

基于巨噬细胞极化观察白术内酯Ⅱ对胃癌细胞的作用

袁梦云, 张星星, 谢晓东, 陈敏, 王红星, 吴坚, 赵智强*
(南京中医药大学附属医院, 南京 210029)

[摘要] 目的:研究白术内酯Ⅱ对巨噬细胞极化的影响并探讨其发挥抗肿瘤的作用机制。方法:用佛波酯(PMA)诱导THP-1细胞分化成巨噬细胞,噻唑蓝(MTT)比色法检测不同浓度白术内酯Ⅱ作用不同时间,对巨噬细胞生长的影响,筛选出白术内酯Ⅱ的安全给药浓度。不同浓度白术内酯Ⅱ作用24 h,巨噬细胞与胃癌细胞共培养,光镜下观察2种细胞的存活状态,MTT比色法检测胃癌细胞的增殖变化,筛选出白术内酯Ⅱ的有效给药浓度。将细胞分为空白组、模型组、白术内酯Ⅱ(200, 100, 50 mg·L⁻¹)组。划痕实验观察不同浓度白术内酯Ⅱ作用后巨噬细胞对胃癌细胞迁移及形态的影响。流式细胞术(FCM)检测M1, M2型巨噬细胞表面标志CD86, CD206表达;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)及蛋白免疫印迹法(Western blot)检测M1, M2型巨噬细胞相关肿瘤坏死因子(TNF)- α , 人类白细胞抗原2(HLA-DRA), CD80, 转化生长因子- β (TGF- β), 白细胞介素(IL)-10和IL-6 mRNA和蛋白表达;Western blot检测巨噬细胞内磷脂酰肌醇激酶(PI3K)和磷酸化(p)-PI3K蛋白表达。结果:当白术内酯Ⅱ质量浓度为1, 10, 50, 100, 200 mg·L⁻¹时,对巨噬细胞生长无抑制作用;与模型组比较, 50, 100, 200 mg·L⁻¹白术内酯Ⅱ作用的巨噬细胞可显著抑制胃癌细胞增殖($P < 0.01$);与模型组比较, 白术内酯Ⅱ(200, 100 mg·L⁻¹)组胃癌细胞迁移率降低($P < 0.05$);白术内酯Ⅱ(200, 100, 50 mg·L⁻¹)组M1型巨噬细胞表面标志CD86表达增高($P < 0.05$, $P < 0.01$), 白术内酯Ⅱ(200 mg·L⁻¹)组M2型巨噬细胞表面标志CD206表达下降($P < 0.05$);白术内酯Ⅱ(200, 100 mg·L⁻¹)组M1型巨噬细胞相关细胞因子TNF- α , HLA-DRA, CD80 mRNA表达增高($P < 0.05$, $P < 0.01$), 白术内酯Ⅱ(200 mg·L⁻¹)组TNF- α 蛋白表达增高($P < 0.05$);白术内酯Ⅱ(50 mg·L⁻¹)组M2型巨噬细胞相关细胞因子TGF- β mRNA表达显著降低($P < 0.01$), 白术内酯Ⅱ(200 mg·L⁻¹)组IL-10, IL-6蛋白表达降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);白术内酯Ⅱ(200, 100 mg·L⁻¹)组p-PI3K蛋白表达降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:白术内酯Ⅱ通过减少巨噬细胞内p-PI3K的表达,诱导巨噬细胞向M1型极化,进而抑制胃癌增殖和迁移。

[关键词] 白术内酯Ⅱ; 巨噬细胞; 胃癌; 免疫调节

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)21-0100-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201928

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200723.1339.021.html>

[网络出版日期] 2020-7-23 14:22

Observation on Effect of Atractylodesin II on Gastric Cancer Cells Based on Macrophage Polarization

YUAN Meng-yun, ZHANG Xing-xing, XIE Xiao-dong, CHEN Min, WANG Hong-xing,
WU Jian, ZHAO Zhi-qiang*

(Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the anti-tumor effect mechanism of atractylenolide II by studying its effect on macrophage polarization. **Method:** Phorbol myristate acetate (PMA) was used to induce THP-1 cells differentiation into macrophages, and methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay was used to detect the effect of different concentrations of atractylenolide II on macrophage growth at

[收稿日期] 20191111(017)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81704031);江苏省中医药管理局课题项目(YB2017020, YB2017016);江苏省研究生培养创新工程(KYCX19_1214, KYCX19_1205)

[第一作者] 袁梦云,在读硕士,从事中医药治疗消化系统肿瘤研究, E-mail: 51668882@163.com

[通信作者] * 赵智强,博士,教授,主任中医师,博士生导师,从事中医药治疗消化系统肿瘤研究, Tel: 010-13337831520, E-mail: zq11142004@sina.com

