厚朴三物汤通过调节 Rab27a 表达抑制外泌体分泌抗结直肠癌*

陈舒[1]，荣康[2]，张楠[3]，孙维义[3]

1. 河南中医药大学，河南 郑州 450046；2. 郑州大学第五附属医院消化内科，河南 郑州 450052；
3. 河南中医药大学第一附属医院普外科，河南 郑州 450000

摘要：目的：探讨厚朴三物汤（Houpo Sanwu decoction，HPSWD）调节 Rab27a 表达和外泌体分泌抗结直肠癌的作用机制。方法：将 MC38 细胞分为空白对照组、阴性对照组、Rab27a 过表达组，采用 Western blot 和 RT－qPCR 法检测转染效率。将 MC38 细胞分为空白组、对照血清组（10% 对照血清）、含药血清组（10% HPSWD 含药血清）、Rab27a 组（10% HPSWD 含药血清＋Rab27a 过表达）、5－FU 组（25 mg·L^{-1} 5－FU）。采用 Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭能力，流式细胞术检测细胞凋亡率，透射电子显微镜观察外泌体形态。采用 Western blot 和 RT－qPCR 法检测细胞 Rab27a、CD63、ALIX、TSG101 表达水平。结果：RT－qPCR 和 Western blot 显示，与空白对照组比较，Rab27a 过表达组细胞 Rab27a 表达水平升高（$P<0.000\ 1$）；与阴性对照组比较，Rab27a 过表达组细胞 Rab27a 表达水平升高（$P<0.000\ 1$）。Transwell 显示，与空白组比较，含药血清组细胞迁移和侵袭数量减少（$P<0.000\ 1$）。与对照血清组比较，含药血清组细胞迁移和侵袭数量减少（$P<0.000\ 1$）。与含药血清组比较，Rab27a 组细胞迁移和侵袭数量增加（$P<0.01$）。流式细胞术显示，与对照血清组比较，含药血清组细胞凋亡率升高（$P<0.000\ 1$）。与含药血清组比较，Rab27a 组细胞凋亡率降低（$P<0.000\ 1$）。透射电镜显示，外泌体为双层膜的圆形颗粒。Western blot 显示，与空白组、对照血清组比较，含药血清组细胞 Rab27a、CD63、ALIX、TSG101 蛋白表达水平降低（$P<0.000\ 1$）。与含药血清组比较，Rab27a 组细胞 Rab27a、CD63、ALIX、TSG101 蛋白表达水平升高（$P<0.01$）。RT－qPCR 显示，与空白组、对照血清组比较，含药血清组细胞 *Rab27a* mRNA、*CD63* mRNA、*ALIX* mRNA、*TSG101* mRNA 表达水平降低（$P<0.000\ 1$）。与含药血清组比较，Rab27a 组细胞 *Rab27a* mRNA、*CD63* mRNA 表达水平升高（$P<0.01$），5－FU 组细胞 *ALIX* mRNA、*TSG101* mRNA 表达水平升高（$P<0.000\ 1$）。结论：厚朴三物汤可能通过调节 Rab27a 表达，抑制外泌体分泌，从而发挥抗结直肠癌的作用。

关键词：厚朴三物汤；结直肠癌；Rab27a；外泌体
DOI：10.16368/j.issn.1674－8999.2025.04.140
中图分类号：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674－8999(2025)04－0867－09

Houpo Sanwu Decoction Inhibiting Exosome by Regulating Rab27a Expression Against Colorectal Cancer

CHEN Shu[1]，RONG Kang[2]，ZHANG Nan[3]，SUN Weiyi[3]

1. Henan University of Chinese Medicine，Zhengzhou Henan China 450046；2. Department of Gastroenterology，The Fifth Affiliated Hospital to Zhengzhou University，Zhengzhou Henan China 450052；3. Department of General Surgery，The First Affiliated Hospital to Henan University of Chinese Medicine，Zhengzhou Henan China 450000

Abstract：Objective：To explore the mechanism of Houpo Sanwu Decoction（HPSWD）in regulating Rab27a expression and exosome secretion against colorectal cancer. Methods：MC38 cells were divided into blank control group，negative control group and Rab27a overexpression group，and the transfection efficiency was detected by Western blot and RT－qPCR. MC38 cells were divided into blank group，control serum group（10% control serum），drug－containing serum group（10% HPSWD drug－containing serum），Rab27a group（10%

* **基金项目**：河南省自然科学基金项目（222300420489）

HPSWD drug – containing serum + Rab27a overexpression), and 5 – FU group(25 mg · L^{-1}). Transwell assay was used to detect cell migration and invasion ability, flow cytometry to detect apoptosis rate, and transmission electron microscopy to observe exosome morphology. Western blot and RT – qPCR were used to detect the expression levels of cellular Rab27a, CD63, ALIX, and TSG101. Results: RT – qPCR and Western blot showed that the expression level of Rab27a in cells of Rab27a overexpression group was elevated when compared with the blank control group($P < 0.000\ 1$); and the expression level of Rab27a in cells of the Rab27a overexpression group was elevated when compared with the negative control group($P < 0.000\ 1$). Transwell showed that compared with the blank group Transwell showed that the number of cell migration and invasion was reduced in the drug – containing serum group compared with the blank group($P < 0.000\ 1$). The number of cell migration and invasion was reduced in the drug – containing serum group compared with the control serum group($P < 0.000\ 1$). The number of cell migration and invasion was increased in the Rab27a group compared to the drug – containing serum group($P < 0.01$). Flow cytometry showed increased apoptosis in the drug – containing serum group compared with the control serum group($P < 0.000\ 1$). The apoptosis rate was decreased in the Rab27a group compared with the drug – containing serum group($P < 0.000\ 1$). Transmission electron microscopy showed that the exosomes were round particles with double membrane. Western blot showed that the protein expression levels of Rab27a, CD63, ALIX, TSG101 were decreased in the cells of the drug – containing serum group when compared with the blank group and the control serum group($P < 0.000\ 1$). Compared with the drug – containing serum group, the protein expression levels of Rab27a, CD63, ALIX, and TSG101 in cells of Rab27a group were increased($P < 0.01$). RT – qPCR showed that compared with the blank group and control serum group, the expression levels of *Rab27a* mRNA, *CD63* mRNA, *ALIX* mRNA, and *TSG101* mRNA in cells of the drug – containing serum group were levels were reduced($P < 0.000\ 1$). Compared with the drug – containing serum group, the expression levels of *Rab27a* mRNA and *CD63* mRNA in cells of the Rab27a group were increased($P < 0.01$), and the expression levels of *ALIX* mRNA and *TSG101* mRNA in cells of the 5 – FU group were increased($P < 0.000\ 1$). Conclusion: Houpo Sanwu Decoction may exert anti colorectal cancer effects by regulating Rab27a expression and inhibiting exosome secretion.

