华蟾素对肺癌大鼠 PI3K/AKT 信号通路的抑制作用

陈稀烦[1]，魏晓炎[2]，侯乐萍[1](1.杭州市老年病医院药剂科，杭州 310022；2.浙江省肿瘤医院药剂科，杭州 310022)

摘要：目的 探讨华蟾素对肺癌模型大鼠肿瘤标志物、免疫功能及 PI3K/AKT 信号通路蛋白表达的影响。**方法** 将 80 只 Wistar 大鼠随机分为对照组、模型组、华蟾素组和环磷酰胺组，每组 20 只，采用气管内灌注致癌碘油液建立肺癌大鼠模型。分别于第 4，8 周比较组织病理形态、血清肿瘤标志物癌胚抗原(CEA)、糖类抗原-125(CA125)和神经元特异性烯醇化酶(NSE)水平，T 细胞亚群 $CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$细胞及 NKT 细胞含量，AKT-1、Cyclin D1、NF-κB mRNA 表达，PI3K、p-AKT 蛋白表达。**结果** 华蟾素组大鼠体质量先减少，3 周后逐渐增加，环磷酰胺组大鼠的体质量先减少，4 周后有所增加。与模型组比较，华蟾素组和环磷酰胺组的肿瘤体积、质量显著降低，抑瘤率显著增加(P<0.05)；肺组织肿胀不明显，肺泡囊及上皮细胞结构基本清晰；华蟾素组和环磷酰胺组血清 CEA、CA125、NSE 水平显著降低，AKT-1、Cyclin D1 和 NF-κB mRNA 表达显著降低，PI3K、p-AKT 蛋白表达显著降低；华蟾素组 $CD3^+$和 $CD4^+$细胞含量显著升高，$CD8^+$和 NKT 细胞含量显著降低，且第 8 周与第 4 周相比，差异具有统计学意义(P<0.05)。**结论** 华蟾素可增加肺癌模型大鼠体质量，降低肿瘤体积和质量，增加抑瘤率，改善肿瘤标志物和免疫功能，其机制可能与降低 AKT-1、Cyclin D1、NF-κB mRNA 水平和 PI3K、p-AKT 蛋白表达有关。

关键词：肺癌；华蟾素；肿瘤标志物；免疫功能；PI3K/AKT 信号通路

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1007-7693(2020)04-0425-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.04.008

引用本文：陈稀烦，魏晓炎，侯乐萍. 华蟾素对肺癌大鼠 PI3K/AKT 信号通路的抑制作用[J]. 中国现代应用药学，2020，37(4): 425-430.

Inhibitory Effect of Cinobufotalin on Lung Cancer Rats PI3K/AKT Signaling Pathway

CHEN Xifan[1], WEI Xiaoyan[2], HOU Leping[1](*1.Department of Pharmacy, Hangzhou Geriatric Hospital, Hangzhou 310022, China; 2.Department of Pharmacy, Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of cinobufotalin on the tumor markers, immune function and expression of PI3K/AKT signaling pathway protein in lung cancer model rats. **METHODS** Eighty Wistar rats were randomly divided into control group, model group, cinobufagin group and cyclophosphamide group, 20 rats in each group. Lung cancer rat model were established by injected with carcinogenic iodized oil solution. The histopathological morphology, serum levels of carcinoembryonic antigen(CEA), carbohydrate antigen-125(CA125) and neuron-specific enolase(NSE), content of $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ and NKT cells, expressions of AKT-1, Cyclin D1, NF-κB mRNA, PI3K and p-AKT proteins were compared at the 4th and 8th weeks respectively. **RESULTS** The body weight of rats in cinobufotalin group decreased at first, then increased gradually after 3 weeks, and cyclophosphamide group decreased at first, and increased after 4 weeks. The volume and weight of tumors in cinobufotalin group and cyclophosphamide group were decreased significantly, and the inhibition rate were increased significantly(P<0.05). The swelling of lung tissue was not obvious, and pathology obviously and the structure of alveolar sac and epithelial cells was basically clear in cinobufotalin group and cyclophosphamide group. The serum CEA, CA125 and NSE levels in cinobufotalin group and cyclophosphamide group were significantly reduce, the content of $CD3^+$, $CD4^+$ were increased significantly, the content of $CD8^+$ and NKT cells were lower, the expression of AKT-1, Cyclin D1, NF-κB mRNA were significantly reduce, the expression of PI3K and p-AKT protein were significantly reduce, and the 8th week was better than that of the 4th week(P<0.05). **CONCLUSION** Cinobufotalin can increase the body weight, decrease the volume and weight of lung cancer, increase the inhibition rate, improve the tumor markers and immune function of lung cancer model rats. The mechanism may be related to the decrease of AKT-1, Cyclin D1, NF-κB mRNA level and PI3K, p-AKT protein expression.

