

基于 PI3K/Akt 信号通路探讨防己黄芪汤对三阴性乳腺癌裸鼠肿瘤生长的抑制作用

邓显光¹, 裴晓华², 陈睿旖³, 秦默仪⁴, 刘丽芳⁵, 范洪桥^{4,6*}

(1. 湖南中医药大学第二附属医院乳腺科, 湖南长沙 410005; 2. 北京中医药大学第三附属医院乳腺科, 北京 100029; 3. 湖南中医药大学第一附属医院健康管理科, 湖南长沙 410007; 4. 湖南中医药大学第一附属医院美容整形科, 湖南长沙 410007; 5. 湖南中医药大学第一附属医院乳腺科, 湖南长沙 410007; 6. 北京中医药大学东直门医院厦门医院乳腺科, 福建厦门 361015)

摘要: **目的** 探讨防己黄芪汤对三阴性乳腺癌 (TNBC) 裸鼠肿瘤生长的抑制作用。**方法** 使用 4T1 细胞建立 TNBC 裸鼠移植瘤模型, 成瘤后将裸鼠分为模型组和防己黄芪汤低、中、高剂量组 (4.03、8.06、16.12 g/kg), 灌胃给药 21 d。采用 HE 染色观察肿瘤组织病理变化, RT-qPCR 法检测肿瘤组织 *PI3K*、*Akt* 以及糖酵解关键酶 *HK2*、*PKM2*、*LDHA* mRNA 表达; Western blot 法检测肿瘤组织 *PI3K*、*Akt*、p-*PI3K*、p-*Akt*、*HK2*、*PKM2*、*LDHA* 蛋白表达; 比色法检测肿瘤组织乳酸水平。**结果** 与模型组比较, 防己黄芪汤各剂量组肿瘤体积减小 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 肿瘤细胞密度降低, 有丝分裂象减少, 无红细胞渗出; 肿瘤组织 *HK2*、*PKM2*、*LDHA* 蛋白和 mRNA 表达均降低 ($P < 0.01$), *PI3K*、*Akt* mRNA 及其蛋白磷酸化水平均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 防己黄芪汤可通过抑制 *PI3K/Akt* 信号通路激活, 下调糖酵解相关酶表达, 减少乳酸生成, 从而干预 TNBC 糖酵解代谢重编程, 发挥抗三阴性乳腺癌作用。

关键词: 防己黄芪汤; 三阴性乳腺癌; 糖酵解; *PI3K/Akt* 信号通路; 代谢重编程

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2026)03-0997-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2026.03.041

乳腺癌已成为全球女性中最常见的恶性肿瘤^[1]。三阴性乳腺癌 (triple-negative breast cancer, TNBC) 是指缺乏雌激素受体、孕激素受体和人类表皮生长因子受体 2 表达的一种亚型, 约占所有乳腺癌的 15% 至 20%^[2]。由于缺乏相应受体, 目前 TNBC 针对性的治疗手段较少, 已成为乳腺癌中最具挑战性的亚型之一^[3]。

肿瘤代谢重编程被认为是癌细胞增殖和转移的重要驱动力之一^[4]。其中, 有氧糖酵解在维持肿瘤细胞生长等方面发挥关键作用^[5]。在 TNBC 中, 有氧糖酵解代谢增强^[6-7]。糖酵解相关酶如己糖激酶 2 (hexokinase 2, *HK2*)、丙酮酸激酶 M2 型 (pyruvate Kinase M2, *PKM2*)、乳酸脱氢酶 A (lactate dehydrogenase A, *LDHA*) 等激活后可促进 TNBC 侵袭转移^[8-10]。此外, 磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, *PI3K*) /蛋白激酶 B

(protein kinase B, *Akt*) 信号通路可调节多种糖酵解关键酶表达, 增强肿瘤细胞的糖酵解代谢^[11]。通过抑制 *PI3K/Akt* 信号通路减少有氧糖酵解代谢已成为防治 TNBC 转移侵袭的关键策略^[12]。

