

· 药理 ·

## 加味四君子汤含药血清对肝癌 Hep-G2 细胞的影响

施胜英<sup>1,2</sup>, 林海桢<sup>1</sup>, 周激<sup>1</sup>, 王素丽<sup>1</sup>, 林敬明<sup>1\*</sup>

(1. 南方医科大学珠江医院, 广州 510280; 2. 广州医科大学附属第三医院, 广州 510150)

**[摘要]** 目的:探讨加味四君子汤含药血清对肝癌 Hep-G2 细胞增殖、凋亡、周期的影响及其作用机制。方法:不同浓度加味四君子汤含药血清处理 Hep-G2 细胞后,采用细胞活性检测试剂盒(CCK-8)检测细胞增殖;AnnexinV/碘化丙啶(PI)流式细胞术检测细胞凋亡率和周期;hoechst33342 荧光染色观察细胞凋亡形态;免疫印迹法(Western blot)检测细胞中磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)/雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路相关蛋白表达水平。结果:加味四君子汤含药血清呈浓度依赖性抑制肝癌 Hep-G2 细胞的增殖,诱导 Hep-G2 细胞凋亡,阻滞细胞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期。hoechst33342 染色后,随着含药血清浓度的增加,Hep-G2 细胞核显著呈碎块状致密浓染。同时,加味四君子汤含药血清能够抑制 Hep-G2 细胞 Akt,mTOR,核糖体 S6 蛋白激酶(S6),真核翻译起始因子 4E 结合蛋白 1(4EBP1)的磷酸化,从而上调 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)和下调细胞周期蛋白(CyclinD<sub>1</sub>),B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)的表达。加味四君子汤含药血清与 300 nmol·L<sup>-1</sup>的 PI3K/mTOR 双重抑制剂 VS-5584 联合使用具有协同作用,含药血清能增强 PI3K/mTOR 双重抑制剂 VS-5584 对 Hep-G2 细胞中 PI3K/Akt/mTOR 信号通路靶点 Akt 和 mTOR 磷酸化的抑制作用。结论:加味四君子汤含药血清能抑制 Hep-G2 细胞的增殖,诱导其凋亡,阻滞其于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期,其机制可能通过阻断 PI3K/Akt/mTOR 信号通路而实现。

**[关键词]** 加味四君子汤; 含药血清; 肝癌 HepG2 细胞; 增殖; 凋亡; 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/雷帕霉素靶蛋白信号通路

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)18-0088-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016180088

### Effect of Jiawei Sijunzi Decoction Containing Serum on Human Hepatocellular Carcinoma Hep-G2 Cells

SHI Sheng-ying<sup>1,2</sup>, LIN Hai-zhen<sup>1</sup>, ZHOU Wei<sup>1</sup>, WANG Su-li<sup>1</sup>, LIN Jing-ming<sup>1\*</sup>

(1. Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510280, China;

2. The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510150, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of Jiawei Sijunzi decoction containing serum on proliferation, apoptosis, and cell cycle of human hepatocellular carcinoma Hep-G2 cells and explore its action mechanism. **Method:** After Hep-G2 cells were processed with different concentrations of Jiawei Sijunzi decoction containing serum, cell counting kit-8 (CCK-8) was used to measure the proliferation of Hep-G2 cells, apoptosis rate and cell cycle were detected by AnnexinV/propidium iodide (PI) flow cytometry. Apoptotic morphology was determined by hoechst33342 staining. The expression levels of related proteins of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) / protein kinase B (Akt) / mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway in Hep-G2 cells were evaluated by Western blot assay. **Result:** Jiawei Sijunzi decoction containing serum inhibited the proliferation and induced apoptosis of human hepatoma Hep-G2 cells in a dose-dependent manner. Cells were arrested in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase. Hoechst33342 staining results showed prominent morphological changes with chromatin condensation,

