DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20230707.002
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms2/detail/46.1049.R.20230707.1554.004.html

枫蓼肠胃康联合5-FU抑制IL-6/STAT3通路治疗结肠炎相关性结肠癌的实验研究

汪倩如[1,2],钟立璠[1,3],黄 凌[1,4]✉
(1.海南省药物临床前药理毒理学研究重点实验室,海南 海口 570100;2.海南省创伤与灾难救援研究重点实验室,海南 海口 570100;3.海南医学院海南省药物安全性评价研究中心,海南 海口 571199;4.海南医学院药学院,海南 海口 571199)

[**摘要**] **目的**:探讨枫蓼肠胃康联合5-氟尿嘧啶给药对结肠炎相关性结肠癌小鼠的治疗作用及机制。**方法**:建立结肠炎相关性结肠癌小鼠模型,经枫蓼肠胃康和5-氟尿嘧啶给药后,观察小鼠的行为及活动情况;HE染色观察小鼠结肠组织的病理学变化;采用Western blot检测小鼠结肠组织在IL-6/STAT3通路相关蛋白的表达。**结果**:联合给药组小鼠的存活率明显提高,且小鼠肠壁增厚及间质炎症情况明显减轻。Western blot结果显示经造模后小鼠结肠组织中P-STAT3及IL-6的表达水平明显升高,联合给药后,抑制了IL-6/STAT3通路中Cyclin D1、CDK4和Bcl-2蛋白表达,上调了Bax的表达($P<0.05$)。**结论**:枫蓼肠胃康联合5-氟尿嘧啶可抑制IL-6/STAT3通路来发挥对结肠炎相关性结肠癌的抑制作用。

[**关键词**] 结肠炎相关性结肠癌;枫蓼肠胃康;5-FU;IL-6/STAT3
[**中图分类号**] R574.62;R735.35 [**文献标识码**] A [**文章编号**] 1007-1237(2023)18-1361-06

Study on the mechanism of action of Feng-Liao-Chang-Wei-Kang combined with 5-fluorouracil in the treatment of colitis-associated colon cancer

WANG Qian-ru[1,2], ZHONG Li-fan[1,3], HUANG Ling[1,4]✉
(1. *Hainan Province Key Laboratory for Drug Preclinical Study of Pharmacology and Toxicology Research, Haikou* 570100, *China*; 2. *Key Laboratory of Hainan Trauma and Disaster Rescue, Haikou* 570100, *China*; 3. *Hainan Research Center for Drug Safety Evaluation, Hainan Medical College, Haikou* 57119, *China*; 4. *School of Pharmaceutical Sciences Hainan Medical University, Haikou* 57119, *China*)
[*Foundation Project*]: *This study was supported by National Natural Science of China* (81760674); *Hainan Graduate Innovative Research Project*(*Hys*2020-371)
[*Author*]: *WANG Qian-ru*, *M.M.*, *E-mail*: 1843521920@*qq.com*.
[*Correspondence to*]: *HUANG Ling*, *Professor*, *E-mail*: *puer*6@163.*com*.
Received: 2023-04-13 *Revised*: 2023-07-05 *JHMU*, 2023;29(18):1361-1366

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[ABSTRACT] **Objective**: To investigate the therapeutic effects and mechanisms of Feng-Liao-Chang-Wei-Kang combined with 5-fluorouracil administration in mice with colitis-associated colon cancer. **Methods**: To establish a colitis-associated colon cancer mouse model and observe the behavior and activity of mice after Feng-Liao-Chang-Wei-Kang and 5-fluorouracil administration; HE staining was used to observe the pathological changes of mouse colonic tissue; Western blot was used to detect the expression of mouse colon tissue in IL-6/STAT3 pathway-related proteins. **Results**: The survival rate of mice in the co-administered group was significantly increased, and the intestinal wall thickening and interstitial inflammation of mice were significantly reduced. Western blot results showed that the expression levels of P-STAT3 and IL-6 were significantly increased in the colonic tissue of mice after modeling, and the combined administration inhibited the expression of Cyclin D1, CDK4 and Bcl-2 protein in the IL-6/STAT3 pathway and upregulated the expression of Bax($P<0.05$). **Conclusion**: Feng-Liao-Chang-Wei-Kang combined with 5-fluorouracil inhibits IL-6/STAT3 pathway to exert inhibition of colitis-associated colon cancer inhibition of colitis-associated colon

[基金项目]国家自然科学基金(81760674);海南省研究生创新科研课题(Hys2020-371)
[作者简介]汪倩如,硕士,E-mail:1843521920@qq.com。
[通讯作者]黄凌,教授,E-mail:puer6@163.com。
[收稿日期]2023-04-13 [修回日期]2023-07-05 网络出版时间:2023-07-10 10:24:16

cancer.

