

清肺化痰解毒方对非小细胞肺癌细胞耐药的逆转作用研究^Δ

陈帅龙^{1,2*}, 刘慧慧^{1,2}, 桑 锋³, 蒋立峰^{4#} (1. 河南中医药大学第一附属医院血液肿瘤科, 郑州 450003; 2. 中西医结合防治重大疾病河南省协同创新中心, 郑州 450003; 3. 河南中医药大学第一附属医院艾滋病临床研究中心, 郑州 450003; 4. 河南省肿瘤医院中西医结合科, 郑州 450008)

中图分类号 R965;R273;R730.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)12-1553-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.12.06



摘要 **目的** 基于微RNA-641(miR-641)/胞外信号调节激酶(ERK)信号通路,探讨清肺化痰解毒方(QFHYJDF)对非小细胞肺癌(NSCLC)细胞耐药的逆转作用。**方法** 以人NSCLC亲本细胞A549为对象,采用浓度梯度递增联合高浓度冲击策略构建吉非替尼耐药细胞系A549/GR。在筛选干预浓度及时间后,将耐药细胞分为对照血清组(20%空白血清作用48 h)、QFHYJDF含药血清组(20%QFHYJDF含药血清作用48 h)和常规培养组(常规培养48 h),检测各组细胞的相对活力和总凋亡率,以及细胞中miR-641和神经纤维蛋白1(NF1)、ERK1/2、磷酸化ERK1/2(p-ERK1/2)的表达水平。**结果** 与常规培养组和对照血清组比较,QFHYJDF含药血清组细胞的相对活力均显著降低,总凋亡率均显著升高,细胞中NF1蛋白的表达均显著上调,miR-641和p-ERK1、p-ERK2蛋白的表达均显著下调($P<0.05$)。**结论** QFHYJDF可抑制吉非替尼耐药肺癌细胞的增殖,促进其凋亡,上述作用可能与上调NF1蛋白表达、抑制miR-641表达及ERK信号通路活性有关。

关键词 清肺化痰解毒方;非小细胞肺癌;吉非替尼耐药;miR-641/ERK信号通路

Study on the reversal effect of Qingfei huayu jiedu formula on drug resistance in non-small cell lung cancer cells

CHEN Shuailong^{1,2}, LIU Huihui^{1,2}, SANG Feng³, JIANG Lifeng⁴ (1. Dept. of Hematology and Oncology, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China; 2. Collaborative Innovation Center of Prevention and Treatment of Major Diseases by Chinese and Western Medicine, Henan Province, Zhengzhou 450003, China; 3. AIDS Clinical Research Center, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China; 4. Dept. of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Henan Cancer Hospital, Zhengzhou 450008, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the reversal effect of Qingfei huayu jiedu formula (QFHYJDF) on drug resistance in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells based on the microRNA-641 (miR-641)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway. **METHODS** The human parental NSCLC cell line A549 was used to establish gefitinib-resistant cells A549/GR by combining concentration gradient increment with high-concentration pulse strategy. After screening for optimal intervention concentration and duration, the resistant cells were divided into a control serum group (treated with 20% blank serum for 48 h), QFHYJDF-containing serum group (treated with 20% QFHYJDF-containing serum for 48 h), and the normally cultured group (normally cultured for 48 h). The cell relative viability, total apoptosis rate, as well as the expression levels of miR-641, neurofibromin 1 (NF1), ERK1/2, and phosphorylated ERK1/2 (p-ERK1/2), were assessed in each group. **RESULTS** Compared with the normally cultured group and the control serum group, the QFHYJDF-containing serum group exhibited significantly decreased cell relative viability and significantly increased total apoptosis rate ($P<0.05$). Moreover, the expression of NF1 protein was significantly up-regulated, while the expression levels of miR-641 and p-ERK1, p-ERK2 proteins were significantly down-regulated in the QFHYJDF-containing serum group ($P<0.05$).

Δ 基金项目 国家自然科学基金联合基金项目(No.U1704181);河南省卫生健康委国家中医临床研究基地科研专项(No.2022JDZX1-53);河南省中医药科学研究专项课题(No.2023ZY2201);河南省协同创新中心(中西医结合防治重大疾病协同创新中心)项目(No. 教科技[2023]413号)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向:中西医结合防治恶性肿瘤。
E-mail:1744131172@qq.com

通信作者 副主任医师,硕士生导师,博士。研究方向:中西医结合防治恶性肿瘤。E-mail:Jlf_2000@126.com

CONCLUSIONS QFHYJDF can inhibit proliferation and promote apoptosis of gefitinib-resistant lung cancer cells, which may be associated with up-regulating NF1 protein expression, down-regulating miR-641 expression, and inhibiting the activity of the ERK signaling pathway.