Key words: Houpo Sanwu Decoction; colorectal cancer; Rab27a; exosome

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)在全球癌症发病率中位居第三,病死率位居第二[1-2]。近年来,我国结直肠癌发病率呈上升趋势,其发病率和死亡率在所有恶性肿瘤中位居第三和第五[3]。CRC 因起病隐匿,早期临床症状不明显,导致大多数患者在确诊时已处于中晚期或出现转移[4]。尽管手术、化疗等方法可在一定程度上缓解症状,但许多 CRC 患者预后仍较差,且化疗会产生严重的不良反应和毒性[5-7]。目前,中医药已被证实具有抗肿瘤作用,可提高化疗、放疗、靶向治疗及免疫治疗的疗效,同时减轻治疗相关的不良反应[8-9]。

外泌体是由哺乳动物细胞分泌的脂质双层膜小泡,直径为 40 ~ 150 nm[6,10]。大量证据表明,外泌体作为细胞间通信的信使,尤其是肿瘤来源的外泌体,通过携带环状 RNA、微小 RNA、mRNA、蛋白质及脂质等分子,在肿瘤的发生、发展、转移及耐药性中发挥重要作用[6,11]。Rab27a 作为 Rab27 小 GTP 酶家族的重要成员,是细胞内分泌途径的关键蛋白,对多泡体的转运及外泌体的分泌具有正向调节作用[12]。Rab27a 已被证明是一种促进人类癌症发展的癌蛋白[13]。

厚朴三物汤(Houpo Sanwu decoction, HPSWD)源自《金匮要略》,由厚朴、大黄、枳实组成。厚朴理气导滞,大黄通腑泄热,枳实破气消积。CRC 的主要病机为正虚、气机升降失调,以厚朴为主的厚朴三物汤重在行气导泄,是调理气机升降的经典方剂,临床用于治疗多种胃肠疾病。研究表明,厚朴中的厚朴酚、大黄中的大黄素以及枳实均具有抗癌作用[14-16]。但 HPSWD 治疗 CRC 的分子机制尚不明确,限制了其在临床的应用。因此,本研究以小鼠 CRC 细胞 MC38 为实验对象,探讨 Rab27a 调控外泌体分泌的潜在机制,为 HPSWD 在 CRC 临床治疗中的应用提供科学依据。

1　材料

1.1　动物　SPF 级 SD 大鼠 20 只,6 周龄,体质量(200 ± 10)g,购于北京华阜康生物科技股份有限公司,生产许可证号:SCXK(京) – 2019 – 0008。大鼠饲养于河南中医药大学第一附属医院动物实验中心,温度 24 ~ 26 ℃,湿度 45% ~ 55%,光暗周期 12 h/12 h,自由进食和饮水。本实验由河南中医药大学第一附属医院实验动物福利伦理委员会审核批准,伦理审批号:YFYDW2022015。

1.2　细胞　小鼠结直肠癌 MC38 细胞购自北京北

纳科技有限公司，货号：BNCC337716，传代至第 4 代进行后续实验。

1.3　药物及试剂　厚朴、大黄、枳实（河南中医药大学第一附属医院制剂中心）；5－氟尿嘧啶（5－fluorouracil，5－FU）（天津金耀药业有限公司，批号：H12020959）；Rab27a 过表达重组质粒（北京博迈德基因技术有限公司，货号：BM8387）；Lipofectamine™ 3000 转染试剂、Transwell 小室（赛默飞世尔科技公司，货号：L3000015、14312）；RPMI Medium 1640 培养基、1×PBS 缓冲液、胎牛血清、胰蛋白酶、结晶紫染液、BCA 蛋白浓度检测试剂盒、RNA 提取试剂盒、2%磷钨酸负染色液（北京索莱宝科技有限公司，货号：31800、P1020、S9020、T1300、G1061、PC0020、R1200－50T、G1870）；CCK－8 试剂盒（北京赛百科科技有限公司，货号：F25）；Matrigel 基质胶（康宁生命科学公司，货号：356234）；Rab27a、CD63、TSG101、ALIX 抗体（Servicebio 生物科技有限公司，货号：GB111106、GB12620、GB111106、GB124080）；荧光定量逆转录试剂盒、荧光定量检测试剂盒（宝日医生物技术北京有限公司，货号：RR047A、RR820A）；凋亡检测试剂盒（苏州四正柏生物科技有限公司，货号：FXP018）。

1.4　仪器　酶标仪、荧光定量 PCR 仪（伯乐生命医学产品上海有限公司，型号：Model 550、CFX）；显微镜（Leica 公司，型号：DM3000）；掌上离心机、垂直电泳仪、转印电泳仪（Servicebio 生物科技有限公司，型号：MS6000、SVE－2、SVT－2）；化学发光仪（上海勤翔科学仪器有限公司，型号：6100）；超微量分光光度计（赛默飞世尔科技公司，型号：NanoDrop2000）；流式细胞仪（必达科生物苏州有限公司，型号：BeamCyte－1026）；透射电镜（日本 Jeol 公司，型号：JEM1230）。

2　方法

2.1　药物制备　厚朴三物汤由厚朴 24 g、大黄 12 g、枳实 9 g 组成。按原方药量加入 4 倍体积水，浸泡 30 min，回流提取，沸腾后 10 min 用纱布过滤出药液。药渣再加 2 倍体积水提取，方法同前。合并 2 次药液，减压浓缩至质量浓度为 2 g·mL^{-1}的药液，4 ℃ 保存备用[17]。

