

益气健脾化痰方协同 5-FU 对胃癌的抑制作用及机制

吴坚, 陈彦臻, 张星星, 谢晓东, 陈敏, 邹玺, 刘沈林*
(江苏省中医院, 南京中医药大学附属医院, 南京 210029)

[摘要] **目的:** 观察益气健脾化痰方协同 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)对 615 小鼠胃癌生长的抑制作用,并通过肿瘤微环境中的肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)极化方向,探讨其可能的作用机制。**方法:** 40 只 615 小鼠随机分为正常组,益气健脾化痰方(25 g·kg⁻¹)组,5-FU(25 mg·kg⁻¹)组,联合(益气健脾化痰方 25 g·kg⁻¹+5-FU 25 mg·kg⁻¹)组,每组 10 只。腋下接种 MFC 胃癌细胞建立小鼠胃癌移植瘤模型。苏木素-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色法观察各组小鼠肿瘤病理的改变;流式细胞仪测定肿瘤组织中 M1, M2 型 TAMs 含量;免疫组化观察腋下移植瘤中 CD206 的表达;实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测瘤组织中 TAMs 相关基因白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β),白细胞介素-12(interleukin-12, IL-12),肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α),精氨酸酶 1(arginase-1, Arg1),几丁质酶 3 蛋白 3(chitinase 3-like 3, Ym1)的 mRNA 表达水平。Real-time PCR, 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测瘤组织中上皮间质转化(epithelial mesenchymal transformation, EMT)相关上皮性钙黏附蛋白(E-cadherin),神经性钙黏附蛋白(N-cadherin),锌指转录因子 Slug, Snail, 波形蛋白(Vimentin)mRNA 及蛋白的表达。**结果:** 各组小鼠胃癌细胞排列呈巢状及片状,细胞间质见促纤维缔结组织反应及少量炎症细胞浸润。各药物组可见明显肿瘤凝固性坏死,残留肿瘤细胞量正常组>益气健脾化痰方组>5-FU 组>联合组。免疫组化表明,各给药组均能减少瘤体 CD206 的表达,以联合组最明显。流式细胞仪检测证实,与正常组比较,各给药组均能减少 M2 型 TAMs 的含量($P < 0.05$, $P < 0.01$),联合组减少 M2 型 TAMs 的含量最明显;益气健脾化痰方组、联合组均能增加 M1 型 TAMs 的含量($P < 0.05$, $P < 0.01$),以益气健脾化痰方组最为明显。与正常组比较,益气健脾化痰方组、联合组均能下调 Arg1, Ym1 mRNA,上调 IL-1 β , TNF- α , IL-12 mRNA 表达($P < 0.05$)。与 5-FU 组比较,联合组能明显升高 IL-1 β , IL-12, TNF- α mRNA,下调 Arg1, Ym1 mRNA 表达($P < 0.05$)。与正常组比较,益气健脾化痰方组能上调 E-cadherin mRNA 及蛋白表达($P < 0.05$),下调 N-cadherin, Vimentin mRNA 表达($P < 0.05$);联合组能上调 E-cadherin,下调 N-cadherin, Slug, Snail, Vimentin mRNA 表达($P < 0.05$),上调 E-cadherin,下调 N-cadherin, Slug 蛋白表达($P < 0.01$)。与 5-FU 组比较,联合组能上调肿瘤组织中 E-cadherin,下调 N-cadherin, Slug, Vimentin mRNA 及蛋白表达($P < 0.05$)。**结论:** 益气健脾化痰方对胃癌生长有一定的抑制作用,与 5-FU 联用有较好的协同抑制胃癌生长、改善胃癌上皮间质转化,机制可能与促进胃癌中 TAMs 从 M2 表型向 M1 表型转化有关。

[关键词] 益气健脾化痰方; 5-氟尿嘧啶; 胃癌; 肿瘤相关巨噬细胞; 上皮间质转化

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)07-0065-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200123

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190918.0829.001.html>

[网络出版时间] 2019-09-18 10:48

Inhibitory Effect and Mechanism of Yiqi Jianpi Huayu Recipe Combined with 5-FU on Gastric Cancer

WU Jian, CHEN Yan-zhen, ZHANG Xing-xing, XIE Xiao-dong, CHEN Min, ZOU Xi, LIU Shen-lin*
(Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the synergistic effect and mechanism of Yiqi Jianpi Huayu (YQJPHY)

[收稿日期] 20190603(009)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81973782);国家自然科学基金青年科学基金项目(81704031);江苏省中医药管理局课题项目(YB2017020, YB2017016)

