

基于 PI3K/Akt 通路探讨健脾化痰方对大肠癌 SW480 增殖的影响

奚松阳¹, 陈彦¹, 滕钰浩¹, 李洁玘¹, 张瑛瑛¹, 邹玺², 吴坚², 周锦勇², 王瑞平^{2*}

(1. 南京中医药大学附属医院, 南京 210029; 2. 江苏省中医院, 南京 210029)

[摘要] **目的:**探讨健脾化痰方基于 PI3K/Akt 通路抑制大肠癌 SW480 增殖的相关机制。**方法:**取对数生长期的 SW480 细胞, 噻唑蓝 (MTT) 检测不同质量浓度健脾化痰方 (0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 g·L⁻¹) 对 SW480 细胞增殖的影响; 不同质量浓度健脾化痰方 (1, 2, 4 g·L⁻¹) 培养 24 h, 另设空白组, 流式细胞仪检测对 SW480 细胞凋亡、细胞周期的影响, 实时荧光定量聚合酶链式反应 (qPCR) 法检测健脾化痰方对 SW480 细胞中磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (PI3K), 蛋白激酶 B (Akt), p27, 细胞周期素 D₁ (Cyclin D₁), B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 基因表达的影响, 蛋白质免疫印迹 (Western blot) 法检测健脾化痰方对 SW480 细胞中 PI3KⅢ, Akt, p27, Cyclin D₁, Bcl-2 及 Bax 蛋白表达的影响。**结果:**健脾化痰方对人大肠癌细胞 SW480 增殖有抑制作用, 且呈现量效和时效关系。与空白组比较, 健脾化痰方作用于 SW480 细胞后明显促进细胞凋亡, 细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期, 健脾化痰方明显降低 PI3K, Akt, Cyclin D₁, Bcl-2 基因及蛋白的表达, 明显升高 p27, Bax 基因及蛋白的表达 ($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论:**健脾化痰方对人大肠癌细胞 SW480 增殖具有抑制作用, 其机制可能是通过下调 PI3K 和 Akt 的表达, 从而影响下游的 Cyclin D₁, p27, Bcl-2, Bax 的表达, 引起 SW480 细胞发生 G₀/G₁ 期阻滞和凋亡。

[关键词] 健脾化痰方; PI3K/Akt 通路; 细胞周期; 细胞凋亡; 大肠癌

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)16-0097-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016160097

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160628.1613.036.html>

[网络出版时间] 2016-06-28 16:13

Effect of Jianpi Huayu Decoction on Proliferation in Human Colorectal Carcinoma Cells (SW480) Through PI3K/Akt Pathway

XI Song-yang¹, CHEN Yan¹, TENG Yu-hao¹, LI Jie-pin¹, ZHANG Ying-ying¹,
ZOU Xi², WU Jian², ZHOU Jin-yong², WANG Rui-ping^{2*}

(1. *Affiliated Hospital to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;*

2. *Jiangsu Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China*)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Jianpi Huayu decoction (JHD) on the proliferation in human colorectal carcinoma cells (SW480) through PI3K/Akt pathway. **Method:** SW480 cells in the logarithmic phase were collected. MTT was used to determine the effect of JHD with different concentrations (0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 g·L⁻¹) on the proliferation of SW480 cells. Flow cytometry assay was used to determine the effects of JHD on cell cycle and apoptosis in SW480 cells. qPCR assay was used to observe the expressions of genes (PI3K, Akt, p27, Cyclin D₁, Bcl-2, Bax) after JHD acting on SW480 cells. Western blot assay was used to observe the expressions of proteins (PI3KⅢ, Akt, p27, Cyclin D₁, Bcl-2, Bax) after JHD acting on SW480 cells. **Result:** JHD inhibited the proliferation of SW480 cells in a concentration and time-dependent manner. Compared with the blank group, JHD can promote cell apoptosis after acting on SW480 cells; as the cell cycle was arrested in G₀/G₁ phase, JHD can obviously reduce PI3K, Akt, Cyclin D₁, Bcl-2 gene and protein expressions, and significantly increase p27

