

半夏泻心汤对食管癌 Eca9706 细胞周期、 凋亡及 STAT3 蛋白的影响

崔姗姗, 邵雷, 高小玲, 吴耀松*
(河南中医药大学, 郑州 450008)

[摘要] **目的:**观察半夏泻心汤对食管癌 Eca9706 凋亡机制的影响。**方法:**体外培养食管癌 Eca9706 细胞,采用流式细胞术观察半夏泻心汤($4, 2, 1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)对食管癌 Eca9706 细胞周期及凋亡的影响,采用免疫印迹法(Western blot)检测半夏泻心汤对 Eca9706 细胞信号转导和转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)蛋白的表达。**结果:**半夏泻心汤各剂量作用于食管癌 Eca9706 细胞 24 h 后,食管癌 Eca9706 细胞早期凋亡明显增加($P < 0.05$),食管癌 Eca9706 细胞分裂被明显阻止于休眠细胞/DNA 合成前期(G_0/G_1);半夏泻心汤各剂量作用于食管癌 Eca9706 24 h 后,可使细胞 STAT3 蛋白表达明显降低($P < 0.05$),以高浓度半夏泻心汤效果最佳。**结论:**半夏泻心汤可能存在影响食管癌 Eca9706 细胞周期(细胞分裂间期 $G_1, S, G_2/M$ 期之间)的调控点;半夏泻心汤促进肿瘤细胞凋亡可能与干预 STAT3 转录因子表达有关。

[关键词] 半夏泻心汤; 食管癌; 细胞周期; 凋亡; 信号转导和转录激活因子 3

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)04-0142-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016040142

Effect of Banxia Xiexin Tang on Cell Cycle, Apoptosis and STAT3 Protein Expression of Esophageal Carcinoma Eca9706 Cells

CUI Shan-shan, SHAO Lei, GAO Xiao-ling, WU Yao-song*

(Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the apoptosis mechanism of Banxia Xiexin Tang on esophageal carcinoma Eca9706 cells. **Method:** Flow cytometry technique was used to detect the effect of Banxia Xiexin Tang on cell cycle and apoptosis of esophageal carcinoma Eca9706 cells; Western blot was used to detect the effect of Banxia Xiexin Tang on signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) protein expression of Eca9706 cells. **Result:** After 24 h of treatment by Banxia Xiexin Tang, the early apoptosis of cells was significantly increased, and cell division was significantly blocked in G_0/G_1 phase, STAT3 protein expression was reduced after 24 h of treatment by Banxia Xiexin Tang, and the high concentration Tang exhibited the best effect. **Conclusion:** Banxia Xiexin Tang may have the regulation points between G_1, S and G_2/M phase to affect cell cycle, and its mechanism of promoting apoptosis of tumor cells may be associated with interfering the expression of STAT3 transcription factors.

[Key words] Banxia Xiexin Tang; esophageal carcinoma; cell cycle; apoptosis; signal transducer and activator of transcription 3

半夏泻心汤由法半夏、干姜、黄连、黄芩、人参、甘草组成,主治寒热错杂的心下痞。该方首见于

[收稿日期] 20150731(012)

[基金项目] 河南省教育厅自然科学基金项目(12B360003,15B360003)

