

缺氧微环境下仙连解毒方抑制结直肠癌细胞增殖的作用及机制

姜瑞阳¹, 徐长亮^{1,2*}, 程海波^{1,2}, 沈卫星^{1,2}, 范旻旻^{1,2}, 谭佳妮^{1,2}, 赖岳阳^{2,3},
余成涛^{1,2}, 孙东东^{1,2}, 李柳^{1,2}

(1. 南京中医药大学第一临床医学院, 南京 210023;
2. 江苏省中医药防治肿瘤协同创新中心, 南京 210023;
3. 南京中医药大学医学院·整合医学学院, 南京 210023)

[摘要] 目的: 观察缺氧微环境下仙连解毒方对含溴结构域蛋白4(Brd4)诱导的核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路激活的影响, 探讨其抑制结直肠癌细胞 HT-29 增殖的作用机制。方法: 于缺氧培养箱或常氧培养箱中培养人结直肠癌细胞 HT-29, 给予仙连解毒方(0.8、1、1.2、1.6、3.2、6.4、12.8 g·L⁻¹)干预细胞 48 h, 采用噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞活力; 采用线粒体膜电位荧光探针(JC-1)检测仙连解毒方(1.25、2.5、5 g·L⁻¹)对细胞线粒体膜电位的影响, 采用流式细胞术检测结直肠癌细胞 HT-29 凋亡情况; 细胞克隆形成实验及 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EDU)法检测结直肠癌细胞 HT-29 细胞增殖能力; 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Brd4 及其下游蛋白如 c-核蛋白类基因(c-Myc)、六亚甲基双乙酰胺诱导蛋白 1(HEXIM1)的表达水平, 同时检测仙连解毒方对 NF- κ B 信号通路相关蛋白的影响。结果: 与空白组比较, 仙连解毒方(0.8、1、1.2、1.6、3.2、6.4、12.8 g·L⁻¹)组均能抑制结直肠癌细胞 HT-29 细胞活力($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且缺氧培养下细胞半数抑制浓度(IC₅₀) > 常氧培养组。与空白组比较, 仙连解毒方(1.25、2.5、5 g·L⁻¹)组细胞线粒体膜电位明显下降、细胞凋亡增多($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与空白组比较, 仙连解毒方(1.25、2.5、5 g·L⁻¹)组细胞克隆数减少, EDU 阳性细胞数减少($P < 0.05$, $P < 0.01$)。Western blot 结果显示, 与空白组比较, 仙连解毒方(1.25、2.5、5 g·L⁻¹)组细胞内 Brd4、c-Myc 蛋白表达量均有不同程度的下降, HEXIM1 表达升高($P < 0.05$, $P < 0.01$); 磷酸化(p)-NF- κ B p65、磷酸化 NF- κ B 抑制蛋白 α (p-I κ B α)蛋白表达下调($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论: 缺氧微环境下仙连解毒方可抑制 Brd4 调控的结直肠癌细胞 HT-29 增殖, 抑制 NF- κ B 信号通路的激活可能是其机制之一。

[关键词] 仙连解毒方; 结直肠癌; 缺氧微环境; 细胞增殖; 含溴结构域蛋白4(Brd4); 核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)08-0079-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220422

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211209.0628.001.html>

[网络出版日期] 2021-12-12 15:03

Effect and Mechanism of Xianlian Jiedu Prescription Against Proliferation of Colorectal Cancer Cells in Hypoxic Microenvironment

JIANG Rui-yang¹, XU Chang-liang^{1,2*}, CHENG Hai-bo^{1,2}, SHEN Wei-xing^{1,2}, FAN Min-min^{1,2},
TAN Jia-ni^{1,2}, LAI Yue-yang^{2,3}, YU Cheng-tao^{1,2}, SUN Dong-dong^{1,2}, LI Liu^{1,2}

(1. *The First Clinical College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China*;
2. *Jiangsu Collaborative Innovation Center of Traditional Chinese Medicine in Prevention and Treatment of Tumor, Nanjing 210023, China*; 3. *School of Medicine and Holistic Integrative Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China*)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Xianlian Jiedu prescription (XLJDP) on the activation of nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway induced by bromodomain-containing protein 4

[收稿日期] 2021-09-05

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(81930117)

