

# 半夏泻心汤含药血清对胃癌微环境中 BMSCs 生长增殖的影响

杨柏林<sup>1</sup>, 刘喜平<sup>1\*</sup>, 崔国宁<sup>1</sup>, 董俊刚<sup>1</sup>, 明海霞<sup>1</sup>, 辛宝<sup>2</sup>, 吴高峰<sup>1</sup>

(1. 甘肃中医药大学基础医学院, 兰州 730000; 2. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046)

**[摘要]** 目的:观察半夏泻心汤及不同配伍药组含药血清对胃癌微环境中骨髓间充质干细胞(BMSCs)生长增殖的影响,并探讨其作用机制。**方法:**设 BMSCs 常规培养为空白组;模型组采用 transwell 小室将人胃癌 BCG-823 细胞与大鼠 BMSCs 非接触共培养建立胃癌微环境;半夏泻心汤及不同配伍含药血清组(全方组、辛开组、苦降组、甘补组)在上室内加入体积浓度为 10% 的相应配伍药含药血清。倒置显微镜观察 BMSCs 细胞形态、噻唑蓝(MTT)比色法观察 BMSCs 的增殖率,流式细胞术(FCM)检测 BMSCs 的细胞周期,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测原癌基因(c-Myc)和端粒酶逆转录酶(TERT)蛋白的表达,实时荧光定量 PCR 检测 c-Myc 和 TERT mRNA 的表达。**结果:**全方组、辛开组、苦降组、甘补组含药血清在 4,5,6,7 d 对 BMSCs 的增殖有明显抑制作用,全方组明显优于甘补组( $P < 0.05$ );第 7 天的检测结果显示全方组、辛开组、苦降组、甘补组含药血清均可降低 c-Myc 和 TERT 表达水平,升高 G<sub>1</sub> 期细胞比例,降低 S 期细胞比例,全方组明显优于甘补组( $P < 0.05$ )。**结论:**半夏泻心汤及不同配伍药组含药血清可抑制胃癌微环境中 BMSCs 的异常增殖,半夏泻心汤全方为最佳配伍。

**[关键词]** 骨髓间充质干细胞;半夏泻心汤;胃癌微环境;细胞增殖;原癌基因;端粒酶逆转录酶

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)22-0097-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016220097

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160919.1350.054.html>

**[网络出版时间]** 2016-09-19 13:50

## Effect of Serum Containing Banxia Xiexin Tang on Growth and Proliferation of Bone Mesenchymal Stem Cells in Gastric Carcinoma Microenvironment

YANG Bo-lin<sup>1</sup>, LIU Xi-ping<sup>1\*</sup>, CUI Guo-ning<sup>1</sup>, DONG Jun-gang<sup>1</sup>, MING Hai-xia<sup>1</sup>, XIN Bao<sup>2</sup>, WU Gao-feng<sup>1</sup>

(1. College of Basic Medicine, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

2. Shanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of serum containing Banxia Xiexin Tang and its different combinations with other herbs on growth and proliferation of Bone Mesenchymal Stem Cells (BMSCs) in gastric carcinoma microenvironment. **Method:** To BMSCs were routinely cultured as blank group. In this study, a co-culture system of BMSCs and gastric carcinoma cell line BCG-823 was established by using transwell chamber as model group. Groups of serum containing of Banxia Xiexin Tang and its different combinations with other herbs (Quanfang group, Xinkai group, Kujiang group and Ganbu group) were added with the corresponding drug-containing serums at the concentration of 10%. The phase-contrast microscope was used to the morphology of BMSCs cell, methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) method was adopted to observe the proliferation rate of BMSCs, flow cytometry (FCM) was applied to test BMSCs cell cycle, c-Myc and expression of telomerase reverse transcriptase (TERT) protein were detected by Western blot, fluorescence Real-time PCR test was used to

