

创新中药与经典名方专栏

DOI: 10.16305/j.1007-1334.2026.z20251003001

基于网络药理学和裸鼠体内实验探讨补脾胃泻阴火升阳汤通过 HIF-1 α 调节糖酵解途径抗结肠癌的机制张文星^{1,2}, 高允海³

1. 辽宁中医药大学第一临床学院(辽宁 沈阳 110847); 2. 辽宁中医药大学附属医院肛肠科(辽宁 沈阳 110032); 3. 辽宁中医药大学附属医院普外科(辽宁 沈阳 110032)

【摘要】 目的 通过网络药理学结合体内实验,探讨补脾胃泻阴火升阳汤治疗结肠癌的作用机制。**方法** ①利用 TC MSP、GeneCards、OMIM、DrugBank 数据库搜索补脾胃泻阴火升阳汤活性成分和结肠癌相关靶点,采用 STRING 平台构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,并进行基因本体(GO)和京都基因和基因组数据库(KEGG)富集分析。②60 只 BALB/C 裸鼠皮下注射人结肠癌 HCT-116 细胞建立结肠癌模型,随机分为模型组、中药组(20.93 g·kg⁻¹)、西药组(卡培他滨:390 mg·kg⁻¹)、中药联合西药组(中药:20.93 g·kg⁻¹;卡培他滨:390 mg·kg⁻¹)。并对各组裸鼠给予相应药物灌胃,共干预 2 周。监测裸鼠肿瘤生长情况,测量各组瘤体质量;采用苏木精-伊红(HE)染色法观察裸鼠肿瘤组织病理改变;利用免疫组织化学(免疫组化)技术检测肿瘤组织中缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、葡萄糖转运蛋白 1(GLUT1)、己糖激酶 2(HK2)以及乳酸脱氢酶 A(LDHA)蛋白的表达;借助 Western blot 和逆转录实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)技术检测肿瘤组织中 HIF-1 α 、GLUT1、HK2、LDHA 蛋白及 mRNA 的表达。**结果** ①筛选获得补脾胃泻阴火升阳汤与结肠癌的交集基因共 141 个。其中,肿瘤蛋白 p53、蛋白激酶 B1(AKT1)、表皮生长因子受体(EGFR)和 HIF-1 α 等可能是补脾胃泻阴火升阳汤治疗结肠癌的关键靶点。其作用机制主要涉及 p53、血管内皮生长因子(VEGF)、缺氧诱导因子-1(HIF-1)等信号通路。②与模型组相比,HE 染色及免疫组化结果显示,各药物干预组肿瘤组织均出现不同程度的细胞破裂与坏死现象,Western blot 检测结果显示,各药物干预组肿瘤组织中 HIF-1 α 、GLUT1、HK2 以及 LDHA 蛋白的表达水平均显著降低($P<0.05$);RT-qPCR 检测结果显示,西药组和中药联合西药组肿瘤组织中 LDHA 的 mRNA 表达水平,以及各药物组肿瘤组织中 HIF-1 α 、GLUT1 和 HK2 的 mRNA 表达水平均显著降低($P<0.05$)。与模型组和中药组相比,中药联合西药组肿瘤组织的破坏程度更显著,肿瘤组织中 HIF-1 α 、GLUT1、HK2 以及 LDHA 蛋白的表达水平降低($P<0.05$)。**结论** 补脾胃泻阴火升阳汤应用后可协同抑制糖酵解,从而抑制结肠癌移植瘤的生长,其机制可能与下调 HIF-1 α 表达,抑制糖酵解中的 GLUT1、HK2 以及 LDHA 关键酶的表达有关。

【关键词】 结肠癌;经典名方;肿瘤代谢重编程;网络药理学;缺氧诱导因子-1 α ;糖酵解;中药研究

Exploring mechanism of Bupiwai Xieyinhuo Shengyang Decoction in treating colon cancer via HIF-1 α -mediated regulation of glycolytic pathway based on network pharmacology and nude mouse *in vivo* experimentsZHANG Wenxing^{1,2}, GAO Yunhai³

[基金项目] 辽宁省教育厅高校基本科研项目储备项目(2024-JYTCB-042)

[作者简介] 张文星,男,博士研究生,主要从事中医治疗大肠癌的临床与研究工作

[通信作者] 高允海,主任医师,教授,博士研究生导师;

E-mail: lnzy123n@126.com

1. First Clinical College, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, Liaoning 110847, China; 2. Department of Anorectal Surgery, Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, Liaoning 110032, China; 3. Department of General Surgery, Affiliated Hospital of

Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, Liaoning 110032, China

Abstract: Objective To investigate the mechanisms of Bupiwel Xieyinhuo Shengyang Decoction (BpwXyhSyD) in treating colon cancer through network pharmacology combined with *in vivo* experiments. **Methods** ① Using TCMSP, GeneCards, OMIM, and DrugBank databases to search for active ingredients and colon cancer-related targets of BpwXyhSyD, a protein-protein interaction (PPI) network was constructed using the STRING platform, while Gene Ontology (GO) and Kyoto Gene and Genome Database (KEGG) enrichment analysis were performed. ② Sixty BALB/C nude mice were subcutaneously injected with human colon cancer HCT-116 cells to establish a colon cancer model and randomly divided into four groups: model group, traditional Chinese medicine (TCM) group (20.93 g·kg⁻¹), Western medicine group (capecitabine: 390 mg·kg⁻¹), and combined TCM-Western medicine group (TCM: 20.93 g·kg⁻¹; capecitabine: 390 mg·kg⁻¹). Mice in each group received corresponding drug interventions for a total of 2 weeks. Tumor growth was monitored by measuring tumor weights in each group. Histopathological changes in tumor tissues were observed using hematoxylin and eosin (HE) staining. Immunohistochemical techniques were employed to detect the expression of HIF-1 α , GLUT1, HK2, and LDHA in tumor tissues. Western blot and RT-qPCR analyses were conducted to assess the protein and mRNA expression levels of HIF-1 α , GLUT1, HK2, and LDHA in tumor tissues. **Results** ① A total of 141 intersection genes between the BpwXyhSyD and colon cancer were successfully identified. Among these, p53, AKT1, EGFR, and HIF-1 α may represent key therapeutic targets for the BpwXyhSyD in colon cancer treatment. The underlying mechanisms primarily involve signaling pathways such as p53, VEGF and HIF-1. ② Compared with the model group, HE staining and immunohistochemistry revealed varying degrees of cellular disruption and necrosis in tumor tissues across all drug intervention groups. Western blot analysis demonstrated significantly reduced relative expression levels of HIF-1 α , GLUT1, HK2, and LDHA proteins in tumor tissues treated with each intervention. RT-qPCR results demonstrated significantly reduced mRNA expression levels of *LDHA* in both the Western medicine group and the TCM-Western medicine group ($P < 0.05$), along with significantly reduced mRNA expression of *HIF-1 α* , *GLUT1*, and *HK2* in all drug intervention groups ($P < 0.05$). Furthermore, compared with the model group and the TCM group, the tumor tissue in the TCM-Western medicine group exhibited more pronounced destruction, along with lower expression levels of HIF-1 α , GLUT1, HK2, and LDHA proteins ($P < 0.05$). **Conclusion** The use of BpwXyhSyD synergistically inhibits glycolysis, thereby suppressing the growth of colon cancer xenografts. The mechanism may involve downregulating HIF-1 α expression and inhibiting the expression of key enzymes in glycolysis, including GLUT1, HK2, and LDHA. **Keywords:** colon cancer; classic famous formula; tumor metabolic reprogramming; network pharmacology; HIF-1 α ; glycolysis; research on traditional Chinese medicine

