

健脾活血解毒法拆方含药血清对人大肠癌细胞 HCT-116 细胞的增殖抑制作用及其机制研究

丁宁¹, 杨宇飞^{1*}, 刘羿男², 许云¹, 何斌¹

(1. 中国中医科学院西苑医院, 北京 100191; 2. 北京大学医学部基础医学院, 北京 100191)

[摘要] **目的:**探讨健脾活血解毒法拆方含药血清对人结直肠癌细胞系 HCT-116 细胞的生长、细胞凋亡率、细胞凋亡相关基因和自噬基因表达的影响。**方法:**实验分为对照组、健脾组、活血组、解毒组、健脾活血组、健脾解毒组和健脾活血解毒组,分别采用酸性磷酸酶法(APA)、流式细胞术(FCM)和 Western blot 法检测各组含药血清对肿瘤细胞的生长、细胞凋亡率的变化、凋亡相关基因 Caspase-3 表达以及自噬相关基因 LC3 表达。**结果:**各组 10% 含药血清作用 24 h 后均能抑制 HCT-116 细胞增殖,但组间不具有明显差异。光镜下可见,健脾活血解毒法各组含药血清作用 24 h 后,细胞数量减少,且体积变小;细胞早期及中晚期凋亡率与对照组相比无显著性差异,但自噬相关蛋白 LC3 出现活性剪切条带。**结论:**健脾活血解毒法含药各拆方血清体外可抑制人结直肠癌 HCT-116 细胞增殖,机制可能与自噬作用通路密切相关。

[关键词] 结直肠癌; HCT-116 细胞; 含药血清; 自噬; 凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0272-04

[doi] 10.11653/syjf2013110272

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130329.1402.004.html>

[网络出版时间] 2013-03-29 14:02

Inhibition of Drug-containing Serum Decomposed Formulas of Jianpi Huoxue Jiedu Method on Prolifation of Human Colorectal Cancer Cell Line HCT-116 Cells

DING Ning¹, YANG Yu-fei^{1*}, LIU Yi-nan², XU Yun¹, HE Bin¹

(1. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100191, China;
2. School of Basic Medical, Peking University, Beijing 100191, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the impacts of the drug-containing serum of decomposed formulas based on Jianpi Huoxue Jiedu method on growth, rate of apoptosis, apoptosis related genes and autophagy gene expression t in human colorectal cancer cell line HCT-116 cells. **Method:** The experiment was divided into a control group, Jianpi group, Huoxue group, Jiedu group, Jianpi + Huoxue group Jianpi + Jiedu group and Jiapi + Huoxue + Jiedu group respectively, using the acid phosphatase enzymatic (APA), flow cytometry (FCM) and Western blot to assay each drug-containing serum' treated tumor cell's growth, apoptosis rate changes, apoptosis-related genes Caspase-3 expression and autophagy LC3 gene expression. **Result:** After 10% drug-containing serum treated for 24 h, it showed inhibited proliferation of HCT-116 cells, however, no significant difference between the groups was found. The decrease in cell number and the shrinking in volume could be observed by light microscope after drug-containing serum treated for 24 h. Early and late apoptotic rate compared with the control group showed no significant difference, but autophagy related protein LC3 appeared active shear bands. **Conclusion:** The drug-

[收稿日期] 20121031(581)

[第一作者] 丁宁,在读博士,主治医师,从事中西医结合肿瘤临床工作,Tel:010-62875599,E-mail:010dingning@163.com

[通讯作者] * 杨宇飞,博士生导师,主任医师,从事中西医结合肿瘤临床工作,Tel:010-62875599,E-mail:yyf93@vip.sina.com

containing serum of Jianpi Huoxue Jiedu method can inhibit human colorectal cancer cell line HCT-116 cells on proliferation *in vitro*. The mechanism may be closely related to the autophagy pathway.

