

健脾消癌方对小鼠大肠癌皮下移植瘤细胞凋亡及相关蛋白表达的影响

宋程¹, 杨晓², 施晓玲³, 唐蔚^{3*}

(1. 湖南省肿瘤医院, 中南大学湘雅医学院附属肿瘤医院, 长沙 410006;
2. 湖南中医药大学, 长沙 410208; 3. 湖南省中医药研究院附属医院, 长沙 410006)

[摘要] 目的:通过体内实验研究健脾消癌方对小鼠大肠癌皮下移植瘤细胞凋亡及相关蛋白表达的影响,探讨其抗大肠癌复发转移的作用机制。方法:通过皮下注射结肠癌细胞 CT-26 构建大肠癌皮下移植瘤小鼠模型,随机分为模型组,健脾消癌方低(15.75 g·kg⁻¹),中(31.5 g·kg⁻¹),高(63 g·kg⁻¹)剂量组及5-氟尿嘧啶(5-Fu)组,分别给药14 d后,处死小鼠,剪取瘤体、称取瘤质量后剪碎瘤组织,采用流式细胞术检测各组细胞凋亡情况,并采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞凋亡相关蛋白表达情况。结果:与模型组比较,健脾消癌方(15.75, 31.5, 63 g·kg⁻¹)组瘤质量均减轻($P < 0.05$),细胞凋亡率均升高($P < 0.05$);B细胞淋巴瘤-2基因相关X蛋白(Bax),半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3),半胱氨酸蛋白酶-8(Caspase-8)表达增高($P < 0.05$),B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)表达降低($P < 0.05$);与健脾消癌方(15.75, 31.5 g·kg⁻¹)组比较,健脾消癌方(63 g·kg⁻¹)组 Bax, Caspase-3, Caspase-8 增高明显($P < 0.05$)。结论:健脾消癌方可通过促进小鼠大肠癌皮下移植瘤细胞凋亡实现抑瘤作用,其机制可能与其调节细胞凋亡相关蛋白表达有关。

[关键词] 健脾消癌方; 中医药; 大肠癌; 细胞凋亡

[中图分类号] R22;R24;R273;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)03-0120-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2018030120

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171114.1126.018.html>

[网络出版时间] 2017-11-14 11:26

Effect of Jianpi Xiaoi Recipe on Apoptosis of Subcutaneous Tumor Cells and Expression of Related Proteins in Mice with Colorectal Carcinoma

SONG Cheng¹, YANG Xiao², SHI Xiao-ling³, TANG Wei^{3*}

(1. Hunan Cancer Hospital, The Affiliated Cancer Hospital of Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410006, China; 2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 3. The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Jianpi Xiaoi recipe *in vivo* on apoptosis of subcutaneous tumor cells and expression of related proteins in mice with colorectal carcinoma, and investigate its mechanisms of anti metastasis and recurrence of colorectal cancer. **Method:** By subcutaneous injection of CT-26 colon cancer cells to construct models of subcutaneous colorectal cancer, and then these mice were randomly divided into five groups: model group, Jianpi Xiaoi low (15.75 g·kg⁻¹), medium (31.5 g·kg⁻¹), high (63 g·kg⁻¹) dose groups, and 5-Fu group. After treatment for 14 days, the animals were sacrificed, and their tumors were taken and weighed. Then the tumors were sheared to detect the apoptosis of every group by flow cytometry. In addition, expression of related proteins was detected by Western blot. **Result:** As compared with model group, tumor weights

[收稿日期] 20170825(011)

[基金项目] 湖南省自然科学基金项目(2016JJ4057);湖南省中医药科研计划项目(201624)