结肠癌是临床上最常见的消化系统恶性肿瘤,属于中医学“肠覃”“脏毒”“锁肛痔”等范畴,中医学多认为正气不足是其发生的内在因素,多种原因引起的痰湿瘀毒聚集于肠道,而发为本病^[1]。随着腹腔镜技术及放射治疗、化学疗法、靶向治疗、免疫治疗等综合疗法的发展,结肠癌的预后相对较好,但术后正虚邪盛的根本病机尚未得到解决,因此影响患者生活质量,且容易复发。近年来,中医药治疗结肠癌的优势不断凸显,能够有效缓解患者放射治疗、化学疗法后的毒副作用,减缓术后复发。

脾胃为水谷之海,气血生化之源。生理状态下,脾主运化,胃主受纳,能够为机体提供能量;若脾胃功能受损,则细胞能量匮乏,气机不畅,则细胞微环境中废物堆积,进而影响功能^[2]。阴火理论肇始于李东垣的《脾胃论》,其核心为“火与元气不两立”,阴火是因脾胃受损、气机不畅、邪气郁积而成。病理状态下,脾胃不足,中气下陷,下焦元气动力不足,两火相得,即为东垣所说的阴火^[3-4]。这种虚性

亢奋的病理状态,与糖酵解过度活跃时的能量代谢紊乱高度契合。

异常的糖酵解代谢[瓦尔堡(Warburg)效应]是其重要生物学特征,表现为肿瘤细胞主要通过糖酵解获取能量,这种代谢重编程为肿瘤的增殖、侵袭和转移提供物质和能量基础^[5]。而其与阴火的“虚火妄动”具有相似性,均表现为能量生成效率低下但代谢活动异常活跃。

李东垣创立的补脾胃泻阴火升阳汤由羌活、柴胡、黄芩、炙甘草、黄连、苍术、升麻、人参、黄芪、石膏组成,以“补脾胃、泻阴火、升阳气”为主要功效,在调理脾胃疾病方面应用广泛。补脾胃泻阴火升阳汤中的主要成分,例如柴胡皂苷D^[6]、黄芪甲苷^[7]、苍术素^[8]、人参皂苷Rg3^[9]、黄芩苷^[10]、小檗碱^[11]等,在糖酵解途径中发挥作用。因此,本研究从结肠癌的根本病机入手,拟通过网络药理学和裸鼠体内实验研究补脾胃泻阴火升阳汤联合卡培他滨对结肠癌的作用及机制,为补脾胃泻阴火升阳汤在结肠癌

治疗中的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 网络药理学方法

1.1.1 补脾胃泻阴火升阳汤相关成分的收集与靶点整理 通过 TCMSp 数据库 (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php/>) 检索补脾胃泻阴火升阳汤中各中药活性成分, 依据口服生物利用效率值 (OB) $\geq 30\%$ 且化合物与药物的相似性 (DL) ≥ 0.18 作为筛选阈值, 从数据库中依次对“柴胡”“甘草”“黄芪”“苍术”“羌活”“升麻”“人参”“黄芩”“黄连”的成分进行检索, 并结合文献进行补充。因 TCMSp 数据库未收录“石膏”的有效成分, 且《脾胃论》原文提及“长夏微用, 过时去之, 从权”, 指出石膏并非必需, 故根据文献^[12-13]将石膏的成分及作用靶点删除。将筛选获得的活性成分靶点信息, 在 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 中转化为对应靶基因, 获取对应的靶点基因信息。

1.1.2 结肠癌相关靶基因的获取 分别利用 Drugbank 数据库 (<https://go.drugbank.com/>)、OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>) 和 Genecards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 进行检索, 以“colon cancer”为关键词, 以 $\geq$ 疾病相关性分 (relevance score) 的中位数“2.38”为标准进行筛选。获得与疾病相关的靶点信息。

1.1.3 结肠癌疾病靶点与药物成分靶点的交集靶基因预测 将获得的补脾胃泻阴火升阳汤有效成分作用靶点与结肠癌相关靶点导入 Venny 在线作图工具 (<https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/>), 获得疾病与药物的交集靶点, 并制作韦恩 (Venn) 图。

1.1.4 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络的构建及核心基因的筛选 在 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>) 中输入交集靶点, 限定研究物种来源于人种 (homo sapiens), 形成 PPI 网络, 通过 Cytoscape 3.7.2 软件将 PPI 网络做可视化处理, 使用 Cyto NCA 插件对网络进行分析, 依次筛选出核心靶点进行后续研究。

1.1.5 基因本体 (GO) 和京都基因与基因组数据库 (KEGG) 富集分析 将交集靶点导入 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp/>), 进行 GO 和 KEGG 富集分析, 预测此方治疗结肠癌的作用机制, 结果以气泡图和柱状图展示。

1.2 裸鼠体内实验

1.2.1 细胞 人结肠癌 HCT-116 细胞购自赛文创新

(北京) 生物科技有限公司, 并由本课题组实验室长期保存。

1.2.2 动物 60 只 SPF 级雄性 BALB/C 裸鼠, 4~6 周龄, 体质量 20~22 g, 购自斯贝福 (北京) 生物科技有限公司, 动物生产许可证号: SCXK (京) 2024-0001。动物使用许可证号: SYXK (辽) 2013-0009。7 d 适应性喂养结束后随机抽取裸鼠进行造模。所有的动物饲养条件和动物实验方案都经过辽宁中医药大学动物实验伦理委员会的审批 [伦理审批号: 2025 (DW)-055-01]。

1.2.3 药物与试剂 补脾胃泻阴火升阳汤方组成: 柴胡 30 g, 黄连 10 g, 升麻 15 g, 苍术 20 g, 羌活 20 g, 黄芩 10 g, 炙甘草 20 g, 石膏 6 g, 人参 10 g (批号分别为 2509083、2510043、2502181、2506273、2509151、2504191、2507161、2503051、2509251), 安徽普仁中药饮片有限公司; 黄芪 20 g (批号: 25092601), 安国市光明饮片加工厂, 按比例配伍。以上药物购自辽宁中医药大学附属医院门诊部, 中药饮片均为正品, 符合《中华人民共和国药典 (2025 年版): 一部》^[14] 的规定。卡培他滨片 (批号: H20133361), 购自齐鲁制药有限公司。

伊红染液、苏木精染液 (批号分别为 G1005-2、G1005-1), 武汉塞维尔生物科技有限公司; 超敏化学发光检测试剂盒 (批号: S6009M), 上海百赛生物技术股份有限公司; 聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜 (0.45 μm) (批号: IPVH00010), 美国 Millipore 公司; β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体、己糖激酶 2 (HK2) 抗体、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 抗体、乳酸脱氢酶 A (LDHA) 抗体、葡萄糖转运蛋白 1 (GLUT1) 抗体 (批号分别为 20536-1-AP、22029-1-AP、20960-1-AP、19987-1-AP、21829-1-AP), 武汉三鹰生物技术有限公司。

1.2.4 主要仪器 石蜡切片机、石蜡包埋机、自动染色机、高性能脱水机、超薄切片机 (型号分别为 RM2245、EG1150H、EMAC20、ASP6025、EMUC7), 德国 Leica 公司; 石蜡冷冻台 (型号: YD-6D), 浙江益迪仪器有限公司; 脱色摇床 (型号: Orbital Shaker TS-1000), 电泳槽、基础电泳仪电源、转印槽 (型号分别为 Mini PROTEAN® Tetra、PowerPac™、Trans Blot®), 美国 Bio-Rad 公司; 酶标仪 (型号: Epoch)、冰冻切片机 (型号: Cryo Star™ NX50), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2.5 造模方法 60 只雄性 BALB/C 裸鼠 7 d 适应性喂养结束后, 建立结肠癌裸鼠皮下移植瘤模型。