[KEYWORDS] Colitis-associated colon cancer; Feng-Liao-Chang-Wei-Kang; 5-fluorouracil; IL-6/STAT3

结直肠癌(colorectal cancer,CRC)是世界第三大癌症,发病率和死亡率逐年上升[1]。结肠炎相关性结肠癌(Colitis-associated colon cancer,CACC)是由活动性结肠炎发展而来的,随着结肠炎严重程度、患病时长以及结肠损伤范围的增加,CACC的发病率不断提高[2,3]。

5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil,5-FU)是一种化疗药物,临床上用于治疗结直肠癌、乳腺癌、胃癌等癌症[4,5]。但由于5-FU首关效应明显,极易产生不良反应及耐药性[6,7]。因此,5-FU常与其他药物联合给药来提高5-FU对结肠癌的治疗作用。枫蓼肠胃康(Feng-Liao-Chang-Wei-Kang,FLCWK)由牛耳枫和辣蓼草组成,含有许多化学成分如黄酮类、生物碱类等,具有抗溃疡性结肠炎、抗炎镇痛等作用[8,9],在临床上主要用于治疗结肠炎、肠易激综合征等症[9,10]。

课题组前期研究发现,枫蓼肠胃康能通过抑制IL-6/STAT3通路增效5-FU抑制结肠癌细胞的增殖、促进结肠癌细胞凋亡。本研究采用CACC小鼠模型,观察CACC小鼠在给药后结肠组织的病变情况,探讨联合给药对IL-6/STAT3通路的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

枫蓼肠胃康颗粒购自海口市制药厂有限公司,氟尿嘧啶注射液购自上海旭东海普药业有限公司,IL-6、IL-1β、STAT3、P-STAT3抗体购自Cell Signaling Technology,Cyclin D1、CDK4、Bax、Bcl-2、β-actin抗体购自Abcam公司,蛋白浓度测定试剂盒、ECL发光试剂盒购自上海碧云天生物科技有限公司。

1.2 实验动物

100只4～6周龄BALB/c小鼠,雄性,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号SCXK(沪)2017-0005。

1.3 分组及给药

取小鼠100只,随机分成5组,空白对照组10只,AOM/DSS模型组30只,FLCWK(4 g/kg)组、5-FU(24 mg/kg)组、5-FU(24 mg/kg)+FLCWK(4 g/kg)联合给药组各20只。FLCWK组和联合给药组从造模第1天开始灌胃注射FLCWK溶液;5-FU组和联合给药组在造模结束前一周开始尾静脉注射5-FU,1 d注射1次,共7次。

1.4 建立CACC动物模型

造模开始时,空白对照组腹腔注射生理盐水,AOM/DSS模型组、FLCWK组、5-FU组、5-FU+FLCWK联合给药组小鼠腹腔注射12.5 mg/kg AOM。一周后,除空白对照组以外其他组小鼠饮用含2.5%DSS饮用水一周、正常饮用水2周,以此为一个循环,共反复3个循环建立CACC小鼠模型(见图1)。造模结束后处死小鼠,取盲肠到肛门部位,沿着结肠组织纵轴方向将其切开,用生理盐水将粪便清洗干净,观察肠内膜肿瘤病变情况。然后取部分结肠放入4%中性甲醛固定,其余组织放入-80 ℃保存进行后续蛋白检测试验。

1.5 小鼠一般情况观察

饲养期间每2日观察并记录各组小鼠的饮食、精神、毛发及活动状态,观察小鼠的疾病活动指数(DAI)、结肠长度、成瘤率、肿瘤大小变化等。小鼠疾病活动指数(DAI)=(体重下降分数+大便性状分数+便血分数)/3。

