

从细胞凋亡和周期研究旋覆归连方抑制食管癌 Eca9706 细胞增殖作用

吴耀松, 马俊华, 陈玉龙*, 尹素改
(河南中医学院, 郑州 450046)

[摘要] 目的: 从细胞增殖、周期和凋亡研究旋覆归连方治疗食管癌作用机制。方法: 体外培养食管癌细胞株 Eca9706, MTT 法检测旋覆归连方抑制细胞增殖作用, 观察其时效和量效; 1×10^5 /孔细胞接种于 6 孔板, 加入 15, 25, 60 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的药物作用 48 h, 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡。结果: 旋覆归连方具有很强的抑制 Eca9706 增殖作用, 具有剂量依赖性, IC_{50} 58.11 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 质量浓度 15, 25, 60 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 在 96 h 内抑制率依时增加; 早、晚期凋亡率用药组与阴性对照组相比明显增高 ($P < 0.05$); 细胞 G_1/G_0 期比率也明显增加 ($P < 0.05$), 60 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组出现了明显的凋亡峰。结论: 旋覆归连方能抑制食管癌细胞的增殖, 具有浓度和时间依赖性, 可能与其阻滞了细胞 G_1/G_0 期和诱导细胞凋亡有关。

[关键词] 旋覆归连方; 食管癌; 增殖; 周期; 凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0177-04

[doi] 10.11653/syfy2013180177

Researching the Inhibitory Effect of Xuanfu Guilian Prescription on Eca9706 Esophagus Carcinoma Cell Proliferation from the Cell Cycle and Apoptosis

WU Yao-song, MA Jun-hua, CHEN Yu-long*, YIN Su-gai
(Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** From the cell proliferation, cycle and apoptosis researching the mechanism which

[收稿日期] 20130212(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173177)

[第一作者] 吴耀松, 硕士, 从事中医肿瘤方证的研究, Tel:0371-65680049, E-mail:linawys@163.com

[通讯作者] * 陈玉龙, 博士, 副教授, 硕导, 从事肿瘤病机与防治的研究。Tel:0371-65680049, E-mail:cyl72621@163.com

[参考文献]

- [1] 卜繁慧. 小儿解表颗粒治疗小儿急性上呼吸道感染疗效观察[J]. 实用医技杂志, 2008, 15(17): 2217.
- [2] 王春茹. 中西医结合治疗急性呼吸道感染 118 例[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 295.
- [3] 曾常茜. 分泌型 IgA 在黏膜抗感染中的作用[J]. 北华大学学报: 自然科学版, 2005, 6(1): 33.
- [4] 王孝钦. 培土生金方治疗小儿反复呼吸道感染[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 216.
- [5] 邓中甲. 方剂学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003, 30.
- [6] 徐叔云, 卞如谦, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 203.

- [7] 李娴, 雷娜, 段小花, 等. 寒冷刺激致小鼠上呼吸道黏膜免疫功能低下模型的研究[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(8): 1662.
- [8] Makinen T M, Juvonen R, Jokelainen J, et al. Cold temperature and low humidity are associated with increased occurrence of respiratory tract infections[J]. Respiratory Medicine, 2009, 103(3): 456.
- [9] 陈奇. 中药药理学研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 278.
- [10] 史跃杰. 黄芩黄连水煎剂对厌氧菌的体外抑菌活性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17): 226.
- [11] 陈艳, 江明锋, 叶煜辉, 等. 溶菌酶的研究进展[J]. 生物学杂志, 2009, 26(2): 64.

[责任编辑 聂淑琴]

Xuanfu Guilian prescription treats esophageal cancer. **Method:** Esophageal carcinoma cells (Eac9706) *in vitro* were cultured, and the cell proliferation inhibitory rate of Xuanfu Guilian prescription were detected with MTT assay to observe the time-and dose-effect; 1×10^5 cells/wells were seeded in 6 wells plate and respectively mixed in Xuanfu Guilian prescription extracts (15, 25, 60 mg · L⁻¹); after cultured 48 h, the cell cycle and apoptosis of Eac9706 were detected by flow cytometry (FCM). **Result:** Xuanfu Guilian prescription can inhibit strongly the proliferation of Eca9706 cell, and have dose dependent, 50% inhibition concentration (IC₅₀) 58.11 mg · L⁻¹. The inhibition rate of concentration 15, 25, 60 mg · L⁻¹ increased on time in 96 h. Early and late apoptosis rate of treatment group were significantly increaser than the negative ($P < 0.05$). The cells rate of G₀/G₁ also increased significantly ($P < 0.05$), and the 60 mg · L⁻¹ group appeared apoptosis peak. **Conclusion:** Xuanfu Guilian prescription can inhibit the proliferation of Eac9706 cells and there is in dose and time dependent, which mechanism may be related to drug block of cells to G₀/G₁ phase and induce cell apoptosis.

