

· 半夏泻心汤防治胃癌机制研究专题 ·

[编者按] 胃癌(GC)是常见的恶性肿瘤之一,据2020年世界卫生组织(WHO)数据显示,我国胃癌发病率和死亡率居世界首位,分别占全球发病和死亡的44.0%和48.6%,严重威胁人类的生命和健康。虽然手术、放疗、化疗及免疫治疗等能提高生存率,但仍会出现并发症多、敏感性降低、不良反应大等问题。半夏泻心汤出自《伤寒杂病论》,由半夏、黄芩、干姜、人参、黄连、大枣、甘草组成,具有调和寒热、辛开苦降之功效,是寒热错杂之痞证的代表方剂,可治疗胃炎、胃溃疡、胆囊炎等多种证属寒热错杂的消化道疾病,对胃癌、结肠癌等消化道肿瘤有一定的治疗效果。古今医家将半夏泻心汤的方证病机总结为胃虚有热、寒热互结、湿热为病。脾为太阴湿土之脏,喜温燥而恶寒湿,易被痰湿所困,伤及脾阳,致脾阳不足,运化功能失常。痰湿内生,痰久可化热从而产生热毒,阳气不足,运化失司,生寒于内;痰瘀互结,日久缠绵,化热于外,因虚致实,因实致虚,如此反复,逐渐形成寒热错杂之痞证。半夏既可散结消痞、降逆止呕为君药,又与干姜相伍辛开以散痞气,起到化痰散结之功。黄连、黄芩苦寒共为臣药,苦降以泻痞热来清解癌毒。人参、大枣甘温益气、补脾气,为佐药。甘草调和诸药,为使药。人参、甘草、大枣相伍健脾补虚。诸药配伍,共奏健脾补虚、化痰散结、清解癌毒之功,与胃癌发生发展的中医核心病机及病理演化特征贴切。现代临床和实验研究也证实了此方对胃癌的良好治疗作用,发现半夏泻心汤对于胃癌放化疗及术后恢复阶段出现的各类不良反应,如以呕吐、腹泻为主的胃肠道反应可有效缓解,并且可通过增加胃黏膜血供,促进局部微循环而改善胃黏膜病变,增强抗胃癌效果,改善胃癌术后患者生活质量抑制耐药等,并可通过调控胃癌细胞周期、诱导胃癌细胞凋亡来抑制胃癌细胞的增殖、侵袭、转移,保护腹膜间皮细胞、抑制胃癌细胞腹膜转移,调节胃癌微环境、抑制骨髓间充质干细胞(BMSCs)的恶性转化等方面抑制胃癌的发生发展。本课题组致力于半夏泻心汤防治胃癌的研究,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,其含药血清可诱导人胃癌细胞凋亡,能够抑制胃癌微环境转化后BMSCs的异常生长增殖、降低迁移趋化能力,并抑制人胃癌腹膜高转移潜能细胞株GC9811-P细胞的增殖及侵袭转移,亦可抑制胃癌细胞来源外泌体诱导的BMSCs迁移、侵袭。此专题围绕半夏泻心汤含药肠吸收液对胃癌微环境中PMN-MDSCs凋亡、以及迁移侵袭的影响,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,并对半夏泻心汤防治胃癌的作用机制研究作一综述,旨在全面地揭示半夏泻心汤防治胃癌的作用机制及其药效物质基础,为半夏泻心汤的进一步临床应用提供重要科学依据。

半夏泻心汤含药肠吸收液对胃癌微环境中PMN-MDSCs 迁移侵袭的影响

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)迁移侵袭的影响。方法:制备含生药量 $0.63\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的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)法筛选半夏泻心汤含药肠吸收液对PMN-MDSCs的最佳干预浓度及时间,用于后续实验,分为空白组、模型组、FAK抑制剂组及半夏泻心汤组(26%、18%、10%半夏泻心汤含药肠吸收液),采用细胞划痕实验和Transwell实验检测PMN-MDSCs的迁移和侵袭能力,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测肿瘤微环境中血管内皮细胞生长因子(VEGF)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)细胞因子表达,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测PMN-MDSCs通路相关蛋白局部黏着斑激酶(FAK)、磷酸化(p)-FAK、蛋白酪氨酸激酶(Src)、磷酸化(p)-Src蛋白表达水平。结果:与24 h比较,作用48 h 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($P<0.05$, $P<0.01$),与作用48 h比较,培养72 h 50%半夏泻心汤含药肠吸收液对PMN-MDSCs的抑制率低于48 h($P<0.01$),5%、100%半夏泻心汤含药肠吸收液略高于48 h($P<0.05$, $P<0.01$),其余浓度抑制率差异无统计学意义,且48 h半数抑制浓度(IC_{50})为18.09%,说明18%半夏泻心汤

