

## 中药胃康宁防治胃癌作用的机制探讨

钟娃<sup>1</sup>, 阚方巨<sup>2</sup>, 于钟<sup>1</sup>, 闵存云<sup>2</sup>, 李庆明<sup>1\*</sup>

(1. 广州中山大学附属第二医院消化科, 广州 510120;

2. 广州中山大学附属第二医院中医科, 广州 510120)

[摘要] 目的: 观察健脾解毒散结中药胃康宁含药血清对胃癌细胞周期调控因子 CyclinD1, CyclinD2, Cdk4 (Cyclin dependant kinase4, CDK4), Cdk6 和 p16<sup>INK4a</sup>mRNA 及其蛋白表达的作用。方法: 分别将高、中、低不同剂量的中药胃康宁制剂 ig SD 大鼠, 制备含药血清, 然后分别用不同剂量含药血清培养胃癌细胞; 采用免疫组织化学 SABC 法及 RT-PCR 法检测各组胃癌细胞中 CyclinD1, CyclinD2, Cdk4, Cdk6 和 p16<sup>INK4a</sup>mRNA 和蛋白的表达。结果: 免疫组化结果显示, 与空白对照组比较, 胃康宁高、中、低剂量组 CyclinD1 灰度值变化, 无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); CyclinD2, Cdk4, Cdk6 灰度值均有明显升高, 而 p16<sup>INK4a</sup> 灰度值则显著降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); RT-PCR 结果显示, 胃康宁高、中、低剂量组 CyclinD1 OPTDI 值变化, 无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 但能明显降低 CyclinD2, Cdk4 和 Cdk6 OPTDI 值, 同时升高 p16<sup>INK4a</sup> OPTDI 值 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结论: 中药胃康宁可抑制胃癌细胞促细胞周期相关因子 CyclinD2, Cdk4 和 Cdk6 的表达, 同时增强胃癌细胞周期抑制因子 p16<sup>INK4a</sup> 的表达, 这可能是健脾解毒散结中药胃康宁抑制胃癌细胞生长的作用机制。

[关键词] 中药胃康宁; 胃癌; 机制

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)04-0109-05

## Effects and mechanisms of Weikangning on gastric cancer

ZHONG Wa, KAN Fang-ju, YU Zhong, MIN Cun-yun, LI Qing-ming\*

(The Second Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects and mechanisms of Chinese herbal medicine—Weikangning on gastric cancer. **Method:** Total of 120 SD rats were divided into control group, high dose group, medium dose group and low dose group, and fed with natural saline, 20, 10 and 5 g/kg of Weikangning decoction respectively. The experimental animals were finally killed for the preparation of drug-containing serum. The gastric cancer cell MGC-803 was cultured with the drug-containing serum drawn from the rats in different groups. The expressions of CyclinD1, CyclinD2, Cdk4, Cdk6 and p16<sup>INK4a</sup> were detected with immunohistochemistry method-SABC. The expression of mRNA of CyclinD1, CyclinD2, Cdk4, Cdk6 and p16<sup>INK4a</sup> were detected with RT-PCR. **Result:** In high, medium and low dose group, the gray scales and the OPDTI value of CyclinD1 had no remarkable change; the gray scales of CyclinD2, Cdk4, Cdk6 and the OPDTI values of p16<sup>INK4a</sup> increased significantly, but the gray scales of p16<sup>INK4a</sup> and the OPDTI values of CyclinD2, Cdk4, Cdk6 decreased remarkably, compared with those in control groups. **Conclusion:** The Chinese herbal medicine Weikangning decoction can decrease the expressions of CyclinD2, Cdk4, Cdk6, increase the expression of p16<sup>INK4a</sup>. This effect may be involved in mechanism of gastric cancer cell growth inhibition gain by the Weikangning decoction.

