·方与药·

灵芝三萜提取物A1诱导结直肠癌细胞死亡的机制研究

封　莲[1],杨玉萍[1],林惠云[1],李　晔[2],吴长辉[2],杜　建[1],曹治云[1*]
(1.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;
2.福建仙芝楼生物科技有限公司,福建 福州 350108)

摘　要： 目的　探讨灵芝三萜提取物A1(简称A1)诱导结直肠癌细胞死亡的作用机制。　方法　采用CCK-8法筛选A1最佳干预浓度,确定62.5、125和250 μg/mL作为后续实验的低、中、高干预浓度。① 将HCT-116细胞分为0、62.5、125、250 μg/mL组,分别加入0、62.5、125、250 μg/mL A1干预48 h,应用荧光探针标记法检测细胞内活性氧(ROS)水平;流式细胞术(Annexin V/PI双染法)检测细胞凋亡情况;Western blot检测凋亡相关蛋白[半胱天冬酶-3(Caspase-3)、Caspase-8及其剪切体]、自噬相关蛋白[P62、微管相关蛋白1轻链3(LC3)]及铁死亡相关蛋白[溶质载体家族7成员11(SLC7A11)、谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)]的蛋白表达量。② 采用两因素交叉分组设计,将A1(0、62.5、125、250 μg/mL)与铁死亡抑制剂Fer-1(0、0.5、1、2 μmol/L)按不同浓度组合进行联合干预48 h,共设16个处理组,进行ATP实验检测发光强度以评估细胞活力。③ 将HCT-116细胞分为对照组、A1组、Fer-1组和A1+Fer-1组,对照组不给予任何干预;A1组加入125 μg/mL A1干预;Fer-1组加入2 μmol/L Fer-1干预;A1+Fer-1组分别加入125 μg/mL A1和2 μmol/L Fer-1干预,集落形成实验观察细胞克隆形成数量。　结果　① 与0 μg/mL组比较,62.5、125、250 μg/mL组ROS平均荧光强度和细胞凋亡率均明显升高($P<0.05$);与62.5 μg/mL组比较,125、250 μg/mL组ROS平均荧光强度和细胞凋亡率均明显升高($P<0.05$);与125 μg/mL组比较,250 μg/mL组ROS平均荧光强度和细胞凋亡率明显升高($P<0.05$)。与0 μg/mL组比较,62.5 μg/mL组P62蛋白相对表达量明显升高($P<0.05$);125 μg/mL组P62蛋白相对表达量明显升高($P<0.05$),SLC7A11蛋白相对表达量明显降低($P<0.05$);250 μg/mL组SLC7A11和GPX4蛋白相对表达量均明显降低($P<0.05$),Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-8、P62蛋白相对表达量和LC3 Ⅰ/LC3 Ⅱ均明显升高($P<0.05$)。与62.5 μg/mL组比较,250 μg/mL组P62蛋白相对表达量明显升高($P<0.05$)。② 在不同浓度Fer-1处理条件下,随着A1浓度升高,HCT-116细胞活力均逐渐下降,以250 μg/mL组下降最为明显。③ 与对照组比较,A1组和A1+Fer-1组克隆球数量明显减少($P<0.05$),Fer-1组差异无统计学意义($P>0.05$);与A1组比较,A1+Fer-1组克隆球数量明显减少($P<0.05$)。　结论　灵芝三萜提取物A1能够通过诱导凋亡、自噬及铁死亡等多种细胞死亡途径,从而协同促进结直肠癌HCT-116细胞死亡。

