DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.06.026

基于TGF－β1/Smad2通路探讨六君子汤促进食管癌相关成纤维细胞凋亡的分子机制

刘娅茹[1],刘洋[1],陈星[1],菅佳宁[1],肖小乔[1],周哲旭[1],胡啸博[1],陈玉龙[2]
[1.河南中医药大学中医学院(仲景学院),河南 郑州 450046;
2.河南省中医方证信号传导重点实验室,河南中医药大学,河南 郑州 450046]

摘要:目的 肿瘤相关成纤维细胞(cancer－associated fibroblasts,CAFs)是肿瘤组织中被癌细胞激活的成纤维细胞,具有成肌纤维细胞的特性。CAFs可以为肿瘤细胞提供营养支持和侵袭通道,从而帮助肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移。观察六君子汤对食管癌相关CAFs凋亡的影响,并探讨其分子机制,为六君子汤治疗食管癌的临床应用提供实验依据。方法 ①MTT法检测不同浓度六君子汤对CAFs活性的影响。②MTT法检测不同浓度TE－1条件培养基(即TE－1M)对CAFs活性的影响。③ELISA检测六君子汤对各分组CAFs分泌转化生长因子－β1(TGF－β1)的影响。④流式细胞术检测各分组CAFs凋亡水平。⑤RT－qPCR检测六君子汤对各分组CAFs凋亡相关分子mRNA的表达水平的影响。⑥Western Blot法检测六君子汤对各分组CAFs凋亡相关分子蛋白的表达水平的影响。结果 ①MTT检测结果显示:与空白组相比,50 μg/mL的六君子汤对CAFs的活性抑制无明显影响,其他浓度组对CAFs的活性均有抑制作用($P<0.05$)。②MTT检测结果显示:与空白组相比,10%、20%和30% TE－1M对CAFs的增殖具有促进作用,其中20%浓度的TE－1M对CAFs的增殖作用最显著($P<0.001$),40% TE－1M($P<0.05$)及50% TE－1M($P<0.01$)对CAFs的增殖有明显的抑制作用。③ELISA法检测结果显示:与空白组相比,模型组CAFs分泌TGF－β1含量下降($P<0.001$);与模型组相比,六君子汤组TGF－β1含量显著升高($P<0.001$);与六君子汤组相比,抑－六君子汤组(SB－431542抑制剂＋六君子汤组)TGF－β1含量降低($P<0.001$)。④流式细胞术检测结果显示:与空白组相比,模型组凋亡率无明显差异;与模型组相比,六君子汤组凋亡率显著升高($P<0.001$);与六君子汤组相比,抑－六君子汤组凋亡率明显下降($P<0.001$)。⑤PCR检测结果显示:与空白组相比,模型组Smad2、FAP基因表达升高($P<0.01$,$P<0.001$);与模型组相比,六君子汤组Smad2、Caspase－3和FAP表达显著升高($P<0.05$,$P<0.01$,$P<0.001$);与六君子汤组相比,抑－六君子汤组Smad2、Caspase－3和FAP明显下降($P<0.05$,$P<0.001$)。⑥Western Blot检测结果显示:与空白组相比,模型组Smad2蛋白表达水平下降($P<0.01$);与模型组相比,六君子汤组Smad2和Caspase－3表达显著升高($P<0.001$),FAP蛋白表达水平升高($P<0.05$)。与六君子汤组相比,抑－六君子汤组Smad2、Caspase－3明显下降($P<0.01$),FAP蛋白表达下降($P<0.05$)。结论 与食管癌细胞间接共培养条件下通过抑制TGF－β1/Smad2通路促进CAFs增殖;六君子汤可以通过TGF－β1/Smad2通路诱导CAFs凋亡。

关键词:六君子汤;癌相关成纤维细胞;TGF－β/Smad2;细胞凋亡;食管癌
中图分类号:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2026)06-0146-07

Exploring Molecular Mechanism of Liujunzi Decoction(六君子汤) Promoting Apoptosis of Esophageal Cancer－Related Fibroblasts Based on TGF－β1/Smad2 Pathway

LIU Yaru[1],LIU Yang[1],CHEN Xing[1],JIAN Jianing[1],XIAO Xiaoqiao[1],ZHOU Zhexu[1],HU Xiaobo[1],CHEN Yulong[2]
[1. College of Traditional Chinese Medicine,Henan University of Chinese Medicine(Zhongjing College),Zhengzhou 450046,Henna,China;
2. Henan International Joint Laboratory of Traditional Chinese Medicine Syndrome and Prescription in Signaling,
Henan University of Chinese Medicine,Zhengzhou 450046,Henna,China]

Abstract:*Objective* Cancer－associated fibroblasts(CAFs),which have the properties of myofibroblasts,are fibroblasts in tumor tissue that are activated by cancer cells and. CAFs can provide nutritional support and invasion channels for tumor cells,thereby helping tumor cell proliferation,invasion and metastasis. This paper observed the effect of Liujunzi Decoction(六君子汤) on the apoptosis of esophageal cancer－related CAFs and discussed its molecular mechanism,so as to provide experimental

