

# 加味四君子汤含药血清对胃癌细胞 SGC-7901 凋亡相关因子表达的影响

聂闪闪, 李洵, 赵玉航, 王东生\*  
(中南大学湘雅医院, 长沙 410008)

**[摘要]** **目的:**研究加味四君子汤含药血清对胃癌细胞 SGC-7901 凋亡相关因子表达的影响,进一步探讨其具体抗肿瘤作用机制。**方法:**40 只 SD 大鼠随机分为加味四君子汤低、中、高剂量组(0.213, 0.426, 0.853 g·kg<sup>-1</sup>),空白组,每组 10 只,空白组给予等体积的生理盐水灌胃,各组连续灌胃 10 d,末次给药 1.5 h 后,水合氯醛腹腔麻醉,心脏采血,分离血清,56 °C 灭菌,0.22 μm 过滤,制备加味四君子汤高、中、低剂量组含药血清,各剂量组含药血清孵育胃癌细胞 SGC-7901,运用流式细胞仪检测细胞早期和晚期凋亡情况,运用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)技术检测肿瘤抑制基因 p53, c-核蛋白类基因(c-Myc),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3),凋亡相关基因 B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2) mRNA 的表达,运用细胞免疫荧光技术检测 p53, c-Myc, Caspase-3, Bcl-2 蛋白的相对表达量情况。**结果:**与空白组比较,加味四君子汤含药血清高剂量组细胞凋亡比率显著升高( $P < 0.01$ ),且可使胃癌细胞 SGC-7901 早期+晚期凋亡率达到 22.58% ( $P < 0.01$ )。Real-time PCR 结果显示加味四君子汤中剂量组能显著促进 Caspase-3 mRNA 表达( $P < 0.01$ ),加味四君子汤高剂量组能显著上调 p53 及 c-Myc mRNA 表达量( $P < 0.01$ ),加味四君子汤高剂量组显著抑制 Bcl-2 mRNA 表达( $P < 0.01$ )。免疫荧光结果显示加味四君子汤高剂量组能使 c-Myc, Caspase-3, p53 蛋白表达水平显著升高( $P < 0.01$ ),而 Bcl-2 蛋白表达水平显著降低( $P < 0.05$ )。**结论:**加味四君子汤含药血清能抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,促进凋亡相关分子 p53, c-Myc, Caspase-3 的表达,发挥抗肿瘤作用。

**[关键词]** 加味四君子汤含药血清; 胃癌细胞 SGC-7901; 细胞凋亡; 肿瘤抑制基因 p53; c-核蛋白类基因(c-Myc); 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3); 凋亡相关基因 B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)

**[中图分类号]** R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)09-0025-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20190824

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190102.1111.009.html>

**[网络出版时间]** 2019-01-04 11:11

## Effect of Modified Si Junzitang Drug Serum on Expression of Apoptosis-related Molecules of Gastric Cancer Cell SGC-7901

NIE Shan-shan, LI Xun, ZHAO Yu-hang, WANG Dong-sheng\*  
(Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of modified Si Junzitang (MSJZT) drug serum on the expression of apoptosis-related molecules of gastric cancer cell SGC-7901 and further its anti-tumor mechanism. **Method:** A total of 40 SD rats were randomly divided into four groups: low-dose, middle-dose, high-dose MSJZT (0.213, 0.426, 0.853 g·kg<sup>-1</sup>) groups and normal group ( $n = 10$ ). The treatment groups were administrated through gastric perfusion, and the normal group was given the equivalent volume of normal saline for 10 days. 1.5 h after the last treatment, chloral hydrate peritoneal anesthesia was performed, blood was collected from heart, and different doses of serum were separated to prepare drug-containing serum of low-dose, middle-dose, high-dose