**[收稿日期]** 20160413(002)

**[基金项目]** 广东省自然科学基金项目(S2013010014796);广州市海珠区科普计划项目(2014HZKP-DS-2)

**[第一作者]** 施胜英, 硕士, 药师, 从事中药抗肿瘤药物的筛选及作用机制研究, Tel:18819312747, E-mail:564121475@qq.com

**[通讯作者]** \* 林敬明, 博士, 教授, 从事中草药有效成分的提取分离以及活性研究, Tel:13802500660, E-mail:linjm1231@163.com

fragmentation and formation of apoptotic bodies in dose-dependent manner. Western blot analysis showed that Jiawei Sijunzi decoction containing serum could inhibit phosphorylation of Akt, mTOR, ribosomal S6 kinase (S6), and eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4EBP1), up-regulate the expression levels of Bax, and down-regulate the expression levels of CyclinD<sub>1</sub>, Bcl-2. Jiawei Sijunzi decoction containing serum and PI3K/mTOR dual inhibitor VS-5584 had a synergism effect, and Jiawei Sijunzi decoction containing serum enhanced the inhibitory effects on phosphorylation of Akt and mTOR. **Conclusion:** Jiawei Sijunzi decoction containing serum could inhibit the proliferation of Hep-G2 cells, induce apoptosis and arrest Hep-G2 cells in G<sub>1</sub> phase. This inhibitory effect may be induced by blocking the PI3K/Akt/mTOR pathway.

[**Key words**] Jiawei Sijunzi decoction; containing serum; Hep-G2 cells; proliferation; apoptosis; phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) / protein kinase B (Akt) / mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway

原发性肝癌是指肝细胞或肝内胆管细胞发生的癌肿,是我国常见的恶性肿瘤之一,位居全球癌症相关死亡原因的第 3 位<sup>[1]</sup>。目前肝癌的治疗主要为手术切除、肝移植、局部消融、化学治疗栓塞、生物治疗及分子靶向治疗等,但这些方法的治疗效果欠佳,易复发,预后差。中医药治疗已成为肝癌辅助治疗的重要组成部分,中药在改善症状体征、减毒增效、预防复发、提高生存质量、延长生存期等方面具有独特的优势。中医学认为,肝癌乃脏腑气血亏虚、脾虚湿聚、痰凝血瘀,六淫邪毒入侵,邪凝毒结,致气、血、湿、瘀、毒互结而为肝积,本病在肝,而累及脾胃、胆等,以脏腑气血亏虚为本<sup>[2]</sup>。确立扶正祛邪为其治疗方法,强调祛邪为主,扶正固本为辅。益气健脾法为扶正祛邪法的一种,四君子汤是益气健脾的代表方。

四君子汤出自《太平惠民和剂局方》,由人参、白术、茯苓、甘草组成,是健脾益气的基础方,主治脾胃气虚之证。近年在肿瘤防治方面应用广泛,尤其是在肿瘤晚期、正气亏虚之时,具有“调补正气,扶正固本”的作用,是扶正祛邪的常用良方,临床上常用于消化道肿瘤的治疗,如肝癌、胃癌、结肠癌等<sup>[3]</sup>。石斛具有益胃生津、滋阴清热、补脾胃、利肝胆、抗肿瘤的功能<sup>[4-5]</sup>。半枝莲具有清热解毒、败毒抗癌、消肿散结、祛瘀止血的功效,常与其他中药联合治疗多种肿瘤<sup>[6]</sup>。本课题组前期研究发现,半枝莲提取物能够抑制 Hep-G2 和 QGY-7701 细胞增殖,促进细胞凋亡,阻滞细胞周期<sup>[7-8]</sup>,石斛与半枝莲能够提升四君子汤健脾益气、扶正祛邪和抗肿瘤的作用。研究表明磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)/雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路与肿瘤细胞增殖分化、凋亡、细胞周期过程、迁移、新陈代谢和血管生成密切相关,且处于异常活化状态<sup>[9]</sup>。因

此抑制该信号通路有可能成为肝癌靶点治疗和预防转移、复发的关键。本研究以四君子汤为基础,加味半枝莲和石斛组成加味四君子汤,从 PI3K/Akt/mTOR 信号通路角度探讨加味四君子汤含药血清对肝癌 Hep-G2 细胞增殖、凋亡和周期等的影响。

