

健脾消癌方通过调控 FGF2 抑制 PI3K/Akt 信号通路 改善肠癌化疗耐药

简小兰¹, 宁康文², 杨家翔², 寇胜兰², 邝婉婷², 汪紫琪²,
谭愉琴², 曾普华¹, 谭玲娟^{1*}, 彭巍^{1*}

(1. 湖南省中西医结合医院/湖南省中医药研究院附属医院, 长沙 410006;
2. 湖南中医药大学研究生院, 长沙 410208)

[摘要] 目的:探讨健脾消癌方改善结肠癌 5-氟尿嘧啶(5-FU)耐药的作用及机制。方法:建立人结肠癌细胞(HCT116)/5-FU 耐药细胞系;不同体积分数(10%、15%、20%)的健脾消癌方含药血清及无药血清干预,设置 10% 小牛血清组(FBS 组)、成纤维细胞生长因子受体(FGFR)抑制剂组(AZD4547 组)、成纤维细胞生长因子 2(FGF2)重组蛋白组(FGF2 组)为对照。FGF2 组使用敏感 HCT116 细胞,其他组使用 HCT116/5-FU 细胞。检测细胞耐药性、细胞培养液中 FGF2 的表达水平、细胞中 FGF2 mRNA 的表达、FGF2/FGFR、磷酸肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)蛋白表达水平。将耐药细胞移植到裸鼠腋窝建立肿瘤模型,分为模型组、健脾消癌方组(15 g·kg⁻¹)、5-FU 组(0.02 g·kg⁻¹)、健脾消癌方+5-FU 组(15 g·kg⁻¹+0.02 g·kg⁻¹)、AZD4547 组(0.012 5 g·kg⁻¹)和 AZD4547+5-FU 组(0.012 5 g·kg⁻¹+0.02 g·kg⁻¹)。观察各组的瘤体增长及 FGF/FGFR 和 PI3K/Akt 蛋白的表达情况。结果:健脾消癌方各浓度组 HCT116/5-FU 细胞的生存比率均降低,其中 20% 浓度组细胞生存率降低最显著;健脾消癌方各浓度组培养液中 FGF2、细胞中 FGF2 mRNA 表达均降低,其中 20% 浓度组降低最显著($P<0.01$);HCT116/5-FU 细胞中 FGF2、磷酸化(p)-FGFR1 蛋白表达显著增高,FGFR1 蛋白表达降低($P<0.01$),健脾消癌方干预后 FGF2、p-FGFR1 表达明显下调,FGFR1 表达升高($P<0.05$);健脾消癌方干预后 p-Akt、p-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)表达下调,Akt、B 淋巴细胞瘤-2 基因相关启动子(Bad)表达上调($P<0.05$)。动物实验发现,健脾消癌方联合 5-FU 组明显抑制耐药瘤体生长,健脾消癌方联合 5-FU 组降低 FGF2、p-FGFR1、p-PI3K、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达,升高 Bad 蛋白表达。提示健脾消癌方能够抑制结肠癌 FGF2/FGFR1 信号表达调控 PI3K/Akt 及下游信号通路。结论:健脾消癌方可以改善肠癌化疗耐药性,其机制可能是通过下调 FGF2 表达抑制 PI3K/Akt 信号通路激活。

[关键词] 健脾消癌方; 结直肠癌; 化疗耐药; 成纤维细胞生长因子; 磷酸肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)

[中图分类号] R256;R285;R574 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)06-0120-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20251123

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.r.20250325.1417.001>

[网络出版日期] 2025-03-25 16:58:44 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



Jianpi Xiaocai Prescription Ameliorates Chemotherapy Resistance in Colon Cancer by Targeting FGF2 to Inhibit PI3K/Akt Signaling Pathway

JIAN Xiaolan¹, NING Kangwen², YANG Jiexiang², KOU Shenglan², KUANG Wanting²,
WANG Ziqi², TAN Yuqin², ZENG Puhua¹, TAN Lingjuan^{1*}, PENG Wei^{1*}

(1. Hunan Provincial Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410006, China;

[收稿日期] 2025-01-04

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81904109);湖南省自然科学基金项目(2023JJ30361,2019JJ50344);中医药特色临终关怀服务模式与中医药临终关爱技术研究(ZXYJHMZYYS2024-034);湖南省中医药管理局“十四五”中医药科技创新平台建设项目[湘中医药函(2022)93号]

[第一作者] 简小兰,博士,副主任医师,从事肿瘤病中西医结合防治方法和规律研究,E-mail:jianxiaolan1988@126.com

[通信作者] * 谭玲娟,硕士,主治医师,从事肿瘤病中西医结合防治方法和规律研究,E-mail:418497975@qq.com;

* 彭巍,硕士,副主任医师,从事肿瘤病中西医结合防治方法和规律研究,E-mail:1289382701@qq.com

2. Graduate School, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect and mechanism of Jianpi Xiaoi prescription (JPXA) in ameliorating the 5-fluorouracil (5-FU) resistance of colon cancer. **Methods:** A HCT116/5-FU resistant cell line was established. Different concentrations (10%, 15%, 20%) of JPXA-containing serum and drug-free serum were used for intervention, and 10% fetal bovine serum (10% FBS), fibroblast growth factor receptor (FGFR) inhibitor (AZD4547), and recombinant fibroblast growth factor 2 (FGF2) were set as the control groups. Sensitive HCT116 cells were used in the FGF2 group, while HCT116/5-FU cells were used in other groups. Drug resistance, the level of FGF2 in the cell culture medium, the mRNA level of FGF2 in cells, and the protein levels of FGF2/FGFR and phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) were determined. The drug-resistant cells were transplanted into the axilla of nude mice to establish a tumor model. The modeled mice were allocated into model, JPXA (15 g·kg⁻¹), 5-FU (0.02 g·kg⁻¹), JPXA+5-FU (15 g·kg⁻¹+0.02 g·kg⁻¹), AZD4547 (0.012 5 g·kg⁻¹), and AZD4547+5-FU (0.012 5 g·kg⁻¹+0.02 g·kg⁻¹) groups. The tumor growth and the protein levels of FGF/FGFR and PI3K/Akt in each group were observed. **Results:** The survival rate of HCT116/5-FU cells decreased in all the JPXA groups with different concentrations. The cell survival rate was decreased most obviously in the 20% JPXA group. The level of FGF2 in the cell culture medium and the mRNA level of FGF2 in cells of each JPXA group decreased, and the decrease was the most significant in the 20% group ($P<0.01$). HCT116/5-FU cells showed up-regulated protein levels of FGF2 and phosphorylated fibroblast growth factor receptor 1 (p-FGFR1), but down-regulated protein level of FGFR1 ($P<0.01$). JPXA down-regulated the expression of FGF2 and p-FGFR1 and up-regulated the expression of FGFR1 ($P<0.05$). In addition, JPXA down-regulated the expression levels of phosphorylated protein kinase B (p-Akt) and phosphorylated mammalian target of rapamycin (p-mTOR), while up-regulating the expression levels of Akt and Bcl-2-associated death promoter (Bad) ($P<0.05$). Animal experiments showed that the JPXA combined with 5-FU significantly inhibited the growth of drug-resistant tumors, reduced the protein levels of FGF2, p-FGFR1, phosphorylated phosphatidylinositol-3-kinase (p-PI3K), p-Akt, and p-mTOR, and increased the expression of Bad. It indicated that JPXA can inhibit the FGF2/FGFR1 signaling in colon cancer and regulate PI3K/Akt and downstream signaling pathways. **Conclusion:** JPXA can ameliorate the chemotherapy resistance of colon cancer through down-regulating FGF2 expression and inhibiting the activation of the PI3K/Akt signaling pathway.

