

芪珍胶囊抗结肠癌的作用机制研究

郭丹丹, 郭铨洁, 桑婷婷, 王玉洁, 吴凯凯, 郭翠玲, 方 柳, 王兴亚*

浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053

摘 要: 目的 探究芪珍胶囊对人结肠癌细胞 HCT116 及裸鼠移植瘤模型的作用及机制。方法 HCT116 细胞给予芪珍胶囊进行干预, 采用 MTT 法和流式细胞术检测细胞存活率和凋亡情况; 采用 Western blotting 法考察芪珍胶囊对聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 (poly ADP-ribose polymerase, PARP)、B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3)、Caspase-9、剪切型 Caspase-9 (cleaved Caspase-9)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR)、磷酸化 mTOR (p-mTOR)、腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)、p-AMPK、细胞外信号调节蛋白激酶 (extracellular signal regulated kinase, ERK)、p-ERK、p38 和 p-p38 蛋白表达的影响; 采用 qRT-PCR 法检测芪珍胶囊对程序性死亡分子配体-1 (programmed death ligand 1, PD-L1) mRNA 表达的影响。建立结肠癌裸鼠移植瘤模型, 考察芪珍胶囊对裸鼠体质量、瘤体积和瘤质量的影响; 采用 ELISA 法检测各组裸鼠血清中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和 IL-1 β 水平; 采用 qRT-PCR 法检测各组裸鼠肿瘤组织核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)、TNF- α 、IL-6、CD68、单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 和 PD-L1 mRNA 表达; 采用 Western blotting 法考察各组裸鼠肿瘤组织 PD-L1 蛋白表达。以 γ -干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 诱导 HCT116 细胞, 考察芪珍胶囊对细胞存活率及 PD-L1 蛋白表达的影响。结果 芪珍胶囊显著抑制 HCT116 细胞存活率 ($P < 0.01$ 、 0.001), 显著促进细胞凋亡 ($P < 0.01$ 、 0.001), 显著下调细胞中 Caspase-9、Caspase-3 和 Bcl-2 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 显著上调细胞中 cleaved Caspase-9、cleaved PARP、p-mTOR/mTOR、p-AMPK/AMPK、p-ERK/ERK 和 p-p38/p38 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 显著下调细胞中 PD-L1 mRNA 表达水平 ($P < 0.05$)。结肠癌裸鼠移植瘤模型中, 芪珍胶囊显著抑制移植瘤生长 ($P < 0.05$ 、 0.01), 降低氟尿嘧啶导致的裸鼠体质量减轻, 显著降低血清中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 显著降低肿瘤组织中 NF- κ B、TNF- α 、IL-6、CD68、MCP-1、iNOS 和 PD-L1 mRNA 表达水平 ($P < 0.05$), 显著降低肿瘤组织中 PD-L1 蛋白表达水平 ($P < 0.01$)。芪珍胶囊显著抑制 IFN- γ 诱导的 HCT116 细胞中 PD-L1 蛋白表达水平 ($P < 0.001$)。结论 芪珍胶囊能够通过诱导细胞凋亡、抑制炎症反应及 PD-L1 表达等途径抑制结肠癌的发生发展, 可能是一种潜在的免疫检查点抑制剂。

关键词: 芪珍胶囊; 结肠癌; 增殖; 凋亡; 炎症反应; 程序性死亡分子配体-1

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)10-2967-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.10.013

Study on mechanism of Qizhen Capsule against colon cancer

GUO Dan-dan, GUO Cheng-jie, SANG Ting-ting, WANG Yu-jie, WU Kai-kai, GUO Cui-ling, FANG Liu, WANG Xing-ya

Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective To explore effect and mechanism of Qizhen Capsule (芪珍胶囊) on human colon cancer cell HCT116 and transplanted tumor models in nude mice. **Methods** HCT116 cells were treated with Qizhen Capsules for intervention. MTT and flow cytometry were used to detect cell survival and apoptosis; Western blotting was used to investigate the effects of Qizhen Capsules on poly ADP-ribose polymerase (PARP), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Caspase-3, Caspase-9, cleaved Caspase-9, mTOR, phosphorylated mTOR (p-mTOR), adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), p-AMPK, extracellular signal-regulated protein

收稿日期: 2020-12-02

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81973521); 浙江省科技厅一流学科药学科基金资助项目 (2018-2020)

作者简介: 郭丹丹 (1992—), 女, 硕士, 研究方向为肿瘤药理学。Tel: 15757184013 E-mail: zyy2097851005@163.com

*通信作者: 王兴亚 (1975—), 女, 博士, “钱江学者”特聘教授, 博士生导师, 从事肿瘤及代谢性疾病的防治研究。

Tel: 18668093229 E-mail: xywang@zcmu.edu.cn

kinase (ERK), p-ERK, p38 and p-p38 expressions; qRT-PCR was used to detect the effect of Qizhen Capsule on programmed death ligand 1 (PD-L1) mRNA level. Transplanted tumor model of colon cancer in nude mice was established, effects of Qizhen Capsule on body weight, tumor volume and tumor weight of nude mice were investigated; ELISA was used to detect tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and IL-1 β levels in serum of nude mice; qRT-PCR was used to detect nuclear factor- κ B (NF- κ B), TNF- α , IL-6, CD68, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and PD-L1 mRNA levels in tumor; Western blotting was used to investigate PD-L1 expression in tumor tissues of nude mice in each group. IFN- γ was used to induce HCT116 cells to investigate the effect of Qizhen Capsule on cell survival rate and PD-L1 expression. **Results** Qizhen Capsule significantly inhibited the survival rate of HCT116 cells ($P < 0.01, 0.001$), significantly promoted cell apoptosis ($P < 0.01, 0.001$), significantly down-regulated expressions of Caspase-9, Caspase-3 and Bcl-2 in cells ($P < 0.05, 0.01$), significantly up-regulated expressions of cleaved Caspase-9, cleaved PARP, p-mTOR/mTOR, p-AMPK/AMPK, p-ERK/ERK and p-p38/p38 in cells ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), significantly down-regulated PD-L1 mRNA level in cells ($P < 0.05$). In transplanted tumor model of colon cancer in nude mice, Qizhen Capsules significantly inhibited the growth of transplanted tumors ($P < 0.05, 0.01$), reduced the body weight of nude mice caused by fluorouracil, significantly reduced TNF- α , IL-6 and IL-1 β levels in serum ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), significantly reduced mRNA levels of NF- κ B, TNF- α , IL-6, CD68, MCP-1, iNOS and PD-L1 in tumor tissues ($P < 0.05$), significantly reduced PD-L1 expression in tumor tissues ($P < 0.01$). Qizhen Capsules significantly inhibited PD-L1 expression in HCT116 cells induced by IFN- γ ($P < 0.001$). **Conclusion** Qizhen Capsules can inhibit the occurrence and development of colon cancer by inducing cell apoptosis, inhibiting inflammation and PD-L1 expression, which may be a potential immune checkpoint inhibitor.

