

香砂六君子汤对结肠癌荷瘤裸鼠的调控作用*

包益洁¹, 高菲¹, 王东毅¹, 陈进宝², 吴宏磊², 贾琳琳²

1. 上海中医药大学附属普陀医院, 上海 200062; 2. 上海中医药大学, 上海 200120

摘要: 目的: 探讨香砂六君子汤对结肠癌荷瘤裸鼠的调控作用。方法: 将裸鼠接种小鼠结肠癌细胞株 CT26 复制肿瘤模型, 将建模成功者按随机数字表分为 5 组, 即模型组、阳性组 (奥沙利铂, $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 及香砂六君子汤低、中、高剂量组 ($5.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $10.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $21.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。阳性组尾静脉注射给药, 其余组大鼠灌胃方式给药, 模型组给予相同体积的生理盐水, 连续给药 4 周。称量裸鼠的肿瘤质量并计算抑瘤率; HE 染色观察肿瘤组织病理学变化; 流式细胞术检测细胞增殖指数 (proliferation index, PI)、凋亡率变化; RT-PCR 法测定裸鼠肿瘤组织 *PI3K* mRNA、*Akt* mRNA、*Bcl-2* mRNA、*Bax* mRNA、*Caspase3* mRNA 水平; Western Blot 法检测裸鼠肿瘤组织 p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、Bcl-2、Bax、Cleaved-Caspase3、Capase3 蛋白表达。结果: 与模型组比较, 香砂六君子汤低、中、高剂量组及阳性组裸鼠的肿瘤质量显著降低 ($P < 0.05$) 抑瘤率显著升高 ($P < 0.01$); 裸鼠肿瘤细胞 PI、凋亡率显著升高 ($P < 0.01$); 可显著升高 *Bax* mRNA、*Caspase3* mRNA 水平, 降低 *Bcl-2* mRNA 水平, 显著降低 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、Bcl-2/Bax、Cleaved-Caspase3/Capase3 水平 ($P < 0.01$)。结论: 香砂六君子汤可抑制结肠癌荷瘤裸鼠肿瘤生长, 其机制可能与促进细胞凋亡有关。

关键词: 香砂六君子汤; 结肠癌; 细胞增殖; 细胞凋亡; 大鼠

DOI: 10.16368/j.issn.1674-8999.2021.10.452

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-8999(2021)10-2159-07

Regulating Effect of Xiangsha Liujunzi Decoction on Colon Cancer Bearing Nude Mice

BAO Yijie¹, GAO Fei¹, WANG Dongyi¹, CHEN Jinbao², WU Honglei², JIA Linlin²

1. Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai China 200062; 2. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai China 200120

Abstract: Objective: To investigate the regulating effect of Xiangsha Liujunzi Decoction on colon cancer-bearing nude mice. Methods: Nude mice were inoculated with the mouse colon cancer cell line CT26 to replicate the tumor model, and the successful models were divided into 5 groups according to a random number table: the model group, the positive group (oxaliplatin, $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and Xiangsha Liujunzi Decoction low ($5.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), medium ($10.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and high ($21.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) dose groups. The positive group was given by tail vein injection, and the rest of the rats were given by gavage. The model group was given the same volume of saline. The administration was continued for 4 weeks. Weigh the tumor mass of nude mice and calculate the tumor inhibition rate. And observe the histopathological changes of the tumor and detect the changes in cell proliferation index (PI) and apoptosis rate. And the *PI3K* mRNA, *Akt* mRNA and *Bcl-2* mRNA, *Bax* mRNA, *Caspase3* mRNA levels of tumor tissue in nude mice were determined by RT-PCR; The expression of p-PI3K, PI3K, p-Akt, Akt, Bcl-2, Bax, Cleaved-Caspase3, Capase3 protein in tumor tissues of nude mice was detected by Western Blot method. Results: Compared with the model group, the tumor weight of the nude mice in the low, medium and high dose groups of Xiangsha Liujunzi Decoction and the positive group was significantly reduced, and the tumor inhibition rate was significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the nude mouse tumor cells PI and apoptosis rate also increased significantly ($P < 0.01$). And it can significantly increase the level of *Caspase3* mRNA, and significantly reduce the level of p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, Bcl-2/Bax, Cleaved-Caspase3/Capase3 ($P < 0.01$). Conclusion: Xiangsha Liujunzi Decoction

* 基金项目: 上海市自然科学基金资助项目(19ZR1447800)

can inhibit tumor growth in nude mice bearing colon cancer, which may be related to the promotion of apoptosis.

