

## 通莲汤对荷瘤裸鼠的抑瘤作用及机制研究

贾永森<sup>1</sup>, 王亚<sup>1</sup>, 孙瑞军<sup>2</sup>, 喇孝瑾<sup>1</sup>, 田春雨<sup>1</sup>, 秦丽娟<sup>2</sup>, 李继安<sup>1\*</sup>, 韩炳生<sup>3\*</sup>

(1. 河北联合大学中医学院, 河北 唐山 063000; 2. 河北联合大学基础医学院, 河北 唐山 063000;  
3. 深圳市中医院外科, 广东 深圳 518020)

**[摘要]** 目的: 探讨复方通莲汤对胃癌 MGC803 细胞荷瘤裸鼠的抑瘤作用及对肿瘤组织增殖细胞核抗原(PCNA)表达的影响, 为其临床应用提供实验依据。方法: 胃癌细胞株 MGC803 接种于裸鼠右前肢皮下。模型组 ig 生理盐水溶液 10 mL·kg<sup>-1</sup>, 阳性对照组 ig 消癌平片 1.80 g·kg<sup>-1</sup> 的药液 10 mL·kg<sup>-1</sup>, 复方通莲汤高、中、低剂量组分别 ig 1.50, 0.75, 0.37 g·kg<sup>-1</sup> 的药液 10 mL·kg<sup>-1</sup>, 各组连续给药 3 周, 再连续观察 3 周, 6 周内连续测定裸鼠瘤体体积, 最后脱臼处死全部裸鼠, 分离瘤组织, 计算抑瘤率, 免疫组织化学法检测肿瘤组织 PCNA 表达。结果: 通莲汤抑制瘤体生长与时间呈正相关, 开始给药后第 4 周达抑瘤峰值; 通莲汤高剂量组瘤重(1.55 ± 0.68) g, 抑瘤率为(58.40 ± 1.56)%, 与模型组比较有显著性差异(P < 0.05); 通莲汤可显著抑制 PCNA 表达(P < 0.05)。结论: 通莲汤可抑制裸鼠人胃癌 MGC803 细胞移植瘤生长, 其抑瘤机制与下调肿瘤细胞 PCNA 蛋白表达有关。

**[关键词]** 通莲汤; 胃癌; MGC803 细胞; 荷瘤裸鼠; 增殖细胞核抗原

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)18-0133-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014180133

## Mechanism of Inhibiting Tumor Growth on Nude Mice Modeled with Gastric Cancer MGC803 Cells by Tonglian Decoction

JIA Yong-sen<sup>1</sup>, WANG Ya<sup>1</sup>, SUN Rui-jun<sup>2</sup>, LA Xiao-jin<sup>1</sup>, TIAN Chun-yu<sup>1</sup>,  
QIN Li-juan<sup>2</sup>, LI Ji-an<sup>1\*</sup>, HAN Bing-sheng<sup>3\*</sup>

(1. Traditional Chinese Medicine (TCM) College, Hebei United University, Tangshan 063000, China;  
2. School of Basic Medicine, Hebei United University, Tangshan 063000, China;  
3. Surgery Department, Shenzhen TCM Hospital, Shenzhen 518020, China)

**[Abstract]** **Objective:** The purpose of the research is to observe inhibition of Tonglian decoction (TD) on nude mice modeled with gastric cancer cells MGC803 and on proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in tumor tissue, to provide experimental basis for clinical application of TD. **Method:** MGC803 cells were inoculated subcutaneously in right forelimbs of all mice. Mice in model group were treated with saline solution 10 mL·kg<sup>-1</sup> orally. Mice in positive control group were treated with xiaoaping tablet at dosage of 10 mL·kg<sup>-1</sup>, 1.80 g·kg<sup>-1</sup> (crude drug) of liquid. Mice in TD groups were subdivided as high (1.50 mg·kg<sup>-1</sup>), medium (0.75 g·kg<sup>-1</sup>) and low (0.37 g·kg<sup>-1</sup>) dose group of drug liquid, with dosage of 10 mL·kg<sup>-1</sup>. All mice were administrated for 3 weeks and were observed for another 3 weeks continuously. Tumor volumes were measured for 6 weeks every day from the beginning of MGC803 cells transplanted. All mice were killed for isolation of tumor tissue, inhibition ratio of tumor-weight measured. Finally, PCNA expression was examined with immunohistochemistry. **Result:** TD inhibits tumor growth with positive correlation with time, the inhibitory peak