KEYWORDS Qingfei huayu jiedu formula; non-small cell lung cancer; gefitinib resistance; miR-641/ERK signaling pathway

肺癌是全球发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一,且发病隐匿,大多数患者确诊时已处于晚期。肺癌从病理学上可分为小细胞肺癌和非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC),其中NSCLC是肺癌最常见的病理类型,占肺癌患者总数的80%以上^[1]。肺癌的常见治疗方案包括手术、放疗、化疗、免疫治疗、靶向治疗、中医药治疗。目前,根治性手术切除是治疗肺癌的最有效方式,但仅限于早、中期患者;而对于大部分晚期患者而言,已失去手术切除机会,药物治疗成为其重要的治疗手段。相对于化疗、放疗等传统治疗方式,靶向治疗具有毒副作用小、患者生存质量高、用药方便、治疗效果等优点^[2]。表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors, EGFR-TKIs)是用于EGFR基因突变的晚期NSCLC患者的一线治疗方案^[3],其中吉非替尼作为首代靶向药物,虽已应用多年、疗效较好,但大多数患者会在应用9~13个月后出现耐药现象^[4-6]。因此,逆转吉非替尼耐药已成为NSCLC临床治疗亟待解决的问题之一。

中医认为,肺癌的病机关键在于“正虚毒泛”,正气亏虚,邪毒集聚,阻滞气血阴阳,以致气滞血瘀、邪毒内蕴、痰湿内生^[7]。可见,虚、毒、瘀、痰湿贯穿于肺癌发生发展的全过程^[8]。清肺化痰解毒方(Qingfei huayu jiedu formula, QFHYJDF)是河南省肿瘤医院中西医结合科在临床实践中总结出的经验方,能扶正培本、化痰解毒。本课题组前期研究发现,联用QFHYJDF可有助于逆转吉非替尼耐药、延缓疾病进展^[9];细胞实验进一步显示,QFHYJDF可通过下调细胞间充质-上皮转化因子和胰岛素样生长因子1受体的表达,显著抑制吉非替尼耐药细胞的增殖^[10]。然而,QFHYJDF逆转吉非替尼耐药的具体分子机制尚未完全阐明,仍需进一步探索。microRNA-641(miR-641)/胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)信号通路是参与多种肿瘤细胞生长和存活等生物学过程的关键信号通路,抑制该信号通路可有效减缓肿瘤进展和耐药的发生^[11-12]。多项研究证实,miR-641/ERK信号通路异常激活与吉非替尼耐药密切相关,是调控NSCLC细胞耐药的重要靶点;Zhang等^[13]的研究发现,抑制ERK信号通路,可有助于逆转NSCLC细胞耐药;牛可等^[14]的研究指出,抑制C-C基序趋化因子配体2,能降低磷酸化ERK(phosphorylated ERK, p-ERK)蛋白的表达水平,从而逆转吉非替尼耐药;Chen等^[15]在18例对厄洛替尼耐药的EGFR突变型NSCLC患者的肿瘤组织中发现,其miR-641的表达水平较治疗前显著升高,提示miR-641表达

上调可能与NSCLC耐药的发生发展显著相关。基于上述研究成果,本课题组提出如下科学假设:QFHYJDF可能通过调控miR-641/ERK信号通路来逆转NSCLC对吉非替尼的获得性耐药。为此,本研究以人NSCLC亲本细胞A549为对象,通过构建吉非替尼耐药细胞,初步探讨QFHYJDF能否通过调控miR-641/ERK信号通路来逆转NSCLC细胞对吉非替尼耐药,以期延长药物有效作用时间、改善患者预后、完善NSCLC的中西医结合治疗策略提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

CytoFLEX型流式细胞仪购自美国Beckman Coulter公司;BK-EL10C型酶标仪购自博科控股集团有限公司;Ta2-FL型倒置显微镜购自日本Nikon公司;OYY-6C型电泳仪、DYCZ-24DN型垂直电泳槽均购自北京六一仪器厂;BPN-150CH(UV)型CO₂恒温培养箱购自上海一恒科学仪器有限公司;7500型实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪购自美国ABI公司。