[Key words] Weikangning; gastric cancer; mechanism

我们以往的研究表明, 健脾解毒散结中药胃康宁能抑制胃癌细胞 p53, VEGF 及其受体的表达<sup>[1]</sup>,

并将胃癌细胞阻滞于 G0 ~G1 期, 而不进入 S 期<sup>[2]</sup>。本文进一步研究了中药“胃康宁”对胃癌细胞周期

[收稿日期] 2009-08-18

[基金项目] 广东省自然科学基金(7001589); 广东省中医药管理局课题(1060168)

[通讯作者] \* 李庆明, Tel: 13660318901; E-mail: Likh @ essence. com. cn

调控因子 CyclinD1, CyclinD2, Cdk4, Cdk6 和 p16<sup>INK4a</sup>表达的影响,以探讨胃康宁防治胃癌的作用机制。

### 1 材料与方

**1.1 材料** 中药胃康宁:党参 30 g,半枝莲 30 g,白毛藤 15 g,五灵脂 15 g,田七 5 g,水蛭 10 g,鸡内金 15 g,枳实 10 g,大黄 3 g,甘草 5 g 等组成。药液制备:以上药物混合后加 3 倍体积的清水煎煮 3 次,将所得药液混匀后经过滤除菌,分别制成浓度为 0.5, 1, 2(生药) g/mL 的中药制剂。供制备大鼠含药血清用。

**1.2 动物** SD 大鼠,清洁级,雌雄各半,体重 200 ~ 250 g 由广州中医药大学实验动物中心提供(实验动物合格证编号:2005A031);分为空白对照组、药物高剂量组、药物中剂量组、药物低剂量组 4 组,每组 30 只。MGC-803 胃癌细胞株由中山大学实验动物中心提供。

**1.3 试剂** 细胞培养试剂:小牛血清, RPMI-1640M,培养基购于英荦创津试剂公司,免疫组化试剂:S-ABC 试剂盒(产品批号 SA1020), DAB 显色液(产品批号 AR1022),胃癌细胞周期调控因子克隆抗体 CyclinD1(产品批号 BA0487) CyclinD2(产品批号 BA0491)、Cdk4 (Cyclin dependant kinase4, Cdk4)(产品批号 BA0310)、Cdk6 (产品批号 BA0316)、p16<sup>INK4a</sup>(产品批号 RB9228),以上产品均由中国武汉博士德公司提供。

**1.4 主要实验仪器** PCR 仪(PCT-100 型 PCR 仪,美国);凝胶成像系统(COD GEL2000 美国);UV-2201 型紫外分光光度计(SHIMADZU,日本);凝胶摄像系统(Polaroid,美国);全自动图像处理系统(KONTRON IBAS2.0,德国);UV-2450 分光光度计(日本岛津公司)等。

### 2 实验方法

**2.1 中药胃康宁含药血清制备** SD 大鼠,清洁级,体重 200 ~250 g,共 120 只,随机分为 4 组。给药组分别按 5, 10, 20(生药) g/kg 剂量 ig,对照组给予相同体积的生理盐水,每日 1 次,连续 1 周。末次 ig 后 1 h 在无菌条件下自腹主动脉采血,1 700 r/min 离心制备含药血清;将所采各组动物血清分别混合, -70 °C 冷藏备用,临用前需 56 °C 灭活 30 min。

**2.2 胃癌细胞培养** 复苏 MGC-803 胃癌细胞株,用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液,置于 37

, 5% CO<sub>2</sub> 孵育箱中培养 48 ~72 h,每 24 h 换培养液 1 次。待培养瓶底铺满胃癌细胞后,弃去培养液,用 0.25% 胰蛋白酶消化胃癌细胞,含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液调整细胞浓度为 2 ×10<sup>6</sup> /mL 分别接种。设空白对照组、血清对照组、胃康宁含药血清高、中、低剂量实验组共 5 组进行培养。

