

半夏泻心汤含药肠吸收液对胃癌微环境中PMN-MDSCs 凋亡的影响

魏晶晶¹, 朱中博¹, 刘喜平^{1*}, 李沛清¹, 陈启明², 戴丽蓉¹, 施丽娟¹, 段海婧¹, 王庆苗¹
(1. 甘肃中医药大学 甘肃省中药新产品创制工程实验室, 甘肃省中医方药挖掘与创新转化重点实验室, 兰州 730000; 2. 兰州大学 第一医院, 兰州 730013)

[摘要] 目的: 观察半夏泻心汤含药肠吸收液对胃癌微环境中多形核髓系来源抑制细胞(PMN-MDSCs)凋亡的影响。方法: 制备半夏泻心汤含药肠吸收液, 以Transwell小室将胃癌细胞与PMN-MDSCs非接触共培养建立胃癌微环境模型, 采用细胞增殖与活性检测-8(CCK-8)法筛选0.63 g·mL⁻¹复溶液制备而成的0~100%半夏泻心汤含药肠吸收液的最佳干预浓度及时间, 分为空白组、模型组、奥沙利铂组(10 mg·L⁻¹)及半夏泻心汤组(26%、18%、10%含药肠吸收液), 采用CCK-8法检测PMN-MDSCs的增殖, 流式细胞术检测PMN-MDSCs的凋亡, 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测PMN-MDSCs胃癌微环境凋亡相关蛋白, B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)蛋白表达水平。结果: 作用24、48 h, 与空白组比较, 5%、50%、75%、100%半夏泻心汤含药肠吸收液对PMN-MDSCs的抑制率均有升高($P<0.05$, $P<0.01$), 作用72 h, 除50%半夏泻心汤含药肠吸收液对PMN-MDSCs的抑制率低于48 h($P<0.01$), 其余浓度各自抑制率差异无统计学意义, 且48 h半数抑制浓度(IC₅₀)为18.40%, 说明18%半夏泻心汤含药肠吸收液在48 h为最佳干预浓度及时间。与空白组比较, 模型组PMN-MDSCs的存活率明显升高($P<0.05$), 凋亡率明显下降($P<0.05$); 与模型组比较, 半夏泻心汤组PMN-MDSCs存活率均明显降低($P<0.05$), 凋亡率明显升高($P<0.05$), 以半夏泻心汤组(26%含药肠吸收液)最为明显($P<0.05$)。与空白组比较, 模型组PMN-MDSCs促凋亡蛋白Bax、Caspase-3表达明显降低($P<0.05$), 抗凋亡蛋白Bcl-2表达明显上升($P<0.05$)。与模型组比较, 奥沙利铂组、半夏泻心汤组PMN-MDSCs Caspase-3蛋白表达升高($P<0.05$), Bcl-2蛋白表达明显降低($P<0.05$), 奥沙利铂组、半夏泻心汤组(10%含药肠吸收液)Bax蛋白表达升高($P<0.05$)。结论: 半夏泻心汤含药肠吸收液能通过调控胃癌微环境PMN-MDSCs凋亡相关蛋白Bax、Caspase-3及Bcl-2的表达, 诱导PMN-MDSCs凋亡。

[关键词] 胃癌微环境; 髓源性抑制细胞; 细胞凋亡; 半夏泻心汤

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)10-0058-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.202201725

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220926.1135.001.html>

[网络出版日期] 2022-09-27 19:50:04

Effect of Banxia Xiexintang-containing Intestinal Absorption Solution on PMN-MDSCs Apoptosis in Gastric Cancer Microenvironment

WEI Jingjing¹, ZHU Zhongbo¹, LIU Xiping^{1*}, LI Peiqing¹, CHEN Qiming², DAI Lirong¹,
SHI Lijuan¹, DUAN Haijing¹, WANG Qingmiao¹

(1. Gansu Engineering Laboratory for New Products of Traditional Chinese Medicine (TCM), Gansu Key Laboratory of TCM Excavation and Innovative Transformation, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. The First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730013, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Banxia Xiexintang (BXT)-containing intestinal

[收稿日期] 2022-04-02

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81860813, 81860782); 甘肃省高等学校创新基金项目(2020B-007); 甘肃省委组织部陇原青年创新创业人才项目(2020RCXM183); 甘肃省中医方药挖掘与创新转化重点实验室开放基金项目(ZYFY-2020-003)

