[文章编号] 1671-587X(2026)04-0932-10 DOI:10.13481/j.1671-587X.20260406

党参多糖通过TGF-β/Smad信号通路对小鼠结直肠癌肝转移的抑制作用

唐桂艳[1]，崔大鹏[2]，孙中帅[2]，张 彬[3]，马太原[1]

（1. 吉林大学第一医院普通外科中心结直肠肛门外科，吉林 长春 130021；2. 河北北方学院附属第一医院肝胆外科，河北 张家口 075000；3. 河北省保定市第二医院普通外科，河北 保定 071000）

[摘 要] **目的：**探讨党参多糖（CPPs）对小鼠结直肠癌肝转移的抑制作用，并阐明其对转化生长因子β（TGF-β）/Smad信号通路、上皮-间质转化（EMT）和炎症因子谱的调控作用。**方法：**采用经脾内注射绿色荧光蛋白（GFP）标记的小鼠结肠癌MC-38细胞建立小鼠肝转移模型。50只建模成功小鼠随机分为造模组、5-氟尿嘧啶（5-FU）组、低剂量CPPs（CPPs-L）组、中剂量CPPs（CPPs-M）组和高剂量CPPs（CPPs-H）组，每组10只。采用HE染色观察各组小鼠肝组织病理形态表现，免疫荧光染色观察各组小鼠肝肿瘤组织中细胞增殖活性，小动物活体成像技术评估CPPs作用后各组结直肠癌小鼠肝转移程度，酶联免疫吸附（ELISA）试验检测各组小鼠血清白细胞介素1β（IL-1β）、白细胞介素6（IL-6）和肿瘤坏死因子α（TNF-α）水平，实时荧光定量PCR（RT-qPCR）法检测各组小鼠肝肿瘤组织中E-钙黏素（*E-cadherin*）、N-钙黏素（*N-cadherin*）和波形蛋白（*Vimentin*）mRNA表达水平，Western blotting法检测各组小鼠肝肿瘤组织中转化生长因子β1（TGF-β1）、Smad2和Smad3及其磷酸化形式、E-cadherin、N-cadherin和Vimentin蛋白表达水平。**结果：**HE染色，与造模组比较，各剂量CPPs组小鼠肿瘤细胞排列逐渐稀疏，异型性减弱，核分裂象减少。免疫荧光染色，与造模组比较，其他各组小鼠肝转移灶中细胞增殖活性降低（$P<0.05$）。活体成像实验，抑制3周后，与造模组比较，CPPs-L组、CPPs-M组和CPPs-H组小鼠肝肿瘤组织荧光感兴趣面积（ROI）随剂量增加而逐渐减小（$P<0.05$），其中CPPs-H组小鼠ROI与5-FU组相近。ELISA法检测，与造模组比较，5-FU组、CPPs-L组、CPPs-M组和CPPs-H组小鼠血清中TNF-α、IL-1β和IL-6水平均降低（$P<0.05$）；与5-FU组比较，CPPs-H组小鼠血清中IL-1β和IL-6水平均升高（$P<0.05$）。Western blotting法检测，与造模组比较，5-FU组和各剂量组CPPs小鼠肝肿瘤组织中TGF-β1蛋白表达水平均降低，p-Smad2/Smad2和p-Smad3/Smad3比值均降低；随着CPPs剂量增加，小鼠肝肿瘤组织中E-cadherin蛋白表达水平逐渐升高，N-cadherin和Vimentin蛋白表达水平逐渐降低。RT-qPCR法检测，与造模组比较，各剂量CPPs组小鼠肝肿瘤组织中*E-cadherin* mRNA表达水平升高（$P<0.05$），*N-cadherin*和*Vimentin* mRNA表达水平降低（$P<0.05$）。**结论：**CPPs可显著抑制小鼠结直肠癌肝转移，其机制可能通过抑制TGF-β/Smad信号通路阻断EMT，并降低炎症因子表达以减轻炎症反应。

[关键词] 党参多糖；结直肠肿瘤；肝转移；上皮-间质转化；炎症介质

[中图分类号] R735.3 [文献标志码] A

[收稿日期] 2025-10-05 [录用日期] 2025-12-11

[基金项目] 吉林省科技厅重点研发项目（20240304063SF）；河北省科技厅重点研发计划项目-卫生健康创新专项（223777101D）

[作者简介] 唐桂艳（1987－），女，吉林省长春市人，主治医师，医学硕士，主要从事结直肠癌良恶性疾病诊疗方面的研究。

[通信作者] 张 彬，主任医师，硕士研究生导师（E-mail：15712576000@163.com）；

马太原，副主任医师，硕士研究生导师（E-mail：mty15804302180@fooxmail.com）

©《吉林大学学报（医学版）》编辑部，开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University（Medicine Edition）. Open access under CC BY-NC-ND license.

Inhibitory effect of *Codonopsis pilosula* polysaccharides on colorectal cancer liver metastasis through TGF-β/Smad signaling pathway

