

赵嘉宁,梁惠玲,杨炯,等. 天门冬水提取物对人结肠癌细胞增殖、凋亡、迁移的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(6): 14-22.

Zhao JN, Liang HL, Yang X, et al. Effects of aqueous extract of asparagus on the proliferation, apoptosis and migration of colon cancer HCT116 cell [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(6): 14-22.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.06.003

天门冬水提取物对人结肠癌细胞增殖、凋亡、迁移的影响

赵嘉宁¹, 梁惠玲¹, 杨 炯¹, 李艳菊², 王飞清^{1,3}, 陶奕汐³, 王 琨³,
严雪梅³, 刘 洋^{1,3*}

(1. 贵州中医药大学, 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学, 贵阳 550004; 3. 贵州中医药大学第一附属医院, 贵阳 550001)

【摘要】 目的 本实验研究天门冬水提取物对人结肠癌 HCT116 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响。**方法** 本研究利用结晶紫染色法观察结肠癌 HCT116 细胞形态学变化, 采用 CCK-8 法、集落形成实验、EdU/Hoechst 33258 荧光染色检测天门冬水提取物对 HCT116 细胞增殖的影响, AnnexinV-FITC/PI 流式细胞术检测细胞凋亡率, 伤口愈合实验和 Transwell 侵袭实验检测细胞的迁移和侵袭情况, Real-time PCR 检测基因 *p53* 和 *Bax* 的 mRNA 水平。**结果** 天门冬水提取物处理 HCT116 细胞 24 h 后, 细胞数目较对照组明显减少, 贴壁不牢, 出现不同程度核固缩。天门冬水提取物以剂量依赖的方式抑制 HCT116 细胞活性, 促进细胞凋亡。集落形成实验、EdU/Hoechst 33258 荧光染色法、伤口愈合实验、Transwell 侵袭实验结果提示天门冬水提取物抑制细胞增殖、迁移和侵袭。Real-time PCR 的结果显示天门冬组凋亡基因 *p53* 和 *Bax* mRNA 高表达。**结论** 天门冬水提取物可导致凋亡基因 *p53* 和 *Bax* 的 mRNA 高表达从而抑制结肠癌 HCT116 细胞的增殖、迁移和侵袭, 促进其凋亡。

【关键词】 天门冬水提取物; HCT116 细胞; 增殖; 凋亡; 迁移; 侵袭

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 06-0014-09

Effects of aqueous extract of asparagus on the proliferation, apoptosis and migration of colon cancer HCT116 cell

ZHAO Jianing¹, LIANG Huiling¹, YANG Xu¹, LI Yanju², WANG Feiqing^{1,3}, TAO Yixi³, WANG Kun³,
YAN Xuemei³, LIU Yang^{1,3*}

(1. GuiZhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China. 2. Guizhou Medical University, Guiyang 550004. 3. the First Hospital Attached to GuiZhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001)

【Abstract】 Objective To study the effects of water extract of asparagus on the proliferation, apoptosis, migration, and invasion of human colorectal cancer cell line HCT116. **Methods** A CCK-8 assay, colony-forming experiment and EdU/Hoechst 33258 fluorescent dye test were performed to detect the inhibitory effect of water extract of asparagus on the proliferation of human colorectal cancer HCT116 cells. The apoptosis rate was observed via Annexin V-FITC/PI flow cytometry. The detection of cell migration and invasion were investigated by a wound healing test and

【基金项目】 国家自然科学基金 (82160519); 贵州省科技厅项目 ([2017]7140、[2018]2759、黔科合支撑[2022]一般 181); 贵阳市科技局项目 (筑科合 [2019]9-2-2); 贵中医科学院内 (2019)44、45、46 号。

【作者简介】 赵嘉宁 (1996—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 民族医药防治肿瘤研究。E-mail: zhaojianinghao@126.com

【通信作者】 刘洋 (1978—), 男, 硕士生导师, 博士, 研究方向: 民族医药防治肿瘤研究。E-mail: ly7878@163.com

Transwell invasion test, respectively. Real-time PCR was used to detect the mRNA levels of genes *p53* and *Bax*. **Results** Compared with the control group cells, the HCT116 cells that had been treated with water extract of asparagus for 24 h were significantly fewer in number, adhered to the wall less firmly, and exhibited different degrees of nuclear pyknosis. The water extract of asparagus could inhibit the activity of HCT116 cells and promote apoptosis in a dose-dependent manner. The result of a colony formation test, EdU/Hoechst 33258 fluorescence staining, wound healing test, and Transwell invasion test reveal that the water extract of asparagus inhibited cell proliferation, migration, and invasion. The Real-time PCR result show that the water extract of asparagus could upregulate the expression of apoptosis genes *p53* and *Bax*. **Conclusions** The water extract of asparagus can inhibit the proliferation, migration, and invasion of colorectal cancer HCT116 cells, promote their apoptosis, and lead to the high expression of apoptosis genes *p53* and *Bax*.

[Keywords] asparagus; HCT116 cells; proliferation; apoptosis; migration; invasion

结直肠癌是消化系统高发的恶性肿瘤,由于其起病较隐匿、发病时多已属中晚期,预后较差。据最新全球癌症数据统计显示,结直肠癌是男性第三、女性第二高发肿瘤,一般人群累计终生风险为 5%,恶性致死率排名第三^[1-2]。在中国,结直肠癌死因排位上升到第 5 位,且呈年轻化趋势^[3],这给患者、家庭乃至整个国家带来了巨大的身体和经济负担^[4]。众所周知,化学疗法的毒副反应较大,而新兴的靶向治疗方法面临耐药性和价格昂贵的严峻挑战,因此,开发具有多种化学结构和药理作用的天然抗肿瘤药物与治疗肿瘤疾病需求的殷切期盼不谋而合^[5]。天门冬是百合科植物天冬(*asparagus cochinchinensis* (Lour) Merr)的块根^[6],是我国一种传统中草药,《神龙本草经》将其归为上品,记载此药主风湿偏痹,强骨髓,杀三虫,去浮尸,言久服轻生益气延年,当代临床常用于治疗阴虚发热、咳嗽吐血、肺癰、咽喉肿痛、消渴、便秘等病症。近年来国内外研究从天门冬分离出天门冬素、甾体皂苷、低聚糖和多糖等多种成分^[7-8],据文献报道这些成分具有抗炎、抗氧化、增强免疫力、抗肿瘤活性等药理作用,且几乎对人体没有毒副反应^[9-11]。目前有关天门冬抗肿瘤作用的研究主要集中在单体及粗提物通过诱导肿瘤细胞凋亡、周期阻滞,抑制其增殖、迁移、肿瘤生长,延长荷瘤小鼠生存期等方面^[12-15],然而有关天门冬对人结直肠癌 HCT116 细胞的影响报道尚属空白。本研究评价了天门冬水提取物对人结肠癌 HCT116 细胞的增殖、迁移、侵袭的抑制及促进凋亡等作用效果,旨为天门冬的开发和应用提供依据。