[第一作者] 宋程, 博士, 主治医师, 从事中西医结合防治恶性肿瘤研究, Tel:0731-89762331, E-mail:77083182@qq.com

[通信作者] *唐蔚, 硕士, 主治医师, 从事中西医结合防治恶性肿瘤研究, Tel:0731-85920220, E-mail:173521216@qq.com

of Jianpi Xiaoi recipe high, middle and low dose groups were reduced ($P < 0.05$), and the rates of apoptosis were increased ($P < 0.05$); the expression levels of X proteins related to B cell lymphoma-2 (Bax), Caspase-3, Caspase-8 were increased ($P < 0.05$), while the expression of B cell lymphoma-2 (Bcl-2) was decreased ($P < 0.05$). In addition, the increase in Bax, Caspase-3, and Caspase-8 in Jianpi Xiaoi recipe high dose group was more obvious than that in the low and middle dose groups. **Conclusion:** Jianpi Xiaoi recipe can inhibit the growth of subcutaneous tumor cells in mice with colorectal cancer by promoting its apoptosis, and its mechanism may be related to regulating the expressions of apoptosis related proteins.

[**Key words**] Jianpi Xiaoi recipe; traditional Chinese medicine; colorectal cancer; apoptosis

大肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是严重威胁人类健康的恶性肿瘤之一,因其具有高发病率、高复发转移率和高死亡率的特点而一直倍受关注。近年来,随着生活方式及饮食结构的改变,我国大肠癌发病率急剧上升^[1]。目前,大肠癌的治疗仍以外科手术为主,辅以化学药物治疗、放射治疗、靶向药物治疗等,术后5年总生存率在50%左右^[2]。中医药治疗以“整体观念”和“辨证论治”为基本原则,可通过多环节、多途径、多靶点起效,已成为我国大肠癌综合治疗的重要组成部分。大量临床研究证实中医药通过改善结直肠癌患者临床症状、调节机体免疫功能、增强放疗敏感性、减轻放疗不良反应、减少耐药的产生等,在改善大肠癌患者预后、降低大肠癌的复发转移率方面发挥着重要作用。

凋亡是导致细胞死亡的生理性调节过程^[3]。肿瘤的发生、发展与细胞凋亡进程受阻有着密切联系^[4]。因此可通过观察药物对肿瘤细胞凋亡的影响,研究药物的潜在抗肿瘤机制。近年来,中医药在诱导肿瘤细胞凋亡、调控凋亡相关基因方面的研究取得一定进展^[5],但大多局限于中药单药、单体。

本课题组前期研究显示复方健脾消癌方配合化疗可降低大肠癌术后患者的复发转移率,延长患者生存期,且联合化疗治疗晚期转移性结直肠癌可提高患者疾病控制率,延长晚期大肠癌患者的无进展生存期和总生存期,并能减轻化疗所致的血液及消化道不良反应、提高患者生活质量、有效降低肿瘤标志物^[6-8]。但中药复方防治大肠癌的作用机制尚不明确。本实验拟以大肠癌皮下移植瘤小鼠模型为实验对象,研究健脾消癌方对大肠癌细胞凋亡及相关蛋白表达的影响,以探讨健脾消癌方抗大肠癌复发转移的机制。

1 材料

1.1 动物 SPF级4~6周龄BALB/C小鼠42只,体重20~26g,雌雄各半,由斯莱克景达实验动物有限公司提供,许可证号SYXK(湘)2015-0008,于SPF

级动物实验室饲养。本研究获得湖南省中医药研究院实验动物伦理委员批准(编号2015036)。

1.2 细胞 小鼠结肠癌细胞CT-26购自上海生物医学工程研究所。

1.3 药物 健脾消癌方由人参、白术、法半夏、灵芝、黄芪、茯苓、薏苡仁、淫羊藿、莪术、白花蛇舌草、半枝莲、蚤休、麸炒枳壳、郁金、甘草组成。以上药材均购自于湖南省中医药研究院附属医院门诊中药房,为同一批次同一产地药材,由湖南省中医药研究院附属医院药剂科马荣丽药师鉴定符合2015年版《中国药典》规定。将以上药味按处方量抓取,加入10倍量水浸泡1h,加入药罐中煎制1h,滤过,将滤液储存,再加入8倍量水,煎煮1h,滤过,将2次滤液合并,浓缩至含生药 $2.1\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,储存于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。阳性药5-氟尿嘧啶(5-Fu,0.25g/支)购自北京紫竹药业有限公司,批号01546243Y。

