

本文引用: 赵 沅, 黄启宣, 胡响当. 天马颗粒Ⅲ含药血清通过下调 HK2 表达抑制结直肠癌细胞迁移和侵袭[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(10): 1861-1868.

天马颗粒Ⅲ含药血清通过下调 HK2 表达抑制 结直肠癌细胞迁移和侵袭

赵 沅^{1,2}, 黄启宣¹, 胡响当^{1*}

1. 湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙 410005; 2. 曲靖市中医医院, 云南 曲靖 655099

〔摘要〕 **目的** 探讨天马颗粒Ⅲ含药血清(TMKL)对结直肠癌(CRC)细胞侵袭、迁移的影响,验证天马颗粒Ⅲ含药血清是否通过调控己糖激酶 2(HK2)的表达从而抑制 CRC 细胞的侵袭、迁移。**方法** 以结直肠癌 SW480 细胞作为研究对象,采用 CCK-8 法筛选 TMKL 作用 SW480 的最佳浓度,将 SW480 细胞分为空白血清组(BS 组)、TMKL 含药血清组(TMKL 组),以验证 TMKL 对 SW480 细胞的作用。通过质粒转染技术构建 HK2 敲低 SW480 细胞株后,将细胞随机分为空白质粒组(sh-NC 组)、敲低 HK2 组(sh-HK2 组)、敲低 HK2 后使用空白血清干预组(sh-HK2+BS 组)、敲低 HK2 后使用 TMKL 含药血清干预组(sh-HK2+TMKL 组)。通过 CCK-8 法检测细胞增殖能力;Transwell 法检测细胞侵袭、迁移能力;RT-qPCR 法、Western blot 法检测细胞 HK2、上皮钙黏素(E-cadherin)、神经钙黏素(N-cadherin)的 mRNA 及蛋白表达水平。**结果** 与 BS 组相比, TMKL 组细胞增殖、侵袭、迁移能力明显下降($P<0.01$), HK2 的 mRNA 及蛋白表达水平明显降低($P<0.01$), E-cadherin 表达水平明显升高($P<0.01$), N-cadherin 表达水平明显降低($P<0.01$)。在 HK2 敲低背景下,与 sh-NC 组相比, sh-HK2 组细胞增殖、侵袭和迁移能力显著下降($P<0.01$), E-cadherin 的 mRNA 及蛋白表达水平显著升高(均 $P<0.01$), HK2 和 N-cadherin 的 mRNA 及蛋白水平显著降低($P<0.01$)。与 sh-HK2 组相比, sh-HK2+TMKL 组 HK2 的 mRNA 及蛋白表达水平显著降低($P<0.01$)。**结论** TMKL 含药血清可抑制结直肠癌细胞增殖、侵袭和迁移,该作用机制可能与下调 HK2 表达,从而抑制细胞 EMT 进程有关。

〔关键词〕 结直肠癌; 天马颗粒Ⅲ; 己糖激酶 2; 细胞增殖; 细胞迁移; 细胞侵袭

〔中图分类号〕 R266

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.10.008

Tianma Granules Ⅲ-containing serum inhibits migration and invasion of colorectal cancer cells by downregulating HK2 expression

ZHAO Yuan^{1,2}, HUANG Qixuan¹, HU Xiangdang^{1*}

1. The Second Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China;

2. Qujing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Qujing, Yunnan 655099, China

〔Abstract〕 **Objective** To investigate the effects of Tianma Granules Ⅲ (TMKL)-containing serum on the invasion and migration of colorectal cancer (CRC) cells, and to verify whether TMKL inhibits these processes by regulating hexokinase 2 (HK2) expression. **Methods** Human CRC SW480 cells were used as the research subject. The optimal concentration of TMKL for treating SW480 cells was first determined using the CCK-8 assay. SW480 cells were divided into blank serum group (BS group) and TMKL-

〔收稿日期〕 2025-03-15

〔基金项目〕 湖南省卫生健康委员会课题(C202304017114); 湖南省中医药管理局科研项目(D2023008); 湖南中医药大学校级科研项目(2021XJJ054)。

〔通信作者〕 * 胡响当, 男, 硕士, 主任医师, 硕士研究生导师, E-mail: 656714298@qq.com。

containing serum group (TMKL group) to verify the effects of TMKL. Subsequently, a HK2-knockdown SW480 cell line was established via plasmid transfection, and these cells were randomly assigned into blank plasmid group (sh-NC group), HK2-knockdown group (sh-HK2 group), HK2-knockdown+blank serum intervention group (sh-HK2+BS group), and HK2-knockdown+TMKL-containing serum intervention group (sh-HK2+TMKL group). Cell proliferation was evaluated by CCK-8 assay; cell invasive and migratory capacities were assessed using Transwell assay; mRNA and protein expression levels of HK2, E-cadherin, and N-cadherin were measured by RT-qPCR and Western blot, respectively. **Results** Compared with the BS group, the TMKL group exhibited significantly reduced capacities of cell proliferation, invasion, and migration (all $P<0.01$), along with markedly lower HK2 mRNA and protein expression levels ($P<0.01$), obviously upregulated E-cadherin expression ($P<0.01$), and significantly downregulated N-cadherin expression ($P<0.01$). Under the condition of HK2 knockdown, compared with the sh-NC group, the sh-HK2 group exhibited significantly reduced capacities of cell proliferation, invasion, and migration (all $P<0.01$), significantly upregulated mRNA and protein expression of E-cadherin ($P<0.01$), and significantly downregulated mRNA and protein expression of HK2 and N-cadherin ($P<0.01$). Compared with the sh-HK2 group, the sh-HK2+TMKL group showed significantly lower mRNA and protein expression levels of HK2 ($P<0.01$). **Conclusion** TMKL-containing serum can inhibit the proliferation, invasion, and migration of CRC cells, and the mechanism may be related to the downregulation of HK2 expression, thereby inhibiting the process of epithelial-mesenchymal transition (EMT).

