

肠炎宁片对结直肠腺瘤-癌模型大鼠的治疗作用及机制

张凯轩¹ 杨 洋¹ 付志文² 贾胜娟² 魏 玮¹

(1. 中国中医科学院望京医院脾胃病科, 北京 100102; 2. 江西康恩贝中药有限公司, 上饶 334499)

【摘要】目的 观察肠炎宁片对结直肠腺瘤-癌(CRA-CRC)模型大鼠的治疗作用, 探讨其可能的作用机制。**方法** 随机取6只大鼠作为正常组(Normal组), 其余30只大鼠制备CRA-CRC模型, 予1, 2-二甲基肼二盐酸盐(1, 2-DMH) 60 mg/kg腹腔注射, 1次/周, 持续15周。第7周, 采用随机区组设计将模型大鼠分为模型组(Model组)、黄连素组(HLS组)、肠炎宁片低剂量组(L-CYN组)、肠炎宁片中剂量组(M-CYN组)、肠炎宁片高剂量组(H-CYN组), 每组6只。HLS组给予0.027 g/kg黄连素灌胃, L-CYN组、M-CYN组、H-CYN组分别给予0.3、0.6、1.2 g/kg肠炎宁片灌胃, Normal组、Model组给予等量蒸馏水灌胃。均1次/d, 持续8周。对比各组一般情况、体质量、腹腔解剖结构及肠道肿瘤发生情况、肠道肿瘤组织病理变化、结直肠组织中血管内皮生长因子(VEGF)蛋白表达和凋亡相关蛋白Cleaved Caspase-3表达。**结果** 造模第15周, 与Normal组比较, Model组体质量低($P<0.05$); 与Model组比较, HLS组、L-CYN组、M-CYN组、H-CYN组体质量差异无统计学意义($P>0.05$)。Model组大鼠腹腔有大量腹水。各组大鼠腹腔均未见明显脏器异常, 肉眼观察未见肿瘤脏器转移。与Normal组比较, Model组大鼠结肠长度短($P<0.05$), 肿瘤数量多($P<0.01$); 与Model组比较, H-CYN组大鼠结肠长度长($P<0.05$), HLS组、H-CYN组、M-CYN组大鼠肿瘤数量少($P<0.05$), H-CYN组有1只大鼠肉眼未观察到肿瘤。与Normal组比较, Model组大鼠肿瘤大($P<0.01$); 与Model组比较, HLS组、H-CYN组、M-CYN组大鼠肿瘤小($P<0.01$, $P<0.05$)。Model组结肠腺体和细胞数量明显增加, 细胞间有大量炎症细胞浸润, 细胞排列密集, 可见大小与形态显著变化的肿瘤细胞, 含有大而深染的细胞核, 核分裂现象多, 局灶腺体可见中-重度异型增生、高级别上皮内瘤变、局灶原位癌形成。L-CYN组杯状细胞消失, 细胞增生, 排列紧密, 有明显的核分裂, 可见许多细小核仁。HLS组和M-CYN组病理结果相仿, 可见淋巴滤泡增生、腺体修复样改变、隐窝脓肿、固有腺体局灶减少。H-CYN组腺体排列较整齐, 局灶炎症细胞浸润、糜烂、固有腺体局灶减少, 核分裂现象偶见。Model组大鼠腺癌发生率为50%, 管状腺瘤发生率为33.3%, 另1只大鼠为重度异型增生, 所有大鼠均造模成功。L-CYN组大鼠肠道肿瘤组织病理变化改善不明显, HLS组、M-CYN组、H-CYN组肠道肿瘤组织病变程度减轻, 其中H-CYN组效果最明显。与Model组比较, L-CYN组大鼠VEGF蛋白表达低, 但差异无统计学意义($P>0.05$), HLS组、M-CYN组、H-CYN组大鼠VEGF蛋白表达低($P<0.05$)。与Normal组比较, Model组大鼠结直肠组织中Cleaved Caspase-3蛋白表达低($P<0.05$)。与Model组比较, 各中药治疗组和HLS结直肠组织中Cleaved Caspase-3蛋白表达高($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 肠炎宁片可以改善CRA-CRC模型大鼠临床症状及结直肠黏膜病理变化, 其作用机制可能与降低VEGF表达并促进Cleaved Caspase-3表达有关。

【关键词】 肠炎宁片; 结直肠癌; 结直肠腺瘤; 癌前病变; 血管内皮生长因子; 活性半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶3

DOI: 10.16025/j.1674-1307.2024.09.002

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是起源于结直肠黏膜上皮的恶性肿瘤, 其癌前病变包括锯齿状病变、异型增生和结直肠腺瘤(colorectal adenoma, CRA)等^[1], 其中, CRA是最常见的癌前病变^[2]。随着人们生活习惯的改变, CRC的发

生率和死亡率呈不断升高趋势。2022年我国新增CRC患者51.71万例, 仅次于肺癌; 死亡24万例, 排名第四^[3]。在我国, 85%~90%的CRC是由CRA发展而来, 其过程长达数年甚至数十年, 为CRC的防治提供了时间窗口^[4]。针对癌前病变进行早

基金项目: 国家中医药管理局传承创新团队项目(ZYYCXTD-C-202210); 肠炎宁片中药大品种工艺优化及临床循证医学研究项目(2021A002)

作者简介: 张凯轩, 男, 25岁, 硕士。研究方向: 中医药防治脾胃病。

通信作者: 魏玮, E-mail: weiwei3816@mail.cintcm.ac.cn

引用格式: 张凯轩, 杨洋, 付志文, 等. 肠炎宁片对结直肠腺瘤-癌模型大鼠的治疗作用及机制[J]. 北京中医药, 2024, 43(9): 964-972.