[收稿日期] 2022-04-28

[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

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迁移距离显著增大($P<0.01$),迁移及侵袭数量显著增多($P<0.01$);与模型组比较,FAK抑制剂组、半夏泻心汤含药肠吸收液组PMN-MDSCs的迁移距离均显著减小($P<0.01$),迁移及侵袭数量显著减少($P<0.01$),以26%含药肠吸收液组最为显著($P<0.01$);与空白组比较,模型组PMN-MDSCs通路相关蛋白FAK、p-FAK、Src、p-Src表达显著升高($P<0.01$),VEGF、MMP-9细胞因子表达均显著上升($P<0.01$)。与模型组比较,FAK抑制剂组、半夏泻心汤含药肠吸收液组(26%、18%、10%)PMN-MDSCs FAK、p-FAK、Src蛋白表达降低($P<0.01$),FAK抑制剂组、半夏泻心汤含药肠吸收液组(18%)p-Src蛋白表达显著降低($P<0.01$),VEGF、MMP-9细胞因子表达显著降低($P<0.01$)。结论:半夏泻心汤含药肠吸收液通过下调胃癌微环境PMN-MDSCs FAK信号通路蛋白FAK、p-FAK、Src、p-Src的表达,抑制PMN-MDSCs迁移侵袭。

[关键词] 胃癌微环境;髓源性抑制细胞;半夏泻心汤;黏着斑激酶(FAK)信号通路

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2023)10-0048-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.202202221

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220719.1809.010.html>

[网络出版日期] 2022-07-20 14:23:30

Effect of Banxia Xiexintang-containing Intestinal Absorption Solution on Migration and Invasion of PMN-MDSCs 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 containing intestinal absorption solution (BXCias) on migration and invasion of polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells (PMN-MDSCs) in gastric cancer microenvironment. **Method:** The complex solution (containing $0.63 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ crude drug) was prepared. Gastric cancer cells were subjected to non-contact co-culture with PMN-MDSCs in Transwell chamber to create gastric cancer microenvironment. Cell counting kit-8 (CCK-8) assay was used to screen the optimal intervention concentration and time of BXCias on PMN-MDSCs for subsequent experiment. The blank group, model group, FAK inhibitor group, and BXCias groups (26%, 18%, and 10%) were designed. Scratch assay and Transwell assay were employed to detect the migration and invasion ability of PMN-MDSCs, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to measure the expression of vascular endothelial cell growth factor (VEGF) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in tumor microenvironment. The expression levels of PMN-MDSCs pathway-related proteins FAK, phosphorylated (p)-FAK, protein tyrosine kinase (Src), and p-Src were detected by Western blot. **Result:** The inhibition rates of PMN-MDSCs by 5%, 50%, 75%, and 100% BXCias at 48 h were higher than those at 24 h ($P<0.05$, $P<0.01$). The inhibition rate of PMN-MDSCs by 50% BXCias at 72 h was lower than that at 48 h ($P<0.01$), and the inhibition rates by 5% and 100% BXCias at 72 h were higher than those at 48 h ($P<0.05$, $P<0.01$). There was no significant difference in the inhibition rate by other concentration levels at 48 h. The half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) at 48 h was 18.09%, indicating that 18% BXCias and 48 h were the optimal concentration and time, respectively. The migration distance of PMN-MDSCs was large ($P<0.01$), and the number of migrating and invading cells increased ($P<0.01$) in the mode group compared with those in the blank group. Compared with model group, FAK inhibitor and BXCias at different concentration decreased the migration distance of PMN-MDSCs ($P<0.01$), and the number of migrating and invading cells ($P<0.01$), especially the 26% BXCias ($P<0.01$). The expression of PMN-MDSCs pathway-related proteins FAK, p-FAK, Src and p-Src ($P<0.01$) and the expression

of VEGF and MMP-9 ($P<0.01$) were higher in the model group than in the blank group. Compared with model group, FAK inhibitor and BXCIA (26%, 18%, 10%) decreased the expression of FAK, p-FAK, and Src ($P<0.01$), and FAK inhibitor and 18% BXCIA reduced the expression of p-Src ($P<0.01$), and the expression of VEGF and MMP-9 ($P<0.01$). **Conclusion:** BXCIA can inhibit the migration and invasion of PMN-MDSCs by down-regulating the expression of FAK, p-FAK, Src, and p-Src proteins in the FAK signaling pathway of PMN-MDSCs in gastric cancer microenvironment.

[Keywords] gastric cancer microenvironment; myeloid-derived suppressor cells; Banxia Xiexintang; FAK signaling pathway