**[收稿日期]** 20160201(004)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81260525);甘肃省属高校基本科研业务费专项资金项目(BH-2011-068)

**[第一作者]** 杨柏林,硕士,从事方剂的临床应用及作用机制研究,Tel:0931-8765409,E-mail:lxpd-257@163.com

**[通讯作者]** \*刘喜平,博士,教授,从事方剂的临床应用及作用机制研究,E-mail:lxpd-257@163.com

detect c-Myc and TERT mRNA expressions. **Result:** Quanfang group, Xinkai group, Kujiang group and Ganbu group medicated serum at 4, 5, 6, 7 d had a significant inhibitory effect on the proliferation of BMSCs, Quanfang group was superior to Ganbu group ( $P < 0.05$ ), the detection results at the 7<sup>th</sup> day show that Quanfang group, Xinkai group, Kujiang group and Ganbu group medicated serum can decrease c-Myc and TERT expressions, elevate G<sub>1</sub> phase cell proportion, and reduce the proportion of S phase cells, and Quanfang group was superior to Ganbu group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The serum containing Banxia Xiexin Tang and its different combinations with other herbs inhibit the abnormal proliferation of BMSCs in gastric carcinoma microenvironment, the overall prescription of Banxia Xiexin Tang shows the best compatibility.

[**Key words**] bone mesenchymal stem cell; Banxia Xiexin Tang; gastric carcinoma microenvironment; cell proliferation; c-Myc; telomerase reverse transcriptase (TERT)

骨髓间充质干细胞(BMSCs)良好的迁移性、肿瘤趋向性<sup>[1]</sup>及易于分离扩增和导入外源基因的特点,使其成为肿瘤生物治疗的首选载体,是胃癌治疗的全新思路与探索<sup>[2-3]</sup>。然而研究发现 BMSCs 本身,尤其在肿瘤微环境中可能恶性转化,具有成瘤风险<sup>[4-5]</sup>。如何有效预防 BMSCs 恶性转化,是值得探索的重要科学问题。半夏泻心汤是中医临床防治胃癌的常用方剂<sup>[6]</sup>。本课题组前期研究表明半夏泻心汤含药血清可诱导人胃癌细胞凋亡,抑制人胃癌细胞增殖<sup>[7-8]</sup>,对胃癌腹膜转移 GC9811-P 细胞生长亦有一定的抑制作用<sup>[9]</sup>,推测半夏泻心汤能作用于胃癌微环境,干预 BMSCs 的恶性转化。据此,本研究采用 transwell 小室将人胃癌 BGC-823 细胞与大鼠 BMSCs 共培养方式建立胃癌微环境中 BMSCs 的生长转化模型,观察半夏泻心汤及其配伍药对胃癌微环境中 BMSCs 生长增殖的影响。

## 1 材料

**1.1 动物及细胞** SPF 级 Wistar 大鼠 40 只,体重(130 ± 10)g,雌雄各半,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,合格证号 SCXK(京)2014-0004。人胃癌 BGC-823 细胞,由上海中科院细胞库提供,大鼠 BMSC 由重庆威斯腾生物科技有限公司提供,培养传代至第 3 代用于实验。

**1.2 药物与试剂** 半夏泻心汤(半夏、干姜、黄芩、黄连、人参、大枣、甘草)药材饮片由兰州复兴厚药材有限责任公司提供,经甘肃中医药大学药学院景明教授鉴定为正品。胎牛血清,DMEM/F12 培养基(Hyclone 公司,批号分别为 SH3002201B, SH3025601B);0.05%胰酶-EDTA(Gibco 公司,批号 25300054);RNA 提取试剂盒(北京百泰克公司,批号 20151024);噻唑蓝(MTT)试剂盒,兔抗人原癌基因(c-Myc)多克隆抗体,兔抗人端粒酶逆转录酶(TERT)多克隆抗体,兔抗人甘油醛-3-磷酸脱氢酶

(GAPDH)多克隆抗体,羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(Abcam 公司,批号分别为 20140165, ab39688, ab183105, ab37168, ab37168);聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(Roche 公司,批号 3010040001),ECL 增强化学发光检测试剂盒(Thermo 公司,批号 32209)。采用 Primer premier 5 软件进行引物设计和合成。c-Myc(100 bp):上游 5'-GCCCATTTGTC AACATGAGTTATG-3',下游 5'-GTTTGGTCCGCT CGTAGTTG-3';TERT(120 bp):上游 5'-TCAGG GTCTACGCCTGTCATC-3',下游 5'-GCCAGGCGAA ACTGAAAGG-3';β-肌动蛋白(β-actins)(150 bp):上游 5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3',下游 5'-TTTAATGTCACGCACGATTTC-3'。

