

# 加减理冲汤通过 Fas/FasL 途径及 caspase 凋亡途径对裸鼠移植瘤细胞凋亡的作用机制研究<sup>Δ</sup>

施国善<sup>1\*</sup>, 郝铁霞<sup>2</sup>, 陈哲<sup>3</sup>, 李旭<sup>4</sup>, 马立威<sup>4#</sup>(1. 贵州中医药大学基础中医学院, 贵阳 550025; 2. 贵州中医药大学基础医学院, 贵阳 550025; 3. 齐齐哈尔医学院公共卫生学院, 黑龙江齐齐哈尔 161006; 4. 齐齐哈尔医学院医药科学研究院, 黑龙江齐齐哈尔 161006)

中图分类号 R285;R985 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)07-0895-07  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.07.12



**摘要** 目的 探讨加减理冲汤(MLCD)对裸鼠移植瘤细胞凋亡的作用及机制。方法 培养胃癌 AGS 细胞并构建裸鼠移植瘤模型;将裸鼠分为模型组以及 MLCD 低、中、高剂量组(150、300、600 mg/kg),连续灌胃蒸馏水/相应药液,每日 1 次,连续 4 周。每 6 d 测量 1 次裸鼠移植瘤的大小并计算移植瘤体积;给药结束后处死裸鼠并分离移植瘤组织,检测移植瘤组织中乳酸脱氢酶(LDH)、活性氧(ROS)含量并评估线粒体膜电位变化;观察移植瘤组织的病理形态变化;检测移植瘤组织中胱天蛋白酶(caspase)-3、caspase-8、caspase-9 酶活性,以及 Fas、Fas 配体(FasL)蛋白表达和 caspase-3、caspase-8、caspase-9、Fas、FasL mRNA 表达。结果 与模型组比较,MLCD 各剂量组裸鼠移植瘤体积均有不同程度缩小,LDH、ROS 含量以及 caspase-3、caspase-8、caspase-9 酶活性均显著升高/增强,线粒体膜电位显著降低,Fas、FasL 蛋白表达以及 caspase-3、caspase-8、caspase-9、Fas、FasL mRNA 表达均显著上调,以上指标大部分差异有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。病理结果显示,随着 MLCD 给药剂量的增加,移植瘤组织中细胞的紧密程度逐渐下降,出现松散、碎片逐渐增多等典型的细胞凋亡形态学特征。结论 MLCD 能诱导裸鼠移植瘤细胞凋亡,其作用机制可能与激活 Fas/FasL 途径及 caspase 凋亡途径有关。

**关键词** 加减理冲汤;AGS 细胞;caspase 凋亡途径;Fas/FasL 途径;细胞凋亡

## Mechanism of modified Lichong decoction on apoptosis of transplanted tumor cells in nude mice via Fas/FasL pathway and caspase apoptosis pathway

SHI Guoshan<sup>1</sup>, HAO Tiexia<sup>2</sup>, CHEN Zhe<sup>3</sup>, LI Xu<sup>4</sup>, MA Liwei<sup>4</sup>(1. School of Basic Chinese Medicine, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China; 2. School of Basic Medical Sciences, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China; 3. School of Public Health, Qiqihar Medical University, Heilongjiang Qiqihar 161006, China; 4. Institute of Medical Sciences, Qiqihar Medical University, Heilongjiang Qiqihar 161006, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To investigate the effect and mechanism of modified Lichong decoction (MLCD) on the apoptosis of transplanted tumor cells in nude mice. **METHODS** Human gastric cancer AGS cells were cultured, and a nude mice transplanted tumor model was established. The nude mice were divided into the model group and MLCD low-, medium- and high-dose groups (150, 300, 600 mg/kg). They were given distilled water or the corresponding drug solution by gavage once daily for four consecutive weeks. The size of transplanted tumors in nude mice was measured every six days, and the tumor volume was calculated. After the medication, the nude mice were sacrificed, and the transplanted tumor tissues were isolated. The contents of lactate dehydrogenase (LDH) and reactive oxygen species (ROS) in the transplanted tumor tissues were detected, and the changes in mitochondrial membrane potential were assessed. The pathological morphological changes were observed. The enzymatic activities of caspase-3, caspase-8, and caspase-9, as well as protein expressions of Fas and FasL and mRNA expressions of caspase-3, caspase-8, caspase-9, Fas and FasL in the transplanted tumor tissues, were detected. **RESULTS** Compared with the model group, the volume of transplanted tumors in nude mice from all MLCD dose groups was reduced

<sup>Δ</sup> 基金项目 贵州省基础研究计划面上项目(No.黔科合基础MS[2026]660, No.黔科合基础-ZK[2021]一般502)

\* 第一作者 讲师,博士。研究方向:中医药抗肿瘤。E-mail: sguoshan@163.com

# 通信作者 副研究员,博士。研究方向:天然药物抗肿瘤。E-mail: 549133553@qq.com

to varying degrees. The contents of LDH and ROS, as well as the enzymatic activities of caspase-3, caspase-8 and caspase-9, were significantly increased/enhanced. The mitochondrial membrane potential was significantly decreased. The protein expressions of Fas and FasL, and the mRNA expressions of caspase-3, caspase-8, caspase-9, Fas and FasL were significantly up-regulated. Most of these differences were statistically significant ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Pathological results showed that with increasing doses of MLCD, the cellular density in the transplanted tumor tissues gradually decreased, and typical morphological features of apoptosis, such as loosening and increasing fragmentation, became more prominent. **CONCLUSIONS** MLCD can induce apoptosis in transplanted tumor cells of nude mice, and its mechanism may be related to the activation of the Fas/FasL pathway and the caspase apoptotic pathway.

