

· 药理 ·

## 养正散结汤对人胃癌 MKN-45 细胞增殖、 凋亡及 ERK 通路的影响

肖真真, 邓海霞, 陈更新\*, 邱超芬, 周奥强  
(广州中医药大学第二附属医院, 广州 510120)

**[摘要]** **目的:**探讨养正散结汤对人胃癌 MKN-45 细胞增殖、凋亡及细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)通路的影响。**方法:**将养正散结汤组(0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 g·L<sup>-1</sup>)作用于胃癌 MKN-45 细胞,设置空白组,分别孵育 24, 48, 72 h 后采用细胞增殖活性检测方法(CCK-8)检测细胞增殖情况;用养正散结汤组(0.4, 0.8 g·L<sup>-1</sup>)处理细胞,运用平板克隆形成实验观察细胞的克隆形成能力;用 4, 8 g·L<sup>-1</sup>养正散结汤干预细胞,利用流式细胞仪检测细胞的凋亡情况;用 2, 4, 8 g·L<sup>-1</sup>养正散结汤处理细胞,采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 ERK 表达及其磷酸化水平。**结果:**与空白组比较,养正散结汤组能明显抑制 MKN-45 细胞的增殖,处理 24, 48 h 后,养正散结汤从 2 g·L<sup>-1</sup>开始,处理 72 h 后,从 1.5 g·L<sup>-1</sup>开始,细胞存活率逐渐降低,呈明显浓度依赖性( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。经不同质量浓度的养正散结汤干预 48 h 后,养正散结汤组细胞克隆形成率显著低于空白组( $P < 0.01$ ),呈一定的量效关系,0.8 g·L<sup>-1</sup>养正散结汤干预后, MKN-45 细胞集落基本无法形成;养正散结汤组细胞凋亡率明显高于空白组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );干预 12 h 后,与空白组比较,养正散结汤从 4 g·L<sup>-1</sup>开始下调 MKN-45 细胞中 ERK 蛋白的磷酸化水平( $P < 0.01$ )。**结论:**养正散结汤能抑制人胃癌细胞 MKN-45 的增殖,促进其凋亡,其作用机制可能与抑制 ERK 的磷酸化有关。

**[关键词]** 养正散结汤; MKN-45 细胞; 增殖; 凋亡; 细胞外信号调节激酶通路(ERK)

**[中图分类号]** R22; R242; R2-031; R273; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)03-0039-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20190327

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181115.0949.017.html>

**[网络出版时间]** 2018-11-16 15:11

### Effect of Yangzheng Sanjie Decoction on Proliferation, Apoptosis and ERK Pathway of Human Gastric Cancer MKN-45 Cells

XIAO Zhen-zhen, DENG Hai-xia, CHEN Geng-xin\*, QIU Chao-fen, ZHOU Ao-qiang  
(The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Yangzheng Sanjie decoction on proliferation, apoptosis and extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway of human gastric cancer MKN-45 cells. **Method:** Gastric cancer cell line MKN-45 was treated for 24, 48, 72 h with Yangzheng Sanjie decoction (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 g·L<sup>-1</sup>); cell proliferation was measured by cell counting kit-8 (CCK-8); cell colony forming ability was observed by the plate cloning experiment after intervention with Yangzheng Sanjie decoction (0.4, 0.8 g·L<sup>-1</sup>); MKN-45 cells was treated with 4, 8 g·L<sup>-1</sup>, and then cell apoptosis was detected by flow cytometry; the expression of ERK and its phosphorylation level were detected by Western blot assay after treatment with 2, 4, 8 g·L<sup>-1</sup>.