[**Keywords**] colorectal cancer; Tianma Granules III; hexokinase 2; cell proliferation; cell migration; cell invasion

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是全球常见的消化道恶性肿瘤之一,在全球恶性肿瘤中发病率位居第三^[1],且发病率及死亡率呈上升趋势^[2],不仅给公共医疗造成负担,更对人民生命健康造成严重威胁^[3]。目前 CRC 治疗主要以外科手术治疗为主,结合化疗、靶向药物等综合治疗^[4]。综合治疗使患者生存期得到一定的延长,但化疗不良反应明显,易导致患者免疫功能下降^[5],而靶向药物的有效人群少,费用高,给 CRC 的治疗带来诸多困难。因此,研究 CRC 的分子机制,寻找有效且毒副作用小的防治方法具有重要意义。

研究证实,中药治疗 CRC 可有效抑制肿瘤细胞转移、提高机体免疫功能、降低术后复发转移率,是目前治疗 CRC 的有效手段之一^[6-7]。何永恒教授基于临床经验,结合化痞膏、黄芪益损汤、内消瘰疬丸三方,创立了天马颗粒。通过不断精简、优化配方,最终获得天马颗粒Ⅲ(Tianma Granules III, TMKL),具有攻毒祛邪、化痰散结、通经止痛的功效。本课题组前期研究证实 TMKL 可抑制 CRC 细胞增殖^[8],有效延长患者术后 5 年生存率,降低术后复发、转移概率,提高患者术后生存质量^[9],且治疗中晚期 CRC 毒副作用小,疗效确切^[10]。本课题组从 TMKL 的干预靶点、具体机制等多个环节探讨其对 CRC 的影响。前期研究发现,TMKL 可通过 Friend 白血病整合素 1 转录因子基因上调克洛索的蛋白表达,达到抑制 HCT116 细胞增殖、诱导凋亡的效果^[11]。TMKL 可抑

制 DNA 甲基转移酶 1、DNA 甲基转移酶 3a 的蛋白表达,促进结直肠癌细胞中 Friend 白血病整合素 1 转录因子启动子去甲基化,进而上调其表达^[12]。目前,已经从多方面证实 TMKL 具有抑制 CRC 的作用。

己糖激酶 2(hexokinase II, HK2)是肿瘤细胞糖酵解过程中的关键限速酶,可通过提高肿瘤细胞葡萄糖代谢率加快肿瘤进展^[13]。研究显示,HK2 在 CRC 细胞中呈高表达^[13],可提高 CRC 细胞对化疗药物的耐药性^[14],并抑制 CRC 细胞的凋亡^[15]。上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是指上皮细胞向间充质细胞表型转化的过程,在肿瘤的侵袭、迁移过程中起重要作用^[16]。其中上皮钙黏素(E-cadherin)蛋白的低表达,神经钙黏素(N-cadherin)蛋白的高表达是 EMT 发生过程中的重要体现^[17]。研究表明,HK2 可通过多种信号通路调控 EMT 过程, HK2 可激活信号转导与转录激活因子 3、Snail 家族转录抑制因子 1 等关键转录因子,从而抑制 E-cadherin 表达,最终加速肿瘤细胞侵袭迁移^[18-19]。而抑制 HK2 表达可降低 CRC 细胞中波形蛋白、扭曲螺旋转录因子 1 表达,上调 E-cadherin 表达,从而部分逆转 EMT 表型^[20]。因此, HK2 为 CRC 治疗的潜在靶点^[21-22],研究针对 HK2 的靶向治疗对提高 CRC 的认识及诊治水平具有重要意义。根据课题组前期研究及 TMKL 的临床有效性,本团队指出假设:TMKL 可能是通过调控 HK2 以抑制细胞 EMT 进程,进而抑制 CRC 细胞的侵袭、迁移,达到治疗结直肠癌的作用。基于此,

本研究拟在前期研究基础上,进一步验证 TMKL 的抗 CRC 侵袭、迁移作用是否依赖于 HK2 介导的 EMT 调节,为揭示中药复方抗肿瘤机制提供实验基础。

1 材料

1.1 实验细胞及动物

人结肠癌细胞 SW480 购自普诺赛生命科技有限公司,编号为:CL-0223B。SPF 级 SD 雄性大鼠 40 只,体质量 180~220 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。动物许可证号:SYXK(湘)2019-0009;动物质量合格证号:430727221100100741;动物实验经湖南中医药大学实验动物伦理审查委员会批准,批号:LLBH-202201060003。

