

本文引用:宋琳,张利,蒋益兰. 健脾消癌方对缺氧微环境诱导的结肠癌细胞生物学行为影响及抑癌机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(2): 211-217.

健脾消癌方对缺氧微环境诱导的结肠癌细胞生物学行为影响及抑癌机制研究

宋琳¹,张利¹,蒋益兰^{2*}

(1.江苏省中西医结合医院,江苏南京 210028;2.湖南中医药大学附属中西医结合医院,湖南长沙 410006)

[摘要] **目的** 研究健脾消癌方对缺氧微环境下结肠癌细胞生物学行为的影响,并探讨其抑癌机制。**方法** 将对数生长期的结肠癌 SW620 细胞随机分为健脾消癌方组(10%健脾消癌方的含药血清培养)和对照组(10%的空白血清培养),两组同时在缺氧环境下诱导培养 14 d。采用 Real-time PCR 和 Western blot 检测两组结肠癌细胞低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、VEGF、Bcl-2、Caspase-3、MMP-9、Survivin mRNA 及蛋白的表达;MTT 法检测细胞增殖;Transwell 检测细胞迁移能力;流式细胞术检测细胞凋亡。**结果** 与对照组比较,健脾消癌方组结肠癌 SW620 细胞 HIF-1 α 、VEGF、Bcl-2 mRNA 和蛋白水平降低($P<0.05$),Caspase-3 mRNA 和蛋白水平升高($P<0.05$);健脾消癌方组结肠癌 SW620 细胞在 48、72、96 h 时细胞存活率降低($P<0.01$),迁移和穿透室膜细胞数降低($P<0.05$),细胞凋亡率升高($P<0.05$)。**结论** 健脾消癌方能下调缺氧微环境中结肠癌细胞 HIF-1 α 水平,间接影响其下游靶基因的表达,抑制结肠癌细胞增殖、促进细胞凋亡、减弱细胞的迁移,发挥抗癌作用。

[关键词] 结肠癌;健脾消癌方;缺氧;低氧诱导因子-1 α ;生物学行为;抑癌机制

[中图分类号]R285.5 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.02.010

Effect and Anti-cancer Mechanism of Jianpi Xiaoai Formula on the Biological Behavior of Colon Cancer Cells in Hypoxic Micro-environment

SONG Lin¹, ZHANG Li¹, JIANG Yilan^{2*}

(1. Jiangsu Provincial Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing, Jiangsu 210028, China;

2. Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese

Medicine, Changsha, Hunan 410006, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of Jianpi Xiaoai Formula on the biological behavior of colon cancer cells in hypoxic microenvironment and to explore its possible mechanism. **Methods** SW620 colon cancer cells in logarithmic growth phase were randomly divided into the Jianpi Xiaoai Formula group (cultured with 10% Jianpi Xiaoai Formula serum) and the control group (cultured with 10% blank serum), both groups were induced and cultured in hypoxic environment for 14 days at the same time. Real-time PCR and Western blot were used to detect the expressions of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α), VEGF,

[收稿日期]2020-06-04

[基金项目]国家自然科学基金面上项目(81373602)。

[作者简介]宋琳,女,博士,研究方向:肿瘤病中西医结合防治与规律研究。

[通讯作者]* 蒋益兰,女,教授,主任医师,E-mail:tianshangren623@163.com。

Bcl-2, Caspase-3, MMP-9, Survivin mRNA in colon cancer cells of the two groups; MTT was used to detect cell proliferation; transwell was used to detect cell migration and invasion ability; flow cytometry was used to detect cell apoptosis. **Results** Compared with the control group, the mRNA and protein levels of HIF-1 α , VEGF and Bcl-2 in SW620 colon cancer cells of the Jianpi Xiaoi Formula group decreased ($P<0.05$), Caspase-3 increased ($P<0.05$); the survival rate of SW620 colon cancer cells decreased at 48, 72 and 96 hours ($P<0.01$), the number of migrating and penetrating ependymal cells decreased ($P<0.05$), and the cells apoptotic rate increased ($P<0.05$) in the Jianpi Xiaoi Formula group. **Conclusion** Jianpi Xiaoi Formula can down-regulate the expression of HIF-1 α in colon cancer cells in hypoxic microenvironment, indirectly affect the expression of its downstream target genes, inhibit the proliferation of colon cancer cells, promote cell apoptosis, reduce cell migration, so as to play an anti-cancer role.