[Keywords] Jianpi Xiaoi prescription; colorectal cancer; chemotherapy resistance; fibroblast growth factor; phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt)

结直肠癌(CRC)是全球常见恶性肿瘤之一,发病率和死亡率分别为常见恶性肿瘤的第3位和第2位,有逐年上升的趋势^[1]。据文献[2-3]报道早期局限期(I期和II期)结直肠癌患者的5年生存率接近90%,而晚期结直肠癌,伴有远处器官扩散患者的生存率为13.1%。对于早中期结直肠癌患者手术治疗及术后的辅助化疗是主要治疗手段。对于晚期结直肠癌,化疗仍然是主要治疗手段之一,但化疗易出现耐药,导致治疗失败,疾病进展,不能获得满意临床疗效^[4]。探索结直肠癌化疗耐药机制,寻找化疗药物耐药的靶点,改善结直肠癌化疗耐药性,提高化疗药物疗效,延长患者生存期,是结直肠癌临床治疗中亟待解决的问题。因此,深入研究化疗耐药机制并进行阻断,对结直肠癌的治疗有重要意义。成纤维细胞生长因子(FGF)信号通路对正常和癌症生物学至关重要,FGF信号异常活化可以让肿瘤细胞获得耐药潜能,在肿瘤细胞FGF与FGF受体(FGFR)结合后诱导并激活的下游信号传导途径中,有多条信号通路与肿瘤耐药机制有关,其中一条通路就是磷酸肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)^[5]。PI3K/Akt下游又有哺乳动物雷帕霉素靶蛋

白(mTOR)、糖原合酶激酶-3 β (GSK-3 β)、B细胞淋巴瘤-2基因相关启动子(Bad)、叉头蛋白(FKHR)、核转录因子- κ B(NF- κ B)等多条信号通路,调节细胞周期、影响细胞的凋亡、增殖、转移等^[6],与耐药发生密切相关。中医药是补充和替代医学的一个重要组成部分,在中国具有几千年的使用历史,其在结直肠癌的治疗中也发挥了一定的作用,具有抗复发和转移、提高生存质量、调节免疫力、延长生存期等作用^[7]。GUO等^[8]发现芪珍胶囊能够抑制结直肠癌细胞增殖、促进凋亡,抑制裸鼠肠癌移植瘤体的生长。LYU等^[9]发现葛根芩连汤联合免疫治疗可以抑制结直肠癌移植瘤生长,可以调节肠道菌群,显著增加了外周血和肿瘤组织中CD8⁺T细胞的比例,下调程序性死亡受体-1(PD-1)和增加白细胞介素-2(IL-2)水平,提示联合治疗可以通过抑制抑制性检查点有效恢复T细胞功能。健脾消癌方是湖南省中西医结合医院名中医蒋益兰教授临床治疗结直肠癌的有效验方,课题组前期临床观察该方联合化疗治疗晚期转移性结直肠癌能够提高患者的无进展生存期(PFS)和总生存时间(OS),很大程度上提升了患者的生存质量。前期实

验研究发现健脾消癌方具有抑制肠癌细胞增殖,阻滞周期,促进细胞凋亡的作用^[10],能够抑制肠癌裸鼠瘤体生长,降低转移率^[11],对PI3K/Akt信号通路具有一定调节作用^[12]。健脾消癌方配合化疗疗效优于单纯化疗,说明健脾消癌方具有化疗增效的作用^[13],但其增效机制有待进一步探索。健脾消癌方是否改善结直肠癌化疗耐药,在耐药中的作用机制也有待深入研究。本研究拟建立结直肠癌化疗耐药细胞[人结肠癌细胞(HCT116)/5-氟尿嘧啶(5-FU)],观察健脾消癌方干预后对耐药细胞存活率、FGF2及PI3K/Akt信号通路的影响,进一步探索健脾消癌方对结直肠癌的疗效机制。

1 材料

1.1 动物和细胞株 SD大鼠20只,体质量(200±20)g,雌雄各半,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司(证书编号430727211102382265)。BALB/C-nu/nu裸鼠36只,体质量(20±2)g,雌雄各半,购自上海洁思杰实验动物有限公司(证书编号110324230100279065)。人结肠癌细胞系HCT 116购自中国科学院(No.Tchu99)并在RPMI 1640培养基中培养。当细胞达到90%汇合时进行传代,细胞传至第5代,取汇合率为80%的对数生长期细胞进行实验。

1.2 伦理 符合湖南省中医药研究院实验动物伦理委员会伦理要求,伦理编号SBWJW2022-0155。

1.3 药物 健脾消癌方处方:人参10g、薏苡仁30g、半枝莲30g、重楼10g、莪术10g、郁金15g、枳壳10g、甘草6g。人参颗粒(批号21050001)、薏苡仁颗粒(批号21100343)、半枝莲颗粒(批号21090168)、重楼颗粒(批号21060077)、莪术颗粒(批号21050100)、郁金颗粒(批号21050031)、枳壳颗粒(批号21030139)、甘草颗粒(批号21100285),购自四川新绿色药业科技发展股份有限公司,适量的热水完全溶解为相当于生药1.5g·mL⁻¹,4℃保存,1周内用完。FGF2重组蛋白(美国R&D Systems公司,批号3718-FB);FGFR抑制剂(AZD4547)、5-FU(德国Selleck公司,批号分别为5623、4823)。

1.4 试剂 胎牛血清(FBS)、RPMI 1640培养基(美国Gibco公司,批号分别为2296205、8121027);杜氏磷酸缓冲盐溶液(D-PBS)、蛋白定量法(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为1203、P0012S);Cell Titer-Glo试剂盒(美国Promega公司);FGF2酶联免疫吸附测定法

(ELISA)试剂盒、FGF2抗体、磷酸化(p)-PI3K抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab246531、ab208687、ab182651);p-FGFR1抗体、FGFR抗体、PI3K p110 α (C73F8)、p-Akt抗体(Ser473)、Akt抗体(美国Cell Signaling公司,批号分别为52928、#9740、#4249、#4060、#4691);p-mTOR抗体(S2448)、mTOR抗体、Bad抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国Proteintech公司,批号分别为30195914、30245823、30678345、30320674);化学发光底物(美国Thermo Scientific公司,批号VF304342);放射免疫沉淀法(RIPA)细胞裂解液、硝酸纤维素蛋白质印迹膜、TRIzol(美国Sigma公司,批号分别为SCBF7966V、A15030279、15596018);实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,批号#R223);实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(日本Takara公司,批号AK41788A);羊抗鼠免疫球蛋白(Ig)G(北京科颖生物技术有限公司,批号01325/50237);羊抗兔IgG(北京中山金桥生物技术有限公司,批号119986)。

1.5 仪器 Heracell 2401型细胞培养箱(美国Thermo公司);SE 300型电泳仪、SE 300型移膜仪(美国Hoefer公司);Tanon5200型全自动化学发光成像分析系统(上海天能有限公司);Synergy2型全自动酶标仪(美国BioTek公司);LC 480型Real-time PCR仪(瑞士Roche公司);LC-20AT系列高效液相色谱仪(日本京都岛津公司)。

2 方法

2.1 高效液相色谱仪对健脾消癌方进行分析 采用高效液相色谱法(HPLC)建立了健脾消癌方的色谱图,使用岛津LC-20AT系列HPLC系统(日本京都岛津公司)和InertSustain C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μ m)进行HPLC分析。对照品柚皮苷(中国食品药品检定研究院,批号0722-200108),野黄芩苷(中国食品药品检定研究院,批号110842-202010),新橙皮苷、甘草酸铵(中国食品药品检定研究院,批号分别为11857-201703、110731-202122),甘草素(成都克洛玛生物科技有限公司,批号CHB-G-0071),异甘草苷(成都克洛玛生物科技有限公司,批号CHB-Y-0791)购自中国食品药品检定研究院。分离条件设定为流动相A为0.1%甲酸水溶液,流动B为甲醇;流速为1.0 mL·min⁻¹,进样量为5 μ L,检测波长为230 nm,柱温为30℃。

