

# 槐耳清膏对结肠癌细胞生长和迁移的影响及其作用机制

关铁军 刘岩 杨玉波 王斌 齐晓红 陈峰 李慧

**【摘要】** 目的 中药槐耳清膏具有抗肿瘤效应,但其对结肠癌的作用及机制尚不清楚。本研究旨在探讨槐耳清膏对人结肠癌细胞生长和迁移的影响及作用机制。方法 体外培养人结肠癌细胞系 HCT116,采用 MTT 法检测槐耳清膏对肿瘤细胞生长的抑制作用;采用 Boyden 趋化小室检测槐耳清膏对肿瘤细胞迁移能力的影响;采用荧光定量 PCR 法检测药物对 MMP-9 表达的影响;应用流式细胞技术检测药物对细胞凋亡和细胞周期的影响。结果 槐耳清膏对 HCT116 细胞生长有明显的抑制作用,该抑制作用具有药物剂量和时间依赖性。与细胞共培养 96 小时后,槐耳清膏的抑制作用最强;与对照组相比,10 mg/mL、20 mg/mL 和 30 mg/mL 槐耳清膏对肿瘤细胞的抑制作用分别为 25% ( $P=0.025$ )、42% ( $P=0.032$ ) 和 67% ( $P=0.018$ )。槐耳清膏能明显抑制肿瘤细胞的迁移,11 mg/mL 药物的抑制率为 63% ( $P=0.01$ );槐耳清膏(8mg/mL 和 11mg/mL) 处理后的肿瘤细胞中 MMP-9 的表达量下降( $2.73 \pm 0.32$  vs  $4.8 \pm 0.36$ ,  $P=0.02$ ;  $1.46 \pm 0.25$  vs  $4.8 \pm 0.36$ ,  $P=0.004$ );槐耳清膏可阻滞细胞停留在 S 期,但对细胞凋亡无明显影响。结论 体外试验证实槐耳清膏对结肠癌细胞的生长及迁移能力具有抑制作用,其作用机制可能是阻滞细胞停留在 S 期和下调 MMP-9 的表达。

**【关键词】** 结肠肿瘤; 细胞增殖; 细胞运动; 细胞周期; 细胞凋亡

**Inhibitory effects of Extract of Fungi of Huaier on human colon cancer cells** GUAN Tie-jun\*, LIU Yan, YANG Yu-bo, WANG Bin, QI Xiao-hong, CHEN Feng, LI Hui. \* Department of Surgical Oncology, Jilin Cancer Hospital, Changchun 130012, China  
Corresponding author: LI Hui, Email: 181966963@qq.com

**【Abstract】 Objective** Extract of Fungi of Huaier (EFH), a traditional Chinese medicine, has been shown to possess anti-tumor effect. However, the role and mechanisms of EFH in colon cancer are still unknown. This study aimed to explore effects of EFH on colon cancer cell growth and migration. **Methods** HCT116 cells were cultured in vitro and treated with EFH. MTT method was used to detect growth of HCT116; Boyden chamber was used to test cell migration; Real-time PCR was conducted to analyze the expression of MMP-9; Flow cytometry was applied to detect cell cycle and apoptosis. **Results** Cell proliferation assay showed EFH significantly inhibited tumor cell growth compared with the control and inhibition effects were dose and time-dependent. Co-culture with tumor cells for 96 hours, EFH showed the strongest inhibitory effects compared with the control and the inhibitory effects of 10mg/mL, 20mg/mL and 30mg/mL of EFH were 25% ( $P=0.025$ ), 42% ( $P=0.032$ ) and 67% ( $P=0.018$ ) respectively. Moreover EFH (10mg/mL) significantly inhibited the migration of tumor cells with inhibitory rate up to 63% ( $P=0.01$ ). Expression of MMP-9 in tumor cells treated by EFH (8mg/mL and 11mg/mL) was decreased compared to control ( $2.73 \pm 0.32$  vs  $4.8 \pm 0.36$ ,  $P=0.028$ ;  $1.46 \pm 0.25$  vs  $4.8 \pm 0.36$ ,  $P=0.004$ ). In addition, EFH blocked cell cycle progression without triggering cell apoptosis. **Conclusions** EFH inhibits colon cancer cell proliferation and migration, and is likely due to down regulation of MMP-9 expression and blockage of cell cycle in S phase.

