

复方半枝莲抑制人结肠癌 COLO205 细胞增殖

罗花¹, 邓家刚¹, 郭宏伟², 廖泽勇³, 杜正彩^{4*}

- (1. 广西中医药大学, 广西中药药效研究重点实验室, 南宁 530001;
2. 广西医科大学转化医学研究中心, 南宁 530021; 3. 广西药用植物研究所, 南宁 530023;
4. 广西中医药大学广西中医药科学实验中心, 南宁 530001)

[摘要] **目的:**探讨复方半枝莲对人结肠癌细胞 COLO205 体内外生长的抑制作用及机制。**方法:**体外培养 COLO205 细胞,分为空白组,顺铂(0.15 g·L⁻¹)组,复方半枝莲高、中、低剂量(0.60, 0.30, 0.15 g·L⁻¹)组。利用噻唑蓝(MTT)法检测复方半枝莲对 COLO205 细胞增殖抑制率的影响。采用免疫印迹法(Western blot)分别检测细胞内凋亡相关蛋白 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax), 细胞凋亡调控因子(PUMA)的表达情况。选用 SPF 级裸鼠,于背部接种结肠癌 COLO205 细胞,待瘤体长到肉眼可见时,测量瘤体大小,根据瘤体大小区间随机分为复方半枝莲高、低浓度组,紫杉醇组和空白组,应用结肠癌移植瘤裸鼠模型体内实验检测复方半枝莲对 COLO205 细胞体内生长的影响。**结果:**体外细胞实验表明,经复方半枝莲作用后的人结肠癌细胞 COLO205 细胞出现了变形,并有细胞膜破损,细胞数逐渐减少,脱落而死亡的现象。48 h 时复方半枝莲对 COLO205 细胞的抑制作用最强。其高、中、低剂量组抑制率分别为 68.46%, 63.11%, 54.91%;且经复方半枝莲干预,COLO205 细胞内的 Bax, PUMA 表达上调, Bcl-2 表达下调;体内移植瘤实验显示,与空白组肿瘤体积比较,给药组的肿瘤体积明显减小。**结论:**复方半枝莲在体内外对人结肠癌细胞 COLO205 的生长均具有抑制作用,其机制可能与诱导细胞凋亡有关。

[关键词] 复方半枝莲; 人结肠癌 COLO205; 细胞增殖; B 淋巴细胞瘤-2; Bcl-2 相关 X 蛋白; 细胞凋亡调控因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)14-0125-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016140125

Antiproliferation Effect of Compound Banzhilian on Human Colon Cancer COLO205 Cell Line

LUO Hua¹, DENG Jia-gang¹, GUO Hong-wei², LIAO Ze-yong³, DU Zheng-cai^{4*}

- (1. Guangxi Key Laboratory of Efficacy Study on Chinese Materia Medica, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China; 2. Center for Translational Medicine, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 3. Guangxi Institute of Medicinal Plant, Nanning 530023, China;
4. Guangxi Scientific Experimental Center of Traditional Chinese Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the antiproliferation effect of compound Banzhilian on COLO205 human colon cancer cells *in vitro* and *in vivo*. **Method:** COLO205 cells were cultured *in vitro* and divided into blank group, cisplatin group (0.15 g·L⁻¹), and compound Banzhilian high dose group, middle dose group and low dose group (0.60, 0.30, 0.15 g·L⁻¹). The effect of rate of compound Banzhilian on antiproliferation rate of COLO205 cells was detected by 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Western blot assay was used to detect the expression levels of apoptosis-related proteins including Bcl-2, Bax, and

[收稿日期] 20151025(002)

[基金项目] 广西中药药效研究重点实验室(省级)开放课题项目(13-051-06-K7, 14-045-12-K8);广西“八桂学者”工程专项([2013]3号);广西协同创新中心建设计划项目[(2015)12号]

[第一作者] 罗花, 硕士, 从事中药理论与药效筛选、新药开发研究, Tel: 15277197867, E-mail: luohualgn@foxmail.com

