

## 化瘀解毒方对胃癌细胞凋亡的作用及机制

魏征<sup>1</sup>, 张爱华<sup>1</sup>, 李亚峰<sup>1</sup>, 梁瑞峰<sup>1</sup>, 崔伟峰<sup>1</sup>, 王艳春<sup>2</sup>, 张俊萍<sup>1\*</sup>  
(1. 河南省中医药研究院, 郑州 450004; 2. 河南省人民医院, 郑州 450000)

**[摘要]** 目的:观察化瘀解毒方(Huayu Jiedu recipe, HYJDR)对胃癌细胞凋亡的影响,探讨HYJDR对胃癌细胞凋亡的作用机制,为HYJDR的临床运用提供实验依据。方法:运用噻唑蓝(thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT)比色法检测HYJDR(5, 10, 15, 20, 25, 30 g·L<sup>-1</sup>)对胃癌SGC-7901细胞活力影响,测定HYJDR对SGC-7901细胞的半数抑制浓度(median inhibition concentration, IC<sub>50</sub>)。利用碘化丙啶(propidium iodide, PI)和hoechst双荧光染色检测HYJDR对胃癌SGC-7901细胞的凋亡影响情况。蛋白免疫印迹法(Western blot)检测HYJDR对胃癌凋亡相关蛋白表达情况的影响。实时荧光聚合酶链反应(Real-time-polymerase chain reaction, Real-time PCR)检测HYJDR对胃癌细胞凋亡相关蛋白信使RNA(mRNA)表达水平的影响。结果:与空白组比较, HYJDR质量浓度>10 g·L<sup>-1</sup>时可以明显抑制胃癌细胞的增殖活力,随着HYJDR浓度的增加,细胞活力下降明显(P<0.05),呈明显的浓度依赖性。HYJDR可以促进胃癌细胞的凋亡,随着HYJDR浓度的增加,细胞的凋亡逐渐增多。与空白组比较, HYJDR可以明显抑制胃癌细胞凋亡相关蛋白B淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)表达(P<0.05),同时提高Bcl-2细胞凋亡抵抗蛋白(Bcl-2 antagonist of cell death, Bad)和Bcl-2相关蛋白X(Bcl-2-associated X, Bax)等促凋亡蛋白表达(P<0.05)。PCR结果显示,与空白组比较, HYJDR(5, 10 g·L<sup>-1</sup>)组可以有效抑制胃癌细胞中Bcl-2 mRNA表达(P<0.05), HYJDR各组促进Bad mRNA表达(P<0.05)。结论:HYJDR可以明显促进胃癌细胞SGC-7901的凋亡,其作用很可能是通过提高Bad mRNA表达,抑制Bcl-2蛋白表达来实现的。

**[关键词]** 化瘀解毒方; 胃癌; 凋亡; 机制

**[中图分类号]** R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)21-0062-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20201927

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200723.1137.017.html>

**[网络出版日期]** 2020-7-23 11:42

### Study on Effect and Mechanism of Huayu Jiedu Recipe on Apoptosis of Gastric Cancer Cells

WEI Zheng<sup>1</sup>, ZHANG Ai-hua<sup>1</sup>, LI Ya-feng<sup>1</sup>, LIANG Rui-feng<sup>1</sup>, CUI Wei-feng<sup>1</sup>,  
WANG Yan-chun<sup>2</sup>, ZHANG Jun-ping<sup>1\*</sup>

(1. Henan Academy of Chinese Medicine, Zhengzhou 450004, China;

2. Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of Huayu Jiedu recipe (HYJDR) on apoptosis of gastric cancer cells, explore the mechanism of HYJDR on apoptosis of gastric cancer cells and provide experimental basis for clinical application of HYJDR. **Method:** Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) method was used to detect the effect of HYJDR (5, 10, 15, 20, 25, 30 g·L<sup>-1</sup>) on the activity of SGC-7901 cells and the median inhibition concentration (IC<sub>50</sub>) of HYJDR on SGC-7901 cells. Propidium iodide (PI) and Hoechst double fluorescence staining were used to detect the effect of HYJDR on the apoptosis of gastric cancer SGC-7901 cells. Western blot was used to detect the effect of HYJDR on the expression of apoptosis related proteins in gastric

