参芪固本方调控IL-17信号通路改善癌因性疲乏的作用机制Δ

李　鑫[1*]，方崇锴[2]，黄　越[3,4]，李要轩[3,4]，黄海福[3,4]，吴先林[3]，CHEN Zhesheng[5]，李　萌[3,4#]（1.广州中医药大学深圳医院（福田）治未病中心，广东 深圳　518034；2.广州中医药大学科技创新中心，广州　510405；3.深圳市中医肿瘤医学中心，广东 深圳　518034；4.广州中医药大学深圳医院（福田）肿瘤科，广东 深圳　518034；5.圣约翰大学，美国 纽约　11439）

中图分类号　R965；R285　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2025）14-1722-08
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2025.14.06

摘　要　目的　基于网络药理学和细胞实验探讨参芪固本方改善癌因性疲乏（CRF）的作用机制。**方法**　基于TCMSP等数据库挖掘参芪固本方活性成分及CRF相关靶点，并进行富集分析。采用白细胞介素17（IL-17）诱导A549细胞建立CRF细胞模型，使用低（1.0 mg/mL）、高质量浓度（1.5 mg/mL）参芪固本方干预，通过细胞划痕实验、流式细胞术、酶联免疫吸附测定、实时荧光定量聚合酶链式反应实验及Western blot等方法验证其对细胞活力、迁移、凋亡、炎症因子及其mRNA表达、凋亡相关蛋白和IL-17信号通路关键蛋白的影响。**结果**　共得到84个活性成分及209个CRF交集靶点，其中槲皮素、山柰酚和木犀草素等为核心活性成分，肿瘤蛋白p53、丝氨酸/苏氨酸激酶1、IL-6、肿瘤坏死因子（TNF）等为核心靶点，IL-17、TNF、磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B信号通路为关键通路。与IL-17干预组比较，IL-17+参芪固本方低、高质量浓度组细胞的迁移率，B淋巴细胞瘤2（Bcl-2）蛋白表达，上清液中IL-6、TNF-α水平，IL-17受体A（IL-17RA）、IL-6、TNF-α mRNA表达，IL-17RA、核因子κB p65亚基（p65）蛋白表达和磷酸化p65（p-p65）/p65比值均显著降低或下调（$P<0.05$）；凋亡率，Bcl-2相关X蛋白（Bax）、切割型胱天蛋白酶3蛋白表达、Bax/Bcl-2比值，磷酸化p38丝裂原活化的蛋白激酶（p-p38 MAPK）蛋白表达、p-p38 MAPK/p38 MAPK比值均显著升高或上调（$P<0.05$）；且高质量浓度组上述指标的改善大多优于低质量浓度组（$P<0.05$）。**结论**　参芪固本方可能通过调控IL-17信号通路、抑制炎症因子表达、激活p38 MAPK依赖的凋亡过程来改善CRF。

关键词　参芪固本方；网络药理学；癌因性疲乏；细胞实验

Mechanism of Shenqi guben formula in improving cancer-related fatigue by regulating IL-17 signaling pathway

LI Xin[1], FANG Chongkai[2], HUANG Yue[3,4], LI Yaoxuan[3,4], HUANG Haifu[3,4], WU Xianlin[3], CHEN Zhesheng[5], LI Meng[3,4]（1. Preventive Treatment of Disease Center, Shenzhen Hospital (Futian) of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangdong Shenzhen 518034, China; 2. Science and Technology Innovation Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 3. Shenzhen Traditional Chinese Medicine Oncology Medical Center, Guangdong Shenzhen 518034, China; 4. Dept. of Oncology, Shenzhen Hospital (Futian) of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangdong Shenzhen 518034, China; 5. St. John's University, New York 11439, USA）

ABSTRACT　OBJECTIVE To explore the mechanism of Shenqi guben formula (SQGB) in improving cancer-related fatigue (CRF) based on network pharmacology and cellular experiments. **METHODS** Active components of SQGB and CRF-related targets were identified on the basis of databases such as the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology platform. An *in vitro* CRF cell model was established by inducing A549 cells with interleukin-17 (IL-17). Cells were treated with low (1.0 mg/mL) or high (1.5 mg/mL) concentrations of SQGB. The effects on cell viability, migration, apoptosis, inflammatory factors, mRNA expression, apoptosis-related proteins and key proteins of IL-17 signaling pathway were evaluated using scratch assay, flow cytometry, ELISA, real-time fluorescent quantitative PCR and Western blot analysis. **RESULTS** SQGB contained 84 active components acting on 209 potential CRF targets. Among these, quercetin, kaempferol, and luteolin were identified as the core components of the compound. Core targets included

Δ **基金项目** 国家自然科学基金面上项目（No.82374536）；深圳市科技计划项目（No.JCYJ20230807120508018）；深圳市“医疗卫生三名工程”周岱翰国医大师中医肿瘤学团队项目（No.SZZYSM202311-011）；广州中医药大学校院联合科技创新基金-深圳医院基金立项项目（No.GZYFT2024Y10）；广州中医药大学深圳医院（福田）科研专项（No.GZYSY2024016）

* **第一作者** 主治医师，硕士。研究方向：中医药防治内科疾病。E-mail：511292381@qq.com

\# **通信作者** 主治医师，硕士。研究方向：中西医结合防治肿瘤相关疾病。E-mail：llhyy2021@163.com

tumor protein p53, AKT serine/threonine kinase 1, IL-6, and tumor necrosis factor (TNF). IL-17, TNF and phosphatidylinositol-3-kinase-serine/threonine protein kinase (PI3K/Akt) signaling pathways were identified as crucial pathways. Compared with IL-17 intervention group, the cell migration rate, B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) protein expression, the levels of IL-6 and TNF-α in the supernatant, mRNA expression of IL-17 receptor A (IL-17RA), TNF-α, and IL-6, as well as the protein expression of IL-17RA and nuclear factor kappa-B p65 subunit (p65), and phosphorylated (p)-p65/p65 ratio in IL-17+SQGB low- and high- quality concentration groups were all significantly decreased or down-regulation ($P<0.05$); the apoptosis rate, expression levels of Bcl-2 associated X protein (Bax) and cleaved caspase-3 protein, the ratio of Bax/Bcl-2, the expression level of p-p38 protein, and the p-p38/p38 ratio were all significantly increased or up-regulated ($P<0.05$). Moreover, the improvement effects of these indicators were mostly better in the high-quality concentration groups compared to the low-quality concentration groups ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** SQGB ameliorates CRF by regulating the IL-17 signaling pathway, inhibiting the expression of inflammatory factors, and activating p38 MAPK-dependent apoptosis pathway.

