

·博硕园地·

基于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路探讨清解扶正颗粒 调控糖酵解抑制大肠癌转移的作用机制

黄 伟^{1,2}, 李 煌³, 贾沛芝^{2,4}, 朱晓勤^{2,4}, 林久茂^{2,4*}

(1. 福建中医药大学附属第三人民医院, 福建 福州 350108;

2. 福建中医药大学中西医结合学院 中西医结合研究院, 福建 福州 350122;

3. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122;

4. 福建省中西医结合老年性疾病重点实验室, 福建 福州 350122)

摘要: 目的 研究清解扶正颗粒(QFG)通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路调控糖酵解抑制大肠癌转移的作用机制。方法 (1)细胞实验:① 常规培养 HCT116 细胞,按照随机数字表法分为 0 mg/mL 组、0.5 mg/mL 组、1.0 mg/mL 组、1.5 mg/mL 组,采用不同浓度 QFG 分别干预 24 h 和 48 h,通过 CCK-8 法检测细胞存活率,qRT-PCR 检测各组细胞 PKM2 mRNA 转录水平,从而筛选出 QFG 最佳干预参数为 1.0 mg/mL、48 h。② 在此基础上,按照随机数字表法分为空白组和 QFG 组,空白组不加任何干预药物,QFG 组予以 1.0 mg/mL 的 QFG 溶液干预 48 h,采用细胞划痕实验检测迁移能力、Transwell 实验检测侵袭能力、生化法检测乳酸含量、流式细胞术联合 2-NBDG 荧光探针检测细胞葡萄糖摄取能力,同时通过 Western blot 检测 PKM2 蛋白相对表达量。③ 构建 PKM2 过表达载体,转染至 HCT116 细胞,分为 0 mg/mL 组、过表达空载(NC)组、PKM2 过表达(PKM2 OE)组,采用 qRT-PCR 和 Western blot 分别检测 PKM2 mRNA 转录水平和蛋白相对表达量,以验证转染结果。④ 将转染成功的细胞分为 NC 组、PKM2 OE 组、NC+QFG 组和 PKM2 OE+QFG 组,通过 CCK-8 法检测细胞存活率、细胞划痕实验检测迁移、Transwell 实验检测侵袭、流式细胞术联合 2-NBDG 荧光探针检测细胞葡萄糖摄取,通过 Western blot 检测 PKM2 蛋白相对表达量。(2)动物实验:采用皮下接种结肠癌细胞 HCT116 构建裸鼠皮下移植瘤模型,7 d 后裸鼠腋下见明显质硬肿瘤生长,即为造模成功。将造模成功的裸鼠按照随机数字表法分为模型组及低、中、高剂量组,每组 6 只,低、中、高剂量组分别按 0.5、1.0、2.0 g/(kg·d)给予 QFG 灌胃,模型组给予生理盐水灌胃,灌胃体积均为 10 mL/kg,每日 1 次,连续干预 15 d。干预结束后对小鼠进行称重,2 d 1 次,持续 15 d,在灌胃第 3、6、9、12、15 天测量瘤体长径,计算瘤体体积。随后取肿瘤组织进行 HE 染色,观察组织病理结构。采用 Western blot 检测 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白(PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、mTOR、HIF1- α 、Myc)表达量,免疫组化检测肿瘤组织糖酵解相关蛋白(PKM2、MCT1、MCT4、GLUT1)表达量。结果 (1)细胞实验:① QFG 可呈时间、剂量依赖性抑制细胞增殖。干预 24 h 时,与 0 mg/mL 组比较,1.0、1.5 mg/mL 组细胞存活率显著下降($P<0.05$),0.5、1.0、1.5 mg/mL 组 PKM2 mRNA 转录水平均上调($P<0.05$);干预 48 h 时,与 0 mg/mL 组比较,1.0、1.5 mg/mL 组细胞存活率与 PKM2 mRNA 转录水平同步降低($P<0.05$),0.5 mg/mL 组 PKM2 mRNA 变化差异无统计学意义($P>0.05$)。综合增殖抑制与 PKM2 转录水平结果,且规避 1.5 mg/mL 高浓度造成的严重细胞损伤,选定 1.0 mg/mL、干预 48 h 作为后续实验条件。② 与空白组比较,QFG 组细胞迁移和侵袭能力降低($P<0.05$),乳酸含量和荧光强度均降低($P<0.05$),PKM2 蛋白相对表达量升高($P<0.05$)。③ PKM2 OE 组 PKM2 mRNA 转录水平和蛋白相对表达量均较 0 mg/mL 组和 NC 组明显升高($P<0.05$),表明细胞转染成功;④ 与 NC 组比较,PKM2 OE 组细胞迁移、侵袭、存活率、荧光强度均升高($P<0.05$),NC+QFG 组上述指标均降低($P<0.05$);与 PKM2 OE 组比较,PKM2 OE+QFG 组上述指标也降低($P<0.05$)。与 NC 组相比,PKM2 OE 组 PKM2 蛋白相对表达量升高($P<0.05$);NC+QFG 组 PKM2 蛋白相对表达量亦高于 NC 组($P<0.05$),但低于 PKM2 OE 组($P<0.05$);与 PKM2 OE 组比较,PKM2 OE+QFG 组 PKM2 蛋白相对表达量变化差异无统计学意义($P>0.05$)。(2)动物实验:与模型组比较,低、中、高剂量组瘤体体积、瘤体重量均降低($P<0.05$);模型组细胞形态和组织结构排列较为规则,低、中、高剂量组细胞形态不规则,组织结构较为紊乱,且有不同程度的核大深染,部分还出现组织出血;与模型组比较,低剂量组 PKM2、p-Akt 蛋白相对表达量均升高($P<0.05$),Akt 蛋白相对表达量降低($P<0.05$),中剂量组 p-PI3K、HIF1- α 蛋白相对表达量均降低($P<0.05$),PKM2 蛋白相对表达量升高($P<0.05$),高剂量组 p-Akt、mTOR、HIF1- α 蛋白相对表达量均降低($P<0.05$);与模型组比较,低、中、高剂量组瘤体中 PKM2 阳性表达均升高($P<0.05$),MCT1、MCT4、GLUT1 阳性表达均降低($P<0.05$)。结论 清解扶正颗粒可通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路以及调控 PKM2 功能状态抑制大肠癌细胞异常糖酵解与侵袭转移。

关键词: 大肠癌;清解扶正颗粒;PKM2;糖酵解;HCT116 细胞

大肠癌(colorectal cancer, CRC)是全球高发的

恶性肿瘤,据统计数据显示,50 岁以下年轻患者确诊大肠癌时更易处于晚期并发生远处转移,该人群远处转移比例明显高于 50 岁及以上老年患者;同时 20~49 岁人群的远处转移发病率自 1998 年以来

收稿日期:2026-05-07;接受日期:2026-06-28

基金项目:福建省自然科学基金项目(2022J01889;2026J001898)