表1 DAI评分标准

Tab 1 DAI scoring standard

计分	体重下降(%)	大便性状	便血
0	0	正常	正常
1	1-5	-	-
2	6-10	半稀便	肉眼可见少量出血
3	11-15	-	-
4	>15	稀便	肉眼可见大量出血

1.6 Western blot检测小鼠结肠组织IL-6/STAT3通路相关蛋白的表达

提取蛋白,BCA蛋白定量后上样。浓缩胶90 V恒压,分离胶120 V恒压,样品迁移至底部时切下目的蛋白区域凝胶,将滤纸、凝胶、PVDF膜夹成三明治样子进行转膜。200 mA恒流转膜1 h后,将PVDF膜取出放入5%脱脂奶粉或BSA中封闭2 h。TBST洗膜3次后加入一抗,4 ℃孵育过夜。TBST洗膜3次,加入二抗孵育1.5 h,TBST洗膜3次后进行显影。

1.7 HE染色观察结肠组织病理学变化

将固定好的结肠组织进行脱水、包埋、切片,将载玻片放入60 ℃烘箱中烘烤过夜后进行染色:二甲苯脱蜡、乙醇浸泡、苏木素染色、盐酸分化、伊红染色、脱水、透明、中性树胶封片。

1.8 统计学处理

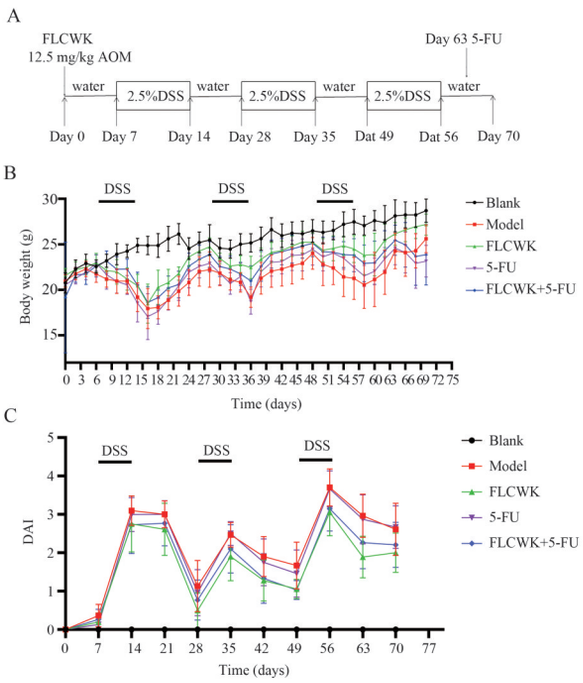
利用统计学分析软件SPSS26.0、Graph Pad Prism8.0对实验数据进行分析，结果均以平均值±标准误（Means ± SEM）表示，采用单因素方差分析（One-way ANOVA）对实验数据进行分析，$P<0.05$表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 FLCWK联合5-FU对小鼠状态的影响

如图1所示，在饮用DSS期间，小鼠体重明显下降，活动减少，严重的出现便血、腹泻；当把DSS换成正常饮用水后，这些症状逐渐缓解，体重逐渐恢复正常。第三个饮用水阶段，小鼠体重增加，尾静脉注射5-FU后，5-FU组与联合给药组的小鼠体重均有所下降，而FLCWK组小鼠则表现出良好的精神状态，症状也较轻。饮用DSS期间，除空白组外的各组小鼠疾病活动指数（DAI）明显上升，把DSS换成正常饮用水后，DAI逐渐下降。

