



DOI:10.12404/j.issn.1671-1815.2404123

引用格式:蔡蓉,王上,肖柳,等.基于 Wnt/ β -catenin 通路探讨葛根芩连汤对结直肠肿瘤生长的影响和机制[J].科学技术与工程,2025,25(8):3142-3151.

Cai Rong, Wang Shang, Xiao Liu, et al. Exploring the effect and mechanism of Gegen Qinlian Decoction on colorectal cancer based on Wnt/ β -catenin pathway[J]. Science Technology and Engineering, 2025, 25(8): 3142-3151.

医药、卫生

基于 Wnt/ β -catenin 通路探讨葛根芩连汤对结直肠肿瘤生长的影响和机制

蔡蓉¹, 王上¹, 肖柳², 周燕萍¹, 胡作为², 李云海^{1*}

(1. 湖北中医药大学中医学学院, 武汉 430061; 2. 湖北中医药大学附属中西医结合医院, 武汉 430022)

摘要 基于 Wnt/ β -catenin 通路探究葛根芩连汤(Gegen Qinlian Decoction, GQD)对结直肠癌的抗肿瘤作用及对胞质分裂的蛋白质调节因子 1(protein regulator of cytokinesis 1, PRC1)核易位的影响。采用 BALB/c 裸鼠皮下接种 CT26 结直肠癌细胞株制备结直肠肿瘤体内模型,分别按低(L-GQD)、中(M-GQD)及高(H-GQD)剂量连续灌药干预 25 d,模型组(Control)作为空白对照,并记录裸鼠皮下肿瘤生长变化,于末次给药后取出肿瘤后观察。苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining, HE)、免疫组化(immunohistochemistry, IHC)和原位末端转移酶标记技术(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)检测肿瘤的增殖和凋亡情况,并通过 qRT-PCR 和蛋白质免疫印迹分析(western blot, WB)检测 Wnt/ β -catenin 信号及其下游因子的表达变化;此外, WB 检测 GQD 对 PRC1 的磷酸化水平其亚细胞定位的影响。结果表明:相较于 Control 组, GQD 以剂量依赖方式抑制体内结直肠肿瘤的生长并提高其凋亡水平; IHC 结果显示 GQD 下调了增殖相关蛋白细胞周期蛋白 D1(CyclinD1)、增殖标志物 Ki-67(Ki67)和血小板-内皮细胞黏附分子(CD31)的表达($P < 0.05$),同时促进了凋亡相关蛋白胱天蛋白酶 3(Caspase 3)和胱天蛋白酶 9(Caspase 9)的表达($P < 0.05$);进一步发现 GQD 可抑制 Wnt/ β -catenin 信号的激活,推测可能与降低 PRC1 磷酸化水平并增加其核保留比例有关。GQD 可显著抑制结直肠肿瘤的增殖并促进其凋亡, GQD 还可抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活,且可能与介导 PRC1 的核易位有关。

关键词 葛根芩连汤(GQD); 结直肠癌(CRC); Wnt/ β -catenin 信号; 蛋白质调节因子 1(PRC1)

中图分类号 R273; 文献标志码 A

Exploring the Effect and Mechanism of Gegen Qinlian Decoction on Colorectal Cancer Based on Wnt/ β -catenin Pathway

CAI Rong¹, WANG Shang¹, XIAO Liu², ZHOU Yan-ping¹, HU Zuo-wei², LI Yun-hai^{1*}

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, China;

2. Affiliated Hospital of Traditional Chinese and Western Medicine of Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430022, China)

[Abstract] Based on the Wnt/ β -catenin pathway, to investigate the anti-tumor effect of Gegen Qinlian Decoction (GQD) on colorectal cancer and its effect on nuclear translocation of protein regulator of cytokinesis 1 (PRC1). BALB/c nude mice were subcutaneously inoculated with the CT26 colorectal cancer cell line and divided into GQD low(L-GQD), medium(M-GQD), and high(H-GQD) dose groups, with the model group serving as the control. The mice were administered the drug daily for 25 days, and the growth of the tumors was recorded. Following the conclusion of the previous administration, the tumor was surgically excised and subjected to subsequent observation. The proliferation and apoptosis of the tumor were assessed using hematoxylin-eosin staining(HE), immunohistochemistry(IHC), and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling(TUNEL) staining techniques, while the Wnt/ β -catenin pathway was examined through qRT-PCR and western blot(WB) analysis. Furthermore, alterations in the expression of catenin signals and downstream factors were investigated. In addition, WB was used to detect the effects

收稿日期: 2024-06-03; 修订日期: 2025-01-03

基金项目: 湖北省教育厅科学技术研究项目(Q20232011); 湖北省自然科学基金联合基金(2024AFD308); 湖北省中医药管理局重点学科建设项目([2023]-2号)

第一作者: 蔡蓉(1986—), 女, 汉族, 湖北汉川人, 博士研究生, 讲师。研究方向: 中医药防治肿瘤。E-mail: cairong1009@163.com。

* 通信作者: 李云海(1971—), 男, 汉族, 江西九江人, 教授, 博士研究生导师。研究方向: 中医经典理论与临床研究。E-mail: 155350975@qq.com。

of GQD on the phosphorylation level of PRC1 and its subcellular localization. Compared with the model group, GQD inhibited the growth and increased the apoptosis level of colorectal tumors *in vivo* in a dose-dependent manner. IHC results show that GQD down-regulated the expressions of proliferation-related proteins cyclin1, marker of proliferation Ki-67 (Ki67), and platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) ($P < 0.05$), and promoted the expressions of apoptosis-related proteins Caspase 3 and Caspase 9 ($P < 0.05$). GQD is further found to inhibit the activation of Wnt/ β -catenin signaling, which may be related to the reduction of PRC1 phosphorylation level and the alteration of its nuclear retention ratio. This inhibition of Wnt/ β -catenin signaling by GQD is closely associated with the suppression of colorectal tumor proliferation and the promotion of apoptosis. Moreover, GQD may involve in mediating nuclear translocation of PRC1.

