

枳实消痞丸诱导胃癌 SGC-7901 细胞凋亡的研究

吴耀松*, 彭贵军

(河南中医学院, 郑州 450046)

[摘要] 目的:从细胞增殖、凋亡和周期角度研究枳实消痞丸治疗胃癌的机制。方法:胃癌 SGC-7901 细胞阴性对照组加完全培养基, 1×10^4 细胞/孔接种于 96 孔板, 将枳实消痞丸分为 4, 2, 0.5, 0.125, 0.05 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 5 个质量浓度加入, 分别作用 24, 48, 72 h, MTT 法检测细胞增殖; 1×10^5 /孔接种于 6 孔板, 加入 2, 0.5, 0.125 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 3 个质量浓度的药物, 分别培养 48, 72 h, 流式细胞仪检测细胞周期和细胞凋亡。结果:枳实消痞丸 4, 2, 0.5, 0.125, 0.05 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度作用于胃癌 SGC-7901 细胞, 抑制率依次降低; 作用于 24, 48, 72 h, 抑制率渐增。枳实消痞丸增加了 G_0/G_1 期的细胞比率, 促进细胞凋亡, 高、中浓度强于低浓度。结论:枳实消痞丸抑制了细胞的增殖, 具有时间和浓度依赖性, 其机制可能与药物阻滞细胞于 G_0/G_1 期和诱导细胞凋亡有关。

[关键词] 枳实消痞丸; SGC-7901 细胞; 细胞周期; 凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0278-04

[doi] 10.11653/syjf2013160278

Studying of Apoptosis of SGC-7901 Cell Induced by Zhishi Xiaopi Wan

WU Yao-song*, PENG Gui-jun

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

[Abstract] **Objective:** Study on the mechanism of Zhishi Xiaopi Wan treatment on Gastric cancer from cell proliferation, apoptosis and cycle. **Method:** Complete medium was mixed in negative control group; 1×10^4 cells/wells were seeded at 96 wells plate and divided into negative control, Zhishi Xiaopi Wan in 0.05, 0.125, 0.5, 2, 4 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ concentration groups; the cells were treated with drugs for 24, 48, 72 h, and cell proliferation was detected by MTT method; 1×10^5 cells/wells were seeded in 6 wells plate, and the drugs of low (0.125 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), medium (0.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), high (2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) concentration respectively were put into wells for 48, 72 h, then the cell cycle and apoptosis of gastric cancer SGC-7901 cells were detected by flow cytometry (FCM). **Result:** Gastric cancer SGC-7901 cells were treated by the 0.125, 0.5, 2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ of Zhishi Xiaopi Wan, and its inhibition rate is in dose and time dependent. Zhishi Xiaopi Wan could increase SGC-7901 cells in G_0-G_1 phase percentage and promote apoptosis; The high, medium concentration was stronger than the lows. **Conclusion:** Zhishi Xiaopi Wan can inhibit the proliferation of SGC-7901 cell and there is in dose and time dependent, which mechanism may be related to drug block of cells to G_0/G_1 phase and induce cell apoptosis.

[Key words] Zhishi Xiaopi Wan; SGC-7901 cells; cell cycle; apoptosis

胃癌是严重危害人类健康的常见肿瘤之一^[1]。枳实消痞丸是治疗胃癌和胃癌前病变的有效方剂, 出自李东垣的《兰室秘藏》。从枳实消痞丸中药物

的组成看, 本方是由枳术汤、半夏泻心汤、四君子汤 3 方加减化裁而成。综观全方, 消补兼施, 寒热并用, 为行气消痞良剂^[2]。

流式细胞仪(flow cytometry, FCM)将激光光学技术、流体喷射技术、计算机技术和电子技术等集于一体, 优越性强, 既可定量又可定性, 且具有快速、简单和敏感性高的特点, 还可进行多参数和活体细胞分析^[3]。

[收稿日期] 20130124(009)

[基金项目] 河南中医学院苗圃工程项目

[通讯作者] * 吴耀松, 硕士, 讲师, 从事肿瘤与免疫炎症研究,
E-mail: linawys@163.com

笔者应用流式细胞仪观察枳实消痞丸 3 个不同质量浓度诱导体外人胃腺癌细胞 SGC-7901 凋亡和周期的情况,并探讨其作用机制,为临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 药物 枳实消痞丸原方组成:干生姜:炙甘草:麦芽曲:白茯苓:白术:半夏曲:人参:炙厚朴:枳实:黄连 1:2:2:2:2:3:3:4:5:5。药物购于河南中医药大学第三附属医院。经中药鉴定学科鉴定为正品。

