

# 黄芪-莪术配伍联合 5-氟尿嘧啶对 CT26. WT 结肠癌原位移植瘤模型小鼠中 Th17/Treg 平衡及肿瘤相关 mRNA 和蛋白表达的影响

郭文晖<sup>1</sup>, 齐卓操<sup>1,2</sup>, 关汉卿<sup>1</sup>, 刘甜甜<sup>1</sup>, 梁立<sup>1</sup>, 余倩慧<sup>1</sup>, 梁研<sup>1</sup>, 唐德才<sup>1\*</sup>

(1. 南京中医药大学 中医学院·中西医结合学院, 江苏 南京 210023;

2. 上海中医药大学 基础医学院, 上海 201203)

**[摘要]** 黄芪-莪术配伍是临床常用治疗肿瘤的组合, 基于 Th17/Treg 细胞平衡探究黄芪-莪术配伍联合 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU) 对结肠癌原位移植瘤模型小鼠肿瘤生长的可能作用机制。该研究将 90 只 BALB/c 雄性小鼠随机分为 9 组: 空白组, 模型组, 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 组, 黄芪-莪术 (2:1) 配伍高、中、低剂量组, 联合 5-FU 高、中、低剂量组, 每组 10 只。除空白组外其余各组小鼠建立 CT26. WT 结肠癌原位移植瘤模型。术后 24 h 空白组与模型组给予生理盐水灌胃 (10 mL·kg<sup>-1</sup>, 每日 1 次); 5-FU 组用 5-FU 腹腔注射 (25 mg·kg<sup>-1</sup>, 隔日 1 次); 黄芪-莪术高、中、低剂量组分别用黄芪-莪术药液灌胃 (12、6、3 g·kg<sup>-1</sup>, 每日 1 次); 联合高、中、低剂量组分别用黄芪-莪术相应剂量灌胃和 5-FU 腹腔注射, 用药剂量和方法同上。各组均干预 3 周后处死小鼠取肿瘤组织, 称瘤体质量并计算平均瘤重; 检测各组小鼠脾组织 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞中辅助性 T 细胞 17 (Th17)/调节性 T 细胞 (Treg) 百分比变化趋势; 检测转化生长因子-β (transforming growth factor-β, TGF-β)、肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)、γ-干扰素 (IFN-γ)、Smad4、N-钙粘蛋白 (N-cadherin)、基质金属蛋白酶-7 (matrix metalloproteinase-7, MMP-7) 在血液中 mRNA 表达水平及肿瘤组织中蛋白表达水平。结果表明, 与模型组比较, 各给药组小鼠瘤体质量均降低 (P<0.01); 各给药组小鼠脾组织中 CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> 均有不同程度降低 (P<0.001), CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> 细胞比例均升高 (P<0.001 或 P<0.05), 表明 Th17/Treg 始终保持动态平衡, 且联合用药组的效果优于其他组别; 各给药组血液中 TGF-β、TNF-α、IFN-γ、Smad4、N-cadherin、MMP-7 mRNA 及原位移植瘤中 TGF-β、TNF-α、IFN-γ、Smad4、N-cadherin、MMP-7 蛋白的表达均不同程度降低 (P<0.01 或 P<0.001), 并且呈一定剂量依赖性。黄芪-莪术配伍联合 5-FU 可抑制 CT26. WT 结肠癌小鼠原位移植瘤的生长, 其机制可能与维持体内 Th17/Treg 的动态平衡, 下调 TGF-β、TNF-α、IFN-γ、Smad4、N-cadherin、MMP-7 肿瘤相关因子的表达水平有关。

**[关键词]** 黄芪; 莪术; 结肠癌; Th17/Treg; 转化生长因子-β; 肿瘤坏死因子-α; γ-干扰素

## Effect of Astragali Radix-Curcumae Rhizoma compatibility combined with 5-fluorouracil on Th17/Treg balance and tumor-related mRNA and protein expression in orthotopic xenograft model mice of CT26. WT colorectal carcinoma

GUO Wen-hui<sup>1</sup>, QI Zhuo-cao<sup>1,2</sup>, GUAN Han-qing<sup>1</sup>, LIU Tian-tian<sup>1</sup>, LIANG Li<sup>1</sup>, YU Qian-hui<sup>1</sup>, LIANG Yan<sup>1</sup>, TANG De-cai<sup>1\*</sup>

(1. School of Traditional Chinese Medicine·School of Integrated Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Basic Medical College, Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

**[Abstract]** Astragali Radix-Curcumae Rhizoma (AR-CR) is a combination commonly used in the clinical treatment of tumors. Based on the T helper 17 (Th17)/regulatory T cell (Treg) balance, the present study explored the possible mechanism of AR-CR

**[收稿日期]** 2021-09-06

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目 (81873021); 江苏省中医药科技发展专项 (2020ZX01); 江苏省研究生科研创新计划项目 (KYCX20\_1576)

**[通信作者]** \*唐德才, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药药效、配伍机制及应用, E-mail: 290022@njucm.edu.cn

**[作者简介]** 郭文晖, 硕士研究生, E-mail: gwh18340807580@163.com

combined with 5-fluorouracil (5-FU) on the tumor growth of orthotopic xenograft model mice of colorectal carcinoma. Ninety male BALB/c mice were randomly divided into nine groups, i. e., a blank group, a model group, a 5-FU group, high-, medium-, and low-dose AR-CR (2:1) groups, and high-, medium-, and low-dose AR-CR+5-FU groups, with 10 mice in each group. The orthotopic xenograft model of CT26. WT colorectal carcinoma was induced in mice except those in the blank group. Twenty-four hours after the operation, mice in the blank group and the model group received normal saline by gavage ( $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ , once per day), and those in the 5-FU group received 5-FU by intraperitoneal injection ( $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , once every other day). Mice in the AR-CR groups received AR and CR decoctions by gavage (12, 6, and  $3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , once a day) and those in the combination groups received AR and CR decoctions and 5-FU (doses and administration methods were the same as above). After intervention for three weeks, all mice were sacrificed and tumor tissues were collected. The tumor mass was weighed and the average tumor weight was calculated. The changing trend of Th17/Treg (%) in the  $\text{CD4}^+$ T lymphocytes of the spleen tissues of the mice in each group was detected. The mRNA expression in the blood and protein expression in the tumor tissues of transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Smad4, N-cadherin, matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) were detected. The experimental results revealed that compared with the model group, the groups with drug intervention showed reduced tumor mass ( $P < 0.01$ ), decreased  $\text{CD4}^+$ IL-17 $^+$  in the spleen tissues to varying degrees ( $P < 0.001$ ), and increased proportion of  $\text{CD4}^+$ Foxp3 $^+$  ( $P < 0.001$  or  $P < 0.05$ ), indicating that Th17/Treg maintained dynamic balance, and the effect of the combination groups was predominant. Additionally, the mRNA expression in the blood and protein expression in the tumor tissues of TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , Smad4, N-cadherin, and MMP-7 declined to varying degrees in a dose-dependent manner ( $P < 0.01$  or  $P < 0.001$ ). The AR-CR combined with 5-FU can inhibit the tumor growth of orthotopic xenograft model mice of CT26. WT colorectal carcinoma. The mechanism may be related to maintenance of Th17/Treg dynamic balance in the body and down-regulation of TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , Smad4, N-cadherin, and MMP-7 expression.

