

基于数据挖掘、网络药理学和动物实验探究中药治疗癌症恶病质用药规律及作用机制

陈 晟¹, 段熔辉¹, 刘正艺¹, 胡宇翔¹, 肖望重¹, 文 静¹, 杨仁义², 孙银辉^{3*}, 王理槐^{1*}

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

2. 湖南省中西医结合医院, 湖南 长沙 410000

3. 湖南中医药大学医学院, 湖南 长沙 410208

摘要: 目的 探讨中医药治疗癌症恶病质 (cancer cachexia, CC) 的用药规律、核心组方及其多维作用机制。方法 通过数据挖掘, 从 211 篇文献中筛选出高频药物和核心组方, 随后利用网络药理学方法, 筛选核心处方的活性成分和靶点, 构建“药物-成分-靶点”网络和蛋白质-蛋白质相互作用网络, 并进行基因本体论 (gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析, 并通过分子对接验证核心成分与靶点的结合能力。在 A549 荷瘤裸鼠 CC 模型上, 通过检测体质量、摄食量、肌肉功能、炎症因子 [白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)] 水平和关键蛋白 [肌肉萎缩 F-box 蛋白 (muscle atrophy F-box protein, Atrogin-1)、肌肉环指蛋白 1 (muscle ring-finger protein-1, MuRF1)、蛋白激酶 B1 (protein kinase B1, Akt1)、缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 等] 表达量进行体内药效验证。结果 最终纳入方剂 67 首, 涉及药物 171 味, 确定核心组方为茯苓、白术、黄芪、山药、炙甘草。网络药理学预测出 149 个潜在靶点, 涉及磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (phosphatidylinositol-3-hydroxykinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、缺氧反应因子-1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)、p53 和凋亡等信号通路, 分子对接显示槲皮素等核心成分与核心靶点结合良好。体内实验显示, 核心处方高剂量组疗效最佳, 显著改善了 CC 裸鼠的厌食症状、维持体质量、恢复握力峰值和股四头肌湿质量 (均 $P < 0.05$)。机制方面, 核心组方显著降低了裸鼠血清 IL-6 和 TNF- α 水平; 免疫荧光显示其显著抑制了腓肠肌中 Atrogin-1 和 MuRF1 的表达, 同时上调了抗凋亡蛋白蛋白激酶 B1 (protein kinase B1, Akt1) 和 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 的表达, 并下调了 HIF-1 α 、肿瘤蛋白 p53 (tumor protein p53, TP53) 和原癌基因蛋白 c-Myc (cellular-Myc, MYC) 等促凋亡及代谢重编程蛋白的表达 (均 $P < 0.05$), 调控结果与网络药理学预测的 HIF-1 α 、PI3K-Akt 信号通路调控一致。结论 中医药治疗 CC 的核心组方以健脾渗湿、益气扶正为主要法则, 其机制可能通过 PI3K-Akt/HIF-1 α 等通路, 实现对代谢重编程、炎症反应及细胞凋亡的综合调节, 并有效抑制泛素-蛋白酶体途径, 从而发挥多维度、整体性的抗癌病质作用。

关键词: 癌症恶病质; 数据挖掘; 网络药理学; 分子对接; HIF-1 α ; 茯苓; 白术; 黄芪; 山药; 炙甘草; 槲皮素

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)06-2216-18

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.06.018

Exploring medication patterns and mechanisms of traditional Chinese medicines in treatment of cancer cachexia based on data mining, network pharmacology, and animal experiments

CHEN Sheng¹, DUAN Ronghui¹, LIU Zhengyi¹, HU Yuxiang¹, XIAO Wangzhong¹, WEN Jing¹, YANG Renyi², SUN Yinhui³, WANG Lihuai¹

1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China

2. Hunan Province Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Changsha 410000, China

3. College of Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

收稿日期: 2025-11-08

基金项目: 国家科技重大专项 (2024ZD0521301); 湖南省中医肿瘤临床研究中心平台项目 (2021SK4023); 2024 年湖南中医药大学研究生创新课题项目 (2024CX111)

作者简介: 陈 晟, 硕士研究生, 从事中西医结合防治恶性肿瘤研究。Tel: 13317355490 E-mail: 20233042@stu.hnucm.edu.cn

*通信作者: 王理槐, 副主任医师, 硕士研究生导师, 从事中西医结合防治恶性肿瘤研究。E-mail: 310600@hnucm.edu.cn

孙银辉, 讲师, 从事肿瘤病理学研究。E-mail: 34688088@qq.com

Abstract: Objective To investigate the medication rules, core formula, and multi-dimensional mechanisms of traditional Chinese medicine (TCM) in the treatment of cancer cachexia (CC). **Methods** Medication rules and the core formula were screened from 211 publications through data mining. Network pharmacology was subsequently applied to identify the active components and potential targets of the core formula, followed by gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analyses and molecular docking validation. Finally, the therapeutic efficacy and mechanisms were validated *in vivo* using an A549 tumor-bearing nude mouse CC model. Evaluation indicators included tumor-free body weight, food intake, muscle function, inflammatory cytokines [interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α)], and key proteins [muscle atrophy F-box protein (Atrogin-1), muscle RING-finger protein-1 (MuRF1), protein kinase B1 (Akt1), and hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α)]. **Results** A total of 67 prescriptions involving 171 drugs were identified, and the core formula was determined as Fuling (*Poria*), Baizhu (*Atractylodis Macrocephalae Rhizoma*), Huangqi (*Astragali Radix*), Shanyao (*Dioscoreae Rhizoma*), and Zhigancao (*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Praeparata cum Melle*). Network pharmacology predicted 149 potential targets involved in the PI3K-Akt, HIF-1 α , p53, and apoptosis signaling pathways. Molecular docking showed that core components, such as quercetin, exhibited strong binding affinities with key targets. *In vivo* experiments demonstrated that the high-dose core formula exhibited the best therapeutic effect, significantly improving anorexia, maintaining tumor-free body weight, and restoring peak grip strength and quadriceps wet weight (all $P < 0.05$). Mechanistically, the core formula significantly reduced serum levels of IL-6 and TNF- α . Furthermore, it markedly inhibited the expression of muscle-atrophy-related proteins Atrogin-1 and MuRF1 in the gastrocnemius muscle. It also upregulated the expression of the anabolic protein Akt1 and anti-apoptotic protein B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), while downregulating the expression of metabolic reprogramming and pro-apoptotic proteins, including HIF-1 α , tumor protein p53 (TP53), and cellular-Myc (MYC) (all $P < 0.05$). These results were consistent with the regulatory patterns predicted for the HIF-1 α and PI3K-Akt signaling pathways. **Conclusion** The core TCM formula for treating CC follows the therapeutic principles of invigorating the spleen, resolving dampness, supplementing *qi*, and strengthening healthy *qi*. Its mechanism likely involves the modulation of the PI3K-Akt/HIF-1 α signaling axis to comprehensively regulate metabolic reprogramming, inflammatory response, and cell apoptosis while effectively inhibiting the ubiquitin-proteasome pathway, thereby exerting a multi-dimensional and holistic anti-cachexia effect.

Key words: cancer cachexia; data mining; network pharmacology; molecular docking; HIF-1 α ; *Poria*; *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma*; *Astragali Radix*; *Dioscoreae Rhizoma*; *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Praeparata cum Melle*; quercetin

癌症恶病质 (cancer cachexia, CC) 是一种多因素全身性代谢综合征, 在晚期癌症患者中发生率高, 是影响患者预后的重要危险因素, 也是癌症患者死亡的主要原因之一^[1]。CC 目前归因于厌食导致的脂肪、肌肉、骨骼肌、线粒体能量等代谢紊乱, 肌肉萎缩是其临床最典型的特征^[2], 表现为体质量和骨骼肌质量下降, 但具体潜在机制未明, 更缺乏疗效确切的干预策略。因此, 阐明 CC 的发病机制及探索有效干预策略对提高晚期癌症患者专科治疗依从性、改善生活质量和延长生存期至关重要。中医药防治 CC 发挥多成分、多途径、多靶点等特色优势, 多从“虚劳”论治, 在 CC 治疗中发挥积极作用^[3]。本研究通过整合数据挖掘、网络药理学和分子对接的方法, 探究中医药治疗 CC 的用药组方规律及作用机制, 并通过实验进行验证, 以期为临床应用和实验研究提供参考与借鉴。

1 资料与方法

1.1 数据挖掘

1.1.1 数据来源 计算机检索万方数据库、维普期

刊数据库、中国知网数据库, 收集中医药治疗 CC 的相关文献, 检索年限为各数据库建库至 2024 年 9 月 1 日。检索式以“中国知网”为例, 检索条件: (主题% = “恶病质” + “癌症恶病质” + “癌性恶病质” + “肿瘤恶病质” + “恶病质状态” + “恶液质”) AND (主题% = “中医药” + “中西医” + “中药” + “方剂” + “中医” + “丸” + “散” + “膏” + “汤” + “片”) NOT (主题% = “综述” + “系统综述” + “数据挖掘” + “数据分析” + “Meta 分析” + “研究进展”); 检索范围: 中文文献。

1.1.2 文献纳入标准 ①临床观察或随机对照研究; ②临床确诊为恶性肿瘤恶病质患者; ③治疗组单用中药制剂 (如汤剂、丸剂、散剂、膏方、中成药等) 口服, 或与化学药联合, 对照组单用化学药口服; ④临床疗效显著, 并提供了完整、可靠的数据。

1.1.3 文献排除标准 ①重复发表的文献, 仅录入其中 1 篇; ②文献中未提及具体处方组成或用药信息不完整者; ③中药单体、中成药或外洗剂、注射剂等外用中药。

1.1.4 数据规范化处理 文献中的自拟方药直接纳入。文献中所使用的成方有准确来源的,以原方纳入(如参苓白术散:白扁豆、白术、茯苓、甘草、桔梗、莲子、人参、砂仁、山药、薏苡仁)。对于文献中涉及的合方(即2首或以上方剂联用)或中成药,若其药物组成明确,将其拆解为单味中药进行统计,并去除重复药味。药方中所涉中药依据《中华本草》及《中国药典》2020年版进行标准化处理,如“淫羊藿、仙灵脾”统一为淫羊藿,“山茱萸、山萸肉”统一为山茱萸。古今称呼有别的,统一为现代名称,如薯蓣记为山药。药方中所使用药材未被《中华本草》或《中国药典》收录的做单独标注处理。

1.1.5 数据库建立及用药规律分析 运用 Microsoft Excel 2021 软件建立中医药治疗 CC 的方药数据库,结合 SPSS 27.0、SPSS Modeler18 软件对文献中涉及的药物频次、药物分类、性味归经进行频数统计,对组方用药规律进行关联规则分析和聚类分析。

1.2 网络药理学研究

1.2.1 药物主要成分、潜在靶点的筛选 采用 TC MSP 数据库 (<https://old.tcmsp-e.com/tcm-sp.php>) 检索核心组方药物。筛选条件:口服利用度 (oral bioavailability, OB) > 30%, 类药性 (drug-like-ness, DL) > 0.18。筛选出核心药物的活性成分及相关预测靶点,并使用 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 进行标准化处理,获得矫正后药物靶点基因。

1.2.2 疾病相关基因收集 分别于 GeneCards (<http://www.genecards.org/>)、OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>) 2 个数据库,以“cancer cachexia”为检索词检索, relevance score > 1 为 GeneCards 数据库筛选条件,并去除重复值,获得 CC 相关靶点基因。

1.2.3 药物治疗 CC 的潜在作用靶点 通过 R 语言“Venn”包,得到药物靶点基因与疾病相关基因交集,并绘制韦恩图。

1.2.4 核心药物-活性成分-交集靶点网络构建 将核心中药活性成分、中药治疗 CC 潜在靶点导入 Cytoscape 3.9.1 软件 (<http://www.cytoscape.org/>),通过网络分析功能,构建“核心药物-活性成分-交集靶点”网络以及相互作用网络图,获取核心活性成分。

