

健脾养正方通过抑制PKM2调控的有氧糖酵解对大肠癌 HCT116细胞凋亡和EMT的影响

王红星, 吴坚, 袁梦云, 张星星, 陈敏, 刘沈林*
(南京中医药大学附属医院, 南京 210029)

[摘要] 目的:观察健脾养正方通过下调丙酮酸激酶同工酶M2(PKM2)蛋白表达而抑制有氧糖酵解过程,从而对大肠癌HCT116细胞的促凋亡和抑制上皮间质转化(EMT)的作用机制。方法:采用噻唑蓝(MTT)比色法检测健脾养正方对大肠癌HCT116细胞增殖的影响;通过流式细胞术检测健脾养正方(2.0,4.0,8.0 g·L⁻¹)对HCT116细胞诱导凋亡的影响;通过细胞划痕和细胞侵袭实验(Transwell)观察健脾养正方(2.0,4.0,8.0 g·L⁻¹)对HCT116细胞的迁移和侵袭能力的影响;通过乳酸(LD)测试盒和葡萄糖测定试剂盒分别检测健脾养正方(2.0,4.0,8.0 g·L⁻¹)对HCT116细胞糖酵解代谢的影响;通过蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组细胞凋亡相关蛋白B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2),Bcl-2相关X蛋白(Bax)和EMT相关蛋白上皮型钙黏蛋白(E-cadherin),神经型钙黏蛋白(N-cadherin),波形蛋白(Vimentin)及糖酵解关键蛋白PKM2的表达;结果:MTT比色法显示,与空白组比较,健脾养正方作用HCT116细胞48 h,随着药物浓度增加,健脾养正方对HCT116细胞增殖抑制效应也增加,且在质量浓度为4.0 g·L⁻¹时,HCT116细胞抑制率在53.87%左右,从而选取健脾养正方2.0,4.0,8.0 g·L⁻¹作为低、中、高剂量组进行研究;细胞流式结果显示,与空白组比较,健脾养正方低、中、高剂量组均明显诱导HCT116细胞凋亡($P<0.05$),且随给药浓度增加,诱导细胞凋亡作用更明显($P<0.05$);细胞划痕和Transwell显示,与空白组比较,健脾养正方低、中、高剂量组均具有抑制HCT116细胞迁移和侵袭作用($P<0.05$),随给药浓度增加,作用更明显($P<0.05$);乳酸和葡萄糖的测定显示,与空白组比较,随给药浓度增加,健脾养正方低、中、高剂量组细胞产生的乳酸量逐渐减少($P<0.05$),葡萄糖利用量亦逐渐降低($P<0.05$);Western blot显示,与空白组比较,健脾养正方低、中、高剂量组E-cadherin, Bax蛋白表达量上调($P<0.05$),N-cadherin, Vimentin, Bcl-2及PKM2蛋白表达量下调($P<0.05$)。结论:健脾养正方可有效诱导大肠癌HCT116细胞凋亡及抑制EMT,其机制可能与其通过下调PKM2蛋白表达而抑制HCT116细胞的有氧糖酵解途径有关。

[关键词] 健脾养正方; HCT116细胞; 凋亡; 上皮间质转化(EMT); 丙酮酸激酶同工酶M2(PKM2); 有氧糖酵解

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)16-0093-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201622

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200619.1356.004.html>

[网络出版日期] 2020-6-19 14:11

Effect of Jianpi Yangzheng Recipe on Apoptosis and EMT of HCT116 Cells in Colorectal Cancer by Inhibiting Aerobic Glycolysis Regulated by PKM2

WANG Hong-xing, WU Jian, YUAN Meng-yun, ZHANG Xing-xing, CHEN Min, LIU Shen-lin*
(Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of Jianpi Yangzheng recipe in inhibiting aerobic glycolysis by down-regulating the expression of pyruvate kinase isoenzyme M2 (PKM2) protein, in order to promote apoptosis and inhibit epithelial-mesenchymal transition (EMT) in HCT116 cells of colorectal cancer.

[收稿日期] 20200608(019)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81973782);国家自然科学基金青年科学基金项目(81704031);第三届国医大师传承工作室及全国名中医传承工作室建设项目(国中医药办人教函[2018]119号);江苏省研究生科研创新计划项目(KYCX19_1205, KY-CX19_1214)