1 材料和方法

1.1 细胞

人结肠癌 HCT116 细胞系由中国科学院上海细

胞生物所提供。

1.2 主要试剂与仪器

天门冬(贵阳济仁堂药业有限公司);高糖 DMEM 细胞培养基(美国 GIBCO 公司,批号 2200905);胎牛血清(以色列 BI 公司,批号 1706126);PBS 缓冲液(北京索莱宝公司,批号 422R023);青/链霉素混合液(北京索莱宝公司,批号 20201023);胰酶细胞消化液(南京碧云天公司,批号 70120500);二甲基亚砜(北京索莱宝公司,批号 710N0317);4%多聚甲醛(北京索莱宝公司,批号 70085400);结晶紫染料(北京索莱宝公司,批号 20191119);细胞增殖-毒性检测试剂盒 CCK-8(日本同仁公司);EdU/Hoechst 33342 试剂盒(广州锐博公司,批号 S0626);Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物科技有限公司,批号 20210727);逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 检测试剂盒(北京全式金生物技术有限公司);氯仿、异丙醇、无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司);引物合成、DEPC 处理水(上海生物工程有限公司)。

CO₂ 恒温培养箱、酶标仪(美国 Thermo 公司);超净工作台(上海博讯实业有限公司);低速离心机、微量移液器(德国 Eppendorf 公司);流式细胞分析仪(美国 BD 公司);倒置显微镜、荧光显微镜 BX53(日本 Olympus 公司);PCR 扩增仪(北京东胜创新生物科技有限公司);6 孔培养板、48 孔培养板、96 孔培养板、Transwell 小室(美国 Corning 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 天门冬水提取物制备

精密称取天门冬饮片 50 g,加 10 倍体积水称重,浸泡 2 h,回流提取 2 次,每次 1 h,抽滤,合并滤液,用水补足减少的重量,药液在 70℃ 减压浓缩,浓缩至含生药 1 g/mL 浓度,取浓缩液 2 mL 加水稀释

至 10 mL, 1000 r/min 离心 5 min, 上清液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 滤液分装于无菌离心管, 置于 -20°C 冰箱中保存备用。天门冬水提取物的制备方法参考了先前的研究^[16-17]。

1.3.2 细胞培养

将人结肠癌 HCT116 细胞培养于添加 100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素、10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基, 置于 37°C 、5% CO_2 的恒温加湿培养箱中培养, 2~3 d 以 1:3 的比例传代 1 次。取对数生长期的细胞用于后续实验。

1.3.3 CCK-8 检测天门冬水提取物对人结肠癌细胞 HCT116 增殖的影响

取生长状态良好的 HCT116 细胞接种于 96 孔板中, 接种密度为 6×10^3 个/孔, 置于 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养, 待细胞完全贴壁生长后, 去除原培养基, 添加含不同浓度的天门冬水提取物的完全培养基, 各组对应浓度分别为 25、50、100、150、200 $\mu\text{g/mL}$, 并设置空白对照组 (control), 每个药物浓度设 6 个复孔, 96 孔板周围一圈均每孔加入 200 μL PBS 溶液, 培养 24、48 或 72 h, 换液, 每孔加入含 10% CCK-8 的完全培养基 100 μL , 培养箱中继续孵育 4 h。用酶标仪测定 450 nm 波长处的 OD 值。实验重复 3 次, 记录每块板的数值, 并计算 IC_{50} 及抑制率。

细胞增殖抑制率 = $(1 - \text{实验组吸光度值} / \text{对照组吸光度值}) \times 100\%$

1.3.4 结晶紫染色

待细胞生长至 70%~90% 融合度时, 消化收集细胞, 按细胞密度为每毫升 1×10^5 个的要求在 6 孔细胞培养板进行接种, 37°C 、5% 的 CO_2 细胞培养箱培养 24 h, 待细胞融合度达 50% 时开始加药, 以完全培养基作为空白对照组, 分别加入 50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ (依据 CCK-8 实验结果确定此浓度为余下实验设计浓度) 天门冬水提取物的完全培养基作用 24 h。PBS 洗涤 2 遍, 4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 洗涤 2 遍, 1% 结晶紫染色 15 min, 自来水洗去多余结晶紫染料, 室温自然晾干后在倒置显微镜下对细胞形态变化进行观察分析、拍照。

1.3.5 集落形成实验

将细胞密度为 700 个/孔生长状态良好的 HCT116 细胞接种到 6 孔板中, 37°C 、5% 的 CO_2 细胞培养箱培养 24 h, 吸弃旧培养基, 给药组分别加入含 50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度天门冬水提取物培养基, 对

照组加入完全培养基, 每 3 d 换液 1 次, 待细胞集落形成合适大小时 (药物处理 14 d), 吸弃条件培养基, PBS 洗涤 2 次, 然后将细胞集落固定在 4% 多聚甲醛中 20 min, 弃液后 PBS 洗涤 2 次, 结晶紫溶液染色 15 min, 吸弃染色液, PBS 洗涤 2~3 次, 室温自然晾干, 用光镜计数含有 50 个以上细胞的集落数。实验重复 3 次。