Key words: Xiangsha Liujunzi Decoction; colon cancer; proliferation; apoptosis; rat

结肠癌是指起源于结肠黏膜上皮的恶性肿瘤。调查显示,我国结肠癌发病率位居消化道肿瘤的第3位,且其发病率逐年增长,5年生存率为50%~60%^[1]。但是目前部分结肠癌患者就诊时已处于中晚期,常规放化疗、靶向治疗等综合疗效均不甚理想,患者预后差,远期生存率低^[2]。香砂六君子汤出自《古今名医方论》,具有益气化痰、理气畅中的功效。研究发现,香砂六君子汤可提升大肠癌术后化疗患者的生存质量^[3]。另有报道,香砂六君子汤配合化疗有助于减轻结肠癌患者的临床症状,较单纯化疗患者效果更佳^[4]。PI3K/Akt是调控结肠癌细胞增殖、分化和迁移的经典信号通路,阻断该通路可抑制人结肠癌细胞株的增殖^[5-6]。Bcl-2/Bax通路是调控细胞凋亡程序的常见通路,可诱发线粒体途径所致的细胞凋亡,进而提高人结肠癌细胞株的凋亡率^[7-8]。但香砂六君子汤对结肠癌肿瘤生长的具体作用机制尚不清楚,是否能通过调控PI3K/Akt、Bcl-2/Bax信号通路抑制恶性肿瘤细胞增殖、促进其凋亡也未明确。鉴于此,本研究旨在为香砂六君子汤辅助结肠癌抗肿瘤治疗的应用奠定基础。

1 材料

1.1 动物与细胞 50只BALB/c裸鼠,雌雄各半,4~6周龄,体质量18~22g,清洁级,购自中国科学院上海药物研究所,生产许可证号:SCXK(沪)2019-0001。适应性喂养1周,12h光照12h黑暗,温度18~22℃,相对湿度50%~60%。伦理批号:SHUTCM20190204。

小鼠结肠癌细胞株CT26(中国科学院上海生科院细胞资源中心,货号:031516802),置于37℃、5%CO₂的培养箱培养。

1.2 药物与试剂 香砂六君子汤(由人参3g,白术6g,茯苓6g,炙甘草2g,陈皮2.5g,半夏3g,木香2g,砂仁2.5g,生姜6g组成,福州同春医药有限公司,批号:20180415、20180613、20180911、20190212、20190123、20190105、20190114、20180905、20180724);奥沙利铂[齐鲁制药(海南)有限公司,批号:A131104]。RPMI 1640培养基、配套培养液(美国Gibco公司,货号:G1216117、G1216138);苏木素-伊红(hematoxylin eosin, HE)染色试剂盒(武汉博士

德生物科技有限公司,批号:181204A);Trizol试剂盒(美国Invitrogen公司,批号:T20180315C);BCA蛋白定量试剂盒(美国Invitrogen公司,批号:B20180427B);PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、Bcl-2、Bax、Caspase3、Cleaved-Caspase3、单克隆抗体(美国Sigma公司,批号:180617、180712、180715、180622、180913、180423、180719)。

1.3 仪器 游标卡尺(日本Mitutoyo公司,量程:0~200mm,精确度:0.01mm);ACS-15型电子天平(德国Sartorius公司);CX-41型光镜(日本Olympus公司);FC500型流式细胞仪(美国Beckman公司);QPK212型聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)仪(日本Toyobo公司)。

2 方法

2.1 建模、动物分组及药物干预 RPMI培养基(含10%小牛血清+1%L-谷氨酰胺+1%青霉素+1%链霉素)培养小鼠结肠癌细胞株CT26,待贴壁后用0.25%胰蛋白酶消化,离心并弃去消化液,调整细胞浓度至 $5 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 。取细胞悬液在裸鼠颈部背侧皮下接种,每只0.2mL,10d后游标卡尺测量肿瘤短径,若 $>0.4 \text{ cm}$ 则认为建模成功。将建模成功者按随机数字表分为5组,即模型组、阳性组(奥沙利铂 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)及香砂六君子汤低、中、高剂量组($5.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $10.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $21.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。阳性组尾静脉注射给药,其余组大鼠灌胃给药。每天1次,共4周。

2.2 对裸鼠的肿瘤质量及抑瘤率的影响 干预后颈椎脱臼法处死裸鼠,迅速、完整剥离肿瘤组织,称量肿瘤质量,计算抑瘤率。

抑瘤率 = (给药组肿瘤质量 - 空白组肿瘤质量) / 给药组肿瘤质量 $\times 100\%$

2.3 观察肿瘤组织病理学变化 取肿瘤组织,固定、脱水、透明、包埋、修剪并连续切片,厚4 μm 。苏木精染色5min后流水冲洗5min,1%盐酸乙醇分化30s,流水冲洗30s;0.5%伊红染色3min,蒸馏水冲洗30s,梯度浓度乙醇洗脱,二甲苯处理,中性树脂封固。在高倍光镜下观察病理学变化。

2.4 检测细胞增殖指数(proliferation index, PI)、凋亡率变化 取约15g肿瘤组织制成单细胞悬液,

调整细胞浓度 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 4°C 70% 乙醇固定。加 Solution A 125 μL , 10 min 后加 Solution B 100 μL , 10 min 后加 Solution C 100 μL , 置冰避光下静置 10 min。流式细胞仪测定细胞 PI。采用钙离子依赖性磷脂结合蛋白 - V (calcium dependent phospholipid binding protein Annexin V, Annexin V) - 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染色, 上机, 测凋亡率。

