

基于 Wnt 信号通路研究黄芩汤干预炎症微环境下结肠癌细胞上皮间质转化与细胞周期进程的作用机制

马旭冉^{1,2}, 王敦方², 冯 雪², 刘雅清², 刘 滨^{2,3}, 杨伟鹏^{2*}

1. 山东中医药大学药物研究院, 山东 济南 250355

2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

3. 黑龙江中医药大学基础医学院, 黑龙江 哈尔滨 150006

摘要: **目的** 研究黄芩汤对炎症微环境下结肠癌 HT-29 细胞上皮间质转化与细胞周期进程的影响。**方法** 使用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导淋巴瘤 THP-1 细胞, 取细胞上清液作为条件培养基, 将条件培养基加入 HT-29 细胞培养体系中构建炎症微环境下结肠癌细胞模型, 给予黄芩汤 (500、250、125 $\mu\text{g/mL}$) 干预后, Transwell 法检测细胞迁移与侵袭能力; Western blotting 检测海马无翅基因 3a (recombinant wingless type MMTV integration site family member 3a, Wnt3a)、 β -连环蛋白 (β -catenin)、E-cadherin、糖原合酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)、细胞周期蛋白依赖激酶 4 (cyclin dependent kinase 4, CDK4) 和细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1) 的蛋白表达; qRT-PCR 检测 Wnt3a、 β -catenin、E-cadherin、GSK-3 β 、CDK4 和 cyclin D1 的 mRNA 表达。**结果** 与对照组比较, 黄芩汤组迁移与侵袭的细胞数目均显著减少 ($P < 0.01$), 细胞中 E-cadherin、GSK-3 β 蛋白和 mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.01$), CDK4、cyclin D1、Wnt3a、 β -catenin 蛋白和 mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.01$), 呈剂量相关性。**结论** 黄芩汤能够有效抑制炎症微环境下结肠癌细胞的上皮间质转化异常, 其作用机制可能与降低经典 Wnt 通路中 Wnt3a、 β -catenin 表达, 同时促进 E-cadherin、GSK-3 β 表达有关。黄芩汤还可通过有效抑制 CDK4、cyclin D1 的表达来修复周期检查点, 从而调节炎症微环境下结肠癌细胞的细胞周期紊乱。

关键词: 黄芩汤; 结肠癌; 炎症微环境; 上皮间质转化; 细胞周期; Wnt 信号通路; 黄芩苷; 汉黄芩苷; 千层纸素 A 苷; 甘草素二糖苷

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2023)07-2155-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.07.015

Mechanism of Huangqin Decoction on epithelial-mesenchymal transition and cell cycle of colon cancer cells under inflammatory conditions based on Wnt signaling pathway

MA Xu-ran^{1,2}, WANG Dun-fang², FENG Xue², LIU Ya-qing², LIU Bin^{2,3}, YANG Wei-peng²

1. Institute of Pharmaceutical Research, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

3. School of Basic Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150006, China

Abstract: Objective To study the effect of Huangqin Decoction (黄芩汤) on epithelial-mesenchymal transition and cell cycle process of colon cancer HT-29 cells in inflammatory microenvironment. **Methods** Lipopolysaccharide (LPS) was used to induce lymphoma THP-1 cells, and cell supernatant was used as conditioned medium. The conditioned medium was added to HT-29 cell culture system to construct colon cancer cell model in inflammatory microenvironment. After intervention with Huangqin Decoction (500, 250, 125 $\mu\text{g/mL}$), cell migration and invasion ability were detected by Transwell method. Western blotting was used to detect recombinant wingless type MMTV integration site family member 3a (Wnt3a), β -catenin, E-cadherin, glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and cyclin D1 protein expressions; qRT-PCR was used to detect Wnt3a, β -catenin, E-cadherin,

收稿日期: 2022-12-05

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81473592); 国家自然科学基金面上项目 (82074328); 中国中医科学院科技创新工程项目 (CI2021B015, CI2021A04604)

作者简介: 马旭冉, 博士, 讲师, 研究方向为中药药理学。Tel: 15811093082 E-mail: 60230092@sducm.edu.cn

*通信作者: 杨伟鹏, 博士, 研究员, 研究方向为中药药理学。Tel: (010)64093014 E-mail: hrbywp@sina.com

GSK-3 β , CDK4 and cyclin D1 mRNA expressions. **Results** Compared with control group, number of migrating and invading cells in Huangqin Decoction group were significantly decreased ($P < 0.01$), E-cadherin, GSK-3 β protein and mRNA expression levels were significantly increased ($P < 0.01$), while CDK4, cyclin D1, Wnt3a, β -catenin protein and mRNA expression levels were significantly decreased in a dose-dependent manner ($P < 0.01$). **Conclusion** Huangqin Decoction can effectively inhibit the abnormal epithelial-mesenchymal transition of colon cancer cells in inflammatory microenvironment, and its mechanism may be related to reducing the expressions of Wnt3a and β -catenin in classical Wnt pathway and promoting the expressions of E-cadherin and GSK-3 β . Huangqin Decoction can also repair the periodic checkpoint by effectively inhibiting the expressions of CDK4 and cyclin D1, thus regulating the cell cycle disorder of colon cancer cells in inflammatory microenvironment.

