

补肾活血汤通过调控 PI3K/Akt/mTOR 通路对 HEI-OC1 细胞的抗衰老作用

郭向东¹, 王青玲², 张梦娴², 周颖东², 康浩然¹, 王庆林^{3*}

(1. 河南中医药大学第一附属医院耳鼻喉科, 河南 郑州 450000; 2. 河南中医药大学, 河南 郑州 450046; 3. 河南医学高等专科学校, 河南 郑州 451191)

摘要: **目的** 探讨补肾活血汤延缓耳蜗毛细胞株 HEI-OC1 衰老的潜在机制。**方法** 应用 *D*-半乳糖建立衰老 HEI-OC1 细胞模型, 设立对照组、模型组、补肾活血汤组、PI3K 抑制剂组和补肾活血汤+PI3K 抑制剂组。采用 ELISA 法检测细胞 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 水平, DCFH-DA 法检测细胞 ROS 水平, Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡率, Western blot 法检测细胞 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 蛋白表达, RT-qPCR 法检测细胞 *Beclin-1*、*P62*、*Bcl-2*、*Bax* mRNA 表达。**结果** 与对照组比较, 模型组 HEI-OC1 细胞 SOD 和 GSH-Px 活性、ROS 水平、*Beclin-1* 和 *Bcl-2* mRNA 表达均降低 ($P<0.01$), MDA 水平、细胞凋亡率、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 蛋白表达、*P62* 和 *Bax* mRNA 表达均升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 各给药组均可改善以上指标 ($P<0.05$, $P<0.01$), 其中补肾活血汤+PI3K 抑制剂组作用最为显著, 而补肾活血汤组与 PI3K 抑制剂组之间比较无差异。**结论** 补肾活血汤可通过促进自噬、抑制凋亡和减轻氧化应激损伤延缓 HEI-OC1 细胞的衰老, 其机制可能与抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路有关。

关键词: 补肾活血汤; HEI-OC1 细胞; 衰老; 氧化应激; 凋亡; 自噬; PI3K/Akt/mTOR 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)03-0930-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.03.041

老年性聋是老年人最常见的感觉障碍之一, 其发病机制十分复杂, 迄今为止, 能减轻耳蜗神经细胞损伤、延缓听觉功能减退的治疗措施相对较少^[1]。中医学认为老年性聋属于“耳鸣”“耳聋”范畴, 肾虚血瘀是其主要病机, 补肾活血、化瘀开窍是其主要治法^[2]。近年来研究发现, 补肾活血汤治疗老年性聋在临床上应用广泛且疗效显著, 但是有关其作用机制和途径的研究却鲜见报道^[3]。既往研究发现, 补肾活血汤可通过抑制凋亡来延缓耳蜗毛细胞株 HEI-OC1 的衰老^[4], 而 PI3K/Akt/mTOR 信号通路可通过调控自噬与凋亡在细胞增殖和生长方面发挥重要作用^[5]。因此, 通过药物调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路, 从而对耳蜗神经细胞起到精准靶向保护, 有可能在老年性聋的防治工作中发挥重要作用。本实验以体外培养小鼠耳蜗来源的耳蜗毛细胞株 HEI-OC1 为对象, 应用 *D*-半乳糖 (*D*-gal) 诱导建立衰老细胞模型, 深入探讨 PI3K/Akt/mTOR 信号通路在补肾活血汤改善 HEI-OC1 细胞衰老中的发挥作用, 以期为临床上应用补肾活血汤治疗老年性聋提供依据。

1 材料

1.1 细胞株 小鼠耳蜗毛细胞株 HEI-OC1, 由美国豪斯耳研所 Fedrico Kalinec 教授惠赠。

1.2 实验动物 4 周龄 SPF 级健康 SD 大鼠 40 只, 雌雄各半, 体质量 (150 ± 20) g, 购自河南华兴动物养殖中心, 动物合格证号 410981201100011477, 实验动物使用许可证号 SYXK (豫) 2020-0002, 饲养于河南中医药大学 SPF 级动物实验室, 室温 (23 ± 2) °C, 自由饮食和饮水, 适应性饲养 7 d。研究方案由河南中医药大学实验动物伦理委员会批准 (编号 DWLL202106202), 实验过程遵循实验室规则, 对实验动物遵循 3R 原则给予人道关怀和保护。

1.3 药物 补肾活血汤配方颗粒 (熟地黄 18 g、菟丝子 18 g、杜仲 6 g、肉苁蓉 6 g、枸杞子 6 g、补骨脂 18 g、山萸肉 6 g、独活 6 g、当归 6 g、红花 3 g、没药 6 g), 购自四川新绿色药业科技发展有限公司。

