

益气补肾方含药血清对人胃癌细胞 SGC-7901 增殖转移及 CD44⁺EpCAM⁺ 干细胞比例的影响

刘云霞¹, 徐叶峰¹, 姚勇伟¹, 王翌庆¹, 蒋沈君¹, 王娜², 贾祯² (1. 杭州市第三人民医院肿瘤科, 杭州 310009; 2. 浙江中医药大学, 杭州 310053)

摘要: 目的 探讨益气补肾方含药血清对人胃癌细胞 SGC-7901 增殖转移能力及 CD44⁺EpCAM⁺ 干细胞比例的影响。方法 分别以低、中、高不同浓度益气补肾方含药血清及空白血清干预人胃癌细胞 SGC-7901。采用 MTT 法检测 24, 48, 72 h 细胞增殖抑制率, Transwell 小室检测胃癌细胞迁移侵袭能力。采用 5-氟尿嘧啶(5-Fu)共培养富集胃癌干细胞, 流式细胞术检测药物干预后 CD44⁺EpCAM⁺ 干细胞比例。结果 干预 48, 72 h 后, 益气补肾方组细胞增殖抑制率显著高于同时期阴性对照组及空白对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。Transwell 结果显示, 与阴性对照组和空白对照组比较, 益气补肾方各组透膜细胞数显著降低, 迁移能力受明显抑制, 差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。流式细胞术结果显示, 终浓度为 $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 5-Fu 共培养 24 h 后, 胃癌干细胞比例显著提升, 益气补肾方干预后各组细胞中 CD44⁺EpCAM⁺ 干细胞比例均下调, 中、高浓度组与模型对照组相比, 差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。结论 益气补肾方含药血清能显著抑制人胃癌细胞 SGC-7901 增殖, 并呈时间、剂量相关性, 其抗转移作用可能与下调胃癌干细胞表面标志物 CD44、EpCAM 表达, 降低 CD44⁺EpCAM⁺ 干细胞比例有关。

关键词: 益气补肾方; 胃癌; 增殖转移; 干细胞

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2018)12-1805-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.12.011

引用本文: 刘云霞, 徐叶峰, 姚勇伟, 等. 益气补肾方含药血清对人胃癌细胞 SGC-7901 增殖转移及 CD44⁺EpCAM⁺ 干细胞比例的影响[J]. 中国现代应用药理学, 2018, 35(12): 1805-1810.

Effects of Yiqi Bushen Formula-containing Serum on Proliferation and Metastasis of Human Gastric Cancer Cell SGC-7901 and CD44⁺EpCAM⁺ Double Positive Cancer Stem Cells Ratio

LIU Yunxia¹, XU Yefeng¹, YAO Yongwei¹, WANG Yiqing¹, JIANG Shenjun¹, WANG Na², JIA Zhen² (1. Department of Oncology, Hangzhou Third Hospital, Hangzhou 310009, China; 2. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of Yiqi Bushen Formula-containing serum on proliferation and metastasis of human gastric cancer cell SGC-7901 and CD44⁺EpCAM⁺ double positive cancer stem cells ratio. **METHODS** The human gastric cancer cell line SGC-7901 was intervened by low, medium and high concentrations of Yiqi Bushen Formula-containing serum and blank serum respectively. The proliferation inhibition rate of 24, 48, 72 h cells was detected by MTT assay. Transwell was used to detect the migration and invasion ability of gastric cancer cells. Gastric cancer stem cells were enriched by co-cultured with 5-fluorouracil (5-Fu). Flow cytometry was used to detect the CD44⁺EpCAM⁺ double positive cancer stem cells ratio in gastric cancer stem cells after drug intervention. **RESULTS** After 48, 72 h intervention, the cell proliferation inhibition rate of the Yiqi Bushen Formula group was significantly higher than that of the negative control group and the blank control group, with a significant difference ($P < 0.05$). Transwell showed that compared with the negative control group and the blank control group, the number of permeable membrane cells in each group of Yiqi Bushen Formula group decreased significantly, and the migration ability was significantly inhibited, with a significant difference ($P < 0.01$). Flow cytometry showed that after co-culture with $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 5-Fu, the proportion of stem cells in gastric cancer increased significantly. The CD44⁺EpCAM⁺ double positive cancer stem cells ratio in each group was down. The middle and high concentration groups was higher than that of the model control group with a significant difference ($P < 0.01$). **CONCLUSION** Yiqi Bushen Formula-containing serum can significantly inhibit the proliferation of human gastric cancer cell SGC-7901, and it is time and dose correlation. Its anti metastasis effect may be related to the down regulation of the expression of CD44 and EpCAM from the surface markers and reduction of the CD44⁺EpCAM⁺ double positive cancer stem cells ratio in gastric cancer cells.