[第一作者] 姜瑞阳, 在读硕士, 从事中医药防治结直肠癌临床及基础研究, E-mail: 15105191723@163.com

[通信作者] * 徐长亮, 博士, 讲师, 从事中医药防治肿瘤研究, E-mail: 113560206@qq.com

(Brd4) in hypoxic microenvironment and to explore its mechanism in inhibiting the proliferation of colorectal cancer HT-29 cells. **Method:** The human colorectal cancer HT-29 cells were cultured in a hypoxic incubator or normoxia incubator and treated with XLJDP at 0.8, 1, 1.2, 1.6, 3.2, 6.4, and 12.8 g·L⁻¹ for 48 h, respectively. Following the detection of cell vitality using methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) colorimetry, the effects of XLJDP (1.25, 2.5, and 5 g·L⁻¹) on the cell mitochondrial membrane potential were determined using a fluorescent probe (JC-1), and the apoptosis of colorectal cancer HT-29 cells was detected by flow cytometry. The cell colony formation assay and 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EDU) staining were conducted to test the proliferation of colorectal cancer HT-29 cells. The Western blot was carried out to measure the expression levels of Brd4 and its downstream relevant proteins such as c-Myc and hexamethylene bisacetamide-inducible protein 1 (HEXIM1), as well as the effects of XLJDP on related proteins in the NF- κ B signaling pathway. **Result:** Compared with the blank control group, XLJDP at 0.8, 1, 1.2, 1.6, 3.2, 6.4, and 12.8 g·L⁻¹ inhibited the vitality of colorectal cancer HT-29 cells ($P<0.05$, $P<0.01$), with the median inhibitory concentration (IC₅₀) under the hypoxic condition higher than that under the normoxia condition. Compared with the blank control group, XLJDP at 1.25, 2.5, and 5 g·L⁻¹ significantly decreased the mitochondria membrane potential, enhanced the apoptosis ($P<0.05$, $P<0.01$), and lowered the number of cell colonies and also the EDU-positive cells ($P<0.05$, $P<0.01$). The results of Western blot showed that compared with the blank control group, XLJDP at 1.25, 2.5, and 5 g·L⁻¹ down-regulated Brd4, c-Myc, p-NF- κ B p65, and p-I κ B α protein expression to varying degrees and up-regulated the expression of HEXIM1 ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** In the hypoxic microenvironment, XLJDP inhibits the proliferation of colorectal cancer HT-29 cells regulated by Brd4, which may be related to its inhibition of the activation of NF- κ B signaling pathway.

[Keywords] Xianlian Jiedu prescription; colorectal cancer; hypoxia microenvironment; cell proliferation; bromodomain-containing protein 4 (Brd4); nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway

结直肠癌是影响人类健康福祉的重大疾病之一。截至2020年,全球估计有癌症新增病例数1 930万,其中结直肠癌的发病率位列第3,死亡率高居第2位,造成了严重的社会负担^[1]。经典腺瘤-癌进展模型认为结直肠癌是由获得性遗传和表观遗传变化的积累导致的,这些变化将正常腺上皮转化为侵袭性腺癌^[2]。表观遗传学泛指与DNA序列变化无关的且可遗传的基因表达改变^[3]。越来越多的证据表明,表观遗传的变化,特别是DNA甲基化及组蛋白修饰,在结直肠癌的发生发展过程中发挥重要作用^[4]。含溴结构域蛋白4(Brd4)是转录调控蛋白溴结构域和额外末端结构域(BET)表观遗传调节因子家族的成员之一,可促进包括肝细胞癌、淋巴瘤、结直肠癌、卵巢癌等在内的多种肿瘤的发展及远端转移^[5]。缺氧是实体瘤特征之一,缺氧微环境下,肿瘤具有更强的侵袭性和治疗耐药性表型^[6]。

中医药治疗恶性肿瘤有着悠久的历史,在降低复发与转移率、减轻化疗不良反应、延长生存期、改善生活质量等方面意义重大^[7]。仙连解毒方是岐黄学者程海波教授的临床经验方,方由仙鹤草、黄连、炙黄芪、生薏苡仁等按特定比例制成,诸药合用,可

奏清热化湿、祛瘀解毒、健脾益气之功。本研究基于核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路,从表观遗传学的角度,通过抑制Brd4的表达,调控抑癌基因c-核蛋白类基因(c-Myc)转录,探讨缺氧微环境下仙连解毒方对结直肠癌细胞增殖的影响及机制,为临床治疗大肠癌提供实验室依据。

