

doi:10.3969/j.issn.1671-038X.2016.07.07

藤龙补中汤对大肠癌肺转移及肿瘤相关巨噬细胞作用

邓 珊¹, 安红梅², 胡 兵¹

(¹上海中医药大学附属龙华医院 肿瘤科 中医肿瘤研究所,上海 200032;

²上海中医药大学附属龙华医院 科技处,上海 200032)

摘要:[目的]观察藤龙补中汤对大肠癌肺转移和肿瘤相关巨噬细胞(II型巨噬细胞)的作用。[方法]采用尾静脉注射法建立小鼠大肠癌肺转移模型,随机分为3组,每组10只;对照组蒸馏水灌胃,每天1次;中药组,藤龙补中汤灌胃,每天1次;化疗组,5-Fu腹腔注射,每周1次;连续用药3周后,剥离小鼠肺组织,称重并计数转移结节;免疫组织化学方法检测小鼠肺转移灶肿瘤相关巨噬细胞标志基因 Arginase I、VEGF 表达及血管生成。[结果]与对照组相比,藤龙补中汤可以显著抑制大肠癌肺转移,藤龙补中汤治疗后小鼠肺转移结节和肺质量显著降低。藤龙补中汤治疗后小鼠大肠癌肺转移组织肿瘤相关巨噬细胞显著减少,同时 VEGF 表达及血管生成降低。[结论]藤龙补中汤可以抑制大肠癌肺转移,可能与抑制肿瘤相关巨噬细胞、血管生成相关。

关键词:大肠癌;肺转移;藤龙补中汤;肿瘤相关巨噬细胞;VEGF;血管生成

中图分类号:R735

文献标志码:A

文章编号:1671-038X(2016)07-0515-05

Teng-Long-Bu-Zhong Decoction inhibits metastasis and tumor-associated macrophages in colorectal carcinoma

DENG Shan¹, AN Hong-mei², HU Bing¹

(¹ Department of Oncology, Institute of Traditional Chinese Medicine in Oncology, Shanghai 200032, China; ² Department of Science & Technology; Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

Corresponding author: HU Bing, E-mail: beearhu@hotmail.com

Abstract: [Objective] To observe the effects of Teng-Long-Bu-Zhong Decoction (TLBZD), a traditional Chinese herbal formula, on lung metastasis and tumor-associated macrophages (TAM) (Type II macrophage) in colorectal carcinoma. [Methods] The model of lung metastasis of colorectal carcinoma in mice was established by tail vein injection. Those mice were randomly divided into three groups (10 mice per group): the control group was intragastric administrated with distilled water once a day; the Chinese medicine group was intragastric administrated with TLBZD daily; and chemotherapy group were administrated with 5-Fu by intraperitoneal injection once a week. After three weeks of treatment, the mouse lungs were stripped and weighed, and the metastatic nodules in lung surface were counted. The expression of Arginase I (the marker gene of tumor associated macrophages), VEGF and angiogenesis in metastatic lesions were detected by immunohistochemistry method. [Results] Compared with control group, TLBZD significantly inhibited lung metastasis of colorectal carcinoma. After three weeks of TLBZD treatment, the lung weight and metastatic nodules were significantly reduced. TLBZD also significantly decreased TAM, and reduced the expression of VEGF and angiogenesis. [Conclusion] TLBZD can inhibit lung metastasis of colorectal carcinoma, and it may be related to inhibition of TAM and angiogenesis.

Key words: colorectal carcinoma; lung metastasis; Teng-Long-Bu-Zhong Decoction; tumor-associated macrophages; VEGF; angiogenesis

收稿日期:2015-10-19

基金项目:国家自然科学基金(No:81273726,81473625),上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划(No:ZY3-CCCX-3-3025),上海市组织工程重点实验室开放课题(No:TE1401)

