

健脾消癌方对结肠癌 TGF- β /lncRNA-ATB/miR-200a 信号通路的影响

罗吉¹, 罗燕¹, 李勇敏¹, 谭小宁¹, 吕元¹, 马荣丽², 蒋益兰^{1*}

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

[摘要] 目的:观察健脾消癌方对结肠癌 SW620 细胞中转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)/长链非编码 RNA-ATB(long noncoding RNA ATB, lncRNA-ATB)/微小 RNA 200a(microRNA 200a, miR-200a) 信号通路的影响,探讨健脾消癌方抑制结肠癌转移的可能作用机制。方法:10%、15%、20%健脾消癌方含药血清处理 TGF- β 诱导后 SW620 细胞,实时定量荧光聚合酶链式反应(Real-time polymerase chain reaction, Real-time PCR)检测 lncRNA-ATB, miR-200a, E 盒结合锌指蛋白(Zinc finger E-box-binding homeobox 1, ZEB1) mRNA 的表达水平,蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测 ZEB1 蛋白表达水平。结果:与空白组比较, TGF- β 诱导组 lncRNA-ATB, ZEB1 mRNA 相对表达量升高, miR-200a mRNA 相对表达量下降($P < 0.01$);与 TGF- β 诱导组比较,健脾消癌方低剂量组 lncRNA-ATB, ZEB1 mRNA 相对表达量降低, miR-200a 相对表达量升高($P < 0.05$);与 TGF- β 诱导组比较,健脾消癌方中、高剂量组 lncRNA-ATB, ZEB1 mRNA 相对表达量显著降低, miR-200a 相对表达量升高($P < 0.01$)。与空白组比较, TGF- β 诱导组的 ZEB1 蛋白相对表达量升高($P < 0.05$);与 TGF- β 诱导组比较,健脾消癌方低剂量组 ZEB1 蛋白相对表达量稍降低,差异无统计学意义,健脾消癌方中、高剂量组 ZEB1 蛋白相对表达量显著降低($P < 0.01$)。结论:健脾消癌方可能通过抑制 SW620 细胞 TGF- β 诱导的 lncRNA-ATB 的表达,增加 miR-200a 的表达,降低 ZEB1 表达来抑制结肠癌的转移。

[关键词] 健脾消癌方; SW620 细胞; 转化生长因子- β ; 长链非编码 RNA-ATB; 微小 RNA 200a

[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)06-0161-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180685

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171212.1730.004.html>

[网络出版时间] 2017-12-13 13:34

Effect of Jianpi Xiaocai Prescription on TGF- β /lncRNA-ATB/miR-200a Signal Pathway in Colorectal Cancer

LUO Ji¹, LUO Yan¹, LI Yong-min¹, TAN Xiao-ning¹, LYU Yuan¹, MA Rong-li², JIANG Yi-lan^{1*}

(1. Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine Affiliated Hospital, Changsha 410006, China;

2. Graduate School, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Jianpi Xiaocai prescription (JPXAD) on the transforming growth factor- β (TGF- β) / long noncoding RNA-ATB (lncRNA-ATB) / microRNA 200a (miR-200a) signal pathway in colon cancer cells SW620, in order to study the anti-metastatic effect of JPXAD in colorectal cancer. **Method:** The 10%, 15%, 20% JPXAD-containing serum was given to SW620 cells after the treatment with TGF- β , Real-time PCR was applied to detect the mRNA expressions of lncRNA-ATB, miR-200a and Zinc finger E-box-binding homeobox 1 (ZEB1), and Western blot was used to determine the protein expression of

[收稿日期] 20171030(002)

[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); 湖南省中医药研究院重点项目(201604)

[第一作者] 罗吉, 博士, 助理研究员, 从事中西医结合防治肿瘤疾病研究, Tel: 0731-85920129, E-mail: luoj27@163.com

[通信作者] * 蒋益兰, 主任医师, 博士生导师, 从事中西医结合防治肿瘤疾病研究, Tel: 0731-88889828, E-mail: tianshangren624@163.com