[**Keywords**] gegen qinlian decoction(GQD); colorectal cancer(CRC); Wnt/ β -Catenin signal; protein regulator of cytokinesis 1(PRC1)

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是一种常见的消化道恶性肿瘤。最新全球癌症统计数据表明,CRC的新发病例已超过190万,死亡人数超过93.5万人,约占所有癌症病例和死亡人数的1/10,位列所有癌症发病率第三,且死亡率第二^[1]。而在中国,CRC的发病率呈逐年上升趋势,患者趋向年轻化,造成严重的医疗和经济负担^[2]。目前,CRC的治疗方式以手术、化疗和靶向治疗为主,其中手术对早期CRC治疗具有良好效果,但不适宜治疗晚期转移性的CRC患者^[3];而化疗的副作用则易降低患者的依从性和生活质量,特别会对晚期老年CRC患者造成极大的身体负担^[4];靶向药物治疗尽管具有针对性强和副作用小等优势,但药物开发通常较为漫长,且对复杂病情的患者治疗存在一定局限性^[5]。因此,迫切需要探索更为有效的CRC治疗方案。

细胞分裂的蛋白质调节因子1(protein regulator of cytokinesis 1,PRC1)是一种微管相关蛋白调节因子,其高表达与CRC患者的预后不良有关^[6],但在CRC中的研究十分有限。据报道,PRC1的上调可增强体内肿瘤的增殖和转移能力,且其表达与Wnt信号通路显著相关^[7];机制上,PRC1磷酸化激活后易位至细胞核,以抑制大量的非家族特异性转录因子,从而维持Wnt/ β -catenin的转录活性^[8],而这种激活可加大癌细胞的干性并最终促进癌症的发展。Wnt/ β -catenin信号是一种生长调节通路,与干细胞状态维持、细胞更新和成体组织稳态等各种生物过程密切相关。已有大量研究证实,Wnt/ β -catenin信号通路是治疗CRC的靶向关键点^[9-10]。综上可知,PRC1可能在促进Wnt驱动的CRC发生中有着重要地位。

研究表明,中药在治疗癌症中具有重要作用^[11],特别是中药复方可对CRC产生多靶点效应,最大限度地减少常规治疗方式引起的毒副作用,并延长CRC患者的生存期^[12]。葛根芩连汤(Gegen Qinlian Decoction,GQD)是一种由葛根、黄芩、黄连、甘草4味药材组成的经典重要复方药剂,在临床上常用于治疗急性肠炎、糖尿病等疾病,临床应用范

围广,可异病同治^[13]。研究表明,GQD可通过调节肠道微生物提高结直肠癌患者的免疫力^[14],且可重塑肿瘤微环境,增强程序性细胞死亡1(programmed cell death 1,PD-1)对结直肠癌的治疗效果^[15];GQD还可对缓解CRC耐药具有潜在价值^[16]。研究发现,GQD中的活性成分葛根素、汉黄芩素、小檗碱和甘草次酸等对CRC中Wnt信号通路的靶点有协同抑制作用^[17]。但目前GQD针对结直肠癌发展的分子机制仍需深入探究。课题组前期通过GO富集分析发现,GQD与微管结合等分子功能和有丝分裂等生物过程极其相关,这可能受PRC1所调控^[18]。因此,推测GQD可能通过调控PRC1介导的Wnt/ β -catenin通路影响CRC的进展,但并未见相关报道。鉴于此,以结肠癌CT26荷瘤裸鼠为研究对象,基于探究GQD对结直肠肿瘤增殖及凋亡的影响,并观察PRC1磷酸化及核易位的变化,阐明GQD对结直肠癌的抑癌机制,为GQD治疗CRC提供可靠的理论依据。

1 实验材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 细胞和动物

小鼠结肠癌细胞株CT26购买于中国科学院上海细胞生物研究所。25只6周龄的SPF级BALB/c裸鼠,体重20~23g,皆购于湖北中医药大学(动物许可证号:SYXK(鄂)2017—0067)。饲养于湖北中医药大学SPF级动物房中,温度为(22±2)℃,湿度为50%~60%,分笼饲养适应1周。动物实验开展许可已由湖北中医药大学机构动物护理和使用委员会批准(实验伦理号:HUCMS 202112001)。

1.1.2 主要试剂

RPMI1640培养基(批号:12633012)及胎牛血清(批号:42F7180K)购自美国Gibco公司;Perfect-Start Green qPCR SuperMix(批号:AQ601-04)购自北京全式金公司;RevertAid Reverse Transcriptase(批号:EP0441)和NE-PER试剂盒(批号:78833)购自美国Thermo公司;TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(显

色法)(批号:C1098)和BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号:P0012)购自上海碧云天公司;抗体 Caspase 3(批号:ab184787)、Caspase 9(批号:ab202068)、CyclinD1(批号:ab16663)、Ki67(批号:ab15580)、CD31(批号:ab182981)、PRC1(批号:ab51248)、p-PRC1(批号:ab62366)、Lam B(批号:ab133741)、 β -catenin(批号:ab265591)购自英国 Abcam 公司。

1.1.3 仪器

主要仪器:SW-CJ-1FCDJ型超净工作台(苏杭科技器材公司),水平摇床(型号:STS-2),2300型CO2细胞培养箱(美国谢尔登公司)购于上海琪特分析仪器有限公司;CR21GII型台式高速冷冻离心机(日本日立 HITACHI 公司),快速转膜仪(伯乐生命科学产品(上海)有限公司);化学发光仪(上海勤翔科学仪器有限公司,型号610020-9Q);DYY-4C电泳仪(北京市六一仪器厂);5700型荧光定量PCR仪(ABI公司);JSM-6510LV显微镜(日本电子 JEOL 公司)。

1.2 药物制备

葛根芩连汤中药饮片购自湖北中医药大学国医堂。葛根芩连汤方药组成为:葛根 15 g,黄芩 9 g,黄连 9 g,甘草 6 g。葛根加冷水浸泡 30 min 后,再加入总药量 10 倍量水先煎煮 20 min,之后加入黄芩,黄连和甘草共同煎煮 20 min;依上反复煎煮 2 次,将两次煎煮出的药液混合、过滤,分装保存。其中含生药量分别为 5、10、20 g/kg,按含药量来设置分组,分为葛根芩连汤低(记为 L-GQD)、中(记为 M-GQD)和高(记为 H-GQD)剂量组;药液于 4 °C 冷藏备用。

1.3 造模与给药

复苏并培养 CT26 小鼠结肠癌细胞至对数生长期,每只裸鼠右前肢背部皮下注射细胞密度为 1×10^7 个/mL 的 0.2 mL 细胞悬液进行接种,接种 7 d 并可见平均直径约 5 mm 肿瘤视为造模成功。将 CT26 荷瘤裸鼠随机分为 4 组,每组 5 只,分为 Control 组(等量生理盐水)、L-GQD 组(5 g/kg)、M-GQD 组(10 g/kg)和 H-GQD 组(20 g/kg),采用灌胃给药的方式,每天一次给药,周期为 25 d,观察并记录裸鼠体内肿瘤变化情况。

1.4 组织学观察

给药结束后,先对动物进行了麻醉处理,确认小鼠处于深麻状态后,再执行颈椎脱臼法处死并解剖,以取出全部肿瘤组织,观察肿瘤浸润情况,将其放于白色背景下直尺旁拍照。取部分各组裸鼠肿瘤组织,于 4% 多聚甲醛中固定,48 h 后经过修块、脱水、浸蜡、包埋、切片(4 ~ 5 μ m 厚度),制成石蜡