different time points to screen out the safe concentration of atractylenolide II. The macrophages were treated with different concentrations of atractylenolide II for 24 hours and then were co-cultured with gastric cancer cells. The survival of the two types of cells was observed under light microscope. The proliferation of gastric cancer cells was detected by MTT assay to determine the effective administration concentrations of atractylenolide II. Cells were divided into blank group, model group, atractylenolide II high dose group ($200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), atractylenolide II medium dose group ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), and atractylenolide II low dose group ($50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Wound healing assay was carried out to observe the effects of different concentrations of atractylenolide II on the migration and morphology of gastric cancer cells. The expression levels of M1 and M2 macrophage surface markers CD86 and CD206 were detected by flow cytometry analysis (FCM). Quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot were used to detect M1, M2 macrophage-associated tumor necrosis factor (TNF) - α , human leukocyte antigen 2 (HLA-DRA), CD80, transforming growth factor (TGF) - β , interleukin (IL) -10 and IL-6 genes and protein expression. Western blot was used to detect intracellular phosphatidylinositol kinase (PI3K) and p-PI3K protein expression in macrophages. **Result:** When the concentration of atractylenolide II was 1, 10, 50, 100, 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, it showed no inhibition on macrophage growth. As compared with the model group, macrophages treated with 50, 100, 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ atractylenolide II significantly inhibited tumor cell proliferation ($P<0.01$). As compared with the model group, the migration rate of tumor cells in the atractylenolide II (200, 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) groups decreased ($P<0.05$). The expression levels of CD86 on M1 macrophage surface in the atractylenolide II (200, 100, 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) groups were increased ($P<0.05, P<0.01$), and the expression levels of CD206 on M2 macrophage in the atractylenolide II (200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) group were decreased ($P<0.05$). The expression levels of M1 macrophage-associated cytokines TNF- α , HLA-DRA, CD80 mRNA in the atractylenolide II (200, 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) groups were increased ($P<0.05, P<0.01$), and TNF- α protein expression in the atractylenolide II (200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) group was increased ($P<0.05$), M2 type macrophage-associated cytokine TGF- β mRNA expression levels in the atractylenolide II (50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) group were decreased, and IL-10, IL-6 protein expression levels in the atractylenolide II (200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) group were decreased ($P<0.05, P<0.01$). The expression levels of p-PI3K protein in the atractylenolide II (200, 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) groups were also decreased ($P<0.05, P<0.01$). **Conclusion:** Atractylenolide II could induce the polarization of macrophages to M1 type by reducing the expression of p-PI3K in macrophages and inhibiting the proliferation and migration of gastric cancer cells.

[Key words] atractylenolide II; macrophages; gastric cancer; immune regulation

胃癌是严重的全球性健康问题,每年有超过100万人被新诊断为胃癌^[1]。尽管过去50年全球发病率和病死率有所下降,但在世界大部分地区仍保持着75%的高死亡率^[2]。在中国,胃癌是第二大癌症^[3]。2015年统计结果显示,当年中国约有679 100人被诊断为胃癌,498 000人最终死亡,占世界病例和死亡人数近一半^[4]。

近年来,随着免疫学发展,肿瘤微环境中众多免疫细胞——巨噬细胞、树突状细胞、中性粒细胞、调节性T细胞、效应T细胞及自然杀伤细胞等成为治疗肿瘤的新靶点。巨噬细胞是机体固有免疫的重要细胞,也是特异性免疫应答的关键细胞,是机体维持自身稳定的关键因素。活化的巨噬细胞可极化成M1和M2型2种类型,二者的基因表达模式

存在很大差异,各自受完全不同的基因调控系统所支配。M1型巨噬细胞又称经典活化型巨噬细胞,倾向于Th1型应答的基因表达模式,既能分泌多种细胞因子,还能高效率呈递抗原,是一类行使抵御病原体入侵、监视肿瘤病变功能的巨噬细胞,表现出很强的促炎及抗原呈递能力,对病原体和肿瘤细胞可发挥宿主免疫清除功能^[5];而M2型巨噬细胞倾向于Th2型应答的基因表达模式,在肿瘤发生时,促进肿瘤血管生成和组织重塑,具有驱动肿瘤生长和浸润的作用^[6-7]。二者功能迥异,甚至相互拮抗。研究表明,肿瘤微环境中的巨噬细胞具有巨大的内在可塑性,所表达的表型可受多种因素的影响、调控^[8]。因此,有针对性的调控巨噬细胞表达为M1型,已成为目前抗肿瘤研究的热点之一。

白术性苦,甘,温,归脾、胃经。2020年版《中国药典》载其具有健脾益气,燥湿利水的功效。现代医学研究发现,白术有增强机体免疫功能的作用^[9-11],白术挥发油可提高巨噬细胞的活性,增强机体非特异性免疫功能。白术内酯、苍术酮等挥发油是白术的主要药效成分,其中苍术酮在加热、炮制后含量会明显下降,因此白术内酯成为白术中药煎剂的主要作用成分^[12]。在白术内酯中,白术内酯 I, II, III 是最常见的白术内酯类成分,以往药理研究发现其具有调节胃肠蠕动、抗肿瘤等作用,并且无明显机体毒性。白术内酯多种通路促肿瘤细胞凋亡的作用机制目前已有多篇文献报道^[13-14],而其是否可以通过调节肿瘤微环境中的巨噬细胞促进机体的抗肿瘤免疫作用,目前尚未见文献报道。因此,本文主要通过实验观察白术内酯 II 对巨噬细胞的调节作用,并探讨其可能的机制。

1 材料

1.1 细胞株 SGC-7901 人胃癌细胞, THP-1 人单核细胞由中国科学院典型培养物保藏委员会上海细胞库(暨中国科学院细胞库)提供,不超过7次细胞传代。对于所有实验,细胞生长至融合度为80%~90%。SGC-7901 细胞用含10%新生牛血清(CS)的DMEM培养液培养;THP-1 细胞用含10%胎牛血清(FBS)的RPMI 1640培养液培养。

1.2 药品与试剂 佛波酯(PMA), 噻唑蓝(MTT)(美国Sigma公司,批号分别为SLBX8889, MKCK7253);白术内酯 II(成都曼斯特生物科技公司,批号 MUST-19030202);胰酶细胞消化液(南京碧云天生物技术公司,批号 061319190715);trizol(美国Life Technologies公司,批号 213409);逆转录试剂盒,SYBR Master Mix 荧光定量试剂盒(南京诺唯赞生物试剂公司,批号分别为 7E242J8, 7E141K7);CD86-APC human(德国Miltenyi Biotec公司,批号 B265383);APC anti-human CD206(美国Biolegend公司,批号 5171019408);肿瘤坏死因子(TNF)- α , 白细胞介素(IL)-6, 磷脂酰肌醇激酶(PI3K)和磷酸化(p)-PI3K, β -肌动蛋白(β -actin)一抗(美国Cell Signaling Technology公司,货号分别为 8184s, 12153s, 5405s, 4228s, 8457t);PCR 逆转录试剂 HiScript III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)kit, 定量试剂 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix kit(南京诺唯赞公司,货号分别为 R323-01, Q711-02)。

