

仙连解毒方维持肿瘤相关血管内皮细胞稳态 抑制肿瘤血管新生的作用机制

王启娟¹, 沈卫星^{1,2*}, 姜瑞阳¹, 徐长亮^{1,2}, 沈政洁³, 闫秋莹², 孙东东², 程海波^{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. 南京中医药大学张家港附属医院, 江苏 苏州 215600)

[摘要] 目的:观察仙连解毒方对肿瘤相关内皮细胞(CRE)增殖、凋亡、迁移的影响,并探讨仙连解毒方调控血管生成素2(Ang2)维持肿瘤相关内皮细胞稳态抑制肿瘤新生血管生成的作用机制。方法:人结肠癌细胞HCT-116条件培养基诱导人脐静脉内皮细胞系(HUVEC-c)为肿瘤相关内皮细胞。设置空白组、条件培养基组、仙连解毒方组(1、2、3 g·L⁻¹),分别作用于肿瘤相关内皮细胞48 h。采用噻唑蓝(MTT)比色法检测CRE细胞增殖能力;倒置显微镜观察CRE细胞形态变化;流式细胞术检测各组细胞凋亡率;细胞伤口愈合实验和Transwell迁移实验检测CRE细胞2D/3D迁移能力;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测仙连解毒方对CRE细胞波形蛋白(Vimentin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、Ang2等蛋白的表达。结果:MTT比色法结果显示,与空白组比较,条件培养基组细胞活力明显增强($P<0.05$);与条件培养基组比较,仙连解毒方组细胞增殖率显著降低($P<0.01$);细胞形态发生明显改变。流式细胞术结果显示,与条件培养基组比较,仙连解毒方组细胞总凋亡率均显著上升($P<0.01$)。细胞伤口愈合实验和Transwell迁移实验结果显示,与空白组比较,条件培养基组2D、3D迁移能力增强($P<0.05, P<0.01$);与条件培养基组比较,仙连解毒方组2D迁移能力显著减弱($P<0.01$),仙连解毒方组(2、3 g·L⁻¹)3D迁移能力显著减弱($P<0.01$)。Western blot结果显示,与空白组比较,条件培养基组N-cadherin、Vimentin、MMP-9、Ang2蛋白表达水平明显上升($P<0.05, P<0.01$);与条件培养基组比较,仙连解毒方组Ang2蛋白表达水平明显下降($P<0.05, P<0.01$),仙连解毒方组(2、3 g·L⁻¹)N-cadherin、Vimentin、MMP-9蛋白表达水平显著下降($P<0.01$)。结论:仙连解毒方可能是通过降低Ang2在肿瘤相关血管内皮细胞中的表达,抑制肿瘤血管新生,维持血管内皮细胞稳态,从而抑制CRE细胞的增殖、迁移、分化,并诱导其凋亡。

[关键词] 仙连解毒方; 结肠直肠癌; 血管稳态; 血管生成素2; 条件培养基

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)08-0086-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220828

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20220216.0927.002.html>

[网络出版日期] 2022-02-16 14:07

Mechanism of Xianlian Jiedu Prescription in Maintaining Cancer Relative Vascular Endothelial Cell Homeostasis and Inhibiting Tumor Neovascularization

WANG Qi-juan¹, SHEN Wei-xing^{1,2*}, JIANG Rui-yang¹, XU Chang-liang^{1,2}, SHEN Zheng-jie³,
YAN Qiu-ying², SUN Dong-dong², CHENG Hai-bo^{1,2}

(1. The First Clinical Medical College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;
2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Traditional Chinese Medicine for Prevention and Treatment of Tumor, Nanjing 210023, China; 3. Zhangjiagang Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Suzhou 215600, China)

[收稿日期] 2021-12-29

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(81930117);国家自然科学基金项目(82104956)