基金项目:国家自然科学基金项目(82074313);河南省"双一流"创建学科中医研究专项研究生创新能力培养项目(HSRP－DFCTCM－2023－8－04);河南中医药大学研究生科研创新能力提升计划重点项目(2023KYCX009)
作者简介:刘娅茹(1997－),女,河南周口人,硕士,研究方向:中医方证信号传导。
通讯作者:陈玉龙(1974－),男,河南郑州人,教授,博士研究生导师,博士,研究方向:肿瘤病机与防治。E-mail:cyl72621@163.com。

basis for the clinical application of Liujunzi Decoction in the treatment of esophageal cancer. *Methods* ①The effect of TE－1 conditioned medium(TE－1M) on CAFs activity was detected by MTT method. ②The effect of Liujunzi Decoction on CAFs activity was detected by MTT method. ③The effects of Liujunzi Decoction on the secretion of transforming growth factor－β1 (TGF－β1) from CAFs were measured by ELISA. ④Flow cytometry was performed to detect the effect of Liujunzi Decoction on apoptosis of CAFs. ⑤The effects of Liujunzi Decoction on mRNA expression levels of CAFs apoptosis－related molecules were detected by RT－qPCR. 6. The effects of Liujunzi Decoction on apoptosis－related molecular protein expression levels of CAFs were detected by Western Blot. *Results* ①The results of MTT showed that compared with the blank group, 50 μg/mL Liujunzi Decoction had no significant effect on the activity inhibition of CAFs, and the other concentration groups had an inhibitory effect on the activity of CAFs ($P<0.05$). ②The results of MTT showed that compared with the blank group, 10%, 20% and 30% TE－1M had a promoting effect on the proliferation of CAFs, among which 20% TE－1M had the most significant proliferation effect on CAFs ($P<0.001$), and 40% TE－1M ($P<0.05$) and 50% TE－1M ($P<0.01$) had a significant inhibitory effect on the proliferation of CAFs. ③The results of ELISA method showed that compared with the blank group, the content of TGF－β1 secreted by CAFs in the model group decreased ($P<0.001$), the content of TGF－β1 in the Liujunzi Decoction group was significantly increased ($P<0.001$), and the content of TGF－β1 in the SB－431542 inhibitor＋Liujunzi Decoction group was decreased compared with that in the Liujunzi Decoction group ($P<0.001$). ④The results of flow cytometry showed that there was no significant difference in the apoptosis rate in the model group compared with that in the blank group. Compared with the model group, the apoptosis rate of the Liujunzi Decoction group was significantly increased ($P<0.001$), and the apoptosis rate of the SB－431542 inhibitor＋Liujunzi Decoction group was significantly decreased compared with the Liujunzi Decoction group ($P<0.001$). ⑤The results of PCR showed that the expressions of Smad2 and FAP genes in the model group were increased ($P<0.01$, $P<0.001$) compared with those in the blank group, and the expressions of Smad2, Caspase－3 and FAP in the Liujunzi Decoction group were significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$) compared with those in the model group. Compared with those of the Liujunzi Decoction group, the expressions of Smad2, Caspase－3 and FAP in the were significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.001$). ⑥The results of Western blot showed that compared with the blank group, the expression of Smad2 protein in the model group decreased ($P<0.01$). The expressions of Smad2 and Caspase－3 in the Liujunzi Decoction group were significantly increased ($P<0.001$) compared with those in the model group and the expression level of FAP protein was increased ($P<0.05$). Compared with those in the Liujunzi Decoction group, the expressions of Smad2 and Caspase－3 were significantly decreased in the SB－431542 inhibitor＋Liujunzi Decoction group ($P<0.01$), and the expression of FAP protein was decreased ($P<0.05$). *Conclusion* The proliferation of CAFs was promoted by inhibiting TGF－β1/Smad2 pathway in indirect coculture with esophageal cancer cells. Liujunzi Decoction can induce CAFs apoptosis through TGF－β1/Smad2 pathway, and the induction effect of TGF－β1/Smad2 pathway on apoptosis of CAFs is more obvious in co－culture environment.

Keywords: Liujunzi Decoction(六君子汤); CAFs; TGF－β1/Smad2; apoptosis; esophageal cancer

食管癌是癌症相关死亡的第六大原因，也是全球第八大常见癌症，在亚洲地区以食管鳞状细胞癌为主[1]。目前治疗食管癌的主要方法是手术治疗，且仅限于早期寡转移且一般状况良好可以耐受手术治疗的患者[2]。所以针对食管癌的发生、发展机制及防治方法都亟需进一步研究。

癌相关成纤维细胞(cancer associated fibroblasts, CAFs)作为肿瘤邻近细胞，为肿瘤提供营养支持，促进肿瘤细胞葡萄糖的摄取及乳酸的分泌[3]；其次，CAFs可以提高肿瘤细胞的迁移和侵袭能力[4－6]；最后，CAFs可以促进肿瘤血管生成，为肿瘤细胞提供支持[7－8]。鉴于CAFs在肿瘤的发生、发展及转移中发挥的重要作用，那么启动CAFs的死亡程序是治疗肿瘤的另一突破口。癌相关成纤维细胞活化蛋白(FAP)作为其标志物，对于转化生长因子－β(TGF－β)负责调节肿瘤微环境中的基质细胞，其中包括CAFs及细胞外成分。有研究表明TGF－β信号通路同时有抑制肿瘤和促进肿瘤发展的双向作用。例如，TGF－β1和TGF－βRI在肿瘤发生早期被确定为肿瘤抑制因子，而它们在后期发挥促进肿瘤的作用[9]。所以可以改变TGF－β信号传导的影响癌症的发展[10]。另有大量研究表明，TGF－β可以直接通过激活Caspase－3通路促进细胞凋亡[11－12]。

中医药在食管癌的治疗中发挥着其独特的作用。有研究表明，中医药联合西医治疗，在干预癌前病变、增强放疗化疗效果以及改善患者生存质量等方面都起到了很好的作用[13－14]。食管癌在中医属于“噎膈”“反胃”等范畴，中医食管癌辨证分型标准尚未统一，有研究发现[15]，食管癌证型有13个，其中常见证型为痰瘀互结、痰气交阻、气虚阳微、脾虚气滞，共占比67.7%。六君子汤是由四君子汤加陈皮、半夏两味中药，既有健脾补气之效，亦有燥湿化痰之能。在体内外试验研究中发现，六君子汤对食管癌细胞的增殖有明显抑制作用，并能增强顺铂对肿瘤细胞的杀伤作用[16－18]。六君子汤可以抑制在CAFs共培养环境下的肿瘤细胞的能量代谢[19]。但六君子汤对CAFs的细胞行为学并没有进行探索，所以本实验将重点研究六君子汤对CAFs凋亡的影响，并探讨其分子机制，为六君子汤治疗食管癌的临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞株

