

## 通莲 I 号方及其拆方对食管癌 Eca109 细胞增殖及细胞周期的影响

贾永森<sup>1\*</sup>, 李继安<sup>1</sup>, 韩炳生<sup>2</sup>, 陈树山<sup>3</sup>

(1. 河北联合大学中医学院, 河北 唐山 063000; 2. 深圳市中医院, 广东 深圳 518020;  
3. 唐山市中医医院, 河北 唐山 063000)

**[摘要]** 目的:研究通莲 I 号方及其拆方在不同浓度下对食管癌 Eca109 细胞形态和生长周期的调节作用;探讨该方抑制食管癌细胞增殖的机制。方法:将 Eca109 细胞以  $1 \times 10^6$  个/皿密度接种于  $\Phi 100$  mm 培养皿中,以 10% 小牛血清 DMEM 培养液培养,37 °C,5% 饱和湿度的 CO<sub>2</sub> 培养箱孵育,细胞贴壁 24 h,分别加入浓度为 25 ~ 3 200 mg·L<sup>-1</sup> 倍比梯度的通莲 I 号方(T)、清热解毒拆方(Q)、活血行气拆方(H)、滋阴养血拆方(Z)等 4 方提取液,孵育 48 h 后,MTT 比色法检测细胞增殖变化、光镜观察细胞形态、流式细胞技术(FCM)测定细胞周期。结果:T、Q、H 的 IC<sub>50</sub> 值分别为 386,771,729 mg·L<sup>-1</sup>;与空白对照组(C)相比,T、Q、H 3 方显著影响 Eca109 细胞周期变化:G1 期细胞所占比率分别为 69.43%,60.84%,61.90%。同时,T、Q、H 组细胞的 S 期与 C 组比较,均有显著性差异( $P < 0.05$ ),T 方作用最强。而 Z 方对细胞的抑制作用较弱,与 C 组无显著性差异。结论:通莲 I 号方通过抑制细胞进入 S 增殖期从而干预食管癌 Eca109 细胞生长,各拆方具有协同作用,全方作用最优。

**[关键词]** 食管癌; Eca109 细胞; 通莲 I 号方; 细胞周期

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)12-0191-04

## Effect of Tonglian Decoction and its Formulae on Cell Proliferation and Cell Cycle of Cell Line Eca109 of Esophageal Carcinoma

JIA Yong-sen<sup>1\*</sup>, LI Ji-an<sup>1</sup>, HAN Bing-sheng<sup>2</sup>, CHEN Shu-shan<sup>3</sup>

(1. Traditional Chinese Medicine (TCM) College of Hebei United University, Tangshan 063000, China;  
2. TCM Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518020, China;

**[收稿日期]** 20111114(009)

**[基金项目]** 唐山市科学技术研究与发展计划课题(11150205A-7);深圳市科技研发资金项目(ZYA201007060089A);河北联合大学博士科研启动基金(BS09034);河北联合大学青年科学基金(QK032/2010)

**[通讯作者]** \* 贾永森,医学博士,讲师,从事肿瘤疾病中医方证基础研究,Tel:0315-3725103,E-mail:jiayongsen@126.com

物质,具有显著的抗肿瘤、抗氧化、抗炎活性<sup>[6-7]</sup>,但是仙鹤草多糖的生理活性至今鲜有报道,本实验研究发现仙鹤草总多糖可抑制脑胶质瘤 U251 细胞株的增殖,并呈现剂量依赖性,其作用机制可能与诱导肿瘤细胞凋亡有关。该研究结果为药用植物的深入研究提供了良好的理论依据。

### [参考文献]

- [1] 武晓丹,金哲雄. 仙鹤草的研究进展[C]. 第一届全国中药商品学术大会论文集,2008:297.
- [2] 马丽萍,赵培荣,王留兴,等. 仙鹤草水提液对食管癌 Eca109 细胞生长的抑制作用[J]. 郑州大学学报:医学版,2007,42(1):149.

