

葛花解酲汤对脾虚湿热型溃疡性结肠炎“炎-癌转化”中相关原抑癌基因表达的影响

李晓玲¹, 吴玉泓², 李海龙¹, 殷银霞³, 舍雅莉¹, 郝民琦⁴, 梁永林^{1*}

¹甘肃中医药大学基础医学院, 兰州 730000; ²深圳大学附属华南医院;

³北京中医药大学深圳医院(龙岗), 深圳 518111; ⁴南方医科大学中西医结合医院, 广州 510000

摘要:探讨葛花解酲汤对脾虚湿热型溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)-溃疡性结肠炎相关癌变(ulcerative colitis associated carcinogenesis, UCAC)的“炎-癌转化”小鼠结肠组织中相关原抑癌基因表达的影响。80只SPF级C57BL/6雄性小鼠随机选出10只为空白组(K组), 其余70只建立脾虚湿热模型。脾虚湿热模型建立后, 将其随机分为模型1、2、3周期组(M1、M2、M3组)、葛花解酲汤高、中、低剂量组(G、Z、D组)和阳性对照美沙拉嗪组(Y组), 10只/组, 以氧化偶氮甲烷(azoxymethane, AOM)/葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulfate, DSS)继续建立UC-UCAC的“炎-癌转化”模型。各组给予对应药物治疗4周。观察小鼠一般状态; 统计小鼠体重变化; 电镜下观察小鼠结肠黏膜超微结构; WB和RT-qPCR分别检测小鼠结肠组织中c-jun、c-fos、c-myc、p53、RB1蛋白及基因的表达。与K组比, M3组小鼠一般状态差, 体重增长量显著下降($P < 0.01$), 结肠黏膜上皮细胞核染色不均匀, 细胞内线粒体等见大量增生肿胀, c-jun、c-fos、c-myc蛋白及基因表达显著升高($P < 0.01$), p53、RB1蛋白及基因表达显著降低($P < 0.01$); 与M3组比, 各治疗组小鼠一般状态改善, 体重增长量升高, 结肠黏膜上皮细胞核染色较均匀, 细胞内线粒体等增生肿胀情况改善, c-jun、c-fos、c-myc蛋白及基因表达降低, p53、RB1蛋白及基因表达升高, 以G、Z和Y组最为显著($P < 0.01$, $P < 0.05$)。葛花解酲汤可能通过抑制原癌基因c-jun、c-fos、c-myc的激活, 促进抑癌基因p53、RB1的表达, 调控细胞增殖与凋亡, 延缓炎-癌转化进程, 修复受损的结肠黏膜组织, 预防UCAC的发生。

关键词:葛花解酲汤; 溃疡性结肠炎; 炎-癌转化; 脾虚湿热; 原癌基因; 抑癌基因

中图分类号: 285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)5-0858-10

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.5.014

Effect of Gehua Jiecheng Decoction on proto-tumor suppressor gene expression in the “inflammation-cancer transformation” of ulcerative colitis with spleen deficiency and damp-heat

LI Xiao-ling¹, WU Yu-hong², LI Hai-long¹,
YIN Yin-xia³, SHE Ya-li¹, HAO Min-qi⁴, LIANG Yong-lin^{1*}

¹School of Basic Medical Sciences, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

²South China Hospital, Shenzhen University; ³Shenzhen Hospital of Beijing University of Traditional Chinese Medicine (Longgang), Shenzhen 518111, China; ⁴Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510000, China

Abstract: To investigate the effect of Gehua Jiecheng Decoction on the expression of related pro-tumor suppressor genes in mice colon tissue of the “inflammation-cancer transformation” about ulcerative colitis (UC)-ulcerative colitis associated carcinogenesis (UCAC) with spleen deficiency and damp heat syndrome. Among 80 SPF C57BL/6 male mice, 10 were randomly selected as blank group (group K), and the other 70 were set up to build the spleen deficiency damp-heat model. After the

收稿日期: 2022-11-02 接受日期: 2023-03-02

基金项目: 国家自然科学基金(81860810); 2021年深圳市名中医药专家学术经验传承工作室建设项目-新建项目(20111130-7); 敦煌医学与转化教育部重点实验室2018年度开放基金(DHYX18-17); 2022年度中医学一级学科“岐黄英才”导师专项基金博导项目(2022-5)

* 通信作者 Tel: 86-018993031885; E-mail: zjyl875532437@126.com

establishment of spleen deficiency damp-heat model, they were randomly divided into model 1, 2, 3 cycle group (M1, M2, M3), high, middle, low dose Gehua Jiecheng Decoction group (G, Z, D) and positive control mesalazine group (Y), 10 cases in each group. The "inflammation-cancer transformation" about UC-UCAC was further established by azoxymethane (AOM)/dextran sodium sulfate (DSS). Each group was treated with corresponding drugs and the course of treatment was 4 weeks. Then to observed the general condition of mice, counted the body weight of mice, observed the ultrastructure of colonic mucosa under electron microscope, and detected the expression of c-jun, c-fos, c-myc, p53 and RB1 proteins and genes in mouse colon tissues by WB and RT-qPCR, respectively. Compared with the group K, the group M3 mice were in a worse general condition, body weight gain were significantly lower ($P < 0.01$), the colonic mucosal epithelial cell nuclear staining were not uniform, the intracellular mitochondria showed a large amount of hyperplasia and swelling, and the proteins and genes expression of c-jun, c-fos and c-myc were significantly higher ($P < 0.01$). The proteins and genes expression of p53 and RB1 were significantly lower ($P < 0.01$). Compared with the group M3, the general condition of treatment group mice were improved, body weight gain were higher, colonic mucosa epithelial nuclei were relatively uniform, the mitochondria in cells hyperplasia swelling improvements, the proteins and genes expression of c-jun, c-fos and c-myc were lower. The proteins and genes expression of p53 and RB1 were higher. Groups G, Z and Y were in the most significant level ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Gehua Jiecheng Decoction may can inhibit the expression of proto-oncogenes *c-jun*, *c-fos* and *c-myc*, promote the expression of tumor suppressor genes *p53* and *RB1*, regulate cell proliferation and apoptosis, delay the process of inflammation-cancer transformation, repair the damaged colonic mucosa tissue, and prevent the occurrence of UCAC.