Key words: Qizhen Capsule; colorectal cancer; proliferation; apoptosis; inflammatory response; programmed death ligand 1

结肠癌是一种常见的胃肠道恶性肿瘤，其发病率和死亡率高，转移性结肠癌患者的 5 年生存率不超过 10%^[1-4]。目前，手术、化疗、放疗及靶向手段是治疗结肠癌的主要策略。然而，这些传统的治疗方式具有术后并发症、耐药性及不良反应等局限性。近年来，中医药因其疗效显著、不良反应少而被广泛用于防治癌症。天然化合物或补充剂具有潜在的抗癌作用^[5-6]。紫杉醇可以逆转非小细胞肺癌干细胞对顺铂诱导的耐药性^[7]，对乳腺癌、卵巢癌、头颈癌、结肠癌和肺癌均有明显的治疗作用^[8-9]。参麦注射液主要由红参和麦冬组成，可通过改善化疗药物阿霉素和紫杉醇在小鼠体内的亚细胞分布，增强对结肠癌细胞的毒性^[10]。康莱特®注射液（薏苡仁提取物）与吉西他滨联用可显著提高局部晚期或转移性胰腺癌患者的无进展生存期^[11]。金龙胶囊可抑制胃癌细胞增殖，并促进其凋亡^[12]。

芪珍胶囊是一种有效的抗癌中药制剂，临床用于肺癌、乳腺癌和胃癌的辅助治疗，主要由珍珠、黄芪、三七、大青叶和重楼组成，具有益气化痰、清热解毒的功效。芪珍胶囊主要活性成分为黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rb₁ 和人参皂苷 Rg₁。芪珍胶囊与多西他赛或顺铂等化疗药物联用，能够协同抑制乳腺癌、晚期非小细胞肺癌、胃癌患者的肿瘤生长，提高患者免疫功能和生活质量^[13-16]。芪珍胶囊可以增加乳腺癌患者 CD4/CD8 细胞，改善免疫功能，缓解放化疗引起的

骨髓抑制等不良反应^[17]。目前，芪珍胶囊对结肠癌的作用及其抗肿瘤的作用机制尚不清楚。人结肠癌细胞 HCT116 是从结肠癌的男性患者中分离的恶性细胞株，由于其在无胸腺的裸鼠中具有较好致瘤性，可形成上皮样肿瘤，被广泛用于结肠癌研究^[18]。本研究从体内外探究芪珍胶囊抗结肠癌的作用及机制，为其临床应用提供依据。

1 材料

1.1 细胞

HCT116 细胞购自美国 ATCC。

1.2 动物

SPF 级 BALB/c 雄性裸鼠 60 只，4 周龄，体重 18~20 g，购自上海斯莱克实验动物有限责任公司，动物许可证号 SYXK2018-0012。动物饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心，温度（24±2）℃、湿度（50±10）%，保持良好通风，自由进食饮水。动物实验经浙江中医药大学实验动物管理与伦理委员会批准（批准号 ZSLL-2018-015）。

1.3 药品与试剂

芪珍胶囊（批号 160908，0.3 g/粒）购自宁波大昌药业有限公司，经高效液相色谱法测定每粒芪珍胶囊含 4.85 mg 三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rb₁ 和人参皂苷 Rg₁，符合《中国药典》2015 年版规定；氟尿嘧啶注射液（批号 02170302，0.25 g/支）购自山西普德药业有限公司；DMEM 培养基、胎牛血清、青链霉素混合液、0.25%胰酶购自美国 Gibco 公司；

MTT 购自美国 AMRESCO 公司; 凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司; β -actin 抗体 (批号 4967S)、聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 (poly ADP-ribose polymerase, PARP) 抗体 (批号 9542S)、B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体 (批号 2876S)、程序性死亡分子配体-1 (programmed death ligand 1, PD-L1) 抗体 (批号 13684T)、半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 抗体 (批号 9665)、Caspase-9 抗体 (批号 9508)、剪切型 Caspase-9 (cleaved Caspase-9) 抗体 (批号 7237P)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 抗体 (批号 2983S)、磷酸化 mTOR (p-mTOR) 抗体 (批号 5536S)、腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK) 抗体 (批号 2603S)、p-AMPK 抗体 (批号 2535S)、细胞外信号调节蛋白激酶 (extraeellular signal regulated kinase, ERK) 抗体 (批号 9102S)、p-ERK 抗体 (批号 4377)、p38 抗体 (批号 9218S)、p-p38 抗体 (批号 9211S)、辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 抗体购自美国 CST 公司; BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 23209) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; ECL 显影液 (批号 170-5061)、EASYspin 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒 (批号 RN07) 购自北京艾德莱生物科技有限公司; iTaq™ Universal SYBR Green Supermix (批号 172-5124) 购自美国 BIO-RAD 公司; PCR 试剂盒 (批号 R2233-01) 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; 人重组 γ -干扰素 (interferon- γ , IFN- γ , 批号 071527-3) 购自美国 PEPROTECH 公司; 白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) ELISA 试剂盒 (批号 MM-0049H2)、IL-1 β ELISA 试剂盒 (批号 MM-0181H2)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒 (批号 MM-0122H2) 购自江苏酶免实业有限公司; β -actin、核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)、TNF- α 、IL-6、CD68、单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS)、PD-L1 引物购自上海生工生物技术有限责任公司。

1.4 仪器

CKX31SF 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); HYC-360 型 4 °C 医用冷藏箱、DW-25L262 型 -20 °C 医用低温冷藏箱 (青海海尔特种电器有限公

司); 902 型 -80 °C 超低温冰箱、3111 型 CO₂ 培养箱、1300SERIES A2 型生物安全柜 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); ELX808 型酶标仪 (美国 BIOTEK 公司); GeneAmp 9700 型基因扩增仪 (美国 Applied Biosystems 公司); CFX96 型实时荧光定量 PCR 仪、蛋白电泳仪 (美国 BIO-RAD 公司); MiniChem™ 610 型化学成像分析仪 (北京赛智创业科技有限公司); 5424R 型高速离心机、5404 型高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

HCT116 细胞用含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素混合液的 DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。

2.2 芪珍胶囊对 HCT116 细胞存活率的影响

取处于对数生长期的 HCT116 细胞, 以 1×10^4 /mL 接种于 96 孔板中, 培养至细胞融合度为 50%。芪珍胶囊溶于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 配制质量浓度为 2.1 mg/mL 的母液, 经 0.22 μ m 滤膜滤过, 使用时以 DMEM 培养基稀释。设置对照组和芪珍胶囊 (0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mg/mL) 组, 各给药组加入 200 μ L 相应药物, 对照组加入不含药物的培养基, 分别培养 24、48、72 h, 每孔加入 20 μ L MTT 溶液 (5 mg/mL), 孵育 4 h; 每孔加入 150 μ L 二甲基亚砜 (DMSO), 室温振荡 10 min, 采用多功能酶标仪于 490 nm 测定吸光度 (A) 值, 以空白对照孔的 A 值作为参照, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.3 芪珍胶囊对 HCT116 细胞凋亡的影响

取处于对数生长期的 HCT116 细胞, 以 2×10^5 /孔接种于 6 孔板中, 培养至细胞融合度为 50%。设置对照组和芪珍胶囊 (0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mg/mL) 组, 各给药组加入相应药物, 对照组加入不含药物的培养基, 培养 24 h, 收集细胞, 以含 Annexin V-FITC/碘化丙啶 (PI) 的结合缓冲液重悬, 避光孵育 15 min, 采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况, 以早期凋亡细胞 (Annexin V⁺/PI⁻) 和晚期凋亡细胞 (Annexin V⁺/PI⁺) 计算凋亡率。

2.4 芪珍胶囊对 HCT116 细胞 Caspase-9、cleaved Caspase-9、Caspase-3、Bcl-2、PARP、mTOR、p-mTOR、AMPK、p-AMPK、ERK、p-ERK、p38 和 p-p38 蛋白表达的影响