切片。按照苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining, HE)进行染色,脱蜡、梯度乙醇水化,苏木素染色、冲洗、脱水、封片。最后于显微镜下观察结构变化,并采集图像。

1.5 免疫组化(immunohistochemistry, IHC)

对石蜡切片脱蜡至水,切片于抗原修复缓冲液中处理,烤片 30 min 以抗原修复,3% H_2O_2 中孵育 25 min,滴加 3% 牛血清蛋白(BSA)封闭后,分别加入待检蛋白一抗,稀释比为 1:200 在 4 °C 孵育过夜,于 37 °C 温箱孵育二抗,30 min 后进行二氨基联苯胺(DAB)显色。苏木素染液复染、脱水,树胶封片。显微镜下检测 Caspase 3、Caspase 9、CyclinD1、Ki67 和 CD31 染色情况,用 Image J 测定每张片子的面积积分光密度(IOD)以确认阳染情况,表示单位面积蛋白表达水平。

1.6 原位末端转移酶标记技术

取上述包埋好的组织进行切片,之后按照原位末端转移酶标记技术(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling, TUNEL)细胞凋亡试剂盒的操作进行染色,用蛋白酶 K 修复,37 °C 反应 10 min, PBS 反复浸洗。取适量 TdT 和 dUTP(1:9)混合后覆盖组织,湿盒中 37 °C 避光反应 30 min, PBS 浸洗 3 次。每个样本滴加 50 μ L DAB 显色工作液,室温显色,再经过复染、分化返蓝、脱水、透明,封片后使用光学显微镜观察凋亡细胞。每张切片选择 3 个视野,用 Image J 软件中 IHC Profiler 插件对每张视野的染色情况进行自动化评分。

1.7 逆转录聚合酶链式反应

采用 TRIzol 试剂从肿瘤组织中提取总 RNA,使用反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA,并使用 SYBR Green 法进行扩增,进行逆转录聚合酶链式反应(qRT-PCR)分析。引物序列如表 1 所示,反应条件:95 °C 预变性 3 min, 95 °C 15 s, 60 °C 40 s, 共 40 个循环。使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 公式计算 RNA 的相对表达水平。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of qRT-PCR

引物	引物序列(5'→3')
h-Wnt-F	CCTCCACGAACCTGCTTACA
h-Wnt-R	GTFTCTCGACAGCCTCGGTT
h- β -catenin-F	CTGAGGAGCAGCTTCAGTCC
h- β -catenin-R	ACTCCATCAAATCAGCTTGAGTA
h-CD44-F	ACAGCAACCAAGAGGCAAGA
h-CD44-R	TGGTGTGGTTGAAATGGTGC
h-CD133-F	CGGGTGCACGGGATGGT
h-CD133-R	GTTCTCTGGGCAGAAGAGGAG
h-GAPDH-F	CTGACTTCAACAGCGACACC
h-GAPDH-R	GTGGTCCAGGGGCTTACTC

1.8 蛋白质免疫印迹分析 (western blot, WB)

称取肿瘤组织 0.1 g, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤一次, 加入 RIPA 蛋白裂解液 200 μ L 后提取总蛋白; 此外, 按照细胞核和细胞质提取试剂 (NE-PER) 盒说明书提取细胞核和细胞质蛋白。采用 BCA 蛋白浓度测定法进行蛋白定量后, 取蛋白 50 μ g 上样, 凝胶电泳后转膜, 封闭后分别依次孵育一抗和二抗, 化学发光仪器显影, 结合灰度分析法分别检测 β -catenin、PRC1 和 p-PRC1 的蛋白表达水平。

1.9 数据处理与分析

采用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计分析, 单因素方差分析法进行多组比较, 两两比较采用 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 视为有统计学意义。

2 实验结果

2.1 GQD 处理对体内 CRC 肿瘤生长的影响

CT26 荷瘤裸鼠按对应剂量, 每日灌胃 GQD 后观察其生理状况; 各组肿瘤生长曲线如图 1(a) 所示, 从 0 d 开始计算, 发现第 5、10、15、20 天的肿瘤大小随时间变化上升, 与对照组相比, 荷瘤裸鼠服用 GQD 后, 肿瘤生长速度减慢; 待 25 d 后, L-GQD、M-GQD 和 H-GQD 组的肿瘤体积均显著小于 Control 组 ($P < 0.05$)。取出肿瘤对其观察发现 [图 1(b)], GQD 处理后肿瘤的体积显著降低。对各组肿瘤质量比较发现, 与 Control 组相比 [图 1(c)], L-GQD、M-GQD 和 H-GQD 组的肿瘤质量均显著小于 Control 组 ($P < 0.05$)。结果表明, GQD 对体内 CRC 肿瘤的生长存在显著抑制作用。

2.2 GQD 对体内 CRC 肿瘤病理变化的影响

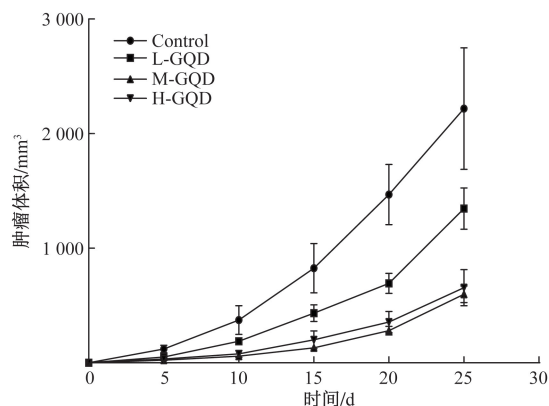
通过 HE 染色观察 GQD 对 CT26 肿瘤病理形态学变化的影响, 如图 2 所示, 肿瘤坏死程度随药物剂量加重。Control 组中癌细胞出现明显的细胞异型性, 核增大伴深色染色, 且核膜不规则。而随加入 GQD 剂量的增加, CRC 肿瘤中的癌细胞密度显著降低, 体积减小, 并观察到病理性核运动。其中, 在 H-GQD 组中肿瘤坏死面积显著增加。这些观察结果进一步证实了 GQD 具有体内抗肿瘤活性。

2.3 GQD 对体内 CRC 肿瘤凋亡的影响

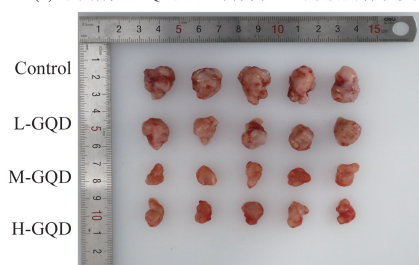
如图 3 所示, TUNEL 染色显示, 相较于 Control 组, 肿瘤中的凋亡情况随着 GQD 的剂量升高而显著增加 ($P < 0.05$), 说明 GQD 可以促进体内结直肠肿瘤的凋亡水平。

