

本文引用:陈娟,徐琳本,蒋益兰,翦林宏,曾宏亮,谭小宁. 健脾消癌方调控巨噬细胞 M2 极化对结直肠癌细胞侵袭作用的研究[J]. 湖南中医药大学学报,2022,42(12):2002-2007.

## 健脾消癌方调控巨噬细胞 M2 极化对结直肠癌细胞侵袭作用的研究

陈娟,徐琳本,蒋益兰,翦林宏,曾宏亮,谭小宁\*  
(湖南省中医药研究院,湖南长沙 410006)

**[摘要]** **目的** 探讨健脾消癌方调控巨噬细胞 M2 极化对结直肠癌 HCT116 细胞侵袭转移能力的影响。**方法** 使用佛波酯诱导 THP-1 细胞成 M0 型巨噬细胞,通过 Transwell 法构建 HCT116 细胞与 M0 型巨噬细胞共培养体系,设立空白血清对照组、健脾消癌方含药血清组、IL-4+空白血清组、IL-4+健脾消癌方含药血清组。RT-PCR 法检测巨噬细胞 M2 极化相关基因 C-C 基序趋化因子 22 (C-C motif chemokine22, CCL22)、精氨酸酶-1 (arginase-1, Arg-1) 表达,Transwell 法检测 HCT116 侵袭转移能力,Western blot 法检测 HCT116 中 E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、波形蛋白 (Vimentin) 及基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase, MMP-9) 蛋白表达水平。**结果** 与空白血清对照组比较,IL-4+空白血清组能上调 CCL22、Arg-1 表达 ( $P<0.01$ ),下调 HCT116 细胞 E-cadherin 表达、上调 Vimentin、MMP-9 表达 ( $P<0.01$ ),增加结直肠癌 HCT116 细胞侵袭数 ( $P<0.01$ );与空白血清对照组比较,健脾消癌方含药血清组能下调 CCL22、Arg-1 表达 ( $P<0.05$ ),上调 HCT116 细胞 E-cadherin 表达 ( $P<0.05$ ),下调 Vimentin 表达 ( $P<0.05$ ),减少结直肠癌 HCT116 细胞侵袭数 ( $P<0.01$ );与 IL-4+空白血清组比较,IL-4+健脾消癌方含药血清组可下调 CCL22 ( $P<0.05$ )、Arg-1 ( $P<0.01$ ) 表达,上调 HCT116 细胞 E-cadherin 表达 ( $P<0.05$ ),下调 Vimentin、MMP-9 表达 ( $P<0.05$ ),减少结直肠癌 HCT116 细胞侵袭数 ( $P<0.01$ )。**结论** 健脾消癌方能一定程度上抑制巨噬细胞 M2 极化,阻断 HCT116 细胞上皮间质转化进程而抑制结直肠癌细胞侵袭转移。

**[关键词]** 健脾消癌方;结直肠癌;巨噬细胞;M2 极化;共培养;侵袭转移;上皮间质转化

**[中图分类号]**R285.5 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.12.008

### Effects of Jianpi Xiao'ai Formula on the invasion of colorectal cancer cells by regulating M2 polarization of macrophages

CHEN Juan, XU Linben, JIANG Yilan, JIAN Linhong, ZENG Hongliang, TAN Xiaoning\*  
(Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of Jianpi Xiao'ai Formula on the invasion ability of HCT116 colorectal cancer cells by regulating macrophage M2 polarization. **Methods** THP-1 cells were induced to M0 macrophages by phorbol ester. Then, HCT116 cells and M0 type macrophages were co-cultured by Transwell. The co-cultured cells were randomly divided into blank serum control group, Jianpi Xiao'ai Formula serum group, IL-4 + blank serum group, and IL-4 + Jianpi Xiao'ai Formula serum group. The RT-PCR was used to detect the expression of C-C motif chemokine22 (CCL22) and arginase-1 (Arg-1), the related genes of M2 polarization in macrophages, and Transwell was applied to detect the invasion and metastasis of HCT116. The expression levels of E-cadherin, Vimentin and matrix metalloproteinase (MMP-9) in HCT116 were determined by Western blot. **Results** Compared with blank serum control group, IL-4 + blank serum group could up-regulate the expression

