

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2020.12.016

芪术抗癌方及其联合 5-氟尿嘧啶对 CT26. WT 结肠癌原位移植瘤模型小鼠肿瘤组织中凋亡相关蛋白表达的影响

杜相宇, 唐德才*

南京中医药大学, 江苏省南京市仙林大道 138 号, 210023

摘要 目的 探讨芪术抗癌方抗结肠癌的可能作用机制。方法 将 90 只 BALB/c 雄性小鼠随机分为空白组, 模型组, 5-氟尿嘧啶 (5-Fu) 组, 芪术抗癌方高、中、低剂量组, 联合高、中、低剂量组, 每组 10 只。除空白组外其余各组小鼠建立 CT26. WT 结肠癌原位移植瘤模型。术后 24 h 空白组与模型组予生理盐水 10 ml/(kg·d) 灌胃; 5-Fu 组予注射用 5-Fu 25 mg/(kg·d) 腹腔注射给药, 隔日 1 次; 芪术抗癌方高、中、低剂量组分别灌胃芪术抗癌方药液 24、12、6 g/(kg·d), 每日 1 次; 联合高、中、低剂量组分别灌胃芪术抗癌方相应剂量和 5-Fu 腹腔注射给药, 用药剂量和方法同上。各组均干预 3 周后处死小鼠取肿瘤组织, 称重并计算抑瘤率; 检测各组小鼠肿瘤组织中半胱天冬氨酸蛋白水解酶 3 (Caspase-3)、B 淋巴细胞瘤 2 (Bcl-2) 及 B 淋巴细胞瘤 2 相关 X 蛋白 (Bax) 蛋白及 mRNA 表达。结果 与模型组比较, 其余各组小鼠瘤体质量均降低 ($P < 0.01$); 联合高剂量组抑瘤率最高, 达 82.700%。各给药组对肿瘤组织中 Caspase-3、Bax 蛋白及 mRNA 表达均不同程度上调, 而 Bcl-2 蛋白及 mRNA 表达下调, 并且芪术抗癌方及其联合 5-Fu 对 Caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白及 mRNA 表达调节呈一定剂量依赖性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 芪术抗癌方可以抑制 CT26. WT 原位移植瘤的增殖, 且与 5-Fu 同用具有增效作用, 其机制可能与上调肿瘤组织中 Caspase-3、Bax 表达及下调 Bcl-2 表达有关。

关键词 芪术抗癌方; 结肠癌; 5-Fu; 细胞凋亡; 半胱天冬氨酸蛋白水解酶 3; B 淋巴细胞瘤 2

结肠癌是一种常见的消化道肿瘤, 2015 年中国癌症统计数据显示, 我国结直肠癌的发病率、病死率在全恶性肿瘤中均位居第五位, 且多数患者发现时已属中晚期^[1]。目前结肠癌以手术治疗为主, 放疗、化疗及靶向药物治疗为辅, 但术后五年生存率只有 50% 左右, 而结肠癌转移患者中, 五年生存率降低到 30%^[2]。近年来中医药在肿瘤治疗以及联合放疗、化疗药物治疗中扮演着越来越重要的角色。芪术抗癌方是我们治疗结肠癌的基础用方, 此方针对结肠癌原位癌气虚血瘀、痰热内蕴病机, 具有补气活血、清热化痰散结的功效。有研究^[3]表明, 结肠癌的发生发展与某些细胞凋亡蛋白的抑制或者活化关系十分密切, 如半胱天冬氨酸蛋白水解酶 3 (Caspase-3)、B 淋巴细胞瘤 2 (Bcl-2) 以及 B 淋巴细胞瘤 2 相关 X 蛋白 (Bax) 等。

本研究建立 CT26 结肠癌原位移植瘤小鼠模型, 检测其结肠癌组织中凋亡相关蛋白及其 mRNA 表达的变化, 进而阐述其抗结肠癌的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物及细胞株

