

参苓白术散协同奥沙利铂对人结肠癌细胞增殖及凋亡的作用

余文燕¹, 王桦影¹, 王国娟^{2*}, 刘江源¹, 刘智明¹, 魏祥燕¹

(1. 江西中医药大学中医基础理论分化发展研究中心, 江西省中医病因生物学重点实验室, 南昌 330004; 2. 江西中医药大学附属医院, 南昌 330006)

[摘要] **目的:**探讨参苓白术散(Shenling Baizhu San, SBS)对人结肠癌 HCT116 细胞增殖及凋亡的影响。**方法:**以化疗药奥沙利铂(oxaliplatin, L-OHP)为阳性药,采用噻唑蓝[3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, MTT]比色法检测 SBS 联用 L-OHP 前后对 HCT116 细胞生长的抑制情况,碘化丙啶(PI)染色分析细胞周期分布,Annexin V-FITC 试剂盒检测 HCT116 细胞凋亡,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测其对细胞内 B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)蛋白的影响。**结果:**① MTT 比色法结果显示,分别取 0.002,0.004,0.008,0.016,0.032,0.064,0.128 g·L⁻¹ L-OHP 联用 5% SBS 药物血清作用于 HCT116 细胞 48 h,与联用前各组比较,联用后各组细胞抑制率均明显上升($P < 0.05$),其中以 0.064 g·L⁻¹ L-OHP 联用 5% SBS 最高,达(94.95 ± 0.90)%;②周期结果显示,与联用前 L-OHP(0.002,0.004,0.008 g·L⁻¹)组比较,分别联用 5% SBS 后,G₂/M 期 HCT116 细胞分布增多,均由 G₀/G₁,S 和 G₂/M 期转至 G₂/M 期,以 L-OHP 0.008 g·L⁻¹联用 5% SBS 组最为明显($P < 0.05$);③凋亡结果显示,与联用前 L-OHP(0.002,0.004,0.008 g·L⁻¹)组比较,分别联用 5% SBS 后均能明显增加 HCT116 细胞凋亡率($P < 0.05$),以高剂量联用组凋亡率最高,为(24.97 ± 2.45)%;④蛋白检测显示,与 5% 空白血清组比较,L-OHP(0.002,0.004,0.008 g·L⁻¹)分别联用 5% SBS 后,Bax 蛋白表达量明显上调($P < 0.05$),以 L-OHP 0.008 g·L⁻¹联用 5% SBS 组最高。分别与空白血清组、空白组比较,各用药组 Bcl-2 蛋白表达量均明显降低($P < 0.05$),其中以 L-OHP 0.008 g·L⁻¹联用 5% SBS 组最低。**结论:**参苓白术散能协同 L-OHP 抑制人结肠癌 HCT116 细胞增殖及凋亡,其作用机制可能是通过促进 HCT116 细胞增殖、诱导细胞凋亡、改变细胞周期分布、上调 Bax 蛋白表达及下调 Bcl-2 蛋白表达来实现的。

[关键词] 结肠癌;参苓白术散;奥沙利铂;增殖;周期;凋亡

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5;R273 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)18-0118-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20181716

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180614.1141.003.html>

[网络出版时间] 2018-06-14 15:24

Effect of Shenling Baizhu San Combined with Oxaliplatin on Proliferation and Apoptosis of Human Colon Cancer Cells

YU Wen-yan¹, WANG Hua-ying¹, WANG Guo-juan^{2*}, LIU Jiang-yuan¹, LIU Zhi-ming¹, WEI Xiang-yan¹

(1. *Research Center for Differentiation and Development of Basic Theory of Traditional*

Chinese Medicine (TCM), Jiangxi University of TCM, Key Laboratory of Etiology and Biology of TCM in Jiangxi Province, Nanchang 330004, China;

2. Affiliated Hospital of Jiangxi University of TCM, Nanchang 330006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Shenling Baizhu San (SBS) on the proliferation and

[收稿日期] 20171201(002)

[基金项目] 江西省自然科学基金项目(20161BAB215208);江西省卫生计生委中医药科研课题项目(2015A047);江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ150838);江西中医药大学课题项目(2014BS002)

