

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.24.017

健脾消癌方对人结直肠癌裸鼠移植模型肿瘤组织上皮间质转化及转化生长因子 β 的影响

谭小宁, 李勇敏, 罗吉, 罗燕, 蒋益兰*

(湖南省中医药研究院附属医院, 湖南省长沙市麓山路 58 号, 410006)

摘要 目的 探讨健脾消癌方拮抗结直肠癌转移的可能作用机制。方法 60 只 BALB/c-nu 裸鼠随机分为模型组、空白组及中药低、高剂量组。除空白组外, 其余裸鼠采用盲肠黏膜内注射 HCT116 细胞方法建立人结直肠癌裸鼠移植模型。中药低、高剂量组分别予健脾消癌方 10、40 g/(kg·d) 灌胃; 模型组和空白组以生理盐水 2 ml/100 g 灌胃。每日 1 次, 连续给药 4 周。运用 Western Blot 方法检测肿瘤组织中 E-钙粘蛋白、波形蛋白、转化生长因子 β (TGF- β) 蛋白表达量; 比较各组大鼠结肠癌肝、肺、淋巴转移情况。结果 中药高、低剂量组肝、肺、淋巴转移率低于模型组 ($P < 0.05$), 中药高剂量组的肝、肺转移率低于低剂量组 ($P < 0.05$)。与空白组比较, 各组 E-钙粘蛋白表达均明显降低, 波形蛋白、TGF- β 表达均明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 中药高、低剂量组 E-钙粘蛋白表达均明显升高, 波形蛋白、TGF- β 表达均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 中药高、低剂量组各指标比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 健脾消癌方通过 TGF- β 介导而上调 E-钙粘蛋白、下调波形蛋白表达, 逆转人结直肠癌裸鼠移植模型肿瘤组织上皮间质转化进程, 可能是其拮抗结直肠癌转移的作用机制之一。

关键词 结直肠癌; 肿瘤转移; 健脾消癌方; 上皮间质转化; 转化生长因子 β

结直肠癌发病率居全球恶性肿瘤的第 3 位^[1], 局部或远处转移是患者预后差的主要原因。上皮间质转化 (epithelial mesenchymal transition, EMT) 是肿瘤转移的一大特征, 与肿瘤侵袭和转移有密切联系^[2-3]。在此过程中, 上皮细胞失去极性而细胞间黏附能力下降, 同时获得间质细胞表型以及运动和侵袭能力, 表现为细胞表面上皮标志物 E-钙粘蛋白下降, 间质标志物波形蛋白上升。转化生长因子 β (TGF- β) 是 EMT 和肿瘤细胞发生转移的一个主要的诱导物^[4-5]。健脾消癌方是我们临床经验方, 可有效拮抗结直肠癌术后复发转移, 提高生存质量, 延长生存期^[6]。本实验观察健脾消癌方对肿瘤组织 EMT 及 TGF- β 的影响, 探讨健脾消癌方抗结直肠癌转移的可能作用机理。

1 材料

1.1 动物和细胞

SPF 级 BALB/c-nu 裸鼠 60 只, 雌性, 4~6 周

龄, 体重 18~20 g, 购自湖南斯莱克实验动物有限公司, 实验动物合格证号: 43004700012242。人结肠癌细胞 HCT116 细胞株购自于中国科学院上海细胞研究所, 目录号 TCHu 99。

1.2 药物

健脾消癌方组成: 党参 15 g, 白术 15 g, 茯苓 15 g, 法半夏 10 g, 黄芪 20 g, 灵芝 30 g, 麸炒枳壳 6 g, 薏苡仁 30 g, 淫羊藿 15 g, 郁金 15 g, 莪术 10 g, 白花蛇舌草 30 g, 半枝莲 30 g, 重楼 30 g, 炙甘草 3 g。购于湖南省中医药研究院附属医院中药房, 取 5 倍量处方, 用 10 倍温水浸泡 0.5 h, 加热煎 2 h; 药渣再加 8 倍水煎 1 h, 趁热过滤。将 2 次水煎溶液混匀、过滤, 浓缩至浓度为 2.0 g/ml 的溶液。密封后, 4℃ 保存备用。

