

## 二至丸对人结肠癌细胞的侵袭转移作用

王桦影<sup>1</sup>, 余文燕<sup>1\*</sup>, 王国娟<sup>2</sup>, 刘红宁<sup>1</sup>, 魏祥燕<sup>1</sup>, 应鹏云<sup>1</sup>

(1. 江西中医药大学中医基础理论分化发展研究中心, 江西省中医病因生物学重点实验室, 南昌 330004; 2. 江西中医药大学附属医院, 南昌 330006)

**[摘要]** **目的:**探讨二至丸(Erzhivan, EZW)对人属结肠癌细胞株 HCT116 侵袭及迁移的作用。**方法:**以人结肠癌细胞株 HCT116 为研究对象,以化疗药奥沙利铂(oxaliplatin, L-OHP)作为阳性对照,以 20%、10%、5% EZW 含药血清做为高、中、低剂量,运用 Transwell 法检测 EZW 及联用 L-OHP 后对 HCT116 细胞侵袭的影响,划痕实验观察细胞迁移情况,蛋白免疫印迹法(Western blot, WB)检测其对细胞血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)表达的影响。**结果:**①Transwell 实验显示,与空白组比较,各用药组穿模细胞数均减少( $P < 0.05$ ),以联用后穿模细胞数最少。②划痕实验显示,与空白组比较,各用药组均能抑制 HCT116 细胞的迁移( $P < 0.05$ )。12 h EZW 高浓度组抑制率高于 L-OHP 组( $P < 0.05$ ),其余时间段 EZW 各剂量组抑制率低于 L-OHP 组( $P < 0.05$ ),各时间段联用组抑制率均高于 EZW 高、中、低剂量组( $P < 0.05$ ),12 h 联用组抑制率高于 L-OHP 组( $P < 0.05$ ),48 h 联用组抑制率低于 L-OHP 组( $P < 0.05$ )。③WB 实验显示,与空白组比较,10%、20% EZW 组,VEGF 蛋白表达量均明显降低( $P < 0.05$ ),联用组与 L-OHP 组相比蛋白表达量降低( $P < 0.05$ );与空白组相比,EZW 含药血清各组降低了 E-cadherin 蛋白的表达( $P < 0.05$ ),联用组和 L-OHP 组 E-cadherin 蛋白表达量均显著升高,且联用后 E-cadherin 蛋白表达量最高( $P < 0.05$ )。**结论:**二至丸能抑制结肠癌 HCT116 细胞侵袭转移,并以协同 L-OHP 后效果最佳,可能与其降低 VEGF 蛋白表达,协同 L-OHP 升高 E-cadherin 蛋白表达有关。

**[关键词]** 结肠癌; 二至丸; 奥沙利铂; 侵袭; 转移

**[中图分类号]** R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)17-0028-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20190922

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190116.1931.011.html>

**[网络出版时间]** 2019-01-17 16:32

### Effect of Erzhivan on Invasion and Metastasis of Human Colon Cancer Cells

WANG Hua-ying<sup>1</sup>, YU Wen-yan<sup>1\*</sup>, WANG Guo-juan<sup>2</sup>, LIU Hong-ning<sup>1</sup>, WEI Xiang-yan<sup>1</sup>, YING Peng-yun<sup>1</sup>

(1. Research Center for Differentiation and Development of Basic Theory of Traditional Chinese Medicine (TCM), Jiangxi University of TCM, Key Laboratory of Etiology and Biology of TCM in Jiangxi Province, Nanchang 330004, China;

2. Affiliated Hospital of Jiangxi University of TCM, Nanchang 330006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Erzhivan (EZW) on the invasion and metastasis of human colon cancer HCT116 cells. **Method:** The abilities of invasion (number of transmembrane cells) and migration (relative width of 48 h scratch) were observed by Transwell assay. Western blot was used to detect vascular endothelial growth factor (VEGF) and E-cadherin protein, respectively. **Result:** ① Transwell results showed that compared with the blank control group, the number of model piercing cells in each drug group was decreased ( $P < 0.05$ ), and the number of perforating model cells was the least after combined use of L-OHP.