[第一作者] 吴坚,博士,助理研究员,从事脾胃病及消化肿瘤疾病研究, E-mail: czcyg@sina.com

[通信作者] *刘沈林,硕士,教授,主任中医师,博士生导师,从事脾胃病及消化肿瘤疾病研究, E-mail: lsljsszy@126.com

recipe combined with 5-fluorouracil (5-FU) on inhibiting gastric cancer growth, and investigate its possible mechanism through polarization direction of tumor-associated macrophages (TAMs) in tumor micro-environment. **Method:** A total of forty 615 mice were randomly divided into four groups including control group, YQJPHY (25 g·kg⁻¹) group, 5-FU (25 mg·kg⁻¹) group and combined group (YQJPHY plus 5-FU), with 10 mice in each group. The gastric cancer transplantation model was induced by axillary inoculation of MFC gastric cancer cells. Changes in tumor pathology were observed with hematoxylin-eosin staining (HE) method. The contents of M1 and M2 TAMs in tumor tissues were determined with flow cytometry, while the expression of CD206 in tumor was observed with immunohistochemistry. The mRNA expressions of TAM-related genes including interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-12 (IL-12), tumor necrosis factor- α (TNF- α), arginase-1 (Arg1), and chitinase 3-like 3 (Ym1) were detected by using quantitative real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR). Furthermore, the mRNA and protein expressions of epithelial-mesenchymal transition (EMT) related epithelial calcium adhesion protein (E-cadherin), nervous calcium adhesion protein (N-cadherin), Zinc finger transcription factor Slug, Snail and Waveform protein (Vimentin) were detected with Real-time PCR and Western blot, respectively. **Result:** The gastric cancer cells in tumors were distributed in nest and/or flaky shape, with fibroblastic connective tissue reaction and inflammatory cells infiltrated in interstitium. Coagulative necrosis of tumor was observed in various treatment groups. The amount of residual cancer cells in mouse was as follows from largest to smallest: control group > YQJPHY group > 5-FU group > combined group. Immunohistochemical studies showed that all treatment groups can reduce the expression of CD206 in the tumor, and the effect was most obvious in the combined group. The contents of M2-TAM in all treatment groups were lower than those in control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the most significant difference in the content of M2-TAMs was shown between the control group and the combined group. The contents of M1 TAMs were increased in YQJPHY and combined groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$), with the largest incremental range in YQJPHY group. The expressions of Arg1 and Ym1 in YQJPHY and combined groups were lower, while IL-1 β , TNF- α and IL-12 levels were higher than those in control group ($P < 0.05$). The mRNA expressions of IL-1 β , IL-12 and TNF- α in the combined group were significantly higher, while Arg1 and Ym1 mRNA expression levels were lower than those in the 5-FU group ($P < 0.05$). As compared with the control group, the mRNA and protein expression levels of E-cadherin were up-regulated ($P < 0.05$), while the mRNA expression levels of N-cadherin and Vimentin were down-regulation in the YQJPHY group ($P < 0.05$), E-cadherin mRNA and protein expression levels were up-regulated, while N-cadherin, Slug, Snail, Vimentin mRNA expression as well as N-cadherin and Slug protein expression levels were down-regulated in the combined group ($P < 0.05$). As compared with the 5-FU group, the mRNA and protein expression levels of E-cadherin were up-regulated ($P < 0.05$), while the mRNA and protein expression levels of N-cadherin, Slug and Vimentin were down-regulated in the combined group ($P < 0.05$). **Conclusion:** YQJPHY has an inhibitory effect on the growth of gastric cancer, and after being combined with 5-FU, it has a good synergistic effect on inhibiting the growth of gastric cancer and decreasing EMT. The mechanism may be related to promoting the conversion from M2-TAMs to M1-TAMs in gastric tumor micro-environment.

[**Key words**] Yiqi Jianpi Huayu recipe; 5-fluorouracil; gastric cancer; tumor-associated macrophages; epithelial-mesenchymal transition

胃癌是我国较常见的消化系统恶性肿瘤,其发病率在我国所有恶性肿瘤中高居第 2 位,病死率位居第 3 位^[1]。既往研究多通过胃癌细胞自身的基因突变解释胃癌的发生发展。而最新研究认为,癌症的发展需要基因突变,但只有在肿瘤生长环境对突变的癌细胞比正常细胞更适合的情况下,癌细胞才有机会获得生存优势,即肿瘤是生长环境选择的

产物^[2-3]。越来越多研究表明,肿瘤周围免疫抑制的炎症微环境是肿瘤形成的重要因素,可推动胃癌的恶性进程,导致治疗失败。肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)是肿瘤微环境中数量最多的免疫细胞,肿瘤微环境对 TAM 表型和功能有明显影响——最初呈促炎抗肿瘤的 M1 型,随着肿瘤的增加,在短时间内迅速转变为抑制

炎症、促进肿瘤进展的 M2 型,而肿瘤环境移除后,又可从 M2 型转化为 M1 型^[4-5]。M1 型巨噬细胞以白细胞介素-12(interleukin-12, IL-12),白细胞介素-23(interleukin-23, IL-23)高表达,白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)低表达为特征,能分泌炎症介质白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β),白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6),肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α),具有 CD86, CD16/32 等特征表面分子标志,抗原呈递能力强,诱导 Th1 型免疫应答,具有促进炎症反应、杀伤病变细胞、抑制肿瘤生长的作用^[6]。M2 型巨噬细胞以高表达 IL-10,转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β),低表达 IL-12 为特征,能表达精氨酸酶 1(arginase1, Arg1)和几丁质酶 3 蛋白 3(chitinase 3-like 3, Ym1)等特征基因,具有清道夫受体 CD163,甘露醇受体 CD206, CD68 等特征表面分子标志,抗原呈递能力弱,参与 Th2 型免疫应答,能抑制 T 细胞活性,积极参与肿瘤的增殖、侵袭转移、上皮间质转化(epithelial mesenchymal transformation, EMT),耐药,血管/淋巴管生成等过程^[7-8],与肿瘤的不良预后密切相关,是肿瘤免疫治疗的潜在靶点^[9]。

