

· 基础研究 ·

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2024.12.005

补肾健脾方介导法尼醇X受体抑制肝癌细胞AH-130诱导大鼠恶病质的作用及其机制

冯思棋^a, 钟蕙^a, 李诗颖^a, 李芸^a, 吴中华^b, 汤晓雯^c, 周张杰^a, 吴婷婷^a (上海中医药大学 a. 附属上海市中西医结合医院 肿瘤科; b. 科技创新中心; c. 中药研究所 中药标准化教育部重点实验室暨上海市复方中药重点实验室, 上海 201203)

[摘要] **目的:**探讨补肾健脾方(BSJP)介导法尼醇X受体(FXR)抑制肝癌细胞AH-130诱导的癌性恶病质(CC)大鼠模型的作用及其机制。**方法:**腹腔注射AH-130细胞建立肝癌CC大鼠模型,实验分为空白对照组、模型对照组、FXR激动剂(CDCA)组、BSJP组和BSJP+CDCA组。建模后,用CDCA、BSJP连续治疗大鼠16 d,每周称量大鼠体重。实验结束时开腹,取腹主动脉血、粪便及附睾、腹股沟和肩胛区棕色脂肪质量。采用液相色谱-质谱法(LC-MS)检测大鼠血清和粪便中胆汁酸组分及含量, WB、qPCR法检测大鼠空肠、棕色及白色脂肪组织中FXR、Wnt家族成员10b(Wnt10b)、 β -连环蛋白(β -catenin)、解偶联蛋白1(UCP-1)的表达。**结果:**与空白对照组相比,模型对照组大鼠体质量明显降低($P < 0.01$);与模型对照组相比,CDCA、BSJP、BSJP+CDCA组大鼠体质量均增加(均 $P < 0.01$)。与空白对照组相比,模型对照组附睾、腹股沟和肩胛区域及总棕色脂肪质量均上升(均 $P < 0.05$);与模型对照组相比,各治疗组大鼠附睾、腹股沟区、棕色脂肪质量均下降(均 $P < 0.05$),而肩胛区棕色脂肪组织质量下降无差异($P > 0.05$);各治疗组总棕色脂肪质量均显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。LC-MS分析显示,各组大鼠血清及粪便中胆汁酸组成及含量均发生改变。qPCR、WB法结果证实,与模型组相比,BSJP和BSJP+CDCA可促进大鼠回肠、棕色脂肪及白色脂肪组织中FXR mRNA和蛋白表达升高(均 $P < 0.05$),Wnt10b、 β -catenin、UCP-1 mRNA和蛋白表达均下降(均 $P < 0.05$)。**结论:**BSJP能够抑制肝癌AH-130细胞诱导的大鼠CC,并减轻由此引起的体质量下降和棕色脂肪组织的形成,其机制可能涉及调控FXR并通过抑制棕色脂肪中与Wnt通路相关的Wnt10b、 β -catenin和UCP-1的表达来实现。

[关键词] 癌性恶病质;肝细胞癌;补肾健脾方;法尼醇X受体;棕色脂肪

[中图分类号] R735.7;R730.2;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)12-1204-07

Effects of Bushen Jianpi formula on farnesoid X receptor-mediated inhibition of hepatocellular carcinoma AH-130 cell-induced cachexia in rats and its underlying mechanism

FENG Siqi^a, ZHONG Yi^a, LI Shiyang^a, LI Yun^a, WU Zhonghua^b, TANG Xiaowen^c, ZHOU Zhangjie^a, WU Tingting^a (a. Oncology Department of Shanghai TCM-Integrated Hospital; b. Science and Technology Innovation Center; c. The Ministry of Education Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines and the SATCM Key Laboratory for New Resources and Quality Evaluation of Chinese Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Bushen Jianpi formula (BSJP) in mediating the inhibitory effects of farnesoid X receptor (FXR) on cancer cachexia (CC) induced by hepatocellular carcinoma AH-130 cells in a rat model and its underlying mechanism. **Methods:** A liver cancer cachexia rat model was established by intraperitoneal injection of AH-130 cells. The rats were divided into five groups: blank control, model control, CDCA (FXR agonist), BSJP, and BSJP + CDCA groups. After modelling, the rats were treated with CDCA, BSJP, or their combination for consecutive 16 days, and their body weights were measured weekly. At the end of the experiment, the rats were sacrificed, and abdominal aortic blood, feces, and brown adipose tissues from the epididymal, inguinal, and scapular regions were collected. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) was used to detect the composition and content of bile acids in serum and feces of rats. WB and qPCR were used to detect the expression of FXR, Wnt family member 10b

[基金项目] 2021年度“科技创新行动计划”扬帆计划项目(No. 21YF1444400);2024年虹口区卫健委中医药科研课题(No. HKZYY-2024-24);虹口区第二轮“国医强优”三年行动计划(2022-2024)(No. HKGYQYXM-2022-10);上海市虹口区卫生健康委员会中医药科研课题(No. HKQGYQY-ZYY-2022-17);2019年上海市中西医结合医院科研课题(No. 中西医18-01-02);上海中医药大学预算内项目(No. 2019LK048)

