

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research炙红芪 - 醋莪术干预结肠炎相关结肠癌
血管生成的机制研究Mechanism study on the angiogenesis of colitis - associated colon cancer intervened
by Hedysari Radix Paeparata Cum Melle - vinegar processed Curcumae Rhizoma

刘 婷^{1,2}, 吕瑞龙^{1,2}, 张转红^{1,2},
张育贵², 马定财^{1,2}, 辛二旦^{1,2},
孙宇靖², 窦芬瑜^{1,2}, 柴梦娜^{1,2},
李越峰²

(1. 甘肃中医药大学 药学院, 甘肃 兰州 730000;
2. 甘肃中医药大学 科研实验中心, 甘肃 兰州
730000)

LIU Ting^{1,2}, LÜ Rui-long^{1,2},
ZHANG Zhuan-hong^{1,2},
ZHANG Yu-gui²,
MA Ding-cai^{1,2}, XIN Er-dan^{1,2},
SUN Yu-jing², DOU Fen-yu^{1,2},
CHAI Meng-na^{1,2}, LI Yue-feng²

(1. College of Pharmacy, Gansu
University of Chinese Medicine, Lanzhou
730000, Gansu Province, China; 2.
Scientific Research and Experimental
Center of Gansu University of Chinese
Medicine, Lanzhou 730000, Gansu
Province, China)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目
(82574743, 82560778, 81960713,
82160750); 甘肃省教育厅产业支撑
计划基金资助项目(2021CYZC -
21); 甘肃省科技计划(创新基地与
人才计划)基础研究创新群体项目
基金资助(21JR7RA569); 2024 年甘
肃省重点人才基金资助项目
(2024RCXM77); 甘肃省高等学校产
业支撑计划项目基金资助
(2024CYZC-41); 2024 年度甘肃省
联合科研基金资助项目
(24JRRA882)

作者简介: 刘婷(1999 -), 女, 博士研究生在读,
主要从事中药及复方加工炮制机制
及活性成分研究

通信作者: 李越峰, 教授, 博士生导师
Tel: (0931) 5161175
E-mail: lyftcm@163.com

摘要:目的 探讨炙红芪 - 醋莪术抑制结肠炎相关结肠癌血管生成的作用机制。
方法 将 60 只 SPF 级 C57BL/6J 小鼠随机分为 A ~ F 6 组, 分别是 A: 空白组; B: 模型组 [氧化偶氮甲烷 (AOM)/葡聚糖硫酸钠 (DSS), AOM/DSS 组]; C: 柳氮磺胺吡啶组; D: 炙红芪组; E: 炙红芪 - 醋莪术 (4:1) 组; F: 醋莪术组, 每组 10 只。用 AOM 与 DSS 联合诱导结肠炎相关结直肠癌 (CAC) 小鼠模型的同时, 各组给药干预, 空白组给予 0.9% NaCl 溶液, 干预 17 周后实验结束。用 Masson 染色法观察各组小鼠结肠组织中胶原纤维面积的表达; 用免疫组化法测定各组小鼠结肠组织中微血管密度; 使用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法测定各组小鼠血清中血管内皮生长因子 (VEGF) 及一氧化氮 (NO) 的表达; 用蛋白免疫印迹法 (WB) 检测磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (PI3K/AKT) 通路关键蛋白及 VEGF 表达。
结果 在药物干预治疗 17 周后, 空白组、模型组、柳氮磺胺吡啶组、炙红芪 - 醋莪术 (4:1) 组、炙红芪组及醋莪术组的微血管数量分别为 (23.20 ± 4.21)、(73.60 ± 13.52)、(44.80 ± 2.78)、(33.40 ± 6.31)、(41.60 ± 3.36) 和 (47.80 ± 7.29) 个, 血清中 VEGF 的含量分别为 (83.03 ± 24.13)、(153.61 ± 18.69)、(115.08 ± 11.43)、(87.03 ± 25.24)、(91.33 ± 32.37) 和 (101.93 ± 19.74) pg · mL⁻¹, 血清中 NO 的含量分别为 (28.46 ± 5.91)、(40.62 ± 2.28)、(30.62 ± 6.54)、(29.18 ± 5.37)、(30.87 ± 5.30) 和 (32.29 ± 3.43) μmol · L⁻¹。与空白组相比, 模型组小鼠结肠组织中胶原纤维染色面积、微血管数量显著增加, 血清中 VEGF、NO 含量显著上升, 结肠组织中 PI3K、AKT、mTOR 磷酸化表达及 VEGF 的表达显著升高; 与模型组比较, 炙红芪 - 醋莪术 (4:1) 组、炙红芪组及醋莪术组小鼠结肠组织中胶原纤维面积及微血管数量显著减少, 血清中 VEGF、NO 含量均有所降低, 结肠组织中 PI3K、AKT、mTOR 的磷酸化表达及 VEGF 的表达明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。
结论 炙红芪 - 醋莪术配伍抗结肠炎相关结肠癌的作用优于单味药, 其作用机制与炙红芪 - 醋莪术通过调控 PI3K/AKT 信号通路关键蛋白的表达, 抑制结肠炎相关结肠癌的血管生成密切相关。