通信作者:林久茂, E-mail: linjiu-mao@fjtc.edu.cn

DOI: 10.13260/j.cnki.fjtc.2026.07007

持续以每年2.7%的速度上升,是导致年轻患者大肠癌病死率逐年攀升的关键因素^[1-2]。清解扶正颗粒(Qingjie Fuzheng Granules, QFG)是辅助治疗大肠癌的中药复方,具有清热解毒、益气健脾的功效,契合大肠癌“邪毒蕴结、正气亏虚”的核心病机,研究显示其可抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路磷酸化,进而抑制大肠癌细胞增殖、凋亡、转移^[3-4]。然而其作用机制研究多集中于细胞凋亡、自噬调控及信号通路激活等方面^[5-6],鲜有研究系统阐述其对肿瘤代谢过程的具体影响,缺乏对肿瘤能量代谢等关键环节的深入探究。因此,本研究以结直肠癌细胞HCT116及裸鼠皮下移植瘤模型为研究对象,体外借助CCK-8法、细胞划痕、Transwell、流式细胞术和Western blot等多项实验,探究QFG的生物学作用并验证PKM2的靶点功能;同时建立BALB/c裸鼠HCT116皮下移植瘤模型,观测QFG对移植瘤生长的干预效果,检测瘤组织中相关通路蛋白表达。从体外细胞与在体动物2个层面综合阐明QFG经PKM2调控PI3K/Akt/mTOR通路、抑制糖酵解以阻碍结直肠癌侵袭转移的分子机制,以期对结直肠癌转移的中医药防治提供实验依据与潜在作用靶点。

1 实验材料

1.1 实验动物及细胞株 SPF级4周龄BALB/c裸鼠,24只,雄性,购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(苏)2023-0009。饲养于江西中洪博元生物技术有限公司SPF级实验室,实验动物使用许可证:SYXK(赣)2020-0001。饲养温度20~26℃,湿度40%~70%,12h光照/黑暗循环交替,小鼠生长繁殖饲料饲养,自由饮水。实验全程均遵循相关动物保护规定实施并通过江西中洪博元生物技术有限公司实验动物伦理委员会批准(审批号:LL202307060003)。人结肠癌HCT116细胞(湖南丰晖生物科技有限公司,货号:XB8396)。

1.2 实验药物 制备清解扶正颗粒溶液,将白花蛇舌草、半枝莲、炙黄芪、炒麦芽分别磨碎后按重量比1:1:1:1称量并混合,加入12倍蒸馏水,加热回流提取2次,每次1.5h,提取液过滤后,合并2次滤液,滤液浓缩至相对密度为1.28g/mL的稠膏,与可溶性淀粉按照1:1.42比例混合,在16目筛上制粒,干燥箱中60℃干燥,在干燥器中放冷后,再以10目筛和80目筛整粒,即得颗粒。

1.3 实验试剂 Leibovitz's L-15完全培养基(武汉普诺赛生命科技有限公司,货号:PM151010);DMEM完全培养基(含10%FBS、1%青-链霉素,货号:KGM12800S)、CCK-8试剂盒(货号:KGA317)均购自南京凯基生物科技发展有限公司;2-NBDG葡

萄糖探针(美国MCE公司,货号:HY-116215);L-乳酸(LA)比色法测试盒(货号:E-BC-K044M)、BCA蛋白定量试剂盒(货号:E-BC-K318-M)均购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;结晶紫(北京索莱宝科技有限公司,货号:G1061);PKM2抑制剂(上海吉玛制药技术有限公司,货号:PKM2-IN-1);Lipofectamine™ 3000转染试剂(含P3000试剂,货号:L3000015)、超敏发光液(货号:RJ239676)均购自美国Thermo Fisher Scientific公司;TRIzol试剂(货号:CW0580S)、RNA超纯提取试剂盒(货号:CW0581M)、RNA逆转录试剂(货号:R223-01)均购自北京康为世纪生物科技有限公司;PKM2抗体(货号:15822-1-AP)、PI3K抗体(货号:60225-1-IG)、Akt抗体(货号:10176-2-AP)、p-Akt抗体(货号:80455-1-RR)、mTOR抗体(货号:66888-1-Ig)、Myc抗体(货号:16286-1-AP)、Rabbit Anti-MCT1抗体(货号:20139-1-AP)、Anti-GLUT1抗体(货号:21829-1-AP)均购自美国Proteintech公司;p-PI3K抗体(美国Affinity Biosciences公司,货号:AF3241);HIF1-α抗体(货号:bs-0737R)、Rabbit Anti-MCT4抗体(货号:bs-2698R)均购自北京博奥森生物技术有限公司;Mouse Anti-β-Actin抗体(北京全式金生物技术有限公司,货号:HC201);HRP conjugated Goat Anti-Mouse IgG(H+L)(货号:GB23301)、HRP conjugated Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)(货号:GB23303)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;苏木素(北京中杉金桥生物技术有限公司,货号:ZLI-9610)。

1.4 实验仪器 CO₂恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司,型号:BPN-80CW);实时荧光定量PCR仪[伯乐生命医学产品(上海)有限公司,型号:CFX Connect™];化学发光成像系统(上海天能科技有限公司,型号:Tanon-5200);流式细胞仪[艾森生物(杭州)有限公司,型号:NovoCyte 2060R];倒置显微镜(日本奥林巴斯株式会社,型号:BX43);高速离心机(德国Eppendorf公司,型号:5424R);酶标仪(上海闪谱生物科技有限公司,型号:SuPer Max3100);酶标仪(北京六一仪器厂,型号:WD-2012B);紫外可见分光光度计(德国NanoPhotometer公司;型号:NP80)。

2 实验方法

2.1 细胞实验

2.1.1 细胞培养及分组 HCT116细胞贴壁先培养于Leibovitz's L-15完全培养基中,置于37℃、5%CO₂、95%饱和湿度的恒温培养箱中进行培养,待细胞贴壁且融合度达到80%~90%时,使用0.25%胰蛋白酶消化,按1:2的比例进行传代,移到含10%FBS、1%青-链霉素DMEM完全培养基中,置于37℃、5%CO₂、95%饱和湿度的恒温培养箱中继续培养,取处

于对数生长期且生长状态良好的 HCT116 细胞制备细胞悬液,按每孔 0.8×10^4 个细胞均匀接种至 96 孔板中,按照随机数字表法将其分为 4 组:0 mg/mL 组、0.5 mg/mL 组、1.0 mg/mL 组、1.5 mg/mL 组,每组设置 6 个平行复孔。

2.1.2 CCK-8 法检测细胞活力 使用含 DMEM 完全培养基溶解配制不同浓度 QFG (0.5、1.0、1.5 mg/mL)。待细胞完全贴壁后,空白组加入含 DMEM 完全培养基 100 μ L,0 mg/mL 组、0.5 mg/mL 组、1.0 mg/mL 组、1.5 mg/mL 组分别加入对应的含药培养基 100 μ L,分别在 24 h 和 48 h 后更换成不含 DMEM 培养基 100 μ L,于避光条件下向每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂,置于培养箱中孵育 2 h,随后使用酶标仪在 450 nm 波长处检测每孔的吸光度(A)。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{QFG组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{0\text{mg/mL组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$$