**1.3 仪器** FACS Vantage SE 型流式细胞检测仪(美国 Becton Dickinson 公司),FTC2000 型荧光定量 PCR 仪(加拿大 Funglyn Biotech 公司),ChemiDoc MP 型数码凝胶图像处理系统(美国 Bio-Rad 公司),CK-40 型倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司),353097 型 transwell(美国 Costar 公司),MCO-15AC-SC 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(日本 Sanyo 公司),Varioskan LUX 型酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司)。

## 2 方法

**2.1 含药血清的制备** 依据原方配伍<sup>[10]</sup>,将半夏泻心汤分为 4 组:全方组(半夏 60 g,干姜 45 g,黄芩 45 g,黄连 15 g,人参 45 g,大枣 20 枚,甘草 45 g),辛开组(半夏 60 g,干姜 45 g),苦降组(黄芩 45 g,黄连 15 g),甘补组(人参 45 g,大枣 20 枚,甘草 45 g)。各组药物饮片浸泡 30 min,煎煮 2 次,每次 30 min,各组药液浓缩为含生药 2 g·mL<sup>-1</sup>。参考文献方法<sup>[11]</sup>,每组选 SPF 级 Wistar 大鼠 10 只,将各组药液分别连续灌胃 3 次,第 1,2 次间隔 1 d,第 2,3 次间隔 3 h,每次 7 mL·kg<sup>-1</sup>(相当于 60 kg 成人日服用量的 10 倍),第 3 次给药后 2 h 无菌条件下心脏采血。

静置 4 h,  $3\ 000\ r \cdot \min^{-1}$  离心 20 min, 分离血清,  $56\ ^\circ\text{C}$ , 30 min 水浴灭活,  $-20\ ^\circ\text{C}$  保存备用。

**2.2 分组及细胞共培养体系的建立** 实验分为空白组 (BMSCs 单独常规培养), 模型组 (BMSCs 与 BGC-823 细胞共培养), 半夏泻心汤全方及辛开、苦降、甘补组 (分别简称辛开组、苦降组、甘补组、全方组)。将第 3 代 BMSC 细胞调整密度为  $2 \times 10^5$  个/mL, 种植于 transwell 共培养系统的下室, 再将 transwell 的上室置于孔中, BGC-823 细胞以  $2 \times 10^5$  个/mL, 接种于上室内。模型组及各实验组采用具有耐高温聚酯薄 (PET) 膜的 transwell 悬挂式培养小室结合 6 孔板进行非接触式共培养, 各实验组在上室内加入体积浓度为 10% 的各实验组含药血清。分别培养 7 d 后终止培养, 收集细胞, 观察各组细胞的形态变化, 并进行其他相关检查。

**2.3 MTT 法检测 BMSCs 细胞增殖** 收集各组 BMSC 细胞消化成单细胞悬液, 调整密度为  $1 \times 10^4$  个/mL, 分别接种于 96 孔培养板, 每孔  $200\ \mu\text{L}$ , 同时加入  $5\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  MTT 溶液  $20\ \mu\text{L}$ , 将培养板在 5%  $\text{CO}_2$ ,  $37\ ^\circ\text{C}$  饱和湿度培养箱中内孵育 4 h, 加入二甲基亚砷 (DMSO)  $150\ \mu\text{L}$ , 低速震荡 10 min, 用酶标仪分别于第 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 d 测定吸光度  $A$ , 每组设 3 复孔。计算细胞增殖率。细胞增殖率 =  $(A_{\text{实验组/空白组}} - A_{\text{空白孔}}) / A_{\text{空白孔}} \times 100\%$ 。每个样品计数 3 次, 取平均值, 以时间为横坐标, 细胞增殖率为纵坐标, 绘制细胞增殖曲线。

