

[药 理]

基于 IP3R-Grp75-VDAC1-MCU 钙调控轴介导的线粒体凋亡探讨归芪益元膏联合顺铂对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肿瘤生长的影响

马 抢 平¹, 梁 建 庆^{1,2,3*}, 罗 强³, 李 金 田^{2,3}, 李 娟¹
(1. 甘肃中医药大学基础医学院, 甘肃 兰州 730101; 2. 敦煌医学与转化教育部重点实验室, 甘肃 兰州 730000; 3. 甘肃中医药大学中医临床学院, 甘肃 兰州 730101)

摘要: **目的** 探讨归芪益元膏联合顺铂对气阴两虚型 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肿瘤生长的影响。**方法** 采用随机数字表法取 10 只 C57BL/6J 小鼠作为空白组, 剩余 50 只复制气阴两虚型 Lewis 肺癌荷瘤小鼠模型, 模型复制成功后采用随机数字表法分为模型组、顺铂组 (5×10^{-3} g/kg) 和归芪益元膏高、中、低剂量 (7.0、3.5、1.75 g/kg) 联合顺铂 (5×10^{-3} g/kg) 组, 连续干预 13 d 后取材。HE 染色观察肿瘤组织病理变化; 透射电镜观察肿瘤组织细胞超微结构; TUNEL 染色观察肿瘤细胞凋亡率; 免疫荧光染色检测肿瘤组织 IP3R、Grp75、VDAC1、MCU 蛋白表达; Western blot 及 RT-qPCR 法检测肿瘤组织 IP3R、VDAC1、Grp75、MCU、Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白和 mRNA 表达。**结果** 与模型组比较, 各给药组小鼠肿瘤质量降低 ($P<0.05$), 肿瘤抑制率升高 ($P<0.05$), 肿瘤组织细胞凋亡率升高 ($P<0.05$), VDAC1、IP3R、Grp75、MCU 平均荧光强度增强 ($P<0.05$), IP3R、VDAC1、Grp75、MCU、Bax、Caspase-3 蛋白和 mRNA 表达升高 ($P<0.05$), Bcl-2 蛋白和 mRNA 表达降低 ($P<0.05$); 与顺铂组比较, 归芪益元膏各剂量联合顺铂组作用效果更佳 ($P<0.05$, $P<0.01$), 肿瘤细胞排列疏松且不规则细胞核破裂, 大片细胞坏死, 线粒体出现畸形, 线粒体嵴排列紊乱、断裂, 甚至融合。**结论** 归芪益元膏联合顺铂能够通过修复 IP3R-GRP75-VDAC 复合体功能, 从而激活 Ca^{2+} 流入线粒体, 调控肿瘤细胞 Ca^{2+} 稳态并诱导细胞线粒体凋亡, 抑制气阴两虚型 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肿瘤的生长。

关键词: 归芪益元膏; 肺癌; 气阴两虚; 顺铂; IP3R-Grp75-VDAC1-MCU 轴; 钙离子; 线粒体; 凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2026)07-2180-09

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2026.07.008

Effect of Guiqi Yiyuan Ointment combined with cisplatin on tumor growth in lewis lung cancer tumor-bearing mice mediated by mitochondrial apoptosis via the IP3R-Grp75-VDAC1-MCU calcium regulation axis

MA Qiang-ping¹, LIANG Jian-qing^{1,2,3*}, LUO Qiang³, LI Jin-tian^{2,3}, LI Juan¹
(1. School of Basic Medicine, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730101, China; 2. The Key Laboratory of the Ministry of Education of Dunhuang Medicine and Transformation, Lanzhou 730000, China; 3. The Clinical College of Traditional Chinese Medicine, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730101, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the effect of Guiqi Yiyuan Ointment combined with cisplatin on tumor growth in Lewis lung cancer tumor-bearing mice with Qi and Yin deficiency. **METHODS** A total of 10 C57BL/6J mice were randomly selected as the blank group using a random number table. The remaining 50 mice were used to establish a model of Lewis lung cancer with Qi and Yin deficiency. After successful modeling, the mice were randomly divided into a model group, a cisplatin group (5×10^{-3} g/kg), and high-, medium-, and low-dose Guiqi Yiyuan Ointment combined with cisplatin groups (7.0, 3.5, and 1.75 g/kg, respectively, combined with 5×10^{-3}

收稿日期: 2025-07-25
基金项目: 国家自然科学基金 (82160872); 甘肃省教育厅“双一流”科研重点项 (GSSYLXM-05); 敦煌医学与转化教育部重点实验室开放课题 (DHXY24-01); 2024 年度中医学一级学科“岐黄英才”导师专项基金博导项目 (ZYXKBD-202418)
作者简介: 马抢平 (1981—), 男, 硕士, 从事中医药防治肿瘤研究。Tel: 13792977578, E-mail: 370260818@qq.com
* 通信作者: 梁建庆 (1976—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中医药防治肿瘤研究。Tel: 13639332348, E-mail: 1766424015@qq.com

g/kg cisplatin). Samples were collected after 13 consecutive days of intervention. HE staining was used to observe the pathological changes of tumor tissues; transmission electron microscopy was used to observe the ultrastructure of tumor cells; TUNEL staining was used to detect the apoptosis rate of tumor cells; immunofluorescence staining was used to detect the protein expressions of IP3R, Grp75, VDAC1, and MCU in tumor tissues; Western blot and RT-qPCR were used to detect the protein and mRNA expressions of IP3R, VDAC1, Grp75, MCU, Bcl-2, Bax, and Caspase-3 in tumor tissues. **RESULTS** Compared with the model group, the tumor weight in each administration group decreased ($P<0.05$), the tumor inhibition rate increased ($P<0.05$), the apoptosis rate of tumor tissues increased ($P<0.05$), the mean fluorescence intensity of VDAC1, IP3R, Grp75 and MCU increased ($P<0.05$), and the protein and mRNA expressions of IP3R, VDAC1, Grp75, MCU, Bax and Caspase-3 increased ($P<0.05$), while the protein and mRNA expressions of Bcl-2 decreased ($P<0.05$). Compared with the cisplatin group, the effects in the Guiqi Yiyuan Ointment combined with cisplatin groups were significantly better ($P<0.05$, $P<0.01$). Tumor cells were loosely arranged with irregular nuclear rupture and extensive necrosis. Mitochondria appeared deformed, with disordered arrangement and fracture of mitochondrial cristae, or even fusion. **CONCLUSION** Guiqi Yiyuan Ointment combined with cisplatin can inhibit the tumor growth in Lewis lung cancer tumor-bearing mice with Qi and Yin deficiency. The mechanism may involve restoring the function of the IP3R-Grp75-VDAC complex, thereby activating Ca^{2+} influx into mitochondria, regulating tumor cell Ca^{2+} homeostasis, and inducing mitochondrial apoptosis. **KEY WORDS:** Guiqi Yiyuan Ointment; lung cancer; Qi and Yin deficiency; cisplatin; IP3R-Grp75-VDAC1-MCU axis; calcium ions; mitochondria; apoptosis

