

·方与药·

清解扶正方调控 Wnt/ β -catenin 信号通路 抑制结直肠癌肝转移的机制研究

任丽萍,房文铮,林开敏,陈妹钦,华杭菊,卢丽莎,吴 婷,陈武进*
(福建中医药大学附属人民医院,福建 福州 350004)

摘要: 目的 探究清解扶正方调控 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制结直肠癌肝转移的作用及机制。方法 采用半脾注射 HCT116-luc 细胞构建结直肠癌肝转移小鼠模型,通过活体成像观察肿瘤脏器转移情况,将 30 只构建成功的荷瘤裸鼠以简单随机数字表法分为 5 组,每组 6 只:模型组、低剂量组(2 g/kg)、中剂量组(4 g/kg)、高剂量组(8 g/kg)及阳性药物组(XAV939, 10 mg/kg)。以体质量 20 g 小鼠为基准换算给药体积,统一给药容积为 0.4 mL,低、中剂量组以蒸馏水补足至 0.4 mL;模型组灌胃等体积蒸馏水,阳性药物组采用腹腔注射给药,连续给药 6 周,末次给药后行活体成像检测,观察 5 组肝脏形态变化及移植瘤活体成像结果;TUNEL 荧光染色检测移植瘤细胞凋亡水平;Western blot 检测肿瘤组织 Wnt3a、Wnt1、 β -catenin 及 p- β -catenin 蛋白的相对表达量。结果 模型组小鼠肝脏体积显著增大,肝表面可见大量清晰肿瘤转移结节,证实半脾肝转移肿瘤模型构建成功;与模型组比较,其余 4 组小鼠肝脏体积缩小,肝脏表面转移结节数量明显减少,其中低剂量组与阳性药物组肝脏转移病灶最少,大体形态改善最显著。活体成像结果显示:与模型组比较,其余 4 组肝脏及脾脏荧光强度均降低。TUNEL 荧光染色结果显示,各给药组凋亡细胞数量均高于模型组($P<0.05$),其中阳性药物组和低剂量组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),中、高剂量组细胞凋亡数量明显低于阳性药物组($P<0.05$)。Western blot 结果显示,与模型组比较,各给药组 Wnt3a、Wnt1 及 β -catenin 蛋白相对表达量均降低($P<0.05$),p- β -catenin 蛋白相对表达量升高($P<0.05$);与阳性药物组比较,低剂量组 Wnt1 和 Wnt3a 蛋白相对表达量均降低($P<0.05$),中剂量组 Wnt3a 蛋白相对表达量也降低($P<0.05$),高剂量组 Wnt1、Wnt3a 及 p- β -catenin 蛋白相对表达量均降低($P<0.05$), β -catenin 蛋白相对表达量上升($P<0.05$)。提示与阳性药物组比较,清解扶正方各剂量组对上游 Wnt1/Wnt3a 信号的抑制作用更为显著,中、低剂量组对 β -catenin 磷酸化及降解水平的调控效应与阳性抑制剂相当。结论 清解扶正方可通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路活化,进而抑制结直肠癌肝转移,且清解扶正方各剂量组均显示有效,但未呈剂量递增累积效应,低剂量(2 g/kg)为本研究中抗结直肠癌肝转移的优势剂量。

关键词: 结直肠癌;肝转移;清解扶正方;Wnt/ β -catenin 信号通路;细胞凋亡

结直肠癌是常见的消化道恶性肿瘤,在我国发病率位居第二,病死率位居癌症死亡原因第五^[1],对国民生命与健康产生巨大危害。该病早期通常无明显症状,约 30% 的患者在初诊时已发生肝转移,即使完全切除肝转移灶,仍有约 65% 的患者在 5 年内复发^[2]。因此,预防和抑制肝转移,对提高大肠癌患者的生存率具有重要意义。

Wnt/ β -catenin 通路对结肠癌等肿瘤的形成和发展起到重要调控作用^[3-4]。据报道,超过 94% 的肠癌患者存在该通路的异常变化^[5]。 β -catenin 是该通路的关键蛋白,其被异常激活后,致使肿瘤干细胞自我更新及调节分化的功能失调,从而促进肿瘤的发生、发展^[6]。因此,研究靶向抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路对肠癌的治疗具有重大意义。