**【Key words】** Colonic Neoplasms; Cell Proliferation; Cell Movement; Cell Cycle; Apoptosis

结肠癌是消化道常见的恶性肿瘤,发病率呈逐

年上升趋势<sup>[1]</sup>。目前结肠癌的化疗方案仍是以 5-氟尿嘧啶为基础的联合化疗,这种化疗副作用大,患者耐受性差。虽然靶向药物的应用等改善了结肠癌的预后,但是结肠癌患者死亡率仍居高不下。因此,探寻新的结肠癌治疗手段具有重要的临床意义。槐耳清膏是从槐耳中提取出来的一种中药,研究表明,

DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-3224.2015.03.11

作者单位:130012 长春,吉林省肿瘤医院腹部肿瘤外科(关铁军、杨玉波、王斌、陈峰),血液肿瘤病重点实验室(李慧、刘岩),放疗科(齐晓红)

通讯作者:李慧,Email:181966963@qq.com

槐耳清膏具有抗肿瘤效应,目前该药已应用于乳腺癌、肝癌等的临床治疗<sup>[2-5]</sup>,但其在结直肠癌中的作用及其确切的作用机制仍不清楚。本研究以结肠癌细胞株 HCT116 为研究对象,采用体外试验探讨槐耳清膏对人结肠癌细胞的生长和迁移的影响及其作用机制。

## 材料与方法

### 一、一般资料

人结肠癌细胞 HCT116 购自美国 ATCC 细胞库,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、RPMI-1640 培养液和胰酶购自美国 Hyclone 公司,0.22 μm 滤膜和 8 微米孔径 Borden Chamber 购自美国 CORNING 公司,槐耳清膏购自启东盖天力药业有限公司,采用 RPMI1640 培养液将其配置成 200 g/L 的储存液,0.22 μm 滤膜过滤除菌,-20℃ 冰箱中保存。四氮唑蓝(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) 和二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO) 购自美国 Sigma 公司,Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒和周期试剂盒购自美国 BD 公司,RNA 提取试剂盒、SYBR Green Realtime PCR Master Mix 试剂盒购自上海凯杰公司,高效逆转录试剂盒购自日本 ToYoBo 公司。Wellscan Mk3 酶标仪购自美国 Thermo 公司,DM3000 生物显微镜购自德国 Leica 公司,LightCycler 480 购自 Roche 公司。

### 二、方法

1. 细胞培养:采用 RPMI-1640(含 10% 灭活 FBS) 培养 HCT116 细胞,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱内培养,细胞达到 90% 覆盖率时进行细胞传代。

2. 细胞毒试验:将对数生长期 HCT116 细胞( $5 \times 10^3$ , 100 μL) 接种于 96 孔培养板,12 小时后去除培养液,每孔加入含槐耳清膏的培养液(200 μL),使药物终浓度分别达到 0.5、1、2、5、10、20、30、40 和 50 mg/mL,无药物组作为对照,每组设 3 试验复孔。培养细胞 36 小时后每孔加入 MTT(0.5% 20 μL),采用酶标仪在波长 570 nm 处测定吸光度(OD),按以下公式计算抑制率或 IC<sub>50</sub>: 细胞增殖抑制率 = (对照组 OD 值 - 实验组 OD 值) / 对照组 OD 值 × 100%。

3. 细胞增殖试验:采用胰酶消化对数生长期的 HCT116 细胞,将细胞( $4 \times 10^3$ , 200 μL) 加入培养板

中培养 5 小时,待细胞贴壁后,每孔加入含槐耳清膏的培养液(200 μL),使药物终浓度分别达到 5、10、20 和 30 mg/mL,每组设 3 试验复孔,在 24、48、72 和 96 小时后每孔加入 MTT,检测 OD 值,计算细胞增殖情况。

