

健脾消癌方对大肠癌肝转移裸鼠模型肝组织 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达的影响

王容容¹, 谭小宁², 李勇敏², 唐蔚², 王其美², 杨晓¹, 简小兰¹, 蒋益兰^{2*}

(1. 湖南中医药大学, 长沙 410208; 2. 湖南省中医药研究院附属医院, 长沙 410006)

[摘要] **目的:**研究健脾消癌方对大肠癌肝转移裸鼠模型肝组织中磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)通路相关蛋白表达的影响,探讨其拮抗大肠癌肝转移的作用机制。**方法:**随机抽取 10 只 BALB/C-nu 裸鼠作为空白组,其余裸鼠建立人大肠癌细胞肝转移裸鼠模型,建模 3 d 后取存活裸鼠 30 只,随机分为模型组,健脾消癌方组(41.6 g·kg⁻¹),人参皂苷 Rg₃ 组(5.2 mg·kg⁻¹),各组裸鼠灌胃相应药物及生理盐水 4 周后脱颈处死,观察各组裸鼠肝转移情况,采用蛋白免疫印迹法(Western blot)测定肝组织第 10 号染色体同源缺失性磷酸酶和张力蛋白基因(PTEN),磷酸化第 10 号染色体同源缺失性磷酸酶和张力蛋白基因(p-PTEN),Akt,磷酸化蛋白激酶(p-Akt)蛋白表达情况。**结果:**健脾消癌方及人参皂苷 Rg₃ 组肝转移率明显低于模型组($P < 0.05$);与空白组比较,模型组中 p-PTEN, p-Akt 蛋白表达明显升高($P < 0.05$),与模型组比较,健脾消癌方组与人参皂苷 Rg₃ 组肝组织中 p-PTEN, p-Akt 蛋白表达明显降低($P < 0.05$);健脾消癌方组与人参皂苷 Rg₃ 组 p-PTEN, p-Akt 表达差异无统计学意义。与空白组比较,模型组 PTEN, Akt 蛋白表达明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,健脾消癌方组与人参皂苷 Rg₃ 组 PTEN, Akt 蛋白表达量明显升高($P < 0.05$);健脾消癌方组与人参皂苷 Rg₃ 组 PTEN, Akt 蛋白表达差异无统计学意义。**结论:**健脾消癌方可拮抗大肠癌肝转移,其作用机制可能与升高 PTEN 蛋白表达,降低 p-PTEN, p-Akt 蛋白表达有关。

[关键词] 健脾消癌方; 大肠癌; 肝转移; 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 通路

[中图分类号] R285.5; R22; R241.2; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)06-0177-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180688

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171213.1032.034.html>

[网络出版时间] 2017-12-13 16:36

Effect of Jianpi Xiaoi Prescription on Expressions of Protein Related to PI3K/Akt Pathway in Liver Tissues of Nude Mice Model of Colorectal Cancer with Liver Metastasis

WANG Rong-rong¹, TAN Xiao-ning², LI Yong-min², TANG Wei², WANG Qi-mei²,
YANG Xiao¹, JIAN Xiao-lan¹, JIANG Yi-lan^{2*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

2. Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine Affiliated Hospital, Changsha 410006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Jianpi Xiaoi prescription on the expressions of proteins related to phosphatidyl inositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signal pathway in liver tissues of nude mice model of colorectal cancer with liver metastasis, in order to explore the mechanism in antagonizing the liver metastasis of colorectal cancer. **Method:** Ten BALB/C-nu nude mice were randomly selected as the control group. The remaining mice were used to establish the model of colon cancer with liver metastasis. Three days after

[收稿日期] 20171030(033)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373602,81774287);中央引导地方科技发展专项(2017CT5029);湖南中医药大学在读研究生创新项目(2016CX06)

[第一作者] 王容容,在读博士,从事肿瘤病中西医结合防治方法和规律研究, Tel: 15116291574, E-mail: 745323799@qq.com

[通信作者] * 蒋益兰,博士生导师,主任医师,中医药防治恶性肿瘤的临床与实验研究, Tel: 13907319712, E-mail: tianshangren624@163.com

modeling, 30 survived nude mice were collected and divided into model group, Jianpi Xiaoi prescription group ($41.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and Rg_3 group ($5.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). After the mice were given the corresponding drugs and physiological saline by gavage for 4 weeks, the protein expressions of chromosome 10 homologous phosphatase and tension protein gene (PTEN), phosphorylation chromosome 10 homologous phosphatase and tension protein gene (p-PTEN), Akt, phosphorylation protein kinase B (p-Akt) in liver tissues were evaluated by Western blot.

