

健脾消癌方对结肠癌细胞中 Akt/mTOR 信号通路的影响

简小兰, 曾普华, 李勇敏, 谭小宁, 何凤姣, 蒋益兰*

(湖南省中医药研究院附属医院, 中医肿瘤学湖南省重点实验室, 抗肿瘤中药创新平台, 长沙 410006)

[摘要] **目的:** 探讨健脾消癌方含药血清对人结肠癌 HCT116 细胞蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(Akt/mTOR)信号通路相关蛋白表达的影响。**方法:** 以 15% 健脾消癌方含药血清处理结肠癌 HCT116 细胞, 采用 Transwell 侵袭实验检测 HCT116 细胞迁移、侵袭作用, 采用蛋白质印迹法(Western blot)检测 HCT116 细胞中 Akt, 磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt), mTOR, 磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR), 核糖体 S6 蛋白激酶(S6K1), 磷酸化核糖体 S6 蛋白激酶(p-S6K1), 真核细胞始动因子 4E 结合蛋白(4EBP1), 磷酸化真核细胞始动因子 4E 结合蛋白(p-4EBP1)等蛋白的表达, 正常血清组设立相同浓度正常血清组(15%), 10% 胎牛血清组(FBS)。**结果:** 与正常血清组比较, 健脾消癌方含药血清组迁移细胞数与侵袭细胞数均显著降低($P < 0.01$); 与正常血清组比较, Akt 蛋白表达无明显下调, p-Akt 蛋白表达显著下调($P < 0.01$); 与正常血清组比较, mTOR 蛋白表达无明显下调, p-mTOR 蛋白表达显著下调($P < 0.01$); 与正常血清组比较, S6K1 蛋白表达无明显下调, p-S6K1 蛋白表达显著下调($P < 0.01$); 与正常血清组比较, 4EBP1 蛋白表达无明显下调, p-4EBP1 蛋白表达显著下调($P < 0.01$)。**结论:** 健脾消癌方抗结肠癌复发转移的机制可能与抑制 Akt/mTOR 信号通路的激活有关。

[关键词] 健脾消癌方; 结直肠癌; 迁移及侵袭; 蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(Akt/mTOR); 磷酸化

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)07-0073-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200422

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191104.1208.005.html>

[网络出版时间] 2019-11-04 13:39

Effect of Jianpi Xiao'ai Prescription on Akt/mTOR Signaling Pathways in Colorectal Cells

JIAN Xiao-lan, ZENG Pu-hua, LI Yong-min, TAN Xiao-ning, HE Feng-jiao, JIANG Yi-lan*

(*Innovative Platform of Anti-tumor Chinese Drugs, Hunan Key Laboratory of Chinese Medicine Oncology, The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410006, China*)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of drug-containing serum of Jianpi Xiaoi prescription on protein kinase B (Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathways in colorectal cells HCT116. **Method:** The HTC116 cells were treated by 15% concentration of drug-contained serum, and then the cell migration and invasion were detected by Transwell assay, the protein expression levels of Akt, phosphorylated protein kinase B (p-Akt), mTOR, phosphorylated mammalian target of rapamycin (p-mTOR), ribosomal protein S6 kinase, polypeptide1 (S6K1), phosphorylated ribosomal protein S6 kinase, polypeptide1 (p-S6K1), 4E-binding protein1 (4EBP1), and phosphorylated 4E-binding protein1 (p-4EBP1) in HCT116 cells were detected by Western blot. The control group was treated by untreated serum (15%), and 10% fetal bovine serum (FBS). **Result:** As compared with the control group, the number of migration and invasion cells was significantly reduced in drug-contained serum group ($P < 0.01$), the expression of Akt had no obvious decrease, p-Akt protein

[收稿日期] 20190628(003)

[基金项目] 中央引导地方科技发展专项(2017CT5029); 国家自然科学基金项目(81774287); 湖南省自然科学基金项目(2019JJ50344); 湖南省中医药研究院重点项目(201802)

