

· 实验研究 ·

黄芪-莪术-重楼配伍降低血管内皮通透性抑制结肠癌转移作用的研究

刘甜甜¹, 卞勇^{1,2}, 关汉卿¹, 梁研¹, 郭文晖¹, 余倩慧¹, 唐德才¹

(1. 南京中医药大学中医学院·中西医结合学院, 江苏 南京 210023; 2. 南京中医药大学实验动物中心, 江苏 南京 210023)

摘要:目的 观察黄芪-莪术-重楼配伍对人脐静脉内皮细胞株(HUVEC)通透性与细胞紧密连接的影响及其抑制人结肠癌细胞系(HCT116)血行转移的作用机制。方法 制备空白对照血清和黄芪-莪术-重楼配伍含药血清。构建 HUVEC-HCT116 共培养体系, 实验分为共培养模型组, 黄芪-莪术-重楼配伍低、中、高剂量(2.1、4.2、8.4 g·kg⁻¹)组。另设 HUVEC 单培养对照组。CCK-8 法检测细胞增殖; FITC-dextran 法、Transwell 法检测 HUVEC 通透性与 HCT116 跨内皮迁移数量; 免疫荧光法检测 ZO-1 蛋白的分布; Western blot 法检测 RhoA、ROCK 及 ZO-1 蛋白表达量。结果 黄芪-莪术-重楼配伍不同剂量含药血清处理 48 h 后, HUVEC 增殖均显著减少($P < 0.01$)。与单培养对照组相比, 共培养模型组 FITC-dextran 渗透量、跨越内皮迁移的 HCT116 细胞数量明显增加($P < 0.01$), ZO-1 蛋白表达下调($P < 0.01$), RhoA、ROCK 蛋白表达上调($P < 0.01$); 与共培养模型组相比, 黄芪-莪术-重楼配伍各剂量组 FITC-Dextran 渗透量、跨越内皮迁移的 HCT116 细胞数量均减少($P < 0.05$), ZO-1 蛋白表达上调($P < 0.05$), RhoA、ROCK 蛋白表达下调($P < 0.05$), 且呈现剂量依赖性。结论 黄芪-莪术-重楼配伍可能通过抑制 RhoA/ROCK 通路调控 HUVEC 紧密连接相关蛋白 ZO-1 的表达, 降低血管内皮通透性, 进而抑制结肠癌血行转移。

关键词:黄芪-莪术-重楼配伍; 结肠癌; 血管通透; 共培养; 紧密连接

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-0482(2022)02-0115-07

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2022.0115

引文格式: 刘甜甜, 卞勇, 关汉卿, 等. 黄芪-莪术-重楼配伍降低血管内皮通透性抑制结肠癌转移作用的研究[J]. 南京中医药大学学报, 2022, 38(2): 115-121.

Study on the Inhibitory Effect of Huangqi-Ezhu-Chonglou Combination on Metastasis of Colon Cancer by Reducing Vascular Endothelial Permeability

LIU Tian-tian¹, BIAN Yong^{1,2}, GUAN Han-qing¹, LIANG Yan¹, GUO Wen-hui¹, YU Qian-hui¹, TANG De-cai¹

(1. School of Chinese Medicine, School of Integrated Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Laboratory Animal Center, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the effects of Huangqi-Ezhu-Chonglou combination (HEC) on the permeability and tight junction of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and to explore the mechanism of HEC on inhibiting the hematogenous metastasis of colon cancer cells (HCT116). **METHODS** Control serum and HEC-mediated serum were prepared. The co-culture system of HUVEC-HCT116 was constructed and divided into single culture control group, co-culture model group and HEC low, medium and high dose (2.1, 4.2, 8.4 g·kg⁻¹) groups. In addition, HUVEC single culture control group was set up. Cell proliferation was detected by CCK-8 method; FITC-dextran method and transwell method were used to detect the permeability of HUVEC and the number of cross endothelial migration of HCT116 cells; The distribution of ZO-1 protein in HUVEC was detected by immunofluorescence; The protein expressions of RhoA, ROCK and ZO-1 were detected by Western blot. **RESULTS** The proliferation of HUVEC was inhibited after 48 h of treatment with different doses of HEC mediated serum ($P < 0.01$). Compared with the single culture control group, FITC-dextran penetration and the number of transendothelial migration of HCT116 in the co-culture model group significantly increased ($P < 0.01$), the expression of ZO-1 was down-regulated ($P < 0.01$), and the expressions of RhoA and ROCK were up-regulated ($P < 0.01$); Compared with the co-culture model group, the FITC-dextran penetration and the number of transendothelial migration of HCT116 in the HEC group significantly decreased ($P < 0.05$), the expression of ZO-1 protein was up-regulated ($P < 0.05$), and the expressions of RhoA and ROCK were down-regulated in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). **CONCLUSION** HEC may regulate the expression of tight junction associated proteins ZO-1 in HUVEC by inhibiting RhoA/ROCK pathway, reduce vascular endothelial permeability, and then inhibit colon cancer hematogenous metastasis.