关键词: 炙红芪 - 醋莪术; 结肠炎相关结肠癌; 血管生成; 信号通路; 作用机制

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.18.012

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A

文章编号: 1001-6821(2025)18-2639-06

Abstract: Objective To explore the mechanism by which processed Radix Hedysari and vinegar - processed Rhizoma Curcumae inhibit angiogenesis in colitis - associated colorectal cancer (CAC). **Methods** Sixty SPF - grade C57BL/6J mice were randomly divided into six groups (A - F), A: Blank control; B: Model group [Azoxymethane (AOM)/Dextran sodium sulfate (DSS) AOM/DSS group]; C: Sulfasalazine

group; D: Fried Astragalus group; E: Fried Astragalus – Vinegar Curcuma (4:1) group; F: Curcuma zedoaria group. Each group contained 10 mice. A CAC mouse model was induced using combined AOM and DSS. Simultaneously, each treatment group received intervention, the blank group received 0.9% sodium chloride solution. The experiment concluded after 17 weeks of intervention. Collagen fiber area expression in colon tissues was assessed using Masson's trichrome staining. Microvessel density in colon tissues was determined via immunohistochemistry. Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and nitric oxide (NO) levels were measured using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Key proteins in the phosphatidylinositol – 3 – kinase/ protein kinase B (PI3K/AKT) pathway and VEGF expression were detected by Western blotting (WB). **Results** After 17 weeks of pharmacological intervention, the microvessel counts in the blank group, model group, sulfasalazine group, honey – fried Radix Hedysari – vinegar – processed Rhizoma Curcumae (4:1) group, honey – fried Radix Hedysari group, and vinegar – processed Rhizoma Curcumae group were (23.20 ± 4.21) , (73.60 ± 13.52) , (44.80 ± 2.78) , (33.40 ± 6.31) , (41.60 ± 3.36) , and (47.80 ± 7.29) , respectively. The serum VEGF concentrations were (83.03 ± 24.13) , (153.61 ± 18.69) , (115.08 ± 11.43) , (87.03 ± 25.24) , (91.33 ± 32.37) , and (101.93 ± 19.74) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. The serum NO levels were (28.46 ± 5.91) , (40.62 ± 2.28) , (30.62 ± 6.54) , (29.18 ± 5.37) , (30.87 ± 5.30) , and (32.29 ± 3.43) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. Compared with the blank group, the model group exhibited significant increases in the collagen fiber staining area and microvessel density in colonic tissue, markedly elevated serum VEGF and NO levels, and significantly enhanced phosphorylation of PI3K, AKT, and mTOR as well as upregulated VEGF expression in colonic tissue. In comparison with the model group, the honey – fried Radix Hedysari – vinegar – processed Rhizoma Curcumae (4:1) group, honey – fried Radix Hedysari group, and vinegar – processed Rhizoma Curcumae group demonstrated significant reductions in the collagen fiber area and microvessel count in colonic tissue, decreased serum VEGF and NO concentrations, and markedly suppressed phosphorylation of PI3K, AKT, and mTOR along with downregulated VEGF expression in colonic tissue ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The combined use of processed Radix Hedysari and vinegar – processed Rhizoma Curcumae exerts a better anti – CAC effect than the single herb. Its mechanism is closely related to regulating the expressions of key proteins in the PI3K/AKT signaling pathway, thereby inhibiting angiogenesis in colitis – associated colorectal cancer.