2.2　含药血清制备　将 20 只 SD 大鼠随机分为对照组和厚朴三物汤组。根据人与动物体表面积换算灌胃剂量，厚朴三物汤组大鼠的灌胃剂量为 4 g·kg^{-1}，对照组大鼠以等剂量生理盐水灌胃，连续 7 d。

末次给药后 1 h，异氟醚麻醉大鼠，腹主动脉采血，3 000 r·min^{-1}离心 15 min，上清液 56 ℃水浴灭活 30 min。在无菌操作台上，用 0.22 μm 过滤器去除细菌，然后密封保存在－80 ℃冰箱。

2.3　细胞培养与转染　细胞培养：将 CRC 细胞株 MC38 置于含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基，5% CO_2、37 ℃培养箱中培养。所有用于细胞培养的胎牛血清均在 4 ℃离心过夜，以确保去除胎牛血清来源的外泌体。

细胞转染：取对数生长期的 MC38 细胞，待其贴壁后分为空白对照组、阴性对照组、Rab27a 过表达组。将细胞培养至密度为 70% ~90%，用培养基稀释载体，并添加 P3000™，混匀。在稀释好的 Lipofectamine™ 3000 中加入稀释的载体（1∶1），室温孵育 5 min。将混合液加入培养液中，摇匀，37 ℃孵育 3 d。使用 Western blot 和 RT－qPCR 法检测转染效率。

2.4　CCK－8 实验检测细胞活力　取对数生长期的 MC38 细胞，以每孔 8 000 个接种于 96 孔板。培养 24 h 后，将细胞分为对照组（对照组血清干预）和 HPSWD 组（厚朴三物汤组血清干预）。每组再分为 3 个血清浓度，即 5%对照组、5% HPSWD 组、10%对照组、10% HPSWD 组、20%对照组、20% HPSWD 组，加入相应的血清进行培养。以完全培养基为空白组，培养 24 h 后，在酶标仪 450 nm 波长处检测细胞活力。

2.5　Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭能力　取对数生长期的 MC38 细胞，将细胞随机分为空白组（完全培养基）、对照血清组（10%对照血清）、含药血清组（10% HPSWD 含药血清）、Rab27a 组（10% HPSWD 含药血清＋Rab27a 过表达）、5－FU 组（25 mg·L^{-1} 5－FU）。将 Matrigel 在 4 ℃下解冻，使用 4 ℃无血清培养基稀释基质胶，终浓度为 1 g·L^{-1}。冰上将稀释的 Matrigel 垂直于下室底部，37 ℃孵育成凝胶（迁移实验此步省略）。在无血清培养基中进行悬浮细胞计数，细胞浓度设定为 2×10^5 mL^{-1}。24 孔板下室注入含 10%胎牛血清的培养基，上室注入细胞悬液，培养箱孵育后用 4%多聚甲醛后固定。结晶紫染色液染色后 PBS 冲洗，取

出小室，用镊子取出薄膜，晾干后用中性胶密封，最后在显微镜下拍照计数。

2.6　流式细胞术检测细胞凋亡水平　细胞分组同 2.5。干预 24 h 后收集细胞，用胰蛋白酶消化，在冷 PBS 中洗涤 2 次。然后用 75% PBS 和无水乙醇固定。加入 5 μL Annexin V－FITC 和 15 μL PI 染色液，在室温下避光孵育 15 min，采用流式细胞仪进行检测。

2.7　外泌体的提取　取 50 mL 细胞培养物，4 ℃离心 10 min，获得上清液。将上清液离心 10 min，并转移到无菌离心管中，在超速离心机中 4 ℃离心 30 min。去除上清液后，4 ℃离心 70 min。取出管底的澄清沉淀物，重悬于 PBS 中，通过 0.22 μm 过滤器过滤，从而获得外泌体。

2.8　透射电子显微镜观察外泌体形态　采用吸管将一小滴外泌体样品放在蜡盘上。取铜网，使有支撑膜的表面与样品液表面接触，静置 3～5 min，取出铜网，用滤纸条吸附多余的液滴，稍干。取 2% 磷钨酸溶液滴于蜡盘上。将吸附样品的铜网置于染液表面（样品与染液接触），静置 3～5 min。去除铜网后，用滤纸条将多余的液滴吸出，并在白炽灯下晾干。最后，在透射电子显微镜下观察并拍照。

2.9　Western blot 实验检测 Rab27a、CD63、ALIX、TSG101 蛋白表达水平　使用 PBS 洗涤细胞，加入裂解液、蛋白酶抑制剂，4 ℃、12 000 r·min^{-1} 离心 15 min，收集上清液。采用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒测定蛋白浓度，煮沸，经 15% SDS－PAGE 处理后转移到 PVDF 膜上。5% 脱脂乳室温封闭 1 h，一抗（稀释比例均为 1∶5 000）室温孵育 4 h，二抗（稀释比例均为 1∶5 000）室温孵育 2 h，按照 ECL 试剂盒说明书配置显影液并拍照。以 actin 为内参蛋白，使用 Image Lab 软件进行分析，将目的蛋白与内参蛋白的灰度值比值作为目的蛋白的相对表达水平。

2.10　RT－qPCR 法检测 *Rab27a*、*CD63*、*ALIX*、*TSG101* 基因表达水平　采用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA，超微量分光光度计检测 RNA 纯度，并记录 A260/A280 比值。采用荧光定量逆转录试剂盒将总 RNA 进行逆转录，荧光定量检测试剂盒进行 PCR 扩增。以 *GAPDH* 作为内参基因，使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算目的基因的相对表达水平。引物序列见表 1。