**2.4 流式细胞术检测 BMSCs 细胞周期** 细胞培养与分组同 2.3 项, 加入体积浓度为 10% 的含药血清, 另设空白组, 各组细胞培养 7 d 后终止培养, 将 BMSC 消化后重悬细胞, 每管细胞样品中加入碘化丙啶染色液  $0.5\ \text{mL}$ ,  $37\ ^\circ\text{C}$  避光温育 30 min。冰浴避光存放, 24 h 内完成 FCM 检测。激发波长 488 nm 处检测红色荧光, 同时检测光散射情况, 分析细胞 DNA 含量和光散射分析, 计算  $G_1$ ,  $G_2$  期及 S 期细胞比例。实验重复 3 次。

**2.5 蛋白质免疫印迹法 (Western blot) 检测 c-Myc 和 TERT 蛋白表达** 细胞培养与分组同 2.3 项, 加入体积浓度为 10% 的含药血清, 另设空白组, 收集培养 7 d 后的细胞, 用 PBS 洗 2 遍, 裂解细胞,  $4\ ^\circ\text{C}$ ,  $12\ 000\ r \cdot \min^{-1}$  离心 5 min, 取上清液蛋白定量。取等量各组蛋白上样、电泳, 转膜至 PVDF 膜上, 清洗后封闭, 加入一抗 (1:1 000), 二抗 (1:5 000) 结合反应, 洗涤后,  $4\ ^\circ\text{C}$  温育 1.5 h, ECL 显色, 在凝胶图象处理系统中曝光检测, 分析目标条带/CAPDH 条带, 计算相对量。实

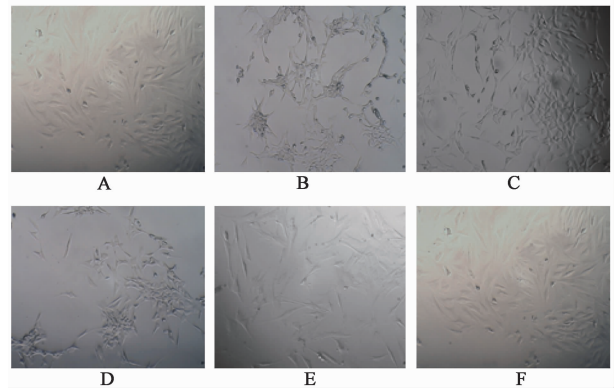
验重复 3 次。

**2.6 实时荧光定量 PCR 检测 c-Myc 和 TERT mRNA 表达** 细胞培养与分组同 2.3 项, 加入体积浓度为 10% 的含药血清, 另设空白组, 收集培养 7 d 后细胞, 提取总 RNA, 反转录成 cDNA; 采用 PCR 反应, 反应条件:  $94\ ^\circ\text{C}$  4 min,  $94\ ^\circ\text{C}$  20 s,  $60\ ^\circ\text{C}$  30 s,  $72\ ^\circ\text{C}$  30 s, 循环 35 次, 以  $\beta$ -actin 为内参, 分析产物表达相对定量, 结果以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示。

**2.7 统计学分析** 采用 SPSS 17.0 软件, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 计数资料采用  $\chi^2$  检验, 组间比较用配对样本  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 半夏泻心汤对 BMSCs 细胞形态学的影响** 空白组 BMSCs 呈短平长梭形, 有序均匀排列, 成纤维细胞样生长, 有明显的折光性。模型组细胞排列紊乱, 呈不规则型, 细胞间连接疏松, 细胞变细变长, 胞核变小, 呈团生长, 与人胃 BGC-823 癌细胞形态有相似之处。经含药血清干预后大部分细胞呈梭形, 偶见团状生长, 其中全方组和甘补组明显优于辛开组、苦降组。见图 1。



A. 空白组; B. 模型组; C. 辛开组; D. 苦降组; E. 甘补组; F. 全方组 (图 2 同)

图 1 半夏泻心汤对各组 BMSCs 细胞形态学的影响 (倒置显微镜,  $\times 100$ )

Fig. 1 Effect of Banxia Xiexin Tang on BMSCs morphology of each Group (under phase-contrast microscope,  $\times 100$ )

