

肺癌微环境脾气虚证肿瘤组织相关巨噬细胞 microRNA 的表达及加味黄芪建中汤干预机制研究*

魏自太^{1,2}, 包素珍^{1△}, 李恒楠¹, 李小东¹

(1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053; 2. 衢州职业技术学院, 浙江 衢州 324000)

摘要: **目的** 研究肺癌微环境脾气虚证肿瘤组织相关巨噬细胞 microRNA 的表达及加味黄芪建中汤的影响。**方法** 50 只小鼠采用苦寒泻下, 劳倦, 节食的方法造模, 在建立小鼠脾气虚证 Lewis 肺癌模型后, 加味黄芪建中汤灌胃治疗 10d, 脱颈椎处死小鼠, 取肿瘤组织。采用 microRNA 基因芯片检测正常小鼠巨噬细胞与 3 组肿瘤组织相关巨噬细胞 MicroRNA 基因表达的变化。**结果** “脾气虚”组肿瘤组织相关巨噬细胞 microRNA 的表达谱表达异常(与正常组比较), 不同于肿瘤组, 具有独特的 microRNA 变化, 而加味黄芪建中汤可明显双向调节“脾气虚”组肿瘤组织相关巨噬细胞 microRNA 的表达谱的异常变化, 使其恢复正常。**结论** 加味黄芪建中汤可使“脾气虚”组 microRNA 的表达谱接近恢复正常。

关键词: 脾气虚; 加味黄芪建中汤; 微环境; 肿瘤相关巨噬细胞 microRNA

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2017)02-0011-07

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.02.003

中医药在改善肿瘤患者的症状、延长肿瘤患者的生存率、减少肿瘤转移等方面发挥了很大的作用。加味黄芪建中汤是临床总结的处方, 其药物作用靶点多, 长期应用不易耐药, 因此, 进一步研究其对肿瘤微环境的影响的机制具有临床指导意义。

1 材料

1.1 动物

健康 C57BL/6 小鼠 50 只, 雌性, 体质量 18~22g, 小鼠 Lewis 肺癌瘤株, 浙江中医药大学实验动物中心提供。

1.2 药物与试剂

加味黄芪建中汤: 黄芪 9g, 白芍 18g, 桂枝 9g, 甘草 6g, 生姜 10g, 大枣 10g, 饴糖 30g, 浙贝母 10g, 白花蛇舌草 30g, 仙鹤草 12g, 经水煎、过滤、灭菌, 制成浓度相当于含生药 1g/mL 的药液; 共 144g 购自浙江中医药大学中医门诊部。加味黄芪建中汤灌胃, 每日 0.4mL/20g。按照《中药药理研究方法学》计算小鼠的等效剂量: $144 \div 60 \times 9.01 = 21.624 \text{g/kg}$ 。

大黄浓缩液: 大黄 300g(药物购自浙江中医药大学中医门诊部), 打粉。按 1:6, 300g 大黄粉加水 1 800mL, 将大黄水溶液负压浓缩成 300mL 大黄液, 浓度为 1g/mL, 在 4℃冰箱保存备用。大黄液灌胃, 每日 1mL/20g。mirVanaTM miRNA Isolation Kit, (美国 Ambion 公司)、Envision 工作液(基因(上海)生物有限公司)、胎牛血清和 RPMI1640 培养液(美国 Gibco 公司)。

1.3 仪器与设备

Agilent Mouse miRNA(8*60K)v19.0 基因芯片(上海伯豪公司)、安捷伦芯片扫描仪(美国安捷伦科技公司)。

2 方法

2.1 分组

随机将实验小鼠分为 5 组: 正常组、脾气虚组、肿瘤组、肿瘤脾虚组、肿瘤黄芪组。依据文献资料, 采用大黄浓缩液建立脾气虚模型。

2.2 模型建立

50 只 C57BL/6 小鼠, 雌性, 体质量(18±2)g, 在

* 基金项目: 浙江省自然科学基金(LY13H270010)

收稿日期: 2017-02-27

作者简介: 魏自太(1971-), 男, 甘肃庄浪人, 医学博士, 副教授, 研究方向: 中医药治疗肿瘤疾病。

△通信作者: 包素珍, E-mail: weizitai1971@163.com

动物实验中心常规适应饲养 1 周后, 采用苦寒泻下法造模(大黄浓缩液灌胃, 每只小鼠每次 1ml/20g, 每日 1 次), 同时每日游泳、间隔 1 日节食(下午 4:00-第 2 天早晨 8:30), 连续 14d。在脾气虚模型建成后, 取传代后第 13 天的 C57 荷瘤小鼠新鲜无坏死 Lewis 肿瘤组织, 制成肿瘤细胞悬液; 用生理盐水调整为 1×10^7 个/mL; 取上述肿瘤细胞悬液 0.2mL, 给肿瘤组, 肿瘤脾虚组, 肿瘤黄芪组小鼠右腋下皮下接种肿瘤。