[第一作者] 余文燕,博士,讲师,主治医师,从事中医药防治肿瘤的研究,Tel:0791-87142858,E-mail: henrie09@qq.com

[通信作者] *王国娟,博士,主治医师,讲师,从事中医药防治肿瘤的临床与实验研究,Tel:0791-87142858,E-mail: wgj171911@126.com

apoptosis of human colon cancer HCT116 cells. **Method:** The growth of HCT116 cell lines treated with SBS was investigated by 3- (4, 5-dimethyl-2-thiazolyl) -2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay, the cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry propidium iodide (PI) staining, and its apoptosis was monitored by Annexin V-FITC kit. B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated X protein (Bax) were monitored by Western blot (WB). **Result:** ① MTT results showed that the inhibition rates of HCT116 cells treated by the groups of 0.002, 0.004, 0.008, 0.016, 0.032, 0.064, 0.128 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ oxaliplatin combined with 5% SBS serum respectively were all significantly increased compared with those uncombined with 5% SBS serum after 48 hours ($P < 0.05$). The inhibition rate of the group of 0.064 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ in L-OHP combined with 5% SBS serum was the highest or $(94.95 \pm 0.90)\%$. ② Cell cycle results showed that the distributions of HCT116 cells were all increased in G_2/M phase, which were transferred from G_0/G_1 , S and G_2/M phases to G_2/M phase after the combined administration of low, medium and high-dose oxaliplatin (0.002, 0.004, 0.008 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) with 5% SBS serum respectively, and the high-dose oxaliplatin combined 5% SBS serum was the most significant ($P < 0.05$). ③ Apoptosis results showed that the apoptosis of HCT116 cells could be induced by low, medium and high-dose oxaliplatin before and after being combined with 5% SBS serum respectively ($P < 0.05$), and the high-dose combination group showed the highest apoptosis rate or $(24.97 \pm 2.45)\%$. ④ WB results showed that compared with the 5% blank serum group, the expression of Bax protein was significantly up-regulated after the combined administration of low, medium and high-dose L-OHP with 5% SBS respectively ($P < 0.05$). Compared with blank serum group and blank control group, the expression of Bcl-2 protein in each drug group was significantly decreased ($P < 0.05$), and the high-dose combination group showed the lowest expression. **Conclusion:** SBS could inhibit the proliferation and apoptosis of HCT116 cell lines when being combined with oxaliplatin. The mechanism may be achieved by inhibiting the proliferation, inducing the cell apoptosis, changing the cell cycle distribution, up-regulating the Bax protein expression and down-regulating the Bcl-2 protein expression.

[Key words] colon cancer; Shenling Baizhu San; oxaliplatin; proliferation; cell cycle; apoptosis

大肠癌是目前世界发病率排行第 4 位的恶性肿瘤^[1],化疗是临床常用的治疗手段,占据着重要的地位,然而其在大面积杀死癌细胞的同时,也会破坏机体正常细胞,导致机体免疫系统受损,甚者导致化疗中断或终止。中医药因具备安全有效、多靶点等作用,在肿瘤防治研究中日益受到研究者的关注。结肠癌属于中医“肠覃”“脏毒”“积聚”等范畴,病因主要包含正气不足与邪毒内侵两方面,治宜扶正祛邪并举,归结起来多为健脾化湿、解毒活血^[2]。参苓白术散是出自宋代《太平惠民和剂局方》,由人参、茯苓、白术、甘草、山药、扁豆、薏苡仁、桔梗、砂仁、莲子组成,具有益气健脾,渗湿止泻之功效,一直以来被医家誉为治疗脾虚湿盛证的代表方,目前该方已逐步应用于肿瘤治疗领域,如近年研究发现该方可通过调节细胞免疫因子从而抑制肺癌细胞生长^[3],可能直接刺激辅助性 T1 细胞(Th1)分泌白细胞介素-2(IL-2),从而诱导杀伤细胞分泌干扰素- γ (IFN- γ),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)而发挥抗肿瘤作用^[4],且能辅助介入治疗晚期肺癌、肝癌、胃癌、肠癌术后证属脾虚弱挟湿型,提高患者对化疗药物的

耐受性,减少胃肠道不适等毒副反应,提高患者的生存质量^[5-8]。目前国内外尚未见该方对人结肠癌细胞凋亡作用机制的研究报道,本实验前期研究发现,参苓白术散能有效抑制结肠癌细胞增殖,为进一步探讨其具体作用机制是否与细胞凋亡途径有关,本实验观察了参苓白术散对人属结肠癌细胞增殖及凋亡的作用,以进一步明确该方的药理机制,拓展其应用领域,为中医药防治结肠癌提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞株 人结肠癌细胞株 HCT116 购于中国科学院上海生科院细胞资源中心,编号 B10ON-12342,由江西中医药大学中医基础理论分化发展研究中心(江西省中医病因生物学重点实验室)传代培养。

