

## 四君子汤含药血清调控 hTERT, TRF1, Tankyrase 表达及对 UCAC 的影响

黄晓燕<sup>1\*</sup>, 马媛萍<sup>2</sup>, 李桂贤<sup>1</sup>, 郑超伟<sup>3</sup>, 李敏<sup>3</sup>

(1. 广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530023; 2. 广西国际壮医医院, 南宁 530001;  
3. 广西中医药大学, 南宁 530000)

**[摘要]** **目的:**应用四君子汤含药血清干预肠癌 SW480 细胞,观察人端粒酶逆转录酶(hTERT),端粒结合因子 1 (TRF1),端锚聚合酶(Tankyrase)mRNA 及蛋白的表达变化,探讨其防治溃疡性结肠癌相关癌变(UCAC)的可能机制。**方法:**体外培养肠癌 SW480 细胞,分别予空白胎牛血清、四君子汤含药血清、美沙拉嗪含药血清干预,将经过干预后的 SW480 细胞,采用实时荧光定量 PCR 及蛋白免疫印迹法检测肠癌 SW480 细胞中 hTERT,TRF1 及 Tankyrase mRNA 和蛋白表达水平。**结果:**与空白血清组比较,四君子汤(2.16,4.32,8.64 g·kg<sup>-1</sup>)含药血清组和美沙拉嗪含药血清组均能降低 hTERT,TRF1, Tankyrase mRNA 表达( $P < 0.05$ );与美沙拉嗪含药血清组比较,四君子汤(4.32,8.64 g·kg<sup>-1</sup>)含药血清组明显降低 hTERT,TRF1 mRNA 表达( $P < 0.05$ ),四君子汤(2.16,4.32,8.64 g·kg<sup>-1</sup>)含药血清组 Tankyrase mRNA 表达明显升高( $P < 0.05$ )。与空白血清组比较,四君子汤(2.16,4.32,8.64 g·kg<sup>-1</sup>)含药血清组和美沙拉嗪含药血清组 hTERT,TRF1 蛋白表达均降低( $P < 0.05$ ),美沙拉嗪含药血清组 Tankyrase 蛋白表达降低( $P < 0.05$ );四君子汤含药血清组 Tankyrase 蛋白表达呈下降趋势,但无统计学差异;与美沙拉嗪含药血清组比较,四君子汤(8.64 g·kg<sup>-1</sup>)含药血清组 hTERT 蛋白表达明显降低( $P < 0.05$ ),四君子汤(4.32, 8.64 g·kg<sup>-1</sup>)含药血清组 TRF1 蛋白表达明显降低( $P < 0.05$ ),四君子汤(2.16 g·kg<sup>-1</sup>)含药血清组 Tankyrase 蛋白表达明显升高( $P < 0.05$ )。**结论:**四君子汤含药血清可能通过下调 hTERT,TRF1,Tankyrase 表达,抑制癌细胞增殖,诱导癌细胞凋亡,达到防治 UCAC 的作用。

**[关键词]** 溃疡性结肠炎相关癌变; 四君子汤; 人端粒酶逆转录酶; 端粒重复序列结合因子 1; 端锚聚合酶

**[中图分类号]** R22;R2-031;R273;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)08-0128-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20180717

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180111.0908.014.html>

**[网络出版时间]** 2018-01-12 10:00

### Effect of Serum of Si Junzitang in Regulating hTERT, TRF1 and Tankyrase Expressions and UCAC

HUANG Xiao-yan<sup>1\*</sup>, MA Yuan-ping<sup>2</sup>, LI Gui-xian<sup>1</sup>, ZHENG Chao-wei<sup>3</sup>, LI Min<sup>3</sup>