**[收稿日期]** 20140415(007)

**[基金项目]** 广东省深圳市科技研发资金计划(ZYA201007060089A)

**[第一作者]** 贾永森, 医学博士, 副教授, 从事肿瘤疾病中医方证基础研究, Tel: 0315-3725103, E-mail: jysen@163.com

**[通讯作者]** \* 李继安, 医学博士, 教授, 从事内科疾病中西医结合临床研究, Tel: 0315-3726292, E-mail: lnyy@vip.sina.com;

\* 韩炳生, 主任医师, 从事肿瘤疾病外科临床研究, Tel: 0755-88359666, E-mail: hbsaa@sina.com

appeared at 4 weeks after medication; tumor weight in TD high-dose group was  $(1.55 \pm 0.68)$  g, and the inhibition ratio was  $(58.40 \pm 1.56)\%$ , which was significantly different from that in the model group ( $P < 0.05$ ). Positive rate of PCNA expression also decreased significantly, showing statistical difference from the model group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** TD inhibits tumor growth on nude mice modeled with MGC803, through down regulation of PCNA protein expression.

[**Key words**] Tonglian decoction; gastric cancer; MGC803; nude mice transplanted with tumor; proliferating cell nuclear antigen

胃癌是指发生于胃上皮组织的恶性肿瘤,发展中国属于高发地区,中国占到 42%。在我国的所有肿瘤疾病中,胃癌发病率、致死率均居第 2 位<sup>[1]</sup>。中医药治疗胃癌具有优势,表现在个体化、多靶点控制肿瘤生长和减少复发转移等方面;临床上与放化疗结合,可增效减毒,提高生存质量,并延长生存期。

胃癌属中医“胃脘痛”、“反胃”、“积聚”等范畴,多由长期饮食不节、情志抑郁等,导致脾胃失调、肝胃不和,进而久病入络、瘀血热毒内结,最终发为本病<sup>[2]</sup>。根据该病基本病机,在“通幽汤”(《脾胃论》)基础上,结合现代中药药理研究成果,自拟“通莲汤”以化瘀理气、解毒散结、养血润燥。已有研究表明,该方通过抑制细胞进入 M 分裂期从而干预胃癌 MGC803 细胞增殖,其抑癌机制与下调核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 信号通路  $\kappa$ B 抑制蛋白激酶 (IK- $\kappa$ B) 和 NF- $\kappa$ B 蛋白有关<sup>[3]</sup>。本研究通过荷瘤裸鼠实验,观察通莲汤对胃癌瘤体的抑制作用以及对细胞增殖核抗原 (PCNA) 的影响,丰富该方防治胃癌的分子机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 4~5 周龄裸鼠 (BALB/c),雌、雄各半,体质量 18~22 g,购于中国食品药品检定研究院,合格证号 SCXK(京)2009-0017;裸鼠在层流架内饲养,恒温 22~25 °C、恒湿  $(55 \pm 5)\%$ ,所有食物和水均灭菌后使用。

**1.2 细胞株** MGC803 胃癌细胞株,由中国医学科学院基础医学研究所细胞中心提供。

**1.3 药物** 通莲汤(地黄,当归,升麻,槟榔,通关藤,半枝莲,白花蛇舌草等),各单味药物均购于北京同仁堂唐山连锁药店有限公司,提取液含生药材  $1\ 500\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。消癌平片(批号 110706,南京圣和制药有限公司)。

**1.4 试剂** 增殖细胞核抗原(PCNA)鼠抗人单克隆抗体(即用型,CST 公司),新生小牛血清(GIBCO 公司),DMEM 培养基(GIBCO 公司),胰蛋白酶(GIBCO 公司);MTT(Amresco 公司),DMSO(Amresco 公司)。

**1.5 仪器** 1100 型无菌超净台 (FORMA 公司),

NOVAPATH 450 型酶标光度计 (Bio-Tek 公司), 3336 型 CO<sub>2</sub> 培养箱 (FORMA 公司),TMD-2 倒置式显微镜 (Nikon 公司), 3MK 型低温高速离心机 (Sigma 公司),JJ-2 型组织匀浆机 (Waring 公司)。

## 2 方法

**2.1 方药配制** 各味中药以纱布过滤掉药物杂质,并加入 30 倍体积超纯水,浸泡 30 min,100 °C 温浸 6 h,4 层医用纱布过滤,收集药液,浓缩至 200 mL,冷却至室温,4 °C  $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1} \times 15\ \text{min}$ ,离心 2 次,吸取药液上清,0.22  $\mu\text{m}$  滤器滤过后,加热浓缩收膏,以生理盐水(NS)配至  $10\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,1.5 mL 离心管分装,-20 °C 保存备用。