Result: The liver metastasis rate and the expressions of p-PTEN, p-Akt in liver tissues of Jianpi Xiaoi prescription group and Rg_3 group were significantly lower than those in model group ($P < 0.05$). The expressions of p-PTEN, p-Akt in liver tissues were significantly higher than those of control group ($P < 0.05$); but there was no significant difference between Jianpi Xiaoi prescription group and positive control group. The expression of PTEN, Akt in model group were significantly lower than control group ($P < 0.05$). The expressions of PTEN, Akt in Jianpi Xiaoi prescription group and positive control group were significantly higher than those in model group ($P < 0.05$), there was no significant difference between Jianpi Xiaoi prescription group and Rg_3 group. **Conclusion:** Jianpi Xiaoi prescription could reduce the liver metastasis rate of colorectal cancer, the mechanism may increase the expression of PTEN in liver tissues, and down-regulate the expressions of p-PTEN, p-Akt.

[**Key words**] Jianpi Xiaoi prescription; colorectal cancer; liver metastasis; phosphatidyl inositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) pathway

大肠癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,也是世界上导致患者死亡的主要原因之一^[1]。大肠癌患者死亡的主要原因是局部复发和远处转移,肝转移是大肠癌最常见的转移部位。目前大肠癌的主要治疗手段有手术、放化疗、靶向治疗及中医药治疗;在临床运用中,中医药在提高患者生活质量,改善机体免疫功能,减轻患者临床症状,防治复发转移及延长患者生存期等方面疗效明显,且占有一定优势。健脾消癌方是蒋益兰教授 30 年临床实践总结的经验方。前期临床研究表明,本方能降低大肠癌患者术后复发转移率,提高生存质量,延长生存期^[2-3];前期实验研究结果表明,健脾消癌方能有效延长裸鼠生存期,降低裸鼠肝转移率,降低肝组织血管内皮生长因子(VEGF)和血管内皮生长因子受体(VEGFR-2)蛋白表达^[4-5],因此推测其抗大肠癌肝转移机制可能与降低 VEGF 表达有关。健脾消癌方降低 VEGF 表达从而抑制血管生成的作用机制尚不清楚,有待深入研究。分子信号通路是防治大肠癌的重要作用机制,中医药可通过调控大肠癌细胞多条信号通路调节血管新生^[6],其中磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)信号通路是调控 VEGF 表达的重要信号通路^[7-8],本研究在前期研究基础上,通过建立大肠癌肝转移裸鼠模型,检测 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达水平,探索健脾消癌方拮抗大肠癌肝转移可能的作用机制。

1 材料

1.1 动物及细胞株 SPF 级 BALB/C-nu 雄性裸鼠

60 只,4~6 周龄,体质量 16~20 g,由湖南斯莱克实验动物有限公司提供,合格证号 SCXK(湘)2015-0008,符合湖南省中医药研究院实验动物伦理委员会指导原则。人结肠癌细胞株 HCT116 购买于中国科学院细胞库,编号 TCHu99。

1.2 仪器 6500 系列 CO_2 恒温孵育箱(法国 Jouan 公司),164-5050 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司),DYCZ-40A 型转膜仪(北京六一仪器厂),G:BOX 型凝胶成像系统(英国 Syngene 公司),DY89-1 型电动匀浆器(宁波新芝公司),XDS-600C 型倒置显微镜(上海蔡康光学仪器厂)。