[第一作者] 崔姗姗,副教授,从事肿瘤病机及防治学研究, Tel:13623869133, E-mail:sscui@126.com

[通讯作者] * 吴耀松,副教授,从事中医肿瘤病机与防治研究, Tel:13939057785, E-mail:linawys@163.com

《伤寒杂病论》,所治病证几乎包括了所有的消化系统病变^[1]。临床上半夏泻心汤可用于胃癌,食管癌肿瘤放、化疗引起的各种消化道反应,也可用于消化道肿瘤的直接治疗^[2]。国际癌症研究中心(IARC)全球癌症统计报告显示:2002 年食管癌发病人数为 462 000 人,是世界上最常见的 8 大恶性肿瘤之一。2 000 多年以前我国河南西部一带已有该病流行,统称“噎膈”^[3]。课题组前期研究表明,半夏泻心汤能够抑制胃腺癌 SGC-7901 细胞增殖,促进细胞凋亡,改变细胞的形态^[4-5]。信号转导和转录激活因子 3(STAT3)是 STAT 家族的重要成员,是肿瘤细胞与其所处的肿瘤微环境这一炎性网络中的关键节点,在慢性炎症介导肿瘤形成的过程中发挥重要作用^[6],可调节与肿瘤发生,发展相关的多个靶基因转录,促进肿瘤的增殖,迁移,抗凋亡,抗耐药等,在人体多种恶性肿瘤中呈持续激活状态,为公认的癌基因^[7]。STAT3 的激活使得肿瘤持续生长及癌基因显现,引起下游凋亡因子过度表达。

为进一步探讨半夏泻心汤对食管癌细胞生长的影响,本研究利用流式细胞术和免疫印迹法观察半夏泻心汤对食管癌细胞株 Eca9706 的周期、凋亡及 STAT3 蛋白表达的影响,并初探其作用机制,为临床提供理论依据。

1 材料

1.1 药物 半夏泻心汤原方组成,药物剂量比例为人参-甘草-黄芩-黄连-干姜-法半夏(3:3:3:1:3:4)。药物购于河南中医学院第三附属医院,经河南中医药大学宋宁副教授鉴定为正品,符合 2015 年版《中国药典》标准。

1.2 细胞株 人食管癌细胞株 Eca9706 购于中国医学科学院细胞研究中心。

1.3 主要试剂 DMEM 高糖培养基(Gibco 公司,批号 20130605),胎牛血清(Hyclone 公司),3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT, Sigma 公司,批号 M2128),二甲基亚砜(DMSO, Amresco 公司,批号 0231),AnnexinV-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(批号 KAG106)和细胞 DNA 含量检测试剂盒(批号 KAG511)均购于凯基生物公司,STAT3 蛋白抗体(Santa Cruz 公司,批号 sc-482)。

1.4 仪器 UV1902 型紫外分光光度计(德国 Bio Mate 公司),Heraeus 型细胞培养箱(德国 Kendro 公司),AxioLab A1 型倒置显微镜(德国 ZEISS 公司),ELx800 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司),FACSCalibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司),SG-603 型生物安全

柜(美国 Bake 公司)。

2 方法

2.1 药物提取 所有药物采用双蒸水煎煮,武火煮沸后,文火煎煮 20 min,合并 2 次药汁,按 1:1 的比例加入 95% 乙醇,4 ℃ 冰箱静置 24 h,收集上清后采用滤纸过滤,旋转蒸发仪回收乙醇,低温真空干燥后冷藏备用。体外实验时药液用不含血清培养基稀释,过滤除菌,根据需要调整药物浓度。

2.2 细胞培养 细胞采用 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液置 CO₂ 培养箱培养,每 48 h 更换培养基,实验时消化消化细胞,接种于 96 孔板中。

2.3 细胞生长增殖的时效和量效关系检测 96 孔板细胞种植密度为 1×10^4 细胞/孔,于培养箱培养 24 h。设空白组,半夏泻心汤组,每组 3 个复孔。药物组设半夏泻心汤质量浓度 8,4,2,1,0.5 g·L⁻¹;空白组加完全培养基。继续培养 24,48,72 h,去除培养上清,每孔加入 0.5 mg·L⁻¹ 的 MTT 100 μL,培养 4 h 后加入 150 μL DMSO,酶标仪在波长为 570 nm 测定吸光度 A。按抑制率 = $(1 - A_{\text{实验孔}570/630} / A_{\text{对照孔}570/630}) \times 100\%$ 计算抑制率^[6]。

2.4 细胞凋亡检测 按照 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒要求操作。Eca9706 细胞按照 1×10^5 个接种于 6 孔细胞培养板中,置 37 ℃ 5% CO₂ 恒温培养箱中 24 h,分别加入高、中、低质量浓度(4,2,1 g·L⁻¹)半夏泻心汤,空白组只加完全培养基,置培养箱中培养 24 h,收获细胞,按说明处理细胞, FACSCalibur 型流式细胞仪检测,CellQuest 软件获取并分析。