防己黄芪汤在抗肿瘤方面具有潜在优势^[13-14], 研究发现其在体内外均可抑制 TNBC 进展^[15]。课题组前期通过高通量测序发现防己黄芪汤抗 TNBC 机制与调控 *PI3K/Akt* 信号通路有关^[16], 但缺乏实验验证。防己黄芪汤还可降低乳腺癌患者血清中有氧糖酵解的关键酶表达^[17]。因此, 本研究探讨防己黄芪汤是否可通过 *PI3K/Akt* 信号通路抑制 TNBC 糖酵解代谢, 以期防己黄芪汤作为治疗 TNBC 的基础方提供实验依据, 也为中医药通过调控代谢干预肿瘤进展提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 20 只 SPF 级雌性 BALB/c 裸鼠, 4~6

收稿日期: 2025-06-30

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82474519); 国家自然科学基金青年项目 (82205128); 湖南省自然医卫行业联合基金项目 (2025JJ80951); 北京市自然科学基金 (7232275); 湖南省教育厅科学研究项目重点项目 (23A0291); 湖南省卫健委科研计划项目 (B202304136157); 湖南中医药大学 2024 年本科生科研创新基金项目 (2024BKS011); 湖南省教育厅科学研究项目优秀青年项目 (25B0342)

作者简介: 邓显光 (1996—), 男, 博士, 医师, 从事中医药防治乳腺疾病的研究。E-mail: 1585512822@qq.com

* 通信作者: 范洪桥 (1987—), 男, 博士, 副主任医师, 从事中医药防治乳腺疾病的研究。E-mail: fhq530286@126.com

周龄, 体质量 14.8~15.9 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (湘) 2019-004], 饲养于湖南中医药大学科技创新中心动物实验室 SPF 级环境 [实验动物使用许可证 SYXK (湘) 2019-0009]。本动物实验经湖南中医药大学科技创新中心动物伦理委员会批准 (伦理编号 HNUCM21-2401-07)。

1.2 细胞 小鼠乳腺癌 4T1 细胞 (货号 CL-0007) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.3 药物 防己黄芪汤由防己 15 g (批号 A1055402)、黄芪 20 g (批号 A2019012)、白术 10 g (批号 A3060622)、甘草 6 g (批号 A306L142)、大枣 5 g (批号 A3070352)、生姜 6 g (批号 A3080627) 组成, 各药材配方颗粒均由广东一方制药有限公司生产, 购自湖南中医药大学第一附属医院。取上述配方颗粒, 加入 31 mL 生理盐水, 通过超声助溶制成 2 g/mL 的混悬液以用于灌胃, 灌胃前使用水浴加热并颠倒混匀。

1.4 试剂 β -actin、LDHA、PKM2 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司, 货号 20536-1-AP、19987-1-AP、60268-1-Ig); Hexokinase II (HK2)、PI3K p85、p-PI3K p85、Akt、p-Akt 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司, 货号 2867T、4292、17366、9272、9271); 山羊抗鼠 IgG、山羊抗兔 IgG 二抗、L-乳酸 (A) 比色法测试盒 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 货号 E-AB-1001、E-AB-1003、E-BC-K044-M); ECL 发光液 (合肥白鲨生物科技有限公司, 货号 BL520B); cDNA Synthesis SuperMix (gDNA Purge)、NovoStart SYBR High-Sensitivity qPCR SuperMix (上海近岸科技有限公司, 货号 E047-01B、E099-01A)。

1.5 仪器 无耗材细胞计数仪 [高分 (北京) 生物科技有限公司]; Panoramic MIDI 数字玻片扫描仪 (匈牙利 3DHISTECH 公司); ABI QuantStudio6 FLEX Q6 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); ChemiDoc-XRS+ 凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); 石蜡切片机 [徠卡显微系统 (上海) 贸易有限公司]。

2 方法

2.1 造模、分组及给药 20 只裸鼠适应性喂养 7 d 后, 根据体质量随机分为模型组和防己黄芪汤低、中、高剂量组, 每组 5 只。取处于对数生长期的 4T1 细胞, PBS 重悬细胞, 使用细胞计数仪计数, 调整细胞密度至 5×10^6 个/mL, 注射于裸鼠腋

