

# 基于酸性微环境研究养阴扶正方对肺癌小鼠体内HIF-1 $\alpha$ 、Arg1表达的影响

魏冬梅\*, 孙玺媛, 尹钢, 姜梅, 刘锐, 陈宏<sup>#</sup>

齐齐哈尔市第一医院, 黑龙江 齐齐哈尔  
Email: weidongmei1000@126.com, #qszyywdm@163.com

收稿日期: 2020年12月7日; 录用日期: 2020年12月30日; 发布日期: 2021年1月8日

## 摘要

目的: 探讨养阴扶正方对肺癌小鼠体内HIF-1 $\alpha$ 、Arg1表达的影响。方法: 建立Lewis肺癌C57BL/6鼠移植瘤模型, 建模成功后, 分别予以养阴扶正方低、中、高剂量组进行干预; 绘制肿瘤生长曲线, 计算抑瘤率, Elisa方法检测瘤组织中乳酸的含量, West-blot、Real-time分别检测Lewis肺癌HIF-1 $\alpha$ 、Arg1的蛋白及mRNA表达。结果: Lewis肺癌移植瘤模型建立; 养阴扶正方可抑制Lewis肺癌生长, 降低Lewis肺癌乳酸, 减瘤组织HIF-1 $\alpha$ 、Arg1的mRNA的表达。结论: 养阴扶正方改善了肺癌的酸性微环境, 通过对HIF-1 $\alpha$ 、Arg1的调控, 减少M2型TAMs的数量, 降低免疫抑制蛋白因子的分泌, 逆转了免疫抑制, 抑制了肺癌的生长, 是养阴扶正方抗NSCLC的新机制。

## 关键词

肺癌, 养阴扶正方, HIF-1 $\alpha$ Arg1

## A Study of the Effects of Yangyin Fuzheng Decoction on HIF-1 $\alpha$ and Arg1 Expression in Lung Cancer Mice Based on Acidic Microenvironment

Dongmei Wei\*, Xiyuan Sun, Gang Yin, Mei Jiang, Rui Liu, Hong Chen<sup>#</sup>

The First Hospital of Qiqihar, Qiqihar Heilongjiang  
Email: weidongmei1000@126.com, #qszyywdm@163.com

\*第一作者。

<sup>#</sup>通讯作者。

文章引用: 魏冬梅, 孙玺媛, 尹钢, 姜梅, 刘锐, 陈宏. 基于酸性微环境研究养阴扶正方对肺癌小鼠体内 HIF-1 $\alpha$ 、Arg1 表达的影响[J]. 世界肿瘤研究, 2021, 11(1): 1-7. DOI: 10.12677/wjcr.2021.111001

## Abstract

**Objective:** Discuss the effects of Yangyin Fuzheng Decoction on HIF-1 $\alpha$  and Arg1 expression in lung cancer mice. **Method:** Establish the model of Lewis lung cancer C57BL/6 mouse transplantation tumor; the low, medium and high dose of Yangyin Fuzheng Decoction were given for intervention after modeling successfully. Draw the tumor growth curve, calculate tumor-inhibition rate, detect the lactic acid content of with Elisa, test HIF-1 $\alpha$ , Arg1 protein and mRNA expression of Lewis lung cancer with West-blot and Real-time respectively. **Result:** The establishment of Lewis lung cancer transplantation tumor model establishment; Yangyin Fuzheng Decoction can inhibit the growth of Lewis lung cancer, decrease Lewis lung cancer lactic acid and reduce mRNA expression of tumor tissue HIF-1 $\alpha$  and Arg1. **Conclusion:** Yangyin Fuzheng Decoction improves the acidic microenvironment of lung cancer by regulating HIF-1 $\alpha$  and Arg1, reduces the amount of M2 style TAMs, decreases the secretion of immunosuppressive protein factor, reverses the immunosuppression and inhibits the growth of lung cancer, which is an Anti-NSCLC new mechanism of Yangyin Fuzheng Decoction.