1.4 试剂 *D*-gal (美国 Sigma 公司, 批号 G5388); 胎牛血清 (FBS)、DMEM (高糖) 培养基、胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司, 批号 10099133C、11995040、25200056); ROS

收稿日期: 2021-12-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81403439); 河南省科技攻关计划项目 (202102310174); 河南省中医药科学研究专项重点课题项目 (20-21ZY1045)

作者简介: 郭向东 (1980—), 男, 硕士, 副主任医师, 从事耳鼻喉疾病的研究。Tel: 13837167721, E-mail: guoxiangdong0618@126.com

*通信作者: 王庆林 (1979—), 女, 硕士, 副教授, 从事老年病的研究。Tel: 18037130712, E-mail: wangqinglin1008@126.com

活性氧检测试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司，批号 S0033）；AnnexinV/PI 双染试剂盒、TRIzol（美国 Invitrogen 公司，批号 V13241、15596026）；LY294002（美国 MCE 公司，批号 HY-10108）；GAPDH 抗体（武汉赛维尔生物科技有限公司，批号 GB12002）；p-PI3K p85（Tyr458）/p55（Tyr199）、PI3K p85、p-Akt（Ser473）、Akt、p-mTOR（Ser2448）、mTOR 抗体（美国 Cell Signaling Technology 公司，批号 17366、4257、4060、9272、5536、2983）；Bax、Bcl-2 抗体（英国 Abcam 公司，批号 ab32503、ab182858）；HiScript II Q RT SuperMix for qPCR（南京诺唯赞生物科技股份有限公司，批号 R323）；反转录反应试剂盒（美国 Fermentas 公司，批号 K1622）。

1.5 仪器 Forma 3111 型水套式 CO₂ 培养箱（美国 Thermo 公司）；流式细胞分析仪（美国 BD 公司）；凝胶成像系统（美国 Bio-Rad 公司）；实时荧光定量 PCR 仪（瑞士 Roche 公司）；Tanon 6600 发光成像工作站（上海天能科技有限公司）；倒置显微镜（日本奥林巴斯公司）。

2 方法

2.1 补肾活血汤含药血清制备 大鼠随机分为补肾活血汤含药血清组和空白血清组，每组 20 只，按人与大鼠体表面积换算，含药血清组大鼠灌胃给予补肾活血汤 7.41 g/kg（临床等效剂量），每天 2 次，连续 7 d；空白血清组大鼠灌胃给予等体积蒸馏水，于末次给药后 1 h，无菌条件下腹主动脉取血，室温静置 2 h，3 000 r/min 离心 10 min，取上清，56 ℃灭活 30 min，0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌，分装后于-20 ℃冰箱保存备用。

2.2 MTT 法筛选补肾活血汤含药血清最佳浓度和作用时间 HEI-OC1 细胞用含 10% FBS 的 DMEM 培养基，于 33 ℃、10% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养，观察细胞融合度达 80%~90% 后，胰酶消化传代并继续培养。取对数生长期 HEI-OC1 细胞，按照 5×10⁴/mL 密度接种于 96 孔板中，实验设 6 个复孔，分为对照组和药物组，设置观察时间为 12、24、36 h。对照组先加入 4 μL 20 mg/mL *D*-gal；药物组先以不同浓度补肾活血汤含药血清（10%、20%、30%）处理 0.5 h，再加入 4 μL 20 mg/mL *D*-gal，再加完全培养基，每孔体系为 200 μL，置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中继续孵育 36 h。作用结束后，每孔加 20 μL 5 mg/mL MTT，继续置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 4 h，弃上清液，每孔加 150 μL DMSO，脱色摇床上振荡 10 min，完全混匀。全波长酶标仪检测 490 nm 波长处光密度（*OD*）值，计算细胞活力。

2.3 分组及给药 选用第 2~4 代 HEI-OC1 细胞，分为 5 组，对照组用 DMEM 培养基培养 24 h；模型组用 20 mg/mL *D*-gal+DMEM 培养基孵育 24 h；补肾活血汤组用 20 mg/mL *D*-gal+20% 补肾活血汤含药血清+DMEM 培养基孵育 24 h；PI3K 抑制剂组用 20 mg/mL *D*-gal+20 μmol/L LY294002（PI3K 抑制剂）+DMEM 培养基孵育 24 h；补肾活血汤+PI3K 抑制剂组用 20 mg/mL *D*-gal+20% 补肾活血汤含药血