窝处, 每只注射 100 μ L。根据人与小鼠体表面积进行剂量换算, 以临床用量的等效剂量为防己黄芪汤中剂量, 即 8.06 g/kg, 高、低剂量为 16.12、4.03 g/kg。当皮下肿瘤最大直径达到 5 mm 时, 灌胃给药, 其中模型组灌胃等体积生理盐水, 持续 21 d。给药期间, 每隔 7 d 测量 1 次肿瘤大小, 使用游标卡尺测量肿瘤最长径 (a) 和最短径 (b), 肿瘤体积 (tumor volume, TV) 计算公式为 $TV = 0.5 \times a \times b^2$ 。末次给药后, 大鼠禁食不禁水 24 h, 摘眼球取血, 随后脱颈处死, 摘取肿瘤组织, 每个肿瘤组织剪取部分固定于多聚甲醛中, 用于组织病理学检测, 剩余部分用于 RT-qPCR、Western blot 和乳酸水平检测。

2.2 HE 染色观察肿瘤组织病理形态 取多聚甲醛中固定的肿瘤组织, 流水冲洗, 乙醇梯度脱水, 浸蜡, 包埋切片, 烤片; 依次用二甲苯 I、二甲苯 II 各浸泡 10 min, 随后置于梯度乙醇中各浸泡 5 min, 脱蜡; 将切片置于苏木精染液中染色 10 min, 盐酸乙醇分化, 自来水冲洗返蓝; 将切片置于伊红染液中染色 25 min; 依次用 70%、80%、95%、100% 梯度乙醇脱水; 随后依次将切片放入二甲苯 I、二甲苯 II 中透明; 滴加中性树胶封片, 完全干燥后于显微镜下观察并拍照。

2.3 RT-qPCR 法检测肿瘤组织 PI3K、Akt、HK2、PKM2、LDHA mRNA 表达 剪取约 100 mg 的肿瘤组织, 加入研磨珠和 TRIzol 裂解液, 使用低温研磨仪研磨, 按照试剂盒说明书提取 RNA, 使用 Nanodrop 分光光度计测定 RNA 浓度。按照试剂盒说明书配制逆转录反应体系, 将 RNA 逆转录为 cDNA, 于 PCR 仪中进行扩增, 反应体系为 20 μ L, 以 β -actin 为内参, 使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行定量分析。引物由武汉皮诺飞生物科技有限公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	序列(5'→3')	长度/bp
PIK3	正向 GCGTGACATGTAGGCTCTCAG	148
	反向 CTATACGGCCCGCACTGTAA	
Akt	正向 GCCGCCTGATCAAGTTCTCC	119
	反向 TTCAGATGATCCATGCGGGG	
β -actin	正向 GTGACGTTGACATCCGTAAGA	245
	反向 GCCGGACTCATCGTACTCC	
HK2	正向 TCAGATCGAGAGTACTGCC	191
	反向 CCAGTCCACGGTTCTCTCTT	
PKM2	正向 CTGTGCTGTGAAGGATGCC	167
	反向 ACGCATGGTGTGGTGAATC	
LDHA	正向 TGTAAGTCCGAAGTCAAGC	205
	反向 GCCACTGATTTCCAAGCCA	

2.4 Western blot 法检测肿瘤组织 PI3K、Akt、p-PI3K、p-Akt、HK2、PKM2、LDHA 蛋白表达 剪取适量肿瘤组织，加入 RIPA 裂解液，使用低温组织研磨仪研磨，BCA 法测定蛋白浓度，调整各组蛋白浓度至一致。加入蛋白上样缓冲液后加热，使蛋白变性，每孔上样量约 30 μg。电泳分离蛋白，并转至 PVDF 膜上，用快速封闭液封闭 10 min，按照说明书稀释一抗，加入一抗后 4 ℃ 孵育过夜，TBST 洗膜，按照说明书稀释二抗，加入二抗后室温孵育 2 h，TBST 洗膜，滴加显影液显色、曝光。以 β-actin 为内参，采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值。

2.5 乳酸水平检测 取约 50 mg 肿瘤组织，加入 0.5 mL PBS，使用组织研磨仪进行匀浆处理，离心后取上清，按照说明书进行操作。取 96 孔板，加入试剂盒中的标准品以及待测样品各 5 μL，随

后依次加入 100 μL 酶工作液、20 μL 显色液，37 ℃ 孵育 10 min，加入终止液，使用酶标仪测定各孔在 530 nm 波长处的光密度 (OD) 值。通过标准品 OD 值建立拟合曲线，并计算样本的乳酸含量，实验重复 3 次。

