

DOI 10.19656/j.cnki.1002-2406.20231106

# 健脾补肾法对人结直肠癌裸鼠 VEGF - C、 VEGFR - 3、E - cadherin、Vimentin 表达的影响

叶鑫<sup>1</sup>, 王梦涵<sup>1</sup>, 袁婉婧<sup>1</sup>, 胡凡<sup>1</sup>, 曾宏亮<sup>2</sup>, 谢彪<sup>1</sup>✉

(1. 湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙 410005;

2. 湖南省中医药研究院, 湖南 长沙 410031)

**【摘要】**目的:探讨健脾补肾法对人结直肠癌裸鼠血管内皮生长因子C(VEGF - C)、血管内皮生长因子受体3(VEGFR - 3)、E黏钙蛋白(E - cadherin)、波形纤维蛋白(Vimentin)的影响。方法:16只裸鼠接种人结直肠癌细胞株HCT116构建结直肠癌移植瘤模型,随机分为对照组和实验组,对照组给予生理盐水灌胃,实验组给予健脾补肾中药复方灌胃,两组均隔天给药1次,持续14 d。给药结束后,脱颈处死后剥离瘤体,免疫组化检测肿瘤组织中VEGF - C、VEGFR - 3、E - cadherin、Vimentin的表达。结果:16只结直肠癌移植瘤模型裸鼠均构建成功,免疫组化结果显示:与对照组比较,实验组移植瘤组织中VEGF - C、VEGFR - 3、Vimentin的表达均明显下调( $P < 0.05$ ),E - cadherin的表达明显上调( $P < 0.05$ )。结论:健脾补肾法能下调人结直肠癌裸鼠中促进肿瘤淋巴管生成和转移的VEGF - C、VEGFR - 3表达及上皮-间质转化标志物Vimentin表达,同时上调E - cadherin表达,有抑制肿瘤细胞转移的作用。

**【关键词】**健脾补肾法;结直肠癌;VEGF - C;VEGFR - 3;E - cadherin;Vimentin

## 【引用格式】

叶鑫,王梦涵,袁婉婧,等.健脾补肾法对人结直肠癌裸鼠VEGF - C、VEGFR - 3、E - cadherin、Vimentin表达的影响[J].中医药信息,2023,40(11):39 - 42,52.

YE X, WANG M H, YUAN W J, et al. Effects of spleen fortifying and kidney tonifying method on VEGF - C, VEGFR - 3, E - cadherin and Vimentin in nude mice with human colorectal cancer[J]. Information on TCM, 2023, 40(11):39 - 42, 52.

结直肠癌是一种常见的消化道恶性肿瘤,其早期特异性症状不明显,发生和发展极其隐蔽,因此大部分结直肠癌被发现时已经是中晚期。此时,肿瘤细胞已转移至淋巴结或远处器官,预后差,治愈率低,是导致结直肠癌病死率居高不下的主要原因之一<sup>[1]</sup>。手术及长期放化疗依然是大多数结直肠癌患者的首选治疗方案,但其预后效果略有不足,尤其是针对转移性病变的患者。研究表明,转移性病变的患者五年生存率仅约12%,生存率是未转移患者的50%<sup>[2]</sup>。

中医药治疗强调治病求本,扶正祛邪,注重防治,临床常用健脾补肾之法,养先后天之本,扶正气以御邪,同时促进脾的运化功能和肾的气化功能,有助于津液的代谢和血液的化生,以祛瘀之法祛除“痰”“瘀”等结直肠癌病理产物,瘀血去则新血生,从而使人体的病理状态趋于正常。

上皮-间质转化(epithelial - mesenchymal transition, EMT)在肿瘤的发展和转移中起着不可忽视的作用<sup>[3]</sup>,而波形纤维蛋白(Vimentin)是EMT的标志蛋白,参与

**基金项目:**中医药防治肛肠疾病重点实验室基金资助(湘中医药函[2020]51号);长沙市杰出创新计划(kq1707012);湖南中医药大学校级科研基金与联合基金项目(2021XJJ067)

**第一作者简介:**叶鑫(1998 -),男,2022级中医外科学肛肠病学硕士研究生,主要研究方向:结直肠肿瘤的临床诊治。

**✉通信作者简介:**谢彪(1982 -),男,博士,外科学结直肠肿瘤博士后,主任医师,主要研究方向:结直肠肿瘤的临床诊治。

调控肿瘤细胞的黏附和转移,在多种上皮来源的恶性肿瘤中均显示高表达。E黏钙蛋白(E-cadherin)可以增强细胞黏附力,高表达时可以抑制肿瘤细胞浸润转移,是公认的抑癌因子,其表达缺失是EMT的发生标志<sup>[4-5]</sup>。