Key words: Gehua Jiecheng Decoction; ulcerative colitis; inflammation-cancer transformation; spleen deficiency and damp heat syndrome; proto-oncogene; tumor suppressor gene

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是发生于结肠的一种炎症性疾病, 主要损伤结肠黏膜, 可由结肠近端逐渐累及全结肠^[1]。若炎症持续刺激, 易引发结肠炎相关癌症的发生^[2]。溃疡性结肠炎相关癌变 (ulcerative colitis associated carcinogenesis, UCAC) 是 UC 严重并发症之一, 其癌变经历“炎症-不典型增生-癌”的演变过程^[3,4]。炎症到肿瘤的发生发展过程是一个逐级进行的过程, 存在着复杂的生物学过程。对于炎-癌转化的发病机制, 有研究认为其与原癌基因的过度活化和抑癌基因的失活有关, 原癌基因和抑癌基因表达失衡是肿瘤发生的本质原因^[5]。

祖国医学将 UC 并发的癌变归属于“久毒痢”诊断范畴^[6]。而炎性肠癌的主要病机为脾虚湿热^[7]。葛花解酲汤以水利渗湿、发散酒湿热邪、理气醒脾、健脾益气为法合而成方^[8,9]。故本研究通过建立脾虚湿热 UC-UCAC 小鼠模型, 以葛花解酲汤进行干预治疗, 通过观察小鼠结肠黏膜超微结构变化、葛花解酲汤对脾虚湿热 UC-UCAC 小鼠结肠组织相关原癌基因、抑癌基因表达的影响, 探究其延缓脾虚湿热 UC-UCAC 转化可能的作用机制, 以期预防 UCAC 的发生奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验药物

本实验中葛花解酲汤配方颗粒由甘肃中医药大

学附属医院提供 (厂家: 广东一方制药有限公司)。葛根 (批号: 19030881), 泽泻 (批号: 20038271), 茯苓 (批号: 20034861), 猪苓 (批号: 20012321), 砂仁 (批号: 2004731), 白豆蔻 (批号: 20012101), 青皮 (批号: 18036501), 陈皮 (批号: 20016071), 木香 (批号: 20016161), 干姜 (批号: 20027321), 建曲 (批号: 20013781), 党参 (批号: 20031491), 白术 (批号: 20019871); 美沙拉嗪肠溶片 (规格 0.25 g/片, 黑龙江天宏药业股份有限公司, 批号: 20200406), 使用蒸馏水配置成浓度为 0.03 g/mL 溶液。氧化偶氮甲烷 (azoxymethane, AOM) (上海西格玛奥德里奇, 批号: SLCF1963); 葡聚糖硫酸钠 (dextran sodium sulfate, DSS) (上海翌圣生物科技有限公司, 批号: D9016340); 利血平 (北京索莱宝, 批号: 1201C021)。

1.2 动物

选取 10 周龄左右 SPF 级 C57BL/6 小鼠 80 只 (均为雄鼠), 体重 18 ~ 22 g, 由甘肃中医药大学科研实验中心提供, 饲养环境温度 21 ~ 25 °C、相对湿度 50% ~ 60%, 12 h 明暗交替, 噪音 < 50 dB, 实验动物质量合格证号: NO. 62001000000606, 实验动物设施使用证明编号: NO. 00000588, 本研究经甘肃中医药大学伦理委员会批准 (2020-295)。

1.3 试剂

反转录试剂盒、荧光定量试剂盒、免封闭 PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (8%) (PartI)、ECL 化学发光

超敏显色试剂盒、三色预染蛋白分子量 Marker(批号: H2010081、H0001451、P3129150、S8021530、G1129220,上海翌圣生物科技有限公司);PCR 引物(上海生工生物工程股份有限公司合成);HE 染色试剂盒、十二烷基硫酸钠(SDS)、甘氨酸、三羟甲基氨基甲烷(TRIS)、中性树胶、苏木素、高效 RIPA 组织/细胞快速裂解液(批号: G1120、102V033、516V066、304A075、8590、1140、20201113,北京索莱宝科技有限公司);c-myc、p53 抗体(批号: 43635、43339,美国 Gene Tex 公司)。c-fos、RB1、GAPDH 抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗(批号: B8401、B2301、B1501、B0201,美国 ImmunoWay 公司);c-jun 抗体(批号: GR3356166-3,英国 Abcam 公司)。

1.4 仪器

Lq5 型 RT-qPCR 仪、电泳仪、蛋白转印模块、曝光机(美国 Bio-Rad 公司);切片机(德国 Leica 公司);显微镜(日本 OLYMPUS 公司,型号: IX51);超微量分光光度计(美国 Pultton 公司,型号: P100+)。