KEYWORDS: Yiqi Bushen formula; gastric cancer; proliferation and metastasis; cancer stem cells

基金项目: 国家自然科学基金项目(81473505); 浙江省自然科学基金项目(LY18H290001); 杭州市社会发展自主申报项目(20180533B58)

作者简介: 刘云霞, 女, 主任中医师 Tel: 13136166588 E-mail: zjhzylyx@163.com

我国是胃癌高发国家,根据国家癌症中心最新统计数据表明,在男性患者中胃癌的发病率居第2位,女性患者中居第4位,而死亡率均高居第2位,IV期患者5年生存率<20%^[1]。手术切除仍是目前唯一可能治愈的手段,然而根治术后仍有60%患者会出现局部复发或远处转移,中位生存期仅为7~13个月,分子靶向治疗可提高疗效,但价格昂贵^[2-3]。

近年研究表明^[4-5],肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)的转移和归巢在肿瘤的复发转移过程中占据了非常重要的地位。CSC是恶性肿瘤组织中一小部分具有极强自我更新能力和不定向分化能力的细胞,这些细胞与分化较成熟肿瘤细胞相比,其对传统治疗手段如放疗、化疗,甚至生物治疗更具抵抗力,是恶性肿瘤难以根治和复发转移的根本原因^[6]。

中医药在抑制肿瘤细胞增殖、改善临床症状、预防转移、延长生存期等多方面具有独特的优势。项目组多年临床实践发现,中药复方益气补肾方可通过直接抑瘤、调节机体免疫功能、化疗增敏等途径,有效发挥预防胃癌术后患者复发和转移的作用^[7-8]。本实验通过研究益气补肾方含药血清对人胃癌细胞SGC-7901增殖转移能力及CD44⁺EpCAM⁺干细胞比例的影响,部分阐明益气补肾方抗胃癌增殖转移的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株与动物

人胃癌细胞株SGC-7901,购于中国科学院细胞库,由浙江中医药大学动物实验中心提供。

SD大鼠40只,5~6周龄,♂,SPF级,体重(200±20)g,由浙江中医药大学动物实验中心提供,合格证编号:SCXK(浙)2013-0184。适应性饲养1周后用于实验。

1.2 药品试剂与仪器

益气补肾方由黄芪20g,女贞子12g,茯苓12g,猪苓12g,薏苡仁30g,枸杞子12g,半枝莲30g,藤梨根30g,莪术10g,八月札10g,红枣30g,炙甘草6g组成,均购于华东医药公司。5-氟尿嘧啶注射液(5-Fu,规格:10mL:0.25g;批号:1705161)由天津金耀氨基酸有限公司提供。MTT粉由Sigma公司进口分装。FITC-Mouse Anti-Human CD44单克隆抗体(货号:555478)、PE-Mouse Anti-Human EpCAM单克隆抗体(货号:

565399)由美国BD Biosciences公司提供。

AlphaClean 1300超净工作台(Heal Force公司); Thermo Forma 3110系列细胞培养箱(Thermo Scientific公司); RE-300旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); Nikon eclipse 80i显微镜(日本Nikon公司); Varioscan Flash多功能全波长酶标仪(Thermo公司); THZ-C型振荡器(江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司); Thermo Fisher Micro 21(R)台式冷冻多用离心机(Thermo公司); 3-18K低温离心机(Sigma公司); FACS Calibur流式细胞检测仪(美国BD公司)。

1.3 益气补肾方水煎剂及含药血清的制备

将益气补肾方中药饮片放置砂锅中,加相当药材量5倍的冷水浸泡1h,煮沸30min,再加3倍量水继续煎煮20min,过滤,合并2次滤液,将煎得的水煎液采用旋转蒸发器浓缩后,加入酒精调节乙醇浓度到70%,沉淀过夜后离心去沉淀,制备成每毫升含生药3g的水煎剂,即3g·mL⁻¹,调整pH值7.0~7.2,分装,4℃保存备用。

