

# 丹参饮加味方诱导胃癌 SGC-7901 细胞凋亡 及其机制研究

蒋时红, 张珊珊, 刘燕  
(河南中医学院方剂学科, 郑州 450046)

**[摘要]** **目的:** 探讨丹参饮加味方体外诱导胃癌 SGC-7901 细胞凋亡的分子机制。**方法:** 以丹参饮加味方 120, 240, 480 mg·L<sup>-1</sup> 作用细胞 24, 48, 72, 96 h 后, 应用四甲基偶氮唑盐法 (MTT) 和流式细胞仪检测该方对胃癌 SGC-7901 细胞的抑制率和凋亡率的影响; 采用免疫组化法检测丹参饮加味方对 Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响。**结果:** 与空白对照组相比, 丹参饮加味方各组细胞抑制率、凋亡率明显升高 ( $P < 0.05$ ), Bax 蛋白表达量显著增强 ( $P < 0.05$ ), Bcl-2 蛋白表达量明显降低 ( $P < 0.05$ )。**结论:** 丹参饮加味方能体外抑制胃癌细胞的生长, 其诱导 SGC-7901 细胞凋亡的作用机制可能与上调 Bax, 下调 Bcl-2 蛋白的表达有关。

**[关键词]** 丹参饮加味方; 胃癌细胞株; 细胞凋亡; Bcl-2; Bax

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)03-0166-04

**[doi]** 10.11653/syfy2014030166

## Experimental Study on Effect and Mechanism of Jiawei Danshen Decoction on Apoptosis of Gastric Cancer SGC-7901 Cells

JIANG Shi-hong, ZHANG Shan-shan, LIU Yan

(Herbal Prescription Department, Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the apoptosis molecular mechanism of gastric cancer SGC-7901 cells induced by Jiawei Danshen decoction. **Method:** After gastric cancer SGC-7901 cells treated with Jiawei Danshen decoction for 24, 48, 72 and 96 h, cell growth inhibition rate and apoptosis rate were detected by MTT and flow cytometry. The immunocytochemistry method was used to study the effects of Jiawei Danshen decoction on the expression of Bcl-2 and Bax in SGC-7901 cells. **Result:** the inhibition rate of SGC-7901 induced by Jiawei Danshen decoction was higher than that of negative control group ( $P < 0.05$ ). The result of Apoptosis rate showed SGC-7901 cells induced by Jiawei Danshen decoction has a higher apoptosis rate compared with the negative control group ( $P < 0.05$ ). After treated with Jiawei Danshen decoction, the expression of Bcl-2 was obviously decreased and the expression of Bax was obviously increased. **Conclusion:** The Jiawei Danshen decoction can induce apoptosis of SGC-7901 cells. The mechanism may be relate to its regulation on the expression of Bcl-2 and Bax.

**[Key words]** Jiawei Danshen decoction; gastric cancer cell line; cells apoptosis; Bax; Bcl-2

胃癌是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一, 据统计, 全球每年新发病例 80 余万例, 占有新发癌症病例的 9%, 仅次于肺癌、乳腺癌和肠癌, 居第 4 位, 每年有 60 余万人因胃癌死亡, 居癌症死因的第

2 位<sup>[1-2]</sup>。丹参饮加味方由我省名老中医李发枝教授在名方丹参饮的基础上加味而成的中药复方。主要由丹参、檀香、砂仁、桔梗、蒲公英组成, 在临床上用于治疗胃炎、胃痛、瘀血性胃溃疡、慢性萎缩性胃炎、胃癌前病变等胃部病变, 且取得了很好的疗效。但有关其作用机制的研究尚不够深入。为进一步探讨其作用机制, 本研究观察了丹参饮加味方对 SGC-7901 胃癌细胞的体外抑制作用、诱导胃癌 SGC-7901 细胞凋亡及对凋亡相关蛋白表达的影响以探讨该方

