

寒热不同宿体大肠癌模型建立及差异分析

李慧璇¹, 覃景春¹, 吕智豪², 梁裕琪¹, 文彬^{1*}

(1. 广州中医药大学 科学创新中心, 脾胃研究所, 广州 510405;

2. 广州中医药大学 第一临床医学院, 广州 510000)

[摘要] 目的:探求机体在寒、热不同内环境压力下大肠癌发生的相关性。方法:将70只(雌雄各半)Wistar大鼠随机分为正常组10只,寒模组30只,热模组30只。寒模组予冰水(0℃)灌胃和冷水(10℃)泡浴制作寒证模型,热模组予乙醇(30%)和辣椒素(0.9 g·L⁻¹)溶液制作热证模型,正常组给予生理盐水灌胃,10 mL·kg⁻¹·d⁻¹,持续5周。寒模组、热模组于第6周制作大肠癌模型,均予DMH溶液颈后皮下注射,25 mg·kg⁻¹,每周1次,连续12次。造癌期间热模组仅予30%乙醇溶液,寒模组维持造模,10 mL·kg⁻¹·d⁻¹,持续38周。观察各组大鼠一般状态,测定摄食量、体质量变化情况。于第27,29,32,35,38周分批取材,将肠组织进行苏木精-伊红(HE)染色,钠、钾-三磷酸腺苷酶(Na⁺K⁺-ATP),钙、镁-三磷酸腺苷酶(Ca²⁺Mg²⁺-ATP)活性、乳酸脱氢酶(LDH)活性以及琥珀酸脱氢酶(SDH)活性检测。结果:寒模组大鼠出现便血、腹水等症状明显早于热模组。与正常组比较,寒模组、热模组摄食量、体质量降低。与正常组比较,寒模组第32,35周大肠长度较短($P<0.05$),热模组第27,29,38周Na⁺K⁺-ATP, Ca²⁺Mg²⁺-ATP活性显著升高($P<0.05$, $P<0.01$);寒模组第29,35周SDH酶活性降低($P<0.05$, $P<0.01$);热模组第38周SDH酶活性显著升高($P<0.01$);寒模组第27周LDH酶活性显著降低($P<0.01$);热模组第29,32周LDH活性显著升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与热模组比较,寒模组大肠质地表现出较大的脆性,纤维化加重,促纤维增生性特征表现明显;肿瘤发生率较高,肿瘤分化程度严重;寒模组第27,29,38周Na⁺K⁺-ATP, Ca²⁺Mg²⁺-ATP酶活性显著降低($P<0.01$);第29,38周SDH酶活性显著降低($P<0.01$),第32周LDH活性降低($P<0.05$)。结论:大肠癌处于寒冷环境时,促进肿瘤发生,处于热环境时在后期亦促进肿瘤发生。

[关键词] 寒、热证候; 大肠癌模型; 三磷酸腺苷酶(ATP); 乳酸脱氢酶(LDH); 琥珀酸脱氢酶(SDH)

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)21-0109-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201964

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200723.1603.033.html>

[网络出版日期] 2020-7-23 16:52

Colorectal Cancer Modeling and Difference Analysis in Cold and Heat Conditions

LI Hui-xuan¹, QIN Jing-chun¹, LYU Zhi-hao², LIANG Yu-qi¹, WEN Bin^{1*}

(1. Science and Technology Innovation Center, Piwei Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 2. The First Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the correlation between the occurrence of colorectal cancer and different internal environment (cold and heat). **Method:** The 70 Wistar rats (male and female) were randomly divided into blank group (10 cases), cold model group (30 cases) and heat model group (30 cases). The cold syndrome model was made by intragastric infusion of cold water (0℃) and soaking in cold water (10℃). The heat model was made by ethanol (30%) and capsaicin solution (0.9 g·L⁻¹). The blank group was given normal

[收稿日期] 20191231(008)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81673944)

[第一作者] 李慧璇,在读硕士,从事寒热不同宿体大肠癌选择发生方式差异研究,E-mail:505594561@qq.com

[通信作者] *文彬,博士,教授,博士生导师,从事肿瘤微环境与结肠癌早期启动分子机制研究,Tel:020-36585077,E-mail:wenbin@gzucm.edu.cn

