

引用:马亚波,胡响当,鲁海燕,罗敏,徐胜艳,李磊磊,杨宗亮.天马颗粒剂基于miR-34a调控大肠癌细胞增殖及凋亡的实验研究[J].中医导报,2025,31(4):21-26.

# 天马颗粒剂基于miR-34a调控大肠癌细胞增殖及凋亡的实验研究\*

马亚波<sup>1</sup>,胡响当<sup>2</sup>,鲁海燕<sup>2</sup>,罗敏<sup>2</sup>,徐胜艳<sup>2</sup>,李磊磊<sup>2</sup>,杨宗亮<sup>2</sup>

(1.湖南中医药大学,湖南 长沙 410208;2.湖南中医药大学第二附属医院,湖南 长沙 410005)

[摘要] 目的:探究天马颗粒剂基于miR-34a调控大肠癌细胞增殖及凋亡的分子机制。方法:采用不同浓度的天马颗粒剂含药血清孵育SW480细胞,24 h后通过MTT法筛选天马颗粒剂含药血清作用浓度;将SW480细胞分为正常对照组、空白血清组、正常剂量组、50%正常剂量组。正常对照组正常培养,正常剂量组予17.0 μg/mL天马颗粒剂含药血清干预,50%正常剂量组予8.5 μg/mL天马颗粒剂含药血清干预,空白血清组予空白血清干预,24 h后采用RT-PCR检测miR-34a表达,采用MTT检测细胞增殖,采用流式细胞术检测细胞的凋亡情况,采用Western blotting检测细胞中p53及cleaved Caspase-3表达。将SW480细胞分为天马颗粒剂组、天马颗粒剂+NC inhibitor组、天马颗粒剂+miR-34a inhibitor组。天马颗粒剂组予天马颗粒剂含药血清(17.0 μg/mL)干预,天马颗粒剂+NC inhibitor组及天马颗粒剂+miR-34a inhibitor组分别给予NC inhibitor及miR-34a inhibitor转染,随后予天马颗粒剂含药血清(17.0 μg/mL)干预,24 h后采用Western blotting检测细胞中p53及cleaved Caspase-3的表达。结果:天马颗粒剂含药血清体外作用浓度为17.0 μg/mL。天马颗粒剂可抑制SW480细胞的增殖,促进SW480细胞的凋亡,上调大肠癌细胞中miR-34a、p53、cleaved Caspase-3的表达,且对大肠癌细胞的调控作用具有剂量依赖性。抑制miR-34a可逆转天马颗粒对大肠癌细胞的促凋亡及抗增殖作用。结论:天马颗粒剂可通过上调miR-34a促进p53、cleaved Caspase-3的表达抑制大肠癌细胞增殖,促进大肠癌细胞凋亡。

[关键词] 大肠癌;天马颗粒剂;miR-34a;细胞增殖;细胞凋亡

[中图分类号] R285.5;R735.3+1;R273 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2025)04-0021-06

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.04.004

## Experimental Study on the Regulation of Proliferation and Apoptosis of Colorectal Cancer Cells by Tianma Granules(天马颗粒剂) Based on miR-34a

MA Yabo<sup>1</sup>, HU Xiangdang<sup>2</sup>, LU Haiyan<sup>2</sup>, LUO Min<sup>2</sup>, XU Shengyan<sup>2</sup>, LI Leilei<sup>2</sup>, YANG Zongliang<sup>2</sup>

(1.Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan 410208, China;

2.The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan 410005, China)

[Abstract] Objective: To investigate the molecular mechanism of Tianma granules in regulating the proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells based on miR-34a. Methods: SW480 cells were incubated with drug-containing serum of Tianma granules at different concentrations. After 24 hours, MTT assay was used to screen the action concentration of drug-containing serum of Tianma granules. SW480 cells were divided into normal control group, blank serum group, normal dose group and 50% normal dose group. The SW480 cells were cultured normally in normal control group. The SW480 cells were treated with Tianma granule medicated serum (17.0 g/mL) in normal dose group, and Tianma granules medicated serum (8.5 g/mL) in 50% normal dose group. The SW480 cells were cultured with blank serum in blank serum group. After 24 hours, the expression of miR-34a was detected by RT-PCR, and the proliferation of cells was detected by MTT. The apoptosis of cells was detected by flow cytometry, and the expressions of p53 and cleaved Caspase-3 were detected by Western blotting. SW480 cells were divided into Tianma granules group, Tianma granules +NC inhibitor group, and Tianma granules+miR-34a inhibitor group. The SW480 cells were treated with drug-containing serum

\*基金项目:湖南中医药大学校级科研基金资助项目(2021XJJ064);湖南省自然科学基金资助项目(2022JJ30448);湖南中医药大学中医学一流学科开放基金项目(2022ZYX06)