1.2 主要药品与试剂

QFHYJDF组方药材包括苇茎、桃仁、冬瓜仁、鱼腥草、夏枯草、薏苡仁、鸡内金、全蝎、蜈蚣,其对应免煎颗粒(批号分别为A2123023、A2112353、A309B023、AB430103、A3120303、A3100303、A3101373、A3090853、A2023122001,每袋均相当于原药材10 g)均由河南中医药大学第一附属医院提供。

吉非替尼对照品(批号G792795,纯度≥98%)购自上海麦克林生化科技股份有限公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS;批号DX-1001)购自内蒙古大溪生物科技有限公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号G3522)购自广州捷倍斯生物科技有限公司;RPMI-1640基础培养基、细胞凋亡检测试剂盒(批号分别为QS-S006、QS-S306)均购自旗赛生物科技(武汉)有限公司;兔抗神经纤维蛋白1(neurofibromin 1, NF1)多克隆抗体、兔抗p-ERK1/2多克隆抗体、兔抗ERK1/2多克隆抗体、鼠抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠免疫球蛋白G二抗(批号分别为27249-1-AP、28733-1-AP、11257-1-AP、60004-1-Ig、SA00001-1)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;HRP标记的羊抗兔免疫球蛋白G二抗(批号A0208)购自上海碧云天生物技术有限公司;RIPA裂解液、ECL试剂(批号分别为G2002、G2014)均购自武汉塞维爾生物科技有限公司;第一链互补DNA合成试剂盒、SYBR Green Master Mix试剂盒(批号分别为MR201、Q412)均购自南

京诺唯赞生物科技有限公司; Trizol 总 RNA 提取试剂(批号 15596-026)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; PCR 所用引物由北京擎科生物科技股份有限公司设计、合成。

1.3 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只, 体重 200~220 g, 购自斯贝福(北京)生物技术有限公司, 动物生产许可证号为 SCXK(京)2019-0004。所有动物饲养于河南中医药大学第一附属医院实验动物中心[温度(22±2)℃、相对湿度(45±5)%、每 12 h 光照/黑暗交替], 自由摄食、饮水。实验方案遵循《实验动物护理与使用指南》, 经河南中医药大学第一附属医院实验动物福利伦理审查委员会审批(批准文号 YFYDW2024019)。

1.4 细胞系

人 NSCLC 亲本细胞 A549 购自美国 ATCC 公司。

2 方法

2.1 耐药细胞系的构建

采用浓度梯度递增联合高浓度冲击策略经体外诱导构建吉非替尼耐药细胞系 A549/GR, 具体操作如下: 取对数生长期的亲本细胞 A549, 接种于含 10% FBS、1% 青霉素-链霉素双抗的 RPMI-1640 基础培养基中, 以 5 μmol/L 为吉非替尼的起始浓度进行传代培养; 待细胞稳定生长、传代后, 逐步增加培养基中吉非替尼的浓度(5、10、20、40 μmol/L), 继续培养; 经过 6 个月的诱导, 若细胞能在含 40 μmol/L 吉非替尼的培养基中稳定生长、传代, 经显微形态学观察和半数抑制浓度(IC₅₀)检测(CCK-8 法, 以亲本细胞为参照)确认, 获得耐药细胞系 A549/GR。

2.2 QFHYJDF 含药血清和空白血清制备

取各中药免煎颗粒, 按组方比例(苇茎 30 g、桃仁 10 g、冬瓜仁 30 g、鱼腥草 30 g、夏枯草 30 g、薏苡仁 30 g、鸡内金 30 g、全蝎 6 g、蜈蚣 6 g)混匀, 以水稀释制成 1.80 g/mL(以生药量计)的 QFHYJDF 药液。

将 40 只 SD 大鼠随机分为含药组和正常组, 每组 20 只。含药组大鼠单次灌胃 QFHYJDF 药液 10.50 g/kg(以生药量计, 按正常成人临床等效剂量的 6.25 倍以体表面积换算而得), 正常组大鼠灌胃等体积生理盐水, 每天 2 次, 连续 10 d。各组大鼠于末次给药前禁食、不禁水 12 h, 末次给药 1 h 后经腹腔注射氨基甲酸乙酯 2 mg/g 麻醉, 采集腹主动脉血。血样于室温下静置 2 h 后, 以 2 500 r/min 离心 30 min, 收集上清液, 于 56℃ 恒温水浴中灭活 30 min, 再经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 即得含药血清和空白血清, 分装后于 -80℃ 下保存, 备用。