## Keywords

Lung Cancer, Yangyin Fuzheng Decoction, HIF-1 $\alpha$ , Arg1

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

随着近几十年来肿瘤免疫学和分子生物学的发展与进步, 研究发现恶性实体肿瘤组织中肿瘤细胞外 pH 偏酸性, 为 6.5~6.9, 细胞内 pH 值 > 7.4, 相对偏碱性, 相应正常组织细胞外 pH 偏碱性, 为 7.2~7.5 [1] [2] [3], 因此, 乳酸导致了肺癌的酸性微环境形成, 是酸性微环境的主要成分。肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophages, TAMs) 是存在于肿瘤微环境中的一群巨噬细胞, 是肿瘤微环境中关键的炎性细胞 [4], 巨噬细胞分为经典活化巨噬细胞 M1 型和选择性活化巨噬细胞 M2 型。研究表明, 在低氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 的作用下, 乳酸诱导 VEGF 和 M2 型 TAMs 的极化, 乳酸还可诱导巨噬细胞表达精氨酸酶-1 (arginase 1, Arg-1), Arg-1 可产生多胺, 促进肺癌的生长 [5]。因此, 在前期研究的基础上, 我们提出: 养阴扶正方可以抑制 HIF-1 $\alpha$ 、Arg1 的表达, 减少乳酸的生成及抑制 TAMs 向 M2 型的迁移, 上调免疫应答, 逆转免疫抑制, 改善肺癌酸性免疫抑制微环境, 进而抑制肺癌的发展。为养阴扶正方应用和肿瘤微环境研究提供一种新的实验和理论依据。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 实验材料

#### 2.1.1. 细胞与动物

Lewis 肺癌细胞株: 购自美国 ATCC 公司; C57BL/6 小鼠, 雄性, 鼠龄 6~8 周, 20  $\pm$  2 g/只, SPF 级, 购自浙江维通利华实验动物技术有限公司, 动物合格证号: SCXK(浙)2019-0001。本实验通过《齐齐哈尔

市第一医院实验动物管理办法(试行)》伦理审核(NO.2020-05)。

### 2.1.2. 药品

养阴扶正方由黄芪、党参、沙参、天冬、麦冬、生白术、山药、白花蛇舌草、拳参、绞股蓝、茯苓、莪术组成，取以上药加水煎煮二次，每次加 10 倍量水，提取 2 小时，滤过后合并滤液，制成 5.25 克(生药)/ml，齐齐哈尔市中医医院制剂室提供。

## 2.2. 方法

### 2.2.1. Lewis 肺癌荷瘤鼠模型的建立

体外培养 Lewis 肺癌细胞系，传代培养，取对数生长期细胞经 PBS 冲洗、胰酶消化、离心后加入生理盐水制成细胞悬液，调整细胞浓度至  $5 \times 10^6$ /ml，测定活细胞数大于 95%，在无菌工作台内，取细胞悬液 0.2 ml，接种到 C57BL/6 小鼠右前肢腋窝处皮下，接种后腋窝皮下会出现可触摸到的肿瘤结节，则造模成功。

### 2.2.2. 实验分组及给药方法

瘤体达到  $100 \text{ mm}^3$  时，将 40 只肺癌模型 C57BL/6 荷瘤鼠随机分为 4 组，每组 10 只。分别为 Control 组(模型组): 0.4 ml 生理盐水灌胃，每日一次; YYFZDL 组(养阴扶正方组低剂量组): 养阴扶正方 26 g/kg/d, 0.4 ml 灌胃，每日一次, YYFZDM 组(养阴扶正方中剂量组): 养阴扶正方 52 g/kg/d, 0.4 ml 灌胃，每日一次, YYFZDH 组(养阴扶正方组高剂量组): 养阴扶正方 104 g/kg/d, 0.4 ml 灌胃，每日一次。药物治疗 21 天。

## 2.3. 观察指标及测定

### 2.3.1. 养阴扶正方对 Lewis 肺癌的增殖抑制作用以及对荷瘤鼠体重影响

药物治疗后，每 3 天用游标卡尺测量 1 次 C57BL/6 荷瘤鼠瘤灶长短径(由 3~4 名实验组成员对 C57BL/6 小鼠肿瘤最长径(m)与短径(n)进行测量，最终取平均值)，按 Steel 公式计算肿瘤体积:  $V = mn^2/2$ ，测算 C57BL/6 荷瘤鼠肿瘤体积的变化，每 3 天用精密电子天平测量 C57BL/6 荷瘤鼠体重变化，绘制肿瘤生长曲线; 无菌操作下从 C57BL/6 荷瘤鼠右侧前肢皮下剥取肿瘤组织，剔除纤维包膜，称量其瘤重，计算抑瘤率。

