL-8、TNF- $\alpha$  的分泌均明显降低, 其中以小青龙汤高剂量组降低最为明显 [MUC5AC (ng/L): 胞外含量为 1 318.63 $\pm$ 126.86 比 2 531.94 $\pm$ 87.77, 胞内含量为 1 048.96 $\pm$ 54.33 比 1 217.57 $\pm$ 80.77, IL-8 (ng/L): 583.94 $\pm$ 28.04 比 832.01 $\pm$ 73.48, TNF- $\alpha$  (ng/L): 104.99 $\pm$ 6.79 比 151.95 $\pm$ 8.21, 均  $P < 0.05$ ]。Western Blot 结果显示: 与空白对照组比较, 炎症模型组中 I $\kappa$ B 的表达明显降低 (I $\kappa$ B/ $\beta$ -actin: 0.524 6 $\pm$ 0.064 1 比 0.918 2 $\pm$ 0.117 2,  $P < 0.05$ ), P65 表达明显升高 (P65/ $\beta$ -actin: 1.203 1 $\pm$ 0.037 9 比 0.978 7 $\pm$ 0.160 5,  $P < 0.05$ ); 与炎症模型组比较, PDTC 组、小青龙汤高剂量组 I $\kappa$ B 表达均明显升高 (I $\kappa$ B/ $\beta$ -actin: 0.935 2 $\pm$ 0.083 3、0.817 8 $\pm$ 0.057 8 比 0.524 6 $\pm$ 0.064 1, 均  $P < 0.05$ ), 而 P65 的表达均明显降低 (P65/ $\beta$ -actin: 0.863 6 $\pm$ 0.059 2、0.931 3 $\pm$ 0.113 3 比 1.203 1 $\pm$ 0.037 9, 均  $P < 0.05$ )。结论 中、高剂量小青龙汤效果最佳, 可抑制肺癌 H292 细胞活性, 降低细胞 MUC5AC 分泌, 减少 IL-8、TNF- $\alpha$  释放, 这可能与调控 NF- $\kappa$ B 信号通路有关。

**【关键词】** 小青龙汤; 肺癌; 核转录因子- $\kappa$ B; 黏蛋白 5AC; 炎症

**基金项目:** 国家自然科学基金 (81503490); 河南省科技攻关项目 (192102310160, 182102310296)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2020.06.025

**Regulatory mechanism of Xiaoqinglong Decoction on mucin 5AC secretion in lung cancer H292 cells based on nuclear transcription factor- $\kappa$ B signaling pathway** Jiang Shihong, He Qianwen, Zhang Peixu, Sang Yazhou, Liu Dongjing, Liu Yan, Chen Yulong, Wu Yaosong  
Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, Henan, China  
Corresponding author: Wu Yaosong, Email: linawys@163.com

**【Abstract】** **Objective** To study the effect of Xiaoqinglong Decoction on the activity and mucin 5AC (MUC5AC) secretion of human lung cancer H292 cells, and to explore the molecular mechanism of Xiaoqinglong Decoction in the treatment of lung cancer. **Methods** Lung cancer H292 cells in logarithmic division were selected and divided into blank control group, inflammation model group, nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) pathway inhibitor group [pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) 100  $\mu$ mol/L], and Xiaoqinglong Decoction high, medium and low dose groups (1 000, 500 and 250 mg/L). The effect of Xiaoqinglong Decoction on cell viability in each dose group was detected by MTT method; the secretion level of MUC5AC in H292 cells induced by interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and the effects of Xiaoqinglong Decoction subgroups (1 000  $\mu$ g/mL, 500  $\mu$ g/mL) on the secretions of MUC5AC, IL-8 and TNF- $\alpha$  in inflammatory model cells were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA); Western Blot was used to detect the effects of Xiaoqinglong Decoction on NF- $\kappa$ B signaling pathway and its protein expressions of inhibitor protein (I $\kappa$ B) and P65 protein in inflammatory model cells. **Results** Compared with the blank control group, the absorbance values (A) of Xiaoqinglong Decoction acting on the H292 cells for 24 and 48 hours were decreased significantly, and the experiments showed dose dependence; the inhibitory rates of 1 000 mg/L and 500 mg/L Xiaoqinglong Decoctions on the cells were more suitable for the subsequent experiments. Compared with the inflammatory model group, the secretions of MUC5AC, IL-8 and TNF- $\alpha$  in PDTC group, Xiaoqinglong Decoction high dose and medium dose subgroups were significantly decreased, and the decrease amplitude of Xiaoqinglong Decoction high dose subgroup was the highest [MUC5AC (ng/L): [MUC5AC (ng/L): extracellular content 1 318.63 $\pm$ 126.86 vs. 2 531.94 $\pm$ 87.77, intracellular content 1 048.96 $\pm$ 54.33 vs. 1 217.57 $\pm$ 80.77, IL-8 (ng/L): 583.94 $\pm$ 28.04 vs. 832.01 $\pm$ 73.48, TNF- $\alpha$  (ng/L): 104.99 $\pm$ 6.79 vs. 151.95 $\pm$ 8.21, all  $P < 0.05$ ]. The results of Western Blot showed that compared with the blank control group, the expression of I $\kappa$ B in the inflammatory model group was significantly decreased (I $\kappa$ B/ $\beta$ -actin: 0.524 6 $\pm$ 0.064 1 vs. 0.918 2 $\pm$ 0.117 2,  $P < 0.05$ ), and the expression of P65 was significantly increased (P65/ $\beta$ -actin: 1.203 1 $\pm$ 0.037 9 vs. 0.978 7 $\pm$ 0.160 5,  $P < 0.05$ ); compared with the inflammatory model group, the levels of expression of I $\kappa$ B in PDCA group and Xiaoqinglong Decoction high dose group