2.3 QFHYJDF 含药血清作用浓度和时间筛选

采用 CCK-8 法检测。取处于对数生长期且活力稳定的 A549/GR 细胞, 经消化、悬浮、吹打, 制成单细胞悬液, 并以每孔 5 000 个细胞接种于 96 孔板中, 将其分为不同浓度空白血清组(5%、10%、20%、40% 空白血清)、不同浓度 QFHYJDF 组(5%、10%、20%、40% 含药血清)、对照组(含培养基和细胞, 用于评估细胞自然增殖状态)、空白对照组[无细胞, 仅含培养基, 用于矫正背景光密度(OD)值], 每组设置 3 个复孔。分别于培养 24、48、72 h 时, 加入 CCK-8 试剂 10 μL, 继续孵育 2 h, 再使用酶标仪于 450 nm 波长处检测各孔的 OD 值, 并按下式计算细胞增殖抑制率: 细胞增殖抑制率(%)=[1-(实验组 OD 值-空白对照组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白对照组 OD 值)]×100%。根据计算结果选择含药血清的最佳浓度及作用时间。

2.4 A549/GR 细胞增殖的检测

采用 CCK-8 法检测。取处于对数生长期且活力稳定的 A549/GR 细胞, 分为常规培养组(Control 组)、对照血清组(NC-Serum 组, 20% 空白血清, 根据“2.3”项下结果设置)、QFHYJDF 含药血清组(QFHYJDF-Serum 组, 20% 含药血清, 根据“2.3”项下结果设置), 并设置不含细胞、不含药物的空白对照组, 每组设置 3 个复孔。培养 48 h(根据“2.3”项下结果设置)后, 每孔加入 CCK-8 试剂 10 μL, 继续孵育 2 h, 再使用酶标仪于 450 nm 波长处检测各孔的 OD 值, 并按下式计算细胞相对活力: 细胞相对活力(%)=(实验组 OD 值-空白对照组 OD 值)/(Control 组 OD 值-空白对照组 OD 值)×100%。

2.5 A549/GR 细胞凋亡的检测

采用流式细胞术检测。取处于对数生长期且活力稳定的 A549/GR 细胞, 按“2.4”项下方法分为 Control 组、NC-Serum 组、QFHYJDF-Serum 组, 每组设置 3 个复孔。培养 48 h 后, 收集细胞, 用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次, 经胰酶消化后重悬, 再以 1 200 r/min 离心 5 min; 收集细胞, 以 Binding buffer 重悬, 随后加入 Annexin V-FITC 试剂 5 μL 和 PI 染色液 5 μL, 避光孵育 15 min 后, 使用流式细胞仪检测各组细胞的总凋亡率。

2.6 A549/GR 细胞中 miR-641 表达的检测

采用实时荧光定量 PCR 法检测。取处于对数生长期且活力稳定的 A549/GR 细胞, 按“2.4”项下方法分为 Control 组、NC-Serum 组、QFHYJDF-Serum 组, 每组设置 3 个复孔。培养 48 h 后, 收集细胞, 按相应提取试剂盒说明书方法提取其总 RNA 并测定浓度、纯度; 然后, 按相应逆转录试剂盒说明书方法操作, 将 RNA 逆转录成 cDNA, 配制相应反应体系后以两步法进行 PCR 扩增。

反应体系(总体积10 μL)包含:cDNA模板2 μL 、正/反向引物各0.2 μL 、SYBR Green Master Mix试剂5 μL 、无核酶水2.6 μL 。反应条件如下:预变性(95 $^{\circ}\text{C}$,10 min)后,进行40个循环的变性(95 $^{\circ}\text{C}$,10 s)和退火延伸(60 $^{\circ}\text{C}$,30 s),最后进行熔解曲线分析(95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s $\rightarrow$ 60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s $\rightarrow$ 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s)。以U6为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算miR-641的相对表达量,结果以Control组为参照进行归一化处理。U6的正、反向引物序列分别为5'-CGCTTCGGCAGCACATATAC-3'、5'-AAATATGGA-ACGCTTCACGA-3',预期产物大小为87 bp;miR-641的正向引物序列为5'-TGCGCAAAGACATAGGATAG-AGTC-3',反向引物为试剂盒配套(具体序列不予公开),预期产物大小为72 bp。