[**Key words**] colorectal cancer; HCT-116 cells; drug-containing serum; autophagy; apoptosis

结直肠癌是发病率和病死率较高的恶性肿瘤,目前我国城市和农村发病率位居第三位^[1]。在西苑医院肿瘤科前期的临床和基础研究中表明:中医药能够延长晚期结直肠癌的中位生存期和疾病进展期,提高生活质量,单纯中医治疗在中位生存期和总生存期及生活质量上优于单纯化疗^[2]。西苑医院肿瘤科作为国家中医药管理局“十一五”结直肠癌专病建设组长单位和“十二五”重点专科建设单位,联合全国 26 家医院,进行了 575 例的回顾性研究及 469 例的前瞻性研究表明:晚期结直肠癌患者一、二、三年生存率分别为 42.24%, 15.34%, 7.41%。中西医结合的模式也在疗效上得到肯定,肿瘤控制率达到 74.3%,肿瘤控制率指完全缓解(CR)+部分缓解(PR)+病变稳定(SD),其中(CR+PR)占 16.3%。并在 2011 年中国老年学会肿瘤分会上提出了结直肠癌脾虚、气血瘀滞、毒邪久犯三位一体致病理论——即以脾虚为本,以毒邪为用,瘀邪为助而发生发展的见解,并在临床治疗中摸索出以健脾活血解毒为治则的中医治疗思路,取得了较为满意的疗效^[3]。本研究将健脾活血解毒法方剂进行拆方及组合实验,探讨其在体外的抗肿瘤效应。

1 材料

1.1 细胞及培养 人结直肠癌细胞系 HCT-116(北京大学医学部细胞生物学系惠赠)细胞用含 10% 新生牛血清、100 U·mL⁻¹青霉素、100 U·mL⁻¹链霉素的 DMEM 培养基在 37 ℃, 5% CO₂ 饱和湿度培养,待细胞汇合度达到 90% 时,用 0.25% 的胰蛋白酶消化,以 1:4 比例传代培养。

1.2 药物组成 中药健脾活血解毒方,由三部分组成。健脾:太子参 30 g,茯苓 10 g,炒白术 10 g,炙甘草 6 g,黄芪 20 g;活血:三七粉 3 g;解毒:红藤 15 g,藤梨根 15 g,蛇六谷 15 g,八月札 15 g。

1.3 动物 健康成年 Wistar 大鼠,体重 180 ~ 220 g,由中国中医科学院西苑医院实验动物中心提供,许可证号 SCXK(京)2011-0004。

1.4 仪器与试剂 AA-160 精密电子天平(Denver),高速台式冷冻离心机(Sigma),二氧化碳恒温培养箱(Napco),M680 微孔板酶标仪(Bio-Rad),FACScan 流式细胞分析仪(Thermo orion),DYY-6C 电泳仪(北京六一仪器厂)。Caspase-3(sc-

65496)、LC3(sc-134226)兔抗人多克隆抗体(Santa Cruz 公司),凋亡检测试剂盒(cx1001)(北京宝赛生物技术有限公司)。

2 方法

2.1 分组及含药血清制备 将大鼠 35 只随机分为 7 组,分别为对照组、健脾组、活血组、解毒组、健脾活血组、健脾解毒组、健脾活血解毒组。对照组 0.9% 氯化钠注射液(10 mL·kg⁻¹, 2 次/d),药物按照人日剂量的 5 倍按健脾组(19 g·kg⁻¹, 2 次/d),活血组(0.75 g·kg⁻¹, 2 次/d),解毒组(15 g·kg⁻¹, 2 次/d),健脾活血组(19.75 g·kg⁻¹, 2 次/d)健脾解毒组(34 g·kg⁻¹, 2 次/d),健脾活血解毒组(34.75 g·kg⁻¹, 2 次/d),均连续 ig 3 d(共 5 次),末次给药后 2 h,3.5% 水合氯醛 ip 麻醉,腹主动脉取血。静置后离心后获得血清,0.22 μm 滤网过滤,56 ℃ 灭活 30 min, -80 ℃ 保存备用。