## 1 材料

**1.1 药物制备** 加味四君子汤方药组成:人参 9 g,白术 9 g,茯苓 9 g,炙甘草 6 g,半枝莲 60 g,石斛 9 g,以上药材由南方医科大学珠江医院药房提供。10 倍量加味四君子汤药材(人参 90 g,白术 90 g,茯苓 90 g,炙甘草 60 g,半枝莲 600 g,石斛 90 g)加入 10 倍量的 75% 乙醇浸渍过夜,回流提取 2 次,每次 2 h,合并提取液。再加入 10 倍量蒸馏水提取 1 次,合并 3 次提取液,过滤后 3 000 r·min<sup>-1</sup>离心 15 min 得上清液。60 ℃ 旋蒸浓缩为浸膏,含生药 2.0 g·mL<sup>-1</sup>,4 ℃ 储存备用。

**1.2 动物及细胞** 30 只 SPF 级 7 周龄 SD 大鼠,雌雄各半,体重(200 ± 20)g,购自南方医科大学,合格证号 SCXK(粤)2011-0015。随机分为空白血清组、加味四君子汤含药血清低、中、高剂量组、五氟尿嘧啶含药血清组。肝癌 Hep-G2 细胞由南方医科大学珠江医院药剂科周本杰老师惠赠。

**1.3 细胞培养** 肝癌 Hep-G2 细胞采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基培养于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中,置于 37 ℃ 5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中,隔天换液,倒置显微镜下观察细胞生长的状态,当细胞的汇合度达到 70% ~ 80% 时,进行消化传代或用于实验。

**1.4 药物与试剂** PI3K/mTOR 双重抑制剂 VS-5584(美国 Selleck 公司,批号 S7016);活细胞计数(CCK-8)试剂盒,Annexin V/碘化丙啶(PI)检测试剂盒(日本同仁化学研究所,批号分别为 CK04,AD02-05);Hoechst 33342 染色液(北京雷根生物技

术有限公司,批号 DA0013);胎牛血清,DMEM 培养基,0.25% 胰酶(美国 Gibco 公司,批号分别为 41Q2041K, S115419, 25300-054); Pan-Akt 抗体, p-Akt ( Ser473 ) 抗体, p-S6 ( Ser240/244 ) 抗体, p-4EBP1 ( Ser65 ), p-mTOR ( Ser2448 ), mTOR 抗体(美国 CST 公司,批号分别为#4691, #4060, #2215, #9451, #2971, #2972);细胞周期蛋白( CyclinD<sub>1</sub> ), B 淋巴细胞瘤-2( Bcl-2 ), Bcl-2 相关 X 蛋白( Bax ) 抗体(沈阳万类生物科技有限公司,批号分别为 WL01435a, WL01556, WL01637);甘油醛-3-磷酸脱氢酶( GAPDH ) 抗体(南京恩晶生物科技有限公司,批号 E12-052)。

**1.5 仪器** IX51-A21PH 型倒置相差显微镜, IX73-A12FL/PH 型倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司); Synergy H4 型酶标仪(美国 Bio Tek 公司), Microfuge22R 型高速低温离心机(美国贝克曼公司), FACSCanto 型流式细胞仪(美国 BD 公司)。

## 2 方法

**2.1 含药血清制备** 30 只 SD 大鼠,分 5 组,每组雌雄各半。根据“人和动物体表面积折算的等效剂量比率表”<sup>[10]</sup> 计算大鼠等效剂量为 10.17 g·kg<sup>-1</sup>, 1/2 剂量 5.08 g·kg<sup>-1</sup> 为低剂量组, 2 倍剂量 20.33 g·kg<sup>-1</sup> 为高剂量组,每天 ig 给药 2 次,中间间隔 4 h,另设空白血清组(ig 等体积生理盐水)和五氟尿嘧啶含药血清组(ip, 10.00 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)。各组均连续给药 3 d,取血前禁食 12 h,末次给药后 1 h,用 3% 戊巴比妥钠麻醉,在无菌条件下经腹主动脉取血,室温静置 3 h, 4 ℃, 3 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 分离含药血清。将同组大鼠含药血清混匀, 56 ℃ 水浴 30 min 灭活血清,用 0.22 μm 微孔过滤器过滤除菌, 15 mL 离心管分装, -20 ℃ 储存备用。

