

健脾养正消癥汤通过抑制有氧糖酵解对胃癌HGC-27细胞增殖及干细胞特性的影响

陶鹤云^{1,2}, 刘元杰^{1,2}, 李洁玘^{1,2}, 曾树宏^{1,2}, 张莹^{1,2}, 刘沈林¹, 邹玺^{1*}

(1. 南京中医药大学附属医院, 南京 210029; 2. 南京中医药大学第一临床医学院, 南京 210023)

[摘要] 目的:观察健脾养正消癥汤通过抑制有氧糖酵解过程而对人胃癌细胞HGC-27增殖过程及干细胞特性的影响,并探讨其具体机制。方法:采用噻唑蓝(MTT)比色法测定健脾养正消癥汤(0.25、0.5、1、2、4、8、16、32 g·L⁻¹)处理胃癌细胞HGC-27的存活率及化疗敏感性的变化;细胞克隆形成实验检测健脾养正消癥汤(2、4、8 g·L⁻¹)对细胞克隆形成能力的影响;葡萄糖检测试剂盒和乳酸测定试剂盒检测健脾养正消癥汤处理后胃癌细胞有氧糖酵解水平的变化;流式细胞术检测胃癌HGC-27细胞中干细胞亚群的比例;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测胃癌细胞中乳酸脱氢酶(LDH)及己糖激酶2(HK2)、葡萄糖转运蛋白1(GLUT1)、丙酮酸激酶同工酶M2(PKM2)等糖酵解相关蛋白的表达及八聚体结合转录因子4(OCT4)、SRY-box转录因子2(SOX2)、Nanog等干细胞特性相关蛋白的表达。结果:MTT比色法结果表明,与空白组比较,健脾养正消癥汤(0.5、1、2、4、8、16、32 g·L⁻¹)组能够抑制胃癌HGC-27细胞活力($P<0.05$, $P<0.01$),其半数抑制浓度(IC₅₀)为4.83 g·L⁻¹,且健脾养正消癥汤能够提高胃癌HGC-27细胞对顺铂化疗的敏感性;克隆形成实验表明,与空白组比较,健脾养正消癥汤(2、4、8 g·L⁻¹)均能显著减少胃癌HGC-27细胞克隆形成数($P<0.01$),且呈现浓度依赖性;流式细胞术表明,与空白组比较,健脾养正消癥汤(2、4、8 g·L⁻¹)作用后细胞的CD44⁺CD24⁺ALDH⁺细胞亚群比例率明显降低($P<0.05$);葡萄糖检测和乳酸检测表明,与空白组比较,健脾养正消癥汤(2、4、8 g·L⁻¹)能有效抑制胃癌细胞的葡萄糖摄取和乳酸生成($P<0.01$);Western blot表明,与空白组比较,健脾养正消癥汤(2、4、8 g·L⁻¹)能下调SOX2、Nanog、OCT4等干性相关蛋白及PKM2、LDH、GLUT1、HK2等有氧糖酵解途径相关蛋白的水平($P<0.05$, $P<0.01$),并呈浓度依赖性。结论:健脾养正消癥汤对胃癌细胞增殖具有明显抑制作用,且能够降低胃癌干细胞特性,其作用机制可能与干预胃癌的糖代谢通路—有氧糖酵解有关。

[关键词] 胃癌; 健脾养正消癥汤; 有氧糖酵解; 肿瘤干细胞特性; 增殖

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)11-0082-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.202202421

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20221103.1543.005.html>

[网络出版日期] 2022-11-04 09:40:01

Jianpi Yangzheng Xiaozheng Decoction Affect Proliferation and Stemness of Gastric Cancer HGC-27 Cells by Inhibiting Aerobic Glycolysis

TAO Heyun^{1,2}, LIU Yuanjie^{1,2}, LI Jiepin^{1,2}, ZENG Shuhong^{1,2}, ZHANG Ying^{1,2}, LIU Shenlin¹, ZOU Xi^{1*}

(1. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;

2. The First Clinical Medical College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Jianpi Yangzheng Xiaozheng decoction (JYXD) on the proliferation and stemness of the human gastric cancer (GC) cell line HGC-27 by inhibiting aerobic glycolysis, and explore the underlying mechanism. **Method:** Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was employed to determine the survival rate and chemotherapy sensitivity of HGC-27 cells treated with JYXD (0.25, 0.5, 1, 2,

[收稿日期] 2022-05-30

[基金项目] 江苏省2019年省级重点研发计划专项资金(社会发展)项目(BE2019771);江苏省中医院第三批高峰人才培养计划项目(省中医[2021]111号)

