

益气复元汤联合化疗药含药血清对大肠癌 Lovo 细胞 Bcl-2, Bax 表达的影响

秦伟夫^{1*}, 贺菊乔²

(1. 广西瑞康医院, 南宁 530011; 2. 湖南中医药大学, 长沙 410007)

[摘要] 目的: 观察益气复元汤是否增加化疗药诱导大肠癌 Lovo 细胞凋亡的影响以及其分子水平作用机制。方法: 试验分为益气复原汤、化疗药、益气复原汤 + 化疗药各自含药血清、血清对照组、空白对照组等 5 组, 吖啶橙/溴乙烷 (AO/EB) 双荧光染色法、Annexin V-FITC (FITC, 异硫氰酸荧光素) 单染法检测各组对大肠癌 Lovo 细胞凋亡诱导作用, Western blot (蛋白免疫印迹) 法检测 Lovo 细胞凋亡蛋白 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2), 多肽抗原 (Bax) 的表达。结果: 细胞形态学及流式细胞检测都表明益气复原汤含药血清对大肠癌 Lovo 细胞有诱导凋亡作用, 并增强化疗药诱导癌细胞凋亡效应; Western blot 法检测显示 血清对照组与空白对照组中 Bcl-2, Bax 蛋白表达无明显差异; 益气复元汤联合化疗组、化疗组、益气复元汤组、血清对照组各组 Bcl-2, Bax 蛋白表达组间两两比较具有显著差异, $P < 0.01$; 益气复元汤联合化疗组 Bcl-2 表达最弱, 其次是化疗组, 再次是益气复元汤组, 血清对照组最强。 益气复元汤联合化疗组 Bax 表达最强, 其次是化疗组, 再次是益气复元汤组, 血清对照组最弱。结论: 益气复元汤对 Lovo 肠癌细胞有诱导细胞凋亡作用, 并增强化疗药诱导癌细胞凋亡效应; 下调 Bcl-2 蛋白及上调 Bax 蛋白的表达是诱导 Lovo 肠癌细胞凋亡的主要机制之一。

[关键词] 益气复元汤; 中药含药血清; 细胞凋亡; B 细胞淋巴瘤/白血病 2, 多肽抗原表达

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)17-0158-04

Influence of Drug-Containing Serum of Yiqi Fuyuan Tang Combined with Chemotherapy on Bcl-2, Bax Expression of Colorectal Cancer Lovo Cell

QIN Wei-fu^{1*}, HE Ju-qiao²

(1. Guang Xi Ruikang Hospital, Nanning 530011, China;

2. Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

[Abstract] **Objective:** To observe influence of Yiqi Fuyuan Tang (YQFYT) combined with chemotherapy on apoptosis of colorectal cancer Lovo cells and the related molecular mechanism. **Method:** Experiment was divided into 5 groups: YQFYT-containing serum group, chemotherapeutic drugs-containing serum group, YQFYT + chemotherapeutic drugs-containing serum group, serum control group and blank control group. Apoptosis of colorectal cancer Lovo cells was investigated with AO/EB double fluorescent staining and single staining of Annexin V-FITC for each group. Expression of apoptosis proteins Bcl-2 and Bax of Lovo cell was determined. **Result:** The results indicated that YQFYT-containing serum had action of inducing apoptosis in colorectal cancer Lovo cells, and enhanced the effects of induced apoptosis of chemotherapeutic drugs. Western blot assay showed that: Bcl-2, Bax protein expression was not significantly different between serum control group and blank control group; There was significant difference between treatment groups ($P < 0.01$). The order from weak to strong of the Bcl-2 protein expression was as follows: YQFYT + chemotherapeutic drugs-containing serum group, chemotherapeutic drugs-containing serum group, YQFYT-containing serum group, serum control group. The order for bax protein expression

[收稿日期] 20100525(012)

[通讯作者] * 秦伟夫, 医学博士, 外科主治医师, 研究方向: 肛肠疾病研究, Tel: 0771-3113882, E-mail: wanlson@sina.com

was just the opposite. **Conclusion:** Serum YQFYT-containing serum has action of inducing apoptosis in colorectal cancer Lovo cells, and can enhance the effects of chemotherapeutic drugs for inducing apoptosis. Down-regulation of Bcl-2 protein expression and up-regulation of Bax protein expression might be one of the main mechanisms for apoptosis of Lovo colon cancer cells.