$$\text{PI} = (S + G_2M) / (G_0/G_1 + S + G_2M) \times 100\%$$

2.5 检测肿瘤组织 PI3K/Akt、Bcl - 2/Bax 通路相关基因表达 取肿瘤组织 1 mm^3 研磨匀浆, 采用 Trizol 试剂盒提取总 RNA, 模板为六聚体引物和逆转录酶, 对 PI3K mRNA、Akt mRNA、Bcl - 2 mRNA、Bax mRNA、Caspase3 mRNA 检测。PI3K 上游引物: 5' - ATCGCTAGAGCTAGAGCTAGCTAG - 3', 下游引物: 5' - TCGATAGCTATATTAAGCGAGAGA - 3', 片段长度 312 bp; Akt 上游引物: 5' - TCGATAGCTAAGC-TATAGCTAGAT - 3', 下游引物: 5' - AGC-CGCGAGAGCTAGAGATTTAG - 3', 片段长度 326 bp; Bcl - 2 上游引物: 5' - TCGCTCTCGCTAT-AGCTAGACTAG - 3', 下游引物: 5' - TCGCTCGAG-TATGTAGCTAGTCAA - 3', 片段长度 410 bp; Bax 上游引物: 5' - TCGCGCTAGAGAGCTAGAGCTAG - 3', 下游引物: 5' - ACAAACCAAACGCGCGGAGAGA - 3', 片段长度 308 bp; Caspase3 上游引物: 5' - TC-GATATATGTTTTGTTGTTGTCGC - 3', 下游引物: 5' - CGCTCGCTCGCGAGAGCTAGAGC - 3', 片段长度 308 bp; β - actin 上游引物: 5' - TGAGATCG-AGAGAGCTCTTCTCGC - 3', 下游引物: 5' - CGCGC-TCGAGAGCTAGAGGCTCGA - 3', 片段长度 300 bp。反应条件: 94°C (3 min)、 94°C (1 min)、 55°C (1 min), 共 30 个循环, 最后 72°C (1 min)。对产物电泳, Image - Pro PLUS 图像分析软件分析, 目的基因的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

2.6 检测肿瘤组织 PI3K/Akt、Bcl - 2/Bax 通路相关蛋白表达 取肿瘤组织 1 mm^3 剪碎、匀浆、研磨后加裂解液, $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液采用 BCA 蛋白定量试剂盒对总蛋白定量, 转膜、封闭。加入一抗 4°C 过夜孵育; 加入二抗, 室温孵育 2 h; 洗膜, 发光液处理; 曝光、显影和定影。分析计算目的蛋白表达, 其中内参为 β - actin。

2.7 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析, 数据以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 描述, 计量资料经检验均符合正态分布且方差齐, 其中多组间比

较采用单因素方差分析, 两组间对比以 SNK - q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对裸鼠的肿瘤质量和抑瘤率的影响 共 49 只裸鼠建模成功, 模型组 9 只, 其余各 10 只, 灌胃治疗期间香砂六君子汤高剂量组有 1 只裸鼠由于操作不甚刺破食管死亡。与模型组比较, 香砂六君子汤中、高剂量组及阳性组裸鼠的肿瘤质量极显著降低, 抑瘤率极显著升高 ($P < 0.01$); 与阳性组比较, 香砂六君子汤高剂量组裸鼠的肿瘤质量显著降低, 抑瘤率极显著升高 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 干预后各组肿瘤质量和抑瘤率对比 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	肿瘤质量(m/g)	抑瘤率/%
模型组	9	1.58 \pm 0.20	0
阳性组	10	0.75 \pm 0.15**	52.53 \pm 9.17**
香砂六君子汤低剂量组	10	1.02 \pm 0.17	35.44 \pm 4.01
香砂六君子汤中剂量组	10	0.74 \pm 0.16**	53.16 \pm 9.62**
香砂六君子汤高剂量组	9	0.50 \pm 0.09***##	68.35 \pm 11.33***##

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与阳性组比较, ## $P < 0.01$

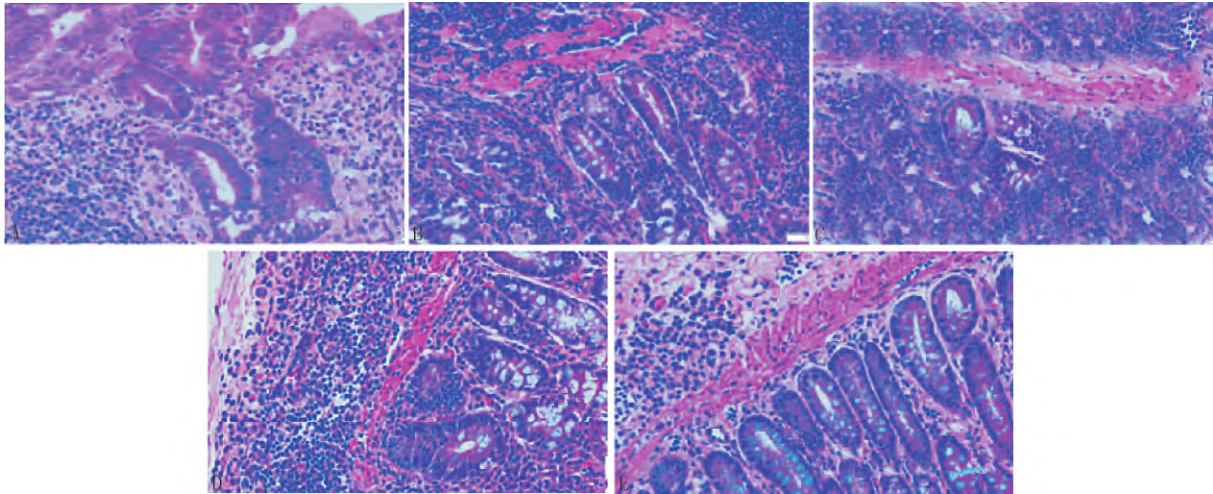
3.2 裸鼠肿瘤组织病理学变化 模型组裸鼠肿瘤组织结肠腺体排列紊乱, 几乎无杯状细胞, 细胞层次紊乱且拥挤, 大量炎症细胞浸润; 香砂六君子汤低剂量组裸鼠肿瘤组织结肠腺体紊乱排列, 少量杯状细胞, 细胞层次紊乱, 有炎症细胞浸润; 香砂六君子汤中剂量组和阳性组裸鼠肿瘤组织部分结肠腺体紊乱排列, 有杯状细胞, 部分细胞层次紊乱, 有部分炎症细胞浸润; 香砂六君子汤高剂量组裸鼠肿瘤组织结肠腺体形态轻度不规则, 有部分杯状细胞, 细胞层次清晰, 少量炎症细胞浸润。见图 1。