saline by gavage, $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, for 5 consecutive weeks. The colorectal cancer model was made by subcutaneous injection of DMH solution in the back of neck in the cold model group and heat model group at the 6th week, $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, once a week, for 12 consecutive times. During the carcinogenesis, only 30% ethanol solution was given to the heat model group, and the modeling was maintained in cold model group, $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, for 38 weeks. The general state of the rats in each group was observed, and the changes of food intake and body weight were measured. At the 27th, 29th, 32th, 35th and 38th weeks, samples were collected in batches. Intestinal tissues were subjected to hematoxylin-eosin staining (HE) and detection of sodium, potassium-adenosine triphosphate ($\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-ATP}$), calcium, magnesium-adenosine triphosphate ($\text{Ca}^{2+} \text{Mg}^{2+} \text{-ATP}$) activity, lactate dehydrogenase (LDH) activity and succinate dehydrogenase (SDH) activity. **Result:** The symptoms of hematochezia and ascites in cold model group were earlier than those in heat model group. As compared with the blank group, the food intake and body weight were decreased in cold model group and heat model group. As compared with the blank group, the length of the large intestine was shorter in cold model group at the 32nd and 35th week ($P < 0.05$), the activities of $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-ATP}$, $\text{Ca}^{2+} \text{Mg}^{2+} \text{-ATP}$ increased significantly in heat model group at the 27th, 29th and 38th week ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the SDH enzyme activity was decreased in the cold model group at the 29th and 35th week ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the SDH enzyme activity was significantly increased in the heat model group at the 38th week ($P < 0.01$). At the 27th week, LDH enzyme activity was significantly reduced in cold model group ($P < 0.01$). The LDH activity was increased significantly in heat model group at 29th and 32nd week ($P < 0.05$, $P < 0.01$). As compared with the heat model group, the large intestine texture of the cold model rats showed greater brittleness, aggravated fibrosis, more obvious fibroproliferative characteristics, higher tumor incidence, and more serious tumor differentiation. The $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-ATP}$, $\text{Ca}^{2+} \text{Mg}^{2+} \text{-ATP}$ enzyme activities of the cold model rats were significantly reduced at 27th, 29th, and 38th weeks ($P < 0.01$), the SDH enzyme activity was significantly reduced in the cold model rats at 29th and 38th weeks ($P < 0.01$), the LDH activity was reduced in the cold model group at 32nd week ($P < 0.05$). **Conclusion:** Cold environment for colorectal cancer promotes tumorigenesis, and the hot environment can also promote tumorigenesis in a later stage.

[Key words] cold and heat syndrome; colorectal cancer model; adenosine triphosphate (ATPase); lactate dehydrogenase (LDH); succinate dehydrogenase (SDH)

大肠癌作为高死亡率的常见恶性肿瘤,其发病年龄越来越年轻化^[1]。目前,手术、化疗是常见的治疗大肠癌的手段。近来研究表明,根据中医辨别寒证、热证,能更好指导选择治疗的方案,取得较好的临床效果^[2]。从现代肿瘤生物学的角度看,肿瘤是一种渐变的、连续的、内外环境持续选择压力下长期的演变过程,机体本身的内在环境不同,其病程演变特征亦有所不同,在肿瘤启动时,整个恶性基质重塑的特征亦会不同^[3-5]。无论是机体的外在表现还是主观感受,疾病发生时表现出的各种症状,其本质就是机体寒热(阴阳)内环境的失衡。寒证和热证是临床常见的中医证候,反映机体脏腑阴阳的偏盛与偏衰^[6],而机体内在环境的平衡与紊乱与外在表象紧密联系。因此辨识疾病寒热对疾病的治疗有着不可替代的作用,同时也是中医“辨证论治”的基础与前提。根据个体化的差异,选择不同的治疗方法,恰巧与中医“同病异治”相同^[7]。因此,

寒证、热证与大肠癌的演变相关性需要进一步研究。

大肠癌是机体与环境长期相互作用的结果,临床上通常要需要至少10年的演变过程,本研究课题组一直以来致力于探求一种适于观察中药干预研究的缓慢演进的大鼠肠癌模型(造模时间34~38周),使本研究不仅能看到肿瘤进程尽可能详细的过程,也可以观察各个阶段中药的作用。在缓慢的肿瘤发生进程中,左金丸在1,2-二甲胍(DMH)诱导的大鼠大肠癌早期有非常显著地抑制肿瘤发生,但其药效与离体实验中的单体研究结果正好相反,在体外实验中,与小檗碱比较,吴茱萸碱具有更好的抑制肿瘤细胞作用,但在活体实验中,含吴茱萸组份较高的反左金丸却在阻碍着肿瘤发生进程中的效果明显弱于左金丸,本研究推测中药寒热药性、以及机体的寒热属性对药效都存在重要的影响^[8-12]。因此,为探求机体在寒、热不同内环境压力

下大肠癌发生的相关性。本研究从寒热不同宿体下制作大肠癌模型,在整体水平探讨寒热不同宿体下大肠癌选择发生模式变化,为以后指导临床治疗提供基础。

1 材料

1.1 动物 SPF级Wistar大鼠70只,雌雄各半,6~7周,体质量180~220 g,购于广州中医药大学实验动物中心,许可证号SYXK(粤)2013-0034。本实验在广州中医药大学实验动物中心屏障环境实验室进行,许可证号SYXK(粤)2013-0001。本实验取得广州中医药大学实验动物伦理委员会批准(批号S2017037)。

1.2 试剂 辣椒素(合成,纯度97%,上海麦克林生化科技有限公司,批号201424);1,2-二甲肼(DMH,西格玛奥德里奇贸易有限公司,批号BCBQ2802V);BCA蛋白含量检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司,批号20181102);超微量 Na^+K^+ , $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$,总ATP酶试剂盒,琥珀酸脱氢酶试剂盒(SDH),乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20181029,20181115,20181123)。苏木素和伊红染色液(碧云天生物技术有限公司,批号20181104);中性树胶(上海国药集团化学试剂有限公司,批号20171208)。

1.3 仪器 Forma Scientific 900型超低温冰箱(美国Thermo Fisher公司);DK-8D型电热恒温水槽(上海新诺仪器设备有限公司);MuLtifuge X1R型冷冻型离心机(美国Thermo Fisher公司);iMark-10970多功能酶标仪(美国Bio-Rad公司);IX53型倒置荧光显微镜(日本Olympus公司)。