清解扶正方为福建中医药大学附属人民医院肿瘤科经过多年临床实践,基于传统中医药理论总

结而出。在临床使用广泛,尤其在肠癌中疗效确切,且未见明显的毒副作用。为进一步探讨清解扶正方在肠癌肝转移的治疗作用及机制,本研究通过建立小鼠半脾肝转移模型,基于 Wnt/ β -catenin 通路,探讨清解扶正方对大肠癌肝转移小鼠的肿瘤抑制作用及对相关因子的影响,探索清解扶正方抑制大肠癌肝转移的作用机制。

1 实验材料

1.1 实验动物 Balb/c 裸小鼠,4 周龄,雄性,18~22 g,购买自江苏集萃药康生物科技股份有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(苏)2023-0009)。饲养于江西中洪博元生物技术有限公司,实验动物使用许可证号:SYXK(赣)2023-0015。饲养条件:温度 20~26 °C,湿度 40%~70%。动物实验经江西中洪博元生物技术有限公司实验动物伦理委员会审批(审批号:LL-202410150004)。

1.2 实验细胞 HCT116-luc 细胞(货号:iCell-h375)采购自镜像点(上海)细胞技术有限公司。

1.3 实验药物 清解扶正方(含炙黄芪、半枝莲、党参、白花蛇舌草、炙甘草、炒麦芽等,总生药量 73 g),购于福建中医药大学附属人民医院。药物制备:取

收稿日期:2026-02-15;接受日期:2026-05-15

基金项目:福建省自然科学基金项目(2023J01849);福建中医药大学优势学科专项课题资助(X2022013-专项);福建省科技创新联合资金项目(2024Y9496)

通信作者:陈武进, E-mail: 767005078@qq.com

DOI: 10.13260/j.cnki.fjtc.2026.07011

上述中药经水提、减压浓缩后,加蒸馏水定容配制成药浓度为 0.4 g/mL 药液,离心取上清液,4 °C 冷藏备用,使用前摇匀。XAV939(Tankyrase 抑制剂,美国 MCE 公司,货号:HY-15147)为经典 Wnt/ β -catenin 信号通路特异性抑制剂。

1.4 实验试剂 McCoy's 5A 基础培养基(武汉普诺赛生命科技有限公司,货号:PM150710);TUNEL 检测液(上海碧云天生物技术有限公司,货号:C1090);BCA 蛋白定量试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,货号:E-BC-K318-M);PVDF 膜(德国默克密理博,货号:IPVH00010);脱脂奶粉(北京普利莱基因技术有限公司,货号:P1622); β -肌动蛋白内参抗体(Mouse Anti β -Actin,北京全式金生物有限公司,货号:HC201,1:2 000);Wnt 家族成员 3A 抗体(Rabbit Anti WNT3A,江苏亲科生物有限公司,货号:DF6113);磷酸化 β -连环蛋白抗体(Rabbit Anti p- β -Catenin,江苏艾美科生物技术有限公司,货号:YP1558,1:1 000);1%青霉素链霉素混合液(货号:P1400)和荧光素钾盐(货号:IL2330)购自北京索莱宝科技有限公司;Wnt 家族成员 1 抗体 Rabbit Anti WNT1(货号:27935-1-AP,1:1 000)和 β -连环蛋白抗体 Rabbit Anti β -catenin(货号:66379-1-Ig,1:20 000)购自武汉三鹰生物技术有限公司;DAPI 染色液(货号:G1012)、HRP 酶标记抗小鼠二抗(HRP conjugated Goat Anti-Mouse IgG, H+L, 货号:GB23301,1:2 000)和 HRP 酶标记抗兔二抗(HRP conjugated Goat Anti-Rabbit IgG, H+L, 货号:GB23303,1:2 000)购自武汉赛维尔生物技术有限公司;澳洲胎牛血清(货号:10099-141)和超敏发光液(货号:RJ239676)购自美国赛默飞世尔科技有限公司。

1.5 实验仪器 CO₂培养箱(上海一恒科学仪器有限公司,型号:BPN-80CW);活体成像系统[瑞孚迪生物医学(上海)有限公司,型号:IVIS Lumina XRMS Series III];显微镜(日本奥林巴斯株式会社,型号:BX53);超高灵敏度化学发光成像系统(上海天能科技有限公司,型号:Tanon-5200);医用离心机(长沙英泰仪器有限公司,型号:TD4A);高速离心机(德国艾本德股份公司,型号:5424R);全自动酶标仪(上海闪谱生物科技有限公司,型号:SuPerMax 3100);组织脱水机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司,型号:KD-TS3S1);电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械有限公司,型号:HGZF-101-1);热恒温培养箱(山东博科生物科技公司,型号:DHP-9054);石蜡包埋机(型号:HistoCore Arcadia)、切片机(型号:HistoCore BIOCUT)和摊片机(型号:HI1210)均购自德国 Leica 公司。