关键词：结直肠癌;灵芝三萜化合物;细胞凋亡;细胞自噬;铁死亡;HCT-116细胞

结直肠癌(colorectal cancer,CRC)为临床高发的消化道恶性肿瘤,其发病率与病死率分别位列全球恶性肿瘤第3位和第2位,对人类健康构成严重威胁[1]。目前CRC的治疗方式以外科手术切除为主,同时辅以放疗、化疗、靶向治疗和免疫治疗等多种手段,其核心作用机制在于诱导肿瘤细胞死亡[2]。细胞程序性死亡(programmed cell death,PCD)包括细胞凋亡、自噬性细胞死亡、焦亡、铁死亡及铜死亡等多种形式。已有研究发现,多种中药活性成分和中成药如大黄素、灵芝多糖、片仔癀等均可通过PCD途径发挥抗肿瘤效用[3-4]。灵芝在肿瘤治疗中已有广泛应用,既往研究表明灵芝三萜提取物在CRC中有抑制肿瘤生长、增殖、迁移的作用[5-6],但其是否能够诱导肿瘤细胞程序性死亡尚需进一步阐明。灵芝三萜提取物A1(以下简称A1)是以灵芝子实体为原料,进行高压处理、醇提水沉、离心等分离纯化工艺,并经干燥成型等工序制备高含量中性灵芝三萜。因此,本研究以HCT-116细胞系为模型,探讨灵芝三萜提取物A1诱导CRC细胞凋亡、自噬和铁死亡等程序性死亡的作用方式,为灵芝三萜提取物抗肿瘤应用提供理论依据。

1　实验材料

1.1　实验细胞　人结直肠癌细胞HCT-116(目录号:TCHu99)购自中国科学院细胞库。细胞培养液由DMEM高糖培养基、10% FBS、1×青霉素-链霉素配制而成,细胞培养环境为5% CO_2、37 ℃的恒温培养箱,当细胞汇合度达到70%～90%时,给予胰酶消化传代并接种,用于后续实验。

1.2　实验药物　A1购自福建仙芝楼生物科技有限公司。用微量天平称取500 mg A1粉末加入2 mL二甲基亚砜(DMSO),通过电超声(75 Hz,5 min)助溶,后依次经过0.45、0.22 μm微孔滤膜过滤,最终配制成250 mg/mL灵芝三萜提取物A1溶液。

收稿日期:2026-03-09;**接受日期:**2026-04-15
基金项目:福建省高校产学合作项目(2026Y4014);福建中医药大学横向课题(XZL2024001)
通信作者:曹治云,E-mail:caozhiyun@fjtcm.edu.cn
DOI:10.13260/j.cnki.jfjtcm.2026.08012

1.3 实验试剂 DMEM高糖培养基(货号:C11995500BT)、胎牛血清(货号:10099141C)均购自美国Gibco公司;青霉素-链霉素(美国Cytiva公司,货号:SV30010);0.25%含EDTA胰酶(大连美仑生物技术有限公司,货号:MA0233-1);DMSO(美国Sigma-Aldrich公司,货号:D5879);CCK-8试剂(美国Apexbio公司,货号:K1018-100);Annexin V-EGFP/PI细胞凋亡检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司,货号:KGA1101);半胱天冬酶-3(Caspase-3)抗体(货号:19677-1-AP)、半胱天冬酶-8(Caspase-8)抗体(货号:13423-1-AP)、溶质载体家族7成员11(SLC7A11)抗体(货号:66009-1-Ig)、谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)抗体(货号:26864-1-AP)、P62抗体(货号:67763-1-Ig)、微管相关蛋白1轻链3(LC3)抗体(货号:80294-1-RR)、β-actin抗体(货号:14600-1-AP)、GAPDH抗体(货号:60004-1-Ig)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;CellTiter-Lumi™ Ⅱ发光法细胞活力检测试剂盒(货号:C0056S)、活性氧检测试剂盒(货号:S0033S)均购自上海碧云天生物技术有限公司;铁死亡抑制剂Ferrostatin-1(Fer-1)(美国MCE公司,货号:HY-100579);1%结晶紫(北京索莱宝科技有限公司,货号:G1062)。

1.4 实验仪器 细胞计数仪(上海睿钰生物科技有限公司,型号:IC1000);倒置显微镜(德国Leica公司,型号:DMIL LED);流式细胞仪(美国BD公司,型号:FACSCelesta);超高灵敏化学发光成像系统(美国Bio-Rad公司,型号:734BR4832);酶标仪(上海赛默飞世尔仪器有限公司,型号:357-911802)。