**KEYWORDS** modified Lichong decoction; AGS cells; caspase apoptotic pathway; Fas/FasL pathway; cell apoptosis

胃癌作为消化系统常见的恶性肿瘤,其2023年全球新增患者约90万、死亡患者超70万,病死率在我国恶性肿瘤中列第3位<sup>[1-2]</sup>。目前,临床上常用的胃癌化疗药物均存在较为严重的不良反应,因此迫切需要寻找低毒、高效的临床治疗药物,以提升患者的预后质量<sup>[3]</sup>。

中医药凭借多途径、多环节、多靶点、低毒性等特性,在肿瘤防治领域受到广泛关注<sup>[4]</sup>。理冲汤收录于著名医家张锡纯所著《医学衷中参西录》,原方由黄芪等9味中药组成<sup>[5]</sup>。理冲汤具有治疗胃痛、消化不良等脾胃病症,以及肿块、结节类疾病和消耗性、虚弱类疾病的功能特性,结合中医理论中胃癌“元气亏虚、癌毒侵袭、痰饮内生、瘀血阻滞”的基本病机,目前该方的应用得以拓展至胃癌的治疗。本课题组在原方基础上进行加减优化,减去知母、天花粉等清热养阴的药物,加入白花蛇舌草、半枝莲、守宫、鹿角、龟甲等具有清热解毒、消除肿块、补充元气功效的药物,组成了加减理冲汤(modified Lichong decoction, MLCD)复方。该改良方剂由12种中药材组成,方中西洋参、白术、黄芪健运脾胃;三棱、莪术消食积、化瘀血、消肿块;鹿角、龟甲补充人体元阴元阳;白花蛇舌草、半枝莲清热解毒;水蛭、守宫消肿块;海藻化痰散结;各味药共奏扶正抗癌之效。

本课题组前期研究证实,MLCD在体内和体外均能通过激活线粒体途径,抑制胃癌AGS细胞的增殖,并诱导其凋亡<sup>[6-7]</sup>。中药抗肿瘤具有多途径、多靶点的特性,MLCD抗胃癌作用的调控是否有其他途径参与,目前尚不清楚。有研究表明,细胞凋亡是一个复杂的生物学过程,受内源性线粒体途径和外源性死亡受体途径共同调控<sup>[8]</sup>。Fas(又称“CD95”)是肿瘤坏死因子受体超家族成员,Fas/Fas配体(Fas ligand, FasL)途径属于肿瘤细胞经典的死亡受体途径,该途径通过Fas与其配体FasL相互作用来调节细胞凋亡,参与细胞的生理和病理过程<sup>[9]</sup>。此外,研究表明,胱天蛋白酶(caspase)家族与细胞凋亡紧密相关,目前已证实人体内共有11个caspase家族成

员;caspases依据其功能可分为炎症caspase和凋亡caspase<sup>[10]</sup>。其中,caspase-8、caspase-9分别作为线粒体途径和死亡受体途径的凋亡酶,与caspase-3共同参与细胞凋亡的调控<sup>[11]</sup>。基于此,本研究通过胃癌AGS细胞构建裸鼠移植瘤模型,基于Fas/FasL途径及caspase凋亡途径,探究MLCD的体内抗细胞凋亡作用机制,以期为MLCD的临床应用提供科学的实验数据。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括:3111型恒温细胞培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司)、Safire2型全波长多功能酶标仪(奥地利Tecan公司)、Q5型荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国ABI公司)、Observer A1型荧光显微镜(德国Zeiss公司)、ChemiDoc™ MP全能型荧光成像系统(美国Bio-Rad公司)、BioSpec-nano型微量紫外分光光度计(日本岛津公司)。

### 1.2 主要药材与试剂

守宫、白花蛇舌草、半枝莲、海藻、水蛭、三棱、莪术、鹿角、龟甲、白术、黄芪、西洋参12种中药材均购自贵州一品药业连锁有限公司,经齐齐哈尔医学院天然药物化学实验中心郭丽娜教授鉴定均为真品。DMEM培养基(批号RNBL5292)购自美国Sigma公司;胎牛血清(批号JC63436)购自美国CLARK Bioscience公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)测定试剂盒(批号20211187)购自南京建成生物工程研究所有限公司;RNAiso Plus试剂盒、PCR反转录试剂盒、荧光定量PCR试剂盒(批号分别为AN70637A、AJ60658A、AJG1421A)均购自日本Takara公司;AO-EB染色试剂盒、 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)内参引物(批号分别为J407FA0005、H429KA9897)均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒(批号E134892)购自美国Invitrogen公司;caspase-3、caspase-8、caspase-9活性检测试剂盒(批号分别为

A206250721、A206250814、A206250930)均购自上海碧云天生物技术有限公司;线粒体膜电位检测试剂盒(批号6113547)购自美国BD公司;Fas、FasL抗体(批号分别为82419、15285)均购自美国Abcam公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG、兔单克隆甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(批号分别为#12、#07)均购自美国CST公司。