[**Key words**] Xuanfu Guilian prescription; esophageal carcinoma cell Eac9706 cells; proliferation; cell cycle; apoptosis

食管癌是常见的恶性肿瘤之一,中国每年约有 25 万新诊断的食管癌病例,占全世界食管癌病例数的一半,治疗食管癌效果不佳,5 年生存率不到 15%^[1]。食管癌属于中医噎膈范畴,中医药治疗对于缓解梗阻,控制病情进展,防止转移,减少肿瘤的发生,有确切疗效^[2-3]。笔者通过文献和应用抗肿瘤体外模型进行药物筛选,结合食管癌病理病机,组成了治疗食管癌方药旋覆归连方,发现它不同浓度醇提物抑制食管癌细胞生长作用不同,其疗效与提取组分密切相关^[4-5]。为了进一步研究该方作用机制,笔者检测了旋覆归连方对食管癌细胞株增殖抑制作用的时效和量效,并应用流式细胞仪检测其中 3 个浓度作用于细胞的周期和凋亡的变化,为临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 药物 旋覆花,菊科植物欧亚旋覆花 *Inula britannica* L. 的干燥头状花序;黄连,毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch 的根茎;当归,伞形科当归 *Angelica sinensis* Diel 的根;购于河南中医学院第三附属医院,经河南中医学院中药鉴定专家宋宁副教授鉴定。

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

1.3 试剂 胎牛血清 (Hyclone, nUCO153), DMEM 高糖培养基 (GIBCO, 批号 20130605), 二甲基亚砜 (DMSO, Amresco, 批号 0231), MTT (Sigma, M2128), Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (KAG106), 细胞 DNA 含量检测试剂盒 (KAG511), 均为凯基生物公司。

1.4 仪器 Heraeus 细胞培养箱 (德国 Kendro), 紫

外分光光度计 (Bio Mate), 倒置显微镜 (ZESS), ELx800 型酶标仪 (BIO-TEK), SG-603 生物安全柜 (Bake), FACSCalibur 型流式细胞仪 (BD)。

2 方法

2.1 药物提取 中药旋覆花 90 g, 当归 60 g, 黄连 50 g, 分别加入 85% 乙醇, 4 °C 冷浸提取 1 周, 每 2 h 振摇 1 次, 1 周后, 用滤纸过滤, 旋转蒸发仪 45 °C 浓缩至 100 mL, 转移至蒸发皿, 低温真空干燥, 所得提取物置 -20 °C 冰箱保存, 备用。

2.2 细胞培养 生长于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱, 每间隔 48 h 更换 1 次培养基, 试验时, 细胞用消化液 [含 0.02% 乙二胺四乙酸二钠盐 (EDTA) 和 0.25% 胰蛋白酶以 1:1 比例配制] 进行消化, 并接种于 96 孔板中或 $\Phi 100$ mm 培养皿中。

2.3 药物对细胞增殖抑制作用的量效和时效 以 1×10^4 个细胞/孔接种 96 孔培养板, 于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱培养 24 h。设阴性对照组、中药组, 每组 3 个复孔, 85% 乙醇提取物剂量为 12.5, 25, 50, 100, 200 mg · L⁻¹, 继续培养 48 h, 去除培养上清, 每孔加入 0.5 mg · L⁻¹ 的 MTT 100 μ L, 继续培养 4 h, 小心吸去上清, 并加入 150 μ L DMSO 溶解紫色沉淀, 用酶标仪在波长为 A₅₇₀/A₆₃₀ nm, 测定吸收度 (A)。按公式: 抑制率 = (1 - 实验孔平均 A₅₇₀/A₆₃₀ 值 / 对照孔平均 A₅₇₀/A₆₃₀) × 100%。同样方法, 将提取剂量浓度换成 15, 25, 60 mg · L⁻¹, 分别培养细胞 24, 48, 72, 96 h, 酶标仪 A₅₇₀/A₆₃₀ nm 处测 A, 计算抑制率。

2.4 细胞凋亡检测 按照 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒要求进行, 简而言之, 食管癌 Eca9706 细胞 (1×10^5 个) 接种于 6 孔细胞培养板中, 放入

37 ℃, 5% CO₂ 恒温培养箱中 24 h, 分别加入旋覆归连方的 3 个质量浓度 (60, 25, 15 mg·L⁻¹), 阴性对照组只加培养液, 放入培养箱中培养 48 h, 收获细胞, 按凋亡试剂盒说明处理细胞, FACSCalibur 流式细胞仪检测, CELLQuest 软件获取并分析。实验重复 4 次。