血管内皮生长因子C(VEGF-C)是近来发现的介导肿瘤淋巴管生成及淋巴结转移的重要因子,血管内皮生长因子受体3(VEGFR-3)是VEGF-C其中一个重要受体,其在人体各组织中均有表达,但在肿瘤发生时,VEGFR-3在许多肿瘤组织中处于过表达的状态<sup>[6-7]</sup>。

因此,本实验以裸鼠成瘤模型为研究对象,通过免疫组化法检测裸鼠瘤体组织中VEGF-C、VEGFR-3、Vimentin及E-cadherin的表达情况,探讨健脾补肾药对结直肠癌移植瘤组织的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

16只SPF级裸鼠,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,体质量18~20g,雌雄各半,饲养于湖南省中医药研究院中药研究所动物实验中心的独立通气笼盒内,温度24℃,湿度40%~50%,白昼交替。动物质量合格证:430727201101778068,许可证号:SCXK2019-0004。本次实验符合《实验动物管理条例》相关规定。

### 1.2 药物与试剂

健脾补肾中药复方组方:人参15g,黄芪20g,砂仁5g,白术15g,茯苓15g,陈皮6g,半夏9g,山药20g,女贞子10g,墨旱莲10g,菟丝子10g,枸杞子10g,鸡血藤10g,白花蛇舌草2g,三七3g,半枝莲15g,甘草5g;其配方颗粒购买于湖南中医药大学第二附属医院。VEGF-C、VEGFR-3抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号:A110188078、BB09192758);E-cadherin、Vimentin抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:00113481、00110734);人结直肠癌细胞株(中国科学院上海细胞库,HCT116)。

### 1.3 主要仪器

显微镜(奥林巴斯BX53);石蜡切片机(YB-8LF);轮转式切片机(RM2245);自动组织脱水机(HP300);生物组织摊烤片机(湖北省孝感市亚光医用电子技术有限公司YT-7F型);细胞培养基(DMEM)。

### 1.4 建模、分组及给药

取HCT116人结直肠癌细胞株150μL(约含细胞 $1 \times 10^7$ 个)接种于已自适应1周的裸鼠右腿内侧构建

结直肠癌移植瘤模型。在笼中饲养14d后,将16只建模后的裸鼠随机分为对照组和实验组两组。裸鼠建模成功后首次灌胃时间记为第1天。对照组灌胃0.9%氯化钠溶液0.4mL/d,实验组灌胃健脾补肾中药复方23.4g/kg,两组均隔天给药1次,连续14d。

### 1.5 取材

灌胃第15天脱颈处死裸鼠,剥离瘤体,眼科剪将其剪成两部分,一部分常规制作石蜡组织切片,另一部分放入-80℃冰箱冻存。

### 1.6 观察指标与方法

将包埋好的肿瘤组织经流水冲洗后用蒸馏水浸泡5min;切片置于柠檬酸钠缓冲液中煮沸15min、流水冲洗;而后浸泡于3%过氧化氢溶液20min、PBS冲洗三次;封闭灭活内源性过氧化物酶后分别加VEGF-C、VEGFR-3、E-cadherin、Vimentin等一抗(1:100体积比稀释),置入4℃冰箱过夜,室温复温后加二抗(1:500体积比稀释)室温放置30min、PBS冲洗3次;DAB显色、苏木精复染;脱水、透明、封片。本研究由病理科医师进行阅片。

VEGF-C、VEGFR-3、E-cadherin及Vimentin显示胞质及胞膜阳性(有黄色或棕褐色颗粒)。计算阳性细胞数比率,<5%的细胞阳性着色为0分;6%~25%的细胞阳性着色为1分;26%~50%的细胞阳性着色为2分;51%~75%的细胞阳性着色为3分;>75%的细胞阳性着色为4分。

### 1.7 统计学方法

采用SPSS 25.0软件进行统计分析,计量资料采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较符合正态分布采用t检验,不符合正态分布采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

