

陈舒,张静蕾,荣康,等. 基于 Rab27a 研究厚朴三物汤对结直肠癌模型小鼠外泌体的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34 (10): 18-27.

Chen S, Zhang JL, Rong K, et al. Effect of Houpu Sanwu decoction on exosomes in colorectal cancer model mice based on Rab27a [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(10): 18-27.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.10.003

# 基于 Rab27a 研究厚朴三物汤对结直肠癌模型小鼠外泌体的影响

陈舒<sup>1</sup>,张静蕾<sup>2</sup>,荣康<sup>3</sup>,张楠<sup>4\*</sup>,孙维义<sup>4</sup>

(1.河南中医药大学,郑州 450003;2.中山大学附属第一医院,广州 510080;3.郑州大学第五附属医院  
消化内科,郑州 450052;4.河南中医药大学第一附属医院 普外科,郑州 450003)

**【摘要】** 目的 探讨厚朴三物汤对 C57BL/6J 小鼠皮下瘤的影响和机制。方法 将小鼠结直肠癌 MC-38 细胞通过皮下注射入 C57BL/6J 小鼠体内建立结直肠癌皮下瘤模型,将造模成功的小鼠随机分组为模型对照组、厚朴三物汤低剂量组、厚朴三物汤中剂量组、厚朴三物汤高剂量组、5-氟尿嘧啶组(5-FU 组)、联合组(5-氟尿嘧啶+厚朴三物汤中剂量组),每组小鼠各 6 只。分别给予生理盐水和厚朴三物汤灌胃或生理盐水和 5-FU 腹腔注射,每天 1 次,连续 24 d。干预期间定期检测小鼠精神状态、饮食等一般情况,定期检测小鼠肿瘤体积的变化。取材后,对各组皮下瘤进行称重并采用 HE 染色观察小鼠皮下瘤病理组织变化;采用透射电子显微镜、Western blot、NTA 对结直肠癌组织来源的外泌体进行鉴定;采用 RT-qPCR 和 Western blot 检测肿瘤组织中 Rab27a 和外泌体标志物 CD63、TSG101、ALIX 的 mRNA 和蛋白表达水平。**结果** 厚朴三物汤可以抑制小鼠肿瘤的生长,厚朴三物汤各剂量组、联合组的肿瘤生长缓慢,均受到不同程度的抑制,其中中药各剂量组以中剂量灌胃抗癌效果最佳,且与 5-FU 联用(联合组)呈协同作用;厚朴三物汤可以促使肿瘤发生坏死,表现出与 5-FU 组相同的抗癌作用,剂量越高,坏死程度越严重,并且厚朴三物汤与 5-FU 联用(联合组)呈协同作用;厚朴三物汤可以抑制小鼠 Rab27a 和外泌体中特异性标志物 CD63、ALIX 和 TSG101 的蛋白表达量和 mRNA 的相对表达量。**结论** 厚朴三物汤的抗结直肠癌机制可能与 Rab27a 调控的外泌体分泌减少有关。

**【关键词】** 厚朴三物汤;结直肠癌;Rab27a;外泌体

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 10-0018-10

## Effect of Houpu Sanwu decoction on exosomes in colorectal cancer model mice based on Rab27a

CHEN Shu<sup>1</sup>, ZHANG Jinglei<sup>2</sup>, RONG Kang<sup>3</sup>, ZHANG Nan<sup>4\*</sup>, SUN Weiyi<sup>4</sup>

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China.

2. the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080.

3. Department of Gastroenterology, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052.

4. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450003)

**【基金项目】** 河南省自然科学基金项目(222300420489);国家中医优势专科(外科)(cz0338-03)。

**【作者简介】** 陈舒(1997—),女,硕士,住院医师,研究方向:消化系统肿瘤临床与实验研究。E-mail:18238792138@sina.cn

**【通信作者】** 张楠(1969—),男,主任医师,博士生导师,研究方向:消化系统肿瘤临床与基础研究。E-mail:jinglei.1999@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect and mechanism of Houpu Sanwu decoction on subcutaneous tumors in C57BL/6J mice. **Methods** Mouse colorectal cancer MC-38 cells were injected subcutaneously into C57BL/6J mice to establish a subcutaneous tumor model of colorectal cancer. The model mice were then divided randomly into model control, Houpu Sanwu decoction (HPSWD) low dose, HPSWD medium dose, HPSWD high dose, 5-fluorouracil (5-FU), and combination groups (5-FU+HPSWD medium dose) ( $n=6$  mice per group). The mice were treated with normal saline and Houpu Sanwu decoction by gavage, or normal saline and 5-FU by intraperitoneal injection once a day for 24 consecutive days. During the intervention period, the mental state, diet, and other general conditions of the mice, as well as changes in tumor volume, were monitored regularly. At the end of the experiment, the subcutaneous tumors in each group were removed and weighed, and pathological features were examined by hematoxylin and eosin staining. Transmission electron microscopy, Western blot, and nanoparticle tracking analysis were used to identify exosomes derived from colorectal cancer tissues. Tumor mRNA and protein expression levels of Rab27a and the exosome markers CD63, TSG101, and ALIX were detected by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction and Western blot, respectively. **Results** Houpu Sanwu decoction inhibited tumor growth in mice. Tumor growth was inhibited to varying degrees in all the HPSWD dose groups and in the combination group. The HPSWD medium dose group showed the greatest anticancer effect, and the combination group showed a synergistic effect with 5-FU. Houpu Sanwu decoction induced tumor necrosis in a dose-dependent manner, with a similar anticancer effect to 5-FU. Houpu Sanwu decoction also inhibited the protein and mRNA expression levels of Rab27a and the exosome-specific markers CD63, ALIX, and TSG101 in mice. **Conclusions** Houpu Sanwu decoction inhibits tumor growth and the secretion of exosomes, possibly by regulating Rab27a.

