

复方藤梨汤对结肠癌细胞移植瘤裸鼠肿瘤生长及 Wnt/β-catenin 信号通路的影响

刘 强, 赖象权*

(贵州中医药大学第一附属医院肛肠科, 贵州 贵阳 550000)

摘要: 目的 探究复方藤梨汤对结肠癌 HCT116 细胞移植瘤裸鼠肿瘤生长的抑制作用。方法 建立人结肠癌 HCT116 细胞移植瘤裸鼠模型, 采用不同剂量复方藤梨汤 (12、24、48 g/kg) 进行 18 d 的灌胃给药。取裸鼠移植瘤, 检测肿瘤质量并计算抑瘤率; TUNEL 染色检测肿瘤组织细胞凋亡情况; HE 染色检测肿瘤组织细胞密度及转移情况; 免疫组化法检测肿瘤组织 c-Myc、cyclinD1 表达; Western blot 法检测肿瘤组织 β-catenin、E-cadherin、Vimentin、MMP-7 蛋白表达; RT-qPCR 法检测肿瘤组织 β-catenin、E-cadherin、Vimentin mRNA 表达。结果 与模型组比较, 不同剂量复方藤梨汤对结肠癌小鼠肿瘤生长均具有抑制作用, 其中高剂量组抑瘤率达 35.59%; 可降低细胞密度, 促进肿瘤细胞凋亡, 且与剂量呈正相关; 肿瘤组织 c-Myc、cyclinD1、β-catenin、Vimentin、MMP-7 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), E-cadherin 蛋白表达升高 ($P < 0.05$); E-cadherin mRNA 表达升高 ($P < 0.05$), β-catenin、Vimentin mRNA 表达降低 ($P < 0.05$)。结论 复方藤梨汤可以抑制结肠癌细胞移植瘤裸鼠肿瘤生长, 其作用机制可能与调控 Wnt/β-catenin 信号通路有关。

关键词: 复方藤梨汤; 结肠癌; HCT116 细胞; 移植瘤; Wnt/β-catenin 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2025)02-0601-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2025.02.040

结肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是一种在消化系统中常见的高度转移性疾病, 也是全球最普遍的癌症之一。仅在 2020 年, 全球新诊断 CRC 的患者就超过了 200 万例^[1-3]。目前, CRC 的治疗主要以化疗和放疗为主, 但由于高转移率和高复发率, CRC 的预后仍然堪忧。Wnt/β-catenin 信号通路在胚胎发育和维持组织稳态中扮演着关键的角色^[4]。然而, 该通路的异常激活与癌症密切相关, 尤其在 CRC 的发生发展中起到关键的驱动作用^[5-6]。研究发现, 高达 80% 的 CRC 患者表现出 β-catenin 蛋白在细胞核内积聚^[7-8]。

传统中医药在肿瘤治疗中展现出了诸多优势, 包括多成分的综合作用、多种信号通路的调控以及对炎症因子的抑制^[9-10]。复方藤梨汤是贵州中医药大学第一附属医院赖象权教授多年用于治疗 CRC 术后的临床经验方, 由藤梨根、鳖甲、冬凌草、黄芪和当归组成^[11]。前期研究发现, 复方藤梨汤通过负调控 Wnt/β-catenin 信号通路, 在一定程度上抑制小鼠 CRC 细胞的增殖和迁移, 并诱导了其凋亡。然而, 在复方藤梨汤干预 CRC 小鼠后, 对肿瘤的生长及 Wnt/β-catenin 信号通路相关蛋白在其中的表达机制仍需深入研究。因此, 本研究旨在观察复方藤梨汤对小鼠 CRC 移植瘤的影响, 并以 Wnt/β-catenin 信号通路的调节为切入

点, 深入探讨其抑制 CRC 的潜在分子机制, 以期为 CRC 的治疗提供新的理论基础和干预思路。

1 材料

1.1 动物与细胞株 32 只 SPF 级 BALB/c 雄性裸鼠, 3 周龄, 购于江苏集萃药康生物科技股份有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXX(苏)2018-0008], 饲养于 SPF 级实验室, 温度 20~26 ℃, 相对湿度 40%~70%, 自由饮食。本研究所涉及的动物实验均经贵州中医药大学实验动物管理和使用委员会批准 (伦理审查编号 20220133)。人结肠癌细胞 HCT116 细胞株 (批号 BNCC287750), 购于北京北纳创联生物技术研究院。