[收稿日期] 20150827(014)

[基金项目] 国家中医药管理局项目 (JDZX2012087); 江苏省中医药重点学科建设项目 (JS1305); 江苏省中医药领军人才项目 (LJ200908)

[第一作者] 奚松阳, 硕士, 从事中西医结合抗肿瘤的基础及临床研究, Tel:15050584086, E-mail: ruijianxsy@163.com

[通讯作者] *王瑞平, 博士, 教授, 博士生导师, 主任医师, 从事肿瘤的中西医结合治疗, Tel:13815883181, E-mail: wrp61@163.com

and Bax gene and protein expressions ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Jianpi Huayu decoction can inhibit the proliferation in human colorectal carcinoma cells (SW480) by down-regulating PI3K and Akt expressions, impacting downstream Cyclin D₁, p27, Bcl-2 and Bax expressions, inducing G0/G1-phase cell cycle arrest and apoptosis, and inhibiting the proliferation of SW480 cells.

[**Key words**] Jianpi Huayu decoction; PI3K/Akt pathway; cell cycle; apoptosis; colorectal cancer

结直肠癌(colorectal carcinoma, CRC)是最常见的恶性肿瘤之一,并且是全世界主要的死亡原因之一^[1]。目前多种化疗药物广泛用于治疗结肠癌,但由于副作用,如神经毒性、骨髓抑制等,严重妨碍了其临床应用及疗效^[2]。与化疗药物比较,中药副作用相对较少,且在临床上取得了不错的临床疗效^[3-4]。根据中医原理,中医复方不仅强调对症处理而且强调恢复和保持身体的平衡,这与现代的靶向治疗非常相似^[5]。健脾化癥方为王瑞平教授近 30 年临床实践总结的经验方。本方已在临床实践中广泛被运用,且取得了不错的疗效^[6],并在此基础上,进行了一系列的实验研究,证实健脾化癥方能抑制结肠癌细胞 LoVo 的增殖能力,并诱导细胞凋亡^[7],且其对结肠癌 LoVo 细胞裸鼠皮下移植瘤有显著的抑制作用,其作用可能与下调 miRNA31 以及上调 miRNA143 的表达有关^[8]。为了更进一步研究其作用机制,本研究以人大肠癌细胞 SW480 细胞作为研究对象,体外研究健脾化癥方对 SW480 细胞生长、凋亡及细胞周期的影响,为中医药治疗肠癌提供新的思路和方法。

1 材料

1.1 细胞株 人大肠癌 SW480 细胞株购于中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库。细胞株用含 10% 小牛血清 RPMI-1640 培养液,并置于 37 °C 5% CO₂ 饱和湿度的孵箱中培养。

1.2 药物及试剂 健脾化癥方由江苏省中医院提供(白术 10 g,蚤休 15 g,地锦草 10 g,半枝莲 30 g,莪术 10 g,丹参 15 g,茵陈 15 g),共 105 g,用 1 050 mL 蒸馏水加热回流提取 2 次,合并提取液,微波真空干燥,以 5 000 r·min⁻¹ 反复离心 3 次,每次 10 min,小心吸取上清液,0.22 μm 滤膜过滤后配制成相当于生药质量浓度 1 g·mL⁻¹ 的水提灭菌液, -80 °C 保存备用。RPMI-1640 培养液(凯基公司,批号 20141225),小牛血清(杭州四季青生物工程公司,批号 131226),0.25% 胰酶(美国 Gibco 公司,批号 27250-018),噻唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司,批号 M2128),实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)试剂盒(日本 TaKaRa 公司,批号 AK2104),凋亡试剂

盒(Binding Buffer, AnnexinV-FITC 染料,PI 染料)(凯基公司,批号 20141208);磷脂酰肌醇-3-羟激酶(PI3K),蛋白激酶 B(Akt),p27,细胞周期素 D₁(Cyclin D₁),B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)抗体,二抗兔抗及鼠抗(美国 CST 公司,批号 0912014),β-肌动蛋白(β-actin)抗体(美国 Sigma 公司,批号 091204),其余试剂均为国产分析纯。PCR 引物由美国 Invitrogen 公司合成。