[作者简介] 冯思棋(1997—),女,硕士生,主要从事中西医结合治疗恶性肿瘤研究。E-mail: fengsiqi746746@163.com

[通信作者] 吴婷婷, E-mail: wtt6683@126.com

(Wnt10b), β -catenin, and uncoupling protein 1 (UCP-1) in the ileum, brown adipose, and white adipose tissues of rats. **Results:** Compared with the blank control group, the body mass of the rats in the model group was significantly reduced ($P < 0.01$); compared with the model control group, the body mass of the rats in CDCA, BSJP and BSJP + CDCA groups all increased ($P < 0.01$). Compared with the blank control group, the epididymal, inguinal, scapular, and total brown adipose tissue mass were all elevated in the model control group (all $P < 0.05$); compared with the model control group, the brown fat mass in the inguinal and epididymis regions of the rats decreased significantly in all treatment groups ($P < 0.05$), but this decrease was not significant in the scapular region ($P > 0.05$); besides, the total brown fat mass decreased notably in all treatment groups compared to the model control group (all $P < 0.01$). LC-MS analysis showed that the composition and content of bile acids in the serum and feces of rats were altered in all groups. qPCR and WB results confirmed that, compared to the model group, BSJP and BSJP + CDCA promoted the mRNA and protein expression of FXR in the ileum, brown adipose, and white adipose tissues of rats (all $P < 0.05$), and decreased the mRNA and protein expression of Wnt10b, β -catenin, UCP-1 (all $P < 0.05$). **Conclusion:** The BSJP formula can inhibit hepatocellular carcinoma cell AH-130-induced cachexia in rats, alleviating the associated body weight loss and brown adipose tissue formation. The mechanism may involve the regulation of FXR and the inhibition of the expression of Wnt10b, β -catenin, and UCP-1 in brown adipose tissue through the Wnt signaling pathway.

[Key words] cancer cachexia (CC); hepatocellular carcinoma; Bushen Jianpi formula (BSJP); farnesoid X receptor (FXR); brown adipose tissue

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(12): 1204-1210. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.12.005]

癌性恶病质(cancer cachexia, CC)是晚期恶性肿瘤患者所面临的一种具有毁灭性的复杂并发症^[1],其发病率高达60%~80%^[2],是肿瘤治疗的不良预后因子。骨骼肌萎缩是CC的必要条件,而脂肪丢失发生于肌肉萎缩之前^[3]。“白色脂肪棕色变”是脂肪丢失的主要原因之一,即存储能量的白色脂肪转化为消耗能量的米色/棕色脂肪,米色/棕色脂肪细胞通过线粒体解偶联蛋白-1(uncoupling protein-1, UCP-1)^[4]介导的解偶联进行非战栗性产热,进而消耗能量,导致体重减轻^[5],因此UCP-1是脂肪棕色变的促进基因之一^[6]。研究发现,法尼醇X受体(farnesoid X receptor, FXR)在前体或成熟的白色脂肪细胞中高表达^[7],且与体重指数呈正相关,而Wnt/ β -catenin信号通路与FXR和脂肪棕色变密切相关^[8]。CC可归于中医“虚劳”范畴^[9]。补肾健脾方(Bushen Jianpi formula, BSJP)由健脾四君子汤合补肾六味地黄丸化裁而成,全方补中有泻,凉中有温,涩中有渗,阴阳平调,共奏补肾健脾之功。课题组前期研究^[10]表明,BSJP能够显著改善晚期肝癌小鼠的CC状态,并调节胆汁酸代谢,而胆汁酸代谢与CC相关^[11]。基于此,本研究从BSJP法着手,探究其治疗CC的机制或许为有效控制CC提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、动物、中药及主要试剂

吉田AH-130肝癌细胞购自ATCC细胞库。SPF级、雄性、7周龄、体质量(200±20)g的Wistar大鼠购于中国科学院上海实验动物中心清洁级动物室,实验动物合格证号为SYXK(沪)2022-0009,饲养于室温(22±2)℃、湿度45%~55%和自然昼夜节律光

照的环境中,予以大鼠标准颗粒饲料喂养,自由饮水。动物实验已获得上海中医药大学动物伦理委员会批准(动物伦理批件号:PZSHUTCM200628008)。

中药BSJP颗粒剂购自江阴天江药业有限公司,FXR激动剂鹅去氧胆酸(chenodeoxycholic acid, CDCA)购于美国MCE公司。RIPA裂解液(P0013E)、BCA蛋白定量试剂盒(WB2123)购自上海碧云天生物技术有限公司,SDS-PAGE凝胶配置试剂盒(WB0130)、一抗稀释液(WB0158)、二抗稀释液(WB0159)、快速封闭液(WB6014)购自上海威奥生物技术有限公司,FXR(12295S)、GAPDH(D16H111)购自美国CST公司,Wnt10b(ab70816)、 β -catenin(ab32572)、UCP-1(ab234430)购自英国Abcam公司,HRP标记抗兔/抗小鼠二抗购自Jackson公司,TRIzol购自Invitrogen公司,RT试剂盒(RR036A)、Sybr Green(RR420A)购自TaKaRa公司,PCR引物由上海英潍捷基贸易有限公司合成。

1.2 肝癌CC大鼠模型的构建

参照文献[12]的方法制备肝癌CC大鼠模型。复苏AH-130细胞,使用含10%FBS、100 mg/L链霉素和 1×10^5 U/L青霉素的改良型RPMI 1640培养液,置于5% CO₂、37℃培养箱中培养。细胞汇合度达70%~80%时,使用胰蛋白酶消化1~2 min,用0.9%生理盐水配成 1×10^8 个/mL的细胞悬液,实验组每只大鼠腹腔注射1 mL细胞悬液,共16只大鼠;对照组非荷瘤大鼠腹腔注射等剂量生理盐水,共4只大鼠。