KEYWORDS: Huangqi-Ezhu-Chonglou combination; colon cancer; vascular permeability; co-culture; tight junction

收稿日期: 2021-10-29

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81873021); 江苏省中医药科技发展专项(2020ZX01); 江苏省研究生科研与实践创新计划项目(KY-CX21_1764)

第一作者: 刘甜甜, 女, 硕士研究生, E-mail: liutiantian1368@163.com

通信作者: 唐德才, 男, 教授, 主要从事中药药性、配伍机制及应用研究, E-mail: 290022@njucm.edu.cn

转移是恶性肿瘤最显著的生物学特征,也是导致患者死亡的主要原因。血管内皮屏障的通透性与肿瘤转移密切相关^[1],肿瘤细胞血行转移过程中需要两次跨越血管屏障(内渗、外渗)进出血液循环系统才能实现远端转移^[2],血管内皮通透性的增加为肿瘤跨越血管内皮转移提供了有利条件。紧密连接是由跨膜蛋白[闭合蛋白(Claudin)、咬合蛋白(Occludin)、连接黏附分子(JAM)]、胞质附着蛋白(Zonula occludens,ZO)以及细胞骨架(微丝)等共同组成的复合体^[3],是维持血管通透性和机械屏障的重要结构,也是阻碍肿瘤细胞跨血管内皮的重要屏障^[4]。研究表明,转移性肿瘤细胞能通过分泌外泌体^[5]、生长因子^[6]、基质金属蛋白酶^[7]等多种因子抑制血管内皮 ZO-1、Occludin 等紧密连接蛋白的表达,破坏血管内皮间紧密连接,增加血管通透性,进而实现远端转移。

黄芪、莪术、重楼分别是补气药、活血药、解毒药的代表,常用于肿瘤的治疗。含“黄芪-莪术-重楼”配伍的复方如芪术蚤复方^[8]、益气化瘀解毒方^[9]、健脾消癌方^[10]等均在临床被用于抗肿瘤转移,且能显著抑制肿瘤术后患者的复发转移率,提高生存率。课题组前期研究也表明,黄芪-莪术-重楼配伍可以抑制结肠癌原位移植瘤的生长与转移^[11];黄芪-莪术药对配伍不仅可以抑制结肠癌细胞的黏附与迁移^[12],还可抑制肿瘤血管新生^[13],改善肿瘤血管结构,促进肿瘤血管正常化新生^[14]。因此,本研究拟观察黄芪-莪术-重楼配伍在人结肠癌细胞系 HCT116 跨血管内皮迁移过程中对血管间紧密连接以及血管通透性的影响,探究黄芪-莪术-重楼配伍抑制 HCT116 细胞血行转移的作用机制,为黄芪-莪术-重楼配伍抗肿瘤转移的临床应用提供依据。

1 材料

1.1 实验细胞

人脐静脉内皮细胞株(HUVEC)、HCT116 均购于中国科学院细胞库。

1.2 实验动物

32 只 4~5 周 SD 雄性大鼠,体质量(200±20)g,购自杭州医学院,合格证号:SCXK(浙)2019-0002。饲养于南京中医药大学实验动物中心 SPF 级屏障环境,室温(22±1)℃,湿度为 40%~70%,12 h 明/暗光照周期,实验期间自由进食和饮水。实验动物环境使用许可证号:SYXK(苏)2018-0049。所有实

验操作符合科技部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》,并获得南京中医药大学动物伦理委员会批准(伦理批号:202110A048)。

1.3 主要药物与试剂

黄芪为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根;莪术为温郁金 *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling 的干燥根茎;重楼为云南重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunanensis* (Franch.) Hand. - Mazz. 的干燥根茎。上述药材饮片均购自江苏省中医院中药房,由南京中医药大学药学院陆免林教授鉴定。胎牛血清(美国 Gibco,批号:2115802RP),CCK-8 法细胞增殖检测试剂盒(凯基生物,批号:KGA317-1),异硫氰酸荧光素-葡聚糖(FITC-dextran,美国 Sigma,批号:FD40-100MG),细胞膜荧光探针 DiI 标记溶液(广州碧云天,批号:C1036),细胞膜荧光探针 DiO 标记溶液(广州碧云天,批号:C1038),戊巴比妥钠(美国 Sigma,批号:F20160721),GAPDH 抗体(美国 Affinity,批号:AF7021),RhoA 抗体(美国 Affinity,批号:AF6352),ROCK 抗体(美国 Affinity,批号:AF7016),ZO-1 抗体(武汉三鹰,批号:21773-1-AP),FITC 标记山羊抗兔 IgG(武汉三鹰,批号:SA0003-2)。

1.4 主要仪器

超净工作台(中国苏州净化,SW-CJ-1FD),CO₂ 培养箱(美国 Thermo,BB150),Count star 细胞计数仪(上海睿钰生物科技,IC1000),荧光酶标仪(瑞士 Tecan,Infinite M1000 Pro),荧光倒置显微镜摄像系统(德国 Leica,ebq 100-04),超高分辨率激光共聚焦显微镜(德国 Leica,SP8 STED 3X),垂直电泳槽(上海天能科技,VE-180),凝胶成像系统(上海天能科技,5300)。

2 方法

2.1 中药水提液制备

根据课题组前期研究^[11]和临床使用经验,选用黄芪、莪术、重楼药物用量比例为 4:2:3。药物浸泡 0.5 h 后,加 10 倍量的纯水煮沸回流提取 2 次,每次 1 h,并用挥发油测定器收集莪术油。趁热过滤后合并 2 次滤液。旋转蒸发浓缩药液后,加入莪术油合并药液,定容至药液浓度为 1 g·mL⁻¹ 即为黄芪-莪术-重楼配伍高剂量组药液,中、低剂量组按照 1:1、1:3 的比例用纯水进行稀释,置于 4℃ 保存。