[**Keywords**] colon cancer; Jianpi Xiaoi Formula; hypoxia; hypoxia inducible factor-1 α ; biological behavior; anti-cancer mechanism

结肠癌是临床上常见的消化系统恶性肿瘤,其发病率和死亡率高居恶性肿瘤的第三位,根据中国癌症中心数据统计,我国结肠癌发病率占全球24.3%,死亡率占全球 22.9%,并且呈逐年上升趋势^[1]。目前,结肠癌治疗主要为手术辅以放化疗、基因治疗及分子靶向治疗等,其 5 年总体生存率仍不及 50%^[2],结肠癌已成为严重威胁人类健康的一类疾病。因此,研究结肠癌发病机制中的关键调控分子以及揭示侵袭转移机制,对结肠癌的防治具有重要的理论价值。研究表明肿瘤的发生发展、复发转移与肿瘤所处的微环境密切相关。由于恶性肿瘤异常的血管形成以及肿瘤细胞无限制的生长导致微环境中氧含量降低,即缺氧微环境。缺氧条件下可导致低氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)的积累,肿瘤细胞在 HIF-1 α 的转录调控下适应低氧环境,并且通过激活靶基因使其在肿瘤发展、侵袭和转移中发挥重要作用^[3-4],导致肿瘤常规治疗预后较差。因此,研究 HIF-1 α 信号通道与肿瘤之间的关系尤为重要。

中医药具有多途径、多靶点的特点,可有效改善肿瘤微环境,从而诱导结肠癌细胞凋亡、抑制诱导肿瘤基因表达和癌症细胞迁移^[5]。本课题组前期临床研究^[6-7]表明,健脾消癌方治疗晚期结直肠癌能稳定瘤体、有效降低肿瘤标志物、提高患者生活质量、延长肠癌患者中位无进展生存期和中位总生存时间。

本文从分子生物学层面探讨健脾消癌方对结肠癌的抗癌机制,研究在缺氧微环境下健脾消癌方对 SW620 结肠癌细胞 HIF-1 α 水平及下游靶基因 VEGF、Bcl-2、Caspase-3、MMP-9、Survivin 的影响,揭示其在缺氧微环境下的抗癌机制。

1 材料与方法

1.1 动物及细胞系

SPF 级 SD 大鼠 10 只,1.5~2 个月龄,体质量(200 \pm 20) g,雌雄各半,购自上海斯莱克实验动物有限公司,合格证号:SCXK(沪)2007-005。结肠癌 SW620 细胞系购自中科院上海细胞研究所(批号 2018051233577),用 RPMI-1640 完全培养基(内含 10%小牛血清,1%链霉素),在 CO₂ 培养箱中传代培养。缺氧诱导条件:37 $^{\circ}$ C,5% CO₂,94% N₂,培养 14 d。

1.2 药物

健脾消癌方(甘草 3 g,炒枳壳 6 g,莪术 10 g,法半夏 10 g,党参 15 g,白术 15 g,茯苓 15 g,淫羊藿 15 g,郁金 15 g,黄芪 20 g,薏苡仁 30 g,半枝莲 30 g,灵芝 30 g,重楼 30 g,白花蛇舌草 30 g)饮片符合 2020 年版《中华人民共和国药典》^[8]规定的标准,购自江苏省中西医结合医院。将以上所有药按 5 倍量处方,加 8 倍量水浸泡 30 min,煎煮 1 h,过滤;再加 6 倍量水,煎煮 1 h,过滤,合并两次滤液静置 24 h,12 000 r/min 离心 15 min 后将上清液浓缩至 850 mL,4 $^{\circ}$ C 冷藏 48 h,离心冷藏液得到约 800 mL 上清,灭菌后制成含生药 2.1 g/mL 的水煎剂备用。

1.3 主要试剂及仪器

胎牛血清(批号:P160704)、二甲亚枫(批号:35605-5G-F)均购自美国 Sigma 公司;胰酶消化液(批号:824300)、RPMI1640 细胞培养液(批号:SA166734)购自美国 Gibco 公司;青霉素(批号:25465787)、链霉素(批号:5465687)、乙醇(批号:

8754187)购自上海国药集团;DEPC、MTT 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;RNA 提取试剂盒(批号:SA1022,AB218110,AB23356)、RNA 逆转录试剂盒购自日本 TAKARA 公司;SYBR GREEN 试剂盒(批号:P160704,ST728)、Western blot 一抗(批号:ab78334)购自美国 ABI 公司;Western blot 二抗(南京建成生物研究所,批号:ab189075);Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(美国 BD 公司,批号:ab489075);Transwell 小室(批号:ab889075)(美国康宁公司)。CKX41 倒置显微镜(日本 Olympus 公司);Multiskan 全波长酶标仪(德国 Thermo 公司);QuantStudioTM 6 Flex 荧光定量 PCR 系统(美国 ABI 公司);PowerPAC 凝胶电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);FACS Aria II 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.4 健脾消癌方含药血清制备

