DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.07.048

解毒三根汤对结肠癌CT-26细胞的影响研究

赵云[1],甘婷[1],丁瑞景[2],韦书霞[2],刘俊霞[1],赵桂桂[1],张五钢[1]
(1.郑州工业应用技术学院医学院,河南 新郑 451100;2.原阳县中医院,河南 新乡 453500)

摘要:目的 探讨解毒三根汤对结肠癌CT-26细胞的影响研究。方法 选取健康清洁级BALB/c小鼠90只,随机分为对照组、模型组和解毒三根汤组,除对照组外其余组小鼠建立结肠癌小鼠模型,模型组给予生理盐水灌胃,解毒三根汤组给予解毒三根汤灌胃,1周后通过眼球获取各组小鼠血清;将各组小鼠血清与CT-26细胞共培养,采用四甲基偶氮唑盐比色法(methyl thiazolyl tetrazolium assay,MTT)检测细胞增殖,Transwell法检测细胞迁移能力,细胞侵袭试验检测细胞侵袭能力,Western blot检测BCL2-Associated X的蛋白质(BCL2-Associated X,Bax)、B淋巴细胞瘤-2基因(B-cell lymphoma-2,Bcl-2)蛋白表达。结果 解毒三根汤血清组细胞培养24、48和72 h时吸光值分别为0.198±0.068、0.321±0.103和0.462±0.106,明显低于对照血清组和模型血清组($P<0.05$);解毒三根汤血清组迁移细胞数、侵袭细胞数分别为(122.03±10.48)个/HP和(32.10±5.15)个/HP,明显低于对照血清组和模型血清组($P<0.05$);解毒三根汤血清组Bax蛋白相对表达量为0.978±0.106,明显高于对照血清组和模型血清组($P<0.05$),而Bcl-2蛋白相对表达量为0.354±0.092,明显低于对照血清组和模型血清组($P<0.05$)。结论 解毒三根汤能够抑制结肠癌患者CT-26细胞增殖、迁移和侵袭能力,研究其机制发现可能与调控Bax、Bcl-2表达有关。

关键词:解毒三根汤;结肠癌;CT-26细胞;增殖;迁移;侵袭
中图分类号:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)07-0236-03

Effect of Jiedu Sangen Decoction(解毒三根汤) on CT-26 Cells in Colon Cancer

ZHAO Yun[1],GAN Ting[1],DING Ruijing[2],WEI Shuxia[2],LIU Junxia[1],ZHAO Guigui[1],ZHANG Wugang[1]
(1. School of Medicine,Zhengzhou Institute of Industrial Application Technology,Xinzheng 451100,Henan,China;
2. Yuanyang County Hospital of Traditional Chinese Medicine,Xinxiang 453500,Henan,China)

Abstract:*Objective* To study the effect of Jiedu Sangen Decoction(解毒三根汤) on CT-26 cells in colon cancer. *Methods* Ninety healthy and clean BALB/c mice were randomly divided into control group,model group and Jiedu Sangen Decoction group. The colon cancer mouse models in all groups except for the control group were established. The model group received normal saline by gavage,and the Jiedu Sangen Decoction group received Jiedu Sangen Decoction by gavage. After 1 week,the serum was obtained from each group through eyeball. The serum of mice in each group was co-cultured with CT-26 cells,the cell proliferation was detected by MTT method,the cell migration was detected by Transwell method,the cell invasion was detected by invasion test,and the protein expressions of Bax and bcl-2 were detected by Western blot. *Results* After 24 h,48 h and 72 h of cell cultured,the light absorption values of the Jiedu Sangen Decoction group were 0.198±0.068,0.321±0.103 and 0.462±0.106,which were significantly lower than those of the control group and the model group($P<0.05$). The numbers of migrating cells and invading cells in the Jiedu Sangen Decoction group were (122.03±10.48)/HP and (32.10±5.15)/HP,which were significantly lower than those in the control group and the model group($P<0.05$). The relative expression level of Bax protein in Jiedu Sangen Decoction group was 0.978±0.106,significantly higher than that in the control serum group and model serum group($P<0.05$),while the relative expression level of Bcl-2 protein was 0.354±0.092,significantly lower than that in the control group and model group($P<0.05$). *Conclusion* Jiedu Sangen Decoction can inhibit the proliferation,migration and invasion of colon cancer CT-26 cells,and its mechanism may be related to the regulation of the expressionsof Bax and Bcl-2.