KEYWORDS Shenqi guben formula; network pharmacology; cancer-related fatigue; cellular experiments

癌因性疲乏(cancer-related fatigue,CRF)被定义为持续存在的、与活动量不匹配的疲乏感,是恶性肿瘤患者的常见症状之一[1]。CRF无法通过休息缓解,可影响患者的身心健康及日常功能。研究显示,20%～46%的恶性肿瘤患者会在治疗过程中或接受治疗后出现不同程度的CRF,且持续疲劳者的死亡风险比无疲劳者高2.56倍[2－3]。虽然CRF在恶性肿瘤患者中的高发性已得到学界广泛关注,但目前尚无特异性药物被批准用于治疗该病。已有研究者尝试使用抗炎药物、抗抑郁药物和兴奋剂来缓解CRF,但疗效不佳[4]。例如,抗炎药物虽然能够减少慢性炎症对疲乏的影响,但并未在所有患者中表现出显著疗效,且长期使用可能引发免疫抑制或其他不良反应[5]。

参芪固本方是国医大师周岱翰教授的临床经验方,由党参、黄芪、白术、茯苓等中药组成,具有健脾益肾、滋阴补阳的功效。该方已在临床广泛用于术后恢复、化疗及免疫治疗的恶性肿瘤患者[6－7]。本团队前期的临床观察研究显示,参芪固本方可降低CRF患者的炎症指标,改善其体力和生存质量(另文待发),但具体机制尚不明确。基于此,本研究拟通过网络药理学分析及细胞实验,初步揭示参芪固本方改善CRF的药效物质及作用机制,以期为该药的临床使用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括NanoDrop One/OneC型微量核酸蛋白浓度测定仪和QuantStudio 5型荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]、PowerPac Basic 164-5050型电泳仪和Mini Trans-Blot 170-3930型转印槽(美国Bio-Rad公司)、Synergy-HT型酶标仪(美国BioTek公司)、1300NovoCyte型流式细胞仪(美国ACEA Biosciences Inc.)、BDS400型倒置生物显微镜(重庆奥特光学仪器有限责任公司)、L3-5K型冷冻离心机(湖南可成仪器设备有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

参芪固本方冻干粉(1 g冻干粉相当于1 g生药,于4 ℃保存)由广州中医药大学深圳医院(福田)中药房自制。

青-链霉素溶液(100×,批号15140-122)、胎牛血清(批号10099-141)均购自美国Life Technologies公司;RPMI-1640培养基(批号C11875500BT)购自美国Gibco公司;CCK-8试剂盒(批号GH802)购自东仁化学科技(上海)有限公司;白细胞介素6(interleukin-6,IL-6)、肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)试剂盒(批号分别为CB10373-Hu、CB11762-Hu)均购自上海科艾博生物技术有限公司;重组人IL-17蛋白(纯度＞98%,批号ab9567)购自英国Abcam公司;Annexin Ⅴ-FITC/PI凋亡检测试剂盒(批号A211-01)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(兔抗,批号10494-1-AP)购自武汉三鹰生物技术有限公司;β-肌动蛋白(β-actin)抗体(批号AF7018)、IL-17受体A(IL-17 receptor A,IL-17RA)抗体(批号DF3602)、p38丝裂原活化的蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase,p38 MAPK)抗体(批号AF6456)、核因子κB p65亚基(nuclear factor kappa-B p65 subunit,p65)抗体(批号AF5006)、磷酸化p38 MAPK(phosphorylated p38 MAPK,p-p38 MAPK)抗体(批号AF4001)、磷酸化p65(phosphorylated p65,p-p65)抗体(批号AF2006)、B细胞淋巴瘤2(B-cell lymphoma 2,Bcl-2)抗体(批号BF9103)、Bcl-2关联X蛋白(Bcl-2 associated X protein,Bax)抗体(批号AF0120)、切割型胱天蛋白酶3(cleaved-caspase 3,cleaved-CASP3)抗体(批号AF7022)均购自美国Affinity Biosciences公司(以上一抗仅Bcl-2是鼠抗,其余均为兔抗);逆转录试剂(批号K1622)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;IRDye 680RD标记的山羊抗兔免疫球蛋白G二抗(批号925-68071)、IRDye 800CW标记的山羊抗小鼠免疫球蛋白G二抗(批号925-32210)均购自美国LI-COR公司;PCR所

用引物由生工生物工程（上海）股份有限公司设计、合成。

1.3 细胞

人A549肺癌细胞（批号FH0045）购自上海富衡生物科技有限公司。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 参芪固本方活性成分及CRF靶点获取

使用TCMSP数据库（https://tcmsp-e.com/），以口服生物利用度≥30%、类药性≥0.18为条件[8]，筛选得到参芪固本方的活性成分。通过TCMSP网站内置靶点预测功能获取活性成分对应靶点，将整理得到的靶点经UniProt数据库（https://www.uniprot.org/）校准得到标准化的基因名，即为参芪固本方的药物成分靶点。以“cancer-related fatigue”为关键词检索GeneCards数据库（https://www. genecards. org/）、OMIM数据库（https://www.omim.org/），得到CRF的相关靶点，剔除重复靶点，经UniProt数据库校正，得到疾病靶点。通过R 4.3.2软件对药物成分靶点与疾病靶点取交集，使用Cytoscape 3.7.2软件构建“药物-成分-作用靶点”网络。

