

艾灸对结肠炎相关性结肠癌大鼠细胞增殖相关蛋白PCNA、CyclinD1的影响

李昆珊^{1,2}, 林亚莹^{1,2}, 李灵杰³, 陈珂旭³, 赵继梦^{1,2}, 李国娜^{1,2}, 王照钦¹, 李琪^{1,2*}, 黄艳^{1,2*}

¹上海市针灸经络研究所, 上海

²上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院, 上海

³上海中医药大学, 上海

Email: lkunshan@163.com, *zyshy2015@126.com, *liqi283202819@163.com

收稿日期: 2021年1月20日; 录用日期: 2021年2月28日; 发布日期: 2021年3月9日

摘要

目的: 观察艾灸“天枢、气海”穴对结肠炎相关性结肠癌(CAC)模型大鼠肿瘤的影响, 从细胞增殖角度探讨艾灸对CAC的作用机制。方法: 将SD大鼠随机分为正常组、模型组、隔药灸组、隔姜灸组。采用AOM/DSS方法构建CAC模型, 隔药灸组和隔姜灸组选用“天枢、气海”穴, 每穴灸2壮/次, 共30次。观察大鼠结肠组织成瘤率、组织病理学改变和肿瘤评分; ELISA法检测血清CysC含量; 免疫组化法、Western blot法检测结肠组织PCNA和CyclinD1蛋白表达水平。结果: 与正常组比, 模型组成瘤率和肿瘤评分均升高($P < 0.05$), 光镜下结肠组织可见不同级别异型增生, 达到腺癌程度; 血清CysC含量、结肠组织PCNA和CyclinD1蛋白的表达均显著升高($P < 0.05$)。与模型组比, 隔药灸组、隔姜灸组成瘤率和肿瘤评分均降低($P < 0.05$), 血清CysC含量、结肠组织PCNA和CyclinD1蛋白的表达均显著降低($P < 0.05$)。结论: 隔药灸和隔姜灸可延缓CAC肿瘤生长, 其机制可能与降低结肠组织PCNA和CyclinD1蛋白的表达, 从而抑制结肠细胞增殖相关。

关键词

结肠炎相关性结肠癌, 艾灸, 增殖细胞核抗原, 细胞周期蛋白D1, 细胞增殖

Effect of Moxibustion on Cell Proliferation-Related Proteins PCNA and CyclinD1 in Colitis-Associated Colon Cancer Rats

*通讯作者。

文章引用: 李昆珊, 林亚莹, 李灵杰, 陈珂旭, 赵继梦, 李国娜, 王照钦, 李琪, 黄艳. 艾灸对结肠炎相关性结肠癌大鼠细胞增殖相关蛋白 PCNA、CyclinD1 的影响[J]. 中医学, 2021, 10(2): 157-168. DOI: 10.12677/tcm.2021.102022

Kunshan Li^{1,2}, Yaying Lin^{1,2}, Lingjie Li³, Kexu Chen³, Jimeng Zhao^{1,2}, Guona Li^{1,2},
Zhaoqin Wang¹, Qi Li^{1,2*}, Yan Huang^{1,2*}

¹Shanghai Research Institute of Acupuncture and Meridian, Shanghai

²Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai

³Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai

Email: lkunshan@163.com, *zyshy2015@126.com, *liqi283202819@163.com

Received: Jan. 20th, 2021; accepted: Feb. 28th, 2021; published: Mar. 9th, 2021

Abstract

Objective: To observe the effect of moxibustion “Tianshu” and “Qihai” on the growth of colon tumors in colitis-associated cancer (CAC) model rats, and explore the mechanism of moxibustion in CAC from the perspective of cell proliferation. **Methods:** SD rats were randomly divided into normal group, model group, herb-partitioned moxibustion group and ginger-partitioned moxibustion group. The CAC model was constructed by AOM/DSS method. Herb-partitioned moxibustion group and ginger-partitioned moxibustion group used moxibustion “Tianshu” and “Qihai”, with 2 times per pointeach time, a total of 30 times. The tumor formation rate, histopathological changes and tumor score of colon tissues were observed. Serum CysC was detected by ELISA. The expression of PCNA and CyclinD1 proteins in colon tissues was detected by immunohistochemistry and Western blot. **Results:** Compared with normal group, the tumor formation rate and tumor score of the colon tissues in model group were both increased ($P < 0.05$), and different grades of dysplasia can be seen in colon tissue under light microscope, reaching the level of adenocarcinoma. The content of serum CysC, the expression of PCNA and CyclinD1 proteins in colon tissues were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with model group, the tumor formation rate and tumor score of the colon tissues in herb-partitioned moxibustion group and ginger-partitioned moxibustion group were both reduced ($P < 0.05$). The content of serum CysC, the expression of PCNA and CyclinD1 protein in colon tissues were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Herb-partitioned moxibustion and ginger-partitioned moxibustion can delay the growth of CAC tumors, and their mechanism may be related to inhibit the cell proliferation of colon tissue by reducing the expression of PCNA and CyclinD1 proteins.

Keywords

Colitis-Associated Cancer, Moxibustion, Proliferating Cell Nuclear Antigen, CyclinD1, Cell Proliferation

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

结肠炎相关性结肠癌(Colitis-associated cancer, CAC)是由肠道慢性炎症反复损伤、修复、增生引起的结肠癌变。CAC的发病率是散发性结直肠癌的5~11倍,研究表明在炎症性肠病(Inflammatory bowel disease, IBD)患者确诊8~10年后,发展为CAC的风险每年增加0.5%~1.0%,最终因CAC死亡人数约占IBD患者总数的15% [1] [2]。目前临床治疗CAC主要涵盖手术治疗、放疗、化疗、免疫治疗和其他支持治疗等

方式。手术治疗是 CAC 首选疗法,但其 5 年生存率仅为 50%左右,其他治疗效果亦不令人满意[3]。前期研究发现针灸能够在一定程度上改善 IBD 肠道形态学和超微结构,减少炎症反应,防止炎症向肿瘤的转变,同时在 CAC 的发病过程中,针灸也发挥了延缓肿瘤生长的作用[4] [5] [6] [7] [8]。