4. 细胞迁移试验:采用无血清培养基饥饿培养肿瘤细胞 12 小时,然后将培养液替换为含槐耳清膏的培养液(药物终浓度为 11 μg/mL) 并继续孵育 12 小时<sup>[6]</sup>。吸取 10 mg/ml 细胞外基质(extracellular matrix, ECM) 均匀涂抹在小室的下层<sup>[7]</sup>,试验前使用 PBS 37℃ 包被 Transwell chamber 2 小时,将细胞( $2 \times 10^4$ , 200 μL) 加入 Transwell 上室,400 μL 全血清加入下室,继续培养 6 小时后,用棉签拭去未发生迁移的细胞。采用 4% 多聚甲醛固定 chamber 10 min 后采用 0.05% 结晶紫染色 20 min。使用手术刀片将膜完整切下,随机取 3 个视野,显微镜下计数迁移细胞数并取其平均值。每试验组设 3 复孔并重复试验 3 次。

5. 荧光定量 PCR:收集槐耳清膏处理后的 HCT116 细胞(药物终浓度分别为 5、8 和 11 mg/mL) 并按照 Qiagen 试剂盒说明提取 RNA,按照 ToYoBo 高效反转录试剂盒说明合成 cDNA。由上海生物工程有限公司设计并合成引物,引物序列如下:β-actin 上游: TGAGCGGGCTACAGCTT; 下游: TCCTTAATGTCACGCACGATT; MMP-9 上游: TCAGGGAGACGCCCATTT; 下游: GGCAGGGTTTCCCATCAG。PCR 反应条件:95℃ 预变性 30 s,95℃ 变性 5 s,55℃ 退火 15 s,72℃ 延伸 45 s。共 40 个循环。计算目的基因 mRNA 的表达量与看家基因 β-actin 表达量的比值并分析加药组与对照组之间的差异。每组设 3 复孔,且重复试验 3 次。

6. 细胞凋亡试验:收集对数生长期细胞  $1 \times 10^6$  个接种于 6 孔板,每孔 2 ml 总体系,实验分为槐耳清膏组(终浓度为 11 mg/mL) 及对照组。培养 24 h 后收集细胞,加入 300 μL Binding Buffer 重悬细胞并加入 5 μL AnnexinV-FITC 混匀后,室温避光孵育 15 min,上机前 5 min 加入 5 μL PI,补加 200 μL 的 1 × Binding Buffer,于 1 h 内用流式细胞仪检测细胞凋亡率,重复试验 3 次。

7. 细胞周期试验:取对数生长期细胞  $2 \times 10^6$  个接种于 7.5cm 培养瓶中培养 24 小时,将细胞进行胰酶消化后取细胞沉淀,按照细胞周期试剂盒说明检测细胞周期。细胞沉淀中加入 RNase

(10 mg/mL 5 μL) 后室温放置 1 h ,然后加入 PI 染液(100 μg/mL) 室温避光染色 30 分钟 ,采用流式细胞仪检测细胞周期变化 ,重复试验 3 次。

### 三、统计学分法

计数资料两组间比较使用  $\chi^2$  检验 ,计量资料以 Mean  $\pm$  SD 表示 ,两组间均数比较采用 *t* 检验 ,多组均数比较采用单因素方差分析 ,采用 SPSS 17.0 统计学软件 ,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、槐耳清膏抑制人结肠癌 HCT116 细胞生长

1. 槐耳清膏对肿瘤细胞的生长抑制作用呈剂量依赖性: 文献报道 槐耳清膏具有抑制肝癌细胞生长的特性。为了研究槐耳清膏对结肠癌细胞的生物学作用 ,我们首先检测了该药对结肠癌细胞体外增殖的影响。采用 10 个浓度点的槐耳清膏(0.5、1、2、5、10、20、30、40 和 50 mg/mL ,无药物组作为对照) 与 HCT116 细胞共培养 72 小时 ,结果显示 ,槐耳清膏(5-50 mg/mL) 可抑制 HCT116 细胞体外增殖 ,该抑制作用具有药物剂量依赖性 ,随药物浓度增加而对细胞生长的抑制作用增强(图 1)。本研究证实槐耳清膏对 HCT116 细胞抑制的 IC<sub>50</sub> 为 11 mg/mL。