2.1.3 细胞划痕实验检测细胞迁移能力 取处于对数生长期且生长状态良好的 HCT116 细胞制备细胞悬液,将细胞接种至 6 孔板中,每孔约 1×10^6 个细胞,按随机数字表法将其分为空白组和 QFG 组,待融合度达到 90% 以上后进行划痕,使用 200 μ L 枪头在每孔进行划痕,弃去培养基,用 PBS 清洗,换成无血清培养基后给每孔划痕拍照,记为 0 h;QFG 组予以 1.0 mg/mL 的 QFG 溶液干预 48 h,空白组不加任何干预药物,放入培养箱中,48 h 后给每孔的划痕拍照。通过 ImageJ 测量划痕面积计算各组细胞划痕愈合率。

2.1.4 Transwell 实验检测细胞侵袭能力 取处于对数生长期且生长状态良好的 HCT116 细胞制备细胞悬液,按 5×10^4 个/mL 细胞密度接种于 24 孔板中,待细胞贴壁后,按随机数字表法将其分为空白组和 QFG 组,空白组不加任何干预药物,QFG 组予以 1.0 mg/mL 的 QFG 溶液干预 48 h。吸弃各孔溶液后消化,用无血清培养基重悬细胞,将 0.3 mL 含 5×10^4 个细胞悬液接种于预先基质胶包被(侵袭实验)的 Transwell 小室上室中,下室加入 0.5 mL 含 FBS 的完全培养基,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、95% 饱和湿度的恒温培养箱中培养 48 h 后,取出小室,弃去培养基,将小室拿出用 4% 多聚甲醛固定 20 min,用 0.1% 结晶紫染色 1 h,超纯水漂洗 3 次,用棉签擦去上室未迁移细胞和小室内的多余液体,于倒置显微镜下进行观察并拍照,拍照完成后去除染色液,加入 33% 乙酸处理,在 562 nm 波长下用酶标仪测定各孔吸光度(A)。

$$\text{相对侵袭率} = A_{\text{QFG组}} / A_{\text{空白组}} \times 100\%$$

2.1.5 生化检测细胞乳酸含量 按照 L-乳酸(LA)比色法试剂盒操作说明书检测细胞上清中乳酸的含量,收集细胞上清,1 000 r/min 离心 20 min,按照试剂盒说明书进行生化检测,用酶标仪在 530 nm

处测定各孔吸光度(OD 值),计算各组细胞培养基中乳酸含量。

2.1.6 流式细胞术结合 2-NBDG 荧光探针检测细胞葡萄糖摄取能力 吸弃各孔溶液,加入含 50 $\mu\text{mol/L}$ 2-NBDG 无葡萄糖的 DMEM 培养基 1 mL,孵育 30 min,用温热的 PBS 清洗细胞 3 次,用胰蛋白酶消化 24 孔板内细胞,使细胞脱壁,置于离心机中以 1 500 r/min 离心 5 min,弃上清,加 500 μL PBS 重悬细胞后,置于 NovoCyte™ 流式细胞仪,检测各组细胞的平均 2-NBDG 探针荧光强度,以评估细胞对葡萄糖的摄取能力。

2.1.7 Western blot 检测 PKM2 蛋白相对表达量 收集细胞,弃去培养基,用 RIPA 裂解液提取总蛋白;加入 RIPA 裂解液,提取组织总蛋白,12 000 r/min 高速离心机 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min,取上清液,BCA 蛋白定量试剂盒对总蛋白进行定量。蛋白样品变性后,进行十二烷基硫酸钠凝胶电泳 1.5 h,后用 300 mA 恒流转膜 1 h。PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉封闭后,进行一抗 PKM2 (1:1 000)孵育,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,次日 PVDF 膜室温孵育二抗 2 h,置于超高灵敏度化学发光成像系统中进行显影,目的蛋白灰度值/内参灰度值为目的蛋白相对表达量。

2.1.8 HCT116 细胞转染构建 PKM2 过表达细胞 取对数生长期、状态良好的 HCT116 细胞制备细胞悬液,以 5×10^4 个/mL 的密度接种于 6 孔板,分为 0 mg/mL 组、过表达空载组(NC)、PKM2 过表达(PKM2 OE)组。0 mg/mL 组不做任何处理,其他 2 组待细胞融合度达 70% 时开展转染实验。转染前更换 1 mL 无血清培养基,取 2 支灭菌 EP 管,各加入 125 μL Opti-MEM,一管加入 5 μL lipofectamine™ 3000 试剂,另一管加入 2.5 μg DNA 与 5 μL P3000 试剂,混匀后室温静置 5 min。将两管液体充分混匀,室温孵育 15 min 后滴加至对应细胞孔中,置于孵箱中培养。转染 4 h 后,每孔加入 1 mL 含 20% 血清的完全培养基,继续培养 48 h 后采用 qRT-PCR 和 Western blot 分别检测 PKM2 mRNA 转录水平和蛋白相对表达量,以验证转染结果。

2.1.9 qRT-PCR 检测 PKM2 mRNA 表达 采用 TRI-zon 试剂提取细胞中的总 RNA,采用 RNA 超纯提取试剂盒提取 mRNA,利用紫外可见分光光度计测定 mRNA 的浓度和纯度(A_{260}/A_{280}),通过 RNA 逆转录试剂合成 cDNA,采用荧光 PCR 仪进行荧光定量 PCR。反应步骤如下:预变性 95 $^{\circ}\text{C}$,10 min;变性 95 $^{\circ}\text{C}$,10 s;退火 58 $^{\circ}\text{C}$,30 s;延伸 72 $^{\circ}\text{C}$,30 s;40 个循环。引物序列由通用生物系统(安徽)有限公司提供,见表 1,以 β -actin 作为内参,基因的转录水平采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列(5'→3')	长度/ bp
β-actin	F:TGGCAGCCAGCACAATGAA	19
	R:CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA	25
PKM2	F:GCTTCTGACCCCATCCTCTACC	22
	R:GCGTTATCCAGCGTGATTTTG	21

2.1.10 多实验验证 PKM2 对细胞生物学行为及糖代谢的调控作用 将转染成功的 HCT116 细胞分为空载组(NC)组、PKM2 过表达(PKM2 OE)组、空载+QFG(NC+QFG)组、PKM2 过表达+QFG(PKM2 OE+QFG)组,采用前文所述细胞划痕、Transwell、CCK-8、流式细胞术结合 2-NBDG 荧光探针及 Western blot 实验方法,分别检测各组细胞迁移、侵袭、存活率、葡萄糖摄取及 PKM2 蛋白相对表达量。

2.2 动物实验

2.2.1 裸鼠皮下移植瘤模型构建及分组 取对数生长期 HCT116 细胞,胰酶消化并调节细胞密度至 $1 \times 10^8/\text{mL}$,取 BALB/c 裸鼠 24 只,于其右侧腋下接种 0.1 mL 细胞悬液,即接种细胞数为 2×10^6 个,7 d 后裸鼠腋下见明显质硬肿瘤生长即是造模成功^[7-8]。采用随机数字表法将所有裸鼠分为模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组,每组 6 只。使用生理盐水将 QFG 配制成浓度为 50、100、200 mg/mL 溶液,用于低、中、高剂量组灌胃。低、中、高剂量组分别按 0.5、1.0、2.0 g/(kg·d)给与 QFG 灌胃,模型组按 1.0 g/(kg·d)给予生理盐水灌胃,灌胃体积均为 10 mL/kg,每日 1 次,连续干预 15 d。第 16 天进行取材,取 3 只裸鼠肿瘤组织进行 Western blot 实验,另外 3 只裸鼠肿瘤组织进行免疫组化和 HE 染色实验。