### 2.3.2. 养阴扶正方对 Lewis 肺癌乳酸的影响

取 C57BL/6 荷瘤鼠右侧前肢皮下瘤组织及左腋下的脂肪组织，以眼科剪充分剪碎，分别放入 Hanks 缓冲液中(300 mg/ml)，混匀后以 300 G 室温  $37^\circ\text{C}$  离心 10 min。吸取上清液，过滤后得到肿瘤组织上清。乳酸 Elisa 检测试剂盒检测上清液中及乳酸含量。

### 2.3.3. 养阴扶正方 Lewis 肺癌 HIF-1 $\alpha$ 、Arg1 表达的影响

Western blot 法检测瘤组织 HIF-1 $\alpha$ 、Arg1 蛋白表达: 提取瘤组织全蛋白，蛋白定量后加入相应体积缓冲液煮沸变性，SDS-PAGE 凝胶电泳分离、转膜并封闭，一抗  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜，次日洗脱，加入辣根过氧化物酶标记的二抗，室温孵育 1 h 左右，充分洗脱后化学发光法显影; Real-time PCR 法检测瘤组织 HIF-1 $\alpha$ 、Arg1 mRNA 表达: 采用 Trizol 法提取瘤组织总 RNA，测定纯度并定量后逆转录，取逆转录产物进行 Real-time PCR 反应，检测 HIF-1 $\alpha$ 、Arg1 mRNA 表达的变化。

## 3. 统计方法

采用 SPSS20.0 软件，计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示，组间比较采用单因素方差分析，组间两

两比较采用 t 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

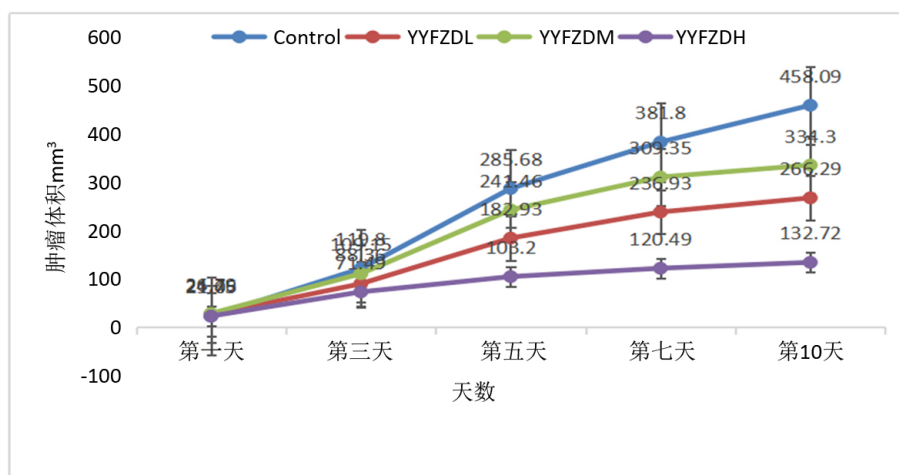
## 4. 结果

### 4.1. 养阴扶正方对 Lewis 肺癌细胞的增殖抑制作用以及对荷瘤鼠体重影响

**Table 1.** The body weight, Lewis lung cancer xenograft tumor weight and tumor inhibition rate of mice in each group  
**表 1.** 各组小鼠体重、Lewis 肺癌移植瘤重量及肿瘤抑制率( $\bar{x} \pm s$ , n = 10)

组别	体重(g)	瘤重(g)	抑瘤率(%)
模型组	15.15 ± 0.93	3.22 ± 0.31	
YYFZDL 组	16.11 ± 0.88 <sup>▲</sup>	1.53 ± 0.09 <sup>**</sup>	52.48
YYFZDM 组	13.63 ± 0.96 <sup>**★</sup>	1.37 ± 0.10 <sup>**</sup>	57.45
YYFZDH 组	14.50 ± 0.88 <sup>★</sup>	1.20 ± 0.09 <sup>**★</sup>	62.73

注：与模型组相比，<sup>\*\*</sup>P < 0.01；与 YYFZDH 组相比，<sup>▲</sup>P < 0.01；与 YYFZDL 相比，<sup>★</sup>P < 0.01。