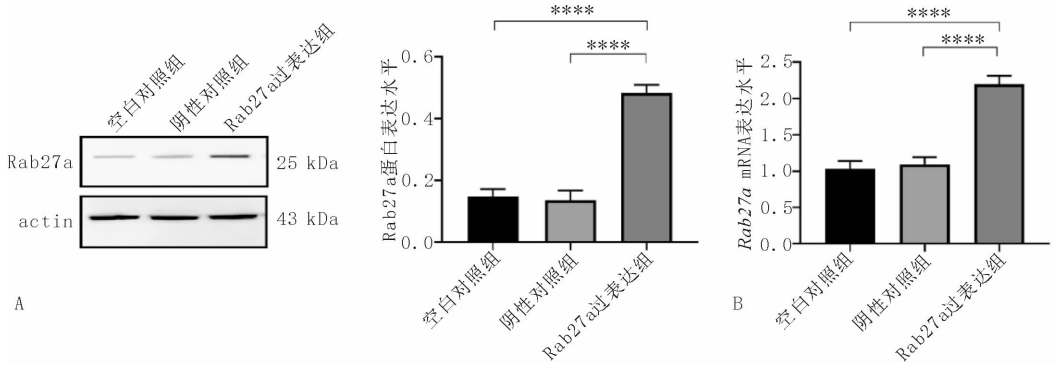
表 1　引物序列

基因	序列（5′－3′）	长度/bp
Rab27a	F：ACAAACATAAGCCACGCGAT	137
	R：TCCTCACTTAGCTGATCCGCAGA	
CD63	F：TGAAGCAGGCCATTACCCAT	68
	R：ACCCACTGCAATGATGACCAC	
ALIX	F：TCCAATGACCTGTACAAGCCT	137
	R：GGCTTACACAGAAGTGCGAT	
TSG101	F：ATATAATATTCCAATATGCCTGT	87
	R：GTCATTGAACTAGTAGGCTT	
GAPDH	F：CCTCGTCCCGTAGACAAAATG	135
	R：TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT	

2.11　统计学方法　采用 GraphPad Prism 9.5.1 软件对实验数据进行统计分析，Adobe Photoshop2020 软件绘图，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。多组间比较若服从正态分布，采用单因素方差分析，方差齐者采用 *LSD* 检验；若不服从正态分布，采用秩和检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3　结果

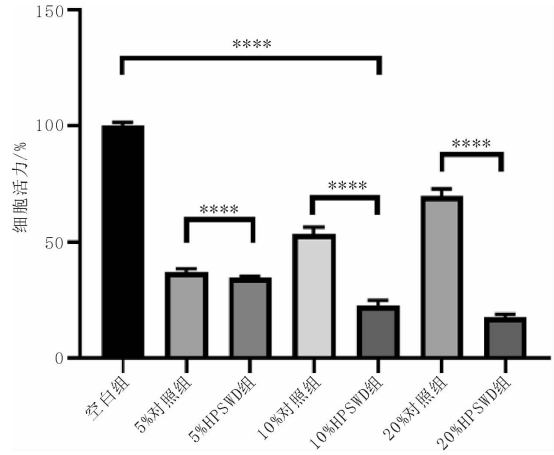
3.1　Rab27a 在 MC38 细胞中的转染情况　RT－qPCR 和 Western blot 显示，与空白对照组比较，Rab27a 过表达组细胞 Rab27a 表达水平升高（$P<0.000\ 1$）；与阴性对照组比较，Rab27a 过表达组细胞 Rab27a 表达水平升高（$P<0.000\ 1$），说明 Rab27a 在 MC38 细胞中成功过表达，见图 1。



注：A：Rab27a 蛋白表达水平比较；B：*Rab27a* mRNA 表达水平比较；＊＊＊＊ $P<0.000\ 1$。

图 1　各组 MC38 细胞中 Rab27a 蛋白和基因表达水平比较

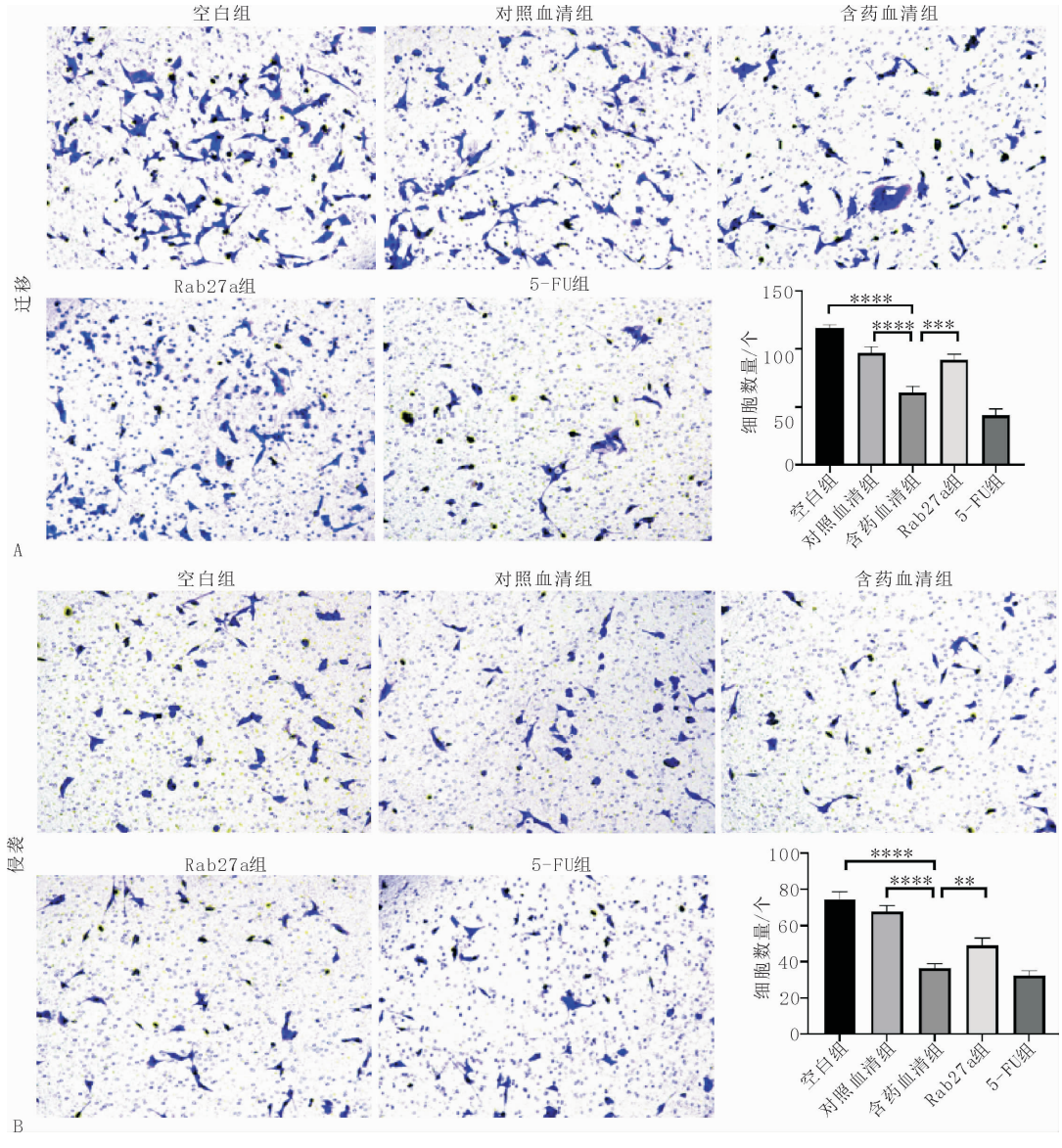
3.2　HPSWD 对 MC38 细胞活力的影响　CCK－8 检测显示，与空白组比较，10% HPSWD 组细胞活力降低（$P<0.000\ 1$）。与 5% 对照组比较，5% HPSWD 组细胞活力降低（$P<0.000\ 1$）。与 10% 对照组比较，10% HPSWD 组细胞活力降低（$P<0.000\ 1$）。与 20% 对照组比较，20% HPSWD 组细胞活力降低（$P<0.000\ 1$），见图 2。因 20% HPSWD 的抑制作用太强，故选择 10% HPSWD 进行后续实验。