- [3] 邹夏慧. 仙鹤草抗肝癌 SMMC-7721 细胞作用的实验研究[D]. 南昌:江西医学院,2005.
- [4] 高凯民,周玲,陈金英,等. 仙鹤草煎剂对 HL-60 细胞的体外诱导凋亡作用[J]. 中药材,2000,23(9):561.
- [5] 刘倩,白素芬,喇孝瑾,等. 二精丸多糖两种测定方法的比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(8):32.
- [6] 牟华. 姬松茸多糖对 HT-29 细胞与内皮细胞侵袭、黏附的影响和作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(9):216.
- [7] 刘光建,王璐,王菲菲,等. 鱼腥草多糖对小鼠肝、肾、心肌和脑组织抗氧化作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(8):207.

[责任编辑] 聂淑琴

3. TCM Hospital of Tangshan, Tangshan 063000, China)

**[ Abstract ] Objective:** To investigate effect of Tonglian decoction (T) on proliferation of esophageal carcinoma cell line Eca109 through determination of cell morphology and cell cycle, and to discuss inhibition mechanism of the prescription on esophageal carcinoma. **Method:** Human esophageal carcinoma cell line Eca109 cultured *in vitro* were treated with T and its separated formulae, including clearing-heat-and-detoxification formula (Q), activating-blood-and-promoting-Qi formula (H) and nourishing-Yin-and-blood formula (Z). Cell proliferation was assayed by MTT, cells morphology was observed with microscope and cell cycle was measured with Flow Cyto Meter (FCM). **Result:** Dose for 50 percent cells inhibition rates ( $IC_{50}$ ) of T, Q and H was 386, 771, 729  $mg \cdot L^{-1}$ , respectively. T, Q and H inhibit cell proliferation predominantly, rate of  $G_1$  phase of cell cycle reached to 69.43%, 60.84%, 61.90%, respectively. Cells number in S phase treated with T, Q, and H had significant difference with controlled group ( $P < 0.05$ ), and T had the best effect. But Z has little inhibition power, having no difference with controlled group. **Conclusion:** T can be used to regulate Eca109 carcinoma cell proliferation with inhibiting cells S phase. During whole process, 3 separated formulae cooperate with each other to insure effect of T.

**[ Key words ]** esophageal carcinoma; Eca109 cell line; Tonglian decoction; cell cycle

在我国,食管癌发病率位居消化道肿瘤第二位,其初期无症状,当患者自觉不适时大多已属中晚期,危害极大,男、女患者死亡率分别为 21.6/10 万和 9.6/10 万,位居世界第一位和第三位<sup>[1]</sup>。笔者所在研究组进行了《脾胃论》名方“通幽汤”治疗瘀血内结型食管癌的系统研究<sup>[2-4]</sup>,在此基础上结合现代中药药理研究理论,筛选组方“通莲 1 号方”,开展了该方对体外食管癌细胞增殖及周期影响的研究。

### 1 材料

**1.1 药物与试剂** 通莲 1 号方(T):白花蛇舌草 3 g,熟地黄 1.5 g,当归 3 g,莪术 2 g,麦冬 3 g,升麻 3 g,槟榔 1.5 g,半支莲 3 g。按照药物功能进行拆方:清热解毒组(Q)(白花蛇舌草、半枝莲),活血行气组(H)(槟榔、升麻、莪术)和滋阴养血组(Z)(熟地黄、当归、麦冬)。三组拆方各药量与全方相同。各单味药物均购自唐山市同仁堂药房;DMEM 培养基(GIBCO 公司);小牛血清(BCS)(GIBCO 公司);胰蛋白酶(华美公司);MTT(Amresco 公司);DMSO(Amresco 公司);RNase A(Sigma 公司);碘化丙啶(PI)(sigma 公司)。

**1.2 细胞** 人食管癌 Eca109 细胞株(购自中国科学院上海生物所)。

**1.3 仪器** FACSCDLIBUR 流式细胞仪(BRADY 公司), 1100 型无菌超净台(FORMA 公司), VCX750 细胞超声破碎仪(SONICS 公司), 3336 CO<sub>2</sub> 培养箱(FORMA 公司), TMD-2 倒置式显微镜(NIKON 公司), EF-D 荧光显微镜(NIKON 公司),

R134A 型低温高速离心机(Eppendorf 公司), 3MK 型低温高速离心机(Sigma 公司), NOVAPATH 450 酶标光度计(Bio-Tek 公司)。