原发性支气管肺癌（简称肺癌），是世界范围内导致死亡的主要恶性肿瘤之一^[1-2]，占全球癌症新发病例的 11.4%^[3]，死亡率高达 18%，发病率呈逐年上升趋势^[4]。肺癌的发生与吸烟、职业、空气污染、长期的电离辐射等有关^[5]。现代医学目前针对肺癌的治疗手段以手术、放化疗为主^[5]，并伴随诸多不良反应^[6]。课题组前期研究显示，归芪益元膏联合化疗可显著改善肺癌患者的临床症状和生活质量，延长患者生存期^[7-8]。因此，深入探讨归芪益元膏针对肺癌治疗的作用尤为重要。

细胞器之间的动态互作关联多种细胞间功能，内质网-线粒体轴被认为是细胞器间系统的代表^[9]，其中线粒体相关内质网膜蛋白质对细胞间功能至关重要，内质网-线粒体偶联（mitochondrial associated endoplasmic reticulum membranes, MAM）蛋白主要参与细胞内钙稳态的调控^[10-13]。内质网-线粒体轴广泛参与维持细胞稳态，MAM 蛋白的改变是肿瘤发生的一个关键因素，其可能是癌症诊断和治疗的潜在靶点。肌醇 1, 4, 5 三磷酸受体（inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptors, IP3R）-葡萄糖调节蛋白 75（glucose-regulated protein 75, Grp75）-电压依赖性阴离子通道 1（voltage-dependent anion channel 1, VDAC1）钙调节轴是位于 MAM 内的复合结构，介导 Ca^{2+} 从内质网向线粒

体转运，诱导癌细胞线粒体凋亡，抑制肿瘤生长^[14-16]。因此，本研究以气阴两虚型 Lewis 肺癌荷瘤小鼠为研究对象，从 IP3R-Grp75-VDAC1-线粒体钙离子单向转运蛋白（mitochondrial calcium uniporter, MCU）钙调控轴介导的线粒体凋亡角度，探讨归芪益元膏联合顺铂对气阴两虚型 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肿瘤生长的影响。

1 材料

1.1 动物及细胞 C57BL/6J 雄性小鼠，4~5 周龄，体质量 14~16 g，购自斯贝福（北京）生物技术有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK（京）2024-0001]，饲养于甘肃中医药大学动物实验中心 SPF 级实验室 [实验动物使用许可证号 SYXK（甘）2021-0004]，环境温度 22~26 ℃，相对湿度 40%~70%，每 12 h 进行 1 次明暗循环，动物实验通过甘肃中医药大学动物实验中心伦理审查（伦理审查号 SY2024-285）。Lewis 肺癌细胞株（货号 CL-0140）购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 药物 归芪益元膏由甘肃中医药大学附属医院中药房提供，4 ℃ 保存备用；顺铂（20 mg，批号 3M0625B03，齐鲁制药有限公司）购自甘肃中医药大学西药房。

1.3 试剂 RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量检测试剂盒、5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、RNA 提取

液、RNA 溶解液、qPCR Mix 试剂、 β -actin 抗体、IP3R 抗体、VDAC1 抗体、Grp75 抗体、MCU 抗体、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax) 抗体、B 淋巴细胞瘤-2 (B lymphocytoma-2, Bcl-2) 抗体、半胱天冬蛋白酶-3 (Caspase-3) 抗体、HRP-山羊抗兔抗体 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 批号 G2002-100ML、G2026-200T、G2075-100ML、G3013、G3029、G3337、GB15003、GB11742、GB121939、GB11852、GB111353、GB15690、GB154380、11742、GB23303)。

1.4 仪器 D3024R 台式高速冷冻微量离心机 [大龙兴创实验仪器 (北京) 股份公司]; SVE-2 垂直电泳仪、SVT-2 转印电泳仪、SCG-W3000 化学发光仪 (武汉赛维尔生物科技有限公司); CFX Connect 荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 气阴两虚型 Lewis 肺癌荷瘤小鼠模型复制 C57BL/6 小鼠以温热中药 (麻黄、制附子、细辛、天南星各 9 g, 水煎浓缩到 1 g/mL, 灌胃体积 0.4 mL/只) 灌胃加 “刨花烟熏” (每天 1 次, 每次 30 min) 持续干预 10 d。观察小鼠一般状态, 如毛发脱落、竖立、无光泽, 运动明显下降, 反应灵敏度降低, 气短喘粗、神疲乏力、体质量下降、饮食减少等, 表明气阴两虚型模型小鼠复制成功, 可纳入下一步实验研究。

解冻并复苏 Lewis 肺癌细胞, 在 37 ℃、5% CO₂ 及饱和湿度的细胞培养箱中培养并传代, 采用第三代细胞悬液, 将细胞密度调至 2×10⁶/mL, 接种于气阴两虚型模型小鼠右颈部皮下, 每只 0.2 mL。待 3~5 d 后, 小鼠右颈部皮下肉眼可见黄豆粒大小的肿块 (电子游标卡尺测得肿块长径约为 5 mm), 视为气阴两虚型 Lewis 肺癌荷瘤小鼠模型建立成功^[17], 纳入实验研究。

2.2 分组及干预 C57BL/6 小鼠适应性喂养 1 周后, 采用随机数字表法取 10 只为空白组, 剩余 50 只小鼠按 “2.1” 项下方法复制气阴两虚型 Lewis 肺癌荷瘤小鼠模型, 模型复制成功后随机分为模型组、顺铂组和归芪益元膏高、中、低剂量联合顺铂组, 按成人 (60 kg) 药物剂量 115 g, 通过体质量折算系数换算^[18], 归芪益元膏高、中、低剂量为 7.0、3.5、1.75 g/kg, 灌胃给药; 空白组和模型组灌胃生理盐水, 每天 1 次; 顺铂给药剂量为 5 mg/kg, 腹腔注射, 每周 1 次。干预 13 d 后, 小鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 进行麻醉,

取材待检。

2.3 肿瘤体积及抑制率测定 在无菌环境下剥离皮下肿瘤组织并称定质量, 计算肿瘤抑制率, 公式为肿瘤抑制率= [(模型组平均肿瘤质量-给药组平均肿瘤质量)/模型组平均肿瘤质量] ×100%^[19]。

