

解毒三根汤干预肿瘤相关成纤维细胞及抑制结肠癌侵袭转移的实验研究

阮善明¹ 沈敏鹤¹ 林 红² 郑丽萍² 王 益² 李梦婷²

摘要 **目的** 观察解毒三根汤(虎杖根、水杨梅根、藤梨根)对结肠癌 CT-26 细胞的迁移能力及对肿瘤相关成纤维细胞(CAFs)转化生长因子 β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP-9)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)的影响。**方法** BALB/c 小鼠皮下接种 CT-26 结肠癌细胞(1.2×10^6 mL);随机分为 3 组:正常对照组,模型组,解毒三根汤组。Transwell 观察 3 组血清对 CT-26 细胞迁移力的影响,ELISA 法检测 3 组 CAFs 上清液中 TGF- β_1 、MMP-9 的表达量,实时荧光定量 PCR 检测各组 CAFs 中 α -SMA、TGF- β_1 mRNA 表达量。**结果** 解毒三根汤组透膜结肠癌 CT-26 细胞数量较模型组明显减少,差异有统计学意义($P < 0.01$);24 h 及 48 h 解毒三根汤组刺激的 CAFs 上清液中 TGF- β_1 、MMP-9 的表达量较模型组降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);解毒三根汤组 α -SMA、TGF- β_1 mRNA 表达量较模型组明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 解毒三根汤降低 CAFs 上清液中 TGF- β_1 、MMP-9 的表达量,降低 CAFs 中 α -SMA mRNA、TGF- β_1 mRNA 的表达量,可能是其抑制肿瘤细胞迁移侵袭的机制。

关键词 清热解毒法;虎杖根;水杨梅根;藤梨根;CT-26 结肠癌细胞;迁移

Jiedu Sangen Decoction Intervened Carcinoma-Associated Fibroblasts and Inhibited Migration and Invasion of Colon Cancer: an Experimental Research RUAN Shan-ming¹, SHEN Min-he¹, LIN Hong², ZHENG Li-ping², WANG Yi², and LI Meng-ting² 1 Department of Tumor, First Affiliated Hospital, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou (310006), China; 2 Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou (310006), China

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Jiedu Sangen Decoction (JSD, consisting of *Polygonum cuspidatum*, *Geum Japonicum* Thunb., *Radix Actinidiae* Chinensis) on the migration capability of colon cancer CT-26 cells were observed, and on expressions of carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) such as transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1), matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), and α -smooth muscle actin (α -SMA). **Methods** The BALB/C mice were subcutaneously inoculated with colon cancer CT-26 cells (1.2×10^6 mL) and then randomly divided into 3 groups, i.e., the normal control group, the model group, the JSD treated group. The effects of three different serums on the migration ability of colon cancer CT-26 cells were observed using Transwell. The expression quantities of TGF- β_1 and MMP-9 in the supernatant of CAFs were detected using ELISA. The mRNA expression quantities of TGF- β_1 and α -SMA in CAFs were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** The number of semi-permeable film cells in the JSD treated group significantly decreased, when compared with the model group, showing statistical significance ($P < 0.01$). Compared with the model group, the expressions of TGF- β_1 and MMP-9 in the supernatant of CAFs decreased in the JSD treated group at 24 and 48 h, showing statistical difference ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, the mRNA expressions of TGF- β_1 and α -SMA in the JSD treated group obviously decreased, showing statistical difference ($P < 0.01$). **Conclusion** JSD could decrease expressions of TGF- β_1 and MMP-9 in the supernatant of CAFs, lower mRNA expressions of α -SMA and TGF- β_1 , which might be possible mechanisms for

基金项目:国家公益性行业科研专项基金项目(No. 200807018);浙江省教育厅科研项目(No. Y201016272);浙江省中医药优秀青年人才基金计划项目(No. 2013ZQ011)

作者单位:1. 浙江中医药大学附属第一医院肿瘤科(杭州 310006);2. 浙江中医药大学第一临床医学院(杭州 310006)

通讯作者:沈敏鹤, Tel: 13758186666, E-mail: Smh3288@yahoo.com.cn

DOI: 10. 7661/CJIM. 2013. 09. 1242

inhibiting the migration and invasion of tumor cells.