### 2 方法

**2.1 细胞培养** 以 10% 小牛血清 DMEM 培养液 10 mL,接种 Eca109 细胞于  $\Phi 100$  mm 培养皿中,置于 37 °C, 5% 饱和湿度的 CO<sub>2</sub> 培养箱培养。

**2.2 方药配制** 通莲 I 号方及拆方均以纱布过滤掉药物杂质,并加入 30 倍体积 MilliQ 水,浸泡 30 min,武火煮沸,文火煎煮 40 min,收集药液,入烧杯中浓缩 4 方药至 200 mL, 5 000  $r \cdot \min^{-1} \times 30$  min 高速离心,取上清,计算各方药提取物浓度,以 DMEM 培养液配制至 400  $g \cdot L^{-1}$ ,超净工作台过滤除菌,1.5 mL 离心管分装, -20 °C 保存备用。

**2.3 对肿瘤细胞增殖的影响** 以  $1 \times 10^4$  个细胞/孔的密度接种于 96 孔平面培养板,含小牛血清培养液使细胞贴壁 24 h,分别加入 T 方、Q 拆方、H 拆方和 Z 拆方提取物的培养液,设置 8 个梯度药物浓度为 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1 600, 3 200  $mg \cdot L^{-1}$ ; 对照组(C)加 10% 小牛血清培养基。每组 3 个复孔,继续培养 48 h。MTT 染色 4 h 后加入 DMSO,在酶标仪上以 570 nm/630 nm 测定吸光度(A)。实验重复 3 次。按照公式计算各药物组对肿瘤细胞增殖的抑制率,求出各方半数有效量( $IC_{50}$ )。

细胞生长抑制率 = (1 - 实验组 A/对照组 A)  $\times 100\%$

**2.4 细胞形态观察** Eca109 细胞于  $\Phi 100$  mm 培养皿中正常培养 24 h,将 MTT 实验测定的通莲 I 号

方及拆方相应 IC<sub>50</sub> 值浓度提取液加入,对照组加 10% 小牛血清培养基,48 h 后以荧光显微镜 200 倍目镜下观察细胞形态变化。

**2.5 对细胞周期的影响** 以 1 × 10<sup>6</sup> 细胞密度接种 Eca109 细胞于 Φ100 mm 培养皿中,贴壁 24 h,加入含有 4 种方药 IC<sub>50</sub> 的药物提取液,继续培养 24 h,收集入 15 mL 离心管中,PBS 2 mL 重悬细胞,加入 70% 乙醇固定细胞,4 °C 过夜。弃掉乙醇,并在 3 mL 预冷的 PBS 中重悬细胞,再离心,弃掉 PBS,依次加入 PBS 850 μL,10 g·L<sup>-1</sup> RNase A 10 μL,1% Triton X-100 100 μL,1 g·L<sup>-1</sup> PI 40 μL,37 °C 下避光孵育 5 min。400 目筛网过滤细胞,上流式细胞仪分析细胞周期,并用 Modifit LT 软件分析结果,得出不同组别细胞在各细胞周期的百分比率。

**2.6 统计学方法** 各组细胞抑制率组间差异比较、细胞周期分布率的比较均以卡方检验;各组细胞 IC<sub>50</sub> 求值使用 SPSS 18.0 软件,*F* 检验,曲线拟合方程。

### 3 结果

#### 3.1 对 Eca109 细胞生长抑制半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>)

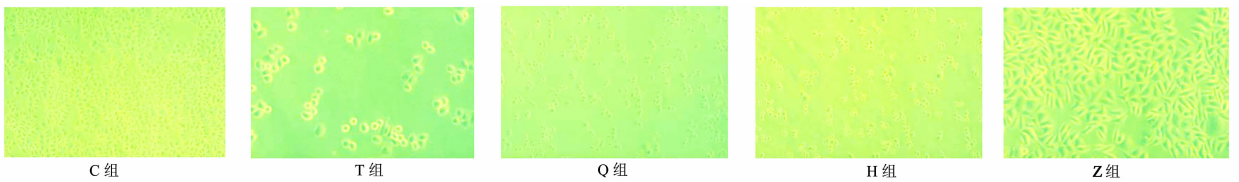
除 Z 拆方组外,各组细胞抑制率随药物浓度呈正比增高,具有明显剂量依赖关系,T 组抑制作用强于其他各组。应用 *F* 检验,拟合曲线方程得出 T 组 IC<sub>50</sub> 386 mg·L<sup>-1</sup>,Q 组 IC<sub>50</sub> 771 mg·L<sup>-1</sup>,H 组 IC<sub>50</sub> 729 mg·L<sup>-1</sup>。Z 组细胞在方药作用下,细胞生长受抑制较弱,较高药物浓度时,抑制率为负值,与其他 3 组有极显著性差异 (*P* < 0.01)。见表 1。