**[收稿日期]**2022-07-23

**[基金项目]**国家自然科学基金项目(81774287);湖南省自然科学基金项目(2020JJ4413);湖南省教育厅科学研究项目(19C1412)。

**[第一作者]**陈娟,女,硕士,主治医师,研究方向:中西医结合基础研究。

**[通信作者]\***谭小宁,女,硕士,副研究员,E-mail:xiaoning2005@163.com。

of CCL22 and Arg-1 ( $P<0.01$ ), down-regulate the expression of E-cadherin and up-regulate the expression of Vimentin and MMP-9 in HCT116 cells ( $P<0.01$ ), and increased the invasion number of colorectal cancer HCT116 cells ( $P<0.01$ ). Compared with blank serum control group, Jianpi Xiao'ai Formula serum group showed the lower expression of CCL22 and Arg-1 ( $P<0.05$ ), higher E-cadherin expression in HCT116 cells ( $P<0.05$ ), lower Vimentin expression ( $P<0.05$ ), and less colorectal cancer HCT116 cell invasion ( $P<0.01$ ). Compared IL-4 + blank serum group, IL-4 + Jianpi Xiao'ai Formula serum group could down-regulate CCL22 ( $P<0.05$ ), and Arg-1 expression ( $P<0.01$ ), up-regulated E-cadherin expression in HCT116 cells ( $P<0.05$ ), down-regulated the expression of Vimentin and MMP-9 ( $P<0.05$ ), and decreased the number of colorectal cancer HCT116 cell invasion ( $P<0.01$ ). **Conclusion** Jianpi Xiao'ai Formula could inhibit M2 polarization of macrophages, block EMT process of HCT116 cells and inhibit the invasion and metastasis of colorectal cancer cells.

[**Keywords**] Jianpi Xiao'ai Formula; colorectal cancer; macrophage; M2 polarization; co-culture; invasion and metastasis; epithelial-mesenchymal transition

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是最常见的恶性肿瘤之一,在全球所有恶性肿瘤的发病率和死亡率中分别位居第3位和第2位<sup>[1]</sup>。研究表明,40%~50%的患者在诊断初期即发现有远处转移,其中无转移者5年生存率接近90%,而已转移者5年生存率仅为10%<sup>[1]</sup>。肿瘤微环境是肿瘤的生长场所,具有低氧、低pH、炎症、乳酸堆积等特点,在促进肿瘤转移中具有关键作用<sup>[2]</sup>。在肿瘤微环境中的巨噬细胞被称作肿瘤相关巨噬细胞(tumor associated macrophages, TAM),TAM数量和分型变化与CRC的发生发展和临床治疗密切相关<sup>[3]</sup>。研究证实,M2型巨噬细胞不但能发挥免疫抑制作用,还能促进肿瘤微环境中的血管生成和基质重塑等,进而促进肿瘤转移<sup>[4]</sup>。

健脾消癌方是湖南省名中医蒋益兰教授根据多年的临床经验,结合现代医学知识,根据CRC“脾气亏虚、瘀毒内结”的病机特点,以扶正祛邪为原则,以健脾益气、化瘀解毒为治法而创立,具有显著的临床疗效<sup>[5-6]</sup>。本实验在前期研究的基础上,以TAM作为研究对象,在体外通过将巨噬细胞与人CRC细胞HCT116共培养的方法来模拟CRC免疫微环境,探索健脾消癌方拮抗CRC转移的机制。

## 1 材料

### 1.1 细胞

人CRC细胞HCT116购于中国科学院上海细胞研究所,目录号TCHu 99;人单核巨噬细胞THP-1购于中国科学院上海细胞研究所,目录号:TCHu 57。

### 1.2 药物

健脾消癌方组成:人参15g,茯苓15g,薏苡仁30g,淫羊藿15g,白花蛇舌草30g,石见穿30g,莪术10g,郁金15g,炒枳壳6g。选用一级药材,按生药量加入10倍水,煎煮1h,保存药液;药渣再加入8倍量水,煎煮1h;合并药液,浓缩成近2倍水

量时,放置过夜,去沉淀,继续浓缩成1.5g生药/mL备用。

### 1.3 实验动物

雄性SD大鼠20只,SPF级,体质量180~220g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(湘)2019-0004,实验动物质量合格证号:43072721110275225,饲养于湖南省中医药研究院屏障环境,实验动物使用许可证号:SYXK(湘)2020-0008。饲养环境:温度22~26℃、相对湿度50%~70%、12h/12h光暗交替。本实验方案经湖南省中医药研究院实验动物福利伦理委员会批准实施(伦理审查编号:2021-0008),所有实验操作均按照《实验动物护理和使用指南》进行。