2.3 给药方法

①正常组: 生理盐水灌胃, 每日 1 次, 每次 0.4mL; ②脾气虚组: 生理盐水灌胃, 每日 1 次, 每次 0.4mL; ③肺癌组: 生理盐水灌胃, 每日 1 次, 每次 0.4mL; ④脾气虚肺癌组: 生理盐水灌胃, 每日 1 次, 每次 0.4mL; ⑤脾气虚肺癌黄芪组: 中药加味黄芪建中汤灌胃, 每日 1 次, 每次 0.4mL。脾气虚证肺癌模型建立后, 各组按以上方法给药, 连续 9d, 第 10 天禁食不禁水 12h, 脱颈椎处死小鼠。

2.4 肿瘤相关巨噬细胞 MicroRNA 基因芯片检测

巨噬细胞标本分离提取: (1) 依据实验建立的 Lewis 肺癌模型, 分为肿瘤脾虚、肿瘤组、肿瘤黄芪组; 在注射 3 周后肿瘤组织大小达到 $2.0\text{cm} \times 1.5\text{cm}$ 时取肿瘤组织分离巨噬细胞。(2) 分离肿瘤相关巨噬细胞: 将肿瘤剪成 $1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 1\text{mm}$ 以下碎片; 于 RPMI1640 培养液 (含 2% 胎牛血清, 0.005% DNA 酶 I, 0.05% 胶原酶 IV) 中, 37°C 缓慢震荡孵育 1h, 细胞悬液 100 目筛网过滤, 离心 3min, 去除残留组织块, 取上清 400g 离心 10min, 沉淀重悬于 6mL RPMI1640 培养液中, 转移至 60mm*15mm 细胞培养皿中, 5% CO_2 , 37°C 正常培养 1h 后去除上清, PBS 洗两遍去除未贴壁细胞; 所得贴壁细胞即为肿瘤相关巨噬细胞。(3) 分离正常小鼠腹腔巨噬细胞: 给小鼠腹腔注射 5mL 含枸橼酸钠的 PBS; 轻拍打小鼠腹部, 用注射器抽出混有巨噬细胞的 PBS 溶液; 500g 离心 10min; 取适量 RPMI1640 培养基重悬细胞, 置于细胞培养皿中, 5% CO_2 , 37°C 正常培养 1h 后去除上清, PBS 洗两遍去除未贴壁细胞; 所得贴壁细胞即为肿瘤相关巨噬细胞。培养皿中的巨噬细胞用 mirVana™ miRNA Isolation Kit 处理后, 送上海伯豪公司检测。

2.5 统计学方法

采用统计软件包 SPSS21.0 版统计, 计量资料两组间比较用 t 检验, 多组间比较用单因素分析; 计量资

料数值用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示; 基因芯片采用 cluster 聚类分析。

3 结果

选取正常组 (正常组小鼠腹腔巨噬细胞基因表达信号为阴性对照), 肿瘤 (肺癌) 脾虚组, 肿瘤 (肺癌) 组, (脾虚) 肿瘤 (肺癌) 黄芪组, 分别将肿瘤组织相关巨噬细胞 microRNA 4 组数据进行比较, 取差异倍数 (foldchange, FC) 大于 2 倍以上的差异基因。

3.1 microRNA 基因表达水平比较

肿瘤脾虚组、肿瘤组、肿瘤黄芪组与正常组小鼠比较后, 发现肿瘤黄芪组与正常组小鼠 microRNA 基因表达水平趋向接近 (倍数关系接近等于 1), 趋向正常。

(1) 肿瘤脾虚组 microRNA 基因表达水平低, 肿瘤黄芪组 microRNA 基因表达水平高, 与正常组接近 (倍数关系接近等于 1)。见图 1。

表 1 正常组与肿瘤脾虚组, 肿瘤黄芪组 microRNA 基因表达水平比较

SystematicName	正常/黄芪_FC	正常/脾虚_FC
mmu-miR-3091-5p	0.906573628	63.28479457
mmu-miR-669n	1.279922716	55.82824115
mmu-miR-3102-5p	1.266791682	7.847726156
mmu-miR-466i-3p	1.279721964	4.730276775
mmu-miR-705	0.743583365	4.434769741
mmu-miR-3082-5p	0.94594388	3.187014759
mmu-miR-466f-3p	1.18619599	2.945516021
mmu-miR-7a-5p	1.984452046	2.730166619
mmu-miR-23b-3p	1.780429611	2.612304368
mmu-miR-574-5p	1.082545077	2.39205009
mmu-miR-721	0.567169713	2.381508503
mmu-miR-24-3p	1.671705252	2.15921215
mmu-miR-1187	1.415682457	2.141484893
mmu-miR-34a-5p	1.451076923	2.092477341
mmu-miR-423-5p	1.842975638	2.091173117