**【Keywords】** Houpu Sanwu decoction; colorectal cancer; Rab27a; exosome

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是全球普遍存在的恶性疾病之一,也是癌症相关死亡和健康负担的原因<sup>[1]</sup>。由于经济发展、生活方式和饮食的改变, CRC 的发病率和死亡率在我国仍处于上升趋势<sup>[2]</sup>。结直肠癌的发病是一个复杂的发育过程,涉及多个阶段和多个基因的参与,具有非典型的早期症状<sup>[3]</sup>。虽然系统根治性切除术和辅助化疗可以达到最大的治疗效果,但许多患者出现局部复发和远处转移,生存率尚不理想,且化疗药物长期使用后存在毒性高、不良反应多等问题<sup>[4-6]</sup>。大量研究证实了中药及其成分可以提高治疗效果,最大限度地减少不良反应,在结直肠癌防治中的作用得到了认可<sup>[7-9]</sup>。

近年来,外泌体作为新兴的纳米级生物载体,在肿瘤治疗领域越来越受到关注。外泌体是细胞释放的脂质双层膜囊泡,直径范围为 30~150 nm,通过将核酸、蛋白质、脂质和代谢物等生物活性货物转移到靶细胞中发挥作用,突出了外泌体在癌症诊断、治疗和药物递送方面的潜力<sup>[10]</sup>。Rab27a 属于 Ras GTP 酶超家族的 Rab (Ras 相关蛋白),参与外泌体的生物发生和分泌过程<sup>[11]</sup>。目前, Rab27a 被确定为介导 CRC 发展的癌蛋白,可能是 CRC 潜在的治疗靶点<sup>[12]</sup>。

结直肠癌患者多有脾胃功能失调,其治疗需要调整脾胃气机升降,重建脏腑阴阳、气血、邪正的平衡,以通为补。出自中医学著作《金匱要略》的厚朴三物汤 (Houpu Sanwu decoction, HPSWD) 重在行气泄满,是调理升降泄下的经典方剂。现代药理学发现,厚朴三物汤里厚朴中的厚朴酚、大黄中的大黄素和枳实均具有抗癌功效<sup>[13-15]</sup>,且有研究证明大黄中的大黄素具有抑制外泌体的作用<sup>[16]</sup>。因此,厚朴三物汤符合 CRC 治疗原则。本研究以 C57BL/6J 小鼠为研究对象,基于 Rab27a 探讨厚朴三物汤对 CRC 模型小鼠的抗癌效果以及对外泌体分泌的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 细胞

小鼠结直肠癌 MC38 细胞购自北京北纳创联生物技术研究所,货号 BNCC337716。

#### 1.1.2 实验动物

36 只雄性 SPF 级 C57BL/6J 小鼠 (6~8 周龄),体重 (20±2) g,购于北京华阜康生物科技股份有限公司 [SCXK (京) 2019-0008],于河南中医药大学第一附属医院动物实验中心 [SYXK (豫) 2022-0004]

适应性饲养 1 周后开始实验,本研究已得到河南中医药大学第一附属医院实验动物福利伦理审查委员会批准(YFYDW2022015)。饲养条件为室温 24~26 ℃,相对湿度 45%~55%,光照周期 12 h/12 h 明/暗交替。实验过程符合 3R 原则。

## 1.2 主要试剂与仪器

厚朴三物汤(厚朴 24 g、大黄 12 g、枳实 9 g)由河南中医药大学第一附属医院制剂中心提供。5-氟尿嘧啶(5-FU)(天津金耀药业有限公司, H12020959,规格:25 mg);RPMI Medium 1640 培养基(索莱宝, 31800);1×PBS 缓冲液(索莱宝, P1020);胎牛血清(索莱宝, S9020);胰蛋白酶(索莱宝, T1300);HE 染色试剂盒(索莱宝, G1120);BCA 蛋白浓度检测试剂盒(索莱宝, PC0020);一抗抗体 Rab27a、CD63、TSG101、ALIX 抗体(赛维尔, GB111106、GB12620、GB111106、GB124080);二抗抗体 Rab27a、CD63、TSG101、ALIX 抗体(赛维尔, GB23303、GB23301、GB23301、GB23303);RNA 提取试剂盒(索莱宝, R1200-50T);荧光定量逆转录试剂盒(宝日医, RR047A);荧光定量检测试剂盒(宝日医, RR820A);2%磷钨酸(索莱宝, G1871)。酶标仪(Bio-Rad, Model 550);显微镜(Leica, DM3000);掌上离心机(赛维尔, MS6000);全景切片扫描仪(3D-histech, Panoramic DESK);垂直电泳仪(赛维尔, SVE-2);转印电泳仪(赛维尔, SVT-2);化学发光仪(CLINX, 6100);超微量分光光度计(Thermo, NanoDrop2000);荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad, CFX);透射电镜(日本 jeol 公司, JEM1230);纳米颗粒追踪分析仪(Particle Metrix, ZetaView PMX 110)。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 细胞培养

将 CRC 细胞株 MC38 置于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中培养,置于含 5% CO<sub>2</sub> 的 37 ℃ 培养箱中培养。所有用于细胞培养的胎牛血清均在 4 ℃ 下通过离心(1234.7 r/min)过夜产生,以确保去除任何胎牛血清来源的外泌体。

### 1.3.2 异种移植瘤模型建立

模型建立参照文献<sup>[17]</sup>。MC38 细胞皮下注射( $n=6, 2 \times 10^6$ /只),5 d 后观察肿瘤成瘤情况。

### 1.3.3 动物分组及处理方法

36 只小鼠均造模成功,随机将其分为 6 组,分别为模型对照组、厚朴三物汤低剂量组、厚朴三物汤中剂量组、厚朴三物汤高剂量组、5-氟尿嘧啶(5-

FU)组、联合组(5-氟尿嘧啶+厚朴三物汤中剂量组),每组 6 只。其中模型对照组每天给予小鼠生理盐水灌胃,厚朴三物汤低、中、高剂量组、联合组每天给予小鼠的灌胃剂量分别为 11 g/(kg·d)、22 g/(kg·d)、44 g/(kg·d)、22 g/(kg·d),5-FU 组、联合组腹腔注射 5-FU 溶液,剂量分别为  $0.25 \times 10^{-3}$  g/(kg·d)。连续给药 24 d。

### 1.3.4 小鼠皮下瘤体积测定

首次测量标记为第 0 天,每 5 d 测量小鼠皮下瘤的长径与短径,并用游标卡尺测量肿瘤的长径(a)与其垂直方向的短径(b),计算体积= $0.5 \times a \times b^2$ 。

### 1.3.5 肿瘤组织样本的 HE 染色

肿瘤组织从固定液中取出,进行石蜡包埋。蜡块切片后放入载玻片。将组织切片放置于二甲苯中浸泡,使石蜡溶解。接着进行样本切片水化。水化后的切片进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色。最后风干并用中性树胶封片。用全景切片扫描仪采集并保存图片。

### 1.3.6 RNA 提取和定量逆转录 PCR (reverse transcription coupled to the quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)

采用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。采用超微量分光光度计检测 RNA 纯度,并记录  $A_{260}/A_{280}$  比值。荧光定量逆转录试剂盒将总 RNA 进行逆转录,采用荧光定量检测试剂盒进行 PCR 扩增。以 GAPDH 作为内参,使用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法计算相对 mRNA 表达水平。引物序列见表 1。