作者简介:邓 珊,女,硕士研究生,研究方向:中西医结合肿瘤基础与临床

通讯作者:胡 兵, E-mail: beearhu@hotmail.com

大肠癌包括直肠癌和结肠癌,是全球最常见恶性肿瘤之一,其发病率在男性中居第二位,在女性中居第三位,由于吸烟、体力活动过少、肥胖、食用红肉与加工后肉制品以及过度饮酒等因素影响,大肠癌发病率呈现上升趋势^[1]。转移是大肠癌治疗失败常见原因,大肠癌常见肝、肺转移,转移性大肠癌治疗主要依赖于手术、化疗及靶向治疗,其 5 年生存率仅有 10%^[2],预防大肠癌转移成为重要的治疗策略。藤龙补中汤是上海市龙华医院治疗消化道肿瘤的临床验方,已证实可抑制大肠癌细胞增殖,促大肠癌细胞凋亡和细胞衰老^[3-4];本研究在血行转移模型中观察了藤龙补中汤对大肠癌肺转移的影响及可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及细胞株

BALB/C 小鼠 30 只,6 周龄,雌性,体重 18~23 g,购自上海斯莱克实验动物公司,饲养于龙华医院 SPF 级动物实验室。小鼠大肠癌 CT26 细胞株购于上海润成生物科技公司。

1.2 主要仪器及主要试剂

培养箱,美国 NuAire 公司产品;低速离心机,美国 Thermo 公司产品;倒置显微镜,日本 NIKON 公司产品;5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil,5-Fu)注射液购于上海旭东海普药业有限公司,批号为 110114,10 ml(0.25 g)/支。CD31,VEGF,Arginase I 抗体均购买于 Santa Cruz 生物技术公司。

1.3 中药制备

藤龙补中汤由藤梨根 30 g,龙葵 15 g,白术 9 g,薏苡仁 30 g,半枝莲 30 g 等组成(专利号 ZL200910197565.2),生药由上海中医药大学附属龙华医院中药房提供。中药按比例配方,加 8 倍量水浸泡 30 min,武火煮沸后文火煎煮 30 min,过滤;药渣加 6 倍水继续煎煮 30 min,滤过;合并两次滤液浓缩至 1.5 g/ml,分装于 15 ml 离心管,4℃储存备用。

1.4 动物模型制作及分组

常规培养大肠癌 CT26 细胞,消化并计数,用 PBS 调整细胞浓度至 5×10^6 个/ml,取细胞悬液,无菌操作予以每只小鼠 0.1 ml 细胞悬液进行尾静脉注射,随机分为对照组、中药组(藤龙补中汤)、化疗组(5-Fu),每组 10 只。尾静脉注射的前一日开始给药,中药组以藤龙补中汤灌胃,0.3 ml/次,1 次/d;化疗组以 5-Fu 腹腔注射,按 30 mg/kg 换算,0.3 ml/次,浓度为 2 mg/ml,1 次/周;对照组蒸馏水灌胃,0.3 ml/次,1 次/d。共治疗 3 周。3 组动物均给予饲料,自由饮用无菌水。

1.5 观察项目及方法

1.5.1 转移灶生长情况

开始治疗后,每日观察小

鼠生长情况,2~3 周后小鼠出现死亡,解剖小鼠发现肺转移灶即停止试验,实验结束后,脱颈椎处死小鼠,剥离肺组织,称取肺组织质量并计数肺表面转移结节数量。

1.5.2 免疫组化检测 免疫组化法检测 Arginase I、VEGF、CD31 表达。4%多聚甲醛固定肺组织,常规石蜡包埋、切片、脱蜡,3%过氧化氢封闭 10 min,PBS 冲洗;置于柠檬酸缓冲液中(pH6.0)高温高压修复抗原 2 min,PBS 冲洗;免疫性动物血清孵育 5 min,PBS 冲洗;加入 Arginase I、CD31、VEGF(浓度 1:100)4℃过夜,PBS 冲洗;加入对应二抗,37℃孵育 30 min,PBS 冲洗,DAB 显色,苏木精复染,封片;Image Pro 软件分析蛋白表达平均光密度值。

1.6 统计学处理

使用 SPSS 15.0 进行统计。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用完全随机方差分析 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 藤龙补中汤对 CT26 大肠癌小鼠肺转移影响

实验结束后,脱颈椎处死小鼠,对照组肺表面可见明显转移灶,藤龙补中汤、5-Fu 治疗后,肺表面转移结节显著减少,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。

表 1 CT26 大肠癌血行转移模型肺转移结节数

$\bar{x} \pm s$		
组别	小鼠/只	肺转移结节/个
对照组	6	21.33±4.13
化疗组	6	7.66±0.82 ¹⁾
中药组	7	12.60±2.88 ¹⁾