胃癌(GC)是世界上最常见的恶性肿瘤之一,发病率和死亡率均位居前列^[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群体^[2]。当胃癌发生后,可诱导髓系的 PMN-MDSCs 产生并通过脉管系统向肿瘤部位逐渐聚集,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]。黏着斑激酶(FAK)信号通路是胞内外信号传导的中枢,是细胞迁移和侵袭的重要信号通路^[6]。有研究显示,PMN-MDSCs 可以通过激活 FAK 信号通路,从而增强自身向肿瘤微环境的迁移侵袭^[7],但具体的作用机制仍不十分清楚。因此,干预肿瘤微环境中 PMN-MDSCs 的迁移侵袭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,半夏泻心汤出自《伤寒论》,是该治法的代表方剂^[8],半夏泻心汤由半夏、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^[9]。课题组前期研究表明,半夏泻心汤能够降低胃癌微环境转化后骨髓间充质干细胞(BMSCs)的迁移趋化能力,抑制人胃癌 BGC-823 细胞在裸鼠体内的致瘤性^[10],抑制人胃癌腹膜高转移潜能细胞株 GC9811-P 细胞的增殖及侵袭转移^[11-12],亦可抑制胃癌细胞来源外泌体诱导的 BMSCs 迁移、侵袭^[13]。然而,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 迁移侵袭的影响,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,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 半夏泻心汤方药组成: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,饮片均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,上海佰晔生物科技股份有限公司,批号 AB-FBS0500S);鼠源 CD11b、鼠源 Ly6C、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(莱恩生物科技股份有限公司,批号 M4839-500T);6 孔 Transwell 小室、24 孔 Transwell 小室(美国 Corning 公司,批号分别为 3412、3413);结晶紫

(北京索莱宝科技有限公司,批号730F041);BD基质胶(美国BD公司,批号8155016); 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FAK、蛋白酪氨酸激酶(Src)、磷酸化(p)-Src抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为3285T、2109T、6943T);磷酸化(p)-FAK抗体、PF-573228抑制剂(英国Abcam公司,批号分别为ab81298、ab273523);小鼠血管内皮细胞生长因子(VEGF)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,货号分别为ml-E3329、ml-037717)。

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^[14],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)^[15],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段肠段均以台式液冲洗后翻转,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2 mL台式液,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;1 200 r·min⁻¹离心5 min(离心半径10 cm,下同)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,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 μ g·L⁻¹)、G-CSF(40 μ g·L⁻¹)。在孵育第3天,添加鼠源重组蛋白IL-13(80 μ g·L⁻¹)^[16]。第4~5天取培养皿底部PMN-MDSCs,分别加入CD11b、Ly6C、Ly6G抗体5 μ 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5×10³个/孔,每孔100 μ L接种于96孔板,37℃、5% CO₂培养箱中培养24 h后弃上清,加入完全培养基180 μ 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%浓度的半夏泻心汤含药肠吸收液20 μ 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 μ L,37℃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_{药物组}/A_{空白组})×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 Prism 8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(IC₅₀),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℃、5% CO₂培养箱中,MFC细胞、PMN-MDSCs细胞均用含有10%FBS和1%青-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,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℃、5%CO₂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 μL;PF-573228 FAK抑制剂组,在模型组的基础上,参考文献方法^[17],上室加入含10 mmol·L⁻¹ PF-573228 200 μL,分别培养48 h后终止培养,收集细胞,进行各指标的检测。

2.5 细胞划痕实验检测PMN-MDSCs的横向迁移水平 将PMN-MDSCs按5×10⁵个/孔,接种于6孔板底部,置37℃、5%CO₂培养箱培养,待细胞密度达80%~90%时进行实验。在6孔板底画一条横线,用200 μL移液器吸头在孔内垂直横线划痕,并用无菌PBS洗涤2次,以去除死细胞。MFC以5×10⁵个/孔,接种于孔径为0.4 μm的Transwell小室内,实验时将小室插于板孔中,进行共同培养。细胞分组及培养干预同2.4项,培养48 h,移除上层小室,用PBS清洗,在倒置显微镜下拍0、48 h照片,用Image J图形软件测量划痕距离,每孔随机取3个位点,根据划痕宽度判断细胞的生长运动能力。细胞划痕愈合率=(0 h划痕宽度-48 h划痕宽度)/0 h划痕宽度×100%。

2.6 Transwell法检测PMN-MDSCs的纵向迁移水平 采用具有PC膜的Transwell悬挂式培养小室结合24孔板进行非接触共培养,将MFC以5×10⁴个/孔接种于24孔板底部,PMN-MDSCs以5×10⁴个/孔接种于孔径为8 μm的Transwell小室内,实验时将小室插于板孔中,进行共培养。干预方法:空白组在小室下室加入完全培养基720 μL;模型组在小室下室加入完全培养基720 μL;半夏泻心汤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80 μL;PF-573228 FAK抑制剂组在模型组的基础上,上室加入含10 mmol·L⁻¹ PF-573228 80 μL。培养48 h取出小室,揩去上室残留细胞,随后用4%多聚甲醛固定穿膜后细胞,室温放置15 min, PBS洗去固定液后,0.1%结晶紫染色30 min,在倒置显微镜下观察拍照,对膜中间和四周5个视野计数并求平均值,检测PMN-MDSCs纵向迁移能力。