2.2 含药血清对肿瘤细胞生长的影响 用酸性磷酸酶法(acid phosphatase assay, APA),取对数生长期 HCT-116 细胞,消化后制成单细胞悬液,按密度 1.5 × 10³ 个/孔接种于 96 孔培养板,培养 24 h,细胞完全贴壁后,实验分为空白对照组和各实验组(同 2.1),分别在 5%, 10% 含药血清处理 24 h 后,弃去培养液,用 100 μL 4-硝基苯磷酸盐缓冲液洗 2 遍,再加入 10 mmol·L⁻¹ 的硝基苯磷酸盐溶液 100 μL(用 0.1 mol·L⁻¹ 醋酸缓冲液配制,含 0.1% Triton X-100),置 37 ℃ 孵育 2 h,每孔加入 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠 10 μL 终止反应。用酶联免疫检测仪在 405 nm 处检测吸光度(A),重复实验 3 次。计算细胞增殖的抑制率。

$$\text{抑制率} = (1 - A_{\text{含药血清组}} / A_{\text{空白对照组}}) \times 100\%$$

2.3 含药血清对细胞凋亡率的影响 采用 AnnexinV-PI 双染法检测 实验分组同 2.1。各组分别作用 24 h 后收集细胞,按 AnnexinV-PI 细胞凋亡检测试剂盒提供的方法进行染色,流式细胞仪(FACSCalibur BD 公司)测定细胞的凋亡率。

2.4 含药血清对凋亡和自噬相关基因的表达的影响 采用 Western blot 检测,实验分组同 2.1。收集各组细胞,用 Bradford 法对蛋白质进行定量。蛋白质样品与等量 2 × SDS 凝胶加样缓冲液充分混合,煮沸变性 5 min,10% SDS-PAGE 80 V 电泳分离,湿

转至硝酸纤维素膜上。5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 分别加抗 Caspase-3 单抗 (1:500)、LC3 单抗 (1:500)、抗 Actin 单抗 (1:500)、抗细胞色素 c 单抗 (1:500) 室温孵育 1 h。TBST 洗膜 3 次, 10 min/次, 然后与结合有辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠及兔抗山羊 IgG (1:5 000) 室温孵育 1 h, TBS 洗膜 3 次, 10 min/次, 与化学发光剂 ECL 反应, X 射线胶片曝光显影。

2.5 数据处理 用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用配对 *t* 检验, $P <$

0.05 表示有显著性差异。

3 结果

3.1 含药血清各组对 HCT-116 细胞增殖的影响 倒置显微镜下观察: 对照组癌细胞胞质透明、呈扁平状铺展生长, 而加入 10% 含药血清组细胞数量减少, 细胞呈现聚集回缩状态, 细胞质中出现大小不等的空泡, 细胞体积变小, 出现萎缩, 胞质内容物增多 (图 1)。APA 检测显示 5%, 10% 含药血清作用 24 h 后抑制细胞的生长 ($P < 0.05$); 健脾活血解毒法的各组拆方组合, 组间不具有显著性差异 (图 2)。

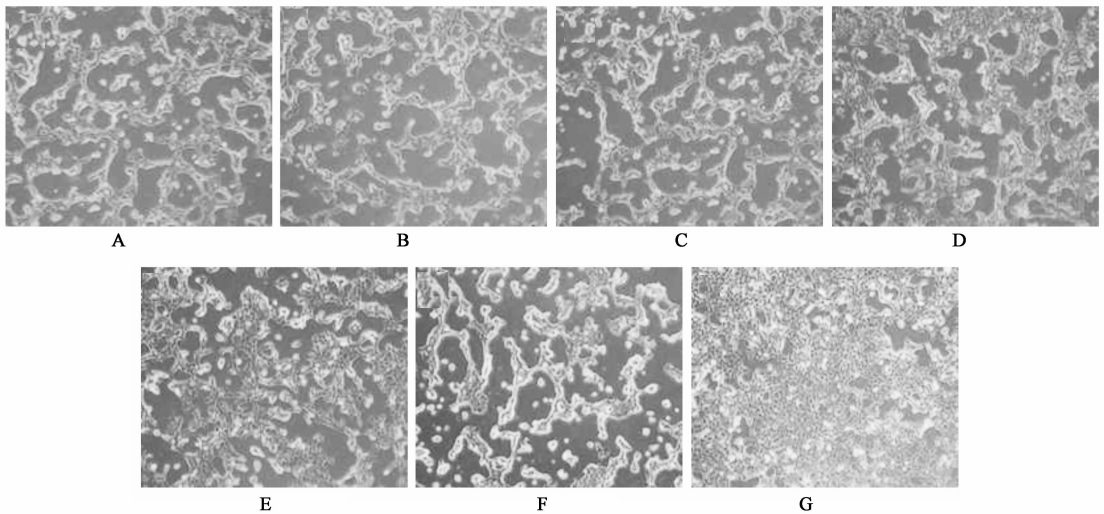


图 1 健脾活血解毒法各拆方 10% 含药血清作用 24 h 后 HCT-116 细胞的形态变化 (相差显微镜, $\times 400$)