[第一作者] 王红星,在读硕士,从事消化道肿瘤研究,E-mail:15851897789@163.com

[通信作者] *刘沈林,硕士,主任中医师,教授,从事消化道肿瘤研究,E-mail:ls11949@126.com

Method: The effect of different concentrations of Jianpi Yangzheng recipe on HCT116 cell proliferation was detected by methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) colorimetry. Flow cytometry was used to detect the effect of different concentrations of Jianpi Yangzheng recipe (2.0, 4.0, 8.0 g·L⁻¹) on HCT116 cell apoptosis. The effect of Jianpi Yangzheng recipe (2.0, 4.0, 8.0 g·L⁻¹) on the migration and invasion ability of HCT116 cells was observed by cell scratch and cell invasion assay (Transwell). The effect of different concentrations of Jianpi Yangzheng recipe (2.0, 4.0, 8.0 g·L⁻¹) on glycolysis metabolism of HCT116 cells were detected by lactic acid (LD) test kit and glucose assay kit, respectively. Western blot was used to detect the expressions of apoptosis-related proteins, like B lymphocyte tumor-2 gene (Bcl-2), Bcl-2 related X protein (Bax) and EMT-related proteins, like epithelial cadherin (E-cadherin), neurogenic cadherin (N-cadherin), Vimentin, and PKM2, the key protein of glycolysis, in each group. **Result:** MTT assay showed that, compared with the blank group, HCT116 cells were treated with Jianpi Yangzheng recipe for 48 h. With the increase of drug concentration, the inhibitory effect of Jianpi Yangzheng recipe on the proliferation of HCT116 cells was also increased; and when the concentration was 4.0 g·L⁻¹, the inhibition rate of HCT116 cells was about 53.87%. Therefore, 2.0, 4.0, 8.0 g·L⁻¹ were selected as low, medium and high-dose groups for the study. The cell flow cytometry results indicated that, compared with the blank group, the low, medium and high-dose groups all significantly induced the apoptosis of HCT116 cells ($P < 0.05$), and the effect in inducing apoptosis was more obvious with the increase of drug concentration ($P < 0.05$). Cell scratch and Transwell showed that, compared with the blank group, all the groups had an inhibitory effect on migration and invasion of HCT116 cells ($P < 0.05$), and the effect was more significant with the increase of drug concentration ($P < 0.05$). The determination of lactic acid and glucose indicated that compared with the blank group, with the increase of drug concentration, the amount of lactic acid produced by cells in each group gradually decreased ($P < 0.05$), while the glucose dosage also gradually decreased ($P < 0.05$). Western blot showed that, compared with the blank group, the protein expressions of E-cadherin and Bax were up-regulated in groups with different concentrations, whereas the protein expressions of N-cadherin, Vimentin, Bcl-2 and PKM2 were down-regulated ($P < 0.05$). **Conclusion:** Jianpi Yangzheng recipe can effectively induce the apoptosis of HCT116 cells and inhibit EMT in colorectal cancer. The possible mechanism may be related to the inhibition of aerobic glycolysis pathway of HCT116 cells by down-regulating PKM2 protein expression.

[Key words] Jianpi Yangzheng recipe; HCT116 cells; apoptosis; epithelial-mesenchymal transition (EMT); pyruvate kinase isoenzyme M2 (PKM2); aerobic glycolysis

结直肠癌(CRC)是全球最常见的恶性肿瘤之一,每年有60万人死于结直肠癌,目前手术、放疗和新化疗的标准治疗方法显著降低了死亡率,但在短时间内仍频繁发生复发和耐药。到2030年,全球CRC的负担预计将增加60%,达到220多万新病例,110万人左右死亡^[1-2]。正常细胞在氧气存在下通过线粒体氧化分解葡萄糖产生ATP,而大多数癌细胞通过有氧糖酵解代谢葡萄糖产生ATP和乳酸,这一现象被称为Warburg效应^[3]。大量研究表明,丙酮酸激酶同工酶M2(PKM2)是调节Warburg效应糖酵解的关键酶,其在肿瘤细胞中过度表达,促进肿瘤细胞糖酵解,是肿瘤细胞增殖、代谢、侵袭和转移所必需的^[4-5]。鉴于PKM2在肿瘤细胞中的重要作用,PKM2可能是一个治疗肿瘤的潜在靶点,多项研究

发现PKM2是与癌症的不良预后相关。因此,靶向抑制PKM2可能是癌症治疗的新希望^[6]。全国名中医刘沈林教授结合数十年临床经验,认为“脾虚失运,癌毒内陷”是大肠癌的主要病机,同时,刘沈林教授亦认为,正气不足是大肠癌的病机关键,并贯穿于大肠癌患者病程始终。“得胃气则生,失胃气则死;纳谷者昌,失谷者亡”,故调理脾胃,恢复胃肠功能,增强患者体质,是治疗的重点。刘沈林教授运用“益气健脾,化痰解毒”法治疗大肠癌患者,病证结合,在益气健脾,重用“黄芪、党参”以健脾扶正的基础上,加用“三棱、莪术”化痰解毒,治疗大肠癌患者,收效良好,并经多年探索,从而创立健脾养正方,该方由炙黄芪60g,炒党参30g,三棱30g,莪术30g组成。课题组前期通过在体实验证实了健脾养

正方具有抑制MFC荷瘤615小鼠皮下移植瘤的生长,改善化疗后机体的免疫状态,并具有抑制肿瘤的EMT作用^[7-8]。本实验在此基础上,通过体外实验研究健脾养正方对大肠癌HCT116细胞的增殖抑制及对上皮间质转化(EMT)的抑制作用,并通过有氧糖酵解途径探讨其可能作用机制。