模型建立方法^[15]:取密度为 1×10^7 个/mL的HCT-116细胞悬液0.1 mL,接种于裸鼠腋下,接种处可在5~7 d内通过触诊检测到黄豆大小的结节,则视为造模成功,实验中60只裸鼠成瘤率为100%。测量移植瘤体积(V_T), $V_T=(a\times b^2)/2$,式中 a 为瘤体长径(mm), b 为瘤体短径(mm)。

1.2.6 分组与干预 将60只皮下移植瘤模型裸鼠随机分成4组,每组15只,分别为模型组、中药组、西药组、中药联合西药组。中药组药物:将补脾胃泻阴火升阳汤按比例配伍,浓缩、干燥成干浸膏,实验时称取干浸膏1 000 mg于离心管内,加10 mL无菌0.9%氯化钠溶液,超声0.5 h助溶,配制成浓度为 $100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的中药溶液。中药组根据临床给药剂量换算成裸鼠给药剂量为 $20.93\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,按照 $0.1\text{ mL}\cdot 10\text{ g}^{-1}$ 的给药体积给予裸鼠上述中药溶液灌胃。西药组裸鼠予卡培他滨片,按照 $390\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量、 $0.1\text{ mL}\cdot 10\text{ g}^{-1}$ 的给药体积灌胃。中药联合西药组裸鼠按照上述两种方式和剂量联合给药。模型组给予等体积的0.9%氯化钠溶液。于造模后第9天开始给药,每周6 d、每日1次,第7天不灌胃,持续2周。

灌胃2周后应用戊巴比妥钠过量注射至裸鼠死亡,剥离肿瘤标本,记录标本质量,并记录裸鼠去瘤后的体质量。肿瘤抑制率($\%$)= $(1-\text{各组平均瘤质量}/\text{模型组平均瘤质量})\times 100\%$ 。

1.2.7 生化指标 实验结束后裸鼠眼眶静脉丛取血,按试剂盒说明书检测各组裸鼠的肌酐清除率、尿素氮、氨基转移酶、超氧化物歧化酶水平。

1.2.8 苏木精-伊红(HE)染色观察肿瘤组织病理学 将裸鼠结肠癌移植瘤组织经固定、脱水、包埋、切片后,进行脱蜡水化,苏木精作背景染色,盐酸乙醇溶液分色,再用伊红重染色。再对切片进行冲洗、脱水等操作,封片后,在显微镜下观察、拍照。

1.2.9 免疫组织化学(IHC)法观察肿瘤组织相关蛋白表达 将石蜡切片浸于抗原修复液中,常规脱水透明、组织包埋以及切片($4\text{ }\mu\text{m}$),经抗原修复、阻断、封闭后滴加HIF-1 α 、GLUT1、HK2、LDHA一抗($1:1\ 000$)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,PBS清洗并二抗室温孵育2 h,滴加DAB显色。苏木精复染后盐酸乙醇分化、返蓝、脱水、透明、封片,镜下观察并分析各阳性蛋白的表达。采用ImageJ 8.0软件对肿瘤组织中HIF-1 α 、GLUT1、HK2、LDHA蛋白表达进行半定量分析,计算每张图片的平均光密度值(MOD),MOD值越高表示阳性表达越强。

1.2.10 逆转录实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测肿瘤组织中HIF-1 α 、GLUT1、HK2、LDHA的mRNA表达 采用TRIzol法提取总RNA,后逆转录为cDNA;miRNA则按miRNA提取及转录试剂盒说明书提取并转录为cDNA。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$,10 min;95 $^{\circ}\text{C}$,15 s;60 $^{\circ}\text{C}$,1 min,40个循环。扩增所用引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成,引物序列见表1。以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算mRNA的相对表达量。

表1 引物序列

基因	引物序列(5'-3')	引物长度/bp
HIF-1 α	上游:CACTAGACAAAGTTCACCTGAGAGAC	26
	下游:ACATTGACCATATCGCTATCCACATC	26
GLUT1	上游:CCCATCCCATCCACCACACTC	21
	下游:GCCTGCCAAAGCGATTAACAAAG	23
HK2	上游:ATCGGCGTGGATGGCTCTG	19
	下游:GAGGAAGCGGACATCACAATCG	22
LDHA	上游:GGTGGTGGACAGTGCCTACG	20
	下游:CGCCTAAGGTTCTTCATTATGCTCTC	26

注:HIF-1 α 为缺氧诱导因子-1 α 基因,GLUT1为葡萄糖转运蛋白1基因,HK2为已糖激酶2基因,LDHA为乳酸脱氢酶A基因。

1.2.11 Western blot法检测结肠癌组织相关蛋白的表达 提取裸鼠肿瘤组织,加入裂解液进行研磨,然后离心并收集上清液。根据二辛可酸(BCA)蛋白定量法的结果,混合上样缓冲液和总蛋白样品,电泳完成再转印至PVDF膜,放置在封闭液中1 h。然后在4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 β -actin、HIF-1 α 、GLUT1、HK2、LDHA一抗($1:1\ 000$)过夜,加入二抗在避光条件下室温孵育1 h,洗膜后曝光成像。各指标的灰度值用ImageJ软件进行分析并作图。

1.3 统计学方法 采用SPSS 26.0软件对实验数据进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。若数据满足正态分布,多组之间定量数值比较采用单因素方差分析,方差齐则采用Bonferroni检验;若数据不符合正态分布,则采用非参数检验。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 网络药理学分析结果

2.1.1 补脾胃泻阴火升阳汤的药物成分与结肠癌疾病的共同靶点 采用GeneCards、OMIM和Drugbank数据库检索结肠癌疾病相关靶点,去重后共获得1 629个疾病相关靶点,进一步通过Venny

2.1.0 网站,将上述靶点与 268 个药物成分进行交集分析,最终筛选出 141 个交集靶点基因,绘制 Venn 图,见图 1。

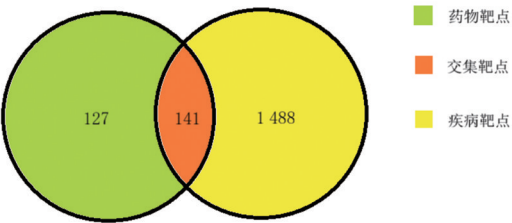


图1 补脾胃泻阴火升阳汤核心组方成分-结肠癌靶点韦恩(Venn)图

2.1.2 基于 STRING 数据库的交集靶点网络分析及核心靶点筛选 将 141 个交集靶点基因信息上传至 STRING 数据库,进行 PPI 网络构建,获得包含 141 个节点和 3 013 条边的 PPI 网络,进一步利用 CytoScape 3.7.2 软件对 PPI 数据进行可视化处理。其中节点代表补脾胃泻阴火升阳汤与结肠癌的共同靶点,边代表靶点间的相互作用关系;网络图中节点越大、颜色越深,代表其 Degree 值越大。对游离节点进行删除。以“Degree”作为排序标准筛选核心靶点,关键靶点包括肿瘤蛋白 53(TP53)、蛋白激酶 B1(AKT1)、表皮生长因子受体(EGFR)、缺氧诱导因子 1A(HIF1A),见图 2。