2 实验方法

2.1 细胞培养 将冻存 HCT116-luc 细胞从液氮中取出,快速融化后加入 15 mL 预热完全培养基,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入培养基重悬后接种至培养皿中,37 °C、5% CO₂培养,次日更换培养基。往培养皿中加入 0.25% 胰酶(含 0.02% EDTA),37 °C 消化 2 min,待细胞变圆后用含血清培养基终止,1 000 r/min 离心 5 min 后进行传代。取对数生长期细胞,消化后收集细胞悬液并以 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清;加入 1×PBS 重悬细胞沉淀,计数后细胞总量约为 1.5×10⁸个;加入 3 mL 1×PBS 重悬细胞,制备成细胞悬液,每只实验小鼠接种 100 μ L 细胞悬液(细胞量约为 5×10⁶个)。

2.2 动物造模 所有裸鼠购入后统一进行 7 d 适应性饲养,适应期间观察裸鼠一般状态,包括精神活跃度、皮肤有无伤口;适应性饲养结束后,剔除体弱多病、存在外伤或隐性感染、脏器外观异常的不合格个体,最终纳入 30 只健康合格裸鼠用于正式实验,以确保纳入实验的裸鼠基线状态完全一致,排除非处理因素对实验结果的干扰。动物适应性饲养结束后进行造模。采用舒泰 50 联合速眠新腹腔注射麻醉小鼠,小鼠保持左侧卧位进行横向固定,碘伏消毒待手术区后,于小鼠左侧腋后线肋缘下,纵行切开长约 0.5~1.0 cm 的创口,逐层分离腹壁组织,充分暴露腹腔视野。将脾脏下极牵出切口外,使用 1 mL 无菌注射器,于脾脏被膜下平行进针约 2 mm,缓慢匀速推注 0.1 mL HCT116-luc 结直肠癌细胞悬液。注射部位脾被膜可见发白肿胀,拔针时用止血小纱布轻轻按压 30 s 以上,防止细胞的渗漏和倒流。10 min 后用 4-0 丝线结扎该侧血管和韧带,沿脾脏中央无血管解剖平面完整切除脾脏下极,彻底电凝或压迫止血脾脏残端切面,确认无活动性出血后,将保留的脾脏上极及周边网膜组织轻柔回纳至腹腔原位。最后采用逐层缝合方式关闭腹壁肌层与皮肤,完成手术操作。

2.3 动物分组及干预 本实验采用完全随机设计方法开展动物干预研究。待裸鼠造模周期满 17 d 后,通过小动物活体成像系统验证成模情况,将成模合格的荷瘤裸鼠采用简单随机数字表法进行随机分组,共分为 5 组,每组 6 只,分别为:模型组、低剂量组(2 g/kg)、中剂量组(4 g/kg)、高剂量组(8 g/kg)、阳性药物组(10 mg/kg)。按 20 g 小鼠体重折算给药体积,统一给药容积 0.4 mL,低、中剂量组以蒸馏水补足至 0.4 mL,模型组给予等体积蒸馏水,阳性药物组腹腔注射 XAV939,持续给药 6 周。给药结束后进行活体成像观察。

2.4 活体成像检测 小鼠按照 150 mg/kg 剂量腹腔注射荧光素钾盐,使用异氟烷麻醉后等待 10~

15 min, 将小鼠俯卧位置于小动物活体成像系统暗箱中, 并采集图像, 参数设置如下: 发射波长 620 nm, 曝光时间 30 s, 成像视野(FOV)设置为 C 模式, 成像区域尺寸 10 cm, 光圈 F/1。

2.5 TUNEL 染色检测移植瘤组织凋亡情况 将固定好的移植瘤组织样本经梯度乙醇脱水后, 放入二甲苯 I、II 透明各 45 min, 再放入石蜡 I、石蜡 II、各 50~60 min, 石蜡包埋后切片。石蜡切片脱蜡至水: 将石蜡切片进行烤片, 然后将切片放入二甲苯 I 10 min、二甲苯 II 10 min、无水乙醇 I 3 min、无水乙醇 II 3 min、95% 乙醇 3 min、80% 乙醇 3 min、纯水 2 min。将切片移入湿盒中, 每个样本上滴加 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Proteinase K 工作液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min。PBS 充分洗涤 3 次, 每次 5 min。用吸水纸吸掉组织周围的 PBS, 每张玻片滴加足够量的 TUNEL 检测液, 42 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 h。用 PBS 洗去多余的检测液, 滴加 DAPI 避光孵育 3 min, 对标本进行染核, 用 PBS 冲洗多余的 DAPI; 再用吸水纸吸干玻片上的液体, 随后用含抗荧光淬灭剂的封片液封, 在荧光显微镜下观察并采集图像。