KEYWORDS: lung cancer; cinobufotalin; tumor markers; immune function; PI3K/AKT signaling pathway

肺癌为常见的恶性肿瘤，发病率逐年上升，是 21 世纪严重威胁人类健康的疾病，目前治疗以手术、放疗、化疗等为主，化疗虽可一定程度延长患者生存率，但具有明显的肝脏和血液等不良

基金项目：浙江省医药卫生科技项目(2015KYB056)

作者简介：陈稀烦，男，主管药师　Tel: (0571)88178465　E-mail: f952885222958@163.com

反应[1-2]。华蟾素为传统中药中华大蟾蜍皮提取加工制剂，具有清热解毒、活血化瘀等功效，可调节免疫功能，促进肿瘤细胞凋亡，对多种肿瘤细胞都具有抑制作用，现已广泛应用于临床肺癌等恶性肿瘤的治疗，但其作用机制尚不明确[3-4]。因此，本研究以气管内灌注致癌碘油液建立肺癌大鼠模型，通过免疫功能及 PI3K/AKT 信号通路蛋白表达研究，旨在探讨华蟾素治疗肺癌的可能作用机制。

1 材料

1.1 动物

健康 Wistar 大鼠 80 只，8~10 周龄，清洁级，♀♂各半，体质量(180±20)g，北京维通利华实验动物技术有限公司。实验动物许可证号：SCXK(京)2017-0011；合格证号：11001118110099 2。实验动物及条件符合《实验动物管理条件》要求。采用 12 h 昼夜节律饲养，自由饮水与进食，适应环境饲养 1 周进行试验。

1.2 药品与试剂

青霉素钠注射剂[华北制药股份有限公司，批号：20180317；规格：0.48 g(80 万单位)]；注射用硫酸链霉素(山东鲁抗医药股份有限公司，批号：20171125；规格：每支 2 g)；华蟾素注射液(安徽金蟾生化股份有限公司，批号：20180623；规格：每支 5 mL)；注射液环磷酰胺(江苏盛迪医药有限公司，批号：201710290317；规格：每支 200 mg)；碘油(郑州派尼化学试剂，批号：2018512)；三甲基胆蒽、二乙基亚硝胺(批号：20170412，20170624)均购自上海西格玛奥德里奇公司；HE 染色试剂盒(北京索莱宝生物技术有限公司，批号：20181104)；CEA、CA125、NSE 试剂盒(批号：J170024，J170039，J20180017)均购自广州科方生物技术股份有限公司；$CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$细胞检测试剂盒(批号：J20180312，J20171103，J20180506)均购自南京百奥生物科技有限公司；NKT 细胞检测试剂盒(北京同立海源生物科技有限公司，批号：J11030071)；FITC 试剂盒(杭州联科生物技术公司，批号：J0811023)；AKT-1、Cyclin D1、NF-κB mRNA 引物(合成日期：20180512，20180514，20180515)均购自上海生物工程公司；p-PI3K、p-AKT 单抗(批号：20180221，20170926)均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 仪器

NI500 显微镜(日本尼康公司)；ADVIA 2400 全自动生化分析仪(德国西门子公司)；13R 离心机[力康集团力新仪器(上海)有限公司]；7600 全自动生化分析仪(日本日立公司)；Biotek aQuant 型酶标仪(上海坤肯生物化工有限公司)；FAC Scalibur 型流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司)；全自动免疫染片机(美国 DAKO 公司)；RT-PCR 扩增分析系统(美国罗氏公司)。