(1. *The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China;*

*2. Guangxi International Zhuang Medical Hospital, Nanning 530001, China;*

*3. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, China)*

**[Abstract]** **Objective:** To observe the gene and protein expressions of human telomerase reverse transcriptase (hTERT), telomere binding factor 1 (TRF1), endonucleopolymerase (Tankyrase) in colorectal cancer SW480 cells treated with Si Junzitang serum, in order to explore the possible mechanism of prevention and treatment of ulcerative colorectal cancer-associated carcinogenesis (UCAC). **Method:** Colorectal cancer SW480

**[收稿日期]** 20170903(008)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81460714);广西自然科学基金项目(2014GXNSFBA118183);广西中医药管理局面上项目(GZPT1209)

**[通信作者]** \* 黄晓燕,博士,副主任医师,从事中医药防治消化系统疾病研究,E-mail:huangxiaoyan0705@163.com

cells were *in vitro* cultured and intervened with blank fetal bovine serum, different concentrations of Si Junzitang containing serum and mesalazine serum. After intervention, SW480 cells were detected by Real-time PCR and Western blot for the mRNA and protein expressions of hTERT, TRF1 and Tankyrase. **Result:** Compared with the blank serum group, the serum levels of hTERT, TRF1 and Tankyrase were decreased in the low, medium and high-dose group and the methadiazine serum group ( $P < 0.05$ ). Compared with the methacillin-containing serum group, the gene expression of Tankyrase in the serum group was significantly lower than that in the serum of Si Junzitang ( $P < 0.05$ ), and the gene expressions of hTERT and TRF1 were significantly decreased in the high-dose group ( $P < 0.05$ ). Compared with the blank serum group, the serum levels of hTERT and TRF1 were decreased in Si Junzitang group, the middle and high-dose groups and the methadiazine serum group ( $P < 0.05$ ), the protein expression of Tankyrase was decreased in the drug group ( $P < 0.05$ ), the protein expression of Tankyrase in the Si Junzitang group was decreased, but with no significant difference. Compared with the methacillin-containing serum group, the protein expression of hTERT was significantly decreased in the high-dose group ( $P < 0.05$ ), the protein expression of TRF1 was significantly decreased in the high-dose group ( $P < 0.05$ ), the protein expression of Tankyrase in the serum-containing group was significantly lower than that in the low-dose group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The serum of Si Junzitang may inhibit the proliferation of cancer cells and induce the apoptosis of cancer cells by down-regulating the expressions of hTERT, TRF1 and Tankyrase.

[ **Key words** ] ulcerative colitis-associated carcinogenesis; Si Junzitang; human telomerase reverse transcriptase; telomere repeat binding factor 1; Tankyrase

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种原因不明的慢性非特异性肠道炎症,其主要临床症状为腹痛、腹泻、黏液脓血便、里急后重,部分患者可出现关节、皮肤、眼、口等肠外表现。流行病学资料提示,溃疡性结肠炎的患病率及发病率在国内外都有逐年增长的趋势<sup>[1-2]</sup>,已被世界卫生组织列为难治疾病之一<sup>[3]</sup>。而溃疡性结肠炎相关癌变 (ulcerative colitis associated carcinogenesis, UCAC) 是溃疡性结肠炎严重并发症之一,其癌变为“炎症-不典型增生-癌”的模式<sup>[4]</sup>,并与 UC 病变范围、患病时间、炎性反应程度、发病年龄等因素有关<sup>[5]</sup>。因此,有效的控制炎症,延缓或降低 UC 复发,对预防 UCAC 的发生、发展显得尤为重要。

目前普遍认为定期结肠镜检查可对 UCAC 起到积极的预防作用,但至今仍无直接证据表明结肠镜检查的检测能降低 UCAC 的死亡率<sup>[6]</sup>。目前用于预防 UCAC 的药物主要有 5-氨基水杨酸、硫唑嘌呤类药物等,长期服用上述药物产生的副作用可增加该病的死亡率,且对是否降低 UCAC 的发病率尚未明确<sup>[7-8]</sup>。中医药对防治轻中度 UC 疗效明确,其发病根本以脾虚为主,湿热毒瘀痰为标,贯穿始终,发则治其标,缓则治其本,顾护根本为主要治疗原则<sup>[9]</sup>。本课题组前期研究发现健脾益气四君子汤可延长端粒活性,增强端粒酶表达,减少肠上皮细胞凋亡,促进肠上皮屏障修复,从而有效的缓解炎症<sup>[10]</sup>。为