Key words: Huangqin Decoction; colon cancer; inflammatory microenvironment; epithelial-mesenchymal transition; cell cycle; Wnt signaling pathway; baicalin; wogonoside; oroxyloside; liquiritin apioside

炎症反应是机体抵御组织损伤或病原体不可或缺的防御机制,当细菌、病毒或外毒素等威胁因素出现时,炎症反应被激活,并随这些因素的消退而消退,然而当这些因素持续存在或正常愈合过程受到干扰时,急性炎症反应可能不会消退,而是发展为慢性炎症,损害免疫系统并导致组织严重损伤等病理变化,机械损伤或感染后的组织修复与再生是炎症微环境下受到严格调控的复杂过程^[1]。炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)包括克罗恩病(Crohn's disease, CD)与溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)2种慢性自身免疫性疾病,与环境变化、广泛失调的免疫反应、易感基因变异与肠道微生物群异常等多种致病因素有关^[2]。结肠炎相关结直肠癌(colitis associated colorectal cancer, CAC)于1925年已被认定为UC的严重并发症^[3]。更长的UC持续时间与CAC风险增加之间存在正相关,据估计,UC的CAC风险在10年后为2%,20年后升至8%,30年后飙升为18%^[4]。尽管CAC的发病机制至今尚未完全明确,但UC和CAC的发展过程总是相互交织的,通过UC-发育异常-CAC的序列进展与炎症反应、低度及高度不典型增生的发展有关,炎性介质与免疫调节剂的表达平衡、炎症微环境中不同类型炎性细胞数与活化情况等决定了肿瘤的生长速度与严重程度。特定的促炎信号通路诱导参与调节发育不良上皮细胞中细胞周期检查点的转录因子激活,并且不同的免疫反应导向不同的结果。因此,预防结肠炎对预防结肠癌至关重要。

黄芩汤出自《伤寒论》,清热止痢,和中止痛,常用于治疗湿热下痢,现代广泛应用于IBD的治疗及结肠癌的辅助治疗,临床疗效显著,被誉为“万世治痢之祖方”,诸如葛根芩连汤、甘草芍药汤等止泻方均由此方加减化裁而来。课题组前期研究发现黄芩汤具有多途径的、效应明确的抗炎、抗氧化

应激作用机制^[5-6],提示黄芩汤在对结肠炎具有显著疗效的基础上,或许可以进一步遏制炎症微环境下结肠癌细胞的某些异常机制。为了验证这一假说,本研究构建了体外炎症微环境下结肠癌细胞模型,结合分子生物学的方法,多层次、多方面地进行动态研究,以探究并验证黄芩汤是否可以通过调节相关通路及靶标来改善炎症微环境下结肠癌细胞周期紊乱、上皮间质转化异常等机制。

1 材料

1.1 细胞

人单核型细胞淋巴瘤 THP-1 细胞、人结肠腺癌 HT-29 细胞均购自中国医学科学院基础医学研究所实验细胞资源库。

1.2 药材

黄芩、白芍、炙甘草和大枣饮片均购自北京华邈药业有限公司,经中国中医科学院中药研究所李先端研究员分别鉴定为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根、毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎炮制后制得、鼠李科植物枣 *Ziziphus jujuba* Mill. 的干燥成熟果实。

1.3 药品与试剂

DMEM/F-12 培养基(批号 01-172-1ACS)购自以色列 BI 公司;RPMI 1640 培养基(批号 11875-093)、胎牛血清(批号 10099-141)、胰酶(批号 25300-054)购自 Invitrogen 公司;PBS 溶液(批号 SH30256-01)购自 Hyclone 公司;二甲基亚砜(批号 D2650)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS, 批号 L2880)购自美国 Sigma 公司;Matrigel 基底膜基质(批号 356234)购自美国 Corning 公司;人白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)ELISA 试剂盒(批号 D6050)、人肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)ELISA 试剂盒(批号 DTA00D)购自 R&D 公司;SDS-PAGE 凝胶