ZEB1. Result: Compared with the control group, the relative expression of lncRNA-ATB in the TGF- β group increased, while the relative expression of miR-200a decreased, and the relative mRNA expression of ZEB1 increased significantly ($P < 0.01$); compared with the TGF- β group, the expression level of lncRNA-ATB in low-dose JPXAD group decreased, while miR-200a increased, and ZEB1 decreased significantly ($P < 0.05$); compared with the TGF- β group, the expression level of lncRNA-ATB in median-and high-dose JPXAD groups decreased, while miR-200a increased, and ZEB1 decreased significantly ($P < 0.01$). Compared with control group, the relative protein expression of ZEB1 in the TGF- β group increased significantly ($P < 0.05$); compared with the TGF- β group, the protein expression of ZEB1 in low-dose JPXAD group decreased slightly; compared with the TGF- β group, the protein expression of ZEB1 in median-and high-dose JPXAD groups decreased significantly ($P < 0.01$). **Conclusion:** JPXAD may inhibit the metastasis of colorectal cancer by inhibiting the expression of lncRNA-ATB induced by TGF- β , increasing the expression of miR-200 and decreasing the protein expression of ZEB1.

[Key words] Jianpi Xiaoi prescription; SW620 cell; transforming growth factor- β ; long noncoding RNA-ATB; microRNA 200a

结直肠癌是我国常见的消化道恶性肿瘤之一,随着我国人口老龄化、生活方式、饮食习惯的改变,发病率和死亡率均处于高水平,2013 年我国新增结直肠癌患者约 34.8 万例,发病率居恶性肿瘤的第 4 位;死亡患者约 16.5 万例,死亡率居恶性肿瘤的第 5 位^[1]。目前,手术切除是治疗结直肠癌的首要手段,但是约 20% 的结直肠癌患者发现时已处于 IV 期,这些患者中 80% 出现了不能手术切除的转移性病变,虽可采取放化疗、靶向治疗等,但其带来的毒副作用、耐药性等,在一定程度上制约了西医对中晚期结直肠癌的治疗^[2-3]。中医药治疗结直肠癌尤其独特优势,其参与到结直肠癌的治疗过程中,并通过抑制结直肠癌细胞增殖,诱导细胞凋亡,阻滞细胞周期,抑制侵袭与迁移,影响血管生成,逆转耐药等起到抗术后复发和转移,减毒增效,改善症状和生活质量,延长生存期等作用^[4-5]。本课题组长期致力于中医药防治结直肠癌的研究,并通过多年临床经验总结出治疗结直肠癌的健脾消癌方,本课题组前期已证实其可通过调节基质金属蛋白酶(MMP)-9,基质金属蛋白酶抑制剂-1(TIMP-1),内皮生长因子(VEGF)等因子影响血管生成,并可通过逆转化生长因子- β (TGF- β)诱导的上皮-间充质转分化(EMT)过程治疗结直肠癌^[6-7]。但是,TGF- β 调控 EMT 的机制复杂,据报道,TGF- β 诱导的长链非编码 RNA-ATB(lncRNA-ATB)可通过调控微小 RNA(miR)200/E 盒结合锌指蛋白(ZEB1)在抑制肝癌、骨肉瘤、结直肠癌等增殖、迁移、侵袭中起到关键作用^[8-9]。但是中医药能否通过调控 TGF- β /lncRNA-ATB/微小 RNA 200a(miR-200a)在结直肠癌中起作

用尚未见报道,本实验拟从该信号通路进一步研究健脾消癌方治疗结直肠癌的作用机制。

1 材料

1.1 细胞株和动物 人结肠癌细胞株 HCT116 购自中国科学院上海细胞中心;SPF 级 SD 大鼠 20 只,雌雄各半,体质量(220 ± 20)g,购自湖南省长沙斯莱克实验动物中心,合格证号 SCXK(湘)2016-0002,动物实验符合湖南省中医药研究院附属医院实验动物伦理委员会规定。