3.3 对裸鼠肿瘤细胞 PI、凋亡率的影响 与模型组比较, 香砂六君子汤低、中、高剂量组及阳性组裸鼠肿瘤细胞 PI、凋亡率极显著升高 ($P < 0.01$); 与阳性组比较, 香砂六君子汤高剂量组裸鼠肿瘤细胞 PI、凋亡率极显著升高 ($P < 0.01$)。见表 2、图 2 - 图 3。

表 2 各组细胞 PI、凋亡率对比 ($\bar{x} \pm s$)

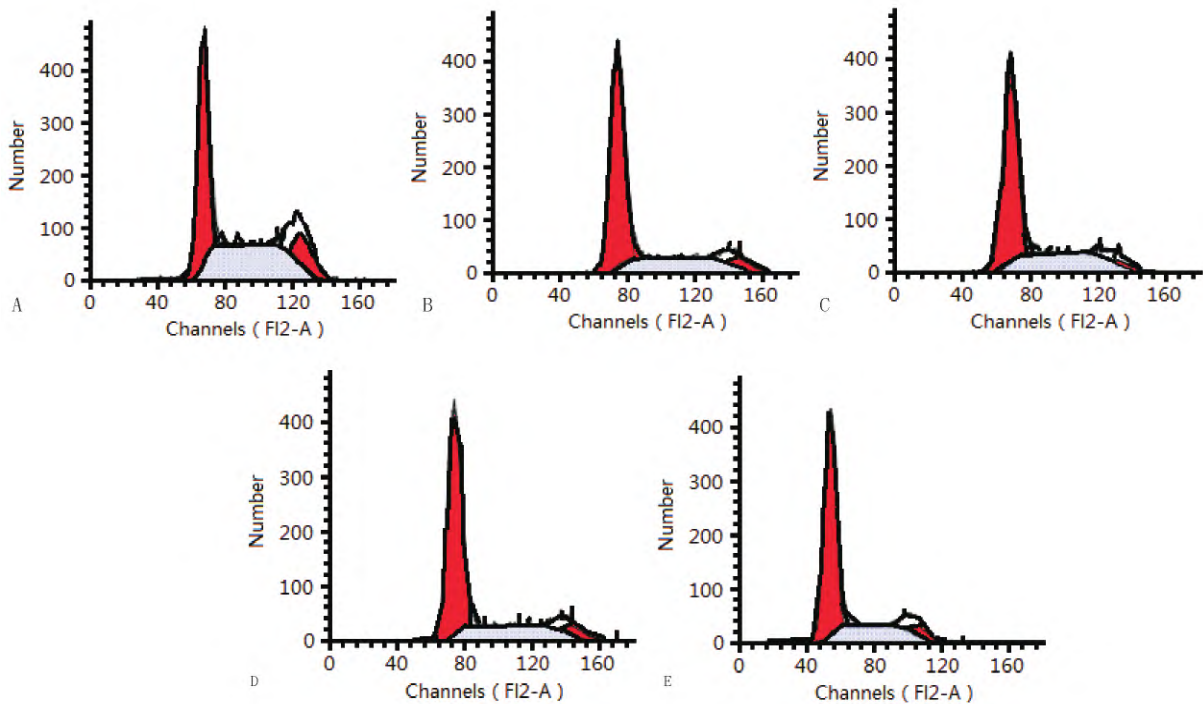
组别	n	PI/%	凋亡率/%
模型组	3	5.69 \pm 0.15	3.53 \pm 0.58
阳性组	3	32.86 \pm 5.89**	28.80 \pm 4.15**
香砂六君子汤低剂量组	3	22.43 \pm 4.15**	18.97 \pm 3.12**
香砂六君子汤中剂量组	3	33.07 \pm 6.15**	28.56 \pm 4.07**
香砂六君子汤高剂量组	3	42.88 \pm 7.10***##	45.37 \pm 5.88***##

注: 与模型组比较, ** $P < 0.01$; 与阳性组比较, ## $P < 0.01$



注: A: 模型组; B: 阳性组; C: 香砂六君子汤低剂量组; D: 香砂六君子汤中剂量组; E: 香砂六君子汤高剂量组

图1 各组肿瘤组织病理学变化观察(HE染色, ×400)