1.3 试剂 BCA protein assay kit 试剂盒(上海碧云天生物技术公司,批号 P0012-1); β -肌动蛋白(β -actin),第 10 号染色体同源缺失性磷酸酶和张力蛋白基因(PTEN),磷酸化 PTEN(p-PTEN),蛋白激酶 B(Akt),磷酸化 Akt(p-Akt)单克隆抗体,二抗兔抗或鼠抗(英国 Abcam 公司,批号分别为 60008-1-Ig,ab32199,ab109454,ab32505,ab81283,129736);人参皂苷 Rg_3 (湖南省食品药品检验研究院,批号 110804);苏木素-伊红(HE)染色试剂(美国 Solarbio 公司,批号 G1120)。

2 方法

2.1 药物制备 健脾消癌方药物组成为人参 10 g,薏苡仁 30 g,郁金 15 g,莪术 10 g,半枝莲 30 g,重楼 10 g。上述药物按 2015 年版《中国药典》标准规格采购于湖南省中医药研究院附属医院中药房,饮片由该院中药房主任药师田其学鉴定为正品。取以上

15味中药,5倍量处方,第1次加8倍量水浸泡0.5 h,加热煎煮1 h,趁热过滤;第2次加6倍量水,煎煮1 h,趁热过滤;合并2次滤液,静置24 h,离心,冰箱内冷藏48 h,将冷藏液离心,上清液滤过,灭菌,减压浓缩至含生药 $2.1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,密封后, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.2 造模^[9]与分组 裸鼠购进后,适应性饲养3 d后随机抽取10只作为空白组。取30只造模成功且存活的裸鼠按照随机数字表随机分为3组,即模型组,健脾消癌方组,人参皂苷 Rg_3 组。造模后第15天开始给药,按照人体体表面积与小鼠体表面积比例换算^[10],健脾消癌方按70 kg成人质量 $320\text{ g}\cdot\text{d}^{-1}$ 用量计算,20 g裸鼠每日剂量为 $41.6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,每日1次;人参皂苷 Rg_3 灌胃剂量为 $5.2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,每日1次。空白组及模型组每日灌胃生理盐水1次,连续给药4周。末次给药2 h后处死裸鼠。

2.3 指标检测

2.3.1 肉眼观察 观察裸鼠成瘤情况,裸鼠死亡或处死后即刻打开腹腔,充分暴露肝脏,仔细观察肝脏表面有无转移癌结节,同时观察腹腔淋巴结及其他脏器有无转移,并统计每组动物肝转移率。

2.3.2 组织学观察 每组取裸鼠部分肝脏标本(有转移癌结节者以结节为中心取材),以10%甲醛固定24 h后,以HE染色制作病理切片,置于显微镜下观察裸鼠肝转移情况。

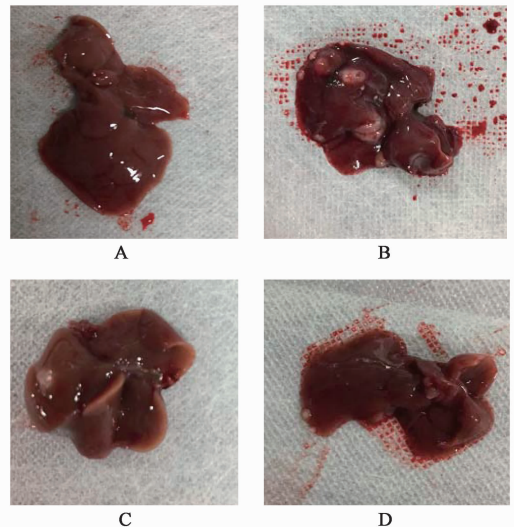
2.3.3 蛋白免疫印迹法检测 肝组织 PTEN, p-PTEN, Akt, p-Akt 蛋白表达 称取肝组织0.1 g,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤1次后加入RIPA蛋白裂解液200 μL 提取细胞总蛋白,采用苯二甲基氯化铵(BCA)蛋白浓度测定法进行蛋白定量,通过聚丙烯酰胺电泳按相对分子质量大小分离,再转移到杂交膜上,加入封闭液5 mL,封闭60 min,加入PTEN, p-PTEN, Akt, p-Akt, β -actin 一抗(1:5 000),放入摇床, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜,将蛋白条带用TBST洗涤3次后用稀释后的二抗(1:5 000)与膜共同孵育45~60 min。再用TBST洗3次后,采用化学发光试剂曝光显影,扫描底片,蛋白相对表达量以灰度值比值表示。