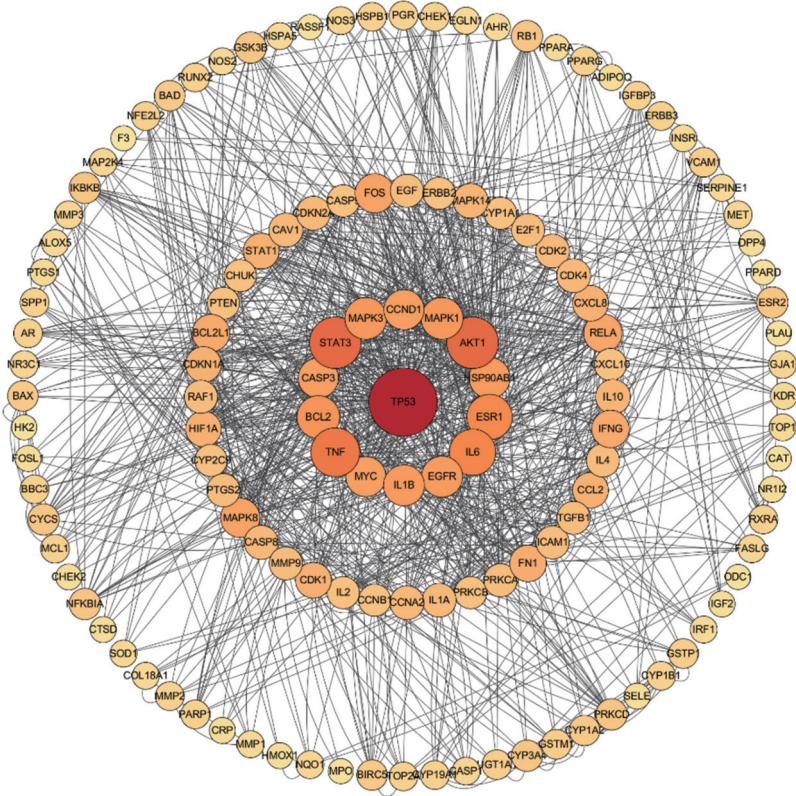


图2 交集靶点蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络图

2.1.3 “中药-活性成分-靶点”网络构建 为更直观地分析数据关系,我们以大写字母缩写指代中药名称(如“CH”指代柴胡),以“字母+数字”组合指代中药的活性成分及中药间的共有成分(如“A1”指代柴胡与其他药物之间的共有有效成分),具体编码规则详见表 2。然后构建“中药-活性成分-靶点”网络,见图 3。

2.1.4 GO 和 KEGG 富集分析 GO 分析富集了 1 033 条功能条目,包括 72 条细胞组成、202 条分子功能和 759 条生物过程。其中,生物过程涉及基因

表达、细胞凋亡、细胞增殖等方面;细胞组成涉及细胞核、细胞质、核质等方面;分子功能涵盖蛋白质聚化、酶、蛋白质同二聚化活性等方面。

KEGG 分析共有 179 条通路,涉及 p53 信号通路、血管内皮生长因子(VEGF)信号通路、缺氧诱导因子-1(HIF-1)信号通路等,说明药物作用的关键靶点与抑癌、血管生成等通路密切相关,见图 4。

2.2 体内实验结果

2.2.1 对裸鼠一般状态和生化指标的影响 模型组与中药组在实验初期裸鼠均出现易疲倦现象,进

表 2 编号与中药活性成分指代关系表

指代字母	中药	指代字母	中药
CH	柴胡	A4	柴胡、黄芪、甘草、黄连
RS	人参	B1	人参、黄芩
SM	升麻	B2	人参、黄芩、羌活
HQ	黄芪	C1	升麻、甘草、黄芩、羌活
GC	甘草	D1	黄芪、甘草
HL	黄连	D2	黄芪、甘草
CZ	苍术	D3	黄芪、甘草
HN	黄芩	D4	黄芪、甘草
QH	羌活	F1	黄连、黄芩
A1	柴胡、人参、升麻、黄芩	F2	黄连、黄芩
A2	柴胡、黄芪、甘草	G1	苍术、黄芩
A3	柴胡、人参、黄芪、甘草		

食稍减少,体质量有所下降,中药组约 2 d 后症状减轻,两组均无死亡情况。西药组治疗初期裸鼠即出现活动和进食明显减少、大便次数增多,体质量持续减轻的情况。中药联合西药组治疗后不久裸鼠出现活动减少、进食减少、大便次数增多的情况,约 3 d 后症状减轻。各组裸鼠生化指标情况见表 3,与模型组相比,西药组以及中药联合西药组丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶、尿素氮、肌酐水平均有所升高($P<0.01$),中药组丙氨酸氨基转移酶水平亦升高($P<0.01$);与中药组相比,中药联合西药组丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶、尿素氮、肌酐水平均有所升高($P<0.01$);与西药组相比,中药联合西药组丙氨酸氨基转移酶有所升高($P<0.05$);其余指标未见明显统计学差异($P>0.05$)。

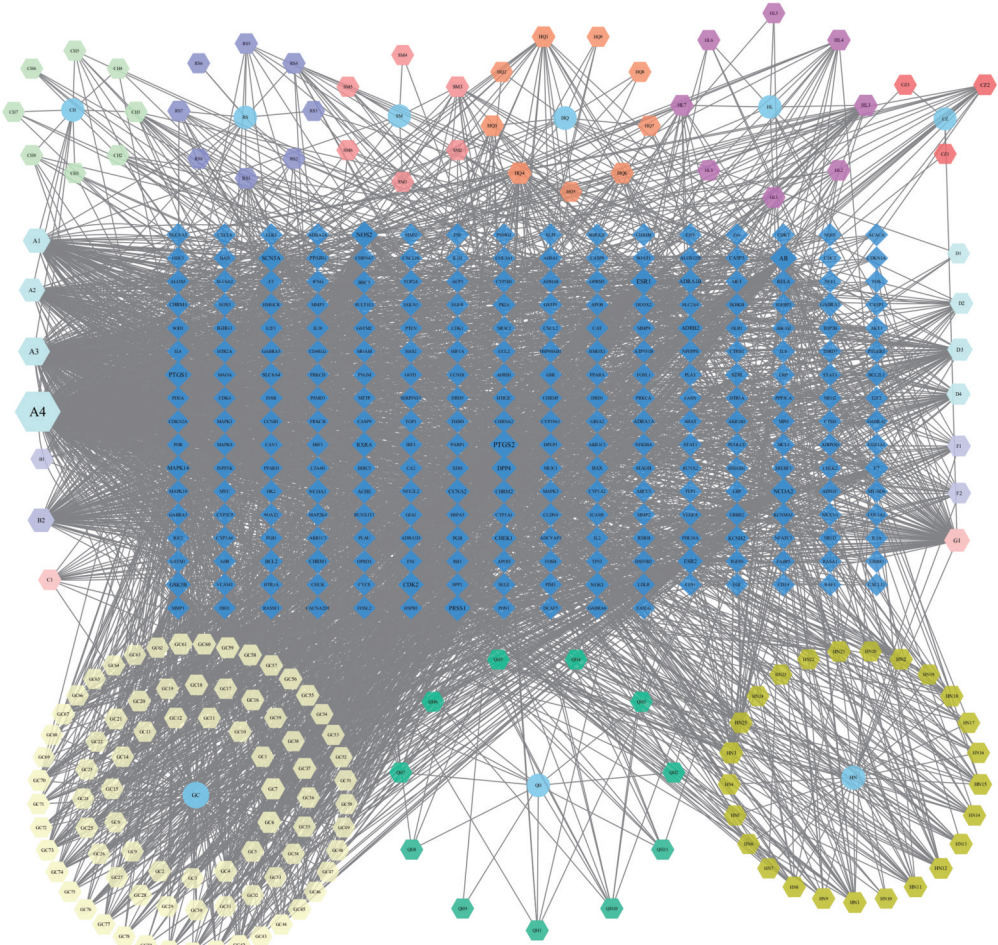
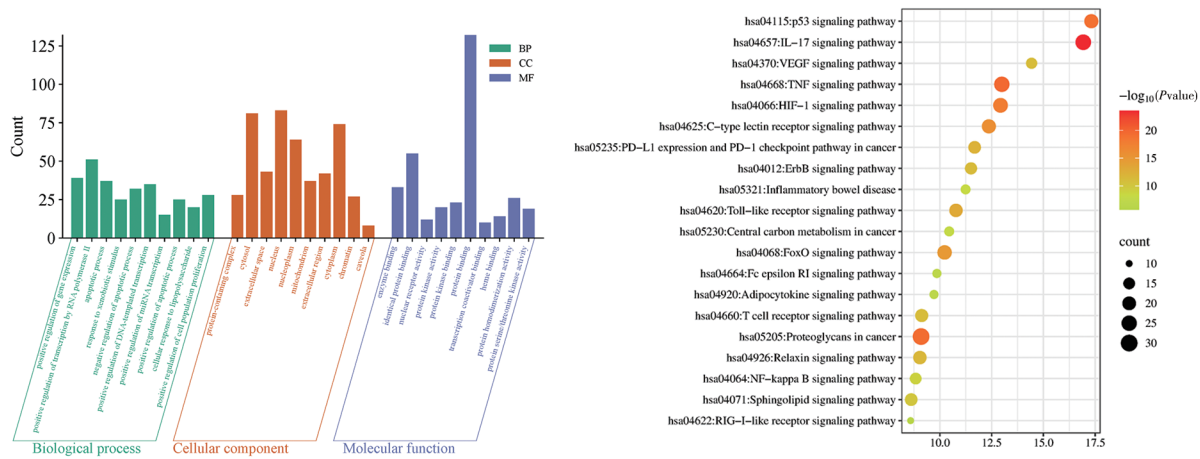