通信作者:杨宗亮,男,副主任医师,研究方向为肛肠疾病的防治

(17.0 g/mL) in Tianma granule group. The Tianma granule+NC inhibitor group and Tianma granule+miR-34a inhibitor group were transfected with NC inhibitor and miR-34a inhibitor, respectively, followed by intervention with drug-containing serum (17.0 g/mL) of Tianma granules. After 24 h, the expressions of p53 and cleaved Caspase-3 were detected by Western blotting. Results: The serum concentration of Tianma granules *in vitro* was 17.0  $\mu$ g/mL. Tianma granule could inhibit the proliferation of SW480 cells, promote the apoptosis of SW480 cells, and up-regulate the expression of miR-34a, p53 and cleaved Caspase-3 in colorectal cancer cells. The regulatory effect on colorectal cancer cells was dose-dependent. Inhibition of miR-34a could reverse the pro-apoptosis and anti-proliferation effects of Tianma granules on colorectal cancer cells. Conclusion: Tianma granules can inhibit colorectal cancer cell proliferation and promote colorectal cancer cell apoptosis by up-regulating the expressions of p53 and cleaved Caspase-3 by up-regulating miR-34a.

[Keywords] colorectal cancer; Tianma granules; miR-34a; cell proliferation; cell apoptosis

大肠癌是一种常见的消化道恶性肿瘤,分为近端结肠癌、远端结肠癌、远端直肠癌3种亚型<sup>[1]</sup>。近年来大肠癌发病率及死亡率呈上升趋势,大肠癌新增病例从2015年的38.8万例增长至2020年的55.5万例<sup>[2]</sup>。此外,大肠癌也是中国癌症死亡的主要原因,死亡率约为28.6%<sup>[3]</sup>。寻找危害性较小的有效治疗手段仍是目前大肠癌研究的重点。中药复方具有靶点多、副作用小、疗效良好等特点,有望广泛应用于结直肠癌的治疗与管理<sup>[4]</sup>。天马颗粒剂是何永恒教授治疗大肠癌的有效经验方,具有抑制大肠癌发生及发展的作用,但其具体机制仍不明确。前期研究证实天马颗粒剂具有治疗大肠癌作用,且低表达的miR-34a与大肠癌发生及发展密切相关<sup>[4-5]</sup>。本研究推测天马颗粒剂可能通过诱导miR-34a表达抑制大肠癌细胞增殖,并促进癌细胞凋亡。为探究天马颗粒剂与miR-34a在大肠癌中的潜在联系,本研究进行了相关实验研究。

## 1 材 料

1.1 实验细胞 人大肠癌细胞株SW480(CL-0223)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 实验动物 8周龄SPF级SD雄性大鼠(180~200 g),购自北京维通利华实验动物技术有限公司上海分公司,生产许可证号:SCXK(沪)2022-0007。动物质量合格证号:430727221100100741。饲养条件为:12 h光暗交替循环,自由饮食,温度(21 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C,湿度(59 $\pm$ 1)%。动物适应性饲养1周后进行实验。动物实验已获得湖南中医药大学实验动物福利伦理委员会批准(伦理编号:LLBH-202201060003)。

1.3 药物 天马颗粒剂(湖南中医药大学第二附属医院,批准文号:[湘]卫药剂9706024)由蜈蚣、全蝎、制马钱子、蚤休、半边莲、黄柏、醋制三棱、醋制莪术、夏枯草、制胆南星、海藻、黄芪、当归、党参、石斛、山药、车前子、火麻仁组成,经刘红梅副主任药师鉴定为正品。

1.4 试剂 10%(体积分数)胎牛血清(美国Gibco公司,批号:10100147C);1%(体积分数)链霉素-青霉素混合液(北京索莱宝公司,批号:P1400);DMEM培养基(美国Gibco公司,批号:11965092);MTT试剂盒(上海碧云天公司,批号:C0009S);Annexin V-FITC染色试剂盒(上海碧云天生物公司,批号:C1062S);miRNA提取试剂盒(中国Haigene公司,批号:B1802);一步法miRNA反转录试剂盒(中国Haigene公司,批号:D1801);0.25%胰蛋白酶(北京索莱宝公司,批号:T1300);

RIPA裂解液(上海碧云天公司,批号:P0013C);p53抗体(美国Abcam公司,批号:ab26);cleaved Caspase-3抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:66470-2-Ig); $\beta$ -actin抗体(美国Abcam公司,批号:ab6276);ECL试剂盒(上海碧云天公司,批号:P0018S);HRP交联的二抗(美国Abcam公司,批号:ab6789)。

1.5 主要仪器 0.22  $\mu$ m微孔滤膜(美国Millipore);湿式转膜仪(美国伯乐公司,型号:1703930);凝胶成像仪(美国伯乐公司,型号:12003154);荧光定量PCR仪(美国Applied biosystems公司,型号:A26337)。