Keywords:Jiedu Sangen Decoction(解毒三根汤);colon cancer;CT-26 cells;proliferation;migration;invasion

流行病学研究[1]提示我国结肠癌的发病率和病死率逐年升高,分别位于我国恶性肿瘤的第3位和第5位。随着临床诊断技术的发展,得到确诊的结直肠癌患者可较及时地进行治疗,但对于出现异时性和同时性转移的患者,现阶段的根治方法有限,及时早期切除原发肿瘤,后期复发和转移的几率也较大,进而造成患者死亡。研究[2]提示肿瘤的转移和局部复发是造成患者高病死率的主要原因,尽管肿瘤早期即出现转移,但多无法察觉转移,当出现症状时多已蔓延至全身各个器官,因而如何有效控制结肠癌的转移对提高患者的生活质量和生存率具有重要意义。

水杨梅根、虎杖根、藤梨根是组成解毒三根汤的主要中药,最早由浙江省中医院肿瘤科研制成功,其参考“清热解毒法”

基金项目:河南省软科学研究计划项目(202400410302)
作者简介:赵云(1988-),女,河南漯河人,实验师,学士,研究方向:医学教育。

治疗消化道恶性肿瘤,相关文献[3-4]已证实解毒三根汤能够通过作用肿瘤微环境而抑制结肠癌的转移和侵袭转移,但相关机制尚存在分歧,多认为肿瘤微环境与炎性微环境关系密切。本研究探讨解毒三根汤对结肠癌 CT-26 细胞的影响研究,旨在探讨解毒三根汤治疗结肠癌的相关机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞及动物

鼠源性结肠癌细胞株 CT-26,购自上海生科院细胞库;健康清洁级 BALB/c 小鼠 90 只,6~8 周龄,雌雄各半,体质量 17~23 g,购自浙江中医药大学实验动物中心。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组、造模及给药 随机分为对照组、模型组和解毒三根汤组,除对照组外其余组小鼠建立结肠癌小鼠模型,模型组给予生理盐水灌胃,解毒三根汤组给予解毒三根汤灌胃。造模方法:取小鼠结肠癌细胞(CT-26 结肠癌细胞)复苏后进行传代培养,取对数期细胞,生理盐水调整浓度为 $3\sim4\times10^6$/mL,每只 0.2 mL 接种于小鼠右腋皮下,若 7 d 后小鼠接种部位出现不光滑肿块,证实造模成功[5]。

1.2.2 动物血清提取及 CT-26 细胞培养 灌胃 1 周后取最后 1 次灌胃 2 h 后的眼球获取各组小鼠血清,3000 r/min 离心 10 min 后取上清液,水浴恒温 30 min 灭活,-20 ℃保存备用;

将各组小鼠血清与 CT-26 细胞共培养,10% 胎牛血清培养液培养 CT-26 细胞,37 ℃,$CO_2$5% 培养箱培养,当细胞铺满瓶底 80%~90% 时进行传代。

1.2.3 四甲基偶氮唑盐比色法(methyl thiazolyl tetrazolium assay,MTT)法检测 各组细胞接种于 96 孔板上,每孔 3×10^4 个细胞,常规培养 48 h 后,每孔加入 MTT 溶液 20 μL,再 4 h 反应后将 200 μL 二甲基亚砜(DSMO)加入进去,当充分反应后采用酶标仪检测吸光度。

1.2.4 Transwll 试验 24 孔培养板放入细胞侵袭小室 Transwell,小室上层加入无血清 RPMI1640 细胞悬液,每小室 2×10^4/300 μL,小室下层加入 FBS10% 的培养液 600 μL,37 ℃,$CO_2$5% 培养箱培养 24 h,24 h 后小室 Transwell 取出,棉签擦去小室上室面细胞,PBS 轻洗 1 遍,浸入结晶紫液(1%)15 min 染色,晾干后拍照计数,随机取 8 个清晰视野确定迁移细胞数量[6]。

1.2.5 侵袭试验 细胞融合度至 90% 后使用枪头(10 μL)进行划痕,无菌 PBS 液漂洗划落细胞后添加培养液,培养箱培养,细胞划痕后进行拍照,计算细胞迁移能力。