SPF 级 BALB/c 雄性小鼠 90 只, 4~5 周龄, 体重 (20±2) g, 购自上海斯莱克实验动物有限公司, 实验动物许可证号码: SCXK (沪) 2017-0005。CT26. WT 鼠结肠癌细胞, 购于北京市肿瘤防治研究所。将 CT26. WT 细胞置于含 10% 小牛血清、青霉素 (100 U/mL)、链霉素 (100 U/mL) 的 RPMI 1640 培养液中, 37℃、5% CO₂ 条件下培养, 细胞贴壁生长, 细胞生长至 3 d 左右, 于显微镜下观察细胞长满贴壁, 即可传代, 每 3 d 传代 1 次。

1.2 药物及制备

芪术抗癌方组成: 黄芪 20 g, 莪术 10 g, 重楼 15 g, 仙鹤草 20 g, 天冬 15 g, 法半夏 10 g, 均购自

基金项目: 国家自然科学基金 (81573627, 81873021)

* 通讯作者: talknow@163.com, 13951978921

江苏省中医院。将上药 5 倍量加 4.5 L 水浸泡 0.5 h, 提取 2 次, 每次 1 h, 合并滤液浓缩至 225 ml, 即生药量浓度为 2 g/ml, 4℃ 保存备用。将 225 mg 注射用 5-氟尿嘧啶 (5-Fu, Solarbio 公司, 批号: 709D021) 加入 90 ml 生理盐水中, 摇匀后 4℃ 保存备用。

1.3 主要试剂与仪器

RPMI 1640 培养基、新生小牛血清、0.25% 胰蛋白酶, 均购自 Gibco 公司; Histoacryl 医用组织胶水 (德国贝朗公司, 批号: 1050044); 蛋白提取试剂盒 (江苏凯基生物科技股份有限公司, 批号: 20190620); DEPC 水 (碧云天生物技术有限公司, 批号: R0022); Trizol (合肥博美生物技术有限公司, 批号: vs20181205); SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (TliRNaseH Plus, 大连宝生物技术有限公司, 批号: A650t-1); PBS 缓冲液 (武汉谷歌生物技术有限公司, 批号: 190123); 考马斯亮蓝 G250 (南京瑞景科技有限公司, 批号: A01); BSA (碧云天生物技术公司, 货号: 190319); 蛋白上样缓冲液 [天根生化科技 (北京) 有限公司, 批号: 190218]; 预染 Marker (Thermo 公司, 批号: 18K14); 显影液 (新赛美生物技术有限公司, 批号: 190120115); Caspase-3、Bcl-2、Bax 抗体 (Proteintech 公司, 批号: 19677-1-AP, 12789-1-AP, 50599-2-Ig)。

荧光倒置生物显微镜 (南京江南永新光学有限公司, 型号: XD-202); 光密度测量计 (北京博达科贸公司, 型号: BD-600); 分析天平 [塞多利斯科仪器 (北京) 有限公司, 型号: BSA124S]; 垂直电泳槽 (型号: VE-480)、横向电泳槽 (型号: HE-420)、凝胶成像系统 (型号: 5300), 上海天能科技有限公司; 高速低温离心机 (Thermo Fisher Scientific 公司, 型号: MicroCL 17R); RT-PCR 仪 (杭州安杰思生物科技股份有限公司, 型号: AFD9600); 微量分光光度计 (杭州奥盛仪器有限公司, 型号: Nano-100)。

1.4 造模方法

取对数生长期的 CT26.WT 细胞制备成单细胞悬液, 细胞密度为 1×10^{10} 个/L, 抽取 0.1 ml, 即接种细胞数为 1×10^6 个, 接种于近交系 BALB/c 小鼠右腋下。10 d 后长出直径约 1 cm 的实体瘤。参考文献 [4-5] 建立小鼠 CT26.WT 结肠癌原位移植瘤模型: 首先处死皮下荷瘤小鼠, 皮肤消毒, 剥离皮下肿瘤, 立即浸入含青霉素、链霉素各 100 U/ml 的生理盐水中, 剔除周围结缔组织, 取

肿瘤生长旺盛的鱼肉状组织, 剪碎成 1 mm^3 大小的瘤块备用。将 BALB/c 小鼠分别称重, 2% 戊巴比妥钠 100 mg/kg 右侧腹腔内注射麻醉后取仰卧位, 固定四肢, 乙醇消毒腹部术野。左下腹部切口约 1 cm, 将切口右侧皮肤及皮下层稍作游离, 显露盲结肠, 拖出至皮下, 关闭其上下缘的腹腔。用 4 号针头轻轻刮去盲结肠交界处少许浆膜, 有血液渗出, 选取 1 粒已制备好的瘤块贴于划破处, 用 Histoacryl 医用组织胶水黏合, 将外置肠段回纳入腹, 缝合腹壁。整个过程遵循无菌操作原则。小鼠清醒后置于 SPF 级动物房中常规饲养。