1 材料

1.1 细胞株 人结肠细胞系 HT-29 细胞株购自中国科学院上海生命科学院细胞库,编号 TCHu103,本研究均采用传代20代以内的细胞进行实验。

1.2 药品与试剂 仙连解毒方主要由仙鹤草、黄连、炙黄芪、生薏苡仁等药物组成,饮片均购自江苏省中医院;经南京中医药大学邹立思教授鉴定为正品,复方由南京中医药大学药理教研室煎制:煎制前将所有饮片浸泡2 h,以10倍和8倍蒸馏水煎煮2次并抽滤,将药液浓缩至1 200 g·L⁻¹,醇沉后浓缩至3 000 g·L⁻¹。置于-20℃保存备用。在处理细胞前,将浓缩液室温解冻并离心,2 000×g离心15 min(离心半径30 cm),取上清液并用0.22 μ m滤膜过滤除菌。加入仙连解毒方后调培养基pH 7.2~7.4。RPMI 1640培养基(上海源培生物技术有限公司,批

号 J210918), 胎牛血清(美国 Gibco 公司, 批号 10099-141C), 噻唑蓝(MTT)、结晶紫染料(美国 Sigma 公司, 批号分别为 #MKCK3153、#MKBT4498 V), RIPA 细胞裂解液、线粒体膜电位荧光探针(JC-1)、5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EDU)试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司, 批号分别为 P0013D、C2005、011121210326), 细胞凋亡检测、PAGE 凝胶快速制备、ECL 化学发光超敏显色试剂盒(翌圣生物科技股份有限公司, 批号分别为 A2001231、P5111090、S3115070), 甘油醛 3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、c-Myc、NF- κ B 抑制蛋白 α (I κ B α)、磷酸化(p)-I κ B α 、p-NF- κ B p65、鼠抗免疫球蛋白(Ig)G、兔抗 IgG 抗体(美国 CST 公司, 批号分别为 5174s、5605T、4814T、2859T、3033T、7076s、7074s), NF- κ B p65(美国 Santa Cruz 公司, 批号 #F1419), Brd4、HEXIM1 抗体(美国 Abcam 公司, 批号分别为 GR3375497-2、GR312418-2)。

1.3 仪器 XD202 型超净工作台(中国苏州安泰空气技术有限公司), HERAcell 150i 型二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司), ECLIPSE Ti-5 型荧光倒置显微镜(日本 Nikon 公司), FACSCanto™ 型流式细胞仪(美国 BD 公司), ProwerPac™ Basic 型凝胶电泳仪(美国 Bio-Rad 公司), Tanon-5500 型化学发光凝胶成像仪器(中国上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 HT-29 细胞用 RPMI 1640 培养基(培养基含 10% 胎牛血清, 100 U·mL⁻¹ 青霉素及 100 U·mL⁻¹ 链霉素)培养, 常氧培养将细胞静置于 37 °C, 5% CO₂ 细胞培养箱中; 将细胞置于缺氧培养箱(该培养箱内条件为 95% N₂ 和 5% CO₂, O₂ 浓度维持在 1% 以下)中, 以实现缺氧条件。

2.2 MTT 比色法检测细胞活力 取对数生长期的结肠癌 HT-29 细胞, 以 1×10⁴ 个/mL 接种于 96 孔板, 100 μ L/孔, 待细胞贴壁后加入仙连解毒方醇提物(0.8、1、1.2、1.6、3.2、6.4、12.8 g·L⁻¹)处理细胞, 置于常氧或缺氧培养箱中 48 h。药物干预结束后, 每孔加入 5 g·L⁻¹ MTT 20 μ L, 继续培养 3 h。反应结束后, 吸取孔内培养液, 加入二甲基亚砜(DMSO) 150 μ L, 置于摇床上 15 min 缓慢摇匀以溶解沉淀, 用酶标仪检测 490 nm 处的吸光度 *A*, GraphPad Prism v9.0.0 软件计算细胞增殖抑制率。

2.3 集落形成试验 取对数生长期的细胞, 将 HT-29 细胞悬液以 800 个细胞/孔接种于六孔板, 37 °C, 1% CO₂ 培养 48 h, 当 HT-29 细胞完全贴壁时, 加入仙连解毒方醇提物(1.25、2.5、5 g·L⁻¹), 在缺氧培养

箱中培养 10 d 左右, >50 个细胞/菌落被认为是 1 个克隆, 结晶紫染色, 拍照并计数。

2.4 EDU 法检测细胞增殖能力 细胞经各浓度仙连解毒方处理 48 h, 加入预热的 EDU 工作液 37 °C 孵育 2 h, 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤, 加入 0.3% TritonX-100 室温孵育 10 min, PBS 洗涤, 分步加入染色液及 Hoechst 染核, 于荧光倒置显微镜下拍照, 细胞核蓝染, EDU 绿染为阳性细胞, 随机选取 5 个视野进行拍照计数, 计算 EDU 染色的阳性率, 阳性率 = EDU⁺细胞数/Hoechst⁺细胞数×100%。

