

健脾消癌方调控 iNOS-ARG1 轴诱导线粒体功能障碍抑制 结肠癌进展

罗星¹, 潘博², 傅剑锋², 黄佳¹, 彭巍^{2*}, 刘芳^{1*}

(1. 湖南中医药大学 湖南省中西医结合医院, 长沙 410006;

2. 湖南省中医药研究院 湖南省中医药研究院肿瘤研究所, 长沙 410013)

[摘要] 目的:探讨健脾消癌方通过调控诱导型一氧化氮合酶-精氨酸酶1(iNOS-ARG1)代谢轴,诱导线粒体活性氧(mito-ROS)介导的线粒体结构与功能障碍,从而抑制结肠癌进展的机制。方法:采用人重组干扰素- γ (IFN- γ , 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)与N(ω)-羟基-L-精氨酸(Nor-NOHA, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)联合干预24 h构建人结肠癌HCT116细胞精氨酸代谢紊乱模型,随后分别给予5%、10%、20%健脾消癌方含药血清干预。采用细胞增殖检测计数试剂盒8(CCK-8)、5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EdU)染色、克隆形成实验检测细胞增殖;Transwell小室实验和划痕实验评估侵袭与迁移;JC-1与MitoSOX染色评估线粒体膜电位与活性氧(ROS)水平;透射电镜(TEM)观察线粒体超微结构;蛋白免疫印迹法(Western blot)与免疫荧光分析iNOS、ARG1及线粒体动力学蛋白融合蛋白2(MFN2)与动力相关蛋白1(DRP1)表达;比色法/酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测L-精氨酸、瓜氨酸与尿素水平。结果:与空白组比较,模型组iNOS表达明显上调、ARG1下调,ARG1-iNOS下降,L-精氨酸和尿素含量下降、瓜氨酸水平升高($P<0.05$);同时mito-ROS积聚显著增强,JC-1红/绿比值降低,线粒体出现肿胀与嵴断裂,提示代谢紊乱可诱发线粒体损伤。与模型组比较,健脾消癌方各剂量组均可进一步下调ARG1/iNOS,增强一氧化氮(NO)及其反应性氮物质积聚,L-精氨酸和尿素水平进一步下降、瓜氨酸显著升高($P<0.01$);细胞EdU阳性率、克隆形成率、划痕愈合率及Transwell穿膜数均随含药血清浓度升高而显著下降($P<0.01$);mito-ROS水平升高,JC-1红/绿比值进一步下降。TEM显示线粒体肿胀和空泡化加剧,MFN2蛋白表达下调、DRP1上调($P<0.01$),呈剂量依赖性。结论:健脾消癌方可在精氨酸代谢失衡基础上进一步激活NO主导的氧氮应激,诱导线粒体ROS积聚、膜电位崩解及动力失衡,抑制结肠癌细胞增殖与迁移,揭示了其“代谢-线粒体”协同靶向的抗癌机制。

[关键词] 健脾消癌方; 结直肠癌; 诱导型一氧化氮合酶-精氨酸酶1(iNOS-ARG1); 精氨酸代谢; 线粒体功能障碍

[中图分类号] R256;R735;R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)13-0099-13

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20251729

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20250804.1851.008>

[网络出版日期] 2025-08-05 09:54:21



Jianpi Xiao'ai Prescription Inhibits Colorectal Cancer Progression by Inducing Mitochondrial Dysfunction via Modulation of iNOS-ARG1 Axis

LUO Xing¹, PAN Bo², FU Jianfeng², HUANG Jia¹, PENG Wei^{2*}, LIU Fang^{1*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Hunan Provincial Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Changsha 410006, China; 2. Institute of Oncology, Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410013, China)

[收稿日期] 2025-04-23

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81774287);湖南省中医药管理局重点课题(A2023042);湖南省自然科学基金项目(2023JJ30364, 2023JJ60458, 2023JJ30367);国家中医药管理局第四届国医大师潘敏求传承工作室项目(国中医药办人教函[2022]245号);中国中医科学院学术传承与传播项目(CI2022E014XB);湖南省临床医学技术创新指导项目(2021SK51010);湖南省卫生健康委科研项目(D202319019427)

[第一作者] 罗星,主治医师,从事中西医结合防治结肠癌研究,E-mail:luoxing1213666@163.com

[通信作者] *刘芳,主任医师,从事中西医结合防治恶性肿瘤研究,E-mail:liufang66886@163.com;

*彭巍,副主任医师,从事中西医结合防治恶性肿瘤研究,E-mail:pengwei120120@163.com

[Abstract] Objective: To investigate the mechanism by which Jianpi Xiao'ai prescription (JPXAP) inhibits colorectal cancer progression by regulating the inducible nitric oxide synthase-arginase 1 (iNOS-ARG1) metabolic axis and inducing mitochondrial reactive oxygen species (mito-ROS)-mediated mitochondrial structural and functional impairment. **Methods:** An arginine metabolism disorder model of human colorectal cancer HCT116 cells was established by combined treatment with recombinant human interferon- γ (IFN- γ , 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and N(ω)-hydroxy-L-arginine (Nor-NOHA, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 24 h, followed by intervention with 5%, 10%, or 20% JPXAP-containing serum. Cell proliferation was assessed using cell counting kit-8 (CCK-8), 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) staining, and colony formation assays. Cell invasion and migration were evaluated using Transwell chamber and wound healing assays. Mitochondrial membrane potential (MMP) and ROS levels were assessed by JC-1 and MitoSOX staining, respectively. Mitochondrial ultrastructure was observed by transmission electron microscopy (TEM). The expression of iNOS, ARG1, and mitochondrial dynamics-related proteins, including mitofusin 2 (MFN2) and dynamin-related protein 1 (DRP1), was analyzed by Western blot and immunofluorescence. The levels of L-arginine, citrulline, and urea were determined by colorimetric methods and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results:** Compared with the blank group, the model group exhibited significantly upregulated iNOS expression, downregulated ARG1 expression, a decreased ARG1/iNOS ratio, reduced L-arginine and urea levels, and increased citrulline levels ($P<0.05$). Meanwhile, mito-ROS accumulation was significantly increased, the JC-1 red/green fluorescence ratio was decreased, and mitochondria showed swelling and cristae disruption, indicating that metabolic disorder induced mitochondrial injury. Compared with the model group, all JPXAP-treated groups further decreased the ARG1/iNOS ratio, enhanced nitric oxide (NO) and reactive nitrogen species accumulation, further reduced L-arginine and urea levels, and increased citrulline levels ($P<0.01$). EdU-positive rate, colony formation rate, wound healing rate, and Transwell invasion number all decreased significantly with increasing serum concentration ($P<0.01$). Mito-ROS levels were further elevated, and the JC-1 red/green ratio further decreased. TEM revealed aggravated mitochondrial swelling and vacuolization. MFN2 expression was downregulated and DRP1 expression was upregulated ($P<0.01$), in a dose-dependent manner. **Conclusion:** JPXAP further activates NO-mediated oxidative/nitrosative stress under arginine metabolism imbalance, inducing mito-ROS accumulation, MMP collapse, and mitochondrial dynamics imbalance, thereby inhibiting colorectal cancer cell proliferation and migration. These findings reveal an antitumor mechanism of JPXAP based on coordinated targeting of the "metabolism-mitochondria" axis.

[Keywords] Jianpi Xiao'ai prescription; colorectal cancer; inducible nitric oxide synthase-arginase 1 (iNOS-ARG1); arginine metabolism; mitochondrial dysfunction

结直肠癌(CRC)是全球范围内最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率均居高不下,严重威胁人类健康^[1]。据全球癌症统计数据,CRC在发达国家发病率高居第2位,并呈现年轻化、复发率高及转移能力强等临床特征,严重影响患者生存质量和预后^[2]。肿瘤微环境中代谢重编程在CRC发生发展中发挥着关键作用,其中精氨酸代谢作为一种重要的免疫和代谢交叉通路,其紊乱状态被认为与CRC细胞持续增殖、迁移及免疫逃逸密切相关^[3]。精氨酸主要通过诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和精氨酸酶1(ARG1)两条酶促途径进行代谢,两者在细胞内相互竞争底物,维持代谢动态平衡^[4]。在肿瘤环境中,iNOS-ARG1失衡可导致氮氧化物过度生成和免疫抑制,从而促进肿瘤进展。此外,线粒体作为能量代谢和氧化应激调控的中心,易受到精氨酸代谢紊乱诱发的活性氧(ROS)损伤,表现为线粒体膜电位(MMP)降低、结构破坏及功能障碍等一系列变化^[5-6]。线粒体功能障碍被认为是肿瘤细胞发生氧化损伤、代谢应激及免疫逃逸的重要驱动因素^[7]。因此,靶向调节iNOS-ARG1代谢轴并干预线粒体功能损伤,可能成为阻断结直肠癌发展的潜在策略。

中医药在恶性肿瘤的防治中具有独特优势,《金匱要略》中“脾虚湿盛、湿毒内蕴”被认为是CRC发病的重要病机之一^[8]。基于“体寒瘤热”恶性肿瘤病机理论,本课题组前期组方“健脾消癌方”,是湖南省名中医蒋益兰主任医师的经验方,由六君子汤加减化裁而来,取党参、白术、黄芪等以益气健脾,配伍白花蛇舌草、半枝莲等清热解毒、软坚散结,体现了“扶正祛邪”治癌思路^[9]。前期基础研究发现^[10-13],健脾消癌方可显著抑制HCT116结肠癌细胞及其5-氟尿嘧啶(5-Fu)耐药株的增殖,促进细胞凋亡,并阻断细胞周期第一间期/合成前期(G_0/G_1)细胞周期进程。动物实验显示其可抑制肝转移结肠癌瘤体生长,下调趋化因子受体4(CXCR4)、转化生长因子- β (TGF- β)等迁移相关因子表达,改善肿瘤微环境。基于超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱联用技术(UPLC-Q-TOF-MS)与网络药理学分析发现,该方通过调控磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)等多条信号通路发挥抗癌作用。临床研究方面^[14-16],健脾消癌方联合FOLFIRI方案(含亚叶酸钙、5-Fu和伊立替康的化疗方案)或瑞戈非尼等方案治疗晚期结