2 方法

2.1 寒证、热证大肠癌模型复制 参照许汝福等^[13]各组例数不等的完全随机区段分组法,将70只Wistar大鼠(雌雄各半),随机分为正常组10只,寒模组30只,热模组30只。SPF级适应性喂养1周后开始实验,寒证、热证大肠癌动物模型的复制,将寒模组予0℃冰水灌胃和10℃冷水泡浴^[14]造模,热模组30%乙醇和辣椒素 $0.9\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 溶液^[15]造模;正常组大鼠予生理盐水灌胃, $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,持续5周。第6周制作大肠癌模型,寒模、热模组大鼠予DMH溶液颈后皮下注射, $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,1次/周^[16],连续12次。由于辣椒素有抗癌作用^[17],造癌期间热模组仅予30%乙醇溶液,寒模组维持造模。 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,持续38周。所有给药剂量均参照《中药药理研究方法学》^[18]关于“人和动物体表面积折算等效剂量比

值表”换算。

2.2 模型建立成功标准 寒证、热证大肠癌模型评价标准,①一般状况,根据《实用中医证候动物模型学》^[19]记载,寒证模型表现为蜷缩畏寒,耳廓、爪趾颜色淡(白),舌唇淡白等症状;热证模型表现为烦躁多动,活动增加。耳廓、趾爪颜色红,舌唇色红等症状。参考文献[20-21]将大鼠一般情况、摄食量、体质量等变化作为寒证、热证模型评价。大鼠通过DMH诱发大肠癌时,可以出现腹水、黏液便、血便等^[22]症状。肉眼可见肿瘤。②相关生化指标检测,ATP,LDH,SDH活性的变化能够表明寒模组、热模组的改变,寒模组能量代谢慢,热模组能量代谢快。③大肠肿瘤组织学检测,根据世界卫生组织的分类及诊断标准^[23-24],对腺体或绒毛复杂程度、细胞核形态和层次排列和核异型程度,腺瘤的异性增生可以分为①轻度异型增生腺瘤,②中度异型增生腺瘤,③重度异型增生腺瘤。腺瘤可以分为①高分化腺瘤,②中分化腺瘤,③低分化腺瘤。若满足2个以上指标,可认为寒证、热证大肠癌模型建立。

2.3 组织样本采集与处理 分别于第27,29,32,35,38周末,正常组随机抽取2只,余各组均随机抽取大鼠6只(雌雄各半)。麻醉处死,将部分大肠组织用于4%多聚甲醛溶液固定,余样本放置-80℃冰箱保存。

2.4 指标检测

2.4.1 一般状态、摄食量、体质量 观察各组大鼠精神状态、毛发光泽、爪指颜色、大小便情况。记录大鼠每日摄食量,及每周测量大鼠体质量变化。

2.4.2 大肠长度及质地 取材时记录大肠长度,同时观察大肠质地、颜色,以了解寒热对大肠的影响。

2.4.3 大肠黏膜病理组织学观察 将大肠组织进行苏木素-伊红(HE)染色,并镜下观察大肠黏膜变化以及对肿瘤程度进行分型、分级。

2.4.4 ATP,SDH,LDH活性测定 取出冻存的大肠组织,按说明书操作,制备1%的匀浆液。同时用聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)法检测蛋白定量,酶联免疫吸附法检测大肠组织三磷酸腺苷(ATP)活性、琥珀酸脱氢酶(SDH)活性、乳酸脱氢酶(LDH)活性。

2.5 统计学处理 采用SPSS 25.0统计软件实验数据,计量资料结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组数据间比较采用单因素方差分析,LSD检验运用于两两比较, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。正常组用于与大肠癌发生情况进行比较,同时用于比较大鼠机体自然衰老

情况。由于实验周期较长及经费不足等原因,每次正常组仅抽取2只。且每次取材时间相距较近,正常组的周数差异较小,故统计时采取5次取材均共用正常组(6只)数据,以进行统计。

3 结果

3.1 寒证、热证大肠癌大鼠对一般状态的影响

表1 寒证、热证大肠癌大鼠对一般状态的影响

Table 1 Effect of cold and heat syndromes on general status of colorectal cancer rats

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	第17周	第27周	第28周	第32周	第35周
正常	-	活动正常,精神状态佳,无明显异常表现	活动正常,精神状态佳,无明显异常表现	活动正常,精神状态佳,无明显异常表现	活动正常,精神状态佳,无明显异常表现	活动正常,精神状态佳,无明显异常表现
寒模	25	性情淡漠,活动减少,蜷缩成团,耳廓、爪趾苍白,舌青紫色,粪便质软	精神欠佳,懒动,便血、水样便	毛发不光泽,便血,水样便,肛门脏秽	精神状态较差,毛发欠光泽,黏液便伴腹部肿大	精神萎靡,不好动,黏液便及便血、伴腹部肿大
热模	25	性情暴躁,活动增加,耳廓、爪趾呈红色,舌红,粪便硬	形体消瘦,易受惊,形成弓背状,大便干结	消瘦,便血、肛门脏秽	精神状态尚可,毛发易脏,拉水样便及便血	形体消瘦,腹部肿大及便血