2.1.2 蛋白-蛋白相互作用网络的构建

将交集靶点导入STRING数据库（https://string-db.org/），物种设置为“Homo sapiens”、最低相互作用阈值设置0.7，构建蛋白-蛋白相互作用（protein-protein interaction，PPI）网络图。将PPI网络图导入Cytoscape 3.7.2软件进行拓扑学分析，包括度值（degree）和相互作用评分（combined score），并以degree＞9为标准筛选核心靶点。

2.1.3 生物功能富集分析

将交集靶点导入DAVID数据库（https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp）进行基因本体（gene ontology，GO）功能、京都基因和基因组数据（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）通路富集分析。$P<0.01$表示差异有统计学意义。

2.2 细胞实验

2.2.1 IL-17作用于A549细胞的最佳浓度、时间筛选

采用CCK-8法检测。取A549细胞，接种于完全培养基，于37 ℃、5% CO_2条件下培养。取对数生长期细胞以5×10^3个/孔接种于96孔板中，培养24 h后，将其分为对照组[加入完全培养基（不含IL-17）100 μL]和给药组[分别加入含不同质量浓度IL-17（0、25、50、100、200 ng/mL）的完全培养基100 μL]。同时，设置不含细胞、不含药物的空白组。每组设置3个复孔。取各组细胞，分别培养24、48 h后，于避光条件下加入CCK-8试剂10 μL；继续培养2 h，使用酶标仪于450 nm波长处检测各孔的吸光度（A）值，计算细胞活力：细胞活力＝（$A_{实验组}-A_{空白组}$）/（$A_{对照组}-A_{空白组}$）。

2.2.2 参芪固本方干预剂量筛选

采用CCK-8法检测。取对数生长期细胞以5×10^3个/孔接种于96孔板中，培养24 h后，将其分为IL-17干预组[加入含有100 ng/mL IL-17（按“2.2.1”项下结果设置）、不含参芪固本方的完全培养基100 μL]和参芪固本方组[分别加入含100 ng/mL IL-17及不同质量浓度参芪固本方（0.50、0.75、1.00、1.25、1.50、1.75、2.00 mg/mL）的完全培养基100 μL]。同时，设置不含细胞、不含药物的空白组。每组设置3个复孔。培养48 h（按“2.2.1”项下结果设置）后，按“2.2.1”项下方法检测并计算细胞活力。

2.2.3 细胞迁移能力检测

采用细胞划痕实验进行检测。取对数生长期细胞以2×10^5个/孔接种于6孔板中，培养24 h后，使用无菌200 μL枪尖于单细胞层上垂直、均匀快速地划各孔细胞的培养皿底部，保持划痕宽度一致。之后将其分为对照组、IL-17干预组和IL-17+参芪固本方低、高质量浓度组（根据“2.2.2”项下结果，参芪固本方低、高质量浓度分别为1.0、1.5 mg/mL），每组设置3个复孔。于0、48 h时观察、拍照。使用Image J软件测量划痕宽度并计算细胞迁移率：细胞迁移率（%）＝（0 h初始面积－48 h终点面积）/0 h初始面积×100%。

2.2.4 细胞凋亡检测

采用流式细胞术检测。取对数生长期细胞以2×10^5个/孔接种于6孔板中，培养24 h后，按“2.2.3”项下方法分组、给药。培养48 h后，收集各组经不含乙二胺四乙酸胰酶消化的细胞，用磷酸盐缓冲液（PBS）冲洗后，以300×g离心5 min。加入染色缓冲液100 μL重悬细胞，加入Annexin Ⅴ-FITC染液和PI染色液各5 μL，于避光、室温下反应10 min，使用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.2.5 细胞上清液中IL-6、TNF-α水平检测

采用ELISA法检测。取对数生长期细胞以2×10^5个/孔接种于6孔板中，培养24 h后，按“2.2.3”项下方法分组、给药。培养48 h后，收集各组细胞的上清液，使用酶标仪检测其IL-6、TNF-α水平。严格按照相应试剂盒说明书操作。

2.2.6 细胞中IL-17 RA、IL-6、TNF-α mRNA表达检测

采用实时荧光定量PCR法进行检测。取对数生长期细胞以2×10^5个/孔接种于6孔板中，培养24 h后，按“2.2.3”项下方法分组、给药。培养48 h后，收集各组细胞，使用Trizol法提取总RNA。经检测浓度、纯度后，反转录为cDNA。以cDNA为模板进行PCR扩增。反应体系包括：2×SYBR Green Master Mix 10 μL，正、反向引物各0.4 μL（10 μmol/L），模版cDNA（100 ng/μL）2 μL，无核酸酶水7.2 μL。扩增条件如下：95 ℃预变性30 s；95 ℃变性5 s，60 ℃退火34 s，共循环40次。以GAPDH

作为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算各目标基因mRNA的相对表达量，结果以对照组为参照进行归一化处理。引物序列及产物长度见表1。

表1　引物序列及产物长度

基因	引物序列(5′→3′)	产物长度/bp
IL-17RA	正向:GCTTCACCCTGTGGAACGAAT	98
	反向:TATGTGGTGCATGTGCTCAAA	
IL-6	正向:ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG	149
	反向:CCATCTTTGGAAGGTTCAGGTTG	
TNF-α	正向:CCTCTCTCTAATCAGCCCTCTG	220
	反向:GAGGACCTGGGAGTAGATGAG	
GAPDH	正向:GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	197
	反向:GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG	

2.2.7　细胞中凋亡蛋白和IL-17信号通路关键蛋白表达检测

采用Western blot法检测细胞凋亡核心调控蛋白（Bax、Bcl-2、cleaved-CASP3）和IL-17信号通路关键调控蛋白（IL-17RA、p38 MAPK、p-p38 MAPK、p65、p-p65）的表达。取对数生长期细胞以2×10^5个/孔接种于6孔板中，培养24 h后，按“2.2.3”项下方法分组、给药。培养48 h后，收集各组细胞，提取总蛋白，经含量测定、变性处理后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并转移至聚偏氟乙烯膜上，以5%脱脂牛奶于室温下封闭1 h；洗膜后，加入相应一抗（IL-17RA、p38 MAPK、p65、p-p65、Bax、Bcl-2、cleaved-CASP3的稀释度均为1∶1 000，p-p38 MAPK的稀释度为1∶800，β-actin、GAPDH的稀释度均为1∶5 000），于4 ℃孵育过夜；洗膜后，加入相应二抗（稀释度为1∶10 000），于室温下孵育1 h；经曝光、成像后，使用Image J软件进行分析，以目的蛋白与内参（β-actin或GAPDH）的灰度值比值作为目的蛋白的表达水平。