**2.3 中药胃康宁对胃癌细胞周期调控因子 CyclinD1, CyclinD2, Cdk4, Cdk6, p16<sup>INK4a</sup> 表达的影响**

**2.3.1 胃癌细胞总 RNA 的提取** 用异硫氰酸胍-酚一步法,采用 Gibico 公司的 Trizol,按说明书进行操作。提取后的 RNA 经紫外线分光光度计和琼脂糖电泳进行完整性、纯度及浓度的测定,溶于 DEPC 水中, -70 °C 冰箱保存备用。

**2.3.2 引物设计合成** 参照 CyclinD1, CyclinD2, Cdk4, Cdk6, p16<sup>INK4a</sup> 的序列设计引物(见表 1),由上海博亚生物技术公司合成。

表 1 CyclinD1, CyclinD2, Cdk4, Cdk6 和 p16<sup>INK4a</sup>引物序列

	正向引物	反向引物
Cylin D1	5-GAGACCATCCCCCTGACGCC-3	5-GTCCCCAGAGTCCGAAAGAT-3
Cylin D2	5-TGCATGTTCTTGGCTCC-3	5-TTAAAGTCGGTGGCACACA-3
-actin	5-CTAAAGGCAACGAGCCGTTTC-3	5-CITAGGAGTGGGGTGGCTT-3
Cdk4	5-GAGACCATCCCCCTGACGCC-3	5-GTCCCCAGAGTCCGAAAGAT-3
Cdk6	5-TGCATGTTCTTGGCTCC-3	5-TTAAAGTCGGTGGCACACA-3
-actin1	5-CTATCTAGCCATAGCTA-3	5-CTATCCCTAGAGTGGC-3
p16 <sup>INK4a</sup>	5-CCTCGGTCCTGATGCTACT-3	5-TTCAATCGGGATGCT-3
-actin	5-CTAAAGGCAACGAGCCGTTTC-3	5-CITAGGAGTGGGGTGGCTT-3

**2.3.3 RT-PCR** 取 2 μg RNA 溶于 DEPC 处理后的水中,加入 oligodT 0.5 μL 后,70 °C 5 min,取出后迅速放在冰上 1 min,加入 200 U/ μL MMLV 逆转录酶 1 μL, 40 U/ μL Rnasin 0.5 μL, 5 ×RT Buffer 5 μL, 10 mmol/L dNTPs 1.5 μL, 42 °C 60 min,合成 cDNA 第一链,70 °C 5 min 灭活逆转录酶。取 cDNA 5 μL, 10 ×PCR Buffer 3 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 3 μL, 正链引物终浓度 0.8 μL, 负链引物终浓度 0.8 μL, 5 IU/L Taq 酶 0.5 μL, 补加双蒸水至 30 μL。在不同的反应条件获得相应的产物。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色后拍照,并用全自动图像处理系统分别测量电泳条带面积与平均光密度的乘积值(OPTDI 值)与 -actin 的 OPTDI 值的比值(A)作为各基因 mRNA 的相对表达量。

**2.3.4 对 CyclinD1, CyclinD2, Cdk4, Cdk6 和 p16<sup>INK4a</sup>蛋白表达的影响** 将胃癌细胞按 1x10<sup>5</sup> /mL

的浓度均匀接种于含 10% 含药血清的培养基中, 分别培养三代后, 用免疫组织化学 SABC 法检测 CyclinD1, CyclinD2, Cdk4, Cdk6 和 p16<sup>INK4a</sup> 蛋白的表达, 按说明书进行, 结果采用德国 KONTRON IBAS 2.0 全自动图像处理系统进行灰度定量分析。

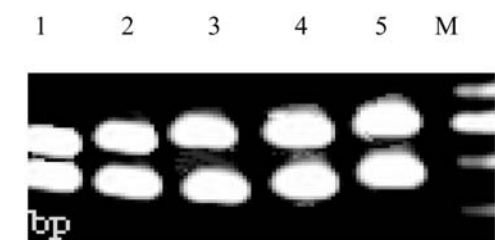
**2.3.5 统计学处理** : 所有实验结果采用均数 ± 标准差(  $\bar{x} \pm s$  ) 表示, 显著性水准 = 0.05。所有统计均采用 SPSS 12.0 for windows 统计软件进行。

