

# 西黄丸通过调控 JNK/p38 MAPK/NF- $\kappa$ B 和铁死亡信号通路增强奥希替尼对结肠癌的杀伤作用

王小杉<sup>1</sup>, 陈雪<sup>2</sup>, 李新宇<sup>2</sup>, 范大明<sup>3</sup>, 崔刚<sup>1</sup>, 薛松<sup>1</sup>, 孙静<sup>1</sup>, 薛颖<sup>2\*</sup>, 宋伟<sup>2\*</sup>

(1. 山东中医药大学第一临床医学院, 山东 济南 250014; 2. 山东第一医科大学附属省立医院肿瘤微创综合治疗科, 山东 济南 250000; 3. 山东省济南市中心医院病理科, 山东 济南 250000)

**摘要:** 目的 利用类器官技术和细胞实验探索西黄丸联合奥希替尼对结直肠癌细胞及类器官的抗肿瘤作用。方法 通过 CCK-8 实验检测不同品牌及不同质量浓度 (0、100、200、300、400  $\mu$ g/mL) 西黄丸提取液对结直肠癌细胞增殖的影响和 IC<sub>50</sub> 值, 同时利用结晶紫染色进行验证。通过 CCK-8 实验探索西黄丸联合奥希替尼对结直肠癌细胞的杀伤力, 并计算出 HSA、Loewe、ZIP 协同作用模型分数及最佳联合用药浓度 (作为后续实验浓度)。结晶紫染色检测最佳联合浓度对细胞活性的影响; Transwell 迁移、侵袭实验检测单用药和联合用药对结直肠癌细胞迁移侵袭的影响; Western blot 法检测铁死亡关键调控因子 (p-Nrf2、FSP1)、NF- $\kappa$ B、p38 MAPK、p-JNK 蛋白表达。建立 6 例患者来源结直肠癌类器官, 通过 HE 染色鉴定类器官与来源肿瘤组织的一致性, 利用 3D 细胞活性试剂盒检测每例类器官用西黄丸和奥希替尼处理后的 IC<sub>50</sub> 值以及联合用药的杀伤力。**结果** 不同品牌及不同质量浓度西黄丸提取液对 HT29、HCT8、DLD-1 肠癌细胞均有不同程度的抑制作用; 协同分数 (HCT8 细胞中 HSA、Loewe、ZIP 模型协同分数分别为 11.50、13.88、5.80; DLD-1 细胞中 HSA、Loewe、ZIP 模型分数分别 24.06、20.64、14.75) 显示, 西黄丸显著增强了奥希替尼对肠癌细胞的杀伤作用, 并确定最佳联合剂量区间 (奥希替尼 2.5~6  $\mu$ mol/L、西黄丸 200~300  $\mu$ g/mL); 联合用药组的结直肠癌细胞活性降低 ( $P<0.01$ ), 迁移侵袭能力降低 ( $P<0.01$ )。在类器官水平上, 联合组结直肠癌类器官的增殖活性降低。与单药比较, 联合用药后联合组铁死亡关键调控因子的蛋白表达降低 ( $P<0.01$ ), p-JNK、p38 MAPK、NF- $\kappa$ B 蛋白表达也降低 ( $P<0.01$ )。**结论** 西黄丸联合奥希替尼对结直肠癌细胞和类器官均较单药有更强的抗肿瘤作用, 且可能与 JNK/p38 MAPK/NF- $\kappa$ B 通路以及 Nrf2、FSP1 铁死亡相关蛋白有关。

**关键词:** 西黄丸; 奥希替尼; 类器官; 结直肠癌; 铁死亡; JNK/p38 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2025)03-0993-10

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.03.046

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是全球第三大常见和第二大致命癌症<sup>[1]</sup>。化疗、靶向和免疫治疗均在结直肠癌治疗中有重大进展, 然而其预后仍旧很差, 5 年生存率仅为 64%~67%<sup>[2]</sup>。耐药性是结直肠癌治疗的主要障碍<sup>[3]</sup>。因此, 迫切需要开发新的临床用药思路。

西黄丸由牛黄、麝香、乳香和没药组成, 具有清热解毒、祛肿止痛的作用<sup>[4]</sup>。研究表明, 西黄丸能抑制肿瘤生长, 对化疗具有减毒增效的作用, 能延长患者生存时间<sup>[5-6]</sup>。奥希替尼是第三代表皮生长因子受体 (EGFR) 酪氨酸激酶抑制剂, 已被批准为 EGFR 激活突变或 T790M 耐药突变的晚期非小细胞肺癌患者的一线治疗<sup>[7]</sup>。EGFR 异常扩增在结直肠癌中起关键作用, 是重要的潜在治疗靶

点<sup>[8]</sup>。有研究发现, 奥希替尼通过诱导细胞凋亡表现出强大的抗结肠癌作用, 还显著增强了结直肠癌细胞对一线药物 5-氟尿嘧啶或奥沙利铂的敏感性<sup>[9]</sup>。类器官是从患者肿瘤样本中培养的一种体外模型, 能够模拟肿瘤微环境和生物学特性<sup>[10]</sup>, 不但与原肿瘤组织高度相似, 还在长期体外培养中遗传稳定, 这使其成为结直肠癌患者药物筛选的优越模型<sup>[11]</sup>。因此, 本研究基于类器官技术探究西黄丸联合奥希替尼治疗结直肠癌是否具有协同抗肿瘤效果, 以期提供新的临床治疗思路, 进一步实现精准医学。

## 1 材料

1.1 细胞 人结直肠癌细胞 HT29、HCT-8、DLD-1 (货号 ZQ0057、ZQ0331、ZQ0325, 均传至 5 代), 购自上海中乔

收稿日期: 2024-07-17

基金项目: 山东省重点研发计划项目 (2022CXGC020501)

作者简介: 王小杉 (1997—), 女, 硕士生, 从事中西医结合防治肿瘤的研究。Tel: 19527447723, E-mail: w1272578928@163.com

\*通信作者: 薛颖 (1993—), 女, 博士, 副研究员, 从事肿瘤防治的研究。Tel: 18321781568, E-mail: 19111210116@fudan.edu.cn

宋伟 (1963—), 男, 博士, 教授, 从事中西医结合防治肿瘤的研究。Tel: 1516888733, E-mail: sdslysw@163.com

新舟生物科技有限公司。

1.2 药物 西黄丸分别购自山东宏济堂制药集团股份有限公司(批号2304005)、津药达仁堂集团股份有限公司乐仁堂制药厂(批号1120129)、浙江天一堂药业有限公司(批号2305018)、九寨沟天然药业股份有限公司(国药准字Z51021028);奥希替尼(美国MCE公司,货号HY-15772)。

1.3 试剂 McCoy's 5A 基础培养基、青霉素-链霉素-两性霉素B混合溶液(上海中乔新舟生物科技有限公司,批号RL2311004、SK3427311);RPMI-1640 基础培养基(美国Gibco公司,批号6123120);胰蛋白酶消化液(美国MCE公司,批号292229);新西兰源胎牛血清(FBS,美国Invigentech公司,批号S42302202);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,批号A311-02);0.1%结晶紫水溶液、DMSO(北京索莱宝科技有限公司,货号G1064、D8371);BCA蛋白浓度测定试剂盒、3D CellTiter-Lumi™ 发光检测试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司,批号060723240229、C0061L);磷酸化核因子E2相关因子2(p-Nrf2)抗体(美国Thermo Fisher Scientific公司,货号PA5-67520);铁死亡抑制蛋白1(FSP1)、核因子κB(NF-κB)、p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)、磷酸化c-Jun氨基末端激酶(p-JNK)抗体(美国CST公司,货号24972S、8242S、8690S、4668S);组织专用消化液、肠癌类器官培养基(上海诺典生物科技有限公司,货号ND-3001-DS、ND-1001-CM);Matrigel Matrix 基质胶(厦门模基生物科技有限公司,批号20231803A);BSA(德国Sigma公司,货号A1933-1G)。

1.4 仪器 37℃恒温CO<sub>2</sub> HERAcCell 150i 细胞培养箱、1300系列II级A2生物安全柜、Multiskan FC 酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);倒置生物显微镜[蔡司科技(苏州)有限公司];PowerPac™ 通用电泳仪电源、Mini-PROTEAN® Tetra 电泳槽(美国Bio-Rad公司);Amersham Imager680 成像仪(美国ProteinSimple公司);SpectraMax Mini 多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司)。