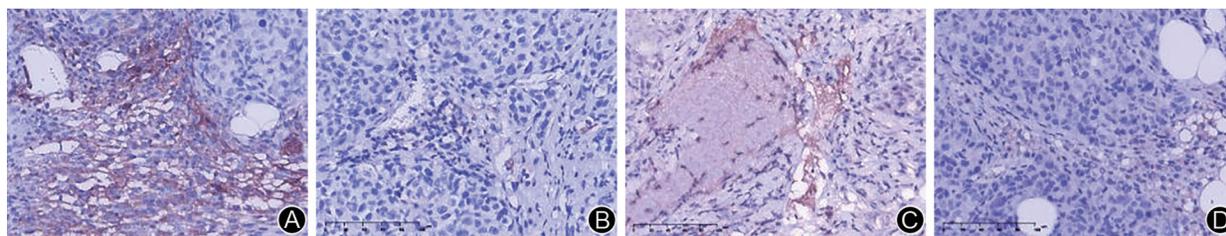
## 2 结果

### 2.1 两组裸鼠移植瘤组织中VEGF-C、VEGFR-3免疫组化表达情况比较

VEGF-C、VEGFR-3在对照组中均呈现高表达,经健脾补肾中药复方干预后,与对照组比较,实验组移植瘤组织中VEGF-C和VEGFR-3的表达明显下调,差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$ )。结果见图1、表1。

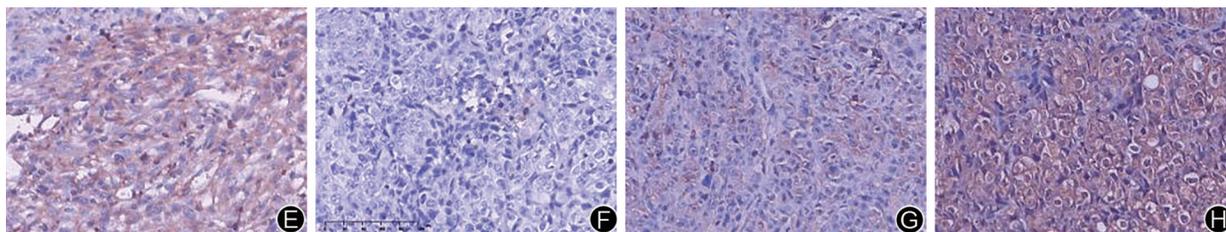
### 2.2 两组裸鼠移植瘤组织中Vimentin、E-cadherin免疫组化表达情况比较

Vimentin在对照组中呈现高表达,E-cadherin呈现低表达,经健脾补肾中药复方干预后,与对照组比较,实验组移植瘤组织中Vimentin表达明显下调,E-cadherin表达明显上调,差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$ )。结果见图2、表2。



注: A为对照组 VEGF - C 表达情况; B为实验组 VEGF - C 表达情况; C为对照组 VEGFR - 3 表达情况; D为实验组 VEGFR - 3 表达情况。

图1 两组肿瘤组织中 VEGF - C、VEGFR - 3 的表达 (× 40)



注: E为对照组 Vimentin 表达情况; F为实验组 Vimentin 表达情况; G为对照组 E - cadherin 表达情况; H为实验组 E - cadherin 表达情况。

图2 两组肿瘤组织中 Vimentin、E - cadherin 的表达 (× 40)

表1 两组移植瘤组织中 VEGF - C、VEGFR - 3 表达情况比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	VEGF - C	VEGFR - 3
对照组	8	2.00 ± 0.82	2.42 ± 0.53
实验组	8	0.14 ± 0.38*	0.28 ± 0.49*

注: 与对照组比较, \*P < 0.05。

表2 两组移植瘤组织中 Vimentin、E - cadherin 表达情况比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	Vimentin	E-cadherin
对照组	8	2.29 ± 0.76	1.43 ± 0.98
实验组	8	0.14 ± 0.38*	2.57 ± 0.53**

注: 与对照组比较, \*P < 0.05; 与对照组比较, \*\*P < 0.05。

### 3 讨论

健脾补肾法是通过应用六君子汤合二至丸加减解毒祛瘀类中药而实现, 前期研究已表明本法可明显抑制人结直肠癌移植瘤的增殖<sup>[8]</sup>。健脾补肾中药复方中人参健脾补气、益肾气助肾阳, 黄芪扶正祛邪、健脾益气, 二者合而为君; 茯苓、山药健脾补肾、益气养阴, 白术、茯苓健脾渗湿, 女贞子、墨旱莲益肾滋阴, 菟丝子、枸杞子补肾填精为臣; 气虚易滞, 砂仁化湿开胃以助行气, 陈皮理气健脾, 气为血之帅, 气虚则血瘀滞于内, 三七、鸡血藤活血化痰, 脾失运化, 痰瘀阻于内, 半夏燥湿化痰, 共为佐药; 再以清热解毒的白花蛇舌草、半枝莲, 健脾益气, 调和诸药的甘草为佐使。全方应用补气药、补阴药, 加以两味清热解毒药, 伍以活血、化痰、渗湿、理气药, 共奏健脾益气、补肾固本、活血行气、化痰解毒之功效。人参中的主要成分人参皂苷 Rb2 具有抑制结直肠癌细胞 EMT 的作用, 人参皂苷 Rb3 则能够抑制血