**[Key words]** Astragali Radix; Curcumae Rhizoma; colon cancer; Th17/Treg; TGF- $\beta$ ; TNF- $\alpha$ ; IFN- $\gamma$

DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20211008.401

世界卫生组织(WHO)2020年发布的《2020年世界癌症进展报告》中表明,结肠癌的发病率在所有癌症中位列第三(10.0%),病死率位列第二(9.4%),男性结肠癌发病率高于女性<sup>[1]</sup>,且中国结直肠癌的发病率不断上升,病死率位列第五<sup>[2]</sup>。目前,手术治疗仍然是攻克早期结肠癌的主要治疗方法,晚期则主要以化疗为主,由于结肠癌发现时往往已至中晚期或伴随转移灶<sup>[3]</sup>,而传统手术治疗存在创伤大、恢复慢、费用昂贵和时间较长等缺点<sup>[4]</sup>。因此,近年来临床上开始使用中医药与化疗药物联合使用来加强其抗肿瘤转移、侵袭、浸润等作用,并减少化疗的毒副作用<sup>[5]</sup>。

基于中医理论,肿瘤发生的病机离不开正气亏虚,瘀血内阻。“虚瘀”为肿瘤最基本的病机<sup>[6]</sup>。最新研究表明,Th17、Treg、 $\text{CD4}^+$ T细胞等可通过影响上皮细胞的增殖、迁移和存活<sup>[7]</sup>干预结肠癌细胞的生长。因此研究Th17/Treg平衡有助于揭示结肠癌免疫调控可能的分子机制。课题组前期研究已证明了补气活血药对黄芪-莪术可促进肿瘤血管正常化从而发挥抗肿瘤转移作用。而含黄芪的肿瘤治疗中药注射液可下调肺癌患者转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$

(tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、 $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )等细胞因子表达,介导肿瘤血管新生<sup>[8]</sup>。本实验旨在研究黄芪、莪术配伍联合5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)对结肠癌相关因子的影响,通过建立CT26. WT结肠癌原位移植瘤小鼠模型,检测其脾组织中Th17/Treg细胞的百分比变化以及结肠癌小鼠血液中肿瘤相关mRNA及原位移植瘤组织中蛋白表达情况,进一步观察黄芪-莪术药对联合5-FU对小鼠原位移植瘤的抑制作用,并从免疫因素方面探讨其对结肠癌治疗的影响及可能作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物及细胞株

BALB/c 雄性小鼠 90 只, 4~5 周龄, 体质量 20~22 g, 购自南京市江宁区青龙山动物繁殖场, 实验动物许可证号 SYXK(苏)2017-0001。实验动物均饲养于南京中医药大学实验动物中心, SPF 级独立通风屏障系统, 所有动物实验操作均符合南京中医药大学实验动物中心伦理委员会标准, 实验动物伦理号 201808A011。小鼠结肠癌细胞(CT26. WT 细胞)购自北京市肿瘤防治研究所, 充液法运输。采用青霉素( $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、链霉素( $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、含 10% 胎牛血清及 RPMI-1640 培养基, 在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 CT26. WT 细胞。

**1.2 药品与制备** 与课题组前期研究结果一致,黄芪采用豆科黄芪属植物蒙古黄芪 *Astragalus mongholicus* Bunge 的干燥根,莪术采用姜科植物温郁金 *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling 的干燥根茎。生黄芪、醋莪术购自江苏省中医院中药房,经南京中医药大学药学院陆兔林教授鉴定。黄芪、莪术药液制备:根据临床用药经验和本课题组前期实验结果,精密称取黄芪 400 g、莪术 200 g,加入 10 倍量药材的纯水浸泡 0.5 h,回流装置提取 2 次,煮沸 1 h 后,同样方法提取第 2 遍,挥发油测定器收集莪术油,合并 2 次药液,旋转蒸发浓缩药液,加入收集的莪术油,定容至 300 mL,即生药量浓度为  $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,所得药液即为黄芪-莪术高剂量组(黄芪质量浓度约为  $1.33 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、莪术质量浓度约为  $0.67 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),将黄芪-莪术高剂量组药液进行稀释,此时中剂量组药液黄芪质量浓度约为  $0.67 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、莪术质量浓度约为  $0.34 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,低剂量组药液黄芪质量浓度约为  $0.34 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、莪术质量浓度约为  $0.17 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,置于  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。5-FU:225 mg 5-FU 用 0.5% 二甲基亚砜(DMSO)溶解,加入 90 mL 生理盐水(0.9% 氯化钠),超声振荡 5 min,制备 5-FU 混悬液用于小鼠腹腔注射。

**1.3 试剂与仪器** 注射用 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil,批号 709D021, Solarbio 公司); RPMI-1640 培养基(批号 KGM31800S-500,江苏凯基生物技术股份有限公司);胎牛血清(批号 8122818)、胰蛋白酶(批号 1820802)购自 Gibco 公司;青链霉素双抗溶液(批号 HS20200925,上海传秋生物科技有限公司);戊巴比妥钠(批号 F200220915,中国医药上海化学试剂公司);Histoacryl 医用组织胶水(批号 1050052,台湾柏朗股份有限公司);TGF- $\beta$ (批号 21898-1-AP)、TNF- $\alpha$ (批号 17590-1-AP)、Smad4(批号 10231-1-AP)、N-cadherin(批号 22018-1-AP)、基质金属蛋白酶-7(matrix metalloproteinase-7, MMP-7,批号 10374-2-AP)、IFN- $\gamma$ (批号 ab171081)购自 Proteintech 公司;磷酸盐缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS 缓冲液,批号 02-024-1ACS,上海帝博思生物科技有限公司);BCA 蛋白定量试剂盒(批号 23228,美国 Thermo 公司);脱脂奶粉(批号 B0014K121800, Biosharp 公司);蛋白上样缓冲液[批号 200218,天根生化科技(北京)有限公司];显影液(批号 042016160525,碧云天生物技术有限公司)。