全国名中医刘沈林教授认为,“脾气虚损,癥瘕积聚”是胃癌的主要病机,多运用“健脾益气、消癥散结”理论指导临床用药。同时,刘沈林教授认为,正虚是胃癌患者病机关键,在辨证基础上,应重用黄芪、党参为代表的健脾扶正之药味,有益于正气回复,快速提高疗效,以归芍六君子、黄芪建中汤等化裁,创立益气健脾化痰方治疗胃癌,得到了江苏省中医药科技项目立项。其中,重用炙黄芪(60 g),炒党参(30 g),以防病重药轻,增益健脾扶正之功;另配三棱、莪术二药化痰散结,并借其流通之力,行补药之滞。该方药专效宏,临床大量病例证实,该方能有效改善胃癌患者的临床症状和相关检测指标。

前期课题组通过在体实验证实,益气健脾化痰方联合 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)能显著抑制小鼠胃癌皮下移植瘤的生长,其机制可能与降低髓源抑制性细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)的含量有关^[10]。而 MDSCs 为 TAMs 的前体^[11], TAMs 具有更强的免疫抑制性,在肿瘤免疫逃逸过程发挥重要调节作用。因此,本研究进一步通过体内实验,采用 MFC 荷瘤小鼠腋下移植瘤模型,观察益气健脾化痰方与 5-FU 联合使用对胃癌生长的影响,并从 TAMs 表型转化探讨可能的机制,以期为临床治疗肿瘤用药研发和联合用药推广提供实验

依据。

1 材料

1.1 动物 鼠源胃癌 MFC 细胞购自凯基生物公司,编号 KGB5001。SPF 级 615 小鼠 40 只,体质量(20 \pm 2)g,购自天津血液病研究所,合格证号 SCXK(津)2015-0001。饲养于南京医科大学动物研究中心(峨嵋岭分部)屏障环境动物房。中心实验室许可证号 TCM-2009-161。动物实验的开展取得了南京医科大学实验动物伦理委员会的同意,编号 IACUC-1703033。

1.2 药物 5-FU 天津金耀氨基酸有限公司,批号 118010409;益气健脾化痰方由炙黄芪 60 g,炒党参 30 g,三棱 30 g,莪术 30 g 组成,所有饮片购自江苏省中医院,经该院曹圆药师鉴定,符合 2015 年版《中国药典》标准。益气健脾化痰方给药剂量依据“等效剂量直接折算法”所得,中药加双蒸水 1 500 mL 文火煎煮 30 min,得水煎液,再加双蒸水 1 000 mL 继续煎煮 30 min,倒出滤液,双层纱布过滤。按 25 g \cdot kg⁻¹剂量给药,每剂含生药量 150 g,将水煎液定容为 115 mL,折合生药量含 1.3 g \cdot mL⁻¹,放于 4 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

1.3 试剂 1640 培养基,胎牛血清(以色列 Bioind 公司,批号分别为 01-100-1ACS, 04-001-1ACS);胰蛋白酶溶液(碧云天生物技术公司,批号 C0201);PE anti-mouse F4/80, Alexa Fluor 488 anti-mouse CD86, APC anti-mouse CD206(美国 BioLegend 公司,批号分别为 123110, 105017, 141708);免疫球蛋白(Ig)G₁ K isotype control(美国 eBioscience 公司,批号 12-4714-41);苏木素-伊红(HE, 珠海贝索生物技术有限公司,批号 719021);FcR blocking reagent(德国 Miltenyi 公司,批号 130-092-575);逆转录试剂盒(日本 Takara 公司,批号 RR047A);SYBR GREEN(美国 ABI 公司,批号 436759);trizol reagent(美国 Ambion 公司,批号 15596018)。 β -肌动蛋白(β -actin)(13E5) Rabbit mAb, 锌指转录因子 Snail(C15D3) Rabbit mAb, EMT 相关上皮性钙黏附蛋白(E-cadherin)(24E10) Rabbit mAb, 神经性钙黏附蛋白(N-cadherin)(D4R1H) Rabbit mAb(美国 CST 公司,批号分别为 4970S, 3879S, 3195S, 13116S);小鼠 MMR/CD206 affinity purified polyclonal Ab(美国 R&D 公司,批号 AF2535-SP)。

1.4 仪器 HERAcell 1501 型 CO₂ 培养箱, 1300A2 型生物安全柜(美国 Thermo 公司);IX51 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);Milli Q 型超纯水机(美

国 Millipore 公司);C6 型分析型流式细胞仪(美国 BD 公司);DS-11 型紫外光度仪(美国 DeNovIX 公司);7500Fast 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 Applied Biosystems 公司)Mini-Sub cell GT cell 型蛋白电泳仪及转膜仪, CHEMIDOC XRS 图像处理仪(美国伯乐公司)。