1.3 主要试剂和仪器

DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司, 批号: 8116293); 0.25% 胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司, 批号: 1766146); 胎牛血清 (美国 Gibco 公司, 批号: 1640958); ECL 发光液 (Beyotime, 批号: p0018); 抗体 TGF- β (货号 ab92486)、E-钙粘蛋白 (货号:

基金项目: 国家自然科学基金 (81373602)

* 通讯作者: tianshangren624@163.com, (0731) 85920129

ab76055)、波形蛋白(货号: ab137321)、 β -actin(货号: ab8226)均购自 Abcam 公司。超净工作台(美国 Thermo Fisher, 型号 Heraguard ECO); 二氧化碳孵箱(美国 Thermo Fisher 公司, 型号 3141); 低温高速离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司, 型号 TGL-18M); 化学发光成像系统(GENE 公司, 型号: ChemiXRQ); 微量核酸蛋白浓度分析仪(英国 BioDrop 公司, 型号 Touch Duo PC); 电泳仪(美国 Hoefer 公司, 型号 ps3008); 转膜仪(美国 Bio-rad 公司, 型号 Mini Trans-Blot C); 光学显微镜(德国 Lecia 公司, 型号: DM4000)。

2 方法

2.1 动物造模、分组及给药

采用随机数字表法选出 50 只裸鼠造模, 余 10 只作为空白组。取对数生长期人结肠癌 HCT116 细胞, 调整细胞浓度约 $4 \times 10^7/\text{ml}$, 参考文献 [7], 2.5% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 左下腹切开约 1.5 cm 切口, 暴露盲肠。用微量注射器将 50 μl HCT116 细胞 30°角倾斜进针, 注入盲肠浆膜和肌层之间, 用 3% 碘酒清洁注射区域, 缝合腹壁。空白组仅注射 50 μl 生理盐水。

接种细胞 14 天后, 造模后裸鼠中 38 只腹部有小肿块。抽签法选择 2 只处死后取盲肠处肿块病理切片。图 1 示, 造模 2 周后裸鼠腹部盲肠处肿块病理切片可见细胞核大畸形, 深染, 核分裂相, 癌组织排列成团状, 呈弥散状浸润生长, 证实为肿瘤组织, 说明原位盲肠处肿瘤形成。其余 36 只按随机数字表法分为中药低、高剂量组及模型组, 每组 12 只。造模后第 15 天开始给药, 中药低、高剂量组分别予健脾消癌方 10 g/(kg·d)、40 g/(kg·d) 灌胃; 模型组和空白组以生理盐水 2 ml/100 g 灌胃。各组均每日 1 次, 连续给药 4 周。

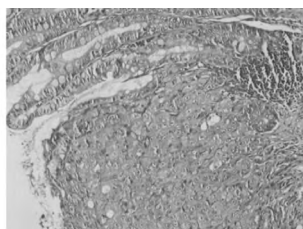


图 1 造模 2 周后裸鼠原位盲肠处肿瘤组织/病理切片 (HE 染色, $\times 400$)

2.2 观察指标及方法

2.2.1 肿瘤组织形态学变化 末次给药 2 h 后处死裸鼠, 取肝、肺、肠系淋巴(有转移结节者以结节为中心取材)、结肠及盲肠肿瘤组织以 10% 福

尔马林固定, 脱水、透明、石蜡包埋、切片、脱蜡后 HE 染色制作病理切片, 显微镜下观察肿瘤组织。

2.2.2 结肠癌肝、肺、淋巴转移情况 肉眼及镜下检查结直肠癌裸鼠移植模型结肠癌肝、肺、淋巴转移, 计算转移率。转移率 = 转移大鼠数/该组动物数。

2.2.3 Western Blot 法检测 E-钙粘蛋白、波形蛋白、TGF- β 蛋白表达 裸鼠处死后即刻打开腹腔, 取盲肠原位种植处肿瘤组织约 1.0 g, 液氮研磨后, 加入 200 μl RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, 蛋白定量后上样 SDS-PAGE 电泳, PVDF 膜转移, 5% 脱脂奶粉封闭 60 min, 剪取对应的蛋白条带分别加入 E-钙粘蛋白、波形蛋白、TGF- β 、 β -actin 一抗, 4℃过夜, TBS-T 洗 3 次后将稀释后的二抗(用封闭液稀释 HRP 标记的二抗, 稀释比例 1:1000)与膜共同孵育 1~2 h, TBS-T 洗 3 次, 5~10 min/次, ECL 显影。将各条带用 Image J 1.44 软件进行灰度扫描并以 β -actin 为内参计算各组平均值。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析, 数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析进行组间比较。P < 0.05 认为差异有统计学意义。