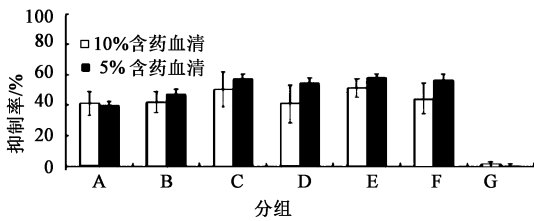


图 2 健脾活血解毒法各拆方 10%, 5% 含药血清作用 24 h 对 HCT-116 细胞 24 h 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 含药血清各组对细胞凋亡率的影响 经流式细胞仪检测, 对照组细胞凋亡率很低, 而各含药血清组细胞凋亡率均升高 (包括早期凋亡和中、晚期凋亡率), 但与对照组相比无显著性差异 (表 1)。

3.3 含药血清各组对 Caspase-3 和 LC3 蛋白表达的影响 Western Blotting 检测各含药血清组与 HCT-116 细胞作用 24 h 后, 活血组、解毒组、健脾活血组、健脾解毒组的凋亡相关蛋白 Caspase 3 表达略有增高, 而各组与自噬相关 LC3 蛋白均出现活性剪切条带。其中解毒组、健脾活血组、健脾解毒组的 LC3 活性剪切条带更为明显 (图 3)。

表 1 健脾活血解毒法各拆方 10% 含药血清作用 HCT-116 细胞 24 h 细胞凋亡率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$) %

组别	早期凋亡细胞	中、晚期凋亡细胞
健脾方	2.56 ± 1.79	7.32 ± 3.94
活血方	4.90 ± 2.95	6.30 ± 3.39
解毒方	3.17 ± 2.64	8.30 ± 2.03
健脾活血方	3.02 ± 2.48	8.49 ± 3.02
健脾解毒方	6.25 ± 3.30	9.36 ± 2.01
健脾活血解毒方	4.20 ± 2.21	7.38 ± 2.53
空白血清	1.34 ± 1.93	3.89 ± 3.42

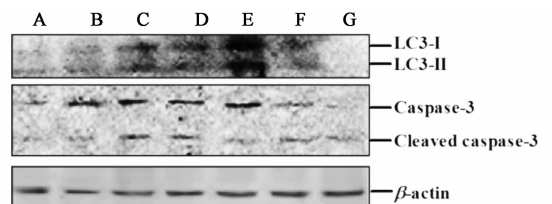


图 3 健脾活血解毒法各拆方 10% 含药血清作用 HCT-116 细胞 24 h 后 Caspase-3, LC3 蛋白的表达

4 讨论

结直肠癌在古籍未有专著论述,散在于中医的“肠风”、“肠覃”、“脏毒”、“下瘀”病范畴。在西苑医院肿瘤科的治疗经验中,结合晚期结直肠癌脾虚、血瘀、毒聚的核心病机进行辨证论治,为此提出了“健脾、活血、解毒法”。健脾活血解毒法立足于健脾为本,健脾方来自于经方四君子汤,其创新之处在于结合晚期肠癌病人病机将党参换为 30 g 太子参,另外结合晚期病人气血俱亏的特点加 20 g 黄芪。与传统扶正相比健脾的治则更体现了晚期结直肠癌患者的辨证特点^[4]。近年来,越来越多的肿瘤研究专注于挖掘古方经方,研究发现,“益气健脾方”应用于结肠癌手术患者临床疗效明显,可以促进患者术后肠道功能恢复,减轻术后炎症反应,且能降低患者不良反应的发生率^[5]。作者发现健脾活血解毒法各拆方组 5%, 10% 含药血清作用 HCT-116 肿瘤细胞,能显著抑制肿瘤细胞增殖。各组细胞抑制率均在 50% 以上,镜下观察细胞数量减少,细胞形态不规则,呈肿胀成簇或悬浮。但流式细胞检测发现 10% 含药血清作用 HCT-116 肿瘤细胞 24 h 细胞早期凋亡率并不高,因此考虑健脾活血解毒法各组合药血清引起的细胞死亡很可能不通过凋亡通路诱导。Caspase-3 是依赖胱天蛋白酶的凋亡途径的重要效应者,为此作者又检测了凋亡相关蛋白 Caspase-3,发现含药血清各组与对照相比,活血组、解毒组、健脾+活血组、健脾+解毒组 Caspase-3 表达略增高,各含药血清组及对照组均有 Caspase-3 剪切带表达。为了求证各含药血清组到底因何种机制诱导细胞死亡,作者又检测了与自噬机制相关标志物 LC3。发现各含药血清组与对照组相比,各组 LC3 蛋白均有表达,考虑健脾活血解毒法引起的细胞死亡与自噬机制相关,凋亡在其中只起辅助作用。