超纯水机(型号 Master-D UVF,上海和泰仪器有限公司);垂直电泳槽(型号 VE-180),凝胶成像系统(型号 5300)购自上海天能科技有限公司;高速低温离心机(型号 MicroCL 17R, ThermoFisher Scientific 公司);RT-PCR 仪(型号 AFD9600,杭州安杰思生物科技有限公司);微量分光光度计(型号 Nano-100,杭州奥盛仪器有限公司)。

**1.4 造模** 使用对数生长期的 CT26. WT 细胞制备单细胞悬液,细胞密度约为  $1 \times 10^7$  个/mL。抽取 0.1 mL(细胞数约为  $1 \times 10^6$  个)细胞悬液接种于 BALB/c 小鼠右腋下,建立皮下异位移植瘤小鼠模型,14 d 后长出直径约 1 cm 的实体瘤。小鼠 CT26. WT 结肠癌原位移植瘤模型造模方法参考前期研究进行<sup>[9]</sup>。颈椎脱臼法处死异位移植瘤小鼠,消毒后完整剥离瘤体,置于含双抗的生理盐水中。选取类似鱼肉状肿瘤组织,眼科手术剪制备  $1 \text{ mm}^3$  大小的组织块备用。腹腔麻醉小鼠,待其翻正反射消失,对手术切口及其周围部位进行消毒。小鼠左下腹部作 1 cm 左右切口,将小鼠的游离盲结肠拖至体外,用 4 号针头刮去盲结肠交界处少许浆膜,使用 Histoacryl 医用组织胶固定 1 粒瘤块。组织胶晾干后,将外置肠段纳入腹中,无菌缝合。待小鼠麻醉清醒后置于 SPF 级动物房中常规饲养。

**1.5 分组与给药** 雄性 BALB/c 小鼠 90 只,适应性饲养 1 周后,10 只作为空白组,80 只用于建立结肠癌原位移植瘤模型。术后将 80 只 BALB/c 模型小鼠随机分为 8 组,即模型组、5-FU 组、黄芪-莪术高剂量组、黄芪-莪术中剂量组、黄芪-莪术低剂量组、联合高剂量组、联合中剂量组、联合低剂量组,每组 10 只。本实验小鼠给药根据课题组前期研究<sup>[10]</sup>和“人和动物体表面积折算的等效剂量比率表”换算得到,约为人体用量的 9 倍,则黄芪-莪术药液的标准(中剂量组)为  $6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。各组给药情况如下:空白组与模型组予以生理盐水灌胃,5-FU 组予以  $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  5-FU 腹腔注射,高剂量组灌胃给予黄芪-莪术  $12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  药液,中剂量组灌胃给予黄芪-莪术  $6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  药液,低剂量组灌胃给予黄芪-莪术  $3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  药液,联合用药组分别灌胃给予 12、6、3  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  药液且腹腔注射  $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  5-FU。灌胃给药体积均为  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,每日 1 次,连续 21 d;5-FU 每 2 d 腹腔注射 1 次,共 11 次。用药期间每日观察各组小鼠的精神、活动情况、饮食、大

小便及一般情况。

**1.6 瘤体质量及平均瘤重** 除空白组外,完整剥离小鼠原位移植瘤组织,称瘤体质量,每组小鼠编号  $m_1 \sim m_{10}$ , 计算平均瘤重,平均瘤重(g) =  $(m_1 + m_2 + \dots + m_{10})/10$ 。

**1.7 Flow Cytometry 检测脾组织 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞中 Th17/Treg 细胞百分比变化** 取材时将脾脏放入离心管中。PBS 洗涤 2 次,然后将其转移到培养皿中。使用显微镜载玻片将脾脏挤压研磨,以提取脾脏所含的细胞基质。收集细胞,混匀。4 ℃,400×g 离心细胞悬液,沉淀细胞,弃上清。收集上一步骤细胞于流式管中,加入 1 mL FACS 缓冲液,4 ℃,1 700 r·min<sup>-1</sup> 离心 4 min,弃上清。加入 100 μL FACS 缓冲液,并加入细胞表面抗原 CD4 10 μL 及 10 倍稀释后 FVD 2 μL,避光孵育。用 FACS 缓冲液洗涤细胞

2 次,弃上清,用 4% 多聚甲醛重悬细胞,静置。洗涤并重悬细胞,加入 -20 ℃ 预冷的甲醇 450 μL。冰上孵育 30 min。洗涤细胞 2 次后弃上清,加入胞内抗体各 1 μL,4 ℃ 避光孵育 1 h。洗涤细胞 2 次后弃上清,重悬。应用 FlowJo10.0 软件上机分析流式结果。

**1.8 RT-PCR 法检测血液中 TGF-β、TNF-α、IFN-γ、Smad4、N-cadherin、MMP-7 mRNA 表达** 采用 TRIzol 法分别提取各组血液中 RNA。计算 RNA 浓度和纯度,按照 SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒进行反转录,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成、扩增并检测,引物序列见表 1。反应条件:95 ℃ 预变性 30 s;然后 95 ℃ 10 s,52 ℃ 34 s,60 ℃ 34 s 进行 40 个循环,每个循环结束采集荧光。扩增反应在 RT-PCR 仪上进行,采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法对结果进行分析。

表 1 RT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for RT-PCR

基因	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')	产物长度/bp
TGF-β	GCGGACTACTATGCTAAAGAGG	GTAGAGTTCCACATGTTGCTCC	125
TNF-α	AAGAGGCACTCCCCAAAAG	GTGGTTTGTGAGTGTGAGGGT	226
IFN-γ	GGAACCTCTGCCCTCAATGT	CTCCACAATAGCCTTCAGTGC	374
Smad4	CACTATGAGCGGGTTGTC	GGTGCTGGTGGCGTTAGA	92
N-cadherin	GCCATCATCGCTATCCTTCT	CCGTTTCATCCATACCACAAA	169
MMP-7	GAACAGGCTCAGGACTATCTC	ACATCTGGCACTCCACATC	54