1 材料

1.1 细胞 大肠癌HCT116细胞为南京中医药大学附属医院中心实验室常规培养。

1.2 药品 健脾养正方购自南京中医药大学附属医院中药房,由炙黄芪、炒党参、三棱、莪术组方而成,并经南京中医药大学附属医院曹园药师鉴定,黄芪为豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* 的干燥根,党参为桔梗科植物党参 *Codonopsis pilosula* 的干燥根,三棱为黑三棱科植物黑三棱 *Sparganium stoloniferum* 的干燥块茎,莪术为姜科植物广西莪术 *Curcuma kwangsiensis* 的干燥根茎,均符合2015年版《中国药典》的标准。

1.3 试剂 噻唑蓝(MTT,美国Sigma公司,批号L2880);细胞凋亡试剂盒(凯基生物公司,KGA105-KGA108);乳酸(LD)测试盒(南京建成生物工程研究所,批号20190517);葡萄糖测定试剂盒(上海荣盛生物药业有限公司,批号20181209137); β -肌动蛋白(β -actin),上皮型钙黏蛋白(E-cadherin),神经型钙黏蛋白(N-cadherin),B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2),Bcl-2相关X蛋白(Bax),波形蛋白(Vimentin)及丙酮酸激酶同工酶M2(PKM2)抗体(美国Cell Signaling公司,批号分别为9665S,3195S,13116S,2870S,5023S,5741S,4053S);二抗(北京中杉金桥公司,批号134658)。

1.4 仪器 HERAcell 1501型CO₂培养箱,1300A2型生物安全柜(美国Thermo公司);IX51型倒置显微镜(日本Olympus公司);ELx800型全自动酶标仪(美国Bio TeK公司);DS-11型紫外光度仪(美国DeNovIX公司);C6流式细胞仪(美国BD公司);PowerPac™ Basic型电泳仪及转膜仪(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 健脾养正方提取 健脾养正方由炙黄芪60g,炒党参30g,三棱30g,莪术30g组成,共150g,用双蒸水1500mL浸泡30min,武火煮沸,继以文火煎煮30min,滤网分离药液,二煎取药渣加双蒸水1200mL,煎法同前,2次药液混合浓缩至生药质量浓度为1.0g·mL⁻¹,用0.22 μ m微孔滤器过滤除菌,

4℃冰箱保存备用。实验时,用含血清的DMEM培养液按所需浓度进行稀释。

2.2 细胞培养 HCT116细胞株培养于含有10%胎牛血清的DMEM培养基中,以37℃5%CO₂进行细胞培养,细胞贴壁生长,每24~48h换液,细胞长至70%~80%传代,取对数期的第4~6代细胞进行实验。

2.3 MTT比色法检测HCT116细胞增殖能力 设健脾养正方质量浓度分别为0.5,1.0,2.0,4.0,8.0,16.0g·L⁻¹。取对数生长期的HCT116细胞株,以5×10⁴个/mL的密度接种于96孔板中,培养箱中孵育24h。次日,弃上清,分别加入0.5,1.0,2.0,4.0,8.0,16.0g·L⁻¹健脾养正方200 μ L/孔,空白组加入等体积的完全培养液,每组设6个复孔。继续培养48h,弃上清,每孔分别加入5g·L⁻¹MTT溶液20 μ L及完全培养液100 μ L,培养箱继续培养4h后弃上清,每孔加入二甲基亚砷(DMSO)150 μ L,避光低速震荡10min,待底部结晶充分溶解后于酶标仪570nm处测定并记录吸光度A,重复3次。按细胞抑制率=(1-A_{给药孔}/A_{空白孔})×100%,计算细胞抑制率。

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡 取对数生长期的HCT116细胞,调整细胞密度为1.0×10⁸个/L,接种于6孔板中,24h后弃旧培养基,给药组分别加入2.0,4.0,8.0g·L⁻¹的健脾养正方水提液2mL,空白组加入等体积完全培养液,作用48h,消化收集细胞于流式管中,用PBS2mL洗2次,设置溶剂组(调零用),空白组,健脾养正方低、中、高剂量(2.0,4.0,8.0g·L⁻¹)组,每组加入binding buffer500 μ L,溶剂组不染色,其余各组加入AnnexinV5 μ L避光室温孵育15min,再加入FITC/PI5 μ L,避光室温孵育5min,上流式机检测细胞凋亡情况。

2.5 细胞划痕实验检测细胞迁移能力 取对数生长期的HCT116细胞,调整细胞密度为1.0×10⁸个/L,接种于6孔板中,培养24h,待细胞融合80%~90%时,用枪头划3条竖线,弃除旧培养基,PBS清洗2次,用无血清DMEM稀释中药至质量浓度为2.0,4.0,8.0g·L⁻¹,分别加入各孔中,每孔2mL,并设置空白组,在光学显微镜下观察各组细胞划痕初始形态,拍照并计为0h,放入培养箱继续培养至24,48h后取出,在光学显微镜下拍摄各组细胞划痕状态,用ImageJ计算划痕面积(以10mm为标尺),并计算细胞24,48h迁移率,迁移率=(划痕面积0h-划痕面积24h或48h)/划痕面积0h。

