

六君子汤提取物对食管癌 Eca109 细胞的增殖抑制作用

尹素改, 王慧慧, 吴耀松, 陈玉龙*

(河南中医学院 分子生物实验中心, 郑州 450046)

[摘要] **目的:**研究六君子汤乙酸乙酯提取物对食管癌 Eca109 细胞增殖的影响。**方法:**以 10^4 个/孔的细胞密度接种 96 孔板中,培养 24 h 后,各组分别加入不同浓度六君子汤提取物的培养液 $100 \mu\text{L}$,质量浓度为 10, 20, 40, 60, 80, 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,另设空白孔,每组设 8 个复孔,采用 MTT 比色法检测六君子汤提取物对食管癌 Eca109 细胞株生长抑制作用,采用流式细胞仪检测药物作用后细胞凋亡情况,激光共聚焦显微镜观察药物作用后细胞形态变化。**结果:**在 10 ~ 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 内,不同浓度六君子汤提取物能有效抑制 Eca109 细胞增殖 ($P < 0.05$)。21.06, 49.65, 67.47 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的六君子汤提取物作用 Eca109 细胞 48 h, 细胞凋亡率明显增加,与空白组相比,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);并且在激光共聚焦显微镜下观察到凋亡小体,与空白组相比,早期凋亡和晚期凋亡的细胞数量明显增多。**结论:**六君子汤提取物能显著抑制食管癌 Eca109 细胞增殖,诱导细胞凋亡,其作用机制有待进一步研究。

[关键词] 六君子汤提取物; 食管癌; Eca109 细胞; 凋亡; 激光共聚焦显微镜; 流式细胞仪

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)01-0163-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015010163

Study of Liujunzi Tang Extract on Inhibiting Human Esophageal Carcinom Eca109 Cells Growth

YIN Su-gai, WANG Hui-hui, WU Yao-song, CHEN Yu-long* (*Molecular Biological Experiment Center of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China*)

[Abstract] **Objective:** To study the effect and mechanism of Liujunzi Tang extract on the proliferation of human esophageal carcinoma cell. **Method:** Esophageal carcinom Eca109 cells were grown in 96-well plates and treated with different concentrations of Liujunzi Tang extract (10, 20, 40, 60, 80, 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). There were 8 wells for each concentrations of Liujunzi Tang extract groups and for the normal group. Inhibitive effect of Liujunzi Tang extract on proliferation was detected by MTT assay, cell apoptosis was detected by flow cytometer and cellular morphology was observed by laser scanning confocal microscopy. **Result:** Liujunzi Tang extract produced a dose-dependent inhibition on the proliferation of Eca109 cells within the concentration of 10-100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($P < 0.05$). Compared to the normal group, Liujunzi Tang extract could significantly increase the apoptosis rate of Eca109 cells after being cultered for 48 h at the concentration of 21.06, 49.65, 67.47 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($P < 0.05$), and the numbers of the apoptotic cells in the early or late stages were increased obviously. **Conclusion:** Liujunzi Tang extract could significantly inhibit the proliferation of Eca109 cells by inducing cell apoptosis. Its exact mechanism will be further investigated.

[Key words] Liujunzi Tang extract; esophageal carcinom; Eca109 cell; apoptosis; laser scanning confocal microscopy; flow cytometer

六君子汤是治疗或辅助治疗肿瘤的有效方剂,临床观察表明,它可以减轻放化疗引起的恶心、呕吐、食欲减退、白细胞减少等毒性作用,提高外周血淋巴细胞转化率、NK 细胞活性、辅助 T 细胞与抑制

T 细胞比率等免疫指标。应用该方治疗进展期胃癌,能改善生活质量,稳定肿瘤病灶,延长生存期^[1-2]。研究表明,该方对人食管癌细胞株 Eca109 和人肝癌细胞株 HepG2 的生长有不同程度抑制作