期筛查与防治,可以显著降低CRC的发生率及死亡率。

魏玮教授在前期临床治疗中发现,湿热是CRA-CRC的关键病机,肠炎宁片是针对该病机的有效治疗药物。但目前关于肠炎宁片防治CRC的疗效及作用机制尚不明确,相关研究亦不多见。因此,本研究采用1,2-二甲基胍二盐酸盐(1,2-DMH)诱导CRA-CRC大鼠模型,以不同剂量肠炎宁片进行干预,观察其作用机制,为临床应用提供实验数据支持。

1 实验材料

1.1 实验动物

SPF级SD雄性大鼠36只,6周龄,体质量230 g左右,购于斯贝福(北京)生物技术有限公司,许可证编号SCXK(京)2019-0010;饲养于中国中医科学院中医基础理论研究所动物房,饲养环境温度 $(21.0\pm 1.3)^{\circ}\text{C}$,相对湿度40%~50%;适应性喂养1周。本实验严格遵守实验动物福利伦理审查的相关规定,批准文号IBTCMCACMSZ1-2305-04。

1.2 实验药物

肠炎宁片(江西康恩贝中药有限公司,国药准字Z36020518);黄连素(四川森科制药有限公司,国药准字H51022370)。

1.3 主要试剂

DMH(东京化成工业株式会社,货号D0741)、 NaHCO_3 (广州广试试剂科技有限公司,货号BD31)、活性半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶3(Cleaved Caspase-3)抗体(美国CST公司,货号9661)、血管内皮生长因子(VEGF)抗体(英国Abcam公司,货号ab1316)、GAPDH抗体(英国Abcam公司,货号ab181602)、Goat Anti-Rabbit IgG, HRP(英国Abcam公司,货号ab6721)、Western Protein Marker I(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号G2086)、BSA Blocking Buffer(北京百奥莱博科技有限公司,货号GPP1818)、SDS-PAGE Loading Buffer(北京百奥莱博科技有限公司,货号GPP1820)、SDS-PAGE Gel Kit(北京百奥莱博科技有限公司,货号GPP1816)、Western blotting Transfer Buffer(10 $\times$)(北京百奥莱博科技有限公司,货号GPP1817)、Tris缓冲盐溶液+Tween-20(TBST,北京百奥莱博科技有限公司,货号GPP1822)、Western Show(美国thermo公司,货号26616)。

1.4 实验仪器

自动组织脱水机[达科为(深圳)医疗设备有限公司,型号HP300],双垂直电泳槽(上海臻诺生物科技有限公司,型号MP-8001),转移槽(上海臻诺生物科技有限公司,型号MP-3030),温控摇床(其林贝尔仪器制造有限公司,型号TS-2000A),电泳仪(上海臻诺生物科技有限公司,型号PP-1150),涡旋振荡仪(其林贝尔仪器制造有限公司,型号QL-902),离心机(德国Eppendorf公司,型号Centrifuge 5415D)。

2 实验方法

2.1 动物造模与分组

将DMH溶于含有0.001 mol/L EDTA的生理盐水中,配制DMH溶液,再用 NaHCO_3 调pH为6.5~7.0,现配现用。随机取6只大鼠作为正常组(Normal组),其余大鼠制备CRA-CRC模型,给予DMH 60 mg/kg腹腔注射,每周1次,持续15周。第7周,用Excel2019按动物体质量分层随机区组设计将模型大鼠分为模型组(Model组)、黄连素组(HLS组)、肠炎宁片低剂量组(L-CYN组)、肠炎宁片中剂量组(M-CYN组)、肠炎宁片高剂量组(H-CYN组),每组6只。根据研究团队预实验和前期研究经验,所用造模方式较为成熟稳定,实验结束后解剖大鼠,通过显微镜观察大鼠结直肠组织病理切片,呈现异型增生、CRA等癌前病变及CRC说明模型制备成功。

2.2 给药方法

根据常用实验动物及人的体表面积比例换算^[5],70 kg成人与200 g大鼠折算系数为0.018。肠炎宁片低、中、高剂量组的用药量分别为成人常规剂量的0.5、1、2倍。以200 g大鼠为例,70 kg成人肠炎宁总剂量为6.72 g/d,则200 g大鼠剂量为0.12 g/d,以此作为中剂量,故中剂量组大鼠剂量为0.6 g/(kg·d),低剂量、高剂量组的用药量为中剂量组的0.5、2倍,即分别为0.3、1.2 g/(kg·d)。70 kg成人每日服用黄连素总剂量为0.3 g,则200 g大鼠剂量为0.005 4 g,故大鼠剂量为0.027 g/(kg·d)。每周根据大鼠体质量计算中药混悬液的相应浓度,配制后置于4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。于造模第7周进行药物干预,HLS组给予0.027 g/(kg·d)黄连素灌胃,L-CYN组、M-CYN组、H-CYN组分别给予0.3、0.6、1.2 g/(kg·d)肠炎宁片灌胃,Normal组、Model组结合体质量,给予蒸馏水2 mL灌胃。1次/d,持续8周。

2.3 观察指标与方法

2.3.1 一般情况：观察大鼠的活动状态、精神情况、大便性状、毛发色泽及光亮度等情况。

2.3.2 体质量：每周对大鼠进行称重，记录体质量。

2.3.3 腹腔解剖结构及肠道肿瘤发生情况：于造模第 15 周末以腹腔麻醉方式处死大鼠，剖取大鼠结直肠（自盲肠末端至肛门取整段结直肠），沿肠系膜纵向剖开，清理肠道粪便，用冰 PBS 缓冲液（4℃）反复漂洗，以肠黏膜面朝上放置于解剖台上，肉眼观察肠黏膜组织的炎症反应、肿瘤发生情况，记录肿瘤数量、大小。肿瘤大小=（长径+短径）/2。

2.3.4 肠道肿瘤组织病理变化观察：选取肿瘤较明显、黏膜红肿糜烂或溃疡处的病变肠段部分，置于 4% 的多聚甲醛固定液中固定 24 h，常规石蜡包埋，切片，苏木精-伊红染色法（HE）染色，观察肠道肿瘤组织病理变化，计算大鼠 CRC 及癌前病变的发生率，肿瘤发生率=（癌前病变只数+癌变只数）/动物总数×100%。