1.3 实验分组及药物治疗

造模后1 d开始给药。实验分为空白对照组、模型对照组、CDCA组、BSJP组和BSJP + CDCA组,每组4只大鼠。空白对照组和模型对照组:等量生理盐

水灌胃; CDCA组: CDCA (100 mg/kg^[13])灌胃; BSJP组: BSJP颗粒剂(根据120 g/60 kg临床用药剂量^[10]换算成大鼠用药剂量: 1.26 mg/mL)灌胃; BSJP + CDCA组: BSJP颗粒剂(1.26 g/mL) + CDCA (100 mg/kg)。每日1次, 2 mL/次, 连续给药16 d。

1.4 大鼠体质量测定及血清、粪便及棕色脂肪收集

每周固定时间称量大鼠体质量, 按照文献[14]的公式“体质量增长率=(D16体质量 - D0体质量)/D0体质量”计算体质量增长率。实验结束后, 大鼠禁食、不禁水过夜, 腹腔注射戊巴比妥钠(20 mg/kg)麻醉后开腹, 取腹主动脉血、粪便和附睾、腹股沟和肩胛区的棕色脂肪组织。

1.5 液相色谱-质谱法(LC-MS)分析大鼠血清和粪便中胆汁酸的组分及含量

分别吸取大鼠血清和粪便样品上清液, 按照LC-MS法分析血清和粪便中胆汁酸的组分及含量。色谱柱: Waters ACQUITY UPLC® BEH C18 column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 流动相A: 5 mmol/L 醋酸铵 + 0.1% 甲酸水溶液; 流动相B: 质谱乙腈, 流速: 300 μL/min, 样品进样量: 5 μL。

1.6 qPCR法检测大鼠空肠及脂肪组织中FXR、Wnt10b、β-catenin、UCP-1 mRNA的表达

将组织剪成细小碎片, 加入适量TRIzol试剂提取组织中总RNA, 根据逆转录试剂盒说明将其逆转录为cDNA, 进行qPCR法检测。PCR引物序列: FXR上游引物为5'-CACGAAGACTCCCTCACAGT-3', 下游引物为5'-CATCCGAACCTTAGCCAGCC-3'; Wnt10b上游引物为5'-CCTGACTTCTGTGAGCGAG A-3', 下游引物为5'-ATCACACAGCACGTAACAGC-3'; β-catenin上游引物为5'-ACTGTTCTACGCCATC ACCA-3', 下游引物为5'-ACCACTGGCCAGAATGATGA-3'; UCP1上游引物为5'-AAGTCCGCCTTCAGATCCAA-3', 下游引物为5'-CTGATTTGCCTCTGGATGCC-3'; β-actin上游引物为5'-AGCCATGTA CGTAGCCATCC-3', 下游引物为5'-ACCCTCAT AGATGGGCACAG-3'。PCR反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 3 s, 60 °C 30 s, 共40个循环。按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$

法计算目的基因mRNA的相对表达量。

1.7 WB法检测大鼠空肠和棕色脂肪组织中FXR、Wnt10b、β-catenin、UCP-1蛋白的表达

将组织剪切成碎片, 加入RIPA裂解液混合均匀, 冰上裂解30 min。以 $15\ 294 \times g$ 离心5 min后, 取上清液, 用BCA法测定蛋白浓度。制备5%浓缩胶5 mL, 加5 μL TEMED和50 μL 10% SDS, 每孔加入40 μg上样液进行电泳, 然后将蛋白质转移至PVDF膜上, 在快速封闭液中封闭25 min。加入稀释比例均为1:1 000的FXR、Wnt10b、β-catenin、UCP-1和GAPDH一抗, 4 °C摇床上处理过夜。次日, 加入羊抗兔二抗(1:10 000)室温中处理2 h。TBST洗膜3次(10 min/次), 加入化学发光检测试剂(试剂A: 试剂B = 1:1)显影后扫描图像, 用Image J软件分析蛋白质条带的灰度值, 以目的蛋白质条带灰度值/GAPDH灰度值反映蛋白质的相对表达量。

1.8 统计学处理

使用SPSS24.0统计软件进行数据处理。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间数据比较采用 t 检验, 多组间数据比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

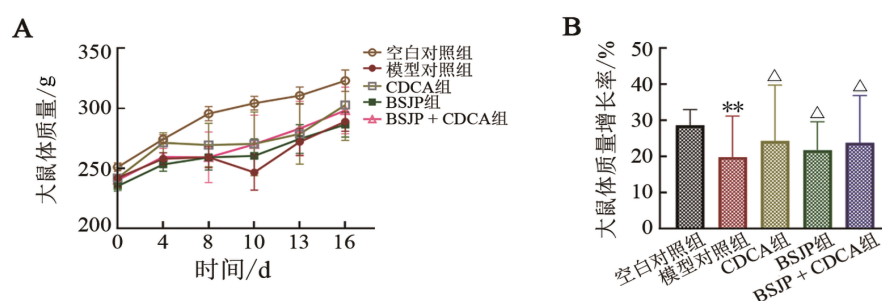
2.1 BSJP改善CC大鼠体质量下降

成功构建肝癌CC大鼠模型。由表1、图1可知, 与空白对照组相比, 模型对照组大鼠的体质量明显下降($P < 0.01$), 表明CC模型造模成功(图1A); 与模型对照组相比, CDCA、BSJP + CDCA组大鼠体质量均有所升高(均 $P < 0.05$), 其中CDCA可明显改善CC大鼠体质量下降, 表明激活FXR能减轻CC导致的体质量下降。分析大鼠体质量增长率(图1B)显示, 与模型对照组相比, BSJP治疗后大鼠体质量有所增加, 联合CDCA后大鼠体质量进一步升高(均 $P < 0.05$), 表明中药BSJP与FXR激动剂CDCA具有协同作用, 联合使用可改善肝癌CC导致的大鼠体质量下降。