1.5 方法

1.5.1 动物分组及造模

选用 10 周龄左右 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠 80 只,体重 18~22 g,适应性喂养 1 周后,随机选出 10 只作为空白组(K 组),剩余 70 只作为造模组。参考脾虚和湿热模型以及现阶段炎癌转化研究的重要动物模型^[10-12],采用病证结合方法建立脾虚湿热 UC-UCAC 转化模型。①小鼠背部皮下注射利血平(1×10^{-4} g/kg),1 次/d,连续 17 d,复制脾虚模型;②利血平注射 7 d 后,剩余 10 d 注射的同时联合自由饮 200 g/L 的蜜糖水+灌服猪油 10 g/kg+灌服白酒(10 mL/kg)10 d,复制湿热模型。脾虚湿热模型复制成功后,将造模组随机分为第 1 周期、第 2 周期、第 3 周期模型组(M1、M2、M3 组),葛花解酩汤高、中、低剂量组(G、Z、D 组),美沙拉嗪组(Y 组),每组 10 只。③造模组在第 18 d 单次腹腔注射 AOM(10 mg/kg),7 d 后再联合三个 DSS 水循环饲喂(2.5% DSS 7 d + 正常饮水 14 d 为 1 个循环)。M1、M2 组小鼠分别在第 1 个、第 2 个 DSS 水循环中 DSS 自由饮结束停止造模,M3、G、Z、D、Y 组小鼠在第 3 个 DSS 水循环中 DSS 自由饮结束停止造模,以观察 UC-UCAC 的动态演变过程,空白组在造模期间灌服同体积蒸馏水、注射同体积生理盐水。

1.5.2 给药方法及标本采集

在第 1 个 DSS 水循环结束后,随着 DSS 水循环进行,各组小鼠分别给予对应药物同时进行干预治疗。G、Z、D 组根据小鼠体表面积每天分别给予 0.25、0.125、0.0625 g/mL(0.2 mL/10 g)剂量的葛花解酩汤颗粒剂冲服灌胃治疗,Y 组灌服美沙拉嗪肠溶片剂水溶液(0.6 g/kg),K 组和 M 组给予等体积蒸馏水灌胃,治疗至第 3 个循环中 DSS 自由饮结束后停止,共计 4 周。K、M3、G、Z、D、Y 组于 4 周治疗后同时进行取材,M1、M2 组小鼠分别于第 1、2 个 DSS 水循环中 DSS 自由饮结束后取材。小鼠断颈处死,并固定于解剖台上,予酒精消毒腹部,沿小鼠腹中线纵行剖开腹腔,将结肠和远端回肠游离,剪取肛门至盲肠末端的全结肠。沿结肠带纵行一分为二剪开结肠,用无菌生理盐水冲洗结肠,一部分固定于 Gluta 固定液(电镜专用,2.5%)固定,另一部分冻存至 -80 °C 备用。

1.5.3 观察小鼠一般状态

观察各组小鼠体重变化、精神状态、活动度、皮毛及大便性状等情况。

1.5.4 观察小鼠结肠黏膜超微结构变化

将电镜固定液里的结肠组织取出后固定包埋、醋酸铀-柠檬酸铅染色,透射电镜观察小鼠结肠黏膜组织超微结构变化情况。

1.5.5 RT-qPCR 检测 c-jun、c-fos、c-myc、p53、RB1 mRNA 的表达量

取 -80 °C 保存的结肠组织 100 mg,Trizol 提取总 RNA,微分光光度计测定 OD 值,计算所提取的 RNA 的纯度和浓度。通过逆转录将总 RNA 转为互补的 cDNA,后进行 DNA 扩增。逆转录反应条件:25 °C 反应 5 min,55 °C 反应 15 min,85 °C 反应 5 min,共 1 个循环。扩增程序:95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 10 s,60 °C 退火/延伸 30 s,仪器默认程序绘制溶解曲线。以 GAPDH 作为内参基因(引物序列见表 1),CT 值数据以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算,独立样本重复 3 次检测,对 mRNA 相对表达量进行分析。

1.5.6 Western blot 法检测 c-jun、c-fos、c-myc、p53、RB1 蛋白含量表达

取 -80 °C 保存的结肠组织 100 mg,剪碎置于 1.5 mL EP 管中,PBS 漂洗 2 次;加入 RIPA 裂解液(含蛋白磷酸酶抑制剂混合物),匀浆后冰上裂解 30 min;离心取上清液,使用分光光度计对所获得蛋白的浓度进行测定;蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳、转

表 1 各基因 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequence of each gene

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequences(5'→3')	产物长度 Product length(bp)
<i>c-jun</i>	F:TGGGCACATCACCCTACAC R:TCTGGCTATGCAGTTCAGCC	119
<i>c-fos</i>	F:GAGCCTCTGCACAGCAATTC R:ACGTGTAAGTACTGCAGCCC	106
<i>c-myc</i>	F:CCTCGAGCTGTTTGAAGGCT R:AATAGGGCTGTACGGAGTCG	127
<i>p53</i>	F:CTCAGCCTCTTGATGACTGCCA R:GCAGGATATCTTCTGAGGAAGT	118
<i>RB1</i>	F:TTGCATGGCTTTTCAGATTCAAC R:CTGAGAGGACAAGCAGGTTC	94
<i>GAPDH</i>	F:GGTTGTCTCTGCGACTTCA R:TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC	183

膜、5%脱脂奶粉封闭、PBST洗膜,后加c-jun(1:1 000)、c-fos(1:1 000)、c-myc(1:2 000)、p53(1:5 000)、RB1(1:1 000)、GAPDH(1:2 000)一抗,4℃孵育过夜;PBST洗膜4次,8 min/次;用封闭液稀释相应的HRP二抗(1:5 000),将PVDF膜置于二抗中,室温下摇床孵育2 h,PBST洗膜;ECL显色曝光,采用ImageJ 1.8.0软件对条带进行分析,将GAPDH作为内参来计算目的蛋白的相对表达量。