## 2 方 法

2.1 天马颗粒剂含药血清制备 天马颗粒剂临床成人每日用量为30 g<sup>[6]</sup>。实验SD大鼠剂量为临床70 kg成人等效剂量的6.3倍,因此天马颗粒剂大鼠灌胃剂量为2.7 g/(kg $\cdot$ d)。取天马颗粒剂2.7 g,加水溶解后,稀释为20 mL。将SD大鼠随机分为给药组及空白组,每组10只。给药组予天马颗粒剂溶液灌胃,每100 g体重灌胃2 mL天马颗粒剂溶液,空白组予生理盐水灌胃,每100 g体重灌胃2 mL生理盐水。2次/d,早晚各1次,连续给药1周,于末次给药后2 h心脏取血,采用一次性非抗凝真空采血管收集全血,4 $^{\circ}$ C静置2 h,4 $^{\circ}$ C下3 500 r/min(离心半径7.7 cm)离心全血15 min,收集上清液。对上清液进行56 $^{\circ}$ C恒温灭活30 min,在超净台上用0.22  $\mu$ m微孔滤膜过滤除菌,获得天马颗粒剂含药血清或空白血清,-20 $^{\circ}$ C保存备用。

2.2 体外作用浓度筛选 取SW480细胞,使用0.1~100.0  $\mu$ g/mL天马颗粒剂含药血清孵育细胞24 h。加入10  $\mu$ L MTT试剂,继续孵育4 h。加入100  $\mu$ L formazan溶解液,37 $^{\circ}$ C下孵育3~4 h,待紫色结晶物充分溶解。使用酶标仪检测各浓度组细胞样品在570 nm处的OD值。以空白血清作为对照,计算各浓度组的细胞抑制率,计算IC<sub>50</sub>值。

2.3 细胞培养及处理 采用含10%胎牛血清及1%链霉素-青霉素混合液的DMEM培养基,于37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>饱和湿度下恒温培养箱中培养。

2.3.1 天马颗粒剂对大肠癌细胞增殖及凋亡的影响 取SW480细胞,分为空白对照组、空白血清组、正常剂量组、50%正常剂量组。正常剂量组:根据IC<sub>50</sub>值确定作用浓度,予17.0  $\mu$ g/mL天马颗粒剂含药血清干预,孵育细胞24 h。50%正常剂量组予8.5  $\mu$ g/mL天马颗粒剂含药血清干预,孵育细胞24 h。空白对照组正常培养,不加入其他干预因素。空白血清组予以空白

血清干预, 孵育细胞24 h。

**2.3.2 天马颗粒剂通过诱导miR-34a对大肠癌细胞增殖及凋亡的影响** 取SW480细胞, 分为天马颗粒剂组、天马颗粒剂+NC inhibitor组、天马颗粒剂+miR-34a inhibitor组。天马颗粒剂组: 予17.0  $\mu\text{g/mL}$ 天马颗粒剂含药血清干预24 h; 天马颗粒剂+NC inhibitor组: 采用Lipofectamine 3000试剂盒将NC inhibitor转染至细胞, 转染48 h后予17.0  $\mu\text{g/mL}$ 天马颗粒剂含药血清干预24 h; 天马颗粒剂+miR-34a inhibitor组: 采用Lipofectamine 3000试剂盒将miR-34a inhibitor转染至细胞, 转染48 h后予17.0  $\mu\text{g/mL}$ 天马颗粒剂含药血清干预24 h。

**2.4 细胞增殖** 采用MTT试剂盒检测细胞增殖。取SW480细胞, 分别于第0 h、24 h、48 h、72 h加入MTT试剂, 孵育4 h。加入formazan溶解液, 继续孵育至紫色物质溶解。使用酶标仪检测各浓度组细胞样品在570 nm的OD值。

**2.5 细胞凋亡** 使用Annexin V-FITC染色试剂盒染色凋亡细胞。取各组SW480细胞, 1 000 $\times$  g离心5 min后收集细胞沉淀, 加入Annexin V-FITC结合液重悬细胞, 依次加入Annexin V-FITC染色液及碘化丙锭, 混匀后室温避光孵育10~20 min, 使用流式细胞仪对凋亡细胞进行计数, 并由流式细胞仪自带的软件分析软件计算细胞凋亡率。

**2.6 miR-34a表达定量** 取各组细胞, miRNA提取试剂盒提取细胞总miRNA。结合miR-34a引物, 通过一步法miRNA反转录试剂盒将miRNA反转录为cDNA, 采用SYBR Green miRNA荧光定量PCR试剂盒进行荧光定量。以GAPDH为内参基因, 通过 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法进行标准化处理。miR-34a引物序列见表1。

表1 引物序列

目的基因	序列	扩增产物片段长度/bp
miR-34a	上游: 5'-GGC AGT GTC TTA GCT GG-3'	17
	下游: 5'-CAA CAT GTC TGC GTA TCT C-3'	19
GAPDH	上游: 5'-GTC TCC TCT GAC TTC AAC AGC G-3'	22
	下游: 5'-CCA CCC TGT TGC TGT AGC CAA-3'	21