按“2.3”项下方法处理细胞, 收集细胞, 加入

RIPA 裂解液, 提取细胞总蛋白, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质量浓度, 蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 5% 脱脂奶粉于室温封闭 1 h, 分别加入 Caspase-9、cleaved Caspase-9、Caspase-3、Bcl-2、PARP、mTOR、p-mTOR、AMPK、p-AMPK、ERK、p-ERK、p38、p-p38、 β -actin 抗体, 4 °C 孵育过夜; TBST 缓冲液洗涤 4 次, 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔/鼠 IgG 抗体 (1:2000), 室温孵育 1 h, TBST 缓冲液洗涤 4 次, 加入 ECL 显影液, 采用化学成像分析仪曝光并拍照。

2.5 芪珍胶囊对 HCT116 细胞 PD-L1 mRNA 表达的影响

按“2.3”项下方法处理细胞, 按照试剂盒说明书提取各组细胞总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物序列: β -actin 上游引物 5'-CTGGAACGGTGAAGGTGACA-3'、下游引物 5'-AAGGAACTTCCTTGAACAATGCA-3'; PD-L1 上游引物 5'-GGTGCCGACTACAAGCGAAT-3'、下游引物 5'-AGCCCTCAGCCTGACATGTC-3'。

2.6 芪珍胶囊对裸鼠移植瘤模型的影响

BALB/c 裸鼠随机分为对照组及芪珍胶囊低、高剂量 (1.5、4.5 g/kg, 分别相当于临床 2、6 倍剂量) 组、氟尿嘧啶 (20 mg/kg) 组、芪珍胶囊 (1.5 g/kg) 联合氟尿嘧啶 (20 mg/kg) 组, 每组 12 只。取处于对数生长期的 HCT116 细胞, 将细胞密度调整为 $2.5 \times 10^7/\text{mL}$, 于裸鼠背部 sc 0.2 mL 细胞悬液, 7~10 d 后, 裸鼠皮下出现结节, 表明移植瘤模型建立成功。芪珍胶囊溶于生理盐水, 分别配制成质量浓度为 150、450 mg/mL 的溶液; 氟尿嘧啶以生理盐水配制成质量浓度为 2 mg/mL 的溶液。自造模第 2 天开始, 芪珍胶囊组 ig 相应药物, 对照组 ig 0.2 mL 生理盐水, 1 次/d; 氟尿嘧啶组 ip 药物, 每 2 天 1 次, 连续 5 周。每周称定各组裸鼠体重, 测量肿瘤长径 (a) 及与长径垂直的瘤体最宽径 (b), 计算肿瘤体积。

$$\text{肿瘤体积} = ab^2/2$$

2.7 芪珍胶囊对裸鼠移植瘤模型血清中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平的影响

末次给药 24 h 后, 裸鼠用 CO₂ 窒息处死, 心脏取血, 血液室温静置至析出, 4 °C、3000 r/min 离心 15 min, 吸取上清, 按试剂盒说明书检测各组裸鼠血清中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平。

2.8 芪珍胶囊对裸鼠移植瘤模型肿瘤组织 NF- κ B、TNF- α 、IL-6、CD68、MCP-1、iNOS 和 PD-L1 mRNA 表达的影响

裸鼠处死后, 取肿瘤组织, 称定质量, 按照试剂盒说明书提取各组裸鼠肿瘤组织总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物序列: NF- κ B 上游引物 5'-ATGGCTTCTATGAGGCTGAG-3'、下游引物 5'-GTTGTTGTTGGTCTGGATGC-3'; TNF- α 上游引物 5'-AGAGGGAGAGAAGCAACTACA-3'、下游引物 5'-GGGTCAGTATGTGAGAGGAAGA-3'; IL-6 上游引物 5'-CGTGGAATGAGAAAAGAGTTGTG-3'、下游引物 5'-CCAGTTTGGTAGCATCCATCATTTCT-3'; CD68 上游引物 5'-TTGGGTGAGGCGGTTTCAGCCA-3'、下游引物 5'-GTGCTCTCTGTAACCGTGGGTGT-3'; MCP-1 上游引物 5'-TGGCTGTGTTTGCTTCTGTC-3'、下游引物 5'-TCTCACTGCCCTATGCCTCT-3'; iNOS 上游引物 5'-GGAAGCGGTAACAAAGGA-3'、下游引物 5'-GCCAGCATAGCGGATG-3'; 其余引物序列见“2.5”项。

2.9 芪珍胶囊对裸鼠移植瘤模型肿瘤组织 PD-L1 蛋白表达的影响

取各组裸鼠肿瘤组织, 加入 500 μL RIPA 裂解液, 使用匀浆机充分破碎肿瘤组织, 4 °C、13 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质量浓度。按“2.4”项下方法检测各组裸鼠肿瘤组织 PD-L1 蛋白表达情况。

2.10 芪珍胶囊对 IFN- γ 诱导的 HCT116 细胞存活率的影响

取处于对数生长期的 HCT116 细胞, 以 $1 \times 10^4/\text{mL}$ 接种于 96 孔板中, 培养至细胞融合度为 50%。设置对照组、模型组、芪珍胶囊 (0.4、0.7 mg/mL) 组、芪珍胶囊 (0.4、0.7 mg/mL) 联合 IFN- γ (10 ng/mL) 组, 模型组和联合给药组加入 IFN- γ (10 ng/mL), 各给药组加入 200 μL 芪珍胶囊溶液, 对照组加入不含药物的培养基, 培养 24 h。按“2.2”项下方法测定各组细胞存活率。

2.11 芪珍胶囊对 IFN- γ 诱导的 HCT116 细胞 PD-L1 蛋白表达的影响

取处于对数生长期的 HCT116 细胞, 以 $2 \times 10^5/\text{孔}$ 接种于 6 孔板中, 培养至细胞融合度为 50%。设置对照组、模型组和芪珍胶囊 (0.4、0.5、0.6、0.7 mg/mL) 组, 模型组和各给药组加入 IFN- γ (10 ng/mL), 各给药组再加入相应药物, 对照组加入不

含药物的培养基, 培养 24 h。按“2.4”项下方法检测各组细胞 PD-L1 蛋白表达情况。

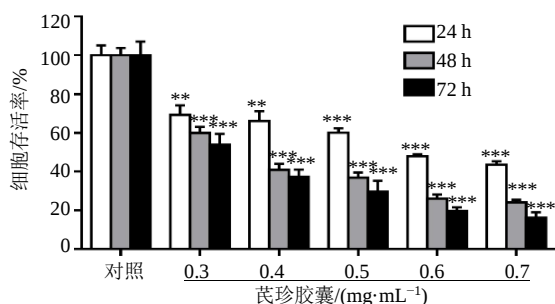
2.12 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 19.0 软件及 GraphPad Prism 5 软件进行数据分析, 采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 或 t 检验对各组数据进行比较。

3 结果

3.1 芪珍胶囊对 HCT116 细胞存活率的影响

如图 1 所示, 与对照组比较, 芪珍胶囊组细胞存活率显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001), 呈剂量和时间相关性。



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group, same as belows

图 1 芪珍胶囊对 HCT116 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of Qizhen Capsule on survival rate in HCT116 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