1.5.7 统计学方法

SPSS 25.0 软件对数据统计分析,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用方差分析,方差齐采用LSD法比较,方差不齐采用Tamhane's T2法比较,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠一般状态

如表2、图1所示,K组小鼠精神状态良好,活跃好动,毛发光泽明亮,反应敏捷,大便呈黄褐色颗

粒状,体重增长快。脾虚湿热模型建立后,造模组小鼠倦怠少动,肛周臭秽难闻,大便黏腻。AOM/DSS造模后,M3组小鼠精神萎靡不振,倦怠少动,毛发粗糙枯槁,反应迟钝,大便稀溏,部分出现脓血便,体重在AOM至第1个DSS水循环期间缓慢增长,在第2至第3个DSS水循环DSS自由饮阶段呈下降趋势、饮水阶段有所上升,体重增长慢;各治疗组小鼠精神状态恢复良好,活跃好动,毛发逐渐光泽明亮,反应逐渐敏捷,大便逐渐成形,多为黄褐色颗粒状,体重增长较快,整体状况得到改善,尤以G、Z、Y组较为明显。

2.2 各组小鼠体重变化情况

如图2所示,在AOM/DSS造模过程中,以AOM单次注射开始记为0周,统计了0~8周时间段内各组小鼠的体重变化趋势。K组小鼠体重一直稳步上升,M3组小鼠体重增长缓慢,除D组外,其他各治疗组小鼠体重增长较快。如表3所示,与K组比,

表 2 各组小鼠一般状态

Table 2 General state of mice in each group

组别 Group	精神状态 State of mind	活动度 Degree of motion	毛发色泽 Fur and gloss	反应情况 Condition of reaction	大便性状 Characteristics of stool	体重变化趋势 Trend of weight change
K	良好	好动	光泽明亮	敏捷	颗粒状	增长快
M3	萎靡	少动	粗糙枯槁	迟钝	稀溏,或见脓血便	增长慢
D	较萎靡	较少动	较粗糙枯槁	较迟钝	稀溏,偶见脓血便	增长较慢
Z	较好	较好动	较光泽明亮	较敏捷	多呈颗粒状	增长较快
G	较好	较好动	较光泽明亮	较敏捷	多呈颗粒状	增长较快
Y	较好	较好动	较光泽明亮	较敏捷	多呈颗粒状	增长较快

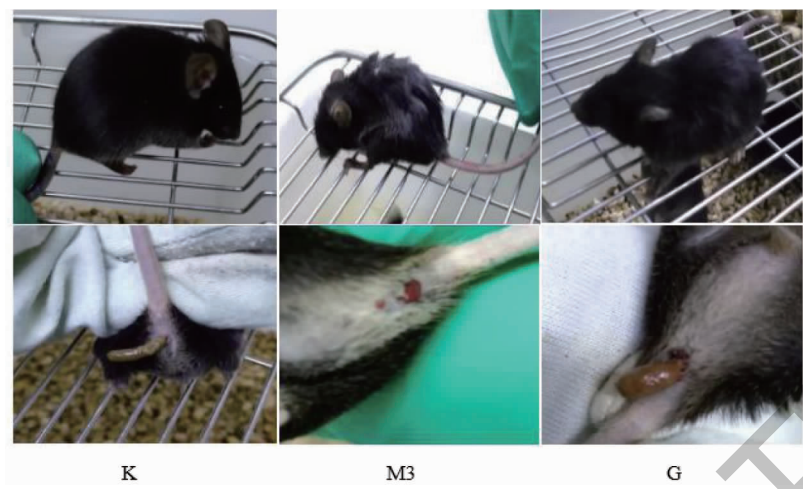


图 1 K、M3、G 三组小鼠一般状态

Fig. 1 General state of mice in groups K, M3 and G

M3 组小鼠 8 周末体重增长量显著降低 ($P < 0.01$)；与 M3 组比, Z、G、Y 组小鼠 8 周末体重增长量显著

升高 ($P < 0.01$)，D 组小鼠 8 周末体重增长量升高不显著 ($P > 0.05$)。

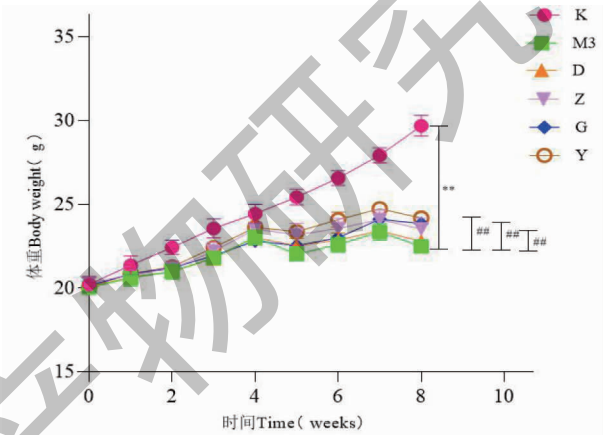


图 2 各组小鼠平均体重变化情况 ($n = 6$)

Fig. 2 Changes in average body weight of mice in each group ($n = 6$)

表 3 各组小鼠 0~8 周体重增长量 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)		
Table 3 Weight gain of mice in each group from 0 to 8 weeks ($\bar{x} \pm s, n = 6$)		
组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	体重增长量 Weight gain (g)
K	-	9.47 \pm 0.15
M3	-	2.47 \pm 0.14 ^{**}
D	7.63	2.70 \pm 0.27
Z	15.26	3.25 \pm 0.34 ^{##}
G	30.52	3.70 \pm 0.14 ^{##}
Y	0.6	4.13 \pm 0.37 ^{##}

注:与 K 组比, ^{**} $P < 0.01$;与 M3 组比, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ 。
Note: Compared with group K, ^{**} $P < 0.01$; Compared with M3 group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$.