1.3 仪器 ELX800 型全自动酶标仪(美国Bio-Tek

公司);MP-4 型电泳仪及转印槽(美国Bio-Rad公司);C6 型流式细胞仪(美国BD公司);2720 型 PCR 扩增仪,7500Fast 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国ABI公司)。

2 方法

2.1 MTT 比色法检测细胞活性 收集对数生长的 THP-1 人单核细胞,调整细胞密度为 5×10^4 个/mL,接种于96孔板中,100 μ L/孔,加入PMA,使其终质量浓度为 $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 37°C 5% CO_2 恒温培养箱培养诱导24 h 贴壁,即可得到诱导的巨噬细胞。巨噬细胞贴壁后,更换为含白术内酯 II 培养液继续培养。白术内酯 II 终质量浓度为 0, 1, 10, 50, 100, 200, 300, 400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。培养24, 48 h, 分别于各孔细胞内加入 $5 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT 20 μ L, 37°C 作用4 h, 弃上清,于各孔内分别加入二甲基亚砷(DMSO)150 μ L, 振荡溶解后,酶标仪上读取各孔细胞在570 nm 波长处吸光度 A , 以检测不同浓度白术内酯 II 对巨噬细胞活性的影响。

2.2 光镜观察及 MTT 比色法检测细胞增殖 诱导巨噬细胞同 2.1 项。换新培养液,加入终质量浓度为 1, 10, 50, 100, 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的白术内酯 II 作用24 h。吸去含药上清,加入 2×10^5 个/mL SGC-7901 胃癌细胞,100 μ L/孔,2种细胞比例为1:1,共培养24 h。倒置显微镜观察孔内细胞状态,拍照。分别于各孔细胞内加入 $5 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT 20 μ L, 37°C 作用4 h, 弃上清,于各孔内分别加入 DMSO 150 μ L, 振荡溶解后,酶标仪上读取各孔细胞在570 nm 波长处 A 。计算肿瘤细胞抑制率,抑制率 = $(A_{\text{溶剂组}} - A_{\text{给药组}}) / (A_{\text{溶剂组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$

2.3 细胞划痕实验检测细胞迁移能力 收集对数生长的 SGC-7901 胃癌细胞,将细胞密度调整至 5×10^6 个/mL,接种于6孔板,2 mL/孔。用Marker笔沿6孔板直径平行等距划线,用于定位,置于 37°C 5% CO_2 细胞培养箱中;待细胞贴壁,细胞汇合度约为80%时,用10 μ L 微量移液器吸管垂直于定位横线方向均匀划线,划痕完毕后,用移液器缓慢洗出培养液,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤除去细胞碎片,将细胞分为空白组(SGC-7901),模型组(SGC-7901+THP-1 上清),白术内酯 II $50 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组(SGC-7901+ $50 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 白术内酯 II 作用 THP-1 后上清),白术内酯 II $100 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组(SGC-7901+ $100 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 白术内酯 II 作用 THP-1 后上清),白术内酯 II $200 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组(SGC-7901+ $200 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 白术内酯 II 作用 THP-1 后上清),空白组换普通培养液外,其余各组分别换为

不同浓度白术内酯Ⅱ干预过24 h的巨噬细胞上清继续培养。培养12, 24, 36 h, 将6孔板置于倒置显微镜下观察结果并拍照, 使用Image J软件打开图片后, 测量划痕面积, 计算细胞迁移率。迁移率=(划痕面积_{0h}-划痕面积_{12h/24h/36h})/划痕面积_{0h}。

2.4 FCM检测细胞极化 收集对数生长的THP-1细胞, 调整细胞密度为 2×10^7 个/mL, 接种于6孔板, 2 mL/孔, PMA诱导细胞贴壁后, 加入白术内酯Ⅱ, 使其终质量浓度为0, 50, 100, 200 mg·L⁻¹。置于37 °C 5% CO₂培养箱培养24 h。收集细胞, 分别进行细胞表面抗原CD86及细胞内抗原CD206的流式染色。其中细胞外抗原CD86抗体染色每管加入CD86 10 μL, 避光孵育30 min。300×g离心3 min, 洗2次, 弃上清, 加入PBS 500 μL重悬。CD206胞内抗体染色每管加入Cell Fixation & Permeabilization Kit中的固定液A, 100 μL/管, 室温避光15 min。300×g离心3 min, 洗1次, 弃上清, 加入PBS 100 μL重悬。加入破膜液B, 100 μL/管, CD206, 5 μL/管。吹打混匀后, 室温避光15 min。300×g离心3 min, 洗2次, 弃上清, 加入PBS 500 μL重悬。1 h内流式细胞仪检测。结果使用FlowJo软件进行分析。