肿瘤形成的一个重要基础为细胞增殖和凋亡失衡,导致细胞数目的不断增加,表现出生长优势,导致细胞增殖失控[9]。现代研究表明增殖细胞核抗原(Proliferating cell nuclear antigen, PCNA)和细胞周期素 D1 (CyclinD1)与细胞增殖直接相关,能够通过提高肿瘤细胞 DNA 的增殖速度,促进肿瘤细胞扩增水平[10] [11] [12]。PCNA 在细胞周期 G₁晚期开始表达, S 期达到峰值,在 DNA 复制、DNA 修复、细胞周期调控和细胞增殖中发挥着重要的作用[13]。过度表达的 CyclinD1 会使原本正常生长的细胞出现持续增殖的状态,进而导致正常细胞转化为肿瘤细胞,其主要促进细胞周期从 G₁期进入 S 期,促进 DNA 的合成[14] [15]。为探讨艾灸对 CAC 的作用机制是否与参与调节细胞增殖有关,本研究观察艾灸对 CAC 模型大鼠结肠组织中 PCNA 和 CyclinD1 的影响,为促进艾灸作为治疗 CAC 的一种补充替代疗法的临床应用提供一定的科学依据。

2. 材料

2.1. 实验动物

购入由上海斯莱克实验动物有限公司提供的 26 只清洁级 SD 雄性大鼠,体质量 100 ± 20 g,将其置于室温 $18^{\circ}\text{C}\sim 22^{\circ}\text{C}$,相对湿度 50%~70%,采光和通风良好的环境中,自由活动。所有动物及饲料均由上海中医药大学实验动物中心提供,动物生产许可证号: SCXK(沪)2017-0005。实验操作遵循美国国立卫生研究院和上海市实验动物伦理委员会的规定。

2.2. 主要试剂和主要仪器

5%BSA 封闭液、ECL 发光试剂盒、RIPA 裂解液、RNA 酶抑制剂、GAPDH 内参、鼠兔通用免疫组化化学试剂盒(上海威奥生物科技有限公司,中国),Anti-PCNA 抗体、Anti-CyclinD1 抗体(Abcam, 英国),Anti-C-myc 抗体(Santa Cruz Biotechnology, 美国),ELISA 试剂盒(R & D Systems, 美国)。组织脱水机、石蜡切片机(Leica, 德国),组织包埋机、全自动酶标仪(Thermo Fisher, 美国),转模仪、电泳槽、凝胶成像系统(Bio-Rad, 美国)。

3. 方法

3.1. 动物分组及模型制备

26 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周后,先采用随机数字表法随机分为 2 组:正常大鼠(正常组) 6 只、造模大鼠 20 只(2 只用于模型鉴定),造模成功后再次将 18 只造模大鼠随机分为模型组、隔药灸组、隔姜灸组,每组各 6 只。造模大鼠予以氧化偶氮甲烷(Azoxymethane, AOM)腹腔注射(2 mg/ml 浓度, 10 mg/Kg) 1 次后正常饮水饲养 7 天,然后改为饮用 3%-2%-2%浓度葡聚糖硫酸钠(Dextran sodium sulfate, DSS)溶液,饮用 DSS 溶液 4 天,正常饮水 17 天[16]。详见图 1。造模后次日,抽取 2 只造模大鼠,通过肉眼观察结肠组织有无肿瘤及 HE 染色检测造模是否成功。

3.2. 干预方法

造模成功后,提前 1 天剃除各组大鼠“天枢(双)、气海”穴附近毛发。正常组和模型组大鼠陪同固定,不予艾灸干预。隔药灸组采用隔药灸治疗:将木香、附子、肉桂等药粉,以黄酒调和,压制于黄铜模具内,制成直径约 0.8 cm,厚约 0.4 cm 的药饼。放于大鼠“天枢”、“气海”穴,取穴方法参考《实验针灸学》[17]。药饼上放置约 90 mg 的艾炷,每穴灸 2 壮,每日 1 次,每周 6 次,共 30 次。隔姜灸组采用

隔姜灸治疗：将新鲜生姜切成直径约 0.8 cm、厚约 0.4 cm 的姜片，余操作同隔药灸组。

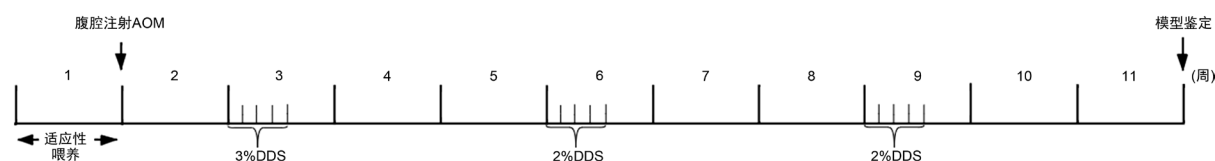


Figure 1. CAC model preparation

图 1. CAC 模型制备示意图

3.3. 结肠组织取材

末次治疗结束，各组大鼠禁食 24 h 后采用 2% 的戊巴比妥钠进行腹腔注射麻醉。麻醉成功后断颈处死，纵向剖开从耻骨联合至回盲部约 5 cm 结肠，生理盐水清洗后肉眼观察结肠肿瘤数量。剪下约 1 cm 含瘤体结肠，固定于 4% 多聚甲醛中。剩余结肠组织剪碎，分装保存在冻存管中，置于 -80°C 冰箱备用。

3.4. 检测指标与方法

3.4.1. 大鼠成瘤率[18]

$$\text{成瘤率} = \frac{\text{每组成瘤大鼠的只数}}{\text{每组大鼠的总只数}} \times 100\%$$

3.4.2. HE 染色法观察大鼠结肠组织病理学变化

组织固定脱水，石蜡包埋，切片为 4 μm 厚度。二甲苯、乙醇脱蜡至水，HE 染色，梯度酒精脱水，二甲苯透明，中性树脂封片。在 200 倍光镜下观察结肠组织形态的改变并拍照分析。