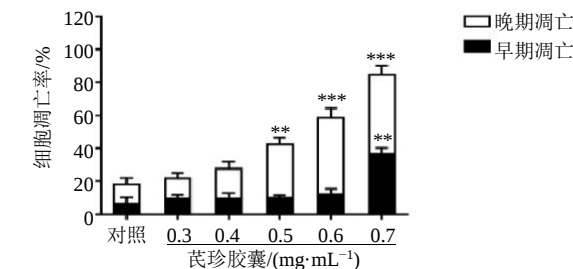
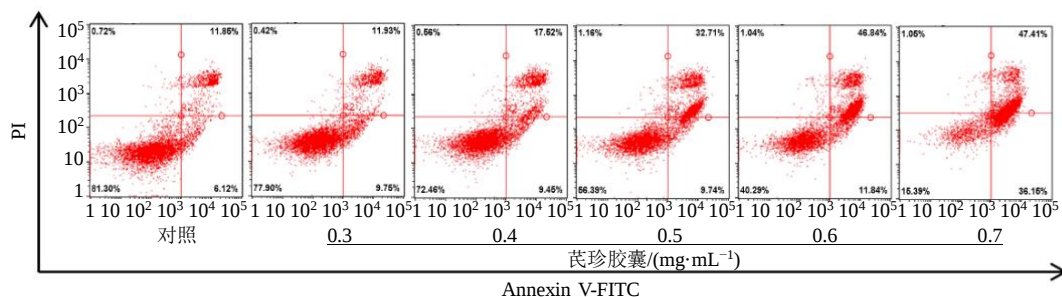


图 2 芪珍胶囊对 HCT116 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of Qizhen Capsule on apoptosis in HCT116 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 芪珍胶囊对 HCT116 细胞凋亡的影响

如图 2 所示, 与对照组比较, 芪珍胶囊 (0.5、0.6、0.7 mg/mL) 组细胞晚期凋亡率显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001), 芪珍胶囊 (0.7 mg/mL) 组细胞早期凋亡率显著升高 ($P < 0.01$)。

3.3 芪珍胶囊对 HCT116 细胞 Caspase-9、cleaved Caspase-9、Caspase-3、Bcl-2、PARP、mTOR、p-mTOR、AMPK、p-AMPK、ERK、p-ERK、p38 和 p-p38 蛋白表达的影响

如图 3、4 所示, 与对照组比较, 芪珍胶囊 (0.6、0.7 mg/mL) 组细胞 Caspase-9、Caspase-3 和 Bcl-2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 芪珍胶囊 (0.5、0.6、0.7 mg/mL) 组细胞 cleaved Caspase-9、cleaved PARP 和 p-AMPK/AMPK 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 各剂量芪珍胶囊组细胞 p-mTOR/mTOR、p-ERK/ERK 和 p-p38/p38 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。

3.4 芪珍胶囊对 HCT116 细胞 PD-L1 mRNA 表达的影响

如图 5 所示, 与模型组比较, 芪珍胶囊 (0.5、0.6、0.7 mg/mL) 组细胞中 PD-L1 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。

3.5 芪珍胶囊对结肠癌裸鼠移植瘤的影响

如图 6-A 所示, 对照组和氟尿嘧啶组裸鼠体质量均低于芪珍胶囊组, 联合用药组裸鼠体质量高于模型组和氟尿嘧啶组, 提示芪珍胶囊可减轻氟尿嘧啶

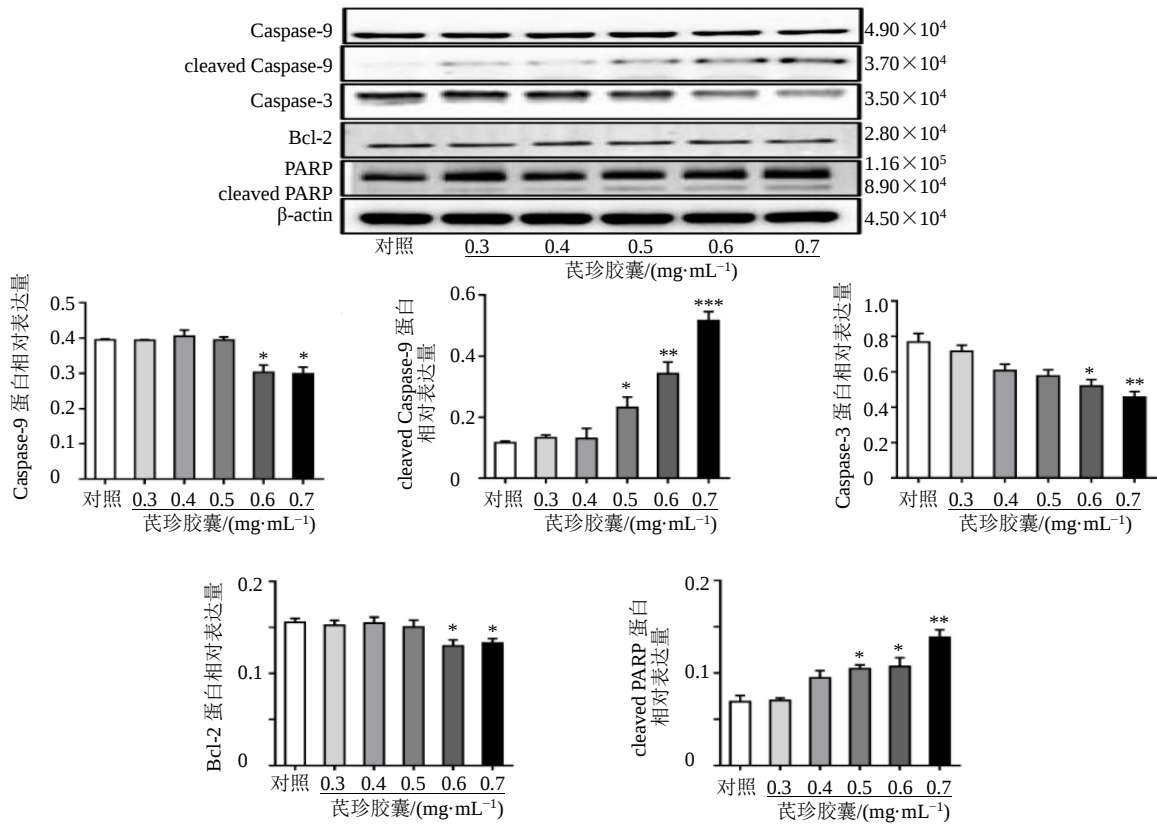


图3 芪珍胶囊对 HCT116 细胞 Caspase-9、cleaved Caspase-9、Caspase-3、Bcl-2 和 PARP 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 3 Effect of Qizhen Capsule on expressions of Caspase-9, cleaved Caspase-9, Caspase-3, Bcl-2, and PARP in HCT116 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

