

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.26.009

益气健脾方对 Wistar 鼠大肠癌模型中异常腺窝病灶的影响 及其相关机制的探讨 *

赵凡尘 李 雁[△] 骆莹滨 周奕阳 徐夏婷

(上海中医药大学附属市中医医院肿瘤科 上海 200071)

摘要 目的:探讨益气健脾方对大肠癌模型异常腺窝病灶(ACF)的抑制效应及其相关机制。**方法:**50 只 Wistar 大鼠随机分为 5 组:中药低剂量组(将中药溶液稀释 3 倍后,5 mL/kg 日灌胃量)、中药中剂量组(5 mL/kg 日灌胃量)、中药高剂量组(15 mL/kg 日灌胃量)、模型组、正常组,每组 10 只大鼠,采用免疫组化法、美兰染色后镜下观察大肠组织。**结果:**各中药组 ACF 及大型 ACF 的数量较模型组减少($P<0.05$),并且中药中剂量组 ACF 数量减少最为明显,差异具有统计学意义($P<0.05$)。造模后 24h、48h 中药组肠腺细胞 PCNA 增殖指数低于模型组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。造模后 24 h、48 h 中药组肠腺细胞凋亡指数高于模型组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。中药组 β -catenin 异位表达均低于模型组,并且中药组 β -catenin 异位表达中高剂量组最高,低剂量组次之,中剂量组最低($P<0.05$)。中药组 MMP-7 的表达均低于模型组,而且各中药组中低剂量 MMP-7 表达最高,高剂量组次之,中剂量组最低($P<0.05$)。**结论:**益气健脾方可以明显降低 Wistar 大鼠 ACF 的发生数量,抑制大肠癌发生中 Wnt 信号的激活,在一定程度上减少了大肠癌的发生,起到了预防作用。

关键词:大肠癌;异常腺窝病灶;益气健脾

中图分类号:R-33; R735.34; R289 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)26-5043-05

Effect of Yiqi Jianpi Fang on Aberrant Crypt Foci Production in Carcinogenesis Wistar Rat Colorectal Cancer Model and Investigation on the Related Mechanism*

ZHAO Fan-chen, LI Yan[△], LUO Ying-bin, ZHOU Yi-yang, XU Xia-ting

(Department of Oncology, Shanghai Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Shanghai University of TCM,
Shanghai, 200071, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the inhibitory effect and the related mechanism of Yiqi Jianpi Fang on aberrant crypt focus (ACF) in Wistar rat colorectal cancer model. **Methods:** 50 Wistar rats were randomly divided into 5 groups: TCM low dose group (TCM solution diluted 3 times, 5 mL/kg daily gastric volume), TCM middle dose group (5 mL/kg daily gastric volume), TCM high dose group (15 mL/kg daily gastric volume), model group, normal group. With 10 rats in each group. The colorectal tissues were observed under microscope after methylene blue staining by immunohistochemistry method. **Results:** Compared with the model group, the number of ACF and large ACF in each TCM group were decreased ($P<0.05$), and the number of ACF in the TCM middle dose group reduced most obvious, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The proliferation indexes of PCNA in intestinal gland cells 24 h and 48 h after modeling in the TCM groups were higher than those in the model group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The apoptosis index of intestinal gland cells 24 h and 48 h after modeling in the TCM groups were higher than those in the model group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The ectopic expression of β -catenin in TCM groups were lower than that in the model group, and it was highest in the high dose group, than was the low dose group, and the middle group was lowest ($P<0.05$). The expression of MMP-7 in TCM groups were lower than that in the model group, and it was highest in the low dose group, than was the high dose group, and the middle dose group was lowest ($P<0.05$). **Conclusion:** Yiqi Jianpi Fang can significantly reduce the number of ACF in Wistar rats, inhibit the activation of Wnt signaling in colorectal cancer, reduce the incidence of colorectal cancer, and have a certain preventive effect.