3.4.3. 基于结肠组织病理形态进行肿瘤评分[19]

标准如下：① 隐窝(正常为 0 分，杯状细胞减少为 1 分；分支状、不规则、隐窝腔扩张为 2 分；萌芽复合体为 3 分)；② 上皮(正常为 0 分，过度增生或畸形隐窝病灶为 1 分，轻度不典型增生：核仁增大、轻度深染、细胞核拥挤分层现象为 2 分，高度不典型增生：细胞核分层、重度深染、多形性、核极性消失为 3 分)，黏膜下浸润(无为 0 分，有为 1 分)。

3.4.4. ELISA 法检测大鼠血清 CysC 浓度

遵照 CysC 检测指标 ELISA 试剂盒的使用方法，为避免实验误差，进行了 2 个复孔的检测，求取平均值。具体操作如下：将 100 μL /孔的标准品、待测样品孵育 2.5 h，洗板。加 100 μL /孔生物素标记抗体，孵育 1 h，洗板。每孔加 100 μL Streptavidin Solution 孵育 45 min，洗板。每孔加 100 μL TMB Substrate Solution 避光孵育 30 min。每孔加 50 μL 终止液，在 450 nm 波长处测定每孔的 OD 值。

3.4.5. 免疫组织化学法检测大鼠结肠组织 PCNA、CyclinD1 蛋白的表达

切片常规脱蜡至水；于 3% H_2O_2 浸泡 10 min，冲洗 10 min；抗原热修复；滴加 5% BSA 封闭液 35 min，滴加一抗[稀释浓度为 PCNA (1:10,000)、CyclinD1 (1:100)]， 4°C 冰箱过夜，PBS 清洗。滴加二抗， 37°C 烘烤 35 min，PBS 清洗。DAB 显色。脱水，透明与封片；随机选取每张组织片上 3~5 个视野拍照，运用 Image-Plus Pro 6.0 软件进行分析，计算出每张图片的阳性目标阳性面积和积分光密度，并计算出平均光密度。

3.4.6. Western blot 法检测大鼠结肠组织 PCNA 和 CyclinD1 蛋白的表达

在剪碎的结肠组织中滴加组织裂解液粉碎匀浆，取上清液；采用 BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度；80

v 恒压电泳 1 h, 根据目的蛋白 120 v 恒压电泳 1~2 h; 在转膜缓冲液中依据目的蛋白 200 mA 恒流转膜 50~70 min; 5% BSA 室温封闭 2 h。洗膜后加入一抗[稀释浓度为 PCNA (1:1000)、CyclinD1 (1:200)、 β -Actin (1:1000)], 4℃ 孵育过夜, 洗膜后加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(Jackson1: 2000)摇床上孵育 2 h。洗膜后用化学发光法进行显色, 放入凝胶成像系统内自动曝光显影。将胶片进行扫描, 用凝胶图像处理系统对样品条带的灰度值进行数字化分析, 以目的蛋白/ β -Actin 的比值为其相对表达量。

3.5. 统计学分析

采用 SPSS26.0 统计分析软件对数据进行统计学处理。若计量资料符合正态分布以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 各组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法或 Tamhane 法; 若计量资料不符合正态分布以中位数(四分位数) [Median (P_{25} , P_{75})]表示, 各组间比较采用秩和检验。计数资料以例数和率进行表示, 采用 Fisher 确切概率法。以 $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义的标准。

4. 结果

4.1. 艾灸延缓结肠炎相关性结肠癌大鼠肿瘤生长的效应观察

4.1.1. 各组大鼠结肠成瘤率比较

正常组大鼠结肠未见瘤体。模型组、隔药灸、隔姜灸大鼠结肠可见瘤体, 肿瘤位于结肠远端三分之二处, 靠近直肠位置最多。隔药灸组和隔姜灸组成瘤率明显低于模型组($P < 0.05$)。详见表 1。

Table 1. Comparison of colon tumor formation rate in rats from each group

表 1. 各组大鼠结肠成瘤率比较

组别	<i>n</i>	成瘤大鼠数	成瘤率(%)
正常组	6	0	0
模型组	6	5	83.33 ¹⁾
隔药灸组	6	2	33.33 ²⁾
隔姜灸组	6	2	33.33 ²⁾

注: 与正常组比, ¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比, ²⁾ $P < 0.05$ 。

4.1.2. 各组大鼠结肠组织病理学观察

正常组结肠组织黏膜及上皮组织完整, 腺体排列有序, 黏膜固有层分布有毛细血管和散在的淋巴细胞, 未见充血、水肿、炎性细胞浸润等表现; 模型组结肠组织可见黏膜层增厚, 大量固有腺体消失, 腺体大小和形状十分不规则, 排列紊乱, 杯状细胞丢失, 腺体内腺上皮细胞排列失去极向, 紧密重叠, 可见多层, 细胞核深染, 核质比增大, 核分裂增多, 间质出血水肿, 部分腺腔高度扩张呈囊状; 隔药灸组结肠组织固有腺体萎缩, 形态不一, 排列紊乱, 杯状细胞部分消失, 淋巴细胞浸润, 间质出血水肿, 核分裂和不典型增生程度较模型组降低; 隔姜灸组结肠固有腺体萎缩, 形态不一, 排列紊乱, 杯状细胞部分消失, 大量炎性细胞浸润, 间质出血水肿及核分裂程度较模型组减轻, 可见不典型增生。详见图 2。

4.1.3. 各组大鼠结肠组织肿瘤评分

与正常组比, 模型组大鼠结肠组织肿瘤评分显著升高($P < 0.05$); 与模型组比, 隔药灸组、隔姜灸组大鼠结肠组织肿瘤评分均显著降低($P < 0.05$); 隔药灸组与隔姜灸组比, 差异无统计学意义($P = 0.514$)。详见表 2。