清+20 μmol/L LY294002+DMEM 培养基孵育 24 h。

2.4 ELISA 法检测细胞 SOD、GSH-Px 活性及 MDA 水平 取各组对数生长期的 HEI-OC1 细胞接种于 6 孔板，于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h。弃去原培养液，PBS 洗涤 2 次，消化离心后收集细胞，加入细胞裂解液（150 mmol/L NaCl、150 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA、1% Triton X-100，pH 8.0），4 ℃离心，取上清液，参照试剂盒说明书检测细胞 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 水平。

2.5 DCFH-DA 法检测细胞 ROS 水平 各组细胞用不含 EDTA 的胰酶消化后，4 ℃、1 500 r/min 离心 5 min，收集细胞，每个样本中加入 1.5 mL 5 μmol/L DCFH-DA 工作液，于 37 ℃避光孵育 20 min，1 500 r/min 离心 10 min，小心弃染色反应液，每孔加入 200 μL PBS 清洗 2 次，再用 200 μL PBS 重悬细胞。半个小时内用 BD 小型流式细胞仪检测 10 000 个细胞中的荧光信号值，得出峰移曲线。

2.6 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡率 收集各组细胞，用 4 ℃预冷的 PBS 清洗，4 ℃、1 000 r/min 离心 5 min，弃上清，加入 1×的 Annexin 结合液重悬细胞，调整密度至 1×10⁶/mL，加入 5 μL Annexin V 和 1 μL 100 μg/mL PI 工作液至每 100 μL 的细胞悬液中，室温孵育 15 min，补充 Annexin 结合液至 400 μL，采用流式细胞仪检测 1×10⁴ 个细胞，利用 Cell Quest 软件进行分析，计算细胞凋亡率。

2.7 Western blot 法检测细胞 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 蛋白表达 将各组细胞以每孔 8×10⁴ 个的密度接种于 96 孔板中，按“2.3”项下分组给药，24 h 后收集细胞，PBS 洗涤 1 次，加入 RIPA 裂解液提取总蛋白，使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度，加 Loading buffer 煮沸 10 min 致蛋白变性。使用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离样品蛋白后，湿转至 PVDF 膜，用 5% 脱脂奶封闭 2 h，加入 1：1 000 稀释的 p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、p-mTOR、mTOR 和 GAPDH 一抗，于 4 ℃孵育过夜，次日将膜与 HRP 偶联的二抗（1：1 000）孵育 50 min，通过增强化学发光法检测印迹中的阳性条带，以 GAPDH 为内参分析各蛋白相对表达。

2.8 RT-qPCR 检测细胞 *Beclin-1*、*P62*、*Bcl-2*、*Bax* mRNA 表达 各组细胞用 PBS 漂洗 3 次后，采用 TRIzol 法提取总 RNA，然后将得到的 mRNA 进行反转录反应，反应条件为 50 ℃ 15 min，85 ℃ 2 min。反转录后的 cDNA 采用实时荧光定量 PCR 仪检测各组细胞 *Beclin-1*、*P62*、*Bcl-2*、*Bax* mRNA 表达量，扩增反应条件为 95 ℃ 30 s，95 ℃ 10 s，60 ℃ 30 s，共 40 个循环，得到扩增曲线与 C_T 值。以 *GAPDH* 为内参，采用 2^{-ΔΔCT} 法计算各基因 mRNA 相对表达，引物序列见表 1。

2.9 统计学分析 通过 GraphPad Prism 8.0 软件进行处理，计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，所有实验数据均进行正态性检验，组间比较采用单因素方差分析。*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

表 1 引物序列

基因	序列(5'→3')	片段长度/bp
Beclin1	正向 TGTTCGAGATGTTGGAGCA	149
	反向 ATGGAAGCTCGCATTGAAGA	
P62	正向 AAGCCGGGTGGGAATGTTG	137
	反向 GCTTGGCCCTTCGGATTCT	
Bcl-2	正向 TTTCTCTCTTCGCGCGTGG	161
	反向 GACATCTCCCTGTTGACGCT	
Bax	正向 GCTTCAGGTTTCATCCAG	156
	反向 GCGGCAATCATCCTCTG	
GAPDH	正向 ACCACAGTCCATGCCATCAC	124
	反向 TCCACCACCTGTGTGCTGTA	

3 结果

3.1 不同浓度补肾活血汤含药血清的细胞活力 与对照组比较, 10% 补肾活血汤含药血清组在 3 个时间点的细胞活力无明显变化 ($P>0.05$); 20% 补肾活血汤含药血清在作用 24 h 后细胞活力下降 ($P<0.05$, $P<0.01$); 30% 补肾活血汤在 3 个时间点的细胞活力均下降 ($P<$