Key words: Colorectal cancer; Aberrant crypt focus; Yiqi Jianpi

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R735.34; R289 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)26-5043-05

* 基金项目:上海中医药大学科技计划项目(2014YSN58)

作者简介:赵凡尘(1976-),男,硕士,副主任医师,从事中医药防治恶性肿瘤方面的研究, E-mail: 1073@szy.sh.cn

[△] 通讯作者:李雁(1961-),男,博士,主任医师、教授,从事中医药防治恶性肿瘤方面的研究

(收稿日期:2017-01-21 接受日期:2017-02-19)

前言

大肠癌的发病率随着群众生活水平的提高,日常饮食结构中高糖份、高脂肪、高蛋白饮食比例的增加,日渐升高^[1]。大肠癌目前的发病率位列恶性肿瘤发病率第三位,中国目前大肠癌发病数占全球大肠癌发病数的 18.6%,并且大肠癌的死亡率居恶性肿瘤死亡率的第四位^[2],中国大肠癌病死率居国内人群恶性肿瘤病死率第五位^[3]。早预防、早治疗是防治大肠癌的关键,因此对于大肠癌癌前疾病和癌前病变的研究来说其意义深远^[4]。异常腺瘤灶(aberrant crypt foci, ACF)是 Bird 等在啮齿动物研究中首次发现的大肠癌癌前病变模型^[5],目前实验研究表明大肠癌癌前病变最先从 ACF 开始^[6]。本研究在前期晚期大肠癌的临床治疗研究中发现,在使用常规化疗同时配合使用益气健脾方,可以使患者达到控制病灶、改善免疫功能以及延长生存期的目的^[5-9]。因此本研究使用 Wistar 大鼠在二甲基胍诱导造模下所形成的大肠癌模型作为可靠的癌前病变模型,通过观察经益气健脾方治疗后异常腺瘤灶(ACF)的变化情况,评价益气健脾方在大肠癌癌前病变中的预防作用。同时通过对大肠癌癌前病变进程中关键性信号通路 Wnt/ β -catenin 的相关信号分子调控作一个初步的探讨,分析益气健脾方对大肠癌的预防作用。

1 材料与方法

1.1 实验方药

益气健脾方(组方:太子参、焦白术、白茯苓、浙贝母、桔梗、生米仁、温莪术、薏苡果、生甘草)由上海市中医医院中药房提供,等份使用浓煎调配成中药溶液相当于含生药 2 g/mL,中药溶液配制由上海市中医医院药剂科作质量监控。

1.2 药品及主要试剂

造模药物二甲基胍(DMH)采购自 Sigma 公司,将二甲基胍加入 0.9%生理盐水中搅拌充分溶解并调配成 1%的造模药物溶液,抽滤除菌,冰箱保存,造模药物溶液保存温为 4 摄氏度,每 2 周配药一次。兔抗鼠多克隆抗体 anti-PCNA、 β -catenin、MMP-7 均由 Abcam 公司处采购,免疫组化 SP 试剂盒由博士德公司处购买。

1.3 实验动物

由上海斯莱克实验动物有限公司提供 Wistar 大鼠,雄性,四至六周龄,体重 80~100 g,常规 SPF 环境下饲养。

1.4 实验仪器

Sartorius 电子天平,德国赛多利斯集团;LEICA 光学显微镜,德国;OLYMPUS 解剖显微镜,日本;Metrohm 744 pHmeter pH 计,瑞士;OLYMPUS 相差倒置显微镜,日本。

1.5 实验方法

1.5.1 动物造模 Wistar 大鼠均采取二甲基胍造模药物皮下注射方式造模。造模药物剂量按照 30 mg/kg 体重,于 Wistar 大鼠颈背部皮下注射,每周 1 次,每周造模注射前测大鼠体重一次,根据大鼠体重调整皮下注射剂量。

1.5.2 分组及给药 (1)50 只 Wistar 大鼠随机分为 5 组:每组 10 只大鼠,分别为中药低剂量组(将中药溶液稀释 3 倍后,5 mL/kg 日灌胃量)、中药中剂量组(5 mL/kg 日灌胃量)、中药高