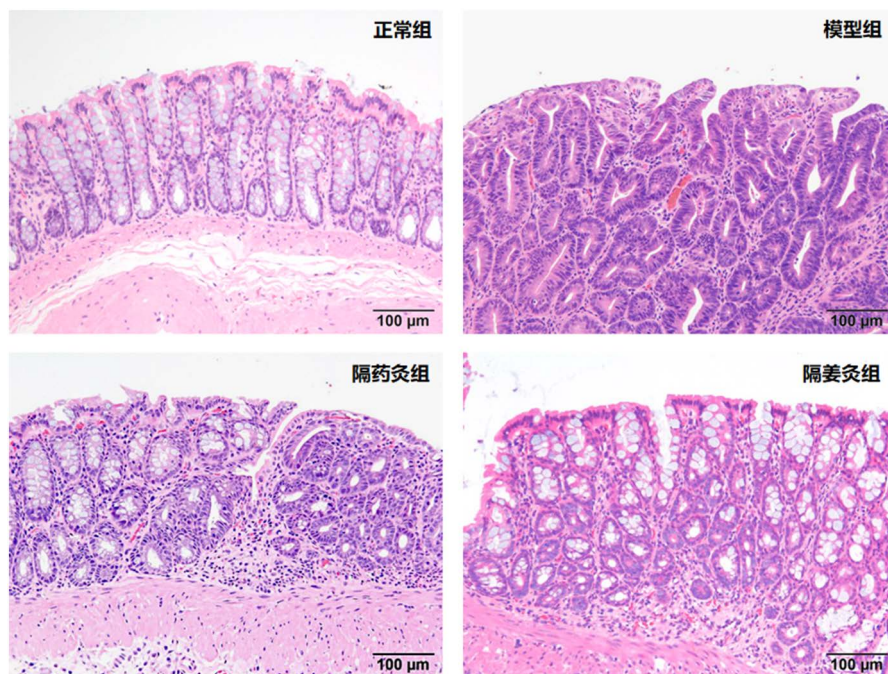


Figure 2. Histopathological observation of the colon in rats from each group

图 2. 各组大鼠结肠组织病理学观察

Table 2. Colon tissue tumor scores rate in rats from each group [Median (P_{25} , P_{75})]

表 2. 各组大鼠结肠组织肿瘤评分[Median (P_{25} , P_{75})]

组别	n	评分
正常组	6	1 (0, 0.25)
模型组	6	3 (2, 4) ¹⁾
隔药灸组	6	1 (1, 1.25) ²⁾
隔姜灸组	6	1 (1, 2) ²⁾

注：与正常组比，¹⁾ $P < 0.05$ ；与模型组比，²⁾ $P < 0.05$ 。

4.1.4. 各组大鼠肿瘤标志物血清 CysC 浓度的比较

与正常组比，模型组大鼠血清 CysC 浓度显著升高($P < 0.01$)；与模型组比，隔药灸组、隔姜灸组大鼠血清 CysC 浓度均显著降低($P < 0.01$, $P < 0.05$)；隔药灸组与隔姜灸组比，差异无统计学意义($P = 0.514$)。详见表 3。

Table 3. Serum CysC concentration in rats from each group [Median (P_{25} , P_{75})]

表 3. 各组大鼠血清 CysC 浓度[Median (P_{25} , P_{75})]

组别	n	浓度(pg/ml)
正常组	6	1317.27 (1061.87, 1799.55)
模型组	6	3665.25(2281.89, 4102.67) ¹⁾
隔药灸组	6	1277.43 (734.68, 1475.86) ²⁾
隔姜灸组	6	1194.83(1093.43, 2022.92) ²⁾

注：与正常组比，¹⁾ $P < 0.05$ ；与模型组比，²⁾ $P < 0.05$ 。

4.2. 艾灸对 CAC 模型大鼠结肠组织细胞增殖的影响

4.2.1. 各组大鼠结肠组织 PCNA 蛋白表达

采用免疫组织化学法检测结果显示：PCNA 蛋白主要定位于结肠组织细胞胞核中，阳性表达呈棕黄色或棕褐色颗粒。模型组中可见较多棕黄色或棕褐色颗粒，分布密集，隔药灸组和隔姜灸组胞核中阳性表达较模型组有不同程度的降低，而正常组胞核中仅见少量黄色或淡黄色细颗粒。与正常组比，模型组大鼠结肠组织 PCNA 平均光密度显著升高($P < 0.01$)；与模型组比，隔药灸组、隔姜灸组大鼠结肠组织 PCNA 平均光密度表达均显著降低($P < 0.05$)；隔药灸组与隔姜灸组比，PCNA 平均光密度表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。详见图 3 和表 4。

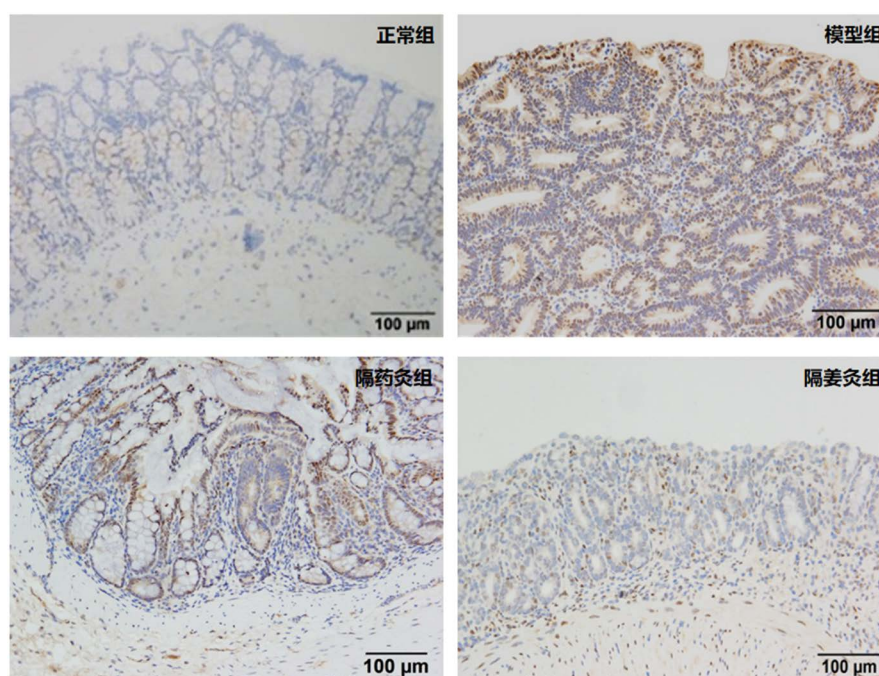


Figure 3. PCNA protein positive expression in rats colon tissue from each group

图 3. 各组大鼠结肠组织 PCNA 蛋白阳性表达

Table 4. Comparison of PCNA protein positive expression in rats colon tissue from each group ($\bar{x} \pm s$)