2 方法

2.1 模型制备与分组

将 6.4 mL 碘油、1.2 g 三甲基胆蒽和 1.6 mL 二乙基亚硝胺混合均匀，70 ℃水浴箱中孵育 12 h，乳状液作为致癌碘油液，造模前 3 d Wistar 大鼠每天肌注青霉素 2 万单位和链霉素 45 mg，以防大鼠感染，提高造模成功率。60 只大鼠腹腔注射水合氯醛麻醉后，置于平板台上仰卧并固定四肢，手术缝线固定上齿，使其喉部肌肉处于松弛状态，无齿镊将舌慢慢拉出，在额镜直视下进行左肺叶支气管灌注 0.1 mL 致癌碘油液，灌注结束后♀♂分养，自由摄食[5-6]。随机分为模型组、华蟾素组和环磷酰胺组，每组 20 只。另选取 20 只 Wistar 大鼠按照上述方法进行操作，左肺叶支气管灌注 0.1 mL 碘油，作为对照组。

2.2 给药方法

灌注诱癌剂后第 2 天给予干预，对照组和模型组腹腔注射 0.9%NaCl 0.5 $mL\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$，华蟾素组腹腔注射 0.5 $mL\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$ 华蟾素注射液，环磷酰胺组腹腔注射 0.5 $mL\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$ 环磷酰胺注射液，每周连续给药 5 d，停药 2 d，连续治疗 8 周。于第 4 周和第 8 周分别处死 10 只大鼠进行指标检测。

2.3 检测指标和方法

2.3.1 一般观察　干预后每周观察各组大鼠体质量变化。

2.3.2 肿瘤体积和质量　末次给药 24 h 后，过量麻醉处死各组大鼠，剥离肿瘤组织，测量肿瘤最长径(a)和最短径(b)，称肿瘤质量，计算肿瘤体积和抑瘤率。体积=$(a\times b^2)/2$，抑瘤率=(1−治疗组平均瘤质量/模型组平均瘤质量)×100%。

2.3.3 HE 染色　取肿瘤组织，固定 24 h 后，经酒精脱水和二甲苯透明后，石蜡包埋，切片，切片间距 5 mm，苏木素-伊红染色，树胶封片后，光学显微镜观察结构。

2.3.4 肿瘤标志物检测　末次给药 24 h 后，采用摘眼球方式取血，离心，取上清，采用 ELISA 法检测血清肿瘤标志物 CEA、CA125 和 NSE 水平。

2.3.5 T 细胞亚群检测　取各组大鼠血液至流式管中，分别加入 10 μL $CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$、NKT 单抗和 50 μL EDTA 抗凝血，混合均匀，避光孵育 20 min，每管加入 2 mL 溶血素，孵育 20 min，离心，弃去上清，加 2 mL PBS 混匀，离心弃去上清，洗涤 2 次，弃上清，加 2 mL PBS 重悬混匀，采用流式细胞仪分析 $CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$和 NKT，采用自带软件区分不同细胞，显示细胞含量，并计算各细胞的百分比。

2.3.6 AKT-1、Cyclin D1、NF-κB mRNA 表达检测　取各组肺组织约 50 mg，提取 RNA，检测纯度，引物序列见表 1。RNA 经反转录后，实时荧光定量 PCR 仪进行检测，40 个循环，预变性 95 ℃ 30 s，变性 95 ℃ 10 s，退火 60 ℃ 30 s，延伸 72 ℃ 30 s，延伸 72 ℃ 5 min，测定各组 AKT-1、Cyclin D1、NF-κB 的 *Ct* 值，计算相对表达量。

表 1　RT-PCR 所用引物序列

Tab. 1　Primers sequence used in RT-PCR

基因	上游引物	下游引物
GAPDH	CATGGTCTACACGTTCCAGT	GGCTAAGCAGTTGGTGGTGC
AKT-1	ATGCTGGACAAGGACGGG	CACGATGTTGGCAAAGAA
Cyclin D1	AGAAGCTGTGCATCTACACCGACA	TGGAGGGCGGATTGGAAATGAACT
NF-κBp65	GGACCAGCAAAGGTTATTGTTC	TTATACACGCCTCTGTCATTCG