表1 BSJP和CDCA对CC大鼠的体质量影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

时间/d	空白对照组	模型对照组	CDCA组	BSJP组	BSJP + CDCA组
0	250.90 ± 3.49	241.90 ± 7.11	241.90 ± 8.71	235.20 ± 4.16	240.23 ± 3.05
4	274.13 ± 3.85	257.95 ± 5.04	271.15 ± 8.28	253.20 ± 5.61	259.43 ± 7.13
8	295.40 ± 5.89	259.18 ± 8.74	269.35 ± 18.09	259.10 ± 10.57	259.10 ± 21.06
10	304.10 ± 5.72	246.55 ± 14.75	270.30 ± 26.54	260.25 ± 14.18	269.90 ± 24.24
13	310.43 ± 7.18	271.95 ± 11.16	278.58 ± 25.17	274.38 ± 11.89	283.00 ± 22.69
16	322.80 ± 8.87	288.78 ± 8.03**	302.53 ± 29.29 [△]	286.33 ± 10.37	298.05 ± 19.38 [△]

与空白对照组相比, ** $P < 0.01$; 与模型对照组相比, [△] $P < 0.05$ 。



与空白对照组相比, ** $P < 0.01$; 与模型对照组相比, $\Delta P < 0.05$ 。

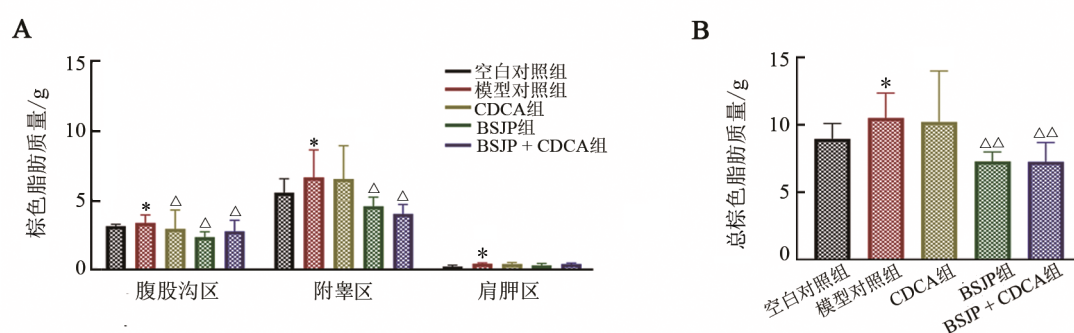
图1 BSJP和CDCA对CC大鼠体重(A)及其增长率(B)的影响

2.2 BSJP抑制CC大鼠腹股沟、附睾及肩胛部棕色脂肪的形成

与空白对照组相比,模型对照组附睾、腹股沟和肩胛区域的棕色脂肪质量均增加(图2A, 均 $P < 0.05$),说明CC会促进棕色脂肪的形成。与模型对照组相比,各治疗组大鼠腹股沟区棕色脂肪的形成减少(均 $P < 0.05$);BSJP组、BSJP + CDCA组附睾区棕色脂肪形成减少(均 $P < 0.05$);CDCA组、BSJP组肩胛区棕色脂肪形成减少(均 $P > 0.05$)。BSJP治疗后各区棕色脂肪形成均明显减少,说明BSJP对棕色脂肪形成

存在抑制作用,附睾区联合用药后棕色脂肪形成进一步减少,表明CDCA与BSJP存在协同作用,可明显抑制棕色脂肪的形成。

与空白对照组相比,模型对照组总棕色脂肪形成明显增多(图2B, $P < 0.05$),说明CC会促进大鼠总棕色脂肪的形成。与模型对照组相比,各治疗组大鼠总棕色脂肪总量均下降,其中BSJP组和BSJP + CDCA组总棕色脂肪形成显著下降($P < 0.01$),说明BSJP和BSJP + CDCA均可明显抑制CC导致的棕色脂肪形成。



A: 各组大鼠腹股沟、附睾、肩胛各区棕色脂肪质量; B: 各组大鼠三区总棕色脂肪质量。与空白对照组相比, * $P < 0.05$; 与模型对照组相比, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