### 1.4 主要试剂

RPMI-1640培养基(美国Hyclone公司,批号:AD21356769);胎牛血清(美国Gibco公司,批号:2148169CP);白细胞介素-4(interleukin-4,IL-4)(美国PeproTech公司,批号:200-04-5);CD14、CD163流式抗体(美国eBioscience公司,批号:12-0149-41、25-1639-41);E-钙黏蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase, MMP-9)、 $\beta$ -actin抗体(美国Proteintech公司,批号:00018701、00096022、573145、10004156);cDNA反转录试剂盒、SYBR Green PCR试剂盒(日本Takara公司,批号:RR047A、RR820A);ECL发光液(美国Thermo公司,批号:SF249787B)。

### 1.5 主要设备

化学发光成像系统(英国Syngene公司,型号G:BOX ChemiXRQ);荧光正置显微镜(德国Leica公司,型号:DM4000);微量核酸蛋白浓度分析仪(英国BioDrop公司,型号:BioDrop Duo);电泳仪、转膜仪(美国Bio-Rad,型号:powerpac、Mini Trans-Blot C);荧光定量PCR仪(美国Roche公司,型号:FAST480II)。

## 2 方法

### 2.1 健脾消癌方含药血清制备

SD大鼠适应性喂养7 d后,随机分为给药组(12只)和对照组(8只)。按体表面积法进行大鼠等效剂量换算,给药组大鼠按14.9 g/kg灌胃给予健脾消癌方水煎液,1次/d,灌胃前空腹12 h,连续1周;对照组大鼠按15 mL/kg灌胃给予生理盐水。于第7天末次灌胃1 h后腹主动脉采血,所采血液以2000 r/min,离心半径10 cm,离心10 min,吸取上清液即血清,合并同组血清,用0.22 μm微孔滤膜过滤除菌后,无菌试管分装,放置于-20℃冰箱内保存备用。

### 2.2 细胞培养及实验分组

人单核巨噬细胞 THP-1 为悬浮生长细胞,培养条件为含10%胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养基;人 CRC 细胞 HCT116 贴壁生长于含10%胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养基中。细胞均在37℃及含有5% CO<sub>2</sub> 环境的饱和湿度箱中培养。M0型巨噬细胞诱导:将人单核巨噬细胞 THP-1 用佛波酯(50 ng/mL)处理24 h后,细胞贴壁生长,流式细胞术检测细胞表面 CD14 蛋白。IL-4(10 ng/mL)诱导巨噬细胞 M0 型极化为 M2 型,流式细胞术检测标志物 CD163 蛋白。

共培养体系建立:利用 Transwell 小室建立非接触的细胞共培养系统,取佛波酯处理24 h的对数生长期的 THP-1 巨噬细胞,使用胰酶消化制成细胞密度为 2×10<sup>6</sup>/mL 的单细胞悬液,每孔约 500 μL 接种于 Transwell 小室内底面,每孔补足培养基至 2 mL。取生长状态良好的 HCT116 细胞,胰酶消化制成细胞密度为 5×10<sup>5</sup>/孔,接种于上室。

实验分组:空白血清对照组(加10%空白血清处理);健脾消癌方含药血清组(加10%含药血清处理);IL-4+空白血清组(加10 ng/mL IL-4 和10%空白血清处理);IL-4+健脾消癌方含药血清组(加10 ng/mL IL-4 和10%含药血清处理)。各组处理48 h后进行检测。

### 2.3 流式细胞术检测巨噬细胞状态

用胰酶消化佛波酯诱导的 THP-1 细胞和 IL-4 诱导的巨噬细胞 M0 型细胞,3000 r/min,离心半径10 cm,离心3 min,小心吸取上清液,收集细胞,用 PBS 清洗2次后进行细胞计数,按照 1×10<sup>7</sup>/mL 的浓度用 PBS(含1% BSA)重悬细胞。待细胞充分混匀后,于每个流式管内加入 100 μL 混悬液,并分别加入具有荧光素偶联的 CD14、CD163 流式抗体 5 μL,混

匀后,室温下避光孵育 30 min, PBS 清洗 2 次后,加入 500 μL 的 PBS(含 1% BSA)对细胞进行重悬,经过滤后上机。

### 2.4 RT-PCR 法检测 Arg-1、CCL22 在巨噬细胞中的表达

收集各组巨噬细胞,提取总 RNA, BCA 法测定浓度,按反转录试剂盒说明书进行 RNA 反转录 cDNA,反转录条件:37℃、30 min, 85℃、20 s。然后以 cDNA 为模板, GAPDH 为内参基因, SYBR Green PCR 试剂盒扩增 Arg-1、CCL22, 扩增条件:95℃预变性 10 min; 95℃变性 15 s, 60℃退火 30 s, 共 40 个循环。每组设置 3 个复孔, 目的基因相对表达量用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 计算。基因引物序列见表 1。