2 实验方法

2.1 CCK-8法筛选A1干预浓度 将HCT-116细胞按1×10^4个/孔浓度接种于96孔板中。细胞贴壁12 h后,灵芝三萜提取物A1以4 000 μg/mL为起始浓度,采用2倍连续稀释法配制成14个递减的浓度梯度,以0 μg/mL作为对照。干预48 h后弃去培养基,PBS溶液清洗后每孔加入100 μL新鲜培养基和10 μL CCK-8试剂,37 ℃下孵育1.5～2 h后,在酶标仪上于450 nm波长检测各孔吸光度(A)值,并计算细胞存活率。结果显示,A1处理可显著降低HCT-116细胞活力。根据剂量-反应曲线分析,A1对HCT-116细胞的半数生长抑制浓度(IC_{50})为92.11 μg/mL($R^2=0.979\ 8$)。结合IC_{50}结果,并为进一步评价A1在不同抑制强度下的生物学效应,分别选取低于IC_{50}、接近IC_{50}及高于IC_{50}的62.5、125、250 μg/mL作为后续实验的低、中、高干预浓度。见图1。

$$细胞存活率=\frac{实验组A值-空白组A值}{对照组A值-空白组A值}\times100\%$$

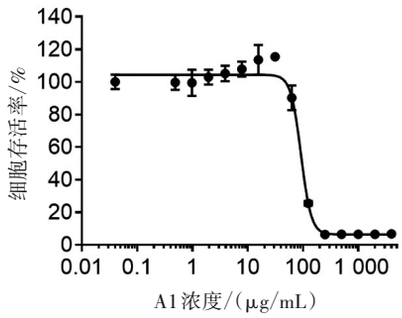


图1 A1抑制HCT-116细胞活力

2.2 DCFH-DA探针检测细胞内活性氧水平 将HCT-116细胞接种于10 cm细胞培养皿中,待细胞贴壁12 h后,分别加入0、62.5、125、250 μg/mL A1干预48 h。使用DCFH-DA作为荧光探针,用无血清培养基按1∶1 000稀释DCFH-DA。用PBS溶液清洗待测细胞,加入稀释好的DCFH-DA溶液,放入37 ℃培养箱中孵育20 min,使探针与细胞充分接触。孵育完毕后吸除DCFH-DA溶液并收集细胞,使用流式细胞仪检测荧光强度变化以反映细胞内活性氧(ROS)水平,数据采用FlowJo软件分析处理。

2.3 Annexin V/PI双染法检测细胞凋亡情况 将HCT-116细胞接种于10 cm细胞培养皿中,待细胞贴壁12 h后,分别加入0、62.5、125、250 μg/mL A1干预48 h。干预结束后用不含EDTA的胰酶消化细胞,PBS溶液清洗2次后计数。进行凋亡实验时,将各浓度干预组细胞以2×10^6个/管分装入流式管中,依次加入5 μL Annexin V-EGFP、5 μL碘化丙啶(PI)混匀,室温避光孵育15 min,应用流式细胞仪检测细胞凋亡情况,数据采用FlowJo软件分析处理。

2.4 Western blot检测凋亡、自噬及铁死亡相关蛋白表达量 将HCT-116细胞接种于6 cm细胞培养皿中,于37 ℃培养箱中培养。待细胞贴壁过夜,分别加入0、62.5、125、250 μg/mL A1干预48 h后提取蛋白,采用BCA法进行测定蛋白质浓度。蛋白经过SDS-PAGE电泳分离后转移至PVDF膜上,牛奶室温封闭2 h,置于Caspase-3、Caspase-8及其剪切体和SLC7A11、GPX4、P62、LC3、β-actin、GAPDH一抗(均1∶1 000)4 ℃下孵育过夜。清洗后置于二抗(1∶2 000)室温下孵育2 h,应用Cytiva多功能成像仪进行显影,数据采用Image Lab软件进行分析整理。

2.5 ATP实验检测细胞活力 HCT-116细胞经胰酶消化后计数,按1×10^4个/孔浓度接种于96孔板中。待细胞贴壁12 h后,采用两因素交叉分组设计,将灵芝三萜提取物A1(0、62.5、125、250 μg/mL)与铁死亡抑制剂Fer-1(0、0.5、1、2 μmol/L)按不同浓度组合进行联合干预,共设16个处理组,每组设

3 个复孔，于 37 ℃培养箱中培养 48 h。干预结束后，每孔按 1∶1 比例加入 PBS 溶液与细胞活力检测试剂，使用酶标仪检测发光强度（Luminescence＝1 000 ms）。