**[收稿日期]** 20191105(020)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81873290);河南省中医药科学研究专项(2017ZY1009);河南省重点研发与推广专项(182102311164);河南省中医管理局拔尖人才项目(豫中医科教[2018]35号);河南省中医管理局青苗人才项目(豫中医科教[2018]16号)

**[第一作者]** 魏征, 博士, 副主任医师, 从事中西医结合肿瘤学临床与基础研究, E-mail: questwz@163.com

**[通信作者]** \*张俊萍, 硕士, 副主任医师, 从事中西医结合肿瘤学临床与基础研究, E-mail: zhangjunping888@163.com

cancer cells. Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to detect the effect of HYJDR on the expression of apoptosis related protein mRNA in gastric cancer cells. **Result:** As compared with blank group, HYJDR ( $>10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) can significantly inhibit the proliferation of gastric cancer cells. With the increase of the concentration of HYJDR, the cell viability decreased significantly obviously in a concentration-dependent manner ( $P<0.05$ ). HYJDR can significantly promote the apoptosis of gastric cancer cells. With the increase of the concentration of HYJDR, the apoptosis of gastric cancer cells gradually increased. As compared with blank group, HYJDR can obviously inhibit the expression of apoptosis-related B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) ( $P<0.05$ ), and increase the expression of apoptosis-promoting proteins such as Bcl-2 antagonist of cell death (Bad) and Bcl-2-associated X (Bax) ( $P<0.05$ ). Real-time PCR results showed that as compared with blank group, HYJDR ( $5, 10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) could effectively inhibit the expression of Bcl-2 protein mRNA in gastric cancer cells ( $P<0.05$ ), and all HYJDR groups could promote the expression level of Bad mRNA ( $P<0.05$ ). **Conclusions:** HYJDR can obviously promote the apoptosis of SGC-7901, and its effect is probably achieved by increasing the expression of Bad mRNA and inhibiting the expression of Bcl-2 protein.

[Key words] Huayu Jiedu recipe; gastric cancer; apoptosis; mechanism

胃癌是世界上与癌症相关的主要死亡原因之一,到2020年将威胁近1 200万人的生命<sup>[1-3]</sup>。根据2015年中国癌症统计数据,胃癌在中国的发病率和死亡率均居高不下,仅次于肺癌<sup>[4]</sup>。由于经济状况和医疗设施落后于城市地区,中国农村地区胃癌的发病率和死亡率大大高于城市地区<sup>[4]</sup>。大多数肿瘤侵袭和转移病例只有在患者住院时才能确诊,许多患者在就诊时已处于中晚期<sup>[5]</sup>。化疗和放疗是本病最常见的治疗方法,在大多数中亚国家传统的民间药物治疗也是一种不可分割的方法<sup>[6-8]</sup>。因此,寻找和开发新型、廉价、有效的抗肿瘤中药候选药物具有重要意义。化瘀解毒方(HYJDR)是在临床经过长期实践选定的有效经验方,临床使用结果显示了其较好的抗肿瘤活性及应用前景。另外,前期细胞实验研究发现, HYJDR能有效抑制胃癌,肺癌等细胞的增殖、侵袭和转移,同时动物实验也给出了相同的实验结果<sup>[9]</sup>。通过促凋亡是杀死肿瘤细胞的主要途径之一, HYJDR能否促进胃癌细胞的凋亡,其机制是什么都尚不清楚。因此,探明HYJDR是如何促进胃癌细胞凋亡,从而达到抑制肿瘤生长乃至杀死肿瘤的作用及分子机制,对于寻找和开发新的抗肿瘤中药意义重大。本实验在课题组前期研究基础上,将进一步对HYJDR在胃癌细胞凋亡过程中的作用进行研究。阐明HYJDR促进胃癌凋亡以及在此过程中的作用机制,可以为HYJDR在临床应用提供一定的实验基础和依据。