1.2 药物 健脾消癌方药物组成:人参 10 g,薏苡仁 30 g,半枝莲 30 g,重楼 10 g,莪术 10 g,郁金 15 g,购自湖南省中医药研究院附属医院中药房,经该院药剂科主任田其学主任药师鉴定,所有药材符合 2015 年版《中国药典》标准。2 倍量处方,温水浸泡 1 h,水量超出药物 5~6 cm,大火煮沸后转小火煎 30 min,趁热过滤,药渣按前法再煎煮 2 次,将 3 次药液混匀、过滤,减压浓缩为含生药 $1.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,4℃保存,1 周内用完。

1.3 试剂 Dulbecco's modified Eagle Media(DMEM)培养基,胎牛血清(美国 Life Technology 公司,批号分别为 05197,1640958);cDNA 逆转录试剂盒,实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)试剂盒(日本 Takara 公司,批号分别为 RR047Q,RR430A);ZEB1 单克隆抗体(美国 CST 公司,批号 3396); β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体(美国 Sigma 公司,批号 A5316);二抗抗体(北京中杉金桥公司,批号 T14987);TGF- β (美国 Peprotech 公司,批号 0716209-1)。

1.4 仪器 HERAcell2401 型二氧化碳细胞培养箱(美国 Thermo 公司);480 II 型荧光定量 PCR 仪(瑞

士 Roche 公司); FACSCalibur 型流式细胞分析仪(美国 BD 公司); SE300 型蛋白质电泳仪, TE22 型蛋白质转膜仪(美国 Hoefer 公司); GBOX 型凝胶成像系统(美国 Syngene 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 HCT116 细胞培养于含 10% 胎牛血清, 100 U·mL⁻¹ 青霉素和链霉素的 DMEM(高糖)培养液中, 置于 37 °C 5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱内进行培养, 细胞汇合率达 80% 左右, 胰酶消化细胞成单个细胞悬液, 1:3 进行传代培养。

2.2 健脾消癌方含药血清制备 将 SD 大鼠随机分成空白组和药物组, 每组 10 只。按照人与大鼠体表面积计算比值换算公式计算大鼠用药剂量^[10], 实验组按相当于 70 kg 成年人 105 g·d⁻¹ 的剂量, 即 9.45 g·kg⁻¹ 剂量对大鼠进行灌胃; 空白组按大鼠体质量灌胃等容积的生理盐水。每天灌胃 1 次, 连续 6 d, 于第 7 天最后 1 次灌胃后 1 h, 10% 水合氯醛腹腔麻醉大鼠, 腹主动脉取血, 4 °C, 2 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 吸取血清, 合并同组动物血清, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, -20 °C 保存备用^[11]。

2.3 分组及给药 选择对数生长期的 SW620 细胞按 5 × 10⁵ 个/孔接种于 60 mm 的培养皿中, 每组设置 3 个重复, 每皿培养基 6 mL; 置于 37 °C 5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱内进行培养过夜, 次日, 更换新鲜培养基。将细胞分为空白组(15% 空白血清), TGF-β 诱导组(TGF-β 10 μg·L⁻¹ 加 15% 空白血清), 健脾消癌方低剂量组(TGF-β 10 μg·L⁻¹ 加 10% 含药血清), 健脾消癌方中剂量组(TGF-β 10 μg·L⁻¹ 加 15% 含药血清), 健脾消癌方高剂量组(TGF-β 10 μg·L⁻¹ 加 20% 含药血清), 置于 37 °C 5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱内进行培养 48 h。

2.4 Real-time PCR 检测 lncRNA-ATB, miR-200a, ZEB1 mRNA 的表达 各组细胞分别培养 48 h 后, 酚-三氯甲烷法提取各组细胞总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳以及紫外分光光度仪测定 RNA 的完整性, 各组样品的 260, 280 nm 波长吸光度 A 比值均在 1.8 ~ 2.1, 符合下一步逆转录实验要求。按 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(Takara) 试剂盒说明书进行总 RNA 逆转录实验, 逆转录条件: 37 °C 30 min; 98 °C 5 min; -20 °C 保存。再以 cDNA 为模板, 与基因特异性引物, 通过 PCR 扩增 lncRNA-ATB, miR-200a, ZEB1 mRNA, 扩增条件: ① 94 °C 30 s, 1 个循环; ② 94 °C 5 s; 59 °C 30 s; 40 个循环; ③ 95 °C 2 s; 60 °C 15 s; 95 °C 2 s; 1 个循环;