[收稿日期] 20140617(021)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173177);河南中医学院苗圃工程项目(MP2012-02)

[第一作者] 尹素改,硕士,讲师,从事肿瘤病机与防治研究, Tel:0371-65680206, E-mail:yinsugai@163.com

[通讯作者] * 陈玉龙,博士,教授,从事肿瘤病机与防治研究, Tel:0371-65680206, E-mail:cyl72621@163.com

用,具有明显剂量依赖性^[3],能够抑制 H22 小鼠肝癌移植瘤生长,增加体重、延长存活时间,诱导肺癌细胞 SPA-A1 和胃癌细胞 BGC2823 凋亡^[4-5]。前期研究发现,本方水煎剂对食管癌细胞有一定抑制作用,但用量较大^[3]。为了提高该方抑制肿瘤效果,对它进行了分部位提取,本文观察了该方乙酸乙酯提取物对食管癌细胞增殖、细胞凋亡的影响。

1 材料

1.1 细胞 人食管癌细胞株 Eca109 为河南中医药大学分子生物试验中心保存。

1.2 药物及试剂 六君子汤参照《医学正传》组方,药物组成与比例为人参-白术-茯苓-甘草-陈皮-制半夏 2:3:2:2:2:3,药材均购自北京同仁堂药店。MTT 和胰酶(北京索来宝科技有限公司,批号 20131113),RPMI 1640 培养基(北京索来宝科技有限公司,批号 20131012),胎牛血清(杭州四季青公司,批号 121005),Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒(凯基生物公司,批号 20131226)。

1.3 仪器 Heraeus 细胞培养箱(德国 Kendro 公司),倒置显微镜(德国 ZESS 公司),BioMate 型紫外分光光度计(美国赛默飞公司),SG-603 生物安全柜(美国 Baker 公司),ELx800 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司),FV1000S-LX81 激光共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司),FACS Calibur Flow Cytometre 型流式细胞仪(美国 BD 公司)。

2 方法

2.1 药物提取 药量按照上述比例称取每味药物对等克数,质量:体积 1:10 加入 95% 乙醇浸泡 7 d,每日震荡两次,混匀。用旋转蒸发仪浓缩药液,上述浓缩液与乙酸乙酯体积比为 2:1 进行萃取,浓缩、低温真空干燥、刮药、称重,出膏率为 0.84% (最终提取出的膏状药物质量/最初买的药物质量)。DMSO 充分溶解配置 100 g·L⁻¹ 的母液,0.22 μm 过滤除菌,-20℃ 冰箱保存,备用。

2.2 细胞培养 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,于 37℃,5% CO₂ 的孵箱中培养细胞,每 2~3 d 传代 1 次,取对数生长期的细胞进行实验。

2.3 MTT 法检测六君子汤提取物对 Eca109 细胞的抑制率 按 10⁴ 个/孔的细胞密度接种 96 孔板中(96 孔板周边孔弃去不用,加无菌 PBS 填充),每孔加 200 μL 细胞悬液(含 10% 胎牛血清),将 96 孔板置于 CO₂ 培养箱中孵育 24 h。弃去培养液,分别加入含不同浓度六君子汤提取物的培养液 100 μL 质量浓度为 10,20,40,60,80,100 mg·L⁻¹,另设空白孔(加培

养液 100 μL 和与溶解药物等量的 DMSO),每组设 8 个复孔。细胞培养 48 h 后,每孔加入 5 g·L⁻¹ 的 MTT 液 15 μL,继续培养 4 h,吸去上液,每孔加入 DMSO 150 μL,轻轻振荡后用酶标仪检测,570,630 nm 处测各孔吸光度 A,计算抑制率,重复 4 次。