[第一作者] 王启娟, 硕士, 从事中医肿瘤临床及研究, E-mail: aprildfg@163.com

[通信作者] * 沈卫星, 博士, 副教授, 从事中医药防治肿瘤研究, E-mail: weixingshen@njucm.edu.cn

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Xianlian Jiedu prescription (XLJDP) on the proliferation, apoptosis, and migration of cancer-related endothelial (CRE) cells, and to decipher the mechanism of XLJDP in regulating angiopoietin2 (Ang2) to maintain CRE cell homeostasis and inhibit tumor neovascularization. **Method:** Human umbilical vein endothelial cell line (HUVEC-c) was induced into CRE cells in the human colorectal cancer HCT-116 cell-conditioned medium. The CRE cells were assigned into the blank group, conditioned medium group, and XLJDP groups (1, 2, 3 g·L⁻¹) and treated for 48 h. The proliferation of CRE cells was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) colorimetry. The morphological changes of CRE cells were observed via an inverted microscope. The apoptosis rate was detected by flow cytometry. Wound healing test and Transwell migration assay were employed to detect the 2D/3D migration ability of CRE cells. The protein levels of vimentin, N-cadherin, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), and Ang2 in CRE cells were measured by Western blot. **Result:** The MTT results showed that the cell viability was higher in the conditioned medium group than in the blank group ($P<0.05$). Compared with the conditioned medium group, XLJDP decreased the cell proliferation rate ($P<0.01$) and changed the cell morphology. The total apoptosis rates of all the XLJDP groups were higher than that of the conditioned medium group ($P<0.01$). The 2D and 3D migration abilities of the conditioned medium group were higher than those of the blank group ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the conditioned medium group, XLJDP at all the concentrations weakened the 2D migration ability ($P<0.01$) and medium- and high-concentration XLJDP weakened the 3D migration ability ($P<0.01$). The protein levels of N-cadherin, Vimentin, MMP-9, and Ang2 were up-regulated in the conditioned medium group compared with those in the blank group ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the conditioned medium group, XLJDP at all the concentrations down-regulated the protein level of Ang2 ($P<0.05$, $P<0.01$), and medium- and high-concentration XLJDP down-regulated those of N-cadherin, vimentin, and MMP-9 protein ($P<0.01$). **Conclusion:** XLJDP may inhibit the proliferation, migration, differentiation, and apoptosis of CRE cells by down-regulating the expression of Ang2, inhibiting tumor neovascularization, and maintaining the cell homeostasis.

[Keywords] Xianlian Jiedu prescription (XLJDP); colorectal cancer; vascular homeostasis; angiopoietin2; conditioned medium

结直肠癌是目前世界上发病率第3位,死亡率居第2位癌症^[1]。预计到2030年,全球结直肠癌的负担将增加60%,达到220多万新病例和110万死亡病例^[2]。虽然过去20年结直肠癌诊断和治疗水平明显提高,但是由于结直肠癌的高转移性,5年的生存率仍低于50%^[3]。结直肠癌细胞可以通过诱导血管新生,促进肿瘤生长及转移,因此肿瘤血管生成在结直肠癌局部和远端转移中发挥重要作用^[4]。目前,西医治疗结直肠癌转移主要通过运用一些激酶抑制剂或者单抗,如贝伐单抗、厄洛替尼,但是由于费用高昂、获得性耐药及一些不良反应,往往限制了该类药物的临床运用^[5]。并有报道表明,该类药物可能会引发更具侵袭性肿瘤表型^[6-7]。因此,开发价格低廉、不良反应低、疗效稳定的防治结直肠癌转移的药物具有重要的临床意义。中医药具有多靶点、低毒、效果好等优势,成为抗肿瘤新药发现的宝库。

肿瘤微环境,尤其是缺氧微环境在肿瘤细胞转移机制中起着重要的促进作用^[8-9]。血管生成素2 (Ang2)是促血管生成的重要细胞因子之一,通过促进血管内皮细胞出芽,导致血管内皮细胞不稳定等,在肿瘤血管新生中起着至关重要的作用^[10]。相比较于血管生成素1(Ang1)、Ang2在肿瘤微环境中过表达,是目前抗肿瘤血管生成的重要靶标。仙连解毒方是岐黄学者程海波教授在癌毒病机理论指导下,根据结直肠癌的中医病机进行组方的临床经验方。前期研究发现,缺氧微环境下仙连解毒方可抑制含溴结构域蛋白4(Brd4)调控的结直肠癌细胞HT-29增殖^[11]。因此,本研究在此基础上,进一步探讨仙连解毒方是否通过调控Ang2在肿瘤相关血管内皮细胞中的表达,维持血管内皮细胞稳态,从而抑制肿瘤相关内皮细胞CRE的增殖、迁移、分化,并诱导其凋亡的作用。

1 材料

1.1 细胞株 人脐静脉内皮细胞株 HUVEC-c 购自上海中乔新舟生物科技有限公司, 编号 ZQ0446; 人结肠癌 HCT116 细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心, 编号 TCHu99, 本研究采用传代 20 代以内细胞进行实验。