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, 200 目筛网过滤后, 经 FACSCaliber 流式细胞仪检测, CELLQuest 软件获取, ModFit LT 3.2 软件进行分析。实验重复 4 次。

2.6 统计学分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS 17.0 数据统计软件进行 ANOVA 方差分析后, 再进行 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义, 进行回归分析之曲线拟合, 应用概率法计算半数抑制率。

3 结果

3.1 对人食管癌细胞株 Eca9706 增殖的抑制作用 从表 1 看: 回归分析法 $Y = 25.23 + 0.38X$; IC₅₀ 58.11 mg·L⁻¹。随着药物剂量的增加, 细胞的增殖下降。

表 1 旋覆归连方作用 48 h 对食管癌 Eca9706 细胞株增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	抑制率/%
阴性对照	12.5	24.32 ± 1.51
旋覆归连方	25	37.75 ± 2.81
	50	44.24 ± 3.02
	100	74.25 ± 4.65
	200	96.59 ± 5.31

选用抑制率为 10%, 30% 和 50%, 通过回归分析法所得方程计算出药物浓度分别为 15, 25, 60 mg·L⁻¹, 作为低、中、高 3 个浓度药物分别作用细胞 24, 48, 72, 96 h 后, 随时间和浓度抑制率依次增高。见图 1。

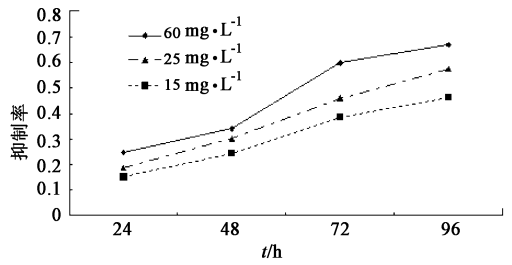


图 1 不同浓度旋覆归连方抑制细胞增殖率和时间关系

作者选用 15, 25, 60 mg·L⁻¹ 的药物浓度作用细胞 48 h 后, 进行凋亡和周期的检测, 进一步探寻旋覆归连方对食管癌的作用机制。

3.2 对人食管癌细胞株 Eca9706 的凋亡作用 旋覆归连方对食管癌 Eca9706 细胞株诱导 48 h 后, 旋覆归连方高、中、低浓度和阴性对照组比较, 早、晚期凋亡率都明显增高 ($P < 0.05$); 早期凋亡率中高浓度和中、低浓度差异显著 ($P < 0.05$); 晚期凋亡率中, 高浓度和中浓度差异显著 ($P < 0.05$), 中浓度比低浓度明显增高 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 旋覆归连方对食管癌 Eca9706 细胞株凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	早期凋亡率	晚期凋亡率
阴性对照	-	3.38 ± 0.50	7.26 ± 0.68
旋覆归连方	60	23.81 ± 2.64 ¹⁾	46.24 ± 5.01 ¹⁾
	25	8.85 ± 0.91 ^{1,2)}	63.17 ± 6.82 ^{1,2)}
	15	7.23 ± 0.75 ^{1,2)}	54.04 ± 5.81 ^{1,3)}

注: 与阴性对照组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与旋覆归连方 60 mg·L⁻¹ 组比较²⁾ $P < 0.05$; 与旋覆归连方 25 mg·L⁻¹ 组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 3 同)。

3.3 对人食管癌细胞株 Eca9706 周期的影响 旋覆归连方对食管癌 Eca9706 细胞株作用 48 h 后, 高、中、低浓度和阴性对照组比较, G₁/G₀ 期 DNA 含量明显增高 ($P < 0.05$), S, G₂/M 期 DNA 含量均明显降低 ($P < 0.05$); 低浓度组和高、中浓度组比较, 在细胞 3 个时期的 DNA 含量均有差异 ($P < 0.05$)。在高浓度组, 细胞出现了明显的凋亡峰 (18.61%)。见表 3。

表 3 旋覆归连方对食管癌 Eca9706 细胞株细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	G ₁ /G ₀ 期	S 期	G ₂ /M 期	凋亡率
阴性对照	-	72.83 ± 2.56	19.58 ± 0.98	7.62 ± 0.31	0
旋覆归连方	60	78.91 ± 3.25 ¹⁾	16.85 ± 0.71 ¹⁾	4.25 ± 0.22 ¹⁾	18.61 ± 1.02
	25	81.20 ± 3.16 ¹⁾	15.65 ± 0.63 ¹⁾	2.66 ± 0.09 ^{1,2)}	0
	15	89.66 ± 3.55 ^{1,2)}	10.35 ± 0.66 ^{1,2,3)}	0 ^{1,2,3)}	0