## 2 方法

2.1 药物制备 参照文献[12-13]报道,将西黄丸碎裂,称量,用50%甲醇浸泡24h,超声振荡10h,继续浸泡4h后离心至相对澄清,风干后加入DMSO(质量浓度为0.1g/mL),超声振荡2h,经0.22 μm 无菌微孔膜过滤后分装,于-20℃冰箱保存。奥希替尼根据说明书加入DMSO配成10 mmol/L母液,于-80℃冰箱保存。

2.2 细胞培养 人结肠癌细胞系HT29、HCT8、DLD-1均培养于37℃、5% CO<sub>2</sub>细胞培养孵箱,HT29细胞使用McCoy's 5A培养基,HCT8、DLD-1细胞使用RPMI-1640培养基,所有培养基均加入1%三抗和10% FBS。当细胞占比达80%~90%,即可进行传代培养。

2.3 CCK-8法检测结肠癌细胞生长抑制率 取生长状态好的HT29、HCT8、DLD-1细胞,以每孔 $5 \times 10^3$ 个的密度

接种至96孔板中,孵育24h后,加入不同品牌不同质量浓度西黄丸提取液(天一堂、乐仁堂、九寨沟、宏济堂,0、50、100、200、300、400、500 μg/mL)处理48h,用不同浓度奥希替尼(0.3125、0.625、1.25、2.5、5、10、20 μmol/L)处理HCT8、DLD-1细胞48h,计算不同细胞系用药IC<sub>50</sub>,基于IC<sub>50</sub>设计药物联合浓度矩阵。

取生长状态好的HCT8、DLD-1细胞,以每孔 $5 \times 10^3$ 个的密度接种至新的96孔板中,横排加入0、0.5、1.5、2、2.5、4、6、8、10 μmol/L奥希替尼,竖排加入0、100、200、250、300、400 μg/mL宏济堂西黄丸提取液,设置药物联合浓度矩阵,处理HCT8、DLD-1细胞48h。吸出培养基,每孔加入110 μL配制好的CCK-8工作液,孵育2~4h后通过酶标仪测定450 nm波长处的吸光度值,计算IC<sub>50</sub>值及细胞抑制率,联合浓度矩阵在SynergyFinder(<https://synergyfinder.fimm.fi>)网站<sup>[14]</sup>分析,得出最佳联合浓度区间及联合模型分数。

2.4 结晶紫染色检测细胞增殖活性 参照文献[15]报道,将HCT8、DLD-1细胞以每孔 $2 \times 10^5$ 个的密度接种于12孔板中,次日给予不同品牌西黄丸(0、200、300 μg/mL)以及最佳联合浓度区间药物(奥希替尼2.5~8 μmol/L、西黄丸200~300 μg/mL)培养48h后弃培养基,用甲醇固定15 min,结晶紫染色15 min,流动水轻柔冲洗后拍照观察。

2.5 Transwell 实验检测细胞侵袭能力 提前将Matrigel胶置于4℃下融化,使用无血清的基础培养基将其按1:8比例进行稀释,每个小室加入100 μL稀释好的胶,37℃放置30 min。实验分为对照组、西黄丸200 μg/mL组、奥希替尼4 μmol/L组及联合组,取200 μL含药无血清细胞悬液加入小室,每孔细胞量控制在 $5 \times 10^4$ 个,在下室分别加500 μL完全培养基,放置于培养箱孵育24h。次日,弃小室培养基,用棉棒轻轻拭去上室的细胞和残留胶,于下室中加入600 μL多聚甲醛,固定15 min后,加入500 μL 0.1%结晶紫染色15 min。PBS轻柔洗涤小室2~3次,放置风干后,于显微镜下观察、拍照。

2.6 Western blot 法检测p-Nrf2、FSP1、p-JNK、p38、NF-κB蛋白表达 取6孔板,每孔接种 $1 \times 10^5$ 个细胞,置于细胞培养箱中孵育24h。实验分为对照组、奥希替尼2、4 μmol/L组、西黄丸100、200、300 μg/mL组、联合组,于细胞培养箱中培养48h。收集各组细胞于离心管中,加入适量裂解液冰上裂解30 min,每隔5 min振荡5 s,4℃离心20 min后取上清,BCA法检测细胞蛋白浓度后,95℃金属浴加热5 min使蛋白变性,配胶、蛋白上样、电泳、转膜后封闭,一抗孵育过夜,二抗孵育1h,通过Amersham Imager 680 成像仪显影。

2.7 肠癌类器官培养 患者来自于山东省立医院,所有实验已通过伦理委员会批准(伦理审批编号SWYX:NO.2023-273)。纳入经病理学确诊的结肠癌恶性肿瘤患者,无主要器官的功能障碍,心、肝、肾功能基本正常。取病人手术样本,放入组织保存液,标本离体后4h内送实验

室检测。用含1%三抗的PBS冰上清洗5次，在生物安全柜中使用无菌刀片将组织切碎，加入10 mL组织消化液37℃水浴40 min左右，取1滴于显微镜下观察消化情况后，加入25 mL含1% BSA的PBS终止消化，100目滤网过滤，1 000×g离心5 min。加入适量红细胞裂解液，静置5 min后加入5倍1% BSA PBS终止裂解，1 000×g离心5 min，弃上清。提前1 d将基质胶拿出来放冰中融化，在冰上用基质胶混悬细胞，接种于24孔板，每孔45 μL，放置于培养箱中30 min，凝固后加入1 mL肠癌培养基，再加入1% Y27632。每3 d进行换液，必要时传代。

**2.8 HE染色验证肠癌类器官与组织的一致性** 移除培养基，每孔加入500~700 μL 10%中性福尔马林，固定过夜。双蒸水漂洗3次，于1 mL 75%、85%、95%乙醇中分别脱水10 min，用细胞刮板轻轻取出基质胶，将胶朝下放置在单层卷纸上，用铅笔画圈定位，折叠后放入标记好的包埋盒。常规石蜡包埋、脱水、切片、HE染色、图像扫描，与类器官来源组织的HE染色图像进行对比。

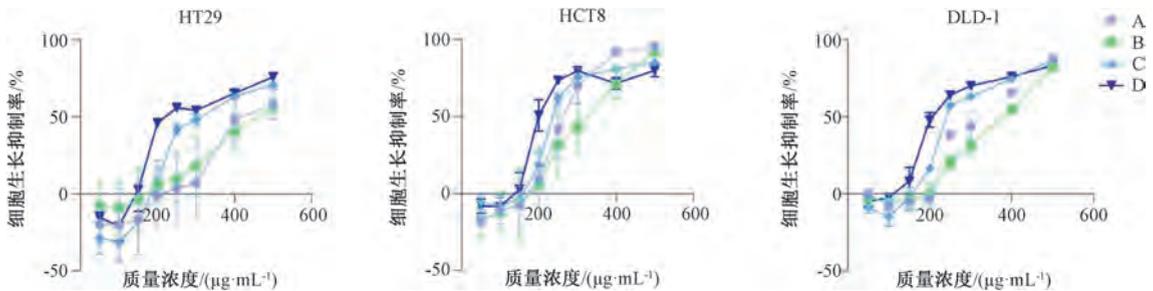
**2.9 肠癌类器官药敏实验** 弃去24孔板中的培养基，每孔加入1 mL冰的含1% BSA的PBS，将Matrigel基质胶吹散，转移到15 mL离心管中，4℃、1 000×g离心5 min。弃上清，加入1 mL TripleE，吹匀后37℃水浴加热10 min；加入5 mL PBS终止消化，4℃、1 000×g离心5 min；用

Matrigel胶于冰上重悬，1.5 μL镜下调整类器官密度，按照每孔1.5 μL接种于黑色框96孔板（孔壁不透明），每孔加100 μL培养基，待类器官长至合适大小后加药。分为对照组、单药组（0、100、200、250、300、400 μg/mL西黄丸提取液，0、1.25、2.5、5 μmol/L奥希替尼）、联合组，分别加药处理24 h，拍照后，使用CellTiter-Lumi™发光检测试剂盒进行类器官活力检测，在SpectraMax Mini多功能酶标仪读数，计算类器官活性抑制率。