1.2 主要药物

TMKL 药物组成:蜈蚣、全蝎、半边莲、黄柏、醋制三棱、胆南星、海藻、黄芪、山药、大黄。购自湖南中医药大学第二附属医院药房(批准文号:1304002H)。

1.3 主要试剂及仪器

胰酶消化液、青霉素-链霉素(美国 GIBCO 公司,批号:25200056、45352);CCK-8 试剂盒(日本同仁公司,批号:CK04);TAKARA 逆转录预混液试剂盒、TAKARA 荧光快速定量 PCR 试剂盒(日本 TAKARA 公司,批号:RR036Q、RR430S);SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、RIPA 裂解液、蛋白上样缓冲液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、超敏 ECL 发光试剂盒、Western 转膜液、Western 一抗稀释液、脱脂奶粉、QuickBlock™ Western 封闭液、转印滤纸、PVDF 膜、脂质体 3000 转染试剂(上海碧云天公司,批号:P0692、P0013B、P0286、P0011、ST728、P0021A、P0023A、P0216、P0252、FFP51、FFP24、L30000001);Opti-MEM™ I 减血清培养基、结晶紫染色液(美国 GIBCO 公司,批号 31985070、C0121);Transwell 小室、Matrigel 基质胶(美国 Corning 公司,批号:3422、356234);山羊抗兔二抗、E-cadherin 抗体、N-cadherin 抗体、HK2 抗体、GAPDH 抗体(美国 ABCAM 公司,批号:ab288151、ab40772、ab76011、ab209847、ab181602)。

超净工作台(北京亚泰隆公司,型号:YT-CJ-2NB);直热式二氧化碳培养箱、高速离心机(美国热电公司,型号:DH-160I、SL02);多功能酶标分析仪(美国 BIORTEK 公司,型号:MB-530);MiniProGel™

蛋白制胶与电泳系统、MiniBlot™ 蛋白转膜系统、脱色摇床、BeyoBath™ 干式恒温金属浴(上海碧云天公司,型号:E6001、E6050、E0016、E6662)。

2 方法

2.1 含药血清制备及浓度选择

将 40 只 SD 雄性大鼠随机分成含药血清组和空白血清组,根据人与动物体表面积折算方法^[23]换算,大鼠中药等效剂量为 1.86 g/(kg·d)。含药血清组大鼠予以 TMKL 中药药液灌胃,空白组大鼠予等量蒸馏水灌胃,2 次/d,连续 7 d。末次灌胃 2 h 后,收集腹主动脉血,在室温下静置 2 h。将收集的全血按分组离心 10 min,提取血清,于 56 ℃ 温水浴灭活 30 min,除菌后分装,于 -80 ℃ 保存。

设置空白血清及不同浓度梯度的 TMKL 含药血清(5%、10%、15%、20%)处理 SW480 细胞 24 h 后,用 CCK-8 法筛选 TMKL 含药血清的最佳干预浓度。

2.2 细胞培养与转染

复苏 SW480 细胞株,采用青霉素-链霉素双抗培养基,在 37 ℃、5%CO₂ 的条件下常规培养。取状态良好的细胞接种于 6 孔板上,当细胞融合率达到 70% 左右时行细胞转染。先使用培养基稀释转染试剂,室温下静置 5 min,后将稀释的 shRNA 加入稀释的 Lipofectamine™ 3000 转染试剂中(体积比 1:1),两者混匀,室温条件下孵育 20 min。往 6 孔板中每孔加入 shRNA 及 Lipofectamine™ 3000 转染试剂混合物,室温下培养 6 h 后更换培养基,培养 48 h 后用于后续实验。

2.3 细胞分组

将 SW480 细胞分为空白血清组(BS 组)、TMKL 含药血清组(TMKL 组)。构建 HK2 敲低 SW480 细胞株后,依据不同干预措施,将 SW480 细胞分为空白质粒组(sh-NC 组)、敲低 HK2 组(sh-HK2 组)、敲低 HK2 后使用空白血清干预组(sh-HK2+BS 组)、敲低 HK2 后使用 TMKL 含药血清干预组(sh-HK2+TMKL 组)。

2.4 CCK-8 法检测细胞增殖能力

取对数生长细胞,以每孔约 80% 的密度接种至 96 孔板,置于 37 ℃、5%CO₂ 培养箱中常规培养 24 h。观察细胞,待细胞贴壁时使用相应浓度药物处理细胞,每组设 4 个复孔。药物处理时间达到后,每孔加

入 10 μ L CCK-8 试剂,于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。将 96 孔板置于振荡器上震荡 1 min,酶标仪检测 450 nm 处各组细胞 OD 值,记录并计算细胞增殖率。

2.5 Transwell 检测细胞迁移及侵袭能力

取分组处理后的细胞,用胰酶消化后计数。向上室加入已稀释的基质胶,置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱静置 30 min。用无血清培养基调整细胞密度,向Transwell 上室中缓慢接种细胞,向下室加入含 10% 血清的适当体积培养基,以液面浸至上室下缘为宜,然后置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养。培养 48 h 后,弃培养基,用 PBS 清洗,取 4% 多聚甲醛加入上室,固定 20~30 min。弃液, PBS 清洗,用棉签擦拭上室细胞后再次 PBS 清洗。风干后上室加 0.2% 结晶紫染色 30 min,待染色结束后用 PBS 清洗。风干后,显微镜下拍照,每孔选 5 个视野,用 ImageJ 计数,观察细胞侵袭情况。无须在 Transwell 上室内铺基质胶,其余步骤同前,以观察细胞迁移情况。

