

半夏泻心汤及其拆方对胃腺癌 SGC-7901 细胞周期和凋亡的影响

周发祥¹, 陈玉龙^{2*}, 庞永芳, 吴耀松
(河南中医学院, 郑州 450008)

[摘要] **目的:**从细胞增殖、凋亡、细胞周期角度,研究半夏泻心汤治疗胃癌机制。**方法:**把半夏泻心汤拆分为苦降、辛开和补益 3 个组方, 1×10^4 细胞/孔接种于 96 孔板, 药物浓度为 4, 2, 0.5, 0.125 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, MTT 法检测细胞增殖; 1×10^5 /孔接种于 6 孔板, 全方和苦降高、低浓度为 0.5, 0.125 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 辛开和补益高、低浓度为 4, 2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 流式细胞仪检测细胞周期和细胞凋亡。观察半夏泻心汤及其拆方对胃癌细胞 SGC-7901 增殖、细胞周期和凋亡的影响, 并与 5-氟尿嘧啶 (5-Fluorouracil, 5-Fu) 比较。**结果:**半夏泻心汤全方及苦降、辛开组方能够抑制 SGC-7901 细胞增殖, 全方 IC_{50} 为 1.645 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 苦降组为 1.446 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 辛开组为 3.867 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 它们增加 SGC-7901 细胞 S 期和 G_0 - G_1 期百分比, 促进细胞凋亡, 高浓度强于低浓度, 但补益组方对此没有作用。**结论:**半夏泻心汤及其拆方能够一定程度的抑制细胞增殖, 以苦降组为最, 补益组作用甚微, 其机制可能与药物阻滞细胞至 G_1 /S 期和诱导细胞凋亡有关。

[关键词] 半夏泻心汤; SGC-7901 细胞; 拆方研究; 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(2012)23-0203-04

Effects of Banxia Xiexin Decoction and its Components on Cell Cycle and Apoptosis of Gastric Cancer SGC-7901 Cells

ZHOU Fa-xiang¹, CHEN Yu-long^{2*}, PANG Yong-fang, WU Yao-song
(Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** Study the effects and mechanism of Banxia Xiexin decoction on gastric cancer. **Method:** Banxia Xiexin decoction was divided into Pungent opening (dried ginger, pinellia ternate) group, Bitter Descending (coptis chinensis, scutellaria) group and Invigoration (glycyrrhiza, ginseng) group by its different nature and flavor. 1×10^4 cells/wells were planted at 96 wells plate, drug concentrations were 4, 2, 0.5, 0.125 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, cell proliferation was detected by MTT method. 1×10^5 cells/wells were planted in 6 wells plate. The high and low concentration of whole Party and Bitter Descending drugs was respectively 0.5, 0.125 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. The high and low concentration of Pungent opening and invigoration was respectively 4, 2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. Effect of Banxia Xiexin decoction and compositions on gastric cancer SGC-7901 cells proliferation, cell cycle and apoptosis ratio were detected and compared with known positive drug 5-fluorouracil (5-FU). **Result:** Banxia Xiexin decoction group, Bitter Descending group and Pungent opening group could inhibit the proliferation of SGC-7901 cell, the IC_{50} values of its were 1.645, 1.446, 3.867 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively, and increased SGC-7901 cells in S phase and G_0 - G_1 phase percentage with promoting apoptosis in dose-dependent manner, but invigoration group had no such effect. **Conclusion:** Banxia Xiexin decoction and its compositions can inhibit the proliferation of SGC-7901 cell, Bitter Descending is strongest and Invigoration group is the weakest, which may be related to blocking of cells

[收稿日期] 20120510(007)

[基金项目] 河南省基础与前沿技术研究(102300410010)

[第一作者] 周发祥, 硕士, 教授, 从事肿瘤病机及防治研究

[通讯作者] * 陈玉龙, 从事肿瘤病机及防治研究, Tel: 0371-65680049, E-mail: eyl72621@163.com

to G₁/S phase and inducing cell apoptosis

[Key words] Banxia Xiexin decoction; SGC-7901 cells; decomposition study; cell cycle; apoptosis

胃癌是一种常见的恶性肿瘤,在我国胃癌的发病率居第 2 位,死亡率则位居第一,严重危害人类健康^[1]。半夏泻心汤是张仲景之《伤寒论》中治疗心下痞经典方剂,临床上用于治疗慢性胃炎、胃溃疡、胃癌等多种消化道疾病。其在肿瘤治疗方面主要用于肿瘤放、化疗引起的各种消化道反应,也用于直接治疗消化道肿瘤,并收到满意疗效^[2]。为了研究半夏泻心汤抗胃癌机制,我们观察了半夏泻心汤及拆方对胃癌细胞生长、周期及凋亡的影响。