进一步揭示其防治 UCAC 的可能机制,本课题组采用血清药理学方法,以公认有效的美沙拉嗪为阳性组,观察其对 SW480 细胞人端粒酶逆转录酶 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT), 端粒结合因子 1 (telomere repeat binding factor 1, TRF1), 端锚聚合酶 (Tankyrase) 的影响,探讨四君子汤防治 UCAC 的生物学机制。

## 1 材料

**1.1 细胞株及动物** 肠癌 SW480 细胞由中山大学实验中心细胞库提供;SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只,体质量 (200 ± 20) g,由广西医科大学动物实验中心提供,合格证号 SCXK (桂)2014-0002。实验涉及动物的饲养和实验过程中都遵守了广西中医药大学实验动物管理与保护的有关准则。

**1.2 药物及试剂** 四君子汤 (党参 15 g,白术 12 g,茯苓 15 g,炙甘草 6 g) 购自广西中医药大学第一附属医院药房,所有药材均由本院中药师杨立农鉴定,党参为桔梗科植物党参 *Codonopsis pilosula* 的干燥根,白术为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* 的干燥根茎,茯苓为多孔菌科植物茯苓 *Poria cocos* 的干燥菌核,甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza inflata* 的干燥根和根茎;美沙拉嗪 (法国博福-益普生公司,国药准字 H20100062)。胎牛血清,DMEM 高糖培养基,青链霉素,磷酸盐缓冲液 (PBS) (美国 Hyclone 公司,批号分别为 SH30087.01, SH30022.01B,

SH30010, SH30256. 01B); hTERT, TRF1, Tankyrase, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 单克隆抗体 (英国 Abcam 公司, 批号分别为 Ab183105, Ab1423, Ab83978, Ab181602); Goat anti-rabbit 免疫球蛋白 (Ig) G-HRP 二抗 (美国 Santa Cruz 公司, 批号 sc-2004); 超敏 ECL 化学发光试剂盒 (碧云天生物技术研究所, 批号 P0018); PageRuler Prestained Protein Ladder (立陶宛 Fermentas 公司, 批号 SM0671); Prime Script™ RT reagent Kit, SYBR Premix EX Taq II Kit (日本 TaKaRa 公司, 批号分别为 RR047A, RR820A)。

**1.3 仪器** Mini 型蛋白电泳系统、电转系统 (美国伯乐公司), TS-1 型脱色摇床 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司), LG2000 型数码凝胶图像分析系统 (杭州朗基科学仪器有限公司), AX-II (127 mm × 178 mm) 型 X 射线摄影暗匣 (广东粤华医疗器械厂有限公司), TGL-18R 型冷冻高速离心机 (珠海黑马医学仪器有限公司), DK-8D 型电热恒温水槽 (上海一恒科技有限公司), HERACELL150i 型细胞恒温培养箱 (美国 Thermo Scientific 公司), DMI6000B 型倒置荧光显微镜 (德国 Leica 公司)。