**Figure 1.** The growth curve of Lewis lung tumor in each group  
**图 1.** Lewis 肺癌各组肿瘤生长曲线

如表 1 所示，养阴扶正方高剂量组小鼠体重略有增加，其余三组体重均有不同程度下降，其中低剂量组下降最明显。各治疗组的瘤重均低于荷瘤对照组，差异显著(P < 0.01)，其中养阴扶正方高剂量组的抑瘤作用最强，抑瘤率为 62.73%，中剂量组的抑瘤率为 57.45%，低剂量组的抑瘤率为 52.48%。说明养阴扶正方具有抑制肿瘤生长的作用。

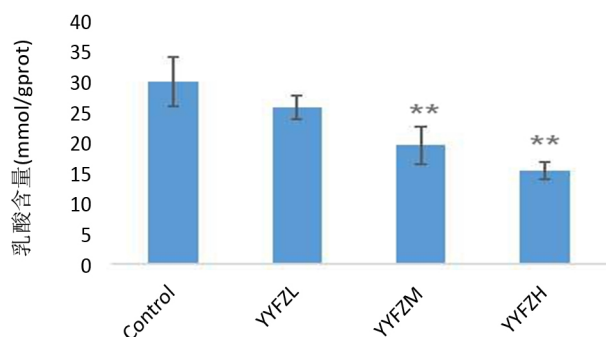
如图 1 所示，AYYFZD 可抑制 Lewis 肺癌的生长，与 Control 组比较，P < 0.01，差异有统计学意义。

### 4.2. 养阴扶正方对 Lewis 肺癌乳酸的影响

**Table 2.** The effect of Yangyin Fuzheng Decoction on lactification in A549 nude mice xenograft tumors modle  
**表 2.** 养阴扶正方对 A549 裸鼠移植瘤乳酸生成的影响(n = 10, mmol/gprot,  $\bar{x} \pm s$ )

	Control	YYFZDL	YYFZDM	YYFZDH
乳酸	30.04 ± 4.07	25.89 ± 2.00	19.64 ± 3.07 <sup>**</sup>	15.45 ± 1.38 <sup>**</sup>

注：<sup>\*\*</sup>与 Control 组比较，P < 0.01。



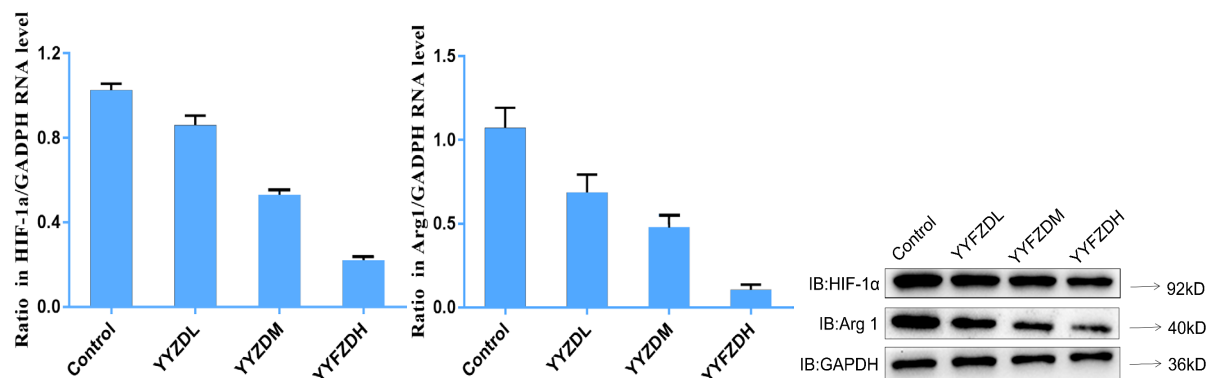
注: \*\*与 Control 组比较,  $P < 0.01$

**Figure 2.** The effect of Yangyin Fuzheng Decoction on lactification of human lung adenocarcinoma cell gland in A549 nude mice xenograft tumors modle

**图 2.** 养阴扶正方对人肺腺癌细胞 A549 裸鼠移植瘤乳酸生成的影响

如表 2、图 2 所示, 药物处理各组荷瘤鼠 21 天后, 检测各组荷瘤鼠瘤组织乳酸含量, 结果显示: 低剂量、中剂量、高剂量的养阴扶正方均能抑制人肺腺癌细胞 A549 裸鼠移植瘤乳酸的生成, 并且随着养阴扶正方剂量的增加, 乳酸生成量逐渐减少, 与 Control 相比较, YYFZDM 组、YYFZDH 组  $P < 0.01$ , 差异极显著。