表 4. 各组大鼠结肠组织 PCNA 蛋白阳性表达的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	平均光密度
正常组	6	0.15 ± 0.01
模型组	6	0.51 ± 0.04 ¹⁾
隔药灸组	6	0.28 ± 0.07 ²⁾
隔姜灸组	6	0.32 ± 0.06 ²⁾

注：与正常组比，¹⁾ $P < 0.05$ ；与模型组比，²⁾ $P < 0.05$ 。

WB 结果表明：与正常组比，模型组大鼠结肠组织 PCNA 蛋白表达显著升高($P < 0.01$)；与模型组比，隔药灸组、隔姜灸组大鼠结肠组织 PCNA 蛋白表达均显著降低($P < 0.05$)。隔药灸组与隔姜灸组比，差异无统计学意义($P > 0.05$)。详见图 4 和表 5。

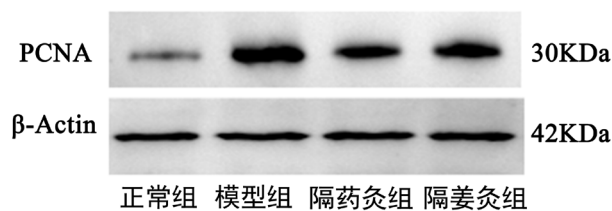


Figure 4. Comparison of colon tissue PCNA protein in rats from each group
图 4. 各组大鼠结肠组织 PCNA 蛋白比较

Table 5. Comparison of the relative expression of PCNA protein in rats colon tissue from each group ($\bar{x} \pm s$)

表 5. 各组大鼠结肠组织 PCNA 蛋白相对表达量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	PCNA/ β -Actin
正常组	6	0.43 \pm 0.10
模型组	6	1.37 \pm 0.31 ¹⁾
隔药灸组	6	0.73 \pm 0.13 ²⁾
隔姜灸组	6	0.71 \pm 0.10 ²⁾

注：与正常组比，¹⁾ $P < 0.05$ ；与模型组比，²⁾ $P < 0.05$ 。

4.2.2. 各组大鼠结肠组织 CyclinD1 蛋白表达

采用免疫组织化学法检测结果显示：CyclinD1 蛋白主要定位于结肠组织细胞核中，阳性表达呈棕黄色或棕褐色颗粒。模型组中可见较多棕黄色或棕褐色颗粒，分布密集，隔药灸组和隔姜灸组细胞核中阳性表达较模型组有不同程度的降低，而正常组细胞核中仅见少量黄色或淡黄色细颗粒。与正常组比，模型组大鼠结肠组织 CyclinD1 平均光密度显著升高($P < 0.01$)；与模型组比，隔药灸组、隔姜灸组大鼠结肠组织 CyclinD1 平均光密度表达均显著降低($P < 0.05$)；隔药灸组与隔姜灸组比，CyclinD1 平均光密度表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。详见图 5 和表 6。

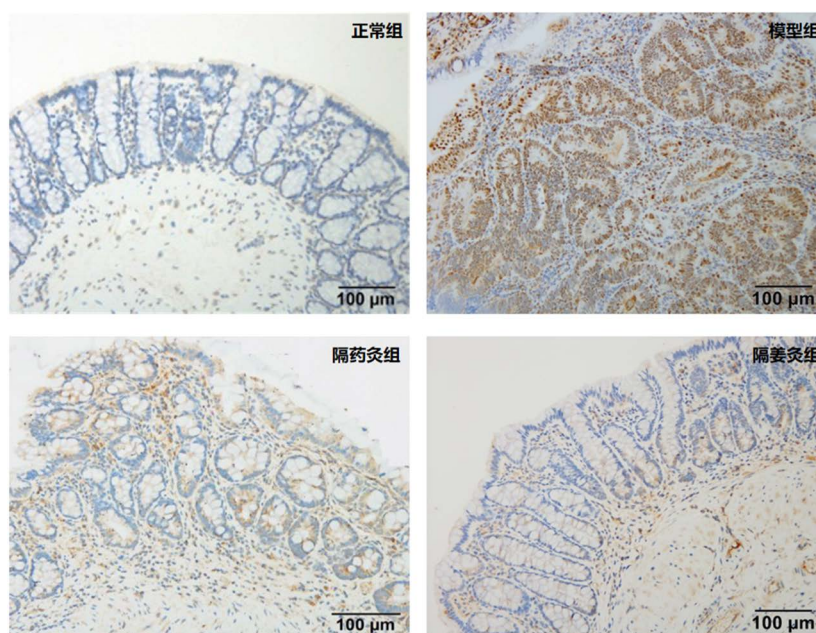


Figure 5. CyclinD1 protein positive expression in rats colon tissue from each group
图 5. 各组大鼠结肠组织 CyclinD1 蛋白阳性表达

Table 6. Comparison of the relative expression of CyclinD1 protein in rats colon tissue from each group ($\bar{x} \pm s$)
表 6. 各组大鼠结肠组织 CyclinD1 蛋白阳性表达的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	平均光密度
正常组	6	0.148 ± 0.390
模型组	6	0.374 ± 0.435 ¹⁾
隔药灸组	6	0.267 ± 0.118 ²⁾
隔姜灸组	6	0.283 ± 0.052 ²⁾

