

复方血竭制剂对小鼠溃疡性结肠炎相关结直肠癌的疗效及可能机制

李方¹ 郑楠¹ 赵亚娇¹ 王雪明² 翟俊山³ 朱超慧³ 李楠³

摘要 目的 初步探讨复方血竭制剂对实验性溃疡性结肠炎相关结直肠癌(UCRCC)的疗效及可能机制。方法 60只5周龄BALB/c小鼠按照随机原则分为正常组、模型组、低剂量复方血竭治疗组和高剂量复方血竭治疗组,实验中进行疾病活动指数(DAI)评分,造模11周后处死小鼠,取出回盲部至肛门全部结肠,行大体及组织学观察,检测各组结肠组织 β -catenin活化水平以及c-myc、PCNA基因转录、总蛋白表达量。结果 模型组肉眼可见黏膜明显充血、水肿,多处息肉状隆起形成;镜下可见大量炎性细胞浸润及不同程度上皮内瘤变,散在癌变表现。两治疗组肉眼可见黏膜充血、水肿,偶见息肉状隆起;镜下可见炎性细胞浸润,少量低级别上皮内瘤变,未见癌变。与正常组相比,模型组及两治疗组小鼠DAI评分以及结肠上皮细胞 β -catenin蛋白入核量、c-myc和PCNA基因的mRNA转录及蛋白表达量均显著升高($P < 0.05$),两治疗组之间差异无统计学意义,但较模型组均显著降低($P < 0.05$)。各组小鼠结肠上皮细胞 β -catenin基因在mRNA转录水平无明显差异。结论 复方血竭制剂能够显著延缓实验性UCRCC的发生,其机制可能与促进结肠组织炎症缓解以及抑制Wnt/ β -catenin通路的激活有关。

关键词 复方血竭;溃疡性结肠炎相关结直肠癌; β -catenin
中图分类号 R 285.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)01-0013-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.01.003

随着人们生活水平的提高,饮食结构不断西化,溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)的发病率在我国逐年上升。作为UC最严重的并发症,溃疡性结肠炎相关性结直肠癌(ulcerative colitis related colorectal cancer, UCRCC)也越来越受到人们的关注。有报道^[1]指出,UCRCC虽然只占所有癌症的1%,却可占UC死亡原因的1/4。因此,开展UCRCC的预防及治疗研究有重要现实意义。近年来,天然药

物由于有较低的毒性,被越来越多地应用于肿瘤的治疗,但目前尚未发现有关血竭对UCRCC作用的报道。本课题组前期对复方血竭制剂在UC治疗中的作用进行了临床及基础研究,并取得显著成果^[2-3]。该实验采用氧化偶氮甲烷(azoxymethane, AOM)/葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulphate, DSS)建立小鼠UCRCC模型,进一步观察复方血竭制剂对UCRCC小鼠的影响,并检测与UCRCC发生发展密切相关的Wnt/ β -catenin信号通路相关分子的变化,初步探讨其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料 SPF级5周龄健康雄性BALB/c小鼠共60只,18~20g,购自北京维通利华实验动物有限公司。AOM试剂购自美国Sigma公司,分子量74.08。DSS试剂购自美国MP Biochemical公司,分子量36 000~50 000。大便潜血试剂购自北京华晟科技公司。复方血竭制剂由解放军第309医院药剂科配制。动物组织蛋白裂解液、蛋白酶抑制剂及逆转录试剂盒均购自北京德路祺科技公司。c-myc、PCNA及 β -actin引物由美国Invitrogen生物技术公司合成。核蛋白提取试剂盒、ECL化学发光试剂盒购自上海碧云天公司。 β -catenin、c-myc、PCNA、 β -actin及histone H抗体均购自美国CST公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及建模 参照文献^[4],将小鼠随机分成正常组、模型组、低剂量复方血竭治疗组和高剂量复方血竭治疗组,每组15只,均饲养于解放军第309医院实验中心,环境温度20~25℃,湿度约30%。先适应性喂养1周,模型组予以单次小剂量(10 mg/kg)AOM试剂经腹腔注射,1周后,3.5% DSS溶液喂养1周,然后无菌蒸馏水自由饮用2周,此3周为1循环周期,继续喂养2循环周期。正常组持续用无菌蒸馏水喂养;低、高剂量治疗组每天分别予以13 ml/kg和26 ml/kg等效剂量(按成人与实验动物体表面积换算系数计算得出,低剂量组用药量:100 ml \times 0.0026/0.02 kg = 13 ml/kg,高剂量组