1.2 药物 复方藤梨汤由藤梨根 120 g、鳖甲 80 g、冬凌草 80 g、黄芪 120 g、当归 80 g 组成, 药材购于北京同仁堂股份有限公司, 加 1 L 纯净水浸泡 1 h, 常规方法煎煮, 药液浓缩至 100 mL, 质量浓度为 4.8 g/mL, 即高剂量, 倍比稀释至 2.4、1.2 g/mL, 即中、低剂量。

1.3 试剂 二甲苯、无水乙醇、95% 乙醇 (批号 33535、32061、32061, 西陇科学股份有限公司); 苏木素染液、苏木素返蓝液、伊红染色液 (货号 G1004、G1040、G1001, 武汉赛维尔生物科技有限公司); 超净高级封片胶 (货号 BA7004, 珠海贝索生物技术有限公司); TUNEL 检测试剂

收稿日期: 2024-04-02

基金项目: 贵州省科技基金 (黔科合支撑 S [2020] 2313 号)

作者简介: 刘 强 (1982—), 男, 硕士, 副主任医师, 从事中医防治肛肠疾病的研究。Tel: 13511902490, E-mail: 382302175@qq.com

* 通信作者: 赖象权 (1966—), 男 (侗族), 主任医师, 博士生导师, 从事中医防治肛肠疾病的研究。Tel: 18384046662, E-mail: 845354140@qq.com

盒 (货号 C1090, 上海碧云天生物技术股份有限公司); DAPI 染液 (货号 KGA215-50, 江苏凯基生物技术股份有限公司)。

1.4 仪器 组织脱水机 (型号 KD-TS3S1, 浙江省金华市科迪仪器设备有限公司); 石蜡包埋机、摊片机 (型号 HistoCore Arcadia、HI1210, 德国 Leica 公司); 荧光显微镜、显微镜 (型号 CKX53、BX43, 日本 Olympus 公司); 超高灵敏度化学发光成像系统仪 [型号 Chemi DocTM XRS+, 伯乐生命医学产品 (上海) 有限公司]。

2 方法

2.1 造模 参考文献 [8] 报道, 3 周龄雄性 BALB/c nude 裸鼠右侧背部皮下接种 0.1 mL 5×10⁷/mL 的 HCT116 细胞悬液, 构建细胞系来源的异体移植肿瘤 (cell line-derived xenograft, CDX) 模型, 待肿瘤体积大于 100 mm³ 时, 选择肿瘤生长无破溃荷鼠作为供瘤鼠, 麻醉, 处死动物, 解剖取瘤体组织, 分割为 3 mm×3 mm 左右肿瘤块。待转接裸鼠右侧背部近腋下位置消毒备皮, 将肿瘤块塞入皮下, 缝合, 消毒, 构建人结肠癌裸鼠皮下移植瘤模型, 保温至裸鼠苏醒后继续于 SPF 级环境饲养。接种 10 d 后观察肿瘤稳定且体积出现明显增大, 即为造模成功。

2.2 分组及给药 将造模成功的裸鼠随机分为模型组和复方藤梨汤低、中、高剂量组 (12、24、48 g/kg), 每组 6 只。复方藤梨汤组每天灌胃给药 2 次, 每次剂量为设计剂量的一半, 按照 10 mL/kg 给药体积给药; 模型组灌胃给予等体积生理盐水, 给药 18 d。

2.3 裸鼠体质量测定及抑瘤率计算 每天记录各组裸鼠体质量。于末次给药 24 h 后, 颈椎脱臼处死小鼠, 取肿瘤组织称重, 计算抑瘤率, 公式为抑瘤率 = [(模型组平均瘤重-实验组平均瘤重)/模型组平均瘤重]×100%。