**3.2 对 Eca109 细胞形态的影响** 倒置显微镜观察各组细胞形态,C 组和 Z 组细胞增殖活跃,呈典型上皮细胞特征;与 C 组和 Z 组相比,T,Q,H 组细胞增长缓慢,细胞形体偏小、皱缩,间隙加大;细胞集落变小,汇合率低,表现在细胞形态和数目有较大差异;T 组细胞生长受抑制最为明显,细胞形态变圆,疏松分散,胞内充满大量颗粒状或空泡样物质。见图 1。

表 1 通莲 I 号方及拆方对 Eca109 细胞抑制作用量效关系 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	抑制率/%			
	T 方	Q 拆方	H 拆方	Z 拆方
25	25.60 ± 3.41	14.36 ± 1.98	17.22 ± 3.67	10.34 ± 1.14
50	31.75 ± 2.22	20.85 ± 3.41	24.30 ± 4.06	12.37 ± 3.43 <sup>2)</sup>
100	45.58 ± 4.82	29.87 ± 2.79	32.80 ± 3.55	13.67 ± 1.85 <sup>2)</sup>
200	48.99 ± 3.57	37.63 ± 4.93	39.08 ± 3.46	10.29 ± 1.15 <sup>2)</sup>
400	51.10 ± 5.73 <sup>1)</sup>	45.20 ± 2.89	47.21 ± 5.63	15.07 ± 3.20 <sup>2)</sup>
800	52.14 ± 2.96 <sup>1)</sup>	51.57 ± 6.51 <sup>1)</sup>	53.91 ± 1.25 <sup>1)</sup>	-9.19 ± 4.54 <sup>2)</sup>
1 600	47.72 ± 4.59	50.24 ± 1.49 <sup>1)</sup>	52.24 ± 3.16 <sup>1)</sup>	-6.55 ± 2.84 <sup>2)</sup>
3 200	36.61 ± 5.14	48.71 ± 3.36	37.91 ± 2.87	-10.94 ± 2.78 <sup>2)</sup>

注:药物有效率<sup>1)</sup> > 50%;与同药物浓度 T,Q,H 方比<sup>2)</sup> *P* < 0.01。



C 组. 空白对照组; T 组. 通莲 I 号方 386 mg·L<sup>-1</sup>; Q 组. 清热解毒拆方 771 mg·L<sup>-1</sup>; H 组. 活血行气拆方 729 mg·L<sup>-1</sup>; Z 组. 滋阴养血拆方 400 mg·L<sup>-1</sup> (表 2 同)

图 1 通莲 I 号方及拆方对 Eca109 细胞生长形态影响的镜下观察 (荧光显微镜, × 200)

**3.3 通莲 I 号方及拆方对 Eca109 细胞生长周期的影响** 表 2 显示 T,Q,H 3 方对 Eca109 细胞周期有明显抑制作用,3 药物组细胞的 G<sub>1</sub> 期 (抑制期) 所占百分比率分别为 69.43%, 61.90%, 60.84%, 而 Z 方对细胞的抑制作用较弱。同时,3 组细胞的 S 期 (增殖期) 与 C 组比较,有显著性差异 (*P* < 0.05); Z

组与 C 组比较,无显著性差异。FCM 结果显示,3 个拆方具有协同作用,共同组成通莲 I 号方的抑制肿瘤生长作用最强。

### 4 讨论

“金元四大家”之一李东垣创制的《脾胃论》名方“通幽汤”在治疗瘀血内结型食管癌中疗效显

表 2 通莲 I 号方及其拆方在 IC<sub>50</sub> 浓度对 Eca109 细胞  
各期细胞所占比率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	细胞周期/%		
	G <sub>1</sub> 期	S 期	G <sub>2</sub> 期
C 组	55.20 ± 3.88	31.42 ± 4.21	13.38 ± 2.90
T 组	69.43 ± 2.75 <sup>1)</sup>	13.51 ± 3.09 <sup>1)</sup>	17.06 ± 3.54
Q 组	61.90 ± 3.42 <sup>1)</sup>	19.28 ± 3.93 <sup>1)</sup>	18.82 ± 2.89
H 组	60.84 ± 2.69	17.37 ± 4.01 <sup>1)</sup>	21.79 ± 3.23
Z 组	57.05 ± 3.91	30.86 ± 3.22	12.09 ± 2.95