2.4 GQD 对体内 CRC 肿瘤中增殖和凋亡相关蛋白表达的影响

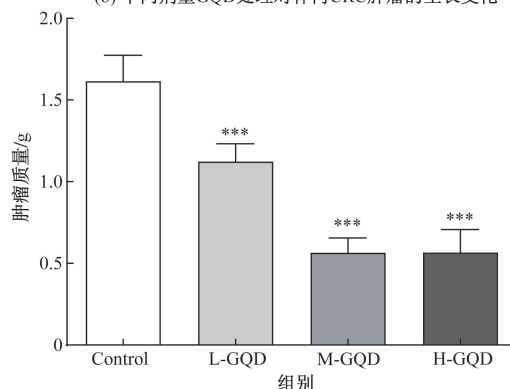
IHC 检测 Caspase 3、Caspase 9、CD31、Cyclind1 和 Ki67 在肿瘤组织的表达情况 (图 4)。相较于



(a) 不同剂量GQD处理对体内CRC肿瘤的体积变化



(b) 不同剂量GQD处理对体内CRC肿瘤的生长变化



(c) 不同剂量GQD处理对体内CRC肿瘤的重量变化

与 Control 组相比, * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$, *** 表示 $P < 0.001$

图 1 不同剂量 GQD 处理对体内 CRC 肿瘤中体积和质量的影响
Fig. 1 Effect of different doses of GQD treatment on volume and weight in CRC tumors *in vivo*

Control 组, 与凋亡相关的标志物 Caspase 3 和 Caspase 9 在肿瘤组织中随 GQD 剂量增加而表达升高 ($P < 0.05$); 与增殖相关的 Cyclind1 和 Ki67 则在肿瘤组织中随 GQD 剂量增加而表达降低 ($P < 0.05$); CD31 常用于评估肿瘤血管生成程度, 也反映其增殖状况, 也表现出随中药剂量升高而表达下调 ($P < 0.05$); 从上述结果进一步确认, GQD 可以增加体内结直肠肿瘤的凋亡水平, 并遏制其增殖能力 ($P < 0.05$), 说明 GQD 可以促进体内结直肠肿瘤的凋亡水平。

2.5 GQD 对体内 CRC 肿瘤中 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响

Wnt/ β -catenin 通路在结直肠癌发展中占有重

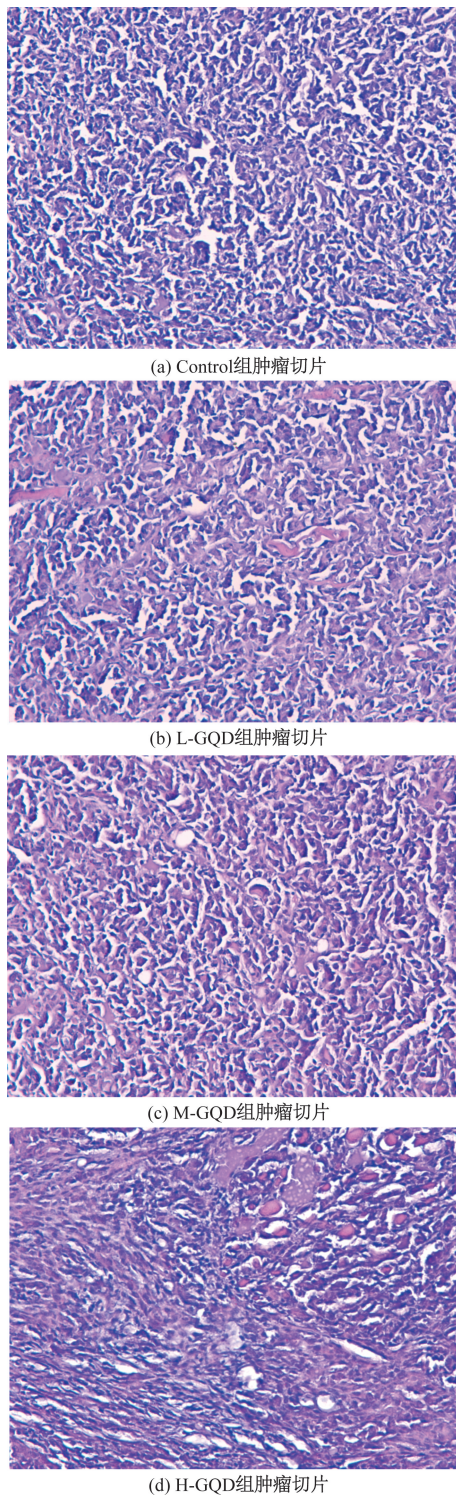
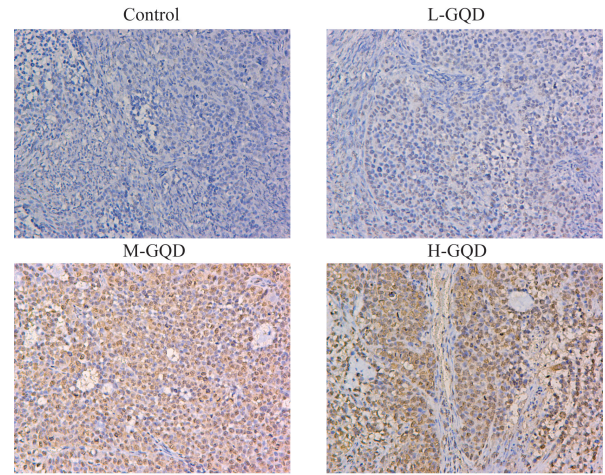


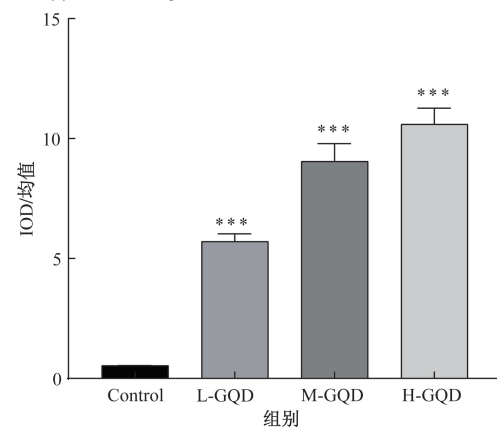
图2 不同剂量GQD处理对体内CRC肿瘤组织形态的影响(100×)

Fig. 2 Effect of different doses of GQD treatment on tumor morphology of CRC *in vivo* (100×)

要地位。通过上述 IHC 结果发现, GQD 可抑制 CyclinD1 蛋白的表达, CyclinD1 是 Wnt 信号通路的下游靶标^[19]。WB 检测发现, GQD 处理后的 β -catenin 的蛋白表达下调 ($P < 0.05$), 如图 5(a) 所示; 进一



(a) 不同剂量GQD处理体内CRC肿瘤组织中TUNEL染色的结果



(b) 不同剂量GQD处理体内CRC肿瘤组织中TUNEL染色的定量分析

与 Control 组相比, * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$, *** 表示 $P < 0.001$; IOD 为面积积分光密度