1 材料

1.1 药物 参照《伤寒论》组方,药物剂量比例分为全方人参(Ginseng Radix Et Rhizoma):甘草(Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma):黄芩(Scutellariae Radix):黄连(Coptidis Rhizoma):干姜(Zingiberis Rhizoma):清半夏(Pinelliae Rhizoma) 3:3:3:1:3:4;辛开组干姜:清半夏 3:4;苦降组黄芩:黄连 3:1;补益组人参:甘草=3:3;药物购于河南中医学院三附院,经河南中医学院中药鉴定专家宋宁副教授鉴定为正品。

1.2 细胞株 中分化胃腺癌细胞株 SGC-7901,由郑州生物工程技术研究中心提供。

1.3 试剂 DMEM 高糖培养基(GIBCO)、胎牛血清(Hyclone),MTT(Sigma)、DMSO(Amresco)、细胞 DNA 含量检测试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(凯基生物公司)。

1.4 仪器设备 Heraeus 细胞培养箱(德国 Kendro),倒置显微镜(ZESS),紫外分光光度计(BioMate),SG-603 生物安全柜(Bake),ELx800 型酶标仪(BIO-TEK),FACSVantage SE 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% 的乙醇,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 × 10⁴ 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、阳性对照组、全方组,辛开组、苦降组、补益组,每组 4 个复孔,半夏泻心汤全方组及其拆方分别设置质量浓度为:4, 2, 0.5, 0.125 g · L⁻¹; 阳性对照组(5-Fu): 25 mg · L⁻¹; 阴性对照为完全培养液。继续培养 48 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。

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

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 × 10⁵ 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,加入 2 个质量浓度半夏泻心汤及其拆方(全方组:0.5 g · L⁻¹(高)、0.125 g · L⁻¹(低),补益组:4 g · L⁻¹(高)、2 g · L⁻¹(低),辛开组:4 g · L⁻¹(高)、2 g · L⁻¹(低),苦降组:0.5 g · L⁻¹(高)、0.125 g · L⁻¹(低),阳性对照组(5-Fu): 25 mg · L⁻¹,放入培养箱中培养 48 h。收获细胞,加入 Annexin V-FITC 混匀后,加入 Propidium Iodide 混匀,避光 5 ~ 15 min,1 h 内流式细胞仪上机检测。实验重复 4 次。

2.5 细胞周期检测 严格按照细胞 DNA 含量检测试剂盒说明进行,实验分组及收集细胞方法同上;简而言之,收获细胞,70% 乙醇固定, PBS 洗去固定液,加入 RNase,加碘化丙啶(PI)染色混匀,200 目筛网过滤,上机检测时,记录激发波长 488 nm 处红色荧光。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 半夏泻心汤及拆方对胃癌细胞株 SGC-7901 增殖的抑制作用 半夏泻心汤全方组、苦降组、辛开组各个浓度与阴性对照组相比较均有显著差异(用 *A* 值统计,明显低于阴性对照组,结果没显示, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);随着药物剂量的增加,细胞的存活率下降,增殖抑制作用增强,呈明显的剂量-效应关系。补益组各个浓度与阴性对照组相比较无差异,见表 1。

表 1 半夏泻心汤及拆方对胃癌细胞株 SGC-7901 增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

药物名称	抑制率/%			
	4 g·L ⁻¹	2 g·L ⁻¹	0.5 g·L ⁻¹	0.125 g·L ⁻¹
全方	91.01 ± 5.27	52.64 ± 5.67	32.11 ± 4.23	18.91 ± 7.12
苦降	97.88 ± 8.27	53.39 ± 3.67	35.82 ± 5.12	17.81 ± 4.12
辛开	47.12 ± 4.18	31.01 ± 3.29	9.76 ± 7.84	0.33 ± 6.54
补益	10.57 ± 5.03	0.04 ± 7.61	0.91 ± 4.82	0.02 ± 4.32

注:回归分析曲线拟合:全方组 $Y=17.789X+19.204$,苦降组 $Y=19.269X+19.31$,辛开组 $Y=11.762X+2.574$;应用概率法 95% 置信区间 IC_{50} :全方组为 1.645 g·L⁻¹;苦降组为 1.446 g·L⁻¹;辛开组为 3.867 g·L⁻¹;补益组在置信区间内没有回归方程和 IC_{50} 。

