

益气复生方对脂多糖诱导胃癌细胞 SGC-7901 炎症的改善作用

林 燕^{1*}, 王艳春², 段春燕¹, 袁凤娟²

(1. 新疆医科大学附属中医医院肿瘤一科, 乌鲁木齐 830000; 2. 新疆维吾尔自治区食品药品检验所, 乌鲁木齐 830002)

摘要: 目的 考察益气复生方对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的胃癌细胞 SGC-7901SGC-7901 增值作用的影响及对其产生的炎症因子的改善作用。**方法** 培养人胃癌细胞 SGC-7901, 用 LPS 诱导 SGC-7901 细胞, 用 MTS 法检测不同浓度的 LPS 对 SGC-7901 细胞活力的影响, 用浓度为 250、50、10 mg/mL 益气复生方作用于细胞, 采用 ELISA 法检测其细胞上清液中炎症因子的释放量。**结果** 益气复生方能够显著降低 SGC-7901SGC-7901 细胞的存活率, 对胃癌细胞起到很好的抑制作用, 能够显著改善 LPS 诱导的胃癌细胞肿瘤坏死因子(TNF- α)、白介素 6(IL-6)、白介素 8(IL-8)炎症因子的释放, 能够促进干扰素(IFN- γ)的释放量。**结论** 益气复生方可以抑制 LPS 刺激的 SGC-7901SGC-7901 细胞炎症因子的释放, 对胃癌细胞具有一定的改善作用。

关键词: 益气复生方; 胃癌细胞; 炎症因子

Effect of Yiqi Fusheng Decoction on the improvement of SGC-7901SGC-7901 inflammation induced by LPS in gastric cancer cells

LIN Yan^{1*}, WANG Yan-Chun², DUAN Chun-Yan¹, YUAN Feng-Juan²

(1. *The First Tumor Department, Affiliated Traditional Chinese Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China*; 2. *Xinjiang Uygur Autonomous Region for Food and Drug Inspection Institute, Urumqi 830002, China*)

ABSTRACT: Objective To investigate the effect of Yiqi Fusheng Decoction on the proliferation of LPS induced gastric cancer cell line SGC-7901SGC-7901 and the improvement of its inflammatory factors. **Methods** Human gastric cancer cell SGC-7901 was cultured, and SGC-7901 cells were induced by LPS. The effect of different concentrations of LPS on the viability of SGC-7901 cells was detected by MTS. The cells were treated with 250, 50, and 10 mg/mL of Yiqi Fusheng Decoction, and the release of inflammatory cytokines in the supernatant was detected by ELISA. **Results** Yiqi Fusheng Decoction could significantly reduce the survival rate of SGC-7901SGC-7901 cells and played a good role in inhibiting gastric cancer cells. It could significantly improve the release of

基金项目: 国家自然科学基金项目(81760860)、新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2016DOIC136)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (81760860) and the Xinjiang Uygur Autonomous Region Natural Science Foundation Project (2016DOIC136)

***通讯作者:** 林燕, 副主任医师, 主要研究方向为中西医结合防治恶性肿瘤的研究。E-mail: linyan@163.com

***Corresponding author:** LIN Yan, Associate Professor, the First Tumor Department, Affiliated Traditional Chinese Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China. E-mail: linyan@163.com

inflammatory factors of tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin 6 (IL-6) and IL-8 induced by LPS in gastric cancer cells, and could promote the release of interferon (IFN- γ). **Conclusion** Yiqi Fusheng Decoction can inhibit the release of inflammatory factors of SGC-7901 cells stimulated by LPS, and can improve the gastric cancer cells.

KEY WORDS: Yiqi Fusheng Decoction; gastric cancer cell; inflammatory factor

1 引言

胃癌是常见的消化恶性肿瘤,虽然近几年其发病率和死亡率有所降低,但在消化道恶性肿瘤中其发病率和死亡率仍位于前列^[1,2]。目前大多认为胃癌可以由慢性浅表性胃炎、慢性萎缩性胃炎等演变而来,慢性炎症与胃癌的发生有着密切的关系^[3]。胃癌目前多采用化疗治疗,中晚期患者也多采用中药联合化疗治疗,可以起到减毒增效的作用,改善患者的生活质量。因此,中药以及中药复方制剂对胃癌的治疗具有一定的疗效^[4,5]。