人食管鳞癌TE－1细胞，由河南中医药大学方证信号传导实验室其他成员进行培养传代冻存，人食管癌相关成纤维细

胞 CAFs，由课题组成员分离、鉴定永生化。

1.2 实验试剂

DMEM 高糖培养基、10 × 磷酸盐缓冲液（PBS）、胰蛋白酶 - EDTA 消化液、四甲基偶氮唑盐（MTT）、Accutase 酶（北京 Solarbio 公司，批号：12100、P1022、T1300、M8180、T1330）；胎牛血清（Excell 公司，批号：FND500）；二甲基亚砜（DMSO）（Amresco 公司，批号：M8180）；AnnexinV - FITC/PI apoptosis kit 凋亡试剂盒（杭州联科生物技术股份有限公司，批号：AP101 - 100 - kit）。

TRIzol 总 RNA 抽提试剂（美国 ambion 公司，批号：332607）；2 × SYBR® Green（武汉 ABclonal 公司，批号：RK21203）；反转录试剂盒（ReverTra Ace qPCR RT Kit）（Toyobo 公司，批号：117000）；人源 Capspae3、FAP、MMP2、GAPDH 引物（生工生物工程公司）；RIPA 裂解液、MSF（北京 Solarbio 公司，批号：R0010、P0100）；TGF - β 受体激酶抑制剂（MCE 公司，批号：SB - 431542）；Smad2、Caspase - 3、FAP 一抗（Cell Signaling Technology 公司，批号为：5339s 、14220s、52818s ）；MMP2 一抗（GeneTex 公司，批号：GTX104577）；GAPDH 一抗（博奥森生物技术公司，批号：bs - 2188R ）；GoatAnti - Rabbit IgG H&L（HRP）（Proteintech 公司，批号：ab205718）。

1.3 主要仪器

CO_2 培养箱、荧光定量 PCR 仪、梯度 PCR 仪、超微量分光光度计、低速离心机（美国赛默飞世尔科技公司）；可调移液器（德国艾本德公司）；超净工作台（苏州安泰空气技术有限公司）；电泳仪、转膜仪、凝胶成像扫描仪（伯乐生命医学产品公司）；超高速离心机、低温高速冷冻离心机（德国艾本德公司）；超纯水机（成都优越科技有限公司）；脱色摇床（SCILOGEX 公司）。

2 方法

2.1 细胞的传代与培养

培养条件：温度为 37 ℃，CO_2 为 5%；细胞完全培养基配置：10% 胎牛血清 +90% 高糖培养基（DMEM）。

传代条件：细胞融合度在 80% ~90% 进行传代。CAFs 传代比例为 1∶2；TE - 1 传代比例为 1∶4。

2.2 六君子汤乙酸乙酯部位提取方法

六君子汤乙酸乙酯部位（以下简称六君子汤），课题组使用不同的药物提取方式，发现乙酸乙酯萃取法得到的药物疗效最佳。所以本实验采用由课题组成员制备好的六君子汤乙酸乙酯部位进行实验[19]。称取适量药品，用 DMSO 溶解为 300 mg/mL，避光储存于 - 20 ℃，此为储存液。然后使用 DMEM 高糖培养基稀释为 3.0 mg/mL，此为工作液，供后续使用。

2.3 TGF - β1 受体激酶抑制剂（TRKI）储存液配置

根据课题组其他成员研究[20]，选用 TGF - β1 受体激酶抑制剂（TRKI）即 SB - 431542，浓度选用 20μmol/L 进行通路验证。根据质量（g）= 浓度（mol/L）× 体积（L）× 分子质量（g/mol）计算公式，配制浓度为 20 mmol/L 的储存液，分装，- 80 ℃保存。

2.4 TE - 1M 的制备

取生长状态良好的 TE - 1 细胞，用细胞计数仪检测融合度为 80% ~90% 进行传代，充分摇匀后放入 CO_2 培养箱，培养 24 h，抽出旧培养基，再次加入 10 mL 完全培养基，继续培养 24 h 后，融合度达 70% ~80% 收集培养基，然后进行 3000 r/min 离心 10 min，取上清（即 TE - 1 M）放于 - 80 ℃超低温冰箱保存。

2.5 MTT 法检测不同浓度 TE - 1M 及六君子汤对 CAFs 增殖的影响

2.5.1 MTT 法检测不同浓度 TE - 1M 对 CAFs 增殖的影响

将 TE - 1 M 不同浓度（将 TE - 1 M 以 0、10% 、20% 、30% 、40% 、50% 比例与完全培养基混合）放于 96 孔板内，板内终体积为 200 μL/孔。细胞培养板内加药培养 48 h 后，加入 MTT 工作液（100 μL/孔），然后将细胞培养板放于 CO_2 培养箱培养 4 ~6 h，每孔加入 DMSO（150 μL/孔），待紫色结晶溶解后，酶标仪选用 490 nm 波长检测各孔的吸光值。根据各孔 OD 值计算出每组的药物抑制率，本实验重复 3 次。计算公式如下：

（各实验组 OD 值/空白组 OD 值 - 1）×100%

2.5.2 MTT 法检测不同浓度六君子汤对 CAFs 增殖的影响

将六君子汤储存液配制为 300 μg/mL 的工作液（药物浓度从低到高依次是 0、50、100、150、200、300 μg/mL）加入培养板内，48 h 后测各孔的吸光值。根据各孔 OD 值计算出每组的药物抑制率，本实验重复 3 次。计算公式如下：