1.2.6 Western blot 检测 Western blot 检测 BCL2-Associated X 的蛋白质(BCL2-Associated X,Bax)、B 淋巴细胞瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2,Bcl-2)蛋白表达:各组小裂解液裂解提取总蛋白,取上清进行电泳分离及转膜;加入 1∶100 稀释的 Bax 和 Bcl-2 特异性一抗,4 ℃孵育过夜,再加入 1∶1000 稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗羊抗兔 IgG,2 h 室温孵育后化学发光剂显色,β-actin 为内参,软件分析结果[7]。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 将本次研究涉及的各类数据输入并分析,其中计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,行方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞增殖情况比较

解毒三根汤血清组细胞培养 24、48 和 72 h 时吸光值明显低于对照血清组和模型血清组($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组细胞不同培养时间吸光值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	0 h	24 h	48 h	72 h
对照血清组	0.105±0.034	0.354±0.087	0.622±0.110	0.840±0.107
模型血清组	0.102±0.031	0.344±0.091	0.610±0.106	0.824±0.112
解毒三根汤血清组	0.104±0.033	0.198±0.068[ab]	0.321±0.103[ab]	0.462±0.106[ab]
F 值	0.622	6.842	9.315	10.154
P 值	0.421	0.009	0.000	0.000

注:a 与对照血清组比较,$P<0.05$;b 与模型血清组比较,$P<0.05$。

2.2 各组细胞迁移情况比较

解毒三根汤血清组迁移细胞数明显低于对照血清组和模型血清组($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组迁移细胞数比较

组别	迁移细胞数(个/HP)	*F* 值	*P* 值
对照血清组	201.12±12.64	51.164	0.000
模型血清组	198.81±13.51		
解毒三根汤血清组	122.03±10.48[ab]		

注:a 与对照血清组比较,$P<0.05$;b 与模型血清组比较,$P<0.05$。

2.3 各组细胞侵袭情况比较

解毒三根汤血清组侵袭细胞数明显低于对照血清组和模型血清组($P<0.05$)。见表 3。

表 3 各组侵袭细胞数比较

组别	侵袭细胞数(个/HP)	*F* 值	*P* 值
对照血清组	87.14±6.80	34.544	0
模型血清组	85.24±7.90		
解毒三根汤血清组	32.10±5.15[ab]		

注:a 与对照血清组比较,$P<0.05$;b 与模型血清组比较,$P<0.05$。

2.4 各组细胞 Bcl-2、Bax 表达比较

解毒三根汤血清组 Bax 蛋白相对表达量为 0.978±0.106,明显高于对照血清组和模型血清组($P<0.05$),而 Bcl-2 蛋白相对表达量为 0.354±0.092,明显低于对照血清组和模型血清组($P<0.05$)。见表 4。

表 4 各组侵袭细胞数比较

组别	Bax 蛋白相对表达量	Bcl-2 蛋白相对表达量
对照血清组	0.722±0.103	0.977±0.100
模型血清组	0.715±0.110	0.970±0.097
解毒三根汤血清组	0.978±0.106[ab]	0.354±0.092[ab]
F 值	9.564	12.215
P 值	0	0

注:a 与对照血清组比较,$P<0.05$;b 与模型血清组比较,$P<0.05$。

3 讨论

结肠癌是最常见的消化系统恶性肿瘤之一,也是消化道恶性肿瘤中造成死亡的最主要因素。结肠癌极易出现转移,其中肝脏是结肠癌最常见的转移器官,但仅有不足 20% 的肝转移患者能够通过手术切除,而且手术后的 5 年生存率仅为20%~40%,其中晚期结肠癌的 5 年生存率更低,仅为 10% 左右,肿瘤细胞的转移已成为造成结肠癌高病死率的最主要原因[8-9]。

肿瘤细胞存在的周围微环境被称为肿瘤微环境,其由肿瘤细胞、基质细胞及细胞外基质等组成。微环境的存在为肿瘤生长、侵袭及转移等提供了必要的物质基础,有利于肿瘤的发生、发展。因此,如何调控肿瘤微环境已成为抑制肿瘤细胞恶性增殖、转移及侵袭的研究重点[10-12]。解毒三根汤由浙江省中医