制备试剂盒(批号 P1200)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 PC0020)购自北京索莱宝科技有限公司; PageRuler Plus Prestained Protein Ladder(批号 26619)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; ECL 发光试剂(批号 WBKLS0500)购自美国 Millipore 公司; HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体(批号 ZB2305)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(批号 ZB-2301)购自北京中杉金桥生物技术有限公司; β -actin 兔抗鼠单克隆抗体(批号 SC-8432)购自 SantaCruz 公司; 兔抗鼠单克隆细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)抗体(批号 55506)、细胞周期蛋白依赖激酶 4(cyclin dependent kinase 4, CDK4)抗体(批号 12790)、E-cadherin 抗体(批号 3195)、糖原合酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)抗体(批号 12456)、海马无翅基因 3a(recombinant wingless type MMTV integration site family member 3a, Wnt3a)抗体(批号 2721)、 β -连环蛋白(β -catenin)抗体(批号 8480)购自美国 CST 公司; 动物组织/细胞总 RNA 提取试剂盒(批号 DP452)购自天根生化科技(北京)有限公司; TB Green® Premix Ex Taq™ II(Tli RNaseH Plus)酶试剂盒(批号 RR420B)、PrimeScript™ RT reagent Kit(Perfect Real Time)试剂盒(批号 RR037B)购自 Takara 公司。

1.4 仪器

HH 系列数显恒温水浴锅(金坛市科析仪器有限公司); 涡旋混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); MCO-15AC 型 CO₂ 培养箱(日本 Sanyo 公司); 倒置光学显微镜(重庆奥特光学仪器有限公司); SW-CJ-1FD 型垂直净化工作台(苏州智净净化设备有限公司); 4600SF 型全自动凝胶发光图像分析系统(上海 Tanon 公司); 蛋白质电泳转印系统(美国 Bio-Rad 公司); LightCycler® 480 Real-Time PCR 仪(瑞士 Roche 公司); NanoDrop 8000 分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

2 方法

2.1 黄芩汤的制备

参照《伤寒论》组方及课题组的前期研究^[7], 黄芩汤由黄芩、芍药、甘草和大枣配伍而成, 按照 3:2:2:2 的比例, 称取一定量的药材, 加入 10 倍体积的水, 煎煮 1 h 后, 趁热滤过药液; 药渣加 8 倍体积的水继续煎煮 1 h 时, 合并 2 次药液, 浓缩成 1 g/mL 药液。经指纹图谱相似度和多成分含量分析控制^[8], 提取率约为 38.89%, 与对照图谱相似系数

为 0.998, 主要含黄酮和萜类化合物, 含黄芩苷 10.094%、汉黄芩苷 2.334%、千层纸素 A 苷 0.953%、黄芩素 0.411%、汉黄芩素 0.149%、千层纸素 A 0.093%、甘草素二糖苷 0.790%、甘草苷 0.344%、异甘草素二糖苷 0.036%、甘草素 0.032%、异甘草苷 0.060%、异甘草素 0.003%。

2.2 细胞培养

HT-29 细胞为贴壁培养细胞系, 用含 5% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM/F-12 培养基, 于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。THP-1 细胞为悬浮细胞系, 用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基, 于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。当细胞生长至培养瓶面积 80% 以上时, 消化传代, 取处于对数生长期的细胞进行实验。

2.3 条件培养基制备

取对数生长期的 THP-1 细胞, 调整细胞密度为 1×10^6 个/皿, 加入 1 μ g/mL LPS, 于培养箱中培养过夜。收集细胞上清并离心后, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测 IL-6、TNF- α 水平; 收集上清与含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基按 1:2 比例混合均匀后制得条件培养基。

2.4 细胞模型制备

取对数生长期的 HT-29 细胞, 使用条件培养基重悬细胞并调整细胞密度为 1×10^6 个/皿, 培养箱中培养 24 h, 制得细胞模型用以后续实验。

2.5 MTT 检测细胞增殖

收集细胞, 将细胞密度调整为 1×10^6 个/皿, 接种于无菌 96 孔板中, 培养箱中培养过夜。次日, 镜下观察细胞单层铺满培养板孔底后, 每孔加入 100 μ L 不同质量浓度(1250、625、312.5、156.25、78、39、19.5、9.8 μ g/mL)黄芩汤溶液, 另设置接种细胞不含药物的对照孔以及未接种细胞不含药物的空白孔, 培养 24 h 后, 镜下观察药物的作用效果, 每孔加入 100 μ L MTT(5 mg/mL), 培养 4 h 后, 每孔加入 200 μ L 二甲基亚砷, 镜下观察结晶物充分溶解后, 在 490 nm 处测定吸光度(A), 计算抑制率。

$$\text{抑制率} = 1 - (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.6 细胞迁移实验

收集细胞, 用不含胎牛血清、含不同质量浓度(125、250、500 μ g/mL)黄芩汤的 DMEM/F-12 培养基将细胞密度调整为 1×10^5 个/皿, 取 200 μ L 细

胞悬液加入孔径 8 μL 的 Transwell 上室中, 下室中加入 600 μL 含 20% 胎牛血清的 DMEM/F-12 培养基, 另设置不含药物的对照组, 培养 24 h 后, 使用 0.1% 结晶紫染色 10 min, 晾干后镜下计数上室微孔膜下层的细胞数目, 随机选取多个视野, 记录平均值。

