藤龙补中颗粒对CT26大肠癌转移的影响及机制

黄晓伟，陈锦芳，邬世威，师子曼，胡兵

上海中医药大学附属龙华医院（上海中医药大学中医肿瘤研究所）肿瘤科，上海 200032

［摘要］**目的：**观察藤龙补中颗粒对CT26大肠癌转移的作用。**方法：**BALB/c小鼠尾静脉注射CT26细胞，随机分为对照组、藤龙补中颗粒小剂量和大剂量组，给予无菌水或小剂量和大剂量藤龙补中颗粒灌胃，每天1次，治疗21 d。治疗结束后，取肺称质量、计数肺表面转移结节。苏木精-伊红染色法（HE）染色观察转移灶。Western blot检测蛋白表达。**结果：**与对照组比较，藤龙补中颗粒治疗后，大小剂量组肺表面转移结节减少、肺质量降低（$P<0.01$）。与对照组比较，大小剂量组基质金属蛋白酶-2（MMP-2）、MMP-9表达均下调（$P<0.01$）。与对照组比较，大小剂量组Wnt蛋白3（Wnt3）、CTNNB1蛋白表达下调（$P<0.01$）。**结论：**藤龙补中颗粒可以抑制CT26大肠癌转移，其作用机制可能与抑制Wnt/β-catenin信号转导、降低MMP-2和MMP-9表达有关。

［关键词］大肠癌；转移；藤龙补中颗粒；Wnt3；β-catenin；基质金属蛋白酶

［中图分类号］R285.5 ［文献标志码］A ［文章编号］0256-7415(2023)11-0156-04

DOI：10.13457/j.cnki.jncm.2023.11.028

Effect and Mechanism of Tenglong Buzhong Granules on Metastasis of CT26 Colorectal Cancer

HUANG Xiaowei, CHEN Jinfang, WU Shiwei, SHI Ziman, HU Bing

Abstract：Objective：To observe the effect of Tenglong Buzhong Granules on the metastasis of CT26 colorectal cancer. **Methods：**CT26 cells were injected into the tail vein of BALB/c mice. They were randomly divided into control group, small dose and large dose groups of Tenglong Buzhong Granules. They were given sterile water or small dose and large dose of Tenglong Buzhong Granules by gavage once a day for 21 days. After treatment, taking the lung to weigh the mass and count the metastatic nodules on the lung surface. Hematoxylin-eosin staining (HE) was used to observe the metastasis. Western blot was used to detect the protein expression. **Results：**Compared with the control group, after the treatment with Tenglong Buzhong Granules, the number of metastatic nodules on the lung surface and the quality of lung in the large and small dose groups were decreased ($P<0.01$). Compared with the control group, the expressions of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in the large and small dose groups were down-regulated ($P<0.01$). Compared with the control group, the expressions of Wnt protein 3 (Wnt3) and CTNNB1 protein in the large and small dose groups were down-regulated ($P<0.01$). **Conclusion：**Tenglong Buzhong Granules can inhibit the metastasis of CT26 colorectal cancer, and its mechanism may be related to the inhibition of Wnt/β-catenin signal transduction and decreased expressions of MMP-2 and MMP-9.

Keywords：Colorectal cancer; Transfer; Tenglong Buzhong Granules; Wnt3; β-catenin; Matrix metalloproteinase

［收稿日期］2023-01-02
［修回日期］2023-03-17
［基金项目］上海市科学技术委员会科研计划项目（16401902500）；上海市自然科学基金项目（20ZR1458700）
［作者简介］黄晓伟（1993-），男，医师，E-mail：616278620@qq.com。
［通信作者］胡兵（1971-），男，主任医师，E-mail：beearhu@hotmail.com。

大肠癌包括结肠癌和直肠癌，是全球常见恶性肿瘤，易发生转移，转移性大肠癌手术率低，远期疗效欠佳。中医药治疗大肠癌发挥了重要的作用，藤龙补中汤(专利号：ZL200910197565.2)是本课题组研发的治疗大肠癌的抗癌中药复方，具有解毒、利湿、健脾功效，由藤梨根、龙葵、白术、薏苡仁和槲寄生等组成，课题组前期研究显示藤龙补中汤可以改善大肠癌患者临床证候，调控表观遗传，调节多基因表达，抑制瘤生长、转移[1-4]。本研究进一步观察了藤龙补中汤颗粒制剂对CT26大肠癌转移的作用和机制。

