

基于 Wnt 通路加味乌梅丸对结肠癌的抑制机制

张 然 李素娟 陈正彦 杨 坤

(河南中医药大学第一附属医院脾胃肝胆科, 郑州, 450000)

摘要 目的:探讨加味乌梅丸抑制结肠癌的效果并分析其作用机制。方法:选取 BALB/c 雄性小鼠 30 只,随机分为空白组、模型组和乌梅丸组,每组 10 只。其中空白组小鼠不接受干预措施,乌梅丸组进行乌梅丸煎剂灌胃处理,空白组及模型组接受等剂量生理盐水灌胃,均干预 28 d,观察肿瘤体积的变化、小鼠的体重及存活率、肿瘤组织 Wnt、JNK 水平变化。结果:模型组与乌梅丸组小鼠肿瘤体积较干预前均有增加的趋势,其中乌梅丸组增加的速度较慢,并在干预 28 d 后肿瘤组织有减小的趋势;干预 28 d 空白组小鼠体重与初始体重相近,模型组及乌梅丸组小鼠体重明显下降,其中模型组较乌梅丸组下降明显,差异有统计学意义($P < 0.05$);干预结束后模型组仅有 4 只小鼠存活,而乌梅丸组有 7 只小鼠存活,存活率差异有统计学意义($P < 0.05$)。模型组及乌梅丸组小鼠肿瘤组织 Wnt、JNK 蛋白及 mRNA 均过表达,其中模型组 Wnt、JNK 表达水平明显高于乌梅丸组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:加味乌梅丸具有明显抑制结肠腺瘤恶化作用,其抗肿瘤机制可能与抑制 Wnt 通路表达有关。

关键词 结肠癌;乌梅丸;肿瘤体积;Wnt 蛋白;JNK 蛋白;抗肿瘤;侵袭能力;疗效

Mechanism Exploration of Modified Wumei Boluses on Colon Cancer Inhibition via Wnt Pathways

Zhang Ran, Li Sujuan, Chen Zhengyan, Yang Kun

(Department of Spleen, Stomach, Liver and Gallbladder, Henan University
of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

Abstract Objective: To investigate the colon cancer inhibition of modified wumei boluses and to analyze some of the action mechanism. **Methods:** A total of 30 BALB/c male mice were randomly divided into blank group, model group and wumei boluses group, with 10 in each group. The mice of blank group did not accept intervention measures, and wumei boluses group had lavage treatment of wumei boluses decoction. Blank group and model group received isodose physiological saline lavage. All the groups had 28 d intervention. The changes of tumor volume, weight of mice and survival rate, concentration changes of Wnt, JNK in the tumor tissue were observed. **Results:** 1) the mice tumor volume increased in the model group and wumei boluses group than before the intervention, and the increase in the wumei boluses group was more slowly. The tumor tissue had a tendency to decrease after 28 d of intervention. 2) After 28 days of the intervention, the mice weight in the blank group was similar to the initial weight, and the mice weight of the model group and the wumei boluses decreased obviously. The decrease of model group was more significantly than that in the wumei boluses group ($P < 0.05$); After the intervention, only 4 mice survived in the model group, and 7 mice survived in the wumei boluses group. The survival rate differences between the two groups were statistically significant ($P < 0.05$). 3) Protein and mRNA of Wnt, JNK in mice tumor tissue of both the model group and wumei boluses group showed high expression, and expression levels of Wnt, JNK in the model group was obviously higher than that of wumei boluses group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The modified wumei boluses has obvious inhibitory effect on deterioration of colonic adenoma, and the mechanism of antitumor may related to the inhibition on the expression of Wnt pathways.

Key Words Colon cancer; Wumei boluses, Wnt; JNK; Antitumor; Invasiveness; Curative effect

中图分类号:R289.5;R735.3 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.08.038

结肠癌是临床常见的消化道恶性肿瘤,随着人们生活方式以及饮食结构的改变,结肠癌的发病率日益增加,发病年龄亦有年轻化趋势^[1-2]。有研究显示结肠癌从良性病变转变成癌前病变,最终发展成恶性病变过程中 Mnt 信号通路被异常激活^[3]。Mnt 信号通路与机体正常胚胎发育密切相关,该通路的标志蛋白相互影响,从而介导相关基因转录,是结肠