1.4 试剂 DMEM培养基(美国Gibco公司,批号XD15891);胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司,批号201504);胰酶(上海碧云天生物技术有限公司,批号P2573);B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)相关X蛋白(Bax),Bcl-2,半胱氨酸蛋白酶(Caspase)-3, Caspase-8, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司,批号分别为A11931, A0208, A11021, A11324, A10868);山羊抗小鼠二抗(美国Proteintech公司,批号SA00001-1)。

1.5 仪器 Z32HK型冷冻高速离心机(德国Hermle公司);MSC12型超净工作台(法国Jouan公司);BT125D型微量电子天平,PB-20型pH酸度计(德国Sartorius公司);IX37型倒置显微镜(日本Olympus公司);Biosciences AccuriC6型流式细胞仪(美国BD公司);DYCZ-40A型转膜仪(北京六一仪器厂);164-5050型电泳仪(美国Bio-Rad公司);Quantimet Q500图像分析系统(德国LEICA Q500IW公司)。

2 方法

2.1 模型制备 参考文献[9],并结合预实验结果,将小鼠结肠癌细胞 CT-26 用 DMEM + 10% 胎牛血清,于 37 °C 5% CO₂ 培养箱中用 6 cm 细胞培养皿培养,隔天按照 1 传 2 的比例传代,10 d 后用胰酶消化后收集对数生长期的 CT-26 细胞,并用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 3 次后,采用 DEME 培养基调整密度为 1 × 10¹⁰ 个/L 的细胞悬液备用。

用 1 mL 注射器吸取配制好的细胞悬液 0.2 mL,向小鼠的右侧腋窝皮下注射,在注射局部可触及明显皮丘后迅速退针。接种 5 d 后,小鼠右腋下可触及直径约 5 mm 左右的皮下结节,提示建模成功。

2.2 分组和给药 将 40 只建模成功的小鼠随机分别为模型组,健脾消癌方低、中、高剂量组及 5-Fu 组,每组 8 只,雌雄各半。各组小鼠均于接种 CT-26 后第 5 天开始给药。健脾消癌方按体重 60 kg 成人 224 g · d⁻¹ 用量计算,25 g 小鼠每日等效剂量为 31.5 g · kg⁻¹,健脾消癌方高剂量组小鼠生药量取 63 g · kg⁻¹,中剂量组小鼠取 31.5 g · kg⁻¹,低剂量组小鼠取 15.75 g · kg⁻¹;5-Fu 组按人小鼠等效剂量 0.1 mg · kg⁻¹ 采用 5-Fu 对小鼠进行腹腔注射,每 3 d 给药 1 次;模型组以 PBS 20 mL · kg⁻¹ 灌胃。模型组、健脾消癌方各组小鼠均每天灌胃 1 次,连续 14 d。

2.3 瘤体采集及称重 给药后第 15 天颈椎脱臼处死小鼠,用眼科剪迅速剪取皮下移植瘤于微量电子天平上称重。

2.4 流式细胞仪检测移植瘤细胞凋亡 取移植瘤,采用凋亡染色后于流式细胞仪上检测各组移植瘤细胞凋亡情况。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测移植瘤 Bcl-2, Bax, Caspase-3, Caspase-8 蛋白表达 分别称取各组移植瘤组织 0.1 g,用 PBS 洗涤 1 次后加入 RIPA 裂解液 200 μL 提取细胞总蛋白,经过电泳及转膜后加入 100 mL · L⁻¹ 5% 脱脂奶粉,封闭 60 min,分别加入 Bcl-2, Bax, Caspase-3, Caspase-8, GAPDH 一抗(1:200),4 °C 过夜,TBST 洗涤 3 次后将稀释后的二抗(用封闭液稀释 HRP 标记的二抗,1:3 000)与膜共同孵育 60 min。TBST 洗涤 3 次后,采用化学发光试剂曝光显影,扫描底片,进行分析,以目的蛋白灰度值/GAPDH 灰度值表示蛋白相对表达量。