were significantly increased (IkB/ $\beta$ -actin:  $0.935\ 2 \pm 0.083\ 3$ ,  $0.817\ 8 \pm 0.057\ 8$  vs.  $0.524\ 6 \pm 0.064\ 1$ , all  $P < 0.05$ ), while the expressions of P65 were significantly decreased (P65/ $\beta$ -actin:  $0.863\ 6 \pm 0.059\ 2$ ,  $0.931\ 3 \pm 0.113\ 3$  vs.  $1.203\ 1 \pm 0.037\ 9$ , all  $P < 0.05$ ). **Conclusions** The medium and high doses of Xiaoqinglong Decoction have the best effect. They can inhibit the activity of lung cancer H292 cells, reduce the cell secretion of MUC5AC and release of IL-8 and TNF- $\alpha$ , and the molecular mechanism may be related to the regulation of NF- $\kappa$ B signaling pathway.

**【Key words】** Xiaoqinglong Decoction; Lung cancer; Nuclear transcription factor- $\kappa$ B; Mucin 5AC; Inflammation

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81503490); Science and Technology Research Project of Henan Province (192102310160, 182102310296)

DOI : 10.3969/j.issn.1008-9691.2020.06.025

肺癌是临床中最常见的恶性肿瘤之一,严重威胁和危害着人们的身体健康,对肺癌治疗方法的研究和探索是当前抗肿瘤领域的一项重要任务。

在中医的认识中,癌症的主要病理机制与“痰、瘀、虚、毒”密切相关。“痰”是肺癌形成中的主要病理产物,并且在肺癌发生发展及转移的过程中起重要作用<sup>[1-2]</sup>。有研究表明,采用化痰法治疗肺癌能明显抑制肺部肿瘤的生长和转移<sup>[3-4]</sup>,临床上许多医家应用化痰法治疗肺癌也取得了较好的效果<sup>[5]</sup>。医圣张仲景所创的小青龙汤是表里双解、温化痰饮的代表方。

黏蛋白 5AC (MUC5AC) 作为呼吸道最重要的黏蛋白之一,与“痰”息息相关。研究表明,多种因素可通过激活核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 信号通路调控 MUC5AC 表达<sup>[6]</sup>。多种炎症因子促进 MUC5AC 转录,增加黏液分泌,如白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 主要通过 NF- $\kappa$ B 信号转导通路调节 MUC5AC 表达<sup>[7]</sup>。但小青龙汤是否通过降低 MUC5AC 表达达到化痰的效果,至今未见报道。

本研究基于 NF- $\kappa$ B 信号通路研究小青龙汤对人肺癌 H292 细胞活性的影响及 MUC5AC 表达的调控机制,探讨小青龙汤干预肿瘤细胞炎症微环境及其化痰机制,为小青龙汤的临床应用提供理论支持。

## 1 材料与方

### 1.1 实验材料

**1.1.1 细胞株:** 人肺癌细胞株 H292 购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

**1.1.2 实验药品:** 参照《金匱要略》组方,小青龙汤药物剂量比例为麻黄:桂枝:细辛:干姜:半夏:芍药:五味子:炙甘草=3:2:3:1:3:1:1:2。小青龙汤总提取物由河南中医药大学分子生物实验中心提取并保存备用。

**1.1.3 主要试剂及耗材:** IL-1 $\beta$  (批号:0103b95R1), 购于美国 PEPROTECH 公司;四甲基偶氮唑盐 (MTT, 批号:M1025), 购于北京 Solarbio 公司;RPMI1640 培养基 (批号:31800), 购于北京 Solarbio 公司;胎