1.2.5 构建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络 将交集靶点上传至 STRING

数据库 (<http://string-db.org/>),物种选择为 Homo sapiens,进行“Multiple Proteins”分析,设置相互作用最小阈值 (degree) > 0.7,得出数据导入 Cytoscape 3.9.1 进行分析并绘制 PPI 网络,使用软件内 cytoNCA 插件计算节点中心度 (betweenness centrality, BC)、紧密度中心度 (closeness centrality, CC)、度中心度 (degree centrality, DC)、局部平均连通度 (local average connectivity based method, LAC)、网络中心度 (network centrality, NC)、子图中心度 (subgraph centrality, SC),连续筛选后,获得核心靶点基因。

1.2.6 基因本体论分析 (gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书通路富集分析 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析 将交集靶点导入 Metascape 数据库 (<https://metascape.org/>),进行 GO 和 KEGG 富集分析,以 $P < 0.05$ 筛选相关信号通路并进行可视化分析。

1.2.7 核心成分与靶点的分子对接 在 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中获得核心成分的 sdf 格式,导入 ChemBio 3D 软件中将其转化 mol2 格式,得到分子对接的配体文件;从 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 下载目标基因蛋白的三维结构,用 PyMOL 软件对其除去水分子及小分子配体,得到分子对接受体文件,用 AutoDock 软件将配体和受体转换格式为 PDBQT 格式,并计算和构建对接活性口袋,然后在 AutoDock Vina 软件中进行分子对接,计算核心成分与靶点的最小结合能,最后在 PyMOL 软件中对对接后结果进行可视化。

1.3 体内实验验证

1.3.1 药品及试剂 核心组方剂量依据本研究数据挖掘得出的高频药物及《中国药典》2020年版推荐用量确定。全方由茯苓 10 g (批号 ZY1761)、白术 10 g (批号 ZY1690)、山药 10 g (批号 ZY2383)、黄芪 30 g (批号 ZY2376)、炙甘草 6 g (批号 ZY4521) 组成,其中黄芪为君药重用以益气扶正,成人每日生药总量为 66 g。饮片均购自湖南中医药大学第一附属医院中药房,经肖望重副主任药师鉴定,分别为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核、菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎、薯蓣科植物薯蓣 *Dioscorea polystachya* Turcz. 的干燥根茎、豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge 的干燥根、

豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎经炙制而成。将上述药材混合，粉碎过 80 目筛，加入 8 倍量蒸馏水浸泡 30 min，煎煮 2 次，每次 1 h。合并滤液，于 50 °C 减压浓缩至相对密度约 1.2，冷冻干燥后获提取物干粉 16.5 g。药物临用前以生理盐水配制。醋酸甲地孕酮分散片（批号 XY8394）购自西安德天药业股份有限公司。

无水乙醇（批号 10009218）、二甲苯（批号 10023418）、中性树胶（批号 10004160）均购自国药集团化学试剂有限公司；柠檬酸钠抗原修复液（批号 G1202）、DAB 显色试剂盒（批号 G1212-200T）购自武汉 Servicebio 公司。BCA 蛋白浓度测定试剂盒、苏木素-伊红（HE）染色试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司，货号分别为 P0010、C0105）；胎牛血清（FBS）、青霉素-链霉素溶液、RPMI-1640 培养基（美国 Thermo Fisher Scientific 公司，货号分别为 10099141、15140122、11875101）；白细胞介素-6（interleukin-6, IL-6）、肿瘤坏死因子- α （tumor necrosis factor- α , TNF- α ）酶联免疫吸附检测（enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）试剂盒，甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH）、增殖细胞核抗原（proliferating cell nuclear antigen, PCNA）、肌肉萎缩 F-box 蛋白（muscle atrophy F-box protein, Atrogin-1）、肌肉环指蛋白 1（muscle RING-finger protein-1, MuRF1）、蛋白激酶 B1（protein kinase B1, Akt1）、B 细胞淋巴瘤-2（B-cell lymphoma-2, Bcl-2）、原癌基因蛋白 c-Myc（cellular-Myc, MYC）抗体，辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase, HRP）标记山羊抗兔免疫球蛋白 G（immunoglobulin G, IgG）二级抗体（武汉 ABclonal 生物科技有限公司，货号分别为 RM17601、RM17658、A19056、A12427、A3699、A3101、A17909、A19693、AE070、AS014）；缺氧诱导因子-1 α （hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α ）抗体（英国 Abcam 公司，货号 ab179483）；肿瘤蛋白 p53（tumor protein p53, TP53）抗体（中国武汉 Proteintech 公司，货号 10442-1-AP）。

1.3.2 细胞及动物 人肺癌细胞株 A549 购自武汉普诺赛生命科技有限公司，并在 37 °C、5% CO₂ 的培养条件下孵育。细胞培养使用补充 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素溶液的 RPMI-1640 培养基中，置于 37 °C、5% CO₂ 的培养条件下孵育，待细胞汇合度达 80% 时按 1:3 传代，取对数生长期细胞用于

实验。选用健康的雄性 SPF 级 BALB/c nu 裸鼠 48 只，6~8 周龄，体质量 22~24 g，购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司，生产许可证号 SCXK（湘）2021-0002。裸鼠饲养于标准温度（22±1）°C 的可控环境中，自由提供标准啮齿动物水和食物。本实验经湖南中医药大学第一附属医院动物伦理委员会审批通过（批准文号 22503312）。

1.3.3 仪器 5810R 型高速低温离心机（德国 Eppendorf 公司）；MCO-170AIC 型 CO₂ 细胞培养箱（日本 PHCbi 公司）；Bio-GS3 型数字握力计（上海泰盟软件有限公司）；Multiskan FC 型微孔板阅读仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；R-3000 型旋转蒸发仪（瑞士 BÜCHI 公司）；FD-1A-50 型真空冷冻干燥机（北京博医康实验仪器有限公司）；PowerPac Basic 型垂直电泳仪（美国 Bio-Rad 公司）；Trans-Blot Turbo 型快速转膜仪（美国 Bio-Rad 公司）；ChemiDoc XRS+ 型全自动化学发光图像分析系统（美国 Bio-Rad 公司）；RM2235 型石蜡切片仪（德国 Leica 公司）；DMI8 型倒置荧光显微镜（德国 Leica 公司）；BX53 型正置光学显微镜（日本 Olympus 公司）。

1.3.4 动物分组、造模及给药 雄性 BALB/c 裸鼠适应性喂养 1 周后，采用课题组成熟的 CC 造模方法进行 A549 细胞移植^[4-8]。收集对数生长期 A549 细胞，用生理盐水重悬，取 5×10⁶ 个细胞接种于每只裸鼠右侧腋窝皮下（0.2 mL/只）。接种后约 7 d，待肿瘤体积达到约 100 mm³ 时，且裸鼠体质量较对照组出现显著下降（ $P < 0.05$ ，且降幅 > 5%），同时伴有摄食量减少、精神萎靡、皮肤褶皱度增加等典型恶病质体征时，视为造模成功。将裸鼠随机分为 6 组（每组 8 只）：对照组，模型组，核心组，低剂量组、中剂量组、高剂量组，阳性对照组。根据《药理实验方法学》人与小鼠体表面积换算系数（9.1）计算给药剂量^[9]。成人临床日等效剂量（66 g/60 kg）对应的小鼠等效剂量约为生药 10 g/kg。实验设低、中、高 3 个剂量组，给药剂量分别为提取物 1.25、2.50、5.00 g/kg（折合生药量分别为 5、10、20 g/kg，分别相当于临床等效剂量的 0.5、1、2 倍）。中药提取物用生理盐水溶解后，各剂量组每日 ig 给予相应浓度的提取物，剂量分别为 1.25、2.50、5.00 g/kg。阳性对照组每日 ig 给予醋酸甲地孕酮分散片（0.024 g/kg）^[9]。对照组和模型组每日 ig 给予等量生理盐水。所有组均连续给药 21 d。

1.3.5 整体疗效与行为学指标检测 主要通过动态监测和功能性指标评估中药干预对 CC 的疗效。在连续给药 21 d 期间,每日记录裸鼠摄食量和裸鼠体质量,并计算扣除肿瘤质量后的干质量。每日使用数字卡尺测量肿瘤的长径(a)和短径(b),计算肿瘤体积($V=0.5 \times a \times b^2$)^[10]。采用握力测试进行功能性评估,每周进行 1 次,具体操作如下:使用带有金属网格的数字握力计测量肌肉力量,记录 4 肢的峰值力量,对每只裸鼠进行 3 次实验取平均值。在接种肿瘤细胞后第 21 天或当模型组肿瘤体积达到 2 000 mm³时,实验结束将裸鼠安乐死。随后,快速解剖各组裸鼠,立即眼眶取血并分离血清。同时,精确称量肿瘤组织、腓肠肌和股四头肌的湿质量。鉴于骨骼肌消耗是 CC 最核心的病理特征,且腓肠肌富含对代谢紊乱高度敏感的快肌纤维,常被作为评价肌萎缩程度和药物疗效的金标准组织^[11-13],本研究重点选取双侧腓肠肌,一部分置于 4%多聚甲醛固定,另一部分液氮速冻保存,用于后续的病理形态学观察及分子机制检测。

1.3.6 血清炎症指标检测 取冻存的裸鼠血清,按照 ELISA 试剂盒说明书要求进行操作。利用微孔板阅读仪在 450 nm 波长处测定各组样本的吸光度(A)值,通过标准曲线计算血清中炎症因子 IL-6、TNF- α 的表达水平,以评估药物对全身炎症调节作用。

1.3.7 HE 染色 将分离的股四头肌组织进行 4%多聚甲醛固定 24 h,并进行常规石蜡包埋。随后,将组织切成 10 μ m 的切片,进行 HE 染色,并在光学显微镜下观察肌纤维形态。为定量评估肌肉萎缩程度,使用 Image J 软件在 HE 染色的组织切片上随机选取 5 个视野,测量肌纤维的横截面积。

1.3.8 免疫荧光检测 将新鲜分离的腓肠肌组织用 OCT 包埋剂包埋,进行冰冻切片(厚度 6 μ m)。切片在 -20 $^{\circ}$ C 下保存备用。实验时取出切片,使用 4%多聚甲醛固定 15 min,接着用 0.3% Triton X-100 透化 10 min。然后使用 5% BSA 封闭液在室温下封闭 30 min。随后,分别滴加 Atrogin-1、MuRF1 相应的一抗(稀释比例均为 1:200),于 4 $^{\circ}$ C 湿盒中孵育过夜。次日,用 PBS 清洗切片后,加入荧光标记的抗兔 IgG 荧光二抗(稀释比例 1:400),于室温避光孵育 60 min。最后,用 DAPI 染液复染细胞核 5 min,抗荧光淬灭剂封片。使用荧光显微镜采集图像后,采用 Image J 软件对目标蛋白的平均荧光强度或阳性面积进行定量分析。