## 1 材料

**1.1 试剂及抗体** 1640培养基(Hyclone公司,批号SH30809.01);胎牛血清(FBS, Gibco公司,批号

10270106);核酸提取裂解液,聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)定量试剂盒,赫克斯特33342溶液(Hoechst 33342 Solution),蛋白免疫印迹法(Western blot)发光液,辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔和羊抗小鼠二抗(Thermo公司,批号分别为15596026, 23227, 62249, 34580, 32460, 31430);4倍蛋白上样缓冲液( $4\times$  Loading buffer, Bio-Rad公司,批号1610747);胰蛋白酶消化液,细胞裂解液和噻唑蓝(MTT)粉剂(碧云天公司,批号分别为C0201, P0013B, ST316); $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin), B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2), B淋巴细胞瘤-2细胞凋亡抵抗蛋白(Bad)和B淋巴细胞瘤-2相关X蛋白(Bax)抗体(Cell Signaling公司,批号分别为3700S, 15071S, 9268S, 2774S);碘化丙啶(PI)染液(Sigma公司,批号P4170);全基因反转录试剂盒(TaKaRa公司,批号R036A-1);实时荧光定量聚合酶链反应(Real-time PCR)混合酶反应试剂盒(罗氏公司,批号32597600)。

**1.2 细胞** 人胃癌SGC-7901细胞株购自中国科学院上海细胞库(编号TCHu 46),课题相关实验通过河南省中医药研究院伦理委员会审查通过(伦理编号HNZYJYJ2018-0012)。

**1.3 HYJDR方组成及溶液制备** 为了保证药效的一致性,药物来源使用配方颗粒剂,确保指纹图谱的一致性。化瘀解毒方:全蝎3 g,天龙3 g,三七粉3 g,半枝莲15 g。将配方颗粒剂全蝎、天龙、三七粉、半枝莲(广东一方制药有限公司,批号分别为6125422, 6117692, 7050862, 5093142)换算成等效生药量配伍比例后,溶于不含血清的1640培养基

240 mL中。用孔径为0.22微米的无菌滤膜过滤除菌,配置成含生药量为 $100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的母液待用。

**1.4 仪器** ERIES 8000 WJ型恒温培养箱(美国Thermo公司);EnSpire型全自动酶标仪(美国PerkinElmer公司);Mini X25型蛋白质凝胶垂直电泳仪,Universar Hood III型蛋白凝胶分析系统(美国Bio-Rad公司);X72型倒置荧光显微镜(日本奥林巴斯公司);LightCycler 96型实时荧光定量PCR仪(瑞士罗氏公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** 人胃癌细胞株SGC-7901细胞用完全培养基(含有10% FBS,1%青链霉素的1640培养基)贴壁培养,培养皿置于恒温细胞培养箱中。细胞培养箱条件设置为( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,5% $\text{CO}_2$ )。细胞生长到80%~90%,1:4传代培养,待细胞生长到75%左右时,用胰蛋白酶消化细胞,重悬成单细胞悬液备用。

**2.2 细胞活力测定** 取对数生长期胃癌SGC-7901细胞,用胰蛋白酶消化细胞,重悬成单细胞悬液使细胞密度约为 $5\times 10^4$ 个/L,用移液器将重悬后的细胞均匀地接种到96孔板中,每孔加 $100\text{ }\mu\text{L}$ 。继续在培养箱中培育过夜。待细胞贴壁后将板上的细胞分为空白组(等量的空白1640培养液)和(5,10,15,20,25,30 $\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )的HYJDR组。按不同分组对每孔进行相应的加药处理。96孔板继续孵育24 h,每孔加入MTT  $20\text{ }\mu\text{L}$ , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温继续孵育4 h,轻轻移除上清,每孔立刻加入二甲基亚砜(DMSO) $150\text{ }\mu\text{L}$ 。全自动酶标仪检测,设置波长为490 nm,读取吸光度 $A$ ,计算出每组抑制率和24 h的半数抑制浓度。

**2.3 Hoechst和PI双荧光染色** 细胞接种到6孔板,培养箱孵育过夜,待细胞贴壁生长以后进行相应的处理。空白组加入等量空白1640培养液,HYJDR组分别加入含有HYJDR(2.5,5,10 $\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )的培养基。继续培养24 h,利用PI联合Hoechst双荧光染色,直接向培养板中加入Hoechst,终质量浓度 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,室温避光孵育5~10 min。继续加入PI染色液,终质量浓度为 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,室温避光孵育3~5 min,荧光显微镜下观察,拍照。