2.3　统计学分析

所有实验独立重复3次。采用SPSS 26.0软件进行数据统计分析，采用GraphPad Prism 10.0软件绘图。满足正态分布的计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用方差分析，进一步两两比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3　结果

3.1　网络药理学分析结果

3.1.1　参芪固本方抗CRF的活性成分及靶点

初步检索获得黄芪活性成分17个、党参活性成分17个、茯苓活性成分6个、白术活性成分4个、淫羊藿活性成分23个、女贞子活性成分9个、五味子活性成分8个，药物作用靶点共238个；得到CRF相关靶点8 387、529个，去重后获得与CRF相关疾病靶点8 792个；将药物作用靶点与CRF相关疾病靶点取交集，获得参芪固本方治疗CRF的交集靶点209个。

3.1.2　参芪固本方抗CRF的核心活性成分预测

“药物-成分-靶点”网络中包括节点289个、边1 499条；通过分析degree值，筛选出排前5位的核心活性成分，分别为槲皮素、山柰酚、木犀草素、常春藤皂苷元、7-*O*-甲基-异微凸剑叶莎醇。

3.1.3　核心靶点及PPI网络

PPI网络中包括节点109个、边2 542条，获得10个核心靶点，分别为肿瘤蛋白p53（tumor protein p53，TP53）、丝氨酸/苏氨酸激酶1（AKT serine/threonine kinase 1，AKT1）、IL-6、IL-1β、表皮生长因子受体、TNF、原癌因子Jun、CASP3、原癌因子MYC、Bcl-2。

3.1.4　生物功能富集分析

GO功能富集分析共得到568个条目（$P<0.01$），其中生物学过程占411个条目，涉及信号转导、基因表达的正调控、凋亡过程的负调控等；细胞组分占57个条目，涉及细胞质、细胞核、等离子膜等；分子功能占100个条目，涉及蛋白质结合、酶结合、蛋白质同分异构活性等。

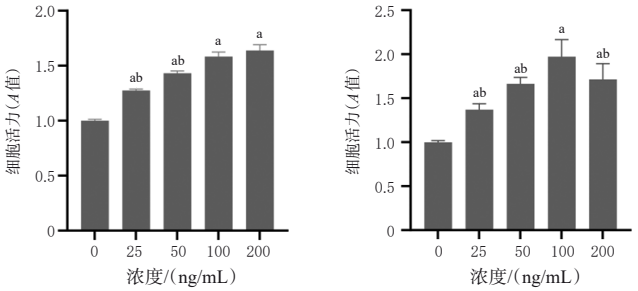
KEGG通路富集分析共得到151条通路（$P<0.01$），主要包括IL-17信号通路、TNF信号通路、磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B信号通路（PI3K/Akt）、细胞衰老、p53信号通路等；其中，P值最小且富集分数最高的为IL-17信号通路，富集靶点数最多的为PI3K/Akt信号通路。

网络药理学分析结果预测，参芪固本方通过抑制IL-17信号通路改善CRF相关肿瘤炎症微环境。基于KEGG富集通路及PPI核心靶点（IL-6、TNF-α）的关联性，本研究采用IL-17诱导A549细胞构建CRF细胞模型，通过IL-17信号通路及其调控的下游促炎因子模拟肿瘤炎症微环境。

3.2　细胞实验验证结果

3.2.1　IL-17作用的最佳浓度、时间筛选与参芪固本方干预剂量筛选

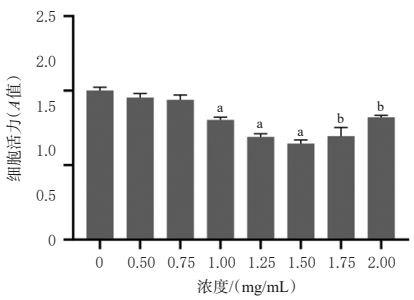
干预24、48 h后，与0 ng/mL IL-17比较，随干预浓度升高，细胞活力逐渐增加（$P<0.05$）；与100 ng/mL IL-17干预48 h比较，200 ng/mL IL-17时细胞活力显著降低（$P<0.05$），因此选择100 ng/mL IL-17作用48 h为最佳实验条件（图1）。图2结果显示，参芪固本方在1.00～1.50 mg/mL范围时，A值随浓度升高显著降低（$P<0.05$），且在1.50 mg/mL达到抑制峰值；当浓度升至1.75 mg/mL时，A值回升，抑制效应减弱。1.00 mg/mL是首次出现抑制的浓度，反映药物起效浓度；1.50 mg/mL为抑制峰值浓度，反映药物最佳效能。因此选定1.00 mg/mL（低质量浓度）和1.50 mg/mL（高质量浓度）作为后续实验的干预浓度。



A. 不同浓度IL-17干预24 h　　B. 不同浓度IL-17干预48 h

a：与0 ng/mL IL-17比较，$P<0.05$；b：与100 ng/mL IL-17比较，$P<0.05$。

图1　不同浓度IL-17干预24、48 h细胞活力比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）



a：与0 mg/mL参芪固本方比较，$P<0.05$；b：与1.50 mg/mL参芪固本方比较，$P<0.05$。

图2　不同浓度参芪固本方对IL-17诱导的A549细胞活力的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