1.2 药品与试剂 仙连解毒方由仙鹤草、黄连、生薏仁、炙黄芪等中药按特定剂量比例组成, 方中饮片购自江苏省中医院, 经南京中医药大学中药资源与鉴定专家邹立思教授鉴定为正品, 本方交由南京中医药大学药理教研室煎制, 将饮片置于清水中浸泡 2 h, 分别加入 10、8 倍药量的水煎煮 2 次, 每次 2 h, 收集合并 2 次滤液, 浓缩至含生药 $1\ 200\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 之后再经 60% 乙醇醇沉 1 h 后进行抽滤, 低温减压形成含生药 $3\ 000\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓缩药液, 保存备用。仙连解毒方药液使用时, 先经 $2\ 000\times\text{g}$ 离心 15 min (离心半径 30 cm), 取上清, 经 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜滤过除菌, 仙连解毒方给药后将培养基调整 pH 7.2~7.4。胎牛血清 (美国 Gibco 公司, 批号 10099-141C), 内皮细胞培养基 (ECM, 上海中乔新舟生物科技有限公司, 批号 33646S023), RPMI 1640 培养基、磷酸盐缓冲液 (PBS)、青霉素-链霉素溶液、胰蛋白酶溶液 (上海源培生物科技股份有限公司, 批号分别为 F210916、D210903、H120904、L430916), 噻唑蓝 (MTT, 美国 Sigma 公司, 批号 #MKCK3153), 细胞凋亡检测试剂盒、PAGE 凝胶快速制备试剂盒、ECL 化学发光超敏显色试剂盒 (上海翌圣生物科技有限公司, 批号分别为 A2001231、P5111090、S3115070), 结晶紫染色液、Western 及 IP 细胞裂解液、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、PVDF 膜 $0.2\ \mu\text{m}$ 、二抗辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠免疫球蛋白 (Ig)G(H+L)、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L) (上海碧云天生物技术有限公司, 批号分别为 C0121、P0013、P1045、P0012S、FFP28、A0216、A0208), N-钙黏蛋白 (N-cadherin) 抗体 (美国 Santa Cruz 公司, 批号 sc-59987), 波形蛋白 (Vimentin)、血管生成素 2 (Ang2)、基质金属蛋白酶-9 (MMP-9)、 β -微管蛋白 (β -tubulin) 抗体 (美国 Abcam 公司, 批号分别为 ab92547、ab155106、ab38898、ab6046)。

1.3 仪器 ECLIPSE Ti-5 型荧光倒置显微镜 (日本 Nikon 公司), HERAcCell 150i 型二氧化碳培养箱 (美国 Thermo 公司), Spark 10M 型酶标仪 (瑞士 Tecan 公司), PowerPac™ Basic 型电泳仪、电泳槽 (美国 Bio-Rad 公司), CytoFlex 型流式细胞仪 (美国

Beckman 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 HCT116 细胞用 RPMI 1640 培养基 (含 10% 胎牛血清、 $100\ \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素及 $100\ \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素) 培养; HUVEC-c 细胞采用 ECM 培养基 (含 5% 胎牛血清、1% 内皮细胞生长因子, 1% 青霉素-链霉素溶液) 培养。以上细胞均置于 $37\ ^\circ\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养, 细胞密度达 70%~80% 时进行传代。

2.2 条件培养基制备 将 HCT-116 细胞给予 RPMI 1640 培养基培养 24 h, 收集上清, 离心除去死细胞, 并使用 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤器过滤, 制成条件培养基。

2.3 MTT 比色法检测细胞活力 收集 HUVEC-c 细胞并计数, HUVEC-c 细胞以 1×10^4 接种于 96 孔板中。置于 5% CO_2 孵化箱中培养 24 h, 每孔加入由条件培养基配置的不同浓度的仙连解毒方 (分别为 0.25、0.5、1、1.5、2、2.5、3、6 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) $100\ \mu\text{L}$, 孵育 48 h; 取出 96 孔板, 每孔加入 MTT $10\ \mu\text{L}$ 继续孵育 4 h, 弃上清, 加入 DMSO $200\ \mu\text{L}$, 振荡 10 min 使晶体完全溶解, 酶标仪在 490 nm 处检测吸光度 A 。