**[收稿日期]** 20181014(007)

**[基金项目]** 江西省卫生计生委中医药科研课题项目(2018A361);江西省教育厅科学技术项目(GJJ150838);江西省自然科学基金项目(20161BAB215208);江西中医药大学校级课题项目(2014BS002)

**[第一作者]** 王桦影,在读硕士,从事中医药防治肿瘤的研究,E-mail:232282403@qq.com

**[通信作者]** \*余文燕,博士,主治医师,讲师,从事中医药防治肿瘤的研究,E-mail:henrie09@qq.com

② Scratch test results showed that compared with the blank control group, the migration of HCT116 cells was inhibited in each treatment group ( $P < 0.05$ ). The inhibitory rate of high-dose EZW group was higher than that of L-OHP group at 12 h ( $P < 0.05$ ), and the inhibition rate of EZW in other time groups was lower than that of L-OHP group ( $P < 0.05$ ). The inhibition rate of combined treatment group was higher than that of EZW groups ( $P < 0.05$ ). The figure of combined group was higher than that of L-OHP group at 12 h ( $P < 0.05$ ), and combined group was lower than L-OHP group at 48 h ( $P < 0.05$ ). ③ Western blot results showed that compared with the control group, the expressions of VEGF protein in 10% and 20% EZW group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), and the expression of VEGF protein in 5.19 mg·L<sup>-1</sup> L-OHP combined with 10% EZW group was lower than that in L-OHP group ( $P < 0.05$ ). Compared with the blank control group, EZW groups decreased the expression of E-cadherin protein ( $P < 0.05$ ). And 5.19 mg·L<sup>-1</sup> L-OHP combined with 10% EZW group and L-OHP group increased the expression of E-cadherin protein significantly. Compared with L-OHP group, the expression of E-cadherin protein was the highest ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** EZW can inhibit the invasion and metastasis of colon cancer HCT116 cells, and the best effect is achieved after combined with L-OHP. This may be related to the decrease of VEGF protein expression and the increase of E-cadherin protein expression after combination with L-OHP.

[ **Key words** ] colon cancer; Erzhiwan; oxaliplatin; invasion; metastasis

结肠癌是全球诊断的第三大癌症,是癌症死亡的重要原因,其发病率和死亡率在世界范围内变化高达 10 倍,预计到 2030 年结肠癌的全球负担将增加到 60%<sup>[1-2]</sup>。手术和化疗是治疗肿瘤的主要手段,但结肠癌细胞易向重要器官扩散和生长转移,从而成为阻碍其治疗的重要瓶颈。肿瘤细胞的侵袭转移主要与肿瘤转移基因与转移抑制基因、血管形成、细胞外基质降解、细胞黏附等因素有关<sup>[3]</sup>。血管内皮生长因子(VEGF)参与肿瘤血管生成和诱导与细胞外基质降解相关的酶和蛋白,是肿瘤细胞浸润和迁移的重要因子<sup>[4]</sup>。近年来,越来越多的研究表明,上皮-间质转化(EMT)是肿瘤侵袭和转移的一个早期过程,而 E-钙黏蛋白(E-cadherin)作为介导细胞间黏附的一个重要分子,其缺失会启动 EMT,导致肿瘤浸润和转移<sup>[5]</sup>。因此,VEGF 和 E-cadherin 是肿瘤侵袭转移相关的重要分子。

二至丸(Erzhiwan, EZW)是出自清代《医方集解》的名方,方含女贞子、墨旱莲,味简性平、滋而不腻,具有滋补肝肾的功效,临床常用于治疗肝肾阴虚、头晕耳鸣、骨质疏松等证<sup>[6-8]</sup>。诸多体内外实验证实其能抑制肿瘤生长、显著减少瘤体的数目,减轻多种致癌因素对机体的损害<sup>[9-11]</sup>。本实验组前期临床研究及文献整理发现肝肾阴虚证在非手术、非放疗化疗大肠癌中占第 4 位,手术后非放疗化疗大肠癌占第 3 位<sup>[12]</sup>,因而肝肾阴虚证型结肠癌在临床中是常见、多发的证型,对其防治尤为重要。前期研究发现该方可抑制结肠癌细胞增殖<sup>[13]</sup>,为了探索其对细胞

增殖的影响是否与侵袭转移有关,故本实验在前期研究的基础上,以体外细胞培养的方式,运用 Transwell 法,划痕法及蛋白免疫印迹法(Western blot)探讨 EZW 药物血清对结肠癌细胞侵袭转移的影响,以进一步阐明其抗结肠癌的机制。