**[收稿日期]** 20130603(003)

**[基金项目]** 河南省科技攻关项目(122102310189)

**[第一作者]** 蒋时红, 医学硕士, 教授, 从事中医药防治肿瘤作用机制及应用研究, Tel: 0371-65680027, E-mail: jsh0418@126.com

抗胃癌作用的机制。

## 1 材料

**1.1 药物** 丹参饮加味方主要有丹参 15 g,檀香 3 g,砂仁 6 g,蒲公英 30 g,桔梗 12 g 组成。上述药物均购于河南中医学院第三附属医院,经我校中药鉴定学科鉴定皆符合药典。

**1.2 细胞株** 人胃腺癌细胞株 SGC-7901,由河南省生物工程技术研究中心提供。

**1.3 试剂** RPMI Medium1640 (Solarbio 公司,批号 111005),无支原体新生牛血清(杭州天杭生物科技有限公司,批号 111005),四甲基偶氮唑盐 (Solarbio 公司,批号 A111105D),Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(凯基生物公司,批号 07K2641)。

**1.4 仪器** 8000WJ 型二氧化碳培养箱(Thermo 电子公司),36012 型光学显微镜(Olympus 公司),ELx800 型酶标仪(Bio-Tek 公司),HVE-50 型全自动高压灭菌器(Hirayama 公司),WaterPro PS 型超纯水制备器(Labconco 公司)。

## 2 方法

**2.1 药物制备** 用无水乙醇浸泡丹参饮加味方 1 周后,用滤纸过滤,将过滤后的丹参饮加味方提取液用旋转蒸发仪浓缩至 100 mL,转移至蒸发皿,干燥后用二甲基亚砷热溶、过滤,滤液质量浓度为  $135 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (原液)。实验时,用含血清的 1640 培养液将原液稀释为  $480, 240, 120 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  供实验用。

**2.2 细胞培养** 复苏胃癌细胞株,用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,置于  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$  培养箱,隔天换液 1 次,3 d 传代 1 次,实验时常规消化对数生长期细胞进行实验。

**2.3 对细胞的生长抑制作用** 采用 MTT 法。将对数生长期的细胞常规消化后按  $5 \times 10^5$  个/mL 接种于 96 孔板中,置于  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养 24 h,加入终质量浓度  $480, 240, 120 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的丹参饮加味方,同时设空白对照组、氟尿嘧啶对照组,每组 5 个复孔,继续培养 24,48,72,96 h,去除培养上清,每孔加入 MTT 溶液( $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )100  $\mu\text{L}$ ,继续培养 4 h,小心吸弃上清,每孔加入 150  $\mu\text{L}$  二甲基亚砷(DMSO),震荡 10 min,待紫色结晶完全溶解,用酶标仪在波长 570 nm/630 nm 测定吸光度(A)。

**2.4 细胞凋亡的测定** 以  $480, 240, 120 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的丹参饮加味方和氟尿嘧啶  $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  作用胃癌细胞 48,72 h 后,用不含 EDTA 的胰酶消化并制成单细胞悬液,计数收集各组细胞( $5 \times 10^5$  个)于流式上机管中,加入 500  $\mu\text{L}$  的 Binding Buffer 悬浮细胞,并加入

5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 混匀后再加入 5  $\mu\text{L}$  的 Propidium Iodide 混匀,对照组加入 PBS,于室温条件下避光反应 5 ~ 15 min,在 1 h 内用流式细胞仪检测凋亡率(激发波长 488 nm,发射波长 530 nm)。

**2.5 细胞凋亡相关蛋白表达的检测** 将灭菌盖玻片置于 6 孔板中,于盖玻片中央滴加 100  $\mu\text{L}$  密度为  $10^5$  个/mL 的细胞悬液,制作细胞爬片。分别于各组中加入相对应的含药培养液,继续培养 48,72 h 后取出盖玻片,用 PBS 洗涤 3 次。免疫细胞化学技术采用常规 SP 法,所有操作严格按照说明书步骤进行,用 PBS 代替一抗做阴性对照,用已知 Bcl-2 和 Bax 阳性染色的食管癌组织切片做阳性对照。

结果判定:以细胞浆或核膜出现黄色、棕黄色和棕褐色颗粒为阳性细胞区域进行分析。用 Smart scope 图像分析系统对每张图像阳性染色细胞区域进行分析。参照 Fromowit Z 等的综合计分法,根据染色细胞比例和染色程度判断染色结果<sup>[3]</sup>。每张图片随机选取 5 个高倍视野( $\times 400$  倍),计数阳性细胞及阳性细胞率。