2.4 统计学方法 采用SPSS 19.0统计软件进行统计分析。实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,两两比较采用LSD-*t*检验法, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 健脾消癌方对裸鼠肝转移的影响 接种成功的裸鼠腹部可见明显肿块生长,模型组、健脾消癌方

组和人参皂苷 Rg_3 组均可在裸鼠肝脏表面见1处或多处白灰色肝转移结节。空白组未见肝转移结节,肝脏结构完整,表面光滑,质地柔软,部分裸鼠可见腹腔淋巴结及肺转移。见图1。



A. 空白组;B. 模型组;C. 健脾消癌方组;D. 人参皂苷 Rg_3 组(图2同)

图1 健脾消癌方对各组裸鼠肝转移的影响

Fig.1 Effect of Jianpi Xiaoi prescription on liver metastasis of nude mice

3.2 健脾消癌方对裸鼠肝转移的影响 光镜下观察可见空白组肝脏细胞生长正常,肝小叶结构完整。模型组、健脾消癌方组及人参皂苷 Rg_3 组可见呈浸润生长的癌细胞团,肿瘤细胞成索状或团状排列,肝小叶结构破坏,细胞核深染,呈分裂状,切片染色示分化差的腺癌;部分裸鼠肝脏镜下可见坏死组织带。健脾消癌方组中未见肝转移瘤,人参皂苷 Rg_3 组中未见肝转移,其中健脾消癌方组中可见肝细胞异常增生,细胞核深染,呈分裂状态,肝细胞未见细胞浆,见图2。

3.3 健脾消癌方对裸鼠肝组织 PTEN, p-PTEN, Akt, p-Akt 蛋白表达的影响 健脾消癌方及人参皂苷 Rg_3 组肝转移率明显低于模型组($P<0.05$)。与空白组比较,模型组裸鼠肝组织中 p-PTEN, p-Akt 蛋白表达明显升高($P<0.05$);与模型组比较,健脾消癌方组与人参皂苷 Rg_3 组裸鼠肝组织中 p-PTEN, p-Akt 蛋白表达明显降低($P<0.05$);健脾消癌方组与人参皂苷 Rg_3 组 p-PTEN, p-Akt 表达差异无统计学意义。见表1,图3。

与空白组比较,模型组 PTEN, Akt 蛋白表达明显降低($P<0.05$);与模型组比较,健脾消癌方组与人参皂苷 Rg_3 组 PTEN, Akt 蛋白表达明显升高($P<$

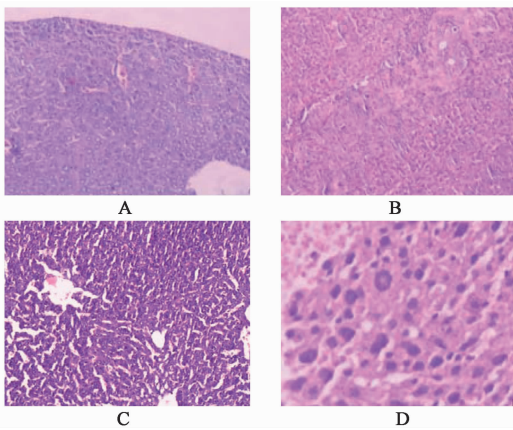


图 2 健脾消癌方对裸鼠肝脏病理形态的影响 (HE, ×200)

Fig. 2 Effect of Jianpi Xiaoi prescription on pathological microscopy in liver of nude mice (HE, ×200)

