

## 仙连解毒方对人结直肠癌细胞增殖及糖酵解的 调控作用及机制

陶李蕙苹<sup>1,2</sup>, 赖岳阳<sup>2,3\*</sup>, 程海波<sup>1,2</sup>, 沈卫星<sup>1,2</sup>, 谭佳妮<sup>1,2</sup>, 徐长亮<sup>1,2</sup>, 余成涛<sup>1,2</sup>,  
范旻旻<sup>1,2</sup>, 李柳<sup>1,2</sup>, 沈政洁<sup>4</sup>

1. 南京中医药大学第一临床医学院, 南京 210023;
2. 江苏省中医药防治肿瘤协同创新中心, 南京 210023;
3. 南京中医药大学医学院·整合医学学院, 南京 210023;
4. 苏州大学附属张家港医院, 江苏苏州 215600)

**[摘要]** 目的:观察仙连解毒方对人结直肠癌细胞HCT-116增殖及糖酵解的影响,并探讨其潜在的分子机制。方法:采用噻唑蓝(MTT)比色法测定仙连解毒方处理结直肠癌细胞HCT-116后的存活率,细胞克隆形成实验和5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EDU)细胞增殖实验检测细胞增殖能力,葡萄糖试剂盒检测仙连解毒方处理结直肠癌HCT-116细胞48 h葡萄糖摄取量的变化,乳酸试剂盒检测仙连解毒方处理结直肠癌HCT-116细胞48 h乳酸生成量的变化,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测磷酸化雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR)、雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、葡萄糖转运蛋白1(GLUT1)、乳酸脱氢酶(LDHA)等糖酵解相关蛋白的表达,探讨仙连解毒方对结直肠癌糖酵解过程的影响。结果:仙连解毒方对结直肠癌HCT-116细胞的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为6.82 g·L<sup>-1</sup>;克隆形成实验和EDU细胞增殖实验表明,与空白组比较,仙连解毒方(1.625、3.25、6.50 g·L<sup>-1</sup>)均能明显抑制结直肠癌HCT-116细胞增殖(P<0.05, P<0.01);葡萄糖检测和乳酸检测表明,与空白组比较,仙连解毒方(1.625、3.25、6.50 g·L<sup>-1</sup>)能有效抑制葡萄糖摄取和乳酸生成(P<0.05, P<0.01),且有剂量依赖性;Western blot表明,与空白组比较,仙连解毒方(1.625、3.25、6.50 g·L<sup>-1</sup>)均能下调p-mTOR/mTOR、LDHA、GLUT1蛋白表达水平(P<0.05, P<0.01),且随剂量的增加而降低。结论:仙连解毒方对结直肠癌细胞的增殖和糖酵解中的瓦博格效应(Warburg)具有明显的抑制作用,其机制可能与调控mTOR信号通路,下调LDHA、GLUT1等糖酵解过程中的关键蛋白和酶类的表达水平有关。

**[关键词]** 结直肠癌; 仙连解毒方; 糖酵解; 增殖

**[中图分类号]** R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)08-0072-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220729

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220129.1445.009.html>

**[网络出版日期]** 2022-01-29 17:04

### Effect of Xianlian Jiedu Prescription on Proliferation and Glycolysis of Human Colorectal Cancer HCT-116 Cells and Mechanism

TAO Li-huiping<sup>1,2</sup>, LAI Yue-yang<sup>2,3\*</sup>, CHENG Hai-bo<sup>1,2</sup>, SHEN Wei-xing<sup>1,2</sup>, TAN Jia-ni<sup>1,2</sup>,  
XU Chang-liang<sup>1,2</sup>, YU Cheng-tao<sup>1,2</sup>, FAN Min-min<sup>1,2</sup>, LI Liu<sup>1,2</sup>, SHEN Zheng-jie<sup>4</sup>

1. The First Clinical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;
2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Traditional Chinese Medicine in Prevention and Treatment of Tumor, Nanjing 210023, China;
3. School of Medicine and Holistic Integrative Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;
4. Zhangjiagang Hospital Affiliated to Soochow University, Suzhou 215600, China)

**[收稿日期]** 2021-12-16

**[基金项目]** 国家自然科学基金重点项目(81930117);国家自然科学基金青年项目(82004310);江苏省自然科学基金青年项目(BK20190236);江苏省研究生培养创新工程研究生科研与实践创新计划项目(KYCX21\_1672)