## 1 材料

**1.1 细胞** 人属结肠癌细胞株 HCT116 购于中国科学院上海生命科学院细胞资源中心,编号 B100N-12342。

**1.2 动物** 清洁级雄性 SD 大鼠,体质量 200 ~ 250 g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,合格证号 SCXK(湘)2011-0003,饲养于江西中医药大学中医基础理论分化发展研究中心动物实验室,许可证号 SYXK(赣)2014-0008。

**1.3 试剂** 胎牛血清(杭州四季青生物公司,批号 090501); MaCoys 5A Medium (Life Technologies Corporation 公司,批号 AB10113944); 胰蛋白酶(Solarbio 公司,批号 T8150); 噻唑蓝(MTT, Sigma 公司,批号 M2128-1G); Transwell 小室(北京诺博莱德科技有限公司,批号 corning3413Costar); matrigel 胶(BD 公司,批号 354234); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术研究,批号 P0012); RIPA 裂解液,二抗 HRP 标记山羊抗小鼠(康为世纪生物公司,批号分别为 CW2333S, CW0102); 彩色预染蛋白质 marker(武汉博士德生物工程有限公司,批号 AR1118);  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin) mouse monoclonal antibody(美国 Affinity 公司,批号 T0022); anti-VEGF

receptor 1 antibody, anti-E-cadherin antibody (英国 Abcam 公司,批号分别为 ab32152, ab40772); 二抗 HRP 标记山羊抗兔(全式金生物公司,批号 HS101-01); 奥沙利铂(江苏恒瑞医药股份有限公司,国药准字 H20000686, 50 mg/瓶),用超纯水 10 mL 将其溶解成  $0.005 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  母液备用。

**1.4 仪器** 3111 型  $\text{CO}_2$  培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); CKX41 型荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司); SPARK 10M 型全自动酶标仪(瑞士 Tecan 公司); Mini-PROTEAN 型电泳转印仪, ChemiDoc XRS + 型化学发光凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司); 5804R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)。

**1.5 药物** EZW 方含墨旱莲 500 g, 酒女贞子 500 g, 购于江西省中医院中药房,均来源于江中中药饮片有限公司,墨旱莲、酒女贞子批号分别为 160705, 160516, 经江西中医药大学褚晓兰教授鉴定分别为菊科植物鳢肠 *Eclipta prostrata* 干燥地上部分和木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* 干燥成熟果实,符合 2010 年版《中国药典》<sup>[14]</sup> 要求。剂量及制备方法参照 2010 年版《中国药典》<sup>[14]</sup>, 用 5 倍的清水浸泡 30 min, 煎煮 30 min, 再以 4 层纱布过滤后,用 4 倍量的水同法煎煮,收集滤液,2 次合并后浓缩至  $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  下备用,全程由江西中医药大学中医基础理论分化发展研究中心制备。

## 2 方法

**2.1 药物血清的制备** 清洁级 SD 雄性大鼠 30 只,体质量 200 ~ 250 g,随机分为 2 组, EZW 药物血清组 15 只,空白血清组 15 只,灌服等体积的生理盐水。参照 2010 年版《中国药典》<sup>[14]</sup>, 每天服生药约 36 g, 根据大鼠与人剂量的换算系数是 6.17<sup>[15]</sup>, 按标准计量的 8 倍剂量煎煮后灌胃,连续给药 5 d, 末次禁食 12 h 给药,2 h 内腹主动脉采血,离心后分离血清,  $56 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴锅内灭活 30 min, 使用  $0.22 \text{ }\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤除菌分装,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱保存备用<sup>[16]</sup>。课题组前期 MTT 比色法发现, EZW 药物血清体积分数为 20% 时,对结肠癌 HCT16 细胞抑制率最高,故将 20%, 10%, 5% EZW 药物血清设置为 EZW 高、中、低剂量组。经 SPSS 19.0 统计学分析得出, L-OHP 作用于 HCT116 细胞 48 h 的半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 为  $10.38 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 故选取其 1/2 即  $5.19 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  作为其体外给药剂量。

**2.2 细胞培养** 人结肠癌 HCT116 细胞置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中,在含 10% 胎牛血清和含 90%

MaCoy's 5A Medium 培养基中培养,用 0.25% 的胰蛋白酶消化并收集细胞,取对数生长期细胞进行实验。

**2.3 分组** 实验共分为 6 个组,空白组, 5% EZW 药物血清组, 10% EZW 药物血清组, 20% EZW 药物血清组,  $5.19 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  L-OHP + 10% EZW 空白血清组,  $5.19 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  L-OHP + 10% EZW 药物血清组。