**2.4 细胞总蛋白提取** 细胞接种与培养同2.3项,培养24 h,去除培养基,磷酸缓冲液(PBS)轻轻洗2遍,每孔加入裂解液 $100\text{ }\mu\text{L}$ 。冰上裂解20 min,用细胞刮刮下细胞,转移到1.5 mL指型管。 $12\ 000\text{ rmin}^{-1}$ 离心15 min取上清,进行蛋白质浓度测定。

**2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测凋亡相关蛋白** 根据总蛋白的浓度,用PBS对蛋白进行浓度

平衡,然后加入 $4\times$  loading buffer充分混匀。将蛋白在热浴锅上进行加热变性。变性后的蛋白在10%聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)上进行电泳,电泳90 min,将SDS-PAGE胶中的蛋白电转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,转膜,取下PVDF膜,用5%脱脂奶粉常温封闭2 h,TBST溶液洗3次,一抗(Bcl-2,Bad,Bax 1:1 000) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。然后用洗膜缓冲溶液(TBST)洗3次,二抗(1:1 000)室温孵育2 h。将PVDF膜加上化学发光液后,利用蛋白质凝胶成像系统拍照并分析。

**2.6 RNA提取** 细胞接种与培养同2.3项,培养24 h,每孔加入1 mL裂解液,室温放置5 min。 $12\ 000\text{ rmin}^{-1}$ 离心5 min,去上清。每管加入三氯甲烷 $200\text{ }\mu\text{L}$ ,充分振荡混匀后静置15 min。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $12\ 000\text{ rmin}^{-1}$ 离心15 min。吸取上层水相至另一离心管中,加入异丙醇0.5 mL充分混匀,静置 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $12\ 000\text{ rmin}^{-1}$ 离心10 min,弃上清,沉淀即为RNA。乙醇洗涤并悬浮沉淀。离心,弃上清,室温晾干。去离子水溶解备用。

**2.7 Real-time PCR检测凋亡相关蛋白mRNA表达** 用提取好各组RNA,反转录为cDNA,备用。Bad,Bcl-2,Bax和 $\beta$ -actin引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。Bad(249 bp):上游5'-CCCAGAGTTTGAGCCGAGTG-3',下游5'-CCCATCCCTTCGTCGTCCT-3'。Bcl-2(88 bp):上游5'-TTGCCAGCCGGAACCTATG-3',下游5'-CGAAGGCGACCAGCAATGATA-3'。Bax(155 bp):上游5'-CCCAGAGAGGTCTTTTTCCGAG-3',下游5'-CCAGCCCATGATGGTTCTGAT-3'。 $\beta$ -actin(250 bp):上游5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3',下游5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'。PCR反应条件:预变性 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  6 min;解链 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  10 s, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  60 s, $97\text{ }^{\circ}\text{C}$  1 s;扩增 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  10 s,Bcl-2,Bad,Bax( $62\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), $\beta$ -actin( $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ )10 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  10 s,40个循环。最终用获得的 $C_t$ 并计算 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值进行计算分析。

**2.8 统计学分析** 所有实验数据用SPSS 19.0软件进行分析,计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,单个比较采用 $t$ 检验,多组数据差异比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 HYJDR对细胞增殖的影响** 空白组人胃癌SGC-7901细胞生长状态良好,呈现自然分裂增殖状态。与空白组细胞比较,经不同浓度HYJDR分别处理24 h,与空白组比较,质量浓度>

10 g·L<sup>-1</sup> HYJDR 处理 SGC-7901 细胞的增殖数量明显减少 ( $P < 0.05$ ), 说明细胞的活力在下降; HYJDR 质量浓度  $< 5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时对细胞的增殖影响差异无统计学意义。随着 HYJDR 浓度的增加, SGC-7901 细胞的抑制率在不断增强。见表 1。HYJDR  $> 10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时对胃癌细胞 SGC-7901 具有明显的抑制作用。同时计算出 HYJDR 对胃癌 SGC-7901 细胞的 24 h 半数抑制浓度为  $11.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。为排除药物细胞毒作用对实验的影响, 后续实验选用质量浓度 2.5, 5, 10 g·L<sup>-1</sup> HYJDR 作用胃癌细胞 24 h 做进一步研究。

**3.2 HYJDR 对胃癌细胞凋亡的影响** 为了排除细胞生长过程中自然凋亡对实验的影响, 以空白组细胞生长状态作为对照, 只计数健康存活细胞。与空白组比较, HYJDR 处理组健康存活的细胞数量明显减少 ( $P < 0.05$ )。且随着药物浓度的增高, 细胞的数