**2.7 p53及cleaved Caspase-3蛋白表达** 取各组细胞, 采用0.25%胰蛋白酶消化细胞2 min, 离心, 弃上清液。向沉淀中加入RIPA裂解液, 待细胞裂解后, 4  $^{\circ}\text{C}$ 下12 000 $\times$  g离心裂解液5 min, 收集上清液。使用SDS-PAGE电泳法分离蛋白, 后通过湿式转膜仪进行转膜。待蛋白转移至PVDF膜后, 加入含5%脱脂奶粉的封闭液, 室温摇床孵育1 h。加入稀释后的一抗[p53 (1:1 000), cleaved Caspase-3 (1:1 000),  $\beta$ -actin (1:5 000)], 4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。加入稀释后的二抗(HRP交联, 1:10 000), 37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h。使用ECL试剂盒进行发光显影处理。通过凝胶成像仪检测蛋白条带, 采用Image Pro Plus 6.0软件分析条带光密度值, 根据 $\beta$ -actin光密度值计算p53及cleaved Caspase-3相对

表达量。

**2.8 统计学方法** 收集3次重复实验数据, 采用SPSS 26.0软件进行数据统计与分析。计量资料符合正态分布且方差齐, 以“均数 $\pm$ 标准差”( $\bar{x}\pm s$ )表示, 采用单因素方差分析, 采用LSD- $t$ 检验进行两两比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。使用GraphPad 9.0软件计算天马颗粒剂的 $\text{IC}_{50}$ 值。

### 3 结果

**3.1 天马颗粒含药血清作用浓度筛选** 天马颗粒剂含药血清对大肠癌细胞株的 $\text{IC}_{50}$ 值为17.22  $\mu\text{g/mL}$ 。因此本研究后续选择17  $\mu\text{g/mL}$ 天马颗粒含药血清为正常剂量。(见图1)

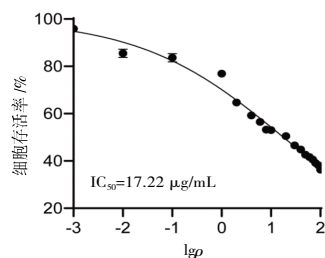
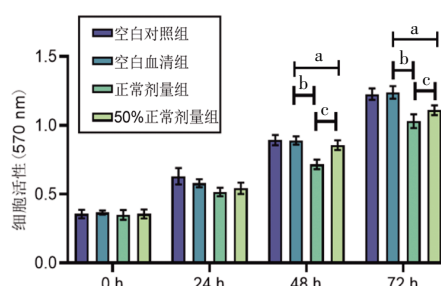


图1 天马颗粒含药血清对大肠癌细胞存活率的影响

**3.2 天马颗粒剂含药血清对大肠癌细胞增殖及凋亡的影响** 空白血清组细胞活性及细胞凋亡率与空白对照组比较, 差异无统计学意义( $P>0.05$ ), 因此可排除血清对实验的影响。48、72 h后, 正常剂量组、50%正常剂量组细胞活性均低于空白血清组( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ), 且正常剂量组细胞活性低于50%正常剂量组( $P<0.05$ ), 表明8.5  $\mu\text{g/mL}$ 及17.0  $\mu\text{g/mL}$ 天马颗粒剂含药血清均可抑制大肠癌细胞增殖, 且17.0  $\mu\text{g/mL}$ 天马颗粒含药血清的抑制作用优于8.5  $\mu\text{g/mL}$ 。(见图2)

正常剂量组、50%正常剂量组细胞凋亡率均高于空白血清组( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ), 且正常剂量组细胞凋亡率高于50%正常剂量组( $P<0.05$ ), 表明8.5  $\mu\text{g/mL}$ 及17.0  $\mu\text{g/mL}$ 天马颗粒剂含药血清均可促进大肠癌细胞凋亡, 且17.0  $\mu\text{g/mL}$ 天马颗粒含药血清的作用优于8.5  $\mu\text{g/mL}$ 。(见图3~4)



注: 与空白血清组比较,  $^aP<0.05$ ,  $^bP<0.01$ ; 与50%正常剂量组比较,  $^cP<0.05$ 。

图2 4组细胞活性比较 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

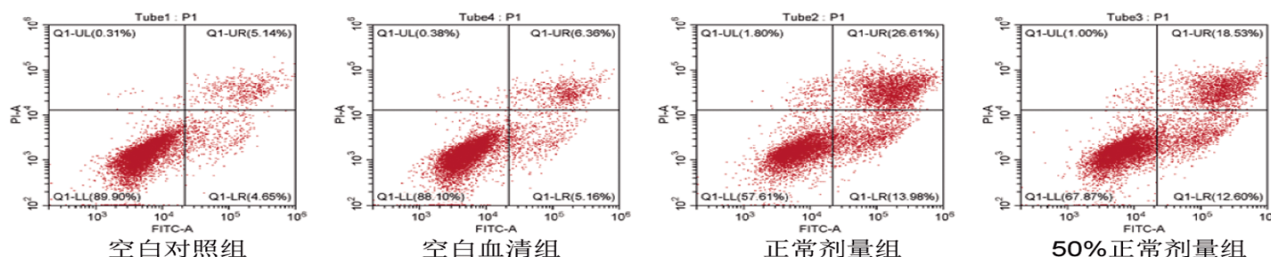
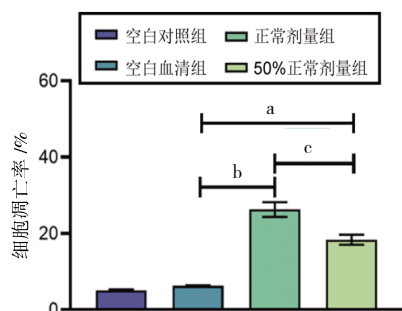