4 讨论

中医认为食管癌多由忧思郁怒、年老体虚、饮食酒伤、它病转化等多种因素所引起,属于中医噎膈范畴,病机包括痰阻、血瘀、气郁、气血津亏等,其中痰血互阻、毒邪郁滞最为常见,也是导致食管癌不断发展的主要机制^[2-3]。本中药复方中紧扣食管癌病机,其中旋覆花降气行水化痰、降逆止呕为君药。当归补血调经、活血止痛、润肠通便,与君药旋覆花配合即可化痰活血起到散结消瘤的作用,又可降气止呕,同时养血以补正气为臣药^[5]。黄连,味苦,性寒,具有泻火解毒、清热燥湿之功能,在本复方中,取其泻火解毒以消除痰瘀郁久所产生之痰瘀毒、热毒,同时又以寒凉之性,制约旋覆花、当归之温,使复方寒热阴阳平和,为佐使药。三药配合,共奏降气化痰祛瘀,清热解毒散结,抑制肿瘤之功能。

MTT 法是用于分析细胞活性、生长、增殖而检测肿瘤放射和抗肿瘤药物的敏感性的一种常用的方法^[6]。MTT 法检测了旋覆花归连方不同浓度对食管癌细胞增殖的抑制作用和浓度成正比关系。进一步选择抑制率分别为 10%、30% 和 50% 所对应的药物浓度,用 MTT 法检测了这 3 个浓度分别作用 24, 48, 72, 96 h 后对细胞的影响,发现随着时间的延长,细胞抑制率依次增高。由此可知,旋覆花归连方对食管癌 Eca9706 细胞株的抑制作用不仅具有浓度依赖性,还具时间依赖性。

为了进一步探索旋覆花归连方抑制细胞生长的机制,笔者对食管癌细胞株 Eca9706 作用 48 h 后,检测其周期和凋亡的变化情况。

流式细胞仪(flow cytometry, FCM)检测凋亡^[7]结果显示:旋覆归连方高、中、低 3 个浓度作用食管癌细胞 48 h 后,能明显诱导食管癌细胞的凋亡。细胞凋亡属于程序性死亡,主要有 2 条独立的途径:一条是通过死亡受体激活途径;另一条通路是线粒体-细胞色素 C 途径^[6]。旋覆归连方能引起食管癌细胞株的凋亡,说明启动了细胞的凋亡机制,但具体通过哪条途径诱导凋亡,还有待进一步研究。

连续分裂的细胞从一次有丝分裂结束到下一次有丝分裂结束的整个过程,为一个细胞周期^[9]。从

表 3 中流式细胞仪检测周期分析,旋覆归连方阻滞于食管癌细胞的 G₀/G₁ 期。在细胞周期中起着重要作用的主要有两类调控因子:第一类是对细胞分裂增殖有调控作用的细胞生长因子;第二类为细胞内自身合成的蛋白质,即细胞周期正、负性调控因子,如正性调控因子周期蛋白和周期蛋白依赖性激酶,负性调控因子为细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子和 p21^{Waf1/cip1} 等效应蛋白^[10]。旋覆归连方是否影响了负性调控因子,还待进一步研究。

综上所述,旋覆归连方抑制了食管癌细胞的增殖,具有剂量和时间依赖性,其机制与药物阻滞细胞 G₁/G₀ 期和诱导细胞凋亡有关,分子机制需要进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Enzinger P C, Mayer R J. Esophageal cancer[J]. N Engl J Med, 2003, 349(23): 2241.
- [2] 司富春, 陈玉龙, 徐晓宇. 古代中医文献对食管癌的认识[J]. 河南中医, 2005, 25(6): 77.
- [3] 周衡, 黄贵华. 中医对食管癌的认识和治疗研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2012(2): 212.
- [4] 陈玉龙, 司富春. 中医药治疗食道癌方药分析[J]. 时珍国医国药, 2008(2): 401.
- [5] 高学敏. 中药学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2005: 413, 108, 538.
- [6] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. Immunol Methods, 1983, 65(1/2): 55.
- [7] 吴耀松, 尹素改, 陈玉龙. 在中医学院研究生中开设“流式细胞术”的探索[J]. 世界中西医结合杂志, 2011, 6(12): 1079.
- [8] Ryo H D, Bergmann A. The role of apoptosis-induced proliferation for regeneration and cancer[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012, 4(8): 797.
- [9] Kastan M B, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer[J]. Nature, 2004, 432(7015): 316.
- [10] Mitrea D M, Yoon M K, Ou L, et al. Disorder-function relationships for the cell cycle regulatory proteins p21 and p27[J]. Biol Chem, 2012, 393(4): 259.

[责任编辑 聂淑琴]