Key words: Honey – processed Hedysari Radix – vinegarprocessed Curcumae Rhizoma; colitis – associated colon cancer; angiogenesis; signaling pathway; mechanism of action

中医理论认为肿瘤血管生成是本虚标实之证,指正气内虚和邪毒亢盛相争的结果。在治疗上主要以扶正培本、化瘀解毒为2大治疗原则^[1]。因此用药物配伍治疗能够达到更好的效果。结肠炎相关结肠癌是结肠炎 – 癌病理过程的典型模型,发病机制呈现为“炎症 – 不典型增生 – 癌变”。炎症与肿瘤发生的机制是当前研究的热点之一^[2-3]。研究表明,肿瘤微环境中血管新生是结肠炎相关结肠癌发生、发展的重要因素^[4]。溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 特别是其相应癌变的发生、发展和转移与血管的新生密切相关。正常情况下,体内血管的生长与抑制处于动态平衡状态,一旦失衡就会导致许多疾病的发生^[5]。炎症及癌变过程中血管的新生主要依赖于各种血管生成相关因子的调节,结肠炎向结肠癌转化是一个复杂的过程,涉及多个信号通路和分子^[6-7]。炙红芪 – 醋莪术通过多成

分、多靶点、多通路共同发挥其抗结肠炎相关结肠癌的作用,其中,磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B (phosphatidylinositol – 3 – kinase/ protein kinase B, PI3K/AKT) 信号通路是炙红芪 – 醋莪术抗结肠炎相关结肠癌的一条主要信号通路。血管生成是肿瘤发生发展的一个重要因素,PI3K/AKT信号通路与血管生成有着紧密联系,并发现PI3K/AKT通路是调控酶联免疫吸附试验 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达的重要信号通路之一^[8],因此,本研究在课题组前期对炙红芪 – 醋莪术抗结肠炎相关结肠癌研究的基础上^[9],进一步通过蛋白免疫印迹法 (western blot, WB) 考察经炙红芪 – 醋莪术 (4:1)^[9] 干预结肠炎相关结肠癌小鼠后PI3K/AKT信号通路中关键蛋白的表达,探讨炙红芪 – 醋莪术发挥其抗结肠炎相关结肠癌血管生成的作用及作用机制。

材料与方法

1 材料

动物 C57BL/6J 小鼠(6~8 周龄)60 只,体质量(20 ± 2) g,购自甘肃中医药大学实验动物中心,动物许可证号:SYXK(甘)2022-548,本实验经甘肃中医药大学实验动物中心伦理委员会审查批准(伦理批号:2022-551)。实验动物于甘肃中医药大学无特定病原菌动物(specific pathogen free, SPF)级实验室常规饲养,饲养室的环境温度控制在(22 ± 2)℃,相对湿度控制在 45%~50%,12 h 光暗周期循环,常规标准饲料喂养,自由饮水,饲养 1 周后进行实验。

