

三子颗粒下调 *miR-205-5p* 抑制小鼠脾虚型肠道腺瘤生长研究

陈爱梅, 陈允旺, 魏引延, 滑永志, 张 卿

江苏联合职业技术学院连云港中医药分院, 江苏 连云港 222006

摘要: 目的 探讨三子颗粒通过降低微小核糖核酸-205-5p (*miR-205-5p*) 水平抑制小鼠脾虚型肠道腺瘤生长的作用。方法 取70只4周龄的雄性C57BL/6J小鼠, 采用对氧化偶氮甲烷(AOM)/葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导小鼠结直肠腺瘤模型, 将建模小鼠随机分为模型组、阿司匹林($200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组、*miR* inhibitor-NC($2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组、*miR-205-5p* inhibitor($2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组和三子颗粒低、中、高剂量($1.7, 3.4, 6.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组, 造模期间ig给药, 每天1次。比较各组小鼠肠道腺瘤的数量并测量腺瘤体积; 苏木素-伊红(HE)染色观察小鼠肠道腺瘤的病理情况; CCK-8法检测各组小鼠肠道腺瘤细胞增殖活力; 原位末端标记(TUNEL)法检测小鼠肠道腺瘤细胞凋亡; 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测肠道腺瘤 *miR-205-5p* 表达量及磷酸酯酶与张力蛋白同源物(*PTEN*)、B淋巴细胞瘤-2(*Bcl-2*)、*Bcl-2*相关X蛋白(*Bax*)、*Ki67* mRNA表达量; Western blotting法检测*PTEN*、*Bcl-2*、*Bax*、*Ki67*蛋白表达水平; 荧光素酶活性实验验证 *miR-205-5p* 和*PTEN*的靶向关系。结果 与模型组比较, 阿司匹林组和三子颗粒低、中、高剂量组小鼠肠道腺瘤数量、体积及细胞增殖活性均显著降低, 凋亡率显著升高($P<0.05$), *miR-205-5p* 表达量、*Bcl-2*、*Ki67* mRNA及蛋白表达量显著降低, *PTEN*、*Bax* mRNA及蛋白表达量显著升高($P<0.05$), 其中三子颗粒作用呈剂量相关性; 与 *miR* inhibitor-NC组比较, *miR-205-5p* inhibitor组小鼠肠道腺瘤数量、体积及细胞增殖活性均显著降低, 凋亡率显著升高($P<0.05$), *miR-205-5p* 表达量、*Bcl-2*、*Ki67* mRNA及蛋白表达量显著降低, *PTEN*、*Bax* mRNA及蛋白表达量显著升高($P<0.05$); 荧光素酶活性实验证实 *miR-205-5p* 可靶向调控*PTEN*。结论 三子颗粒可抑制小鼠脾虚型肠道腺瘤生长, 可能是通过下调 *miR-205-5p*, 上调*PTEN*、*Bax*表达, 下调*Bcl-2*、*Ki67*表达发挥作用的。

关键词: 三子颗粒; *miR-205-5p*; 脾虚型肠道腺瘤; 磷酸酯酶与张力蛋白同源物(*PTEN*); 凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)06-1224-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.06.008

Study on Sanzi Granules downregulated *miR-205-5p* inhibiting growth of intestinal adenoma of spleen deficiency type in mice

CHEN Aimei, CHEN Yunwang, WEI Yinyan, HUA Yongzhi, ZHANG Qing

Lianyungang TCM Branch of Jiangsu Union Technical Institute, Lianyungang 222006, China

Abstract: Objective To investigate the effect of Sanzi Granules on inhibition of *miR-205-5p* on the growth of intestinal adenoma of spleen deficiency type in mice. **Methods** Seventy 4-week-old male C57BL/6J mice were treated with *p*-azomethane (AOM)/sodium glucan sulfate (DSS) to induce colorectal adenoma, and randomly divided the modeled mice into model group, aspirin ($200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, *miR* inhibitor NC ($2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, *miR-205-5p* inhibitor ($2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, and Sanzi Granules low, medium, and high dose ($1.7, 3.4, 6.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) groups. The number and volume of intestinal adenomas were measured. Hematoxylin eosin (HE) staining was used to observe the pathology of intestinal adenoma in mice. Cell counting kit - 8 (CCK-8) was used to detect the proliferation of intestinal adenoma cells of mice in each group. Detection of apoptosis of intestinal adenoma cells in mice by TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL). Real time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression of *miR-205-5p* in intestinal adenoma and the mRNA expression of phosphatase and tensin homolog (*PTEN*), B lymphoblastoma 2 (*Bcl-2*), *Bcl-2* related X protein (*Bax*), *Ki67*. Western blotting was used to detect the protein expressions of *PTEN*, *Bcl-2*, *Bax* and *Ki67*. The targeting relationship between *miR-205-5p* and *PTEN* was verified by luciferase activity experiment. **Results** Compared with the model group, the number, volume and cell proliferation activity of intestinal adenomas in the aspirin group and the Sanzi Granules low, medium and high dose groups decreased, the apoptosis rate increased ($P<0.05$), the expression of *miR-205-5p*, *Bcl-2*, *Ki67* mRNA and protein decreased, and the expression of *PTEN*, *Bax* mRNA and protein

收稿日期: 2022-12-29

基金项目: 江苏省中医药管理局科技项目(JD2019SZXYB15)

第一作者: 陈爱梅(1978—),女,硕士,副教授,从事中医学基础与消化病学研究。E-mail: gghzyy@126.com

increased ($P < 0.05$). The effect of Sanzi Granules was dose dependent. Compared with *miR* inhibitor NC group, the number, volume and cell proliferation activity of intestinal adenoma of mice in *miR*-205-5p inhibitor group decreased, the apoptosis rate increased ($P < 0.05$), the expression of *miR*-205-5p, Bcl-2, Ki67 mRNA and protein decreased, and the expression of PTEN, Bax mRNA and protein increased ($P < 0.05$). Luciferase activity experiment confirmed that *miR*-205-5p could target and regulate PTEN. **Conclusion** Sanzi Granules can inhibit the growth of intestinal adenoma of spleen deficiency type in mice, possibly by mediating *miR*-205-5p, down regulating the expression of Bcl-2 and Ki67, and up regulating the expression of PTEN and Bax.

