

# 消癌解毒方对结肠癌的抑制作用及对 Treg 细胞的影响

谭佳妮<sup>1</sup>, 石文静<sup>1</sup>, 沈卫星<sup>1,2</sup>, 徐长亮<sup>1</sup>, 孙东东<sup>1,2</sup>, 程海波<sup>1,2\*</sup>

(1.南京中医药大学转化医学研究中心,国家中医药管理局名医验方评价与转化重点实验室,江苏省抗肿瘤验方与产业化工程实验室,江苏 南京 210023;2.江苏省中医药防治肿瘤协同创新中心,江苏 南京 210023)

**摘要:**目的 探讨消癌解毒方对结肠癌的抗肿瘤作用及作用机制。方法 皮下注射结肠癌细胞 CT26 于 BALB/c 小鼠右腋下,建立荷瘤小鼠模型,连续灌胃给药 14 d 后,处死小鼠,分离外周血单核细胞,流式细胞仪检测消癌解毒方对 Treg 细胞分布的影响,免疫组化检测消癌解毒方对肿瘤组织内 Foxp3 蛋白表达的影响。结果 消癌解毒方可以显著抑制结肠癌荷瘤的增长,降低 CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞在外周血及脾脏的分布,减少 Foxp3 蛋白在肿瘤组织内的表达。结论 消癌解毒方具有显著抑制结肠癌增殖的作用,其机制可能与减少外周血内 Treg 细胞的分布及肿瘤组织中 Foxp3 的表达进而影响其下游信号通路传导相关。

**关键词:**消癌解毒方;结肠癌;调节性 T 细胞

中图分类号:R285 文献标志码:A 文章编号:1672-0482(2017)05-0515-04

DOI:10.14148/j.issn.1672-0482.2017.0515

## Effect of Xiaoi Jiedu Decoction Recipe on Colon Cancer and Distribution of Treg Cells

TAN Jia-ni<sup>1</sup>, SHI Wen-jing<sup>1</sup>, SHEN Wei-xing<sup>1,2</sup>, XU Chang-liang<sup>1</sup>, SUN Dong-dong<sup>1,2</sup>, CHENG Hai-bo<sup>1,2\*</sup>

(1. Translational Medicine Research Center, Key Laboratory of Famous Doctors' Proved Recipe Evaluation and Transformation of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Provincial Lab of Anticarcinoma Proved Recipe Research and Engineering Industrialization, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China; 2. TCM Treatment on Tumor Collaborative Innovation Center of Jiangsu Province, Nanjing, 210023, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To explore the anti-tumor effect and mechanism of Xiaoi Jiedu Decoction on colon cancer. **METHODS** CT26 cells were injected subcutaneously into the right armpit of C57 mice to establish the tumor-bearing model. These mouse were sacrificed after 14 d administration. Mononuclear cells of the peripheral blood were isolated and the distribution of Treg cells were detected by flow cytometry. The expression of Foxp3 protein in tumor tissue was detected by immunohistochemistry method. **RESULTS** Xiaoi Jiedu Decoction significantly inhibited the proliferation of colon cancer in mice, decreased the distribution of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg cells in peripheral blood and decreased the expression of Foxp3 protein in tumor tissues. **CONCLUSION** Xiaoi Jiedu Decoction can significantly inhibit the proliferation of colon cancer by decreasing the distribution of Treg cells in peripheral blood and the expression of Foxp3 in the tumor tissues, thus affecting the downstream signal pathway. **KEY WORDS:** Xiaoi Jiedu Decoction; colon cancer; regulatory T cells

消癌解毒方是国医大师周仲瑛教授在癌毒的理论指导下,结合了近 60 年的临床经验而总结出来的对抗恶性肿瘤的经验方,现已在临床上被广泛证实疗效显著<sup>[1-3]</sup>。有报道显示<sup>[4]</sup>,消癌解毒方除具有消癌解毒作用外,更具有扶正祛邪之功效,与化学治疗药物联合应用时,能够提高肿瘤患者的免疫力,但该方的作用机制尚不明确。

调节性 T 细胞(Regulatory T cell, Treg)是一群具有免疫抑制功能的 T 细胞亚群,在维持免疫平

衡中发挥重要作用, Foxp3 为其特异性标志。Treg 细胞具有诱导宿主对肿瘤产生免疫耐受,使肿瘤细胞发生免疫逃逸的作用,与肿瘤的发生和发展密切相关。最新研究发现,在结直肠癌<sup>[5]</sup>、卵巢癌<sup>[6]</sup>、肝癌<sup>[7]</sup>等患者的外周血及肿瘤微环境中, Treg 细胞的比例增高,同时 Treg 细胞的浸润与肿瘤患者预后呈负相关性。Treg 细胞在肿瘤微环境中的形成、转化和促进免疫逃逸的机制及调控因素已成为近年研