表 1 各基因引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')	产物长度/bp
ARG1	正向:TGGACAGACTAGGAATTGGCA	102
	反向:CCAGTCCGTCAACATCAAAACT	
CCL22	正向:GCCTACTCTGATGACCGTGG	102
	反向:GAGAGTTGGCACAGGCTTCT	
GAPDH	正向:ACAGCCTCAAGATCATCAGC	104
	反向:GGTCATGAGTCTTCCACGAT	

### 2.5 Transwell 法检测 HCT116 细胞侵袭转移能力

Matrigel 胶与无血清培养基按 1:2 稀释后,每个小室铺胶 60 μL,置于 37℃培养箱内 60 min,使胶凝固制备 Transwell 小室,然后每个小室加 70 μL 基础培养基,37℃、30 min 水化基底膜。将各组 HCT116 细胞用无血清基础培养基(含 5 g/L BSA)制成细胞悬液,调整细胞密度为 1×10<sup>5</sup>/mL,吸取 100 μL 加入到小室上室内,下室加入佛波酯处理 24 h 的对数生长期的 THP-1 巨噬细胞,培养 24 h。取出上室,放到装有 PBS 的新孔中,上室 PBS 洗 3 遍,用棉球擦干净上室细胞,用 4%多聚甲醛固定 20 min,将膜取下。0.1%结晶紫染色 5 min,水洗 5 次,置膜于载玻片上,显微镜下观察并拍照。

### 2.6 Western blot 法检测 HCT116 细胞中 E-cadherin、Vimentin、MMP-9 表达

收集各组 HCT116 细胞,加 200 μL RIPA 裂解液和 1% PMSF 提取细胞总蛋白, BCA 法蛋白定量后上样 SDS-PAGE 电泳, PVDF 转膜, 5% BSA 封闭 60 min, 剪取对应蛋白条带分别加入 E-cadherin(稀释比例 1:2000)、Vimentin(稀释比例 1:2000)、MMP-9(稀释比例 1:1000)和 β-actin(稀释比例 1:2500)一抗, 4℃孵育过夜, TBS-T 洗 3 次, 将稀释后的二抗(用封闭液稀释 HRP 标记的二抗, 稀释比例 1:5000)

与膜共同孵育 2 h, TBS-T 洗 3 次×5 min, ECL 显影。将各条带用 Image J 软件进行灰度扫描并以  $\beta$ -actin 为内参计算各组平均值。

### 2.7 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析, 数据用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示, 资料符合正态性及方差齐性时, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析; 不满足正态性或方差齐性时, 采用非参数检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 巨噬细胞诱导与极化

人单核巨噬细胞 THP-1 形态饱满, 大小均一, 为单独生长的悬浮细胞(图 1A), 采用佛波酯刺激 THP-1 细胞 24 h 后, 光镜下观察到大部分细胞仍呈圆形或椭圆形, 但细胞大小较诱导前缩小, 贴壁较紧(图 1B)。CD14 作为人巨噬细胞特异性标记物, 用以检测单核巨噬细胞的分化效率。据流式细胞术检测结果可知, 佛波酯处理后的细胞促进 CD14 的蛋白表达(图 1C、1D), 说明 THP-1 细胞被成功诱导成 M0 型巨噬细胞。IL-4 诱导巨噬细胞 M0(见图 2A)极化为 M2 型(流式细胞术检测标志物 CD163), 光镜下观察到大部分细胞仍呈椭圆形, 贴壁较紧, 且易成团生长(图 2B)。据流式细胞术检测结果可知, IL-4 处理后的细胞 CD163 蛋白表达升高(图 2C、1D), 说明 IL-4 能诱导巨噬细胞 M0 型极化成 M2 型。