2.6 Transwell实验检测细胞侵袭能力 将溶解的

matrigel胶,按matrigel-PBS 1:29稀释,在Transwell 8.0 μm 小室表面铺上稀释的matrigel胶100 μL ,放在培养箱中孵育1 h,使形成一层基质屏障膜,并将上层析出液小心吸去;将处于对数生长期的HCT116细胞制成单细胞悬液,计数,接种于Transwell小室里,每孔细胞数约为 2×10^4 个,用无血清培养基进行培养;将Transwell小室放于24孔板内,在Transwell下室中加入含10% FBS的DMEM培养基,组别设置及加药同2.5项;培养箱中培养48 h;取出Transwell小室,放于95%乙醇中固定20 min,PBS漂洗2次,用结晶紫染色15 min;PBS冲洗,Transwell上室中未迁移的细胞用棉签轻轻擦去;在倒置显微镜下观察,对膜底细胞进行拍照、计数、统计学分析。

2.7 乳酸测定检测细胞产生乳酸情况 取对数生长期的HCT116细胞,调整细胞密度为 1.0×10^8 个/L,接种于6孔板中,组别设置及加药培养同2.6项,根据乳酸(LD)测试盒说明书,设置空白管,对照管,测定管。空白管加入双蒸水0.02 mL,对照管加入的3 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对照品0.02 mL,测定管加入待测样本(收集的各组细胞培养液)0.02 mL。每管均加入酶工作液1 mL以及显色剂0.2 mL,混匀后,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴准确反应10 min,每管加入终止液2 mL混匀,以530 nm,1.0 cm光径,双蒸水调零测各管A,并进行统计。

2.8 葡萄糖氧化酶法测定各组培养液中葡萄糖的浓度 取对数生长期的HCT116细胞,调整细胞密度为 1.0×10^8 个/L,接种于6孔板中,组别设置及加药培养同2.6项,按照葡萄糖测定试剂盒说明书,设置空白管,校准管,质控管及样本管。空白管加入双蒸水10 μL ,校准管加入校准液10 μL ,质控管加入质控液10 μL ,样本管加入待测样本(收集的各组细胞培养液)10 μL 。每管均加入葡萄糖试剂1 mL混匀,置37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴准确反应10 min,以波长505 nm,比色杯光径1.0 cm,用空白管调“零”点测定各管A。葡萄糖($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)=(A样本管/A校准管)×校准管浓度,其中,校准品理论浓度为5.55 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.9 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测EMT相关蛋白及PKM2蛋白表达 取对数生长期的HCT116细胞,调整细胞密度为 1.0×10^8 个/L,接种于6孔板中,组别设置及加药培养同2.6项,培养48 h,弃旧培养基,PBS清洗,每皿加RIPA裂解液150 μL ,充分混匀裂解,吸取总蛋白匀浆,超声裂解后,以4 $^{\circ}\text{C}$,12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心20 min,收集上清,

BCA法测定总蛋白浓度,计算上样量。将提取的蛋白样品与5×的SDS蛋白上样缓冲液按4:1体积比混匀,99 $^{\circ}\text{C}$ 煮蛋白10 min,按计算的上样量加至适当浓度SDS-PAGE胶中进行电泳分离。电泳完毕后根据蛋白分子量切胶转膜,转膜完成后,5%奶粉封闭1 h,分别加入相应一抗(E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, Bax, Bcl-2, PKM2, β -actin, 1:1 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST洗膜3次,每次10 min,加入相应种属来源的二抗(1:6 000),室温孵育1 h。TBST洗3次,每次10 min,ECL液显影曝光检测蛋白表达情况。

2.10 统计学方法 Western blot和划痕实验采用Image J软件分析,数据采用SPSS 21.0软件分析;数据显示为 $\bar{x} \pm s$,满足正态分布和方差齐性的多组之间均数比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD法;方差不齐者采用Dunnett's T3检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 健脾养正方对HCT116细胞增殖的影响 与空白组比较,不同质量浓度健脾养正方作用HCT116细胞48 h,随给药浓度增加,健脾养正方对HCT116细胞增殖抑制效应也增加,呈一定的浓度依耐性,且在浓度为4.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,HCT116细胞抑制率在53.87%左右($P < 0.05$)。本研究选2.0, 4.0, 8.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为低、中、高剂量组进行后续实验。见表1。

表1 健脾养正方对HCT116细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 1 Effect of Jianpi Yangzheng recipe on proliferation of HCT116 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	A	48 h抑制率 /%
空白	-	1.864±0.017	-
健脾养正方	0.5	1.361±0.018	26.97±0.94
	1.0	1.114±0.009	40.21±0.49
	2.0	0.990±0.009	46.86±0.48
	4.0	0.859±0.005 ¹⁾	53.87±0.27 ¹⁾
	8.0	0.774±0.003 ¹⁾	58.47±0.18 ¹⁾
	16.0	0.687±0.005 ¹⁾	63.14±0.26 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 健脾养正方对HCT116细胞凋亡的影响 与空白组比较,健脾养正方组随给药浓度的增加,HCT116细胞凋亡率明显升高($P < 0.05$),健脾养正方高剂量组细胞凋亡率较健脾养正方中剂量组升高($P < 0.05$)。见表2。