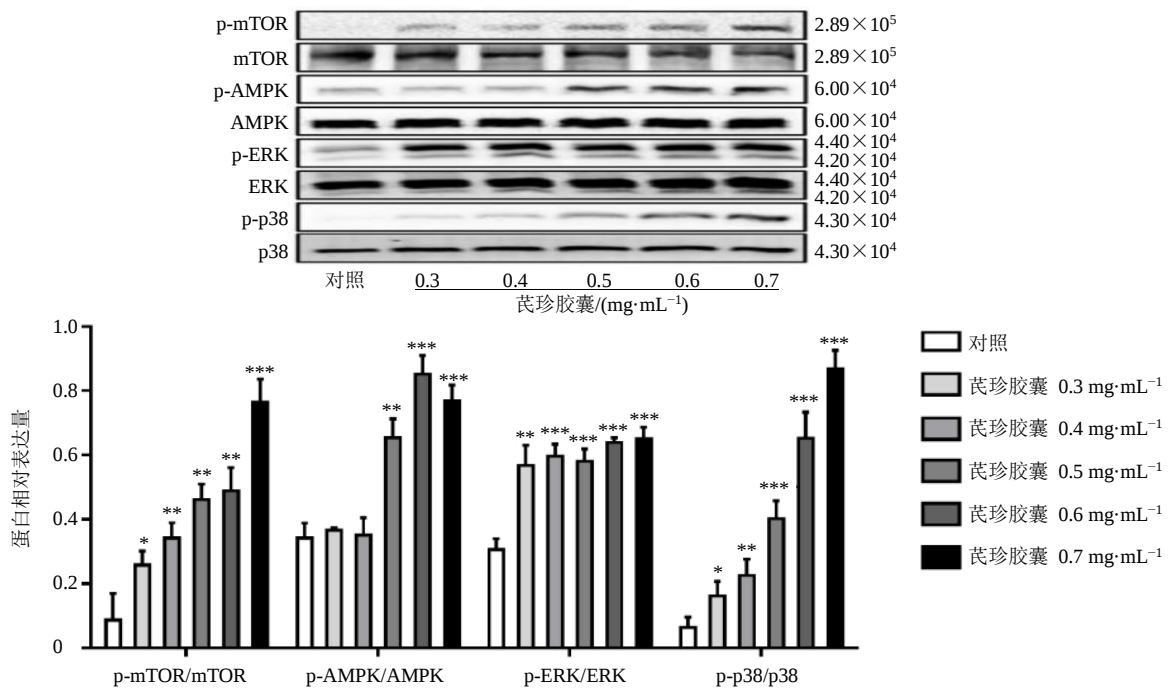


图4 芪珍胶囊对 HCT116 细胞 mTOR、p-mTOR、AMPK、p-AMPK、ERK、p-ERK、p38 和 p-p38 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 4 Effect of Qizhen Capsule on expressions of mTOR, p-mTOR, AMPK, p-AMPK, ERK, p-ERK, p38, and p-p38 in HCT116 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

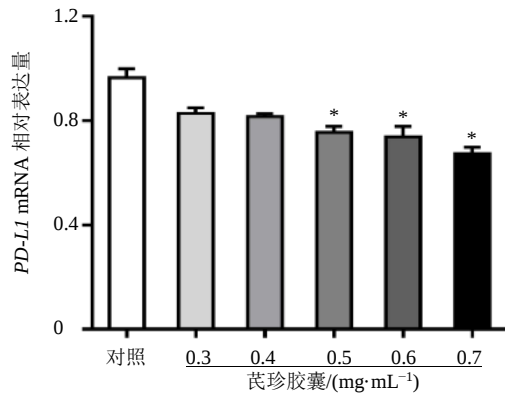


图 5 芪珍胶囊对 HCT116 细胞 *PD-L1* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of Qizhen Capsule on *PD-L1* mRNA level in HCT116 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

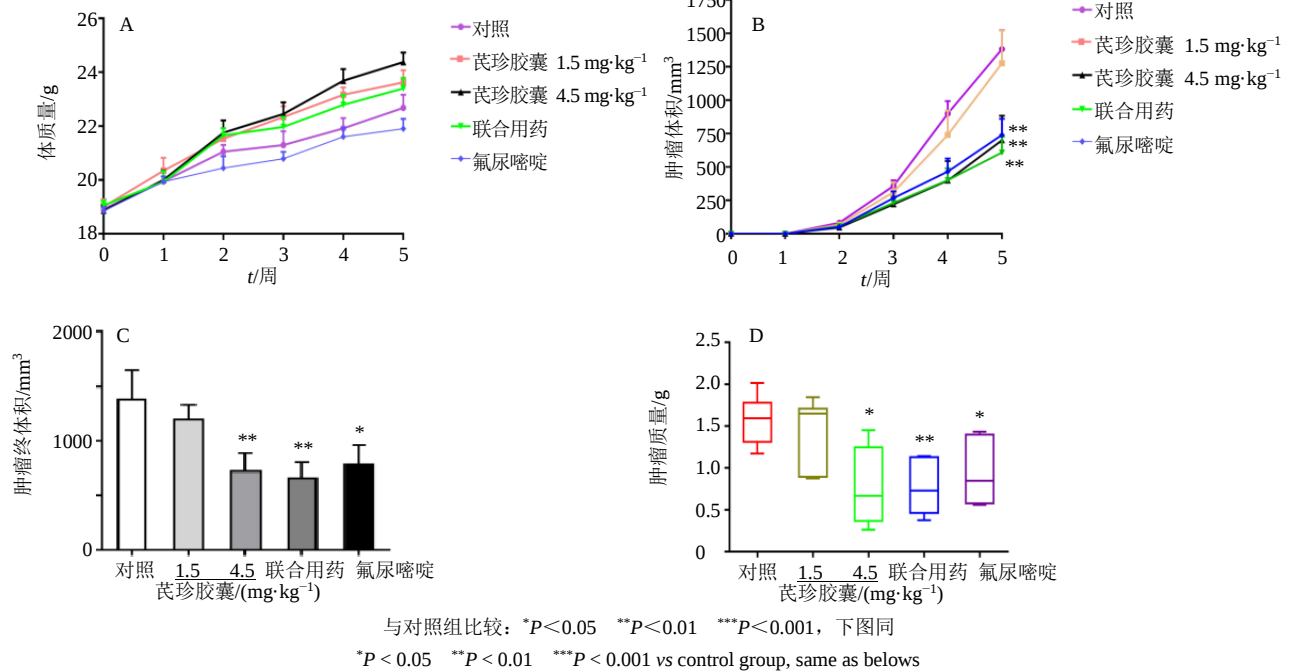


图 6 芪珍胶囊对裸鼠移植瘤模型体重 (A)、肿瘤体积 (B)、肿瘤终体积 (C) 和肿瘤质量 (D) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 6 Effect of Qizhen Capsule on body weight (A), tumor volume (B), average final tumor volume (C), and tumor weight (D) of nude mouse xenografts ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

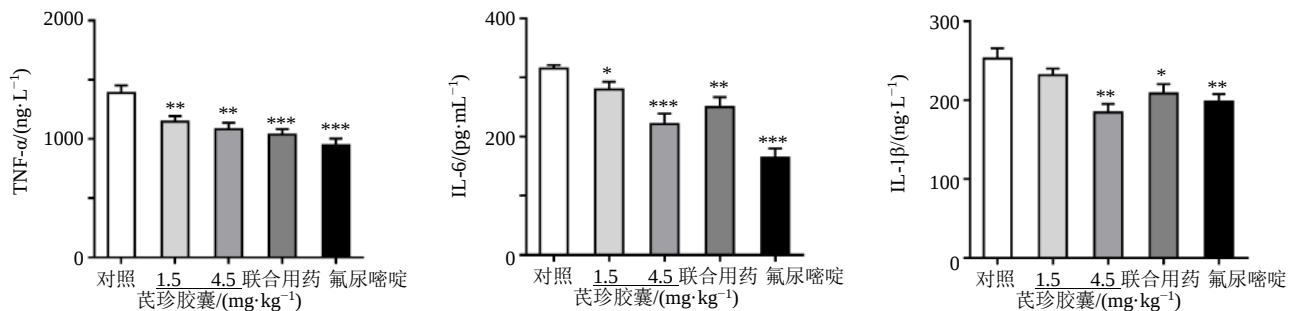


图 7 芪珍胶囊对裸鼠移植瘤模型血清中 *TNF-α*、*IL-6* 和 *IL-1β* 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of Qizhen Capsule on levels of *TNF-α*, *IL-6*, and *IL-1β* in serum of nude mouse xenografts model ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