2 方法

2.1 造模、分组及给药 参考文献[12]的造模方法,消化、收集 MFC 细胞,离心去上清,无菌生理盐水洗 2 次,将细胞重悬于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中。进行细胞计数,调整细胞密度为 5×10^7 个/mL,对小鼠右侧腋下皮肤进行 75% 乙醇消毒,每只小鼠右腋下接种 0.2 mL。1 周后小鼠腋下可触及明显肿块,说明荷瘤模型成功建立。将 40 只成瘤的小鼠随机分为正常组,5-FU 组,益气健脾化癥方组、联合组,每组 10 只。正常组每日 1 次灌胃生理盐水($0.02 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$);益气健脾化癥方组每日 1 次灌胃益气健脾化癥方水提液($25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, $0.02 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$);5-FU 组,隔日腹腔注射 5-FU 组溶液($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $0.02 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$);联合组每日 1 次灌胃益气健脾化癥方($25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, $0.02 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$),隔日腹腔注射 5-FU($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $0.02 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$)。连续给药 15 d,眼眶取血处死小鼠。

2.2 HE 染色观察病理变化 多聚甲醛固定各组小鼠腋下肿瘤,石蜡包埋切片,75 °C 烤片 30 min,二甲苯脱蜡,梯度乙醇浸泡。苏木素溶液浸泡 5 min,分化返蓝后,伊红染色 3 min。显微镜下观察并拍照。

2.3 益气健脾化癥方对瘤体中 TAMs 表型重塑的影响

2.3.1 流式细胞仪检测肿瘤组织中 M2, M1 型 TAMs 含量 将肿瘤组织分离成单细胞悬液,每管加入相应细胞外抗体(F4/80, CD86),避光孵育 30 min。加入磷酸盐缓冲液(PBS)3 mL,300 × g 离心 5 min,去上清。加入 Cell Fixation & Permeabilization Kit 中的固定液 A,100 μL/管,室温避光 15 min。300 × g 离心 3 min,洗 1 次,弃上清,加入 PBS 100 μL 重悬。加入破膜液 B 100 μL/管及胞内抗体(CD206)。吹打混匀后,室温避光 15 min。300 × g 离心 3 min 离心洗 2 次,弃上清,加入 PBS 500 μL 重悬。1 h 内流式细胞仪检测。具体设门及抗体选择,在 FSC,SSC 中选单核淋巴细胞群。在该群细胞中,F4/80⁺,CD206⁺为 M2 型巨噬细胞,F4/80⁺,CD86⁺为 M1 型巨噬细胞。

2.3.2 Real-time PCR 检测移植瘤中 TAMs 相关 mRNA 的表达 于液氮中取冻存的移植瘤瘤块,每组 3 块,共 12 块,剪成 0.2 cm³ 大小,PBS 洗 2 次,研磨组织,加入 trizol 试剂 1 mL,研磨震荡,静置 5 min;加入三氯甲烷 0.2 mL,混匀,静置 3 min;4 °C,1 万 r·min⁻¹ 离心 15 min;取上清液,加入等体积异丙醇,混匀,静置 10 min;4 °C,1 万 r·min⁻¹ 离心 10 min;加入 75% 乙醇 1 mL,轻轻混匀,4 °C,7 500 r·min⁻¹ 离心 5 min,弃上清,室温晾干;取 RNA 样品于紫外分光光度计上测定 260 nm 和 280 nm 波长处的吸光度 A,计算纯度及浓度。逆转录合成 cDNA,条件:42 °C 2 min 去除残留 DNA;50 °C 15 min,85 °C 5 s。将 cDNA 进行 PCR 反应,反应条件:94 °C 预变性,1 个循环;94 °C 5 s,55 °C 15 s,72 °C 10 s,共 40 个循环。实验结果采用 2^{-ΔΔC_t} 法计算各组瘤组织中 TAMs 相关 IL-1β, IL-12, TNF-α, Arg1, Ym1 mRNA 相对表达量。PCR 引物由 Invitrogen 公司设计合成,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Sequence of primer

	引物	序列(5'-3')	长度/bp
E-cadherin	上游	CTCGGCCTGAAGTGACTGTAAC	240
	下游	CAGCAACGTGTTTCTGCATTTTC	
N-cadherin	上游	GTGCCATTAGCCAAGGGAATTCAGC	370
	下游	GCGTTCCTGTTCCACTCATAGGAGG	
Snail	上游	GTTTCCTGCTGGCTCTCTTG	369
	下游	CCAAGTGGGTTGGCTTTAGTT	
Slug	上游	GAAGCCCAACTACAGCGAAC	178
	下游	AAGGCCCGCTGGGTAAGGAG	
Vimentin	上游	TGGACAGAGATTCCCAGAGG	186
	下游	TTCCTGTCAGTGGCTGATTG	
TNF-α	上游	AGTCCGGGCAGGTCTACTTT	174
	下游	TTGGACCCTGAGCCATAATC	
IL-1β	上游	CCTGGGAAACAACAGTGCTC	199
	下游	GGTTTCTTGACCCCTGAGC	
IL-12	上游	ATGTGTCCTCAGAAGCTAACCATC	586
	下游	AGTGTCTGCCAGGAGGATGTCAC	
Arg1	上游	CTCCAAGCCAAAGTCTTAGAG	185
	下游	AGGAGCTGTCATTAGGGACATC	
Ym1	上游	AGAAGGGAGTTTCAAACCTGGT	109
	下游	GTCTTGCTCATGTGTGAAGTGA	
β-actin	上游	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	250
	下游	CTCCTTAATGTCACGCAGCAT	