### 3 结果

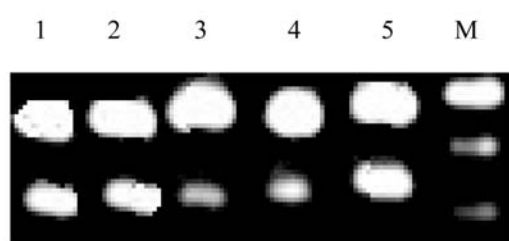
表 2 中药胃康宁含高血清对 MGC-803 胃癌细胞 CyclinD1, CyclinD2, Cdk4, Cdk6 和 p16<sup>INK4a</sup> mRNA 表达的影响 (  $\bar{x} \pm s, n = 30$  )

组别	OPTDI				
	Cyclin D1	CyclinD2	Cdk4	Cdk6	p16 <sup>INK4a</sup>
空白对照	1.12 ± 0.35	0.68 ± 0.22	0.45 ± 0.17	0.42 ± 0.20	0.25 ± 0.21
血清对照	1.02 ± 0.40	0.65 ± 0.30	0.46 ± 0.23	0.44 ± 0.15	0.27 ± 0.19
胃康宁低剂量	1.20 ± 0.36	0.44 ± 0.18 <sup>3)</sup>	0.42 ± 0.21 <sup>3)</sup>	0.43 ± 0.18	0.32 ± 0.25 <sup>3)</sup>
胃康宁中剂量	1.11 ± 0.29	0.39 ± 0.20 <sup>1,2)</sup>	0.35 ± 0.15 <sup>1,2)</sup>	0.30 ± 0.12 <sup>1,2)</sup>	0.35 ± 0.23 <sup>1,2)</sup>
胃康宁高剂量	1.03 ± 0.31	0.31 ± 0.19 <sup>1,2)</sup>	0.30 ± 0.11 <sup>1,2)</sup>	0.29 ± 0.14 <sup>1,2)</sup>	0.39 ± 0.18 <sup>1,2)</sup>

注: 与空白对照组相比, <sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与血清组比较, <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与胃康宁高剂量血清组比较, <sup>3)</sup>  $P < 0.05$



Cyclin D1 mRNA电泳图



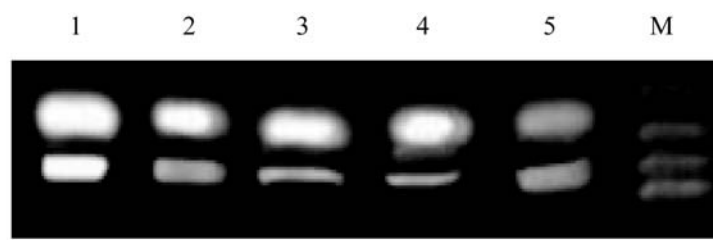
Cyclin D2 mRNA电泳图

图 1 各组胃癌细胞 Cyclin D1, Cyclin D2 的表达

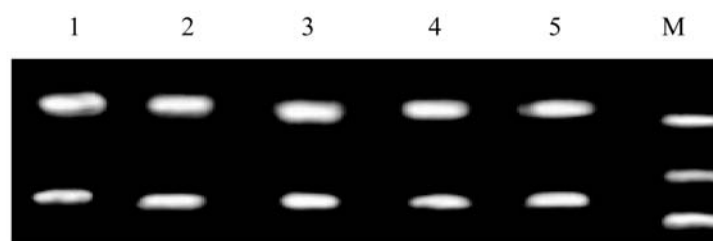
自 1 至 M 分别为血清对照组, 胃康宁低剂量血清组, 胃康宁中剂量血清组, 胃康宁高剂量血清组, 空白对照组和 Marker, Marker 最亮处为 500bp