2.4 细胞形态学观察 细胞接种及培养同 2.3 项, HUVEC-c 细胞分为 5 组: 空白组、条件培养基组、仙连解毒方组 (1、2、3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$); 按组别加入相应浓度的仙连解毒方, 在 5% CO_2 培养箱中培养 48 h, 倒置显微镜下观察细胞形态变化。

2.5 流式细胞术检测细胞凋亡 细胞接种、培养、分组同 2.4 项, 细胞培养 48 h, 消化细胞, 按照细胞凋亡检测试剂盒说明书, 染色后室温避光孵育 15 min, 流式细胞仪检测细胞凋亡状态。

2.6 平板划线检测细胞 2D 迁移能力 细胞分组及给药同 2.4 项, 将细胞接种于 6 孔板 24 h, 使用 $10\ \mu\text{L}$ 枪头, 在细胞培养面划线, 0、24、48 h, 分别拍照, 并统计细胞迁移距离。

2.7 Transwell 小室检测细胞 3D 迁移能力 细胞分组及给药同 2.4 项, 将细胞接种于 Transwell 小室, 并给予相应浓度的仙连解毒方, 48 h, 取出小室, 用棉花擦去上室未穿过的细胞, 使用结晶紫染色, 显微镜下观察细胞, 并统计迁移率。

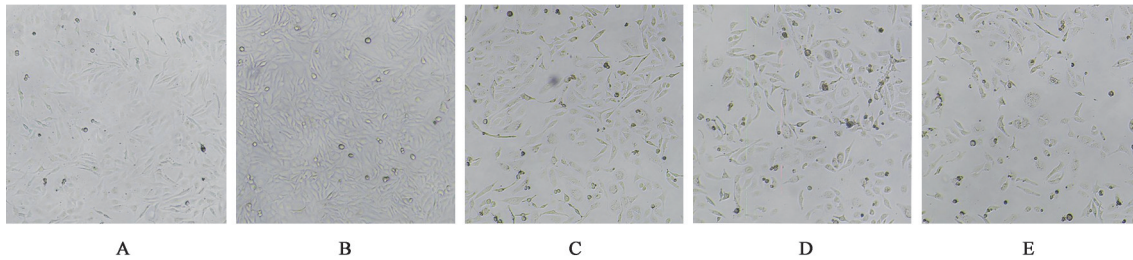
2.8 蛋白质免疫印迹法检测蛋白表达 细胞分组及给药同 2.4 项, 细胞给药 48 h, 收集细胞, 加入含蛋白酶磷酸酶抑制剂的蛋白裂解液, 裂解完成后于 $4\ ^\circ\text{C}$, $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min (离心半径 30 cm), 取上清液转移至新的离心管中。使用 BCA 法定量各组蛋白浓度, 加入上样缓冲液, 金属浴 $100\ ^\circ\text{C}$ 加热变性, 将各组蛋白样品加入 SDS-PAGE 胶泳道, 电泳

分离,再将蛋白湿转至PVDF膜0.2 μ m,脱脂奶粉室温封闭2 h,孵育相应一抗(1:1 000),4 $^{\circ}$ C孵育过夜,洗涤,室温条件下孵育二抗(1:5 000)1 h,洗涤,曝光,使用Image J图像分析软件测得条带灰度值后比较各组间的差异性。

2.9 统计学分析 GraphPad Prism 8.0用于统计处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 仙连解毒方抑制条件培养基刺激的HUVEC-c细胞增殖 与空白组比较,条件培养基组细胞活力明显增强($P < 0.05$),条件培养基组细胞增殖速度加快。遂予不同质量浓度仙连解毒方作用于条件培养基刺激的HUVEC-c细胞48 h,与条件培养基组比较,仙连解毒方组细胞增殖率随着仙连解毒方浓度升高而显著降低($P < 0.01$)。倒置显微镜观察给予仙连解毒方处理后,条件培养基刺激后HUVEC-c细胞发生碎裂并伴有细胞脱落现象。见表1和图1。



注:A.空白组;B.条件培养基组;C-E.仙连解毒方组(1、2、3 g·L⁻¹)(图2-图5同)

图1 仙连解毒方对条件培养基刺激的HUVEC-c细胞形态的影响(倒置显微镜,×100)

Fig. 1 Effect of XLJDP on morphology of HUVEC-c cells stimulated by conditioned medium (inverted microscope, ×100)