**[收稿日期]** 20180829(002)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81273735);广东省高水平大学建设项目(A1-AFD018171Z11081);广东省中医院中医药科学技术研究专项(YN2016ML06, YN2014ZH05);广东省科技计划项目(2013B021800169)

**[第一作者]** 肖真真, 硕士, 从事中医药治疗消化系统疾病的基础研究, Tel:020-81887233, E-mail:768197690@qq.com

**[通信作者]** \*陈更新, 博士, 主任医师, 从事中医药防治消化系统疾病的研究, Tel:020-81887233, E-mail:gxchen@gzucm.edu.cn

**Result:** Compared with the blank group, Yangzheng Sanjie decoction could significantly inhibit the proliferation of MKN-45 cells. After treatment for 24, 48 h, Yangzheng Sanjie decoction started from  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , and after treatment for 72 h, it started from  $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , the cell viability gradually decreased in a concentration-dependent manner ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). After 48 hours of intervention with different concentrations of Yangzheng Sanjie decoction, the cell clone formation rate of Yangzheng Sanjie decoction was significantly lower than that of the blank group with a dose-response relationship ( $P < 0.01$ ). After the intervention with Yangzheng Sanjie decoction at a concentration of  $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , cell colonies could not be formed; the apoptosis rate of Yangzheng Sanjie decoction was significantly higher than that of the blank group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); after 12 h of intervention, compared with the blank group, Yangzheng Sanjie decoction started from  $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , and the phosphorylation level of ERK protein in MKN-45 cells was down-regulated ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Yangzheng Sanjie decoction can inhibit the proliferation of human gastric cancer cell line MKN-45 and promote its apoptosis. The mechanism may be related to the inhibition of phosphorylation of ERK.

[ **Key words** ] Yangzheng Sanjie decoction; MKN-45 cells; proliferation; apoptosis; extracellular signal-regulated kinase pathway (ERK)

胃癌是我国最常见的上消化道恶性肿瘤之一, 据统计显示, 2014 年, 中国胃癌发病例数约为 41 万, 死亡例数约为 29.4 万, 在恶性肿瘤死亡率位居第 3 位<sup>[1]</sup>。因胃癌早期无特异性症状及体征, 且易出现局部浸润或远处转移, 故往往确诊时病情已进展至中晚期, 严重威胁患者的生命健康。随着现代技术的发展, 胃癌治疗手段不断改善, 但术后复发、化疗耐药、放疗抵抗等仍是难以解决的问题。近年来, 中医药治疗胃癌的临床疗效备受关注, 对于其机制的研究也不断深入。细胞外信号调节激酶 (ERK) 是丝裂原活化的蛋白激酶 (MAPK) 信号传导通路中的一员, 其异常激活与肿瘤的发生发展关系密切。研究表明, 在胃癌组织中, ERK 蛋白及其磷酸化 (p-ERK) 的阳性表达率均明显高于癌旁正常组织, ERK 过度激活及表达在胃癌的发生发展中起着重要作用<sup>[2-3]</sup>。因此, 抑制 ERK 的异常活化成为中医药调控胃癌细胞增殖与凋亡的途径之一。养正散结汤是广东省中医院陈更新教授总结 20 多年临床经验的协定方, 经多年临床验证, 疗效确切<sup>[4]</sup>。前期基础研究表明, 养正散结汤不仅能抑制胃癌前病变细胞的增殖, 促进其凋亡, 还对人胃癌裸鼠移植瘤有抑制作用, 并能通过上调抑癌性 miR-7 的表达负性调控胃黏膜中表皮生长因子受体 (EGFR) 来发挥对胃癌细胞增殖的抑制作用<sup>[5-8]</sup>。但养正散结汤对于信号通路传导的研究未见文献报道。在 MAPK/ERK 信号通路中, ERK 的活化是将信号转导至细胞核的关键, 故本研究采用养正散结汤浸膏粉干预人胃癌细胞 MKN-45, 观察细胞的增殖、克隆形成能力及凋亡的情况, 并进一步检测 ERK 蛋白的表

达及其磷酸化, 探讨养正散结汤可能的信号传导通路。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 人胃癌细胞株 MKN-45 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

**1.2 试剂** RPMI 1640 培养基, 胎牛血清, 胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司, 批号分别为 8118159, 42F5471K, 1956297); SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒, 结晶紫染色液, 细胞增殖活性检测 (CCK-8) 试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号 C0038, P0012A, C0121); Annexin V-FITC/碘化丙啶 (PI) 细胞凋亡双染试剂盒 (美国 BD Biosciences 公司, 批号 5043815); 磷酸化-ERK (p-ERK), ERK, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 单克隆抗体 (美国 CST 公司, 批号分别为 4370, 4695, 2118); HRP 标记的羊抗兔免疫球蛋白 (Ig)G (武汉博士德生物工程有限公司, 批号 BA1054); ECL 发光液 (美国 Millipore 公司, 批号 1606902)。