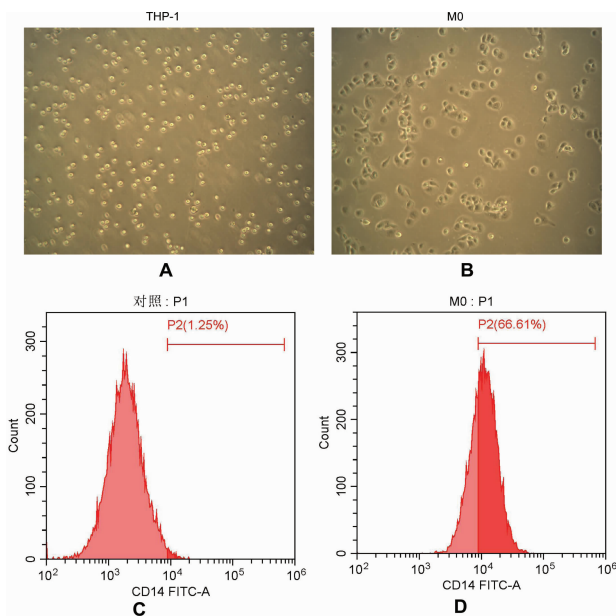


图 1 THP-1 细胞诱导成 M0 型巨噬细胞

注: A. THP-1 细胞光学显微镜图( $\times 100$ ); B. 佛波酯刺激 THP-1 细胞 24 h 后光学显微镜图( $\times 100$ ); C. THP-1 细胞 CD14 蛋白流式细胞术检测图; D. M0 型巨噬细胞 CD14 蛋白流式细胞术检测图。

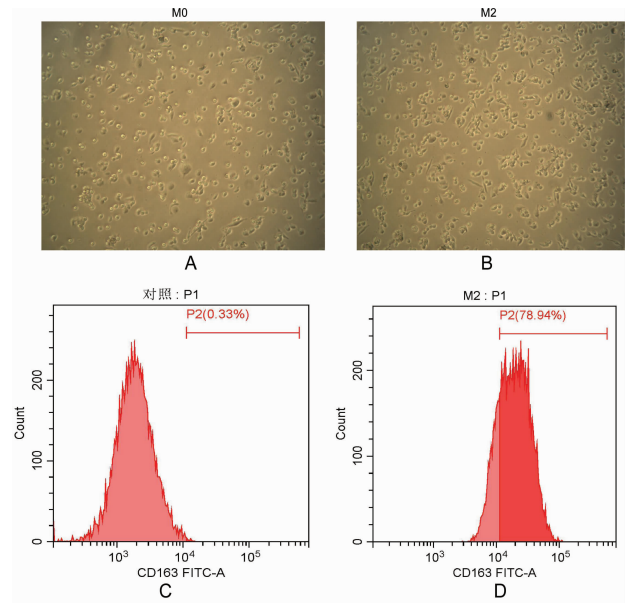


图 2 巨噬细胞 M0 型极化为巨噬细胞 M2 型

注: A. M0 型巨噬细胞光学显微镜图( $\times 100$ ); B. IL-4 处理 M0 型巨噬细胞 24 h 后光学显微镜图( $\times 100$ ); C. M0 型巨噬细胞 CD163 蛋白流式细胞术检测图; D. M2 型巨噬细胞 CD163 蛋白流式细胞术检测图。

### 3.2 健脾消癌方对巨噬细胞中 CCL22、Arg-1 mRNA 表达的影响

与空白血清对照组比较, 健脾消癌方含药血清组 CCL22、Arg-1 表达水平显著降低( $P < 0.05$ ); IL-4+空白血清组及 IL-4+健脾消癌方含药血清组 CCL22、Arg-1 表达水平显著增加( $P < 0.01$ )。与 IL-4+空白血清组比较, IL-4+健脾消癌方含药血清组 CCL22、Arg-1 表达水平显著降低( $P < 0.01$ )。详见图 3。

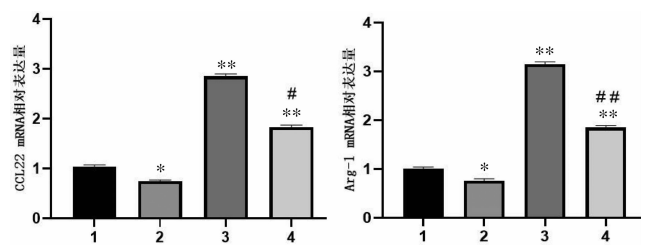


图 3 各组巨噬细胞中 Arg-1、CCL22 mRNA 表达

注: 1. 空白血清对照组; 2. 健脾消癌方含药血清组; 3. IL-4+空白血清组; 4. IL-4+健脾消癌方含药血清组。与空白血清对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与 IL-4+空白血清组比较, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ 。

