

加味左金丸对大肠癌裸鼠 ERK/MAPK 信号通路的干预作用

胡丽娟

广东省中医院消化内科, 广东 广州 510006

[摘要] 目的: 探讨加味左金丸通过 MAPK 信号通路对人大肠癌裸鼠移植瘤的影响。方法: 建立人大肠癌裸鼠皮下移植瘤模型, 采用皮下注射 HT29 大肠癌细胞株制作大肠癌裸鼠模型。45 只实验裸鼠随机分为 3 组: 生理盐水组、加味左金丸高剂量组、加味左金丸低剂量组; 观察不同组别对裸鼠致瘤的影响, 动态观察各组裸鼠肿瘤体积变化, 绘制肿瘤生长曲线。采用免疫印迹法 (Western blot) 检测移植瘤 ERK/MAPK 活性及 RT-PCT 法检测组织 ERK/MAPK mRNA 的表达。结果: 移植瘤接种成功率 100%。裸鼠成瘤潜伏期一般 3~5 天, 最长不超过 7 天。成瘤初表现为皮下黄白色结节, 成瘤早期瘤体基本成椭圆形, 表面光滑, 2 周后逐渐增大为紫蓝色结节, 边界清, 略可活动, 触之质中, 逐渐不规则, 表面凹凸不平, 呈结节状。瘤体表面可见皮下有较多血管进入。裸鼠接种 2 周内, 生理盐水组瘤体生长较快, 加味左金丸各剂量组生长较慢。特别在后期, 生理盐水组裸鼠显得尤为消瘦, 拥挤少动, 饮食方面各组差异不明显。当肿瘤直径达 1cm 以后, 生长速度较慢, 荷瘤鼠渐呈消瘦、精神萎靡、消瘦及恶病质衰竭状态发展。剖视肿瘤, 大部分呈类圆形, 个别形态不规则, 色灰白, 质硬。尸检未见腹腔脏器转移以及心、肝、脾、肺、肾、脑等重要脏器的损伤。加味左金丸各剂量组裸鼠皮下肿瘤组织生长较生理盐水组明显减慢 ($P < 0.05$)。加味左金丸各剂量组间比较, 差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。加味左金丸各剂量组肿瘤组织 ERK/MAPK 相对活性明显较低 ($P < 0.05$)。加味左金丸各剂量组间比较, 差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。结论: 加味左金丸抑制人大肠癌裸鼠移植瘤的增殖, 延缓肿瘤的生长, 其机制之一可能是与抑制 MAPK 信号通路相关的 ERK/MAPK 的表达有关。

[关键词] 加味左金丸; 裸鼠; 移植瘤; ERK/MAPK 信号通路

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2015) 02-0230-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.02.107

MAPK 信号通路的失调出现在结直肠癌发展的早期, 很多证据显示 MAPK 通路涉及结直肠癌的肿瘤侵袭和转移。笔者采用人大肠癌细胞株 HT29 裸小鼠皮下移植瘤模型, 观察含黄连、吴茱萸等中药组成的加味左金丸对裸鼠移植瘤的作用, 并初步揭示其作用机制, 为临床更好应用中草药抗肿瘤提供实验基础。

1 材料与方

1.1 癌细胞株 HT29 HT29 培养于 37℃、5%CO₂ 浓度的培养箱中, 培养液为含 10%FBS 的 RPMI 1640。隔天更换培养液一次, 每周传代 1~2 次, 传代时用 0.25% 的胰酶消化处理和 PBS 洗涤。

1.2 药品与试剂 加味左金丸由黄连、吴茱萸、青黛组成, 药物购自广东省中医院。中药煎煮过程: 每次煎煮好一周剂量, 先煮黄连和吴茱萸, 用纱布滤出药液, 装入大号研钵中, 倒入青黛慢慢研磨, 尽量使青黛慢慢溶入药液中, 最后煎取所需药液量, 放入 4℃冰箱备用。