[第一作者] 陶鹤云,在读硕士,从事中医药防治肿瘤的临床研究,E-mail:2296975246@qq.com

[通信作者] * 邹玺,博士,主任中医师,从事中医药防治肿瘤的临床研究,E-mail:zxvery@126.com

4, 8, 16, 32 g·L⁻¹). Colony formation assay was employed to detect the effect of JYXD (2, 4, 8 g·L⁻¹) on the colony formation of the cells. The aerobic glycolysis level of HGC-27 cells after treatment with JYXD was measured by glucose assay kit and lactic acid assay kit. The proportion of stem cell subsets in HGC-27 cells was detected by flow cytometry. Western blot was employed to determine the expression of glycolysis-associated proteins such as lactate dehydrogenase (LDH), hexokinase 2 (HK2), glucose transporter 1 (GLUT1), and pyruvate kinase isozyme M2 (PKM2), and the expression of stemness-associated proteins such as octamer-binding transcription factor 4 (OCT4), SRY-box transcription factor 2 (SOX2), and Nanog. **Result:** JYXD (0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 g·L⁻¹) inhibited the activity of HGC-27 cells ($P<0.05$, $P<0.01$), with the inhibitory concentration 50(IC₅₀) of 4.83 g·L⁻¹, and it improved the sensitivity of HGC-27 cells to cisplatin chemotherapy. Compared with the control group, JYXD (2, 4, 8 g·L⁻¹) reduced the colony formation number of HGC-27 cells ($P<0.01$) in a concentration-dependent manner. Flow cytometry showed that compared with that in the control group, the proportion of CD44⁺CD24⁺ALDH⁺ population in the cells treated with JYXD (2, 4, 8 g·L⁻¹) decreased ($P<0.05$). In addition, JYXD (2, 4, 8 g·L⁻¹) inhibited the glucose uptake and lactic acid production of HGC-27 cells. Western blot showed that compared with the control group, JYXD (2, 4, 8 g·L⁻¹) down-regulated the expression levels of SOX2, Nanog, OCT4, PKM2, LDH, GLUT1, and HK2 ($P<0.05$, $P<0.01$) in a concentration-dependent manner. **Conclusion:** JYXD may inhibit the proliferation and reduce the stemness of HGC-27 cells by regulating the aerobic glycolysis.

[Keywords] gastric cancer; Jianpi Yangzheng Xiaozheng decoction; aerobic glycolysis; stemness of cancer cells; proliferation

胃癌(GC)目前仍然是全球范围内高发的恶性肿瘤,最新的GLOBOCAN统计数据显示,2020年有超过100万的胃癌新发病例和大约76.9万的死亡病例,发病率和死亡率分别位于全球第5位和第4位^[1]。近年来由于新兴的治疗手段的开发,例如免疫治疗、靶向治疗及外科手术治疗进展等,可供选择的进展期胃癌的综合治疗方案较前增加,然而高复发转移可能及后期对常规治疗的抵抗导致其远期治疗效果并不乐观^[2-4]。中医药除了其本身的抗肿瘤活性,在化疗增敏、降低化疗不良反应、改善生活质量等方面显示出了独特的优势和潜力^[5]。首届全国名中医刘沈林教授是吴门医派学术传人,在吸收运用前人理论的基础上,通过长期临床实践,针对胃癌,提出了“脾虚正衰是病机关键,癌毒是重要病理因素”的理论。健脾养正消癥汤即是根据此理论,由《何氏虚劳心传》中的健脾资生丸及《沈氏尊生书》中的血癥丸化裁而来。此方的前期临床试验表明,晚期胃癌患者在常规化疗的基础上增加健脾养正消癥汤可以显著延长患者生存期,并提高患者的生活质量评分^[6]。然而其潜在的抗癌机制尚未阐明。肿瘤干细胞(CSCs)被认为是常规治疗杀伤大部分肿瘤细胞后残余的具有干样特性的细胞亚群,通常导致治疗的耐药。因此,针对肿瘤干细胞的治疗将是肿瘤研究的一个重要挑战。对各种肿瘤类

型(包括消化系统肿瘤如胃癌、肠癌,脑肿瘤如胶质母细胞瘤,及其他高发病率的肿瘤如乳腺癌、肺癌等)的诸多体内外实验研究均表明,CSCs比其他分化的癌细胞表现出更强烈的有氧糖酵解^[7-9],因此,从靶向代谢重编程的角度来降低胃癌干细胞特性,从而破除胃癌高复发、预后差的困局,是值得探索的研究方向,这也与健脾养正消癥汤改良方所体现出的临床效果不谋而合。本实验从该复方对胃癌增殖的影响入手,观察其对GC干细胞特性及有氧糖酵解过程的影响,尝试阐明健脾养正消癥汤改良方对胃癌细胞作用的机制。