2.2 耐药细胞系的建立 采用浓度梯度递增的方

法来诱导耐药细胞株:预实验检测亲代细胞的半数抑制浓度(IC_{50}),选择 $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 5-FU(在此质量浓度下大部分HCT116细胞能够继续存活,属于相对安全的浓度)作为起始浓度,每48 h更换1次药物,去除死亡细胞后传代培养。观察没有明显细胞死亡后,选择对数生长期细胞进行传代,并增加25%~50%药物浓度进行共培养。最终待细胞稳定存活于 $5 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 药物浓度后,进行连续传代培养,没有观察到明显细胞死亡后,定义所得的细胞亚株为HCT116/5-FU耐药细胞株。为保证耐药性的持续存在,该细胞亚株培养时均应给予 $5 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的5-FU。在对耐药细胞进行检测前,应当给予耐药细胞株2周的药物洗脱期培养。

2.3 健脾消癌方含药血清的制备 SD大鼠20只,雌雄各半,随机分成2组,每组10只。实验组按70 kg成年人 $120 \text{g}\cdot\text{d}^{-1}$ 的等效量为 $10.8 \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ [14];对照组按大鼠体质量灌胃等容积的生理盐水。每天灌胃1次,连续6 d,于第7天最后1次灌胃1 h后,腹腔麻醉,腹主动脉取血, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存,24 h内离心($2000 \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,离心半径10 cm,下同,10 min),吸取血清,合并同组动物血清,用 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

2.4 CellTiter GLO法检测耐药性 设健脾消癌方组(10%、15%、20%浓度)、无药血清组(10%、15%、20%浓度)、FBS组(10%FBS),FGFR抑制剂组(AZD4547组, $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),FGF2重组蛋白组(FGF2组, $150 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、溶液(仅含培养液)调零孔。FGF2使用敏感HCT116细胞,其他组使用HCT116/5-FU细胞。5-FU设置浓度梯度0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10、50、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。将处于对数生长期的细胞胰酶消化后,完全培养基重悬成细胞悬液并计数,调整浓度为 5×10^4 个/mL,在96孔培养板中每孔加入细胞悬浮液 $100 \mu\text{L}$,每组3个复孔, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵箱中培养24 h细胞贴壁后吸去培养基,更换含有相应药物及不同5-FU浓度的培养液,并放入培养箱培养72 h。培养终止前每孔加入CellTiter-GLO溶液 $100 \mu\text{L}$,反应约10 min后,酶标仪检测luciferase值,计算 IC_{50} 、细胞存活率。

2.5 ELISA检测细胞培养液中FGF2的表达 按照上述分组和处理方法,采用健脾消癌方干预72 h,收集各组细胞培养上清。根据ELISA试剂盒的说明书,将FGF2标准产物和细胞培养上清液加入用FGF2抗体包被的反应孔中,在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 温育1 h,洗涤3次,将新鲜稀释的酶标抗体加入每个反应孔中,在

$37 \text{ }^\circ\text{C}$ 温育1 h,冲洗3次,并在每个反应孔中加入临时制备的底物溶液20 min,在450 nm处测定吸光度,绘制标准曲线并计算样品浓度。

2.6 Real-time PCR检测FGF2 mRNA表达 按上述分组及处理,健脾消癌方干预72 h,收集各组细胞。采用TRIzol一步法提取总RNA,取总RNA $2 \mu\text{g}$,按照逆转录试剂盒的说明进行逆转录cDNA,然后以cDNA为模板进行Real-time PCR扩增目的基因。逆转录条件为 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸15 min、 $85 \text{ }^\circ\text{C}$ 失活2 min,再参考SYBR Green说明进行循环扩增,扩增条件: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性5 min, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性10 s、 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火20 s、 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸20 s,共40个循环。以GAPDH作为Real-time PCR的内参基因,设计了FGF2引物。用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 分析Real-time PCR结果,计算表达差异,重复3次。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
GAPDH	上游GCACCACCAACTGCTTA	179
	下游AGTAGAGGCAGGGATGAT	
FGF2	上游AGTGTGTGCTAACCGTTACCT	170
	下游ACTGCCAGTTCGTTTCAGTG	

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞内FGF2/FGFR、PI3K/Akt蛋白表达 按上述分组及处理,健脾消癌方干预72 h,收集各组细胞。将细胞用冰预冷的PBS冲洗3次加入含有苯甲基磺酰氟(PMSF) $4 \mu\text{L}$ 的RIPA缓冲液 $400 \mu\text{L}$,冰上裂解30 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $12000 \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min,取上清,BCA试剂盒进行蛋白定量,按照比例加入十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)蛋白缓冲液,煮沸5 min,立即分装,置 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 备用。取蛋白 $50 \mu\text{g}$ 上样,SDS-PAGE凝胶电泳后转膜至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,封闭,密封,分别加入FGF2、p-FGFR1、FGFR1、PI3K、p-PI3K、Akt、Bad(1:1000),p-Akt(1:2000),mTOR(1:20000),p-mTOR、GAPDH(1:10000)一抗,室温孵育4 h,加入二抗,室温孵育2 h,增强化学发光法(ECL)发光,检测蛋白的表达水平,GAPDH为内参。以Image J软件分析结果。

2.8 裸鼠腋下移植瘤建立及干预 培养HCT116/5-FU细胞,收集细胞悬液调整密度为 2×10^7 个/mL,注射到36只BALB/C-nu/nu裸鼠右腋下,每只注射

细胞悬液 0.1 mL,即接种细胞数为 2×10^6 个,观察裸鼠腋下种植瘤生长,时间 2 周,腋下见明显的肿瘤生长既是造模成功^[11]。分为模型组、健脾消癌方组、5-FU 组、健脾消癌方+5-FU 组、FGFR 抑制剂组、FGFR+5-FU 组,每组 6 只。接种细胞后进行相关药物干预。模型组给予等体积生理盐水灌胃,0.2 mL/只,1 次/d,每周 5 d。中药予人体等效浓度药液灌胃给药^[14],每只 0.2 mL ($1.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$),每天 1 次,每周 5 d;5-FU 组按人腹腔给药 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 折算为 3.7 mg/周 (约 0.15 mL),为每周 2 次;FGFR 抑制剂组按人腹腔给药 $12.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给药,每日 1 次;均予生理盐水灌胃,每日 1 次,每周 5 d。干预持续 5 周。每周测量瘤体大小,计算体积,体积 = $0.52 \times \text{长径} \times \text{短径}^2$,观察体积增长情况,体积净增长 = 每周测得体积 - 分组前体积。5 周后处理裸鼠,剥离瘤体,称质量。

2.9 Western blot 检测 FGF2/FGFR1 和 PI3K/Akt 蛋白在裸鼠瘤体中的表达 将各组瘤体取 0.2 g 分别置于装有预冷生理盐水的平皿中,在平皿中剪碎肿瘤组织,加入含有 $10 \mu\text{L}$ PMSF 的 RIPA 裂解液 1 mL,用组织捣碎机 $10\ 000 \sim 15\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 研磨制成组织匀浆,并冰上摇床上 30 min 充分裂解, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清,BCA 试剂盒进行蛋白定量测定蛋白浓度,按照比例加入 SDS-PAGE 蛋白缓冲液,煮沸 5 min,立即分装,置 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 备用。按前法(此前细胞内 FGF2/FGFR、PI3K/Akt 蛋白表达检测方法)进行蛋白浓度定量、蛋白储存、电泳、转移、一抗二抗孵育、发光等,检测裸鼠瘤体内 FGF2/FGFR1 和 PI3K/Akt 蛋白的表达水平,GAPDH 为内参。