### 3.3 健脾消癌方对 HCT116 细胞侵袭转移能力的影响

Transwell 小室穿膜细胞的数量反映肿瘤细胞的体外侵袭转移能力。与空白血清对照组比较, 健脾消癌方含药血清组及 IL-4+健脾消癌方含药血清组 HCT116 细胞的侵袭数量明显减少( $P < 0.01$ ); IL-4+空白血清组细胞共培养体系中 HCT116 细胞的侵袭数

量显著增加( $P<0.01$ )。与 IL-4+空白血清组比较,IL-4+健脾消癌方含药血清组 HCT116 细胞的侵袭数量降低( $P<0.01$ )。详见图 4。

### 3.4 健脾消癌方对 HCT116 细胞 E-cadherin、Vimentin、MMP-9 蛋白表达的影响

与空白血清对照组比较,健脾消癌方含药血清组 HCT116 细胞中 Vimentin 蛋白表达降低,而 E-cadherin 蛋白表达升高( $P<0.05$ );L-4+空白血清组及 IL-4+健脾消癌方含药血清组 HCT116 细胞中 Vimentin、MMP-9 蛋白表达增加,而 E-cadherin 蛋白表达降低( $P<0.01$ )。与 IL-4+空白血清组比较,IL-4+健脾消癌方含药血清组 HCT116 细胞 E-cadherin 蛋白表达升高,Vimentin、MMP-9 蛋白表达降低( $P<0.05$ )。详见图 5。

## 4 讨论

目前,CRC 仍然是严重危害全球的公共健康难题,其发病率和死亡率均位居癌症前三<sup>[1]</sup>。从临床来看,肿瘤细胞往往通过营造独特的肿瘤微环境来逃避免疫监视<sup>[7]</sup>。肿瘤微环境中高乳酸、缺氧等可以促进 TAM 的浸润或募集,TAM 能够整合肿瘤微环境中的不同信号形成两种相反的极化状态,不同极化类型的巨噬细胞能够表达不同的细胞因子、酶类以及细胞表面标志物。根据功能和表型的不同,巨噬细胞大致可分为 M1 型和 M2 型两类<sup>[8]</sup>。

M2 型巨噬细胞能抑制局部免疫,促进肿瘤免疫逃逸和进展。GORDON 等<sup>[9]</sup>发现,在人类 CRC 中,M2 型巨噬细胞可以高表达 PD-1,而 PD-1 抑制了 T 细胞的抗肿瘤功能和巨噬细胞的吞噬功能,发挥免疫抑制作用,促进肿瘤的发展。M2 型巨噬细胞不但能导致免疫抑制,还能促进肿瘤转移<sup>[10]</sup>。研究证实,结肠癌中 M2 型巨噬细胞可以通过释放各种趋化因子、促炎因子和生长因子来促进转移<sup>[11]</sup>。WAHAB 等<sup>[12]</sup>认为,CRC 微环境中大量浸润的巨噬细胞在 IL-4、IL-13 等多种因子诱导作用下分化为 M2 型的 TAM,若可以阻断相关因子,将有助于免疫治疗取得成功。

中医药防治肿瘤具有独特优势,中医药能够系统调控机体,抗肿瘤复发转移,减少手术并发症,减轻放射治疗(简称“放疗”)、化学药物治疗(简称“化疗”)、分子靶向治疗等所致毒副反应,发挥协同增敏作用,改善肿瘤患者临床症状,提高生存质量,延长生存期,从而提高临床获益率<sup>[13-15]</sup>。蒋益兰教授经过长期临床实践,凝练总结出 CRC 主要由“脾虚、瘀积、岩毒”所致<sup>[16]</sup>。正气亏虚是大肠癌发病的内因,而脾为“后天之本”“气血生化之源”,脾虚则肠癌“留著于脉,稽留而不去,息而成积”,是 CRC 的“病复”(复发)和“传舍”(转移)的病机主线。蒋益兰教授以“健脾益气,化瘀解毒”为防治 CRC 术后复发转移的基本治法,拟定防治 CRC 复发转移的经验方健脾消癌方。加之手术创伤、放疗、化疗导致的损伤等影响,