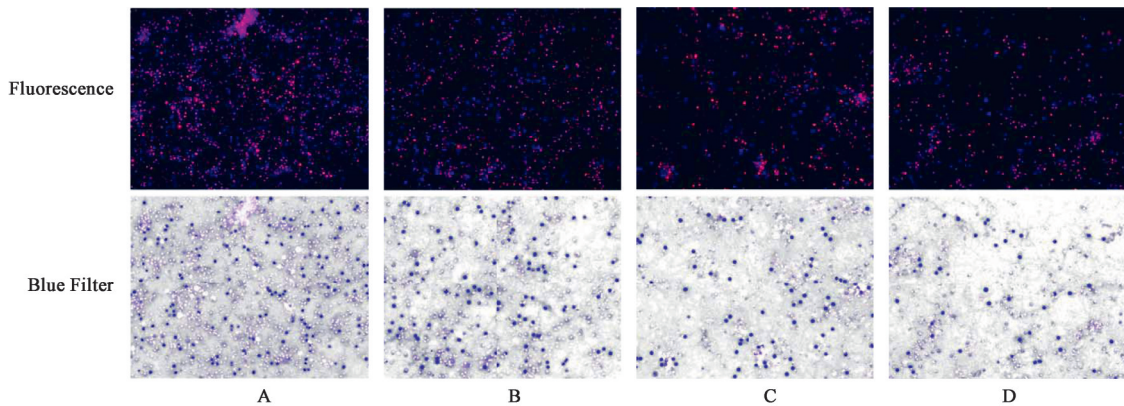
表 1 HYJDR 对 SGC-7901 细胞生长抑制作用的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 1 Inhibitory effect of HYJDR on growth of SGC-7901 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	抑制率/%
空白	-	0
HYJDR	5	8.886±2.668
	10	23.35±3.046 <sup>1)</sup>
	15	69.27±0.392 <sup>1)</sup>
	20	87.28±0.766 <sup>1)</sup>
	25	95.47±0.427 <sup>1)</sup>
	30	98.51±0.460 <sup>1)</sup>

注: 与空白组比较 <sup>1)</sup>  $P < 0.05$  (表 2, 3 同)。

量减少呈一定的正相关性, 结果说明, HYJDR 可以显著促进胃癌细胞的凋亡, 并呈一定的浓度依赖性。见图 1。



A. 空白组; B~D. HYJDR (2.5, 5, 10 g·L<sup>-1</sup>) 组 (图 2 同)

图 1 HYJDR 对胃癌细胞凋亡的影响 ( $\times 50$ )

Fig. 1 Effect of HYJDR on apoptosis of gastric cancer cells ( $\times 50$ )

**3.3 HYJDR 对胃癌凋亡相关蛋白的影响** 与空白组比较, HYJDR 各组 Bad, Bax 蛋白表达明显增高 ( $P < 0.05$ ), Bcl-2 蛋白表达明显降低 ( $P < 0.05$ ), 说明 HYJDR 可以显著促进胃癌细胞的凋亡, 而且具有明显浓度相关性。见图 2, 表 2。

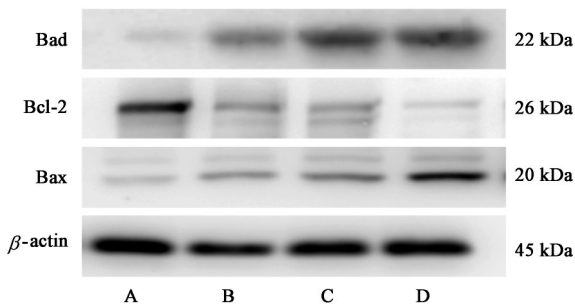


图 2 HYJDR 对胃癌细胞凋亡相关蛋白的影响

Fig. 2 Effect of HYJDR on apoptosis-related proteins in gastric cancer cells

**3.4 HYJDR 对胃癌凋亡相关 mRNA 的影响** 与空白组比较, HYJDR 各组胃癌细胞中 Bad mRNA 表达水平明显增高 ( $P < 0.05$ ), HYJDR (5, 10 g·L<sup>-1</sup>) 组 Bcl-2 mRNA 表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ )。说明 HYJDR 能通过调控凋亡相关蛋白 Bcl-2, Bad mRNA 水平来促进胃癌细胞的凋亡。见表 3。