2.3.7 免疫组织法检测肺组织 PI3K、p-AKT 蛋白表达　取固定后的肺组织石蜡切片，常规烤片、脱蜡，柠檬酸抗原修复，超纯水冲洗，50 μL 3%H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶，PBS 缓冲溶液洗涤，50 μL 山羊血清封闭 15 min，倾去剩余溶液，滴加新鲜配制 PI3K、p-AKT 一抗，4 ℃孵育过夜，PBS 缓冲溶液洗涤，滴加 PI3K、p-AKT 二抗，避光孵育 2 h。DAB 显色，苏木素浅染、梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树胶剂封片，蛋白表达量以积分光密度(*IOD*)表示。

2.4　统计学方法

采用 SPSS 19.0 进行统计数据分析，计数资料以 *n*(%)表示，应用χ^2 检验；计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 *t* 检验比较组内和组间差异，*P*<0.05 为差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　各组大鼠体质量比较

对照组大鼠的体质量逐渐增加；模型组大鼠的体质量逐渐减少；华蟾素组大鼠的体质量先减少，3 周后逐渐增加；环磷酰胺组大鼠的体质量先减少，4 周后有所增加。第 8 周各组体质量比较，差异有统计学意义(*P*<0.05)。结果见图 1。

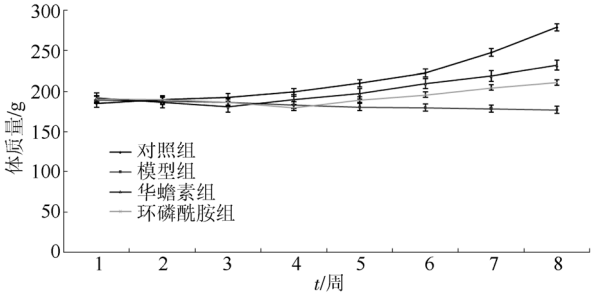

图 1　各组大鼠体质量比较

Fig. 1　Comparison of weight in each group of rats

3.2　各组大鼠肿瘤体积、质量和抑瘤率比较

与模型组比较，华蟾素组和环磷酰胺组的肿瘤体积、质量显著降低，抑瘤率显著增加，且与第 4 周相比，第 8 周肿瘤体积、质量显著降低，抑瘤率显著增加，差异均有统计学意义(*P*<0.05)。华蟾素组的肿瘤体积、质量高于环磷酰胺组，抑瘤率低于环磷酰胺组，但差异无统计学意义。结果见表 2。

3.3　各组大鼠肺组织病理形态学比较

治疗第 8 周，对照组未见肺组织明显病理改变；模型组肺组织肿胀，缺乏反弹性，表面粗糙，气管黏膜充血红肿，肺泡囊扩张，上皮细胞明显破损，大量肿瘤细胞片状或条索状排列紊乱；华蟾素组和环磷酰胺组肺组织形态好于模型组，肺组织肿胀不明显，肺组织病理明显改善，肺泡囊及上皮细胞结构基本清晰。结果见图 2。

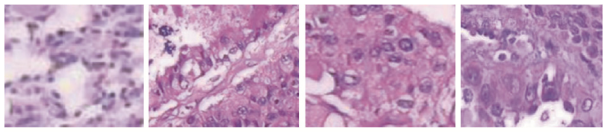

图 2　各组大鼠肺组织病理形态学观察结果(HE，400×)

Fig. 2　Pathomorphological observation of lung tissue in each group of rats(HE, 400×)

3.4　各组大鼠血清 CEA、CA125、NSE 水平比较

与对照组比较，模型组血清 CEA、CA125、NSE 水平显著升高(*P*<0.05)；与模型组比较，华蟾素组和环磷酰胺组血清 CEA、CA125、NSE 水平显著降低，且第 8 周 CEA、CA125、NSE 水平低于第 4 周，差异均有统计学意义(*P*<0.05)。但华蟾素组和环磷酰胺组比较，差异无统计学意义。结果见表 3。

表 2 各组大鼠肿瘤体积、质量和抑瘤率比较($\bar{x}\pm s$，n=10)

Tab. 2 Comparison of tumor volume, weight and inhibition rate in each group of rats($\bar{x}\pm s$, n=10)