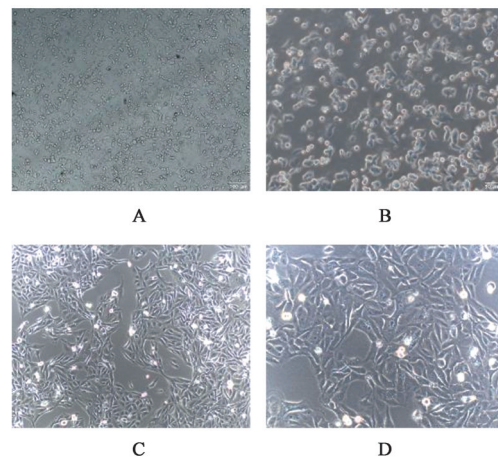
2.10 统计学方法 采用 SPSS 28.0 进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据进行正态分布及组间方差齐性检验,2 项均符合者,两组比较采用成组 t 检验,多组比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),若有 1 项不符合时,采用非参数检验中的多个独立样本 Kruskal-Wallis H 进行统计处理,检验水准为 0.05。

3 结果

3.1 健脾消癌方的高效液相色谱分析 为了验证药品质量的稳定性,采用 HPLC 对健脾消癌方进行含量分析。根据健脾消癌方的主要药物成分,选取柚皮苷、野黄芩苷、新橙皮苷、甘草酸铵、甘草素、异甘草苷,得到混合对照品的 HPLC 色谱图,健脾消癌方的 HPLC 图中有 12 个主要特征峰,分别为 5 号色

谱峰(柚皮苷),6 号色谱峰(野黄芩苷),7 号色谱峰(新橙皮苷),13 号色谱峰(甘草酸铵)。将 6 个批次健脾消癌方进行相似性评价,样品色谱图与对照图谱的相似度均 >0.950 ,说明样品质量稳定。见增强出版附加材料。

3.2 HCT116/5-FU 细胞的镜下特点 为获得人结肠癌耐药细胞系,采用浓度梯度法干预 HCT116。首先以 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5-FU 干预,每 48 h 增加 5-FU 浓度,直至细胞在 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度条件下稳定生长。光镜下,结肠癌敏感 HCT116 细胞呈上皮样单层排列,大小均匀,边界清晰,呈类梭形,贴壁生长。经 5-FU 干预后形成耐药细胞会发生明显改变,形状不规则,多数呈类圆形,轮廓清晰。见图 1。



注:A、B.HCT116 5-FU 耐药株 100、200 倍;C、D.敏感 HCT116 细胞 100、200 倍

图 1 HCT116/5-FU 耐药细胞及敏感 HCT116 细胞特点(倒置显微镜)

Fig. 1 Microscopic characteristics of HCT116/5-FU drug-resistant cells and sensitive HCT116 cells (inverted microscope)

3.3 健脾消癌方对 HCT116/5-FU 细胞存活率的影响 与 FBS 组比较,FGF2 组的敏感 HCT116 细胞存活率明显增高($P < 0.05$),提示耐药能力增强;抑制 FGFR 后,HCT116/5-FU 细胞存活率明显下降($P < 0.05$),说明 FGF2 的高表达与耐药发生相关。与相同浓度无药血清组比较,健脾消癌方 10%、15%、20% 浓度均能够降低 HCT116/5-FU 细胞生存率,其中 20% 浓度组细胞生存率降低最显著($P < 0.01$),说明健脾消癌方可降低化疗耐受性,改善化疗耐药。见表 2。

3.4 健脾消癌方对 HCT116/5-FU 细胞 IC_{50} 的影响 FBS 组的 5-FU 浓度为 $23.45 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,10%、15%、20% 健脾消癌方含药血清组的 5-FU 浓度分别为 20.33 、 17.46 、 $5.136 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,10%、15%、20% 无药血清组的 5-FU 浓度分别为 26.09 、 21.10 、

表2 健脾消癌方对HCT116/5-FU细胞的存活率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of Jianpi Xiaoqi prescription (JPXA) on survival rate of HCT116/5-FU cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度	0.01 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.05 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
FBS组	10%	0.95±0.05	0.91±0.01	0.91±0.01	0.91±0.01	0.91±0.02
健脾消癌方组	10%	1.00±0.01	0.96±0.03 ¹⁾	0.94±0.01 ^{1,6)}	0.96±0.02 ^{1,6)}	0.70±0.09 ^{1,4,8)}
	15%	0.99±0.02	0.91±0.03	0.89±0.01 ^{4,5,7)}	0.91±0.02 ^{3,6,7)}	0.90±0.06 ⁶⁾
	20%	0.99±0.02	0.94±0.01 ^{2,4)}	0.89±0.05	0.79±0.04 ^{2,4,5,8)}	0.70±0.04 ^{2,4,5,8)}
无药血清组	10%	0.98±0.02 ⁷⁾	0.96±0.01 ^{2,5)}	0.96±0.01 ^{2,6)}	0.96±0.01 ^{2,6)}	0.96±0.02 ^{1,6)}
	15%	0.97±0.02 ⁷⁾	0.95±0.01 ^{2,5)}	0.95±0.01 ^{2,6)}	0.95±0.01 ^{2,6)}	0.95±0.02 ^{1,6)}
	20%	0.97±0.02 ⁷⁾	0.90±0.01 ⁷⁾	0.90±0.01 ^{5,7)}	0.90±0.01 ^{6,7)}	0.90±0.02 ^{6,7)}
AZD4547组	1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	1.00±0.05	0.90±0.03	0.79±0.053 ¹⁾	0.68±0.04 ²⁾	0.61±0.03 ^{2,6)}
FGF2组	150 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	1.03±0.02 ¹⁾	0.98±0.04 ^{1,5)}	0.96±0.026 ^{1,6)}	0.96±0.02 ^{1,6)}	0.97±0.02 ¹⁾

组别	浓度	5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
FBS组	10%	0.82±0.05	0.73±0.05	0.43±0.01	0.38±0.05
健脾消癌方组	10%	0.77±0.04 ^{6,7)}	0.66±0.06 ^{6,8)}	0.37±0.06 ^{6,7)}	0.19±0.03 ^{2,4,6,8)}
	15%	0.81±0.03 ^{6,7)}	0.55±0.10 ^{5,8)}	0.39±0.03 ^{3,6,7)}	0.17±0.07 ^{1,4,5,8)}
	20%	0.59±0.03 ^{2,4,5,8)}	0.41±0.07 ^{2,4,5,8)}	0.30±0.02 ^{2,4,6,8)}	0.11±0.04 ^{2,4,5,8)}
无药血清组	10%	0.87±0.06 ⁶⁾	0.78±0.05 ^{6,7)}	0.46±0.01 ^{1,6)}	0.41±0.05 ⁶⁾
	15%	0.86±0.05 ⁶⁾	0.73±0.05 ^{6,8)}	0.46±0.02 ⁶⁾	0.41±0.05 ⁶⁾
	20%	0.77±0.05 ^{6,7)}	0.69±0.04 ^{6,8)}	0.43±0.01 ^{6,7)}	0.33±0.02 ^{6,8)}
AZD4547组	1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.48±0.04 ²⁾	0.25±0.05 ²⁾	0.11±0.04 ²⁾	0.01±0.01 ²⁾
FGF2组	150 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0.93±0.06 ⁶⁾	0.88±0.03 ^{2,6)}	0.49±0.02 ^{1,6)}	0.48±0.03 ^{1,6)}

注:与FBS组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与相同浓度无药血清组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$;与AZD4547组比较⁵⁾ $P<0.05$,⁶⁾ $P<0.01$;与FGF2组比较⁷⁾ $P<0.05$,⁸⁾ $P<0.01$ (表5同)

19.61 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, AZD4547组的5-FU浓度为3.455 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, FGF2组的5-FU浓度为39.29 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,结果显示耐药细胞(10%FBS)、无药血清的 IC_{50} 均较高,而健脾消癌方各浓度组 IC_{50} 降低,其中20%浓度组最低。

3.5 健脾消癌方对HCT116/5-FU细胞培养液中FGF2表达及细胞中FGF2 mRNA的表达影响 HCT116/5-FU细胞培养液及细胞中(FBS组)FGF2、FGF2 mRNA高表达,添加FGF2重组蛋白的敏感HCT116细胞培养液及细胞中FGF2、FGF2 mRNA也成高表达,说明肠癌耐药的发生伴随FGF2升高。与无药血清组比较,健脾消癌方各浓度组培养液中FGF2及细胞中FGF2 mRNA表达均降低,其中20%浓度组降低最显著($P<0.01$),提示健脾消癌方可以降低FGF2表达。见表3。