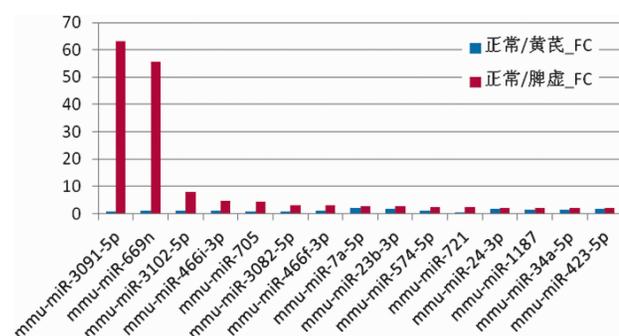


图 1 正常/黄芪组 正常/脾虚组基因表达水平比较

(2) 肿瘤脾虚组 microRNA 基因表达水平高, 肿瘤黄芪组 microRNA 基因表达水平低, 与正常组接近 (倍数关系接近等于 1)。见图 2。

表 2 肿瘤脾虚组, 肿瘤黄芪组与正常组 microRNA 基因表达水平比较

SystematicName	黄芪/正常_FC	脾虚/正常_FC
mmu-miR-423-3p	0.876763	10.52625
mmu-miR-212-5p	0.876763	10.81225
mmu-miR-32-5p	0.876763	10.97857
mmu-miR-677-5p	0.876763	12.16071
mmu-miR-30d-3p	0.876763	13.14112
mmu-miR-322-3p	0.876763	14.06623
mmu-miR-582-3p	0.876763	14.33805
mmu-let-7f-1-3p	0.876763	14.54589
mmu-miR-33-5p	0.876763	14.96364
mmu-miR-542-5p	0.876763	15.67844
mmu-miR-450b-5p	0.876763	16.63433
mmu-miR-3078-5p	0.876763	41.64312
mmu-miR-450b-3p	0.876763	48.89812
mmu-miR-505-5p	0.876763	57.90773
mmu-miR-878-3p	0.876763	70.56918
mmu-miR-3474	0.876763	101.1428
mmu-miR-542-3p	0.876763	138.5793

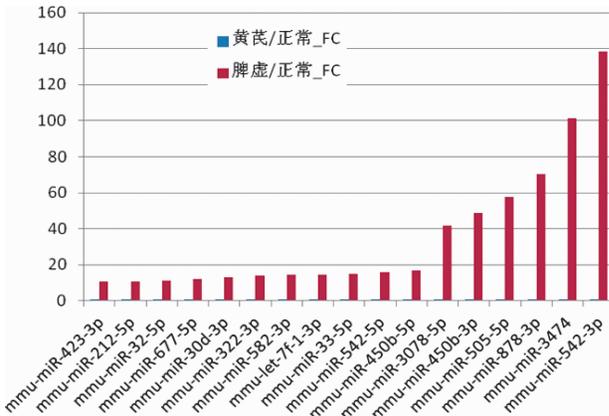


图 2 黄芪/正常组 脾虚/正常组基因表达水平比较

(3) 肿瘤组 microRNA 基因表达水平低, 肿瘤黄芪组 microRNA 基因表达水平高, 与正常组接近 (倍数关系接近等于 1)。见图 3。

表 3 正常组与肿瘤组, 肿瘤黄芪组 microRNA 基因表达水平比较

SystematicName	正常/黄芪_FC	正常/肿瘤_FC
mmu-miR-484	1.938319	3.299597
mmu-miR-3102-5p	1.266792	2.588405
mmu-let-7i-5p	1.944537	2.574692
mmu-miR-5121	1.492305	2.114352
mmu-miR-30e-5p	1.881351	2.107601
mmu-miR-423-5p	1.842976	2.067174
mmu-miR-872-5p	1.511751	2.026375