**1.9 Western blot 法检测肿瘤组织 TGF-β、TNF-α、IFN-γ、Smad4、N-cadherin、MMP-7 蛋白表达** 根据全蛋白提取试剂盒提取蛋白,BCA 法检测蛋白浓度。SDS-PAGE 电泳分离,PVDF 膜转膜,5% 脱脂奶粉封闭;一抗 4 ℃ 孵育过夜;二抗室温孵育 2 h,按 0.1 mL·cm<sup>-2</sup> 显影液计算用量,将显影液加于 PVDF 膜上,暗室中迅速将膜蛋白贴在 X 光胶片上曝光,洗片机中显影、洗像。调整曝光时间,直至出现最佳条带。Western blot 结果使用灰度值测量计扫描,使用 QuantityOne 4.6.6 分析软件将条带灰度值数值化。

**1.10 统计学分析** 本实验数据采用 IBM SPSS Statistics 26.0 软件进行处理,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。各组方差齐时,两两相比较时采用 LSD 法检验;方差不齐时,采用 Games-Howell 多重比较法。统计结果以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, $P < 0.05$  时表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组小鼠平均瘤重比较** 空白组小鼠均无瘤体。与模型组比较,黄芪-莪术各剂量组、联合各剂

量组及 5-FU 组平均瘤重均显著下降( $P < 0.01$ ),其中联合各剂量组抑制肿瘤生长效果明显;与 5-FU 组比较,联合高剂量组平均瘤重下降最明显( $P < 0.05$ ),见表 2。结果表明,黄芪、莪术配伍联合 5-FU 对结肠癌小鼠原位移植瘤的抑制作用优于单用 5-FU 组和中药单用组,其中联合高剂量组平均瘤重最低,效果最好。

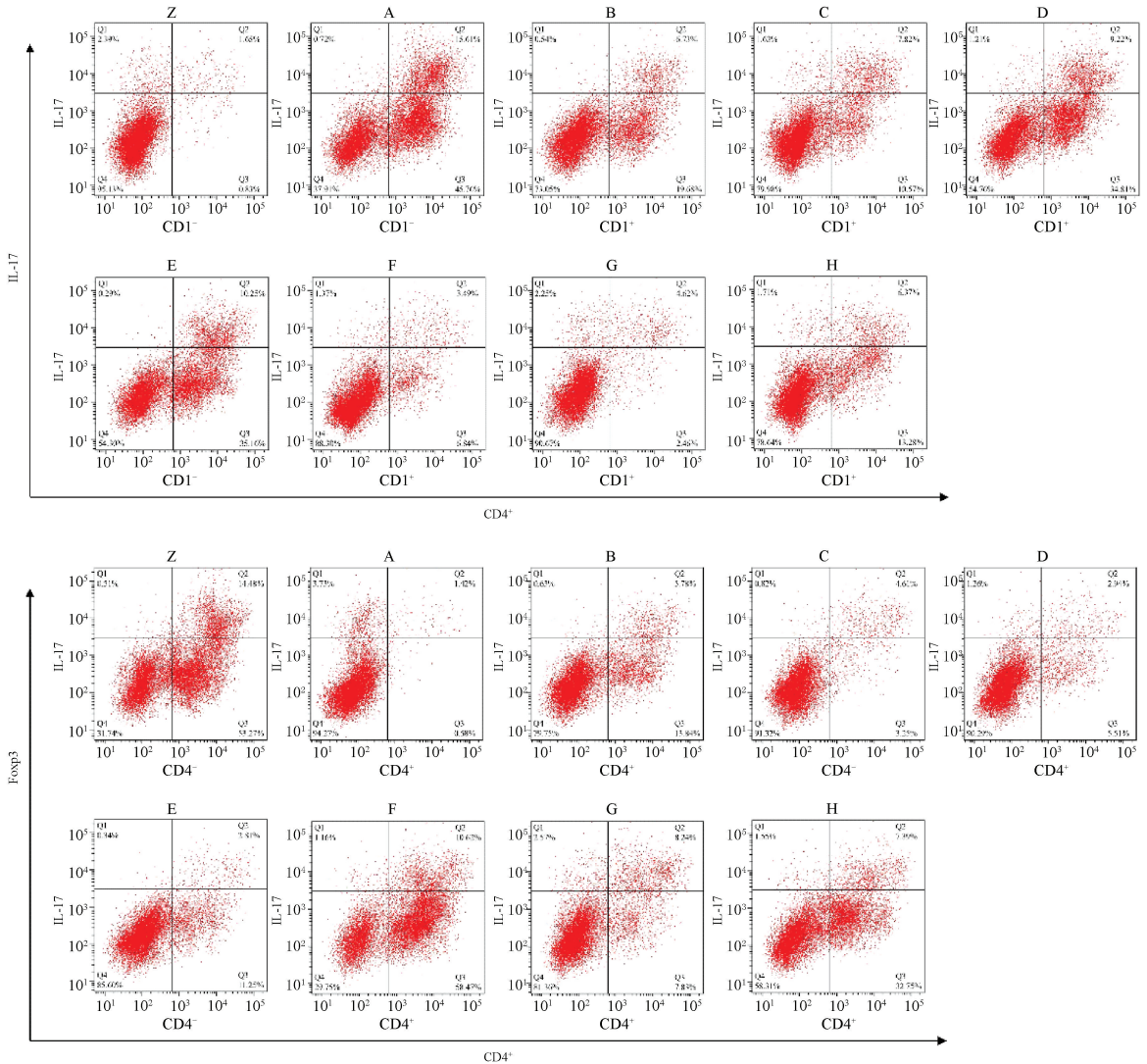
表 2 给药后各组小鼠的原位移植瘤平均瘤重( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  
 Table 2 The average tumor weight of orthotopic-transplanted tumors of mice in each group after administration ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	平均瘤重/g
模型	1.43±0.53
5-FU	0.60±0.18 <sup>1)</sup>
黄芪-莪术高剂量	0.78±0.22 <sup>1)</sup>
黄芪-莪术中剂量	0.93±0.21 <sup>1,2)</sup>
黄芪-莪术低剂量	0.92±0.23 <sup>1,2)</sup>
联合高剂量	0.40±0.15 <sup>1,2)</sup>
联合中剂量	0.61±0.24 <sup>1)</sup>
联合低剂量	0.63±0.15 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与 5-FU 组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。