1.3.6 EdU 染色检测细胞 DNA 合成率

将生长对数期细胞按每毫升 2×10^4 个细胞悬液接种在 48 孔板中, 待细胞贴壁且融合度达 50% 时, 吸弃旧培养基, 添加含 50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 天门冬水提取物的完全培养基, 对照组添加完全培养基, 继续培养 24 h, 加入 1000:1 浓度的 EdU 标记液在 37°C 温箱内孵育 2 h。PBS 洗涤细胞 2 次, 4% 多聚甲醛中固定 30 min, 2 $\mu\text{g/mL}$ 甘氨酸溶液中摇床孵育 5 min, PBS 洗涤 5 min, 0.5% TritonX-100 摇床 10 min, PBS 洗涤 5 min, 荧光染料避光孵育 30 min, PBS 每次洗涤 10 min, 共 3 次。然后用倒置荧光显微镜成像。实验重复 3 次, 并对每个孔中至少 10 个来自 3 个位置的细胞进行拍照、分析。

$\text{DNA 合成率} = (\text{红色荧光细胞数} / \text{蓝色荧光细胞数}) \times 100\%$

1.3.7 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率

选取生长状态良好的 HCT116 细胞消化并计数, 按为每毫升 1×10^5 个细胞密度求接种于 6 孔板中, 放入 CO_2 孵箱中培养 24 h。根据实验分组设计加入相应药物浓度的条件培养基, 药物作用 24 h 后使用不含 EDTA 的胰酶消化, 消化时间不宜过长, 2000 r/min 离心 5 min, 收集细胞, 并用预冷的 PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次, 每个样品管加入 500 μL Binding Buffer 重悬细胞, 加入 Annexin V-FITC/PI 荧光染料, 避光反应 5 min 后, 利用流式细胞仪分析结果。实验重复 3 次, FlowJo 10.0 软件分析细胞凋亡率。

1.3.8 伤口愈合试验

用伤口愈合法测定细胞迁移率, 将 2×10^5 个/孔细胞接种到 6 孔板上, 在 37°C 温箱、完全培养基中培养 24 h。天门冬水提取物与不含 FBS 的新鲜培养基配置成实验设计浓度, 将单层划伤, 分别在不同药物浓度环境中孵育 24 h。在倒置显微镜下拍摄了 6 个不同的位置, 实验重复 3 次。用 Image J 软件分析伤口面积。

1.3.9 Transwell 侵袭试验

将各浓度组处理 24 h 并饥饿 24 h 的 HCT116 细胞(5×10^4 个/孔)重悬于 200 μL 的无 FBS 高糖 DMEM 培养基中,接种到上室内(有基质凝胶涂层膜),下室加入 600 μL 含 20%FBS 完全培养基,孵育 24 h 后,用棉签从膜上表面取出未侵入的细胞,侵入细胞固定,结晶紫染色,倒置显微镜拍照,每组随机 6 各视野。实验重复 3 次,Image J 软件计数。

1.3.10 Real-time PCR 检测 *p53*、*Bax* 基因表达

取生长对数期 HCT116 细胞按实验设计药物浓度组接种细胞于 6 孔板中,每组 3 个复孔,处理 24 h。用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次,TRIzol 法提取总 RNA,按 TRIzol 试剂说明书进行操作,紫外分光光度计测定 RNA 溶液浓度和纯度。取总 RNA 1 μL 按要求逆转录为 cDNA 循环进行扩增。再以此为模版,按 25 μL 体系进行 PCR 反应。以 GAPDH 基因为内参,反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,59 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,40 cycles。Melt curve:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,65 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 cycles。结果通过 PCR 仪记录的 Ct 值对起始模板相对定量分析,每个样本设 3 个复孔,重复 3 次。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行数据处理,用 Graph Pad Prism 8 软件进行统计作图。数据结果用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,获得数据分析为正态性分布,多组间比较采用单因素方差分析,当 $P<0.05$ 视为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 天门冬水提取物抑制 HCT116 细胞的增殖

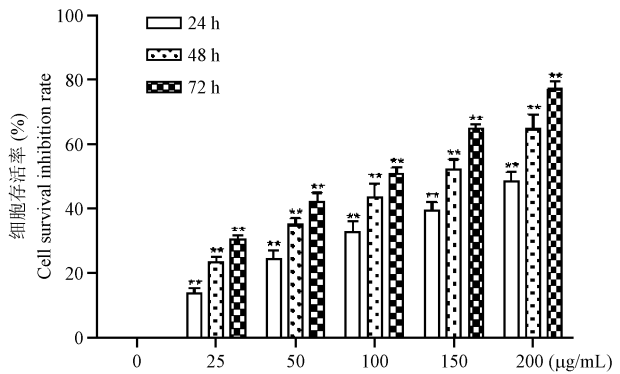
CCK-8 法检测天门冬水提取物对 HCT116 细胞活性的影响,结果如(图 1)所示,天门冬水提取物以浓度和时间依赖性方式抑制 HCT116 细胞的活性,且差异均具有统计学意义($P<0.01$)。通过 Graph

Pad Prism 8 软件计算其 24 h 半抑制浓度 IC_{50} 为 (200.17 ± 12.08) $\mu\text{g/mL}$,结果表明天门冬水提取物在 24 h 已发挥抑制 HCT116 细胞生长的作用,接下来我们的实验均采用天门冬水提取物浓度为 50、100、200 $\mu\text{g/mL}$,以 0 $\mu\text{g/mL}$ 作为空白对照组,处理时间为 24 h 的干预条件。