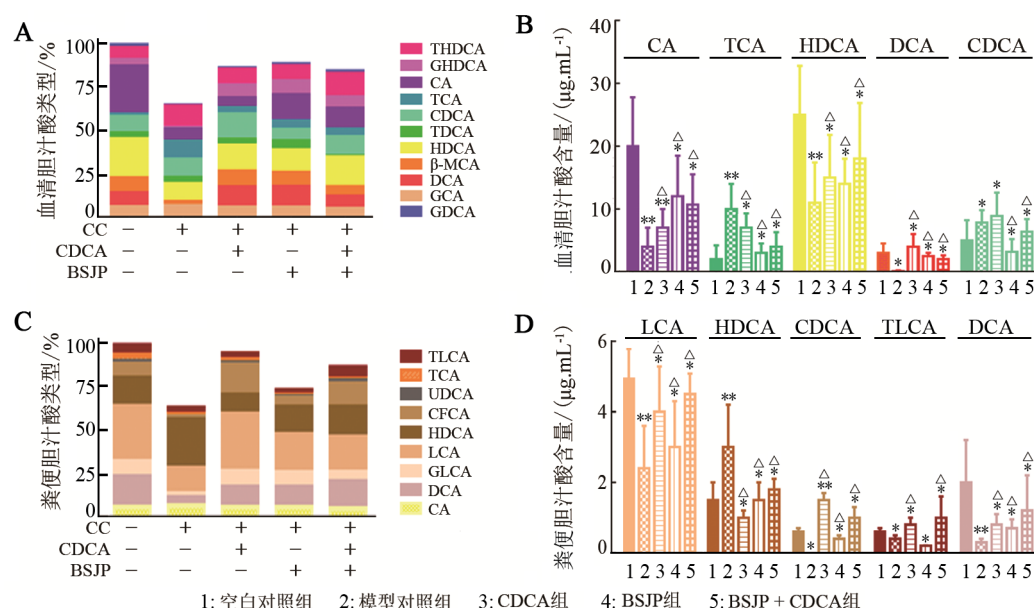
图2 BSJP和CDCA对各组CC大鼠腹股沟、附睾及肩胛区和总棕色脂肪质量的影响

2.3 BSJP可明显改善CC大鼠模型体内胆汁酸的合成及代谢

LC-MS分析结果(图3A、B)显示,与空白对照组相比,模型对照组CC大鼠血清中胆酸(cholic acid, CA)、猪去氧胆酸(deoxycholic acid, HDCA)、去氢胆酸(dehydrocholic acid, DCA)血清含量均有所下降,而牛磺胆酸(taurine cholic acid, TCA)、鹅脱氧胆酸(chenodeoxycholic acid, CDCA)含量均升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型对照组相比,各治疗组CA、HDCA、DCA均有所上升,除CDCA组CDCA升高外,其余治疗组TCA、CDCA均下降,其中,BSJP组及BSJP + CDCA组作用明显,说明BSJP及CDCA药物对血清中各类胆汁酸含量具有调节作用。

图3C、D显示,与空白对照组相比,石胆酸(lithocholic acid, LCA)、CDCA、牛磺石胆酸(taurocholic acid, TLCA)、DCA在粪便中含量均下降,而HDCA含量明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型对照组相比,除BSJP组TLCA降低外,其余各治疗组的LCA、CDCA、TLCA、DCA在粪便中含量均升高,而HDCA含量均下降。

以上实验结果提示,不同胆汁酸类型可能是与CC疾病密切相关的代谢标志物。CC模型使大鼠胆汁酸合成及代谢发生变化,而BSJP和CDCA药物均可改善CC模型大鼠对胆汁酸合成及代谢的影响,进而调节肝肠循环中的胆汁酸吸收及代谢水平。



A、B: 大鼠血清中胆汁酸的类型(A)和含量(B); C、D: 大鼠粪便中胆汁酸的类型(A)和含量(B)。THDCA: 牛磺猪去氧胆酸(taurodeoxycholic acid); GHDCA: 甘氨酸猪去氧胆酸(glycohyodeoxycholic acid); TDCA: 牛磺脱氧胆酸(taurodeoxycholic acid); β-MCA: β-鼠胆酸(β-muricholic acid); GCA: 甘氨酸胆酸(glycocholic acid); GDCA: 甘氨酸鹅脱氧胆酸(glycochenodeoxycholic acid); UDCA: 熊脱氧胆酸(ursodeoxycholic acid); GLCA: 甘氨酸石胆酸(glycolithocholic acid)。与空白对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型对照组相比, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图3 BSJP和CDCA对各组CC大鼠血清和粪便中胆汁酸组成及含量

2.4 BSJP可促进大鼠空肠组织中FXR mRNA和蛋白的表达

qPCR法检测结果(图4A)显示, 与空白组对照相比, CDCA组、BSJP + CDCA组大鼠空肠组织中FXR mRNA表达均升高差异无统计学意义(均 $P > 0.05$); 与模型对照组相比, BSJP + CDCA组大鼠空肠组织中FXR mRNA表达升高($P < 0.05$), 说明BSJP + CDCA药物对空肠组织中FXR mRNA的表达具有促进作用。WB法检测结果(图4B)显示, 与空白对照组相比, 模型对照组空肠组织中FXR蛋白表达降低($P < 0.05$); 与模型对照组相比, BSJP + CDCA组空肠组织中FXR蛋白的表达升高($P < 0.05$)。结果表明, BSJP可以与FXR激动剂CDCA产生协同作用, 共同促进FXR mRNA和蛋白的表达。