**2.2 细胞培养** 以 10% 小牛血清 DMEM 培养液 8 mL,接种 MGC803 细胞于  $\Phi 100\ \text{mm}$  培养皿中,置于 37 °C,5% 饱和湿度的 CO<sub>2</sub> 培养箱孵育。

**2.3 分组及给药** 裸鼠 50 只,随机分为 5 组,每组 10 只,分别为模型对照组,阳性对照药(消癌平)组,通莲汤高、中、低剂量组。将 MGC803 细胞传代至对数生长期,常规消化离心,计数,以  $1 \times 10^7/\text{mL}$  密度接种于裸鼠右前肢皮下。模型对照组 ig NS  $10\ \text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ;阳性药组 ig 消癌平片水溶液(生药量)  $1.8\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,通莲汤高、中、低剂量组(生药量,下同)分别灌胃  $1.50, 0.75, 0.37\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  的药液(以 NS 配成),消癌平、通莲汤给药量均为  $10\ \text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。各组均连续 ig 给药 3 周,后续观察 3 周。6 周后,裸鼠脱臼处死,取肿瘤组织,剔除脂肪组织,称取湿质量,计算瘤质量系数,经 4% 中性甲醛固定,用于免疫组织化学观察。

**2.4 活体瘤体体积测定** 每次给药时同步测量肿瘤体积,测量肿瘤长、短径,计算肿瘤体积  $V = ab^2/2$  (a 为长径,b 为短径)。

**2.5 计算抑瘤率** 6 周后麻醉处死荷瘤鼠,从皮下完整剥取肿瘤组织,剔除纤维包膜,于电子天平上称取瘤重,计算抑瘤率。

抑瘤率 = (模型组平均瘤重 - 处理组平均瘤重) / 模型组平均瘤重  $\times 100\%$

**2.6 免疫组化法测定 PCNA** 用  $40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  甲醛固定瘤块,石蜡包埋、切片行 HE 染色. 免疫组织化学法步骤按说明书进行,所有切片均在同一光强度,同一放大倍数下进行图像分析,染色阳性物质呈棕黄色颗粒状,位于细胞核内. 虽然阳性染色分布不均匀,强度有差别,但只要明确阳性产物即作为阳性细胞. 表达率测定:每例标本在 400 倍光镜下,随机计数 10 个视野,记录每个视野的阳性表达率(阳性细胞数/全视野细胞数),取其均数作为每例样本阳性表达率的评定依据. 所占比率为 0~5% 为阴性(-),5%~25% 为弱阳性(+),25%~50% 为中度阳性(++) ,50% 以上为强阳性(+++).

**2.7 统计学方法** 采用 SPSS 18.0 统计软件统计分

析. 两组间差别显著性检验进行方差分析,各药抑瘤率、抑瘤时效关系采用  $t$  检验分析;PCNA 阳性细胞率采用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义.

**3 结果**

**3.1 各药影响瘤体体积的时效关系** 灌胃荷瘤裸鼠后,各药物组瘤体体积均得到不同程度的抑制. 通莲汤高剂量组、消癌平组瘤体体积在第 4 周达到峰值;通莲汤中、低剂量组瘤体体积较之模型组虽然增长缓慢,但与时间呈正相关,与模型组相比无显著性差异. 第 5~6 周,通莲汤高剂量组、消癌平组瘤体体积显著缩小,与模型组比较有显著性差异( $P < 0.05$ ),高剂量通莲汤与消癌平作用相当. 如表 1.

表 1 通莲汤对 MGC803 细胞荷瘤裸鼠瘤体体积影响的时效关系( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 $/\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	瘤体体积/ $\text{mm}^3$					
		第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 5 周	第 6 周
模型	-	381.43 ± 40.74	696.89 ± 39.67	803.44 ± 36.48	856.80 ± 42.53	951.33 ± 47.10	983.39 ± 51.75
消癌平	1.80	321.29 ± 41.57	493.60 ± 35.74	489.61 ± 39.12	511.86 ± 54.79	478.96 ± 41.71 <sup>1)</sup>	418.32 ± 54.31 <sup>1)</sup>
通莲汤	1.50	353.86 ± 29.88	412.67 ± 36.55	444.82 ± 32.15	503.03 ± 36.99	476.08 ± 35.49 <sup>1)</sup>	416.50 ± 41.74 <sup>1)</sup>
	0.75	363.47 ± 47.12	507.58 ± 49.79	555.27 ± 39.56	585.59 ± 41.22	610.12 ± 45.70	650.98 ± 43.21
	0.37	365.16 ± 36.75	629.63 ± 32.14	599.69 ± 41.57	639.37 ± 42.57	686.34 ± 43.68	720.34 ± 40.88