2.6 Western blot 检测细胞中 HK2、E-cadherin、N-cadherin 蛋白表达水平

提取细胞蛋白,配制 BCA 工作液;测定蛋白浓度后,进行电泳,设置电压为 75 V,时间设为 130 min,然后行转膜、封闭 2 h,再加入配制好的一抗工作液 [E-cadherin (1:2 500)、N-cadherin (1:3 000)、HK2 (1:500)、GAPDH (1:5 000)] 孵育,4 $^{\circ}$ C 过夜;洗膜 3 次后加入二抗 (1:1 500) 室温孵育 2 h;加入化学发光液,使用 ImageJ 分析图像。

2.7 RT-qPCR 检测细胞中 HK2、E-cadherin、N-cadherin mRNA 表达水平

按照 Trizol 试剂盒说明提取细胞总 RNA;根据逆转录试剂盒使用说明操作合成 cDNA。PCR 条件:预变性 (95 $^{\circ}$ C $\times$ 30 s) $\times$ 1 次,循环反应 (95 $^{\circ}$ C $\times$ 5 s,60 $^{\circ}$ C $\times$ 10 s) $\times$ 40 次;利用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 方法分析结果。引物序列详见表 1。

2.8 统计学分析

实验数据采用 GraphPad Prism 9.5 进行统计学分析并绘制统计图。方差齐且符合正态分布的两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析;数据不符合正态分布或方差不齐时,采

表 1 引物序列
Table 1 PCR primers

基因名称	引物	长度/bp
E-cadherin	正向:CGAGAGCTACACGTTACCGG	119
	反向:GGGTGTCGAGGGAAAAATAGG	
N-cadherin	正向:TCAGGCGTCTGTAGAGGCTT	94
	反向 ATGCACATCCTTCGATAAGACTG	
HK2	正向:GAGCCACCACTACCCTACT	249
	反向:CCAGGCATTCCGCAATGTG	
GAPDH	正向:GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	197
	反向:GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG	

用非参数检验中多个独立样本 *Kruskal-Wallis H* 秩和检验。以 *P*<0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 TMKL 含药血清最佳干预浓度

与空白血清组比较,10%、15%、20% 的 TMKL 含药血清对 SW480 细胞增殖能力均有抑制作用 (*P*<0.001, *P*<0.000 1)。基于此,选择 20% 的 TMKL 含药血清浓度为效应浓度进行后续实验研究。详见图 1。

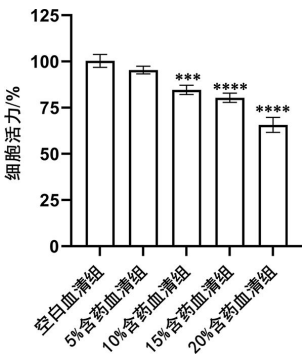


图 1 不同浓度 TMKL 含药血清对 SW480 细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)

Fig.1 Effects of varying concentrations of TMKL-containing serum on SW480 cell proliferation ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)
注:与空白血清组比较,****P*<0.001;*****P*<0.000 1。

3.2 TMKL 含药血清抑制 SW480 细胞的增殖、侵袭、迁移及 EMT 情况

与 BS 组相比, TMKL 组 SW480 细胞的增殖能力明显下降 (*P*<0.01), 细胞侵袭和迁移数明显减少 (*P*<0.01), E-cadherin 的 mRNA 及蛋白表达水平明显升高 (*P*<0.01), N-cadherin 的 mRNA 及蛋白表达水平明显降低 (*P*<0.01)。详见图 2—4。

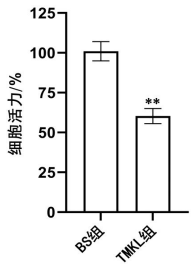


图2 TMKL含药血清对SW480细胞增殖能力的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig.2 Comparison of effects of TMKL-containing serum on proliferative capacity among different groups of SW480 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)
注:与BS组比较,** $P<0.01$ 。

3.3 TMKL含药血清下调SW480细胞中的HK2表达情况

与BS组比较, TMKL组HK2的mRNA及蛋白表达水平明显降低($P<0.01$)。详见图5。

3.4 验证HK2敲低效率

与sh-NC组比较, sh-HK2-1、sh-HK2-2、sh-HK2-3组的HK2 mRNA及蛋白表达水平均降低($P<0.05, P<0.001, P<0.0001$)。基于此, 选择sh-HK2-3质粒用于后续实验。详见图6。