2.5 Real-time PCR检测相关基因表达水平 细胞培养与加药同2.4项, 收集细胞, 以trizol充分裂解细胞, 常规方法提取细胞总RNA。用紫外线分光光度仪检测RNA样品浓度及纯度, 样品在260, 280 nm处的比值, 以在1.8~2.0为合格, 以RNA为模版逆转录合成cDNA, 用PCR仪进行反应, 扩增条件: 预变性95 °C 30 s循环1次; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 循环40次; 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 95 °C 15 s, 循环1次。采用2^{-ΔΔC_t}对PCR结果进行数据分析, 计算 $\Delta C_t = C_{t \text{ 目的基因}} - C_{t \text{ 内参基因}}$; $\Delta \Delta C_t = \Delta C_{t \text{ 给药组}} - \Delta C_{t \text{ 空白组}}$; 差别倍数=2^{-ΔΔC_t}, 其中正常组的数值均为1。检测巨噬细胞中M1型及M2型相关mRNA表达情况。引物序列由英潍捷基(上海)公司设计合成, 见表1。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测巨噬细胞相关蛋白表达 细胞培养与加药同2.4项, 收集细胞, 弃去培养液, 用PBS洗涤2次, 加入RIPA细胞裂解液, 用细胞刮刮下贴壁细胞, 吸至离心管中, 超声波破碎细胞3次, 15 s/次。4 °C, 12 000 r·min⁻¹离心20 min, 取上清液, 至于新离心管中。用BCA法测定组织蛋白浓度, 每个样品取20 μg上样量进行反应。经聚丙烯酰胺凝胶分离, 转到PVDF膜, 用5% BSA封闭1 h, 取出封闭好的膜, 分别置于TNF-α,

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
β-actin	上游 TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA	295
	下游 CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG	
TNF-α	上游 CCCAGGGACCTCTCTCTAATC	211
	下游 TGAGGTACAGGCCCTCTGAT	
HLA-DRA	上游 GGCTTGAAGAATTTGGACGA	175
	下游 GGCTCTCTCAGTTCCACAGG	
CD80	上游 GGTCCAAATTGTTGGCTTTC	230
	下游 TTTGTGCCAGCTCTTCAACA	
TGF-β	上游 CAACAATTCCTGGCGATACC	192
	下游 AACCCGTTGATGTCCACTTG	

IL-6, IL-10, PI3K, p-PI3K(1:1 000)抗体孵育, 4 °C冰箱过夜, 次日用TBST漂洗3次, 10 min/次, 后放入相应二抗(1:1万)中室温孵育1 h, 经TBST漂洗4次, 5 min/次, 采用双色红外激光成像系统进行发光和条带分析。用Image Lab图像分析软件进行结果分析, 测得条带的灰度值, 比较各组间差异。

2.7 统计学方法 结果采用SPSS 22.0统计软件对数据进行处理分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。满足正态分布和方差齐性的多组之间均数比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较用最小显著性差异法(LSD); 方差不齐者采用Dunnett's T3检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 白术内酯Ⅱ对巨噬细胞生长的影响 与空白组比较, 白术内酯Ⅱ 1, 10, 50, 100, 200 mg·L⁻¹作用24, 48 h, 巨噬细胞生长无明显变化; 白术内酯Ⅱ 300, 400 mg·L⁻¹作用24 h, 巨噬细胞生长无明显变化, 作用48 h, 则巨噬细胞的生长受到抑制($P < 0.05$)。因此, 本实验选用1, 10, 50, 100, 200 mg·L⁻¹的白术内酯Ⅱ作用于巨噬细胞。见表2。

3.2 白术内酯Ⅱ作用后的巨噬细胞对SGC-7901胃癌细胞增殖的影响 与模型组比较, 50, 100, 200 mg·L⁻¹组白术内酯Ⅱ作用后巨噬细胞能显著抑制SGC-7901胃癌细胞的增殖($P < 0.01$), 并与浓度呈正相关。见图1, 表3。

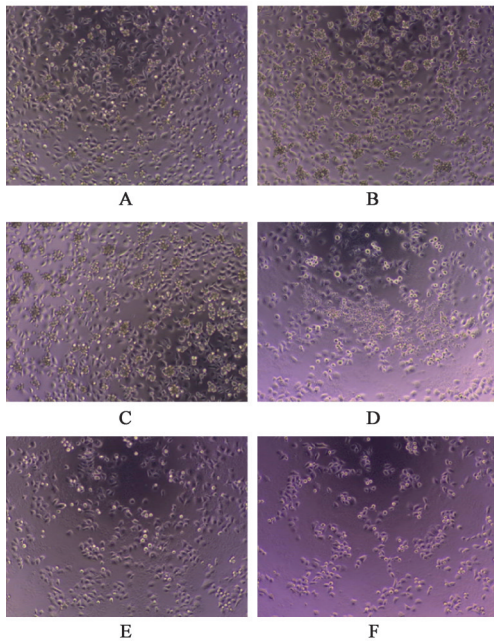
3.3 白术内酯Ⅱ作用后的巨噬细胞对肿瘤细胞迁移能力的影响 细胞培养至24, 36 h, 与模型组比较, 白术内酯Ⅱ 100, 200 mg·L⁻¹组细胞划痕面积增加, 划痕愈合率降低($P < 0.05$)。表明白术内酯Ⅱ能够通过影响巨噬细胞抑制SGC-7901胃癌细胞迁移

表2 白术内酯II对巨噬细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of atractylenolide II on macrophage proliferation ($\bar{x}\pm s, n=3$) %

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	24 h	48 h
空白	-	0.00±1.61	0.00±5.28
白术内酯II	1	4.04±2.13	9.30±3.69
	10	-0.18±1.33	0.31±1.07
	50	1.76±8.12	14.16±27.75
	100	6.85±10.13	0.93±1.40
	200	9.84±7.02	19.53±5.81
	300	11.25±8.29	38.14±4.03 ²⁾
	400	12.83±16.74	53.95±10.53 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01。



A. 空白组; B. 模型组; C~F. 白术内酯II 10, 50, 100, 200 mg·L⁻¹组
图1 光镜下白术内酯II作用后的巨噬细胞对SGC-7901胃癌细胞的形态影响(倒置显微镜, ×40)

Fig. 1 Morphological effect of macrophages treated with atractylenolide II on SGC-7901 cells under light microscope (inverted microscope, ×40)