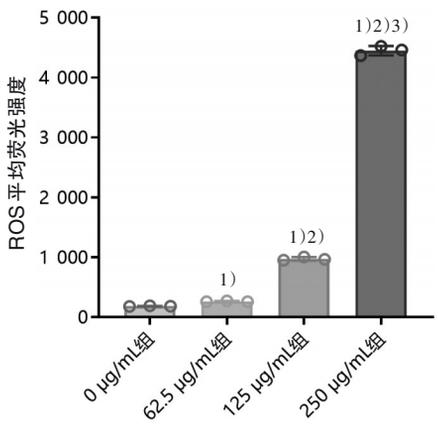
2.6 集落形成实验观察细胞克隆形成数量　HCT-116 细胞经胰酶消化后计数，按 500 个/孔的密度接种于 12 孔板中，并将细胞分为对照组、A1 组、Fer-1 组和 A1＋Fer-1 组。待细胞贴壁 12 h 后，对照组不给予任何干预；A1 组加入 125 μg/mL A1 干预；Fer-1 组加入 2 μmol/L Fer-1 干预；A1＋Fer-1 组分别加入 125 μg/mL A1 和 2 μmol/L Fer-1 干预，置于 37 ℃培养箱中培养。待对照组集落达到 50 个细胞时结束实验。弃去培养基，PBS 溶液清洗，加入中性福尔马林室温固定 15 min，用 0.5% 结晶紫染液染色，15 min 后洗去多余染液，待板晾干后进行拍照与集落计数。

2.7 统计学方法　采用 GraphPad Prism 10.6 软件进行数据分析。计量资料符合正态分布以（$\bar{x}\pm s$）表示，组间比较采用单因素方差分析，若方差齐，两两比较采用 Tukey 多重比较检验；若方差不齐，则采用 Games-Howell 检验。选用非线性回归分析剂量与抑制率，拟合生长抑制曲线，计算半抑制率药物浓度值（IC_{50}）。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3　结　果

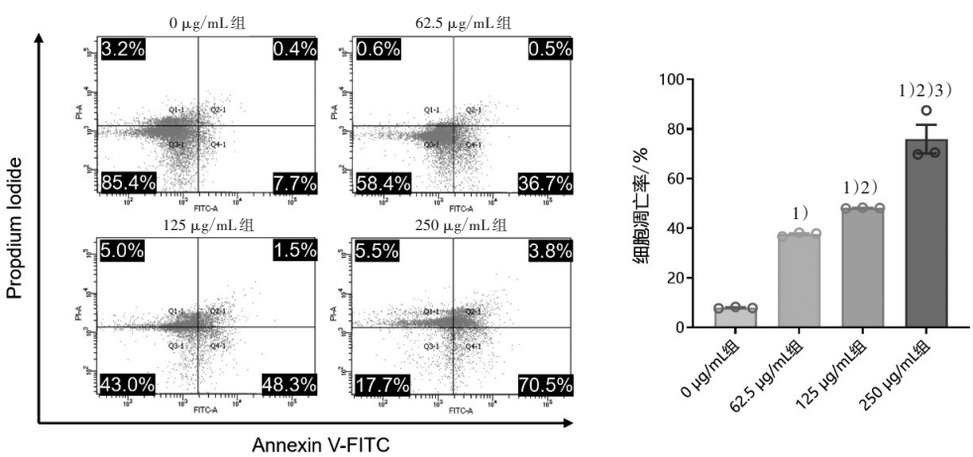
3.1 4 组 ROS 平均荧光强度比较　与 0 μg/mL 组比较，62.5、125、250 μg/mL 组 ROS 平均荧光强度均明显升高（$P<0.05$）；与 62.5 μg/mL 组比较，125、250 μg/mL 组 ROS 平均荧光强度均明显升高（$P<0.05$）；与 125 μg/mL 组比较，250 μg/mL 组 ROS 平均荧光强度明显升高（$P<0.05$）。见图 2。

3.2 4 组细胞凋亡率比较　与 0 μg/mL 组比较，62.5、125、250 μg/mL 组细胞凋亡率均明显升高（$P<0.05$）；与 62.5 μg/mL 组比较，125、250 μg/mL 组细胞凋亡率均明显升高（$P<0.05$）；与 125 μg/mL 组比较，250 μg/mL 组细胞凋亡率明显升高（$P<0.05$）。见图 3。



注：与 0 μg/mL 组比较，1）$P<0.05$；与 62.5 μg/mL 组比较，2）$P<0.05$；与 125 μg/mL 组比较，3）$P<0.05$。

