

健脾解毒方对大肠癌细胞 mTOR 信号通路 相关蛋白表达的影响

施利¹, 毛丹¹, 张绍钊¹, 黄建华², 刘新义¹, 张英进¹, 雷三林¹, 马进安¹, 向大雄¹, 胡春宏¹, 张四方^{1*}
(1.中南大学湘雅二医院, 湖南长沙 410008, 2.湖南中医药大学药学院, 湖南长沙 410028)

[摘要] **目的** 探讨健脾解毒方对大肠癌细胞增殖的影响及可能作用机制。**方法** 采用水提法制作健脾解毒方提取物, 利用超高效液相-高分辨飞行时间质谱法分析健脾解毒方的主要成分, MTT 法检测健脾解毒方对大肠癌细胞增殖的影响, Graphpad Prism5 软件计算 IC₅₀ 值, 流式细胞术检测细胞周期, Western Blot 技术检测 Phospho-mTOR、Phospho-P53 和 P21 的蛋白表达。**结果** 健脾解毒方能够抑制大肠癌细胞增殖, 处理 24, 48, 72 h 后四种大肠癌细胞系的 IC₅₀ 值分别为 HCT116 (6.894, 5.668, 3.648 mg/mL)、LoVo (14.65, 8.737, 7.849 mg/mL)、SW48 (8.029, 7.026, 5.740 mg/mL) 及 HT29 (13.06, 9.646, 8.448 mg/mL); 健脾解毒方使大肠癌细胞周期阻滞在 G1 期; 并能够下调 Phospho-mTOR 蛋白表达 ($P < 0.05$), 上调 Phospho-P53 和 P21 蛋白的表达 ($P < 0.05$), 使大肠癌细胞周期阻滞在 G1 期。**结论** 健脾解毒方可能通过 mTOR-P53-P21 途径抑制大肠癌细胞的增殖, 这可能是健脾解毒方治疗大肠癌的作用机制之一。

[关键词] 健脾解毒方; 大肠癌; 细胞增殖; 半抑制浓度; mTOR

[中图分类号] R285.5; R735.3+4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.12.003

Effect of Jianpi Jiedu Formula on the Expressions of Proteins Related to mTOR Signal Pathway in Colon Cancer Cell Line

SHI Li¹, MAO Dan¹, ZHANG Shaofan¹, HUANG Jianhua², LIU Xinyi¹, ZHANG Yinjin¹, LEI Sanlin¹,
MA Jin'an¹, XIANG Daxiong¹, HU Chunhong¹, ZHANG Sifang^{1*}

(1. The Second Hospital of Xiangya, Central South University, Changsha, Hunan 410011, China;

2. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410028, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of Jianpi Jiedu Formula (JPJD) on inhibiting colon cancer cell proliferation capacity and its possible mechanism. **Methods** The main components of water extract of JPJD were analyzed by U-PLC-Q-TOF/MS. The effect of JPJD on colon cancer cell proliferation capacity was determined by MTT assays. The IC₅₀ value concentration were calculated by Graphpad Prism5 software. The cell cycle was detected by Flow cytometric method. The protein levels of Phospho-mTOR (P-mTOR), Phospho-P53 (PP53) and P21 were examined by Western Blot. **Results** MTT assays demonstrated that JPJD can inhibit the colon cancer cell proliferation capacity. The IC₅₀ value concentration of JPJD at 24 h, 48 h and 72 h after treatment were 6.894, 5.668, 3.648 mg/mL in HCT116 cell, 14.650, 8.737, 7.849 mg/mL in LoVo cell, 8.029, 7.029, 5.740 mg/mL in SW48 cell and 13.06, 9.646, 8.448 mg/mL in HT29 cell, respectively. JPJD could down-regulate the expression of Phospho-mTOR protein, up-regulate the expression of Phospho-P53 and P21 protein, and keep the cycle of the large intestine cancer cells at G1 phase. **Conclusion** The JPJD could inhibit HCT116, LoVo, SW48 and HT29 cells proliferation capacity by mTOR-P53-P21 signaling pathways, and it may be the probable mechanism of JPJD on colorectal cancer.