2.2 含药血清制备

SPF级雄性SD大鼠32只,分为黄芪-莪术-重楼配伍低剂量组($2.1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、中剂量组($4.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、高剂量组($8.4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)以及空白对照组(生理盐水)。灌胃给药,每日1次,连续7d,末次给药1h后腹主动脉采血。血液静置2h后于离心机中 $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10min。取上层血清,将同组各血清混合,于 $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中灭活30min,使用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤灭菌后移入无菌离心管中,置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.3 HUVEC-HCT116共培养模型体系构建与分组

取对数生长期的HUVEC细胞和HCT116细胞,胰酶消化制成单细胞悬液,以1:1的比例分别接种在Transwell小室的上室和下室中,构建HUVEC-HCT116共培养体系,并于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\%\text{ CO}_2$ 细胞培养箱中静置培养。HUVEC-HCT116共培养体系构建后,实验分为共培养模型组、黄芪-莪术-重楼配伍低剂量组、黄芪-莪术-重楼配伍中剂量组、黄芪-莪术-重楼配伍高剂量组,另设HUVEC细胞单独培养为单培养对照组。

2.4 细胞增殖实验

将对数生长期的HUVEC细胞接种于96孔板,根据分组,分别给予10%的空白对照血清以及10%的低、中、高剂量黄芪-莪术-重楼配伍含药血清,培养箱中继续培养。于24、48h后各取出一块96孔板检测,每孔加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ CCK-8 孵育1h后,酶标仪于 450 nm 波长处测定每孔的吸光度(OD)值并计算细胞相对增殖率。细胞相对增殖率 = $\text{OD}_{\text{含药血清}} / \text{OD}_{\text{空白对照血清}} \times 100\%$ 。

2.5 单层血管内皮通透性实验

根据分组,依次在HUVEC-HCT116共培养体系中加入10%的空白对照血清以及10%的低、中、高剂量黄芪-莪术-重楼配伍含药血清,单培养对照组给予10%的空白对照血清,培养箱中继续培养48h。各组上、下室更换等体积无血清培养基后,在上室中加入 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ FITC-dextran, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育30min。30min后分别取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 各组Transwell下室培养基,荧光酶标仪检测吸收波长为 480 nm 、发射波长为 520 nm 的各组荧光强度。以FITC-dextran荧光强度来反映单层血管内皮通透性。

2.6 跨血管内皮迁移实验

取对数生长期的HUVEC细胞,用DiO细胞膜

荧光探针工作溶液进行染色,胰酶消化后制备成单细胞悬液,铺于Transwell小室($8.0\text{ }\mu\text{m}$)中,并取对数生长期的HCT116细胞铺于下室构建共培养体系,另设下室不含HCT116细胞的HUVEC单培养组作为单培养对照组。待HUVEC单培养组细胞形成致密单层后,将Transwell小室移至新的24孔板中。取对数生长期的HCT116细胞,用DiI细胞膜荧光探针工作溶液进行染色,胰酶消化后,按照每孔 3×10^4 个加入含HUVEC单层的Transwell上室中,并根据分组依次加入10%的空白对照血清以及10%的低、中、高剂量黄芪-莪术-重楼配伍含药血清, HUVEC单培养组加入10%的空白对照血清。下室均加入含20%胎牛血清的RPMI 1640培养基。培养箱中静置培养32h,荧光显微镜观察拍摄迁移细胞数量。

2.7 免疫荧光实验

根据分组,依次在HUVEC-HCT116共培养体系中加入10%的空白对照血清以及10%的低、中、高剂量黄芪-莪术-重楼配伍含药血清,单培养组给予10%的空白对照血清,48h后从培养箱中取出。4%多聚甲醛室温固定15min,0.25% Triton透膜15min,再用5%BSA封闭液封闭30min。PBS洗涤后,加入一抗(ZO-1 1:100) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。加入FITC标记的山羊抗兔二抗(1:500)室温孵育1h, PBS洗涤后,DAPI染核,超高分辨率激光共聚焦显微镜观察拍照,采用Image J软件进行荧光强度分析。

2.8 Western blot实验

取出分组给药48h后的HUVEC-HCT116共培养体系,预冷PBS洗涤HUVEC细胞,加细胞裂解液裂解细胞后,离心收集蛋白。BCA法蛋白定量后,加入蛋白上样缓冲液, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、10min加热变性, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。SDS-PAGE凝胶电泳、转膜,5%BSA室温封闭2h。封闭后加入一抗(RhoA、ROCK、ZO-1 1:500, GAPDH 1:2000), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。室温孵育HRP偶联的二抗(1:1000)1h后, ECL显色。采用Image J软件进行蛋白条带灰度值分析。

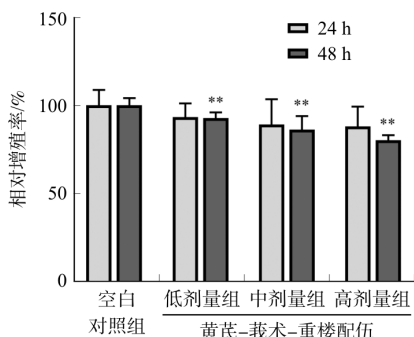
2.9 统计学方法

使用SPSS 26.0软件进行统计分析,计量资料均符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较方差齐性采用LSD-t法,方差不齐采用Dunnnett T_3 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 黄芪-莪术-重楼配伍对 HUVEC 细胞增殖的影响