3.6 健脾消癌方对细胞中FGF2、p-FGFR1、FGFR1蛋白表达的影响 与HCT116敏感细胞比较,HCT116/5-FU细胞中FGF2、p-FGFR1表达显著增高,FGFR1表达显著降低($P<0.01$),说明FGF2的高

表3 健脾消癌方对HCT116/5-FU细胞培养液中FGF2表达及细胞中FGF2 mRNA表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of JPXA on FGF2 in cell culture medium and FGF2 mRNA in HCT116/5-FU cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度	FGF2/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	FGF2 mRNA
FBS组	10%	148.17±9.28	1.12±0.12
健脾消癌方组	10%	104.28±9.18 ^{2,3,4)}	0.50±0.01 ^{2,3,4)}
	15%	49.83±1.67 ^{2,3,4)}	0.38±0.04 ^{2,3,4)}
	20%	16.50±4.41 ^{2,3,4)}	0.14±0.01 ^{2,3,4)}
无药血清组	10%	163.17±3.33	0.89±0.11
	15%	143.17±5.00	0.99±0.07
	20%	117.06±4.19 ¹⁾	0.64±0.15 ¹⁾
FGF2组	150 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	359.83±3.33 ¹⁾	0.86±0.05 ¹⁾

注:与FBS组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与相同浓度无药血清组比较³⁾ $P<0.01$;与FGF2组比较⁴⁾ $P<0.01$

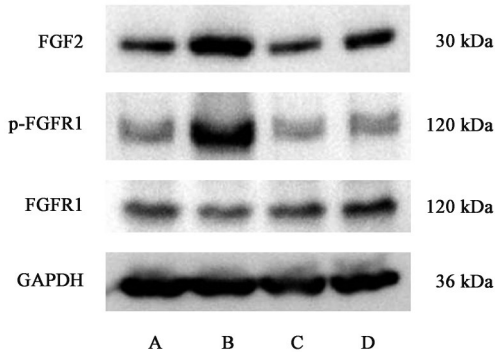
表达促进结肠癌耐药。健脾消癌方干预后,与HCT116/5-FU无药血清组比较,FGF2、p-FGFR1表达显著下调($P<0.01$),FGFR1表达显著升高($P<0.01$),说明健脾消癌方可以抑制耐药细胞中FGF2/FGFR1信号表达。见表4、图2。

表4 健脾消癌方对细胞中FGF2、p-FGFR1、FGFR1蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of JPXA prescription on expression of FGF2, p-FGFR1, FGFR1 proteins of cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	细胞	体积分数/%	FGF2	p-FGFR1	FGFR1
无药血清组	HCT 116	20	0.523±0.023	0.426±0.015	0.494±0.008
	HCT 116/5-FU	20	1.193±0.044 ¹⁾	1.474±0.032 ¹⁾	0.422±0.018 ¹⁾
健脾消癌方组	HCT 116	20	0.502±0.023	0.351±0.018 ²⁾	0.515±0.02
	HCT 116/5-FU	20	0.643±0.022 ²⁾	0.399±0.021 ²⁾	0.605±0.024 ²⁾

注:无药血清组间HCT116/5-FU与HCT116组比较¹⁾ $P<0.01$;同型细胞健脾消癌方与无药血清比较²⁾ $P<0.01$



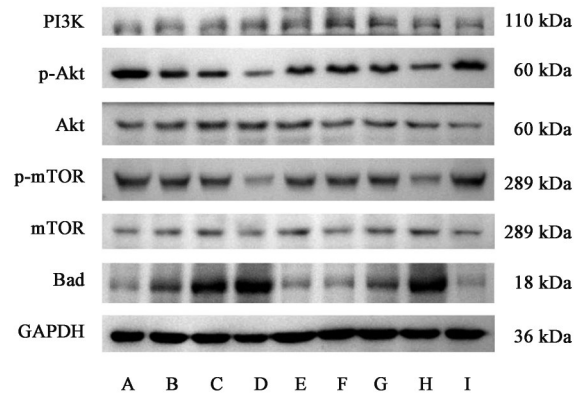
注:A.20%无药血清组(HCT116细胞);B.20%无药血清组(HCT116/5-FU细胞);C.20%健脾消癌方组(HCT116细胞);D.20%健脾消癌方组(HCT116/5-FU细胞)

图2 各组细胞内FGF2、p-FGFR1、FGFR1蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoretic of FGF2, p-FGFR1, FGFR1 proteins expression of cells in each group

3.7 健脾消癌方对细胞中PI3K、p-Akt、Akt、p-mTOR、mTOR、Bad蛋白表达的影响 抑制FGFR后,HCT116/5-FU细胞中p-Akt、p-mTOR低表达,Bad蛋白高表达;添加FGF2重组蛋白后,敏感HCT116细胞中PI3K、Akt、mTOR、Bad低表达,p-Akt、p-mTOR高表达,说明FGF2促进耐药主要是通过活化PI3K/Akt下游信号通路。健脾消癌方干预后,与相同浓度无药血清组比较,15%、20%浓度

组Akt、Bad表达上调,p-Akt、p-mTOR下调,20%浓度组调节最明显,差异具有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$),提示健脾消癌方可以抑制耐药细胞中Akt及下游信号通路。健脾消癌方改善耐药,可能通过调控FGF2抑制PI3K/Akt及下游信号通路。见图3、表5。



注:A.FBS组;B.10%健脾消癌方组;C.15%健脾消癌方组;D.20%健脾消癌方组;E.10%无药血清组;F.15%无药血清组;G.20%无药血清组;H.AZD4547组;I.FGF2组

图3 各组细胞中PI3K、p-Akt、Akt、p-mTOR、mTOR、Bad蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoretic expression of PI3K, p-Akt, Akt, p-mTOR, mTOR, Bad proteins in each group

表5 健脾消癌方对细胞中PI3K、p-Akt、Akt、p-mTOR、mTOR、Bad蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