1.2 药物 参苓白术散由人参 100 g,麸炒白术 100 g,茯苓 100 g,桔梗 50 g,莲子 50 g,麸炒薏苡仁 50 g,砂仁 50 g,山药 100 g,炒白扁豆 75 g,甘草 100 g 组成,方中人参用党参代替,药材购于江西省中医院中药房,所有药材经江西中医药大学褚晓兰教授鉴定,符合 2015 年版《中国药典》^[9]要求。用

5 倍的水浸泡 30 min, 煎煮 30 min, 再以 4 层纱布过滤后, 用 4 倍量的水同法煎煮, 收集滤液, 2 次合并后浓缩至含生药 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下备用, 全程由江西中医药大学中医基础理论分化发展研究中心监制。奥沙利铂 (L-OHP, 江苏恒瑞医药股份有限公司, 批号 H20000686, $50 \text{ mg}/\text{瓶}$), 以超纯水 10 mL 将其溶解成 $0.005 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 L-OHP 母液备用。

1.3 试剂 胎牛血清 (杭州四季青生物工程公司, 批号 090501); RPMI 1640 培养基 (Gibco 公司, 批号 507766); 胰蛋白酶 (Solarbio 公司, 批号 T8150); 噻唑蓝 (MTT, Sigma 公司, 批号 M2128-1G); RIPA 裂解液, 考马斯亮蓝蛋白定量试剂盒, 彩色预染超高分子蛋白质 marker (武汉博士德生物工程有限公司, 批号分别为 AR0105-30, AR0145, AR1118); Annexin V-FITC/碘化丙啶 (PI) 双染法细胞凋亡检测试剂盒, PI 染色液 (上海美吉生物技术有限公司, 批号分别为 Mbchem™ M3021, Mbchem™ M4404); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天生物技术有限公司, 批号 P0012); B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 一抗 (美国 Abcam 公司, 批号分别为 ab32124, ab32503); β -肌动蛋白鼠单克隆抗体 (β -actin, 美国 Affinity 公司, 批号 T0022); 二甲基亚砜 (DMSO, 北京索莱宝科技有限公司, 批号 CAS 67-68-5); HRP-羊抗兔免疫球蛋白 (Ig) G 酶标二抗 (北京康为世纪有限公司, 批号 CW0102)。

1.4 仪器 3111 型 CO_2 培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 5424R 型小型台式高速冷冻离心机 (德国艾本德公司); MoFlo XDP 型流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司); SPARK 10M 型全自动酶标仪 (瑞士 Tecan 公司); Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System 165-8001 型电泳转印仪, ChemiDoc XRS + 型化学发光凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.5 动物 清洁级雄性 SD 大鼠, 体质量 $200 \sim 250 \text{ g}$, 购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 合格证号 SCXK(湘)2011-0003, 本实验经江西中医药大学实验动物伦理委员会审查批准, 饲养于江西中医药大学中医基础理论分化发展研究中心动物实验室。

2 方法

2.1 细胞培养 人结肠癌 HCT116 细胞置于 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ $5\% \text{ CO}_2$ 的培养箱中, 在含 10% 胎牛血清和含 90% RPMI 1640 培养基中培养, 用 0.25% 的胰蛋白酶消化并收集细胞, 取对数生长期细胞进行实验。

2.2 药物血清的制备 SD 大鼠随机分为 2 组, 参苓白术散药物血清组 15 只, 灌服参苓白术散汤剂, 参照 2015 年版《中国药典》^[9], 每天服生药约 77.5 g , 根据大鼠与人剂量的换算系数是 6.17, 按标准剂量的 8 倍煎煮后灌胃; 空白血清组 15 只, 灌服等体积的生理盐水。连续给药 5 d, 末次禁食 12 h 给药, 2 h 内腹主动脉采血, $15\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 分离血清, $56 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min 灭活, 使用 $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌分装, $-40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用^[10-11]。