2. 槐耳清膏对肿瘤细胞生长抑制作用呈时间依赖性: 为了进一步验证槐耳清膏对 HCT116 细胞的生长抑制作用 ,我们采用 10、20 和 30 mg/ml 的槐耳清膏处理细胞 ,并分别在 24、48、72 和 96 小时检测药物的抑制作用。结果显示 ,不同浓度的槐耳清膏对细胞增殖的抑制作用均具有时间依赖性 ,96 小时药物的抑制作用最强 ,与对照组相比 ,10、20 和 30 mg/ml 的槐耳清膏对细胞的抑制作用分别为 25% 区(1.15  $\pm$  0.06 vs 0.87  $\pm$  0.12  $P = 0.025$ ) ,

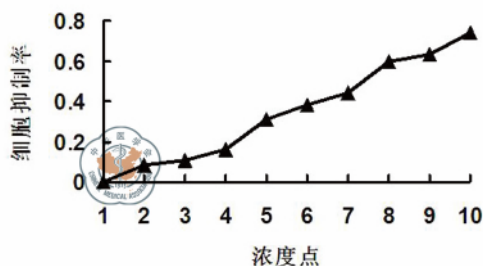
42%(1.15  $\pm$  0.06 vs 0.674  $\pm$  0.1  $P = 0.032$ ) 和 67%(1.15  $\pm$  0.06 vs 0.379  $\pm$  0.07  $P = 0.018$ ) ,见图 2。

### 二、槐耳清膏阻滞 HCT116 细胞周期但不影响细胞早期凋亡

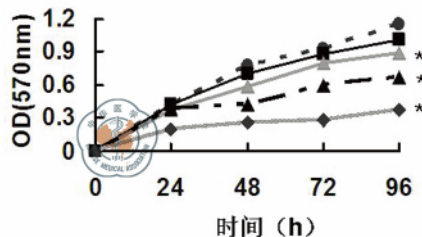
为了进一步探究槐耳清膏抑制 HCT116 细胞增殖的生物学机制 ,我们采用流式细胞技术检测了药物处理后 HCT116 细胞周期及细胞凋亡。槐耳清膏(11 mg/mL) 处理 HCT116 细胞 48 小时后 ,与对照组相比 ,细胞早期凋亡率为(3.21  $\pm$  1.57) % vs (4.11  $\pm$  1.21) % ,两组之间差异无统计学意义( $P = 0.59$  ,图 3)。细胞周期结果显示 ,与对照组相比 ,槐耳清膏(11mg/mL) 处理组细胞中 S 期所占比例增加(22.96%  $\pm$  4.67 vs 66.30%  $\pm$  7.03) ,两组之间具有显著的统计学差异( $P = 0.005$  ,图 4)。该试验结果提示槐耳清膏可能通过阻滞细胞周期停留在 S 期而抑制 HCT116 细胞增殖 ,但不影响 HCT116 细胞凋亡。

### 三、槐耳清膏抑制 HCT116 细胞迁移能力并降低细胞中 MMP-9 基因表达

肿瘤细胞的迁移能力是影响肿瘤细胞向远处器官转移的重要因素之一。为了验证槐耳清膏是否影响结肠癌细胞迁移 ,我们采用 Boyden Chamber 细胞迁移试验进行了检测。结果证实 ,与对照组相比 ,槐耳清膏(11 mg/mL) 可以显著抑制 HCT116 细胞迁移(68  $\pm$  7.55 vs 25  $\pm$  4.93  $P = 0.01$ ) ,抑制率达 63%(图 5 ~ 6)。为了进一步研究导致该抑制作用的生物学机制 ,我们检测了药物处理后 HCT116 细胞中基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase 9 , MMP-9) 的表达水平。MMP-9 是 MMP 家族成员中最重要的一员 ,文献报道 MMP-9 能有效分解基底膜中 IV 型胶原蛋白 ,参与肿瘤细胞转移。本实验结果