[第一作者] 魏晶晶, 在读硕士, 从事方剂的临床应用及作用机制研究, E-mail: 857332234@qq.com

[通信作者] * 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: lxp-257@163.com

absorption solution on the apoptosis of polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells (PMN-MDSCs) in gastric cancer microenvironment. **Method:** BXT-containing intestinal absorption solution was prepared, and gastric cancer cells and PMN-MDSCs were non-contact co-cultured in Transwell chamber to establish gastric cancer microenvironment. Cell counting kit-8 (CCK-8) assay was used to screen the optimal intervention concentration and time of 0-100% BXT-containing intestinal absorption solution prepared by $0.63 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ reconstitution solution. Cells were classified into blank group, model group, oxaliplatin group ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), and BXT (26%, 18%, 10% BXT-containing intestinal absorption solution) group, and the apoptosis of PMN-MDSCs was detected by flow cytometry. The expression of apoptosis-related B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), and cysteine-aspartic acid protease-3 (Caspase-3) in PMN-MDSCs was detected by Western blot. **Result:** After treatment for 24 h and 48 h, the PMN-MDSCs-inhibiting rate was increased by 5%, 50%, 75%, and 100% BXT-containing intestinal absorption solution compared with that in the blank group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). At 72 h, the PMN-MDSCs-inhibiting rate by 50% BXT-containing intestinal absorption solution was lower than that at 48 h ($P < 0.01$), and the PMN-MDSCs-inhibiting rate by 5%, 75%, and 100% BXT-containing intestinal absorption solution showed no significant difference from that at 48 h. Moreover, the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) at 48 h was 18.40%. Thus, 18% BXT-containing intestinal absorption solution and 48 h were the optimal intervention concentration and time. The survival rate of PMN-MDSCs in model group was higher than that in the blank group ($P < 0.05$), and the apoptosis rate was lower than that in the blank group ($P < 0.05$). Compared with model group, BXT containing intestinal absorption solution lowered the survival rate and raised apoptosis rate of PMN-MDSCs ($P < 0.05$), particularly the 26% BXT-containing intestinal absorption solution ($P < 0.05$). The expression of Bax and Caspase-3 in PMN-MDSCs was lower in the model group than in the blank group ($P < 0.05$), and the expression of Bcl-2 was higher in the model group than in the blank group ($P < 0.05$). The expression of Caspase-3 in PMN-MDSCs increased ($P < 0.05$) and the expression of Bcl-2 decreased ($P < 0.05$) in oxaliplatin group and BXT group compared with those in the model group. The expression of Bax rose in oxaliplatin group and BXT group (10% BXT-containing intestinal absorption solution) ($P < 0.05$). **Conclusion:** BXT can induce the apoptosis of PMN-MDSCs by regulating the expression of apoptosis-related proteins Bax, Caspase-3, and Bcl-2 in gastric cancer microenvironment.

[Keywords] gastric cancer microenvironment; myeloid-derived suppressor cells; apoptosis; Banxia Xiexintang

胃癌(GC)是全球癌症相关死亡的主要原因之一^[1],其发病与所在肿瘤微环境中的多种细胞相关。其中,多形核髓系来源抑制细胞(PMN-MDSCs),是一类未分化成熟并具有免疫抑制特性的细胞^[2]。当胃癌发生后,可诱导PMN-MDSCs生成,伴随着肿瘤的发生发展在肿瘤部位逐渐聚集,成为肿瘤微环境的重要组成部分^[3]。PMN-MDSCs可以通过分泌趋化因子、细胞因子和酶或者发挥免疫抑制功能而发生免疫逃逸,增强了肿瘤细胞的增殖存活、黏附及侵袭,促进了肿瘤的进展和转移^[4-5]。因此,干预肿瘤微环境中PMN-MDSCs的增殖浸润对肿瘤的治疗具有重要意义。

胃癌属中医学“伏梁”“反胃”“积聚”等范畴,在前期研究中,课题组提出“本虚标实、寒热错杂”是胃癌的基本中医病机,“健脾散结,平调寒热”是其

关键中医治法,半夏泻心汤出自《伤寒论》,是该治法的代表方剂^[6],由半夏、黄芩、干姜、人参、黄连、大枣、甘草组成,其防治胃癌的临床疗效已被众多临床研究证实^[7]。课题组前期研究表明,半夏泻心汤对胃癌荷瘤裸鼠有明显的抑瘤作用^[8],其含药血清可诱导人胃癌细胞凋亡^[9],亦可抑制骨髓间充质干细胞(BMSCs)外泌体诱导的人胃癌细胞增殖^[10]及胃癌微环境中间充质干细胞(MSCs)的异常生长增殖^[11],并抑制胃癌微环境诱导的腹膜间皮细胞凋亡^[12]。但含药血清通过体内代谢后,其药效成分含量降低,或发生复杂的变化,非药物的干扰成分增多,增加了实验质控的难度,降低了实验效能,难以真实反映药物的药效。与含药血清比较,采用外翻肠囊法制备的含药肠吸收液,其药效成分含量高、干扰成分少、药物活性显著。因此,本文采用半夏