### 1.3 细胞株及实验动物

人源胃癌 AGS 细胞购自中国科学院上海细胞库。4~5 周龄的 SPF 级 BALB/c 裸鼠 40 只(雌、雄各半),购自北京维通利华实验动物科技有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2019-0011。裸鼠饲养在贵州中医药大学实验动物研究所 SPF 级动物房(实验温度 20~26 °C,相对湿度 40%~70%,每 12 h 光暗循环,自由摄食、饮水),使用许可证号:SYXK(黔)2021-0005。本研究动物实验方案获得贵州中医药大学实验动物伦理审查委员会批准(编号:20230268),实验过程中实验动物按照 3R 原则给予人道关怀。

## 2 方法

### 2.1 MLCD 药液的制备

取“1.2”项下 12 种药材饮片(饮片混合后的总质量为 240 g),采用回流提取法制备 MLCD,药物的成分鉴定及其冻干粉的具体制备过程参考本课题组前期研究<sup>[6-7]</sup>;随后用生理盐水将冻干粉稀释成质量浓度为 100 mg/mL 的 MLCD 药液以备后续使用。

### 2.2 建模、分组及给药

裸鼠适应性饲养 1 周后,把处于对数生长期的人源胃癌 AGS 细胞以  $3 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$  的浓度接种至 40 只裸鼠的左前肢腋下,每只裸鼠接种量为 0.2 mL。观察裸鼠的成瘤情况,当接种处肉眼可见明显结节时,表明已成瘤,即裸鼠移植瘤模型构建成功。将 40 只建模成功的裸鼠分为模型组和 MLCD 低、中、高剂量组,每组 10 只。MLCD 低、中、高剂量组裸鼠根据前期预实验结果并结合实验动物体重,分别给予 150、300、600 mg/kg 的 MLCD 药液;模型组裸鼠给予等体积蒸馏水。裸鼠每天灌胃 1 次,连续 4 周。

### 2.3 裸鼠移植瘤体积的测定

从给药第 1 天起每隔 6 d 测量 1 次各组裸鼠的肿瘤大小(长径、短径),并计算移植瘤体积[移植瘤体积 =  $\frac{1}{2}$ (长径  $\times$  短径<sup>2</sup>)]用以评估移植瘤的生长情况。给药结束后处死裸鼠,立即分离肿瘤组织保存备用。

### 2.4 裸鼠移植瘤组织中 LDH 含量检测

选取“2.3”项下每组 3 只裸鼠的新鲜移植瘤组织(约 50 mg),放入装有液氮的研钵中研磨,直至无明显沉淀,随后将研磨物收集至无菌 EP 管中。在每个 EP 管中加入 2 mL 磷酸盐缓冲液,对各组样本进行稀释。取 150  $\mu\text{L}$  稀释后的样本加入 96 孔板,并对应加入反应试剂,在室温下孵育 5 min,采用酶标仪测定 450 nm 波长处的光密度(optical density, OD)值;同法测定标准品(丙酮酸)对应的 OD 值,绘制标准曲线。依照说明书方法测定移植瘤组织中 LDH 的含量。

### 2.5 裸鼠移植瘤组织病理形态观察

选取“2.3”项下每组 3 只裸鼠的新鲜移植瘤组织(约 20 mg),用组织固定液固定,经脱水、石蜡包埋、切片处理后,将切片捞至载玻片上,置于烤箱中烤干。随后进行脱蜡和水化,制成待测组织切片。向各组切片滴加通透液,于室温下反应 10 min。将预先配制好的 AO-EB 染色液分别滴加至各组白片上,室温避光反应 15 min,以磷酸盐缓冲液洗掉染色液,滴加防淬灭树脂胶封片;采用荧光显微镜观察移植瘤组织的病理形态并拍照。

### 2.6 裸鼠移植瘤组织中线粒体膜电位检测

选取“2.3”项下每组 3 只裸鼠的新鲜移植瘤组织(约 20 mg),依照“2.5”项下方法制成组织切片。向各组切片滴加通透液,于室温下反应 10 min。将预先配制好的 JC-1 染色液分别滴加至各组切片,于 37 °C 避光孵育 30 min。滴加洗涤液对染色玻片漂洗 3 次,用磷酸盐缓冲液冲洗,滴加防淬灭树脂胶封片。采用荧光显微镜观察组间颜色变化,以绿/红荧光强度比值反映线粒体膜电位的变化(当绿/红荧光强度比值升高时,表示细胞线粒体膜电位降低)。

### 2.7 裸鼠移植瘤组织中 ROS 含量检测

选取“2.3”项下每组 3 只裸鼠的移植瘤组织(约 50 mg),放入装有液氮的研钵中研磨,以获取组织的细胞悬液,并收集到离心管中。将提前配制好的 DCFH-DA 荧光探针添加至细胞悬液,于 37 °C 避光孵育 30 min。随后加入磷酸盐缓冲液进行清洗,接着离心并弃去上清液,重复清洗 3 次。最后用磷酸盐缓冲液溶解,均匀铺在 24 孔板中。在酶标仪荧光模块下,设定激发波长为 488 nm、发射波长为 525 nm,检测各组样本的荧光强度值。以模型组荧光强度值为对照,对各组荧光强度数据进行归一化处理,得 ROS 的相对荧光强度,以此反映 ROS 含量(相对荧光强度越大,表示 ROS 含量越高)。