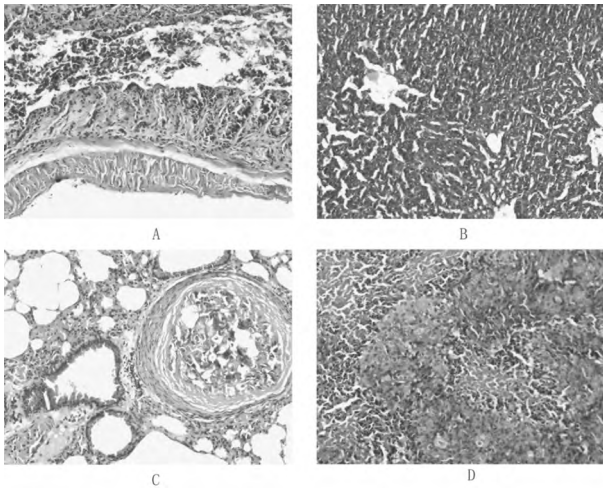
3 结果

3.1 裸鼠肿瘤组织转移形态学结果

造模 6 周后, 部分裸鼠在肝、肺、肠系淋巴等部位出现肿块、结节。取肝、肺、肠系淋巴(有转移结节者以结节为中心取材)、结肠及盲肠原位肿瘤组织病理切片(见图 2), 图 2A 为原位结肠癌组织, 明显可见核大畸形, 深染, 核分裂相, 癌组织呈弥散状浸润生长; 图 2B 细胞排列杂乱无序, 核大不规则, 核仁明显, 间有小腔样结构, 肝小叶结构破坏, 切片染色显示为裸鼠结肠癌肝转移, 细胞呈低分化癌; 图 2C 裸鼠肺部癌细胞大小不一, 裸样核及核分裂明显, 核仁不清, 组织异型性大, 为结肠癌肺转移; 图 2D 肠系淋巴结有弥漫性癌细胞转移浸润, 聚集成团, 明显异形性, 胞核圆形, 核分裂相增多, 为裸鼠结直肠癌淋巴转移。

3.2 各组裸鼠结肠癌肝、肺、淋巴转移比较

表 1 示, 中药高、低剂量组肝、肺、肠系淋巴转移率低于模型组 (P < 0.05), 中药高剂量组的肝、肺转移率低于中药低剂量组 (P < 0.05), 表明健脾消癌方能有效降低结肠癌转移, 且高剂量抑制肿瘤转移效果较低剂量好。



注: A, 裸鼠原位结肠癌; B, 裸鼠结肠癌肝转移, 细胞呈低分化腺癌; C, 裸鼠结肠癌肺转移; D 裸鼠结肠癌肠系淋巴转移

图 2 造模 6 周后肿瘤组织病理切片图(HE 染色, $\times 400$)

表 1 各组裸鼠结肠癌肝、肺、淋巴转移比较 [鼠数(%)]

组别	鼠数	肝转移	肺转移	肠系淋巴转移
空白组	10	—	—	—
模型组	12	7 (58.3)	5 (41.7)	7 (5.38)
中药低剂量组	12	3 (25.0)	2 (16.7)	3 (25.0)
中药高剂量组	12	2 (16.7)	1 (8.3)	3 (25.0)

3.3 各组裸鼠原位种植肿瘤组织中 E-钙粘蛋白、波形蛋白、TGF- β 蛋白表达比较

表 2 示, 与空白组比较, 其余各组 E-钙粘蛋白表达均明显降低, 波形蛋白、TGF- β 蛋白表达均明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 中药高、低剂量组 E-钙粘蛋白表达均明显升高, 波形蛋白、TGF- β 表达均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 中药高、低剂量组各指标比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

4 讨论

健脾消癌方以扶正祛邪为原则, 以健脾益气、化瘀解毒为治法, 具有显著的临床疗效^[8]。方中以六君子汤为加减化裁, 薏苡仁、灵芝、黄芪、淫羊藿助六君子汤健脾益气, 莪术、郁金活血化瘀,