2.3.3 免疫组化(IHC)观察益气健脾化痰方对移植瘤中 CD206 蛋白表达 对瘤体组织切片进行二甲苯脱蜡、乙醇水合,蒸馏水清洗。放入盛有抗原修复液的高压锅内高压修复 3 min,待室温冷却后滴加一抗(1:500),37 °C 孵育 2 h,PBS 浸洗 3 次;滴加二抗,37 °C 孵育 30 min,PBS 浸洗 3 次;DAB 溶液显色;显微镜下观察染色深浅,及时终止显色反应;苏木素复染,分化返蓝,用梯度乙醇脱水,二甲苯透明封片;显微镜下观察,拍照保存。

2.4 益气健脾化痰方对瘤体 EMT 转化的影响

2.4.1 Real-time PCR 检测移植瘤中 EMT 相关 mRNA 的表达 将肿瘤组织提取总 RNA 及 PCR 反应同 2.3.2 项。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各组瘤组织中 EMT 相关基因(E-cadherin, N-cadherin, Snail, Slug, Vimentin)的相对表达量。PCR 引物由 Invitrogen 公司设计合成,引物序列见表 1。

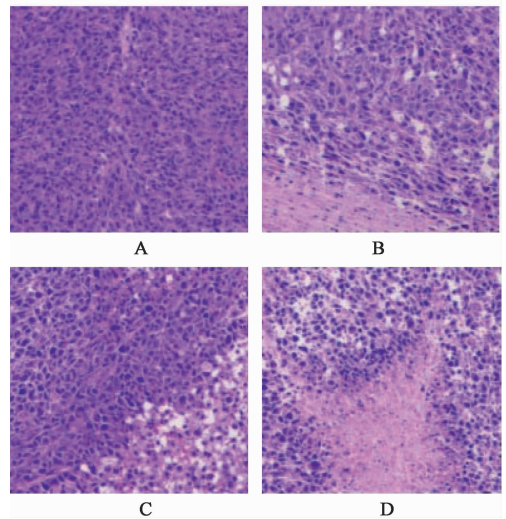
2.4.2 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测腋下移植瘤中 EMT 相关蛋白的表达 从液氮中取出肿瘤组织,振荡破碎,RIPA 裂解液 4 °C 反应 40 min,1 万 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清,二奎啉甲酸(BCA)法测定蛋白质浓度。取蛋白质 20 $\mu\text{g}/\text{孔}$,进行 10% SDS-PAGE 分离,将蛋白转膜至聚偏二氟乙烯膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,一抗(1:1 000)4 °C 孵育过夜;洗膜缓冲液(TBST)洗膜;二抗室温孵育 2 h,TBST 洗膜,双激光红外成像仪扫描图像,分析 EMT 相关蛋白表达量。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件分析,所有结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较运用 q 检验,多组间比较运用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 益气健脾化痰方对荷瘤 615 小鼠皮下移植瘤病理的影响 各组小鼠瘤体均可见,胃癌细胞异型性明显,呈多边形,大小不一,细胞核分裂像多见。肿瘤细胞排列呈巢状及片状,细胞间质见促纤维结缔组织反应及少量炎症细胞浸润。药物治疗组可见明显肿瘤凝固性坏死,残留肿瘤细胞量从大到小为正常组,益气健脾化痰方组,5-FU 组,联合组。见图 1。

3.2 益气健脾化痰方对瘤体内 M1, M2 型 TAMs 含量的影响 与正常组比较,益气健脾化痰方组、联合组均能增加 M1 型 TAMs 的含量($P < 0.05$, $P < 0.01$);5-FU 组、益气健脾化痰方组、联合组均能减少 M2 型 TAMs 的含量($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与



A. 正常组;B. 5-FU 组;C. 益气健脾化痰方组;D. 联合组(图 2 同)
图 1 益气健脾化痰方对小鼠腋下瘤病理形态的影响(HE, $\times 100$)
Fig. 1 Effect of Yiqi Jianpi Huayu recipe on pathological morphology of tumor(HE, $\times 100$)

5-FU 组比较,联合组能升高 M1 型 TAMs ($P < 0.05$),降低 M2 型 TAMs($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 益气健脾化痰方对小鼠瘤体中巨噬细胞表型的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 2 Effect of Yiqi Jianpi Huayu recipe on macrophage types in tumor($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	M1-TAM	M2-TAM
正常	-	1.81 \pm 0.11	10.63 \pm 0.95
5-FU	0.025	1.71 \pm 0.13	8.34 \pm 1.43 ¹⁾
益气健脾化痰方	25	5.27 \pm 0.35 ^{2,4)}	6.47 \pm 0.56 ^{1,4)}
联合	25 + 0.025	3.78 \pm 0.33 ^{1,3)}	5.57 \pm 1.14 ^{2,4)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与 5-FU 组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3 ~ 5 同)。