0.05, $P<0.01$), 表明细胞活力随着补肾活血汤含药血清浓度和作用时间的增加而逐渐下降, 因此本实验选用细胞活力相对稳定的 20% 补肾活血汤作用 24 h 进行后续实验, 见表 2。

表 2 不同浓度补肾活血汤含药血清的细胞活力($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	12 h	24 h	36 h
对照组	1.00±0.05	1.00±0.03	1.00±0.03
10% 补肾活血汤组	0.97±0.04	0.98±0.02	1.02±0.03
20% 补肾活血汤组	0.92±0.11	0.84±0.06 [△]	0.73±0.09 [△]
30% 补肾活血汤组	0.81±0.05 [△]	0.62±0.04 ^{△△}	0.42±0.07 ^{△△}

注: 与对照组比较, [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$ 。

3.2 补肾活血汤对细胞 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 水平的影响 与对照组比较, 模型组细胞 SOD、GSH-Px 活性降低 ($P<0.01$), MDA 水平升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 各给药组细胞 SOD、GSH-Px 活性升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), MDA 水平降低 ($P<0.01$), 以补肾活血汤+PI3K 抑制剂组作用最为显著, 见表 3。

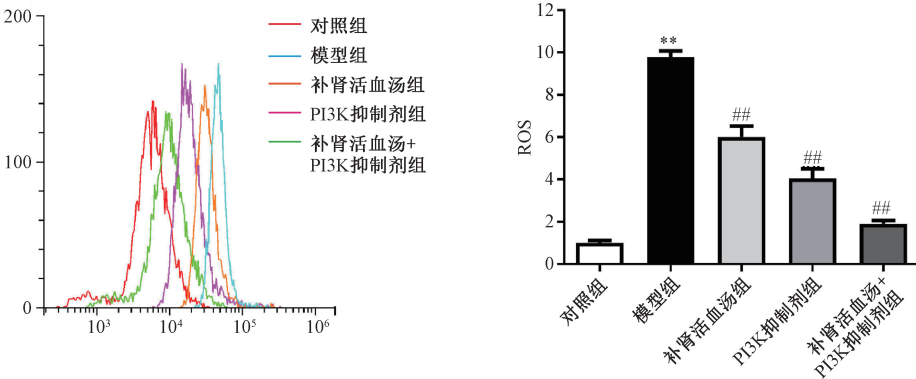
表 3 各组细胞 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 水平比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	SOD/(U·mg ⁻¹)	GSH-Px/(U·mg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)
对照组	115.67±0.81	57.90±13.08	36.79±9.50
模型组	66.02±0.50 ^{**}	20.09±7.27 ^{**}	89.13±15.26 ^{**}
补肾活血汤组	91.92±0.72 [#]	46.37±10.28 ^{##}	47.58±11.48 ^{##}
PI3K 抑制剂组	93.13±0.65 [#]	47.26±11.31 ^{##}	45.20±11.59 ^{##}
补肾活血汤+PI3K 抑制剂组	110.48±0.88 ^{##}	52.47±12.47 ^{##}	39.23±10.36 ^{##}

注: 与对照组比较, ^{**} $P<0.01$; 与模型组比较, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$ 。

3.3 补肾活血汤对细胞 ROS 水平的影响 与对照组比较, 模型组细胞 ROS 水平升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 各给药组细胞 ROS 水平均降低 ($P<0.01$), 提示 D-gal 能诱导