**2.2 流式细胞术检测各组小鼠脾组织 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞中 Th17/Treg 细胞百分比的变化** 结果提示,造模成功后,与空白组相比,模型组 CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>细胞水平升高;给药后,与模型组相比,各组小鼠脾组织 CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>细胞表达有所降低,差异有统计学意义( $P<0.001$ );与 5-FU 组比较,联合高、

中剂量组均显著降低( $P<0.001$ ),见图 1、表 3。与空白组比较,模型组 CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>水平下降;与模型组比较,脾组织 CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>水平均不同程度升高且具有显著差异( $P<0.001$  或  $P<0.05$ );与 5-FU 组比较,联合高、中剂量组均显著升高( $P<0.001$ ),见图 1、表 3。



Z. 空白组; A. 模型组; B. 5-FU 组; C. 黄芪-莜术高剂量组; D. 黄芪-莜术中剂量组; E. 黄芪-莜术低剂量组; F. 联合高剂量组; G. 联合中剂量组; H. 联合低剂量组(图 2、3 同)。

图 1 给药后各组小鼠脾组织中 Th17、Treg 细胞表达

Fig. 1 Expression of Th17 and Treg cells in the spleen tissue of each group of mice after administration

**2.3 各组小鼠血液中相关因子 mRNA 表达比较** 与空白组比较,模型组 TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、Smad4、N-cadherin、MMP-7 mRNA 表达显著增加( $P<0.001$ );与模型组比较,5-FU 组、黄芪-莜术各

剂量组、联合各剂量组 TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、Smad4、N-cadherin、MMP-7 mRNA 表达均显著降低( $P<0.001$  或  $P<0.01$ );与 5-FU 组比较,联合高、中、低剂量组 TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、Smad4、N-cadherin、

表3 给药后各组小鼠脾组织中 Th17、Treg 细胞表达水平比较( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

Table 3 Comparison of Th17 and Treg cell expression levels in spleen tissues of each group after administration ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

组别	Th17/%	Treg/%	Th17/Treg
空白	1.48±0.20	15.16±0.51	0.10±0.40
模型	16.74±1.08 <sup>1)</sup>	1.44±0.12 <sup>1)</sup>	11.62±8.79
5-FU	6.91±0.21 <sup>2)</sup>	4.93±0.61 <sup>2)</sup>	1.40±0.34
黄芪-莪术高剂量	8.07±0.24 <sup>2)</sup>	4.30±0.25 <sup>2)</sup>	1.88±0.97
黄芪-莪术中剂量	9.14±0.10 <sup>2)</sup>	3.08±0.11 <sup>3)</sup>	2.97±0.93
黄芪-莪术低剂量	10.12±0.15 <sup>2)</sup>	2.37±0.31	4.27±0.49
联合高剂量	3.63±0.19 <sup>2,4)</sup>	10.34±0.26 <sup>2,4)</sup>	0.35±0.74
联合中剂量	4.64±0.20 <sup>2,4)</sup>	7.61±0.51 <sup>2,4)</sup>	0.61±0.40
联合低剂量	6.49±0.15 <sup>2)</sup>	6.20±0.86 <sup>2)</sup>	1.05±0.17

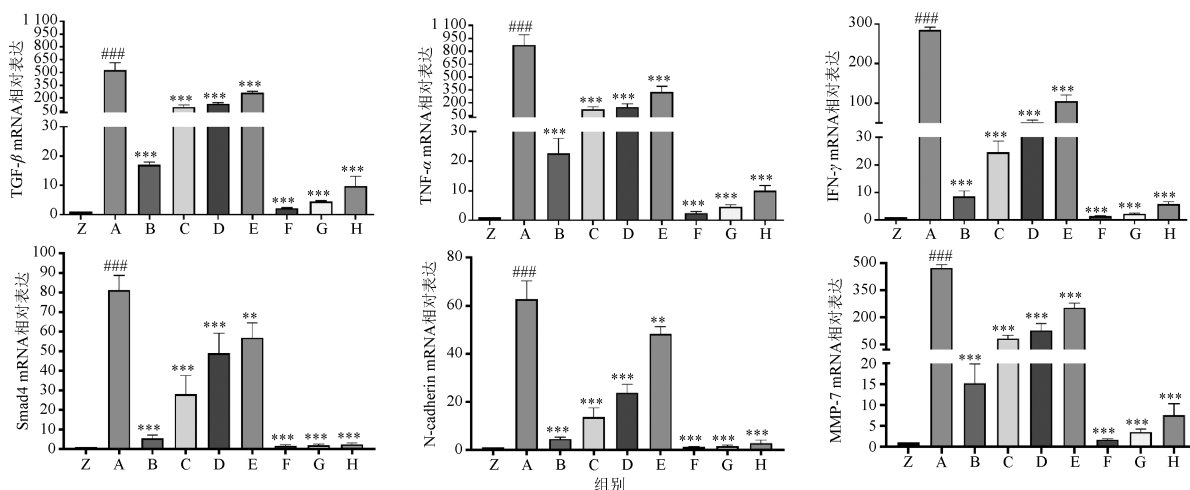
注:与空白组相比<sup>1)</sup>  $P<0.001$ ;与模型组相比<sup>2)</sup>  $P<0.001$ ,<sup>3)</sup>  $P<0.05$ ;与5-FU组比较<sup>4)</sup>  $P<0.001$ 。

MMP-7 mRNA 表达均降低,但差异无统计学意义,见图2。

2.4 各组小鼠肿瘤组织中相关因子蛋白表达的比较 Western blot 结果显示,与空白组相比,模型组 TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、Smad4、N-cadherin、MMP-7 蛋白表达均显著增加( $P<0.001$ );与模型组相比,5-FU 组、黄芪-莪术各剂量组、联合各剂量组 TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、Smad4、N-cadherin、MMP-7 蛋白表达均显著降低( $P<0.001$ );与5-FU组相比,联合各剂量组 TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、Smad4、N-cadherin、MMP-7 蛋白表达均显著降低( $P<0.001$  或  $P<0.01$ ),见图3。

### 3 讨论

结肠癌是发生于结肠部位的消化道恶性肿瘤,



与空白组相比### $P<0.001$ ;与模型组相比\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$ (图4同)。