**3.2 中药胃康宁对 CyclinD1, CyclinD2, Cdk4, Cdk6 和 p16<sup>INK4a</sup> 表达的影响** 检测结果显示, 各用药组胃癌细胞中 CyclinD1 的表达不受抑制 ( $P > 0.05$ ); CyclinD2, Cdk4 和 Cdk6 的表达均受到不同程度的抑制 ( $P < 0.01$ ), 染色变浅, 且与用药剂量相关, ( $P < 0.05$ ); 各用药组胃癌细胞中 p16<sup>INK4a</sup> 的表达得到不同程度的增强, 染色加深, 并呈现药物剂量依赖性的改变, 增强作用以高剂量组为显著 ( $P < 0.01$ ) (见表 3, 图 4 ~8)。

**3.1 中药胃康宁对 CyclinD1, CyclinD2, Cdk4, Cdk6 和 p16<sup>INK4a</sup> mRNA 表达的影响** 检测结果表明, 所有胃癌细胞中均可见 CyclinD1, CyclinD2, Cdk4, Cdk6 和 p16<sup>INK4a</sup> mRNA 表达, 用药组与对照组相比, 用药组 CyclinD1 OPTDI 值变化不大 ( $P > 0.05$ ), 说明 CyclinD1 的表达没有受到抑制; CyclinD2, Cdk4, Cdk6 的 OPTDI 值明显下降 ( $P < 0.01$ ), p16<sup>INK4a</sup> 的 OPTDI 值明显升高 ( $P < 0.01$ ), 并且药物浓度越高, 作用越强(与对照组比  $P < 0.05$ , 见表 2, 图 1 ~3)。



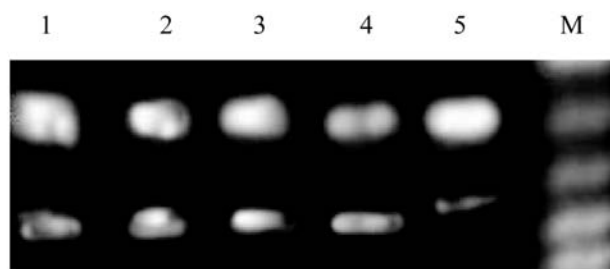
Cdk4 mRNA表达PCR电泳图



Cdk6 mRNA表达PCR电泳图

图 2 各组胃癌细胞 Cdk4 和 Cdk6 mRNA 的表达

自 1 至 M 分别为血清对照组、胃康宁低剂量血清组、胃康宁中剂量血清组、胃康宁高剂量血清组、空白对照组和 Marker, Marker 最亮处分别为 700bp 和 500bp



p16<sup>INK4a</sup> mRNA表达PCR电泳

图 3 各组胃癌细胞 p16<sup>INK4a</sup> mRNA 的表达

自 1 至 M 分别为血清对照组、胃康宁低剂量血清组、胃康宁中剂量血清组、胃康宁高剂量血清组、空白对照组和 Marker, Marker 最亮处分别为 700bp 和 500bp