HEI-OC1 细胞的氧化应激损伤, 而补肾活血汤可以减轻氧化应激损伤, 见图 1。



注: 与对照组比较, ^{**} $P<0.01$; 与模型组比较, ^{##} $P<0.01$ 。

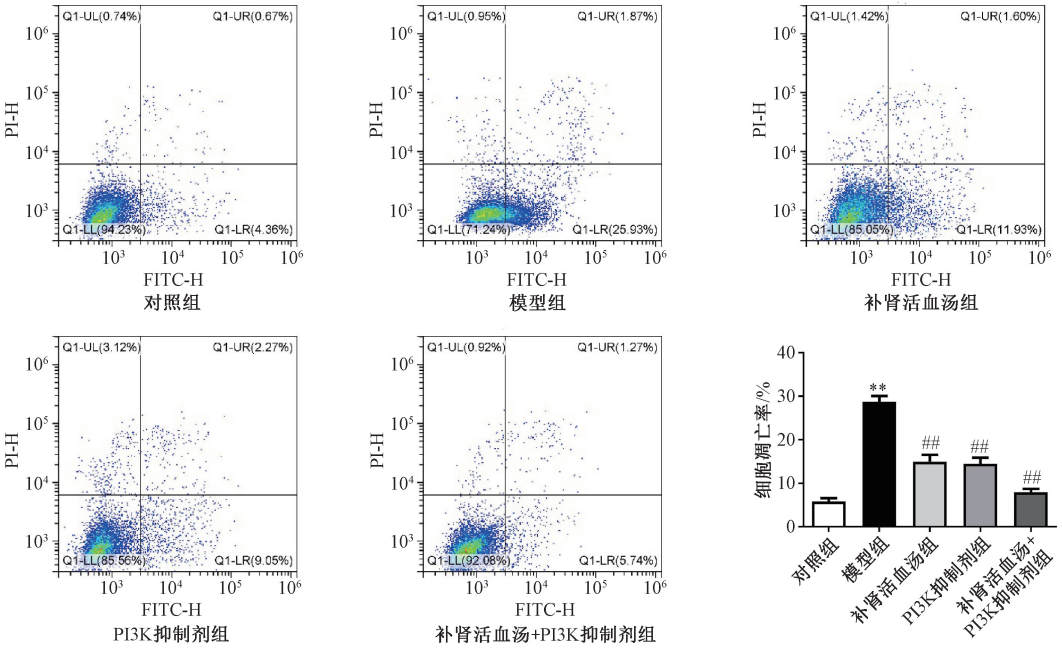
图 1 补肾活血汤对细胞 ROS 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

3.4 补肾活血汤对细胞凋亡率的影响 与对照组 (5.77%) 比较, 模型组细胞凋亡率升高, 为 28.76% ($P<0.01$); 与模型组比较, 补肾活血汤组、PI3K 抑制剂组和补肾活血汤+PI3K 抑制剂组细胞凋亡率降低 ($P<0.01$), 分别为 14.95%、14.44%、7.92%, 提示补肾活血汤可以通过降低细胞凋亡而减轻 D-gal 引起的 HEI-OC1 细胞衰老, 见图 2。

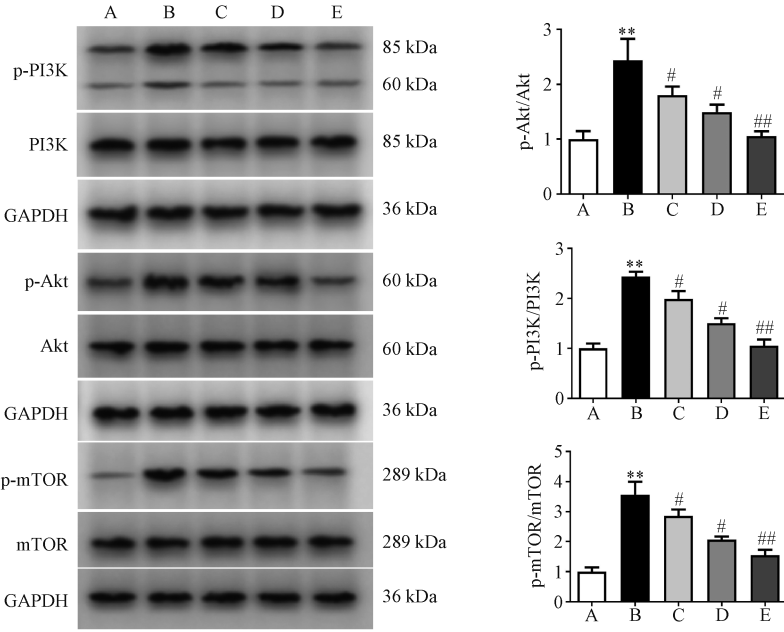
3.5 补肾活血汤对细胞 PI3K/Akt/mTOR 通路蛋白表达的

影响 与对照组比较, 模型组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 蛋白表达比值升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 各给药组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 蛋白表达比值均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 且补肾活血汤+PI3K 抑制剂组作用最显著, 见图 3。

3.6 补肾活血汤对细胞 Beclin-1、P62、Bcl-2、Bax mRNA 表达的影响 与对照组比较, 模型组细胞 Beclin-1、Bcl-2 mRNA 表达降低 ($P<0.01$), P62、Bax mRNA 表达升高



注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，## $P<0.01$ 。
图 2 补肾活血汤对细胞凋亡率的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)