## 2 方法

**2.1 药物制备** 用蒸馏水将四君子汤药材煎煮并浓缩配制成含生药  $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的药液, 过滤分装,  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。美沙拉嗪用蒸馏水配制, 过滤分装,  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**2.2 含药血清制备** 将 50 只清洁级雄性 SD 大鼠, 按体质量随机分为 5 组, 美沙拉嗪组、空白组、四君子汤低、中、高剂量组, 每组 10 只, 给药剂量参照“人和动物按体表面积折算的等效剂量比率表”计算<sup>[11]</sup>, 按公式: 给药剂量 = 临床常用量 × 动物等剂量系数 (按体表面积) × 培养液内稀释度, 并参照文献计算大鼠等效剂量为  $4.32 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,  $1/2$  剂量  $2.16 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  为低剂量组, 2 倍剂量  $8.64 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  为高剂量组<sup>[12]</sup>。治疗组予不同剂量四君子汤灌胃, 美沙拉嗪组予美沙拉嗪 ( $0.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 灌胃, 空白组予等体积的生理盐水灌胃, 每天 2 次, 连续 7 d。末次给药后 1 h, 用 10% 水合氯醛麻醉, 在无菌条件下经腹主动脉采血, 血样置于 10 mL 离心管, 静置 2 h, 置于  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min, 分离血清, 血清以  $56 \text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴灭活 30 min, 用  $0.22 \text{ }\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤除菌, 置  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**2.3 细胞培养及干预** 将肠癌 SW480 细胞置于 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中接种, 置于

$37 \text{ }^{\circ}\text{C}$   $5\% \text{ CO}_2$  培养箱培养, 隔天换液, 倒置显微镜下观察细胞生长的状态, 实验时, 细胞用消化液进行消化, 并接种于 96 或 6 孔板中。取对数生长期的细胞, 用含  $0.25\%$  胰酶的消化液进行消化, 并接种于 6 孔板中, 每孔 1 mL, 分为空白血清组、四君子汤含药血清低、中、高剂量组、美沙拉嗪含药血清组, 血清含量均为  $10\%$ , 继续培养 24 h。

**2.4 实时荧光定量 PCR (Real time PCR) 检测肠癌 SW480 细胞 hTERT, TRF1, Tankyrase mRNA 表达** 细胞培养和处理同 2.3 项, 含药血清作用细胞 48 h 后, 收集细胞, 使用 trizol 法提取总 RNA, 并用 RNase-free 的 DNase I 纯化, 使用 UV-1750 型紫外分光光度仪检测纯化后 RNA 浓度, 电泳检测总 RNA 完整性, 逆转录试剂盒反转录合成 cDNA, 按逆转录试剂盒配制 cDNA 合成所需反应液, RNase Free dd  $\text{H}_2\text{O}$   $10 \text{ }\mu\text{L}$ ,  $5 \times$  PrimeScript™ Buffer (for real time)  $2 \text{ }\mu\text{L}$ , PrimeScript™ RT Enzyme Mix I  $1 \text{ }\mu\text{L}$ , Oligo dT Primer ( $50 \text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $1 \text{ }\mu\text{L}$ , Random 6 mers ( $100 \text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $2 \text{ }\mu\text{L}$ , RNA  $4 \text{ }\mu\text{L}$ , 共  $20 \text{ }\mu\text{L}$ , 逆转录条件:  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  60 min,  $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$  3 min。用 Real-time PCR 仪进行扩增, 采用  $20 \text{ }\mu\text{L}$  反应体系, 将荧光定量 PCR 引物、内参于  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  混匀、离心, 放入荧光定量 PCR 仪, 反应条件:  $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min,  $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$  变性 5 s,  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,  $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 15 s, 共 40 个循环。取得扩增曲线、扩增产物溶解曲线及 Ct 值, 采用仪器自带软件进行数据和溶解曲线分析, 计算各组 hTERT, TRF1, Tankyrase mRNA 相对表达量。引物序列由广州蓝吉生物技术有限公司合成, 见表 1。

**2.5 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测肠癌 SW480 细胞 hTERT, TRF1, Tankyrase 蛋白表达** 细胞培养和处理同 2.3 项, 含药血清作用细胞 48 h 后, 收集细胞, 按细胞裂解液说明书提取细胞蛋白, 测定蛋白浓度, 蛋白上样, 电泳, 转膜, 封闭, 洗膜, 一抗 hTERT (1 : 1 000), Tankyrase (1 : 1 000), TRF1 (1 : 2 000)  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  封闭过夜, 洗膜, 二抗 (1 : 5 000) 室温封闭 1 h, 洗膜, ECL 化学发光, 拍照。以目的条带灰度值/GAPDH 灰度值表示蛋白相对表达量。