**2.10 统计学分析** 通过GraphPad Prism 9.0软件进行处理，计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示，多组间比较采用单因素方差分析。所有实验均进行3次及以上独立实验避免误差。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 不同品牌及质量浓度西黄丸提取液对HT29、HCT8、DLD-1肠癌细胞增殖的影响** 4种品牌西黄丸提取液干预HT29、HCT8、DLD-1肠癌细胞48 h，3种细胞活性均被抑制且呈浓度依赖性 ( $P < 0.01$ )，见图1。分别计算HT29、HCT8、DLD-1细胞在4种品牌西黄丸提取液中的 $IC_{50}$ 值，见表1。结晶紫染色实验显示，与0 μg/mL组比较，4种品牌西黄丸各质量浓度提取液处理过的HCT8、DLD-1细胞染色面积均有不同程度减少，见图2、表2~3。后续实验选择 $IC_{50}$ 值较低的宏济堂西黄丸提取液。



注：A为天一堂西黄丸，B为乐仁堂西黄丸，C为九寨沟西黄丸，D为宏济堂西黄丸。

图1 不同品牌及质量浓度西黄丸提取液对HT29、HCT8、DLD-1肠癌细胞生长抑制率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

表1 不同品牌西黄丸提取液对HT29、HCT8、DLD-1肠癌细胞的 $IC_{50}$ 值

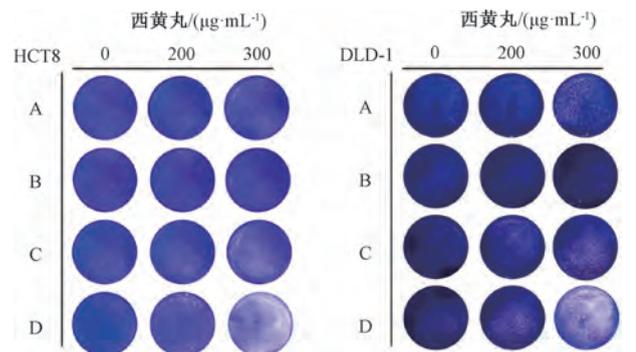
组别	天一堂	乐仁堂	九寨沟	宏济堂
DLD-1	322.6	367.4	267.3	231.5
HCT8	266.4	317.9	246.4	218.3
HT29	441.9	455.3	300.4	274.7

表2 不同品牌西黄丸提取液对HCT8细胞48 h存活率影响 (%， $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	天一堂	乐仁堂	九寨沟	宏济堂
0 μg/mL	75.00±2.24	75.62±2.36	71.41±3.32	73.9±4.98
200 μg/mL	67.86±6.87	71.31±7.45	64.56±4.12	41.85±6.37**
300 μg/mL	62.95±4.35	73.76±7.21	51.51±6.01***	25.75±3.77***

注：与0 μg/mL组比较，\*\* $P < 0.01$ ；与200 μg/mL组比较，\*\*\* $P < 0.01$ 。

**3.2 西黄丸联合奥希替尼对HCT8、DLD-1肠癌细胞抑制率的影响及药物协同作用评分** 药物干预HCT8、DLD-1肠癌细胞48 h后，与对照组比较，西黄丸组（0、50、100、



注：A为天一堂西黄丸，B为乐仁堂西黄丸，C为九寨沟西黄丸，D为宏济堂西黄丸。

图2 不同品牌西黄丸提取液对HCT8、DLD-1肠癌细胞活性的影响（结晶紫染色）

200、300、400、500 μg/mL)和奥希替尼组（0.312 5、0.625、1.25、2.5、5、10、20 μmol/L)细胞抑制率均升高且呈浓度依赖性 ( $P < 0.01$ )。西黄丸在HCT8、DLD-1中的

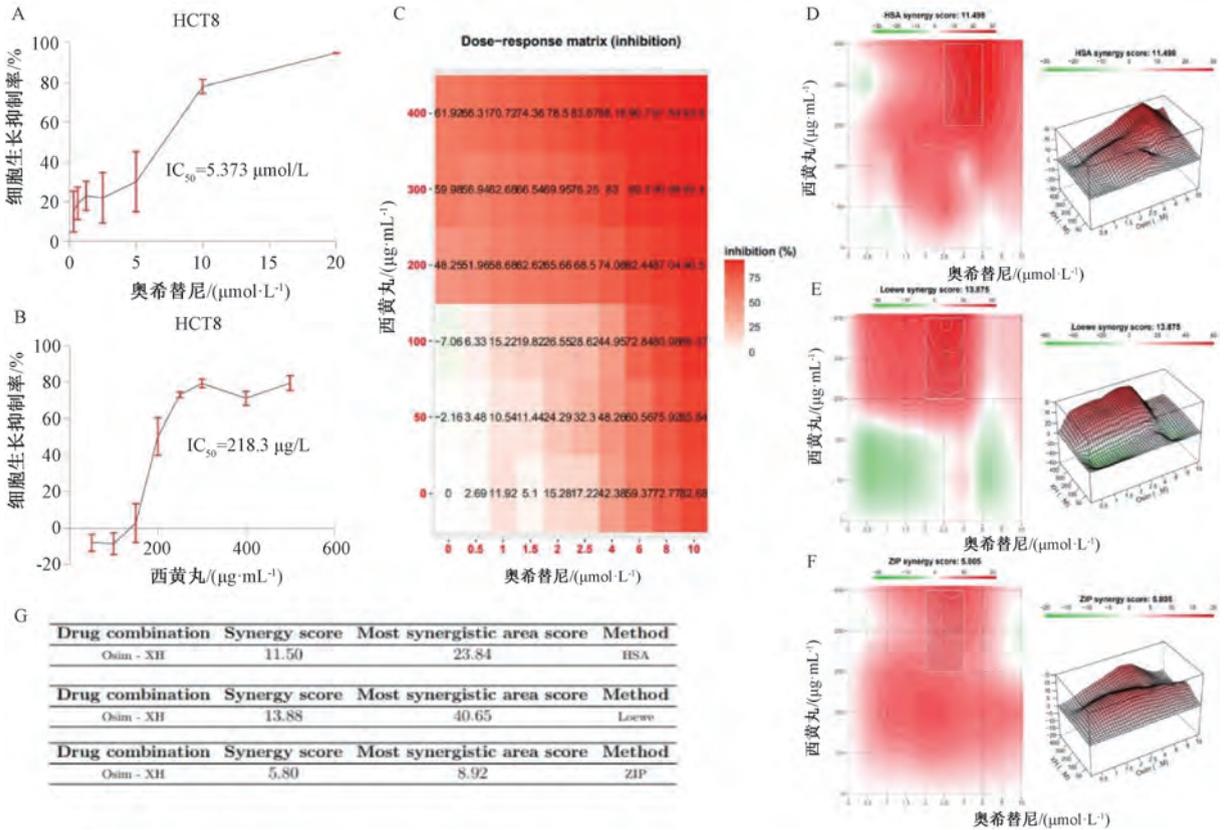
**表 3 不同品牌西黄丸提取液对 DLD-1 细胞 48 h 存活率影响 (% ,  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )**

组别	天一堂	乐仁堂	九寨沟	宏济堂
0 $\mu\text{g/mL}$	78.89 $\pm$ 2.41	77.69 $\pm$ 0.67	79.88 $\pm$ 3.41	76.62 $\pm$ 1.97
200 $\mu\text{g/mL}$	75.36 $\pm$ 2.02	77.41 $\pm$ 1.01	68.7 $\pm$ 1.81**	59.86 $\pm$ 1.86**
300 $\mu\text{g/mL}$	63.19 $\pm$ 3.48*** <sup>##</sup>	75.55 $\pm$ 1.28	60.09 $\pm$ 3.3*** <sup>##</sup>	36.67 $\pm$ 4.1*** <sup>##</sup>

注:与 0  $\mu\text{g/mL}$  组比较,\*\* $P<0.01$ ;与 200  $\mu\text{g/mL}$  组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$ 。

IC<sub>50</sub>值分别为 218.3、231.5  $\mu\text{g/mL}$ ,奥希替尼在 HCT8、

DLD-1 中的 IC<sub>50</sub>值分别为 5.373、6.941  $\mu\text{mol/L}$ 。西黄丸联合奥希替尼浓度矩阵干预 HCT8、DLD-1 肠癌细胞 48 h 后,抑制率随着联合药物浓度升高而升高,且白色方框标记范围属于最佳联合浓度,后续实验浓度在其中选择。HCT8 药物联合协同作用 HSA、Loewe、ZIP 模型分数分别为 11.50、13.88、5.80,DLD-1 药物联合协同作用 HSA、Loewe、ZIP 模型分数分别 24.06、20.64、14.75,所有大于 0 的得分都是协同作用,且表现出高度协同作用的药物组合是临床研究的有吸引力的候选者<sup>[16]</sup>,见图 3~4。