①



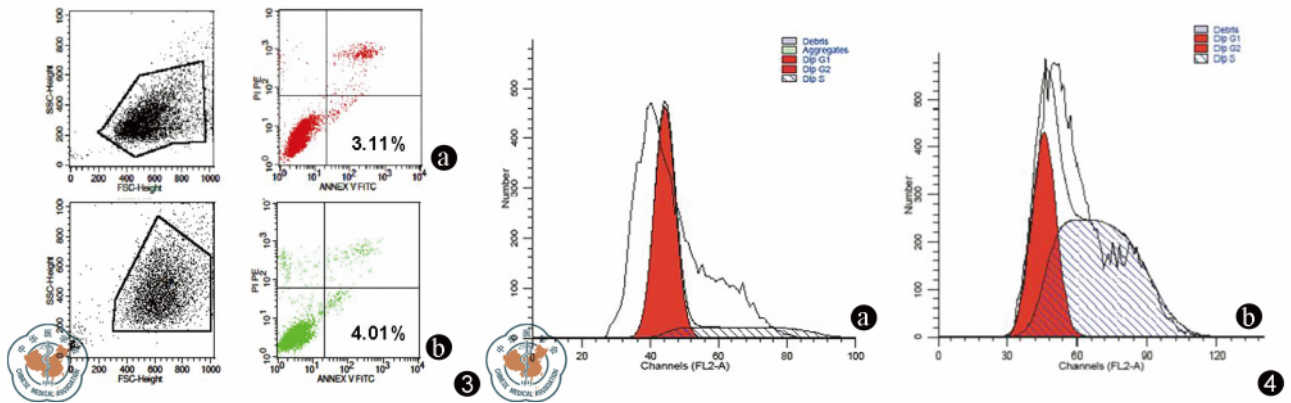
②

注: \* 为  $P < 0.05$

图 1 不同浓度的槐耳清膏对 HCT116 细胞的抑制作用曲线图; 图 2 槐耳清膏在不同时间点对 HCT116 细胞的抑制作用曲线图

显示 ,与对照组相比 ,槐耳清膏( 8 和 11 mg/mL) 处理后的 HCT116 细胞中 MMP-9 的表达量明显降低 ( 4.8 ± 0.36 vs 2.73 ± 0.32 ,*P* = 0.02; 4.8 ± 0.36 vs

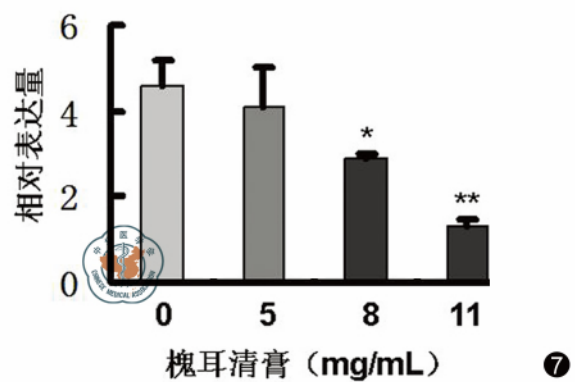
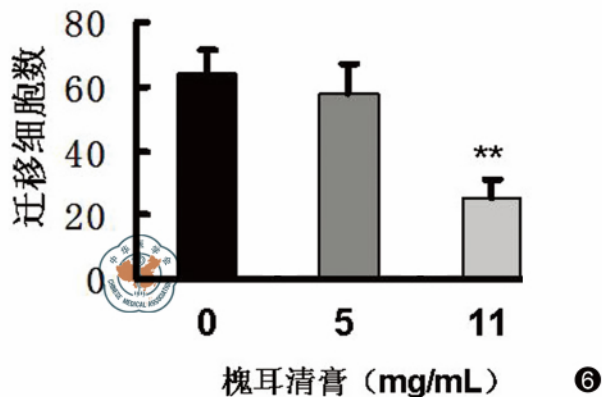
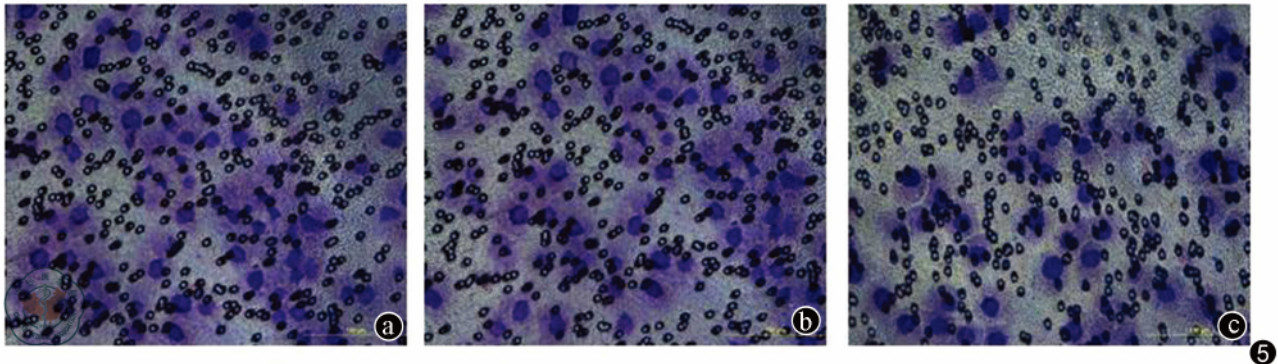
1.46 ± 0.25 ,*P* = 0.004) ,说明槐耳清膏可能通过下调 MMP-9 的表达从而抑制 HCT116 细胞的迁移能力( 图 7) 。