**2.6 统计学分析** 应用 SPSS 19.0 统计软件处理各组数据, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 符合正态分布资料采用单因素方差分析检验; 若为非正态分布资料应用秩和检验来比较两组间差异是否有统计学意义。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 四君子汤含药血清对肠癌 SW480 细胞**

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

引物	上游序列	下游序列	长度/bp
h-TERT	5'-CGTCATCGAGCAGACTCC-3'	5'-GTAGGACTTGCCCCTGATGC-3'	106
TRF1	5'-TCTCTCTTTGCCGAGCTTCC-3'	5'-ACTGGCAAGCTGTTAGACTGGAT-3'	108
Tankyrase	5'-GCCCAAGATGAATGCACT-3'	5'-AGCCGTAAGTCAAGCAGGAGG-3'	102
GAPDH	5'-GATTCCACCCATGGCAAATT-3'	5'-TCTCGCTCTGGAAGATGCT-3'	95

注: GenBank 上查找目的基因 mRNA 序列, 在 CDS 区设计特异性引物。

hTERT, TRF1, Tankyrase mRNA 的影响 与空白血清组比较, 四君子汤含药血清低、中、高剂量组和美沙拉嗪含药血清组均能降低 hTERT, TRF1, Tankyrase mRNA 表达 ( $P < 0.05$ ); 与美沙拉嗪含药血清组比较, 四君子汤含药血清中、高剂量组可明显降低 hTERT, TRF1 mRNA 表达 ( $P < 0.05$ ), 四君子汤含药血清低、中、高剂量组可明显升高 Tankyrase mRNA 表达 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 四君子汤含药血清对 SW480 细胞 hTERT, TRF1, Tankyrase mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of Si Junzhitang medicated serum on hTERT, TRF1 and Tankyrase mRNA expressions in SW480 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

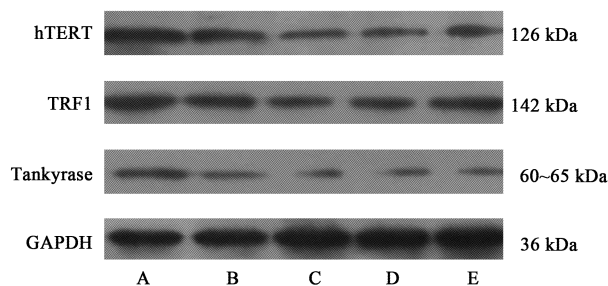
组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	hTERT	TRF1	Tankyrase
空白血清	-	1.00 ± 0.03	0.97 ± 0.09	0.96 ± 0.04
四君子汤	2.16	0.60 ± 0.15 <sup>1)</sup>	0.55 ± 0.11 <sup>1)</sup>	0.68 ± 0.16 <sup>1,2)</sup>
含药血清	4.32	0.30 ± 0.07 <sup>1,2)</sup>	0.26 ± 0.04 <sup>1,2)</sup>	0.55 ± 0.17 <sup>1,2)</sup>
	8.64	0.26 ± 0.01 <sup>1,2)</sup>	0.28 ± 0.03 <sup>1,2)</sup>	0.45 ± 0.08 <sup>1,2)</sup>
美沙拉嗪	0.4	0.52 ± 0.07 <sup>1)</sup>	0.45 ± 0.06 <sup>1)</sup>	0.21 ± 0.02 <sup>1)</sup>
含药血清				

注: 血清体积分数均为 10%; 与空白血清组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与美沙拉嗪含药血清组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$  (表 3 同)。