TANG Guiyan[1], CUI Dapeng[2], SUN Zhongshuai[2], ZHANG Bin[3], MA Taiyuan[1]
(1. Department of Colorectal and Anal Surgery, General Surgery Center, First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, First Affiliated Hospital, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China; 3. Department of General Surgery, Second Hospital, Baoding City, Hebei Province, Baoding 071000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the inhibitory effect of *Codonopsis pilosula* polysaccharides (CPPs) on colorectal cancer liver metastasis in the mice, and to clarify its regulatory effects on the transforming growth factor-β (TGF-β)/Smad signaling pathway, epithelial-mesenchymal transition (EMT), and inflammatory cytokine profiles. Methods: The mouse liver metastasis model was established by intrasplenic injection of green fluorescent protein (GFP)-labeled mouse colon cancer MC-38 cells. Fifty successul modeling mice were randomly divided into modeling group, 5-fluorouracil (5-FU) group, low dose of CPPs (CPPs-L) group, a medium dose of CPPs (CPPs-M) group, and high dose of CPPs (CPPs-H) group, with 10 mice in each group. Immunofluorescence staining was used to detect the proliferation activities of the tumor cells in the liver tumor tissue, and small-animal *in vivo* imaging was used to detect the degree of liver metastasis in colorectal cancer of the mice in various groups after treated with CPPs; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the serum levels of interleukin-1β (IL-1β), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor-α (TNF-α) of the mice in various groups; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression levels of *E-cadherin*, *N-cadherin*, and *Vimentin* mRNA in liver metastatic focus tumor tissue of the mice in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of TGF-β1, Smad2/3 and their phosphorylated forms, as well as E-cadherin, N-cadherin, and Vimentin proteins in liver metastatic focus tumor tissue of the mice in various groups. Results: The HE staining results showed that compared with modeling group, the tumor cells in CPPs groups were arranged more sparsely, with reduced atypia and fewer mitotic figures. The immunofluorescence staining results showed that compared with modeling group, the proliferation activities of the cells in liver tumor tissue of the mice in the other groups was decreased ($P<0.05$). *In vivo* imaging results showed that after 3 weeks of inhibition, compared with model group, the region of interest (ROI) in liver metastatic focus of the mice in CPPs-L, CPPs-M, and CPPs-H groups was gradually decreased in a dose-dependent manner ($P<0.05$), and the ROI in liver tumor tissue in CPPs-H group was similar to that in 5-FU group. The ELISA results showed that compared with modeling group, the serum levels of TNF-α, IL-1β, and IL-6 of the mice in 5-FU, CPPs-L, CPPs-M, and CPPs-H groups were decreased ($P<0.05$); the serum levels of IL-1β and IL-6 of the mice in CPPs-H group were higher than those in 5-FU group ($P<0.05$). The Western blotting results showed that compared with modeling group, the expression level of TGF-β1 protein and the ratios of p-Smad2/Smad2 and p-Smad3/Smad3 in liver tumor tissue of the mice in 5-FU and different doses of CPPs groups were decreased; with the increasing of CPPs dose, the expression level of E-cadherin protein was gradually increased, while the expression levels of N-cadherin and Vimentin proteins were gradually decreased. The RT-qPCR results showed that compared with model group, the *E-cadherin* mRNA expression level in liver tumor tissue of the mice in different doses of CPPs groups were increased ($P<0.05$), while the *N-cadherin*

and *Vimentin* mRNA expression levels were decreased ($P<0.05$). **Conclusion**: CPPs can significantly inhibit colorectal cancer liver metastasis in the mice, and its mechanism may be related to blocking EMT by inhibiting the TGF-β/Smad signaling pathway and reducing the expression of inflammatory cytokines to alleviate the inflammatory response.

KEYWORDS *Codonopsis pilosula* polysaccharides; Colorectal neoplasm; Liver metastasis; Epithelial-mesenchymal transition; Inflammatory cytokines

结直肠癌是全球范围内发病率和死亡率均居前列的恶性肿瘤[1]。结直肠癌远处转移以肝脏最为常见[2-3]。结直肠癌肝转移是影响结直肠癌患者长期生存率和总体预后的重要因素[4]。目前针对结直肠癌肝转移的治疗手段包括手术切除、靶免治疗及放射治疗等，虽然治疗效果较之前有很大提高，但同时也伴有明显不良反应，严重影响患者生活质量[5-6]。因此，探讨新型高效、低毒的抗肿瘤药物及其作用机制具有重要的临床转化价值。肿瘤转移是一个复杂的多步骤级联过程[7]，从分子水平来看，转化生长因子β（transforming growth factor-β，TGF-β）/Smad信号通路作为肿瘤进展的关键调控者，在结直肠癌转移过程中发挥核心作用[8]。该通路的异常激活可诱导上皮-间质转化（epithelial-mesenchymal transition，EMT），使肿瘤细胞丧失上皮细胞特性，获得间充质细胞的迁移和侵袭能力，是触发肿瘤转移的重要分子机制[9-10]。EMT过程中，E-钙黏素（E-cadherin）被视为维持上皮表型的关键分子，而N-钙黏素（N-cadherin）与波形蛋白（Vimentin）则作为表征间质特性的经典标志蛋白。此外，肿瘤微环境中的慢性炎症反应通过分泌多种促炎细胞因子，如白细胞介素1β（interleukin 1β，IL-1β）、白细胞介素6（interleukin 6，IL-6）和肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor，TNF-α），创造有利于肿瘤生长和转移的微环境，进一步推动疾病进展[11-12]。因此，靶向TGF-β/Smad信号通路和炎症微环境成为抑制结直肠癌肝转移的潜在治疗策略。党参作为中国传统医学中历史悠久的补气药材，具有增强免疫力、抗炎和抗氧化等多种药理作用[13]。党参多糖（*Codonopsis pilosula* polysaccharides，CPPs）是党参中提取的主要活性成分之一，由α-(1→4)-D-葡聚糖、β-(1→3)-D-葡聚糖和杂多糖等组成[14]。近年来，体内外研究[15-16]显示：CPPs具有显著的抗肿瘤活性，可通过多种机制抑制肿瘤生长和转移。在肝癌、胃癌和肺癌等多种肿瘤模型中，CPPs已被证实能够抑制肿瘤细胞增殖、诱导细胞凋亡、增强免疫监视、抑制血管生成及调控关键信号通路[17-18]。研究[19]显示：CPPs可能通过调节无翅-整合位总蛋白/β-连环蛋白（Wingless-related，integration-site/β-catenin，Wnt/β-catenin）和磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B（phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B，PI3K/AKT）等信号通路抑制某些肿瘤的EMT过程。然而，CPPs对结直肠癌肝转移的治疗效果及其可能涉及的TGF-β/Smad信号通路调控机制尚未系统阐明。考虑到TGF-β/Smad通路在肿瘤EMT及转移中的核心地位，探讨CPPs对该通路的影响对理解其抗转移机制具有重要意义。CPPs作为天然提取物，具有低毒性和多靶点作用的特点，研究其抗肿瘤转移机制不仅有助于开发新型辅助治疗药物，也为中医药防治肿瘤提供科学依据[20]。基于此，本研究构建小鼠结直肠癌肝转移模型，系统评估不同剂量CPPs对结直肠癌肝转移的抑制效果，深入探讨其对TGF-β/Smad信号通路、EMT关键分子及炎症因子表达的调控作用，旨在从分子机制层面揭示CPPs抑制结直肠癌肝转移的作用靶点，为其临床应用提供理论基础，并为开发基于天然产物的抗肿瘤转移新药提供重要线索。