**3.2 半夏泻心汤对 BMSCs 增殖率的影响** 从第 2 天开始, 模型组相同时间点 BMSCs 增殖率明显高于空白组 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 半夏泻心汤及其配伍含药血清组 BMSCs 的增殖率均有降低, 其中全方组和甘补组在 4, 5, 6, 7 d 增殖率降低最为明显 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 全方组 BMSCs 的增殖率在 4, 5, 6, 7 d 明显低于甘补组 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

**3.3 半夏泻心汤对 BMSCs 细胞周期变化的影响** 与空白组比较, 模型组  $G_1$  期 BMSCs 细胞比例明显

降低 ( $P < 0.05$ ), S 期 BMSCs 细胞比例显著增加 ( $P < 0.01$ ),  $G_2/M$  期 BMSCs 细胞比例明显增加 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 全方组、辛开组、苦降组、甘补组均可增高  $G_1$  期 BMSCs 细胞比率 ( $P < 0.05$ ); 全方组、辛开组、苦降组均可降低 S 期

BMSCs 细胞比率 ( $P < 0.05$ ); 全方组及甘补组可降低  $G_2/M$  期 BMSCs 细胞比率 ( $P < 0.01$ )。全方组降低  $G_2/M$  期 BMSCs 细胞比率明显优于甘补组 ( $P < 0.05$ )。辛开组、苦降组对  $G_2/M$  期 BMSCs 细胞比率无明显干预作用。见表 2。

表 1 半夏泻心汤对各组 BMSCs 细胞增殖率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	%
空白	1.51 ± 1.20	32.23 ± 2.13	33.51 ± 1.37	38.51 ± 1.48	64.16 ± 2.86	78.15 ± 2.06	127.40 ± 0.45	
模型	2.12 ± 1.36	34.13 ± 2.08 <sup>1)</sup>	40.24 ± 2.46 <sup>2)</sup>	76.39 ± 2.40 <sup>2)</sup>	165.92 ± 0.04 <sup>2)</sup>	190.24 ± 1.87 <sup>2)</sup>	244.43 ± 0.09 <sup>2)</sup>	
辛开	1.72 ± 1.76	35.33 ± 2.18	30.00 ± 1.93 <sup>3)</sup>	73.34 ± 2.40	144.33 ± 1.43 <sup>3)</sup>	189.24 ± 2.02	239.06 ± 1.30 <sup>3)</sup>	
苦降	1.65 ± 1.28	34.45 ± 2.36	37.40 ± 2.70	75.12 ± 1.48	141.17 ± 1.57 <sup>3)</sup>	186.15 ± 1.78	221.48 ± 0.27 <sup>3)</sup>	
甘补	1.87 ± 1.62	33.56 ± 2.26	28.13 ± 1.57 <sup>4)</sup>	66.43 ± 1.38 <sup>3)</sup>	112.27 ± 2.33 <sup>4)</sup>	142.24 ± 1.91 <sup>3)</sup>	161.88 ± 1.49 <sup>4)</sup>	
全方	1.92 ± 1.10	36.08 ± 2.10	29.63 ± 0.64 <sup>3)</sup>	62.39 ± 2.40 <sup>4,5)</sup>	101.53 ± 1.42 <sup>4,5)</sup>	120.15 ± 1.21 <sup>4,5)</sup>	154.44 ± 1.32 <sup>4,5)</sup>	

注:与空白组同时时间点比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组同时时间点比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ ;与甘补组同时时间点比较<sup>5)</sup>  $P < 0.05$ 。血清体积浓度均为 10% (表 2~4 同)。