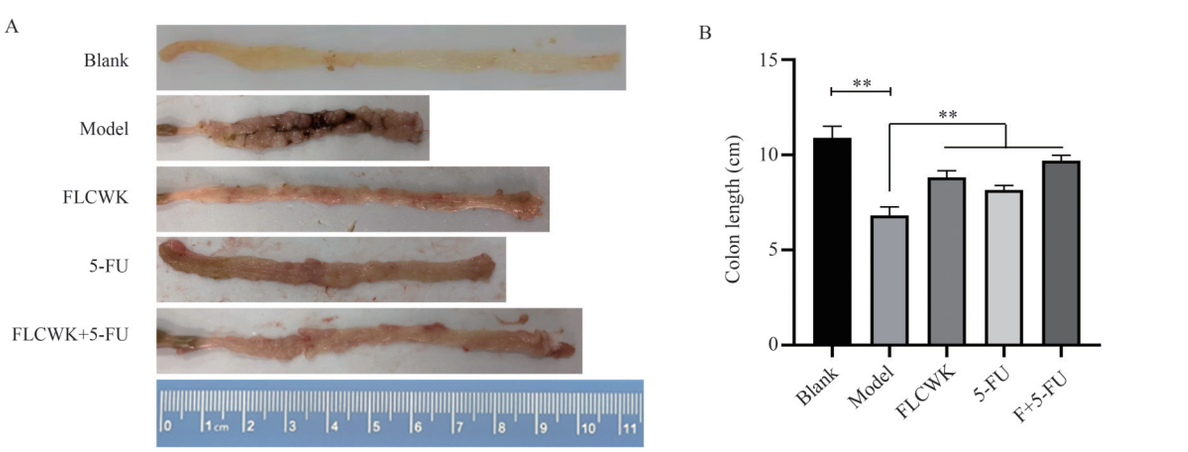
采用AOM/DSS造模后，第70天处死小鼠，取盲肠到肛门部位，沿着结肠组织纵轴方向将其切开，用生理盐水将粪便清洗干净，测量结肠长度并观察肿瘤大小。如图2所示，空白组小鼠结肠肠壁通透，未观察到肿瘤；模型组小鼠全部成瘤，肠壁增厚，能明显观察到有多个肿瘤分布其上，且结肠长度明显缩短（$P<0.01$）；与模型组相比，FLCWK组、5-FU组及联合给药组小鼠结肠长度均显著增长（$P<0.01$），全部成瘤但可观察到肿瘤数目明显减少、肿瘤大小相比模型组更小。