图3 “中药-活性成分-靶点”网络图

2.2.2 对裸鼠移植瘤瘤体质量及裸鼠去瘤后体质量的影响 各组裸鼠移植瘤给药前瘤体体积对比显示,各组之间无明显统计学差异($P>0.05$),表明各组之间具有可比性。各组裸鼠移植瘤瘤体质量对

比结果显示,与模型组相比,中药组、西药组以及中药联合西药组的移植瘤瘤体质量明显降低,差异有统计学意义($P<0.01$);与中药组、西药组比较,中药联合西药组裸鼠移植瘤瘤体质量明显降低,差异有



注:BP为生物过程,CC为细胞组分,MF为分子功能。

图4 GO和KEGG信号通路富集分析

表3 各组皮下移植瘤裸鼠生化指标情况(n=15, $\bar{x} \pm s$, $\mu\text{mol/L}$)

组别	丙氨酸氨基转移酶	天冬氨酸氨基转移酶	肌酐	尿素氮
模型组	19.87±2.03	24.93±2.84	14.47±3.09	3.53±0.34
中药组	23.80±2.33**	26.60±2.79	14.73±2.76	3.80±0.40
西药组	43.40±4.98**	28.40±2.99**	24.53±3.64**	4.39±0.42**
中药联合西药组	48.47±5.69***△	29.13±4.22***	26.67±6.21***	4.77±0.83***

注:与模型组比较,** $P<0.01$;与中药组比较,## $P<0.01$;与西药组比较,△ $P<0.05$ 。

统计学意义($P<0.01$)。中药联合西药组裸鼠肿瘤抑制率高达69.32%,中药组抑制率为34.70%,而西药组抑制率为44.58%。各组裸鼠去瘤体质量对比结果显示,与模型组相比,中药组和中药联合西药组的裸鼠去瘤后体质量明显增加,差异有统计学意义($P<0.05, P<0.01$),而西药组裸鼠去瘤后体质量无明显统计学差异($P>0.05$);中药联合西药组裸鼠去瘤后体质量较中药组降低,较西药组增加,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表4。

表4 各组结肠癌裸鼠肿瘤瘤体质量及裸鼠去瘤后体质量比较(n=15, $\bar{x} \pm s$)

组别	给药前瘤体体积/ mm^3	瘤体质量/g	肿瘤抑制率/%	裸鼠去瘤后体质量/g
模型组	90.91±8.83	2.36±0.26	—	20.21±0.44
中药组	87.57±9.00	1.54±0.37**	34.70	22.83±0.60*
西药组	88.37±9.44	1.31±0.24**	44.58	20.10±0.75
中药联合西药组	88.09±8.57	0.72±0.11***△△	69.32	22.04±0.49***△△

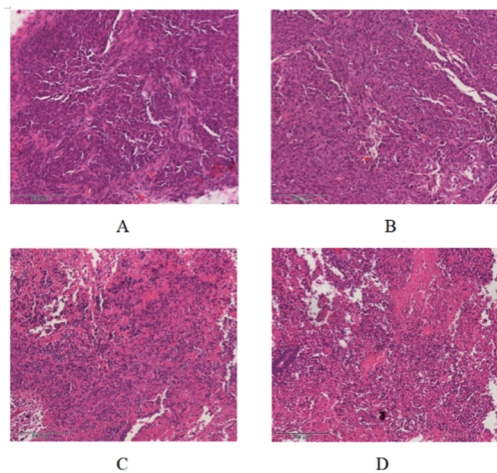
注:“—”表示无。与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与中药组比较,## $P<0.01$;与西药组比较,△△ $P<0.01$ 。

2.2.3 对肿瘤组织病理学的影响 对各组裸鼠的肿瘤组织进行HE染色观察,结果显示,在模型组中大量的肿瘤细胞排列紧密,细胞形态不规则,并存在病理性核分裂象;中药组中,较多肿瘤细胞分布,多数呈大的多边形至圆形;西药组中,肿瘤细胞坏死;而在中药联合西药组中,肿瘤细胞的数量减少,体积缩小,分布稀疏且病理性核分裂象有明显改善。见图5。

2.2.4 对肿瘤组织中HIF-1 α 、GLUT1、HK2、LDHA表达的影响 IHC检测结果显示,与模型组相比,中药组肿瘤组织中HIF-1 α 、GLUT1、HK2和LDHA蛋

白表达水平显著降低($P<0.05, P<0.01$);而与中药组和西药组相比,中药联合西药组肿瘤组织中HIF-1 α 、GLUT1、HK2和LDHA表达水平明显降低($P<0.05, P<0.01$),棕色区域不明显。见图6。

2.2.5 对结肠癌肿瘤组织中HIF-1 α 、GLUT1、HK2、LDHA mRNA表达的影响 结果显示,与模型组相比,在西药组和中药联合西药组中,肿瘤组织中HIF-1 α 、GLUT1、HK2和LDHA的mRNA表达水平均显著降低($P<0.01$)。与模型组相比,中药组肿瘤组织中LDHA的mRNA的表达水平无明显差异($P>0.05$),而HIF-1 α 、GLUT1、HK2的mRNA表达水平均显