Key words: Sanzi Granules; *miR*-205-5p; spleen deficiency type intestinal adenoma; phosphatase and tensin homolog (PTEN); apoptosis

据世界卫生组织国际癌症研究机构(IARC)发布的2020年全球癌症数据显示,结直肠癌发病率位列全球第3,死亡率位列全球第2^[1],研究其发病机制并对其进行预防治疗具有重要意义。肠道腺瘤是由肠黏膜上皮存在异性增生所致的一种消化道息肉。研究认为^[2],肠道腺瘤是结直肠癌的癌前病变,80%~95%的结直肠癌都是由肠道腺瘤发展而来的。临床上主要通过早期结肠镜检查并进行及时切除防治肠道腺瘤,但内镜下切除并不能降低肠道腺瘤的复发率和癌变率^[3],且目前国内外尚没有能够预防和治疗肠道腺瘤发生、复发及癌变的有效治疗方案。微小核糖核酸-205-5p(*miR*-205-5p)是近年来新发现的一种非编码小分子RNA,位于1号染色体q32.2区段,已被证实与乳腺癌^[4]、胃癌^[5]和肺癌^[6]等多种恶性肿瘤的增殖转移及耐药有关。侯丽英等^[7]发现,*miR*-205-5p在结肠癌组织及细胞系中异常高表达,抑制*miR*-205-5p表达可通过靶向上调轴抑制蛋白2(AXIN2)的表达抑制结肠癌细胞增殖、促进凋亡。近年来,随着中医“治未病”理论体系的发展,中医药在防治癌前病变中的作用受到广泛关注。李忠意等^[8]研究显示,民族药三子颗粒对大肠腺瘤内镜下切除术后改善临床症状及预防术后复发方面疗效显著,但其是否能够抑制肠道腺瘤的生长及可能作用机制尚未见相关报道。本研究通过构建肠道腺瘤小鼠模型,探讨三子颗粒对肠道腺瘤生长的抑制作用及可能机制。

1 材料

1.1 动物与细胞

70只4周龄SPF级雄性C57BL/6小鼠,雌雄各半,体质量(20.25 ± 2.49)g,购自中国科学院上海药物研究所,实验动物生产许可证号SCXK(沪)2020-0005。本实验通过江苏联合职业技术学院连云港中医药分院医学伦理委员会审查,伦理学批号2020-002-12。

293T细胞,购自中国科学院细胞库。

1.2 药物与主要试剂

三子颗粒(购自内蒙古大唐药业有限公司,每

袋3.3 g,国药准字Z15020239,批号19091205);对氧化偶氮甲烷(AOM)(购自美国Sigma公司,批号A5486-25MG);葡聚糖硫酸钠(DSS,购自美国MP Biomedicals,批号0216011080);阿司匹林片(购自西南药业股份有限公司,批号20211014A,规格每片0.5 g,每盒20片);苏木素-伊红(HE)试剂盒(购自上海沪震实业有限公司,批号CM0419B);CCK-8试剂盒(购自上海莼试生物技术有限公司,批号CS-ELISA1721);原位末端标记法(TUNEL)试剂盒(购自美国AAT Bioquest公司,批号G001-1-1);Trizol试剂盒(购自上海一研生物科技有限公司,批号EY-10009);实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)试剂盒(购自上海信裕生物科技有限公司,批号90805-1);Bradford蛋白浓度测定试剂盒(购自美国Amresco公司,批号M173-KIT);兔抗人磷酸酯酶与张力蛋白同源物(PTEN)、B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、Ki67、 β 肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体(购自美国Abcam公司,批号ab1025、ab2216、ab1307、ab2124、ab1629);羊抗兔PTEN、Bcl-2、Bax、Ki67、 β -actin多克隆抗体(购自美国Abcam公司,批号ab0102、ab1326、ab2010、ab1448、ab2237)。miR inhibitor-NC、miR-205-5p inhibitor、miR mimics-NC、miR-205-5p mimics均由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成,其中miR inhibitor-NC上游引物5'-TGGACGATACGAGACCA-3',下游引物5'-CGAATGCAGTTACGAGCC-3'; miR-205-5p inhibitor上游引物5'-GATTGACCAGTACGGACTAG-3',下游引物5'-CGACGGCATTATATGATCA-3'; miR-205-5p mimics上游引物5'-CGGTAGCATAAGTACGGT-3',下游引物5'-AGGCATGACGATACGACC-3'; miR-NC上游引物5'-GCCATAGCAGAGTACGTAA-3',下游引物5'-ATTGCACGCACAGTACGAC-3'。

1.3 主要仪器

MarCal 16 GN型游标卡尺(购自德国MarCal公司);Contour Elite型光学显微镜(购自美国Bruker

公司); Revolve FL型荧光显微镜(购自美国ECHO公司); Keebio-96G型PCR仪(购自上海金鹏分析仪器有限公司); Keebio-miniES型电泳仪(购自上海金鹏分析仪器有限公司); Azure200凝胶成像分析系统(购自美国Azure Biosystems公司)。

