

# 槐耳清膏对结直肠癌细胞增殖和侵袭能力的影响

邹一丰<sup>1,2</sup>, 刘华山<sup>1,2</sup>, 戎煜明<sup>1,3</sup>, 谈应鑫<sup>1,2</sup>, 陈曦<sup>1,2</sup>, 翁敬容<sup>1,2</sup>, 范德军<sup>1,2</sup>, 林绪涛<sup>1,2</sup>

1.中山大学附属第六医院结直肠肛门外科 广东 广州 510655

2.广东省结直肠盆底疾病研究重点实验室 广东 广州 510655

3.中山大学附属肿瘤医院综合科 广东 广州 510610

**【摘要】** 目的 探究槐耳清膏对结直肠癌细胞增殖和侵袭能力的影响。方法 应用MTS、Transwell、流式细胞术及Western blot等研究槐耳清膏对人结直肠癌细胞系的抑制作用,并建立小鼠动物模型。结果 MTS表明槐耳清膏能够抑制SW480细胞增殖;Transwell表明槐耳清膏可抑制SW480侵袭能力;流式细胞术表明槐耳清膏可诱导SW480细胞凋亡;Western blot显示槐耳清膏可上调Bax, cleavage caspase-3,抑制Bcl-2等蛋白;小鼠体内皮下成瘤实验提示亦可抑制肿瘤生长。结论 槐耳清膏可抑制结直肠癌细胞的增殖及侵袭能力,并可诱导SW480细胞凋亡,其作用机制可能与激活Bcl-2/Bax/Cleaved caspase-3凋亡相关信号通路相关。

**【关键词】** 结直肠癌; 槐耳; 免疫调节; 微环境

## Effects of Huaier aqueous extract on the proliferation and invasion of colorectal cancer cell SW480

ZOU Yi-feng<sup>1,2</sup>, LIU Hua-shan<sup>1,2</sup>, RONG Yu-ming<sup>1,3</sup>, TAN Ying-xin<sup>1,2</sup>, CHEN Xi<sup>1,2</sup>, WENG Jing-rong<sup>1,2</sup>, FAN De-jun<sup>1,2</sup>, LIN Xu-tao<sup>1,2</sup>

1.Department of Colorectal Surgery, The Sixth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510655, China

2.Guangdong Provincial Key Laboratory of Colorectal and Pelvic Floor Diseases, the Sixth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510655, China

3.Department of VIP Region, Cancer Center of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510610, China

Corresponding author: Lin Xutao, Email: linxt23@mail.sysu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To investigate the effects of Huaier extract on the proliferation and invasion of colorectal cancer cell SW480. **Methods** MTS, Transwell, Flow cytometry and Western blotting assays were used to study the effects of Huaier aqueous extract on SW480 cells in vitro. The effects of Huaier aqueous extract on SW480 cells in vivo were performed on subcutaneous transplantation tumor models of human CRC cell SW480 in BALB/c Nude Mice. **Results** MTS assays showed that Huaier extract inhibited cell proliferation in a concentration- and time-dependent manner. The Transwell assays demonstrated that the invasion of SW480 cells was significantly inhibited after administration of Huaier extract in SW480 cells. PI-annexin-V double staining assays using flow cytometry revealed that SW480 cell apoptosis was induced by Huaier extract. The up-regulation of Bax and cleavage caspase-3 and down-regulation of Bcl-2 were observed after treatment with Huaier extract in SW480 cells via Western blotting. In vivo, the administration of Huaier extract to mice inhibited tumor growth. **Conclusions** The current study revealed that Huaier extract inhibited the growth and invasion and induced cell apoptosis of CRC cell SW480, possibly via activation of Bcl-2/Bax/Cleaved caspase-3 apoptosis-associated pathway.