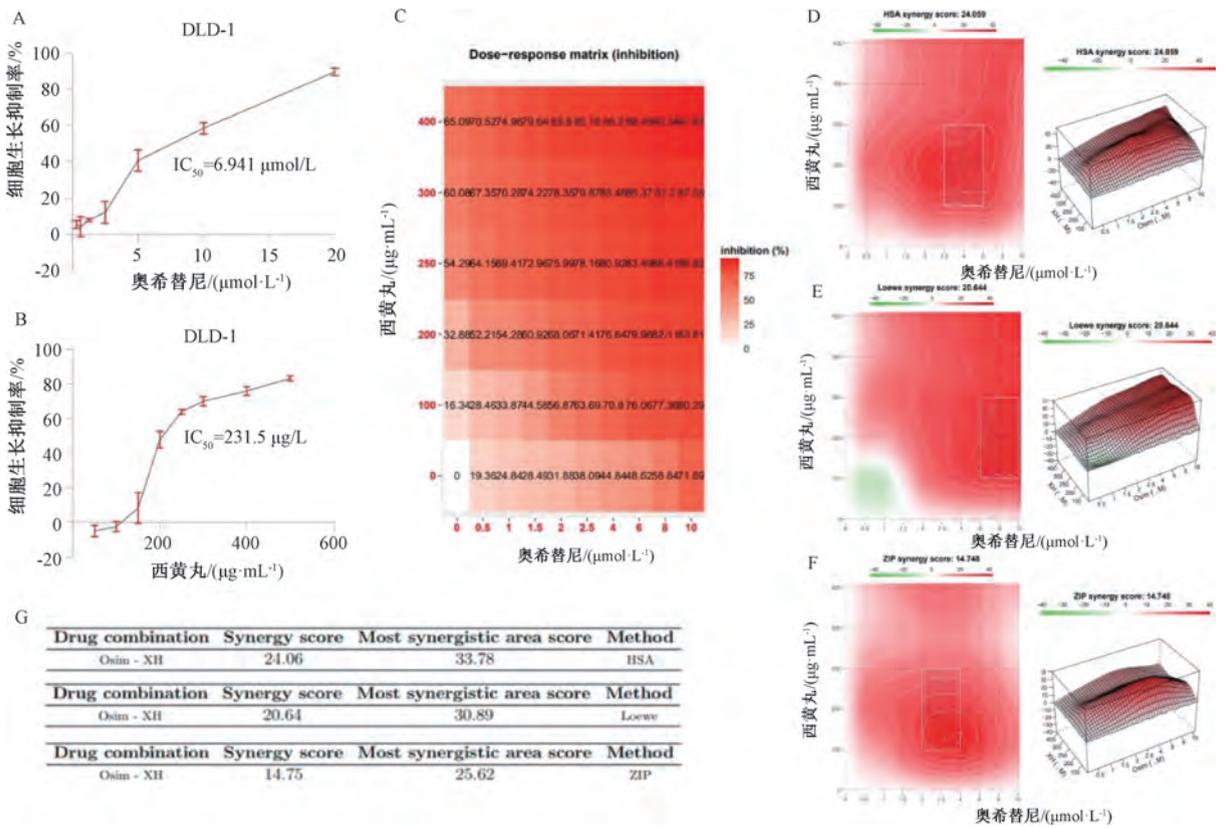
注: A~B 分别为奥希替尼、西黄丸干预 HCT8 细胞 48 h 后的 IC<sub>50</sub> 及生长抑制率图, C 为西黄丸联合奥希替尼干预 HCT8 细胞 48 h 后的生长抑制率矩阵图, D~F 分别为西黄丸联合奥希替尼干预 HCT8 细胞 48 h 后的 HSA、Loewe、ZIP 协同作用模型矩阵图, G 为西黄丸联合奥希替尼干预 HCT8 细胞 48 h 后的 HSA、Loewe、ZIP 协同模型分数。

**图 3 西黄丸联合奥希替尼在 HCT8 细胞中的药物协同作用 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )**

**3.3 西黄丸联合奥希替尼对 HCT8、DLD-1 肠癌细胞活性和增殖的影响** 根据联合协同作用 HSA、Loewe、ZIP 模型选定药物联合浓度为西黄丸提取液 200、300  $\mu\text{g/mL}$ ,奥希替尼 2.5、4、6  $\mu\text{mol/L}$ 。与空白组比较,联合药物浓度越高,HCT8、DLD-1 细胞的结晶紫染色数量面积越小,很大程度上抑制了肠癌细胞的活性和增殖能力,且联合用药部分优于单药组 ( $P<0.01$ ),见图 5、表 4。

**3.4 西黄丸联合奥希替尼对 HCT8、DLD-1 肠癌细胞侵袭的影响** 与对照组比较,西黄丸 200  $\mu\text{g/mL}$  和奥希替尼 4  $\mu\text{mol/L}$  组细胞数量均有下降 ( $P<0.01$ ),值得注意的是联合用药组对抑制肠癌细胞的迁移侵袭能力更强 ( $P<0.01$ ),见图 6、表 5。

**3.5 西黄丸联合奥希替尼对 HCT8 肠癌细胞铁死亡相关蛋白表达和 NK/p38 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路的影响** 与空白组比较,西黄丸组 (100、200、300  $\mu\text{g/mL}$ )、奥希替尼组 (2、4  $\mu\text{mol/L}$ ) 和联合组 (200  $\mu\text{g/mL}$ +4  $\mu\text{mol/L}$ ) HCT8 肠癌细胞中抵抗铁死亡关键调控蛋白 p-Nrf2 蛋白表达降低 ( $P<0.01$ ),且具有浓度依赖性,说明西黄丸在肠癌细胞中可能诱导铁死亡。与奥希替尼组比较,联合组 p-Nrf2、FSP1 蛋白表达均降低 ( $P<0.01$ ),说明西黄丸联合奥希替尼可能诱导肠癌细胞铁死亡。已有研究表明 JNK/p38 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路与肠癌抗肿瘤机制相关<sup>[17]</sup>,抑制 JNK/p38 MAPK/NF- $\kappa$ B 等信号通路有抑制结直肠癌细胞增殖和诱导凋亡的作用<sup>[18]</sup>。与空白组比较,奥西替尼



注：A~B分别为奥希替尼、西黄丸干预DLD-1细胞48h后的IC<sub>50</sub>及生长抑制率图，C为西黄丸联合奥希替尼干预DLD-1细胞48h后的生长抑制率矩阵图，D~F分别为西黄丸联合奥希替尼干预DLD-1细胞48h后的HSA、Loewe、ZIP协同作用模型矩阵图，G为西黄丸联合奥希替尼干预DLD-1细胞48h后的HSA、Loewe、ZIP协同模型分数。

图4 西黄丸联合奥希替尼在DLD-1细胞中的药物协同作用 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

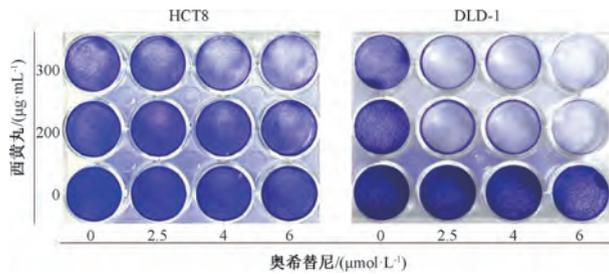


图5 西黄丸联合奥希替尼对HCT8、DLD-1肠癌细胞克隆形成的影响(结晶紫染色)