1.3 仪器 7500 型 qPCR 仪(美国 Life Technologies 公司),2720 型 PCR 扩增仪(美国 Applied Biosystems 公司),5417R 型冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司),Calibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司),Power Poc 型蛋白质免疫印迹(Western blot)电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 MTT 实验 取对数生长期的 SW480 细胞,以 8 × 10⁴ 个/mL 密度接种于 96 孔培养板,每孔 100 μL,培养 24 h 后,加入不同质量浓度含药培养液(0.25,0.5,1,2,4 g·L⁻¹)100 μL 或普通 RPMI-1640 培养液,每一质量浓度作 6 个复孔,分别培养 12,24,48 h 后,弃培养液,每孔加入 120 μL(含 RPMI-1640 100 μL 和 MTT 20 μL),继续培养 4 h。倾去药液及培养液,每孔加入 DMSO 150 μL,避光振荡 10 min,充分溶解沉淀后,在酶标仪 490 nm 条件下,检测吸光度 A。

$$\text{抑制率} = (1 - A_{\text{药物组}} / A_{\text{对照组}}) \times 100\%$$

2.2 细胞凋亡实验 向直径 6 cm 培养皿中接种 8 × 10⁵ 个 SW480 细胞,培养 24 h 以使细胞贴壁,弃原培养液分别加入质量浓度为 1,2,4 g·L⁻¹ 的健脾化癥方溶液或普通 RPMI-1640 培养液,继续培养 24 h 后,胰酶消化,2 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,弃去上清,4 °C 预冷 PBS 洗涤细胞 2 次,离心弃上清,用 Binding Buffer 500 μL 重悬细胞,分别加入 5 μL Annexin V-FITC 及 5 μL PI 染料混匀,室温下避光震荡 15 min,流式细胞仪(Flow cytometry, FCM)检测细胞凋亡情况。

2.3 细胞周期实验 向直径 10 cm 培养皿中接种 2 × 10⁶ 个 SW480 细胞,培养 24 h 以使细胞贴壁,弃原培养液换成无血清的 RPMI-1640 培养液,继续培养

24 h, 弃培养液, 分别加入质量浓度为 1, 2, 4 g·L⁻¹ 的健脾化痰方溶液培养或普通 RPMI-1640 培养液, 继续培养 24 h 后, 胰酶消化, 1 500 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃掉上清, 4 °C 预冷 PBS 洗涤细胞 2 次, 离心弃上清, 每管加入 4 °C 预冷 75% 乙醇 1 mL, 于 4 °C 固定过夜。离心收集细胞, 4 °C 预冷 PBS 洗涤细胞 3 次, 加入 100 mg·L⁻¹ RNAse 15 μL, 涡旋振荡混合均匀, 4 °C 避光放置 15 min, 加入含 50 mg·L⁻¹ PI 的 PBS 500 μL, 4 °C 避光孵育 30 min, FCM 进行细胞周期检测。

2.4 qPCR 实验 向直径 6 cm 培养皿中接种 8 × 10⁵ 个 SW480 细胞, 培养 24 h 以使细胞贴壁, 弃原培养液, 加入 5 mL 不同质量浓度含药培养液 (1, 2, 4 g·L⁻¹) 或普通 RPMI-1640 培养液继续培养 24 h 后, 提取细胞总 RNA, 经 RT 逆转录试剂盒合成 cDNA 后进行聚合酶链反应, 配制 qPCR 反应管中反应液, 用 PCR 仪进行扩增反应, 扩增条件为 95 °C 预变性 45 s, 1 个循环; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火/延伸 45 s, 60 个循环。采用 2^{-ΔΔC_t} 法进行结果分析, 将不同标本的 RQ 值 (RQ = 2^{-ΔΔC_t}) 进行比较。ΔC_t = 目的基因 C_t 值 - 内参照基因 C_t 值, 内参为甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH), ΔΔC_t = 实验组 ΔC_t - 空白组 ΔC_t, RQ = 2^{-ΔΔC_t}, 其中空白组的数值均为 1。引物序列见表 1。