图3 不同剂量 GQD 处理对体内 CRC 肿瘤凋亡的影响(100×)

Fig. 3 Effect of different doses of GQD treatment on apoptosis of CRC tumors *in vivo* (100×)

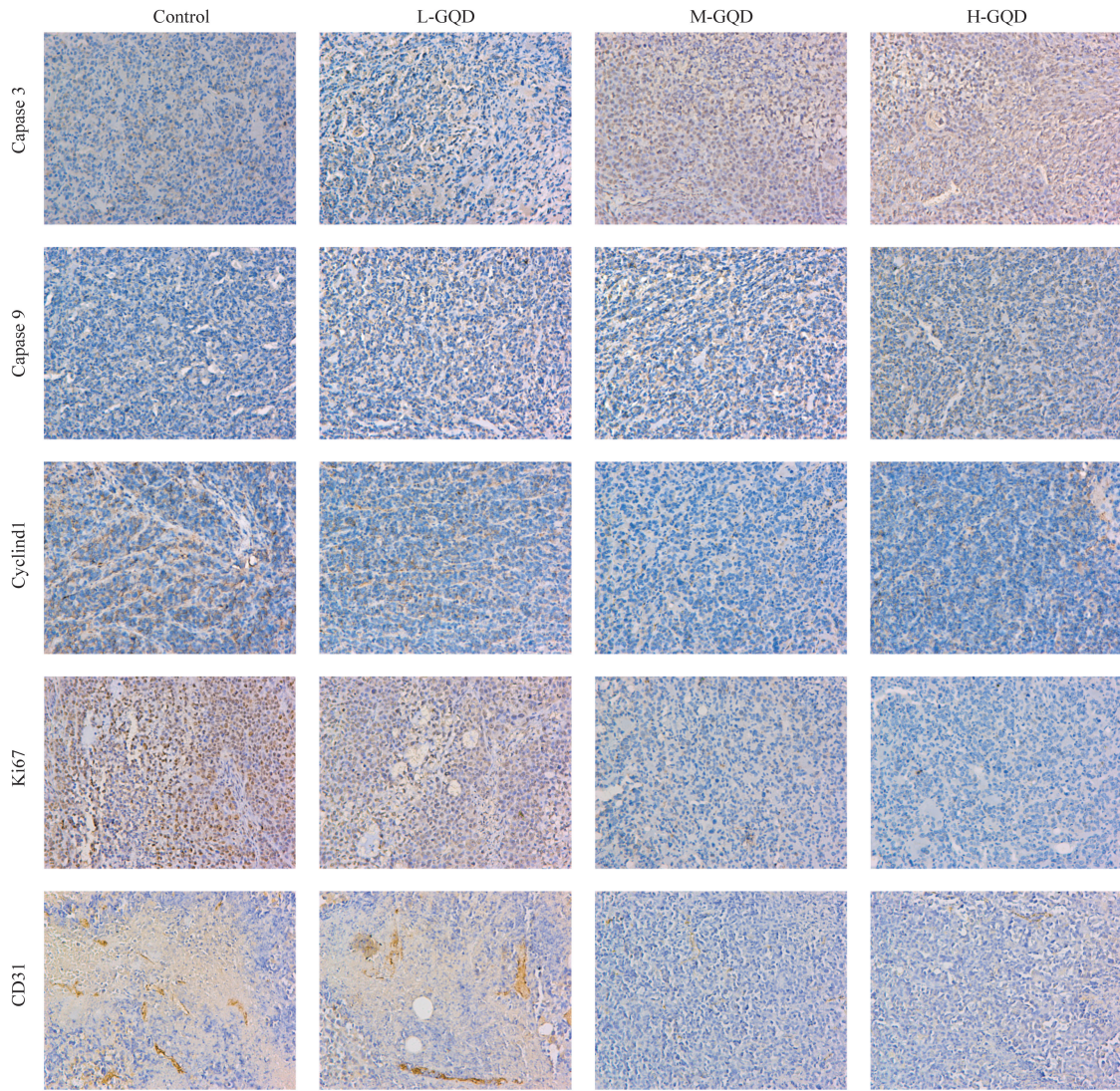
步通过 QPCR 检测 Wnt 和 β -catenin 的表达, 由图 5(b) 可知, 相较于 Control 组, GQD 处理后 Wnt 和 β -catenin 的 mRNA 表达均下调 ($P < 0.05$)。综上所述, GQD 可抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路, 从而调控结直肠癌的发展。

2.6 GQD 对体内 CRC 肿瘤中干细胞标志物的影响

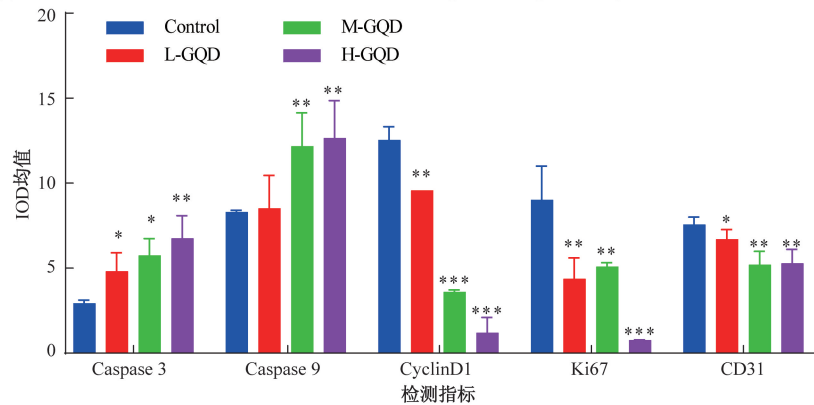
CD44 和 CD133 在临床上可作为结直肠癌患者预后的标志物, 通过 QPCR 检测 GQD 对肿瘤组织中 CD44 和 CD133 的表达(图 6), 可以看出, GQD 可显著抑制 CT26 肿瘤中 CD44、CD133 的 mRNA 表达 ($P < 0.05$)。

2.7 GQD 对体内 CRC 肿瘤中 PRC1 及磷酸化水平的影响

通过前期生信分析发现, GQD 可能通过调控微管相关因子来影响结直肠癌的发展, 而 PRC1 是微管相关蛋白的重要调节因子, 可能存在重要作用。



(a) IHC检测不同剂量GQD处理体内CRC肿瘤组织中的Caspase 3、Caspase 9、CyclinD1、Ki67和CD31表达变化



(b) 对不同剂量GQD处理体内CRC肿瘤组织中Caspase 3、Caspase 9、CyclinD1、Ki67和CD31的定量分析

与 Control 组相比, *表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$, ***表示 $P < 0.001$; IOD 为面积积分光密度