牛血清 (批号:A25F00H), 购于美国 GEMINI 公司;胰蛋白酶乙二胺四乙酸 (EDTA, 批号:T1320), 购于北京 Solarbio 公司;MUC5AC 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒 (批号:L170113570) 购于武汉 Cloud-clone Corp 公司;白细胞介素-8 (IL-8) ELISA 试剂盒 (EK0413), 购于武汉博士德生物公司;TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒 (EK0525) 购于武汉博士德生物公司;NF- $\kappa$ B 通路抑制蛋白 (IkB) 抗体 (ab32518) 购于上海 Abcam 公司;抗-NF- $\kappa$ B P65 (ab32536) 购于上海 Abcam 公司。

**1.1.4 主要仪器设备:** ELx-800 酶标仪购于美国 BIO-TEK 公司;CO170R-230-1000 二氧化碳培养箱购于德国 Eppendorf 公司;DFC450C 荧光倒置显微镜购于日本 Nikon 公司;L530 离心机购于湖南湘仪离心机仪器有限公司;430639 细胞培养瓶购于 Corning 公司;3599 细胞培养板购于上海 Corning 公司;VE-186 电泳仪购于上海 Tanon 公司;Universal Hood III 凝胶成像系统购于美国 BIO-RAD 公司。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 MTT 法检测 H292 细胞活性:** 使用对数生长期细胞,每孔加入浓度为  $4 \times 10^4$  个/mL 的细胞悬液 200  $\mu$ L 于 96 孔板中,分为空白对照组和小青龙汤高、中、低剂量组 (1 000、500、250  $\mu$ g/mL) 分别于 24 h 和 48 h 观察 H292 细胞活性。运用公式计算细胞抑制率:细胞抑制率=[1-加药组平均吸光度 (A) 值/空白对照组平均吸光度 (A) 值]  $\times$  100%。

**1.2.2 建立炎症模型:** 观察不同浓度 (0、1.25、2.5、5、10 mg/L) IL-1 $\beta$  作用不同时间 (6、12、24、48 h) 诱导 H292 细胞后细胞分泌至胞外的 MUC5AC 含量及其占细胞产生 MUC5AC 总量 (胞外+胞内) 的百分比,采用 ELISA 试剂盒进行检测,确定 H292 细胞分泌 MUC5AC 最多的时间点和 IL-1 $\beta$  浓度,从而筛选出 IL-1 $\beta$  诱导的最佳浓度及最佳作用时间。

**1.2.3 实验分组及小青龙汤剂量筛选:** 使用对数生长期细胞,每孔加入浓度为  $4 \times 10^4$  个/mL 的细胞悬液 200  $\mu$ L 于 96 孔板中,分为空白对照组、炎症模型组 (完全培养基+IL-1 $\beta$ )、NF- $\kappa$ B 通路抑制剂组 (完全培

培养基 +IL-1β + 吡咯烷二硫代氨基甲酸酯(PDTC), 100 μmol/L, 即 PDTC 组)、小青龙汤高、中、低剂量组(完全培养基 +IL-1β + 小青龙汤 1000、500、250 mg/L), 24 h 后弃去原培养液并加入上述各分组药物(除 IL-1β 外)200 μL, 4 h 后加入 IL-1β (终浓度 5 μg/L, 空白对照组除外), 24 h 后进行抑制率检测, 筛选小青龙汤的最佳剂量。

**1.2.4 ELISA 法检测 H292 细胞 MUC5AC、IL-8、TNF-α 分泌:** 小青龙汤选用高、中剂量组, 24 h 后按实验要求收集上清或细胞, 严格按照试剂盒说明书进行操作。

**1.2.5 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测小青龙汤对 H292 中 IκB、P65 蛋白的影响:** 实验分组同 1.2.4, 24 h 后收集细胞, 裂解后采用 BCA 法进行蛋白定量, 在电压 80 V 进行电泳, 转膜封闭后, 一抗(1:1000 稀释)孵育过夜, 二抗(1:2000 稀释)室温孵育 1 h 后检测条带, 以目的条带与内参 β-肌动蛋白(β-actin)的灰度值比值表示蛋白表达量。