正常组比较,寒模组和热模组大鼠表征,如耳廓、舌质、趾爪的颜色变化、粪便的形态改变,与《实用中医证候动物模型学》^[19]中对寒证和热证症状描述相符。经过皮下注射DMH后,与热模组比较,寒模组大鼠较早出现便血、腹水等症状,表明寒证对大鼠大肠癌模型影响更为明显,见表1。

3.2 寒证、热证大肠癌大鼠对摄食量、体质量的影响
与正常组比较,寒模组、热模组摄食量、体质量均有降低趋势。与热模组比较,寒模组摄食量、体

质量升高。寒模组、热模组的摄食量、体质量与《实用中医证候动物模型学》^[23]中对寒证和热证症状描述相符。见表2,3。

表2 寒证、热证对大肠癌大鼠摄食量的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effects of cold and heat syndromes on food intake of colorectal cancer rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	第17周	第27周	第29周	第32周	第35周	第38周
正常	-	20.58±2.01	22.18±1.55	21.76±2.67	21.26±1.74	20.29±2.01	20.71±1.97
寒模	25	21.33±1.77	20.62±1.70	19.71±2.56	18.80±1.34	17.90±0.34	16.29±2.48
热模	25	18.26±2.08	17.26±2.33	17.44±2.54	16.57±3.06	15.91±2.64	14.56±2.19

表3 寒证、热证对大肠癌大鼠体质量的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effects of cold and heat syndromes on body weight of colorectal cancer rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	第17周	第27周	第29周	第32周	第35周	第38周
正常	-	437.50±144.91	494.17±172.41	499.17±178.03	502.50±179.66	522.50±178.01	528.33±188.01
寒模	25	403.33±122.22	457.50±153.91	420.83±133.99	442.50±137.14	457.50±127.31	469.17±114.52
热模	25	391.39±116.98	380.00±85.62	405.83±108.60	420.83±109.47	430.00±114.28	437.50±109.58

3.3 寒证、热证大肠癌大鼠对Na⁺K⁺-ATP和Ca²⁺Mg²⁺-ATP酶活性变化的影响
与正常组比较,热模组第27,29,38周Na⁺K⁺-ATP, Ca²⁺Mg²⁺-ATP活性明显升高($P<0.05, P<0.01$)。与热模组比较,寒模组第27,29,38周Na⁺K⁺-ATP, Ca²⁺Mg²⁺-ATP酶活性显著降低($P<0.01$)。见表4,5。

3.4 寒证、热证大肠癌大鼠对SDH酶活性变化的影响
与正常组比较,寒模组第29,35周SDH酶活

性降低($P<0.05, P<0.01$),热模组第38周SDH酶活性显著升高($P<0.01$)。与热模组比较,寒模组第29,38周SDH酶活性显著降低($P<0.01$)。见表6。

3.5 寒证、热证大肠癌大鼠对LDH酶活性变化的影响
与正常组比较,寒模组第27周LDH酶活性显著降低($P<0.01$),热模组第29,32周LDH活性明显升高($P<0.05, P<0.01$)。与热模组比较,寒模组第32周LDH活性降低($P<0.05$)。见表7。

表4 寒证、热证大肠癌大鼠对Na⁺K⁺-ATP酶活性变化的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of cold and hot syndromes on changes of Na⁺K⁺-ATPase activity in colorectal cancer rats ($\bar{x}\pm s, n=6$) U·mg⁻¹

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	第27周	第29周	第32周	第35周	第38周
正常	-	2.37±0.91	2.15±0.55	1.91±0.67	2.89±0.34	2.91±0.35
寒模	25	1.49±0.83 ⁴⁾	1.7±0.93 ⁴⁾	3.48±1.30	3.05±0.95	1.08±0.54 ⁴⁾
热模	25	5.39±1.74 ¹⁾	4.99±1.13 ²⁾	3.66±0.88	3.12±0.58	3.88±1.02 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与热模组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01(表6~9同)。

表5 寒证、热证大肠癌大鼠对Ca²⁺Mg²⁺-ATP酶活性变化的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of cold and heat syndrome colorectal cancer rats on changes in Ca²⁺Mg²⁺-ATPase ($\bar{x}\pm s, n=6$) U·mg⁻¹

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	第27周	第29周	第32周	第35周	第38周
正常	-	1.71±0.79	1.64±0.35	1.26±0.62	1.54±0.58	1.90±0.38
寒模	25	1.07±0.72 ⁴⁾	2.74±0.73 ⁴⁾	2.37±0.61	2.21±0.60	1.18±0.55 ⁴⁾
热模	25	2.73±0.93 ¹⁾	6.29±1.90 ²⁾	2.34±0.81	2.37±0.84	3.26±0.95 ²⁾

表6 寒证、热证大肠癌大鼠对SDH酶活性变化的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 6 Effect of cold and heat syndromes on changes of SDH enzyme activity in colorectal cancer rats ($\bar{x}\pm s, n=6$) U·mg⁻¹

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	第27周	第29周	第32周	第35周	第38周
正常	-	24.41±11.78	18.26±6.36	16.55±5.28	20.37±6.35	19.04±10.21
寒模	25	16.76±11.49	10.24±6.78 ^{1,4)}	12.12±7.94	7.50±4.51 ²⁾	13.17±7.20 ⁴⁾
热模	25	72.92±85.78	69.67±86.82	57.04±45.63	46.76±32.05	60.09±21.12 ²⁾