2.6 统计学方法 实验数据采用 SPSS 21.0 统计分析软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据符合正态分布及方差齐性时,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,多重比较采用 *LSD* 法;数据不符合正态分布或方差不齐时,则采用非参数检验中多个独立样本 Kruskal-Wallis *H* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 健脾消癌方对移植瘤质量的影响 与模型组比较,各用药组瘤质量均减轻(*P* < 0.05);与健脾消癌方中、低剂量组比较,健脾消癌方高剂量组瘤质量最低(*P* < 0.05)。见表 1。

表 1 健脾消癌方对移植瘤质量的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of Jianpi Xiaocai recipe on tumor weight of transplanted tumor ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g · kg ⁻¹	肿瘤质量/g
模型	-	0.25 ± 0.00
健脾消癌方	15.75	0.22 ± 0.00 ¹⁾
	31.5	0.15 ± 0.01 ¹⁾
	63	0.12 ± 0.00 ^{1,2)}
5-Fu	0.1 × 10 ⁻³	0.16 ± 0.01 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾*P* < 0.05;与健脾消癌方低剂量、中剂量组比较²⁾*P* < 0.05(表 2~4 同)。

3.2 健脾消癌方对移植瘤细胞凋亡率的影响 与模型组比较,各用药组凋亡率均升高(*P* < 0.05);与健脾消癌方中、低剂量组比较,健脾消癌方高剂量组凋亡率最高(*P* < 0.05)。见表 2。

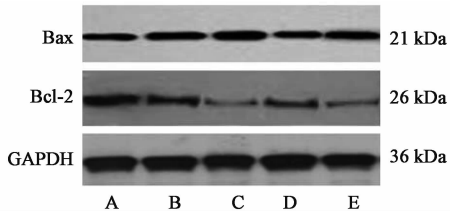
表 2 健脾消癌方对移植瘤细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of Jianpi Xiaocai recipe on apoptosis rate of transplanted tumor cells ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g · kg ⁻¹	凋亡率/%
模型	-	3.90 ± 0.12
健脾消癌方	15.75	16.40 ± 0.32 ¹⁾
	31.5	29.57 ± 0.50 ¹⁾
	63	68.53 ± 0.77 ^{1,2)}
5-Fu	0.1 × 10 ⁻³	26.13 ± 0.67 ¹⁾

3.3 健脾消癌方对移植瘤 Bax, Bcl-2 蛋白表达的影响 与模型组比较,各用药组 Bax 表达均增高(*P* < 0.05);与健脾消癌方中、低剂量组比较,健脾消癌方高剂量组 Bax 表达增高(*P* < 0.05)。与模型组比较,各用药组 Bcl-2 表达均降低(*P* < 0.05)。见图 1,表 3。

3.4 健脾消癌方对移植瘤 Caspase-3, Caspase-8 蛋白表达的影响 与模型组比较,各用药组 Caspase-3, Caspase-8 表达均增高(*P* < 0.05);与健脾消癌方中、低剂量组比较,健脾消癌方高剂量组 Caspase-3,



A. 模型组; B~D. 健脾消癌方低、中、高剂量组; E. 5-Fu 组

图 1 移植瘤 Bax, Bcl-2 蛋白表达电泳

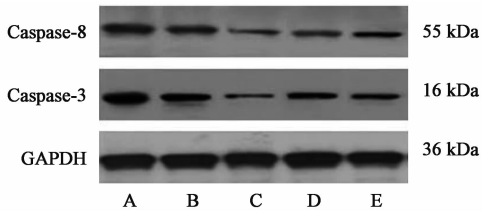
Fig. 1 Electrophoresis of expressions of Bax and Bcl-2 proteins of transplanted tumor