2.4 TUNEL 染色检测肿瘤组织细胞凋亡情况 取部分肿瘤组织于多聚甲醛中固定, 将固定好的组织样本经乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡后, 石蜡包埋, 切片。将组织石蜡切片烤片, 经二甲苯和梯度乙醇脱蜡至水, 切片于湿盒中滴加 50 μg/mL Proteinase K 工作液, 37 °C 反应 30 min; PBS 洗涤 3 次, 滴加 DAPI 避光孵育 5 min, 对标本进行染核。切片于荧光显微镜下观察并采集图像。DAPI 染色在紫外的激发下为蓝色, TUNEL 阳性表达为相应荧光素标记的红光。

2.5 HE 染色观察肿瘤组织病理学 取肿瘤组织石蜡切片, 脱蜡水化, 苏木素染色、伊红染色、脱水封片, 最后于显微镜下观察并采集图像。

2.6 免疫组化法检测肿瘤组织 c-Myc、cyclinD1 蛋白表达 取肿瘤组织石蜡切片, 脱蜡水化、抗原修复、通透、封闭、分别孵育 c-Myc 和 cyclinD1 一抗、孵育二抗、DAB 显色、苏木素复染、脱水透明、封片, 最后于显微镜下观察并采集图像。使用 ImageJ 软件进行定量分析。

2.7 RT-qPCR 法检测肿瘤组织 β -catenin、Vimentin mRNA 表达 取各组肿瘤组织, 提取 RNA, 再根据逆转录试剂盒

合成 cDNA, 以 cDNA 为模板, 在荧光定量 PCR 仪上进行扩增反应, 以 β -actin 为内参, 采用 2^{-ΔΔCT} 法计算 β -catenin、Vimentin mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	序列
β -catenin	正向 5'-CACATCAGGACACCCAACGG-3' 反向 5'-CGTATGTTGCCACGCCCTT-3'
E-cadherin	正向 5'-ATCGCCTACACCACCGTCA-3' 反向 5'-GGCATCATCATCGGTCACCTT-3'
Vimentin	正向 5'-GCCAGCACTATGAAAGCGTG-3' 反向 5'-TCCAGGGACTCGTTAGTGC-3'
β -actin	正向 5'-AGGGAAATCGTGCCTGAC-3' 反向 5'-CATACCAAGAAGGAAGGCT-3'

2.8 Western blot 法检测肿瘤组织 β -catenin、E-cadherin、Vimentin、MMP-7 蛋白表达 取各组肿瘤组织, 提取组织蛋白, 蛋白定量后加热变性, 备用。各组蛋白样本经电泳、转膜后, 加封闭液封闭, 加 β -catenin、E-cadherin、Vimentin、MMP-7、 β -actin 一抗 4 °C 孵育过夜, 次日加 HRP conjugated Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) 二抗室温孵育 1 h, 洗膜后显影, 采集各蛋白条带图片。通过 ImageJ 软件进行灰度值分析。

2.9 统计学分析 通过 SPSS 19 软件进行处理, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验。*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 复方藤梨汤对 CRC 移植瘤裸鼠肿瘤生长的影响 与模型组比较, 复方藤梨汤各剂量组裸鼠体质量均降低 (*P*<0.05), 瘤重均有不同程度的降低, 其中高剂量组瘤重降低较为显著 (*P*<0.05), 呈剂量依赖性, 见图 1、表 1。