2.3 给药浓度确定 本课题组前期实验研究发现, ①L-OHP 作用人结肠癌细胞 HCT116 48 h 的半抑制浓度 (IC_{50}) 为 $0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[12], 故将其体外给药的高、中、低质量浓度依次设置为 0.008 , 0.004 , $0.002 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; ②经前期 MTT 比色法, 根据结肠癌 HCT116 细胞对参苓白术散的敏感度制出细胞抑制率曲线, 抑制率数据经统计学软件分析得出参苓白术散含药血清作用于结肠癌 HCT116 细胞 48 h IC_{10} 为 $(4.89 \pm 0.76)\%$, 故以 5% 参苓白术散含药血清作为其联用 L-OHP 用药体积分数。

2.4 分组 实验共分为 8 个组, 分别为空白组 (Blank), 5% 空白血清组 (BK), L-OHP 高剂量 ($0.008 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) + 5% 空白血清组 (KL1), L-OHP 中剂量 ($0.004 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) + 5% 空白血清组 (KL2), L-OHP 低剂量 ($0.002 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) + 5% 空白血清组 (KL3), L-OHP 高剂量 ($0.008 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) + 5% 参苓白术散含药血清组 (SL1), L-OHP 中剂量 ($0.004 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) + 5% 参苓白术散含药血清组 (SL2), L-OHP 低剂量 ($0.002 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) + 5% 参苓白术散含药血清组 (SL3)。

2.5 MTT 比色法检测细胞活性 取对数生长期的 HCT116 细胞, 经胰酶消化制成单细胞悬液, 调整密度至 5×10^4 个/mL, 接种于 96 孔板中, 每孔 $100 \text{ }\mu\text{L}$, 待细胞贴壁后加药, 每孔 $100 \text{ }\mu\text{L}$, 同时设等体积不加细胞的调零组, 处理同实验组, 每种药物浓度均设 5 个复孔, 置 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ $5\% \text{ CO}_2$ 培养 48 h, 加入 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT $10 \text{ }\mu\text{L}$, 继续培养 4 h, 每孔加入 DMSO $150 \text{ }\mu\text{L}$ 溶解蓝色结晶甲瓞, 低速振荡 10 min 后于 490 nm 处的波长测定各孔的吸光度 A , 计算细胞抑制率, 实验至少重复 3 次, 细胞增殖抑制率 = $[1 - (\text{实验孔 } A - \text{调零孔 } A) / (\text{空白孔 } A - \text{调零孔 } A)] \times 100\%$ 。

2.6 流式细胞术检测细胞凋亡及周期分布 取对数生长期的 HCT116 细胞, 经胰酶消化制成单细胞悬液, 调整密度至 5×10^4 个/mL, 细胞接种于 6 孔板

内, 2 mL/孔, 按实验方案分组, 每组均设 3 个复孔, 药物作用 48 h 后消化细胞, 4 ℃, 2 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清, 每管用含 5% FBS 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 500 μL 洗涤。检测细胞周期予每管加细胞固定液 (含 70% 预冷乙醇, 5% FBS, 25% PBS) 200 μL 固定 1 h 后等速离心, 弃上清, 继用 PBS 洗涤 2 次, 弃上清, 避光条件下, 每管加 PI 100 μL, 静置 30 min, 加 PBS 300 μL 混匀, 上流式细胞仪检测。检测细胞凋亡则用 Bidding Buffer 400 μL 悬浮细胞, 在悬液中加入 AnnexinV-FITC 5 μL, 轻轻混匀后于 2~8 ℃ 避光条件下孵育 15 min, 后加入 PI 10 μL 同等条件下孵育 5 min, 1 h 内上流式细胞仪检测。

2.7 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 测定细胞 Bax, Bcl-2 蛋白表达 按照细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒说明书提取胞浆、细胞核蛋白, 检测蛋白浓度, 制备 10% 分离胶, 5% 堆积胶, 蛋白变性, 离心, 上样, 180 V 电压电泳 1.5~2 h, 15 V, 45 min, 半干转膜, 5% 的脱脂奶粉封闭液封闭, 摇床缓慢摇 2 h。封闭过的膜加入 Bax, Bcl-2 及内参蛋白 β-actin 一抗, 抗原抗体结合 (1:1 000, 1:1 000~1:1 万, 1:3 000~1:1 万)。4 ℃ 摇床缓慢摇动过夜, 保存于 4 ℃ 冰箱, 洗膜, 加入 HRP 标记的二抗以结合一抗及 HRP 标记的抗生物素抗体 (1:1 万), 室温摇床缓慢摇动 2 h, 在暗室中显影, 凝胶成像仪拍照, 以目的蛋白的灰度值/相应内参蛋白的灰度值作为蛋白相对定量。