**1.3 统计学分析:** 采用 SPSS 21.0 软件对实验数据进行统计分析。对数据进行正态分布检验, 符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 组间比较采用单因素方差分析, 不符合正态分布者进行转化后比较。P<0.05 为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 小青龙汤对 H292 细胞活性的影响(表 1):** 小青龙汤对细胞的抑制作用具有时间和剂量的依赖性。小青龙汤各剂量组吸光度(A)值均明显低于空白对照组(均 P<0.01), 选择作用 24 h 进行后续实验。

**表 1 各组 H292 细胞吸光度(A)值和抑制率的比较**

组别	样本数(例)	吸光度(A)值( $\bar{x} \pm s$ )		抑制率(%)	
		24 h	48 h	24 h	48 h
空白对照组	4	1.172 ± 0.043	1.653 ± 0.025		
小青龙汤高剂量组	4	0.748 ± 0.076 <sup>a</sup>	0.864 ± 0.051 <sup>a</sup>	36.16	47.77
小青龙汤中剂量组	4	0.944 ± 0.090 <sup>a</sup>	1.214 ± 0.006 <sup>a</sup>	19.44	26.58
小青龙汤低剂量组	4	1.008 ± 0.049 <sup>a</sup>	1.406 ± 0.015 <sup>a</sup>	14.01	14.97

注:与空白对照组比较,<sup>a</sup>P<0.01;空白代表无此项

**2.2 不同时间及不同浓度 IL-1β 诱导对 H292 细胞分泌的胞外 MUC5AC 含量比例的影响(表 2):** 5 mg/L IL-1β 诱导 24 h 时, H292 细胞分泌的 MUC5AC 含量占比最高, 后续实验选用 5 mg/L IL-1β 诱导 24 h 作为模型。

**表 2 不同时间及不同浓度 IL-1β 诱导对 H292 分泌胞外 MUC5AC 含量比例的影响**

IL-1β (mg/L)	样本数(例)	胞外 MUC5AC 比例(%)			
		6 h	12 h	24 h	48 h
0	4	56.39	58.76	58.98	55.48
1.25	4	55.55	47.97	59.70	51.40
2.50	4	53.39	46.45	52.21	52.32
5.00	4	43.28	50.18	65.49 <sup>a</sup>	48.85
10.00	4	52.87	51.55	56.30	55.82

注:IL-1β 为白细胞介素-1β, MUC5AC 为黏蛋白 5AC; 与 IL-1β 0 mg/L 比较, <sup>a</sup>P<0.05

**2.3 不同剂量小青龙汤孵育 4 h 再加入 IL-1β 对 H292 细胞增殖的影响(表 3):** 与空白对照组比较, PDTC 组和小青龙汤高、中剂量组吸光度(A)值明显降低, 抑制率也有利于后续实验的进行, 故选用小青龙汤高、中剂量进行后续实验。

**表 3 不同剂量小青龙汤孵育 4 h 后加入 IL-1β 对 H292 细胞增殖的影响**

组别	样本数(例)	吸光度(A)值( $\bar{x} \pm s$ )	抑制率(%)
空白对照组	4	1.000 0 ± 0.010 0	
炎症模型组	4	0.860 7 ± 0.093 3	13.93
PDTC 组	4	0.797 3 ± 0.086 6 <sup>a</sup>	20.27
小青龙汤高剂量组	4	0.740 3 ± 0.080 7 <sup>a</sup>	25.97
小青龙汤中剂量组	4	0.801 7 ± 0.081 3 <sup>a</sup>	19.83
小青龙汤低剂量组	4	0.902 3 ± 0.080 1	9.77

注:IL-1β 为白细胞介素-1β, PDTC 为吡咯烷二硫代氨基甲酸酯; 与空白对照组比较, <sup>a</sup>P<0.05; 空白代表无此项

**2.4 小青龙汤对 IL-1β 诱导的 H292 细胞分泌 MUC5AC 的影响(表 4):** 与空白对照组比较, 炎症模型组 H292 细胞分泌 MUC5AC 胞外与胞内含量均明显升高(均 P<0.05); 与炎症模型组比较, PDTC 组与小青龙汤高、中剂量组细胞 MUC5AC 胞外和胞内含量均明显低于炎症模型组(均 P<0.05), 且以小青龙汤高剂量组降低最为明显。

