

健脾解毒方对人结肠癌HCT116/L-OHP裸鼠皮下移植瘤的作用及Caspase3表达的影响

张瑞娟, 余倩云, 许建华, 孙珏, 赵成根, 范忠泽

■背景资料

在西方国家, 结肠癌无论发病率或死亡率均排列第3位, 2009年我国肿瘤登记地区恶性肿瘤中, 结肠癌的发病率位居第3位, 死亡率位居第5位, 中药治疗具有增加放、化疗疗效及减轻其不良反应的优势, 受到越来越多的重视。

张瑞娟, 余倩云, 许建华, 孙珏, 赵成根, 范忠泽, 上海中医药大学附属普陀医院中医肿瘤科 上海市 200062

张瑞娟, 主治医师, 主要从事中医药治疗肿瘤的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81073105

上海市科学技术委员会基金资助项目, No. 10ZR1427300

作者贡献分布: 此课题由范忠泽与许建华设计; 研究过程由张瑞娟操作完成; 研究所用试剂及分析工具由孙珏与赵成根提供; 数据分析由张瑞娟与余倩云完成; 本论文写作由张瑞娟与余倩云完成。

通讯作者: 范忠泽, 教授, 主任医师, 200062, 上海市普陀区兰溪路164号, 上海中医药大学附属普陀医院中医肿瘤科。

ptyutcm@163.com

电话: 021-22233902

收稿日期: 2013-11-05 修回日期: 2013-11-23

接受日期: 2013-12-05 在线出版日期: 2014-01-28

Effects of Jianpi Jiedu decoction on tumor growth and Caspase3 expression in HCT116/L-OHP colon cancer xenografts in nude mice

Rui-Juan Zhang, Qian-Yun Yu, Jian-Hua Xu, Jue Sun, Cheng-Gen Zhao, Zhong-Ze Fan

Rui-Juan Zhang, Qian-Yun Yu, Jian-Hua Xu, Jue Sun, Cheng-Gen Zhao, Zhong-Ze Fan, Department of Oncology, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No.81073105; and the Shanghai Science and Technology Committee Funded Projects, No.10ZR1427300

Correspondence to: Zhong-Ze Fan, Professor, Chief Physician, Department of Oncology, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 164 Lanxi Road, Shanghai 200062, China. ptyutcm@163.com

Received: 2013-11-05 Revised: 2013-11-23

Accepted: 2013-12-05 Published online: 2014-01-28

Abstract

AIM: To observe whether Jianpi Jiedu decoction and oxaliplatin (L-OHP) have a synergistic effect on human colon cancer HCT116/L-OHP xenografts in nude mice and to explore the underlying mechanism.

METHODS: A xenograft tumor model was established using L-OHP-resistant human colon cancer HCT116 cells in nude mice. Mice were randomly divided into a control group, a L-OHP

group, a Jianpi Jiedu decoction group, a low dose Jianpi Jiedu decoction plus L-OHP group, and a high dose Jianpi Jiedu decoction plus L-OHP group. During the treatment process, the long and short diameters of tumors were measured to calculate tumor volume according to the formula and depict tumor growth curve. After treatment, the tumor weight was measured to calculate tumor inhibition rate and tumor weight inhibition rate. The expression level of Caspase 3 in tumor xenografts was detected using immunohistochemistry and Western blot.

RESULTS: Tumor volume and tumor weight were significantly lower in the high dose Jianpi Jiedu decoction plus L-OHP group ($995.54 \text{ mm}^3 \pm 87.26 \text{ mm}^3$; $0.85 \text{ g} \pm 0.06 \text{ g}$) and low dose Jianpi Jiedu decoction plus L-OHP group ($1318.32 \text{ mm}^3 \pm 100.68 \text{ mm}^3$; $1.06 \text{ g} \pm 0.07 \text{ g}$) than in the Jianpi Jiedu decoction group ($1967.83 \text{ mm}^3 \pm 178.83 \text{ mm}^3$; $1.71 \text{ g} \pm 0.11 \text{ g}$) and L-OHP group ($1698.46 \text{ mm}^3 \pm 147.61 \text{ mm}^3$; $1.56 \text{ g} \pm 0.12 \text{ g}$) ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Tumor inhibition rate and tumor weight inhibition rate were significantly higher in the high dose Jianpi Jiedu decoction plus L-OHP group (55.63%; 56.85%) and low dose Jianpi Jiedu decoction plus L-OHP group (41.25%; 46.19%) than in the Jianpi Jiedu decoction group (12.30%; 13.20%) and L-OHP group (24.31%; 20.81%) ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Jianpi Jiedu decoction plus L-OHP significantly increased the expression of Caspase3 protein in tumor xenografts in nude mice compared to other groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$).