3.2 仙连解毒方促进条件培养基刺激的HUVEC-c细胞凋亡 与条件培养基组比较,仙连解毒方组(1、2、3 g·L⁻¹)细胞总凋亡率均显著上升($P < 0.01$),并具有浓度依赖性。见表2。

表2 仙连解毒方对条件培养基刺激的HUVEC-c细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of XLJDP on apoptosis rate of HUVEC-c cells stimulated by conditioned medium ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	凋亡率/%
空白组		1.72±0.20
条件培养基组		1.90±0.16
仙连解毒方组	1	17.32±1.87 ¹⁾
	2	31.58±1.84 ¹⁾
	3	39.91±2.18 ¹⁾

注:与条件培养基组比较¹⁾ $P < 0.01$

为进一步观察仙连解毒方对条件培养基刺激的HUVEC-c细胞凋亡、迁移等影响,后续实验采用仙连解毒方组(1、2、3 g·L⁻¹)进行实验,作用时间48 h。

表1 仙连解毒方对条件培养基刺激的HUVEC-c细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effect of XLJDP on proliferation of HUVEC cells stimulated with conditioned medium ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	细胞存活率/%
空白组		92.39±4.11
条件培养基组		98.93±2.53 ¹⁾
仙连解毒方组	0.25	89.18±1.97 ²⁾
	0.5	70.45±2.82 ²⁾
	1	57.63±2.21 ²⁾
	1.5	53.10±1.95 ²⁾
	2	50.64±4.69 ²⁾
	2.5	47.96±2.41 ²⁾
	3	29.32±2.69 ²⁾
	6	24.17±1.75 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与条件培养基组比较²⁾ $P < 0.01$ (表4同)

3.3 仙连解毒方对条件培养基诱导的HUVEC-c细胞迁移的影响 与空白组比较,条件培养基组细胞2D迁移能力显著增强($P < 0.01$);与条件培养基组比较,仙连解毒方组(1、2、3 g·L⁻¹)细胞2D迁移能力显著减弱($P < 0.01$),并具有浓度依赖性。见表3,图2。

表3 仙连解毒方对条件培养基刺激的HUVEC-c细胞迁移能力的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of XLJDP on 2D migration in HUVEC-c cells stimulated by conditioned medium ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	划痕迁移率/%	
		24 h	48 h
空白组		3.99±0.11	42.31±1.99
条件培养基组		30.12±1.02 ¹⁾	77.43±1.50 ¹⁾
仙连解毒方组	1	17.20±0.62 ²⁾	36.96±1.78 ²⁾
	2	5.97±0.97 ²⁾	27.32±1.10 ²⁾
	3	3.41±0.52 ²⁾	19.53±2.50 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与条件培养基组比较²⁾ $P < 0.01$