**[收稿日期]** 20180823(022)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81373554);湖南省科技计划项目(2016SK2018)

**[第一作者]** 聂闪闪, 硕士, 医师, 从事中西医结合防治胃癌的基础与临床研究, E-mail: NNS085@csu.edu.cn

**[通信作者]** \*王东生, 博士生导师, 主任医师, 从事中西医结合治疗肿瘤的临床与基础研究, E-mail: wdsh66@aliyun.com

MSJZT groups, in order to incubate SGC-7901 gastric cancer cell. Early and late apoptosis rates were detected with flow cytometry. Afterwards, the tumor suppressor gene p53, c-nucleoprotein gene (c-Myc), cysteine-aspartic acid protease-3 (Caspase-3), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) mRNA expressions were confirmed by fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). The protein expressions of p53, c-Myc, Caspase-3, Bcl-2 were detected by immunofluorescence. **Result:** Compared with the normal group, the high-dose MSJZT group could obviously increase the apoptosis rate to 22.58% ( $P < 0.01$ ). The results of Real-time PCR showed that the middle-dose MSJZT group significantly promoted the mRNA expression of Caspase-3 ( $P < 0.01$ ), the medium-dose group significantly increased the mRNA expressions of p53 and c-Myc ( $P < 0.01$ ), and the high-dose group significantly inhibited the mRNA expression of Bcl-2 ( $P < 0.01$ ). The immunofluorescence results showed that the high-dose MSJZT group could significantly increase the protein expressions of c-Myc, Caspase-3 and p53 ( $P < 0.01$ ), while the protein expression of Bcl-2 was significantly reduced ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** MSJZT drug serum could exert an anti-tumor effect by inhibiting the expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2, and promoting the expressions of pro-apoptotic-related molecules p53, c-Myc, Caspase-3.

[**Key words**] modified Si Junzitang (MSJZT) drug serum; gastric cancer SGC-7901; apoptosis; tumor suppressor gene p53 (p53); c-nucleoprotein gene (c-Myc); cysteine-aspartic acid protease-3 (Caspase-3); B-cell lymphoma-2 (Bcl-2)

胃癌是消化系统最常见的肿瘤之一,是继肺癌、乳腺癌、结直肠癌、前列腺癌之后的第 5 大恶性肿瘤。其发病率和死亡率主要集中在东亚,尤其是中国<sup>[1]</sup>。尽管近年来其治疗方法取得的一定的进展,但是由于早期胃癌的无症状性,明确诊断已处于进展期,其预后不容乐观<sup>[2]</sup>。胃癌主要治疗方法包含手术、放疗和化疗<sup>[3]</sup>,其目的主要是杀灭肿瘤细胞,但随之而来的副作用及并发症如疲劳、疼痛、腹泻、恶心、呕吐、脱发、骨髓抑制等严重影响了人们的生存质量<sup>[4-5]</sup>。因此,寻找新的治疗方法是至关重要的,中药以高效、低毒、多部位、多靶点的特性,已成为治疗恶性肿瘤研究的热点<sup>[6]</sup>。四君子汤源自《太平惠民和剂局方》,是由人参片、白术、茯苓、甘草片 4 味药构成,均有补脾益气、扶正固本的疗效<sup>[7]</sup>。中医认为胃癌的病机在于以正气虚损,故治疗当以扶正为先,后世多以四君子汤为主方,在此基础上根据患者不同的临床表现进行增减<sup>[7-8]</sup>。现代药理学研究表明四君子汤具有明显的抗肿瘤效果<sup>[9-11]</sup>,本方基于课题组王东生教授常年临床经验,在四君子汤基础上加入了抗肿瘤中药白花蛇舌草、黄连片,但其具体作用机制尚不明确。故本研究采用血清药理学方法,探讨加味四君子汤含药血清对胃癌细胞 SGC-7901 凋亡相关分子表达的影响,为临床防治胃癌开辟新途径。

## 1 材料

**1.1 动物及细胞** SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只,体质量 200 ~ 220 g,购自湖南斯莱克景达实验动物公司,

合格证号 SYXK(湘)2015-0017。SGC-7901 人胃癌细胞株,由中南大学湘雅医院卫生部肿瘤蛋白质组学重点实验室馈赠。动物实验获得了中南大学实验动物伦理委员会批准,批号 201707224136。

**1.2 药物及试剂** 加味四君子汤草药购自于中南大学湘雅医院中药房,经中南大学湘雅医院中药筛选工程技术中心主任王东生教授鉴定均为正品,人参片 15 g(黑龙江,批号 17061608),白术 15 g(浙江,批号 17052501),茯苓 15 g(云南,批号 17070109),甘草片 6 g(内蒙古,批号 170701),白花蛇舌草 30 g(广西,批号 17061609),黄连片 6 g(四川,批号 7032201);胎牛血清, RPMI 1640 培养基,青链霉素混合液,胰蛋白酶,磷酸盐缓冲液(PBS)(美国 Hyclone 公司,批号分别为 12676-452, 31800022, p2802, 25200-073, p1543); Annexin V-FITC/碘化丙啶(PI)凋亡试剂盒(杭州科联生物公司,批号 KA3085);B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2),肿瘤抑制基因 p53,半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3),c-核蛋白类基因(c-Myc)抗体(南京金斯瑞生物科技有限公司,批号分别为 GB12008,13076,11029,11009);辣根酶标记山羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G 二抗(南京金斯瑞生物科技有限公司,批号 GB21301);RNA 提取试剂盒(美国 Omega Bio-Tek 公司,批号 R6934-01);cDNA 逆转录试剂盒(上海赛默飞世尔科技有限公司,批号#K2188);荧光定量试剂盒(上海 Roche Applied Science 公司,批号 02243005620);牛血清白蛋白(BSA)试剂(上海