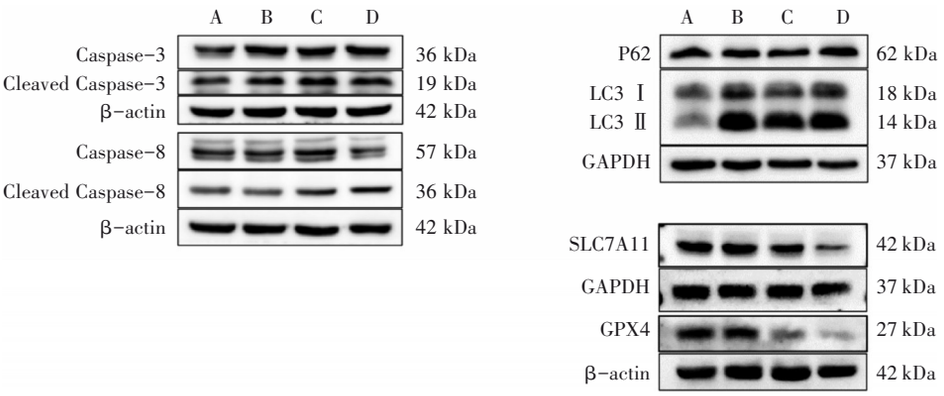
图 2　4 组 ROS 荧光强度比较



注：与 0 μg/mL 组比较，1）$P<0.05$；与 62.5 μg/mL 组比较，2）$P<0.05$；与 125 μg/mL 组比较，3）$P<0.05$。

图 3　4 组细胞凋亡情况比较

3.3 4 组凋亡、自噬及铁死亡相关蛋白表达量比较　与 0 μg/mL 组比较，62.5 μg/mL 组 P62 蛋白相对表达量明显升高（$P<0.05$）；125 μg/mL 组 P62 蛋白相对表达量明显升高（$P<0.05$），SLC7A11 蛋白相对表达量明显降低（$P<0.05$）；250 μg/mL 组 SLC7A11 和 GPX4 蛋白相对表达量均明显降低（$P<0.05$），Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-8、P62 蛋白相对表达量和 LC3 Ⅰ/LC3 Ⅱ均明显升高（$P<0.05$）。与 62.5 μg/mL 组比较，250 μg/mL 组 P62 蛋白相对表达量明显升高（$P<0.05$）。见图 4 和表 1。



注：A 0 μg/mL组；B 62.5 μg/mL组；C 125 μg/mL组；D 250 μg/mL组。

图4 4组细胞凋亡、自噬及铁死亡相关蛋白条带图

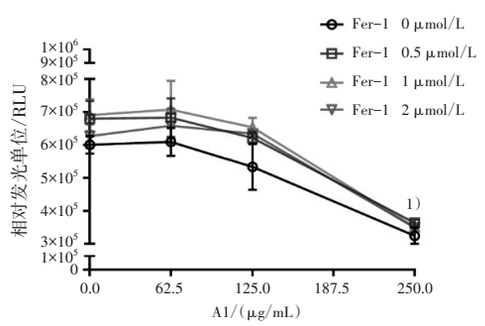
表1 4组细胞凋亡、自噬及铁死亡相关蛋白相对表达量比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	Caspase-3	Cleaved Caspase-3	Caspase-8	Cleaved Caspase-8
0 μg/mL组	3	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
62.5 μg/mL组	3	1.070±0.209	0.913±0.186	1.158±0.281	1.132±0.236
125 μg/mL组	3	1.134±0.422	1.153±0.150	1.198±0.195	1.199±0.171
250 μg/mL组	3	1.154±0.357	1.154±0.074[1)]	0.689±0.380	1.328±0.177[1)]

组别	n	P62	LC3 Ⅰ/LC3 Ⅱ	SLC7A11	GPX4
0 μg/mL组	3	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
62.5 μg/mL组	3	1.154±0.035[1)]	1.512±0.492	0.910±0.136	0.926±0.106
125 μg/mL组	3	1.236±0.069[1)]	1.710±0.602	0.693±0.169[1)]	0.763±0.284
250 μg/mL组	3	1.403±0.126[1)2)]	1.825±0.438[1)]	0.643±0.018[1)]	0.657±0.195[1)]