[通讯作者] * 杜正彩, 硕士, 副主任药师, 从事中药药效筛选及新产品开发研究, Tel: 15907719818, E-mail: duzhengcai@163.com

p53 up-regulated modulator of apoptosis (PUMA). SPF nude mice were used for *in vivo* experiment, and they were inoculated with human colon cancer cells COLO205 in their back skin. Tumors size would be measured after they could be seen. According to the volume of tumors, nude mice were randomly divided into compound Banzhilian high and low dose groups, paclitaxel group and blank group. The effect of compound Banzhilian *in vivo* growth of COLO205 cells was detected with using colon cancer transplantation tumor models in nude mice. **Result:** In the *in vitro* experiment, after being treated with compound Banzhilian, most COLO205 cells were deformed with damages of cell membrane, the number of cells decreased gradually, and eventually died. Statistical analysis showed that the antiproliferation effect on COLO205 cells was at 48 h treatment with compound Banzhilian. The inhibition rates were 68.46%, 63.11%, and 54.91% respectively in compound Banzhilian high, middle and low dose groups, the expression levels of Bax and PUMA were up-regulated in COLO205 cells treated with compound Banzhilian, while the expression level of Bcl-2 was down-regulated. The *in vivo* transplantation tumor experiment showed that tumor volume in treatment groups was significantly smaller than that of in blank group. **Conclusion:** Compound Banzhilian can inhibit COLO205 colon cancer cells proliferation both *in vitro* and *in vivo*, and its potential mechanism may be related to the induction of apoptosis.

[**Key words**] compound Banzhilian; human colon cancer cell line COLO205; cell proliferation; Bcl-2; Bax; p53 up-regulated modulator of apoptosis

结肠癌是指结肠黏膜上皮在环境或遗传等多种因素作用下发生的恶性病变,其发病率和死亡率排在我国癌症的前 5 位^[1]。在世界肿瘤的发生率中也呈逐年上升趋势^[2]。目前西医治疗结肠癌的方法主要有手术、放化疗等方案,但具有易复发或转移,产生耐药性等劣势,单味药治疗难以针对其复杂的症状。中药复方因具有多靶点、多通道、不易产生耐药性等多种作用被越来越多人所接受,并可从整体上进行全面调节,治疗癌症当用复方和法^[3]。中药复方是指在辨证审因决定治法以后,选择合适的药物酌定用量,按照组成原则妥善配伍而成的一组药物^[4]。本课题选用邓家刚教授配伍的复方半枝莲,体内外作用于人结肠癌细胞,研究其抗结肠癌作用。该方由半枝莲、白花蛇舌草、白头翁等 7 味药物组成,对治疗肠癌具有较好的临床疗效,可减轻患者便秘结塞等症状,明显延长患者寿命。研究显示该复方中的各味药材大都具有抗癌作用^[5-10]。但目前对于复方抗结肠癌的研究较少,欠缺深入的体内及机制研究。本文以复方半枝莲为研究对象,观察其对结肠癌 COLO205 细胞体内、外生长的抑制作用及其作用机制,为其抗结肠癌临床用药提供实验依据。

1 材料与方

1.1 细胞株 人结肠癌细胞 COLO205 购自中国科学院细胞库。

1.2 动物 SPF 级 BALB/c 裸鼠,雄性,体重(20 ± 2) g,购买于广西医科大学动物实验中心,合格证号 SCXK(桂)2014-0002,自由进食纯净水及高压消毒

灭菌不含致敏原的饲料。

1.3 试剂及药品 噻唑蓝(MTT,美国 Amresco 公司,货号 0793),胰蛋白酶(美国 Amresco 公司,批号 3518B039),胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号 1428479);肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体,B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)抗体,Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)抗体,细胞凋亡调控因子(PUMA)抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号分别为 3700,2870,5023,4976);顺铂(中国齐鲁制药有限公司,批号 8090162DB),紫杉醇(PTX,美国 Invitrogen 公司,货号 P22310),复方中所有药材均购自广西南宁市仁爱医院药房,其余试剂均为国产分析纯。

1.4 仪器 accuric6 型流式细胞仪(美国 BD 公司),ST16R 型离心机(美国 Thermo 公司),Biotek 型全波长酶标仪(美国 Thermo 公司),381 型 CO₂ 培养箱(美国 Theymo Forma 公司),Mini trans blot cell 型蛋白电泳槽,Mini proean 型电泳仪和 Pacerpac Basic 型转移槽(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 药物制备 复方半枝莲:白头翁 12 g,半枝莲 20 g,生半夏 6 g,薏苡仁 30 g,鸡内金 30 g,茯苓 20 g,白花蛇舌草 20 g。第 1 次加 10 倍量水,浸泡 30 min 后,煎煮 30 min,第 2 次加 8 倍量水,煎煮 30 min。合并 2 次煎液,浓缩至膏状,水浴挥干,研成粉末,取粉末 0.200 g 溶于二甲基亚砜(DMSO) 2 mL 中配成 100 g·L⁻¹母液,用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌。