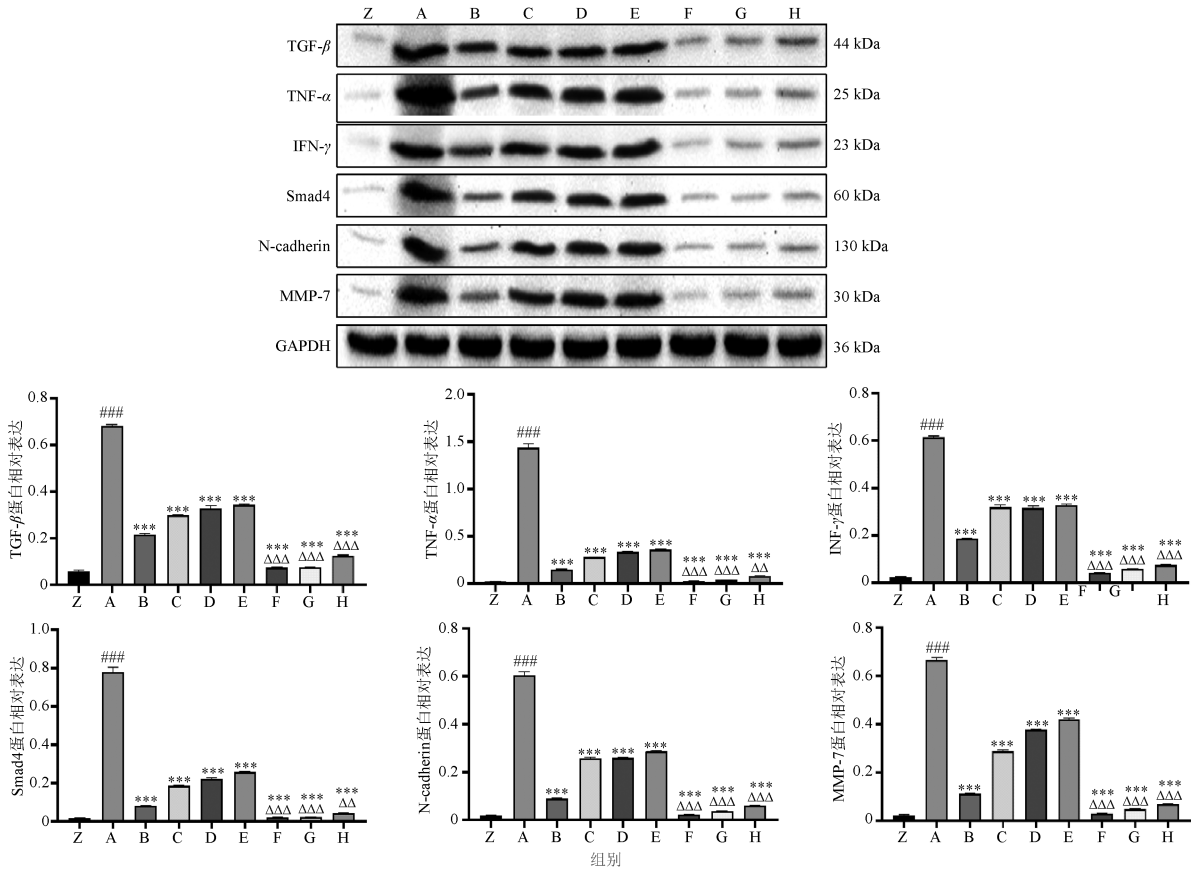
图2 给药后各组小鼠血液中 TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、Smad4、N-cadherin、MMP-7 mRNA 的表达( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ )

Fig. 2 Expression of TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , Smad4, N-cadherin, and MMP-7 mRNA in the blood of mice in each group after administration ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ )

在过去20年里,结肠癌病死率总体呈上升趋势<sup>[11-12]</sup>,将来还可能持续增加。结肠癌是西医学的病名,根据其临床症状在中医学中属于“肠风下血”“积聚”“肠覃”“癥瘕”等范畴<sup>[13]</sup>。《灵枢·五变篇》谓:“人之善病肠中积聚者……则肠胃恶,恶则邪气留之,积聚乃伤,肠胃之间,寒温不次,邪气稍至,蓄积留止,大聚乃起。”结肠癌的发病机制不外乎“虚”“实”两方面,正虚失固,脏腑功能失调,气滞血瘀、痰结毒聚或后天失养而成慢性肠道疾病,日久积滞而成有型之肿块<sup>[14]</sup>。黄芪-莪术药对最早源于张锡纯《医学衷中参西录》,黄芪为补气药,可补五脏虚损;莪术为破血行气之药,可行气散瘀;二药配伍,散

中有收,行中有补,补而不壅滞,攻而不伤正。二药配伍在临床上运用于气虚血瘀所致癥瘕积聚<sup>[15-16]</sup>。本实验结果显示,黄芪-莪术配伍高、中、低剂量组和联合高、中、低剂量组均可以降低 CT26.WT 结肠癌原位移植瘤体质量,且随着联合组剂量的增加,瘤体质量逐渐降低,说明具有一定剂量依赖性。联合高剂量组平均瘤重较5-FU组降低,说明高剂量的黄芪-莪术配伍联合5-FU治疗有协同增效作用,抑制瘤体生长效果优于单用5-FU治疗。

Th17 细胞和 Treg 细胞是 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞的2种亚型,TCR 激活时,初始 CD4<sup>+</sup>T 细胞可分化为辅助性 T 细胞(Th)的几种细胞系之一,包括 Th17 和



与 5-FU 组相比 $\Delta\Delta P < 0.01$ ,  $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ 。

图 3 给药后各组小鼠原位移植瘤中 TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、Smad4、N-cadherin、MMP-7 蛋白的表达( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 3 Protein expression of TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , Smad4, N-cadherin, and MMP-7 in orthotopic-transplanted tumors of mice in each group after administration ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Treg 细胞。已有研究表明, Th17 细胞和 Treg 细胞之间的动态平衡可以影响自身免疫和癌症治疗<sup>[17]</sup>, 是一对在功能上和分化上相互拮抗的免疫细胞, 同出一源且由 TGF- $\beta$  或 TGF- $\beta$  和 IL-6 介导分化<sup>[18]</sup>。Th17 细胞与促进自身免疫、致癌和抗肿瘤免疫方面密切相关<sup>[19]</sup>, 主要分泌 IL-17、IL-6 等细胞因子, 通过调节肿瘤微环境和炎症反应参与肿瘤免疫的动态变化过程<sup>[20]</sup>。而 Treg 细胞在免疫耐受方面通过细胞间的接触或分泌 TGF- $\beta$ 、IL-10 等细胞因子, 抑制自身免疫和抗肿瘤免疫<sup>[21]</sup>, 具有负向免疫调节的作用。Treg 细胞特异性的转录因子 Foxp3 在其发挥免疫抑制功能中起着相当重要的作用。实验结果表明, 造模成功后, Th17 表达升高, Treg 降低。给药后与模型组相比, 脾组织中 CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> 细胞表达呈现不同程度的降低, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> 细胞表达呈现不同程度的升高。与 5-FU 组相比, 联合高、中剂量组 CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> 细胞表达水平显著降低, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> 表达水