表4 西黄丸联合奥希替尼对HCT8、DLD-1肠癌细胞活性的影响(%,  $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	HCT8	DLD-1
空白组	92.35±2.92	90.31±3.16
2.5 μmol/L 奥希替尼	87.79±2.40	82.74±4.92**
4 μmol/L 奥希替尼	70.81±1.99**	71.79±3.36**##
6 μmol/L 奥希替尼	50.12±3.85**	55.76±4.61**
200 μg/mL 西黄丸	55.84±3.43**	57.24±3.21**
300 μg/mL 西黄丸	35.15±2.75**	37.99±2.14**
200 μg/mL 西黄丸+2.5 μmol/L 奥希替尼	51.51±2.00**	19.48±1.67**
200 μg/mL 西黄丸+4 μmol/L 奥希替尼	48.64±3.13**	15.17±1.78**
200 μg/mL 西黄丸+6 μmol/L 奥希替尼	46.03±3.16**	7.59±1.97**
300 μg/mL 西黄丸+2.5 μmol/L 奥希替尼	33.83±3.75**	14.20±1.38**
300 μg/mL 西黄丸+4 μmol/L 奥希替尼	25.71±2.96**	13.27±2.08**
300 μg/mL 西黄丸+6 μmol/L 奥希替尼	13.77±1.23**	4.23±3.53**

注：与空白组比较，\*\* $P < 0.01$ ；与2.5 μmol/L奥希替尼组比较，## $P < 0.01$ 。

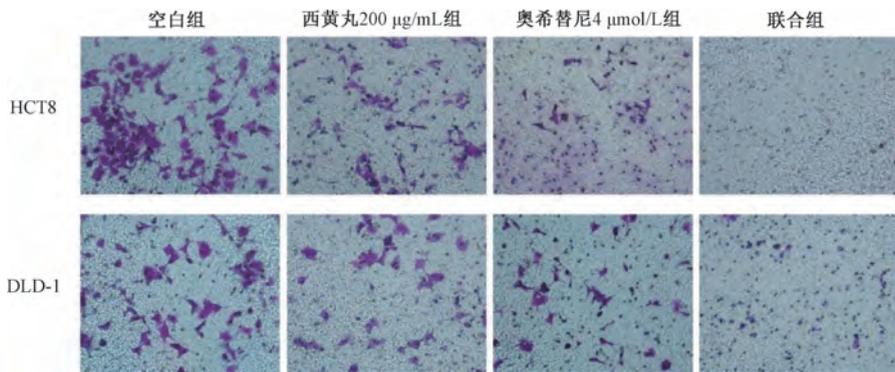


图6 西黄丸、奥希替尼和联合用药对 HCT8、DLD-1 细胞侵袭的影响 (结晶紫染色, ×200)

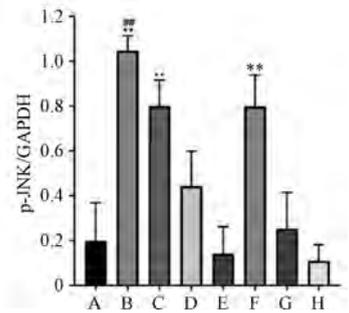
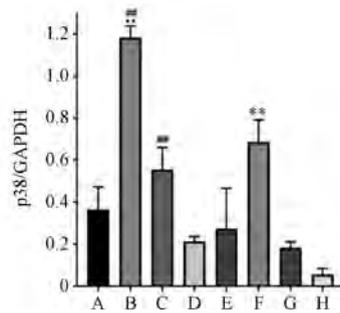
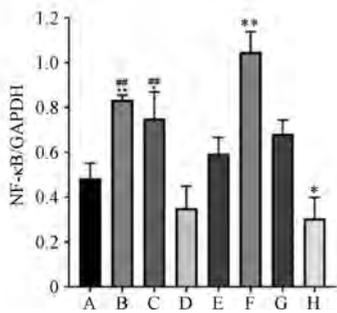
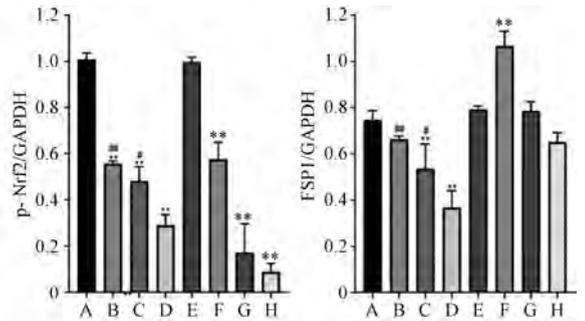
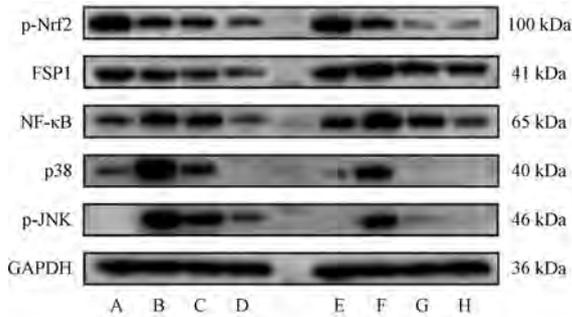
表5 西黄丸、奥希替尼和联合用药对 HCT8、DLD-1 侵袭细胞数的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

组别	空白组	西黄丸 200 μg/mL	奥希替尼 4 μmol/L	联合组
DLD-1	240.3±8.15	146±18.33**	108.3±7.37**	54.67±9.5***
HCT8	228.7±5.51	183±15.13**	180.3±8.62**	90.33±11.06***

注:与空白组比较,\*\* $P<0.01$ ;与4 μmol/L奥希替尼组比较,\*\*\* $P<0.01$ 。

2 μmol/L组和西黄丸 100 μg/mL组 p-JNK、p38、NF-κB 蛋白表达均升高 ( $P<0.01$ ),奥西替尼 4 μmol/L组 p-JNK、NF-κB 蛋白表达均升高 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );与奥希替尼 2

μmol/L组比较,联合组 p-JNK、p38、NF-κB 蛋白表达均降低 ( $P<0.01$ ),说明西黄丸有可能也通过抑制 JNK/p38 MAPK/NF-κB 信号通路起到抗肿瘤的作用,见图7。



注: A 为空白组 1, B~C 分别为奥西替尼 2、4 μmol/L 组, D 为西黄丸 200 μg/mL+奥西替尼 4 μmol/L 组, E 为空白组 2, F~H 分别为西黄丸 100、200、300 μg/mL 组。与空白组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与西黄丸 200 μg/mL+奥西替尼 4 μmol/L 组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ 。

图7 西黄丸、奥希替尼和联合用药对 HCT8 细胞 p-Nrf2、FSP1、p-JNK、p38 MAPK、NF-κB 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

3.6 肠癌类器官与组织一致性验证 本实验成功构建 6 例山东省立医院患者来源的肠癌类器官,将肠癌患者手术组织与其所对应的肠癌类器官做病理切片 HE 染色,可见所构建类器官皆与肠癌组织形态学一致,可用于后续实验,见图 8 (编号来源课题组生物样本库)、表 6。

3.7 西黄丸联合奥希替尼对 6 例肠癌类器官生长抑制率的

影响 将 6 例来自不同患者的肠癌类器官用西黄丸 (0、100、200、250、300、400 μg/mL) 和奥希替尼 (0、1.25、2.5、5 μmol/L) 处理 24 h,因肿瘤类器官具有异质性,不同的类器官由于个体差异对西黄丸和奥希替尼表现为不同的敏感性,故每例类器官单药组 IC<sub>50</sub>各有不同。但值得注意的是,与单药组比较,联合用药组 (西黄丸 200 μg/mL+

