

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2021.05.012

调肠消瘤方对结直肠腺瘤术后患者复发率及结肠组织 Beclin1、p53、Cox-2 表达的影响

李叶, 钟彩玲, 杨四萍, 张北平✉

广州中医药大学第二附属医院/广东省中医院, 广东省广州市越秀区大德路 111 号, 510120

[摘要] 目的 观察调肠消瘤方对结直肠腺瘤术后复发的影响, 并探讨可能的作用机制。方法 结直肠腺瘤患者 84 例随机分为治疗组和对照组各 42 例, 两组患者均予内镜下息肉切除术, 治疗组术后每天口服调肠消瘤方, 每日 1 剂, 连服 3 个月; 对照组不进行中西药物干预。术后 1 年复查肠镜, 观察腺瘤性息肉复发情况并计算复发率。治疗前及术后 1 年采用免疫组化法检测结肠组织 Beclin1、p53、环氧化酶 2 (Cox-2) 表达。结果 最终 81 例患者完成临床试验, 治疗组脱落 1 例, 对照组脱落 2 例。术后 1 年治疗组 41 例患者复发 5 例, 复发率为 12.2%, 对照组 40 例患者复发 16 例, 复发率为 40.0%, 治疗组复发率显著低于对照组 ($t=8.15$, $P=0.04$)。治疗组复发腺瘤平均每人 (1.80 ± 1.30) 个, 对照组平均每人 (2.19 ± 1.56) 个, 两组复发腺瘤人均个数差异无统计学意义 ($t=0.501$, $P=0.622$)。术后 1 年两组患者结肠组织 Beclin1、p53、Cox-2 表达均较治疗前降低 ($P<0.05$), 且治疗组较对照组降低更明显 ($P<0.05$)。结论 调肠消瘤方能有效降低结直肠腺瘤术后的复发率, 其可能通过抑制细胞自噬、减少异常细胞增殖、减轻结肠黏膜炎症而发挥疗效。

[关键词] 结直肠腺瘤; 调肠消瘤方; 肿瘤复发; 细胞自噬; 结肠组织; 炎症

结直肠癌是癌症相关的主要死亡原因之一, 2015 年我国结直肠癌新发病例达 37.63 万, 上升至恶性肿瘤第 5 位^[1]。散发结直肠癌多由结直肠腺瘤发展而来, 内镜下切除结直肠腺瘤是首选的治疗方法, 可预防 75% 的结直肠癌^[2]。但结直肠腺瘤内镜下切除后复发率高^[3], 一项 Meta 分析^[4]提示, 术后第一年结直肠腺瘤复发率为 37%, 第五年复发率达 60%。罗云坚教授是广东省名老中医, 长期从事结直肠腺瘤的治疗研究工作, 积累了丰富的临床经验, 他认为脾虚湿瘀互结是结直肠腺瘤的重要病机^[5], 临床应用以健脾祛湿、活血化瘀法组方的调肠消瘤方能有效减少结直肠腺瘤的复发^[6]。本研究应用调肠消瘤方治疗结直肠腺瘤术后患者, 观察其预防复发的疗效, 同时检测治疗前后患者结肠组织 Beclin1、p53、环氧化酶 2 (Cox-2) 的变化, 探讨其可能作用机制。本研究经过广东省中医院伦理委员会批准 (批件号: B2017-124-01)。

基金项目: 广东省省级科技计划 (2017A020213005); 广东省中医院临床研究专项 (1010 专项) 重点研发计划 (YN10101914)

✉ 通讯作者: doctorzhp@163.com, 13602762766

1 临床资料

1.1 诊断标准

参照《实用内科学》^[7]: 结肠镜检查发现结肠和/或直肠息肉, 病理诊断为腺瘤样病变。

1.2 纳入标准

符合以上结直肠腺瘤诊断标准; 息肉数量不超过 10 个; 年龄 18~75 岁; 签署知情同意书。

1.3 排除标准

病理证实息肉已癌变; 妊娠或正准备妊娠的妇女, 哺乳期妇女; 合并心、肺、肝、肾、造血系统和内分泌系统严重原发性疾病; 合并严重精神疾病。

1.4 剔除标准

未曾用研究药物者; 无任何检测记录者; 在入组后服用影响判定疗效的中、西药物, 如止泻药物和/或抗痉挛药物、阿司匹林或其他非甾体类抗炎药; 治疗期间接受肠道手术者。