2.5 JC-1 法检测线粒体膜电位的改变 细胞经各浓度仙连解毒方处理 48 h, 每孔加入 JC-1(12 孔板)染色工作液 500 μ L, 37 °C 孵育 20 min。孵育期间, 按照每 JC-1 染色缓冲液(5 \times) 500 μ L 加入蒸馏水 4 mL 的比例, 配制适量的 JC-1 染色缓冲液(1 \times)。孵育, 用染色缓冲液洗涤 2 次, 加入适量细胞培养基, 于荧光倒置显微镜下观察。

2.6 流式细胞术检测细胞凋亡 取对数生长期的结肠癌细胞 HT-29 接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁后加入仙连解毒方醇提物(1.25、2.5、5 g·L⁻¹)处理细胞, 并设立空白组, 置于缺氧培养箱中作用 48 h。用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化各组细胞, 用 PBS 洗涤并收集细胞, 以 Binding buffer 100 μ L 重悬细胞, 并加入 FITC 染液 5 μ L、PI 染液 10 μ L, 移液枪吹打混匀, 室温下静置 15 min, 上机前再向各管中加入 Binding buffer 液 400 μ L 混匀, 使终体系为 500 μ L, 流式细胞仪检测各组细胞的凋亡情况。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测蛋白表达 取对数生长期的结肠癌细胞, 给予仙连解毒方醇提物(1.25、2.5、5 g·L⁻¹)与缺氧培养箱中干预 48 h 后提取蛋白。用预冷的 PBS 洗涤细胞, 向每个培养皿中加入裂解液 500 μ L, 细胞刮刮下并转移至新的离心管中, 冰上裂解 30 min 后离心(12 000 \times g, 15 min, 离心半径 30 cm), 收集上清。调整蛋白浓度后加入 4 \times loading buffer 置于金属浴中加热变性(95 °C, 10 min)。进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白(80 V), 湿转膜(300 mA, 90 min), 5% 脱脂牛奶封闭过夜(4 °C)。一抗(1:1 000)孵育过夜(4 °C)。洗膜、二抗(1:1 万)室温孵育 1 h, 最后用 ECL, 剂盒发光显色, Image J 软件进行条带数据分析。

2.8 统计学方法 采用 GraphPad Prism v9.0.0 软件进行数据处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间独立样本 *t* 检验, 多组间均数比较采用单因素方差分析,

$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 仙连解毒方对结直肠癌细胞活力的影响 与空白组比较,常氧和缺氧条件仙连解毒方能有效抑制 HT-29 细胞活力,细胞存活率逐渐下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),缺氧条件仙连解毒方对 HT-29 细胞的半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 $5.53 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,常氧条件细胞的 IC_{50} 为 $4.94 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,见表 1。后续缺氧条件下仙连解毒方干预设定给药质量浓度分别为 5、2.5、1.25 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

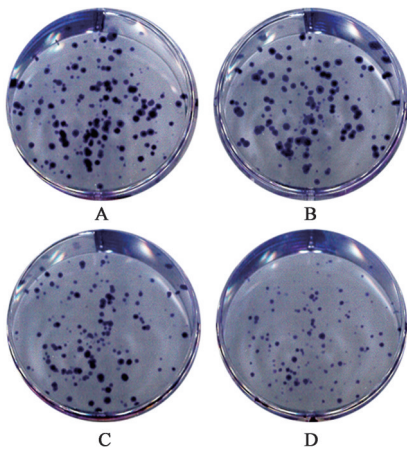
表 1 仙连解毒方对 HT-29 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effect of Xianlian Jiedu prescription on viability of HT-29 cells under hypoxia ($\bar{x} \pm s, n=3$) %

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	常氧细胞存活率	厌氧细胞存活率
空白组		100.00±0.00	100.00±0.00
仙连解毒方组	0.8	90.27±3.09 ¹⁾	95.48±1.06 ¹⁾
	1	91.57±3.78 ¹⁾	83.86±4.07 ¹⁾
	1.2	77.43±1.23 ²⁾	73.68±1.38 ¹⁾
	1.6	66.16±0.98 ²⁾	68.15±2.42 ²⁾
	3.2	61.23±1.94 ²⁾	58.49±1.30 ²⁾
	6.4	39.97±0.86 ²⁾	47.32±1.35 ²⁾
	12.8	28.38±3.69 ²⁾	36.49±1.09 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2-表 6 同)