益气复生方在胃癌的治疗中具有一定的疗效,可以通过调节机体的免疫力、或者直接抑制肿瘤,从而抑制细胞的转移和侵袭^[6]。因此说明中药复方制剂在治疗胃癌方面具有一定的疗效。研究表明癌症的产生与炎症有着密切的关系,本研究探讨益气复生方对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导胃癌细胞释放的炎症因子的影响。

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

SGC-7901 细胞(人胃癌细胞,美国 ATCC 细胞库); 甲硝酸阿帕替尼片(批号: 180210KB, 江苏恒瑞医药股份有限公司); 益气复生方(由新疆医科大学附属中医医院提供); 胎牛血清、DMEM 培养基(美国 Gibco 公司); 青霉素和链霉素(双抗,美国 Hyclone 公司); LPS(美国 Biosharp 公司); 细胞活力检测试剂 MTS(美国 Promega 公司); TNF- α 、IL-6、IL-8ELISA 试剂盒(美国 eBioscience 公司); IFN- γ 试剂盒(联科生物技术有限公司)。

BPN-CH 型 CO₂ 培养箱(上海一恒科学仪器有限公司); DSY2000X 倒置荧光显微镜(重庆澳浦光电技术有限公司); TDZ5-WS 型多管架自动平衡离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司); SpectraMax M2 多功能酶标仪(美国美谷分子仪器有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 细胞处理分组及加药

SGC-7901 细胞于 37 °C、5%CO₂ 及饱和湿度环境下培养于含 10%胎牛血清 DMEM 培养基中,取对数生长期的细胞悬液,以 180 μ L(1 \times 10⁴ 个/孔)接种于 96 孔培养板内,

孵育 18~24 h 后进行后续实验。将 SGC-7901 细胞随机分组: (1)正常对照组(control): 以含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养,终体积补充至 200 μ L(补充液与样品溶液相同); (2)LPS 组: 该组加 1 μ g/mL LPS 10 μ L, 终体积补充至 200 μ L(补充液为培养基); (3)空白对照组(blank): 加无细胞的培养基 200 μ L; (4)筛选样品组(sample): 益气复生方采用 DMSO 进行初步溶解,其溶解后初始浓度为 100 mg/mL, 后用培养基进行稀释。每孔加入益气复生方 10 μ L、LPS 10 μ L, 使终体积为 200 μ L, 提取物终浓度分别为 250、50、10 mg/mL; (5)阳性药组加 PBS 溶解的甲硝酸阿帕替尼片 10 μ L, 其浓度为 1 mg/mL, 样品与细胞共同孵育 24 h 后进行相关指标检测。

2.2.2 细胞活力检测

细胞给药孵育 24 h 后,用 MTS 法检测细胞活性^[7]。每孔加入 10 μ L MTS 混合液,继续培养 4 h 显色,于酶标仪 490 nm 波长处检测各孔的光吸收值。

细胞存活率 = $(OD_{\text{sample}} - OD_{\text{blank}}) / (OD_{\text{control}} - OD_{\text{blank}}) \times 100\%$

2.2.3 细胞上清液中炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-8、IFN- γ 检测

细胞孵育 24 h 后,每孔取细胞上清液 20 μ L, TNF- α 检测时细胞上清稀释 150 倍后按试剂盒说明书进行操作,用酶标仪在 450 nm 波长处检测各孔的光吸收值。IL-6、IL-8、IFN- γ 检测时每孔取细胞上清液 50 μ L, 稀释 10 倍后按试剂盒说明书进行操作,用酶标仪在 450 nm 波长处检测各孔的光吸收值。

3 结果与分析

3.1 益气复生方对 LPS 诱导胃癌细胞 SGC-7901 细胞活力的影响

益气复生方对 LPS 诱导 SGC-7901 细胞活力的影响见表 1,由表 1 可以明显看出益气复生方作用于 LPS 诱导的 SGC-7901 细胞后,给药浓度越高,细胞的存活率越低,说明益气复生方对 LPS 诱导的 SGC-7901 细胞具有一定的抑制作用。

3.2 益气复生方对胃癌细胞 SGC-7901 的抑制率

益气复生方提取液与抑制率关系见图 1,由图 1 可以看出,SGC-7901 经过不同浓度益气复生方提取液处理后,随着浓度的增加对细胞增殖的抑制作用增强,当浓度为

表1 益气复生方对 LPS 诱导 SGC-7901 细胞活力的影响($n=5$)
Table 1 Effect of Yiqi Fusheng Decoction on the activity of LPS induced SGC-7901 cells ($n=5$)