KEYWORDS heat clearing and detoxication method; *Polygonum cuspidatum*; *Geum Japonicum* Thunb; *Radix Actinidiae* Chinensis; colon cancer CT-26 cell; migration

解毒三根汤是浙江省中医院肿瘤科 20 世纪 70 年代根据清热解毒法研制的治疗消化道恶性肿瘤的有效验方,由水杨梅根、虎杖根、藤梨根 3 味产自浙江的中药组成。为探求其药理作用及机制,拟从结肠癌 CT-26 细胞迁移能力及肿瘤微环境中肿瘤相关成纤维细胞(CAFs)上清液中转化生长因子 β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 的表达情况及 CAFs 中 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)、TGF- β_1 mRNA 的表达量等评价清热解毒中药(水杨梅根、虎杖根、藤梨根)对结肠癌 CT-26 细胞迁移侵袭能力的影响及其可能机制,现将结果报告如下。

材料与方法

1 细胞株 鼠源性结肠癌细胞株(CT-26),小鼠成纤维细胞株(L929)由浙江中医药大学,均由中国科学院细胞库购买。

2 动物 健康清洁级 BALB/c 小鼠,150 只,体重(20 ± 3) g,6~8 周龄,雄性。购自浙江中医药大学实验动物中心提供。

3 药物 解毒三根汤(藤梨根 30 g 水杨梅根 30 g 虎杖根 30 g),购自浙江省中医院中药房,每毫升含生药 1.2 g。藤梨根:产地浙江临安,批号:20101117;水杨梅根:产地浙江临安,批号:20101210;虎杖根:产地浙江临安,批号:20090302。

药物制备:将药材加 8~10 倍纯水浸泡 30 min,藤梨根、水杨梅根、虎杖根同煎,武火煎开后,再文火煎 30 min。两煎将剩余药渣再加入 3~5 倍纯水再次煎 25 min。将 2 次煎的药汁浓缩成浓度为含生药 1.2 g/mL,分装灭菌,备用。

4 主要试剂 RPMI Medium 1640:GIBCO 公司;胎牛血清(FBS):GIBCO 公司;0.25%胰酶溶液:杭州吉诺生物医药技术有限公司;PBS:杭州科易生物技术有限公司;DMSO:无锡海硕生物有限公司;小鼠 MMP-9 的 ELISA 试剂盒:购自杭州达文生物科技有限公司,R&D 公司进口分装;小鼠 TGF- β_1 的 ELISA 试剂盒:购自杭州达文生物科技有限公司,R&D 公司进口分装;Total RNA 提取试剂盒:宝生物工程(大连)有限公司;PCR 逆转录试剂:宝生物工程(大连)有限公司;基因表达水平差异检测(real-time PCR):

SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Perfect Real Time, TaKaRa 公司,Catalog No. DRR041A)。

5 主要仪器 超低温冰箱:MDF-328E,日本 SANYO 公司;二氧化碳培养箱:5410-220 precision scienetific;超净工作台:BCM-1000A,苏州安泰空气技术有限公司;台式离心机:LDZ 5-2,北京京立离心机有限公司;电热恒温水槽:DK-450 B 型,上海森信实验仪器有限公司;倒置式生物显微镜:ZX70-S8F,日本 Olympus 公司;多功能酶标仪:Thermo,3001-1249;紫外分光光度计:Eppendorf 公司;PCR 基因扩增仪:美国 Bio-Rad 公司;iQ[™]5 多重实时荧光定量 PCR 仪:美国 Bio-Rad 公司。