A：CACC小鼠模型的建立及给药；B：各组小鼠体重变化；C：各组小鼠DAI变化

图1 造模后各组小鼠体重及DAI变化

Fig 1 Changes in body weight and DAI of mice in each group after modeling



A：各组小鼠结肠图片；B：各组小鼠结肠长度；$^{**}P<0.01$

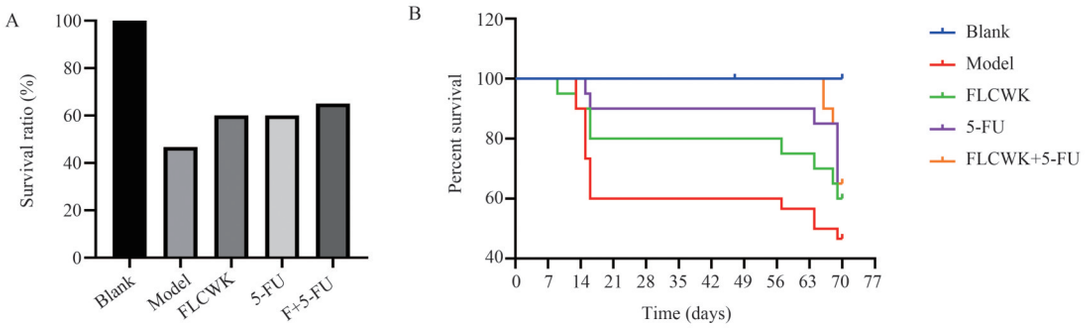
图2 造模后各组小鼠结肠长度

Fig 2 Colonic length of mice in each group after modeling

2.2 FLCWK联合5-FU对小鼠存活率的影响

如图3所示，第一个DSS饮用期间，模型组小鼠死亡率最高，有近1/3的小鼠死亡；第二个DSS饮用期间，各组小鼠均无死亡；第三个DSS饮用期间，

各组小鼠均有死亡。FLCWK组和5-FU组小鼠存活率较模型组显著升高，联合给药组的小鼠存活率较FLCWK组和5-FU组高。



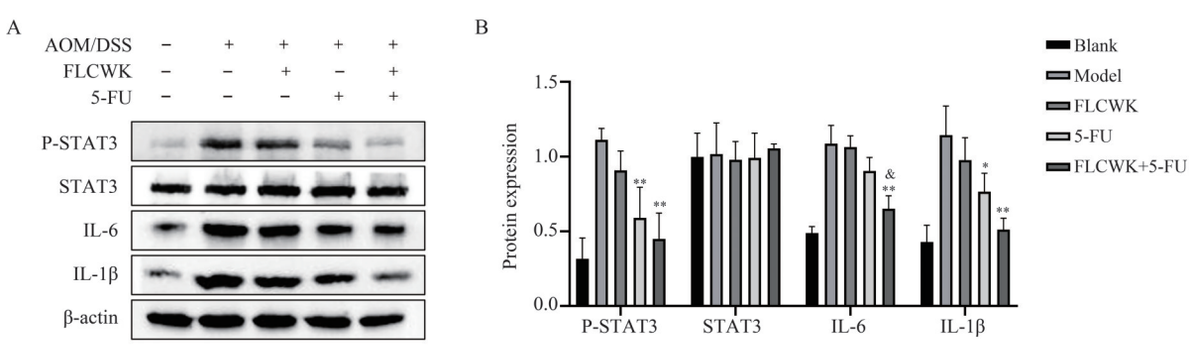
A：造模结束后小鼠存活率；B：小鼠生存曲线

图3　各组小鼠存活率

Fig 3　Survival rate of mice in each group

2.3　FLCWK联合5-FU对IL-6/STAT3通路相关蛋白的影响

如图4所示，采用AOM/DSS造模后，模型组小鼠P-STAT3、IL-6、IL-1β蛋白表达明显上升；FLCWK与5-FU联合给药后，P-STAT3、IL-6、IL-1β的表达相比模型组明显下降（$P<0.01$）。STAT3的表达在造模及给药后无明显差异。实验结果表明，FLCWK联合5-FU给药能更有效的抑制P-STAT3、IL-6、IL-1β的表达。



A：Western blot检测P-STAT3、STAT3、IL-6、IL-1β蛋白的表达；B：分析蛋白的相对表达；与模型组对比：$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与5-FU组对比：$^{\&}P<0.05$

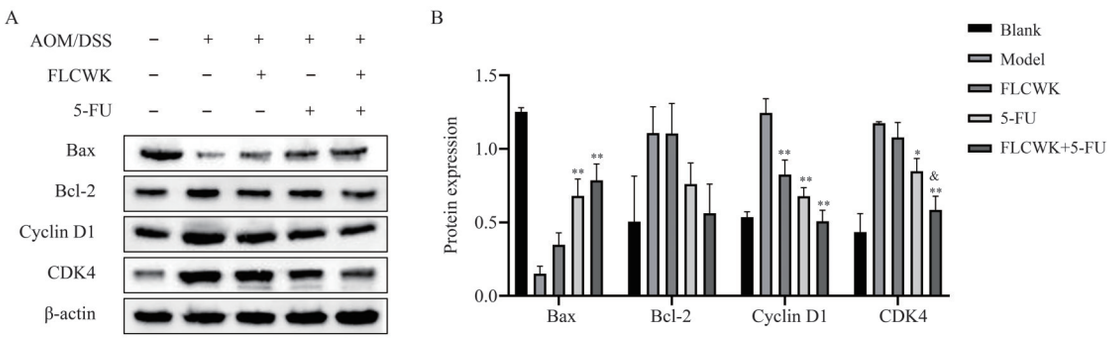
图4　Western blot检测CACC小鼠结肠P-STAT3、STAT3、IL-6、IL-1β的表达

Fig 4　Western blot detection of colonic P-STAT3, STAT3, IL-6, IL-1β expression in CACC mice

如图5所示，用AOM/DSS造模后，Cyclin D1、CDK4以及Bcl-2的表达上升，Bax的表达明显下降。FLCWK联合5-FU给药显著降低了Cyclin D1和CDK4的表达（$P<0.01$）、上调了Bax的表达（$P<0.01$）。

2.4　FLCWK联合5-FU对小鼠结肠病理学的影响

如图6所示，空白对照组细胞排列整齐，无炎性细胞浸润。模型组可以观察到结肠表面有多发性息肉样及结节状肿物，杯状细胞排列不规则，隐窝结构发生改变，核增大，核分裂常见，基底大量淋巴细胞聚集，肠壁增厚，符合CACC诊断标准。FLCWK和5-FU单独给药组，细胞排列相比模型组较整齐，炎性细胞浸润较模型组均有减轻；联合给药组细胞排列明显整齐，炎性浸润明显减轻。