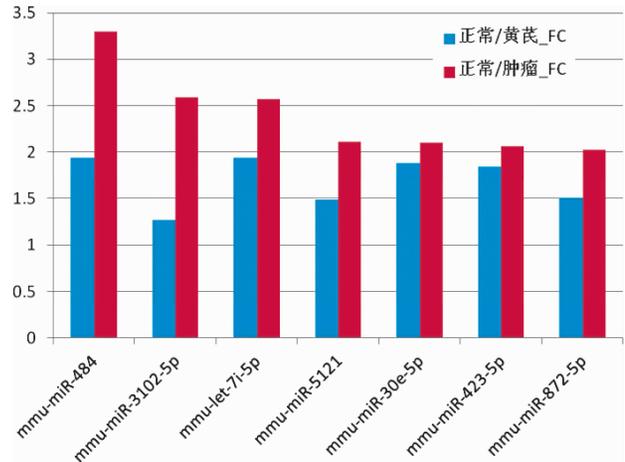


图 3 正常/黄芪组 正常/肿瘤组基因表达水平比较

(4) 肿瘤组 microRNA 基因表达水平高, 肿瘤黄芪组 microRNA 基因表达水平低, 与正常组接近 (倍数关系接近等于 1)。见图 4。

表 4 肿瘤组, 肿瘤黄芪组与正常组 microRNA 基因表达水平比较

SystematicName	黄芪/正常_FC	肿瘤/正常_FC
mmu-miR-3069-3p	1.646073	2.096696
mmu-miR-3473a	1.537811	2.106282
mmu-miR-6243	1.766269	2.290526
mmu-miR-706	1.427368	2.358418
mmu-miR-1949	1.913253	2.442465
mmu-miR-3968	1.502649	2.519398
mmu-miR-5100	1.981341	4.733371
mmu-miR-574-5p	0.923749	5.453863
mmu-miR-466i-5p	1.281196	5.755132
mmu-miR-1187	0.706373	6.355343
mmu-miR-669n	0.781297	8.304241
mmu-let-7b-3p	0.876763	10.00922
mmu-miR-3082-5p	1.057145	10.49116
mmu-let-7f-1-3p	0.876763	14.62763
mmu-miR-468-3p	0.876763	101.1428

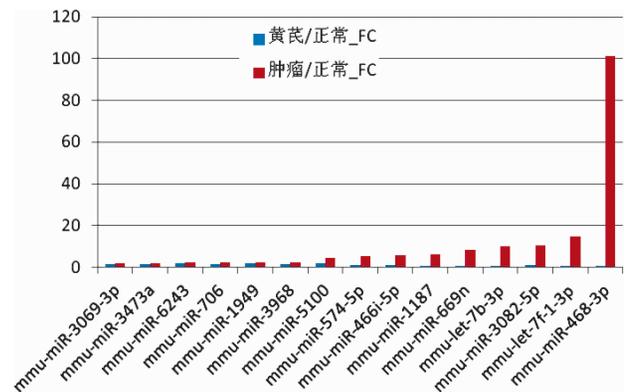


图 4 黄芪/正常组 肿瘤/正常组基因表达水平比较

3.2 肿瘤黄芪组,肿瘤组,肿瘤脾虚组均与正常组比较的热图

(1) 肿瘤黄芪组与肿瘤组均与正常组比较

从图 5(热图 1)看出,与正常组比较,在肿瘤组中 miR-484, miR-3102-5p, let-7i-5p, miR-5121, miR-30e-5p, miR-423-5p, miR-872-5p 基因表达水平低;与正常组比较,肿瘤组 miR-3069-3p, miR-3473a, miR-6243, miR-706, miR-1949, miR-3968, miR-5100, miR-574-5p, miR-466i-5p, miR-1187, miR-669n, let-7b-3p, miR-3082-5p, let-7f-1-3p, miR-468-3p 基因表达水平高。

与正常组比较,在肿瘤黄芪组中 miR-484, miR-3102-5p, let-7i-5p, miR-5121, miR-30e-5p, miR-423-5p, miR-872-5p 基因表达水平高于肿瘤组中基因表达水平;与正常组比较,在肿瘤黄芪组中 miR-466i-5p, miR-1187, miR-669n, miR-3082-5p, miR-468-3p, let-7b-3p, let-7f-1-3p, miR-574-5p 基因表达水平接近正常;与正常组比较,在肿瘤黄芪组中 miR-3473a, miR-6243, miR-706, miR-1949, miR-3968, miR-5100, miR-3069-3p 基因表达水平低于肿瘤高于正常。

(2) 肿瘤黄芪组与肿瘤脾虚组均与正常组比较

从图 6(热图 2)看出,与正常组比较,肿瘤脾虚组 miR-3091-5p, miR-669n, miR-3102-5p, miR-466i-3p, miR-705, miR-3082-5p, miR-466f-3p, miR-574-5p, miR-721, miR-7a-5p, miR-1187, miR-34a-5p, miR-423-5p, miR-24-3p, miR-23b-3p, 等基因表达水平低;与正常组比较,肿瘤脾虚组 miR-3098-5p, miR-30a-5p, miR-3968, miR-19a-3p, miR-6407, miR-3069-3p, miR-6243, miR-128-3p, miR-3070b-3p, miR-196a-1-3p, miR-1981-5p, let-7b-3p, miR-3102-3p, miR-1956, miR-5122, miR-3078-5p, miR-450b-3p, miR-505-5p, miR-878-3p, miR-3474, miR-542-3p, miR-423-