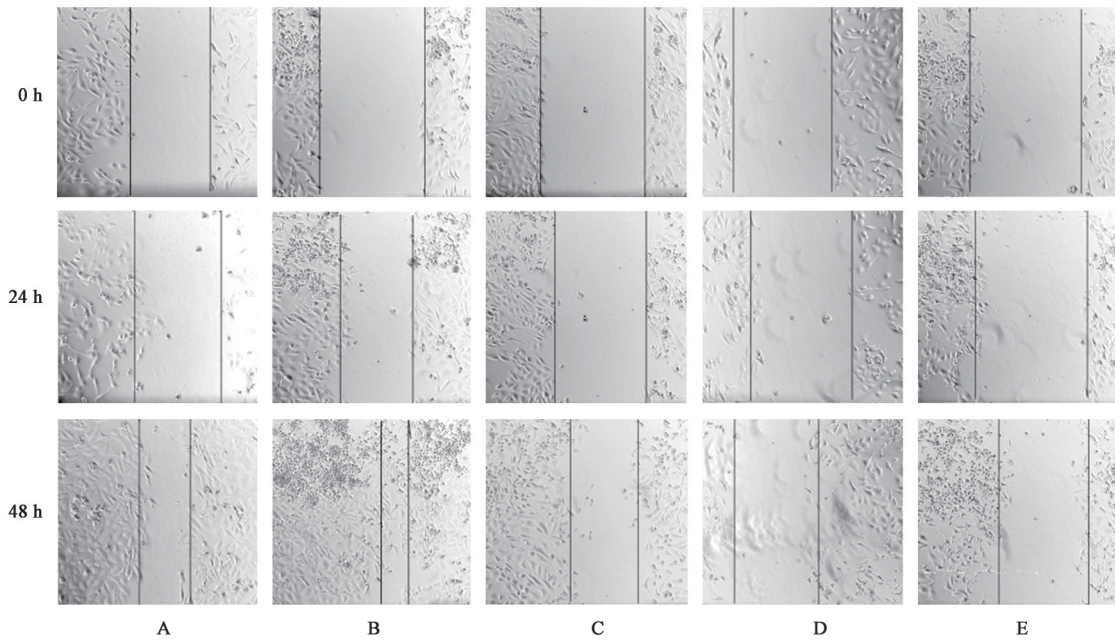


图2 仙连解毒方对条件培养基刺激的HUVEC-c细胞迁移能力的影响(倒置显微镜,×40)

Fig. 2 Effect of XLJDP on 2D migration in HUVEC-c cells stimulated by conditioned medium (inverted microscope, ×40)

3.4 仙连解毒方对条件培养基诱导的HUVEC-c细胞侵袭的影响 与空白组比较,条件培养基组3D迁移能力增强($P<0.05$);与条件培养基组比较,仙连解毒方组($2, 3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)3D迁移能力显著减弱($P<0.01$),并具有浓度依赖性。见表4和图3。

表4 仙连解毒方对条件培养基刺激的HUVEC-c细胞侵袭能力的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of XLJDP on 3D migration in HUVEC-c cells stimulated by conditioned medium ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	侵袭细胞数/个
空白组		122.33±11.24
条件培养基组		147.67±9.61 ¹⁾
仙连解毒方组	1	131.33±11.93
	2	74.67±11.24 ²⁾
	3	37.67±07.02 ²⁾

3.5 仙连解毒方对条件培养基诱导的HUVEC-c细胞迁移相关蛋白表达的影响 与空白组比较,条件

培养基组N-cadherin, Vimentin, MMP-9蛋白表达水平明显上升($P<0.05, P<0.01$);与条件培养基组比较,仙连解毒方组($2, 3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)N-cadherin, Vimentin, MMP-9蛋白表达水平显著下降($P<0.01$),并具有浓度依赖性。见表5,图4。

3.6 仙连解毒方对条件培养基刺激的HUVEC-c细胞促血管生成因子Ang2蛋白表达的影响 与空白组比较,条件培养基组Ang2蛋白表达水平明显上升($P<0.05$);与条件培养基组比较,仙连解毒方组($1, 2, 3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)Ang2蛋白表达水平明显下降($P<0.05, P<0.01$),并具有浓度依赖性。见表6,图5。

4 讨论

结直肠癌是全世界最常见的癌症之一,近年来随着人民生活水平的提高、饮食习惯的改变及人口老龄化的加剧,我国结直肠癌的发病率和死亡率呈上升趋势。本课题组传承国医大师周仲瑛教授“癌毒”学说,在岐黄学者程海波教授带领下创建中医癌毒病机理论体系。癌毒病机理论认为,大肠癌是

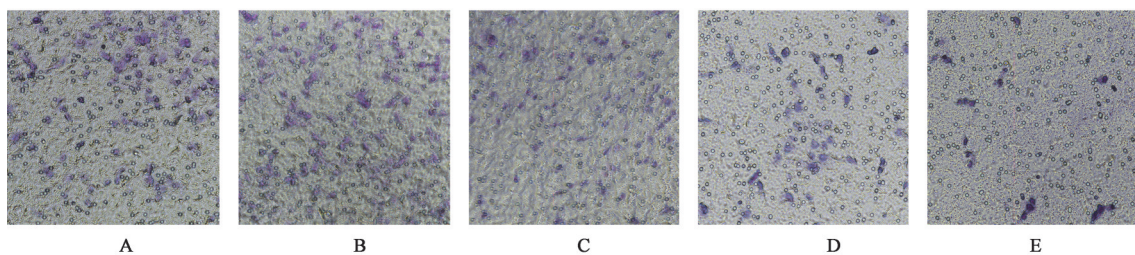


图3 仙连解毒方对条件培养基刺激的HUVEC-c细胞侵袭能力的影响(结晶紫,×40)

Fig. 3 Effect of XLJDP on 3D migration in HUVEC-c cells stimulated by conditioned medium (crystal violet, ×40)