2016-08-26 接收

基金项目:北京市自然科学基金(编号:7132175)

作者单位:¹河北北方学院研究生院,张家口 075000

中国人民解放军第309医院²药剂科、³消化科,北京 100091

作者简介:李方,男,硕士研究生;

李楠,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: qiaomulee@126.com

用量为 26 ml/kg) 复方血竭制剂灌胃,自 AOM 腹腔注射当天开始至实验结束,余步骤同模型组。正常组予以生理盐水灌胃对照。实验开始后,每天进行疾病活动指数(disease activity index, DAI) 计分。DAI 评分标准,体质量下降:0 = 无,1 = 1% ~ 5%, 2 = 6% ~ 10%, 3 = 11% ~ 15%, 4 = 15% 以上;大便性状:0 = 正常,1 = 松散,3 = 稀便;便血:0 = 隐血(-) 2 = 隐血(+) 4 = 肉眼血便;DAI = 3 个项目积分的总和 ÷ 3。

1.2.2 大体观察 11 周后,乙醚麻醉并脱颈处死小鼠,取出回盲部至肛门全部大肠,用直尺测量长度后,沿纵轴剖开结肠,PBS 溶液冲洗干净,使用放大镜观察结肠组织大体病变。然后,取病变部位结肠分为 3 部分:一部分用于提取 RNA, -80 °C 冰箱保存;一部分用于提取总蛋白或者核蛋白, -80 °C 冰箱保存;其余用于苏木精 - 伊红(HE) 染色。

1.2.3 组织学观察 取一部分结肠组织,切成 0.5 cm 大小,10% 福尔马林溶液固定,常规石蜡包埋、切片切片,厚约 4 μm,脱蜡、透明后行 HE 染色。光学显微镜下观察。

1.2.4 Western blot 检测小鼠结肠上皮细胞 c-myc、PCNA 总蛋白及核内 β-catenin 蛋白表达 总蛋白提取:从 -80 °C 冰箱取出结肠组织,匀浆后利用单去污剂裂解缓冲液置于冰上持续裂解 30 min;4 °C、12 000 r/min 离心 10 min;取上清液,用于检测 c-myc、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 等表达。核蛋白提取:按照核蛋白试剂盒说明书步骤提取组织核蛋白,用于检测核内 β-catenin 蛋白表达。提取蛋白后进行加样,SDS-PAGE 凝胶电泳,电转膜 1 h,5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后 4 °C 孵育一抗过夜;孵育二抗后 ECL 试剂盒行化学发光显色。

1.2.5 qRT-PCR 检测小鼠结肠上皮细胞 c-myc、PCNA 及 β-catenin 基因转录 从 -80 °C 冰箱取出结肠组织,运用液氮迅速研磨为粉末,转入无酶 EP 管内,每 100 mg 组织内加入 1 ml TRIzol。4 °C、5 000 r/min 离心 5 min,取上清液,转入新的无酶 EP 管中,加入 1/5 体积的氯仿,混匀后室温静置 5 min。4 °C、12 000 r/min 离心 15 min。取上清液,加入等体积异丙醇, -20 °C 静置 20 min。4 °C、12 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,加入 1 ml 75% 乙醇洗涤沉淀。4 °C、12 000 r/min 离心 5 min。之后用 DEPC 水稀释后测浓度、逆转录。Primer5.0 设计引物(表 1),反应条件为 95 °C 30 s、95 °C 5 s、60 °C 5 s、72

°C 30 s、40 个循环。以 β-actin 作为内参,扩增完成后,采用 2^{-ΔΔCt} 检测目的基因相对表达量。

表 1 小鼠引物序列

基因	引物序列(5'-3')	长度(bp)
β-catenin	F:CGCCTCACTCAGCTCCCCTC	108
	R:CGCCTCACTCAGCTCCCCTC	
c-myc	F:ACGCTGACGAAAGTGTGGT	112
	R:TCTGGGTTTTCCGGGGTAGC	
PCNA	F:CCTGCTGGGATATTAGCTCCA	109
	R:CAGCGGTAGGTGTGAAGC	
β-actin	F:CTTCCAGCCTTCCTTCTGG	110
	R:CTGTGTTGGCTACAGGTCT	