**[第一作者]** 陶李蕙苹,在读博士,从事中医药肿瘤防治研究,E-mail:353171642@qq.com

**[通信作者]** \*赖岳阳,博士,讲师,从事中医药肿瘤防治研究,E-mail:laiyy@njucm.edu.cn

**[Abstract] Objective:** To explore the effect of Xianlian Jiedu prescription (XLJDP) on the proliferation and glycolysis of human colorectal cancer HCT-116 cells and the underlying mechanism. **Method:** HCT-116 cells were cultured with XLJDP and then the survival rate was examined by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The effect on the HCT116 cell proliferation was detected by colony formation assay and 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EDU) incorporation assay. The amount of glucose consumed by HCT-116 cells was measured by glucose test kit, and the amount of produced lactic acid was determined by lactic acid test kit 48 h after the treatment with XLJDP. The expression of glycolysis-related proteins mammalian target of rapamycin (mTOR), phosphorylated mTOR (p-mTOR), glucose transporter 1 (GLUT1), and lactate dehydrogenase (LDHA) was detected by Western blot. **Result:** The half-maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of XLJDP against HCT-116 cells was  $6.82 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Compared with the blank group, XLJDP ( $1.625, 3.25, 6.50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) inhibited the proliferation of HCT-116 cells ( $P<0.05, P<0.01$ ). Moreover, compared with the blank group, XLJDP ( $1.625, 3.25, 6.50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) suppressed glucose uptake and lactic acid production in a dose-dependent manner ( $P<0.05, P<0.01$ ). The expression of p-mTOR/mTOR, LDHA, and GLUT1 was down-regulated by XLJDP ( $P<0.05, P<0.01$ ). **Conclusion:** XLJDP can significantly inhibit the proliferation and the Warburg effect of glycolysis in colorectal cancer cells by regulating the mTOR signaling pathway and the down-regulating the expression of LDHA, GLUT1, and other key proteins and enzymes in glycolysis.

**[Keywords]** colorectal cancer; Xiaolian Jiedu prescription; glycolysis; proliferation

结直肠癌是全球第3大高发的恶性肿瘤,2020年全球癌症统计数据表明结直肠癌新发病例数超过190万,死亡病例数超过93.5万,死亡率位居全球第2位<sup>[1]</sup>。尽管近年来开展的早期诊断和干预措施有效提高了结直肠癌的总体生存率,但由于高复发、高转移及治疗耐受性等原因,晚期结直肠癌患者的预后仍然较差<sup>[2]</sup>。目前,中医药在调节机体免疫、增效减毒、提高生存质量及预防复发转移等方面的独特优势已受到肿瘤学界的广泛关注,已成为肿瘤综合治疗中的重要组成部分<sup>[3-5]</sup>。结直肠癌相关的中医药防治研究正积极开展,其中抗结直肠癌中药复方的开发和转化应用是研究的重点,也是提高结直肠癌患者生存预后的关键<sup>[6-7]</sup>。

岐黄学者程海波教授根据其多年临床经验,以癌毒病机理论为指导形成了治疗结直肠癌的临床验方仙连解毒方,全方由仙鹤草、黄连、炙黄芪、生薏苡仁等药物组成。前期临床研究表明,仙连解毒方联合奥沙利铂联合卡培他滨化疗方案(XELOX)治疗晚期结直肠癌能显著增强患者机体免疫水平,减少化疗不良反应,改善生存质量<sup>[8]</sup>。同时,实验研究表明,仙连解毒方可通过调控含溴结构域蛋白4(BRD4)抑制核转录因子- $\kappa\text{B}$ (NF- $\kappa\text{B}$ )信号通路的激活,影响缺氧微环境下结直肠癌细胞的增殖<sup>[9]</sup>。团队构建湿热瘀毒证结直肠癌小鼠模型,给与仙连解毒方干预,基于转录组测序技术揭示了仙连解毒方可通过调控肠上皮细胞增殖、细胞色素P450酶代

谢、花生四烯酸代谢等信号通路,干预湿热瘀毒证小鼠结直肠癌的发生和发展<sup>[10]</sup>。本实验在前期研究的基础上,以人结直肠癌细胞株HCT-116为研究对象,进一步观察仙连解毒方对结直肠癌增殖及糖酵解过程的影响,探讨仙连解毒方调控结直肠癌发生发展的潜在机制。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 人结直肠癌细胞HCT-116细胞株购自上海中乔新舟生物科技有限公司(批号ZQ0125),本研究均采用传代20代以内的细胞进行实验。