2.7 细胞侵袭实验

收集细胞, 用不含胎牛血清、含不同质量浓度 (125、250、500 $\mu\text{g/mL}$) 黄芩汤的 DMEM/F-12 培养基, 将细胞密度调整为 1×10^5 个/皿, 取 200 μL 细胞悬液加入孔径 8 μL 的含 Matrigel 胶的 Transwell 上室中, 下室中加入 600 μL 含 20% 胎牛血清的 DMEM/F-12 培养基, 另设置不含药物的对照组, 培养 24 h 后, 使用 0.1% 结晶紫染色 10 min, 晾干后镜下计数上室微孔膜下层的细胞数目, 随机选取多个视野, 记录平均值。

2.8 Western blotting 检测蛋白表达

使用 RIPA 裂解液提取各组细胞总蛋白, BCA 法检测蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 封闭后加入一抗 (1:1000), 摇床 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 洗膜后, 加入二抗 (1:5000), 摇床室温孵育 1.5 h, 显影拍照, 使用 Image J 软件进行灰度值分析。

2.9 qRT-PCR 检测 mRNA 表达

按照试剂盒说明书提取细胞总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物由上海 Sangon 有限公司提供, 引物序列见表 1。

2.10 统计学分析

使用 GraphPad Prism 9.0 软件对数据进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 One-way ANOVA 检验。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列 (5'-3')
β -actin	F: CATGTACGTTGCTATCCAGGC R: CTCCTTAATGTCACGCACGAT
cyclin D1	F: GCCCTCGGTGTCCTACTTCAAATG R: TCCTCCTCGCACTTCTGTTCTC
β -catenin	F: GCCCTCGGTGTCCTACTTCAAATG R: GCCCTCGGTGTCCTACTTCAAATG
GSK-3 β	F: GTATAGATGTATGGTCTGCTGGCTGTG R: CATTCTCTGATTGCTCCCTTGTTGG
E-cadherin	F: GATTCTGCTGCTCTTGCTGTTTCTTC R: TCCTCTTCTCCGCTCCTTCTTC
Wnt3a	F: AGCTACCCGATCTGGTGGTC R: CAAACTCGATGTCCTCGCTAC
CDK4	F: ATGGCTACCTCTCGATATGAGC R: CATTGGGGACTCTCACACTCT

3 结果

3.1 黄芩汤对炎症微环境下 HT-29 细胞增殖能力的影响

如图 1 所示, 使用 LPS 诱导后的 THP-1 细胞上清液中炎症因子 IL-6 与 TNF- α 水平均显著升高 ($P < 0.01$), 符合条件培养基制备要求。细胞模型给予黄芩汤处理 24 h 后, 如图 2 所示, 随着黄芩汤质量浓度 (9.8~156.25 $\mu\text{g/mL}$) 的增加, 细胞抑制率逐渐上升; 当质量浓度高于 156.25 $\mu\text{g/mL}$ 时, 随着黄芩汤质量浓度的增加, 细胞抑制率不再上升, 因此选用 500、250、125 $\mu\text{g/mL}$ 进行后续实验。

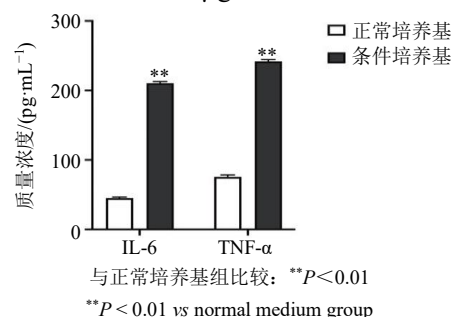


图 1 条件培养基中 IL-6 和 TNF- α 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 IL-6 and TNF- α levels in conditioned medium ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

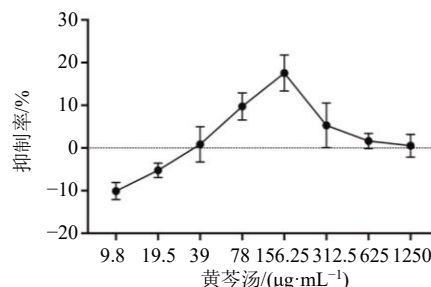


图 2 黄芩汤对炎症微环境下 HT-29 细胞增殖能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of Huangqin Decoction on proliferative capacity of HT-29 cells in inflammatory microenvironment ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 黄芩汤对炎症微环境下 HT-29 细胞迁移能力的影响

如图 3 所示, 与对照组比较, 黄芩汤中、高剂量组细胞数目显著减少 ($P < 0.01$), 表明黄芩汤可有效抑制炎症条件下 HT-29 细胞的迁移能力。

3.3 黄芩汤对炎症微环境下 HT-29 细胞侵袭能力的影响

如图 4 所示, 与对照组比较, 黄芩汤中、高剂量组细胞数目显著减少 ($P < 0.01$), 表明黄芩汤对炎症条件下 HT-29 细胞的侵袭能力有显著抑制作用。