2.3 小鼠结肠黏膜超微结构变化

如图 3(红色箭头)所示, K 组小鼠结肠黏膜上皮细胞大小一致、排列整齐、结构完整, 细胞核大小一致, 染色质分布均匀。与 K 组比, M1 组小鼠结肠黏膜上皮细胞核体积略有增大; M2 组小鼠结肠黏膜上皮细胞核不规则, 染色质分布不均匀; M3 组小鼠结肠黏膜上皮细胞大小不等, 见明显核仁。与 M3 组比, G、Z、Y 组小鼠结肠黏膜上皮细胞排列不甚规则, 染色较均匀; D 组小鼠结肠黏膜上皮细胞排列不规则, 核浆比值增大, 染色质分布于核膜下, 可见核仁。如图 4(蓝色箭头)所示, K 组小鼠结肠黏膜上皮细胞未见明显核仁, 线粒体、内质网和高尔基体清晰可见, 未见异常增生、肿胀。与 K 组比, M1 组小

鼠结肠黏膜上皮细胞核内个别线粒体和内质网略有增生;M2 组小鼠结肠黏膜上皮细胞核内线粒体、内质网、高尔基体增生、肿胀;M3 组小鼠结肠黏膜上皮细胞核内线粒体、内质网、高尔基体大量增生、肿胀,

线粒体可见嵴断裂。与 M3 组比,G、Z、Y 组小鼠结肠黏膜上皮细胞核内线粒体、内质网、高尔基体稍有肿胀;D 组小鼠结肠黏膜上皮细胞核内线粒体、高尔基体,粗面内质网仍肿胀。

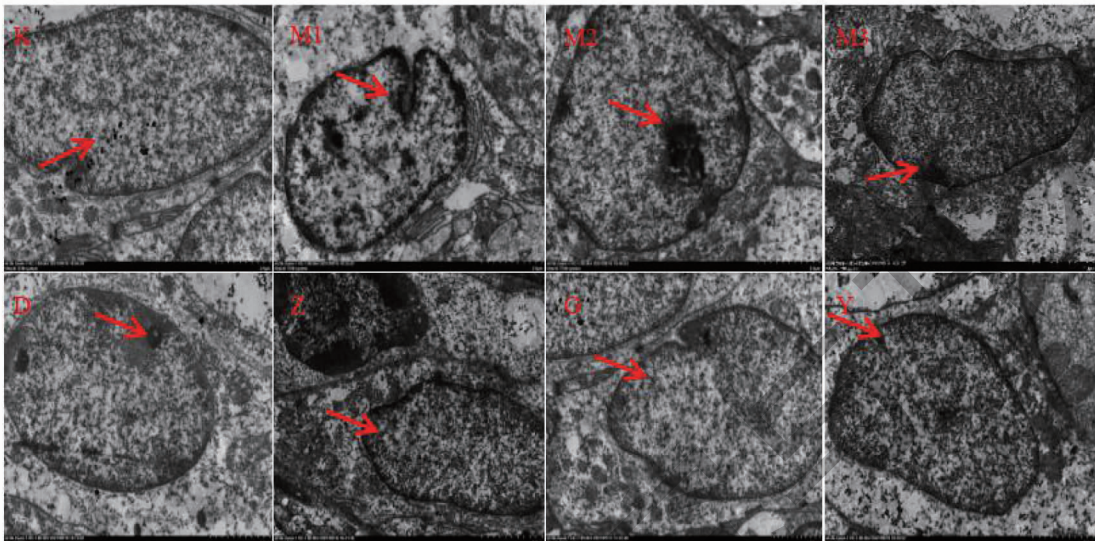


图 3 各组小鼠结肠黏膜超微结构变化

Fig. 3 Ultrastructural changes of colonic mucosa in each group

注:G 组放大倍数为 3 000,其余各组放大倍数为 4 000。Note:Magnification of G group was 3 000,and other groups was 4 000.

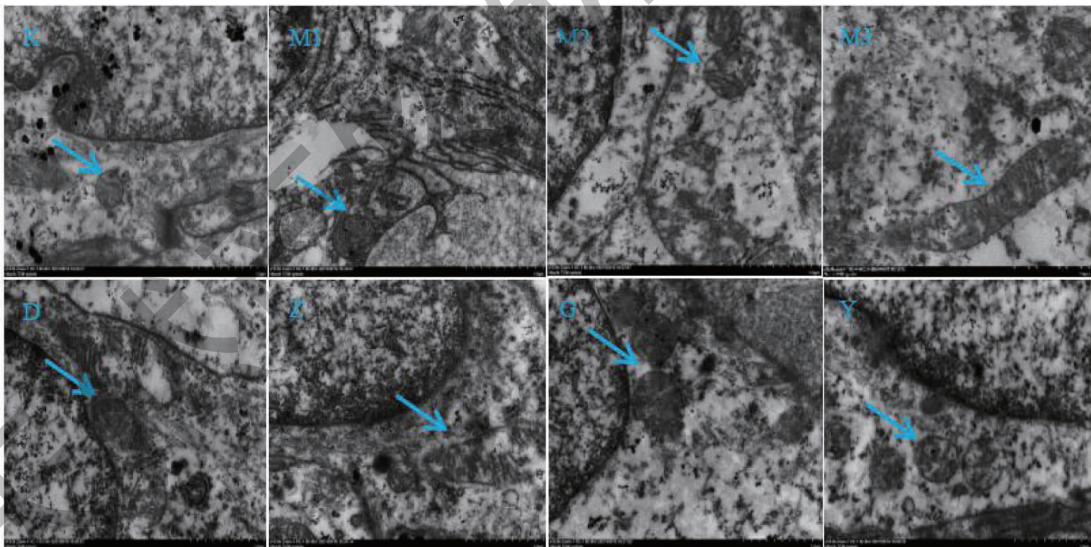


图 4 各组小鼠结肠黏膜超微结构变化(×10 000)