#### 4.3. 养阴扶正方对 Lewis 肺癌荷瘤鼠的瘤组织 HIF-1 $\alpha$ 、Arg1 蛋白的影响



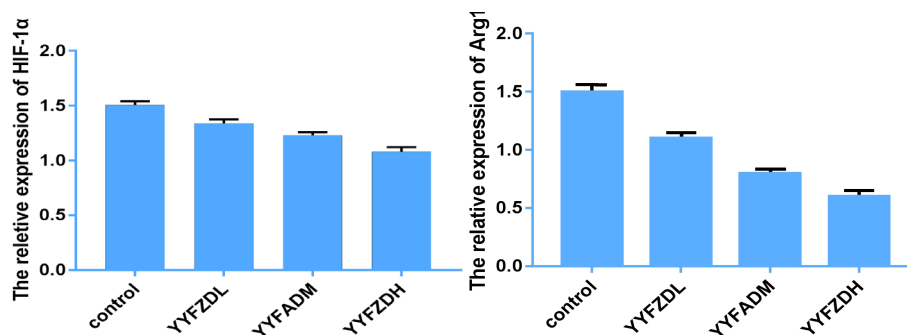
**Figure 3.** The effect of Yangyin Fuzheng Decoction on HIF-1 $\alpha$  and arg1 protein of human lung adenocarcinoma cell gland xenograft tumors in A549 nude mice xenograft tumors modle

**图 3.** 养阴扶正方对人肺腺癌细胞 A549 裸鼠移植瘤 HIF-1 $\alpha$ 、Arg1 蛋白的影响

如图 3 所示, 与 Control 组比较, YYFZDL 组、YYFZDM 组瘤组织中的 HIF-1 $\alpha$ 、Arg1 蛋白的表达量减少,  $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ , 差异有统计学意义; 与 YYFZDM 组比较, YYFZDH 组瘤组织中的 HIF-1 $\alpha$ 、Arg1 蛋白的表达量减少,  $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ , 差异有统计学意义。

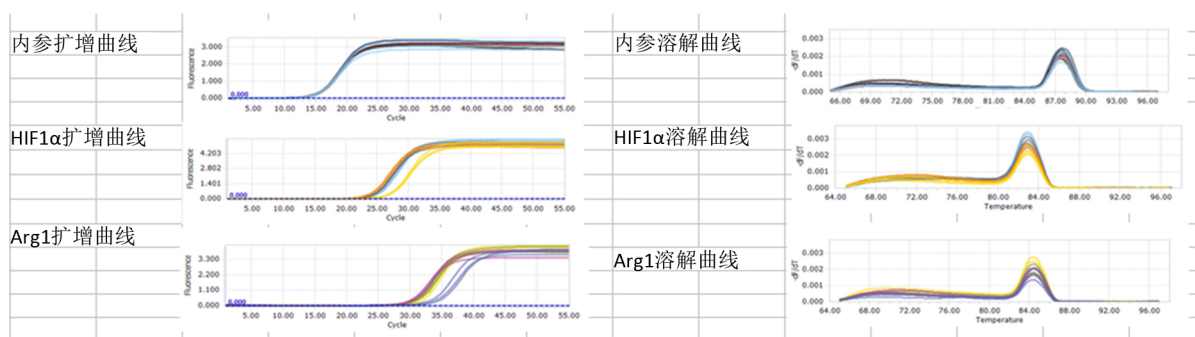
#### 4.4. 养阴扶正方对荷瘤鼠瘤组织的 HIF-1 $\alpha$ 、Arg1mRNA 的影响

如图 4、图 5 所示, 与 Control 组比较, YYFZDL 组、YYFZDM 组瘤组织中的 HIF-1 $\alpha$ 、Arg1 的 mRNA 表达量减少,  $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ , 差异有统计学意义; 与 YYFZDM 组比较, YYFZDMH 组瘤组织中的 HIF-1 $\alpha$ 、Arg1 的 mRNA 表达量减少,  $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ , 差异有统计学意义。



**Figure 4.** The effect of Yangyin Fuzheng Decoction on HIF-1 $\alpha$  and arg1 mRNA expression of human lung adenocarcinoma cell gland xenograft tumors in A549 nude mice xenograft tumors modle