1 材料与方法

1.1 实验动物、细胞、主要试剂和仪器 40只C57BL/6J雄性小鼠（北京华阜康生物科技股份有限公司），体质量18～22 g，6～8周龄，实验前在SPF级动物房内适应性饲养7 d。饲养条件：温度(22±2)℃，湿度(55±10)%，光照周期为12 h光/12 h暗，自由摄取标准颗粒饲料和无菌饮水。动物生产许可证号：SCXK（京）2021-0006；动物使用许可证号：SYXK（吉）2022-0010。实验用细胞为绿色荧光蛋白（green fluorescent protein，GFP）标记的小鼠结肠癌MC-38细胞（河北北纳生物科技有限公司），按照标准程序复苏和培养。RPMI-1640培养基（美国Gibco公司），胎牛血清和胰蛋白酶细胞消化液（中国OriCell公司），磷酸盐缓冲液（phosphate-buffered saline，PBS）、放射性免疫

沉淀分析（radioimmunoprecipitation assay，RIPA）裂解液和组织/细胞总RNA提取试剂盒（中国Servicebio公司），二辛可宁酸（bicinchoninic acid，BCA）蛋白浓度测定试剂盒和反转录试剂盒、HE染色试剂盒（中国Solarbio公司），实时荧光定量PCR（real-time fluorescence quantitative PCR，RT-qPCR）试剂盒（中国Novoprotein公司），5-氟尿嘧啶（5-fluorouracil，5-FU）（中国金耀公司，国药准字H12020959），注射用CPPs（北京Solarbio公司），兔抗GAPDH、山羊抗兔IgG和山羊抗小鼠IgG（中国EpiZyme公司），兔抗Vimentin抗体、小鼠抗E-cadherin抗体、兔抗N-cadherin抗体、兔抗TGF-β1抗体、兔抗（Smad2/3）抗体、兔抗磷酸化Smad2（phosphorylated Smad 2，p-Smad2）抗体和兔抗磷酸化Smad3（phosphorylated Smad 3，p-Smad3）抗体（中国Bioss公司）。细胞实验超净工作台（上海博迅实业有限公司，型号：BHC-1300IIA2），CO_2恒温恒湿培养箱（美国Thermo Fisher Scientific Inc公司，型号：Heracell 150i），ChemiDoc MP全能成像系统（美国Bio-Rad Laboratories，型号：170-8280），小动物活体成像仪（上海铂金埃尔默公司，型号：IVIS Lumina LT），显微镜及显微照相系统（日本Olympus科技公司，型号：OLYMPUS-DP70）。

1.2 小鼠结直肠癌肝转移模型的建立和分组给药 40只小鼠在腹腔注射5%戊巴比妥钠（0.1 mL·10 g^{-1}）麻醉后，逐层切开腹腔暴露脾脏。取2×10^7个MC-38细胞悬液（0.1 mL）缓慢注射入脾脏，注射点持续按压5 min以避免出血及细胞外漏，将脾脏放回腹腔并逐层缝合。术后第7天利用小动物活体成像技术评估肝转移建模是否成功。肝转移模型成功的判定基于以下标准[21]：①一般健康状况：监测小鼠体质量和一般状态（如腹胀或腹水）；②大体检查：处死小鼠后，仔细检查肝脏，肝表面或实质上出现可见的灰白色结节被视为转移的初步指标；③组织病理学验证：将含有可疑结节的肝组织固定、切片并进行HE染色，通过显微镜观察到结直肠癌细胞浸润肝组织，最终确认模型构建成功。建模成功的40只小鼠随机分为5组：造模组、5-FU组（10 mg·kg^{-1}·d^{-1} 5-FU）、低剂量CPPs（CPPs-L）组（50 mg·kg^{-1}·d^{-1} CPPs）、中剂量CPPs（CPPs-M）组（100 mg·kg^{-1}·d^{-1} CPPs）和高剂量CPPs（CPPs-H）组（250 mg·kg^{-1}·d^{-1} CPPs），每组8只。各组小鼠均采用腹腔注射给药，每日1次，连续21 d。本实验方案经吉林大学第一医院实验动物福利伦理委员会审批通过（伦理审批号：2023-AEEI-015）。

1.3 标本采集和处理 给药期间每日记录小鼠一般体征，每3 d记录1次体质量。末次给药后，小鼠腹腔注射麻醉，心脏采血0.5～1.0 mL，室温静置2 h后3 000 r·min^{-1}离心30 min，分离血清保存于－80 ℃。脱颈处死小鼠后，将其固定于解剖板，充分暴露腹部。用组织剪沿腹中线剪开皮肤及肌层，打开腹腔，轻柔拨开胃肠道等周围组织，充分暴露肝脏。仔细观察肝脏各叶表面及内部，寻找并识别肝转移灶组织（通常呈灰白色结节状，与正常肝组织界限清晰）。使用精细解剖镊与眼科剪，沿瘤周边缘仔细分离转移瘤与正常肝组织，操作过程中尽量避免挤压或损伤瘤体。完整剥离后，根据实验需求将转移瘤组织进行分割处理：一部分立即置于4%多聚甲醛溶液中固定用于后续病理学检查，一部分放入含RNA保存液的冻存管中以备RT-qPCR分析，剩余部分直接置于无菌冻存管并迅速转移至－80 ℃超低温冰箱保存，用于Western blotting法分析。