2.2 细胞培养 人结肠癌 COLO205 细胞培养于

RPMI1640 细胞培养基中,置于 37 ℃ 5% CO₂ 95% 湿度培养箱中,每 3 d 换 1 次液^[11]。待细胞长到 80% ~ 90% 时,弃掉培养基,洗涤细胞,胰酶消化,1 000 r·min⁻¹离心 3 min,弃上清,加培养基重悬细胞,按 1:4 稀释传代。

2.3 细胞分组 取对数生长期细胞制成 2 × 10⁴ 个/mL 悬液,接种于 96 孔培养板,每孔 100 μL,设置空白组,顺铂(0.15 g·L⁻¹)组,复方半枝莲高、中、低质量浓度(0.60, 0.30, 0.15 g·L⁻¹)组,每组 6 个复孔,培养 24 h 后,弃去原培养液,空白组加培养液,其余各组加入含药培养液各 180 μL。

2.4 细胞增殖抑制率检测 利用 MTT 法检测复方半枝莲对 COLO205 的抑制作用,药物与细胞共同培养 24, 48, 72 h 后,每孔加入 5.0 g·L⁻¹ MTT 20 μL,继续于 37 ℃ 5% CO₂ 培养箱内温育 4 h,每孔加入 DMSO 150 μL,充分振荡使结晶溶解。用酶标仪于 490 nm 波长处测定各孔的吸光度 A。

$$\text{细胞增殖抑制率} = (1 - A_{\text{药物组}} / A_{\text{空白组}}) \times 100\%$$

2.5 免疫印迹法 (Western blot) 检测相关蛋白表达 根据预实验选取复方半枝莲的最佳质量浓度 0.45 g·L⁻¹,作用于人结肠癌 COLO205 细胞 24, 48, 72 h 后提取蛋白,测定蛋白浓度,加热变性后进行电泳、转膜、封闭,分别加 Bcl-2, Bax, PUMA, β-actin 一抗(1:1 000)孵育过夜,洗膜后加入二抗(1:5 000)孵育 1 h,洗膜后发光、显影、扫描,以目的蛋白/β-actin 表示蛋白相对表达。

2.6 建立移植瘤模型 将 COLO205 细胞与 Matrigel 胶混悬配成 2 × 10⁷ 个/mL 的细胞悬液,于裸鼠右背处皮下注射 0.1 mL,待瘤体形成肉眼可观时,用游标卡尺测瘤体体积。根据瘤体体积大小进行随机分组,每组 4 只,分组后每隔 3 d 秤量裸鼠体重,测量瘤块大小。设复方半枝莲高、低质量浓度(100, 50 mg·kg⁻¹)组,紫杉醇(PTX, 20 mg·kg⁻¹)组,空白组。紫杉醇组每周 ip 紫杉醇,复方半枝莲组每天 ig 复方半枝莲,第 30 天时,脱颈处死小鼠,剥离瘤体,称重,拍照。

2.7 统计学方法 采用 SPSS 21.0 软件包,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,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 复方半枝莲对人结肠癌 COLO205 细胞增殖的抑制作用 与空白组比较,除低质量浓度在 24 h 外,顺铂组和复方半枝莲组在不同时间段的 A 均显著减小($P < 0.01$)。复方半枝莲对 COLO205 细胞

增殖的抑制率随着药物浓度的增加而增大,呈量效关系。复方半枝莲高、中、低质量浓度对 COLO205 细胞增殖的抑制率在 48 h 最大。见表 1。

表 1 复方半枝莲对 COLO205 细胞生长抑制率的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 1 Effect of Banzhilian compound on antiproliferation rate of COLO205 cells($\bar{x} \pm s, n = 6$) %

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	24 h	48 h	72 h
空白	0	-	-	-
顺铂	0.15	45.74 ± 3.76 ¹⁾	68.36 ± 1.28 ¹⁾	69.51 ± 2.41 ¹⁾
复方半枝莲	0.15	7.50 ± 3.07	54.91 ± 6.59 ¹⁾	26.44 ± 14.55 ¹⁾
	0.30	28.87 ± 9.70 ¹⁾	63.11 ± 3.09 ¹⁾	48.48 ± 6.27 ¹⁾
	0.60	55.80 ± 7.10 ¹⁾	68.46 ± 1.33 ¹⁾	63.56 ± 0.18 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

