

Research on the Regulation of wnt/ β -catenin Signaling Pathway by the Combination of Acupuncture and Medicine in Non-small Cell Lung Cancer

Lirui Kong¹ Yan Zhang¹ Hongye Xie¹ Dahai He¹ Huali Wang¹ Chan Xiong² Hua Wei²

1. Clinical Laboratory, Traditional Chinese Medicine Hospital of Pidu District, Chengdu, Sichuan, 611730, China
2. Department of Respiratory Medicine, Traditional Chinese Medicine Hospital of Pidu District, Chengdu, Sichuan, 611730, China

Abstract

Objective: To explore the possible mechanism of Yam Pills combined with acupuncture on non-small cell lung cancer (NSCLC) microenvironment and wnt/ β -catenin signaling pathway. **Methods:** 100 patients with NSCLC were randomly divided into radiation therapy group (group A) and combination therapy Group (group B: Yam Pills combined with acupuncture). By comparing the results before and after treatment of the immune function, the level of VEGF, and the positive expression rate of Wnt1, β -catenin, and Sox-2, to analyze the effective mechanism of the combination therapy in regulating the microenvironment and signal pathway of non-small cell lung cancer. **Results:** Before treatment, the positive expression of wnt/ β -catenin in group A and group B were higher than adjacent normal controls. There was no significant difference in cellular immune function, the level of VEGF, and positive expression of wnt/ β -catenin between the two groups. After treatment, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺, and the level of VEGF were not significantly different between group B and group A. The levels of CD3⁺ and NK in group B were higher than group A, and the life quality of group B was higher than group A. **Conclusion:** The combination of acupuncture and medicine participate in regulation the microenvironment of NSCLC and the wnt/ β -catenin signal pathway, and its mechanism may point to this combination therapy could improve immune function, down-regulating the activation of the signal pathways such as Wnt1 and β -catenin, and related to the expression of downstream Sox-2 target genes.

Keywords

non-small cell lung cancer; the combination of acupuncture and medicine; signal pathway

针药结合调控非小细胞肺癌 wnt/ β -catenin 信号通路的研究

孔丽蕊¹ 张艳¹ 谢红叶¹ 何大海¹ 王华丽¹ 熊婵² 魏华²

1. 成都市郫都区中医医院检验科, 中国·四川成都 611730
2. 成都市郫都区中医医院呼吸科, 中国·四川成都 611730

摘要

目的: 探讨薯蓣丸结合针刺治疗对非小细胞肺癌(NSCLC)微环境及wnt/ β -catenin信号通路的可能作用机制。**方法:** 100例NSCLC患者随机分为化疗放射治疗组(A组)与薯蓣丸联合针刺组(B组), 治疗前检测免疫功能、VEGF水平和Wnt1、 β -catenin、Sox-2蛋白的阳性表达率, 治疗后检测免疫功能、和VEGF水平, 分析针药结合在调控非小细胞肺癌微环境及信号通路的效应机制。**结果:** 治疗前A组与B组wnt/ β -catenin阳性表达均高于癌旁正常对照组, 两组间细胞免疫功能、VEGF水平、wnt/ β -catenin阳性表达无明显差异。治疗后CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺、VEGF水平B组与A组无明显差异; CD3⁺、NK含量高于A组, 生活质量高于A组。**结论:** 针药结合参与调控NSCLC微环境和wnt/ β -catenin信号通路, 其机制可能与针药联合提高免疫功能, 下调Wnt1、 β -catenin信号通路的激活及下游Sox-2靶基因的表达有关。

关键词

非小细胞肺癌; 针药结合; 信号通路

1 引言

肺癌作为一种恶性肿瘤, 占肿瘤死因第一位^[1], 其中非小细胞肺癌(NSCLC)约占肺癌的80%以上^[2]。NSCLC的病因与发病机制主要为外源因素影响、肿瘤微环境影响

和异质恶性肿瘤细胞分化调控。肺癌微环境中浸润的免疫细胞参与了肺癌疾病的进展和免疫逃逸, VEGF在肿瘤新血管形成中发挥重要作用, Wnt信号通路异常激活与肿瘤发生密切相关, 肿瘤微环境和信号传导通路能促进癌症的发病过程^[3-4]。针药结合治疗非小细胞性肺癌可以增加药物在患者体内的靶向性, 减轻消化系统、造血系统不良反应, 调节免疫功能, 抑制肿瘤淋巴管及肿瘤细胞生长, 减少