3 结果

3.1 防己黄芪汤对 TNBC 裸鼠肿瘤生长的影响 注射 4T1 细胞第 7 天时，所有小鼠肿瘤直径均已达到 5 mm，第 8 天时灌胃给药。如表 2 所示，模型组小鼠肿瘤体积随时间延长而增大；与模型组比较，第 14 天 (给药 7 d) 后，防己黄芪汤中、高剂量组肿瘤体积减小 ($P<0.05$, $P<0.01$)，第 21 天 (给药 14 d) 后，防己黄芪汤各剂量组肿瘤体积减小 ($P<0.01$)，说明防己黄芪汤具有抑制 TNBC 肿瘤生长的作用。

表 2 各组 TNBC 裸鼠肿瘤体积变化比较 (mm³, $\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
模型组	65.38±6.73	276.61±30.35	1 134.47±119.61	2 930.06±162.60
防己黄芪汤低剂量组	69.74±6.81	237.16±32.23	609.50±129.54**	1 141.54±167.29**
防己黄芪汤中剂量组	60.68±6.05	212.29±29.50*	472.48±118.33**	899.55±154.67**
防己黄芪汤高剂量组	69.31±6.75	197.36±28.26**	402.46±83.88**	849.46±148.35**

注：与模型组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

3.2 防己黄芪汤对 TNBC 裸鼠肿瘤组织病理形态的影响 模型组肿瘤细胞呈大片状或巢状分布，形态不一，排列紧密，核呈异型性，核大、深染，可见核分裂，呈现典型的肿瘤恶性特征；多个区域可见有丝分裂象，提示肿瘤细胞增殖高度活跃；局灶可见肿瘤坏死区，部分区域伴有红细胞渗出，提示肿瘤生长快速导致血供不足。与模型组比较，防己黄芪汤低剂量组肿瘤细胞密度降低，部分区域细胞排列较松散，间质略增多，有丝分裂象减少，无红细胞渗出；防己黄芪汤中剂量组肿瘤细胞细胞密度降低，间质增多，有丝分裂象减少；防己黄芪汤高剂量组肿瘤细胞排列稀疏，大片区域细胞密度较低，核深染程度减轻，核分裂象较少，无红细胞渗出，见图 1。

3.3 防己黄芪汤对 TNBC 裸鼠肿瘤组织 HK2、PKM2、LDHA mRNA 及蛋白表达的影响 与模型组比较，防己黄芪汤各剂量组肿瘤组织中糖酵解关键酶 HK2、PKM2、LDHA mRNA 及蛋白表达均降低 ($P<0.01$)，表明防己黄芪汤可抑制肿瘤组织中糖酵解代谢水平，见图 2、表 3。

3.4 防己黄芪汤对 TNBC 裸鼠肿瘤组织乳酸水平的影响 与模型组比较，防己黄芪汤各剂量组肿瘤

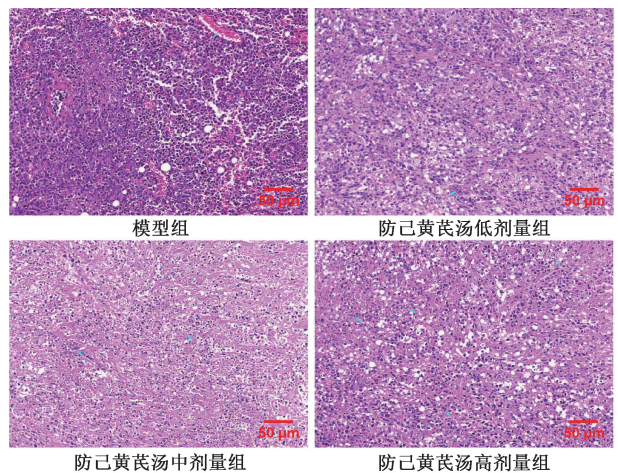
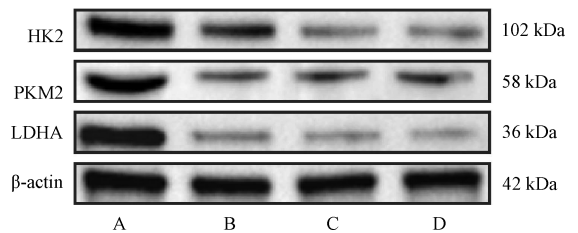


图 1 各组裸鼠乳腺癌移植瘤 HE 染色 (×400)