3.2.2　参芪固本方对IL-17诱导的A549细胞迁移、凋亡及凋亡相关蛋白的影响

与对照组比较，IL-17干预组细胞的迁移率、Bcl-2蛋白的表达均显著升高或上调，凋亡率、Bax和cleaved-CASP3蛋白的表达、Bax/Bcl-2比值均显著降低或下调（$P<0.05$）；与IL-17干预组比较，IL-17+参芪固本方低、高质量浓度组细胞的迁移率、Bcl-2蛋白的表达均显著降低或下调，凋亡率、Bax和cleaved-CASP3蛋白的表达、Bax/Bcl-2比值均显著升高或上调（$P<0.05$）；与IL-17+参芪固本方低质量浓度组比较，IL-17+参芪固本方高质量浓度组细胞的迁移率、cleaved-CASP3蛋白表达均显著降低或下调，凋亡率显著升高（$P<0.05$）。结果见表2、图3～图5。

表2　各组细胞迁移、凋亡及凋亡相关蛋白比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	迁移率/%	凋亡率/%	Bcl-2/β-actin	Bax/β-actin	cleaved-CASP3/β-actin	Bax/Bcl-2
对照组	41.40±3.32	17.467±0.258	0.858±0.063	0.795±0.048	0.676±0.024	1.041±0.095
IL-17干预组	74.07±1.31^{a}	8.670±0.229^{a}	1.080±0.090^{a}	0.642±0.071^{a}	0.428±0.042^{a}	0.490±0.109^{a}
IL-17+参芪固本方低质量浓度组	39.70±1.61^{b}	17.213±0.199^{b}	0.533±0.072^{b}	0.947±0.054^{b}	1.035±0.101^{b}	1.801±0.277^{b}
IL-17+参芪固本方高质量浓度组	21.40±2.52^{bc}	28.313±0.420^{bc}	0.637±0.075^{b}	0.878±0.043^{b}	0.830±0.058^{bc}	1.399±0.243^{b}

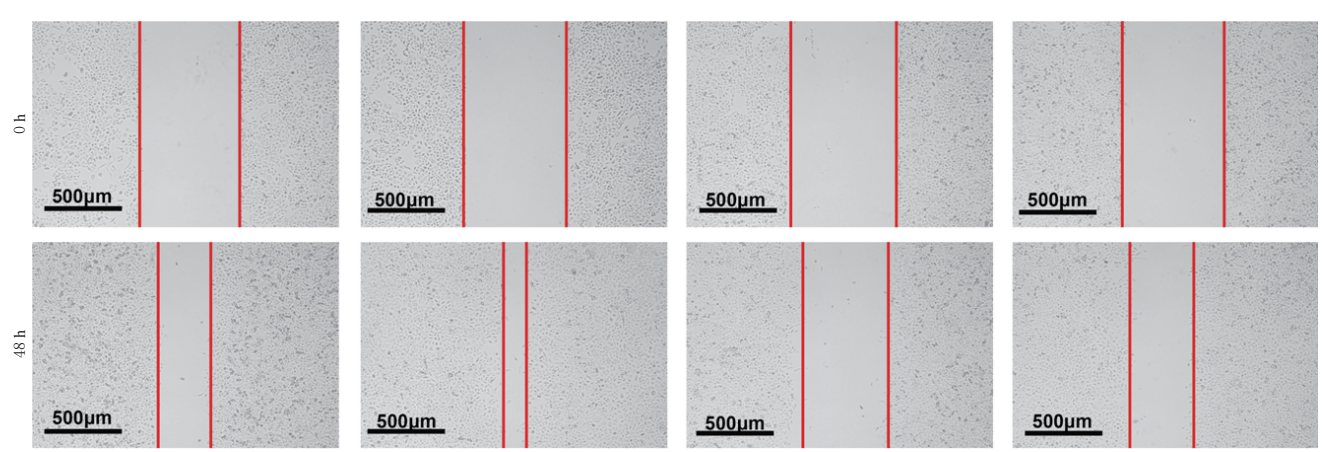
a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与IL-17干预组比较，$P<0.05$，c：与IL-17+参芪固本方低质量浓度组比较，$P<0.05$。

3.2.3　参芪固本方对IL-17诱导的A549细胞炎症因子的影响

与空白组比较，IL-17干预组细胞上清液中IL-6、TNF-α水平均显著升高（$P<0.5$）；与IL-17干预组比较，IL-17+参芪固本方低、高质量浓度组细胞上清液中IL-6、TNF-α水平均显著降低（$P<0.5$）；与IL-17+参芪固本方低质量浓度组比较，IL-17+参芪固本方高质量浓度组细胞上清液中IL-6、TNF-α水平均显著降低（$P<0.5$）。结果见表3。

3.2.4　参芪固本方对IL-17诱导的A549细胞IL-17 RA、IL-6、TNF-α mRNA表达的影响

与对照组比较，IL-17干预组细胞中IL-17RA、IL-6、TNF-α mRNA的表达均显著上调（$P<0.05$）；与IL-17干预组比较，IL-17+参芪固本方低、高质量浓度组细胞中IL-17RA、IL-6 mRNA的表达均显著下调（$P<0.05$）；与IL-17+参芪固本方低质量浓度组比较，IL-17+参芪固本方高质量浓度组细胞中IL-17RA、IL-6、TNF-α mRNA的表达均显著下调（$P<0.05$）。结果见表3。