分组	细胞存活率(%)
正常对照组	99.99±7.38
LPS 对照组	99.13±9.42
甲硝酸阿帕替尼片组	37.78±5.46 ^{##}
益气复生方 250 mg/mL 组	33.42±6.78 ^{##}
益气复生方 50 mg/mL 组	73.28±2.31 [#]
益气复生方 10 mg/mL 组	90.63±6.42 [#]

注:与对照组比较,[#]表示具有显著性差异, $P<0.05$;^{##}表示具有极显著性差异, $P<0.01$ 。

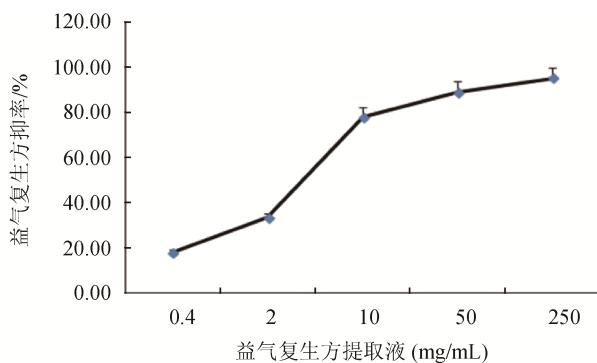


图1 益气复生方提取液与抑制率关系($n=5$)

Fig. 1 Relationship between extraction liquid of Yiqi Fusheng Decoction and inhibition rate ($n=5$)

250、50、10、2、0.4 mg/mL 时,抑制率的均值分别为 95.31%、89.22%、78.24%、33.42%、18.21%,并且成剂量依赖性。

3.3 益气复生方对 LPS 诱导 SGC-7901 细胞炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-8、IFN- γ 释放的影响

与正常细胞比较,LPS 可以明显促进 SGC-7901 细胞炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 的分泌,可以显著抑制 IFN- γ 的释放, $P<0.01$ 。然而不同浓度的益气复生方(10、50、

250 mg/mL)以及阳性药作用于细胞后能够显著抑制 LPS 诱导的 SGC-7901 细胞炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 的释放,益气复生方具有浓度依赖性。益气复生方各剂量组与阳性药组对 IFN- γ 的分泌具有一定的促进作用,结果可以看出益气复生方具有浓度依赖性。结果如表 2 所示。

4 结论与讨论

机体的慢性炎症,免疫功能的紊乱等与胃癌的发生、发展有着密切的关系^[8]。现阶段多采用放疗和化疗的手段进行治疗恶性肿瘤,但与此同时对人体的自身免疫细胞也具有一定的损伤,会使患者产生严重的不良反应,致使患者在治疗中具有很大的局限性。减毒增效、改善患者的生活是治疗胃癌的有效手段之一^[9]。现今越来越多的中药,单体以及成方制剂治疗肿瘤成为我国治疗肿瘤的重要手段之一。中药成方制剂的治疗也越来越被重视。此类药作用靶点多,毒副作用相对较低,临床运用范围较为广泛^[10]。

本研究使用的益气复生方由党参、黄芪、茯苓、炒白术、肉豆蔻、八月札等组成,党参具有补中益气、养血、生津、消渴等功效^[11];黄芪具有补气固表、利水消肿、脱毒排脓等功效;茯苓具有宁心安神、抗菌、抗肿瘤等功效;炒白术具有健脾止泻、疏肝理气、滋阴养血等功效;肉豆蔻具有祛痰、解毒、健脾,促进消化等功效;八月札味苦,性平,具有疏肝理气等功效。诸味药联合使用,具有活血解毒、益气健脾、滋阴补肾的功效。阳性药甲硝酸阿帕替尼片在治疗胃癌患者临床用药上具有一定的疗效,现临床用药较为广泛,故本研究以甲硝酸阿帕替尼片作为阳性对照^[12]。由本研究结果中可以看出益气复生方与甲硝酸阿帕替尼片抗炎效果均较为显著,但中药成方制剂副作用小,作用靶点广泛,为后期中药治疗肿瘤的研究奠定了基础。

炎症细胞因子与胃癌发病有着密切的关系,例如 TNF- α ,是一种重要的促炎因子,该炎症因子可诱导细胞的增值分化,促使细胞发生炎症反应^[13]。有研究表明,临床胃癌患者中与正常人相比较,胃癌患者血清中 TNF- α 浓