结晶紫染色观察到随着天门冬水提取物浓度的增加,细胞数量逐渐减少,贴壁不牢,细胞皱缩,出现不同程度的核固缩,细胞核内空泡化(图 2)。

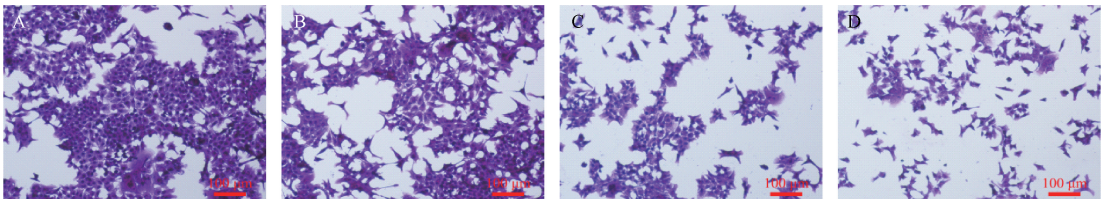
集落形成试验结果表明,药物组的集落数明显低于空白对照组(图 3),且差异均具有统计学意义($P<0.01$),提示天门冬水提取物对 HCT116 细胞的集落形成能力有明显抑制作用。

EdU/Hoechst 33342 荧光双染法结果如(图 4)所示,在天门冬水提取物中培养 24 h 的细胞数量与对照组相比随浓度梯度显著减少,EdU 相对荧光强度百分率随浓度增加显著降低,且差异均具有统计学意义($P<0.05$)。表明天门冬水提取物对 HCT116 细胞的 DNA 合成能力有明显抑制作用。

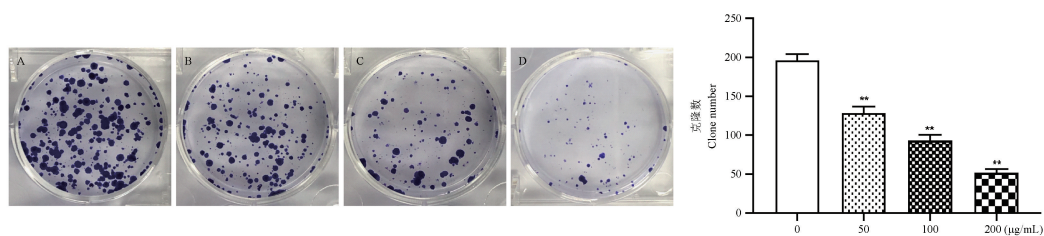


注:与对照组比较, ** $P<0.01$ 。
图 1 各组细胞 12~72 h 细胞存活率
Note. Compared with the control group, ** $P<0.01$.

Figure 1 12~72 h cell survival rate of cells in each group



注:A:对照组;B:天门冬 50 $\mu\text{g/mL}$;C:天门冬 100 $\mu\text{g/mL}$;D:天门冬 200 $\mu\text{g/mL}$ 。
图 2 天门冬水提取物对 HCT116 细胞形态的影响
Note. A, Control group. B, Asparagus 50 $\mu\text{g/mL}$. C, Asparagus 100 $\mu\text{g/mL}$. D, Asparagus 200 $\mu\text{g/mL}$.
Figure 2 Effect of the water extract of asparagus on HCT116 cells morphology

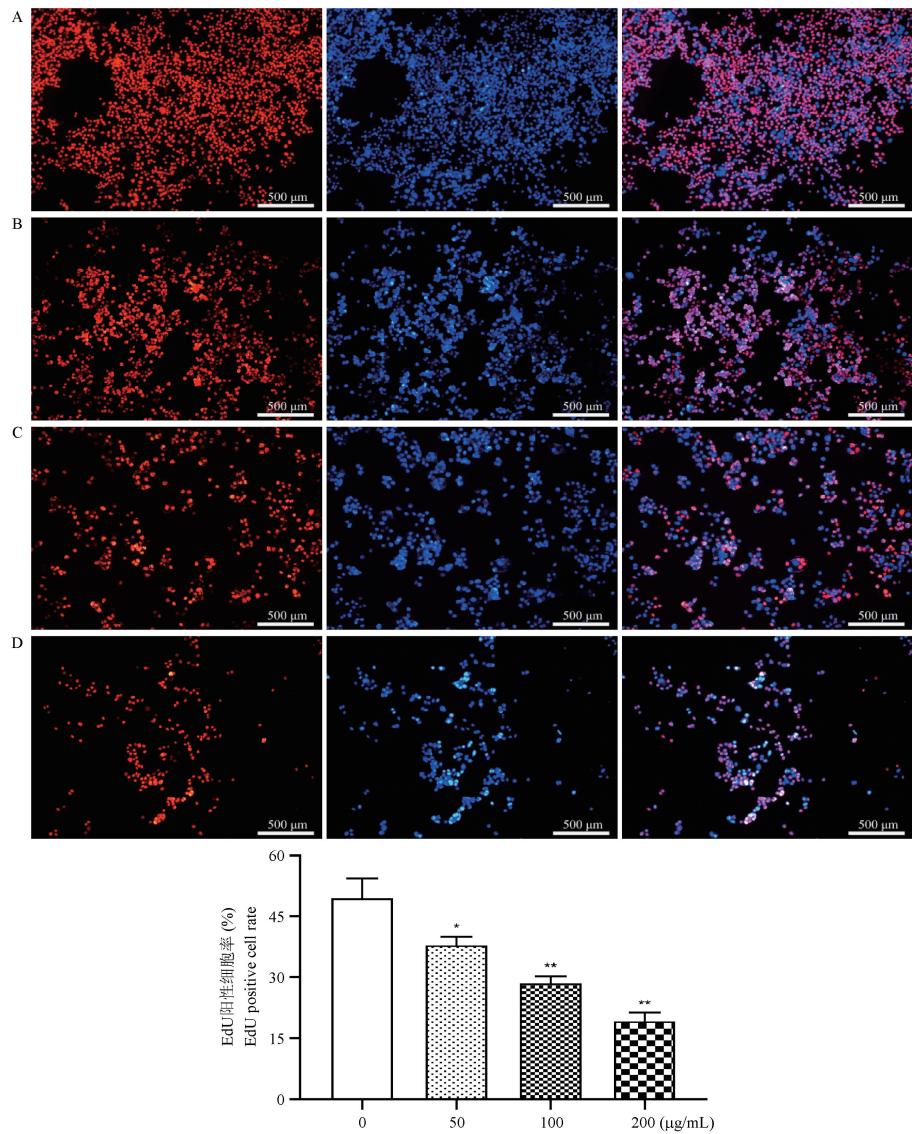


注:A;对照组;B:天门冬 50 µg/mL;C:天门冬 100 µg/mL;D:天门冬 200 µg/mL。与对照组比较, ** $P<0.01$ 。

图 3 各组细胞克隆形成能力比较

Note. A, Control group. B, Asparagus 50 µg/mL. C, Asparagus 100 µg/mL. D, Asparagus 200 µg/mL. Compared with the control group, ** $P<0.01$.