图3 4组细胞凋亡流式图



注:与空白血清组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ,<sup>b</sup> $P<0.01$ ;与正常剂量组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ 。

图4 4组细胞凋亡率比较 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

3.3 天马颗粒含药血清对大肠癌细胞凋亡因子的影响 空白血清组p53及cleaved Caspase-3蛋白相对表达量与空白对照组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),因此可排除血清对凋亡因子的影响。正常剂量组、50%正常剂量组p53及cleaved Caspase-3蛋白相对表达量均高于空白血清组( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );且正常剂量组p53及cleaved Caspase-3蛋白相对表达量高于50%正常剂量组( $P<0.05$ )。(见图5~6)

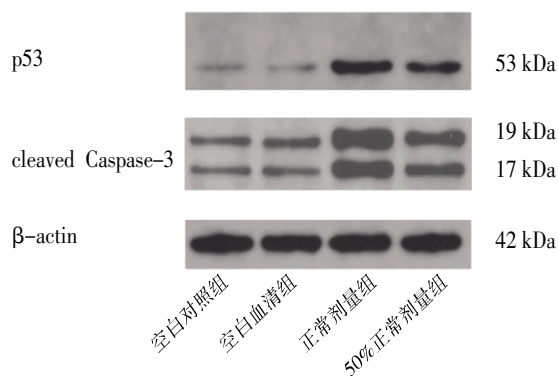
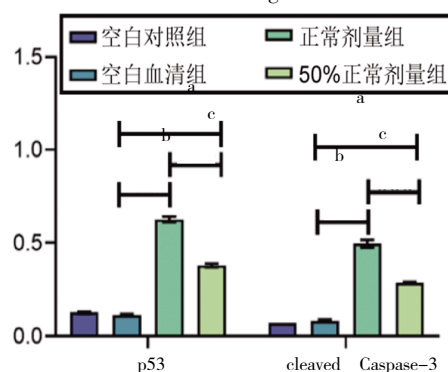


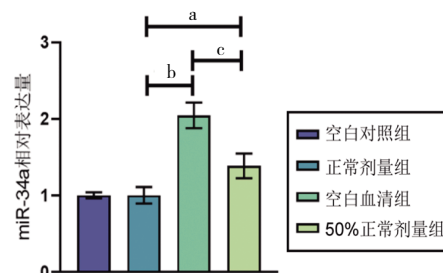
图5 4组细胞 p53 及 cleaved Caspase-3 蛋白表达 Western blotting 图



注:与空白血清组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ,<sup>b</sup> $P<0.01$ ;与正常剂量组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ 。

图6 4组细胞 p53 及 cleaved Caspase-3 蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

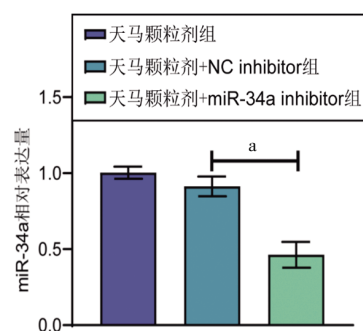
3.4 天马颗粒剂含药血清对大肠癌细胞miR-34a表达的影响 正常剂量组和50%正常剂量组miR-34a相对表达量均高于空白血清组( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),表明天马颗粒可诱导miR-34a在大肠癌细胞中的表达。正常剂量组miR-34a相对表达量高于50%正常剂量组( $P<0.01$ )。(见图7)



注:与空白血清组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ,<sup>b</sup> $P<0.01$ ;与50%正常剂量组比较,<sup>c</sup> $P<0.01$ 。

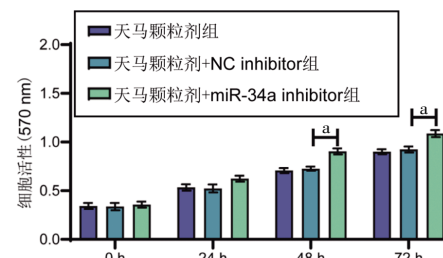
图7 4组大肠癌细胞中 miR-34a 相对表达量比较 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

3.5 天马颗粒剂通过诱导miR-34a对大肠癌细胞凋亡的影响 天马颗粒剂+miR-34a inhibitor组miR-34a表达低于天马颗粒剂+NC inhibitor组( $P<0.05$ )。天马颗粒剂+NC inhibitor组细胞活性、细胞凋亡率与天马颗粒剂组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),可排除细胞转染对大肠癌细胞的影响。48、72 h后,天马颗粒剂+miR-34a inhibitor组细胞活性高于天马颗粒剂+NC inhibitor组( $P<0.05$ ),且天马颗粒剂+miR-34a inhibitor组细胞凋亡率低于天马颗粒剂+NC inhibitor组( $P<0.05$ ),表明下调miR-34a可逆转天马颗粒剂对大肠癌细胞的促凋亡及抗增殖作用。天马颗粒剂可通过诱导miR-34a表达促进大肠癌细胞凋亡。(见图8~11)