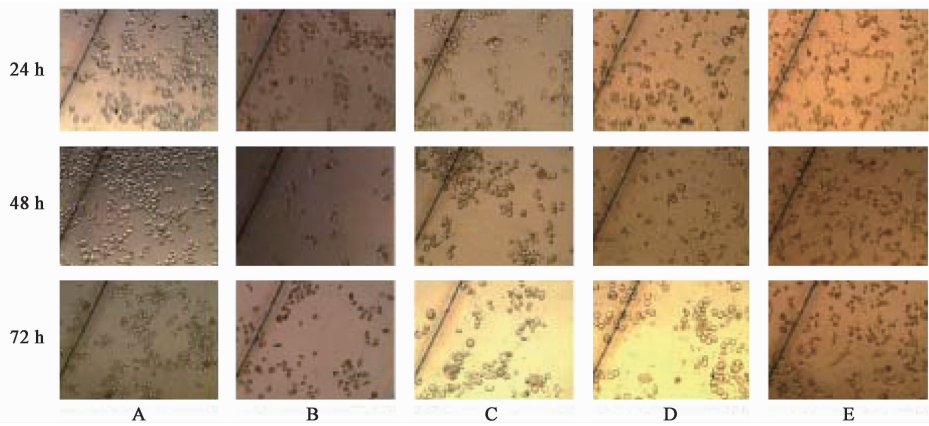
3.2 复方半枝莲对人结肠癌 COLO205 细胞形态的影响 空白组的细胞核质均匀,核仁清楚,细胞形态完整,生长良好,形成贴壁的圆形细胞。药物干预后,复方半枝莲低浓度组 24 h 时间点与空白组的细胞形态相似。其他药物组细胞形态逐渐改变,细胞数逐渐减少,细胞变形,形态不规则,体积缩小,折光性差,细胞悬浮、逐渐脱落而死亡。见图 1。

3.3 复方半枝莲对人结肠癌 COLO205 细胞 Bcl-2, Bax, PUMA 蛋白表达的影响 与空白组比较,复方半枝莲可上调 Bax 和 PUMA 的表达($P < 0.05, P < 0.01$),下调 Bcl-2 的表达($P < 0.01$)。见图 2。

3.4 复方半枝莲对 COLO205 细胞体内生长的影响 复方半枝莲在体内也可抑制 COLO205 细胞的生长,与空白组肿瘤体积比较,紫杉醇组与复方半枝莲高、低剂量组的肿瘤体积均明显减小($P < 0.05, P < 0.01$)。其中紫杉醇的抑制率为 73.60%,复方半枝莲高剂量组抑制率 53.05%,复方半枝莲低剂量组抑制率为 34.26%。见图 3。

4 讨论

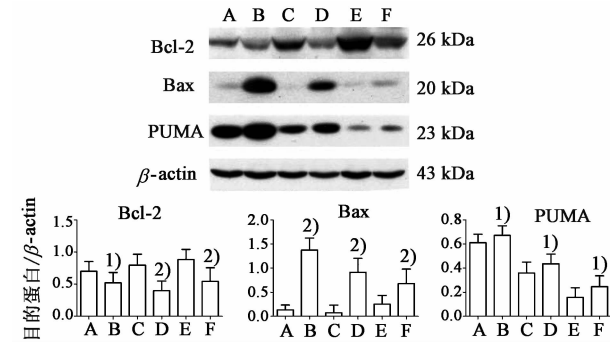
结肠癌与其他癌症一样在起病上具有隐匿渐进性,在病因上具有不确定性,在病机上具有虚、痰、癖、毒的共性,在病性上具有正虚邪实、寒热夹杂的特性,在症状上具有复杂多变性,迄今为止尚无特效的治疗方法。临床研究证实,中药复方对于结肠癌的治疗具有副作用低、提高机体免疫力、不易产生耐药性等特点,可以作为结肠癌治疗的辅助措施。目前已有大量复方用于结肠癌的研究,且具有较好的疗效^[12-15]。复方半枝莲为邓家刚教授的多年临床经验方,对治疗肠癌具有较好的临床疗效,可减轻患者便秘结塞等症状,明显延长患者寿命。方中以半枝莲、白花蛇舌草为君药,二者均为性寒之品,功能