**【Key words】** Colorectal cancer; Huaier aqueous extract; Immunoregulation; Microenvironment

结直肠癌是常见的恶性肿瘤之一,其治疗原则主要是以手术为主的综合性治疗,包括放疗、化疗、生物免疫治疗等,但单一治疗方法总体疗效仍有待提高<sup>[1-3]</sup>。在现有治疗方法的基础上,探索新的辅助治疗手段,是提高其治疗效果的重要方法。槐耳是生长在老龄中国槐树杆上的槐栓菌,属于菌物界、真菌门、担子菌亚门、层菌纲、非褶菌目、多孔菌科、栓菌属,含有多种有机成分和10余种矿物质元素。其主要成分是多糖蛋白,具有独特的直接抗癌作用和显著的免疫增强调节作用<sup>[4,5]</sup>。现有研究表明槐耳颗粒对多种恶性肿瘤包括直肠癌具有独特及显著的抗肿瘤免疫增强调节作用,其临床疗效已在肝癌、乳腺癌等恶性肿瘤中得到证实<sup>[6,7]</sup>。本研究通过结直肠癌 SW480 细胞系的体内体外模型,探讨槐耳清膏在结直肠癌中的作用及其可能机制。

## 1 材料与方法

1.1 实验材料 槐耳清膏用 DMEM 配置成 100 mg/ml 溶液,用 0.22  $\mu\text{m}$  的滤器过滤后 $-20^{\circ}\text{C}$ 长期保存;人结直肠癌细胞株 SW480 购自中科院上海细胞库;6 只 4 周龄雄性 BALB/c 裸鼠购自中山大学实验动物中心。

### 1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人结直肠癌细胞株 SW480 常规培养在包含 10% 血清、1% 青霉素-链霉素、1% 非必需氨基酸、1% 左旋谷氨酸的 DMEM 培养体系中,放在  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养,每 2-3 天换液一次。应用 0.25% 胰酶  $37^{\circ}\text{C}$  消化细胞 2-3 min,消化后传代培养,培养条件同前。

1.2.2 MTS 法检测细胞增殖 消化重悬 SW480 细胞后,在 96 孔板中每孔加入 150  $\mu\text{l}$  含 5000 个细胞的完全培养基,培养 24 h 后将细胞培养液吸进,替换为含有 0, 1, 2, 4, 6 and 10 mg/ml 的槐耳清膏的完全培养基,继续培养 24、48、72 h 后,每孔加入 20  $\mu\text{l}$  的 MTS 溶液在  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的环境下孵育 3 个小时,490 nm 读取吸光度值。每个浓度重复五个孔。

1.2.3 Transwell 侵袭实验 将预先溶解好的 Matrigel 胶用无血清培养基按 1:9 的比例配成溶液, $37^{\circ}\text{C}$  孵育 4 h。取 50  $\mu\text{l}$  上述溶液均匀的铺在 Transwell 小室上层。消化细胞并计数,无血清培养液重悬细胞,混匀,每个 Transwell 小室加入 200  $\mu\text{l}$

含  $5 \times 10^4$  个细胞,同时上室用 4, 6 mg/ml 的槐耳清膏处理细胞,以不加槐耳清膏溶液处理的作为对照组。培养 36 h 后取出小室,固定,染色,拍照,计数并统计分析。

1.2.4 流式细胞检测 用含 0, 4, 6 mg/ml 的槐耳清膏处理细胞 48 h 后,消化离心后用 100  $\mu\text{l}$  1X Annexin V buffer 轻轻重悬细胞,加入 5  $\mu\text{l}$  Annexin V-FITC 和 5  $\mu\text{l}$  碘化丙啶染色液,轻轻混匀,室温避光孵育 15 min,随即进行流式细胞仪检测,Annexin V-FITC 为绿色荧光,PI 为红色荧光。

1.2.5 裸鼠皮下成瘤 小鼠先自由进食、饮水适应环境 1 周,然后给予下述处理:于裸鼠背部皮下注射 HCT116 细胞悬液 100  $\mu\text{l}$  (即  $1 \times 10^6$  cells)。继续按上述条件饲养一周,观察成瘤情况。皮下注射结直肠癌细胞 1 周后,根据成瘤大小,按分层随机抽样的方法分成 2 组,分别按体重给予 4 g/kg 槐耳清膏溶液<sup>[8]</sup>。每 3 天测量一次肿瘤最大长径(L)和横径(S),肿瘤体积= $\pi \text{L}^2 \text{S} / 6$ <sup>[9]</sup>。