6 方法

6.1 细胞培养液及相关缓冲液配制方法

6.1.1 RPMI-1640 培养基 RPMI-1640 干粉,10.4 g;NaHCO₃,2.0 g;双蒸水,1 000 mL。充分溶解后,用 CO₂ 调节 pH 至 7.4 左右(0.45 ± 0.22) μ m 孔径过滤器过滤除菌,置于 4℃ 冰箱中,用前加胎牛血清至终浓度 10%,加双抗使其浓度为 100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素,4℃ 保存。

6.1.2 细胞消化液 EDTA 0.2 g,NaCl 8.0 g,Na₂HPO₄ · 12H₂O 0.184 g,KH₂PO₄ 0.2 g,PBS 缓冲液(pH 7.2~7.4):NaCl 37mmol/L,KCl 2.7mmol/L,Na₂HPO₄ 4.3 mmol/L,KH₂PO₄ 1.4 mmol/L。

6.1.3 1%结晶紫溶液的配制 称取 5 g 结晶紫粉剂,溶于 100 mL 甲醇中,配制成 5%浓度的结晶紫溶液,用时再用 PBS 溶液稀释成为 1%浓度的结晶紫溶液。

6.2 条件培养基的收集方法 将 CT-26 细胞培养于 100 mL 培养瓶中,待 70%~80%融合时更换 7 mL 新鲜培养基继续培养 24 h 后收集,1 300 r/min 离心 10 min 以去除细胞及碎屑,并用 0.22 μ m 孔径的滤器进行过滤,即用或冻存与 -80℃ 中备用。使用时与新鲜培养基以 1:1 的比例混匀使用,保证细胞有足够的营养供应。

7 动物造模及给药方法 健康 BALB/c 小鼠 150 只,随机分成 3 组:正常对照组、模型组、解毒三根汤组。分笼饲养,将小鼠适应性饲养 1 周,正常饮食。除正常对照组外,模型组及解毒三根汤组均先建立结肠癌模型,取小鼠 CT-26 结肠癌细胞株复苏后培养传

代,收集对数生长期的细胞,以生理盐水调整细胞浓度至 $6 \times 10^6/\text{mL}$,以每只 0.2 mL 接种于小鼠右侧腋下皮下。造模 7 天后解毒三根汤组按解毒三根汤拟定剂量水煎剂(浓度 1.2 g/mL,剂量 0.4 mL/20 g)定时灌胃[拟定剂量根据体表面积法,以人的每日剂量(藤梨根 30 g 水杨梅根 30 g 虎杖根 30 g)折算成小鼠的剂量,小鼠剂量 = 人的剂量(mg/kg) × 人的平均体重 × 0.0026/20 g,20 g 为小鼠平均体重,0.0026 为人和动物体表面积折算系数^[1],然后以标准剂量的 0.5、1.0、1.5 倍分高、中、低浓度进行梯度预实验,结果显示中浓度最佳],每天 1 次,连续 10 天,模型组及正常对照组予生理盐水,剂量 0.4 mL/20 g,每天 1 次,连续 10 天。各组小鼠末次灌胃(禁食不禁水 12 h)4 h,眼球取血,3 000 r/min 离心 15 min 后,用移液枪吸取上清血清,56 ℃ 水浴箱灭活 30 min,0.2 μm 微孔滤膜过滤除菌,置于 -20 ℃ 保存备用。

8 CT-26 细胞的培养 将 CT-26 细胞用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素 RPMI-1640 培养基,置 37 ℃、5% CO_2 的培养箱内静置培养,取对数生长期的细胞待用。

9 肿瘤相关成纤维细胞的建立和培养 将 L929 细胞用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素 RPMI-1640 培养基,置 37 ℃、5% CO_2 的培养箱内静置培养,取对数生长期的细胞待用。取对数生长期的 L929 细胞,以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 培养于 6 孔板的每孔中,用条件培养基与新鲜培养基以 1:1 的比例混匀使用,每隔 1 天换液 1 次,连续培养 72 h。3 组细胞培养 72 h 后弃去原有培养基,分别加入含 10% 正常对照组血清、模型组血清及含解毒三根汤组血清的 RPMI 1640 培养液培养 48 h。