1.5 脱落标准

患者自行退出; 失访者; 出现严重的合并症或并发症或严重不良事件; 虽然完成试验, 但服药量不在应服量的 80%~120% 范围内。

1.6 一般资料

选取 2017 年 10 月至 2018 年 3 月在广东省中医院脾胃病科住院或门诊诊断为结直肠腺瘤的合格受试者 84 例,按随机数字表法分为治疗组和对照组各 42 例。治疗组中男性 22 例,女性 20 例,平均年龄 (55.98 ± 10.48) 岁,病程 0~3 个月,平均腺瘤数目 (2.93 ± 2.35) 个;对照组中男性 22 例,女性 20 例,平均年龄 (53.55 ± 11.09) 岁,病程 0~2 个月,平均腺瘤数目 (2.43 ± 1.71) 个。两组患者在性别、年龄、病程、腺瘤数目方面差异无统计学意义 ($P > 0.05$),具有可比性。

2 方法

2.1 治疗方法

所有患者行肠镜下结直肠腺瘤切除术,术后治疗组口服调肠消瘤方,组成:党参 15 g,白术 15 g,白花蛇舌草 30 g,三七 10 g,莪术 15 g,炙甘草 5 g 等,每日 1 剂,连服 3 个月。对照组不予中药和西药干预。

2.2 观察指标及方法

2.2.1 结直肠腺瘤术后复发率 术后 1 年复查肠镜 (CV-290 型,奥林巴斯公司),记录结直肠腺瘤个数、大小、性质 (分为管状、绒毛状、管状-绒毛状),并进行病理组织检查,观察结直肠腺瘤术后复发率。复发率 = 复发例数/本组总病例数 $\times$ 100%。

2.2.2 结肠组织 p53、Beclin1、Cox-2 表达 采用免疫组化法检测,方法:1) 脱蜡和水化:将结肠组织切片先后置于二甲苯、无水乙醇、70%~95%乙醇中浸泡。2) 用蒸馏水洗 3 次,每次 5 min。3) 抗原微波热修复,反复 2 次。PBS 洗 2 次,每次 5 min。4) 滴加 5% BSA 封闭液,甩去多余液体。5) 滴加一抗 (Beclin1 抗体、Cox-2 抗体、p53 抗体各稀释 100 倍),4℃ 过夜, PBS 洗 3 次,每次 5 min。6) 滴加生物素化山羊抗兔 IgG,37℃ 30 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min。7) 滴加试剂 SABC,37℃ 30 min, PBS 洗 4 次,每次 5 min。8) DAB 显色。9) 蒸馏水洗,苏木素复染 1 min。10)

脱水、透明、封片、镜检。显微镜 (DV300-1 型,广州粤显光学仪器有限责任公司) 下观察,所有切片放大倍数为 400 倍。每张切片观察 Beclin1、p53、Cox-2 抗体表达的 6 个视野,免疫组化结果以单个视野下积分光密度 (IOD) 来表示。采用 Image-ProPlus 6.0 软件分析。兔 IgG SABC 免疫组化试剂盒 (批号: 12L19B)、DAB 显色试剂盒 (批号: 13G10C22),博士德生物技术有限公司; Beclin1 (货号: AF5128)、Cox-2 (货号: AF7003)、p53 (货号: AF0879) 抗体, Affinity Bioscience 公司。治疗前和术后 1 年各检测 1 次。

2.2.3 安全性评估 治疗前后患者均行血常规、凝血三项、心电图等安全性检查,同时记录不良事件发生情况。

2.3 统计学分析

采用 SPSS 18.0 软件建立数据库并进行统计学分析。计量资料均进行正态性检验,如符合正态分布以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,若方差齐性治疗前后比较采用配对 t 检验;对不符合正态分布或方差不齐,采用非参数检验的秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 两组患者结直肠腺瘤术后复发率及复发腺瘤数目比较