1.3 统计学处理 应用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析及两两比较的 SNK-q 检验, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DAI 评分及结肠长度 正常组小鼠皮毛顺滑,活泼机敏,觅食正常,大便成形。模型组小鼠经 AOM 腹腔注射第 3 天开始,部分出现懒动、拱背表现;DSS 喂养 1 周后逐渐出现腹泻、黏液脓血便,食欲下降,皮毛无光泽,摄食减少,3 ~ 5 周后部分小鼠逐渐出现脱肛;实验后期,小鼠一般情况极差,摄食较少,活动量下降明显。治疗组小鼠腹泻、黏液脓血便较模型组轻,持续时间短,后期无肉眼血便。模型组及治疗组结肠长度较正常组明显缩短(P < 0.05);与模型组相比,治疗组结肠长度较长(P < 0.05),两治疗组结肠长度差异无统计学意义。见图 1、表 2。

2.2 大体观察 正常组小鼠结肠组织未见明显异常。模型组黏膜充血、水肿明显,可见息肉状隆起形成。高、低剂量治疗组均可见结肠组织黏膜充血、水肿,较模型组明显减轻,偶见息肉状隆起。

2.3 组织学观察 正常组结肠黏膜上皮组织完整,腺体排列规则,无明显炎性细胞浸润。模型组可见广泛坏死、糜烂,上皮细胞脱落,大量炎性细胞浸润及不同程度上皮内瘤变,并可见癌变表现,核大深染,核质比例增大。低剂量治疗组可见广泛糜烂、坏死,黏膜上皮脱落,多量炎性细胞浸润,少量低级别上皮内瘤变。高剂量治疗组可见糜烂、坏死,伴多量炎性细胞浸润,偶见低级别上皮内瘤变。见图 2。

2.4 Western blot 检测结果 与正常组相比,模型组及两治疗组结肠上皮细胞 PCNA、c-myc 总蛋白及

表2 小鼠 DAI 评分及结肠长度比较 (n = 15 $\bar{x} \pm s$)

项目	正常组	模型组	低剂量复方血竭制剂组	高剂量复方血竭制剂组	F 值	P 值
DAI(分)	0.34 ± 0.10	4.22 ± 0.26*	3.17 ± 0.14* #	3.09 ± 0.16* #	1 295.00	<0.001
结肠长度(cm)	8.87 ± 0.53	6.76 ± 0.32*	7.17 ± 0.44* #	7.22 ± 0.37* #	86.70	<0.001

与正常组比较: * P < 0.05; 与模型组比较: # P < 0.05

表3 细胞 c-myc、PCNA 总蛋白及核内 β-catenin 蛋白表达量 (n = 15 $\bar{x} \pm s$)

项目	正常组	模型组	低剂量组	高剂量组	F 值	P 值
β-catenin	0.127 ± 0.011	1.826 ± 0.192*	1.063 ± 0.144* #	1.059 ± 0.108* #	418.1	<0.001
c-myc	0.141 ± 0.022	0.933 ± 0.105*	0.615 ± 0.083* #	0.620 ± 0.079* #	259.9	<0.001
PCNA	0.065 ± 0.008	0.238 ± 0.026*	0.132 ± 0.016* #	0.136 ± 0.021* #	215.7	<0.001