**2.2 CCK-8 检测细胞增殖** 取对数生长期 Hep-G2 细胞,调整密度为 3 × 10<sup>4</sup> 个/mL,接种于 96 孔板,每孔 100 μL。分为空白组(不加细胞)、空白血清组、四君子汤含药血清低、中、高剂量组、五氟尿嘧啶含药血清组,血清含量均为 10%,每组设 6 个复孔。细胞培养 24 h 后,加无血清培养基培养 24 h,再加入不同浓度的含药血清培养 12, 24, 48 h。于预定时间取出培养板,每孔加入 CCK-8 溶液 10 μL,继续培养 2 h,选择 450 nm 波长测定各孔吸光度 A,计算增殖抑制率。实验重复 3 次。

$$\text{增殖抑制率} = (A_{\text{加药组}} - A_{\text{空白血清组}}) / (A_{\text{空白组}} - A_{\text{空白血清组}}) \times 100\%$$

**2.3 流式细胞术检测 Hep-G2 细胞凋亡和周期**

取对数生长期 Hep-G2 细胞,调整密度为 1 × 10<sup>5</sup> 个/mL,接种于 6 孔板,每孔 1 mL,分为空白血清组、四君子汤含药血清低、中、高剂量组、五氟尿嘧啶含药血清组,血清含量均为 10%,培养 24 h 后,加无血清培养基培养 24 h,再加入不同浓度的含药血清培养 48 h,收集细胞进行 AnnexinV/PI 双染和 PI 单染,流式细胞仪检测细胞凋亡率和周期。

**2.4 hoechst33342 染色法观察 Hep-G2 细胞形态** 细胞培养和处理同 2.3 项,含药血清处理 48 h 后,细胞吸弃培养基,室温下 4% 的多聚甲醛固定 15 min。细胞用磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗,加入 0.5% Triton-X-100 反应 15 min,采用 PBS 漂洗细胞,避光加入 hoechst33342 染色液,室温作用 15 min,洗涤,荧光显微镜下观察细胞并拍照。

**2.5 免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达** 细胞培养和处理同 2.3 项,含药血清作用细胞 48 h 后,收集细胞,按细胞裂解液说明书提取细胞蛋白,测定蛋白浓度,蛋白上样,电泳,转膜,封闭,洗膜,一抗(1:1 000) 4 ℃ 封闭过夜,洗膜,二抗(1:5 000)室温封闭 1 h,洗膜,ECL 化学发光,拍照。以目的条带/GAPDH 表示蛋白相对表达。

**2.6 统计学方法** 采用 SPSS 19.0 统计软件,计量数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较方差齐时采用 LSD 检验,方差不齐时采用 Dunnett's T3 检验。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 加味四君子汤含药血清对肝癌 Hep-G2 细胞增殖的影响** 与空白血清组比较,含药血清作用于 Hep-G2 细胞 12, 24, 48 h 后,能呈浓度和时间依赖性地抑制细胞的增殖,细胞增殖活力受到了明显的抑制(P < 0.05, P < 0.01)。见表 1。

表 1 加味四君子汤含药血清对 Hep-G2 细胞增殖抑制率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Inhibitory effect of Jiawei Sijunzi decoction containing serum on proliferation of Hep-G2 cells( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	12 h	24 h	48 h
A	0	0	0
B	5.59 ± 1.55 <sup>1)</sup>	9.76 ± 3.01 <sup>1)</sup>	16.07 ± 4.21 <sup>2)</sup>
C	10.78 ± 1.39 <sup>1)</sup>	13.17 ± 1.78 <sup>2)</sup>	23.48 ± 2.13 <sup>2)</sup>
D	17.63 ± 2.42 <sup>2)</sup>	22.34 ± 3.95 <sup>2)</sup>	39.33 ± 2.88 <sup>2)</sup>
E	23.31 ± 2.13 <sup>2)</sup>	30.64 ± 1.21 <sup>2)</sup>	45.56 ± 3.26 <sup>2)</sup>

注:A. 空白血清组;B~D. 四君子汤含药血清低、中、高剂量组;E. 五氟尿嘧啶含药血清组;血清含量均为 10%;与空白血清组比较<sup>1)</sup>P < 0.05, <sup>2)</sup>P < 0.01(表 2, 图 1~3 同)。

**3.2 加味四君子汤含药血清对肝癌 Hep-G2 细胞凋亡及周期的影响** 含药血清作用肝癌 Hep-G2 细胞 48 h 后,与空白血清组比较,四君子汤含药血清中、高剂量组、五氟尿嘧啶含药血清组中 Hep-G2 细胞凋亡率显著上升 ( $P < 0.01$ )。随着含药血清浓度