2.6 Western blot 检测目的蛋白 取一定质量的移植瘤组织, 加入 RIPA 裂解液, 用组织研磨仪进行研磨, 提取组织总蛋白, 置于高速离心机内, 转速设置为 12 000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 取上清液, BCA 蛋白定量试剂盒对总蛋白进行定量。蛋白样品加入 5 $\times$ SDS 上样缓冲液, 混匀后于 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸变性 5 min, 冰上冷却后瞬时离心备用。配制 SDS-PAGE 凝胶(10% 分离胶、5% 浓缩胶), 样品先以 80 V 恒压电泳至溴酚蓝指示剂进入分离胶, 调整电压至

120 V 继续电泳, 总电泳时长约 1.5 h, 然后用 300 mA 恒流转膜 1 h。PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后, 再用一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 次日室温孵育二抗 2 h, 随后滴加超敏发光液, 并置于超高灵敏度化学发光成像系统中进行显影。采用 ImageJ 软件图像分析系统检测各目的蛋白光密度值, 以 β -actin 为内参, 对比分析各目的蛋白相对表达量。

2.7 统计学方法 所有数据均采用 GraphPad Prism 9.5.1 软件进行绘图及统计学分析。符合正态分布且方差齐性的定量数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两采用 Tukey 法进行事后检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 5 组肝脏形态和移植瘤活体成像结果比较 5 组肝脏形态观察可见, 模型组小鼠肝脏体积显著增大, 肝表面可见大量清晰肿瘤转移结节, 证实半脾肝转移肿瘤模型构建成功; 与模型组相比, 各给药组小鼠肝脏体积缩小, 肝脏表面转移结节数量明显减少, 其中低剂量组与阳性药物组肝脏转移病灶最少, 大体形态改善最显著。见图 1。

活体成像结果显示: 模型组小鼠肝脏与脾脏组织均检测到荧光素表达, 且表达强度最高; 与模型组比较, 其余 4 组荧光强度均下降 ($P < 0.05$)。见图 2 和表 1。

