

# 清胰化积方联合吉西他滨对人胰腺癌 SW1990 移植瘤细胞凋亡及 Bcl-2 蛋白表达的影响

沈晔华<sup>1</sup>, 傅 洁<sup>1</sup>, 刘鲁明<sup>1\*</sup>, 沈 瑾<sup>2</sup>, 李栋良<sup>2</sup>

(1. 复旦大学附属肿瘤医院, 上海 200032; 2. 复旦大学上海医学院, 上海 200032)

**[摘要]** 目的: 研究中药清胰化积复方联合化疗药物吉西他滨对人胰腺癌细胞 SW1990 凋亡及 Bcl-2 蛋白表达的影响。方法: 将荷 SW1990 裸小鼠随机分为模型组、化疗组、化疗联合中药高、中、低剂量组, 计算各组治疗后抑瘤率, 并采用流式细胞术检测药物作用后肿瘤细胞的凋亡率, 采用免疫组化法检测各组 Bcl-2 蛋白的表达情况。结果: 化疗联合中药各组的瘤重均小于化疗组, 化疗联合中药中剂量组的肿瘤细胞凋亡率高于化疗组, Bcl-2 蛋白表达程度下降, 有显著性差异。结论: 清胰化积复方与吉西他滨联合应用, 对人胰腺癌细胞 SW1990 体内生长具有协同抑制作用, 下调 Bcl-2 蛋白的表达, 促进细胞凋亡可能是其作用机理之一。

**[关键词]** 清胰化积方; 胰腺癌; 凋亡; Bcl-2 蛋白

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)02-0084-03

## Effect of Qingyi Huaji Decoction Combined with Gemcitabine on Apoptosis and Expression of Bcl-2 protein of Pancreatic Cancer SW1990 in Vivo

SHEN Ye-hua<sup>1</sup>, FU Jie<sup>1</sup>, LIU Lu-ming<sup>1\*</sup>, SHEN Jin<sup>2</sup>, LI Dong-liang<sup>2</sup>

(1. Department of Integrated Chinese and Western Medicine, Fudan University, Cancer Hospital, Central Laboratory of Fudan University, Cancer Hospital, Shanghai 200032;

2. Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of the herbal decoction Qingyi Huaji formula (QYHJ) combined with gemcitabine on apoptosis and expression of Bcl-2 protein of human pancreatic cancer SW1990 in vivo. **Methods:** Tumor-burdened nude mice were randomized into control group, Chemo group, groups of Chemo plus QYHJ at different doses. After treatment, inhibiting rates of tumor growth were calculated. Cell apoptosis of each group was extracted by flow cytometry (FCM). Expression of Bcl-2 protein was learned by method of immunohistochemistry. **Result:** Tumor weight in the Chemo plus QYHJ groups at different doses was significantly lower than that in the Chemo group ( $P < 0.05$ ). Compared to the Chemo group, cell apoptosis rate in the Chemo plus QYHJ groups at middle dose was higher ( $P < 0.05$ ), while the expression of Bcl-2 was lower ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** QYHJ formula may have synergistic action on Gemcitabine, to inhibit the proliferation of human pancreatic cancer SW1990 in vivo, possibly by inhibiting expression of Bcl-2 protein and inducing cell apoptosis.

**[Key words]** Qingyi Huaji formula; Pancreatic cancer; Apoptosis; Bcl-2 protein

**[收稿日期]** 2009-01-23

**[基金项目]** 上海市科委重点项目(02DZ19106)

**[通讯作者]** \* 刘鲁明, Tel: (021)64175590-1308

吉西他滨(Gemcitabine)为晚期胰腺癌的一线化疗药物,但其治疗有效率低(28%),中位生存期短(5.6月)<sup>[1]</sup>,迫切需要寻求新的药物以提高吉西他滨的疗效。2002年以来,我院开展了清胰化积方治疗晚期胰腺癌的临床和实验研究。前期研究结果提示,清胰化积方对SW1990胰腺癌的体内生长具有一定的抑制作用,其机理可能与调控肿瘤细胞周期并诱导肿瘤细胞凋亡有关<sup>[2]</sup>,该方与吉西他滨联合治疗对SW1990具有协同抑瘤作用<sup>[3]</sup>。为进一步明确清胰化积方对化疗的增效作用及其机理,本研究观察了该方对SW1990人胰腺癌细胞凋亡及Bcl-2蛋白表达的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 药物** 清胰化积方由蛇六谷、白花蛇舌草、半枝莲、薏仁、绞股蓝等组成,常规制成中药水煎剂,浓缩为含生药3.6,1.8,0.9g·mL<sup>-1</sup>的药液,置4℃冰箱保存。由肿瘤医院药剂科制作。吉西他滨(健择)购于美国礼来公司(粉针剂:200mg/支,批号FF5C04B)。