$$\text{细胞抑制率} = (1 - \text{实验组 } A / \text{对照组 } A) \times 100\%$$

2.4 流式细胞仪检测 观察含不同浓度六君子汤提取物对 Eca109 细胞凋亡的影响。Eca109 细胞按每孔 10⁵/mL 的密度接种于培养皿中,培养 24 h 后,加入含不同浓度六君子提取物的 RPMI 1640 培养液,空白组加培养液与溶解药物等量的 DMSO,细胞培养 48 h 后,用不含 EDTA 的胰酶消化,收集细胞,4℃ PBS 洗,离心收集,计数 10⁵ 个细胞于流式管中,加结合液 Buffer 重悬细胞,然后加 Annexin V-FITC,避光 10 min,后加 PI 避光 5 min,1 h 内上机检测。用流式细胞仪进行检测,采用 Cellquest 软件获取数据,Modfit LM 软件分析数据。重复 4 次试验。

2.5 激光共聚焦检测凋亡小体 观察不同浓度六君子汤提取物诱导 Eca109 细胞凋亡的影响。Eca109 细胞按每孔 10⁵/mL 的密度接种于激光共聚焦专用的小培养皿中,培养 24 h 后,加入含 IC₅₀ (49.653 mg·L⁻¹) 六君子提取物的 RPMI 1640 培养液,空白组加培养液与溶解药物等量的 DMSO,细胞培养 48 h 后,吸去培养液,用 PBS 洗两遍,然后加 500 μL 的 Buffer,然后 5 μL 的 Annexin V-FITC,避光 10 min,后加 PI 避光 5 min,激光共聚焦进行检测。Viewer 软件分析图片。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 17.0 数据统计软件进行方差分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行 LSD-t 检验,P < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对 Eca109 细胞抑制率的影响 六君子汤提取物各浓度组作用 Eca-109 细胞 48 h 后,抑制率随浓度的增加而增加,呈现一定的量效关系,回归分析法得 R² = 0.927, F = 50.499, Y = 0.01X + 0.017,根据概率法得 IC₅₀ 49.653 mg·L⁻¹。IC₂₀ 21.064 mg·L⁻¹, IC₇₀ 67.466 mg·L⁻¹。见表 1。

3.2 细胞形态学的改变 显微镜下观察,随着加药物浓度的增加,与空白组相比,细胞变圆,贴壁细胞数目逐渐减少,见图 1。

3.3 六君子汤提取物对 Eca109 细胞凋亡的影响 取六君子汤终质量浓度为 21.06,49.65,67.47 mg·L⁻¹,抑制率分别为 20%,50%,70%,作用于 Eca109

表 1 六君子汤提取物对 Eca109 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 1 Effects of different concentrations of Liujunzi Tang extract on proliferation of Eca109 cells ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	A	抑制率/%
空白	-	1.21 ± 0.12	-
六君子汤	100	0.11 ± 0.02	90.56
	80	0.08 ± 0.02	93.31
	60	0.55 ± 0.22	54.98
	40	0.86 ± 0.05	28.81
	20	0.95 ± 0.03	21.71
	10	1.02 ± 0.05	15.90

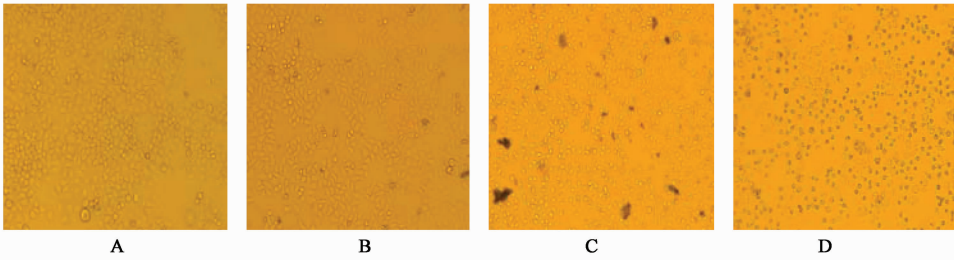
细胞 48 h 后,六君子汤处理组与空白组比较,凋亡明显增加 ($P < 0.01$)。见表 2,图 2。