CONCLUSION: Jianpi Jiedu decoction plus L-OHP can inhibit tumor growth of xenografts in nude mice and increase the efficacy of L-OHP possibly by up-regulating the expression of Caspase 3 to promote apoptosis.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Jianpi Jiedu decoction; Colon carcinoma; Apoptosis; Caspase3

■同行评议者

李康, 教授, 广东药学院药科学院药物分析教研室

Zhang RJ, Yu QY, Xu JH, Sun J, Zhao CG, Fan ZZ. Effects of Jianpi Jiedu decoction on tumor growth and Caspase3 expression in HCT116/L-OHP colon cancer xenografts in nude mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(3): 364-370 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/364.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i3.364>

摘要

目的: 观察中药健脾解毒方对人结肠癌HCT116/奥沙利铂(oxaliplatin, L-OHP)裸鼠皮下移植瘤化疗的增效作用, 初步探讨其增效的作用机制。

方法: 建立人结肠癌耐奥沙利铂细胞株HCT116/L-OHP裸鼠皮下移植瘤模型, 随机分为空白组、奥沙利铂组、健脾解毒方组、健脾解毒方低剂量联合奥沙利铂组、健脾解毒方高剂量联合奥沙利铂组。治疗中测量肿瘤的长径和短径, 根据公式计算瘤体体积, 描绘瘤体生长曲线, 治疗结束后称取瘤质量, 公式计算瘤体抑制率和瘤质量抑制率; 免疫组织化学, Western blot技术检测皮下移植瘤Caspase3的表达。

结果: 健脾解毒方高剂量联合奥沙利铂组的瘤体体积和瘤质量($995.54 \text{ mm}^3 \pm 87.26 \text{ mm}^3$; $0.85 \text{ g} \pm 0.06 \text{ g}$)及健脾解毒方低剂量联合奥沙利铂组的瘤体体积和瘤质量($1318.32 \text{ mm}^3 \pm 100.68 \text{ mm}^3$; $1.06 \text{ g} \pm 0.07 \text{ g}$)明显低于单用健脾解毒方组($1967.83 \text{ mm}^3 \pm 178.83 \text{ mm}^3$; $1.71 \text{ g} \pm 0.11 \text{ g}$)或奥沙利铂组($1698.46 \text{ mm}^3 \pm 147.61 \text{ mm}^3$; $1.56 \text{ g} \pm 0.12 \text{ g}$), 有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 同时健脾解毒方高剂量联合奥沙利铂组的瘤体抑制率和瘤质量抑制率(55.63%; 56.85%)及健脾解毒方低剂量联合奥沙利铂组的瘤体抑制率和瘤质量抑制率(41.25%; 46.19%)明显高于单用健脾解毒方组(12.30%; 13.20%)或奥沙利铂组(24.31%; 20.81%), 有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 健脾解毒方联合奥沙利铂组均可上调裸鼠皮下移植瘤组织Caspase3蛋白的表达, 有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

结论: 健脾解毒方联合奥沙利铂能抑制裸鼠结肠癌皮下移植瘤的生长, 增加奥沙利铂的疗效, 其增效的机制是通过上调Caspase3的表达而促进细胞凋亡有关。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 健脾解毒方; 结肠癌; 凋亡; 半胱天冬酶3

核心提示: 健脾解毒方具有益气健脾、理气解毒之功效, 长期用于胃癌、大肠癌的治疗, 具有改

善患者临床症状、提高生活质量的作用, 本实验显示健脾解毒方联合奥沙利铂能抑制裸鼠结肠癌皮下移植瘤的生长, 增加奥沙利铂的疗效, 其增效的机制是通过上调Caspase3的表达而促进细胞凋亡有关。

张瑞娟, 余倩云, 许建华, 孙珏, 赵成根, 范忠泽. 健脾解毒方对人结肠癌HCT116/L-OHP裸鼠皮下移植瘤的作用及Caspase3表达的影响. *世界华人消化杂志* 2014; 22(3): 364-370 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/364.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i3.364>

0 引言

在西方国家, 结直肠癌无论发病率或死亡率均排列第3位, 男性发病率和死亡率仅次于前列腺癌和肺癌, 女性发病率和死亡率仅次于乳腺癌和肺癌^[1]。2009年我国肿瘤登记地区恶性肿瘤中, 结直肠癌的发病率位居第3位, 死亡率位居第5位^[2]。目前治疗方式有手术、化疗、放疗、靶向治疗、基因治疗、中药治疗等, 中药治疗具有增加放、化疗疗效及减轻其不良反应的优势^[3]。健脾解毒方具有益气健脾、理气解毒之功效, 长期用于胃癌、大肠癌的治疗, 具有改善患者临床症状、提高生活质量的作用^[4,5]。本实验建立人结肠癌耐奥沙利铂(oxaliplatin, L-OHP)细胞株HCT116/L-OHP的皮下移植瘤模型, 观察健脾解毒方联合奥沙利铂对瘤体的影响, 为进一步明确其疗效和作用机制提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 人结肠癌耐奥沙利铂细胞株HCT116/L-OHP为实验室本课题组前期自行诱导, 培养于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液(含青霉素、链霉素各100 U/mL)中, 37%、50 mL/L CO₂饱和湿度培养箱中常规培养, 培养体系中加入终浓度为5 μg/mL的L-OHP以维持耐药性, 实验在停用L-OHP培养2 wk后取处于对数生长期的细胞经MTT法检测, 对L-OHP的耐药倍数达8.15倍。♂, Balb/c裸鼠60只, 4-6周龄, 购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 动物许可证号为: SCXK(沪): 2008-0016。常规饲养于上海中医药大学附属普陀医院SPF级动物实验室[动物实验室许可证号: SYXK(沪)2008-0055]。二氧化碳恒温培养箱(CELL240型), 德国贺利氏公司; 倒置显微镜, 日本Olympus公司; 眼科剪、眼科弯镊, 上海器材厂; 950 mL/L乙醇(分析纯), 上海振兴化工厂; 奥沙利铂, 江苏恒瑞医药股份有限公司;