直肠癌,能显著提高疾病控制率、改善免疫功能、延长无进展生存期,且安全性良好,但其是否可通过调控精氨酸代谢平衡并干预线粒体功能障碍,尚未被系统阐明。本研究以结肠癌HCT116细胞为研究对象,基于人重组干扰素- γ (IFN- γ)/N(ω)-羟基-L-精氨酸(Nor-NOHA)诱导的精氨酸代谢紊乱模型,系统考察健脾消癌方对肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭能力的影响,并从线粒体结构、膜电位及ROS水平等方面,探讨其对线粒体功能障碍的调控作用。进一步结合蛋白免疫印迹法(Western blot)与免疫荧光双染,分析iNOS-ARG1表达动态及相关代谢物变化,从机制层面揭示健脾消癌方通过iNOS-ARG1轴诱导线粒体结构损伤功能障碍干预结肠癌进展的潜在作用,为中医药抗CRC提供新思路 and 实验依据。

1 材料

1.1 细胞系及细胞培养 本研究所用HCT116细胞系为人源结肠癌细胞,购自武汉普诺赛生命科技有限公司(货号CL-0096),经STR鉴定为正确。HCT116细胞为贴壁生长的上皮细胞样细胞,培养时采用McCoy's 5A培养基,加入10%胎牛血清(FBS)和1%青霉素-链霉素混合液(P/S),于37℃、5%CO₂、95%空气湿润环境下培养。细胞传代按1:3比例进行,实验所用细胞均传代至第8代,细胞状态良好时用于后续实验。

1.2 动物 健康SPF级雄性SD大鼠,体质量(250±20)g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[SCXK(湘)2021-0004]。动物饲养于湖南中医药大学实验动物中心,环境条件控制为温度(22±2)℃,相对湿度(55±10)%,12h昼夜循环,给予自由摄食饮水。

1.3 伦理 所有动物实验程序均遵循《实验动物管理条例》和伦理审查原则,已获湖南中医药大学实验动物伦理委员会批准(伦理批号LL2023053109)。在动物处置过程中,遵循“3R原则”(替代、减少、优化)以最大限度减少动物痛苦与使用数量,确保实验过程符合伦理规范和动物福利要求。

1.4 试剂及药物 IFN- γ 、Nor-NOHA(美国MedChemExpress公司,批号分别为HY-P7025A、HY-112885);细胞增殖计数检测试剂盒(CCK-8)、结晶紫染色液、JC-1线粒体膜电位检测试剂盒、细胞总蛋白裂解液(RIPA)、聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)蛋白浓度检测试剂盒、核染色使用4',6-二脒基-2-苯基吡啶染色液(DAPI)(上海碧云天生物

技术有限公司,批号分别为C0037、C0121、C2006、P0013B、P0012、C1002);5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EdU)细胞增殖检测试剂盒(广州锐博生物科技有限公司,批号C10310-2);基质胶(Matrigel,美国Corning公司,批号356234);MitoSOX™ Red线粒体ROS探针(美国Invitrogen公司,批号M36008);4%多聚甲醛固定液(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号G1101);0.1%Triton X-100[西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司,批号T8787];增强型化学发光检测试剂盒(ECL,美国Bio-Rad公司,批号1705061);一抗包括兔抗iNOS(英国Abcam公司,批号ab15323);兔抗ARG1(美国Proteintech公司,批号16001-1-AP);兔抗线粒体融合蛋白2(MFN2)、兔抗动力相关蛋白1(DRP1)、兔抗 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国CST公司,批号分别为11925、8570、4967);Alexa Fluor 488及594标记的荧光二抗(美国Invitrogen公司,批号分别为A-11001、A-11012)、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG,H+L)(武汉三鹰生物技术有限公司,批号SA00001-2);L-精氨酸比色法试剂盒(武汉伊莱瑞特科技股份有限公司,批号E-BC-K850-M);尿素检测试剂盒(合肥白鲨生物科技有限公司,批号BL1484B);瓜氨酸酶联免疫吸附检测试剂盒(武汉伊莱科生物技术有限公司,批号ELK9241);四氧化钨(OsO₄)、醋酸铀、柠檬酸铅(美国Electron Microscopy Sciences公司,批号分别为19152、541-09-3、20596-93-4)。

1.5 仪器 ELx800型酶标仪(美国BioTek公司);IX73型倒置荧光显微镜(日本Olympus公司);TCS SP8型激光共聚焦显微镜(德国Leica公司);HT7700型透射电子显微镜(TEM,日本Hitachi公司);3111型CO₂培养箱(美国Thermo Scientific公司);5430R型高效高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司);Mini-protean小垂直板电泳槽、小型Trans-blot转印槽(美国Bio-Rad公司);5200型凝胶成像分析系统(上海天能生命科学有限公司);Scientz-II D型超声波细胞破碎仪(宁波新芝生物有限公司);Evolution 201型紫外-可见分光光度计(美国Thermo Fisher公司)。

2 方法

2.1 健脾消癌方含药血清制备 中药含药血清法是目前中医药基础研究中广泛应用的一种“体内给药-体外干预”模式,主要通过动物灌胃给药,收集血清后应用于体外实验,以模拟药物经胃肠吸收、肝肾代谢后形成的真实活性物质环境。相比直接使

用中药煎剂处理细胞,该方法可部分排除复杂原液中多糖、蛋白等大分子干扰,更贴近药物在体内生物转化后的有效成分状态,具有更好的生理相关性和研究可重复性,已在抗肿瘤、抗炎、神经保护等多个中药作用机制研究中获得验证^[17]。虽然人和鼠在代谢酶系统方面确实存在一定种属差异,但小鼠仍是国际上广泛接受的含药血清模型动物,其代谢产物可为体外机制研究提供重要的前期实验依据^[18]。

健脾消癌方由党参15 g、白术10 g、茯苓15 g、法半夏6 g、重楼6 g、黄芪20 g、白花蛇舌草30 g、半枝莲30 g、菝葜15 g、甘草6 g组成。所有饮片均购自湖南省中医药研究院附属医院,经张水寒主任药师鉴定,均符合2020年版《中华人民共和国药典》药品标准。健脾消癌方各中药按传统中药水煎方法,将药材加10倍体积蒸馏水浸泡30 min后煎煮2次,每次1 h,合并煎液,经四层纱布过滤后减压浓缩为相当于含生药2 g·mL⁻¹的浸膏液。浸膏液经高压灭菌后备用。

20只SD大鼠随机分为健脾消癌方组与正常组,每组10只。根据体表面积换算法(人到大鼠的换算系数为6.3),以临床等效剂量灌胃,健脾消癌方组每日大鼠给药剂量为17.12 g·kg⁻¹,正常组给予等体积生理盐水,每日1次,连续给药7 d。设定7 d给药周期主要基于中药“缓效长调”的药理特性,亦参考本课题组及相关研究中发现:连续用药5~7 d后可在动物血浆中稳定检出多种中药代谢产物,且血药浓度及代谢稳定性优于单次给药模式,有助于获得更具代表性的含药血清。末次给药1 h后,麻醉处死大鼠,依据以往药代动力学资料,该时间点为多数中药成分吸收峰值附近,能反映血清中有效成分浓度相对稳定、作用明确的时间窗,已被广泛用于中药含药血清制备^[18]。经腹主动脉采血,静置2 h后,3 000 r·min⁻¹离心10 min,离心半径10 cm,分离血清。所获血清在56℃水浴中热灭活30 min,经0.22 μm微孔滤膜除菌过滤后,分装于无菌离心管中,-80℃低温保存,备用于后续细胞实验。前期课题组已通过UPLC-Q-TOF-MS发现该方通过调控PI3K/Akt、MAPK等多条信号通路发挥抗癌作用^[12]。

2.2 CCK-8检测细胞活力 采用CCK-8试剂盒检测不同处理条件下HCT116细胞的活力变化。将对数生长期的HCT116细胞以5×10³个/孔的密度接种于96孔板中,置于含10%FBS的无精氨酸RPMI 1640培养基中培养24 h后,分别给予不同浓度的

IFN-γ(5、10、20、50 μg·L⁻¹)、Nor-NOHA(50、100、200、400 μmol·L⁻¹)处理或健脾消癌方含药血清(5%、10%、20%)干预,设空白组,并同步设置24 h和48 h两个时间点。处理结束后,每孔加入CCK-8试剂10 μL,继续孵育2 h,在450 nm波长处使用酶标仪测定各孔吸光度A。每组设置3个复孔,实验重复3次。细胞活力按以下公式计算:细胞活力=(药物组A₄₅₀-溶剂组A₄₅₀)/(空白组A₄₅₀-溶剂组A₄₅₀)×100%。通过比较不同浓度与时间条件下细胞活力的变化,筛选出对细胞活力无显著抑制(活力>80%)的处理组合,用于后续精氨酸代谢紊乱模型的构建与药物干预机制研究。