**1.1.2 细胞株** SW1990人胰腺癌细胞株,由中山大学实验动物中心细胞库提供。

**1.1.3 实验动物** BALB/C-nu/nu裸小鼠40只,雌性,体重18~22g,由中国科学院上海实验动物中心提供。在SPF环境下饲养。

**1.1.4 主要仪器和试剂** FACSCaliburxi流式细胞仪由Becton Dickinson公司生产;曲通(Tritonx-100)购自Research公司;碘化丙啶(Propidium iodide)购自Sigma公司;鼠抗人Bcl-2蛋白单抗购自美国Santa Cruz公司;二抗Envision试剂、DAB显色试剂盒购自丹麦DAKO公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物模型的建立** 将体外生长并处于对数生长期的胰腺癌SW1990细胞以 $6 \times 10^6 \cdot 0.2 \text{ mL}^{-1}$ 接种于裸小鼠右肩胛皮下。传代后,取生长旺盛期的瘤组织,切成1mm<sup>3</sup>大小块状,接种于裸小鼠右肩胛皮下。

**1.2.2 分组治疗** 肿瘤接种后1周,裸小鼠皮下移植瘤出现。将裸小鼠随机分为5组,每组8只。模型组ig生理盐水0.4mL,每日1次,d<sub>1,21</sub>,同时生理盐水0.4mL ip,d<sub>1,5,9</sub>;化疗组予吉西他滨120mg·kg<sup>-1</sup> ip,d<sub>1,5,9</sub><sup>[4]</sup>,同时ig生理盐水0.4mL,每日1

次,d<sub>1,21</sub>;化疗+中药高剂量组予吉西他滨120mg·kg<sup>-1</sup> ip,d<sub>1,5,9</sub>,ig清胰化积方72g·kg<sup>-1</sup>,每日1次,d<sub>1,21</sub>;化疗+中药中剂量和化疗+中药低剂量分别ig清胰化积方36,18g·kg<sup>-1</sup>外,其余同化疗+中药高剂量组。

**1.2.3 抑瘤率计算** 治疗结束后处死小鼠,称瘤重,计算抑瘤率,肿瘤生长抑制率%=(模型组平均瘤重-治疗组平均瘤重)/模型组平均瘤重×100%。

**1.2.4 凋亡率检测** 采用流式细胞术。取冰盐水保存的肿瘤组织,洗去血块与黏液,制成单细胞悬液,乙醇固定,调整细胞数为 $1.0 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ ,加入碘化丙啶染色,上流式细胞仪检测。自动拟合出细胞周期各时相比比例、细胞凋亡率。

**1.2.5 Bcl-2蛋白检测** 采用免疫组织化学EnVision二步法:将肿瘤组织标本以10%甲醛固定24h。脱水、透明、浸蜡、包埋。标本切片,脱蜡,PBS洗。加入柠檬酸三钠,加热进行抗原修复。加入一抗(工作浓度1:100),4℃过夜,缓冲液洗。加入二抗,作用30min,缓冲液洗。DAB显色。水洗,以苏木素衬染2~3min。分化、蓝化,常规脱水、透明,树胶封片。Bcl-2蛋白在胰腺肿瘤细胞中表达于胞浆,呈黄色或棕黄色颗粒状。参照文献对位于细胞质的Bcl-2蛋白表达进行评分,阳性细胞百分率评分标准:0~9%为0分;10%~39%为1分;40%~69%为2分;70%~89%为3分;90%~100%为4分。显色强度评分标准:无显色为0分;较浅显色为1分、中等显色为2分、较深显色为3分、很深显色4分。综合评分=阳性细胞百分率评分×显色强度评分/4。

**1.3 统计学分析** 以方差分析法比较各组间瘤重及凋亡率,以秩和检验比较各组间Bcl-2蛋白的表达。

## 2 结果

**2.1 各组SW1990移植瘤的瘤重比较** 各治疗组的瘤重均小于模型组( $P < 0.01$ )。各合用组治疗后的瘤重均小于单用吉西他滨( $P < 0.05$ )。合用高、中、低剂量组的抑瘤率分别为92.69%,93.41%,92.92%,而化疗组抑瘤率为88.77%。各合用组间的瘤重比较无显著性差异( $P > 0.05$ )。详见表1。

**2.2 各组SW1990移植瘤细胞凋亡率比较** 各治疗组的肿瘤细胞凋亡率均高于模型组( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。合用中剂量组细胞凋亡率最高,与化疗组比较有显著性差异( $P < 0.01$ )。合用高、低两个