[第一作者] 简小兰, 博士, 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] * 蒋益兰, 博士生导师, 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: tianshangren624@163.com

expression was significantly lowered in the drug-contained serum group ($P < 0.01$), the expression of mTOR had no obvious decrease, but p-mTOR protein expression was significantly lowered in drug-contained serum group ($P < 0.01$), the expression of S6K1 had no obvious decrease, but p-S6K1 protein expression was significantly lowered in the drug-contained serum group ($P < 0.01$), the protein expression of 4EBP1 had no obvious decrease, but p-4EBP1 protein expression was significantly lowered in the drug-contained serum group ($P < 0.01$). **Conclusion:** The anti-tumor mechanism and transfer of Jianpi Xiaoi prescription may be related to inhibiting the activation of Akt/mTOR signaling pathways in colorectal cancer.

[**Key words**] Jianpi Xiaoi prescription; colorectal cancer; migration and invasion; protein kinase B (Akt) /mammalian target of rapamycin (mTOR); phosphorylated

结直肠癌是我国常见恶性肿瘤之一,随着人们生活水平的不断提高和饮食习惯改变,发病率呈逐年上升趋势^[1],发病率和死亡率分别为常见恶性肿瘤的第 4 位和第 5 位^[2-3],5 年生存率不及 50%,容易复发转移^[1]。复发转移是引起结直肠癌患者死亡的主要原因。中医药辨证治疗结直肠癌具有抗复发和转移、提高生存质量、调节免疫力、延长生存期等作用的特点^[4-5],是转移患者预后的有效保护性因子^[6]。本课题组从“虚、瘀、毒”论治结直肠癌,以健脾益气,化痰解毒为治法,拟方健脾消癌方,获得良好临床疗效,具有较好的术后抗复发转移作用^[7-8],实验研究发现健脾消癌方具有抑制肠癌细胞生长,促进细胞凋亡,阻滞细胞周期的作用^[9],但其抗复发转移机制尚未完全明确,还需进一步探索。蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(Akt/mTOR)信号通路在结直肠癌中存在异常激活,与结直肠癌的发生发展、转移均有密切相关性,临床上将其作为结直肠癌治疗靶点也取得一定疗效^[10]。本实验在前期研究的基础上选择健脾消癌方含药血清最佳干预浓度(15%)干预 HCT116 细胞,检测细胞迁移及侵袭能力,检测 Akt/mTOR 信号通路相关蛋白 Akt,磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt),mTOR,磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR),核糖体 S6 蛋白激酶(S6K1),磷酸化核糖体 S6 蛋白激酶(p-S6K1),真核细胞始动因子 4E 结合蛋白(4EBP1),磷酸化真核细胞始动因子 4E 结合蛋白(p-4EBP1)等蛋白的表达情况,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 SPF 级 SD 大鼠 20 只,雌雄各半,体质量(200 ± 20)g,购自湖南长沙沙莱克实验动物中心,许可证号 SYXK(湘)2015-008,动物实验符合湖南省中医药研究院实验动物伦理委员会规定。细胞株人结肠癌细胞株 HCT116 购买于中国

科学院细胞库,编号 TCHu 99。

1.2 药物 健脾消癌方核心药物:人参片 10 g,薏苡仁 30 g,半枝莲 30 g,重楼 10 g,莪术 10 g,郁金 15 g。购自湖南省中医药研究院中药房,由湖南省中医药研究院附属医院中药师马荣丽鉴定均为正品。2 倍量处方,温水浸泡 1 h,水量超出药物 3 ~ 5 cm,大火煮沸后转小火煎 30 min,趁热过滤,药渣按前法再煎煮 2 次,将 3 次药液混匀、过滤,恒温水浴箱上浓缩为相当于含生药 1.5 g·mL⁻¹,4 °C 保存备用。