注：与正常组比，¹⁾ $P < 0.05$ ；与模型组比，²⁾ $P < 0.05$ 。

WB 检测结果提示：与正常组比，模型组大鼠结肠组织 CyclinD1 蛋白表达显著上升($P < 0.001$)；与模型组比，隔药灸组、隔姜灸组大鼠结肠组织 CyclinD1 蛋白表达显著下调($P < 0.001$)；隔药灸组与隔姜灸组比，差异无统计学意义($P = 0.443$)。详见图 6 和表 7。

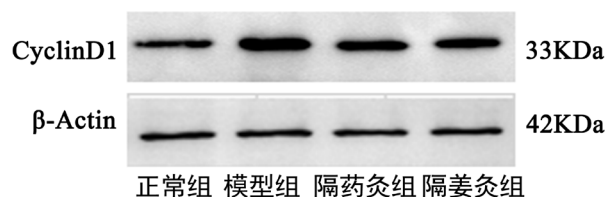


Figure 6. Comparison of colon tissueCyclinD1 protein in rats from each group
图 6. 各组大鼠结肠组织 CyclinD1 蛋白比较

Table 7. Comparison of the relative expression of CyclinD1 protein in rats colon tissue from each group ($\bar{x} \pm s$)
表 7. 各组大鼠结肠组织 CyclinD1 蛋白相对表达量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	CyclinD1/ β -Actin
正常组	6	0.70 ± 0.10
模型组	6	1.46 ± 0.19 ¹⁾
隔药灸组	6	1.02 ± 0.09 ²⁾
隔姜灸组	6	0.96 ± 0.08 ²⁾

注：与正常组比，¹⁾ $P < 0.05$ ；与模型组比，²⁾ $P < 0.05$ 。

5. 讨论

近年来，CAC 模型的制备主要涵盖自发型、基因工程型、化学致癌物型 3 种方法。化学致癌物诱导的 CAC 模型具有造价低、周期短、癌变率高的优势而成为研究的热点[20] [21] [22]。其中因腹腔注射 AOM 结合 DSS 饮水的方法制备的 CAC 动物模型成瘤率高，且可在动物身上复制出 IBD 的相关临床症状、体征及病理学改变，较好地模拟了人类 CAC 的发生发展而成为最常用且公认的方法之一[16] [23] [24]。

众所周知，肿瘤的发生和发展离不开肿瘤细胞的增殖。正常细胞在体外传代培养中，分裂增殖到一定的次数，虽仍保持存活力但增殖能力明显下降或停滞于非增值状态，肿瘤细胞则不同，可获得无限增殖的“永生性”[9]。PCNA 是真核染色体 DNA 复制机制的重要组成部分，可增加 DNA 复制和修复错误率，参与肿瘤细胞的增殖过程[25] [26]。同时研究表明 PCNA 还能够评估细胞的成熟程度和分裂的风险[27]。PCNA 与 DNA 聚合酶 δ g't 共同促进 RNA/DNA 引物的合成，与交互因子共同参与 DNA 复制和修复、DNA 甲基化、组蛋白乙酰化、细胞周期控制和细胞存活等细胞过程[28] [29] [30] [31] [32]。有研究

发现 PCNA 的阳性表达率越高, 癌细胞增殖越旺盛, 细胞分化程度越低, 复制时间越短, 转移速度越快 [33]。CyclinD1 是短半衰基因编码蛋白质, 是细胞增殖信号的关键蛋白之一, 在结肠癌中存在过度表达 [34]。CyclinD1 蛋白主要对细胞周期 G₁ 期起正向调控作用, 通过作用于 G₁ 期的多种蛋白, 并与这些蛋白产生相互影响, 调节细胞周期进程, 加快 G₁ 期向 S 期转变的进程, 造成细胞增殖失控及恶性生长, 诱发肿瘤的发生发展 [35] [36]。在正常情况下, G₁ 期的 CyclinD1 表达是恒定的, 在基因扩增、易位的情况下会引起 CyclinD1 过表达, 缩短细胞周期, 细胞异常增殖, 不断堆积, 诱导细胞癌变 [37]。

中医认为, 结肠炎相关性结肠癌应归属于“积聚”、“癌病”等范畴。其病因病机多因正气内虚、脏腑功能失调、感受邪毒, 导致气滞、血瘀、痰凝、湿浊、毒聚等病理变化聚集肠腑, 久之相互胶结而至肠癌的产生 [38]。本研究选取气海、天枢两穴进行艾灸治疗可发挥益气理脾、通肠调腑, 扶正培元之效。天枢为大肠募穴, 穴内气血循胃经运行而外出大肠经, 是肠腑气机运行的枢机, 可健脾和胃, 通调肠腑。气海隶属任脉, 循行于肠腑所属的位置, 正所谓“经络所过, 主治所及”, 且气海穴位于下腹部, 具有近治作用, 故气海可补气理气, 治疗肠腑病证。