1.3.9 免疫组织化学检测 将石蜡包埋的腓肠肌组织制备成 4 μ m 连续切片,经脱蜡、梯度水化后,置于柠檬酸缓冲液(pH 6.0)中进行高温高压抗原修复。自然冷却后,滴加 3% H₂O₂溶液阻断内源性过氧化物酶,并使用血清或 BSA 进行封闭。随后,滴加 HIF-1 α 、Akt1、TP53、Bcl-2 及 MYC 一抗(稀释比例均为 1:200),于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日,PBS 清洗切片,滴加 HRP 标记的抗兔 IgG 二抗,室温孵育 50 min。经 DAB 显色、苏木素复染细胞核,常规脱水、透明及封片。尽管 HIF-1 α 、MYC 和 TP53 常被视为肿瘤标志物,但在 CC 的骨骼肌病理中,它们同样发挥关键调控作用,恶病质诱导的肌肉微循环障碍可导致局部缺氧及 HIF-1 α 升高,进而重塑肌肉代谢^[14-15];肌肉内 p53 的激活可直接诱导肌纤维凋亡及萎缩^[16];而 MYC 的异常表达则与泛素-蛋白酶体系统的激活密切相关^[17]。同时,Akt1 和 Bcl-2 作为经典的生存与合成信号,在恶病质肌肉中通常受到抑制^[18-19]。因此,本实验在肌肉组织中检测上述蛋白,旨在揭示中药核心组方对肌肉“缺氧-代谢-萎缩”网络的整体调控机制。图像采集使用光学显微镜完成,并采用 Image J 软件对目标蛋白的积分密度进行定量分析,评估各组蛋白的相对表达水平。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 27.0 软件、GraphPad Prism 软件对实验数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较在进行方差齐性检验之后,再采用单因素方差分析(One-way ANOVA),进一步两两比较采用 LSD 法或 Tamhane's T2 法。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 数据挖掘

2.1.1 用药频次统计 共检索出中医药治疗 CC 文献 221 篇,依据纳入、排除标准筛选后最终纳入文献 67 篇,涉及处方 67 首,药味 171 味,用药 1 017 频次。使用频次较高的药物有茯苓(44 次)、白术(36 次)、黄芪(32 次)、炙甘草(24 次)、山药(22 次)、陈皮(19 次)、人参(18 次)、党参(17 次)等。详见表 1。

2.1.2 药物关联规则分析 运用 SPSSmodeler18.0 软件对使用频次较高的前 30 味药进行关联规则分析,设置最小规则置信度为 80%,最低条件支持度 15%为筛选条件,分析结果见表 2,其中茯苓与白术

表 1 中药使用频次 (前 20)

Table 1 Frequency of traditional Chinese medicines (TCMs) (top 20)

中药	频次	中药	频次
茯苓	44	太子参	16
白术	36	当归	15
黄芪	32	麦冬	14
炙甘草	24	薏苡仁	14
山药	22	白花蛇舌草	13
陈皮	19	砂仁	13
人参	18	熟地黄	13
党参	17	鸡内金	12
甘草	17	白芍	10
大枣	16	生姜	10

共同出现 35 次、茯苓与炙甘草共同出现 22 次、茯苓与山药共同出现 22 次、白术与山药共同出现 22 次, 共现频次较高且支持度与置信度均较高, 表明上述药物组合正相关性较高, 常同时使用, 并将其关联规则导入 Cytoscape 3.9.1 进行网络化展示, 茯苓、白术、黄芪、山药、炙甘草为网络图中权重排名顺序较为靠前的中药, 体现出该 5 味中药为中医药治疗 CC 出现频次较高且与其他药物关联性较强, 考虑将其作为核心组方药物, 见图 1。

2.1.3 药物聚类分析 运用 SPSS24.0 软件对使用高频次的 30 味药进行聚类分析, 据此可将常用药物分为 9 类, 其中第 1 类: 白术、茯苓、炙甘草、山药、黄芪、陈皮、党参、薏苡仁; 第 2 类: 木香、

表 2 中医药治疗 CC 的关联规则

Table 2 Association rules of TCMs in treatment of CC

后项	前项	共现频次	支持度/%	后项	前项	共现频次	置信度/%
茯苓	白术	36	53.73	茯苓	炙甘草	24	100.00
茯苓	炙甘草	24	35.82	熟地黄	山茱萸	7	100.00
白术	山药	22	32.84	白术	枸杞子	7	100.00
茯苓	山药	22	32.84	茯苓	山茱萸	7	100.00
茯苓	陈皮	19	28.36	茯苓	山药	22	95.45
茯苓	党参	17	25.37	茯苓	陈皮	19	94.74
茯苓	大枣	16	23.88	茯苓	砂仁	13	92.31
白术	当归	15	22.39	大枣	生姜	10	90.00
茯苓	当归	15	22.39	茯苓	白术	36	88.89
茯苓	薏苡仁	14	20.90	茯苓	桔梗	9	88.89
白术	熟地黄	13	19.40	茯苓	木香	9	88.89
茯苓	砂仁	13	19.40	茯苓	党参	17	88.24
茯苓	熟地黄	13	19.40	大枣	柴胡	8	87.50
大枣	生姜	10	14.93	茯苓	柴胡	8	87.50
茯苓	生姜	10	14.93	茯苓	当归	15	86.67

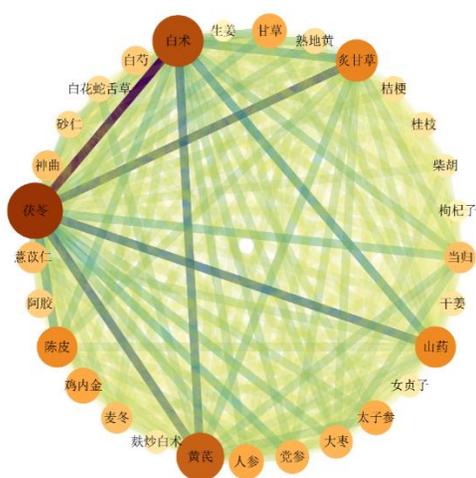


图 1 高频药物关联规则网络

Fig. 1 Association rule network of high-frequency TCMs

砂仁、大枣、生姜、当归、柴胡; 第 3 类: 白芍、桂枝、干姜、桔梗; 第 4 类: 人参; 第 5 类: 白花蛇舌草、太子参; 第 6 类: 北沙参、麦冬、甘草; 第 7 类: 麸炒白术; 第 8 类: 山茱萸、熟地黄、枸杞子、姜半夏; 第 9 类: 鸡内金; 见图 2。

2.1.4 核心组方整理 通过关联分析显示, 茯苓、白术、黄芪、山药、炙甘草的关联性较高, 可考虑作为核心组方成分。聚类分析得出 9 类药物, 其中第 1 类包含前述核心组方药物。进一步回溯原始文献中该 5 味药物的临床常用剂量, 并参照《中国药典》2020 年版规定, 将关联分析与聚类分析结果与临床应用相结合, 最终得到核心组方: 茯苓 10 g、白术 10 g、黄芪 30 g、山药 10 g、炙甘草 6 g。

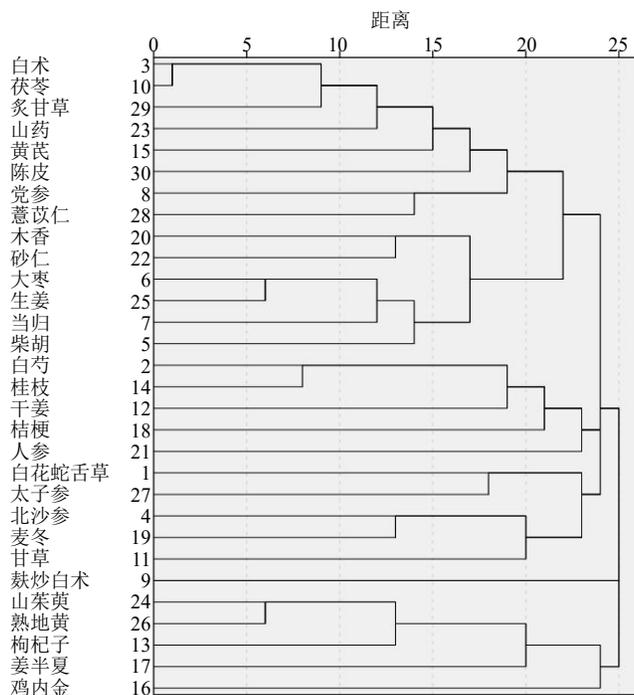


图2 高频药物聚类分析谱系图

Fig. 2 Hierarchical clustering analysis diagram of high-frequency TCMs

2.2 网络药理学分析

2.2.1 核心组方及成分靶点获取及筛选 在TCMSP数据库中检索茯苓、白术、黄芪、山药、炙甘草，设置筛选条件为 $OB \geq 30\%$ ，且 $DL \geq 0.18$ ，去除重复值后，共得到 121 活性成分，221 个潜在靶点。利用 Uniprot 数据库对筛选后的潜在靶点转换为标准化的基因名称。

2.2.2 疾病靶点预测 从 GeneCards、OMIM 2 个数据库中，以“cancer cachexia”为检索词、relevance score > 1 为 GeneCards 数据库筛选条件。汇总并去除重复值后，获得 CC 相关基因 3 951 个。

2.2.3 潜在作用的预测以及韦恩图的构建 将活性成分靶点同疾病靶点取交集，并构建韦恩图，得到核心组方治疗 CC 的潜在靶点 149 个，见图 3。

2.2.4 核心药物-活性成分-交集靶点网络构建分析 将核心组方的活性成分、中药治疗 CC 潜在靶点导入 Cytoscape 3.9.1 软件，得到 270 个节点（包括 121 个活性成分、149 个潜在靶点）、1 375 条边。主要成分包括槲皮素 (quercetin)、山柰酚 (kaempferol)、异鼠李素 (isorhamnetin)、芒柄花黄素 (formononetin)、毛蕊异黄酮 (calycosin) 等，见图 4。

2.2.5 构建 PPI 网络和筛选核心 PPI 网络 将核心组方成分-疾病共同靶点导入 STRING 数据库，设置度值 (degree) > 0.7 进行筛选，删除与潜在作

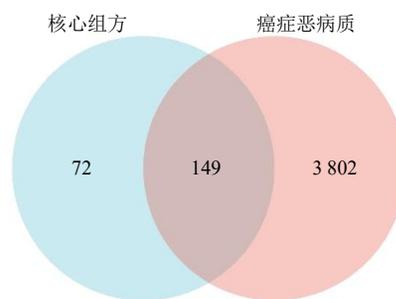


图3 药物与疾病交集靶点韦恩图

Fig. 3 Venn diagram of drug-disease intersection targets

用靶点无关的分散靶点，结果显示网络中包括 142 个节点和 1 279 条边，然后导入 Cytoscape 3.9.1 软件对其进行可视化分析，见图 5。通过软件内 cytoNCA 插件计算 BC、CC、DC、EC、NC、SC 数值，共进行 2 次筛选后，选取 degree 值前 10 的靶点作为核心靶点，包括 HIF-1 α 、Akt1、TP53、IL-6、信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、Bcl-2、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL1B)、STAT1、MYC。