将40只SD大鼠随机分为2组,益气补肾方组给予30g·kg⁻¹生药灌胃,每日1次,连续7d;空白对照组给予0.9%生理盐水,每只0.5mL,每日1次,连续7d。末次给药1h后腹腔注射麻醉,无菌条件下腹主动脉采血,静置1h,3000r·min⁻¹离心15min后取上清液,同组血清混合,经过56℃灭活30min,0.22μm微孔滤膜过滤除菌,获得益气补肾方含药血清及空白血清。无菌条件下分装后,于-20℃条件下保存备用。

1.4 各组细胞培养及血清干预方法

阴性对照组:将SGC-7901细胞接种于含10%胎牛血清、链霉素100U·mL⁻¹、青霉素100U·mL⁻¹的RPMI 1640培养液中,在37℃、5%CO₂培养箱中培养,每1~2d换液1次,常规传代培养。空白对照组:在常规培养条件下,待细胞进入对数生长期后,用10%对照组空白血清干预24,48,72h。益气补肾组:细胞培养方法与阴性对照组、空白对照组相同,分别用5%(低浓度组)、10%(中浓度组)、15%(高浓度组)益气补肾方含药血清干预24,48,72h。

1.5 指标测定

1.5.1 MTT法检测SGC-7901细胞增殖抑制率
取对数生长期的细胞,胰酶消化离心后,按每孔100μL细胞混悬液(2000个细胞)接种于96孔培养

板中,待细胞单层铺满孔底(贴壁)后,各实验组分别加入 100 μL 培养液。空白对照组用 10%空白血清干预 24, 48, 72 h, 益气补肾组分别用 5%(低浓度组), 10%(中浓度组), 15%(高浓度组)含药血清干预 24, 48, 72 h。吸弃上清液, 加入新鲜培养液 200 μL 后, 每孔再加入 20 μL MTT 溶液 ($5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 即 0.5% MTT), 继续培养 4 h。吸弃上清, 每孔加入 150 μL 二甲基亚砜, 在摇床上低速振 10 min, 使甲臞结晶充分溶解。在酶标仪上选择 490 nm 处测定各孔吸光值(即 A 值), 记录实验结果。细胞增殖抑制率(inhibition ratio, IR): 抑制率(%)=[1-(实验组各复孔平均 A 值-空白对照组平均 A 值)/(细胞对照组平均 A 值-空白对照组平均 A 值)] $\times$ 100%。以上实验重复多次。

1.5.2 Transwell 小室检测胃癌细胞迁移侵袭能力 Matrigel 胶铺胶, 取出 Transwell 小室, 放入 24 孔板中。每孔已有 600 μL 含有血清的培养基。分别取各组干预后细胞, 胰酶消化, PBS 清洗后用无血清的培养基重悬细胞, 稀释至 $2\times 10^5\cdot\text{mL}^{-1}$ 。在小室上层加入细胞悬液 400 μL 。放入细胞培养箱培养 8 h 后取出小室, 用棉签擦去微孔滤膜内侧未穿过的细胞。固定液固定 2 min, 纯水清洗后, 再用苏木精染色 5 min, 纯水清洗, 最后用伊红染色 10 s, 吹水清洗, 棉签擦干。显微镜下取左右上下中共 10 个视野, 拍照, 细胞计数后取平均值。

1.5.3 5-Fu 共培养富集胃癌 CSC 及流式细胞术检测 $\text{CD44}^+\text{EpCAM}^+$ 干细胞比例 取状态良好、处于对数生长期的 SGC-7901 细胞, 用 0.25%胰酶消化 5~10 min, 吸管反复吹打使之尽可能呈单细胞悬液。在常规培养基中分别加入终浓度为 5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 5-Fu 共培养富集胃癌 CSC。24 h

后将细胞消化离心, 重悬于含 2.5% FBS 的 PBS 缓冲液中。按照推荐的稀释度加入 CD44 单克隆抗体和 EpCAM 单克隆抗体, 不加抗体组作为空白对照, 单染 CD44 和单染 EpCAM 用于流式细胞仪调节补偿参数, 室温避光孵育 30 min, 用含 2.5% FBS 的 PBS 液洗涤 2 遍, 含 1%多聚甲醛的 PBS 液固定, 用 FACSCalibur 流式细胞仪测定 $\text{CD44}^+\text{EpCAM}^+$ 干细胞比例。确定最佳 5-Fu 浓度后, 取对数生长期细胞, 该浓度 5-Fu 共培养 24 h 后, 分别加入各组药物继续干预 24 h, 重复上述操作进行 CSC 比例测定。