结合本研究模型组大鼠成瘤率、病理形态中发现特征性腺癌和肿瘤评分检测结果, 说明采用 AOM/DSS 方法制备出 CAC 动物模型。CysC 在肿瘤的生长、侵袭、转移中具有重要的作用, 并且不受年龄、性别、炎症因子、脂血和溶血等因素的影响, 临床上已作为消化系统恶性肿瘤的标志物, 有助于判断肿瘤的转移及预后 [39] [40] [41]。隔药灸、隔姜灸“天枢”、“气海”穴干预 CAC 模型大鼠, 发现其可降低成瘤率、肿瘤评分和血清 CysC 水平。病理形态学方面, 模型组形成大小不等、形状不一、排列不规则的腺样结构, 细胞常不规则地排列成多层, 核大小不一, 核分裂多见等典型的腺癌病变 [42], 与模型组比, 隔药灸组和隔姜灸组呈现分化高、异型性小, 与原有组织形态相似, 核分裂现象减少的组织形态学变化。上述结果表明艾灸疗法能不同程度延缓炎症介导的肿瘤生长。为探究细胞增殖是否为艾灸延缓肿瘤生长的作用途径之一, 进一步采用免疫组化法和 Western blot 法检测大鼠结肠组织 PCNA、CyclinD1 蛋白表达。PCNA、Cyclin D1 蛋白主要对细胞周期 G₁ 期、S 期起正向调控作用。细胞周期是指细胞从一次分裂完成开始到下一次分裂结束所经历的全过程, 划分为间期与分裂期两个阶段。G₁ 期为 DNA 合成前期, S 期为 DNA 复制期, 作为间期的主要阶段, G₁ 期为 DNA 的合成做好了准备工作, S 期合成 DNA、组蛋白和 DNA 复制所需要的酶。可见 G₁ 期、S 期在细胞合成中发挥至关重要的作用。结果发现 CAC 模型大鼠结肠组织中 PCNA、CyclinD1 蛋白较正常组明显升高, 说明模型组大鼠结肠组织细胞增殖活跃。经过隔药灸与隔姜灸干预后, 大鼠结肠组织中 PCNA、CyclinD1 蛋白均明显降低, 提示隔药灸与隔姜灸干预可降低 CAC 大鼠结肠组织 PCNA、CyclinD1 蛋白的表达, 改善 CAC 大鼠结肠肿瘤增殖的情况。同时研究发现隔药灸组和隔姜灸组在改善 CAC 模型大鼠结肠组织肿瘤相关指标及 PCNA、CyclinD1 蛋白中没有表现出明显的差异性, 表明两种艾灸方法发挥了相似的作用。

基金项目

国家自然科学基金(81873372), 上海市自然科学基金课题(20ZR1453200), 上海市卫生和计划生育委员会卫生行业临床研究专项(20184Y0106)。

参考文献

- [1] Siegel, R.L., Miller, K.D. and Jemal, A. (2019) Cancer Statistics 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **69**, 7-34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>
- [2] Munkholm, P. (2003) Review Article: The Incidence and Prevalence of Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, **18**, 1-5. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.18.s2.2.x>
- [3] Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J. and Jemal, A. (2015) Global Cancer Statistics, 2012.

- CA: A Cancer Journal for Clinicians, **65**, 87-108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>
- [4] Zhao, C., Bao, C., Li, J., Zhu, Y.F., Wang, S.Y., Yang, L., *et al.* (2015) Moxibustion and Acupuncture Ameliorate Crohn's Disease by Regulating the Balance between Th17 and Treg Cells in the Intestinal Mucosa. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2015**, Article ID: 938054. <https://doi.org/10.1155/2015/938054>
- [5] Wei, K., Zhang, D., Hong, J., Zhang, C.H., Feng, X.M., Huang, Y., *et al.* (2015) Herb-Partitioned Moxibustion and the miRNAs Related to Crohn's Disease: A Study Based on Rat Models. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2015**, Article ID: 265238. <https://doi.org/10.1155/2015/265238>
- [6] Peng, L., Wang, Y., Chang, X., Wu, H.G., Liu, M., Ma, F.Q., *et al.* (2016) Effect of Moxa-Burning Heat Stimulating Liangmen (ST 21) and Zusanli (ST 36) on Proliferation and Apoptosis Signaling Proteins in Rats with Stress-Induced Gastric Ulcer. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, **36**, 340-346. [https://doi.org/10.1016/S0254-6272\(16\)30047-4](https://doi.org/10.1016/S0254-6272(16)30047-4)
- [7] Wang, X., Liu, Y., Dong, H., Wu, L., Feng, X.M., Zhou, Z.G., *et al.* (2015) Herb-Partitioned Moxibustion Regulates the TLR2/NF- κ B Signaling Pathway in a Rat Model of Ulcerative Colitis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2015**, Article ID: 949065. <https://doi.org/10.1155/2015/949065>
- [8] 陆娜, 顾沐恩, 丁邦友, 丁光宏, 郑寒丹, 李璟, 等. 艾灸对结肠炎相关性结肠癌大鼠 P2X7 受体、Wnt/b-catenin 信号通路影响的研究[J]. 上海针灸杂志, 2020, 39(6): 758-765.
- [9] 周彩存, 王绿化, 周道安. 肿瘤学[M]. 上海: 同济大学出版社, 2010: 48.
- [10] Gao, H., Dong, H., Li, G. and Jin, H. (2018) Combined Treatment with Acetazolamide and Cisplatin Enhances Chemoresensitivity in Laryngeal Carcinoma Hep-2 Cells. *Oncology Letters*, **15**, 9299-9306. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8529>
- [11] 陈亚玲. TSP-1、IGF- II 蛋白及 PCNA 在子宫肌瘤组织中的表达及临床意义[J]. 中国妇幼健康, 2015, 30(31): 5464-5466.
- [12] 牛德方, 崔岩, 陈辉. CyclinD1 表达与泌尿系统肿瘤关系的研究进展[J]. 实用肿瘤学杂志, 2016, 30(6): 547-550.
- [13] Bravo, R., Fey, S.J., Bellatin, J., Mose Larsen, P., Arevalo, J. and Celis, J.E. (1981) Identification of a Nuclear and of a Cytoplasmic Polypeptide Whose Relative Proportions Are Sensitive to Changes in the Rate of Cell Proliferation. *Experimental Cell Research*, **136**, 311-319. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(81\)90009-4](https://doi.org/10.1016/0014-4827(81)90009-4)
- [14] 顾兴洲. Pin1 与 CyclinD1 在肾透明细胞癌中的表达及意义[D]: [硕士学位论文]. 天津: 天津医科大学, 2014.
- [15] Moghaddam, S.J., Haghighi, E.N., Samiee, S., Shahid, N., Keramati, A.R., Dadgar, S., *et al.* (2007) Immunohistochemical Analysis of p53, cyclinD1, RB1, c-fos and N-ras Gene Expression in Hepatocellular Carcinoma in Iran. *World Journal of Gastroenterology*, **13**, 588-593.
- [16] Koliaraki, V., Pasparakis, M. and Kollias, G. (2015) IKK β in Intestinal Mesenchymal Cells Promotes Initiation of Colitis-Associated Cancer. *Journal of Experimental Medicine*, **212**, 2235-2251. <https://doi.org/10.1084/jem.20150542>
- [17] 余曙光, 郭义. 实验针灸学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2009: 150-152.
- [18] 杨琼, 孙元水, 张喆, 胡抢, 余碧英. 二甲胍诱导大鼠结肠癌模型的建立及其病理学特征和肠道菌群变化[J]. 中华医院感染学杂志, 2020, 30(21): 3242-3246.
- [19] 张瑞, 朱娜, 马静, 张文平, 刘近春, 原丽莉. 一种溃疡性结肠炎相关性结肠癌小鼠模型的建立[J]. 山西医科大学学报, 2016, 47(8): 720-723.
- [20] 唐晓艳. 溃疡性结肠炎相关性结肠癌动物模型建立及癌变机制初探[D]: [博士学位论文]. 北京: 北京协和医学院, 2010.
- [21] 杨德芳, 孙可丰, 韩莹, 张岩. 地龙提取液对结肠炎相关性结肠癌 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2019, 27(1): 25-30.
- [22] 杨旭, 杨澜, 马怡茗, 赵新华, 汪红英. PAR₂ 与小鼠结肠肿瘤局部进展的相关性分析[J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2017, 9(4): 17-21.
- [23] Greten, F.R., Eckmann, L., Greten, T.F., Park, J.M., Li, Z.-W., Egan, L.J., *et al.* (2004) IKK β Links Inflammation and Tumorigenesis in a Mouse Model of Colitis-Associated Cancer. *Cell*, **118**, 285-296. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.013>
- [24] 吴琼, 郭蒙, 叶华, 朱宇珍, 郑学宝. 溃疡性结肠炎相关性结直肠癌中 AOM/DSS 模型应用研究[J]. 海南医学, 2013, 24(19): 2880-2883.
- [25] Fukami-Kobayashi, J. and Mitsui, Y. (2005) Overexpression of Proliferating Cell Nuclear Antigen in Mammalian Cells Negates Growth Arrest by Serum Starvation and Cell Contact. *Japanese Journal of Cancer Research*, **90**, 286-293. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1999.tb00746.x>
- [26] Wang, S.C. (2014) PCNA: A Silent Housekeeper or a Potential Therapeutic Target. *Trends in Pharmacological*