药品与试剂 红芪,采购于甘肃省陇南市武都区米仓山地区,经甘肃中医药大学药学院中药鉴定教研室王明伟副教授鉴定为豆科植物多序岩黄芪(*Hedysarum polybotrys* Hand. - Mazz.)的干燥根,经初加工切制后得红芪饮片。符合《中国药典》2020 版^[10]要求。莪术,批号:210804,陇西县徽鑫药业提供,经甘肃中医药大学药学院中药鉴定教研室王明伟副教授鉴定为姜科植物温郁金(*Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling)的干燥根茎。符合《中国药典》2020 版^[11]要求。小鼠 VEGF ELISA 试剂盒、小鼠 NO ELISA 试剂盒,均为上海酶联生物科技有限公司生产;预染 Marker、高效 RIPA 组织裂解液、BCA 试剂盒、四甲基乙二胺(Tetramethylethylenediamine, EMED)、5x 蛋白上样缓冲液、30% 制胶液、1M Tris-HCl 缓冲液,均为北京索莱宝科技有限公司生产;Glycine、三羟甲基氨基甲烷[Tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris]、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS),均为杭州沃森生物技术有限公司生产;PVDF 膜,美国 Millipore 公司生产;超敏型 ECL 发光液,湖北亚科因生物科技有限公司生产;actin,江苏亲科生物研究中心有限公司生产;CD34,武汉 servicebio 公司生产;磷酸化蛋白激酶 B(phosphorylated protein kinase, p-AKT)、蛋白激酶 B(protein kinase B, AKT)、磷酸化磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphorylated phosphatidylinositol-3-kinase, p-PI3K)、磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、山羊抗 IgG,均为美国 Abcam 公司生产。

仪器 I2-5K 酶标仪,瑞士 Sunrise TECAN 公司产品;DYCZ-40K Western blot 转膜仪,北京六一生物科技有限公司产品;DYCZ-24K Western blot 电泳仪,北京六

一生物科技有限公司产品;CeIview 6000Plus 化学发光成像仪,美国 Azure Biosystems 公司产品;BT125D 十万分之一分析天平,北京赛多利斯科学仪器有限公司产品;Donatello 脱水机,DIAPATH 公司产品;Scientz-48L 高通量组织研磨器,宁波新芝生物科技有限公司产品。

2 实验方法

2.1 炙红芪、醋莪术的制备

2.1.1 炙红芪的制备

红芪蜜炙方法为课题组前期优化所得,具体工艺如下:将一定量红芪饮片加入炼蜜中,闷润 1 h,每 100 g 红芪用炼蜜 25 g,将烘箱温度设为 70℃,饮片厚度为 3 cm,烘制 2.5 h。根据上述条件制备炙红芪饮片,烘制完成后,取出放凉,备用^[12-13]。

2.1.2 醋莪术的制备

莪术醋制方法用《中国药典》2020 版“莪术”项下醋莪术炮制方法醋煮法(通则 0213),进行炮制^[14]。

2.2 构建 CAC 小鼠模型

实验的第一天通过腹膜内注射给予 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量的氧化偶氮甲烷(azoxymethane, AOM)。适应性饲养 1 周后除空白组外,给予小鼠 2.0%~2.5% (w/v) 的葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)水溶液以自由饮用,持续 1 周,然后给予无菌水自由饮用 2 周,此为 1 个周期,整个实验持续 17 周。

2.3 动物分组与处置方法

将 60 只 SPF 级 C57BL/6J 小鼠按计算机随机数字表法,随机分为空白组 10 只,结肠炎相关结肠癌造模组 50 只。将其随机分为 A~F 6 组,分别是 A:空白组;B:模型组;C:柳氮磺胺吡啶组;D:炙红芪组;E:炙红芪-醋莪术(4:1)组;F:醋莪术组,每组 10 只,自由摄食和饮水。

自结肠炎相关结肠癌模型复制开始,各给药组小鼠以 0.20 mL/20 g 灌胃给予相应的药物,利用人和小鼠体表面积折算等效剂量作为小鼠用药量,得到炙红芪-醋莪术(4:1)组给药量为 $6.83 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,炙红芪组给药量为 $1.37 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,醋莪术组给药量为 $1.37 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,柳氮磺胺吡啶给药量为 $0.46 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,空白组和模型组小鼠以等量蒸馏水灌胃。整个实验持续 17 周。

2.4 样品采集

结肠炎相关结肠癌小鼠血清 在给药干预的第 111 d 时,各组小鼠均禁止进食但自由饮水,并测定记录当日各组小鼠体质量。待第 112 d,测定记录当日各组小鼠体质量之后,将小鼠腹腔注射戊巴比妥钠进行麻醉,股动脉取血,在 4℃ 下放置 2 h,以 10 000