Figure 3 Comparison of cell clone formation ability in each group



注:A;对照组;B:天门冬 50 µg/mL;C:天门冬 100 µg/mL;D:天门冬 200 µg/mL。与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 4 各组 EdU 阳性细胞率比较

Note. A, Control group. B, Asparagus 50 µg/mL. C, Asparagus 100 µg/mL. D, Asparagus 200 µg/mL. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 4 Comparison of EdU positive cell rate in each group

2.2 天门冬水提取物促进 HCT116 细胞的凋亡

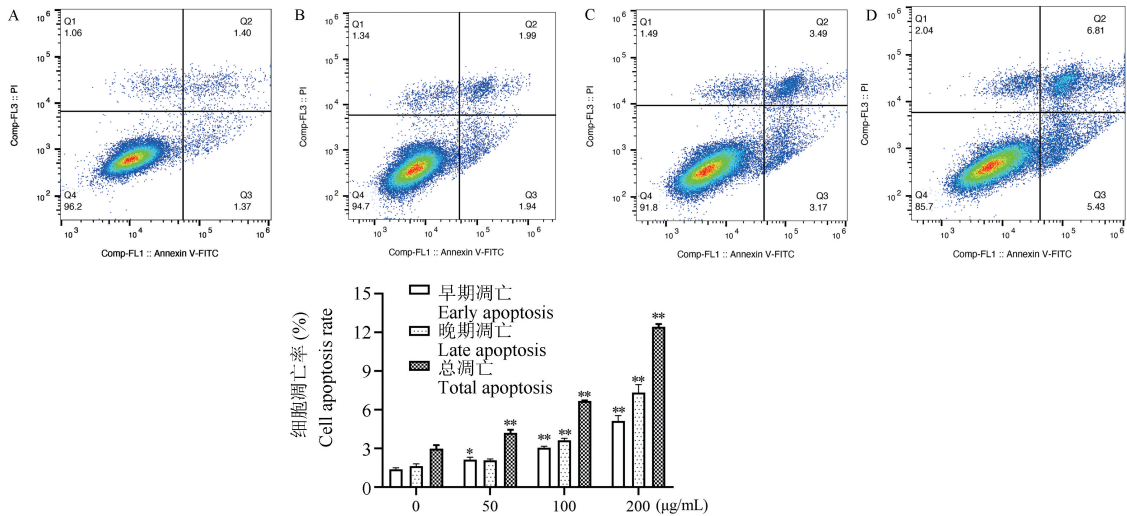
流式细胞术检测分析结果表明,50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 的天门冬水提取物均可促进 HCT116 细胞凋亡,且呈浓度依赖性,总凋亡率分别为 $(4.20 \pm 0.19)\%$ 、 $(6.68 \pm 0.04)\%$ 、 $(12.45 \pm 0.17)\%$,与对照组比较差异均具有统计学意义($P<0.01$),其中早期凋亡率较对照组增加,且差异均具有显著统计学意义($P<0.05$),晚期凋亡率与对照组相比,100、200 $\mu\text{g/mL}$ 组差异具有统计学意义($P<0.01$) (图 5)。

Real-time PCR 结果表明,随着天门冬水提取物浓度的增加,凋亡相关基因 *p53*、*Bax* 的 mRNA 表达水平升高,与空白对照组比较,100、200 $\mu\text{g/mL}$ 组差异具有显著的统计学意义($P<0.01$) (图 6)。

2.3 天门冬水提取物抑制 HCT116 细胞的迁移和侵袭

天门冬水提取物处理 HCT116 细胞 24 h 后,伤口愈合实验检测结果显示,划伤 24 h 后,随着药物浓度的增加,其迁移率逐渐降低,具体结果如(图 7)所示,各浓度组与 control 组比较均具有统计学差异($P<0.01$)。提示天门冬水提取物能抑制 HCT116 细胞的迁移能力。

Transwell 侵袭试验结果表明,不同浓度的天门冬水提取物均能抑制 HCT116 细胞的侵袭能力,且呈现剂量依赖关系。统计学分析显示在 HTC116 细胞侵袭能力方面,各天门冬水提取物浓度组与 control 组之间比较存在统计学差异($P<0.01$) (图 8)。

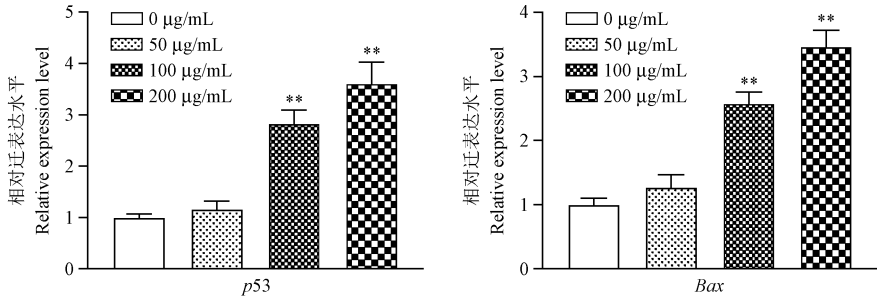


注:A:对照组;B:天门冬 50 $\mu\text{g/mL}$;C:天门冬 100 $\mu\text{g/mL}$;D:天门冬 200 $\mu\text{g/mL}$ 。与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 5 各组细胞凋亡比较

Note. A, Control group. B, Asparagus 50 $\mu\text{g/mL}$. C, Asparagus 100 $\mu\text{g/mL}$. D, Asparagus 200 $\mu\text{g/mL}$. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 5 Comparison of apoptosis of cells in each group