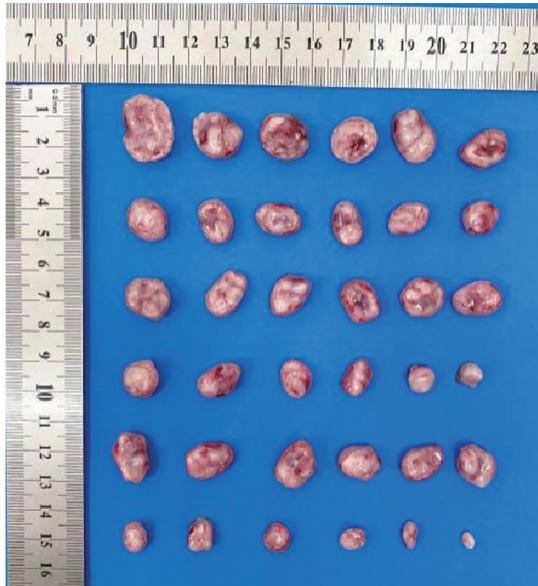
Table 5 Effect of JPXA prescription on expression of PI3K, p-Akt, Akt, p-mTOR, mTOR, Bad proteins in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度	PI3K	p-Akt	Akt	p-mTOR	mTOR	Bad
FBS组	10%	0.332±0.020	0.897±0.040	0.310±0.017	0.623±0.014	0.229±0.016	0.219±0.015
健脾消癌方组	10%	0.361±0.011 ⁸⁾	0.473±0.013 ^{2,6,8)}	0.333±0.005 ⁸⁾	0.442±0.017 ^{2,6,8)}	0.260±0.010 ^{6,8)}	0.559±0.024 ^{2,4,6,8)}
	15%	0.443±0.013 ^{2,6,8)}	0.441±0.013 ^{2,4,6,8)}	0.415±0.011 ^{2,4,6,8)}	0.413±0.019 ^{2,3,6,8)}	0.217±0.007 ^{1,5,8)}	1.122±0.029 ^{2,4,5,8)}
	20%	0.495±0.024 ^{2,6,8)}	0.288±0.012 ^{2,4,5,8)}	0.478±0.012 ^{2,4,6,8)}	0.213±0.009 ^{2,4,5,8)}	0.266±0.010 ^{1,5,8)}	1.537±0.024 ^{2,4,6,8)}
无药血清组	10%	0.388±0.017 ^{1,8)}	0.460±0.011 ^{2,6,8)}	0.352±0.012 ^{1,5,8)}	0.427±0.015 ^{2,6,8)}	0.269±0.007 ^{1,5,8)}	0.218±0.015 ^{6,8)}
	15%	0.463±0.011 ^{2,6,8)}	0.588±0.013 ^{2,6,8)}	0.329±0.008 ⁸⁾	0.456±0.012 ^{2,6,8)}	0.255±0.008 ^{6,8)}	0.261±0.009 ^{1,6,8)}
	20%	0.467±0.018 ^{2,6,8)}	0.496±0.015 ^{2,6,8)}	0.329±0.009 ⁸⁾	0.475±0.016 ^{2,6,8)}	0.278±0.012 ^{1,8)}	0.445±0.018 ^{2,6,8)}
AZD4547组	1 μmol·L ⁻¹	0.368±0.009	0.317±0.012 ²⁾	0.315±0.012	0.243±0.012 ²⁾	0.303±0.012 ²⁾	1.217±0.025 ²⁾
FGF2组	150 mg·L ⁻¹	0.251±0.010 ^{2,6)}	0.764±0.016 ^{2,6)}	0.199±0.005 ^{2,6)}	0.694±0.024 ^{1,6)}	0.178±0.010 ^{1,6)}	0.154±0.006 ^{2,6)}

3.8 健脾消癌方对裸鼠移植瘤体质量及体积的影响 建立耐药肿瘤模型,分组干预,与模型组、健

脾消癌方组、5-FU组比较,健脾消癌方联合5-FU组瘤体质量显著降低($P<0.01$),联合组疗效优于单药

组,说明健脾消癌方能够改善耐药,抑制瘤体生长。见图4、表6和表7。



注:A.模型组;B.健脾消癌方组;C.5-FU组;D.健脾消癌方+5-FU组;E.AZD4547组;F.AZD4547+5-FU组(图5同)

图4 各组对肠癌裸鼠移植瘤的抑制作用

Fig. 4 Inhibitory effect of each group on transplanted tumors in nude mice of colorectal cancer

3.9 健脾消癌方对耐药移植瘤中 FGF2、p-FGFR1、FGFR1、p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、p-mTOR、mTOR、Bad 蛋白表达的影响 与模型组、健脾消癌方组、

表6 健脾消癌方对耐药移植瘤体质量的影响 (n=6)

Table 6 Effect of JPXA prescription on tumor mass (n=6)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	瘤体质量($\bar{x}\pm s$)/g	瘤体抑制率 /%
模型组		1.833±0.250	
健脾消癌方组	15	1.300±0.141 ²⁾	29.1
5-FU组	0.02	1.550±0.187 ³⁾	15.4
健脾消癌方+5-FU组	15+0.02	0.633±0.207 ^{2,4,6,8)}	65.5
AZD4547组	0.012 5	1.400±0.141 ²⁾	23.6
AZD4547+5-FU组	0.012 5+0.02	0.283±0.147 ^{2,4,6,8)}	84.6

注:与模型组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与健脾消癌方组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01;与5-FU组比较⁵⁾P<0.05,⁶⁾P<0.01;与AZD4547组比较⁷⁾P<0.05,⁸⁾P<0.01(表7-表9同)

5-FU组比较,健脾消癌方联合5-FU组 FGF2、p-FGFR1 蛋白表达显著降低(P<0.01),说明健脾消癌方抑制耐药瘤体内 FGF2/FGFR1 信号表达(表8、图5)。与模型组、健脾消癌方组、5-FU组比较,健脾消癌方联合5-FU组 p-PI3K、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达明显降低(P<0.05, P<0.01);与模型组、5-FU组比较,健脾消癌方联合5-FU组、健脾消癌方组 Bad 蛋白表达显著升高(P<0.01),说明健脾消癌方抑制耐药瘤体内 PI3K/Akt 及下游信号通路信号表达。健脾消癌方改善耐药,可能通过调控 FGF2 抑制 PI3K/Akt 及下游信号通路。见表9、图5。

表7 健脾消癌方对耐药移植瘤体积的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 7 Effect of JPXA prescription on volume growth of transplanted tumor ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	D7	D14	D21	D28	D35
模型组		119.90±24.43	225.92±43.21	369.32±79.36	624.67±79.80	967.52±130.35
健脾消癌方组	15	31.88±35.83 ²⁾	88.40±57.09 ²⁾	176.55±72.41 ²⁾	299.30±116.03 ²⁾	499.22±118.88 ²⁾
5-FU组	0.02	107.62±100.06	237.66±167.78	298.72±131.54	473.98±77.36 ^{2,3)}	719.08±103.12 ^{2,4)}
健脾消癌方+5-FU组	15+0.02	26.07±22.98 ²⁾	69.15±46.60 ^{2,5,8)}	107.66±52.61 ^{2,6,7)}	161.92±49.47 ^{2,3,6,8)}	202.32±58.45 ^{2,4,6,8)}
AZD4547组	0.012 5	68.19±64.73	179.98±60.72 ³⁾	250.86±114.81	384.13±130.87 ²⁾	511.70±151.30 ^{2,5)}
AZD4547+5-FU组	0.012 5+0.02	34.21±29.81 ²⁾	28.87±24.30 ^{2,3,5,8)}	45.81±31.88 ^{2,4,6,8)}	45.60±26.65 ^{2,4,6,8)}	63.04±34.34 ^{2,4,6,8)}

表8 健脾消癌方对肿瘤组织中 FGF2、p-FGFR1、FGFR1 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 8 Effect of JPXA prescription on expression of FGF2, p-FGFR1, FGFR1 proteins in tumor tissues ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	FGF2/GAPDH	p-FGFR1/GAPDH	FGFR1/GAPDH
模型组		0.829±0.027	0.679±0.03	0.945±0.012
健脾消癌方组	15	0.799±0.029	0.525±0.013 ²⁾	0.983±0.029
5-FU组	0.02	0.910±0.054 ³⁾	0.698±0.017 ⁴⁾	0.971±0.037
健脾消癌方+5-FU组	15+0.02	0.302±0.020 ^{2,4,6,8)}	0.281±0.015 ^{2,4,6,8)}	0.997±0.052
AZD4547组	0.012 5	0.602±0.060 ^{2,4,6)}	0.511±0.015 ^{2,6)}	0.986±0.055
AZD4547+5-FU组	0.012 5+0.02	0.151±0.008 ^{2,4,6,8)}	0.138±0.006 ^{2,4,6,8)}	1.002±0.027 ¹⁾