1.5 分组及给药方法

90 只小鼠适应性饲养 3 天后, 采用随机数字表法分为空白组, 模型组, 5-Fu 组, 芪术抗癌方高、中、低剂量组, 联合高、中、低剂量组, 每组 10 只。除空白组外其余各组小鼠建立结肠癌原位移植瘤模型。术后 24 h 空白组与模型组予生理盐水 10 ml/(kg·d) 灌胃给药; 5-Fu 组予 5-Fu 25 mg/(kg·d) 腹腔注射给药, 隔日 1 次; 芪术抗癌方高、中、低剂量组分别灌胃芪术抗癌方药液 24、12、6 g/(kg·d), 每日 1 次, 其中中剂量为临床等效剂量; 联合高、中、低剂量组分别灌胃芪术抗癌方相应剂量和 5-Fu 腹腔注射给药, 用药剂量和方法同上。各组均干预 3 周。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 瘤体质量及平均抑瘤率 末次给药后第 2 天处死小鼠, 取瘤组织, 称瘤体质量并计算抑瘤率。平均抑瘤率(%) = (模型组平均瘤体质量 - 治疗组平均瘤体质量) / 模型组平均瘤体质量 $\times 100\%$ 。

1.6.2 RT-PCR 法检测肿瘤组织 Caspase-3、Bcl-2、Bax mRNA 表达 采用 Trizol 法分别提取各组肿瘤组织中总 RNA。计算 RNA 浓度和纯度, 按照 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 试剂盒进行反转录, 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成、扩增并检测。反应条件: 95℃ 预变性 5 min; 然后 95℃ 15 s, 60℃ 20 s, 72℃ 40 s 进行 40 个循环。扩增反应在 RT-PCR 仪上进行, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 数据统计方法对结果进行分析。Caspase-3: 上游 TCTGACTG-GAAAGCCGAAAC, 下游 GCAAGCCATCTCCTCAT-CA, 产物长度 269 bp; Bcl-2: 上游 AGGGGGAAA-CACCAGAATC, 下游 GGTAGCGACGAGAGAAGT, 产物长度 128 bp; Bax: 上游 ATGGAGCTGCAGAG-GATT, 下游 AATGTCCAGCCCATGATGGTTC, 产物长度 371 bp; β -actin: 上游 GCTGTGCTATGTT-GCTCTAG, 下游 CGCTCGTTGCCAATAGTG, 产物长

度 283 bp。

1.6.3 Western-blot 法检测肿瘤组织 Caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白表达 根据全蛋白提取试剂盒提取蛋白, BCA 法检测蛋白浓度。SDS-PAGE 电泳分离, PVDF 膜转膜, 5% 脱脂奶粉封闭; 一抗 4℃ 孵育过夜; 二抗室温孵育 2 h, 按 0.1 ml/cm² 显影液计算用量, 将显影液加于 PVDF 膜上, 暗室中迅速将膜蛋白贴在 X 光胶片上曝光, 洗片机中显影、洗像。调整曝光时间, 直至出现最佳条带。Western Blot 结果使用光密度测量计扫描, 使用 Quantity One 4.6.6 分析软件将条带灰度值数值化。

1.7 统计学方法

使用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 结果以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 法。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组小鼠瘤体质量及抑瘤率比较

空白组小鼠均无瘤体。表 1 示, 与模型组比较, 其余各组小鼠瘤体质量均降低 ($P < 0.01$); 与 5-Fu 组比较, 联合高剂量组小鼠瘤体质量降低 ($P < 0.05$); 芪术抗癌方高剂量组小鼠瘤体质量较芪术抗癌方低、中剂量组低 ($P < 0.05$); 联合低剂量组小鼠瘤体质量亦低于芪术抗癌方低剂量组 ($P < 0.05$); 联合高剂量组小鼠瘤体质量低于芪术抗癌方高剂量组, 联合中、低剂量组 ($P < 0.05$)。5-Fu 组及芪术抗癌方高、中、低剂量组抑瘤率分别为 73.736%、63.715%、45.248%、42.228%, 联合高、中、低剂量组抑瘤率分别为 82.700%、72.808%、66.596%。