优宁维生物科技公司,批号 G5001);4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)荧光染料,抗荧光淬灭封片剂(南京金斯瑞生物科技有限公司,批号分别为 G1012, G1401)。

**1.3 仪器** JKCJ0631 型超净工作台(中国苏净安泰公司);HEPA CLASS100 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo 公司);D3024R 型台式高速冷冻型微量离心机(北京大龙医疗设备有限公司);D1008E 型掌上离心机(杭州佑宁仪器有限公司);Applied Biosystems 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);BDFACSCalibur 型流式细胞仪(上海普迪生物技术有限公司);XTL-2400 型体式显微镜(上海蔡康公司);ECLIPSE C1 型正置荧光显微镜,DS-U3 型成像系统(日本尼康公司);FBZ2001-up-p 型超微量分光光度计(上海羽通仪器仪表厂);GT1001 型组化笔(上海基因科技有限公司);Image-Pro Plus 6.0(美国 Media Cybernetics 公司)。

## 2 方法

**2.1 含药血清制备** SD 大鼠随机分为 4 组,以正常成人剂量按照《药理实验方法学》<sup>[12]</sup>中“人与动物按体表面积折算的等效剂量比值表”计算出大鼠等效剂量,2 倍剂量为高剂量组,正常剂量为中剂量组,1/2 剂量为低剂量组得到加味四君子汤高、中、低剂量(0.853,0.426,0.213 g·kg<sup>-1</sup>)组,空白组给予等体积的生理盐水,连续灌胃 10 d,每日 2 次,末次给药 1.5 h,水合氯醛腹腔麻醉,心脏采血,分离血清,于 56 °C 水浴锅灭菌 30 min,0.22 μm 过滤,-20 °C 保存备用。

**2.2 细胞凋亡率检测** 选取对数生长期的 SGC-7901 单细胞悬液,接种于 6 孔板内,每孔 5 × 10<sup>5</sup> 个细胞,每组设置 3 个复孔,常规培养 24 h 过夜,弃培养基,加入加味四君子汤低、中、高剂量含药血清,体积分数为 10%,继续培养 48 h,收集细胞,吸净 PBS,经 Annexin V-FITC 染色,流式细胞仪检测细胞早期及晚期凋亡情况。

**2.3 Real-time PCR 检测相关 mRNA 表达** 细胞分组及加药培养同 2.2 项,取培养 48 h 的 SGC-7901 细胞,加入蛋白裂解液,提取总 RNA,逆转录为 cDNA,以 cDNA 为模板,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)基因为内参,行定量 PCR 检测,常规条件进行,实验重复 3 次。反转录条件:65 °C 保温 5 min,42 °C 保温 60 min,70 °C 灭活 5 min;PCR 扩增条件:预变性 95 °C 10 min,95 °C 15 s,60 °C 60 s,40 个循环,以

2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>表示 mRNA 相对表达。引物由上海赛默飞世尔科技有限公司合成,见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
Bcl-2	上游 GGAGATTGTGGCCTTCTTTG	157
	下游 GCATCCCAGCCTCCGTTATC	
c-Myc	上游 TGCTGCCAAGAGGGTCAAGT	160
	下游 GCTCCGTTTTAGCTCGTTCC	
Caspase-3	上游 TGGAAGCGAATCAATGGACTCT	170
	下游 TGAATGTTCCCTGAGGTTTGC	
GAPDH	上游 ACTTTGGCGTATTGTCAGAAGGACT	266
	下游 GTTTTAGATGGCTCCAGGTCAGG	