【作者简介】孔丽蕊(1972-), 女, 中国河南濮阳人, 本科, 主任技师, 从事临床生化免疫及质量控制管理研究。

肿瘤细胞转移并促进肿瘤细胞凋亡^[5]。然而, 针药结合与肿瘤微环境和信号通路在 NSCLC 中的作用和调控机制尚未完全清楚。为探讨针药结合对 NSCLC 微环境肿瘤基质免疫细胞、wnt/ β -catenin 信号通路的调控作用和影响机制, 作者对 NSCLC 患者外周血中的免疫细胞、VEGF 因子和组织中 wnt1、 β -catenin 信号通路、Sox-2 蛋白表达进行研究分析。

2 资料与方法

2.1 一般资料

选择中国四川省成都市郫都区中医医院 2015 年 4 月—2018 年 1 月收治的 100 例经病理科明确诊断为 NSCLC 的血液、石蜡包埋组织, 术前未进行过放化疗且资料完整。分为化疗放射治疗组(A组)和薯蓣丸联合针刺组(B组)各 50 例, 经治疗后, 再次进行血液的指标检测。

纳入标准: ①经病理检查确诊为 NSCLC 患者; ②本次治疗前, 未接受放疗和化疗; ③治疗依从性较好, 能定期随访; ④心、肝、肾等重要脏器功能正常; ⑤标本收集征得患者知情同意。

排除标准: ①临床资料不完整; ②随访期间失访; ③合并其他恶性肿瘤。

本研究经医院伦理委员会批准。

2.2 方法

化疗放射治疗组(A组): 采用 DC 治疗方案, 多西他赛 70mg/m², d1; 顺铂 25mg/m², d1-3, 每个周期 21d, 1 个疗程四周期。

薯蓣丸联合针刺组(B组): 采用药物分型治疗, 以益气除痰方为基本方案, 按照肺郁痰淤, 脾虚痰湿, 阴虚痰热, 气阴两虚四个症型, 辨证加减治疗。

每个疗程 21d, 共治疗 2 个疗程。另联合针刺, 选取确定治疗非小细胞肺癌使用频率较高的三个穴位为主穴, 即加用针刺双侧足三里、内关、关元。3d 针刺一次, 每个疗程 21d, 共治疗 2 个疗程。

2.3 观察指标

2.3.1 Wnt1、 β -catenin 及 Sox-2 在 NSCLC 组织中的阳性表达

治疗前 Wnt1、 β -catenin 及 Sox-2 蛋白表达采用免疫组化 sp 方法。将收集的 100 例 NSCLC 组织及癌旁正常组织于离体 1h 内用 10% 甲醛溶液固定、脱水, 石蜡包埋成块, 切片, 进行免疫组化染色。

结果判断: 所有染色结果由两位病理医生进行双盲法判定。每例在显微镜下随机选择 10 个高倍镜视野($\times 400$), 每个视野计数 100 个细胞观察。染色强度评分为: 0 分为无色或与背景均匀一致的淡黄色; 1 分为淡黄色; 2 分为棕黄色; 3 分为棕褐色。阳性细胞数百分比评分: 0 分为阳性细胞百分比 < 5%; 1 分为阳性细胞百分比 5%~25%; 2 分为阳性细胞百分比 25%~50%; 3 分为阳性细胞百分比 > 50%。染色强度评分与阳性细胞数百分比评分之和为最终得

分, 0-4 分判断为阴性表达, > 4 分判定为阳性表达。

2.3.2 治疗前、后免疫功能及 VEGF 因子水平

治疗前、后分别测定两组患者外周血 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、NK 百分含量, VEGF 因子水平。免疫功能采用流式细胞术在流式细胞仪上检测。VEGF 因子采用化学发光法检测。

2.3.3 生命质量

利用生活质量 (quality of life, QOL) 记分表对患者治疗前后生存质量进行评价, 满分为 60 分, 生活质量极差的为小于 20 分, 差的为 21~30 分, 一般为 31~40 分, 较好的为 41~50 分, 良好的为 51~60 分。

2.4 统计方法

借助 SPSS 22.0 软件分析研究结果, 均数 \pm 标准差表示文中计量资料, t 检验, [n (%)] 表示文中计数资料, X² 检验, P < 0.05 则存在统计学差异。