能力。见图2,表4。

3.4 白术内酯II对巨噬细胞极化的影响

3.4.1 白术内酯II对巨噬细胞极化特异性指标的影响 与模型组比较,白术内酯II各组M1型巨噬细胞表面标志CD86表达均有增高($P<0.05, P<0.01$),其中白术内酯II 200 mg·L⁻¹组显著增高($P<0.01$);与模型组比较,白术内酯II M2型巨噬细胞表面标志CD206表达有降低趋势,其中白术内酯II 200 mg·L⁻¹组降低明显($P<0.05$)。见表5。

表3 白术内酯II作用巨噬细胞对SGC-7901胃癌细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 3 Effect of macrophage treated with atractylenolide II on proliferation of SGC-7901 cells ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	A _{570 nm}	抑制率/%
空白	-	2.21±0.08	0.00±3.62
模型	-	2.31±0.51	-4.55±2.43
白术内酯II	1	2.21±0.03	0.14±1.52
	10	1.90±0.06	14.88±2.74 ^{1,2)}
	50	1.63±0.08 ¹⁾	27.76±3.67 ^{1,2)}
	100	1.36±0.02 ¹⁾	40.58±0.86 ^{1,2)}
	200	1.21±0.09 ¹⁾	47.46±4.10 ^{1,2)}

注:与空白组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.01。

3.4.2 白术内酯II对巨噬细胞极化相关基因的影响 与模型组比较,白术内酯II各组M1型巨噬细胞相关基因TNF- α , HLA-DRA, CD80 mRNA表达有增高趋势,白术内酯II 100, 200 mg·L⁻¹组明显增高($P<0.05, P<0.01$), 200 mg·L⁻¹组HLA-DRA, CD80显著增高($P<0.01$)。与模型组比较,白术内酯II 50, 100 mg·L⁻¹组M2型巨噬细胞相关基因TGF- β mRNA表达有降低趋势,白术内酯II 50 mg·L⁻¹组显著降低($P<0.01$)。见表6。

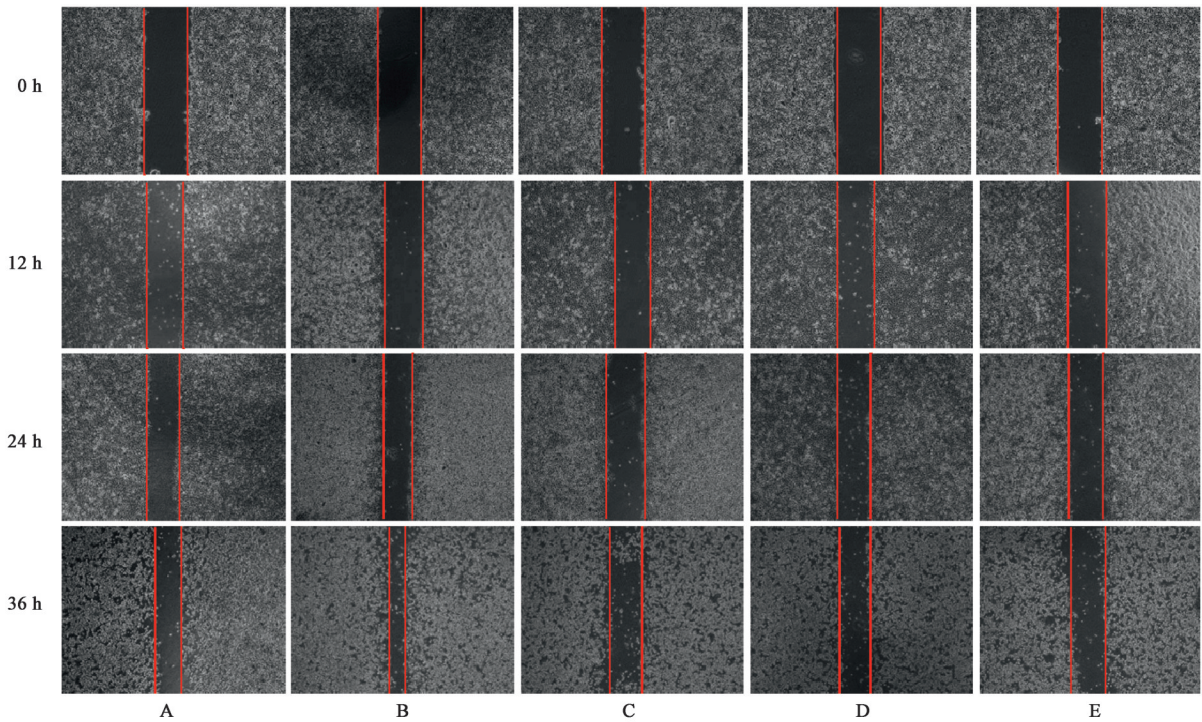
3.4.3 白术内酯II对巨噬细胞极化相关蛋白的影响 与模型组比较,白术内酯II各浓度组M1型巨噬细胞相关蛋白TNF- α 均有增高趋势,其中白术内酯II 200 mg·L⁻¹组表达增高($P<0.05$)。白术内酯II各浓度组M2型巨噬细胞相关蛋白IL-10均有降低趋势,其中白术内酯II 200 mg·L⁻¹表达降低($P<0.05$);与模型组比较,白术内酯II各浓度组M2型巨噬细胞相关蛋白IL-6表达降低($P<0.05$),其中白术内酯II 100, 200 mg·L⁻¹组显著降低($P<0.01$)。见表7,图3。

3.5 白术内酯II对巨噬细胞PI3K磷酸化的影响

与模型组比较,白术内酯II各浓度组PI3K表达无明显变化,p-PI3K表达有降低趋势,其中白术内酯II 100 mg·L⁻¹组p-PI3K表达降低($P<0.05$),白术内酯II 200 mg·L⁻¹组p-PI3K表达显著降低($P<0.01$)。见图4,表8。

4 讨论

有研究报道治疗恶性肿瘤方剂中,白术的使用频次在20余种,补益中药中居于前位,在胃癌治疗中居于首位^[15]。白术对脾胃的强健作用在多部中医典籍中均有记载,《名医别录》载其“益津液,暖