3.2 半夏泻心汤及拆方对胃癌细胞株 SGC-7901 的诱导凋亡作用 高浓度时,全方组、苦降组和辛开组早、晚期凋亡率与阴性对照组相比较均增高 ($P < 0.01$),补益组与阴性对照组相比较早、晚期凋亡率无差异;苦降组早、晚期凋亡率高于全方组与辛开组 ($P < 0.01$)。

低浓度时,对于早期凋亡率,苦降组、辛开组与阴性对照组相比均增高 ($P < 0.01$),苦降组凋亡高于辛开组 ($P < 0.01$)。对于晚期凋亡比率,全方、辛开、苦降与阴性对照组比较增高 ($P < 0.05$),苦降组高于全方组、辛开组 ($P < 0.01$)。对于早期凋亡率全方组、辛开组、苦降组高、低浓度相比均有差异 ($P < 0.05$)。对于晚期凋亡率全方组和苦降组高低浓度相比较有明显差异 ($P < 0.05$),见表 2。

3.3 半夏泻心汤及拆方对胃癌细胞株 SGC-7901 细胞周期的影响 高浓度时, G_1 期全方组、苦降组与阴性对照组相比细胞比率较高 ($P < 0.05$);S 期苦降组与阴性对照组相比较细胞比率增高 ($P < 0.05$)。 G_2/M 期全方组、苦降组与阴性对照组相比细胞比率减低 ($P < 0.05$);全方组与苦降组比较增高 ($P < 0.05$)。辛开组低于补益组 ($P < 0.05$)。

表 2 半夏泻心汤全方组及其拆方组对 SGC-7901 胃癌细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n=4$) %

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	早期凋亡率	晚期凋亡率
阴性对照	-	2.91 ± 0.54	2.22 ± 0.65
阳性对照 5-Fu	0.025	19.09 ± 1.64	5.63 ± 1.52
全方高	0.5	16.41 ± 1.32 ^{2,9)}	10.79 ± 4.53 ^{1,9)}
苦降高	0.5	39.51 ± 1.13 ^{2,4,9)}	22.86 ± 5.18 ^{2,4,9)}
辛开高	4	15.05 ± 0.11 ^{2,6,9)}	10.02 ± 0.85 ^{1,6)}
补益高	4	1.45 ± 1.88 ^{2,6,8)}	0.92 ± 0.29 ^{1,6,7)}
全方低	0.125	3.95 ± 1.00 ⁹⁾	5.60 ± 0.93 ^{1,9)}
苦降低	0.125	23.25 ± 3.17 ^{2,4,9)}	16.52 ± 3.50 ^{2,4,9)}
辛开低	2	10.13 ± 0.32 ^{2,4,6,9)}	8.50 ± 0.49 ^{1,6)}
补益低	2	1.31 ± 2.86 ^{2,6,8)}	2.03 ± 1.83 ^{6,7)}

注:与阴性对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与同剂量全方组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与同剂量苦降组比较⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$;与同剂量辛开组比较⁷⁾ $P < 0.05$,⁸⁾ $P < 0.01$ 。同一药物高、低浓度比较⁹⁾ $P < 0.05$,¹⁰⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

高浓度全方组和苦降组在 G_1 期、S 期细胞比率高于其低浓度 ($P < 0.05$);在 G_2/M 期,高浓度苦降组细胞比率少于其低浓度 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 半夏泻心汤全方组及其拆方组对 SGC-7901 胃癌细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, n=4$) %

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	G_1 期	S	G_2/M 期
阴性对照	-	52.9 ± 0.34	19.14 ± 1.46	27.96 ± 3.20
阳性对照 5-Fu	0.025	63.09 ± 4.05	28.23 ± 4.18	8.68 ± 1.79
全方高	0.5	59.38 ± 0.84 ^{1,9)}	21.86 ± 1.73 ⁹⁾	18.76 ± 2.46 ^{2,10)}
苦降高	0.5	60.37 ± 1.06 ^{1,9)}	31.69 ± 0.81 ^{2,4,9)}	7.94 ± 1.20 ^{2,4,9)}
辛开高	4	54.71 ± 3.06 ^{3,5)}	21.78 ± 3.49 ⁶⁾	23.51 ± 4.08 ⁶⁾
补益高	4	51.98 ± 3.40 ^{3,5)}	17.73 ± 2.82 ⁶⁾	30.29 ± 3.36 ^{4,6,7)}
全方低	0.125	54.66 ± 0.85 ⁹⁾	20.36 ± 4.68 ⁹⁾	24.98 ± 1.22
苦降低	0.125	56.44 ± 0.75 ⁹⁾	22.96 ± 6.20 ^{1,9)}	20.6 ± 1.56 ⁹⁾
辛开低	2	53.6 ± 1.13	21.88 ± 1.49	24.52 ± 2.39
补益低	2	49.26 ± 4.87 ⁵⁾	18.56 ± 3.71	32.18 ± 6.37 ^{3,5)}