**1.2 药物及制备**<sup>[9]</sup> 仙连解毒方由仙鹤草、黄连、生薏苡仁、炙黄芪等中药按特定剂量比例组成,方中饮片购自江苏省中医院,经南京中医药大学中药资源与鉴定专家邹立思教授评估为正品,本方交由南京中医药大学药理教研室煎制,将饮片置于清水中浸泡2 h,分别加入10、8倍药量水煎煮2次,每次2 h,收集合并2次滤液,浓缩至含生药 $1\ 200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,之后再经60%乙醇醇沉1 h后进行抽滤,低温减压形成生药含量为 $3\ 000 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓缩药液,保存备用。仙连解毒方药液使用时,先经 $2\ 000 \times\text{g}$ 离心15 min(离心半径30 cm),取上清,经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜滤过除菌,仙连解毒方给药后将培养基调整pH 7.2~7.4。

**1.3 试剂** 胎牛血清(Capricorn scientific公司,批号CP14-1299);McCoy'5A培养基、胰蛋白酶溶液、青霉素-链霉素(上海源培生物科技股份有限公司,

批号分别为 L630KJ、S330JV、S110JV); 噻唑蓝 (MTT)、结晶紫染料 (美国 Sigma 公司, 批号分别为 #MKCK3153、#MKBT4498V); EDU 细胞增殖检测试剂盒、细胞裂解液 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号分别为 C0071S、P0013); 蛋白 Marker、BCA 蛋白定量检测试剂盒、ECL 检测试剂盒 (美国 Thermo 公司, 批号分别为 26619、23227、32106); 乳酸 (LD) 测试盒 (南京凯基生物科技发展有限公司, 批号 KGT023); 葡萄糖 (Glu) 测试盒 (南京建成生物工程研究所, 批号 F006); 哺乳动物雷帕霉素蛋白 (mTOR)、 $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 抗体 (美国 Abcam 公司, 批号分别为 ab2732、ab227387), 磷酸化 (p)-mTOR、葡萄糖转运蛋白 1 (GLUT1)、乳酸脱氢酶 (LDHA) 抗体 (美国 CST 公司, 批号分别为 5536S、73015S、3582S)。

**1.4 仪器** HERAcell 150i 型二氧化碳培养箱 (美国 Thermo 公司), XD 202 型倒置显微镜 (德国 Leica 公司), Spark 型多功能酶标仪 (瑞士 TECAN 公司), ECLIPSE Ti-5 型荧光倒置显微镜 (日本 Nikon 公司), PowerPac Basic 型电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司), Tanon-5500 型化学发光凝胶成像仪器 (中国天能科技有限公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** HCT-116 细胞株培养采用 McCoy's 5A 完全培养基 (含 10% 胎牛血清,  $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  青霉素及  $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  链霉素) 于  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中常规培养, 取对数生长期的细胞用于后续实验。

**2.2 MTT 比色法检测细胞存活率** 取对数生长期的 HCT-116 细胞, 将细胞密度调整为  $5 \times 10^4$  个/mL, 接种于 96 孔培养板, 每孔  $100 \mu\text{L}$ , 第 2 天吸去上清培养液, 设空白组, 每孔加  $100 \mu\text{L}$ ; 仙连解毒方 ( $0.94$ 、 $1.88$ 、 $3.75$ 、 $7.50$ 、 $15.00$ 、 $30.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 每孔加入  $100 \mu\text{L}$ , 每组设 3 个复孔。置于  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱内孵育 48 h, 每孔加入  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  MTT  $10 \mu\text{L}$ , 继续孵育 4 h 后弃上清, 加入二甲基亚砜 (DMSO)  $200 \mu\text{L}$ , 振荡 10 min 使甲臞完全溶解。于酶标仪上测 490 nm 波长处吸光度  $A$ , 计算各组肿瘤细胞存活率。存活率 = 给药组  $A$  / 空白组  $A \times 100\%$ 。

**2.3 克隆形成实验检测细胞增殖情况** 取对数生长期的 HCT-116 细胞悬液 (约含  $5 \times 10^2$  个细胞)  $2 \text{ mL}$  接种到 6 孔板中, 并使细胞分散均匀。设置空白组、仙连解毒方组 ( $1.625$ 、 $3.25$ 、 $6.50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 每组 3 个复孔, 继续培养 14 d, 用甲醇固定集落,  $0.1\%$  结晶紫染