参考文献[9]方法制备健脾消癌方药物和空白血清,SD 大鼠 10 只,雌雄各半,随机分成 2 组,每组 5 只。健脾消癌方组大鼠灌胃健脾消癌方[10.8 g/kg,相当于 70 kg 成年人等效量(120 g/d)],对照组按大鼠体质量灌胃等容积的生理盐水。每日 1 次,连续 6 d,于第 7 天末次灌胃 1 h 后,10%水合氯醛(3 mL/kg)腹腔麻醉,腹主动脉取血,4 °C 保存,24 h 内离心(2 000 r/min,10 min),吸取血清,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,-20 °C 保存备用。

1.5 细胞分组与处理

将处于对数生长期的结肠癌 SW620 细胞用胰酶消化后,按 1:3 扩大到 2 个培养皿中继续培养,每组设 6 个复孔,实验重复 3 次。将 2 个培养皿的细胞随机分为对照组和健脾消癌方组,其中对照组细胞用缺氧环境诱导培养 14 d,同时用 10%的空白血清培养,健脾消癌方组细胞用缺氧环境诱导 14 d,同时用含 10%健脾消癌方的血清培养。

1.6 观察指标及检测方法

1.6.1 Real-time PCR 法检测 HIF-1 α 、VEGF、Bcl-2、Caspase-3、MMP-9 及 Survivin mRNA 水平 收集细胞,Trizol 提取各组细胞总 RNA,并通过逆转录得到 cDNA,设计并合成 HIF-1、VEGF、Survivin、MMP-9、Bcl-2、Caspase-3 及 GAPDH 定量引物,引物序列见表 1。

1.6.2 Western blot 法检测 HIF-1 α 、VEGF、Bcl-2、

表 1 基因引物序列

基因名称	引物序列	引物长度/bp
HIF-1 α	正向引物 5'-CTGACCTGCACTCAATCAA-3'	96
	反向引物 5'-CTTTGCTTCTGTCTTCAGCA-3'	
VEGF	正向引物 5'-GGAGCTCAGGACATTCCTGTG-3'	112
	反向引物 5'-GGAGGAAGGTCAACCACTCAC-3'	
Survivin	正向引物 5'-GAGAACGAGCCAGACTTGGC-3'	105
	反向引物 5'-CCTCTGGTCCCACCTTCAAGA-3'	
MMP-9	正向引物 5'-GTGCTGGCTGCTGCTTTGCTG-3'	108
	反向引物 5'-GTCGCCCTCAAAGCTTGAAT-3'	
Bcl-2	正向引物 5'-TTCTTTGAGTTCGCTGGGGTC-3'	126
	反向引物 5'-TGCATATTTGTTGGGGCAGG-3'	
Caspase-3	正向引物 5'-TGGAACAAATGGACCTGTTGACC-3'	102
	反向引物 5'-AGGACTCAAATTCGTGTCACC-3'	
GAPDH	正向引物 5'-CTGGGACGACATGGAGAAAA-3'	112
	反向引物 5'-AAGGAAGCTGGAAGACTGC-3'	

Caspase-3、MMP-9 及 Survivin 蛋白表达水平 用胰酶消化并收集处于对数生长期的结肠癌 SW620 细胞系。BCA 法测定蛋白浓度,蛋白变性。取 30 μg 蛋白经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白,转膜至 PVDF 膜,5%(M/V)脱脂奶粉的封闭液中封闭 2 h;用 TBST 洗膜 3 次后,加入用 TBST 按 1:500 稀释的一抗,置于摇床 4 °C 冰箱过夜;用 TBST 洗膜 3 次,每次 5 min;将二抗用 TBST 按 1:1 000 稀释后室温与膜接触,孵育 2 h 后,用 TBST 洗膜 3 次;加 ECL 显影剂,用自动凝胶成像分析仪检测,用凝胶成像处理系统对目标条带的分子量和光密度值做处理分析。