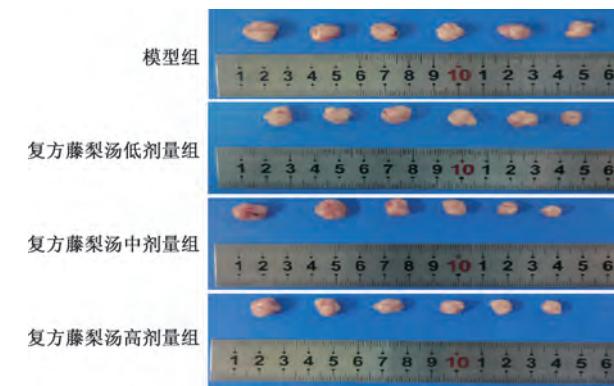


图 1 各组裸鼠肿瘤形态

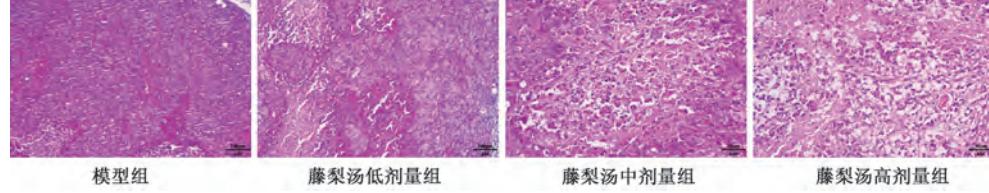
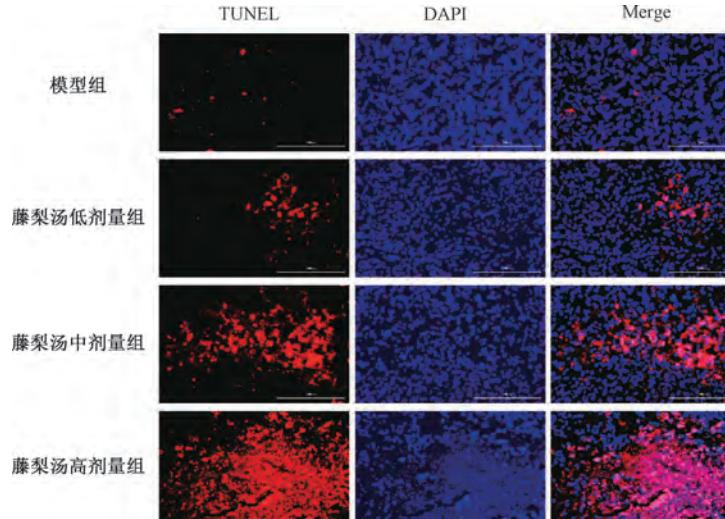
3.2 复方藤梨汤对 CRC 移植瘤裸鼠肿瘤组织形态学的影响 如图 2 所示, 模型组肿瘤细胞丰富, 胞体饱满, 细胞核染色深, 增生活跃, 毛细血管丰富, 大量侵入肌组织, 坏死区较少; 与模型组比较, 复方藤梨汤各剂量组肿瘤组织均有不同程度的坏死区, 细胞核可见不同程度的固缩, 组织内毛细血管数量减少, 细胞密度随剂量的增加而降低。

表1 各组CRC移植瘤裸鼠体质量、瘤重和抑瘤率比较
($\bar{x} \pm s$, n=6)

组别	体质量/g	瘤重/g	抑瘤率/%
模型组	23.58±2.47	0.59±0.05	—
复方藤梨汤低剂量组	20.72±0.67*	0.55±0.08	6.78
复方藤梨汤中剂量组	20.12±1.06*	0.42±0.16	28.81
复方藤梨汤高剂量组	20.08±1.84*	0.38±0.14*	35.59

注:与模型组比较, * $P<0.05$ 。

3.3 复方藤梨汤对CRC移植瘤裸鼠肿瘤组织细胞凋亡的影响 如图3所示,与模型组比较,复方藤梨汤各剂量组裸鼠肿瘤组织细胞凋亡程度增加,且呈剂量依赖性。

图2 各组CRC移植瘤裸鼠肿瘤组织形态学(HE染色, $\times 200$)图3 各组CRC移植瘤裸鼠肿瘤组织细胞凋亡情况($\times 400$)

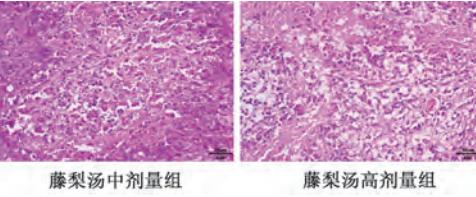
3.6 复方藤梨汤对CRC移植瘤裸鼠肿瘤组织 β -catenin、E-cadherin、Vimentin、MMP-7蛋白表达的影响 如图6所示,与模型组比较,复方藤梨汤中、高剂量组裸鼠肿瘤组织 β -catenin蛋白表达降低($P<0.05$),E-cadherin蛋白表达升高($P<0.05$),复方藤梨汤各剂量组裸鼠肿瘤组织Vimentin、MMP-7蛋白表达均降低($P<0.05$)。