注:与天马颗粒剂+NC inhibitor组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ 。

图8 3组细胞 miR-34a 相对表达量比较 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )



注:与天马颗粒剂+NC inhibitor组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ 。

图9 3组细胞活性比较 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

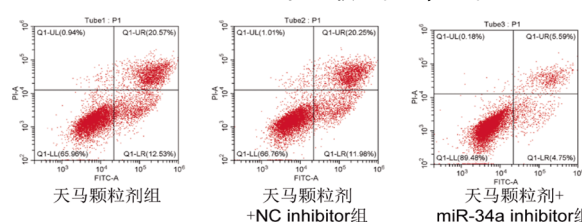
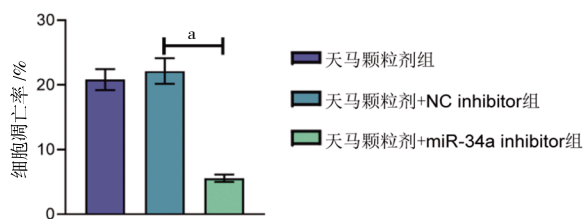


图10 3组大肠癌细胞凋亡流式图





注:与天马颗粒剂+NC inhibitor组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ 。

图 11 3 组大肠癌细胞凋亡率比较 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

3.6 天马颗粒剂通过诱导miR-34a对大肠癌细胞凋亡因子表达的影响 天马颗粒剂+NC inhibitor组p53及cleaved Caspase-3蛋白相对表达量与天马颗粒剂组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),可排除细胞转染方式对大肠癌细胞凋亡因子的影响。天马颗粒剂+miR-34a inhibitor组p53及cleaved Caspase-3蛋白相对表达量低于天马颗粒剂+NC inhibitor组( $P<0.05$ ),表明下调miR-34a可逆转天马颗粒剂对p53及cleaved Caspase-3蛋白相对表达的上调效应。(见图12~13)

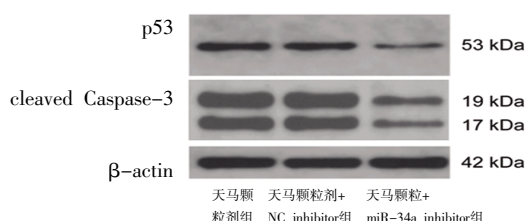
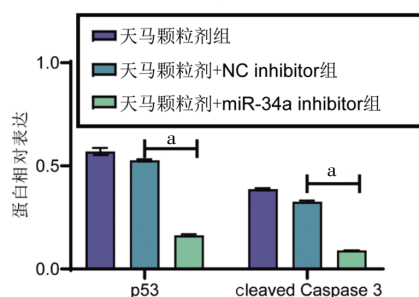


图 12 3 组大肠癌细胞 p53 及 cleaved Caspase-3 蛋白表达 Western blotting 图



注:与天马颗粒剂+NC inhibitor组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ 。

图 13 3 组细胞 p53 及 cleaved Caspase-3 蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

#### 4 讨 论

大肠癌属于中医学中“肠覃”“脏毒”“锁肛痔”等范畴。天马颗粒剂化裁自古方化痞膏、黄芪益损汤及内消瘰疬丸,具有活血化瘀、清热解毒、化痰消积之效。方中蜈蚣、全蝎、制马钱子均为有毒中药,有以毒攻毒、散结消肿、通络止痛之功效。三者相须为用。蚤休、半边莲、黄柏三药合用清热解毒,消肿止痛。醋制三棱、醋制莪术均有破血行气消癥之功,其中醋制增强祛瘀作用。夏枯草、制胆南星、海藻化痰软坚散结。黄芪、当归既可托毒外出,又可补气养血。党参、石斛、山药益气养阴护胃,配合黄芪、当归,一可补耗伤之气血,二可防攻伐太过,顾护胃气,三可扶正祛邪。车前子、火麻仁通利二便,引邪外出,推陈出新。全方以攻毒祛邪为主,兼以扶正培本,攻补兼施,从而达到“祛邪不伤正,扶正不留邪”的目的,切合大肠癌虚、毒的病因病机特点。