2.7 Transwell法检测PMN-MDSCs的侵袭水平 在4℃条件下,将Matrigel基质胶与预冷的无血清培养基按1:8稀释,取50 μL均匀地铺被于Transwell小室上室,在37℃培养箱中过夜凝固。

将MFC以5×10⁴个/孔接种于24孔板底部,PMN-MDSCs以5×10⁴个/孔接种于孔径为8 μm的Transwell小室内(含有Matrigel),实验时将小室插于板孔中,进行共培养。干预方法同2.6项,培养48 h取出小室,棉签擦去小室内未迁移的细胞,4%多聚甲醛固定15 min,0.1%结晶紫染色30 min,在倒置显微镜下观察拍照,显微镜下随机5个视野,计数并评价细胞侵袭能力。

2.8 ELISA检测肿瘤微环境中VEGF、MMP-9因子含量 将PMN-MDSCs以5×10⁵个/孔接种于6孔板底部,MFC以5×10⁵个/孔接种于孔径为0.4 μm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。收集下室细胞上清液,3 000 r·min⁻¹离心20 min,分离上清,按试剂盒说明书,检测VEGF、MMP-9含量。

2.9 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测FAK、p-FAK、Src、p-Src蛋白表达 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℃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(FAK、p-FAK、Src、p-Src、β-actin 1:1 000),4℃孵育过夜,用PBST洗3次,用封闭液将二抗按1:10 000稀释,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FAK、p-FAK、Src、p-Src蛋白相对表达水平。

2.10 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(97.50±1.35)%,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($P<0.05, P<0.01$);干预72 h时50%半夏泻心汤含药肠吸收液对PMN-MDSCs的抑制率低于48 h($P<0.01$),5%、100%半夏泻心汤含药肠吸收液对PMN-MDSCs的抑制率

高于48 h($P<0.05, P<0.01$)。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 IC_{50} 分别为23.24%、18.09%、8.56%。因此,在后续实验中将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

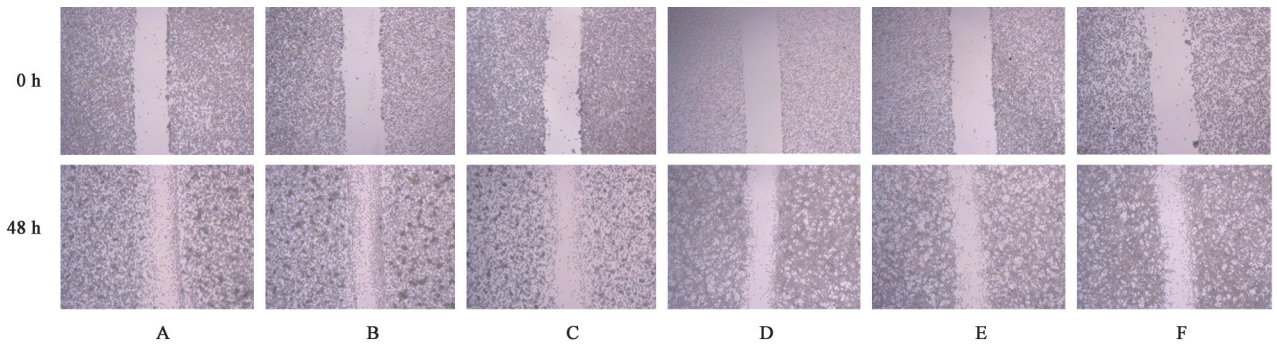
Table 1 Effect of Banxia Xiexintang-containing intestinal absorption solution on proliferation of PMN-MDSCs

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	25.09	0.91±0.03	38.01	0.99±0.03	31.08
半夏泻心汤组	1	1.06±0.06	26.65	0.89±0.07	39.20	0.97±0.03	33.06
	5	0.98±0.04	32.34	0.59±0.07	41.12 ²⁾	0.81±0.03	45.57 ⁴⁾
	10	0.78±0.04	47.09	0.77±0.06	47.94	0.74±0.02	50.39
	25	0.66±0.07	57.18	0.67±0.12	55.60	0.57±0.02	64.12
	50	0.51±0.06	68.26	0.39±0.02	77.75 ¹⁾	0.68±0.07	55.56 ⁴⁾
	75	0.69±0.04	44.03	0.52±0.03	67.69 ²⁾	0.48±0.03	71.09
	100	0.70±0.02	43.12	0.50±0.01	69.54 ²⁾	0.46±0.02	73.23 ³⁾

注:与24 h同体积分数比较¹⁾ $P<0.05, ^2)$ $P<0.01$;与48 h同体积分数比较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横向迁移的影响 干预48 h与空白组比较,模型组PMN-MDSCs的迁移距离显著增大,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,FAK

抑制剂组、半夏泻心汤26%、18%、10%含药肠吸收液组PMN-MDSCs的迁移距离均显著减小($P<0.01$),以26%含药肠吸收液组最为显著。见图1和表2。



注:A空白组;B模型组;C.FAK抑制剂组;D~F.半夏泻心汤组(26%、18%、10%)(图2~图4同)

图1 半夏泻心汤含药肠吸收液对胃癌微环境中PMN-MDSCs横向迁移的影响(倒置显微镜)

Fig. 1 Effect of Banxia Xiexintang-containing intestinal absorption solution on lateral migration of PMN-MDSCs in gastric cancer microenvironment (inverted microscope)