1.3 人大肠癌细胞株 HT29 裸小鼠移植瘤模型的制备 HT29

细胞生长至铺满培养瓶 80%~90%, 用 0.25% 的胰酶消化后收集, 制成单细胞悬液, 悬浮于生理盐水中。BALB/C 裸鼠 45 只, 饲养于广东省中医院科学研究中心无菌饲养间内 (SPF 级), 裸鼠所用水、饲料、笼具一切器具均经高压蒸汽消毒法灭菌。

1.4 动物分组及处理 BALB/C 裸小鼠 (购自广州维柏鑫生物科技有限公司, 合格证号: 1215708), 4~6 周龄, 重量: 18~22 g, 45 只, 雌雄各半。观察裸鼠均健康, 取肿瘤细胞悬液, 于每只裸鼠左侧或右侧肋腹部皮下注射 0.2 mL, 细胞量为 2×10^6 /只。将人大肠癌皮下移植的裸小鼠随机分为 3 组, 尽量做到雌雄各半。①生理盐水组: 15 只, 生理盐水 0.5 mL 灌胃; ②加味左金丸低剂量组: 15 只, 以中药汤药 0.67 g/kg 灌胃, 相当于 60 kg 成人用量; ③加味左金丸高剂量组: 15 只, 2 g/kg 灌胃, 相当于 60 kg 成人用量 3 倍。7 天造模成功后, 每组均连续灌胃 1 月。

1.5 抑瘤率 观察裸鼠成瘤时间, 肿瘤生长特性。待肿瘤生长至 15~75 mm³ 时用于下一步实验。每组灌胃结束后, 用游

[收稿日期] 2014-09-11

[基金项目] 广东省中医药局资助项目 (20111209)

[作者简介] 胡丽娟 (1978-), 女, 副主任中医师, 研究方向: 中西医结合脾胃病学。

标卡尺测量每组裸鼠移植瘤的大小。抑瘤率 = $1 - (\text{加味左金丸各剂量组结束时平均体积} - \text{加味左金丸各剂量组开始时平均体积}) / (\text{生理盐水组结束时平均体积} - \text{生理盐水组开始时平均体积}) \times 100\%$ 。

1.6 移植瘤 ERK/MAPK 活性 灌胃结束后的第 2 天, 将裸鼠断颈处死, 快速取下移植瘤体, 放入液氮中保存, 后转入 -80°C 冰箱中保存待测。细胞经实验因素处理后, 离心收集。使用冰冷的 PBS 洗涤细胞 3 次, 加入裂解缓冲液振荡混匀, 冰浴 30 min, 4°C 12000 rpm、离心半径 10 cm 离心 10 min, 取上清, 即为胞质蛋白。使用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。调整样品的蛋白量进行 SDS-PAGE, 将电泳分离的蛋白转移到 PVDF 膜上。PBST 洗膜 5 min。室温下用 5% 脱脂奶粉(PBST 溶解)封闭 PVDF 膜 1 h。随后加入抗 ERK1/2 或抗 β -actin(1:2000) 4°C 孵育过夜。PBST 洗脱 3 次, 加入相应的二抗, 孵育 1 h, 漂洗 3 次。将 PVDF 膜用发光试剂 ECL 显色, 暗室中曝光到 X 光片上, 凝胶成像系统扫描分析结果。

1.7 移植瘤 ERK/MAPK mRNA 表达量 灌胃结束后的第 2 天, 将裸鼠断颈处死, 快速取下移植瘤体, 放入液氮中保存, 后转入 -80°C 冰箱中保存待测。RT-PCR 法检测组织 ERK/MAPK mRNA 的表达。采用 Trizol 试剂(美国 IBCO 公司), 参照说明对各组组织总 RNA 进行提取。取 2 μL RNA 逆转录合成 cDNA。反应条件: 94°C 预变性 2 min 后, 94°C 变性 45 s、 52°C 退火 45 s、 72°C 延伸 1 min, 35 个循环, 最后 72°C 延伸 7 min。取 3 μL 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭(EB)显色, 目的条带用图像分析系统作吸光度测定, 以 β -actin 为内参照, ERK/MAPK mRNA 与 β -actin 吸光度的比值作为 ERK/MAPK mRNA 的相对含量进行半定量分析, 比较不同组 ERK/MAPK mRNA 表达的差异。ERK/MAPK mRNA 的引物序列按 cDNA 文库查获, 引物由上海赛百胜生物技术公司合成。 β -actin 的引物序列: 上游引物 5'-GGATCAGCAAGCAGGAGTATGA-3', 下游引物 5'-CGCAAGTTAGGTTTTGTCAAGAAAGGGT-3', 扩增片段长度为 116 bp。