A：Western blot检测Bax、Bcl-2、Cyclin D1、CDK4蛋白的表达；B：分析蛋白的相对表达；与模型组对比：$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与5-FU组对比：$^{\&}P<0.05$

图5　Western blot检测CACC小鼠结肠Bax、Bcl-2、Cyclin D1、CDK4的表达

Fig 5　Western blot detection of colonic Bax, Bcl-2, Cyclin D1, CDK4 expression in CACC mice

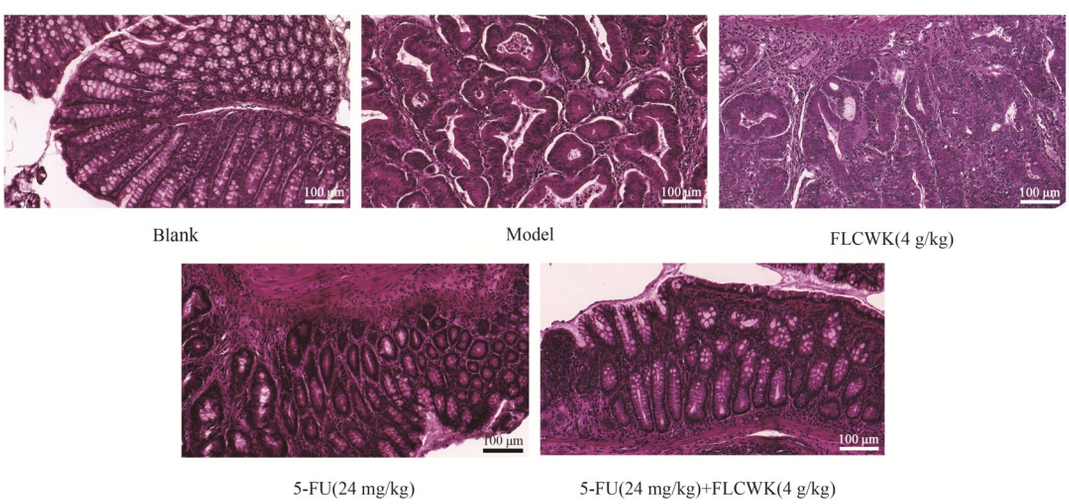


图6　各组小鼠HE染色情况示意图（×200）

Fig 6　Schematic diagram of HE staining in each group of mice（×200）

3　讨论

结肠癌发病率高且死亡率高，年轻人患结肠癌的概率也在逐年增加，寻找有效的药物及靶点治疗结肠癌已成为当前研究的热点[11]。结肠癌的发生发展，与多种信号转导途径相关，其中IL-6/STAT3是一条经典的信号通路，激活IL-6/STAT3信号通路会导致细胞增殖的发生，促进癌症的发展[12]。

有研究表明，IL-6/STAT3通路的异常激活与CyclinD1、Bcl-2等过度表达而导致肿瘤细胞过度增殖和凋亡抑制有关[13]。Bcl-2及Bax在细胞凋亡过程中发挥重要的作用[14]。Bax与Bcl-2形成异源二聚体，当Bax/Bcl-2比值下降时，抑制细胞凋亡[15-17]。Cyclin D1及CDK4参与肿瘤细胞的发生与发展，细胞分裂失调引起的细胞增殖异常是肿瘤标志性特征之一。从细胞周期的一个步骤进行到下一个步骤是由周期蛋白依赖性激酶（CDKs）控制的[18]。当受到刺激时，细胞周期蛋白D会和CDK4发生相互作用[19]。肿瘤细胞中，CDK4与Cyclin D1的激活导致细胞一直分裂，促进肿瘤生长[20]。

本实验采用CACC小鼠模型，观察FLCWK联合5-FU给药后对小鼠的治疗作用。结果发现，FLCWK联合5-FU给药显著提高了小鼠的存活率，减轻了小鼠肠壁增厚及间质炎症情况。FLCWK联合5-FU能够抑制STAT3的磷酸化、抑制IL-6及IL-1β的表达；同时能够抑制Cyclin D1、CDK4、Bcl-2的表达，上调Bax的表达。