3.2 四君子含药血清对 SW480 细胞 hTERT, TRF1, Tankyrase 蛋白表达的影响 与空白血清组比较, 四君子汤含药血清低、中、高剂量组和美沙拉嗪含药血清组均能降低 hTERT, TRF1 蛋白表达 ( $P < 0.05$ ), 美沙拉嗪含药血清组能降低 Tankyrase 蛋白表达 ( $P < 0.05$ ), 四君子汤含药血清组 Tankyrase 蛋白表达虽呈下降趋势, 但无明显统计学差异; 与美沙拉嗪含药血清组比较, 四君子含药血清高剂量组明显降低 hTERT 蛋白表达 ( $P < 0.05$ ), 四君子含药血清中、高剂量组明显降低 TRF1 蛋白表达 ( $P < 0.05$ ), 四君子汤含药血清低剂量组可明显升高 Tankyrase 蛋白表达 ( $P < 0.05$ )。见图 1, 表 3。

#### 4 讨论

UCAC 的发病机制尚不明确, 是一个涉及多



A. 空白血清组; B ~ D. 四君子汤含药血清低、中、高剂量组; E. 美沙拉嗪含药血清组

图 1 四君子含药血清作用 SW480 细胞后 hTERT, TRF1, Tankyrase 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of medicated serum Si Junzhitang on hTERT, TRF1 and Tankyrase protein expressions in SW480 cells

表 3 四君子汤含药血清对 SW480 细胞 hTERT, TRF1, Tankyrase 蛋白的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of Si Junzhitang medicated serum on hTERT, TRF1 and Tankyrase protein expressions in SW480 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	hTERT /GAPDH	TRF1 /GAPDH	Tankyrase /GAPDH
空白血清	-	0.82 ± 0.05	0.79 ± 0.03	0.58 ± 0.07
四君子汤	2.16	0.60 ± 0.09 <sup>1)</sup>	0.60 ± 0.07 <sup>1)</sup>	0.51 ± 0.15 <sup>2)</sup>
含药血清	4.32	0.47 ± 0.03 <sup>1)</sup>	0.45 ± 0.01 <sup>1,2)</sup>	0.40 ± 0.11
	8.64	0.40 ± 0.01 <sup>1,2)</sup>	0.50 ± 0.01 <sup>1,2)</sup>	0.39 ± 0.10
美沙拉嗪	0.4	0.52 ± 0.06 <sup>1)</sup>	0.63 ± 0.06 <sup>1)</sup>	0.28 ± 0.01 <sup>1)</sup>
含药血清				

mRNA, 多信号, 多阶段的复杂过程, 早期检测 UCAC 患者的 DNA 发现染色体不稳定性、微卫星不稳定性及 DNA 甲基化<sup>[13]</sup>。大部分研究者认为炎症与 UCAC 的发展密切相关<sup>[14]</sup>, 氧化应激与炎症紧密相连。在致炎因素刺激下, 机体产生大量活性氧 (ROS), 炎症慢性反应过程中, ROS 会造成附近细胞的基因突变, 修复不及时便会引发细胞癌变, 并且能够促进肿瘤细胞增殖、生长和转移, 抑制肿瘤细胞凋亡<sup>[15]</sup>; ROS 过多还会导致 DNA 单链断裂发生在染色体末端, 使端粒缩短加速。端粒缩短和端粒酶