1.6.3 MTT 法检测结肠癌 SW620 细胞增殖活性 将处于对数生长期的结肠癌 SW620 细胞随机分为健脾消癌方组和对照组,给予相应干预后,调整细胞浓度按 4×10^3 /孔接种于 96 孔板培养 12 h。两组各孔均分别加入含药培养液,培养 67 h 后,取出 96 孔板,每孔中加入 MTT 试剂 20 μL,37 °C CO₂ 培养箱孵育 4 h。小心吸出各孔内液体,每孔加入 150 μL DMSO,置摇床上避光孵育 20 min,用酶标仪在 490 nm 波长处检测吸光度(OD)值,以对照组 OD 值为参数,计算细胞存活率。

1.6.4 Transwell 细胞迁移实验检测结肠癌 SW620 细胞迁移 将处于对数生长期的结肠癌 SW620 细胞调整浓度后按 4×10^5 /孔接种于 6 孔板,随机分为健脾消癌方组和对照组。将细胞换成不完全培养液饥饿 12 h,胰酶消化吸收细胞,PBS 缓冲液洗涤 3

次,用不完全 DMEM 培养基稀释细胞调整密度为 $10^6/\text{mL}$,在每孔上室加入 $150\ \mu\text{L}$ 细胞悬液,下室加入 $500\ \mu\text{L}$ 10% DMEM 完全培养液,置于 $37\ ^\circ\text{C}$ CO_2 培养箱 48 h 后,从培养板中取出 Transwell 小室,吸出液体,PBS 缓冲液洗涤小室 3 遍后,加入无水乙醇,放置 30 min。将小室反扣于吸水纸上,室温干燥基底膜,用结晶紫染色 10 min,流水漂洗 3 遍,于显微镜下观察,随机选取 5 个视野观察细胞并拍照,Image J 软件计数细胞数值,结果以细胞数表示。

1.6.5 流式细胞术检测结肠癌 SW620 细胞凋亡 取 Falcon 管分为健脾消癌方组和对照组,将处于对数生长期的结肠癌细胞用 0.25% 胰酶消化,离心收集后用预冷的 PBS 漂洗 2 次,加 $1\times$ 缓冲液制成 $1\times 10^6/\text{mL}$ 细胞悬液;每个 Falcon 管中加入 $100\ \mu\text{L}$ 细胞悬液,样本管同时加入 AV-FITC 和 PI 染料,同步设立阴性管(不加任何荧光抗体)和两只单阳管(分别加入 AV-FITC 和 PI 染料)震荡混匀后室温避光孵育 20 min。用 $1\times$ 缓冲液洗涤细胞 1 次,弃上清;用 $100\ \mu\text{L}$ $1\times$ 缓冲液溶解 $0.5\ \mu\text{g}$ Sav-FITC 加入 Falcon 管中,混匀。加入 $5\ \mu\text{L}$ PI,室温避光孵育 15 min。各管依次加入 $1\times$ Binding 缓冲液 $400\ \mu\text{L}$,1 h 内用流式细胞仪检测实验结果。

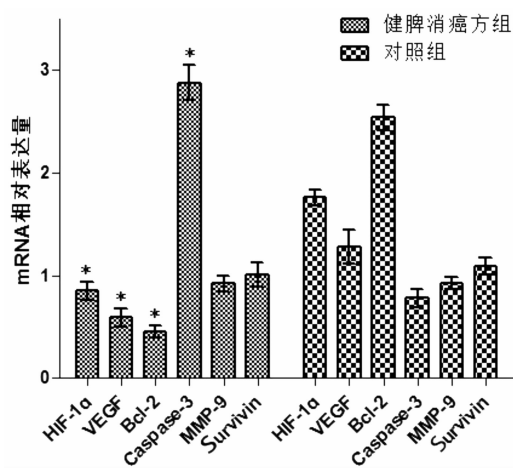
1.7 统计学方法

采用 SPSS 19.0 对数据进行分析,计量资料采用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较用方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 HIF-1 α 、VEGF、Bcl-2、Caspase-3、MMP-9 及 Survivin mRNA 表达水平比较

与对照组比较,健脾消癌方组 HIF-1 α 、VEGF 及 Bcl-2 mRNA 表达降低($P<0.05$),Caspase-3 mRNA 表达升高($P<0.05$)。见图 1。