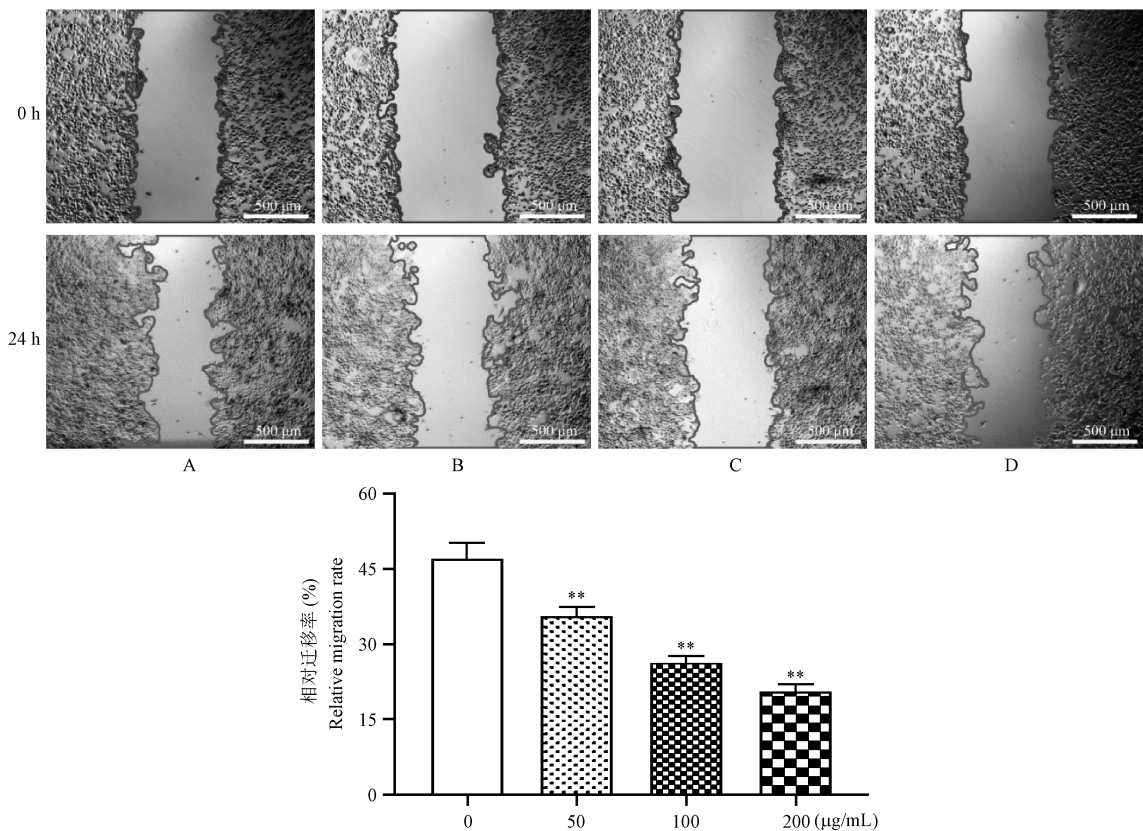


注:与对照组比较, ** $P<0.01$ 。

图 6 各组细胞中 *p53*、*Bax* 基因 mRNA 表达水平变化

Note. Compared with the control group, ** $P<0.01$.

Figure 6 Changes in the expression of mRNA levels of *p53* and *Bax* genes in cells of each group changed

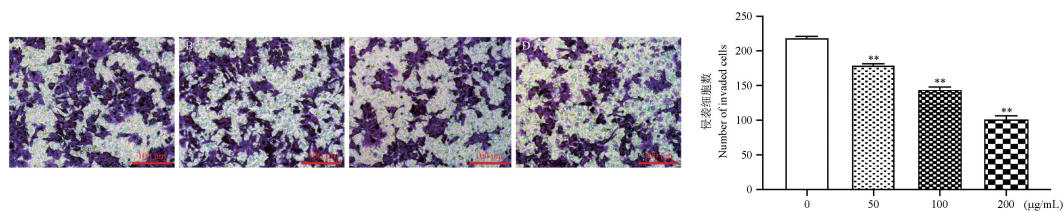


注:A;对照组;B;天门冬 50 μg/mL;C;天门冬 100 μg/mL;D;天门冬 200 μg/mL。与对照组比较, ** P<0.01。

图 7 天门冬水提取物对 HCT116 细胞迁移能力的影响

Note. A, Control group. B, Asparagus 50 μg/mL. C, Asparagus 100 μg/mL. D, Asparagus 200 μg/mL. Compared with the control group, ** P<0.01.

Figure 7 Effect of asparagus on the migration ability of colon cancer HCT116 cell



注:A;对照组;B;天门冬 50 μg/mL;C;天门冬 100 μg/mL;D;天门冬 200 μg/mL。与对照组比较, ** P<0.01。

图 8 天门冬水提取物对 HCT116 细胞侵袭能力的影响

Note. A, Control group. B, Asparagus 50 μg/mL. C, Asparagus 100 μg/mL. D, Asparagus 200 μg/mL. Compared with the control group, ** P<0.01.

Figure 8 Effect of asparagus on the invasion ability of colon cancer HCT116 cell

3 讨论

结直肠癌的形成是一个复杂的过程,中医学认为,大抵是患者正气亏损,邪毒侵袭,导致气滞、痰凝、湿聚等病理变化所致,是一个整体为虚,局部为实的全身性疾病。临床研究发现结直肠癌患者大多出现免疫抑制^[18],这种免疫功能紊乱可对应中医

“正气虚损”的微环境。基于此,扶正法是中医理论中非常重要的治疗大法,刘嘉湘教授主张^[19]“扶正治癌”,认为准确辨证、严守病机,立足扶正,据实祛邪,把握疾病的主要矛盾和矛盾的主要方面,让扶正与祛邪有机结合,如此可掌握治疗肿瘤的主动权。所以近年来益气扶正类中药在恶性肿瘤治疗中的研究与应用越来越受到重视^[20-22]。