1.2 细胞株 中分化胃腺癌细胞株 SGC-7901(郑州生物工程技术有限公司)。

1.3 试剂 胎牛血清(Hyclone),DMEM 高糖培养基(Gibco),DMSO(Amresco),MTT(Sigma),Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、细胞 DNA 含量检测试剂盒(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 应用蒸馏水煎煮,武火煮沸,文火 20 min,煎煮 2 次,合并 2 次煎煮的药汁,按 1:1 的比例加入 95% 乙醇,4 ℃ 冰箱静置 24 h,收集上清液,过滤、回收乙醇,干燥,冷藏备用。体外实验,用不含血清培养基稀释,过滤除菌,根据不同的需要调整药物浓度。

2.2 细胞培养 生长于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,置于 37 ℃,5% CO₂ 培养箱,每间隔 48 h 更换 1 次培养基,试验时,消化,并接种于 96 孔板中或 6 孔板培养皿中。

2.3 细胞生长抑制作用 以 1×10^4 细胞/孔接种 96 孔平面培养板,于 37℃,5% CO₂,饱和湿度的 CO₂ 培养箱培养 24 h。设阴性对照组、枳实消痞丸药物组。药物组分别设置质量浓度为:4,2,0.5,0.125,0.05 g·L⁻¹,每组 4 个复孔;阴性对照为完全培养液。继续培养 24,48,72 h,加入 MTT,用酶标仪在波长为 570 nm(λ_{630 nm}),测定吸光度(A)。按公式计算抑制率^[4]。

$$\text{抑制率} = (1 - \text{实验孔平均 } A_{570/630} / \text{对照孔平均 } A_{570/630}) \times 100\%$$

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,SGC-7901 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,分别加入枳实消痞丸的

高、中、低 3 个质量浓度(胃癌 SGC-7901 细胞 2,0.5,0.125 g·L⁻¹),阴性对照组只加培养液,放入培养箱中培养 48,72 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 FACSCalibur 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,测 $P < 0.05$ 有统计学意义,进行回归分析进行曲线拟合,应用概率法计算半数抑制率。

3 结果

3.1 对 SGC-7901 增殖的抑制作用 回归分析法 24 h: $UY = 11.812X + 8.125$,48 h: $Y = 16.76X + 13.183$,72 h: $Y = 16.371X + 19.691$;应用概率法 95% 置信区间 IC₅₀ 24 h 为 3.530 g·L⁻¹,48 h 为 2.212 g·L⁻¹,72 h 为 1.817 g·L⁻¹。可见枳实消痞丸对细胞的抑制呈现明显的时效关系。见表 1。

表 1 枳实消痞丸对 SGC-7901 细胞株抑制率的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$) %

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	24 h	48 h	72 h
枳实消痞丸	4	60.38 ± 6.85	79.27 ± 8.02	82.19 ± 8.76
	2	20.63 ± 2.94	47.46 ± 5.43	56.36 ± 5.70
	0.5	17.85 ± 2.01	26.78 ± 3.34	37.23 ± 4.21
	0.125	12.02 ± 1.67	14.56 ± 1.91	20.67 ± 2.45
	0.005	8.59 ± 0.92	9.72 ± 0.93	11.28 ± 1.20

从抑制率分析,笔者选择了 48,72 h 2 个时间点和 2,0.5,0.125 g·L⁻¹ 3 个浓度进行流式细胞仪凋亡和周期的检测。

3.2 对 SGC-7901 的诱导凋亡作用 从表 2 可以看出:早期和晚期凋亡,枳实消痞丸各浓度组与阴性对照组比较,高、中浓度作用的细胞早期凋亡率均显著增加($P < 0.05$),且低浓度组与中、高浓度组差异明显($P < 0.05$)。同浓度作用 48,72 h 凋亡率比较,作用 72 h 比作用 48 h 的明显增高($P < 0.05$)。

3.3 枳实消痞丸对胃癌细胞株 SGC-7901 细胞周期的影响 从表 3 可以看出,枳实消痞丸各浓度组作用 SGC-7901 细胞 48 h 和 72 h 后,G₁/G₀ 期细胞 DNA 含量较阴性对照组比较,高、中浓度组增高

表 2 枳实消痞丸对胃癌 SGC-7901 细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s$)