Fig. 4 Ultrastructural changes of colonic mucosa in each group (×10 000)

2.4 葛花解醒汤对小鼠结肠组织 *c-jun*、*c-fos*、*c-myc*、*p53*、*RB1* mRNA 表达的影响

如图 5 所示,与 K 组比,M3 组小鼠结肠组织中 *c-jun*、*c-fos*、*c-myc* mRNA 表达显著升高($P<0.01$), *p53*、*RB1* mRNA 表达显著降低($P<0.01$)。与 M3

组比,G、Z、Y 组小鼠结肠组织中 *c-jun*、*c-fos*、*c-myc* mRNA 表达显著降低($P<0.01$), *p53*、*RB1* mRNA 表达显著升高($P<0.01$),D 组小鼠结肠组织中 *c-jun*、*c-myc* mRNA 表达差异不显著($P>0.05$)。

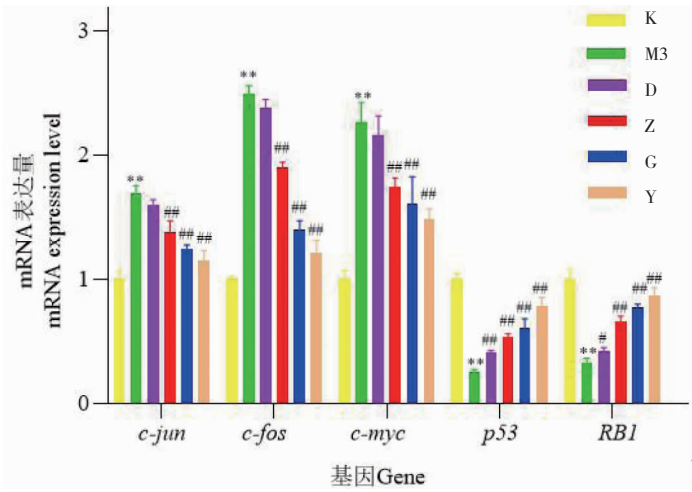


图5 各组小鼠结肠组织中 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Comparison of mRNA expression in colon tissues of mice in each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与 K 组比, ** $P < 0.01$;与 M3 组比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。Note: Compared with group K, ** $P < 0.01$; Compared with M3 group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

2.5 葛花解酲汤对小鼠结肠 c-jun、c-fos、c-myc、p53、RB1 蛋白表达的影响

如图 6、7 所示,与 K 组小鼠比,M3 组小鼠结肠组织中 c-jun、c-fos、c-myc 蛋白表达显著升高($P < 0.01$),p53、RB1 蛋白表达显著降低($P < 0.01$);与

M3 组小鼠比,G、Z、Y 组小鼠结肠组织中 c-jun、c-fos、c-myc 蛋白表达显著下降($P < 0.01$),p53、RB1 蛋白表达显著升高($P < 0.01$);D 组小鼠结肠组织中 c-jun 蛋白表达差异无显著性($P > 0.05$)。

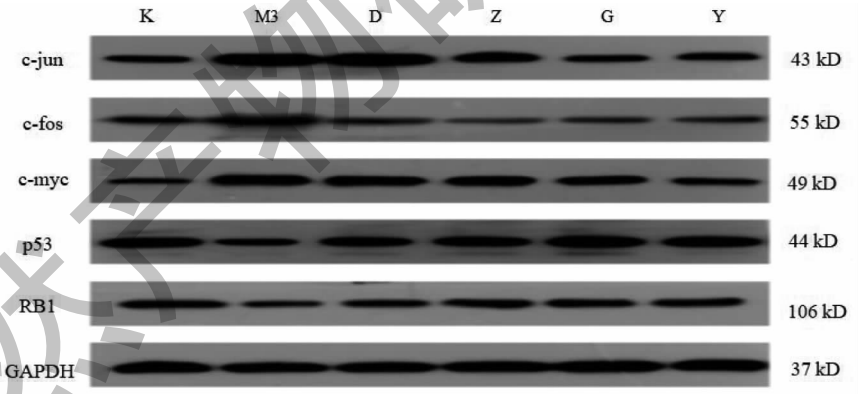


图6 各组小鼠结肠组织 c-jun、c-fos、c-myc、p53、RB1 蛋白的表达

Fig. 6 Expression of c-jun, c-fos, c-myc, p53 and RB1 in colon tissue of mice in each group

3 讨论与结论

UCAC 是在 UC 持续反复刺激下逐渐形成的^[2]。炎症进展为肿瘤的过程包含着复杂的生物学过程,研究者认为体内原癌基因的过度激活和抑癌基因的失活是导致肿瘤形成的本质原因^[5]。即癌变的过程涉及细胞癌基因和抑癌基因的变化。原癌基因是存在于动物基因组中的细胞癌基因,是与细胞增殖密切相关的基因,若原癌基因过度表达,细

胞会因过度增殖而形成肿瘤;抑癌基因亦称抗癌基因,是细胞增殖生物过程的负向调节因子^[13]。有研究显示,与结直肠癌相关的原癌基因典型代表包括有 c-jun、c-fos、c-myc,与结直肠癌相关的抑癌基因典型代表包含有 p53、Rb 基因^[14]。c-jun、c-fos 和 c-myc 均属 myc 基因家族,其可促进细胞增殖,对肿瘤的形成起着重要作用^[15]。c-fos 和 c-jun 均为立早基因,激活的 c-fos 和 c-jun 以 c-jun/c-fos 二聚体或 c-jun