A. 空白组; B. 模型组; C~E. 白术内酯 II 50, 100, 200 mg·L⁻¹组

图2 白术内酯 II 作用巨噬细胞对 SGC-7901 胃癌细胞迁移能力的影响(倒置显微镜, ×40)

Fig. 2 Effect of macrophages treated with atractylenolide II on migration ability of SGC-7901 cells (inverted microscope, ×40)

表4 白术内酯 II 作用巨噬细胞对 SGC-7901 细胞划痕面积及愈合率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of macrophages treated with atractylenolide II on scratch area and healing rate of SGC-7901 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	划痕愈合率/%		
		12 h	24 h	36 h
空白	-	14.55±1.44	35.86±8.85	45.69±6.36
模型	-	17.50±3.53	36.29±5.59	55.57±7.37
白术内酯 II	50	5.89±1.93	16.81±0.48	36.42±9.11
	100	6.39±3.28	12.77±3.34 ²⁾	22.29±3.81 ^{1,2)}
	200	7.37±2.29	11.44±2.59 ²⁾	22.32±4.18 ^{1,2)}

注:与空白组比较¹⁾P<0.05;与模型组比较²⁾P<0.05。

表5 白术内酯 II 对巨噬细胞极化的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of different concentrations of atractylenolide II on macrophage polarization ($\bar{x} \pm s, n=3$) %

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	CD86	CD206
模型	-	5.64±0.43	29.39±2.14
白术内酯 II	50	11.60±0.85 ²⁾	26.02±6.99
	100	20.15±2.3 ¹⁾	20.18±4.38
	200	24.75±1.3 ²⁾	17.53±2.84 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01(表6~8同)。

胃”;《医学启源》载“除胃热,强脾胃”;《日华子本草》载“利小便,止反胃呕逆”。白术内酯作为其主要作用成分,研究发现,可以直接发挥促使胃癌细

胞凋亡的效应,尤其是白术内酯 I, III, 具有抗炎、抗肿瘤、调节胃肠道运动和促进营养物质吸收等作用。李小芳等^[13]发现白术内酯 I 对胃癌细胞有促凋亡作用,白术内酯 III 对结肠癌细胞也有促凋亡作用。张彩霞等^[16]发现白术内酯 II 对大肠癌细胞有促凋亡作用。

近年来,多个研究发现中药单体具有调节肿瘤微环境中免疫细胞的作用。费煜畅等^[17]发现黄芪多糖(APS)能通过调节细胞免疫功能抑制肿瘤生长,王莉新等^[18]发现黄芪甲苷通过诱导 M1 型巨噬细胞极化发挥抗肿瘤作用。汲广全等^[19]发现白术多糖能增强巨噬细胞吞噬功能。

巨噬细胞是肿瘤微环境中重要的免疫细胞。

表6 白术内酯II对巨噬细胞TNF- α , HLA-DRA, CD80, TGF- β mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of atractylenolide II on expression of TNF- α , HLA-DRA, CD80 and TGF- β mRNA in macrophages($\bar{x}\pm s, n=3$)

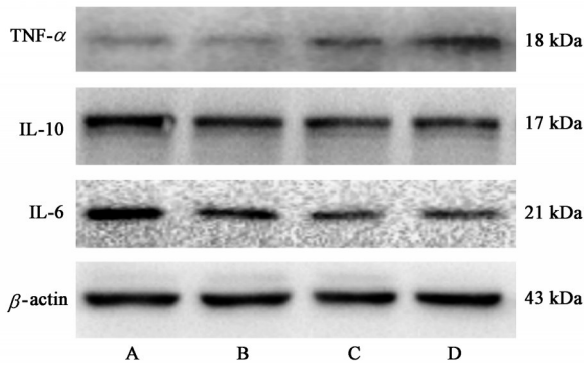
组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	TNF- α	HLA-DRA	CD80	TGF- β
白术内酯II	50	1.08±0.24	1.18±0.14	1.44±0.32	0.63±0.03 ²⁾
	100	1.30±0.06 ¹⁾	1.59±0.19 ¹⁾	1.61±0.38 ¹⁾	0.91±0.10
	200	1.26±0.11 ¹⁾	1.93±0.22 ²⁾	2.40±0.41 ²⁾	1.13±0.14

注:设模型组TNF- α , HLA-DRA, CD80, TGF- β mRNA相对表达为1。

表7 白术内酯II对巨噬细胞TNF- α , IL-10, IL-6蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of atractylenolide II on expression of TNF- α , IL-10 and IL-6 in macrophages($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	TNF- α / β -actin	IL-10/ β -actin	IL-6/ β -actin
模型	-	0.14±0.01	0.47±0.01	0.28±0.01
白术内酯II	50	0.19±0.46	0.37±0.01	0.18±0.04 ¹⁾
	100	0.31±0.15	0.33±0.11	0.17±0.04 ²⁾
	200	0.38±0.16 ¹⁾	0.26±0.19 ¹⁾	0.16±0.01 ²⁾



A. 模型组; B~D. 白术内酯II 50, 100, 200 mg·L⁻¹组(图4同)

图3 白术内酯II作用M1型M2型巨噬细胞相关蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of M1 and M2 macrophage-associated protein expression by atractylenolide II

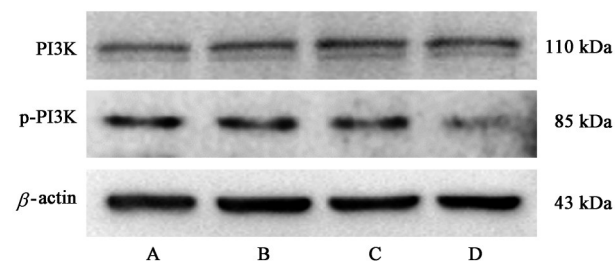


图4 白术内酯II作用巨噬细胞PI3K及p-PI3K蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of macrophage PI3K and p-PI3K protein expression by atractylenolide II