表2 益气复生方对 SGC-7901 细胞炎症因子释放的影响($n=5$)
Table 2 Effect of Yiqi Fusheng Decoction on the release of inflammatory factors in SGC-7901 cells ($n=5$)

组别	剂量(mg/mL)((mg/kg)	TNF- α (pg/mL)	IL-6(pg/mL)	IL-8(pg/mL)	IFN- γ (pg/mL)
正常对照组	—	189.48±11.31	176.30±11.15	188.30±10.15	33.12±13.83
LPS 组	10 ⁻³	241.26±43.30 ^{##}	207.12±53.43	201.35±91.18 ^{##}	43.38±21.78 ^{**}
甲硝酸阿帕替尼片组	10	69.51±21.05 ^{**}	31.45±13.28 ^{**}	34.55±14.28 ^{**}	163.10±27.39 ^{**}
益气复生方 250 μ g/mL 组	250	71.08±24.34 ^{**}	32.05±12.28 ^{**}	37.38±13.78 ^{**}	170.73±41.43 ^{**}
益气复生方 50 μ g/mL 组	50	103.42±35.52 [*]	66.01±26.33 [*]	68.01±24.33 [*]	100.81±20.85 [*]
益气复生方 10 μ g/mL 组	10	178.13±41.23 ^{**}	175.10±35.39 ^{**}	179.10±23.39 ^{**}	40.36±11.78 ^{**}

注:与对照组比较,^{##}表示具有极显著性差异, $P<0.01$;与 LPS 组比较,^{*}表示具有显著性差异, $P<0.05$,^{**}表示具有极显著性差异, $P<0.01$ 。

度明显升高^[14]。IL-6 也是促炎细胞因子,通常是在免疫激活后第一个产生的,可加重炎症疾病的病理过程,在先天性免疫和获得性免疫中扮演着重要的角色,可以调控 T 淋巴细胞,使其分化和激活,诱导辅助 T 细胞的活化,使调节性 T 淋巴细胞和辅助性 T 淋巴细胞之间保持平衡,并且在慢性炎症性疾病中发挥了重要的作用^[15],IL-8 主要由巨噬细胞,淋巴细胞等细胞产生,可以促进 T 细胞的趋化,因此抑制 IL-8 的表达可以降低癌细胞的分化与迁移^[16]。Yu 等^[17]研究表明 IFN- γ 可以抑制细胞分化,在炎症反应中起着重要的作用,可以抑制炎症信号通路的转导。而本研究结果显示益气复生方可以抑制 TNF- α , IL-8, IL-6 的产生,可以促进 IFN- γ 的产生,对 LPS 诱导的 SGC-7901 细胞产生的炎症因子具有一定的改善作用。