1 材料与方法

1.1 主要药品与试剂 RPMI1640培养液、胎牛血清和胰蛋白酶均购自美国Gibco公司。BCA蛋白浓度检测试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。β-连环蛋白(Catenin Beta 1，CTNNB1)和基质金属蛋白酶-2(MMP-2)抗体为美国Bioworld公司产品。基质金属蛋白酶-9(MMP-9)抗体为Santa Cruz Biotechnology公司产品。Wnt3蛋白(Wnt3)抗体由美国Abcam公司提供。藤龙补中颗粒由上海中医药大学药学院制备，浸膏得率为15.89%，其中野黄芩苷、对羟基桂皮酸和多糖含量分别为1.39%、0.027 9%和15.25%[5]，实验中以无菌水溶解藤龙补中颗粒。

1.2 动物模型 SPF级6~8周龄BALB/c雄鼠30只，体质量(18±2)g，由上海斯莱克实验动物有限公司提供[SCXK(沪)2017-0005]，饲养于复旦大学实验动物中心[SYXK(沪)2014-0029]SPF级屏障系统中(动物伦理审批号：202112025Z)，自由进食、饮水。小鼠CT26大肠癌细胞购自于上海中科院细胞库，常规培养，胰酶消化、计数，调细胞浓度为4×10^6个/mL，小鼠尾静脉注射0.1 mL细胞悬液，随机分为3组：对照组、藤龙补中颗粒小剂量组和大剂量组，分别给予无菌水、34.19 mg或51.29 mg藤龙补中颗粒(0.2 mL)(剂量参考既往研究)灌胃[6]，每天1次，共3周；实验结束后处死小鼠，取肺组织计算肺结节数、称质量，保存肺组织备用。

1.3 苏木精-伊红染色法(HE) 4%多聚甲醛固定肺组织，石蜡包埋，4微米切片，二甲苯脱蜡，再经由高浓度到低浓度乙醇，最后入蒸馏水，HE 5 min、蒸馏水洗1 min，0.5%盐酸乙醇分化10 s，蒸馏水洗2 min，0.2%氨水返蓝40 s，蒸馏水洗，0.5%伊红染色5 min，梯度乙醇脱水，二甲苯透明，树脂封片，显微镜下观察，拍照。

1.4 Western blot法检测蛋白表达 肺组织剪碎、匀浆，冰上裂解，12 000 r/min(半径8.5 cm)、4 ℃离心机离心5 min，取上清，BCA法测定蛋白浓度。蛋白裂解液加入上样缓冲液，然后100 ℃高温变性5 min，于聚丙烯酰胺凝胶中电泳，湿转法进行转膜，用5%脱脂奶粉封闭1 h，加入Wnt3(1∶1 000)、CTNNB1(1∶1 000)、MMP-2(1∶800)、MMP-9(1∶500)、或GAPDH(1∶2 000)抗体4 ℃孵育过夜，PBST洗涤，HRP标记的二抗(1∶2 000)室温孵育2 h，PBST洗涤，化学发光检测试剂显影，Quantity One软件分析蛋白表达。

1.5 统计学方法 数据使用SPSS21.0软件进行统计分析。结果以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，用独立样本t检验比较组间均数的差异，单因素方差分析比较组间差异，按α=0.05的检验标准，$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 藤龙补中颗粒对CT26大肠癌肺转移的影响 见表1、图1。治疗结束后取肺计数肺表面转移结节、称质量，并采用HE染色法观察转移灶。与对照组比较，藤龙补中颗粒治疗后，大小剂量组肺表面转移结节减少、肺质量降低($P<0.01$)。同时显微镜下观察显示，藤龙补中颗粒治疗后肺转移灶缩小。提示藤龙补中颗粒可以抑制CT26大肠癌肺转移。

表1 藤龙补中颗粒对CT26大肠癌肺转移的影响($\bar{x}\pm s$)

组 别	鼠数	转移结节(个)	肺质量(mg)
对照组	10	78.50 ± 6.45	330.40 ± 16.51
小剂量组	10	61.70 ± 4.06①	284.10 ± 15.74①
大剂量组	10	38.70 ± 4.42①	253.40 ± 12.66①