0.05); 健脾消癌方组与人参皂苷 Rg₃ 组 PTEN, Akt 表达差异无统计学意义。见表 2, 图 3。

表 1 健脾消癌方对裸鼠肝转移率及肝组织中 p-PTEN, p-Akt 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Jianpi Xiaoi prescription on liver metastasis and Comparison on protein expressions of p-PTEN, p-Akt in liver tissues of nude mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	肝转移率/%	p-PTEN /β-actin	p-Akt /β-actin
空白	-	0	0.322 ± 0.202	0.382 ± 0.281
模型	-	90 ¹⁾	0.875 ± 0.346 ¹⁾	0.855 ± 0.328 ¹⁾
健脾消癌方	41.6	70 ²⁾	0.584 ± 0.448 ²⁾	0.556 ± 0.421 ²⁾
人参皂苷 Rg ₃	5.2 × 10 ⁻³	50 ²⁾	0.674 ± 0.301 ²⁾	0.694 ± 0.309 ²⁾

注: 与空白组比较¹⁾ P < 0.05; 与模型组比较²⁾ P < 0.05 (表 2 同)。

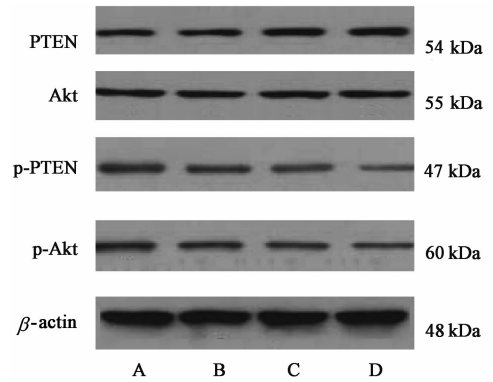
表 2 健脾消癌方对裸鼠肝组织中 PTEN, Akt 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of Jianpi Xiaoi prescription on protein expressions of PTEN, Akt in liver tissues of nude mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p-PTEN/β-actin	p-Akt/β-actin
空白	-	0.608 ± 0.281	0.598 ± 0.327
模型	-	0.360 ± 0.296 ¹⁾	0.382 ± 0.209 ¹⁾
健脾消癌方	41.6	0.925 ± 0.336 ²⁾	0.895 ± 0.306 ²⁾
人参皂苷 Rg ₃	5.2 × 10 ⁻³	0.852 ± 0.401 ²⁾	0.885 ± 0.287 ²⁾

4 讨论

肿瘤的无控性侵袭生长和转移是大肠癌患者的主要死因, 这种侵袭转移与肿瘤新生血管密切相关。血管新生需要一系列调控因子参与, VEGF 是作用最强、特异性最高的促血管生长因子之一, 其中



A. 模型组; B. 空白组; C. 健脾消癌方组; D. 人参皂苷 Rg₃ 组

图 3 裸鼠肝组织中 PTEN, Akt, p-PTEN, p-Akt 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of protein expressions of PTEN, Akt, p-PTEN, p-Akt in liver tissues of nude mice

VEGF 的调控机制复杂, 涉及多条信号通路, 其中 PI3K/Akt 是调控 VEGF 表达的重要信号通路^[4,11]。PI3K/Akt 的活性主要受 PTEN 的调控, PTEN 是迄今为止发现的第一个具有蛋白磷酸酶活性和脂质磷酸酶活性的抑癌基因。PTEN 通过使 PIP3 去磷酸化还原成 PIP2, 维持细胞内低水平的 PIP3, 从而实现对 PI3K/Akt 信号通路的负性调节。在此过程中 PTEN 本身被磷酸化, 磷酸化的 PTEN 活性下降^[12], 导致其对 PI3K/Akt 信号通路抑制作用下降, 从而激活该通路。

蒋益兰教授认为大肠癌转移患者以脾胃亏虚、气血不足、瘀毒未尽, “虚、瘀、毒” 并存为其病机特点。而“脾为后天之本”, “脾为气血生化之源”, 故采用“健脾益气, 化瘀解毒” 为法治疗^[13], 据此形成了防治大肠癌转移的经验方健脾消癌方。方中人参主健脾益气, 以健生化之源, 疗诸虚不足, 从而达到扶正固本的目的; 薏苡仁健脾渗湿, 重楼、半枝莲、莪术、郁金, 清热解毒, 理气消痰化瘀, 此为祛邪。全方健脾益气, 化瘀解毒, 扶正祛邪, 标本兼顾, 顺应了大肠癌术后转移患者“虚、瘀、毒” 并存的病机特点。前期临床研究证实本方能降低肠癌术后肝转移, 临床配合化疗可有效延长患者生存期, 降低复发转移率^[14]。