[Keywords] Jianpi Jiedu Formula; colon cancer; cell proliferation; IC₅₀; mTOR

[收稿日期] 2016-09-01

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (81273722)。

[作者简介] 施利, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中西医结合恶性肿瘤基础与临床研究。

[通讯作者] * 张四方, 男, 副教授, 硕士研究生导师, E-mail: m13308439612@163.com。

健脾解毒方为湖南省首届老中医师承导师朱伟光教授治疗大肠癌的有效经验方,全方由黄芪、白术、西洋参、半枝莲、甘草等11味药物组成,具有健脾益气、清热解毒之功,随症加减在临床上取得了很好疗效^[1-2]。本研究采用水提法制作健脾解毒方,利用超高效液相-高分辨飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF/MS)法分析健脾解毒方的主要成分,应用MTT法、流式细胞术、Western Blot等技术,探讨健脾解毒方对大肠癌HCT116、LoVo、SW48及HT29细胞增殖的影响,并进一步探讨其可能的作用机制,为健脾解毒方治疗大肠癌的临床推广应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

RPMI-1640培养液,美国Corning公司产品;胎牛血清澳大利亚Ausbian公司产品;噻唑兰美国Genview公司产品;BCA Protein Assay Kit试剂盒上海碧云天生物技术公司产品,NP-40裂解液上海鼎国生物技术有限公司;P-mTOR(phospho s2448)、PP53(phospho s15)及P21抗体美国abcam公司产品;标准品毛蕊苷、黄芩苷、人参皂苷Re、芹菜素、人参皂苷Rb₁、黄芪甲苷、甘草酸、白术内酯II均购自南京森贝伽生物科技有限公司,供定量测定用,HPLC测定质量分数均 $\geq 98\%$;乙腈(色谱纯)德国Merck公司产品;甲酸(色谱纯)美国sigma公司。色谱柱为ACQUITY UPLC BEH C₁₈柱(50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm)美国Waters公司产品;CO₂培养箱及生物安全柜为中国Heal Force公司产品;SDS-PAGE蛋白电泳仪为上海天能公司产品;倒置相差显微镜为中国Motic公司产品;酶标仪为美国Thermo公司产品;美国Bechman-Coulter流式细胞仪,美国UVP-2000图像分析系统,美国PHANTOM 4300图像扫描仪,ACQUITY UPLC超高效液相色谱仪、Xevo G2 QToF四级杆飞行时间质谱仪美国Waters公司产品。

1.2 细胞培养

人大肠癌HCT116、LoVo、SW48及HT29细胞和人正常结直肠粘膜FHC细胞(均购自长沙艾佳生物技术有限公司),于含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液中生长,37℃、5%CO₂培养箱中培养,隔天换液,待细胞贴壁生长铺满瓶底达80%以上时常规消化、传代、冻存。

1.3 健脾解毒方的制备

健脾解毒方药材由湖南省中医药研究院中药

研究所提供,并经湖南省中医药研究院中药研究所中药鉴定研究室谢昭明研究员鉴定。健脾解毒方由中南大学湘雅二医院药剂科刘新义博士制备,具体步骤如下:按比例称取健脾解毒方中各组分,浸泡1 h,分别加8倍水和6倍水加热回流提取,每次2 h,混合后滤过,真空负压旋转浓缩后分瓶密封,折算成生药为1 g/mL。

1.4 UPLC-Q-TOF/MS法测定健脾解毒方粗提物中多种有效成分

液相色谱条件 色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C₁₈柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm),0.1%甲酸水(A)-乙腈(B),使用前超声脱气,用0.22 μm微孔滤膜滤过;梯度洗脱程序:流动相 0~2 min,95%A;2~40 min,50%A;40~50 min,0A;50~52 min,0A;0~2 min,5%B;2~40 min,50%B;40~50 min,100%B;50~52 min,100%B;流速:0.4 mL/min,柱温20℃,进样量1 μL。质谱条件:离子源为点喷雾电离源正离子模式(ESI⁺),毛细管电压为1.1 kV,锥孔电压为40 V,离子源温度为100℃,脱溶剂气温度为350℃,脱溶剂气流量为800 L/h,碰撞能量低能量为6 V,梯度高能量为20 V,碰撞气体为氩气,扫描时间为0.2 s,质谱扫描范围100~1 200 m/z。

1.5 细胞生存率检测

采用MTT法检测健脾解毒方对大肠癌HCT116、LoVo、SW620及HT29细胞和人正常结直肠粘膜FHC细胞增殖的影响。分别收集对数期细胞,接种于96孔培养板中,每组设置6个复孔,分别培养24、48、72 h后取出,加入MTT溶液10 μL,继续培养4 h,用酶标仪检测各孔在570 nm处波长的吸光值(OD值),计算平均OD值和细胞生存率。细胞生存率(Cell Viability)=健脾解毒方各浓度组平均OD值/空白对照组平均OD值×100%。实验重复3次。