2.5 BSJP可上调CC大鼠棕色脂肪组织中FXR表达并下调Wnt10b、β-catenin、UCP-1 mRNA和蛋白的表达

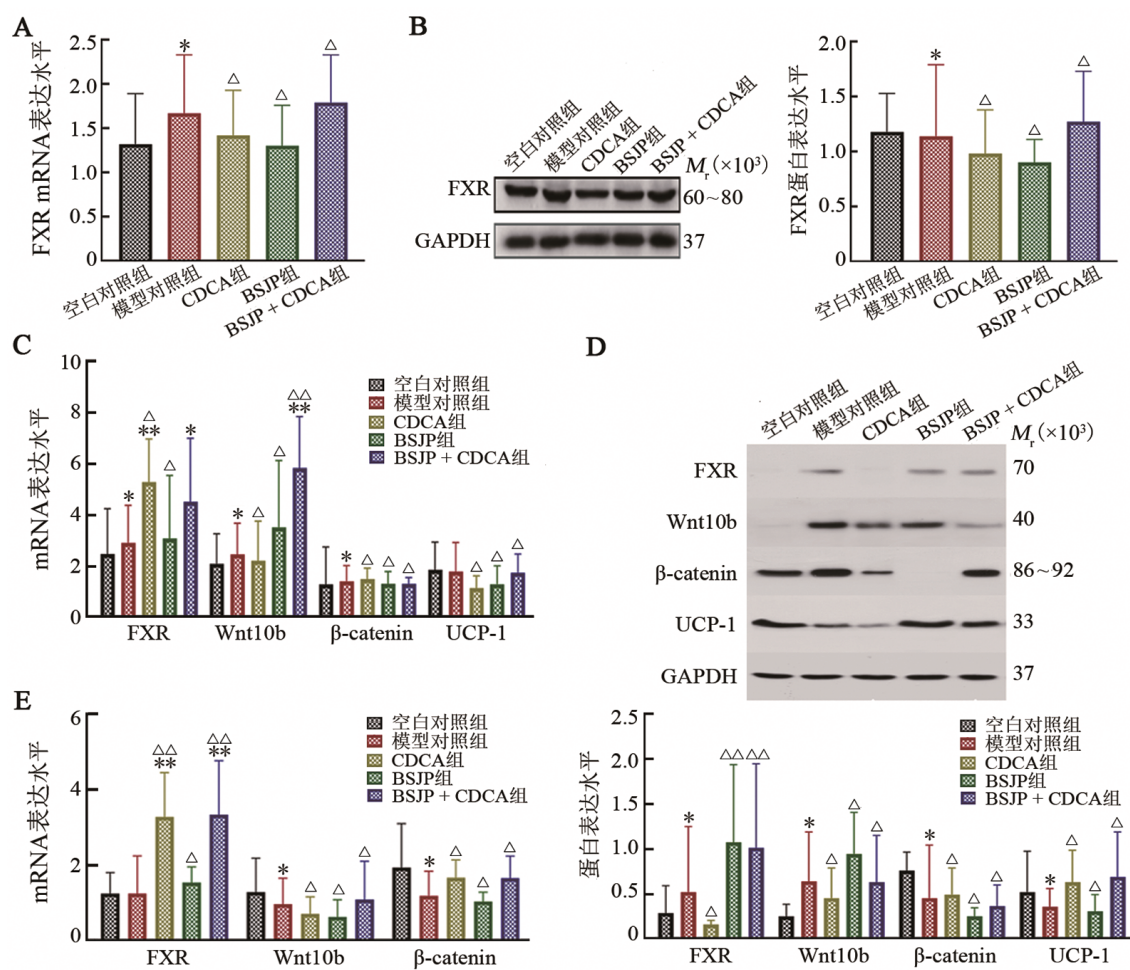
qPCR法检测结果(图4C)显示, 与空白对照组相比, CDCA组、BSJP + CDCA组大鼠棕色脂肪组织中FXR mRNA表达均升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 模型对照组Wnt10b、β-catenin mRNA表达均升高(均 $P < 0.05$); 与模型对照组相比, 各治疗组FXR mRNA的表达均上调, 其中CDCA组、BSJP + CDCA组上调显著(均 $P < 0.05$); CDCA组Wnt10b mRNA表达降低; BSJP组、BSJP + CDCA组β-catenin mRNA表达

降低(均 $P < 0.05$); UCP-1 mRNA在各治疗组中表达均下降(均 $P < 0.05$), 其中CDCA组下降最为明显。结果说明, BSJP及CDCA对大鼠棕色脂肪组织中Wnt/β-catenin信号通路可能存在一定的抑制作用, 且可能是通过提高FXR mRNA表达实现的。

WB法检测结果(图4D)显示, 与空白对照组相比, 模型对照组Wnt10b蛋白表达明显升高($P < 0.05$)。与模型对照组相比, BSJP组、BSJP + CDCA组FXR蛋白表达明显升高及β-catenin蛋白表达下降(均 $P < 0.05$); CDCA组Wnt10b蛋白表达下降; BSJP组UCP-1蛋白表达下降($P < 0.05$)。结果表明, BSJP和CDCA均可上调CC大鼠棕色脂肪组织中FXR的表达, 并对Wnt/β-catenin信号通路相关蛋白存在抑制作用。

2.6 BSJP能促进CC大鼠白色脂肪组织中FXR mRNA表达并下调Wnt10b、β-catenin mRNA的表达

qPCR法检测结果(图4E)显示, 与空白对照组相比, 模型对照组大鼠白色脂肪组织中FXR mRNA的表达变化不明显; 与模型对照组相比, 各治疗组FXR mRNA表达均上升, 其中CDCA组和BSJP + CDCA组显著升高(均 $P < 0.01$)。此外, 与模型对照组相比, CDCA组和BSJP组Wnt10b mRNA的表达下降(均 $P < 0.05$); BSJP组β-catenin mRNA的表达下降($P < 0.05$)。结果进一步说明, BSJP也能促进白色脂肪组织中FXR mRNA的表达, 并可抑制Wnt/β-catenin信号通路中相关基因的表达。