天冬始载于《神农本草经》, 包含天门冬素、甾体皂苷、低聚糖和多糖类等多种成分^[6-7], 具有清热、养肺肾阴的功效。天冬除了显著的抗炎、抗氧化、增强免疫力等作用, 亦被发现具有抗癌活性。临床常采用以天门冬等中药组成的复方治疗恶性肿瘤性疾病^[23], 其能够发挥稳定病灶、改善生存质量及延长生存期等功效。研究发现天门冬皂苷提取物对结直肠癌细胞^[24]有显著的细胞毒性作用, Bousserouel 等^[13]结果更详细地表明, ASP 的甲醇提取物可以通过激活人结肠腺癌细胞 SW480 和 SW620 的 TRAIL 死亡受体通路诱导细胞凋亡。程伟^[25]研究表明天冬多糖体在外常氧和缺氧下可抑制人肝癌细胞 (SK-Hep1 和 Hep-3B) HIF1 α 和 VEGF 表达, 从而抑制人肝癌细胞 (SK-Hep1 和 Hep-3B) 增殖、迁移、侵袭和血管形成。本课题以天门冬水提物为研究对象, 因前期药物分析发现, 天门冬水提物主要活性成分包括总皂苷、多糖、槲皮素、 β -谷甾醇和 7-甲氧基-2-甲基异黄酮, 故天门冬水提物可能具有多效协同抑制结直肠癌增殖的作用, 且天门冬水提物获取程序较简化, 易于临床广泛推广^[26]。

本研究采用人结直肠癌 HCT116 细胞为载体, 通过 CCK-8 法、集落形成实验、EdU 荧光染色法检测天门冬水提取物对 HCT116 细胞增殖的影响, 结果表明, 天门冬水提取物可有效抑制 HCT116 细胞增殖, 并呈一定的时间和浓度依赖性。

细胞凋亡又称细胞程序性死亡 (programmed cell death, PCD), 在大多数恶性肿瘤发病学上占有重要地位。Liu 等^[27]用流式细胞术进行细胞凋亡分析, 评价天门冬皂苷 G(7) 对细胞凋亡的影响, 结果显示, 随着天门冬皂苷浓度的增加, 肺癌细胞 NCI-H460 的凋亡细胞的百分比增加, 天门冬皂苷可呈剂量依赖性地促进人大细胞肺癌细胞系 NCI-H460 的凋亡, 从而发挥抑制肿瘤细胞增殖的作用。本研究采用流式细胞术检测天门冬水提物对 HCT116 细胞的抑制作用, 结果显示经天门冬水提物处理后, 细胞凋亡率随浓度升高而升高。另外, 通过伤口愈合实验和 Transwell 侵袭实验模拟 HCT116 细胞的侵袭迁移状况, 结果显示天门冬水提取物干预 HCT116 细胞后, 迁移距离减少, 细胞侵袭穿过小室的细胞数目明显减少。提示天门冬水提物可诱导 HCT116 细胞发生凋亡, 并以浓度依赖方式明显抑制人结肠癌 HCT116 细胞增殖、迁移和侵袭。

p53 基因是肿瘤领域研究最为广泛的基因之一, 大多数人类肿瘤与其变化有关^[28]。Bax 是 Bcl-2 基因家族的成员, 通过剪切露出 BH3 结合域, 释放细胞色素 C, 激活细胞内 Caspase 酶原, 其表达量增多往往导致细胞凋亡加速^[29]。近年研究发现, Bax 基因是 p53 的转录靶标^[30], Bax 基因表达上调可能是由激活的 p53 诱导的。薯蓣皂苷元是天冬抗肿瘤的活性成分, 有研究表明其能抑制乳腺癌生存和增殖, 主要是通过增强 p53 蛋白表达, 抑制核因子- κ B (NF- κ B) 与 DNA 结合和 p38 有丝分裂原活化的蛋白激酶 (MAKP) 的活化, 诱导细胞凋亡^[31]。本研究发现, 天门冬水提物可上调 HCT116 细胞 p53 和 Bax 的 mRNA 表达水平, 提示天门冬水提物可调控凋亡相关因子, 促进 HCT116 细胞的凋亡, 且其对信号分子的调控具有一定的剂量依赖性趋势。

中药复方现代研究中, 由于水与乙醇的极性不同, 醇提取物和水提取物有效成分的含量、种类存在差异^[32], 考虑到醇提法的成本及对工人的毒性, 本研究以水作为提取溶剂, 提高提取效率的同时的保留了天冬中的多糖和总氨基酸等活性成分, 在诱导结肠癌肿瘤细胞凋亡, 抑制肿瘤细胞增殖方面, 取得了较好的结果^[33-35]。本实验以人结肠癌肿瘤细胞系 HCT116 为研究对象, 通过 CCK-8 实验、细胞凋亡率及凋亡相关基因 p53、Bax 表达的检测, 发现: 一定浓度的天门冬水提取物能够上调 HCT116 结肠癌细胞 p53、Bax mRNA 的表达、诱导 HCT116 结肠癌细胞凋亡, 降低其迁移、侵袭能力, 具有较好的抗肿瘤潜力, 其机制可能与上调 Bax、p53 的表达有关, 进而为扶正类中药水提物治疗结肠癌提供一定的实验依据, 为其后期的研究与开发奠定基础。

参考文献:

- [1] Zhu J, Tan Z, Hollis-Hansen K, et al. Epidemiological trends in colorectal cancer in China: an ecological study [J]. Dig Dis Sci, 2017, 62(1): 235-243.
- [2] Siegel RL, Medhanie GA, Fedewa SA, et al. State variation in early-onset colorectal cancer in the United States, 1995-2015 [J]. J Natl Cancer Inst, 2019, 111(10): 1104-1106.
- [3] Siegel RL, Jakubowski CD, Fedewa SA, et al. Colorectal cancer in the young: epidemiology, prevention, management [J]. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2020, 40: 1-14.
- [4] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [5] Lam KS. New aspects of natural products in drug discovery [J]. Trends Microbiol, 2007, 15(6): 279-289.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医

药科技出版社, 2015.