A. 空白组; B. 顺铂组; C ~ E. 复方半枝莲 (0.15, 0.30, 0.60 g·L⁻¹) 组

图 1 复方半枝莲对 COLO205 细胞的影响 (倒置显微镜, ×20)

Fig. 1 Effect of Banzhilian compound on COLO205 cells (inverted microscope, ×20)



A. 24 h 空白组; B. 24 h 复方半枝莲组; C. 48 h 空白组; D. 48 h 复方半枝莲组; E. 72 h 空白组; F. 72 h 复方半枝莲组。与同时时间点空白组比较¹⁾ $P < 0.05$; ²⁾ $P < 0.01$

图 2 复方半枝莲对 COLO205 细胞凋亡相关蛋白的影响

Fig. 2 Effect of Banzhilian compound on cell apoptosis related proteins in COLO205 cells

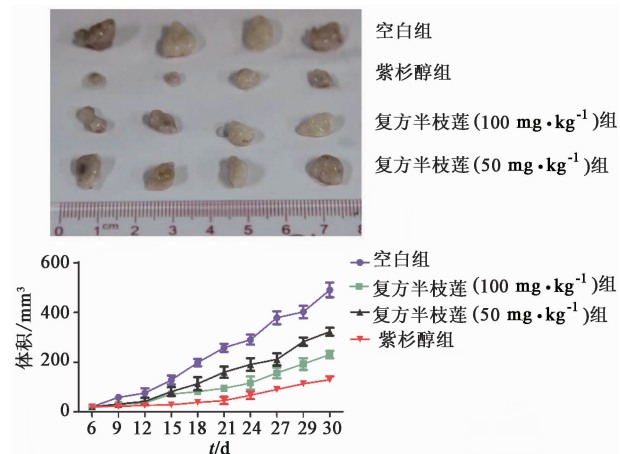


图 3 复方半枝莲对结肠癌移植瘤体积的影响

Fig. 3 Effect of Banzhilian compound on tumor size in human colon cancer xenografts

清热解毒,多用于热毒痈肿,如肺痈、肠痈、癌肿等病症^[16-17];白头翁清热解毒、凉血止痢,半夏燥湿化

痰、消痞散结,薏苡仁排脓、解毒散结,三者辅助君药解毒散结,共为臣药;茯苓、鸡内金均为健脾和胃之品,既可扶正驱邪,又可防苦寒药物伤脾碍胃,用作佐药。诸药配伍应用,共奏清热解毒,散结抑癌之功效。现代研究显示半枝莲具有抗肿瘤,增强免疫力,抗病原微生物等多种药理活性^[18],白头翁可增强免疫力、抗肿瘤、抗炎等^[19],白花蛇舌草具有良好的抗肿瘤、抗化学诱变、免疫调节等作用^[20]。

本实验用复方半枝莲体外作用于人结肠癌 COLO205 细胞,研究其抗结肠癌生长的作用,发现复方半枝莲在 48 h 时对人结肠癌 COLO205 细胞抑制作用最强,其原因可能是复方半枝莲持续作用于细胞 72 h,其药效降低,而在 24 h 时其药效未达到最佳有效浓度。经复方半枝莲作用后的 COLO205 细胞出现了凋亡坏死的现象,Bax 和 PUMA 的表达上调,Bcl-2 的表达下调,揭示了复方半枝莲很可能是通过线粒体凋亡信号通路诱导 COLO205 细胞的凋亡。在恶性肿瘤发生过程中,凋亡相关基因的突变或表达异常可阻断凋亡,促使肿瘤的发生^[21]。Bcl-2 蛋白家族在调节线粒体凋亡方面起着重要作用,按功能可分为两类,一类可抑制凋亡,如 Bcl-2,而另一类则可促进凋亡,如 Bax。Bcl-2 和 Bax 可结合形成异二聚体,促进细胞凋亡。已有研究发现 Bcl-2/Bax 可决定细胞的凋亡程度^[22]。如有研究发现白花蛇舌草可通过下调 Bcl-2,上调 Bax 的表达从而诱导结肠癌 HT-29 细胞凋亡^[15]。PUMA 是一种强大的促凋亡基因,其促凋亡作用是通过与 Bcl-2 结合,一方面抑制了 Bcl-2 的活性,另一方面激活 Bax,可见其可和 Bcl-2 家族抗凋亡蛋白 BH3 功能域竞争性结合,直接使抗凋亡蛋白功能失活,丧失抗调