1.3 试剂 DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司,批号 NZD1131);胎牛血清(以色列 Biological industries 公司,批号 1616316);BCA 蛋白浓度测定试剂盒,RIPA 裂解液,结晶紫(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为 P0012,P0013b,c0121),PMSF(德国 Merck 公司,批号 539134-1ML);Akt(Y89),p-Akt(phospho S473),mTOR(Y391),p-mTOR(phospho S2448),S6K1(E343),p-S6K1(phospho T389),4EBP1(Y329),p-4EBP1(phospho T37),β-肌动蛋白(β-actin)(AC-15)抗体(美国 Abcam 公司,批号分别为 ab32505,ab81283,ab32028,ab109268,ab32529,ab60948,ab32024,ab75767,ab6276);山羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G(康为世纪生物科技有限公司,批号 01325/50237);山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 119986);Transwell 小室(日本 Millipore 公司,批号 PIEP12R48)。

1.4 仪器 HERAcell 2401 型细胞培养箱(美国 Thermo 公司),SE300 型电泳仪及转膜仪(美国 Hoefer 公司),G:BOX 型凝胶成像系统(美国 Syngene 公司)。

2 方法

2.1 健脾消癌方含药血清的制备 SD 大鼠随机分成正常组和药物组,每组 10 只。药物组按相当于 70 kg 成年人 120 g·d⁻¹ 等效量,即 10.8 g·kg⁻¹ 灌胃^[11];正常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 次灌胃后 1 h,10% 水合氯醛按 3 mL·kg⁻¹腹腔麻醉,腹主动脉取血,4 ℃ 保存,24 h 内 2 000 r·min⁻¹离心 10 min,吸取血清,合并同组血清,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,-20 ℃ 保存备用。

2.2 细胞培养 HCT116 细胞培养于含 10% 胎牛血清,1% 青-链霉素的 DMEM 高糖培养液中,置于 37 ℃,5% CO₂ 细胞培养箱中培养。细胞长满培养皿底约 90% 时,进行细胞传代,更换培养液,取汇合率为 80% 的对数期细胞进行实验。

2.3 Transwell 检测细胞迁移、侵袭能力 应用 Transwell 小室(孔径 8 μm)进行侵袭实验,首先制备含 Matrigel 胶的 Transwell 小室。取对数期生长的 HCT116 细胞,调整细胞密度为 5 × 10⁵ 个/mL,接种于 6 孔板,分别以 15% 含药血清和 15% 正常血清,10% 胎牛血清处理细胞。24 h 后收集细胞,用 DMEM 高糖培养基重悬细胞均调整密度为 1 × 10⁶ 个/mL,分别取各组细胞悬液 100 μL 加入 Transwell 小室上室,24 孔板下室加入含 15% FBS 培养液 600 μL。常规培养 24 h,取出小室清洗后甲醇固定 15 min,风干 10 min,0.1% 结晶紫染色 20 min,用棉签擦去上室半透膜上层内残留和细胞,PBS 清洗 3 次,显微镜下观察穿过小室的细胞数,拍照,计数。迁移实验除不在小室铺胶外,其余步骤同侵袭实验。

2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Akt/mTOR 信号通路蛋白的表达 选择健脾消癌方含药血清 15% 处理细胞,设 15% 正常血清组,10% 胎牛血清组,培养 48 h,收集细胞,预冷磷酸盐缓冲液(PBS)洗细胞 3 次,加入含有 PMSF 4 μL,100 × 磷酸化酶抑制剂 40 μL 的 RIPA 缓冲液 400 μL,冰上裂解 30 min,4 ℃,12 000 r·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 SDS-PAGE 蛋白缓冲液,煮沸 5 min,立即分装,置 -80 ℃ 备用。取蛋白 50 μg 上样,SDS-PAGE 凝胶电泳后转膜至 PVDF 膜,封闭,一抗 Akt,p-Akt,mTOR,p-mTOR(1:5 000);S6K1,p-S6K1,4EBP1(1:10 000);β-actin,p-4EBP1(1:2 000)室温孵育 4 h,二抗(1:5 000)室温孵育 2 h,ECL 发光,分别检测蛋白的表达水平,β-actin 为内参。以 Image J 软件分析结果。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 19.0 进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