1.4 HE染色观察各组小鼠肝肿瘤组织病理形态表现 固定于4%多聚甲醛（不少于48 h）的肿瘤组织经梯度乙醇（80%、90%、95%、100%）脱水、二甲苯透明及石蜡浸润包埋后，制成4 μm切片。依次经二甲苯脱蜡、梯度乙醇（100%、95%、90%、80%、70%）水化后，苏木素染核（1～2 min）、1%盐酸乙醇溶液分化（3 s）、伊红复染（2～3 min）。染色后切片经乙醇逐级脱水、二甲苯透明，中性树胶封片。光学显微镜下观察切片形态并采集图像，分析肿瘤细胞形态表现及组织病理变化。

1.5 免疫荧光染色观察各组小鼠肝肿瘤组织中细胞增殖活性 取造模组、5-FU组、CPPs-L组、CPPs-M组和CPPs-H组小鼠肝转移灶固定石蜡切片，经脱蜡、水化与抗原修复后封闭，孵育Ki-67一抗并配套荧光二抗，4′，6-二脒基-2-苯基吲哚（4′，6-diamidino-2-phenylindole，DAPI）复染细胞核后抗淬灭封片。在统一成像条件下获取多视野图像，盲法排除坏死与伪影区域，计数Ki-67阳性细胞核与总细胞核数，计算Ki-67指数。设置阴性对照（省略一抗或同型对照）与阳性对照以验证特异性与一致性。以Ki-67指数代表细胞增殖活性。

1.6 小动物活体成像技术评估CPPs作用后各组结直肠癌小鼠肝转移程度 采用小动物活体成像检测小鼠肝脏区域荧光并计算荧光感兴趣区域面积（region of interest，ROI）。以ROI代表小鼠肝转移负担情况。

1.7 ELISA法检测各组小鼠血清中TNF-α、IL-1β和IL-6水平 取全血室温静置后离心分离血清，按试剂盒说明书设置标准孔、空白孔与样本孔，依次加入生物素化抗体和酶结合物并洗板，加TMB显色后以终止液终止反应，于450 nm波长处读取吸光度（A）值，依据标准曲线计算炎症因子水平。

1.8 RT-qPCR法检测各组小鼠肝肿瘤组织中EMT相关基因mRNA表达水平 采用RT-qPCR法检测造模组、5-FU组、CPPs-L组、CPPs-M组和CPPs-H组小鼠肝转移灶中EMT相关基因*E-cadherin*、*N-cadherin*和*Vimentin* mRNA表达水平，以*GAPDH*为内参，采用$2^{-\triangle\triangle Ct}$法计算。引物序列：*E-cadherin*正向引物5′-CGAGAGCTACACGTTCACGG-3′，*E-cadherin*反向引物5′-GGGTGTCGAGGGAAAAATAGG-3′；*N-cadherin*正向引物5′-TTTGATGGAGGTCTCCTAACACC-3′，*N-cadherin*反向引物5′-ACGTTTAACACGTTGGAAATGTG-3′；*Vimentin*正向引物5′-GACGCCATCAACACCGAGTT-3′，*Vimentin*反向引物5′-CTTTGTCGTTGGTTAGCTGGT-3′；*GAPDH*正向引物5′-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3′，*GAPDH*反向引物5′-CTTTGTCGTTGGTTAGCTGGT-3′。

1.9 Western blotting法检测各组小鼠肝肿瘤组织中相关蛋白表达水平 取小鼠肝转移灶组织，以RIPA裂解液裂解，离心取上清，BCA法定量蛋白浓度。等量蛋白经10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）分离后转移至聚偏二氟乙烯（polyvinylidene fluoride，PVDF）膜，封闭后依次孵育一抗（TGF-β1、Smad2、Smad3、p-Smad2、p-Smad3、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin），稀释比例均为1∶1 000和辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）标记的二抗（1∶5 000），增强化学发光（enhanced chemiluminescence，ECL）法显影。采用ChemiDoc MP成像系统采集图像，Image J软件分析条带灰度值。以GAPDH为内参，计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平＝目的蛋白条带灰度值/GAPDH条带灰度值。以造模组为参照，计算5-FU组、CPPs-L组、CPPs-M组和CPPs-H组小鼠肝转移灶中目的蛋白表达水平。

1.10 统计学分析 采用SPSS 26.0和GraphPad Prism 8.0软件进行统计学分析及图表绘制。各组小鼠肝转移灶荧光面积，肝转移灶肿瘤细胞增殖活性、血清中IL-1β、IL-6和TNF-α水平，各组小鼠肝转移灶中*E-cadherin*、*N-cadherin*、*Vimentin* mRNA表达水平TGF-β1、p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3、E-cadherin、N-cadherin和Vimentin蛋白表达水平均符合正态分布，以$\bar{x}\pm s$表示，多组间样本均数比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-*t*检验或Dunnett's T3法。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组小鼠一般体征和体质量 给药前3 d，各组小鼠活动度、毛发和体质量等一般情况比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。造模组小鼠随给药天数增加，活动度逐渐降低，后期出现毛发稀疏枯槁，且有大量腹水现象；5-FU组小鼠活动亦有减少，毛发光泽稍差，存在少量腹水，体质量下降明显；不同剂量CPPs组小鼠体质量均呈缓慢上升趋势，且CPPs-L组和CPPs-M组小鼠体质量变化趋势与造模组相近。CPPs-L组和CPPs-M组小鼠毛发稍差，进食进水均减少，活动度低；CPPs-H组小鼠毛发光泽明显优于其他4组，且活动度良好。见图1。