注：＊＊＊＊$P<0.000\ 1$。

图 2　各组 MC38 细胞活力比较

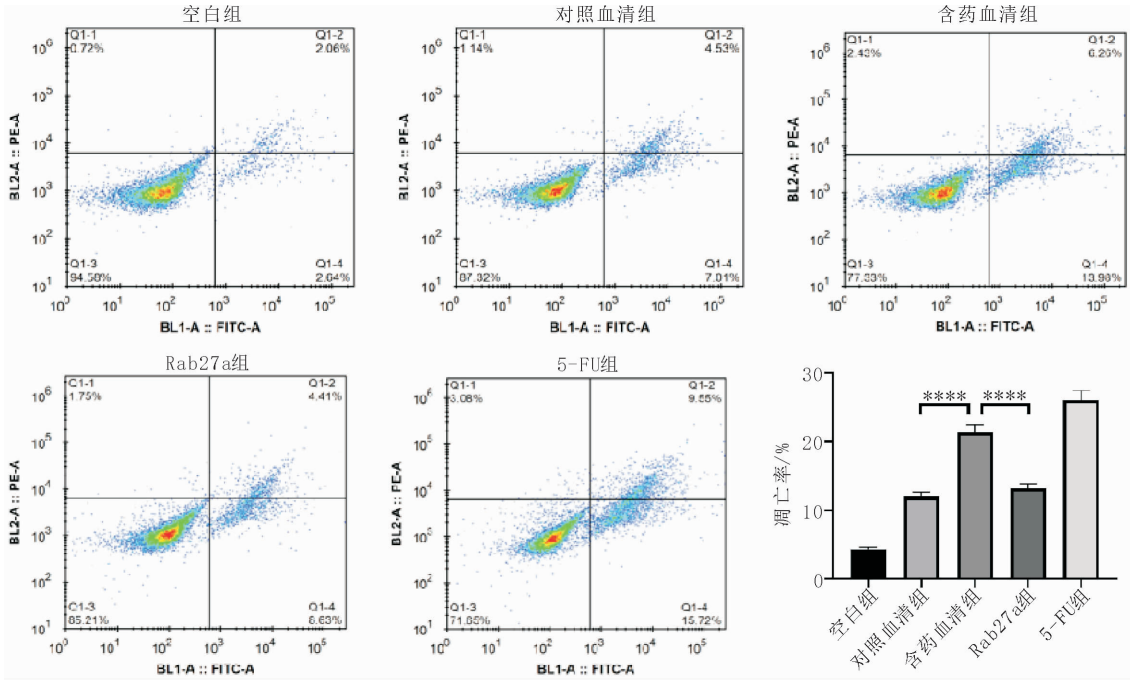
3.3　HPSWD 对 MC38 细胞迁移、侵袭的影响　Transwell 显示，与空白组比较，含药血清组细胞迁移和侵袭数量减少（$P<0.000\ 1$）。与对照血清组比较，含药血清组细胞迁移和侵袭数量减少（$P<0.000\ 1$）。与含药血清组比较，Rab27a 组细胞迁移和侵袭数量增加（$P<0.01$），见图 3。