④ 50 °C 保存。PCR 反应结束后首先对解离曲线进行分析, 确保只有单一产物被扩增; 之后对被扩增基因进行相对定量分析, 实验重复 3 次。lncRNA-ATB 和 ZEB1 mRNA 表达水平以 GAPDH 作为内参照, 以 $\Delta C_t = \Delta C_{t_{目的基因}} - \Delta C_{t_{内参基因}}$; $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{最低样本}} - \Delta C_{t_{其他样本}}$, 计算相对表达 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。miR-200a 表达计算方法与 lncRNA-ATB mRNA 表达计算方法相同, 以 U6 作为内参照。lncRNA-ATB, miR-200a, ZEB1 mRNA 所用引物均由上海生物工程有限公司合成, 见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 List of primers

引物	序列(5'-3')	长度/ bp
lncRNA-ATB	TCTGGCTGAGGCTGGTTGAC	86
	ATCTCTGGGTGCTGGTGAAGG	
ZEB1	ACTCTGATTCTACACCGC	198
	TGTCACATTGATAGGGCTT	
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGT	226
	GAAGATGGTGATGGGATTTCT	
miR-200a	GCCCGCTAGCTTATCAGACTGATG	75
	GTGCAGGGTCCGAGGT	
U6	GCGCGTCGTGAAGCGTTC	75
	GTGCAGGGTCCGAGGT	

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 ZEB1 蛋白表达 药物处理完毕后, 使用蛋白裂解液(强)提总蛋白, 二喹啉甲酸(BCA)法测定所提取的蛋白质浓度。按 40 μg/孔蛋白进行 10% SDS-PAGE 分离, 湿转法将蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜(PVDF)膜上, 5% BSA 室温封闭 2 h, 分别加入适量稀释后抗体 ZEB1(1:1 000), β-actin(1:5 000), 在摇床上 4 °C 孵育过夜; 聚山梨酯与三乙醇胺缓冲盐溶液(TBST)洗涤(每次 15 min, 共 3 次), 分别加入相应二抗, 山羊抗兔(1:5 000, 应用于 ZEB1), 山羊抗小鼠(1:5 000, 应用于 β-actin), 室温摇床合适转速孵育 1 h, TBST 洗涤(每次洗涤 15 min, 共 2 次), TBS 洗涤 1 次 15 min, 加入适量增强化学发光法(plus-ECL)发光试剂, 暗室内曝显影, 图像分析。以目的蛋白灰度值/β-actin 灰度值表示蛋白相对表达量。

2.6 统计学分析 采用 Graphpad Prism 6 软件进行统计分析, 计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据进行正态分布检验及组间方差齐性检验, 符合正态分布及方差齐性, 采用单因素方差分析; 不符合正态分布、方差分析, 采用 Kruskal-Wallis H 进行统计处理; 组间两两比较采用 LSD 法。以 $P < 0.05$ 为差异具有

统计学意义。

3 结果

3.1 健脾消癌方对结肠癌细胞 SW620 中 lncRNA-ATB 相对表达量的影响 与空白组比较, TGF- β 诱导组的 lncRNA-ATB 相对表达量显著升高 ($P < 0.01$); 与 TGF- β 诱导组比较, 健脾消癌方低剂量组 lncRNA-ATB 相对表达量明显降低 ($P < 0.05$), 健脾消癌方中、高剂量组 lncRNA-ATB 相对表达量显著降低 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 TGF- β 处理 48 h 及健脾消癌方对结肠癌细胞 SW620 中 lncRNA-ATB 相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of treatment with TGF- β and Jianpi Xiaoi prescription on expression of lncRNA-ATB in SW620 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	TGF- β 质量浓度 / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	体积分数 / %	lncRNA-ATB
空白	-	15	1.000 \pm 0.011
TGF- β 诱导	10	15	1.868 \pm 0.055 ²⁾
健脾消癌方	10	10	1.689 \pm 0.071 ³⁾
	10	15	1.473 \pm 0.039 ⁴⁾
	10	20	1.275 \pm 0.097 ⁴⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 TGF- β 诱导组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3 ~ 5 同)。