**1.3 仪器** R 系列旋转蒸发仪 (上海申花科技有限公司); 311 型 CO<sub>2</sub> 培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); IC1000 型 Countstar 自动细胞计数仪 (美国 Inno-Alliance Biotech 公司); VICTOR X5 型酶标仪 (美国 Perkinelmer 公司); FC 500 型流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司); Mini-protean Tetra System 小型垂直电泳槽, Mini Trans-Blot 型小型转印槽, ChemiDoc Touch 型高灵敏度化学发光成像仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 养正散结汤的制备** 由生黄芪 30 g, 佛手

15 g, 制天南星 10 g, 莪术 15 g, 半枝莲 15 g, 白花蛇舌草 30 g 组成, 中药饮片均购自广东省中医院中药房, 经湖南中医药研究院中药研究所李若存研究员鉴定, 均符合 2015 年版《中国药典》标准<sup>[8]</sup>。制备方法<sup>[6]</sup>, 称取养正散结汤饮片 115 g, 加入 10 倍量双蒸水浸泡 30 min, 武火煮至沸腾后转文火煎煮 30 min, 收集过滤液; 加入 8 倍量双蒸水, 按之前煎煮方法再煎煮 1 次; 将 2 次收集的过滤药液混合, 置入旋转蒸发仪中浓缩, -80 ℃ 冰箱内过夜冷冻成冰, 放入冷冻干燥机干燥, 收集中药浸膏粉 18.11 g (每 1 g 浸膏粉含生药量 6.35 g)。

体外实验药液配制, 称取中药浸膏粉 0.4 g 加入无血清 RPMI 1640 培养基 20 mL 中, 配制质量浓度为 20 g·L<sup>-1</sup> 的药液, 震荡至完全溶解, 0.22 μm 针头滤器过滤, 4 ℃ 保存备用。

**2.2 细胞培养** 人胃癌细胞株 MKN-45 细胞接种于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 的完全培养基中, 置于 37 ℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。待细胞贴壁达到 80%~90% 时使用胰酶消化, 1:3 传代至新的培养基中继续培养。取对数生长期细胞进行实验。

**2.3 CCK-8 法检测细胞增殖** 对数生长期的 MKN-45 细胞, 胰酶消化制备细胞悬液, 计数后调整细胞密度 (5 × 10<sup>4</sup> 个/mL), 以每孔 100 μL 接种于 96 孔板中, 37 ℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h。待细胞贴壁后吸取原培养基, 分别加入含养正散结汤 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 g·L<sup>-1</sup> 的 10% FBS 培养基 100 μL, 每组 6 个复孔, 继续培养 24, 48, 72 h。培养结束后更换新鲜的 10% FBS 培养基, 避光加入的 CCK-8 溶液 10 μL, 于 37 ℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 1 h, 用酶标仪在 450 nm 波长下检测吸光度 A, 细胞存活率 =  $A_{\text{中药组}}/A_{\text{空白组}} \times 100\%$ 。独立重复实验 3 次。

**2.4 平板克隆形成实验检测细胞克隆** 根据 CCK-8 实验的细胞增殖统计结果分析, 以养正散结汤 2 g·L<sup>-1</sup> 作为低质量浓度组, 4, 8 g·L<sup>-1</sup> 作为养正散结汤中、高质量浓度组。制备 MKN-45 细胞悬液, 计数后以每孔 500 个细胞接种于 6 孔板中。根据预实验, 设置空白组, 将养正散结汤中、高质量浓度组稀释 10 倍, 用 0.4, 0.8 g·L<sup>-1</sup> 养正散结汤质量浓度干预细胞, 待细胞贴壁后, 空白组加入含 10% FBS 培养基, 中药组加入对应质量浓度的药液。常规培养 48 h 后弃去原培养基, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗, 加入 10% FBS 培养基, 置于 37 ℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 10 d。结束培养后弃去上清液, PBS