表 3 中药胃康宁对 CyclinD1、CyclinD2、Cdk4、Cdk6 和 p16<sup>INK4a</sup>表达的免疫组化图像处理结果

组别	各组图像的灰度值 / $\mu\text{m}^2$				
	Cyclin D1	CyclinD2	Cdk4	Cdk6	p16 <sup>INK4a</sup>
空白对照	170.69 ±1.79	145.31 ±1.83	144.52 ±0.20	144.55 ±0.70	155.22 ±0.57
血清对照	168.01 ±3.49	143.90 ±2.02	146.65 ±0.55	145.31 ±0.65	150.65 ±0.55
胃康宁低剂量血清	171.82 ±2.39	145.20 ±1.99 <sup>3)</sup>	161.80 ±0.66 <sup>1, 2, 3)</sup>	146.33 ±0.63 <sup>3)</sup>	145.80 ±0.56
胃康宁中剂量血清	175.90 ±3.96	158.01 ±1.62 <sup>1, 2, 3)</sup>	178.65 ±0.52 <sup>1, 2)</sup>	158.01 ±0.72 <sup>1, 2)</sup>	145.80 ±0.56
胃康宁高剂量血清	173.31 ±1.09	169.51 ±1.71 <sup>1, 2)</sup>	182.22 ±0.57 <sup>1, 2)</sup>	169.04 ±0.61 <sup>1, 2)</sup>	130.52 ±0.59 <sup>1, 2)</sup>

注:与空白对照组相比,<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与血清组比较,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与胃康宁高剂量血清组比较,<sup>3)</sup>  $P < 0.05$

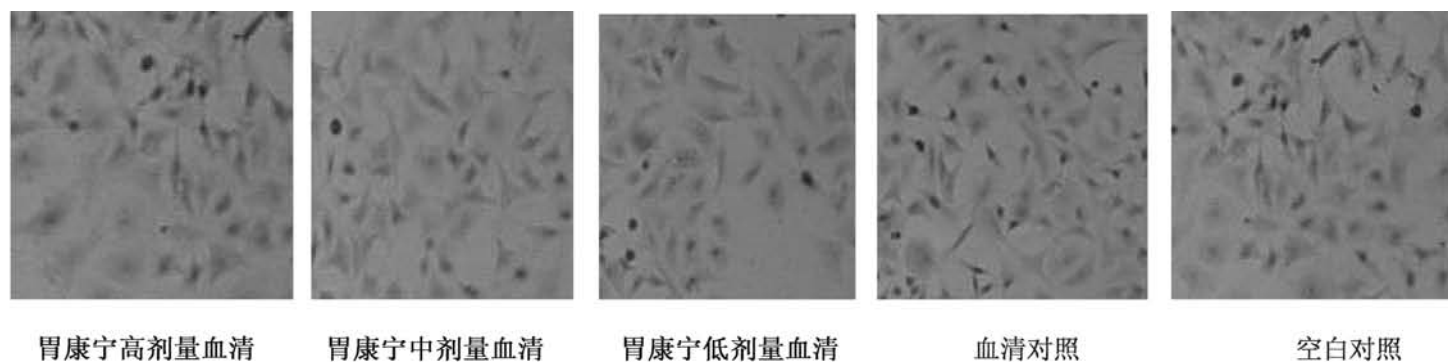


图 4 各组胃癌细胞 Cyclin D1 表达的情况 (×200)