2 方法

2.1 分组、建模和干预

取70只4周龄的雄性C57BL/6小鼠适应性饲养1周后随机分为模型组、阿司匹林(阳性药, $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ [9])组、*miR* inhibitor-NC ($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组、*miR*-205-5*p* inhibitor ($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组和三子颗粒低、中、高剂量(1.7 、 3.4 、 $6.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组, 每组10只。各组小鼠经ip给予 $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的AOM, 1周后给予3个循环的DSS喂饲(饮用含5% DSS的水1周+正常饮水2周为1个循环) [10]。三子颗粒低、中、高剂量组在第1次喂饲含5% DSS的水当日开始ig给予三子颗粒 [11], 阿司匹林组ig给予阿司匹林, 模型组给予等量生理盐水, 每天1次; *miR* inhibitor-NC组和*miR*-205-5*p* inhibitor组小鼠分别经尾iv注射 0.2 mL $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的*miR* inhibitor-NC和*miR*-205-5*p* inhibitor, 每2天注射1次, 连续1周。

2.2 标本采集、腺瘤计数和病理观察

实验结束后禁水24 h, 将小鼠经颈椎脱臼法处死, 沿下腹中线打开腹腔, 剪取全部肠管, 使用预冷的磷酸盐缓冲溶液(PBS)冲洗干净, 纵行打开肠腔, 用预冷的PBS再次漂洗干净后平铺于滤纸上, 黏膜面向上, 观察并记录小鼠肠道腺瘤数量并测量大小, 腺瘤体积=(最长径 $\times$ 垂直短径 2)/2。将结直肠组织剪成 $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$ 大小, 部分放入EP管中液氮中速冻后保存于 -80°C 冰箱内, 以备后续实验。另一部分置于10%的甲醛液中固定, 次日将固定好的结直肠组织经梯度脱水后进行石蜡包埋、常规切片和HE染色, 于光学显微镜观察病理学变化。

2.3 CCK-8检测各组小鼠肠道腺瘤细胞增殖

取各组小鼠肠道腺瘤组织, 剪碎后加入胰蛋白酶消化制成 $1 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞悬液, 按照每孔 $100 \mu\text{L}$ 接种至96孔板。加入RPMI 1640完全培养基置于恒温细胞培养箱培养48 h, 每孔加入 $10 \mu\text{L}$ 的CCK-8试剂, 于 37°C 恒温细胞培养箱中继续孵育2 h, 于多功能酶标仪450 nm处测定各孔吸光度(*A*)值, 以此反映细胞增殖活性。

2.4 TUNEL检测小鼠肠道腺瘤细胞凋亡

取各组小鼠肠道腺瘤组织, 依次进行脱水、固定、石蜡包埋, 并制成 $4 \mu\text{m}$ 厚的切片。严格按照

TUNEL检测试剂盒说明书操作, 检测小鼠肠道腺瘤组织中的细胞凋亡情况。在光学显微镜下, 每张切片随机选取5个视野观察细胞凋亡情况(正常细胞细胞核呈蓝色, 凋亡细胞细胞核呈棕色), 计算细胞凋亡率。

2.5 qRT-PCR法检测肠道腺瘤*miR*-205-5*p*表达及*PTEN*、*Bcl*-2、*Bax*、*Ki67* mRNA表达水平

取小鼠肠道腺瘤组织, 加液氮研磨成粉末状, Trizol法提取组织总RNA, 反转录得到互补脱氧核糖核酸(cDNA), 以cDNA为模板进行PCR扩增, 引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成, 引物序列见表1。反应体系: cDNA $2 \mu\text{L}$ 、上下游引物各 $0.5 \mu\text{L}$ 、 $10 \times \text{PCR Buffer}$ $2.5 \mu\text{L}$ 、三磷酸碱基脱氧核苷酸(dNTPs) $2.5 \mu\text{L}$ 、 MgSO_4 $2.5 \mu\text{L}$ 、超纯无酶双蒸水(RNase-Free ddH₂O)补足体系至 $25 \mu\text{L}$; 反应程序: 95°C 、2 min, 95°C 、20 s, 65°C 、30 s, 72°C 、20 s, 45个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法对小鼠肠道腺瘤*miR*-205-5*p*表达及*PTEN*、*Bcl*-2、*Bax*、*Ki67* mRNA进行定量分析。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'→3')
<i>miR</i> -205-5 <i>p</i> -F	TGCAGGACATAGCGATTTCAG
<i>miR</i> -205-5 <i>p</i> -R	GCTAGCAGGAGTACGA
<i>PTEN</i> -F	CGGATACGAGATA
<i>PTEN</i> -R	CATGACGAGACTGAG
<i>Bcl</i> -2-F	TGCACACGAGTATGACA
<i>Bcl</i> -2-R	ACGAGTATCGATTACGT
<i>Bax</i> -F	GACGAGTACGATT
<i>Bax</i> -R	TAAGTATGTACGACCAGC
<i>Ki67</i> -F	GCAGAGATATACGAAG
<i>Ki67</i> -R	TACACCAGTTACGACAG
β -actin-F	TGGCAGCCTAGCAGC
β -actin-R	CGGATATAGAGCCAA

2.6 Western blotting检测*PTEN*、*Bcl*-2、*Bax*、*Ki67*蛋白表达水平

取小鼠肠道腺瘤组织, 液氮充分研磨后通过蛋白提取试剂盒提取组织总蛋白, Bradford法进行蛋白定量, 凝胶电泳分离蛋白。半干法将凝胶转至PVDF膜上, 将膜置于5%脱脂奶粉中 37°C 封闭2 h, 加入稀释比为1:2 000的一抗于 4°C 冰箱中孵育过夜。次日TBST充分洗膜后加入稀释比为1:5 000二抗, 室温孵育2 h, TBST再次洗膜后滴加化学发光液显影, 采用Azure200型凝胶成像系统分析各蛋白条带灰度值。