收稿日期:2017-03-11;修稿日期:2017-06-28

基金项目:国家自然科学基金(81373511,81403079,81573910,81673559);江苏省自然科学基金(BK20131416, BK20161045);江苏省高校自然科学基金面上项目(16KJB360001);江苏省高校优势学科建设工程资助项目

作者简介:谭佳妮(1987-),女,内蒙古赤峰人,南京中医药大学助理研究员。\*通信作者:nzychb@163.com

究热点。本研究以 CT26 荷瘤小鼠为研究对象,观察消癌解毒方对肿瘤增殖的影响。同时,通过检测消癌解毒方对小鼠体内 Treg 细胞的分布,探讨其抗肿瘤机制。

## 1 材料

### 1.1 药品与试剂

消癌解毒方由白花蛇舌草、半枝莲、山慈菇、太子参、莪术、麦冬组成,中药饮片均购于亳州国苑中药材饮片有限公司;10 倍药量水煎煮 2 次(2 h 和 1.5 h),收集合并 2 次滤液,减压浓缩至适当体积最终成 2 g/mL 浓度的滤液,溶液于 4 °C 保存备用。注射用奥沙利铂(江苏恒瑞医药股份有限公司);注射用生理盐水(开开援生制药股份有限公司);RPMI-1640 培养基(上海元培);胎牛血清(FBS, Hyclone 公司);Foxp3 抗体(Abcam 公司);DAB(天根生化科技有限公司);FITC-CD4、PE-Foxp3 抗体(eBioscience 公司)。小鼠外周血淋巴细胞分离液 Kit(LSD1090,天津灏洋),小鼠脾脏单个核细胞分离液 Kit(LDS1090PK,天津灏洋)。

### 1.2 细胞株及动物

小鼠结肠癌 CT26 细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。SPF 级雄性 BALB/c 小鼠,共 40 只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司南京分公司,体质量 18~22 g,合格证号:SCXR(苏)2013-0026。

### 1.3 实验器材

FACSCanto™ 流式细胞仪(美国 BD 公司);荧光倒置显微镜(Nikon 公司)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

CT26 细胞用 RPMI-1640 培养基(培养基中含 10% 的胎牛血清,100 U/mL 青霉素及 100 U/mL 链霉素),细胞静置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。

### 2.2 荷瘤小鼠模型建立及给药

收集培养的 CT26 细胞,调整细胞密度  $2 \times 10^6$  mL<sup>-1</sup>。用 75% 酒精消毒 BALB/c 小鼠右腋皮肤,每只鼠皮下接种 0.2 mL 细胞悬液,制作小鼠结肠癌荷瘤模型。次日,按体质量将小鼠随机分为 5 组,模型组,消癌解毒方高剂量组(20 g/kg),消癌解毒方低剂量组(10 g/kg),奥沙利铂组(5 mg/kg),每组 8 只。另取 8 只未造模的 BALB/c 小鼠,作为正常对照组。小鼠连续灌胃给药 14 d,末次给药 2 h 后摘

眼球取血处死小鼠,同时取出小鼠脏器,进行后续试验。

### 2.3 外周血单个核细胞分离

小鼠给药后,摘眼球取血于抗凝管中,采用小鼠外周血淋巴细胞分离液 Kit, Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法分离外周血单个核细胞,台盼蓝染色进行细胞活性检测、计数后用 PBS 重悬后,备用。

### 2.4 脾脏淋巴细胞分离

各组小鼠处死后,分离新鲜脾脏,用眼科剪将组织剪至匀浆状,吸取组织匀浆并研磨,用 200 目滤网过滤到离心管内,500 g 离心 15 min,弃上清。用 PBS 重悬沉淀成细胞密度为  $2 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$  mL<sup>-1</sup> 的单细胞悬液。然后应用小鼠脾脏单个核细胞分离液 Kit 按说明书步骤,分离脾脏单个核细胞。计数后 PBS 重悬细胞调整细胞密度,备用。