3.2 5 组移植瘤组织细胞凋亡情况比较 见表 2 和图 3。

3.3 5 组移植瘤组织 Wnt3a、Wnt1、 β -catenin 和 p- β -catenin 蛋白相对表达量比较 见表 3 和图 4。

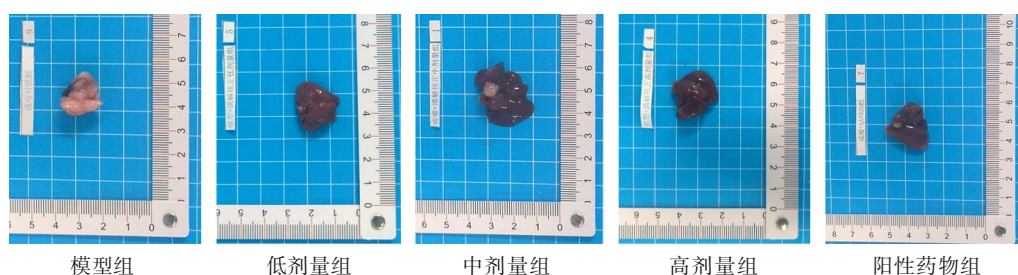


图 1 5 组肝脏形态比较

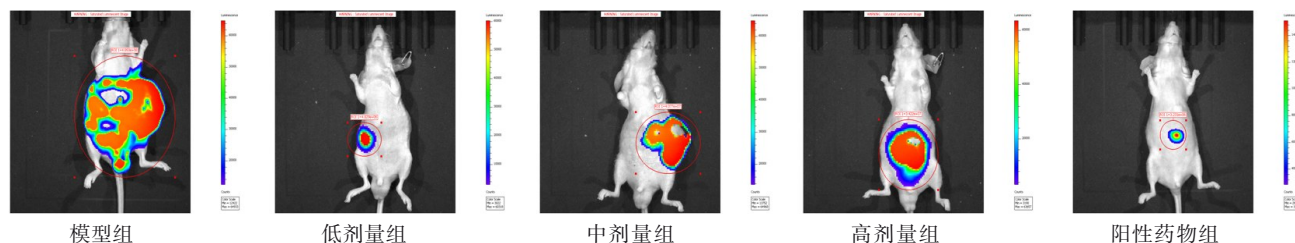


图 2 5 组移植瘤活体成像结果比较

表 1 5 组移植瘤活体成像荧光强度比较 ($\bar{x}\pm s$)		
组别	<i>n</i>	荧光强度(ROI 区域内 每秒发射的总光子数)
模型组	6	$4.84\times 10^8\pm 1.34\times 10^8$
低剂量组	6	$2.37\times 10^7\pm 1.82\times 10^7$ ¹⁾
中剂量组	6	$5.28\times 10^7\pm 1.73\times 10^7$ ¹⁾
高剂量组	6	$3.08\times 10^7\pm 1.17\times 10^7$ ¹⁾
阳性药物组	6	$8.33\times 10^6\pm 5.09\times 10^6$ ¹⁾

注:与模型组比较,1) $P<0.05$ 。

表 2 5 组移植瘤组织细胞凋亡数量比较 ($\bar{x}\pm s$)		
组别	<i>n</i>	细胞凋亡数量/(个/视野)
模型组	6	4.75 ± 1.26
低剂量组	6	28.00 ± 7.44 ¹⁾
中剂量组	6	17.25 ± 1.71 ¹⁾²⁾
高剂量组	6	22.25 ± 4.57 ¹⁾²⁾
阳性药物组	6	33.75 ± 2.87 ¹⁾

注:与模型组比较,1) $P<0.05$;与阳性药物组比较,2) $P<0.05$ 。

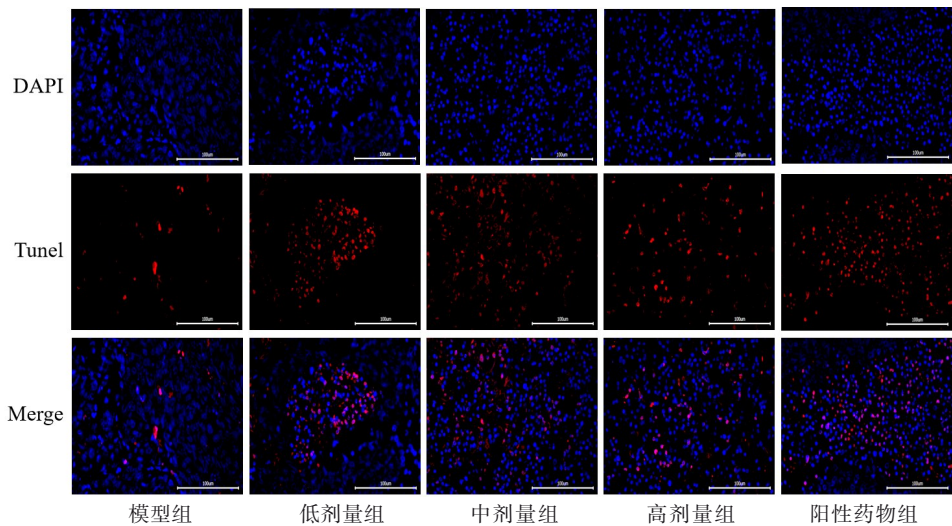


图 3 5 组移植瘤细胞凋亡 TUNEL 染色荧光图

表 3 5 组移植瘤组织 Wnt3a、Wnt1、 β -catenin 和 p- β -catenin 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)					
组别	<i>n</i>	Wnt3a	Wnt1	β -catenin	p- β -catenin
模型组	6	0.69 ± 0.03	0.65 ± 0.06	1.14 ± 0.03	0.07 ± 0.00
低剂量组	6	0.09 ± 0.01 ¹⁾²⁾	0.05 ± 0.01 ¹⁾²⁾	0.26 ± 0.03 ¹⁾	0.39 ± 0.05 ¹⁾
中剂量组	6	0.11 ± 0.02 ¹⁾²⁾	0.27 ± 0.02 ¹⁾	0.28 ± 0.04 ¹⁾	0.35 ± 0.03 ¹⁾
高剂量组	6	0.11 ± 0.02 ¹⁾²⁾	0.04 ± 0.01 ¹⁾²⁾	0.77 ± 0.02 ¹⁾²⁾	0.21 ± 0.03 ¹⁾²⁾
阳性药物组	6	0.25 ± 0.03 ¹⁾	0.23 ± 0.03 ¹⁾	0.35 ± 0.06 ¹⁾	0.41 ± 0.07 ¹⁾