1.6 流式细胞仪检测细胞周期

用含10%胎牛血清RPMI-1640培养液培养大肠癌HCT116、LoVo、SW620及HT29细胞,收集对数期细胞,加入无血清培养液,接种于50 mL培养瓶中,孵育24 h使细胞同步化(各组细胞生长至60%融合)。更换细胞培养液,实验分2组,分别为空白对照组(Con)、健脾解毒方组(JPJD)。继续于恒温培养箱中培养干预24 h后,胰酶消化细胞,制成单细胞悬液,配制细胞浓度为 1×10^6 mL,用流式细胞仪测定细胞周期分布百分比,计算细胞增殖指数(proliferation index,PI)。PI=(S+G2/M)/(G0/G1+S+G2/M)×100%。实验重复3次。

1.7 Western Blot检测蛋白的表达

10%胎牛血清 RPMI-1640 培养液培养大肠癌 HCT116、LoVo、SW620 及 HT29 细胞,收集对数期细胞,加入无血清培养液,接种于 50 mL 培养瓶中,孵育 24 h 使细胞同步化(各组细胞生长至 60%融合)。更换细胞培养液,实验分 2 组,分别为空白对照组和健脾解毒方组,继续于恒温培养箱中培养干预 48 h 后,收集各组细胞,加入 100 μ L 裂解缓冲液,冰浴放置 120 min,期间轻摇振荡。然后 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min,取上清液。应用 Bradford 法检测蛋白浓度。每孔上样 50 μ g,保持各孔蛋白量平衡,加入 SDS 缓冲液,煮沸 5 min,10%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质,然后将蛋白转印至 NC 膜上,用 Tris 缓冲盐溶液稀释脱脂奶粉为 5%浓度封闭液,室温封闭 2 h,再加入 P-mTOR、PP53 及 P21 抗体(1:700)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,经 Tris 缓冲盐溶液洗膜 3 次后,加入相应过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 二抗(1:4 000)室温孵育 1 h,Tris 缓冲盐溶液洗膜 10 min \times 3 次,ECL 发光显色,凝胶成像仪进行拍照记录并进行灰度分析。以目的蛋白与 β -actin 的光密度比值表示目的基因在蛋白水平的表达。实验

重复 3 次。

1.8 数据处理

运用 Graphpad Prism5 软件计算 IC₅₀ 值。采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析,实验数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,方差齐性时两组间比较采用独立样本 *t* 检验,方差不齐时采用秩和检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 UPLC-Q-TOF/MS 法检测到健脾解毒方提取物中 7 种主要成分

以 2015 版《中华人民共和国药典》中对复方中各单味草药的质量控制标准为依据,我们选取了 17 个标准样品并配成混标。分别取混合对照品溶液、供试品溶液各 2 μ L,按色谱和质谱条件进样,分别得到供试品图谱和对照品图谱(见图 1)。依照相应的保留时间和相应的质谱信息进行比对,最终鉴定出毛蕊异黄酮葡萄糖苷、人参皂苷 Re、芹菜素、人参皂苷 Rb₁、黄芪甲苷、甘草酸、白术内酯 II 共 7 个成分,其详细质谱信息见表 1。