2.2.6 GO 和 KEGG 富集分析 将交集靶点导入 Metascap 数据库，进行 GO 注释与 KEGG 通路分析，以 $P < 0.05$ 为筛选条件，共得到 GO 条目 2 719

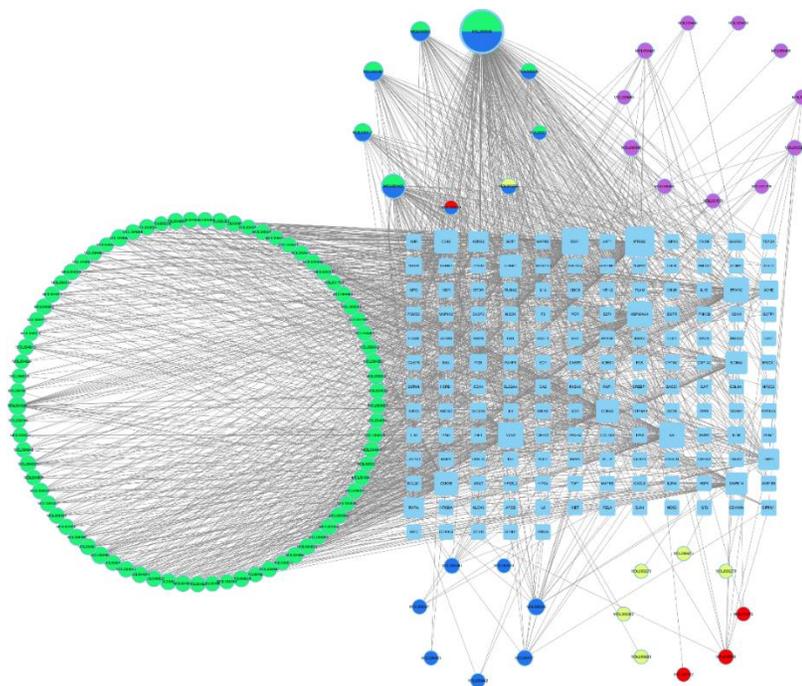


图4 药物-活性成分-交集靶点网络

Fig. 4 Network of drug-active components-intersection targets

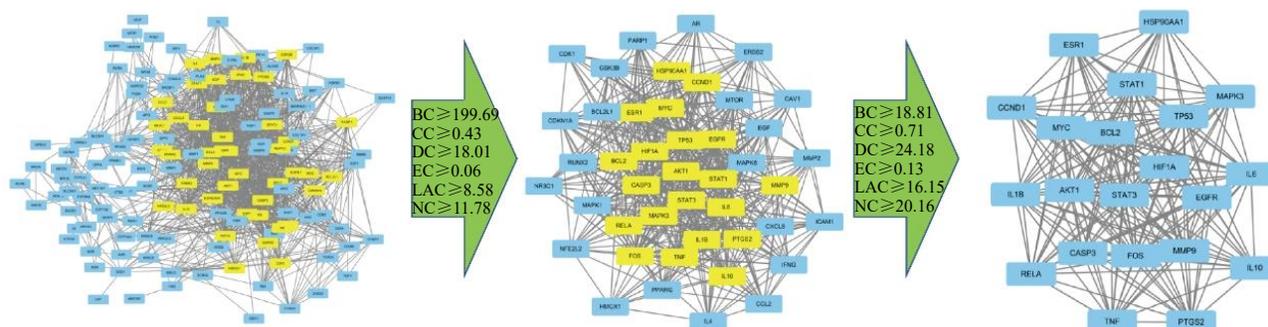


图5 PPI 交互网络与核心网络的筛选

Fig. 5 Screening of PPI network and core network

个, KEGG 条目 185 个。GO 条目中, 生物过程 (biological process, BP) 条目 2 450 个、细胞组分 (cellular component, CC) 条目 89 个、分子功能 (molecular function, MF) 条目 108 个。各筛选 10 个条目进行可视化分析, 见图 6。从 BP 来看, 核心组方主要参与对氧化应激的响应、细胞对化学应激的响应、对金属离子的响应、对活性氧物质的响应、对缺氧的响应、调节细胞凋亡信号通路、核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) /NF- κ B 抑制蛋白 (inhibitory of NF- κ B, I κ B) 激酶信号传导、细胞外信号调节激酶 1 (extracellular signal-regulated kinase 1, ERK1) 和 ERK2 级联反应、DNA 损伤引发的内源性细胞凋亡信号通路、无配体时的外源性细胞凋

亡信号通路; 在 CC 方面, 核心组方的作用位置可能是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶复合物、细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶全酶复合物、线粒体外膜、细胞器外膜、内质网腔、黏着斑、核膜、内吞小泡腔、早幼粒细胞白血病小体、内质网分子伴侣复合物; 从 MF 来看, 核心组方可能影响了泛素样蛋白连接酶结合、热休克蛋白结合、抗氧化活性、有丝分裂原活化蛋白激酶活性、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性、NF- κ B 结合、参与凋亡信号通路的半胱氨酸型内肽酶活性、死亡结构域结合、蛋白质折叠伴侣、p53 结合。

KEGG 通路富集气泡图中点越大表示该通路上所富集的基因越多, 颜色越蓝表示 *P* 值越小。KEGG

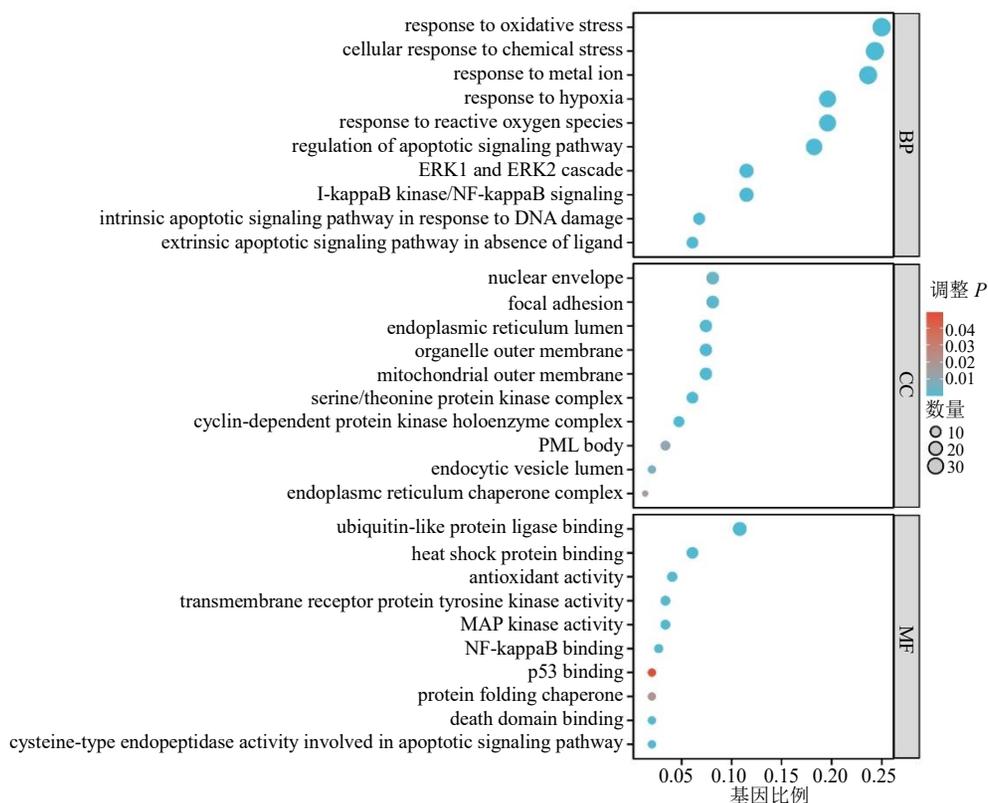


图 6 GO 功能富集分析气泡图

Fig. 6 Bubble plot of GO functional enrichment analysis

分析提示核心组方治疗 CC 主要涉及对非小细胞肺癌、HIF-1 α 信号通路、结直肠癌、磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (phosphatidylinositol-3-hydroxykinase, PI3K)/Akt 信号通路、凋亡、p53 信号通路、叉头框 O 转录因子 (forkhead box O, FoxO) 信号通路、鞘脂信号通路、氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferator activated receptor, PPAR) 信号通路、内质网蛋白质加工等信号通路的调控, 见图 7。

2.2.7 分子对接 分子对接可以将化合物配体与蛋白质受体结合, 通过计算结合能来预测分子间的结合模式与亲和力, 通常结合能 ≤ -5 kcal/mol (1 kcal = 4.2 kJ) 的物质与靶点结合性较好^[20]。本研究基于网络拓扑分析结果, 选取 degree 值排名靠前且能体现组方药物核心药效基础的 5 个关键活性成分进行验证^[21], 包括槲皮素、山柰酚、异鼠李素、芒柄花黄素、毛蕊异黄酮。对接结果显示, 上述核心成分与核心靶点 HIF-1 α 、Akt1、TP53、Bcl-2、MYC 等结合能均较低, 提示关键成分与关键靶点形成稳定结构的可能性较高, 根据分子对接结果绘制热图直观呈现各成分与靶点之间的结合可能性, 见图 8。选取对接最好的分子进行展示, 如图 9 所示。

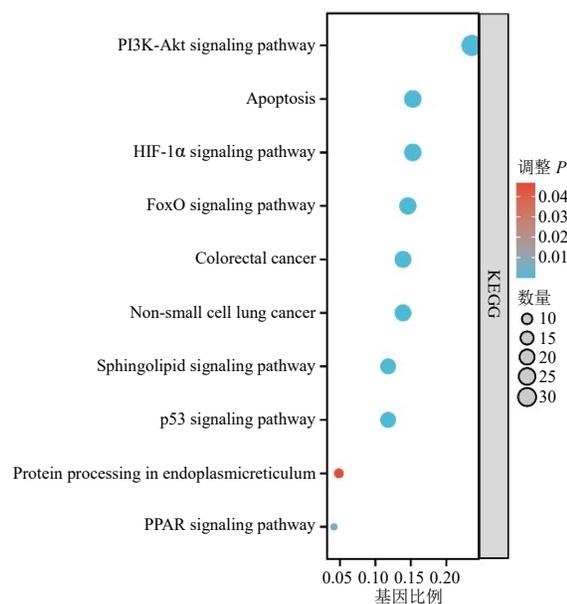


图 7 KEGG 通路富集分析气泡图

Fig. 7 Bubble plot of KEGG pathway enrichment analysis

2.3 实验验证结果

2.3.1 核心组方对裸鼠一般情况的影响 裸鼠在接种后第 7 天即呈现出典型的恶病质症状: 日均摄食量迅速下降 ($P < 0.05$), 并导致体质量持续显著

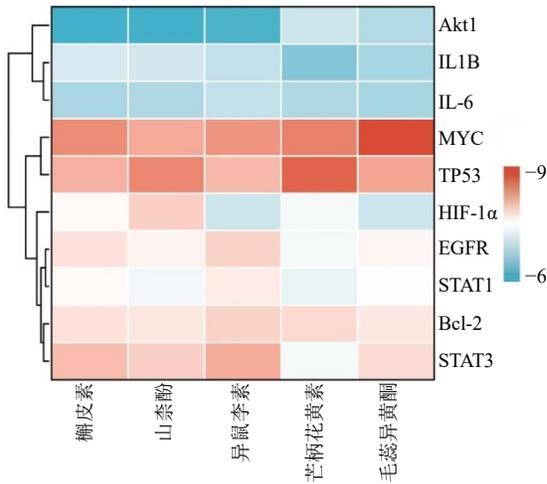


图 8 分子对接结果热图

Fig. 8 Heatmap of molecular docking results

下降 ($P < 0.05$)。实验终点各组裸鼠的整体外观显示, 模型组裸鼠体型明显消瘦, CC 表型严重, 而核心组方 (特别是高剂量组) 的干预有效改善了这一体征 (图 10-A)。核心组方的干预有效减少了体质量损失 ($P < 0.05$)。其中, 高剂量组的保护作用最为显著, 其体质量曲线在整个观测期内均显著优于其他治疗组, 并展现出最接近对照组水平的体质量维持效果 (图 10-B)。在肿瘤生长方面, 核心组方亦展现出显著疗效 (图 10-C)。实验终点显示, 核心组方高剂量组抑瘤活性最强, 肿瘤湿质量极显著低于模型组 ($P < 0.01$)。值得注意的是, 阳性对照组虽然有效维持了体质量, 但对肿瘤生长的抑制作用不显著 ($P > 0.05$)。摄食量方面, 核心组方高剂量组的日均摄食量在整个治疗期内显著高于模型