组别	第 4 周			第 8 周		
	肿瘤体积/cm³	肿瘤质量/g	抑瘤率/%	肿瘤体积/cm³	肿瘤质量/g	抑瘤率/%
对照组	0.00±0.00	0.00±0.00	–	0.00±0.00	0.00±0.00	–
模型组	18.12±1.48[1)]	15.21±2.54[1)]	–	19.35±1.53[1)]	16.42±2.59[1)]	–
华蟾素组	13.08±1.21[1)2)]	9.22±1.89[1)2)]	39.38±1.06[2)]	7.01±1.34[1)2)3)]	6.37±1.05[1)2)3)]	61.21±1.57[2)3)]
环磷酰胺组	11.17±1.33[1)2)]	8.51±1.56[1)2)]	44.05±1.37[2)]	5.12±0.98[1)2)3)]	5.42±0.76[1)2)3)]	66.99±1.46[2)3)]

注：与对照组比较，[1)]P<0.05；与模型组比较，[2)]P<0.05；与同组第 4 周比较，[3)]P<0.05。

Note: Compared with control group, [1)]P<0.05; compared with model group, [2)]P<0.05; compared with the same group of the 4th weeks, [3)]P<0.05.

表 3 各组大鼠血清癌胚抗原(CEA)、糖类抗原-125(CA125)和神经元特异性烯醇化酶(NSE)水平比较($\bar{x}\pm s$，n=10)

Tab. 3 Comparison of carcinoembryonic antigen(CEA), carbohydrate antigen-125(CA125) and neuron-specific enolase(NSE) in each group of rats($\bar{x}\pm s$，n=10)

组别	第 4 周			第 8 周		
	CEA/ng·mL⁻¹	CA125/μg·mL⁻¹	NSE/ng·mL⁻¹	CEA/ng·mL⁻¹	CA125/μg·mL⁻¹	NSE/ng·mL⁻¹
对照组	31.04±4.37	43.18±6.37	52.17±7.65	30.87±4.52	44.11±5.39	54.03±7.25
模型组	226.08±9.67[1)]	367.59±15.68[1)]	519.22±17.05[1)]	230.14±9.86[1)]	358.71±14.63[1)]	526.09±16.54[1)]
华蟾素组	147.23±8.58[1)2)]	219.46±12.62[1)2)]	312.62±11.37[1)2)]	67.51±6.57[1)2)3)]	131.14±7.69[1)2)3)]	139.17±9.68[1)2)3)]
环磷酰胺组	141.85±9.12[1)2)]	208.79±11.93[1)2)]	308.55±12.08[1)2)]	62.76±5.96[1)2)3)]	122.51±8.23[1)2)3)]	131.76±9.46[1)2)3)]

注：与对照组比较，[1)]P<0.05；与模型组比较，[2)]P<0.05；与同组第 4 周比较，[3)]P<0.05。

Note: Compared with control group, [1)]P<0.05; compared with model group, [2)]P<0.05; compared with the same group of the 4th week, [3)]P<0.05.

3.5 各组大鼠 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺细胞及 NKT 细胞含量比较

与对照组比较，模型组 CD3⁺和 CD4⁺细胞含量显著降低，而 CD8⁺和 NKT 细胞含量显著升高(P<0.05)；华蟾素组 CD3⁺和 CD4⁺细胞含量显著升高，CD8⁺和 NKT 细胞含量显著降低，且第 8 周优于第 4 周(P<0.05)；环磷酰胺组 CD3⁺和 CD4⁺细胞低于华蟾素组，CD8⁺和 NKT 细胞含量高于华蟾素组，差异均有统计学意义(P<0.05)。环磷酰胺组与模型组比较，差异无统计学意义。结果见表 4。

3.6 各组大鼠 AKT-1、Cyclin D1、NF-κB mRNA 表达比较

与对照组比较，模型组脑组织 AKT-1、Cyclin D1 和 NF-κB mRNA 表达水平显著升高，差异有统计学意义(P<0.05)。与模型组比较，华蟾素组和环磷酰胺组 AKT-1、Cyclin D1 和 NF-κB mRNA 表达水平显著降低，且第 8 周低于第 4 周，差异均有统计学意义(P<0.05)。但华蟾素组和环磷酰胺组比较，差异无统计学意义。结果见表 5。