[Key words] Yiqi Fuyuan Tang; Chinese medicine-containing serum; apoptosis; Bcl-2, Bax expression

益气复原汤是以补中益气汤为基础方拟成的药膳方,临床应用对大肠癌术后化疗具有较好的减轻化疗毒副反应及提高机体免疫力作用,并经体外血清药理学试验证实对大肠癌 Lovo 细胞增殖有抑制作用,同时可使 Lovo 细胞周期阻滞于 G_0/G_1 期,能加强化疗药抑癌作用。本试验将进一步探讨该方对人大肠癌 Lovo 细胞凋亡的影响,了解其是否增强化疗药诱导细胞凋亡作用,并从分子水平探讨其作用机制。

1 材料

1.1 制剂及试剂 人大肠癌 Lovo 细胞,胎牛血清,由湘雅医学院试验中心提供,批号 2009918; DMEM (改良 Eagle 培养基) 为美国 GIBCOL 公司产品,批号 1459076; 胰蛋白酶,批号 1118394; Annexin V-FITC (批号 20090515)、人吖啶橙 (AO, 批号 A6025)、溴乙烷 (EB, 批号 E7186)、bax 抗体 (批号 H0105)、Bcl-2 抗体 (批号 10205) 等均为武汉博士德生物制品公司产品。

1.2 主要仪器 DFM-20 荧光显微镜(上海蔡康光学仪器有限公司), Epics-XL 型流式细胞仪(美国 BC 公司)。

2 方法

2.1 含药血清制备 益气复原汤由鸡肉 200 g, 黄芪 30 g, 党参 30 g, 薏米 30 g, 香菇 30 g, 山药 20 g, 枸杞 20 g, 龙眼肉 15 g, 陈皮 15 g, 升麻 15 g, 生姜 5 片, 大枣 5 枚等组成。药物购于湖南中医药大学附属一附院,传统方法煎制,浓缩为 $10.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。健康 SD 大鼠 40 只(由湖南中医药大学动物中心提供),雌雄各半,体重 200 g,随机分为 4 组。中药组以 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ ig}$, 2 次/d, 连续 2 d; 化疗组第 1 天用奥沙利铂的 $0.031 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, CF $0.046 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 5-FU $0.15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ ip}$; 第 2 天 CF $0.046 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 5-FU $0.15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ ip}$ 。中药 + 化疗组用药为以上中药联合化疗,空白对照组以生理盐水 $\text{ig} + \text{ip}$, 用量等同中药 + 化疗组。参照按制备含药血清通法^[1]于末次给药后 1 h, 经右心室取血,通过离心取得含药血清,置 56 °C 水浴中

灭活 30 min, 用 $0.22 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤除菌;置 -20 °C 保存备用。

2.2 细胞凋亡的形态学观察 (AO/EB 双荧光染色法) 将肠癌细胞接种于培养瓶中,待贴壁后用无血清 DMEM 液培养 24 h, 换含 10% 各组大鼠血清浓度培养液培养(空白对照组继续用无大鼠血清 DMEM 液培养) 48 h, 胰蛋白酶消化收集细胞, PBS 液调整细胞悬液密度为 $2 \times 10^6 / \text{mL}$ 。取细胞悬液 100 μL , 各加 5 μL AO 和 EB; 取上述染色液 1 滴, 滴在洁净玻片上, 加盖玻片后立即置荧光显微镜下观察。