## 2.8 裸鼠移植瘤组织中 caspase-3、caspase-8、caspase-9 酶活性检测

选取“2.3”项下每组3只裸鼠的移植瘤组织(约100 mg),置于装有液氮的研钵中,并加入蛋白裂解液,研磨至无明显沉淀。将研磨后的混合物收集至EP管,离心后收集上清液。按照试剂盒说明书操作,检测 caspase-3、caspase-8、caspase-9 对应的OD值。将测得的OD值通过标准曲线分析血浆钠(pNA)浓度,以pNA浓度反映 caspase 酶的活性(pNA浓度越高,表示 caspase 酶活性越强)。

## 2.9 裸鼠移植瘤组织中 Fas/FasL 途径相关蛋白表达检测

采用 Western blot 法检测。选取“2.3”项下每组3只裸鼠的新鲜移植瘤组织(约100 mg),置于装有液氮的研钵内,加入RIPA蛋白裂解液研磨至无沉淀,于冰浴中反应30 min,离心后弃去沉淀,获取含蛋白的上清液。使用BCA试剂盒进行蛋白定量。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,并将其电转至PVDF膜上,经封闭、一抗(Fas、FasL、GAPDH的稀释度分别为1:600、1:800、1:1000)、二抗(稀释度为1:2000)反应后,进行ECL化学发光成像获取图像信息。利用成像系统自带软件分析条带灰度值,以目标蛋白与内参蛋白(GAPDH)条带灰度值的比值表示目标蛋白的相对表达水平。

## 2.10 裸鼠移植瘤组织中 Fas/FasL 途径、caspase 凋亡途径相关基因 mRNA 表达检测

采用荧光定量PCR法检测。选取“2.3”项下每组3只裸鼠的新鲜移植瘤组织(约100 mg),放入盛有液氮的研钵中,加入Trizol进行研磨,直至无沉淀。采用酚-氯仿法提取总RNA,使用微量紫外分光光度计测定各组RNA的浓度及纯度。依照反转录试剂盒说明书,对提取的总RNA反转录合成cDNA。以cDNA作为模板,按照荧光定量试剂盒说明书设置仪器的反应参数(95℃预变性30 s;95℃变性5 s,65℃退火31 s,共40个循环),进行PCR荧光扩增反应。以 $\beta$ -actin为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各目标基因mRNA的相对表达水平。PCR引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计并合成,PCR引物序列及产物长度见表1。

### 2.11 统计学分析

采用SPSS 19.0软件进行数据分析。计量资料满足正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,进一步两两比较采用Dunnett-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

表1 PCR引物序列及产物长度

基因	引物序列	产物长度/bp
$\beta$ -actin	上游:5'-GTTGTGACGACGAGCG-3' 下游:5'-GCACAGAGCTCGCCT-3'	93
caspase-3	上游:5'-TCGCTTCCATGATGATCTTTG-3' 下游:5'-CTGCCTCTTCCCCAATTCT-3'	110
caspase-9	上游:5'-CATGCTCAGGATGAAGCCA-3' 下游:5'-AGGTTCTCAGACCGGAAACA-3'	93
caspase-8	上游:5'-AGGCCAGATCTTCACTGTCC-3' 下游:5'-GGTCACTTGAACCTTGGGAA-3'	114
Fas	上游:5'-GCATCTGGACCTCTCTACTCT-3' 下游:5'-TCCTCAATCCAACTCCCTTG-3'	108
FasL	上游:5'-GCACACAGCATCATCTTTGG-3' 下游:5'-GGACCTTGAGTTGGACTTGC-3'	109

## 3 结果

### 3.1 MLCD对裸鼠移植瘤生长抑制的影响

与模型组比较,给药第14天,MLCD高剂量组裸鼠移植瘤体积显著缩小( $P<0.05$ );给药第21天,MLCD中、高剂量组裸鼠移植瘤体积均显著缩小( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );给药第28天,MLCD低、中、高剂量组裸鼠移植瘤体积均显著缩小( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。结果见表2。

表2 各组裸鼠移植瘤体积比较( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	给药第1天	给药第7天	给药第14天	给药第21天	给药第28天
模型组	108.84 ± 14.72	284.11 ± 25.43	539.44 ± 46.51	640.49 ± 58.53	739.98 ± 60.41
MLCD低剂量组	112.81 ± 12.41	280.23 ± 24.12	517.47 ± 47.33	601.58 ± 61.40	680.34 ± 56.62 <sup>a</sup>
MLCD中剂量组	104.94 ± 14.41	276.06 ± 18.82	501.54 ± 54.51	578.17 ± 57.52 <sup>a</sup>	645.90 ± 57.54 <sup>a</sup>
MLCD高剂量组	110.25 ± 10.11	270.11 ± 20.70	479.87 ± 46.91 <sup>a</sup>	538.14 ± 53.83 <sup>a</sup>	600.50 ± 58.43 <sup>b</sup>