凋亡和自噬是两种最重要的细胞程序性死亡。自噬是存在于正常细胞的生理功能,细胞在营养缺乏时会启动自噬机制。并且自噬能够吞噬衰老细胞器转化为能量,为线粒体供能模式起到了重要的补充作用^[6-7]。在自噬过程中,部分或整个细胞质、细胞器被包裹进双层膜的囊泡,形成自噬泡或自噬体,自噬在肿瘤中的作用比较复杂,一方面自噬可以保护细胞抵抗药物对肿瘤细胞的杀伤作用,另一方面过度的自噬可以诱导细胞走向死亡^[8-9]。近年来越来越多的研究证实自噬参与到细胞程序性死亡,一些植物来源化合物如刀豆凝集素(ConA)可以诱导细胞自噬形式的程序性死亡。凋亡和自噬之间存在

多种复杂关系。凋亡和自噬可以由同样的上游信号激活,比如 ROS, p53 等^[10-11],凋亡和自噬之间还存在一种复杂的关系^[12],在有些情况下,自噬和凋亡一起发生;而在另一些情况下,细胞以一种选择的模式在凋亡和自噬之间切换。健脾活血解毒法各组分诱导 HCT-116 细胞凋亡与自噬是否存在一定的关联或拮抗还有待进一步探讨。

本实验结果表明健脾、活血、解毒法对肿瘤细胞均有直接杀伤作用,而合方的体外抗肿瘤效应并不更明显,其原因可能很多,有待进一步分析研究。

[参考文献]

- [1] 雷通海. 最新的中国肿瘤发病死亡数据——评“中国肿瘤登记地区 2006 年肿瘤发病和死亡资料分析”[J]. 中国肿瘤, 2010(6): 366.
- [2] 杨宇飞, 陈焱新, 吴煜. 祛邪胶囊对晚期结直肠癌患者生存期和生活质量的随机对照研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2008(2): 111.
- [3] 郭中宁. 580 例晚期结直肠癌患者中医综合诊疗方案多因素分析[C]. 第五届中国老年肿瘤学大会论文集, 2011: 395.
- [4] 孙晓霞, 孟静岩. 扶正解毒活血法抗大肠癌转移的理论探析[J]. 江西中医药, 2008(4): 10.
- [5] 杨满菊. 益气健脾方治疗结肠癌外科术后的临床疗效观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(13): 262.
- [6] Colombo M I. Autophagy: a pathogen driven process[J]. IUBMB Life, 2007(4/5): 238.
- [7] Qu X, Zou Z, Sun Q, et al. Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development[J]. Cell, 2007, 128: 931.
- [8] Marx J. Autophagy: is it cancer's friend or foe? [J]. Science, 2006, 312: 1160.
- [9] Eugenia Morselli, Lorenzo Galluzzi, Oliver Kepp, et al. Anti-and pro-tumor functions of autophagy[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 10: 1016.
- [10] Ruth Scherz-Shouval, Elena Shvets, Fass E, et al. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4 [J]. EMBO, 2007, 26: 1749.
- [11] D Crighton, S Wilkinson, J O'Keefe, et al. A p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis [J]. Cell, 2006, 126: 121.
- [12] Sophie Pattingre, Amina Tassa, Qu X, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit BECLIN 1-dependent autophagy[J]. Cell, 2005, 122, 927.

[责任编辑 何伟]