**2.4 Transwell 实验检测细胞侵袭能力** 收集对数生长期正常 HCT116 细胞,制成  $5 \times 10^4$  个/mL 细胞悬液,接种于 6 孔培养板中,置  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中培养,待细胞贴壁长至 70% 左右,祛除培养基,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 遍,每孔加入相应的含药培养基 2 mL,置培养箱中培养 48 h。实验前将 matrigel 胶从  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱取出  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  过夜融化,以无血清培养液稀释 matrigel 至  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,按  $50 \text{ }\mu\text{L}$ /孔加入 Transwell 细胞培养小室的上室,超净台中过夜风干。临用前每室加入无血清培养液  $100 \text{ }\mu\text{L}$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱放置 90 min,后去除未结合的 matrigel 胶。各组细胞培养 48 h 后,分别制成  $2.5 \times 10^5$  个/mL 细胞悬液,  $200 \text{ }\mu\text{L}$ /孔加入 Transwell 细胞培养小室的上室,同时,把含 10% 胎牛血清的培养液  $600 \text{ }\mu\text{L}$  加入 Transwell 细胞培养小室的下室,置于培养箱培养 24 h,把 Transwell 细胞培养小室取出,用生理盐水洗 3 遍,滤膜用 95% 的乙醇固定 20 min,用双蒸水洗 3 遍,以 0.1% 结晶紫染色 30 min,以蒸馏水冲洗,上层大量未迁移细胞反复用湿棉签缓慢擦拭,放置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  烘箱中 1 h,烘干。侵袭穿膜细胞数用 200 倍光学显微镜观测,每膜的穿膜细胞数计算镜下 5 个不同视野即上、下、左、右、中,取平均值,重复 3 次。

**2.5 划痕实验检测细胞迁移能力** 取对数生长期 HCT116 细胞接种于 6 孔培养板,置  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养。待细胞融合到 90% 左右时,去除培养基, PBS 洗 2 遍,用  $200 \text{ }\mu\text{L}$  移液器枪头沿空的中轴轻划出一道痕,每孔平行划 5 道,经 PBS 清洗后,根据分组情况加入相应的药物,每孔加入培养基 3 mL,用显微镜放大 100 倍拍照,依次拍摄给药后同一划痕、同一位置 0, 12, 24, 36, 48 h 照片,采用 Image-Pro Plus 6.0 软件测量细胞划痕的宽度,实验至少重复 3 次,取平均值。

$$\text{细胞迁移抑制率} = \left( 1 - \frac{L_{0 \text{ h 用药组}} - L_{x \text{ h 用药组}}}{L_{0 \text{ h 空白组}} - L_{x \text{ h 空白组}}} \right) \times 100\%$$

$L$  表示划痕的宽度,  $x$  表示不同时间。

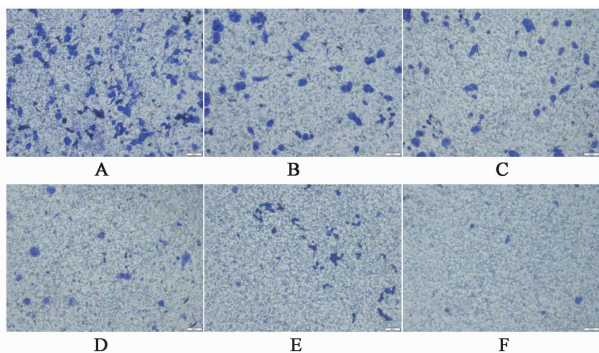
**2.6 Western blot 检测细胞 VEGF, E-cadherin 蛋白表达** 细胞分组培养 48 h,使用 RIPA 裂解液提取

细胞总蛋白,根据 BCA 试剂说明书检测蛋白浓度。取 30  $\mu\text{g}$ /孔蛋白样品进行 10% SDS-PAGE 分离,用湿转法(270 mA,75 min)将蛋白质转移到 PVDF 上,5%的脱脂奶粉室温封闭 1 h,分别加入  $\beta$ -actin, VEGF, E-cadherin 一抗(1:5 000,1:1 000,1:5 000) 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。用 TBST 洗膜 3 次后加入二抗(1:1 万)室温孵育 1 h,用 TBST 洗膜 3 次,加入增强化学发光法(ECL)试剂,用化学发光凝胶成像仪检测,使用 Bio-Rad 公司的 Image Lab 软件分析。