a:与模型组比较, $P<0.05$ ; b:与模型组比较, $P<0.01$ 。

### 3.2 MLCD对裸鼠移植瘤组织中LDH含量的影响

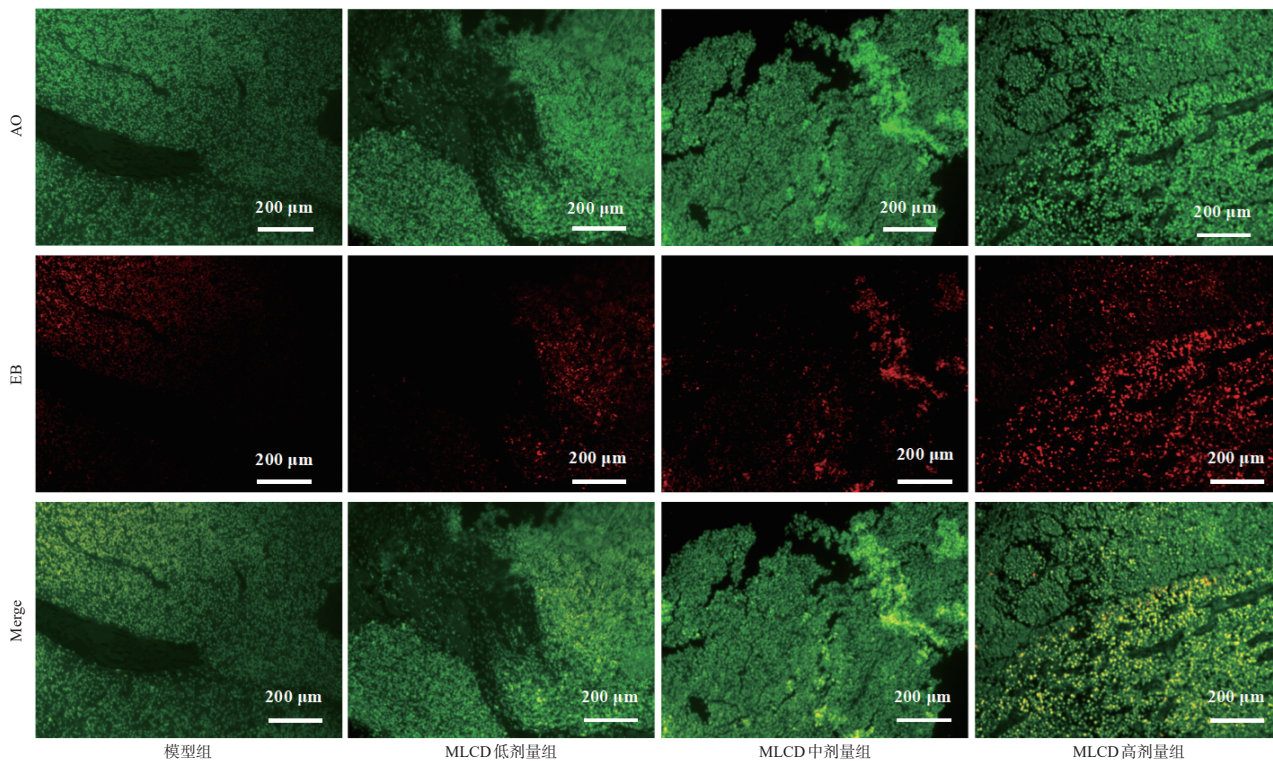
模型组和MLCD低、中、高剂量组裸鼠移植瘤组织中的LDH含量分别为(72.91 ± 11.23)、(104.56 ± 12.51)、(133.45 ± 13.30)、(176.76 ± 14.40)( $n=3$ )。与模型组比较,MLCD各剂量组裸鼠移植瘤组织中的LDH含量均显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),且呈一定的剂量依赖趋势。

### 3.3 MLCD对裸鼠移植瘤组织病理形态的影响

模型组裸鼠移植瘤组织内细胞分布密集,经AO染色后的绿色荧光强度均匀一致,仅可见少量经EB染色的红色荧光;而在MLCD各剂量组中,随着MLCD剂量的增加,裸鼠移植瘤组织内细胞的紧密程度逐渐下降,出现松散、碎片逐渐增多等典型的细胞凋亡形态学特征,经EB染色后的红色荧光强度则逐渐增强。结果见图1。

### 3.4 MLCD对裸鼠移植瘤组织中线粒体膜电位的影响

模型组和MLCD低、中、高剂量组裸鼠移植瘤组织中绿/红荧光强度比值分别为7.91 ± 0.71、12.97 ± 1.67、18.87 ± 3.19、32.80 ± 4.29( $n=3$ )。与模型组比较,随着



注:绿色荧光表示AO染色状态,红色荧光表示EB染色状态。

图1 各组裸鼠移植瘤组织病理形态观察显微图(AO-EB染色)

给药剂量的增加,MLCD各剂量组裸鼠移植瘤组织中细胞的红色荧光逐渐减弱、绿色荧光逐渐增强,说明线粒体膜电位染料以聚合物的形式逐渐向单体形式转变,即细胞线粒体膜电位显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),呈去极化的状态。结果见图2。