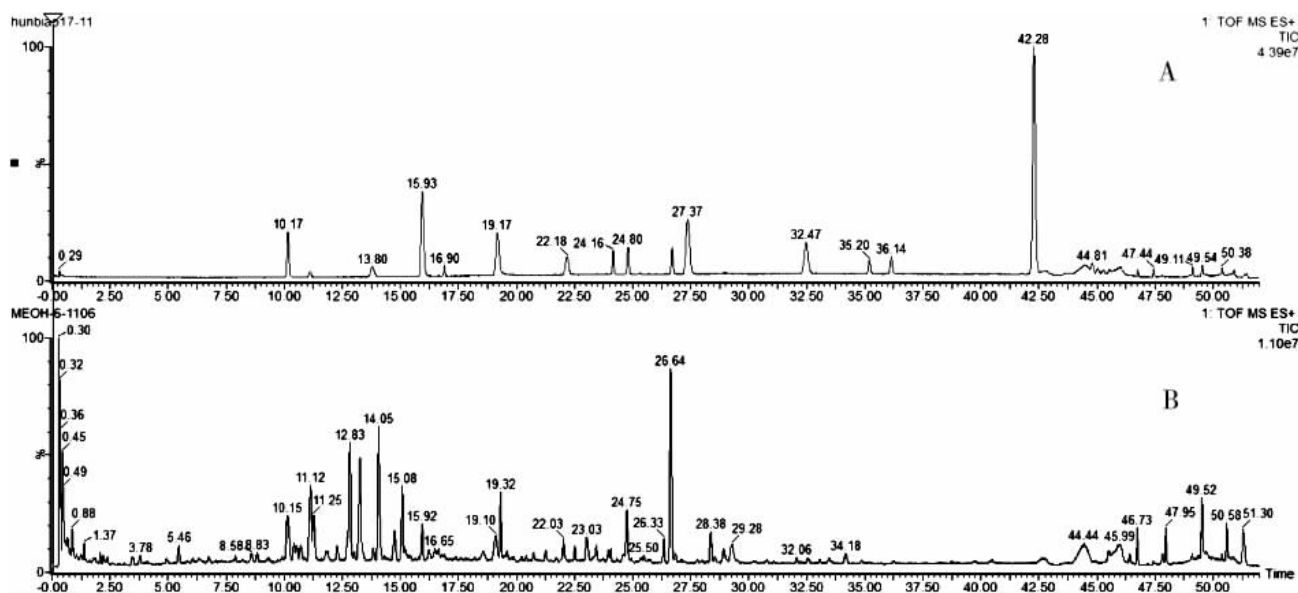


图 1 对照品混合物(A)和健脾解毒方(B)的总离子流图

表 1 健脾解毒方提取物 7 种成分质谱信息

化合物	化学结构式	保留时间(min)	选择离子	理论值(M)	测定值(M0)	测定值(m)	偏差
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	10.17	[M+H] ⁺	447.1301	447.1326	447	5.59
黄芪甲苷	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄	24.80	[M+H] ⁺	785.4687	785.4696	785	1.15
人参皂苷 Re	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	16.90	[M+H] ⁺	947.5579	947.5585	947	0.63
人参皂苷 Rb ₁	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	24.16	[M+H] ⁺	1 109.610 8	1 109.610 7	1109	-0.09
甘草酸	C ₂₄ H ₄₂ O ₁₆	26.72	[M+H] ⁺	607.4116	607.4155	607	6.42
芹菜素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	19.17	[M+H] ⁺	271.0606	271.0618	271	4.42
白术内酯 II	C ₁₅ H ₁₈ O ₂	32.47	[M+H] ⁺	233.1537	233.1546	233	3.86

注:[M+H]⁺为质子化分子离子;M为离子质量的实测值;M0为离子质量的理论值;m为离子的质量数;偏差=[(M-M0)/m] \times 10⁶。

2.2 健脾解毒方对大肠癌 HCT116、LoVo、SW48 及 HT29 细胞增殖的影响

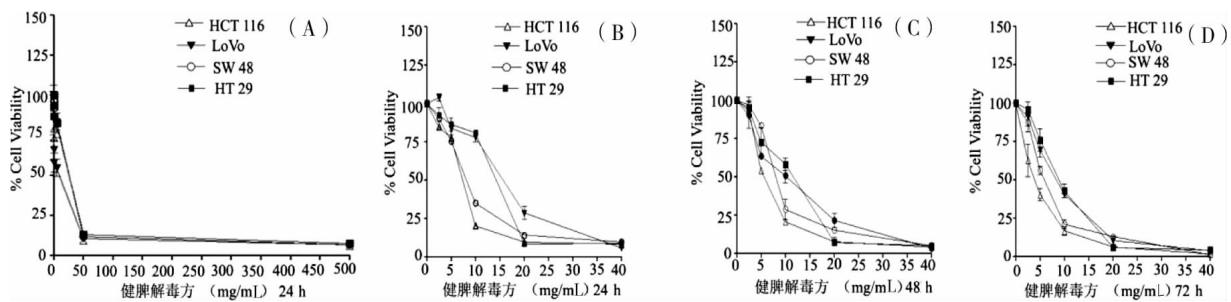
将健脾解毒方分别设置 0、0.05、0.5、5、50、500 mg/mL 共 6 个浓度梯度干预 24、48、72h 后, 采用 MTT 法计算出健脾解毒方各浓度组细胞生存率值, 结果表明 4 种大肠癌细胞系在 5~50 mg/mL 浓度区间细胞生存率值均能达到 50%, 见图 2 (A)。通过 Graphpad Prism5 软件计算 IC₅₀ 值, 结果显示, 健脾解毒方干预 24、48、72 h 后, 四种大肠癌细胞系的 IC₅₀ 值分别为 HCT116 (6894, 5668, 3648 mg/mL)、LoVo (1465、

8737、7849 mg/mL)、SW48 (8029、7026、5.740 mg/mL) 及 HT29 (13.06、9.646、8.448 mg/mL), 提示健脾解毒方对大肠癌 HCT116、LoVo、SW620 及 HT29 细胞的增殖抑制作用与时间有一定相关性, 见表 2。采用 2 倍稀释法重新设置 0、2.5、5、10、20、40 mg/mL 共 6 个浓度梯度分别干预 24、48、72 h 后, 计算出健脾解毒方各浓度组细胞生存率值并绘制出各组细胞生存率的曲线图, 见图 2(B、C 和 D), 提示健脾解毒方对大肠癌细胞系 HCT116、LoVo、SW48 及 HT29 的增殖抑制作用与浓度相关。