3.7 各组大鼠 PI3K、p-AKT 蛋白表达比较

与对照组比较，模型组 PI3K、p-AKT 蛋白表达显著增加，差异有统计学意义(P<0.05)。与模型组比较，华蟾素组和环磷酰胺组 PI3K、p-AKT 蛋白表达显著降低，且第 8 周低于第 4 周，差异均有统计学意义(P<0.05)。但华蟾素组和环磷酰胺组比较，差异无统计学意义。结果见表 6 和图 3。

表 4 各组大鼠外周血 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺细胞及 NKT 细胞含量比较($\bar{x}\pm s$，n=10)

Tab. 4 Comparison of contents of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ and NKT cell in each group of rats($\bar{x}\pm s$, n=10) %

组别	第 4 周				第 8 周			
	CD3⁺	CD4⁺	CD8⁺	NKT	CD3⁺	CD4⁺	CD8⁺	NKT
对照组	63.51±3.12	45.34±2.61	23.08±2.69	2.35±0.41	62.95±3.06	46.02±2.47	23.62±2.43	2.43±0.39
模型组	43.29±3.34[1)]	31.91±2.03[1)]	31.03±2.24[1)]	4.62±0.37[1)]	44.57±2.846[1)]	32.15±1.89[1)]	30.59±2.26[1)]	4.57±0.38[1)]
华蟾素组	49.33±2.65[1)2)]	36.04±1.98[1)2)]	26.65±2.51[1)2)]	3.76±0.35[1)2)]	57.36±2.51[1)2)3)]	42.66±2.13[1)2)3)]	20.17±1.89[1)2)3)]	2.81±0.33[1)2)3)]
环磷酰胺组	41.02±3.27[1)4)]	30.68±1.74[1)4)]	31.28±2.17[1)4)]	4.43±0.32[1)4)]	42.31±2.87[1)4)]	32.03±2.07[1)4)]	29.57±2.14[1)4)]	4.29±0.37[1)4)]

注：与对照组比较，[1)]P<0.05；与模型组比较，[2)]P<0.05；与同组第 4 周比较，[3)]P<0.05；与华蟾素组比较，[4)]P<0.05。

Note: Compared with control group, [1)]P<0.05; compared with model group, [2)]P<0.05; compared with the same group of the 4th week, [3)]P<0.05; compared with cinobufotalin group, [4)]P<0.05.

表 5 各组大鼠脑组织 AKT-1、Cyclin D1、NF-κB mRNA 表达比较($\bar{x}\pm s$，n=10)

Tab. 5 Comparison of mRNA expression of AKT-1, Cyclin D1 and NF-κB in brain tissue in each group of rats($\bar{x}\pm s$, n=10)

组别	第 4 周			第 8 周		
	AKT-1	Cyclin D1	NF-κB	AKT-1	Cyclin D1	NF-κB
对照组	0.23±0.04	0.12±0.02	0.07±0.02	0.21±0.05	0.11±0.03	0.08±0.02
模型组	0.97±0.03[1)]	1.42±0.11[1)]	0.85±0.06[1)]	0.99±0.04[1)]	1.39±0.10[1)]	0.88±0.05[1)]
华蟾素组	0.63±0.04[1)2)]	1.02±0.09[1)2)]	0.62±0.07[1)2)]	0.43±0.03[1)2)3)]	0.61±0.09[1)2)3)]	0.51±0.04[1)2)3)]
环磷酰胺组	0.59±0.06[1)2)]	0.98±0.08[1)2)]	0.64±0.08[1)2)]	0.39±0.06[1)2)3)]	0.59±0.11[1)2)3)]	0.54±0.06[1)2)3)]

注：与对照组比较，[1)]P<0.05；与模型组比较，[2)]P<0.05；与同组第 4 周比较，[3)]P<0.05。

Note: Compared with control group, [1)]P<0.05; compared with model group, [2)]P<0.05; compared with the same group of the 4th week, [3)]P<0.05.