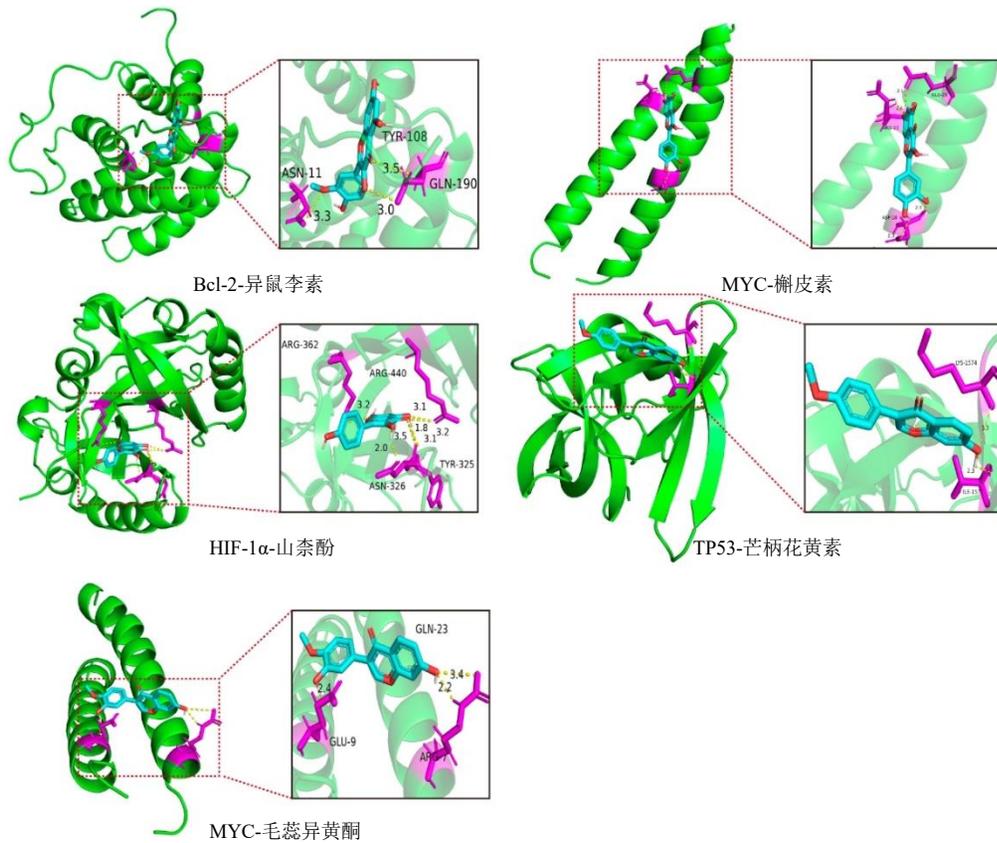


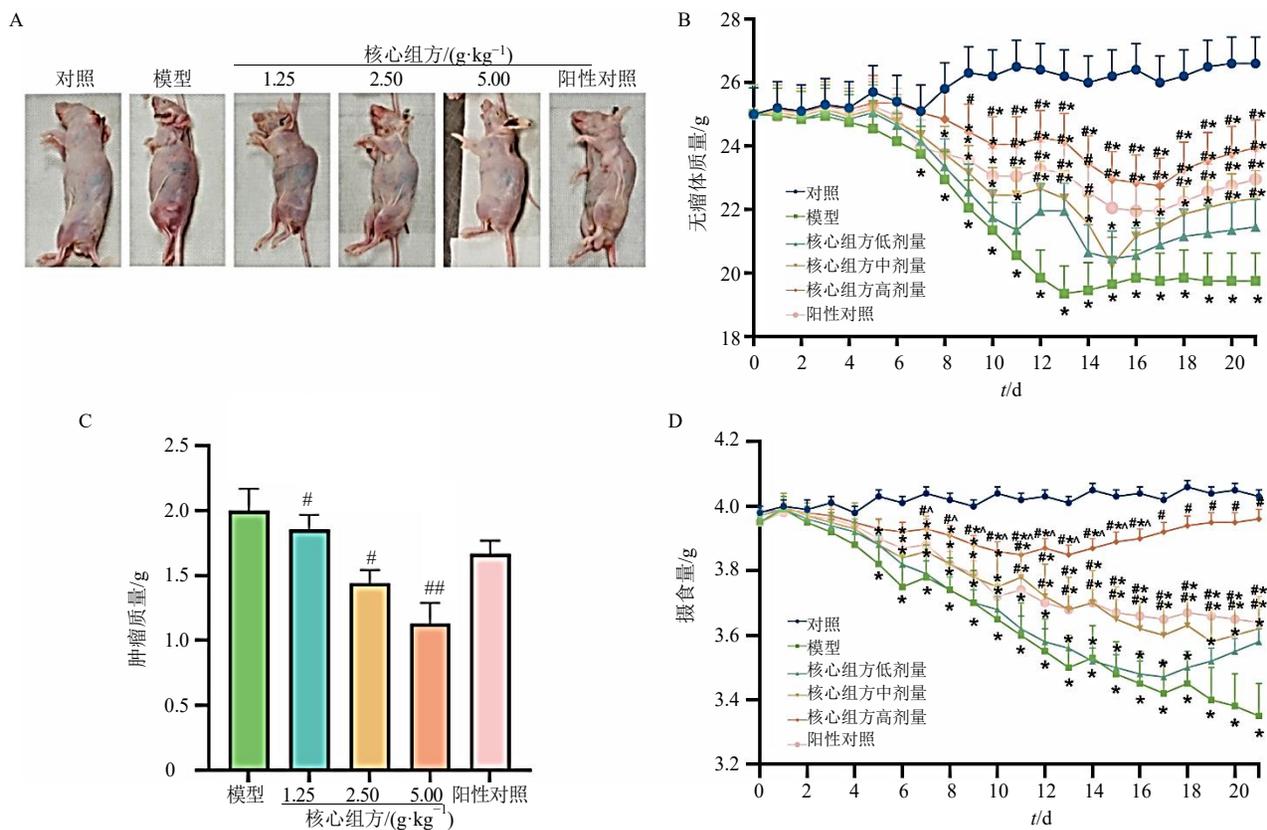
图 9 分子对接可视化

Fig. 9 Visualization of molecular docking

组和其他剂量组 ($P < 0.05$), 有效缓解了恶病质导致的厌食症状 (图 10-D)。

2.3.2 核心组方对 CC 引起的肌肉萎缩的影响 为了评估核心组方对骨骼肌萎缩的保护作用, 本研究测量了裸鼠的骨骼肌湿质量及肌肉功能。在实验终

点, 模型组裸鼠的股四头肌湿质量均显著低于对照组 ($P < 0.05$), 提示严重的肌肉萎缩。核心组方仅高剂量组显著提高了股四头肌的湿质量 ($P < 0.05$) (图 11-B)。同时, 功能性评估显示, 模型组裸鼠的前肢握力峰值显著低于对照组 ($P < 0.05$), 提示肌



A-核心组方可缓解 CC 裸鼠的整体情况；B-裸鼠无瘤体重随时间变化图；C-荷瘤移植后第 21 d 处死时的肿瘤质量；D-裸鼠摄食量随时间变化图；与对照组比较：* $P < 0.05$ ，与模型组比较：# $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ；与低剂量组比较：^ $P < 0.05$ （下图同）。

A-core formula alleviates overall condition of CC nude mice; B-change in tumor-free body weight of nude mice over time; C-tumor mass at time of sacrifice on day 21 post-transplantation; D-change in food intake of nude mice over time; * $P < 0.05$ vs control group, # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, ^ $P < 0.05$ vs low-dose group (same as below).

图 10 核心组方缓解 CC 裸鼠的整体情况 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 10 Core formula alleviates overall condition of CC nude mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

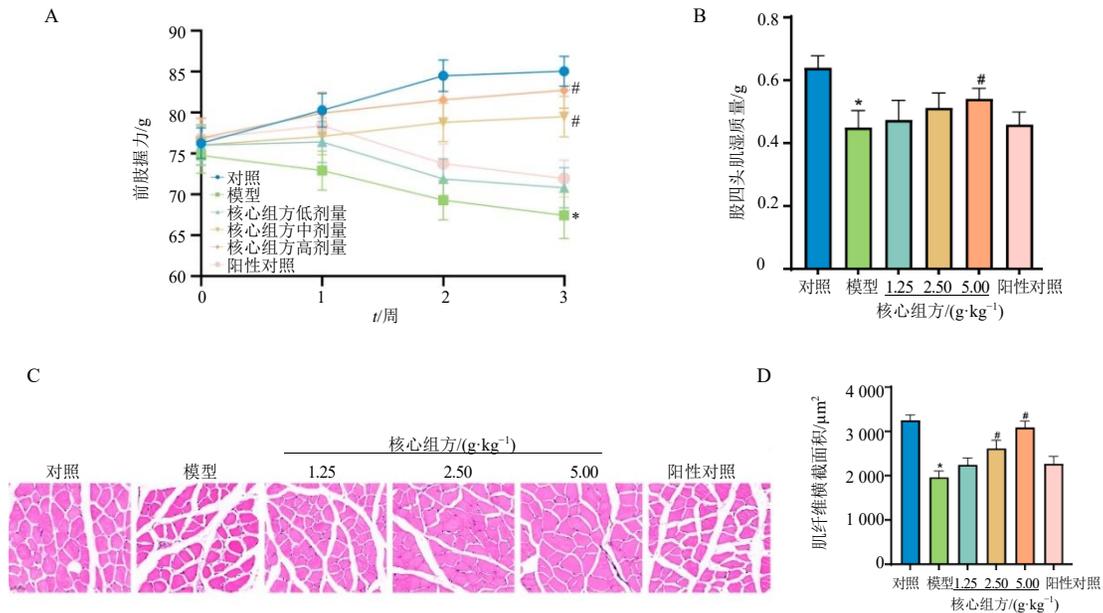
肉力量受损；核心组方干预显著改善了裸鼠的肌肉力量，中、高剂量组的握力峰值显著高于模型组 ($P < 0.05$)，恢复效果最佳，而低剂量组和阳性对照组的改善效果不显著（图 11-A）。

为确定 CC 模型诱导的恶病质导致的肌肉萎缩程度，本研究进行了 HE 染色观察。模型组的股四头肌纤维横截面积显著减小，且形态不规则，肌纤维间隙显著增宽，提示存在严重的肌肉萎缩。相比之下，接受中药干预的裸鼠表现出明显的改善。其中，中、高剂量裸鼠的肌纤维横截面积维持最好，形态饱满，显著优于模型组 ($P < 0.05$)，且与对照组无显著差异（图 11-C）。综合以上表明，核心组方能够有效阻止 CC 导致的肌肉质量损失，并恢复裸鼠的肌肉功能。

2.3.3 核心组方改善 CC 引起的全身炎症 采用 LISA 法检测裸鼠血清中炎症因子 IL-6 和 TNF- α 的

表达水平（图 12）。模型组血清 IL-6 和 TNF- α 水平与对照组相比显著升高 ($P < 0.05$)，表明肿瘤诱导了强烈的全身炎症反应；相比于模型组，核心组方中、高剂量组显著降低了血清 IL-6 和 TNF- α 水平 ($P < 0.05, 0.01$)，表现出明显的抗炎作用。提示核心组方干预可通过减轻全身炎症负担来缓解 CC。

2.3.4 核心组方抑制 CC 腓肠肌中 Atrogin-1、MuRF1 的表达 为评估中药干预对恶病质诱导的肌肉蛋白降解的作用，本研究检测了 Atrogin-1 和 MuRF1 在腓肠肌中的蛋白表达水平（图 13）。结果显示，与对照组相比，模型组裸鼠腓肠肌细胞内 Atrogin-1 和 MuRF1 的平均荧光强度均显著上调 ($P < 0.05$)，提示肌肉蛋白降解途径被高度激活。核心组方干预后，高剂量组表现出最强的抑制效果，其 Atrogin-1 和 MuRF1 荧光强度显著低于模型组 ($P < 0.01$)，并呈现出接近对照组的趋势，且强于中



A-前肢握力; B-股四头肌湿质量; C-HE染色(×400)及肌纤维横截面积。
A-forelimb grip strength; B-quadriceps wet weight; C-HE staining (× 400) and muscle fiber cross-sectional area.