2.7 荧光素酶活性实验验证*miR*-205-5*p*和*PTEN*的靶向关系

采用TargetScan靶基因预测软件预测*miR*-205-

5p的靶基因。将PTEN基因3'非翻译区(UTR)端野生型(WT)及突变型(Mut)质粒克隆到双荧光报告质粒中,分别与*miR-205-5p* mimics、*miR* mimics-NC共转染293T细胞。常规培养48 h后,按照检测试剂盒说明书检测*miR-205-5p* mimics组和*miR* mimics-NC组中PTEN荧光素酶相对活性。

2.8 统计学分析

采用SPSS 22.0软件进行统计学检验,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,2组差异比较采用*t*检验进行分析。

3 结果

3.1 小鼠肠道腺瘤的数量及体积比较

与模型组比较,阿司匹林组和三子颗粒低、中、高剂量组小鼠肠道腺瘤数量及体积显著降低($P < 0.05$),其中三子颗粒作用呈剂量相关性,且三子颗粒中剂量组小鼠肠道腺瘤数量及体积与阿司匹林组差异无统计学意义($P > 0.05$)。与*miR* inhibitor-NC组比较,*miR-205-5p* inhibitor组小鼠肠道腺瘤数量及体积显著降低($P < 0.05$),见表2。

表2 小鼠肠道腺瘤的数量及体积比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Comparison of number and volume of intestinal adenomas in mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	腺瘤数量	腺瘤体积/mm ³
模型	—	15.22±2.84	50.72±8.84
阿司匹林	0.2	8.70±1.39 [#]	22.45±3.93 [#]
三子颗粒	1.7	12.21±2.05 ^{#&}	38.90±6.67 ^{#&}
	3.4	8.97±1.33 ^{#△}	25.16±4.24 ^{#△}
	6.8	6.46±1.12 ^{#&△▽}	13.34±2.09 ^{#&△▽}
<i>miR</i> inhibitor-NC	0.002	15.35±2.82	46.52±8.11
<i>miR-205-5p</i> inhibitor	0.002	10.04±1.77 [▲]	21.14±3.76 [▲]

与模型组比较:[#] $P < 0.05$;与阿司匹林组比较:[&] $P < 0.05$;与三子颗粒低剂量组比较:[△] $P < 0.05$;与三子颗粒中剂量组比较:[▽] $P < 0.05$;与*miR* inhibitor-NC组比较:[▲] $P < 0.05$

[#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs aspirin group; [△] $P < 0.05$ vs Sanzi Granules low dose group; [▽] $P < 0.05$ vs Sanzi Granules medium dose group; [▲] $P < 0.05$ vs *miR* inhibitor-NC group

3.2 小鼠肠道腺瘤的病理情况

模型组小鼠肠道内可见多个大小不一的腺瘤;阿司匹林组和三子颗粒各剂量组小鼠肠道内腺瘤数量较模型组均有不同程度的减少。*miR* inhibitor-NC组小鼠肠道内同样可在肠道内观察到大量腺瘤形成,*miR-205-5p* inhibitor组小鼠肠道内腺瘤数量则显著降低,见图1。

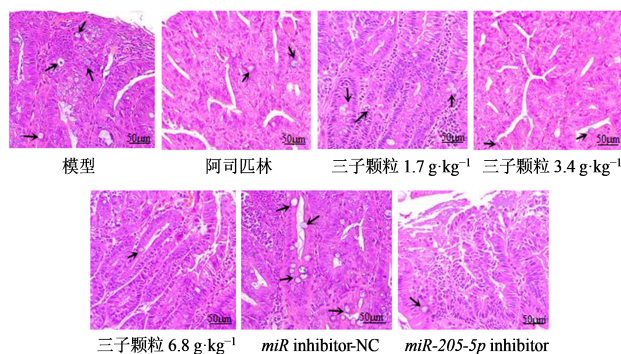


图1 各组小鼠肠道腺瘤的病理情况(HE染色,×400)

Fig. 1 Pathology of intestinal adenoma in mice of each group (HE staining, ×400)

3.3 小鼠肠道腺瘤细胞增殖

与模型组比较,阿司匹林组和三子颗粒低、中、高剂量组小鼠肠道腺瘤细胞增殖活性显著降低($P < 0.05$),其中三子颗粒作用呈剂量相关性,且三子颗粒中剂量组小鼠肠道腺瘤细胞增殖活性与阿司匹林组差异无统计学意义($P > 0.05$)。与*miR* inhibitor-NC组比较,*miR-205-5p* inhibitor组小鼠肠道腺瘤细胞增殖活性显著降低($P < 0.05$),见表3。

3.4 小鼠肠道腺瘤细胞凋亡

与模型组比较,阿司匹林组和三子颗粒低、中、高剂量组小鼠肠道腺瘤细胞凋亡率升高($P < 0.05$),其中三子颗粒作用呈剂量相关性,且三子颗粒中剂量组小鼠肠道腺瘤细胞凋亡率与阿司匹林组差异无统计学意义($P > 0.05$)。与*miR* inhibitor-NC组比较,*miR-205-5p* inhibitor组小鼠肠道腺瘤细胞凋亡率显著升高($P < 0.05$),见图2和表4。

表3 小鼠肠道腺瘤增殖活性比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Comparison of proliferative activity of intestinal adenomas in mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	细胞增殖活性(A值)
模型	—	1.44±0.17
阿司匹林	0.2	0.87±0.15 [#]
三子颗粒	1.7	1.18±0.21 ^{#&}
	3.4	0.92±0.16 ^{#△}
	6.8	0.64±0.11 ^{#&△▽}
<i>miR</i> inhibitor-NC	0.002	1.39±0.25
<i>miR-205-5p</i> inhibitor	0.002	0.90±0.15 [▲]

与模型组比较:[#] $P < 0.05$;与阿司匹林组比较:[&] $P < 0.05$;与三子颗粒低剂量组比较:[△] $P < 0.05$;与三子颗粒中剂量组比较:[▽] $P < 0.05$;与*miR* inhibitor-NC组比较:[▲] $P < 0.05$