3.3 益气健脾化痰方对腋下移植瘤中 CD206 的影响 与正常组比较,各给药组均能减少 M2 型 TAMs 的数量。其中,联合组减少 M2 型 TAMs 的数量最明显。见图 2。

3.4 益气健脾化痰方对 EMT 及 TAMs 相关 mRNA 的影响 与正常组比较,益气健脾化痰方组能上调 E-cadherin mRNA 相对表达,下调 N-cadherin, Vimentin mRNA 相对表达($P < 0.05$),5-FU 组、联合组均能上调 E-cadherin mRNA 相对表达,下调 N-cadherin, Snail, Slug, Vimentin mRNA 相对表达($P < 0.05$)。与 5-FU 组比较,联合组能上调肿瘤组织中 E-cadherin mRNA 相对表达,下调 N-cadherin, Slug, Vimentin mRNA 相对表达($P < 0.05$)。见表 3。

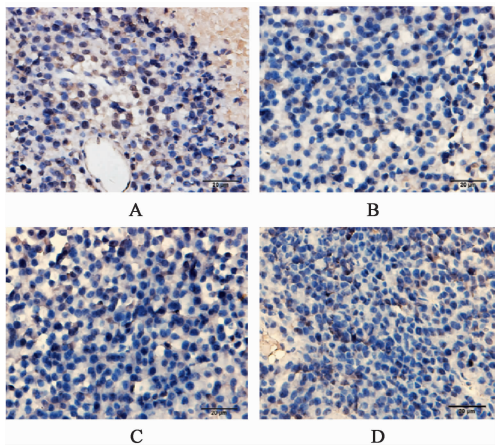


图 2 益气健脾化痰方对腋下瘤 CD206 的影响(IHC, ×200)
Fig. 2 Effect of Yiqi Jianpi Huayu recipe on CD206 in tumor (IHC, ×200)

表 3 益气健脾化痰方对 EMT 相关 mRNA 表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of Yiqi Jianpi Huayu recipe on the expression of EMT-related genes($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	E-cadherin	N-cadherin	Snail	Slug	Vimentin
5-FU	0.025	2.11 ± 0.49 ¹⁾	0.58 ± 0.05 ¹⁾	0.53 ± 0.03 ¹⁾	0.36 ± 0.04 ¹⁾	0.59 ± 0.04 ¹⁾
益气健脾化痰方	25	1.31 ± 0.13 ^{1,3)}	0.86 ± 0.01 ¹⁾	1.05 ± 0.07 ³⁾	0.92 ± 0.15 ³⁾	0.80 ± 0.19 ¹⁾
联合	25 + 0.025	3.12 ± 0.6 ^{1,3)}	0.20 ± 0.02 ^{1,3)}	0.41 ± 0.33 ¹⁾	0.21 ± 0.04 ^{1,3)}	0.23 ± 0.01 ^{1,3)}

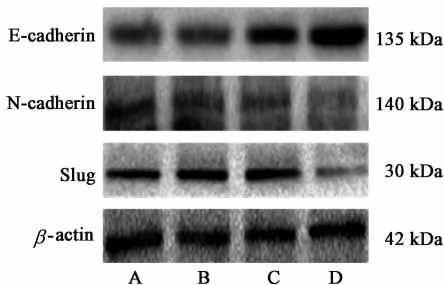
注:设正常组相关 mRNA 相对表达均为 1(表 4 同)。

表 4 益气健脾化痰方对 TAMs 相关 mRNA 表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of Yiqi Jianpi Huayu recipe on expression of TAMs-related mRNA($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TNF- α	IL-1 β	IL-12	Ym1	Arg1
5-FU	0.025	0.86 ± 1.31	1.09 ± 0.08	0.76 ± 0.09	0.64 ± 0.05 ¹⁾	0.62 ± 0.08 ¹⁾
益气健脾化痰方	25	1.65 ± 0.43 ^{1,3)}	1.37 ± 0.09 ^{1,3)}	1.42 ± 0.20 ^{1,3)}	0.51 ± 0.04 ¹⁾	0.64 ± 0.08 ¹⁾
联合	25 + 0.025	2.64 ± 0.63 ^{1,3)}	1.97 ± 0.37 ^{1,3)}	2.12 ± 0.29 ^{1,3)}	0.35 ± 0.13 ^{1,3)}	0.31 ± 0.09 ^{1,3)}

E-cadherin 蛋白表达 ($P < 0.05$), 下调 N-cadherin, Slug 蛋白表达 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 3, 表 5。



A. 正常组; B. 益气健脾化痰方组; C. 5-FU 组; D. 联合组

图 3 益气健脾化痰方对肿瘤中 EMT 相关蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of Yiqi Jianpi Huayu recipe on EMT-related proteins in tumor