（各实验组 OD 值/空白组 OD 值）×100%

2.6 MTT 法检测各分组六君子汤对 CAFs 活性的影响

设置空白组、模型组、六君子汤组、SB - 431542 + 六君子汤组（简称：抑 - 六君子汤组），以 1 mL 体积为例，各组加药配制如表 1。

表 1 各组药物及培养基体积 单位：μL

组别	完全培养基	六君子汤工作液	TE - 1M	SB - 431542
空白组	1000	0	0	0
模型组	800	0	200	0
六君子汤组	750	50	200	0
抑 - 六君子汤组	749	50	200	1

48 h 后测各孔的吸光值。根据各孔 OD 值计算出各组 CAFs 活性抑制率，本实验重复 3 次。计算公式如下：

（各实验组 OD 值/空白组 OD 值）×100%

2.7 流式细胞术检测六君子汤对各分组 CAFs 凋亡的影响

收集各组上清置于流式管中，Accutase 消化酶消化细胞后，将细胞悬液收集到流式管中，离心，PBS 重悬，重复两次弃上清，加入凋亡检测液，配制比例为 100 μL 1 × loading buffer∶5 μL Annexin V - FITC∶10 μL PI。每管用 300 μL 配置好的凋亡检测液进行重悬，轻柔涡旋混匀后，室温避光孵育 5 min，在 1 h 内检测完毕。选择 FLH1/FLH3 通道进行信号收集，每组重复 3 次，flowjo 软件进行数据分析。

2.8 ELISA 试剂盒检测各分组 CAFs 细胞分泌 TGF - β1 水平

参考 ELISA 试剂盒说明书检测各分组细胞上清 TGF - β1 水平，采用间接法酶联免疫吸附试验，依次加入标本、标准品、HRP 标记放入预先包被的微孔中进行抗体检测，经过温育并彻底洗涤，底物 TMB 显色。

打开酶标仪，将 OD 值设为 450 nm 依次测量各孔吸光值（检测要在加完终止液 15 min 内进行），根据标准品曲线 OD 值及浓度得到标准曲线，并得到回归方程，根据方程式计算各

组浓度，根据MTT各组细胞的抑制率归一化处理后进行统计分析。

2.9 PCR测各分组CAFs凋亡相关分子mRNA表达水平

2.9.1 提取总RNA 将各分组的细胞经Trizol裂解后，检测样本浓度及纯度，将高浓度RNA进行稀释，最终浓度为1 μg/μL。然后设置温度为65 ℃，变性5 min。根据反转录试剂盒说明书进行反转录试剂配制，每管加入5×RT Buffer 2 μL，Enzyme Mix 0.5 μL，Primer mix 0.5 μL。设置反应温度为反应结束后，根据需要，向每管加入适量的DEPC水将cDNA稀释，然后放于-80 ℃冰箱备用。

2.9.2 引物序列 具体引物序列见表2。

表2 引物序列

名称	序列
hCaspase-3	5′> ACAGTCCAGTTCTGTACCACG <3′
hFAP	5′> AGACCACCAGAGAGCATATTTTG <3′
hMMP2	5′> CCTTCTCCCAAGGTCCATAGC <3′
hGAPDH	5′> TCAACGGATTTGGTCGTATTGG <3′

2.9.3 荧光定量PCR 使用10 μL体系进行样品反应，根据2×SYBR Green说明书，每孔加入5 μL SYBR Green，正向、反向引物(10nmol/L)各0.2 μL，cDNA体积4.6 μL。变性温度为95 ℃，5 min；各个循环内的反应温度为95 ℃ 5 s，65 ℃ 30 s，循环数为40。

2.9.4 结果分析 将数据导出到Excel表中，根据不同组的内参，用$2^{-\triangle\triangle Ct}$计算各个样品中目的基因相对表达量。

2.10 Western-blot法检CAFs凋亡相关分子蛋白表达水平

(1)蛋白提取。准备好RIPA裂解液，每100 μL体积加入1 μL磷酸酶抑制剂和1 μL PMSF。每孔加入100 μL混合液裂解细胞，然后进行超声仪破碎，条件为：200 W，工作3 s，间歇5 s，工作5次。裂解完成后放于冰上静置20 min，高速离心30 min。

根据BCA试剂盒说明书，进行样本浓度检测，统一各样本浓度和体积后进行变性，条件为：37 ℃的水浴锅内，温育30 min。上样后，分离目的蛋白，进行使用凝胶电泳，电泳条件为：60 V，30 min；90 V，80 min。转膜，牛奶封闭，孵育一抗，洗涤，孵育二抗。稀释比例见表3。

表3 抗体稀释比例

目的蛋白名称	抗体体积：1% BSA/牛奶
Caspase-3	1∶1000
FAP	1∶3000
MMP2	1∶2000
Smad2	1∶1000
GAPDH	1∶1000

(2)打开Image Lab生物图像分析软件，然后将条带放入显影区域内，进行显影。使用分析软件中的体积工具，圈出每组条带范围，然后得出目的蛋白的光密度值，以目的条带光密度值/内参条带光密度值，用于后续分析。

2.11 统计学方法

每组实验重复3次，数据采用IBM SPSS 21.0软件进行分析，结果采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)进行描述。若结果符合正态分布且方差齐，采用多因素方差分析检验，方差不齐用登尼特检验。若不符合正态分布，则选择非参数检验。