的增加,与空白血清组比较,四君子汤含药血清中、高剂量组、五氟尿嘧啶含药血清组中  $G_1/G_0$  期的细胞比例明显增大,含药血清低、中、高剂量组、五氟尿嘧啶含药血清组中 S 期细胞逐渐减少 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 加味四君子汤含药血清对 Hep-G2 细胞凋亡率和周期分布比例的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	凋亡率	$G_0/G_1$	S	$G_2/M$
A	$7.10 \pm 1.56$	$51.06 \pm 1.25$	$39.65 \pm 1.49$	$9.29 \pm 1.06$
B	$9.73 \pm 1.07$	$53.33 \pm 2.07$	$37.10 \pm 1.48^{1)}$	$9.57 \pm 0.61$
C	$18.37 \pm 2.60^{2)}$	$57.66 \pm 2.11^{2)}$	$34.45 \pm 0.62^{2)}$	$7.89 \pm 1.81$
D	$29.02 \pm 3.14^{2)}$	$60.20 \pm 3.15^{2)}$	$30.26 \pm 1.24^{2)}$	$9.54 \pm 2.32$
E	$32.60 \pm 2.08^{2)}$	$62.03 \pm 2.25^{2)}$	$28.30 \pm 1.87^{2)}$	$9.67 \pm 0.52$

**3.3 加味四君子汤含药血清对 Hep-G2 细胞形态的影响** hoechst33342 染色后,荧光显微镜下可见经含药血清处理的细胞出现核固缩、碎裂、溶解等现象,而且含药血清浓度的越大越明显。见图 1。

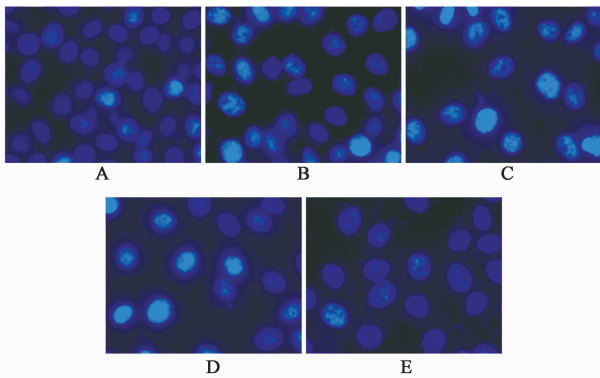


图 1 加味四君子汤含药血清对 Hep-G2 细胞形态的影响 (hoechst33342,  $\times 400$ )

Fig. 1 Effect of Jiawei Sijunzi decoction containing serum on morphology of Hep-G2 cells (hoechst33342,  $\times 400$ )

**3.4 加味四君子汤含药血清对 Hep-G2 细胞 Akt, mTOR, S6, 4EBP1 磷酸化的影响** 加味四君子汤含药血清处理 Hep-G2 细胞 48 h 后,与空白血清组比较,含药血清中、高剂量组中细胞 Akt, mTOR, S6, 4EBP1 的磷酸化表达水平下降 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),且随着浓度的增加,含药血清抑制磷酸化的作用越明显。见图 2。

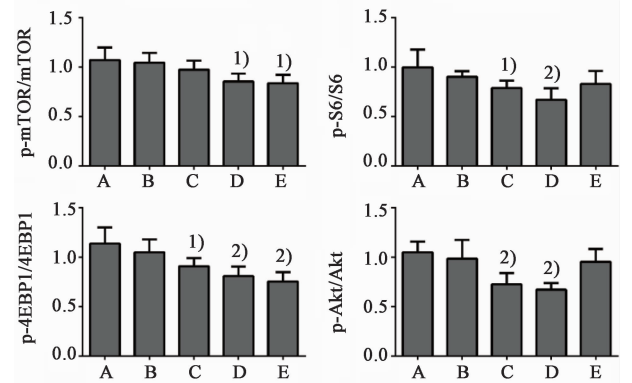
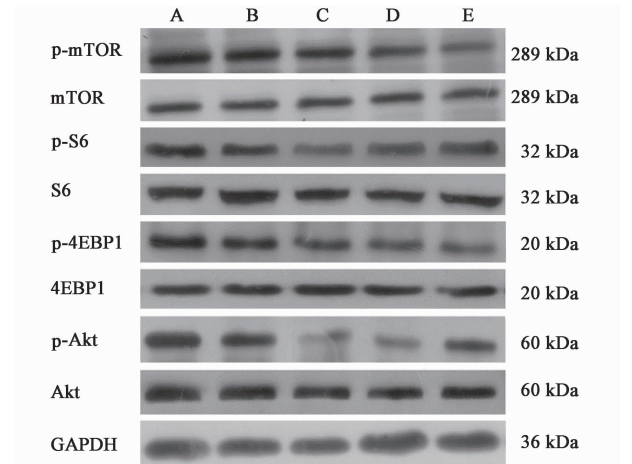