色, 显微镜下计数  $>50$  个细胞的集落数。

## 2.4 EDU 细胞增殖检测试剂盒检测细胞增殖情况

取对数生长期的 HCT-116 细胞 (约含  $2.5 \times 10^4$  个细胞)  $1 \text{ mL}$ , 接种于 24 孔板, 并使细胞分散均匀。设空白组、仙连解毒方组 ( $1.625$ 、 $3.25$ 、 $6.50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 每组 3 个复孔, 处理 48 h, 按 EDU 细胞增殖检测试剂盒说明进行操作, 显微镜下拍照, 计算 EDU 染色阳性细胞率。

**2.5 LD 水平检测** 对数生长期的 HCT-116 细胞贴壁 24 h, 分别加入仙连解毒方 ( $1.625$ 、 $3.25$ 、 $6.50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 孵育 48 h, 收集细胞上清液, 依 LD 检测试剂盒说明进行操作。

**2.6 Glu 水平检测** 取对数生长期的 HCT-116 细胞贴壁 24 h, 加入仙连解毒方 ( $1.625$ 、 $3.25$ 、 $6.50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 孵育 48 h, 收集细胞, 将上述细胞悬液, 依 Glu 检测试剂盒说明进行操作。

**2.7 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测相关蛋白表达** 取对数生长期细胞, 加入  $0.25\%$  胰蛋白酶消化, 制备单细胞悬液, 调整细胞密度为  $1 \times 10^5$  个/mL, 按照每孔  $2 \text{ mL}$  将细胞均匀种于 6 孔板, 培养箱中培养 24 h。待细胞贴壁后, 分别加入仙连解毒方组 ( $1.625$ 、 $3.25$ 、 $6.50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 等体积的细胞培养基, 每组设置 3 个复孔,  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养 48 h。弃上清, 收集细胞, RIPA 裂解, 提取蛋白。BCA 定量后进行蛋白变性, 进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳, 采用湿转膜, 室温封闭 2 h, 一抗兔抗  $\beta$ -actin ( $1:5000$ ), GLUT1、LDHA、p-mTOR、mTOR ( $1:1000$ ),  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜。PBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。经 PBST 洗膜后加二抗 ( $1:1$  万),  $37^\circ\text{C}$  孵育 1 h, 再次 PBST 漂洗 3 次, 每次 10 min。将其浸于 ECL 发光液中 2 min, 并进行拍照成像, Image J 软件进行灰度分析。

**2.8 统计学方法** 采用 SPSS 19.0 统计软件处理数据, Graphpad Prism 6.0 绘图, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间独立样本  $t$  检验, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 根据方差齐性采用单因素方差分析和  $q$  检验比较各组间差异,  $P < 0.05$  认为差异具有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 仙连解毒方对人结直肠癌 HCT-116 细胞存活率的影响** 与空白组比较, 仙连解毒方作用于 HCT-116 细胞株 48 h, 细胞存活率显著降低 ( $P < 0.01$ ), 并呈一定的浓度依赖效应, 差异有统计学差异。经计算, 仙连解毒方作用于 HCT-116 细胞 48 h 的半数抑

制浓度( $IC_{50}$ )为  $6.82 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。根据  $IC_{50}$ , 后续分别用仙连解毒方  $1.625$ 、 $3.25$ 、 $6.50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  处理 HCT-116 细胞。见表 1。

表 1 仙连解毒方对 HCT-116 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 1 Effect of Xianlian Jiedu prescription on viability of HCT-116 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞存活率/%
空白组		100.00
仙连解毒方组	0.94	$77.59 \pm 1.75^{2)}$
	1.88	$67.56 \pm 3.17^{2)}$
	3.75	$64.17 \pm 3.09^{2)}$
	7.50	$55.78 \pm 1.13^{2)}$
	15.00	$40.16 \pm 0.90^{2)}$
	30.00	$15.16 \pm 1.61^{2)}$

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ (表 2-表 5 同)

**3.2 仙连解毒方对人结直肠癌 HCT-116 细胞增殖能力的影响** 与空白组比较,仙连解毒方组 ( $1.625$ 、 $3.25$ 、 $6.50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 作用于 HCT-116 细胞株后, HCT-116 细胞克隆形成数明显降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 存在浓度依赖性。见表 2 和图 1。EDU 细胞增殖实验结果表明,与空白组比较,仙连解毒方组 ( $1.625$ 、 $3.25$ 、 $6.50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 作用后细胞的 DNA 合成率明显降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 见表 3 和图 2。细胞克隆形成实验和 EDU 细胞增殖实验结果表明仙连解毒方能有效抑制结直肠癌细胞的增殖。