3 结果

3.1 100 名 NSCLC 患者基线特征

化疗放射治疗组(A组)和薯蓣丸联合针刺组(B组)在性别、年龄上无统计学差异, 见表 1。

表 1 基线情况表

组别	化疗放射治疗组 (A组)	薯蓣丸联合针刺组 (B组)	P 值
性别			
男性	25 (50%)	23 (46%)	P > 0.05
女性	25 (50%)	27 (54%)	
年龄	59.59 \pm 5.14	59.59 \pm 5.36	P > 0.05

注: A 组与 B 组性别、年龄比较, P > 0.05。

3.2 Wnt1、 β -catenin 及 Sox-2 在 NSCLC 组织中的阳性表达

Wnt1、 β -catenin 及 Sox-2 在 A 组、B 组 NSCLC 组织及癌旁正常肺组织中的阳性表达率分别为 64%、66%、13.3%; 4%、74%、0%; 78%、80%、6.7%。Wnt1 主要在细胞浆中表达, β -catenin 主要在细胞核中表达, Sox-2 主要在细胞核中表达, 胞浆中有少量表达。Wnt1、 β -catenin 及 Sox-2 在 NSCLC 组织中及癌旁正常肺组织中的阳性表达率存在差异, 有统计学意义 (P < 0.01); A 组与 B 组间 Wnt1、 β -catenin 及 Sox-2 差异无统计学意义, P > 0.05。详见表 2。

表 2 A 组、B 组及癌旁正常肺组织 Wnt1、 β -catenin 及 Sox-2 阳性表达 [例 (%)]

组别	Wnt1	β - catenin	Sox - 2
对照组 (n=30)	4 (13.3)	0 (0.0)	2 (6.7)
A 组 (n=50)	32 (64.0) *	37 (74.0) *	39 (78.0) *
B 组 (n=50)	33 (66.0) *	37 (74.0) *	40 (80.0) *

注: A 组、B 组与对照组比较: *P < 0.01; A 组与 B 组比较: P > 0.05。

3.3 免疫功能及 VEGF 水平变化

治疗前 A 组与 B 组 CD4 +、CD8 +、CD19 +、CD3 +、NK、CD4 + /CD8 +、VEGF 水平均没有明显差异, P > 0.05。治疗后 B 组 CD3 +、NK 百分比含量高于 A 组, P < 0.05; CD4 +、CD8 +、CD19、CD4 + /CD8 +、VEGF 与 A 组差异不明显, P > 0.05。详见表 3。

3.4 生活质量

治疗前 A 组与 B 组生活质量评分结果差异不明显, P > 0.05, 治疗后 B 组生活质量评分结果明显高于 A 组, P < 0.05, 详见表 4。

4 讨论

中药和针刺是中国传统医学的重要组成部分, 合理运用针药联合可以有效地调节人体阴阳及气血精津液, 促进正气恢复以抵御邪气。多项临床研究指出, 针药并用辅助治疗肺癌, 在稳定瘤体、减轻化疗毒副作用、改善生存质量及延长生存期方面具有独特优势。

NSCLC 患者处于细胞免疫抑制状态, 肿瘤细胞逃避机体多种免疫监视并大量扩增, 起患者免疫功能紊乱^[6]。免疫炎症反应参与调节肿瘤的发生、发展, 大量动物实验和临床研究表明^[7-11], 中药联合针刺可以提高机体的免疫功能。本实验采用针刺配合中药对 NSCLC 进行治疗, 发现针刺对调节患者的免疫功能, 升高外周血中 CD3 +、NK 百分比含量, 改善患者临床症状, 提高患者生命质量, 与 Johnston 等^[12]提出的“针灸免疫增强假说”相一致。

VEGF 是一种内皮细胞的特异性丝裂原, 通过特异地促进内皮细胞分裂、增殖及迁移, 促进血管形成和提高血管通透性, 在肿瘤新生血管生成过程中发挥着至关重要的作用^[13-14]。实验发现, 化疗放射治疗组和薯蓣丸联合针刺组对 VEGF 均有抑制作用, 可能与抑制巨噬细胞浸润、分泌促血

管生长因子和蛋白酶, 从而减少肿瘤养分来影响肿瘤血管生成有关。两组 VEGF 水平比较没有显著性差异 (P > 0.05), 说明通过化疗放射和针药结合两种治疗, 都可使血管形成信号传递途径下调, 达到抗肿瘤血管形成的作用^[15-16]。