啉的不良反应。如图 6-B、C 所示,与对照组比较,芪珍胶囊高剂量组、氟尿嘧啶组和联合用药组裸鼠肿瘤体积显著减小 ($P < 0.05$ 、 0.01)。如图 6-D 所示,与对照组比较,芪珍胶囊高剂量组、氟尿嘧啶组和联合用药组裸鼠肿瘤质量显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01),表明芪珍胶囊能有效抑制裸鼠肿瘤生长,减轻氟尿嘧啶诱导的体质量减轻。

3.6 芪珍胶囊对裸鼠移植瘤模型血清中 *TNF-α*、*IL-6* 和 *IL-1β* 水平的影响

如图 7 所示,与对照组比较,各给药组裸鼠血清中 *TNF-α* 和 *IL-6* 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001),芪珍胶囊高剂量组、氟尿嘧啶组和联合用药组裸鼠血清中 *IL-1β* 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.7 芪珍胶囊对裸鼠移植瘤模型肿瘤组织 $NF-\kappa B$ 、 $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 、 $CD68$ 、 $MCP-1$ 、 $iNOS$ 和 $PD-L1$ mRNA 表达的影响

如图 8 所示, 与对照组比较, 各给药组裸鼠肿瘤组织中 $CD68$ mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 芪珍胶囊高剂量组、氟尿嘧啶组和联合用药

组裸鼠肿瘤组织中 $NF-\kappa B$ 、 $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 和 $MCP-1$ mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 芪珍胶囊低剂量组、氟尿嘧啶组和联合用药组裸鼠肿瘤组织中 $iNOS$ mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 芪珍胶囊高剂量组和联合用药组裸鼠肿瘤组织中 $PD-L1$ mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

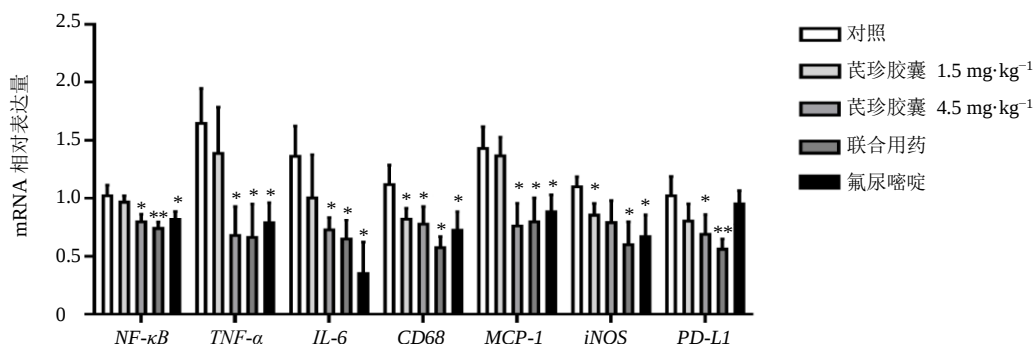


图 8 芪珍胶囊对裸鼠移植瘤模型肿瘤组织 $NF-\kappa B$ 、 $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 、 $CD68$ 、 $MCP-1$ 、 $iNOS$ 和 $PD-L1$ mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effect of Qizhen Capsule on mRNA levels of $NF-\kappa B$, $TNF-\alpha$, $IL-6$, $CD68$, $MCP-1$, $iNOS$, and $PD-L1$ in tumor of nude mouse xenografts model ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.8 芪珍胶囊对裸鼠移植瘤模型肿瘤组织 PD-L1 蛋白表达的影响

如图 9 所示, 与对照组比较, 芪珍胶囊高剂量组和联合用药组裸鼠肿瘤组织中 PD-L1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。

3.9 芪珍胶囊对 IFN- γ 诱导的 HCT116 细胞存活率的影响

如图 10 所示, 与对照组比较, 模型组细胞存活率无明显变化; 与模型组比较, 各给药组细胞存活率显著降低 ($P < 0.001$)。

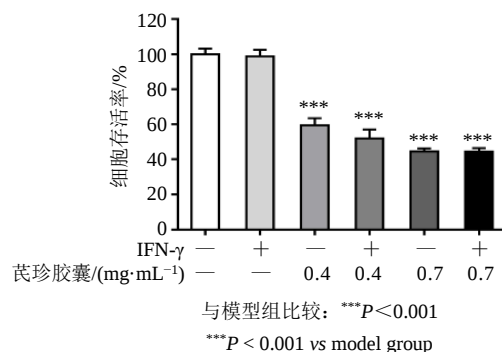


图 10 芪珍胶囊对 IFN- γ 诱导的 HCT116 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Effect of Qizhen Capsule on survival rate in HCT116 cells induced by IFN- γ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.10 芪珍胶囊对 IFN- γ 诱导的 HCT116 细胞 PD-L1 蛋白表达的影响

IFN- γ 是促进 PD-L1 表达最强的刺激因子^[19]。如图 11 所示, 与对照组比较, 模型组细胞 PD-L1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 芪珍胶囊 (0.5、0.6、0.7 mg/mL) 组细胞 PD-L1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.001$)。以上结果表明芪珍胶囊可以抑制 PD-L1 在异种移植瘤中的表达, 也可以抑制 IFN- γ 诱导的 HCT116 细胞中 PD-L1 表达, 提示芪珍胶囊可能在结肠癌中起到免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitors, ICPI) 的作用。

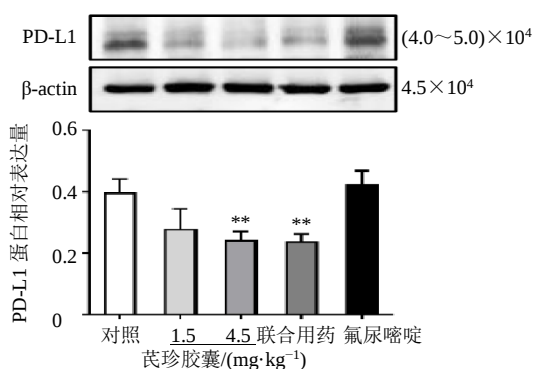
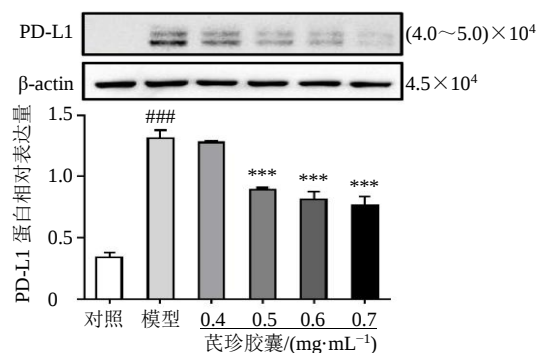


图 9 芪珍胶囊对裸鼠移植瘤模型肿瘤组织 PD-L1 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Effect of Qizhen Capsule on PD-L1 expression in tumor of nude mouse xenografts model ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: *** $P < 0.001$
$P < 0.001$ vs control group; *** $P < 0.001$ vs model group

图 11 芪珍胶囊对 IFN- γ 诱导 HCT116 细胞中 PD-L1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 11 Effect of Qizhen Capsule on PD-L1 expression in HCT116 cells induced by IFN- γ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