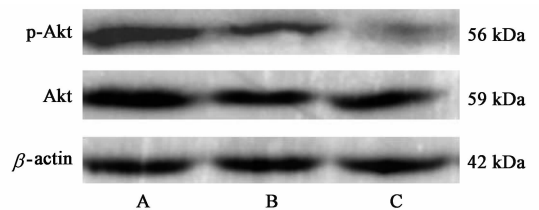
3.1 健脾消癌方含药血清对细胞迁移、侵袭的影响 与胎牛血清组和正常血清组比较,健脾消癌方含药血清处理 HCT116 细胞 24 h,迁移细胞数与侵袭细胞数均显著降低($P < 0.01$)。说明健脾消癌方含药血清能抑制 HCT116 细胞迁移及侵袭。见表 1。

表 1 健脾消癌方含药血清对细胞迁移及侵袭的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 1 Effect of drug-contained serum on migration and invasion in HCT116 cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	体积分数/%	迁移细胞数	侵袭细胞数
胎牛血清	10	572.00 ± 8.50	87.00 ± 4.04
正常血清	15	515.00 ± 8.02	75.00 ± 3.51
含药血清	15	429.00 ± 6.56 ^{1,2)}	48.00 ± 3.06 ^{1,2)}

注:与胎牛血清组比较¹⁾ $P < 0.01$;与正常血清组比较²⁾ $P < 0.01$ (表 3,5 同)。

3.2 健脾消癌方含药血清对 Akt,p-Akt 蛋白表达的影响 与正常血清组比较,含药血清组 Akt 蛋白表达无明显下调,p-Akt 蛋白表达显著下调($P < 0.01$)。与胎牛血清组比较,含药血清组 Akt 蛋白表达明显下调($P < 0.05$),p-Akt 蛋白表达显著下调($P < 0.01$)。说明健脾消癌方含药血清对 HCT116 细胞 Akt 的磷酸化具有抑制作用,见图 1,表 2。



A. 10% 胎牛血清组;B. 15% 正常血清组;C. 15% 含药血清组(图 2~4 同)
图 1 健脾消癌方含药血清作用后 Akt,p-Akt 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of Jianpi Xiaoi prescription drug-contained serum on Akt,p-Akt protein

表 2 健脾消癌方含药血清对 Akt,p-Akt 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	体积分数/%	Akt/β-actin	p-Akt/β-actin
胎牛血清	10	1.127 ± 0.116	0.790 ± 0.064
正常血清	15	0.974 ± 0.124	0.481 ± 0.063
含药血清	15	0.932 ± 0.141 ¹⁾	0.217 ± 0.036 ^{2,3)}

注:与胎牛血清组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与正常血清组比较³⁾ $P < 0.01$ (表 4 同)。

3.3 健脾消癌方含药血清对 mTOR,p-mTOR 蛋白表达影响 与胎牛血清组和正常血清组比较,含药

血清组 mTOR 蛋白表达无明显下调, p-mTOR 蛋白表达显著下调 ($P < 0.01$)。说明健脾消癌方含药血清对 HCT116 细胞 mTOR 的磷酸化具有抑制作用。见图 2, 表 3。

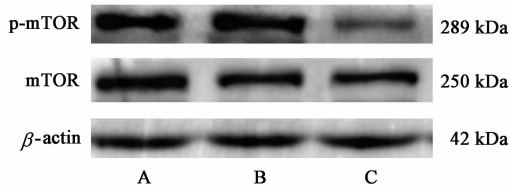


图 2 健脾消癌方含药血清作用后 mTOR, p-mTOR 蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of Jianpi Xiaoi prescription drug-contained serum on mTOR, p-mTOR protein