1.6 统计学方法

所有数据采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 计数资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 进行多样本均数间比较的单因素方差分析, 方差齐时, 采用 LSD 法; 方差不齐时, 采用 Games-Howell 法, $P<0.05$ 表示具有统计学差异。

2 结果

2.1 益气补肾方对 SGC-7901 细胞增殖生长的影响 空白对照组与阴性对照组各个时间的细胞增殖数(A 值)均无明显差异($P>0.05$)。不同浓度的益气补肾方含药血清作用于 SGC-7901 细胞 48, 72 h 后, 对胃癌细胞的增殖生长均有抑制作用。并且与时间、剂量呈正相关, 随着给药浓度的提高和给药时间的延长, 细胞增殖抑制率均显著高于同时期阴性对照组及空白对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。提示益气补肾方能显著抑制 SGC-7901 细胞增殖生长。24 h 干预的各组细胞增殖抑制率差异无统计学意义($P>0.05$)。此时间点对细胞活力影响不大, 故选用 24 h 作为后续体外侵袭实验药物干预时间。结果见表 1。

表 1 不同浓度益气补肾方含药血清对 SGC-7901 细胞增殖抑制的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Tab. 1 Effect of different concentrations of Yiqi Bushen Formula-containing serum on proliferation inhibition of SGC-7901 cells($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组 别	24 h		48 h		72 h	
	A 值	IR/%	A 值	IR/%	A 值	IR/%
阴性对照组	0.523 $\pm$ 0.033	—	0.897 $\pm$ 0.053	—	1.300 $\pm$ 0.068	—
空白对照组	0.543 $\pm$ 0.031	-3.82	0.906 $\pm$ 0.061	-1.00	1.341 $\pm$ 0.060	-3.20
低浓度组	0.530 $\pm$ 0.034	-1.34	0.856 $\pm$ 0.068	4.57	1.022 $\pm$ 0.075 ¹⁾²⁾	21.38
中浓度组	0.515 $\pm$ 0.029	1.53	0.790 $\pm$ 0.060 ¹⁾²⁾	11.92	0.942 $\pm$ 0.063 ¹⁾²⁾	27.54
高浓度组	0.512 $\pm$ 0.026	2.10	0.719 $\pm$ 0.066 ¹⁾²⁾	19.84	0.844 $\pm$ 0.081 ¹⁾²⁾	35.08

注: 与阴性对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与空白对照组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with the negative control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with normal control group, ²⁾ $P<0.05$.

2.2 益气补肾方对 SGC-7901 细胞侵袭转移的影响
Transwell 检测各组药物干预 24 h 后透膜细胞数目。实验结果显示,空白对照组与阴性对照组比较,透膜细胞数无明显差异($P>0.05$)。与阴性对照组比较,益气补肾方各组透膜细胞数显著降低,迁移能力受明显抑制,差异有显著统计学意义($P<0.01$)。提示益气补肾方能显著抑制 SGC-7901 细胞侵袭转移。结果见表 2,图 1。

表 2 各组透膜细胞数及对 SGC-7901 细胞侵袭抑制率的比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	透膜细胞数/个	侵袭抑制率/%
阴性对照组	292.00±12.51	—
空白对照组	285.10±11.09	2.36
低浓度组	127.20±6.14 ¹⁾²⁾	55.38 ¹⁾²⁾
中浓度组	110.40±5.40 ¹⁾²⁾	61.28 ¹⁾²⁾
高浓度组	73.30±7.23 ¹⁾²⁾	74.29 ¹⁾²⁾

注:与阴性对照组比较,¹⁾ $P<0.01$;与空白对照组比较,²⁾ $P<0.01$ 。
Note: Compared with the negative control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with normal control group, ²⁾ $P<0.01$ 。

2.3 不同浓度 5-Fu 共培养富集 CSC 及各组 CD44⁺EpCAM⁺干细胞比例结果

表 3 结果显示,不同浓度 5-Fu 均能一定程度

上提升 CD44⁺EpCAM⁺比例。与阴性对照组比较,15, 20, 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组 CD44⁺EpCAM⁺比例显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。其中浓度为 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 效果最佳,提示富集 CSC 成功。用此干预方法得模型对照组。

