

# 胃康舒宁对胃癌细胞株体外生长及细胞周期的影响

蒋时红\*, 刘燕, 吴耀松

(河南中医学院方剂学科, 郑州 450046)

**[摘要]** 目的:观察中药复方胃康舒宁对胃癌细胞株 SGC-7901 体外生长情况及细胞周期的影响。方法:以胃康舒宁 200, 400, 800 mg·L<sup>-1</sup>作用细胞 24, 48, 72, 96 h 后,采用四甲基偶氮唑盐法(MTT)和流式细胞仪方法检测细胞抑制率和细胞周期各时相比率变化。结果:与空白对照组相比,胃康舒宁各组细胞抑制率明显升高( $P < 0.05$ ),其中 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞周期比率明显升高( $P < 0.05$ )。结论:胃康舒宁能体外抑制胃癌细胞的生长,且能将细胞周期阻滞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期。

**[关键词]** 胃康舒宁; 胃癌细胞株; 体外抑制; 细胞周期

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0191-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013110191

## Effect of Weikang Shuning Compound on Growth and Cell Cycle of Gastric Cancer Cells *in vitro*

JIANG Shi-hong\*, LIU Yan, WU Yao-song

(Discipline of Prescriptions, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the growth inhibition and cell cycle arrest on gastric cancer cell line caused by Weikang Shuning compound. **Method:** After the 24, 48, 72 and 96 h action of Weikang Shuning, growth inhibition and DNA content of each phase cell cycle were detected by using MTT and flow cytometry technique. **Result:** The inhibition rate and DNA content in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase of Weikang Shuning groups were significantly higher than those of negative control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Weikang Shuning could inhibit the proliferation of SGC-7901 cells *in vitro*, and arrest the cell cycle at G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase.

**[Key words]** Weikang Shuning; gastric cancer cell line; inhibition *in vitro*; cell cycle

胃癌是我国死亡率很高的主要恶性肿瘤之一。近年来,应用中药复方对胃癌进行防治研究已成为当今医学研究的热点,尤其是对于无法手术及放化疗的晚期患者,中医治疗作为主要的治疗手段,在胃癌的治疗中发挥着重要的作用<sup>[1-2]</sup>。胃康舒宁由太子参、石斛、白术、半枝莲、石见穿等中药组成。既往研究表明该方用于治疗慢性萎缩性胃炎、胃癌手术后放化疗期间的症状改善以及晚期胃癌患者能取得很好的疗效,且对胃癌前病变的改善及相关蛋白的

表达有明显的影 响<sup>[3-5]</sup>。本实验通过体外实验,观察了胃康舒宁对人胃癌细胞增殖及其细胞周期时相分布的影响,探讨胃康舒宁对胃癌细胞株的干预作用及机制。

### 1 材料

**1.1 试剂及细胞株** 人胃癌细胞株 SGC-7901,由河南省生物工程技术研究中心提供,本实验室传代培养。氟脲嘧啶(上海旭东海普药业有限公司,批号 H31020593), RPMI 1640 (solarbio 公司,批号 31800-500),四甲基偶氮唑盐(MTT, Solarbio 公司,批号 M8180),无支原体新生牛血清(杭州天杭生物科技有限公司,批号 100701),二甲基亚砜(Amresco 公司,批号 Amresco0231),细胞 DNA 含量检测试剂盒(凯基生物公司,批号 KAG511)。

**1.2 仪器** ELx800 型酶标仪(Bio-Tek 公司),

**[收稿日期]** 20120913(011)

**[基金项目]** 河南省科技攻关项目(102101310500-8)

**[通讯作者]** \* 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

36012 型光学显微镜 (Olympus 公司), CKX41 倒置荧光相差显微镜 (Olympus 公司), 3-18K 台式离心机 (Sigma 公司)。

## 2 方法

**2.1 药物配制** 胃康舒宁方经蒸馏水浸泡后于砂锅中煎煮 40 min 去渣, 95% 乙醇澄取上清液过滤, 回收乙醇, 减压干燥成粉末, 以 RPMI 1640 溶解过滤除菌并配制成实验所需浓度, 加入 10% 的小牛血清, 4 °C 冰箱避光保存备用。

**2.2 细胞培养** 将 SGC-7901 细胞接种于含 10% 小牛血清, 100 U·mL<sup>-1</sup> 青霉素和 U·mL<sup>-1</sup> 链霉素的 RPMI 1640 培养液中, 置于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 饱和湿度的培养箱中孵育, 每 2 天换液 1 次, 待细胞生长至对数生长期, 以常规胰酶蛋白消化法传代培养。