表 2 健脾解毒方对大肠癌细胞不同时间点 IC₅₀ 值的影响

	HCT116	LoVo	SW48	HT29
24 h	6.894±0.542	14.65±1.142	8.029±0.709	13.06±0.107
48 h	5.668±0.467*	8.737±0.68*	7.026±0.593	9.646±0.765*
72 h	3.648±0.279**	7.849±0.61*	5.740±0.435**	8.448±0.671**
24 h VS 48 h	<i>t</i> =6.476 <i>P</i> =0.032	<i>t</i> =21.375 <i>P</i> =0.002	<i>t</i> =4.672 <i>P</i> =0.061	<i>t</i> =13.344 <i>P</i> =0.005
24 h VS 72 h	<i>t</i> =28.313 <i>P</i> =0.001	<i>t</i> =21.972 <i>P</i> =0.002	<i>t</i> =15.377 <i>P</i> =0.006	<i>t</i> =20.876 <i>P</i> =0.003
48 h VS 72 h	<i>t</i> =8.542 <i>P</i> =0.014	<i>t</i> =2.377 <i>P</i> =0.142	<i>t</i> =7.689 <i>P</i> =0.026	<i>t</i> =6.547 <i>P</i> =0.031

注: 与 24 h 组比较, **P*<0.05; 与 48 h 组比较, #*P*<0.05。



注: A, 健脾解毒方 (0~500 mg/mL) 干预 24 h 各组细胞增殖曲线图; B、C 和 D, 健脾解毒方 (0~40 mg/mL) 分别干预 24、48、72 h 各组细胞增殖曲线图。

图 2 MTT 法检测健脾解毒方对大肠癌细胞增殖的影响

2.3 健脾解毒方对大肠癌 HCT116、LoVo、SW48 及 HT29 细胞周期的影响

依据计算得到的大肠癌 HCT116、LoVo、SW48 及 HT29 细胞的 IC₅₀ 值结果, 设定健脾解毒方的干预浓度分别为 HCT116 (7 mg/mL)、LoVo (14 mg/mL)、SW48 (8 mg/mL) 及 HT29 (13 mg/mL), 干预 24 h 后采用流式细胞仪检测健脾解毒方对各组细胞周期的影响, 结果显示, 与对照组比较健脾解毒方组 G₁ 期细胞所占比例明显上升, S 期+G₂ 期细胞比例显著下降, 其增殖指数也显著性降低, 具有统计学差异 (*P*<0.05)。这些数据提示健脾解毒方能够抑制大肠癌 HCT116、LoVo、SW48 及 HT29 细胞 DNA 合成并使细胞周期阻滞于 G₁ 期, 见表 3。

表 3 健脾解毒方对大肠癌细胞周期的影响 ($\bar{x}\pm s, \%, n=3$)

		Con	JPJD	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
HCT116	G1	50.81±4.61	71.12±6.21*	-21.986	0.002
	S	27.91±2.1	16.21±1.35*	27.020	0.001
	G2	14.01±1.2	8.31±0.81*	25.315	0.002
LoVo	G1	48.15±4.17	68.17±5.76*	-21.809	0.002
	S	28.03±2.34	18.01±1.54*	21.694	0.002
	G2	15.01±1.23	9.54±0.78*	21.054	0.002
SW48	G1	49.12±4.16	69.12±5.38*	-28.394	0.001
	S	28.01±2.52	17.61±1.17*	13.343	0.006
	G2	14.21±1.71	9.23±0.81*	10.210	0.009
HT29	G1	50.08±4.31	67.21±5.52*	-16.818	0.004
	S	26.91±2.1	19.02±1.65*	30.369	0.001
	G2	14.81±1.31	9.72±0.79*	16.954	0.003

注: 与对照组比较, **P*<0.05。

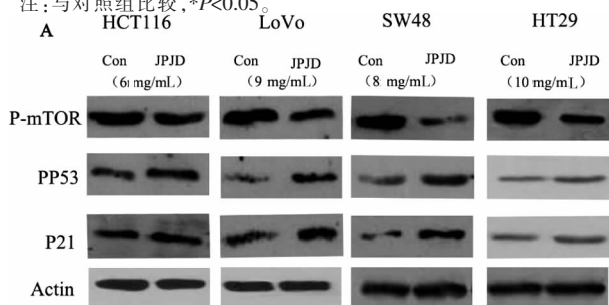
2.4 健脾解毒方对大肠癌 HCT116、LoVo、SW48 及 HT29 细胞 Phospho-mTOR (P-mTOR)、Phospho-P53 (PP53)和 P21 蛋白表达的影响