表 3 各组细胞表面标记 CD44⁺EpCAM⁺比例的比较($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Comparison of cell surface marker CD44⁺EpCAM⁺ ratios in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	CD44 ⁺ EpCAM ⁺ 比例/%
阴性对照组	1.37±0.40
5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 5-Fu 组	1.53±0.45
10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 5-Fu 组	1.97±0.25
15 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 5-Fu 组	3.12±0.36 ¹⁾
20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 5-Fu 组	7.23±1.00 ¹⁾
25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 5-Fu 组	6.20±1.20 ¹⁾

注:与阴性对照组比较,¹⁾ $P<0.05$ 。
Note: Compared with the negative control group, ¹⁾ $P<0.05$ 。

各组细胞干预后,实验结果表明,与模型对照组相比,空白对照组及各浓度益气补肾方组 CD44⁺EpCAM⁺比例均有下调,其中中、高浓度组 CD44⁺EpCAM⁺比例均 $<1\%$,与模型对照组相比,差异有显著统计学意义($P<0.01$)。提示益气补肾方能下调 SGC-7901 中胃癌 CSC 比例。结果见图 2。

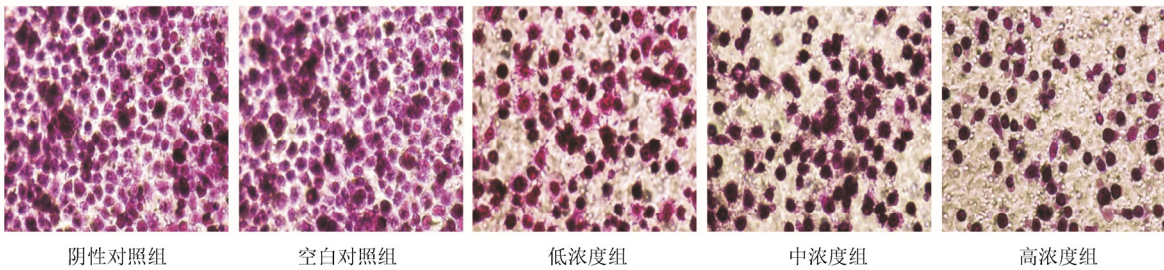


图 1 各实验组透膜细胞染色结果(HE, 200 $\times$)

Fig. 1 Staining results of permeable membrane cells in each experimental group(HE, 200 $\times$)

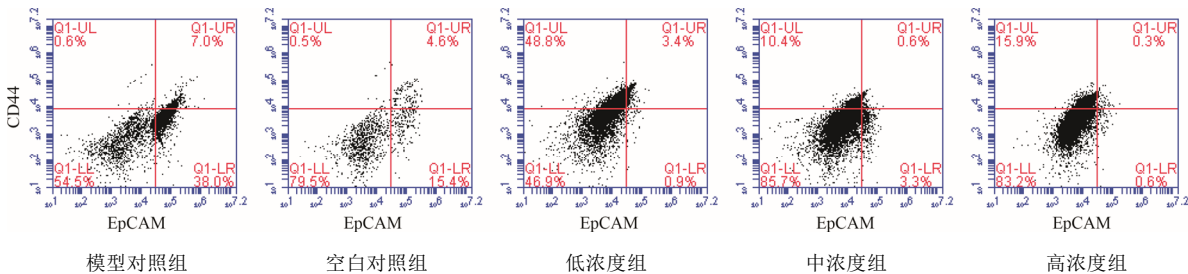


图 2 各实验组 CD44⁺EpCAM⁺标记流式细胞术检测结果

Fig. 2 Results of CD44⁺EpCAM⁺ labeling by flow cytometry in each experimental group

3 讨论

肿瘤转移是个复杂的多阶梯瀑布过程,肿瘤细胞从原发灶的增殖生长到远处转移灶的形成,需要经过漫长的过程和诸多生物学应变阶段。CSC是近年来肿瘤转移领域研究的热点,被认为是肿瘤组织内驱动肿瘤细胞发生发展的核心动力。CSC具有自我更新、多向分化、无限增殖潜能,有高致瘤性,并与肿瘤耐药及复发转移密切相关。只要体内残存极小部分CSC,就能诱发肿瘤复发和远处转移^[9]。既往研究表明,CSC标志物在胃癌组织中的表达量与其浸润深度和淋巴结受累程度成正相关,并且与预后有关^[10-11]。Wakamatsu等^[12]研究发现CSC标志物在胃癌弥漫型淋巴结转移灶的表达量显著高于原发肿瘤。