#### 4 讨论

中医药被誉为“全人类的瑰宝”<sup>[10]</sup>, 随着科学技术的发展, 从中医学中逐渐发现了许多有价值的“宝藏”<sup>[11-12]</sup>。中草药产品在我国已作为抗肿瘤药物使用数千年, 一些中药具有抗癌特性, 且没有副作用<sup>[13]</sup>。中医药已成为抗肿瘤药物研究的热点和候选物质的来源。一种理想的抗癌药物应该可以引起癌细胞的死亡<sup>[14]</sup>。

本实验研究发现, HYJDR 可增加 SGC-7901 细

表2 HYJDR对胃癌细胞凋亡相关蛋白的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 2 Effect of HYJDR on apoptosis-related proteins in gastric cancer cells( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	Bad/ $\beta$ -actin	Bcl-2/ $\beta$ -actin	Bax/ $\beta$ -actin
空白	-	1.000±0.054	1.000±0.032	1.000±0.061
HYJDR	2.5	2.367±0.404 <sup>1)</sup>	0.467±0.058 <sup>1)</sup>	1.430±0.157 <sup>1)</sup>
	5	3.933±0.252 <sup>1)</sup>	0.390±0.036 <sup>1)</sup>	2.160±0.216 <sup>1)</sup>
	10	4.467±0.451 <sup>1)</sup>	0.220±0.036 <sup>1)</sup>	4.000±0.436 <sup>1)</sup>

表3 HYJDR对胃癌细胞凋亡相关mRNA的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of HYJDR on apoptosis-related mRNA in gastric cancer cells( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	Bad	Bcl-2	Bax
空白	-	1.000±0.100	1.000 0±0.087	1.000±0.200
HYJDR	2.5	2.163±0.280 <sup>1)</sup>	0.933 3±0.057	1.017±0.204
	5	2.840±0.180 <sup>1)</sup>	0.813 3±0.035 <sup>1)</sup>	1.017±0.197
	10	3.287±0.284 <sup>1)</sup>	0.720 0±0.072 <sup>1)</sup>	1.141±0.337

细胞的凋亡。MTT比色法显示HYJDR对胃癌细胞有浓度依赖性的生长抑制作用。结果进一步表明HYJDR浓度的增加,活细胞数减少,凋亡细胞数增加。表明HYJDR的抗肿瘤作用主要是通过促进细胞凋亡来实现的。已知肿瘤细胞凋亡主要涉及细胞表面死亡受体介导和线粒体凋亡途径<sup>[15-17]</sup>。因此,本研究推测HYJDR的促凋亡作用可能是通过线粒体途径介导的。为了进一步阐明HYJDR促进细胞凋亡的分子机制,本研究检测了Bcl-2家族的凋亡相关蛋白(Bad,Bcl-2和Bax)。Bcl-2是线粒体相关调控蛋白,可以抑制细胞凋亡,Bad和Bax是诱导细胞凋亡的蛋白。Western blot结果分析显示HYJDR抑制Bcl-2蛋白表达,上调Bad和Bax蛋白表达,促进细胞凋亡。这些数据共同表明HYJDR可能是激活了线粒体介导的凋亡途径。这一结论与MTT比色法,Hoechst和PI检测结果完全一致。与众多研究结果相似,这些数据表明,大部分中药天然产物是通过线粒体途径诱导细胞凋亡的<sup>[18-19]</sup>。PCR结果发现HYJDR对Bad mRNA具有明显的增加表达作用,对于Bcl-2 mRNA有明显的抑制作用。Bad蛋白表达可以直接抑制Bcl-2蛋白表达,而HYJDR可以直接增加Bad mRNA表达,从而增加Bad蛋白表达量,抑制Bcl-2蛋白,促进胃癌凋亡。

综上所述,HYJDR很可能是通过线粒体凋亡途径,通过促进Bad蛋白表达,从而降低Bcl-2表达,Bcl-2被抑制后会上调Bax表达,而Bax表达在体外具有明显的凋亡诱导作用。其机制很可能是HYJDR增强了Bad mRNA表达丰度,直接促进Bad蛋白表达,抑制Bcl-2蛋白的抗凋亡作用,从而促进

HYJDR能明显促进胃癌细胞凋亡。Hoechst和PI双荧光染色法发现HYJDR明显促进细胞凋亡。随着胃癌的凋亡的。但是HYJDR是如何使Bad mRNA表达丰度增高的,有待本研究进一步研究。

[参考文献]

[1] FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. Int J Cancer, 2015, 136(5): 359-386.