**表 4 各组 H292 细胞分泌 MUC5AC 胞外和胞内含量比较**

组别	样本数(例)	胞外含量 (ng/L, $\bar{x} \pm s$ )	胞内含量 (ng/L, $\bar{x} \pm s$ )	胞外含量占比(%)
空白对照组	4	1 332.74 ± 113.25	929.78 ± 47.03	58.91
炎症模型组	4	2 531.94 ± 87.77 <sup>a</sup>	1 217.57 ± 80.77 <sup>a</sup>	67.53
PDTC 组	4	1 413.86 ± 55.01 <sup>b</sup>	902.37 ± 68.90 <sup>b</sup>	61.04
小青龙汤高剂量组	4	1 318.63 ± 126.86 <sup>b</sup>	1 048.96 ± 54.33 <sup>ab</sup>	55.70
小青龙汤中剂量组	4	1 428.98 ± 97.56 <sup>b</sup>	1 073.33 ± 103.71 <sup>b</sup>	57.11

注: MUC5AC 为黏蛋白 5AC, PDTC 为吡咯烷二硫代氨基甲酸酯; 与空白对照组比较, <sup>a</sup>P<0.05; 与炎症模型组比较, <sup>b</sup>P<0.05

**2.5 小青龙汤对 IL-1β 诱导的 H292 细胞分泌 IL-8、TNF-α 的影响(表 5):** 炎症模型组的 IL-8 和 TNF-α 水平均明显高于空白对照组(均 P<0.05);

而 PDTC 组与小青龙汤高、中剂量组的 IL-8 和 TNF-α 水平均明显低于炎症模型组(均  $P < 0.05$ ), IL-8 分泌以 PDTC 组降低最为明显, TNF-α 分泌以小青龙汤高剂量组降低最为明显。

表 5 各组 H292 细胞分泌 IL-8 和 TNF-α 水平的比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数 (例)	IL-8 (ng/L)	TNF-α (ng/L)
空白对照组	4	545.66 ± 34.94	99.28 ± 6.04
炎症模型组	4	832.01 ± 73.48 <sup>a</sup>	151.95 ± 8.21 <sup>a</sup>
PDTC 组	4	428.76 ± 39.71 <sup>ab</sup>	122.15 ± 10.74 <sup>ab</sup>
小青龙汤高剂量组	4	583.94 ± 28.04 <sup>b</sup>	104.99 ± 6.79 <sup>b</sup>
小青龙汤中剂量组	4	576.53 ± 46.11 <sup>b</sup>	121.89 ± 9.64 <sup>ab</sup>

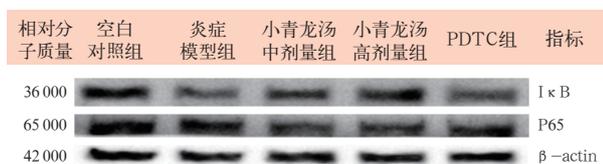
注: IL-8 为白细胞介素-8, TNF-α 为肿瘤坏死因子-α, PDTC 为吡咯烷二硫代氨基甲酸酯; 与空白对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与炎症模型组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

2.6 小青龙汤对 IL-1β 诱导的 H292 细胞 IκB、P65 蛋白表达的影响(表 6, 图 1): 与空白对照组比较, 炎症模型组中 NF-κB 通路相关蛋白 IκB 的表达明显降低, P65 表达明显升高, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ ); 与炎症模型组比较, PDTC 组、小青龙汤高剂量组 IκB 表达明显升高, P65 表达明显降低, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。

表 6 各组 H292 细胞 IκB、P65 蛋白表达的比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数 (例)	IκB/β-actin (相对灰度值)	P65/β-actin (相对灰度值)
空白对照组	4	0.918 2 ± 0.117 2	0.978 7 ± 0.160 5
炎症模型组	4	0.524 6 ± 0.064 1 <sup>a</sup>	1.203 1 ± 0.037 9 <sup>a</sup>
PDTC 组	4	0.935 2 ± 0.083 3 <sup>c</sup>	0.863 6 ± 0.059 2 <sup>c</sup>
小青龙汤高剂量组	4	0.817 8 ± 0.057 8 <sup>c</sup>	0.931 3 ± 0.113 3 <sup>c</sup>
小青龙汤中剂量组	4	0.669 2 ± 0.121 3 <sup>b</sup>	1.024 4 ± 0.041 6 <sup>c</sup>

注: IκB 为核转录因子-κB 通路抑制蛋白, β-actin 为 β-肌动蛋白, PDTC 为吡咯烷二硫代氨基甲酸酯; 与空白对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与炎症模型组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$