图 2 加味四君子汤含药血清对 Hep-G2 细胞 Akt, mTOR, S6, 4EBP1 磷酸化的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 2 Effect of Jiawei Sijunzi decoction containing serum on protein expressions of Akt, mTOR, S6 and 4EBP1 in Hep-G2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

**3.5 加味四君子汤含药血清对 Hep-G2 细胞中 Akt 下游底物 CyclinD<sub>1</sub>, Bax, Bcl-2 蛋白表达的影响** 与空白血清组比较,加味四君子汤含药血清中、高剂量组和五氟尿嘧啶含药血清组均能增加与凋亡相关的 Bax 蛋白表达,降低 CyclinD<sub>1</sub>, Bcl-2 蛋白表达 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见图 3。

**3.6 加味四君子汤含药血清与 VS-5584 联合作用对 Hep-G2 细胞中 Akt, mTOR 磷酸化的影响** 加味四君子汤含药血清中剂量组与  $300 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 PI3K/mTOR 双重抑制剂 VS-5584 联合作用于 Hep-G2 细胞 48 h 后,细胞的 Akt 和 mTOR 磷酸化水平

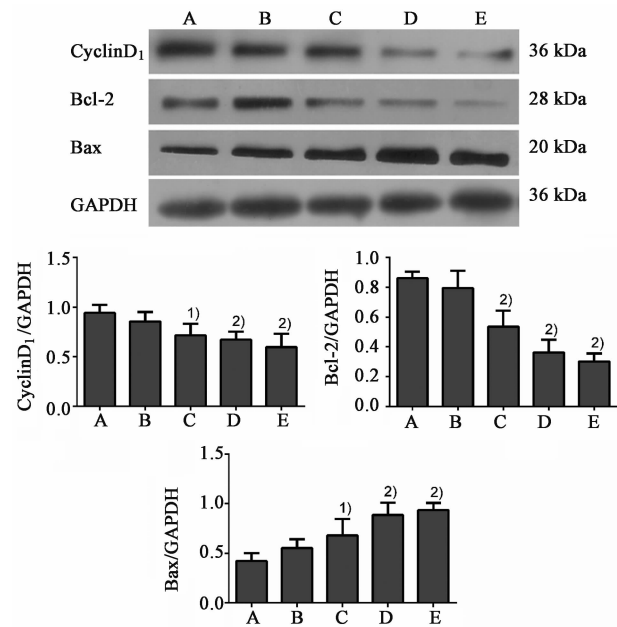


图 3 加味四君子汤含药血清对 Hep-G2 细胞 CyclinD<sub>1</sub>, Bax, Bcl-2 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 Effect of Jiawei Sijunzi decoction containing serum on protein expression levels of CyclinD<sub>1</sub>, Bax, Bcl-2 in Hep-G2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

均低于两者单用或空白血清组 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。加味四君子汤含药血清能增强 PI3K/mTOR 双重抑制剂 VS-5584 对 Hep-G2 细胞中 Akt, mTOR 磷酸化的抑制作用。见图 4。