图 11 核心组方对 CC 裸鼠骨骼肌萎缩的保护作用 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 11 Protective effect of core formula on skeletal muscle atrophy in CC nude mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

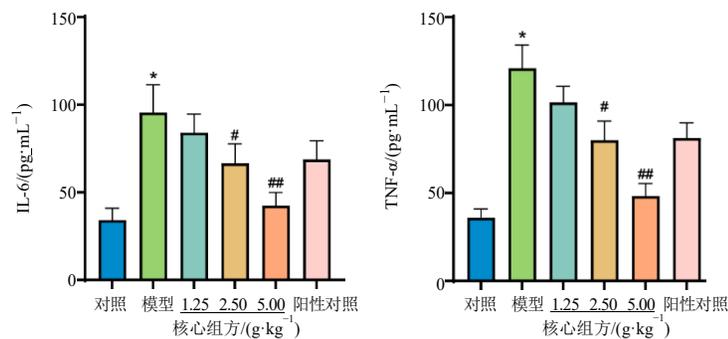


图 12 核心组方对血清炎症因子 IL-6 和 TNF-α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 12 Effect of core formula on levels of serum inflammatory cytokine IL-6 and TNF-α ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

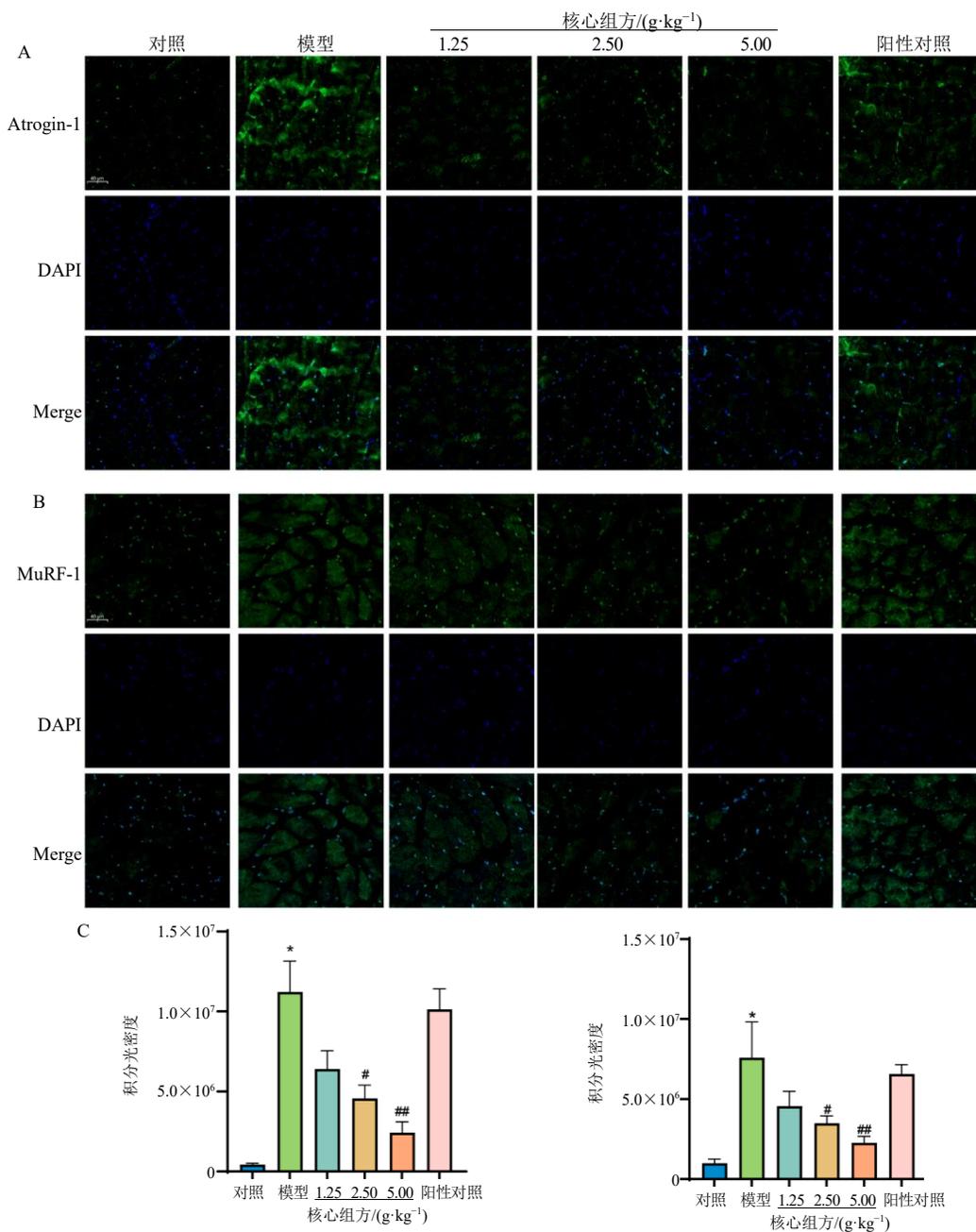
剂量组和低剂量组。阳性对照组则未能对 Atrogin-1 和 MuRF1 的表达产生显著抑制作用。这证明核心组方干预可以通过抑制蛋白降解途径活化来有效缓解 CC。

2.3.5 核心组方通过多靶点调控蛋白合成、凋亡和代谢信号缓解 CC 为验证网络药理学预测的核心分子机制,实验进一步通过 IHC 技术检测核心靶点 HIF-1α、Akt1、TP53、Bcl-2 和 MYC 在腓肠肌中的表达水平(图 14)。免疫组化定量结果显示,模型组裸鼠的蛋白合成通路受到抑制,表现为 Akt1 的表达水平显著下降 ($P < 0.05$);同时,促凋亡蛋白 TP53 和 HIF-1α、MYC 的表达水平显著升高 ($P < 0.05$),而抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平则显

著降低 ($P < 0.05$)。该结果表明恶病质诱导了多重分子失衡。核心组方干预后,分子失衡得到有效纠正,中、高剂量组显著恢复了 Akt1、Bcl-2 的表达,并显著降低了 TP53、HIF-1α 和 MYC 的表达水平 ($P < 0.05, 0.01$)。

3 讨论

CC 是一种与肿瘤发展相关的代谢性疾病,常发生于胰腺癌、食道癌、胃癌、肺癌、肝癌和肠癌等癌症的晚期,其特征为体质量减轻、骨骼肌损失^[22],属于中医“虚劳”范畴,多由癌毒痰瘀日久、阴火内生、营卫失司等多种因素共同影响,以脏腑气血阴阳虚衰为基本病机^[23-24]。凡病久虚不愈,唯有益胃、补肾二途,因此中医治疗 CC 的基



A-Atrogin-1 免疫荧光染色 (×400); B-MuRF-1 免疫荧光染色 (×400); C-免疫荧光定量 (从左到右分别为 Atrogin-1、MuRF-1)。
 A-Atrogin-1 immunofluorescence staining (× 400); B-MuRF1 immunofluorescence staining (× 400); C-quantitative analysis of immunofluorescence (Atrogin-1 and MuRF1 from left to right).

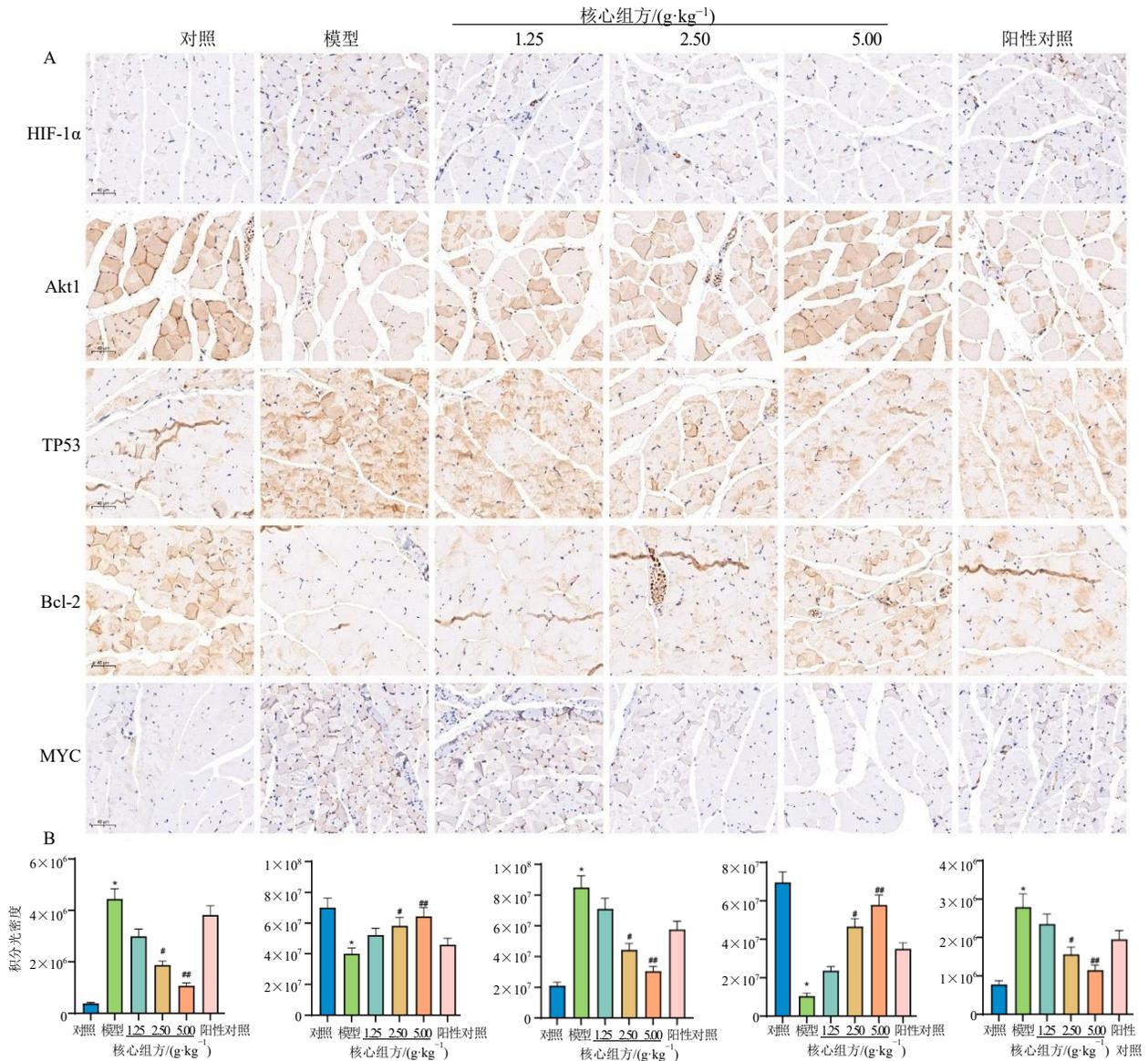
图 13 核心组方对腓肠肌 Atrogin-1 和 MuRF1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 13 Effect of core formula on Atrogin-1 and MuRF1 protein expressions in gastrocnemius muscle ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

本原则为“扶正祛邪”，以“补虚”为要，改善患者临床症状、减轻药物不良反应、延缓疾病进展，从而提高生活质量^[25]。

本研究通过数据挖掘中医药治疗 CC 的有效组方，数据挖掘方法已大量应用到中医药组方规律及治病机制的研究^[26]。本研究共纳入处方 67 首，涉及中药 171 味，进行数据整理分析，在药物配伍上，

使用频次最高的中药为茯苓、白术、黄芪、炙甘草、山药等，性味多选用温、平、甘，药物归经以脾、肺、肾为主。根据关联规则分析与聚类分析，挖掘出中医药治疗 CC 的核心组方为“茯苓、白术、黄芪、山药、炙甘草”。方中茯苓、白术、炙甘草作为“四君子汤”的核心组成部分，主治脾气虚弱，《脾胃论》有云：“夫脾胃虚弱……倦怠嗜卧，四肢不收，



A-免疫组化染色 (×400); B-免疫组化染色的积分光密度定量 (从左到右分别为 HIF-1α、Akt1、TP53、Bcl-2、MYC)。

A-immunohistochemistry staining (×400); B-quantitative analysis of IOD of immunohistochemistry staining (HIF-1α, Akt1, TP53, Bcl-2, and MYC from left to right).