[#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs aspirin group; [△] $P < 0.05$ vs Sanzi Granules low dose group; [▽] $P < 0.05$ vs Sanzi Granules medium dose group; [▲] $P < 0.05$ vs *miR* inhibitor-NC group

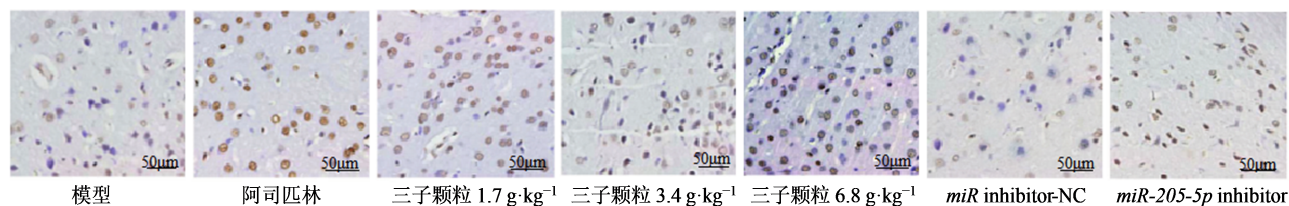


图2 各组小鼠肠道腺瘤细胞凋亡情况(TUNEL染色, ×400)

Fig. 2 Apoptosis of intestinal adenoma cells in mice of each group (TUNEL staining, × 400)

表4 小鼠肠道腺瘤细胞凋亡率比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Comparison of apoptosis rate of intestinal adenoma cells in mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	凋亡率/%
模型	—	15.04±2.33
阿司匹林	0.2	35.37±6.49 [#]
三子颗粒	1.7	23.16±4.25 ^{#&}
	3.4	37.43±6.14 ^{#△}
	6.8	50.72±8.53 ^{#&△▽}
miR inhibitor-NC	0.002	17.54±2.96
miR-205-5p inhibitor	0.002	32.85±5.78 [▲]

与模型组比较:[#] $P < 0.05$;与阿司匹林组比较:[&] $P < 0.05$;与三子颗粒低剂量组比较:[△] $P < 0.05$;与三子颗粒中剂量组比较:[▽] $P < 0.05$;与miR inhibitor-NC组比较:[▲] $P < 0.05$

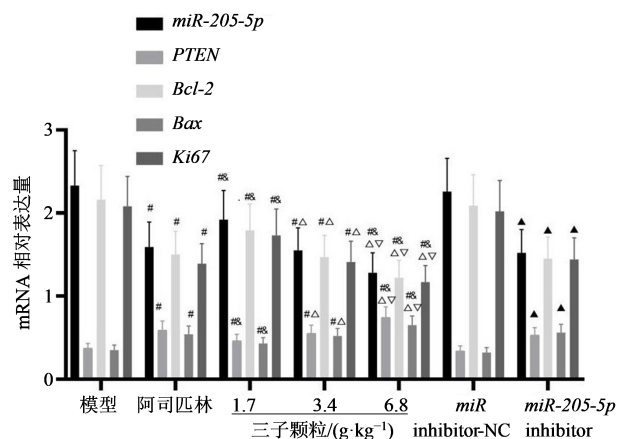
[#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs aspirin group; [△] $P < 0.05$ vs Sanzi Granules low dose group; [▽] $P < 0.05$ vs Sanzi Granules medium dose group; [▲] $P < 0.05$ vs miR inhibitor-NC group

3.5 小鼠肠道腺瘤 miR-205-5p 表达及 PTEN、Bcl-2、Bax、Ki67 mRNA 表达水平

与模型组比较,阿司匹林组和三子颗粒低、中、高剂量组小鼠肠道腺瘤 miR-205-5p 表达及 Bcl-2、Ki67 mRNA 表达显著降低,PTEN、Bax mRNA 表达显著升高($P < 0.05$),其中三子颗粒作用呈剂量相关性,且三子颗粒中剂量组小鼠肠道腺瘤 miR-205-5p 表达及 PTEN、Bcl-2、Bax、Ki67 mRNA 表达与阿司匹林组差异无统计学意义($P > 0.05$)。与 miR inhibitor-NC 组比较,miR-205-5p inhibitor 组小鼠肠道腺瘤 miR-205-5p 表达及 Bcl-2、Ki67 mRNA 表达显著降低,PTEN、Bax mRNA 表达显著升高($P < 0.05$),见图3。

3.6 小鼠肠道腺瘤 PTEN、Bcl-2、Bax、Ki67 蛋白表达水平

与模型组比较,阿司匹林组和三子颗粒低、中、高剂量组小鼠肠道腺瘤 Bcl-2、Ki67 蛋白表达降低,PTEN、Bax 蛋白表达显著升高($P < 0.05$),其中三子颗粒作用呈剂量相关性,且三子颗粒中剂量组小鼠肠道腺瘤 PTEN、Bcl-2、Bax、Ki67 蛋白表达与阿司匹林组差异无统计学意义($P > 0.05$)。与 miR



与模型组比较:[#] $P < 0.05$;与阿司匹林组比较:[&] $P < 0.05$;与三子颗粒低剂量组比较:[△] $P < 0.05$;与三子颗粒中剂量组比较:[▽] $P < 0.05$;与miR inhibitor-NC组比较:[▲] $P < 0.05$

[#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs aspirin group; [△] $P < 0.05$ vs Sanzi Granules low dose group; [▽] $P < 0.05$ vs Sanzi Granules medium dose group; [▲] $P < 0.05$ vs miR inhibitor-NC group