2.5 细胞周期检测 实验分组及收集细胞方法同 2.4;严格按照细胞 DNA 含量检测试剂盒说明进行样品处理,300 目筛网过滤后,经流式细胞仪检测,CellQuest 软件获取,ModFit LT 3.2 软件进行分析。

2.6 STAT3 蛋白检测 实验分组及收集细胞方法同上。采用免疫印迹法(Western blot)检测每组细胞 STAT3 蛋白的表达,上样,SDS-PAGE 凝胶电泳,转至硝酸纤维素膜,封闭,洗涤,加入一抗(1:200),洗涤,加入二抗反应,洗涤,加入 ECL 试剂盒 A, B 液,曝光,显影,定影,洗片。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 16.0 统计软件,方差分析后进行 LSD-t 检验,进行回归分析及曲线拟合,应用概率法计算半数抑制率。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 半夏泻心汤对细胞生长增殖的时效和量效关

系的影响 24, 48, 72 h 回归方程分别为 $Y = 8.973X + 12.558$, $Y = 9.737X + 25.158$, $Y = 6.506X + 49.775$; 应用概率法 95% 置信区间半抑制浓度 (IC_{50}) 24, 48, 72 h 分别为 4.07, 2.21, 0.66 $g \cdot L^{-1}$ 。可见半夏泻心汤对细胞的抑制呈现明显的时效关系。半夏泻心汤作用 24 h, 4 $g \cdot L^{-1}$ 剂量可使细胞抑制率接近半数, 0.5 $g \cdot L^{-1}$ 药物剂量对细胞抑制率较差。因此本课题组选择药物作用 24 h 的 3 个质量浓度 4, 2, 1 $g \cdot L^{-1}$ 进行凋亡和周期的检测。见表 1。

表 1 半夏泻心汤对食管癌细胞株 Eca9706 增殖抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 1 Effects of Banxia Xiexin Tang on proliferation of esophageal cancer Eca9706 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$) %

浓度/ $g \cdot L^{-1}$	24 h	48 h	72 h
8	81.04 ± 9.01	89.52 ± 9.64	92.61 ± 10.1
4	51.81 ± 5.91	80.68 ± 8.79	85.56 ± 9.23
2	37.98 ± 4.33	78.15 ± 8.46	80.66 ± 9.05
1	25.19 ± 2.73	21.31 ± 2.87	72.46 ± 9.02
0.5	5.86 ± 0.67	7.05 ± 0.89	18.42 ± 2.18

3.2 半夏泻心汤对食管癌细胞株 Eca9706 的诱导凋亡作用 细胞给药 24 h 后, 与空白组相比, 半夏泻心汤高、中剂量组食管癌细胞早期凋亡率明显升高 ($P < 0.05$), 且高、中浓度与低浓度作用区别明显 ($P < 0.05$); 与空白组相比, 半夏泻心汤高、中、低剂量组晚期凋亡率明显升高 ($P < 0.05$), 而 3 个剂量组之间没有明显差异。见表 2。

表 2 半夏泻心汤对食管癌细胞株 Eca9706 凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 2 Effects of Banxia Xiexin Tang on apoptosis of esophageal cancer Eca9706 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$) %

组别	浓度/ $g \cdot L^{-1}$	早期	晚期
空白	-	3.01 ± 0.45	2.84 ± 0.49
半夏泻心汤	1	6.23 ± 0.89	9.56 ± 1.27 ¹⁾
	2	19.71 ± 2.64 ^{1,2)}	12.23 ± 3.45 ¹⁾
	4	22.91 ± 3.09 ^{1,2)}	13.40 ± 1.89 ¹⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与半夏泻心汤 1 $g \cdot L^{-1}$ 组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 3 同)。