1 材料

1.1 细胞株 人类未分化GC细胞系HGC-27获得自中国科学院,编号TCHu 22,由南京中医药大学第一附属医院中心实验室常规培养,采用传代后第3~5代细胞进行实验。

1.2 药物及制备 健脾养正消癥汤所有饮片均购自江苏省中医院,并由南京中医药大学第一附属医院主管中药师刘志辉鉴定均为正品。方药组成:党参30 g、生黄芪60 g、炒白术10 g、炒白芍10 g、当归10 g、石见穿15 g、三棱30 g、莪术30 g、白花蛇舌草15 g、陈皮6 g、生甘草5 g。所有饮片用双蒸水2 210 mL浸泡30 min,然后用中火煮沸30 min,回流提取,后再次用10倍双蒸水重复上一过程。将得到

的药液混合,再次加热回流,使其终质量浓度为 $1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,灭菌并通过 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤,于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 储存备用。顺铂溶液制备:用生理盐水 $1\ \text{mL}$ 将顺铂对照品(美国Sigma公司,批号P4394) $100\ \text{mg}$ 充分溶解,分装避光保存至 $-20\ ^\circ\text{C}$ 冰箱待用。

1.3 试剂 RPMI 1640培养基、青-链霉素[赛默飞世尔科技(中国)有限公司,批号分别为2085154、2240832];新生小牛血清(浙江天杭生物科技有限公司,批号20010401);噻唑蓝(MTT,美国Sigma公司,批号L2362);胰酶细胞消化液(0.25%胰酶,不含EDTA)、结晶紫染色液、细胞裂解液(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为C0205、C0121、P0013);葡萄糖测定试剂盒(葡萄糖氧化酶法)(上海荣盛生物药业有限公司,批号20181209290);乳酸测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号20190603);乳酸脱氢酶(LDH)及己糖激酶2(HK2)抗体(美国Proteintech公司,批号分别为19987-1-AP、66287-1-Ig);丙酮酸激酶同工酶M2(PKM2)、葡萄糖转运蛋白1(GLUT1)、SRY-box转录因子2(SOX2)、Nanog、八聚体结合转录因子4(OCT4)、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国Cell Signaling公司,批号分别为4053S、73015S、3579S、4093S、2750S、9665S);乙醛脱氢酶(ALDH)检测试剂盒[安诺伦(北京)生物科技有限公司,批号01700];CD44、CD24抗体、FcR段封闭试剂(德国Miltenyi公司,批号分别为130-133-900、130-115-328、130-059-901);二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号134293)。

1.4 仪器 1300A2型生物安全柜、HERAcell 1501型 CO_2 培养箱(美国Thermo公司);IX51型倒置显微镜(日本Olympus公司);ELx800型全自动酶标仪(美国Bio Tek公司);C6流式细胞仪(美国BD公司);PowerPac™ Basic型电泳仪及转膜仪(美国Bio-Rad公司);Tanon-5500型化学发光凝胶成像仪器(中国天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 在完成细胞复苏后,用RPMI 1640完全培养基(含10%小牛血清及100单位/mL的青-链霉素)将HGC-27细胞培养于 $37\ ^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中。当细胞长满至培养皿面积的80%左右,进行细胞传代。取对数期细胞进行下一步实验。

2.2 MTT比色法检测细胞存活率 人胃癌HGC-27细胞生长至对数期时,将细胞消化重悬后接种于96孔板,每孔约5 000个细胞左右(每孔

$100\ \mu\text{L}$),再次放入培养箱中孵育24 h,根据实验计划加入浓度梯度的含药培养基或单纯培养基,每孔 $200\ \mu\text{L}$,每组设置5个复孔。根据预实验结果,确定健脾养正消癥汤及顺铂化疗对HGC-27细胞的有效浓度范围,据此确定每组给药浓度。中药组药物质量浓度为0.25、0.5、1、2、4、8、16、32 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$;化疗组药物质量浓度为0.078 125、0.156 25、0.312 5、0.625、1.25、2.5、5、10、20、40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$;化疗+中药组药物浓度选择:化疗药物浓度梯度同化疗组药物浓度,中药药物浓度则根据中药组实验结果,均取1/3半数抑制浓度(IC_{50}) $1.6\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。将加药后的96孔板继续放回培养箱中孵育24 h,弃去上清,每孔加入含0.5% MTT溶液的完全培养液 $20\ \mu\text{L}$,4 h后再次弃上清,每孔加入二甲基亚砜(DMSO) $150\ \mu\text{L}$,将96孔板置于摇床上低速震荡10 min以充分溶解孔内结晶物。使用酶标仪测定490 nm吸光度 A ,计算细胞存活率。细胞存活率= $A_{\text{给药组}}/A_{\text{空白组}}\times 100\%$ 。