■ 研发前沿

Caspase3是Caspase家族成员中的关键效应酶, 是细胞凋亡的执行蛋白。近年来, Caspase3与结直肠癌的发病关系引起许多学者的高度重视, 同时健脾解毒方治疗结直肠癌的作用机制是否与调控Caspase3有关, 这些都是目前亟待解决的课题。

■相关报道

曾浩然等发现,在正常结肠黏膜、结肠腺瘤及结肠癌组织中,Caspase3的表达阳性率依次降低,说明Caspase3表达缺失在正常结肠黏膜异常增生及癌变的过程中发挥着作用。Larmouret等对结肠癌组织Caspase3研究显示,其表达缺失同结肠癌的分化程度相关。

甲醇(分析纯),上海振兴化工厂;EDTA, Sigma公司;Caspase3多克隆抗体, Proteintech Group; 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L), 上海博谷生物科技有限公司。健脾解毒方由生黄芪30 g、党参15 g、生白术15 g、八月札24 g、薏苡仁30 g、野葡萄藤30 g、红藤30 g、猪苓24 g, 由上海中医药大学中药学院水提制备浸膏粉, 1 g浸膏粉含生药6.06 g, 本实验体内给药根据人与小鼠等效剂量换算公式^[6], 健脾解毒方低剂量组为6.71 g/kg, 健脾解毒方高剂量组为13.42 g/kg。

1.2 方法

1.2.1 皮下移植瘤的建立: 取对数生长期HCT116/L-OHP细胞, 将细胞用0.25%胰蛋白酶(trypsin)消化后收集到离心管中, 然后用磷酸缓冲液(PBS)分别制成浓度为 2×10^6 /mL的细胞悬液。取4-6周龄 δ , Balb/c, 裸鼠6只, 体质量 20 ± 2 g。常规消毒裸鼠右前肢的腋部皮下, 用1 mL微量注射器及23号针头吸取HCT116/L-OHP单细胞悬液, 确定针头位于裸鼠右前肢的腋部皮下后, 注入0.2 mL制备好的单细胞悬液, 术毕酒精棉球压迫穿刺点半分钟, 隔离鼠笼内SPF条件下, 恒温恒湿饲养。经过12-20 d, 待皮下肿瘤生长至直径约100-200 mm左右, 选择肿瘤生长旺盛且无破溃的荷瘤鼠, 作为供瘤鼠, 脱颈椎处死, 皮肤予1%碘伏、750 mL/L乙醇消毒, 小心用眼科剪剪开皮肤, 沿移植瘤包膜小心剥离皮下肿瘤组织, 将剥离的移植瘤块于无菌条件下, 生理盐水冲洗表面的血污, 去除坏死组织和纤维组织, 将瘤体剪碎至1 mm³大小的组织块, 在超净工作台用20号套管针接种于裸鼠右侧前肢腋部皮下。

1.2.2 分组及给药方式: 当肿瘤生长至150-300 mm³左右时, 选择瘤体生长良好、无自发出血坏死、瘤周无感染病灶的荷瘤鼠50只为实验模型, 分别将上述造模裸鼠随机分为5组, 每组10只, 分别是: A: 空白组: 腹腔注射蒸馏水, 每周一、三、五各1次; 生理盐水灌胃, 每周一、二、三、四、五各1次; B: 奥沙利铂组: 腹腔注射奥沙利铂5 mg/kg, 每周一、三、五各1次; 生理盐水灌胃, 每周一、二、三、四、五各1次; C: 健脾解毒方组: 健脾解毒方高剂量13.42 g/kg灌胃, 每周一、二、三、四、五各1次; 腹腔注射蒸馏水, 每周一、三、五各1次; D: 健脾解毒方低剂量联合奥沙利铂组: 健脾解毒方低剂量6.71 g/kg灌胃, 每周一、二、三、四、五各1次; 腹腔注射奥沙利铂5 mg/kg, 每周一、三、五各1次; E: 健脾解毒方高剂量联合奥沙利铂组: 健脾解