注：A 为对照组，B 为模型组，C 为补肾活血汤组，D 为 PI3K 抑制剂组，E 为补肾活血汤+PI3K 抑制剂组。与对照组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

图 3 补肾活血汤对细胞 PI3K/Akt/mTOR 通路蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

($P<0.01$)；与模型组比较，各给药组细胞 *Beclin-1*、*Bcl-2* mRNA 表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)，*P62*、*Bax* mRNA 表达降低 ($P<0.01$)，见表 4。

4 讨论

老年性聋是由于衰老而引发的听觉功能障碍，属中医“耳聋”范畴，肾气亏虚和气滞血瘀是老年性聋的主要病机^[6]。补肾活血汤组方严谨，配伍得当，山茱萸、熟地黄

为君，意在补肾益精；枸杞子、菟丝子、杜仲、补骨脂等为臣，温肾而养耳窍；配合当归、没药、红花通利血脉，上述诸药合用发挥补肾填精、活血通络之功效，切合肾虚血瘀致听觉衰老的病机，因此在临床上对老年性聋有较好的疗效。

研究表明，细胞自噬、凋亡和氧化应激三者的交互作用 是老年性聋的主要发病机制^[7-8]。当自噬减弱与凋亡增强

表 4 各组细胞 *Beclin-1*、*P62*、*Bcl-2*、*Bax* mRNA 表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	<i>Beclin-1</i> mRNA	<i>P62</i> mRNA	<i>Bcl-2</i> mRNA	<i>Bax</i> mRNA
对照组	1.01±0.04	1.01±0.03	1.01±0.06	1.01±0.04
模型组	0.34±0.02**	2.77±0.25**	0.36±0.03**	2.73±0.32**
补肾活血汤组	0.81±0.05##	1.43±0.10##	0.62±0.06#	1.51±0.17##
PI3K 抑制剂组	0.84±0.08##	1.35±0.14##	0.76±0.05##	1.44±0.09##
补肾活血汤+PI3K 抑制剂组	0.93±0.11##	1.12±0.09##	0.89±0.07##	1.18±0.10##

注：与对照组比较,** $P<0.01$ ；与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

时，机体不能及时消化受损的线粒体和过氧化物酶体，造成活性氧产生增多，从而攻击线粒体 DNA，加速染色体的破坏，加重了有害物质对细胞的损伤，导致机体不能正常运转，是诱发听觉细胞衰老死亡的重要原因^[9-10]。实验研究发现，补肾活血汤可通过调节细胞自噬与凋亡的平衡来实现对衰老耳蜗细胞的保护作用^[11]，但这种调节机制是通过何种信号通途实现的尚不清楚。*Beclin-1* 可招募其他蛋白形成自噬体，是启动自噬的关键蛋白^[12]，而 *P62* 是自噬配体蛋白，可锚定在待降解蛋白上，自噬发生时会被溶酶体降解，因此，其表达降低表明自噬流下游通畅^[13]。*Bcl-2* 与 *Bax* 分别是重要的抑凋亡基因和促凋亡基因^[14-15]。随着年龄的增长，耳蜗毛细胞线粒体的抗氧化能力下降，SOD、GSH-Px 活性降低，MDA 水平升高，从而导致 ROS 聚集，引起耳蜗毛细胞的丢失与变性^[16]。本实验结果显示，与模型组比较，各给药组均能上调 *Beclin-1*、*Bcl-2* mRNA 表达，下调 *P62*、*Bax* mRNA 表达，降低细胞凋亡率、ROS 和 MDA 水平，提高 SOD、GSH-Px 活性，其中补肾活血汤组+PI3K 抑制剂组作用最为显著。以上结果表明，补肾活血汤含药血清能减轻 *D*-gal 对 HEI-OC1 细胞的氧化应激损伤，其机制可能是通过增强自噬和抑制细胞凋亡实现的。

PI3K/Akt/mTOR 是参与自噬和凋亡调控的重要信号通路之一^[17]。PI3K 是该信号通路上的关键蛋白，可作为第二信使来调节细胞的生长、增殖和代谢^[18]。Akt 是 PI3K 下游的关键蛋白，PI3K 激活后生成 PIP3 与 Akt 的结构域相互识别，激活的 Akt 由细胞膜转移到细胞质或细胞核内，进而继续靶向调控下游信号分子（如 mTOR），调控细胞的生命活动^[19-20]。本实验选择 PI3K 抑制剂阻断 PI3K/Akt/mTOR 信号通路，以此验证补肾活血汤对自噬和凋亡的调控机制与该信号通路的相关性。研究结果显示，与模型组比较，PI3K 抑制剂组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 蛋白表达比值降低，补肾活血汤组能达到和 PI3K 抑制剂组相同的效果，且补肾活血汤和 PI3K 抑制剂具有协同促进作用，说明当 PI3K/Akt/mTOR 通路被阻断后，*D*-gal 对 HEI-OC1 细胞的自噬抑制作用和凋亡激活作用被削弱，而补肾活血汤可能与 PI3K 抑制剂相似，发挥抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路磷酸化水平的作用。