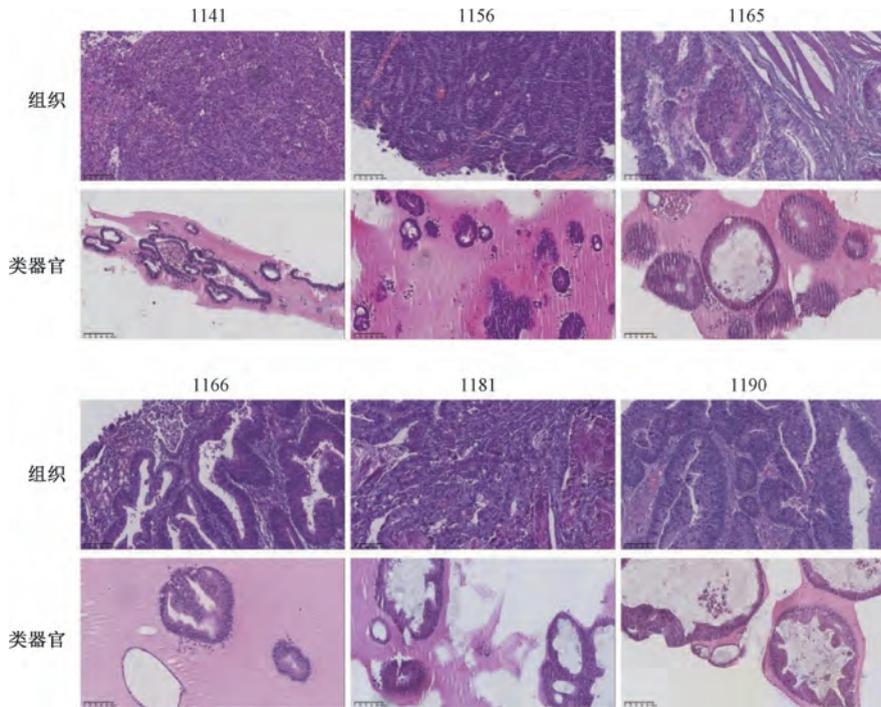


图8 6例肠癌手术组织病理切片与肠癌类器官一致性比对(HE染色)

表6 6例手术患者基本信息及病理情况表

编号	性别	年龄	病理
1141	男	58	乙状结肠;隆起溃疡型中分化腺癌,切面积5 cm×1.1 cm,脉管内查见癌栓,侵犯浆膜下纤维层及肠周脂肪;管状绒毛状腺瘤,2枚,直径2 cm,0.8 cm 增生性息肉;上、下切线和肠系膜切线均未查见癌,上切线另查见增生性息肉1枚;肠周淋巴结(19枚)未查见转移癌 免疫组化:Her2(0),MLH1(+),MSH2(+),MSH6(+),PMS2(+),提示可能为MSS或MSI-L;特殊染色Reticulum(+)
1156	女	69	右半结肠;溃疡型中分化腺癌,伴黏液产生,切面积9 cm×2.5 cm,侵达浆膜下脂肪组织(PT3),肿瘤出芽分级1级,未见肯定的脉管内癌栓;回肠及结肠切线未查见癌;肠周淋巴结(19枚)未查见癌 免疫组化:Her2(0),MLH1(+),MSH2(+),MSH6(+),PMS2(+)
1165	女	66	直肠;溃疡型中分化腺癌,切面积2.5 cm×0.3 cm,侵达黏膜下层,未查见脉管内癌栓及神经累及;上、下切线未见癌; 肠周淋巴结(11枚)未见癌 免疫组化:MLH1(+),MSH2(+),MSH6(+),PMS2(+),CD34+(脉管),S100+(神经),CK(AE1/AE3)(+)
1166	男	42	直肠;溃疡型中分化腺癌,肿瘤面积5 cm×3.5 cm,切面积5 cm×1.2 cm,侵达外膜;上、下切线未查见癌;肠周淋巴结 (13枚)未查见癌 免疫组化:Her2(2+),MLH1(+),MSH2(+),MSH6(+),PMS2(+)
1181	男	73	直肠;溃疡型中分化腺癌,切面积4 cm×0.6 cm,侵达浆膜下层;另见1枚管状腺瘤伴低级别上皮内瘤变,直径1 cm; 上、下切线未查见癌;肠周淋巴结(2/18枚)查见转移癌;“肠壁异物结节”为脂肪坏死结节,体积1.8 cm×1.4 cm× 0.9 cm 免疫组化:MLH1(+),MSH2(+),MSH6(+),PMS2(+)
1190	男	70	直肠;隆起型中分化腺癌,切面积3 cm×0.8 cm,侵达黏膜下层,未见明确脉管癌栓;上、下切线未查见癌;肠周淋巴结 (13枚)未查见癌 免疫组化:Desmin(+),P53(-),Ki-67(80%),Her2(1+),MLH1(+),MSH2(+),MSH6(+),PMS2(+)

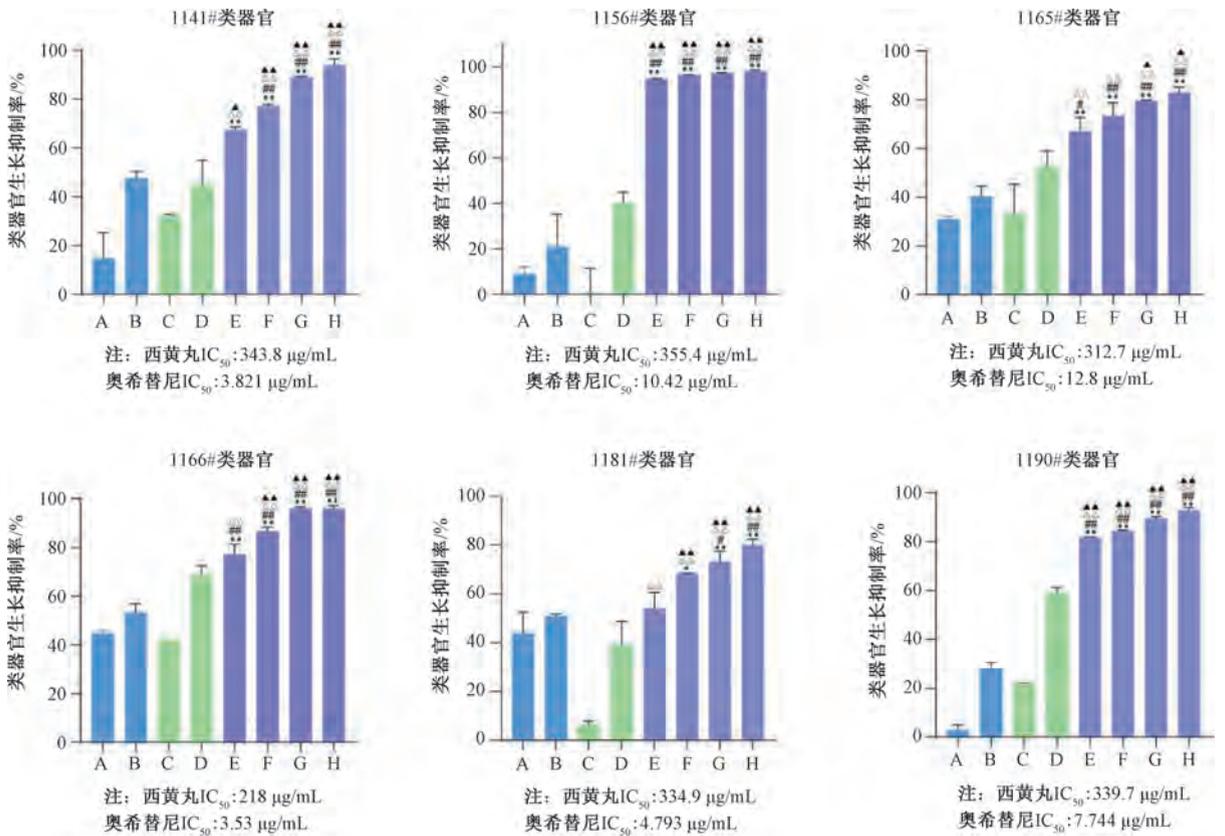
注:(+)或(1+)代表弱阳性,+号数量越多表示阳性越强;(-)和(0)代表阴性结果,(-)表示指标无表达或无基因突变,(0)表示无染色或阴性结果。

奥希替尼2 μmol/L、西黄丸300 μg/mL+奥希替尼2 μmol/L、西黄丸200 μg/mL+奥希替尼4 μmol/L、西黄丸300 μg/mL+奥希替尼4 μmol/L)处理24 h后肠癌类器官生长抑制率均提高(P<0.01),且呈浓度依赖性,见图9。与单药组比较,联合用药组处理24 h后6例类器官生长速度均更为缓慢,部分伴有崩解,并出现皱缩以及死亡,表明联合用药组具有明显的抗肿瘤作用,见图10。

#### 4 讨论

结直肠癌是世界上最常见的癌症之一,急需开发新的

治疗思路。西黄丸是一种经典抗肿瘤药方,可诱导癌细胞凋亡,抑制其增殖、迁移侵袭和血管生成,改善免疫功能和肿瘤微环境,发挥抗肿瘤作用<sup>[19]</sup>。西黄丸作为癌症辅助药物,多与化疗联合,对抗肿瘤有明显的增敏效果<sup>[20]</sup>。现今中药制剂应用广泛,与靶向、放化疗相结合的优势越来越受重视<sup>[21]</sup>,成分复杂的中药具有多靶点的优势,一直是开发新药的丰富来源,然而,也给探索其抗癌机制带来了困难。目前也还没有大规模的临床试验支持西黄丸的抗癌功效,未来的研究需解决上述局限性。