剂量组(15 mL/kg 日灌胃量)、模型组、正常组。除正常组外,将 DMH(30 mg/kg)于 Wistar 大鼠颈背部皮下注射。每周重复注射 1 次。连续皮下注射 12 周。在第 2 次注射后的第 2 天起各组大鼠开始灌胃给药 2 次/日。最后一次注射第 5 周后将所有大鼠处死并进行结肠异常腺瘤灶检测。

(2)根据我们前期临床研究结果,按照人与 Wistar 大鼠体表面积换算,中药组每只 Wistar 模型鼠灌胃益气健脾汤剂量为 5 mL/kg·日。30 只大鼠随机分为 3 组:分别为模型组、中药组、正常组,每组 10 只 Wistar 大鼠。除正常组外,模型组、中药组大鼠在颈背部处进行 DMH(30 mg/kg)皮下注射(每周一次),从第 2 次 DMH 皮下注射的前 3 天开始各组每日灌胃给药 2 次(5 mL/kg/日),共 8 次。在最后一次皮下造模药物注射后 24h 和 48 h,每组随机处死 5 只,并进行肠腺细胞增殖与凋亡实验。

1.5.3 异常腺瘤(ACF)病灶检测及诊断标准 大鼠深度麻醉后脱臼处死,剖腹。解剖并游离出大鼠全结肠。将大鼠结肠沿纵向剪开并将肠内容物漂洗干净,在零度 PBS 中清洗干净,将大鼠结肠标本平铺夹在两张滤纸之间,并将标本放置在甲醛固定液中固定 48h,使用 0.2% 亚甲蓝溶液将固定后的标本染色 20 分钟后转移到一只载玻片上,将玻片在倒置显微镜(40X 倍相差物镜)下观察,并详细记录 ACF 的数量和尺寸^[9]。采用盲法观察记录 ACF 数据,3 个及 3 个以上的异常腺瘤组成的 ACF 记为大型 ACF 并记录于总数,由单个异常腺瘤所构成的 ACF 病灶排除在外不做记录^[10]。

1.5.4 肠腺细胞增殖与凋亡观察 TUNEL 法:(1)将石蜡包埋的组织切片按常规脱蜡水化;(2)将标本用 PBS 漂洗 3×5 min;(3)漂洗后的标本加入 Proteinase K 工作液,在正常室温下进行反应 20 min;并且再次使用 PBS 漂洗 3×5 min;(4)同 TUNEL 混合液进行反应 A 液:1 mL TDT Buffer+10 μ L TDT, B 液:10 μ L biotin-dNTP,将 A、B 二液混合,30 μ L/片,在 37 摄氏度下反应 1 小时;PBS 漂洗 3×3 min;(5)将漂洗后的标本置入封闭液中浸没,室温封闭 10 min,再次使用 PBS 漂洗 3×3 min;(6)进行标记反应;(7)镜下观察计算凋亡指数。

PCNA 表达测定:将组织固定后,实验操作步骤按照兔抗鼠多克隆抗体 anti-PCNA 试剂盒使用说明进行。以 PBS 替代一抗作为阴性对照,PCNA 阳性表达标准为在镜下观察到细胞核内呈现棕黄色颗粒。盲法记录结果,记录者使用图象分析仪随机观察三个视野的阳性表达面积,PCNA 细胞平均增殖指数=阳性表达面积×光密度 OD 值,取平均值。

1.5.5 免疫组织化学染色及结果判断 采取 SP 染色试剂盒免疫组化染色法检测 β -catenin 蛋白的表达率。 β -catenin 结果的判定^[11]:使用图象分析仪,阴性对照以 PBS 作为阴性对照,阳性标志为细胞染色后细胞内出现棕黄色颗粒状物。细胞膜阳性表达 <70%则判定为表达缺失;细胞质或细胞核阳性表达 >10%则判定为细胞质或细胞核阳性表达。 β -catenin 的正常表达着色部位在细胞膜上, β -catenin 异位表达标准为细胞膜表达缺失和细胞质或细胞核阳性表达。

采取免疫组化染色法检测 MMP-7 的表达。MMP-7 仅在大肠癌细胞细胞质中表达,其判定标准为:阴性:细胞相对周围正常腺体细胞对比未染色,阳性:细胞的细胞质着色呈黄色或棕