2.4 HE 染色观察肿瘤组织病理变化 将新鲜肿瘤组织切成约 2.0 cm×2.0 cm×0.3 cm 大小, 4% 多聚甲醛固定, 经脱水、透明、包埋后切片, 苏木精液 60 ℃ 染色 30~60 s, 清洗, 伊红 60 ℃ 染色 30~60 s, 清洗后封片, 于 400 倍镜下观察组织病理学变化。

2.5 TUNEL 法检测肿瘤组织细胞凋亡情况 取肿瘤组织石蜡切片, 无水乙醇清洗, 蛋白酶 K 修复组织后, 加入破膜液破膜, 之后加入 buffer 常温孵育 10 min。严格按照 TUNEL 检测试剂盒说明书进行染色操作, 封片。于荧光显微镜下观察细胞凋亡情况, 并计算细胞凋亡率, 公式为凋亡率= (凋亡细胞数/肿瘤细胞总数) ×100%^[20]。

2.6 透射电镜观察肿瘤组织线粒体变化 将新鲜肿瘤组织切割成 1 mm³ 的小组织块, 用电镜固定液固定, 依次用 30%、50%、70%、80%、95%、100%、100% 乙醇脱水, 同等比例丙酮与 812 包埋剂渗透包埋, 60 ℃ 烤箱聚合 48 h, 半薄切片机切片, 甲苯胺蓝染色后于光镜下定位, 2% 醋酸铀饱和乙醇溶液避光染色, 超纯水清洗, 2.6% 枸橼酸铅溶液避二氧化碳染色, 超纯水清洗, 切片干燥过夜, 于透射电镜下观察组织超微结构。

2.7 免疫荧光染色检测肿瘤组织 IP3R、VDAC1、Grp75、MCU 蛋白荧光表达强度 取肿瘤组织石蜡切片, 脱蜡至水, 修复后山羊血清封闭 30 min, 加入 IP3R、VDAC1、Grp75、MCU 一抗孵育过夜, 清洗, 加入二抗避光室温孵育 50 min; DAPI 复染细胞核, 避光室温孵育 10 min, 加入自发荧光淬灭剂 B 液 5 min, 冲洗 10 min, 加入抗荧光淬灭封片剂封片, 采集图像。

2.8 Western blot 法检测肿瘤组织 IP3R、VDAC1、Grp75、MCU、Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达 肿瘤组织研磨后加入裂解液裂解, 离心后取上清液, 采用 BCA 试剂盒进行蛋白定量, 按 1 : 4 比例将蛋白溶液与 5×还原型蛋白上样缓冲液混合, 100 ℃ 沸水浴加热变性。蛋白上样, 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 转膜, 5% 脱脂奶粉封闭液 37 ℃ 封闭 2 h, 加入 1 : 1 000 比例稀释的 IP3R、

VDAC1、Grp75、MCU、Bax、Bcl-2、Caspase-3 一抗, 4 ℃ 孵育过夜, 次日加入二抗室温孵育 2 h, 洗涤后采用化学发光法于暗室曝光并分析条带灰度值。

2.9 RT-qPCR 法检测肿瘤组织 *IP3R*、*VDAC1*、*Grp75*、*MCU*、*Bax*、*Bcl-2*、*Caspase-3* mRNA 表达 称取 5~20 mg 组织, 加入 1 mL RNA 提取液到研磨管中。按 RNA 提取试剂盒说明书提取 RNA, 使用 Nanodrop 2000 检测 RNA 浓度及纯度, 按照反转录试剂盒进行逆转录反应。使用荧光定量 PCR 仪进行扩增反应, 依次加入 2×HSF Purple Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μL, 正反向引物各 0.4 μL, cDNA 相应体积, 然后加 ddH₂O 补足至 20 μL。反应条件为 95 ℃ 30 s; 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 40 s, 循环 40 次。引物由武汉赛维尔生物科技有限公司合成, 序列见表 1。

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer sequences

基因	引物序列	产物长度/ bp
<i>IP3R</i>	正向 5'-CCAAAGCCCTGTGGGAAGT-3'	113
	反向 5'-AGCCAAGTAATGCCCTGTAGC-3'	
<i>VDAC1</i>	正向 5'-GATGTCTTCACCAAGGGCTACG-3'	206
	反向 5'-TCAGTGCCAGGGTGTGTC-3'	
<i>Grp75</i>	正向 5'-AGACAGGGGTGATTTGACCA-3'	131
	反向 5'-AGCATCCATGCTAAGGTATGGC-3'	
<i>MCU</i>	正向 5'-TCGTGGAGAGTTAGAGGAC-3'	39
	反向 5'-AGAATGCCAACTGGGTGG-3'	
<i>Bax</i>	正向 5'-GCCTTTTGTCTACAGGGTTTCAT-3'	151
	反向 5'-TATTGCTGTCCAGTTCATCTCCA-3'	
<i>Bcl-2</i>	正向 5'-AGGATTGTGGCCTTCTTTGAGT-3'	211
	反向 5'-ACAGCCAGGAGAAATCAAACAGA-3'	
<i>Caspase-3</i>	正向 5'-AGCACCTGTTACTATTCTGGAG-3'	191
	反向 5'-GGATCTGTTTCTTTGCGTGGA-3'	
<i>GAPDH</i>	正向 5'-CCTCGTCCCGTAGACAAAATG-3'	133
	反向 5'-TGAGGTCAATGAAGGGTCTGT-3'	

2.10 统计学分析 采用 SPSS 26.0 软件进行处理, 若数据符合正态分布且方差齐性, 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。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 归芪益元膏联合顺铂对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肿瘤质量及抑制率的影响 如表 2 所示, 与模型组比较, 各给药组小鼠肿瘤质量降低 ($P<0.05$); 与顺铂组比较, 归芪益元膏各剂量联合顺铂组小鼠肿瘤质量降低更显著 ($P<0.05$), 肿瘤抑制率升高更显著 ($P<0.05$)。