4 讨论

半夏泻心汤是张仲景之《伤寒论》中治疗心下痞经典方剂,由清半夏、干姜、黄芩、黄连、人参、甘草、大枣组成,主治寒热错杂心下痞,为辛开苦降、寒热并用之名方,临床常用于胃癌的治疗。为了深入探讨半夏泻心汤作用机制,我们根据其组成药物,分为辛开、苦降、补益 3 个组方,比较研究全方及 3 个组方对胃癌细胞的作用。

半夏泻心汤全方及其拆方与阴性对照和阳性对照组比较,在 48 h 内各个组药物剂量对胃癌 SGC-7901 细胞均有明显的抑制作用,存在一定的剂量依赖性,各组药物对细胞的抑制作用依次是苦降组、全方组、辛开组和补益组,其中各中药组的抑制率中以苦降组最为明显,最稳定,全方组次之。为了进一步研究半夏泻心汤抑制细胞生长的机制,我们观察了这些药物对胃癌细胞的细胞周期和凋亡影响。

细胞周期是指细胞增殖的过程,是细胞通过分裂生成与本身相同的细胞群体,细胞从一次分裂到下一轮的分裂结束,称为一个周期,分为 4 个阶段:DNA 合成前期(G_1 期)、DNA 合成期(S 期)、DNA 合成后期(G_2 期)、有丝分裂期(M 期)。有时细胞的周期延长,长期处于静止状态,而不发生增殖,称为 G_0 期^[3]。现在,越来越多实验研究显示肿瘤属于细胞周期性疾病^[4-5]。从而使细胞周期分析在细胞及肿瘤生物学方面显得尤其重要。本实验结果表明,半夏泻心汤全方及各个拆方 2 个不同浓度的药物作用于 SGC-7901 细胞 48 h 后,细胞的周期分布发生了改变,不同组方之间有一定的差异。与阴性对照组相比较苦降组、全方组、辛开组高低 2 个浓度能明显的增加人胃癌细胞 SGC-7901 在 S 期和 $G_0 \sim G_1$ 期数目,随着浓度增加而阻滞细胞数增加,说明药物减少了肿瘤细胞的 DNA 合成,使细胞阻滞于 G_1/S 期,补益组对细胞周期没有明显影响。细胞增殖的一个周期中,在 G_1 ,S 和 G_2/M 期之间存在着影响细胞周期进行的调控点,我们的研究说明半夏泻心汤及其组方可能通过这些调控点来影响细胞的增殖^[6]。

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^[7-8]。本实验用 PI 染色发现细胞出现典型的凋亡现象,细胞凋亡时出现周期阻滞,Annexin V-FITC 法流式细胞仪检测结果也显示,半夏泻心汤全方、苦降、辛开组均使细胞出现凋亡,苦降组作用最强,全方组次之,且高浓度作用强于低浓度,与细胞增殖实验结果一致,说明诱导细胞凋亡可能也是半夏泻心汤抑制细胞增殖的原因之一。

综上所述,本研究发现,半夏泻心汤及其拆方能够一定程度的抑制细胞增殖,以苦降组为最,补益组作用甚微,其机制可能与药物阻滞细胞至 G_1/S 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] Ferlay J, Shin H R, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127:2893.
- [2] 花宝金,鲍艳举. 半夏泻心汤治疗肿瘤体悟[J]. *中医杂志*, 2007, 48(1):19.
- [3] Williams G H, Stoeber K. The cell cycle and cancer[J]. *J Pathol*, 2012, 226(2):352.
- [4] Hartwell L H, Kastan M B. Cell cycle control and cancer [J]. *Science*, 1994, 266(5192): 1821.
- [5] Sherr C J. Cancer cell cycle [J]. *Science*, 1996, 274(5293):1672.
- [6] 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.
- [7] Wong R S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2011, 26:30.
- [8] 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.

[责任编辑 聂淑琴]