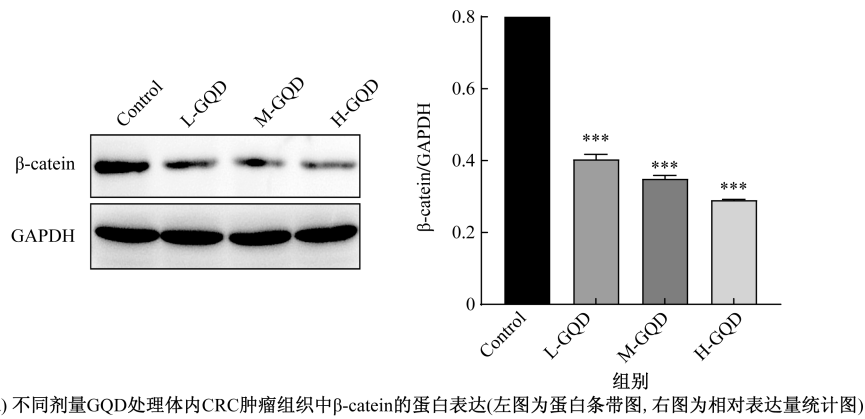
图 4 不同剂量 GQD 处理对体内 CRC 肿瘤中 Caspase 3、Caspase 9、CyclinD1、Ki67 和 CD31 表达的影响 (100 ×)

Fig. 4 Effects of different doses of GQD treatment on the expression of Caspase 3, Caspase 9, CyclinD1, Ki67 and CD31 in CRC tumors *in vivo* (100 ×)

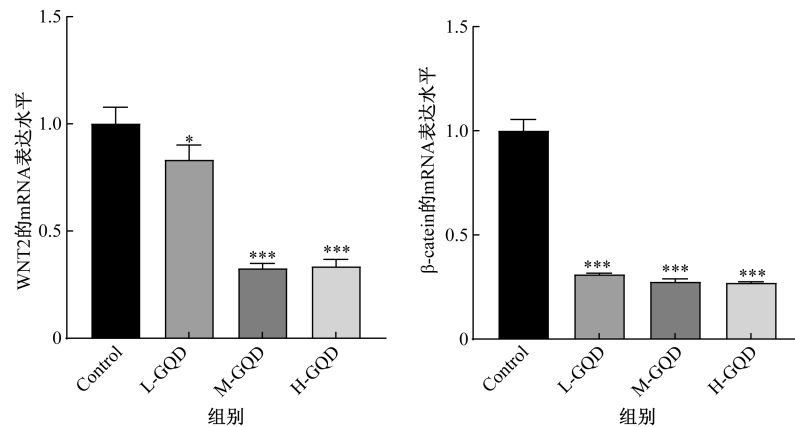
通过 WB 检测发现(图 7),相较于 Control 组,GQD 处理后并不影响 PRC1 的表达,但是会抑制 PRC1 的 T481 磷酸化水平从而影响其稳定性。

2.8 GQD 对体内 CRC 肿瘤中 PRC1 核保留的影响

PRC1 的亚细胞定位决定了其在细胞增殖中的



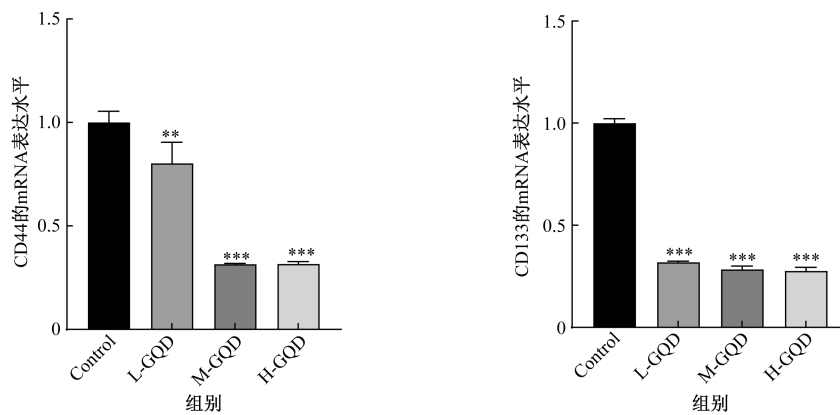
(a) 不同剂量GQD处理体内CRC肿瘤组织中β-catein的蛋白表达(左图为蛋白条带图,右图为相对表达量统计图)



(b) 不同剂量GQD处理体内CRC肿瘤组织中Wnt2和β-catein的mRNA表达

与 Control 组相比, * 表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$, ***表示 $P < 0.001$

图5 不同剂量 GQD 处理对体内 CRC 肿瘤中 Wnt/β-catenin 信号通路的影响(100 ×)
Fig. 5 Effect of different doses of GQD treatment on the Wnt/β-catenin signaling pathway in CRC tumors *in vivo* (100 ×)



(a) 不同剂量GQD处理体内CRC肿瘤组织中CD44的mRNA表达 (b) 不同剂量GQD处理体内CRC肿瘤组织中CD133的mRNA表达

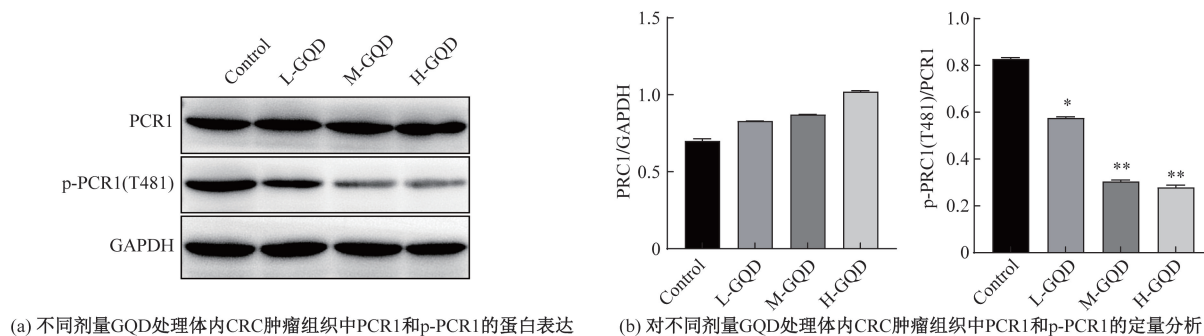
与 Control 组相比, * 表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$, ***表示 $P < 0.001$

图6 不同剂量 GQD 处理对体内 CRC 肿瘤中 Wnt/β-catenin 信号通路的影响

Fig. 6 Effect of different doses of GQD treatment on the Wnt/β-catenin signaling pathway in CRC tumors *in vivo*

功能,选择影响磷酸化变化更高的 GQD 中剂量和高剂量组与 Control 组中 PRC1 的表达位置情况对比。Lam B 是作为核蛋白样品检测的内参蛋白。由图 8 可知,经 GQD 处理后的肿瘤中 PRC1 出现明显核保留情况,这说明 GQD 可通过改变 PRC1 表达位置影