本次研究最终 81 例患者完成临床试验,脱落 3 例,治疗组 1 例,对照组 2 例。脱落原因为 1 例妊娠,2 例未复查肠镜。术后 1 年治疗组 41 例中复发 5 例,复发率为 12.2%;对照组 40 例中复发 16 例,复发率为 40.0%,治疗组复发率显著低于对照组 ($t = 8.15$, $P = 0.04$)。复发患者中,治疗组复发腺瘤数为 1~4 个,平均每人 (1.80 ± 1.30) 个,对照组患者复发腺瘤为 1~7 个,平均每人 (2.19 ± 1.56) 个,两组复发腺瘤每人平均个数差异无统计学意义 ($t = 0.501$, $P = 0.622$)。

3.2 两组患者治疗前及术后 1 年结肠组织 Beclin1、p53、Cox-2 表达比较

表 1 示,治疗前两组患者结肠组织 Beclin1、

表 1 两组结直肠腺瘤患者治疗前及术后 1 年结肠组织 Beclin1、p53、Cox-2 表达比较 (IOD, $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	例数	Beclin1	p53	Cox-2
治疗组	治疗前	42	72.59 $\pm$ 28.17	66.03 $\pm$ 32.07	114.34 $\pm$ 48.5
	术后 1 年	41	20.42 $\pm$ 14.62 ^{a)} b)	32.79 $\pm$ 14.72 ^{a)} b)	46.86 $\pm$ 13.59 ^{a)} b)
对照组	治疗前	42	72.73 $\pm$ 21.87	74.63 $\pm$ 39.90	120.22 $\pm$ 47.14
	术后 1 年	40	37.53 $\pm$ 18.30 ^{a)}	47.39 $\pm$ 27.15 ^{a)}	70.20 $\pm$ 13.59 ^{a)}

注: Cox-2, 环氧化酶 2。

a) 与本组治疗前比较, $P < 0.05$; b) 与对照组术后 1 年比较, $P < 0.05$ 。

p53、Cox-2 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。术后 1 年两组患者结肠组织 Beclin1、p53、Cox-2 表达均降低 ($P < 0.05$), 且治疗组降低更明显 ($P < 0.05$)。

3.3 安全性结果

两组患者治疗前后血常规、凝血三项、心电图等检查均未见异常; 治疗期间均无不良事件。

4 讨论

结直肠腺瘤可归属于中医学“肠覃”“肠瘤”等病证范畴。罗云坚教授认为, 脾胃虚弱、湿浊内生、瘀血内停, 三者共同致病, 是结直肠腺瘤复发的重要病理基础, 主张治疗上应辨病与辨证相结合, 治以健脾化湿、活血化瘀、解毒消瘤^[5-6]。王庆其教授认为, 正气虚弱, 痰、瘀、湿、毒积聚于肠, 久而形成结直肠息肉, 提出应改善胃肠局部的微生态环境, 使之不利于细胞异变和肿瘤的生长; 按气血、寒热、虚实为纲调理肠胃功能, 以治疗其本; 此外应重视化湿浊、行瘀浊、通腑气、解积毒等以祛邪积^[8]。劳绍贤教授也提出, 胃肠息肉的主要病机为脾气不能散精, 湿蕴痰阻, 结聚于胃肠, 主张按癥瘕积聚来治疗胃肠息肉病, 术后息肉复发率高可能与局部瘀血内停相关, 故治疗上应健脾、运脾, 同时注重活血行气、通利抑癌^[9]。调肠消瘤方中党参、白术健脾益气以治本, 白术健脾燥湿, 祛除肠道湿浊, 三七活血化瘀, 祛除肠道之瘀滞, 湿瘀得除而瘤无以再发。同时结直肠腺瘤是癌前病变, 结合现代药理研究成果^[10-11], 选用有抑杀癌细胞作用的中药如白花蛇舌草、莪术等以解毒消瘤。本研究结果发现, 经过调肠消瘤方干预, 结直肠腺瘤复发率明显降低, 具有良好的临床疗效。

细胞自噬是广泛存在于真核细胞的一种生理现象, 它能清除异常蛋白, 同时清除炎症介质和细胞因子, 从而成为调节炎症反应的重要途径, 是机体一种重要的防御和保护机制^[12]。Beclin1 基因是首个确认的哺乳动物的自噬基因, 是自噬重要的正性调节因子, 也是自噬启动的标志。高金雪等^[13]通过 Meta 分析亦发现 Beclin1 在正常黏膜、腺瘤组织及大肠癌组织中阳性率依次递增, Beclin1 基因促进了大肠癌的形成与发展。野生型的 p53 是最常见的抑癌基因之一, 其表达的蛋白可以调节细胞周期启动的转录因子, 具有负性调节细胞周期的作用; p53 突变及失活会导致细胞凋亡与增殖的不平衡生长, 进而导致了结直肠癌的发生发展^[14]。正常细胞中难以检测到野生型基因表达的 p53 蛋白, 因为