- Sciences*, **35**, 178-186. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2014.02.004>
- [27] 陶伟华, 孙红娜, 欧阳璐璐. 子宫肌瘤组织中 PCNA、EGFR 的表达特点及与患者病理学特征的关系[J]. 实验与检验医学, 2020, 38(3): 591-594.
- [28] Maga, G. and Hubscher, U. (2003) Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA): A Dancer with Many Partners. *Journal of Cell Science*, **116**, 3051-3060. <https://doi.org/10.1242/jcs.00653>
- [29] Garg, P. and Burgers, P.M. (2005) DNA Polymerases That Propagate the Eukaryotic DNA Replication Fork. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, **40**, 115-128. <https://doi.org/10.1080/10409230590935433>
- [30] Johnson, A. and O'Donnell, M. (2005) Cellular DNA Replicases: Components and Dynamics at the Replication Fork. *Annual Review of Biochemistry*, **74**, 283-315. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073859>
- [31] Meslet-Cladière, L., Norais, C., Kuhn, J., Briffotiaux, J., Sloostra, J.W., Ferrari, E., *et al.* (2007) A Novel Proteomic Approach Identifies New Interaction Partners for Proliferating Cell Nuclear Antigen. *Journal of Molecular Biology*, **372**, 1137-1148. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.06.056>
- [32] Milutinovic, S., Zhuang, Q. and Szyf, M. (2002) Proliferating Cell Nuclear Antigen Associates with Histone Deacetylase Activity, Integrating DNA Replication and Chromatin Modification. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 2074-2078. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202504200>
- [33] 于贺军, 李冰, 薛秀娟, 徐璐, 程栋. 细胞周期蛋白 D1、p27 及增殖细胞核抗原在前列腺癌中的表达及意义[J]. 癌症进展, 2020, 18(19): 2033-2036.
- [34] 关高娃, 马晓, 司海, 等. Cyclin D1、MMR、FIB 与结肠癌预后的相关性分析[J]. 中国癌症防治杂志, 2020, 12(4): 435-440.
- [35] Lakshminarayana, S., Augustine, D., Rao, R., Patil, S., Habib Awan, K., Samudrala, S., *et al.* (2018) Molecular Pathways of Oral Cancer That Predict Prognosis and Survival: A Systematic Review. *Journal of Carcinogenesis*, **17**, 7. https://doi.org/10.4103/jcar.JCar_17_18
- [36] Osaki, M., Oshimura, M. and Ito, H. (2004) PI3K-Akt Pathway: Its Functions and Alterations in Human Cancer. *Apoptosis*, **9**, 667-676. <https://doi.org/10.1023/B:APPT.0000045801.15585.dd>
- [37] Udhayakumar, G., Jayanthi, V., Devaraj, N. and Devaraj, H. (2007) Interaction of MUC1 with Beta-Catenin Modulates the Wnt Target Gene cyclinD1 in *H. Pylori*-Induced Gastric Cancer. *Molecular Carcinogenesis*, **46**, 807-817. <https://doi.org/10.1002/mc.20311>
- [38] 周仲瑛. 中医内科学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2010: 447.
- [39] Kos, J., Krasovec, M., Cimerman, N., Nielsen, H.J., Christensen, I.J. and Brünner, N. (2000) Cysteine Proteinase Inhibitors Stefin A, Stefin B, and Cystatin C in Sera from Patients with Colorectal Cancer: Relation to Prognosis. *Clinical Cancer Research*, **6**, 505-511.
- [40] 张云燕, 朱礼刚, 陈新宽, 仇卫民. 血清 CysC 在消化道肿瘤患者中的临床意义[J]. 放射免疫学杂志, 2010, 23(5): 566-567.
- [41] 陈乐宝, 黄东标. CA199、CysC 和 Hcy 联检对胰腺癌的诊断价值[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(9): 1265-1266.
- [42] 陈杰, 李甘地. 病理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 137-138+142.