3.4 半夏泻心汤含药肠吸收液对胃癌微环境中PMN-MDSCs纵向迁移的影响 干预48 h与空白组比较,模型组PMN-MDSCs的迁移数量显著增多($P<0.01$);与模型组比较,FAK抑制剂组、半夏泻心汤26%、18%、10%含药肠吸收液组PMN-MDSCs的迁移数量减少($P<0.01$),以26%含药肠吸收液组最为显著。见图2和表3。

3.5 半夏泻心汤含药肠吸收液对胃癌微环境中PMN-MDSCs侵袭的影响 干预48 h与空白组比较,模型组PMN-MDSCs的侵袭数量增多($P<0.01$);与模型组比较,FAK抑制剂组、半夏泻心汤组(26%、18%、10%含药肠吸收液)PMN-MDSCs的侵袭数量显著减少($P<0.01$),以26%含药肠吸收液组最为显著。见图3和表3。

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

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

组别	体积分数/%	划痕愈合率/%
空白组		45.00±1.35
模型组		71.42±0.41 ¹⁾
FAK抑制剂组	10 ³⁾	40.00±0.42 ²⁾
半夏泻心汤组	26	22.72±0.16 ²⁾
	18	53.84±1.37 ²⁾
	10	56.00±1.55 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.01$; ³⁾表示单位为 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (表3-表5同)

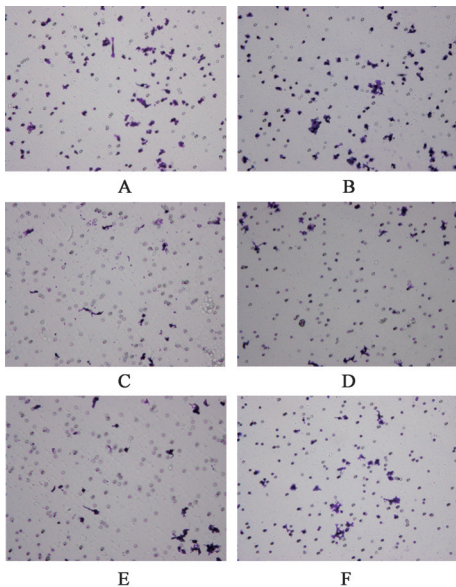


图2 半夏泻心汤含药肠吸收液对胃癌微环境中PMN-MDSCs纵向迁移的影响(结晶紫,×200)

Fig. 2 Effect of Banxia Xiexintang-containing intestinal absorption solution on longitudinal migration of PMN-MDSCs in gastric cancer microenvironment (crystal violet, ×200)

3.6 半夏泻心汤含药肠吸收液对胃癌微环境中PMN-MDSCs VEGF、MMP-9细胞因子表达的影响

干预48 h与空白组比较,模型组PMN-MDSCs VEGF、MMP-9因子表达显著上升($P<0.01$)。与模型组比较,FAK抑制剂组、半夏泻心汤组(26%、18%、10%含药肠吸收液)PMN-MDSCs VEGF、MMP-9因子表达显著降低($P<0.01$),以26%含药肠吸收液组最为显著。见表4。

3.7 半夏泻心汤含药肠吸收液对胃癌微环境中PMN-MDSCs FAK、p-FAK、Src、p-Src蛋白表达的影响

干预48 h与空白组比较,模型组PMN-MDSCs

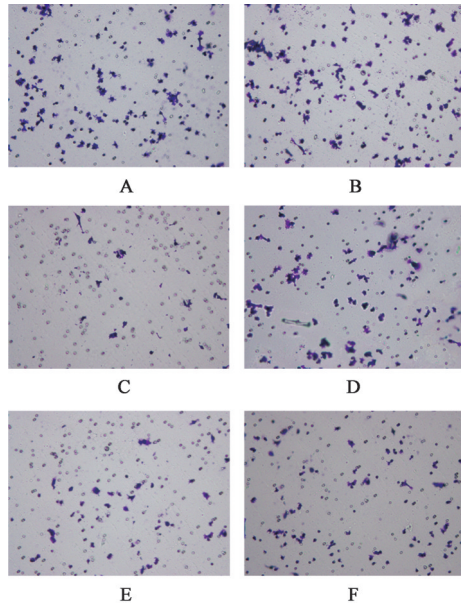


图3 半夏泻心汤含药肠吸收液对胃癌微环境中PMN-MDSCs侵袭的影响(结晶紫,×200)

Fig. 3 Effect of Banxia Xiexintang-containing intestinal absorption solution on invasion of PMN-MDSCs in gastric cancer microenvironment (crystal violet, ×200)

表3 半夏泻心汤含药肠吸收液对胃癌微环境中PMN-MDSCs迁移及侵袭的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 3 Effect of Banxia Xiexintang-containing intestinal absorption solution on migration and invasion of PMN-MDSCs in gastric cancer microenvironment ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	体积分数/%	迁移	侵袭
空白组		77.13±0.70	101.12±3.20
模型组		93.67±1.20 ¹⁾	113.08±0.87 ¹⁾
FAK抑制剂组	10 ³⁾	27.00±1.88 ²⁾	53.21±1.08 ²⁾
半夏泻心汤组	26	17.12±0.73 ²⁾	16.20±1.29 ²⁾
	18	24.26±0.56 ²⁾	26.00±1.08 ²⁾
	10	39.08±0.67 ²⁾	35.25±1.57 ²⁾