%

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	早期凋亡率		晚期凋亡率	
		48 h	72 h	48 h	72 h
阴性对照	-	2.86 ± 0.40	4.77 ± 0.99	2.32 ± 0.42	8.56 ± 0.92
枳实消痞丸	2	15.89 ± 2.01 ¹⁾	20.36 ± 0.52 ^{1,4)}	10.87 ± 1.21 ¹⁾	19.77 ± 2.23 ^{1,4)}
	0.5	13.54 ± 1.67 ^{1,2)}	18.46 ± 2.01 ^{1,4)}	7.34 ± 0.86 ^{1,2)}	11.35 ± 1.74 ^{1,2,4)}
	0.125	2.96 ± 0.37 ^{2,3)}	6.37 ± 0.69 ^{2,3,4)}	3.10 ± 0.40 ^{2,3)}	6.82 ± 0.83 ^{2,3,4)}

注:与阴性对照组比较¹⁾ $P < 0.05$;与枳实消痞丸 2 g·L⁻¹组比较²⁾ $P < 0.05$;与枳实消痞丸 0.5 g·L⁻¹组比较³⁾ $P < 0.05$;同浓度作用 48 h 和 72 h 比较;⁴⁾ $P < 0.05$ 。(表 3 同)。

($P < 0.05$),低浓度组没有显著差异;S 期细胞 DNA 含量高浓度较阴性对照组减少($P < 0.05$),且明显低于低浓度组($P < 0.05$),中、低浓度组没有区别; G_2/M 期 DNA 含量除低浓度作用 48 h 与阴性对照

组比较无显著差异外,其他均较阴性对照组显著减少($P < 0.05$),且高、中浓度明显低于低浓度组($P < 0.05$)。同浓度比较,除了在 G_2/M 期高低浓度作用的细胞 72 h 较 48 h 相应降低外,其他均无显著差别。

表 3 枳实消痞丸对 SGC-7901 胃癌细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

%

药物	组别	质量浓度/g·L ⁻¹	G_1/G_0 期	S	G_2/M 期
48 h	阴性对照	-	52.19 ± 6.01	20.01 ± 4.61	27.80 ± 1.76
	枳实消痞丸	2	64.68 ± 6.03 ¹⁾	13.56 ± 2.85 ¹⁾	21.76 ± 2.48 ¹⁾
		0.5	62.74 ± 5.95 ¹⁾	16.67 ± 2.62	20.59 ± 2.99 ¹⁾
		0.125	54.01 ± 5.83 ^{2,3)}	18.15 ± 2.78 ²⁾	27.84 ± 2.84 ^{2,3)}
72 h	枳实消痞丸	2	70.45 ± 6.86 ¹⁾	12.67 ± 1.61 ¹⁾	16.88 ± 1.50 ^{1,4)}
		0.5	63.33 ± 5.96 ¹⁾	17.07 ± 1.70	19.60 ± 2.74 ¹⁾
		0.125	55.04 ± 5.42 ²⁾	20.56 ± 2.87 ²⁾	24.40 ± 1.99 ^{1,2,3,4)}

4 讨论

中药复方枳实消痞丸是临床常用行气消痞有效方剂,广泛用于多种胃肠疾病,并取得满意的疗效^[5]。该方临床疗效显著,安全可靠,值得研究。

MTT 法可以检测细胞的存活和生长状况^[6-8]。本实验采用 MTT 法对枳实消痞丸作用 24,48,72 h 后的 SGC-7901 细胞进行细胞毒性试验检测,结果显示枳实消痞丸对 SGC-7901 细胞具有较强的抑制作用,且表现出剂量和时间依赖性。随着药物浓度的减少,其抑制率依次降低。以药物浓度为 2 g·L⁻¹来看,随着时间的延长,其抑制率依次升高。为了进一步研究枳实消痞丸抑制细胞生长的机制,笔者观察了该方对胃癌细胞的细胞周期和凋亡影响。

细胞周期是指连续分裂细胞从一次有丝分裂结束到下一次有丝分裂结束所经历的整个过程^[9]。细胞周期各时相的 DNA 含量不同,正常细胞的 G_1/G_0 期具有二倍体细胞的 DNA 含量,而 G_2/M 期具有四倍体细胞的 DNA 含量,而 S 期的 DNA 含量介于二倍体和四倍体之间。按照 DNA 含量的不同,可将细胞周期各时相区分为 G_1/G_0 期, S 期和 G_2/M 期。

荧光染料碘化丙啶(PI)是一种插入性核酸荧光染料,但不能穿过完整的细胞膜。用乙醇固定细胞,使 PI 可以进入细胞并与核酸结合^[10]。用流式细胞术可以检测 DNA 结合 PI 的荧光强度反映出胞内 DNA 的含量,可计算出 G_1/G_0 期、S 期和 G_2/M 期的细胞百分比^[11]。