采用氧化偶氮甲烷/葡聚糖硫酸钠（AOM/DSS）建立CACC小鼠模型，HE染色观察小鼠结肠病理变化，Western blot检测IL-6/STAT3通路相关蛋白的表达。结果发现，FLCWK联合5-FU能够抑制IL-6/STAT3通路来发挥对CACC的抑制作用。

作者贡献度说明：

汪倩如：设计实验、进行实验、分析数据、撰写论文；钟立璠：设计实验、论文修改；黄凌：提供研究思路、指导论文撰写及修改。所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

1 Wong MCS, Huang J, Lok V, et al. Differences in incidence and mortality trends of colorectal cancer worldwide based on sex, age, and anatomic location [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2021, 19(5): 955-966,e961.

2 Low END, Mokhtar NM, Wong Z, et al. Colonic mucosal transcriptomic changes in patients with long-duration ulcerative colitis revealed colitis-associated cancer pathways [J]. J Crohns Colitis, 2019, 13(6): 755-763.

3 Shah SC, Itzkowitz SH. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: Mechanisms and management [J]. Gastroenterology, 2022, 162(3):715-730,e3.

4 Vodenkova S, Buchler T, Cervena K, et al. 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future [J]. Pharmacol Ther, 2020, 206: 107447.

5 Sharma MR, Joshi SS, Kindler HL. 5-FU, irinotecan, nab-paclitaxel in gastrointestinal cancers-response [J]. Clin Cancer Res, 2020, 26(14): 3890.

6 Xie P, Mo JL, Liu JH, et al. Pharmacogenomics of 5-fluorouracil in colorectal cancer: Review and update [J]. Cell Oncol (Dordr), 2020, 43(6): 989-1001.

7 Valencia-Lazcano AA, Hassan D, Pourmadadi M, et al. 5-Fluorouracil nano-delivery systems as a cutting-edge for cancer therapy [J]. Eur J Med Chem, 2023, 246: 114995.

8 赵丹，安妮，陈常玉，等. 枫蓼肠胃康的研究进展 [J]. 现代药物与临床，2014，29(12)：1446-1450.

9 李苗苗，赵晖，张乐，等. 枫蓼肠胃康制剂治疗急性胃肠炎有效性及安全性的系统评价与Meta分析[J]. 中国中药杂志，2023，48(7)：1951-1961.

10 戎萍，闫海虹，潘桂赟，等. 枫蓼肠胃康治疗慢性胃炎临床疗效的Meta分析 [J]. 辽宁中医药大学学报，2023，25(4)：1-5.

11 Birgisson H, Olafsdottir EJ, Sverrisdottir A, et al. Screening for cancer of the colon and rectum: A review on incidence, mortality, cost and benefit [J]. Laeknabladid, 2021, 107(9): 398-405.

12 Shi W, Yan D, Zhao C, et al. Inhibition of IL-6/STAT3 signaling in human cancer cells using Evista [J]. Biochem Biophysic Res Commun, 2017, 491(1): 159-165.

13 Strasser A, Vaux DL. Cell Death in the origin and treatment of cancer[J]. Mol Cell, 2020, 78(6): 1045-1054.

14 Spitz AZ, Gavathiotis E. Physiological and pharmacological modulation of BAX [J]. Trends Pharmacol Sci, 2022, 43(3):206-220.

15 Hafezi S, Rahmani M. Targeting BCL-2 in cancer: Advances, challenges, and perspectives [J]. Cancers (Basel), 2021, 13(6): 1292.

16 Edlich F. BCL-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 500(1): 26-34.

17 Huska JD, Lamb HM, Hardwick JM. Overview of BCL-2 family proteins and therapeutic potentials [J]. Methods Mol Biol, 2019, 1877: 1-21.

18 Icard P, Fournel L, Wu Z, et al. Interconnection between metabolism and cell cycle in cancer [J]. Trends Biochem Sci, 2019, 44(6): 490-501.

19 Łukasik P, Załuski M, Gutowska I. Cyclin-dependent kinases (CDK) and their role in diseases development-review [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(6):2935.

20 Gao X, Leone GW, Wang H. Cyclin D-CDK4/6 functions in cancer [J]. Adv Cancer Res, 2020, 148: 147-169.

[本文编辑] 雷 燕 宋睿璞 朱金月