3.2 健脾消癌方对结肠癌细胞 SW620 中 miR-200a 相对表达量的影响 与空白组比较, TGF- β 诱导组的 miR-200a 相对表达量显著下降 ($P < 0.01$); 与 TGF- β 诱导组比较, 健脾消癌方低剂量组 miR-200a 相对表达量明显升高 ($P < 0.05$), 健脾消癌方中、高剂量组 miR-200a 相对表达量显著升高 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 TGF- β 处理 48 h 及健脾消癌方对结肠癌细胞 SW620 中 miR-200a 相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of treatment with TGF- β and Jianpi Xiaoi prescription on expression of miR-200a in SW620 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	TGF- β 质量浓度 / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	体积分数 / %	miR-200a
空白	-	15	1.008 \pm 0.017
TGF- β 诱导	10	15	0.655 \pm 0.030 ²⁾
健脾消癌方	10	10	0.781 \pm 0.014 ³⁾
	10	15	0.852 \pm 0.025 ⁴⁾
	10	20	0.930 \pm 0.078 ⁴⁾

3.3 健脾消癌方对结肠癌细胞 SW620 中 ZEB1 mRNA 相对表达量的影响 与空白组比较, TGF- β

诱导组 ZEB1 mRNA 相对表达量显著升高 ($P < 0.01$); 与 TGF- β 诱导组比较, 健脾消癌方低剂量组 ZEB1 mRNA 相对表达量明显降低 ($P < 0.05$), 健脾消癌方中、高剂量组 ZEB1 mRNA 相对表达量显著降低 ($P < 0.01$)。见表 4。

表 4 TGF- β 处理 48 h 及健脾消癌方对结肠癌细胞 SW620 中 ZEB1 mRNA 相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of treatment with TGF- β and Jianpi Xiaoi prescription on mRNA expression of ZEB1 in SW620 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	TGF- β 质量浓度 / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	体积分数 / %	ZEB1
空白	-	15	1.011 \pm 0.006
TGF- β 诱导	10	15	22.489 \pm 0.568 ²⁾
健脾消癌方	10	10	17.123 \pm 0.961 ³⁾
	10	15	8.680 \pm 0.445 ⁴⁾
	10	20	0.891 \pm 0.044 ⁴⁾

3.4 健脾消癌方对结肠癌细胞 SW620 中 ZEB1 蛋白表达的影响 与空白组比较, TGF- β 诱导组的 ZEB1 蛋白相对表达量明显升高 ($P < 0.05$); 与 TGF- β 诱导组比较, 健脾消癌方低剂量组 ZEB1 蛋白相对表达量稍降低, 差异无统计学意义, 健脾消癌方中、高剂量组 ZEB1 蛋白相对表达量显著降低 ($P < 0.01$)。见图 1, 表 5。

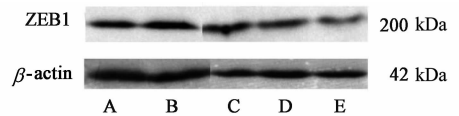


图 1 健脾消癌方作用结肠癌细胞 SW620 ZEB1 蛋白表达电泳
Fig. 1 Electrophoresis of protein expression of ZEB1 in HCT116 cells

表 5 TGF- β 处理 48 h 及健脾消癌方对结肠癌细胞 SW620 中 ZEB1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of treatment with TGF- β and Jianpi Xiaoi prescription on expression of ZEB1 in SW620 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	TGF- β 质量浓度 / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	体积分数 / %	ZEB1/ β -actin
空白	-	15	1.011 \pm 0.006
TGF- β 诱导	10	15	1.388 \pm 0.015 ¹⁾
健脾消癌方	10	10	1.295 \pm 0.040
	10	15	0.734 \pm 0.045 ⁴⁾
	10	15	0.734 \pm 0.045 ⁴⁾
	10	20	0.537 \pm 0.068 ⁴⁾