表7 寒证、热证大肠癌大鼠对LDH酶活性变化的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 7 Effect of cold and hot syndromes on changes of LDH enzyme activity in colorectal cancer rats ($\bar{x}\pm s, n=6$) U·mg⁻¹

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	第27周	第29周	第32周	第35周	第38周
正常	-	4 109.34±444.45	4 051.16±357.88	4 115.60±424.75	4 180.10±428.13	6 459.17±820.44
寒模	25	5562.25±1 339.83 ²⁾	7 698.40±2 081.70	5 369.49±905.86 ³⁾	9 165.45±9 002.60	4 325.12±808.75
热模	25	5 979.04±1 539.12	9 446.00±1 129.76 ¹⁾	5 291.60±758.36 ²⁾	5 451.77±457.36	5 206.37±1 459.02

3.6 寒证、热证大肠癌大鼠对大肠组织长度及质地的影响 与正常组比较,寒模组第32,35周大肠长度较短(P<0.05),热模组大肠长度亦较短。与热模

组比较,寒模组大肠长度较短。与热模组比较,寒模组大肠质地表现出较大的脆性,纤维化加重,促纤维增生性特征表现明显。见表8。

表8 寒证、热证大肠癌大鼠对大肠组织长度及质地的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 8 Effects of cold and hot syndromes on colorectal tissue length and texture in colorectal cancer rats ($\bar{x}\pm s, n=6$) cm

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	第27周	第29周	第32周	第35周	第38周
正常	-	17.25±2.48	16.25±0.28	16.30±4.53	15.57±1.70	15.15±1.34
寒模	25	17.34±1.89	14.92±1.46	11.98±2.49 ¹⁾	11.88±2.11 ¹⁾	14.12±2.87
热模	25	18.37±1.27	15.25±1.82	13.82±1.23	12.63±1.10 ¹⁾	14.28±1.09

3.7 寒证、热证对大肠癌大鼠发生情况的影响 根据WHO分类及诊断标准^[23-24]及病理切片,发现寒模组和热模组大鼠肿瘤发生率各不相同。与正常组比较,寒模组、热模组均发生大肠癌,表明大肠癌模型造癌成功。与热模组比较,寒模组肿瘤发生率升高,且病变更为严重,表明寒证对大肠癌大鼠的影响更甚。见表9。

3.8 寒证、热证大肠癌大鼠对肿瘤组织情况与组织学的影响 与正常组比较,寒模组、热模组不同时期取材均可见肿瘤,表明大肠癌模型建立成功。与热模组比较,寒模组肿瘤发生情况、分化程度及病理变化均较严重。见表10,图1,2。

4 讨论

大肠癌^[25]是禀赋不足,癌毒侵犯,湿热瘀毒蕴

表9 寒证、热证对大肠癌大鼠发生情况的影响

Table 9 Effects of cold and heat syndromes on incidence of colorectal cancer in colorectal cancer rats

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	组织类型	肿瘤发生率/%				
			第27周	第29周	第32周	第35周	第38周
正常	-	腺瘤/腺癌	0	0	0	0	0
寒模	25	轻度异性增生腺瘤	33.34	33.34	0	0	0
		中度异性增生腺瘤	16.67	0	0	50	16.67
		重度异型增生腺瘤	16.67	33.34	33.34	0	33.34
		高分化腺癌	16.67	16.67	33.34	33.34	16.67
		中分化腺癌	0	0	0	16.67	0
		低分化腺癌	16.67	16.67	33.34	0	33.34
热模	25	轻度异性增生腺瘤	16.67	16.67	0	33.34	0
		中度异性增生腺瘤	50.00	33.34	50.00	16.67	0
		重度异型增生腺瘤	16.67	33.34	16.67	16.67	66.67
		高分化腺癌	0	0	16.67	16.67	0
		中分化腺癌	16.67	0	16.67	16.67	0
		低分化腺癌	0	0	0	0	33.34