注: IκB 为核转录因子-κB 通路抑制蛋白, β-actin 为 β-肌动蛋白 PDTC 为吡咯烷二硫代氨基甲酸酯

图 1 各组 H292 细胞 IκB、P65 蛋白表达的电泳条带

### 3 讨论

肺癌的发生虽然是多因素作用的结果, 但与“痰”的关系最为密切。《黄帝内经》云: “……津液涩渗, 著而不去, 而积皆成矣。” 痰不仅是肺癌发病过程中的病理产物, 同时也是致病因素, 能够加重脏腑功能失常, 使络脉不通、痰瘀互结, 日久伤及肝脾

肾等多个脏腑, 贯穿于肺癌发生发展过程的始终<sup>[8]</sup>, 因此, “痰”是肺癌最重要的病机之一。

小青龙汤出自《伤寒杂病论》, 是由医圣张仲景所创的表里双解、温化痰饮的代表方剂。目前临床主要将小青龙汤用于支气管哮喘、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、肺炎、急性支气管炎、过敏性鼻炎、咳嗽变异性哮喘、肺纤维化和急性呼吸窘迫综合征等呼吸系统疾病的治疗, 并取得了良好的治疗效果<sup>[9-12]</sup>。有临床报道显示, 小青龙汤亦可用于治疗肺癌患者内有痰饮、外感风寒之咳嗽, 疗效显著<sup>[13-14]</sup>。

本研究采用 MTT 法对小青龙汤作用 24、48 h 后 H292 细胞的 A 值进行检测, 以明确小青龙汤对 H292 细胞生长的抑制作用。结果显示, 不同剂量小青龙汤(1 000、500、250 mg/L)作用于 H292 细胞 24、48 h 后, 均能抑制 H292 细胞生长。说明小青龙汤确实具有一定的抗癌作用。

MUC5AC 是气道黏蛋白基因中表达最为丰富的一种, 对气道内水液的流动、黏液的分泌状态及黏稠度有调节作用, 其表达异常提示气道内存在大量黏液, 肺泡内及肺组织间水分相对较多<sup>[15-16]</sup>。而脱落的气道上皮细胞、异物颗粒、聚集的炎症细胞及黏液是“痰饮”形成的基础<sup>[17]</sup>。MUC5AC 的高表达和高分泌不仅导致高分泌的气道黏液与各种刺激颗粒及坏死脱落细胞混合形成痰, 同时也出现在多种肺部疾病中。MUC5AC 的高表达、高分泌不仅严重影响了黏液的黏弹性和黏液(痰液)的清除<sup>[18]</sup>, 而且与肺癌的转移和不良预后相关<sup>[19]</sup>。研究表明, 多种炎性因子促进 MUC5AC 转录, 增加黏液分泌<sup>[20]</sup>。

由于小青龙汤具有很好的化痰祛饮作用, 研究显示, 小青龙汤可降低 COPD 患者血中 IL-8、IL-6、TNF-α 水平<sup>[13]</sup>, 说明其有很强的抗炎作用。为了验证小青龙汤是否可以通过抗炎减少 MUC5A 合成和分泌, 本研究首先应用肺癌细胞株 H292 细胞(气道上皮细胞)在炎性因子 IL-1β 的刺激下, 建立体外炎症模型, 结果显示 5 mg/L IL-1β 作用 24 h 时, H292 细胞分泌的胞外 MUC5AC 含量比例最高, 同时 IL-8 和 TNF-α 增加。应用该模型研究表明, 高、中剂量小青龙汤可较好抑制 H292 细胞胞外和胞内的 MUC5AC 含量, 减少细胞分泌 IL-8 和 TNF-α, 提示小青龙汤确实可以通过降低炎症反应减少黏蛋白分泌。

NF-κB 是一种在基因表达中起关键性调控作用的重要转录因子, 参与免疫反应、炎症反应、细胞凋亡、肿瘤发生等多种生物进程。NF-κB 信号通路可

直接和间接调节 MUC5AC 表达<sup>[21]</sup>。研究表明,多种炎症因子如 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  可通过激活 NF- $\kappa$ B 信号通路调控 MUC5AC 表达,增加黏液分泌。为了深入研究小青龙汤降低炎症反应和减少 MUC5AC 分泌机制,本研究结合 NF- $\kappa$ B 信号通路抑制剂,观察小青龙汤对该通路相关分子的影响,结果显示, NF- $\kappa$ B 信号通路抑制剂也可以减少 IL-1 $\beta$  诱导模型炎症反应和 MUC5AC 分泌,说明 NF- $\kappa$ B 信号参与该模型病理过程。进一步研究显示,小青龙汤可以使 P65 表达降低, I $\kappa$ B 的表达升高,提示小青龙汤发挥作用与抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路有关。