**2.7 统计学方法** 采用 SPSS 19.0 软件对各组数据进行统计分析,所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,数据均以正态分布,若方差齐,采用单因素方差分析 LSD-*t* 检验进行两两比较,若方差不齐,采用单因素方差分析 Dunnett's *T*3 进行两两比较, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 EZW 对 HCT116 细胞侵袭能力的影响** 与空白组比较,各用药组穿膜细胞数均减少( $P < 0.05$ );与 EZW 低浓度组比较,EZW 中、高浓度组穿膜细胞数减少( $P < 0.05$ ),与 EZW 中浓度组比较,EZW 高浓度组穿膜细胞数减少( $P < 0.05$ ),EZW 能够抑制 HCT116 细胞的侵袭,并呈剂量依赖性。与 EZW 低、中浓度组比较,L-OHP 组和 L-OHP + EZW 组穿膜细胞数减少( $P < 0.05$ )。见图 1,表 1。



A. 空白组; B ~ D. EZW (5%, 10%, 20%) 组; E. L-OHP 组; F. L-OHP + 10% EZW 组(图 2,3 同)

**图 1 EZW 对结肠癌 HCT116 细胞侵袭能力的影响(结晶紫,  $\times 200$ )**

**Fig.1 Effect of EZW on invasion ability of HCT116 cells in colon cancer (crystal violet,  $\times 200$ )**

**3.2 EZW 对 HCT116 细胞迁移能力的影响** 培养 12 h,与空白组比较,各用药组细胞迁移率均降低( $P < 0.05$ );与 EZW 中剂量组比较,EZW 高剂量组,L-OHP 组迁移率升高( $P < 0.05$ );与 EZW 高剂量组,L-OHP 组比较,联用组迁移率降低( $P <$

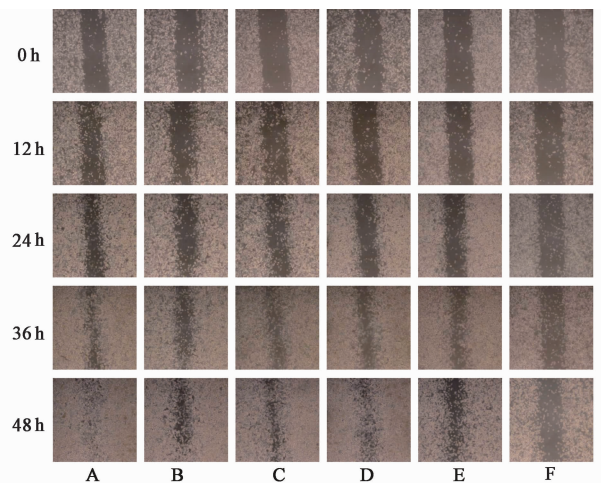
**表 1 EZW 对结肠癌 HCT116 细胞侵袭能力的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )**

**Table 1 Effect of EZW on invasion ability of HCT116 cells in colon cancer( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )**

组别	浓度	穿膜细胞数/个
空白	-	81.33 $\pm$ 6.43
EZW	5%	67.33 $\pm$ 5.03 <sup>1)</sup>
	10%	51.67 $\pm$ 2.52 <sup>1,2)</sup>
	20%	17.67 $\pm$ 6.03 <sup>1,2,3)</sup>
L-OHP	5.19 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	26.33 $\pm$ 6.11 <sup>1,2,3)</sup>
L-OHP + EZW	5.19 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ L-OHP + 10% EZW	15.67 $\pm$ 3.21 <sup>1,2,3)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与 EZW 低浓度组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ;与 EZW 中浓度组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ 。