3.3 半夏泻心汤对食管癌细胞株 Eca9706 周期的影响 细胞给药 24 h 后, 与空白组相比, 半夏泻心汤高、中、低剂量组位于休眠细胞/DNA 合成前期 (G_0/G_1) 的细胞百分率明显升高 ($P < 0.05$), 说明细胞的分裂被阻止在 G_0/G_1 期, 尤其高浓度组作用

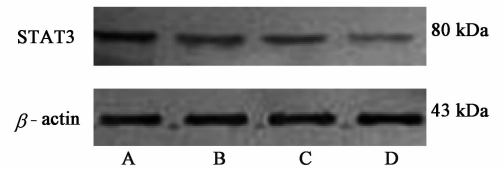
明显 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 半夏泻心汤对食管癌细胞株 Eca9706 周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 3 Effects of Banxia Xiexin Tang on cell cycle of esophageal cancer Eca9706 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$) %

组别	浓度/ $g \cdot L^{-1}$	G_0/G_1 期	S	G_2/M 期
空白	-	54.09 ± 7.02	19.99 ± 2.10	25.92 ± 2.94
半夏泻心汤	1	57.22 ± 7.31	20.01 ± 2.87	22.77 ± 2.98
	2	66.05 ± 7.14	16.23 ± 2.88	17.72 ± 2.17 ^{1,2)}
	4	71.21 ± 6.91 ¹⁾	14.38 ± 3.00	14.41 ± 2.05 ^{1,2)}

3.4 半夏泻心汤对食管癌细胞株 Eca9706 细胞 STAT3 蛋白表达的影响 从半夏泻心汤中剂量组, 高剂量组蛋白条带变淡明显, 说明 STAT3 蛋白表达降显著, 其中高剂量组差异显著。见图 1, 表 4。



A. 空白组; B ~ D. 半夏泻心汤 (4, 2, 1 $g \cdot L^{-1}$) 组

图 1 半夏泻心汤对食管癌细胞株 Eca9706 细胞 STAT3 蛋白表达的影响

Fig. 1 Effects of Banxia Xiexin Tang on STAT3 protein expression of esophageal cancer Eca9706 cells

表 4 半夏泻心汤对食管癌细胞株 Eca9706 细胞 STAT3 蛋白表达 A 影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 4 Effects of Banxia Xiexin Tang on optical density ratio for STAT3 protein expression of esophageal cancer Eca9706 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	浓度/ $g \cdot L^{-1}$	A
空白	0	1.19 ± 0.13
半夏泻心汤	1	0.90 ± 0.30
	2	0.85 ± 0.26
	4	0.76 ± 0.21 ¹⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

半夏泻心汤作为辛开苦降的代表方剂, 可用于食管癌, 反流性食管炎等消化系统疾病, 该方辛开苦降甘补, 可治疗消化系统寒热错杂, 气机痞塞, 吻合中医食管癌的主要病机, 临床疗效显著。

流式细胞仪能快速地 对单细胞悬液进行多参数分析, 分辨率高, 精确度好, 在肿瘤药物治疗及药物筛选方面有非常重要的意义^[8]。细胞周期可分为 DNA 合成前期 (G_1 期), DNA 合成期 (S 期), DNA

合成后期(G_2 期),有丝分裂期(M 期)。在某些时候由于细胞周期延长,细胞处于停止分裂状态时期而不发生增殖,称为 G_0 期^[9]。越来越多实验研究表明,细胞的正常分化过程受阻是肿瘤发生的重要原因,可归属于细胞周期性疾病^[10-11]。从而使细胞周期分析在肿瘤学方面显得极其重要。STAT3 是 STAT 家族的重要成员,具有强烈的抑制细胞凋亡,促进细胞增殖的作用,参与人类恶性肿瘤的发生和发展^[12],可调节与肿瘤发生和发展相关的多个靶基因转录。因此可认为肿瘤细胞生物学行为的产生和维持均依赖于 STAT3 的活性^[13],从而促进多种趋化因子的释放,加重肿瘤相关性炎症,促进肿瘤的不断