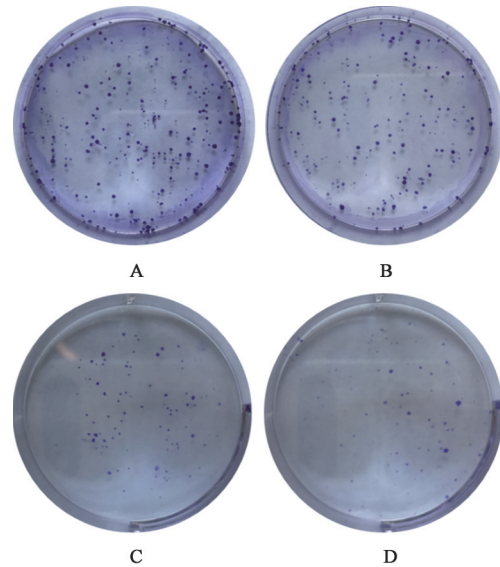
表 2 仙连解毒方对 HCT-116 细胞克隆形成率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Effect of Xianlian Jiedu Prescription on clone formation rate of HCT-116 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	克隆形成率/%
空白组		$100.00 \pm 0.00$
仙连解毒方组	1.625	$68.97 \pm 7.68^{1)}$
	3.25	$36.40 \pm 4.72^{2)}$
	6.50	$13.79 \pm 4.09^{2)}$

**3.3 仙连解毒方对人结直肠癌 HCT-116 细胞 LD 水平与 Glu 消耗量的影响** 与空白组比较,仙连解毒方组 ( $1.625$ 、 $3.25$ 、 $6.50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) HCT-116 细胞的 Glu 消耗量和 LD 水平随给药浓度升高而下降 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 且有浓度依赖性, 提示仙连解毒方能抑制 HCT-116 摄取 Glu, 减少糖酵解过程中 LD 的产生, 参与调控肠癌 HCT-116 细胞的能量代谢过程。见表 4。

**3.4 仙连解毒方对 HCT-116 细胞糖酵解相关蛋白水平调控的影响** 与空白组比较,仙连解毒方 ( $1.625$ 、



注: A. 空白组; B、C、D. 仙连解毒方组 ( $1.625$ 、 $3.25$ 、 $6.50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) (图 2、图 3 同)

图 1 仙连解毒方对 HCT-116 细胞克隆形成率的影响 (结晶紫染色)

Fig. 1 Effect of Xianlian Jiedu prescription on clone formation rate of HCT-116 cells (crystal violet staining)

表 3 仙连解毒方对 HCT-116 细胞 DNA 合成率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of Xianlian Jiedu prescription on rate of DNA synthesis of HCT-116 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	DNA 合成率/%
空白组		$69.65 \pm 3.51$
仙连解毒方组	1.625	$52.34 \pm 6.51^{1)}$
	3.25	$34.16 \pm 4.09^{2)}$
	6.50	$17.02 \pm 4.40^{2)}$

$3.25$ 、 $6.50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 处理人结直肠癌 HCT-116 细胞, 与空白组比较, p-mTOR、LHDA、GLUT1 等蛋白表达水平明显下调 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 并呈浓度依赖效应, 提示仙连解毒方可通过调控糖酵解相关蛋白的表达影响结直肠癌 HCT-116 细胞的能量代谢过程。见图 3 和表 5。

#### 4 讨论

肿瘤是造成社会疾病经济负担的主要原因之一, 过度增殖是其重要的行为特征<sup>[11]</sup>, 肿瘤细胞的快速增殖需要摄取大量能量, 其主要来源于有氧糖酵解过程。肿瘤细胞的有氧糖酵解使其利用糖的效率远高于正常细胞, 即使在氧气充足的情况下, 仍然通过糖酵解方式在细胞胞浆中发酵 LD, 加快了 ATP 产生的速度, 支持癌细胞快速增殖, 肿瘤细胞中的这一代谢特征被称 Warburg 效应<sup>[12]</sup>。Warburg 效应满足了肿瘤细胞高生物合成和能量代