4 讨论

“正气虚则呈岩”, 脾气亏虚、正气不足是胃癌发生的病理基础, 瘀血、癌毒均为正气虚衰基础

在 TAMs 相关 mRNA 相对表达中, 与正常组比较, 5-FU 组、益气健脾化痰方组、联合组能下调 M2 相关 Arg1, Ym1 mRNA 相对表达 ($P < 0.05$), 益气健脾化痰方组、联合组能上调 M1 相关基因 TNF- α , IL-1 β , IL-12 mRNA 相对表达 ($P < 0.05$)。与 5-FU 组比较, 联合组能更好的升高 IL-1 β , IL-12, TNF- α mRNA 相对表达 ($P < 0.05$), 下调 Arg1, Ym1 mRNA 相对表达 ($P < 0.05$)。见表 4。

3.5 益气健脾化痰方对 EMT 相关蛋白的影响 与正常组比较, 益气健脾化痰方组能上调 E-cadherin 蛋白表达 ($P < 0.05$), 联合组能上调 E-cadherin 蛋白表达 ($P < 0.01$); 联合组下调 N-cadherin, Slug 蛋白表达 ($P < 0.01$)。与 5-FU 组比较, 联合组能上调

上产生的病理产物, 中晚期胃癌患者的生存时间和复发转移也往往取决于其正气的盛衰。因此, “正气亏虚”为胃癌发生的基本病机之一, “益气健脾”是治疗胃癌的首要原则, 受到历代医家的重视。在胃癌的发生发展过程中, 瘀血内阻、癌毒深藏既是重要的致病因素, 后期也会进一步损伤正气, 变成继发病因, “化痰消癥”也是治疗胃癌的重要方法。益气健脾化痰方重用炙黄芪、炒党参益气扶正, 增益健脾扶正之功; 配以三棱、莪术化痰散结, 并借其流通之力, 行补药之滞。临床大量病例证实, 益气健脾化痰方加减治疗胃癌患者, 提高患者生活质量, 减轻化疗后骨髓抑制、血细胞降低效果显著。5-FU 是临床治疗肿瘤的基础化疗药物, 在抑制肿瘤生长有较肯定的疗效, 但其因其毒副反应较大, 对患者免疫功能损伤明显, 限制了其临床应用及疗效。前期本课题组实验证实, 益气健脾化痰方对胃癌有一定的抑制作

表 5 益气健脾化痰方对 EMT 相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of Yiqi Jianpi Huayu recipe on the expression of EMT-related proteins ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	E-cadherin/ β -actin	N-cadherin/ β -actin	Slug/ β -actin
正常	-	0.33 ± 0.09	0.53 ± 0.08	0.62 ± 0.11
益气健脾化痰方	25	0.53 ± 0.04 ¹⁾	0.41 ± 0.10	0.52 ± 0.07
5-FU	0.025	0.69 ± 0.09 ²⁾	0.38 ± 0.01 ¹⁾	0.62 ± 0.03
联合	25 + 0.025	0.87 ± 0.08 ^{2,3)}	0.23 ± 0.03 ^{2,3)}	0.3 ± 0.08 ^{2,4)}

用,且与 5-FU 有较好的协同抑瘤作用,机制与调节免疫有关^[10,13],但具体作用机制并未深入探讨。本实验从肿瘤微环境 TAMs 表型转化的角度,进行了相关研究。

文献报道证实,肿瘤周围免疫抑制的炎症微环境可推动胃癌的恶性进程和治疗失败。肿瘤细胞产生大量炎症因子、趋化因子,在肿瘤周围形成特殊的炎症微环境,诱导聚集并重塑微环境内的免疫细胞,使其不但丧失免疫监控、免疫清除的能力,而且释放多种免疫抑制介质、蛋白水解酶等,促进肿瘤发生发展^[14]。恢复微环境里免疫细胞受抑制的表型,将重新恢复免疫系统对肿瘤的杀伤作用,显著改善预后^[15]。TAMs 是肿瘤微环境中最重要的免疫抑制性细胞之一,可以分泌多种可溶性介质,积极参与肿瘤的增殖、侵袭转移,促进肿瘤的 EMT,是肿瘤免疫治疗的潜在靶点。研究证实,TAMs 分泌的 TGF- β_1 可通过 Smad2/3 通路,作用于锌指转录因子 Snail, Slug, E-cadherin, Vimentin, 促进 EMT 的发生^[16]。在非小细胞肺癌中^[17], TAMs 可激活 β -catenin 通路,促进肺癌细胞的 EMT,增加其侵袭转移能力。TAMs 也能通过分泌大量 IL-6,与 IL-6 受体结合,激活细胞质内 JAK 激酶,使 STAT3 发生磷酸化转入核内,诱导 Snail 转录因子上调,下调 E-cadherin 表达,增加肿瘤的 EMT^[18]。

本研究对胃癌微环境中 TAMs 的表型进行了观察。Real-time PCR 及流式细胞检测均证实,各组治疗后 TAMs 的 M2 表型减少,但益气健脾化痰方组、联合组既可以升高 M1 型 TAMs 表达,又能降低 M2 型 TAMs 表达。免疫组化检测小鼠瘤体 CD206 发现,各组肿瘤组织 TAMs 的 M2 表型均有所减少,联合组减少的最为明显。以上结果表明,益气健脾化痰方组能下调 M2-TAMs,增加 M1-TAMs 的含量,并与 5-FU 有明显的协同作用,不仅可以加强 5-FU 对 M2-TAMs 的抑制作用,而且可以进一步促进 M1-TAMs 转化,减轻肿瘤微环境的免疫抑制。