10 观察指标及检测方法

10.1 Transwell 观察各组 CT-26 细胞的迁移运动 于 24 孔培养板中放入细胞侵袭小室 Transwell (装有聚碳酸酯微孔膜,孔径 8 μm ,美国 Costar 公司),在小室的上层加无血清 RPMI 1640 的细胞悬液 $2 \times 10^4/300 \mu\text{L}$,小室下层加 600 μL 含 10% FBS 的 1640 培养液,37 ℃、5% CO_2 培养箱中静置培养 24 h。24 h 后,取出 Transwell 小室,用棉签轻轻擦去小室上面的细胞,PBS 轻轻地洗 1 遍,直接浸入 1% 结晶紫液染色 15 min,取出晾干,拍照计数。随机计数 8 个视野,以确定迁移细胞数量,对比分析评价其迁移能力。

10.2 ELISA 法检测各组 CAFs 上清液中 $\text{TGF-}\beta_1$ 、MMP-9 表达量 根据 $\text{TGF-}\beta_1$ 试剂盒、MMP-9 试剂盒说明书操作。在铺板时严格进行细胞

计数,吹打均匀,加量一致来避免误差。

10.3 RT-PCR 检测各组 CAFs 中 $\alpha\text{-SMA}$ 、 $\text{TGF-}\beta_1$ mRNA 表达量 用离心吸附柱法提取给血清处理后第 48 h 后各组细胞的总 mRNA,进行浓度、纯度和完整性的检测后,按照逆转录试剂盒说明书将 mRNA 逆转录为 cDNA,以荧光定量 RT-PCR 对 p53 mRNA 水平进行检测。引物设计:采用 Primer Premier 6.0 和 Beacon designer 软件进行荧光引物的设计,然后由上海生物工程有限公司负责合成。引物序列: $\alpha\text{-SMA}$ (NM_007392.2):上游 5'-GCAC-CCAGCACCATGAAGATCAAG-3',下游 5'-GAAG-GTAGACAGCGAAGCCAGGAT-3'。 $\text{TGF-}\beta_1$ (NM_011577):上游 5'-CTCCCGTGGCTTCTAGTGCTG-3',下游 5'-GGCTTCGATGCGCTTCCGTTTCA-3'。反应条件:反转录:42 ℃ 5 min,95 ℃ 10 s;PCR 反应:95 ℃,5 s;61 ℃,30 s(退火),45 个循环;熔点曲线分析 50 ℃ ~ 95 ℃。

11 统计学方法 用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 Transwell 观察各组 CT-26 细胞的迁移运动 (表 1,图 1) 与正常对照组比较,模型组透膜结肠癌

表 1 各组血清 CT-26 透膜细胞数量比较(个, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	CT-26 细胞数量
正常对照	10	284.600 ± 28.679
模型	10	530.600 ± 33.548 *
解毒三根汤	10	81.600 ± 15.346 Δ

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

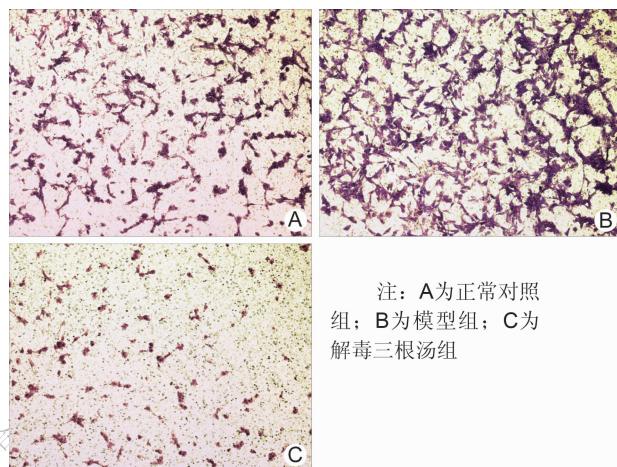


图 1 各组 CT-26 透膜细胞示意图 (结晶紫液染色, $\times 10$)