4 讨论

课题组前期体外研究证明,复方藤梨汤通过调节Wnt/ β -catenin信号通路对小鼠CRC细胞产生抗肿瘤作用,但其在体内的调节作用尚不清楚。因此,本研究采用裸鼠移植CRC肿瘤块皮下成瘤,用不同剂量复方藤梨汤进行灌胃干预,以探究其对CRC小鼠肿瘤抑制作用。实验结果显示,复方藤梨汤可抑制CRC移植瘤小鼠肿瘤的生长,且高剂量组的抑瘤率达35.59%,还可促进肿瘤细胞的坏死和凋亡。本研究首次证明复方藤梨汤在体内抑制了CRC移植瘤的

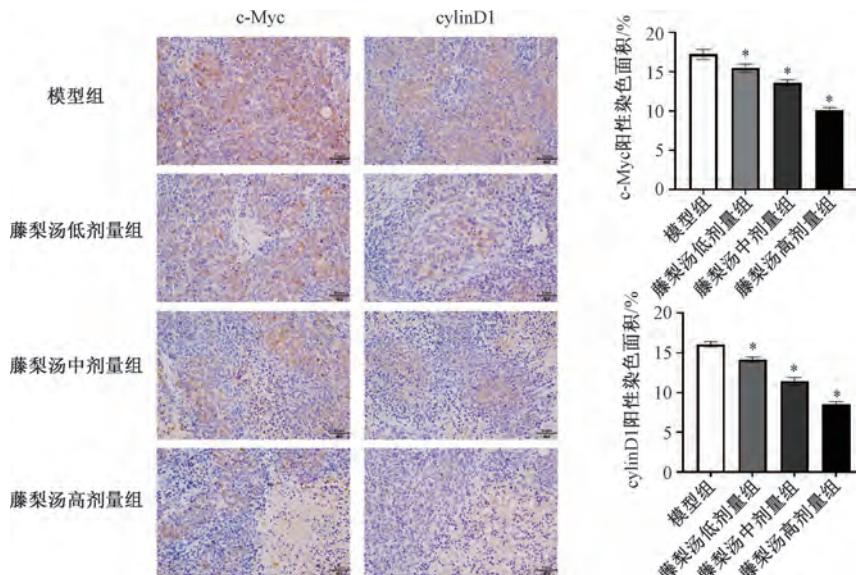
3.4 复方藤梨汤对CRC移植瘤裸鼠肿瘤组织c-Myc、cyclinD1蛋白表达的影响 如图4所示,与模型组比较,复方藤梨汤各剂量组裸鼠肿瘤组织c-Myc、cyclinD1蛋白表达降低($P<0.05$),且呈剂量依赖性。

3.5 复方藤梨汤对CRC移植瘤裸鼠肿瘤组织 β -catenin、E-cadherin、Vimentin mRNA表达的影响 如图5所示,与模型组比较,复方藤梨汤中、高剂量组裸鼠肿瘤组织 β -catenin、Vimentin mRNA表达均降低($P<0.05$),复方藤梨汤各剂量组裸鼠肿瘤组织E-cadherin mRNA表达均升高($P<0.05$)。