注:与模型组比较,1) $P<0.05$;与阳性药物组比较,2) $P<0.05$ 。

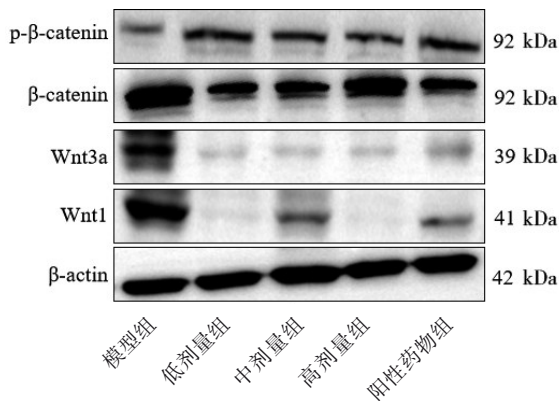


图 4 5 组移植瘤组织 Wnt3a、Wnt1、 β -catenin 和 p- β -catenin 蛋白印迹图

4 讨 论

结直肠癌是临床常见消化道恶性肿瘤,肝转移是导致患者预后不良的关键因素。Wnt/ β -catenin

信号通路异常激活在结直肠癌发生、侵袭及肝转移进程中发挥核心调控作用^[7-10]。正常生理状态下,细胞质内 β -catenin 可被糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)、腺瘤性结肠息肉病蛋白(APC)、轴蛋白(Axin)构成的降解复合体磷酸化,经泛素-蛋白酶体途径快速降解,通路处于静息状态^[7,10];当 Wnt 通路异常激活,Wnt1、Wnt3a 等上游配体高表达并与细胞膜受体结合,可抑制降解复合体活性,使 β -catenin 磷酸化受阻,大量 β -catenin 在胞质蓄积并入核,与 T 细胞因子(TCF)/淋巴增强因子(LEF)转录因子结合,启动下游肿瘤增殖、侵袭及转移相关靶基因转录,最终促进肠癌细胞肝侵袭、定植与转移^[7,10]。研究证实,结肠癌患者组织中 β -catenin 异常高表达与不良预后密切相关^[11],其异常蓄积与入核是驱动肿瘤进展的关键环节,亦是干预肠癌转移的重要

靶点。

中医学认为,结直肠癌肝转移核心病机为脾胃气虚、癌毒内蕴,治疗当以益气健脾、扶正固本、清热解毒、消散癌毒为基本原则^[12-15]。清解扶正方为福建中医药大学附属人民医院肿瘤科经验方,方中炙黄芪、党参益气健脾,扶助正气;半枝莲、白花蛇舌草清热解毒,抗癌祛邪;炙甘草、炒麦芽健脾和中,顾护胃气。全方扶正不助邪,祛邪不伤正,与本病病机高度契合。前期临床与基础研究证实,本方联合化疗可提高晚期肠癌疗效,减轻毒副反应^[16-17],并通过调控 PI3K/Akt、ERK、铁死亡相关通路发挥抗肿瘤作用^[18-21]。

本研究采用小鼠半脾肝转移模型,从活体成像、细胞凋亡、信号通路蛋白 3 个层面开展研究。活体成像结果显示,清解扶正方各剂量组干预后,小鼠肝脏与脾脏部位荧光强度显著降低,提示本方能够有效抑制结直肠癌肝转移灶的形成与生长。TUNEL 染色结果表明,清解扶正方可显著提高移植瘤细胞凋亡率,其中低剂量组凋亡效果与阳性抑制剂 XAV939 相当,提示诱导肿瘤细胞凋亡是本方抗转移的重要途径。Western blot 结果显示,清解扶正方干预后,Wnt1、Wnt3a 蛋白表达显著降低,从源头阻断通路激活的上游信号,减少胞外促转移信号向细胞内传导;同时磷酸化 β -catenin 表达显著升高,总 β -catenin 表达显著降低,提示清解扶正方可有效激活 β -catenin 降解复合体,促进其磷酸化降解,减少胞内功能性 β -catenin 蓄积,阻止其入核启动下游转移相关基因表达,进而抑制结肠癌细胞的侵袭转移能力^[7,10]。与仅靶向作用于 β -catenin 下游降解环节、不直接调控 Wnt1、Wnt3a 等上游配体的 XAV939^[22-23]比较,清解扶正方可同时调控 Wnt/ β -catenin 通路上游配体与下游效应蛋白,展现出多靶点、全链条调控的优势。本研究中阳性药物组 Wnt1、Wnt3a 表达较模型组亦显著降低,推测该现象与 Wnt/ β -catenin 通路固有的负反馈调控环路密切相关^[24-25]:当 β -catenin 降解增多、通路异常活化被抑制后,细胞可通过负反馈机制适应性地反向下调上游 Wnt1、Wnt3a 配体表达,进而维持信号网络稳态。因此,本研究结果与 XAV939 的经典作用机制并无矛盾^[22-23]。