癌发生的关键因素之一,因此,抑制 Mnt 通路的活化是治疗结肠癌的靶方向。乌梅丸源自《伤寒论》,既往该方被视为此方为止痛安蛔的要方,随着医药研究的逐渐深入,有临床观察显示乌梅丸可明显改善结肠癌患者腹泻、便秘等症状,也有研究人员利用乌梅丸治疗胰腺癌后临床获益理想,生存期得到延长^[4],认为乌梅丸对消化道肿瘤的临床疗效值得肯

基金项目:河南省卫生厅 2013 年卫生政策研究课题计划(YWZY201312)

作者简介:张然(1983.09—),男,研究生,主治医师,中医药防治胃肠道肿瘤,E-mail:zhnagran1983926@163.com

通信作者:李素娟(1962.06—),女,本科,主任医师,中医药防治胃肠病,E-mail:LSJ8788@sina.com

定。本研究探讨乌梅丸治疗消化道恶性肿瘤的作用机制是否是通过 Mnt 信号通路进行桥接。我们制备结肠癌动物模型,利用乌梅丸进行干预,通过 Western blotting 及 PCR 法对 Mnt 信号通路上的标志蛋白进行检测,探析乌梅丸治疗结肠癌的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 选取 SPF 级昆明雄性小鼠 30 只,体重 18 ~ 24 g,平均体重 (17.26 ± 1.52) g,鼠龄 2 ~ 4 个月,平均鼠龄 (2.48 ± 0.36) 个月,由本院附属中医药大学实验动物中心提供,并在该动物中心 SPF 级饲养,饲养温度 23 ~ 25 ℃,平均饲养温度 (14.41 ± 1.41) ℃。将 30 只小鼠随机分为空白组、模型组及乌梅丸组,每组 10 只。3 组小鼠在体重、鼠龄等一般情况比较,差异无统计学意义 (P > 0.05),具有可比性。

1.1.2 药物 加味乌梅丸,药物组成:乌梅 50 g、当归 20 g、细辛 3 g、川椒 6 g、桂枝 10 g、黄连 3 g、黄柏 10 g、党参 10 g、干姜 10 g、制附片 10 g、白芍 30 g、生黄芪 30 g、炒枳壳 10 g、木香 10 g。上述中药饮片购自北京华邈中药工程技术开发中心,本院药剂科制备,常规水煎煮后用水浴浓缩并置于 4 ℃ 环境保存备用。

1.1.3 试剂与仪器 10% 水合氯醛 (天津市光复精细化工研究所),SDS-PAGE 电泳胶 (北京碧云天生物技术有限公司),Trizol (美国 Invitrogen 公司),逆转录试剂盒 (美国 Promega 公司),- actin、Wnt、JNK 一抗和碱性磷酸酶标记山羊抗兔 (美国 CST 公司),PCR 引物 (上海生工生物工程有限公司),BCA 蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、超敏 ECL 化学发光试剂盒 (北京碧云天生物技术有限公司),聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜 (美国 Millipore 公司),RPMI1640 完全培养液 (美国 Hyclone 公司),BALB/c 小鼠来源的 CT26 细胞株 (韩国 he Korean Cell Line Bank)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 将购买的 CT26 细胞于 RPMI1640 完全培养液中培养并调整密度为 2 × 10³ μ/L,后将 CT26 细胞注射于小鼠右前腋下部位。空白组小鼠不接受模型制备,当小鼠肿瘤直径 4 ~ 5 mm 时随机分为模型组及乌梅丸组,每组 10 只^[5]。

1.2.2 干预方法 乌梅丸组小鼠予 10 mg/(kg · d) 乌梅丸汤剂进行灌胃,1 次/d。空白组及模型组小鼠接受相同剂量生理盐水进行灌胃,连续灌胃 28 d。

1.2.3 检测指标与方法

1) 肿瘤体积、体重及存活率的变化:注射前、注射后每隔 3 d 测量一次肿瘤体积,利用游标尺作为测量工具,以 (长 × 宽²) × 2 视为肿瘤体积计算公式。小鼠的体重变化率 = (当前质量 - 初始质量) × 100%。存活率 = (当前小鼠数量/初始小鼠数量) × 100%。