图 14 核心组方对腓肠肌关键靶蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 14 Effect of core formula on expression of key target proteins in gastrocnemius muscle ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

精神不足。”补气健脾是治疗 CC 的关键。脾为生痰之源，茯苓健脾渗湿，导痰饮水湿之邪从小而走，则水道通条，故水谷精微之气得以布散而濡养周身，白术则燥湿浊而助脾胃以运化水谷，食欲渐开，饮食得进则气血生化源泉不竭，升清阳而助脾气得升，清升浊降则精力旺盛；炙甘草为药中“国老”，补气调中，《神农本草经》言其“坚筋骨，长肌肉，倍力气。”既能够调和脾胃、补虚强壮，还能调和诸药，使全方和缓，增强药效，利于长期治疗。所谓甘者缓也，炙甘草亦可缓急止痛，缓解因病程长、

体虚乏力带来的消耗性疼痛。此外，配以黄芪补气扶正，黄芪气味甘温，能补生生之气，外固而内托，卫外得固则可抵御外邪，防邪内侵复伤正气，内托癌毒则可预防肿瘤扩散；山药则肺、脾、肾三脏并补，先天后天相互滋养，脾气充肾气足则可补虚强壮，且山药养阴而滋润又可制约白术、黄芪之温燥，使得全方补虚而不郁滞，燥湿而不伤阴，整个治疗过程既能增强患者体质，又能祛除体内的病邪，达到缓解 CC 的双重疗效。这种配伍既能够帮助改善患者的身体虚弱，又在“解毒”层面上对抗癌症及

其治疗过程中的毒邪损伤实现了“扶正”与“解毒”的有机结合，与CC的“虚劳”病机相呼应，符合辨证思维和临床应用经验，具有可行性。

通过网络药理学对核心组方治疗CC的作用机制进一步研究，预测出主要活性成分为槲皮素、山柰酚、异鼠李素、芒柄花黄素、毛蕊异黄酮。槲皮素和山柰酚都是天然黄酮类化合物，二者在抗炎、抗氧化、抗肿瘤及改善代谢功能等方面具有类似的作用机制^[27]，进一步研究发现，这2种化合物能够通过调控PI3K/Akt、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、NF- κ B等信号通路，抑制炎症因子的产生，减少细胞凋亡，增加细胞内线粒体含量，减轻CC裸鼠的肌肉质量损失，改善运动功能^[28-30]；此外槲皮素还可能通过调节内质网应激和铁死亡途径，减轻细胞因氧化应激引起的损伤、降低凋亡，从而保护细胞^[31-32]。异鼠李素是槲皮素的甲基化代谢产物，有研究发现异鼠李素可改善糖尿病裸鼠的胰岛素抵抗、氧化应激，以及抑制IL-6等促炎细胞因子的产生，减轻炎症。芒柄花黄素是一种异黄酮素，体内外实验研究表明，其能调节PI3K/Akt/FoxO3a通路，降低C-反应蛋白、TNF- α 和IL-6等炎症因子水平及肌肉生长抑制素的表达，改善肌纤维及肌管萎缩^[33]。毛蕊异黄酮是一种植物来源的雌激素异黄酮，为甘草和黄芪中的主要活性成分^[34]，近期研究证实，毛蕊异黄酮可能通过调控腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)、PI3K/Akt等信号通路，抑制肿瘤细胞迁移和增殖，诱导其凋亡，从而对多种肿瘤具有广泛的抗肿瘤效应^[35-38]。此外，最新实验显示，在吉西他滨耐药肺癌细胞模型中，毛蕊异黄酮可通过NF- κ B等途径抑制肺癌细胞的增殖。

根据PPI分析后筛选核心组方治疗CC的核心靶点为HIF-1 α 、Akt1、TP53、IL6、STAT3、Bcl-2、EGFR、IL1B、STAT1、MYC。基于GO分析，核心组方的活性成分作用于线粒体外膜和内质网腔等多个有关能量代谢和应激响应的细胞器，参与对氧化应激和化学应激的反应、对缺氧的反应、内外源凋亡信号通路的调节等多个生物途径，一定程度上解释了在肿瘤微环境的缺氧条件下，核心组方在机体细胞增殖与凋亡平衡中扮演重要角色，有助于缓解CC相关的代谢紊乱与骨骼肌消耗。KEGG通路分析显示，核心组方治疗CC主要涉及多个重要信

号通路，包括非小细胞肺癌、HIF-1信号通路、结肠直肠癌、PI3K/Akt信号通路、凋亡、p53信号通路、FoxO信号通路、鞘脂信号通路、PPAR信号通路及内质网蛋白质加工等。其中较为靠前的有HIF-1信号通路和PI3K/Akt信号通路，研究表明，HIF-1 α 的转录表达情况取决于氧水平，在常氧条件下，HIF-1 α 半衰期短且极不稳定，经羟基化后，肿瘤抑制蛋白结合HIF-1 α ，并形成E3泛素连接酶受体结构域，从而引起泛素化后蛋白酶体途径降解^[39]；在肿瘤微环境下，缺氧条件诱导癌细胞基因重编程，以适应生存^[40-41]，因此除缺氧外的许多机制如癌基因的激活、抑癌基因的失活、生长因子信号的活化也可激活HIF-1 α ^[42-43]，尤其是PI3K/Akt信号通路在活化HIF-1 α 表达起到重要作用^[44]，使癌细胞在缺氧情况下仍高效率利用葡萄糖、脂质与氨基酸，影响正常细胞的代谢，加重骨骼肌萎缩与体质量下降，核心组方对该通路的调节可能有助于减轻缺氧及基因重编程带来的代谢紊乱，降低肌肉消耗。

基于上述机制解析，并与既往抗CC中药复方研究进行横向对比，本研究筛选出的核心组方展现出独特的配伍特色与机制优势。目前临床治疗CC多选用六君子汤或补中益气为法等经典名方^[45-47]。六君子汤虽善于健脾化痰，但方中半夏、陈皮性燥，久服恐伤恶病质患者本已亏虚之阴液；而常规益气方剂虽能补气，往往缺乏对阴液的兼顾及对代谢微环境的针对性调节。相比之下，本研究基于大数据挖掘提炼出的核心组方(茯苓、白术、黄芪、山药、炙甘草)体现了“益气-健脾-养阴”的三维配伍智慧：方中重用黄芪大补元气以托毒外出，配合山药脾肾双补、气阴两顾。这种配伍既保留了“四君子”健脾运化之功，又通过山药之润制约了术、芪之燥，更契合恶病质晚期“气血枯竭、阴阳两虚”的核心病机。在机制层面，既往研究多侧重于验证中药对IL-6、TNF- α 等促炎细胞因子的抑制效应^[48]，而本研究在证实上述抗炎作用的基础上，进一步揭示了核心组方通过调控HIF-1 α 介导的“代谢重编程”来缓解肌肉消耗的深层机制。这种从“外周抗炎”向“代谢纠偏”的视角延伸，为中医药治疗恶病质提供了更为多维、系统的科学依据。

为验证网络药理学预测，本研究构建A549细胞荷瘤裸鼠CC模型，设置低、中、高剂量核心组方组及醋酸甲地孕酮阳性对照组。结果显示，模型组裸鼠无瘤体质量持续下降，21d降幅约25%，摄

食量锐减；高剂量组体质量曲线最接近对照组，终点无瘤体质量显著高于模型组，摄食量恢复至正常80%以上，握力峰值提升约40%，提示核心组方有效对抗厌食、体质量丢失、功能下降的恶病质三联征。模型组股四头肌湿质量下降约35%，肌纤维横截面积缩小50%；高剂量组湿质量恢复至正常90%，肌纤维面积显著增大，HE染色显示肌纤维排列整齐、间隙缩小。免疫荧光显示，与模型组比较，高剂量组 Atrogin-1、MuRF1 荧光强度分别下降约60%、55%，证实核心组方通过抑制泛素-蛋白酶体途径保护肌肉质量。模型组血清 IL-6、TNF- α 水平升高约3倍，高剂量组分别下降约55%、50%。IHC检测显示，模型组 HIF-1 α 、TP53、MYC 表达上调，Akt1、Bcl-2 下调；高剂量组 HIF-1 α 、TP53、MYC 积分光密度分别下降约50%、45%、40%，Akt1、Bcl-2 恢复至正常80%以上，与网络药理学预测的 HIF-1 α 、PI3K-Akt、p53 通路调控一致。

本研究发现，高剂量组的疗效最为显著，提示该方剂的疗效具有明确的正向剂量-效应关系。CC 属重症、难治之证，病机复杂且多邪夹杂，唯有药力峻猛、剂量充足方能扶正祛邪、推陈致新，以迅速扭转疾病的恶性进展，这符合中医“用药如用兵”以及“攻伐峻烈以除重疾”的临证思路。阳性药醋酸甲地孕酮虽能改善食欲与体质量，却对肿瘤体积、肌肉萎缩、握力及炎症指标无显著影响。相比之下，中药核心组方不仅恢复脾胃运化、增加营养摄入，更通过槲皮素、山柰酚抑制 HIF-1 α 介导的瓦博格 (Warburg) 效应，减少肿瘤对葡萄糖竞争；芒柄花黄素、毛蕊异黄酮下调 Atrogin-1/MuRF1，阻断泛素-蛋白酶体途径；同时降低 IL-6/TNF- α 、恢复 Akt1/Bcl-2，抑制肌细胞凋亡，实现从能量供应到蛋白保护的全链条干预，凸显多靶点整体调节优势。

综合数据挖掘、网络药理学与实验验证，本研究提出核心组方治疗 CC 的健脾渗湿-代谢重编程-抗炎与抗凋亡 3 级机制模型：健脾渗湿（茯苓-白术-山药）恢复脾胃运化，改善厌食、湿浊内生，为气血生化提供物质基础；代谢重编程（降低 HIF-1 α 、升高 Akt1）抑制肿瘤细胞 Warburg 效应，减少葡萄糖竞争，恢复骨骼肌能量供应；抗炎与抗凋亡（降低 IL-6/TNF- α 、抑制 Atrogin-1/MuRF1）阻断炎症-蛋白降解正反馈环，保护肌纤维完整性。该模型将中医扶正祛邪宏观辨证与西医代谢-炎症微观机制有机融合，体现了中医药治疗复杂疾病的整体观。

本研究核心组方剂量参考临床常用剂量与实验折算结果，可为临床应用提供初步参考。临证时，建议结合患者体质、肿瘤类型、恶病质分期及兼夹证候进行个体化加减，如脾虚湿盛明显者可酌情重用茯苓、白术以增强渗湿健脾之力；气阴两虚为主者，可适当增加黄芪、山药用量以益气养阴；痰瘀互结者，可酌加陈皮、半夏以理气化痰、活血散结。此外，本研究仍存在一定局限性，尚需在后续工作中深化。首先，本实验重点关注了核心组方对 PI3K/Akt/HIF-1 α 通路关键节点蛋白 (Akt1、HIF-1 α) 及下游功能执行蛋白 (Atrogin-1、MuRF1) 表达量的调控，虽然现有研究证实 Atrogin-1 和 MuRF1 的转录表达直接受控于 PI3K/Akt 通路的活化状态^[49-53]，足以反映该通路的整体功能改变，但缺乏对上游关键激酶磷酸化水平，如 p-PI3K、p-Akt 的直接检测，未能完整展示信号转导的级联反应过程。其次，本研究遵循中医药“整体观”思想，验证了复方的综合效应，但尚未对网络药理学预测的槲皮素、山柰酚等活性成分进行单体体外验证，无法明确各成分对复方整体疗效的具体贡献度及潜在的协同或拮抗作用。未来研究将结合 Western blotting、基因敲除技术及体外细胞实验，深入解析核心组方调控通路的磷酸化级联机制及药效物质基础。