### 2.5 流式细胞仪检测 Treg 细胞亚群

调整以上步骤分离所得的单个核细胞悬液细胞密度为  $1 \times 10^6$  mL<sup>-1</sup>,取出 500 μL,分别加入 5 μL Foxp3-PE-Cy5 抗体及 5 μL CD4-FITC 抗体。同时,实验中设 Foxp3-PE-Cy5 及 CD4-FITC 单阳性对照。避光孵育 25 min 后,用 PBS 洗涤,1% 多聚甲醛固定,用流式细胞仪检测细胞分布并对结果进行分析。

### 2.6 免疫组化染色

给药结束后,处死各组小鼠,剥取右腋下的瘤组织。用 4% 的多聚甲醛固定后,石蜡包埋,制作厚度为 0.3 μmol/L 的组织切片。二甲苯及梯度酒精对切片脱水脱蜡后,在切片上滴加 3% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 以抑制内源性过氧化酶,PBS 洗 3 次,每次 5 min。随后,将切片放于枸橼酸钠-枸橼酸缓冲液中,置于微波炉内小火微波,保持温度 95 °C 以上 15 min 取出,自然冷却至室温。加正常山羊血清封闭 20 min,弃去封闭液,在切片上滴加 Foxp3 一抗(1:200 稀释),放于 4 °C 冰箱内过夜。第 2 天取出切片静置于室内,待切片温度恢复至室温后,倾去一抗,PBS 洗 3 次,每次 5 min。滴加二抗工作液(1:500)室温孵育 2 h,弃去二抗。PBS 漂洗后,用 DAB 显色液显色,苏木素复染。切片常规梯度酒精脱水、二甲苯透明后,用中性树脂胶封片。最后,显微镜下随机选择 5 个视野拍照,进行数据统计。

### 2.7 统计学分析

以上每组实验及检测均重复 3 次以上,所有数据采用 SPSS Statistics 21 统计软件分析。实验结

果用  $\bar{x} \pm s$  表示,单因素方差分析进行组间显著性比较。

### 3 结果

#### 3.1 消癌解毒方对 CT26 荷瘤小鼠肿瘤体积及肿瘤质量的影响

各剂量的消癌解毒方对瘤组织质量的影响如表

表 1 消癌解毒方对荷瘤小鼠瘤体积及瘤质量的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	瘤体积/mm <sup>3</sup>	瘤质量/g	抑瘤率/%
模型组	8	1 286.7±138.9	2.51±0.16	
消癌解毒方低剂量组(10 g/kg)	8	1 039.2±101.3**	1.97±0.13*	21.5
消癌解毒方高剂量组(20 g/kg)	8	552.53±47.36**	1.07±0.09**	57.3
奥沙利铂组(5 mg/kg)	8	402.14±44.17**	0.75±0.12**	70.1

注:与模型组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ 。

#### 3.2 消癌解毒方对 CT26 荷瘤小鼠体质量和脏器指数的影响

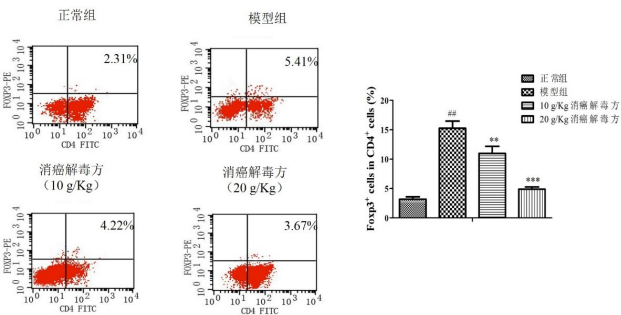
结果如表 2 所示,消癌解毒方给药 14 d 对荷瘤

表 2 消癌解毒方对小鼠体质量和脏器指数的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	体质量/g	脾脏指数/%	胸腺指数/%
正常组	8	27.5±1.33	0.50±0.09	0.21±0.03
模型组	8	27.3±1.45	0.54±0.09	0.23±0.05
消癌解毒方低剂量组(10 g/kg)	8	27.6±2.34	0.58±0.11	0.24±0.06
消癌解毒方高剂量组(20 g/kg)	8	26.7±2.01	0.61±0.07	0.23±0.05
奥沙利铂组(5 mg/kg)	8	26.3±2.57	0.51±0.06	0.21±0.04