1.8 统计学方法 数据均以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。所有指标分析经 SPSS 软件统计处理。组间比较、两两比较分别采用 ANOVA 及组间均数的两两比较, 采用最小显著(LSD)法。

2 结果

2.1 一般状况观察 见图 1、图 2、图 3。移植瘤接种成功率 100%。裸鼠成瘤潜伏期一般 3~5 天, 最长不超过 7 天。成瘤初表现为皮下黄白色结节, 成瘤早期瘤体基本成椭圆形, 表面光滑, 2 周后逐渐增大为紫蓝色结节, 边界清, 略可活动, 触之质中, 逐渐不规则, 表面凹凸不平, 呈结节状。瘤体表面可见皮下有较多血管进入。裸鼠接种 2 周内, 生理盐水组瘤体生长较快, 加味左金丸各剂量组生长较慢。特别在后期, 生理盐水组裸鼠显得尤为消瘦, 拥挤少动, 饮食方面各组差异不明显。当肿瘤直径达 1 cm 以后, 生长速度较慢, 荷瘤鼠渐呈

消瘦、精神萎靡、消瘦及恶病质衰竭状态发展。剖视肿瘤, 大部分呈类圆形, 个别形态不规则, 色灰白, 质硬。尸检未见腹腔脏器转移以及心、肝、脾、肺、肾、脑等重要脏器的损伤。

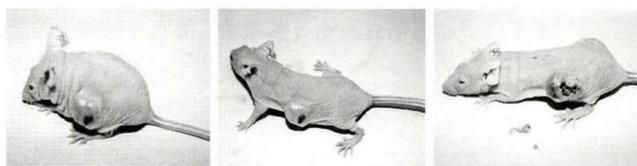


图 1 2 周加味左 图 2 2 周加味左金 图 3 2 周生理盐水
金丸低剂量组 丸高剂量组 组

2.2 各组肿瘤生长抑制情况比较 见表 1。加味左金丸各剂量组裸鼠皮下肿瘤组织生长较生理盐水组明显减慢($P < 0.05$)。加味左金丸各剂量组组间比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组肿瘤生长抑制情况比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	开始时(cm ³)	用药第 15 天(cm ³)	结束时(cm ³)	抑瘤率(%)
加味左金丸低剂量组	15	0.095 ± 0.005	0.512 ± 0.074 ¹⁾²⁾	0.741 ± 0.065 ¹⁾²⁾	55.5
加味左金丸高剂量组	15	0.074 ± 0.004	0.584 ± 0.052 ¹⁾	0.853 ± 0.083 ¹⁾	58.3
生理盐水组	15	0.067 ± 0.007	0.678 ± 0.023	1.254 ± 0.032	

与同期生理盐水组比较, ① $P < 0.05$; 与同期加味左金丸高剂量组比较, ② $P > 0.05$

2.3 各组肿瘤组织 ERK/MAPK 相对活性比较 见表 2。加味左金丸各剂量组肿瘤组织生长 ERK/MAPK 相对活性明显较低($P < 0.05$)。加味左金丸各剂量组组间比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 各组肿瘤组织 ERK/MAPK 相对活性比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	吸光值
加味左金丸低剂量组	15	0.195 ± 0.045 ¹⁾²⁾
加味左金丸高剂量组	15	0.235 ± 0.025 ¹⁾
生理盐水组	15	0.364 ± 0.057