毒方高剂量13.42 g/kg灌胃, 每周一、二、三、四、五各1次; 腹腔注射奥沙利铂5 mg/kg, 每周一、三、五各1次。各组给药时间均为4 wk。

1.2.3 肿瘤瘤体抑制率计算: 从接种瘤体第1周开始用游标卡尺测量肿瘤体积, 描绘各组肿瘤生长曲线及计算瘤体抑制率。肿瘤体积 $V = 1/2ab^2$ (a、b分别表示肿瘤的长径和短径); 肿瘤瘤体抑制率 = [(对照组平均瘤体体积-给药组平均瘤体体积)/对照组平均瘤体体积] $\times 100\%$ 。

1.2.4 肿瘤瘤质量抑制率计算: 治疗结束后处死裸鼠, 迅速剥离瘤体, 称取瘤质量, 计算肿瘤瘤质量抑制率。肿瘤瘤质量抑制率 = [(对照组平均瘤质量-给药组平均瘤质量)/对照组平均瘤质量] $\times 100\%$ 。

1.2.5 免疫组织化学SP法检测皮下移植瘤Caspase3的表达: 移植瘤组织经甲醛固定, 石蜡包埋, 4 μ m厚连续切片。每例标本切片3张用于免疫组织化学染色, 免疫组织化学采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(SP)法。Caspase3免疫组织化学染色阳性判断标准: 背景清亮, 细胞质或/和细胞核着棕黄色颗粒者为阳性细胞。免疫组织化学阳性细胞阳性度强弱用Image Proplus 6.0数码医学图像分析系统定量分析测定, 每张切片在200倍光镜下随机观察3个具有代表性的视野, 避开非特异性染色区, 以积分光密度值(IA/AREA)来表示。

1.2.6 Western blot方法检测Caspase3的表达: 皮下移植瘤组织称重后, 细胞裂解液(1 mL裂解液中加入PMSF 5 μ L/mL, 蛋白酶抑制剂5 μ L/mL, DTT 5 μ L/mL)抽提细胞总蛋白, 采用试剂盒进行蛋白的定量。制备10%SDS聚丙烯酰胺凝胶, 待胶凝固后, 上样加至分离胶孔中, 边缘孔加入Marker, 电泳, 半干转膜, 转好的膜放入封闭液中封闭, 加入一抗, 孵育过夜, 洗膜, 二抗孵育2 h, 洗膜, 显色, 用凝胶成像系统记录结果。Western blot蛋白定量分析用Image J图像处理软件分析测定, 以目标A值与内参A值的比值来表示。

统计学处理 采用SPSS16.0统计学软件进行统计学分析, 各组数据以mean \pm SD表示, 方差齐性检验后, 采用单因素方差分析, 组间两两比较采用SNK-q检验, 检验标准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 健脾解毒方对裸鼠皮下移植瘤体积和瘤体抑制率的影响 各组随着时间的延长, 肿瘤体积

表 1 各组裸鼠给药前后瘤体体积及瘤体抑制率比较 ($n = 10$, mean \pm SD)

分组	给药前(mm ³)	给药后(mm ³)	瘤体抑制率(%)
空白组	210.78 \pm 20.12	2243.88 \pm 200.52 ^{df}	—
奥沙利铂组	208.16 \pm 19.23	1698.46 \pm 147.61 ^{bf}	24.31
健脾解毒方组	198.52 \pm 16.40	1967.83 \pm 178.83 ^{cf}	12.30
健脾解毒方低剂量联合奥沙利铂组	209.71 \pm 12.98	1318.32 \pm 100.68 ^{bce}	41.25
健脾解毒方高剂量联合奥沙利铂组	212.56 \pm 19.34	995.54 \pm 87.26 ^{bd}	55.63

^b $P < 0.01$ vs 空白组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 奥沙利铂组; ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$ vs 健脾解毒方高剂量联合奥沙利铂组。

表 2 各组裸鼠给药后瘤体质量及瘤体质量抑制率比较 ($n = 10$, mean \pm SD)

分组	瘤质量(g)	瘤质量抑制率(%)
空白组	1.97 \pm 0.09 ^{df}	—
奥沙利铂组	1.56 \pm 0.12 ^{bf}	20.81
健脾解毒方组	1.71 \pm 0.11 ^{bf}	13.20
健脾解毒方低剂量联合奥沙利铂组	1.06 \pm 0.07 ^{bde}	46.19
健脾解毒方高剂量联合奥沙利铂组	0.85 \pm 0.06 ^{bd}	56.85

^b $P < 0.01$ vs 空白组; ^d $P < 0.01$ vs 奥沙利铂组; ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$ vs 健脾解毒方高剂量联合奥沙利铂组。