表4 半夏泻心汤含药肠吸收液对胃癌微环境中PMN-MDSCs VEGF、MMP-9细胞因子表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 4 Effect of Banxia Xiexintang-containing intestinal absorption solution on expression of PMN-MDSCs VEGF and MMP-9 cytokines in gastric cancer microenvironment ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	体积分数/%	VEGF	MMP-9
空白组		43.16±0.48	10.02±0.28
模型组		46.73±0.55 ¹⁾	11.65±0.47 ¹⁾
FAK抑制剂组	10 ³⁾	45.55±0.42 ²⁾	10.05±0.22 ²⁾
半夏泻心汤组	26	40.73±0.33 ²⁾	8.75±0.32 ²⁾
	18	42.66±0.15 ²⁾	10.04±0.03 ²⁾
	10	45.57±0.37 ²⁾	10.51±0.37 ²⁾

FAK、p-FAK、Src、p-Src 蛋白表达显著上升 ($P < 0.01$)。与模型组比较,FAK 抑制剂组、半夏泻心汤组 (26%、18%、10% 含药肠吸收液) PMN-MDSCs FAK、

p-FAK、Src、蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$), FAK 抑制剂组、半夏泻心汤组 (18% 含药肠吸收液) p-Src 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$)。见表 5 和图 4。

表 5 半夏泻心汤含药肠吸收液对胃癌微环境中 PMN-MDSCs FAK、p-FAK、Src、p-Src 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Banxia Xiexintang-containing intestinal absorption solution on protein expressions of PMN-MDSCs FAK, p-FAK, Src, p-Src in gastric cancer microenvironment ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	FAK/ β -actin	p-FAK/ β -actin	Src/ β -actin	p-Src/ β -actin
空白组		0.64 \pm 0.01	0.66 \pm 0.02	0.83 \pm 0.02	0.73 \pm 0.01
模型组		0.70 \pm 0.02 ¹⁾	0.95 \pm 0.02 ¹⁾	0.88 \pm 0.01 ¹⁾	0.96 \pm 0.03 ¹⁾
FAK 抑制剂组	10 ³⁾	0.48 \pm 0.01 ²⁾	0.54 \pm 0.04 ²⁾	0.71 \pm 0.03 ²⁾	0.73 \pm 0.07 ²⁾
半夏泻心汤组	26	0.55 \pm 0.03 ²⁾	0.56 \pm 0.02 ²⁾	0.59 \pm 0.01 ²⁾	0.95 \pm 0.02
	18	0.57 \pm 0.03 ²⁾	0.61 \pm 0.05 ²⁾	0.63 \pm 0.02 ²⁾	0.76 \pm 0.01 ²⁾
	10	0.61 \pm 0.02 ²⁾	0.76 \pm 0.02 ²⁾	0.64 \pm 0.01 ²⁾	1.09 \pm 0.01

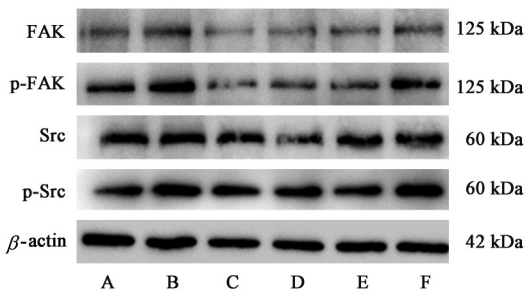


图 4 PMN-MDSCs 中 FAK、p-FAK、Src、p-Src 蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of FAK, p-FAK, Src, p-Src protein expression in PMN-MDSCs

4 讨论

肿瘤可产生免疫抑制微环境,大多数肿瘤可以观察到外周血和肿瘤组织中 MDSCs 比例的升高,其在肿瘤的发生发展过程中起着重要的作用,可阻碍机体的抗肿瘤能力。MDSCs 主要由骨髓的前体细胞生成,生理情况下细胞因子作用于髓细胞,可分化成单核细胞、巨噬细胞、粒细胞及成熟树突状细胞等,在肿瘤等病理刺激下阻断了其正常分化,可参与调控抗肿瘤免疫功能外,还可通过侵袭、上皮-间质转化(EMT)、血管生成、参与转移前微环境形成等非免疫学机制促进肿瘤进展^[18]。根据 MDSCs 表型和生物学功能,分为 PMN-MDSCs 和 M-MDSCs,种属不同,其中鼠源 MDSCs 定义分别为 CD11b⁺Ly6G^{high}Ly6C^{low}、CD11b⁺Ly6G^{low}Ly6C^{high}^[19]。有研究显示,一方面 MDSCs 可先于肿瘤细胞到达转移靶器官,形成转移前微环境,通过血管生成、抑制正常免疫系统等为肿瘤提供一个合适的生存环境,使其进一步发生迁移侵袭。另一方面还可诱导肿瘤细胞上调 MMP-9 及 VEGF 等促进肿瘤细胞的侵袭和转移^[20-21]。因此,干预胃癌微环境中 PMN-