2.3 克隆形成实验检测细胞增殖能力 取处于对数增殖期的HGC-27细胞,以500个/孔均匀铺至6孔板,待细胞贴壁弃去旧培养液,换入浓度梯度的加药培养基或不加药培养基,设置空白组、健脾养正消癥汤组(2、4、8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),24 h去药,换入新鲜不加药完全培养基,继续常规培养7~10 d,待其形成肉眼可见的克隆,且每孔里大多数都形成含有50个细胞以上的细胞团。用4%多聚甲醇固定,使用0.1%结晶紫染色,显微镜下计数>50个细胞的集落数。

2.4 流式细胞术检测干细胞亚群比例 细胞培养铺板方法同2.3项,设置空白组、健脾养正消癥汤组(2、4、8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),在含药培养基干预24 h,每组收集约 1×10^6 个细胞,每管加入配置好的缓冲液(0.1 g BSA+20 mL PBS) $100\ \mu\text{L}$ 重悬;向各组中加入FcR段封闭试剂 $10\ \mu\text{L}$,活化后的ALDH试剂 $5\ \mu\text{L}$,避光 $4\ ^\circ\text{C}$ 孵育30 min;然后加入CD44、CD24抗体各 $2\ \mu\text{L}$,避光 $4\ ^\circ\text{C}$ 孵育15 min;利用未加药细胞设置单阳管,分别加入ALDH、CD44、CD24抗体, $4\ ^\circ\text{C}$ 孵育;每管加入缓冲液 $500\ \mu\text{L}$ 洗涤细胞,离心机设置为 $1\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心(离心时间3 min,离心半径30 cm),弃上清,此步骤重复2次;各管加入缓冲液 $500\ \mu\text{L}$ 重悬;流式细胞仪检测各组 $\text{CD44}^+\text{CD24}^+\text{ALDH}^+$ 细胞亚群比例;实验重复3次。

2.5 细胞乳酸产量检测 细胞培养铺板方法同2.3项,分别加入不同浓度的含药培养基(健脾养正消癥汤2、4、8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),培养24 h,收集细胞上清液,按照乳酸测试盒说明书要求来检测各组乳酸浓度。

2.6 细胞葡萄糖消耗率检测 细胞培养铺板方法同2.3项,分别加入不同浓度的含药培养基(健脾养正消癥汤2、4、8 g·L⁻¹),培养24 h,收集细胞上清液,按照葡萄糖测定试剂盒(葡萄糖氧化酶法)说明书的要求,检测各组葡萄糖浓度,葡萄糖消耗率=细胞上清葡萄糖浓度/新鲜培养基葡萄糖浓度×100%。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测有氧糖酵解途径相关蛋白及肿瘤干性相关蛋白表达 将对数生长期的HGC-27细胞消化重悬后,调整细胞密度为5×10⁷个/L,接种于6孔板中,细胞贴壁生长后,加入浓度梯度的含药培养基(健脾养正消癥汤2、4、8 g·L⁻¹)或空白培养基常规培养24 h,消化收集细胞,RIPA裂解,提取蛋白。BCA法测定总蛋白浓度,计算上样量。将提取的蛋白样品与5×SDS蛋白上样缓冲液按4:1体积比混匀,99℃煮10 min,按计算的上样量加至适当浓度SDS-PAGE胶中进行电泳分离。电泳完毕后根据蛋白分子量切胶转膜,转膜完成后,5%奶粉封闭1 h,分别加入相应一抗(HK2、PKM2、GLUT1、LDH、SOX2、OCT4、Nanog, β-actin, 1:1 000),4℃孵育过夜,TBST洗膜3次,每次10 min,加入二抗(1:6 000),室温孵育1 h。ECL液显影曝光检测蛋白表达情况。

2.8 统计学分析 数据均采用SPSS 22.0软件进行分析,组间比较采用独立样本t检验或最小显著性差异法(LSD)-t检验,使用 $\bar{x} \pm s$ 表示。Western blot实验采用Image J软件分析。P<0.05表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 健脾养正消癥汤对胃癌HGC-27细胞存活率的影响 与空白组比较,健脾养正消癥汤对胃癌HGC-27细胞干预24 h,≥0.5 g·L⁻¹时,其细胞存活率明显降低(P<0.05, P<0.01),并呈浓度依赖性,健脾养正消癥汤作用于HGC-27细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)为4.83 g·L⁻¹,本研究的后续实验使用健脾养正消癥汤2、4、8 g·L⁻¹进行分组。见表1。