### 1.3.7 蛋白免疫印迹(Western blot)试验

用 PBS 冲洗肿瘤组织后,使用无菌组织剪将组织剪成极小块并置于匀浆管中,加入裂解液、蛋白

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名称 Gene name		引物(5'-3') Primer(5'-3')
Rab27a	F	CGCTATGGGTTTCCTGCTTCT
	R	TCCTCTTTCACTGCCCTCTGGT
CD63	F	AACATAACTGTGGGCTGTGGGA
	R	GATAATTCCCAAGACCTCCACAAA
ALIX	F	GTATTGGCTTCCCTTAACCTTCC
	R	TCCAACAATCTTAGCGACTCCTC
GAPDH	F	CCTCGTCCCCTAGACAAAATG
	R	TGAGGTCATGAAGGGCTCGT
TSG101	F	GTCAAAGTCAATGTCATCGCT
	R	CTCGATAACGCACTGGGATTG

酶抑制剂。离心 15 min (4 °C, 800 r/min), 收集上清液使用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒测定蛋白浓度, 在蛋白加载缓冲液中煮沸, 样品经 15% SDS-PAGE 处理后转移到 PVDF 膜上。将膜密封于 5% 脱脂乳中, 在室温下在摇壶上密封 1 h。用 5% BSA 的 TBST 缓冲液将一抗稀释至合适浓度, 放入相应的膜中, 使膜与一抗充分接触, 在摇床上摇匀, 4 °C 摇过夜, 用 1 × TBST 洗涤 3 次。将二抗稀释, 与 5% 牛血清白蛋白结合, 引入适当的孵育箱, 在室温下振荡 1 h, 然后用 1 × TBST 洗涤 3 次。最后对样品进行曝光并拍照分析。

### 1.3.8 外泌体的提取

取新鲜的肿瘤组织轻轻切成小薄片 (1 ~ 2 mm), 在 RPMI-1640 培养基中 37 °C 孵育 30 min, 经过胶原蛋白水解酶 D 和 DNase 解离组织后, 进行一个过滤步骤 (70 μm), 进一步以 212.4 r/min 离心 10 min 和 385 r/min 离心 20 min 用于去除细胞和组织碎片。取上清液以 725 r/min 离心 20 min 和 258.7 r/min 离心 2.5 h, 取出管底的澄清沉淀物, 重悬于 PBS 中, 获得外泌体<sup>[18]</sup>。所有离心均在 4 °C 且无菌条件下实施。

### 1.3.9 外泌体的鉴定

#### (1) Western blot 检测

具体步骤参考 1.3.7。

#### (2) 透射电子显微镜观察

用吸管将一小滴样品放在蜡盘上。取铜网, 使有支撑膜的表面与样品液表面接触, 静置 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 (使样品与染液接触), 静置 5 min。去除铜网后, 用滤纸条将多余的液滴吸出, 然后在白炽灯下晾干。使用透射电镜进行拍摄。

### (3) 纳米粒子跟踪分析 (nanoparticle tracking analysis, NTA)

分离的外泌体样品用 1 × PBS 缓冲液稀释, 测量粒径和浓度。在 11 个位置记录并分析了 NTA 测量结果。ZetaView 系统用 110 nm 的聚苯乙烯颗粒进行校准。温度维持在 23 °C 和 37 °C。

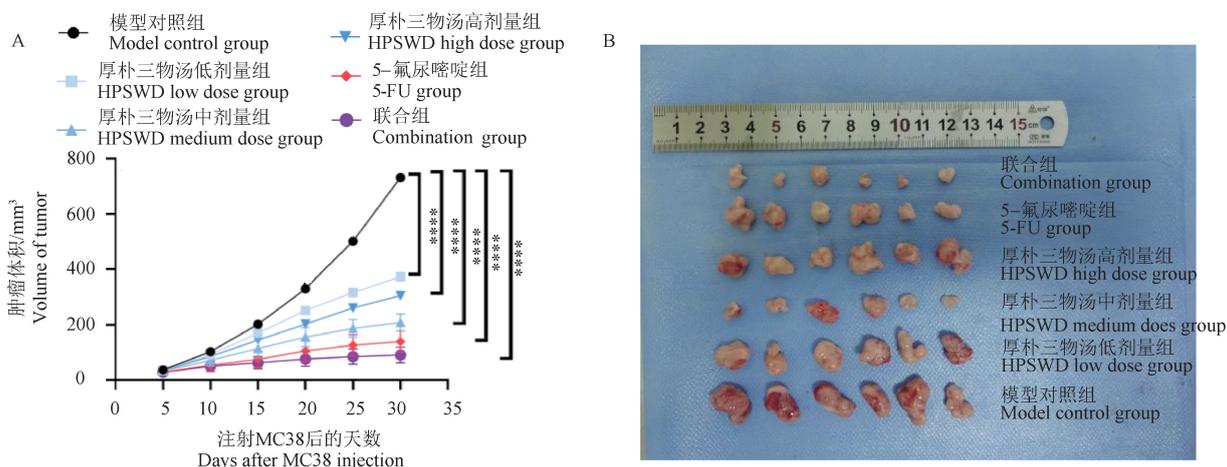
## 1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 9.5.1 和 Adobe Photoshop 2020 软件对实验数据进行处理及图表绘制。定量资料组间比较采用平均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。多组间比较先行方差分析, 方差齐则采用单因素方差分析 (ANOVA); 方差不齐, 则行秩和检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HPSWD 对小鼠皮下瘤体积的影响

如图 1 所示, 与模型对照组相比, 厚朴三物汤低、中、高剂量组和联合组的肿瘤生长缓慢, 均受到不同程度的抑制 ( $P < 0.05$ ), 表现出与 5-FU 组相同的抑制作用, 其中以联合组抑制肿瘤生长最显著 ( $P < 0.05$ )。在厚朴三物汤各剂量组中, 以中剂量组抑制肿瘤生长程度最显著 ( $P < 0.05$ )。结果表明, 厚



注: A: 厚朴三物汤干预后, 小鼠肿瘤组织体积的变化; B: 厚朴三物汤干预后, 取材时小鼠肿瘤组织图片。与模型对照组相比, \*\*\*\*  $P < 0.0001$ 。

图 1 肿瘤体积生长曲线和小鼠肿瘤组织图片

Note. A, Changes in tumor tissue volume in mice after intervention with Houpu Sanwu decoction. B, Pictures of tumor tissue of mice after intervention with Houpu Sanwu decoction when the samples were taken. Compared with the model control group, \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