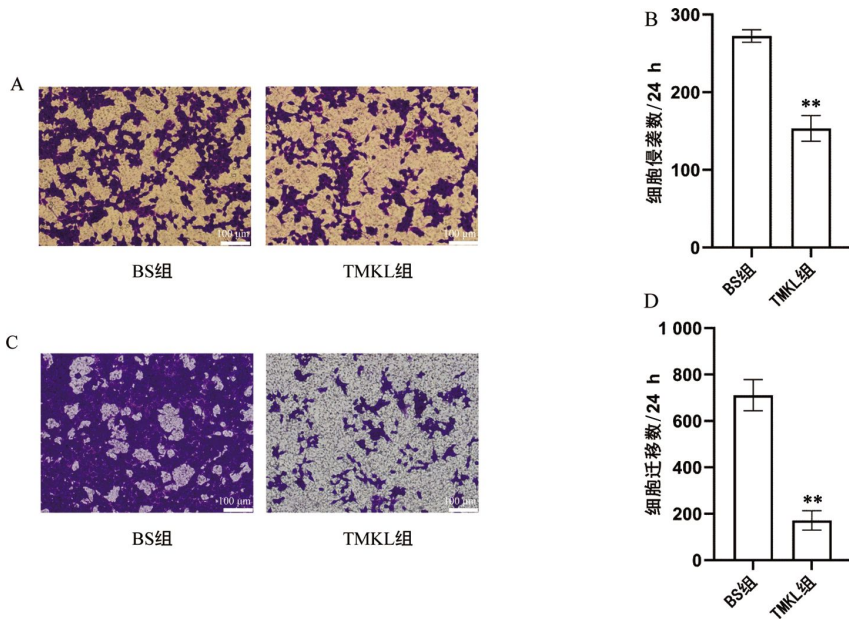


图3 TMKL含药血清对SW480细胞侵袭和迁移能力的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig.3 Effects of TMKL-containing serum on invasive and migratory capacities of SW480 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)
注:A.各组细胞侵袭数比较($\times 200$); B.各组细胞侵袭数统计; C.各组细胞迁移数比较($\times 200$); D.各组细胞迁移数统计。与BS组比较,** $P<0.01$ 。

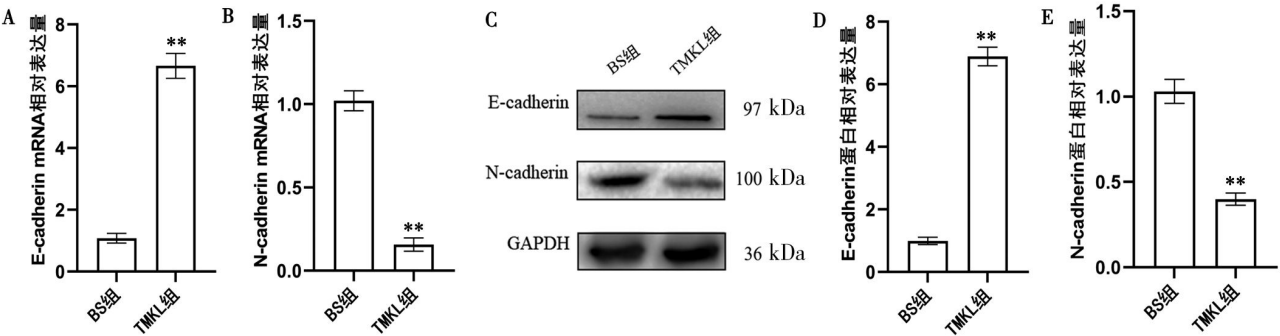


图4 TMKL含药血清对SW480细胞E-cadherin、N-cadherin表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig.4 Effects of TMKL-containing serum on the expression of E-cadherin and N-cadherin in SW480 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)
注:A.E-cadherin的mRNA相对表达水平; B.N-cadherin的mRNA相对表达水平; C.E-cadherin和N-cadherin的蛋白条带; D.E-cadherin的蛋白相对表达水平; E.N-cadherin的蛋白相对表达水平。与BS组比较,** $P<0.01$ 。

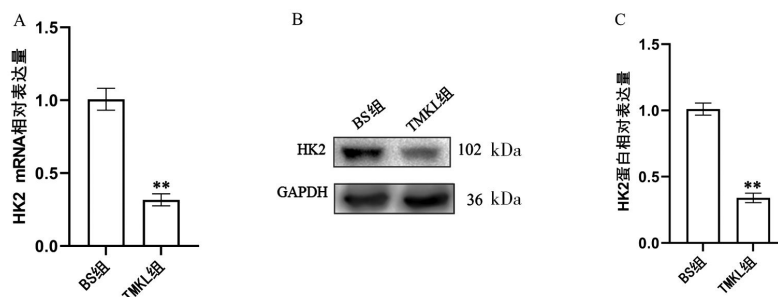


图5 TMKL含药血清对SW480细胞HK2表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.5 Effects of TMKL-containing serum on HK2 expression in SW480 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:A.HK2的mRNA相对表达水平;B.HK2的蛋白条带;C.HK2的蛋白相对表达水平。与BS组比较,** $P<0.01$ 。

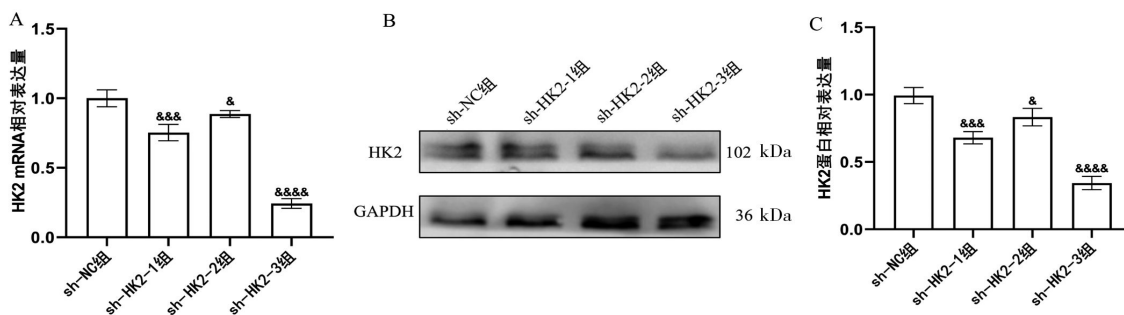


图6 各组SW480细胞中HK2表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.6 Comparison of HK2 expression levels among different groups of SW480 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:A.HK2的mRNA相对表达水平;B.HK2的蛋白条带;C.HK2的蛋白相对表达水平。与sh-NC组比较,* $P<0.05$; $^{***}P<0.001$; $^{****}P<0.0001$ 。