3.2 缺氧条件下仙连解毒方对结直肠癌细胞增殖的影响 细胞集落形成实验,与空白组比较,仙连解毒方组单个细胞形成集落的能力明显减弱 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图 1、表 2。EDU 增殖实验结果,与空白组比较,仙连解毒方组细胞 EDU 阳性率明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),缺氧微环境下仙连解毒方可抑制结直肠癌细胞的增殖。见图 2、表 3。



注:A. 空白组;B-D. 仙连解毒方组(1.25、2.5、5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)(图 2-图 5 同)

图 1 仙连解毒方对 HT-29 细胞克隆形成率的影响(结晶紫染色)

Fig. 1 Effect of Xianlian Jiedu prescription on clone formation rate of HT-29 cells (crystal violet staining)

表 2 仙连解毒方对 HT-29 细胞克隆形成率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of Xianlian Jiedu prescription on clone formation rate of HT-29 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	克隆形成率/%
空白组		100.00±0.00
仙连解毒方组	1.25	80.24±6.88 ¹⁾
	2.5	53.50±5.02 ²⁾
	5	33.13±5.50 ²⁾

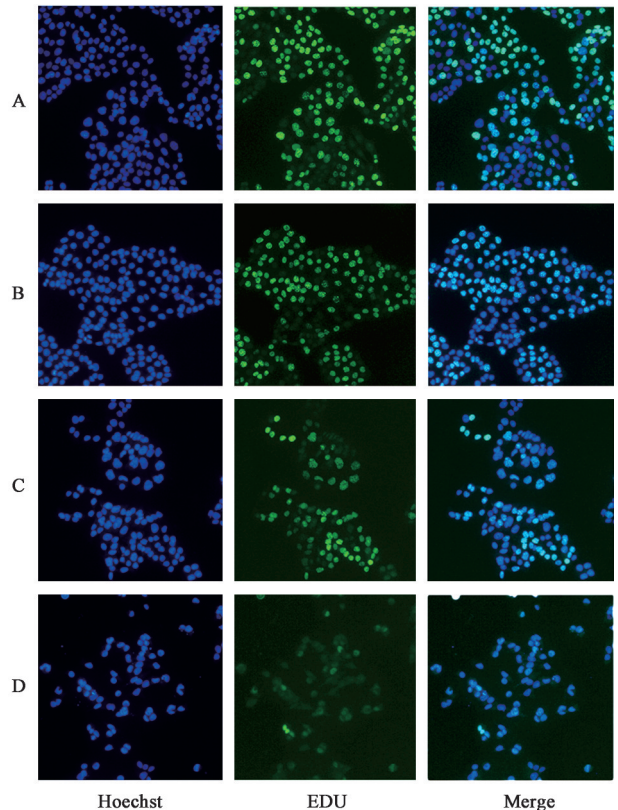


图 2 仙连解毒方对 HT-29 细胞增殖能力的影响(Hoechst, ×100)

Fig. 2 Effect of Xianlian Jiedu prescription on proliferation of HT-29 cells (Hoechst, ×100)

表 3 仙连解毒方对 HT-29 EDU 细胞阳性率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Xianlian Jiedu prescription on positive rate of HT-29 EDU cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	EDU 细胞阳性率/%
空白组		84.58±2.13
仙连解毒方组	1.25	71.98±2.58 ¹⁾
	2.5	55.90±4.38 ²⁾
	5	44.11±2.56 ²⁾

3.3 缺氧条件下仙连解毒方对 HT-29 细胞线粒体膜电位的影响 与空白组比较,仙连解毒方组 HT-29 细胞绿色荧光强度显著增强,红色荧光强度显著减弱,表明仙连解毒方能够显著减弱 HT-29 细胞线粒体膜电位,见图 3。