与空白对照组相比,给药 24 h 后黄芪-莪术-重楼配伍各剂量含药血清均可抑制 HUVEC 细胞的增殖,但差异无统计学意义。给药 48 h 后,黄芪-莪术-重楼配伍各剂量含药血清均可抑制 HUVEC 增殖,差异有统计学意义($P < 0.01$),且呈现剂量依赖性。黄芪-莪术-重楼配伍各剂量组 HUVEC 的相对增殖率均在 80% 以上,表明黄芪-莪术-重楼配伍虽可抑制 HUVEC 的增殖但对其增殖活性的影响较弱。结果见图 1。

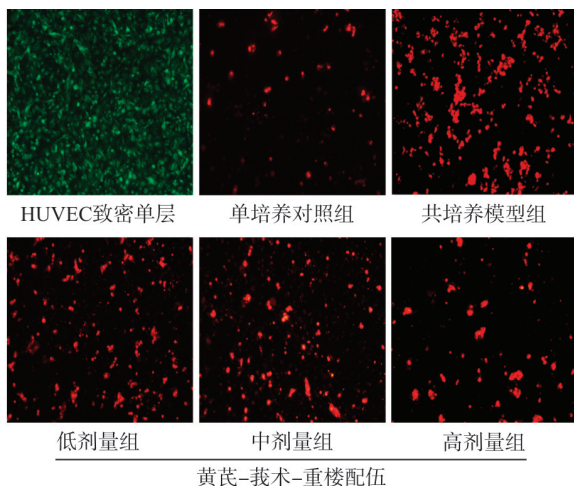


注:与空白对照组相比,** $P < 0.01$ 。

图 1 黄芪-莪术-重楼配伍对 HUVEC 细胞增殖的影响
Fig. 1 Effect of Huangqi-Ezhu-Chonglou combination on the proliferation of HUVECs

3.2 黄芪-莪术-重楼配伍对单层 HUVEC 细胞通透性的影响

共培养模型组的荧光强度较单培养对照组明显



注:绿色荧光为 HUVEC 致密单层;红色荧光为跨内皮迁移的 HCT116;与单培养对照组相比,** $P < 0.01$;与共培养模型组相比,# $P < 0.05$,### $P < 0.01$ 。

图 3 黄芪-莪术-重楼配伍对 HCT116 细胞跨血管内皮迁移的影响

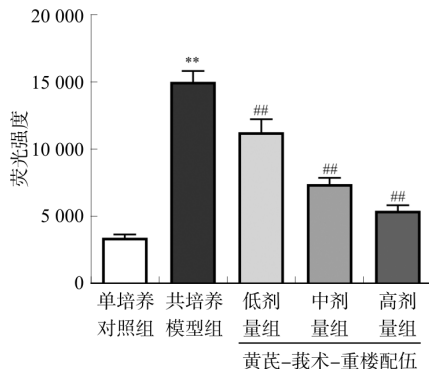
Fig. 3 Effect of Huangqi-Ezhu-Chonglou combination on transvascular endothelial migration of HCT116 cells

3.4 黄芪-莪术-重楼配伍对 HUVEC 细胞 ZO-1 表达的影响

增加($P < 0.01$),表明 HCT116 与 HUVEC 共培养后,会破坏 HUVEC 单层通透性,促进 FITC-dextran 的渗出;与共培养模型组相比,黄芪-莪术-重楼配伍各剂量组荧光强度表达明显减弱($P < 0.01$),FITC-dextran 的渗出明显减少,受损 HUVEC 单层的通透性明显降低,且呈剂量依赖性。结果见图 2。

3.3 黄芪-莪术-重楼配伍对结肠癌 HCT116 细胞跨血管内皮迁移的影响

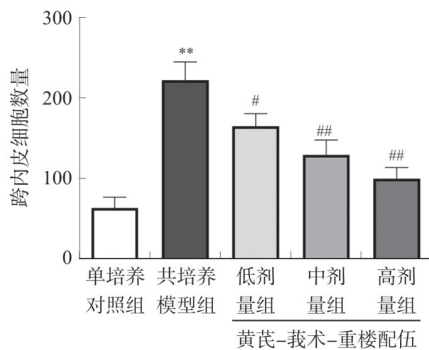
与单培养对照组相比,共培养模型组跨越单层血管内皮的 HCT116 数量明显增多($P < 0.01$);黄芪-莪术-重楼配伍各剂量组跨越单层血管内皮的 HCT116 数量较共培养模型组均显著减少($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果见图 3。