注:各組同一周期细胞与 C 组比较<sup>1)</sup> P < 0.05

著<sup>[5]</sup>，“通莲 1 号方”是在此方基础上结合现代药理学研究筛选组方而成，全方由白花蛇舌草、熟地黄、当归、莪术、麦冬、升麻、槟榔、半支莲 8 味中药组成，方中莪术活血行气；半支莲、白花蛇舌草清热解毒，解除体内之瘀毒；麦冬、当归、熟地黄滋阴养血润燥；槟榔下行而破气滞，升麻升清而降浊阴，一升一降，胃气乃通。综观全方，祛邪扶正，攻守兼备，既侧重活血行气、解毒，又不忘滋阴养血。

表 1 和图 1 显示，该方及清热解毒、活血行气两拆方可不同程度抑制 Eca109 细胞的增殖，其抑制率随药物浓度增加而上升，呈浓度依赖性，以全方作用最优，对细胞的半数抑制率药量仅为 386 mg · L<sup>-1</sup>，显示出良好药效。清热解毒和活血行气拆方组对细胞的半数抑制率药量均明显高于全方；实验结果说明单个拆方对细胞的抑制力量较弱，组成全方后各药相互协同作用加强，显示出各味中药相须为用，相互配合发挥最佳疗效。

细胞周期中的 G<sub>1</sub> 期又称合成前期，该期特点是物质代谢活跃，细胞体积显著增大<sup>[6]</sup>。这一期的主要意义在于为下阶段 S 期的 DNA 复制作好物质和能量的准备，代表了细胞生长尚处于抑制状态，其所占整个细胞百分比率是衡量细胞生长受抑制情况的重要指标<sup>[7]</sup>。从表 2 可知，全方组 G<sub>1</sub> 期占到了 69.43%，对细胞抑制最强。S 期即 DNA 合成期，是细胞增殖的活跃期<sup>[8]</sup>；该方及清热解毒、活血行气

两拆方中 S 期细胞明显少于空白对照组和滋阴养血组。本研究结果表明，通莲 I 号方通过抑制 Eca109 细胞从 G<sub>1</sub> 期进入 S, G<sub>2</sub>M 增殖期，从而抑制细胞增殖。

值得注意的是，滋阴养血拆方疗效不及其他两拆方，其浓度达到 800 mg · L<sup>-1</sup> 以上时，抑制率为负值，据此我们推测，Eca109 细胞的生长、浸润环境与中医理论认为的血瘀病机（血液的高凝状态）有关，当滋阴养血作用单独存在时，为肿瘤细胞的生存提供了有利条件。有关通莲 I 号方抑制食管癌细胞生长的细胞内分子机制研究正在进行中。

### [参考文献]

- [1] 钟钊,谭家驹,徐致祥.食管癌流行病学病因学研究进展[J].河南预防医学杂志,2011,22(1):1.
- [2] 贾永森,吕翠田,吴范武,等.通幽汤及拆方对食管癌 EC9706 细胞 PI3K/AKT 信号通路影响的研究[J].辽宁中医杂志,2011,38(7):1306.
- [3] 贾永森,王媛媛,司富春.噎膈证方对人表皮生长因子刺激的食管癌 EC9706 细胞生长信号转导的影响[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(3):100.
- [4] 刘忠昌,贾永森,包巨太.通幽汤及其拆方对食管鳞癌细胞的抑制作用及其机理研究[J].江苏中医药,2011,43(7):86.
- [5] 李东垣(金),靳国印(校注).脾胃论[M].北京:中国医药科技出版社,2011:89.
- [6] 王卫华,王昌正,吴本俨.miR-92b 对胃癌细胞周期和凋亡的影响[J].军医进修学院学报,2011,32(10):1048.
- [7] 金延华,刘春彦,金爱花,等.草苈蓉苯丙素苷对肺癌细胞周期分布和凋亡的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(7):213.
- [8] 沈波,徐峰,何丽钦,等.天芝草胶囊对肿瘤细胞周期的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(19):226.

[责任编辑 聂淑琴]