2.3 精氨酸代谢紊乱HCT116细胞模型构建 为构建以iNOS表达上调、ARG1表达下调为特征的精氨酸代谢紊乱细胞模型,本研究选用人结直肠癌HCT116细胞进行建模。依据前期CCK-8实验筛选结果,确定干预剂量为IFN-γ(10 μmol·L⁻¹)和Nor-NOHA(200 μmol·L⁻¹),联合处理时间为24 h。细胞在含10%FBS的RPMI-1640基础培养基中培养,待贴壁生长稳定后,给予IFN-γ与Nor-NOHA联合干预,以诱导iNOS表达升高、ARG1表达抑制,从而模拟肿瘤细胞中精氨酸代谢紊乱的病理状态^[19-20]。

该模型通过诱导精氨酸代谢关键酶表达失衡,表现为iNOS上调、ARG1下调,伴随L-精氨酸耗竭、尿素合成减少、瓜氨酸积聚,成功模拟了结直肠癌TME中以“一氧化氮/反应性氮物质(NO/RNS)过载-免疫抑制-代谢重构”为特征的典型代谢紊乱状态^[21],具有良好的病理相似性与机制靶向相关性。已有研究表明,iNOS-ARG1信号通路紊乱是驱动肿瘤线粒体损伤、ROS积聚和迁移能力增强的重要机制^[22]。因此,该模型不仅可用于研究代谢失衡对肿瘤行为的影响,也为筛选和验证代谢干预类中药(如健脾消癌方)提供了可靠平台。本研究以此模型为基础,进一步探讨健脾消癌方是否可通过调控iNOS-ARG1代谢轴恢复代谢稳态,抑制肿瘤细胞恶性行为,从而评估其“靶向代谢-干预功能-阻断进展”的抗癌药效潜力。

2.4 分组及干预 在建立精氨酸代谢紊乱HCT116细胞模型的基础上,依据前期实验筛选的建模条件(IFN-γ 10 μg·L⁻¹+Nor-NOHA 200 μmol·L⁻¹,干预24 h),将细胞分为以下6组进行药物干预实验:(1)空白组,不进行任何药物干预,培养基中加入10%空白大鼠血清,处理24 h;(2)模型组,加入

IFN- γ ($10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)和Nor-NOHA ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)联合干预24 h,诱导iNOS-ARG1失衡并模拟精氨酸代谢紊乱状态;(3)健脾消癌方低剂量组(JPXAP-L),在模型基础上加入5%健脾消癌方含药血清干预24 h;(4)健脾消癌方中剂量组(JPXAP-M),在模型基础上加入10%健脾消癌方含药血清干预24 h;(5)健脾消癌方高剂量组(JPXAP-H),在模型基础上加入20%健脾消癌方含药血清干预24 h;(6)阳性对照组(PC),在模型基础上进一步加入较高剂量的IFN- γ ($20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)和Nor-NOHA ($400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)联合干预24 h,用于模拟iNOS-ARG1持续高失衡状态下的细胞损伤特征。

2.5 EdU实验检测细胞增殖 将HCT116细胞以适当密度接种于24孔板中,贴壁生长24 h后,分别给予相应处理因素干预24 h。处理结束后,加入终浓度为 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的EdU工作液,继续孵育2 h。随后依次用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤、固定液(4%多聚甲醛)固定30 min,穿透液(0.5% Triton X-100)处理20 min,最后根据EdU细胞增殖检测试剂盒要求加入反应液,避光反应30 min。反应结束后,用Hoechst 33342染液染核,室温避光孵育10 min。使用荧光显微镜拍摄图像,检测EdU阳性细胞(红色荧光)与细胞总数(蓝色荧光)并进行定量分析。细胞增殖率按下列公式计算:细胞增殖率=EdU阳性细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 。

2.6 克隆形成实验检测细胞长期增殖 将HCT116细胞以300个/孔的密度接种于6孔板中,贴壁生长后分别给予相应处理因素干预24 h。处理结束后,弃去药液,换用常规含10%FBS的完全培养基继续培养10 d,期间每2~3 d更换1次培养基,每个克隆由至少50个细胞组成。克隆形成期结束后,弃去培养基,用PBS轻洗,4%多聚甲醛固定30 min,结晶紫染色液染色15 min,去除多余染料后用清水洗净并自然晾干。使用数码相机拍照记录,采用Image J软件对克隆数进行统计分析。细胞克隆形成率按下列公式计算:克隆形成率=克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

2.7 Transwell基质胶小室实验检测细胞侵袭 实验使用带 $8 \mu\text{m}$ 孔径的Transwell小室,并在小室上室内预先铺设Matrigel基质胶,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h使其凝固。将HCT116细胞以 5×10^4 个/孔的密度接种于无血清培养基中,分别加入相应处理因素干预24 h。处理结束后,细胞用PBS洗涤并重悬于无血清培养基中,加入至上室;下室加入含10%FBS的完全培养基作为化学趋化剂,继续培养24 h。孵育结束后,移

除上室未穿膜细胞,用棉签轻轻擦除,上室用PBS洗涤,4%多聚甲醛固定30 min,结晶紫染色液染色15 min,洗去多余染料并自然晾干。使用显微镜随机拍摄5个视野,采用Image J软件对穿膜细胞数进行统计分析。

2.8 划痕愈合实验检测细胞迁移 将HCT116细胞以 5×10^5 个/孔的密度接种于6孔板中,待细胞单层长满至融合后,使用无菌200 μL 枪头沿直线在细胞单层中央划出一道均匀划痕。PBS轻柔清洗3次,去除脱落细胞后,分别加入相应处理因素干预,继续培养24 h。划痕起始时(0 h)及干预结束时(24 h)分别使用倒置显微镜拍照记录划痕区域。使用Image J软件测量划痕宽度变化,计算迁移率。细胞迁移率按下列公式计算:迁移率=(初始划痕宽度-24 h划痕宽度)/初始划痕宽度 $\times 100\%$ 。每组设3个复孔,实验重复3次,代表图来自各组中最具代表性的典型视野。

2.9 TEM观察线粒体微观结构 将HCT116细胞以 1×10^6 个/皿的密度接种于6 cm培养皿中,待贴壁后分别给予相应处理因素干预24 h。干预结束后,收集细胞,经PBS缓冲液洗涤2次后立即加入预冷的2.5%戊二醛固定液,4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜。固定后的细胞经1%锇酸二次固定,梯度乙醇脱水后,用环氧树脂包埋,超薄切片(厚度70 nm)后,使用醋酸铀和柠檬酸铅进行对比染色。在透射电子显微镜下观察并拍摄图像,评估线粒体的数量、大小、嵴结构、肿胀、断裂等变化。随机选择视野进行观察,代表图来自各组中最具代表性的典型视野。

2.10 MitoSOX™ Red检测线粒体活性氧(mito-ROS) 将HCT116细胞以 5×10^5 个/孔的密度接种于6孔板中,待贴壁生长后,分别给予相应处理因素干预24 h。处理结束后,弃去培养基,用PBS缓冲液洗涤2次,随后加入 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MitoSOX Red工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min,避光条件下完成染色。染色结束后,用PBS再次轻柔洗涤细胞3次,固定后于激光共聚焦显微镜下采集图像。荧光激发波长为510 nm,发射波长为580 nm,线粒体ROS呈红色荧光信号。随机选择多个视野进行拍摄,并采用Image J软件进行荧光强度的半定量分析,代表图来自各组中最具代表性的典型视野。

2.11 JC-1检测线粒体膜电位 将HCT116细胞以 5×10^5 个/孔的密度接种于6孔板中,待贴壁生长后,分别给予相应处理因素干预24 h。处理结束后,弃去培养基,用PBS缓冲液洗涤2次,随后加入JC-1工

作液,37℃孵育20 min,避光条件下完成染色。染色结束后,用JC-1染色缓冲液轻柔洗涤细胞3次,于倒置荧光显微镜下采集图像。高膜电位状态下JC-1聚集于线粒体形成J-聚集体,发出红色荧光;而低膜电位状态下JC-1以单体形式存在,发出绿色荧光。分别使用激发波长为525 nm(绿色)与585 nm(红色)通道进行成像。随机选择多个视野进行拍摄,并采用Image J软件进行红/绿荧光强度比值的半定量分析。

2.12 免疫荧光染色检测 iNOS-ARG1 共定位表达 将HCT116细胞以 5×10^5 个/孔的密度接种于含盖玻片的6孔板中,待细胞贴壁生长稳定后,分别给予相应处理因素干预24 h。处理结束后,弃去培养基,使用PBS缓冲液洗涤2次,随后加入4%多聚甲醛固定细胞10 min,再以0.1% Triton X-100渗透处理10 min。之后加入5%牛血清白蛋白(BSA)封闭液室温封闭30 min,并分别加入一抗抗体:兔抗-iNOS抗体(1:500)和兔抗-ARG1抗体(1:500),4℃条件下孵育过夜。次日弃去一抗,用PBS洗涤3次后,加入Alexa Fluor 594标记的抗兔IgG(1:1 000)和Alexa Fluor 488标记的抗小鼠IgG二抗(1:2 000),于室温避光孵育1 h。染色结束后,用PBS洗涤3次,并用含DAPI的抗荧光淬灭封片液封片。最终于激光共聚焦荧光显微镜下分别使用激发波长为488 nm(绿色,ARG1)、594 nm(红色,iNOS)及405 nm(蓝色,DAPI)通道进行成像。每组随机选择多个视野进行图像采集,并采用Image J软件进行荧光强度及共定位关系的分析。