表5 仙连解毒方对条件培养基刺激的HUVEC-c细胞迁移相关蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of XLJDP on expression of migration-related proteins in HUVEC-c cells stimulated by conditioned medium ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	N-cadherin/ β -tubulin	Vimentin/ β -tubulin	MMP-9/ β -tubulin
空白组		0.40±0.04	0.15±0.02	0.20±0.04
条件培养基组		0.54±0.05 ¹⁾	0.24±0.03 ²⁾	0.65±0.06 ²⁾
仙连解毒方组	1	0.50±0.06	0.11±0.02 ³⁾	0.72±0.07
	2	0.34±0.04 ³⁾	0.03±0.01 ³⁾	0.14±0.05 ³⁾
	3	0.22±0.04 ³⁾	0.02±0.01 ³⁾	0.05±0.03 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与条件培养基组比较³⁾ $P<0.01$

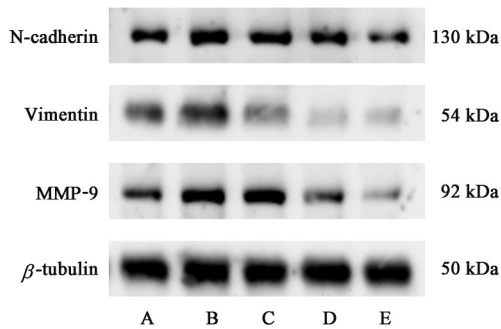


图4 HUVEC-c细胞迁移相关蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of expression of migration-related proteins in HUVEC-c cells

表6 仙连解毒方对条件培养基刺激的HUVEC-c细胞促血管生成因子Ang2蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of XLJDP on expression level of Ang2 protein in HUVEC-c cells stimulated by conditioned medium ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	Ang2/ β -tubulin
空白组		0.86±0.11
条件培养基组		1.08±0.07 ¹⁾
仙连解毒方组	1	0.93±0.05 ²⁾
	2	0.75±0.06 ³⁾
	3	0.48±0.03 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$;与条件培养基组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$

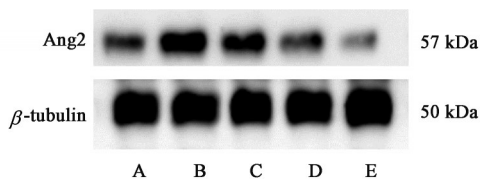


图5 HUVEC-c细胞促血管生成因子Ang2蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of expression level of Ang2 protein in HUVEC-c cells

人体在肠腑功能失常,气血郁滞的基础上,同时受湿邪外侵、情志失调、饮食不节、正气亏虚等体内外多种因素诱导,生成癌毒,并与湿浊、瘀血等病理因素相互搏结于肠腑而导致的恶性病变^[12]。同时正气亏虚是大肠癌转移的根本原因,癌毒流注是肿瘤

转移的病机关键。晚期大肠癌患者正气亏虚、癌毒流注,癌毒常与痰、瘀、湿、热等病理因素相互胶结,病机复杂,故需要运用多法联合治疗肿瘤转移^[13]。

本团队在癌毒病机理论的指导下,结合结直肠癌的中医病机理论,研制出防治大肠癌的有效验方仙连解毒方。方中仙鹤草解毒补虚,黄连抗癌解毒,炙黄芪益气健脾,生薏苡仁清热利湿,治疗大肠癌湿热瘀毒证,具有清热化湿、祛瘀解毒、健脾益气的功效^[14]。在前期研究中已发现缺氧微环境下仙连解毒方可抑制结直肠癌细胞增殖^[11],也可通过影响细胞色素P450家族2亚家族c多肽40(CYP2C40)、NIMA相关蛋白激酶7(Nek7)、胰岛再生基因3g(Reg3g)等基因及细胞色素P450酶对外源性药物的代谢作用等信号通路发挥干预结直肠肿瘤的作用^[14]。