与同期生理盐水组比较, ① $P < 0.05$; 与同期加味左金丸高剂量组比较, ② $P > 0.05$

2.4 各组肿瘤组织 ERK/MAPK mRNA 表达量比较 见表 3。加味左金丸各剂量组肿瘤组织生长 ERK/MAPK 相对活性明显较低($P < 0.05$)。加味左金丸各剂量组组间比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 3 各组肿瘤组织 ERK/MAPK mRNA 表达量比较($\bar{x} \pm s$) $\times 10^6$

组别	n	ERK/MAPK mRNA 表达量
加味左金丸低剂量组	15	2.344 ± 0.395 ¹⁾²⁾
加味左金丸高剂量组	15	2.613 ± 0.103 ¹⁾
生理盐水组	15	4.045 ± 0.200

与同期生理盐水组比较, ① $P < 0.05$; 与同期加味左金丸高剂量组比较, ② $P > 0.05$

3 讨论

近年来研究发现, MAPK 信号传导通路是与肿瘤发生、发展、侵袭、转移有关的重要信号传导通路之一, MAPK 信号传导通路及机制的阐明对于靶向干预相关疾病药物的研究具有重要意义, 必将为恶性肿瘤等重大疾病的治疗提供新的思路^[1]。虽然并行存在 5 条 MAPK 信号通路, 其中 ERK/MAPK 途径是细胞增殖调节最主要的途径之一, 该通路的活化在肠上皮细胞的分化中起了重要作用。ERK/MAPK 信号通路的激活涉及结直肠癌的发病、进展和致瘤行为的证据越来越多^[2]。ERK/MAPK 途径所有的激酶可能都是治疗结直肠癌的有效靶点, 现在许多研究小组在研制新的抑制剂。各条 MAPK 通路在结直肠癌中的精确作用成为研究热点。

加味左金丸为左金丸加青黛, 青黛虽为后增药物, 但在处方配伍关系中居臣药之位, 黄连为君, 青黛为臣, 吴茱萸为佐使。黄连性味苦寒, 功效清热、解毒、燥湿; 青黛性味苦寒, 功效清热、解毒、泻火; 吴茱萸性味辛温, 功效降逆止呕、散寒止痛。方中重用黄连入胃、大肠经以清热毒、祛湿热; 青黛与之相须为用, 更能增强君药之功效; 少佐辛温之吴茱萸以制君臣药之过于寒凉, 并降逆止呕、止痛, 以兼治恶心呕吐、疼痛之症状。在本研究中, 加味左金丸低剂量组对裸鼠移植瘤大肠癌的抑瘤率与高剂量组比较, 差异不明显; 加味左金丸各剂量均能使 ERK/MAPK 的活性降低, 抑制 ERK/MAPK mRNA 的表达, 使大肠移植瘤的生长受到抑制。

既往研究表明, 在离体的条件下, 黄连小檗碱和吴茱萸碱可以诱导大肠癌 HT29 细胞的凋亡, 对 HT29 细胞生长有明显的抑制作用, 对 HT29 细胞端粒酶催化亚基(hTERT)表达有抑制作用^[3-5]; 1, 2-DMH 诱导大肠癌实验模型中, 加味左金丸可以有效阻碍早期癌症的发生和发展; 在 DMH 诱导大肠癌的

过程中, 加味左金丸可以很显著地干预癌症的发生, 在癌症发展的进程中, 加味左金丸可以有效地延缓癌症的进程^[6]。

加味左金丸在本次试验中对裸鼠肿瘤组织大小及肿瘤相关因子有较好的抑制作用, 提示中医药防治大肠具有一定优势, 为中医药治疗大肠癌提供新的思路与方法, 为加味左金丸的临床应用提供了新的实验依据, 为大肠癌患者的中药防治、阻断癌前病变、改善预后和提高生活质量开辟了一条新途径, 拓宽了中医药现代化研究的领域。

[参考文献]