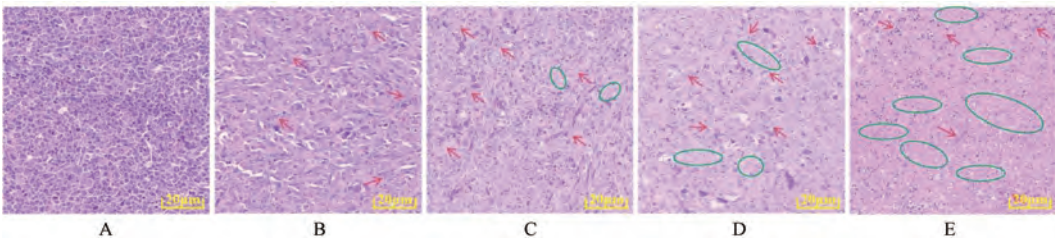
表 2 各组小鼠肿瘤质量及抑制率比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)
Tab. 2 Comparison of tumor weight and inhibition rate of mice in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	肿瘤质量/g	肿瘤抑制率/%
模型组	2.18±0.42	—
顺铂组	1.32±0.22 [*]	0.38±0.14
归芪益元膏低剂量联合顺铂组	1.05±0.14 ^{*#}	0.49±0.16 [#]
归芪益元膏中剂量联合顺铂组	0.92±0.14 ^{*##}	0.56±0.13 [#]
归芪益元膏高剂量联合顺铂组	0.70±0.15 ^{*##}	0.67±0.07 ^{##}

注: 与模型组比较, $^*P<0.05$; 与顺铂组比较, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$ 。

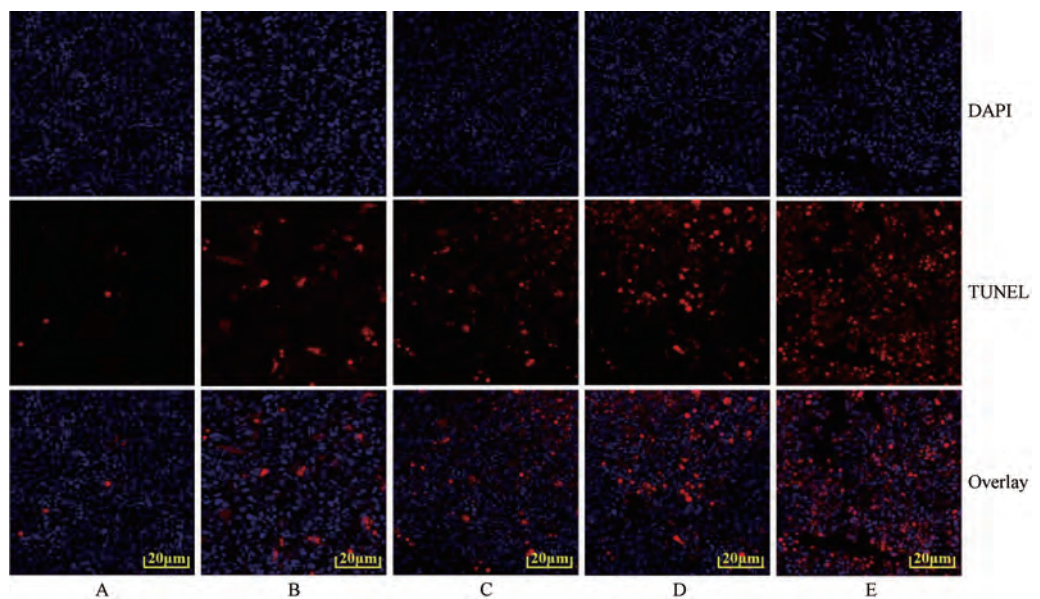
3.2 归芪益元膏联合顺铂对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肿瘤组织病理学的影响 如图 1 所示, 模型组小鼠肿瘤组织细胞排列整齐、紧密, 核深染, 无细胞破裂坏死; 与模型组比较, 各给药组小鼠肿瘤细胞有不同程度的排列紊乱, 核破裂, 细胞坏死, 其中归芪益元膏高剂量联合顺铂组肿瘤细胞核破裂、坏死明显, 并出现大量坏死区域。

3.3 归芪益元膏联合顺铂对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肿瘤组织细胞凋亡率的影响 如图 2、表 3 所示, 与模型组比较, 各给药组小鼠肿瘤组织细胞凋亡率升高 ($P<0.05$); 与顺铂组比较, 归芪益元膏各剂量联合顺铂组小鼠肿瘤组织细胞凋亡率升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。



注: A 为模型组, B 为顺铂组, C~E 分别为归芪益元膏低、中、高剂量联合顺铂组。红色箭头指示细胞崩裂的碎片, 绿色圆圈指示肿瘤组织坏死区域。

图 1 各组小鼠肿瘤组织 HE 染色 (×400)
Fig. 1 HE staining of tumor tissues of mice in each group (×400)



注：A 为模型组，B 为顺铂组，C~E 分别为归芪益元膏低、中、高剂量联合顺铂组。DAPI 染色的细胞核为蓝色，TUNEL 阳性染色的细胞核为红色，Overlay 为 TUNEL/DAPI 叠加结果。

图 2 各组小鼠肿瘤组织细胞凋亡情况（TUNEL 染色）

Fig. 2 Apoptosis in tumor tissues of mice in each group (TUNEL staining)

表 3 各组小鼠肿瘤组织细胞凋亡率比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

Tab.3 Comparison of apoptosis rate in tumor tissues of mice in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

组别	凋亡率/%
模型组	1.51±0.12
顺铂组	4.14±0.49 *
归芪益元膏低剂量联合顺铂组	8.74±0.59 *#
归芪益元膏中剂量联合顺铂组	17.78±1.35 *##
归芪益元膏高剂量联合顺铂组	30.01±1.69 *##

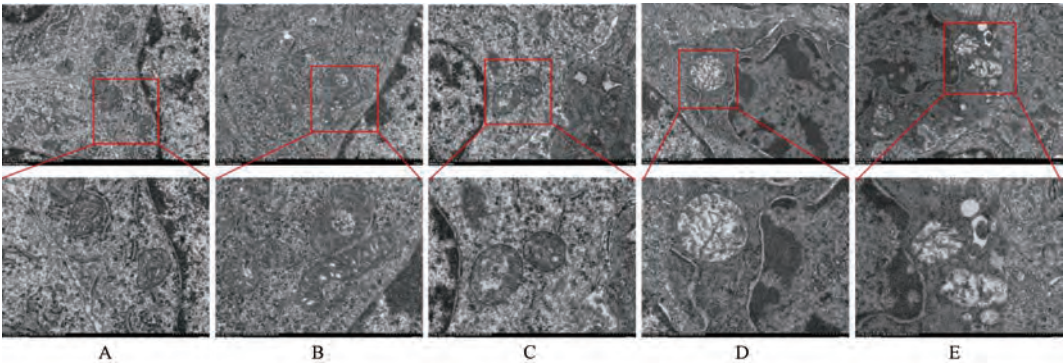
注：与模型组比较,* $P<0.05$; 与顺铂组比较,# $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