2) Western blotting 检测肿瘤组织 Wnt、JNK 的蛋白水平:每组随机选择 3 只小鼠脱颈处死后,剪取肿瘤组织 100 mg 置于离心管中,空白组小鼠取相同部位组织相同质量进行观察,根据不同组织质量加入相应的裂解液,放置于 4 ℃ 进行匀浆处理后设置 15 000 r/min 转速进行离心,用移液枪抽吸上清液,使用 BCA 试剂盒对 25 μL 上清液进行蛋白浓度测定,同时计算上样量。完成上述步骤后以 4:1 的比例往上清液中样缓冲液,将混合液置于 100 ℃ 金属浴锅中进行蛋白变性 7 min。根据碧云天 BCA 试剂盒说明书配制胶体 (6% 浓缩胶,12% 分离胶),将事先计算好每组上样量将标本加入胶体中 60 V 进行电 145 min 后将胶体上的蛋白转印至 PVDF 膜中,再用丽春红进行 PVDF 膜染色观察蛋白是否顺利转印至 PVDF 膜中。用 TBST 将脱脂奶粉配制成 5% 浓度,将转印后目的蛋白的 PVDF 膜进行封闭 2 h,随后用 TBST 进行洗涤 3 次,1 min/次。将 PCDF 膜置于化学发光成像仪上,滴入 ECL 发光液显影,随后进行数据读取。

3) PCR 法检测肿瘤组织 Wnt、JNK 的 mRNA 水平变化:每组随机选择 3 只小鼠脱颈处死后,剪取肿瘤组织 100 mg 置于离心管中,加用液氮后研磨成碎块,加入 1 mL Trizol 充分反应后按照说明书进行总 RNA 的提取,并测定总 RNA 水平,利用 PT-RNA 两步法的操作说明将 mRNA 逆转录成 cDNA,以该 cDNA 为扩增模板进行 Wnt、JNK、GAPDH 指标的扩增。转录过程:5 ℃ (6 min) - 55 ℃ (90 s) - 72 ℃ (90 s) - 72 ℃ (10 min) - 5 ℃ (1 h)。具体引物序列参见表 1。

表 1 指标引物序列

引物	序列 (5'→3')
Wnt	上游 GGAAGACCATGTGGACCTGT
	下游 GGATTAGGGCTTCCTCTTGG
JNK	上游 GCTGGAGAGGCTGCCAAGTTT
	下游 AGGTCCCGCTGTTGCTGTTGTA
GAPDH	上游 ACGGCAAGTCAACGGCACAG
	下游 GAAGACGCCAGTAGACTCCACGAC

表 2 2 组小鼠肿瘤体积比较($\bar{x} \pm s, \text{mm}^3$)

组别	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
模型组	0	38. 14 ± 4. 26	169. 28 ± 12. 84	893. 41 ± 21. 42	1624. 24 ± 45. 23
乌梅丸组	0	40. 26 ± 3. 98	90. 28 ± 9. 24 *	332. 49 ± 12. 42 *	201. 35 ± 8. 78 *

注:与模型组同期比较, * $P < 0. 05$

表 3 3 组小鼠肿瘤体积比较($\bar{x} \pm s, \text{mm}^3$)

组别	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
模型组	20. 31 ± 0. 76	16. 27 ± 0. 16 *	12. 02 ± 0. 83 *	10. 25 ± 0. 42 *	8. 22 ± 0. 27 *
乌梅丸组	19. 88 ± 0. 89	17. 02 ± 0. 11	15. 42 ± 0. 34 * Δ	13. 44 ± 0. 61 * Δ	15. 27 ± 0. 78 * Δ
空白组	20. 14 ± 0. 83	19. 92 ± 0. 91	20. 22 ± 0. 79	19. 98 ± 0. 28	19. 95 ± 0. 36