**2.4 细胞免疫荧光检测蛋白表达** 细胞分组及加药培养同 2.2 项,取培养 48 h 的 SGC-7901 细胞,用组化笔在爬片细胞均匀分布处画圈,加入破膜液,室温放置 20 min,PBS 反复冲洗,加入 3% BSA 封闭,室温放置 30 min,去除 BSA,分别加入适量稀释的一抗,p53(1:500);Bcl-2(1:1000);Caspase-3(1:1000);c-Myc(1:1000)4 °C 过夜,脱色摇床洗涤爬片 3 次,加二抗室温下孵育 50 min,PBS 清洗二抗,加入 DAPI 染色液,室温下避光孵育 10 min,PBS 缓冲液反复清洗,用抗荧光淬灭封片剂封闭爬片,荧光显微镜采集图像,运用 Image-Pro Plus 6.0 将绿色/红色荧光单色照片转换为黑色图片,选取图片中黑色作为判断阳性的统一标准,分析每张图片得出积分吸光度 IA。

**2.5 统计学分析** 采用 SPSS 22.0 统计学软件分析处理数据,各组间比较采用单因素方差分析(满足正态性和方差齐性),各组凋亡率比较采用秩和检验,所有计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对胃癌细胞 SGC-7901 凋亡率的影响** 与空白组比较,加味四君子汤含药血清中、高剂量组细胞早期+晚期凋亡率明显升高( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ )。与加味四君子汤低剂量组比较,加味四君子汤高剂量组可更强地促进肿瘤细胞凋亡率,可达到 22.58% ( $P < 0.05$ )。见表 2。

**3.2 对 Bcl-2, p53, c-Myc, Caspase-3 mRNA 表达的影响** 与空白组比较,加味四君子汤中剂量组能显著促进 Caspase-3 mRNA 表达( $P < 0.01$ ),加味四君子汤高剂量组能显著促进 p53, c-Myc mRNA 表达

表 2 加味四君子汤含药血清对胃癌细胞 SGC-7901 凋亡率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Effect of MSJZT drug serum on cell apoptosis rate ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	凋亡率/%
空白	-	4.15 ± 0.27
加味四君子汤	0.213	15.78 ± 2.37
	0.426	18.93 ± 1.07 <sup>1)</sup>
	0.853	22.58 ± 1.17 <sup>2,3)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与加味四君子汤低剂量组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ 。

表 3 加味四君子汤含药血清对胃癌细胞 SGC-7901 Bcl-2, p53, c-Myc, Caspase-3 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of MSJZT drug serum on mRNA expressions of Bcl-2, p53, c-Myc, Caspase-3 in SGC-7901 cell ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Bcl-2	p53	c-Myc	Caspase-3
空白	-	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.10
加味四君子汤	0.213	3.09 ± 0.53 <sup>2)</sup>	0.49 ± 0.04 <sup>2)</sup>	0.20 <sup>2,6)</sup>	0.92 ± 0.18
	0.426	1.47 ± 0.23 <sup>4)</sup>	0.34 ± 0.03 <sup>2,4)</sup>	0.36 ± 0.01 <sup>2,4)</sup>	0.61 ± 0.06 <sup>2,4)</sup>
	0.853	10.39 ± 0.14 <sup>2,4,6)</sup>	0.71 ± 0.02 <sup>2,4,6)</sup>	0.62 ± 0.04 <sup>2,4,6)</sup>	0.75 ± 0.02 <sup>1)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与加味四君子汤低剂量组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ ;与加味四君子汤中剂量组比较<sup>5)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>6)</sup>  $P < 0.01$ (表 4 同)。

3.3 对 c-Myc, Caspase-3, p53, Bcl-2 蛋白表达的影响 与空白组比较,加味四君子汤高剂量组能使 c-Myc, Caspase-3, p53 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ ),而 Bcl-2 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ )。

( $P < 0.01$ ),并能显著抑制 Bcl-2 mRNA 表达 ( $P < 0.01$ )。与加味四君子汤低剂量组比较,加味四君子汤中、高剂量组对 p53, c-Myc, Caspase-3 mRNA 表达的促进效果更强 ( $P < 0.01$ )。与加味四君子汤中剂量组比较,加味四君子汤低、高剂量组对 Bcl-2 mRNA 表达抑制效果更强 ( $P < 0.01$ )。与加味四君子汤高剂量组比较,加味四君子汤中剂量组对 Caspase-3 mRNA 表达的促进效果更强,但差异无统计学意义。见表 3。