表 2 六君子汤提取物作用后细胞的凋亡情况 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 2 Effects of different concentrations of Liujunzi Tang extract on apoptosis of Eca109 cells ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	凋亡率/%
空白	-	1.52 ± 1.12
六君子汤	67.47	19.95 ± 1.28 ¹⁾
	49.65	11.99 ± 1.13 ¹⁾
	21.06	6.58 ± 1.24 ¹⁾

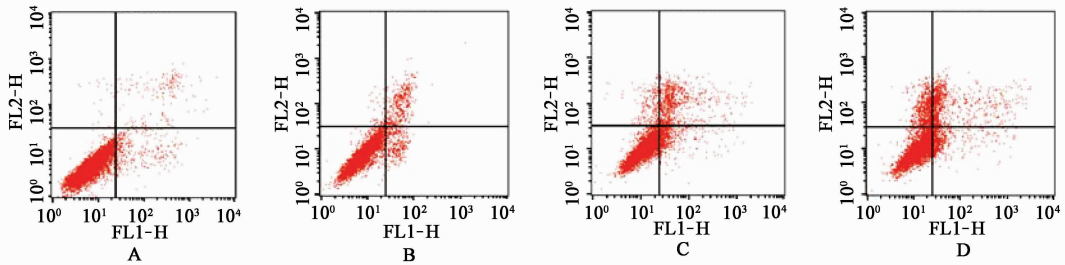
注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。



A. 空白组; B. 六君子汤 21.06 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; C. 六君子汤 49.65 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; D. 六君子汤 67.47 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组

图 1 六君子汤提取物对 Eca109 细胞形态的影响 ($\times 100$)

Fig. 1 Effect of Liujunzi Tang extract on the morphology of Eca109 cells ($\times 100$)



A. 空白对照组; B. 六君子汤 21.06 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; C. 六君子汤 49.65 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; D. 六君子汤 67.47 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组

图 2 六君子汤提取物对食管癌 Eca109 细胞的影响

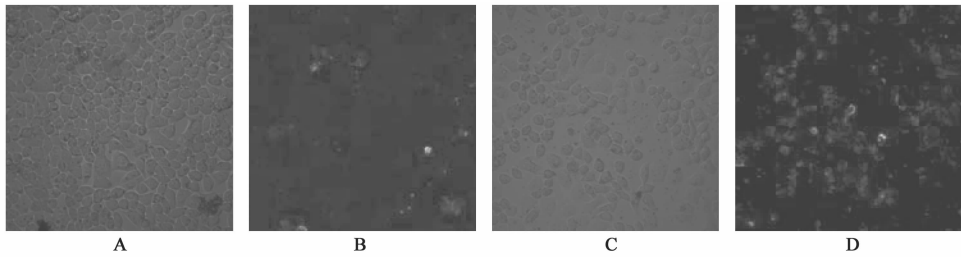
Fig. 2 Effect of Liujunzi Tang extract on the apoptosis of Eca109 cells

3.4 激光共聚焦显微镜观察凋亡小体 用不同浓度的六君子提取物作用 Eca109 细胞 48 h 后,经 PI 和 Annexin V-红色, FITC 染色,在激光共聚焦显微镜下显示,有些细胞膜呈现绿色,说明为早期凋亡,一些膜为绿色,且核呈红色为晚期凋亡细胞,且体积变小,变圆,形成凋亡小体,与对照组相比,早期凋亡和晚期凋亡的细胞数量明显增多。见图 3。

4 讨论

六君子汤是健脾和胃的经典方剂。研究发现,古代治疗噎膈,现代用来治疗食管癌的方药。六君子汤组药:人参、白术、茯苓、陈皮、半夏、甘草处于用药前 10 位^[6]。食管癌是常见的恶性肿瘤之一,我国