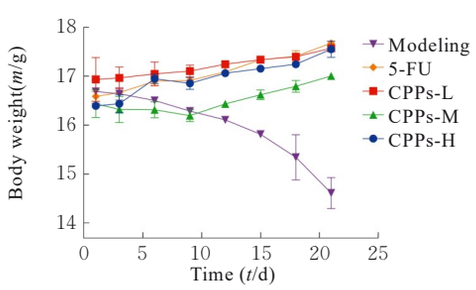


图1 不同时间点各组小鼠体质量

Fig. 1 Body weights of mice in various groups at different time points

2.2 CPPs作用后结直肠癌小鼠肝转移灶病理形态表现和肿瘤细胞增殖活性 皮下观察显示：造模组小鼠皮下形成了体积显著增大的肿块，肿瘤表面呈灰白色，质地坚硬，与周围组织界限清晰；与造模

组比较，CPPs-L组和CPPs-M组小鼠皮下肿瘤体积变小，质地更软；CPPs-H组和5-FU组小鼠皮下肿瘤体积明显缩小，部分小鼠甚至观察不到明显肿块，皮肤表面保持完整性，组织界限清晰（图2）。HE染色结果（图3）显示：造模组小鼠肿瘤组织中肿瘤细胞排列紧密，核大深染，核分裂象明显；随剂量增加各剂量CPPs组，肿瘤细胞排列逐渐稀疏，坏死区域增多，核分裂象减少。Ki-67免疫荧光染色结果（图3）显示：造模组小鼠肿瘤组织中Ki-67阳性细胞百分率高达（85.6±7.2）%，表明肿瘤细胞增殖活跃；CPPs-L组、CPPs-M组和CPPs-H组小鼠Ki-67阳性率分别降至（65.3±6.8)%、(48.2±5.9)%和(32.5±4.7)%,5-FU组为(29.8±5.2)%,均低于造模组($P<0.05$)。

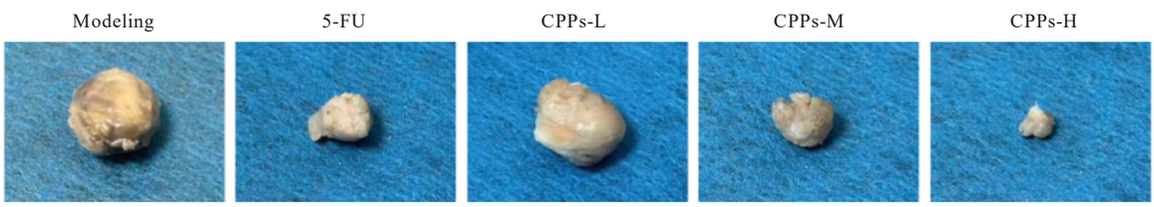


图2 CPPs处理后各组小鼠肝转移灶病理形态表现

Fig. 2 Patho morphology of liver metastatic focus of mice in various groups after treated with CPPs

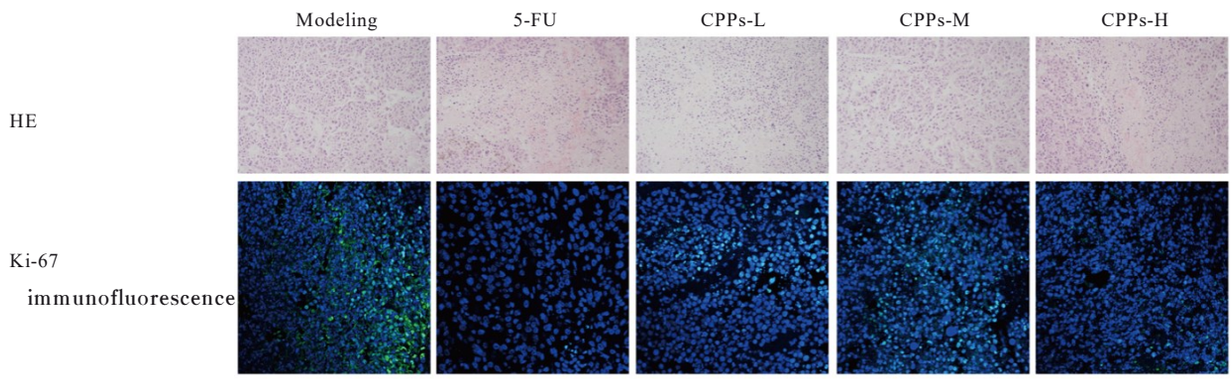


图3 CPPs处理后各组小鼠肝转移灶中肿瘤细胞增殖活性(×200)

Fig. 3 Proliferation activities of tumor cells in liver metastatic focus of mice in various groups after treated with CPPs (×200)

2.3 CPPs作用后各组结直肠癌小鼠肝转移程度

给药第7天，各组小鼠肝区均检测到荧光信号，组间ROI比较差异无统计学意义（$P>0.05$），提示各组均成功建立肝转移模型且初始转移浸润程度相近。给药第21天，与造模组比较，其他给药组小鼠肝区ROI值均降低（$P<0.05$）；其中5-FU组小鼠ROI值最低，各剂量CPPs小鼠ROI值呈剂量依赖性降低（CPPs-H组<CPPs-M组<CPPs-L组），提示肝转移负担显著减轻。见表1。

表1 各组小鼠肝区荧光ROI

Tab. 1 Fluorescen ROI in liver region of mice in various groups ($n=5, \bar{x}\pm s$)

Group	ROI	
	Time(t/d) 7	21
Modeling	89.43±12.18	1 243.47±55.77
5-FU	90.98±13.06	730.03±15.76*
CPPs-L	88.79±12.05	1 189.18±179.62$^{*○}$
CPPs-M	88.81±21.85	899.54±238.00$^{*△○}$
CPPs-H	83.72±23.75	761.29±181.36$^{*△\#○}$

$^{*}P<0.05$ compared with modeling group; $^{△}P<0.05$ compared with CPPs-L group; $^{\#}P<0.05$ compared with CPPs-M group; $^{○}P<0.05$ compared with 5-FU group.