2.5 Western bolt 实验 向直径 10 cm 培养皿中接种 2 × 10⁶ 个 SW480 细胞, 培养 24 h 以使细胞贴壁, 弃原培养液, 加入不同质量浓度含药培养液 (1, 2, 4 g·L⁻¹) 或普通 RPMI-1640 培养液 5 mL 继续培养 24 h 后, 提取细胞总蛋白, 以双辛丁酸 (BCA) 法进行蛋白定量检测上样量。上样后进行电泳分离蛋白质。电泳结束后, 采用湿转法将蛋白质转移至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上, 5% 牛血清白蛋白 (BSA) 室温封闭 1 h 后, 一抗 4 °C 孵育过夜 (PI3KIII, Akt, p27, Cyclin D₁, Be1-2, Bax 1:1 000 稀释, β-actin 1:5 000 稀释), TBST

表 1 qPCR 引物序列及基因片段大小

Table 1 qPCR primers and amplicon lengths

基因	引物/5'-3'	扩增长度 /bp
Cyclin D ₁	上游 ACCTGAGGAGCCCAACAAC	112
	下游 GCTTCGATCTGCTCTGGC	
PI3K	上游 GTGGATGTATTGAAGCACCT	237
	下游 GCAGGGTTTAGAGGAGACAGAA	
Akt	上游 GGATTTGATGAGGAGTTCACG	117
	下游 GAGTAGGAGAACTGGGGAAGT	
p27	上游 TGCAACCGACGATTCTTCTACTCAA	185
	下游 CAAGCAGTGTATCTGTATAAACAAGGA	
Bax	上游 TTTGCTTCAGGGTTTCATCC	213
	下游 GCCACTCGGAAAAAGACCTC	
Be1-2	上游 TCGCCCTGTGGATGACTGAG	143
	下游 CAGACTTTCAGAGACGCCAGGA	
GAPDH	上游 AGCCACATCGCTCAGACAC	66
	下游 GCCCAATACGACCAATCC	

洗膜 5 min × 4 遍, 二抗室温孵育 1 h (1:1 000 稀释), TBST 洗膜 5 min × 3 遍, TBS 洗膜 5 min × 1 遍, 化学发光法显色成像, 检测相关蛋白的表达。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计分析软件处理数据, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组数据间的比较采用 Oneway-ANOVA 分析, P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 SW480 细胞增殖的影响 不同质量浓度 (0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 g·L⁻¹) 的健脾化痰方溶液分别作用 SW480 细胞 12, 24, 48 h, 与空白组比较, 随着药物质量浓度的增大、作用时间的延长, 其对细胞的抑制率也明显增大 (P < 0.05, P < 0.01)。见表 2。