2.2 各组小鼠肿瘤组织中凋亡相关因子 mRNA 表达比较

表 2 示, Caspase-3 mRNA 表达比较: 与模型

表 1 各组小鼠瘤体质量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	瘤体质量
模型组	10	3.162 ± 0.867
5-Fu 组	10	0.831 ± 0.345*
芪术抗癌方高剂量组	10	1.147 ± 0.512*▲#
芪术抗癌方中剂量组	10	1.732 ± 0.672*
芪术抗癌方低剂量组	10	1.827 ± 0.879*
联合高剂量组	10	0.547 ± 0.251*△▽
联合中剂量组	10	0.860 ± 0.526*#▽
联合低剂量组	10	1.056 ± 0.758*▲▽

注: 与模型组比较, * $P < 0.01$; 与 5-Fu 组比较, △ $P < 0.05$; 与芪术抗癌方低剂量组比较, ▲ $P < 0.05$; 与芪术抗癌方中剂量组比较, # $P < 0.05$; 与芪术抗癌方高剂量组比较, ▽ $P < 0.05$; 与联合高剂量组比较, ▼ $P < 0.05$

组比较, 除芪术抗癌方中、低剂量组外, 其余各组均增加 ($P < 0.01$); 芪术抗癌方高剂量组高于芪术抗癌方低剂量组 ($P < 0.05$); 联合高剂量组高于 5-Fu 组、芪术抗癌方高剂量组、联合中剂量组和联合低剂量组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 联合中剂量组高于芪术抗癌方中剂量组、联合低剂量组 ($P < 0.05$); 联合低剂量组高于芪术抗癌方低剂量组 ($P < 0.05$)。

Bax mRNA 表达比较: 与模型组比较, 其余各组均增加 ($P < 0.01$); 联合高剂量组高于芪术抗癌方高剂量组、联合中剂量组和联合低剂量组 ($P < 0.05$); 联合中剂量组高于芪术抗癌方中剂量组, 联合低剂量组高于芪术抗癌方低剂量组 ($P < 0.05$)。

Bcl-2 mRNA 表达比较: 与模型组比较, 5-Fu 组和联合高、中、低剂量组降低 ($P < 0.05$); 芪术抗癌方低剂量组高于芪术抗癌方中、高剂量组和联合低剂量组 ($P < 0.05$); 联合高剂量组低于芪术抗癌方高剂量组和联合中、低剂量组 ($P < 0.05$); 联合中剂量组低于芪术抗癌方中剂量组 ($P < 0.05$)。

表 2 各组小鼠肿瘤组织中凋亡相关因子 mRNA 表达比较 (灰度值, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	Caspase-3	Bax	Bcl-2
模型组	10	1.224 ± 0.202	0.980 ± 0.245	2.777 ± 1.555
5-Fu 组	10	10.972 ± 2.177**	4.924 ± 1.161**	0.847 ± 0.088*
芪术抗癌方高剂量组	10	3.136 ± 0.573**▲	3.282 ± 0.594**	1.082 ± 0.082▲
芪术抗癌方中剂量组	10	1.192 ± 0.179	2.681 ± 0.307**	1.304 ± 0.267▲
芪术抗癌方低剂量组	10	0.160 ± 0.073	1.835 ± 0.249**	3.151 ± 0.486
联合高剂量组	10	23.236 ± 3.581**△▽☆	7.463 ± 1.927**▽△☆	0.027 ± 0.004*△▽☆
联合中剂量组	10	17.791 ± 1.193**△#☆	4.922 ± 1.537**#	0.448 ± 0.080*△#
联合低剂量组	10	4.075 ± 0.352**▲	4.091 ± 1.244**▲	0.717 ± 0.075*▲