2.4 ELISA法检测各组小鼠血清中炎症因子水平

与造模组比较，各剂量CPPs组小鼠血清中TNF-α、IL-1β和IL-6水平均明显降低($P<0.05$)，且是呈剂量依赖性。与5-FU组比较,CPPs-H组小

鼠血清中TNF-α水平差异无统计学意义（$P>0.05$），但IL-1β和IL-6水平均升高（$P<0.05$）。见表2。

2.5 各组小鼠肝肿瘤组织中EMT标志物mRNA表达水平 与造模组比较，其他各组小鼠肝肿瘤组织中*E-cadherin* mRNA表达水平升高（$P<0.05$），*N-cadherin*和*Vimentin* mRNA表达水平降低（$P<0.05$）。与5-FU组比较，CPPs-H组小鼠肝肿瘤组织中*E-cadherin* mRNA表达水平升高（$P<0.05$）；*N-cadherin*与*Vimentin* mRNA表达水平降低（$P<0.05$）。

表2 各组小鼠血清中TNF-α、IL-1β和IL-6水平

Tab. 2 Levels of TNF-α, IL-1β and IL-6 in seurm of mice in various groups [$n=3$, $\bar{x}\pm s$, ρ_B/(ng·L^{-1})]

Group	TNF-α	IL-1β	IL-6
Modeling	215.14±3.86	183.95±8.53	200.44±15.49
5-FU	91.47±3.24*	53.00±5.43*	63.14±9.90*
CPPs-L	196.87±8.91$^{*○}$	147.86±7.95*	166.74±12.25*
CPPs-M	140.89±17.04$^{*△}$	113.43±16.91$^{*△}$	140.03±11.64$^{*△}$
CPPs-H	122.69±11.38$^{*△#}$	84.83±12.80$^{*△#○}$	98.81±23.21$^{*△#○}$

$^{*}P<0.05$ compared with modeling group; $^{△}P<0.05$ compared with CPPs-L group; $^{#}P<0.05$ compared with CPPs-M group; $^{○}P<0.05$ compared with 5-FU group.

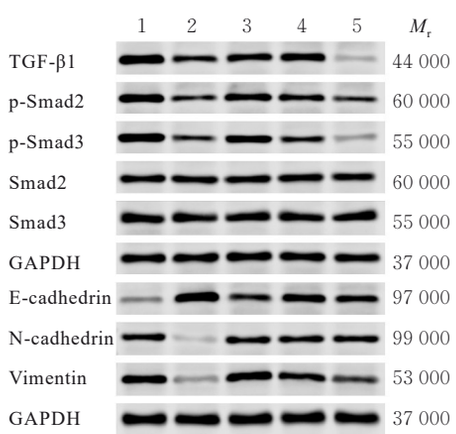
表3 各组小鼠肝肿瘤组织中*E-cadherin*、*N-cadherin*、*Vimentin* mRNA表达水平

Tab. 3 Expression levels of *E-cadherin*, *N-cadherin*, and *Vimentin* mRNA in liver tumor tissue of mice in various groups ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Group	E-Cadherin	N-Cadherin	Vimentin
Modeling	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
5-FU	3.16±0.61*	0.43±0.11*	0.51±0.10*
CPPs-L	1.10±0.16$^{*○}$	0.81±0.10$^{*○}$	0.71±0.08$^{*○}$
CPPs-M	1.86±0. 26$^{*△○}$	0.62±0.10$^{*△○}$	0.59±0.05$^{*○}$
CPPs-H	2.76±0.30$^{*△#○}$	0.45±0.12$^{*△#}$	0.46±0.07$^{*△#}$

$^{*}P<0.05$ compared with modeling control group; $^{△}P<0.05$ compared with CPPs-L group; $^{#}P<0.05$ compared with CPPs-M group; $^{○}P<0.05$ compared with 5-FU group.

2.6 各组小鼠肝肿瘤组织中EMT标志物及TGF-β/Smad信号通路相关蛋白表达水平 与造模组比较，5-FU组和各剂量CPPs组小鼠肝肿瘤组织中E-cadherin蛋白表达水平升高，N-cadherin和Vimentin蛋白表达水平均降低；其中5-FU组小鼠肝肿瘤组织中E-cadherin蛋白表达水平最高，N-cadherin和Vimentin蛋白表达水平最低。与造模组比较，各剂量CPPs组小鼠肝肿瘤组织中TGF-β1蛋白表达水平均降低。与造模组比较，各剂量CPPs组小鼠肝转移灶中p-Smad2/Smad2和p-Smad3/Smad3比值降低。见图4。



Lane 1: Model control group; Lane 2: 5-FU group; Lane 3: CPPs-L group; Lane 4: CPPs-M group; Lane 5:CPPs-H group.

图4 各组小鼠肝肿瘤组织中TGF-β1、Smad2/3、p-Smad2/3、E-cadherin、N-cadherin和Vimentin蛋白表达电泳图

Fig. 4 Electrophoregram of expressions of TGF-β1, Smad2/3, p-Smad2/3, E-cadherin, N-cadherin, and Vimentin proteins in liver tumor tissue of mice in various groups

3 讨 论

本研究阐明了CPPs在小鼠结直肠癌肝转移模型中的治疗潜力：CPPs通过抑制TGF-β/Smad信号通路、阻断EMT并下调促炎因子水平，显著抑制肿瘤的肝脏转移。上述发现为CPPs在结直肠癌肝转移治疗中的应用提供了重要实验依据。

结直肠癌肝转移是影响患者预后的关键因素，现有治疗手段疗效有限且不良反应多[22-23]。本研究构建的MC-38小鼠结直肠癌肝转移模型成功模拟了结直肠癌肝转移的病理过程，活体成像技术直观