CT-26 细胞数量增多($P < 0.01$)；解毒三根汤组的透膜结肠癌 CT-26 细胞数量较模型组明显减少,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2 各组 CAFs 上清液中 TGF- β_1 表达量比较(表 2) 与正常对照组比较,模型组 24、48 h TGF- β_1 的表达量均明显上升($P < 0.01$)；解毒三根汤组刺激 24、48 h CAFs 上清液中 TGF- β_1 的表达量较模型组均降低,差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$)。

表 2 各组 CAFs 上清液中 TGF- β_1 表达量比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	TGF- β_1	
		24 h	48 h
正常对照	10	150.533 $\pm$ 4.930	152.950 $\pm$ 3.891
模型	10	170.183 $\pm$ 3.309 *	180.483 $\pm$ 4.375 *
解毒三根汤	10	160.000 $\pm$ 5.062 Δ	163.917 $\pm$ 3.620 $\Delta\Delta$

注：与正常对照组同期比较, * $P < 0.01$ ；与模型组同期比较, $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$

3 各组 CAFs 上清液中 MMP-9 的表达量比较(表 3) 与正常对照组比较,模型组 24、48 h CAFs 上清液中 MMP-9 的表达量均上升($P < 0.01$)；而解毒三根汤组刺激 24、48 h CAFs 上清液中 MMP-9 的表达量较模型组均降低,差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$)。

表 3 各组 CAFs 上清液中 MMP-9 表达量比较 (ng/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	MMP-9	
		24 h	48 h
正常对照	10	1.142 $\pm$ 0.012	1.163 $\pm$ 0.019
模型	10	1.197 $\pm$ 0.018 *	1.303 $\pm$ 0.372 *
解毒三根汤	10	1.168 $\pm$ 0.023 Δ	1.195 $\pm$ 0.023 $\Delta\Delta$

注：与正常对照组同期比较, * $P < 0.01$ ；与模型组同期比较, $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$

4 各组 CAFs 中 α -SMA、TGF- β_1 mRNA 表达量比较(表 4) 与正常对照组比较,模型组 α -SMA、TGF- β_1 mRNA 的表达量明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,解毒三根汤组可明显降低 α -SMA、TGF- β_1 mRNA 的表达量,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 4 各组 CAFs 中 α -SMA、TGF- β_1 mRNA 表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	α -SMA mRNA	TGF- β_1 mRNA
正常对照	10	1.729 $\pm$ 0.294	0.214 $\pm$ 0.045
模型	10	4.579 $\pm$ 0.159 *	1.708 $\pm$ 0.143 *
解毒三根汤	10	2.516 $\pm$ 0.258 Δ	0.838 $\pm$ 0.057 Δ

注：与正常对照组比较, * $P < 0.01$ ；与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

讨 论

肿瘤实质-间质相互作用涉及多种细胞因子、信号通路及细胞组份,它们之间形成一个错综复杂的信号网络,TGF- β 是较经典的信号通路。TGF- β_1 可促进微环境中成纤维细胞的趋化和活化,激活免疫细胞与基质上皮细胞的对话,促进上皮-间质转型(Epithelial-to-Mesenchymal Transition, EMT),并能诱导血管内皮生长因子(VEGF)、金属蛋白酶 MMP-2 和 MMP-9 的表达,负调控金属蛋白酶抑制因子,促进血管形成,最终导致肿瘤微环境改变,使其有利于肿瘤的浸润转移^[2]。Fries MA 等^[3]利用小干扰 RNA 技术干扰 TGF- β_1 合成,可阻止 LNT-229 胶质瘤细胞周围免疫细胞 NKG2D 表达的下调,明显增强 MHC I 类链相关蛋白 A(MICA)表达,从而提高 CD $_8^+$ T 细胞和 NK 细胞的杀伤能力,降低了肿瘤侵袭和迁移能力。