注：A：细胞迁移数量比较；B：细胞侵袭数量比较；＊＊$P<0.01$，＊＊＊$P<0.001$，＊＊＊＊$P<0.000\ 1$。

图 3　各组 MC38 细胞迁移、侵袭数量比较

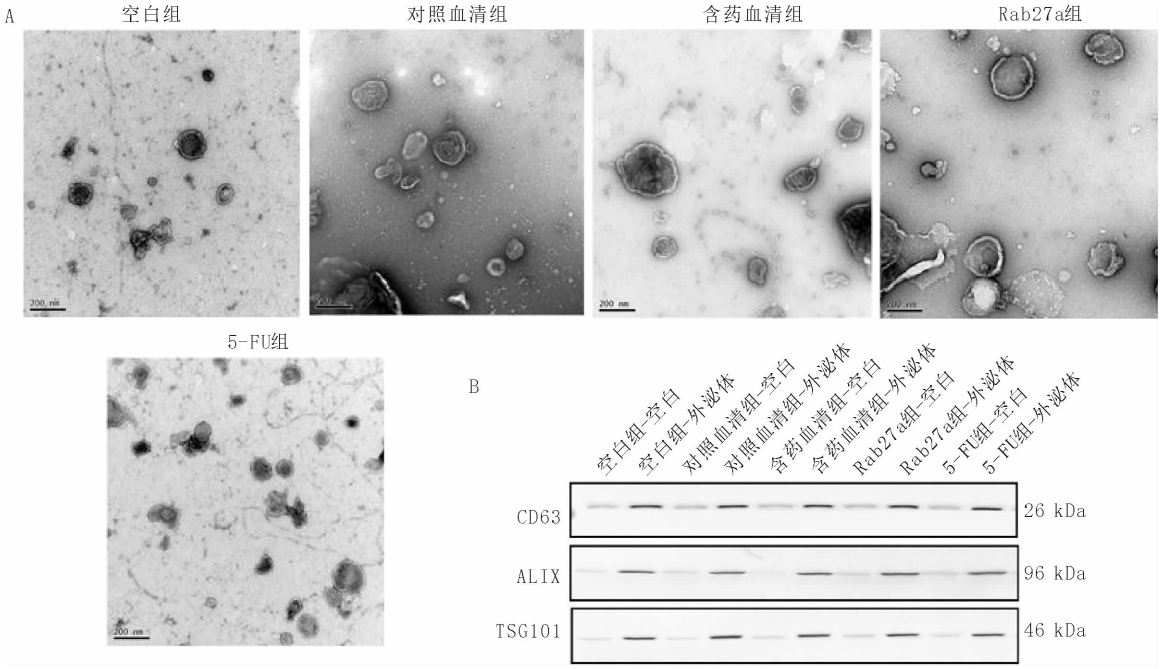
3.4　HPSWD 对 MC38 细胞凋亡的影响　流式细胞术显示，与对照血清组比较，含药血清组细胞凋亡率升高（$P<0.000\ 1$）。与含药血清组比较，Rab27a 组细胞凋亡率降低（$P<0.000\ 1$），见图 4。



注：* * * * $P<0.000\ 1$。

图 4　各组 MC38 细胞凋亡率比较

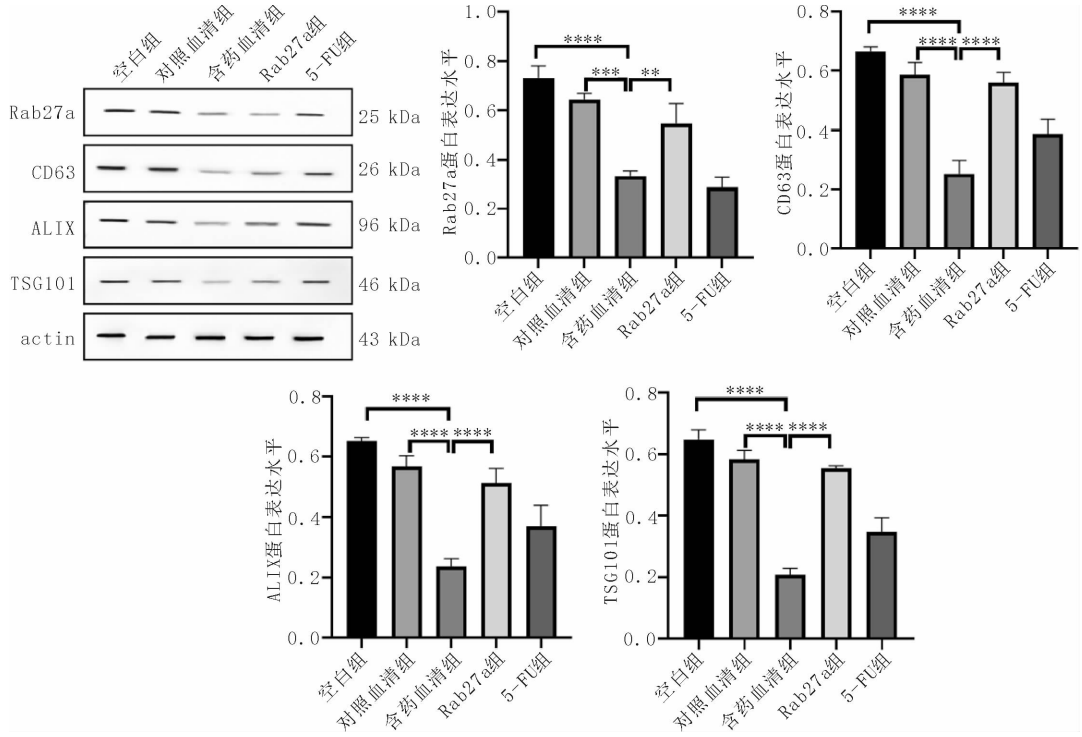
3.5　透射电镜观察 MC38 细胞来源的外泌体　Rab27a 是一种调节囊泡运输的小 GTP 酶，已被证明参与外泌体的分泌过程[12]。因此，本研究进一步探索 HPSWD 是否通过调控 Rab27a 抑制外泌体分泌。从 CRC 细胞上清液中提取外泌体，透射电镜显示外泌体为双层膜的圆形颗粒，符合典型的外泌体特征，见图 5A。采用 Western blot 法鉴定 CRC 来源的外泌体特异性标志物表达情况，结果显示 CD63、ALIX 及 TSG101 蛋白表达均呈阳性，见图 5B。