注: Caspase-3, 半胱天冬氨酸蛋白酶 3; Bcl-2, B 淋巴细胞瘤 2; Bax, B 淋巴细胞瘤 2 相关 X 蛋白; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 5-Fu 组比较, △ $P < 0.01$; 与芪术抗癌方低剂量组比较, ▲ $P < 0.05$; 与芪术抗癌方中剂量组比较, # $P < 0.05$; 与芪术抗癌方高剂量组比较, ▽ $P < 0.05$; 与联合中剂量组比较, ▼ $P < 0.05$; 与联合低剂量组比较, ☆ $P < 0.05$

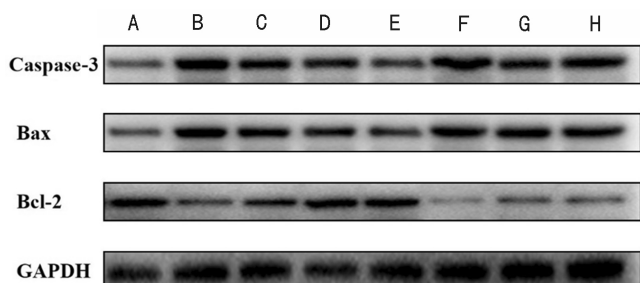
表 3 各组小鼠肿瘤组织中凋亡相关因子蛋白表达比较 (光密度值, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	Caspase-3	Bax	Bcl-2
模型组	10	0.111 ± 0.002	0.113 ± 0.000	0.787 ± 0.017
5-Fu 组	10	0.509 ± 0.046*	0.506 ± 0.022*	0.341 ± 0.022*
芪术抗癌方高剂量组	10	0.366 ± 0.009*▲#	0.373 ± 0.011*▲#	0.456 ± 0.011*▲#
芪术抗癌方中剂量组	10	0.280 ± 0.014*▲	0.293 ± 0.005*▲	0.561 ± 0.021*▲
芪术抗癌方低剂量组	10	0.235 ± 0.007*	0.237 ± 0.005*	0.672 ± 0.025*
联合高剂量组	10	0.571 ± 0.024*▽▼☆	0.557 ± 0.021*△▽▼☆	0.102 ± 0.000*△△▽▼☆
联合中剂量组	10	0.291 ± 0.148*☆	0.294 ± 0.006*☆	0.184 ± 0.001*△△#☆
联合低剂量组	10	0.470 ± 0.017*▲	0.436 ± 0.020*▲	0.260 ± 0.019*△△▲

注: Caspase-3, 半胱天冬氨酸蛋白水解酶 3; Bcl-2, B 淋巴细胞瘤 2; Bax, B 淋巴细胞瘤 2 相关 X 蛋白; 与模型组比较, * $P < 0.01$; 与 5-Fu 组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$; 与芪术抗癌方低剂量组比较, ▲ $P < 0.05$; 与芪术抗癌方中剂量组比较, # $P < 0.05$; 与芪术抗癌方高剂量组比较, ▽ $P < 0.05$; 与联合中剂量组比较, ▼ $P < 0.05$; 与联合组低剂量组比较, ☆ $P < 0.05$

2.3 各组小鼠肿瘤组织中凋亡相关因子蛋白表达比较

表 3 示, 与模型组比较, 其余各组小鼠肿瘤组织 Caspase-3、Bax 蛋白表达均增加, Bcl-2 蛋白表达均降低 ($P < 0.01$); 芪术抗癌方各剂量组小鼠 Caspase-3、Bax 蛋白表达两两比较差异均有统计学意义, Bcl-2 蛋白表达随浓度增加而降低 ($P < 0.05$); 与 5-Fu 组比较, 联合高剂量组 Bax 蛋白表达升高, 联合高、中、低剂量组 Bcl-2 蛋白表达均升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 联合各剂量组小鼠 Caspase-3、Bax 蛋白表达两两比较差异均有统计学意义, Bcl-2 蛋白表达随浓度增加而降低 ($P < 0.05$); 联合中剂量组 Bcl-2 蛋白表达低于芪术抗癌方中剂量组 ($P < 0.05$); 联合低剂量组 Caspase-3、Bax 蛋白表达较芪术抗癌方低剂量组高, Bcl-2 蛋白表达较芪术抗癌方低剂量组低 ($P < 0.05$)。各组小鼠肿瘤组织 Caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白电泳图见图 1。