泻心汤含药肠吸收液,观察其对胃癌微环境中PMN-MDSCs凋亡的影响,以期从干预PMN-MDSCs角度探讨半夏泻心汤防治胃癌的作用机制。

1 材料

1.1 动物及细胞 SPF级雄性SD大鼠6只,体质量180~220 g,SPF级C57雄性小鼠6只,4~6周龄,体质量15~20 g,均由甘肃中医药大学实验动物中心提供,合格证号SCXK(甘)2020-0001,使用许可证号SYXK(甘)2020-0009。本研究涉及动物的实验均经甘肃中医药大学实验动物伦理委员会审查批准(批号2021-021)。小鼠胃癌细胞MFC由武汉普诺赛生命科技有限公司提供,目录号为CL-0156,传至第3代备用。

1.2 药物与试剂 半夏泻心汤由法半夏12 g、黄芩9 g、干姜9 g、人参9 g、黄连3 g、大枣9 g、炙甘草9 g组成,中药饮片购于甘肃中医药大学附属医院中药房,经甘肃中医药大学药学院景明教授鉴定符合2020年版《中华人民共和国药典》规定。1640基础培养基、胰酶消化液(上海源培生物科技股份有限公司,批号分别为L210KJ、H120901);小鼠骨髓间充质干细胞培养基、红细胞裂解液、台式液(武汉普诺赛生命科技有限公司,批号分别为CM-M131、R1010-500、PB180338);胎牛血清(FBS,上海佰晔生物科技有限公司,批号AB-FBS0500S);鼠源CD11b抗体、鼠源Ly6C抗体、鼠源Ly6G抗体[赛默飞世尔科技(中国)有限公司,批号分别为11-0112-81、17-5932-80、12-9668-80];粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、重组鼠白细胞介素-13(IL-13)(杭州联科美讯生物医药技术有限公司,批号分别为315-03-20、250-05-10、210-13-10);细胞增殖与活性检测-8(CCK-8)试剂盒(莱恩生物科技有限公司,批号M4839-500T);6孔Transwell小室(美国Corning公司,批号3412);奥沙利铂(北京索莱宝科技有限公司,批号61825-94-3); β -肌动蛋白(β -actin)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号00104925);兔抗蛋白B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、兔抗Bcl-2相关X蛋白(Bax)、鼠抗胱天蛋白酶-3(Caspase-3)[安诺伦(北京)生物科技有限公司,批号分别为YM3041、YM3619、YT0656];山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G、山羊抗鼠IgG(成都正能生物技术有限公司,批号分别为KK2315、KK0315)。

1.3 仪器 CRY-180型CO₂培养箱(天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司);FACSCelesta型高端分析型

流式细胞检测仪(美国BD公司);CKK41型倒置显微镜(日本奥林巴斯Olympus公司);SpectraMax i3x型全波长酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);R21G型高速冷冻离心机(日本日立公司);DYCZ-24DH型电泳仪、DYY-7C型电转仪(北京六一生物科技有限公司);GeLView 6000Plus型化学发光成像系统(广州博鹭腾生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 半夏泻心汤含药肠吸收液制备 按原方比例,参考现代临床用量^[13],称取法半夏12 g、黄芩9 g、干姜9 g、人参9 g、黄连3 g、大枣9 g、炙甘草9 g,将饮片混合浸泡30 min,煎煮2次,第1次加10倍水,煎煮30 min后取煎液,第2次加8倍水,煎煮30 min后合并2次药液,加热浓缩至120 mL,制备成含生药0.5 g·mL⁻¹的半夏泻心汤药液。置于-80℃冰箱冻存后转入冷冻干燥机冻干,48 h取出,得30 g冻干粉(即1 g冻干粉含2 g生药量)。使用台式液复溶,配置为含生药0.63 g·mL⁻¹的复溶液,4℃保存备用。

参考文献方法(大鼠外翻肠囊法)^[14],取SPF大鼠,禁食12 h,戊巴比妥钠麻醉后剪取肠段,剥离肠系膜,洗净肠管内容物。取幽门至回盲瓣之间肠段共4段,每段长度均为14 cm。所取4段肠段均以台氏液冲洗后翻转,结扎成囊状。将半夏泻心汤台式液复溶90 mL加入麦氏浴管中,通入95% O₂和5% CO₂气体,37℃恒温。肠管中注入台氏液2 mL,再置于麦氏浴管。2 h后收集4段肠管中所得,经0.22 μ m细胞滤器滤过除菌,获得半夏泻心汤含药肠吸收液,4℃储存备用。