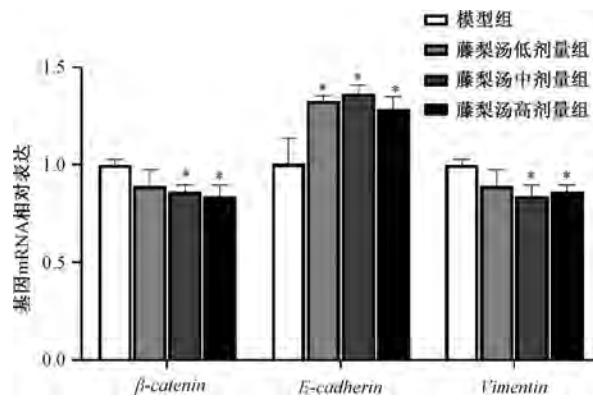
生长。

Wnt/ β -catenin通路在Wnt信号传导中起关键作用,其中 β -catenin在信号传递中扮演着重要角色。当细胞浆内和核内的 β -catenin异常积聚时,会激活Wnt/ β -catenin通路下游的蛋白,包括c-Myc、细胞周期蛋白D1(cyclinD1)等,从而促进肿瘤细胞增殖,减少凋亡,最终导致肿瘤的发生和发展^[12-14]。莫安徽等^[15]研究发现,白藜芦醇能够抑制Wnt/ β -catenin信号通路激活从而抑制CRC大鼠肿瘤组织生长;Hao等^[16]研究显示,姜黄素可能通过抑制Wnt/ β -catenin信号通路抑制CRC小鼠肿瘤生长。王容容等^[17]研究发现,固本消癌方主要通过抑制Wnt/ β -catenin通路下游c-Myc蛋白的表达调控肠癌代谢,进而在肠癌的临床治疗中发挥作用。本研究结果表明,复方藤梨汤能够抑制CRC移植瘤小鼠 β -catenin、c-Myc、cyclinD1蛋白表达及 β -catenin mRNA表达,与上述研究一致。



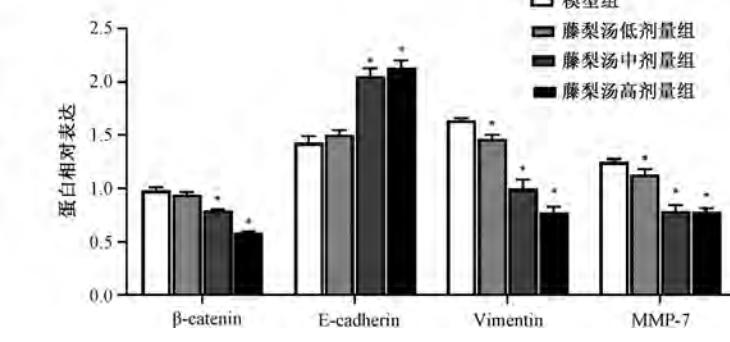
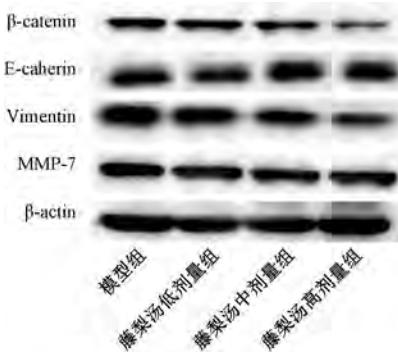
注: 与模型组比较, * $P < 0.05$ 。

图4 各组CRC移植瘤裸鼠肿瘤组织c-Myc、cylindinD1蛋白表达比较($\times 400$, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)



注: 与模型组比较, * $P < 0.05$ 。

图5 各组CRC移植瘤裸鼠肿瘤组织 β -catenin、E-cadherin、Vimentin mRNA表达比较($\bar{x} \pm s$, $n=6$)



注: 与模型组比较, * $P < 0.05$ 。

图6 各组CRC移植瘤裸鼠肿瘤组织 β -catenin、E-cadherin、Vimentin、MMP-7蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

体内外均能抑制CRC的侵袭和转移,该机制与抑制Wnt/ β -catenin信号通路进而抑制EMT有关。本研究发现,复方藤梨汤可促进CRC移植瘤中E-cadherin蛋白及mRNA表达,同时抑制Vimentin蛋白及mRNA表达,与上述研究

一致。

综上所述,复方藤梨汤可以在一定程度上抑制人结肠癌HCT116细胞移植瘤的生长,其作用机制可能与调控Wnt/ β -catenin信号通路,促进细胞凋亡、抑制细胞增殖及

迁移有关。本研究首次揭示复方藤梨汤对CRC移植瘤小鼠肿瘤生长的抑制作用及可能的分子机制,为复方藤梨汤作为抗肿瘤药奠定了理论基础,但抗结肠癌的分子机制错综复杂,还需更进一步的探究。

参考文献:

- [1] Tao L, Zhu Y, Gu Y, et al. ARHGAP25: A negative regulator of colorectal cancer (CRC) metastasis via the Wnt/β-catenin pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 858: 172476.
- [2] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [3] Richards S, Walker J, Nakanishi M, et al. Haploinsufficiency of Casitas B-lineage lymphoma augments the progression of colon cancer in the background of adenomatous polyposis coli inactivation[J]. *Am J Pathol*, 2020, 190(3): 602-613.
- [4] Liu J, Xiao Q, Xiao J, et al. Wnt/β-catenin signaling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 3.
- [5] Cheng X, Xu X, Chen D, et al. Therapeutic potential of targeting the Wnt/β-catenin signaling pathway in colorectal cancer[J]. *Biomed Pharmacol*, 2019, 110: 473-481.
- [6] Kumaradevan S, Lee S Y, Richards S, et al. C-Cbl expression correlates with human colorectal cancer survival and its Wnt/β-catenin suppressor function is regulated by Tyr371 phosphorylation[J]. *Am J Pathol*, 2018, 188(8): 1921-1933.
- [7] Kim S E, Huang H, Zhao M, et al. Wnt stabilization of β-catenin reveals principles for morphogen receptor-scaffold assemblies[J]. *Science*, 2013, 340(6134): 867-870.
- [8] He K, Gan W J. Wnt/β-catenin signaling pathway in the development and progression of colorectal cancer[J]. *Cancer Manag Res*, 2023, 15: 435-448.
- [9] 桑亚洲, 张艳, 刘燕, 等. 肿瘤恶病质发病机制及中医药防治研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(1): 203-213.
- [10] 吴万根. 中医药在现代肿瘤治疗中的补充作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2020, 40(11): 1291-1293.
- [11] 何本求, 张芳, 邓洪燕, 等. 化疗联合复方藤梨汤对结直肠癌术后25例临床观察[J]. 中国民族民间医药, 2020, 29(19): 88-92.
- [12] Lu M L, Zhang Y, Li J, et al. MicroRNA-124 inhibits colorectal cancer cell proliferation and suppresses tumor growth by interacting with PLCB1 and regulating Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(1): 121-136.
- [13] Han Z, An N, Qin J, et al. Long non-coding RNA Linc00675 suppresses cell proliferation and metastasis in colorectal cancer via acting on miR-942 and Wnt/β-catenin signaling[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 101: 769-776.
- [14] Ji Y, Lv J, Sun D, et al. Therapeutic strategies targeting Wnt/β-catenin signaling for colorectal cancer (Review) [J]. *Int J Mol Med*, 2022, 49(1): 1.
- [15] 莫安徽, 杨生辉, 黄琰菁, 等. 白藜芦醇对结肠癌大鼠果蝇WNT同源基因/β-连环蛋白信号通路的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(19): 2631-2635.
- [16] Hao J, Dai X, Gao J, et al. Curcumin suppresses colorectal tumorigenesis via the Wnt/β-catenin signaling pathway by downregulating Axin2[J]. *Oncol Lett*, 2021, 21(3): 186.
- [17] 王容容, 王其美, 蒋益兰, 等. 健脾消癌方联合化疗治疗晚期转移性结直肠癌的临床研究[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(5): 1732-1736.
- [18] Zhao H, Zhao C, Li H, et al. E2A attenuates tumor-initiating capacity of colorectal cancer cells via the Wnt/β-catenin pathway[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 276.
- [19] Ma C T, Luo H S, Gao F, et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes the progression of colorectal cancer by interacting with E-cadherin[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(2): 2606-2612.
- [20] Yuan H, Wei R, Xiao Y, et al. RHBDF1 regulates APC-mediated stimulation of the epithelial-to-mesenchymal transition and proliferation of colorectal cancer cells in part via the Wnt/β-catenin signalling pathway[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 368(1): 24-36.
- [21] Zhang Z X, Lin M, Wang J L, et al. Calycoxin inhibits breast cancer cell migration and invasion by suppressing EMT via BATF/TGF-B1[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(12): 16009-16023.
- [22] Wu X, Yu N, Zhang Y, et al. Radix *Tetrastigma hemsleyani* flavone exhibits antitumor activity in colorectal cancer via Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 6437-6446.
- [23] Zhu M, Gong Z, Wu Q, et al. Sanguinarine suppresses migration and metastasis in colorectal carcinoma associated with the inversion of EMT through the Wnt/β-catenin signaling[J]. *Clin Transl Med*, 2020, 10(1): 1-2.
- [24] Wang J, Cai H, Liu Q, et al. Cinobufacini inhibits colon cancer invasion and metastasis via suppressing Wnt/β-catenin signaling pathway and EMT[J]. *Am J Chin Med*, 2020, 48(3): 703-718.