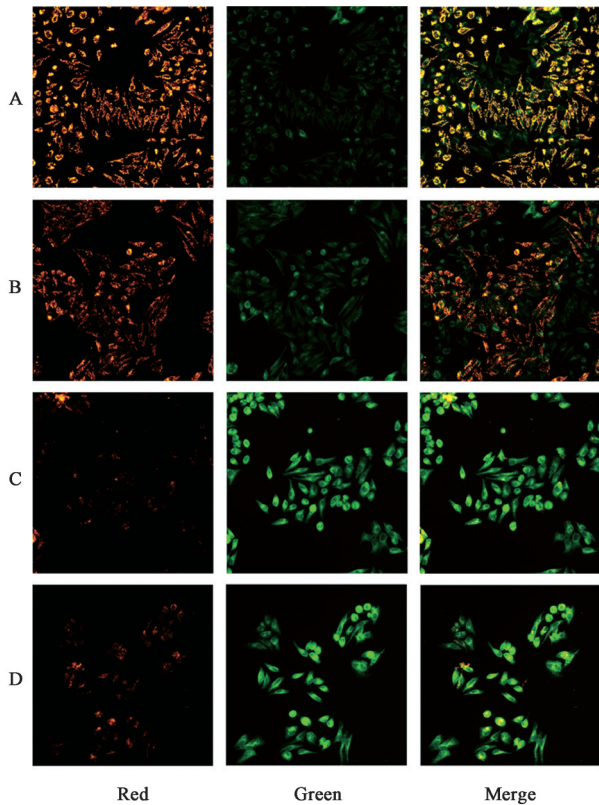


图3 缺氧条件下仙连解毒方对HT-29细胞线粒体膜电位的影响(线粒体膜电位荧光,×100)

Fig. 3 Effect of Xianlian Jiedu prescription on mitochondrial membrane potential of HT-29 cells under hypoxia (JC-1, ×100)

3.4 缺氧条件下仙连解毒方对结直肠癌细胞HT-29凋亡的影响 与空白组比较,仙连解毒方组细胞凋亡率均明显升高($P<0.05, P<0.01$),呈浓度依赖性。见表4。

表4 仙连解毒方对HT-29细胞凋亡率的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Xianlian Jiedu prescription on apoptosis rate of HT-29 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	凋亡率/%
空白组		2.91±0.72
仙连解毒方组	1.25	13.75±2.39 ¹⁾
	2.5	20.29±1.58 ¹⁾
	5	35.91±2.94 ²⁾

3.5 缺氧条件下仙连解毒方对Brd4及其下游蛋白的影响 Brd4深入参与表观遗传学调控,在结直肠癌细胞、组织中高表达,靶向Brd4在结直肠癌的治疗中具有重要潜力^[8]。与空白组比较,仙连解毒方组Brd4、c-Myc蛋白表达水平明显下调($P<0.05, P<0.01$),HEXIM1蛋白表达水平明显升高($P<0.05, P<0.01$)。见表5、图4。

表5 仙连解毒方对HT-29细胞中Brd4及其下游相关蛋白的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Xianlian Jiedu prescription on Brd4 and its downstream relative proteins in HT-29 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	Brd4 /GAPDH	HEXIM1 /GAPDH	c-Myc /GAPDH
空白组		0.77±0.03	0.46±0.03	0.70±0.03
仙连解毒方组	1.25	0.61±0.04 ¹⁾	0.66±0.02 ¹⁾	0.65±0.06 ¹⁾
	2.5	0.53±0.01 ¹⁾	0.72±0.04 ¹⁾	0.36±0.01 ²⁾
	5	0.28±0.02 ²⁾	0.83±0.06 ²⁾	0.24±0.01 ²⁾

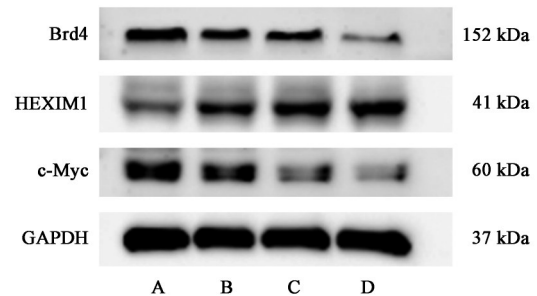


图4 HT-29细胞中Brd4及其下游相关蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of Brd4 and its downstream target genes in HT-29 cells

3.6 缺氧条件下仙连解毒方对NF-κB信号通路的影响 与空白组比较,仙连解毒方组HT-29细胞p-NF-κB p65、p-IκBα蛋白表达水平均降低($P<0.05, P<0.01$), p-NF-κB p65/NF-κB p65、p-IκBα/IκBα均降低($P<0.05, P<0.01$)。提示仙连解毒方给药后,能够抑制NF-κB信号通路激活。见图5、表6。

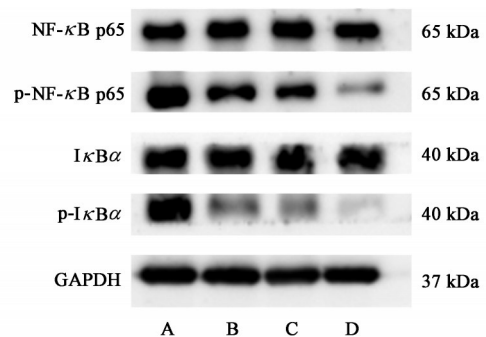


图5 仙连解毒方作用NF-κB信号通路相关蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of Xianlian Jiedu prescription on NF-κB signal pathway related protein expression