其含量少, 同时半衰期较短, 而突变后 p53 蛋白半衰期延长, 能在试验中被检测到, 故临床试验中检测的 p53 蛋白通常是突变型 p53 蛋白^[15]。王政江等^[16]发现正常结直肠黏膜、癌旁正常组织、结直肠腺瘤、结直肠癌的 p53 蛋白表达阳性率逐渐递增。江康伟等^[17]亦发现, 结直肠腺瘤患者高危组的 p53 表达明显高于低危组, 且与腺瘤大小、个数、不典型增生及病理分型有关。Roncucci 等^[18]研究发现, 结直肠肿瘤患者的正常肠黏膜处于明显慢性炎症状态。环氧化酶 (Cox) 是花生四烯酸在体内代谢生成的前列腺素产物, 可分为环氧化酶 1 (Cox-1) 和环氧化酶 2 (Cox-2), Cox-2 在正常组织中表达量低, 经炎症反应、癌蛋白等刺激下表达量增高, 与炎症反应、肿瘤的发生及发展密切相关^[19]。异常腺体灶和腺瘤患者外观正常结肠黏膜组织中的 Cox-2 等炎症因子表达水平明显高于无肿瘤者, 提示炎症在结直肠肿瘤的早期形成过程中发挥重要作用^[20]。

本研究结果显示, 经过调肠消瘤方干预后, 结直肠腺瘤患者术后 1 年结肠组织 Beclin1、p53 及 Cox-2 显著降低, 且低于对照组, 提示调肠消瘤方可抑制结肠组织的细胞自噬及异常细胞增殖, 降低结肠黏膜的炎症水平, 从而发挥防治结直肠腺瘤复发的作用。细胞自噬与细胞增殖、肠黏膜炎症在腺瘤发生及复发中的相互作用复杂^[21], 调肠消瘤方如何发挥调控三者的机制, 仍需从细胞及动物实验角度开展进一步深入探索。

参考文献

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADDE PD, et al. Cancer statistic-sin China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] WINAWER SJ, ZAUBER AG, HO MN, et al. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup [J]. N Engl J Med, 1993, 329(27): 1977-1981.
- [3] FACCIORUSSO A, DI MASO M, SERVIDDIO G, et al. Development and validation of a risk score for advanced colorectal adenoma recurrence after endoscopic resection [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(26): 6049-6056.
- [4] SHI X, YANG Z, WU Q, et al. Colorectal adenoma recurrence rates among post-polypectomy patients in the placebo-controlled groups of randomized clinical trials: a meta-analysis [J]. Oncotarget, 2017, 8(37): 62371-62381.
- [5] 李叶, 苏艺胜, 张北平, 等. 罗云坚防治大肠息肉复发经验 [J]. 实用中医药杂志, 2018, 34(12): 1533-1534.