3.4 归芪益元膏联合顺铂对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肿瘤组织细胞线粒体超微结构的影响 如图 3 所示，模型组小鼠肿瘤组织细胞内部线粒体形态结构完整，线粒体嵴清楚；各给药组小鼠肿瘤组织线粒

体数量减少，畸形，双层膜结构模糊，线粒体嵴排列紊乱或断裂、变形，甚至出现融合状态。

3.5 归芪益元膏联合顺铂对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肿瘤组织 VDAC1、IP3R、Grp75、MCU 蛋白表达的影响 如图 4、表 4 所示，与模型组比较，各给药组小鼠肿瘤组织 VDAC1、IP3R、Grp75、MCU 蛋白表达升高 ($P<0.05$)；与顺铂组比较，归芪益元膏各剂量联合顺铂组小鼠肿瘤组织 VDAC1、IP3R、Grp75、MCU 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

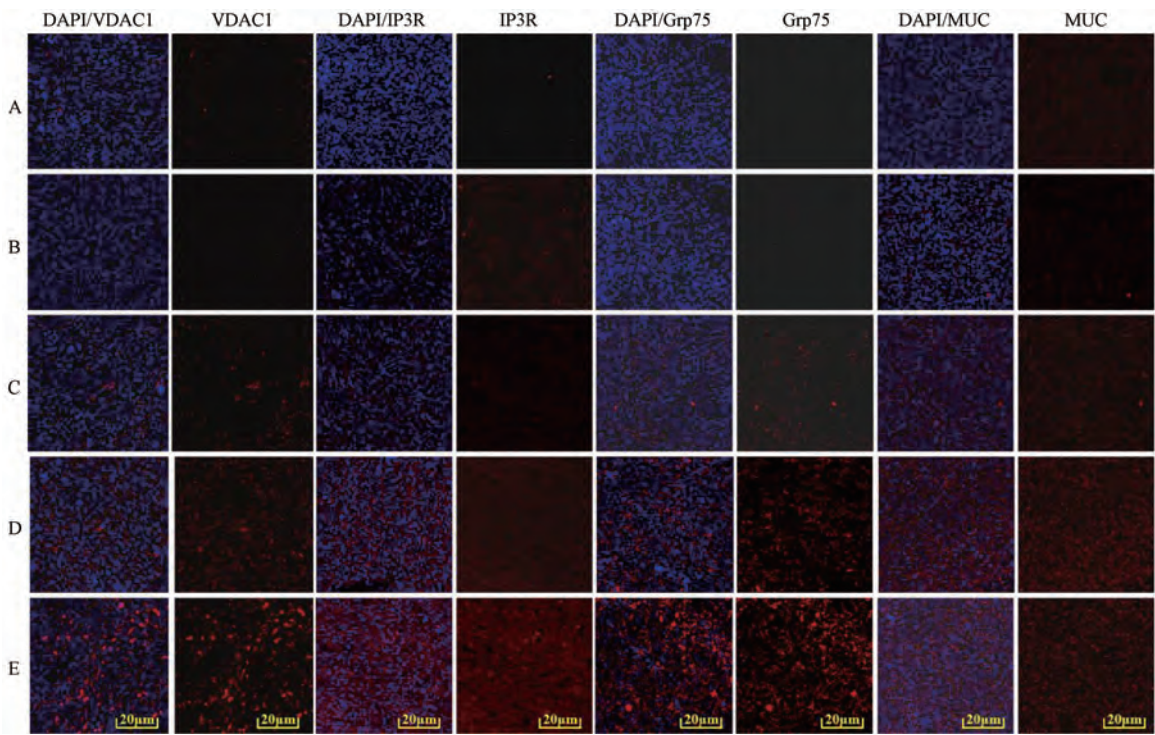
3.6 归芪益元膏联合顺铂对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肿瘤组织 IP3R、VDAC1、Grp75、MCU、Bax、Bcl-2、Caspase-3 mRNA 表达的影响 如表 5 所示，与



注：A 为模型组，B 为顺铂组，C~E 分别为归芪益元膏低、中、高剂量联合顺铂组。

图 3 各组小鼠肿瘤组织细胞线粒体超微结构变化

Fig. 3 Changes of mitochondrial ultrastructure of tumor tissue cells in each group



注：A 为模型组，B 为顺铂组，C~E 分别为归芪益元膏低、中、高剂量联合顺铂组。

图 4 各组小鼠肿瘤组织 VDAC1、IP3R、Grp75、MCU 蛋白免疫荧光染色

Fig. 4 Immunofluorescence staining of VDAC1, IP3R, Grp75 and MCU proteins in tumor tissues of mice in each group

表 4 各组小鼠肿瘤组织 VDAC1、IP3R、Grp75、MCU 蛋白表达比较（%， $\bar{x}\pm s$ ， $n=4$ ）

Tab. 4 Comparison of VDAC1, IP3R, Grp75 and MCU protein expressions in tumor tissues of mice in each group（%， $\bar{x}\pm s$ ， $n=4$ ）

组别	IP3R	ADV1	Grp75	MCU
模型组	0.44±0.07	1.84±0.28	1.74±0.35	4.44±0.55
顺铂组	3.90±0.28 [*]	2.81±0.27 [*]	3.79±0.37 [*]	14.27±2.32 [*]
归芪益元膏低剂量联合顺铂组	8.73±0.81 ^{*#}	10.63±0.60 ^{*#}	12.94±0.52 ^{*#}	20.08±2.21 ^{*#}
归芪益元膏中剂量联合顺铂组	21.47±0.76 ^{*##}	19.58±1.18 ^{*##}	29.05±1.63 ^{*##}	40.87±1.24 ^{*##}
归芪益元膏高剂量联合顺铂组	42.86±1.01 ^{*##}	30.81±2.56 ^{*##}	50.32±0.57 ^{*##}	55.90±2.08 ^{*##}

注：与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ；与顺铂组比较，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ 。

表 5 各组小鼠肿瘤组织 IP3R、VDAC1、Grp75、MCU、Bax、Bcl-2、Caspase-3 mRNA 表达比较（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=4$ ）