综上所述，本研究发现补肾活血汤可能通过调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的相关基因和蛋白表达，增强衰老 HEI-OC1 细胞的自噬，减轻细胞凋亡和氧化应激损伤，从而达到延缓 *D*-gal 对 HEI-OC1 细胞衰老的作用。

参考文献：

[1] 王健艳，谭静芊，杨洛盈，等. 老年性聋部分致病机制和干预的研究进展[J]. 中华耳科学杂志，2021，19（1）：151-156.

[2] 李 莉，王俊锋，吕 翔，等. 中医药防治感音神经性耳聋的实验研究进展[J]，中华中医药学刊，2017，35（2）：313-316.

[3] 江 波，吕 琨，罗 蒙，等. 补肾活血化痰开窍方对耳鸣模型大鼠血液肾虚相关指标的影响[J]. 广州中医药大学学报，2018，35（5）：866-870.

[4] 宣伟军，黄力毅，宣 毅，等. 复方健耳剂对抗老年性耳蜗神经细胞凋亡超微结构观察及上调 NeuN 和 BDNF 定位表达作用[J]. 中国实验动物学报，2020，28（3）：338-344.

[5] 韦新风，贺祖宏，邹圣宇，等. 自噬在内耳中的作用及研究进展[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志，2020，55（11）：1086-1090.

[6] 王璐璐，刘逸远，谭 愿，等. “血瘀”理论对突发性聋临床指导意义[J]. 辽宁中医药大学学报，2021，23（7）：77-80.

[7] Gu M, Mei X L, Zhao Y N. Sepsis and cerebral dysfunction: BBB damage, neuroinflammation, oxidative stress, apoptosis and autophagy as key mediators and the potential therapeutic approaches[J]. *Neurotox Res*, 2021，39（2）：489-503.

[8] Wells H R R, Newman T A, Williams F M K. Genetics of age-related hearing loss [J]. *J Neurosci Res*, 2020，98（9）：1698-1704.

[9] Ye B, Fan C, Shen Y, *et al.* The antioxidative role of autophagy in hearing loss[J]. *Front Neurosci*, 2019，12：1010-1016.

[10] Peixoto P B, Vona B, Löwenheim H, *et al.* Age-related hearing loss pertaining to potassium ion channels in the cochlea and auditory pathway[J]. *Pflugers Arch*, 2021，473（5）：823-840.

[11] 关 伟，朱丽军，郝日雯，等. 补肾聪耳方对药物性耳聋模型大鼠 MAPK 信号通路相关蛋白的影响[J]. 中医杂志，2018，59（14）：1232-1235.

[12] Xu H D, Qin Z H. Beclin 1, Bcl-2 and autophagy[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1206：109-126.

[13] Shin W H, Park J H, Chung K C. The central regulator P62 between ubiquitin proteasome system and autophagy and its role in the mitophagy and Parkinson's disease[J]. *BMB Rep*, 2020，53（1）：56-63.

[14] Huska J D, Lamb H M, Hardwick J M. Overview of BCL-2 family proteins and therapeutic potentials[J]. *Methods Mol Biol*, 2019，1877：1-21.

[15] Lebeaupin C, Blanc M, Vallée D, *et al.* Bax inhibitor-1: between stress and survival [J]. *FEBS J*, 2020, 287(9): 1722-1736.

[16] Keithley E M. Pathology and mechanisms of cochlear aging[J]. *J Neurosci Res*, 2020, 98(9): 1674-1684.

[17] Xu F, Na L X, Li Y F, *et al.* Roles of the PI3K/Akt/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours [J]. *Cell Biosci*, 2020, 10(1): 54.

[18] Bilanges B, Posor Y, Vanhaesebroeck B. PI3K isoforms in cell signalling and vesicle trafficking [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(9): 515-534.

[19] Liu G Y, Sabatini D M. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(4): 183-203.

[20] Uko N E, Güner O F, Matesic D F, *et al.* Akt pathway inhibitors[J]. *Curr Top Med Chem*, 2020, 20(10): 883-900.