注:与对照组比较,* $P<0.05$

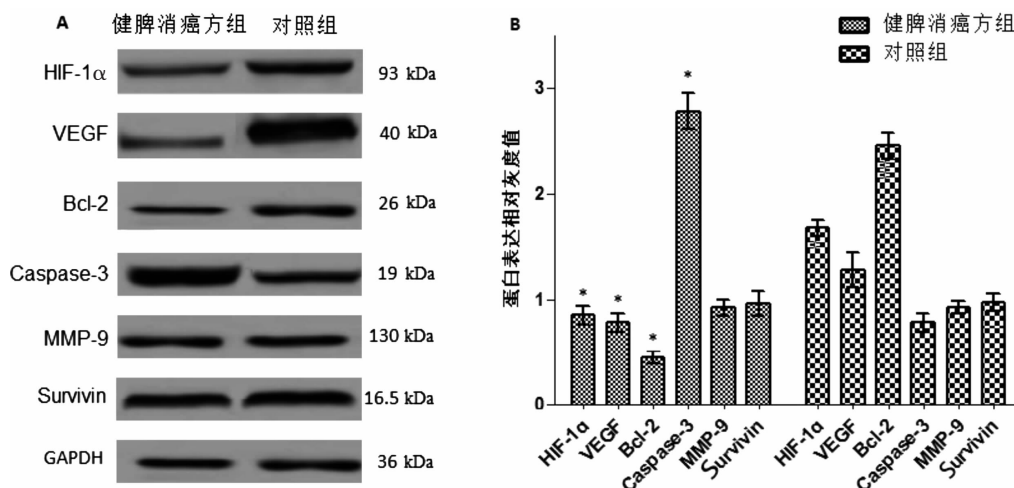
图 1 两组 HIF-1 α 、VEGF、Bcl-2、Caspase-3、MMP-9 及 Survivin mRNA 表达比较

2.2 两组 HIF-1 α 、VEGF、Bcl-2、Caspase-3、MMP-9 及 Survivin 蛋白表达比较

与对照组比较,健脾消癌方组 HIF-1 α 、VEGF 及 Bcl-2 蛋白表达降低($P<0.05$),Caspase-3 蛋白表达升高($P<0.05$)。见图 2。

2.3 两组 SW620 细胞存活率比较

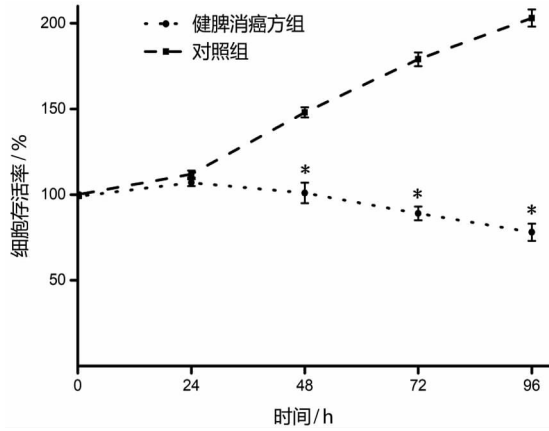
第 0、24、48、72 和 96 时,健脾消癌方组结肠癌细胞的存活率分别为($99\%\pm 1\%$),($107\%\pm 2\%$),($101\%\pm 4\%$),



注:与对照组比较,* $P<0.05$

图 2 两组 HIF-1 α 、VEGF、Bcl-2、Caspase-3、MMP-9 及 Survivin 蛋白电泳图(A)及表达比较(B)

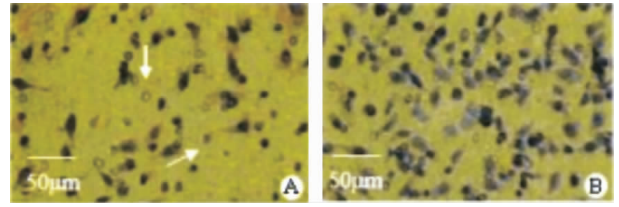
(89%±5%)和(78%±6%),对照组结肠癌细胞存活率分别为(100%±1%),(112%±2%),(148%±8%),(179%±4%)和(203%±6%)。与对照组比较,健脾消癌方组第48、72、96小时SW620细胞存活率降低($P<0.01$)。见图3。