表 2 健脾养正方对 HCT116 细胞凋亡的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of Jianpi Yangzheng recipe on apoptosis of HCT116 cells($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	48 h 凋亡率/%
空白	-	1.83±0.06
健脾养正方	2.0	2.83±0.12 ¹⁾
	4.0	2.97±0.21 ¹⁾
	8.0	9.73±0.12 ^{1,2)}

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$;与健脾养正方中剂量组比较²⁾ $P<0.05$ 。

3.3 对大肠癌 HCT116 细胞迁移能力的影响 与空白组比较,健脾养正方各组的 HCT116 细胞迁移能力明显降低($P<0.05$),且随给药浓度增加,其抑制 HCT116 细胞迁移能力增强。健脾养正方中剂量组细胞迁移率较健脾养正方低剂量组明显降低($P<0.05$)。见图 1,表 3。

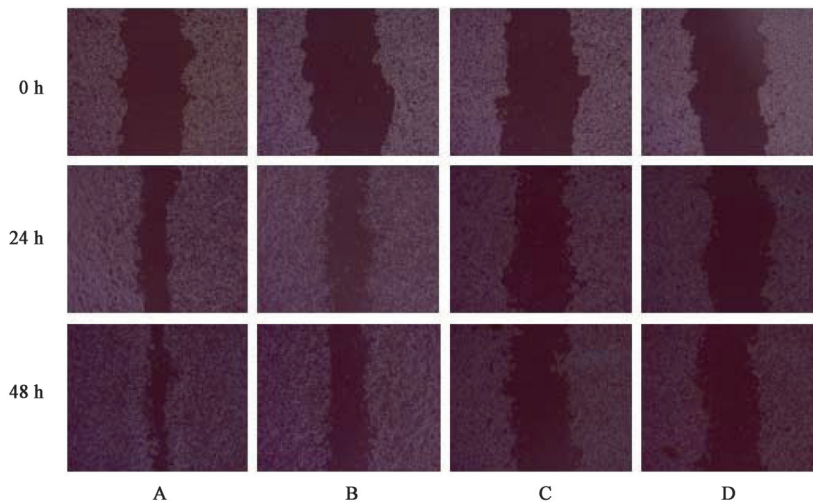
3.4 健脾养正方对大肠癌 HCT116 细胞侵袭能力的影响 与空白组比较,健脾养正方各组的 HCT116 细胞侵袭能力明显降低($P<0.05$),且随给

药浓度增加,健脾养正方抑制 HCT116 细胞侵袭能力增强,各组间存在统计学差异($P<0.05$)。见图 2,表 4。

3.5 健脾养正方对 HCT116 细胞产生乳酸的影响 与空白组比较,健脾养正方各组 HCT116 细胞产生的乳酸量明显减少($P<0.05$),随给药浓度增加,乳酸产生量逐渐降低,且各给药组之间具有统计学差异($P<0.05$)。见表 5。

3.6 健脾养正方对 HCT116 细胞利用葡萄糖的影响 与空白组比较,健脾养正方各组 HCT116 细胞利用葡萄糖量明显减少($P<0.05$),并随健脾养正方给药浓度增加,利用葡萄糖量逐渐降低($P<0.05$)。见表 6。

3.7 健脾养正方对 HCT116 细胞凋亡与 EMT 相关蛋白及 PKM2 蛋白表达的影响 与空白组比较,健脾养正方各组 HCT116 细胞 E-cadherin, Bax 蛋白表达量上调($P<0.05$),各组间有统计学差异($P<0.05$);健脾养正方各组 N-cadherin, Vimentin, Bcl-2 及 PKM2 蛋白表达下调($P<0.05$)。见图 3,表 7。



A. 空白组;B,C,D 分别为健脾养正方低、中、高剂量组(图 2,3 同)

图 1 健脾养正方对 HCT116 细胞迁移能力的影响(光学显微镜,×100)

Fig. 1 Effect of Jianpi Yangzheng recipe on migration ability of HCT116 cells(optical microscope,×100)

表 3 健脾养正方对 HCT116 细胞迁移能力的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Jianpi Yangzheng recipe on migration of HCT116 cells($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	0 h 划痕面积 /mm ²	24 h 划痕面积 /mm ²	48 h 划痕面积 /mm ²	24 h 迁移率 /%	48 h 迁移率 /%
空白	-	2 410.88±59.97	1 033.61±87.23	706.56±112.77	57.12±0.023 1	70.69±0.015 3
健脾养正方	2.0	2 570.24±59.58	1 528.96±191.36	1 347.21±140.54	40.51±0.036 3 ¹⁾	47.58±0.032 2 ¹⁾
	4.0	2 622.08±33.54	1 969.28±281.41	1 809.28±93.95	24.89±0.025 4 ^{1,2)}	30.98±0.013 2 ^{1,2)}
	8.0	2 513.92±63.87	2 234.88±140.67	2 030.72±171.64	11.36±0.027 6 ¹⁾	18.19±0.011 6 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$;与健脾养正方低剂量组比较²⁾ $P<0.05$ 。