图3 小鼠肠道腺瘤 miR-205-5p 表达及 PTEN、Bcl-2、Bax、Ki67 mRNA 表达水平($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 3 Expression of miR-205-5p and mRNA expression levels of PTEN, Bcl-2, Bax and Ki67 in intestinal adenoma of mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

inhibitor-NC 组比较,miR-205-5p inhibitor 组小鼠肠道腺瘤 Bcl-2、Ki67 蛋白表达显著降低,PTEN、Bax 蛋白表达显著升高($P < 0.05$),见图4、5。

3.7 荧光素酶活性实验验证 miR-205-5p 和 PTEN 的靶向关系

Target Scan 数据库分析结果显示,PTEN 的 3' UTR 序列中存在 miR-205-5p 的结合位点,提示

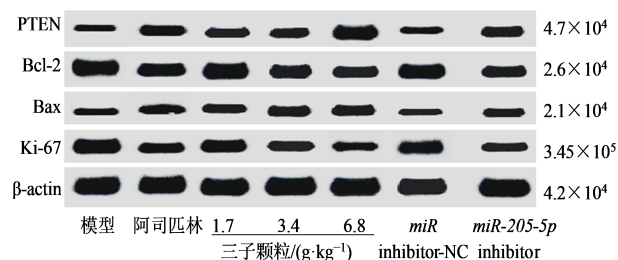
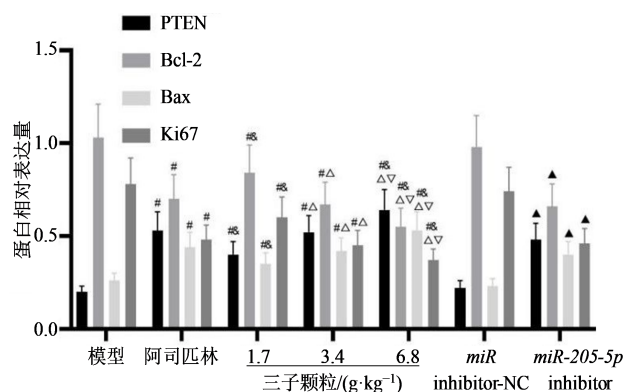


图4 肠道腺瘤 PTEN、Bcl-2、Bax、Ki67 蛋白电泳图

Fig. 4 Electrophoresis of PTEN, Bcl-2, Bax, Ki67 proteins in intestinal adenoma



与模型组比较: # $P < 0.05$; 与阿司匹林组比较: * $P < 0.05$; 与三子颗粒低剂量组比较: ^ $P < 0.05$; 与三子颗粒中剂量组比较: ∇ $P < 0.05$; 与三子颗粒高剂量组比较: ▽ $P < 0.05$; 与 miR inhibitor-NC 组比较: ▲ $P < 0.05$

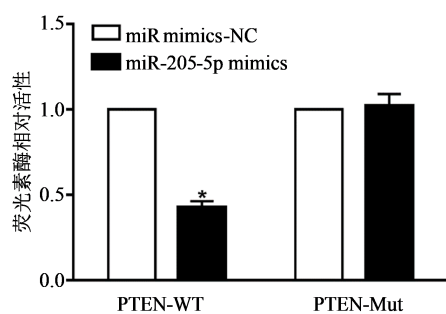
$P < 0.05$ vs model group; * $P < 0.05$ vs aspirin group; ^ $P < 0.05$ vs Sanzi Granules low dose group; ∇ $P < 0.05$ vs Sanzi Granules medium dose group; ▽ $P < 0.05$ vs Sanzi Granules high dose group; ▲ $P < 0.05$ vs miR inhibitor-NC group

图5 小鼠肠道腺瘤PTEN、Bcl-2、Bax、Ki67蛋白表达水平($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 5 Expression levels of PTEN, Bcl-2, Bax, Ki67 protein in intestinal adenoma of mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

PTEN可能是miR-205-5p的靶基因。在转染PTEN-WT的细胞中,miR-205-5p mimic组细胞荧光素酶相对活性低于miR mimics-NC组细胞,差异有统计学意义($P < 0.05$);在转染PTEN-Mut的细胞中,miR-205-5p mimic组与miR mimics-NC组细胞荧光素酶相对活性差异无统计学意义($P > 0.05$),见图6。

PTEN 3' UTR WT 5' -AGUUCGUAUGUAGUAUGCGGCAUUA-3'
miR-205-5p 3' -AGUUCGUAUGUAGUAUGCCGUAAGA-5'
PTEN 3' UTR Mut 5' -AGUUCGUAUGUAGUAUGCGUAGUAU-3'



与 miR mimics-NC 组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs miR mimics-NC group

图6 miR-205-5p靶基因预测及荧光素酶相对活性检测

Fig. 6 Prediction of miR-205-5p target gene and detection of relative activity of luciferase

4 讨论

由于肠道腺瘤癌变是结直肠癌发生的最主要途径,有报道显示^[12],结直肠腺瘤的癌变率高达61%,因此预防肠道腺瘤癌变是降低结直肠癌发生

率的关键环节。目前临床上主要依赖于肠镜筛查及手术切除肠道腺瘤,但在药物干预方面,国内外尚没有公认的预防肠道腺瘤癌变的有效治疗方案,而传统中医药的应用为此提供了新的可能和选择。