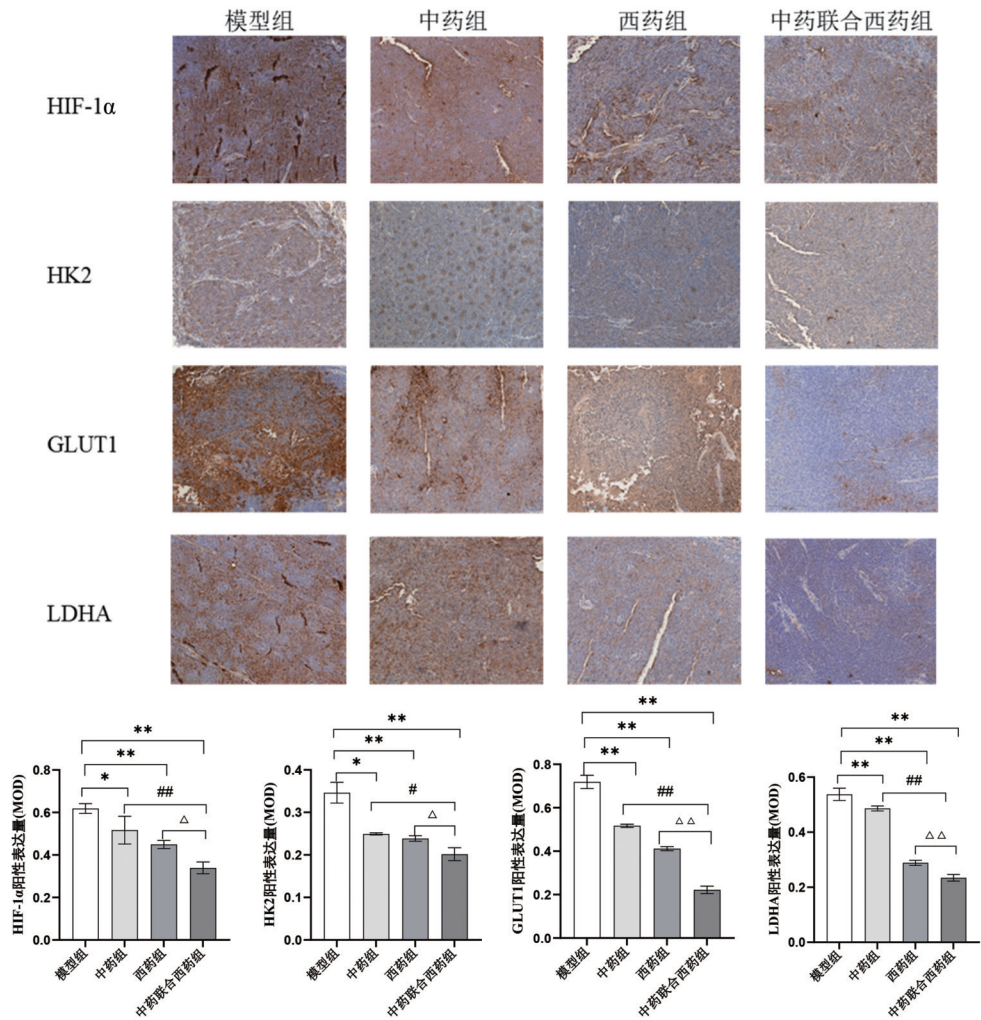


注:A为模型组、B为中药组、C为西药组、D为中药联合西药组。

图5 各组裸鼠肿瘤组织病理学(苏木精-伊红染色,×20)

著降低($P<0.01$);与中药组相比,中药联合西药组中 *HIF-1 α* 、*GLUT1*、*HK2*和*LDHA*的mRNA表达水平均显著降低($P<0.01$);与西药组相比,中药联合西药组中 *HIF-1 α* 、*GLUT1*、*HK2*的mRNA表达水平均显著降低($P<0.01$),而*LDHA*的mRNA表达水平降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表5。

2.2.6 对结肠癌肿瘤组织中 *HIF-1 α* 、*HK2*、*GLUT1*、*LDHA* 蛋白表达的影响 与模型组相比,中药组、西药组、中药联合西药组裸鼠肿瘤组织中 *HIF-1 α* 、*HK2*、*GLUT1*、*LDHA* 蛋白的表达水平均降低($P<0.05$)。而中药联合西药组 *HIF-1 α* 、*HK2*、*GLUT1*、*LDHA* 蛋白的表达水平较中药组、西药组降低($P<0.05$)。见图7。



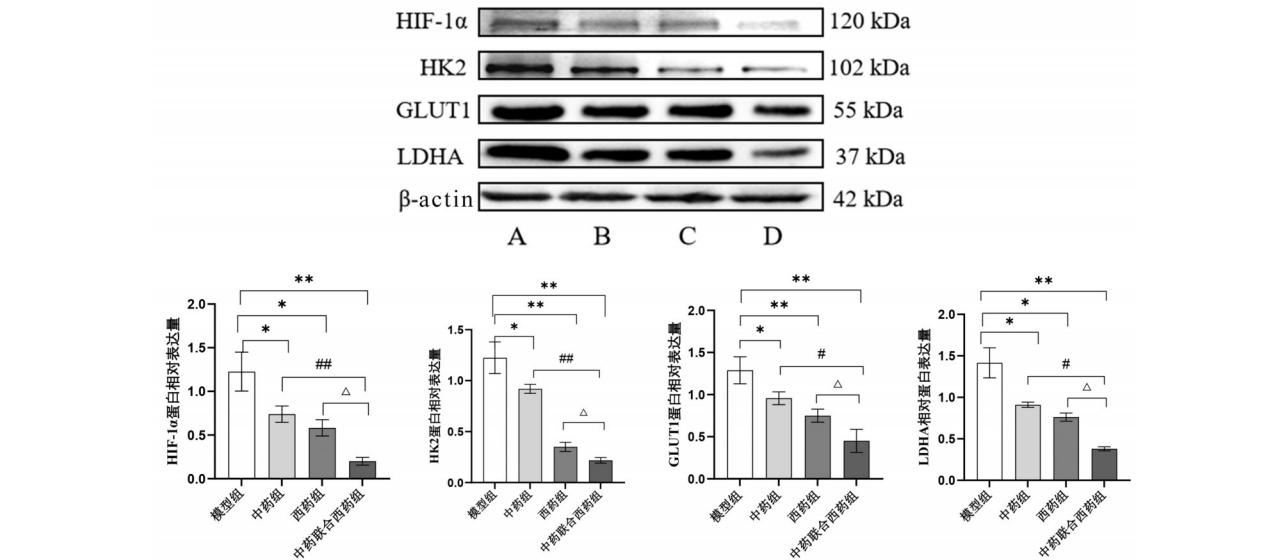
注:MOD为平均光密度值,*HIF-1 α* 为缺氧诱导因子-1 α ,*HK2*为己糖激酶2,*GLUT1*为葡萄糖转运蛋白1,*LDHA*为乳酸脱氢酶A。与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与中药组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与西药组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$;n=15, $\bar{x}\pm s$ 。

图6 各组裸鼠结肠癌组织 *HIF-1 α* 、*GLUT1*、*HK2*、*LDHA* 表达比较(免疫组织化学法,×20)

表 5 各组裸鼠结肠癌肿瘤组织中相关 mRNA 表达的比较 (n=15, $\bar{x}\pm s$)

组别	HIF-1 α	GLUT1	HK2	LDHA
模型组	1.001 $\pm$ 0.034	1.000 $\pm$ 0.021	1.000 $\pm$ 0.007	1.001 $\pm$ 0.048
中药组	0.411 $\pm$ 0.020**	0.626 $\pm$ 0.004**	0.812 $\pm$ 0.005**	0.893 $\pm$ 0.005
西药组	0.207 $\pm$ 0.005**	0.351 $\pm$ 0.006**	0.216 $\pm$ 0.004**	0.512 $\pm$ 0.073**
中药联合西药组	0.162 $\pm$ 0.006*** $\Delta\Delta$	0.115 $\pm$ 0.002*** $\Delta\Delta$	0.126 $\pm$ 0.000*** $\Delta\Delta$	0.221 $\pm$ 0.004*** $\Delta\Delta$