天马颗粒剂是治疗大肠癌的有效经验复方。前期研究证

实天马颗粒剂可显著提高大肠癌患者术后的5年生存率,降低复发或病灶转移的可能性<sup>[9]</sup>,且天马颗粒剂对大肠癌细胞株SW480具有抗增殖及促凋亡的作用<sup>[7]</sup>。彭天书<sup>[8]</sup>通过大肠癌皮下荷瘤模型及体外细胞模型证实天马颗粒剂原方及精简方均可抑制肿瘤生长及细胞恶性行为,并证明了天马颗粒剂的体内及体外安全性。邓松华等<sup>[10]</sup>研究表明天马颗粒剂中蜈蚣、全蝎、半边莲可有效抑制大肠癌细胞增殖。本研究证实天马颗粒剂含药血清可抑制大肠癌细胞SW480增殖,促进大肠癌细胞SW480凋亡。本研究还确定了天马颗粒剂含药血清对大肠癌细胞的 $IC_{50}$ 值,并以该值为参考确定药物体外作用浓度,为后续相关研究提供了药物浓度参考。

miR-34a是miR-34的家族成员之一,为抑癌基因。miR-34a是乳腺癌、肝癌、胃癌、大肠癌等恶性肿瘤的潜在预后指标<sup>[10]</sup>。在大肠癌中,miR-34a失活是促进肿瘤形成、生长、转移的关键性事件<sup>[11-12]</sup>。miR-34a具有基因表达调控的生物学活性,可通过靶向目的基因串扰p53通路和Wnt通路等关键的癌症相关通路<sup>[13-14]</sup>,调控下游细胞凋亡、细胞周期、血管生成等癌细胞生物学过程。研究<sup>[15-16]</sup>表明,结直肠癌患者miR-34a表达低于健康者。miR-34a是抑制大肠癌细胞增殖、迁移、侵袭等恶性行为的重要节点,其表达水平高低影响大肠癌发生发展,是大肠癌治疗的重要靶点之一。本研究定量检测了miR-34a在各组大肠癌细胞中的表达,结果表明50%正常剂量组及正常剂量组大肠癌细胞miR-34a表达均上调,且正常剂量组miR-34a表达高于50%正常剂量组,表明天马颗粒剂可诱导miR-34a表达,且可能具有剂量依赖性效应。随后本研究采用miR-34a inhibitor逆转天马颗粒剂对miR-34a的上调效应,发现癌细胞增殖增加,且细胞凋亡减少,表明下调miR-34a可逆转天马颗粒剂对大肠癌细胞的抑制作用。由此可见,miR-34a是天马颗粒剂在大肠癌中的作用靶点。

p53是一种肿瘤抑制因子。研究<sup>[17]</sup>表明,miR-34a可通过直接靶向TP53和MDM4诱导p53激活。本研究证实天马颗粒剂诱导的miR-34a作用机制可能涉及p53蛋白。正常剂量组及50%正常剂量组p53蛋白相对表达量均高于空白血清组,且正常剂量组p53蛋白相对表达量高于50%正常剂量组。同时miR-34a inhibitor下调miR-34a表达可逆转这一作用,表明miR-34a-p53相互作用可能是天马颗粒剂抑制大肠癌的重要机制。这一潜在关系还需进一步研究探讨。Caspase-3是一种半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶,在细胞凋亡过程中具有关键作用。cleaved Caspase-3是其活化形式,经由半胱天冬酶9激活的Caspase-3活化而成,能有效执行细胞凋亡<sup>[18]</sup>。Caspase-3作为凋亡信号通路中最后的执行者,其表达异常与多种肿瘤的发生发展密切相关<sup>[19]</sup>。本研究结果显示,正常剂量组及50%正常剂量组cleaved Caspase-3蛋白相对表达量高于空白血清组,且正常剂量组cleaved Caspase-3蛋白相对表达量高于50%正常剂量组。同时下调miR-34a可逆转cleaved Caspase-3的表达上调,表明天马颗粒剂可通过诱导凋亡因子p53和cleaved Caspase-3的表达来促进癌细胞的凋亡。

除了p53和cleaved Caspase-3外,凋亡还涉及核因子E2相关因子2(Nrf-2)、B淋巴细胞瘤2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)等因子<sup>[20]</sup>。前期研究<sup>[13]</sup>已证明天马颗粒剂可以下调Bcl-2

的表达来促进肿瘤细胞凋亡。Bcl-2具有抑制细胞凋亡的作用,其在结直肠癌组织中表达阳性率高于正常结直肠组织及癌旁组织,且与结直肠癌的TNM分期有关<sup>[21]</sup>。研究<sup>[22]</sup>表明,Nrf2通路在结肠癌的发生及进展过程中发挥重要作用,而降低Nrf2水平能够显著抑制结肠癌细胞的增殖和迁移。山姜素可通过提高Nrf2水平抑制结肠细胞NCM460的增殖及促进其凋亡<sup>[23]</sup>。红景天苷可通过下调NRF2抑制口腔鳞癌细胞增殖和迁移,诱导细胞凋亡<sup>[24]</sup>。当归多糖可通过增强Nrf2信号传导抑制高糖诱导视网膜神经节细胞凋亡<sup>[25]</sup>,说明Nrf2具有两面性,而天马颗粒剂对其影响如何,是后续研究的探索方向。