中医对“肠道腺瘤”无明确病名及记载,根据其临床表现将其归于“积聚”“肠癖”“大肠息肉”等范畴,其病位证素以脾为主,肠次之,脾虚不健为发病之本,湿浊瘀毒阻滞肠道为致病之标^[13]。治疗应健运脾胃、益气养阴以治本虚,清热利湿、解毒逐瘀以解其标,标本兼治,以预防癌变倾向为主。民族药三子颗粒由黄芪、乌梅、石榴子、榧藤子、余甘子、花椒、钩藤、广郁金、甘草等药物组成,临床发现该方剂在防治肠道腺瘤方面临床疗效显著^[14]。方中以民族药石榴子、余甘子和榧藤子为代表药物,石榴子温中健胃、余甘子补益强气、榧藤子消食导滞;以黄芪、乌梅为君药,黄芪补益脾胃,乌梅柔肝健脾,共奏益气养阴生津、柔肝助运之功;以钩藤为臣药,清热柔肝、下气熄风;以花椒、广郁金为佐药,花椒温中散寒、除湿止痛,广郁金行气散瘀、疏泄湿热;以甘草为使药,调和诸药。诸药相合,共奏益气养阴、逐瘀解毒之效。现代药理学研究表明^[15],石榴子中黄酮、有机酸、糖、脂肪酸、挥发油等活性成分具有抗癌、抗氧化及抗痢疾性腹泻作用;余甘子水提取物通过体内调节胃肠道激素和肠道微生物组缓解功能性消化不良^[16];榧藤子总皂苷被证实具有增强抗氧化能力和抗肿瘤作用^[17]。本研究中,与模型组比较,阿司匹林组和三子颗粒低、中、高剂量组小鼠肠道腺瘤数量、体积及细胞增殖活性均降低,凋亡率升高,其中三子颗粒作用呈剂量相关性,提示三子颗粒有抑制小鼠脾虚型肠道腺瘤生长的作用。邱仁静等^[18]从中医角度深入探讨了三子方的组成药物的药理研究,认为该方是建立在祖国医学的理论基础及其所含药物的现代药理作用上发挥防治结直肠腺瘤作用的,本研究结果与上述研究相一致。

miRNA可通过与靶基因的3'端非编码区(3'-UTR)结合沉默或降解靶基因,从而在转录后水平调控基因表达。近年来,越来越多的证据表明^[19],miRNA在多种恶性肿瘤的发生发展过程中起至关重要的作用。已有多项研究指出^[20-22],miR-205-5p参与了多种心血管疾病、免疫系统疾病以及恶性肿瘤的发生发展。Chang等^[23]研究证实,LINC00941可能通过作用于miR-205-5p显著促进结肠癌进展。PTEN基因是定位于人染色体10q23的一种抑癌基因,与

人类恶性肿瘤的发生普遍相关。本研究中,与模型组比较,阿司匹林组和三子颗粒低、中、高剂量组小鼠肠道腺瘤 *miR-205-5p* 表达、Bcl-2、Ki67 mRNA 及蛋白表达降低,PTEN、Bax mRNA 及蛋白表达升高,其中三子颗粒作用呈剂量相关性;与 *miR* inhibitor-NC 组比较,*miR-205-5p* inhibitor 组小鼠肠道腺瘤数量、体积及细胞增殖活性均降低,凋亡率升高,*miR-205-5p* 表达、Bcl-2、Ki67 mRNA 及蛋白表达降低,PTEN、Bax mRNA 及蛋白表达升高;荧光素酶活性实验证实 *miR-205-5p* 可靶向调控 PTEN。综合以上研究结果推测,三子颗粒可能是通过介导 *miR-205-5p* 靶向调控 PTEN 及其下游通路 Bcl-2、Ki67、PTEN、Bax 表达,发挥抑制小鼠脾虚型肠道腺瘤生长作用的。Yao 等^[24]研究指出,*miR-205-5p* 可通过靶向 PTEN 参与胃癌的进展过程。Xia 等^[25]报道指出,结直肠癌腺瘤小鼠中 PTEN 表达较低,Ki67 水平升高。本研究结果与上述研究相一致。

综上所述,三子颗粒可抑制小鼠脾虚型肠道腺瘤生长,可能是通过降低 *miR-205-5p* 表达,下调 Bcl-2、Ki67 表达,上调 PTEN、Bax 表达发挥作用的。本研究通过动物体内实验初步阐释了三子颗粒对小鼠肠道腺瘤生长的抑制作用及可能机制,为其应用于肠道腺瘤的临床治疗提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Baidoun F, Elshiw K, Elkerai Y, et al. Colorectal cancer epidemiology: Recent trends and impact on outcomes [J]. *Curr Drug Targets*, 2021, 22(9): 998-1009.
- [2] Lähde M, Heino S, Höglström J, et al. Expression of R-spondin 1 in *Apc^{Min/+}* mice suppresses growth of intestinal adenomas by altering Wnt and transforming growth factor beta signaling [J]. *Gastroenterology*, 2021, 160(1): 245-259.
- [3] Mirza K L, Wickham C J, Noren E R, et al. Full-thickness laparoendoscopic excision for management of complex colon polyps [J]. *Dis Colon Rectum*, 2021, 64(12): 1559-1563.
- [4] Ma C P, Shi X J, Guo W C, et al. *miR-205-5p* downregulation decreases gemcitabine sensitivity of breast cancer cells via ERp29 upregulation [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(5): 3525-3533.
- [5] Zhang J L, Zhang J X, Pang X C, et al. *miR-205-5p* suppresses angiogenesis in gastric cancer by downregulating the expression of VEGFA and FGF₁ [J]. *Exp Cell Res*, 2021, 404(2): 112579.
- [6] Zhao Y L, Zhang J X, Yang J J, et al. *miR-205-5p* promotes lung cancer progression and is valuable for the diagnosis of lung cancer [J]. *Thorac Cancer*, 2022, 13(6): 832-843.
- [7] 侯丽英, 张惠玲, 李霞, 等. 微小 RNA-205-5p 调控轴抑制蛋白 2 基因表达对结肠癌细胞增殖凋亡的影响及作用机制的临床研究 [J]. *中华实验外科杂志*, 2021, 38(2): 241-245.
Hou L Y, Zhang H L, Li X, et al. microRNA-205-5p participating in the proliferation and apoptosis of colon cancer cells by regulating the expression of axis inhibition protein 2 gene [J]. *Chin J Exp Surg*, 2021, 38(2): 241-245.
- [8] 李忠意, 朱传旺, 商竞宇, 等. 民族药三子方防治腺瘤性大肠息肉术后复发的临床观察 [J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2022, 30(7): 500-504.
Li Z Y, Zhu C W, Shang J Y, et al. Clinical observation on the prevention and treatment of postoperative recurrence of adenomatous colonic polyp by ethnic medicine Sanzifang [J]. *Chin J Integr Tradit West Med Dig*, 2022, 30(7): 500-504.
- [9] 张璐, 隋华, 伏杰, 等. 经方对条件性基因敲除 *APC^{Min/+}* 小鼠肠道腺瘤发生和肠道菌群的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(5): 2327-2332.
Zhang L, Sui H, Fu J, et al. Effect of classic prescription on intestinal adenoma and intestinal flora in conditional gene knockout *APC^{Min/+}* mice [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2020, 35(5): 2327-2332.
- [10] Zhang Y, Pu W, Bousquenaud M, et al. Emodin inhibits inflammation, carcinogenesis, and cancer progression in the AOM/DSS model of colitis-associated intestinal tumorigenesis [J]. *Front Oncol*, 2021, 10: 564674.
- [11] 邱仁静. 民族药三子方通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制 *APC^(min/+)* 小鼠大肠腺瘤生长的研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2021.
Qiu R J. Inhibitory effect of Sanzifang on colorectal adenoma growth in *APC^(Min/+)* mice by regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway. [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2021.
- [12] 熊晓杰, 谷云飞. 健脾祛湿方对大肠腺瘤患者行内镜下治疗后的临床效果 [J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2020, 26(5): 964-967.
Xiong X J, Gu Y F. Clinical observation after the treatment of colorectal adenoma by JianPi QuShi recipe under endoscope [J]. *Chin J Surg Integr Tradit West Med*, 2020, 26(5): 964-967.
- [13] 刘见荣, 沈卫星, 程海波, 等. 参白解毒方显著抑制小鼠结直肠腺瘤的形成及癌变: 基于 PTEN/PI3K/AKT 通路 [J]. *南方医科大学学报*, 2022, 42(10):