### 3.5 MLCD对裸鼠移植瘤组织中ROS含量的影响

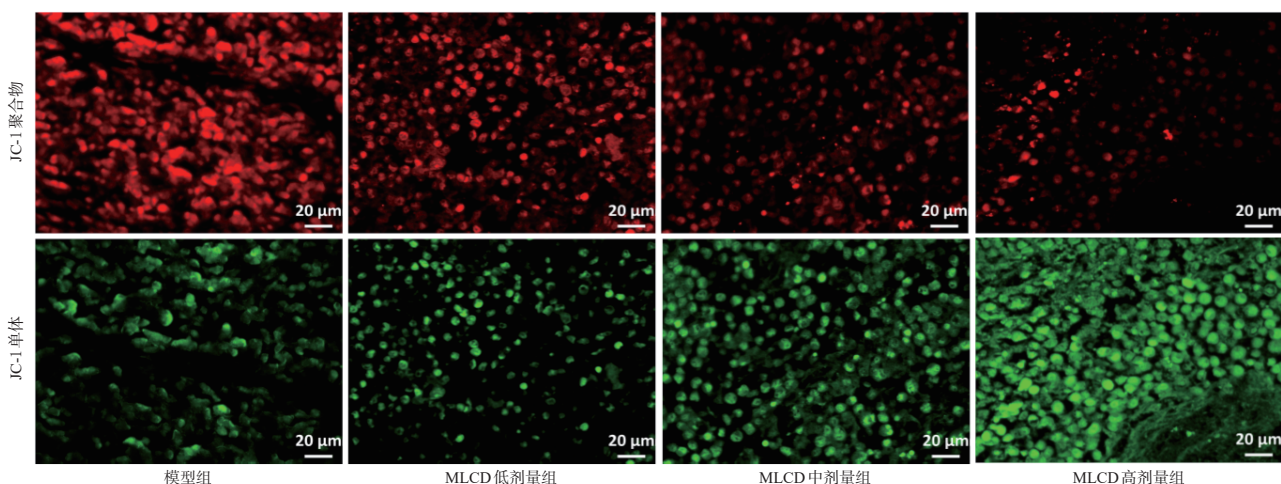
模型组和MLCD低、中、高剂量组裸鼠移植瘤组织中ROS的相对荧光强度分别为 $1.00 \pm 0.35$ 、 $3.51 \pm 0.85$ 、 $5.08 \pm 0.98$ 、 $6.59 \pm 1.03$  ( $n=3$ )。与模型组比较,MLCD各剂量组裸鼠移植瘤组织中ROS含量显著增加( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),且呈一定的剂量依赖趋势。

### 3.6 MLCD对裸鼠移植瘤组织中caspase酶活性的影响

与模型组比较,MLCD各剂量组裸鼠移植瘤组织中caspase-3、caspase-8、caspase-9酶的活性显著增强( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),且呈一定的剂量依赖趋势。caspase酶的pNA浓度结果见表3。

### 3.7 MLCD对裸鼠移植瘤组织中Fas/FasL途径相关蛋白表达的影响

与模型组比较,MLCD各剂量组裸鼠移植瘤组织中Fas(MLCD低剂量组除外)、FasL蛋白表达水平均显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),且呈一定的剂量依赖趋势。结果见图3、表4。



注:红色荧光表示线粒体膜电位较高时的聚合物状态,绿色荧光表示线粒体膜电位较低时的单体状态。

图2 各组裸鼠移植瘤组织中线粒体膜电位变化荧光图

表3 各组裸鼠移植瘤组织中 caspase 酶的 pNA 浓度比较 ( $\bar{x} \pm s, n=3, \mu\text{mol/L}$ )

组别	caspase-3 pNA 浓度	caspase-8 pNA 浓度	caspase-9 pNA 浓度
模型组	5.463 ± 0.651	4.292 ± 0.881	4.707 ± 0.733
MLCD 低剂量组	9.856 ± 1.710 <sup>a</sup>	7.801 ± 1.484 <sup>a</sup>	8.863 ± 1.830 <sup>a</sup>
MLCD 中剂量组	15.455 ± 2.305 <sup>a</sup>	12.456 ± 2.092 <sup>a</sup>	13.518 ± 2.127 <sup>a</sup>
MLCD 高剂量组	23.177 ± 2.828 <sup>a</sup>	17.076 ± 2.248 <sup>a</sup>	19.493 ± 1.516 <sup>a</sup>

a: 与模型组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与模型组比较,  $P < 0.01$ 。

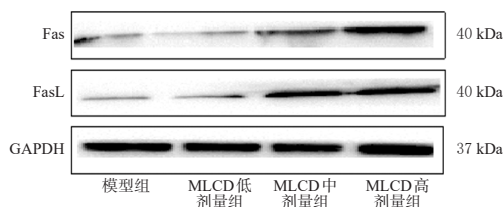


图3 各组裸鼠移植瘤组织中 Fas、FasL 蛋白表达电泳图

表4 各组裸鼠移植瘤组织中 Fas、FasL 蛋白表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	Fas/GAPDH	FasL/GAPDH
模型组	0.361 ± 0.025	0.265 ± 0.023
MLCD 低剂量组	0.391 ± 0.022	0.357 ± 0.030 <sup>a</sup>
MLCD 中剂量组	0.715 ± 0.047 <sup>a</sup>	0.736 ± 0.036 <sup>a</sup>
MLCD 高剂量组	0.928 ± 0.037 <sup>a</sup>	0.915 ± 0.039 <sup>a</sup>

a: 与模型组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与模型组比较,  $P < 0.01$ 。

### 3.8 MLCD 对裸鼠移植瘤组织中 Fas/FasL 途径、caspase 凋亡途径相关基因 mRNA 表达的影响

与模型组比较, MLCD 各剂量组裸鼠移植瘤组织中 caspase-3、caspase-8、caspase-9、Fas、FasL 的 mRNA 表达水平均显著升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 且呈一定的剂量依赖趋势。结果见表 5。