肿瘤间质重塑是肿瘤发生和发展过程中的一个重要改变,而上皮-间质的相互作用在上皮性肿瘤的浸润和转移过程中起着重要的作用, α -SMA 作为间质细胞表型转化的指标,是肌纤维母细胞的细胞表型可靠标志蛋白。SMA(+)肌纤维母细胞能够分泌多种可溶性生长因子(如转化生长因子 TGF、肝细胞生长因子 HGF 等),参与合成降解细胞外基质的蛋白酶类(如尿激酶、基质金属蛋白酶等),体外实验还证实其能够阻碍免疫细胞与肿瘤细胞之间的信号传递,导致肿瘤细胞逃避宿主的免疫监视而浸润进展^[5]。另有研究发现,胃癌 III ~ IV 期与 I ~ II 期相比,有淋巴结转移组与无淋巴结转移组相比,SMA 强阳性率均为前者高于后者,提示随着胃癌病程的进展,肿瘤相关纤维母细胞 SMA 的表达有增加的趋势,从而促进肿瘤侵袭^[6]。Lewis MP 等^[7]从细胞水平上进一步证实了肿瘤来源的 TGF- β_1 可诱导肌纤维母细胞形成。

研究发现,MMPs 可以直接降解细胞外基质,促进肿瘤细胞的浸润和转移。有研究显示,MMP-9 也可以通过释放可溶性的 Kit 配体,募集骨髓来源的干细胞和祖细胞,而这些表达 c-Kit 的祖细胞会促使转移微环境形成^[8]。另有研究发现,肿瘤细胞移植于 MMP-9 缺失小鼠经辐射没有血管生成的组织中,发现这些组织中没有血管形成。然而,当把 CD11b-骨髓细胞再移植于 MMP-9 缺失小鼠后,这些组织中就有血管形成^[9]。同时,MMP-9 可通过区室作用与细胞表面的 CD44 链对接水解非活性 TGF- β 而激活 TGF- β 。另一方面,MMP-2、MMP-9 及 MMP-14 还能间接地调节 TGF- β 的生物活性,它们可剪切 ECM 组分中

TGF- β 相连蛋白 1 (LTBP-1), 从而使 TGF- β 从 ECM 相连部位释放出来^[10], 促进肿瘤的浸润和转移。

本实验所用清热解毒法的解毒三根汤剂(水杨梅根、虎杖根、藤梨根组成), 藤梨根甘、咸寒、微涩。能祛风除湿、消痈医疮, 有抗癌作用, 尤对胃肠道癌肿疗效较佳。现代研究表明, 藤梨根通过下调细胞周期调控的调节因子 Cyclin E 和上调抑癌基因 TP53 的表达, 抑制细胞恶性增殖, 并通过上调肿瘤坏死因子、TRAILR2 基因, 下调生长因子受体 CerB2 基因的表达, 促进细胞凋亡和分化, 同时能下调 uPA, uPAR, FGFR2 等基因的表达, 提示对肿瘤的新生血管有抑制作用^[11]。另有研究证实, 藤梨根乙酸乙酯提取物在体外对肺癌细胞有较强的抑制作用, 且呈现出时间与剂量依赖性, 抗肺癌作用与抑制肺癌细胞 DNA 合成、下调 Ki-67 抗原表达强度、降低癌细胞增殖活性有关^[12]。

中药虎杖性微寒、味微苦、涩, 具祛风利湿、散瘀定痛、止咳化痰等功效。通过 3_H-TdR 掺入法药敏试验进行虎杖提取物及含药血清在体外抗 HepG2 肿瘤细胞的实验研究显示虎杖提取物对 HepG2 细胞有很好的抑制作用, 其抑制率随着药物浓度增加而相应增高^[13]。白藜芦醇不仅能特异性的抑制人肝癌细胞 HepG2、大鼠乳腺癌细胞 SHZ-888 的生长, 而且还首次观察到它对乳腺癌细胞 MCF-7 的阿霉素耐药株 MCF-7/ADM(耐药指数达 140 倍) 的生长起到较强的抑制作用^[14]。