2.8 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件对各组数据进行统计分析, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据均以正态分布检测, 若方差齐, 采用单因素方差分析 LSD-*t* 检验进行两两比较, 若方差不齐, 采用单因素方差分析 Dunnett's *T3* 进行两两比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 参苓白术散协同 L-OHP 对 HCT116 细胞增殖的影响 与同质量浓度 L-OHP 联用 5% 空白血清组比较, 除 0.002, 0.008 g·L⁻¹ L-OHP 联用 5% 参苓白术散组外, 其余组联用后细胞抑制率均明显升高 ($P < 0.05$), 其中以 0.064 g·L⁻¹ 的 L-OHP 联用 5% 参苓白术散对细胞的抑制率最高。与 0.002 g·L⁻¹ L-OHP 联用 5% 空白血清组分别比较, 0.004, 0.016, 0.064, 0.128 g·L⁻¹ 的 L-OHP 联用 5% 空白血清组对细胞的抑制率均明显升高 ($P < 0.05$), 其中以 0.064 g·L⁻¹ 的 L-OHP 联用 5% 空白血清组细胞的抑制率最高。与 0.004 g·L⁻¹ 的 L-OHP 联用 5% 空

白血清组比较, 0.016, 0.064, 0.128 g·L⁻¹ L-OHP 联用 5% 空白血清组细胞抑制率均明显升高 ($P < 0.05$)。与 0.016 g·L⁻¹ L-OHP 联用 5% 空白血清组比较, 0.064, 0.128 g·L⁻¹ 的 L-OHP 联用 5% 空白血清组对细胞的抑制率均明显升高 ($P < 0.05$); 与 0.064 g·L⁻¹ 的 L-OHP 联用 5% 空白血清组比较, 0.128 g·L⁻¹ 的 L-OHP 联用 5% 空白血清组对细胞的抑制率明显升高 ($P < 0.05$)。不同浓度 L-OHP 联用 5% 参苓白术散后 HCT116 细胞的 IC₅₀ 由 0.01 g·L⁻¹ 降为 0.008 g·L⁻¹, 说明参苓白术散能增强 L-OHP 作用于 HCT116 细胞的敏感性。从而抑制其增殖, 且以联用 L-OHP 后效果更佳, 见表 1。

表 1 L-OHP 联用参苓白术散对 HCT116 细胞抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1 Effect of 48 h L-OHP combined with SBS on proliferation of HCT116 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	L-OHP 质量浓度/g·L ⁻¹	细胞抑制率/%
L-OHP + 5% 空白血清	0.002	14.68 ± 0.83
	0.004	21.67 ± 1.61 ¹⁾
	0.008	29.55 ± 4.65
	0.016	38.55 ± 3.14 ^{1,2)}
	0.032	72.41 ± 0.47
	0.064	93.85 ± 0.58 ^{1,2,3)}
L-OHP + 5% 参苓白术散 含药血清	0.002	28.23 ± 1.25
	0.004	35.19 ± 0.21 ²⁾
	0.008	43.08 ± 0.92
	0.016	55.40 ± 0.10 ³⁾
	0.032	83.94 ± 0.7 ⁴⁾
	0.064	94.95 ± 0.90 ⁴⁾
	0.128	81.95 ± 1.63 ⁵⁾

注: 与 0.002 g·L⁻¹ L-OHP + 5% 空白血清组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与 0.004 g·L⁻¹ L-OHP + 5% 空白血清组比较²⁾ $P < 0.05$; 与 0.016 g·L⁻¹ L-OHP + 5% 空白血清组比较³⁾ $P < 0.05$; 与 0.064 g·L⁻¹ L-OHP + 5% 空白血清组比较⁴⁾ $P < 0.05$; 与 0.128 g·L⁻¹ L-OHP + 5% 空白血清组比较⁵⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 参苓白术散协同 L-OHP 对 HCT116 细胞周期的影响 BK 组和 Blank 组细胞主要阻滞在 G₀/G₁ 期, KL1, KL2, KL3 组细胞分别阻滞在 G₂/M, S 和 G₀/G₁ 期, SL1, SL2, SL3 组细胞均阻滞在 G₂/M 期, 以 SL1 组最为明显 ($P < 0.05$)。与 Blank 组比较, SL1 组 S 期细胞明显增多 ($P < 0.05$); 与 KL1 组比较, SL1 组 S 期细胞则明显减少 ($P < 0.05$)。