3 结果

3.1 不同浓度六君子汤对CAFs活性的影响

与空白组相比，50 μg/mL的六君子汤对CAFs的活性抑制无明显影响，其他浓度组对CAFs的活性均有抑制作用($P<0.05$)。150 μg/mL的六君子汤对CAFs的活性抑制率大约30%。结合实验需要，将采用150 μg/mL浓度的六君子汤进行后续实验。见表4。

表4 不同浓度六君子汤对CAFs活性的影响($\bar{x}\pm s$)

浓度/(μg/mL)	n	抑制率/(%)
0	4	0
50	4	9.23±5.88
100	4	20.63±4.92*
150	4	35.23±2.43**
200	4	54.34±3.42***
300	4	82.63±2.76***

注：*与0 μg/mL比较，$P<0.05$；**与0 μg/mL比较，$P<0.01$；***与0 μg/mL比较，$P<0.001$。

3.2 不同浓度TE-1M对CAFs的增殖影响

与空白组相比，10%、20%和30% TE-1M对CAFs的增殖具有促进作用，其中20%浓度的TE-1M对CAFs的增殖作用最显著($P<0.001$)，40% TE-1M($P<0.05$)及50% TE-1M($P<0.01$)对CAFs的增殖有明显的抑制作用。见表5。

表5 不同浓度TE-1M对CAFs的增殖的影响($\bar{x}\pm s$)

TE-1 M含量/(%)	n	增殖率/(%)
0	3	0
10	3	0.03±5.2
20	3	13.72±3.33***
30	3	3.68±2.43
40	3	-6.13±1.85*
50	3	-10.25±1.74**

注：*与空白组比较，$P<0.05$；**与空白组比较，$P<0.01$；***与空白组比较，$P<0.001$。

3.3 各组对CAFs分泌TGF-β1的影响

与空白组相比，模型组CAFs分泌TGF-β1含量下降($P<0.001$)；与模型组相比，六君子汤组TGF-β1含量显著升高($P<0.001$)；与六君子汤组相比，抑-六君子汤组TGF-β1含量降低($P<0.001$)。见表6。

表6 各组对CAFs分泌TGF-β1影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	TGF-β1含量/(ng/mL)
空白组	3	6 208.89±164.43
模型组	3	4 054.08±358.97***
六君子汤组	3	12 587.65±849.7^^^
抑-六君子汤组	3	8 630.24±356.59###

注：***与空白组比较，$P<0.001$；^^^与模型组比较，$P<0.001$；###与六君子汤组比较，$P<0.001$。

3.4 各组对CAFs凋亡的影响

与空白组相比，模型组凋亡率无明显差异；与模型组相比，六君子汤组凋亡率显著升高($P<0.001$)；与六君子汤组相比，抑-六君子汤组凋亡率明显下降($P<0.001$)。见表7、插页XXⅧ图1。

3.5 各组对CAFs凋亡相关分子mRNA表达水平的影响

与空白组相比，模型组Smad2、FAP基因表达升高($P<$

0.01，$P<0.001$）；与模型组相比，六君子汤组 Smad2、Caspase－3 和 FAP 表达显著升高（$P<0.05$，$P<0.01$，$P<0.001$）；与六君子汤组相比，抑－六君子汤组 Smad2、Caspase－3 和 FAP 明显下降（$P<0.05$，$P<0.001$）。见表 8。

表 7 各组对 CAFs 凋亡的影响（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	凋亡率/（%）
空白组	3	11.87±3.99
模型组	3	13.82±3.55
六君子汤组	3	41.66±5.72$^{\wedge\wedge\wedge}$
抑－六君子汤组	3	19.91±4.16$^{\#\#\#}$

注：$\wedge\wedge\wedge$ 与模型组比较，$P<0.001$；### 与六君子汤组比较，$P<0.001$。

表 8 各组对 CAFs 凋亡相关分子 mRNA 表达水平的影响（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	Smad2	Caspase－3	FAP
空白组	3	1	1	1
模型组	3	1.31±0.20*	0.99±0.03	2.42±0.43***
六君子汤组	3	2.70±0.49$^{\wedge}$	2.80±0.79$^{\wedge\wedge}$	4.72±0.26$^{\wedge\wedge\wedge}$
抑－六君子汤组	3	2.09±0.81$^{\#}$	1.55±0.10$^{\#}$	3.22±0.16$^{\#\#\#}$

注：* 与空白组比较，$P<0.05$；*** 与空白组比较，$P<0.001$；$\wedge$ 与模型组比较，$P<0.05$；$\wedge\wedge$ 与模型组比较，$P<0.01$；$\wedge\wedge\wedge$ 与模型组比较，$P<0.001$；# 与六君子汤组比较，$P<0.05$；### 与六君子汤组比较，$P<0.001$。

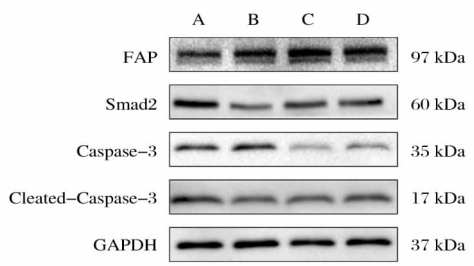
3.6 各组对 CAFs 凋亡相关分子蛋白表达水平的影响

与空白组相比，模型组 Smad2 蛋白表达水平下降（$P<0.01$）；与模型组相比，六君子汤组 Smad2 和 Caspase－3 表达显著升高（$P<0.001$），FAP 蛋白表达水平升高（$P<0.05$）。与六君子汤组相比，抑－六君子汤组 Smad2、Caspase－3 明显下降（$P<0.01$），FAP 蛋白表达下降（$P<0.05$）。见表 9、图 2。