2.3.5 免疫组织化学染色（IHC）检测结直肠组织中血管内皮生长因子（VEGF）蛋白表达：每组随机选取 3 只大鼠结直肠远端组织蜡块，通过 IHC 染色检测大鼠结直肠黏膜组织中 VEGF 的表达。将病理蜡块经烤片后脱蜡、水化，用抗原修复盒微波炉高火 5 min 后插入组织切片，低火 15 min 后取出常温冷却进行抗原修复，经一抗、二抗孵育，二氨基联苯胺（DAB）显色后，用苏木精复染后脱水封片。用 Case Viewer 在 40×视野下随机选择 5 处视野，用 Image J 软件进行分析，计算阳性染色区域的光密度值（MOD）后取平均值，并用 Graphpad Prism9 软件制图。

2.3.6 Western blotting 检测凋亡相关蛋白 Cleaved Caspase-3 检测：将大鼠解剖后取结直肠组织液氮中冷冻，随后转移至 -80℃ 冰箱内保存。提取蛋白样本并测定其含量后，进行凝胶电泳，转膜，经封闭，一抗、二抗孵育，显影检测目的蛋白表达。用 Quantity One v. 4.6.2 软件读取条带灰度值，Cleaved Caspase-3 蛋白相对表达量= Cleaved Caspase-3 灰度值/GAPDH 灰度值。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 23.0 统计软件对数据进行分析。符合正态分布的计量资料用均数±标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，多组比较采用单因素方差分析，两两比较采

用 Kruskal-Wallis H 检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组大鼠一般情况比较

Normal 组大鼠精神状态良好，正常摄食，饮水、大小便均正常，毛色润泽，行动灵活，体质量逐渐增长。Model 组大鼠懒动，精神不振，毛发晦暗无光泽，部分脱毛严重，拱背少动。M-CYN 组、H-CYN 组大鼠精神状态较 Model 组改善。HLS 组、Model 组各有 1 只大鼠发生明显腹泻，形体瘦削，精神状态萎靡。各组大鼠均未见便血。

3.2 各组大鼠体质量比较

造模第 1 周，各组大鼠体质量比较差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ）。造模第 15 周，与 Normal 组比较，其余各组体质量低（ $P < 0.05$ ）；与 Model 组比较，HLS 组、L-CYN 组、M-CYN 组、H-CYN 组体质量差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ）。见表 1。

表 1 各组大鼠体质量比较（ $g, \bar{x} \pm s$ ）

组别	n	体质量	
		第 1 周	第 15 周
Normal 组	6	245.58±9.83	556.25±51.41
Model 组	6	239.37±10.28	394.78±54.97*
HLS 组	6	248.22±9.64	388.90±35.20*
L-CYN 组	6	243.73±9.13	403.93±46.35*
M-CYN 组	6	247.00±3.65	400.15±38.82*
H-CYN 组	6	245.43±9.89	425.45±54.87*

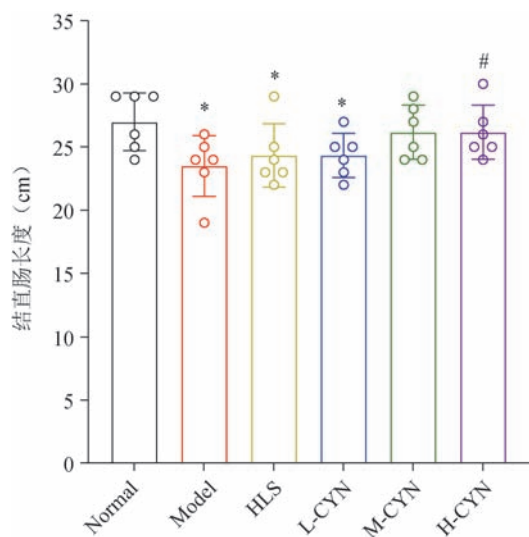
与 Normal 组比较，* $P < 0.05$

3.3 各组大鼠腹腔解剖结构及肠道肿瘤肉眼观察结果比较

3.3.1 大鼠腹腔解剖结构：Model 组大鼠腹腔有大量腹水。各组大鼠腹腔均未见明显脏器异常，肉眼观察未见肿瘤脏器转移。

3.3.2 大鼠结直肠长度：截取大鼠自盲肠末端至肛门取整段结直肠组织，测量其长度，与 Normal 组比较，Model 组、HLS 组、L-CYN 组大鼠结直肠长度短（ $P < 0.05$ ）；与 Model 组比较，H-CYN 组大鼠结直肠长度长（ $P < 0.05$ ）。见图 1。

3.3.3 大鼠肠道肿瘤数量、大小：造模第 15 周处死大鼠。与 Normal 组比较，Model 组及各给药组大鼠肿瘤数量多（ $P < 0.01$ ）；与 Model 组比较，HLS 组、H-CYN 组、M-CYN 组大鼠肿瘤数量少（ $P < 0.05$ ， $P < 0.01$ ），H-CYN 组有 1 只大鼠肉眼未观察到肿瘤。与 Normal 组比较，Model 组大鼠肿瘤大（ $P < 0.01$ ）；与 Model 组比较，HLS 组、H-CYN 组、