图中各组 Cyclin D1 染色较为均匀,差异不显著

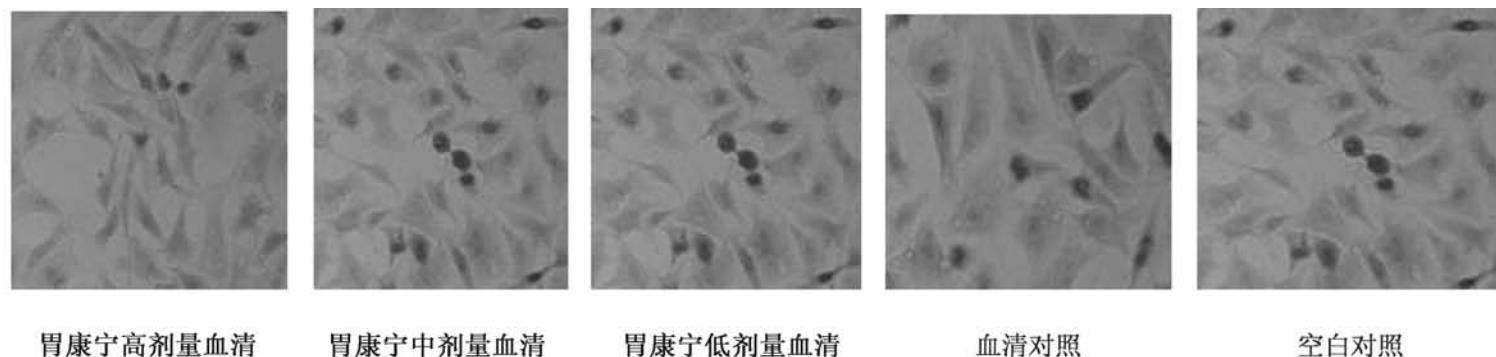


图 5 各组胃癌细胞 Cyclin D2 表达的情况 (×400)

图中各组 Cyclin D2 表达,随用药剂量的增加,染色变浅

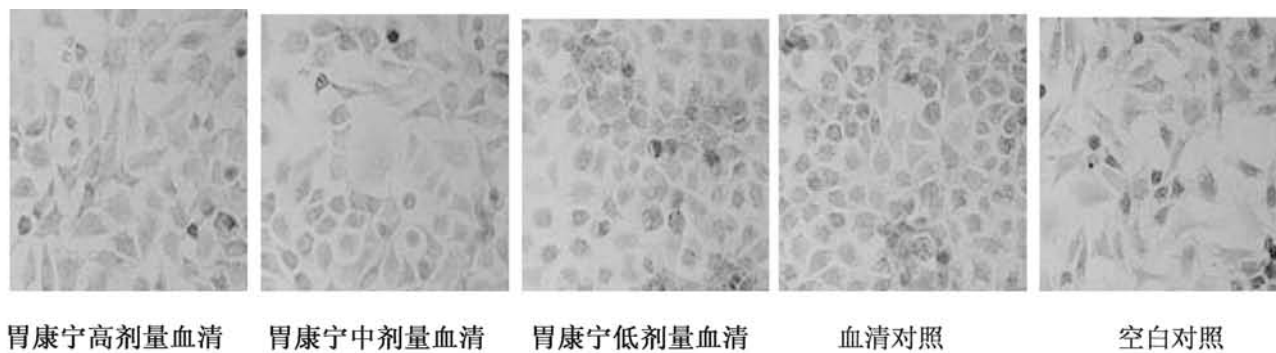


图 6 各组胃癌细胞 Cyclin D4 表达的情况 (×400)

图中各组 Cyclin D4 表达,随用药剂量的增加,染色变浅

#### 4 讨论

随着对肿瘤细胞周期及其调控机制的研究进展,人们逐渐认识到肿瘤是多基因变化导致细胞周期紊乱,细胞失控性生长所致的一类疾病,肿瘤的过度增殖与癌细胞周期调控因子紊乱密切相关,目前这一观点已得到国内外学者的一致认同<sup>[3]</sup>。因此,细胞周期调控异常是肿瘤发生的一个重要机制,其中 G1/S 转换的调控机制是研究的热点。我们采用

健脾解毒散结中药胃康宁防治胃癌,研究表明“胃康宁”能抑制胃癌细胞 p53、VEGF 及其受体的表达,并将胃癌细胞阻滞于 G0~G1 期,而少进入 S 期。因此,我们设想,中药“胃康宁”可能是通过调节胃癌细胞周期调控因子而达到这一效应的。作为直接参与细胞周期调控的细胞素 Cyclins 和细胞周期素依赖蛋白激酶(Cyclin dependent kinsases, Cdk) Cdk 在肿瘤的发生发展中具有重要的作用。其中 Cyclin D-