平显著升高。由此推测, 黄芪-莪术配伍用药可以调整 Th17/Treg 的动态平衡来维持肿瘤微环境的稳态, 联合 5-FU 药效更佳。

TGF- $\beta$  是在结肠中表达的属于转化生长因子超家族的多功能细胞因子<sup>[22]</sup>, 在瘤形成的早期抑制肿瘤的生长, 但在中晚期则促进肿瘤的进展(尤其是转移)<sup>[23]</sup>, 是免疫抑制性肿瘤微环境的主要调节剂<sup>[24]</sup>。TGF- $\beta$  是激活癌间质所必需的细胞因子, 通过抑制抗肿瘤免疫反应并影响上皮和内皮细胞在肿瘤的晚期阶段的分化, TGF- $\beta$  与上皮间质转化(EMT)也密切相关<sup>[25-26]</sup>。TGF- $\beta$  和 IL-6 协调配合介导分化 Th17 和 Treg 细胞<sup>[18]</sup>, Smad4 蛋白是 TGF- $\beta$  信号转导通路下游重要的信号分子, TGF- $\beta$ /Smad4 通路可以调控肿瘤细胞的活动<sup>[27]</sup>, 敲除 Smad4 时, TGF- $\beta$  诱导的 EMT 可以被有效阻断<sup>[28]</sup>, 这表明 TGF- $\beta$ /Smad4 信号通路对 EMT 的促进作用是通过对 Smad4 的依赖实现的<sup>[29]</sup>。TNF- $\alpha$  主要由巨噬细

胞分泌<sup>[30]</sup>, Th17 细胞也可分泌 TNF- $\alpha$ <sup>[31]</sup>, 具有促进和抑制肿瘤形成的双向作用, 通过诱导 EMT<sup>[32]</sup> 和促进 MMP-7 的产生, 影响免疫和肿瘤微环境或直接作用于肿瘤。INF- $\gamma$  是一种可以由 T 细胞分泌的炎症因子, 也可由选择性活化(同时分泌 IL-17 和 INF- $\gamma$ ) 的 Th17 细胞分泌<sup>[33]</sup>, 不仅可以通过抑制细胞分裂阻止肿瘤生长, 也可以通过调节 TRAIL 以及受体的表达促使肿瘤细胞凋亡<sup>[34]</sup>。根据实验结果及上述研究推测, TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$  可能是影响 Th17/Treg 细胞平衡的相关指标, 而 TGF- $\beta$ /Smad4 则是抑制结肠癌肿瘤转移重要信号传导通路。N-cadherin、MMP-7 是 EMT 过程的重要指标。N-cadherin 是一种间质标志物, 在多种组织中表达并起到介导细胞-细胞黏附功能的跨膜蛋白<sup>[35]</sup>。多种癌症都与 N-钙粘蛋白表达上调密切相关, 从而介导肿瘤细胞的侵袭和转移<sup>[36]</sup>。MMP-7 主要作用于肿瘤的浸润及转移, 通过 Wnt 通路, 分解基底膜及细胞外基质, 诱发 EMT 引起肿瘤的侵袭和转移<sup>[37]</sup>。RT-PCR 结果显示, 除个别给药组差异无统计学意义外, 与模型组相比, 各组小鼠血液中 TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$ 、Smad4、N-cadherin、MMP-7 mRNA 表达均降低, 联合组能够降低结肠癌免疫相关指标, 这表明联合用药组抗结肠癌效果优于中药药对单用及阳性药组。Western blot 结果显示, 与模型组相比, 各组小鼠原位瘤组织中 TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$ 、Smad4、N-cadherin、MMP-7 蛋白表达均降低; 与 5-FU 组相比, 联合高、中、低剂量组均能抑制 TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$ 、Smad4、N-cadherin、MMP-7 蛋白表达, 且联合组蛋白的表达明显低于其他组, 见图 4。

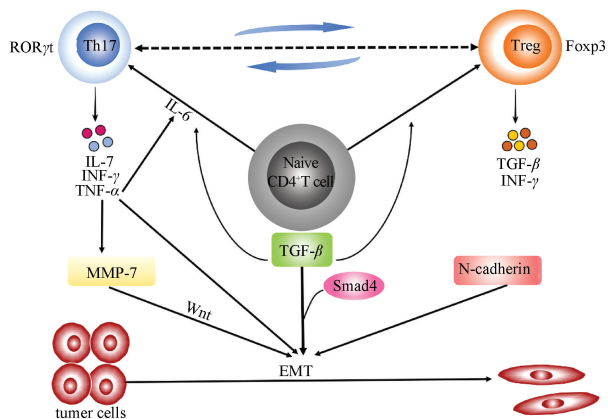


图 4 黄芪-莪术联合 5-FU 治疗结肠癌的可能作用途径  
Fig. 4 Underlying pathway of Astragali Radix-Curcumae Rhizoma combined with 5-FU in the treatment of colon cancer

综上所述, 实验结果表明黄芪、莪术配伍能抑制 CT26. WT 结肠癌原位移植瘤的生长, 联合 5-FU 可协同增效, 明显抑制肿瘤的生长。给药后, 与模型组比较, 各组 CT26. WT 原位移植瘤小鼠脾组织 CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> 不同程度降低, 同时 CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> 细胞比例升高, TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$ 、Smad4、N-cadherin、MMP-7 mRNA 及蛋白表达下降。由此推测, 其作用机制可能与通过维持 Th17/Treg 的平衡, 下调 TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$ 、Smad4、N-cadherin、MMP-7 肿瘤相关因子的表达水平来抑制肿瘤生长和 EMT 过程、促进肿瘤细胞凋亡有关; 而且证明了联合用药对于结肠癌的治疗效果要优于单用化疗药或者黄芪、莪术药对配伍。  
[参考文献]