注:与单培养对照组相比,** $P < 0.01$;与共培养模型组相比,### $P < 0.01$ 。

图 2 黄芪-莪术-重楼配伍对单层 HUVEC 细胞通透性的影响

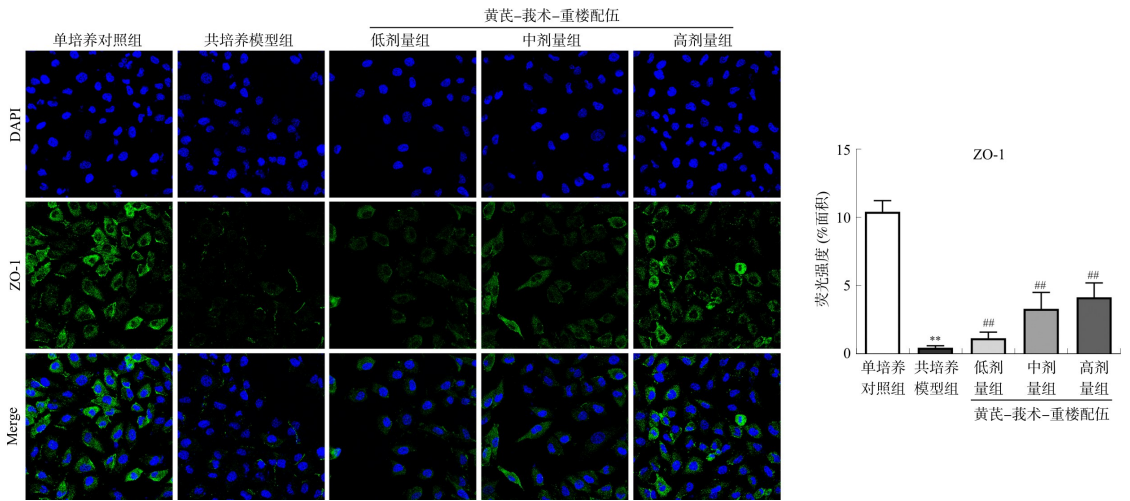
Fig. 2 Effect of Huangqi-Ezhu-Chonglou combination on permeability of monolayer HUVECs



3.4 黄芪-莪术-重楼配伍对 HUVEC 细胞 ZO-1 表达的影响

免疫荧光结果显示,紧密连接蛋白 ZO-1 主要集中在 HUVEC 细胞膜上表达。与单培养对照组相比,共培养模型组 ZO-1 荧光强度较弱且呈断点状分布,蛋白表达量明显减少($P<0.01$);黄芪-莪术-

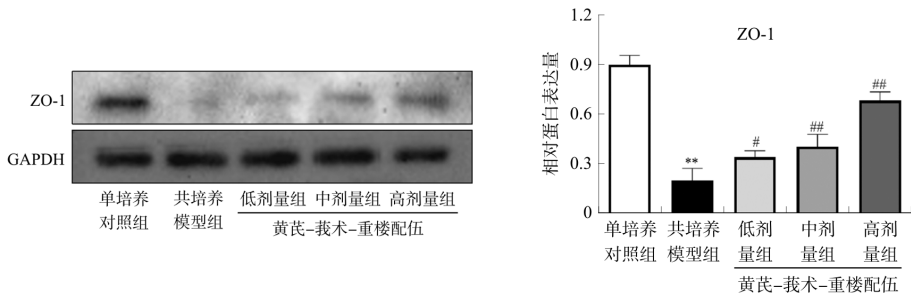
重楼配伍各剂量组 ZO-1 荧光强度较共培养模型组显著增强($P<0.01$),其分布也较为连续,未出现明显断点,蛋白表达量明显增加($P<0.05, P<0.01$)。结果见图 4~5。



注:与单培养对照组相比, ** $P<0.01$;与共培养模型组相比,### $P<0.01$ 。

图 4 免疫荧光法检测黄芪-莪术-重楼配伍对 HUVEC 细胞 ZO-1 表达的影响

Fig. 4 Effect of Huangqi-Ezhu-Chonglou combination on the expression of ZO-1 in HUVECs by immunofluorescence assay



注:与单培养对照组相比, ** $P<0.01$;与共培养模型组相比, # $P<0.05$, ### $P<0.01$ 。

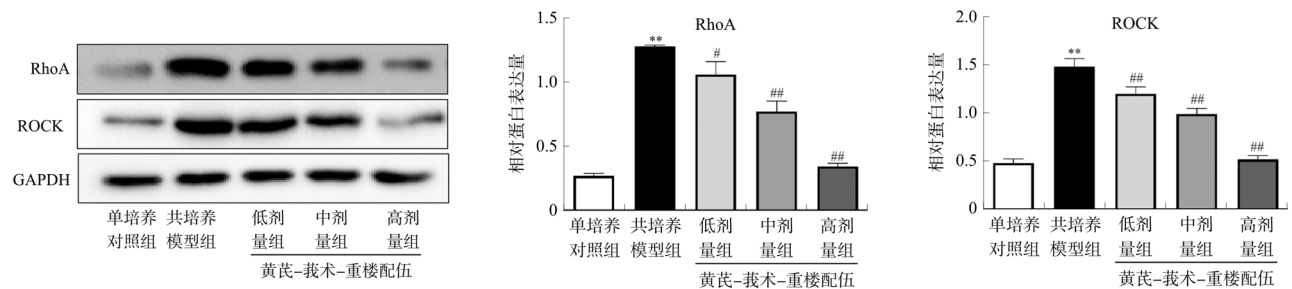
图 5 各组 HUVEC 细胞中 ZO-1 蛋白表达的比较

Fig. 5 Comparison of ZO-1 protein expression in HUVECs in each group

3.5 黄芪-莪术-重楼配伍对 RhoA、ROCK 蛋白表达的影响

ROCK 蛋白表达显著增加($P<0.01$);与共培养模型组相比,黄芪-莪术-重楼配伍各剂量组 RhoA、ROCK 蛋白表达显著降低($P<0.05, P<0.01$)。见图 6。