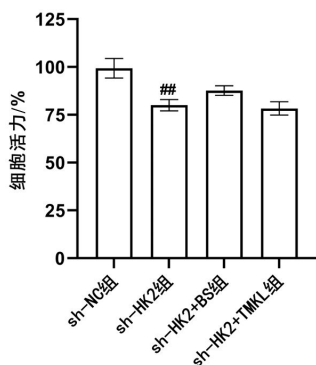


图7 各组SW480细胞增殖能力比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.7 Comparison of proliferative capacity among different groups of SW480 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与sh-NC组比较,## $P<0.01$ 。

3.5 TMKL含药血清通过下调HK2表达抑制SW480细胞增殖、侵袭、迁移能力的情况

与sh-NC组比较,sh-HK2组细胞增殖能力显著下降($P<0.01$),侵袭和迁移细胞数量显著减少($P<0.01$)。详见图7—8。

3.6 TMKL含药血清通过下调HK2表达抑制SW480细胞EMT相关蛋白及mRNA表达的情况

与sh-NC组比较,sh-HK2组E-cadherin的mRNA及蛋白表达水平显著升高($P<0.01$),HK2、N-

cadherin的mRNA及蛋白表达水平显著降低($P<0.01$)。与sh-HK2组比较,sh-HK2+TMKL组HK2的mRNA及蛋白表达水平显著降低($P<0.01$)。与sh-HK2+BS组比较,sh-HK2+TMKL组HK2的mRNA及蛋白表达水平降低($P<0.05, P<0.01$)。详见图9。

4 讨论

CRC根据其症状不同可归属于中医学“便血”“脏毒”“肠风”“锁肛痔”“肠覃”等范畴。TMKL由何永恒教授依据CRC“本虚标实,虚实夹杂”的基本病机制,并经不断精简方剂配伍而成,方中蜈蚣及全蝎为君药,皆入肝经,蜈蚣可通达内外,全蝎可穿筋透骨,两者相需共奏通络止痛、攻毒散结之效;半边莲、黄柏为臣药,两者配伍既使清热解毒之力倍增,又辅君药攻癌毒、清瘀热。佐药中三棱破血行气、祛瘀消积;胆南星降气行瘀、清火化痰;海藻功能软坚散结、清热化痰;黄芪甘温,偏于补脾阳,山药甘平,偏补脾阴,二者配伍既有健脾益气之效,更有扶正固本之功。使药为大黄,其性味苦寒,可引邪外出,配合黄芪攻补兼施,扶正不留邪。全方共奏攻毒祛邪、散瘀消肿、化痰散结、通经止痛之功,体现了扶正

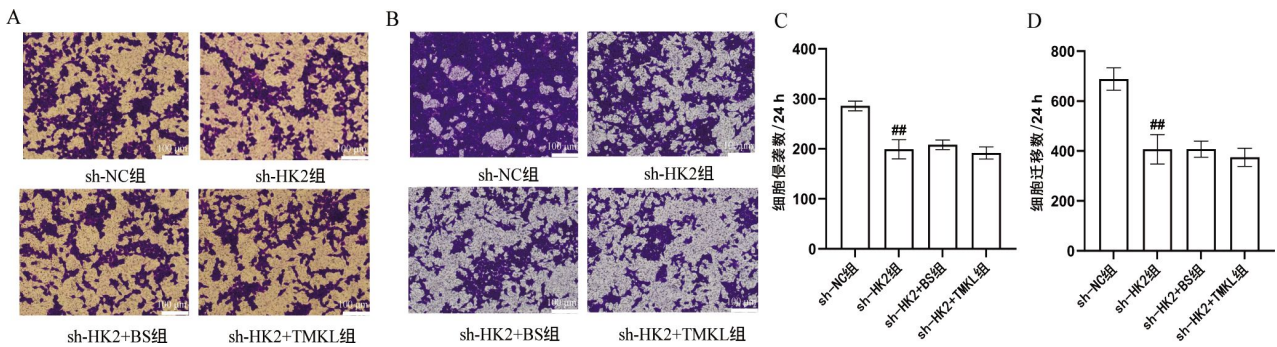


图8 各组 SW480 细胞侵袭和迁移能力比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.8 Comparison of invasive and migratory capacities among different groups of SW480 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:A.各组细胞侵袭数比较($\times 200$);B.各组细胞侵袭数统计;C.各组细胞迁移数比较($\times 200$);D.各组细胞迁移数统计。与 sh-NC 组比较, $^{##}P < 0.01$ 。