与对照组比较,¹⁾ $P < 0.01$ 。

2.2 藤龙补中汤对 CT26 大肠癌转移模型小鼠肺组织质量影响

肺组织称重结果如表 2 所示,经藤龙补中汤、5-Fu 治疗后小鼠肺组织质量显著低于对照组($P < 0.01$)。

表 2 CT26 大肠癌血行转移模型肺组织质量

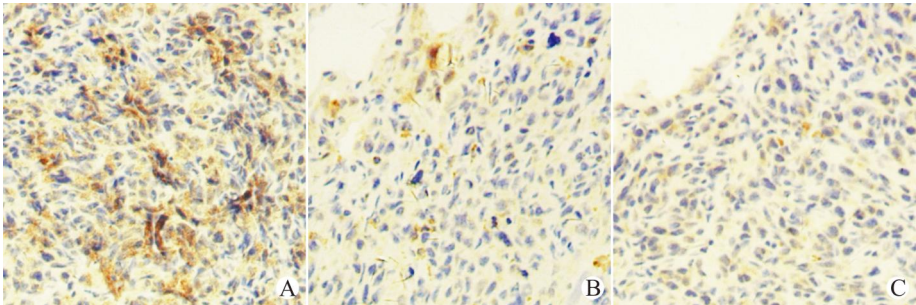
$\bar{x} \pm s$		
组别	小鼠/只	肺组织质量/g
对照组	6	0.43±0.05
化疗组	6	0.21±0.06 ¹⁾
中药组	7	0.27±0.07 ¹⁾

与对照组比较,¹⁾ $P < 0.01$ 。

2.3 藤龙补中汤对 CT26 大肠癌肺转移灶肿瘤相关巨噬细胞影响

本研究采用肿瘤相关巨噬细胞(Tumor-associated macrophages,TAM)(M2 型巨噬细胞)标志基因 Arginase 1(Arg-1)表达检测藤龙补中汤对 CT26

大肠癌肺转移灶 TAM 的影响^[5-7]。结果显示在 CT26 大肠癌肺转移灶中有较多 TAM 分布,藤龙补中汤、5-Fu 治疗后 TMA 数量显著减少($P<0.01$)。见图 1,表 3。



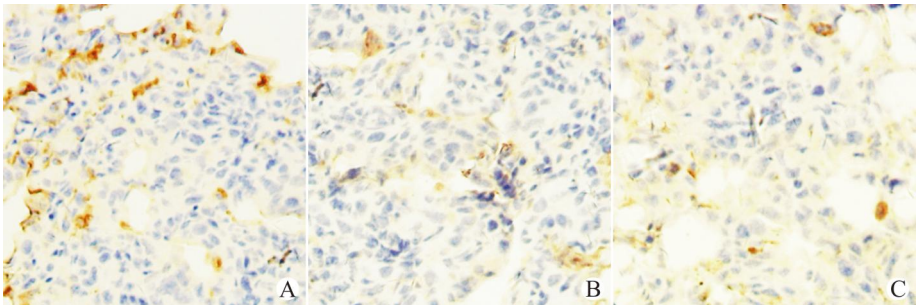
A:对照组;B:化疗组;C:中药组。
图 1 CT26 大肠癌小鼠肺转移灶 TAM 分布(免疫组织化学染色,×200)

表 3 CT26 大肠癌小鼠肺转移灶 TAM 平均光密度值		
组别	n	平均光密度
对照组	3	0.070 5±0.033 1
化疗组	3	0.007 9±0.000 8 ¹⁾
中药组	3	0.011 9±0.001 6 ¹⁾

与对照组比较,¹⁾ $P<0.01$ 。

2.4 CT26 大肠癌小鼠肺转移灶 VEGF 表达影响

免疫组化检测显示 VEGF 阳性表达呈棕色阳性颗粒,在 CT26 大肠癌小鼠肺转移灶有较多表达,藤龙补中汤、5-Fu 治疗后 VEGF 表达显著减少($P<0.01$)。见图 2,表 4。