3.2 健脾养正消癥汤对胃癌HGC-27细胞化疗敏感性的影响 通过对比单独使用顺铂和中药联合顺铂对胃癌细胞存活率的影响,与化疗组比较,当化疗联合低剂量的健脾养正消癥汤时,胃癌细胞存活率降低(P<0.05),化疗组IC₅₀为0.72 mg·L⁻¹,化疗+中药组的IC₅₀为0.39 mg·L⁻¹。见表2。表明健脾养正消癥汤能够增加胃癌细胞对化疗的敏感性。

3.3 健脾养正消癥汤对胃癌HGC-27细胞克隆形成能力的影响 与空白组比较,健脾养正消癥汤在

表1 健脾养正消癥汤对HGC-27细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Effect of Jianpi Yangzheng Xiaozheng decoction on viability of HGC-27 cells($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	细胞存活率/%
空白组		100.00±0.00
中药组	0.25	95.51±2.34
	0.5	91.20±2.03 ¹⁾
	1	80.33±2.33 ²⁾
	2	69.00±6.38 ¹⁾
	4	53.58±2.28 ²⁾
	8	27.41±3.94 ²⁾
	16	24.83±3.34 ²⁾
32	22.29±4.47 ²⁾	

注:与空白组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01(表4、表6、表7同)

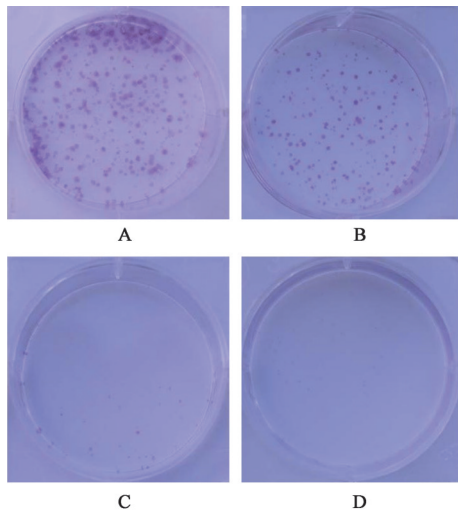
表2 健脾养正消癥汤对HGC-27细胞化疗敏感性的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Effect of Jianpi Yangzheng Xiaozheng decoction on chemosensitivity of HGC-27 cells($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	顺铂质量浓度/mg·L ⁻¹	细胞存活率/%
空白组		100.00±0.00
化疗组	0.078 125	92.15±3.61
	0.156 25	72.34±3.63 ¹⁾
	0.312 5	63.24±6.77 ¹⁾
	0.625	40.13±1.86 ¹⁾
	1.25	32.90±2.68 ¹⁾
	2.5	26.71±2.32 ¹⁾
	5	22.60±2.20 ¹⁾
	10	19.67±1.69 ¹⁾
	20	15.37±0.87 ¹⁾
	40	14.53±0.83 ¹⁾
化疗+中药组(1.6 g·L ⁻¹)	0.078 125	83.68±2.08 ²⁾
	0.156 25	68.67±1.58 ²⁾
	0.312 5	43.61±0.97 ²⁾
	0.625	37.19±1.97
	1.25	27.08±0.30 ²⁾
	2.5	19.63±0.20 ²⁾
	5	18.22±0.39
	10	13.25±0.16 ²⁾
20	12.58±0.12 ²⁾	
40	11.84±0.48 ²⁾	

注:与空白组比较¹⁾P<0.05;与化疗组比较²⁾P<0.05

2 g·L⁻¹时即能显著减少胃癌HGC-27细胞克隆形成数(P<0.01),呈浓度依赖性。见图1、表3。表明健脾养正消癥汤能有效降低胃癌细胞的增殖能力。



注: A. 空白组; B、C、D. 健脾养正消癥汤组(2、4、8 g·L⁻¹)(图2、图3同)

图1 健脾养正消癥汤对胃癌HGC-27细胞克隆形成率的影响(结晶紫)

Fig. 1 Effect of Jianpi Yangzheng Xiaozheng decoction on clone formation rate of HGC-27 cells (crystal violet)

表3 健脾养正消癥汤对胃癌HGC-27细胞克隆形成率的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Jianpi Yangzheng Xiaozheng decoction on clone formation rate of HGC-27 cells($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	克隆形成率/%
空白组		42.70±2.58
中药组	2	24.90±1.33 ¹⁾
	4	4.80±0.72 ¹⁾
	8	2.10±0.50 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.01(表5同)

3.4 健脾养正消癥汤对胃癌HGC-27细胞干细胞亚群比例的影响 与空白组比较,健脾养正消癥汤(2、4、8 g·L⁻¹)作用后细胞的干细胞亚群比例率明显降低(P<0.05)。见表4。