表 9 健脾消癌方对肿瘤组织中 p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、p-mTOR、mTOR、Bad 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 9 Effect of JPXA prescription on expression of p-PI3K, PI3K, p-Akt, Akt, p-mTOR, mTOR, Bad proteins in tumor tissues ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p-PI3K /GAPDH	PI3K /GAPDH	p-Akt /GAPDH	Akt /GAPDH	p-mTOR /GAPDH	mTOR /GAPDH	Bad /GAPDH
模型组		0.289±0.024	0.158±0.01	0.808±0.044	0.431±0.040	0.32±0.020	0.192±0.010	0.309±0.049
健脾消癌方组	15	0.303±0.011	0.152±0.011	0.79±0.080	0.358±0.014 ¹⁾	0.328±0.019	0.189±0.031	1.025±0.048 ²⁾
5-FU 组	0.02	0.309±0.033	0.153±0.005	0.731±0.026	0.438±0.032 ³⁾	0.314±0.017	0.181±0.012	0.690±0.058 ^{2,4)}
健脾消癌方+5-FU 组	15+0.02	0.202±0.018 ^{2,4,6)}	0.149±0.007	0.354±0.042 ^{2,4,6)}	0.286±0.015 ^{2,4,6)}	0.224±0.031 ^{1,4,5)}	0.183±0.012	0.976±0.075 ^{2,6,8)}
AZD4547 组	0.012 5	0.205±0.015 ^{2,4,6)}	0.148±0.024	0.386±0.021 ^{2,4,6)}	0.233±0.034 ^{2,4,6)}	0.175±0.021 ^{2,4,6)}	0.187±0.032	0.507±0.021 ^{2,4,6)}
AZD4547+5-FU 组	0.012 5+0.02	0.202±0.029 ^{1,4,5)}	0.153±0.012	0.426±0.029 ^{2,4,6)}	0.20±0.015 ^{2,4,6)}	0.120±0.004 ^{2,4,6,7)}	0.172±0.010	0.937±0.033 ^{2,6,8)}

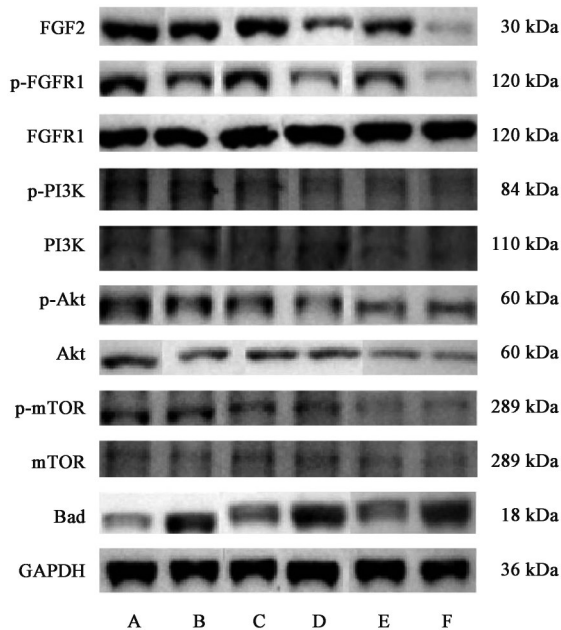


图 5 各组肿瘤组织蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoretic expression of tissue proteins in each group

4 讨论

结直肠癌为全球高发恶性肿瘤病之一,根据最新全球癌症统计数据,2020 年结直肠癌全球发病 193.2 万,死亡 93.5 万,发病率及死亡率均居前列^[1],造成严重的社会负担。结直肠癌的 5 年生存率约 64%,转移性患者 5 年生存率仅约 12%^[15],约 1/3 的结直肠癌患者在确诊时已发现转移^[16],复发转移是引起患者死亡的主要原因,如何控制复发转移一直是临床面对的难题。化学治疗是术后辅助及晚期肠癌的主要治疗手段,5-FU 类药物是结直肠癌的基础化疗药物,但临床上常出现结直肠癌细胞对 5-FU 发生耐药的情况^[17]。耐药一直是影响结直肠癌临床疗效的主要原因之一,化疗的耐药将导致肿瘤复发或转移,影响患者生存期。因此化疗耐药机制一

直是研究的核心问题。中医药联合治疗是否能改善耐药性值得探讨。

PI3K 是一种脂质激酶,可调节细胞内信号级联,调节多种细胞过程。PI3Ks 被认为是癌症治疗中化疗耐药的重要原因。Akt 也是 PI3K 信号通路的重要下游效应物,调节多种途径,包括抑制细胞凋亡、刺激细胞生长和调节细胞代谢^[18]。Akt 的激酶活性是由 FGF、血管内皮生长因子(VEGF)、神经生长因子(NGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、表皮生长因子(EGF)和胰岛素样生长因子(IGF)等多种生长因子诱导的^[19]。PI3K/Akt 信号通路是肿瘤发生、发展与耐药的经典信号通路。AKAO 等^[20]证明 microRNA-34a 的异常表达可引起人结肠癌 DLD-1 细胞对 5-FU 的耐药,通过激活 PI3K/Akt 信号通路,生存时间从 12 h 提高到 48 h。LIN 等^[21]研究发现半枝莲明显抑制 HCT-8/5FU 细胞的增殖,促进细胞凋亡,其抗耐药机制可能是通过抑制 PI3K/Akt 信号通路的激活。

FGF 家族由 23 个 FGF 信号多肽组成,作为有效的有丝分裂原^[22]。FGF 通过刺激成纤维细胞、内皮细胞和癌细胞的生长来发挥广泛的有丝分裂活性^[23-24]。FGF 信号通路对正常和癌症生物学至关重要。哺乳动物 FGF 家族成员通过与硫酸肝素和 FGFR 的不同亲和力结合,参与多种信号通路。FGF2,又称碱性 FGF(bFGF),是 FGF 超家族中典型的和研究最多的成员。FGF2 是生理和病理条件下细胞生长和分化的重要调控因子。与其受体相互作用,介导受体二聚化、磷酸化和信号通路的激活,如 PI3K/Akt 通路,与耐药密切相关^[25]。前期研究发现 HCT116/5-FU 细胞中 FGF2 高表达,FGF2 通过激活 PI3K 下游的 Akt/mTOR 和 Akt/Bad 信号通路来促进结肠癌的化疗耐受性^[26]。

本研究发现 HCT116/5-FU 细胞中 FGF2、p-FGFR1 表达明显增高,FGFR1 表达降低,细胞培养液中 FGF2、细胞中 FGF2 mRNA 高表达,与敏感 HCT116 比较有显著差异;敏感 HCT116 细胞添加 FGF2 重组蛋白后,细胞存活率增高,提示耐药能力增强,说明 FGF2 的高表达与耐药发生相关。抑制 FGFR 受体后,HCT116/5-FU 细胞存活率明显下降,进一步说明 FGF2 与耐药相关。添加 FGF2 重组蛋白后,敏感结肠癌细胞中 PI3K、Akt、mTOR、Bad 低表达,p-Akt、p-mTOR 高表达;抑制 FGFR 后,耐药结肠癌细胞中 p-Akt、p-mTOR 低表达,Bad 蛋白表达高表达;说明 FGF2 促进耐药主要是通过活化 PI3K/Akt 下游信号通路,结肠癌耐药可能系 FGF2 介导激活 PI3K/Akt 信号通路发生。

本课题组长期临床实践,总结“虚、瘀、毒”并存是结直肠癌的基本病机特点,治当以“健脾益气,化痰解毒”,拟方健脾消癌方,药物有人参、薏苡仁健脾益气,以扶正补虚,半枝莲、重楼清热解毒,莪术、郁金活血化瘀,枳壳行气化痰,炙甘草调和诸药,全方配伍,扶正抗癌,标本兼顾,攻补兼施。经过临床验证获得较好疗效,其联合化疗具有增效作用,但其联合化疗的增效机制有待探索,可能通过改善耐药提高临床疗效。本研究细胞实验发现,健脾消癌方组均降低 HCT116/5-FU 细胞生存比率,其中 20% 组细胞生存率降低最明显,提示健脾消癌方具有改善 HCT116/5-FU 细胞耐药性的作用。健脾消癌方组培养液中 FGF2、细胞中 FGF2 mRNA 表达均降低,其中 20% 组降低最明显;健脾消癌方干预后 FGF2、p-FGFR1 表达明显下调,FGFR1 表达升高;健脾消癌方干预后 Akt 及下游信号受到调控,p-Akt、p-mTOR 表达下调,Bad 表达上调。动物实验发现,健脾消癌方联合 5-FU 组明显抑制耐药瘤体生长,健脾消癌方联合 5-FU 组降低 FGF2、p-FGFR1、p-PI3K、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达,升高 Bad 蛋白表达。健脾消癌方可以改善肠癌化疗耐药性,可能是通过抑制 FGF2 表达,并进一步抑制 PI3K/Akt 信号通路激活。