注：A：外泌体透射电镜图；B：外泌体特异性标志物 CD63、ALIX、TSG101 蛋白条带图。

图 5　外泌体的超微结构和 Western blot 鉴定

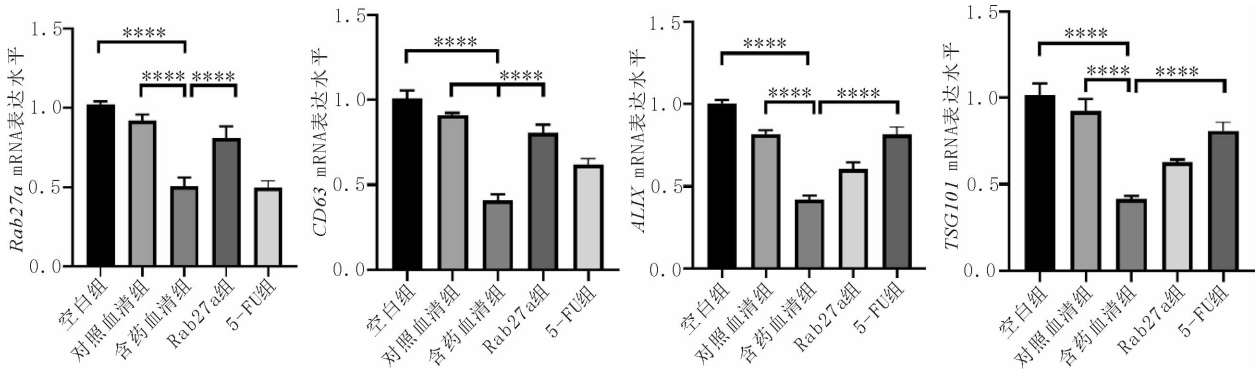
3.6　HPSWD 对 MC38 细胞 Rab27a、CD63、ALIX、TSG101 蛋白表达水平的影响　Western blot 显示，与空白组、对照血清组比较，含药血清组细胞 Rab27a、CD63、ALIX、TSG101 蛋白表达水平降低（$P<0.000\ 1$）。与含药血清组比较，Rab27a 组细胞 Rab27a、CD63、ALIX、TSG101 蛋白表达水平升高（$P<0.01$），见图 6。



注：＊＊$P<0.01$；＊＊＊$P<0.001$；＊＊＊＊$P<0.000\ 1$。

图 6　各组 MC38 细胞 Rab27a、CD63、ALIX、TSG101 蛋白表达水平比较

3.7　HPSWD 对 MC38 细胞 *Rab27a*、*CD63*、*ALIX*、*TSG101* 基因表达水平的影响　RT－qPCR 显示，与空白组、对照血清组比较，含药血清组细胞 *Rab27a* mRNA、*CD63* mRNA、*ALIX* mRNA、*TSG101* mRNA 表达水平降低（$P<0.000\ 1$）。与含药血清组比较，Rab27a 组细胞 *Rab27a* mRNA、*CD63* mRNA 表达水平升高（$P<0.01$），5－FU 组细胞 *ALIX* mRNA、*TSG101* mRNA 表达水平升高（$P<0.000\ 1$），见图 7。



注：＊＊＊＊$P<0.000\ 1$。

图 7　各组 MC38 细胞 *Rab27a*、*CD63*、*ALIX*、*TSG101* 基因表达水平比较

4　讨论

外泌体作为一种由哺乳动物细胞分泌的囊泡结构，因其双层膜结构而确保内容物不被降解，其在肿瘤中的作用受到广泛关注[6,18]。研究表明，外泌体影响细胞的生长、凋亡、迁移、侵袭和治疗耐受性，并参与多种恶性肿瘤的发生发展[19-21]。越来越多的研究表明，Rab27a 在多种癌症中异常表达，并控制

外泌体的释放，从而影响癌症进程[22-23]。但外泌体和 Rab27a 在 CRC 中的作用和调控机制尚未被广泛分析。深入研究 CRC 的发生发展机制，对于发掘新型治疗靶点和预防策略具有重要意义。

近年来，CRC 的发病率和病死率增长迅速[24-25]。CRC 属于中医“肠覃”“伏梁”“积聚”“脏毒”“锁肛痔”等范畴。CRC 的主要病机为正虚、气机升降失调，“正虚”是肿瘤发病的根本原因，CRC 则是在脾虚的基础上产生。《灵枢・水胀》云：“肠覃何如？岐伯曰：寒气客于肠外与卫气相搏，气不得荣，因有所系，僻而内着，恶气乃起，瘪肉乃生。始生也，大如鸡卵。”指出 CRC 虚实夹杂的病理特征。“气机升降失调”是 CRC 形成的基本病理过程，《素问・五脏别论》曰：“六腑者传化物而不藏，故实而不能满也。”说明六腑功能“以通为用”。六腑之气宜通不宜滞，滞则胀满，气机痞塞不通，升降失调，引发精、血、津液运行失常，聚湿为痰，血停为瘀，病理产物痰、瘀、毒等因而蓄积，停滞于虚弱之大肠，进一步加重气机失衡，最终导致 CRC 的发生。目前，中医药在 CRC 治疗中具有显著作用，并可与放化疗联合治疗肿瘤[26]。厚朴三物汤以行气为主，其主要功效为行气除满、去积通便，主治气滞不行、大便不通、实热内积、腹胀腹痛等症状，符合 CRC 顺应六腑“通降”的治则。临床治疗中，厚朴三物汤针对气滞便秘的疗效确切，其相关成分的抗肿瘤作用也有报道[14-16]。

为了深入探讨厚朴三物汤治疗 CRC 的作用靶点和机制，本研究观察了厚朴三物汤对 CRC 细胞的抑制作用及对 Rab27a 和外泌体分泌的调节作用。结果表明，与 10% 对照血清组比较，10% HPSWD 含药血清组的细胞活力受到抑制，表明 HPSWD 具有抗 CRC 细胞生长的作用。然后，通过 Transwell 实验和流式细胞术发现 HPSWD 具有抑制 CRC 细胞迁移、侵袭和促进凋亡的功能，且 10% HPSWD 含药血清 + Rab27a 过表达组与 10% HPSWD 含药血清组结果相反，表明 HPSWD 抗 CRC 作用可能是通过下调 Rab27a 实现的。随后，深入探索 HPSWD 是否通过调节 Rab27a 抑制外泌体分泌。从 CRC 细胞上清液中提取外泌体，透射电镜观察到外泌体为双层膜的圆形颗粒。采用 RT－qPCR 和 Western blot 检测，结果显示 HPSWD 可抑制 Rab27a 和外泌体标志物（CD63、ALIX 和 TSG101）的表达，而 Rab27a 过表达可促进外泌体的分泌。由此推测，HPSWD 治疗 CRC 的机制可能与调控 Rab27a 从而抑制外泌体分泌有关。

综上，本研究表明厚朴三物汤对 CRC 细胞具有一定的抑制作用，可能与下调 Rab27a 表达从而抑制癌细胞中外泌体分泌有关。此外，Rab27a 过表达可有效逆转厚朴三物汤对 CRC 细胞的拮抗作用。本研究为 CRC 细胞提供了新的肿瘤微环境相关调控机制，有助于制定 CRC 治疗新策略。厚朴三物汤有望成为治疗 CRC 的新型复方中药，未来将在动物实验和临床试验中进一步探索。

参考文献：

[1] LI C, LI X. Exosome－derived Circ_0094343 promotes chemosensitivity of colorectal cancer cells by regulating glycolysis via the miR－766－5p/TRIM67 axis[J]. Contrast Media Mol Imaging, 2022, 2022: 2878557.