清洗 3 次, 使用 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min, PBS 冲洗后加入结晶紫色液染色 15 min, 以流水缓慢洗去染色液, 待干燥后进行细胞克隆计数, 计算克隆形成率。独立重复实验 3 次。克隆形成率 = 克隆数/接种细胞数 × 100%。

**2.5 流式细胞术检测细胞凋亡** 选取养正散结汤中、高质量浓度组, 用含 10% FBS 培养基稀释养正散结汤为 4, 8 g·L<sup>-1</sup>, 设置含 10% FBS 培养基为空白组。取对数生长期的 MKN-45 细胞 (8 × 10<sup>5</sup> 个/孔) 接种于 6 孔板中, 待细胞培养 24 h 后弃上清, PBS 清洗, 分别加入对应的溶剂, 置于 37 ℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 h。收集细胞于相应流式管中, 1 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 用预冷 PBS 洗涤 3 次, 加入 binding buffer 300 μL 和 Annexin V-FITC 5 μL 混匀, 避光孵育 15 min 后, 加入 binding buffer 200 μL, 上机前 5 min 加入 PI 5 μL 染色, 上流式细胞仪检测。独立重复实验 3 次。

**2.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 测定细胞中 ERK 蛋白表达及其磷酸化水平** 制备 MKN-45 细胞悬液, 计数调整细胞密度, 以 6 × 10<sup>5</sup> 个/孔接种于 6 孔板中。待细胞贴壁后, PBS 清洗, 用含 10% FBS 培养基配制养正散结汤低、中、高质量浓度组 (2, 4, 8 g·L<sup>-1</sup>) 处理细胞, 置于 37 ℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 12 h。收集细胞, PBS 清洗 3 次后加入裂解液裂解细胞, 涡旋震荡, 4 ℃, 13 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min, 提取总蛋白上清液, 采用 BCA 法测定蛋白浓度, 蛋白变性, 置于 -80 ℃ 冰箱保存。配胶进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜, 5% BSA 配制封闭液, 室温摇床封闭 1 h, 吸取封闭液, 分别加入抗兔 GAPDH, ERK 单克隆抗体 (1:1 000) 和抗兔 p-ERK 单克隆抗体 (1:2 000), 置于摇床上室温孵育 30 min 后, 4 ℃ 孵育过夜, TBST 液洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入对应的二抗 (1:5 000) 室温摇床孵育 1 h, TBST 液洗膜 3 次, 每次 10 min, 洗膜后使用 ECL 发光液进行曝光, 利用 Image Lab 软件分析各条带的灰度值, 计算目的蛋白与内参蛋白的灰度比值。独立重复实验 3 次。

**2.7 统计学分析** 计量数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 23.0 统计软件进行统计学分析, 采用单因素方差分析对计量资料组间进行比较, 以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 养正散结汤对 MKN-45 细胞增殖的影响** 与空白组比较, 经养正散结汤处理 24, 48 h 后, 从 2 g·L<sup>-1</sup> 开始, 随着给药质量浓度的增加, 细胞存活

率逐渐降低 ( $P < 0.01$ ); 给药 72 h 后, 从  $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  开始, 随着给药质量浓度的增加, 细胞存活率明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 1。

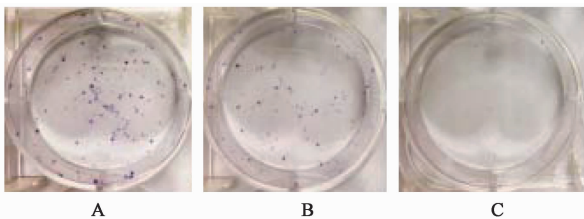
表 1 养正散结汤对 MKN-45 细胞增殖存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 1 Effect of Yangzheng Sanjie decoction on proliferation rate of MKN-45 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ ) %