流式细胞仪检测结果显示:与阴性对照组相比,枳实消痞丸高、中浓度组所作用的细胞在 G_1/G_0 期的比率明显增加,处于 S 期和 G_2/M 期细胞比率相应减少,说明枳实消痞丸在 G_1/G_0 期阻滞了 SGC-7901 细胞 DNA 的合成,从而抑制细胞的增殖。在细胞的 G_1 期,可以合成 mRNA, tRNA, rRNA 和核蛋白体,从而为 DNA 的合成做准备^[12]。枳实消痞丸使 G_1 期细胞比率增高,可能由于过多细胞受损过重,超过了自身的修能力,难以通过 G_1/S 期检查点,从而抑制细胞增殖^[13]。

凋亡称为程序性死亡,它与肿瘤的发生发展密切相关,许多癌基因与抑癌基因都参与细胞凋亡的过程,一些天然药物提取物可通过干预细胞凋亡起到治疗作用^[14,15]。流式细胞仪用于检测细胞凋亡

具有其他方法不可比拟的优越性,既可定量又可定性,且具有操作快速、简单和灵敏性高等优点^[16]。流式细胞仪通常根据细胞膜的完整性将细胞分为“死”细胞和“活”细胞,因此凋亡细胞和正常细胞归为活细胞。Annexin V 与 PI 匹配使用,就可以将处于不同凋亡时期的细胞区分开来^[17]。流式细胞仪检测结果也显示:枳实消痞丸高、中浓度作用 SGC-7901 细胞 48 h 和 72 h 后能促进其凋亡,与细胞增殖实验结果一致,说明诱导细胞凋亡可能也是枳实消痞丸抑制细胞增殖的原因之一。

综上所述,本研究发现,枳实消痞丸能够抑制细胞增殖,并具有剂量和时间依赖性,其机制可能与药物阻滞细胞至 G₂/G₀ 期和诱导细胞凋亡有关,其分子机制需要进一步研究。

[参考文献]

[1] Yang L. Incidence and mortality of gastric cancer in China[J]. World J Gastroenterol, 2006,12(1):17.
 [2] 陈洁,梁超. 枳实消痞丸配伍特点及治疗功能性消化不良浅析[J]. 中医临床研究,2011,24(3):99.
 [3] McCloskey T W, Oyaizu N, Coronese M, et al. Use of a flow cytometric assay to quantitate apoptosis in human lymphocytes[J]. Clin Immunol Immunopathol, 1994,71(1):14.
 [4] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版社,1996:73.
 [5] 唐瑜之. 枳实消痞丸在肠胃病中的运用举隅[J]. 中国中医急症,2010,19(9):1628.
 [6] Leveque D, Jehl F. P-glycoprotein and pharmlalokietics [J]. Anticancer Res,1995, 15(2):331.
 [7] Uchiyama Kokubu N, Watanabe T, Nakajima M. A bioassay for the actibity of PSC 833 in human serum

serum for modulation of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance [J]. Anticancer Drugs, 2000, 11(7):583.
 [8] Labroille G, Belloc F, Bilhou Nabera C, et al. Cytometric study of intracellular P-gp expression and reversal of drug resistance [J]. Cytometry,1998,2(2):86.
 [9] 杨抚华. 医学细胞生物学概论[M]. 成都:四川技术出版社,1996:237.
 [10] 曹云新,刘智广,张晓楠. 流式细胞术细胞周期分析样品保存条件的研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 1999,15(4):317.
 [11] 梁智辉,朱慧芬,陈九舞. 流式细胞术基本原理与实用技术[M]. 武汉:华中科技大学出版社,2008:69.
 [12] Ngeow J, Tan I B, Choo S P. Targeted therapies in the treatment of gastric cancer [J]. Asia Pac J Clin Oncol, 2011,7(3):224.
 [13] Abrieu A, Brassac T, Galas S, et al. The Polo-like kinase Plx1 is a component of the MPF amplification loop at the G₂/M-phase transition of the cell cycle in Xenopus eggs [J]. Cell Sci,1998,111(12):1751.
 [14] Wong R S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2011,26:30.
 [15] Gao L L, Feng L, Yao S T, et al. Molecular mechanisms of celery seed extract induced apoptosis via s phase cell cycle arrest in the BGC-823 human stomach cancer cell line [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2011,12(10):2601.
 [16] 姜泊. 细胞凋亡基础与临床[M]. 北京:人民军医出版社,1999:280.
 [17] 王书奎,周振英. 实用流式细胞术彩色图谱[M]. 上海:第二军医大学出版社,2004:36.

[责任编辑 聂淑琴]