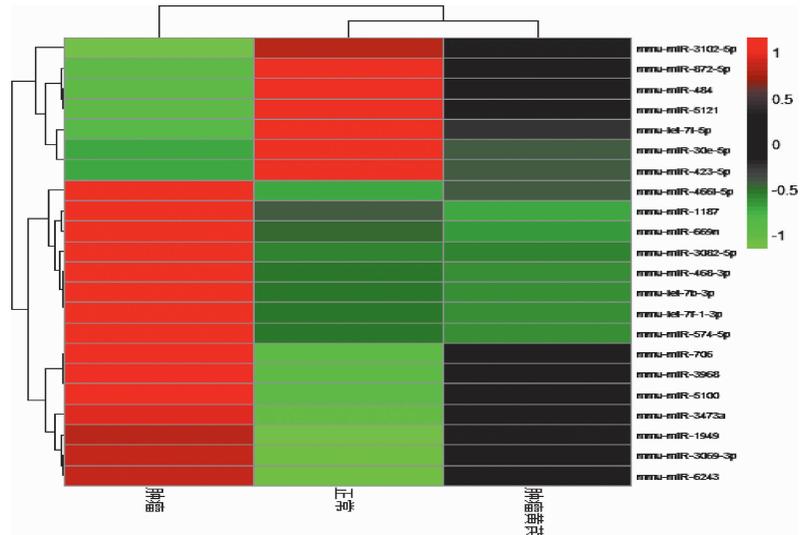


图 5(热图 1) 肿瘤黄芪组与肿瘤组均与正常组比较

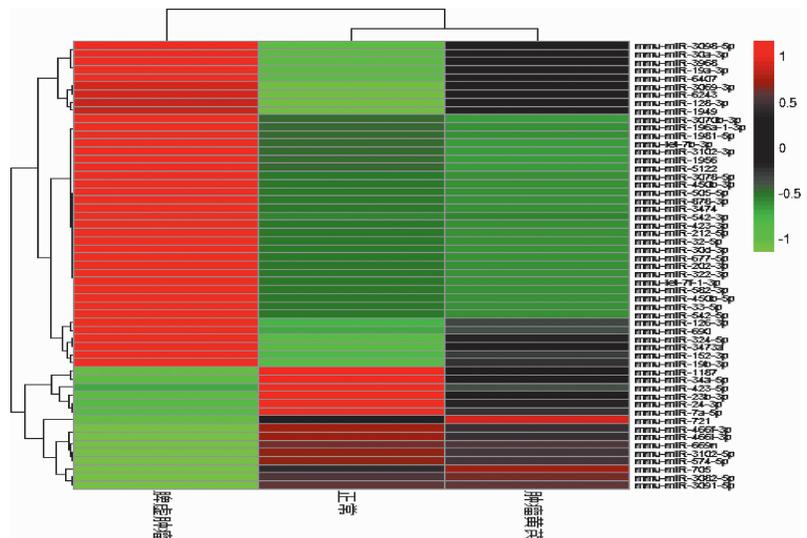


图 6(热图 2) 肿瘤黄芪组与肿瘤脾虚组均与正常组比较

3p, miR-212-5p, miR-32-5p, miR-30d-3p, miR-677-5p, miR-202-3p, miR-322-3p, let-71-1-3p, miR-582-3p, miR-450b-5p, miR-33-5p, miR-542-5p, miR-125-3p, miR-690, miR-324-5p, miR-3473a, miR-152-3p, miR-19-3p 等基因表达水平高。

与正常组比较,肿瘤黄芪组 miR-3098-5p, miR-30a-5p, miR-3968, miR-19a-3p, miR-6407, miR-3069-3p, miR-6243, miR-128-3p, miR-3070b-3p, miR-196a-1-3p, miR-1981-5p, let-7b-3p, miR-3102-3p, miR-1956, miR-5122, miR-3078-5p, miR-450b-3p, miR-505-5p, miR-878-3p, miR-3474, miR-542-3p, miR-423-3p, miR-212-5p,

miR-32-5p, miR-30d-3p, miR-677-5p, miR-202-3p, miR-322-3p, let-71-1-3p, miR-582-3p, miR-450b-5p, miR-33-5p, miR-542-5p, miR-125-3p, miR-690, miR-324-5p, miR-3473a, miR-152-3p, miR-19-3p 等基因表达水平接近正常组; miR-7a-5p, miR-1187, miR-34a-5p, miR-423-5p, miR-24-3p, miR-23b-3p 等基因表达水平上调; miR-3091-5p, miR-669n, miR-3102-5p, miR-466i-3p, miR-705, miR-3082-5p, miR-466f-3p, miR-574-5p, miR-721 基因表达水平接近正常组。

4 讨论

肿瘤微环境在肿瘤的转移中扮演着极为重要的角色,在肿瘤微环境中,聚集于缺血、缺氧及坏死区的肿瘤相关巨噬细胞在肿瘤发展中具有重要功能,在一般情况下,巨噬细胞被分为两个亚型:经典的M1和M2型巨噬细胞^[1],M1巨噬细胞表型的特征是表达一系列的促炎细胞因子,趋化因子和效应分子,作为重要的细胞组分参与炎症反应和抗肿瘤免疫。相反,M2巨噬细胞表达抗炎分子,发挥抗炎和致瘤性的活动。在大多数的肿瘤中,巨噬细胞浸润提供了一种免疫抑制的微环境而促进肿瘤生长,其分泌的物质促进肿瘤血管生成,生长,转移和免疫抑制。晚期肿瘤的进展过程中,肿瘤相关巨噬细胞一般转向M2表型特征和低的肿瘤杀伤活性^[2-3]。