与 Normal 组比较, * $P<0.05$; 与 Model 组比较, # $P<0.05$

图1 造模第15周各组大鼠结直肠长度比较

M-CYN 组大鼠肿瘤小 ($P<0.05$, $P<0.01$)。见图2、3。

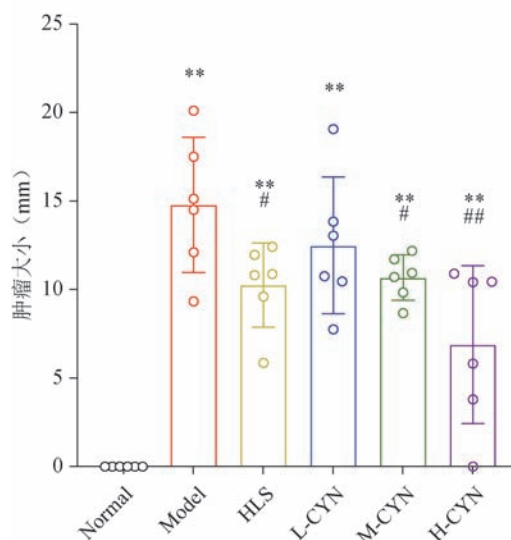
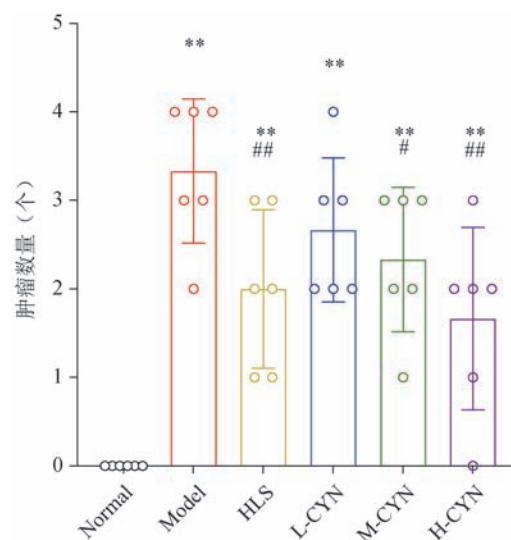
3.4 各组大鼠肠道组织病理变化比较

各组大鼠 HE 染色结果见图4。Normal 组结肠腺体排列规整, 细胞核位于基底部, 细胞间可见少量炎性细胞浸润。Model 组结肠腺体和细胞数目明显增加, 细胞间有大量炎症细胞浸润, 细胞排列密集, 可见大小与形态显著变化的肿瘤细胞, 含有大而深染的细胞核, 核分裂现象多, 局灶腺体可见中-重度异型增生、高级别上皮内瘤变、局灶原位癌形成。L-CYN 组杯状细胞消失, 细胞增生, 排列紧密, 有明显的核分裂, 可见许多细小核仁。HLS 组和 M-CYN 组病理结果相仿, 可见淋巴滤泡增生、腺体修复样改变、隐窝脓肿、固有腺体局灶减少。H-CYN 组腺体排列较整齐, 局灶炎症细胞浸润、糜烂、固有腺体局灶减少, 核分裂现象偶见。

Model 组大鼠腺癌发生率为 50% (分别伴有轻度异型增生和中度异型增生), 管状腺瘤发生率为 33.3%, 另 1 只大鼠为重度异型增生, 所有大鼠均造模成功。L-CYN 组大鼠肠道肿瘤组织病理变化改善不明显, HLS 组、M-CYN 组、H-CYN 组肠道肿瘤组织病变程度减轻, 其中 H-CYN 组效果最明显。见表2。

3.5 各组大鼠结直肠组织中 VEGF 蛋白表达比较

与 Normal 组比较, Model 组大鼠结直肠组织细胞质中可见大量棕黄色颗粒, VEGF 蛋白表达高 ($P<0.01$)。与 Model 组比较, L-CYN 组大鼠 VEGF



与 Normal 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 Model 组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$

图2 造模第15周各组大鼠肠道肿瘤数量及大小比较

蛋白表达低, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$), HLS 组、M-CYN 组、H-CYN 组大鼠 VEGF 蛋白表达低 ($P<0.05$)。见图5、表3。

3.6 各组大鼠结直肠组织中凋亡相关蛋白 Cleaved Caspase-3 表达比较

与 Normal 组比较, Model 组大鼠结直肠组织中 Cleaved Caspase-3 蛋白表达低 ($P<0.05$)。与 Model 组比较, 各中药治疗组和 HLS 组结直肠组织中 Cleaved Caspase-3 蛋白表达高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。见图6、表4。