1.2.6 蛋白质印记(Western blotting) 配置 SDS-PAGE 分离胶,每孔上样 80  $\mu\text{g}$  蛋白,应用硝酸纤维素膜转膜,以 5% 脱脂牛奶封闭,然后一抗按照如下比例加入过夜孵育(至少 12 h): mouse anti-Bcl-2 (1:1000, Abcam), rabbit anti-Bax (1:1000, Abcam), rabbit anti-cleavage caspase-3 (1:500, Abcam), rabbit anti-GAPDH (1:5000, Sigma Aldrich)。加入二抗孵育 1 h,应用 TBST 清洗后扫膜分析。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行分析。组间差异比较采用 *t* 检验或单因素方差分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示, $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 槐耳清膏对人结直肠癌 SW480 细胞系增殖的影响 MTS 实验结果表明,槐耳清膏能够抑制 SW480 细胞的生长,且其抑制效应具有剂量依赖性(图 1A),0、1、2、4、6 和 10 mg/ml 的槐耳清膏作用 SW480 细胞 48 h 后,其抑制率分别为:0、13.2%、22.3%、44.1%、50.2% 和 57.9%。基于上述结果,后续实验我们选用 4 和 6 mg/ml 的槐耳清膏作用浓度。应用 4 和 6 mg/ml 的槐耳清膏分别作用 SW480 细胞 24 h、48 h 及 72 h 后,MTS 显示槐耳清膏对 SW480 细胞的生长抑制作用呈现一定的时间依赖性(图 1B)。

2.2 槐耳清膏对人结直肠癌 SW480 细胞系侵袭能力的影响 Transwell 侵袭实验结果表明,在 4 和 6 mg/ml 的槐耳清膏作用 48 h 后,SW480 细胞系的侵袭能力受到明显抑制,而且 6 mg/ml 作用浓度下的抑制效应相比于 4 mg/ml 作用浓度更加显著(图 2)。

2.3 槐耳清膏对人结直肠癌 SW480 细胞系凋亡的影响 PI-annexin-V 流式实验结果表明,SW480 细胞在 0、4 和 6 mg/ml 的槐耳清膏作用 48 h 后早期凋亡与晚期凋亡总比例分别为 6.29%、10.93% 和 14.34%,呈现出一定的递增趋势,而且早期凋亡与晚期凋亡比例都随着槐耳清膏浓度的增加呈现递增趋势(图 3A)。Western blotting 检测

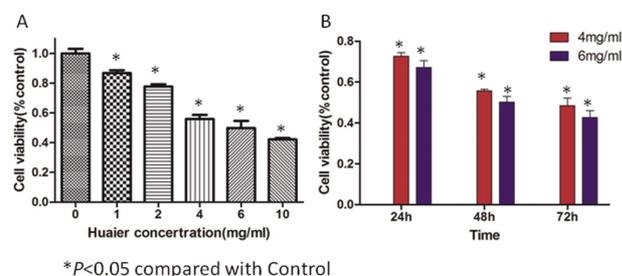
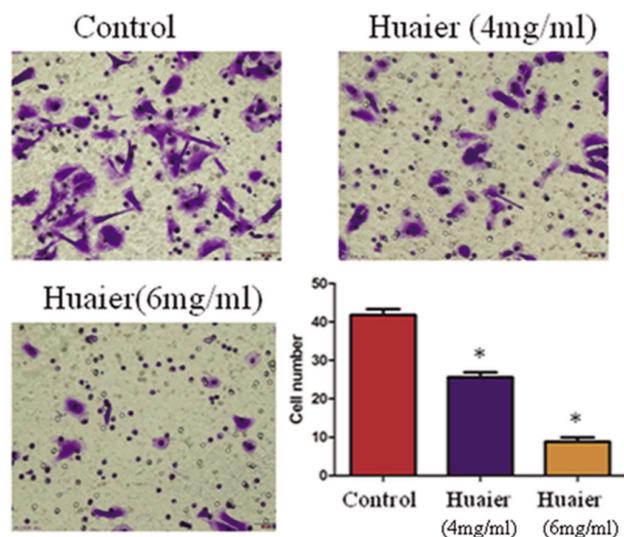