管生成起到抑癌作用<sup>[9-10]</sup>。甘草中的甘草黄酮能明显抑制转移性结直肠癌细胞 EMT<sup>[11]</sup>。本次实验研究结果表明健脾补肾法可能对人结直肠癌组织的转移具有抑制作用。

目前针对转移性结直肠癌的治疗主要采用靶向药物<sup>[12]</sup>, 其中代表便是表皮生长因子 (EGFR) 靶向药物及血管内皮生长因子靶向药物, 尽管该治疗方法显示了较好的治疗效果, 但是患者个体的耐药性及此类药物有严格的适用人群等依然是限制其应用的首要问题<sup>[13-14]</sup>。肿瘤发展的过程中, E - cadherin 的缺失抑或是 Vimentin 表达升高都能提示 EMT 的发生, 诸多研究显示, 结直肠癌的组织学分级、分化程度及临床分期与 E - cadherin 的低表达密切相关<sup>[15]</sup>, 而 Vimentin 在分化程度低的结直肠癌组织中表达明显高于中 - 高分化腺癌组织<sup>[16]</sup>, 因此作为 EMT 标志物的 E - cadherin 与 Vimentin 具有成为预测结直肠癌发生、发展的潜在新靶点的潜力。本次研究结果表明, 健脾补肾法可下调人结直肠癌裸鼠组织中 VEGF - C、VEGFR - 3、Vimentin 的表达同时上调 E - cadherin 的表达, 下一步或许可以通过研究健脾补肾法来进一步探索结直肠癌的转移, 发现新的靶点。

有研究表明, VEGFR - 3 与 VEGF - C 特异性结合后, 可降低内皮细胞间黏附力, 增加淋巴管通透性, 促进肿瘤细胞侵袭转移<sup>[17]</sup>, VEGF - C/VEGFR - 3 信号通路是肿瘤转移过程中促进肿瘤淋巴管生成和转移的重要信号传导途径<sup>[18]</sup>, 乳腺癌中 VEGF - C 是非 EMT 细胞转化为 EMT 细胞的重要介质<sup>[19]</sup>。因此, 可以推测运

用健脾补肾法在人结直肠癌裸鼠组织中可能通过抑制 VEGF - C/VEGFR - 3 信号通路的激活而降低 Vimentin 的表达或提高 E - cadherin 表达进而抑制 EMT 的发生, 达到抑制肿瘤转移的效果。

#### 4 结论

综上所述, 健脾补肾法通过下调人结直肠癌裸鼠组织 VEGF - C、VEGFR - 3、Vimentin 的表达同时上调 E - cadherin 的表达, 说明健脾补肾法能抑制肿瘤细胞的转移, 从而达到抗肿瘤的效果, 可能是通过抑制 EMT 转化发挥作用, 但其具体途径及作用机制仍需进一步研究。

#### 【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 carcinomas in 185 countries[J]. CA carcinoma J Clin, 2021, 71(3):209 - 249.
- [2] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Carcinoma statistics, 2019[J]. CA carcinoma J Clin, 2019, 69(1):7 - 34.
- [3] 吴建龙, 刘建伟, 刘海丽, 等. 错配修复蛋白与上皮间质转化标记物在大肠癌中的表达及相互关系[J]. 河北医学, 2019, 25(3): 610 - 614.
- [4] 刘碧霞. SERPINB5 促进结直肠癌侵袭转移的机制研究[D]. 南昌:南昌大学, 2022:2 - 30.
- [5] 杨琦, 孙正, 朱亦邈, 等. 黄芩 - 莪术配伍调控 EMT 对结肠癌 HT - 29 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(3):736 - 743.
- [6] 赵丽霞, 任成波, 马峰, 等. 肺癌组织 MTA1、VEGF - C 表达变化及与患者临床病理特征、预后关系[J]. 广东药科大学学报, 2022, 38(1):103 - 108.
- [7] 利斌, 王平, 熊健, 等. 非小细胞肺癌中 VEGF - C、VEGF - D、VEGFR - 3 表达与微淋巴管密度的关系[J]. 安徽医科大学学报, 2013, 48(8):933 - 937.