高度活化介导肠上皮细胞破坏肠黏膜屏障参与 UCAC 的发生。

端粒是染色体末端的 DNA 重复序列和端粒蛋白的复合体,主要功能是维持染色体的完整与稳定,由端粒 DNA 和端粒结合蛋白共同组成<sup>[16]</sup>。端粒结合蛋白由 shelterin 复合体构成,包括 TRF1, TRF2, TIN2, Rap1, TPP1, POT1, 其中 TRF1, TRF2 在保护端粒和维持端粒稳定方面发挥重要的作用。Tankyrase 是二磷酸腺苷核糖多聚合酶家族中一员,有 1 和 2 两种, Tankyrase1 是作为 TRF1 的配体而发现的, Tankyrase1 基因定位于人类第 8 号染色体,是 1 种由 1 327 个氨基酸残基组成的、相对分子质量为 132 kDa 的蛋白质,由 4 个独特的功能区组成:①N-末端的 HPS 区;②ANK(ankyrin-related domain)区,该区靠近 N 末端,包括 24 个 ANK 重复序列,是 Tankyrase-1 与各种蛋白相互作用的部位;③SAM 区;④C 末端<sup>[17]</sup>。Tankyrase1 和 TRF1 在细胞端粒长度的调控过程中发挥着重要作用,在细胞间期 Tankyrase1 与 TRF1 结合共同定位于染色体末端,催化 TRF1 核糖基化而从端粒脱落,从而维持端粒长度在一个较稳定的平均水平。85%~90% 的癌细胞中会出现端粒酶基因的激活,维持肿瘤细胞永生<sup>[18]</sup>。端粒酶是由端粒酶相关蛋白(TP1),端粒酶 RNA(hTR)及其逆转录酶亚单位 hTERT 3 部分组成,其主要功能是延长端粒及修复断裂的染色体末端。端粒酶活化与肿瘤的发生发展关系密切<sup>[19-21]</sup>, hTERT 既是端粒酶的重要组成部分,又是端粒酶的限速亚单位,直接决定端粒酶的活性。研究发现 hTERT 转录激活对端粒酶激活具有重要意义,葛莲英等<sup>[22]</sup>研究发现 RNA 干扰(RNAi)沉默 hTERT 基因能有效抑制 SW480 肿瘤细胞生长,并降低端粒酶活性,诱导肿瘤细胞凋亡。本研究结果发现与空白血清组比较,四君子汤含药血清低、中、高剂量组和美沙拉嗪含药血清组均能降低 hTERT, TRF1, Tankyrase mRNA 表达;与美沙拉嗪含药血清组比较,四君子汤含药血清中、高剂量组明显降低 hTERT, TRF1 mRNA 表达, Tankyrase mRNA 表达美沙拉嗪含药血清组较四君子汤含药血清组降低明显。与空白血清组比较,四君子汤含药血清低、中、高剂量组和美沙拉嗪含药血清组均能降低 hTERT, TRF1 蛋白表达,美沙拉嗪含药血清组能降低 Tankyrase 蛋白表达,四君子汤含药血清组 Tankyrase 蛋白表达虽呈下降趋势,但无明显统计学意义;与美沙拉嗪含药血清组比较,四君子汤含药血清高剂量组

明显降低 hTERT 蛋白表达,四君子汤含药血清中、高剂量组明显降低 TRF1 蛋白表达, Tankyrase 蛋白表达美沙拉嗪含药血清组较四君子汤含药血清低剂量组降低明显。四君子汤出自《太平惠民和剂局方》,为治疗脾胃气虚经典代表方药,该方由人参、白术、茯苓、炙甘草组成,4 味药皆平和之品,不偏不盛,不热不燥,补而不峻,益而无害,诸药合用共奏益气健脾、扶正培元之效。推测四君子汤含药血清可能通过下调 hTERT, TRF1, Tankyrase 表达,抑制端粒酶活性,从而发挥防治 UCAC 的疗效。

综上所述,四君子汤含药血清防治 UCAC 的作用机制可能与其影响 hTERT, TRF1, Tankyrase 的表达而抑制癌细胞增殖,诱导癌细胞凋亡有关,后期本课题组将对四君子汤含药血清做药理学分析,检测其发挥疗效药理成分的机制。