2.3 Annexin V-FITC 单染法检测 细胞收集同上, 按 Annexin V-FITC 染色说明操作, 上流式细胞仪进行细胞凋亡检测。

2.4 Western blot 法检测凋亡蛋白 Bcl-2, Bax 的表达 将大肠癌 Lovo 细胞接种于培养瓶中,待贴壁后用无血清 DMEM 液培养 24 h, 换含 10% 各组大鼠血清浓度的培养液继续培养(空白对照组继续用无大鼠血清 DMEM 液培养) 48 h, 温 PBS 冲洗, 收集细胞, 充分混合沉淀后加 loading buffer, 经电泳、取胶、转膜、封闭及杂交、发光鉴定等程序等到底片, 进行扫描与分析。

2.5 数据处理 采用 SPSS 11.5 统计软件, 测定值用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行单因素方差分析, 组间比较用 LSD 法检验。以 $P < 0.05$ 为有差异性测定。药物联合作用判断以金正均 Q 值法判断: $Q = \frac{Ea + b}{(Ea + Eb - Ea \times Eb)}$, $Ea + b$ 为合并用药的药效, Ea 、 Eb 分别为 A 药和 B 药单独用药时的药效, 式中分子代表“实测合并效应”, 分母代表“期望合并效应”, Q 值即二者比值。Q < 0.85 为拮抗(-); 0.85 < Q < 1.15 为相加(+); Q > 1.15 为协同(++).

3 结果与分析

3.1 细胞形态观察 荧光显微镜观察, 见图 1。血清对照组与空白对照组细胞形态无明显差异, 未见凋亡细胞; 而益气复原汤组细胞部分染成棕红色, 透亮度下降, 折光性增强, 提示有细胞凋亡。化疗组细胞形态较益气复原汤明显, 凋亡细胞增多, 还可见少

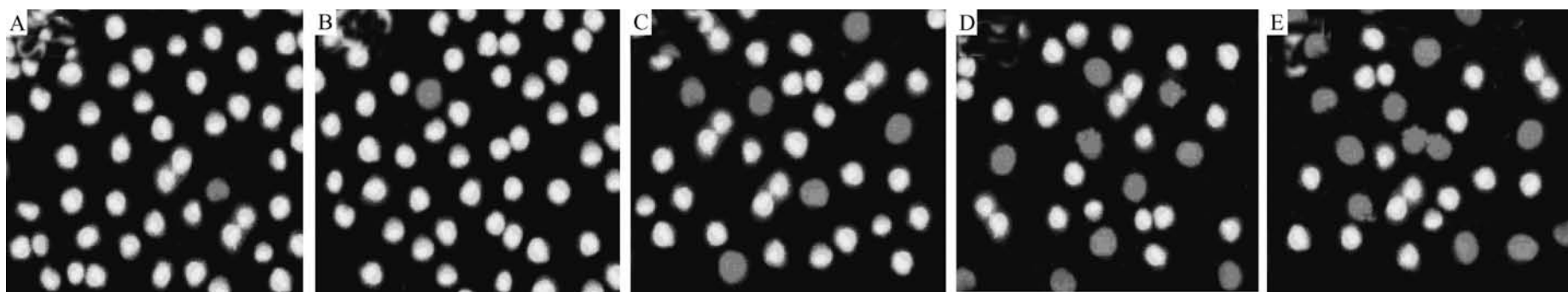


图 1 含药血清作用 48 h 人结肠癌细胞形态学观察(AO/EB 染色, ×40)

A. 空白对照组; B. 血清对照组; C. 益气复元汤生药 201 g·kg⁻¹含药血清组; D. 化疗组; E. 益气复元汤生药 201 g·kg⁻¹含药血清 + 化疗组
量凋亡小体, 而益气复元汤联合化疗组凋亡细胞、凋亡小体均最多。

3.2 流式细胞分析检测 通过流式细胞分析检测结果显示(表 1): 血清对照组与空白对照组 M1 区阳性细胞较少, 无明显凋亡现象, 2 组之间无统计学差异, $P > 0.05$; 益气复元汤组、化疗组、益气复元汤 + 化疗组 M1 区阳性细胞比例(凋亡率)两两比较有统计学差异, $P < 0.05$ 。益气复元汤 + 化疗组凋亡现象最为明显, 其次是化疗组, 再次是益气复元汤组。经金正均 Q 值法判断表明 Q 值 1.15 为协同, 益气复元汤 + 化疗药联用 Q 值为 1.27, 具有协同作用。