- 1452-1461.
- Liu J R, Shen W X, Cheng H B, et al. Shenbai Jiedu Fang inhibits AOM/DSS-induced colorectal adenoma formation and carcinogenesis in mice via miRNA-22-mediated regulation of the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway [J]. J South Med Univ, 2022, 42(10): 1452-1461.
- [14] Shang J Y, Guo H, Li J, et al. Exploring the mechanism of action of Sanzi formula in intervening colorectal adenoma by targeting intestinal flora and intestinal metabolism [J]. Front Microbiol, 2022, 13: 1001372.
- [15] 切尼项毛, 才让吉, 文成当智, 等. 基于Apriori算法和"味性化味" 矢量模型的含石榴子藏药方剂的用药规律及药性研究 [J]. 中国药房, 2020, 31(8): 906-912.
- Qie N, Cairangji, Wen C, et al. Study on medication regulation and pharmaceutical property of Tibetan medicine prescription of *Punica granatum* seeds based on apriori algorithm and "ro nus Zhu rJes" vector model [J]. China Pharm, 2020, 31(8): 906-912.
- [16] Li X Q, Lin Y L, Jiang Y Q, et al. Aqueous extract of *Phyllanthus emblica* L. alleviates functional dyspepsia through regulating gastrointestinal hormones and gut microbiome *in vivo* [J]. Foods, 2022, 11(10): 1491.
- [17] Lin M, Jian J B, Zhou Z Q, et al. Chromosome-level genome of *Entada phaseoloides* provides insights into genome evolution and biosynthesis of triterpenoid saponins [J]. Mol Ecol Resour, 2022, 22(8): 3049-3067.
- [18] 邱仁静, 林琳, 田耀洲. 民族药三子方防治结直肠腺瘤的理论探讨 [J]. 中国医药导报, 2021, 18(4): 123-126.
- Qiu R J, Lin L, Tian Y Z. Theoretical study on the prevention and treatment of colorectal adenoma with Sanzi Decoction of ethnic drug [J]. China Med Her, 2021, 18(4): 123-126.
- [19] Hill M, Tran N. miRNA interplay: Mechanisms and consequences in cancer [J]. Dis Model Mech, 2021, 14(4): dmm047662.
- [20] Meng X D, Yin J J, Yu X L, et al. microRNA-205-5p promotes unstable atherosclerotic plaque formation *in vivo* [J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2020, 34(1): 25-39.
- [21] Zhang S, Lin S H, Tang Q F, et al. Knockdown of miR-205-5p alleviates the inflammatory response in allergic rhinitis by targeting B-cell lymphoma 6 [J]. Mol Med Rep, 2021, 24(5): 818.
- [22] Li H N, Zhang H M, Li X R, et al. MiR-205-5p/GGCT attenuates growth and metastasis of papillary thyroid cancer by regulating CD44 [J]. Endocrinology, 2022, 163(4): bqac022.
- [23] Chang L, Zhou D M, Luo S X. Novel lncRNA LINC00941 promotes proliferation and invasion of colon cancer through activation of MYC [J]. Oncotargets Ther, 2021, 14: 1173-1186.
- [24] Yao L N, Shi W F, Gu J W. Micro-RNA 205-5p is involved in the progression of gastric cancer and targets phosphatase and tensin homolog (PTEN) in SGC-7901 human gastric cancer cells [J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 6367-6377.
- [25] Xia R M, Liu T, Li W G, et al. RNA-binding protein RBM24 represses colorectal tumorigenesis by stabilising PTEN mRNA [J]. Clin Transl Med, 2021, 11(10): e383.

[责任编辑 兰新新]