2.13 精氨酸代谢物试剂盒检测 将HCT116细胞以 5×10^5 个/孔的密度接种于6孔板中,待细胞贴壁生长后,分别给予相应处理因素干预24 h。处理结束后,弃去培养基,使用预冷PBS缓冲液洗涤细胞2次,刮取细胞后于离心管中收集,并通过超声波细胞破碎法裂解细胞,4℃条件下 $12\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清备用。随后按照L-精氨酸、尿素及瓜氨酸含量检测试剂盒说明书要求,分别取适量样本加入反应体系中,在室温或37℃条件下孵育特定时间后,于酶标仪上读取相应波长下的A,L-精氨酸在波长520 nm,尿素在波长625 nm,瓜氨酸在波长450 nm。根据标准曲线换算样品中对应代谢物的浓度,L-精氨酸和瓜氨酸分别以 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 蛋白计,尿素以 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 计。每组设3个重复孔,并重复3次实验,最终结果取平均值进行统计分析。

2.14 Western blot检测 iNOS、ARG1、MFN2、DRP1 蛋白表达 将HCT116细胞以 5×10^5 个细胞/孔的密度接种于6孔板中,待细胞贴壁生长后,分别给予相应处理因素干预24 h。处理结束后,弃去培养基,用预冷PBS缓冲液洗涤细胞,刮取细胞并用RIPA裂解液(含蛋白酶抑制剂)裂解,总蛋白经4℃、 $12\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min后取上清,使用BCA法测定蛋白浓度。每组取20 μg 等量蛋白样品,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后转膜至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜。用5%脱脂奶粉封闭膜1 h后,分别加入一抗兔抗iNOS(1:2 000)和兔抗ARG1(1:1 000),兔抗MFN2(1:3 000)、兔抗DRP1(1:2 000)于4℃孵育过夜。次日,PBS-T洗膜3次后加入HRP标记的兔二抗(1:8 000),室温孵育1 h。洗膜后使用ECL化学发光试剂盒显影,于凝胶成像系统下获取图像。以 β -actin为内参进行归一化处理,采用Image J软件对条带灰度进行半定量分析,灰度分析为3次重复实验结果的平均值。

2.15 统计学分析 所有实验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用R语言(版本4.5.0)及相关统计分析包进行数据处理与分析。对各组数据进行正态性检验及方差齐性检验,若满足正态分布及方差齐性,采用单因素方差分析,并结合最小显著差异法进行组间两两比较;若不满足正态性或方差齐性,则采用非参数检验,并结合Dunn's检验进行多组比较。统计显著性以P值判断, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 精氨酸代谢紊乱HCT116细胞模型建立 与空白组比较,IFN- γ 在 $10\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下对细胞活力无显著影响,而当浓度升高至 $20\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 及以上时,24 h和48 h细胞活力均显著下降($P < 0.01$)。Nor-NOHA在 $200\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下细胞活力基本保持良好,而在 $200\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $400\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度处理后,细胞活力分别于24 h和48 h出现明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表1。综合不同浓度与时间点的细胞耐受性及后续机制激活需求,最终确定IFN- γ ($10\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)和Nor-NOHA($200\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)作为联合干预剂量24 h,用于构建以iNOS上调、ARG1下调为特征的精氨酸代谢紊乱HCT116细胞模型。

3.2 健脾消癌方抑制精氨酸代谢紊乱HCT116细胞增殖 与空白组比较,模型组HCT116细胞活力及EdU增殖率无显著下降,但克隆形成率轻度下降($P < 0.05$)。与模型组比较,健脾消癌方含药血清5%、

表1 不同浓度IFN- γ /Nor-NOHA单独处理HCT116细胞后细胞活力($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 1 Cell viability of HCT116 cells treated with different concentrations of IFN- γ or Nor-NOHA alone ($\bar{x}\pm s, n=3$) %

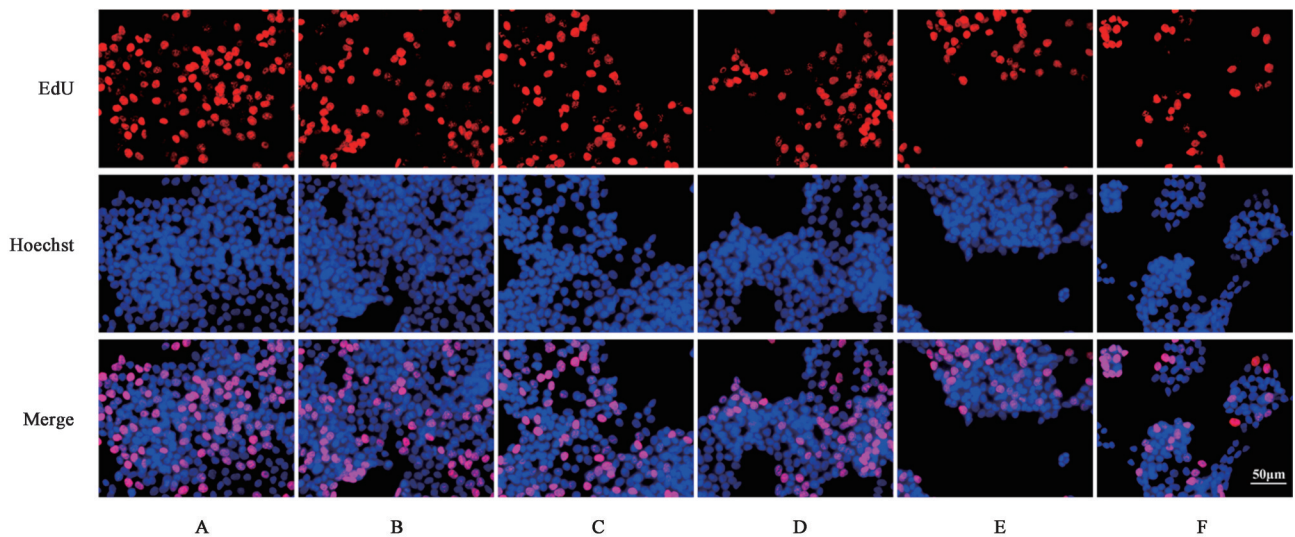
组别	浓度	24 h细胞活力	48 h细胞活力
空白组		100.92 \pm 0.81	99.65 \pm 2.20
IFN- γ 组	5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	99.98 \pm 2.49	97.50 \pm 2.58
	10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	97.56 \pm 3.40	96.53 \pm 2.44
	20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	91.67 \pm 1.07 ²⁾	87.88 \pm 1.58 ²⁾
	50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	83.06 \pm 3.33 ²⁾	78.51 \pm 2.60 ²⁾
空白组		102.09 \pm 2.82	100.38 \pm 3.48
Nor-NOHA组	50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	101.94 \pm 1.49	95.15 \pm 0.62
	100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	96.45 \pm 2.19	90.40 \pm 1.50 ¹⁾
	200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	95.02 \pm 0.28 ¹⁾	88.57 \pm 4.76 ¹⁾
	400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	88.16 \pm 1.59 ²⁾	73.26 \pm 0.84 ²⁾

注:与相应空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$

10%、20%干预可明显降低细胞活力、EdU阳性比例及克隆形成率,均呈浓度依赖性下降($P<0.05$,

$P<0.01$)。其中,JPXAP-H组最明显。与模型组比较,PC在多项指标中均表现出显著抑制作用,差异具有统计学意义($P<0.01$)。上述结果表明,健脾消癌方可有效抑制精氨酸代谢紊乱状态下HCT116细胞的短期与长期增殖,且具有明显的浓度依赖性。见图1、图2、表2。

3.3 健脾消癌方抑制精氨酸代谢紊乱HCT116细胞侵袭和转移 空白组与模型组HCT116细胞穿膜细胞数差异无统计学意义,细胞迁移率变化稍降低($P<0.05$)。与模型组比较,健脾消癌方含药血清5%、10%、20%干预可显著抑制细胞穿膜细胞数并降低划痕愈合率,均呈剂量依赖性下降($P<0.01$)。其中,JPXAP-H组最为显著。与模型组比较,阳性对照组表现出最强的抑制作用($P<0.01$)。结果提示健脾消癌方在精氨酸代谢紊乱背景下可显著抑制HCT116细胞的侵袭与迁移能力,且具有明显的剂量依赖性。见表3、图3、图4。



注:A.空白组;B.模型组;C.JPXAP-L组;D.JPXAP-M组;E.JPXAP-H组;F.PC组(图2-图9同)

图1 健脾消癌方对HCT116增殖能力的影响(Edu, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of Jianpi Xiaoi prescription on HCT116 cell proliferation by EdU assay (Edu, $\times 200$)

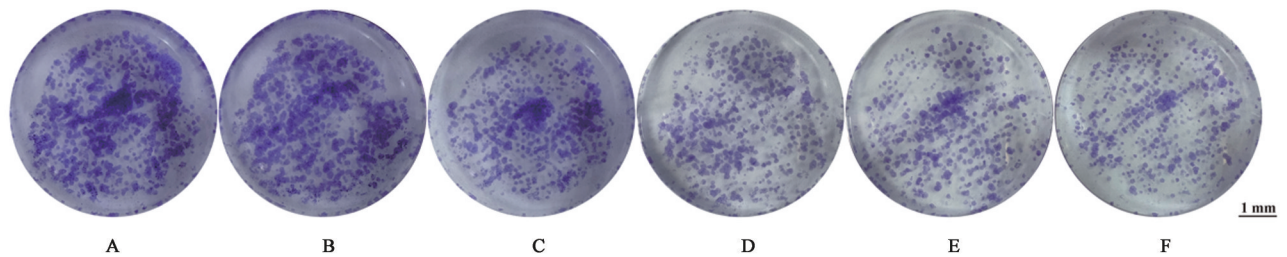


图2 健脾消癌方对HCT116长期增殖的影响(结晶紫, $\times 100$)

Fig. 2 Effect of Jianpi Xiaoi prescription evaluation on long-term proliferative capacity of HCT116 cells (Crystal, $\times 100$)