$r \cdot \min^{-1}$ 离心 15 min,将上清液放入 1.50 mL 的冷冻管中,并在 -80°C 的冰箱中保存,用于酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 测定,待采血完成后将小鼠脱颈处死。

结肠炎相关结肠癌小鼠结肠组织 小鼠处死后开腹迅速剖取结肠,测量结肠长度,并对结肠组织中肿瘤个数进行计数。然后将结肠组织纵向剪开,用冷生理盐水冲洗干净。将部分结肠组织于 4% 甲醛中进行固定,用于 Masson 染色观察及免疫组化分析,将部分结肠组织装入冻存管,转入 -80°C 冰箱中保存,用于结肠组织相关蛋白的 WB 测定。

样品收集与处理 给药第 112 d 各组小鼠均禁食禁水。各组小鼠称重,收集结肠组织存放于 4% 多聚甲醛固定液中,收集胸腺、脾,剪去脾、胸腺周边的脂肪组织,生理盐水清洗,滤纸吸干后称量记录。

2.5 结肠组织 Masson 染色切片观察血管生成情况

取在 4% 多聚甲醛固定液固定 1 周后的结肠组织,剪至适宜大小,脱水、透明石蜡包埋,制备组织切片,进行 Masson 染色、中性树胶封片,用显微镜镜检,用 Image J 软件分析胶原沉积情况。

2.6 免疫组化法检测 CD34 表达

取长度 0.50 cm 的结肠组织,进行免疫组化染色。加入 (CD34) 抗体 (1:100), 4°C 过夜。磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 清洗 3 次,加入二抗 (1:500), 孵育 2 h, 50% 甘油封片。切片中 CD34 的阳性染色为棕黄色,表示其在血管内皮细胞胞浆中表达。微血管密度 (micro vessel density, MVD) 计数法按照 Weidner 法校正^[15]。

2.7 ELISA 法检测血清中血管生成内皮因子 VEGF、NO 含量

经采集处理得到的血清分别进行 VEGF、一氧化氮 (nitric oxide, NO) 测定检测方法均用 ELISA 试剂盒检测,具体步骤按照相应试剂盒说明方法操作。

2.8 WB 检测小鼠结肠组织中 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白的表达

分别称取各组 60 mg 结肠组织,加入裂解液,提取总蛋白并定量,样本经过电泳、转膜、封闭处理后,

按照抗体稀释比例添加一抗 p-mTOR、mTOR、p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT、VEGF、actin,在 4°C 孵育过夜,清洗后添加相应二抗,室温孵育 2 h,化学发光底物显影,用 ImageJ 软件分析目标蛋白的灰度值。

3 统计学处理

用 SPSS 28.0 软件进行统计分析,符合正态分布且方差齐的用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析;若不符合正态分布且方差不齐,用 W-H 秩和检验。用 Origin 2022、Graphpad prism 10 软件进行绘图。

结 果

1 小鼠的一般状态

17 周干预结束后,与空白组比较,模型组小鼠体重质量持续下降,疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 评分升高,结肠长度较短,肿瘤个数较多,经药物干预后,与模型组小鼠相比,炙红芪-醋莪术组、炙红芪组及醋莪术组小鼠的体重质量均有不同程度的回调,DAI 评分均有不同程度的下降,且结肠长度较长,肿瘤个数较少。根据小鼠一般状态的结果表明,炙红芪-醋莪术组显示出较好的改善效果。

2 Masson 染色测定结果

17 周给药干预结束后,小鼠结肠组织 Masson 染色结果,见图 1。与空白组比较,模型组结肠组织胶原纤维染色面积增加;与模型组比较,各给药组结肠组织胶原纤维面积减少。Masson 染色测定结果表明,炙黄芪-醋莪术 (4:1) 组优于其他各给药组。

3 免疫组化法检测 CD34 表达结果

肿瘤血管新生的程度可以通过检测 MVD 来判断,而血管内皮细胞的标志 CD34 可以直接反映出微血管密度。因此,对结肠组织中 CD34 的表达的检测可间接判断炙红芪-醋莪术配伍前后对结肠炎相关结肠癌血管新生的影响。在药物 17 周的治疗干预下,免疫组化结果,与空白对照组比较,模型组小鼠结肠组织中 CD34 的表达升高,在统计学上差异具有统计学意义 ($P < 0.01$);与模型组比较,柳氮磺胺吡啶组、炙红芪-醋莪术 (4:1) 组、炙红芪组及醋莪术组