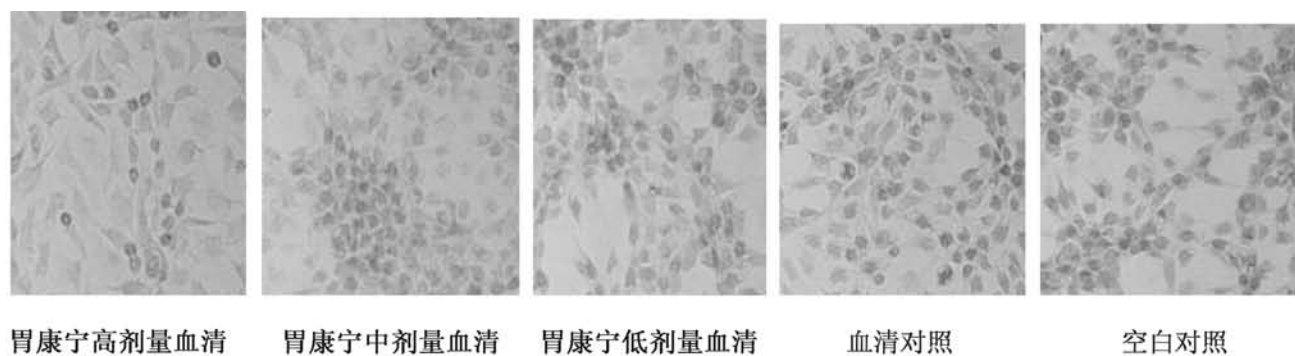


图 7 各组胃癌细胞 Cdk6 表达的情况( ×200)  
图中各组 Cdk6 的表达随用药剂量的增加, 染色变浅

图 8 各组胃癌细胞 p16<sup>INK4a</sup> 表达的情况( ×400)  
图中各组 p16<sup>INK4a</sup> 的表达随用药剂量的增加, 染色变深

Cdk4/6 复合物的形成并积累是 G1 期进行的关键步骤, 它们是促进细胞增殖及肿瘤细胞分裂增殖的重要因素<sup>[4]</sup>。同时, 在 G1/S 转换中, 称为细胞周期素激酶抑制物( Cyclin kinase inhibitors, Ckis) 的两个蛋白家族包括 INK4 家族如: p15INK4B、p16INK4A 和 p18INK4C 等; 另外一个家族包括 p21WAF1/CIP1、p27KIP1 和 p57KIP2 等, 这些抑制物分别与相应的 cdk 相结合, 从而抑制 Cyclin/Cdk 复合物对细胞周期的促进作用<sup>[5]</sup>。本实验结果表明, 各用药组胃癌细胞 CyclinD1 mRNA 及其蛋白的表达不受影响, 而 CyclinD2, Cdk4 和 Cdk6 mRNA 及其蛋白的表达均受到抑制, p16<sup>INK4a</sup> mRNA 及蛋白的表达增强, 说明中药胃康宁通过抑制促细胞周期因子 CyclinD2, Cdk4 和 Cdk6 的表达, 以及促进细胞周期抑制因子 p16<sup>INK4a</sup> 的表达, 从而抑制胃癌细胞增殖。这可能是健脾解毒散结中药胃康宁防治胃癌的作用机制之一。

#### [ 参考文献 ]

- [ 1 ] 李庆明, 余谦, 闵存云. p53 突变与 VEGF 在大鼠胃癌中的表达及中药胃康宁的防治作用 [ J ]. 世界华人消化杂志, 2003, 11: 997.
- [ 2 ] QML, FJK, CYM. Effect of Weikangning on gastric cell growth and expression of vascular endothelial growth factor and its receptors KDR and Flt-1 [ J ]. World J Gastroenterol, 2005, 11(7) : 938.
- [ 3 ] Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer [ J ]. Nature, 2001, 411(6835) : 342.
- [ 4 ] So JB, Samarasinghe K, Raju GC, et al. Expression of cell-cycle regulators p27 and cyclin E correlates with survival in gastric carcinoma patients [ J ]. J Surg Res, 2000, 94: 56.
- [ 5 ] Coqueret O. Linking cyclins to transcriptional control [ J ]. Gene, 2002, 299(1-2) : 35.