0.05)。培养 24 h,与空白组比较,各用药组细胞迁移率均降低( $P < 0.05$ );与 EZW 高剂量组比较,L-OHP 组,L-OHP + EZW 组迁移率降低( $P < 0.05$ )。培养 36 h,与空白组比较,除 EZW 高剂量组,各用药组细胞迁移率均降低( $P < 0.05$ );与 EZW 低、中、高剂量组比较,L-OHP 组,L-OHP + EZW 组迁移率降低( $P < 0.05$ )。培养 48 h,与空白组比较,除 EZW 高剂量组,各用药组细胞迁移率均降低( $P < 0.05$ );与 EZW 低、中、高剂量组比较,L-OHP 组,L-OHP + EZW 组迁移率均降低( $P < 0.05$ );与 L-OHP 组比较,L-OHP + EZW 组迁移率降低( $P < 0.05$ )。表明 EZW 能抑制 HCT116 细胞的迁移,并以协同 L-OHP 效果最佳。见图 2,表 2。



**图 2 EZW 对结肠癌 HCT116 细胞迁移能力的影响(倒置显微镜,  $\times 100$ )**

**Fig.2 Effect of EZW on metastasis ability of HCT116 cells in colon cancer (inverted microscope,  $\times 100$ )**

表 2 EZW 对结肠癌 HCT116 细胞迁移率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of EZW on metastasis ability of HCT116 cells in colon cancer ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度	12 h	24 h	36 h	48 h
空白	-	35.00 ± 2.48	63.97 ± 12.34	85.99 ± 10.97	99.83 ± 0.92
EZW	5%	21.53 ± 4.04 <sup>1)</sup>	37.40 ± 3.65 <sup>1)</sup>	67.85 ± 5.09 <sup>1)</sup>	83.06 ± 10.30 <sup>1)</sup>
	10%	17.05 ± 4.22 <sup>1)</sup>	37.64 ± 2.57 <sup>1)</sup>	68.31 ± 9.83 <sup>1)</sup>	84.56 ± 7.12 <sup>1)</sup>
	20%	25.95 ± 3.67 <sup>1,3)</sup>	45.03 ± 2.82 <sup>1)</sup>	71.82 ± 11.18	96.07 ± 3.45
L-OHP	5.19 mg·L <sup>-1</sup>	24.63 ± 3.93 <sup>1,3)</sup>	34.48 ± 1.37 <sup>1,4)</sup>	41.66 ± 5.64 <sup>1,2,3,4)</sup>	67.56 ± 11.52 <sup>1,2,3,4)</sup>
L-OHP + EZW	5.19 mg·L <sup>-1</sup> L-OHP + 10% EZW	17.17 ± 4.19 <sup>1,4,5)</sup>	33.02 ± 0.58 <sup>1,4)</sup>	37.31 ± 5.44 <sup>1,2,3,4)</sup>	43.83 ± 6.12 <sup>1,2,3,4,5)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与 EZW 低浓度组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ;与 EZW 中浓度组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ;与 EZW 高浓度组比较<sup>4)</sup>  $P < 0.05$ ;与 L-OHP 组比较<sup>5)</sup>  $P < 0.05$  (表 3 同)。

**3.3 EZW 对 HCT116 细胞 VEGF 和 E-cadherin 蛋白表达的影响** VEGF 蛋白表达,与空白组比较, EZW 低剂量组, L-OHP 组表达升高 ( $P < 0.05$ ), EZW 中、高剂量组表达降低 ( $P < 0.05$ );与 EZW 低剂量组比较,其余用药组表达均减少 ( $P < 0.05$ );与 EZW 中、高剂量组比较, L-OHP, L-OHP + EZW 组表达均升高 ( $P < 0.05$ );与 L-OHP 组比较, L-OHP + EZW 组表达降低 ( $P < 0.05$ )。E-cadherin 蛋白表达,与空白组比较, EZW 低、中、高剂量组表达降低 ( $P < 0.05$ ), L-OHP 组, L-OHP + EZW 组表达升高 ( $P < 0.05$ );与 EZW 低、中、高剂量组比较, L-OHP 组, L-OHP + EZW 组表达升高 ( $P < 0.05$ );与 L-OHP 组比较, L-OHP + EZW 组表达升高 ( $P < 0.05$ )。结果表明, EZW 能下调 VEGF 蛋白表达,协同 L-OHP 上调 E-cadherin 蛋白表达。见图 3, 表 3。