**2.6 统计学分析** 采用 SPSS 17.0 统计软件,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用完全随机设计的方差分析,各药物组与对照组间的比较采用 Dunnett *t* 检验,以  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对胃癌 SGC-7901 细胞的生长抑制作用** 与空白对照组相比,丹参饮加味方各组与氟尿嘧啶组处理 24 ~ 96 h 后细胞的抑制率均有显著升高( $P < 0.05$ ),且随着时间的延长和剂量的增加,细胞抑制作用明显增强。结果表明丹参饮加味对人胃癌 SGC-7901 细胞增殖具有较强抑制作用,其抑制作用呈一定的时间/剂量依赖性。见表 1。

**3.2 对胃癌 SGC-7901 细胞凋亡的影响** 与空白对照组相比,丹参饮加味方  $120 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组的早、晚期凋亡率未见明显差异,而  $240, 480 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组的早、晚期凋亡率明显高于空白对照组( $P < 0.05$ )。见表 2。

**3.3 对胃癌 SGC-7901 细胞凋亡相关蛋白表达量的影响** 与空白对照组比较,丹参饮加味方  $240, 480 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组 Bax 蛋白的表达量明显增强( $P < 0.05$ ), $120 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组 Bax 蛋白的表达量未见明显差异,而该方各组 Bcl-2 蛋白的表达量明显减弱( $P < 0.05$ )。可见,丹参饮加味方能促进胃癌 SGC-7901 细胞 Bax 蛋白的表达,而降低 Bcl-2 蛋白的表达。见表 3,图 1。

表 1 丹参饮加味方对 SGC-7901 细胞抑制率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h	48 h	72 h	96 h
空白对照	-	0	0	0	0
氟尿嘧啶	25	24.32 ± 9.47 <sup>2,6,8)</sup>	58.15 ± 10.74 <sup>2,8)</sup>	66.47 ± 8.43 <sup>2,8)</sup>	84.41 ± 3.01 <sup>2,8)</sup>
丹参饮加味方	480	26.13 ± 12.42 <sup>2,7)</sup>	44.57 ± 25.41 <sup>2)</sup>	67.77 ± 7.96 <sup>2,8)</sup>	86.94 ± 5.78 <sup>2,8)</sup>
	240	13.51 ± 6.72 <sup>2,4,5)</sup>	34.35 ± 17.03 <sup>2,4)</sup>	46.94 ± 18.88 <sup>2,4,6)</sup>	66.22 ± 7.31 <sup>2,4,6)</sup>
	120	9.01 ± 3.06 <sup>2,4,6)</sup>	15.87 ± 14.01 <sup>2,4,6,7)</sup>	32.94 ± 10.99 <sup>2,4,6,8)</sup>	51.89 ± 5.57 <sup>2,4,6,8)</sup>

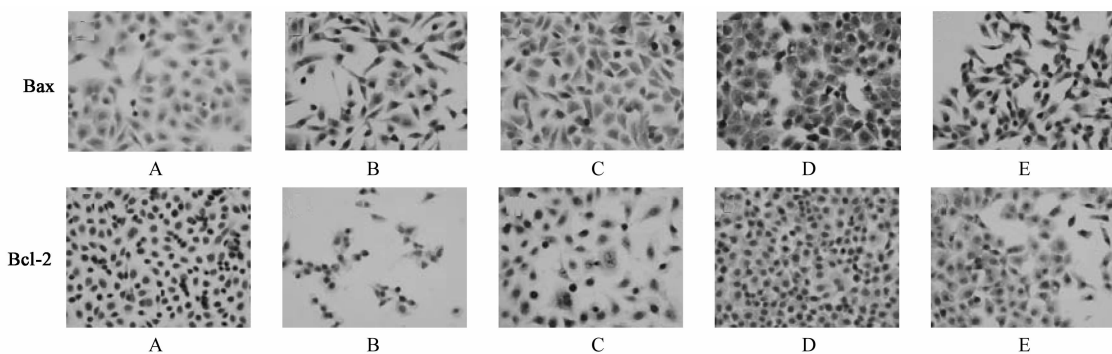
注:与空白对照比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与氟尿嘧啶比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ ;与丹参饮加味方 480  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  比较<sup>5)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>6)</sup>  $P < 0.01$ ;与丹参饮加味方 240  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  比较<sup>7)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>8)</sup>  $P < 0.01$  (表 2 ~ 3 同)。