A. 对照组　B. IL-17干预组　C. IL-17+参芪固本方高质量浓度组　D. IL-17+参芪固本方低质量浓度组

图3　细胞划痕实验显微图（×40）

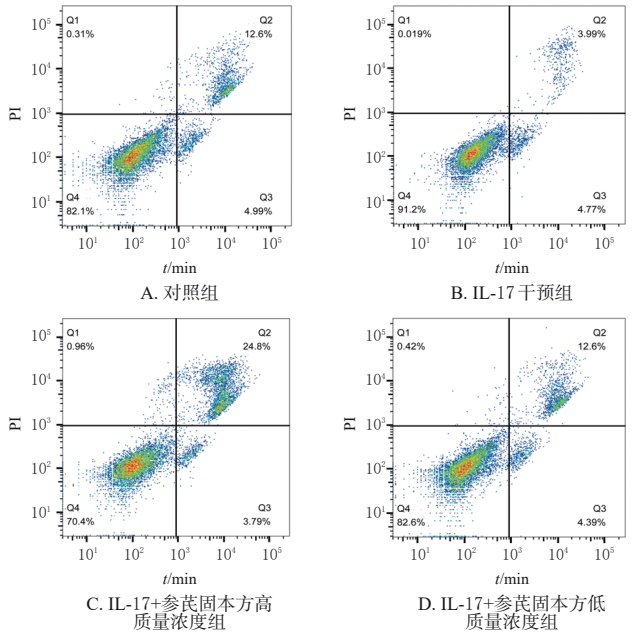
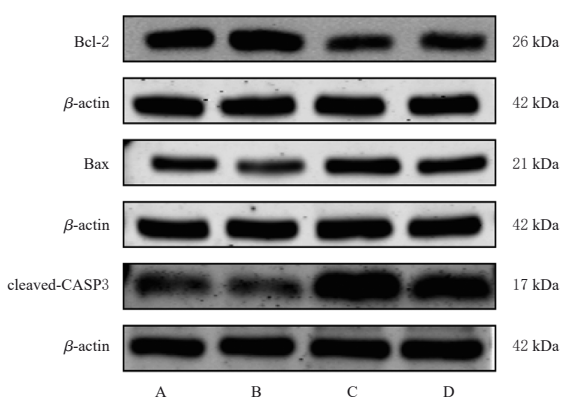


图4　细胞凋亡流式细胞图



A：对照组；B：IL-17干预组；C：IL-17+参芪固本方高质量浓度组；D：IL-17+参芪固本方低质量浓度组。

图5　细胞凋亡相关蛋白电泳图

表3　各组细胞炎症因子以及IL-17RA、IL-6、TNF-α mRNA表达的比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	IL-6/(pg/mL)	TNF-α/(pg/mL)	IL-17RA mRNA	IL-6 mRNA	TNF-α mRNA
对照组	23.708±0.305	33.707±0.706	1.003±0.129	1.003±0.100	1.010±0.149
IL-17干预组	31.573±0.185[a]	51.916±0.237[a]	1.293±0.042[a]	2.067±0.035[a]	1.580±0.115[a]
IL-17+参芪固本方低质量浓度组	27.416±0.624[b]	44.586±0.737[b]	0.987±0.099[b]	1.287±0.219[b]	1.417±0.225
IL-17+参芪固本方高质量浓度组	24.124±0.653[bc]	33.847±0.770[bc]	0.447±0.006[bc]	0.463±0.029[bc]	0.407±0.021[bc]

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与IL-17干预组比较，$P<0.05$，c：与参芪固本方低质量浓度组比较，$P<0.05$。

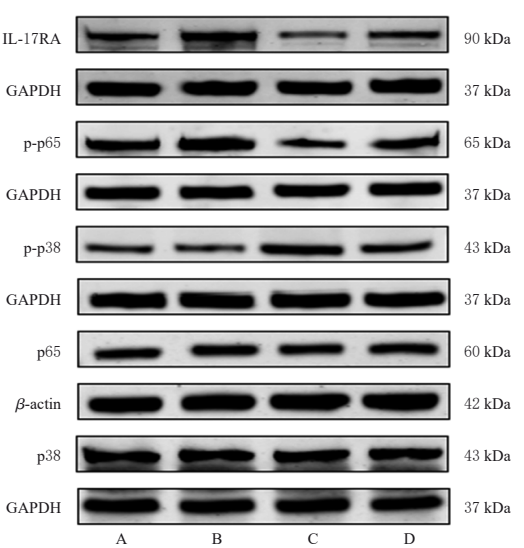
3.2.5　参芪固本方对IL-17诱导的A549细胞IL-17信号通路关键蛋白表达的影响

与对照组比较，IL-17干预组细胞中IL-17RA、p-p65的表达和p-p65/p65比值均显著上调或升高，p-p38 MAPK蛋白表达和p-p38 MAPK/p38 MAPK比值均显著下调或降低（$P<0.05$）；与IL-17干预组比较，IL-17+参芪固本方低、高质量浓度组细胞中IL-17RA、p-p65蛋白的表达和p-p65/p65比值均显著下调或降低，p-p38 MAPK蛋白的表达、p-p38/p38比值均显著上调或升高（$P<0.05$）；与IL-17+参芪固本方低质量浓度组比较，IL-17+参芪固本方高质量浓度组细胞中IL-17RA、p-p65蛋白表达、p-p65/p65比值均显著下调或降低，p-p38 MAPK蛋白表达、p-p38 MAPK/p38 MAPK比值均显著上调或升高（$P<0.05$）。结果见表4、图6。

表4　各组细胞IL-17信号通路关键蛋白表达的比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	IL-17RA	p-p65/GAPDH	p65/β-action	p-p38 MAPK/GAPDH	p38 MAPK/GAPDH	p-p65/p65	p-p38 MAPK/p38 MAPK
对照组	0.688±0.051	0.785±0.084	0.872±0.044	0.621±0.047	0.966±0.089	0.887±0.115	0.676±0.024
IL-17干预组	0.969±0.049[a]	0.999±0.030[a]	0.877±0.037	0.590±0.045[a]	0.996±0.062	1.140±0.020[a]	0.428±0.042[a]
IL-17+参芪固本方低质量浓度组	0.675±0.092[b]	0.795±0.029[b]	0.847±0.095	0.784±0.048[b]	1.016±0.095	0.893±0.044[b]	0.830±0.058[b]
IL-17+参芪固本方高质量浓度组	0.281±0.052[bc]	0.517±0.080[bc]	0.827±0.036	1.030±0.011[bc]	0.937±0.043	0.628±0.121[bc]	1.035±0.101[bc]

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与IL-17干预组比较，$P<0.05$，c：与IL-17+参芪固本方低质量浓度组比较，$P<0.05$。