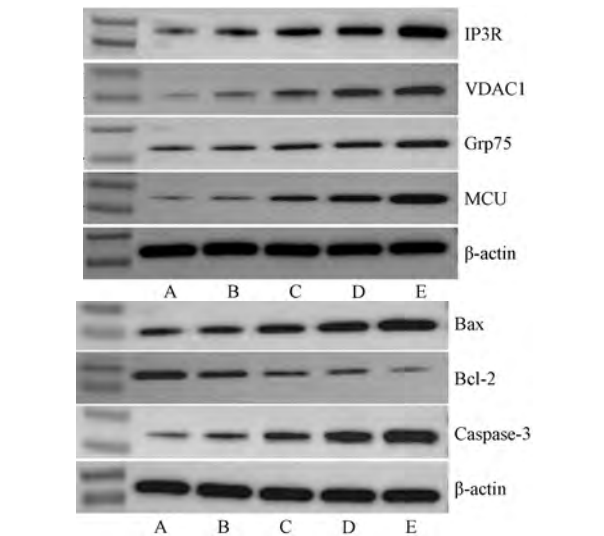
Tab. 5 Comparison of mRNA expressions of IP3R, VDAC1, Grp75, MCU, Bax, Bcl-2, Caspase-3 mRNA in tumor tissues of mice in each group（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=4$ ）

组别	IP3R	VDAC1	Grp75	MCU	Bax	Bcl-2	Caspase-3
模型组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
顺铂组	1.19±0.05 [*]	1.21±0.06 [*]	1.19±0.04 [*]	1.45±0.05 [*]	1.16±0.04 [*]	0.81±0.03 [*]	1.32±0.08 [*]
归芪益元膏低剂量联合顺铂组	1.45±0.07 ^{*#}	1.36±0.07 ^{*#}	1.43±0.05 ^{*#}	1.98±0.08 ^{*#}	1.58±0.07 ^{*#}	0.61±0.02 ^{*#}	1.61±0.06 ^{*#}
归芪益元膏中剂量联合顺铂组	1.78±0.08 ^{*##}	1.83±0.09 ^{*##}	1.64±0.08 ^{*##}	2.33±0.15 ^{*##}	2.00±0.11 ^{*##}	0.36±0.02 ^{*##}	1.88±0.09 ^{*##}
归芪益元膏高剂量联合顺铂组	2.32±0.09 ^{*##}	2.25±0.14 ^{*##}	2.02±0.07 ^{*##}	2.79±0.17 ^{*##}	2.33±0.07 ^{*##}	0.25±0.01 ^{*##}	2.23±0.05 ^{*##}

注：与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ；与顺铂组比较，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ 。

模型组比较，各给药组小鼠肿瘤组织 IP3R、VDAC1、Grp75、MCU、Bax、Caspase-3 mRNA 表达升高（ $P<0.05$ ），Bcl-2 mRNA 表达降低（ $P<0.05$ ）；与顺铂组比较，归芪益元膏各剂量联合顺铂组小鼠肿瘤组织 IP3R、VDAC1、Grp75、MCU、Bax、Caspase-3 mRNA 表达升高（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ），

Bcl-2 mRNA 表达降低（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ）。
3.7 归芪益元膏联合顺铂对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肿瘤组织 IP3R、VDAC1、Grp75、MCU、Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达的影响 如图 5、表 6 所示，与模型组比较，各给药组小鼠肿瘤组织 IP3R、VDAC1、Grp75、MCU、Bax、Caspase-3 蛋



注：A 为模型组，B 为顺铂组，C~E 分别为归芪益元膏低、中、高剂量联合顺铂组。

图 5 各组小鼠肿瘤组织 IP3R、VDAC1、Grp75、MCU、Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白条带图

Fig. 5 Protein bands of IP3R, VDAC1, Grp75, MCU, Bax, Bcl-2 and Caspase-3 in tumor tissues of mice in each group

表 6 各组小鼠肿瘤组织 IP3R、VDAC1、Grp75、MCU、Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab. 6 Comparison of protein expressions of IP3R, VDAC1, Grp75, MCU, Bax, Bcl-2 and Caspase-3 in tumor tissues of mice in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	IP3R	VDAC1	Grp75	MCU	Bax	Bcl-2	Caspase-3
模型组	0.09±0.01	0.04±0.01	0.34±0.04	0.09±0.01	0.52±0.04	0.94±0.07	0.27±0.04
顺铂组	0.28±0.01 [*]	0.25±0.03 [*]	0.39±0.04 [*]	0.20±0.03 [*]	0.58±0.06 [*]	0.63±0.07 [*]	0.42±0.05 [*]
归芪益元膏低剂量联合顺铂组	0.39±0.01 ^{*#}	0.53±0.07 ^{*#}	0.51±0.05 ^{*#}	0.49±0.03 ^{*#}	0.78±0.06 ^{*#}	0.42±0.09 ^{*#}	0.65±0.08 ^{*#}
归芪益元膏中剂量联合顺铂组	0.52±0.06 ^{*##}	0.68±0.05 ^{*##}	0.56±0.05 ^{*##}	0.71±0.07 ^{*##}	0.93±0.08 ^{*##}	0.33±0.05 ^{*##}	0.94±0.06 ^{*##}
归芪益元膏高剂量联合顺铂组	0.73±0.05 ^{*##}	0.87±0.11 ^{*##}	0.76±0.09 ^{*##}	1.16±0.08 ^{*##}	1.15±0.12 ^{*##}	0.08±0.02 ^{*##}	1.17±0.10 ^{*##}

注：与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ；与顺铂组比较，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ 。

汤加甘肃道地药材岷归制成的膏剂，已获专利（专利号 ZL201710477542.1）。全方由黄芪、人参、当归、熟地、枸杞子、麦冬、五味子组成，共奏益气滋阴、养血活血功效，契合肺癌气阴两虚证型^[7-8]。前期课题组研究表明，归芪益元膏可联合化疗改善患者的临床症状，延长患者生存期^[7-8]。因此，本研究以气阴两虚型 Lewis 肺癌荷瘤小鼠为模型，探讨归芪益元膏辅助顺铂对气阴两虚型 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肿瘤生长的影响。

维持 Ca^{2+} 稳态对癌细胞的生长至关重要^[24-25]，线粒体相关膜结构（MAMs）作为连接线粒体与内质网的物理平台，主要调控 Ca^{2+} 稳态^[26-27]。MAMs 中 Ca^{2+} 调节因子的典型微结构域由位于内质网的 IP3 受体、VDAC1 及 Grp75^[26]，其中 Grp75 作为 IP3R 与 VDAC1 之间的物理连接桥梁，形成 IP3R/Grp75/VDAC1 复合物，直接影响线粒体 Ca^{2+} 蓄

白表达升高（ $P<0.05$ ），Bcl-2 蛋白表达降低（ $P<0.05$ ）；与顺铂组比较，归芪益元膏各剂量联合顺铂组小鼠肿瘤组织 IP3R、VDAC1、Grp75、MCU、Bax、Caspase-3 蛋白表达升高（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ），Bcl-2 蛋白表达降低（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ）。