- [1] 季宇彬, 胡哲清, 邹翔. MAPK 信号通路及其研究进展[J]. 中国药理通讯, 2010, 27(2): 17-18.
- [2] 徐伟丽, 孙文广, 马莺. MAPK 信号通路及结直肠癌[J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18(2): 389-392.
- [3] 谭宇蕙, 陈冠林, 郭淑杰, 等. 小檗碱对人胃癌 MGC-803 细胞生长抑制及诱导凋亡的作用[J]. 中国药理学通报, 2001, 17: 40-43.
- [4] 常金荣, 文彬, 王汝俊, 等. 吴茱萸碱和小檗碱对 HT29 细胞凋亡及端粒酶催化亚基(hTERT)表达的影响[J]. 中药药理与临床, 2008, 24(2): 6-8.
- [5] 常金荣, 文彬, 王汝俊, 等. 吴茱萸碱和小檗碱对 HT29 细胞生长抑制和凋亡作用的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2008, 19(3): 191-195.
- [6] 文彬, 熊曼利, 戴伟怡. 左金丸及反左金丸对实验性大肠癌不同时期甲基转移酶表达的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(20): 2074-2078.

(责任编辑: 骆欢欢)

内病外治新疗法常年招生(教社证字 G03005 号)

一、鼻炎头痛学习班: 重点讲解为什么鼻炎、鼻窦炎、过敏性鼻炎不在鼻部肺部治疗能快速神奇治愈。顽固性正偏头痛、头晕、三叉神经痛、牙痛、口腔溃疡, 结膜炎, 失眠神经衰弱, 不在头部治疗的新理论和快速治愈方法。**二、颈肩腰腿痛学习班:** 重点讲解为什么腰痛不治腰, 腿疼不治腿, 足跟痛不治脚, 肩周炎有真假, 骨质增生能软化, 治股骨头坏死与膝关节炎取穴一样等关节软组织疼痛的新理论和快速治愈方法。**三、内科病学习班:** 讲解 2 型糖尿病, 胃病、结肠炎、冠心病、胆囊炎、小儿腹泻、厌食同治一个病根新理论。**四、男科妇科病学习班:** 讲解男女乳腺增生、痛经、前列腺炎、阳痿, 早泄, 慢性肾炎、同治一个病根的外治新理论。**五、皮肤科:** 讲解点耳穴, 根治青春痘, 湿疹, 皮炎, 各种癣疮等皮肤病的外治方法。**六、快速查病诊断班:** 患者无需开口, 看一眼患者的双腿便知道患者的病根在哪里, 超前诊断患者现在或将来易患什么病。让患者心服口服, 是大夫接诊快速准确诊断不可少的绝招技术。**七、特效针法学习班:** 一秒钟埋线法治疗各种慢性疑难病。泻血法, 六针法、X 针法、穿针法一次性治疗胳膊外上髁炎, 急性腰扭伤, 牙痛, 尾骨痛, 足跟痛, 踝关节扭伤, 棘上韧带损伤等症收效神速, 大多患者入针即效, 拔针即愈。以上各科明确全身慢性疑难病原发病因和继发病症的鉴别诊断治疗, 本疗法防治结合治未病, 可作为大夫本人即家庭治疗保健康复之首选。本校为学员可代为办理劳动和社会保障部门颁发的全国通用高级按摩师证书, 中医康复保健证书, 高级针灸师证书, 网上可查, 凭证可开业。每月 1 号, 15 号开班。本疗法把疑难病的诊断治疗简单化。有无医学基础 7~10 天即可学会, 学校有实习门诊, 患者很多, 不熟练可多学几天, 学会为止。七个科学费 5000 元。地址: 河北省石家庄市健康路省第四人民医院西 200 米, 石家庄内病外治新疗法培训学校, 联系人: 王卫平。手机 13930962015。详情登陆 www.nbwzxlf.com, 农行卡号: 6228481250018026419, 邮政账号: 601331001200114327, 乘车路线: 石家庄火车站乘 131 路省四院下西行 200 米即到或石家庄北站乘 5 路省四院下西行 200 米即到。