表4 健脾养正消癥汤对胃癌HGC-27细胞干细胞亚群比例的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Jianpi Yangzheng Xiaozheng decoction on percentage of GC stem-like cell population of HGC-27 cells($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	干细胞亚群比例/%
空白组		12.10±3.24
中药组	2	4.07±0.27 ¹⁾
	4	2.25±0.14 ¹⁾
	8	1.23±0.42 ¹⁾

3.5 健脾养正消癥汤对胃癌细胞有氧糖酵解水平的影响 与空白组比较,健脾养正消癥汤组(2、4、

8 g·L⁻¹)乳酸产量和葡萄糖消耗率随着给药浓度的升高而下降,差异具有统计学意义,这表明该方能够显著抑制胃癌细胞的有氧糖酵解水平。见表5。

表5 健脾养正消癥汤对胃癌HGC-27细胞有氧糖酵解水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Jianpi Yangzheng Xiaozheng decoction on aerobic glycolysis level of HGC-27 cells($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	乳酸产量/mmole·L ⁻¹	葡萄糖消耗率/100%
空白组		5.06±0.217	56.4±4.7
中药组	2	4.67±0.315 ¹⁾	34.0±2.8 ¹⁾
	4	2.68±0.179 ¹⁾	16.4±2.7 ¹⁾
	8	0.84±0.406 ¹⁾	8.7±2.4 ¹⁾

3.6 健脾养正消癥汤对胃癌细胞干性及有氧糖酵解相关蛋白表达的影响 和空白组比较,使用健脾健脾养正消癥汤(2、4、8 g·L⁻¹)处理胃癌HGC-27细胞,SOX2、Nanog、OCT4等干性相关蛋白表达及PKM2、LDH、GLUT1、HK2等有糖糖酵解途径相关蛋白表达下降(P<0.05, P<0.01),并呈浓度依赖性,表明健脾养正消癥汤能抑制胃癌有氧糖酵解途径,并下调其干细胞特性。见表6、表7和图2、图3。

表6 健脾养正消癥汤对胃癌HGC-27细胞干性相关蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of Jianpi Yangzheng Xiaozheng decoction on cancer stemness related protein expression in HGC-27 cells($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	SOX2/ β -actin	Nanog/ β -actin	OCT4/ β -actin
空白组		1.118±0.052	1.274±0.158	0.880±0.117
中药组	2	0.759±0.016 ²⁾	0.940±0.294	0.560±0.173
	4	0.597±0.194 ²⁾	0.159±0.030 ²⁾	0.069±0.005 ²⁾
	8	0.153±0.030 ²⁾	0.176±0.032 ²⁾	0.207±0.248 ²⁾

4 讨论

肿瘤干细胞(CSCs)被认为是肿瘤细胞的来源,这一假说的提出最早可以追溯至20世纪90年代后期,其认为在各种类型的恶性肿瘤中均存在一组负责疾病发生发展和治疗耐药的细胞^[10-12]。基于该假说的理论,多项研究已经在许多肿瘤中发现了细胞分层模型,在这种分层模型的顶点处存在一群少数的未分化的细胞,即称为CSCs,不仅可以保持其自身的“永生性”,而且可以产生多个肿瘤细胞^[13-14]。如果抗肿瘤治疗无法消除CSCs,仅作用于分化的癌细胞,则最终将难以免于肿瘤复发甚至转移的结

表7 健脾养正消癥汤对胃癌HGC-27细胞有氧糖酵解相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Effect of Jianpi Yangzheng Xiaozheng decoction on glycolysis related protein expression in HGC-27 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	PKM2/ β -actin	LDH/ β -actin	GLUT1/ β -actin	HK2/ β -actin
空白组		0.658±0.145	0.853±0.116	0.129±0.060	2.118±0.123
中药组	2	0.497±0.491	0.754±0.156	0.404±0.131 ²⁾	0.750±0.178 ²⁾
	4	0.390±0.116	0.529±0.071 ¹⁾	0.069±0.005 ²⁾	0.085±0.050 ²⁾
	8	0.331±0.090 ¹⁾	0.264±0.620 ²⁾	0.042±0.009 ²⁾	0.174±0.040 ²⁾

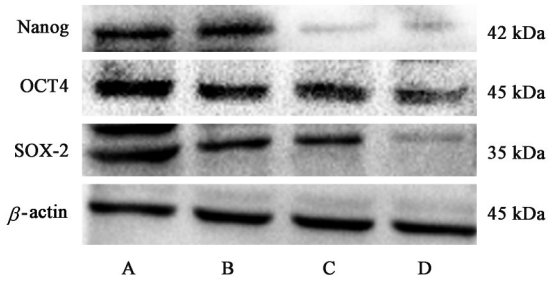


图2 HGC-27细胞SOX2、Nanog、OCT4蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of expression of SOX2, Nanog, OCT4 in HGC-27 cells