注:与模型组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ (表 2~3 同)。

**3.2 各药抑瘤率** 模型组和通莲汤中、低剂量组裸鼠瘤体质量较大;消癌平组,通莲汤高剂量组瘤重较小. 通莲汤高剂量组、消癌平组与模型组相比,有显著性差异( $P < 0.01$ );通莲汤高剂量组与消癌平组作用相当. 如表 2。

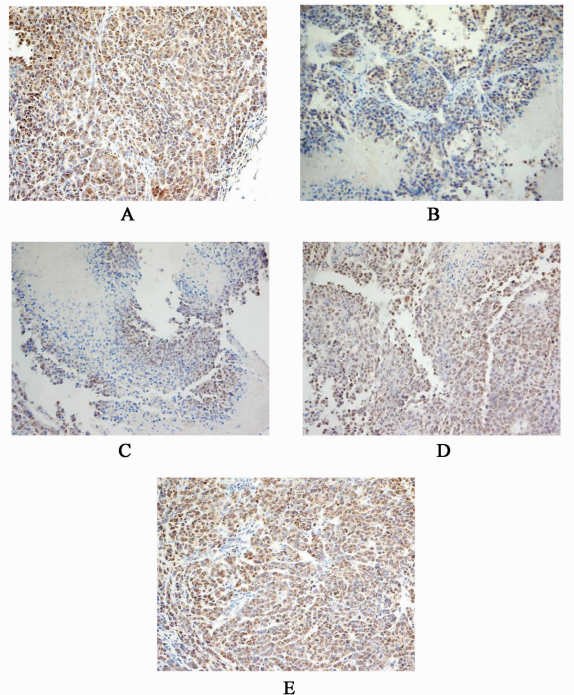
表 2 通莲汤对荷瘤裸鼠瘤体平均瘤重及抑瘤率的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 $/\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	瘤重 $/\text{g}$	抑瘤率 $/\%$
模型	-	3.47 ± 0.85	
消癌平	1.80	1.51 ± 0.70 <sup>1)</sup>	57.97 ± 1.74
通莲汤	1.50	1.55 ± 0.68 <sup>1)</sup>	58.40 ± 1.56
	0.75	2.08 ± 0.57	39.19 ± 2.24
	0.37	2.97 ± 1.01	28.36 ± 3.98

**3.3 皮下移植瘤组织中 PCNA 蛋白的表达** 模型组、通莲汤中、低剂量组瘤体 PCNA 阳性表达率无显著性差异;通莲汤高剂量组、消癌平组 PCNA 阳性表达率与模型组相比有显著性差异( $P < 0.05$ ),说明通莲汤高剂量组均有较好稳定下调 PCNA 表达的作用. 如图 1,表 3。

**4 讨论**

通幽汤乃滋阴润燥、破血行瘀之名方<sup>[4]</sup>,由金



A. 模型组;B. 消癌平  $1.80\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ;C. 通莲汤  $1.50\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ;  
D. 通莲汤  $0.75\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ;E. 通莲汤  $0.37\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$

图 1 各组瘤组织 PCNA 表达( $\times 100$ )

元四大家之一李东垣在《脾胃论》中首创,本研究所拟通莲汤由通幽汤加味化裁而来,专为胃癌阴虚血

表 3 通莲汤对荷瘤裸鼠瘤体组织 PCNA 阳性表达的影响 (n = 10)

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	PCNA 阳性表达 动物数/只			
		-	+	++	+++
模型	-	0	1	5	4
消癌平	1.80	4 <sup>1)</sup>	3	3	0
通莲汤	1.50	4 <sup>1)</sup>	4	1	1
	0.75	2	1	5	2
	0.37	2	2	3	3

亏、热毒内结而设。方中地黄、当归养血润燥，半支莲、白花蛇舌草、通关藤清热解毒，槟榔破滞降浊，升麻和胃升清，一升一降，胃气乃通。综观全方，祛邪扶正，攻守兼备，既重活血行气解毒，又不忘滋阴养血润燥。此外，现代药理表明半支莲、白花蛇舌草、通关藤等具有显著地抗癌作用<sup>[5-6]</sup>。为了探讨该方防治胃癌的机制，笔者观察了其对 MGC803 细胞荷瘤裸鼠的抑制作用及对 PCNA 蛋白表达的影响。鉴于该复方组成药物均为天然中药材，实验中选择同为中药属性的乌骨藤有效提取物-消癌平作为阳性对照药，该药可抑制癌细胞生长诱导肿瘤细胞凋亡、提高机体免疫力防止肿瘤转移、复发，不损伤正常细胞，平衡脏腑各器官，研究表明其对胃癌具有确切疗效<sup>[7]</sup>。