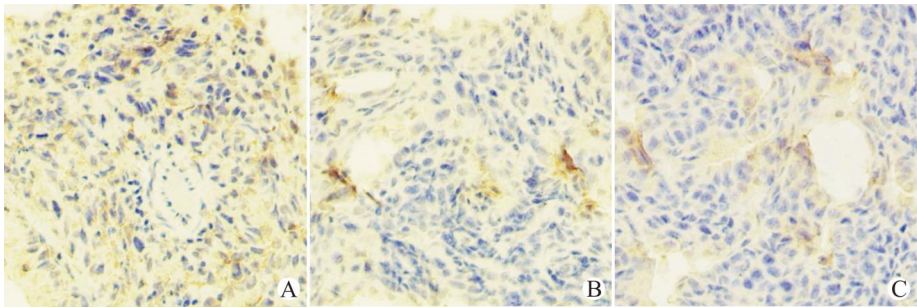
A:对照组;B:化疗组;C:中药组。
图 2 CT26 大肠癌小鼠肺转移灶 VEGF 表达(免疫组织化学染色,×200)

表 4 CT26 大肠癌小鼠肺转移灶 VEGF 平均光密度值		
组别	n	平均光密度
对照组	3	0.026 5±0.001 6
化疗组	3	0.005 7±0.000 5 ¹⁾
中药组	3	0.006 8±0.001 1 ¹⁾

与对照组比较,¹⁾ $P<0.01$ 。

2.5 藤龙补中汤对 CT26 结肠癌小鼠肺转移灶血管生成影响

研究进一步以 CD31 为血管生成标志基因,采用免疫组化法检测了藤龙补中汤对 CT26 大肠癌小鼠肺转移灶血管生成的影响,结果显示,藤龙补中汤组、化疗组的 CD31 阳性染色颗粒明显较少,平均光密度值与对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。见图 3,表 5。



A:对照组;B:化疗组;C:中药组。

图 3 CT26 大肠癌小鼠肺转移灶血管生成(免疫组织化学染色,×200)

表 5 CT26 大肠癌小鼠肺转移灶血管生成
平均光密度值

组别	n	平均光密度
对照组	3	0.030 6±0.001 9
化疗组	3	0.004 6±0.000 3 ¹⁾
中药组	3	0.006 6±0.000 5 ¹⁾

与对照组比较,¹⁾ P<0.01。

3 讨论

中医认为肿瘤的转移主要与正气亏虚、伏邪未尽相关,扶正祛邪是防治肿瘤转移的基本治则。本研究中所使用的藤龙补中汤是上海市龙华医院的经验方,由藤梨根、龙葵、白术、薏苡仁、半枝莲等组成,本方结合肿瘤生物学和中药药理基础,用药组方以达到解毒、利湿、健脾抗肿瘤作用,在扶助正气的同时清除邪毒,并抑制血管的新生,其中藤梨根、龙葵等起主要解毒抗癌作用^[8-9],藤梨根、龙葵同时清热利湿,白术、薏苡仁健脾利湿,半枝莲抗癌的同时抑制肿瘤新生血管生成^[10-11]。本实验结果显示藤龙补中汤治疗后小鼠肺表面转移结节及肺质量显著降低,提示藤龙补中汤可以防治大肠癌肺转移。

肿瘤炎症(Cancer-related inflammation)是促肿瘤转移的重要因素,2009 年 Mantovani 等将炎症列为肿瘤第七大基本特征^[12-13]。肿瘤相关巨噬细胞(Tumor-associated macrophages, TAM)或 M2 型巨噬细胞是介导肿瘤炎症的重要细胞群体,TAM 可以在 M-CSF、IL-4、IL-13、IL-10 等细胞因子作用下活化,低表达 IL-12、IL-23,高表达 IL-10、精氨酸酶(Arginase I, Arg-1),递呈抗原能力低,可以抑制抗肿瘤免疫,促进肿瘤新生血管生成以及肿瘤组织重构,促进肿瘤转移。此外,肿瘤的乏氧环境也参与 TAM 活化,在肿瘤乏氧环境下 HIF-1 α 信号通路激活,上调 CXCL8、CXCR4 等靶基因活化 TAM,促进 NOS2、ARG 基因表达,影响 TAM L-精氨酸代谢;Arg-1 是研究 TAM 的重要标志基因^[5-7,14]。