注：与0 μg/mL组比较，1）$P<0.05$；与62.5 μg/mL组比较，2）$P<0.05$。

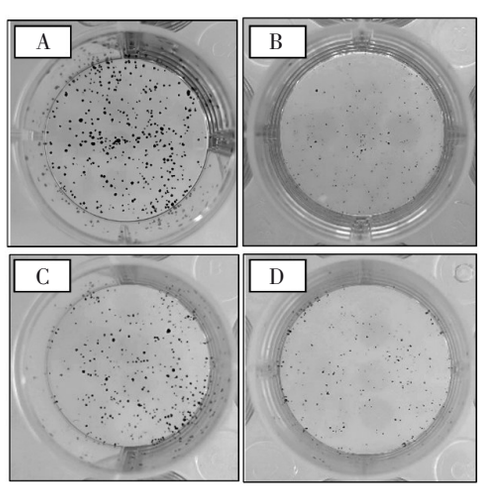
3.4 不同浓度A1对Fer-1抑制后细胞活力的影响 在不同浓度Fer-1处理条件下，随着A1浓度升高，HCT-116细胞活力均逐渐下降。其中，250 μg/mL组下降最为明显。双因素方差分析结果显示，A1浓度对细胞活力具有显著主效应（$P<0.05$），提示A1可显著抑制HCT-116细胞活力；而Fer-1处理主效应未达到统计学显著性水平（$P=0.051\ 2$）。虽然Fer-1干预后细胞活力较A1单独处理组呈一定恢复趋势，但Fer-1与A1之间未观察到显著交互作用（$P=0.986\ 7$）。见图5。



注：与0 μg/mLA1组比较，1）$P<0.05$。

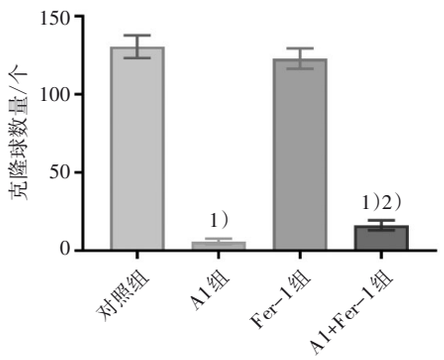
图5 不同浓度A1对Fer-1抑制后细胞活力的影响

3.5 4组细胞集落形成情况比较 与对照组比较，A1组和A1＋Fer-1组克隆球数量明显减少（$P<0.05$），Fer-1组差异无统计学意义（$P=0.246\ 1$）；与A1组比较，A1＋Fer-1组克隆球数量明显减少（$P<0.05$）。见图6和图7。



注：A为对照组；B为A1组；C为Fer-1组；D为A1＋Fer-1组。

图6 4组细胞集落形成图



注：与对照组比较，1）$P<0.05$；与 A1 组比较，2）$P<0.05$。

图 7　4 组克隆球数量比较

4　讨　论

大肠癌的主要病因病机可概括为正气虚损、气滞血瘀、湿热毒聚[7]等。《难经》《伤寒杂病论》关于“肠覃”（腹内肿块）和“下痢赤白脓血”（腹痛、便血）等症状的描述，与现代医学对大肠癌临床表现的认识高度一致，其治则为扶正祛邪，攻补兼施。灵芝作为“补益五脏”之上品中药，其抗肿瘤应用植根于中医“扶正祛邪”的核心理论。现代药理学分析表明，灵芝抗肿瘤的主要功效成分包括灵芝多糖和灵芝三萜。其中，灵芝三萜由以灵芝酸为主的酸性三萜和灵芝醇为主的中性三萜构成。既往研究显示，灵芝三萜可与紫杉醇联合抑制乳腺癌细胞增殖[8]；灵芝酸 A 可诱导肺癌细胞凋亡和自噬，抑制细胞增殖[9]。灵芝三萜提取物的细胞毒效应已被多次报道，但是其对于 CRC 细胞的程序性死亡中的具体作用仍缺乏系统研究。因此，本研究进一步探讨了灵芝三萜提取物 A1 对 CRC 细胞程序性死亡的影响。