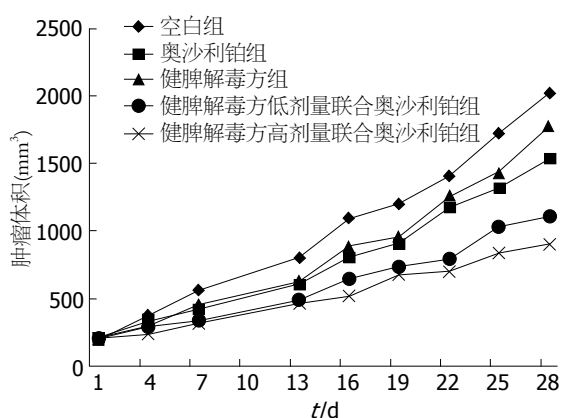


图 1 各组裸鼠瘤体体积的生长曲线。

均增加, 但治疗结束后, 肿瘤体积由大到小为: 空白组、健脾解毒方组、奥沙利铂组、健脾解毒方低剂量联合奥沙利铂组、健脾解毒方高剂量联合奥沙利铂组; 瘤体抑制率由高到低为: 健脾解毒方高剂量联合奥沙利铂组、健脾解毒方低剂量联合奥沙利铂组、奥沙利铂组、健脾解毒方组, 提示健脾解毒方能抑制裸鼠结肠癌皮下移植瘤的生长, 并且联合用药可以增加L-OHP的疗效(表1, 图1)。

2.2 健脾解毒方对裸鼠皮下移植瘤质量及瘤质量抑制率的影响 各组裸鼠皮下移植瘤瘤质量由

大到小为: 空白组、健脾解毒方组、奥沙利铂组、健脾解毒方低剂量联合奥沙利铂组、健脾解毒方高剂量联合奥沙利铂组; 瘤质量抑制率由高到低为: 健脾解毒方高剂量联合奥沙利铂组、健脾解毒方低剂量联合奥沙利铂组、奥沙利铂组、健脾解毒方组, 提示健脾解毒方能抑制裸鼠结肠癌皮下移植瘤的瘤质量, 并且联合用药可以增加L-OHP的疗效(表2)。

2.3 健脾解毒方对裸鼠皮下移植瘤Caspase3的影响

2.3.1 免疫组织化学结果显示: 免疫组织化学结果显示健脾解毒方组、奥沙利铂组、健脾解毒方低剂量联合奥沙利铂组、健脾解毒方高剂量联合奥沙利铂组皮下移植瘤组织Caspase3蛋白的表达均高于空白组; 而健脾解毒方低剂量联合奥沙利铂组和健脾解毒方高剂量联合奥沙利铂组Caspase3蛋白的表达均高于L-OHP组, 提示健脾解毒方可以上调裸鼠皮下移植瘤组织Caspase3蛋白的表达, 通过协同L-OHP促进细胞凋亡而增加疗效(表3, 图2)。

2.3.2 Western blot结果: 结果显示健脾解毒方组、奥沙利铂组、健脾解毒方低剂量联合奥沙利铂组、健脾解毒方高剂量联合奥沙利铂组皮下移植瘤组织Caspase3蛋白的表达均高于空白组; 而健脾解毒方低剂量联合奥沙利铂组和健脾解毒

■创新盘点

本实验采用结肠癌Oxaliplatin(L-OHP)耐药细胞HCT116/L-OHP建立裸鼠皮下移植瘤模型, 观察中药健脾解毒方对人结肠癌裸鼠皮下移植瘤化疗的增效作用及对Caspase3蛋白的影响, 初步探讨其增效的作用机制。