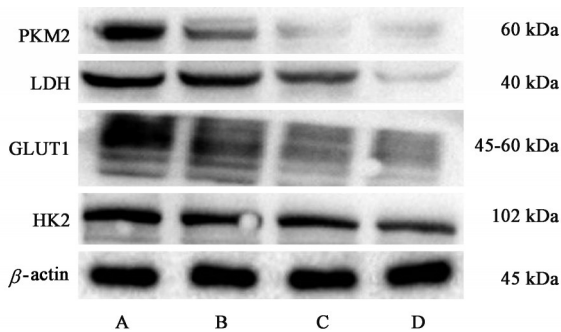


图3 HGC-27细胞PKM2、LDH、GLUT1及HK2蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of expression of PKM2, LDH, GLUT1 and HK2 in HGC-27 cells

局。因此,针对CSCs的治疗是可能成功克服肿瘤的主要挑战之一。和正常细胞比较,即便在存在足够氧气的情况下,快速增殖的癌细胞更倾向于使用糖酵解而不是氧化磷酸化来产生ATP的现象,被称为沃伯格效应(Warburg effect)^[15-16]。多项研究表明,肿瘤干细胞亚群比其他癌细胞更依赖于糖酵解,CSCs中的葡萄糖摄取,几种糖酵解酶,乳酸产生和ATP含量显著增加^[17-19],从而揭示了肿瘤干细胞比较于其他细胞而言的鲜明代谢概况。因此,将注意力转向与干细胞特性严格相关的有氧糖酵解代谢过程可能是治疗的突破口。

大量研究表明,在现代把中医药作为与胃癌常规治疗相结合的重要手段是有效且必要的^[20]。根据胃镜检查观察所见,临床所见绝大多数胃癌患者发病与慢性胃疾迁延不愈关系密切。江苏省中医药肿瘤科刘沈林教授认为,尽管本病的临床表现复

杂,但病机不外乎本虚标实,“本虚”主要在于“脾气虚损”,“标实”主要在于“癥瘕积聚”,“健脾益气”“消癥散结”是中药抗胃癌复发转移的主要治疗法则。健脾养正消癥汤正是以此立法,诸药合用,可扶正兼顾祛邪,从而达到补中气、养营血、行气滞、渗湿浊、解癌毒的功效。

本研究结果显示,健脾养正消癥汤单独使用能够降低胃癌细胞存活率。比DDP 0.72 mg·L⁻¹的IC₅₀,中药起效浓度较高,IC₅₀为4.83 g·L⁻¹。进一步对比了单用顺铂和健脾养正消癥汤联合顺铂对胃癌细胞存活率的影响,当顺铂联合低剂量健脾养正消癥汤,对比其单独使用,IC₅₀从0.72 mg·L⁻¹明显降低至0.39 mg·L⁻¹,其中中药的浓度取其IC₅₀的1/3,是为了避免其本身对胃癌细胞增殖与活性的影响,而重点在于其对降低常规治疗抗性的探讨,实验结果证明了该方可以增加化疗敏感性。克隆形成实验表明健脾养正消癥汤能够降低胃癌细胞克隆形成能力。肿瘤干细胞理论上是处于“静止期”的细胞,而常规治疗如化疗等主要针对的是处于分裂增殖期的肿瘤细胞,从而导致即便在使用常规治疗后,大量处于高度增殖状态的肿瘤细胞被杀死,然而残余的具有高度干性的肿瘤细胞,则成为复发转移的根源。从独立抑制胃癌细胞增殖这个方面来说,健脾养正消癥汤的作用远不如化疗,但是这种增加化疗敏感性,降低肿瘤细胞克隆能力的作用正与肿瘤干细胞治疗理论中靶向其“高度治疗抗性”及“肿瘤起始细胞特性”的原则不谋而合。

本课题进一步探讨了健脾养正消癥汤是否会直接影响胃癌干细胞特性。胃癌细胞系中特异性的干细胞表面标记物尚未完全确定^[21],结合文献查阅及预实验结果,本实验将ALDH、CD44、CD24作为胃癌HGC-27细胞系的干细胞表面标记物,CD44⁺CD24⁺ALDH⁺细胞亚群作为HGC-27细胞中的干细胞亚群。结果表明,健脾养正消癥汤能够显著降低胃癌干细胞亚群比例,并呈浓度依赖性。同时,Nanog、SOX2、OCT4等关键肿瘤干细胞相关转录因子的表达水平显著降低。以上结果均揭示了