更多的M2巨噬细胞富集在低氧肿瘤区,促进血管生成和生长因子的产生,血管生成数量增加了肿瘤进展,肿瘤相关巨噬细胞的数量与患者无复发生存率和总生存率有关^[4-5]。而TAM表现出涉及的重要基因诱导肿瘤细胞凋亡和细胞周期抑制^[6]。最近,人们还发现,肿瘤相关巨噬细胞与癌干细胞相互作用。这种相互作用会导致肿瘤发生,转移,和耐药性^[7-8]。在化疗或免疫治疗后,巨噬细胞可恢复其免疫抑制作用,阻止肿瘤进展和肿瘤细胞的攻击。在临床前模型和在早期临床试验中,巨噬细胞是癌症组合治疗的理想目标^[9]。在肿瘤微环境内的,巨噬细胞在肿瘤的这种矛盾的作用说明它们功能的可塑性,表明针对肿瘤相关巨噬细胞的极性转换,可能代表对癌症的新的治疗策略^[10]。

microRNA是短链的非编码RNA,在癌症发病和转移扩散中有重要作用,特定的miRNA的功能降低,导致其编码蛋白的量发生变化,会导致癌细胞侵袭和转移。某些microRNA的表达过度,是肿瘤的发生和生

存重要原因。抗microRNA技术可以作为抗癌药物的一种新模型,它可以扩展靶向药物的应用领域。

研究结果发现(1)肿瘤脾虚组,肿瘤黄芪组与正常组小鼠比较后,发现肿瘤黄芪组与正常组小鼠microRNA基因表达水平趋向接近(倍数关系接近等于1),趋向正常。

在1.1中,肿瘤脾虚组microRNA基因表达水平低,肿瘤黄芪组microRNA基因表达水平高,与正常组接近(倍数关系接近等于1)与正常组比较,肿瘤脾虚组miR-3091-5p,miR-669n等基因(见图1)表达水平低,经加味黄芪建中汤干预后,其基因表达水平接近正常组(见表1),说明加味黄芪建中汤调高肿瘤脾虚组肿瘤相关巨噬细胞部分microRNA基因表达水平,并接近恢复正常。

在1.2中,肿瘤脾虚组microRNA基因表达水平高,肿瘤黄芪组microRNA基因表达水平低,与正常组接近(倍数关系接近等于1)与正常组比较,肿瘤脾虚组miR-423-3p,miR-212-5p等基因(见图2)表达水平高,经加味黄芪建中汤干预后,其基因表达水平接近正常组(见表2),说明加味黄芪建中汤降低肿瘤脾虚组肿瘤相关巨噬细胞部分microRNA基因表达水平,并接近恢复正常。

说明“脾气虚”病机为,肿瘤相关巨噬细胞部分microRNA基因表达水平均异常,向上高表达或向下低表达。而加味黄芪建中汤具有双向调节功能,其可能部分恢复或逆转肿瘤相关巨噬细胞部分microRNA基因表达水平转为正常巨噬细胞的表达水平,解除其免疫抑制,发挥正常抑制肿瘤的功能。

在1.3中肿瘤组microRNA基因表达水平低,肿瘤黄芪组microRNA基因表达水平高,与正常组小鼠microRNA值比较接近,趋向正常(倍数关系接近等于1)

与正常组比较,肿瘤组miR-484,miR-3102-5p等基因(见图3)表达水平低,经加味黄芪建中汤干预后,其基因表达水平接近正常组(见表3),说明加味黄芪建中汤调高肿瘤脾虚组肿瘤相关巨噬细胞部分microRNA基因表达水平,并接近恢复正常。

在1.4中肿瘤组microRNA基因表达水平高,肿瘤黄芪组microRNA基因表达水平低,与正常组接近(倍数关系接近等于1)与正常组比较,肿瘤组miR-3069-3p,miR-3473a等基因(见图4)表达水平高,经加味黄芪建中汤干预后,其基因表达水平接近正常

组(见表 4),说明加味黄芪建中汤调低肿瘤脾虚组肿瘤相关巨噬细胞部分 microRNA 基因表达水平,并接近恢复正常。

说明“肿瘤组”病机为,肿瘤相关巨噬细胞部分 microRNA 基因表达水平均异常,向上高表达或向下低表达。而加味黄芪建中汤具有双向调节功能,其可能部分恢复或逆转肿瘤相关巨噬细胞部分 microRNA 基因表达水平转为正常巨噬细胞的表达水平,解除其免疫抑制,发挥正常抑制肿瘤的功能。