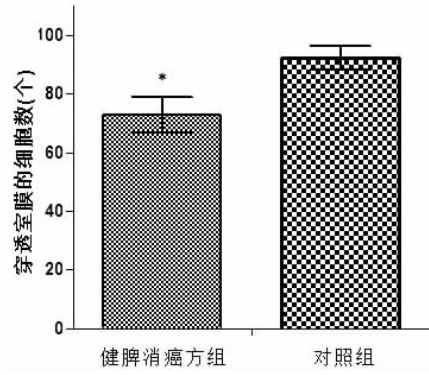
注:与对照组比较,* $P<0.01$
图3 两组SW620细胞存活率比较

2.4 两组SW620细胞迁移能力比较

倒置显微镜下可见对照组细胞数目较多,大小均一,分布均匀,细胞贴壁生长状态,折光性较好,增殖较快;而健脾消癌方组细胞数目较对照组细胞数目明显减少,细胞间连接减少,培养液中可见漂浮的细胞碎片,细胞形态呈皱缩、变小。结果显示健脾消癌方组迁移和穿透室膜的结肠癌细胞数为(72.8±4.3),对照组为(92.3±4.1),与对照组比较,健脾消癌方组迁移和穿透室膜的结肠癌细胞数降低($P<0.05$)。见图4-5。



注:A为健脾消癌方组;B为对照组;箭头表示细胞皱缩、变小
图4 两组细胞形态学观察结果(结晶紫染色×200)



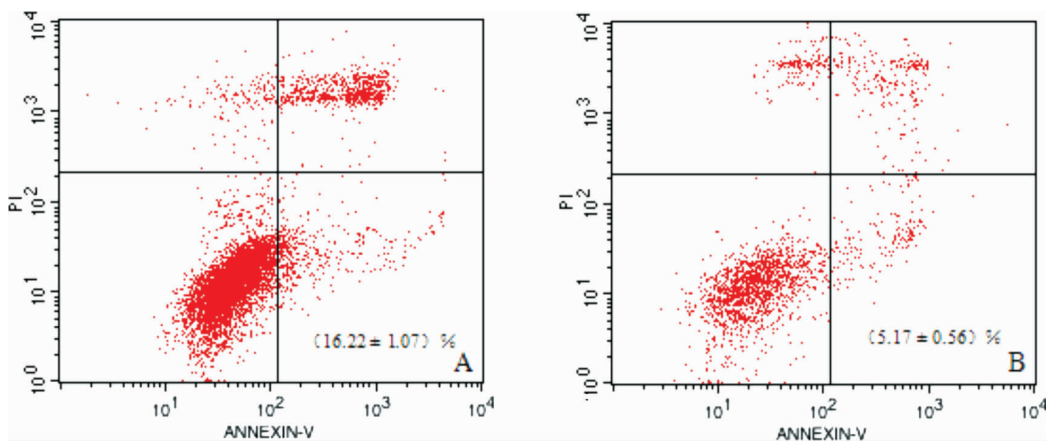
注:与对照组比较,* $P<0.05$
图5 两组结肠癌细胞迁移情况比较

2.5 两组SW620细胞细胞凋亡率比较

健脾消癌方组结肠癌细胞的凋亡率(16.22%±1.07%),高于对照组(5.17%±0.56%)($P<0.05$)。见图6。

3 讨论

《素问·评热病论》曰:“邪之所凑,其气必虚”。《素问·六微旨大论》曰:“物之生从于化,物之极由乎变”,论述了阴阳转化之极致状态。由此,机体产生肿瘤之原因在于环境之变化导致阴阳格拒而成,包括内环境与外环境,中医肿瘤辨证论治的实质就是干预肿瘤微环境^[10]。



注:A为健脾消癌方组;B为对照组;左下方象限为正常SW620细胞,左上方象限为细胞碎片,右上方象限为晚期凋亡细胞,右下方象限为早期凋亡细胞

图6 两组结肠癌细胞凋亡率比较

缺氧是实体瘤客观存在的微环境,贯穿与肿瘤发生发展的全过程。研究表明,肿瘤细胞在缺氧微环境中不但能继续存活,还能通过一系列机制继续生长、逃脱缺氧应急损伤,调控血管生长、能量代谢等使自身适应缺氧环境,这在肿瘤的发生和恶性进展中扮演重要角色^[11-13]。HIF-1 α 是一种缺氧环境中诱导细胞产生应答的转录因子,进入细胞核与特定启动子的反应元件结合后,能调控上百种靶基因的表达,从而对细胞适应缺氧环境起调控作用,其中包括 VEGF^[14]、MMP-9^[15]、Survivin^[16]、Caspase-3^[17]、Bcl-2^[18]等。VEGF 是已知最强的血管渗透剂,能提高血管尤其是微小血管的通透能力,为瘤细胞生长和毛细血管网建立提供物质支持,对于预测肿瘤生长增殖、侵袭转移、临床预后等有重要意义^[14]。MMPs 是一类 Zn²⁺、Ca²⁺依赖性内肽酶家族,能降解并破坏细胞外基质或基膜,MMPs 能调控细胞增殖、凋亡、侵袭和转移、血管生成等^[15]。Survivin 蛋白是凋亡抑制蛋白家族中分子量最小的成员,定位于人类染色体17q25 上,由 3 个内含子和 4 个外显子组成,它可通过蛋白酶依赖途径调控细胞凋亡^[16]。Caspase 是一类在线粒体途径的细胞凋亡过程中起着极其重要的作用的半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶,在凋亡诱导信号的作用下结合特异辅因子后激活,进而激活下游效应型 Caspase,通过裂解特异性底物及激活内源性核酸酶,最终使细胞呈现典型的凋亡形态和生化特征,发生不可逆的死亡^[17]。Caspase 和 Survivin 之间关系密切,Survivin 是一种多功能蛋白,能通过 Caspase 蛋白酶依赖途径调控细胞凋亡^[19]。Bcl-2 家族蛋白是细胞生长的关键调节因子,其家族成员间通过精准的平衡调控细胞的增殖和凋亡,Bcl-2 基因及其编码的蛋白能抑制细胞凋亡,因此又称为凋亡抑制基因^[18]。