综上所述,本研究结果首次表明小青龙汤具有一定抑制肺癌细胞生长、炎症反应和 MUC5AC 合成与分泌的作用,其机制与抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路有关。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] 关秋红, 武维屏. 从病·证·症辨治肺癌探析 [J]. 中医杂志, 2016, 57 (10): 884-886.  
Guan QH, Wu WP. Discussion on the treatment of lung cancer from disease, syndrome and syndrome differentiation [J]. J Tradit Chin Med, 2016, 57 (10): 884-886.
- [2] 项莲莲, 王中奇. “痰瘀”理论与肺癌脑转移 [J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43 (1): 62-64. DOI: 10.13192/j.issn.1000-1719.2016.01.027.  
Xiang LL, Wang ZQ. Phlegm-blood stasis theory and brain metastasis from lung cancer [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2016, 43 (1): 62-64. DOI: 10.13192/j.issn.1000-1719.2016.01.027.
- [3] 代兴斌, 李丹青, 邢明远, 等. 益气除痰散结法对 Lewis 肺癌小鼠的抗肿瘤作用研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29 (1): 27-31. DOI: 10.19378/j.issn.1003-9783.2018.01.006.  
Dai XB, Li DQ, Xing MY, et al. Antitumor Effect of Yiqi Chutan Sanjie therapy on lung cancer of lewis mice [J]. Tradit Chin Drug Research Clin Pharmacol, 2018, 29 (1): 27-31. DOI: 10.19378/j.issn.1003-9783.2018.01.006.
- [4] 方若鸣. 益气除痰法提高非小细胞肺癌患者生存质量及基于内质网通路机理研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2012.  
Fang RM. Study on improving the quality of life of patients with non-small cell lung cancer by supplementing qi and removing phlegm and the mechanism based on endoplasmic reticulum pathway [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2012.
- [5] 王珊珊, 郭茗, 朱垚, 等. 国医大师周仲瑛教授辨治肺癌经验 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30 (12): 4332-4335.  
Wang SS, Guo M, Zhu Y, et al. TCM master ZHOU Zhong-ying's experience in differentiating and treating lung cancer [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2015, 30 (12): 4332-4335.
- [6] Bae CH, Na HG, Cho YS, et al. Clusterin induces MUC5AC expression via activation of NF- $\kappa$ B in human airway epithelial cells [J]. Clin Exp Otorhinolaryngol, 2018, 11 (2): 124-132. DOI: 10.21053/ceo.2017.00493.
- [7] Shimizu S, Kouzaki H, Ogawa T, et al. Eosinophil-epithelial cell interactions stimulate the production of MUC5AC mucin and profibrotic cytokines involved in airway tissue remodeling [J]. Am J Rhinol Allergy, 2014, 28 (2): 103-109. DOI: 10.2500/ajra.2014.28.4018.
- [8] 陈洋洋, 王瑞莉, 时丹丹. 肺癌的中医辨治体会 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16 (65): 134. DOI: CNKI:SUN:WMIA.O.2016-65-109.  
Chen YY, Wang RL, Shi DD. Experience of differentiation and treatment of lung cancer in traditional Chinese medicine [J]. World Latest Med Inform, 2016, 16 (65): 134. DOI: CNKI:SUN:WMIA.O.2016-65-109.
- [9] 李红芬, 毕玲莉, 张茂华. 小青龙汤联合糖皮质激素对支气管哮喘患儿气道重塑及相关炎症因子的影响 [J]. 陕西中医, 2019, 40 (5): 631-633, 654. DOI: 10.3969/j.issn.1000-7369.2019.05.025.  
Li HF, Bi LL, Zhang MH. Effects of Xiaoqinglong decoction combined with glucocorticoid on airway remodeling and related inflammatory factors in children with bronchial asthma [J]. Shaanxi J Tradit Chin Med, 2019, 40 (5): 631-633, 654. DOI: 10.3969/j.issn.1000-7369.2019.05.025.
- [10] 卞玉凡, 李京, 赵春江, 等. 小青龙汤对肺纤维化大鼠肺组织的改善作用及机制研究 [J]. 云南中医学院学报, 2018, 41 (4): 17-20. DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2018.04.004.  