[2] POURHOSEINGHOLI M A, VAHEDI M, BAGHESTANI A R. Burden of gastrointestinal cancer in Asia; an overview [J]. Gastroenterol Hepatol Bed Bench, 2015, 8(1): 19-27.

[3] JEMAL A, BRAY F, CENTER M M, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.

[4] MD C P W, MPH Z R, PHD D B P, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.

[5] FERLAY J, SHIN H R, BRAY F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 [J]. Int J Cancer, 2010, 127(12): 2893-2917.

[6] KIM J. Protective effects of Asian dietary items on cancers—soy and ginseng [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2008, 9(4): 543-548.

[7] ASADI J, MOSTAKHDEM H M. Valproic acid-mediated reduction of DNA double-strand break reparation capacity of irradiated MCF-7 cells [J]. Iran J Med Physic, 2016, 13(4): 289-295.

[8] BURK D R, CICHACZ Z A, DASKALOVA S M.

- Aqueous extract of *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) inflorescences suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 murine macrophages [J]. *J Med Plants Res*, 2010, 4(3):225-234.
- [9] WEI Z, ZHANG J P, AIHUA Z, et al. Anti-tumor effect of Huayu Jiedu formula on SGC-7901 cancer cell [J]. *Bangl J Pharmacol*, 2016, 2(14): 118-125.
- [10] DA Y, YANG X, GUO J C, et al. A great honor and a huge challenge for China: You-you TU getting the Nobel prize in physiology or medicine [J]. *Biomed Biotechnol*, 2016, 17(5): 405-408.
- [11] XU Y, CHEN X, CHEN X, et al. San Huang decoction downregulates aurora kinase A to inhibit breast cancer cell growth and enhance chemosensitivity to anti-tumor drugs [J]. *Pathol Res Pract*, 2016, 212(8): 696-703.
- [12] TU X, DENG Y, CHEN J, et al. Screening study on the anti-angiogenic effects of traditional Chinese medicine - part I: heat-clearing and detoxicating TCM [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 194(24): 280-287.
- [13] LIN J, LI Q, CHEN H, et al. Hedyotis diffusa Willd extract suppresses proliferation and induces apoptosis via IL-6-inducible STAT3 pathway inactivation in human colorectal cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2015, 9(4):1962-1970.
- [14] FERLAY J, AUTIER P, BONIOL M, et al. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006 [J]. *Ann Oncol*, 2007, 18(3): 581-592.
- [15] CHENG A C, LEE M F, TSAI M L, et al. Rosmanol potently induces apoptosis through both the mitochondrial apoptotic pathway and death receptor pathway in human colon adenocarcinoma COLO 205 cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49(2): 485-493.
- [16] KIM K H, SEO H S, CHOI H S, et al. Induction of apoptotic cell death by ursolic acid through mitochondrial death pathway and extrinsic death receptor pathway in MDA-MB-231 cells [J]. *Arch Pharm Res*, 2011, 34(8): 1363-1372.
- [17] LEE C S, JANG E R, KIM Y J, et al. Diarylheptanoid hirsutenone enhances apoptotic effect of TRAIL on epithelial ovarian carcinoma cell lines via activation of death receptor and mitochondrial pathway [J]. *Invest New Drugs*, 2012, 30(2): 548-557.
- [18] TAN A C, KONCZAK I, RAMZAN I, et al. Native Australian fruit polyphenols inhibit cell viability and induce apoptosis in human cancer cell lines [J]. *Nutr Cancer*, 2011, 63(3): 444-455.
- [19] ALSHATWI A A, SHAFI G, HASAN T N, et al. Apoptosis-mediated inhibition of human breast cancer cell proliferation by lemon citrus extract [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2011, 12(6): 1555-1559.

[责任编辑 张丰丰]