表 1 试验各组对大肠癌 Lovo 细胞凋亡率比较(̄±s, n=4)

组别	血清浓度 /%	凋亡率 /%	Q	药物组合 协同性
益气复元汤 + 化疗 ⁷⁾	10	54.53 ± 3.61 ^{1, 2, 3, 4)}	1.27	++
化疗 ⁶⁾	10	45.39 ± 1.89 ^{1, 2, 3)}		
益气复元汤 ⁵⁾	10	25.58 ± 2.61 ^{1, 2)}		
血清对照	10	3.78 ± 0.53		
空白对照	0	3.65 ± 1.01		

注: 与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与血清对照组比较²⁾ $P < 0.01$; 与益气复元汤组比较³⁾ $P < 0.01$; 与化疗组比较⁴⁾ $P < 0.01$; ⁵⁾ 益气复元汤按生药量 201 g·kg⁻¹ ig 2 d 制备含药血清; ⁶⁾ 化疗组第 1 天按奥沙利铂 0.031 g·kg⁻¹ CF 0.046 g·kg⁻¹, 5-FU 0.15 g·kg⁻¹ ip, 第 2 天 CF 0.046 g·kg⁻¹, 5-FU 0.15 g·kg⁻¹; ⁷⁾ 给药方法为 5) + 6) (表 2 同)。

3.3 各组含药血清对大肠癌 Lovo 细胞凋亡蛋白 Bcl-2, Bax 表达的影响 Western Blot 法检测并经 A 值与内参比值统计比较, 结果表明(表 2): 血清对照组与空白对照组中 Bcl-2, Bax 蛋白表达无明显差异。益气复元汤联合化疗组、化疗组、益气复元汤组、血清对照组各组 Bcl-2, Bax 蛋白表达组间两两比较具有显著差异, $P < 0.01$; 益气复元汤联合化疗组 Bcl-2 表达最弱, 其次是化疗组, 再次是益气复元汤组, 血清对照组最强。益气复元汤联合化疗组 Bax 表达最强, 其次是化疗组, 再次是益气复元汤组, 血清对照组最弱。

表 2 试验各组凋亡蛋白 Bcl-2, Bax 与内参比值的比较(%, ̄±s, n=4)

组别	血清浓度 /%	Bcl-2	Bax
益气复元汤 + 化疗 ⁷⁾	10	0.486 ± 0.023 ^{1, 2, 3, 4)}	0.831 ± 0.011 ^{1, 2, 3, 4)}
化疗 ⁶⁾	10	0.564 ± 0.015 ^{1, 2, 3)}	0.756 ± 0.029 ^{1, 2, 3)}
益气复元汤 ⁵⁾	10	0.784 ± 0.017 ^{1, 2)}	0.612 ± 0.025 ^{1, 2)}
血清对照	10	0.851 ± 0.045	0.557 ± 0.063
空白对照	0	0.863 ± 0.036	0.569 ± 0.044

4 讨论

“中药血清药理学”是近 10 余年中新兴的一种中药试验方法, 也是中药药理学研究方法和思维的新突破^[1]。本试验利用益气复元汤大鼠含药血清干预大肠癌 Lovo 细胞, 细胞形态学及流式细胞检测都表明其具有诱导癌细胞凋亡作用, 并能增强化疗药诱导癌细胞凋亡效应。