Figure 1 Tumor volume growth curve and pictures of mouse tumor tissue

朴三物汤可以抑制肿瘤生长,其中以中剂量灌胃抗癌效果最佳,且与 5-FU 联用(联合组)呈协同作用。

## 2.2 HPSWD 对小鼠肿瘤组织重量的影响

与模型对照组相比,厚朴三物汤中剂量组、5-FU 组和联合组的肿瘤重量明显减轻( $P < 0.01$ ),差异具有统计学意义;与厚朴三物汤中剂量组比较,厚朴三物汤低剂量组和厚朴三物汤高剂量组的肿瘤重量明显增高( $P < 0.05$ ),差异具有统计学意义(表 2)。

表 2 厚朴三物汤对小鼠肿瘤组织重量的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 2 Effect of Houpu Sanwu decoction on the weight of tumor tissue in mice

组别 Groups	小鼠肿瘤组织重量/g Weight of tumor tissue in mice
模型对照组 Model control group	0.77±0.27
厚朴三物汤低剂量组 HPSWD low dose group	0.55±0.1 <sup>b</sup>
厚朴三物汤中剂量组 HPSWD medium dose group	0.18±0.12 <sup>a</sup>
厚朴三物汤高剂量组 HPSWD high dose group	0.52±0.23 <sup>b</sup>
5-氟尿嘧啶组 5-FU group	0.30±0.14 <sup>a</sup>
联合组 Combination group	0.09±0.05 <sup>a</sup>

注:与模型对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与厚朴三物汤中剂量组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the model control group, <sup>a</sup> $P < 0.01$ . Compared with HPSWD medium dose group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ .

## 2.3 HPSWD 对小鼠肿瘤组织病理变化的影响

模型对照组中肿瘤细胞胞核异型、核质比高,核仁不明显,可见核分裂象;偶见肿瘤细胞坏死,胞核固缩深染、碎裂或溶解消失。厚朴三物汤各剂量组、联合组的肿瘤均出现不同程度的坏死,表现出与 5-FU 组相同的抗癌作用。上述肿瘤组织 HE 结果说明厚朴三物汤可以促使肿瘤发生坏死,剂量越高肿瘤坏死程度越严重,厚朴三物汤与 5-FU 联用(联合组)呈协同作用(图 2)。

## 2.4 小鼠肿瘤组织来源的外泌体鉴定

经过一系列的操作从肿瘤组织中提取外泌体,通过透射电镜发现外泌体的形状为双层膜的圆形颗粒,符合典型的外泌体特征(图 3)。采用 Western blot 方法鉴定 CRC 产生的外泌体,并揭示了外泌体特异性标志物 CD63、ALIX 和 TSG101 的表达。采用纳米颗粒跟踪分析技术(NTA)分析了细胞的外泌体的大小、分布和数量(图 4)。

## 2.5 厚朴三物汤对 Rab27a 和外泌体特异性标志物 CD63、ALIX 和 TSG101 蛋白的影响

为了明确厚朴三物汤如何影响 Rab27a 和外泌体分泌的,笔者分析了小鼠肿瘤组织中 Rab27a 和外泌体中特异性标志物 CD63、ALIX 和 TSG101 的蛋白表达量(图 5、图 6)。结果发现,相较于模型对照组,厚朴三物汤中剂量组和联合组均能够很好的抑