2.2.2 裸鼠体质量及肿瘤体积测量 在干预过程中对裸鼠进行称重,1 次/2 d,持续 15 d;同时在给药第 3、6、9、12、15 天测量瘤体长短径,计算瘤体体积。

2.2.3 Western blot 检测 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白表达量 参见“2.1.7”项下方法检测 PI3K(1:1 000)、p-PI3K(1:1 000)、Akt(1:5 000)、p-Akt(1:8 000)、mTOR(1:5 000)、HIF1-α(1:1 000)、Myc(1:4 000)蛋白相对表达量,具体步骤同前。

2.2.4 免疫组化检测 PKM2、MCT1、MCT4、GLUT1 表达 取裸鼠肿瘤组织切片,烤片、脱蜡、水化后,用柠檬酸缓冲液进行抗原修复。经 5%BSA 抗原封闭后,分别使用 Anti-PKM2、Rabbit Anti-MCT1、Rabbit Anti-MCT4、Anti-GLUT1(稀释比均为 1:200)进

行一抗孵育,4℃过夜后,进行辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗孵育,经 DAB 显色,苏木素复染反蓝,脱水透明后,封片,在显微镜下进行观察。

2.2.5 HE 染色观察肿瘤组织病理结构 取裸鼠肿瘤组织切片,烤片、脱蜡、水化后,用苏木素染液染色 3~5 min,流水冲洗后,用 1% 盐酸乙醇分化,反蓝液反蓝,伊红染色 3~5 min 后,切片脱水,封片,在显微镜下观察。

2.3 统计学方法 应用 Graphpad Prism 9.0 软件进行图形绘制和统计分析。计量资料符合正态分布以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,若方差齐两两比较采用 S-N-K 法,若方差不齐则采用 Games-Howell 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

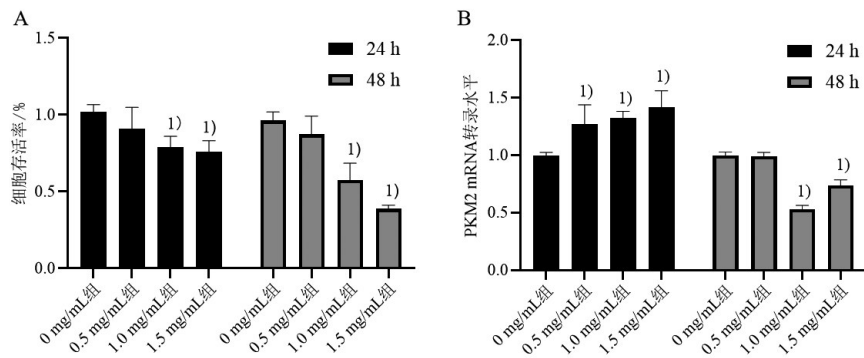
3 结果

3.1 不同浓度 QFG 干预不同时间对细胞存活率和 PKM2 mRNA 转录水平的影响 QFG 干预 24 h 后,与 0 mg/mL 组比较,1.0 mg/mL 组和 1.5 mg/mL 组细胞存活率均降低($P < 0.05$),0.5 mg/mL 组、1.0 mg/mL 组和 1.5 mg/mL 组细胞 PKM2 mRNA 表达均升高($P < 0.05$);QFG 干预 48 h 后,与 0 mg/mL 组比较,1.0 mg/mL 组和 1.5 mg/mL 组细胞存活率均降低($P < 0.05$),1.0 mg/mL 组和 1.5 mg/mL 组细胞 PKM2 mRNA 转录水平均降低($P < 0.05$),0.5 mg/mL 组细胞 PKM2 mRNA 变化差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1。QFG 对细胞增殖的抑制作用呈剂量和时间依赖性,1.0 mg/mL QFG 干预 48 h 时,既能产生的细胞增殖抑制作用($P < 0.05$),又能观察到 PKM2 mRNA 转录水平出现明显下调($P < 0.05$),同时避免了高浓度 QFG(1.5 mg/mL)导致的过度细胞损伤,因此选择 1.0 mg/mL QFG 干预 48 h 作为后续研究的干预措施。

3.2 QFG 对 HCT116 细胞迁移和侵袭能力的影响 与空白组比较,QFG 组细胞迁移能力和侵袭能力均降低($P < 0.05$)。见图 2。

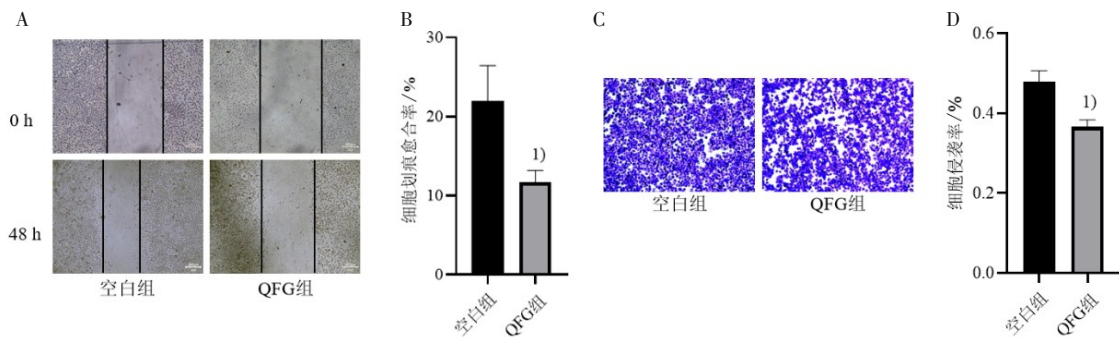
3.3 QFG 对 HCT116 细胞乳酸含量、葡萄糖摄取能力和 PKM2 蛋白相对表达量的影响 与空白组比较,QFG 组细胞乳酸含量和葡萄糖摄取荧光强度均下降($P < 0.05$),PKM2 蛋白相对表达量升高($P < 0.05$)。见图 3。

3.4 HCT116 细胞 PKM2 过表达效率验证 与 0 mg/mL 组比较,PKM2 OE 组 PKM2 mRNA 转录水平、PKM2 蛋白相对表达量均升高($P < 0.05$);与 NC 组比较,PKM2 OE 组 PKM2 mRNA 转录水平、PKM2 蛋白相对表达量均升高($P < 0.05$)。见图 4。