骨髓来源的单核细胞被组织募集活化为巨噬细胞, 进入肿瘤微环境后受多种趋化因子影响分化为M1型和M2型巨噬细胞, 称为肿瘤相关巨噬细胞(TAMs), TAMs主要趋于M2表型。M1型巨噬细胞具有抗肿瘤效应功能, 肿瘤中较高的M1样浸润与较好的预后(抗肿瘤效应)相关, 常见M1型巨噬细胞的表面标志有HLA-DR, CD197, CD86等^[20], 在干

表8 白术内酯II对巨噬细胞PI3K及p-PI3K蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 8 Effect of atractylenolide II on expression of PI3K and p-PI3K protein in macrophages($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	p-PI3K/PI3K
模型	-	0.22±0.001
白术内酯II	50	0.18±0.04
	100	0.09±0.02 ¹⁾
	200	0.07±0.01 ²⁾

扰素(IFN)- γ , 脂多糖(LPS)和肿瘤坏死因子(TNF)- α 等因子作用下, 巨噬细胞向M1型极化, 并分泌ROS, RNS, TNF- α , 白细胞介素(IL)-1, IL-12, IL-23等因子; M2型巨噬细胞表达免疫抑制和肿瘤促进因子, 肿瘤中较高的M2样浸润与预后不良(肿瘤前期)相关。常见M2型巨噬细胞的表面标志有CD209, CD206等^[21]。在IL-4, IL-13, IL-10和TGF- β 等作用下, 巨噬细胞向M2型极化, 并分泌TGF- β , VEGF, EGF等因子^[22]。

PI3K是一种通用的癌细胞驱动因子, 目前许多研究发现在多种癌症中都存在PI3K异常。PI3K作为细胞信号分子参与一系列肿瘤发生发展过程, 连接着生长因子信号和下游很多与细胞增殖、代谢、存活相关的信号通路。几乎在人类的每一种癌细胞中, PI3K都可以作为治疗癌症的重要靶点。SOLER等^[23]发现PI3K是治疗胰腺神经内分泌肿瘤的重要靶点, MAYER等^[24]发现PI3K是治疗乳腺癌的重要靶点。

多年来胃癌细胞中PI3K的研究已趋于成熟, 研究发现PI3K激活能通过PI3K/Akt/mTOR信号传导

途径促进胃癌细胞增殖,并诱导上皮细胞-间充质转化(EMT)的发生和细胞骨架的分解^[25-26]。PI3K除了是奥沙利铂^[27]、塞来昔布^[28]等抗癌药的靶点外,多种中药单体也能通过抑制PI3K激活发挥抗胃癌作用,如LI等^[29]发现蟾酥提取物蟾蜍灵能通过抑制PI3K的上调诱导胃癌细胞凋亡,SHA等^[30]发现雷公藤红素(ART)能通过PI3K/Akt/NF- κ B信号通路诱导细胞凋亡等。

胰腺癌相关巨噬细胞中PI3K标志物上调的发现为通过免疫调节治疗癌症提供新的思路,也使巨噬细胞PI3K成为研究热点。KANEDA等^[31]对临床患者组织标本和基因敲除胰腺癌小鼠的癌及癌旁组织巨噬细胞进行筛选、免疫染色,发现两者癌组织较癌旁组织中巨噬细胞PI3K均有明显升高,并且表型观察发现,PI3K基因敲除鼠较普通胰腺癌鼠的存活率上升,转移率下降。由此证明胰腺癌巨噬细胞上的PI3K标志是肿瘤发生发展的重要靶点。

本实验选取SGC7901胃癌细胞和THP-1源巨噬细胞共培养造胃癌相关巨噬细胞模型,验证PI3K在胃癌巨噬细胞上表达对胃癌同样有促进作用,并发现白术内酯II干预的巨噬细胞与胃癌细胞共培养后,原本无抑瘤活性的巨噬细胞对胃癌细胞具有抑制作用,并可减少胃癌细胞的迁移。此外,本研究发白术内酯II可以促使巨噬细胞向M1型巨噬细胞发生极化,并可对M2型巨噬细胞产生逆转作用,推测白术内酯II通过PI3K抑制使胃癌相关巨噬细胞重新极化,其表型倾向于抑制肿瘤发展的M1型。

巨噬细胞极化是一个受到严格调控的事件,其中多种基因都可能控制反应的结果。这些激活程序不是由一个独特的基因或蛋白形成的,而是由多个不同功能的基因或蛋白联合表达而成的。在不同的信号复合物中,PI3K相关的细胞激酶和磷酸酶,能调节M1或M2巨噬细胞的活化程序,PI3K途径正在成为诱导和控制M1和M2巨噬细胞的核心。本实验通过检测通路中PI3K及磷酸化PI3K表达水平的变化,以期进一步探讨白术内酯II促进巨噬细胞向M1型巨噬细胞发生极化、减少向M2型巨噬细胞的极化作用的分子机制。实验结果显示巨噬细胞内PI3K磷酸化水平减少,提示白术内酯II有可能通过抑制PI3K磷酸化,进而促进M1型巨噬细胞的极化,并启动一系列抗肿瘤效应。这一发现可为白术内酯II应用于临床抗肿瘤治疗提供新的指导依据与干预视角。但具体调控过程和作用机制尚未

阐明,有待后续深入研究。

[参考文献]