虽然靶向药物治疗恶性肿瘤靶点很明确, 但治疗面有限。中医药从整体水平出发, 全面治疗, 其作用机制复杂。本实验研究发现, 大肠癌肝转移裸鼠模型肝组织中, 健脾消癌方组能上调 PTEN, Akt 蛋白表达, 下调 p-PTEN 和 p-Akt 表达, 提示健脾消癌方拮抗大肠癌肝转移可能与上调抑癌基因 PTEN 表达, 抑制 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白的表达有关。

结合前期实验研究结果,本课题组推测健脾消癌方可能是通过调控 PTEN/PI3K/Akt 信号通路降低组织 VEGF 和 VEGFR2 表达,达到抗血管生成从而拮抗大肠癌肝转移的目的。本实验在前期动物研究上的改进是使用人参皂苷 Rg₃ 代替 5-Fu 作为对照药物,人参皂苷 Rg₃ 是从人参中分离出来的主要成分之一,其抗肿瘤机制主要是抑制增殖、转移和血管生成^[15]。需要注意的是,蛋白表达水平的改变与转录水平有一定差距,另外,血管生成的影响因子较多,需进行更深入的研究。

[参考文献]

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

[2] 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(3): 94-96.

[3] 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直肠癌的临床研究[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(5): 1732-1736.

[4] 罗星. 健脾消癌方对裸鼠大肠癌肝转移模型 VEGF 以及 VEGFR-2 表达的影响[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2014. .

[5] 蒋益兰,朱克俭,李勇敏,等. 健脾消癌方防止裸鼠大肠癌术后肝转移的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2010, 16(5): 379-380.

[6] 刘磊,刘健,万磊,等. 中医药对血管新生相关信号通路的影响[J]. 中国临床保健杂志, 2016, 19(3): 315-319.

[7] ZHENG L D, CHEN L, ZHANG M, et al.

Downregulation of ERR α inhibits angiogenesis in human umbilical vein endo-thelial cells through regulating VEGF production and PI3K/Akt/STAT3 signaling pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2015, doi: 10. 1016 j. ejphar. 2015. 11. 014.

[8] Crociani O, Zanieri F, Pillozzi S, et al. hERG1 channels modulate integrin signaling to trigger angiogenesis and tumor progression in colorectal cancer[J]. Sci Rep, 2013, doi: 10. 1038/ srep03308.

[9] 李勇敏,谭小宁,徐琳本,等. 健脾消癌方对结直肠癌转移模型裸鼠血管内皮生长因子与血管内皮抑素表达的影响[J]. 中草药, 2016, 47(16): 2883-2886.

[10] 杨晓,蒋益兰,李勇敏,等. 健脾消癌方对大肠癌肝转移裸鼠模型肝组织 MMP-9、TIMP-1 表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2016, 22(10): 1323-1325.

[11] WANG F, Yamauchi M, Muramatsu M, et al. RACK1 regulates VEGF/Flt1-mediated cell migration via activation of a PI3K/Akt pathway[J]. J Biol Chem, 2011, 286(11): 9097-9106.

[12] 李洁玘,秦垠,邹玺,等. 桂皮醛通过 PI3K/Akt 信号通路抑制 TGF- β_1 诱导的结肠癌细胞 LoVo 上皮间质转化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(18): 105-111.

[13] 蒋益兰,荆珍. 中医药防治大肠癌转移作用与机制的研究概况[J]. 湖南中医杂志, 2009, 25(1): 103-104.

[14] 蒋益兰,潘敏求,蔡美. 健脾消癌饮配合化疗拮抗大肠癌术后复发转移 62 例总结[J]. 湖南中医杂志, 2007, 23(1): 1-3.

[15] 江昌,缪雨青,周文丽,等. 人参皂苷 Rg₃ 的抗肿瘤作用及研究进展[J]. 临床肿瘤学杂志, 2017, 22(7): 664-667.

[责任编辑 张丰丰]