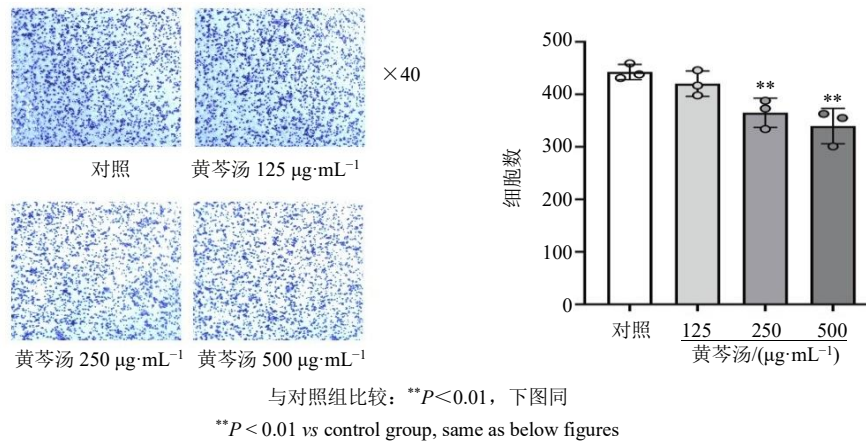


图 3 黄芩汤对炎症微环境下 HT-29 细胞迁移能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of Huangqin Decoction on migratory capacity of HT-29 cells in inflammatory microenvironment ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

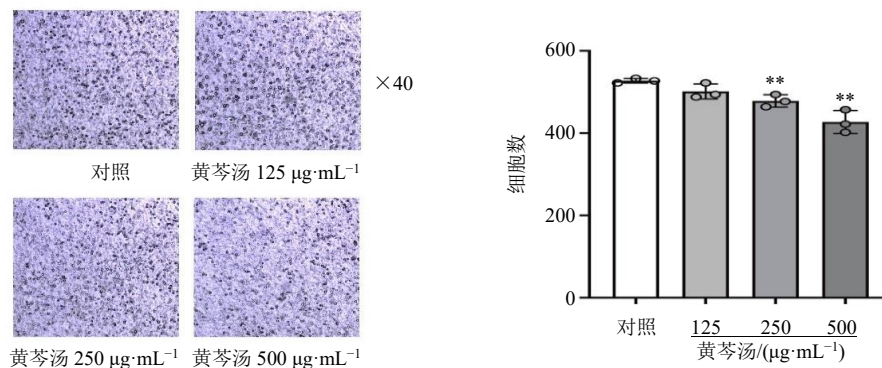


图 4 黄芩汤对炎症微环境下 HT-29 细胞侵袭能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of Huangqin Decoction on invasive capacity of HT-29 cells in inflammatory microenvironment ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 黄芩汤对炎症微环境下 HT-29 细胞 cyclin D1、CDK4、E-cadherin、 β -catenin、GSK-3 β 和 Wnt3a 蛋白表达的影响

如图 5 所示, 与对照组比较, 黄芩汤中、高剂

量组细胞中 E-cadherin、GSK-3 β 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.01$), CDK4、 β -catenin、Wnt3a 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$); 黄芩汤各剂量组 cyclin D1 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$)。