4 讨论

肺癌归属于中医“肺积”“息贲”“肺痿”等范畴^[21]。中医认为本虚标实是肺癌发生的根本，本虚则以阴虚、气阴两虚为主，标实则多为气滞、血瘀、痰凝、毒聚侵袭于肺，故气阴两虚是肺癌发病的主要因素^[22]。由于肺癌早期临床症状不明显，所以大部分患者确诊已是肺癌晚期^[5]。现代医学目前针对肺癌的治疗手段为手术治疗、分子靶向治疗、免疫治疗、化学治疗等^[1]。化疗后的骨髓抑制、胃肠道反应、失眠等，严重影响患者的生活质量和生存期^[6]，随着中医药的发展，中医药在调节癌细胞的增殖、凋亡、迁移、辅助减少化疗毒副作用等治疗肿瘤方面发挥着独特优势^[23]。归芪益元膏是李金田教授以《医学心悟》之黄芪

积^[28]。维持细胞存活和线粒体 ATP 产生需要 Ca^{2+} 从内质网转移到线粒体，但 Ca^{2+} 过量进入线粒体可导致线粒体 Ca^{2+} 通透性转换孔的超负荷和触发开放，促凋亡因子如细胞色素 C、半胱天冬酶激活和细胞凋亡的释放，导致细胞凋亡^[29-30]。线粒体中 Ca^{2+} 超载会导致 Bcl-2 降低和 Bax 升高^[31-32]，以及凋亡小体形成，激活 Caspase-3，活化的 Caspase-3 切割多种细胞蛋白，导致 DNA 修复障碍，最终引起细胞凋亡^[33]。

本研究结果显示，归芪益元膏联合顺铂能够减少线粒体数量，破坏肿瘤组织细胞内部线粒体形态结构的完整性，使线粒体双层膜结构模糊及线粒体嵴断裂、融合等，进而阻断肿瘤生长所需的能量供应；还能上调 IP3R、VDAC1、Grp75、MCU 蛋白表达，进一步说明归芪益元膏联合顺铂能够修复 IP3R-GRP75-VDAC 复合体功能，从而激活 Ca^{2+} 流

入线粒体并诱导细胞凋亡。归芪益元膏联合顺铂能够促进肿瘤细胞的凋亡，上调促凋亡蛋白 Bax、Caspase-3 表达，同时下调抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达，表明归芪益元膏联合顺铂能够调控 Ca²⁺ 稳态，促进肿瘤细胞凋亡。

综上所述，归芪益元膏联合顺铂能够抑制气阴两虚型 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肿瘤生长，其作用机制可能是通过修复 IP3R-GRP75-VDAC 复合体功能，从而激活 Ca²⁺ 流入线粒体并诱导细胞线粒体凋亡。

利益冲突： 本文不存在任何利益冲突。

参考文献：

[1] 葛均波, 徐永健. 内科学第 8 版[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 75-77.

[2] 邢力刚, 马晓林. 2021 版《中华医学会肿瘤学分会肺癌临床诊疗指南》非小细胞肺癌诊疗更新专家解读[J]. 疑难病杂志, 2022, 21(6): 557-560.

[3] Bray F, Laversanne M, Sung H, *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229-263.

[4] Wu F, Wang L, Zhou C. Lung cancer in China: current and prospect[J]. *Curr Opin Oncol*, 2021, 33(1): 40-46.

[5] Bade B C, Dela C S. Lung Cancer 2020: Epidemiology, etiology, and prevention[J]. *Clin Chest Med*, 2020, 41(1): 1-24.

[6] 迟文成, 耿 雪, 姜家康, 等. 中西医结合治疗肿瘤化疗后不良反应的研究进展[J]. 实用临床医药杂志, 2022, 26(8): 126-130; 136.

[7] 马天星, 李金田, 梁建庆, 等. 归芪益元膏联合化疗治疗小细胞肺癌局限期气阴两虚证 30 例临床观察[J]. 甘肃中医药大学学报, 2022, 39(1): 42-46.

[8] 杜双桂, 李金田, 梁建庆, 等. 归芪益元膏联合吉非替尼及放疗治疗晚期肺腺癌气阴两虚证 60 例临床观察[J]. 甘肃中医药大学学报, 2021, 38(3): 51-55.

[9] Rasola A, Bernardi P. Mitochondrial permeability transition in Ca²⁺-dependent apoptosis and necrosis[J]. *Cell Calcium*, 2011, 50(3): 222-233.

[10] Marchi S, Marinello M, Bononi A, *et al.* Selective modulation of subtype III IP3R by Akt regulates ER Ca²⁺ release and apoptosis[J]. *Cell Death Dis*, 2012, 3(5): e304.

[11] Giorgi C, Bonora M, Sorrentino G, *et al.* p53 at the endoplasmic reticulum regulates apoptosis in a Ca²⁺-dependent manner[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(6): 1779-1784.

[12] Pinton P, Ferrari D, Magalhães P, *et al.* Reduced loading of intracellular Ca²⁺ stores and downregulation of capacitative Ca²⁺ influx in Bcl-2-overexpressing cells[J]. *J Cell Biol*, 2000, 148(5): 857-862.

[13] Rimessi A, Marchi S, Patergnani S, *et al.* H-Ras-driven

tumoral maintenance is sustained through caveolin-1-dependent alterations in calcium signaling[J]. *Oncogene*, 2014, 33(18): 2329-2340.

[14] Bravo R, Vicencio J M, Parra V, *et al.* Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress[J]. *J Cell Sci*, 2011, 124(Pt 13): 2143-2152.

[15] Honrath B, Metz I, Bendridi N, *et al.* Glucose-regulated protein 75 determines ER-mitochondrial coupling and sensitivity to oxidative stress in neuronal cells[J]. *Cell Death Discov*, 2017, 3: 17076.

[16] Szabadkai G, Bianchi K, Várnai P, *et al.* Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels[J]. *J Cell Biol*, 2006, 175(6): 901-911.

[17] 顾俊菲, 孙若岚, 刘夫艳, 等. 黄芪-莪术配伍对结肠癌原位移植瘤模型小鼠 SDF-1/CXCR4/NF-κB 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(21): 63-72.

[18] 施新猷. 现代医学实验动物学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000: 335.

[19] 田培裕, 于泓洋, 李 潇, 等. 黄芪-莪术基于 C5a/NETs 途径抑制 Lewis 肺癌小鼠肿瘤转移的机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(14): 27-36.

[20] 李亚玲, 董娟娟, 李俊杰, 等. 敦煌平胃丸对人胃癌细胞株 SCG-7901 裸鼠移植瘤的抑制作用[J]. 中成药, 2020, 42(12): 3288-3292.