剂量组的细胞凋亡率低于化疗组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。详见表 1。

表 1 各组 SW1990 移植瘤的瘤重及凋亡率比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量 ( $g \cdot kg^{-1}$ )	瘤重 (g)	抑瘤率 (%)	凋亡率 (%)
模型组	-	0.83 ± 0.06	-	4.34 ± 1.33
吉西他滨组	0.12	0.09 ± 0.01 <sup>2)</sup>	88.77	21.33 ± 4.07 <sup>2)</sup>
吉西他滨 + 清胰化积方(合用组)	0.12 + 72.0	0.06 ± 0.01 <sup>2,3)</sup>	92.69	8.24 ± 3.42 <sup>1,4)</sup>
	0.12 + 36.0	0.05 ± 0.01 <sup>2,3)</sup>	93.41	30.75 ± 1.90 <sup>2,4)</sup>
	0.12 + 18.0	0.06 ± 0.02 <sup>2,3)</sup>	92.92	16.37 ± 2.90 <sup>2,3)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ , <sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与吉西他滨组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ , <sup>4)</sup> $P < 0.01$ (下同)

2.3 各组 Bcl-2 蛋白表达比较 合用中剂量组的 Bcl-2 蛋白表达评分最低,与模型组和化疗组比较,均有统计学差异 ( $P < 0.01$  和  $P < 0.05$ )。其余各组间比较,无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。详见表 2。

表 2 各组 Bcl-2 蛋白的表达综合评分比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量( $g \cdot kg^{-1}$ )	评分
模型组	-	2.03 ± 0.76
吉西他滨组	0.12	2.06 ± 1.35
吉西他滨 + 清胰化积方	0.12 + 72.0	1.25 ± 1.06
	0.12 + 36.0	0.63 ± 0.79 <sup>2,3)</sup>
	0.12 + 18.0	1.43 ± 1.15

### 3 讨论

Bcl-2 为公认的凋亡抑制基因,钟英强等发现, Bcl-2 蛋白在胰腺癌组织中有较高的表达,提示其对化疗药物的抵抗有可能与其有关。此外,有报道在以吉西他滨治疗胰腺癌的体外实验中, Bcl-2 的 mRNA 水平与肿瘤耐药程度相关,且多次化疗后凋亡抑制基因被激活,从而导致肿瘤耐药性,由此提出了阻断相关凋亡抑制基因以提高化疗效果的思路。

清胰化积方是在长期的临床经验指导下,基于胰腺癌“湿热毒聚”病机所拟定的。方中蛇六谷化痰散积、解毒消肿、行瘀化食为君;白花蛇舌草、半枝莲清热解毒、利湿消肿、活血止痛为臣;绞股蓝扶助

正气、清热解毒、化痰抗癌为佐;薏仁化湿和胃、行气宽中为使。诸药合用,发挥清热解毒、化湿散结、理气行瘀之功效,使热毒湿邪得除,有邪去正安之效。前期研究提示,清胰化积复方对 SW1990 胰腺癌的体内生长具有一定的抑制作用,对肿瘤细胞周期有明显影响,可能通过抑制有丝分裂增殖并导致其凋亡而达到抑瘤作用<sup>[3]</sup>。该方与吉西他滨联合对 SW1990 具有协同抑瘤作用,机理可能与下调肿瘤多药耐药 (MDR) 基因等有关<sup>[4]</sup>。

本实验结果显示:与吉西他滨组比较,合用组高、中、低剂量组的瘤重均有下降,抑瘤率提高。合用中剂量组细胞凋亡率较化疗组明显升高, Bcl-2 蛋白表达下降,提示该方可能通过抑制 Bcl-2 的表达,有效诱导 SW1990 胰腺癌细胞凋亡,从而加强吉西他滨的抗肿瘤效果。但我们也发现,不同剂量联合治疗组间的瘤重无显著性差异,且化疗联合清胰化积高、低剂量组的凋亡率相对于化疗组并无改善,反而有下降, Bcl-2 蛋白表达程度也无明显变化。而在中剂量,即临床等效剂量时,达到最好效果,剂量过高或过低对 Bcl-2 的表达并无明显影响,原因还有待继续研究。

### [参考文献]

[1] Burris HA 3rd, Moore MJ, Andersen J, *et al.* Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial[J]. *J Clin Oncol*, 1997, 15 (6):2403.

[2] 沈晔华,刘鲁明. 清胰消积方对实验性胰腺癌体内生长和细胞周期的影响[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2006, 12(2):97.

[3] 傅洁,刘鲁明,沈瑾,等. 清胰化积方联合健择对 SW1990 抑瘤及逆转 MDR 作用观察[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2007, 13(4):289.

[4] Braakhuis BJ, van Dongen GA, Vermorken JB, *et al.* Preclinical in vivo activity of 2', 2'-difluoro deoxycytidine (Gemcitabine) against human head and neck cancer[J]. *Cancer Res*, 1991, 51(1):211.