2.7 A549/GR细胞中NF1、ERK1/2、p-ERK1/2蛋白表达的检测

采用Western blot法检测。取处于对数生长期且活力稳定的A549/GR细胞,按“2.4”项下方法分为Control组、NC-Serum组、QFHYJDF-Serum组,每组设置3个复孔。培养48 h后,收集细胞,裂解提取总蛋白,蛋白以BCA法测定浓度后加热变性。取变性蛋白适量,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,转移至聚偏二氟乙烯膜上,以5%脱脂奶粉封闭2 h;洗膜后,加入GAPDH、NF1、p-ERK1/2、ERK1/2一抗(稀释比例分别为1:50 000、1:500、1:2 000、1:3 000),于4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜;洗膜后,加入相应羊抗兔、羊抗鼠二抗(稀释比例分别为1:1 000、1:10 000),于室温下孵育2 h;洗膜后,以ECL试剂显色并曝光成像。采用Image J软件对条带灰度值进行定量分析,以目的蛋白与内参蛋白(GAPDH)的条带灰度值比值表示各目的蛋白的相对表达量。

2.8 统计学方法

采用SPSS 24.0软件对数据进行统计分析,GraphPad Prism 8软件进行图形可视化。所有数据以Shapiro-Wilk检验进行正态性检验,以Levene检验进行方差齐性检验。若数据服从正态分布且方差齐,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用Bonferroni检验;若数据不服从正态分布或方差不齐,以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,多组间比较采用Kruskal-Wallis H 检验,进一步两两比较采用Bonferroni校正的Mann-Whitney U 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 A549/GR细胞耐药性验证及含药血清最佳浓度、作用时间筛选结果

CCK-8实验结果显示,A549细胞的 IC_{50} 值为(6.37 $\pm$ 0.48) $\mu\text{mol/L}$,而A549/GR耐药细胞的 IC_{50} 值为(30.73 $\pm$

0.09) $\mu\text{mol/L}$,差异具有统计学意义($P<0.05$);结合显微形态学观察(结果略)判定,吉非替尼耐药细胞已成功构建。

CCK-8实验结果(表1)显示,随着吉非替尼浓度的升高,各浓度QFHYJDF组细胞的活力逐渐下降,增殖抑制率均较同浓度空白血清组显著升高($P<0.05$)。综合考虑,后续研究以20%作为QFHYJDF含药血清的干预浓度,48 h作为其干预时间。

表1 不同浓度、不同作用时间下各组细胞的增殖抑制率比较[$M(P_{25}, P_{75}), n=3, \%$]

组别	24 h	48 h	72 h
对照组	0	0	0
5%空白血清组	2.5(1.1,3.9)	2.5(1.5,3.6)	3.1(1.6,4.9)
10%空白血清组	5.0(3.4,6.6)	5.1(3.5,6.5)	4.9(3.4,6.6)
20%空白血清组	6.2(4.5,7.9)	8.3(6.4,9.9)	7.5(5.5,9.4)
40%空白血清组	9.9(8.0,11.9)	14.9(12.9,16.9)	12.4(9.9,15.0)
5%QFHYJDF组	18.8(16.4,20.9) ^a	20.7(18.4,22.9) ^a	24.9(22.5,27.4) ^a
10%QFHYJDF组	31.2(28.4,33.9) ^a	33.3(30.4,35.9) ^a	37.4(34.4,40.5) ^a
20%QFHYJDF组	43.7(40.4,46.9) ^a	49.9(46.9,52.8) ^a	44.2(40.9,47.4) ^a
40%QFHYJDF组	42.5(39.1,45.7) ^a	47.3(44.0,50.6) ^a	46.8(43.4,50.4) ^a

a:与同浓度空白血清组比较, $P<0.05$ 。

3.2 QFHYJDF含药血清对A549/GR细胞增殖的影响

CCK-8实验结果(表2)显示,与Control组和NC-Serum组比较,QFHYJDF-Serum组的细胞相对活力均显著降低($P<0.05$)。

表2 QFHYJDF含药血清对A549/GR细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

组别	相对活力	总调亡率
Control组	100	4.89 $\pm$ 1.00
NC-Serum组	99.22 $\pm$ 0.38	5.71 $\pm$ 0.38
QFHYJDF-Serum组	59.92 $\pm$ 1.85 ^{ab}	23.70 $\pm$ 1.85 ^{ab}

a:与Control组比较, $P<0.05$;b:与NC-Serum组比较, $P<0.05$ 。

3.3 QFHYJDF含药血清对A549/GR细胞凋亡的影响

流式细胞术检测结果(图1、表2)显示,与Control组和NC-Serum组比较,QFHYJDF-Serum组细胞的总调亡率均显著升高($P<0.05$)。

3.4 QFHYJDF含药血清对A549/GR细胞中miR-641表达的影响

与Control组(1.00 $\pm$ 0.13)和NC-Serum组(0.98 $\pm$ 0.10)比较,QFHYJDF-Serum组细胞中miR-641的表达(0.31 $\pm$ 0.04)均显著下调($P<0.05$)。