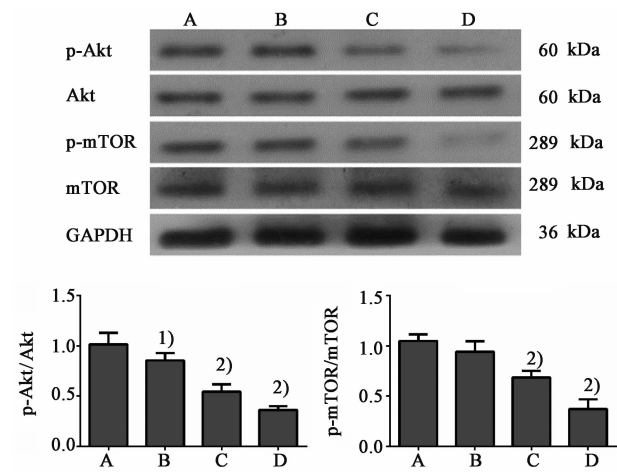


图 4 加味四君子汤含药血清联合 PI3K/mTOR 双重抑制剂 VS-5584 对 Hep-G2 细胞中 Akt, mTOR 磷酸化的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Effect of Jiawei Sijunzi decoction containing serum combined with PI3K/mTOR dual inhibitor VS-5584 on phosphorylation of Akt and mTOR of Hep-G2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

#### 4 讨论

四君子汤出自宋代《太平惠民和剂局方》，全方不偏不盛，不热不燥，适度施力，取了“君子致中和”的古意。现代研究发现，四君子汤具有广泛的药理作用，特别是其作为辅助药物治疗消化道恶性肿瘤方面展现了独特的优势<sup>[11]</sup>。以该方为主治疗消化道中晚期恶性肿瘤，不仅能使其他治疗措施顺利进行，而且能增强机体的免疫力，改善症状，延长生存期，提高生活质量<sup>[12]</sup>。基础研究表明加味四君子汤可将小鼠移植性小鼠肉瘤 S180 的肿瘤细胞周期阻滞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期，继而导致受阻滞的肿瘤细胞发生凋亡<sup>[13]</sup>。不同剂量四君子汤含药血清对人胃癌细胞系 SGC-7901 和肝癌细胞系 SMMC-7721 的细胞增殖均有显著的抑制作用，呈剂量依赖性<sup>[14-15]</sup>。四君子汤抗肿瘤的作用机制体现在诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞生长、调节机体免疫功能、增效减毒、增强机体抗氧化能力及延长荷瘤机体生存期等方面<sup>[16-18]</sup>。石斛和半枝莲均具有抗肿瘤作用，本课题组前期研究也发现半枝莲能抑制肝癌细胞增殖、诱导其凋亡和周期阻滞<sup>[6-8]</sup>，所以四君子汤加用石斛和半枝莲有助益气健脾，增强抗肿瘤之功。

PI3K 是脂激酶家族成员之一，其介导的信号通路在细胞生长、增殖、存活、凋亡和蛋白质的转录、翻译及血管生成中发挥重要的调控作用<sup>[19-21]</sup>。PI3K 通路于肿瘤的发生、发展、转归有密切关系，该通路已成为近年来广泛研究的药物靶点之一。PI3K/Akt/mTOR 信号通路在肝癌中常异常活化，与肝癌的发生、发展、恶化、预后密切相关<sup>[22]</sup>。

本实验在四君子汤的基础上添加石斛和半枝莲组成加味四君子汤，应用加味四君子汤含药血清处理体外培养肝癌细胞 Hep-G2，发现加味四君子汤含药血清高、中剂量组和空白血清组比较，其凋亡率和细胞在 S 期，G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期分布上均具有统计学差异。加味四君子汤含药血清能抑制肝癌 Hep-G2 细胞 Akt, mTOR, S6, 4EBP1 的磷酸化，能增加 Bax 蛋白表达，降低 Bcl-2, CyclinD<sub>1</sub> 蛋白表达。CyclinD<sub>1</sub>, Bax, Bcl-2 均为 Akt 的下游底物，Bax 和 Bcl-2 与细胞凋亡有关，CyclinD<sub>1</sub> 调控着细胞的周期。加味四君子汤含药血清与 PI3K/mTOR 双重抑制剂 VS-5584 联合使用具有协同作用，含药血清能增强 PI3K/mTOR 双重抑制剂 VS-5584 对 Hep-G2 细胞中 PI3K/Akt/mTOR 信号通路靶点 Akt 和 mTOR 磷酸化的抑制作用。实验结果提示，加味四君子汤含药血清可能是通过影响肝癌 Hep-G2 细胞的 PI3K/Akt/mTOR 信

号通路,抑制其关键靶点 Akt, mTOR, S6, 4EBP1 的磷酸化,进而上调 Bax 的表达,下调 Bcl-2, CyclinD<sub>1</sub> 的表达,从而诱导细胞凋亡,阻滞细胞周期,进而抑制细胞增殖。

综上所述,加味四君子汤含药血清可以抑制肝癌 Hep-G2 细胞增殖,诱导其凋亡,阻滞其周期于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期,这可能与加味四君子汤含药血清阻断肝癌 Hep-G2 细胞的 PI3K/Akt/mTOR 信号通路传导有关。

[参考文献]

[1] Vibert E, Ishizawa T. Hepatocellular carcinoma: Western and Eastern surgeons' points of view[J]. J Visc Surg, 2012, 149(5): e302-e306.