3.4 健脾消癌方诱导精氨酸代谢紊乱HCT116细胞线粒体结构和功能损伤 与空白组比较,模型组

HCT116细胞线粒体略有肿胀,部分嵴断裂,提示精氨酸代谢紊乱初步引起线粒体损伤。与模型组比

表 2 健脾消癌方对 HCT116 细胞活力、增殖能力及克隆形成率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of Jianpi Xiaoi prescription on cell viability, proliferative capacity, and colony prescription rate of HCT116 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$) %

组别	CCK-8	EdU 增殖率	克隆形成率
空白组	100.67±0.84	42.13±2.11	47.63±1.40
模型组	99.20±2.00	40.71±3.24	44.37±1.10 ¹⁾
JPXAP-L 组	93.25±2.06 ³⁾	33.94±3.69 ²⁾	36.27±0.84 ³⁾
JPXAP-M 组	86.74±1.17 ³⁾	26.91±0.80 ³⁾	27.69±1.70 ³⁾
JPXAP-H 组	78.73±2.39 ³⁾	21.27±2.36 ³⁾	23.20±1.36 ³⁾
PC 组	71.16±1.35 ³⁾	17.64±3.04 ³⁾	18.19±1.17 ³⁾

注: JPXAP-L 组、JPXAP-M 组、JPXAP-H 组给药体积分数分别为 5%、10%、20% 健脾消癌方含药血清, PC 组给药浓度为 IFN- γ (20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)+Nor-NOHA (400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (表 3-表 6 同)。与空白组比较¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ (表 4-表 6 同)

较, JPXAP-L 组线粒体结构较模型组进一步紊乱, 嵴塌陷明显, 出现轻度空泡化趋势。JPXAP-M 组及 JPXAP-H 组细胞中线粒体膜结构模糊、断裂, 嵴

表 3 健脾消癌方对 HCT116 细胞侵袭和迁移的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Jianpi Xiaoi prescription on invasion and migration of HCT116 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	穿膜细胞数/个	迁移率/%
空白组	123.67±4.73	64.85±2.66
模型组	122.67±6.51	57.47±1.04 ¹⁾
JPXAP-L 组	94.33±2.52 ²⁾	48.70±1.83 ²⁾
JPXAP-M 组	78.00±1.00 ²⁾	40.81±3.47 ²⁾
JPXAP-H 组	49.00±1.00 ²⁾	28.88±4.65 ²⁾
PC 组	30.67±3.06 ²⁾	16.91±0.58 ²⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较²⁾ $P<0.01$

结构严重破坏, 伴有显著的肿胀和空泡化现象, 提示健脾消癌方在该状态下可加重线粒体超微结构损伤, 并呈现剂量依赖性。PC 组线粒体肿胀严重, 结构紊乱, 嵴几乎完全丢失, 为阳性应激对照。提示在精氨酸代谢紊乱背景下, 健脾消癌方可能进一步诱导 HCT116 细胞线粒体结构的损伤。见图 5。

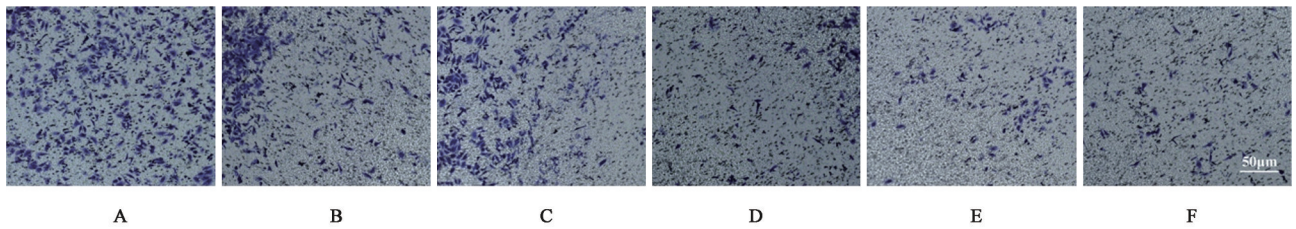


图 3 健脾消癌方对 HCT116 侵袭的影响 (Transwell, $\times 200$)

Fig. 3 Effect of Jianpi Xiaoi prescription on HCT116 cell invasion (Transwell, $\times 200$)

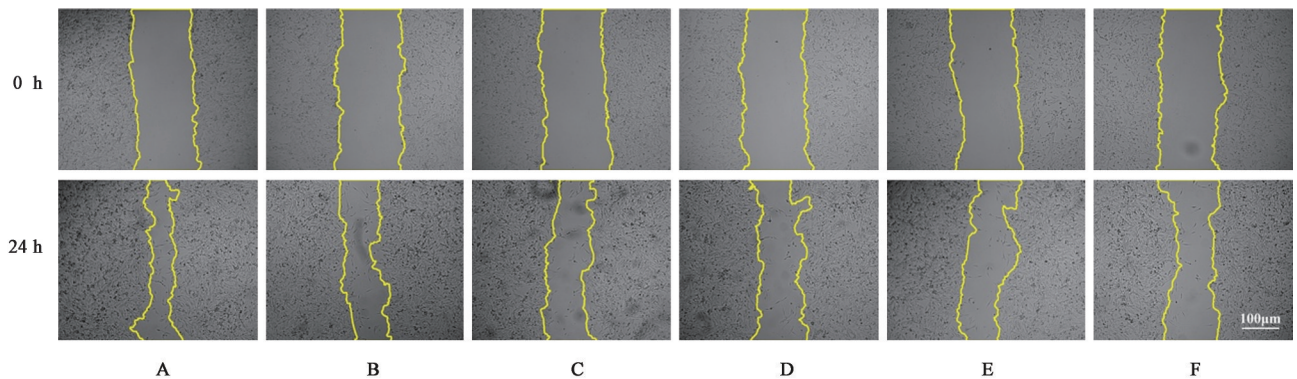


图 4 健脾消癌方对 HCT116 转移的影响 (倒置显微镜, $\times 100$)

Fig. 4 Effect of Jianpi Xiaoi prescription on HCT116 cell migration (inverted microscope, $\times 100$)

与空白组比较, 模型组细胞线粒体 ROS 荧光信号明显增强 ($P<0.05$)。在此基础上, 与模型组比较, 健脾消癌方含药血清 5%、10%、20% 干预可进一步加重 mito-ROS 积聚, 且呈明显的剂量依赖性变化 ($P<0.05, P<0.01$)。与模型组比较, PC 组中细胞线粒体 ROS 信号最强 ($P<0.01$)。在精氨酸代谢紊乱背景下, 健脾消癌方进一步促进线粒体 ROS 积聚,

提示其可能在特定条件下激活氧化应激通路, 加重线粒体损伤。见图 6、表 4。

与空白组比较, 模型组细胞红/绿荧光强度比值明显降低 ($P<0.05$)。与模型组比较, 健脾消癌方含药血清 5%、10%、20% 干预可进一步促进 MMP 的去极化过程, 表现为红/绿荧光随健脾消癌方浓度升高呈明显递减趋势 ($P<0.05, P<0.01$), 且呈明显浓度依赖性。与模

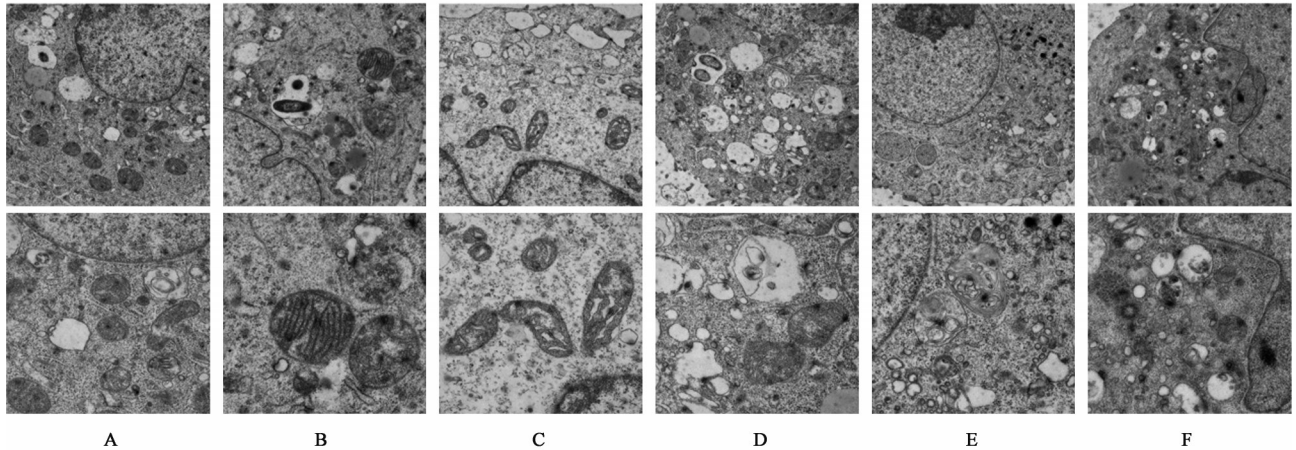


图5 健脾消癌方对HCT116线粒体微观结构的影响(透射电镜,×7000)

Fig. 5 Effect of Jianpi Xiaoi prescription on mitochondrial ultrastructure in HCT116 cells (TEM, ×7000)