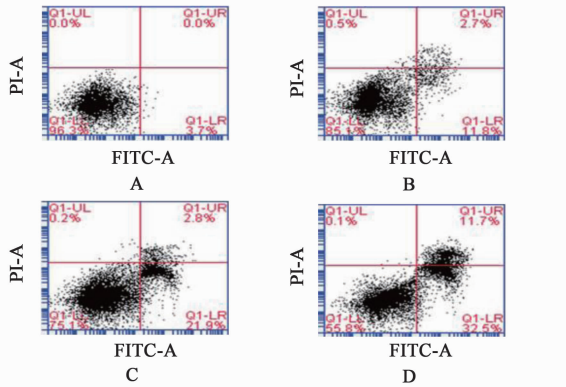
表 2 健脾化痰方对 SW480 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of Jianpi Huayu decoction (JHD) on viability of SW480 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	12 h		24 h		48 h	
		A	抑制率/%	A	抑制率/%	A	抑制率/%
空白	-	0.554 ± 0.053	0	0.880 ± 0.063	0	1.134 ± 0.064	0
健脾化痰方	0.25	0.489 ± 0.079 ¹⁾	11.81 ± 1.68 ¹⁾	0.760 ± 0.048 ¹⁾	13.28 ± 5.76 ¹⁾	0.862 ± 0.026 ²⁾	24.01 ± 2.46 ²⁾
	0.5	0.465 ± 0.055 ²⁾	16.03 ± 9.19 ²⁾	0.698 ± 0.043 ²⁾	20.36 ± 5.03 ²⁾	0.790 ± 0.007 ²⁾	30.36 ± 6.70 ²⁾
	1	0.424 ± 0.061 ²⁾	23.48 ± 1.48 ²⁾	0.609 ± 0.038 ²⁾	30.77 ± 2.12 ²⁾	0.657 ± 0.004 ²⁾	42.09 ± 4.53 ²⁾
	2	0.359 ± 0.030 ²⁾	38.17 ± 7.63 ²⁾	0.498 ± 0.058 ²⁾	43.14 ± 3.52 ²⁾	0.548 ± 0.007 ²⁾	51.67 ± 7.39 ²⁾
	4	0.304 ± 0.052 ²⁾	45.11 ± 8.67 ²⁾	0.410 ± 0.036 ²⁾	53.27 ± 2.96 ²⁾	0.426 ± 0.008 ²⁾	62.41 ± 6.76 ²⁾
	8	0.246 ± 0.050 ²⁾	55.64 ± 7.70 ²⁾	0.291 ± 0.043 ²⁾	66.84 ± 2.02 ²⁾	0.316 ± 0.009 ²⁾	72.17 ± 8.67 ²⁾

注: 与空白组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01 (图 3, 4 同)。

3.2 对 SW480 细胞凋亡的影响 健脾化痰方作用于 SW480 细胞 24 h 后,随着质量浓度的提升早期凋亡率从 $(3.7 \pm 0.56)\%$ 增加到 $(32.5 \pm 2.12)\%$ ($P < 0.01$)。故健脾化痰方能有效地诱导细胞凋亡,且凋亡率呈剂量依赖性。见图 1。



A. 空白组; B. 健脾化痰方 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; C. 健脾化痰方 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; D. 健脾化痰方 $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组(图 2~4 同)

图 1 健脾化痰方对 SW480 细胞凋亡的影响

Fig.1 Effects of JHD on apoptosis of SW480 cells

3.3 对 SW480 细胞周期的影响 健脾化痰方作用于 SW480 细胞 24 h 后,随着质量浓度的提升 G_0/G_1 期细胞比例不断上升,从空白组的 $(39.76 \pm 3.21)\%$ 上升到健脾化痰方 $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组的 $(56.74 \pm 2.62)\%$ ($P < 0.01$)。故健脾化痰方能有效地诱导细胞 G_0/G_1 期阻滞,且阻滞率呈剂量依赖性。见图 2。

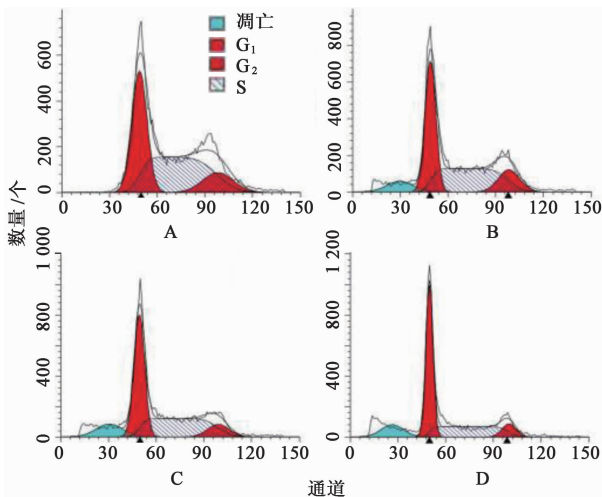


图 2 健脾化痰方对 SW480 细胞周期的影响

Fig.2 Effects of JHD on cell cycle of SW480 cells

3.4 对 SW480 细胞细胞周期,凋亡,PI3K/Akt 相关基因及蛋白的影响 与空白组比较,健脾化痰方对 SW480 细胞的 PI3K, Akt, Cyclin D_1 , Bcl-2 的 mRNA 的表达随着给药质量浓度的上升出现下降,