本研究结果显示,清解扶正方不同剂量均可有效抑制结直肠癌肝转移、诱导肿瘤细胞凋亡并调控 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达,但未呈现随剂量升高而效果持续增强的线性量效关系。

在活体成像及细胞凋亡实验中,低剂量组抑瘤及促凋亡作用最为显著;Western blot 结果亦提示,低、中剂量组对通路核心蛋白的调控作用优于高剂量组,整体呈现“低剂量最优”的非单调量效特点。此种现象与中药复方多成分、多靶点的作用特点密切相关。本方以益气健脾、清热解毒为治法,2 g/kg 剂量既可发挥祛邪抗癌之功,又能顾护正气、调和机体状态,达到扶正与祛邪的平衡,符合中医药“轻剂扶正、中病即止”的用药原则;而 8 g/kg 高剂量虽清热解毒作用更强,但可能因药性偏于攻伐,对整体微环境产生一定影响,加之中药成分在体内存在吸收、代谢的饱和效应,致使药效未随剂量递增而进一步提升。综合药效与作用特点,2 g/kg 为本研究中抗结直肠癌肝转移的优势剂量。

本研究采用半脾肝转移模型模拟临床肠癌肝转移病理过程,贴近疾病真实状态;同时明确清解扶正方对 Wnt/ β -catenin 通路的上游-下游双重调控作用,区别于单一靶点抑制剂,凸显中医药“整体调节、多靶点起效”的优势。但本研究仍存在以下局限性:① 机制探讨深度有待加强。本研究仅检测 Wnt/ β -catenin 通路核心上下游蛋白,未进一步检测 β -catenin 下游靶基因及凋亡关键蛋白,尚不完整构建“通路调控-细胞凋亡-抗转移”的分子证据链,后续可增加相关指标检测,进一步完善机制阐释。② 模型与细胞系选择较为单一。本研究仅采用 HCT116-luc 细胞构建动物模型,未在其他结直肠癌细胞系中验证,结论普适性存在局限,未来可选用多种肠癌细胞系重复关键实验,提高结果可靠性。③ 中医扶正机制实验依据有待补充。本研究侧重阐释“清热解毒、祛邪抗癌”相关机制,对“益气健脾、扶正固本”的核心功效缺乏实验支撑,后续可补充动物体质量、免疫器官指数、外周血免疫因子等指标,强化扶正与祛邪的内在关联,完善中西医结合机制。④ 剂量-效应关系仍需深入研究。本研究虽观察到 2 g/kg 为优势剂量、整体呈非单调量效特点,但仅设置 2、4、8 g/kg 3 个剂量组,未设置更密集的剂量梯度,对本方量效规律的揭示尚不够系统,后续可增设梯度剂量并开展时效观察,进一步明确最优给药范围。

综上,清解扶正方可通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路,抑制上游配体表达,促进 β -catenin 磷酸化降解,诱导肿瘤细胞凋亡,发挥抗结直肠癌肝转移作用。本研究为清解扶正方临床应用提供了实验依据,后续可围绕下游靶基因、凋亡核心蛋白、