如前所述,同样设定健脾解毒方的干预浓度分别为 HCT116 (6 mg/mL)、LoVo (9 mg/mL)、SW48 (8 mg/mL)及 HT29 (10 mg/mL),干预 48 h 后采用 Western Blot 法检测健脾解毒方对 mTOR 信号通路相关蛋白表达的影响,结果显示,与对照组比较健脾解毒方组 P-mTOR 表达水平明显下调,PP53 和 P21 表达水平明显上调,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表 4 及图 3。

表 4 健脾解毒方对大肠癌细胞 P-mTOR、PP53 和 P21

	蛋白表达的影响		$(\bar{x}\pm s\%, n=3)$		
	Con	JPJD	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	
HCT116	P-mTOR	1.32±0.16	0.72±0.08*	12.990	0.006
	PP53	0.33±0.03	0.82±0.07*	-21.218	0.002
	P21	0.26±0.03	0.53±0.06*	-5.892	0.028
LoVo	P-mTOR	1.51±0.17	0.68±0.07*	9.714	0.010
	PP53	0.12±0.01	0.32±0.04*	-11.547	0.007
	P21	0.21±0.02	0.65±0.07*	-8.468	0.014
SW48	P-mTOR	1.55±0.16	0.23±0.02*	16.331	0.004
	PP53	0.22±0.02	0.61±0.05*	-9.650	0.011
	P21	0.21±0.02	0.65±0.07*	-8.468	0.014
HT29	P-mTOR	1.53±0.16	0.75±0.08*	16.887	0.003
	PP53	0.16±0.02	0.34±0.04*	-9.000	0.012
	P21	0.12±0.01	0.25±0.03*	-5.629	0.030

注:与对照组比较,* $P<0.05$ 。



注:Con 对照组,JPJD 健脾解毒方粗提取物组。

图 3 HCT116、LoVo、SW48 及 HT29 细胞两组 P-mTOR、PP53 及 P21 蛋白表达的电泳图

3 讨论

大肠癌是癌症死亡的主要原因之一,大肠癌的治疗方法包括手术、化疗、放疗及靶向治疗等,但是其临床疗效并没有得到大的改善,手术后 5 年生存率约 60%^[2],出现转移灶后 5 年生存率约 10%^[3],因此找到新的能提高临床疗效的综合治疗方法一直是大肠癌治疗的研究热点。在我国,中医药在大肠癌的临床治疗中有着重要地位^[4]。大量临床研究表明,中医药具有改善临床症状、提高免疫力、结合化疗增敏减毒、减少复发转移等独特优势^[5]。脾虚气

弱、瘀毒结聚是大肠癌的主要病因病机,治以健脾益气、清热解毒为法,已成医家共识^[6-7]。虽然近年来关于中医药治疗大肠癌的疗效机制的实验研究取得较大进展^[8],但是基于健脾解毒立法的中医有效方剂的具体作用机制仍不十分清楚。

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR) 是 PI3K/Akt 通路的下游分子。mTOR 包括 mTORC1 和 mTORC2 两个复合物,其中 mTORC1 对雷帕霉素敏感,对各种细胞内(能量及应激)和细胞外(营养、生长因子及激素)信号起反应,通过其下游的 S6K1 和 4E-BP1 促进蛋白质合成,是细胞生长增殖的中心环节^[9]。mTOR 通路可调控与肿瘤发生密切相关的细胞恶性转化、生长增殖、周期调控、侵袭与转移、肿瘤干细胞的形成等多项细胞功能^[10]。mTOR 信号通路异常与大肠癌的发生、发展密切相关^[11]。mTOR 已成为抗肿瘤治疗的靶点,mTOR 抑制剂临床试验结果表现出抗肿瘤活性,新的 mTOR 抑制剂的临床试验仍在进行中^[12-13]。