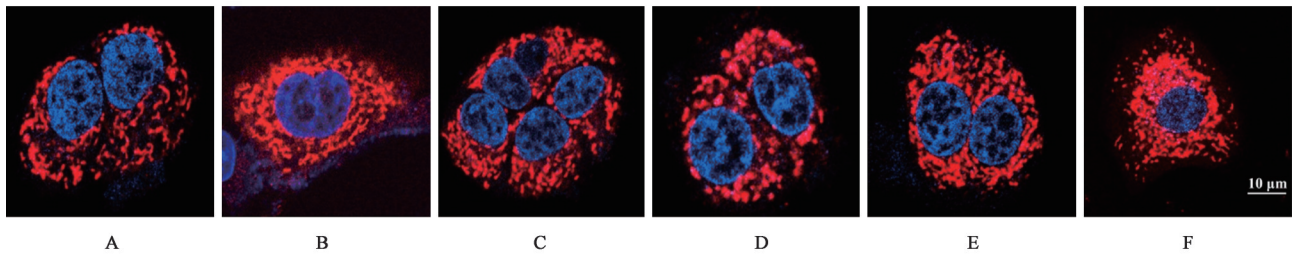


图6 健脾消癌方对HCT116 mito-ROS的影响(MitoSOX,×400)

Fig. 6 Effect of Jianpi Xiaoi prescription on mito-ROS in HCT116 cells (MitoSOX, ×400)

表4 健脾消癌方对HCT116细胞 mito-ROS水平与MMP的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Jianpi Xiaoi prescription on mitochondrial ROS levels and mitochondrial membrane potential (MMP) in HCT116 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	mito-ROS 荧光强度/%	JC-1 红/绿荧光比值
空白组	100.20±1.26	1.26±0.04
模型组	107.27±2.79 ¹⁾	1.04±0.04 ¹⁾
JPXAP-L组	118.27±4.74 ²⁾	0.94±0.02 ²⁾
JPXAP-M组	130.99±3.79 ³⁾	0.77±0.01 ³⁾
JPXAP-H组	141.33±0.66 ³⁾	0.64±0.02 ³⁾
PC组	155.15±3.01 ³⁾	0.51±0.03 ³⁾

型组比较,PC组细胞线粒体膜电位最为严重受损,差异显著($P<0.01$)。在精氨酸代谢紊乱背景下,健脾消癌方进一步加重线粒体膜电位去极化状态,提示其可能诱导线粒体功能障碍。见表4、图7。

3.5 健脾消癌方调节 iNOS-ARG1 平衡诱导 HCT116 细胞精氨酸代谢紊乱 与空白组比较,模型组 HCT116 细胞中 iNOS 荧光强度明显增强,ARG1 表达显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,健脾消癌方含药血清 5%、10%、20% 干预可进一步加重该代谢通路的失衡,表现为 iNOS 表达持续增强而 ARG1 进一步抑制, iNOS-ARG1 比值随药物升高明显下降($P<$

$0.05, P<0.01$), 并呈剂量依赖性变化趋势。与模型组比较,PC 组比值降至最低($P<0.01$)。此外,与模型组比较,健脾消癌方干预后 HCT116 细胞中 L-精氨酸、尿素随剂量升高而明显降低,瓜氨酸水平随剂量升高而明显升高($P<0.05, P<0.01$),进一步提示健脾消癌方通过调控 ARG1/iNOS 信号通路,促进精氨酸代谢重编程。见图8、表5。

与空白组比较,模型组中 iNOS 和 DRP1 蛋白表达水平升高,而 MFN2 及 ARG1 表达明显下降($P<0.05$)。与模型组比较,健脾消癌方含药血清 5%、10%、20% 干预可进一步明显增强 iNOS 和 DRP1 表达,同时进一步抑制 MFN2 和 ARG1 表达($P<0.05, P<0.01$),并呈现浓度依赖性。与模型组比较,PC 组作用最为显著,其 iNOS、DRP1 表达升高, MFN2 及 ARG1 分别下降($P<0.01$)。上述结果表明,健脾消癌方可通过调控 iNOS-ARG1 及 MFN2/DRP1 的表达,扰乱线粒体动力学过程,可能诱导线粒体功能障碍并促进细胞损伤。见表6、图9。

4 讨论

结直肠癌作为高发性消化道恶性肿瘤,其侵袭性强、易复发与转移,严重影响患者预后,TME 中的氨基酸代谢重构,尤其是精氨酸代谢异常,已成为

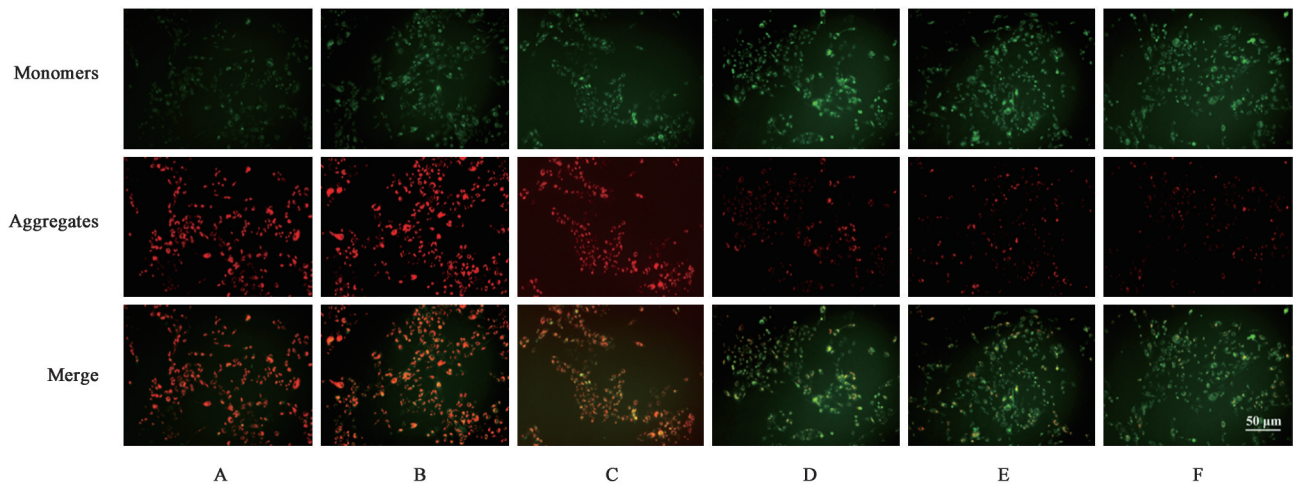


图7 健脾消癌方对HCT116线粒体膜电位的影响(JC-1,×200)

Fig. 7 Effect of Jianpi Xiaoi prescription on mitochondrial membrane potential in HCT116 cells (JC-1,×200)

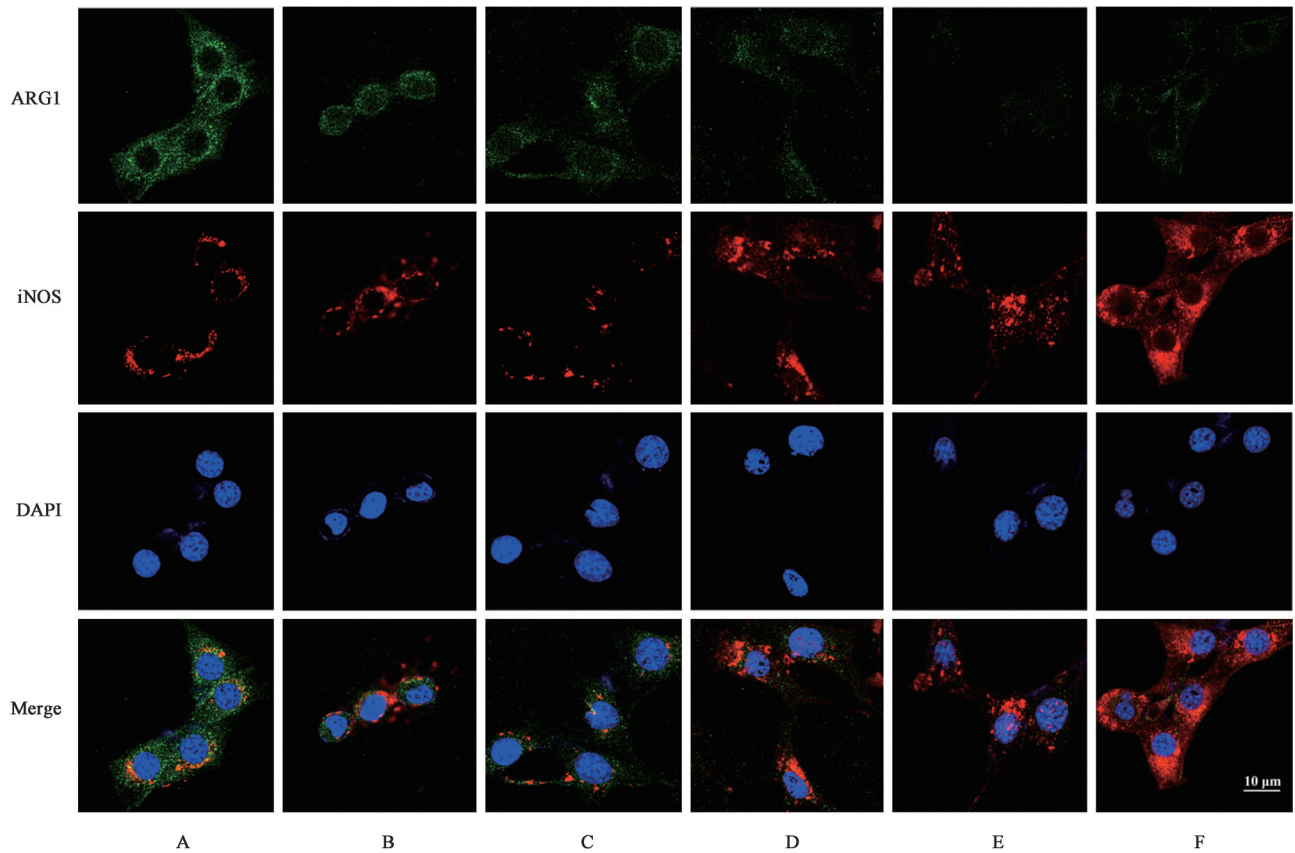


图8 健脾消癌方对HCT116中iNOS-ARG1平衡的影响(免疫荧光双染,×400)