4 讨论

结直肠癌是临床常见的消化道恶性肿瘤之一,中医学中属“积聚”“肠覃”“肠风”“脏毒”范畴^[9]。“癌毒”病机理论认为脾气亏虚是大肠癌发生发展的内在基础,湿热瘀毒是其发展的重要条件^[10]。本团队以“癌毒”病机理论为指导,结合临床实践,提出结

表6 仙连解毒方对NF-κB信号通路相关蛋白表达的影响 (x̄±s, n=3)

Table 6 Effect of Xianlian Jiedu prescription on NF-κB signal pathway related protein expression (x̄±s, n=3)

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	NF-κB p65 /GAPDH	p-NF-κB p65 /GAPDH	IκBα /GAPDH	p-IκBα /GAPDH	p-NF-κB p65 /NF-κB p65	p-IκBα /IκBα
空白组		1.15±0.04	1.16±0.03	1.23±0.06	1.13±0.05	1.01±0.06	0.92±0.02
仙连解毒方组	1.25	1.25±0.01	0.96±0.05 ¹⁾	1.24±0.03	0.62±0.03 ¹⁾	0.76±0.04 ¹⁾	0.50±0.04 ¹⁾
	2.5	1.43±0.04	0.84±0.04 ¹⁾	1.25±0.03	0.42±0.02 ¹⁾	0.59±0.04 ¹⁾	0.33±0.01 ²⁾
	5	1.34±0.05	0.31±0.01 ²⁾	1.30±0.05	0.20±0.01 ²⁾	0.23±0.03 ²⁾	0.15±0.01 ²⁾

直肠癌核心病机证候是“湿热瘀毒证”，在“清热化湿、祛瘀解毒、健脾益气”的治法指导下，创立了防治结直肠癌的基本方仙连解毒方，也是岐黄学者程海波教授临床辨治结直肠癌的有效验方。仙连解毒方中仙鹤草解毒补虚，黄连泻火解毒，二药共奏抗癌解毒之功；炙黄芪性温，味甘，益气健脾，生薏苡仁性微寒，下气利水，诸药合用，全方共奏“清热化湿、祛瘀解毒、健脾益气”之功。

缺氧是肿瘤微环境的一个共同特征，研究表明，缺氧条件下结直肠癌细胞(CRC)表现出对奥沙利铂(OXA)、5-氟尿嘧啶(5-Fu)、多柔比星(DOX)和环磷酰胺(CTX)等的治疗抗性^[11]，且缺氧条件下血管生成、上皮细胞-间充质转化(EMT)、转化生长因子(TGF)-β信号传导增强^[12]。Brd4是转录调控蛋白溴结构域和额外末端结构域(BET)家族的成员之一，Brd4通过其溴结构域识别组蛋白上的乙酰化赖氨酸残基，并将转录调控复合物募集到乙酰化染色质^[13]。Brd4已被证实在多种恶性肿瘤的发病过程中发挥重要作用，Brd4抑制剂可通过多种方式有效抑制恶性肿瘤的生长和预防远端转移^[14]。癌基因Myc导致细胞过度增殖、细胞周期进展和转移^[15]。几乎所有CRC中都显示出Myc水平升高和Myc靶基因的失调^[16]。由于Myc癌基因的转录依赖于Brd4^[17]，因此，调控Brd4为治疗CRC提供了新的治疗前景。NF-κB是一种转录因子，可被各种刺激激活并在细胞存活和增殖中发挥关键作用^[18]。p65的磷酸化和乙酰化是其核易位和转录激活所必需的^[19]。在与指定的启动子结合后，p65还会招募p-TEFb以激活其靶基因的转录^[20]。有文献报道，p65的转录激活依赖于Brd4，可联接p-TEFb和乙酰化的p65^[21]。此外，NF-κB的一个亚基RelA可以被p300乙酰转移酶在310位赖氨酸处乙酰化，以促进与Brd4的2个溴结构域的相互作用^[22]。

本研究通过体外细胞实验探讨了仙连解毒方治疗结直肠癌的有效性及其可能机制。用MTT比色

法，检测不同培养条件下仙连解毒方对结直肠癌细胞HT-29细胞活力的影响，结果提示，与常氧组比较，缺氧条件下IC₅₀升高，这或许与细胞耐药相关。在后续的实验中，聚焦肿瘤缺氧微环境，通过一系列细胞功能实验，证实了仙连解毒方对结直肠癌细胞HT-29细胞增殖的抑制作用。通过Western blot检测给药前后结直肠癌细胞中Brd4蛋白水平的变化，结果提示，予仙连解毒方干预HT-29细胞48 h，Brd4蛋白表达水平下降，且抑制了Brd4下游蛋白c-Myc的表达水平，增加了HEXIM1的蛋白表达水平，同时仙连解毒方可降低NF-κB信号通路相关蛋白的磷酸化水平，如p-NF-κB p65、p-IκBα。

综上所述，缺氧微环境下仙连解毒方可抑制结直肠癌细胞HT-29的增殖，干预Brd4引起NF-κB信号通路激活可能是其机制。本研究为仙连解毒方临床治疗结直肠癌提供了理论指导，然而存在一定局限性，未来仍需要进行小鼠等体内实验进一步验证。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.