图 1 槐耳清膏对人结直肠癌 SW480 细胞系增殖的影响 A. 在不同剂量槐耳清膏作用下 SW480 细胞的抑制率 ( $p < 0.05$ ); B. 在 4mg/ml 及 6mg/ml 槐耳清膏作用下 SW480 细胞的抑制率,结果提示抑制效果与时间有相关性 ( $p < 0.05$ )。



\* $P < 0.05$  compared with Control

图 2 槐耳清膏对人结直肠癌 SW480 细胞系侵袭能力的影响 对照组及实验组 Transwell 侵袭实验典型图及高倍镜下 Transwell 侵袭实验 5 个高倍镜下细胞数平均值 ( $p < 0.05$ )。

细胞凋亡相关蛋白 (Bax, Bcl-2 和 cleavage caspase-3) 显示:SW480 细胞系在 4 和 6 mg/ml 的槐耳清膏作用 48 h 后,Bax 和 cleavage caspase-3 蛋白量相比未处理组增加,而 Bcl-2 蛋白量较少,且 Bax、cleavage caspase-3 和 Bcl-2 在 6 mg/ml 的槐耳清膏作用下的 SW480 细胞蛋白变化程度较 4 mg/ml 明显,但是 cleavage caspase-3 在 4 和 6 mg/ml 的槐耳清膏作用下未见显著差异(图 3B,C)。

2.4 槐耳清膏对人结直肠癌 SW480 细胞系的体内效应 在 6 只裸鼠皮下接种  $2 \times 10^6$  个 SW480 细胞 7 天左右,接种部位可见直径 4 mm 左右的肿瘤,成瘤率 100%。而后按照肿瘤大小,均衡分为两组,其中一组按体重给予 4 g/kg 的槐耳清膏溶液每天 0.1 ml/只,另外一组给予等体积生理盐水灌胃,连续处理 14 天后处理小鼠,剥离肿瘤,肿瘤大小每三天测量一次。所有动物未见肝脏、肺脏、淋巴结等器官组织转移现象。槐耳清膏处理组肿瘤体积明显受到抑制(图 4A,B),肿瘤质量亦小于生理盐水处理组(图 4C),药物处理后两组小鼠体重变化未见明显差异(图 4D),提示槐耳清膏在该剂量条件下对小鼠无明显毒副作用。结合体外实验结果,提示槐耳清膏抑制结直肠癌的生长,并可诱导结直肠癌细胞的凋亡。

### 3 讨论

近年来,中医药逐渐成为开发安全有效临床

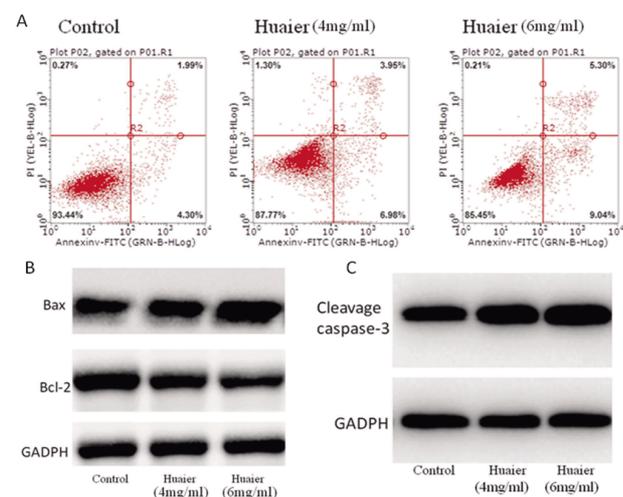
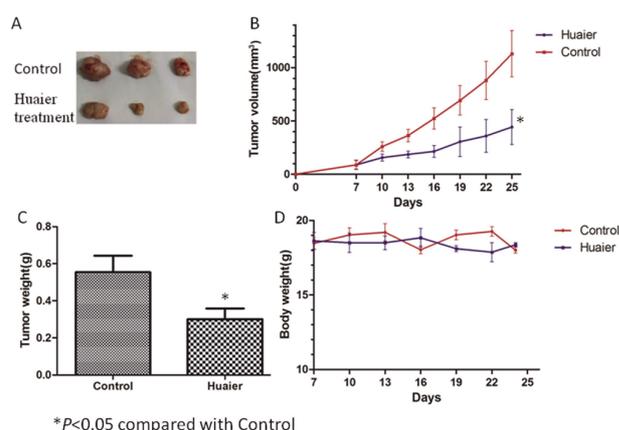