A：对照组；B：IL-17干预组；C：IL-17+参芪固本方高质量浓度组；D：IL-17+参芪固本方低质量浓度组。

图6　各组细胞中IL-17信号通路关键蛋白表达电泳图

4　讨论

慢性低度炎症是CRF发展的核心病理机制，其特征是促炎因子（IL-6、TNF-α、IL-17等）的持续激活，这些因子可通过影响大脑的神经-免疫系统及肿瘤微环境来加重疲劳症状[9]。临床证据表明，在接受辅助化疗的恶性肿瘤患者中，血液循环中IL-6、TNF-α水平的升高与疲劳程度加重显著相关[10]。在卵巢癌荷瘤小鼠体内，血液循环中IL-6、TNF-α及IL-17水平显著升高，并伴随疲劳样行为，提示炎症在CRF中的核心作用[11]。76%～99%的肺癌患者在治疗期间会出现疲劳[12-13]，这一高发率凸显了深入解析CRF潜在机制，尤其是慢性炎症作用的迫

切性。值得注意的是，在慢性炎症反应中，IL-17可通过激活NF-κB信号通路发挥调控作用[14]。该通路的持续活化进一步促进TNF-α、IL-1、IL-6等下游促炎因子的分泌，形成正反馈循环，共同加剧CRF症状。

CRF属中医“虚劳”范畴，国医大师周岱翰教授认为，手术或放化疗所导致的脾胃失调、气血不足、久虚不复成劳是CRF的主要病因[7,15]。《素问·阴阳应像大论》云：“形不足者温之以气，精不足者补之以味”，该方以党参、黄芪为君药，健脾补中、益气养血；淫羊藿、女贞子为臣药，补肾强精生血；佐以白术、茯苓健脾除湿，既助党参补脾胃之气，又增强脾胃之运化，以助后天之源，又以白术苦燥之性以利湿健脾；五味子为使药，载药入脾胃；全方充分体现了健脾、益肾、补气、生血的特点。

4.1 参芪固本方药物靶点分析

本研究共筛选出84个活性成分及209个交集靶点，其中槲皮素、山柰酚和木犀草素等为核心活性成分，TP53、AKT1、IL-6、TNF等为核心靶点，IL-17、TNF、PI3K/Akt信号通路为关键信号通路。研究指出，TP53是一种促发细胞凋亡的抑癌因子，可通过减少肿瘤细胞间接改善CRF[16]。IL-17和TNF信号通路均为促炎通路[17－18]，可通过引发系统性炎症和肌肉消耗从而促进CRF。槲皮素可通过抑制IL-17诱导的NF-κB核转位提高骨骼肌氧化磷酸化效率，从而减轻与CRF相关的肌肉疲劳[19－20]；山柰酚可通过抑制PI3K/Akt和MAPK信号通路诱导细胞凋亡并减轻肿瘤负荷[21]；木犀草素可通过靶向NF-κB和MAPK信号通路减少CRF炎症并促进肿瘤细胞凋亡[22]。

4.2 参芪固本方多靶点协同调控的分子网络机制

中药复方的核心优势在于其多成分协同作用。本研究结果分析显示，淫羊藿、女贞子的主要活性成分共同靶向于MAPK信号通路及cleaved-CASP3、Bax、Bcl-2等关键凋亡调控靶点，协同诱导肿瘤细胞凋亡，有助于减少肿瘤负荷，这可能是该方缓解CRF的潜在途径之一；在抗炎层面，黄芪与党参的活性成分可通过激活NF-κB抑制蛋白IκBα及抑制TNF-α和IL-6等促炎因子的表达，阻断NF-κB炎症信号通路的过度激活，减少促炎因子的分泌。此抗炎效应与淫羊藿、女贞子介导的促凋亡作用在缓解CRF的病理进程中形成协同作用。除调控炎症与免疫外，黄芪及党参的活性成分还可作用于MAPK信号通路，促进线粒体生物合成与葡萄糖代谢；同时激活过氧化物酶体增殖物激活受体α及其γ辅激活因子1α，改善线粒体脂肪酸氧化功能，纠正CRF相关的线粒体功能障碍与能量代谢紊乱。上述多层面的协同药理作用，包括诱导肿瘤细胞凋亡、抑制慢性炎症及改善能量代谢，构成了本方“补气温阳”功效的现代药理学基础。网络药理分析还显示，淫羊藿、女贞子的核心活性成分可靶向雌激素受体1、雄激素受体和盐皮质激素受体等核受体，调控类固醇激素信号传导。内分泌稳态失衡与CRF发生发展密切相关[23]，参芪固本方通过调控激素信号改善下丘脑-垂体-性腺轴功能，纠正内分泌紊乱。该机制直接干预CRF情绪障碍的核心病理环节，从现代药理学层面阐明本方“补肾滋阴温阳”调节内分泌功能、恢复“肾主志”传统功效的科学内涵。综上，参芪固本方通过构建一个涉及肿瘤负荷减轻（凋亡诱导）、炎症抑制、免疫增强、能量代谢改善及内分泌调节的多维度协同调控网络，为改善CRF症状提供了坚实的分子基础。

4.3 参芪固本方调控IL-17信号通路的细胞实验分析

细胞实验结果表明，高质量浓度参芪固本方显著抑制了炎症因子IL-17RA、IL-6和TNF-α mRNA表达水平，并降低NF-κB通路活化指标p-p65/p65比值，同时显著抑制A549细胞迁移能力，与文献研究一致[5]，即抑制炎症反应可有效缓解CRF。另外，低质量浓度参芪固本方则仅抑制IL-17RA和IL-6 mRNA水平，提示复方中不同成分（如槲皮素、山柰酚）可能通过质量浓度依赖的协同作用增强抗炎效应。此外，参芪固本方干预显著提高了细胞凋亡率，并上调了促凋亡蛋白Bax和cleaved-CASP3的表达水平，同时升高了Bax/Bcl2比值以及p38 MAPK通路活化指标p-p38 MAPK/p38 MAPK比值。有趣的是，尽管传统研究认为p38 MAPK活化与炎症相关[24]，但在本研究特定微环境中，p38 MAPK的激活可能通过触发促凋亡信号诱导细胞凋亡，减轻肿瘤负荷，间接改善CRF。然而有文献指出，p38 MAPK的激活可促进骨骼肌疲劳发生，抑制该通路可增强肌肉耐力[25]。这种双重作用提示，p38 MAPK在CRF中的效应可能具有细胞类型特异性，即在肿瘤细胞中促进凋亡有益于疲乏缓解，而在肌肉细胞中需进一步研究其潜在的负面影响。