组别	质量浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h	48 h	72 h
空白	-	100	100	100
养正散结汤	0.5	99.86 ± 0.96	107.97 ± 0.79	105.18 ± 4.15
	1	98.90 ± 1.01	106.63 ± 3.37	103.88 ± 0.55
	1.5	95.49 ± 1.64	98.11 ± 0.75	86.19 ± 1.49 <sup>1)</sup>
	2	82.07 ± 2.95 <sup>2)</sup>	75.93 ± 3.29 <sup>2)</sup>	68.12 ± 3.25 <sup>2)</sup>
	2.5	65.28 ± 3.68 <sup>2)</sup>	56.74 ± 3.00 <sup>2)</sup>	43.09 ± 6.23 <sup>2)</sup>
	3	35.95 ± 2.54 <sup>2)</sup>	34.06 ± 2.01 <sup>2)</sup>	19.59 ± 1.51 <sup>2)</sup>
	3.5	23.97 ± 1.90 <sup>2)</sup>	19.52 ± 2.98 <sup>2)</sup>	13.17 ± 2.54 <sup>2)</sup>

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

### 3.2 养正散结汤对 MKN-45 细胞克隆形成的影响

与空白组比较, 将不同质量浓度的养正散结汤作用于 MKN-45 细胞 48 h 后, 细胞克隆形成率显著降低 ( $P < 0.01$ ), 且随着给药浓度的增加, 细胞形成的克隆数目逐渐减少。见图 1, 表 2。表明养正散结汤明显抑制 MKN-45 细胞的克隆形成能力, 并呈明显的浓度依赖性。



A. 空白组; B, C. 养正散结汤组 (0.4, 0.8  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )

图 1 养正散结汤对 MKN-45 细胞克隆形成的影响

Fig. 1 Effect of Yangzheng Sanjie decoction on formation of MKN-45 cell clone

表 2 养正散结汤对 MKN-45 细胞克隆形成率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 2 Effect of Yangzheng Sanjie decoction on formation rate of MKN-45 cell clones ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	克隆形成率 / %
空白	-	41.47 ± 1.06
养正散结汤	0.4	21.53 ± 3.24 <sup>1)</sup>
	0.8	10.93 ± 0.96 <sup>1,2)</sup>

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与养正散结汤 0.4  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

3.3 养正散结汤对 MKN-45 细胞凋亡的影响 与空白组比较, 养正散结汤给药 48 h 后, 细胞的凋亡率升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。随着给药浓度增加, 养正散结汤诱导细胞凋亡的作用增强 ( $P < 0.01$ )。见表 3。

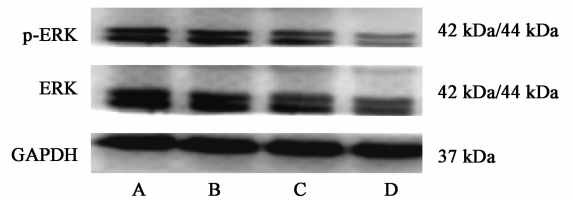
表 3 养正散结汤对 MKN-45 细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 3 Effect of Yangzheng Sanjie decoction on apoptosis of MKN-45 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	凋亡率 / %
空白	-	2.53 ± 0.31
养正散结汤	4	6.63 ± 0.31 <sup>1)</sup>
	8	25.33 ± 1.60 <sup>2,3)</sup>

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与养正散结汤 4  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  比较<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ 。

### 3.4 养正散结汤对 MKN-45 细胞中 ERK 蛋白表达水平及其磷酸化的影响

与空白组比较, 养正散结汤从 4  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  开始, 下调 ERK 蛋白表达及磷酸化水平 ( $P < 0.01$ ), 且随着质量浓度的增加, ERK 蛋白表达及磷酸化水平逐渐降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。表明养正散结汤能明显下调 ERK 蛋白表达及其磷酸化。见图 2, 表 4。



A. 空白组; B ~ D. 养正散结汤组 (2, 4, 8  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )

图 2 养正散结汤作用后 ERK 蛋白表达及磷酸化蛋白电泳

Fig. 2 Electrophoresis of Yangzheng Sanjie decoction on ERK protein expression and phosphorylation

表 4 养正散结汤对 ERK 蛋白表达及磷酸化的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 4 Effect of Yangzheng Sanjie decoction on ERK protein expression and phosphorylation ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	p-ERK/GAPDH	ERK/GAPDH
空白	-	1.00	1.00
养正散结汤	2	0.89 ± 0.05	0.90 ± 0.04
	4	0.66 ± 0.10 <sup>1,2)</sup>	0.68 ± 0.10 <sup>1,2)</sup>
	8	0.49 ± 0.05 <sup>1,3)</sup>	0.53 ± 0.05 <sup>1,3)</sup>