表 2 丹参饮加味方对胃癌 SGC-7901 细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	早期凋亡率		晚期凋亡率	
		48 h	72 h	48 h	72 h
空白对照	-	4.50 ± 1.51 <sup>3,6,7)</sup>	4.68 ± 2.76 <sup>4,6,7)</sup>	2.74 ± 0.42 <sup>4,6,7)</sup>	2.93 ± 1.19 <sup>3,6,7)</sup>
氟尿嘧啶	25	19.96 ± 3.55 <sup>1,5)</sup>	15.38 ± 6.64 <sup>1,5)</sup>	15.08 ± 4.57 <sup>1,5)</sup>	10.81 ± 3.66 <sup>1,5)</sup>
丹参饮加味方	480	36.12 ± 3.33 <sup>2,3,7)</sup>	40.44 ± 0.99 <sup>2,4,7)</sup>	28.56 ± 1.35 <sup>2,4,7)</sup>	33.7 ± 2.13 <sup>2,3,7)</sup>
	240	18.46 ± 3.17 <sup>1,5)</sup>	13.80 ± 2.76 <sup>1,6)</sup>	11.83 ± 4.26 <sup>1,5)</sup>	16.81 ± 3.30 <sup>1,5)</sup>
	120	5.39 ± 1.94 <sup>3,6,7)</sup>	3.80 ± 0.69 <sup>3,6,7)</sup>	2.38 ± 0.34 <sup>3,6,7)</sup>	2.72 ± 0.60 <sup>3,6,8)</sup>

表 3 丹参饮加味方对胃癌 SGC-7901 细胞 Bax 与 Bcl-2 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Bax		Bcl-2	
		48 h	72 h	48 h	72 h
空白对照	-	6.03 ± 1.41 <sup>3,6,7)</sup>	8.85 ± 2.93 <sup>4,6,7)</sup>	57.31 ± 12.29 <sup>4,6)</sup>	55.61 ± 9.03 <sup>3,6,7)</sup>
氟尿嘧啶	25	26.92 ± 5.82 <sup>1,5)</sup>	30.42 ± 7.23 <sup>2,7)</sup>	24.30 ± 3.27 <sup>1)</sup>	24.47 ± 3.36 <sup>1)</sup>
丹参饮加味方	480	40.74 ± 5.87 <sup>2,4,7)</sup>	43.60 ± 5.10 <sup>2,8)</sup>	19.50 ± 2.06 <sup>2,7)</sup>	18.66 ± 4.05 <sup>2,7)</sup>
	240	19.56 ± 3.04 <sup>1,5)</sup>	17.23 ± 3.40 <sup>1,3,6)</sup>	30.20 ± 2.22 <sup>1,5)</sup>	31.19 ± 4.60 <sup>1,5)</sup>
	120	8.79 ± 2.38 <sup>3,6,7)</sup>	10.46 ± 2.89 <sup>3,6)</sup>	39.79 ± 7.96 <sup>1,5)</sup>	37.47 ± 5.45 <sup>1,3,5)</sup>



A. 空白对照组; B. 氟尿嘧啶 25  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组; C. 丹参饮加味方 120  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组;  
D. 丹参饮加味方 240  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组; E. 丹参饮加味方 480  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组

图 1 丹参饮加味方对 SGC-7901 细胞 Bax, Bcl-2 蛋白表达的影响 (HE 染色,  $\times 400$ )

#### 4 讨论

中医药抗肿瘤是当前的研究热点之一。其机制研究主要集中在中医药对肿瘤细胞的凋亡诱导作用的探讨<sup>[4]</sup>。现代医学已不断证实,中医药在某些肿瘤治疗方面有着不可替代的优势。中医认为胃癌的

发生是由于饮食不节、情志失调等所引起机体气血瘀滞<sup>[5-6]</sup>。气行则血行,气滞则血瘀,瘀血日久则阻隔胃气,引起噎膈、呕吐等症状,故气滞血瘀是胃癌的重要病机。本研究所采用的丹参饮加味方以活血化瘀为治则,是经临床验证治疗胃部疾患的有效方