表 2 半夏泻心汤对各组 BMSCs 细胞周期的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Effect of Banxia Xiexin Tang on BMSC cell cycle in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	$G_1$ 期/%	S 期/%	$G_2/M$ 期
空白	87.64 ± 0.28	11.35 ± 0.26	1.01 ± 0.21
模型	59.08 ± 0.73 <sup>1)</sup>	35.89 ± 2.82 <sup>2)</sup>	5.04 ± 2.11 <sup>1)</sup>
辛开	72.45 ± 0.39 <sup>3)</sup>	20.89 ± 1.17 <sup>4)</sup>	4.66 ± 0.78
苦降	65.02 ± 0.47 <sup>3)</sup>	26.88 ± 0.21 <sup>3)</sup>	4.98 ± 0.55
甘补	66.17 ± 3.26 <sup>3)</sup>	33.71 ± 3.36	0.68 ± 0.38 <sup>4)</sup>
全方	68.66 ± 1.07 <sup>3)</sup>	30.83 ± 0.70 <sup>3)</sup>	0.11 ± 0.12 <sup>4,5)</sup>

表 3 半夏泻心汤对各组 BMSCs c-Myc 和 TERT 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Effect of Banxia Xiexin Tang on c-Myc and TERT protein expressions of BMSCs in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	c-Myc	TERT
空白	0.83 ± 0.01	0.92 ± 0.04
模型	1.25 ± 0.07 <sup>2)</sup>	1.17 ± 0.09 <sup>1)</sup>
辛开	1.02 ± 0.02	1.03 ± 0.03
苦降	1.00 ± 0.04 <sup>4)</sup>	1.01 ± 0.05
甘补	0.99 ± 0.08 <sup>4)</sup>	0.98 ± 0.02 <sup>3)</sup>
全方	0.84 ± 0.03 <sup>4,5)</sup>	0.93 ± 0.06 <sup>3)</sup>

3.4 半夏泻心汤对 BMSCs c-Myc 和 TERT 蛋白表达的影响 培养 7 d 后, 模型组 c-Myc 和 TERT 蛋白表达水平较空白组明显升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 与模型组比较, 辛开组、苦降组、甘补组、全方组 c-Myc 和 TERT 蛋白表达均有降低, 其中甘补组及全方组降低明显 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 全方组 c-Myc 蛋白水平明显低于甘补组 ( $P < 0.05$ )。见表 3, 图 2。

3.5 半夏泻心汤对 BMSCs c-Myc 和 TERT mRNA 表达的影响 培养 7 d 后, 模型组 c-Myc, TERT mRNA 表达量较空白组比较明显升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 与模型组比较, 辛开组、苦降组、甘补组、全方组 c-Myc, TERT mRNA 表达均明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 全方组 c-Myc, TERT mRNA 表达明显低于甘补组 ( $P < 0.05$ )。见表 4。

表 4 半夏泻心汤对各组 BMSCs c-Myc 和 TERT mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 4 Effect of Banxia Xiexin Tang on c-Myc and TERT mRNA expression of BMSCs in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	c-Myc	TERT
空白	1.14 ± 0.04	1.00 ± 0.47
模型	2.47 ± 0.03 <sup>1)</sup>	4.57 ± 1.59 <sup>2)</sup>
辛开	1.04 ± 0.04 <sup>3)</sup>	3.22 ± 0.68 <sup>3)</sup>
苦降	0.98 ± 0.03 <sup>4)</sup>	2.80 ± 0.79 <sup>3)</sup>
甘补	0.87 ± 0.01 <sup>4)</sup>	1.45 ± 0.48 <sup>4)</sup>
全方	0.67 ± 0.02 <sup>4,5)</sup>	0.79 ± 0.27 <sup>4,5)</sup>

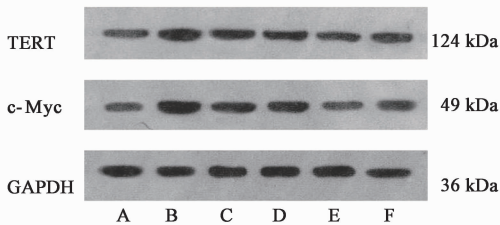


图 2 培养 7 d 后各组细胞 BMSC c-Myc 和 TERT 蛋白表达电泳  
Fig.2 c-Myc and TERT protein electrophoresis of BMSCs in each group after 7 days