与 Blank, KL1 组比较, SL1 组 G₂/M 期细胞明显增加 ($P < 0.05$)。与 Blank, BK 组比较, KL2, SL2 组 G₀/G₁ 期细胞均明显减少 ($P < 0.05$)。与 Blank 组比较, SL2 组 S 期细胞明显增多 ($P < 0.05$)；与 Blank, KL1 组比较, SL2 组 G₂/M 期细胞明显增加

($P < 0.05$)。与 Blank, KL3 组比较, SL3 组 G₀/G₁ 期细胞明显减少 ($P < 0.05$)，G₂/M 期细胞则明显增加 ($P < 0.05$)。综上, 参苓白术散能协同 L-OHP 改变 HCT116 细胞周期分布, 以联用高剂量 L-OHP 效果最佳。见表 2。

表 2 L-OHP 联用参苓白术散对结肠癌细胞 HCT116 周期分布的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度	G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期
Blank	-	86.71 ± 6.18	5.38 ± 7.15	6.56 ± 7.18
BK	5% 空白血清	54.32 ± 4.31	35.18 ± 12.40	10.60 ± 6.64
KL1	5% 空白血清 + 0.008 g·L ⁻¹ L-OHP	28.96 ± 2.02 ¹⁾	45.04 ± 8.82 ¹⁾	26.00 ± 10.19
KL2	5% 空白血清 + 0.004 g·L ⁻¹ L-OHP	29.72 ± 1.53 ^{1,2)}	18.57 ± 4.58 ^{1,2)}	51.70 ± 6.09 ^{1,2)}
KL3	5% 空白血清 + 0.002 g·L ⁻¹ L-OHP	49.70 ± 8.28 ¹⁾	11.32 ± 9.80 ¹⁾	36.98 ± 4.64 ¹⁾
SL1	5% SBS 血清 + 0.008 g·L ⁻¹ L-OHP	27.67 ± 11.11 ^{1,3)}	24.71 ± 2.60 ^{1,3)}	48.46 ± 2.74 ^{1,3)}
SL2	5% SBS 血清 + 0.004 g·L ⁻¹ L-OHP	26.95 ± 6.09 ^{1,2)}	24.59 ± 5.16 ¹⁾	47.61 ± 13.53 ^{1,3)}
SL3	5% SBS 血清 + 0.002 g·L ⁻¹ L-OHP	33.85 ± 7.44 ^{1,4)}	21.38 ± 5.38	44.77 ± 2.29 ^{1,4)}

注: 与 Blank 组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与 BK 组比较²⁾ $P < 0.05$; 与 KL1 组比较³⁾ $P < 0.05$; 与 KL3 组比较⁴⁾ $P < 0.05$ (表 4 同)。

3.3 参苓白术散协同 L-OHP 对 HCT116 细胞凋亡的影响 与 Blank, BK 组比较, 各用药组凋亡率均明显上升 ($P < 0.05$)；与 KL2, KL3 组比较, SL2, SL3 组凋亡率明显升高 ($P < 0.05$)。综上所述, 参苓白术散含药血清联用 L-OHP 前后均能不同程度诱导 HCT116 细胞凋亡, 且以联用高剂量 L-OHP 后效果最佳, 见表 3。

表 3 L-OHP 联用参苓白术散对 HCT116 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

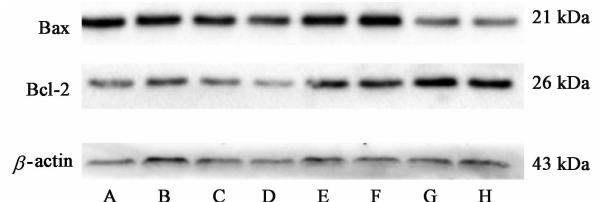
Table 3 Effect of L-OHP combined with SBS on apoptosis of HCT116 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度	凋亡率/%
Blank	-	14.48 ± 0.08
BK	5% 空白血清	15.60 ± 0.11
KL1	5% 空白血清 + 0.008 g·L ⁻¹ L-OHP	21.14 ± 0.46 ¹⁾
KL2	5% 空白血清 + 0.004 g·L ⁻¹ L-OHP	18.36 ± 0.38 ¹⁾
KL3	5% 空白血清 + 0.002 g·L ⁻¹ L-OHP	17.03 ± 0.13 ¹⁾
SL1	5% SBS 血清 + 0.008 g·L ⁻¹ L-OHP	24.97 ± 2.45 ¹⁾
SL2	5% SBS 血清 + 0.004 g·L ⁻¹ L-OHP	20.16 ± 1.54 ^{1,2)}
SL3	5% SBS 血清 + 0.002 g·L ⁻¹ L-OHP	17.65 ± 0.54 ^{1,3)}