2.2 PMN-MDSCs的分离培养与鉴定 4~6周龄C57雄性小鼠6只,体质量15~20 g,颈椎脱臼处死并置于75%乙醇中浸泡5 min;取股骨、胫骨、髌骨,75%乙醇浸泡,转入磷酸盐缓冲液(PBS),剪开骨头两端的股骨头;用RPMI 1640培养液冲骨髓至培养皿中,轻柔反复吹打得骨髓单细胞悬液;于离心机1 200 r·min⁻¹离心5 min(离心半径10 cm,下同)后弃净上清,加红细胞裂解液裂解1 min,用RPMI 1640培养液10 mL终止反应。在4℃,1 200 r·min⁻¹离心20 min,弃去离心管中的上清液,加RPMI 1640培养液并用移液枪反复吹打细胞,使细胞重悬呈现单细胞状态,用200目尼龙网过滤上述重悬细胞至新的离心管中;根据实验需要用培养液调节细胞密度,计数备用。按照1.0×10⁷个/孔接种于培养皿中,24 h内不换液。在培养基培养1~2 d,培养基中只加入

GM-CSF ($40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、G-CSF ($40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)。在孵育第3天,添加IL-13 ($80 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)^[15]。第4~5天取培养皿底部PMN-MDSCs,分别加入CD11b、Ly6C、Ly6G抗体 $5 \mu\text{L}$ 冰上孵育30 min, PBS洗涤后,上流式机器检测分析PMN-MDSCs表型细胞数量。

2.3 CCK-8法筛选半夏泻心汤含药肠吸收液的最佳干预浓度 将PMN-MDSCs调整细胞密度为 5×10^3 个/孔,每孔 $100 \mu\text{L}$,接种于96孔板, 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养24 h后弃上清,加入完全培养基 $180 \mu\text{L}$,分别加入不含半夏泻心汤含药肠吸收液空白台式液、1%、5%、10%、25%、50%、75%、100% 的半夏泻心汤含药肠吸收液 $20 \mu\text{L}$,每组设3个复孔,干预24、48、72 h后终止培养,培养至所需时间后,各培养孔加入CCK-8溶液 $10 \mu\text{L}$, 37°C 培养4 h,用全自动酶标仪检测,振荡1 min,在450 nm波长下检测吸光度 A ,计算细胞生长抑制率,细胞抑制率 = $(1 - A_{\text{药物组}}/A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。根据不同浓度含药肠吸收液对PMN-MDSCs不同时间点的抑制率,使用GraphPad Prism8软件分别计算出半夏泻心汤含药肠吸收液对PMN-MDSCs细胞在24、48、72 h的半数抑制浓度 (IC_{50}),以确定半夏泻心汤的最佳含药肠吸收液浓度。

2.4 细胞共培养体系的建立与分组处理 MFC与PMN-MDSCs均为贴壁细胞,在 37°C 、5% CO_2 培养箱中,MFC细胞、PMN-MDSCs细胞均用含有10% FBS和1%青霉素-链霉素的RPMI 1640培养基培养,待细胞融合度达80%以上时进行传代培养。实验分组及处理如下,空白组取处于对数生长期的PMN-MDSCs细胞,将其单独培养在含有1.8 mL完全培养基的Transwell小室下室。模型组,取对数生长期PMN-MDSCs细胞,含有1.8 mL完全培养基的Transwell小室下室,同时取对数生长期的MFC细胞,接种于Transwell小室的上室,置入 37°C 、5% CO_2 培养箱中进行共培养,上室和下室细胞个数按1:1接种。半夏泻心汤含药肠吸收液组,在模型组的基础上,上室分别加入含26%、18%、10%的半夏泻心汤含药肠吸收液 $200 \mu\text{L}$;奥沙利铂组,在模型组的基础上,参考文献[16]方法,上室加入含 $10 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 奥沙利铂 $200 \mu\text{L}$,分别培养48 h后终止培养,收集细胞,进行各种实验指标的检测。

2.5 CCK-8法检测PMN-MDSCs的增殖 将MFC与PMN-MDSCs共培养干预48 h,取出上室,各孔加入CCK-8溶液,继续培养4 h,按照2.3项下方法,测吸光度 A ,计算细胞存活率,细胞存活率 = $A_{\text{药物组}}/$