注：A 为模型组，B~D 分别为防己黄芪汤低、中、高剂量组。

图 2 各组裸鼠肿瘤组织 HK2、PKM2、LDHA 蛋白条带图 组织乳酸水平均降低 ($P<0.01$)，见表 4。

表3 各组裸鼠肿瘤组织 HK2、PKM2、LDHA mRNA 及蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	mRNA 表达			蛋白表达		
	HK2	PKM2	LDHA	HK2	PKM2	LDHA
模型组	1.00±0.07	1.00±0.20	1.00±0.11	1.20±0.09	1.23±0.07	1.23±0.01
防己黄芪汤低剂量组	0.45±0.07**	0.60±0.12**	0.45±0.08**	0.68±0.11**	0.60±0.15**	0.44±0.07**
防己黄芪汤中剂量组	0.42±0.02**	0.52±0.05**	0.32±0.03**	0.33±0.03**	0.58±0.11**	0.35±0.08**
防己黄芪汤高剂量组	0.42±0.06**	0.44±0.04**	0.35±0.03**	0.30±0.06**	0.54±0.14**	0.37±0.14**

注：与模型组比较，** $P < 0.01$ 。

表4 各组裸鼠肿瘤组织乳酸水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	乳酸/(mmol·L ⁻¹)
模型组	8.84±0.15
防己黄芪汤低剂量组	5.41±0.12**
防己黄芪汤中剂量组	4.56±0.14**
防己黄芪汤高剂量组	4.25±0.15**

注：与模型组比较，** $P < 0.01$ 。

3.5 防己黄芪汤对 TNBC 裸鼠肿瘤组织 PI3K、Akt mRNA 和蛋白表达的影响 与模型组比较，防己黄芪汤各剂量组肿瘤组织 PI3K、Akt mRNA 表达和 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白表达比值均降低

($P < 0.05, P < 0.01$)，见图3、表5。

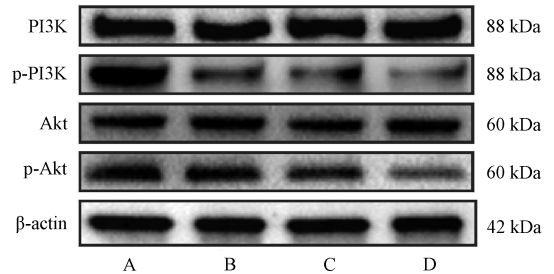


图3 各组裸鼠肿瘤组织 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白条带图

表5 各组裸鼠肿瘤组织 PI3K、Akt mRNA 和蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	mRNA 表达		蛋白表达	
	PI3K	Akt	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt
模型组	1.00±0.04	1.00±0.11	1.19±0.03	1.34±0.22
防己黄芪汤低剂量组	0.42±0.06**	0.36±0.13**	0.81±0.12**	0.84±0.12*
防己黄芪汤中剂量组	0.37±0.17**	0.33±0.16**	0.76±0.11**	0.67±0.12*
防己黄芪汤高剂量组	0.33±0.14**	0.33±0.10**	0.54±0.12**	0.60±0.10**

注：与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

4 讨论

乳腺癌属于中医“乳岩”等范畴。《医宗必读》言：“积之成者，正气不足，而后邪气踞之”，说明乳腺癌的发生是因虚致生，因虚而长，因正气虚弱导致痰饮、瘀血等病理产物凝聚成形。因此，防治 TNBC 的基本法则为扶正气、祛痰湿瘀毒。防己黄芪汤出自《金匮要略·水气病脉证并治》，最初用于治疗表虚风水风湿证。方中防己为君，其功不但利水，还可开三焦之壅滞，三焦通畅，则痰饮、瘀血可气化而散；黄芪为臣，可助肺之宣发以启上焦，健脾胃以运中焦，与防己形成“气行水行”之势；白术佐之，可健脾燥湿，使脾胃气机升降相因，且白术与黄芪相配，使中焦气化得复，水湿自无停聚之机；姜、枣、草调和脾胃。全方共奏健脾益气，行水祛痰之功。近年来研究逐渐揭示，防己黄芪汤在调整人体代谢及抗肿瘤方面具有重要的临床价值^[18-20]。本研究证实，各剂量防己黄芪汤处理 TNBC 荷瘤裸鼠后，能减缓肿瘤生长，进一步证明防己黄芪汤可有效抑制 TNBC 的疾病进展。