表 3 健脾消癌方含药血清对 mTOR, p-mTOR 蛋白表达影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of Jianpi Xiaoi prescription drug-contained serum on relative expressions of mTOR, p-mTOR ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	体积分数/%	mTOR/ β -actin	p-mTOR/ β -actin
胎牛血清	10	0.940 \pm 0.089	0.680 \pm 0.071
正常血清	15	0.869 \pm 0.106	0.666 \pm 0.063
含药血清	15	0.830 \pm 0.110	0.233 \pm 0.052 ^{1,2)}

3.4 健脾消癌方含药血清对 S6K1, p-S6K1 蛋白表达影响 与正常血清组比较, 含药血清组 S6K1 蛋白表达无明显下调, p-S6K1 蛋白表达显著下调 ($P < 0.01$); 与胎牛血清组比较, 含药血清组 S6K1 蛋白表达明显下调 ($P < 0.05$), p-S6K1 蛋白表达显著下调 ($P < 0.01$)。说明健脾消癌方含药血清对 HCT116 细胞 S6K1 的磷酸化具有抑制作用, 见图 3, 表 4。

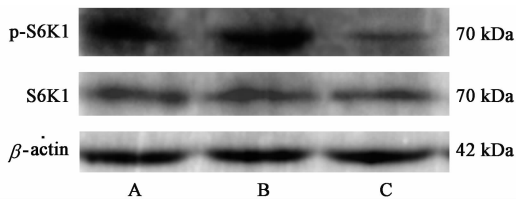


图 3 健脾消癌方含药血清作用后 S6K1, p-S6K1 蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of Jianpi Xiaoi prescription drug-contained serum on S6K1, p-S6K1 protein

表 4 健脾消癌方含药血清对 S6K1, p-S6K1 蛋白表达影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of Jianpi Xiaoi prescription drug-contained serum on relative expressions of S6K1, p-S6K1 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	体积分数/%	S6K1/ β -actin	p-S6K1/ β -actin
胎牛血清	10	0.530 \pm 0.061	0.580 \pm 0.056
正常血清	15	0.511 \pm 0.058	0.590 \pm 0.054
含药血清	15	0.466 \pm 0.056 ¹⁾	0.117 \pm 0.022 ^{2,3)}

3.5 健脾消癌方含药血清对 4EBP1, p-4EBP1 蛋白表达影响 与胎牛血清组和正常血清组比较, 含药血清组 4EBP1 蛋白表达无明显下调, p-4EBP1 蛋白表达显著下调 ($P < 0.01$)。说明健脾消癌方含药血清对 HCT116 细胞 4EBP1 的磷酸化具有抑制作用。见图 4, 表 5。

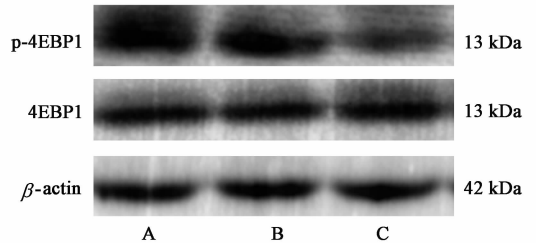


图 4 健脾消癌方含药血清作用后 4EBP1, p-4EBP1 蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of Jianpi Xiaoi prescription drug-contained serum on 4EBP1, p-4EBP1 protein

表 5 健脾消癌方含药血清对 4EBP1, p-4EBP1 蛋白表达影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of Jianpi Xiaoi prescription drug-contained serum on relative expressions of 4EBP1, p-4EBP1 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	体积分数/%	4EBP1/ β -actin	p-4EBP1/ β -actin
胎牛血清	10	1.825 \pm 0.111	1.208 \pm 0.111
正常血清	15	1.810 \pm 0.109	1.244 \pm 0.109
含药血清	15	1.839 \pm 0.113	0.396 \pm 0.058 ^{1,2)}