与加味四君子汤低剂量组比较,加味四君子汤高剂量组对 c-Myc, Caspase-3, p53 蛋白表达有更强烈的促进作用,对 Bcl-2 的表达有更强烈的抑制作用 ( $P < 0.05$ )。见表 4,图 1。

表 4 加味四君子汤含药血清对胃癌细胞 SGC-7901 Bcl-2, p53, c-Myc, Caspase-3 蛋白表达 IA 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of MSJZT drug serum on protein expressions IA of Bcl-2, p53, c-Myc, Caspase-3 in SGC-7901 cell ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

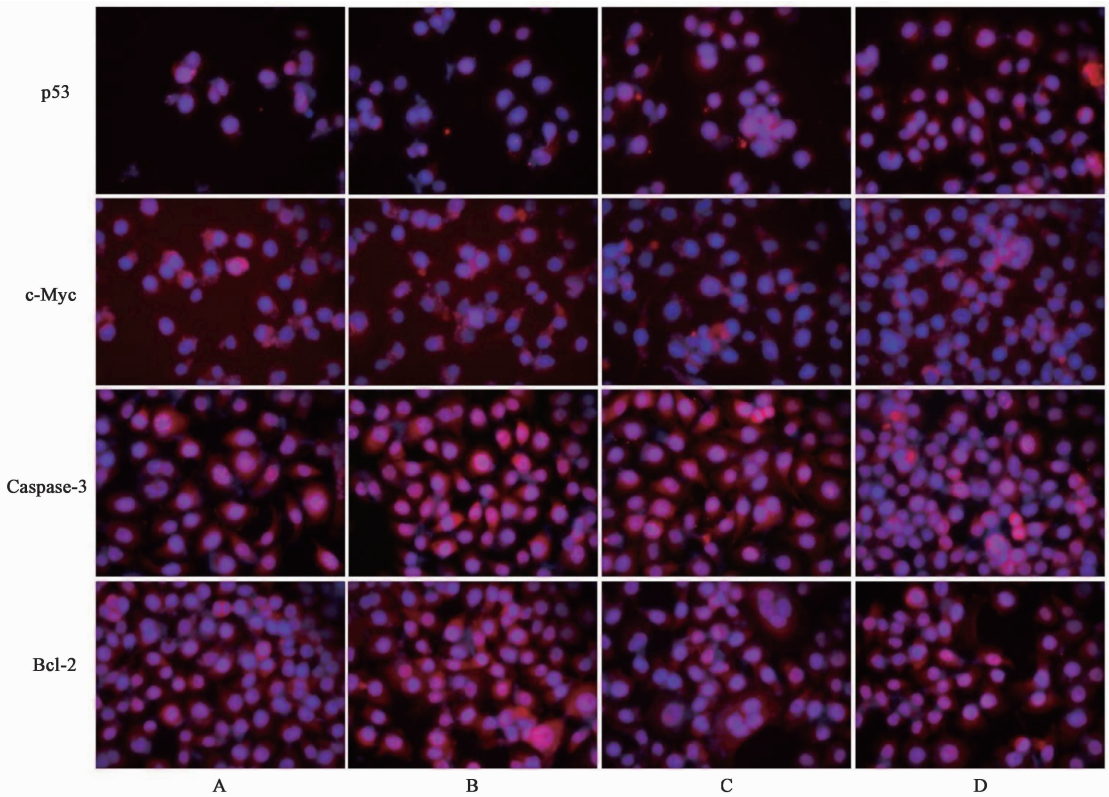
组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Bcl-2	p53	c-Myc	Caspase-3
空白	-	40 034.82 ± 3 150.34	9 023.09 ± 1 303.60	9 807.86 ± 2 092.83	26 617.94 ± 4 083.29
加味四君子汤	0.213	39 694.46 ± 6 410.40	13 118.61 ± 1 973.59	14 512.15 ± 6 483.34	28 835.20 ± 2 363.76
	0.426	35 713.16 ± 3 522.49	13 737.89 ± 3 854.44	27 066.39 ± 5 745.36 <sup>2,3)</sup>	37 240.19 ± 3 474.67 <sup>1)</sup>
	0.853	29 967.82 ± 1 369.26 <sup>1,3)</sup>	19 162.14 ± 3 600.08 <sup>2,3)</sup>	27 071.56 ± 5 738.26 <sup>2,3)</sup>	41 393.38 ± 7 263.54 <sup>2,3)</sup>