■应用要点

本研究证实健脾解毒方可协同L-OHP增加疗效,其增效的机制是通过上调Caspase3的表达而促进细胞凋亡,本实验为中药治疗肿瘤的作用机制提供实验理论依据。

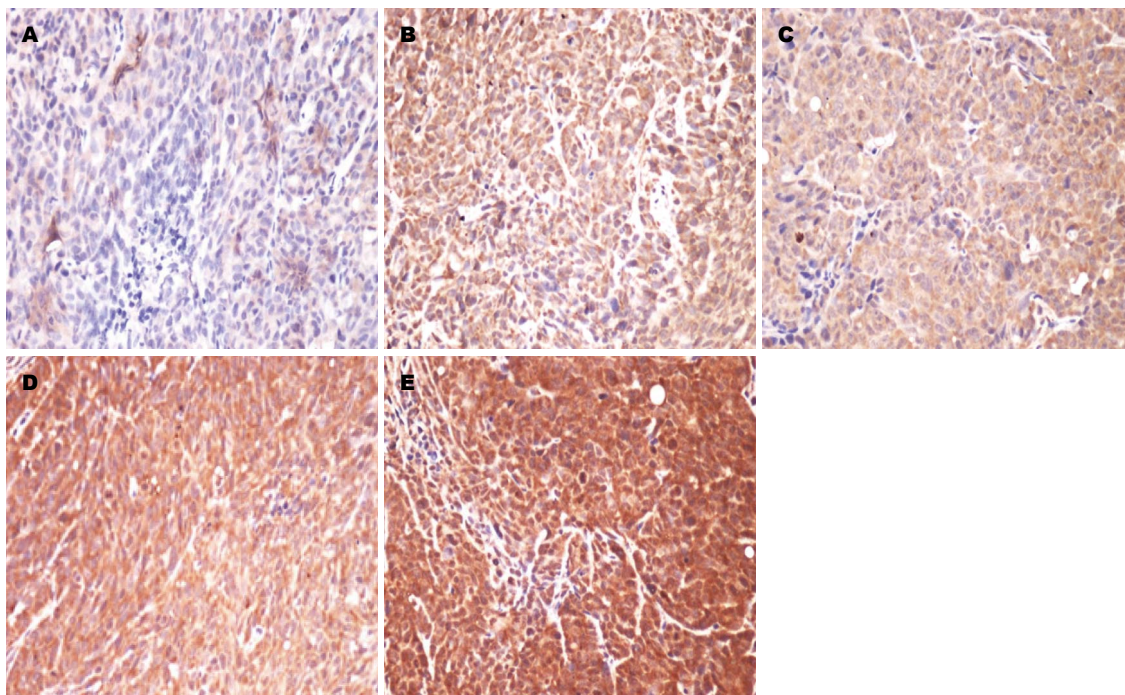


图2 各组裸鼠皮下移植瘤Caspase3蛋白表达(SP法×200)。A: 空白组; B: 奥沙利铂组; C: 健脾解毒方组; D: 健脾解毒方低剂量联合奥沙利铂组; E: 健脾解毒方高剂量联合奥沙利铂组。

表3 各组裸鼠皮下移植瘤Caspase3蛋白表达 (SP法×200)

分组	积分光密度值(I4/AREA)
空白组	0.00003300 ± 0.000002008 ^{df}
奥沙利铂组	0.06104333 ± 0.006085834 ^{bf}
健脾解毒方组	0.03190767 ± 0.000733508 ^{acf}
健脾解毒方低剂量联合奥沙利铂组	0.09773533 ± 0.004860125 ^{bce}
健脾解毒方高剂量联合奥沙利铂组	0.12683300 ± 0.036383126 ^{bd}

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 空白组; ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01 vs 奥沙利铂组; ^e*P*<0.05, ^f*P*<0.01 vs 健脾解毒方高剂量联合奥沙利铂组。

表4 各组裸鼠皮下移植瘤Caspase3蛋白表达 (Western blot)

分组	蛋白相对表达量
空白组	0.498849 ± 0.03 ^{df}
奥沙利铂组	0.6741536 ± 0.04 ^{bf}
健脾解毒方组	0.6352034 ± 0.03 ^{af}
健脾解毒方低剂量联合奥沙利铂组	1.219087 ± 0.08 ^{bde}
健脾解毒方高剂量联合奥沙利铂组	1.378966 ± 0.1 ^{bd}

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 空白组; ^c*P*<0.01 vs 奥沙利铂组; ^e*P*<0.05, ^f*P*<0.01 vs 健脾解毒方高剂量联合奥沙利铂组。

方高剂量联合奥沙利铂组Caspase3蛋白的表达均高于L-OHP组,提示健脾解毒方可以上调裸鼠皮下移植瘤组织Caspase3蛋白的表达,通过协同L-OHP促进细胞凋亡而增加疗效(表4,图3,4)。

3 讨论

近年来,我国结直肠癌的发病率逐年升高,结直肠癌的5年生存率一直徘徊在50%左右,手术后仍有40%-50%患者出现复发转移,化疗就

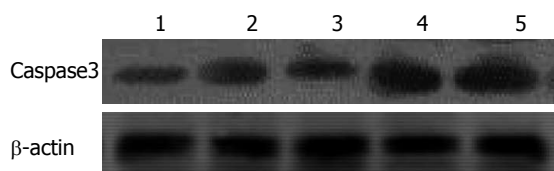


图3 各组裸鼠皮下移植瘤Caspase3蛋白表达(Western blot). 1: 空白组; 2: 奥沙利铂组; 3: 健脾解毒方组; 4: 健脾解毒方低剂量联合奥沙利铂组; 5: 健脾解毒方高剂量联合奥沙利铂组。

成为治疗结直肠癌的主要手段^[7]。奥沙利铂是继卡铂、顺铂后的第3代铂类抗肿瘤药, 2012年美国国家综合癌症网络(National Comprehensive Cancer Network, NCCN)肿瘤学临床实践指南仍指出奥沙利铂是目前治疗结肠癌化疗的标准药物^[8]。健脾解毒方由生黄芪、党参、生白术、八月札、薏苡仁、野葡萄藤、红藤、猪苓组成, 全方具有健脾理气、燥湿解毒之功, 临床应用健脾解毒方对晚期结直肠癌以L-OHP联合5-氟尿嘧啶(5-Fu)、甲酰四氢叶酸钙(CF)的FOLF-FOX4方案化疗有增加近期疗效, 提高生活质量, 减少不良反应的作用, 对化疗取得部分缓解的患者有延长中位生存期的作用, 研究组的中位生存期为13.6 mo, 而对照组为10.2 mo($P<0.05$); 研究组的1年生存率也优于对照组, 分别为80.9%和50.0%($P<0.05$)^[4]。