Bian YF, Li J, Zhao CJ, et al. Effect and mechanism of Xiaoqinglong Decoction on pulmonary fibrosis in rats [J]. J Yunnan Univ Tradit Chin Med, 2018, 41 (4): 17-20. DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2018.04.004.
- [11] 林光资. 小青龙汤联合石膏汤治疗小儿肺炎的临床效果分析 [J]. 中外医疗, 2017, 36 (35): 182-184. DOI: 10.16662/j.cnki.1674-0742.2017.35.182.  
Lin GZ. Analysis of clinical effect of Xiaoqinglong Tang combined with Shigao Tang in treatment of children with pneumonia [J]. China Foreign Med Treatment, 2017, 36 (35): 182-184. DOI: 10.16662/j.cnki.1674-0742.2017.35.182.
- [12] 朱海云, 阚建英, 曹书华. 小青龙汤辅助治疗呼吸机相关性肺炎的疗效观察 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2016, 23 (5): 472-474. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.05.007.  
Zhu HY, Kan JY, Cao SH. Clinical observation on therapeutic effect of Xiaoqinglong decoction for supplementary treatment of patients with ventilator associated pneumonia [J]. 2016, 23 (5): 472-474. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.05.007.
- [13] 张培旭, 蒋时红, 吴耀松. 小青龙汤治疗呼吸系统疾病的研究概况 [J]. 中医研究, 2017, 30 (10): 75-77. DOI: 10.3969/j.issn.1001-6910.2017.10.31.  
Zhang PX, Jiang SH, Wu YS. Research survey of Xiaoqinglong Decoction in the treatment of respiratory diseases [J]. Tradit Chin Med Res, 2017, 30 (10): 75-77. DOI: 10.3969/j.issn.1001-6910.2017.10.31.
- [14] 张亚鹤. 小青龙汤加减小儿咳嗽变异性哮喘肺功能的影响 [J]. 首都食品与医药, 2019, 26 (7): 184. DOI: 10.3969/j.issn.1005-8257.2019.07.164.  
Zhang YH. Effect of Xiaoqinglong Decoction on pulmonary function in children with cough variant asthma [J]. Capital Food Med, 2019, 26 (7): 184. DOI: 10.3969/j.issn.1005-8257.2019.07.164.
- [15] Bonser LR, Erle DJ. Airway mucus and asthma: the role of MUC5AC and MUC5B [J]. J Clin Med, 2017, 6 (12): DOI: 10.3390/jcm6120112.
- [16] Kim EJ, Yoon YP, Woo KW, et al. Verticine, ebeiedine and suchengbeisine isolated from the bulbs of *Fritillaria thunbergii* Miq. inhibited the gene expression and production of MUC5AC mucin from human airway epithelial cells [J]. Phytomedicine, 2016, 23 (2): 95-104. DOI: 10.1016/j.phymed.2015.12.016.
- [17] 王厉敬, 吕晓芳. 解痉止喘液雾化吸入治疗支气管哮喘疗效观察 [J]. 湖北中医杂志, 2003, 25 (11): 25-26. DOI: 10.3969/j.issn.1000-0704.2003.11.016.  
Wang LJ, Lyu XF. Observation of curative effect on 76 cases of bronchial asthma treated by Jiejing Zhichuan Liquid with spray inhalation [J]. Hubei J Tradit Chin Med, 2003, 25 (11): 25-26. DOI: 10.3969/j.issn.1000-0704.2003.11.016.
- [18] Raclawska DS, Tofali F, Fletcher AA, et al. Mucins and their sugars: critical mediators of hyperreactivity and inflammation [J]. Ann Am Thorac Soc, 2016, 13 (Suppl 1): S98-99. DOI: 10.1513/AnnalsATS.201511-743MG.
- [19] Lakshmanan I, Ponnusamy MP, Macha MA, et al. Mucins in lung cancer: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications [J]. J Thorac Oncol, 2015, 10 (1): 19-27. DOI: 10.1097/JTO.0000000000000404.
- [20] Kettle R, Simmons J, Schindler F, et al. Regulation of neuregulin 1beta1-induced MUC5AC and MUC5B expression in human airway epithelium [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010, 42 (4): 472-481. DOI: 10.1165/ajrmb.2009-0018OC.
- [21] Wu S, Li H, Yu L, et al. IL-1 $\beta$  upregulates Muc5ac expression via NF- $\kappa$ B-induced HIF-1 $\alpha$  in asthma [J]. Immunol Lett, 2017, 192: 20-26. DOI: 10.1016/j.imlet.2017.10.006.

(收稿日期: 2019-07-01)