#### 4 讨论

干细胞生存的微环境是干细胞维持稳态的关键,微环境成分的改变和微环境中信号通路的改变可能导致正常的干细胞分化受阻而过度增殖,已有研究表明,胶质瘤微环境<sup>[12]</sup>,肺癌微环境<sup>[13]</sup>,结肠癌微环境<sup>[14]</sup>均可诱导 BMSCs 引起细胞形态、增殖能力等生物学特性的改变。研究认为胃癌发病与 BMSCs 有关,幽门螺杆菌等长期慢性感染,骨髓来源的干细胞会聚集到胃黏膜处,参与损伤修复并增生,从而发生肠化、不典型增生及癌肿<sup>[15]</sup>。临床胃癌组织及裸鼠体内致瘤组织分离得到的胃癌间质干细胞(GC-MSCs),其生物学特性与 BMSCs 相似<sup>[16]</sup>,并证明是肿瘤微环境的重要组成部分,可促进肿瘤的生长,研究进一步显示在胃癌微环境中,BMSCs 可向肿瘤相关成纤维母细胞(TAFs)转化,可促进肿瘤细胞生长<sup>[17]</sup>。也有研究认为短时间的培养虽影响不到其增殖,但处于胃癌微环境中的 BMSCs 生物学特性已发生一定的改变来适应肿瘤微环境<sup>[18]</sup>。

细胞增殖恶化调控的关键在于端粒酶的激活<sup>[19]</sup>,BMSCs 长期体外培养及扩增即可使其具有肿瘤细胞特性,端粒酶活性增强<sup>[20]</sup>。c-Myc 为 8 号染色体癌基因,影响细胞周期及调控基因表达,与端粒酶活性有关,在调控细胞增殖、抑制细胞向终末期分化及抑制细胞凋亡方面有重要的生物学作用。长期体外培养后自发恶性转化的 BMSCs 中 c-Myc 较正常 BMSCs 中表达显著增高<sup>[4,21]</sup>。TERT 在端粒酶的激活中起关键作用,其表达水平决定了端粒酶活性的高低,其基因转录水平被认为是调节端粒酶活性的主要限速步骤之一<sup>[22]</sup>。

本研究结果表明,人胃癌 BGC-823 细胞与大鼠 BMSCs 共培养后,细胞形态排列紊乱,呈团生长,与人胃癌 BGC-823 细胞形态有相似之处,c-Myc 和 TERT 表达水平明显升高,有向胃癌恶性转化的趋势。处于细胞 G<sub>1</sub> 期细胞比例明显降低,S 期及 G<sub>2</sub>/M 期细胞比率显著增加,BMSCs 的生长增殖加快,表明胃癌微环境对 BMSCs 的生长增殖产生了显著影响。半夏泻心汤及不同配伍含药血清对胃癌微环境中 BMSCs 干预后大部分细胞呈梭形,偶见团状生长,其中全方组和甘补组明显优于辛开组、苦降组。半夏泻心汤及其配伍含药血清组在 4,5,6,7 d 对 BMSCs 细胞增殖率均有抑制作用,全方组明显优于甘补组。第 7 天干预结果显示半夏泻心汤及不同配伍含药血清均可升高 G<sub>1</sub> 期 BMSCs 细胞比例,降低 S 期 BMSCs 细胞比例,其中全方组及甘补组可显著

降低 G<sub>2</sub>/M 期 BMSCs 细胞比率,全方组明显优于甘补组;c-Myc 和 TERT 表达水平也明显降低,全方组明显优于甘补组。

BMSCs 被认为是一种免疫缺陷细胞,具有广泛的免疫缺陷性<sup>[23]</sup>,BMSCs 的免疫缺陷性在胃癌治疗的过程中,可能会对机体的抗肿瘤免疫产生不利影响,促进肿瘤进展恶化。BMSCs 的免疫缺陷性与中医“正气不足”的病理特征基本一致。半夏泻心汤由辛开、苦降、甘补药配伍而成,甘补组具有健脾扶正作用。半夏泻心汤全方对胃癌微环境中 BMSCs 的生长增殖抑制作用明显优于甘补组,其可能原因在于辛开、苦降对甘补有“相须”增效作用,表明半夏泻心汤组方配伍的合理性和科学性。