注：A~B分别为2、4 μmol/L奥希替尼组，C~D分别为200、300 μg/mL西黄丸组，E为200 μg/mL西黄丸+2 μmol/L奥希替尼组，F为300 μg/mL西黄丸+2 μmol/L奥希替尼组，G为200 μg/mL西黄丸+4 μmol/L奥希替尼组，H为300 μg/mL西黄丸+4 μmol/L奥希替尼组。与2 μmol/L奥希替尼组比较，\**P*<0.05，\*\**P*<0.01；与4 μmol/L奥希替尼组比较，#*P*<0.05，###*P*<0.01；与200 μg/mL西黄丸组比较，<sup>△</sup>*P*<0.05，<sup>△△</sup>*P*<0.01；与300 μg/mL西黄丸组比较，<sup>▲</sup>*P*<0.05，<sup>▲▲</sup>*P*<0.01。

图9 西黄丸、奥希替尼和联合用药对6例肠癌类器官生长抑制率的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

铁死亡是一种依赖铁调节的细胞死亡形式，由脂质过度过氧化驱动。铁死亡影响化疗、放疗和免疫治疗的疗效，与靶向铁死亡通路的药物联合是有前景的临床策略<sup>[22-23]</sup>。Nrf2和FSP1是抵抗铁死亡的重要调控因子。铁死亡依赖于ROS的产生和积累，特别是脂质ROS，后者的高活性分子被认为是铁死亡过程的主要执行者，细胞通过激活关键的抗氧化相关转录因子Nrf2来应对这种应激条件，Nrf2反过来调节不同类别靶基因的表达，如抗氧化基因（如HO-1、NQO1、CAT和SOD）和嗜铁相关基因（如GPX4、GCLc、ACLS4和SLC7A11）。FSP1（AIFM2）已被发现在铁死亡的保护途径中起关键作用<sup>[24]</sup>。FSP1主要定位于质膜，作为一种依赖于NADPH和NADH的抗氧化剂，与细胞内谷胱甘肽水平无关<sup>[25]</sup>。本研究发现，西黄丸联合奥希替尼组较奥希替尼单药组抑制了FSP1和p-Nrf2蛋白表达，表明西黄丸可增敏奥希替尼诱导结直肠癌的铁死亡。

MAPK通路在调节细胞增殖、分化和应激反应中非常关键，其中JNK/p38信号转导与癌症的发生发展、转移和化疗反应有关<sup>[26]</sup>。研究表明，抑制JNK和p38可能作为肿瘤治疗的手段，对多种肿瘤初步显示出治疗效果<sup>[27]</sup>，且JNK和p38也可作为潜在的免疫联合治疗的靶点<sup>[28]</sup>。NF-κB是一个关键转录因子，来自肿瘤细胞或浸润性炎症细胞

的NF-κB通常在肿瘤发生、肿瘤血管生成和肿瘤相关炎症中起着积极的中介作用<sup>[29]</sup>。研究表明，NF-κB在癌症中的结构性激活会刺激癌细胞进展<sup>[30]</sup>，抑制NF-κB信号通路可能是结直肠癌的一个潜在治疗靶点<sup>[31]</sup>。本研究发现，奥希替尼在结肠癌细胞中激活了JNK/p38 MAPK/NF-κB通路，西黄丸阻断了此通路的激活，且西黄丸联合奥希替尼同样阻断了此通路的激活。西黄丸联合奥希替尼可能是通过上述机制来增强对肠癌细胞的杀伤力，这将为临床提供新的治疗策略。

本研究选择构建患者来源的肠癌类器官进行药敏实验，直接使用患者来源的肿瘤类器官进行药敏筛选的可行性已经在各种肿瘤类型中得到证实<sup>[32]</sup>。类器官是基于发育生物学原理的干细胞自组织制成的三维细胞复合物<sup>[33]</sup>，组织学和遗传特征与亲本肿瘤高度一致<sup>[34]</sup>。目前肿瘤类器官应用主要包括药物筛选和开发，探索微环境和肿瘤异质性研究，以及个性化医疗<sup>[35]</sup>。类器官药物反应与相应患者的无进展生存期显著相关，故已初步用于指导患者化疗策略的调整<sup>[36]</sup>。本实验结果表明，西黄丸联合奥希替尼在患者来源的肠癌类器官中表现出较好的联合杀伤作用。

综上所述，西黄丸联合奥希替尼可以抑制肠癌细胞及类器官的增殖，其机制可能是抑制抗铁死亡相关蛋白Nrf2、

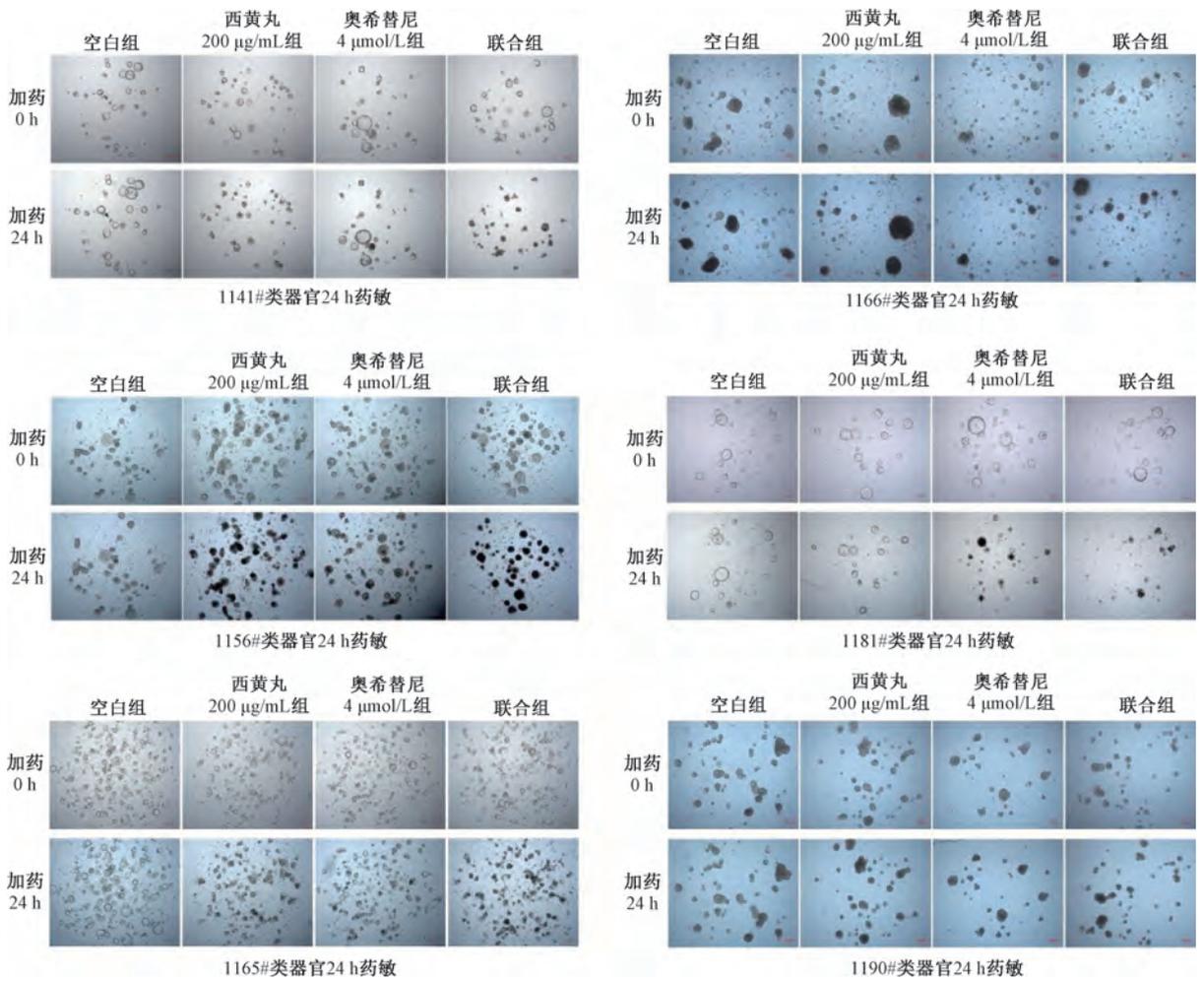


图 10 西黄丸、奥希替尼和联合用药对 6 例肠癌类器官生长情况的影响

FSP1 表达以及抑制 JNK/p38 MAPK/NF-κB 信号通路激活。药物联合协同模型分数表明西黄丸联合奥希替尼具有高度协同杀伤肠癌细胞及类器官的作用，筛选和研究具有抗肿瘤效果的中西医结合方案是治疗结直肠癌的有效策略。

参考文献:

[ 1 ] Liu Y, Lau H C, Cheng W Y, *et al.* Gut microbiome in colorectal cancer: clinical diagnosis and treatment[J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2023, 21(1): 84-96.