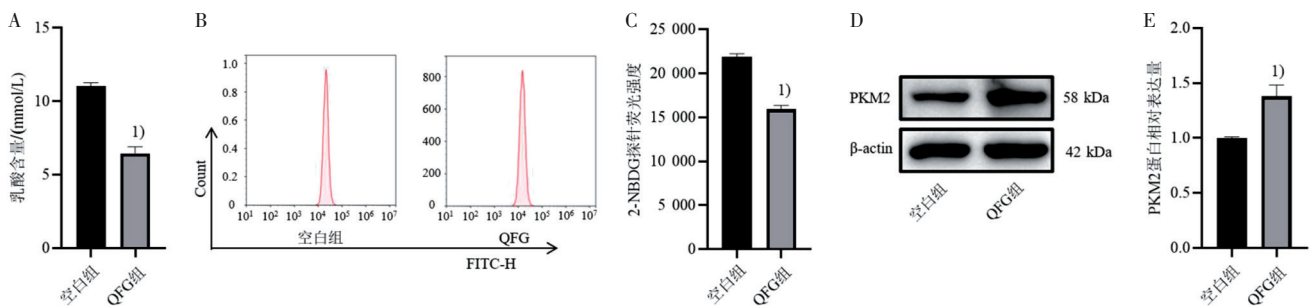
注: A CCK-8 法检测 HCT116 细胞存活率; B qRT-PCR 检测 HCT116 细胞中 PKM2 mRNA 转录水平。与相同干预时间的 0 mg/mL 组比较, 1) $P < 0.05$ 。

图 1 不同浓度 QFG 干预不同时间对细胞存活率和 PKM2-mRNA 转录水平的影响



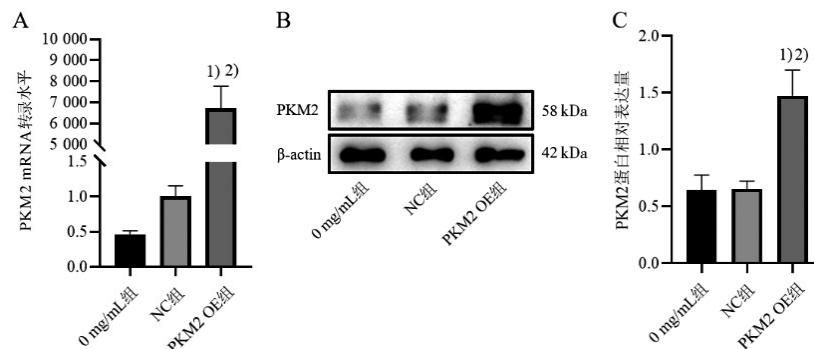
注: A、B 细胞划痕实验检测 HCT116 细胞迁移与定量分析; C、D Transwell 实验检测 HCT116 细胞侵袭与定量分析。与空白组比较, 1) $P < 0.05$ 。

图 2 QFG 对 HCT116 细胞迁移和侵袭能力的影响



注: A L-乳酸(LA)比色法检测乳酸含量; B、C 流式细胞术联合 2-NBDG 荧光探针检测细胞葡萄糖摄取结果与统计分析; D、E Western Blot 检测 HCT116 细胞 PKM2 蛋白相对表达量与统计分析。与空白组比较, 1) $P < 0.05$ 。

图 3 QFG 对 HCT116 细胞乳酸含量、葡萄糖摄取能力和 PKM2 蛋白表达的影响

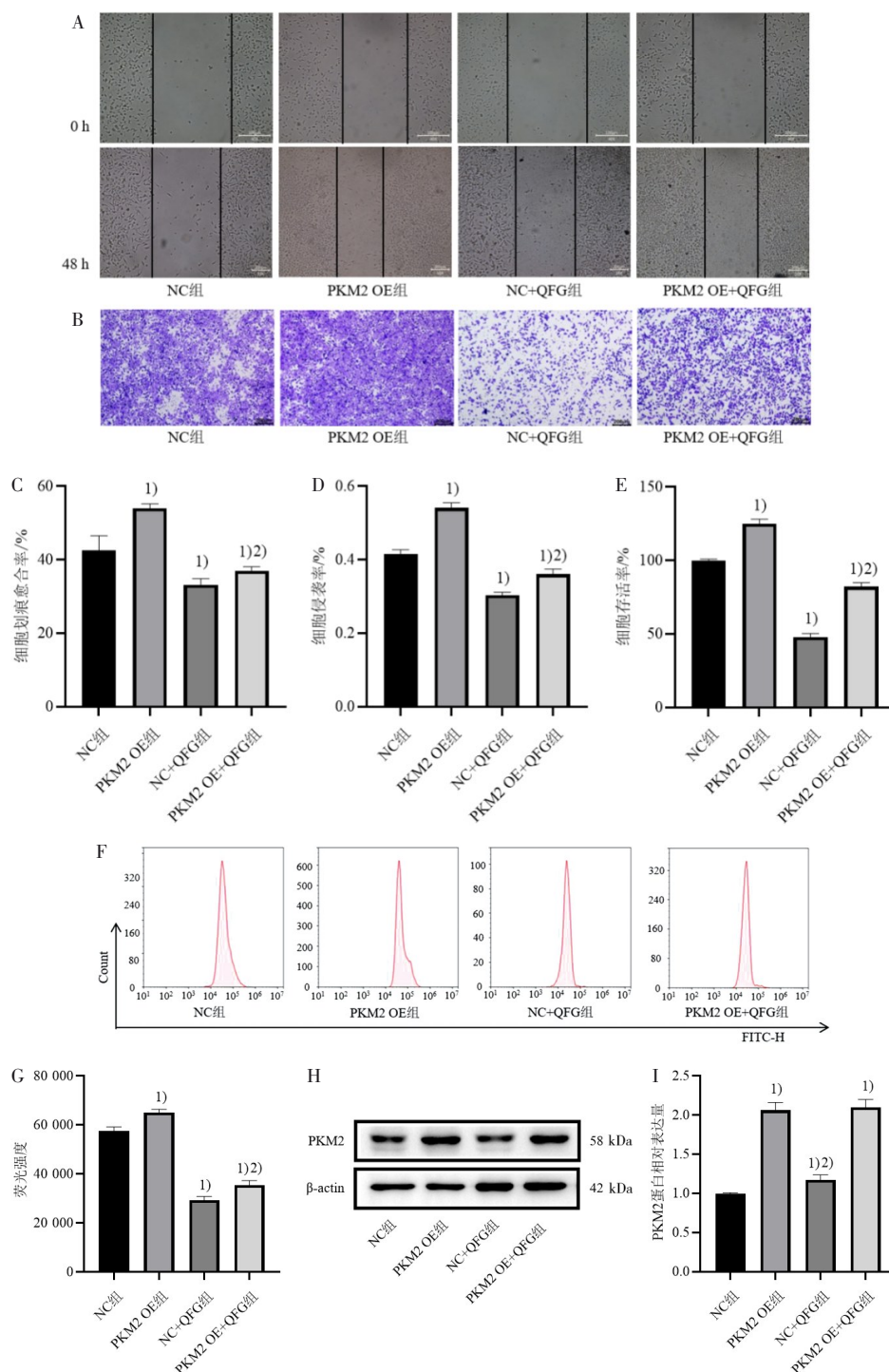


注: A qRT-PCR 检测 HCT116 细胞 PKM2 mRNA 表达; B、C Western blot 检测 HCT116 细胞 PKM2 蛋白印迹图与统计分析。与 0 mg/mL 组比较, 1) $P < 0.05$; 与 NC 组比较, 2) $P < 0.05$ 。