4 讨论

EMT 转录因子 ZEB1 表达的调控机制多种多样, miRNA 对其表达的调控便是其中一种。miRNAs 是一类在进化上保守, 长度为 18 ~ 25 个核苷酸的非编码 RNA, 其可通过调控下游靶基因蛋白或 mRNA 水平, 在肿瘤细胞的增殖、分化、凋亡和癌变等众多生物学功能起关键作用^[12-13]。miR-200a 是一类具有双向作用的小分子 RNA, 它既可作为抑癌基因抑制上皮间质转化转录因子 ZEB1, ZEB2 的表达, 又可通过上皮间质转化促进肿瘤形成^[14]。长链非编码 RNA 是一类转录本长度一般超过 200 nt, 没有开放阅读框(open reading frame, ORF), 缺少蛋白编码功能的一类特殊 RNA 分子, 越来越多的研究结果表明 lncRNA 在肿瘤的发生发展中具有重要的生物学功能^[15-16]。lncRNA-ATB 是由 TGF- β 诱导产生的一类 RNA, 其在肿瘤组织中的表达明显高于正常组织, 其主要通过影响 miR-200a 的表达, 增加 EMT 转录因子 ZEB1 在肿瘤组织中的表达影响肿瘤的侵袭迁移^[17]。

中医学多认为, 结直肠癌多由于“虚”、“瘀”、“毒”相互作用, 相互影响而形成。健脾消癌方以人参、薏苡仁益气健脾, 以健生化之源, 而疗诸虚不足, 从而达到扶正固本的目的; 莪术、郁金活血化瘀, 半枝莲、重楼清热解毒、消痈散结, 全方配伍精要, 攻补兼施, 共奏益气健脾, 化瘀解毒之功。研究表明, 人参皂苷及其代谢产物、人参多糖和人参炔醇均具有抗肿瘤的功效, 其抗肿瘤的机制主要为抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞周期阻滞、诱导肿瘤细胞凋亡、诱导肿瘤细胞分化、增强对肿瘤细胞免疫^[18]。薏苡仁中性油脂可调控肿瘤细胞周期蛋白和信号转导蛋白, 薏苡仁脂可抗血管生成, 薏苡仁多糖可调节机体免疫力, 薏苡仁甲醇提取物可诱导肿瘤细胞凋亡^[19]。莪术中的莪术醇, 姜黄素, β -榄香烯等可通过阻断肿瘤细胞的生长、增殖、诱导凋亡起到抗肿瘤作用^[20-21]。温郁金中的蓬莪术二烯, β -榄香烯, δ -榄香烯均可抑制肿瘤细胞增殖, 诱导细胞凋亡^[22]。半枝莲总黄酮中含有 7 种抗肿瘤成分, 可一定程度上抑制肿瘤细胞的增殖, 抑制血管生成, 诱导细胞凋亡, 而半枝莲多糖可增强机体免疫力^[23-24]。重楼的抗肿瘤作用主要集中于抑制肿瘤细胞增殖、诱导细胞分化凋亡、调节机体免疫力等^[25]。通过现代药理学研究表明, 针对肿瘤发展多因素、多阶段的过程, 健脾消癌方也是通过多环节、多靶点起到抗肿瘤的作用。

本实验发现 SW620 细胞经 TGF- β 诱导后, lncRNA-ATB 相对表达量明显升高, miR-200a 相对表达量下降, ZEB1 mRNA 和蛋白相对表达量升高; 健脾消癌方含药血清处理 48 h 后, SW620 细胞中 TGF- β 诱导的 lncRNA-ATB 的表达被抑制, miR-200a 表达增加, ZEB1 mRNA 和蛋白表达降低, 且以上因子的变化水平均与健脾消癌方的用药剂量呈正相关, 这提示健脾消癌方可通过调节 TGF- β /lncRNA-ATB/miR-200a 信号通路来达到治疗结直肠癌的目的。