4 讨论

理想且能模拟人类 CRC 癌前病变-癌的动物模型对于 CRC 的机制研究及药物开发至关重要。本研究采用 DMH 化学诱导法复制该病的模型, 该方

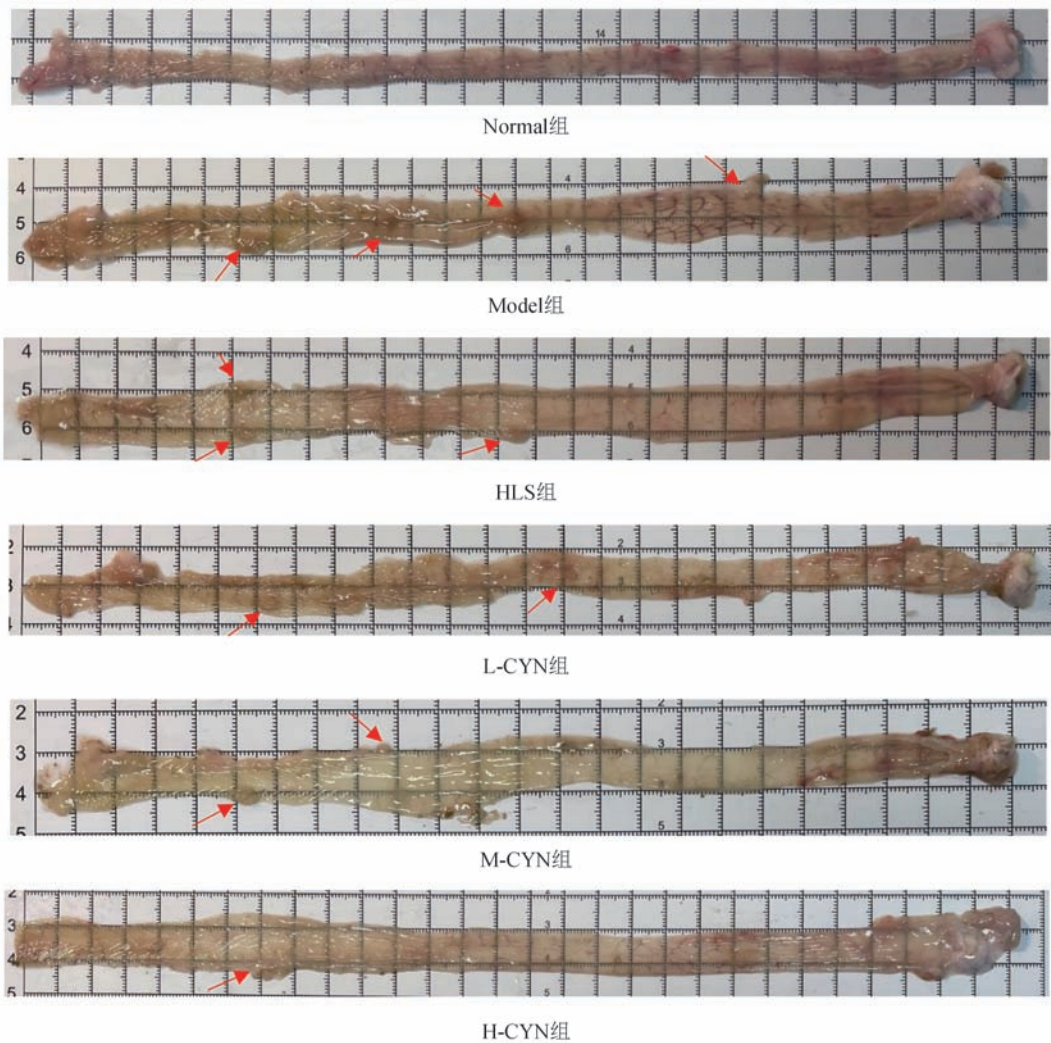


图3 各组大鼠肠道肿瘤发生情况(箭头代表肿瘤所在位置)

表2 各组大鼠结直肠组织病理学病变情况[例(%),n=6]

组别	正常	轻度异型增生	中度异型增生	重度异型增生	腺癌
Normal组	6(100)	—	—	—	—
Model组	—	1(16.7)(管状腺瘤)	1(16.7)(管状腺瘤)	1(16.7)	3(50.0)
HLS组	—	2(33.3)	2(33.3)(1个管状腺瘤)	—	2(33.3)
L-CYN组	—	3(50.0)(2个管状腺瘤)	—	—	3(50.0)
M-CYN组	—	3(50.0)(管状腺瘤)	—	1(16.7)	2(33.3)
H-CYN组	1(16.7)	2(33.3)(1个管状腺瘤)	1(16.7)(管状腺瘤)	1(16.7)	1(16.7)

案较为成熟且解剖结构易辨认,也更接近人类CRC的自然发生发展过程^[6]。文献推荐DMH的用量为20~30 mg/kg^[7-9],但因前期预实验发现20~30 mg/kg对SD大鼠影响较小,成模率较低,而60 mg/kg腹腔注射15周后大鼠均造模成功,因此本研究选用该方案进行实验。

CRC是我国常见的恶性肿瘤,针对癌前病变进行防治可以有效降低CRC的发生率。中医药治

疗CRA及早期CRC的优势在于能降低术后复发率,改善患者症状^[10-11]。经过近40年的验证,肠炎宁片的疗效和安全性得到了认可。研究表明,肠炎宁片具有抗炎、抗肿瘤、调节肠道微生态等作用^[12-14],而炎症、肠道微生态改变等与CRC的发生发展密切相关。本研究发现,服用高剂量肠炎宁片具有防治结直肠正常黏膜组织向腺瘤-癌发展,改善大鼠结直肠黏膜组织的病理变化。同时,进

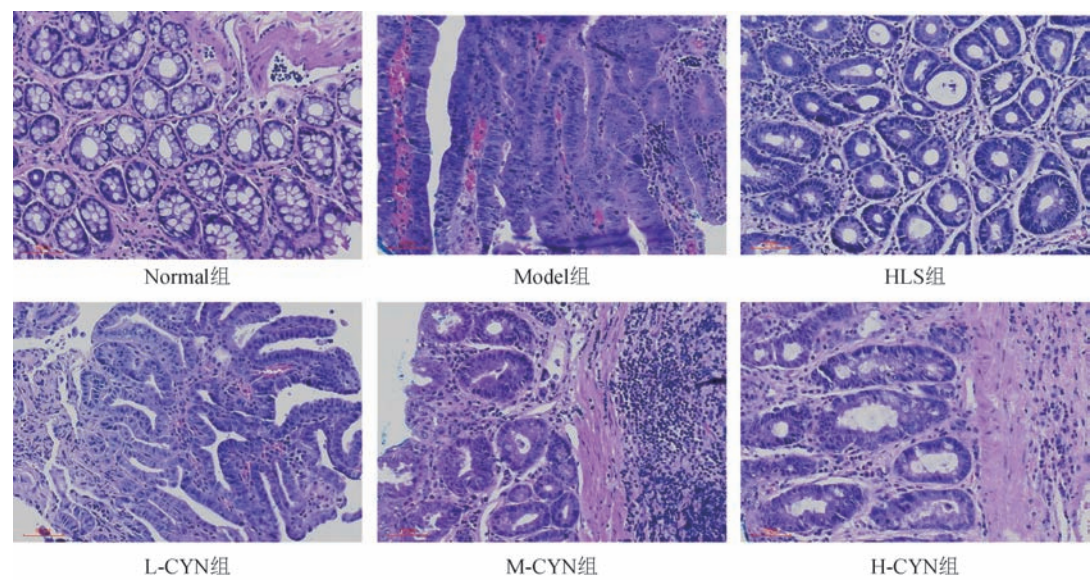


图4 造模第15周各组大鼠肠道组织病理变化(HE染色,200×)