$A_{\text{空白组}} \times 100\%$ 。

2.6 流式细胞术检测PMN-MDSCs的凋亡 将PMN-MDSCs按 5×10^5 个/孔接种于6孔板底部, MFC以 5×10^5 个/孔接种于孔径为 $0.4 \mu\text{m}$ 的Transwell小室内,实验时将小室插于板孔中,进行共培养。细胞分组及培养干预同2.4项,培养48 h,移除上层小室,6孔板底部PMN-MDSCs用无EDTA胰酶消化, $1\ 000 \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min收集细胞,弃上清。用预冷PBS将细胞洗涤2次,重悬细胞,加入Annexin-V-FITC $5 \mu\text{L}$, PI $5 \mu\text{L}$,室温避光反应10 min,1 h内在流式细胞仪上检测PMN-MDSCs的凋亡情况。计算细胞凋亡率,细胞凋亡率 = $(Q2 + Q3)/(Q1 + Q2 + Q3 + Q4) \times 100\%$ (Q代表象限)。独立实验重复3次。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测Bcl-2、Bax、Caspase-3蛋白表达水平 取共培养干预48 h后的各组下室中PMN-MDSCs,提取总蛋白,用BCA法测定各组蛋白浓度,调整蛋白上样浓度并加入蛋白上样缓冲液, 37°C 水浴槽中反应60 min进行变性处理,取等量各组蛋白上样、电泳,转膜至PVDF膜上,清洗后封闭,加一抗(Bcl-2、Bax、Caspase-3、 β -actin, 1:1 000), 4°C 孵育过夜,用PBST洗3次,用封闭液将二抗(1:10 000)温育1.5 h,用PBST洗4次。将ECL曝光液按A液-B液1:1混匀后覆盖在整片膜上反应2 min,采用凝胶图象处理系统软件测灰度值,求蛋白的相对表达水平。独立重复实验3次。

2.8 统计学分析 采用SPSS 23.0分析软件进行统计分析,结果采用 $\bar{x} \pm s$ 来表示,两组间比较,经方差齐性检验后采用单因素方差分析并进行多重比较,不符合正态分布的采用Kruskal-Wallis秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。数据图用GraphPad Prism 8软件进行绘制。

3 结果

3.1 PMN-MDSCs的鉴定结果 根据流式细胞仪前向散射光和侧向散射光检测器排除死亡细胞碎片及颗粒,分选出大小种类较为均一的一群细胞,通过FITC-CD11b标记抗体分选出其中CD11b⁺阳性细胞,在此条件基础上使用FITC-CD11b、PE-Ly6G、APC-Ly6C三染,分选CD11b⁺Ly6G^{high}双阳性细胞,测得占比(83.10 ± 1.52)%,符合PMN-MDSCs的细胞表型特征。

3.2 半夏泻心汤含药肠吸收液对PMN-MDSCs的最佳干预浓度 与干预24 h比较,干预48 h时5%、

50%、75%、100%的半夏泻心汤含药肠吸收液对PMN-MDSCs的抑制率均有升高,差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$);与干预48 h比较,干预72 h时除50%半夏泻心汤含药肠吸收液对PMN-MDSCs的抑制率低于48 h($P<0.01$),其余浓度各自抑制率差异无统计学意义。GraphPad Prism 8软件计算

显示,半夏泻心汤含药肠吸收液在24、48、72 h对PMN-MDSCs细胞的半数抑制浓度(IC_{50})分别为19.04%、18.40%、8.52%。因此,在后续实验中将在48 h作为干预时间点,并根据48 h的 IC_{50} ,选择26%、18%、10%半夏泻心汤含药肠吸收液作为浓度梯度开展后续研究。见表1。

表1 半夏泻心汤含药肠吸收液对PMN-MDSCs增殖的影响

Table 1 Effect of Banxia Xiexintang-containing intestinal absorption solution on proliferation of PMN-MDSCs

组别	体积分数/%	24 h		48 h		72 h	
		$A(\bar{x}\pm s, n=3)$	抑制率/%	$A(\bar{x}\pm s, n=3)$	抑制率/%	$A(\bar{x}\pm s, n=3)$	抑制率/%
空白组		1.07±0.03	22.13	0.99±0.03	31.28	1.02±0.03	29.08
半夏泻心汤组	1	1.05±0.06	26.62	0.92±0.10	36.62	1.00±0.05	30.62
	5	0.99±0.04	31.12	0.60±0.07	41.12 ²⁾	0.78±0.01	47.12
	10	0.82±0.04	44.23	0.76±0.03	49.23	0.73±0.02	51.23
	25	0.64±0.07	58.57	0.69±0.10	54.57	0.56±0.02	64.57
	50	0.52±0.06	67.24	0.39±0.03	77.24 ¹⁾	0.65±0.07	57.24 ⁴⁾
	75	0.57±0.04	62.32	0.53±0.04	66.56 ²⁾	0.51±0.03	68.56
	100	0.68±0.02	55.03	0.50±0.02	69.08 ²⁾	0.47±0.02	71.06

注:与干预24 h比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与干预48 h组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$

3.3 半夏泻心汤含药肠吸收液对胃癌微环境中PMN-MDSCs增殖及凋亡的影响 半夏泻心汤含药肠吸收液干预48 h,与空白组比较,模型组PMN-MDSCs的存活率明显升高,凋亡率明显下降($P<0.05$);与模型组比较,奥沙利铂组、半夏泻心汤组PMN-MDSCs的存活率均明显降低,凋亡率明显升高($P<0.05$),以26%半夏泻心汤组最为明显($P<0.05$)。见表2。