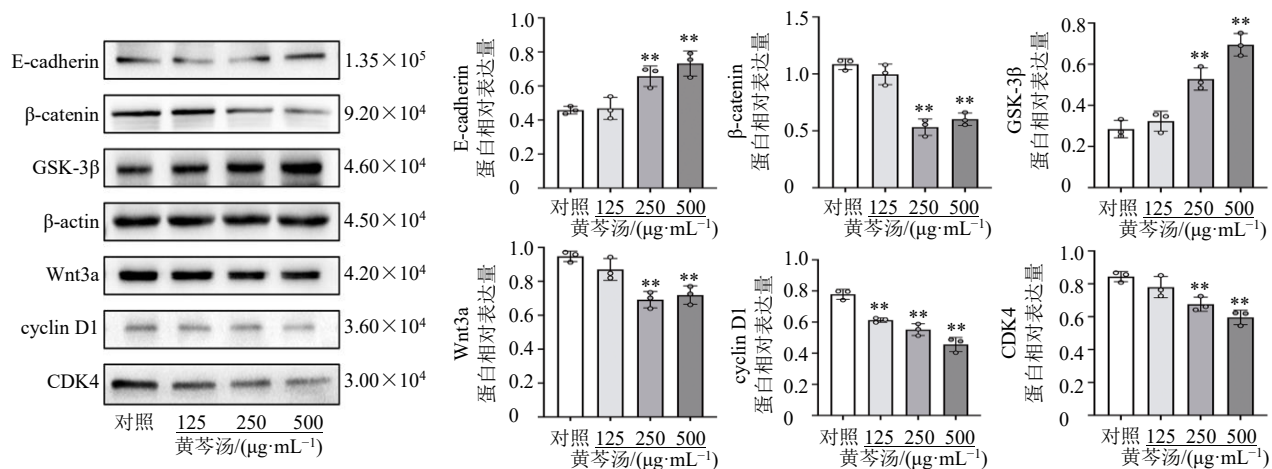


图 5 黄芩汤对炎症微环境下 HT-29 细胞 E-cadherin、 β -catenin、Wnt3a、CDK4、GSK-3 β 和 cyclin D1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of Huangqin Decoction on E-cadherin, β -catenin, Wnt3a, CDK4, GSK-3 β and cyclin D1 protein expressions of HT-29 cells in inflammatory microenvironment ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.5 黄芩汤对炎症微环境下 HT-29 细胞 *cyclin D1*、*CDK4*、*E-cadherin*、 β -*catenin*、*GSK-3 β* 和 *Wnt3a* mRNA 表达的影响

如图 6 所示, 与对照组比较, 黄芩汤各剂量组

细胞 *E-cadherin*、*GSK-3 β* mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.01$), β -*catenin*、*cyclin D1*、*CDK4* mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.01$); 黄芩汤中、高剂量组 *Wnt3a* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。

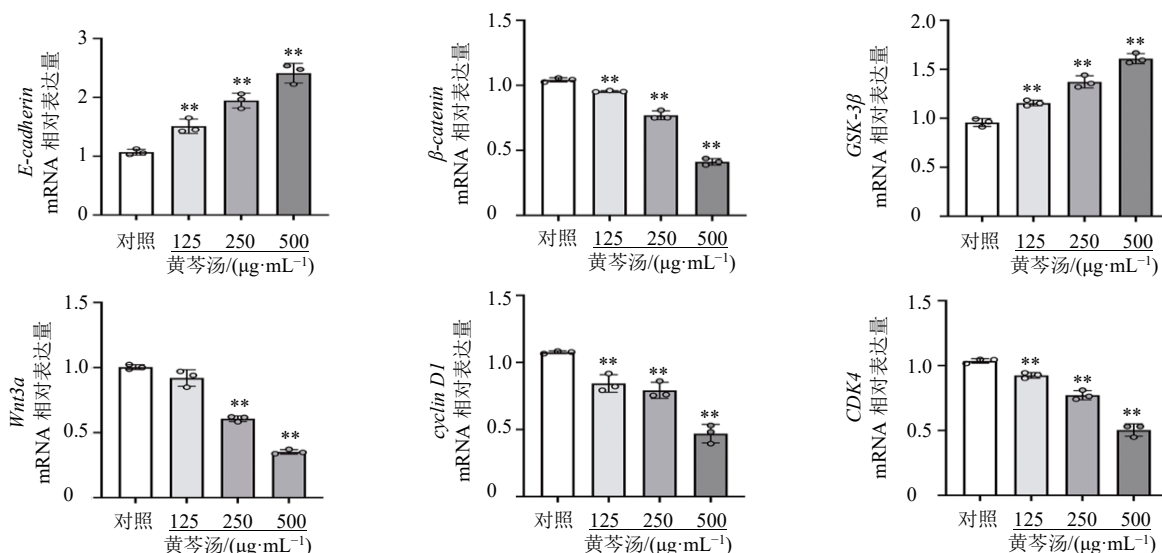


图 6 黄芩汤对炎症微环境下 HT-29 细胞 *E-cadherin*、 β -*catenin*、*Wnt3a*、*CDK4*、*GSK-3 β* 和 *cyclin D1* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 6 Effect of Huangqin Decoction on *E-cadherin*, β -*catenin*, *Wnt3a*, *CDK4*, *GSK-3 β* and *cyclin D1* mRNA expressions of HT-29 cells in inflammatory microenvironment ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

4 讨论

早在 1863 年 Rudolph Virchow 就曾描述过炎症在癌症发展中的作用, 他基于肿瘤组织发现炎性细胞浸润的观察结果提出“癌症起源于淋巴浸润的炎症部位”的假设^[9]。近年来有大量研究显示, 炎症可通过为浸润在肿瘤微环境中的细胞提供生物活性分子来增加患癌风险, 如生长因子、细胞持续增殖有关的趋化因子、抑制细胞凋亡信号、细胞外基质修饰酶等, 还可促进上皮间质转化异常、细胞周期紊乱、基因组变异、能量代谢重排等程序。长期的炎性浸润会诱发结肠黏膜的遗传损伤, 使组织过度修复, 肠上皮细胞增生异常, 最终导致结肠癌。

上皮间质转化是机体发育的关键环节, 常在伤口愈合、组织纤维化和癌症进展中被重新激活, 对于保护机体免受病原体侵害并去除坏死组织至关重要^[10-12]。在上皮间质转化发生时, 上皮细胞发生外形变化并丧失其极性连接被解构, 连接蛋白被重新定位和/或降解, *E-cadherin* 在质膜上的表达被抑制是胞间黏连不稳定进程的重要标志^[13], 同时这也意味着 β -*catenin* 失去了与 *E-cadherin* 的相互作用^[14]。后续随着上皮间质转化的逐步进展, 连接蛋白的表