图 4 HCT116 细胞 PKM2 过表达效率验证

3.5 4组细胞迁移、侵袭、存活率、葡萄糖摄取能力和PKM2蛋白相对表达量比较 与NC组比较,PKM2 OE组细胞迁移、侵袭、存活率、荧光强度均升高($P<0.05$),NC+QFG组上述指标均降低($P<0.05$);与PKM2 OE组比较,PKM2 OE+QFG组细胞迁移、侵袭、存活率均降低($P<0.05$);与NC组相比,

PKM2 OE组PKM2蛋白相对表达量升高($P<0.05$);NC+QFG组PKM2蛋白相对表达量亦高于NC组($P<0.05$),但低于PKM2 OE组($P<0.05$);与PKM2 OE组相比,PKM2 OE+QFG组PKM2蛋白相对表达量变化差异无统计学意义($P>0.05$)。见图5。



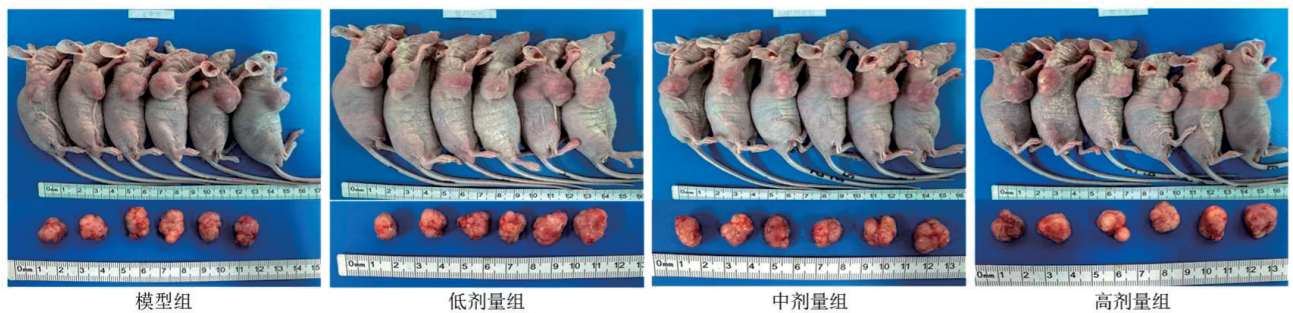
注: A、C 细胞划痕实验检测 HCT116 细胞迁移与定量分析; B、D Transwell 实验检测 HCT116 细胞侵袭与定量分析; E CCK-8 法检测 HCT116 细胞存活率; F、G 流式 2-NBDG 探针检测葡萄糖摄取能力与统计分析; H、I Western blot 检测 HCT116 细胞 PKM2 蛋白印迹图与统计分析。与 NC 组比较, 1) $P<0.05$; 与 PKM2 OE 组比较, 2) $P<0.05$ 。

图5 4组细胞迁移、侵袭、葡萄糖摄取、存活率和PKM2蛋白相对表达量比较

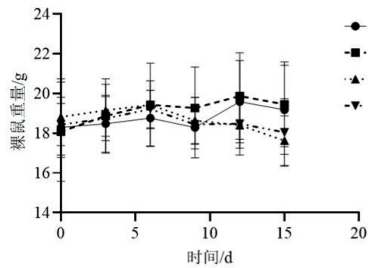
3.6 4组裸鼠移植瘤瘤体生长、组织病理及糖酵解和PI3K/Akt/mTOR通路相关蛋白表达比较 与模型组比较,低、中、高剂量组瘤体体积、瘤体重量均降低($P<0.05$);HE染色结果显示,模型组细胞形态与组织结构排列较为规则,低、中、高剂量组细胞形态不规则,组织结构较为紊乱,且有不同程度的核大深染,部分还出现组织出血;与模型组比较,低剂量组PKM2、p-Akt蛋白相对表达量升高($P<$

0.05),Akt蛋白相对表达量降低($P<0.05$),中剂量组p-PI3K、HIF1- α 蛋白相对表达量降低($P<0.05$),高剂量组p-Akt、mTOR、HIF1- α 蛋白相对表达量均降低($P<0.05$);免疫组化结果显示:与模型组比较,低、中、高剂量组瘤体中PKM2阳性表达均升高($P<0.05$),MCT1、MCT4、GLUT1阳性表达均降低($P<0.05$)。见图6。