与正常组比较: * P < 0.05; 与模型组比较: # P < 0.05

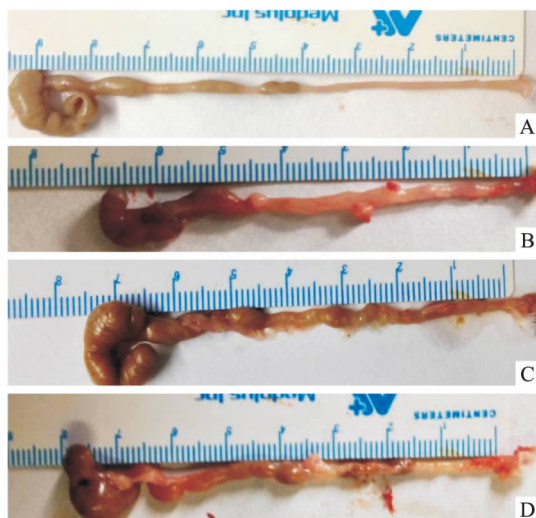


图1 各组小鼠结肠组织标本

A: 正常组; B: 模型组; C: 低剂量复方血竭制剂组; D: 高剂量复方血竭制剂组

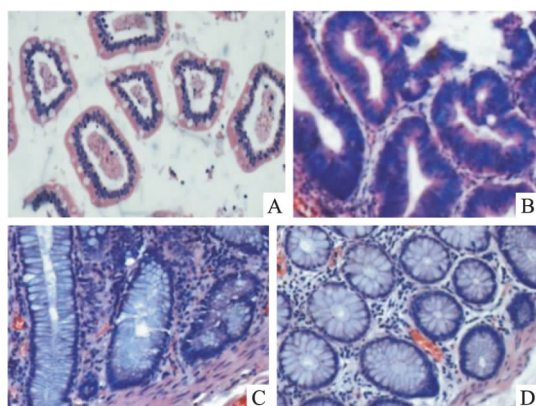


图2 各组小鼠结肠组织染色 HE × 200

A: 正常组; B: 模型组; C: 低剂量复方血竭制剂组; D: 高剂量复方血竭制剂组

细胞核内 β-catenin 蛋白均呈明显高表达状态 (P < 0.05); 与模型组相比, 两治疗组 PCNA、c-myc 总蛋

白及细胞核内 β-catenin 蛋白表达显著降低 (P < 0.05); 两治疗组之间无明显差异。见表3、图3。

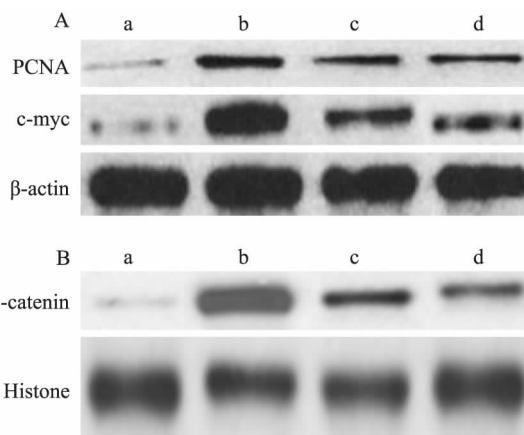


图3 小鼠结肠上皮细胞 c-myc、PCNA 总蛋白及核内 β-catenin 蛋白表达

A: 小鼠结肠上皮细胞 c-myc、PCNA 总蛋白表达; B: 小鼠结肠上皮细胞核内 β-catenin 蛋白表达; a: 正常组; b: 模型组; c: 低剂量复方血竭制剂组; d: 高剂量复方血竭制剂组

2.5 qRT-PCR 检测结果 各组之间 β-catenin 基因表达差异无统计学意义 (F = 0.3304, P = 0.803); 各组之间 c-myc 及 PCNA 基因表达不全相同, 差异有统计学意义 (F = 579.7、481.8, P < 0.05)。与正常组相比, 模型组及各治疗组 c-myc 及 PCNA 表达均明显升高 (P < 0.05); 与模型组相比, 两治疗组 c-myc 及 PCNA 表达均明显降低 (P < 0.05); 两治疗组之间差异无统计学意义。见图4。

3 讨论

UC 目前已被证实是结直肠癌发生的3大独立危险因素之一, 因此, 寻找能够预防及治疗 UC 癌变的药物有重要现实意义。与散发性结肠癌不同, UCRC 的发展需要经过“炎症 - 上皮内瘤变 - 癌

变”的病理过程^[5]。根据文献^[6]报道,本研究选择对 AOM 敏感度最高的 BALB/c 小鼠造模,很好地模拟了 UCRCC 的病理进程。虽然关于该病理过程的发生机制尚未明了,但研究^[7]已经证实 Wnt/ β -catenin 信号通路与其发生及发展关系密切。

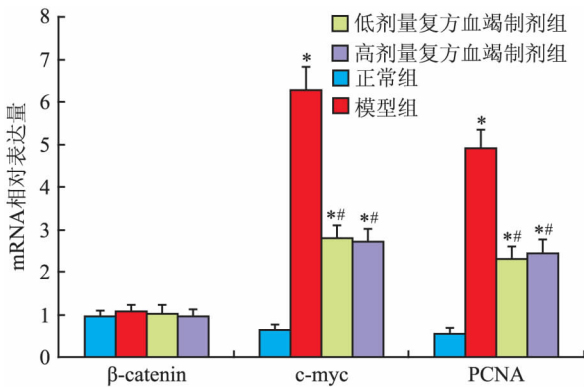


图4 小鼠结肠上皮细胞 β -catenin、c-myc、PCNA 的 mRNA 表达 ($n = 15, \bar{x} \pm s$) 与正常组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