表2 半夏泻心汤含药肠吸收液对胃癌微环境中PMN-MDSCs增殖及凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of Banxia Xiexintang-containing intestinal absorption solution on proliferation and apoptosis of PMN-MDSCs in gastric cancer microenvironment ($\bar{x}\pm s, n=3$) %

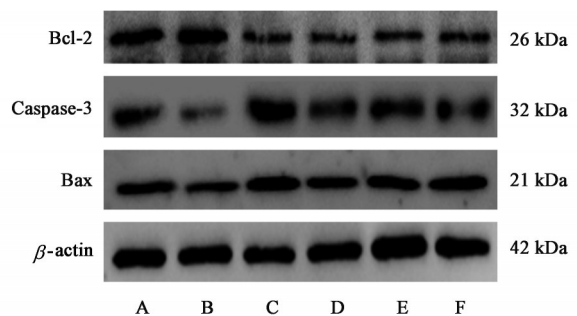
组别	体积分数/%	存活率	凋亡率
空白组		156.76±0.21	6.63±1.34
模型组		184.23±1.24 ¹⁾	3.60±0.41 ¹⁾
奥沙利铂组	10 ³⁾	55.55±2.86 ²⁾	16.67±0.42 ²⁾
半夏泻心汤组	26	53.97±3.10 ²⁾	38.42±1.37 ²⁾
	18	55.03±2.28 ²⁾	7.73±0.16 ²⁾
	10	62.88±3.36 ²⁾	3.63±1.55 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$ (表3同);

³⁾表示单位为mg·L

3.4 半夏泻心汤含药肠吸收液对胃癌微环境中PMN-MDSCs Bcl-2、Bax、Caspase-3蛋白表达的影响 半夏泻心汤含药肠吸收液干预48 h,与空白组

比较,模型组PMN-MDSCs Bax、Caspase-3蛋白表达明显降低,Bcl-2蛋白表达明显升高($P<0.05$)。与模型组比较,奥沙利铂组、半夏泻心汤组PMN-MDSCs Caspase-3蛋白表达明显升高($P<0.05$),Bcl-2蛋白表达明显降低($P<0.05$),奥沙利铂组、半夏泻心汤组(10%含药肠吸收液)Bax蛋白表达升高($P<0.05$)。见图1和表3。



注:A.空白组;B.模型组;C.奥沙利铂组;D-F.半夏泻心汤26%、18%、10%含药肠吸收液组

图1 PMN-MDSCs中Bcl-2、Bax、Caspase-3蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of Bcl-2, Bax, and Caspase-3 protein expression in PMN-MDSCs

4 讨论

长期以来肿瘤被认为可产生免疫抑制微环境,阻碍机体的抗肿瘤能力。MDSCs是髓细胞谱系中最重要的固有部分,生理情况下细胞因子作用于髓细胞,使其向单核细胞、巨噬细胞、粒细胞及成熟

表3 半夏泻心汤含药肠吸收液对胃癌微环境中PMN-MDSCs Bcl-2、Bax、Caspase-3蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Banxia Xiexintang-containing intestinal absorption solution on protein expressions of PMN-MDSCs Bcl-2, Bax and Caspase-3 in gastric cancer microenvironment ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	体积分数 /%	Bcl-2 / β -actin	Bax / β -actin	Caspase-3 / β -actin
空白组		0.80±0.02	0.88±0.05	0.54±0.01
模型组		0.97±0.01 ¹⁾	0.64±0.02 ¹⁾	0.21±0.02 ¹⁾
奥沙利铂组	10 ³⁾	0.50±0.14 ²⁾	1.12±0.03 ²⁾	0.99±0.03 ²⁾
半夏泻心汤组	26	0.37±0.03 ²⁾	0.76±0.13	0.60±0.08 ²⁾
	18	0.32±0.03 ²⁾	0.78±0.14	0.68±0.05 ²⁾
	10	0.41±0.02 ²⁾	1.15±0.02 ²⁾	0.74±0.18 ²⁾