**2.3 胃康舒宁对胃癌细胞体外抑制作用的时效-剂量-效应关系检测** 取对数生长期细胞常规消化, 调整细胞密度至 1 × 10<sup>5</sup> 个/mL, 接种于 96 孔培养板中 (100 μL/孔), 于培养箱中孵育 24 h, 待细胞贴壁后取出, 随机分为 5 组分别加入胃康舒宁药液为 200, 400, 800 mg·L<sup>-1</sup> 每孔 200 μL, 阳性对照组加入氟尿嘧啶 25 mg·L<sup>-1</sup> 每孔 200 μL, 空白对照组 (加细胞不加药)。另设空白调零组 (只加培养液), 每组设 5 个复孔。将培养板置于培养箱中再孵育 24, 48, 72, 96 h 后取出, 每孔加入 5 g·L<sup>-1</sup> MTT 溶液 20 μL, 继续孵育 4 h 后终止培养, 小心吸弃孔内旧液, 加入二甲基亚砷 150 μL/孔, 震荡混匀使结晶充分溶解后,

于酶标仪 490 nm 波长处检测每孔 (A), 并计算抑制率。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{空白对照组}} - A_{\text{用药组}}) / A_{\text{空白对照组}} \times 100\%$$

**2.4 胃康舒宁对 SGC-7901 细胞周期影响的检测** 分别取生长状态良好、处于对数生长期的正常对照组和胃康舒宁药物处理组细胞, 以胰蛋白酶将细胞消化收集细胞, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤细胞 1 次 (离心 1 000 r·min<sup>-1</sup>, 5 min) 收集并调整细胞密度为 1 × 10<sup>6</sup> 个/mL, 制备的单细胞悬液用 70% 的乙醇固定, 4 °C 保存, 染色前用 PBS 洗去固定液, 加入 100 μL RNase A, 37 °C 水浴 30 min, 再加入 400 μL 碘化丙啶 (PI) 染色混匀, 4 °C 避光 30 min, 上流式细胞仪检测, 记录激发波长 488 nm 处红色荧光, 数据经计算机软件分析, 测出细胞周期各时相的变化。

**2.5 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 为有统计意义。

## 3 结果

**3.1 对 SGC-7901 细胞的体外抑制作用** 胃康舒宁作用 SGC-7901 细胞 24 h 以上, 胃康舒宁 200, 400, 800 mg·L<sup>-1</sup> 组对细胞均具有明显的抑制作用, 与空白对照组比较有显著差异 (*P* < 0.05)。随着药物剂量增加和作用时间的延长, 细胞生长抑制明显增强, 细胞存活率明显下降, 呈明显的时间-剂量-效应关系。见表 1。

表 1 胃康舒宁不同作用时间对 SGC-7901 细胞抑制率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别   | 剂量/mg·L <sup>-1</sup> | 24 h                       | 48 h                           | 72 h                           | 96 h                           |
|------|-----------------------|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 空白对照 | -                     | -                          | -                              | -                              | -                              |
| 胃康舒宁 | 800                   | 17.42 ± 6.28 <sup>1)</sup> | 32.37 ± 5.67 <sup>2,3)</sup>   | 36.01 ± 4.70 <sup>2,4,8)</sup> | 48.39 ± 2.29 <sup>2,4,8)</sup> |
|      | 400                   | 18.30 ± 5.89 <sup>1)</sup> | 22.14 ± 8.65 <sup>2,4)</sup>   | 18.52 ± 5.11 <sup>2,4,6)</sup> | 31.26 ± 6.21 <sup>2,4,6)</sup> |
|      | 200                   | 14.29 ± 5.67 <sup>1)</sup> | 16.34 ± 5.86 <sup>1,4,5)</sup> | 12.73 ± 6.84 <sup>1,4,6)</sup> | 24.31 ± 6.03 <sup>2,4,6)</sup> |
| 氟尿嘧啶 | 25                    | 21.14 ± 7.18 <sup>1)</sup> | 51.17 ± 3.66 <sup>2,5,8)</sup> | 67.41 ± 2.13 <sup>2,6,8)</sup> | 82.04 ± 0.92 <sup>2,6,8)</sup> |

注: 与空白对照比较<sup>1)</sup> *P* < 0.05, <sup>2)</sup> *P* < 0.01; 与氟尿嘧啶组比较<sup>3)</sup> *P* < 0.05, <sup>4)</sup> *P* < 0.01; 与胃康舒宁 800 mg·L<sup>-1</sup> 比较<sup>5)</sup> *P* < 0.05, <sup>6)</sup> *P* < 0.01; 与胃康舒宁 400 mg·L<sup>-1</sup> 比较<sup>7)</sup> *P* < 0.05, <sup>8)</sup> *P* < 0.01 (表 2 ~ 3 同)。