糖酵解的异常代谢在 TNBC 发生发展中起到重要的作用^[21]。肿瘤细胞即便在氧气充足的条件下仍优先采用糖酵解途径获取能量，并产生大量乳酸，为细胞迁移侵袭及免疫逃逸提供条件^[22-23]。HK2 作为糖酵解的第一步关键酶，直接催化葡萄糖转化为葡萄糖-6-磷酸，是糖酵解进程的第一个限速酶^[24]；PKM2 是糖酵解终末步骤的限速酶，可控制丙酮酸生成，进而影响乳酸生成^[25]。LDHA 作为乳酸生成的核心酶，其表达与肿瘤酸性微环境密切相关，有助于癌细胞免疫逃逸与转移^[26]。本研究结果表明，防己黄芪汤可下调 HK2、PKM2、LDHA mRNA 和蛋白表达，并减少肿瘤组织中乳酸的生成，提示防己黄芪汤可抑制 TNBC 糖酵解，从而达到抗肿瘤作用。

PI3K/Akt 信号通路作为调控细胞生长、代谢、凋亡及存活的重要通路^[27]，其异常激活可驱动乳腺癌糖酵解重编程^[28]。PI3K 磷酸化激活后可进一步招募并激活下游的 Akt，使 Akt 也磷酸化^[29]。激活的 Akt 可通过多种机制促进糖酵解通路的增强；其一，Akt 可上调葡萄糖转运蛋白表达，增强葡萄

糖摄取^[30-31]；其二，Akt可直接激活HK2，促进葡萄糖进入糖酵解途径的第一步磷酸化反应^[32]；其三，Akt通过激活转录因子如缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)等表达，间接增强糖酵解关键酶活性^[33-34]，从而促进有氧条件下的糖酵解代谢。此外，高水平乳酸的积聚可进一步增强PI3K/Akt信号通路的激活^[35-36]。因此，通过阻断该通路可有效抑制TNBC细胞的糖酵解活性和乳酸生成，已成为当前代谢靶向治疗的重要策略^[37]。本研究结果显示，防己黄芪汤可降低TNBC肿瘤组织中PI3K、Akt mRNA表达以及蛋白磷酸化水平，说明防己黄芪汤抑制TNBC糖酵解与抑制PI3K/Akt信号通路有关。

综上所述，防己黄芪汤可通过下调PI3K/Akt信号通路，降低糖酵解关键酶HK2、PKM2、LDHA表达，减少乳酸生成，抑制TNBC疾病进展。本研究结果可为临床以防己黄芪汤为基础方治疗乳腺癌提供实验依据。

参考文献:

[1] Tang D D, Ye Z J, Liu W W, et al. Survival feature and trend of female breast cancer; a comprehensive review of survival analysis from cancer registration data[J]. *Breast*, 2025, 79(2): 103862.

[2] Foulkes W D, Smith I E, Reis-Filho J S. Triple-negative breast cancer[J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(20): 1938-1948.

[3] Sajid M T, Ahmed M, Azhar M, et al. Age-related frequency of triple negative breast cancer in women[J]. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2014, 24(6): 400-403.

[4] Ferreira L M, Hebrant A, Dumont J E. Metabolic reprogramming of the tumor[J]. *Oncogene*, 2012, 31(36): 3999-4011.

[5] Munkácsy G, Santarpia L, Gyórfy B. Therapeutic potential of tumor metabolic reprogramming in triple-negative breast cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(8): 6945.

[6] Vaupel P, Multhoff G. Revisiting the Warburg effect: historical dogma versus current understanding[J]. *J Physiol*, 2021, 599(6): 1745-1757.

[7] Lunt S Y, Vander Heiden M G. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2011, 27(11): 441-464.

[8] Wang S, Zhuang Y, Xu J, et al. Advances in the study of hexokinase 2 (HK2) inhibitors[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2023, 23(7): 736-746.

[9] Chen P, Lou L, Sharma B, et al. Recent advances on PKM2 inhibitors and activators in cancer applications[J]. *Curr Med Chem*, 2024, 31(20): 2955-2973.

[10] Hou X, Shi X, Zhang W, et al. LDHA induces EMT gene

transcription and regulates autophagy to promote the metastasis and tumorigenesis of papillary thyroid carcinoma[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(4): 347.

[11] Xie Y, Shi X, Sheng K, et al. PI3K/Akt signaling transduction pathway, erythropoiesis and glycolysis in hypoxia (Review) [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(2): 783-791.