[2] 何威华，邓兰，蒋益兰. 健脾消癌方对结肠癌 HCT116 细胞增殖、侵袭及迁移的影响及机制研究[J]. 中医学报，2023，38(12)：2639－2646.

[3] WU J, LU A D, ZHANG L P, et al. Study of clinical outcome and prognosis in pediatric core binding factor－acute myeloid leukemia[J]. Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi, 2019, 40(1): 52－57.

[4] WEI J S, GE X X, TANG Y, et al. An autophagy－related long noncoding RNA signature contributes to poor prognosis in colorectal cancer[J]. J Oncol, 2020, 2020: 4728947.

[5] HU J L, WANG W, LAN X L, et al. CAFs secreted exosomes promote metastasis and chemotherapy resistance by enhancing cell stemness and epithelial－mesenchymal transition in colorectal cancer[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 91.

[6] SHANG A Q, GU C Z, WANG W W, et al. Exosomal circPACRGL promotes progression of colorectal cancer via the miR－142－3p/miR－506－3p－TGF－β1 axis[J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 117.

[7] ZHAO S L, MI Y S, GUAN B J, et al. Tumor－derived exosomal miR－934 induces macrophage M2 polarization to promote liver metastasis of colorectal cancer[J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 156.

[8] WANG S M, LONG S Q, DENG Z Y, et al. Positive role of Chinese herbal medicine in cancer immune regulation[J]. Am J Chin Med, 2020, 48(7): 1577－1592.

[9] 曹叶芝，张琦，汪玲虎，等. 隐丹参酮调节 JAK2/STAT3 通路抑制胃癌耐药细胞增殖[J]. 中医学报，2024，39(5)：1036－1044.

[10] XI L, PENG M X, LIU S Q, et al. Hypoxia－stimulated ATM activation regulates autophagy－associated exosome release from cancer－associated fibroblasts to promote cancer cell invasion[J]. J Extracell Vesicles, 2021, 10

(11):e12146.
[11]ZHENG R, ZHANG K, TAN S Y, et al. Exosomal circLPAR1 functions in colorectal cancer diagnosis and tumorigenesis through suppressing BRD4 via METTL3 – eIF3h interaction[J]. Mol Cancer, 2022, 21(1):49.
[12]OSTROWSKI M, CARMO N B, KRUMEICH S, et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway[J]. Nat Cell Biol, 2010, 12(1):19 – 30.
[13]LI Q Y, ZHAO H X, DONG W W, et al. RAB27A promotes the proliferation and invasion of colorectal cancer cells [J]. Sci Rep, 2022, 12(1):19359.
[14]DAI G L, WANG D, MA S T, et al. ACSL4 promotes colorectal cancer and is a potential therapeutic target of emodin [J]. Phytomedicine, 2022, 102:154149.
[15]JANG Y, KIM E K, SHIM W S. Phytotherapeutic effects of the fruits of Poncirus trifoliata(L.) Raf. on cancer, inflammation, and digestive dysfunction [J]. Phytother Res, 2018, 32(4):616 – 624.
[16]LIU R X, REN W Y, MA Y, et al. BMP7 mediates the anticancer effect of honokiol by upregulating p53 in HCT116 cells[J]. Int J Oncol, 2017, 51(3):907 – 917.
[17]苏国宏. 厚朴三物汤对大鼠消化液分泌的影响[D]. 兰州:兰州大学, 2019.
[18]陈舒, 张静蕾, 荣康, 等. 外泌体在胃癌远处转移和耐药性中的研究进展[J]. 实用医学杂志, 2024, 40(6):870 – 876.
[19]QIU S K, XIE L, LU C, et al. Gastric cancer – derived exosomal miR – 519a – 3p promotes liver metastasis by inducing intrahepatic M2 – like macrophage – mediated angiogenesis[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2022, 41(1):296.
[20]SONG Q, YU H, CHENG Y D, et al. Bladder cancer – derived exosomal KRT6B promotes invasion and metastasis by inducing EMT and regulating the immune microenvironment[J]. J Transl Med, 2022, 20(1):308.
[21]XIE H Y, YAO J, WANG Y X, et al. Exosome – transmitted circVMP1 facilitates the progression and cisplatin resistance of non – small cell lung cancer by targeting miR – 524 – 5p – METTL3/SOX2 axis[J]. Drug Deliv, 2022, 29(1):1257 – 1271.
[22]CHEN L, GUO P, HE Y C, et al. HCC – derived exosomes elicit HCC progression and recurrence by epithelial – mesenchymal transition through MAPK/ERK signalling pathway[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(5):513.
[23]MOHAMED G E G, IBRAHIM F K, SHEHATA H H, et al. Exosomal expression of RAB27A and its related lncRNA Lnc – RNA – RP11 – 510M2 in lung cancer[J]. Arch Physiol Biochem, 2022, 128(6):1479 – 1485.
[24]ZHENG Z B, LUAN N, TU K, et al. The roles of protocadherin – 7 in colorectal cancer cells on cell proliferation and its chemoresistance [J]. Front Pharmacol, 2023, 14:1072033.
[25]陈舒, 荣康, 张楠. 外泌体在结直肠癌放化疗耐药中的研究进展[J]. 医学研究与战创伤救治, 2023, 36(8):864 – 870.
[26]RANJAN A, RAMACHANDRAN S, GUPTA N, et al. Role of phytochemicals in cancer prevention[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(20):4981.

收稿日期:2024 – 10 – 23
作者简介:陈舒(1997 –), 女, 河南商丘人, 医学硕士, 研究方向:消化系统肿瘤的临床与基础研究。
通信作者:张楠(1969 –), 男, 河南郑州人, 医学博士, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向:消化系统肿瘤的临床与基础研究。E – mail:jinglei. 1999@163. com
编辑:刘凯歌