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与养正散结汤 2  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.01$ 。

## 4 讨论

目前胃癌治疗手段多采用手术切除及术后放化疗, 虽然分子靶向药物的出现带来了新的前景,

但总体疗效不尽如人意。迄今为止,中医药治疗胃癌有着独特的优势。曹超等<sup>[9]</sup>采用扶正抑瘤方联合化疗及手术治疗进展期胃癌,疗效确切,可明显减轻化疗所带来的不良反应,缓解术后患者的应激水平,提高患者的免疫防御功能。欧阳兆云等<sup>[10]</sup>总结 20 年来中医药治疗胃癌的相关文献,也证实了中医中药无论是在干预胃癌癌前病变,既病防变,还是在提高中晚期胃癌生存质量,与化疗结合,增强疗效,降低毒副作用,延长生存期等方面,均疗效显著。

在中医学上,胃癌大致归属“积聚”“胃脘痛”等范畴,多由于正气内虚,感受邪毒,情志怫郁,饮食损伤等因素,致使体内阴阳气血失调,脏腑功能失常,出现食滞、气郁、痰凝、血瘀等一系列病理变化,蕴结于脏腑组织,相互搏结,日久积渐而成。陈更新教授认为胃癌病机关键在于脾气亏虚为本,气滞、痰凝、血瘀为标,总属本虚标实、虚实夹杂之证,治疗上以补脾益气为基础,据多年临床实践总结,方用黄芪以益气扶正,辅以佛手、制天南星理气化痰,莪术破血祛瘀、行气止痛,半枝莲、白花蛇舌草清热解毒、消痈散结,共成养正散结汤,以奏抗癌之功效。前期裸鼠皮下移植瘤及体外实验研究表明了养正散结汤能显著抑制胃癌移植瘤,其含药血清对胃癌及癌前病变细胞的生长起抑制作用<sup>[5-8]</sup>。本研究应用养正散结汤浸膏粉干预 MKN-45 细胞,采用 CCK-8 及平板克隆实验观察该方对细胞增殖及克隆能力的影响,结果显示,相较于空白组,随着给药浓度的增加,养正散结汤组 MKN-45 细胞增殖抑制作用逐渐增强,克隆形成率逐渐降低,呈浓度依赖性,表明养正散结汤可明显抑制 MKN-45 细胞增殖和克隆形成能力。从流式细胞术检测结果可知,经养正散结汤干预后,中药组凋亡率逐渐升高,明显高于空白组,提示养正散结汤可诱导 MKN-45 细胞发生凋亡。

近年来,随着分子生物学的不断发展,中医药调节肿瘤细胞信号传导通路受到广泛研究。受体酪氨酸激酶(RTKs)是信号传导通路的最初调节器,EGFR 作为大家族成员之一,以单体形式存在于细胞膜,与相应配体结合后,形成二聚体,在胞质区内磷酸化酪氨酸激酶,从而启动下游的 Ras/Raf/MAPK 等信号传导通路<sup>[11-12]</sup>。MAPK 则是将信号从细胞表面传导到细胞核内部的重要传递者,其信号通路有 4 条,ERK, BMK-1, JNK 和 p38 MAPK,其中经典 MAPK/ERK 信号通路研究最为广泛<sup>[13-14]</sup>。EGFR 自磷酸化后刺激下游的 Ras 蛋白,活化的 Ras 蛋白逐级刺激 Raf, MEK, ERK, 发生磷酸化级联反