[12] Lee J J, Loh K, Yap Y S. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in breast cancer[J]. *Cancer Biol Med*, 2015, 12(4): 342-354.

[13] 武子健. 经方防己黄芪汤临床应用研究进展[J]. *中医药临床杂志*, 2025, 37(1): 181-186.

[14] 李际涛, 闵振兴, 汪 萌, 等. 防己黄芪汤化裁外敷联合温针灸治疗乳腺癌术后上肢淋巴水肿疗效观察[J]. *湖北中医药大学学报*, 2024, 26(5): 78-81.

[15] Guo Y, Fan Y, Pei X. Fangjihuangqi Decoction inhibits MDA-MB-231 cell invasion *in vitro* and decreases tumor growth and metastasis in triple-negative breast cancer xenografts tumor zebrafish model[J]. *Cancer Med*, 2020, 9(7): 2564-2578.

[16] Guo Q, Pei X H, Chu A J, et al. The mechanism of action of Fangji Huangqi Decoction on epithelial-mesenchymal transition in breast cancer using high-throughput next-generation sequencing and network pharmacology[J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 284(2): 114793.

[17] 陈运子, 余海涛, 陈倚天. 防己黄芪汤联合EC方案治疗乳腺癌疗效观察及对血清乳酸脱氢酶、ki-67水平的影响[J]. *新中医*, 2024, 56(14): 158-162.

[18] 姜 健, 殷苏勤, 刘曼曼, 等. 防己黄芪汤对肥胖患者减重后体质量反弹及外周血Th1、Th2细胞水平变化的影响[J]. *中医学报*, 2025, 53(3): 61-66.

[19] 杨雨欣, 张桂菊. 防己黄芪汤古代历史沿革及临床运用考证[J]. *药学前沿*, 2025, 29(1): 155-166.

[20] 李 阳, 张洽淳, 钟 悦, 等. 真武汤合防己黄芪汤皮肤给药治疗癌性腹水的临床观察[J]. *中国民间疗法*, 2024, 32(6): 62-64.

[21] Gandhi N, Das G M. Metabolic reprogramming in breast cancer and its therapeutic implications[J]. *Cells*, 2019, 8(2): 89.

[22] Rivas-Fuentes S, Santos-Mendoza T, Salgado-Aguayo A. A putative role for lactate in the crosstalk between chemokines and glycolysis in solid cancer[J]. *Int J Biol Sci*, 2024, 20(6): 2261-2263.

[23] Rizwan A, Serganova I, Khanin R, et al. Relationships between LDH-A, lactate, and metastases in 4T1 breast tumors[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(18): 5158-5169.

[24] Lis P, Dyląg M, Niedz wiecka K, et al. The HK2 dependent “Warburg Effect” and mitochondrial oxidative phosphorylation in cancer: targets for effective therapy with 3-bromopyruvate [J]. *Molecules*, 2016, 21(12): 1730.

[25] Li T, Han J, Jia L, et al. PKM2 coordinates glycolysis with mitochondrial fusion and oxidative phosphorylation[J]. *Protein Cell*, 2019, 10(8): 583-594.

[26] Urbańska K, Orzechowski A. Unappreciated role of LDHA and LDHB to control apoptosis and autophagy in tumor cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(9): 2085.