院肿瘤科研究而成，水杨梅根、虎杖根、藤梨根是主要组成部分，被证实具有调节肿瘤炎症微环境及相关因子分泌的药效作用，但相关机制尚不明晰[13-15]。

本研究各组细胞增殖情况比较发现解毒三根汤血清组细胞培养 24 、48 和 72 h 时吸光值明显低于对照血清组和模型血清组。上述结果说明与解毒三根汤具有抑制结肠癌 CT-26 细胞增殖的能力。虎杖根含有大量白藜芦醇，属于 Sirt1 的激动剂，文献[16]提示其与姜黄素联合使用可以抑制结直肠癌的细胞增殖并刺激细胞凋亡，其中降低 NF-κB 活性是其主要作用机制；解毒三根汤来达到控制肿瘤的异常增殖，主要可能为白藜芦醇的作用[17-18]。

各组细胞迁移和侵袭情况比较发现解毒三根汤血清组迁移细胞数和侵袭细胞数明显低于对照血清组和模型血清。上述结果说明与解毒三根汤能够显著抑制结肠癌 CT-26 细胞的迁移和侵袭有关。前期的研究发现对细胞的抑制作用可能与凋亡相关蛋白有关，能够上调 Caspase-3 的表达及抑制 mTOR、ROCK2 的表达，进而抑制结肠癌 CT-26 细胞的迁移和侵袭[19-20]。

细胞凋亡受多基因的程序化调控，可以通过分子调控机制诱导肿瘤细胞凋亡。相关研究[21-22]提示 Bax、Bcl-2 蛋白是多种肿瘤恶性增殖、转移及凋亡的重要蛋白，Bax 可存在于整个分子中，不仅可拮抗 Bcl-2 的抑制凋亡作用，甚至可直接促进细胞凋亡；Bcl-2 基因属于细胞凋亡抑制基因，在多种实体肿瘤中均具有异常表达，被认为与肿瘤的预后及发生、发展关系密切[23-24]。本研究各组细胞 Bcl-2、Bax 表达比较发现解毒三根汤血清组 Bax 蛋白相对表达量明显高于其他两组，而 Bcl-2 蛋白相对表达量明显低于对照血清组和模型血清组。上述结果说明解毒三根汤可能是通过调控 Bax、Bcl-2 表达而发挥抑制结肠癌 CT-26 细胞增殖、迁移和侵袭能力。现代药理学研究[25]发现藤梨根能够上调抑癌基因 TP53 和抑制细胞周期调控因子 Cyclin 的表达，促进细胞的凋亡，还可下调 FGFR 及 uPA 的基因表达，抑制肿瘤新生血管的出现。虎杖根具有散瘀止痛、祛风利湿、化痰止咳的作用，文献[15]提示虎杖根对 HepG2 细胞的抑制作用较强，其活性成分白藜芦醇对肝癌细胞、乳腺癌细胞等多种癌细胞株均具有较强的抑制作用。水杨梅根具有消肿止痛、清热解毒的功效，其提取物水杨梅醇发现对宫颈癌和白血病细胞具有抑制作用，可以作用于肿瘤细胞的正丁醇或乙酸乙酯部分发挥作用，进而调控相关凋亡蛋白的表达[13]。