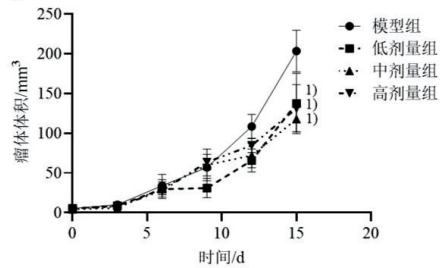
A



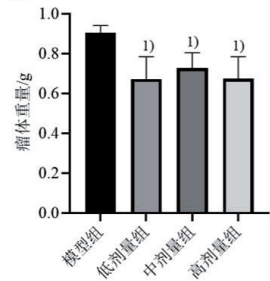
B



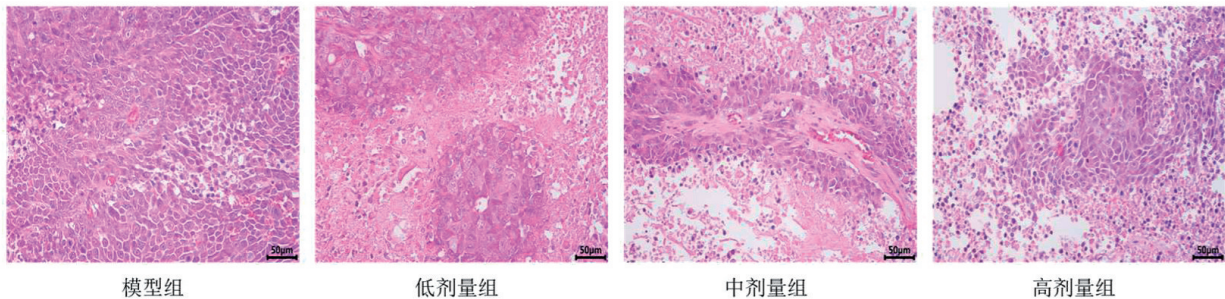
C



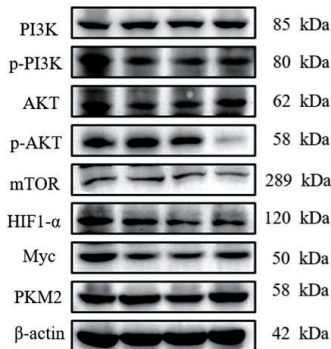
D



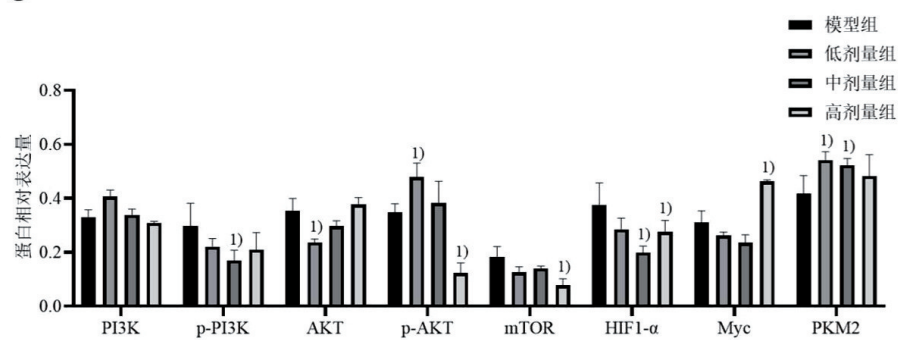
E

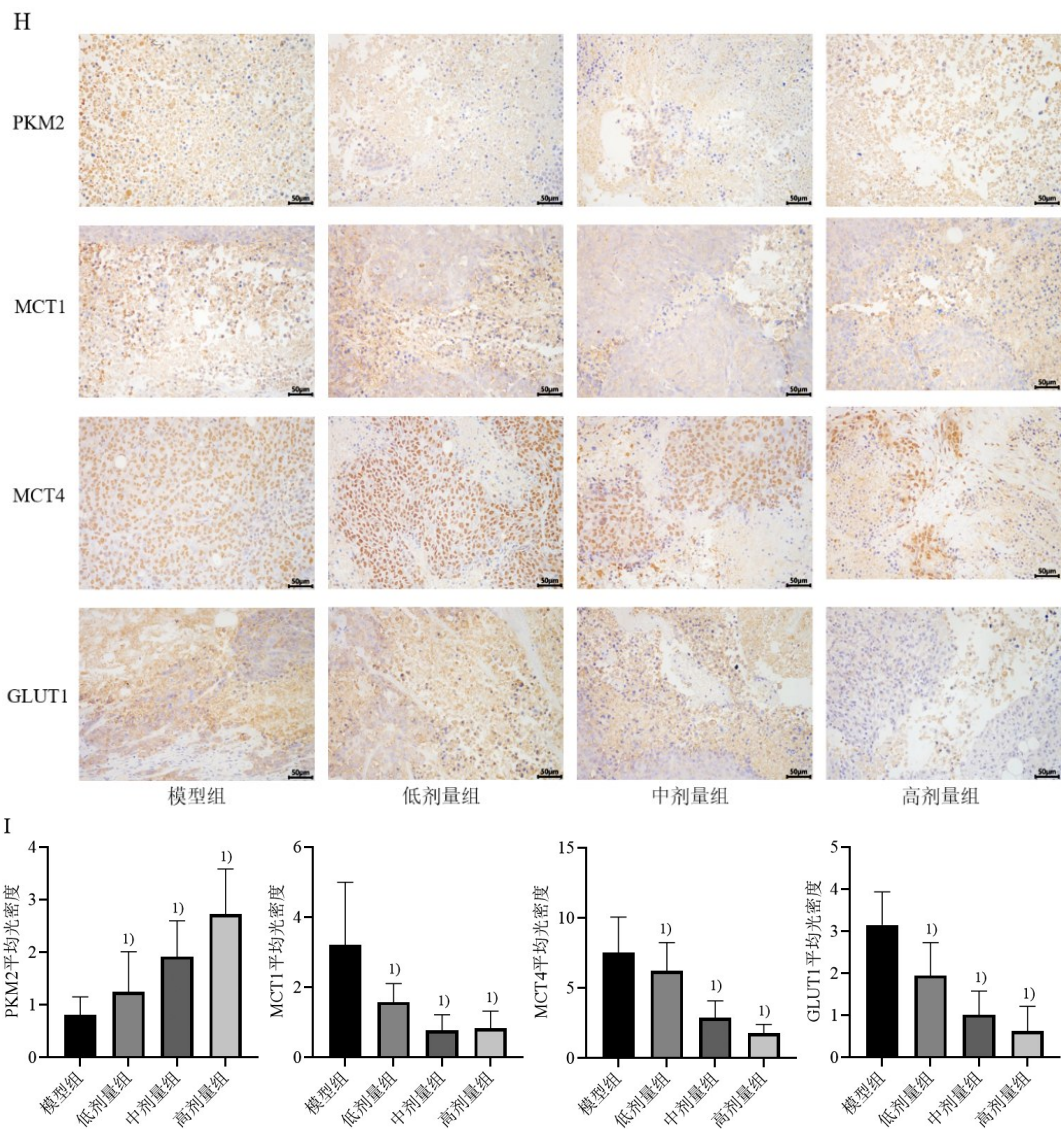


F



G





注: A 裸鼠皮下成瘤及瘤体组织取样、测量; B 裸鼠体质量统计; C 裸鼠瘤体体积统计; D 为裸鼠瘤体质量统计; E HE 染色瘤体病理组织结构观察; F、G Western blot 检测瘤体 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、mTOR、HIF1- α 、Myc、PKM2 蛋白印迹和统计结果; H、I 免疫组化检测瘤体 PKM2、MCT1、MCT4、GLUT1 蛋白表达与统计分析。与模型组比较, 1) $P < 0.05$ 。

图 6 4 组裸鼠移植瘤瘤体生长、组织病理及糖酵解和 PI3K/Akt/mTOR 通路相关蛋白表达比较

4 讨 论

大肠癌的转移是一个多步骤、多分子参与的复杂过程, 有氧糖酵解 (Warburg 效应) 是肿瘤代谢重编程的核心特征^[9]。中医药治疗大肠癌具有多靶点、毒副作用低的作用特点, 可有效控制肿瘤的发生和发展^[10]。QFG 作为临床常用的抗肿瘤中药复方, 由白花蛇舌草、炙黄芪等中药配伍而成, 具有清热解毒、益气健脾的功效, 可兼顾“祛邪”与“扶正”, 多项研究已表明 QFG 可通过调控 PI3K/Akt 信号通路诱导大肠癌细胞凋亡, 抑制大肠癌细胞增殖、迁移和侵袭^[11-12]。

肿瘤微环境是决定大肠癌细胞增殖、侵袭与转移的核心条件, 肿瘤细胞通过 Warburg 效应大量摄取葡萄糖、持续分泌乳酸, 造成微环境酸化、局部缺氧, 进一步诱发炎症浸润与免疫逃逸, 为肿瘤进

展、远处转移创造适宜条件^[13], PKM2 作为有氧糖酵解的核心限速酶, 成为连接肿瘤代谢重编程与微环境稳态的重要分子纽带^[14]。PKM2 存在二聚体、四聚体 2 种功能相反的聚合构象, 二聚体具备促癌活性, 四聚体可逆转肿瘤异常糖酵解^[15]。现有研究普遍认为下调 PKM2 表达可抑制肠癌侵袭转移。但本实验结果显示, QFG 干预后大肠癌细胞 PKM2 总蛋白表达显著升高, 与传统认知存在差异。据此推测, QFG 并非下调 PKM2 表达, 而是促进 PKM2 组装为高活性四聚体, 重塑蛋白功能, 进而抑制肿瘤恶性表型。本实验仅检测 PKM2 总蛋白, 未检测酶活性、构象比例与核定位, 该调控机制仍有待后续验证。