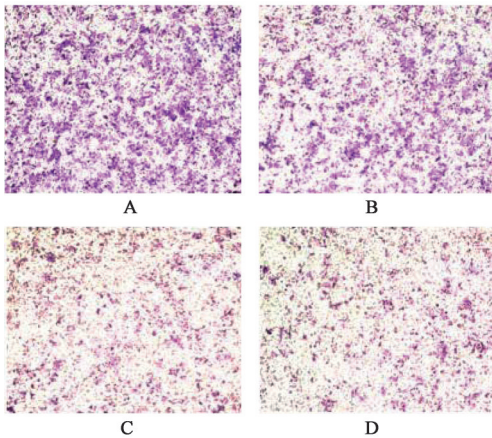


图2 健脾养正方对HCT116细胞侵袭能力的影响(倒置显微镜, ×100)

Fig. 2 Effect of Jianpi Yangzheng recipe on invasion ability of HCT116 cells(inverted microscope, ×100)

表4 健脾养正方对HCT116细胞侵袭能力的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Jianpi Yangzheng recipe on invasion ability of HCT116 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	视野细胞数/个
空白	-	314.70±2.51
健脾养正方	2.0	154.30±1.57 ¹⁾
	4.0	65.33±2.08 ^{1,2)}
	8.0	53.67±1.53 ^{1,2,3)}

注:与空白组比较¹⁾P<0.05;与健脾养正方低剂量组比较²⁾P<0.05;与健脾养正方中剂量组比较³⁾P<0.05(表5~7同)。

表5 健脾养正方对HCT116细胞产生乳酸的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Jianpi Yangzheng recipe on lactic acid production in HCT116 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	乳酸浓度/mmol·L ⁻¹
空白	-	1.396±0.008
健脾养正方	2.0	1.219±0.006 ¹⁾
	4.0	1.178±0.007 ^{1,2)}
	8.0	1.059±0.014 ^{1,2,3)}

表6 健脾养正方对HCT116细胞利用葡萄糖的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of Jianpi Yangzheng recipe on glucose utilization of HCT116 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	A	葡萄糖浓度/mmol·L ⁻¹	葡萄糖利用量/mmol·L ⁻¹
空白	-	0.245±0.001	2.615±0.011	8.887±0.012
健脾养正方	2.0	0.279±0.002	2.978±0.021 ^{1,2)}	8.531±0.020 ^{1,2)}
	4.0	0.335±0.001	3.575±0.011 ^{1,2)}	7.926±0.016 ^{1,2)}
	8.0	0.499±0.013	5.329±0.133 ^{1,2)}	6.174±0.144 ^{1,2,3)}

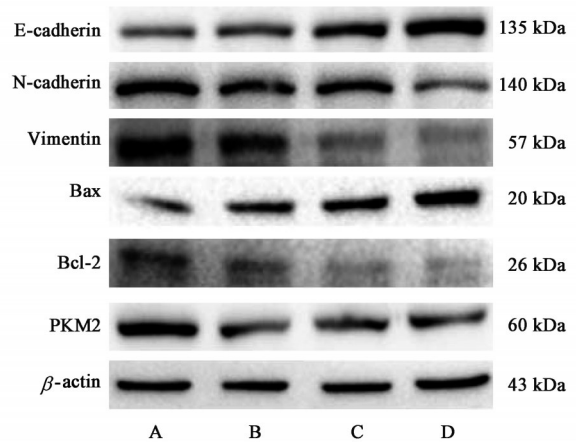


图3 HCT116细胞E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, Bax, Bcl-2及PKM2蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of expression of E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, Bax, Bcl-2 and PKM2 in HCT116 cells

4 讨论

中医学中无“大肠癌”这一名称,从其发病及临床特点来看,属中医学的“肠覃”“肠积”“肠毒”“积聚”“癥瘕”等病的范畴。《黄帝内经·灵枢·水胀》曰:“肠覃……寒气客于肠外,与卫气相搏,气不得荣,因有所系,癖而内著,恶气乃起,息肉乃生。”大肠癌患者正气亏虚贯穿于病程始终,尤其晚期病患,脾气虚衰,癌毒内结,刘沈林教授在整体观念的辨证与现代医学的辨病相结合基础上,予以益气健脾,化痰解毒施治,并于临床多年探索,自创健脾养正方,该方重用炙黄芪(60g)、炒党参(30g)以健脾扶正,在益气健脾扶正基础上,加用化痰消积之三棱、莪术,正如《本草备要》中所云:“宜于破血行气药中加补脾胃药,气旺方能磨积,正旺邪自消也。”三棱、莪术在治疗积聚方面,历来备受推崇,被称为“消癥瘕之专药”。并借其流通之力,行补药之滞。该方味少量大,一方面防病重药轻,二方面发挥药专效宏的作用。前期临床大量病例也证实,健脾养正方加减治疗胃癌患者,延长患者生存期,提高患者生活质量,减轻化疗后骨髓抑制、血细胞降低效果显著^[9]。