发展。本实验结果表明,半夏泻心汤高、中、低 3 个剂量作用于 Eca9706 细胞 24 h 后,高浓度组的细胞分裂被明显阻止在 G_0/G_1 期,不能进入 S 期,进而不能进入细胞分裂阶段。半夏泻心汤高浓度组细胞的早期凋亡也明显增加,表明药物可减少肿瘤细胞 DNA 的合成,使细胞阻滞于 G_1 期,并且呈现剂量依赖性。Western blot 结果显示,给药 24 h 后,半夏泻心汤 3 个剂量组 STAT3 蛋白表达均明显降低,这说明半夏泻心汤可抑制 STAT3 蛋白表达。本课题组前期的胃腺癌 SGC-7901 细胞研究表明,半夏泻心汤可促进 STAT3 下游凋亡相关因子 Bcl-2 促凋亡因子(Bax)的表达,降低 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)的表达^[13]。Bcl-2 是一种抑制凋亡的原癌基因,其对凋亡的各种信号传导途径的交汇点具有重要的调节作用。Bax 基因属于 Bcl-2 基因家族,编码的 Bax 蛋白可与 Bcl-2 形成异二聚体,对 Bcl-2 产生阻抑作用,是极重要的促细胞凋亡基因之一^[14-15]。

因此,研究推测半夏泻心汤对肿瘤起到治疗作用的机制,可能是通过诱导或增加细胞凋亡来抑制肿瘤细胞增殖,其抑制或影响 STAT3 信号通路下游凋亡基因 Bcl-2,半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3),Bax 的表达将在后续实验中进一步探讨。

[参考文献]

[1] 赵鸣芳. 半夏泻心汤的应用思路及作用机理分析

[J]. 江苏中医药, 2005, 26(10): 46-49.

- [2] 何江进. 半夏泻心汤防治胃肠肿瘤化疗引起的胃肠道反应临床观察[J]. 中国中医急症, 2010, 19(4): 581-582.
- [3] 钟钊, 谭家驹, 徐致祥. 食管癌流行病学病因学研究进展[J]. 河南预防医学杂志, 2011, 22(1): 1-10.
- [4] 周发祥, 陈玉龙, 庞永芳, 等. 半夏泻心汤及其拆方对胃腺癌 SGC-7901 细胞周期和凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(23): 203-206.
- [5] 崔姗姗, 高小玲, 吴耀松, 等. 半夏泻心汤对胃腺癌 SGC-7901 细胞形态及 STAT3 通路相关蛋白的影响[J]. 中药药理与临床, 2015, 31(3): 4-8.
- [6] 蒋树龙, 花宝金. JAK2/STAT3/SOCS3 信号通路与肿瘤转移[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2014, 21(6): 698-702.
- [7] Huang S. Regulation of metastases by signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway: clinical implications[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(5): 1362-1366.
- [8] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版社, 1996: 73.
- [9] 吴晓娜, 蒋红兵. 流式细胞术的工作原理及其临床应用[J]. 临床工程, 2011, 26(3): 91-93.
- [10] Williams G H, Kai S. The cell cycle and cancer[J]. J Pathol, 2012, 226(2): 352, 364.
- [11] Hartwell L H, Kastan M B. Cell cycle control and cancer[J]. Science, 1994, 266(5192): 1821-1828.
- [12] 侯嘉杰, 孙倍成. STAT3: 慢性炎症介导肿瘤发生和进展的关键节点[J]. 生物化学与生物物理进展, 2014, 41(1): 69-78.
- [13] 崔姗姗, 陈玉龙, 周发祥, 等. 半夏泻心汤及其拆方诱导胃腺癌 SGC-7901 细胞凋亡机制[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(4): 1287-1289.
- [14] 刘芳, 王朝阳. STAT3 基因沉默对结肠癌细胞 SW480 凋亡的影响[J]. 内蒙古医学杂志, 2013, 45(3): 279-282.
- [15] 杨连君. Bcl-2, Bax 与肿瘤细胞凋亡[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2003, 10(3): 232-234.

[责任编辑 张丰丰]