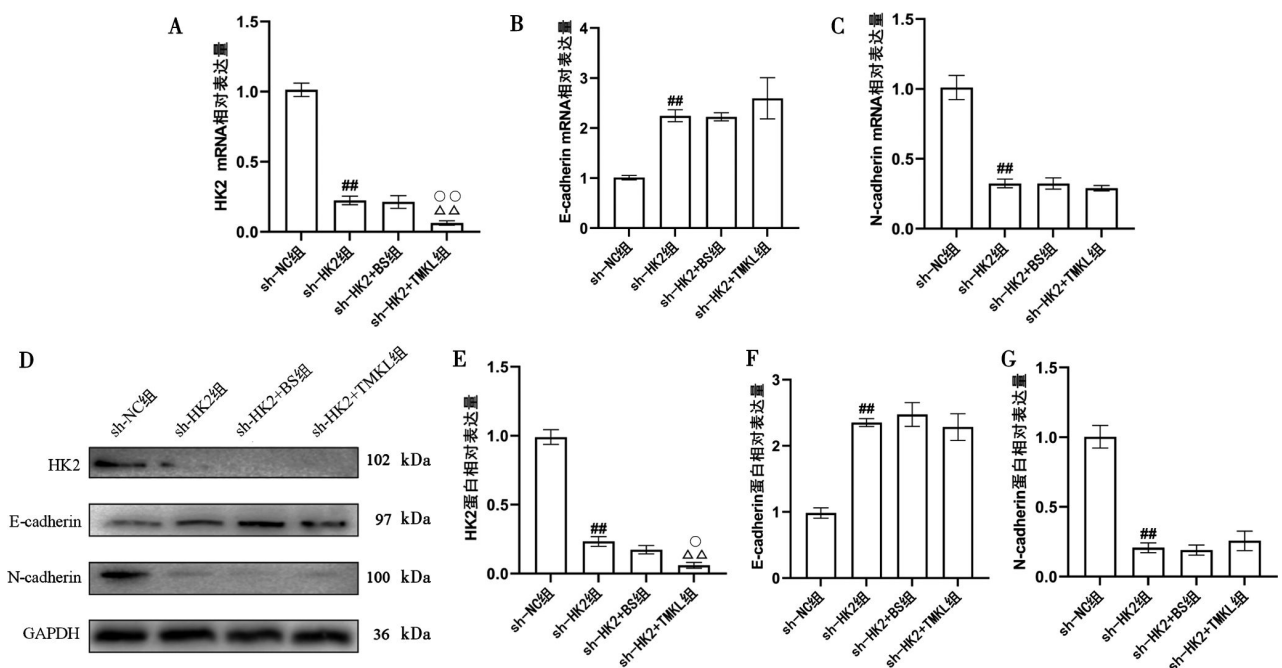


图9 各组 SW480 中 HK2、E-cadherin、N-cadherin 的表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.9 Comparison of HK2, E-cadherin, and N-cadherin expression levels among different group of SW480 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:A.HK2 的 mRNA 相对表达水平;B.E-cadherin 的 mRNA 相对表达水平;C.N-cadherin 的 mRNA 相对表达水平;D.HK2、E-cadherin 和 N-cadherin 的蛋白条带;E.HK2 的蛋白相对表达水平;F.E-cadherin 的蛋白相对表达水平;G.N-cadherin 的蛋白相对表达水平。与 sh-NC 组比较, $^{##}P < 0.01$;与 sh-HK2 组比较, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$;与 sh-HK2+BS 组比较, $^{\circ}P < 0.05$, $^{\circ\circ}P < 0.01$ 。

抗癌的基本思想。TMKL 治疗 CRC 临床疗效显著,毒副作用轻,但其作用机制尚未得到完全阐明。

肿瘤细胞通过异常的糖代谢增强癌细胞增殖和迁移能力的过程即为糖酵解^[24]。己糖激酶作为糖酵解过程的关键限速酶,可将葡萄糖转化为葡萄糖-6-磷酸,进入糖酵解从而生成能量^[25]。现已知的己糖激酶有 4 种,分别位于不同染色体,其中 HK2 结构特殊,更多地参与到肿瘤发生发展中。研究发现, HK2 在 CRC 等多种恶性肿瘤中持续上调,可加快肿瘤细胞增殖及肿瘤进展^[26]。同时, HK2 通过调控 EMT 参与肿瘤侵袭、迁移进程。结合课题组前期研

究基础,本团队推测:TMKL 可能通过调控 HK2 的表达,抑制 CRC 细胞 EMT 进程,进而抑制肿瘤的侵袭、迁移,达到治疗 CRC 的作用。本研究结果显示,单独使用 TMKL 含药血清干预 CRC 细胞可显著下调 CRC 细胞中 HK2 表达,同时抑制细胞增殖、侵袭、迁移,并调控 EMT 标志物 E-cadherin 上调、N-cadherin 下调。单独敲低 HK2 干预可出现类似 TMKL 单药干预的作用,使细胞表型及分子表达呈现一致变化。敲低 HK2 后再给予 TMKL 干预,细胞增殖、侵袭、迁移能力未见差异,EMT 相关标志物的表达水平未出现进一步的改变。上述结果表明, TMKL 对细

胞增殖、侵袭、迁移的抑制作用依赖 HK2 发挥, HK2 是其发挥该效应的关键靶点之一。

本研究结果为 TMKL 后续研究及临床运用提供了实证依据, 仍存在一定局限性, 本次研究仅阐明 HK2 是调控细胞增殖及侵袭迁移的关键靶点, 尚未排除 TMKL 其他靶点的协同作用。此外, TMKL 为多味中药组成的复方, 其中具体哪些活性成分靶向 HK2, 以及其如何调控 HK2 的表达, 仍需深入探究。后续研究将通过网络药理学分析 TMKL 的活性成分及潜在靶点, 结合转录组测序解析 HK2 非依赖的其他通路, 以更全面地揭示其多靶点作用机制, 为 TMKL 在 CRC 治疗中的应用提供更充分的理论依据。