应,将细胞外信号传递细胞核内,调节特异性相关蛋白的表达,在信号通路传导过程中,某一环节的异常都可能会引起细胞生长失控、凋亡失衡,从而影响肿瘤细胞的增殖、分化、凋亡等多种生物学行为<sup>[12,15]</sup>。多项研究表明,EGFR 蛋白的高表达及 ERK 蛋白的异常激活在胃癌的发生发展中起着重要的作用<sup>[16-17]</sup>。前期基础研究验证,养正散结汤能下调 MKN-45 细胞中的 EGFR 蛋白表达<sup>[8]</sup>,故本研究以 EGFR 下游的 ERK 信号通路为切入点,选择关键蛋白 ERK,探索养正散结汤能否抑制 ERK 蛋白的磷酸化。采用 Western blot 检测 ERK 蛋白的表达及其磷酸化水平,结果提示,经养正散结汤处理后,MKN-45 细胞的 ERK 蛋白的磷酸化水平明显下调,且下调趋势随着给药浓度的增加而逐渐明显,表明养正散结汤可能通过抑制 ERK 信号通路来抑制细胞增殖,诱导其凋亡,发挥抗肿瘤作用。

综上所述,养正散结汤能明显抑制 MKN-45 细胞的增殖和克隆形成能力,促进其凋亡,抑制 ERK 信号通路,这可能是养正散结汤发挥其抗肿瘤作用的机制之一。

#### [参考文献]

- [1] CHEN W Q, SUN K X, ZHENG R S, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2014 [J]. Chin J Cancer Res, 2018, 30(1): 1-12.
- [2] 赵杰,陈振栋. ERK 和 JNK 在胃癌中的表达[J]. 黑龙江医药科学,2018,41(1):35-38.
- [3] 王秋红,杜桂清,邓桂霞,等. SASH1 和 p-ERK 在胃癌中的表达及意义[J]. 诊断病理学杂志,2017,24(6):440-444.
- [4] 陈更新,牟涛,李合国. 养正散结汤治疗慢性萎缩性胃炎癌前病变 55 例临床观察[J]. 吉林中医药,2007,27(12):17-18.
- [5] DENG H X, YU Y Y, ZHOU A Q, et al. Yangzheng Sanjie decoction regulates proliferation and apoptosis of gastric cancer cells by enhancing let-7a expression [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(30): 5538-5548.
- [6] 邓海霞,杨乃坤,陈万群,等. 养正散结汤对人胃癌癌前病变细胞增殖、凋亡及抑癌性 miRNA 表达的影响[J]. 中药新药与临床药理,2017,28(4):478-481.
- [7] 邓海霞,陈更新,周奥强,等. 养正散结汤对裸鼠胃癌移植瘤生长及 let-7a/c-Myc 表达的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志,2017,25(10):738-741,746.
- [8] 余娅娅,周奥强,肖真真,等. 养正散结汤调控 miR-7/EGFR 表达抑制胃癌细胞增殖[J]. 中药新药与临床药理,2018,29(2):131-135.

- [ 9 ] 曹超,黄秋林. 扶正抑瘤方联合新辅助化疗、腹腔镜辅助胃癌根治术治疗进展期胃癌痰瘀毒结证患者的疗效观察[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(8): 176-182.
- [10] 欧阳兆云,王鹏飞,史作田,等. 中医中药治疗胃癌的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘,2017,17(83):80.
- [11] 李姜,徐力,李焜. 中医药调节肿瘤细胞信号传导的研究进展[J]. 江苏中医药,2016,48(4):81-85.
- [12] Wee P, WANG Z X. Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways [J]. Cancers, 2017, 9(5): 52.
- [13] Giacomo C, Laura G, Giuliana C, et al. Modulation of sensitivity to antitumor agents by targeting the MAPK survival pathway[J]. Curr Pharm Des, 2013, 19(5): 883-894.
- [14] Burotto M, Chiou V L, Lee J M, et al. The MAPK pathway across different malignancies;a new perspective [J]. Cancer, 2014, 120(22): 3446-3456.
- [15] Hubbard S R, Miller W T. Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling [J]. Curr Opin Cell Biol, 2007, 19(2): 117-123.
- [16] GAO M, LIANG X J, ZHANG Z S, et al. Relationship between expression of EGFR in gastric cancer tissue and clinicopathological features [J]. Asian Pacific J Tropical Med, 2013, 6(4): 260-264.
- [17] WANG Y Z, XIAO H J, WU H T, et al. G protein subunit  $\alpha$  q regulates gastric cancer growth via the p53/p21 and MEK/ERK pathways [J]. Oncol Rep, 2017, 37(4): 1998-2006.
- [责任编辑 张丰丰]