注: a 图为对照组 b 图为槐耳清膏( 11mg/mL)

图 3 槐耳清膏对 HCT116 细胞早期凋亡的影响图; 图 4 槐耳清膏对 HCT116 细胞周期的影响流式细胞术分析图

### 槐耳清膏 (0mg/mL) 槐耳清膏 (5mg/mL) 槐耳清膏 (11mg/mL)



注: a 图为槐耳清膏 0 mg/ml 对结肠癌细胞 HCT116 的迁移能力抑制染色后图像; b 图为槐耳清膏 5 mg/ml 对结肠癌细胞 HCT116 的迁移能力抑制染色后图像; c 图为槐耳清膏 11 mg/ml 对结肠癌细胞 HCT116 的迁移能力抑制染色后图像; \* 为 *P* < 0.05 ,\*\* 为 *P* < 0.01

图 5 不同浓度的槐耳清膏对结肠癌细胞迁移能力抑制染色后图像; 图 6 三组细胞的穿膜细胞数柱状统计图; 图 7 经不同浓度的槐耳清膏处理后 MMP-9 在人结肠癌细胞中的相对表达量

## 讨 论

槐耳清膏是已经用于肝癌、肺癌和乳腺癌临床实践的一种中药<sup>[8-10]</sup>,其主要成分是古槐树上天然菌(槐耳)中的活性蛋白多糖。文献报道<sup>[11]</sup>,槐耳清膏能调节和促进机体免疫功能,动物试验表明槐耳清膏能延长荷瘤小鼠的生存<sup>[12]</sup>。然而槐耳清膏是否可以用于结肠癌的治疗以及其作用机制等方面的研究甚少,因此本研究采用结肠癌细胞系 HCT116 作为研究对象,探讨槐耳清膏在结肠癌细胞中的生物学作用及相关机制。

我们首先检测了槐耳清膏是否能功能性抑制人结肠癌细胞的增殖。我们采用不同的药物浓度分别进行了 HCT116 细胞增殖试验。结果表明,当槐耳清膏浓度低于 5 mg/mL 时,其对细胞无抑制作用,且高浓度的槐耳清膏对结肠癌细胞的抑制作用具有剂量依赖性及时间依赖性。尽管文献报道<sup>[13]</sup>,槐耳清膏具有低毒性的特点,但本实验结果提示临床用药过程中需要注意槐耳清膏的药物剂量和药物使用时间。

细胞的生长受多种机制调控,细胞周期和凋亡是抗肿瘤药物最常见的生物学机制之一。Zhang N 等也报道,槐耳清膏可诱导特定类型的肿瘤发生凋亡从而发挥细胞毒作用<sup>[14-15]</sup>。在本研究中,采用半数致死浓度的槐耳清膏(11 mg/mL)处理后的细胞,细胞凋亡并不受影响,但是细胞周期发生显著变化。和对照组相比,药物处理后的细胞多被阻滞于细胞周期的 S 期。该研究结果提示,临床中槐耳清膏与其它药物联合使用时要注意不同药物对细胞周期的影响,以避免出现互相干扰从而影响药物联合的疗效。