白花蛇舌草、重楼、半枝莲清热解毒。诸药合用, 共奏健脾益气、扶正固本、顾护胃气之功。

EMT 是肿瘤发生发展的关键步骤, 将促使细胞极性和细胞间接触丧失, 使得细胞获得一种迁移、浸润的表达, 实现癌细胞向其他组织转移^[9]。大多数肿瘤细胞都会通过自分泌或旁分泌产生 TGF- β , TGF- β 可通过 Smad 信号通路激活 EMT 主要转录因子如 Snail、Twist 和 Zeb 等表达, 诱导 EMT 发生, 这些转录因子一方面可以抑制上皮细胞黏附蛋白的表达, 同时会介导间充质蛋白的表达^[10], 如 TGF- β 能激活 Smad3/4 复合物而诱导 Snail1 和 Snail2 的表达, 进而抑制 E-钙粘蛋白的表达, 同时, Smad3/4 复合物还可与 N-cadherin 的启动子区域结合, 上调 N-cadherin 的表达, 促进肿瘤细胞 EMT 的发生^[11]。TGF- β 也可通过非 Smad 信号通路, 如 PI3K、MAPK、JNK 等信号通路, 诱导肿瘤 EMT 的发生^[11]。本实验结果显示, 健脾消癌方能通过下调 TGF- β 蛋白表达而逆转人结肠癌裸鼠移植模型肿瘤组织 EMT, 抑制肿瘤转移进程。

研究发现, 发生转移的肿瘤组织中 E-钙粘蛋白表达显著低于未发生转移肿瘤组织, E-钙粘蛋白的异常表达可能与结肠癌的转移以及侵袭相关^[12]。E-钙粘蛋白分子有望作为临床辅助治疗的依据^[13]。波形蛋白是维持细胞骨架结构的重要蛋白, 主要表达在间充质细胞, 与细胞的运动密切相关。上皮来源肿瘤中出现波形蛋白的高表达与肿瘤迁徙、侵袭和转移呈正相关^[14]。张俊君等^[15]研究证实波形蛋白的表达与直肠腺癌的进展和转移密切相关, 提出波形蛋白检测可以作为判断直肠腺癌转移及预后的指标。本研究结果显示, 健脾消癌方能上调肿瘤组织 E-钙粘蛋白蛋白表达, 下调肿瘤组织波形蛋白蛋白表达, 能一定程度上逆转 EMT 过程。相关机制还需对有关信号通路的进一步研究。

参考文献

- [1] JEMAL A, BRAY F, CENTER MM, et al. Global Cancer Statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.

表 2 各组裸鼠原位种植肿瘤组织中 E-钙粘蛋白、波形蛋白、TGF- β 蛋白表达比较(/ β -actin, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	E-钙粘蛋白	波形蛋白	TGF- β
空白组	10	0.654 $\pm$ 0.077	0.232 $\pm$ 0.060	0.220 $\pm$ 0.056
模型组	12	0.263 $\pm$ 0.045 **	0.630 $\pm$ 0.054 **	0.514 $\pm$ 0.038 **
中药高剂量组	12	0.426 $\pm$ 0.053 ** Δ	0.436 $\pm$ 0.052 ** $\Delta\Delta$	0.332 $\pm$ 0.035 ** $\Delta\Delta$
中药低剂量组	12	0.411 $\pm$ 0.067 ** Δ	0.472 $\pm$ 0.062 ** Δ	0.384 $\pm$ 0.046 ** Δ