达被 Wnt 信号调控的异常转录所抑制, 细胞发生突起, 且运动性增加、胞间连接丧失、细胞外基质降解^[15-16], 因此 Wnt 信号通路已成为治疗结肠癌最重要的分子靶点之一^[17]。核 β -*catenin* 水平升高被认为是侵袭性结肠癌的标志。 β -*catenin* 破坏复合物[包括腺瘤性结肠息肉病蛋白 (adenomatosis polyposis coli, APC)、轴抑制蛋白 (axis inhibitor, Axin)、酪蛋白激酶 1 (casein kinase 1, CK1) 和 *GSK-3 β*]的突变或失调导致 Wnt 相关靶点的激活[包括 *c-myc*、*cyclin D1*、基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 和 MMP-9], 从而增强细胞的增殖、侵袭和迁移能力^[18-21]。本研究推测黄芩汤可能通过稳定 β -*catenin* 的突变来对抗泛素-蛋白酶体系统的降解, 减少 *GSK-3 β* 释放, 使 β -*catenin* 在细胞核中的累积及磷酸化进程被抑制, 进而调控下游目标基因激活, 同时黄芩汤还可抑制 IL-1 β 的表达来稳定上皮间质转化相关因子 Snail, 延缓上皮间质转化过程。因此, 黄芩汤可能具有靶向 Wnt 途径及其相关成分来调节上皮间质转化进程异常的潜力。

组织稳态的维持依赖于细胞分裂和死亡 2 个主

要的生理过程。依靠这 2 种机制,细胞对组织损伤做出响应,并根据组织的修复需求进行增殖,细胞增殖是机体发育、维持体内平衡、组织再生、DNA 修复和细胞凋亡等事件相关的微调序列^[22]。细胞增殖过程中的阶段序列称为细胞周期,细胞周期通过其调控作用来限制有丝分裂后 2 个新细胞中不会出现遗传物质的增加或损失。细胞周期进程分为 4 个有序阶段,其进程高度保守且受控,分别为 G₀ 期(间隙期)、S 期(DNA 合成)、G₂ 期(有丝分裂准备期)、M 期(遗传物质和胞质分裂)。目前已知进入细胞周期的细胞受到 G₁/S、G₂/M 和有丝分裂纺锤体 3 个检查点的控制^[23]。其中, G₁/S 转变是一个关键的限制点,导致细胞未来的 3 种命运走向——继续循环、退出活跃增殖或进入 G₀ 期。细胞必须通过严格调节的限制点检查来调节从 G₁ 期进入 S 期并开始 DNA 复制的过程^[24]。根据经典的细胞周期模型, G₁/S 期间的转换起始于 G₁ 期的早期阶段,此时有丝分裂刺激(通过生长因子受体激活)和抑制之间的平衡更偏向于 G₁ 阶段,进而引发 D 型细胞蛋白(cyclin D1、D2 和 D3)表达水平增加。随后 D 型细胞蛋白与 CDK4/6 结合,构成 cyclin D-CDK 复合物进入细胞核,被 CDK 激活激酶复合物磷酸化。CDK4/6 在第一间隙期(G₁ 期)的酶活性由 cyclin D 控制,从而对各种细胞外信号,包括刺激性有丝分裂原、抑制性细胞因子、分化诱导剂、胞间黏附等做出反应^[25]。CDK/cyclin 途径的失调主要表现为通过了常用以严格控制细胞增殖并确保基因组准确性的检查点,进而允许组织不受限制的生长,最终发生发展为肿瘤^[26-28]。本研究结果显示,结肠癌 HT-29 细胞在炎症微环境下出现 CDK4 与 cyclin D1 的蛋白表达失调与转录异常,而黄芩汤可部分逆转转化后的表型,可能是通过抑制 cyclin D1 与 CDK4 的活性来进一步调控细胞周期检查点失常导致的不受控的细胞生长。这些结果也证实了 cyclin D1/CDK4 确实是细胞增殖过程中的重要靶点,黄芩汤作为这些靶点的有效抑制剂可能会对结肠癌进程中的细胞周期异常产生有意义的治疗作用。

本研究发现,黄芩汤可显著抑制炎症微环境下结肠癌 HT-29 细胞的迁移与侵袭,并通过调控依赖于 β -catenin 的经典 Wnt 通路相关位点 E-cadherin、GSK-3 β 、Wnt3a 来干预上皮间质转化异常,同时还可通过有效抑制 cyclin D1、CDK4 2 种细胞周期蛋白的表达试图修复周期检查点。这些药效靶标与炎