远处转移是结肠癌患者死亡的重要原因之一,肿瘤细胞的迁移能力是影响肿瘤细胞发生远处转移的重要因素之一,因此在本研究中,我们也检测了槐耳清膏对 HCT116 细胞迁移能力的影响。实验结果显示,槐耳清膏能显著抑制 HCT116 细胞迁移,同时,药物处理后的 HCT116 细胞中 MMP-9 表达水平降低,说明槐耳清膏可能通过下调 MMP-9 的表达来削弱细胞的迁移能力,更深入的机制正在研究中。

综上所述,槐耳清膏能抑制结肠癌细胞的体外

增殖和细胞迁移,槐耳清膏可影响结肠癌的细胞周期和 MMP-9 的表达。由于本研究结果仅来自于体外试验,还需要更深入的机制研究以及动物试验和临床试验等进一步验证槐耳清膏的抗结肠癌效应。本研究结果为临床应用槐耳清膏治疗结肠癌提供了初步的理论依据,对优化临床联合用药具有启发意义。

## 参 考 文 献

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, CA Cancer. J Clin 2013 63(1):11-30.
- [2] Ren J, Zheng C, Feng G, et al. Inhibitory effect of extract of fungi of Huaier on hepatocellular carcinoma cells. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci 2009 29:198-201.
- [3] Che YX, Zhou MX, Zhan P, et al. The anti-cancer effect of Huaier aqueous extract with rh-Endostatin and DDP. Chinese-German J Clin Oncol 2014 13(8):349-354.
- [4] 李戎, 谢莎, 张莉, 等. 槐耳颗粒逆转人乳腺癌细胞 MCF-7 耐药的初步机制. 中国实用医药 2009 4(17):1-3.
- [5] 杨倩, 唐中华, 徐峰. 槐耳颗粒 30 例甲状腺癌术后辅助治疗应用. 肿瘤学杂志 2009 15(7):683-684.
- [6] 李慧, 刘岩, 田甜. 恩度联合草酸铂对人结肠癌细胞抑制作用的研究. 中华肿瘤防治杂志 2014 21(9):669-673.
- [7] Hui Li, Hong Zhang, Gang Wei, et al. Tumor cell Group VIA Phospholipase A2 Is Involved in Prostate Cancer Development. Prostate 2010 71(4):373-384.
- [8] Li L, Ye S, Wang Y. Progress on experimental research and clinical application of Trametes robiniophila. Bull 2007 2:16.
- [9] Wang X, Zhang N, Huo Q, et al. Anti-angiogenic and antitumor activities of Huaier aqueous extract. Oncol Rep 2012 28:1167-1175.
- [10] 余安平, 李雄英, 李凌. 槐耳颗粒联合沙利度胺抑制鼠肝癌 H22 细胞种植瘤的实验. 肿瘤防治研究 2013 40(9):834-838.
- [11] 孙学征, 赵振华, 黄志坤, 等. 槐耳颗粒联合 TACE 对中晚期肝癌患者 T 淋巴细胞亚群的影响. 中国中医药科技 2013 20(1):66.
- [12] Ren J, Zheng C, Feng G, et al. Inhibitory effect of extract of fungi of Huaier on hepatocellular carcinoma cells. J Huazhong Univ Sci Technolog 2009 29:198-201.
- [13] 姚亚民, 马智勇, 赵艳秋. 金克冲剂合并化疗治疗非小细胞肺癌 41. 中国肿瘤 2001 10(3):184-185.
- [14] Zhang N, Kong X, Yan S, et al. Huaier aqueous extract inhibits proliferation of breast cancer cells by inducing apoptosis. Cancer Sci 2010 101:2375-2383.
- [15] 王运玉, 吴柱国. 槐耳清膏联合羟基脲对 K562 细胞增殖、凋亡及相关基因表达的影响. 实用儿科临床杂志 2009 24(3):192-195.

(收稿日期:2015-01-17)

(本文编辑:马天翼)

关铁军, 刘岩, 杨玉波, 等. 槐耳清膏对结肠癌细胞生长和迁移的影响及其作用机制[J/CD]. 中华结直肠疾病电子杂志, 2015 4(3):275-279.