表 3 健脾消癌方对移植瘤 Bax, Bcl-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of Jianpi Xiaoi recipe on expressions of Bax, Bcl-2 proteins of transplanted tumor ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	Bax/GAPDH	Bcl-2/GAPDH
模型	-	0.38 ± 0.00	0.36 ± 0.00
健脾消癌方	15.75	0.46 ± 0.01 ¹⁾	0.28 ± 0.00 ¹⁾
	31.5	0.42 ± 0.02 ¹⁾	0.14 ± 0.01 ¹⁾
	63	0.54 ± 0.03 ^{1,2)}	0.13 ± 0.00 ¹⁾
5-Fu	0.1 × 10 ⁻³	0.46 ± 0.01 ¹⁾	0.11 ± 0.01 ¹⁾

Caspase-8 表达增高 ($P < 0.05$)。见图 2, 表 4。



A. 5-Fu 组; B. 健脾消癌方高剂量组; C. 模型组; D. 健脾消癌方中剂量组; E. 健脾消癌方低剂量组

图 2 移植瘤 Caspase-3, Caspase-8 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of expressions of Caspase-3, Caspase-8 proteins of transplanted tumor

表 4 健脾消癌方对移植瘤 Caspase-3, Caspase-8 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effect of Jianpi Xiaoi recipe on expressions of Caspase-3, Caspase-8 proteins of transplanted tumor ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	Caspase-3 /GAPDH	Caspase-8 /GAPDH
模型	-	0.13 ± 0.00	0.14 ± 0.00
健脾消癌方	15.75	0.23 ± 0.01 ¹⁾	0.16 ± 0.01 ¹⁾
	31.5	0.28 ± 0.01 ¹⁾	0.17 ± 0.01 ¹⁾
	63	0.57 ± 0.01 ^{1,2)}	0.28 ± 0.01 ^{1,2)}
5-Fu	0.1 × 10 ⁻³	0.81 ± 0.01 ¹⁾	0.37 ± 0.00 ¹⁾

4 讨论

课题组经过长期临床实践,认为“虚、毒、瘀”并

存是结直肠癌的基本病机特点。“正气存内,邪不可干,邪之所凑,其气必虚”,认为正气亏虚是大肠癌发病的内因,而脾为“后天之本”、“气血生化之源”,故又认为诸虚之中尤以脾气亏虚最为重要。在此基础上,感受六淫之邪,或为七情所伤,或饮食失节等,致气血运行不畅,瘀血内阻,日久形成肿块,结聚于肠腑。华佗所著《中藏经》有言:“夫痈疽疮肿之所作也,皆五脏六腑蓄毒不流则生矣,非独因荣卫壅塞而发者也。”说明肿瘤的发生尚与脏腑蕴毒有着密切关系。课题组临床中多采用“健脾益气,化瘀解毒”为法治疗结直肠癌,并创制了防治大肠癌复发转移的健脾消癌方,该方寒温并用,攻补兼施,共奏健脾益气,化瘀解毒之功。

细胞凋亡涉及一系列基因的激活、调控等作用,有多种基因及蛋白质产物的参与,包括 Bcl-2 家族, Caspases 等。Caspases 是一组存在与细胞质中、结构上与半胱氨酸相关的蛋白酶,可特异性断开天冬氨酸残基肽键,从而诱导细胞凋亡^[10],在细胞凋亡调节中居重要地位。Caspases 家族蛋白酶通常以非活性的酶原形式合成,在特定条件下激活后发挥诱导细胞凋亡作用。某些特定蛋白可通过“死亡效应结构域”募集 Caspase-8 或 Caspase-10 酶原,将其激活,活化的 Caspase-8, Caspase-10 可进一步启动 Caspase 级联反应,激活效应因子 Caspase-3 等,从而导致细胞凋亡^[11]。故可认为 Caspases 是细胞凋亡的启动者和执行者,其中 Caspase-3, Caspase-8 蛋白是诱导肿瘤细胞凋亡的重要因子^[12-13]。Bax, Bcl-2 均属于原癌基因 Bcl-2 基因家族,其中 Bax 促进细胞凋亡,而 Bcl-2 可抑制细胞凋亡^[14]。