表 9 各组对 CAFs 凋亡相关分子蛋白表达水平的影响（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	Smad2	Cleaved－Caspase－3/Caspase－3	FAP
空白组	3	1	1	1
模型组	3	0.81±0.07**	0.86±0.13	0.84±0.08
六君子汤组	3	1.20±0.07$^{\wedge\wedge\wedge}$	2.31±0.35$^{\wedge\wedge\wedge}$	1.25±0.02$^{\wedge}$
抑－六君子汤组	3	0.95±0.06$^{\#\#}$	1.47±0.19$^{\#\#}$	0.76±0.10$^{\#}$

注：** 与空白组比较，$P<0.01$；$\wedge$ 与模型组比较，$P<0.05$；$\wedge\wedge\wedge$ 与模型组比较，$P<0.001$；# 与六君子汤组比较，$P<0.05$；## 与六君子汤组比较，$P<0.01$。



注：从 A～D 依次为空白组、模型组、六君子汤组、抑－六君子汤组。

图 2 各组 CAFs 凋亡相关分子蛋白表达水平

4 讨论

中医学认为食管癌属“噎膈”范畴，主要症状是进行性吞咽困难和消瘦。历代医家虽对于食管癌的治疗有不同见解，但多从脾胃入手，总体认为，脾胃虚弱乃是食管癌的主要病机。其病位在食管，属胃系，而足太阴脾经位于食管两旁，故与脾胃关系密切。基于古今医案数据分析食管癌（噎膈）的用药规律研究亦显示，治疗食管癌常见以益气健脾，扶助正气为主，兼顾行气化痰，解毒化瘀[21]。

六君子汤出自《医学正传》，其组方为半夏、陈皮、茯苓、白术、甘草、人参，在治疗食管癌的方药中，六君子汤组方药物排在用药前 10 位，是临床治疗食管癌及术后并发症的常用方药，尤益于脾虚型和气阴两虚型食管癌[22]。在食管癌临床治疗方面，有学者使用六君子汤加减联合卡瑞利珠单抗治疗高龄食管癌患者达到了临床完全缓解[23]；韩辰燕等[24]临床观察六君子汤可以减轻患者便秘、恶心、呕吐等不良反应；也可以减轻患者术后的不良反应，更快恢复患者肠功能[25]。

在一般情况下，成纤维细胞是静止失活性状态，在机体受到损伤的愈合过程中成纤维细胞会被激活。而当肿瘤细胞对周边的成纤维细胞代谢进行重编程，成纤维细胞就会激活，成为普遍意义上的 CAFs[26]。CAFs 标志物包括 FAP、α 平滑肌肌动蛋白（α－SMA）波形蛋白和成纤维细胞特异性蛋白 1（FSP1）等，主要具有细胞运动、细胞收缩和保持细胞完整性的生物学功能[27]。研究发现，通过在转基因小鼠模型中选择性地耗竭肿瘤基质中的 FAP^{+} CAF，促进了细胞因子介导的肿瘤和基质缺氧性坏死，这证明了 FAP^{+} CAF 在促进肿瘤及其微环境的发展中具有重要的作用[28]。

TGF－β 信号转导是控制细胞和组织行为的主要途径之一，在正常生理及病理情况下保持人体内环境平衡。在肿瘤发生过程中，TGF－β 起到关键的协调作用，因为它具有抑癌因子和肿瘤促进子的双重作用[29]。另有研究表明脂肪来源的基质细胞（ADSC）诱导肿瘤细胞凋亡，激活 caspase3/7 信号通路[30]。并有多项研究证明，TGF－β1 促进 CAFs 中的活化成纤维细胞蛋白（FAP）表达，从而促进癌症的侵袭、转移和上皮间质转化[31－32]。

细胞凋亡分为内源性和外源性两种途径，内源性途径是由于化学物质或 DNA 损伤导致细胞内环境失调引发的。它的标志是线粒体外膜通透化（MOMP），从而促使细胞色素 C（Cyt C）释放到胞质溶胶中，从而激活半胱天冬酶－3（Caspase－3）和形成凋亡小体，这种现象通常被认为是细胞不可逆转的死亡之路。Caspase 在细胞凋亡中起到关键的作用，Caspase－3 是经典的半胱天冬酶之一，它是许多关键蛋白发生特异性切割中的重要介质之一。研究表明罗哌卡因通过激活 Caspase－3 促进 HCC 细胞凋亡[33]。在中医药抗肿瘤方面，有大量研究表明中药部分成分可以激活 Caspase－3 表达，从而促进肿瘤细胞的凋亡[34－36]。

本研究结果显示，与 TE－1 细胞共培养后，食管癌相关成纤维细胞的活性率升高，Smad2 和 FAP 蛋白表达水平降低，说明 TE－1 通过抑制 TGF－β1/Smad2 信号通路，从而促进 CAFs 增殖。与模型组相比，六君子汤组可以促进 TGF－β1/Smad2 信号通路的表达，激活 CAFs，进而促进 CAFs 凋亡。加入 TGF－β1 受体激酶抑制剂后，抑制了六君子汤对 CAFs Smad2 和 FAP 蛋白表达水平，从而抑制了 CAFs 的凋亡。反向证明六君子汤可以通过 TGF－β1/Smad2 信号通路促进 CAFs 的凋亡。

综上所述,TGF－β1/Smad2 通路有望成为促进 CAFs 凋亡的潜在靶点,从而抑制食管癌的发展。为六君子汤防治食管癌疾病的研究提供了新的思路,并为接下来的作用机制提供研究基础。