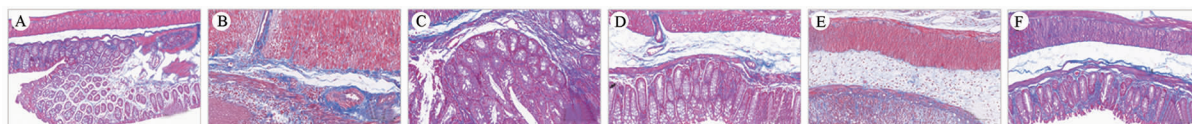


图 1 各组小鼠结肠组织 Masson 染色结果 ($\times 200$)

Figure 1 Masson staining results of colon tissue of mice in each group ($\times 200$)

A: Control; B: Model; C: SASP; D: HPHR; E: HPHR + VPCR (4:1); F: VPCR.

表 1 各组小鼠 CD34 表达结果($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Number of Microvessels (count)
A	5	23.20 ± 4.21
B	5	73.60 ± 13.52 ^{##}
C	5	44.80 ± 2.78 ^{**}
D	5	41.60 ± 3.36 ^{**}
E	5	33.40 ± 6.31 ^{**}
F	5	47.80 ± 7.29 ^{**}

Compared with the control group, ^{##} $P < 0.01$; Compared with the model group, ^{**} $P < 0.01$.

CD34 表达减少, 炙红芪 - 醋莪术 (4:1) 组 CD34 的表达显著减少, 在统计学上差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 1。与空白对照组比较, 模型组小鼠结肠组织可见数量较多微血管, 微血管数量增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 柳氮磺胺吡啶组、炙红芪 - 醋莪术 (4:1) 组、炙红芪组及醋莪术组微血管数量减少, 炙红芪 - 醋莪术 (4:1) 组减少得更为显著, 见表 1。提示炙红芪 - 醋莪术配伍前后均能降低结肠炎相关结肠癌小鼠结肠组织微血管表达水平, 表明炙红芪 - 醋莪术配伍前后均能抑制结肠癌组织中新血管生成。

4 ELISA 法测定血清中血管生成内皮因子 VEGF、NO 含量结果

在药物 17 周的治疗干预下, ELISA 结果显示: 模型组小鼠血清 VEGF、NO 含量较空白组均显著上升 (均 $P < 0.01$), 柳氮磺胺吡啶组、炙红芪 - 醋莪术 (4:1) 组、炙红芪组及醋莪术组小鼠血清中 VEGF、NO

含量较模型组均显著降低, 但炙红芪 - 醋莪术 (4:1) 组降低的更为显著 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见表 2。

5 PI3K/AKT 通路关键蛋白表达

在药物 17 周的治疗干预下, 各组小鼠结肠组织中 PI3K、AKT、mTOR 磷酸化蛋白及 VEGF 的含量表达存在显著差异。与空白组相比, 模型组小鼠结肠组织 PI3K、AKT、mTOR 磷酸化表达水平及 VEGF 的表达水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 柳氮磺胺吡啶组小鼠结肠组织 PI3K 磷酸化表达显著降低 ($P < 0.01$), 其他蛋白表达均无显著性差异, 炙红芪 - 醋莪术 (4:1) 组小鼠结肠组织 PI3K、AKT、mTOR 的磷酸化表达及 VEGF 的表达明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 炙红芪组小鼠结肠组织 PI3K、mTOR 的磷酸化表达及 VEGF 的表达降低 ($P < 0.01$), 醋莪术组小鼠结肠组织 PI3K 磷酸化表达及 VEGF 的表达降低 ($P < 0.05$), 见图 2。

表 2 各组小鼠血清 VEGF 和 NO 含量($\bar{x} \pm s$)