A、B: 大鼠空肠组织中FXR、Wnt10b、β-catenin、UCP-1 mRNA(A)和蛋白(B)表达; C、D: 大鼠棕色脂肪中FXR、Wnt10b、β-catenin、UCP-1 mRNA(C)和蛋白(D)表达; E: 大鼠白色脂肪组织中FXR、Wnt10b、β-catenin mRNA表达。与空白对照相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型对照组相比, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图4 BSJP和CDCA对CC大鼠空肠、棕色及白色脂肪组织中FXR、Wnt10b、β-catenin mRNA和蛋白表达的影响

3 讨论

CC以持续的骨骼肌和脂肪丢失为特征,常规的营养支持不足以缓解病情进展,是患者不良预后或死亡的主要原因^[15]。CC是机体对癌症所引发的慢性炎症反应的一种表现,它通过调节多种炎症介质的表达以及白色脂肪的稳态来发挥作用。白色脂肪组织棕色化在CC中广泛存在并发挥重要作用,是造成CC脂质代谢紊乱的原因之一^[16]。在不同类型肿瘤的CC环境下,白色脂肪减少而棕色脂肪组织含量显著增多且具有明显的活性是肿瘤细胞持续生长并导致机体能量负平衡进而引起消瘦的主要原因^[17]。因此,脂肪棕色变是导致CC的关键病理改变之一^[18]。

胆汁酸参与机体脂肪代谢,血液中胆汁酸含量升高导致的适应性产热可能与白色脂肪棕色变有关,FXR作为胆汁酸的核受体在脂肪棕色变中的作用机制与上调UCP-1有关^[19]。研究^[20]显示,敲除FXR基因后,小鼠脂肪组织中UCP-1含量明显增多,提示

FXR可抑制脂肪棕色变。Wnt/β-catenin信号通路在众多肿瘤中均被激活^[21],为前体脂肪细胞的增殖和分化为白色及棕色脂肪细胞提供了有利条件,进而促进了这些细胞的活化。

“土为万物之母,诸脏腑百骸受气于脾胃而后能强。”脾胃为后天之本,肾主藏精生髓,内藏人体精元。CC日久耗散精元,因此治疗CC宜补肾健脾^[22],但目前采用补肾健脾法治疗CC的研究多停留于临床观察阶段^[23],鲜有相关的机制研究,且多为健脾为主^[24-25]。研究^[26]发现,补肾健脾法被认为是“虚劳”的治疗大法,本研究的BSJP由六味地黄丸化裁而成,包括:党参、白术、泽泻、熟地黄、吴茱萸、山药、茯苓等药物,具有良好的补益肾精、健脾益气的功效。

本研究探讨了BSJP调控FXR抑制肝癌CC及Wnt/β-catenin信号通路激活导致的棕色脂肪形成。研究结果表明,肝癌CC模型会明显降低大鼠体质量并增加棕色脂肪形成,予以FXR激动剂CDCA和BSJP治疗后改善了大鼠体质量降低并抑制棕色脂肪

的形成。LC-MS 检测结果显示,在 CC 大鼠血清及粪便中胆汁酸的组成及含量均发生明显的改变;此外, WB、qPCR 法检测结果显示,BSJP 和 CDCA 药物均可促进肝癌 CC 大鼠空肠及棕色脂肪组织中 FXR 的表达,抑制 Wnt10b、 β -catenin、UCP-1 的表达。

综上所述,胆汁酸核受体 FXR 参与了脂肪棕色变,其内在机制可能与其调控脂肪细胞 Wnt/ β -catenin 通路信号转导有关,而 BSJP 则可通过调节 FXR/Wnt/ β -catenin 信号通路减少肝癌 CC 大鼠空肠及棕色脂肪组织中相关蛋白表达,进而缓解大鼠体质量下降及抑制棕色脂肪形成,实现缓解 CC 进展。