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209.
- [2] 兰蓝, 赵飞, 蔡玥, 等. 中国居民 2015 年恶性肿瘤死亡率流行病学特征分析 [J]. 中华流行病学杂志, 2018, 39(1): 32.
- [3] 高星, 孙会群, 郭永刚, 等. 复方苦参注射液联合化疗治疗晚期结肠癌临床研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2021, 48(3): 128.
- [4] 韦金磊, 张森. 结直肠癌的临床治疗进展 [J]. 中国临床新医学, 2018, 11(2): 202.
- [5] 齐卓操, 唐德才, 尹刚, 等. 基于数据挖掘的古今医方辨治消化系统肿瘤用药规律研究 [J]. 中草药, 2019, 50(22): 5632.
- [6] 梁启军, 熊墨年, 杨光华, 等. 肿瘤血瘀证的治疗策略 [J]. 江西中医药, 2016, 47(6): 17.
- [7] BEAUDRY K, LANGLOIS M J, MONTAGNE A, et al. Dual-specificity phosphatase 6 deletion protects the colonic epithelium against inflammation and promotes both proliferation and tumorigenesis [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(5): 6731.
- [8] 周艳. 艾迪注射液配合化疗治疗肺癌及对细胞因子的影响 [J]. 医学理论与实践, 2016, 29(17): 3043.
- [9] 曹子丰, 唐德才, 时晓霞, 等. 黄芪、莪术配伍联合奥沙利铂对 CT26. WT 原位移植瘤小鼠中 CXCR3、CCR6 表达影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2017, 40(6): 477.
- [10] 杜相宇, 唐德才. 莪术抗癌方及其联合 5-氟尿嘧啶对 CT26. WT 结肠癌原位移植瘤模型小鼠肿瘤组织中凋亡相关蛋白表达的影响 [J]. 中医杂志, 2020, 61(20): 1090.
- [11] GUO P, HUANG Z L, YU P, et al. Trends in cancer mortality in China: an update [J]. Ann Oncol, 2012, 23(10): 2755.
- [12] 刘晓雪, 宇传华, 周薇, 等. 中国近 30 年间结直肠癌死亡趋势分析 [J]. 中国癌症杂志, 2018, 28(3): 177.
- [13] 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.



- [14] 齐卓操,唐德才,高兵,等. 基于古今肿瘤方用药规律的复杂网络分析及决策树模型构建[J]. 中药药理与临床, 2019, 35(5): 167.
- [15] 孙若岚,唐德才,顾俊菲. 黄芪-莪术配伍对结肠癌原位移植瘤小鼠模型抗结肠癌生长转移的干预效应研究[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(9): 2267.
- [16] 刘夫艳,唐德才,谭喜莹. 黄芪-莪术药对基于网络药理学的抗大肠癌分子机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(13): 176.
- [17] KNOCHELMANN H M, DWYER C J, BAILEY S R, et al. When worlds collide: Th17 and Treg cells in cancer and autoimmunity[J]. Cell Mol Immunol, 2018, 15(5): 458.
- [18] BETTELLI E, CARRIER Y, GAO W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector T(H) 17 and regulatory T cells[J]. Nature, 2006, 441(7090): 235.
- [19] REINER S L. Development in motion: helper T cells at work[J]. Cell, 2007, 129(1): 33.
- [20] YE J, LIVERGOOD R S, PENG G. The role and regulation of human Th17 cells in tumor immunity[J]. Am J Pathol, 2013, 182(1): 10.
- [21] KIM J M, RASMUSSEN J P, RUDENSKY A Y. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice[J]. Nat Immunol, 2007, 8(2): 191.
- [22] LI F Z, CAO Y N, TOWNSEND C M, et al. TGF-beta signaling in colon cancer cells [J]. World J Surg, 2005, 29(3): 306.
- [23] 冀为,赵元元,张飞,等. TGF- $\beta$  与细胞内信号通路的交互作用在肿瘤研究中的进展[J]. 中国肿瘤临床, 2018, 45(15): 800.
- [24] ANGIONI R, SANCHEZ-RODRIGUEZ R, VIOLA A, et al. TGF- $\beta$  in cancer; metabolic driver of the tolerogenic crosstalk in the tumor microenvironment[J]. Cancers, 2021, 13(3): 401.
- [25] PICKUP M, NOVITSKIY S, MOSES H L. The roles of TGF- $\beta$  in the tumour microenvironment[J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(11): 788.
- [26] DRABSCH Y, DIJKE P. TGF- $\beta$  signalling and its role in cancer progression and metastasis[J]. Cancer Metast Rev, 2012, 31(3/4): 553.
- [27] 王仕娇,王纯,张敏,等. 中药基于 TGF- $\beta$ /Smad 信号转导通路调控肿瘤细胞[J]. 生命的化学, 2020, 40(4): 535.
- [28] ZHAO M, MISHRA L, DENG C X. The role of TGF- $\beta$ /SMAD4 signaling in cancer[J]. Int J Biol Sci, 2018, 14(2): 111.
- [29] MOON H, JU H L, CHUNG S I, et al. Transforming growth factor- $\beta$  promotes liver tumorigenesis in mice via up-regulation of snail[J]. Gastroenterology, 2017, 153(5): 1378.
- [30] 张鹏飞,张玉军,朱振龙,等. 血清 IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平与结肠癌病程的相关性[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(11): 2716.
- [31] NALBANT A, ESKIER D. Genes associated with T helper 17 cell differentiation and function[J]. Front Biosci, 2016, 8: 427.
- [32] 徐露,王娟,王宣瓔,等. 姜黄素介导 IL-6/STAT3 信号通路修复结肠癌 5-FU 化疗引起的肠黏膜损伤[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(3): 670.
- [33] PETERS A, LEE Y, KUCHROO V K. The many faces of Th17 cells[J]. Curr Opin Immunol, 2011, 23(6): 702.
- [34] 李靖,董文学,杨美盼,等. IFN- $\gamma$  研究进展与临床应用[J]. 卫生职业教育, 2019, 37(23): 157.
- [35] 宋剑婵,于秀杰,司婧文,等. HIF-1 $\alpha$ , E-Cadherin 和 N-Cadherin 在卵巢上皮性肿瘤组织中的表达变化及意义[J]. 山东医药, 2020, 60(19): 74.
- [36] ZHENG X, HU H, LI S. High expression of lncRNA PVT1 promotes invasion by inducing epithelial-to-mesenchymal transition in esophageal cancer[J]. Oncol Lett, 2016, 12(4): 2357.
- [37] WU J, CHEN S, LIU H, et al. Tunicamycin specifically aggravates ER stress and overcomes chemoresistance in multidrug-resistant gastric cancer cells by inhibiting N-glycosylation[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 272.

[责任编辑 马超一]