表 3 48 h EZW 对 HCT116 细胞 VEGF 和 E-cadherin 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of 48 h EZW on expressions of VEGF and E-cadherin proteins in HCT116 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度	VEGF/ $\beta$ -actin	E-cadherin/ $\beta$ -actin
EZW	5%	1.67 ± 0.07 <sup>1)</sup>	0.75 ± 0.04 <sup>1)</sup>
	10%	0.68 ± 0.05 <sup>1,2)</sup>	0.59 ± 0.02 <sup>1,2)</sup>
	20%	0.66 ± 0.12 <sup>1,2)</sup>	0.61 ± 0.02 <sup>1)</sup>
L-OHP	5.19 mg·L <sup>-1</sup>	1.35 ± 0.11 <sup>1,2,3,4)</sup>	2.59 ± 0.27 <sup>1,2,3,4)</sup>
L-OHP + EZW	5.19 mg·L <sup>-1</sup> L-OHP + 10% EZW	0.96 ± 0.07 <sup>2,3,4,5)</sup>	3.86 ± 0.10 <sup>1,2,3,4,5)</sup>

注:设空白组 VEGF, E-cadherin 蛋白相对表达为 1。

途径等优势倍受研究者和临床医师的青睐,能明显提高化疗药物对肿瘤的细胞毒作用,减轻由化疗引起的多种毒副作用,增加化疗药物的敏感性,同时可以提高机体免疫力和抗癌能力<sup>[20]</sup>。

结肠癌属于中医“肠覃”“脏毒”“积聚”“锁肛痔”等范畴,属本虚标实之证,既有脏腑气血亏虚之本虚,亦有气滞、血瘀、痰凝、湿毒等之标实,治疗宜扶正祛邪并举<sup>[21]</sup>。EZW 是出自清代《医方集解》的名方,具有滋补肝肾的功效,临床常用于治疗肝肾阴虚、头晕耳鸣、骨质疏松等证,对于一些晚期肿瘤患者,在化疗药的基础上加用该方治疗,与单纯用化疗药相比,可显著提高患者疗效,明显减少腹泻、毒副作用的发生率,提高化疗安全性及治疗依从性,进而改善患者的生活质量,延长生存期<sup>[22]</sup>。

肿瘤的生长转移与血管生成有关,VEGF 作为血管再生的关键因子,其促进血管形成的机制可能为增加血管通透性,导致血浆纤维蛋白外漏,促进巨噬细胞、纤维母细胞及内皮细胞生长;诱导降解基底膜,促进内皮细胞迁移和生长、诱导血管内皮细胞增殖<sup>[23-24]</sup>。因此,VEGF 在肿瘤生长和转移中起重要

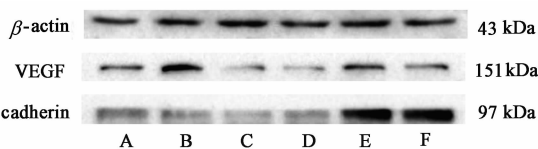


图 3 48 h EZW 对 HCT116 细胞 VEGF, E-cadherin 蛋白表达影响  
Fig. 3 Effect of EZW on expression of VEGF, E-cadherin in HCT116 cells

#### 4 讨论

结肠癌是常见的消化道疾病,其发病率呈不断上升趋势。目前,手术、放疗、化疗是西医治疗结肠癌的常用方法。奥沙利铂是继顺铂、卡铂之后的新型铂类抗肿瘤药物,其机制主要是与 DNA 形成加合物,阻碍 DNA 的转录和翻译,最终导致细胞凋亡<sup>[17]</sup>,目前已被广泛应用于晚期大肠癌的一线治疗及大肠癌术后辅助化疗中,但因其毒副作用大、患者对药物的耐药性、易复发、转移等缺点严重阻碍了治疗进程<sup>[18-19]</sup>。中医药因具有安全、有效、多靶点、多

作用。在 E-cadherin 与肿瘤关系的研究中发现, E-cadherin一方面可以使肿瘤细胞停滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期, 生长受到抑制;另一方面,它的缺失可以降低细胞间黏附强度,导致细胞运动性增加,最终导致癌细胞侵袭转移<sup>[25]</sup>。

本实验通过 Transwell 实验和细胞划痕实验探讨 EZW 药物血清对人属结肠癌 HCT116 细胞侵袭转移的作用,结果表明 EZW 能抑制结肠癌细胞侵袭转移,且能协同奥沙利铂达到最佳治疗效果。Western blot 结果表明,EZW 能下调 VEGF 的表达,协同 L-OHP 上调 E-cadherin 的表达,说明 EZW 能有效协同化疗药奥沙利铂抗结肠癌侵袭转移,其作用机制可能与下调 VEGF 蛋白,上调 E-cadherin 蛋白表达有关,同时证明了中西药结合疗效好的临床事实,但因中医药多靶点、多途径等作用,其具体分子生物学作用机制有待今后的深入挖掘。本实验的研究阐释了 EZW 抗结肠癌的机制,将为后续该方抗结肠癌的研究提供实验及理论依据,以冀指导临床用药,拓宽临床用途,为中医药防治结肠癌提供实验依据。

#### [参考文献]

[1] 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.