复方丹皮酚纳米乳对 A549 裸鼠移植瘤生长的影响

刘 瑾¹, 杨宗统¹, 隋在云^{1*}, 李晓晶¹, 杨 青¹, 姜伟洲², 李克明¹
(1. 山东省中医药研究院, 山东 济南 250014; 2. 潍坊市中医院, 山东 潍坊 261041)

摘要: **目的** 研究复方丹皮酚纳米乳对人肺腺癌 A549 细胞裸鼠移植瘤生长的影响。**方法** 建立 A549 细胞裸鼠移植瘤模型, 将小鼠随机分为模型组, 康莱特注射液组 (1 400 mg/kg), 复方丹皮酚纳米乳低、中、高剂量组 (48、96、192 mg/kg)。从给药当天开始, 每 5 d 测量移植瘤最长径和最短径, 计算肿瘤体积, 绘制生长曲线。给药结束后取肿瘤组织, HE 染色观察其细胞形态变化, 免疫组化法检测 Bax、Bcl-2、COX-2 蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 复方丹皮酚纳米乳高剂量组能抑制肿瘤体积的增长; 中、高剂量组肿瘤细胞核分裂相减少, 细胞坏死和凋亡增多, Bax 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), Bcl-2、COX-2 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 复方丹皮酚纳米乳能促进 A549 裸鼠移植瘤细胞坏死和凋亡, 抑制细胞生长, 其作用机制可能是促进 Bax 蛋白表达, 抑制 COX-2、Bcl-2 蛋白表达。

关键词: 复方丹皮酚纳米乳; 人肺腺癌 A549 细胞; 移植瘤; Bax; Bcl-2; COX-2

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)03-0935-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.03.042

据报道, 2018 年全球新增癌症患者 1 810 万, 有 960 万人因癌症死亡, 其中肺癌发病人数和死亡人数均居恶性肿瘤首位^[1]。因肺癌早期症状体征不典型, 大部分肺癌患者首诊时已处于中晚期^[2]。目前, 放、化疗仍为肺癌的主要治疗手段, 但通常会产生严重的副作用, 近年来出现的新型靶向药物因价格昂贵而大大限制了其在临床的推广应用。现代研究表明中医药在治疗肺癌方面具有多环节、多靶点的作用特点, 可有效改善患者的临床症状, 提高患者的生活质量, 延长生存期^[3-5]。

丹皮酚是毛茛科植物牡丹根皮和萝藦科植物徐长卿干燥根或全草的主要活性成分, 可有效对抗各种消化道恶性肿瘤^[6], 并在体外抑制肺癌细胞增殖, 诱导肺癌细胞凋

亡^[7]。灵芝多糖是多孔菌科灵芝属真菌菌丝体的次生代谢产物, 具有抗肿瘤和免疫调节作用^[8-10], 可有效抑制非小细胞肺癌 A549 和 NCI-H1299 细胞的增殖、迁移和侵袭能力。目前丹皮酚在临床应用的制剂主要为丹皮酚片、丹皮酚乳膏和丹皮酚注射剂, 但是丹皮酚为脂溶性药物, 口服给药生物利用度低, 而注射剂稳定性差且用药剂量大。课题组前期将脂溶性丹皮酚和水溶性灵芝多糖作为有效成分, 制成复方丹皮酚纳米乳, 发现此乳剂药物含量高、稳定性好、分散均匀、生物利用度高。药效学实验显示, 复方丹皮酚纳米乳对人源肺癌 A549 细胞裸鼠移植瘤具有一定的抑制作用^[11], 体外可抑制 A549 细胞的增殖, 诱导细胞周期阻滞和细胞凋亡^[12]。但是, 复方丹皮酚纳米乳对肿瘤相

收稿日期: 2021-05-26

基金项目: 山东省重大科技创新工程项目 (2018CXGC1301); 山东省重点研发计划项目 (2015GSF119030, 2015GSF119029); 山东省中医药科技项目 (2020M141); 齐鲁医派中医学术流派传承项目 (2020)

作者简介: 刘 瑾 (1973—), 女, 硕士, 研究员, 从事中药复方药效物质基础和作用机理研究。Tel: (0531) 82949836, E-mail: jinanlj56@163.com

* 通信作者: 隋在云 (1964—), 女, 研究员, 硕士生导师, 从事中药复方药效物质基础和作用机理研究。Tel: (0531) 82949836, E-mail: zy_505@163.com

网络出版日期: 2022-01-20

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20220119.1713.008.html>