在肿瘤黄芪组,肿瘤脾虚组,肿瘤组均与正常组比较热图分析发现:图 5(热图 1):肿瘤黄芪组与肿瘤组均与正常组比较:与正常组比较,在肿瘤组中 miR-484, miR-3102-5p 等基因表达水平低;与正常组比较,肿瘤组 miR-3069-3p, miR-3473a 等基因表达水平高。说明肿瘤组中肿瘤相关巨噬细胞部分 microRNA 基因表达水平出现上调和下调的异常变化,说明肿瘤组中肿瘤相关巨噬细胞不是正常的发挥抑制肿瘤细胞的巨噬细胞,其 microRNA 基因表达可能促进了肿瘤的生长增殖。与正常组比较,在肿瘤黄芪组中 miR-484, miR-3102-5p 等基因表达水平高于肿瘤组中基因表达水平;与正常组比较,在肿瘤黄芪组中 miR-466i-5p, miR-1187 等基因表达水平接近正常;与正常组比较,在肿瘤黄芪组中 miR-3473a, miR-6243 等基因表达水平低于肿瘤高于正常。说明肿瘤黄芪组中肿瘤相关巨噬细胞部分 microRNA 基因表达水平与正常巨噬细胞接近或发挥正常表达水平,说明肿瘤相关巨噬细胞可能转变为正常的巨噬细胞,其 microRNA 基因表达可能抑制了肿瘤的生长增殖。说明加味黄芪建中汤的干预,可能促使极化的 M2 型肿瘤相关巨噬细胞转变为正常的有抑制肿瘤作用的 M1 巨噬细胞或其促瘤作用部分丧失。

在图 6(热图 2)中:肿瘤黄芪组与肿瘤脾虚组均与正常组比较:与正常组比较,肿瘤脾虚组 miR-3091-5p, miR-669n 等基因表达水平低;与正常组比较,肿瘤脾虚组 miR-3098-5p, miR-30a-5p 等基因表达水平高。说明“脾气虚”肿瘤组中肿瘤相关巨噬细胞更多 microRNA 基因表达水平出现上调和下调的异常变化,说明“脾气虚”可能加重肿瘤相关巨噬细胞 microRNA 基因表达,其 microRNA 基因表达可能促进了肿瘤的生长增殖,说明“脾气虚”加重了这种异常。与正常组比较,肿瘤黄芪组 miR-3098-5p, miR-30a-5p 等基因表达水平接近正常组;经加味黄

芪建中汤干预后,其基因表达水平接近正常组,说明加味黄芪建中汤调高或降低肿瘤脾虚组肿瘤相关巨噬细胞部分 microRNA 基因表达水平,解除“脾气虚”状态,并可能接近恢复正常巨噬细胞功能,可能促使极化的 M2 型肿瘤相关巨噬细胞转变为正常的有抑制肿瘤作用的 M1 巨噬细胞,从而发挥抑制肿瘤生长,增殖和转移。例如 microRNA-423-3p 在肿瘤脾虚组高,肿瘤黄芪组低,与正常组接近,说明加味黄芪建中汤抑制巨噬细胞内 microRNA-423-3p 的表达,miR-423-3p 表达的抑制可以减少肿瘤细胞增殖,克隆形成,细胞迁移和侵袭。在原发喉癌细胞株中过度的 miR-423-3p 表达促进肿瘤的增殖和血管生成,并进一步表明 miR-423-3p 表达抑制可能是有用的临床治疗^[1]。

现代医学研究也发现黄芪建中汤及其组成药物的提取物具有广泛的抗癌作用,刘文^[12]报告白芍总苷可延长荷瘤小鼠的存活时间,对小鼠 S180 腹水瘤及实体瘤的生长具有一定的抑制作用。张文^[13]发现大枣多糖浓度越高抑瘤率越高,肿瘤细胞生长周期时间越短。木文^[14]发现甘草制备总黄酮提取物及单体成分光甘草定对人肝癌 Bel-7402 细胞的增殖显示明显的抑制活性。孙文^[15]发现中药桂枝的水提取物是一种天然的基质金属蛋白酶抑制剂,促进大肠癌细胞凋亡,可以多药物、多靶点抑制大肠癌移植瘤的增殖和转移。刘文^[16]发现生姜醇提物能明显诱导荷瘤细胞凋亡,从而抑制肿瘤的生长,延长半数死亡时间。张文^[17]发现贝母素甲及贝母素乙对乳腺癌细胞具有显著抑制作用。吴文^[18]发现白花蛇舌草主要通过诱导肿瘤细胞凋亡、产生超氧化物等多种途径起到抗肿瘤的作用。

从实验结果分析,加味黄芪建中汤对肿瘤相关巨噬细胞部分 microRNA 基因表达水平具有双向调节作用,促进极化的 M2 型肿瘤相关巨噬细胞转变为正常的有抑制肿瘤作用的巨噬细胞,加味黄芪建中汤对荷瘤小鼠的免疫调节有着重要作用,可能通过调节 TAM 免疫重塑、TAM 表型转化,逆转免疫逃逸,改善肿瘤炎性微环境来控制肿瘤的生长及转移,改善肿瘤预后,为肿瘤治疗带来新的方法。

参考文献:

- [1] Mantovani A, Sozzani S, Locati M, et al. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes[J]. Trends Immunol,