复发和转移是肿瘤的生物学特征,而上皮-间质转化(EMT)是肿瘤转移的重要组成部分,可促使肿瘤细胞迁移、侵袭和转移^[10]。EMT是上皮细胞失去上皮特征,获得间充质表型,肿瘤细胞极性和黏附性丧失,运动能力增强,并凋亡逃避,从而使细胞从原发肿瘤分离并迁移到其他组织的过程。EMT的特征是上皮细胞黏附分子E-cadherin的丢失,同时伴有间充质相关蛋白如N-cadherin, Vimentin的表

表7 健脾养正方对HCT116细胞凋亡与EMT相关蛋白及PKM2表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Effect of Jianpi Yangzheng recipe on apoptosis and expression of EMT-related proteins and PKM2 in HCT116 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	E-cadherin /β-actin	N-cadherin /β-actin	Vimentin /β-actin	Bax /β-actin	Bcl-2 /β-actin	PKM2 /β-actin
空白	-	0.527±0.016	1.121±0.101	2.290±0.251	0.273±0.014	1.390±0.021	0.885±0.014
健脾养正方	2.0	0.642±0.010 ¹⁾	0.974±0.021	1.803±0.152 ¹⁾	0.468±0.025 ¹⁾	1.137±0.044 ¹⁾	0.550±0.024 ¹⁾
	4.0	1.050±0.025 ^{1,2)}	0.887±0.049 ^{1,2)}	1.217±0.152 ^{1,2)}	0.555±0.035 ^{1,2)}	0.756±0.045 ^{1,2)}	0.521±0.019 ¹⁾
	8.0	1.140±0.022 ^{1,2,3)}	0.569±0.077 ^{1,2,3)}	1.029±0.101 ¹⁾	0.721±0.030 ^{1,2,3)}	0.546±0.046 ^{1,2,3)}	0.517±0.021 ¹⁾

达增加,且膜E-cadherin的表达下调被认为EMT的一个标志^[11-12]。而凋亡是一种程序性细胞死亡,是一种重要的稳态机制,有助于平衡细胞死亡和细胞分裂,使细胞数量保持在一个适当的水平,大量研究表明,肿瘤的发生是细胞增殖和凋亡之间无法保持适当的平衡。抗癌药物的主要特点是抑制肿瘤细胞增殖,促进肿瘤细胞凋亡。Bcl-2家族蛋白控制线粒体膜通透性,调节凋亡线粒体膜通透性,可进一步分为两类,一种具有抗凋亡作用,如Bcl-2,另一种具有促凋亡作用,如Bax,这些蛋白具有特殊的意义,因为二者可以决定细胞是否进入凋亡^[13-14]。

根据1920年代,Warburg首次提出的“Warburg effect”,在正常氧条件下,正常细胞主要通过线粒体氧化磷酸化与线粒体呼吸的电子传递链偶联产生ATP,比较之下,许多癌细胞主要通过糖酵解产生ATP,即使在氧气充足的情况下,癌细胞也依赖糖酵解产生ATP供给能量,促进自身增殖^[15-16],其中包括结直肠癌^[17]。越来越多的证据表明,异常的肿瘤代谢可以通过多种病理途径诱导EMT,而糖酵解表型增强的代谢重组在肿瘤侵袭性中起着关键作用,并且,肿瘤细胞周围形成酸性微环境,破坏细胞外基质,促进肿瘤生长、侵袭、转移和免疫逃避^[18-20]。另外,PKM2是催化糖酵解最后一步的关键限速酶,在肿瘤糖代谢中起着重要作用,且PKM2过表达伴随着各种类型癌的侵袭性临床病例特征和不良预后^[18,21]。

本研究中,细胞流式检测结果证实,健脾养正方明显诱导大肠癌HCT116细胞凋亡,且随浓度增加,诱导凋亡作用增强;细胞划痕实验和细胞侵袭实验证实健脾养正方具有明显的抑制HCT116细胞迁移和侵袭作用;乳酸检测和葡萄糖测定中发现,健脾养正方组较空白组HCT116细胞产生乳酸明显减少,且利用葡萄糖明显降低。Western blot结果显示,健脾养正方能调节EMT相关蛋白E-cadherin表达量升高,而N-cadherin, Vimentin的表

达量降低;且该中药可明显调节促凋亡蛋白Bax的表达量增加,而调节抑凋亡蛋白Bcl-2表达量减少。另外,健脾养正方明显下调有氧糖酵解关键蛋白PKM2的表达。

综上所述,健脾养正方具有明显诱导大肠癌HCT116细胞凋亡和抑制HCT116细胞迁移和侵袭的作用,其机制可能与该方使有氧糖酵解关键酶PKM2表达下调,从而抑制HCT116细胞有氧糖酵解途径有关。具体的信号通路以及更深入的机制将是今后的研究重点。