Wnt/ β -catenin 信号通路是调控细胞增殖、分化的一条重要通路;当该通路异常激活时,胞质内降解复合体出现异常,导致正常情况下本该被降解的 β -catenin 蛋白在胞质内积聚并转移入核,入核后的 β -catenin 通过形成转录复合体激活下游靶基因,诱导细胞恶变^[8]。在整个信号转导通路中,胞质内 β -catenin 的积聚及核内异常转位是 UC 癌变的核心事件^[9-10]。所以,干预 Wnt/ β -catenin 通路的关键就是促进 β -catenin 的降解。本实验通过 Western blot 检测表明各 AOM/DSS 处理组结肠上皮细胞核内 β -catenin 蛋白水平均显著高于正常组,提示在 UCRCC 的发生及发展过程中存在 Wnt/ β -catenin 通路的活化,从而导致 β -catenin 核内转位。由于肿瘤的发生涉及多基因、多通路的激活,所以,核内 β -catenin 蛋白的增多也可能与该基因的活化有关。为了进一步明确原因,本研究 qRT-PCR 检测结果显示,各组小鼠结肠上皮细胞内 β -catenin 基因的转录水平并没有明显差异,提示 β -catenin 核内转位增加与该基因的活化并无明显关联,主要由胞质内 β -catenin 的降解减少所致。

研究^[11]证实 c-myc 基因是 Wnt/ β -catenin 通路最为重要的下游靶基因,该基因可促进细胞无限增殖和分裂,在调节细胞生长、分化及恶性转化中发挥作用。PCNA 又称为周期蛋白,是 DNA 聚合酶 δ 的辅助蛋白,其含量可以作为评价细胞增殖状态的一

项指标,与肿瘤的发生、发展关系十分密切^[12]。本实验模型组及两治疗组 c-myc 及 PCNA 在转录及蛋白表达水平均较正常组显著升高,而两治疗组较模型组表达量显著降低,这也与本实验中各组小鼠结肠组织病理学表现相符。

本实验所用复方血竭制剂处方来源于《伤寒杂病论》,主要成分为血竭和白芩。血竭又名麒麟竭,其既能降低血管通透性,清除自由基,激活白细胞,同时还有杀伤癌细胞的功效,不仅可以增强机体的免疫力,而且降低 UC 癌变的概率^[13]。白芩是兰科多年生植物,在中药中属止血类药。现代药理研究^[14]表明,白芩对多种革兰阴性及阳性菌有抑制作用。本课题组前期已经验证了复方血竭制剂在 UC 中的疗效,本实验将其应用于 UCRCC 模型小鼠,结果显示,两治疗组病理损伤、DAI 评分及结肠长度均较模型组明显减轻,说明该中药制剂可以有效延缓小鼠 UC 癌变的进程;而且,该病理结果与对 PCNA、c-myc 及 β -catenin 的检测结果显示呈正相关;由此推断复方血竭制剂的作用机制可能为通过抑制 Wnt 信号通路活化,促进 β -catenin 降解,从而减少其核内转位及其下游癌基因的表达,抑制肿瘤细胞增殖;但 β -catenin 的具体降解机制仍需深入研究。有报道^[15]显示,UCRCC 中还存在 PI3K/Akt 通路活化,而该通路 Wnt/ β -catenin 信号通路具有交叉分子 GSK-3 β ,因此,笔者推测复方血竭制剂很有可能通过抑制 PI3K/Akt 通路活化,增加 Wnt/ β -catenin 通路降解复合体中 GSK-3 β 的激活,进而促进 β -catenin 的降解,本课题组将在后续实验中进一步探索,为推动复方血竭制剂在 UCRCC 防治中的应用提供重要依据。

参考文献

- [1] Herszenyi L, Miheller P, Tulassay Z. Carcinogenesis in inflammatory bowel disease [J]. Dig Dis, 2007, 25(3):267-9.
- [2] Li N, Wang X M, Ji Y, et al. Effects of resina draconis on Toll-like receptor-4/nuclear factor-kappaB and dendritic cell phenotypes in colitis rats [J]. Chinese J Tissue Engineering Res, 2015, 19(5):752-8.
- [3] 赵亚娇,王雪明,李楠,等. 复方血竭制剂对远端型溃疡性结肠炎小鼠肺、肠白介素-6 表达的影响 [J]. 世界华人消化杂志, 2015, 23(21):3352-60.
- [4] Neufert C, Becker C, Neurath M F. An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression [J]. Nat Protoc, 2007, 2(8):1998-2004.
- [5] Nguyen A V, Wu Y Y, Liu Q, et al. STAT3 in epithelial cells