Group	n	VEGF (pg · mL ⁻¹)	NO (μmol · L ⁻¹)
A	7	83.03 ± 24.13	28.46 ± 5.91
B	7	153.61 ± 18.69 ^{##}	40.62 ± 2.28 ^{##}
C	7	115.08 ± 11.43 ^{**}	30.62 ± 6.54 ^{**}
D	7	91.33 ± 32.37 ^{**}	30.87 ± 5.30 ^{**}
E	7	87.03 ± 25.24 ^{**}	29.18 ± 5.37 ^{**}
F	7	101.93 ± 19.74 ^{**}	32.29 ± 3.43 [*]

Compared with the control group, ^{##} $P < 0.01$; Compared with the model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$.

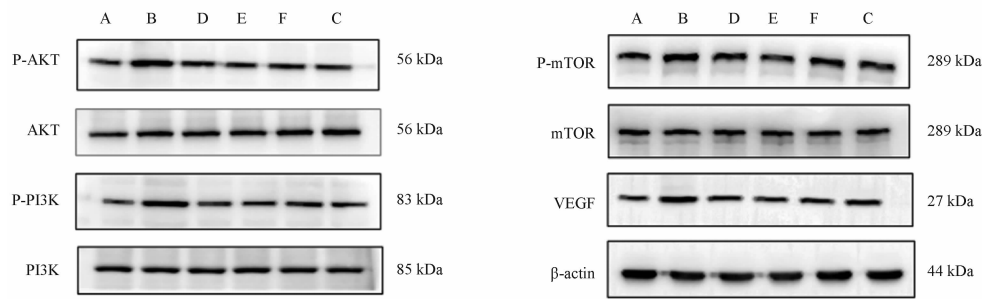


图 2 各组小鼠结肠组织磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路关键蛋白表达变化

Figure 2 Changes in the expression of key proteins of phosphatidylinositol - 3 - kinase/ protein kinase B signaling pathway in colon tissue of mice in each group

Compared with the control group, ^{##} $P < 0.01$; Compared with the model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$.

讨 论

血管生成在结肠炎相关结肠癌的发生、发展过程

中起着至关重要的作用, 结肠组织中的新生血管能为结肠癌细胞的持续生长提供营养物质和氧气^[16], 从而为结肠癌细胞的侵袭转移和增殖提供有利条件^[17]。结肠癌在中医属“肠积”“肠覃”“肠风”“

脏毒”等疾病范畴^[1],其转移、复发与血管新生密切相关。中医学认为肿瘤血管生成的前提是癌毒积聚,由于机体邪气内生,逐渐积聚形成癌毒,癌毒可消耗人体正气,造成机体脏腑功能失调,气血津液运行受阻,津液不能正常输出则留结为痰,血液不能正常运行则停留为瘀,癌毒与痰、瘀搏结形成肿块^[18]。扶正祛邪是肿瘤治疗的方法之一,而炙红芪-醋莪术配伍后,炙红芪负责扶正,醋莪术负责祛邪,2药协同发挥药效。

VEGF是目前已知血管生成促进因子中活性最强、特异性最高的血管生成因子^[19],VEGF的表达受多种信号通路的调控,其中PI3K/AKT信号通路是调控VEGF的一条主要信号通路。炙红芪-醋莪术治疗结肠炎相关结肠癌的作用与PI3K/AKT信号通路密切相关,因此本研究通过蛋白免疫印迹技术测定各组小鼠结肠组织中PI3K/AKT信号通路关键蛋白的表达水平,研究发现炙红芪-醋莪术可以通过下调PI3K/AKT信号通路关键蛋白及VEGF蛋白的表达,进而抑制结肠炎相关结肠癌的血管生成。

结肠炎是一种慢性炎症性肠病,长期的炎症状态可以促进肿瘤的发生和发展。血管生成是肿瘤生长和转移的重要过程,而微血管密度是反映肿瘤血管生成程度的指标之一^[20]。微血管密度的增加可以反映肿瘤血管生成的程度,与结肠炎相关结肠癌的发生和发展密切相关。本研究表明,结肠炎相关结肠癌组织中的微血管数量较多,与正常结肠组织和炙红芪-醋莪术(4:1)组、炙红芪组、醋莪术组相比有显著差异。