3.5 QFHYJDF含药血清对A549/GR细胞中ERK信号通路相关蛋白表达的影响

Western blot实验结果(图2、表3)显示,与Control组和NC-Serum组比较,QFHYJDF-Serum组细胞中NF1蛋白的表达均显著上调,p-ERK1、p-ERK2蛋白的表达均显著下调($P<0.05$)。

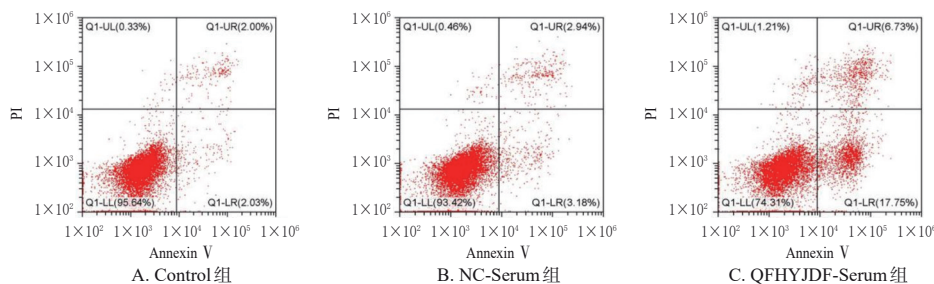


图1 QFHYJDF含药血清对A549/GR细胞凋亡影响的流式细胞图

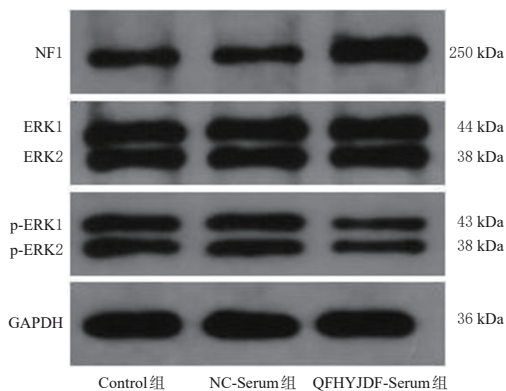


图2 QFHYJDF含药血清对A549/GR细胞中NF1、ERK1/2、p-ERK1/2蛋白表达影响的电泳图

表3 QFHYJDF含药血清对A549/GR细胞中NF1、ERK1/2、p-ERK1/2蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	NF1	ERK1	ERK2	p-ERK1	p-ERK2
Control组	0.34±0.09	0.58±0.01	0.51±0.09	0.50±0.04	0.44±0.03
NC-Serum组	0.32±0.05	0.61±0.05	0.55±0.08	0.52±0.04	0.45±0.04
QFHYJDF-Serum组	0.70±0.08 ^{ab}	0.60±0.04	0.54±0.09	0.18±0.04 ^{ab}	0.20±0.03 ^{ab}

a: 与Control组比较, $P<0.05$; b: 与NC-Serum组比较, $P<0.05$ 。

4 讨论

当今,肺癌的发病率正在逐年增加,不仅给患者带来巨大的痛苦,也给其家庭造成沉重的经济负担^[16]。根据最新公布的数据,我国2022年新发肺癌病例达100万余例,占新发癌症病例总数的20%;肺癌导致死亡的病例达73万余例,占癌症死亡病例总数的28.5%^[17]。NSCLC是肺癌最常见的病理类型,大部分患者在就诊时已处于晚期,并伴有全身多处转移,加之现有治疗方案效果有限,故患者大多预后不良。尽管吉非替尼作为治疗NSCLC的第一代靶向药物,疗效明显,但耐药是其临床应用的主要障碍之一。因此,逆转吉非替尼耐药是当前临床亟待解决的关键问题之一^[4-6]。