- [27] Miricescu D, Totan A, Stanescu-Spinu I I, et al. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in breast cancer: from molecular landscape to clinical aspects[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 22(1): 173.
- [28] Qiao L, Dong C, Ma B. UBE2T promotes proliferation, invasion and glycolysis of breast cancer cells by regulating the PI3K/Akt signaling pathway[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2022, 42(2): 151-159.
- [29] Li H, Prever L, Hirsch E, et al. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in breast cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(14): 3517.
- [30] Fontana F, Giannitti G, Marchesi S, et al. The PI3K/Akt pathway and glucose metabolism: a dangerous liaison in cancer[J]. *Int J Biol Sci*, 2024, 20(8): 3113-3125.
- [31] Shao M, Pan Q, Tan H, et al. CYP3A5 unexpectedly regulates glucose metabolism through the Akt-TXNIP-GLUT1 axis in pancreatic cancer[J]. *Genes Dis*, 2024, 11(4): 101079.
- [32] Zhang T, Zhu X, Wu H, et al. Targeting the ROS/PI3K/Akt/HIF-1 α /HK2 axis of breast cancer cells: combined administration of polydatin and 2-deoxy-D-glucose[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(5): 3711-3723.
- [33] Cheng S C, Quintin J, Cramer R A, et al. mTOR- and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity[J]. *Science*, 2014, 345(6204): 1250684.
- [34] Shin N, Lee H J, Sim D Y, et al. Apoptotic effect of compound K in hepatocellular carcinoma cells via inhibition of glycolysis and Akt/mTOR/c-Myc signaling[J]. *Phytother Res*, 2021, 35(7): 3812-3820.
- [35] Zhang Y, Liu L, Qi Y, et al. Lactic acid promotes nucleus pulposus cell senescence and corresponding intervertebral disc degeneration via interacting with Akt[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2024, 81(1): 24.
- [36] Qian J, Gong Z C, Zhang Y N, et al. Lactic acid promotes metastatic niche formation in bone metastasis of colorectal cancer[J]. *Cell Commun Signal*, 2021, 19(1): 9.
- [37] Wang S, Cheng Z, Cui Y, et al. PTPRH promotes the progression of non-small cell lung cancer via glycolysis mediated by the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 819.

基于 eNOS/NO/c-Src 信号通路探讨山柰酚对缺氧诱导大鼠视网膜微血管内皮细胞损伤的影响

李娜¹, 李占强², 刘焯炳¹, 刘旭¹, 谭大勇^{3*}

(1. 青海大学附属医院眼科, 青海 西宁 810001; 2. 青海大学高原医学研究中心, 青海 西宁 810001; 3. 青海大学附属医院普通外科一科, 青海 西宁 810001)

摘要: 目的 探讨山柰酚对低氧所致大鼠视网膜微血管内皮细胞 (rRMECs) 损伤的保护作用。方法 采用 CCK-8 法筛选山柰酚保护 rRMECs 的有效浓度, 流式细胞术检测细胞凋亡情况, DCFH-DA 法检测 ROS 水平, ELISA 法检测 SOD 活性和 MDA 水平, Western blot 法检测 eNOS、p-eNOS、c-Src、p-c-Src、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达, 并测定 NO 水平。采用 eNOS 抑制剂 L-NAME (10 μ mol/L) 验证阻断 eNOS/NO/c-Src 信号后山柰酚对视网膜内皮细胞的作用。结果 在常氧条件下, 山柰酚在小于 32 μ mol/L 的浓度下对 rRMECs 无毒性; 与常氧组比较, 低氧组 (1% O₂, 12 h) rRMECs 活力降低 ($P < 0.01$), p-eNOS 蛋白表达升高 ($P < 0.01$)。与低氧组比较, 山柰酚组细胞增殖增加 ($P < 0.01$), 细胞凋亡减少 ($P < 0.01$), NO 水平、SOD 活性及 Bcl-2、p-eNOS 蛋白表达升高 ($P < 0.01$), ROS、MDA 水平及 Bax 蛋白表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), p-eNOS 和 p-c-Src 蛋白表达升高 ($P < 0.01$), 而 eNOS 抑制剂 L-NAME 逆转了山柰酚对低氧致 rRMECs 氧化应激损伤的保护作用 ($P < 0.01$)。结论 山柰酚在低氧条件下通过活化 eNOS/NO/c-Src 信号通路对 rRMECs 发挥保护作用, 抑制细胞凋亡, 减少氧化应激, 在治疗低氧相关视网膜血管损伤中具有潜在应用价值。

关键词: 山柰酚; rRMECs; 低氧损伤; 氧化应激; eNOS/NO/c-Src 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2026)03-1002-08

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2026.03.042

收稿日期: 2025-10-11

基金项目: 青海省科技计划项目 (2023-ZJ-768); 2024 年青海省“昆仑英才·高端创新创业人才”项目 (2024 年)

作者简介: 李娜 (1982—), 女, 博士, 副主任医师, 硕士生导师, 从事抗缺氧中藏药防治缺血缺氧性视网膜病变的研究。E-mail: cq_na_li@yeah.net

* 通信作者: 谭大勇 (1981—), 男 (蒙古族), 硕士, 副主任医师, 硕士生导师, 从事抗缺氧中藏药研究。E-mail: 513191840@qq.com