血清药理学方法是中药抗肿瘤机制研究中较普遍使用的一种方法,大鼠、豚鼠、家兔等多被选用做血清药理学的实验动物^[27]。由于血清成分复杂,干扰因素多,且与目前细胞培养常用的 FBS 存在差异,因此细胞培养及干预也存在一定问题,如鼠、兔等动物血清对细胞的培养能力、细胞形态、检测指标是否有一定影响,与 FBS 是否存在差异等。本研

究同时设立 FBS 组为对照组,也提示鼠血清与 FBS 的检测指标存在一定差异。

综上所述,健脾消癌方作为治疗肠癌的经验方,可通过调节结肠癌 FGF2/FGFR1 信号表达抑制 PI3K/Akt 信号通路激活改善肠癌化疗耐药性。本研究提供了基于扶正祛邪为治疗理念的中药方剂在结肠癌治疗中的科学依据,阐明了健脾消癌方在通过调节 PI3K/Akt 信号通路改善肠癌化疗耐药的作用机制,丰富了中医药防治肿瘤的内涵,显示出了重要的临床意义和广阔的应用前景。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] World Health Organization. Global health estimates 2020: Deaths by cause, age, sex, by country and by region, 2000-2019[Z/OL]. [2021-02-20]. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/gh-leading-causes-of-death>.
- [2] 何斌,刘建平,孙红,等. I ~ III 期结直肠癌西医常规治疗后中医干预指南[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(21): 1-9.
HE B, LIU J P, SUN H, et al. Guidelines for TCM intervention after conventional western medicine treatment for stage I - III colorectal cancer [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2023, 29(21): 1-9.
- [3] SIMON K. Colorectal cancer development and advances in screening[J]. Clin Interv Aging, 2016, 11: 967-976.
- [4] BLONDY S, DAVID V, VERDIER M, et al. 5-Fluorouracil resistance mechanisms in colorectal cancer: From classical pathways to promising processes [J]. Cancer Sci, 2020, 111(9): 3142-3154.
- [5] XUE W J, LI M T, CHEN L, et al. Recent developments and advances of FGFR as a potential target in cancer [J]. Future Med Chem, 2018, 10(17): 2109-2126.
- [6] NOOROLYAI S, SHAJARI N, BAGHBANI E, et al. The relation between PI3K/Akt signalling pathway and cancer [J]. Gene, 2019, 698: 120-128.
- [7] WANG K, CHEN Q, SHAO Y, et al. Anticancer activities of TCM and their active components against tumor metastasis [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 133: 111044.
- [8] GUO D, GUO C, FANG L, et al. Qizhen capsule inhibits colorectal cancer by inducing NAG-1/GDF15 expression that mediated via MAPK/ERK activation [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 273: 113964.
- [9] LYU J, JIA Y, LI J, et al. Gegen Qinlian decoction enhances the effect of PD-1 blockade in colorectal cancer with microsatellite stability by remodelling the gut microbiota and the tumour microenvironment [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(6): 415-430.
- [10] 简小兰,杨晓,罗吉,等. 健脾益气化痰解毒方含药血清对结

- 肠癌 HCT116 细胞增殖、周期、凋亡的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2016, 39(11): 909-914.
- JIAN X L, YANG X, LUO J, et al. Effect of Jianpi Yiqi Huayu Jiedu formula on proliferation, cycle and apoptosis of HCT116 colorectal cancer cells[J]. J Beijing Univ Chin Med, 2016, 39(11): 909-914.
- [11] 简小兰, 何兰, 李勇敏, 等. 健脾消痞方及其拆方对肠癌模型裸鼠体质量、瘤体、转移率及 Caspase-3, Bcl-xL, Bax 蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(6): 156-160.
- JIAN X L, HE L, LI Y M, et al. Effect of Jianpi Xiaoi prescription and Its decomposed recipes on body weight, tumors, metastasis rate and expressions of Caspase-3, Bcl-xL, Bax in colorectal cancer model nude mice [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2018, 24(6): 156-160.
- [12] 王容容, 谭小宇, 李勇敏, 等. 健脾消痞方对大肠癌肝转移裸鼠模型肝组织 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(6): 177-181.
- WANG R R, TAN X L, LI Y M, et al. Effect of Jianpi Xiaoi prescription on expressions of protein related to PI3K/Akt pathway in liver tissues of nude mice model of colorectal cancer with liver metastasis[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2018, 24(6): 177-181.
- [13] 王容容, 王其美, 蒋益兰, 等. 健脾消痞方联合化疗治疗晚期转移性结直肠癌的临床研究[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(5): 1732-1736.
- WANG R R, WANG Q M, JIANG Y L, et al. Advanced metastatic colorectal cancer treated with a combination of Jianpi Xiaoi formula and chemotherapy [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2016, 31(5): 1732-1736.
- [14] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- HUANG J H, HUANG X H, CHEN Z Y, et al. Dose conversion among different animals and healthy volunteers in pharmacological study [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [15] XIE Y H, CHEN Y X, FANG J Y. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer[J]. Signal Transduction Target Ther, 2020, 5(1): 22.
- [16] PARI AZDEH S M, JAFARZADEH-ESFEHANI R, FAZILAT-PANAHI D, et al. The potential therapeutic and prognostic impacts of the c-MET/HGF signaling pathway in colorectal cancer[J]. IUBMB Life, 2019, 71(7): 802-811.
- [17] VAN DER JEUGHT K, XU H C, LI Y J, et al. Drug resistance and new therapies in colorectal cancer [J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(34): 3834-3848.
- [18] LIU R, CHEN Y, LIU G, et al. PI3K/Akt pathway as a key link modulates the multidrug resistance of cancers [J]. Cell Death Dis, 2020, 11(9): 797-809.
- [19] LADDHA A P, KULKARNI Y A. VEGF and FGF-2: Promising targets for the treatment of respiratory disorders [J]. Respir Med, 2019, 156: 33-46.
- [20] AKAO Y, NOGUCHI S, LIO A, et al. Dysregulation of microRNA-34a expression causes drug-resistance to 5-FU in human colon cancer DLD-1 cells [J]. Cancer Lett, 2011, 300(2): 197-204.
- [21] LIN J, FENG J, YANG H, et al. *Scutellaria barbata* D. Don inhibits 5-fluorouracil resistance in colorectal cancer by regulating PI3K/Akt pathway [J]. Oncol Rep, 2017, 38(4): 2293-2300.
- [22] BEENKEN A, MOHAMMADI M. The FGF family: Biology, pathophysiology and therapy [J]. Nat Rev Drug Discov, 2009, 8(3): 235-253.
- [23] POWERS C J, MCLESKEY S W, WELLSTEIN A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling [J]. Endocr Relat Cancer, 2000, 7(3): 165-197.
- [24] KORC M, FRIESEL R E. The role of fibroblast growth factors in tumor growth [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2009, 9(5): 639-651.
- [25] AKL M R, NAGPAL P, AYOUB N M, et al. Molecular and clinical significance of fibroblast growth factor 2 (FGF2 / bFGF) in malignancies of solid and hematological cancers for personalized therapies [J]. Oncotarget, 2016, 7(28): 44735-44762.
- [26] JIAN X L, ZENG P H, LI K X, et al. FGF2 promotes the chemotherapy resistance in colon cancer cells through activating PI3K/Akt signaling pathway [J]. Oncol Transl Med, 2023, 9(6): 281-286.
- [27] 邢作英, 王永霞, 曹英杰, 等. 血清药理学研究概要 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2015, 17(1): 219-222.
- XING Z Y, WANG Y X, CAO Y J, et al. Methodological Overview of Serum Pharmacology [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med Mater Med, 2015, 17(1): 219-222.

[责任编辑 张丰丰]