黄色。使用图象分析仪,记录者随机观察三个视野的阳性表达面积,平均免疫组化指数 = 阳性表达面积 × 光密度 OD 值,取平均值。

1.5.6 统计学方法 实验数据统计分析使用 SPSS 19.0 统计软件包。ACF、PCNA 增殖指数、凋亡指数、 β -catenin、MMP-7 的表达等计量数据采用 t 检验;多组间比较采用单因素方差分析,检验标准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 ACF 形成情况

每组 10 只 Wistar 大鼠,在最后一次造模药物皮下注射后第 5 周分别处死,并进行 ACF 病灶检测。各中药组 ACF 及大型 ACF 的数量相对模型组均有减少,且差异具有统计学意义 ($P<0.05$),并且中剂量中药组 ACF 数量减少最为明显 ($P<0.05$)。

表 1 益气健脾方对 DMH 诱导的 Wistar 大鼠 ACF 的影响

Table 1 Effect of Yiqi Jianpi Fang on ACF in DMH-treated Wistar rats

Groups	ACF number	Large ACF number
Normal group	0.0± 0.0	0.0± 0.0
Model group	41.7± 7.1	41.7± 7.1
TCM high dose group	14.7± 3.1*	11.1± 3.0*
TCM middle dose group	13.2± 4.5*	10.2± 3.9*
TCM low dose group	22.7± 4.6*	15.0± 3.3*

Note: Compared with the model group, * $P<0.05$.

2.2 肠腺细胞增生情况

造模后 24 h、48 h 中药组肠腺细胞 PCNA 增殖指数低于模型组,差异具有统计学意义 ($P<0.05$),造模后 48h 中药组肠腺细胞 PCNA 增殖指数高于 24 h ($P<0.05$)。

表 2 各组肠腺细胞 PCNA 增殖指数结果比较 (n=5)

Table 2 Comparison of PCNA proliferation index of intestinal gland cells in each group (n=5)

Groups	24 h	48 h
Model group	1011.00± 88.26	1181.20± 77.40
TCM group	506.80± 57.37 [#]	770.53± 70.33 [#]

Note: Compared with the model group, [#] $P<0.01$; compared with 24h, ^Δ $P<0.01$.

2.3 各组肠腺细胞凋亡情况

造模后 24 h、48 h 中药组肠腺细胞凋亡指数高于模型组,差异具有统计学意义 ($P<0.05$),造模后 48h 中药组肠腺细胞 PCNA 增殖指数高于 24h ($P<0.05$)。

表 3 凋亡指数比较 (n=5,%)

Table 3 Comparison of apoptotic index (n=5,%)

Groups	24 h apoptosis index (%)	48 h apoptosis index (%)
Model group	33.35± 0.0348	37.65± 0.0259
TCM group	43.35± 0.0207 [#]	53.64± 0.0200 [#]

Note: Compared with the model group, [#] $P<0.05$; compared with 24h, ^Δ $P<0.05$.

2.4 异常腺窝病灶 β -catenin 的异位表达情况

中药高剂量组、中剂量组、低剂量组 β -catenin 异位表达低于模型组,并且中药组 β -catenin 异位表达中高剂量组最高,低剂量组次之,中剂量组最低 ($P<0.05$)。

表 4 各组 β -catenin 异位表达结果比较 (n=10,%)

Table 4 Comparison of β -catenin ectopic expression rate in each group

Groups	β -catenin
Model group	67.78± 10.93
TCM high dose group	60.56± 6.35 [#] *
TCM middle dose group	34.50± 5.99 [#]
TCM low dose group	53.78± 9.13 [#]

Note: Compared with the model group, [#] $P<0.05$; compared with the TCM low dose group, ^Δ $P<0.05$, compared with the TCM middle dose group, * $P<0.05$.