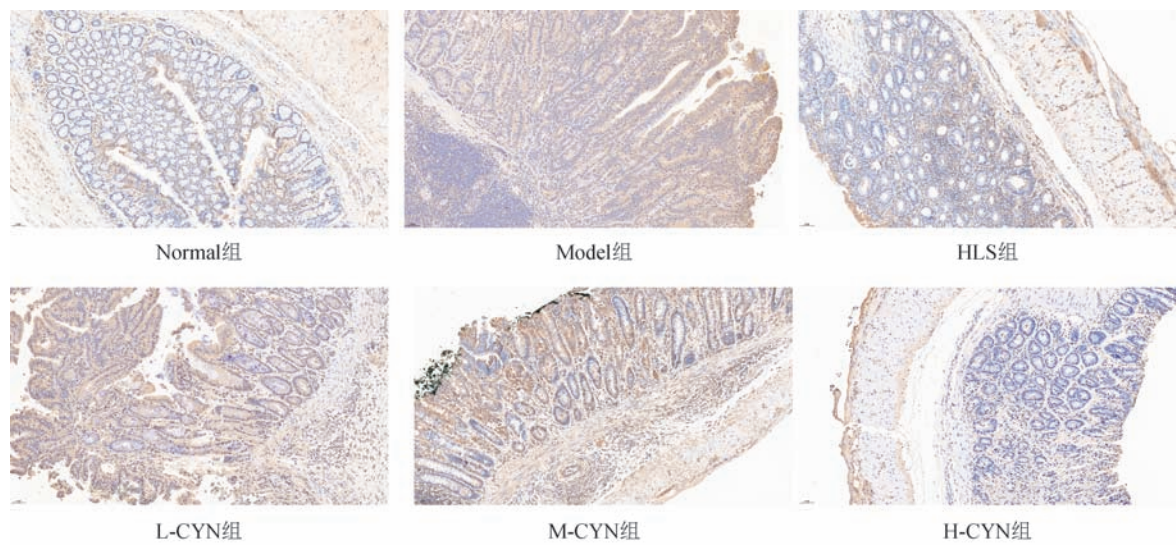


图5 各组大鼠结直肠组织中VEGF蛋白表达比较(免疫组化法,200×)

表3 各组结直肠组织VEGF蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)		
组别	<i>n</i>	VEGF蛋白
Normal组	3	0.0471±0.0039
Model组	3	0.0759±0.0065 [*]
HLS组	3	0.0650±0.0024 ^{**}
L-CYN组	3	0.0713±0.0009 [*]
M-CYN组	3	0.0644±0.0039 ^{**}
H-CYN组	3	0.0601±0.0045 ^{**}
与Normal组比较, * <i>P</i> <0.05; 与Model组比较, # <i>P</i> <0.05, ## <i>P</i> <0.01		

进一步研究发现, 肠炎宁片可能通过降低VEGF蛋白及促进Cleaved Caspase-3蛋白的表达, 诱导肠黏膜上皮组织细胞凋亡, 发挥防治肿瘤的作用。黄连素又名盐酸小檗碱(BBR), 是常见的异喹啉生物

表4 各组结直肠组织凋亡相关蛋白Cleaved Caspase-3表达比较($\bar{x}\pm s$)		
组别	<i>n</i>	Cleaved Caspase-3/GADPH
Normal组	6	0.73±0.11
Model组	6	0.31±0.11 [*]
HLS组	6	1.53±0.10 ^{##}
L-CYN组	6	0.77±0.15 [#]
M-CYN组	6	1.28±0.11 ^{**}
H-CYN组	6	1.54±0.12 ^{##}
与Normal组比较, * <i>P</i> <0.05; 与Model组比较, # <i>P</i> <0.05, ## <i>P</i> <0.01		

碱。研究^[15]表明, 口服BBR 0.3 g/次, 2次/d, 可安全有效地降低内镜下息肉切除术后CRA的复发风险, 为CRC的防治提供了潜在药物。而其作用

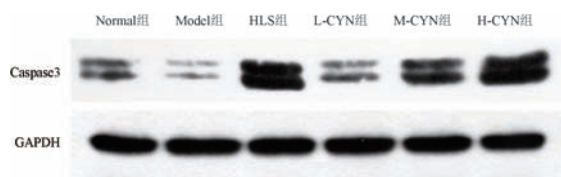


图6 各组大鼠结直肠组织中凋亡相关蛋白 Cleaved Caspase-3 表达

机制可能与调节肠道微生态和维持肠道稳态相关^[16-17]。房静远等^[18]进一步研究发现, BBR 可以通过抑制细小韦氏菌对 B 细胞的功能调节来抑制 CRC 的发生发展。因此, 本研究选用 BBR 作为阳性对照药。

本研究结果显示, 造模 15 周后大鼠活动状态和体质量均明显下降, 且出现不同程度的行动迟缓、腹泻等现象。中药干预后大鼠体质量、进食量、进水量与 Model 组比较差异无统计学意义。动物的体质量对于肿瘤模型及严重程度的评价有其局限性, 考虑可能被腹水及肿瘤质量等掩盖。观察大鼠肠道情况发现, 各中药治疗组与 Model 组比较, 水肿、充血表现明显减少, 肠道肿瘤数量和大小改善, 其中 H-CYN 组改善最明显。HE 染色结果显示, 与 Model 组比较, L-CYN 组大鼠结直肠肿瘤的发生无明显改善, HLS 组、M-CYN 组、H-CYN 组肿瘤发生率下降, 其中 H-CYN 组效果最明显。可见, 高剂量肠炎宁片可减缓结直肠正常黏膜上皮-腺瘤-癌转化进程, 有效防治 CRC。

VEGF-A 是血小板衍生生长因子家族的成员之一, 该家族还包括 VEGF-B、VEGF-C 和 VEGF-D 等^[19]。VEGF 是在生理和病理下刺激血管生成的最重要和最特异的因素之一, 可以促进血管内皮细胞迁移、增殖和新生血管形成, VEGF 在上皮细胞、间充质细胞尤其是肿瘤细胞中的过度合成是所有肿瘤细胞生长的基础^[20-22]。VEGF 的表达与 CRC 患者肿瘤大小、级别、分期相关, VEGF 高表达的 CRC 患者预后差^[23]。微小 RNA-150-5p (miR-150-5p) 可靶向 VEGF-A 抑制肿瘤细胞增殖、迁移、血管生成等过程, 抑制 CRC 生长、转移, 且 VEGF-A 敲除可显著抑制 CRC 进展^[24]。本研究结果表明, VEGF 在 CRC 及癌前病变模型大鼠中表达升高, 经中药治疗后 VEGF 的表达下降, 抑制了腺瘤-癌的进展。