- [7] 徐从立, 陈海生, 谭兴起, 等. 中药天冬的化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2005, 2: 128-130.
- [8] Zhu XL, Li CX, Zhang L, et al. Research advance in bioactive constituents and major biological activities of *Asparagus officinalis* L [J]. *Hans J Food and Nutrition Sci*, 2020, 9(1): 74-81.
- [9] Zhao Q, Xie B, Yan J, et al. *In vitro* antioxidant and antitumor activities of polysaccharides extracted from *Asparagus officinalis* [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 87(1): 392-396.
- [10] Samad NB, Debnath T, Abul Hasnat M, et al. Phenolic contents, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Asparagus cochinchinensis* (Loureiro) Merrill [J]. *J Food Biochem*, 2014, 38(1): 83-91.
- [11] Thakur M, Connellan P, Deseo MA, et al. Characterization and *in vitro* immunomodulatory screening of fructo-oligosaccharides of *Asparagus racemosus* Willd [J]. *Int J Biol Macromol*, 2012, 50(1): 77-81.
- [12] Park M, Cheon MS, Kim SH, et al. Anticancer activity of *Asparagus cochinchinensis* extract and fractions in HepG2 cells [J]. *Appl Biol Chem*, 2011, 54(2): 188-193.
- [13] Bousserouel S, Le Grandois J, Gossé F, et al. Methanolic extract of white asparagus shoots activates TRAIL apoptotic death pathway in human cancer cells and inhibits colon carcinogenesis in a preclinical model [J]. *Int J Oncol*, 2013, 43(2): 394-404.
- [14] Cheng W, Cheng Z, Xing D, et al. *Asparagus* polysaccharide suppresses the migration, invasion, and angiogenesis of hepatocellular carcinoma cells partly by targeting the HIF-1 α /VEGF signalling pathway *in vitro* [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 3769879.
- [15] Chun JM, Cheon MS, Moon BC, et al. Anti-tumor activity of the ethyl acetate fraction from *Asparagus cochinchinensis* in HepG2-xenografted nude mice [J]. *J Korean Soc Appl Biol Chem*, 2011, 54(4): 538-543.
- [16] 刘洋, 李艳菊, 李红日, 等. 天门冬对氟中毒大鼠学习记忆能力干预作用 [J]. 中国公共卫生, 2017, 33(6): 922-925.
- [17] 刘洋, 李艳菊, 唐东昕, 等. 天门冬对氟中毒大鼠认知行为能力的影响及机制 [J]. 山东医药, 2017, 57(42): 37-39.
- [18] Guo L, Wang C, Qiu X, et al. Colorectal cancer immune infiltrates: significance in patient prognosis and immunotherapeutic efficacy [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1052.
- [19] 顾军花, 刘嘉湘. 刘嘉湘教授“扶正治癌”理论核心及运用方法 [J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(4): 495-499.
- [20] 刘平, 李雁, 徐静, 等. 扶正祛邪治则在大肠癌治疗中的应用 [J]. 现代中西医结合杂志, 2019, 28(15): 1692-1696.
- [21] Wang T, Xuan X, Li M, et al. Astragalus saponins affect proliferation, invasion and apoptosis of gastric cancer BGC-823 cells [J]. *Diagn Pathol*, 2017, 12(1): 67.
- [22] Li TF, Lin CC, Tsai HP, et al. Effects of Kuan-Sin-Yin decoction on immunomodulation and tumorigenesis in mouse tumor models [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14: 488.
- [23] 董杰, 夏茂, 季明德, 等. 基于数据挖掘探讨中药治疗中晚期非小细胞肺癌的组方用药规律分析 [J]. 云南中医学院学报, 2018, 41(2): 76-81.
- [24] Jaramillo-Carmona S, Guillén-Bejarano R, Jiménez-Araujo A, et al. *In vitro* toxicity of asparagus saponins in distinct multidrug-resistant colon cancer cells [J]. *Chem Biodivers*, 2018, 15(11): e1800282.
- [25] 程伟. 基于 HIF1 α /VEGF 信号通路研究天冬多糖抑制肝癌细胞迁移、侵袭和血管形成的机制 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2019.
- [26] Almatroodi SA, Alsahli MA, Almatroudi A, et al. Potential therapeutic targets of quercetin, a plant flavonol, and its role in the therapy of various types of cancer through the modulation of various cell signaling pathways [J]. *Molecules*, 2021, 26(5): 1315.
- [27] Liu B, Li B, Zhou D, et al. Steroidal saponins with cytotoxic effects from the rhizomes of *Asparagus cochinchinensis* [J]. *Bioorg Chem*, 2021, 115: 105237.
- [28] Lahalle A, Lacroix M, De Blasio C, et al. The p53 pathway and metabolism: the tree that hides the forest [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(1): 133.
- [29] Naseri MH, Mahdavi M, Davoodi J, et al. Up regulation of *Bax* and down regulation of *Bcl2* during 3-NC mediated apoptosis in human cancer cells [J]. *Cancer Cell Int*, 2015, 15: 551-610.
- [30] Liao JM, Cao B, Deng J, et al. TFIIS. h, a new target of p53, regulates transcription efficiency of pro-apoptotic *Bax* gene [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 23542.
- [31] Looby E, Abdel-Latif MM, Athié-Morales V, et al. Deoxycholate induces COX-2 expression via Erk1/2-, p38-MAPK and AP-1-dependent mechanisms in esophageal cancer cells [J]. *BMC Cancer*, 2009, 9: 190.
- [32] 汤小刚, 洪汝涛. 水提乌药与醇提乌药对急性酒精性肝损伤模型大鼠的保护作用 [J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 32(8): 703-706.
- [33] 杜芳权, 颜继忠. 超声提取天冬多糖和总皂苷工艺研究 [J]. 科技资讯, 2011, 21(7): 96-97.
- [34] 吴飞, 刘梦迪, 李月侠, 等. 天冬中总氨基酸及多糖的提取工艺研究 [J]. 池州学院学报, 2017, 31(3): 60-63.
- [35] 刘亮, 刘英波, 周英信, 等. 天冬中总氨基酸的水提取工艺研究 [J]. 甘肃中医学院学报, 2013, 30(1): 59-60.

[收稿日期] 2021-10-10