MDSCs 的迁移侵袭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》,主治寒热错杂之痞证,方中半夏、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。诸药配伍,共奏健脾补虚、化痰散结、清解癌毒之功,与胃癌发生发展的中医核心病机及病理演化特征贴切。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人胃癌腹膜高转移潜能细胞株 GC9811-P 细胞的增殖及侵袭转移有显著的干预作用。然而,半夏泻心汤能否干预胃癌微环境中 PMN-MDSCs 的迁移及其侵袭,目前并不清楚。针对胃癌及所形成的肿瘤微环境,胃肠发挥的作用更直接,并且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便,制取快速的优势,该模型可用于早期药物高通量的筛选^[22]。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 迁移及侵袭的影响。

本研究采用 CCK-8 法筛选了半夏泻心汤含药肠吸收液对 PMN-MDSCs 的最佳干预浓度及时间,结果表明 PMN-MDSCs 细胞经半夏泻心汤含药肠吸收液干预 48 h,可显著抑制细胞的活力,故后续实验均选取 48 h 作为实验的标准,且 48 h 半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 18.09%。细胞划痕实验、Transwell 实验表明,胃癌微环境中 PMN-MDSCs 细胞迁移、侵袭能力增强,不同浓度半夏泻心汤含药肠吸收液干预后,细胞迁移、侵袭能力降低,以 26% 含药肠吸收液

组最为显著,提示半夏泻心汤含药肠吸收液可抑制胃癌微环境中PMN-MDSCs细胞恶性生物学行为。PMN-MDSCs可以分泌基质金属蛋白酶(MMPs),在肿瘤微环境中募集的PMN-MDSCs可以通过上调MMP家族蛋白酶的表达促进肿瘤微环境中PMN-MDSCs的侵袭^[23]。同时,PMN-MDSCs自身的高蛋白水解酶分泌能加快细胞外基质的水解,增加毛细血管的通透性,进而促进肿瘤细胞的内渗^[24-25]。VEGF是一种强有力的促瘤因子,沉默VEGF介导的信号可抑制肿瘤的存活^[26-27]。PMN-MDSCs通过产生VEGF来影响肿瘤微环境的重建,MDSCs还被认为能促进肿瘤血管生成过程^[28],并且在肿瘤条件下,MDSCs能通过分泌MMP-9调节肿瘤微环境中的VEGF的生物利用度,同时促进骨髓释放可溶性Kit配体,导致EPC的增殖和迁移能力增强^[29]。并进一步对胃癌微环境中VEGF、MMP-9因子含量进行了相应的检测,结果表明,PMN-MDSCs分泌VEGF、MMP-9,在胃癌微环境中VEGF、MMP-9表达上调,但也不排除有胃癌细胞来源的可能,不同浓度半夏泻心汤含药肠吸收液干预后胃癌微环境中VEGF、MMP-9表达下调。

黏着斑激酶FAK信号通路是胞内外信号传导的中枢,是细胞迁移和侵袭的重要信号通路^[6]。FAK是一种125 kDa的蛋白质,被招募为黏着斑动力学的参与者,并充当信号传导支架,用于组装和随后形成黏着斑^[30]。PMN-MDSCs释放产生的VEGF可以激活FAK信号通路,FAK局部黏着斑激酶在Y397的磷酸化为Src酪氨酸蛋白激酶的Sh2结构域创建了一个结合位点,Src被激活,Src磷酸化入核后促进了靶基因MMP-9的表达,随后增强了PMN-MDSCs细胞的活力,促进细胞的侵袭和迁移^[31]。黏着蛋白激酶FAK作为通路上游蛋白,在肺癌、卵巢癌、乳腺癌、结直肠癌等多种肿瘤中均处于高表达和过度活化的状态,同时与肿瘤细胞生存、增殖、凋亡、迁移等有着密切关系^[32-33]。PF573228是目前研究较多的一种ATP竞争的FAK抑制剂,具有高效、高特异性的特点^[34]。本研究以FAK信号通路为切入点,选择通路中的关键蛋白FAK、Src,探索半夏泻心汤能否抑制FAK、Src的磷酸化水平,抑制胃癌微环境中PMN-MDSCs的迁移侵袭。采用Western blot检测FAK、Src蛋白的表达及其磷酸化水平,结果提示,经半夏泻心汤含药肠吸收液处理后,FAK、p-FAK、Src、p-Src蛋白表达降低。