[2] Connell L C, Mota J M, Braghiroli M I, et al. The rising incidence of younger patients with colorectal cancer: questions about screening, biology, and treatment [J]. Curr Treat Options Oncol, 2017, 18(4):23.

[3] 伊日贵,徐晓艳,李时荣. 肿瘤侵袭转移机制研究进展[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2014,28(10):937-939.

[4] 段泽星,谢立群. VEGF 在肿瘤生长和血管生成中的作用 [J]. 世界华人消化杂志,2010,18(27):2894-2900.

[5] David J M, Rajasekaran A K. Dishonorable discharge: the oncogenic roles of cleaved E-cadherin fragments[J]. Cancer Res,2012,72(12):2917-2923.

[6] 闫冰,蔡秀江,姚卫峰,等. 二至丸保肝活性成分群对 CCl<sub>4</sub> 致小鼠急性肝损伤保护作用研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(9):1303-1306.

[7] 赵海梅,周步高,王馨,等. 二至丸预防和治疗性给药对大鼠损伤后肝细胞再生障碍的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(16):128-132.

[8] 胡科. 二至丸对骨质疏松性股骨颈骨折术后愈合及

髋关节功能的影响[J]. 现代中西医结合杂志,2017,26(4):384-386.

[9] 赵益,罗蓉,尚广彬,等. 二至汤含药血清对肿瘤细胞抑制作用的研究[J]. 新中医,2013,45(4):156-159.

[10] 郑里翔,张玉仁,邓科穗,等. 二至汤对阴虚阳虚荷瘤小鼠肿瘤生长的影响[J]. 陕西中医,2008,29(12):1678-1680.

[11] 尚广彬,曾莉萍,赵益,等. 二至丸对诱发性乳腺癌组织中 VEGF 和 MMP-9 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(13):270-273.

[12] 王国娟,余文燕. 大肠癌中医证型规律研究[J]. 中华中医药杂志,2016,31(3):837-840.

[13] 余文燕,王国娟,王桦影,等. 二至丸对结肠癌细胞增殖及凋亡作用的实验研究[J]. 中药药理与临床,2018,34(4):11-15.

[14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:861-862.

[15] 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.

[16] 张军平,张伯礼,山本清高. 中药药物血清的制作方法探讨[J]. 天津中医药,2004,21(4):274-276.

[17] Hato S V, Khong A, de Vries I J, et al. Molecular pathways: the immunogenic effects of platinum-based chemotherapeutics[J]. Clin Cancer Res,2014,20(11):2831-2837.

[18] 王浩,朱莹杰. 中医药防治奥沙利铂所致周围神经毒性研究进展[J]. 解放军医药杂志,2015,27(4):76-80.

[19] 刘海晔. 中药逆转肿瘤多药耐药性的研究进展[J]. 中草药,2015,46(7):1096-1102.

[20] YE L, JIA Y, JI K E, et al. Traditional Chinese medicine in the prevention and treatment of cancer and cancer metastasis [J]. Oncol Lett, 2015, 10(3):1240-1250.

[21] 朱文君,戴建国. 结肠癌的中医药治疗研究进展[J]. 吉林中医药,2013,33(5):535-537.

[22] 王馨,刘端勇,赵海梅,等. 二至丸临床应用综述[J]. 江西中医药,2015,46(4):67-70.

[23] 马莉. VEGF 及其受体的生物学特性及在肿瘤血管生成中的作用[J]. 中国优生与遗传杂志,2016,24(5):146-148.

[24] 张贵彪,朱元章,朱国福. 软坚散结颗粒对人胃腺癌 SGC-7901 细胞 EMT 的抑制作用及相关机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(18):112-117.

[25] 孙琳,张文静,吴靖芳. E-钙黏素、β-连环蛋白与肿瘤关系的研究进展[J]. 中国老年学杂志,2017,37(11):2832-2834.

[责任编辑 张丰丰]