肿瘤新生血管是肿瘤发生转移的重要病理过程,该过程涉及内皮细胞的增殖、迁移、分化及在血管内壁中的重排^[15]。本研究首次发现,仙连解毒方呈剂量依赖性抑制肿瘤相关血管内皮细胞增殖活性,并显著诱导CRE细胞凋亡;与条件培养基组比较,仙连解毒方能显著抑制肿瘤相关内皮细胞迁移能力,维持血管内皮细胞稳定性。研究结果提示仙连解毒方可能具有抑制结直肠癌血管新生的作用。血管生成素是一类与血管生成关系及其密切的一类细胞因子,该家族主要包括Ang1、Ang2、Ang3和Ang4,作为Tie受体酪氨酸激酶(RTKs)的配体,在血管稳态中发挥调节作用^[16]。其中生物学功能研究较为透彻的是Ang1和Ang2。相对于Ang1主要在正常组织中高表达,维持血管稳定性,Ang2主要表达在肿瘤组织中,并可以与Ang1竞争性的结合Tie2受体,破坏血管内皮细胞稳定性,促进血管内皮细胞增殖和迁移^[17-18]。因此,Ang2目前已经成为抗肿瘤新生血管一个重要的药物靶标。本研究发现,相对于正常血管内皮细胞,肿瘤相关血管内皮细胞高表达Ang2,但是经过仙连解毒方处理后,Ang2蛋

白显著下调。因此,提示仙连解毒方可能通过降低Ang2在肿瘤相关血管内皮细胞中的表达,从而起到抑制CRE的增殖、迁移、分化,及诱导其凋亡。

综上,仙连解毒方通过抑制CRE细胞增殖和迁移,调节Ang2信号轴、恢复血管稳态,可能具有抑制结直肠癌转移的功能。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.

[2] ARNOLD M, SIERRA M S, LAVERSANNE M, et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality [J]. *Gut*, 2017, 66(4): 683-691.

[3] HU Z, LI Y, MAO W, et al. Impact of nutritional indices on the survival outcomes of patients with colorectal cancer [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 2279-2289.

[4] LIU Z, SUN B, QI L, et al. Dickkopf-1 expression is down-regulated during the colorectal adenoma-carcinoma sequence and correlates with reduced microvessel density and VEGF expression [J]. *Histopathology*, 2015, 67(2): 158-166.

[5] TOURNIGAND C, CHIBAUDEL B, SAMSON B, et al. Bevacizumab with or without erlotinib as maintenance therapy in patients with metastatic colorectal cancer (GERCOR DREAM; OPTIMO3): a randomised, open-label, phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2015, 16(15): 1493-1505.

[6] XU Y, LI Q, LI X Y, et al. Short-term anti-vascular endothelial growth factor treatment elicits vasculogenic mimicry formation of tumors to accelerate metastasis [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2012, 31(1): 16.

[7] SODA Y, MYSKIW C, ROMMEL A, et al. Mechanisms of neovascularization and resistance to anti-angiogenic therapies in glioblastoma multiforme [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2013, 91(4): 439-448.

[8] BAGHBAN R, ROSHANGAR L, JAHANBAN-ESFAHLAN R, et al. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance [J]. *Cell Commun Signal*, 2020, 18(1): 59.

[9] YU S, ZHOU R, YANG T, et al. Hypoxia promotes colorectal cancer cell migration and invasion in a SIRT1-dependent manner [J]. *Cancer Cell Int*, 2019, doi: 10.1186/s12935-019-0819-9

[10] LEWIS C E, DE PALMA M, NALDINI L. Tie2-expressing monocytes and tumor angiogenesis: regulation by hypoxia and angiopoietin-2 [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(18): 8429-8432.

[11] 姜瑞阳, 徐长亮, 程海波, 等. 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 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20220422.

[12] 程海波, 李柳, 吴勉华, 等. 癌毒病机理论辨治肠癌探讨 [J]. *时珍国医国药*, 2017, 28(10): 2487-2488.

[13] 查鸯岚, 程海波. 程海波运用癌毒病机理论辨治肿瘤转移经验 [J]. *浙江中医药大学学报*, 2017, 41(5): 381-384.

[14] 陈桐庆, 余成涛, 许惠琴, 等. 仙连解毒方干预“湿热瘀毒证”小鼠结直肠肿瘤的转录组学分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20212322.

[15] NORTON K A, POPEL A S. Effects of endothelial cell proliferation and migration rates in a computational model of sprouting angiogenesis [J]. *Sci Rep*, 2016, doi: 10.1038/srep36992.

[16] AUGUSTIN H G, KOH G Y, THURSTON G, et al. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(3): 165-177.

[17] SHIM W S, HO I A, WONG P E. Angiopoietin: A TIE(d) balance in tumor angiogenesis [J]. *Mol Cancer Res*, 2007, 5(7): 655-665.

[18] AHMAD S A, LIU W, JUNG Y D, et al. The effects of angiopoietin-1 and -2 on tumor growth and angiogenesis in human colon cancer [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(4): 1255-1259.

[责任编辑 张丰丰]