注: 与 Blank, BK 组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与 KL2 组比较²⁾ $P < 0.05$; 与 KL3 组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

3.4 参苓白术散协同 L-OHP 对 HCT116 细胞 Bax, Bcl-2 蛋白的影响 与 Blank 组比较, SL1, SL2, SL3 组 Bax 蛋白表达均明显升高 ($P < 0.05$)；SL1 组 Bax 蛋白表达升高最明显。与 BK, Blank 组分别比较, 各用药组 Bcl-2 蛋白表达量均明显降低 ($P < 0.05$)，SL1 组 Bcl-2 蛋白表达降低最明显。参苓白术散能

协同 L-OHP 增强 Bax 蛋白表达, 降低 Bcl-2 蛋白表达, 以联用高剂量 L-OHP 效果最佳。见图 1, 表 4。



A ~ H. 空白组, 5% 空白血清组, L-OHP 高、中、低剂量联合 5% 空白血清组, L-OHP 高、中、低剂量联合 5% 参苓白术散含药血清组

图 1 L-OHP 联用参苓白术散作用于 HCT116 细胞 Bax, Bcl-2 蛋白电泳

Fig. 1 Electrophoresis of L-OHP combined with SBS on protein Bax, Bcl-2 in HCT116 cells

4 讨论

随着人民生活水平的日益改善, 癌症愈发成为国内外发病率和死亡率最高的疾病之一^[13]。结肠癌是癌症中常见的消化系恶性疾病, 给人类生命健康带来了极其恶劣的影响^[14-15]。L-OHP 是继顺铂、卡铂后推出的第三代铂类化合物, 是被临床推荐的 II, III 期结直肠癌的一线化疗药, 然而其在大面积杀死癌细胞的同时, 也会破坏机体正常细胞, 导致机体免疫系统受损, 出现骨髓抑制、恶心呕吐、腹泻等副作用。

中医药治疗肿瘤历史悠久, 其认为癌症患者体质虚弱, 加之化疗为外来之毒侵袭人体, 耗伤正气, 损伤脾胃, 导致脾气不升而腹泻, 胃失和降, 气逆于上, 而恶心呕吐。辨证施治时, 注重以“人”为本,

表 4 L-OHP 联用参苓白术散对 HCT116 细胞 Bax, Bcl-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of L-OHP combined with SBS on expressions of Bax, Bcl-2 in HCT116 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度	Bax/ β -actin	Bcl-2/ β -actin
Blank	-	1	1
BK	5% 空白血清	1.41 \pm 0.35 ¹⁾	0.58 \pm 0.08 ^{1,2)}
KL1	5% 空白血清 + 0.008 g·L ⁻¹ L-OHP	2.56 \pm 0.79 ¹⁾	0.20 \pm 0.02 ^{1,2)}
KL2	5% 空白血清 + 0.004 g·L ⁻¹ L-OHP	3.21 \pm 1.06 ^{1,2)}	0.34 \pm 0.06 ^{1,2)}
KL3	5% 空白血清 + 0.002 g·L ⁻¹ L-OHP	2.55 \pm 0.82 ¹⁾	0.39 \pm 0.05 ^{1,2)}
SL1	5% SBS 血清 + 0.008 g·L ⁻¹ L-OHP	5.52 \pm 1.63 ^{1,2)}	0.14 \pm 0.01 ^{1,2)}
SL2	5% SBS 血清 + 0.004 g·L ⁻¹ L-OHP	3.29 \pm 0.15 ^{1,2)}	0.25 \pm 0.03 ^{1,2)}
SL3	5% SBS 血清 + 0.002 g·L ⁻¹ L-OHP	2.98 \pm 0.33 ^{1,2)}	0.20 \pm 0.02 ^{1,2)}