综上，本研究通过文献-计算-实验整合策略，系统揭示了中医药治疗 CC 的核心组方及其多维度机制，证实了该组方可能通过调控 PI3K/Akt/HIF-1 α 信号轴，改善肌肉缺氧微环境并抑制泛素-蛋白酶体降解途径，为开发安全有效的抗恶病质中药复方提供了科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Muscaritoli M, Rossi Fanelli F, Molino A. Perspectives of health care professionals on cancer cachexia: Results from three global surveys [J]. *Ann Oncol*, 2016, 27(12): 2230-2236.
- [2] Fearon K, Strasser F, Anker S D, et al. Definition and classification of cancer cachexia: An international consensus [J]. *Lancet Oncol*, 2011, 12(5): 489-495.
- [3] Zhang X Y, Qiu H, Li C S, et al. The positive role of traditional Chinese medicine as an adjunctive therapy for cancer [J]. *Biosci Trends*, 2021, 15(5): 283-298.
- [4] 孙银辉, 何晓, 李涵宇, 等. 扶正口服液对诱导性癌症恶病质裸鼠骨骼肌中 ERAD/ERSIA 通路的影响 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2022, 42(11): 1816-1822.
- [5] 王理槐, 窦娴, 陈晟, 等. 扶正口服液通过内质网应激

- 途径改善癌症恶病质肌肉萎缩的机制研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(11): 1809-1815.
- [6] Feng S Q, Wang G J, Zhang J W, *et al.* Combined treatment with apatinib and docetaxel in A549 xenograft mice and its cellular pharmacokinetic basis [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(10): 1670-1680.
- [7] Li L, Wazir J, Huang Z Q, *et al.* A comprehensive review of animal models for cancer cachexia: Implications for translational research [J]. *Genes Dis*, 2023, 11(6): 101080.
- [8] Alves C, Goodyear L, Brum P. Muscle metabolic stress determines cancer cachexia severity in mice [J]. *Front Physiol*, 2022, 13: 1033932.
- [9] 徐叔云. 药理实验方法学 [M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 983.
- [10] Wang D L, Chen W Q, Bi Q Y, *et al.* Baoyuan Jiedu decoction alleviates cancer-induced myotube atrophy by regulating mitochondrial dynamics through p38 MAPK/PGC-1 α signaling pathway [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 523577.
- [11] Kantarci A, Kansal S, Hasturk H, *et al.* Resolvin E1 reduces tumor growth in a xenograft model of lung cancer [J]. *Am J Pathol*, 2022, 192(10): 1470-1484.
- [12] Dodson S, Baracos V E, Jatoi A, *et al.* Muscle wasting in cancer cachexia: Clinical implications, diagnosis, and emerging treatment strategies [J]. *Annu Rev Med*, 2011, 62: 265-279.
- [13] Der-Torossian H, Wysong A, Shadfar S, *et al.* Metabolic derangements in the gastrocnemius and the effect of Compound A therapy in a murine model of cancer cachexia [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2013, 4(2): 145-155.
- [14] Brown J L, Rosa-Caldwell M E, Lee D E, *et al.* Mitochondrial degeneration precedes the development of muscle atrophy in progression of cancer cachexia in tumour-bearing mice [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2017, 8(6): 926-938.
- [15] Muthamil S, Kim H Y, Jang H J, *et al.* Understanding the relationship between cancer associated cachexia and hypoxia-inducible factor-1 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 163: 114802.
- [16] Devine R D, Bicer S, Reiser P J, *et al.* Increased hypoxia-inducible factor-1 α in striated muscle of tumor-bearing mice [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2017, 312(6): H1154-H1162.
- [17] Schwarzkopf M, Coletti D, Sassoon D, *et al.* Muscle cachexia is regulated by a p53-PW1/Peg3-dependent pathway [J]. *Genes Dev*, 2006, 20(24): 3440-3452.
- [18] Robert F, Mills J R, Agenor A, *et al.* Targeting protein synthesis in a Myc/mTOR-driven model of anorexia-cachexia syndrome delays its onset and prolongs survival [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(3): 747-756.
- [19] Geremia A, Sartori R, Baraldo M, *et al.* Activation of Akt/mTORC1 signalling reverts cancer-dependent muscle wasting [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2022, 13(1): 648-661.
- [20] Minagawa K, Wakahashi K, Fukui C, *et al.* Tfl deletion induces extraordinary Cxcl13 secretion and cachexia in VavP-Bcl2 transgenic mice [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1197112.
- [21] Trott O, Olson A J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. *J Comput Chem*, 2010, 31(2): 455-461.
- [22] 陈海彬, 周红光, 李文婷, 等. 网络药理学: 中药复方作用机制研究新视角 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(7): 2873-2876.
- [23] Baracos V E, Martin L, Korc M, *et al.* Cancer-associated cachexia [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4: 17105.
- [24] 张兆洲, 冯媛媛, 王炎. 癌毒传舍的中医病机探讨 [J]. 中医肿瘤学杂志, 2024, 6(2): 8-16.
- [25] 曲一玮, 李晓, 王怀哲, 等. 基于“虚则卫气不足, 劳则营气竭”论恶病质的中医防治 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2023, 29(12): 2001-2004.
- [26] 王胜男, 孔智谦, 周智慧, 等. 基于数据挖掘、网络药理学和分子对接分析中药组方治疗梅尼埃病的作用机制 [J]. 中草药, 2025, 56(6): 2066-2078.
- [27] 冯宇, 呼健. 肿瘤恶病质的中医分期诊治思路探析 [J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(11): 5333-5335.
- [28] Al-Khayri J M, Sahana G R, Nagella P, *et al.* Flavonoids as potential anti-inflammatory molecules: A review [J]. *Molecules*, 2022, 27(9): 2901.
- [29] Li X, Wei S Z, Niu S Q, *et al.* Network pharmacology prediction and molecular docking-based strategy to explore the potential mechanism of Huanglian Jiedu Decoction against sepsis [J]. *Comput Biol Med*, 2022, 144: 105389.
- [30] VanderVeen B N, Cardaci T D, Cunningham P, *et al.* Quercetin improved muscle mass and mitochondrial content in a murine model of cancer and chemotherapy-induced cachexia [J]. *Nutrients*, 2022, 15(1): 102.
- [31] Shibuya S, Watanabe K, Sakuraba D, *et al.* Natural compounds that enhance motor function in a mouse model of muscle fatigue [J]. *Biomedicines*, 2022, 10(12): 3073.
- [32] Chang X, Zhang T, Meng Q Y, *et al.* Quercetin improves cardiomyocyte vulnerability to hypoxia by regulating SIRT1/TMBIM6-related mitophagy and endoplasmic reticulum stress [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 5529913.
- [33] Wang Y, Quan F, Cao Q H, *et al.* Quercetin alleviates acute kidney injury by inhibiting ferroptosis [J]. *J Adv Res*, 2020, 28: 231-243.
- [34] Liu L Y, Hu R, You H Y, *et al.* Formononetin ameliorates muscle atrophy by regulating myostatin-mediated PI3K/Akt/FoxO3a pathway and satellite cell function in

- chronic kidney disease [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(3): 1493-1506.
- [35] Boonmuen N, Gong P, Ali Z, *et al.* Licorice root components in dietary supplements are selective estrogen receptor modulators with a spectrum of estrogenic and anti-estrogenic activities [J]. *Steroids*, 2016, 105: 42-49.
- [36] Zhang Z X, Lin M, Wang J L, *et al.* Calycosin inhibits breast cancer cell migration and invasion by suppressing EMT via BATF/TGF- β 1 [J]. *Aging*, 2021, 13(12): 16009-16023.
- [37] Tian W, Wang Z W, Yuan B M, *et al.* Calycosin induces apoptosis in osteosarcoma cell line via ER β -mediated PI3K/Akt signaling pathways [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21(6): 2349-2356.
- [38] Zhao X G, Li X, Ren Q Y, *et al.* Calycosin induces apoptosis in colorectal cancer cells, through modulating the ER β /MiR-95 and IGF-1R, PI3K/Akt signaling pathways [J]. *Gene*, 2016, 591(1): 123-128.
- [39] Liu Y, Piao X J, Xu W T, *et al.* Calycosin induces mitochondrial-dependent apoptosis and cell cycle arrest, and inhibits cell migration through a ROS-mediated signaling pathway in HepG2 hepatocellular carcinoma cells [J]. *Toxicol In Vitro*, 2021, 70: 105052.
- [40] Mazumder S, Higgins P J, Samarakoon R. Downstream targets of VHL/HIF- α signaling in renal clear cell carcinoma progression: Mechanisms and therapeutic relevance [J]. *Cancers*, 2023, 15(4): 1316.
- [41] Taneja N, Chauhan A, Kulshreshtha R, *et al.* HIF-1 mediated metabolic reprogramming in cancer: Mechanisms and therapeutic implications [J]. *Life Sci*, 2024, 352: 122890.
- [42] Nagao A, Kobayashi M, Koyasu S, *et al.* HIF-1-dependent reprogramming of glucose metabolic pathway of cancer cells and its therapeutic significance [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(2): 238.
- [43] Schönberger T, Fandrey J, Prost-Fingerle K. Ways into understanding HIF inhibition [J]. *Cancers*, 2021, 13(1): 159.
- [44] Infantino V, Santarsiero A, Convertini P, *et al.* Cancer cell metabolism in hypoxia: Role of HIF-1 as key regulator and therapeutic target [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11): 5703.
- [45] Dong S H, Liang S, Cheng Z Q, *et al.* ROS/PI3K/Akt and Wnt/ β -catenin signalings activate HIF-1 α -induced metabolic reprogramming to impart 5-fluorouracil resistance in colorectal cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 15.
- [46] 郝羚伦, 张艳, 彭梦薇, 等. 六君子汤改善肿瘤环境下 C2C12 成肌细胞分化的分子机制 [J]. *中华中医药学刊*, 2025, 43(1): 122-127.
- [47] 张艳, 桑亚洲, 彭梦薇, 等. 六君子汤调控 STAT3/泛素蛋白酶体途径防治肺癌恶病质小鼠肌肉萎缩的机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(5): 8-15.
- [48] 张俊葵, 赵家彬, 张同兴. 补中益气颗粒联合醋酸甲地孕酮改善晚期癌症患者恶液质临床观察 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2009, 16(6): 77-78.
- [49] Xu B B, Cheng Q Q, So W K W. Review of the effects and safety of traditional Chinese medicine in the treatment of cancer cachexia [J]. *Asia Pac J Oncol Nurs*, 2021, 8(5): 471-486.
- [50] Stitt T N, Drujan D, Clarke B A, *et al.* The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors [J]. *Mol Cell*, 2004, 14(3): 395-403.
- [51] Sandri M, Sandri C, Gilbert A, *et al.* Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy [J]. *Cell*, 2004, 117(3): 399-412.
- [52] Nishimura Y, Chunthorng-Orn J, Lord S, *et al.* Ubiquitin E3 ligase Atrogin-1 protein is regulated via the rapamycin-sensitive mTOR-S6K1 signaling pathway in C2C12 muscle cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2022, 323(1): C215-C225.
- [53] Sartori R, Romanello V, Sandri M. Mechanisms of muscle atrophy and hypertrophy: Implications in health and disease [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 330.

[责任编辑 潘明佳]