总之，本次研究采用解毒三根汤能够抑制结肠癌患者 CT-26 细胞增殖、迁移和侵袭能力，研究其机制发现可能与调控 Bax、Bcl-2 表达有关。

参考文献

[1] 魏欣. 广叶绣球菌多糖对 AOM/DSS 诱导小鼠结肠癌的抑制作用及机制研究[D]. 晋中：山西农业大学，2022.
[2] 司晓闯，张雪鹏. β-catenin、BRG1 和 ADAM17 在结肠癌组织中的表达及临床意义[J]. 华北理工大学学报(医学版)，2022，24(5)：364-370.
[3] 阮善明，周萌萌，袁莉，等. 解毒三根汤对结肠癌 SW480 细胞侵袭转移及 AKT/GSK-3β 信号通路的影响[J]. 中医杂志，2019，60(16)：1401-1406.
[4] 严卿莹，阮善明，张恺，等. 解毒三根汤调控糖酵解逆转人结肠癌 LOVO/5-FU 细胞株耐药的机制[J]. 中华中医药杂志，2019，34(4)：1751-1756.
[5] 蒋星，刘平安，谢梦洲，等. 参山颗粒对 CT26.WT 荷瘤小鼠的免疫调节及抗肿瘤作用[J]. 湖南中医药大学学报，2023，43(9)：1576-1583.
[6] 蒋星. 参山颗粒工艺优化及对 CT26.WT 结肠癌荷瘤小鼠抑瘤和免疫作用的研究[D]. 长沙：湖南中医药大学，2023.
[7] 任彩佩. 白藜芦醇通过抑制细胞焦亡抗结肠癌的机制[D]. 太原：山西医科大学，2022.
[8] 脱璐尧，辛红，吕琨，等. 405 例结肠癌患者围手术期的中医证型分布特征研究[J]. 世界中医药，2023，18(16)：2349-2353.
[9] 王艺洁，徐超，王宣璎，等. 不同中医证候的结肠癌肠道菌群特点及肝气郁结型结肠癌肠道菌群的促瘤作用[J]. 中华中医药杂志，2023，38(6)：2832-2837.
[10] 苑清国. 健脾益气方联合针灸治疗结肠癌术后患者的效果[J]. 中国民康医学，2023，35(7)：105-107.
[11] 王蕾，谢智惠，吴平. 结肠癌患者中医证型分布与营养标志物的关系[J]. 临床与病理杂志，2022，42(8)：1829-1835.
[12] 潘丽，井海亮，任益锋，等. 基于“肝脾同病”探析结肠癌肝转移的中医治疗[J]. 中医杂志，2022，63(17)：1638-1643.
[13] 陈欣欣，黄彩莹，仇雯霞，等. 基于 UHPLC-HRMS 探讨水杨梅根水提物对大鼠血浆代谢物的影响[J]. 亚太传统医药，2022，18(5)：20-26.
[14] 王成功，马春月，张瑜，等. 水杨梅根乙酸乙酯提取物对人肝癌 Bel7402 细胞凋亡及增殖的影响[J]. 智慧健康，2021，7(1)：22-24.
[15] 孔德暄，朱映睿，朱蔚然，等. HPLC 同时测定虎杖根不同部位中的 5 种活性成分[J]. 中国现代中药，2020，22(1)：53-57.
[16] 白姣姣，阿丽亚·依拉木，阿布都艾则孜·艾尔肯，等. 中药复方及单体治疗结肠癌药效与机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志，2023，29(4)：246-252.
[17] 吴文婷，李敏，蒲文娟. 白藜芦醇对慢性阻塞性肺疾病大鼠 p38 丝裂原活化蛋白激酶/核因子-κB 信号通路的影响[J]. 陕西医学杂志，2023，52(11)：1489-1492，1534.
[18] 梁爱红，沈小卜，李素云，等. 白藜芦醇保护配子发生的作用及机制研究进展[J]. 中国现代应用药学，2021，38(22)：2906-2912.
[19] FU C X，CHU J F，SHEN A L，et al. Pien Tze Huang alleviates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in CT-26 tumor-bearing mice[J]. Exp Ther Med，2017，14(3)：2291-2297.
[20] PRZYBYSZEWSKA M，MIŁOSZEWSKA J，KOTLARZ A，et al. Imatinib inhibits the renewal and tumorigenicity of CT-26 colon cancer cells after cytoreductive treatment with doxorubicin[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz)，2017，65(1)：51-67.
[21] 吴兴邦. 健脾益肾中药联合化疗治疗结肠癌疗效和安全性的系统评价[D]. 武汉：湖北中医药大学，2022.
[22] 习隽丽，石磊，张昌敏，等. 中医健脾法配合 FOLFOX 化疗方案对结肠癌术后癌因性疲乏、Th1/Th2 免疫应答平衡和周围神经病变的影响观察[J]. 中华中医药学刊，2019，37(6)：1503-1505.
[23] 石婷婷. 芪地补元汤联合化疗治疗结肠癌术后肝肾阴虚型患者的临床观察[D]. 哈尔滨：黑龙江中医药大学，2019.
[24] 李晶. 法氏囊五肽抑制结肠癌 HCT116 细胞增殖效应的机制及其与金雀异黄素联合应用的初步研究[D]. 扬州：扬州大学，2019.
[25] 刘宏飞，何国浓，王杰，等. 藤梨根活性成分熊果酸、齐墩果酸对人胃癌细胞 SGC-7901 增殖以及 VEGF、HIF-1α 表达影响的研究[J]. 浙江中医杂志，2022，57(6)：394-396.