中医学认为,结肠癌多由于“虚”“毒”“瘀”相互作用、相互影响而形成。健脾消癌方是湖南名医蒋益兰教授根据多年临床经验以“益气健脾,化痰解毒”为法创制而成,健脾消癌方以党参、薏苡仁益气健脾,以健生化之源,而疗诸虚不足,从而扶正固本;郁金、莪术活血化瘀,白花蛇舌草、半枝莲清热解毒、散结消痛,全方配伍攻补兼施,共奏益气健脾,化痰解毒之功。健脾消癌方在降低结肠癌术后复发转移

率,延长生存期,改善晚期结肠癌患者临床症状,提高生活质量、稳定瘤体、调节免疫因子 CD4⁺ CD25⁺调节性 T 细胞等方面具有明显优势^[7,20]。并且前期实验也通过 TGF- β /LncRNA-ATB/miR-200a 信号通路^[21]及 Wnt/ β -catenin 信号通路^[22]证实健脾消癌方通过多环节、多靶点起到抗肿瘤的作用。

本实验在缺氧环境下诱导结肠癌 SW620 细胞,同时用健脾消癌方含药血清培养 14 d 后,采用定量 Real-time PCR 检测 SW620 细胞中 HIF-1 α mRNA 和蛋白表达情况,结果提示健脾消癌方能抑制缺氧诱导的结肠癌细胞高表达 HIF-1 α ;进一步实验发现 HIF-1 α 下游靶基因发生了相应表达变化,其中 VEGF、Bcl-2 水平较对照组降低,Caspase-3 较对照组升高;MMP-9、Survivin 水平较对照组略有降低,但在本次实验中表达差异无统计学意义,可能是由于健脾消癌方引起的 HIF-1 α 下调的程度不足以引起其下游靶基因 MMP-9、Survivin 表达产生统计学差异。本次研究也证实健脾消癌方能抑制缺氧微环境中结肠癌细胞 HIF-1 α 的表达,进而引起下游一些促癌因子 VEGF、Bcl-2 表达降低,而抑癌因子 Caspase-3 表达升高,发挥抗癌效应。

本研究观察了健脾消癌方处理的结肠癌细胞生物学行为。健脾消癌方干预下,缺氧微环境中结肠癌 SW620 细胞在 MTT 实验的第 0、24、48、72、96 小时,细胞存活率分别为 99%、107%、101%、89%和 78%,整体生存曲线在对照组下方,其中在 48、72 和 96 h 3 个时间点上,健脾消癌方干预的 SW620 细胞存活率较对照组降低。并且健脾消癌方干预的 SW620 细胞凋亡率明显高于对照组,表明健脾消癌方能抑制缺氧微环境中结肠癌细胞增殖,促进细胞凋亡,发挥对结肠癌的治疗作用。Transwell 实验证实了健脾消癌方干预的缺氧结肠癌 SW620 细胞的迁移和穿透小室的能力较对照组降低,说明健脾消癌方能抑制缺氧环境中结肠癌细胞的迁移。