2.5 MMP-7 表达情况

中药高剂量组、中剂量组、低剂量组 MMP-7 的表达低于模型组,而且各中药组中低剂量 MMP-7 表达最高,高剂量组次之,中剂量组最低 ($P<0.05$)。

表 5 各组 MMP-7 比较 (n=10)

Table 5 Comparison of MMP-7 in different groups

Groups	MMP-7
Model group	1416.815± 138.639
TCM high dose group	442.148± 88.999 [#] *
TCM middle dose group	223.633± 45.663 [#]
TCM low dose group	1050.963± 140.128 [#]

Note: Compared with the model group, [#] $P<0.05$; compared with the TCM low dose group, ^Δ $P<0.05$, compared with the TCM middle dose group, * $P<0.05$.

3 讨论

细胞增殖与凋亡动态平衡失调是肿瘤发生的基础。细胞增殖速率的快慢会影响到分裂细胞数目和 DNA 复制的速度,细胞增殖过快往往提高了 DNA 复制发生错误的机率,如果这种 DNA 的复制错误恒定表达于其子代细胞中,会增大自发突变或基因突变的机会,导致正常细胞逐步转化为恶性细胞^[12]。因此要防治大肠癌癌前病变病灶进一步转化为肿瘤组织,促进肠腺细胞的凋亡,抑制肠腺细胞的增生尤为重要。

在国内外目前已经认为异常腺窝病灶是形态学上的大肠癌癌前病变诊断指标 ACF^[13,14]。在实验中我们可以看到应用益气健脾方能够减少二甲基胍诱导的 Wistar 大鼠癌前病变异常腺窝病灶的发生率。其主要调控机制为益气健脾方促进了肠腺细胞的凋亡,同时抑制了肠腺细胞的增殖。根据本实验的结果,我们可以看到益气健脾方能够通过促进肠腺细胞凋亡抑制肠腺细胞增殖至少是部分地抑制化学性致癌剂的作用,而且下调细胞中 β -catenin 异位表达率,从而影响了 MMP-7 蛋白的表

达,阻止了大肠癌发生中存在的 Wnt 信号通路激活,来抑制造模大鼠的异常腺瘤灶的生成,进而通过使用益气健脾方降低了大肠癌前病变发生的机率,进一步减少了大肠癌的发生率。

启动大肠癌发生、发展中的诸多的信号通路中 Wnt 信号通路是研究较为明确的通路^[15]。大肠癌细胞中常存在异常 Wnt 通路,致使关键分子 β -catenin 不能被降解并且积累在胞浆内,并且转位进入细胞核,导致细胞核内 β -catenin 增多,转录因子 Tcf/LEF 与细胞核内的 β -catenin 相互结合,下游相关靶基因(如 c-myc, cyclinD1, MMP-7)的转录和表达进而被结合产物激活,这一系列变化促使了大肠癌发生^[16]。木尔扎尔等人^[17]在研究中发现 β -catenin 蛋白在结肠癌的异位表达率均高于正常结肠中的异位表达率。同时, MMP-7 在异常的 Wnt 信号通路中可被异位的 β -catenin 的肿瘤性活化激活。在肿瘤侵袭转移的过程中,关键是对细胞外基质 ECM 的破坏。而 MMP-7 在破坏 ECM 的酶类扮演了极其重要的角色^[18]。林久茂等人的研究^[19]表明在启动 Wnt 信号通路中起关键作用的 β -catenin 蛋白的异常表达与 MMP-7 蛋白表达在大肠癌组织内两者间呈正相关,说明能够影响到 Wnt 信号通路启动及导致 MMP-7 蛋白表达的关键在于细胞内 β -catenin 的异常表达。卢青^[20]等发现,异常腺瘤灶与肿瘤在 β -catenin 异位表达率及 MMP-7 表达阳性率这两方面相似而且差异无统计学意义。本研究结果也说明造模大鼠标本中 β -catenin 异位表达率和 MMP-7 阳性率的两者呈正相关,而且在本实验中造模动物标本中 β -catenin 异位表达率和 MMP-7 阳性率在使用益气健脾方后出现下降而且与异常腺瘤灶的发生成正相关。