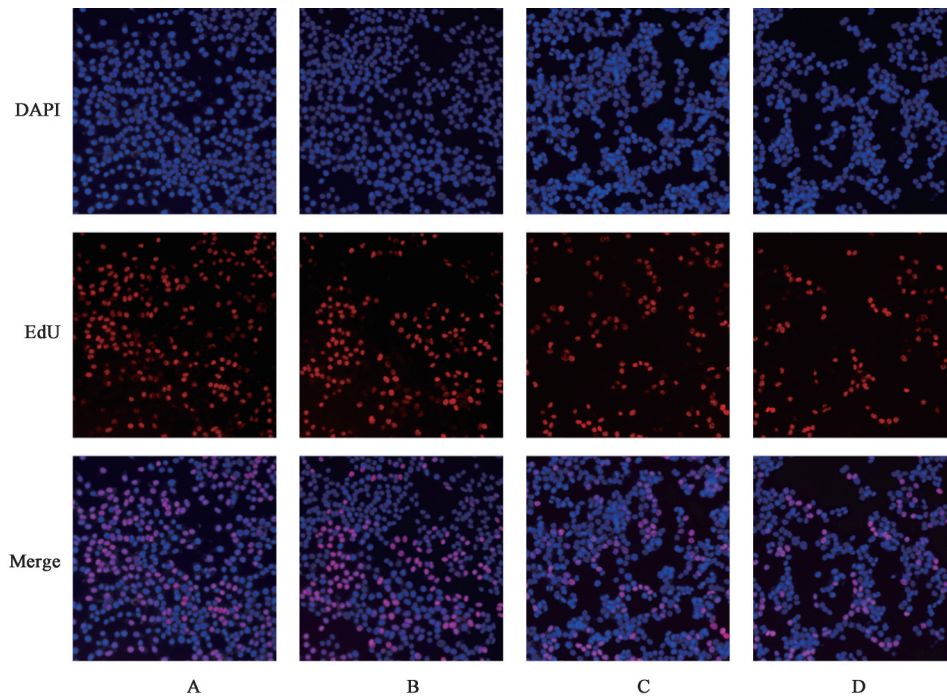


图2 仙连解毒方对HCT-116细胞DNA合成率的影响

Fig. 2 Effect of Xianlian Jiedu Prescription on the rate of DNA synthesis of HCT-116 cells

表4 仙连解毒方对HCT-116细胞LD水平和Glu消耗量的影响  
( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度 /g·L <sup>-1</sup>	LD	Glu消耗量 mmol·L <sup>-1</sup>
空白组		12.19±0.43	4.00±0.20
仙连解毒方组	1.625	10.59±0.30 <sup>1)</sup>	2.89±0.19 <sup>2)</sup>
	3.25	9.38±0.30 <sup>2)</sup>	2.28±0.32 <sup>2)</sup>
	6.50	6.77±0.26 <sup>2)</sup>	0.57±0.21 <sup>2)</sup>

谢的需求,与氧化磷酸化代谢相比,能够增加代谢通量向不同生物合成途径转移,同时维持氧化还原状态,保护肿瘤细胞抵抗缺氧造成的损伤<sup>[13-14]</sup>。Glu摄取加快和LD生成增加是肿瘤细胞糖酵解的主要过程,也是区别肿瘤细胞和正常细胞的重要特征。研究表明,肿瘤细胞糖酵解 Warburg 效应产生的LD是肿瘤酸性微环境的主要成因,酸性微环境在肿瘤的增殖、侵袭迁移、血管生成以及免疫逃逸等过程

表5 仙连解毒方对糖酵解相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 5 Effect of Xianlian Jiedu prescription on glycolysis related protein expression ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	mTOR/ $\beta$ -actin	p-mTOR/ $\beta$ -actin	p-mTOR/mTOR	LDHA/ $\beta$ -actin	GLUT1/ $\beta$ -actin
空白组		0.66±0.04	1.06±0.06	0.68±0.05	0.45±0.02	0.68±0.02
仙连解毒方组	1.625	0.69±0.05	0.77±0.04 <sup>2)</sup>	0.56±0.03 <sup>1)</sup>	0.36±0.02 <sup>1)</sup>	0.52±0.02 <sup>2)</sup>
	3.25	0.67±0.03	0.26±0.07 <sup>2)</sup>	0.33±0.03 <sup>2)</sup>	0.21±0.04 <sup>2)</sup>	0.29±0.03 <sup>2)</sup>
	6.50	0.73±0.02	0.13±0.03 <sup>2)</sup>	0.18±0.03 <sup>2)</sup>	0.15±0.03 <sup>2)</sup>	0.21±0.04 <sup>2)</sup>