[参考文献]

- [1] 陈万青, 郑荣寿, 张思维, 等. 2013 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2017, 26(1): 1-7.
- [2] Kim C W, Baek J H, Choi G S, et al. The role of primary tumor resection in colorectal cancer patients with asymptomatic, synchronous unresectable metastasis: study protocol for a randomized controlled trial [J]. *Trials*, 2016, 17(1): 34-54.
- [3] CHONG Q, LIANG H, CHENG Z J, et al. Identification of metastasis-associated genes in colorectal cancer using meta DE and survival analysis [J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(1): 568-574.
- [4] 徐小涵, 田国庆. 中药有效成分对结直肠癌的作用机制实验研究概况 [J]. 中医杂志, 2014, 55(4): 347-349.
- [5] 吴霜霜, 戚益铭, 阮善明, 等. 结直肠癌中医证候及临证用药规律的研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(8): 1857-1860.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] YUAN J H, YANG F, WANG F, et al. A long noncoding RNA activated by TGF- β promotes the invasion-metastasis cascade in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Cell*, 2015, 25(5): 666-681.
- [9] HAN F, WANG C H, WANG Y, et al. Long noncoding RNA ATB promotes osteosarcoma cell proliferation, migration and invasion by suppressing miR-200s [J]. *Am J Cancer Res*, 2017, 7(4): 770-783.
- [10] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [11] 张君涛, 王平, 刘爱峰, 等. 中药含药血清制备方法的

- 研究概述[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(11): 4006-4009.
- [12] Lages E, Ipas H, Guttin A, et al. MicroRNAs: molecular features and role in cancer[J]. Front Biosci, 2012, 17(4): 2508-2540.
- [13] 王阶, 李敏, 刘咏梅, 等. miRNA在冠心病治疗中的作用及与中医药的相关性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(22): 1-5.
- [14] Schmitt A M, Chang H Y. Long noncoding RNAs in cancer pathways[J]. Cancer Cell, 2016, 29(4): 452-463.
- [15] Sahu A, Singhal U, Chinnaiyan A M. Long noncoding RNAs in cancer: from function to translation[J]. Trends Cancer, 2015, 1(2): 93-109.
- [16] LI H, MA S Q, HUANG J, et al. Roles of long noncoding RNAs in colorectal cancer metastasis[J]. Oncotarget, 2017, 8(24): 39859-39876.
- [17] MA C C, XIONG Z, ZHU G N, et al. Long non-coding RNA ATB promotes glioma malignancy by negatively regulating miR-200a[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2016, 35(1): 90.
- [18] 罗林明, 石雅宁, 姜懿纳, 等. 人参抗肿瘤作用的有效成分及其机制研究进展[J]. 中草药, 2017, 48(3): 582-596.
- [19] 杜萌, 丁安伟, 陈彦. 薏苡仁化学成分及其防治肿瘤作用机制研究[J]. 吉林中医药, 2012, 32(2): 195-198, 201.
- [20] 曾建红, 莫炫永, 戴平, 等. 广西莪术挥发油抗肿瘤作用的谱效关系研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(13): 91-94.
- [21] 赵志梅, 张立杰, 夏天, 等. 莪术主要单体成分抗炎、抗肿瘤作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2017, 40(1): 1745-1747.
- [22] 尹国平, 张清哲, 安月伟, 等. 温郁金化学成分及药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(22): 3354-3360.
- [23] 田新宇, 范翠梅, 渠田田, 等. 半枝莲总黄酮中7种成分的含量测定及抗肿瘤活性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(1): 53-59.
- [24] 牛国晓, 李洁. 半枝莲抗肿瘤机制研究进展[J]. 肿瘤防治研究, 2012, 39(2): 231-233.
- [25] 夏亚飞, 阎姝. 重楼抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 304-307.

[责任编辑 张丰丰]