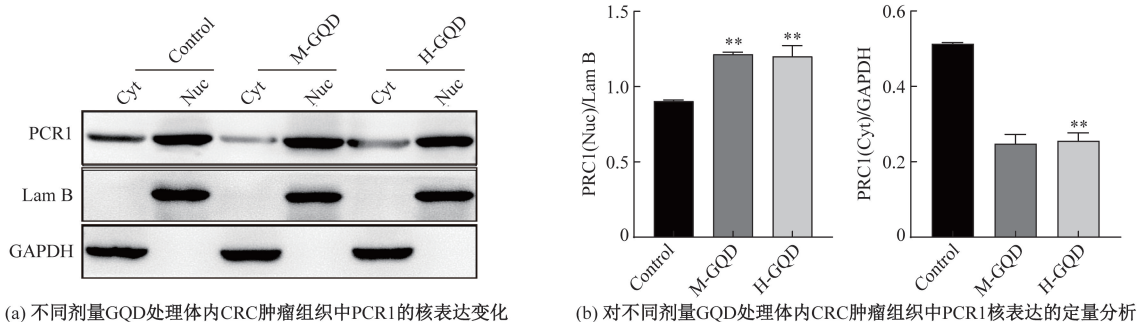
响肿瘤的增殖。血管生成程度,也反映其增殖状况,也表现出随中药剂量升高而表达下调 ($P < 0.05$);从上述结果进一步确认,GQD 可以增加体内结直肠肿瘤的凋亡水平,并遏制其增殖。著增加 ($P < 0.05$);说明 GQD 可以促进体内结直肠肿瘤的凋亡水平。



与 Control 组相比, * 表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$, ***表示 $P < 0.001$

图 7 不同剂量 GQD 处理对体内 CRC 肿瘤中 PRC1 及磷酸化水平的影响

Fig. 7 Effects of different doses of GQD on PRC1 and phosphorylation levels in CRC tumors *in vivo*



与 Control 组相比, * 表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$, ***表示 $P < 0.001$

图 8 不同剂量 GQD 处理对体内 CRC 肿瘤中 PRC1 核保留的影响

Fig. 8 Effect of different doses of GQD treatment on PRC1 nuclear retention in CRC tumors *in vivo*

3 讨论

饮食、生活方式和家族遗传是影响 CRC 发病率的重要因素^[20]; 尽管 CRC 的治愈率和生存率随着更准确的早期诊断方法和日益先进的医疗技术而提高,但在大多数情况下, CRC 仍然是一种无法治愈的疾病^[21]。靶向 Wnt/ β -catenin 信号通路的方式是治疗结直肠癌的重要途径^[22], 而传统中草药组合相比单一西药具有更高和更广泛的治疗潜力。

本次研究中,裸鼠经皮下成瘤造模后,采用 HE、TUNEL 和 IHC 等病理染色方法检测增殖和凋亡相关蛋白的变化,结果显示, GQD 可以显著抑制结肠癌 CT26 肿瘤的增殖并促进其凋亡; 进一步通过 WB 和 QPCR 检测,发现 GQD 可以抑制结肠癌 CT26 肿瘤中 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活; 并且下调其下游 CD44 和 CD133 这两个结直肠肿瘤干细胞标志物的表达,这提示 GQD 有作为以 Wnt 通路为结直肠癌治疗靶点的中药复方潜力; 然而其介导该通路的机制尚不明确。通过课题组前期的生信 GO 富集分析发现 GQD 与微管结合等分子功能和有丝分裂等生物过程极其相关,故而推测可能存在某种调控作用。

研究表明,PRC1 的异常高表达可导致细胞因子表达异常,从而导致肿瘤发生和肿瘤进展^[23], PRC1 在结直肠癌中异常高表达,PRC1 下调后可以阻止 G2/M 期的细胞周期,抑制增殖,促进细胞凋亡,从而遏制结直肠癌的发展^[6]。PRC1 对于纺锤体中区形成和细胞分裂至关重要,并依靠磷酸化完成空间位置的移动以完成有丝分裂^[24],因此,PRC1 的磷酸化在肿瘤增殖中起到重要作用。GQD 并不使 PRC1 的表达下降,但显著下调了其磷酸化水平。PRC1 的磷酸化水平决定了其表达的稳定性:在有丝分裂早期,磷酸化的 PRC1 定位于有丝分裂纺锤体; PRC1 去磷酸化后,会在后期和细胞分裂过程中易位到纺锤体中区/中体^[25],因此,PRC1 的磷酸化有助于增殖,且主要受到核向质的转化途径调控; 而 GQD 可呈剂量依赖的方式显著降低 PRC1 的磷酸化水平,同时增加其核保留,降低了 PRC1 的稳定性以遏制其发挥有丝分裂的作用,最终抑制了结直肠肿瘤的增殖。此外,PRC1 已被报道可通过抑制其他转录因子从而维持 Wnt/ β -catenin 信号通路转录活性的能力^[8], 因此课题组推测 GQD 抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活可能通过介导 PRC1 有关。葛根芩连汤的药用成分以黄酮类化合物为

主^[26],这类化合物可抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路从而阻止癌症的发展^[27-28],这可能是葛根芩连汤发挥抗肿瘤的原因之一。由于实验设计缺乏药物阳性对照,因此主要研究在定性葛根芩连汤在结直肠癌中的抗肿瘤作用。同时仅从动物实验的角度论证葛根芩连汤对 Wnt/ β -catenin 信号通路及对 PRC1 核保留的影响,并未深入探究其互作调控关系,以及其调控的可能关键成分,但从体内实验明确了 GQD 对结直肠癌的抗肿瘤作用及其对关键通路 Wnt/ β -catenin 的抑制作用。后续可再结合细胞实验深入了解具体作用 PRC1 的分子机制,为葛根芩连汤治疗结直肠癌提供理论依据。

4 结论

研究证实,GQD 可通过调控 PRC1 介导的 Wnt/ β -catenin 通路抑制 CRC 的增殖,并促进其凋亡,这与 GQD 可抑制 PRC1 的磷酸化以增加其核保留有关。为 GQD 应用于临床治疗 CRC 的用药策略提供理论依据。后续将结合分子互作技术进一步明确 GQD 靶向 PRC1 的具体分子机制。

参 考 文 献

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA: a Cancer Journal for Clinicians, 2021, 71: 209-249.

[2] Morgan E, Arnold M, Gini A, et al. Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: incidence and mortality estimates from GLOBOCAN[J]. Gut, 2023, 72:338-344.

[3] Siegel R L, Wagle N S, Cercek A, et al. Colorectal cancer statistics, 2023. [J]. CA: a Cancer Journal for Clinicians, 2023, 73: 233-254.