而 p27, Bax 的 mRNA 的表达随着质量浓度的上升而上升 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与空白组比较,随着健脾化痰方的质量浓度升高,PI3K III, Akt, Cyclin D_1 , Bcl-2 蛋白表达量降低, p27, Bax 蛋白表达量升高 ($P < 0.01$)。见图 3, 4。

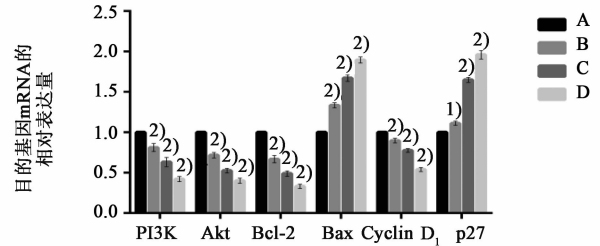


图 3 健脾化痰方作用 SW480 后相关基因的 mRNA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig.3 Effects of JHD on mRNA levels of genes in SW480 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

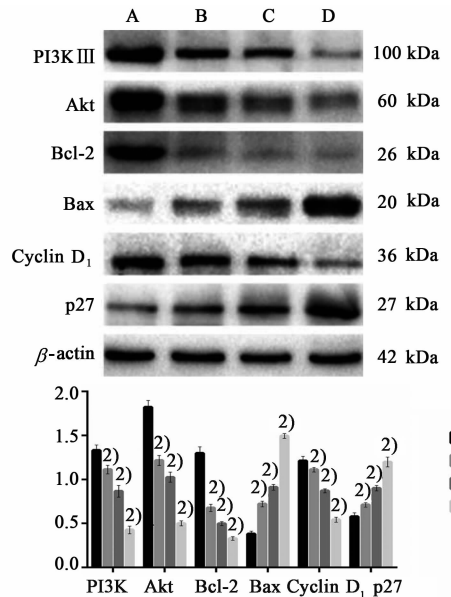


图 4 健脾化痰方对 SW480 后相关蛋白的表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig.4 Effects of JHD on expressions of proteins in SW480 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

4 讨论

中医学认为肠癌的产生多是由于长期的饮食不节,或劳倦过度,或忧思郁结,或久病失养,以致损伤脾胃,气血生化乏源,正气虚损,则邪气乘袭,蕴结于脏腑,气机受阻,血行不畅,瘀毒互结,形成肿瘤。故总结其基本病机为气虚血瘀。健脾化痰方是王瑞平教授针对肠癌患者气虚血瘀的病机特点,以益气健脾、化痰解毒为治疗大法拟定的中药复方制剂。方中白术益气健脾,丹参、莪术活血化瘀、破积通络,蚤休、地锦草、半枝莲、茵陈清热利湿、解毒抗癌,诸药相合共奏益气扶正、化痰散结、解毒抗癌之功效。本