每年约有 25 万新诊断的食管癌病例,占全世界食管癌病例数的一半,预后较差,五年生存率不到 15%^[7]。前期研究发现,本方水煎剂对食管癌细胞有一定抑制作用,但用量较大^[3]。为了提高该方抑制肿瘤效果,对它进行了分部位提取。发现六君子汤乙酸乙酯部位比水部位、乙醇部位、三氯甲烷部位对食管癌细胞增殖的抑制作用更强(结果未显示);其乙酸乙酯部位不同浓度作用 48 h 后可以明显抑制 Eca109 细胞增殖,且随药物浓度的增加而升高,呈剂量-效应依赖关系,半数抑制率为 49.65 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,远远低于前期研究的水煎剂^[3],说明六君子汤溶于极性弱的溶剂中的成分抑制肿瘤生长作用更



A. 空白组(明场); B. 空白组(荧光); C. 六君子汤提取物 $49.65 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组(明场); D. 六君子汤提取物 $49.65 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组(荧光)
图 3 六君子汤提取物对食管癌 Eca109 细胞凋亡的影响($\times 400$)
Fig. 3 Effect of Liujunzi Tang extract on the apoptosis of Eca109 cells($\times 400$)

强。提示就针对抑制肿瘤生长而言,临床上只以水煎剂应用,会丢失很多有效成分。因此,有必要结合现在药理药效学指标对六君子汤利用提取工艺进行深入研究。

逃脱细胞死亡是癌的特性之一,其中凋亡是死亡的主要形式,起到对肿瘤发展的天然限制作用。但是肿瘤细胞以进化许多策略可以减弱或绕过凋亡,比如失去 TP53 的肿瘤抑制功能、增加抗凋亡调节因子的表达能,在肿瘤发展成为高恶性及耐受治疗过程中其重要作用^[8]。也已发现许多天然药物提取物可通过干预细胞凋亡起到治疗作用^[9]。为了进一步研究六君子汤抑制细胞增殖机制,笔者观察了该方对细胞凋亡的影响。研究发现,六君子汤乙酸乙酯提取物可以诱导食管癌细胞凋亡,且有剂量依赖性,用激光共聚焦也观察到了早期凋亡,晚期凋亡现象。

总之,六君子汤乙酸乙酯提取物可明显抑制食管癌 Eca109 细胞增殖作用,且能诱导肿瘤细胞凋亡,但分子机制有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 王海明,杨明会. 六君子汤治疗消化道肿瘤化疗副

反应临床观察[J]. 中国中医急症, 2008, 17(4): 459-460.

[2] 李天传,陈乃杰,吴丹红. 六君子汤配合化疗治疗进展期胃癌临床观察[J]. 山东中医药大学学报, 2010, 34(2):154-155.

[3] 陈玉龙,苗艳艳,司富春. 健脾和胃类方对肿瘤细胞生长抑制的比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 6(3):112-115.

[4] 苏延峰,马景德,胡国友. 六神丸与六君子汤对荷瘤鼠的抑瘤效果及鼠存活时间的影响[J]. 实用医药杂志, 2004, 21(5):442-443.

[5] 胡玉娜,赵晓艳,倪振华,等. 加味六君子汤含药血清对胃癌细胞 BGC2823 增殖和凋亡的影响[J]. 浙江中西医结合杂志, 2010, 20(4):205-207.

[6] 司富春,陈玉龙. 古方治疗噎膈用药分析[J]. 山东中医杂志, 2004, 23(7):385-387.

[7] Enzinger P C, Robert R J. Esophageal Cancer[J]. N Engl J Med, 2003, 349(23):2241-2252.

[8] Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer; the next generation [J]. Cell, 2011, 144(5):646-674.

[10] Yan H, Wang X, Niu J, et al. Anti-cancer effect and the underlying mechanisms of gypenosides on human colorectal cancer SW-480 cells[J]. PLoS One, 2014, 9(4):e95609.

[责任编辑 周冰冰]