[2] 吕萍,沈丹,牟重临. 从脾虚夹痰瘀毒论治中晚期肝癌探讨[J]. 浙江中医杂志, 2012, 47(12): 859-860.

[3] 吕苑. 四君子汤的药理研究和临床应用[J]. 中医研究, 2012, 25(1): 76-78.

[4] 黄静,李胜立,赵宏伟,等. 霍山石斛多糖对四氯化碳致急性肝损伤小鼠的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(4): 528-532.

[5] 鲍丽娟,王军辉,罗建平. 4种石斛水提物对人宫颈癌 HeLaS3 细胞和肝癌 HepG2 细胞的抑制作用[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(36): 15968-15970.

[6] 林敬明,刘煜,罗荣城. 半枝莲的化学成分及其抗肿瘤作用的研究现状[J]. 中药材, 2006, 29(4): 407-410.

[7] 林敬明,刘煜,罗荣城. 半枝莲提取物抗人肝癌 Hep-G2 细胞增殖及其机制研究[J]. 南方医科大学学报, 2006, 26(7): 975-977.

[8] 林敬明,刘煜,罗荣城. 半枝莲抑制人肝癌 QGY-7701 细胞增殖研究[J]. 南方医科大学学报, 2006, 26(5): 591-593.

[9] 孙晓杰,黄常志. PI3K-Akt 信号通路与肿瘤[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(3): 306-311.

[10] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2006: 29-30.

[11] 刘宏杰,陈建杰. 黄芪四君子汤含药血清对人肝癌细胞增殖、迁移和凋亡的影响[J]. 山东医药, 2014, 54(26): 22-24.

[12] 贾建光,马莉,李靖,等. 四君子汤及拆方含药血清对胃癌细胞株侧群细胞的生长抑制研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2013, 18(5): 513-518.

[13] 王玉荣,王泽时. 加味四君子汤诱导小鼠肿瘤细胞凋亡的实验研究[J]. 山西中医学院学报, 2004, 5(1): 16-18.

[14] 陶正鹏,冯秋珍,徐建民. 四君子汤含药血清抑癌作用的实验研究[J]. 湖北中医杂志, 2006, 28(9): 9-10.

[15] 李彬,宋明全. 四君子汤含药血清对 SGC-7901 细胞株凋亡及其相关蛋白表达的影响[J]. 山东中医杂志, 2008, 27(4): 262-265.

[16] 郑玲英,赵银鹰. 四君子汤抗肿瘤药理研究[J]. 实用中西医结合临床, 2010, 10(6): 93-94.

[17] 周昕欣,王彩霞. 加味四君子汤含药血清对 B16 恶性黑色素瘤细胞侵袭和 MMP2、MMP9 表达的影响[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(1): 108-110.

[18] 周昕欣,王彩霞. 加味四君子汤含药血清对 B16 恶性黑色素瘤细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(10): 178-181.

[19] 章尤权,王清泰,陈旭征,等. 白花蛇舌草对人肝癌 HepG2 细胞裸鼠皮下移植瘤 PI3K/Akt 信号通路的影响[J]. 肿瘤基础与临床, 2015, 28(4): 277-280.

[20] 谢玮蓉,张刚. PI3K/Akt/Bcl-2 凋亡信号传导通路的研究进展[J]. 中国当代医药, 2015, 22(30): 22-25.

[21] 杨柳,李昕. Akt/mTOR 信号通路中 p70S6K1、4EBPs 在促进肿瘤发生作用中的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2016, 24(5): 847-850.

[22] 武博荣,金萌,王卫真,等. PI3K/Akt 信号通路在肿瘤调控中的免疫作用及分子机制[J]. 临床合理用药杂志, 2013, 6(6): 135-137.

[责任编辑 张丰丰]