免疫治疗,尤其是 ICPI 治疗,对结肠癌有良好的疗效^[20-21]。抗 PD-1 药物如 pembrolizumab、nivolumab 已被 FDA 批准并用于治疗不匹配修复缺陷和微卫星不稳定性高型结肠癌患者^[21]。由于患者复杂的分子遗传特征,不同的结肠癌亚群对免疫治疗有不同的反应^[22]。然而,ICPI 对呼吸系统、皮肤和胃肠道等器官均具有毒性作用^[23]。因此,开发有效且安全的 ICPI 药物对转移性结肠癌的治疗至关重要。中药具有良好的抗癌作用,可降低 ICPI 诱导的免疫相关不良反应,是一种有前景的免疫治疗药物的辅助/替代品^[23-24]。本研究发现,芪珍胶囊通过抑制 HCT116 细胞增殖、诱导细胞凋亡、调节信号转导级联并抑制 IFN- γ 诱导的 PD-L1 蛋白表达,从而抑制结肠癌细胞生长。芪珍胶囊能够抑制裸鼠移植瘤模型肿瘤生长,抑制炎症反应,缓解氟尿嘧啶引起的体质量下降,抑制免疫缺陷小鼠 PD-L1 表达,提示芪珍胶囊是一种有潜力的抗结肠癌 ICPI 药物。

肿瘤的发生是一个复杂的过程,免疫系统作为机体的防御系统,可以通过适应性或获得性免疫反应有效地识别外来物质并将其清除^[25]。研究表明,免疫检查点分子包括 PD-1 和 PD-L1,均为结肠癌免疫治疗的可能靶点^[26]。PD-L1 在结肠癌组织中高表达^[26]。靶向阻断肿瘤 PD-1/PD-L1 结合可增强抗肿瘤药物的免疫应答,为肿瘤免疫治疗提供机会。肿瘤 PD-L1 可调节肿瘤细胞的免疫非依赖性和内在功能,直接调节细胞凋亡和自噬^[27]。本研究发现,芪珍胶囊显著降低裸鼠移植瘤模型肿瘤组织 PD-L1

表达,降低肿瘤体积和肿瘤质量。在免疫缺陷小鼠和免疫功能小鼠中,卵巢癌、黑色素瘤和结肠癌细胞中 PD-L1 表达下调,癌细胞增殖和肿瘤形成被抑制^[27-28],与本研究结果一致,表明一种新的肿瘤细胞固有的 PD-L1 效应可能是非免疫介导的,也表明 PD-L1 作为一种潜在的抗癌生物标志物具有更广泛的作用。本研究结果显示,IFN- γ 诱导的 HCT116 细胞中 PD-L1 蛋白表达水平升高^[29],芪珍胶囊显著抑制 IFN- γ 诱导的 HCT116 细胞中 PD-L1 蛋白表达水平;而与模型组比较,氟尿嘧啶对裸鼠移植瘤模型肿瘤组织中 PD-L1 表达却无明显影响。有研究发现,氟尿嘧啶能够诱导 HCT116 细胞 PD-L1 表达上调,可能是氟尿嘧啶诱导癌细胞耐药或氟尿嘧啶诱导免疫耐药所致^[30]。综上,芪珍胶囊可通过靶向 PD-L1 表达抑制结肠癌细胞增殖,可能是其发挥有效的免疫或非免疫介导的抗癌作用机制。

炎症反应可促进肿瘤的发生,在癌变过程中发挥重要作用^[31]。20%~40%结肠癌患者存在系统性炎症反应^[32]。结肠癌患者血清中 IL-6 和 TNF- α 水平升高,且 IL-6 和 TNF- α 的共同表达与患者预后差相关^[33]。IL-1 β 和 IL-6 的表达均位于结肠癌上皮和基质中^[34]。本研究结果显示,芪珍胶囊可以显著降低裸鼠移植瘤模型血清中 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平。白藜芦醇和三七能够降低 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 表达^[35-36]。三七能够抑制脂多糖诱导的小鼠 DC2.4 细胞中 IL-6 和 TNF- α 的分泌^[37]。本研究发现,与模型组比较,芪珍胶囊显著抑制裸鼠移植瘤模型肿瘤组织中 NF- κ B、TNF- α 、IL-6、CD68、MCP-1 和 iNOS mRNA 表达水平,提示芪珍胶囊可能通过抑制炎症反应,抑制结肠癌发展。

持续存在的细胞增殖信号、规避生长抑制因子、促进侵袭和转移、细胞永生、诱导血管生成、抵御细胞凋亡是癌症的特征,在肿瘤的发生发展中发挥重要作用^[38]。本研究发现,芪珍胶囊显著抑制 HCT116 细胞增殖,呈剂量相关性,可能与诱导细胞凋亡有关。细胞凋亡是由多种基因调控的过程,PARP 是细胞凋亡的标志,抗凋亡分子 Bcl-2 在结肠癌中高表达^[39]。本研究结果显示,芪珍胶囊下调 HCT116 细胞中 Bcl-2 蛋白表达水平,上调 cleaved Caspases-9 和 cleaved PARP 蛋白表达水平。研究发现,黄芪皂苷能够上调 HT-29 细胞中 cleaved PARP 表达,下调 Bcl-2 和 Caspase-3 表达^[40]。mTOR^[41]、AMPK^[42]和 MAPK^[43]等多种信号通路可以调节细

胞增殖和凋亡。MAPK/ERK 的激活能够诱导细胞凋亡^[44-45]。本研究发现, 芪珍胶囊能够激活 HCT116 细胞中 mTOR、AMPK、ERK 和 p38 信号通路, 提示这些通路可能是芪珍胶囊在 HCT116 细胞中发挥抗癌作用的潜在下游信号级联通路。