Caspase3是属于半胱氨酸蛋白酶家族成员, 在1994年由Fernandez-Ahemri等在Jurkat T细胞系克隆到的一种编码分子量为32 kDa的半胱氨酸蛋白酶而称之为CPP32(cysteine protease protein 32)基因, 在1996年被命名为Caspase3^[9]。Caspase家族蛋白酶的激活在细胞凋亡过程中起着重要作用, 而Caspase3是Caspase家族成员中的关键效应酶, 他是细胞凋亡的执行蛋白, 因此与细胞凋亡关系十分密切, 参与多种因素诱导的细胞凋亡。细胞凋亡现象的发生可以通过细胞外途径接受细胞外环境中肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、Fas等细胞凋亡信号的激活, 使线粒体释放细胞色素C, 或直接作用Caspase3引起细胞凋亡级联反应诱导凋亡, 或者细胞内的死亡信号, 如DNA损伤、三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)耗竭等均可导致线粒体释放细胞色素C, 与半胱天冬酶9(Caspase9)酶原结合形成凋亡复合物, Caspase9被激活, 激活下游的Caspase3使细胞凋亡^[10,11]。Caspase3广泛表达于正常人体组织及肺癌、胃癌、大肠癌、壶腹癌、乳腺癌等多种肿瘤组织中^[12-16]。有研究发现, 在

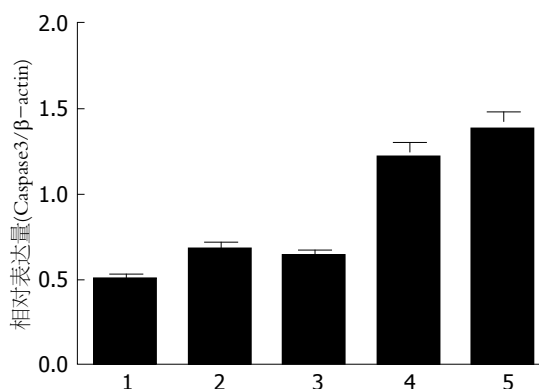


图4 各组裸鼠皮下移植瘤Caspase3蛋白表达(Western blot). 1: 空白组; 2: 奥沙利铂组; 3: 健脾解毒方组; 4: 健脾解毒方低剂量联合奥沙利铂组; 5: 健脾解毒方高剂量联合奥沙利铂组。

■同行评价

本研究采用健脾解毒方治疗结直肠癌并取得一定进展, 具有一定的理论和临床应用价值。

正常结肠黏膜、结肠腺瘤及结肠癌组织中, Caspase3的表达阳性率依次降低, 说明Caspase3表达缺失在正常结肠黏膜异常增生及癌变的过程中发挥着重要作用^[17,18]。并且通过对结肠癌组织Caspase3蛋白表达研究显示, Caspase3蛋白的表达缺失同结肠癌的分化程度相关^[19]。

本实验应用健脾解毒方联合L-OHP对裸鼠人结肠癌耐L-OHP细胞HCT116/L-OHP的皮下移植瘤模型给予干预处理, 结果表明: 健脾解毒方高剂量联合奥沙利铂组的瘤体体积和瘤质量($995.54 \text{ mm}^3 \pm 87.26 \text{ mm}^3$; $0.85 \text{ g} \pm 0.06 \text{ g}$)及健脾解毒方低剂量联合奥沙利铂组的瘤体体积和瘤质量($1318.32 \text{ mm}^3 \pm 100.68 \text{ mm}^3$; $1.06 \text{ g} \pm 0.07 \text{ g}$)明显低于单用健脾解毒方组($1967.83 \text{ mm}^3 \pm 178.83 \text{ mm}^3$; $1.71 \text{ g} \pm 0.11 \text{ g}$)或奥沙利铂组($1698.46 \text{ mm}^3 \pm 147.61 \text{ mm}^3$; $1.56 \text{ g} \pm 0.12 \text{ g}$), 有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 同时健脾解毒方高剂量联合奥沙利铂组的瘤体抑制率和瘤质量抑制率(55.63%; 56.85%)及健脾解毒方低剂量联合奥沙利铂组的瘤体抑制率和瘤质量抑制率(41.25%; 46.19%)明显高于单用健脾解毒方组(12.30%; 13.20%)或奥沙利铂组(24.31%; 20.81%), 有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 健脾解毒方联合奥沙利铂组均可上调裸鼠皮下移植瘤组织Caspase3蛋白的表达, 有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果提示健脾解毒方可协同L-OHP增加疗效, 其增效的机制是通过上调Caspase3的表达而促进细胞凋亡, 本实验为中药治疗肿瘤的作用机制提供了实验理论依据。