亡作用^[23]。另外,移植瘤实验发现复方半枝莲在体内可抑制结肠癌的生长。可见复方半枝莲无论体内体外均具有抗结肠癌的作用,但确切的作用机制还有待进一步研究。

综上所述,复方半枝莲在体内外均可抑制人结肠癌 COLO205 细胞的生长,其机制很可能是通过线粒体凋亡信号通路诱导 COLO205 细胞的凋亡。这将为复方半枝莲在临床上的应用提供有利的参考依据。

[参考文献]

[1] 陈万青,郑荣寿,曾红梅,等. 2011 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤,2015,24(1):1-10.

[2] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin,2011,61(2):69-90.

[3] 朱学明. 论癌症治疗当用复方和法[C]. 宁波:第三届国际中医、中西医结合肿瘤学术交流大会暨第十二届全国中西医结合肿瘤学术大会,2010.

[4] 路晓钦,高月. 中药复方现代化药理研究方法进展[J]. 中药新药与临床药理,2002,13(1):59-61.

[5] 李敏,方明治. 白头翁皂苷 B₁、粉防己碱对奥沙利铂耐药的结肠癌细胞的耐药逆转作用及其机制[J]. 中国癌症杂志,2015,25(1):38-44.

[6] 张铃,林久茂,蔡巧燕,等. 半枝莲不同极性部位提取物体外抗结肠癌活性研究[J]. 福建中医药,2012,43(6):54-56.

[7] 冯娟,刘莉,李宇华,等. 半夏泻心汤抑制 DMH/DSS 诱导的结肠炎相关性结肠癌的发生[J]. 世界华人消化杂志,2007,15(14):1609-1614.

[8] 张峻,徐波,蔡文松,等. 薏苡仁提取液对 AOM 诱发结肠癌大鼠模型组织病理学变化的影响[J]. 中国医疗前沿,2011,6(7):20-21.

[9] 王海峰. 茯苓的现代研究进展[J]. 社区医学杂志,2011,12(9):44-45.

[10] 芦柏震,周俐斐,侯桂兰,等. 白花蛇舌草抗肿瘤作

用研究进展[J]. 医药导报,2009,28(3):344-346.

[11] 刁波,唐瑛,文晔,等. 丁酸钠诱导 COLO205 结肠癌细胞凋亡及其对 Caspase-3 的调控[J]. 世界华人消化杂志,2009,17(15):1558-1560.

[12] 严小军,付丽琴,姚亮亮,等. 养阴化瘀解毒方对结肠炎相关性结肠癌前病变及细胞凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(5):258-261.

[13] 吴东辉. 肠胃清介导 CXCR4/CXCL12 信号转导通路干预小鼠结肠癌肝转移[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(23):242-247.

[14] 隋华,靳宝辉,殷佩浩,等. 健脾解毒方对人结肠癌多药耐药细胞的逆转作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(9):196-200.

[15] 杨满菊. 益气健脾方治疗结肠癌外科术后的临床疗效观察[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(13):262-265.

[16] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:104,118.

[17] 郑永红,韦晓瑜,龙继红. 半枝莲的研究进展[J]. 中草药,2010,41(8):1406-1408.

[18] 陈振华,管咏梅,杨世林,等. 白头翁研究进展[J]. 中成药,2014,36(11):2380-2383.

[19] 代龙,杨培民,魏永利. 中药白花蛇舌草研究进展[J]. 现代中药研究与实践,2009,23(4):75-79.

[20] 郑杰. 肿瘤的细胞和分子生物学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2011:313,316,319.

[21] Xu J, Zhou M, Ouyang J, et al. Gambogic acid induces mitochondria-dependent apoptosis by modulation of Bcl-2 and Bax in mantle cell lymphoma JeKo-1 cells[J]. Chin J Cancer Res,2013,25(2):183-191.

[22] 彭军,林久茂,魏丽慧,等. 白花蛇舌草提取物对结肠癌 HT-29 细胞 Bcl-2 和 Bax 表达的影响[J]. 福建中医药大学学报,2010,20(5):23-26.

[23] 刘春菊,万福生. PUMA 对人体肿瘤的促凋亡作用[J]. 生命的化学,2012,32(1):23-28.

[责任编辑 张丰丰]