表 6 各组大鼠脑组织 PI3K、p-AKT 蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$，n=10)

Tab. 6 Comparison of protein expression of PI3K, p-AKT in brain tissue in each group of rats($\bar{x}\pm s$, n=10)

组别	第 4 周		第 8 周	
	PI3K	p-AKT	PI3K	p-AKT
对照组	0.08±0.02	0.13±0.02	0.07±0.03	0.12±0.03
模型组	2.11±0.05[1)]	1.87±0.09[1)]	2.07±0.10[1)]	1.91±0.09[1)]
华蟾素组	1.42±0.06[1)2)]	1.16±0.12[1)2)]	0.67±0.11[1)2)3)]	0.71±0.08[1)2)3)]
环磷酰胺组	1.35±0.09[1)2)]	1.08±0.14[1)2)]	0.64±0.13[1)2)3)]	0.68±0.10[1)2)3)]

注：与对照组比较，[1)]P<0.05；与模型组比较，[2)]P<0.05；与同组第 4 周比较，[3)]P<0.05。

Note: Compared with control group, [1)]P<0.05; compared with model group, [2)]P<0.05; compared with the same group of the 4th week, [3)]P<0.05.

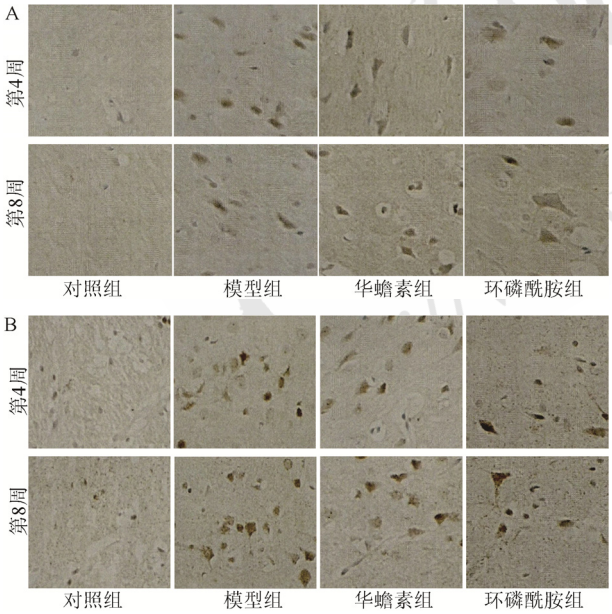

图 3 PI3K 蛋白(A)和 p-AKT 蛋白(B)免疫组化图(ICH，400×)

Fig. 3 Immunohistochemical map of PI3K(A) and p-AKT(B) protein(ICH, 400×)

4 讨论

近年来肺癌已经成为严重危害生命健康的疾病，寻找安全有效的新型抗肿瘤剂是研究的热点，诱导细胞凋亡和抑制细胞生长是其治疗的策略。研究表明，磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/AKT)信号通路在肺癌发生发展中起重要作用，PI3K 激活后的产物与 AKT 结合，可导致 AKT 细胞转位和构象发生改变，抑制 PI3K/AKT 信号通路蛋白表达和细胞生长，并诱导细胞凋亡，从而降低肿瘤标志物水平，有助于预后[7-9]。华蟾素为中华大蟾蜍提取的水溶性制剂，对多种肿瘤细胞都具有抑制作用[10]。刘帝素等[11]研究发现，蟾素可改善肺癌患者 Th1、Th2 及 Th17 相关因子表达，具有免疫调节作用。

本研究发现，华蟾素组大鼠的体质量 3 周后逐渐增加，肿瘤体积、质量显著降低，抑瘤率显著增加，肺组织肿胀不明显，肺泡囊及上皮细胞结构基本清晰，血清 CEA、CA125、NSE 水平显著降低，$CD3^+$和 $CD4^+$细胞含量显著升高，$CD8^+$和 NKT 细胞含量显著降低，AKT-1、Cyclin D1、NF-κB mRNA 和 PI3K、p-AKT 蛋白表达显著降低。PI3K/AKT 信号激活后，肿瘤细胞增殖和运动活性增加，促进内皮活性因子的分泌，酪氨酸受体相关通路发生过度活化，促进肿瘤细胞在 G1/S 期转换，导致肿瘤细胞的增殖和活化，引起肿瘤标志物 CEA、CA125 水平急剧升高，机体免疫功能紊乱[12-14]。华蟾素能够抑制肺癌移植瘤的生长，抑制肿瘤血管生成，诱导肿瘤细胞凋亡，增强单核吞噬细胞对碳粒的吞噬功能以及体液免疫功能，减弱肿瘤细胞免疫抑制效应，改善机体免疫状态，抑制 PI3K/AKT 信号通路蛋白表达[15-17]。综上所述，华蟾素对肺癌模型大鼠具有较好的治疗作用，可改善肿瘤标志物和免疫功能，其机制可能与抑制 PI3K/AKT 信号通路蛋白表达有关。

REFERENCES

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, FEDEWA S A, et al. Colorectal cancer statistics, 2017 [J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(3): 177-193.