大肠癌属于中医学“积聚”“肠风”等范畴,当代医家在总结前人认识和结合现代的临床经验的基础上,认为大肠癌病位在肠,病本在脾,在正气虚损的基础上,以本虚标实为其发病特点^[21]。目前对于大肠癌的中医辨证分型并没有形成统一认识,我们认为脾虚证是临床上大肠癌的常见的中医证型^[22-23]。因此,在大肠癌的中医治疗中益气健脾法起着重要作用。本实验中益气健脾方中重用太子参、白茯苓为君,补益脾肺、益气生津;焦白术、生米仁、温莪术、薏苡果为臣,健脾益气、利水渗湿;佐以浙贝母、桔梗,化痰解毒;使以生甘草补脾益气、调和诸药。

在此思想指导下组创的益气健脾方对大肠癌有较好的治疗作用,我们在前期的临床研究发现应用益气健脾方配合常规化疗治疗晚期大肠癌,具有明确的减少患者症状、改善免疫功能以及延长患者生存期的目的。本实验结果提示:益气健脾方可以明显减少大肠肠黏膜异型增生的发生,增加肠腺细胞的凋亡,明显降低异常腺瘤灶组织内 β -catenin、MMP-7 的表达。本实验通过采用现代分子生物学方法,初步探讨了益气健脾方在防治大肠癌前病变过程中的作用及机理,为临床进一步的应用提供了科学依据。

参考文献(References)

- [1] 陈雪,曹海龙,王斯南,等.高脂饮食促进结肠直肠癌发生机制的研究进展[J].肿瘤药理学,2016,6(1): 11-14
Chen Xue, Cao Hai-long, Wang Si-nan, et al. Research Progress of the Mechanisms of High Fat Diet Induced Colorectal Cancer [J]. Anti-Tumor Pharmacology, 2016, 6(1): 11-14
- [2] Fang JY, Dong HL, Sang XJ, et al. Colorectal Cancer Mortality Characteristics and Predictions in China, 1991-2011 [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(17): 7991-7995
- [3] 赵丽中,王宏磊.大肠癌早期诊断研究进展[J].中国肿瘤,2014,23(2): 103-108
Zhao Li-zhong, Wang Hong-lei. Research Progress in Early Diagnosis of Colorectal Cancer[J]. China Cancer, 2014, 23(2): 103-108
- [4] 侯国伟,刘晓菲,姜南阳,等.大肠癌筛查新策略及研究进展[J].现代生物医学进展,2015,15(9): 1772-1774
Hou Guo-wei, Liu Xiao-fei, Jiang Nan-yang, et al. The New Strategy and Research Progress of Colorectal Cancer Screening [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2015, 15(9): 1772-1774
- [5] Freire P, Figueiredo P, Cardoso R, et al. Predictive value of rectal aberrant crypt foci for intraepithelial neoplasia in ulcerative colitis - a cross-sectional study[J]. Scand J Gastroenterol, 2014, 49(10): 1219-1229
- [6] 鹿志军,唐咏梅,王伟强.某医院就诊人群大肠癌及癌前病变伺机性筛查结果分析[J].西南国防医药,2016,26(10): 1181-1184
Lu Zhi-jun, Tang Yong-mei, Wang Wei-qiang. Results of opportunistic screening of large intestinal carcinomas and precancerosis for patients who visited a hospital [J]. Medical Journal of National Defending Forces in Southwest China, 2016, 26(10): 1181-1184
- [7] 雷彩云,毛丹,丁陈陈,等.健脾解毒方联合化疗治疗大肠癌术后患者的临床观察[J].湖南中医药大学学报,2016,36(11): 64-67
Lei Cai-yun, Mao Dan, Ding Chen-chen, et al. Clinical Observation of Jianpi Jiedu Fang Combined with Chemotherapy on the Treatment of Postoperative Patients with Colorectal Cancer [J]. Journal of Traditional Chinese Medicine University of Hunan, 2016, 36(11): 64-67
- [8] 陈洁,谢国群,贺天临,等.健脾解毒方联合双途径化疗治疗进展期大肠癌临床研究[J].中医学报,2013,28(10): 1443-1445
Chen Jie, Xie Guo-qun, He Tian-lin, et al. Clinical Research of Jianpi Jiedu Prescripton Combined with Double-Channel Chemotherapy Treatment of Patients with Advanced Colorectal Cancer [J]. China Journal of Chinese Medicine, 2013, 28(10): 1443-1445
- [9] Roznovt IA, Ruskin HJ. Theoretical cross-comparative analysis on dynamics of small intestine and colon crypts during cancer initiation [J]. IET Syst Biol, 2015, 9(6): 259-267
- [10] Wongjaikam S, Summart R, Chewonarin T. Apoptosis induction in colon cancer cell lines and alteration of aberrant crypt foci in rat colon by purple rice (*Oryza sativa* L. var. *glutinosa*) extracts [J]. Nutr Cancer, 2014, 66(4): 690-699
- [11] Hsiao CM, Wu YS, Nan FH, et al. Immunomodulator 'mushroom beta glucan' induces Wnt/ β -catenin signalling and improves wound recovery in tilapia and rat skin: a histopathological study [J]. Int Wound J, 2016, 13(6): 1116-1128
- [12] Chen H, Wu L, Li Y, et al. Advanced glycation end products increase carbohydrate responsive element binding protein expression and promote cancer cell proliferation [J]. Mol Cell Endocrinol, 2014, 395(1-2): 69-78
- [13] Moreno CC, Mittal PK, Sullivan PS, et al. Colorectal Cancer Initial Diagnosis: Screening Colonoscopy, Diagnostic Colonoscopy, or Emergent Surgery, and Tumor Stage and Size at Initial Presentation[J].