#### [参考文献]

- [1] Lani P, Kamm M A, Cruz P P D, et al. Inflammatory bowel disease in Asia: a systematic review [J]. J Gastroen Hepatol, 2012, 27(8):1266-1280.
- [2] Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, et al. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases [J]. Gastroenterology, 2011, 140(6):1785-1794.
- [3] Lakatos P L, Lakatos L. Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: changes, causes and management strategies [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(25):3937-3947.
- [4] 李景南. 溃疡性结肠炎癌变机制的研究进展——从炎症到肿瘤 [J]. 中华消化杂志, 2011, 31(3):183-186.
- [5] Laugesen K B, Tøttrup A. Colorectal cancer in ulcerative colitis [J]. Ugeskr Laeger, 2014, 176(4A):V07130441.
- [6] 于成功, 周黎行. 溃疡性结肠炎合并癌变的早期诊治策略 [J]. 医学与哲学, 2017, 38(4):23-26.
- [7] Actis G C, Pellicano R, David E, et al. Azathioprine, mucosal healing in ulcerative colitis, and the chemoprevention of colitic cancer: a clinical-practice-based forecast [J]. Inflamm Allergy Drug Targets, 2010, 9(1):6-9.
- [8] Smith L A, Baraza W, Tiffin N, et al. Endoscopic resection of adenoma-like mass in chronic ulcerative colitis using a combined endoscopic mucosal resection and cap assisted submucosal dissection technique [J]. Inflamm Bowel Dis, 2008, 14(10):1380-1386.
- [9] 杨小文, 王垂杰. 溃疡性结肠炎病机研究简况 [J]. 实用中医内科杂志, 2013, 27(19):95-96.

- [10] 黄晓燕,张涛,王囡囡,等.端粒缩短介导肠上皮细胞凋亡参与溃疡性结肠炎以及四君子汤干预研究[J].时珍国医国药,2014,25(9):2303-2305.
- [11] 李仪奎.中药药理实验方法学[M].上海:上海科学技术出版社,2006:50-53.
- [12] 施胜英,林海桢,周激,等.加味四君子汤含药血清对肝癌 Hep-G2 细胞的影响[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(18):88-93.
- [13] Grivennikov S I. Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia [J]. Sem Immunopathol, 2013,35(2):229-244.
- [14] Thorsteinsdottir S, Gudjonsson T, Nielsen O H, et al. Pathogenesis and biomarkers of carcinogenesis in ulcerative colitis [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2011,8(7):395-404.
- [15] 于卫华,周庆彪,刘颖,等.活性氧调控炎症诱发肿瘤机制的研究进展[J].癌变·畸变·突变,2016,28(2):158-161.
- [16] Meena J, Rudolph K L, Günes C. Telomere dysfunction, chromosomal instability and cancer [J]. Recent Results Cancer Res, 2015, doi:10.1007/978-3-319-20291-4\_3.
- [17] Haikarainen T, Krauss S, Lehtio L. Tankyrases: structure, function and therapeutic implications in cancer [J]. Curr Pharm Design, 2014, 20(41):6472-6488.
- [18] Silva T C R, Leal M F, Calcagno D Q, et al. hTERT, MYC and TP53 deregulation in gastric preneoplastic lesions [J]. BMC Gastroenterol, 2012, doi: 10.1186/1471-230X-12-85.
- [19] Akincilar S C, Unal B, Tergaonkar V. Reactivation of telomerase in cancer [J]. Cell Mol Life Sci, 2016, 73(8):1659-1670.
- [20] XU Y, Goldkorn A. Telomere and telomerase therapeutics in cancer [J]. Genes, 2016, 7(6):22.
- [21] Baichoo E, Boardman L A. Toward a molecular classification of colorectal cancer: the role of telomere length [J]. Front Oncol, 2014, doi: 10.3389/fonc.2014.00158.
- [22] 葛莲英,刘爱群,罗小玲,等. RNA 干扰沉默 hTERT 基因对大肠癌 SW480 细胞生物学特性的影响[J].中华实验外科杂志,2012,29(2):195-198.

[责任编辑 张丰丰]