树突状细胞等方向分化,在肿瘤等病理刺激下其分化过程被阻断,出现了增殖和积累,浸润在肿瘤微环境中^[2]。根据MDSCs表型和生物学功能,分为PMN-MDSCs和M-MDSCs,根据种属不同,其中鼠源MDSCs定义分别为CD11b⁺Ly6G^{high}Ly6C^{low}、CD11b⁺Ly6G^{low}Ly6C^{high}^[17]。在肿瘤微环境中,肿瘤细胞分泌IL-1 β 、IL-6、GM-CSF^[18]等细胞因子,诱导髓源性抑制细胞的大量生成并诱导其募集到肿瘤部位。有研究显示,扩增的PMN-MDSCs一方面可以通过自分泌CC19、S100A8/A9、CC12等因子募集更多的PMN-MDSCs,通过对肿瘤微环境中各种组分的驯化,抑制正常免疫系统,从而使肿瘤获得一个有利于其生长进展的微环境,发生免疫逃逸。另一方面还可诱导肿瘤细胞上调血管内皮生长因子(VEGF)、整合素 $\alpha 4\beta 1$ ($\alpha 4\beta 1$)等因子促进肿瘤细胞的增殖黏附和转移^[19-20]。因此,干预胃癌微环境中PMN-MDSCs的增殖及活性是胃癌治疗的重要靶点及全新策略,成为近年来研究新关注的焦点。

半夏泻心汤出自《伤寒论》,方中法半夏、干姜辛开以化痰散结;黄连、黄芩苦降以清解癌毒;人参、大枣、甘草甘补健脾补虚。胃癌属中医学“伏梁”“反胃”“积聚”等范畴,在前期的研究中,课题组提出“本虚标实、寒热错杂”是胃癌的基本中医病机,“健脾散结,平调寒热”是其关键中医治法。课题组前期研究证实,半夏泻心汤对在体内、体外均有明确的抗肿瘤作用,特别是半夏泻心汤含药血清对胃癌微环境中的间充质干细胞(MSCs)诱发胃癌细胞生长增殖有显著的干预作用。但半夏泻心汤能否干预胃癌微环境中PMN-MDSCs的增殖及其活性,目前并不清楚。针对胃癌及所形成的肿瘤微环境,胃肠往往发挥的直接吸收和干预作用,肠吸

收液成分较入血成分发挥效应更为提前。同时,中药肠吸收液模型具有操作简单,制取快速的优势,该模型可用于早期药物高通量的筛选^[21]。故本研究采用Transwell小室将胃癌细胞与PMN-MDSCs非接触共培养建立胃癌微环境,观察半夏泻心汤含药肠吸收液对胃癌微环境中PMN-MDSCs凋亡的影响。

细胞凋亡是机体内细胞的程序性死亡,在机体内环境的维持及多个系统的发育中发挥重要作用,细胞凋亡受Bcl-2家族和Caspase家族等多个基因的严格调控^[22]。Bcl-2家族蛋白是介导线粒体途径通过调节促凋亡与抗凋亡之间的平衡来维持线粒体的完整性的一类关键蛋白^[23]。Bax可通过增强线粒体膜通透性,改变跨膜电位,从而促使线粒体内细胞色素C释放到细胞质中引起Caspase的级联反应,最终导致Caspase-3被激活,引发细胞的凋亡^[24-27]。Bcl-2蛋白可以通过抑制凋亡蛋白引发的一系列信号的激活发挥抗凋亡作用^[26-27]。

本研究发现,半夏泻心汤含药肠吸收液对PMN-MDSCs增殖有抑制作用,并能诱导PMN-MDSCs的凋亡。并进一步对凋亡相关蛋白的表达进行了相应的检测,结果表明,胃癌微环境中PMN-MDSCs抗凋亡蛋白Bcl-2的表达明显增加,促凋亡的Bax和Caspase-3蛋白的显著下降,而在不同浓度半夏泻心汤含药肠吸收液干预后,Bcl-2蛋白的表达显著降低,Bax和Caspase-3蛋白的表达显著增加,提示半夏泻心汤诱导胃癌微环境中PMN-MDSCs的凋亡与调控抗凋亡蛋白Bcl-2与促凋亡的Bax和Caspase-3蛋白的平衡有关。

本研究为半夏泻心汤通过诱导胃癌微环境中PMN-MDSCs凋亡,调控肿瘤免疫抑制剂微环境达到抗肿瘤作用提供了初步的证据,然而诱导PMN-MDSCs凋亡后肿瘤免疫抑制剂微环境的变化及其对肿瘤细胞生长增殖、迁移侵袭等生物学功能的影响有待进一步研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] DU Y, ZHU H, LIU J, et al. Consensus on eradication of *Helicobacter pylori* and prevention and control of gastric cancer in China (2019, Shanghai) [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2020, 35(4): 624-629.
- [2] GABRILOVICH D I, NAGARAJ S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system [J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9(3): 162-174.