参考文献

- [1] BARTON M K. Cancer cachexia awareness, diagnosis, and treatment are lacking among oncology providers[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(2): 91-92. DOI: 10.3322/caac.21364.
- [2] 吴海涛,王畅,李薇. 肿瘤恶液质的诊治[J]. 肿瘤代谢与营养电子杂志, 2018, 5(3): 231-235. DOI: 10.16689/j.cnki.cn11-9349/r.2018.03.004.
- [3] 刘汇泉,于世英. 肿瘤恶液质发病机制和临床诊疗的研究进展[J]. 临床肿瘤学杂志, 2018, 23(7): 648-654. DOI: 10.3969/j.issn.1009-0460.2018.07.015.
- [4] BARTELT A, HEEREN J. Adipose tissue browning and metabolic health[J]. Nat Rev Endocrinol, 2014, 10(1): 24-36. DOI: 10.1038/nrendo.2013.204.
- [5] 刘洋. 血清 PTHrP 与肿瘤恶液质关系研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘(连续型电子期刊), 2018, 18(55): 64-65. DOI: 10.19613/j.cnki.1671-3141.2018.55.026.
- [6] PEIXOTO Á S, MORENO M F, CASTRO É, *et al.* Hepatocellular carcinoma induced by hepatocyte Pten deletion reduces BAT UCP-1 and thermogenic capacity in mice, despite increasing serum FGF-21 and iWAT browning[J/OL]. J Physiol Biochem, 2023, 79(4): 731-743 [2024-07-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/7001558/>. DOI: 10.1007/s13105-023-00970-4.
- [7] SCHMID A, SCHLEGEL J, THOMALLA M, *et al.* Evidence of functional bile acid signaling pathways in adipocytes[J]. Mol Cell Endocrinol, 2019, 483: 1-10. DOI: 10.1016/j.mce.2018.12.006.
- [8] KAJABADI N, LOW M, JACQUES E, *et al.* Activation of β -catenin in mesenchymal progenitors leads to muscle mass loss[J]. Dev Cell, 2023, 58(6): 489-505.e7. DOI: 10.1016/j.devcel.2023.02.009.
- [9] 曲一玮,李晓,王怀哲,等. 基于“虚则卫气不足,劳则营气竭”论恶液质的中医防治[J]. 中国中医基础医学杂志, 2023, 29(12): 2001-2004. DOI: 10.19945/j.cnki.issn.1006-3250.2023.12.021.
- [10] 吴婷婷,吴伟忠,高东梅,等. 补肾健脾方抑制裸鼠高转移原位肝癌切除术后肿瘤复发以及对索拉非尼的增效减毒作用[J]. 上海中医药杂志, 2015, 49(9): 63-66, 76. DOI: 10.16305/j.1007-1334.2015.09.022.
- [11] FENG L X, ZHANG W L, SHEN Q, *et al.* Bile acid metabolism dysregulation associates with cancer cachexia: roles of liver and gut microbiome[J/OL]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2021, 12(6): 1553-1569[2024-07-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8718071/>. DOI: 10.1002/jcsm.12798.
- [12] MUSOLINO V, PALUS S, TSCHIRNER A, *et al.* Megestrol acetate improves cardiac function in a model of cancer cachexia-induced cardiomyopathy by autophagic modulation[J/OL]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2016, 7(5): 555-566[2024-07-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4864048/>. DOI: 10.1002/jcsm.12116.
- [13] 李鹏飞,蒋玲,候鹏飞,等. 鹅去氧胆酸通过 FXR 调控高脂饮食诱导小鼠肠道 GLP-1 表达水平改善胰岛素抵抗的作用[J]. 陆军军医大学学报, 2024, 46(09): 952-61. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202309152.
- [14] 韦华妮,姜婷,彭娟,等. 补中益气汤通过 PINK1 途径调控骨骼肌线粒体稳态抗运动性疲劳[J]. 中国实验方剂学杂志: 1-10. DOI: 10.13422/j.cnki.syfx.20241840.
- [15] 韩军,萨思进,吴国豪. 癌性恶病质脂肪丢失的分子机制研究进展[J]. 肠外与肠内营养, 2022, 29(1): 51-56. DOI: 10.16151/j.1007-810x.2022.01.010.
- [16] JOSHI M, PATEL B M. The burning furnace: alteration in lipid metabolism in cancer-associated cachexia[J]. Mol Cell Biochem, 2022, 477(6): 1709-1723. DOI: 10.1007/s11010-022-04398-0.
- [17] RICHARD D, PICARD F. Brown fat biology and thermogenesis[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2011, 16(4): 1233-1260. DOI: 10.2741/3786.
- [18] KIR S, SPIEGELMAN B M. Cachexia & brown fat: a burning issue in cancer[J]. Trends Cancer, 2016, 2(9): 461-463. DOI: 10.1016/j.trecan.2016.07.005.
- [19] SASAKI T, KUBOYAMA A, MITA M, *et al.* The exercise-inducible bile acid receptor Tgr5 improves skeletal muscle function in mice[J/OL]. J Biol Chem, 2018, 293(26): 10322-10332[2024-07-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6028981/>. DOI: 10.1074/jbc.RA118.002733.
- [20] SUN L L, XIE C, WANG G, *et al.* Gut microbiota and intestinal FXR mediate the clinical benefits of metformin[J/OL]. Nat Med, 2018, 24(12): 1919-1929[2024-07-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6479226/>. DOI: 10.1038/s41591-018-0222-4.
- [21] 于方媛,刘丽. 靶向 Wnt/ β -catenin 信号通路治疗宫颈癌的研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2024, 31(9): 931-936. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.09.013.
- [22] 吉兆奕,朱健,朱晓云,等. 健脾益肾方对肺癌恶病质模型小鼠肌肉消耗及生存期的影响及机制研究[J]. 北京中医药, 2023, 42(11): 1212-1218. DOI: 10.16025/j.1674-1307.2023.11.011.
- [23] 陈亮. 健脾益肾方联合甲地孕酮治疗消化系统肿瘤恶病质的临床观察[J]. 中国继续医学教育, 2016, 8(3): 189-190. DOI: 10.3969/j.issn.1674-9308.2016.03.135.
- [24] 李斌,干润,杨全军,等. 中医不同治法方药对 CT26 结肠腺癌诱导小鼠恶病质肌肉萎缩的影响[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(5): 1696-1700.
- [25] 徐玲,张学进,杨国良. 四君子汤对癌性恶病质小鼠血清细胞因子的影响[J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(4): 907-910. DOI: 10.13193/j.issn.1673-7717.2015.04.045.
- [26] 赵朝庭,王静,何舟. 中医治疗癌性厌食恶病质综合征的临床研究进展[J]. 广西医科大学学报, 2018, 35(8): 1162-1165. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2018.08.033.

[收稿日期] 2024-07-08

[修回日期] 2024-12-14

[本文编辑] 党瑞山