[参考文献]

- [1] TAN Y Z, PENG C, HU C J, et al. Iridoids from *Valeriana jatamansi* induce autophagy-associated cell death via the PDK1/Akt/ mTOR pathway in HCT116 human colorectal carcinoma cells[J]. *Bioorg Chem*, 2019, 87(6): 136-141.
- [2] ARNOLD M, SIERRA M S, LAVERSANNE M, et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality [J]. *Gut*, 2017, 66 (4) : 683-691.
- [3] LI T, HAN J B, JIA L J, et al. PKM2 coordinates glycolysis with mitochondrial fusion and oxidative phosphorylation [J]. *Protein Cell*, 2019, 10 (8) : 583-594.
- [4] ATSUSHI M, SHIN H, NAOKI Y, et al. Pyruvate kinase isozyme M2 plays a critical role in the interactions between pancreatic stellate cells and cancer cells [J]. *Dig Dis Sci*, 2018, 63 (7) : 1868-1877.
- [5] FUKUDA S, MIYATA H, MIYAZAKI Y, et al. Pyruvate kinase M2 modulates esophageal squamous cell carcinoma chemotherapy response by regulating the pentose phosphate pathway [J]. *Ann Surg Oncol*, 2015, 22(3): 1461-1468.
- [6] LI Y H, LI X F, LIU J T, et al. PKM2, a potential target for regulating cancer [J]. *Gene*, 2018, 668(8):

- 48-53.
- [7] 王敏,刘沈林,吴坚,等. 益气健脾化痰方联合5-FU对MFC荷瘤小鼠皮下移植瘤的生长及免疫功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(6):65-72.
- [8] 吴坚,袁梦云,张星星,等. 益气健脾化痰方与5-FU协同抑制胃癌转移的机制研究[J]. 南京中医药大学学报,2019,35(5):528-534.
- [9] 邹玺,陈玉超,胡守友,等. 健脾养正消癥方对胃癌患者晚期生存期和生活质量的影响[J]. 南京中医药大学学报,2015,31(3):201-205.
- [10] YOU J, LI M, CAO L M, et al. Snail1-dependent cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells via exosomes[J]. QJM,2019,112(8):581-590.
- [11] MIN L, CHENG W, ERGANG G, et al. FOXO3a knockdown promotes radioresistance in nasopharyngeal carcinoma by inducing epithelial-mesenchymal transition and the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Cancer Lett, 2019, 455(7):26-35.
- [12] ROSEWEIR A K, KONG C Y, PARK J H, et al. A novel tumor-based epithelial-to-mesenchymal transition score that associates with prognosis and metastasis in patients with Stage II/III colorectal cancer[J]. Int J Cancer,2019,144(1):150-159.
- [13] ZHOU H P, SUN Y, ZHENG H N, et al. Paris saponin VII extracted from trillium tschonoskii suppresses proliferation and induces apoptosis of human colorectal cancer cells[J]. J Ethnopharmacol, 2019,239(7):1-8.
- [14] PENG W J, ZHANG S F, ZHANG Z Y, et al. Jianpi Jiedu decoction, a traditional Chinese medicine formula, inhibits tumorigenesis, metastasis, and angiogenesis through the mTOR/HIF-1 α /VEGF pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2018, 224(10):140-148.
- [15] LI H, XU H Y, XING R, et al. Pyruvate kinase M2 contributes to cell growth in gastric cancer via aerobic glycolysis [J]. Pathol Res Pract, 2019, 215(6):152-158.
- [16] SHIMADA N, TAKASAWA R, TANUMA S I, et al. Interdependence of GLO I and PKM2 in the Metabolic shift to escape apoptosis in GLO I-dependent cancer cells[J]. Arch Biochem Biophys, 2018,638(1):1-7.
- [17] ZHANG H L, CHENG F, ZHANG M Z, et al. miR-625-5p/PKM2 negatively regulates melanoma glycolysis state[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(3):2964-2972.
- [18] HUANG R, ZONG X Y. Aberrant cancer metabolism in epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis: mechanisms in cancer progression [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2017,115(7):13-22.
- [19] KANG H, KIM H, LEE S M, et al. Role of metabolic reprogramming in epithelial-mesenchymal transition (EMT) [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(8):20-42.
- [20] YU J, LI J, CHEN Y, et al. Snail Enhances Glycolysis in the epithelial-mesenchymal transition process by targeting FBP1 in gastric cancer [J]. Cell Physiol Biochem, 2017,43(1):31-38.
- [21] MA R, LIU Q, ZHENG S, et al. PKM2-regulated STAT3 promotes esophageal squamous cell carcinoma progression via TGF- β_1 -induced EMT [J]. J Cell Biochem, 2019,120(7):11539-11550.

[责任编辑 张丰丰]