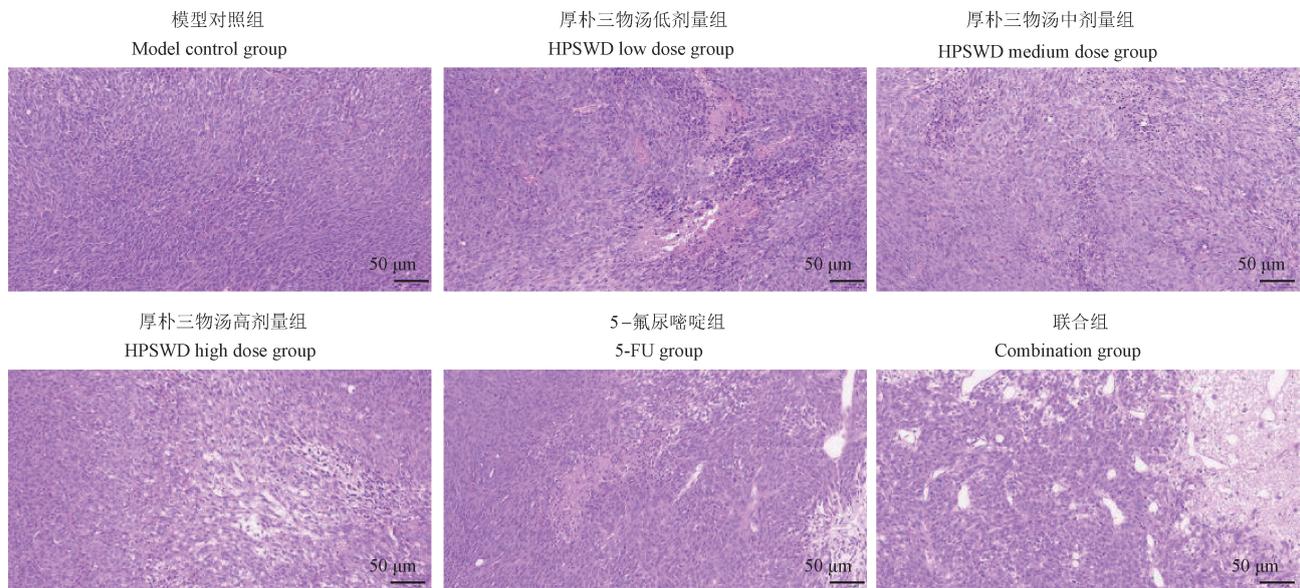


图 2 小鼠肿瘤组织病理学图片

Figure 2 Histopathological picture of mouse tumors

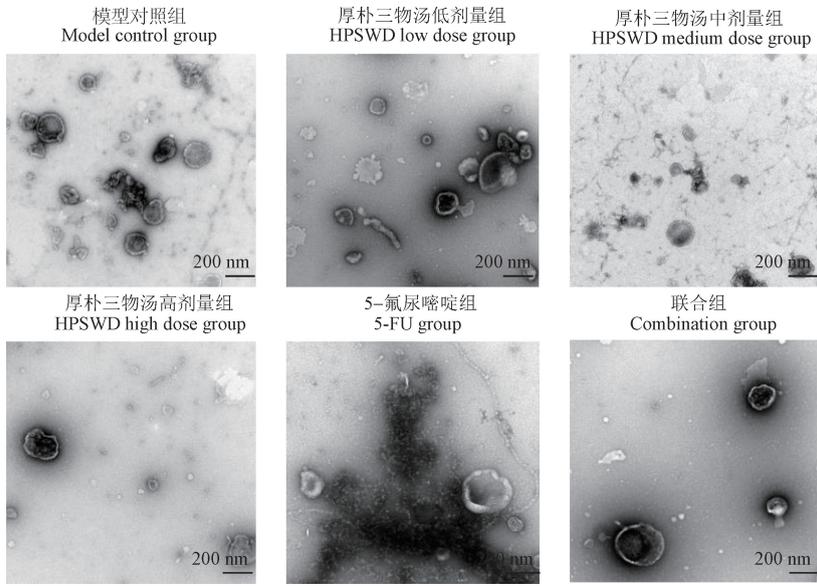


图 3 外泌体的电镜鉴定图片

Figure 3 Electron microscopic identification picture of exosomes

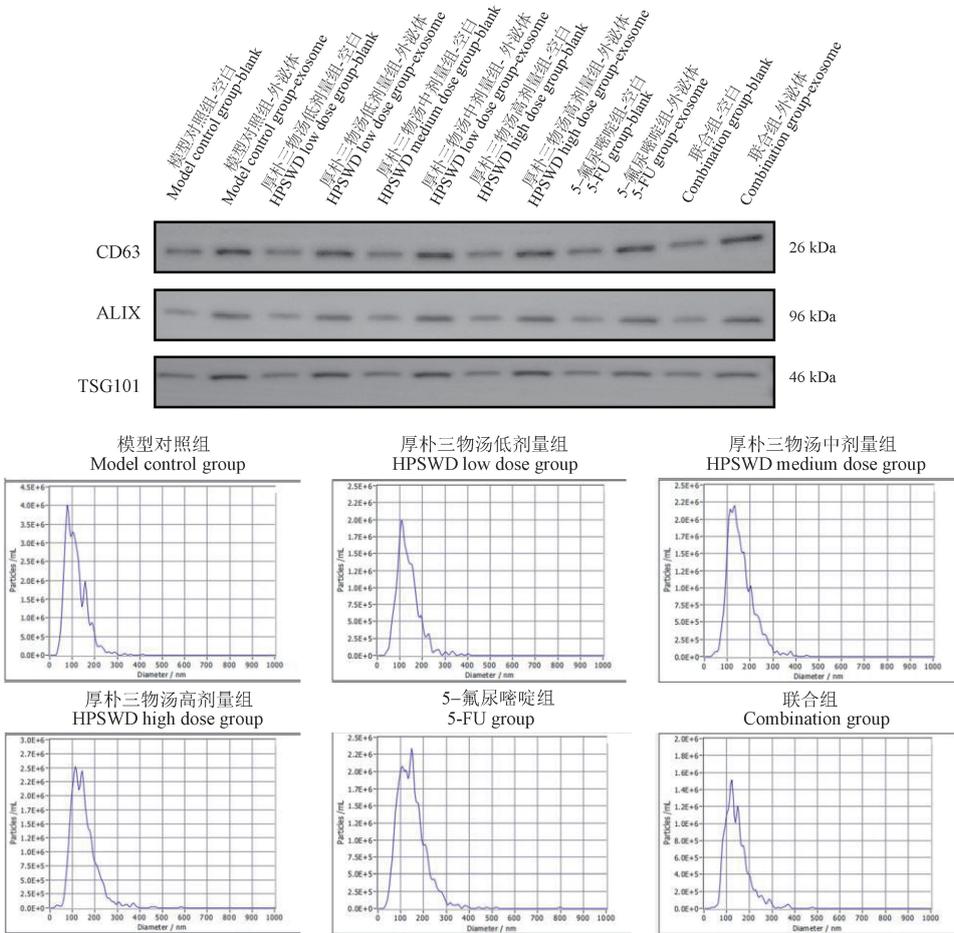


图 4 外泌体的 Western blot 和 NTA 鉴定图片

Figure 4 Western blot and NTA identification pictures of exosomes

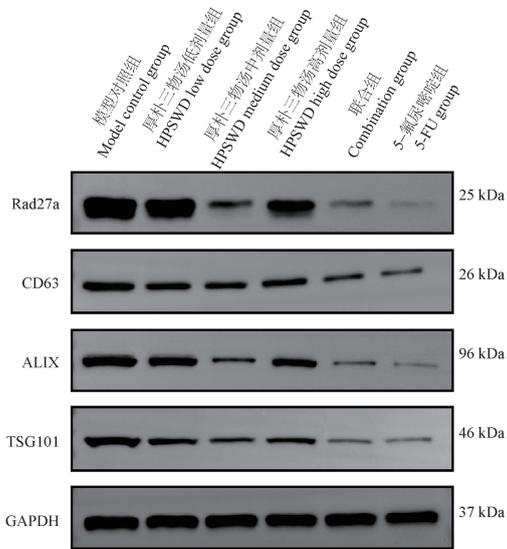
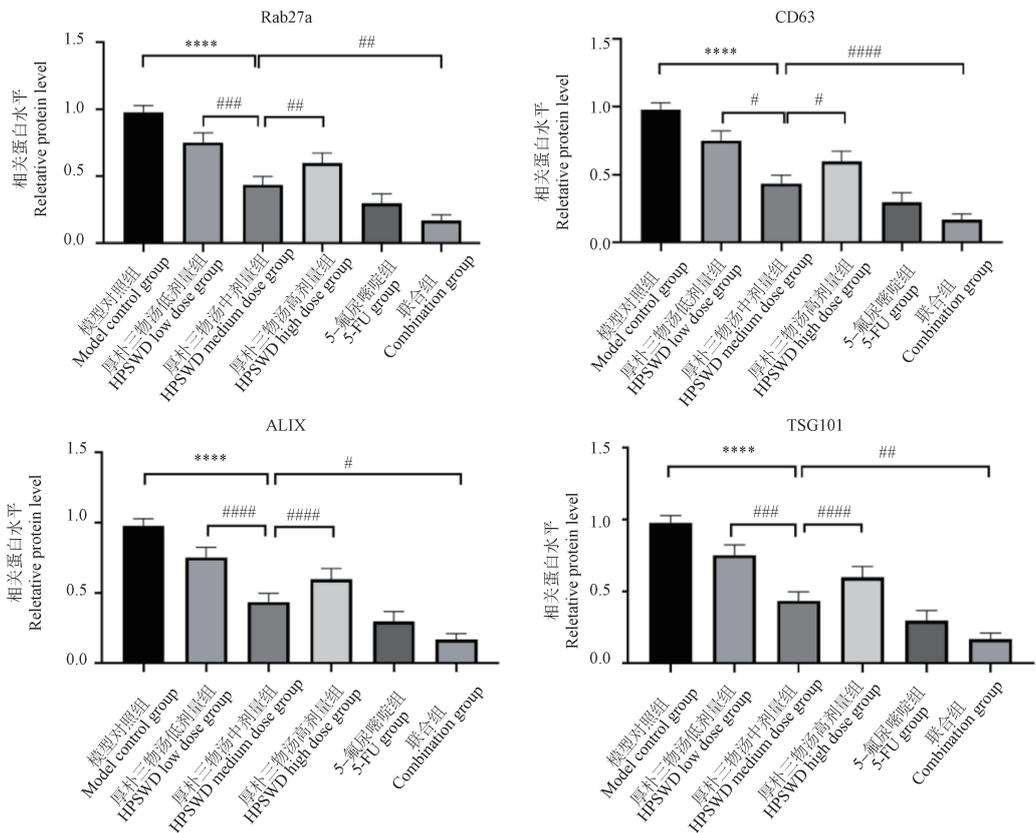