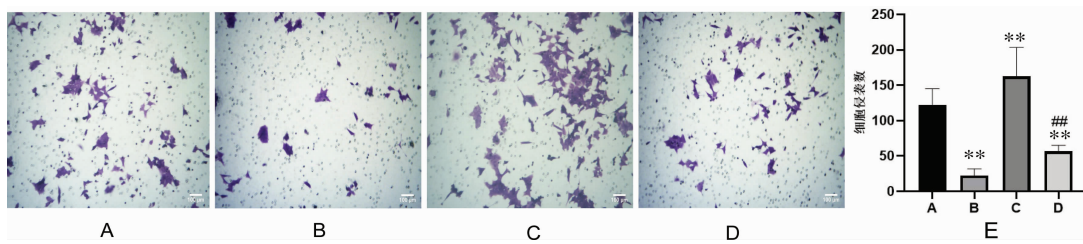


图 4 各组 HCT116 细胞侵袭数量

注:A.空白血清对照组;B.健脾消癌方含药血清组;C.IL-4+空白血清组;D.IL-4+健脾消癌方含药血清组。与空白血清对照组比较,\*\* $P<0.01$ ;与 IL-4+空白血清组比较,## $P<0.01$ 。

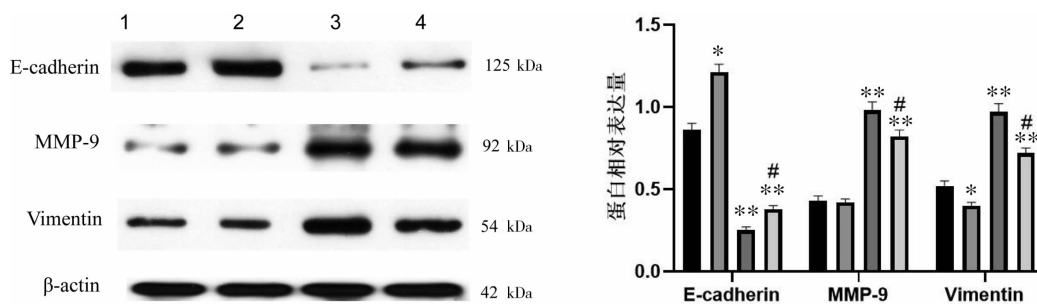


图 5 各组 HCT116 细胞 E-cadherin、Vimentin、MMP-9 蛋白表达

注:1.空白血清对照组;2.健脾消癌方含药血清组;3.IL-4+空白血清组;4.IL-4+健脾消癌方含药血清组。与空白血清对照组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与 IL-4+空白血清组比较,# $P<0.05$ 。

CRC 患者多会出现 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 及免疫球蛋白水平下降<sup>[17]</sup>, 细胞免疫功能降低, 免疫调节机制紊乱, 免疫抑制占优势, 消化道局部免疫功能低下<sup>[18]</sup>。本研究以 CRC 肿瘤微环境为切入点, 探讨健脾消癌方对 TAM 极化的调控作用, 为健脾抗癌中药的临床应用提供实验依据。

临床研究显示, 健脾消癌方联合化疗, 治疗晚期转移性 CRC 可提高患者疾病控制率, 延长晚期 CRC 患者的无进展生存期和总生存期, 并能减轻化疗所致不良反应、提高患者生活质量、有效降低肿瘤标志物<sup>[5-6]</sup>。前期实验研究表明, 健脾消癌方可有效拮抗 CRC 转移<sup>[19-24]</sup>。本研究通过 Transwell 法构建 HCT116 细胞与 M0 型巨噬细胞共培养体系, 探讨健脾消癌方调控巨噬细胞 M2 极化对 HCT116 细胞侵袭转移能力的影响。研究结果显示, M2 型巨噬细胞能够通过下调 HCT116 细胞 E-cadherin 表达, 上调 Vimentin、MMP-9 表达而促进 HCT116 细胞侵袭数量, 健脾消癌方能下调巨噬细胞 M2 型极化相关基因 CCL22、Arg-1 表达, 上调 HCT116 细胞 E-cadherin 表达, 下调 Vimentin 表达, 抑制 HCT116 细胞侵袭数量, 表明健脾消癌方能一定程度上抑制巨噬细胞 M2 极化, 阻断 HCT116 细胞上皮间质转化进程, 而抑制 CRC 细胞侵袭转移能力。本研究为健脾消癌方拮抗 CRC 提供进一步的理论依据和实验依据。关于健脾消癌方如何抑制巨噬细胞 M2 极化需要进行下一步调控机制的深入研究。