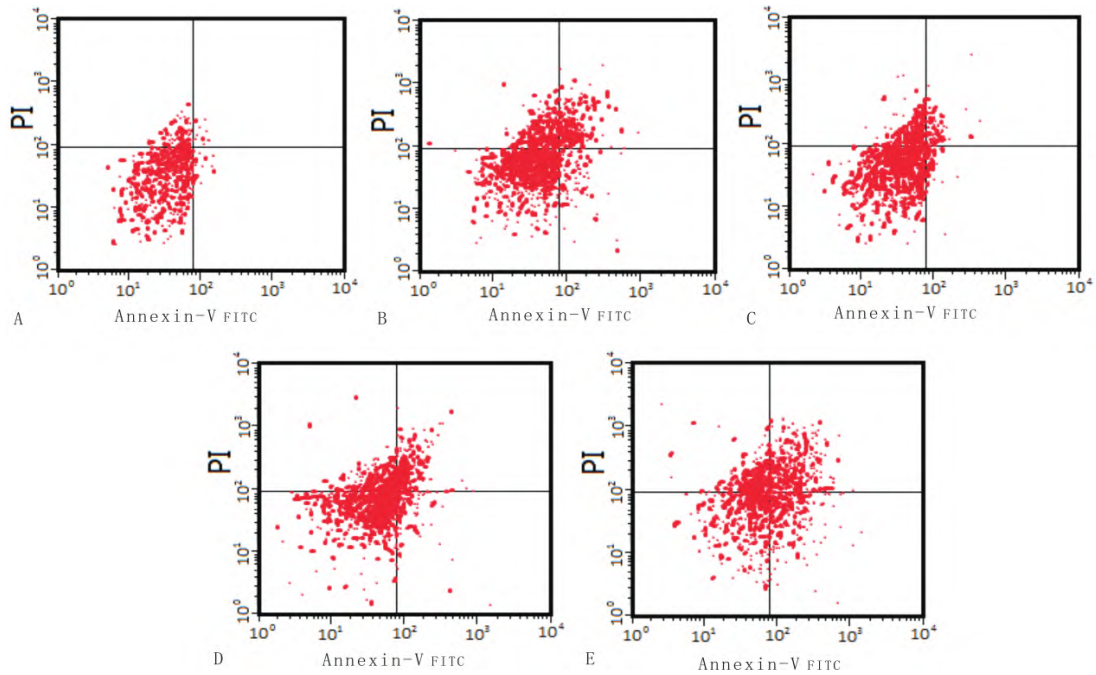


注: A: 模型组; B: 阳性组; C: 香砂六君子汤低剂量组; D: 香砂六君子汤中剂量组; E: 香砂六君子汤高剂量组

图2 各组细胞PI检测图(流式细胞仪检测)

3.4 对裸鼠肿瘤组织 PI3K/Akt、Bcl-2/Bax 通路相关基因表达的影响 各组肿瘤组织 *PI3K* mRNA、*Akt* mRNA 水平差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)；与模型组比较，香砂六君子汤低、中、高剂量组及阳性组裸鼠肿瘤组织 *Caspase3* mRNA、*Bax* mRNA 水平显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，*Bcl-2* mRNA 水平显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)；与阳性组比较，香砂六君子汤高剂量组 *Bcl-2* mRNA 水平显著降低，*Bax* mRNA、*Caspase3* mRNA 水平显著升高 ($P < 0.05$)。见表3。

3.5 对裸鼠肿瘤组织 PI3K/Akt、Bcl-2/Bax 通路相关蛋白表达的影响 与模型组比较，香砂六君子汤低、中、高剂量组及阳性组裸鼠肿瘤组织 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、Bcl-2/Bax、Cleaved-Caspase3/Caspase3 水平显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)；与阳性组比较，香砂六君子汤高剂量组裸鼠肿瘤组织 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、Bcl-2/Bax、Cleaved-Caspase3/Caspase3 水平显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表4、图4。



注: A: 模型组; B: 阳性组; C: 香砂六君子汤低剂量组; D: 香砂六君子汤中剂量组; E: 香砂六君子汤高剂量组

图3 各组裸鼠肿瘤细胞流式图

表3 各组肿瘤组织 PI3K/Akt、Bcl-2/Bax 通路相关基因表达对比

组别	n	PI3K mRNA	Akt mRNA	Bcl-2 mRNA	Bax mRNA	Caspase 3 mRNA
模型组	8	0.68 ± 0.15	0.77 ± 0.14	1.15 ± 0.20	0.42 ± 0.08	0.56 ± 0.11
阳性组	10	0.70 ± 0.14	0.75 ± 0.17	0.72 ± 0.14**	0.72 ± 0.14**	0.78 ± 0.12**
香砂六君子汤低剂量组	10	0.72 ± 0.16	0.79 ± 0.18	0.93 ± 0.17*	0.59 ± 0.10*	0.62 ± 0.10*
香砂六君子汤中剂量组	10	0.71 ± 0.15	0.78 ± 0.17	0.75 ± 0.15**	0.74 ± 0.13**	0.76 ± 0.12**
香砂六君子汤高剂量组	9	0.68 ± 0.16	0.76 ± 0.19	0.50 ± 0.09***	0.96 ± 0.15***	0.89 ± 0.14***