以扶助人体正气为目标。脾为后天之本, 气血化生之源, 因此治疗多从脾入手, 进而达到扶正祛邪的目的。参苓白术散具有益气健脾, 渗湿止泻之功效, 全方药性平和, 配伍严谨, 温而不燥, 用于治疗脾胃虚弱、饮食不化、胸脘痞闷、肠鸣泄泻、面色萎黄、肢倦乏力、舌质淡、苔白腻等脾虚湿盛证, 一直以来被医家誉为治疗脾虚湿盛证的代表方, 对胃肠运动具有双向调节功能, 其主要药物具有调节机体免疫功能、抗菌消炎、促进胃黏膜水肿吸收及促进组织修复的作用^[16]。目前该方已逐步应用于肿瘤治疗领域, 主要表现在减轻放化疗后的毒副反应如消化道症状, 但目前国内外尚未见该方对人结肠癌细胞凋亡作用机制的研究报道。

本实验结果发现, 参苓白术散能增强人结肠癌 HCT116 细胞对 L-OHP 的敏感性, 从而抑制人结肠癌细胞 HCT116 的增殖、改变细胞周期分布、促进人结肠癌细胞 HCT116 凋亡并调控凋亡蛋白 Bax, Bcl-2 的表达, 且以联用高剂量 L-OHP 效果最佳, 说明细胞凋亡, Bcl-2, Bax 均是参苓白术散防治结肠癌的有效靶点, 其作用机制可能是通过促进 HCT116 细胞增殖、诱导细胞凋亡、改变细胞周期分布、上调 Bax 蛋白表达及下调 Bcl-2 蛋白表达来实现的。参苓白术散协同化疗药 L-OHP 通过抑制结肠癌细胞增殖及凋亡途径达到增效减毒的作用可能是其抗结肠癌的重要机制, 同时亦证明了中西药结合疗效好的临床事实, 但因中医药多靶点、多途径等作用, 其具体分子生物学作用机制有待今后的深入挖掘。

[参考文献]

[1] 潘刚, 殷佩浩, 范跃祖. 靶向治疗大肠癌的纳米药物及其载体进展[J]. 国际外科学杂志, 2016, 43(2): 124-128.
[2] 朱文君, 戴建国. 结肠癌的中医药治疗研究进展[J]. 吉林中医药, 2013, 33(5): 535-537.

[3] 李忠. 小鼠肺癌免疫细胞对参苓白术散敏感效果的研究[J]. 海南医学院学报, 2013, 19(6): 742-745.
[4] 黄争荣, 王泳, 王榕平, 等. 参苓白术散对荷瘤小鼠血清 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 的影响[J]. 光明中医, 2010, 25(9): 1584-1586.
[5] 费国新. 参苓白术散辅助介入化疗治疗中、晚期肺癌的临床观察[J]. 湖北中医杂志, 2010, 32(10): 31-32.
[6] 郭兆平, 陈泽民. 参苓白术散加减治疗胃癌术后消化不良[J]. 肿瘤防治研究, 2005, 32(9): 601.
[7] 张蕾蕾, 金华, 金钊, 等. 参苓白术散在肺结核化疗中的减毒增效作用观察[J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(2): 69-70.
[8] 李惠义. 晚期肝癌案一则[J]. 浙江中医药大学学报, 2012, 36(4): 377, 381.
[9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 1186.
[10] 张军平, 张伯礼, 山本清高. 中药药物血清的制作方法探讨[J]. 天津中医药, 2004, 21(4): 274-276.
[11] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
[12] 余文燕, 孙珏, 许建华, 等. 肠胃清药物血清协同奥沙利铂对人结肠癌耐药细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(10): 182-186.
[13] 区俊文, 桂小诗, 李雪梅, 等. 不可思议的关联: 肠道菌群与结肠癌[J]. 肿瘤代谢与营养电子杂志, 2017, 4(1): 104-108.
[14] 罗燕, 罗吉, 蒋益兰, 等. 健脾消癌方抑制结肠癌增殖的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(6): 151-155.
[15] YE L, JIA Y, JI K E, et al. Traditional Chinese medicine in the prevention and treatment of cancer and cancer metastasis (review) [J]. Oncol Lett, 2015, 10(3): 1240-1250.
[16] 董开忠, 高永盛, 秦宁恩加, 等. 参苓白术散对抗生素引起肠道菌群失调小鼠的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(1): 154-157.

[责任编辑 张丰丰]