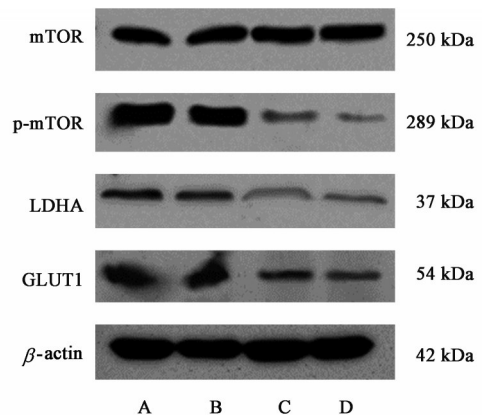


图3 仙连解毒方作用HCT-116细胞糖酵解相关蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of Xianlian Jiedu prescription on glycolysis related protein expression

中发挥重要作用,并影响肿瘤对放化疗的敏感性<sup>[15-17]</sup>。

仙连解毒方是岐黄学者程海波教授的临床经验方,程海波教授传承国医大师周仲瑛教授“癌毒”学说,创建并完善中医肿瘤癌毒病机理论体系,提

高了中医药对多种常见肿瘤的临床辨治疗效。癌毒病机理论认为脏腑功能失调、气血郁滞是肠癌形成的病理基础,癌毒内生并与湿、热、瘀等病理因素交杂搏结于肠道,形成癌肿,因此“湿热瘀毒”是肠癌的核心病机<sup>[18]</sup>。针对癌毒、湿、热、瘀胶结的病理变化,仙连解毒方全方由仙鹤草、黄连、炙黄芪、生薏苡仁等药物组成,共奏“清热化湿、祛瘀解毒、健脾益气”之功。

本实验研究结果表明,仙连解毒方能抑制结直肠癌细胞的增殖并诱导其凋亡,与空白组比较,仙连解毒方干预48 h后结直肠癌细胞的Glu消耗量降低,LD生成水平也显著下调,且存在明显的剂量依赖性,证明仙连解毒方能参与调控结直肠癌的糖酵解过程,干预结直肠癌细胞的能量代谢。通过进一步的机制研究发现,仙连解毒方组的p-mTOR的表达水平较空白组明显下调,糖酵解过程中的关键酶LDHA和参与Glu转运的重要蛋白GLUT1的表达水平均显著下调,并与给药剂量呈一定的相关性。mTOR信号通路是糖酵解过程中Glu转运和LD代谢的重要的调控通路之一,已有研究表明,mTOR的Ser2448位点的磷酸化对下游糖酵解关键酶和Glu转运蛋白等基因的转录具有诱导作用,能够提高糖酵解水平,增加肿瘤细胞对Glu消耗,加快LD生成<sup>[19-22]</sup>。GLUT1作为最常见的Glu转运蛋白,是Glu穿过胞膜进入胞质的重要通道,在多种肿瘤中均呈现高表达,有助于糖酵解过程中大量Glu的转运<sup>[23-25]</sup>,而LDHA作为关键的糖酵解酶,参与了糖酵解过程中LD的形成<sup>[26-27]</sup>。本实验结果提示,仙连解毒方对结直肠癌糖酵解过程的调控可能是通过抑制p-mTOR的表达水平,继而影响糖酵解关键酶LDHA和Glu转运蛋白GLUT1的表达,影响结直肠癌细胞对Glu的摄取及LD的产生。