剂。方中丹参为君,具有活血祛瘀、行气止痛之功效;砂仁和檀香均为理气要药,加上蒲公英和桔梗的清热解毒、消肿散结,共同辅佐君药丹参发挥着重要的作用。

肿瘤的发生和发展主要与细胞增殖过度及凋亡不足有关。而细胞凋亡受抑则是肿瘤形成的重要因素之一。因此调控凋亡相关蛋白基因的表达也是目前抗肿瘤研究的一个重要手段。Bcl-2 是当前发现的最重要的抑制肿瘤细胞凋亡的基因,Bax 是第一个被确定的 Bcl-2 同源基因。当 Bcl-2 高水平表达时,可形成 Bcl-2 和 Bcl-2 同源二聚体,可抑制细胞凋亡<sup>[7-9]</sup>;Bax 高水平表达时,则可形成 Bax 和 Bax 同源二聚体,则使细胞凋亡加速<sup>[10-11]</sup>,这两类物质相互结合、彼此抑制,依据其数量的相对多少决定凋亡的发生与否。

目前,大量实验研究结果发现,胃癌细胞可通过中医药诱导其凋亡。本实验以丹参饮加味方作用于胃癌 SGC-7901 细胞,结果表明不同剂量的丹参饮加味方对人胃癌细胞株 SGC-7901 均有抑制作用,尤以高剂量组抑制最为明显,且呈现了一定的时间/剂量依赖性。与空白对照组比较,丹参饮加味方中、高剂量组其凋亡率显著升高,而低剂量组未见明显作用。丹参饮加味方可使 SGC-7901 细胞 Bcl-2 蛋白表达下降,而促凋亡蛋白 Bax 表达在中、高剂量组增加。由此可见,丹参饮加味方可诱导胃癌细胞凋亡,其促凋亡的作用机制可能是通过上调促凋亡基因 Bax 和下调凋亡抑制基因 Bcl-2 的表达来实现的。

## [参考文献]

- [1] 刘佛添. 胃癌的中医药治疗进展[J]. 淮海医药, 2009,27(1):87.
- [2] 吴耀南,陈少玫. 胃癌前期病变的中医药研究进展[J]. 云南中医中药杂志,2005,26(3):47.
- [3] Fromowitz F B, Viola M V, Chao S, et al. Ras p21 expression in the progress of breast cancer[J]. Hum Pathol,1987,18(12):1268.
- [4] 李要远,萧百圆,贺用和. 风药抗肿瘤的研究进展[J]. 中国中药杂志,2011,36(23):3375.
- [5] 何立丽,孙桂芝,张培彤. 胃癌的病因病机研究进展[J]. 北京中医药,2009,28(3):234.
- [6] 宋亮. 中医治疗胃癌辨证是关键[J]. 现代养生, 2011,22(3),30.
- [7] Kroemer G,Reed J C. Mitochondrial control of cell death [J]. Nat Med,2000,6(5):513.
- [8] 卫培峰,焦晨莉,张三印. 藤梨根提取物诱导胃癌细胞凋亡的研究[J]. 陕西中医学院学报,2005,28(3):5.
- [9] Li Y M, Wen Y, Zhou B P, et al. Enhancement of Bik antitumor effect by Bik mutants [J]. Cancer Res, 2003,63(22):7630.
- [10] 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.
- [11] Jeong S Y, Gaume B, Lee Y J, et al. Bcl-x (L) sequesters its C-terminal membrane anchor in soluble, cytosolic homodimers[J]. EMBO,2004,23(10):2146.

[责任编辑 李玉洁]

## 天津中医药大学期刊编辑部 2014 年征订启事

《天津中医药》月刊,每期 8 元,年定价 96 元,联系电话:022-59596310,联系人:张震之。邮局订阅:邮发代号 6-83 电子邮件:zhongyiyao@vip.126.com, xuebaobj@126.com,网址:http://www.tjzhongyiyao.com,地址:天津市南开区鞍山西道 312 号,邮政编码:300193。

《天津中医药大学学报》双月刊,每期 6 元,年定价 36 元,联系电话:022-59596310,联系人:张震之。邮局订阅:邮发代号 6-153,电子邮件:xuebaobj@vip.126.com, xuebaotxd@126.com,网址:http://www.tjzhongyiyao.com,地址:天津市南开区鞍山西道 312 号,邮政编码:300193。