综上所述,益气复生方可以改善肿瘤细胞中炎症因子的分泌,有助于改善癌症的患病,但其作用机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Gai L, Liu H, Cui JH, *et al.* The allele combinations of three loci based on, liver, stomach cancers, hematencephalon, COPD and normal population: A preliminary study [J]. *Gene*, 2017, 605: 123–130.
- [2] Wang Y, Shen C, Ge J, *et al.* Regular aspirin use and stomach cancer risk in China [J]. *EJSO*, 2015, 41(21): 801–804.
- [3] 尚颖, 赵立元, 陆景坤. 炎性细胞因子与胃癌的关系[J]. *中国药科大学学报*, 2015, 46(1): 123–128.
Shang Y, Zhao LY, Lu JK. Relationship between inflammatory cytokines and gastric cancer [J]. *J China Pharm Univ*, 2015, 46(1): 123–128.
- [4] 唐倩倩, 王云飞, 聂勇战, 等. 贝母素乙增加胃癌细胞对阿霉素化疗敏感性的研究[J]. *新疆医科大学学报*, 2017, 40(4): 481–485.
Tang QQ, Wang YF, Nie YZ, *et al.* Study of peiminine combined with doxorubicin enhance chemotherapy sensitivity in human gastric cancer cell [J]. *J Xinjiang Med Univ*, 2017, 40(4): 481–485.
- [5] 韩靓. 益气复生方通过 ERK/MAPK 通路抑制人结肠癌细胞株 HCT116 侵袭转移的实验研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2012.
Han L. The Research of the inhibition of invasion and metastasis of colon cancer cells HCT116 after administrate Yiqifushengfang by ERK/MAPK signaling pathway [D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2012.
- [6] 段春燕, 王巧琳, 付艳丽, 等. 益气复生方对晚期胃癌化疗患者临床疗效及血清血管内皮生长因子水平的影响[J]. *肿瘤药理学*, 2017, 7(1): 64–68.
Duan CY, Wang QL, Fu YL, *et al.* Effects of Yiqifushengfang on the level of serum vascular endothelial growth factor and clinical efficacy of advanced gastric cancer chemotherapy patients [J]. *Anti-tumor Pharm*, 2017, 7(1): 64–68.
- [7] Li Y, Zhou S, Li J, *et al.* Quercetin protects human brain microvascular endothelial cells from fibrillary β -amyloid1-40-induced toxicity [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015; 5(1): 47–54.
- [8] 万瑶, 徐海峰. 胃癌患者血清炎症因子水平的检验分析[J]. *现代肿瘤医学*, 2015, 23(21): 3137–3139.
Wang Y, Xu HF. Serum inflammatory cytokine levels in patients with gastric cancer [J]. *Mod Oncol*, 2015, 23(21): 3137–3139.
- [9] Zilberman Y, Sonkusale SR. Microfluidic optoelectronic sensor for salivary diagnostics of stomach cancer [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 15(67): 465–471.
- [10] 李月灵, 王高峰, 彭红, 等. 五味子乙素抑制胃癌 SNU-1 细胞增殖和转移的作用机制研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2017, 33(12): 1815–1818.
Li YL, Wang GF, Peng H, *et al.* Research of inhibitory mechanism of salidroside B on proliferation and metastasis of gastric cancer SNU-1 cells [J]. *Chin J Immunol*, 2017, 33(12): 1815–1818.
- [11] 林燕, 段春燕, 付艳丽, 等. 益气复生方对胃癌组织中 STAT3 及 HIF-1 表达的影响[J]. *肿瘤药理学*, 2017, 7(2): 159–163.
Lin Y, Duan CY, Fu YL, *et al.* Effects of Yiqifusheng decoction on expression of STAT3 and HIF-1 in gastric cancer tissue [J]. *Anti-tumor Pharm*, 2017, 7(2): 159–163.
- [12] 秦叔逵, 李进. 阿帕替尼治疗胃癌的临床应用专家共识[J]. *临床肿瘤医学杂志*, 2015, 20(9): 841–843.
Qin SK, Li J. Consensus among experts on the clinical application of apatinib in the treatment of gastric cancer [J]. *Chin Clin Oncol*, 2015, 20(9): 841–843.
- [13] Lee HS, Park HW, Song WJ, *et al.* TNF- α enhance Th2 and Th17 immune responses regulating by IL23 during sensitization in asthma model [J]. *Cytokine* 2016, 79: 23–30.
- [14] 刘爽, 吴志宇, 屈顺喜. 胃癌患者血清 TNF- α 、IL-6、IL-8 水平变化及意义[J]. *山东医药*, 2010, 50(46): 79–80.
Liu S, Wu ZY, Qu SX. Changes and significance of serum TNF- α , IL-6 and IL-8 levels in patients with gastric cancer [J]. *Shandong Med J*, 2010, 50(46): 79–80.
- [15] Rana S, Shahzad M, Shabbir A. Pistacia integerrima ameliorates airway inflammation by attenuation of TNF- α , IL-4, and IL-5 expression levels, and pulmonary edema by elevation of AQP1 and AQP5 expression levels in mouse model of ovalbumin-induced allergic asthma [J]. *Phytomedicine*, 2016, 23(8): 838–845.
- [16] Peng CY, Wang TY, Lee SS, *et al.* Let-7c restores radio- and chemo-sensitivity and impairs stemness in oral cancer cells through inhibiting IL-8 [J]. *J Oral Pathol Med*, 2018, <https://doi.org/10.1111/jop.12711>
- [17] Yu Q, Zeng K, Ma X, *et al.* Resocampferol-mediated anti-inflammatory effects on activated macrophages via the inhibition of JAK2/STAT3, NF- κ B and JNK/p38 MAPK signaling pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 38: 104–114.

(责任编辑: 姜 珊)

作者简介

林燕, 副主任医师。主要研究方向为中西医结合防治恶性肿瘤的研究。
E-mail: 1963478077@qq.com