参考文献

[1] PENNATHUR A,GIBSON M K,JOBE B A,et al. Oesophageal carcinoma[J]. Lancet,2013,381(9864):400－412.
[2] 吕小立,李振妍,王利利,等. 食管癌放疗联合免疫治疗的进展与挑战[J]. 肿瘤学杂志,2023,29(5):373－379.
[3] 陈星,娄翔宇,尚艺婉,等. CAFs 条件培养基影响 EC9706 细胞能量代谢的分子机制探索[J]. 世界科学技术－中医药现代化,2023,25(10):3246－3253.
[4] 宋永祯,王菲,刘忠杰,等. 癌相关成纤维细胞来源的外泌体 miR－625－3p 对卵巢癌细胞 SKOV3 迁移和侵袭能力的影响及其机制[J]. 医学研究与战创伤救治,2023,36(12):1250－1256.
[5] 付立新,席磊,陈燕林,等. 肿瘤相关成纤维细胞通过 p38/MAPK 信号通路促进人乳腺癌细胞迁移[J]. 重庆医科大学学报,2019,44(2):163－168.
[6] 周畅,陈伟强,王宇恒,等. 癌相关成纤维细胞促进胃癌细胞迁移与侵袭[J]. 中山大学学报(医学科学版),2020,41(4):501－508.
[7] 徐丛. 下咽鳞癌相关成纤维细胞在肿瘤血管生成中的作用机制及治疗策略研究[D]. 石家庄:河北医科大学,2023.
[8] 姚禹,朱秀安,王琼. 癌相关成纤维细胞经 VEGF/VEGFR2 轴对口腔鳞状细胞癌血管生成的影响[J]. 皖南医学院学报,2023,42(4):312－316.
[9] WU F L,WEIGEL K J,ZHOU H M,et al. Paradoxical roles of TGF－β signaling in suppressing and promoting squamous cell carcinoma[J]. Acta Biochim Biophys Sin(Shanghai),2018,50(1):98－105.
[10] SHI X K,YANG J,DENG S Z,et al. TGF－β signaling in the tumor metabolic microenvironment and targeted therapies[J]. J Hematol Oncol,2022,15(1):135.
[11] WANG C Y,YANG S S,HUANG X,et al. TGF－β1 reduces the differentiation of porcine IgA－producing plasma cells by inducing IgM^+ B cells apoptosis *via* Bax/Bcl2－Caspase3 pathway[J]. FASEB J,2023,37(10):e23180.
[12] TANG J H,LIU J L,ZHANG X H. The role of osthole on TGF－β－induced lung epithelium apoptosis injury and epithelial－mesenchymal transition－mediated airway remodeling in pediatric asthma[J]. J Healthc Eng,2022,2022:7099097.
[13] 柳芳,刘青,贾立群,等. 中成药在防治食管癌中的研究进展[J]. 中国医院用药评价与分析,2023,23(10):1277－1280.
[14] 刘馨怡,邓天好,刘珍,等. 中医药治疗食管癌的临床及实验研究进展[J]. 湖南中医杂志,2023,39(8):201－206.
[15] 司富春,刘紫阳. 食管癌中医证型和用药规律分析[J]. 中医学报,2012,27(6):655－657.
[16] 尚艺婉,武颖烁,孟丹华,等. 基于 AKT/mTOR 通路探讨六君子汤抑制 EC9706 生长的作用机制[J]. 中华中医药杂志,2024,39(1):180－185.
[17] 尚艺婉,陈星,娄翔宇,等. 健脾和胃法代表方六君子汤对 4NQO 诱导的食管癌模型小鼠治疗作用机制研究[J]. 时珍国医国药,2023,34(11):2605－2609.
[18] 尚艺婉,孟丹华,罗文昭,等. 健脾和胃法六君子汤通过影响细胞能量代谢增强顺铂对 EC9706 活性抑制作用[J]. 中药药理与临床,2021,37(2):7－12.
[19] 陈星,娄翔宇,尚艺婉,等. 六君子汤乙酸乙酯提取物干预 CAFs 条件培养基下 EC9706 细胞能量代谢的机制研究[J]. 中国比较医学杂志,2023,33(11):17－24.
[20] 尚艺婉,朱芮,武颖烁,等. 启膈散乙酸乙酯部位提取物通过抑制 TGF－β1 信号通路干预食管癌细胞的迁移和侵袭[J]. 中国实验方剂学杂志,2023,29(7):66－75.
[21] 陈湘燕. 基于古今医案数据分析食管癌(噎膈)的用药规律研究[D]. 南京:南京中医药大学,2020.
[22] 樊李妍,范修琦,韩懿存,等. 六君子汤治疗食管癌的研究进展[J]. 中医学报,2024,39(4):765－772.
[23] 王赛,周超锋,郭志忠. 六君子汤加减联合卡瑞利珠单抗治疗高龄食管癌患者达临床完全缓解 1 例[J]. 中国民间疗法,2023,31(19):84－86.
[24] 韩辰燕,刘晓芯,董昀,等. 加味香砂六君子汤对食管癌新辅助放化疗患者胃肠道不良反应及生活质量的影响[J]. 西部中医药,2023,36(1):4－7.
[25] 吴伯勋,刘浩,刘洪利. 香砂六君子汤在微创食管癌切除术后肠功能恢复中的应用效果[J]. 医学信息,2021,34(6):169－171.
[26] RÄSÄNEN K,VAHERI A. Activation of fibroblasts in cancer stroma[J]. Exp Cell Res,2010,316(17):2713－2722.
[27] NURMIK M,ULLMANN P,RODRIGUEZ F,et al. In search of definitions: Cancer－associated fibroblasts and their markers[J]. Int J Cancer,2020,146(4):895－905.
[28] KRAMAN M,BAMBROUGH P J,ARNOLD J N,et al. Suppression of antitumor immunity by stromal cells expressing fibroblast activation protein－alpha[J]. Science,2010,330(6005):827－830.
[29] CALON A,TAURIELLO D F,BATLLE E. TGF－beta in CAF－mediated tumor growth and metastasis[J]. Semin Cancer Biol,2014,25:15－22.
[30] TAKAHARA K,Ⅱ M,INAMOTO T,et al. Adipose－derived stromal cells inhibit prostate cancer cell proliferation inducing apoptosis[J]. Biochem Biophys Res Commun,2014,446(4):1102－1107.
[31] HUANG M L,FU M R,WANG J,et al. TGF－β1－activated cancer－associated fibroblasts promote breast cancer invasion,metastasis and epithelial－mesenchymal transition by autophagy or overexpression of FAP－α[J]. Biochem Pharmacol,2021,188:114527.
[32] PING Q R,WANG C H,CHENG X,et al. TGF－β1 dominates stromal fibroblast－mediated EMT *via* the FAP/VCAN axis in bladder cancer cells[J]. J Transl Med,2023,21(1):475.
[33] WANG W T,ZHU M Y,XU Z X,et al. Ropivacaine promotes apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through damaging mitochondria and activating caspase－3 activity[J]. Biol Res,2019,52(1):36.
[34] 李端,王永辉,周静,等. 雷公藤红素通过调控 ATF4/caspase－3/GSDME 信号通路促进肝癌细胞焦亡[J]. 中国药理学通报,2024,40(2):299－307.
[35] 王桂园,田冬雪,李南. β－紫罗兰酮通过 Caspase－3 信号通路对乳腺癌细胞生物学行为的调控作用[J]. 实用癌症杂志,2024,39(2):186－189.
[36] 李红,陈金锐,杨智源. 蛇床子素对口腔癌 KB 细胞周期进程及凋亡的影响[J]. 中成药,2023,45(11):3803－3807.