细胞凋亡是 I 型程序性细胞死亡, 在癌症的发展及恶化过程中起双重作用, 是具有典型形态学特征的过程, 包括细胞减小、细胞质凝聚、膜起

泡、染色质塌陷和 DNA 片段化为寡核大小的片段, 细胞凋亡是正常组织发育过程中消除不必要细胞和维持稳态的主要机制^[25-26]。Caspase 是细胞凋亡的主要执行者。Caspase-3 表达或激活缺陷是癌细胞的标志之一, 是肿瘤细胞发生凋亡的关键调节因子。线粒体损伤后通过释放细胞色素 C, 激活 Caspase-3, 进而启动凋亡程序。Caspase-3 活性低与 CRC 局部复发风险较高相关^[27]。Caspase 是凋亡信号转导的共同通路, 诸多调控细胞凋亡的通路最终都通过 Caspase 酶发挥抗凋亡或促凋亡的作用^[28-29]。本研究通过 Western blotting 检测观察 Cleaved Caspase-3 蛋白表达, 发现经中药干预后 Cleaved Caspase-3 蛋白条带变浅变窄, 蛋白表达下降, 证实肠炎宁片治疗后诱导了大鼠 CRC 细胞凋亡。

综上所述, 肠炎宁片可改善 CRA-CRC 模型大鼠的情况, 通过降低 VEGF 并促进 Cleaved Caspase-3 蛋白表达, 诱导 CRC 细胞凋亡, 从而发挥防治 CRA 及预防 CRC 的作用。

参考文献

- [1] 中华医学会消化内镜学分会结直肠学组. 中国结直肠癌及癌前病变内镜诊治共识(2023, 广州)[J]. 中华消化内镜杂志, 2023, 40(7): 505-520.
- [2] 中华医学会病理学分会消化疾病学组. 胃肠道腺瘤和良性上皮性息肉的病理诊断共识[J]. 中华病理学杂志, 2020, 49(1): 3-11.
- [3] ZHENG RS, CHEN R, HAN BF, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022[J]. 中华肿瘤杂志, 2024, 46: 221-231.
- [4] 国家消化系统疾病临床医学研究中心(上海), 中华医学会消化内镜学分会, 中国抗癌协会肿瘤内镜专业委员会, 等. 中国结直肠癌癌前病变和癌前状态处理策略专家共识[J]. 中华消化内镜杂志, 2022, 39(1): 1-18.
- [5] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 1698.
- [6] 张华月, 李琦, 付晓伶. 结直肠相关癌前病变动物模型的研究进展[J]. 中国医药导报, 2018, 15(5): 27-31, 36.
- [7] BROWN WA, SKINNER SA, MALCONTENTI-WILSON C, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs with activity against either cyclooxygenase 1 or cyclooxygenase 2 inhibit colorectal cancer in a DMH rodent model by inducing apoptosis and inhibiting cell proliferation[J]. Gut, 2001, 48(5): 660-666.
- [8] LIN YW, WANG JL, CHEN HM, et al. Folic acid supplementary reduce the incidence of adenocarcinoma in a mouse model of colorectal cancer: microarray gene

- expression profile[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2011, 30(1):116.
- [9] SILVA-REIS R, CASTRO-RIBEIRO C, GONCALVES M, et al. An Integrative approach to characterize the early phases of dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis in the rat[J]. Biomedicines, 2022, 10(2):409.
- [10] 张北平,魏玮,李爱民,等. 结直肠腺瘤及早期结直肠癌中西医结合诊治专家共识(2021)[J]. 中医杂志, 2022, 63(10):989-997.
- [11] 姚天琦, 林琳, 田耀洲, 等. 益气化湿消瘀方治疗结直肠腺瘤术后湿瘀阻滞证的临床研究[J]. 北京中医药, 2024, 43(3):265-268.
- [12] 田文国, 陈金鹏, 王春芳, 等. 基于网络药理学和分子对接探究肠炎宁颗粒治疗功能性腹泻和腹泻型肠易激综合征的作用机制[J]. 中草药, 2022, 53(22):7135-7147.
- [13] 杨悌, 张代玲, 万启军, 等. 木犀草素对结肠癌细胞生长的影响及作用机制研究[J]. 实用临床医药杂志, 2022, 26(12):84-90.
- [14] 汤文玲. 肠炎宁对炎症性肠病肠道菌群的影响及治疗机制[D]. 杭州:浙江大学, 2020.
- [15] CHEN YX, GAO QY, ZOU TH, et al. Berberine versus placebo for the prevention of recurrence of colorectal adenoma: a multicentre, double-blinded, randomised controlled study[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2020, 5(3):267-275.
- [16] YU YN, YU TC, ZHAO HJ, et al. Berberine may rescue Fusobacterium nucleatum-induced colorectal tumorigenesis by modulating the tumor microenvironment[J]. Oncotarget, 2015, 6(31):32013-32026.
- [17] ZHANG Y, GU Y, REN H, et al. Gut microbiome-related effects of berberine and probiotics on type 2 diabetes (the PREMOT study)[J]. Nat Commun, 2020, 11(1):5015.
- [18] QIAN Y, KANG Z, ZHAO L, et al. Berberine might block colorectal carcinogenesis by inhibiting the regulation of B-cell function by Veillonella parvula[J]. Chin Med J (Engl), 2023, 136(22):2722-2731.
- [19] APTE RS, CHEN DS, FERRARA N. VEGF in signaling and disease: beyond discovery and development[J]. Cell, 2019, 176(6):1248-1264.
- [20] LAN J, LI H, LUO X, et al. BRG1 promotes VEGF-A expression and angiogenesis in human colorectal cancer cells[J]. Exp Cell Res, 2017, 360(2):236-242.
- [21] STEFANI C, MIRICESCU D, STANESCU-SPINU II, et al. Growth factors, PI3K/AKT/mTOR and MAPK signaling pathways in colorectal cancer pathogenesis: where are we now[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(19):10260.
- [22] 焦琳茜, 徐旭英, 郭卉, 等. 舒脉胶囊干预血管内皮细胞-平滑肌细胞共培养模型的作用机制研究[J]. 北京中医药, 2023, 42(7):708-715.
- [23] MOHAMED SY, MOHAMMED HL, IBRAHIM HM, et al. Role of VEGF, CD105, and CD31 in the prognosis of colorectal cancer cases[J]. J Gastrointest Cancer, 2019, 50(1):23-34.
- [24] CHEN X, XU X, PAN B, et al. miR-150-5p suppresses tumor progression by targeting VEGFA in colorectal cancer[J]. Aging (Albany NY), 2018, 10(11):3421-3437.
- [25] KUMAR S. Regulation of caspase activation in apoptosis: implications in pathogenesis and treatment of disease[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1999, 26(4):295-303.
- [26] LIU PF, HU YC, KANG BH, et al. Expression levels of cleaved caspase-3 and caspase-3 in tumorigenesis and prognosis of oral tongue squamous cell carcinoma[J]. PLoS One, 2017, 12(7):e0180620.
- [27] DE HEER P, DE BRUIN EC, KLEIN-KRANENBARG E, et al. Caspase-3 activity predicts local recurrence in rectal cancer[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(19): 5810-5815.
- [28] 罗吉, 罗燕, 李勇敏, 等. 重楼皂苷 I 对结肠癌 HCT116 细胞凋亡及 Bax, Bcl-2, Caspase-3 蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(6):172-176.
- [29] 陈冬梅, 张英, 张晨阳, 等. 萎慈散结方对人三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 及 BT549 的生长抑制作用及其机制研究[J]. 北京中医药, 2024, 43(1):17-22.