症微环境下的损伤修复诱使遗传物质变化进而发生细胞不受控增殖导致的肿瘤密切相关,黄芩汤可通过调节周期控制失调及快速生长分裂来干预永久性的基因组改变。为进一步深入研究黄芩汤干预 CAC 的药效作用及相关机制奠定了理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zhang G S, Ma L X, Bai L J, *et al.* Inflammatory microenvironment-targeted nanotherapies [J]. *J Control Release*, 2021, 334: 114-126.
- [2] Feagins L A. Role of transforming growth factor- β in inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2010, 16(11): 1963-1968.
- [3] Cassidy S, Syed B A. Colorectal cancer drugs market [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(8): 525-526.
- [4] Robles A I, Traverso G, Zhang M, *et al.* Whole-exome sequencing analyses of inflammatory bowel disease-associated colorectal cancers [J]. *Gastroenterology*, 2016, 150(4): 931-943.
- [5] Ma X R, Wang D F, Feng X, *et al.* Huangqin Tang interference with colitis associated colorectal cancer through regulation of epithelial mesenchymal transition and cell cycle [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 837217.
- [6] Wang D F, Shi K F, Wang Y L, *et al.* Effect of Huangqin Tang on colonic gene expression in rats with ulcerative colitis [J]. *Int J Genomics*, 2020, 2020: 4238757.
- [7] Li T, Wang Y W, Wang Y L, *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of Huangqin Tang in febrile rats [J]. *Acta Pharm Sin*, 2014, 49(10): 1418-1425.
- [8] Li T, Zhuang S X, Wang Y W, *et al.* Flavonoid profiling of a traditional Chinese medicine formula of Huangqin Tang using high performance liquid chromatography [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2016, 6(2): 148-157.
- [9] Singh N, Baby D, Rajguru J P, *et al.* Inflammation and cancer [J]. *Ann Afr Med*, 2019, 18(3): 121-126.
- [10] Francou A, Anderson K V. The epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in development and cancer [J]. *Annu Rev Cancer Biol*, 2020, 4: 197-220.
- [11] Debnath P, Huiem R S, Dutta P, *et al.* Epithelial-mesenchymal transition and its transcription factors [J]. *Biosci Rep*, 2022, 42(1): BSR20211754.
- [12] Dongre A, Weinberg R A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(2): 69-84.
- [13] Wong S H M, Fang C M, Chuah L H, *et al.* E-cadherin: Its

- dysregulation in carcinogenesis and clinical implications [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2018, 121: 11-22.
- [14] Gonzalez D M, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition [J]. *Sci Signal*, 2014, 7(344): re8.
- [15] Yuan L, Zhou M M, Huang D W, *et al.* Resveratrol inhibits the invasion and metastasis of colon cancer through reversal of epithelial-mesenchymal transition via the AKT/GSK-3 β /Snail signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(3): 2783-2795.
- [16] Sameri S, Saidijam M, Bahreini F, *et al.* Cancer chemopreventive activities of silibinin on colorectal cancer through regulation of E-cadherin/ β -catenin pathway [J]. *Nutr Cancer*, 2021, 73(8): 1389-1399.
- [17] Daulagala A C, Bridges M C, Kourtidis A. E-cadherin beyond structure: A signaling hub in colon homeostasis and disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(11): 2756.
- [18] Cheng X F, Xu X M, Chen D, *et al.* Therapeutic potential of targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in colorectal cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110: 473-481.
- [19] Albrecht L V, Tejada-Muñoz N, De Robertis E M. Cell biology of canonical Wnt signaling [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2021, 37: 369-389.
- [20] Vallée A, Lecarpentier Y. Crosstalk between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the canonical WNT/ β -catenin pathway in chronic inflammation and oxidative stress during carcinogenesis [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 745.
- [21] Bian J, Dannappel M, Wan C H, *et al.* Transcriptional regulation of Wnt/ β -catenin pathway in colorectal cancer [J]. *Cells*, 2020, 9(9): 2125.
- [22] Poon R Y C. Cell cycle control: A system of interlinking oscillators [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2329: 1-18.
- [23] Wang Z X. Cell cycle progression and synchronization: An overview [J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2579: 3-23.
- [24] Matthews H K, Bertoli C, de Bruin R A M. Cell cycle control in cancer [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23(1): 74-88.
- [25] Martínez-Alonso D, Malumbres M. Mammalian cell cycle cyclins [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2020, 107: 28-35.
- [26] Dang F B, Nie L, Wei W Y. Ubiquitin signaling in cell cycle control and tumorigenesis [J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(2): 427-438.
- [27] Liang S, Mu K, Wang Y, *et al.* CyclinD1, a prominent prognostic marker for endometrial diseases [J]. *Diagn Pathol*, 2013, 8: 138.
- [28] Goel S, DeCristo M J, McAllister S S, *et al.* CDK4/6 inhibition in cancer: Beyond cell cycle arrest [J]. *Trends Cell Biol*, 2018, 28(11): 911-925.

[责任编辑 李亚楠]