肺癌在中医学中属“肺积”“肺癰”“积聚”“咳嗽”“咯血”范畴。《难经·五十六难》曰:“肺之积,名曰息贲,在右肋下,覆大如杯。久不已,令人洒淅寒热,喘咳,发肺壅”;《金匱要略》曰:“若口中辟辟燥,咳即胸中隐隐痛,脉反滑数,此为肺癰,咳唾脓血。脉数虚者为肺痿,数实者为肺癰”。上述论述揭示了肺癌的中医诊断及治法方药^[18]。中医药在治疗恶性肿瘤方面独具优势,可预防患

者术后复发,减少放化疗、靶向治疗的副作用,具有减毒增效的效果^[19]。现代医家认为,肺癌病机为本虚标实,即正气亏虚、正不胜邪,从而导致邪毒集聚、瘀血内结,应以祛痰化瘀、顾护脾胃为主要治法^[20]。QFHYJDF作为经验方,由苇茎、薏苡仁等9味中药组方而成,全方共奏补虚培本、解毒散结、祛痰化瘀之功。

本研究通过构建A549/GR耐药细胞系,借助体外实验初步评价了QFHYJDF含药血清对耐药细胞增殖、凋亡、miR-641/ERK信号通路的影响。结果显示,QFHYJDF含药血清可抑制A549/GR细胞的增殖,促进其凋亡,上调NF1蛋白的表达,并下调miR-641以及p-ERK1、p-ERK2蛋白的表达。研究指出,NF1作为鸟苷三磷酸结合型Ras蛋白激活蛋白家族成员,可加速鸟苷三磷酸水解,从而负向调控Ras/ERK信号通路;而Ras/ERK通路的异常持续激活是NSCLC细胞对EGFR-TKIs产生获得性耐药的核心机制之一^[21]。由此本课题组推测,QFHYJDF含药血清可能通过上调NF1蛋白的表达来抑制Ras激活和ERK蛋白磷酸化,最终减弱ERK信号通路的活性,逆转吉非替尼耐药。还有研究指出,激活ERK信号通路,能调控下游的c-Myc蛋白、细胞周期蛋白D1、B细胞淋巴瘤2、髓样细胞白血病1等效应分子的异常高表达,从而促进细胞增殖、抑制凋亡,是NSCLC细胞对EGFR-TKIs耐药的关键环节^[13,22]。本研究结果显示,QFHYJDF含药血清可抑制ERK信号通路的活性。由此本课题组推测,该方可能通过此途径来下调上述效应分子的表达,进而协同抑制耐药细胞增殖,促进其凋亡,最终发挥逆转吉非替尼耐药的作用,但上述假设尚有待后续实验验证。

然而,本研究尚存在以下局限:(1)本研究仅采用单一浓度QFHYJDF含药血清进行干预,未设置多个浓度梯度,无法明确量效关系;(2)本研究未设置ERK通路特异性抑制剂/激活剂作为对照,也未开展NF1/miR-641的过表达/敲低实验,难以明确药物作用与该通路的因果调控关系;(3)含药血清成分复杂,调控miR-641/ERK信号通路的具体活性成分仍需进一步分离、鉴定;(4)中药复方作用机制尚未完全明确,难以精准定位其作用靶点。