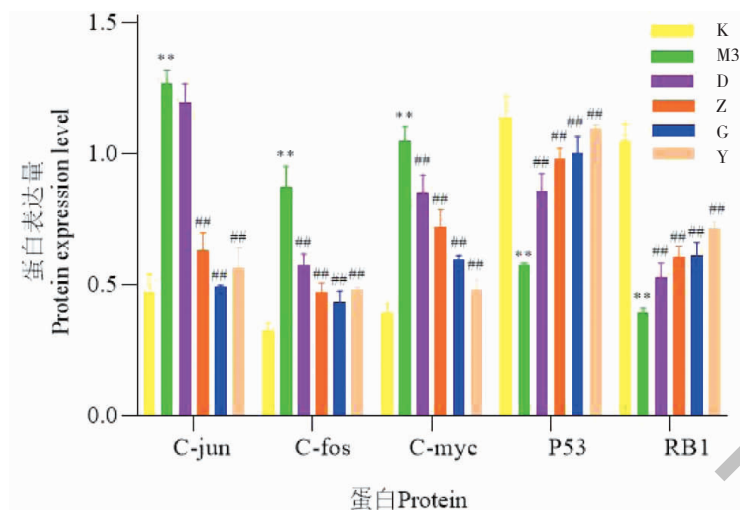


图7 各组小鼠结肠组织中各蛋白表达比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Comparison of protein expression in colonic tissues of each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与K组比, ** $P < 0.01$;与M3组比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。Note: Compared with group K, ** $P < 0.01$; Compared with M3 group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

同二聚体形式构成 *AP-1*, *AP-1* 诱导相应癌基因表达,促使细胞发生恶性转化^[16,17]。*p53* 基因是一种抑癌基因,它通过负向调控细胞周期以调节细胞的增殖分化,当其发生缺失或突变,便可促使细胞无限制生长,引起肿瘤的发生^[18],且有研究显示 *p53* 基因发生突变是 UC 癌变的最关键因素^[19,20]。视网膜母细胞瘤基因 1 (*RB1*) 是人类分离的第一个克隆抑癌基因。已有研究显示, *RB1* 基因参与细胞周期调控、细胞凋亡等生物学过程,且 *pRB* 诱导细胞凋亡是通过抑癌基因 *p53* 激活实现的。在细胞凋亡过程中, *pRB* 有着双向调节作用。一方面,若细胞发生癌变, *pRB* 通过 *p53* 途径启动凋亡程序使恶性细胞发生凋亡;另一方面,若某些因子过度表达或促凋亡蛋白表达时, *pRB* 通过与这些蛋白相互作用,使细胞进行正常的增殖^[21,22]。

在整个结肠炎-癌转化过程中,其病机可归结为脾虚不健、湿热蕴结肠道。许多研究者认为结肠炎-癌转化的病机以脾虚湿热为主。如 Li 等^[7] 认为脾虚湿热是炎性肠癌的主要病机。Fan 等^[23] 认为脾胃虚弱为结肠癌前病变的发病之本。Yan 等^[24] 认为湿热阻滞肠道为其致病之标。Wang 等^[25] 认为湿热蕴结证是肠癌实证的主要证型。葛花解醒汤,又叫“葛花解酒汤”“解醒汤”,出自金元时期李东垣的《脾胃论》,以“饮酒过伤”著称^[26]。在《脾胃论》中对葛花解醒汤的方药组成、方药用量及其主治疾病进行了描述。其云:“青皮三分,木香五分,橘皮、人

参、猪苓、茯苓各一钱五分,神曲炒黄色、泽泻、干生姜、白术各二钱,白豆蔻仁、葛花和砂仁各五钱……但得微汗,酒病去矣。”葛花解醒汤是治疗酒伤之症的代表性方剂。有研究者认为伤“酒”之症,病机可概括为脾胃虚弱、湿热内停^[9]。方中葛花甘寒芳香,为解酒醒脾之良品,且清轻发散,能促使酒湿从表而解,为君药。汉代《医方集解》关于葛花的记载有:“此手足阳明药也。过饮无度,湿热之毒积于肠胃,葛花独入阳明,使湿热从肌肉而解。”神曲消炙腻之积;白蔻、砂仁燥湿和胃;茯苓、白术、泽泻、猪苓健脾利湿,使湿热从小便中走;青皮、橘红、木香行气和胃,行酒食之滞,气行则津布,津布则湿化,以达到除湿疏滞的目的;干姜温运利水;人参益气防辛散太过。总之,葛花解醒汤上以发散、下以利水、中有理气以醒脾,且有健脾助运化之功,是以利水渗湿、发散酒湿热邪、理气醒脾、健脾益气为法合而成方,通过葛花组、理气组、健脾组、利水组、温中组中药的严谨配伍,共奏温脾胃、消酒积、利湿清热之力。总之,葛花解醒汤的病机理论包括本虚标实、寒热错杂、气机升降失调,是集消补兼顾、温清并施、益气行气于一体的方剂^[8,27]。因此,本研究选用葛花解醒汤干预脾虚湿热型 UCAC 小鼠,以探究葛花解醒汤对结肠炎-癌转化进程发挥的作用机制。