本研究的局限性包括：（1）CRF作为全身性综合征，单一肺癌细胞模型难以全面模拟其“神经-免疫-代谢”网络的交互特征；（2）p38 MAPK激活在CRF中的生物学作用尚未完全明确，其在不同细胞类型中的功能差异需进一步验证；（3）复方煎煮产物的化学成分及其转化尚未被表征，可能影响药效的全面评估。未来研究可通过建立脑-肿瘤类器官共培养模型、开展磷酸化蛋白质组学分析等系统解析参芪固本方的多维度作用机制。

综上所述，参芪固本方可能通过调控IL-17信号通路、抑制炎症因子表达、激活p38 MAPK依赖的凋亡过程来改善CRF。

参考文献

[1] BOWER J E. Cancer-related fatigue: mechanisms, risk factors, and treatments[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2014, 11

(10):597-609.
[2] FABI A, BHARGAVA R, FATIGONI S, et al. Cancer-related fatigue: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis and treatment[J]. Ann Oncol, 2020, 31(6): 713-723.
[3] AL M M. Cancer-related fatigue: an overview[J]. Br J Nurs, 2021, 30(4): S36-S43.
[4] AGBEJULE O A, HART N H, EKBERG S, et al. Self-management support for cancer-related fatigue: a systematic review[J]. Int J Nurs Stud, 2022, 129: 104206.
[5] KANG Y E, YOON J H, PARK N H, et al. Prevalence of cancer-related fatigue based on severity: a systematic review and meta-analysis[J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 12815.
[6] 林伟波,周岱翰.中药破壁饮片治肠癌化疗后造血抑制临床研究[J].新中医,2017,49(8):110-113.
[7] 黄裕芳.参芪固本方破壁饮片对化疗后骨髓抑制的临床与实验研究[D].广州:广州中医药大学,2018.
[8] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. J Cheminform, 2014, 6: 13.
[9] BROWNSTEIN C G, TWOMEY R, TEMESI J, et al. Physiological and psychosocial correlates of cancer-related fatigue[J]. J Cancer Surviv, 2022, 16(6): 1339-1354.
[10] SILVA E M, MARIANO V S, PASTREZ P R A, et al. High systemic IL-6 is associated with worse prognosis in patients with non-small cell lung cancer[J]. PLoS One, 2017, 12(7): e0181125.
[11] COHEN M, LEVKOVICH I, KATZ R, et al. Low physical activity, fatigue and depression in breast cancer survivors: moderation by levels of IL-6 and IL-8[J]. Int J Psychophysiol, 2020, 158: 96-102.
[12] 姚利,吴燕,袁洋,等.肺癌化疗患者癌因性疲乏变化轨迹及其影响因素的纵向研究[J].中国临床医学,2022,29(5):795-802.
[13] BADE B C, FAIZ S A, HA D M, et al. Cancer-related fatigue in lung cancer: a research agenda: an official American Thoracic Society research statement[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2023, 207(5): e6-e28.
[14] MIlOVANOVIC J, ARESNIJEVIC A, STOJANOVIC B, et al. Interleukin-17 in chronic inflammatory neurological diseases[J]. Front Immunol, 2020, 11: 947.
[15] 王雄文,乔翠霞,张俊萍,等.参芪固本方破壁饮片与传统汤剂联合鹤蟾片治疗ⅢB、Ⅳ期非小细胞肺癌的疗效及安全性研究[J].中医肿瘤学杂志,2021,3(3):18-23.
[16] VOSKARIDES K, GIANNOPOULOU N. The role of TP53 in adaptation and evolution[J]. Cells, 2023, 12(3): 512.
[17] SUBUDHI I, KONIECZNY P, PRYSTUPA A, et al. Metabolic coordination between skin epithelium and type 17 immunity sustains chronic skin inflammation[J]. Immunity, 2024, 57(7): 1665-1680.
[18] BERKHOUT L C, I'AMI M J, KRUITHOF S, et al. Formation and clearance of TNF-TNF inhibitor complexes during TNF inhibitor treatment[J]. Br J Pharmacol, 2024, 181(8): 1165-1181.
[19] YANG S Y, HU Y, ZHAO R, et al. Quercetin-loaded mesoporous nano-delivery system remodels osteoimmune microenvironment to regenerate alveolar bone in periodontitis via the miR-21a-5p/PDCD4/NF-κB pathway[J]. J Nanobiotechnol, 2024, 22(1): 94.
[20] 黄子祥,徐汪洋,刘彩霞,等.槲皮素通过抑制NF-κB通路缓解IL-1β诱导的小鼠骶髂关节软骨细胞损伤[J].中药材,2025,48(1):212-216.
[21] ALMATROUDI A, ALLEMAILEM K S, ALWANIAN W M, et al. Effects and mechanisms of kaempferol in the management of cancers through modulation of inflammation and signal transduction pathways[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(10): 8630.
[22] CHE D N, SHIN J Y, KANG H J, et al. Luteolin suppresses IL-31 production in IL-33-stimulated mast cells through MAPK and NF-κB signaling pathways[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 83: 106403.
[23] TSIMAFEYEU I, TISHOVA Y, ZUKOV R, et al. Testosterone for managing treatment-related fatigue in patients with metastatic renal cell carcinoma: a phase 2 randomized study FARETES[J]. Am J Clin Oncol, 2021, 44(4): 137-142.
[24] YONG H Y, KOH M S, MOON A. The p38 MAPK inhibitors for the treatment of inflammatory diseases and cancer[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2009, 18(12): 1893-1905.
[25] BENGAL E, AVIRAM S, HAYEK T. p38 MAPK in glucose metabolism of skeletal muscle: beneficial or harmful? [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(18): 6480.

(收稿日期:2025-03-17 修回日期:2025-06-21)
(编辑:舒安琴)