与单培养对照组相比,共培养模型组 RhoA、



注:与单培养对照组相比, ** $P<0.01$;与共培养模型组相比, # $P<0.05$, ### $P<0.01$ 。

图 6 各组 HUVEC 细胞中 RhoA、ROCK 蛋白表达的比较

Fig. 6 Comparison of RhoA and ROCK protein expressions in HUVECs in each group

4 讨论

研究表明,维护血管间紧密连接和保持血管完整性是诱导肿瘤血管正常化、减少转移的重要策略^[15]。现代药理研究表明,黄芪、莪术、重楼均可抑制肿瘤细胞增殖、转移,抑制肿瘤血管新生以及修复内皮损伤、保护血管^[16-20]。三者配伍使用益气活血解毒,一能解毒散邪,杀伤肿瘤细胞;二能荣养血脉,修复血管内层与整体形态,维护血管屏障。三药协同增效,扶正祛邪、标本兼顾,共同发挥抑制肿瘤转移的作用。课题组前期研究也发现黄芪-莪术配伍可抑制结肠癌与血管内皮的黏附进而抑制结肠癌血行转移。黄芪与莪术的主要成分黄芪多糖与姜黄素联用能减少血管分支和出芽,改善肿瘤血管的形态结构,诱导肿瘤血管正常化,抑制血管过度渗漏进而抑制肿瘤的发展^[21];基于前期研究基础,本研究发现黄芪-莪术-重楼配伍能改善 HCT116 细胞引起的血管内皮损伤,维护血管屏障的通透性,并抑制 HCT116 细胞的跨内皮迁移。

ZO-1 是紧密连接的主要组成,连接 Occludin 与肌动蛋白骨架纤维(F-actin),决定着紧密连接的结构和功能^[22],与内皮细胞通透性的关系最为密切,常作为细胞间屏障功能的主要评价指标^[23]。研究表明,肿瘤细胞可以分泌基质金属蛋白酶(MMPs)、血管内皮生长因子(VEGF)等多种物质破坏 ZO-1,促进紧密连接的解离,增加细胞间空隙与血管通透性,从而有利于肿瘤细胞的血行转移^[24-25]。Zhang 等^[26]研究发现麦冬皂苷 C1 能通过增强血管内皮 ZO-1 的表达,维护血管的完整性,阻止非小细胞肺癌渗出血管,进而抑制非小细胞肺癌的转移。魏殿芳^[27]研究也表明阿司匹林上调紧密连接蛋白 ZO-1 和 Occludin 后,能够降低血脑屏障的通透性,抑制肺癌的脑转移。前期研究发现,含黄芪-莪术-重楼配伍的芪术抗癌方抑制 MMP-9、VEGF 等的表达后,可以抑制结肠癌原位移植瘤的肝转移^[28]。本实验使用不同剂量的黄芪-莪术-重楼配伍含药血清处理 HUVEC-HCT116 共培养体系后发现,黄芪-莪术-重楼配伍能够上调 HUVEC-HCT116 共培养体系中 HUVEC 细胞 ZO-1 的表达,提示黄芪-莪术-重楼配伍可能通过调控 ZO-1 蛋白,维护血管屏障功能,发挥抑制 HCT116 细胞跨内皮迁移的作用。

RhoA/ROCK 是调控内皮细胞屏障功能的重要信号通路^[29],紧密连接的结构与功能以及紧密连接

蛋白的分布与表达也受 RhoA/ROCK 的调控。肿瘤细胞分泌相关细胞因子激活 RhoA 及其效应分子 ROCK 后,能够促进 ZO-1 的磷酸化,导致紧密连接解体、血管通透性增加^[30-31]。而使用 ROCK 抑制剂抑制 RhoA/ROCK 通路的激活则可以改善血管屏障功能的损伤,抑制肿瘤转移^[32-33]。本研究也发现, HUVEC 与 HCT116 共培养后, RhoA、ROCK 蛋白的表达显著增加,提示 HCT116 细胞可能通过激活 HUVEC 细胞 RhoA/ROCK 通路抑制 ZO-1 蛋白的表达,破坏血管内皮间的紧密连接,进行跨内皮迁移。黄芪-莪术-重楼配伍可能通过抑制 RhoA/ROCK 通路的激活,增强 ZO-1 蛋白的表达,维持血管的通透性与屏障功能,从而发挥抑制结肠癌 HCT116 细胞跨内皮迁移的作用。

本研究通过体外构建 HUVEC-HCT116 共培养体系,模拟结肠癌细胞穿越血管内皮的相关过程,探究黄芪-莪术-重楼配伍对结肠癌跨血管内皮血行转移的影响。但体外共培养模型难以完全反映肿瘤跨越血管内皮实现血行转移的复杂过程,后续我们将通过体内实验进一步研究黄芪-莪术-重楼配伍对肿瘤血行转移的影响,为补气活血解毒法抗肿瘤转移的临床应用提供依据。

参考文献:

- [1] TOMITA T, KATO M, HIRATSUKA S. Regulation of vascular permeability in cancer metastasis [J]. *Cancer Sci*, 2021, 112(8): 2966-2974.
- [2] 单云龙, 汪思亮, 祝娉婷, 等. 抑制肿瘤转移的新策略: 靶向肿瘤细胞的外渗过程 [J]. *肿瘤*, 2014, 34(8): 754-757. SHAN YL, WANG SL, ZHU PT, et al. The new therapeutic strategy for inhibition of cancer metastasis: Targeting extravasation of cancer cells [J]. *Tumor*, 2014, 34(8): 754-757.
- [3] CONG X, KONG W. Endothelial tight junctions and their regulatory signaling pathways in vascular homeostasis and disease [J]. *Cell Signal*, 2020, 66: 109485.
- [4] ZIHNI C, MILLS C, MATTER K, et al. Tight junctions: From simple barriers to multifunctional molecular gates [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17(9): 564-580.
- [5] LIN YN, ZHANG C, XIANG PP, et al. Exosomes derived from HeLa cells break down vascular integrity by triggering endoplasmic Reticulum stress in endothelial cells [J]. *J Extracell Vesicles*, 2020, 9(1): 1722385.
- [6] LI RR, QI YN, JIANG M, et al. Primary tumor-secreted VEGF induces vascular hyperpermeability in premetastatic lung via the occludin phosphorylation/ubiquitination pathway [J]. *Mol Carcinog*, 2019, 58(12): 2316-2326.
- [7] HARATI R, HAFEZI S, MABONDZO A, et al. Silencing miR-202-3p increases MMP-1 and promotes a brain invasive phenotype in metastatic breast cancer cells [J]. *PLoS ONE*, 2020, 15(10): e0239292.
- [8] 张荣嘎. 芪术蚤复方对乳腺癌模型小鼠的抑制作用及机制研究 [J]. *四川中医*, 2018, 36(12): 53-56. ZHANG RG. Effect and mechanism of Qizhuzao formulation on breast cancer model [J]. *J Sichuan Tradit Chin Med*, 2018, 36(12): 53-56.
- [9] 曾普华, 邵文辉, 潘敏求, 等. 益气化痰解毒方对人肝癌裸鼠 HepG2 移植瘤 MVD、HIF1 α 、VEGF/KDR 表达的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2014, 32(7): 1563-1565.