研究证实^[17-19], 针刺取穴利用经络的循经传导效果, 将毫米波能量传导到肿瘤上, 能有效抑制肿瘤组织的生长, 有效改善肺癌患者的临床症状, 避免肿瘤进一步生长, 减少胃肠道不良反应, 延长生存期, 提高患者的生存质量, 本实验治疗后 B 组生活质量评分结果明显高于 A 组。

Wnt 信号通路的异常激活与多种肿瘤的发生、发展密切相关^[20-21]。Wnt1 蛋白家族是上游的启动因子, β -catenin 是 Wnt 中的关键蛋白, Sox-2 为其下游靶基因之一。A 组、B 组 NSCLC 组织中 Wnt 信号通路中关键分子 Wnt1、 β -catenin 及 Sox-2 蛋白表达高于癌旁正常肺组织 (P < 0.05), 提示该通路在 NSCLC 有异常激活, 而 A 组、B 组间无统计学差异 (P > 0.05)。正常情况下, Wnt 蛋白未与相关受体结合, β -catenin 处于抑制状态。当 Wnt 配体与相关受体结合后, Wnt 信号刺激 CK1、GSK-3 β , 发生 LRP 磷酸化, 导致 β -catenin 降解功能失常, 大量 β -catenin 进入细胞内, 对肿瘤细胞增殖、转移、凋亡进行干预^[22-24]。本实验采用薯蓣丸联合针刺通过刺激足三里、内关、关元等穴位进行治疗后, 机体免疫功能提高, 生存质量提高, 提示针药联合可能通过下调或抑制 Wnt1 的表达, 引起 Wnt-1 通路下游蛋白 VEGF 和下游因子 β -catenin、Sox-2 表达水平下调, 细胞凋亡增加^[25], 从而抑制肺癌细胞的增殖和生长^[26]。

综上所述, 针药结合治疗可有效提高 NSCLC 的免疫功能和提高患者生活质量, 其机制可能与降低 Wnt1、 β -catenin 和 Sox-2 蛋白的表达水平, 从而下调或抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活过程有关。

表 3 两组患者接受治疗前后免疫功能、VEGF 水平变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	CD3+ (%)	CD4+ (%)	CD8+ (%)	NK (%)	CD4+/CD8+	VEGF (ng/ml)
A 组 (n=50)	治疗前	59.09 ± 11.60	39.28 ± 9.96	22.99 ± 7.08	21.87 ± 10.13	1.89 ± 0.83	0.36 ± 0.09
	治疗后	62.12 ± 11.21	41.26 ± 9.55	24.38 ± 7.76	23.34 ± 12.59	1.98 ± 0.84	0.30 ± 0.05
B 组 (n=50)	治疗前	58.98 ± 11.73	40.98 ± 7.32	24.00 ± 9.87	22.12 ± 11.74	1.80 ± 0.78	0.37 ± 0.08
	治疗后	70.14 ± 11.95*	41.22 ± 8.82	24.59 ± 11.63	29.25 ± 15.38*	2.22 ± 0.98	0.24 ± 0.03

注: 治疗后与治疗前比较: *P < 0.05。

表 4 两组患者治疗前后生活质量比较 ($\bar{x} \pm s$, 分)