多细胞系验证、免疫与扶正相关指标、精细剂量梯度开展深入研究,进一步完善作用机制,为中医药防治结直肠癌肝转移提供更充分的科学支撑。

参考文献

- [1] MILLER K D, SIEGEL R L, LIN C C, et al. Cancer treatment and survivorship statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(5): 363-385.
- [2] MOWBRAY N G, CHIN C, DUNCAN P, et al. How successful is liver resection for colorectal cancer liver metastases in patients over 75 years [J]. Ann Hepato-Biliary-Pancreat Surg, 2021, 25(1): 18-24.
- [3] MORAVEC M. Colorectal cancer and canonical Wnt signalling pathway [J]. Cas Lek Cesk, 2012, 151(7): 335-342.
- [4] KLAUS A, BIRCHMEIER W. Wnt signalling and its impact on development and cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(5): 387-398.
- [5] Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer [J]. Nature, 2012, 487(7407): 330-337.
- [6] KANWAR S S, YU Y, NAUTIYAL J, et al. The Wnt/ β -catenin pathway regulates growth and maintenance of colonospheres [J]. Mol Cancer, 2010, 9: 212.
- [7] 顾家伟, 牛耿明, 柯重伟. 经典 Wnt/ β -catenin 信号通路中 β -catenin 在细胞核内外分布的调控机制及潜在治疗靶点的研究进展[J]. 复旦学报(医学版), 2022, 49(2): 300-308.
- [8] 杨晓, 唐蔚, 蒋益兰, 等. 健脾消癌方对人结肠癌 HCT116 细胞周期、凋亡及 Wnt/ β -catenin 信号通路相关因子的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25(6): 61-65.
- [9] 任建琳, 吕祥, 陈文婷, 等. 健脾复方通过 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制裸鼠人大肠癌转移[J]. 中国医药科学, 2014, 4(4): 23-25, 28.
- [10] 申佳林, 赵小莹, 薛成成, 等. 中药靶向 Wnt 信号通路防治结直肠癌研究进展[J]. 中国中药杂志, 2025, 50(16): 3678-3687.
- [11] BALDUS S, MÖNIG S, HUXEL S, et al. MUC1 and nuclear beta-catenin are coexpressed at the invasion front of colorectal carcinomas and are both correlated with tumor prognosis [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(8): 2790-2796.
- [12] 李玉, 李城, 时浩洋, 等. 基于“伏毒”学说审因论治结直肠癌[J]. 天津中医药, 2024, 41(6): 681-686.
- [13] 邹建华, 李刘生, 吴煜. 基于脾虚痰蕴病机探讨健脾化痰法防治结直肠癌[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(1): 103-106.
- [14] 何善泉, 徐心瑶, 陈雪, 等. 从扶正解毒理论探讨中医药防治结直肠癌[J]. 现代中医临床, 2021, 28(5): 1-6.
- [15] 史碧霄, 曹云, 李烜. 归芍六君子汤加减辅助化疗治疗大肠癌肝转移 25 例临床研究[J]. 江苏中医药, 2018, 50(12): 33-36.
- [16] 任丽萍, 卢丽莎, 华杭菊, 等. 扶正抗癌膏联合化疗治疗大肠癌 54 例[J]. 福建中医药, 2018, 49(6): 28-30.
- [17] 华杭菊, 林久茂, 任丽萍, 等. 清解扶正方联合 mFOLFOX4 方案治疗晚期肠癌的疗效观察[J]. 福建中医药, 2019, 50(1): 20-21, 24.
- [18] 杨弘. 基于 PI3K/AKT 和 ERK 信号通路研究清解扶正颗粒抑制大肠癌生长的作用机制[D]. 福州: 福建中医药大学, 2019: 20.
- [19] 曹治云, 余旋, 魏丽慧, 等. 清解扶正颗粒体外抑制血管新生的作用机制研究[J]. 实用中西医结合临床, 2019, 19(1): 4-6, 160.
- [20] 赵锦燕, 朱晓勤, 蓝紫林, 等. 清解扶正颗粒促进凋亡和自噬逆转结直肠癌细胞多药耐药研究[J]. 世界中医药, 2024, 19(15): 2246-2252.
- [21] 吴爱英, 蔡媛, 徐君君, 等. 清解扶正颗粒抑制 Nrf2/SLC7A11/GPX4 通路诱导结直肠癌细胞铁死亡[J]. 黑龙江医药科学, 2025, 48(11): 6-12.
- [22] HUANG S M, MISHINA Y M, LIU S, et al. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling [J]. Nature, 2009, 461(7264): 614-620.
- [23] 包人月, 严小军, 刘建新. Tankyrases 的抑制作用于经典 Wnt 途径: 治疗癌症的新靶点[J]. 中国细胞生物学学报, 2012, 34(11): 1134-1140.
- [24] JHO E H, ZHANG T, DOMON C, et al. Wnt/ β -Catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway [J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(4): 1172-1183.
- [25] LUSTIG B, JERCHOW B, SACHS M, et al. Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of Conductin/Axin2 in colorectal and liver tumors [J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(4): 1184-1193.