注: 与模型组比较, * P < 0.05, ** P < 0.01; 与阳性组比较 #P < 0.05

表4 各组肿瘤组织 PI3K/Akt、Bcl-2/Bax 通路蛋白相对表达量对比

组别	n	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt	Bcl-2/Bax	Cleaved-Capase3/Capase3
模型组	3	1.23 ± 0.22	1.05 ± 0.13	5.60 ± 1.18	1.50 ± 0.24
阳性组	3	0.61 ± 0.10**	0.52 ± 0.08**	0.73 ± 0.15**	1.37 ± 0.20*
香砂六君子汤低剂量组	3	0.98 ± 0.17**	0.69 ± 0.09**	1.94 ± 0.17**	0.89 ± 0.17**
香砂六君子汤中剂量组	3	0.60 ± 0.09**	0.50 ± 0.07**	0.68 ± 0.14**	1.35 ± 0.21**
香砂六君子汤高剂量组	3	0.19 ± 0.04***	0.23 ± 0.04***	0.08 ± 0.02***	1.44 ± 0.23*#

注: 与模型组比较, * P < 0.01; 与阳性组比较 #P < 0.05, ##P < 0.01

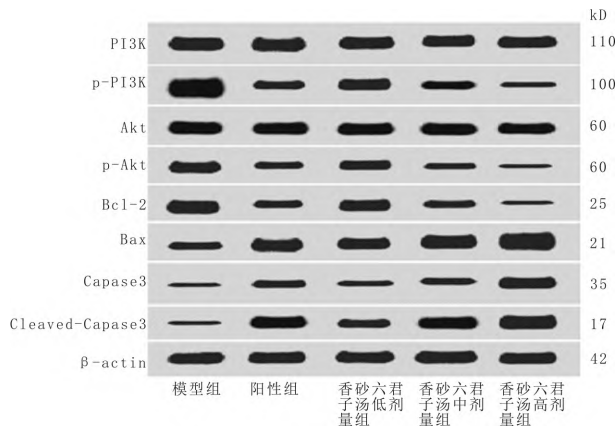


图4 各组裸鼠肿瘤组织 PI3K/Akt、Bcl-2/Bax 通路相关蛋白表达检测

4 讨论

结肠癌是多种病因共同作用的结果,包括遗传因素、致癌物质接触及饮食习惯等,对于无法手术切除的结肠癌患者常规治疗常不能达到理想的成效。中医学认为,结肠癌可归属于“肠覃”“肠癖”“下痢”等范畴,多由外感淫邪、营卫阻滞、湿热邪毒蕴结、劳逸失度等所致,使得肠道气血运行不畅,湿邪瘀血留滞,再加上嗜食肥甘厚腻、不洁之品,导致火毒瘀滞,伤及脾胃,运化失职,宿食停滞,久而久之,湿浊内生,化为郁火,热毒客于肠道^[9-10]。正气亏虚,脾肾不足,气血亏虚,肠道蠕动减慢,传导失职,

加之饮食不节,外感淫邪,湿毒流注下焦,伤及肠道,五脏六腑皆受损,气血阻滞,日久内结成块,生成癌毒^[11-12]。因此,本病乃本虚标实、虚实夹杂之症,中医常以养胃健脾、通下焦、去湿热、畅达气血等为治疗原则。

香砂六君子汤主治脾胃气虚、脘腹胀痛等,由六君子汤加砂仁、木香组成。该方以人参、茯苓、白术为君药,兼具养胃健脾、益气补中、祛邪扶正,重在治本;以半夏、陈皮、砂仁、木香宽中理气、通下焦、燥湿热,重在除标;以甘草调和药性,确保用药安全。本研究发现,阳性组和香砂六君子汤低、中、高剂量组肿瘤质量均显著低于模型组,肿瘤组织均有明显变性、坏死表现,且肿瘤组织PI和凋亡率均高于模型组,提示奥沙利铂和香砂六君子汤具有抑制结肠癌荷瘤裸鼠肿瘤生长的作用,其中香砂六君子汤高剂量组作用优于阳性组。现代药理研究表明,人参、白术提取物的有效成分均可抑制恶性肿瘤细胞的增殖,促进凋亡^[13-14];茯苓可增强机体免疫力,有助于抑制恶性肿瘤细胞免疫逃逸,增强其抗肿瘤作用^[15]。金铎等^[16]对胃癌细胞株SGC-7901分别予以不同浓度加味香砂六君子汤和5-氟尿嘧啶发现,加味香砂六君子汤可促进细胞凋亡,主要是通过将细胞周期阻滞于G2期实现的,且高浓度加味香砂六君子汤的作用显著优于阳性对照药物。杨君等^[17]证实加味香砂六君子汤可抑制胃癌细胞株SGC790增殖;香砂六君子汤在结肠癌腹腔镜术后应用有辅助抗肿瘤作用^[18]。