- [6] 张北平, 赵喜颖, 刘刚. 基于“治未病”理论的腺瘤性大肠息肉的中药干预研究 [J]. 中国全科医学, 2012, 15 (23): 2718-2720.
- [7] 林果为, 王吉耀, 葛均波. 实用内科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2017: 2060-2061.
- [8] 王少墨, 王秀薇, 姚怡, 等. 王庆其治疗大肠息肉经验 [J]. 中医杂志, 2016, 57 (15): 1278-1280.
- [9] 陈万群, 胡玲, 陈响, 等. 从“治未病”防治胃肠息肉 [J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42 (9): 1629-1630.
- [10] 侯山岭. 中药白花蛇舌草化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中医临床研究, 2018, 10 (6): 140-141.
- [11] 韦露秋, 方刚. 莪术有效成分抗肿瘤的细胞分子调控机制研究 [J]. 广西中医药大学学报, 2019, 22 (3): 71-73.
- [12] JONES SA, MILLS KH, HARRIS J. Autophagy and inflammatory diseases [J]. Immunol Cell Biol, 2013, 91 (3): 250-258.
- [13] 高金雪, 吴清明, 刘丹. 大肠癌组织自噬相关蛋白 Beclin1 表达意义 Meta 分析 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2017, 24 (4): 273-277.
- [14] 王媛媛, 青青, 陈科全, 等. CD133 和 p53 在结直肠癌中的表达及临床意义 [J]. 实用医学杂志, 2017, 33 (16): 2677-2681.
- [15] 胡晓舒, 常方方, 徐小艳, 等. EZH2、p53、Ki-67 在结直肠癌及腺瘤组织中的表达及相关性探讨 [J]. 实用医学杂志, 2019, 35 (1): 104-108.
- [16] 王政江, 王德霞, 王政改, 等. 结直肠癌中 PLCE1、p53 基因表达状况及其意义 [J]. 临床和实验医学杂志, 2018, 17 (3): 247-251.
- [17] 江康伟, 陈焕伟, 杨利敏. 结肠腺瘤性息肉中 p53、Ki-67、CD34 表达及意义 [J]. 广东医科大学学报, 2018, 36 (1): 67-69.
- [18] RONCUCCI L, MORA E, MARIANI F, et al. Myeloperoxidase-positive cell infiltration in colorectal carcinogenesis as indicator of colorectal cancer risk [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008, 17 (9): 2291-2297.
- [19] 王云, 朱星枚. NF- κ B 和 Cox-2 对结肠腺瘤性息肉及癌变患者新生血管的影响 [J]. 中国肿瘤临床与康复, 2017, 24 (6): 685-688.
- [20] 李士坤, 曹新广, 任庆梅, 等. 环氧合酶-2 在结肠腺瘤癌灶组织中的表达及临床意义 [J]. 临床内科杂志, 2013, 30 (4): 279.
- [21] 封晓昆, 王贲士, 王安娜, 等. p53 及其凋亡刺激蛋白对结肠癌细胞自噬和凋亡影响机制探讨 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2015, 22 (10): 752-757.

Effect of *Tiaochang Xiaoliu Formula* (调肠消瘤方) on the Recurrence Rate of Patients with Colorectal Adenoma and the Expression of Beclin1, p53 and Cox-2 in Colon Tissue

LI Ye, ZHONG Cailing, YANG Siping, ZHANG Beiping

The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine/ Guangdong Province Traditional Chinese Medical Hospital, Guangzhou, 510120

ABSTRACT Objective To explore the effect of *Tiaochang Xiaoliu Formula* (调肠消瘤方) on the postoperative recurrence of colorectal adenoma, as well as the possible underlying mechanism. **Methods** Eighty-four patients with colorectal adenoma were randomly divided into treatment group and control group, with 42 patients in each group. All patients underwent endoscopic polypectomy; additionally, *Tiaochang Xiaoliu Formula* was administered in treatment group, one dose daily, for three months. Colonoscopy was used to check whether there was recurrence of adenomatous polyps one year after the polypectomy, and the recurrence rate was calculated. The expression of Beclin1, p53 and cyclooxygenase 2 (Cox-2) in colon tissue were detected by immunohistochemical method before treatment and one year after operation. **Results** Eighty-one patients completed the trial, while one case in treatment group and two cases in control group dropped out. The 1-year recurrence rate was 12.2% (5 of the 41 patients) in treatment group, significantly lower than 40.0% (16 of the 40 patients) in control group ($t = 8.15$, $P = 0.04$). The average number of recurrent adenomas per person was 1.80 ± 1.30 in the treatment group and 2.19 ± 1.56 in the control group, with no significant difference between groups ($t = 0.501$, $P = 0.622$). The expression of Beclin1, p53, and Cox-2 in the colon tissue significantly decreased in both treatment and control group one year after the operation when compared to those before treatment ($P < 0.05$), and more changes were seen in the treatment group ($P < 0.05$). **Conclusion** *Tiaochang Xiaoliu Formula* may help decreasing the recurrence rate of colorectal adenoma after operation, possibly by inhibiting autophagy, decreasing abnormal cell proliferation, and relieving inflammation of the colonic mucosa.

Keywords colorectal adenoma; *Tiaochang Xiaoliu Formula* (调肠消瘤方); tumor recurrence; autophagy; colon tissue; inflammation

(收稿日期: 2020-03-22; 修回日期: 2020-07-12)

[编辑: 邓媛]