综上所述,天马颗粒剂含药血清可通过上调miR-34a表达抑制大肠癌细胞增殖,并促进大肠癌细胞凋亡。

# 参考文献

- [1] AHMAD R, SINGH J K, WUNNAVA A, et al. Emerging trends in colorectal cancer: Dysregulated signaling pathways (review)[J]. *Int J Mol Med*,2021,47(3):14.
- [2] CAO W, CHEN H D, YU Y W, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: A secondary analysis of the global cancer statistics 2020[J]. *Chin Med J*, 2021,134(7):783-791.
- [3] WANG K L, CHEN Q, SHAO Y Y, et al. Anticancer activities of TCM and their active components against tumor metastasis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 133: 111044.
- [4] 姚艳茹.天马颗粒防治肠道湿热型大肠腺瘤内镜术后复发疗效观察[D].长沙:湖南中医药大学,2022.
- [5] ELLAKWA DE, MUSHTAQ N, KHAN S, et al. Molecular functions of microRNAs in colorectal cancer: recent roles in proliferation, angiogenesis, apoptosis, and chemoresistance[J]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2024,397(8):5617-5630.
- [6] 黄晨容,郭颂铭,何永恒.天马颗粒剂对延长大肠癌根治术后生存期的临床研究[J].*同济大学学报(医学版)*,2004,25(1):58-60.
- [7] 吴志强.“天马颗粒剂”对大肠癌SW-480细胞凋亡及相关基因的影响的实验研究[D].长沙:湖南中医药大学,2005.
- [8] 彭天书.天马颗粒剂的拆方研究[D].长沙:湖南中医药大学,2015.
- [9] 邓松华,谢彪,彭天书,等.应用正交设计优化天马颗粒剂配方的实验研究[J].*湖南中医药大学学报*,2018,38(3):266-269.
- [10] LI S J, WEI X H, HE J Y, et al. The comprehensive landscape of miR-34a in cancer research[J]. *Cancer Metastasis Rev*,2021,40(3):925-948.
- [11] QIAO P F, YAO L, ZENG Z L. Catalpol-mediated microRNA-34a suppresses autophagy and malignancy by regulating SIRT1 in colorectal cancer[J]. *Oncol Rep*, 2020,43(4):1053-1066.
- [12] ZHU W, LONG J L, YIN Y T, et al. MicroRNA-34a suppresses the invasion and migration of colorectal cancer cells by enhancing EGR1 and inhibiting vimentin[J]. *Exp Ther Med*,2019,18(4):2459-2466.
- [13] YANG Y, YUAN H Y, ZHAO L M, et al. Targeting the miR-34a/LRPPRC/MDR1 axis collapse the chemoresistance in P53 inactive colorectal cancer[J]. *Cell Death Differ*,2022,29(11):2177-2189.
- [14] LUO Y, CHEN J J, LV Q, et al. Long non-coding RNA NEAT1 promotes colorectal cancer progression by competitively binding miR-34a with SIRT1 and enhancing the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. *Cancer Lett*, 2019,440-441:11-22.
- [15] BADR E A E, ALI ASSAR M F, GOHAR S F, et al. The clinical impact of miRNA34a and P53 gene expression in colon cancer[J]. *Biochem Biophys Rep*, 2018,16:88-95.
- [16] MA Z B, KONG X L, CUI G, et al. Expression and clinical significance of miRNA-34a in colorectal cancer[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*,2014,15(21):9265-9270.
- [17] NAVARRO F, LIEBERMAN J. MiR-34 and p53: New insights into a complex functional relationship[J]. *PLoS One*,2015,10(7):e0132767.
- [18] BRETNALL M, RODRIGUEZ -MENOCAL L, DE GUEVARA R L, et al. Caspase -9, caspase -3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis[J]. *BMC Cell Biol*,2013,14:32.
- [19] CUI D P, ZHAO D W, WANG B J, et al. Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) polysaccharide attenuates cellular apoptosis in steroid -induced avascular necrosis of femoral head by targeting caspase-3-dependent signaling pathway[J]. *Int J Biol Macromol*,2018,116:106-112.
- [20] 杨润泽,许文宁,郑火亮,等.脐静脉内皮细胞外泌体对炎症因子刺激下前软骨细胞凋亡的影响[J].*上海交通大学学报(医学版)*,2021,41(2):147-153.
- [21] 黄维莉,吕永晨.结肠癌组织中miR-1915-3p和Bcl-2的表达及其临床意义[J].*吉林大学学报(医学版)*,2021,47(2):453-459.
- [22] 纳鑫,陈丽君,罗敏,等.干扰Nrf2提高二氢青蒿素对结肠癌细胞增殖的抑制作用[J].*昆明医科大学学报*,2017,38(2):33-37.
- [23] 江聪,杨保伟,田甜,等.山姜素调节Nrf2通路对高糖诱导的结肠细胞NCM460异常增殖的影响研究[J].*河北医药*, 2024,46(14):2085-2090.
- [24] 陈华,李婧,罗梅.红景天甙通过NRF2/KEAP1通路对口腔鳞癌细胞生长的影响[J].*中国口腔颌面外科杂志*,2024,22(5):424-429.
- [25] 王艳新,贾冠美,曹朗,等.当归多糖通过Akt/GSK-3 $\beta$ 通路增强Nrf2信号传导对高糖诱导视网膜神经节细胞凋亡的抑制作用[J].*中医导报*,2023,29(5):16-21.

(收稿日期:2024-07-23 编辑:蒋凯彪)