图 3 槐耳清膏对人结直肠癌 SW480 细胞系凋亡的影响 A. 在 4mg/ml 及 6mg/ml 槐耳清膏作用下 sw480 细胞 PI-annexin-V 流式实验结果,提示槐耳清膏促进肿瘤细胞凋亡与剂量有相关性,B,C. 免疫印迹检测提示 SW480 细胞在槐耳清膏作用后相关凋亡蛋白增多,且与剂量相关。



**图4** 槐耳清膏对人结直肠癌 SW480 细胞系的体内效应  
A,B. 槐耳清膏处理组与对照组小鼠肿瘤体积对比,槐耳清膏处理组肿瘤体积明显较对照组小( $p < 0.05$ ); C. 槐耳清膏处理组与对照组肿瘤体积对比,处理组肿瘤体积明显较小( $p < 0.05$ ); D. 槐耳清膏处理组与对照组小鼠体重对比,提示体重无明显差异( $p > 0.05$ )。

新药物的重要来源,对中医药的研究也受到越来越多的关注。槐耳是我国特有的菌类,主要成分为多糖蛋白,其应用于中医药已有 1600 多年的历史<sup>[4]</sup>。本文通过结直肠癌 SW480 细胞系体外体内模型,初步阐明槐耳清膏可抑制 SW480 细胞的恶性生物学行为,并可诱导 SW480 细胞的凋亡。

在肿瘤的发生发展过程中,增殖与凋亡的异常普遍存在<sup>[10]</sup>。因此,抑制肿瘤细胞增殖与诱导其凋亡也成为肿瘤治疗研究的一个方向。本研究证实,槐耳清膏能够在体外体内抑制结直肠癌 SW480 细胞系的增殖,而且在体外实验表明其抑制效应呈现一定时间、剂量依赖性;同时该研究结果也证实,槐耳清膏能够诱导 SW480 细胞的凋亡,并影响凋亡相关蛋白的表达,体内实验表明槐耳清膏亦可抑制肿瘤的生长,其结果与体外实验结果一致。

槐耳抗肿瘤可能的机制包括促进肿瘤细胞的凋亡、抗肿瘤血管生成作用、抑制肿瘤干细胞和提高化疗药物的敏感性等方面。有研究报道槐耳可通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路抑制结直肠癌干细胞的生长<sup>[11]</sup>,也可通过诱导细胞凋亡抑制乳腺癌细胞的增殖<sup>[6]</sup>,这与我们的在结直肠癌中的研究结果较为一致。同时也有研究报道槐耳清膏在卵巢肿瘤中通过 AKT/GSK3 $\beta$ / $\beta$ -catenin 通路发挥抗肿瘤作用<sup>[8]</sup>。在临床应用上,有研究报道槐耳能够改善新辅助化疗乳腺癌患者化疗后的细胞免疫功

能<sup>[12]</sup>。本文一方面应用蛋白质印记技术检测槐耳清膏对 SW480 凋亡相关的蛋白的影响,另一方面,通过流式细胞术检测了槐耳清膏处理后 SW480 细胞的凋亡情况,初步阐明槐耳清膏可诱导结直肠癌细胞发生凋亡,其作用机制可能与激活 Bcl-2/Bax/Cleaved caspase-3 凋亡相关信号通路相关。

目前,槐耳清膏已在肝癌<sup>[13,14]</sup>、乳腺癌<sup>[12]</sup>、肺癌<sup>[15,16]</sup>、胃癌<sup>[17]</sup>等肿瘤中表现出良好的临床疗效。本研究结果为槐耳清膏在结直肠癌中的临床应用提供了理论支持,有利于促进槐耳在结直肠癌中的临床应用,进一步改善结直肠癌患者生存预后。