4 讨论

Akt/mTOR 通路广泛存在于各种生物细胞中, 在正常细胞的生长、增殖中发挥重要作用, 与癌细胞的生长、增殖、分化、代谢、凋亡、转移也关系紧密。在结直肠癌发生和发展中起着重要的作用。Akt/mTOR 通路中, 其上游的 PI3K 可被激活的 Ras 通路以及生长因子、细胞因子、激素等启动激活^[12], 进一步将 PIP2 转化为 PIP3, PIP3 可以作为第二信使激活下游 Akt 蛋白等。活化的 Akt 可直接激活 mTOR, 或通过 TSC1/TSC2 复合物间接激活 mTOR, 磷酸化 mTOR 的 Ser2448 位点^[13-14]。磷酸化 mTOR 可以有效的调控其 2 个下游分子, S6K 和 4EBP1。S6K 和 4EBP1 是 mTOR 下游的 2 个蛋白翻译的关键调节因子, 从而调控相关的 mRNAs 翻译^[15-16]。磷酸化 mTOR 还可以通过清除泛素蛋白从而抑制自噬的发生^[17]。自噬作为溶酶体的主要降解途径之一, 在肿瘤发生、发展及转移过程中起着既能促进又能抑制的双重作用。此外, 研究发现 mTOR 能够调节上皮间质转化 (EMT), 从而促进结直肠癌的转移^[18]。EMT 在转移进程的初始阶段, 起着至关重

要的调节作用,其与细胞迁移、侵袭有关。因此, Akt/mTOR 信号通路的抑制,将有可能降低肠癌复发及转移率,抑制肠癌生长,延长患者生存期,使临床患者获益。

本研究发现健脾消癌方含药血清能抑制 HCT116 细胞迁移及侵袭,对 Akt/mTOR 信号通路中关键蛋白 p-Akt, p-mTOR, p-S6K1, p-4EBP1 的表达均具有一定的抑制作用,提示健脾消癌方有可能是通过抑制 Akt/mTOR 信号通路的激活,从而抑制细胞增殖、侵袭迁移,发挥抗结肠癌及抗复发转移作用。

结直肠癌为我国高发肿瘤病之一,死亡率居前列,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。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,核心药物有人参、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,全方配伍,扶正抗癌,标本兼顾,攻补兼施。现代药理学研究表明健脾消癌方中各单味药均具有一定抗肿瘤作用,主要从抑制肿瘤细胞生长、促进细胞凋亡、细胞周期阻滞、抑制细胞迁移侵袭等方面发挥作用^[19-24]。

大肠癌术后患者的巩固治疗中,健脾消癌方在抑制复发转移方面获得良好疗效^[7-8],本课题组进行了细胞及动物实验^[9],提示健脾消癌方能够抑制 HCT116 细胞增殖,阻滞细胞周期,促进细胞凋亡,与时间、浓度呈正相关;具有促进 E-cadherin 表达,降低 Vimentin 表达,从而抑制 EMT 的作用^[25],抑制迁移侵袭。但其抗肿瘤及抗复发转移机制仍未完全明确,本研究进一步观察健脾消癌方对细胞迁移侵袭的影响,对 Akt/mTOR 信号通路的影响,探讨疗效机制。本研究仅基于蛋白表达变化,具有一定局限性,下阶段可进一步完善该信号通路基因的变化情况检测,进一步探索健脾消癌方抗结肠癌及抗复发转移机制,为临床应用提供科学依据。

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^[26]。由于血清成分复杂,干扰因素多,与目前细胞培养常用的胎牛血清存在差异,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,与胎牛血清是否存在差异等。本研究同时设立胎牛血清组,也提示鼠血清与胎牛

血清对检测指标存在一定差异。

[参考文献]