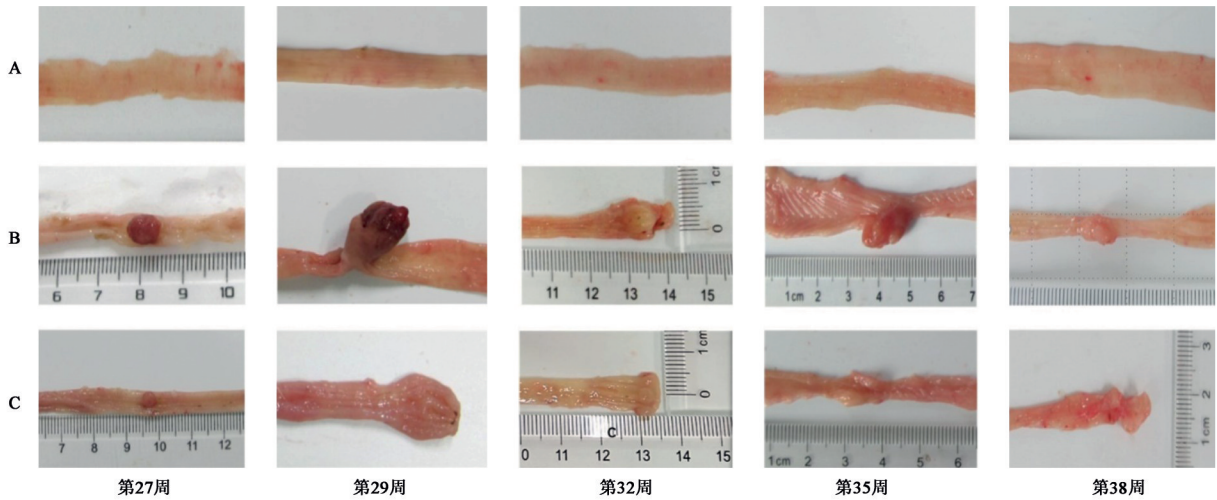
表10 寒证、热证大肠癌大鼠对肿瘤组织情况与组织学的影响

Table 10 Effect of cold and hot syndromes on tumor tissue and histology in colorectal cancer rats

组别	剂量/ mg·kg ⁻¹	比较因素	第27周	第29周	第32周	第35周	第38周
正常	-	肿瘤情况	未见肿瘤组织	未见肿瘤组织	未见肿瘤组织	未见肿瘤组织	未见肿瘤组织
		HE	杯状细胞排列整齐,隐窝结构正常,腺体未见异常	杯状细胞排列整齐,隐窝结构正常,腺体未见异常	杯状细胞排列整齐,隐窝结构正常,腺体未见异常	杯状细胞排列整齐,隐窝结构正常,腺体未见异常	杯状细胞排列整齐,隐窝结构正常,腺体未见异常
寒模	25	肿瘤颜色	红色	红色	白色	红色	粉红
		肿瘤大小/cm	0.7×0.5	1.5×1.0	0.7×0.5	1.3×0.6	0.8×0.3
		肿瘤质地	软	硬	软	硬	硬、脆性
		组织类型	低分化腺癌	低分化腺癌	低分化腺癌	低分化腺癌	高分化腺癌
		HE结果	腺管结构不明显,细胞异形明显	癌细胞形成大小不等,排列不规则的腺体结构	腺体结构紊乱,肠腔逐渐消失	癌细胞弥漫成片,无腺管状结构	腺管状上皮细胞分化较成熟,核多位于基底部
热模	25	肿瘤颜色	粉红色	红色	粉色	粉丝	粉色
		肿瘤大小/cm	0.3×0.2	0.5×0.6	0.2×0.3	0.8×0.5	0.2×0.5
		肿瘤质地	软	软	软	硬	硬
		组织类型	高分化腺癌	中分化腺癌	重度异型增生腺瘤	高分化腺癌	低分化腺癌
		HE	大量淋巴细胞浸润,腺管增生,胞浆内有分泌现象	细胞分化较差,异型性较明显	上皮细胞核明显增大呈不规则形,核染色深浅不等	癌细胞浸润肌层,腺体减少且结构异常	炎症细胞浸润肌层,腺体结构减少,癌细胞核分裂增加

结,长期积累肠道所致。《黄帝内经·素问》:“阳胜则热,阴胜则寒”,阐述了寒热病机与人体阴阳盛衰的关系^[26]。近10年癌症研究进展时表明机体微环境是肿瘤完成其发生发展多步骤的重要依赖甚至有决定作用^[27-30]。寒热在某种程度上是机体内在对于

外界变化的一种生理或病理感受。近来研究表明,热证大肠癌的HSP70的表达增强,且与肿瘤发展阶段密切相关。遂对寒证、热证不同内环境下大肠癌的发生进行研究^[31]。寒热辨证是中医首要辨证及八纲辨证中的重要纲领之一,也是能否精准实现中



A. 正常组; B. 寒模组; C. 热模组(图2同)

图1 寒证、热证大肠癌大鼠不同时期肿瘤发生情况

Fig. 1 Tumor occurrence in rats with cold and heat syndromes in different stages of colorectal cancer