展示了肿瘤转移及CPPs的治疗效果。本研究结果显示：CPPs处理后，CPPs-M和CPPs-H组小鼠在精神状态、饮食摄入和毛发光泽等一般情况方面均优于造模组。与5-FU组比较，各剂量CPPs组小鼠体质量呈上升趋势，这表明CPPs在发挥抗肿瘤作用的同时可能具有更低的全身毒性，这一特点对于肿瘤患者的长期治疗尤为重要[24]。

在肿瘤转移机制中，TGF-β/Smad信号通路起重要作用，其过度激活可促进EMT过程，增强肿瘤细胞的迁移和侵袭能力[8, 25]。本研究通过Western blotting法分析发现：CPPs能显著抑制TGF-β1表达，降低p-Smad2/Smad2和p-Smad3/Smad3比值，表明CPPs可能通过抑制TGF-β/Smad信号通路的激活阻断了下游效应。这一结果与既往研究[26]报道的TGF-β/Smad信号通路在肿瘤转移中的关键作用相符。进一步分析表明：随着CPPs剂量增加，小鼠肝转移灶中上皮标志物E-cadherin表达水平逐渐增加，而间质标志物N-cadherin和Vimentin表达水平逐渐降低，RT-qPCR结果也证实了相应mRNA水平的变化；上述结果共同表明：CPPs可能通过抑制TGF-β/Smad信号通路而逆转EMT过程，从而降低结直肠癌细胞的侵袭和转移能力[27-28]。

炎症微环境作为肿瘤生态系统的关键构成，可通过多条信号轴驱动肿瘤细胞的增殖、侵袭和远处播散[29]。本研究发现：CPPs处理显著降低了小鼠血清中IL-1β、IL-6和TNF-α水平，上述炎症因子均与肿瘤转移密切相关。CPPs-H组小鼠血清中IL-1β和IL-6水平降低程度大于5-FU组。已有研究[30]表明：IL-1β可促进肿瘤细胞的侵袭和血管生成；IL-6可激活STAT3信号通路促进肿瘤细胞存活和转移[31]；而TNF-α可诱导EMT过程[32]。CPPs对上述关键炎症因子的抑制作用揭示了其抗肿瘤转移的另一重要机制。这与既往研究[33]中发现的CPPs具有抗炎和免疫调节功能的结果一致。

肝肿瘤组织病理学分析进一步支持了上述分子机制研究结果。造模组小鼠肿瘤细胞排列紧密，核分裂象明显，而CPPs-H组小鼠肿瘤细胞排列稀疏，肝脏结构相对完整，表明CPPs有效抑制了肿瘤细胞在肝脏的定植和增殖。这种组织学改变与TGF-β/Smad通路抑制和EMT逆转的分子变化相符，共同构成了CPPs抑制结直肠癌肝转移的证据链。

本研究还发现：CPPs的抗肿瘤转移效果呈现明显的剂量依赖性，CPPs-H组效果接近甚至在某些指标上优于5-FU组，这为CPPs临床应用剂量的确定提供了重要参考。此外，与单一靶点的化疗药物不同，CPPs通过调控多条信号通路和多种分子靶点发挥抗肿瘤转移作用，这种多靶点作用模式可能有助于减少肿瘤耐药性的产生，为结直肠癌肝转移的综合治疗提供新的思路[34]。

本研究仍存在一些局限性。首先，本研究尚未深入探讨TGF-β/Smad信号通路与炎症反应之间的交互作用；其次，CPPs抑制肿瘤转移的详细分子机制可能涉及更多信号通路和靶点，需要进一步研究；第三，本研究采用的是动物模型，结果在人体中的适用性有待临床研究验证。未来研究可从以下几个方面深入：一是探讨CPPs与现有化疗药物的协同作用；二是鉴定CPPs中的活性成分并进行结构优化；三是开展前瞻性临床研究，评估CPPs辅助治疗结直肠癌肝转移的安全性和有效性。

综上所述，CPPs可显著遏制小鼠结直肠癌的肝脏转移，其效应主要源于对TGF-β/Smad通路的抑制、EMT进程的阻碍以及炎症因子水平的下调。上述发现不仅丰富了对CPPs抗肿瘤机制的理解，也为临床开发基于CPPs的抗结直肠癌肝转移新策略提供了科学依据，具有重要的理论和应用价值。

利益冲突声明：

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明：

唐桂艳和崔大鹏参与论文选题、实验设计、实验操作、数据整理及论文撰写，孙中帅参与数据整理，张彬和马太原参与论文审阅及修改。

[参考文献]

[1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-263.

[2] SIEGEL R L, WAGLE N S, CERCEK A, et al. Colorectal cancer statistics, 2023[J]. CA Cancer J Clin, 2023, 73(3): 233-254.

[3] HUANG J J, LUCERO-PRISNO D E 3rd, ZHANG L, et al. Updated epidemiology of gastrointestinal cancers in East Asia[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2023, 20(5): 271-287.