基于 TGF－β1/Smad2 通路探讨六君子汤促进食管癌相关成纤维细胞凋亡的分子机制

（正文见 146－151 页）

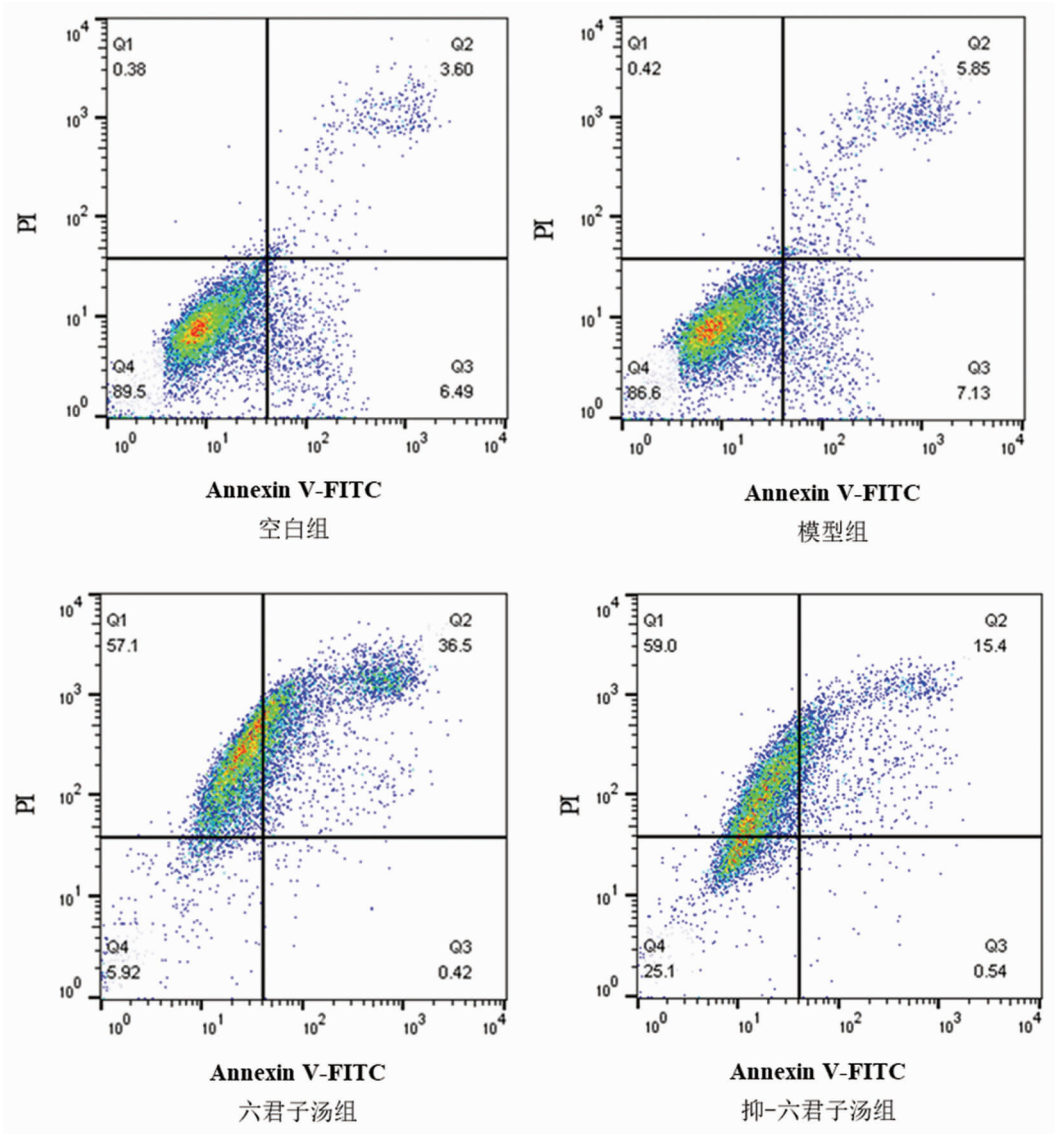


图 1　各组 CAFs 凋亡流式图