[2] FEARON E R, VOGELSTEIN B. A genetic model for colorectal tumorigenesis [J]. Cell, 1990, 61(5): 759-767.

[3] SHARMA S, KELLY T K, JONES P A. Epigenetics in cancer [J]. Carcinogenesis, 2010, 31(1): 27-36.

[4] TOH TB, LIM J J, CHOW E K. Epigenetics in cancer stem cells [J]. Mol Cancer, 2017, 16(1): 29.

[5] HU Y, ZHOU J, YE F, et al. Brd4 inhibitor inhibits colorectal cancer growth and metastasis [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(1): 1928-1948.

[6] JING X, YANG F, SHAO C, et al. Role of hypoxia

- in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment[J]. *Mol Cancer*, 2019,18(1):157.
- [7] 王俊壹. 仙连颗粒联合XELOX方案治疗IV期结直肠癌的临床研究[D]. 南京:南京中医药大学,2019.
- [8] ZHANG P, LI R, XIAO H, et al. Brd4 inhibitor AZD5153 suppresses the proliferation of colorectal cancer cells and sensitizes the anticancer effect of PARP inhibitor[J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(9): 1942-1954.
- [9] 魏小曼,程海波. 基于癌毒病机理论的大肠癌治则治法[J]. *中华中医药杂志*, 2020,35(12):6182-6184.
- [10] 程海波,李柳,周学平,等. 中医肿瘤癌毒病机辨证体系的创建[J]. *中医杂志*, 2020,61(20):1767-1770.
- [11] YANG H, ZHANG H, YANG Y, et al. Hypoxia induced exosomal circRNA promotes metastasis of colorectal cancer via targeting GEF-H1/RhoA axis[J]. *Theranostics*, 2020, 10(18):8211-8226.
- [12] QI L, CHEN J, YANG Y, et al. Hypoxia correlates with poor survival and M2 macrophage infiltration in colorectal cancer[J]. *Front Oncol*, 2020, 10:566430.
- [13] DONITA B, LORENINI E, CIARROCCHI A. Brd4 and cancer: Going beyond transcriptional regulation [J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1):164.
- [14] FILIPPAKOPOULOS P, QI J, PICAUD S, et al. Selective inhibition of BET bromodomains[J]. *Nature*, 2010, 468(7327):1067-1073.
- [15] EILERS M, EISENMAN RN. Myc's broad reach[J]. *Genes Dev*, 2008, 22(20):2755-2766.
- [16] SANSOM O J, MENEIL V S, MUNCAN V, et al. Myc deletion rescues Apc deficiency in the small intestine[J]. *Nature*, 2007, 446(7136):676-679.
- [17] DEVAIAH B N, MU J, AKMAN B, et al. Myc protein stability is negatively regulated by Brd4 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117 (24) : 13457-13467.
- [18] MEFFERT M K, CHANG J M, WILTGEN B J, et al. NF- κ B functions in synaptic signaling and behavior [J]. *Nat Neurosci*, 2003, 6(10):1072-1078.
- [19] NOWAK D E, TIAN B, JAMALUDDIN M, et al. RelA Ser276 phosphorylation is required for activation of a subset of NF- κ B-dependent genes by recruiting cyclin-dependent kinase 9/cyclin T₁ complexes [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(11):3623-3638.
- [20] BARBORIC M, NISSEN R M, KANAAZAWA S, et al. NF- κ B binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II [J]. *Mol Cell*, 2001, 8(2):327-337.
- [21] YOSHIDA H, BANSAL K, SCHAEFER U, et al. Brd4 bridges the transcriptional regulators, Aire and P-TEFb, to promote elongation of peripheral-tissue antigen transcripts in thymic stromal cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(32):E4448-4457.
- [22] SHI J, VAKOC C R. The mechanisms behind the therapeutic activity of BET bromodomain inhibition [J]. *Mol Cell*, 2014, 54(5):728-736.

[责任编辑 张丰丰]