[4] MORRIS V K, KENNEDY E B, BAXTER N N, et al. Treatment of metastatic colorectal cancer: ASCO guideline[J]. J Clin Oncol, 2023, 41(3): 678-700.
[5] SHIN A E, GIANCOTTI F G, RUSTGI A K. Metastatic colorectal cancer: mechanisms and emerging therapeutics[J]. Trends Pharmacol Sci, 2023, 44(4): 222-236.
[6] LIU B L, ZHOU H Y, TAN L C, et al. Exploring treatment options in cancer: Tumor treatment strategies[J]. Sig Transduct Target Ther, 2024, 9(1): 175.
[7] LAWRENCE R, WATTERS M, DAVIES C R, et al. Circulating tumour cells for early detection of clinically relevant cancer[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2023, 20(7): 487-500.
[8] LIU A Y, YU C X, QIU C, et al. PRMT5 methylating SMAD4 activates TGF-β signaling and promotes colorectal cancer metastasis[J]. Oncogene, 2023, 42(19): 1572-1584.
[9] SABOUNI E, NEJAD M M, MOJTABAVI S, et al. Unraveling the function of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in colorectal cancer: Metastasis, therapy response, and revisiting molecular pathways[J]. Biomedecine Pharmacother, 2023, 160: 114395.
[10] THAPA R, AFZAL O, AFZAL M, et al. From LncRNA to metastasis: The MALAT1-EMT axis in cancer progression[J]. Pathol Res Pract, 2024, 253: 154959.
[11] BARDELČÍKOVÁ A, ŠOLTYS J, MOJŽIŠ J. Oxidative stress, inflammation and colorectal cancer: an overview[J]. Antioxidants (Basel), 2023, 12(4): 901.
[12] NIGAM M, MISHRA A P, DEB V K, et al. Evaluation of the association of chronic inflammation and cancer: Insights and implications [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 164: 115015.
[13] CHEN G M, JIANG N, ZHENG J P, et al. Structural characterization and anti-inflammatory activity of polysaccharides from *Astragalus membranaceus*[J]. Int J Biol Macromol, 2023, 241: 124386.
[14] SHA W J, ZHAO B, WEI H Z, et al. *Astragalus* polysaccharide ameliorates vascular endothelial dysfunction by stimulating macrophage M2 polarization *via* potentiating Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. Phytomedicine, 2023, 112: 154667.
[15] YANG Q, MENG D D, ZHANG Q Y, et al. Advances in research on the anti-tumor mechanism of *Astragalus* polysaccharides[J]. Front Oncol, 2024, 14: 1334915.
[16] YANG C, LI D, KO C N, et al. Active ingredients of traditional Chinese medicine for enhancing the effect of tumor immunotherapy[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1133050.
[17] XU Q, CHENG W, WEI J R, et al. Synergist for antitumor therapy: *Astragalus* polysaccharides acting on immune microenvironment[J]. Discov Oncol, 2023, 14(1): 179.
[18] XIONG H T, HAN X P, CAI L, et al. Natural polysaccharides exert anti-tumor effects as dendritic cell immune enhancers [J]. Front Oncol, 2023, 13: 1274048.
[19] CHEN R Q, LI Y T, ZUO L, et al. *Astragalus* polysaccharides inhibits tumor proliferation and enhances cisplatin sensitivity in bladder cancer by regulating the PI3K/AKT/FoxO1 axis [J]. Int J Biol Macromol, 2025, 311: 143739.
[20] WANG F H, ZHANG X T, TANG L, et al. The Chinese Society of Clinical Oncology (CSCO): Clinical guidelines for the diagnosis and treatment of gastric cancer, 2023[J]. Cancer Commun, 2024, 44(1): 127-172.
[21] SATHE A, MASON K, GRIMES S M, et al. Colorectal cancer metastases in the liver establish immunosuppressive spatial networking between tumor-associated macrophages and fibroblasts[J]. Clin Cancer Res, 2023, 29(1): 244-260.
[22] BOND M J G, BOLHUIS K, LOOSVELD O J L, et al. First-line systemic treatment strategies in patients with initially unresectable colorectal cancer liver metastases (CAIRO5): an open-label, multicentre, randomised, controlled, phase 3 study from the Dutch Colorectal Cancer Group[J]. Lancet Oncol, 2023, 24(7): 757-771.
[23] LINARES J, SALLENT-ARAGAY A, BADIA-RAMENTOL J, et al. Long-term platinum-based drug accumulation in cancer-associated fibroblasts promotes colorectal cancer progression and resistance to therapy[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 746.
[24] FASANO M, PIROZZI M, MICELI C C, et al. TGF-β modulated pathways in colorectal cancer: new potential therapeutic opportunities[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(13): 7400.
[25] CHEN Z D, LIANG H Y, YAN X X, et al. *Astragalus* polysaccharide promotes autophagy and alleviates diabetic nephropathy by targeting the lncRNA Gm41268/PRLR pathway[J]. Ren Fail, 2023, 45(2): 2284211.
[26] SUN L I, ZHUO S C, LI X X, et al. *Astragalus* polysaccharide enhances the therapeutic efficacy of cisplatin in triple-negative breast cancer through multiple mechanisms[J]. Oncol Res, 2025, 33(3): 641-651.

[27] NIAN Q, LIU R X, ZENG J H. Unraveling the pathogenesis of myelosuppression and therapeutic potential of natural products[J]. Phytomedicine, 2024, 132: 155810.

[28] TYLUTKA A, WALAS Ł, ZEMBRON-LACNY A. Level of IL-6, TNF, and IL-1β and age-related diseases: a systematic review and meta-analysis [J]. Front Immunol, 2024, 15: 1330386.

[29] GUO Q, JIN Y Z, CHEN X Y, et al. NF-κB in biology and targeted therapy: new insights and translational implications[J]. Sig Transduct Target Ther, 2024, 9(1): 53.

[30] HU Z Y, SUI Q H, JIN X, et al. IL6-STAT3-C/EBPβ-IL6 positive feedback loop in tumor-associated macrophages promotes the EMT and metastasis of lung adenocarcinoma[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2024, 43(1): 63.

[31] LEONE G M, MANGANO K, PETRALIA M C, et al. Past, present and (foreseeable) future of biological anti-TNF alpha therapy[J]. J Clin Med, 2023, 12(4): 1630.

[32] AUYEUNG K K, HAN Q B, KO J K. *Astragalus membranaceus*: a review of its protection against inflammation and gastrointestinal cancers[J]. Am J Chin Med, 2016, 44(1): 1-22.

[33] WU Q, YANG Z P, NIE Y Z, et al. Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: Mechanisms and lab approaches[J]. Cancer Lett, 2014, 347(2): 159-166.

[34] DUAN C Y, YU M J, XU J Y, et al. Overcoming Cancer Multi-drug Resistance (MDR): Reasons, mechanisms, nanotherapeutic solutions, and challenges [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 162: 114643.