综上所述,半夏泻心汤能明显抑制胃癌微环境

中PMN-MDSCs细胞恶性生物学行为,下调胃癌微环境中VEGF、MMP-9表达,并调控VEGF/FAK通路,下调FAK通路中的FAK、Src蛋白磷酸化水平,抑制胃癌微环境中PMN-MDSCs迁移侵袭。本研究初步阐明了胃癌微环境中PMN-MDSCs迁移侵袭的生物学机制,为胃癌的发生、发展提供了重要的科学依据。对于未来的临床应用,VEGF/FAK信号通路和其他多通路的潜在特异性抑制剂(如中药复方和单体)可以作为一个目标来开发,并通过激活这些有效的抗癌调节剂,调节机体免疫系统和微环境,为临床诊治胃癌提供新的治疗途径。

[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] DE SANTO C, SERAFINI P, MARIGO I, et al. Nitroaspirin corrects immune dysfunction in tumor-bearing hosts and promotes tumor eradication by cancer vaccination [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(11): 4185-4190.
- [5] ELLIES L G, FISHMAN M, HARDISON J, et al. Mammary tumor latency is increased in mice lacking the inducible nitric oxide synthase [J]. *Int J Cancer*, 2003, 106(1): 1-7.
- [6] KLEINSCHMIDT E G, SCHLAEPFER D D. Focal adhesion kinase signaling in unexpected places [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2017, 45(3): 24-30.
- [7] YAN H, ZHENG C, LI Z, et al. NPTX1 promotes metastasis via integrin/FAK signaling in gastric cancer [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11(4): 3237-3251.
- [8] 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.
- [9] 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.

- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 刘喜平, 李沛清, 明海霞, 等. 半夏泻心汤含药血清对胃癌腹膜转移细胞系 GC9811-P 增殖及侵袭转移的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(10): 1224-1228.
- [13] 董俊刚, 刘喜平, 李沛清, 等. 半夏泻心汤含药血清对胃癌细胞来源外泌体诱导 BMSCs 增殖、迁移、侵袭的影响 [J]. 中成药, 2022, 44(1): 42-48.
- [14] 邓中甲. 方剂学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 88.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 华宏军, 陈萍, 叶晓华, 等. FAK 抑制剂 PF573228 负调控 CD15s 抑制肝癌细胞侵袭的作用机制研究 [J]. 浙江医学, 2021, 43(6): 600-605, 93.
- [18] 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.
- [19] BRONTE V, BRANDAU S, CHEN S H, et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards [J]. *Nat Commun*, 2016, 7(5): 121-150.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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]. 中药药学报, 2018, 46(3): 121-124.
- [23] LIU Y, LAI L, CHEN Q, et al. MicroRNA-494 is required for the accumulation and functions of tumor-expanded myeloid-derived suppressor cells via targeting of PTEN [J]. *J Immunol*, 2012, 188(11): 5500-5510.
- [24] YANG L, DEBUSK L M, FUKUDA K, et al. Expansion of myeloid immune suppressor Gr⁺CD11b⁺ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis [J]. *Cancer Cell*, 2004, 6(4): 409-421.
- [25] YANG L, HUANG J, REN X, et al. Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1⁺CD11b⁺ myeloid cells that promote metastasis [J]. *Cancer Cell*, 2008, 13(1): 23-35.
- [26] BERG T J, PIETRAS A. Radiotherapy-induced remodeling of the tumor microenvironment by stromal cells [J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 86(Pt 3): 846-856.
- [27] APTE R S, CHEN D S, FERRARA N. VEGF in signaling and disease: Beyond discovery and development [J]. *Cell*, 2019, 176(6): 1248-1264.
- [28] TALMADGE J E, GABRILOVICH D I. History of myeloid-derived suppressor cells [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(10): 739-752.
- [29] MADLAMBAYAN G J, BUTLER J M, HOSAKA K, et al. Bone marrow stem and progenitor cell contribution to neovasculogenesis is dependent on model system with SDF-1 as a permissive trigger [J]. *Blood*, 2009, 114(19): 4310-4319.
- [30] NGUYEN B T, PYUN J C, LEE S G, et al. Identification of new binding proteins of focal adhesion kinase using immunoprecipitation and mass spectrometry [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 12908.
- [31] HERRAIZ T, GALISTEO J. Tetrahydro-beta-carboline alkaloids that occur in foods and biological systems act as radical scavengers and antioxidants in the ABTS assay [J]. *Free Radic Res*, 2002, 36(8): 923-928.
- [32] PAN M R, HOU M F, OU-YANG F, et al. FAK is required for tumor metastasis-related fluid microenvironment in triple-negative breast cancer [J]. *J Clin Med*, 2019, 8(1): 38-43.
- [33] DEVAUD C, TILKIN-MARIAME A F, VIGNOLLE-VIDONI A, et al. FAK alternative splice mRNA variants expression pattern in colorectal cancer [J]. *Int J Cancer*, 2019, 145(2): 494-502.
- [34] ROY S, RUEST P J, HANKS S K. FAK regulates tyrosine phosphorylation of CAS, paxillin, and PYK2 in cells expressing v-Src, but is not a critical determinant of v-Src transformation [J]. *J Cell Biochem*, 2002, 84(2): 377-388.

[责任编辑 张丰丰]