中药水杨梅根为茜草科落叶灌木植物水杨梅的根, 具有清热解毒、消肿止痛、利尿的功效。水杨梅醇提物对白血病和宫颈癌细胞有一定抑制作用^[15], 另有研究揭示水杨梅根抗直肠癌 LS174T 细胞的有效部位可能在乙酸乙酯及正丁醇部位, 其中乙酸乙酯提取物是最主要的活性部位^[16]。

本实验结果肯定了解毒三根汤含药血清能明显抑制 CT-26 结肠癌细胞的迁移能力, 同时从微环境中 CAFs 入手, 发现解毒三根汤含药血清能明显下调 CAFs 上清液中 TGF- β_1 、MMP-9 表达量及 α -SMA、TGF- β_1 mRNA 的表达, 证实解毒三根汤可通过肿瘤微环境的干预来抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭能力。

参 考 文 献

- [1] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 1698.
- [2] Stover DG, Bieri B, Moses HL. A delicate balance: TGF-beta and the tumor microenvironment [J]. J Cell Biochem, 2007, 101(4): 851-861.
- [3] Friese MA, Wischhusen J, Wick W, et al. RNA interference targeting transforming growth factor-beta

enhances NKG2D-mediated antglioma immune response, inhibits glioma cell migration and invasiveness, and abrogates tumorigenicity *in vivo* [J]. Cancer Res, 2004, 64(20): 7596-7603.

- [4] 肖光, 熊小亮, 罗达亚, 等. 非小细胞肺癌中 TGF- β_1 与肿瘤相关纤维母细胞 α -SMA 及 CD34 表达的相关性和意义[J]. 广东医学, 2011, 32(14): 1866-1869.
- [5] Desmouliere A, Guyot C, Gabbiani G. The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior [J]. Int Dev Biol, 2004, 48(5-6): 509-517.
- [6] 王瑞芬, 王正彩, 王健, 等. 胃癌间质中肿瘤相关纤维母细胞 CD34 和 SMA 的表达及意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2007, 23(4): 412-415.
- [7] Lewis MP, Lygoe KA, Nystrom ML, et al. Tumor derived TGF-beta₁ modulates myofibroblast differentiation and promotes HGF/SF dependent invasion of squamous carcinoma cells [J]. Br J Cancer, 2004, 90(4): 822-832.
- [8] Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche [J]. Nature, 2005, 438(7069): 820-827.
- [9] Ahn GO, Brown JM. Matrix metalloproteinase-9 is required for tumor vasculogenesis but not for angiogenesis: role of bone marrow-derived myelomonocytic cells [J]. Cancer Cell, 2008, 13(3): 193-205.
- [10] Tatti O, Vehvilainen P, Lehti K, et al. MT1-MMP releases latent TGF-beta₁ from endothelial cell extracellular matrix via proteolytic processing of LTBP-1 [J]. Exp Cell Res, 2008, 314(13): 2501-2514.
- [11] 李昊, 杨慧萍, 鲁小青. 应用基因芯片研究藤梨根对胃癌细胞的作用[J]. 同济大学学报, 2010, 31(1): 45-52.
- [12] 杜庆聪, 裴艳涛, 杨国涛, 等. 藤梨根乙酸乙酯提取物对肺癌 A549 细胞增殖的影响[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(21): 4180-4183.
- [13] 戴关海, 杨锋, 童晔玲, 等. 虎杖提取物抗人肝癌细胞株 HepG-2 作用的实验研究 [J]. 中国中医药科技, 2009, 16(5): 376-377.
- [14] 冯磊, 张莲芬, 严婷, 等. 中药虎杖中抗癌活性物质研究[J]. 中药材, 2006, 29(7): 689-691.
- [15] 白雪, 林晨, 李药兰, 等. 水杨梅和水团花提取物体外抑菌活性的实验研究 [J]. 中草药, 2008, 39(10): 1532-1535.
- [16] 叶勇, 涂先琴, 宋兴文, 等. 水杨梅根提取物的体外抗肿瘤活性 [J]. 浙江中医药大学学报, 2007, 31(3): 372-473.

(收稿: 2012-08-31 修回: 2012-12-10)