注: HIF-1 α 为缺氧诱导因子-1 α 基因, GLUT1 为葡萄糖转运蛋白 1 基因, HK2 为已糖激酶 2 基因, LDHA 为乳酸脱氢酶 A 基因。与模型组比较, ** $P<0.01$; 与中药组比较, ## $P<0.01$; 与西药组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。



注: A 为模型组, B 为中药组, C 为西药组, D 为中药联合西药组。HIF-1 α 为缺氧诱导因子-1 α , GLUT1 为葡萄糖转运蛋白 1, HK2 为已糖激酶 2, LDHA 为乳酸脱氢酶 A, β -actin 为 β -肌动蛋白。与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与中药组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$; 与西药组比较, $\Delta P<0.05$; $n=15$, $\bar{x}\pm s$ 。

图 7 各组裸鼠结肠癌肿瘤组织中相关蛋白表达比较 (Western blot 法)

3 讨论

葡萄糖为细胞进行代谢的主要物质来源,参与多种细胞活动。在肠癌发生发展过程中的缺氧条件下,主要由糖酵解途径提供能量,具体表现为葡萄糖转运蛋白(如 GLUT1)表达上调,促使葡萄糖大量摄入细胞;己糖激酶(HK)、乳酸脱氢酶(LDH)等糖酵解关键酶活性增强,加速葡萄糖分解为乳酸;同时, HIF-1 α 是缺氧时肿瘤细胞代谢的关键调节剂, HIF-1 α 及其下游信号通路在缺氧微环境或其他因素刺激下过度激活,进一步促进糖酵解相关基因的表达,使得肿瘤细胞依赖糖酵解维持快速增殖和生存^[16-17]。研究^[18]证实, HIF-1 通过上调 GLUT 的表达和增强糖酵解途径中关键酶,包括 HK2 和 LDH 等的转录而提高葡萄糖摄取,促进糖酵解过程,而这些糖酵解关键酶又负反馈调节 HIF-1 活性,从而为肿瘤细胞提供能量。

从中医理论来看, 肠癌患者多存在脾胃虚弱的

基础。脾胃虚弱则运化失常,水谷不能正常转化为气血精微,反而化生痰湿、瘀浊等病理产物。一方面,脾胃虚弱导致机体正气不足,无力抵御外邪,癌毒内生;另一方面,脾胃运化失司,气血运行不畅,可形成内火,即“阴火”。阴火内炽可进一步损伤脾胃,同时促进癌毒的发展。这与现代医学中肠癌糖酵解异常存在一定关联,脾胃虚弱可对应机体整体代谢功能下降,能量生成不足;而阴火内炽则类似糖酵解过度活跃,产生过多酸性代谢产物(如乳酸),形成肿瘤局部的“毒热”微环境,促进肿瘤的进展^[19-20]。补脾胃泻阴火升阳汤与我们熟知的补中益气汤均由李东垣创立,相比较而言补中益气汤中无清热药物,适用于单纯气虚下陷证;补脾胃泻阴火升阳汤增加了黄芩、黄连、石膏等清热药物,可同时治疗“气虚”和“内热”并存的证候,如肿瘤患者放疗后出现的神疲乏力、食欲减退(气虚)与口干口苦,其适应证更广泛。

本研究通过网络药理学研究了补脾胃泻阴火升阳汤的成分及其对结肠癌的潜在治疗靶点。结果表明,补脾胃泻阴火升阳汤含有 141 个可能对结肠癌治疗产生影响的潜在靶点,后续的“中药-有效成分-靶点”网络分析显示,其中,p53、AKT1、EGFR、HIF-1 α 等可能是补脾胃泻阴火升阳汤治疗结肠癌的关键靶点。补脾胃泻阴火升阳汤对结肠癌的治疗作用主要富集在 p53、VEGF、HIF-1 等信号通路,与糖代谢最相关的通路为 HIF-1 信号通路,调节 GLUT1、HK2 以及 LDHA 的表达,在调节糖酵解过程中的关键酶起重要作用,靶向抑制 HIF-1 信号通路从而抑制糖酵解可能是补脾胃泻阴火升阳汤治疗结肠癌的潜在机制。

裸鼠体内实验进一步表明,补脾胃泻阴火升阳汤联合卡培他滨显著抑制裸鼠皮下移植瘤的生长,并能改善肿瘤组织细胞形态。与模型组和其他给药组相比,中药联合西药组裸鼠移植瘤瘤体质量明显降低,且肿瘤抑制率高达 69.32%,提示补脾胃泻阴火升阳汤联合卡培他滨治疗的肿瘤抑制率优于补脾胃泻阴火升阳汤或卡培他滨单药治疗。对药物的安全性评价方面,中药联合西药组干预裸鼠无致死性风险,给药期间中药组及中药联合西药组裸鼠一般状态较模型组有所改善,提示中药可能能够纠正肿瘤的恶病质状态及缓解西药的不良反应。但中药联合西药方案会加重裸鼠肝肾功能指标异常,尤其加剧肝肾功能损伤,整体安全性低于单纯中药治疗,且较单纯西药治疗存在更明显的肝功能波动风险。因此,临床若采用中药联合西药方案,需重点监测患者肝肾功能,尤其是肝功能相关指标,严格控制用药剂量与疗程,降低肝肾损伤风险。我们进一步检测了相关细胞因子和蛋白的表达,结果表明补脾胃泻阴火升阳汤联合卡培他滨能抑制结肠癌移植瘤裸鼠肿瘤组织中 HIF-1 α 蛋白表达水平,下调移植瘤中 HK2、GLUT1、LDHA 的 mRNA 表达水平,抑制糖酵解过程中的关键酶(GLUT1、HK2 以及 LDHA)的表达,从而影响糖酵解过程。已有不少研究表明中药单体及复方可通过肿瘤代谢重编程途径对结肠癌发挥治疗作用。例如,健脾消癌方通过干预结肠癌细胞来源外泌体中微小 RNA-21(miRNA-21)调控癌症相关成纤维细胞的活化与糖酵解,从而抑制结肠癌肺转移^[21]。李鹏昊等^[22]证明了丹酚酸 B 通过下调糖酵解相关蛋白 GLUT1、LDHA 等的表达来抑制糖酵解,从而抑制结肠癌细

胞的增殖等。Weng 等^[23]发现,禁食能够上调法尼基二磷酸法尼基转移酶 1(FDFT1)的表达,从而抑制结肠癌细胞糖酵解和增殖过程。Bessa 等^[24]的研究表明,7 α -乙酰氧基-6 β -苯甲酰氧基-12-O-苯并酰基莲酮能够选择性激活蛋白激酶 C δ (PKC δ),从而降低与葡萄糖代谢直接相关的关键糖酵解标志物的表达,如 GLUT1、HK2,抑制糖酵解从而发挥抗肿瘤作用。此外,Pan 等^[25]报道柚皮苷能够抑制 HIF-1 α 的转录活性,进而降低结肠癌细胞中的糖酵解,从而治疗结肠癌。

磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/AKT/雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路是 HIF-1 α 的上游信号通路,通过翻译激活和稳定性调控,直接促进 HIF-1 α 的表达与功能激活,是缺氧及营养应激下 HIF-1 α 通路激活的关键途径。PI3K 先被生长因子、缺氧等信号激活,进而招募并激活 AKT。AKT 通过磷酸化结节性硬化症复合体(TSC)1/TSC2 复合物解除其抑制,激活 mTOR。mTOR 通过下游的细胞因子,促进 HIF-1 α mRNA 翻译,同时 AKT 可直接磷酸化 HIF-1 α ,抑制其泛素化降解,提升蛋白稳定性。正常生理状态下,该通路调控细胞在缺氧、营养匮乏时的代谢适应(如糖酵解切换)和血管生成;病理状态下,该通路常被异常激活,导致 HIF-1 α 持续高表达,促进肿瘤细胞增殖、侵袭及耐药性形成。李东垣提出的“阴火”本质是脾胃气虚导致的虚火上炎,与现代医学中缺氧微环境下 HIF-1 α 的异常激活具有相似性。补脾胃泻阴火升阳汤通过补脾升阳(黄芪、人参)恢复脾胃运化,减少因气虚导致的代谢紊乱和缺氧,从而降低 HIF-1 α 的表达;同时,泻火药物(黄连、黄芩)直接抑制 HIF-1 α 的转录活性,阻断其下游血管生成因子(VEGF)和糖酵解(GLUT1/LDHA)通路。补脾胃泻阴火升阳汤中的风药(柴胡、升麻、羌活)通过升举清阳,调节 PI3K/AKT/mTOR 通路的空间定位。此外,风药的升散作用可能拮抗因脾虚导致的 mTOR 过度激活,恢复气机平衡。

本研究在方法上融合了网络药理学与体内实验验证,发现补脾胃泻阴火升阳汤可能通过抑制糖酵解过程中关键酶——GLUT1、HK2、LDHA 以及 HIF-1 α 的表达,进而发挥抗结肠癌的作用,也为结肠癌的治疗提供了新的视角和潜在的靶点。然而,本研究也存在一定的局限性。首先,由于本研究在动物模型上进行,且实验的样本量相对较少,因此有必要进行大样本实验,且需在人类受试者中进一

步验证其有效性和安全性;其次,网络药理学仅根据主要相关靶点进行研究,对预测的准确性可能存在偏倚;最后,尽管本研究发现了补脾胃泻阴火升阳汤对糖酵解中关键酶的调节作用,但未探索 HIF-1 α 的上游调控机制,如 PI3K/AKT/mTOR 通路,缺乏代谢产物层面的直接证据。因此,后续我们将进一步进行大样本动物实验研究,或在人类受试者层面开展研究,并对其上游通路机制进行详细阐明。

综上所述,本研究结果表明,补脾胃泻阴火升阳汤可能通过调节糖酵解途径来抑制结肠癌细胞恶性生物学行为,为补脾胃泻阴火升阳汤联合卡培他滨在结肠癌治疗中的应用提供依据,但由于机制复杂,仍需动物实验及临床研究进行验证。

参考文献:

- [1] 赵宇明,莫日根,史圣华. 大肠癌经典方临证精华[M]. 北京:中国中医药出版社,2020: 1.
- [2] 冯向荣,金钊,王倩,等. 从阴火论治肿瘤[J]. 河南中医,2020, 40(3): 348-350.
- [3] 王靖涵,唐晔,崔孔蛟,等. 基于阴火、君火及相火探析张振贤辨治慢性疲劳综合征伴负性情绪经验[J]. 上海中医药杂志, 2025, 59(1): 36-40.
- [4] 方银锐,陈刚毅. 阴火论澄源[J]. 中华中医药杂志, 2025, 40(3): 1364-1367.
- [5] 李一菁,黄胜楠,王子昂,等. 基于有氧糖酵解调节的纳米药物递送系统用于肿瘤治疗的研究进展[J]. 药科学报, 2024, 59(9): 2509-2518.
- [6] 朱艳秋,刘春宏,钱薇,等. 柴胡皂苷 D 对胃癌细胞糖酵解代谢及 YAP1/c-Myc 表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2024, 44(19): 4717-4722.
- [7] 董晓茜,董笑博,高雪,等. 基于“扶正祛邪”探讨黄芪苦参配伍改善结肠癌荷瘤小鼠肿瘤免疫微环境作用机制[J]. 辽宁中医药大学学报, 2025, 27(2): 7-12.
- [8] 瞿领航. 基于“菌群-代谢-炎症”研究麸炒苍术防治结肠炎增效机理[D]. 武汉:湖北中医药大学,2022.
- [9] 黄颖. 人参皂苷 Rg3 通过调控肿瘤相关巨噬细胞极化抑制结肠癌进展作用机制研究[D]. 南京:南京中医药大学,2025.
- [10] 黄莉,王段珩,周艾玲,等. 黄芩苷对高龄小鼠卵巢糖代谢限速酶活性和凋亡蛋白表达的影响[J]. 中华中医药学刊, 2025, 43(2): 141-145.
- [11] 吴国成,陈煥. 黄连素调节非小细胞肺癌细胞糖酵解水平并抑制 A549 细胞 EMT 的发生[J]. 临床肺科杂志, 2020, 25(8): 1206-1211.
- [12] 罗成,叶远航,姜成,等. 基于网络药理学和实验验证探讨宣白承气汤治疗急性肺损伤的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(16): 4329-4337.
- [13] 贾元萍,窦丹,李丽玲,等. 基于网络药理学探讨宣白承气汤治疗急性呼吸窘迫综合征的作用机制[J]. 中医杂志, 2022, 63(6): 564-571.
- [14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2025 版):一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2025.
- [15] 汪舒云,谢曼丽,孙可向,等. 参苓白术散对大肠癌移植瘤模型小鼠化学疗法后肠道黏膜屏障的影响[J]. 上海中医药杂志, 2023, 57(4): 57-64.
- [16] 张彧,田晓玲,付琴,等. 基于“清温并用”理论赤芍-附子调控 HIF-1 α 介导糖酵解干预慢加急性肝衰竭大鼠免疫损伤的作用机制[J]. 上海中医药杂志, 2025, 59(3): 85-93.
- [17] 詹向荣,彭文康,杨芳,等. 菝葜皂苷元靶向 HIF1 α 蛋白稳定性抑制结直肠癌糖代谢重编程的作用机制[J/OL]. 中国中药杂志, 2025 [2025-12-14]. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcm.20250905.704>.
- [18] 贾永恒,姜涛. HIF-1 α 与 Glut-1 在大肠癌中表达及与脉管侵犯的关系[J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(2): 303-306.
- [19] 胡艳娥,文进渝,何佳玮,等. 基于代谢重编程探析肿瘤“体阴用阳”的病机实质[J/OL]. 辽宁中医杂志, 2025 [2025-12-05]. <https://link.cnki.net/urlid/21.1128.R.20250123.1930.010>.
- [20] 刘茂赫,赵林. 基于阴火理论探析癌因性疲乏的病机和辨治[J]. 湖南中医杂志, 2023, 39(12): 88-90.
- [21] 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 CAFs 的活化与糖酵解的研究[J]. 中药药理与临床, 2023, 39(6): 2-7.
- [22] 李鹏昊,梁锐,卜宪越,等. 丹酚酸 B 对结肠癌细胞 HCT116 增殖、迁移、糖酵解和上皮-间充质转化作用及机制研究[J]. 药物评价研究, 2024, 47(8): 1797-1803.
- [23] WENG M L, CHEN W K, CHEN X Y, et al. Fasting inhibits aerobic glycolysis and proliferation in colorectal cancer via the Fdft1-mediated AKT/mTOR/HIF1 α pathway suppression[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 1869.
- [24] BESSA C, LOUREIRO J B, BARROS M, et al. Counteracting colon cancer by inhibiting mitochondrial respiration and glycolysis with a selective PKC δ activator[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(6): 5710.
- [25] PAN G, ZHANG P, CHEN A, et al. Aerobic glycolysis in colon cancer is repressed by naringin via the HIF1A pathway[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2023, 24(3): 221-231.

编辑:杨轶舜

收稿日期:2025-10-03