注:与空白组同期比较, * $P < 0. 05$;与模型组同期比较, $P < 0. 05$

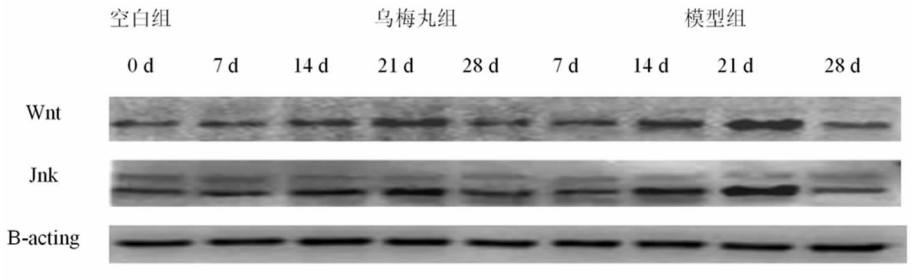


图 1 3 组 Wnt 及 JNK 的蛋白表达

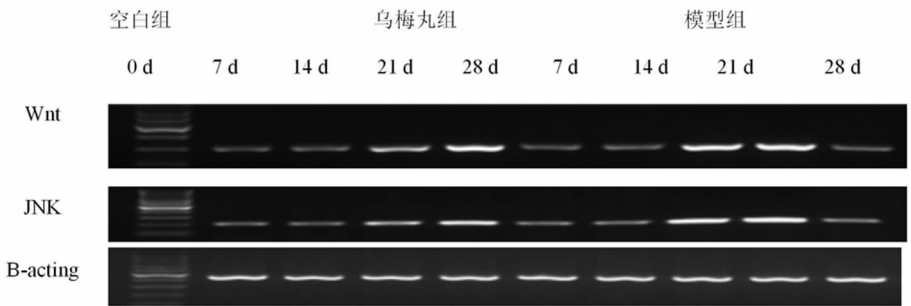


图 2 3 组 Wnt 及 JNK 的 mRNA 表达

1.3 统计学方法 采用 SPSS 9.0 统计软件进行数据处理。其中呈正态分布的计量数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组比较用 t 检验,多组采用多因素方差分析,以 $P < 0. 05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组肿瘤体积比较 模型组与乌梅丸组小鼠肿瘤体积较干预前均有增加的趋势,其中乌梅丸组增加的速度较慢,并在干预 28 d 后肿瘤组织有减小的趋势。见表 2。

2.2 3 组小鼠体重比较 干预 28 d 空白组小鼠体重与初始体重相近,模型组及乌梅丸组小鼠体重明显下降,其中模型组较乌梅丸组下降明显($P < 0. 05$)。见表 3。

2.3 3 组存活率比较 干预结束后空白组所有小鼠均存活,模型组仅有 4 只小鼠存活,存活率 40%,而乌梅丸组有 7 只小鼠存活,存活率 70%,差异有

统计学意义($\chi^2 = 3. 24, P < 0. 05$)。

2.4 3 组大鼠 Wnt、JNK 蛋白比较 模型组及乌梅丸组小鼠肿瘤组织 Wnt、JNK 蛋白及 mRNA 均出现过表达,其中模型组 Wnt、JNK 表达水平明显高于乌梅丸组($P < 0. 05$)。见图 1、图 2。

3 讨论

结肠癌最为临床常见的恶性消化道肿瘤,结肠癌在我国的发病率逐年上升,且发病年龄呈年轻化趋势,其中位发病年龄较欧美国家提前了近 10 年之多,这一数据引起了我国相关医务工作者及科研人员的广泛关注^[6]。随着结肠镜在临床的普遍使用,结肠癌的发现率较前远远提高,但其死亡率仍远远高于其他种类的肿瘤,其中转移性结肠癌虽然在一定时间段内可进行切除治疗,但是术后复发、转移仍是治疗失败的主要原因。目前多数抗癌药物主要是延缓肿瘤的生长,无法抑制其增长,当肿瘤体积逐渐

增大导致肠道梗阻后临床多数无更为有效的办法,最终导致患者死亡。有研究人员曾经利用肠管内支架植入以期缓解肠道局部梗阻,但此方法将影响肠道蠕动,难以达到治疗期望值。因此,探索新的有效的临床方法,减轻结肠癌的病情,延长患者生存时间是目前临床探索的需求。

乌梅丸源自医圣张仲景之《伤寒论·辨厥阴病脉证并治》,主要用于治疗蛔厥证,书中认为“厥阴之为病,消渴,气上撞心,心中疼热,饥而不欲食,食则吐衄。下之利不止”,而结肠癌存在的腹胀、消化不良、腹痛、乏力、消瘦均与蛔厥证的临床表现符合,故使用乌梅丸治疗结肠癌具有一定的理论依据。本研究在清上热温下寒的乌梅丸基础上加用白芍、生黄芪、炒枳壳、木香。方中乌梅为君药,取酸能安蛔之功,肠寒则蛔动更甚,腹痛加剧,加川椒、细辛辛温伏蛔,并驱寒温下;黄连、黄柏苦寒,清解因蛔虫上扰,气机逆乱所致之内热;附子、干姜、桂枝皆为温热之品,可增强散寒温脏之功;当归、党参补益气血,白芍与当归合用可敛阴缓中止痛,加黄芪可助党参益气生血,枳壳、木香加强理气以止痛。中医学认为肿瘤的发生发展虽病因多样,但正气的盛衰是取决于肿瘤转归的主导因素,正气盛则机体可有力抵御病邪,具有正常的自然修复力。现代药理证实黄芪、党参药用成分具有极强的抗肿瘤效应,桂枝提取物亦在动物实验中被证实具有抑制癌细胞增殖的效果^[7-8]。故我们认为加味乌梅丸用于结肠癌有一定的临床基础。本研究数据显示,加味乌梅丸不论是在抑制小鼠肿瘤体积方面,还是提高体重及存活率方面均有明显的优势,这证实了加味乌梅丸确有理想的抗肿瘤效果。