Fig. 8 Effect of Jianpi Xiaoi prescription on iNOS-ARG1 balance in HCT116 cells (IF double,×400)

影响氧化应激水平、细胞凋亡及免疫逃逸的重要因素^[23]。iNOS与ARG1分别代表精氨酸向NO及尿素通路的代谢分流,两者底物竞争关系直接决定了肿瘤局部代谢及免疫状态^[24]。一旦平衡失调,iNOS途径持续激活将导致反应性氮物种过量产生,引发线粒体损伤与细胞功能障碍^[6]。基于此,本研究以iNOS-ARG1代谢轴为切入点,构建IFN- γ 与

Nor-NOHA联合诱导的HCT116细胞代谢紊乱模型,系统评估健脾消癌方对其增殖、迁移能力及线粒体稳态的影响,旨在从代谢-线粒体轴探讨中医药干预肿瘤代谢适应的机制基础。

健脾消癌方由经典方六君子汤加减化裁而来,方中党参、白术、茯苓、法半夏健脾益气、调畅中焦,黄芪增强正气、扶助抗癌之本,配伍白花蛇舌草、半

表5 健脾消癌方对HCT116细胞精氨酸代谢的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Jianpi Xiaocai prescription on arginine metabolism in HCT116 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	AGR1/iNOS	L-精氨酸/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	尿素/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	瓜氨酸/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$
空白组	3.15±0.09	211.67±3.82	22.50±0.60	9.83±0.35
模型组	2.39±0.01 ¹⁾	204.83±5.91 ¹⁾	20.33±0.61 ¹⁾	15.33±0.47 ¹⁾
JPXAP-L组	1.77±0.06 ²⁾	198.77±3.42 ²⁾	20.33±1.06 ²⁾	18.20±0.71 ³⁾
JPXAP-M组	1.24±0.06 ³⁾	178.90±6.40 ³⁾	17.80±0.36 ³⁾	20.20±0.56 ³⁾
JPXAP-H组	0.71±0.08 ³⁾	158.07±5.21 ³⁾	15.60±0.71 ³⁾	22.80±0.30 ³⁾
PC组	0.26±0.02 ³⁾	135.57±6.86 ³⁾	13.50±0.76 ³⁾	25.30±0.42 ³⁾

表6 健脾消癌方对HCT116细胞内iNOS/MFN2/DRP1/ARG1蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of Jianpi Xiaocai prescription on protein expression levels of iNOS, MFN2, DRP1, and ARG1 in HCT116 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	iNOS/ β -actin	MFN2/ β -actin	DRP1/ β -actin	ARG1/ β -actin
空白组	0.30±0.01	1.00±0.01	0.29±0.01	0.99±0.02
模型组	0.35±0.01 ¹⁾	0.89±0.03 ¹⁾	0.46±0.01 ¹⁾	0.89±0.02 ¹⁾
JPXAP-L组	0.39±0.01 ³⁾	0.86±0.03 ³⁾	0.50±0.02 ²⁾	0.84±0.03 ²⁾
JPXAP-M组	0.60±0.02 ³⁾	0.70±0.03 ³⁾	0.71±0.01 ³⁾	0.65±0.03 ³⁾
JPXAP-H组	0.80±0.02 ³⁾	0.54±0.02 ³⁾	0.86±0.03 ³⁾	0.49±0.02 ³⁾
PC组	1.02±0.04 ³⁾	0.40±0.01 ³⁾	0.99±0.04 ³⁾	0.30±0.01 ³⁾

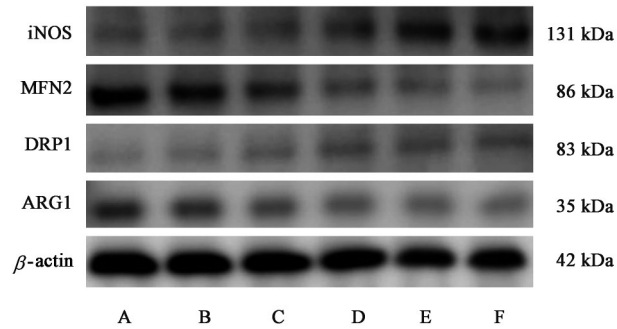


图9 HCT116细胞iNOS/MFN2/DRP1/ARG1蛋白表达电泳

Fig. 9 Electrophoresis of protein expression of iNOS, MFN2, DRP1, and ARG1 in HCT116 cells

枚莲、菝葜清热解毒、软坚散结，重楼入肝散瘀，甘草调和诸药。方以益气健脾为本，佐以解毒化瘀、软坚散结之功，契合“脾虚湿毒”“体寒瘤热”之结直肠癌中医病机。本团队前期研究表明^[11,25]，该方可通过多通路协同抑制结直肠癌细胞增殖、迁移、凋亡及肿瘤微环境免疫抑制，联合化疗方案亦可改善治疗耐受性，提升生活质量。然其是否可通过调控代谢-线粒体轴从代谢源头实现抗肿瘤作用，尚缺乏系统机制证据。

本研究中，构建的IFN- γ /Nor-NOHA诱导HCT116细胞精氨酸代谢紊乱模型，成功诱导iNOS上调、ARG1下调，并伴有L-精氨酸消耗、瓜氨酸积聚、尿素合成减少的代谢表型，符合TME中典型的精氨酸代谢紊乱特征^[20]。然而也需指出，iNOS蛋白水平的上调幅度相对有限，灰度分析与空白组比

较变化不大。该结果可能受以下因素影响：一是诱导时间设置为24 h，可能尚未达到iNOS表达的最大诱导水平；二是iNOS在细胞内表达受反馈调控，其功能主要通过NO产量和下游信号实现，而非单一依赖蛋白表达量^[26]。但ARG1表达显著抑制、下游代谢产物显著改变，仍表明该模型在功能上成功诱导了以iNOS主导的代谢偏移。此外，尽管IFN- γ /Nor-NOHA诱导的模型组在短期内并未表现出与对照组明显的差别，但这并不否认精氨酸代谢紊乱在CRC发展中的重要性。其原因可能在于本研究构建的是一种“亚致死应激”模型，旨在模拟肿瘤细胞在代谢负荷初期尚可维持代谢适应的状态，而非完全失控的肿瘤恶性进展阶段。已有研究表明，在此类状态下，细胞可通过重新编程代谢通路来暂时维持生存和功能，而这一阶段正是干预的“敏感窗口”^[27]。因此，在该背景下进一步施加药物干预，能够真实反映中药对代谢适应-氧化损伤-功能障碍链条的影响，也更加符合肿瘤慢性演进过程中干预介入的时间逻辑。

本研究进一步发现，在iNOS-ARG1失衡背景下，健脾消癌方可显著抑制HCT116细胞的增殖(Edu)、长期克隆能力、侵袭(Transwell)及迁移(划痕愈合)，且呈明显剂量依赖性，表明其抗肿瘤效应在代谢紊乱背景下被放大。近年来，iNOS-ARG1平衡与线粒体氧化损伤之间的机制联系逐渐成为肿瘤代谢研究的重要焦点。一方面，iNOS活性增强将

促进NO生成,而过量NO在细胞内与超氧阴离子反应生成强氧化因子——过氧亚硝酸盐(ONOO⁻),可引发线粒体膜脂过氧化、电子传递链复合物抑制及mtDNA损伤^[28]。另一方面,ARG1表达下调使L-精氨酸大量进入NO通路,加剧氧氮应激反应,在高RNS背景下激活线粒体膜通透性转换孔(mPTP)开放,导致膜电位丧失(MMP下降)和细胞色素C外泄^[29]。此外,NO与RNS还可通过蛋白S-亚硝基化调控线粒体动力学蛋白功能,抑制融合蛋白MFN2表达、激活裂解蛋白DRP1,从而打破线粒体网络平衡,形成结构与功能双重障碍^[30]。基于此,本研究在iNOS-ARG1失衡模型中观察到mito-ROS水平上升、MMP下降及线粒体形态破坏,为上述分子通路提供了实验支撑,也为健脾消癌方通过“代谢-氧化应激-线粒体损伤”链条实现抗肿瘤效应提供了理论依据。

在机制方面,健脾消癌方可能通过三方面协同发挥作用,(1)精氨酸代谢重塑:免疫荧光共染与Western blot结果显示,健脾消癌方进一步增强iNOS表达、抑制ARG1水平,显著降低ARG1/iNOS比值,并加剧瓜氨酸积聚与L-精氨酸耗竭,提示其可放大iNOS主导的NO生成信号通路,驱动精氨酸代谢重编程。这一通路的持续激活可能导致细胞进入“氧氮应激失衡”状态,从而触发损伤级联反应^[31]。(2)线粒体过氧化损伤:JC-1与MitoSOX实验结果表明,健脾消癌方在上述代谢状态下进一步加剧线粒体ROS积聚与膜电位去极化(MMP下降),诱导线粒体氧化损伤,与NO/RNS超负荷引发线粒体mPTP开启、线粒体凋亡通路激活密切相关^[32]。(3)线粒体结构损伤和功能障碍:Western blot数据显示,健脾消癌方剂量依赖性下调线粒体融合蛋白MFN2、上调裂解相关蛋白DRP1,提示其可能促进线粒体裂解、抑制融合,破坏线粒体网络稳态,形成代谢与形态协同受损的线粒体功能障碍表型,这一机制在氧化应激诱导的肿瘤细胞死亡模型中已被广泛证实^[33]。基于上述结果,健脾消癌方在精氨酸代谢失衡背景下具有“代谢应激放大器”效应,其通过促进mito-ROS积聚、扰乱线粒体动态平衡,激活线粒体依赖性细胞损伤程序,抑制结肠癌细胞增殖、迁移。该机制不仅揭示了中医药在精氨酸代谢重编程干预中的潜力,也为未来联合ARG1抑制剂、NO合酶调控剂等代谢抑制剂提供了理论支持。