[4] Damato A, Ghidini M, Dottorini L, et al. Chemotherapy duration for various indications in colorectal cancer: a review[J]. Current Oncology Reports, 2023, 25: 341-352.

[5] Ohishi T, Kaneko M K, Yoshida Y, et al. Current targeted therapy for metastatic colorectal cancer[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24: 1702.

[6] Xu T, Wang X, Jia X, et al. Overexpression of protein regulator of cytokinesis 1 facilitates tumor growth and indicates unfavorable prognosis of patients with colon cancer[J]. Cancer Cell International, 2020, 20(1): DOI:10.1186/s12935-020-01618-9.

[7] Zhan P, Zhang B, Xi G M, et al. PRC1 contributes to tumorigenesis of lung adenocarcinoma in association with the Wnt/beta-catenin signaling pathway[J]. Molecular Cancer, 2017, 16(1): DOI:10.1186/s12943-017-0682-z.

[8] Chiacchiera F, Rossi A, Jammula S, et al. Polycomb complex PRC1 preserves intestinal stem cell identity by sustaining Wnt/beta-catenin transcriptional activity[J]. Cell Stem Cell, 2016, 18(1): 91-103.

[9] 莫林波,唐政山,乔小银,等.茶多酚对氧化偶氮甲烷/葡聚糖

硫酸钠诱导高脂饮食小鼠结直肠癌的影响[J]. 科学技术与工程, 2017, 17(26): 189-195.

Mo Linbo, Tang Zhengshan, Qiao Xiaoyin, et al. The effect of tea polyphenols on azoxymethane/dextran sodium sulfate induced colorectal cancer in high fat diet mice[J]. Science Technology and Engineering, 2017, 17(26): 189-195.

[10] Zhao H, Tang S, Tao Q, et al. Ursolic acid suppresses colorectal cancer by down-regulation of Wnt/ β -catenin signaling pathway activity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71: 3981-3993.

[11] 章新友,李秀云,张春强,等.基于数据挖掘、网络药理学和分子对接方法的肺癌用药规律及核心中药分析[J]. 科学技术与工程, 2022, 22(25): 10912-10923.

Zhang Xinyou, Li Xiuyun, Zhang Chunqiang, et al. Analysis of lung cancer drug use and core Chinese medicines based on data mining, network pharmacology and molecular docking methods [J]. Science Technology and Engineering, 2022, 22(25): 10912-10923.

[12] Sun J, Wei Y, Wang J, et al. Treatment of colorectal cancer by traditional Chinese medicine: prevention and treatment mechanisms[J]. Frontiers in Pharmacology, 2024, 15: 1377592.

[13] 赵明禄,郑佳,郭玉婷.葛根芩连汤及其加减方治疗溃疡性结肠炎的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(20): 239-246.

Zhao Minglu, Zheng Jia, Guo Yuting. Gegen Qinlian decoction and its modification in treatment of ulcerative colitis: a review[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formula, 2023, 29(20): 239-246.

[14] Li Y, Li Z X, Xie C Y, et al. Gegen Qinlian Decoction enhances immunity and protects intestinal barrier function in colorectal cancer patients via gut microbiota[J]. World Journal of Gastroenterology, 2020, 26(48): 7633-7651.

[15] Lü J, Jia Y, Li J, et al. Gegen Qinlian Decoction enhances the effect of PD-1 blockade in colorectal cancer with microsatellite stability by remodelling the gut microbiota and the tumour microenvironment[J]. Cell Death & Disease, 2019, 10(6): 415.

[16] Lin X, Xu L, Gu M, et al. Gegen Qinlian Decoction reverses oxaliplatin resistance in colorectal cancer by inhibiting YTHDF1-regulated m6A modification of GLS1 [J]. Phytomedicine, 2024, 133: 155906.

[17] Li Y, Gong Y, Zhang X, et al. Exploring the synergistic mechanism of Gegen Qinlian Decoction on the Wnt signaling pathway using an integrated strategy of network pharmacology and RNA-seq [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2021, 278: 114283.

[18] 蔡蓉,周燕萍,张金金,等.葛根芩连汤治疗结直肠癌的潜在靶点及作用机制研究[J]. 现代消化及介入诊疗, 2022, 27(9): 1129-1140.

Cai Rong, Zhou Yanping, Zhang Jinjin, et al. The potential target and mechanism of action in the treatment of colorectal cancer[J]. Modern Interventional Diagnosis and Treatment in Gastroenterology, 2022, 27(9): 1129-1140.

[19] Sun J, Ma Q, Li B, et al. RPN2 is targeted by miR-181c and mediates glioma progression and temozolomide sensitivity via the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Cell Death & Disease, 2020, 11(10): DOI:10.1038/s41419-020-03113-5.

[20] Muller C, Ihionkhan E, Stoffel E M, et al. Disparities in early-

- onset colorectal cancer[J]. *Cells*, 2021, 10(5): 1018.
- [21] Parisi A, Porzio G, Pulcini F, et al. What is known about therapeutic strategies in colorectal cancer[J]. *Biomedicines*, 2021, 9(2): 140.
- [22] Liao H, Li X, Zhao L, et al. A PROTAC peptide induces durable beta-catenin degradation and suppresses Wnt-dependent intestinal cancer[J]. *Cell Discovery*, 2020, 6(1): DOI:10.1038/s41421-020-0171-1.
- [23] Bu H, Li Y, Jin C, et al. Overexpression of PRC1 indicates a poor prognosis in ovarian cancer[J]. *International Journal of Oncology*, 2020, 56(3): 685-696.
- [24] Gluszek-Kustusz A, Craske B, Legal T, et al. Phosphorylation controls spatial and temporal activities of motor-PRC1 complexes to complete mitosis[J]. *The EMBO Journal*, 2023, 42(21): e113647.
- [25] Zhu C, Lau E, Schwarzenbacher R, et al. Spatiotemporal control of spindle midzone formation by PRC1 in human cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(16): 6196-6201.
- [26] 路立峰, 张媛媛, 李振兴, 等. 葛根芩连汤药效物质基础及质量控制研究进展[J]. *中成药*, 2022, 44(10): 3239-3243.
Lu Lifeng, Zhang Yuanyuan, Li Zhenxing, et al. Research progress on the pharmacological substance basis and quality control of Gegen Qinlian Decoction[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2022, 44(10): 3239-3243.
- [27] Shaikh T B, Kuncha M, Andugulapati S B, et al. Dehydrozingerone alleviates pulmonary fibrosis *via* inhibition of inflammation and epithelial-mesenchymal transition by regulating the Wnt/ β -catenin pathway[J]. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2023, 953: 175820.
- [28] Hassan A H E, Wang C Y, Oh T, et al. Discovery of a stilbenoid-flavanone hybrid as an antitumor Wnt/ β -catenin signaling pathway inhibitor[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2024, 145: 107178.