中药药效与服用剂量密切相关, 传统中医理论以“辨证定剂量”为核心原则, 剂量选择需随证候

轻重、病势缓急、患者体质强弱动态调整;经方体系更通过剂量梯度精准调控药力峻缓,同时恪守“中病即止”的用药准则,以药效阈值作为剂量终止的判断依据^[16]。本研究发现,相同干预时长下,QFG的抑癌效果随药物浓度升高逐步增强;各浓度药物干预 24 h 均上调 PKM2 mRNA 转录水平,延长至 48 h 后,中、高浓度则转为下调 PKM2 mRNA 转录水平,体现药效随作用时间发生动态变化。提示临床应用 QFG 治疗大肠癌时,需结合患者病情、体质精准把控给药剂量与疗程。

葡萄糖转运体 GLUT1 是介导细胞葡萄糖摄取的核心分子^[17],乳酸转运体 MCT1、MCT4 则负责将胞内乳酸排出至胞外微环境^[18],PI3K/Akt/mTOR 信号通路激活后可通过 HIF1- α 、Myc 等转录因子,调节 GLUT1、MCT1、MCT4 和 PKM2 表达,驱动大肠癌细胞有氧糖酵解与酸性微环境,促进大肠癌侵袭进展^[19-20]。本研究 HE 染色显示,模型组肿瘤组织结构紊乱、核深染、伴出血,QFG 干预可改善上述病理改变,提示其具有抑瘤作用。同时 QFG 可剂量依赖性抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路活化,下调 PI3K、Akt、mTOR 的磷酸化水平,降低 HIF1- α 、Myc 蛋白表达水平,促进 GLUT1、MCT1、MCT4 和 PKM2 糖酵解相关分子的表达,驱动有氧糖酵解进程,提示 QFG 可通过阻断上游信号通路,逆转糖酵解相关分子的异常表达,削弱肿瘤代谢优势。值得注意的是,低剂量 QFG 干预时,肿瘤组织 p-Akt 出现代偿性升高,但该代偿效应并未激活下游 HIF1- α 、mTOR 等促癌分子,未重启糖酵解级联反应;中、高剂量 QFG 则可彻底抑制 Akt 磷酸化,阻断 PI3K/Akt/mTOR 信号传导,使移植瘤体积、质量下降,体现了药物作用的剂量特征与双向调节特点^[21-22]。

综上所述,QFG 可在体内外抑制大肠癌细胞增殖、迁移、侵袭及糖酵解水平,其作用机制与调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路、上调糖酵解关键酶 PKM2 表达密切相关。

参考文献

- [1] SIEGEL R L, WAGLE N S, STAR J, et al. Colorectal cancer statistics, 2026 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2026, 76(2): e70067.
- [2] YU L, XU W. Global trends in gastric and colorectal cancer, 1990 to 2021: a population-based observational study using GBD 2021 data [J]. *Medicine*, 2026, 105(15): e48276.
- [3] YANG H, LIU J X, SHANG H X, et al. Qingjie Fuzheng granules inhibit colorectal cancer cell growth by the PI3K/AKT and ERK pathways [J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2019, 11(5): 377-392.
- [4] GU F R, CHEN Z X, LIM X, et al. Chinese herbal medicine in ulcerative colitis-associated carcinogenesis treatment: mechanisms, progress, and future directions [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2026, 20: 574142.
- [5] 赵锦燕,彭娇,林明和,等.清解扶正颗粒通过抑制线粒体依赖的凋亡、激活 AMPK-PGC-1 α 通路缓解 5-氟尿嘧啶引起的骨骼肌损伤[J]. *南方医科大学学报*, 2026, 46(1): 94-103.
- [6] 刘洁,彭娇,赵锦燕,等.清解扶正颗粒通过 PI3K/AKT 通路抑制宫颈癌 Caski 细胞移植瘤的生长[J]. *福建中医药*, 2022, 53(4): 36-39.
- [7] 陈果,樊梅,田婷婷,等.蟾灵膏调控 PI3K/Akt/m-TOR 信号通路对结直肠癌裸鼠生存质量的改善作用[J]. *中华中医药杂志*, 2026, 41(3): 776-781.
- [8] 简小兰,何兰,李勇敏,等.健脾消癌方及其拆方对肠癌模型裸鼠体质量、瘤体、转移率及 Caspase-3、Bcl-xL、Bax 蛋白表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(6): 156-160.
- [9] AHUJA S, ZAHEER S. Molecular mediators of metabolic reprogramming in cancer: mechanisms, regulatory networks, and therapeutic strategies [J]. *Immunology*, 2026, 177(1): 1-43.
- [10] ZHANG J, WU Y L, TIAN Y Y, et al. Chinese herbal medicine for the treatment of intestinal cancer: preclinical studies and potential clinical applications [J]. *Mol Cancer*, 2024, 23(1): 217.
- [11] HUANG B, LU Y, GUI M X, et al. Qingjie Fuzheng Granule suppresses lymphangiogenesis in colorectal cancer via the VEGF-C/VEGFR-3 dependent PI3K/Akt pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 137: 111331.
- [12] SUN J X, WEI Y, WANG J, et al. Treatment of colorectal cancer by traditional Chinese medicine: prevention and treatment mechanisms [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1377592.
- [13] BAUTISTA J, LAMAS-MACEIRAS M, HIDALGO-TINOCO C, et al. Gut microbiome-driven colorectal cancer via immune, metabolic, neural, and endocrine axes reprogramming [J]. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 2026, 12: 21.
- [14] CHEN T J, WU C H, HUNG M C, et al. Nuclear PKM2 a signal receiver, a gene programmer, and a metabolic modulator [J]. *J Biomed Sci*, 2025, 32(1): 75.
- [15] CHEN T J, LO C J, WU M J, et al. GSH as an A-A type allosteric activator of PKM2: modulating cancer cell homeostasis and ferroptosis susceptibility [J]. *Adv Sci*, 2026, 13(5): e19368.
- [16] ZHOU R R, ZHENG Y J, AN X D, et al. Corrigendum: dosage modification of traditional Chinese medicine prescriptions: an analysis of two randomized controlled trials [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 844063.
- [17] PALLAVI A, SINHA N, ARUNKUMAR N K, et al. Dynamic GLUT trafficking at high glucose levels enhances insulin secretion: dysregulation leads to decreased insulin secretion during type 2 diabetes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2025, 122(33): e2425955122.
- [18] LIU M, LI W W, JI Y, et al. Lactylation in colorectal cancer: unveiling novel mechanisms in metabolism, progression and therapeutic targeting [J]. *Clin Transl Med*, 2026, 16(2): e70629.
- [19] NICOLINI A, FERRARI P. Involvement of tumor immune microenvironment metabolic reprogramming in colorectal cancer progression, immune escape, and response to immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1353787.
- [20] SONG Y L, ZOU M Y, WU S B, et al. Lactate metabolism and protein lactylation in colorectal cancer: from metabolic reprogramming to epigenetic regulation [J]. *Front Oncol*, 2026, 16: 1741782.
- [21] FENG W Y, KAO T C, JIANG J J, et al. The dynamic equilibrium between the protective and toxic effects of matrine in the development of liver injury: a systematic review and meta-analysis [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1315584.
- [22] FONSECA S S S, S PORT'S N M, AGUIAR G P S, et al. Brosimine B and the biphasic dose-response: insights into hormesis and retinal neuroprotection [J]. *Front Pharmacol*, 2025, 16: 1558726.