因此,QFHYJDF的作用机制及其临床转化价值仍需进一步探索。

综上所述,QFHYJDF含药血清可抑制吉非替尼耐药肺癌细胞的增殖、促进其凋亡,上述作用可能与上调NF1蛋白表达、抑制miR-641表达及ERK信号通路活性有关。

参考文献

- [1] YANG H, LIU Y F, CHEN L Q, et al. miRNA-based therapies for lung cancer: opportunities and challenges [J]. *Biomolecules*, 2023, 13(6): 877.
- [2] REN F, FEI Q, QIU K, et al. Liquid biopsy techniques and lung cancer: diagnosis, monitoring and evaluation[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2024, 43(1): 96.
- [3] 赵论, 赵欣, 林晨琛, 等. miR-217靶向FOXO3影响非小细胞肺癌对吉非替尼耐药性及相关机制[J]. *实用医学杂志*, 2024, 40(16): 2277-2283.
- [4] GUAN S X, CHEN X, CHEN Y H, et al. FOXM1 variant contributes to gefitinib resistance via activating Wnt/ β -catenin signal pathway in patients with non-small cell lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2022, 28(17): 3770-3784.
- [5] LEI Y, GUO W, CHEN B W, et al. Tumor-released lncRNA H19 promotes gefitinib resistance via packaging into exosomes in non-small cell lung cancer[J]. *Oncol Rep*, 2025, 54(5): 140.
- [6] XIAO J M, CAO J W, ZHU L, et al. TFAP2C activates PTGES through the NOTCH3 signaling pathway to affect gefitinib resistance in lung adenocarcinoma[J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2025, 77(1): 1-9.
- [7] 吴思雨, 隋博文. 基于“态靶辨治-正虚毒泛”探讨胃癌免疫调控[J]. *上海中医药杂志*, 2024, 58(12): 35-41.
- [8] 许博文, 李杰, 高瑞珂, 等. 基于“阳化气, 阴成形”理论探讨肿瘤的中医辨治[J]. *中医杂志*, 2020, 61(4): 315-318.
- [9] 蒋立峰, 桑锋, 刘怀民, 等. 清肺化痰解毒方治疗非小细胞肺癌吉非替尼获得性耐药临床疗效观察[J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(11): 5575-5578.
- [10] 蒋立峰, 刘怀民, 桑锋, 等. 清肺化痰解毒方对肺癌靶向耐药细胞的逆转作用及机制研究[J]. *中医学报*, 2017, 32(12): 2284-2288.
- [11] ZHAO Y S, ZHENG R Y, CHEN J, et al. CircRNA CDR1as/miR-641/HOXA9 pathway regulated stemness contributes to cisplatin resistance in non-small cell lung cancer(NSCLC)[J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20(1): 289.
- [12] BAO F, AN S, YANG Y, et al. SODD promotes lung cancer tumorigenesis by activating the PDK1/AKT and RAF/MEK/ERK signaling[J]. *Genes*, 2023, 14(4): 829.
- [13] ZHANG Q Y, SHI Y J, LIU S, et al. EZH2/G9a interact to mediate drug resistance in non-small-cell lung cancer by regulating the SMAD4/ERK/c-Myc signaling axis[J]. *Cell Rep*, 2024, 43(2): 113714.
- [14] 牛可, 钟剑鑫, 唐静, 等. CCL2在非小细胞肺癌吉非替尼耐药中的作用及机制[J]. *中国药理学通报*, 2026, 42(1): 131-137.
- [15] CHEN J, CUI J D, GUO X T, et al. Increased expression of miR-641 contributes to erlotinib resistance in non-small-cell lung cancer cells by targeting NF1[J]. *Cancer Med*, 2018, 7(4): 1394-1403.
- [16] GAO X R, GUAN M Y, BO B, et al. Prevalence and associated factors of anxiety and depression in lung cancer patients[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2025, 52(10): e70065.
- [17] 李文轩, 吕章艳, 从悦, 等. 中国原发性非小细胞肺癌治疗方案卫生经济学评价现状[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2025, 32(22): 1350-1362.
- [18] 李晨, 魏小曼, 闫秋莹, 等. 基于肺癌治疗探讨化痰解毒方药的临床应用[J/OL]. *中国实验方剂学杂志*, 2026: 1-17 [2026-01-25]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=RTWLtMhoy7S2b30agMWSU-NmFaTI45ULB3JHwDV-guCof_w1I0vQv_WD2i0ViKuguvrUO9cIktYA5EGBn7AO-lgOAuIEtpwSOLZ87wrT_WngAgGT1jeWPUGkWAcbf-HcuEe0PL3RRwLWqaBgkxbTGEd1e0kIMv7FxlUND6xt9yrrT95c_Dn_G6vQ=&uniplatform=NZKPT&language=CHS.
- [19] 李贵新, 李爽, 高志成, 等. 补中益气汤对晚期非小细胞肺癌术后化疗患者的临床疗效[J]. *中成药*, 2025, 47(2): 463-466.
- [20] 许越淇, 莫丽莎, 柯诗文, 等. 国医大师洪广祥“以补助攻, 留人治病”原则辨治晚期肺癌经验[J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(3): 1078-1081.
- [21] TIAN H X, CHEN Z H, JIE G L, et al. Prognostic features and comprehensive genomic analysis of NF1 mutations in EGFR mutant lung cancer patients[J]. *Cancer Med*, 2023, 12(1): 396-406.
- [22] LIU J X, WEI L Y, MIAO Q, et al. MDM2 drives resistance to Osimertinib by contextually disrupting FBW7-mediated destruction of MCL-1 protein in EGFR mutant NSCLC[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2024, 43(1): 302.

(收稿日期: 2025-12-14 修回日期: 2026-04-14)

(本文责编: 张元媛)