注: Caspase-3, 半胱天冬氨酸蛋白水解酶 3; Bcl-2, B 淋巴细胞瘤 2; Bax, B 淋巴细胞瘤 2 相关 X 蛋白; A, 模型组; B, 5-Fu 组; C, 芪术抗癌方高剂量组; D, 芪术抗癌方中剂量组; E, 芪术抗癌方低剂量组; F, 联合高剂量组; G, 联合中剂量组; H, 联合低剂量组

图 1 各组小鼠肿瘤组织中 Caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白电泳图

3 讨论

目前结肠癌发病率持续升高, 有研究^[8]表明, 中医药联合化疗药可以通过提高患者免疫能力减少肿瘤转移, 降低化疗毒副作用, 增强化疗效果, 降低原位癌增殖等。中医古代文献中早已有“肠覃”“脏毒”等类似于结肠癌症状的记载, 对其病机的认识始终以正气虚衰、血瘀为主, 而或间杂有痰浊、邪热、气阴不足等证^[9]。因此, 治疗上不可一味攻邪, 应注意扶正与祛邪并进。芪术抗癌方寒温并用, 补散同施, 以黄芪、莪术共为君药, 使气旺血行, 积聚自消, 寓祛邪于扶正之中, 药力缓而不弱; 臣以重楼清热解毒, 法半夏化痰散结, 两药配伍清热散结; 佐以天冬养阴生津, 与君药相配气阴双补; 以仙鹤草为使, 可引药直入病位。诸药合用气阴双补、气血同调、兼顾痰浊、热毒自清。本研究结果显示, 芪术抗癌方各剂量组和联合各剂量组均可以降低 CT26.WT 结肠癌原位移植瘤瘤体质量, 且随着芪术抗癌方剂量的增加, 瘤体质量逐渐降低, 说明具有一定剂量依赖性。联合高剂量组瘤体质量亦较 5-Fu 组降低, 说明高剂量的芪术抗癌方联合 5-Fu 治疗抑制瘤体增长效果优于单用 5-Fu 治疗。

在结肠癌的发生发展过程中, 凋亡相关蛋白对其增殖起着重要作用。有研究^[8]表明, Bax (促凋亡) /Bcl-2 (抑制凋亡) 的比值可决定 Caspase-3 这一重要的促凋亡因子的表达, 而 Caspase-3 是凋亡细胞 Caspase 级联反应必经的共同通路, 是导致肿瘤发生发展的重要因素。另有研究^[9]表明, 通过调节 Bax/Bcl-2 和半胱天冬酶途径可诱导 HT-29 人结肠腺癌细胞凋亡。Bcl-2 和 Bax 在肿瘤细胞凋亡中具有重要的调控作用, 过度表达的 Bcl-2 或者下调 Bax 表达可以抑制许多因素诱导的多种肿瘤细胞凋亡, 进而促进肿瘤的发生发展^[10]。下调的 Bcl-2

或者过表达的 Bax 可以促进多种因素诱导的肿瘤细胞的凋亡,使肿瘤细胞凋亡率增高^[11]。

本研究结果显示,各给药组对 CT26. WT 结肠癌原位移植瘤小鼠结肠癌组织中 Caspase-3、Bax 蛋白及 mRNA 表达均上调,而 Bcl-2 蛋白及 mRNA 表达下调;并且对肿瘤组织中 Caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白及 mRNA 表达调节作用,芪术抗癌方呈一定剂量依赖性,高剂量的芪术抗癌方效果更好。同时,高剂量的芪术抗癌方联合 5-Fu 治疗在对 Caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白及 mRNA 表达调节方面优于单用 5-Fu。以上结果说明,芪术抗癌方抗结肠癌增殖疗效肯定,且与 5-Fu 同用具有增效作用,其机制可能与上调肿瘤组织中 Caspase-3、Bax 表达、降低 Bcl-2 表达有关。

参考文献

- [1] 顾晋,汪建平. 中国结直肠癌诊疗规范(2017 年版) [J]. 中华临床医师杂志(电子版),2018,12(1):3-23.
- [2] CÁ CERES B, RAMIREZ A, CARRILLO E, et al. Deciphering the mechanism of action involved in enhanced suicide gene colon cancer cell killer effect mediated by gef and ap- optin [J]. Cancers, 2019, 11(2):264-282.