健脾养正消瘿汤对胃癌干细胞特性具有抑制作用。

肿瘤细胞有氧糖酵解是葡萄糖在有氧气存在的条件下经历一系列酶促反应,最终转化为乳酸盐的过程,其反应过程受到几个关键酶及转运蛋白的影响。其中GLUT1、PKM2、LDH、HK2是有氧糖酵解过程中的几个关键酶及转运蛋白,后续实验中发现健脾养正消瘿方作用胃癌细胞后,胃癌细胞葡萄糖消耗率及乳酸产量均降低,GLUT1、PKM2、LDH、HK2的蛋白表达受到了抑制。因此,健脾养正消瘿方能够在体外抑制胃癌细胞的有氧糖酵解水平。

综上,根据健脾养正消瘿汤临床抗复发转移的有效性,结合本实验结果,联系已有的对肿瘤复发转移机制的理解,推测其对胃癌细胞的抑制作用可能是通过干预胃癌的糖代谢通路—有氧糖酵解,从而进一步调控胃癌干细胞特性来起作用的。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[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 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3):209-249.

[2] 王居祥,徐力. 中医肿瘤治疗学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2014:290.

[3] 宋杰,陈风格,赵伟,等. 胃癌的发病率现状与治疗研究进展[J]. *中国慢性病预防与控制*, 2016, 24(9): 704-707.

[4] TANG H N, HU J H. A comparison of surgical procedures and postoperative cares for minimally invasive laparoscopic gastrectomy and open gastrectomy in gastric cancer[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(7):10321-10329.

[5] YANG L, ZHAO L, ZENG T, et al. Mechanisms underlying therapeutic effects of traditional Chinese medicine on GC [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 8407-8418.

[6] 翁蕾. 健脾养正消瘿方中运用大剂量黄芪、党参治疗中晚期胃癌脾胃气虚证的临床疗效观察[D]. 南京:南京中医药大学, 2019.

[7] CIAVARDELLI D, ROSSI C, BARCAROLI D, et al. Breast cancer stem cells rely on fermentative glycolysis and are sensitive to 2-deoxyglucose treatment[J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(7):e1336.

[8] LIAO J, QIAN F, TCHABO N, et al. Ovarian cancer spheroid cells with stem cell-like properties contribute to tumor generation, metastasis and chemotherapy resistance through hypoxia-resistant metabolism [J].

PLoS One, 2014, 9(1):e84941.

[9] PALORINI R, VOTTA G, BALESTRIERI C, et al. Energy metabolism characterization of a novel cancer stem cell-like line 3AB-OS[J]. *J Cell Biochem*, 2014, 115(2):368-379.

[10] BONNET D, DICK J E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell [J]. *Nat Med*, 1997, 3(7):730-737.

[11] DALLA POZZA E, DANDO I, BIONDANI G, et al. Pancreatic ductal adenocarcinoma cell lines display a plastic ability to bi-directionally convert into cancer stem cells[J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(3):1099-1108.

[12] HASSAN K A, WANG L, KORKAYA H, et al. Notch pathway activity identifies cells with cancer stem cell-like properties and correlates with worse survival in lung adenocarcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(8):1972-1980.

[13] BECK B, BLANPAIN C. Unravelling cancer stem cell potential [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(10):727-738.

[14] ISLAM F, QIAO B, SMITH R A, et al. Cancer stem cell: Fundamental experimental pathological concepts and updates [J]. *Exp Mol Pathol*, 2015, 98(2): 184-191.

[15] PAVLOVA N N, THOMPSON C B. The emerging hallmarks of cancer metabolism[J]. *Cell Metab*, 2016, 23(1):27-47.

[16] CAIRNS R A, HARRIS I S, MAK T W. Regulation of cancer cell metabolism[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(2):85-95.

[17] LIU P P, LIAO J, TANG Z J, et al. Metabolic regulation of cancer cell side population by glucose through activation of the Akt pathway[J]. *Cell Death Differ*, 2014, 21(1):124-135.

[18] CIAVARDELLI D, ROSSI C, BARCAROLI D, et al. Breast cancer stem cells rely on fermentative glycolysis and are sensitive to 2-deoxyglucose treatment[J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(7):e1336.

[19] PALORINI R, VOTTA G, BALESTRIERI C, et al. Energy metabolism characterization of a novel cancer stem cell-like line 3AB-OS[J]. *J Cell Biochem*, 2014, 115(2):368-379.

[20] 苏羚子,焦丽静,许玲. 中医药治疗胃癌临床研究进展 [J]. *世界临床药物*, 2021, 42(5):335-339.

[21] TANIGUCHI H, MORIYA C, IGARASHI H, et al. Cancer stem cells in human gastrointestinal cancer [J]. *Cancer Sci*, 2016, 107(11):1556-1562.

[责任编辑 张丰丰]