TAM 表达 SPARC/osteonectin、基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinases, MMPs)、趋化因子等影响肿瘤基质重构(Matrix remodeling),促进肿瘤转移。TAM 还可分泌多种促血管生成因子,如 VEGF、TGF-β、PDGF、FGF 等,促肿瘤血管生成。此外,TAM 产生 IL-10、TGF-β 等免疫抑制细胞因子,分泌 CCL22 募集调节性 T 细胞(Regulatory T cells, Tregs)抑制肿瘤免疫。本研究发现藤龙补中汤治疗后 CT26 肺转移灶 TAM 标志基因 Arg-1 表达显著减低,提示抑制 TAM 分化可能参与藤龙补中汤对 CT26 肠癌肺转移的作用。

CD31 或血小板/内皮细胞粘附分子 1(Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1)是表达于血管内皮细胞等细胞表面的粘附分子,现广泛作为肿瘤血管生成的标志蛋白^[15]。VEGF 是促血管生成的重要细胞因子,可以由肿瘤细胞、TAM 细胞^[5-7,14]、血管内皮细胞分泌;VEGF 通过刺激血管内皮细胞的增殖,在触发血管形成启动过程中起到关键作用。本研究结果显示藤龙补中汤治疗后 CT26 肺转移灶 CD31 表达显著降低,同时 VEGF 表达降低,提示藤龙补中汤可以抑制 VEGF 表达,进而抑制肿瘤新生血管生成,从而防治大肠癌肺转移。

综上所述,本研究结果显示藤龙补中汤可以抑制 CT26 大肠癌肺转移,可能与抑制肿瘤相关巨噬细胞、血管生成相关,值得进一步深入研究。

参考文献

[1] JEMAL A, BRAY F, CENTER MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61:69—90.

[2] DAVIES JM, Goldberg RM. Treatment of metastatic colorectal cancer[J]. Semin Oncol, 2011, 38:552—560.

[3] 胡 兵, 安红梅, 沈克平, 等. 藤龙补中汤对结肠癌细胞 LS174 T 增殖和凋亡的影响[J]. 中西医结合学报, 2010, 8(6):575—580.

- [4] 胡 兵, 安红梅, 沈克平, 等. 藤龙补中汤促结肠癌 LS174 T 细胞衰老及其机制[J]. 中西医结合学报, 2010, 8(11):1048—1052.
- [5] ALLAVENA P, SICA A, GARLANDA C, et al. The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance[J]. Immunol Rev, 2008, 222:155—161.
- [6] XIAO W, HONG H, KAWAKAMI Y, et al. Regulation of myeloid proliferation and M2 macrophage programming in mice by Lyn/Hck, SHIP, and Stat5[J]. J Clin Invest, 2008, 118:924—934.
- [7] DENG S, HU BING, SHEN KP, et al. Inflammation, macrophage in cancer progression and Chinese herbal treatment[J]. J Basic Clin Pharm, 2012, 2:269—272.
- [8] 陈永杰, 史仁杰. 藤梨根提取物对大肠癌 LoVo 细胞增殖的抑制作用及诱导凋亡的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2012, 20(18):1657—1661.
- [9] LEE SJ, KO JH, LIM KT. Glycine-and proline-rich glycoprotein isolated from *Solanum nigrum* Linne activates caspase-3 through cytochrome c in HT-29 cells [J]. Oncol Rep, 2005, 14:789—796.
- [10] GOH D, LEE YH, ONG ES. Inhibitory effects of a chemically standardized extract from *Scutellaria barbata* in human colon cancer cell lines, LoVo[J]. J Agric Food Chem, 2005, 53:8197—8204.
- [11] 张妮娜, 卜 平, 朱海杭, 等. 半枝莲抑制肿瘤血管生成的作用及其机制研究. 癌症, 2005, 24(12):1459—1463.
- [12] SOLINAS G, MARCHESI F, GARLANDA C, et al. Inflammation-mediated promotion of invasion and metastasis[J]. Cancer Metastasis Rev, 2010, 29(2):243—248.
- [13] COLOTTA F, ALLAVENA P, SICA A, et al. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability [J]. Carcinogenesis, 2009, 30:1073—1081.
- [14] SOLINAS G, GERMANO G, MANTOVANI A, et al. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation[J]. J Leukoc Biol, 2009, 86:1065—1073.
- [15] DEEP G, GANGAR SC, RAJAMANICKAM S, et al. Angiopreventive efficacy of pure flavonolignans from milk thistle extract against prostate cancer: targeting VEGF-VEGFR signaling [J]. PLoS One, 2012, 7: e34630.