#### 3.3 消癌解毒方对 CT26 荷瘤小鼠外周血 Treg 细胞的影响

由图 1 可见,与正常组相比较,模型组小鼠外周血内的 CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> 的 Treg 细胞表达增高(4.33%,2.17%),呈显著性差异;而各给药组小鼠外周血内的 CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> 的 Treg 细胞与模型组相比较明显减少,呈显著性差异。



注:与正常组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ 。 $\bar{x} \pm s, n=8$ 。

图 1 消癌解毒方对荷瘤小鼠外周血 Treg 细胞 (CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>) 的影响

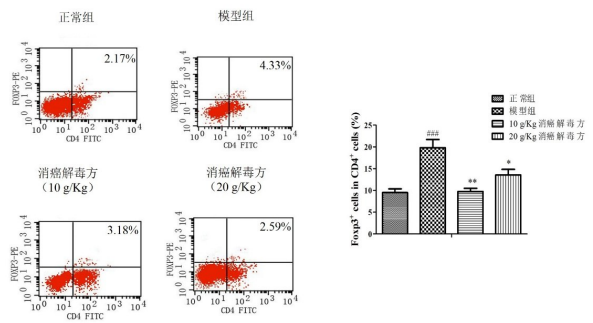
#### 3.4 消癌解毒方对 CT26 荷瘤小鼠脾脏 Treg 细胞的影响

由图 2 可知,小鼠脾脏内 Treg 变化情况与外周

1 所示,各给药组肿瘤平均体积及质量明显小于模型组,消癌解毒方给药低剂量组瘤质量为(1.97±0.13)g,抑瘤率 21.5%;高剂量组瘤质量(1.07±0.15)g,抑瘤率 57.3%,与模型组(2.51±0.16)g 相比,呈显著性差异( $P<0.05\sim 0.01$ )。结果表明消癌解毒方能显著抑制 CT26 荷瘤小鼠肿瘤的生长。

小鼠的脾指数、胸腺指数均无显著影响,各项指标差异不显著。提示消癌解毒方对小鼠的免疫系统无明显毒副作用。

血内相一致。模型组小鼠的 Treg 细胞比正常组小鼠脾脏内显著增高,而给药组小鼠脾脏内的 Treg 细胞呈降低趋势,与模型组相比,具有显著性差异。



注:与正常组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ 。 $\bar{x} \pm s, n=8$ 。

图 2 消癌解毒方对荷瘤小鼠脾脏内 Treg 细胞 (CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>) 分布的影响

#### 3.5 消癌解毒方对肿瘤组织内 Foxp3 蛋白表达的影响

将 CT26 荷瘤小鼠的瘤组织石蜡包埋后,进行切片,随后用免疫组化染色的方法对瘤组织中的 Foxp3 蛋白的表达情况进行分析,结果如图 3 所示,与模型组相比较,消癌解毒方给药组小鼠肿瘤内 Foxp3 表达显著下降,且高剂量的增加趋势更明显。



此结果提示我们,消癌解毒方抑制肿瘤增殖的作用

可能与降低组织内 Foxp3 蛋白表达有关。

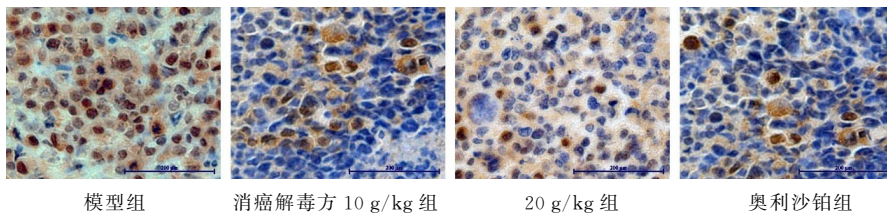


图 3 消癌解毒方对荷瘤组织内 Foxp3 蛋白表达的影响(×400)

### 4 讨论

结直肠癌(Colorectal cancer,CRC)是常见的消化系统恶性肿瘤之一,其发病率居全球恶性肿瘤的第三位,死亡率居第二位。并且,随着不良生活方式及饮食习惯的改变与养成,结直肠癌的临床发病率始终居高不下。