综上所述, 芪珍胶囊能够通过诱导细胞凋亡、抑制炎症及 PD-L1 表达等途径抑制结肠癌的发生发展, 可能是一种潜在的 ICPI。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2019 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(1): 7-34.
- [2] Chen W, Zheng R, Zhang S, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2013 [J]. *Cancer Lett*, 2017, 401: 63-71.
- [3] Perazella M A, Moeckel G W. Nephrotoxicity from chemotherapeutic agents: Clinical manifestations, pathobiology, and prevention/therapy [J]. *Semin Nephrol*, 2010, 30(6): 570-581.
- [4] Miller K D, Siegel R L, Lin C C, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(4): 271-289.
- [5] Kanai M, Otsuka Y, Otsuka K, et al. A phase I study investigating the safety and pharmacokinetics of highly bioavailable curcumin (Theracurmin) in cancer patients [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2013, 71(6): 1521-1530.
- [6] Sharifi-Rad J, Ozleyen A, Boyunegmez Tumer T, et al. Natural products and synthetic analogs as a source of antitumor drugs [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(11): 679.
- [7] Jiang Y Q, Xu X P, Guo Q M, et al. Reversal of cisplatin resistance in non-small cell lung cancer stem cells by *Taxus chinensis* var [J]. *Genet Mol Res*, 2016, 15(3): 1-11.
- [8] Fukuizumi A, Minegishi Y, Omori M, et al. Weekly paclitaxel in combination with carboplatin for advanced non-small-cell lung cancer complicated by idiopathic interstitial pneumonias: A single-arm phase II study [J]. *Int J Clin Oncol*, 2019, 24(12): 1543-1548.
- [9] Kampan N C, Madondo M T, McNally O M, et al. Paclitaxel and its evolving role in the management of ovarian cancer [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 413076.
- [10] Liu W Y, Zhang J W, Yao X Q, et al. Shenmai injection enhances the cytotoxicity of chemotherapeutic drugs against colorectal cancers via improving their subcellular distribution [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38(2): 264-276.
- [11] Schwartzberg L S, Arena F P, Bienvenu B J, et al. A randomized, open-label, safety and exploratory efficacy study of kanglaite injection (KLTi) plus gemcitabine versus gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer [J]. *J Cancer*, 2017, 8(10): 1872-1883.
- [12] Li D, Ni T Y, Tao L, et al. Jinlong Capsule (JLC) inhibits proliferation and induces apoptosis in human gastric cancer cells *in vivo* and *in vitro* [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 107: 738-745.
- [13] 何立丽, 顾恪波, 孙桂芝, 等. 芪珍胶囊对气虚血瘀型非小细胞肺癌患者 NP 方案化疗的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(10): 3780-3784.
- [14] 胡一迪, 谢燊侠, 张辉, 等. 芪珍胶囊联合多西他赛注射液对乳腺癌患者新辅助化疗的效果及安全性评价 [J]. *中国生化药物杂志*, 2017, 37(3): 144-146.
- [15] 陆林, 王杰军. 芪珍胶囊治疗晚期非小细胞肺癌的临床研究 [J]. *临床荟萃*, 2004, 19(18): 1057-1058.
- [16] 王学谦, 侯炜, 董海涛, 等. 芪珍胶囊与化疗联合治疗恶性肿瘤的多中心随机对照临床研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(6): 1968-1971.
- [17] 唐鹏. 芪珍胶囊对乳腺癌化疗患者 T 细胞亚群的影响 [J]. *实用癌症杂志*, 2016, 31(7): 1084-1087.
- [18] Rajput A, Dominguez San Martin I, Rose R, et al. Characterization of HCT116 human colon cancer cells in an orthotopic model [J]. *J Surg Res*, 2008, 147(2): 276-281.
- [19] Burr M L, Sparbier C E, Chan Y C, et al. CMTM6 maintains the expression of PD-L1 and regulates anti-tumour immunity [J]. *Nature*, 2017, 549(7670): 101-105.
- [20] Lichtenstern C R, Ngu R K, Shalpour S, et al. Immunotherapy, inflammation and colorectal cancer [J]. *Cells*, 2020, 9(3): 618.
- [21] Kreidieh M, Mukherji D, Temraz S, et al. Expanding the scope of immunotherapy in colorectal cancer: Current clinical approaches and future directions [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 9037217.
- [22] Wrobel P, Ahmed S. Current status of immunotherapy in metastatic colorectal cancer [J]. *Int J Colorectal Dis*, 2019, 34(1): 13-25.
- [23] Hou L, Ju L Y, Wang J, et al. Use of traditional Chinese medicine in the treatment of immune-related adverse events of cancer immunotherapy [J]. *J Tradit Chin Med Sci*, 2018, 5(4): 323-327.
- [24] Xiang Y N, Guo Z M, Zhu P F, et al. Traditional Chinese medicine as a cancer treatment: Modern perspectives of ancient but advanced science [J]. *Cancer Med*, 2019,

- 8(5): 1958-1975.
- [25] Ribas A, Wolchok J D. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade [J]. *Science*, 2018, 359(6382): 1350-1355.
- [26] Xiao Y, Freeman G J. The microsatellite instable subset of colorectal cancer is a particularly good candidate for checkpoint blockade immunotherapy [J]. *Cancer Discov*, 2015, 5(1): 16-18.
- [27] Feng D F, Qin B, Pal K, *et al*. BRAF V600E-induced, tumor intrinsic PD-L1 can regulate chemotherapy-induced apoptosis in human colon cancer cells and in tumor xenografts [J]. *Oncogene*, 2019, 38(41): 6752-6766.
- [28] Clark C A, Gupta H B, Sareddy G, *et al*. Tumor-intrinsic PD-L1 signals regulate cell growth, pathogenesis, and autophagy in ovarian cancer and melanoma [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(23): 6964-6974.
- [29] Abiko K, Matsumura N, Hamanishi J, *et al*. IFN- γ from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer [J]. *Br J Cancer*, 2015, 112(9): 1501-1509.
- [30] van der Kraak L, Goel G, Ramanan K, *et al*. 5-fluorouracil upregulates cell surface B7-H1 (PD-L1) expression in gastrointestinal cancers [J]. *J Immunother Cancer*, 2016, 4: 65.
- [31] Greten F R, Grivnenikov S I. Inflammation and cancer: Triggers, mechanisms, and consequences [J]. *Immunity*, 2019, 51(1): 27-41.
- [32] Tuomisto A E, Mäkinen M J, Väyrynen J P. Systemic inflammation in colorectal cancer: Underlying factors, effects, and prognostic significance [J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(31): 4383-4404.
- [33] Ueda T, Shimada E, Urakawa T. Serum levels of cytokines in patients with colorectal cancer: Possible involvement of interleukin-6 and interleukin-8 in hematogenous metastasis [J]. *J Gastroenterol*, 1994, 29(4): 423-429.
- [34] Cui G L, Yuan A, Sun Z L, *et al*. IL-1 β /IL-6 network in the tumor microenvironment of human colorectal cancer [J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214(7): 986-992.
- [35] Cui Y Z, Wang Q J, Sun R, *et al*. *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge repairs intestinal mucosal injury induced by LPS in mice [J]. *BMC Compl Altern Med*, 2018, 18(1): 1-6.
- [36] Huang S S, Deng J S, Lin J G, *et al*. Anti-inflammatory effects of trilinolein from *Panax notoginseng* through the suppression of NF- κ B and MAPK expression and proinflammatory cytokine expression [J]. *Am J Chin Med*, 2014, 42(6): 1485-1506.
- [37] Rhule A, Rase B, Smith J R, *et al*. Toll-like receptor ligand-induced activation of murine DC2.4 cells is attenuated by *Panax notoginseng* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 116(1): 179-186.
- [38] Hanahan D, Weinberg R A. The hallmarks of cancer [J]. *Cell*, 2000, 100(1): 57-70.
- [39] Bukholm I K, Nesland J M. Protein expression of p53, p21 (WAF1/CIP1), Bcl-2, Bax, cyclin D1 and pRb in human colon carcinomas [J]. *Virchows Arch*, 2000, 436(3): 224-228.
- [40] Guo H L, Wan B S, Wang J S, *et al*. *Astragalus* saponins inhibit cell growth, aerobic glycolysis and attenuate the inflammatory response in a DSS-induced colitis model [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(2): 1041-1048.
- [41] Sharlow E R, Leimgruber S, Lira A, *et al*. A small molecule screen exposes mTOR signaling pathway involvement in radiation-induced apoptosis [J]. *ACS Chem Biol*, 2016, 11(5): 1428-1437.
- [42] Villanueva-Paz M, Cotán D, Garrido-Maraver J, *et al*. AMPK regulation of cell growth, apoptosis, autophagy, and bioenergetics [J]. *Exp Suppl*, 2016, 107: 45-71.
- [43] Sun Y, Liu W Z, Liu T, *et al*. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2015, 35(6): 600-604.
- [44] Kuo H H, Kakadiya R, Wu Y C, *et al*. Derivatives of 6-cinnamamido-quinoline-4-carboxamide impair lysosome function and induce apoptosis [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(25): 38078-38090.
- [45] Ko J H, Lee J H, Jung S H, *et al*. 2, 5-dihydroxy acetophenone induces apoptosis of multiple myeloma cells by regulating the MAPK activation pathway [J]. *Molecules*, 2017, 22(7): 1157.

[责任编辑 李亚楠]