图 5 Rab27a 和外泌体特异性标志物 CD63、ALIX 和 TSG101 蛋白条带

Figure 5 Protein bands of Rab27a and exosome-specific markers CD63, ALIX, and TSG101



注:与模型对照组相比, \*\*\*\*  $P < 0.0001$ ; 与厚朴三物汤中剂量组比较, #  $P < 0.05$ , ###  $P < 0.01$ , ####  $P < 0.001$ , #####  $P < 0.0001$ 。

图 6 Rab27a 和外泌体特异性标志物 CD63、ALIX 和 TSG101 蛋白表达

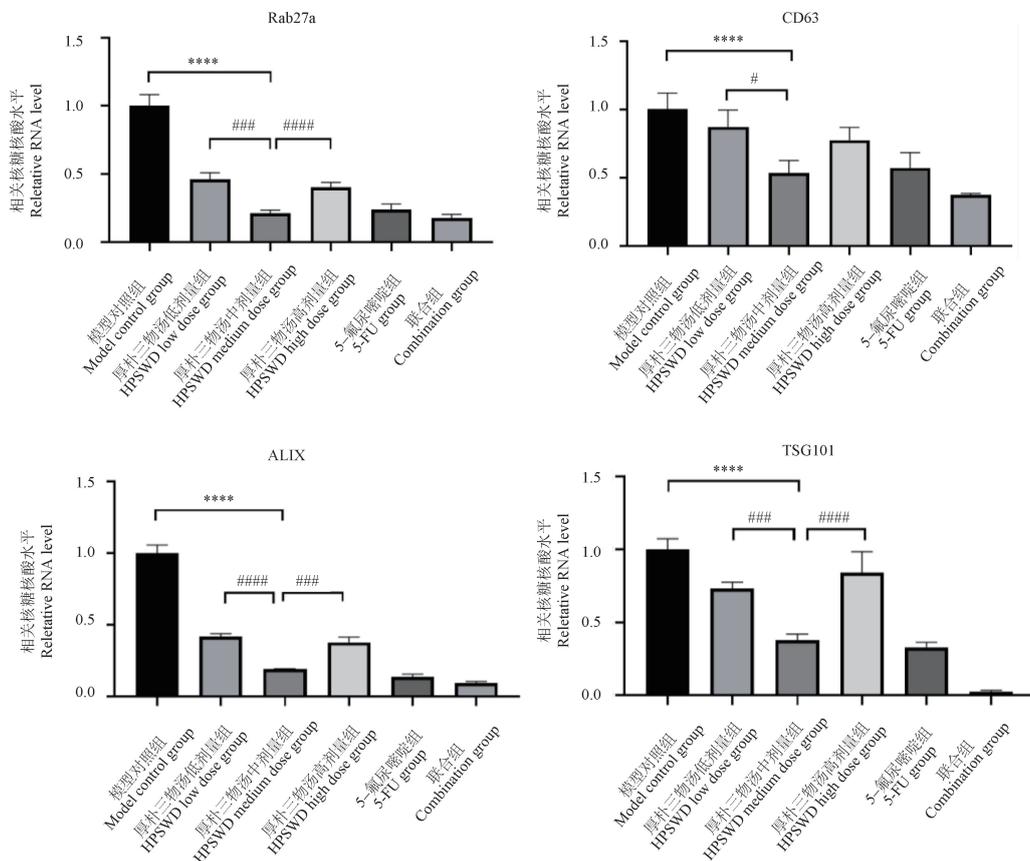
Note. Compared with the model control group, \*\*\*\*  $P < 0.0001$ . Compared with the HP3WD medium dose group, #  $P < 0.05$ , #  $P < 0.01$ , #  $P < 0.001$ , #####  $P < 0.0001$ .

Figure 6 Protein expression of Rab27a and exosome-specific markers CD63, ALIX, and TSG101

制 Rab27a 和外泌体中特异性标志物 CD63、ALIX 和 TSG101 的表达 ( $P < 0.05$ )。Rab27a 与厚朴三物汤的剂量呈一定的剂量关系,但在厚朴三物汤各浓度剂量组中,以中剂量组抑制效果更好 ( $P < 0.05$ ),可能是高剂量的药物灌胃进入体内吸收后,对小鼠的肝肾产生了毒副作用,亦或是影响了小鼠的肿瘤免疫微环境,导致了剂量高疗效反而下降的情况出现,后续会做进一步的研究。

## 2.6 厚朴三物汤对 Rab27a 和外泌体特异性标志物 CD63、ALIX 和 TSG101 mRNA 的影响

相较于模型对照组,厚朴三物汤中剂量组和联合组均能够很好地抑制 Rab27a 和外泌体中特异性标志物 CD63、ALIX 和 TSG101 的表达 ( $P < 0.05$ )。结果发现,Rab27a 与厚朴三物汤的剂量呈一定的剂量关系,但在厚朴三物汤各浓度剂量组中,以中剂量组抑制效果更好 ( $P < 0.05$ ,图 7)。



注:与模型对照组相比,\*\*\*\* $P < 0.0001$ ;与厚朴三物汤中剂量组比较,# $P < 0.05$ ,### $P < 0.001$ ,#### $P < 0.0001$ 。

图 7 Rab27a 和外泌体特异性标志物 CD63、ALIX 和 TSG101 mRNA 表达

Note. Compared with the model control group, \*\*\*\* $P < 0.0001$ . Compared with the HPSWD medium dose group, # $P < 0.05$ , ### $P < 0.001$ , #### $P < 0.0001$ .