Effects of *Qizhu Kangai Formula* (芪术抗癌方) and Its Combination with 5-Fluorouracil on the Expression of Apoptosis-related Proteins in Tumor Tissues of CT26. WT Colon Cancer Orthotopic Transplantation Tumor Model Mice

DU Xiangyu, TANG Decai

Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023

ABSTRACT Objective To explore the effects and possible mechanisms of *Qizhu Kangai Formula* (芪术抗癌方) on colon carcinoma. **Methods** A total of 90 male BALB / c mice were randomly divided into a blank group, a model group, a 5-fluorouracil (5-Fu) group, *Qizhu Kangai Formula* high, medium and low dose group, combined high, medium and low dose group, with 10 mice in each group. Except for the blank group, CT26. WT colon cancer orthotopic transplantation models of mice were established. Twenty-four hours after operation, the blank group and the model group were given 10 ml/(kg · d) of normal saline for gavage; the 5-Fu group was given intraperitoneal injection of 5-fluorouracil 25 mg/(kg · d) once every other day; *Qizhu Kangai Formula* high-dose, medium-dose, and low-dose groups were fed with *Qizhu Kangai Fang* 24, 12, 6 g/(kg · d) liquid solution once a day; Combined high-dose, middle-dose, and low-dose groups, were administered the corresponding doses of *Qizhu Kangai Fang* and 5-fluorouracil intraperitoneally. The dosages and methods were the same as above. Three weeks after intervention, the mice in all groups were killed and tumor tissues were taken to weigh and calculate the tumor inhibition rate; Caspase-3 and B lymphoma 2 (Bcl-2) and blymphoma2 related Bax protein (Bax) and mRNA expression in each group were detected. **Results** Compared with the model group, the tumor mass weight of the mice in other groups decreased ($P < 0.01$); the combined high-dose group had the highest tumor inhibition rate, reaching 82.700%. All administration groups up-regulated the expression of Caspase-3, Bax protein and mRNA in tumor tissue to varying degree, while the expression of Bcl-2 protein and mRNA was down-regulated. The inhibition and regulation effect of *Qizhu Kangai Formula* and combination with 5-fluorouracil on Caspase-3, Bax, Bcl-2 protein and mRNA expression was dose-dependent ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** *Qizhu Kangai Formula* could inhibit the proliferation of CT26. WT orthotopic transplanted tumors, and it has a synergistic effects with 5-Fu. The mechanisms may be related to up-regulation of Caspase-3 and Bax expression and down-regulation of Bcl-2 expression in tumor tissues.

Keywords *Qizhu Kangai Formula* (芪术抗癌方); colon cancer; 5-fluorouracil; apoptosis; caspase-3; B lymphoma 2

[3] 石远凯,孙燕. 临床肿瘤内科手册 [M]. 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 395-425.

[4] HEYER J. Mouse models for colorectal cancer [J]. Am J Cancer Res, 2013, 3(3):240-250.

[5] JACKSTADT R, SANSOM OJ. Mouse models of intestinal cancer [J]. J Pathol, 2016, 238(2):141-151.

[6] 张宗兰,洪磊,方明治. 中医药联合化疗治疗大肠癌研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(9):221-224.

[7] 何亚梅,陈音. 中医药治疗大肠癌研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(A5):98-99.

[8] CROKER BA, O'DONNELL JA, NOWELL CJ, et al. Fas-mediated neutrophil apoptosis is accelerated by Bid, Bak, and Bax and inhibited by Bcl-2 and Mcl-1 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(32):13135-13140.

[9] ARDESTANI SK, TAFVIZI F, EBRAHIMI MT. Heat-killed probiotic bacteria induce apoptosis of HT-29 human colon adenocarcinoma cell line via the regulation of Bax/Bcl2 and caspases pathway [J]. Human Amp Experimental Toxicol, 2019, 38(9):1069-1081.

[10] GUO B, ZHAI D, CABEZAS E, et al. Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation [J]. Nature, 2003, 423(6938):456-461.

[11] 杨连君. bcl-2, bax 与肿瘤细胞凋亡 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2003, 10(3):232-234.

(收稿日期: 2019-09-15; 修回日期: 2019-12-03)

编辑: 邓 媛