参考文献

- [1] CAO W, CHEN H D, YU Y W, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: A secondary analysis of the global cancer statistics 2020[J]. Chinese Medical Journal, 2021, 134(7): 783–791.
- [2] 中华医学会肿瘤学分会, 国家卫生健康委员会医政司. 中国结直肠癌诊疗规范(2023 版)[J]. 协和医学杂志, 2023, 14(4): 706–733.
- [3] KLIMECK L, HEISSER T, HOFFMEISTER M, et al. Colorectal cancer: A health and economic problem[J]. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 2023, 66: 101839.
- [4] YANG Y, WANG H Y, CHEN Y K, et al. Current status of surgical treatment of rectal cancer in China[J]. Chinese Medical Journal, 2020, 133(22): 2703–2711.
- [5] 刘 固, 赵廷江. 完整结肠系膜切除术后 DC-CIK 联合奥沙利铂、卡培他滨治疗结肠癌对免疫水平的影响[J]. 现代消化及介入诊疗, 2021, 26(1): 37–40.
- [6] 耿雪尘, 程海波. 中医药预防结直肠癌术后复发转移的临床研究述评[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(9): 3270–3275.
- [7] 卞龙艳, 杨 威, 陈晓玲, 等. 人参皂苷 Rd 通过调控 circDONSON 表达对结肠癌 SW480 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中成药, 2023, 45(1): 75–80.
- [8] 周晓丽, 高宗跃. 天马颗粒剂抑制人结肠癌细胞株 SW480 增殖机制研究[J]. 中医学报, 2018, 33(4): 511–516.
- [9] 彭天书, 谢 彪, 聂 甜, 等. 天马颗粒剂在抑制结直肠癌术后肿瘤复发中的临床效果[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(3): 191–193.
- [10] 黄国栋, 李家邦, 何永恒, 等. 天马颗粒剂治疗不能行根治术中晚期大肠癌患者临床研究[J]. 中国中医急症, 2006, 15(12): 1346–1347.
- [11] 王华帅, 谢 彪, 罗 敏, 等. 天马颗粒通过 FLI-1/Klotho 通路对结肠癌细胞 HCT116 增殖抑制的作用机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(10): 1656–1662.
- [12] 王华帅, 武明胜, 李一金, 等. 天马颗粒对结肠癌细胞中 FLI-1 启动子甲基化影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(12): 2016–2021.
- [13] 黄 琦, 吴婧婧, 彭 瑶, 等. 结直肠癌组织中 HK2 与 AKT 的表达、临床意义及其相关性分析[J]. 现代肿瘤医学, 2022, 30(19): 3522–3527.
- [14] GAO S J, REN S N, LIU Y T, et al. Targeting EGFR sensitizes 5-Fu-resistant colon cancer cells through modification of the lncRNA-*FGD5-AS1*-miR-330-3p-Hexokinase 2 axis[J]. Molecular Therapy Oncolytics, 2021, 23: 14–25.
- [15] LIU W B, LI W, LIU H D, et al. Xanthohumol inhibits colorectal cancer cells via downregulation of Hexokinases II-mediated glycolysis[J]. International Journal of Biological Sciences, 2019, 15(11): 2497–2508.
- [16] PASTUSHENKO I, BLANPAIN C. EMT transition states during tumor progression and metastasis[J]. Trends in Cell Biology, 2019, 29(3): 212–226.
- [17] 张彦吉, 隋 红, 王凯冰. EMT 在肝细胞肝癌耐药中的分子机制研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2024, 32(1): 172–177.
- [18] BLAHA C S, RAMAKRISHNAN G, JEON S M, et al. A non-catalytic scaffolding activity of hexokinase 2 contributes to EMT and metastasis[J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 899.
- [19] 庆顺杰, 沈智勇. 过表达己糖激酶 2 通过激活 JAK/STAT 途径促进结肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭并调节肿瘤免疫微环境[J]. 南方医科大学学报, 2025, 45(3): 542–553.
- [20] ZHANG B, CHAN S H, LIU X Q, et al. Targeting hexokinase 2 increases the sensitivity of oxaliplatin by Twist1 in colorectal cancer[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2021, 25(18): 8836–8849.
- [21] KUDRYAVTSEVA A V, FEDOROVA M S, ZHAVORONKOV A, et al. Effect of lentivirus-mediated shRNA inactivation of HK1 HK2 and HK3 genes in colorectal cancer and melanoma cells[J]. BMC Genetics, 2016, 17(Suppl 3): 156.
- [22] SHI T G, MA Y C, CAO L, et al. B7-H3 promotes aerobic glycolysis and chemoresistance in colorectal cancer cells by regulating HK2[J]. Cell Death & Disease, 2019, 10(4): 308.
- [23] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069–1072.
- [24] 刘 芳, 常钰玲, 宋艳梅, 等. 氧化还原调节、有氧糖酵解、自噬在肿瘤中的作用及其相互关系[J]. 中国生物制品学杂志, 2022, 35(2): 239–245, 250.
- [25] CHEN J X, LI G R, SUN D J, et al. Research progress of hexokinase 2 in inflammatory-related diseases and its inhibitors[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2024, 264: 115986.
- [26] 卢 妮, 陈书德, 宁怡婷, 等. 己糖激酶 2(HK2)参与肿瘤发生发展的研究进展[J]. 生命的化学, 2022, 42(8): 1502–1509.