- [8] 王梦涵, 袁婉婧, 姚欣, 等. 健脾补肾中药方对结直肠癌裸鼠移植瘤模型 Klotho 及铜死亡相关蛋白的研究[J]. 湖南中医杂志, 2023, 39(3):184 - 187.
- [9] 顾艳宏, 姜争, 李健, 等. 结直肠癌靶向治疗中国专家共识[J]. 中华普通外科学文献(电子版), 2023, 17(1):1 - 8.
- [10] DAI G, Sun B, GONG T, et al. Ginsenoside Rb2 inhibits epithelial mesenchymal transition of colorectal cancer cells by suppressing TGF -  $\beta$ /Smad signaling[J]. Phytomedicine, 2019, 56:126 - 135.
- [11] TANG Y C, ZHANG Y, ZHOU J, et al. Ginsenoside Rg3 targets cancer stem cells and tumor angiogenesis to inhibit colorectal cancer progression in vivo[J]. Int J Oncol, 2018, 52(1):127 - 138.
- [12] MENG F C, LIN J K. Liquiritigenin Inhibits colorectal cancer proliferation, invasion, and epithelial - to - mesenchymal transition by decreasing expression of runt - related transcription factor 2[J]. Oncol Res, 2019, 27(2):139 - 146.
- [13] 丁志海. 靶向药物治疗转移性结肠癌的研究进展[J]. 医疗装备, 2018, 31(6):203 - 204.
- [14] 黄宝强. 药物治疗转移性结肠癌的最新研究进展[J]. 中国医药指南, 2013, 11(11):62 - 63.
- [15] 许欣, 姚冬颖, 赵振亚, 等. 大肠癌中上皮钙粘蛋白、 $\beta$  - catenin 和基质金属蛋白酶 - 9 的表达及其临床意义[J]. 中国老年学杂志, 2015, 13(7):3651 - 3652.
- [16] 申志华, 吴建龙, 刘海丽, 等. 上皮间质转化标记物在大肠癌中的表达及意义[J]. 承德医学院学报, 2018, 35(4):276 - 279.
- [17] 吴贻平, 粟占三. VEGF - C 和 VEGFR - 3 在大肠癌中的表达及意义[J]. 临床医学, 2010, 30(4):15 - 17.
- [18] 郭巍, 陈美霓, 贺晓龙, 等. 前列腺癌组织中 HIF - 1 $\alpha$  和 VEGF - C 及其受体 VEGFR - 3 的表达及意义[J]. 现代泌尿生殖肿瘤杂志, 2014, 6(4):231 - 234.
- [19] 孔德光. 乳腺癌 EMT 肿瘤细胞通过 VEGF - C 促进非 EMT 肿瘤细胞增殖和侵袭的研究[D]. 武汉:武汉大学, 2020:3 - 29.

(收稿日期:2023 - 04 - 23)

### Effects of Spleen Fortifying and Kidney Tonifying Method on VEGF - C, VEGFR - 3, E - cadherin and Vimentin in Nude Mice with Human Colorectal Cancer

YE Xin<sup>1</sup>, WANG Menghan<sup>1</sup>, YUAN Wanjing<sup>1</sup>, HU Fan<sup>1</sup>, ZENG Hongliang<sup>2</sup>, XIE Biao<sup>1✉</sup>

(1. The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410005, China;

2. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410031, China)

**【Abstract】** Objective: To explore the effect of spleen fortifying and kidney tonifying method on VEGF - C, VEGFR - 3, E - Cadherin, and Vimentin in nude mice with human colorectal cancer. Method: Sixteen nude mice were inoculated with human colorectal cancer cell line HCT116 to construct a colorectal cancer transplant tumor model, and then were randomly divided into control group and experimental group. The control group was given normal saline by gavage, while the experimental group was given by gavage a traditional Chinese medicine formula of fortifying the spleen and tonifying the kidney, once every other day for 14 days. After the administration, the mice were killed by neck dislocation, and the tumor bodies were dissected. The expressions of VEGF - C, VEGFR - 3, E - cadherin and Vimentin in tumor tissues were detected by

(下转第 52 页)