PI3K/Akt是调控细胞增殖、分化的关键通路。PI3K属于一种胞内磷脂酰肌醇激酶,具有丝氨酸/苏氨酸激酶和磷脂酰肌醇激酶的活性,被激活后可增加p-PI3K水平,使得在质膜上产生第二信使PIP3,而后者可与细胞内含有pH结构域的蛋白Akt结合,使Akt活化,增加p-Akt,激活核糖体激酶,增强细胞的增殖、存活和侵袭能力。有研究发现,对人结肠癌细胞株SW116予以处理可下调p-PI3K、p-Akt水平,细胞增殖活性也随之下降^[19]。通过基因转染和RNA干扰技术证实PI3K/Akt是结肠癌治疗的新靶点^[20]。目前国内外均有众多学者致力于PI3K抑制剂抗肿瘤的研究^[21-24]。本研究推测香砂六君子汤可能是通过调控PI3K/Akt通路实现抑制肿瘤生长和细胞增殖的作用的。

Bcl-2/Bax是经典的细胞凋亡信号调控通路。Bcl-2是目前细胞凋亡研究中最受关注的癌基因

之一,也是Bcl-2家族重要的成员,其编码的蛋白多分布在线粒体外膜和细胞膜内表面,具有抗凋亡作用,在结肠癌、直肠癌等恶性肿瘤组织中蛋白高表达。Bax的过度表达可拮抗Bcl-2对细胞的保护效应,促使细胞凋亡。Capase3具有拮抗Bcl-2的作用,诱导Capase3蛋白活化,Cleaved-Capase3水平升高,发挥促细胞凋亡的作用^[25]。Bcl-2、Bax、Capase3是目前认为与细胞线粒体凋亡途径密切相关的因素,抑制Bcl-2表达,促进Bax、Capase3表达,增加Cleaved-Capase3水平是抑制恶性肿瘤生长的有效手段^[26-27]。敲除肝癌细胞共激活因子相关精氨酸甲基转移酶1(coactivator-associated arginine methyltransferase1,CARM1)可下调Bcl-2表达,上调Bax表达,增强Capase-3的活性,抑制肝癌细胞生长^[28]。关于Bcl-2/Bax通路参与胃癌发生和发展的报道也较多,新型硫色满酮衍生物可调控该通路抑制胃癌细胞生长并诱导其凋亡^[29];在抗结肠癌的过程中Bcl-2表达下降,而Bax、Capase3表达升高^[30]。本研究中阳性组和香砂六君子汤剂量组Bcl-2/Bax、Cleaved-Capase3/Capase3均下降,且香砂六君子汤的作用呈剂量依赖性。

综上所述,香砂六君子汤可有效抑制结肠癌荷瘤裸鼠肿瘤生长,但高剂量药物较奥沙利铂表现出明显的优势,可抑制肿瘤细胞增殖,促进组织变性和细胞凋亡,可能是通过调控PI3K/Akt、Bcl-2/Bax通路实现的。

参考文献:

- [1]杨淞淳,申泽薇,余灿清,等.中国成年人排便频率与结直肠癌发病风险的前瞻性关联分析[J].中华流行病学杂志,2019,40(4):382-388.
- [2]GROTHEY A,SOBRERO A F,SHIELDS A F,et al.Duration of adjuvant chemotherapy for stage III colon cancer[J].N Engl J Med,2018,378(13):1177-1188.
- [3]全欣,徐川,李敏,等.加味香砂六君子汤对大肠癌术后化疗患者生存质量的影响[J].云南中医学院学报,2017,40(1):37-40.
- [4]樊英华.香砂六君子汤配合化疗治疗结肠癌临床观察[J].陕西中医,2016,37(8):955-956.
- [5]ZHAO J,XU J,ZHANG R.SRPX2 regulates colon cancer cell metabolism by miR-192/215 via PI3K-Akt[J].Am J Transl Res,2018,10(2):483-490.
- [6]ARISAN E D,ERGUL Z,BOZDAG G,et al.Diclofenac induced apoptosis via altering PI3K/Akt/MAPK signaling axis in HCT 116 more efficiently compared to SW480 colon cancer cells[J].Mol Biol Rep,2018,45(6):2175-2184.
- [7]ZHANG R,XU J,ZHAO J,et al.Proliferation and invasion of colon