研究以人大肠癌细胞 SW480 细胞作为研究对象,体外研究健脾化痰方对 SW480 细胞生长、凋亡及细胞周期的影响,以期进一步探讨其抗肿瘤作用机制。

增殖失常是肿瘤细胞的特征之一,很多研究认为癌变与细胞周期失调密切相关^[9]。真核细胞的细胞周期可分为 4 个时期,S 期(DNA 合成期),M 期(细胞分裂期),G₁,G₂ 期^[10]。其中 G₁/S 期和 G₂/M 期的转换是细胞周期中 2 个决定性的关键点。细胞周期的每个时相都有特异的周期蛋白(Cyclin)以及细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK),Cyclin 与 CDK 结合形成活性复合物,通过磷酸化底物靶蛋白改变其活性,从而驱动细胞周期的正常运行^[11-12]。Cyclin D₁ 作用于 G₁ 期的细胞周期相关蛋白,Cyclin D₁ 能与 CDK4,CDK6 形成复合物,进而磷酸化视网膜细胞瘤蛋白(Rb),解除 Rb 与 E2F 的结合,释放 E2F 从而激活 S 期促进基因的转录^[13-15]。Cyclin D₁ 在 G₁ 期积累不足或复合物组分 CDK4,CDK6 表达下降,都将导致 G₁ 期延长或无法进入 S 期,即出现 G₀/G₁ 期阻滞^[16]。另一方面,细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂(cyclin dependent kinase inhibitor, CKI)可直接与 CDK 或 Cyclin/CDK 复合物结合,阻断其活性从而阻滞细胞周期的进程。根据 CKI 结构和作用的不同,分为 INK4 和 CIP/KIP 两大家族。p27 属于 CIP/KIP 家族,其能抑制 Cyclin D₁/CDK4/CDK6 的活性,进而将细胞阻滞于 G₁ 期^[12]。如图 3,4 所示,健脾化痰方可上调 p27 的表达和下调 Cyclin D₁ 的表达,且呈浓度依赖性。

细胞凋亡是一种程序性细胞死亡,其在维持细胞分裂和细胞死亡的平衡过程中起着至关重要的作用。Caspase 家族是细胞凋亡的中心环节,其通常 Caspase 家族可以通过 2 个途径激活:一是死亡信号诱导,死亡受体介导的途径;另一种是线粒体依赖性途径^[17]。Caspase 家族受到多种分子的调节,其中 Bcl-2 家族起着举足轻重的作用,如 Bcl-2 可抑制细胞凋亡,Bax 可促进细胞凋亡^[18]。目前有研究表明 Bax,Bcl-2 蛋白可通过影响线粒体从而调节细胞凋亡,且随着 Bax 的表达升高,Bcl-2 表达的下调,细胞凋亡的比例不断升高^[19]。如图 3,4 所示,随着健脾化痰方浓度的升高,Bax 表达增加,而 Bcl-2 表达降低。

PI3K/Akt 是主要的细胞信号通路之一,由于其在癌症诊疗中的潜在作用,近年来备受关注,是目前肿瘤研究的热点之一^[20]。这条关键通路拥有众多的上游信号和下游效应分子,并且其与细胞的存活、

生长、蛋白质合成等功能密切相关,如 Cyclin D₁, p27 与细胞周期相关,Bcl-2, Bax 与细胞凋亡相关^[21]。如图 3,4 所示,健脾化痰方能显著降低 PI3K III 和 Akt 的表达。

综上所述健脾化痰方对人大肠癌细胞 SW480 增殖具有抑制作用,其机制可能是通过下调 PI3K 和 Akt 的表达,从而影响下游的 Cyclin D₁, p27, Bcl-2, Bax 的表达,引起 SW480 细胞发生 G₀/G₁ 期阻滞和凋亡,进而抑制 SW480 细胞的增殖。当然,肿瘤细胞的生长与调节是一个复杂、多因素共同作用或调节的作用,要完全清楚其中机制还需要更深入的研究。

[参考文献]

- [1] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] Li Q, Zhou S Y, Jing J, et al. Oligosaccharide from apple induces apoptosis and cell cycle arrest in HT29 human colon cancer cells [J]. Int J Biol Macromol, 2013, 57(6): 245-254.
- [3] Gordaliza M. Natural products as leads to anticancer drugs[J]. Clin Transl Oncol, 2007, 9(12): 767-776.
- [4] Harvey A L. Natural products in drug discovery [J]. Drug Discov Today, 2008, 13(19/20): 894-901.
- [5] Tian X Y, Liu L. Drug discovery enters a new era with multi-target intervention strategy [J]. Chin J Integr Med, 2012, 18(7): 539-542.
- [6] 邹玺, 吴坚, 凌博凡, 等. 健脾化痰法防止大肠癌术后化疗后复发转移的临床研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2014, 1(41): 41-43.
- [7] 邹玺, 王瑞平, 李东, 等. 健脾化痰方含药血清对人结肠癌细胞 LoVo 凋亡的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2011, 12(38): 2355-2356, 2513.
- [8] 凌博凡, 王瑞平, 邹玺, 等. 健脾化痰方对裸鼠结肠癌皮下移植瘤及相关 MicroRNAs 的实验研究 [J]. 四川中医, 2012, 8(30): 49-52.
- [9] 崔兵兵, 程丽芳, 侯立静, 等. 熊果酸抑制人肝癌 SMMC-7721 细胞生长及凋亡的实验研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(18): 181-184.
- [10] Suryadinata R, Sadowski M, Sarcevic B. Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates [J]. Biosci Reports, 2010, 30(4): 243-255.
- [11] Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm [J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(3): 153-166.
- [12] Lim S, Kaldis P. Cdk, cyclins and CKIs. roles beyond cell cycle regulation [J]. Development, 2013, 140(15):