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] FOCK K M. Review article: the epidemiology and prevention of gastric cancer [J]. Aliment Pharmacol Therap, 2014, 40(3):250-260.
- [3] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132.
- [4] NIE Y, WU K, YU J, et al. A global burden of gastric cancer: the major impact of China [J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2017, 11(7):651-661.
- [5] RUFFELL B, AFFARA N I, COUSSENS L M. Differential macrophage programming in the tumor microenvironment [J]. Trends Immunol, 2012, 33(3):119-126.
- [6] TAKEDA Y, COSTA S, DELAMARRE E, et al. Macrophage skewing by Phd2 haploinsufficiency prevents ischaemia by inducing arteriogenesis [J]. Nature, 2011, 479(7371):122-126.
- [7] MADSEN D H, LEONARD D, MASEDUNSKAS A, et al. M2-like macrophages are responsible for collagen degradation through a mannose receptor-mediated pathway [J]. J Cell Biol, 2013, 202(6): 951-966.
- [8] BISWAS S K, SICA A, LEWIS C E. Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms [J]. J Immunol, 2008, 180(4):2011-2017.
- [9] 关晓辉, 曲娴, 杨志萍, 等. 白术挥发油对小鼠免疫功能的影响 [J]. 北华大学学报: 自然科学版, 2001, 2(2):122-124.
- [10] 黄利, 李利民, 唐丽燕. 白术水煎剂对小鼠免疫功能的影响 [J]. 中药药理与临床, 2012, 28(1):114-115.
- [11] LEE J C, LEE K Y, SON Y O, et al. Stimulating effects on mouse splenocytes of glycoproteins from the herbal medicine *Atractylodes macrocephala* Koidz [J]. Phytomedicine, 2007, 14(6):390-395.
- [12] 张金莲, 谢日健, 刘明贵, 等. 不同炮制方法对白术中白术内酯I, II, III含量的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(21):15-18.
- [13] 李小芳, 张丹, 宋大强, 等. 白术内酯I对人胃癌细胞SGC-7901裸鼠移植瘤生长及凋亡的影响 [J]. 中

- 国医院药学期刊, 2018, 38(18):1921-1925.
- [14] 潘利文, 宋捷. 白术内酯 I 体内外的抗黑色素瘤研究[J]. 中国医院药学期刊, 2015, 35(8):682-685.
- [15] 李星, 樊巧玲. 胃癌中医辨证与方药应用的文献研究[J]. 中医杂志, 2017, 58(8):693-696.
- [16] 张彩霞, 张亚杰, 江滨, 等. 白术内酯 II 促进大肠癌 Lovo 细胞凋亡及对 PARP1 和 Caspase-3 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(5):157-161.
- [17] 费煜畅, 郑戴波, 潘磊, 等. 黄芪多糖对 LPS 诱导的 THP-1 源巨噬细胞产生细胞因子 TNF- α 、IL-12 和 IL-10 的影响[J]. 浙江中医杂志, 2019, 54(6):448-450.
- [18] 王莉新, 吴文斌, 胥孜杭, 等. 黄芪甲苷通过诱导 M1 型巨噬细胞极化发挥抗肿瘤作用的机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(14):19-24.
- [19] 汲广全, 陈仁琼, 郑建仙. 白术多糖对树突状细胞表型及功能成熟的影响[J]. 食品科学, 2015, 36(3):207-211.
- [20] MUELLER C K, SCHULTZE-MOSGAU S. Histomorphometric analysis of the phenotypical differentiation of recruited macrophages following subcutaneous implantation of an allogeneic acellular dermal matrix[J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2011, 40(4):401-407.
- [21] FUJII K, MANABE I, NAGAI R. Renal collecting duct epithelial cells regulate inflammation in tubulointerstitial damage in mice[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(9):3425-3441.
- [22] WYNN T A, BARRON L, THOMPSON R W, et al. Quantitative assessment of macrophage functions in repair and fibrosis[J]. *Curr Protoc Immunol*, 2011, 14(22):1-12.
- [23] SOLER A, FIGUEIREDO A M, CASTEL P, et al. Therapeutic benefit of selective inhibition of p110 α PI3-kinase in pancreatic neuroendocrine tumors[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(23):5805-5817.
- [24] MAYER I A, ABRAMSON V G, FORMISANO L, et al. A phase Ib study of alpelisib (BYL719), a PI3K α -specific inhibitor, with letrozole in ER+/HER2-negative metastatic breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 23(1):26-34.
- [25] TAPIA O, RIQUELME I, LEAL P, et al. The PI3K/Akt/mTOR pathway is activated in gastric cancer with potential prognostic and predictive significance [J]. *Virchows Arch*, 2014, 465(1):25-33.
- [26] TRAN T N, BRETTINGHAM-MOORE K, DUONG C P, et al. Molecular changes in the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway are common in gastric cancer [J]. *J Surg Oncol*, 2013, 108(2):113-120.
- [27] 徐玲, 曲秀娟, 刘云鹏, 等. 奥沙利铂通过抑制 PI3K/Akt 增强胃癌对 TRAIL 的敏感性[J]. 中国医科大学学报, 2010, 39(9):703-705.
- [28] LIU M, LI C, CHEN Z, et al. Celecoxib regulates apoptosis and autophagy via the PI3K/Akt signaling pathway in SGC-7901 gastric cancer cells [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33(6):1451-1458.
- [29] LI D, QU X, HOU K, et al. PI3K/Akt is involved in bufalin-induced apoptosis in gastric cancer cells [J]. *Anti Cancer Drugs*, 2009, 20(1):59-64.
- [30] SHA M, YE J, ZHANG L X, et al. Celastrol induces apoptosis of gastric cancer cells by miR-21 inhibiting PI3K/Akt-NF- κ B signaling pathway [J]. *Pharmacology*, 2014, 93(1/2):39-46.
- [31] KANEDA M M, CAPPELLO P, NGUYEN A V, et al. Macrophage PI3K γ drives pancreatic ductal adenocarcinoma progression [J]. *Cancer Discov*, 2016, 6(8):870-885.

[责任编辑 张丰丰]