本研究结果显示,模型组小鼠结肠组织 *c-jun*、*c-fos*、*c-myc* 蛋白表达量较空白组均明显升高, *p53*、*RB1* 蛋白表达量较空白组均明显降低; *c-jun*、*c-fos*、*c-*

myc mRNA 表达明显升高, *p53*、*RB1* mRNA 表达量较空白组均明显降低;经各给药组治疗后,小鼠结肠组织 *c-jun*、*c-fos*、*c-myc* 蛋白表达量均明显降低, *p53*、*RB1* 蛋白表达量均明显升高; *c-jun*、*c-fos*、*c-myc* mRNA 表达明显降低, *p53*、*RB1* mRNA 表达量明显升高,且以葛花解酲汤高、中剂量组、美沙拉嗪组更为显著。葛花解酲汤不仅能够改善模型小鼠精神、饮食量、体质量、活动度等一般情况,对小鼠结肠黏膜也有所改善,并可影响相关原癌基因和抑癌基因的表表达量,调控细胞增殖和细胞凋亡等过程。

综上所述,葛花解酲汤可延缓 UC-UCAC 转化进程,预防 UCAC 的发生,其可能通过减少原癌基因的表达,促进抑癌基因的激活,调控细胞增殖和细胞凋亡等生物过程,防治肿瘤的形成,延缓结肠炎-癌的转化进程。

参考文献

- 1 Wu KN, Liang YN, Zhang DB, et al. Protective effects of cinnamaldehyde on DSS induced UC mice [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2021, 33: 1-7.
- 2 Ma QL, Du LD, Zang KH, et al. Overview of research progress in ulcerative colitis [J]. J Med Forum(医药论坛杂志), 2020, 41: 175-177.
- 3 Li JN. Research progress in the carcinogenesis mechanism of ulcerative colitis: from inflammation to tumor [J]. Chin J Digest(中华消化杂志), 2011, 31: 183-186.
- 4 Lv ZL, Chen GJ. Progresses of research on mechanism of carcinogenesis in ulcerative colitis [J]. Chin J Cancer Biother(中国肿瘤生物治疗杂志), 2016, 23: 852-857.
- 5 Li HL, Shao CH, Zhou RY, et al. Latest progress of the tumor suppressor gene and oncogene [J]. Basic Clin Med(基础医学与临床), 2018, 38: 1029-1033.
- 6 Shao WL, Xie B, Yao LL, et al. Research progress of colitis-related precancerosis of colonic carcinoma [J]. J Jiangxi Univ Chin Med(江西中医药大学学报), 2010, 22: 87-91.
- 7 Li WD, Hua BJ. The mechanism of TCM regulating oxidative stress in preventing enteritis carcinogenesis [J]. J J Tradit Chin Med(中医杂志), 2017, 58: 2059-2064.
- 8 Wang Q, Tang DX, Long FX, et al. Research progress of Gehua Jiecheng Decoction on the prevention and treatment of liver diseases [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm(中国民族民间医药), 2017, 26: 67-69.
- 9 Dang CJ, Zhong X. Discussion on the traditional Chinese medicine theory of Gehua alcoholic decoction in the treatment of "wound wine" disease [J]. Tradit Chin Med Res(中

- 医研究), 2015, 28: 4-5.
- 10 Liu XS, Huang SM, Li Z, et al. Study on the mechanism of reserpine induced spleen deficiency in animals [J]. Chin J Med(中国医药学报), 1989, 4: 68-70.
- 11 Dai SX, Zheng XB, Ye QL, et al. Experimental study on animal model of damp-heat ulcerative colitis [J]. Yunan J Tradit Chin Med Mater Med(云南中医中药杂志), 2007, 28: 37-39.
- 12 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: 1998-2004.
- 13 Feng HT, Xiao YJ. An overview of the causes of cell carcinogenesis [J]. Biol Teach(生物学教学), 2019, 44: 4-6.
- 14 Ma SC, Wu LP, Zhao HW, et al. Research current situation and progress on proto-oncogenes and suppressor genes related to colorectal cancer [J]. Hebei Med J(河北医药), 2019, 41: 2210-2215.
- 15 Deng JY, Bi MG. Research progress in influencing factors of proto-oncogene *c-myc* [J]. Tumor(肿瘤), 2009, 29: 1176-1179.
- 16 Wagstaff S C, Bowler W B, Gallagher J A, et al. Extracellular ATP activates multiple signalling pathways and potentiates growth factor-induced *c-fos* gene expression in MCF-7 breast cancer cells [J]. Carcinogenesis, 2000, 21: 2175-2181.
- 17 Feng D Y, Zheng H, Tan Y, et al. Effect of phosphorylation of MAPK and Stat3 and expression of *c-fos* and *c-jun* proteins on hepatocarcinogenesis and their clinical significance [J]. World J Gastroenterol, 2001, 7: 33-36.
- 18 Dong L, Qian Z, Shi RR, et al. Expression of *p53*, *HER-2* and *Ki-67* in colorectal cancer and their clinical significance [J]. Chin J Diagn Pathol(诊断病理学杂志), 2015, 22: 19-22.
- 19 Li XN, Chen J, Wang Y, etc. Molecular biological mechanism of carcinogenesis in ulcerative colitis [J]. Chin J Integr Tradit West Med Digest(中国中西医结合消化杂志), 2008, 16: 276-279.
- 20 Tang K, Wang JG. Research progress of inflammatory bowel disease complicated with colorectal cancer [J]. Clin Educ Gene Pract(全科医学临床与教育), 2010, 8: 647-650.
- 21 Liu SH, Wang SZ, Zhang H, et al. Research advances on *RB1* gene [J]. Hereditas(遗传), 2010, 32: 1097-1104.
- 22 Polyak K, Xia Y, Zweier JL, et al. A model for *p53*-induced apoptosis [J]. Nature, 1997, 389: 300-305.
- 23 Fan YL, Chen XY. Research progress on the relationship between spleen deficiency syndrome and immune system in recent 10 years [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med(中国中医药信息杂志), 2001, 8: 25-27.