注：①与对照组比较，$P<0.01$

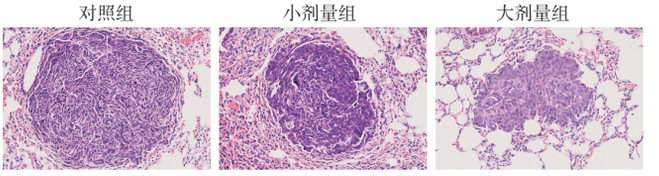
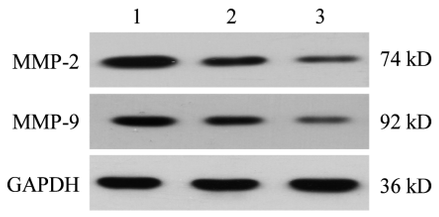


图1 CT26大肠癌肺转移形态(HE，×5)

2.2 藤龙补中颗粒对MMP-2、MMP-9表达的影响 见图2、表2。MMP-2和MMP-9是重要的MMP，与肿瘤转移密切相关。与对照组比较，大小剂量组

MMP-2、MMP-9 表达均下调($P<0.01$)。提示藤龙补中颗粒可以抑制 MMP-2 和 MMP-9 表达。



注：1. 对照组；2. 小剂量组；3. 大剂量组

图 2　藤龙补中颗粒对 MMP-2、MMP-9 表达的影响

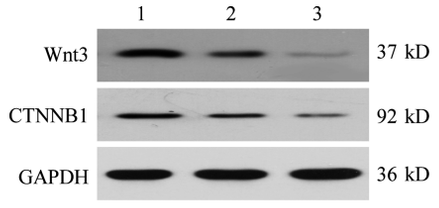
表 2　藤龙补中颗粒对 MMP-2、MMP-9 表达的影响($\bar{x}\pm s$)

组　别	n	MMP-2	MMP-9
对照组	3	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.03
小剂量组	3	0.57 ± 0.05①	0.51 ± 0.06①
大剂量组	3	0.28 ± 0.01①	0.21 ± 0.03①

注：①与对照组比较，$P<0.01$

2.3　藤龙补中颗粒对 Wnt3、CTNNB1 表达的影响

见图 3、表 3。Wnt/β-catenin 信号通路与肿瘤发生发展密切相关，并参与 MMPs 的表达调控。本研究也检测了藤龙补中颗粒对 Wnt3 和 CTNNB1 表达的影响。与对照组比较，大小剂量组 Wnt3、CTNNB1 蛋白表达下调($P<0.01$)，提示藤龙补中颗粒可以抑制 Wnt3 和 CTNNB1 蛋白表达。



注：1. 对照组；2. 小剂量组；3. 大剂量组

图 3　藤龙补中颗粒对 Wnt3、CTNNB1 表达的影响

表 3　藤龙补中颗粒对 Wnt3、CTNNB1 表达的影响($\bar{x}\pm s$)

组　别	n	Wnt3	CTNNB1
对照组	3	1.00 ± 0.18	1.00 ± 0.08
小剂量组	3	0.47 ± 0.04①	0.58 ± 0.10①
大剂量组	3	0.16 ± 0.05①	0.20 ± 0.04①

注：①与对照组比较，$P<0.01$

3　讨论

大肠癌在中医学中属于肠积、积聚、肠覃、脏毒、锁肛痔等病的范畴；如《灵枢·五变》论述“皮肤薄而不泽，肉不坚而淖泽，如此则肠胃恶，恶则邪气留止，积聚乃伤”；《灵枢·水胀》云“肠覃何如？岐伯曰：寒气客于肠外，与卫气相搏，……瘕肉乃生”；《三因极一病证方论》卷十五“脏毒，即是脏中积毒”；《外科大成》记载“锁肛痔，肛门内外如竹节锁紧”。大肠癌与毒聚、湿阻、脾虚密切相关，本项目组在临床实践基础上，以解毒、利湿、健脾立法，结合现代药理学研究，研发了藤龙补中汤，方中藤梨根、龙葵解毒利湿，白术、薏苡仁健脾利湿，半枝莲、槲寄生协同抗癌并抑制血管生成；藤龙补中汤可以调控癌通路和转移相关基因表达[7-8]。本研究显示，藤龙补中颗粒可以抑制 CT26 大肠癌肺转移。