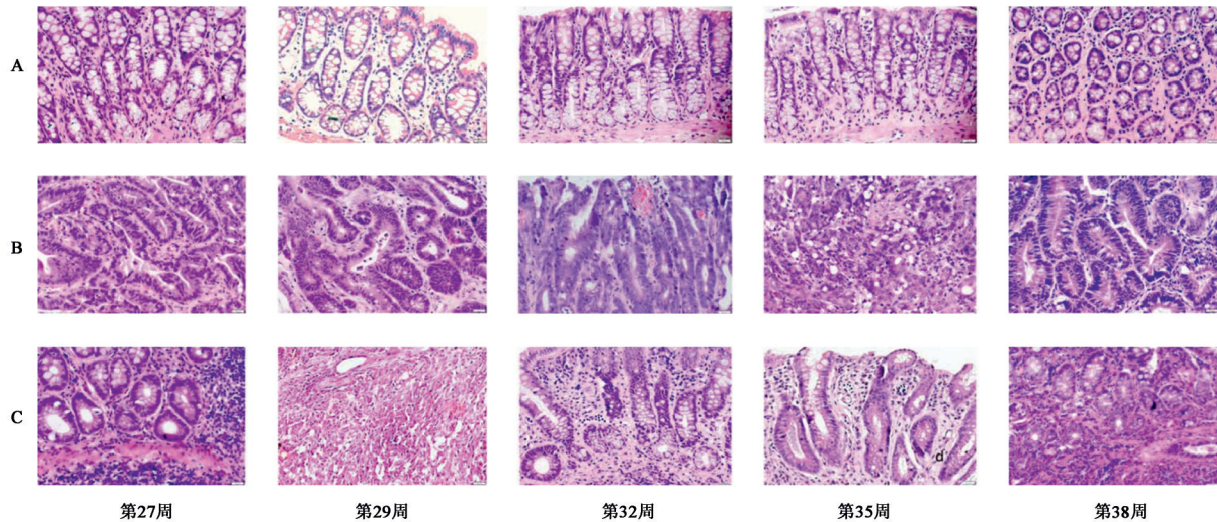


图2 寒证、热证大肠癌大鼠不同时期肿瘤病理情况(HE染色, ×400)

Fig. 2 Tumor pathology in rats with cold syndrome and heat syndromes in different stages of colorectal cancer(HE staining, ×400)

医独特的“个性化”治疗的关键,而“寒者热之,热者寒之”的治则可以指导临床用药。

实验结果表明,寒模组与热模组大鼠表征症状与《实用中医证候动物模型学》^[19]中对寒证和热证症状描述相符。且皮下注射DMH后,出现腹水、血便、肠道发生肿瘤等症状,符合寒证、热证大肠癌的建立标准。文献研究发现^[32-34],能量代谢变化可以体现机体寒热差异,ATP,LDH,SDH可以作为寒模、热模证候的评价指标^[35-36]。本次结果表明,寒模组ATP,SDH,LDH酶活性降低,表明寒模组能量代谢及氧消耗较少。热模组酶活性明显升高,表明热模的能量生成、耗氧增加及产热增多。与热模组比较,寒模组第29周ATP,SDH,LDH酶活性差异最为明显,提示机体大鼠能量代谢较少,耗氧降低,符合

寒模组特征。热模组酶活性升高,符合热模组特征,表明寒证、热证大肠癌模型建立成功。此外,寒模组第29,38周ATP,SDH,LDH酶活性明显降低。热模组第29周ATP,SDH,LDH酶活性明显升高。这表明大肠癌在演变发展的过程中,肿瘤微环境的改变对大肠癌选择发生方式有影响。

本次研究发现寒模组、热模组大肠癌的发生存在着区别。寒模组与热模组比较,寒模组大肠多段形态呈现狭窄、曲张情况,质地表现出较大的脆性,纤维化加重,促纤维增生性特征表现明显。且肿瘤发生率高于热模组,肿瘤体积较大,病理程度较为严重。热模组大肠形态呈现狭窄、曲张情况段数较少,质地未有明显变化。中医认为在肿瘤演变过程中,机体正气与邪气搏斗处于此消彼长的动态变

化。在大肠癌启动时,由于寒模组长期处于寒冷环境,迫使机体正气虚弱,无法抵抗寒邪入侵,肿瘤发生,且较为严重。而热模组则正气亢盛,能抵抗一定热邪入侵,肿瘤处于早期。大肠癌发展到中期时,寒模组和热模组机体内的正气与邪气抵抗处于胶着状态,此时,寒模组和热模组的肿瘤发生率不相上下。大肠癌发展到后期,寒模组禀赋正气不足,寒邪侵袭机体,肿瘤发生且严重。热模组正气抗争处于弱势,无法抵御热邪,则肿瘤发生时处于晚期。现代肿瘤生物学认为,肿瘤细胞与微环境协同促进肿瘤启动^[37],肿瘤细胞在寒热不同微环境中不同的选择,导致肿瘤发生方式存在差异。

在实验过程中本研究采取分阶段取材,可以对寒模组和热模组中肿瘤动态变化及形成过程和发展状况进行有效的跟踪,能够动态观察到整个大肠癌的发生发展,为以后指导临床工作治疗提供基础。寒模组大肠长度、质地脆性、肠道形态和弹性与热模组比较,都有明显差异,表明寒热不同宿体内环境对于肿瘤演变过程的重要作用。此外,大肠长度、质地脆性与弹性与肿瘤启动时整个恶性基质重塑特征相关。肿瘤在寒热不同宿体内环境影响下,肿瘤的发生发展亦有区别,但是造成这种差异的机制仍需要进一步研究。

[参考文献]

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34.

[2] 李硕. 寒热辨证与食管癌化疗方案选择相关性的研究[J]. 结直肠肛门外科, 2016, 22(S2): 88-90.

[3] POLYAK K, HAVIV I, CAMPBELL I G. Co-evolution of tumor cells and their microenvironment[J]. Trends Genet, 2009, 25(1): 30-38.

[4] WEBER C E, KUO P C. The tumor microenvironment[J]. Eur J Surg Oncol, 2012, 21(3): 172-177.

[5] ALLEN M, JONES L J. Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer[J]. J Pathol, 2011, 223(2): 163-177.

[6] 李德新. 中医基础理论[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 183.

[7] 徐玉芬, 杨新妹, 孙校男, 等. 基于“同病异治”的大肠癌不同证候血清蛋白组学探索研究[J]. 中华全科医学, 2015, 13(4): 647-649, 663, 689.