- 3079-3093.
- [13] Iovine B, Iannella M L, Nocella F, et al. Carnosine inhibits KRAS-mediated HCT116 proliferation by affecting ATP and ROS production [J]. *Cancer Lett*, 2012, 315(2):122-128.
- [14] Imoto Y, Yoshida Y, Yagisawa F, et al. The cell cycle, including the mitotic cycle and organelle division cycles, as revealed by cytological observations [J]. *J Electron Microsc*, 2011, 60(S1):117-136.
- [15] Viatour P, Sage J. Newly identified aspects of tumor suppression by RB [J]. *Dis Model Mech*, 2011, 4(5):581-585.
- [16] 隋在云, 王爱洁. 白花蛇舌草和半枝莲微粉配伍对小鼠 H22 肝癌细胞周期及凋亡的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(23):290-292.
- [17] Degtarev A, Yuan J. Expansion and evolution of cell death programmes [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(5):378-390.
- [18] 史倩莹, 方琴, 王季石, 等. 番茄红素诱导 K562 细胞凋亡及机制的探讨 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(7):133-136.
- [19] 刘晓霓, 李玉洁, 杨庆, 等. 瑞香狼毒提取物体外诱导肿瘤细胞凋亡作用比较研究 [J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(10):1440-1444.
- [20] Salakou S, Kardamakis D, Tsamandas A C, et al. Increased Bax/Bcl-2 ratio up-regulates caspase-3 and increases apoptosis in the thymus of patients with myasthenia gravis [J]. *In Vivo*, 2007, 21(1):123-132.
- [21] Wen X X, Zhu J J, Dong L, et al. The role of c2orf68 and PI3K/Akt/mTOR pathway in human colorectal cancer [J]. *Med Oncol*, 2014, 31(8):1-12.
- [责任编辑 周冰冰]

《中国实验方剂学杂志》入选“2015—2016 RCCSE 中国核心学术期刊”

由武汉大学中国科学评价研究中心(RCCSE)、武汉大学图书馆、中国科教评价网(www.nseac.com)共同研制的第4版《RCCSE 中国学术期刊评价研究报告——权威、核心学术期刊排行榜(2015—2016)》已于2015年1月13日公布,《中国实验方剂学杂志》被评定为“RCCSE 中国核心学术期刊(A)”,在参评的112本中医学与中药学类期刊中综合排名第15名。

本次学术期刊评价在重点突出期刊学术影响力的同时,也注重了对期刊网络传播效率和期刊即时反应速率的考察,主要评价指标有:总被引频次、2年影响因子、即年指标、基金论文比、Web即年下载率、二次文献转载量(或国外重要数据库收录情况)和专家定性评价。参评期刊共6201种,排名前5%的“RCCSE 中国权威学术期刊”(A⁺)316种,排名前5%~20%的“RCCSE 中国核心学术期刊”(A)和排名前20%~30%的“RCCSE 中国核心学术期刊(扩展版)”(A⁻)共1572种,准核心的学术期刊1848种(B⁺),一般期刊1828(B)种,较差期刊637种(C)。

“RCCSE 中国核心学术期刊”是继“中文核心期刊(北大)”和“中国科技核心期刊”之后国内推出的又一核心期刊评价体系,极具影响力和权威性。