方药抑瘤体积的时效关系动态观察显示，通莲汤高剂量组最佳抑瘤效果出现在用药第 4 周，这与消癌平的抑瘤趋势一致；通莲汤中、低剂量组瘤体体积抑制作用与用药时间成正比，随着灌胃时间延长，抑瘤率增高；但抑瘤效果不明显，与模型对照组相比，无统计学差异。可见通莲汤抑制胃癌荷瘤裸鼠瘤体体积与所用剂量密切相关。实验表明，高剂量通莲汤具有较理想的抑瘤效果，与临床常用抗癌中药消癌平效果相当。

给药后 6 周处死裸鼠，分离瘤体组织，称重。通莲汤高剂量组、消癌平组瘤重减轻程度明显，与模型组比较，抑瘤率达到 57% ~ 59%，分别与模型组比较有显著性差异 (P < 0.05)，通莲汤中、低剂量组抑瘤率维持在 25% ~ 40%，与模型组比较无统计学差异。与同类研究相比，通莲汤对活体瘤组织的抑瘤率不高，推测这与组方中当归、生地黄等养血润燥类中药有关。对于皮下荷瘤的裸鼠模型，养血类中药反有助于瘤组织的血液供应。但这并不影响该组方的设计构思，因为相对于胃部原位环境的阴亏、燥结等病机而言，使用该类中药具有针对性。

无限制性恶性增殖是细胞癌变的重要生物学特性，胃癌多发生于增殖活跃的细胞。细胞动力学认为，肿瘤细胞的增殖活性是反映肿瘤的增殖潜能的

客观指标。PCNA 作为肿瘤标志物，是一种细胞增殖周期蛋白，存在于细胞核内，它是 DNA 合成酶 δ 的辅助蛋白，在 DNA 合成中起重要作用。PCNA 在 G<sub>0</sub> 期的极早期不表达，在 G<sub>1</sub> 期表达开始增加，S 期达到高峰，到 G<sub>2</sub> 和 M 期表达明显下降。肿瘤细胞增生活跃，处于增殖状态，特别是 S 期即 DNA 合成期的细胞，其 PCNA 表达明显增强，可作为一项评估细胞增殖状态的指标，用于判断肿瘤恶性程度及预后<sup>[8]</sup>。PCNA 高表达者说明细胞处于增殖旺盛状态，肿瘤浸润、转移机会大，预后差，故本研究选用 PCNA 作为评价增殖的指标。结果显示，模型组的增殖细胞核抗原的阳性表达率为 100%，证实肿瘤细胞增生活跃。通莲汤高剂量组，消癌平组的 PCNA 阳性表达率相当，与模型对照组相比较有显著性差异 (P < 0.05)。说明通莲汤高剂量组有较好稳定下调胃癌细胞 PCNA 表达的作用，使细胞增殖受到抑制。

综上，通莲汤有较好的抑制肿瘤生长作用，本研究揭示其抑瘤作用机制可能与下调肿瘤细胞 PCNA 的表达，抑制细胞增殖、分裂，从而干扰 DNA 复制过程而实现抗肿瘤细胞增殖活性。

[参考文献]

[1] 李响, 杨亚平. 关于胃癌辨证与证型的研究综述[J]. 光明中医, 2013, 28(1): 212.

[2] 刘亚娟. 中西医结合肿瘤病学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2005: 286.

[3] 王亚, 贾永森, 喇孝瑾, 等. 通莲汤对胃癌 MGC803 细胞周期及 NF-κBs 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(22): 213.

[4] 李东垣(金). 脾胃论[M]. 靳国印(校注). 北京: 中国医药科技出版社, 2011: 89.

[5] 胡玲, 罗晓韵, 唐纯志, 等. 白花蛇舌草对 H22 肝癌细胞荷瘤组织 bcl-2 和 bax 蛋白表达的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2011, 19(6): 378.

[6] 王中奇, 王妙新. 消癌平注射液治疗中晚期肿瘤临床研究 meta 分析[J]. 药学与临床研究, 2012, 20(6): 531.

[7] 刘帆, 胡婉素, 叶循雯. 消癌平针灌肠疗法联合化疗治疗晚期胃癌疗效观察[J]. 现代医学研究, 2014, 26(1): 28.

[8] Liao X H, Lu D L, Wang N, et al. Estrogen receptor α mediates proliferation of breast cancer MCF-7 cells via a p21/PCNA/E2F1-dependent pathway [J]. FEBS J, 2014, 281(3): 927.

[责任编辑 聂淑琴]