[ 2 ] Mattiuzzi C, Sanchis-Gomar F, Lippi G. Concise update on colorectal cancer epidemiology[J]. *Ann Transl Med*, 2019, 7(21): 609.

[ 3 ] Ahluwalia P, Kolhe R, Gahlay G K. The clinical relevance of gene expression based prognostic signatures in colorectal cancer[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021, 1875(2): 188513.

[ 4 ] 王俊亮, 马学莉, 陶蕊, 等. 西黄丸活性成分、药理作用研究进展及质量标志物预测分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(22): 259-269.

[ 5 ] Mao D, Feng L, Huang S, *et al.* Meta-analysis of Xihuang Pill efficacy when combined with chemotherapy for treatment of breast cancer[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019,

2019: 3502460.

[ 6 ] Guo Q, Xu X, He S, *et al.* Xihuang pills enhance the tumor treatment efficacy when combined with chemotherapy: A meta-analysis and systematic review[J]. *Cancer Res Ther*, 2018, 14(Suppl 5): S1012-S1018.

[ 7 ] Lin W, Wang N, Wu S, *et al.* NUA1-mediated phosphorylation of NADK mitigates ROS accumulation to promote osimertinib resistance in non-small cell lung carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2024, 84(23): 4081-4098.

[ 8 ] Troiani T, Napolitano S, Della Corte C M, *et al.* Therapeutic value of EGFR inhibition in CRC and NSCLC: 15 years of clinical evidence[J]. *ESMO Open*, 2016, 1(5): e000088.

[ 9 ] Jin P, Jiang J, Xie N, *et al.* MCT1 relieves osimertinib-induced CRC suppression by promoting autophagy through the LKB1/AMPK signaling[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(8): 615.

[ 10 ] Nuciforo S, Fofana I, Matter M S, *et al.* Organoid models of human liver cancers derived from tumor needle biopsies[J]. *Cell Rep*, 2018, 24(5): 1363-1376.

[ 11 ] Chan A S, Yan H H N, Leung S Y. Breakthrough moments: Organoid models of cancer[J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 24(6): 839-840.

- [12] 许涛, 李萍, 曾召琼, 等. 犀黄丸提取液对MDA-MB-231乳腺癌细胞功能的影响[J]. 中医学报, 2019, 34(6): 1226-1230.
- [13] Pan G, Wang W, Wang L, *et al.* Anti-breast cancer effects and mechanisms of Xihuang pill on human breast cancer cell lines[J]. *J Tradit Chin Med*, 2013, 33(6): 770-778.
- [14] Ianevski A, Giri A K, Aittokallio T. SynergyFinder 3.0: an interactive analysis and consensus interpretation of multi-drug synergies across multiple samples[J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(W1): W739-W743.
- [15] Tanaka K, Helena A Y, Yang S, *et al.* Targeting Aurora B kinase prevents and overcomes resistance to EGFR inhibitors in lung cancer by enhancing BIM-and PUMA-mediated apoptosis[J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(9): 1245-1261.
- [16] Preuer K, Lewis R P I, Hochreiter S, *et al.* DeepSynergy: predicting anti-cancer drug synergy with deep learning[J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(9): 1538-1546.
- [17] Li S, Ung T T, Nguyen T T, *et al.* Cholic acid stimulates MMP-9 in human colon cancer cells *via* activation of MAPK, AP-1, and NF- $\kappa$ B activity[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(10): 3420.
- [18] Ma Q, Gu L, Liao S, *et al.* NG25, a novel inhibitor of TAK1, suppresses KRAS-mutant colorectal cancer growth *in vitro* and *in vivo*[J]. *Apoptosis*, 2019, 24(1-2): 83-94.
- [19] Xu H B, Chen X Z, Wang X, *et al.* Xihuang pill in the treatment of cancer: TCM theories, pharmacological activities, chemical compounds and clinical applications[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 316: 116699.
- [20] Cheng H, Yang Q, Wang R, *et al.* Emerging advances of detection strategies for tumor-derived exosomes[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(2): 868.
- [21] 乔宏志, 张蕾, 孙娟, 等. 中药功效物质与靶向治疗策略[J]. 南京中医药大学学报, 2018, 34(1): 25-29.
- [22] Chen X, Kang R, Kroemer G, *et al.* Broadening horizons: the role of ferroptosis in cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(5): 280-296.
- [23] Yang J, Mo J, Dai J, *et al.* Cetuximab promotes RSL3-induced ferroptosis by suppressing the Nrf2/HO-1 signalling pathway in KRAS mutant colorectal cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(11): 1079.
- [24] Doll S, Freitas F P, Shah R, *et al.* FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor[J]. *Nature*, 2019, 575(7784): 693-698.
- [25] Gotorbe C, Durivault J, Meira W, *et al.* Metabolic rewiring toward oxidative phosphorylation disrupts intrinsic resistance to ferroptosis of the colon adenocarcinoma cells[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(12): 2412.
- [26] 巩婷婷, 司凯, 刘会平, 等. MAPK级联调控细胞生长及其在免疫、炎症及癌症中作用的研究进展[J]. 中南大学学报(医学版), 2022, 47(12): 1721-1728.
- [27] Yamamoto M, Suzuki S, Togashi K, *et al.* AS602801, an anticancer stem cell candidate drug, reduces survivin expression and sensitizes A2780 ovarian cancer stem cells to carboplatin and paclitaxel[J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(12): 6699-6706.
- [28] Li Y, Qi M, Ding F, *et al.* Tumour targetable and microenvironment-responsive nanoparticles simultaneously disrupt the PD-1/PD-L1 pathway and MAPK/ERK/JNK pathway for efficient treatment of colorectal cancer[J]. *J Drug Target*, 2021, 29(4): 454-465.
- [29] Chen M H, Gu Y Y, Zhang A L, *et al.* Biological effects and mechanisms of matrine and other constituents of *Sophora flavescens* in colorectal cancer[J]. *Pharmacol Res*, 2021, 171: 105778.
- [30] Kaltschmidt B, Witte K E, Greiner J F W, *et al.* Targeting NF- $\kappa$ B signaling in cancer stem cells: a narrative review[J]. *Biomedicines*, 2022, 10(2): 261.
- [31] Buhrmann C, Shayan P, Banik K, *et al.* Targeting NF- $\kappa$ B signaling by calebin A, a compound of turmeric, in multicellular tumor microenvironment: potential role of apoptosis induction in CRC cells[J]. *Biomedicines*, 2020, 8(8): 236.
- [32] Zhu J, Ji L, Chen Y, *et al.* Organoids and organs-on-chips: insights into predicting the efficacy of systemic treatment in colorectal cancer[J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9(1): 72.
- [33] Clevers H. Modeling development and disease with organoids[J]. *Cell*, 2016, 165(7): 1586-1597.
- [34] Tuveson D, Clevers H. Cancer modeling meets human organoid technology[J]. *Science*, 2019, 364(6444): 952-955.
- [35] Pauli C, Hopkins B D, Prandi D, *et al.* Personalized *in vitro* and *in vivo* cancer models to guide precision medicine[J]. *Cancer Discov*, 2017, 7(5): 462-477.
- [36] Mo S, Tang P, Luo W, *et al.* Patient-derived organoids from colorectal cancer with paired liver metastasis reveal tumor heterogeneity and predict response to chemotherapy[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2022, 9(31): e2204097.