在对小鼠肿瘤的 EMT 观察上,各 EMT 相关

mRNA 及蛋白均有调控作用,减少胃癌细胞的 EMT。同时,与 5-FU 组比较,联合组能进一步上调肿瘤组织中 E-cadherin,下调 N-cadherin, Slug, Snail, Vimentin 表达。这也体现了益气健脾化痰方不仅可以单独抑制胃癌的 EMT,也增强 5-FU 对胃癌 EMT 的抑制作用。

综上所述,本部分实验通过荷胃癌 MFC 的 615 小鼠的动物模型,证实了益气健脾化痰方能通过增加瘤体的 M1-TAMs,减少 M2-TAMs,改善胃癌 EMT,抑制胃癌生长;5-FU 组能显著缩小肿瘤体积,减少胃癌 EMT,有一定减低 M2-TAMs 的作用,而对增加 M1-TAMs 无明显作用;5-FU 与益气健脾化痰方联合使用,充分发挥了协同作用,与 5-FU 组比较,显著降低了 M2-TAMs 表型,并增加 TAMs 向 M1 型的转化,减轻肿瘤微环境中的免疫抑制,从而增强了 5-FU 对胃癌 EMT 的抑制,发挥了抑制胃癌生长的作用。

[参考文献]

[1] LI Z, LEI H, LUO M, et al. DNA methylation downregulated mir-10b acts as a tumor suppressor in gastric cancer[J]. Gastric Cancer, 2015, 18(1): 43-54.

[2] ROZHOK A I, DEGREGORI J. Toward an evolutionary model of cancer: considering the mechanisms that govern the fate of somatic mutations[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(29): 8914-8921.

[3] 陈璐, 高威. 肿瘤酸性微环境的形成机制及其对肿瘤进展的影响[J]. 肿瘤, 2019, 39(2): 140-145.

[4] NOY R, POLLARD J W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy [J]. Immunity, 2014, 41(1): 49-61.

[5] FRANKLIN R A, LIAO W, SARKAR A, et al. The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages[J]. Science, 2014, 344(6186): 921-925.

[6] YAMAGUCHI T, FUSHIDA S, YAMAMOTO Y, et al. Tumor-associated macrophages of the M2 phenotype contribute to progression in gastric cancer with peritoneal dissemination [J]. Gastric Cancer, 2016, 19(4): 1052-1065.

- [7] DE PALMA M, LEWIS C E. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies [J]. *Cancer Cell*, 2013, 23 (3) : 277-286.
- [8] BISWAS S K. Metabolic reprogramming of immune cells in cancer progression [J]. *Immunity*, 2015, 43 (3) : 435-449.
- [9] SAWA-WEJKSZA K, KANDEFER-SZERSZEN M. Tumor-associated macrophages as target for antitumor therapy [J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2018, 66 (2) : 97-111.
- [10] 王敏, 刘沈林, 吴坚, 等. 益气健脾化痰方联合 5-FU 对 MFC 荷瘤小鼠皮下移植瘤的生长及免疫功能的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25 (6) : 65-72.
- [11] SICA A, PORTA C, AMADORI A, et al. Tumor-associated myeloid cells as guiding forces of cancer cell stemness [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2017, 66 (8) : 1025-1036.
- [12] 王惠, 徐陆周, 吴坚, 等. 理冲汤加减联合 5-氟尿嘧啶对人肝癌细胞 HepG2 上皮间质转化的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25 (7) : 14-21.
- [13] 邹玺, 陈玉超, 胡守友, 等. 健脾养正消癥方对胃癌患者晚期生存期和生活质量的影响 [J]. *南京中医药大学学报*, 2015, 31 (3) : 201-205.
- [14] 胥孜杭, 张飞, 朱杨壮壮, 等. 肿瘤微环境中不同亚型的髓源抑制性细胞及中医药对其调控作用的研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25 (14) : 45-54.
- [15] LI X, YAO W, YUAN Y, et al. Targeting of tumour-infiltrating macrophages via CCL2/CCR2 signaling as a therapeutic strategy against hepatocellular carcinoma [J]. *Gut*, 2017, 66 (1) : 157-167.
- [16] BORTHWICK L A, MCILROY E I, GOROWIEC M R, et al. Inflammation and epithelial to mesenchymal transition in lung transplant recipients: role in dysregulated epithelial wound repair [J]. *Am J Transplant*, 2010, 10 (3) : 498-509.
- [17] BONDE A K, TISCHLER V, KUMAR S, et al. Intratumoral macrophages contribute to epithelial-mesenchymal transition in solid tumors [J]. *BMC Cancer*, 2012, 12 (1) : 35-36.
- [18] ERRENI M, MANTOVANI A, ALLAVENA P. Tumor-associated macrophages (TAM) and inflammation in colorectal cancer [J]. *Can Microenviron*, 2011, 4 (2) : 141-154.

[责任编辑 张丰丰]