ROS 可介导多种肿瘤细胞的死亡方式[10-12]。在正常细胞中大量 ROS 累积会导致细胞基因突变、DNA 损伤等[13-14]，造成细胞恶变；而在肿瘤细胞中，ROS 的累积则可以促进肿瘤细胞死亡[15]。目前，临床上化疗药如三氧化二砷（As_2O_3）、铂复合物、索拉菲尼等，都是通过增强线粒体 ROS 的产生和提高细胞内氧化压力，进而诱导肿瘤细胞死亡[11]。本研究结果显示，灵芝三萜提取物 A1 亦可促进 CRC 细胞内 ROS 的累积，说明其可能作为潜在的抗大肠癌药物。

ROS 能够诱导凋亡、自噬及铁死亡等多种程序性细胞死亡方式，这些途径在信号层面相互独立但存在复杂的交叉调控关系。自噬与细胞凋亡均为维持细胞稳态的重要过程，二者可由共同调控分子如 P53 介导[16]。此外，铁蛋白自噬可促进铁死亡的发生[17-18]，而铁代谢紊乱与脂质过氧化亦可反向增强自噬活性[19-20]。本研究中观察到 A1 处理后 LC3 Ⅰ/LC3 Ⅱ 比值升高、SLC7A11 与 GPX4 表达下调，提示 A1 可能通过激活自噬，增加细胞内铁负荷与脂质过氧化水平，进而诱发“自噬性铁死亡”。值得注意的是，自噬在生理条件下是细胞维持代谢稳态的自我保护机制，而在外界刺激过度时（如营养缺乏或药物应激）则可转化为促死性过程[21-22]，这可能也是 A1 作用的重要机制之一。功能验证实验进一步支持铁死亡在 A1 诱导的细胞死亡中的关键作用。铁死亡抑制剂 Fer-1 能够有效缓解 A1 所致的细胞毒性并部分恢复细胞活力，提示铁死亡在该过程中占据重要地位。然而，由于 A1 可同时激活多种细胞死亡形式，单一通路的抑制并不能完全阻断其细胞毒效应，说明多种死亡机制之间可能存在协同或叠加关系。

综上所诉，灵芝三萜提取物 A1 可促进细胞死亡与凋亡、自噬和铁死亡等多种途径密切相关，其多靶点、协同诱导细胞死亡的作用模式，可能是其发挥抗肿瘤效应的关键机制。但本研究仍存在一定局限性，如细胞株数量有限，且仅代表 CRC 共识分子分型中的 CMS1 型（免疫型），限制结论的外推性；同时本研究中 A1 促进的多种程序性死亡方式的交互机制仍需深入研究。

参考文献

[1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-263.

[2] 国家卫生健康委员会医政司，中华医学会肿瘤学分会. 中国结直肠癌诊疗规范（2023 版）[J]. 消化肿瘤杂志（电子版），2023, 15(3): 177-206.

[3] ZHENG X Y, YANG S M, ZHANG R, et al. Emodin-induced autophagy against cell apoptosis through the PI3K/AKT/mTOR pathway in human hepatocytes [J]. Drug Des Devel Ther, 2019, 13: 3171-3180.

[4] 朱一锋，王声兴，文智，等. 灵芝多糖对前列腺癌细胞增殖和凋亡的影响及作用机制[J]. 中国老年学杂志，2024, 44(12): 2982-2985.

[5] CHEN N H, ZHONG J J. p53 is important for the anti-invasion of ganoderic acid T in human carcinoma cells [J]. Phytomedicine, 2011, 18(8/9): 719-725.

[6] PANDA S K, SAHOO G, SWAIN S S, et al. Anticancer activities of mushrooms: a neglected source for drug discovery [J]. Pharmaceuticals (Basel), 2022, 15(2): 176.

[7] 曾简，李京向，徐书. 徐书教授从窠囊理论辨治大肠癌经验[J]. 河北中医，2025, 47(4): 537-540.

[8] 夏笠. 灵芝三萜组分与紫杉醇联合用药对 HER-2 过表达的乳腺癌细胞增效作用研究[D]. 福州：福建医科大学，2014: 24.

[9] 邓宇新，黄伟，韦思齐，等. 灵芝酸 A 通过调节 AMPK/ULK1/mTOR 通路对肺癌细胞凋亡和自噬的影响[J]. 河北医学，2025, 31(5): 705-710.

[10] PARK E, CHUNG S W. ROS-mediated autophagy increases intracellular iron levels and ferroptosis by ferritin and transferrin receptor regulation [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(11): 822.

（下转第 76 页）