- Clin Colorectal Cancer, 2016, 15(1): 67-73
- [14] Roncucci L, Mariani F. Prevention of colorectal cancer: How many tools do we have in our basket?[J]. Eur J Intern Med, 2015, 26(10): 752-756
- [15] Arqu s O, Chicote I, Puig I, et al. Tankyrase Inhibition Blocks Wnt/ β -Catenin Pathway and Reverts Resistance to PI3K and AKT Inhibitors in the Treatment of Colorectal Cancer[J]. Clin Cancer Res, 2016, 22(3): 644-56
- [16] Peng X, Luo Z, Kang Q, et al. FOXQ1 mediates the crosstalk between TGF- β and Wnt signaling pathways in the progression of colorectal cancer[J]. Cancer Biol Ther, 2015, 16(7): 1099-1109
- [17] 木尔扎尔,文彬,黄一凡,等. β -catenin 与 wisp-1 在结肠癌中的表达及意义[J].现代肿瘤医学, 2014, 22(2): 366-370
- Muer Cheer, Wen Bin, Huang Yi-fan, et al. Expression and clinical significance of β -catenin and wisp-1 in human colon cancer [J]. Journal of Modern Oncology, 2014, 22(2): 366-370
- [18] He W, Tan RJ, Li Y, et al. Matrix metalloproteinase-7 as a surrogate marker predicts renal Wnt/ β -catenin activity in CKD [J]. J Am Soc Nephrol, 2012, 23(2): 294-304
- [19] 林久茂,魏丽慧,李琼瑜,等.白花蛇舌草通过调控 Wnt/ β -catenin 通路抑制大肠癌细胞及大肠癌干细胞的生长 [J]. 中华中医药杂志, 2015, (5): 1805-1808
- Lin Jiu-mao, Wei Li-hui, Li Qiong-yu, et al. Hedyotis diffusa Willd inhibits the growth of colorectal cancer cells and stem cell via suppressing Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2015, (5): 1805-1808
- [20] 卢青,陶珊,张亚历,等. β -catenin 和 MMP-7 在异常腺瘤病灶中的表达差异的初步探讨[J].中国现代医学杂志, 2011, 21(13): 1447-1450
- Lu Qing, Tao Shan Zhang Ya-li, et al. Different expressions of β -catenin and MMP-7 in Aberrant Crypt Foci [J]. China Journal of Modern Medicine, 2011, 21(13): 1447-1450
- [21] 陈叶,刘金涛,朱源,等.大肠癌中医辨证及治疗概况[J].中国肿瘤, 2015, 24(4): 319-324
- Chen Ye, Liu Jin-tao, Zhu Yuan, et al. The Overview in Traditional Chinese Medicine Syndrome Differentiation and Treatment of Colorectal Cancer[J]. China Cancer, 2015, 24(4): 319-324
- [22] 魏滨,呼雪庆,宋雅楠,等.大肠癌和肝癌术后 " 异病同证 " 的代谢组学研究[J].世界科学技术 - 中医药现代化, 2016, 18(9): 1500-1506
- Wei Bin, Hu Xue-qing, Song Ya-nan, et al. A Metabolomic Research on "The Same TCM Syndrome" in the Postoperative Patients with Liver Cancer and Colorectal Cancer [J]. World Science and Technology-Modernization of Traditional Chinese Medicine, 2016, 18(9): 1500-1506
- [23] 王慧君,吴晴,梁伟,等.健脾法治疗大肠癌作用机制及临床应用[J].吉林中医药, 2015, 35(3): 315-318
- Wang Hui-jun, Wu Qing, Liang Wei, et al. Application and mechanism of Jianpi method in treatment of colorectal cancer[J]. Jilin Journal of Traditional Chinese Medicine, 2015, 35(3): 315-318