综上所述,本研究表明仙连解毒方对结直肠癌细胞的增殖具有明显的抑制作用,并能通过调控mTOR信号通路及LDHA、GLUT1等糖酵解过程中的关键蛋白和酶类的表达水平,影响结直肠癌糖酵解过程,减少Glu摄取和LD生成,抑制Warburg效应。因此,基于糖酵解代谢途径探讨仙连解毒方抑制结直肠癌进展具有切实的科学依据,今后本课题组将在此基础上继续开展体内外研究,深入阐明其干预糖酵解调控肿瘤微环境,抑制结直肠癌进展、转移的作用机制。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 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.
- [2] 田传鑫, 赵磊. 结直肠癌及结直肠癌肝转移流行病学特点[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2021, 28(13): 1033-1038.
- [3] 刘克舜, 赵传琳, 任秦有, 等. 中医药在肿瘤免疫治疗及相关不良反应中应用的研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2021, 29(16): 2902-2907.
- [4] 孙磊涛, 张乐吟, 余洁茹, 等. 中医药干预肿瘤转移前微环境策略及研究进展[J]. *中国中西医结合杂志*, 2021, 41(9): 1143-1147.
- [5] 刘学伟, 娄彦妮, 冯哲, 等. 从国家自然科学基金资助项目浅谈中医药在恶性肿瘤治疗中的增效减毒作用研究现状[J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(1): 253-258.
- [6] 杨宇飞. 中医药在结直肠癌治疗中的优势与展望[J]. *中国中西医结合杂志*, 2020, 40(11): 1294-1297.
- [7] 钱雨凡, 刘宇婧, 陆璐, 等. 中医药调节结直肠癌免疫微环境的研究进展[J]. *上海中医药大学学报*, 2021, 35(4): 94-100.
- [8] 王俊壹. 仙连颗粒联合XELOX方案治疗IV期结直肠癌的临床研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2019.
- [9] 姜瑞阳, 徐长亮, 程海波, 等. 缺氧微环境下仙连解毒方抑制结直肠癌细胞增殖的作用及机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20220422.
- [10] 陈桐庆, 余成涛, 许惠琴, 等. 仙连解毒方干预“湿热瘀毒证”小鼠结直肠肿瘤的转录组学分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20212322.
- [11] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-674.
- [12] PACINI N, BORZIANI F. Cancer stem cell theory and the warburg effect, two sides of the same coin? [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(5): 8893-8930.
- [13] LIBERTI M V, LOCASALE J W. The warburg effect: how does it benefit cancer cells? [J]. *Trends Biochem Sci*, 2016, 41(3): 211-218.
- [14] ICARD P, SHULMAN S, FARHAT D, et al. How the Warburg effect supports aggressiveness and drug resistance of cancer cells? [J]. *Drug Resist Updat*, 2018, doi: 10.1016/j.drup.2018.03.001.

- [15] PARK H J, LYONS J C, OHTSUBO T, et al. Cell cycle progression and apoptosis after irradiation in an acidic environment [J]. *Cell Death Differ*, 2000, 7(8):729-738.
- [16] HAO J. The role of acidic microenvironment in the tumor aggressive phenotypes and the treatment [J]. *Trad Med Res*, 2020, 5(1):4-6.
- [17] BOEDTKJER E, PEDERSEN S F. The acidic tumor microenvironment as a driver of cancer [J]. *Annu Rev Physiol*, 2020, 82:103-126.
- [18] 程海波, 李柳, 吴勉华, 等. 癌毒病机理论辨治肠癌探讨 [J]. *时珍国医国药*, 2017, 28(10):2487-2488.
- [19] 蒋晓月, 江瑛. 乳酸脱氢酶和 Warburg 效应的研究进展 [J]. *生理科学进展*, 2017, 48(5):352-356.
- [20] 袁济钢, 陈敏, 李旭, 等. LY294002 对人胃腺癌细胞株 BGC-823 糖酵解水平的影响及其机制探讨 [J]. *胃肠病学*, 2013, 18(5):260-265.
- [21] CHEN Z, ZUO X, ZHANG Y, et al. MiR-3662 suppresses hepatocellular carcinoma growth through inhibition of HIF-1 $\alpha$ -mediated Warburg effect [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(5):549.
- [22] ZHANG Y, ZHANG C, ZHAO Q, et al. The miR-873/NDP1 axis promotes hepatocellular carcinoma growth and metastasis through the Akt/mTOR-mediated Warburg effect [J]. *Am J Cancer Res*, 2019, 9(5):927-944.
- [23] 李璐佳, 李国文, 谢燕. 光甘草定和槲皮素对乳腺癌细胞能量代谢的调控作用 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(17):3786-3791.
- [24] ANCEY P B, CONTAT C, MEYLAN E. Glucose transporters in cancer - from tumor cells to the tumor microenvironment [J]. *FEBS J*, 2018, 285(16):2926-2943.
- [25] MENG Y, XU X, LUAN H, et al. The progress and development of GLUT1 inhibitors targeting cancer energy metabolism [J]. *Future Med Chem*, 2019, 11(17):2333-2352.
- [26] BAIG M H, ADIL M, KHAN R, et al. Enzyme targeting strategies for prevention and treatment of cancer: Implications for cancer therapy [J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, doi: 10.1016/j.semcancer.2017.12.003.
- [27] EL H B, GRANCHI C, VALLES-MARTI A, et al. The dichotomous role of the glycolytic metabolism pathway in cancer metastasis: Interplay with the complex tumor microenvironment and novel therapeutic strategies [J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, doi: 10.1016/j.semcancer.2019.08.025.

[责任编辑 张丰丰]