**3.2 对 SGC-7901 细胞周期时相的影响** 与空白对照组比较, 氟尿嘧啶和胃康舒宁各组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期可见明显的细胞凋亡峰, 胃康舒宁 200, 400, 800 mg·L<sup>-1</sup> 组随剂量的增高, 凋亡峰也愈明显, 作用 48, 72 h 后胃康舒宁 800, 400 mg·L<sup>-1</sup> G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例分别高达 71.6%, 75.58%, 与空白对照相比分别增加了 19.98%, 22.81%。G<sub>2</sub>/M 期细胞比例分别降至 4.44%, 2.9%。提示胃康舒宁可将 SGC-7901 细胞

阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期。见表 2, 3, 图 1。

## 4 讨论

胃癌是临床常见的恶性肿瘤, 属于中医的伏梁、胃脘痛、噎膈、积聚等范畴<sup>[6]</sup>。胃癌病因病机主要有因虚致病、因痰致病、情志致病、饮食不节、因瘀致病、因结致病、寒邪致病等几个方面<sup>[7]</sup>。现代多数医家对胃癌的治疗形成共识, 认为胃癌是本虚标实之证, 脾胃肾虚为本, 气滞、血瘀、痰凝、邪热为标; 初

表2 胃康舒宁作用 SGC-7901 细胞 48 h 对细胞周期的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 组别   | 剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | G <sub>1</sub>                   | S                            | G <sub>2</sub> /M            |
|------|-------------------------------------|----------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 空白对照 | -                                   | 51.62 ± 0.41 <sup>4,6,7)</sup>   | 37.86 ± 0.61 <sup>4,6)</sup> | 10.76 ± 0.76 <sup>4,5)</sup> |
| 胃康舒宁 | 800                                 | 71.40 ± 3.65 <sup>2,3,7)</sup>   | 24.16 ± 1.49 <sup>2,7)</sup> | 4.44 ± 1.48 <sup>1)</sup>    |
|      | 400                                 | 61.90 ± 2.93 <sup>1,4,5)</sup>   | 32.21 ± 1.34 <sup>4,5)</sup> | 5.89 ± 1.99 <sup>3)</sup>    |
|      | 200                                 | 61.77 ± 4.19 <sup>1,4,5,7)</sup> | 32.73 ± 2.21 <sup>4,6)</sup> | 5.51 ± 3.04                  |
| 氟脲嘧啶 | 25                                  | 81.40 ± 2.75 <sup>2,5,8)</sup>   | 18.36 ± 2.92 <sup>2,8)</sup> | 0.23 ± 0.23 <sup>2,7)</sup>  |

表3 胃康舒宁作用 SGC-7901 细胞 72 h 对细胞周期的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 组别   | 剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | G <sub>1</sub> /G <sub>0</sub> | S                              | G <sub>2</sub> /M              |
|------|-------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 空白对照 | -                                   | 52.77 ± 1.52 <sup>4,6,8)</sup> | 35.45 ± 1.77 <sup>4,6,8)</sup> | 11.78 ± 1.68 <sup>4,6,8)</sup> |
| 胃康舒宁 | 800                                 | 75.58 ± 1.59 <sup>2,4)</sup>   | 21.52 ± 1.61 <sup>2,3)</sup>   | 2.90 ± 0.50 <sup>2,3,7)</sup>  |
|      | 400                                 | 77.31 ± 0.56 <sup>2,4)</sup>   | 19.58 ± 1.8 <sup>2)</sup>      | 6.12 ± 0.04 <sup>2,4,5)</sup>  |
|      | 200                                 | 54.63 ± 2.22 <sup>4,6,8)</sup> | 35.37 ± 2.17 <sup>6,8)</sup>   | 10.34 ± 0.29 <sup>4,6,8)</sup> |
| 氟脲嘧啶 | 25                                  | 85.07 ± 0.88 <sup>2,6,8)</sup> | 14.59 ± 0.70 <sup>2,4,5)</sup> | 0.33 ± 0.18 <sup>2,5,8)</sup>  |