注: 与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

- [6] GUPTA GP, MASSAGUÉ J. Cancer metastasis: building a framework [J]. Cell, 2006, 127(4): 679-695.
- [7] DE WEVER O, DEMETTER P, MAREEL M, et al. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth [J]. Int J Cancer, 2008, 123(10): 2229-2238.
- [8] 倪露露, 杨佳, 骆莹滨, 等. TGF- β 通过不同机制对肿瘤侵袭转移影响的研究述评 [J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(8): 1606-1608.
- [9] HA B, LEE EB, CUI J, et al. YB-1 overexpression promotes a TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition via Akt activation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 458(2): 347-351.
- [10] 蒋益兰, 潘敏求, 蔡美. 健脾消癌饮配合化疗拮抗大肠癌术后复发转移 62 例总结 [J]. 湖南中医杂志, 2007, 23(1): 1-3.
- [11] CÉSPÉDES MV, ESPINA C, GARCÍA-CABEZAS MA, et al. Orthotopic microinjection of human colon cancer cells in nude mice induces tumor foci in all clinically relevant metastatic sites [J]. Am J Pathol, 2007, 170(3): 1077-1085.
- [12] TALMADGE JE, FIDLER IJ. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective [J]. Cancer Res, 2010, 70(14): 5649-5669.
- [13] HA B, LEE EB, CUI J, et al. YB-1 overexpression promotes a TGF- β 1 induced epithelial mesenchymal transition via Akt activation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 458(2): 347-351.
- [14] YANG H, WANG L, ZHAO J, et al. TGF- β -activated SMAD3/4 complex transcriptionally upregulates N-cadherin expression in non-small cell lung cancer [J]. Lung Cancer, 2015, 87(3): 249-257.
- [15] ZU X, ZHONG J, TAN J, et al. TGF- β 1 induces HMGA1 expression in human breast cancer cells: implications of the involvement of HMGA1 in TGF- β signaling [J]. Int J Mol Med, 2015, 35(3): 693-701.
- [16] 辛力, 刘胜春, 张志芬. E-cadherin 在结直肠癌中的表达及临床意义 [J]. 中国医药科学, 2015, 5(10): 129-131.
- [17] 刘娟, 欧玉荣, 景桂英, 等. β -catenin 和 E-cadherin 在结直肠癌中的表达及其临床意义 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2013, 22(3): 234-239.
- [18] SATELLI A, LI S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy [J]. Cell Mol Life Sci, 2011, 68(18): 3033-3046.
- [19] 张俊君, 郭轶. N-cadherin 和 vimentin 在直肠腺癌中的表达及其临床意义 [J]. 重庆医学, 2014, 43(8): 935-940.

Effect of Jianpi Xiao'ai Fang (Spleen-fortifying Cancer-dissolving Decoction, 健脾消癌方) on Epithelial-mesenchymal Transition and Transforming Growth Factor- β in Tumor Tissue of Human Colorectal Cancer Xenograft Model in Nude Mice

TAN Xiaoning, LI Yongmin, LUO Ji, LUO Yan, JIANG Yilan

(Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha, 410006)

ABSTRACT Objective To explore the potential mechanism of *Jianpi Xiao'ai Fang* (Spleen-fortifying Cancer-dissolving Decoction, 健脾消癌方, JXF) in antagonizing the metastasis of colorectal cancer. **Methods** Sixty BALB/c-nu nude mice were randomized into a model group, a blank group and Chinese medicine low and high dose groups. The mice in each group were given HCT116 intramucosal injection into the cecum to establish a human colorectal cancer xenograft model except for those in the blank group. Chinese medicine low and high dose groups were respectively given JXF at the doses of 10 or 40 g/(kg · d) by gavage; the model group and the blank group were given 2 ml/100 g of normal saline by gavage. The interventions were all given once a day for 4 weeks. The expressions of E-cadherin, vimentin, and transforming growth factor- β (TGF- β) in the tumor tissue were detected by Western Blot; the liver, lung and lymphatic metastases of colon cancer in each group were compared. **Results** The liver, lung and lymphatic metastasis rates in Chinese medicine high and low dose groups were lower than those in the model group ($P < 0.05$). The rates of liver and lung metastasis in Chinese medicine high dose group were lower than those in the low dose group ($P < 0.05$). Compared with those in the blank group, the expression of E-cadherin significantly decreased, while the expressions of vimentin and TGF- β significantly increased in other groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); compared with those in the model group, the expressions of E-cadherin significantly increased, while the expressions of vimentin and TGF- β significantly decreased in Chinese medicine high and low dose groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). There was no significant difference in all the indexes between the high and low dose groups ($P > 0.05$). **Conclusion** JXF could up-regulate the expression of E-cadherin and down-regulate the expression of vimentin by TGF- β , and reverse the process of epithelial-mesenchymal transition in human colorectal cancer xenograft model, which may be one of the mechanisms in the antagonism to colorectal cancer metastasis.

Keywords colorectal cancer; metastasis; *Jianpi Xiao'ai Fang* (Spleen-fortifying Cancer-dissolving Decoction, 健脾消癌方); epithelial-mesenchymal transition; transforming growth factor- β (TGF- β)

(收稿日期: 2017-05-20; 修回日期: 2017-07-14)

编辑: 王利芬