- 2002, 23(11): 549 - 555.
- [2] Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(3): 787 - 795.
- [3] Coffelt SB, Tal AO, Scholz A, et al. Angiopoietin-2 regulates gene expression in TIE2-expressing monocytes and augments their inherent proangiogenic functions [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(13): 5270 - 5280.
- [4] Movahedi K, Laoui D, Gysemans C, et al. Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C (high) monocytes [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(14): 5728 - 5739.
- [5] Zijlmans HJ, Fleuren GJ, Baelde HJ, et al. The absence of CCL2 expression in cervical carcinoma is associated with increased survival and loss of heterozygosity at 17q11. 2. [J]. *J Pathol*, 2006, 208(4): 507 - 517.
- [6] Liao Q, Zeng Z, Guo X, et al. LPLUNC1 suppresses IL-6-induced nasopharyngeal carcinoma cell proliferation via inhibiting the Stat3 activation [J]. *Oncogene*, 2014, 33(16): 2098 - 2109.
- [7] Hao NB, Lü MH, Fan YH, et al. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors [J]. *Clin Dev Immunol*, 2012, 2012: 948098.
- [8] Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy [J]. *Immunity*, 2014, 41(1): 49 - 61.
- [9] Sica A, Larghi P, Mancino A, et al. Macrophage polarization in tumour progression [J]. *Semin Cancer Biol*, 2008, 18(5): 349 - 355.
- [10] Ma L, Weinberg RA. MicroRNAs in malignant progression [J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(5): 570 - 572.
- [11] Guan G, Zhang D, Zheng Y, et al. MicroRNA-423-3p promotes tumor progression via modulation of AdipoR2 in laryngeal carcinoma [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(9): 5683 - 5691.
- [12] 刘浩, 杨芬, 余美玲, 等. 白芍总苷对荷瘤小鼠化疗的增效减毒作用研究 [J]. *蚌埠医学院学报*, 2011, 36(9): 917 - 920.
- [13] 张仙土, 付承林, 陈灵斌, 等. 大枣多糖对 S-180 瘤细胞杀伤性实验研究 [J]. *中国现代医生*, 2012, 50(12): 20 - 21.
- [14] 木合布力·阿布力孜, 王永波, 徐方野, 等. 新疆光果甘草黄酮对人肝癌 Bel-7402 细胞增殖的抑制活性研究 [J]. *新疆医科大学学报*, 2013, 36(12): 1744 - 1748.
- [15] 孙鹏达. 桂枝抑制基质金属蛋白酶活性及抗大肠癌机制研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2010.
- [16] 刘辉, 袁健, 李勇, 等. 生姜醇提物诱导荷瘤鼠 HepA 细胞凋亡的研究 [J]. *广东医学*, 2011, 32(8): 969 - 970.
- [17] 张玉人, 林洪生, 张英. 贝母素甲、贝母素乙对 4T1 乳腺癌细胞炎性微环境的干预调节作用 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2014, 20(11): 1504 - 1506.
- [18] 吴逢选, 周郁鸿, 叶宝东. 白花蛇舌草抗肿瘤机制研究进展及其在血液病中的应用 [J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(1): 167 - 169.

(编辑:徐建平)

The Expression of Tumor Associated Macrophages MicroRNA in Lung Cancer Microenvironment Spleen Deficiency Syndrome and the Influence of Modified Huangqi Jianzhong Decoction

WEI Zitai^{1,2}, BAO Suzhen¹, LI Hengnan¹, LI Xiaodong¹

(1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2. Quzhou College of Technology, Quzhou 324000, China)

ABSTRACT: Objective To study the expression of tumor associated macrophages microRNA in lung cancer microenvironment spleen deficiency syndrome and the influence of modified Huangqi Jianzhong soup. **Methods** Using bitter and cold, diarrhea, weary, dieting methods of modeling in 50 mice, after the establishment of mouse spleen deficiency syndrome and Lewis lung cancer model, according to the experimental design of the processing of each group of mice, after modeling Huangqi Jianzhong decoction gavage, the mice were killed off the cervical spine, and tumor tissue was collected. Use MicroRNA gene chip for the detection of variations of normal mice macrophages and three groups of tumor tissue macrophage expression of MicroRNA gene. **Results** MicroRNA microarray detection of tumor associated macrophages of mice found, Spectrum expression of Spleen Qi deficiency group tumor associated macrophage microRNA (compared with the normal group) aberrant, unlike tumor group, has a unique MicroRNA changes, and modified Huangqi Jianzhong decoction can significantly bidirectional regulate "Spleen Qi Deficiency" abnormal changes in expression profiles of tumor-associated macrophages microRNA tissue to make it back to normal. **Conclusion** The modified Huangqi Jianzhong decoction can make "Spleen Qi Deficiency" microRNA back to normal.

KEY WORDS: Spleen Qi deficiency; modified Huangqi Jianzhong decoction; microenvironment; tumor-associated macrophages microRNA