细胞凋亡涉及多基因、多因素的调控, 其中 Bcl-2, Bax 是目前研究较多涉及的基因, 并且证实了其导致细胞死亡的复杂信号通路^[2]。Bcl-2, Bax 蛋白都定位于线粒体膜、内质网膜和核膜上。Bcl-2 可延长细胞寿命, 增加细胞对多种凋亡刺激因素的抗性, 是抑制细胞的凋亡蛋白; 而 Bax 是凋亡基因家族的核心成员之一, 由 p53 直接激活, 可提高凋亡敏感性, 促进 p53 介导的细胞凋亡^[3]。研究表明^[4] 如 Bax 过表达, 而 Bcl-2 的表达不相应增加, 使形成的 Bax/Bax 同二聚体占优势, 则诱发细胞凋亡。本试验用 Western Blot 法检测并经 A 值与内参比值比较发现: 益气复元汤含药血清可下调 Lovo 肠癌细胞的 Bcl-2 蛋白, 并上调其 Bax 蛋白的表达; 化疗药也有类似作用, 与益气复元汤联用作用更明显。由此可知益气复元汤通过干预 Bcl-2 和 Bax 表达的平衡, 减少 Bcl-2/Bcl-2 同二聚体并使形成的 Bax/Bax 同二聚体占优势, 最终导致肠癌细胞的凋亡, 这可能是其诱导大肠癌 Lovo 细胞凋亡的作用机制之一。

(下转第 163 页)

4 讨论

癌症患者多有不同程度的疼痛和免疫力低下,本试验结果显示,从薏苡仁中提取的薏苡仁油具有明显的镇痛和止血作用,并能促进小鼠免疫器官胸腺、脾脏发育,提示可能促进免疫功能的提高,这也为薏苡仁以及薏苡仁油的相关应用提供了必要的试验依据。痔疮患者也多有直肠出血和疼痛等现象,因此,对于薏苡仁油的镇痛、止血作用机制以及新的临床应用尚需进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 刘晓梅. 薏苡仁的药理研究与临床新用[J]. 中国医药指南, 2010, 8(2): 36.
- [2] 雷正杰, 张忠义, 王鹏, 等. 薏苡仁油脂肪酸组成分析[J]. 中药材, 1999, 22(8): 405.
- [3] 高岚, 张仲一, 张莉, 等. 薏苡仁汤镇痛消炎作用的试

验研究[J]. 天津中医学院学报, 2005, 24(1): 17.

- [4] 徐梓辉, 周世文, 黄林清. 薏苡仁多糖对四氧致大鼠胰岛细胞损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2000, 16(6): 639.
- [5] 苗明三. 薏苡仁多糖对环磷酰胺致免疫抑制小鼠免疫功能的影响[J]. 中医药学报, 2002, 30(5): 49.
- [6] 李毓, 吴棣华, 胡笑克. 薏苡仁酯对人鼻咽癌细胞裸鼠移植瘤转移的抑制作用[J]. 华夏医学, 2003, 16(1): 1.
- [7] 吴继萍, 李晓琳. 康莱特注射液治疗晚期肝癌、胰腺癌恶病质的临床研究[J]. 临床合理用药, 2009, 2(22): 42.
- [8] 陶小军, 王德俭, 刘静, 等. 二十五味鬼臼丸的镇痛、抗炎、镇静作用研究[J]. 中成药, 2006, 28(11): 1669.
- [9] 韩雪, 王丽娜, 陆蕊杭. 安痔消炎片的止血与抗溃疡作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(1): 107.

[责任编辑 聂淑琴]

(上接第 160 页)

近年来国内外学者对中药诱导凋亡可行性进行了广泛的研究,也证实许多中草药具有诱导细胞凋亡的作用^[5]。抗癌中药与化疗药物相比,其优势之一是不不良反应小,易被患者接受,如果在临床应用还具有明显减轻化疗毒副作用、提高机体免疫力作用的中药将会更适合应用于广大的肿瘤化疗患者。

[参考文献]

- [1] 张骝, 大海. 中药复方药效工程学[M]. 北京: 中国医药

科技出版社, 2005: 361.

- [2] Adams J M, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family[J]. Trends Biochem Sci, 2001, 26(5): 61.
- [3] 刘宝瑞, 钱晓萍. 临床肿瘤学[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 16.
- [4] 樊代明. 肿瘤研究前沿(第六卷)[M]. 上海: 第四军医大学出版社, 2006: 44.
- [5] 郭宇飞, 孙秀琳. 中药诱导肿瘤细胞凋亡的研究[J]. 世界中医药, 2008, 3(3): 189.

[责任编辑 聂淑琴]