[21] 王永炎, 严世芸. 实用中医内科学[M]. 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2009: 671-672.

[22] 屠洪斌, 董志毅, 王少墨, 等. 原发性肺癌中医证型规律与化疗及靶向治疗的相关性研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2014, 16(9): 1997-2001.

[23] Ye L, Jia Y, Ji K E, *et al.* Traditional Chinese medicine in the prevention and treatment of cancer and cancer metastasis[J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(3): 1240-1250.

[24] Fu Y, Zou T, Shen X, *et al.* Lipid metabolism in cancer progression and therapeutic strategies[J]. *MedComm*, 2020, 2(1): 27-59.

[25] Simoes I C M, Morciano G, Lebedzinska-Arciszewska M, *et al.* The mystery of mitochondria-ER contact sites in physiology and pathology: a cancer perspective[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020, 1866(10): 165834.

[26] Monteith G R, Prevarskeya N, Roberts-Thomson S J. The calcium-cancer signalling nexus[J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(6): 367-380.

[27] Zheng S, Wang X, Zhao D, *et al.* Calcium homeostasis and cancer: insights from endoplasmic reticulum-centered organelle communications[J]. *Trends Cell Biol*, 2023, 33(4): 312-323.

[28] Zhang K, Zhao Z, Lan L, *et al.* Sigma-1 receptor plays a negative modulation on N-type calcium channel[J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 302.

[29] Marchi S, Patergnani S, Missiroli S, *et al.* Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death[J]. *Cell Calcium*, 2018, 69: 62-72.

[30]

Prudent J, McBride H M. The mitochondria-endoplasmic reticulum contact sites: a signalling platform for cell death[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2017, 47: 52-63.

[31]

Bock F J, Tait S W G. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(2): 85-100.

[32]

Pacilli A, Calienni M, Margarucci S, et al. Carnitine-acyltransferase system inhibition, cancer cell death, and prevention of myc-induced lymphomagenesis[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2013, 105(7): 489-498.

[33]

Wei M C, Zong W X, Cheng E H, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death[J]. *Science*, 2001, 292(5517): 727-730.

二至天癸方对早发性卵巢功能不全小鼠卵巢功能及 Treg/Th1 免疫平衡的影响

王晓琪¹, 魏超峰¹, 刘丹琪², 吴海萃³, 连 方^{3*}

(1. 山东中医药大学第一临床医学院, 山东 济南 250014; 2. 上海交通大学附属国际和平妇幼保健院, 上海 200030; 3. 山东中医药大学附属医院, 山东 济南 250011)

摘要: **目的** 探究二至天癸方对早发性卵巢功能不全 (POI) 小鼠卵巢功能及免疫稳态的调节作用。**方法** 50 只雌性小鼠随机分为空白组、模型组和二至天癸方低、中、高剂量组 (2.73、5.46、10.92 g/kg), 每组 10 只, 采用皮下多点注射透明带 3 多肽 (ZP3) 构建 POI 小鼠模型, 灌胃给药 28 d, 期间监测动情周期变化。给药结束后, 计算卵巢指数; HE 染色观察卵巢组织病理变化; ELISA 法检测血清 E₂、FSH、AMH、IFN- γ 、TNF- α 、IL-17A、IL-10、TGF- β 1、IL-23 水平; RT-qPCR 法检测卵巢组织 *Foxp3*、*ROR γ t*、*IL-17A*、*IL-10*、*IFN- γ* 、*T-bet* mRNA 表达; 流式细胞术检测脾脏及卵巢组织中调节性 T 细胞 (CD4⁺Foxp3⁺Treg) 和辅助性 T 细胞 1 (CD4⁺IFN- γ ⁺Th1) 比例; Western blot 法检测卵巢组织 T-bet、Foxp3 蛋白表达。**结果** 与空白组比较, 模型组小鼠卵巢指数降低 ($P<0.01$), 动情周期紊乱, 各级生长卵泡数量减少 ($P<0.01$), 闭锁卵泡数量增多 ($P<0.01$); 血清 AMH、E₂、IL-10、TGF- β 1 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), FSH、IFN- γ 、TNF- α 水平升高 ($P<0.01$); 卵巢组织 *Foxp3*、*IL-10* mRNA 和 Foxp3 蛋白表达降低 ($P<0.01$), *IFN- γ* 、*T-bet*、*ROR γ t* mRNA 和 T-bet 蛋白表达升高 ($P<0.01$); 卵巢及脾脏组织 CD4⁺Foxp3⁺Treg 细胞比例降低 ($P<0.01$), CD4⁺IFN- γ ⁺Th1 细胞比例升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 二至天癸方中、高剂量组小鼠卵巢指数升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), 动情周期紊乱减轻, 各级生长卵泡数量增加 ($P<0.05$, $P<0.01$), 闭锁卵泡数量减少 ($P<0.01$); 血清中 E₂、AMH 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), FSH、IFN- γ 、TNF- α 水平降低 ($P<0.01$); 卵巢组织 *IL-10* mRNA 和 Foxp3 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), *IFN- γ* 、*T-bet* mRNA 和 T-bet 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$); 卵巢及脾脏组织 CD4⁺Foxp3⁺Treg 细胞比例升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), CD4⁺IFN- γ ⁺Th1 细胞比例降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较, 二至天癸方高剂量组小鼠血清 IL-10、TGF- β 1 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$); 卵巢组织 *Foxp3* mRNA 表达升高 ($P<0.01$)。**结论** 二至天癸方能有效改善 POI 小鼠卵巢功能和结构损伤, 其作用机制可能与调节 Treg/Th1 细胞平衡, 抑制相关促炎因子释放, 促进抗炎因子表达, 从而改善卵巢局部免疫炎症微环境密切相关。

关键词: 二至天癸方; 早发性卵巢功能不全; T 淋巴细胞; 炎症因子; Treg/Th1 免疫平衡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2026)07-2188-09

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2026.07.009

Effects of Erzhi Tiangui Formula on ovarian function and Treg/Th1 immune balance in mice with premature ovarian insufficiency

WANG Xiao-qi¹, WEI Chao-feng¹, LIU Dan-qi², WU Hai-cui³, LIAN Fang^{3*}

收稿日期: 2025-08-21

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82174429, 82274573)

作者简介: 王晓琪 (2000—), 硕士在读, 从事中医药防治不孕症的临床与基础研究。E-mail: wangxqi2000@163.com

* 通信作者: 连 方 (1957—), 博士, 主任医师, 从事中医药防治不孕症的临床与基础研究。E-mail: lianfangbangong@163.com