Therapeutic effect and mechanisms of Changyanning Tablets on colorectal adenoma-carcinoma model rats

ZHANG Kaixuan¹, YANG Yang¹, FU Zhiwen², JIA Shengjuan², WEI Wei¹

(1. Department of Spleen and Stomach Diseases, Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China; 2. Jiangxi Conba Traditional Chinese Medicine Co., Ltd., Shangrao 334499)

ABSTRACT Objective To observe the therapeutic effect of Changyanning Tablets on colorectal adenoma-carcinoma (CRA-CRC) model rats and explore its possible mechanisms. **Methods** Six rats were randomly assigned to the normal group (Normal). The remaining rats were intraperitoneally injected with 1, 2-dimethylhydrazine (DMH) at 60 mg/kg once a week for 15 weeks to establish the CRA-CRC model. In the 7th week, the model rats were randomly divided into five groups according to a randomized block design: a model group (Model), a berberine group (HLS), a low dose group of Changyanning Tablets (L-CYN), a medium dose group of Changyanning Tablets (M-CYN), and a high dose group of Changyanning Tablets (H-CYN), with 6 rats in each group. From the 7th week of modeling, the HLS group was given berberine at 0.027 g/kg by gavage, while the L-CYN, M-CYN, and H-CYN groups were given Changyanning Tablets at 0.3, 0.6, and 1.2 g/kg by gavage, respectively. The Normal

and Model groups were given distilled water by gavage. The above drug treatments were performed once daily for 8 weeks. General conditions, body weight, abdominal anatomical structure, incidence of intestinal tumors, pathological changes in intestinal tumor tissues, vascular endothelial growth factor (VEGF) protein expression in colorectal tissues, and cleaved Caspase-3 expression were compared among the groups. **Results** By the 15th week of modeling, compared with the Normal group, the Model group had a lower body weight ($P<0.05$). No significant difference in body weight was observed in the HLS, L-CYN, M-CYN, and H-CYN groups compared with the Model group ($P>0.05$). The Model group showed a large amount of ascites. No obvious organ abnormalities or tumor metastasis were observed in the abdominal cavity of rats in any group. Compared with the Normal group, the Model group had a shorter colorectal length ($P<0.05$) and a higher number of tumors ($P<0.01$). Compared with the results in the Model group, the colorectal length in the H-CYN group was longer ($P<0.05$), and the number of tumors was lower in the HLS, H-CYN, and M-CYN groups ($P<0.05$), with one rat in the H-CYN group showing no visible tumors. Tumor size was larger in the Model group than in the Normal group ($P<0.01$), and smaller in the HLS, H-CYN, and M-CYN groups ($P<0.01$). The Model group showed significant increases in gland and cell numbers in the colon, extensive inflammatory cell infiltration between cells, dense cell arrangement, and significant changes in tumor cell size and morphology, including large and deeply stained nuclei, frequent nuclear division, and focal glandular severe atypical hyperplasia, high-grade intraepithelial neoplasia, and focal in situ carcinoma formation. In the L-CYN group, goblet cells disappeared, cells proliferated and were closely arranged, with obvious nuclear division and numerous small nucleoli. The HLS and M-CYN groups had similar pathological results, including lymph follicle hyperplasia, glandular repair-like changes, crypt abscesses, and focal reduction of inherent glands. The H-CYN group had more organized gland arrangement, focal inflammatory cell infiltration, erosion, and focal reduction of inherent glands, with occasional nuclear division. The Model group had an incidence of adenocarcinoma of 50% and tubular adenoma of 33.3% (with mild and moderate atypical hyperplasia), and one rat with severe atypical hyperplasia. All rats were successfully modeled. The pathological changes in intestinal tumor tissues in the L-CYN group were not significantly improved, whereas the HLS, M-CYN, and H-CYN groups showed reduced tumor tissue lesions, with the H-CYN group showing the most significant effect. Compared with the results in the Model group, VEGF protein expression was lower in the L-CYN group, though not statistically significant ($P>0.05$), and significantly lower in the HLS, M-CYN, and H-CYN groups ($P<0.05$). Cleaved Caspase-3 protein expression was lower in the colorectal tissues of the Model group than that in the Normal group ($P<0.05$). Cleaved Caspase-3 protein expression was higher in the colorectal tissues of the Chinese medicine treatment groups and the HLS group than that in the Model group ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** Changyanning Tablets can improve clinical symptoms and pathological changes in the colorectal mucosa of CRA-CRC model rats, and its mechanism may be related to the negative regulation of VEGF expression and the promotion of cleaved Caspase-3 expression.

Keywords Changyanning Tablets; colorectal cancer; colorectal adenomas; precancerous lesions; VEGF; cleaved Caspase-3

(收稿日期: 2024-06-19)