- regulates inflammation and tumor progression to malignant state in colon [J]. *Neoplasia*, 2013, 15(9):998-1008.
- [6] Suzuki R, Kohno H, Sugie S, et al. Strain differences in the susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice [J]. *Carcinogenesis*, 2006, 27(1):162-9.
- [7] Gao Z H, Lu C, Wang M X, et al. Differential β -catenin expression levels are associated with morphological features and prognosis of colorectal cancer [J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(5):2069-76.
- [8] Battle E, Bacani J, Begthel H, et al. EphB receptor activity suppresses colorectal cancer progression [J]. *Nature*, 2005, 435(7045):1126-30.
- [9] Schneikert J, Behrens J. The canonical Wnt signalling pathway and its APC partner in colon cancer development [J]. *Gut*, 2007, 56(3):417-25.
- [10] Risques R A, Lai L A, Brentnall T A, et al. Ulcerative colitis is a disease of accelerated colon aging: evidence from telomere attrition and DNA damage [J]. *Gastroenterology*, 2008, 135(2):410-8.
- [11] Gregorieff A, Clevers H. Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer [J]. *Genes Dev*, 2005, 19(8):877-90.
- [12] Grossi F, Loprevite M, Chiaramondia M, et al. Prognostic significance of K-ras, p53, bcl-2, PCNA, CD34 in radically resected non-small cell lung cancers [J]. *Eur J Cancer*, 2003, 39(9):1242-50.
- [13] 李敏. 血竭治疗溃疡性结肠炎机理研究 [J]. *实用中医内科杂志*, 2004, 18(6):488-90.
- [14] 韩广轩, 王立新, 王麦莉, 等. 中药白芨化学成分的研究 [J]. *药学实践杂志* 2001, 19(6):360.
- [15] Papadatos-Pastos D, Rabbie R, Ross P, et al. The role of the PI3K pathway in colorectal cancer [J]. *Crit Rev Oncol Hematol* 2015, 94(1):18-30.

Efficacy and mechanism of compound dracorhodin on ulcerative colitis-related colorectal cancer in mice

Li Fang, Zheng Nan, Zhao Yajiao, et al

(Graduate School of Hebei North University, Zhangjiakou 075000)

Abstract *Objective* To investigate the therapeutic effects and mechanism of compound dracorhodin on experimental ulcerative colitis related colorectal cancer (UCRCC). *Methods* Sixty male BALB/c mice were randomly assigned to four groups ($n = 15$): blank control group, model group, low dose of compound dracorhodin group and high dose of compound dracorhodin group. Disease activity index (DAI) was evaluated daily during the experiment. Mice were sacrificed after 11 weeks, from which the colons and rectums were removed. The colon histomorphology was observed by naked eyes and microscope. The expressions of β -catenin, c-myc and PCNA were detected by Western blot and real time quantitative PCR. *Results* In the model group, obvious congestion, edema and polyps were found by naked eyes; lots of inflammatory cells, different degrees of intraepithelial neoplasia and even carcinoma were observed under microscope. In the compound dracorhodin groups, mucosal congestion, edema were observed, and the number of polyps was reduced; inflammatory cells and a small amount of low-grade intraepithelial neoplasia were found under the microscope, no cancer was observed. Compared with the blank group, the DAI scores, nucleus localization of β -catenin protein, the mRNA transcription and protein expression level of c-myc and PCNA were significantly higher ($P < 0.05$) in the model group and the treatment groups ($P < 0.05$). There was no significant difference between the compound dracorhodin groups, but significantly decreased, compared with the model group ($P < 0.05$). The transcription level of β -catenin showed no significant difference among 4 groups. *Conclusion* Compound dracorhodin reduced malignant transformation of experimental ulcerative colitis at least partially through relieving the inflammatory reaction and inhibiting the Wnt/ β -catenin pathway.

Key words compound dracorhodin; ulcerative colitis related colorectal cancer; β -catenin