表5 各组裸鼠移植瘤组织中 Fas/FasL 途径、caspase 凋亡途径相关基因 mRNA 表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	caspase-3 mRNA	caspase-8 mRNA	caspase-9 mRNA	Fas mRNA	FasL mRNA
模型组	1.000 ± 0.022	1.000 ± 0.018	1.000 ± 0.020	1.000 ± 0.014	1.000 ± 0.015
MLCD 低剂量组	2.199 ± 0.236 <sup>a</sup>	1.899 ± 0.279 <sup>a</sup>	1.998 ± 0.244 <sup>a</sup>	1.673 ± 0.214 <sup>a</sup>	1.611 ± 0.228 <sup>a</sup>
MLCD 中剂量组	3.154 ± 0.264 <sup>a</sup>	2.728 ± 0.356 <sup>a</sup>	2.830 ± 0.322 <sup>a</sup>	2.382 ± 0.221 <sup>a</sup>	2.280 ± 0.229 <sup>a</sup>
MLCD 高剂量组	3.934 ± 0.331 <sup>a</sup>	3.332 ± 0.311 <sup>a</sup>	3.648 ± 0.330 <sup>a</sup>	3.009 ± 0.233 <sup>a</sup>	2.864 ± 0.215 <sup>a</sup>

a: 与模型组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与模型组比较,  $P < 0.01$ 。

## 4 讨论

本课题组前期基于胃癌的病理机制对理冲汤进行优化, 获得了本实验药物 MLCD。该方全方协同发挥固本培元、清热解毒、消痰化瘀散结之功效, 以实现扶正抗癌的目标。此外, 本研究中的 MLCD 为醇、水共提物。本课题组前期研究表明, 方中黄芪、莪术、三棱、半枝莲等药材的乙醇提取物以及多数药材的水提物, 均富含较多的抗肿瘤活性成分<sup>[12]</sup>, 并鉴定出 16 种具有抗肿瘤活性的成分<sup>[7]</sup>, 这些成分构成了 MLCD 诱导胃癌 AGS 细胞凋亡的物质基础。

本课题组前期研究证实, 该方在体内和体外均能通

过激活线粒体途径, 抑制胃癌 AGS 细胞的增殖并诱导其凋亡<sup>[6-7]</sup>。本研究基于前期研究成果, 对 MLCD 通过调控 Fas/FasL 途径和 caspase 凋亡途径诱导胃癌 AGS 细胞凋亡的机制展开探讨, 结果表明, 与模型组相比, MLCD 能够抑制裸鼠移植瘤的生长, 并增加移植瘤组织中的 LDH 含量。有文献报道, 细胞 LDH 含量的变化可间接反映细胞的凋亡程度<sup>[12]</sup>, 药物对肿瘤细胞的抑制作用可通过诱导细胞凋亡来实现<sup>[13]</sup>。无论是传统的细胞毒性药物还是靶向药物, 均可通过诱导细胞凋亡发挥抗肿瘤效应<sup>[8]</sup>。本研究进一步观察移植瘤组织的病理形态变化, 结果显示, 经 MLCD 干预的裸鼠移植瘤组织中的细胞呈现出松散、碎片逐渐增多等典型的细胞凋亡形态学特征; 同时, 对移植瘤组织中的 ROS 及线粒体膜电位进行检测发现, MLCD 能增加 ROS 含量, 降低线粒体膜电位。结合相关文献报道, 细胞内 ROS 含量增加会加重线粒体的损伤程度, 这与细胞凋亡的发生密切相关<sup>[14]</sup>; 线粒体膜电位的降低被视为细胞凋亡发生的早期阶段<sup>[15]</sup>。以上结果初步证实 MLCD 能够诱导胃癌裸鼠移植瘤细胞凋亡。

细胞凋亡过程中存在两条传统的凋亡途径, 即内源性线粒体途径和外源性死亡受体途径<sup>[16]</sup>。这两条途径相互联系和相互作用, 共同调节细胞的存活与凋亡平衡: 一方面, 线粒体凋亡途径会释放凋亡信号分子, 这些分子与死亡受体结合, 进而激活 caspase 凋亡酶系, 加速细胞凋亡进程; 另一方面, 死亡受体途径可通过与配体结合, 引发线粒体损伤并释放凋亡信号分子, 以此促进线粒体凋亡途径的激活<sup>[17]</sup>。在 Fas/FasL 途径中, Fas 和 FasL 均表达于细胞表面, 当 Fas 与 FasL 交联后, 形成的复合物可募集 Fas 相关死亡结构域蛋白, 并进一步激活 caspase-8, 启动凋亡信号。这一过程会继续激活 caspase-3、B 细胞淋巴瘤 2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白等内源性线粒体凋亡途径相关因子, 最终致使细胞降解, 诱导癌细胞凋亡<sup>[18-19]</sup>。本研究通过 Western blot 和荧光定量 PCR 实验证实, MLCD 能够上调裸鼠移植瘤组织中 Fas、FasL 蛋白或基因 mRNA 的表达, 这表明 Fas/FasL 途径可能参与了 MLCD 抗胃癌作用的调控。

另外, 在 caspase 凋亡途径中, caspase-3 是诱发细胞凋亡的关键因素, 也是细胞凋亡的主要执行者<sup>[20]</sup>。caspase-3、caspase-8、caspase-9 均为凋亡 caspase 家族成员, 其中 caspase-8 是死亡受体途径的关键酶, caspase-9 是线粒体途径的关键酶, 而 caspase-3 是两条凋亡途径的共同

交汇点。caspase-8、caspase-9 参与细胞凋亡的起始过程,caspase-3 参与细胞凋亡的执行过程<sup>[21]</sup>。本研究检测了裸鼠移植瘤组织中 caspase-3、caspase-8、caspase-9 基因 mRNA 表达情况及酶活性,结果证实 MLCD 可上调上述基因表达并增加酶活性,这表明 caspase 凋亡途径也参与了 MLCD 抗胃癌作用的调控。