本研究结果显示,与模型组比较,健脾消癌方各组尤其高剂量组小鼠大肠癌皮下移植瘤质量降低,细胞凋亡率增高,提示该方可抑制小鼠大肠癌皮下移植瘤增长,其机制与增加肿瘤细胞凋亡有关。进一步探讨其促进肿瘤细胞凋亡机制研究中发现,健脾消癌方各用药组大肠癌皮下移植瘤组织中 Bax 表达增加, Bcl-2 表达降低, Caspase-3, Caspase-8 表达增加,提示健脾消癌方可通过调节细胞凋亡相关蛋白表达发挥促进大肠癌皮下移植瘤细胞凋亡作用。

[参考文献]

[1] CHEN W, ZHENG R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA: Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.

- [2] 石远凯,孙燕. 临床肿瘤内科手册[M]. 6版. 北京: 人民卫生出版社,2015:491-492.
- [3] 王玉,孙黎光,夏春辉. Caspase介导的Fas凋亡途径[J]. 世界华人消化杂志,2006,14(36):3439-3442.
- [4] 尹颖,李凤金,仲丽丽,等. 辽东槲木叶总皂苷对人结肠癌HT-29细胞凋亡的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2017,24(6):49-52.
- [5] 刘宣,范忠泽,李琦. 中医药治疗大肠癌的实验研究进展[J]. 中华中医药杂志,2013,28(6):1808-1811.
- [6] 蒋益兰,潘敏求,蔡美. 健脾消癌饮配合化疗拮抗结肠直肠癌术后复发转移62例总结[J]. 湖南中医杂志,2007,1(23):1-3.
- [7] 蒋益兰,俞天俊,赵晔. 健脾消癌方治疗老年中晚期大肠癌临床观察[J]. 中国中医药信息杂志,2014,21(30):94-96.
- [8] 王容容,王其美,蒋益兰,等. 健脾消癌方联合化疗治疗晚期转移性结肠直肠癌的临床研究[J]. 中华中医药杂志,2016,31(5):1732-1735.
- [9] 吴坚,刘沈林,张星星,等. 健脾养正消癌方对裸鼠皮下移植瘤中肿瘤转移相关因子的影响[J]. 中华中医药杂志,2015,30(9):3311-3314.
- [10] 张国玲,张秀丽,张鑫. 低剂量顺铂与紫杉醇联合用药对结肠癌细胞迁移、凋亡的影响及机制[J]. 山东医药,2017,57(25):31-33.
- [11] 焦佩娟,应小平. Caspase-3与肿瘤细胞凋亡关系的中医药研究进展[J]. 山东中医杂志,2017,36(8):721-724.
- [12] Oberst A, Pop C, Tremblay A G, et al. Inducible dimerization and inducible cleavage reveal a requirement for both processes in Caspase-8 activation [J]. J Biol Chem,2010,285(22):16632-16642.
- [13] Pop C, Salvesen G S. Human caspases: activation, specificity, and regulation [J]. J Biol Chem,2009,284(33):21777-21781.
- [14] 廖彬汛,唐超,潘年松,等. 莪术油对直肠癌SW1463细胞株增殖、凋亡及Caspase-3、Bax、Bcl-2蛋白表达的影响[J]. 药物评价研究,2017,40(7):897-903.

[责任编辑 张丰丰]