综上所述,本研究系统提出健脾消癌方可通过调控iNOS-ARG1代谢平衡,诱导mito-ROS积聚和线粒体功能障碍,抑制HCT116结肠癌细胞的增殖

与转移,为中医药在“代谢-线粒体”调控轴干预结肠癌进展提供了新思路。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] LI Q, XIA C, LI H, et al. Disparities in 36 cancers across 185 countries: Secondary analysis of global cancer statistics[J]. *Front Med*, 2024, 18(5):911-920.
- [2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3):209-249.
- [3] CHEN J, ZHU H, YIN Y, et al. Colorectal cancer: Metabolic interactions reshape the tumor microenvironment[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2022, 1877(5):188797.
- [4] MARKOV N, SABIROVA S, SHARAPOVA G, et al. Mitochondrial, metabolic and bioenergetic adaptations drive plasticity of colorectal cancer cells and shape their chemosensitivity[J]. *Cell Death Dis*, 2025, 16(1):253.
- [5] CHEN C L, HSU S C, ANN D K, et al. Arginine signaling and cancer metabolism[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(14):3541.
- [6] MARZĘTA-ASSAS P, JACENIK D, ZASŁONA Z. Pathophysiology of arginases in cancer and efforts in their pharmacological inhibition[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(18):9782.
- [7] IKEDA H, KAWASE K, NISHI T, et al. Immune evasion through mitochondrial transfer in the tumour microenvironment[J]. *Nature*, 2025, 638(8049):225-236.
- [8] 王佳艺,王其美,蒋益兰. 蒋益兰基于“体寒瘤热”治疗大肠癌肝转移经验[J]. *中医药导报*, 2024, 30(9):111-113.
WANG J Y, WANG Q M, JIANG Y L. Experience of using thermal-cold tumor heat syndrome in treating colorectal cancer with liver metastasis[J]. *Chin J Tradit Med Sci*, 2024, 30(9):111-113.
- [9] 唐迎港,张晓维,何兰,等. 基于“体寒瘤热”探析恶性肿瘤的病机与治疗[J]. *北京中医药大学学报*, 2024, 47(7):998-1004.
TANG Y G, ZHANG X W, HE L, et al. Investigation on pathogenesis and treatment of malignant tumors from the perspective of cold-body-heat-tumor syndrome [J]. *Beijing Univ Tradit Chin Med*, 2024, 47(7):998-1004.
- [10] 罗燕,曾普华,蒋益兰,等. 健脾消癌方干预结肠癌细胞HCT116来源外泌体中miR-21调控CAF的活化与糖酵解的研究[J]. *中药药理与临床*, 2023, 39(6):2-7.
LUO Y, ZENG P H, JIANG Y L, et al. SJXA formula intervention on miR-21 in exosomes from HCT116 cells regulates activation of CAFs and glycolysis [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2023, 39(6):2-7.
- [11] 何威华,邓兰,蒋益兰. 健脾消癌方对结肠癌HCT116细胞增殖、侵袭及迁移的影响及机制研究[J]. *中医学报*, 2023, 38(12):2639-2646.
HE W H, DENG L, JIANG Y L. Effect and mechanism of SJXA formula on proliferation, invasion and migration of HCT116 colorectal cancer cells[J]. *Acta Chin Med*, 2023, 38(12):2639-2646.
- [12] 王莉,宋程,唐蔚. 基于UPLC-Q-TOF-MS结合网络药理学

- 与实验验证探讨健脾消癌方治疗结直肠癌作用机制[J]. 中国中医药信息杂志, 2024, 31(3): 26-33.
- WANG L, SONG C, TANG W. Mechanism investigation of SJXA formula in treating colorectal cancer based on UPLC-Q-TOF-MS, network pharmacology and experimental verification [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*, 2024, 31(3): 26-33.
- [13] 简小兰, 宁康文, 杨家翔, 等. 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[J]. 中国实验方剂学杂志, 2026, 32(6): 120-130.
- JIAN X L, NING K W, YANG J X, et al. SJXA decoction ameliorates chemoresistance in colorectal cancer via FGF2-mediated inhibition of PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2026, 32(6): 120-130.
- [14] 王容容, 王其美, 蒋益兰, 等. 健脾消癌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. Clinical study on JXSXF formula combined with chemotherapy for advanced metastatic colorectal cancer [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2016, 31(5): 1732-1736.
- [15] 宋琳, 胡灿红, 蒋益兰, 等. 瑞戈非尼联合健脾消癌方对结直肠癌的临床疗效及免疫功能的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(7): 1226-1230.
- SONG L, HU C H, JIANG Y L, et al. Regorafenib combined with JXSXF formula improves clinical efficacy and immune function in colorectal cancer [J]. *J Hunan Univ Chin Med*, 2024, 44(7): 1226-1230.
- [16] 杨伊, 苏永华, 贾嘉莉, 等. 健脾消癌汤联合 FOLFIRI 方案化疗治疗脾肾亏虚证晚期结肠癌患者的临床疗效及对其血清 FLI-1/Klotho 信号通路的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2024, 19(5): 1005-1010, 1015.
- YANG Y, SU Y H, JIA J N, et al. SJXT decoction combined with FOLFIRI regimen for advanced colon cancer: Clinical efficacy and effects on serum FLI-1/Klotho signaling pathway [J]. *World J Integr Tradit West Med*, 2024, 19(5): 1005-1010, 1015.
- [17] 孟雪, 吴鸿. 中药含药血清制备的研究进展与思考[J]. 辽宁中医杂志, 2025, 52(6): 122-124.
- MENG X, WU H. Progress and reflections on preparation of medicated serum from Chinese herbal medicine [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 2025, 52(6): 122-124.
- [18] 林陶秀, 张文娟, 张悦健, 等. 最佳中药含药血清浓度的筛选方法研究现状[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(2): 195-202.
- LIN T X, ZHANG W J, ZHANG Y J, et al. Current methods for screening optimal concentrations of herbal medicated serum [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2023, 29(2): 195-202.
- [19] JING Z L, LIU G L, ZHOU N, et al. Interferon- γ in the tumor microenvironment promotes the expression of B7H4 in colorectal cancer cells, thereby inhibiting cytotoxic T cells [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 6053.
- [20] WANG J, DENG S, CHENG D, et al. Engineered microparticles modulate arginine metabolism to repolarize tumor-associated macrophages for refractory colorectal cancer treatment [J]. *J Transl Med*, 2024, 22(1): 908.
- [21] SOMASUNDARAM V, BASUDHAR D, BHARADWAJ G, et al. Molecular mechanisms of nitric oxide in cancer progression, signal transduction, and metabolism [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2019, 30(8): 1124-1143.
- [22] KIELER M, HOFMANN M, SCHABBAUER G. More than just protein building blocks: How amino acids and related metabolic pathways fuel macrophage polarization [J]. *FEBS J*, 2021, 288(12): 3694-3714.
- [23] DU T, HAN J. Arginine metabolism and its potential in treatment of colorectal cancer [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 658861.
- [24] RATH M, MÜLLER I, KROPF P, et al. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: Two competing arginine pathways in macrophages [J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 532.
- [25] 李思思, 徐伟鸿, 廖菁菁, 等. 蒋益兰基于“体寒瘤热”治疗结直肠癌的经验[J]. 中医药导报, 2024, 30(3): 152-155.
- LI S S, XU W H, LIAO J J, et al. Experience in treating colorectal cancer based on cold-body-tumor-heat syndrome by JIANG Yilan [J]. *Chin J Tradit Med Sci*, 2024, 30(3): 152-155.
- [26] LIAO W, YE T, LIU H. Prognostic value of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in human cancer: A systematic review and meta-analysis [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 6304851.
- [27] HEIDEN M G V, DEBERARDINIS R J. Understanding the intersections between metabolism and cancer biology [J]. *Cell*, 2017, 168(4): 657-669.
- [28] VAN DEN B J, BAARDMAN J, OTTO N A, et al. Mitochondrial dysfunction prevents repolarization of inflammatory macrophages [J]. *Cell Rep*, 2016, 17(3): 684-696.
- [29] HUANG J, ZHAO Y, ZHAO K, et al. Function of reactive oxygen species in myeloid-derived suppressor cells [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1226443.
- [30] JEON M J, LEEM J, KO M S, et al. Mitochondrial dysfunction and activation of iNOS are responsible for the palmitate-induced decrease in adiponectin synthesis in 3T3L1 adipocytes [J]. *Exp Mol Med*, 2012, 44(9): 562-570.
- [31] SOSKIĆ S S, DOBUTOVIĆ B D, SUDAR E M, et al. Regulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and its potential role in insulin resistance, diabetes and heart failure [J]. *Open Cardiovasc Med J*, 2011, 5(1): 153-163.
- [32] KOROTKOV S M. Mitochondrial oxidative stress is the general reason for apoptosis induced by different-valence heavy metals in cells and mitochondria [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(19): 14459.
- [33] AGARWAL S, KARUPPUSAMY K A, GUPTA A K. Exploring mitochondrial dynamics and localization under cellular stress: A comprehensive insight [J]. *J Biosci*, 2025, 50(2): 23.

[责任编辑 张丰丰]