[8] 常金荣, 文彬, 王汝俊, 等. 吴茱萸碱和小檗碱对 HT29 细胞凋亡及端粒酶催化亚基(hTERT)表达的影

响[J]. 中药药理与临床, 2008, 24(2): 6-8.

[9] 文彬, 黄秋凌, 熊旻利, 等. 实验性大肠癌模型的建立及中药的干预作用[J]. 中药药理与临床, 2009, 25(4): 79-82.

[10] 文彬, 黄秋凌, 龚艳青, 等. 左金丸及其主要单体成分对大肠癌的干预作用[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(19): 1936-1941.

[11] 文彬, 熊旻利, 戴伟怡, 等. 左金丸及反左金丸对实验性大肠癌不同时期甲基转移酶表达的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(20): 2074-2078.

[12] 龚艳青, 文彬. 左金丸对大肠癌 APC 表达及 DNA 甲基转移酶活性的影响[J]. 南昌大学学报: 医学版, 2010, 50(12): 46-49.

[13] 许汝福, 尹全焕. 各组例数不等的完全随机区段分组法[J]. 中国卫生统计, 1993, 10(5): 45-46.

[14] 杨万斌, 文彬, 张凌杭, 等. 大鼠胃寒证模型造模方法探索[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(20): 4031-4036.

[15] 杨万斌, 文彬, 张凌杭, 等. 大鼠胃热证模型造模方法研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(18): 3644-3649.

[16] 魏华, 张昕, 张晨虹, 等. 二甲胍诱发大鼠大肠癌癌前病变模型的肠道双歧杆菌数量研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2007, 14(20): 1524-1526.

[17] KOKOLUS K M, CAPITANO M L, LEE C T, et al. Baseline tumor growth and immune control in laboratory mice are significantly influenced by subthermoneutral housing temperature[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(50): 20176-20181.

[18] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 33-36.

[19] 陈小野. 实用中医证候动物模型学[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1993: 78-79.

[20] 方肇勤, 潘志强, 卢文丽, 等. 小鼠常见证候的辨证标准[J]. 中国中医基础医学杂志, 2006, 12(7): 508-510.

[21] 孙玉文, 陈康, 刘家强, 等. 中医证候研究及寒证量化方法探索[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(1): 202-203.

[22] 朱明古, 郭文, 袁海锋, 等. 芥菜子对 DMH 诱导大鼠大肠癌预防作用的体内研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2012, 19(1): 33-36.

[23] 郑杰. 结直肠息肉和结直肠癌[J]. 中华病理学杂志, 2005, 34(1): 9-10.

[24] O'BRIEN M J, WINAWER S J, ZAUBER A G, et al. The national polyp study. Patient and polyp characteristics associated with high-grade dysplasia in

- colorectal adenomas [J]. *Gastroenterology*, 1990, 98 (2):371-379.
- [25] 张皓婷. 基于文献资料探讨大肠癌的中医诊治[J]. *中国医药指南*, 2019, 17(8):181-182.
- [26] 周杰, 段延萍. 对《素问·阴阳应象大论》中阴阳寒热病机的认识[J]. *河南中医药学刊*, 2000, 15(2):1-2.
- [27] WINBERG R A. 癌生物学[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2018:602-615.
- [28] DONGRE A, WEINBERG R A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(2):69-84.
- [29] DERYNCK R, WEINBERG R A. EMT and cancer: more than meets the eye[J]. *Dev Cell*, 2019, 49(3): 313-316.
- [30] SHIBUE T, REINHARDT F, WEINBERG R A. Syndecan-mediated ligation of ECM proteins triggers proliferative arrest of disseminated tumor cells [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(23):5944-5957.
- [31] 王洪琦, 张正, 赵燕平, 等. 恶性肿瘤组织中 HSP70、P53 表达与中医热证的关系[J]. *中国中西医结合杂志*, 2004, 24(10):897-900.
- [32] 王海燕, 刘億, 葛巍, 等. 四神丸对慢性复发型结肠炎大鼠结肠组织 LDH、SDH、Na⁺-K⁺-ATPase 和 Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase 活力的影响[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2019, 25(7):928-931.
- [33] 刘春蕾, 韩冰冰, 王世军, 等. 黄连氯仿、乙酸乙酯提取物对实热证模型大鼠 LA、PA、LDH、SDH 的影响 [J]. *山东中医药大学学报*, 2012, 36(2):144-145.
- [34] 任永申, 赵艳玲, 王伽伯, 等. 基于动物热活性检测的肾阴虚/肾阳虚模型寒热属性差异研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(12):94-97, 101.
- [35] 罗培灿, 文彬, 杨万斌, 等. 寒、热证候大鼠大肠癌启动时 ATP 酶和琥珀酸脱氢酶活性的变化[J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(2):310-312, 516.
- [36] 李冀, 柴剑波, 李胜志, 等. 寒、热方剂对消炎痛型胃溃疡寒、热证模型大鼠血清 GAS、MOT 含量的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(20): 170-172.
- [37] CATALANO V, TURDO A, DI FRANCO S, et al. Tumor and its microenvironment: a synergistic interplay [J]. *Semin Cancer Biol*, 2013, 23 (6): 522-532.
- [责任编辑 张丰丰]