P53 基因为抑癌基因,通过调控细胞周期停滞、凋亡及衰老等途径起抑制肿瘤的作用^[14]。P53 基因功能异常与大肠癌的发生发展密切相关,大约有 40%~50% 的大肠癌患者 P53 基因突变^[15]。P21 是细胞周期依赖性激酶抑制蛋白(CDKs)家族中重要的调节因子,促进细胞周期阻滞的主要蛋白^[16]。P53 在肿瘤细胞周期进程中通过活化转录 P21 基因,P21 蛋白能抑制 CDK 磷酸化或 Cyclin-CDK 的活性使肿瘤细胞停滞在 G1 期,从而阻滞细胞周期从 G₁ 期向 S 期的进展^[17]。mTOR 的活化能够磷酸化 P53 蛋白的丝氨酸-15 位点的磷酸酶(由 α-4 亚基和 PP2A 催化亚基组成)从而抑制 P53 的活性^[18]。肿瘤细胞中异常活化的 mTOR 能够抑制 P53 的表达与活性,促进肿瘤异常增殖及肿瘤血管生成,从而使肿瘤细胞获得永生性^[19]。

健脾解毒方由黄芪、白术、西洋参、半枝莲、甘草等 11 味药物组成。元代著名医学家刘元素指出黄芪的作用有五:“补诸虚不足,一也;益元气,二也;壮脾胃,三也;去肌热,四也;排脓止痛,活血生血,内托阴疽,为疮家圣药,五也”。健脾解毒方以黄芪益气健脾解毒,白术健脾益气利水共为君药,全方共奏健脾益气、解毒清热、利湿消肿之功。我们采用水提法制作健脾解毒方,并利用 UPLC-Q-TOF/MS 法检测到了健脾解毒方中 7 种有效成分:毛蕊异黄酮葡萄糖苷、人参皂苷 Re、芹菜素、人参皂苷 Rb₁、黄芪甲苷、甘草酸、白术内酯 II。现代药理研究表明,黄芪提取物毛蕊异黄酮葡萄糖苷能够通过 ERβ/miR-17 信号通路促进大肠癌细胞凋亡^[20],黄芪甲苷具有增强免疫、抑制肺癌侵袭、转移的作用^[21]。西洋参提取物人参皂苷可通过多种途径促进大肠癌细胞凋亡、抑制肿瘤侵袭、转移及进展^[22-23],白术内酯 II 能够诱导黑素瘤细胞周

期 G₁ 期停滞及细胞凋亡^[24],半枝莲提取物芹菜素具有诱导大肠癌 HCT116 细胞凋亡及促进自噬的作用^[25],甘草提取物甘草酸可通过下调 HSP90 基因表达诱导人结肠癌 HT-29 细胞凋亡而发挥抗肿瘤作用^[26]。

本文通过 MTT 法检测健脾解毒方对大肠癌 HCT116、LoVo、SW48 及 HT29 细胞增殖的影响,结果表明,健脾解毒方对 4 种大肠癌细胞系均有抑制增殖的作用,其抑制效率与浓度呈正相关。我们同时运用 Graphpad Prism5 软件计算健脾解毒方干预 24、48 h 及 72 h 后的 IC₅₀ 值,结果提示,随着作用时间延长 IC₅₀ 值下降,其抑制作用增强。说明健脾解毒方的抑制作用与浓度相关并有时间依赖性。健脾解毒方粗提取物对人正常结肠粘膜 FHC 细胞增殖没有影响(数据没有显示),说明其抑制增殖的作用具有针对大肠癌细胞的特点而对正常结肠粘膜细胞没有毒性。

为了进一步明确健脾解毒方抑制大肠癌细胞增殖的具体机制,采用流式细胞仪检测发现健脾解毒方能使大肠癌 HCT116、LoVo、SW48 及 HT29 细胞周期停滞于 G₁ 期。基于 mTOR-P53-P21 通路在大肠癌发生发展中的重要作用,通过检测 P-mTOR、PP53 和 P21 蛋白表达的变化,结果发现,健脾解毒方能够下调 P-mTOR 蛋白表达,上调 PP53 和 P21 蛋白表达,提示健脾解毒方可能通过在转录后水平抑制 mTOR 的活化,进而促进 P53 的活化,进一步活化转录 P21 基因,促使大肠癌细胞 G₁ 期停滞。

综上所述,健脾解毒方具有抑制大肠癌细胞增殖的作用,其抑制作用与浓度及时间相关,健脾解毒方可能通过 mTOR-P53-P21 信号途径抑制大肠癌细胞增殖,这可能是健脾解毒方治疗大肠癌的作用机制之一。

参考文献:

- [1] 张四方,朱伟光,何明大,等.中药干预对结肠癌化疗患者生活质量和负性情绪影响的动态观察[J].中国临床心理学杂志,2007,4(4):125-130.
- [2] Lin FX, Tian LF, Lei CY, et al. Chinese medicine for outcomes in colorectal cancer patients: A retrospective clinical study[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2016,7:1-6.
- [3] Storli KE, Sondena K, Bukholm IR, et al. Overall survival after resection for colon cancer in a national cohort study was adversely affected by TNM stage, lymph node ratio, gender, and old age[J]. Int J Colorectal Dis, 2011, 26(10): 1299-1307.
- [4] Davies JM, Goldberg RM. Treatment of metastatic colorectal cancer [J]. Semin Oncol, 2011, 38(4):552-560.
- [5] 白建平,张海波,李勇,等.中西医结合治疗大肠癌思路与方法探讨[J].陕西中医,2011,32(3):303-304.
- [6] Deng S, Hu B, An HM. Traditional Chinese Medicinal Syndromes and Treatment in Colorectal Cancer [J]. J Cancer Ther, 2012, 3(6):888-897.
- [7] 张艺梁,叶丽红.大肠癌中医研究近况[J].辽宁中医药大学学报,2015,17(4):216-219.

- [8] 刘宣,范忠泽,李琦.中医药治疗大肠癌的实验研究进展[J].中华中医药杂志,2013,28(6):1808-1811.
- [9] Fingar DC, Salama S, Tsou C, et al. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E[J]. Genes Dev, 2002,16(12): 1472-1487.
- [10] Asati V, Mahapatra DK, Bharti SK. PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives [J]. Eur J Med Chem, 2016,109: 314-341.
- [11] Slattery ML, Herrick JS, Lundgreen A, et al. Genetic variation in a metabolic signaling pathway and colon and rectal cancer risk: mTOR, PTEN, STK11, RPKAA1, PRKAG2, TSC1, TSC2, PI3K and Akt1[J]. Carcinogenesis, 2010,31(9):1604-1611.
- [12] Battelli C, Cho D C. mTOR inhibitors in renal cell carcinoma [J]. Therapy, 2011,8(4):359-367.
- [13] Liu L, Zhang W, Li W, et al. A phase I study of ridaforolimus in adult Chinese patients with advanced solid tumors[J]. J Hematol Oncol, 2013,6:48.
- [14] Levine A J, Finlay C A, Hinds P W. P53 is a tumor suppressor gene[J]. Cell, 2004, 116(2 Suppl): 453-456.
- [15] Takayama T, Miyanishi K, Hayashi T, et al. Colorectal cancer: genetics of development and metastasis [J]. J Gastroenterol, 2006,41(3):185-192.
- [16] Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities[J]. Nature Reviews Cancer, 2009, 9(6): 400-414.
- [17] Liu SX, Bishop WR, Liu M. Differential effects of cell cycle regulatory protein p21WAF1/Cip1 on apoptosis and sensitivity to cancer chemotherapy[J]. Drug Resistance Updates, 2003, 6(4):183-195.
- [18] Longerich T. EEF1A2 inhibits the p53 function in hepatocellular carcinoma via PI3K/AKT/mTOR-dependent stabilization of MDM4[J]. Pathologie, 2014,35(Suppl 2):177-184.
- [19] Kong M, Fox C J, Mu J, et al. The PP2A-associated protein alpha4 is an essential inhibitor of apoptosis [J]. Science, 2004, 306(5696): 695-698.
- [20] Chen J, Zhao X, Li X, et al. Calycosin induces apoptosis by the regulation of ERβ/miR-17 signaling pathway in human colorectal cancer cells[J]. Food Funct, 2015, 6(9): 3091-3097.
- [21] Cheng X, Gu J, Zhang M, et al. Astragaloside IV inhibits migration and invasion in human lungcancer A549 cells via regulating PKC-α-ERK1/2-NF-κB pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2014, 23(1):304-313.
- [22] Gum SI, Rahman MK, Won JS, et al. Ginsenoside?Products Triggers Mitochondria/FasL-mediated Apoptosis in Colon Cancer Cells[J]. Phytother Res, 2016, 30(1):136-43.
- [23] Junmin S, Hongxiang L, Zhen L, et al. Ginsenoside Rg3 inhibits colon cancer cell migration by suppressing nuclear factor kappa B activity[J]. J Tradit Chin Med, 2015, 35(4):440-444.
- [24] Ye Y, Wang H, Chu JH, et al. Atractylenolide?II induces G1 cell-cycle arrest and apoptosis in B16 melanoma cells [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 136(1): 279-282.
- [25] Lee Y, Sung B, Kang YJ, et al. Apigenin-induced apoptosis is enhanced by inhibition of autophagy formation in HCT116 human colon cancer cells[J]. Int J Oncol, 2014, 44(5):1599-1606.
- [26] Nourazarian SM1, Nourazarian A, Majidinia M, et al. Effect of Root Extracts of Medicinal Herb Glycyrrhiza glabra on HSP90 Gene Expression and Apoptosis in the HT-29 Colon Cancer Cell Line[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(18): 8563-8566.