**图 4.** 养阴扶正方对人肺腺癌细胞 A549 裸鼠移植瘤 HIF-1 $\alpha$ 、Arg1 mRNA 生成的影响



**Figure 5.** The fusion and amplification curves of HIF-1 $\alpha$  and arg1 mRNA in tumor tissues of each tumor-bearing mice group

**图 5.** 各荷瘤鼠组瘤组织 HIF-1 $\alpha$ 、Arg1mRNA 融解和扩增曲线

## 5. 讨论

肿瘤细胞即使在供氧充足的情况下,葡萄糖代谢也以糖酵解为主,葡萄糖转变为乳酸,并产生 ATP,以适应肿瘤对能量的大量需求,这种代谢称为有氧糖酵解(aerobic glycolysis)。研究表明,肺癌细胞的有氧糖酵解产生乳酸,在低氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )的作用下,乳酸诱导 VEGF 和 M2 型 TAMs 的极化,乳酸还可诱导巨噬细胞表达精氨酸酶-1 (arginase 1, Arg-1), Arg-1 可产生多胺,促进肺癌的生长。在肺癌酸性微环境中, HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 的高表达参与免疫抑制的形成。乳酸作为有氧糖酵解的产物,导致了肺癌酸性微环境,诱导巨噬细胞分泌 VEGF、HIF-1 $\alpha$ , 促进巨噬细胞向 M2 型迁移,形成了以免疫抑制为中心的正气亏虚的酸性微环境。乳酸可以激活巨噬细胞上的 Gps132 受体,促使 M2 型 TAMs 的极化,促进肿瘤的黏附、转移和侵袭。肺癌微环境中的 Gps132 受体及 VEGF、HIF-1 $\alpha$ 、Arg-1, 诱导 M2 型 TAMs 极化,使肺癌酸性微环境向正气亏虚的免疫抑制微环境转变,如《医宗必读》言:“邪气侵袭,正气消残”,形成了“正气亏虚为本,痰、瘀、毒为标”酸性免疫抑制微环境。

养阴扶正方具有益气养阴、化痰通络、散瘀解毒的功效,由党参、沙参、黄芪、天冬、麦冬、生白术、山药、白花蛇舌草、拳参、绞股蓝、败酱草、茯苓、莪术组成,由《温病条辨》的“沙参麦冬汤”化裁而来。经过十余年的临床使用,表明养阴扶正方能够改善非小细胞肺癌患者的临床症状、稳定瘤灶、改善生活质量。本研究结果证实养阴扶正方通过减低瘤组织的 HIF-1 $\alpha$ 、Arg1 的表达,改变了肺癌的免疫微环境,进而抑制肺癌的发展。为养阴扶正方临床治疗非小细胞肺癌及转化提供了新的实验数据。

---

## 基金项目

2019-2020 年度黑龙江省中医药学会青年中医药科技创新项目。

## 参考文献

- [1] Semenza, G.L. (2016) The Hypoxic Tumor Microenvironment: A Driving Force for Breast Cancer Progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, **1863**, 382-391. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.05.036>
- [2] Peppicelli, S., Andreucci, E., Ruzzolini, J., Laurenzana, A., Margheri, F., Fibbi, G., Del Rosso, M., Bianchini, F. and Calorini, L. (2017) The Acidic Microenvironment as a Possible Niche of Dormant Tumor Cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **74**, 2761-2771. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2496-y>
- [3] Wike-Hooley, J.L., Haveman, J. and Reinhold, H.S. (1984) The Relevance of Tumour pH to the Treatment of Malignant Disease. *Radiother & Oncol*, **2**, 343-366. [https://doi.org/10.1016/S0167-8140\(84\)80077-8](https://doi.org/10.1016/S0167-8140(84)80077-8)
- [4] Balkwill, F., Charles, K.A. and Mantovani, A. (2005) Smoldering and Polarized Inflammation in the Initiation and Promotion of Malignant Disease. *Cancer Cell*, **7**, 211-217. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.02.013>
- [5] Colegio, O.R., Chu, N.-Q., Szabo, A.L., Chu, T., Rhebergen, A.M., Jairam, V., et al. (2014) Functional Polarization of Tumour-Associated Macrophages by Tumour-Derived Lactic Acid. *Nature*, **513**, 559-563. <https://doi.org/10.1038/nature13490>