- cancer cells are suppressed by knockdown of TOP2A[J]. *J Cell Biochem* 2018 ,119(9) : 7256 – 7263.
- [8]PARAMITA P ,SUBRAMANIAM V D ,MURUGESAN R ,et al. Evaluation of potential anti – cancer activity of cationic liposomal nanoformulated *Lycopodium clavatum* in colon cancer cells [J]. *IET Nanobiotechnol* 2018 ,12(6) : 727 – 732.
- [9]严卿莹 ,阮善明 ,张恺 ,等. 解毒三根汤调控糖酵解逆转人结肠癌 LOVO/5 – FU 细胞株耐药的机制 [J]. *中华中医药杂志* ,2019 ,34(4) : 1751 – 1756.
- [10]付淑娟 ,周张杰 ,吴婷婷 ,等. 扶正健脾方联合化疗通过 PI3K/AKT 信号通路对肿瘤转移微环境的影响 [J]. *中医学报* ,2019 ,34(4) : 766 – 770.
- [11]王麦绒 ,张鹏天. 中西医结合治疗结肠癌的效果分析 [J]. *中国中医基础医学杂志* ,2018 ,24(10) : 1438 – 1440.
- [12]王晓燕. 花宝金运用半夏泻心汤治疗结肠癌经验 [J]. *中医学报* ,2019 ,34(6) : 1201 – 1204.
- [13]魏然 ,肖玉红 ,徐维 ,等. 人参皂苷 Rh1 对人结肠癌细胞侵袭和转移的影响 [J]. *重庆医学* ,2019 ,48(12) : 1996 – 2000.
- [14]余文燕 ,王梓影 ,王国娟 ,等. 参苓白术散协同奥沙利铂对人结肠癌细胞增殖及凋亡的作用 [J]. *中国实验方剂学杂志* ,2018 ,24(18) : 118 – 123.
- [15]王爱云 ,陈群 ,李成付 ,等. 茯苓多糖硫酸酯影响荷瘤小鼠免疫功能实验研究 [C]. 厦门: 肿瘤病因学研究与中西医结合肿瘤综合诊疗交流研讨会论文集 ,2009: 116 – 119.
- [16]金铎 ,殷东风 ,高宏 ,等. 加味香砂六君子汤诱导胃癌细胞 SGC – 7901 凋亡机制研究 [J]. *辽宁中医药大学学报* ,2020 ,22(2) : 29 – 32 ,221.
- [17]杨君 ,邢向荣 ,高宏 ,等. 加味香砂六君子汤抑制胃癌细胞增殖、侵袭及其机制的研究 [J]. *中医学报* ,2019 ,34(10) : 2164 – 2169.
- [18]周创业 ,王培霞 ,彭金军. 香砂六君子汤对腹腔镜结肠癌根治术患者免疫功能及营养状况的影响 [J]. *药品评价* ,2020 ,17(10) : 46 – 48.
- [19]SEMAAN C ,NEILSON K A ,BROWN B ,et al. Pharmacological inhibition of casein kinase 2 enhances the effectiveness of PI3K inhibition in colon cancer cells [J]. *Anticancer Res* ,2018 ,38(11) : 6195 – 6200.
- [20]LIU T T ,LIU X S ,ZHANG M ,et al. Cartilage oligomeric matrix protein is a prognostic factor and biomarker of colon cancer and promotes cell proliferation by activating the Akt pathway [J]. *J Cancer Res Clin Oncol* 2018 ,144(6) : 1049 – 1063.
- [21]ZHANG H X ,DONG R F ,ZHANG P ,et al. Songorine suppresses cell growth and metastasis in epithelial ovarian cancer via the Bcl – 2/Bax and GSK3 β / β – catenin signaling pathways [J]. *Oncol Rep* ,2019 ,41(5) : 3069 – 3079.
- [22]王思萱 ,龙露叶 ,方雪娇 ,等. 高迁移率族蛋白 B1 促进结肠癌细胞增殖、迁移与侵袭的机制探讨 [J]. *中国病理生理杂志* ,2019 ,35(11) : 1966 – 1973.
- [23]BUMBAT M ,WANG M ,LIANG W ,et al. Effects of Me2SO and trehalose on the cell viability ,proliferation ,and bcl – 2 family gene (BCL – 2 ,BAX ,and BAD) expression in cryopreserved human breast cancer cells [J]. *Biopreserv Biobank* 2020 ,18(1) : 33 – 40.
- [24]LUO Y ,FU X Y ,RU R Z ,et al. CpG oligodeoxynucleotides induces apoptosis of human bladder cancer cells via caspase – 3 – bax/bcl – 2 – p53 axis [J]. *Arch Med Res* 2020 ,51(3) : 233 – 244.
- [25]胡馨予 ,胡爽 ,张峻榕 ,等. 灰树花提取物抗肝癌活性及初步机制研究 [J]. *中国药理学杂志* ,2015 ,50(24) : 2107 – 2111.
- [26]REVATHI S ,HAKKIM F L ,KUMAR N R ,et al. Induction of HT – 29 colon cancer cells apoptosis by pyrogallol with growth inhibiting efficacy against drug – resistant *Helicobacter pylori* [J]. *Anticancer Agents Med Chem* 2018 ,18(13) : 1875 – 1884.
- [27]ZHENG Q ,WANG B ,GAO J ,et al. CD155 knockdown promotes apoptosis via AKT/Bcl – 2/Bax in colon cancer cells [J]. *J Cell Mol Med* 2018 ,22(1) : 131 – 140.
- [28]刘美玲 ,洪宏海 ,王征. CARM1 通过调控 Bax/Bcl – 2 表达和 Caspase – 3 活性进而调控肝癌生长作用 [J]. *世界肿瘤研究* ,2019 ,9(3) : 90 – 97.
- [29]孙新利 ,刘立涛 ,刘雅涵 ,等. 新型硫色满酮衍生物抑制胃癌细胞生长与诱导胃癌细胞凋亡机制研究 [J]. *中国肿瘤* ,2019 ,28(11) : 869 – 875.
- [30]孟雪 ,邱智东 ,王蕾 ,等. 人参皂苷 CK 抑制人结肠癌 SW480 细胞增殖的机制研究 [J]. *中草药* ,2020 ,51(6) : 1567 – 1574.

收稿日期: 2021 – 04 – 27

作者简介: 包益洁 (1988 –) ,女 ,山东青岛人 ,医学硕士 ,研究方向: 中西医结合防治大肠癌。

编辑: 李艳