目前胃癌CSC表面标志物比较公认的有CD44、EpCAM、CD24、CD133等^[13-14],其单独或组合可作为分选胃癌CSC的重要分子标记。CD44、EpCAM在胃癌CSC高表达,且均与胃癌的侵袭与转移有关^[15-16]。CD44是由361个氨基酸构成的蛋白质,在免疫、造血、肿瘤的转移等生物学过程中发挥了关键作用,参与了异质性黏附、免疫炎症反应、淋巴细胞归巢、细胞伪足的形成。其在多种肿瘤细胞中表达上调,可促进肿瘤细胞迁移和侵袭,在胃癌的侵袭和转移过程中也有决定性的意义^[17]。EpCAM是含314个氨基酸的I型穿膜糖蛋白,在细胞表面以多聚体的形式存在,具有调节细胞增殖、分化、迁移等多种生物学功能。研究表明,EpCAM通过促进细胞增殖、免疫逃逸等机制促成肿瘤发生^[18]。Du等^[19]报道EpCAM在胃癌组织中过表达,显著高于非肿瘤组织,且与分化程度及转移相关。转移是肿瘤恶性行为的特征性表现,也是临床治疗失败的主要原因,通过药物的干预,阻断或削弱胃癌CSC的致瘤与侵袭能力可能是防止肿瘤复发、转移的新途径。

胃癌属于中医学“胃脘痛”“反胃”“心腹痞”“伏梁”“积聚”等病证范畴。胃为“水谷之海”,脾为后天之本,气血生化之源。肾为先天之本,五脏之根,肾中精气可以化生一身之气,与人体干细胞能化生全身细胞的功能不谋而合,而CSC是从成体干细胞突变分化而来。手术治疗仅起到减瘤去邪目的,并未从根本上解除患者阴

阳平衡及脏腑功能的失调问题,而化疗则更是伤阴耗气,伤及肾气。正气不足则余邪逐渐强盛,如李中梓在《医宗必读》中说:“积之成也,正气不足,而后邪气踞之。”邪毒乘虚随经气或血脉流窜,客于脏腑,日久成积而导致胃癌的转移与复发。脾肾亏虚是胃癌根治术后转移和复发的主要原因。“治病必求于本”,项目组采用益气补肾方防治胃癌复发和转移,取得了明显的疗效^[7-8]。该方由黄芪、女贞子、茯苓、猪苓、薏苡仁、枸杞子等组成,全方共奏益气补肾、扶正固本、祛邪败毒之效。

本实验以胃癌CSC表面标志物为切入点,探索益气补肾方含药血清抑制人胃癌细胞增殖转移的可能机制。研究发现,益气补肾方能显著抑制人胃癌细胞SGC-7901增殖,并且与时间、剂量呈正相关,随着给药浓度的提高和给药时间的延长,细胞增殖抑制率均显著增高,显示了其较好的抗肿瘤活性。Transwell实验显示益气补肾方各组透膜细胞数显著降低,迁移能力受明显抑制,进一步证实了益气补肾方抑制胃癌细胞侵袭转移的作用。

5-Fu是目前广泛应用于胃、肠等消化道恶性肿瘤的一线化疗药物,主要作用于G₂/M期细胞,对处于增殖分裂期的细胞进行直接杀伤,而大多数处于G₀与G₁期的复含CSC的细胞群体往往能存活,并继续无限增殖生长。CSC在细胞中比例极低,分选CSC的方法主要有悬浮细胞培养法、磁珠分选法和侧群细胞分选法等^[20]。因此,本实验采用侧群细胞分选法,选用不同浓度的5-Fu作用于SGC-7901细胞,通过共培养诱导富集SGC-7901中胃癌CSC,成功建立CD44⁺EpCAM⁺富集细胞模型。流式细胞术检测结果提示,当5-Fu药物浓度为20 μg·mL⁻¹时,CD44⁺EpCAM⁺干细胞比例提升最高,因此可以认为此药物浓度下,非胃癌干细胞的杀伤效果最大,提示CSC富集成功。不同浓度的益气补肾方干预后,流式细胞术检测到CD44⁺EpCAM⁺干细胞比例均下调,表明其抗转移作用可能与下调胃癌CSC表面标志物CD44、EpCAM表达,降低CD44⁺EpCAM⁺干细胞比例有关。