#### [参考文献]

- [1] Nakamizo A, Marini F, Amano T, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cell in the treatment of gliomas[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(8):3307-3318.
- [2] Nakamura K, Ito Y, Kawano Y, et al. Anti-tumor effect of genetically engineered Mesenchymal stem cells in a rat gliomas[J]. *Gene Therapy*, 2004, 11(14):1155-1164.
- [3] Studeny M, Marini F C, Dembinski J L, et al. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2004, 96(21):1593-1603.
- [4] Miuraa M, Miura Y, Padilla-Nash H M, et al. Accumulated chromo-somal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells to malignant transformation[J]. *Stem Cell*, 2006, 24(4):1095-1103.
- [5] Rosland G V, Svendsen A, Torsvik A, et al. Long-term cultures of bone marrow derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(13):5331-5339.
- [6] 张秀玲. 半夏泻心汤临床应用近况[J]. *实用中医内科杂志*, 2014, 28(12):183-185.
- [7] 李沛清, 刘喜平, 席时燕. 半夏泻心方及其配伍药组含药血清对人胃癌 BGC823 细胞生长抑制作用及 p53 表达的影响[J]. *中药药理与临床*, 2005, 21(5):5-7.
- [8] 刘喜平, 李沛清, 席时燕, 等. 半夏泻心方配伍与诱导 BGC-823 细胞凋亡关系的血清药理学研究[J]. *中医杂志*, 2006, 47(2):134-137.
- [9] 李东峰, 赵闻平, 刘喜平, 等. 半夏泻心汤含药血清对人胃癌腹膜转移细胞增殖的影响[J]. *西部中医药*, 2014, 27(1):14-16.
- [10] 邓中甲. 方剂学[M]. 北京: 中国中医药出版社,

- 2003;88.
- [11] 杨彦芳,王玉芹. 中药复方血清药理学方法规范化探讨[J]. 中国中西医结合杂志,2000,20(5):380-381.
- [12] 张亚兰,朱静,田杰,等. 肿瘤微环境中间充质干细胞的相关生物学特性分析[J]. 解放军医学杂志,2010,35(1):67-70.
- [13] 刘永琦,王倩,秦洁,等. 肿瘤微环境对骨髓间充质干细胞形态、生长及增殖的影响[J]. 中国细胞生物学学报,2013,35(2):180-187.
- [14] 景明,陈正君,王雅莉,等. 结肠癌微环境对骨髓间充质干细胞形态、增殖及 CD13、CD133 表达的影响[J]. 药学研究,2014,33(9):497-500.
- [15] Ogasawara N, Tsukamoto T, Inada K, et al. Frequent c-Kit gene mutations not only in gastrointestinal stromal tumors but also in interstitial cells of Cajal in surrounding normal mucosa[J]. Cancer Lett, 2005, 230(2):199-210.
- [16] Houghton J, Stoicov C, Nomura S, et al. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells[J]. Science, 2004,306(3):1568-1571.
- [17] 李争艳,刘杨,翟丽丽,等. 胃癌细胞 SGC-7901 对骨髓来源的间充质干细胞作用的研究[J]. 临床与实验病理学杂志,2011,27(8):856-859.
- [18] Jones D L, Wagers A J. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008,9(1):11-21.
- [19] Shay J W, Wright W E. Hallmarks of telomeres in ageing research[J]. J Pathol, 2007,211(2):114-123.
- [20] Wang Y, Huso D L, Harrington J, et al. Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stemcell culture [J]. Cytotherapy, 2005,7(6):509-519.
- [21] Rubio D, Garcia-Castro J, Martin M C, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation[J]. Cancer Res, 2005,65(8):3035-3039.
- [22] Gronthos S, Zannettino A C, Hay S J, et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow[J]. J Cell Sci, 2003,116(9):1827-35.
- [23] Comite P, Cobianchi L, Avanzini M, et al. Isolation and *ex vivo* expansion of bone marrow derived porcine mesenchymal stromal cells: potential for application in an experimental model of solid organ transplantation in large animals [J]. Transplant Proceed, 2010, 42(4):1341-1343.

[责任编辑 张丰丰]