近年来,对肿瘤的研究不仅局限于肿瘤本身,肿瘤细胞所处的微环境也逐渐被重视。肿瘤浸润的淋巴细胞(Tumor-infiltrating lymphocytes, TILs)是肿瘤免疫微环境的重要组成部分,其中的调节性 T 细胞(Regulatory T cells, Treg)在维持机体免疫平衡、调节免疫状态和维持免疫系统的稳定性中发挥重要作用。Treg 细胞可以分泌 IL-4、IL-10、TGF-β 等抑制性可溶性的细胞因子,形成有利于加强免疫细胞抑制功能的调节性环境,诱导机体免疫耐受<sup>[8]</sup>。此外,Treg 细胞还可以抑制性调控效应性 T 细胞中 Th17 细胞的功能,抑制 IL-17 的分泌,进而产生抗炎作用<sup>[9]</sup>。Foxp3 蛋白是 Treg 细胞最敏感的特异性表达标记物,对 Treg 细胞的活化及功能起调控作用。它是叉头样转录因子家族的成员,于 2001 年被首次报道发现<sup>[10]</sup>。有研究发现<sup>[11]</sup>,Foxp3 的表达功能与 Treg 细胞密切相关。因此,在实验设计中,我们检测了 Foxp3 蛋白在肿瘤组织中的分布情况。

消癌解毒方以白花蛇舌草、山慈菇清热解毒;半枝莲、莪术化痰散结;太子参、麦冬益气养阴。已有大量文献报道,经过长期的临床实践证明消癌解毒方具有显著的抗肿瘤疗效,但有关消癌解毒方对结肠癌的作用尚未见报道。在本项实验中,我们采用结肠癌 CT26 细胞的荷瘤小鼠模型,观察了消癌解毒方抑制结肠癌的药效。同时,观察其对外周血及脾脏中 Treg 细胞分布的影响,及其对免疫系统的影响。由结果可见,消癌解毒方通过抑制调节性 T 细胞的分化,降低肿瘤组织中 Foxp3 蛋白的表达,进而发挥其抗肿瘤的功效。

### 参考文献:

[1] 陈海彬,周红光,程海波,等.消癌解毒方对中晚期恶性肿瘤患者免疫功能的影响[J].南京医科大学学报,2009,29(9):1257-1259.  
CHEN HB, ZHOU HG, CHENG HB, et al. Immune function of Xiaocaijiedufang on patients with advanced malignant tumor [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2009,29(9):1257-1259.

[2] 周红光,吴勉华.消癌解毒方抗肿瘤作用的实验研究[J].时珍国医国药,2010,21(4):815-816.  
ZHOU HG, WU MH. Study on the anti-tumor effect of Jiedu Xiaocai Prescription[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2010, 21(4): 815-816.

[3] 张玉,吴勉华,陈海彬,等.消癌解毒方体内抑瘤作用机制研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(11):234-237.  
ZHANG Y, WU MH, CHEN HB, et al. Study on in vivo Anti-tumor mechanism of Xiaocai Jiedu prescription[J]. Chin J Exper Tradit Med Form, 2011, 17(11): 234-237.

[4] 周红光,陈海彬,吴勉华,等.消癌解毒方配合化疗治疗中晚期恶性肿瘤临床疗效观察[J].中华中医药杂志,2010,25(7):1140-1143.  
ZHOU HG, CHEN HB, WU MH, et al. Clinical observation of Xiaocai Jiedu Prescription combined with chemotherapy on advanced cancer[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2010, 25(7): 1140-1143.

[5] TIMPERI E, PACELLA I, SCHINZARI V, et al. Regulatory T cells with multiple suppressive and potentially pro-tumor activities accumulate in human colorectal cancer[J]. Oncoimmunology, 2016, 5(7): e1175800.

[6] ZHU Q, WU X, WANG X. Differential distribution of tumor-associated macrophages and Treg/Th17 cells in the progression of malignant and benign epithelial ovarian tumors[J]. Oncol Lett, 2017, 13(1): 159-166.

[7] TU JF, DING YH, YING XH, et al. Regulatory T cells, especially ICOS<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells, are increased in the hepatocellular carcinoma microenvironment and predict reduced survival[J]. Sci Rep, 2016, 6: 35056.

[8] BELKAID Y, ROUSE BT. Natural regulatory T cells in infectious disease[J]. Nat Immunol, 2005, 6(4): 353-360.

[9] LEE YK, MUKASA R, HATTON RD, et al. Developmental plasticity of Th17 and Treg cells[J]. Curr Opin Immunol, 2009, 21(3): 274-280.

[10] BENNETT CL, CHRISTIE J, RAMSDELL F, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3[J]. Nat Genet, 2001, 27(1): 20-21.

[11] NISHIKAWA H, SAKAGUCHI S. Regulatory T cells in tumor immunity[J]. Int J Cancer, 2010, 127(4): 759-767.

(编辑:董宇)