在对其作用机理进一步探讨时我们检测了小鼠肿瘤组织 Wnt 信号通路的标志性因子,Wnt/JNK 通路在机体胚胎阶段已参与细胞骨架的重排过程,与原肠胚的形成关系密切^[9-12]。JNK 是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,广泛分布于哺乳动物全身组织,对细胞生长、分化、凋亡以及癌基因的转化都有参与调控^[13-16],JNK 在多数恶性肿瘤组织中均过表达,通过干扰 JNK 或沉默 JNK 基因可明显减弱癌细胞的体外迁移及侵袭力,因此抑制 JNK 的表达是抑制癌细胞运动及侵袭力的靶方向。本研究数据显示,加味乌梅丸可明显抑制结肠癌模型小鼠 Wnt、JNK 表达,

我们认为这是加味乌梅丸抗癌的主要机制之一。此外,本研究利用 Western blotting 检测肿瘤组织相关蛋白因子的变化,仅仅是半定量观察,且无法观察各因子在细胞或组织内的定位变化,下阶段将增加形态学的检查进一步研究加味乌梅丸的作用机制。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部. 中国卫生统计年鉴 2012 [M]. 北京:中国协和医科大学出版社,2012:54.
- [2] 陈琼,刘志才,程兰平,等. 2003 ~ 2007 年中国结直肠癌发病与死亡分析[J]. 中国肿瘤,2012,21(3):179-182.
- [3] Snover DC. Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma [J]. Hum Pathol,2011,42(1):1-10.
- [4] 黄金昶,徐林. 加味乌梅丸治疗胰腺癌 21 例疗效观察[J]. 中国临床医生,2012,40(11):52-55.
- [5] Luo X,Yu Y,Liang A,et al. Intratumoral expression of MIP-1beta induces antitumor responses in a pre-established tumor model through chemoattracting T cells and NK cells[J]. Cell Mol Immunol,2004,1(3):199-204.
- [6] 顾康,殷广福,许正昌. 大肠癌侵袭转移机制研究进展[J]. 临床肿瘤学杂志,2001,6(2):183-186.
- [7] 张惠子,黄金昶. 加味乌梅丸改善荷胰腺癌小鼠恶病质状态的实验研究[J]. 现代肿瘤医学,2018,26(3):328-331.
- [8] 张慧子. 乌梅丸加减方对裸鼠胰腺癌移植瘤生长的抑制及诱导细胞凋亡的实验研究[M]. 北京:北京中医药大学,2011:51-52.
- [9] 刘芳,谢鸣,朱丽瑶. 乌梅丸现代主治病证的研究[J]. 北京中医药大学学报:中医临床版,2011,18(4):37-40.
- [10] Velasco J,Zarrabeitia MT,Prieto JR,et al. Wnt pathway genes in osteoporosis and osteoarthritis:differential expression and genetic association study[J]. Osteoporos Int,2010,21(1):109-118.
- [11] Clément G,Guilleret I,He B,et al. Epigenetic alteration of the Wnt inhibitory factor-1 promoter occurs early in the carcinogenesis of Barrett's esophagus[J]. Cancer Sci,2008,99(1):46-53.
- [12] 张晓云. Oct4 与 Wnt/ β -catenin 信号通路在结直肠癌中的表达及与患者预后的关系[D]. 石家庄:河北医科大学,2014.
- [13] 林绪涛,范德军,何晓生,等. 结直肠癌预后相关分子生物学指标研究现状[J]. 中国实用外科杂志,2014,34(09):890-894.
- [14] 王灿阳,邹德龄,刘维波. 结直肠癌转移相关基因在患者预后评判中的价值[J]. 中华结直肠疾病电子杂志,2014,3(1):35-37.
- [15] Ma CY, Ji WT, Chueh FS, et al. Butein inhibits the migration and invasion of SK-HEP-1 human hepatocarcinoma cells through suppressing the ERK, JNK, p38, and uPA signaling multiple pathways [J]. J Agric Food Chem,2011,59(16):9032-9038.
- [16] 刘佳,张明娟,朱琴梅,等. Wnt/ β -catenin 信号通路在肝癌发病机制中作用的研究[J]. 胃肠病学和肝病杂志,2014,23(9):994-997.

(2017-10-20 收稿 责任编辑:杨觉雄)