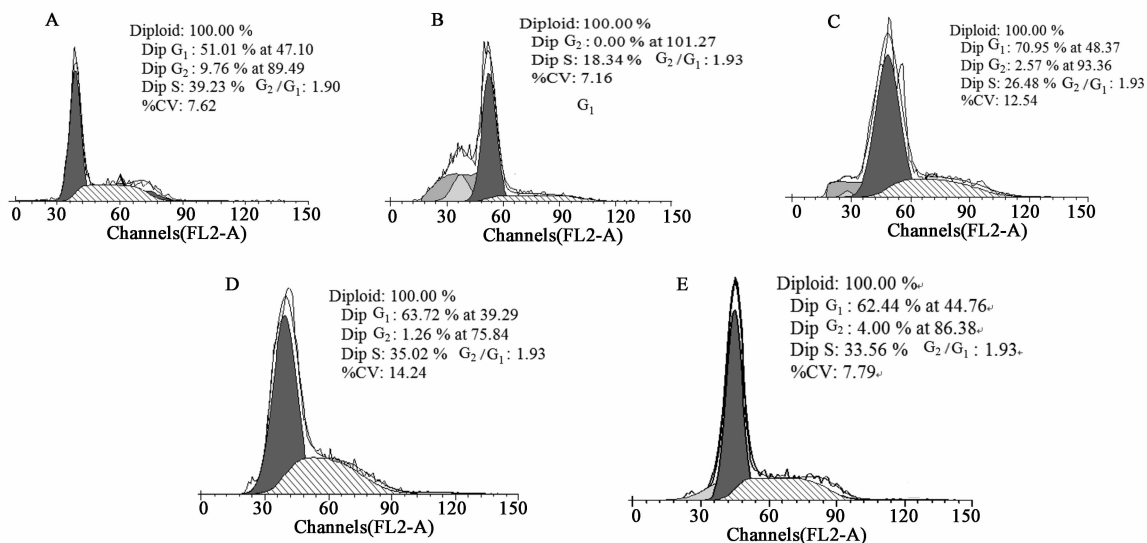
A. 空白对照组; B. 氟脲嘧啶 25  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组; C. 胃康舒宁 800  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组; D. 胃康舒宁 400  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组; E. 胃康舒宁 200  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组

图1 胃康舒宁对 SGC-7901 细胞周期时相的影响

期以标实为主,后期以本虚为主,出现气血两亏、脏器衰弱等症状<sup>[8]</sup>。根据恶性肿瘤的病因病机,治疗上采用辨证论治,分别施以理气行滞、清热解毒、活血化瘀、软坚散结、扶正固本等不同方法。胃康舒宁方是课题组根据多年临床治疗肿瘤总结出来的有效经验方,方中以辛苦寒之半枝莲、石见穿为君,清热解毒又善活血化瘀。半枝莲为唇形科黄芩植物,其味辛、苦、性寒、归肺、肝、肾经,具有清热解毒、散瘀活血功效、可治消化道癌、肝癌、肺癌、宫颈癌、乳腺癌、绒毛膜上皮癌等功效,也可用于疔疮肿毒、咽喉肿痛、毒蛇咬伤、跌打伤痛、水肿、黄疸等。石见穿有清热解毒、活血理气止痛、散结消肿等功能。该药在

临床恶性肿瘤的治疗中,被许多医家辨证应用,均取得良好的效果<sup>[9]</sup>;臣用寒凉之黄连、竹茹,清热燥湿化痰,一助君药清热解毒之功,二能燥湿化痰以散结;太子参、石斛、白术补气健脾,益胃生津防君臣苦寒伤胃之弊,当归、土元补血活血,白芍、佛手柔肝疏肝共为佐药。全方共奏疏肝健脾、益气生津、养血活血之功。综观全方用药轻灵,清热而不伤胃,养阴而不恋邪,且无壅滞之弊,寓治于养之中。该方不仅可以抑制癌细胞的生长,还可以提高人体免疫力,很好地改善胃癌患者免疫力低下的状态,从而抑制肿瘤细胞的生长。

肿瘤的发展一般经过始发、促癌和演变3个漫

# 左归丸对庆大霉素所致肾小管损伤大鼠 c-Jun 氨基末端激酶的影响

范为民<sup>1</sup>, 王小琴<sup>2\*</sup>

(1. 湖北中医药大学, 武汉 430061; 2. 湖北省中医院肾内科, 武汉 430061)