综上所述,槐耳清膏具有诱导结直肠癌细胞凋亡,抑制结直肠癌生长的作用。但由于槐耳清膏成分较为复杂,其抗肿瘤的具有机制有待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] 陈劲松,董世濠,黄炯强,等. 结直肠癌肺转移临床诊治策略 [J]. 消化肿瘤杂志,2016, 8(3):1-6.
- [2] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [3] Punt CJ, Tol J. More is less -- combining targeted therapies in metastatic colorectal cancer [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2009, 6(12):731-733.
- [4] Wang X, Zhang N, Huo Q, et al. Anti-angiogenic and antitumor activities of Huaier aqueous extract [J]. Oncol Rep, 2012,28(4):1167-1175.
- [5] Zhang T, Wang K, Zhang J, et al. Huaier aqueous extract inhibits colorectal cancer stem cell growth partially via downregulation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway [J]. Oncol Lett, 2013, 5(4): 1171-1176.
- [6] Zhang N, Kong X, Yan S, et al. Huaier aqueous extract inhibits proliferation of breast cancer cells by inducing apoptosis [J]. Cancer Sci, 2010, 101(11):2375-2383.
- [7] Li C, Wu X, Zhang H, et al. A Huaier polysaccharide reduced metastasis of human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells via modulating AUF-1 signaling pathway [J]. Tumour Biol, 2015, 36(8):6285-6293.
- [8] Yan X, Lyu T, Jia N, et al. Huaier aqueous extract inhibits ovarian cancer cell motility via the AKT/GSK3 $\beta$ / $\beta$ -catenin pathway [J]. PLoS One, 2013, 8(5):e63731.
- [9] Holmquist-Mengelbier L, Fredlund E, Ljfstedt T, et al. Recruitment of HIF-1 alpha and HIF-2 alpha to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2 alpha promotes an aggressive phenotype [J]. Cancer Cell, 2006,10(5):413-423.
- [10] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next

- generation[J]. Cell, 2011, 144(5):646-674.
- [11] Arora H, Qureshi R, Rizvi MA, et al. Study of apoptosis-related interactions in colorectal cancer [J]. Tumour Biol, 2016, 37(11):14415-14425.
- [12] 徐峰,唐中华. 金克槐耳对新辅助化疗乳腺癌患者细胞免疫功能的影响[J]. 中国普通外科杂志,2009,(05):524-526.
- [13] 郭添胜,曹小龙. 槐耳颗粒联合介入治疗原发性肝癌的疗效观察[J]. 实用医学杂志, 2005,(16):1846-1847.
- [14] 黄炜,严律南,吴泓,等. 槐耳颗粒在肝癌肝移植患者术后临床应用价值的回顾性队列研究 [J]. 中国普外基础与临床杂志, 2010,(06):547-551.
- [15] 李学兵. 金克槐耳颗粒对Ⅲ期非小细胞肺癌患者免疫细胞活性的影响[J]. 临床肺科杂志. 2006,(04):472-473.
- [16] 刘兰芳,李青山,等. 槐耳颗粒对老年晚期非小细胞肺癌生活质量的影响[J]. 肿瘤学杂志. 2006, (01):70-71.
- [17] 姚建高,朱冠宝,陈哲京. Ⅲ期胃癌术后联合化疗与金克的疗效[J]. 中国肿瘤, 2003, (10): 50-52.
- [18] 黄娟妮,林绪涛,梁丽英,等. 炎症微环境下代谢基因 ARG1对结直肠癌细胞增殖的影响研究 [J]. 消化肿瘤杂志, 2015,7(01):1-10.

---

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 本刊最新出版发行情况说明

《消化肿瘤杂志(电子版)》(国际标准连续出版物号 ISSN 1674-7402,国内统一连续出版物号 CN 11-9301/R)是国家卫生健康委员会主管、人民卫生出版社有限公司主办、中山大学附属第一医院为主编单位的消化肿瘤专业电子学术期刊。本刊目前为中国科技核心期刊被《中国科技论文统计源期刊》《中国核心期刊(遴选)数据库》《中国学术期刊网络出版总库》《中文科技期刊数据库》全文收录。本刊旨在为广大医务工作者提供了一个优秀的专业论文发表和交流平台。本刊每年主办或参与举办的全国性和区域性大型学术会议达 10 余次,大大促进了消化肿瘤学术领域的交流,同时出版发行量大、覆盖范围广、在国内具有一定的影响力。欢迎各位同仁向本刊投稿,同时欢迎订阅。