该研究初步揭示了益气补肾方抗胃癌增殖转移的作用机制,为益气补肾法在中医药防治胃癌转移的进一步临床应用奠定实验基础。

REFERENCES

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA: Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] BASS A J, THORSSON V, SHMULEVICH I, et al. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma [J]. Nature, 2014, 513(7517): 202-209.
- [3] MOEHLE M, GOCKEL I, ROESSLER H P, et al. Prospective, open, multi-centre phase I/II trial to assess safety and efficacy of the oesophagogastric junction [J]. BMC Cancer, 2013, 13(75): 1471-2407.
- [4] AHMAD G, AMIJI M M. Cancer stem cell-targeted therapeutics and delivery strategies [J]. Expert Opin Drug Deliv, 2017, 14(8): 997-1008.
- [5] DESHMUKH A, DESHPANDE K, ARFUSO F, et al. Cancer stem cell metabolism: a potential target for cancer therapy [J]. Mol Cancer, 2016, 15(1): 69-78.
- [6] CARNERO A, GARCIA-MAYEA Y, MIR C, et al. The cancer stem-cell signaling network and resistance to therapy [J]. Cancer Treat Rev, 2016(49): 25-36.
- [7] LIU Y X, JIANG S J, KUANG T H, et al. Treatment with Yiqi Bushen Formula combined with chemotherapy for preventing postoperative metastasis of stomach cancer [J]. J Tradit Chin Med, 2009, 29(4): 263-267.
- [8] 刘云霞. 益气补肾口服液抗胃癌术后转移的临床观察[J]. 中国中医药科技, 2010, 17(1): 67-68.
- [9] TRUMPP A, WIESTLER O D. Mechanisms of disease: cancer stem cells-targeting the evil twin [J]. Nat Clin Pract Oncol, 2008, 5(6): 337-347.
- [10] ISHIGAMI S, UENO S, ARIGAMI T, et al. Prognostic impact of CD133 expression in gastric carcinoma [J]. Anticancer Res, 2010, 30(6): 2453-2457.
- [11] MATSUOKA J, YASHIRO M, SAKURAI K, et al. Role of the stemness factors Sox2, Oct3/4, and Nanog in gastric carcinoma [J]. J Surg Res, 2012, 174(1): 130-135.
- [12] WAKAMATSU Y, SAKAMOTO N, OO H Z, et al. Expression of cancer stem cell markers ALDH1, CD44 and CD133 in primary tumor and lymph node metastasis of gastric cancer [J]. Pathol Int, 2012, 62(2): 112-119.
- [13] NGUYEN P H, GIRAUD J, CHAMBONNIER L, et al. Characterization of biomarkers of tumorigenic and chemoresistant cancer stem cells in human gastric carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2017, 23(6): 1586-1597.
- [14] NOSRATI A, NAGHSHVAR F, KHANARI S. Cancer stem cell markers CD44, CD133 in primary gastric adenocarcinoma [J]. Int J Mol Cell Med, 2014(3): 279-286.
- [15] CHETTY C, VANAMALA S K, GONDI C S, et al. MMP-9 induces CD44 cleavage and CD44 mediated cell migration in glioblastoma xenograft cells [J]. Cell Signal, 2012, 24(2): 549-559.
- [16] ZHANG W Q, LI B Y, LIU J, et al. Expressions of EpCAM and CD44 in gastric carcinoma and their clinical significance [J]. Chin J Clin Res(中国临床研究), 2014, 27(12): 1441-1444.
- [17] CHETTY C, VANAMALA S K, GONDI C S, et al. MMP-9 induces CD44 cleavage and CD44 mediated cell migration in glioblastoma xenograft cells [J]. Cell Signal, 2012, 24(2): 549-559.
- [18] KROEPIL F, DULIAN A, VALLBOHMER D, et al. High EpCAM expression is linked to proliferation and lauren classification in gastric cancer [J]. BMC Res Notes, 2013, 6: 253.
- [19] DU W Q, LI W, CAO S S, et al. EpCAM is overexpressed in gastric cancer and its downregulation suppresses proliferation of gastric cancer [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2009, 135 (9): 1277-1285.
- [20] YANG D, QIAN H L, LI G X. Identification and inhibition of gastric cancer stem cells [J]. Chin J Clin Oncol(中国肿瘤临床), 2011, 38(22): 1412-1414.

收稿日期: 2018-07-07

(本文责编: 曹粤锋)