(上接第 5196 页)

- [27] Faivre A, Sagui E, Canini F, et al. Intravenous thrombolysis with rt-PA in stroke: experience of the French military hospital of Toulon from September 2003 to June 2009[J]. Revue neurologique, 2010, 166(11): 909-920
- [28] Zangerle A, Kiechl S, Spiegel M, et al. Recanalization after thrombolysis in stroke patients: predictors and prognostic implications[J]. Neurology, 2007, 68(1): 39-44
- [29] Jung S, Mono ML, Findling O, et al. White matter lesions and intra-arterial thrombolysis[J]. Journal of neurology, 2012, 259(7): 1331-1336
- [30] Wiszniewska M, Devuyst G, Bogousslavsky J, et al. What is the significance of leukoaraiosis in patients with acute ischemic stroke? [J]. Archives of neurology, 2000, 57(7): 967-973
- [31] Deleu D, Inshasi J, Akhtar N, et al. Risk factors, management and outcome of subtypes of ischemic stroke: a stroke registry from the Arabian Gulf[J]. Journal of the neurological sciences, 2011, 300(1-2): 142-147
- [32] Mandava P, Murthy SB, Munoz M, et al. Explicit consideration of baseline factors to assess recombinant tissue-type plasminogen activator response with respect to race and sex [J]. Stroke, 2013, 44(6): 1525-1531
- [33] Seet RC, Zhang Y, Wijedicks EF, et al. Relationship between chronic atrial fibrillation and worse outcomes in stroke patients after intravenous thrombolysis [J]. Archives of neurology, 2011, 68(11): 1454-1458
- [34] Alderazi YJ, Chang J, Yang JP, et al. Impact of Protocol Deviations in Acute Ischemic Stroke Treated With Intravenous rt-PA Within 4.5 Hours After Symptom Onset [J]. The Neurohospitalist, 2012, 2(3): 82-86
- [35] Kufner A, Nolte CH, Galinovic I, et al. Smoking-thrombolysis paradox: recanalization and reperfusion rates after intravenous tissue plasminogen activator in smokers with ischemic stroke [J]. Stroke, 2013, 44(5): 407-413
- [36] Martinez-Ramirez S, Delgado-Mederos R, Marin R, et al. Statin pretreatment may increase the risk of symptomatic intracranial haemorrhage in thrombolysis for ischemic stroke: results from a case-control study and a meta-analysis[J]. Journal of neurology, 2012, 259(1): 111-118
- [37] Ibrahim MM, Sebastian J, Hussain M, et al. Does current oral antiplatelet agent or subtherapeutic anticoagulation use have an effect on tissue-plasminogen-activator-mediated recanalization rate in patients with acute ischemic stroke? [J]. Cerebrovascular diseases, 2010, 30(5): 508-513
- [38] Seitz RJ, Sukiennik J, Siebler M. Outcome after systemic thrombolysis is predicted by age and stroke severity: an open label experience with recombinant tissue plasminogen activator and tirofiban[J]. Neurology international, 2012, 4(2): 9