[2] DENIS F, BASCH E, SEPTANS A L, et al. Two-year survival comparing web-based symptom monitoring *vs* routine surveillance following treatment for lung cancer [J]. JAMA, 2019, 321(3): 306-307.

[3] AFROZE S H, PEDDABOINA C, MCDOWELL A B, et al. Differential effects of treatment with cinobufotalin on three types of ovarian cancer cells [J]. Anticancer Res, 2018, 38(10): 5717-5724.

[4] KAI S, LU J H, HUI P P. Pre-clinical evaluation of cinobufotalin as a potential anti-lung cancer agent [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 452(3): 768-774.

[5] ZHENG X X, CHEN W Y, ZHANG Q, et al. Effect of cinobufotalin on mechanical pain sensitivity in rats with tibial cancer pain and its mechanism [J]. Pharm Today(今日药学), 2018, 28(9): 580-583.

[6] ZHI H, DUAN Z G, ZHANG Y, et al. Rats model of lung cancer and symptoms at primary stage [J]. J Env Health(环境与健康杂志), 2008, 25(4): 302-307.

[7] SUI Y T, CHI W C, JIANG J K, et al. Influence of Qishan Fang combined with cisplatin on PI3K/AKT signal pathway of lung cancer A549 cells [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med(北京中医药大学学报), 2018, 41(7): 553-558.

[8] ZHAO H Y, REN Y H, REN X B. Diprophylline inhibits non-small cell lung cancer A549 cell proliferation and migration, and promotes apoptosis, by downregulating PI3K signaling pathway [J]. Oncol Lett, 2019, 17(1): 857-862.

[9] LI W C, MA X Q, LI Y J, et al. Effects of sphingosine-1-phosphate on apoptosis induced by myocardial ischemia-reperfusion injury and its correction with PI3K/Akt/GSK3β pathway [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(2): 151-155.

[10] XIONG F, SHI Y Y, SHEN J C, et al. Inhibitory effect and mechanism of cinobufotalin on lung cancer NCI-A549 xenograft in nude mice [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther(中国临床药理学与治疗学), 2018, 23(10): 1103-1108.

[11] LIU D S, SHENG S C, LI G C, et al. Study on the effects of cinobufotalin on the serum levels of Th1, Th2 and Th17 related factors of patients with lung cancer [J]. Anti-tumor Pharm(肿瘤药学), 2017, 7(2): 235-239.

[12] LIU L, ZHOU X Y, ZHANG J Q, et al. LncRNA HULC promotes non-small cell lung cancer cell proliferation and inhibits the apoptosis by up-regulating sphingosine kinase 1 (SPHK1) and its downstream PI3K/Akt pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(24): 8722-8730.

[13] XU F, GAO X. Pectolinarigenin inhibits non-small cell lung cancer progression by regulating the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway [J]. Oncol Rep, 2018, 40(6): 3458-3468.

[14] TSAY J J, WU B G, BADRI M H, et al. Airway microbiota is associated with upregulation of the PI3K pathway in lung cancer [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2018, 198(9): 1188-1198.

[15] DONG B S, XU K Y, ZUO C Y, et al. Effect of cinobufotalin combined with doxorubicin on A549 cells apoptosis through Fas/mitochondrial path-way in treatment of lung cancer patients [J]. J Clin Pulmon Med(临床肺科杂志), 2019, 24(1): 121-125, 143.

[16] HAO J K. Effect of cinobufagin on the serum related cytokines and tumor markers in patients with non-small-cell lung cancer [J]. J Ningxia Med Univ(宁夏医科大学学报), 2018, 40(6): 676-680.

[17] GAO P, LU Y S, WU L, et al. Effect of cinobufotalin on the T helper cells 17 and regulatory T cells and the related factors of patients with lung cancer [J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志), 2016, 32(10): 871-873.

收稿日期：2019-02-15

(本文责编：沈倩)

http://www.chinjmap.com