综上所述,健脾消癌方能抑制缺氧环境下结肠癌 SW620 细胞增殖,促进细胞凋亡,减弱细胞迁移和侵袭能力,从而发挥抗癌作用。

参考文献

[1] CHEN W Q, SUN K X, ZHENG R S, et al. Cancer incidence

- and mortality in China, 2014[J]. Chinese Journal of Cancer Research, 2018, 30(1): 1-12.
- [2] SINGH D, LUN J, LIU X, et al. The long-term survival benefits of high and low ligation of inferior mesenteric artery in colorectal cancer surgery: A review and meta-analysis [J]. Medicine, 2017, 96(47): 85-91.
- [3] 马 萌. 肿瘤微环境及其中医证本质—中医现代化路径之探索[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(6): 2255-2261.
- [4] WANG M, ZHAO X, ZHU D, et al. HIF-1 α promoted vasculogenic mimicry formation in hepatocellular carcinoma through LOXL2 up-regulation in hypoxic tumor microenvironment[J]. Journal of Experimental Clinical Cancer Research, 2017, 36(1): 60-64.
- [5] 吴 隰, 王瑞平, 陈 雪, 等. 基于肿瘤微环境学说的中医抗癌策略探讨[J]. 四川中医, 2018, 36(6): 50-53.
- [6] 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.
- [7] 蒋益兰, 俞天俊, 赵 晔. 健脾消癌方治疗老年中晚期大肠癌临床观察[J]. 中国中医信息杂志, 2014, 21(3): 94-96.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典·一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 315-325.
- [9] 张 宏, 王旭昉, 刘美奇, 等. 中药含药血清实验动物灌胃给药剂量探讨[J]. 吉林中医药, 2015, 35(6): 623-625.
- [10] 沈佳雯, 罗 会, 宁 倪, 等. 近年中药治疗结肠癌的药理作用研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2017, 35(10): 2336-2344.
- [11] KUMAR R, KIM EJ, HAN J, et al. Hypoxia-directed and activated theranostic agent: Imaging and treatment of solid tumor[J]. Biomaterials, 2016, 104: 119-128.
- [12] IKEDA Y, HISANO H, NISHIKAWA Y, et al. Targeting and treatment of tumor hypoxia by newly designed prodrug possessing high permeability in solid tumors[J]. Mol Pharm, 2016, 13(7): 2283-2289.
- [13] RAMACHANDRAN S, IENT J, GOTTGENS E L, et al. Epigenetic therapy for solid tumors: highlighting the impact of tumor hypoxia[J]. Genes, 2015, 6(4): 935-956.
- [14] GUAEL D, DURSUN A D, FICICILAR H, et al. Effect of intermittent hypoxia on the cardiac HIF-1/VEGF pathway in experimental type 1 diabetes mellitus[J]. Anatolian Journal of Cardiology, 2016, 16(2): 76-83.
- [15] GAO P, ZHU Y, LING F, et al. Nonischemic cerebral venous hypertension promotes a proangiogenic stage through HIF-1 downstream genes and leukocyte-derived MMP-9[J]. Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism, 2009, 29(8): 1482-1490.
- [16] LI Y, XIA ZL, CHEN LB. HIF-1 α and survivin involved in the anti-apoptotic effect of 2ME2 after global ischemia in rats[J]. Neurological Research, 2011, 33(6): 583-592.
- [17] HOECKE M V, PRIGENT-TESSIER A S, GARNIER P E, et al. Evidence of HIF-1 functional binding activity to caspase-3 promoter after photothrombotic cerebral ischemia[J]. Molecular and Cellular Neuroence, 2007, 34(1): 40-47.
- [18] YANG C C, LIN L C, WU M S, et al. Repetitive hypoxic preconditioning attenuates renal ischemia/reperfusion induced oxidative injury via upregulating HIF-1 alpha-dependent bcl-2 signaling[J]. Transplantation, 2009, 88(11): 1251-1260.
- [19] WU S, ZHOU Y, YANG G X, et al. Sulforaphane-cysteine induces apoptosis by sustained activation of ERK1/2 and caspase 3 in human glioblastoma U373MG and U87MG cells[J]. Oncology Reports, 2017, 37(5): 2829-2838.
- [20] 蒋益兰, 潘敏求, 蔡 美. 健脾消癌饮配合化疗拮抗大肠癌术后复发转移 62 例总结[J]. 湖南中医杂志, 2007, 23(1): 1-3.
- [21] 罗 吉, 罗 燕, 李勇敏, 等. 健脾消癌方对结肠癌 TGF- β /LncRNA-ATB /miR-200a 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(6): 161-166.
- [22] 杨 晓, 唐 蔚, 蒋益兰, 等. 健脾消癌方对人结肠癌 HCT116 细胞周期、凋亡及 Wnt/ β -catenin 信号通路相关因子的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25(6): 61-65.

(本文编辑 苏 维)