MMP 可通过调节胞外基质重构参与肿瘤转移，MMP-2 和 MMP-9 都属于明胶酶，参与大肠癌转移调控，与大肠癌患者的预后负相关；抑制 MMP-2 和 MMP-9 可抑制大肠癌转移[9-12]。Wnt/β-catenin 通路在大肠癌中异常活化，已成为大肠癌的治疗靶标，抑制 Wnt 信号转导可以抑制大肠癌转移[13-14]。Wnt/β-catenin 通路可调控多基因表达，如与增殖相关的 c-Myc，与凋亡相关的 Survivin，与细胞周期相关的 CCND1 等；也有研究显示，该通路还参与 MMPs 的表达调控[15-16]。与对照组比较，藤龙补中颗粒小剂量组与大剂量组 MMP-2、MMP-9、Wnt3、CTNNB1 蛋白表达降低，提示藤龙补中颗粒可能通过 Wnt/β-catenin 通路抑制 MMP-2 和 MMP-9 表达，从而抑制大肠癌转移。

综上所述，藤龙补中颗粒可以抑制 CT26 大肠癌转移，其作用机制可能与抑制 Wnt/β-catenin 信号转导、降低 MMP-2 和 MMP-9 表达有关。

[参考文献]

[1] DENG S，HU B，AN H M，et al. Teng-Long-Bu-Zhong-Tang，a Chinese herbal formula，enhances anticancer effects of 5-Fluorouracil in CT26 colon carcinoma[J]. BMC Complement Altern Med，2013，13：128.

[2] 胡兵，安红梅，闫霞，等. 藤龙补中汤对大肠癌细胞全基因组启动子甲基化影响[J]. 时珍国医国药，2018，29(11)：2564-2566.

[3] 胡兵，闫霞，黄晓伟，等. 藤龙补中汤对大肠癌RKO细胞癌通路基因表达影响[J]. 中国中西医结合消化杂志，2019，27(2)：83-86.

[4] 胡兵，李刚，安红梅，等. 藤龙补中汤联合化疗治疗晚期大肠癌临床研究[J]. 中华中医药学刊，2015，33(1)：37-39.

[5] 许聪聪，王晓晗，梁惠芬，等. 正交试验优选藤龙补中方水提工艺[J]. 中国药业，2019，28(13)：15-18.

[6] 李森，王双双，郑佳露，等. 藤龙补中汤对SW620大肠癌转移和Wnt/β-catenin通路蛋白表达的影响[J]. 中华中医药杂志，2022，37(7)：4083-4085.

[7] 胡兵，闫霞，黄晓伟，等. 藤龙补中汤对大肠癌RKO细胞癌通路基因表达影响[J]. 中国中西医结合消化杂志，2019，27(2)：83-86.

[8] 胡兵，安红梅，郑佳露，等. 藤龙补中汤对大肠癌RKO细胞转移相关基因表达影响[J]. 中国中西医结合消化杂志，2018，26(5)：416-419.

[9] SHI M，YU B，GAO H，et al. Matrix metalloproteinase 2 overexpression and prognosis in colorectal cancer：a meta-analysis[J]. Mol Biol Rep，2013，40(1)：617-623.

[10] YANG B，TANG F，ZHANG B，et al. Matrix metalloproteinase-9 overexpression is closely related to poor prognosis in patients with colon cancer[J]. World J Surg Oncol，2014，12：24.

[11] OBA K，KONNO H，TANAKA T，et al. Prevention of liver metastasis of human colon cancer by selective matrix metalloproteinase inhibitor MMI-166[J]. Cancer Lett，2002，175(1)：45-51.

[12] YAN X，LI M，CHEN L，et al. α-Solanine inhibits growth and metastatic potential of human colorectal cancer cells[J]. Oncol Rep，2020，43(5)：1387-1396.

[13] CHENG X，XU X，CHEN D，et al. Therapeutic potential of targeting the Wnt/β-catenin signaling pathway in colorectal cancer[J]. Biomed Pharmacother，2019，110：473-481.

[14] LIU X，LIU C，CHEN C，et al. Combination of inositol hexaphosphate and inositol inhibits liver metastasis of colorectal cancer in mice through the Wnt/β-Catenin pathway [J]. Onco Targets Ther，2020，13：3223-3235.

[15] YUAN X，SUN X，SHI X，et al. USP39 promotes colorectal cancer growth and metastasis through the Wnt/β-catenin pathway[J]. Oncol Rep，2017，37(4)：2398-2404.

[16] WANG C，ZHANG R，WANG X，et al. Silencing of KIF3B suppresses breast cancer progression by regulating EMT and Wnt/β-Catenin signaling[J]. Front Oncol，2021，10：597464.

（责任编辑：吴凌，李海霞）