- ZENG PH, GAO WH, PAN MQ, et al. Effect of prescription of strengthening qi and clearing poison and toxin on expressions of MVD, HIF1 α and VEGF/KDR on HepG2 hepatocellular carcinoma nude mice transplantation tumor [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2014, 32(7): 1563-1565.
- [10] 彭巍, 唐建清, 龚辉, 等. 健脾消瘤方治疗对大肠肝癌转移患者临床疗效、血管生成因子及 QLQ-c30 评分的影响 [J]. 四川中医, 2021, 39(8): 76-79.
- PENG W, TANG JQ, GONG H, et al. Effect of Jianpi Xiaoi Recipe on clinical efficacy, angiogenesis factors and QLQ-c30 score for patients with liver metastases of colorectal cancer [J]. J Sichuan Tradit Chin Med, 2021, 39(8): 76-79.
- [11] 关汉卿, 刘甜甜, 梁研, 等. 黄芪-莪术-重楼配伍对结肠癌原位移植瘤模型裸鼠肿瘤及癌旁组织中侵袭性仍足相关蛋白表达的影响 [J]. 中医杂志, 2021, 62(16): 1427-1433.
- GUAN HQ, LIU TT, LIANG Y, et al. Effect of Huangqi-Ezhu-Chonglou combination on the expression of invadopodia-related proteins in the tumors and paracancerous tissues of nude mice with colon cancer-derived orthotopic transplant model [J]. J Tradit Chin Med, 2021, 62(16): 1427-1433.
- [12] 吴幸冬, 唐德才. 黄芪配伍莪术对小鼠结肠癌细胞 CT26 黏附和迁移能力的影响 [J]. 中医杂志, 2020, 61(13): 1176-1183.
- WU XD, TANG DC. Effects of compatibility of *Radix astragalii* seu *hedysa* and *Rhizoma curcumae* on adhesion and migration ability of colon cancer cell CT26 in mice [J]. J Tradit Chin Med, 2020, 61(13): 1176-1183.
- [13] 张硕, 唐德才, 谭喜莹, 等. 黄芪-莪术配伍对斑马鱼血管生成的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(8): 179-182, 281-283.
- ZHANG S, TANG DC, TAN XY, et al. Effect of angiogenesis by compatibility of Huangqi (*Radix astragalii*) and ezhu (*Curcuma*) in zebrafish model [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2020, 38(8): 179-182, 281-283.
- [14] 骆殊, 尹刚, 唐德才. 黄芪甲苷与姜黄素配伍对大鼠肝癌裸鼠原位移植瘤新生血管生成的影响 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2016, 23(S1): 12-13.
- LUO S, YIN G, TANG DC. Effect of astragaloside IV combined with curcumin on angiogenesis of orthotopic transplanted human hepatocellular carcinoma in nude mice [J]. Chin J Cancer Prev Treat, 2016, 23(S1): 12-13.
- [15] AGRAWAL V, MAHARJAN S, KIM K, et al. Direct endothelial junction restoration results in significant tumor vascular normalization and metastasis inhibition in mice [J]. Oncotarget, 2014, 5(9): 2761-2777.
- [16] 刘珂, 邱炳勋, 邹利, 等. 黄芪及其有效成分对内皮细胞及其连接的保护作用及机制研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(21): 3912-3917.
- LIU K, QIU BX, ZOU L, et al. Research progress in mechanism of Astragal Radix and its active components on endothelial cells and their junction [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2016, 47(21): 3912-3917.
- [17] 许成勇, 徐冉, 王毓国, 等. 黄芪-莪术配伍对 Lewis 肺癌生长转移及血管生成的抑制作用及机制研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2018, 13(5): 596-598, 602.
- XU CY, XU R, WANG YG, et al. Inhibitive effects and mechanism of the compatibility of astragalii radix and curcumae rhizome on the growth, metastasis and angiogenesis in Lewis lung carcinoma [J]. World J Integr Tradit West Med, 2018, 13(5): 596-598, 602.
- [18] 冒慧敏. 莪术成分 Zedoarndiol 对血管平滑肌细胞增殖和内皮细胞损伤的影响 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- MAO HM. Effects of Zedoarndiol on proliferation of vascular smooth muscle cells and injury of endothelial cells [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2017.
- [19] 赵保胜, 朱寅荻, 马勇, 等. 中药重楼研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11): 267-270.
- ZHAO BS, ZHU YD, MA Y, et al. Advances in studies on paridis rhizoma [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2011, 17(11): 267-270.
- [20] 胡静, 钱晓萍, 刘宝瑞, 等. 重楼醇提物抗鼠 H22 移植瘤血管生成的体内实验研究 [J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18(10): 1886-1889.
- HU J, QIAN XP, LIU BR, et al. Experimental study on inhibiting angiogenesis in H22 hepatoma transplantation tumor mice by alcohol extract of paridis [J]. J Mod Oncol, 2010, 18(10): 1886-1889.
- [21] TANG DC, ZHANG S, SHI XX, et al. Combination of astragalii polysaccharide and curcumin improves the morphological structure of tumor vessels and induces tumor vascular normalization to inhibit the growth of hepatocellular carcinoma [J]. Integr Cancer Ther, 2019, 18: 1534735418824408.
- [22] TORNAVACA O, CHIA MH, DUFTON N, et al. ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell-cell tension, angiogenesis, and barrier formation [J]. J Cell Biol, 2015, 208(6): 821-838.
- [23] 武懿, 晏霞霞. 紧密连接对肺通透性影响的研究进展 [J]. 基础医学与临床, 2021, 41(2): 272-276.
- WU X, YAN FX. Research progress on the effects of tight junction on lung permeability [J]. Basic Clin Med, 2021, 41(2): 272-276.
- [24] FENG SR, CEN JN, HUANG YH, et al. Matrix metalloproteinase-2 and -9 secreted by leukemic cells increase the permeability of blood-brain barrier by disrupting tight junction proteins [J]. PLoS ONE, 2011, 6(8): e20599.
- [25] JIANG M, QIN CY, HAN MY. Primary breast cancer induces pulmonary vascular hyperpermeability and promotes metastasis via the VEGF-PKC pathway [J]. Mol Carcinog, 2016, 55(6): 1087-1095.
- [26] ZHANG YY, ZHAO YZ, WU Y, et al. Ophiopogon saponin C1 inhibits lung tumors by stabilizing endothelium permeability via inhibition of PKC δ [J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(3): 396-407.
- [27] 魏殿芳. Aspirin 减少肺癌细胞释放 TNF- α 对体外肺癌脑转移的影响及其机制 [D]. 唐山: 华北理工大学, 2020.
- WEI DF. Effect and mechanism of Aspirin reducing TNF- α release from lung cancer cells on lung cancer brain metastasis *in vitro* [D]. Tangshan: North China University of Science and Technology, 2020.
- [28] 杜相宇. 以 β -catenin 为中心研究芪术抗癌方联合五氟尿嘧啶对 CT26.WT 原位移植瘤小鼠肝转移的影响 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2020.
- DU XY. Effect of Qizhu anticancer formula combined with pentafluorouracil on liver metastasis of CT26.WT orthotopic transplanted tumor mice based on β -catenin [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2020.
- [29] GONZÁLEZ-MARISCAL L, TAPIA R, CHAMORRO D. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways [J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1778(3): 729-756.
- [30] 赵晓云. Flt-1 在小细胞肺癌细胞穿过人脑微血管内皮细胞单层中的作用及机制研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2008.
- ZHAO XY. Involvement of flt-1 in small cell lung cancer cells migration through human brain microvascular endothelial cells [D]. Shenyang: China Medical University, 2008.
- [31] 蔡倩, 郭慕真, 朱晨笛, 等. p115RhoGEF/RhoA 信号通路在高糖致脑微血管内皮细胞通透性异常中的作用 [J]. 营养学报, 2019, 41(2): 154-162.
- CAI Q, GUO MZ, ZHU CD, et al. Role of p115RhoGEF/RhoA signaling pathway in permeability of brain microvascular endothelial cells exposed to high glucose [J]. Acta Nutr Sin, 2019, 41(2): 154-162.
- [32] LI B, ZHAO WD, TAN ZM, et al. Involvement of Rho/ROCK signalling in small cell lung cancer migration through human brain microvascular endothelial cells [J]. FEBS Lett, 2006, 580(17): 4252-4260.
- [33] 赵晓云, 李波, 曹立业, 等. 小细胞肺癌细胞诱发人脑微血管内皮细胞紧密连接的开放 [J]. 解剖科学进展, 2009, 15(2): 183-187, 191.
- ZHAO XY, LI B, CAO LY, et al. Opening of tight junction of human brain microvascular endothelial cells induced by small cell lung cancer cells [J]. Prog Anat Sci, 2009, 15(2): 183-187, 191.

(编辑: 杨敏敏)