本研究利用Masson染色测定结肠炎相关结肠癌小鼠结肠组织中胶原纤维面积的表达,用免疫组化测定结肠炎相关结肠癌小鼠结肠组织中微血管密度,使用ELISA法测定小鼠血清中VEGF及NO的表达,使用蛋白免疫印迹法测定PI3K/AKT信号通路关键蛋白及VEGF蛋白的表达。结果表明,炙红芪-醋莪术配伍前后均可通过下调PI3K/AKT信号通路关键蛋白及VEGF蛋白的表达抑制结肠炎相关结肠癌小鼠的血管生成,从而达到抗结肠炎相关结肠癌的作用。

参考文献:

- [1] 周仲瑛. 中医内科学[M]. 北京:中国中医药出版社,2003:466—480.
- [2] SCHETTER A J, HEEGAARD N H, HARRIS C C. Inflammation and cancer: Interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways[J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(1):37—49.
- [3] CANDIDO J, HAGEMANN T. Cancer-related inflammation[J]. *J Clin Immunol*, 2013, 33(Suppl 1):S79—S84.

- [4] KAWAMURA T, YAMAMOTO M, SUZUKI K, et al. Tenascin - C produced by intestinal myofibroblasts promotes colitis - associated cancer development through angiogenesis[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2019, 25(4):732—741.
- [5] 盛露露, 马天乐, 江石湖. 炎症性肠病与血管生成[J]. 国际消化病杂志, 2012, 32(01):9—11.
- [6] 宋华琛, 唐晓楠, 张海婧, 等. 结肠炎相关结肠癌机制研究进展[J]. 基础医学与临床, 2018, 38(4):568—572.
- [7] ZHOU W, YANG L, NIE L, et al. Unraveling the molecular mechanisms between inflammation and tumor angiogenesis[J]. *Am J Cancer Res*, 2021, 11(2):301—317.
- [8] 魏余灼, 刘丽, 卜树, 等. 地榆-槐花通过调节PI3K/Akt信号通路抑制溃疡性结肠炎小鼠血管生成[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(11):40—50.
- [9] ZHANG Y, WANG Y, XIN E, et al. Network pharmacology and experimental verification reveal the mechanism of Hedysari Radix and Curcuma Rhizoma with the optimal compatibility ratio against colitis - associated colorectal cancer[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 322:117555. 2023-12-16 [2025-01-29]. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.117555>.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2020, 159.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2020, 286.
- [12] 牛江涛, 曹瑞, 司昕蕾, 等. 不同蜜炙方法对红芪中毛蕊异黄酮和芒柄花素含量的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(9):59—62.
- [13] 李越峰, 牛江涛, 曹瑞, 等. 正交设计法优选红芪最佳蜜炙烘制工艺[J]. 北京中医药大学学报, 2017, 40(2):166—171.
- [14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2020:31—32.
- [15] 王金鑫, 谢胜, 黎丽群, 等. 基于JAK/STAT通路的中医药干预溃疡性结肠炎研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(24):274—282.
- [16] AHLUWALIA A, JONES M K, MATYSIAK - BUDNIK T, et al. VEGF and colon cancer growth beyond angiogenesis: Does VEGF directly mediate colon cancer growth via a non - angiogenic mechanism? [J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20(7):1041—1044.
- [17] BAGNASCO L, PIRAS D, PARODI S, et al. Role of angiogenesis inhibitors in colorectal cancer: Sensitive and insensitive tumors[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2012, 12(4):303—315.
- [18] 程海波. 癌毒病机理论探讨[J]. 中医杂志, 2014, 55(20):1711—1715.
- [19] MELINCOVICI C S, BOSCA A B, SUSMAN S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis[J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2018, 59(2):455—467.
- [20] 王容容, 王其美, 田雪飞, 等. 健脾消癌方通过PI3K/Akt信号通路抑制结肠癌血管生成的研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(2):502—512.

(收稿日期 2025-02-21)