- [3] TARTOUR E, PERE H, MAILLIERE B, et al. Angiogenesis and immunity: A bidirectional link potentially relevant for the monitoring of antiangiogenic therapy and the development of novel therapeutic combination with immunotherapy [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2011, 30(1): 83-95.
- [4] BINNEWIES M, ROBERTS E W, KERSTEN K, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy [J]. *Nat Med*, 2018, 24(5): 541-550.
- [5] WANG P F, SONG S Y, WANG T J, et al. Prognostic role of pretreatment circulating MDSCs in patients with solid malignancies: A Meta-analysis of 40 studies [J]. *Oncoimmunology*, 2018, 7(10): 1494113.
- [6] 张成晶,朱许丽,张颖慧,等. 基于寒热错杂病机中医药在胃癌各阶段防治中的研究[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2018, 24(4): 510-512, 532.
- [7] 陶飞宝. 半夏泻心汤加味治疗胃癌 20 例疗效观察 [J]. *实用中西医结合临床*, 2013, 13(5): 40-42.
- [8] 崔国宁, 刘喜平, 陈嘉慧, 等. 半夏泻心汤联合 IL-12 转染骨髓间充质干细胞对胃癌荷瘤裸鼠抑瘤作用研究 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2020, 27(1): 39-44.
- [9] 汪永锋, 刘喜平, 徐晓艳. 半夏泻心方配伍药组含药血清对人胃癌细胞凋亡及凋亡相关基因的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2006, 13(5): 27-29.
- [10] 崔国宁, 刘喜平, 李沛清, 等. 半夏泻心汤调控 Shh 信号通路对 BMSCs 外泌体诱导的人胃癌细胞 BGC-823 增殖的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2021, 28(8): 77-82.
- [11] 杨柏林, 刘喜平, 崔国宁, 等. 半夏泻心汤含药血清对胃癌微环境中 BMSCs 生长增殖的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(22): 97-102.
- [12] 张炜, 刘喜平, 明海霞, 等. 半夏泻心汤含药血清对胃癌微环境诱导腹膜间皮 HMrSV5 细胞凋亡的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(9): 3735-3738.
- [13] 邓中甲. 方剂学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 88.
- [14] 张旻昱, 龚慕辛, 杨洪军. 含药肠吸收液: 一种新的中药体外药理实验方法 [J]. *中草药*, 2018, 49(15): 3457-3462.
- [15] WU Q, ZHOU L, LV D, et al. Exosome-mediated communication in the tumor microenvironment contributes to hepatocellular carcinoma development and progression [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 53-55.
- [16] 王丽敏, 江智慧, 张明远, 等. 益气活血方联合奥沙利铂对 SGC-7901 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. *中成药*, 2021, 43(10): 2866-2868.
- [17] BRONTE V, BRANDAU S, CHEN S H, et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards [J]. *Nat Commun*, 2016, 7(9): 121-150.
- [18] ROSBOROUGH B R, CASTELLANETA A, NATARAJAN S, et al. Histone deacetylase inhibition facilitates GM-CSF-mediated expansion of myeloid-derived suppressor cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Leukoc Biol*, 2012, 91(5): 701-709.
- [19] PEINADO H, LAVOTSHKIN S, LYDEN D. The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts [J]. *Semin Cancer Biol*, 2011, 21(2): 139-146.
- [20] SAFARZADEH E, ORANGI M, MOHAMMADI H, et al. Myeloid-derived suppressor cells: Important contributors to tumor progression and metastasis [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(4): 3024-3036.
- [21] 何帅, 蔺明焯, 姜亦南, 等. 中药成分肠吸收模型研究进展与思考 [J]. *中医药学报*, 2018, 46(3): 121-124.
- [22] 李利娟, 刘文涛, 罗欢欢, 等. 菟丝子总黄酮对小鼠睾丸间质细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2、Caspase-3 的影响 [J]. *解放军医学院学报*, 2022, 43(2): 199-204.
- [23] CUI J, PLACZEK W J. Post-transcriptional regulation of anti-apoptotic Bcl2 family members [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(1): E308.
- [24] ZHANG Y, YANG X, GE X, et al. Puerarin attenuates neurological deficits via Bcl-2/Bax/cleaved Caspase-3 and Sirt3/SOD2 apoptotic pathways in subarachnoid hemorrhage mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109(1): 726-733.
- [25] 韩欣洁, 孙军平, 张明月, 等. 白藜芦醇对急性肺损伤兔内质网应激和细胞凋亡的影响 [J]. *解放军医学院学报*, 2020, 41(4): 364-368.
- [26] VARDIYAN R, EZATI D, ANVARI M, et al. Effect of L-carnitine on the expression of the apoptotic genes Bcl-2 and Bax [J]. *Clin Exp Reprod Med*, 2020, 47(3): 155-160.
- [27] 王毓国, 窦永起, 赵森. 人参皂苷 Rg₁ 对辐射致肠 IEC-6 细胞损伤保护作用的体外实验 [J]. *解放军医学院学报*, 2020, 41(3): 284-288, 293.

[责任编辑 张丰丰]