分组	例数	治疗前	治疗后
A 组	50	31.65 ± 3.54	40.79 ± 2.46
B 组	50	30.26 ± 3.29	51.18 ± 2.75*

参考文献

- [1] 黄佳滨,隋小芳,王凤玲,等.CXCL12-G801A 基因多态性在非小细胞肺癌中的表达及发病风险相关性研究 [J]. 中国实验诊断学,2017,12(8):1346-1348.
- [2] 叶丽新. 非小细胞肺癌中 MMP-9 和 MMP-13 的表达及临床意义 [J]. 中国现代药物应用,2018,12(18):35-37.
- [3] KO J J, TUDOR R, LI H, et al. Reasons for lack of referral to medical oncology for systemic therapy in stage IV non-small-cell lung cancer: comparison of 2003-2006 with 2010-2011[J]. Current Oncology, 2017,24(6):486-493.
- [4] 蒋涛,周彩存.T 细胞相关免疫疗法在非小细胞肺癌治疗中的研究进展 [J]. 肿瘤,2015,35(8):930-935.
- [5] 初展. 中医针灸改善非小细胞肺癌治疗研究进展 [J]. 医学理论与实践,2019,32(2):190-192.
- [6] 张书卿,张博,洪亮,等. 顺铂联合针灸疗法对晚期肺癌患者血清 CSF、TNF- α 与 IL-2 水平的影响 [J]. 现代生物医学进展,2015,15(14):2689-2691.
- [7] 闫亚南. 直接灸“肝俞”对 HCC 癌前病变大鼠 T 淋巴细胞亚群、NK 细胞和 IL-2 的影响 [D]. 北京:北京中医药大学,2016.
- [8] 许荣忠,李雁. 中医药对非小细胞肺癌免疫调节作用研究进展 [J]. 中医学报,2019,34(3):501-504.
- [9] 张琨,张泽良,俞杞泉,等. 针刺配合穴位贴敷对 III 期非小细胞肺癌患者免疫功能的影响 [J]. 上海针灸杂志,2019,38(8):831-835.
- [10] 陈建. 中药联合外治法对晚期非小细胞肺癌中医症状及免疫功能的影响 [J]. 临床合理用药杂志,2020,13(4):60-62.
- [11] 赵静,侯红松,梁婷,等. 中药对恶性肿瘤患者 T 细胞亚群影响的研究进展 [J]. 现代肿瘤医学,2020,28(4):679-682.
- [12] 施伶俐,周红,童稳圃,等. 针药复合麻醉对肺癌手术患者 γ -干扰素免疫调节活性的影响 [J]. 上海针灸杂志,2015,24(3):18-19.
- [13] 李丹博,崔青荣,周庆伟. EGFR、EML4-ALK 不同基因突变的非小细胞肺癌中医证候分析 [J]. 中医学报,2021,36(10):2228-2232.
- [14] 叶轩婷,焦丽静,王喆,等. 中医药对 EGFR 突变非小细胞肺癌靶向治疗的临床研究循证述评 [J]. 中医肿瘤学杂志,2021,3(4):26-30+36.
- [15] 杨毅,官俏兵,郭丽,等. 丁苯酞通过激活 VEGF/VEGFR2-Notch1/Dll4 信号促进 HUVECs 形成血管 [J]. 中国病理生理杂志,2018,34(6):46-51.
- [16] 周立霞,吴月明,李娜,等. 色素上皮源性因子通过血管内皮生长因子抑制非小细胞肺癌的发生发展 [J]. 中国医科大学学报,2017,46(5):422-424+428.
- [17] Babbar N, Hacker A, Huang Y, et al. Tumor necrosis factor alpha induces spermidine /spermine N1-acetyltransferase through nuclear factor kappaB in non-small cell lung cancer cells[J]. The Journal of biological chemistry,2016,281(34):24182-24192.
- [18] 丁宇炜. 针药并用提高中晚期非小细胞肺癌患者生存质量的临床观察 [J]. 甘肃中医,2015,24(1):23-25.
- [19] 李广大,李笑笑,董健健,等. 电针对脑缺血大鼠神经血管单元及 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响 [J]. 针刺研究,2021,46(2):87-94.
- [20] Neiheisel A, Kaur M, Ma N, et al. Wnt Pathway Modulators in Cancer Therapeutics- An Update on Completed and Ongoing Clinical Trials[J]. International Journal of Cancer, 2021.
- [21] Wang Zhuo. The Wnt signaling pathway in tumorigenesis, pharmacological targets, and drug development for cancer therapy [J]. Biomarker research, 2021,9(1):68-68.
- [22] SHI L, WU Y X, YU J H, et al. esR earch of the relationship between β -catenin and c-mye-mediated Wnt pathway and laterally spreading tumors occurrence[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2017,21(2):252-257.
- [23] 李小江,贾英杰,张文治,等. 肺癌干细胞 wnt 信号通路的研究进展 [J]. 中国肺癌杂志,2011,14(8):695-698.
- [24] Fabre E, Rivera C, Mordant P, et al. Evolution of induction chemotherapy for non- small cell lung cancer over the last 30 years: A surgical appraisal[J]. Thorac Cancer,2015,6 (6):731-740.
- [25] MIKAMI I, YOU L, HE B. Efficacy of Wnt-1 monoclonal antibody in sarcoma cells[J]. BMC Cancer, 2005(5):53.
- [26] 陈思. sox2 在肺癌发生和细胞凋亡中作用机制的研究 [D]. 天津:南开大学,2012.