4 参考文献

- 1 Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T,

- Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008; 58: 71-96 [PMID: 18287387 DOI: 10.3322/CA.2007.0010]
- 2 陈万青, 张思维, 郑荣寿, 曾红梅, 邹小农, 赵平, 吴良有, 李光琳, 赫捷. 中国2009年恶性肿瘤发病和死亡分析. *中国肿瘤* 2013; 22: 2-12
 - 3 张贝克, 白松. 大肠癌治疗进展. *中国老年保健医学* 2013; 11: 42-45
 - 4 张勇, 许建华, 孙珏, 朱晏伟, 李朝衡, 鲍文磊, 梁芳, 孙晓文, 郭刚. 健脾解毒方联合FOLFOX4方案治疗晚期结肠直肠癌临床研究. *环球中医药* 2010; 3: 117-120
 - 5 张晓晓, 孙珏, 许建华, 张勇, 梁芳, 盛艺明, 李炜. 健脾解毒汤联合化疗对胃癌术后患者的影响. *上海中医药杂志* 2012; 46: 78-79, 94
 - 6 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 郑青山, 孙瑞元. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算. *中国临床药理学与治疗学* 2004; 9: 1069-1072
 - 7 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108 [PMID: 15761078 DOI: 10.3322/canjclin.55.2.74]
 - 8 潘海霞, 任刚, 胡洪林, 邓春美, 邓颖, 朱学强, 杨兰, 敖睿, 刘浩. FOLFOX4方案治疗晚期大肠癌近期疗效分析. *实用医院临床杂志* 2008; 5: 65-67
 - 9 Suzuki A, Iwasaki M, Wagai N. Involvement of cytoplasmic serine proteinase and CPP32 subfamily in the molecular machinery of caspase 3 activation during Fas-mediated apoptosis. *Exp Cell Res* 1997; 233: 48-55 [PMID: 9184075 DOI: 10.1006/excr.1997.3546]
 - 10 Stennicke HR, Jürgensmeier JM, Shin H, Devaux Q, Wolf BB, Yang X, Zhou Q, Ellerby HM, Ellerby LM, Bredesen D, Green DR, Reed JC, Froelich CJ, Salvesen GS. Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem* 1998; 273: 27084-27090 [PMID: 9765224 DOI: 10.1074/jbc.273.42.27084]
 - 11 Anichini A, Mortarini R, Sensi M, Zanon M. APAF-1 signaling in human melanoma. *Cancer Lett* 2006; 238: 168-179 [PMID: 16095810 DOI: 10.1016/j.canlet.2005.06.034]
 - 12 Zhao Y, Li XJ, Sui X, Tang XJ, Qin H, Ren H. [Expression and significance of PCNA and Caspase-3 in the tissue of lung cancer]. *Xibao Yu fenzi Mianyi-xue Zazhi* 2010; 26: 154-156 [PMID: 20230677]
 - 13 Xiao LJ, Zhao S, Zhao EH, Zheng X, Gou WF, Takano Y, Zheng HC. Clinicopathological and prognostic significance of Ki-67, caspase-3 and p53 expression in gastric carcinomas. *Oncol Lett* 2013; 6: 1277-1284 [PMID: 24179508 DOI: 10.3892/ol.2013.1532]
 - 14 刘轩, 李荣, 郭守俊, 曾红学. Bag-1和Caspase-3在大肠癌中的表达及临床意义. *实用癌症杂志* 2012; 27: 562-564
 - 15 Xue D, Zuo K, Li X, Zhang T, Chen H, Cheng Y, Chen Y. Expression and prognostic significance of livin, caspase-3, and ki-67 in the progression of human ampullary carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2013; 21: 525-531 [PMID: 23343959 DOI: 10.1097/PAL.0b013e31827da412]
 - 16 dos Passos FS, Cuenca RM, Malafaia O, Ribas-Filho JM, Czeckzo NG, Nassif PA, Ribas CA. [Cytophotometric expressions of CASPASE-3 and CD-34 in breast cancer]. *Rev Col Bras Cir* 2009; 36: 406-412 [PMID: 20069152 DOI: 10.1590/S0100-69912009000500008]
 - 17 曾浩然, 刘学勇, 陈德志, 张红欣, 程敏, 张山, 万祖安. Caspase-3基因在大肠癌、大肠腺瘤中的表达及其与细胞凋亡的关系. *中国厂矿医学* 2008; 21: 515
 - 18 董晓彤, 黄莹, 李巍, 单伟颖, 郑继宁, 陈健. Caspase-3、Bcl-2的表达在结肠癌诊断中的临床意义. *世界华人消化杂志* 2013; 21: 3281-3285
 - 19 Larmonier CB, Arnould L, Larmonier N, Baumann S, Moutet M, Saint-Giorgio V, Pance A, Jeannin JF. Kinetics of tumor cell apoptosis and immune cell activation during the regression of tumors induced by lipid A in a rat model of colon cancer. *Int J Mol Med* 2004; 13: 355-361 [PMID: 14767564]

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静





Published by **Baishideng Publishing Group Co., Limited**
Flat C, 23/F., Lucky Plaza,
315-321 Lockhart Road, Wan Chai, Hong Kong, China
Fax: +852-3177-9906
Telephone: +852-6555-7188
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