- [1] 李道娟,李倩,贺宇彤. 结直肠癌流行病学趋势[J]. 肿瘤防治研究, 2015, 42(3): 305-310.
- [2] 万德森. 结直肠癌流行病学与预防[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2011, 17(1): 3-7.
- [3] 陈万青,郑荣寿,张思维,等. 2013 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2017, 26(1): 1-7.
- [4] 崔晓茹,侯勇,于庆生. 中医药辅助治疗结直肠癌研究进展[J]. 安徽中医药大学学报, 2017, 36(2): 94-96.
- [5] 卢冬雪,刘沈林. 中医药防治结直肠癌术后复发转移的概况[J]. 世界中西医结合杂志, 2017, 12(17): 1620-1623, 1628.
- [6] 陶丽,朱莹杰,顾纛,等. 中医药辨证治疗对结直肠癌肝转移根治性切除的预后影响[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(5): 1051-1056.
- [7] 蒋益兰,潘敏求,蔡美. 健脾消癌饮配合化疗拮抗大肠癌术后复发转移 62 例总结[J]. 湖南中医杂志, 2007, 23(1): 1-3.
- [8] 蒋益兰,潘博,仇湘中. 健脾消癌饮配合化疗治疗大肠癌术后 40 例总结[J]. 湖南中医杂志, 2001, 17(5): 9-10.
- [9] 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.
- [10] BAHRAMI A, KHAZAEI M, HASANZADEH M, et al. Therapeutic potential of targeting PI3K/Akt pathway in treatment of colorectal cancer: rational and progress[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(3): 2460-2469.
- [11] 贺石林,王键,王净净. 中医科研设计与统计学[M]. 长沙:湖南科学技术出版社, 2012: 48-49.
- [12] BARTHOLOMEUSZ C, GONZALEZ-ANGULO A M. Targeting the PI3K signaling pathway in cancer therapy[J]. Expert Opin Ther Targets, 2012, 16(1): 121-130.
- [13] INOKI K, CORRADETTI M N, GUAN K L. Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease[J]. Nat Genet, 2004, 37(1): 19-24.
- [14] NATHAN N, KEPPLER-NOREUIL K M, BIESECKER L G, et al. Mosaic disorders of the PI3K/PTEN/Akt/TSC/mTORC1 signaling pathway[J]. Diabetologia, 2008, 51(3): 512-521.
- [15] DUFNER A, THOMAS G. Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation[J]. Exp Cell Res, 1999, 253(1): 100-109.
- [16] YAN J, ZHOU H, KONG L, et al. Identification of two

- novel inhibitors of mTOR signaling pathway based on high content screening [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2013, 23(10): 123-127.
- [17] JUHASZ G, HILL J H, YAN Y, et al. The class III PI (3) K Vps34 promotes autophagy and endocytosis but not TOR signaling in *Drosophila*[J]. *J Cell Biol*, 2008, 181(4): 655-666.
- [18] PAT G, BOWEN K A, JIANYU L, et al. mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(9): 3246-3256.
- [19] 闫克敏, 肖海娟, 杨林, 等. 人参皂苷 Rh₂ 对结肠癌耐药细胞 HCT116/L-OHP 侵袭迁移能力的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(13): 73-78.
- [20] 刘帆, 侯林, 张晓平, 等. 薏苡仁多糖抗肿瘤作用及免疫作用研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2019, 21(3): 123-126.
- [21] 田新宇, 范翠梅, 渠田田, 等. 半枝莲总黄酮中 7 种成分的含量测定及抗肿瘤活性[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(1): 53-59.
- [22] 朱燕, 谢丽, 杨觅, 等. 重楼抗肿瘤作用机制的研究进展[J]. *癌症进展*, 2015, 13(2): 164-166.
- [23] 孙学然, 杨克, 吕玲玲, 等. 莪术二酮对乳腺癌 HCC1937 细胞迁移和侵袭的影响及机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(3): 66-73.
- [24] 金海峰, 王楼蕾, 吕宾. 郁金抗肿瘤作用的研究进展[J]. *医药导报*, 2009, 28(12): 1565-1568.
- [25] 何兰, 简小兰, 蒋益兰, 等. 健脾消癌方及拆方对结肠癌原位种植瘤裸鼠模型钙黏蛋白、波形蛋白表达的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(6): 1324-1327.
- [26] 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.

[责任编辑 张丰丰]