Figure 7 mRNA expression of Rab27a and exosome-specific markers CD63, ALIX, and TSG101

### 3 讨论

被称为外泌体的囊泡由多种哺乳动物细胞释放,外泌体作为一种新型的递送载体,可以包裹如非编码 RNA、运输蛋白质和核酸等物质,从而能够传递生物细胞间信息<sup>[19]</sup>。由于其双层膜结构导致内容物不容易被降解,以及外泌体的物理和病理功能及其在诊断和治疗应用中的潜力日益得到认可,其在肿瘤中的作用近年来受到研究领域和生物医学行业的广泛关注<sup>[20-21]</sup>。研究表明,外泌体可以成为改变肿瘤微环境和导致肿瘤转移的细胞间通讯的极好介质,影响细胞的生长、凋亡、迁移、侵袭和治疗抵抗,参与多种恶性肿瘤的发生发展<sup>[22-24]</sup>。

在调节囊泡运输的 Rab 蛋白家族成员中, Rab27 及其效应子被认为在它们从细胞内部到质膜附近的运输中起着多功能和关键作用<sup>[25]</sup>。两种 Rab27 亚型 Rab27a、Rab27b 在所有组织中都有表达,但 Rab27a 是在体内表达的主要亚型,尤其富含

整个胃肠道、前列腺等<sup>[11]</sup>。越来越多的研究表明, Rab27a 已成为许多其他癌症肿瘤进展的促进剂, Rab27a 在 CRC 中表达上调,被确定为介导 CRC 发展的癌蛋白<sup>[12]</sup>; Rab27a 能够促进口腔鳞状细胞癌的迁移侵袭,与预后较差有关<sup>[26]</sup>; Rab27a 通过调节促侵袭性外泌体促进黑色素瘤细胞侵袭和转移<sup>[27]</sup>; Rab27a 的下调可以抑制膀胱癌细胞增殖、迁移侵袭和上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT), 并抑制异种移植肿瘤生长<sup>[28]</sup>。最近的研究表明, Rab27a 可以调节多种细胞的外泌体分泌, 包括树突状细胞、结直肠癌、宫颈癌细胞、乳腺癌细胞、黑色素瘤细胞等<sup>[29]</sup>。此外, Rab27a 已被揭示通过控制外泌体分泌在癌细胞的增殖和侵袭中发挥关键作用,外泌体分泌调节肿瘤微环境和癌细胞的功能,从而促进癌症进展,增强肿瘤支持微环境的形成<sup>[30-32]</sup>。然而,它们在 CRC 中的作用和调控机制尚未被广泛分析。因此,必须研究 CRC 发生和发展的生物学原因,以便找到新的治疗靶点将有助于

确定可能的治疗干预措施以改善癌症治疗。

结直肠癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一。在许多发展中国家, CRC 的发病率和死亡率正在迅速上升<sup>[33-34]</sup>。结直肠癌在中医属于“肠覃”“伏梁”“积聚”“脏毒”“锁肛痔”等范畴。结直肠癌的主要病机为正虚、气机升降失调,“正虚”是肿瘤发病的根本原因,结直肠癌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,瘕肉乃生。始生也,大如鸡卵……”。指出结直肠癌虚实夹杂的病理特征。“气机升降失调”是结直肠癌形成的基本病理过程,《素问·五脏别论》云:“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,升降失调使精、血、津液不能正常运转,聚湿为痰、血停为瘀,从而产生痰、瘀、毒等病理产物蓄积,聚积停于虚弱之大肠,进一步加重气机运行的失衡,最终导致结直肠癌的发生。

目前,中医药已被证实对结直肠癌具有重要的抑制作用,并可与放化疗联合治疗肿瘤<sup>[35]</sup>。厚朴三物汤出自于医圣张仲景所著的《金匮要略》,由厚朴、大黄、枳实组成,其中厚朴理气导滞,枳实破气消积,大黄通腑泄热,三味合用共奏行气消积祛瘀之功效<sup>[36]</sup>。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,其功效符合结直肠癌顺应六腑“通降”治则,且临床上治疗气滞便秘疗效确切。现代药理学发现,厚朴三物汤里厚朴中的厚朴酚、大黄中的大黄素和枳实均具有抗癌功效,能够通过抑制肿瘤细胞的自噬和凋亡,肿瘤外的血管生成和 EMT,抑制癌症的侵袭和迁移,从而达到抑制肿瘤生长发展的目的<sup>[13-15]</sup>。因此,不管是从中医理论辨证方面还是相关国内外实验理论方面,笔者认为厚朴三物汤有可能会抑制结直肠癌生长和发展。

进一步研究发现与模型对照组对比,厚朴三物汤可以缓解肿瘤小鼠的不良状态。通过对肿瘤生长方面发现,厚朴三物汤各剂量组、联合组的肿瘤生长缓慢,均受到不同程度的抑制,其中中药各剂量组以中剂量灌胃抗癌效果最佳,且与 5-FU 联用(联合组)呈协同作用。对肿瘤组织切片进行 HE 染色,结果显示厚朴三物汤可以促使肿瘤发生坏死,表现出与 5-FU 组相同的抗癌作用,剂量越高坏死程度越严重,并且厚朴三物汤与 5-FU 联用(联合组)

呈协同作用。从动物肿瘤组织中提取到外泌体,经透射电镜、Western blot 和 NTA 鉴定揭示了外泌体特异性标志物 CD63、ALIX 和 TSG101 的表达。随后采用 RT-qPCR 和 Western blot 检测厚朴三物汤在小鼠肿瘤中对 Rab27a 和外泌体分泌是否具有抑制作用。结果显示厚朴三物汤可以抑制小鼠 Rab27a 和外泌体中特异性标志物 CD63、ALIX 和 TSG101 的蛋白表达量和 mRNA 的相对表达量。以上结果均证明了厚朴三物汤对于结直肠癌的抗肿瘤作用可能是通过下调 Rab27a 从而抑制外泌体分泌实现的。

综上,本研究表明了厚朴三物汤对结直肠癌模型小鼠的皮下瘤的生长具有一定的抑制作用,其抗癌作用可能是通过下调 Rab27a 的表达从而抑制结直肠癌中外泌体的分泌导致的。此外,实验过程中还发现厚朴三物汤和 5-FU 组联合用药呈协同作用。这些结果为结直肠癌提供了新的肿瘤微环境相关调控机制,可能有助于制定结直肠癌治疗的新策略。