综上所述,MLCD 能诱导裸鼠移植瘤细胞凋亡,其作用机制可能与激活 Fas/FasL 途径及 caspase 凋亡途径有关。本研究为 MLCD 的进一步临床应用提供了理论依据,但中药抗肿瘤作用具有多途径、多靶点的特点,其具体的作用机制仍有待进一步实验研究。

## 参考文献

- [1] YANG W J, ZHAO H P, YU Y, et al. Updates on global epidemiology, risk and prognostic factors of gastric cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2023, 29(16): 2452-2468.
- [2] 马丽娟, 吴欣益, 王锡恩. 中医药靶向 PI3K/Akt 通路调控胃癌现状及机制研究进展[J]. *中药材*, 2024, 47(3): 792-795.
- [3] 戴静杰, 潘利斌, 刘彪, 等. 华蟾素调节肠道菌群抑制胃癌细胞进展的机制研究[J]. *中国现代应用药学*, 2024, 41(21): 2906-2916.
- [4] 程翻娥, 李铮, 刘彩月, 等. 密点麻蜥调控 SLC7A11/GPX4 通路诱导胃癌 MKN45 细胞铁死亡的作用及机制[J]. *中药材*, 2024, 47(1): 196-201.
- [5] 周锦宏, 吴小兰, 张嘉恒, 等. 理冲汤对卵巢癌荷瘤小鼠的免疫调节及抗肿瘤作用[J]. *湖南中医药大学学报*, 2024, 44(5): 754-763.
- [6] 施国善, 陈哲, 姚宏玉, 等. 线粒体通路在加减理冲汤提取物抑制胃癌细胞增殖及诱导其凋亡中的调控作用[J]. *中药材*, 2024, 47(7): 1800-1805.
- [7] SHI G S, CHEN Z, FENG M Y, et al. Potential anti-gastric cancer properties of modified Lichong decoction based on metabolomics, network pharmacology, and pharmacological verification[J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 347: 119806.
- [8] 马立威, 陈哲, 王文豹, 等. 从表型差异探讨大戟大枣汤含药血清抗乳腺癌的作用[J]. *中成药*, 2023, 45(7): 2373-2378.
- [9] ABOU SHOUSA S, BAHEEG S, GHONEIM H, et al. The effect of Fas/FasL pathway blocking on apoptosis and stemness within breast cancer tumor microenvironment: preclinical study[J]. *Breast Dis*, 2023, 42(1): 163-176.
- [10] 田森, 陈雨, 陶朋, 等. Caspase 家族与失神经支配骨骼肌萎缩的研究进展[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2024, 41(1): 84-87.
- [11] 朱宏亮, 姜剑伟, 张建军. 盐酸度洛西汀对大鼠应激性胃溃疡保护作用机制的初步探究[J]. *中国新药杂志*, 2019, 28(13): 1612-1618.
- [12] 施国善, 陈哲, 姚宏玉, 等. 加减理冲汤提取物抗胃癌活性及机制研究[J]. *中国医院药学杂志*, 2025, 45(7): 755-763.
- [13] MA L W, ZHANG J L, WANG X M, et al. Design and synthesis of diosgenin derivatives as apoptosis inducers through mitochondria-related pathways[J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 217: 113361.
- [14] MA L W, WANG H J, WANG J, et al. Novel steroidal 5 $\alpha$ , 8 $\alpha$ -endoperoxide derivatives with semicarbazone/thiosemicarbazone side-chain as apoptotic inducers through an intrinsic apoptosis pathway: design, synthesis and biological studies[J]. *Molecules*, 2020, 25(5): 1209.
- [15] WANG W B, CHEN Z, CHEN X T, et al. DG-8d, a novel diosgenin derivative, decreases the proliferation and induces the apoptosis of A549 cells by inhibiting the PI3k/Akt signaling pathway[J]. *Steroids*, 2021, 174: 108898.
- [16] MA L W, CHEN Z, LI J, et al. DP from *Euphorbia fischeriana* S. mediated apoptosis in leukemia cells via the PI3k/Akt signaling pathways[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 279: 113889.
- [17] 代正. 虾青素通过 Fas/FasL 及线粒体途径调控力竭运动大鼠心肌凋亡的研究[D]. 太原: 山西大学, 2024.
- [18] 石晨卉, 周亚萍, 杨明, 等. 南葶苈子水提液调控 Fas/FasL 途径对心力衰竭大鼠心肌细胞的影响[J]. *江苏医药*, 2024, 50(10): 973-976, 封2.
- [19] 金元元, 孟德胜, 刘雅恬. 基于 Fas/FasL 信号通路探究雷帕霉素对食管癌裸鼠瘤体抑制及放疗增敏的作用机制[J]. *现代药物与临床*, 2025, 40(1): 15-22.
- [20] 马立威, 陈哲, 李京, 等. 12-去氧佛波醇-13-棕榈酸酯通过 Fas/FasL 通路调控 K562 细胞凋亡[J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43(3): 684-688.
- [21] 梁俭, 骆杰炉, 蔡庆群, 等. 基于不同 Caspase 凋亡通路的玄参环烯醚萜总苷抑制心肌梗死模型大鼠心肌细胞凋亡的作用机制研究[J]. *中国药房*, 2019, 30(6): 735-740.

(收稿日期: 2025-12-04 修回日期: 2026-02-26)

(编辑: 舒安琴)