**[摘要]** 目的:探讨左归丸对庆大霉素所致肾小管损伤大鼠 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)的影响。方法:将 40 只雄性 Wistar 大鼠随机分为空白对照组(C 组),模型组(M 组),c-Jun 氨基末端激酶特异性抑制剂(SP600125)组(S 组),左归丸组(Z 组),每组 10 只,对照组 ip 给予 0.9% 生理盐水 2.5 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,模型组 ip 硫酸庆大霉素 100 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,SP600125 组左侧 ip 硫酸庆大霉素 100 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,2 h 后右侧 ip SP600125 15 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,左归丸组 ip 硫酸庆大霉素 100 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 和 ig 左归丸水溶液 10 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,4 组大鼠连续给药 10 d。第 11 日测量各组大鼠尿 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(NAG);HE 染色观察各组大鼠肾脏病理状况;免疫组化技术检测各组大鼠肾脏 JNK,c-Jun 的表达;以 Western blot 方法检测各组大鼠肾脏 c-Jun 氨基末端激酶(JNK),c-Jun 蛋白的表达。结果:尿 NAG 酶结果显示:与 C 组比较,M 组尿 NAG 酶显著升高(P<0.01);与 M 组比较,S 组和 Z 组尿 NAG 酶下降(P<0.05)。HE 染色结果显示:C 组肾小管、间质无特殊改变;M 组肾小管上皮细胞出现空泡变性、管腔出现损伤,有大量的炎性细胞浸润;S 组与 Z 组肾小管少量炎性细胞浸润,轻微肿胀变性。免疫组化结果显示:与 C 组比较,M 组 JNK,c-Jun 在肾小管大量表达(P<0.01);与 M 组比较,S 组和 Z 组 JNK,c-Jun 在肾小管表达较少(P<0.01)。免疫印迹杂交结果显示:M 组 JNK,c-Jun 蛋白灰度值较对照组明显升高(P<0.01),S 组与 Z 组较 M 组灰度值下降(P<0.01 或 P<0.05)。结论:左归丸对庆大霉素所致肾小管损伤大鼠的保护作用可能与抑制 c-Jun 氨基末端激酶的激活有关。

**[关键词]** 肾小管损伤;庆大霉素;左归丸;c-Jun 氨基末端激酶特异性抑制剂(Sp600125);c-Jun 氨基末端激酶

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0194-05

**[收稿日期]** 20130205(008)

**[基金项目]** 国家临床重点专科建设项目(FW20113289)

**[第一作者]** 范为民,博士研究生在读,从事中医药防治肾脏疾病研究,E-mail:fanweimin\_9958@163.com

**[通讯作者]** \*王小琴,E-mail:wangxiaqin3@sohu.com

长的阶段。主要与细胞增殖过度及凋亡不足有关。本研究从抑制细胞增殖和对细胞周期调控的角度着手,观察了中药复方胃康舒宁对胃癌细胞 SGC-7901 增殖的影响,发现随着药物剂量的增大,抑制增殖效果越明显;同一剂量随着作用时间延长,抑制效果越明显。提示胃康舒宁对胃腺癌 SGC-7901 细胞的增殖抑制作用存在明显的时间、剂量依赖关系。胃康舒宁对细胞周期各时相也有影响,其水煎液作用胃癌细胞后能使细胞 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期比例增高,S、G<sub>2</sub>/M 期比例降低阻滞 SGC-7901 细胞周期于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期,从而控制胃癌细胞周期进程。

## [参考文献]

[1] 唐武军. 郁仁存老师治疗胃癌经验总结[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(8):69.  
[2] 祁玉娟. 康艾注射液联合 FOLFOX4 方案治疗晚期胃癌的疗效观察及血清 VEGF 水平变化[J]. 中国中药杂志,2008,33(16):2051.

[3] 刘旺根,王守东,冯黎. 胃康舒宁对胃癌前病变大鼠胃黏膜上皮细胞凋亡及其相关调控基因表达的影响[J]. 河南中医,2007,27(9):20.  
[4] 杨丽萍,张文娟,蒋时红,等. 胃康舒宁对大鼠慢性萎缩性胃炎癌前病变癌相关细胞因子的影响[J]. 世界华人消化杂志,2009,17(19):1978.  
[5] 蒋时红,蔡小平,张文娟,等. 胃康舒宁联合西药治疗慢性萎缩性胃炎[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(1):196.  
[6] 周滢,周梅,段恒. 中医药治疗胃癌的理论研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(6):284.  
[7] 王旭旭. 胃癌中医证型分布及演变规律研究[D]. 北京:北京中医药大学,2011:17  
[8] 丁圆圆. 胃癌中医证型、证候及相关性研究[D]. 长春:辽宁中医药大学,2010:7.  
[9] 徐敬宣,薛皎,钱晓萍,等. 石见穿的化学成分及抗肿瘤作用研究进展[J]. 现代肿瘤医学,2011,19(3):587.

[责任编辑 李玉洁]