#### 参考文献:

- [1] CHEN Y, LIU F, CHEN X, et al. MicroRNA-622 upregulates cell cycle process by targeting FOLR2 to promote CRC proliferation [J]. BMC Cancer, 2024, 24(1): 26.
- [2] WANG Z, DAN W, ZHANG N, et al. Colorectal cancer and gut microbiota studies in China [J]. Gut Microbes, 2023, 15(1): 2236364.
- [3] GAO X, LONG R, QIN M, et al. Gab2 promotes the growth of colorectal cancer by regulating the M2 polarization of tumor-associated macrophages [J]. Int J Mol Med, 2024, 53(1): 3.
- [4] LV Y, ZHENG P, MAO Y, et al. Intratumor APOL3 delineates a distinctive immunogenic ferroptosis subset with prognosis prediction in colorectal cancer [J]. Cancer Sci, 2024, 115(1): 257-269.
- [5] DING M, WANG C, HU J, et al. PLOD3 facilitated T cell activation in the colorectal tumor microenvironment and liver metastasis by the TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B pathway [J]. J Transl Med, 2024, 22(1): 30.
- [6] LIU P, YING J, GUO X, et al. An exploration of the effect of Chinese herbal compound on the occurrence and development of large intestine cancer and intestinal flora [J]. Heliyon, 2024, 10(1): e23533.
- [7] MA X, LI Y, LIANG D, et al. Solanine induces ferroptosis in colorectal cancer cells through ALOX12B/ADCY4 molecular axis [J]. J Pharm Pharmacol, 2024, 76(3): 224-235.
- [8] WEI J, ZHENG Z, HOU X, et al. Echinacoside inhibits colorectal cancer metastasis via modulating the gut microbiota and suppressing the PI3K/AKT signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 318(Pt A): 116866.
- [9] KONG P, TANG X, LIU F, et al. Astragaloside IV regulates circ\_0001615 and miR-873-5p/LASP1 axis to suppress colorectal cancer cell progression [J]. Chem Biol Drug Des, 2024, 103

- (1): e14423.
- [10] YANG Q, LI S, OU H, et al. Exosome-based delivery strategies for tumor therapy: an update on modification, loading, and clinical application [J]. *J Nanobiotechnology*, 2024, 22(1): 41.
- [11] MENACEUR C, DUSAÏLLY O, GOSSELET F, et al. Vesicular trafficking, a mechanism controlled by cascade activation of rab proteins: focus on Rab27 [J]. *Biology*, 2023, 12(12): 1530.
- [12] LI Q, ZHAO H, DONG W, et al. RAB27A promotes the proliferation and invasion of colorectal cancer cells [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 19359.
- [13] DAI G, WANG D, MA S, et al. ACSL4 promotes colorectal cancer and is a potential therapeutic target of emodin [J]. *Phytomedicine*, 2022, 102: 154149.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 蔡青云, 许丽君. 大黄素对急性胰腺炎胰腺腺泡细胞外泌体水平和氧化应激的调控作用 [J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2020, 55(3): 373–376.
- CAI Q Y, XU L J. Regulation of emodin on exosome level and oxidative stress of pancreatic acinar cells in acute pancreatitis [J]. *J Zhengzhou Univ Med Sci*, 2020, 55(3): 373–376.
- [17] ZHANG Q, DENG T, ZHANG H, et al. Adipocyte-derived exosomal MTP suppresses ferroptosis and promotes chemoresistance in colorectal cancer [J]. *Adv Sci*, 2022, 9(28): e2203357.
- [18] CRESCITELLI R, LÄSSER C, JANG S C, et al. Subpopulations of extracellular vesicles from human metastatic melanoma tissue identified by quantitative proteomics after optimized isolation [J]. *J Extracell Vesicles*, 2020, 9(1): 1722433.
- [19] CHEN C, LIU Y, LIU L, et al. Exosomal circTUBGCP4 promotes vascular endothelial cell tipping and colorectal cancer metastasis by activating Akt signaling pathway [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2023, 42(1): 46.
- [20] BARUAH H, SARMA A, BASAK D, et al. Exosome: From biology to drug delivery [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2024, 14(6): 1480–1516.
- [21] GUO W, CAI Y, LIU X, et al. Single-exosome profiling identifies ITGB3+ and ITGAM+ exosome subpopulations as promising early diagnostic biomarkers and therapeutic targets for colorectal cancer [J]. *Research*, 2023, 6: 0041.
- [22] QIU S, 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.
- [23] SONG Q, YU H, CHENG Y, 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.
- [24] XIE H, YAO J, WANG Y, 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.
- [25] IZUMI T. *In vivo* roles of Rab27 and its effectors in exocytosis [J]. *Cell Struct Funct*, 2021, 46(2): 79–94.
- [26] HUANG J, YANG J G, REN J G, et al. Overexpression of RAB27A in oral squamous cell carcinoma promotes tumor migration and invasion *via* modulation of EGFR membrane stability [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(17): 13103.
- [27] GUO D, LUI G Y L, LAI S L, et al. RAB27A promotes melanoma cell invasion and metastasis *via* regulation of pro-invasive exosomes [J]. *Int J Cancer*, 2019, 144(12): 3070–3085.
- [28] ZHANG Q, HAO L, SHEN Z, et al. MiR-186-5p suppresses cell migration, invasion, and epithelial mesenchymal transition in bladder cancer by targeting RAB27A/B [J]. *Environ Toxicol*, 2021, 36(11): 2174–2185.
- [29] LI Z, FANG R, FANG J, et al. Functional implications of Rab27 GTPases in cancer [J]. *Cell Commun Signal*, 2018, 16(1): 44.
- [30] CHEN L, GUO P, HE Y, 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.
- [31] MOHAMED GAMAL EL-DIN 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.
- [32] KOH H M, JANG B G, KIM D C. Prognostic significance of Rab27 expression in solid cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 14136.
- [33] ZHENG Z, 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.
- [34] 安庆玲, 谭邓旭, 师长宏. 结直肠癌基因工程小鼠模型研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(5): 660–667.
- AN Q L, TAN D X, SHI C H. Genetically engineered mouse models of colorectal cancer [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(5): 660–667.
- [35] RANJAN A, RAMACHANDRAN S, GUPTA N, et al. Role of phytochemicals in cancer prevention [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(20): 4981.
- [36] 毛宇东, 吴发洪, 王满才, 等. 基于自主神经系统研究厚朴三物汤调控胃肠动力的作用机制 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2023, 32(12): 1607–1616.
- MAO Y D, WU F H, WANG M C, et al. Mechanism of Houpu Sanwu decoction in regulating gastrointestinal motility based on the autonomic nervous system [J]. *Mod J Integr Tradit Chin West Med*, 2023, 32(12): 1607–1616.