## 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: a Cancer Journal for Clinicians, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] KASPRZAK A. The role of tumor microenvironment cells in colorectal cancer (CRC) Cachexia[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(4): 1565.
- [3] YAHAYA M A F, LILA M A M, ISMAIL S, et al. Tumour-associated macrophages (TAMs) in colon cancer and how to reeducate them[J]. Journal of Immunology Research, 2019, 2019: 2368249.
- [4] MA X Q, GAO Y, CHEN Y L, et al. M2-type macrophages induce tregs generation by activating the TGF- $\beta$ /smad signalling pathway to promote colorectal cancer development[J]. OncoTargets and Therapy, 2021, 14: 5391-5402.
- [5] 蒋益兰, 俞天俊, 赵 晔. 健脾消癌方治疗老年中晚期大肠癌临床观察[J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(3): 94-96.
- [6] 王容容, 王其美, 蒋益兰, 等. 健脾消癌方联合化疗治疗晚期转移性结直肠癌的临床研究[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(5): 1732-1736.
- [7] ALMUSAWI S, AHMED M, NATERI A S. Understanding cell-cell communication and signaling in the colorectal cancer microenvironment[J]. Clinical and Translational Medicine, 2021, 11(2): e308.
- [8] WANG H, TIAN T, ZHANG J H. Tumor-associated macrophages (TAMs) in colorectal cancer (CRC): From mechanism to therapy and prognosis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(16): 8470.
- [9] GORDON S R, MAUTE R L, DULKEN B W, et al. PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity[J]. Nature, 2017, 545(7655): 495-499.
- [10] ZHAO S L, MI Y S, GUAN B J, et al. Tumor-derived exosomal miR-934 induces macrophage M2 polarization to promote liver metastasis of colorectal cancer[J]. Journal of Hematology & Oncology, 2020, 13(1): 156.
- [11] WANG D, WANG X H, SI M H, et al. Exosome-encapsulated miRNAs contribute to CXCL12/CXCR4-induced liver metastasis of colorectal cancer by enhancing M2 polarization of macrophages[J]. Cancer Letters, 2020, 474: 36-52.
- [12] WAHAB R, GOPALAN V, ISLAM F, et al. Cellular expression, in-vitro and in-vivo confirmation of GAEC1 oncogenic properties in colon cancer[J]. European Journal of Cell Biology, 2017, 96(6): 487-495.
- [13] 彭 丞, 柴可群. 中西医结合治疗大肠癌研究进展[J]. 浙江中西医结合杂志, 2022, 32(8): 779-782.
- [14] 刘 伟, 胡送娇, 朱锐秋, 等. 中医药调节免疫应答抗结直肠癌的研究状况[J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(13): 1539-1543.
- [15] 仇奕文, 朱莹杰. 健脾法改善结直肠癌患者免疫功能的研究进展[J]. 中医药导报, 2022, 28(5): 120-124.
- [16] 刘佳琴, 罗 吉, 杨 晓, 等. 蒋益兰教授从“虚、瘀、毒”论治大肠癌经验[J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(4): 482-485.
- [17] 张 静, 张 帆, 韩克松, 等. 免疫功能水平与腹腔镜结直肠癌根治术后复发的相关性研究[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2022, 28(1): 42-46.
- [18] 舒 晴, 喻松仁, 白 洋, 等. 脾虚证的免疫学机制研究进展[J]. 江西中医药大学学报, 2018, 30(6): 116-120.
- [19] 杨 晓, 罗 吉, 李勇敏, 等. 健脾消癌方干预结肠癌细胞外泌体 MIF 调控肝 Kupffer 细胞 TGF- $\beta$ 1 表达的研究[J]. 北京中医药大学学报, 2022, 45(2): 184-192.
- [20] 焦 蕉, 唐 麒, 蒋益兰, 等. 健脾消癌方通过 lncRNA HOTAIR/JAK2/STAT3 信号通路抑制结肠癌细胞株 HCT116 转移的机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(23): 66-71.
- [21] 宋 琳, 张 利, 蒋益兰. 健脾消癌方对缺氧微环境诱导的结肠癌细胞生物学行为影响及抑癌机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(2): 211-217.
- [22] 简小兰, 曾普华, 杜 佳, 等. 健脾消癌方对结肠癌 HCT116 细胞迁移、侵袭的影响研究[J]. 中医学报, 2021, 36(1): 132-137.
- [23] 王容容, 蒋益兰, 田雪飞, 等. 健脾消癌方对结直肠癌移植模型裸鼠 NLRP3 炎性小体表达及免疫功能的影响[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(8): 3890-3893.
- [24] 谭小宁, 李勇敏, 罗 吉, 等. 健脾消癌方对人结直肠癌裸鼠移植模型肿瘤组织上皮间质转化及转化生长因子  $\beta$  的影响[J]. 中医杂志, 2017, 58(24): 2137-2140.