#### 4 讨论

胃癌隶属于中医“噎膈”“反胃”“积聚”的范畴,胃癌病机以正虚为本,邪实为标,脾虚是胃癌发生、发展的基本病机,因此在健脾益气的基础上佐以抗癌解毒的中药是治疗胃癌的首要方法。

四君子汤是一气血双补古方,具有益气补血、健脾养胃的作用<sup>[13]</sup>,方中以人参片为君,甘温益气,健脾养胃,白术为臣,健脾燥湿,加强益气助运之力,佐以甘淡茯苓,渗湿健脾,使以甘草片,益气和缓,调和诸药。全方主治脾胃虚弱证候,在此基础上条件加入白花蛇舌草、黄连片,共奏健脾益气,解毒抗癌

之效。加味四君子汤在四君子汤基础上加入了抗肿瘤中药白花蛇舌草和黄连片,现代药理学研究表明其有效成分齐墩果酸和小檗碱都具有明显的抗肿瘤疗效,齐墩果酸其具体的作用机制主要是通过下调 Bcl-2,上调 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax),Caspase 的表达水平诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[14]</sup>。小檗碱能通过抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖,诱导细胞凋亡,其机制可能与其上调抗增殖基因 BTG2 和下调细胞周期蛋白 Cyclin D<sub>1</sub> 的表达相关<sup>[15]</sup>。通过运用盐酸小檗碱干预高糖环境下的人肝癌细胞 HCCLM3,盐酸小檗碱可以提高自噬基因 Beclin1, Atg5 mRNA 表达水平,



A. 空白组; B ~ D. 加味四君子汤低、中、高剂量(0.213, 0.426, 0.853 g·kg<sup>-1</sup>)组

图 1 加味四君子汤含药血清对胃癌细胞 SGC-7901 Bcl-2, p53, c-Myc, Caspase-3 蛋白表达的影响(免疫荧光, ×400)

Fig. 1 Effect of MSJZT drug serum on protein expressions of Bcl-2, p53, c-Myc, Caspase-3 in SGC-7901 cell (IF, ×400)

上调 Bcl-2 mRNA 表达水平,双向发挥促凋亡和提高自噬的作用,发挥抗肿瘤作用<sup>[16]</sup>。四君子汤也能通过上调促凋亡蛋白 Bax 表达,下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,进一步抑制胃癌细胞 BGC-823 侧群细胞的增殖,使细胞生长周期停滞在 G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> 期,促进细胞凋亡<sup>[11]</sup>。

目前认为肿瘤细胞凋亡缺失是导致肿瘤发生的重要因素,诱导肿瘤细胞凋亡已经成为研究热点,从参与凋亡信号传导的通路着手,靶向性调控细胞凋亡,是肿瘤研究的热门领域。传统中药包含诸多抗肿瘤活性成分,寻找高效低毒、靶向清晰的诱导凋亡药物必将是中药抗癌研究的新目标<sup>[17]</sup>。本研究通过研究加味四君子汤含药血清对 c-Myc, Caspase-3, p53, Bcl-2 凋亡相关分子 mRNA 及蛋白水平的影响,探讨加味四君子抗肿瘤的分子机制,为临床防治胃癌提供了理论依据。

原癌基因 c-Myc,位于人类第 8 号染色体上,该基因中高度保守的序列包括两部分,一部分位于编码 c-Myc 的羧基端,一部分位于 c-Myc 的氨基末端<sup>[18]</sup>。c-Myc 过表达能引起细胞凋亡,其作用机制,①c-Myc 蛋白可特异性地与细胞 DNA 结合,调

控基因的转录。②特异性地与 Rb 蛋白结合,参与调节细胞凋亡。③能影响 Fas 与 FasL 的相互作用,c-Myc 基因的过表达能激活 FasL 基因的启动子,促进死亡因子受体(FasL)表达而促进凋亡。④c-Myc 蛋白作用于线粒体可使凋亡蛋白 Bax 和 Apaf-1 表达上调,细胞色素 C 释放,从而激活细胞内源性凋亡通路;同时 c-Myc 蛋白诱导凋亡的作用可被 Bcl-2 的表达抑制,但在某些情况下如与致癌基因同时存在时 c-Myc 则可协同 Bcl-2 导致肿瘤的发生<sup>[19]</sup>。因 Bcl-2 具有抑制细胞丢失、阻止细胞凋亡的功能而被称为“存活基因”,它对各种原因引起的细胞凋亡具有抑制作用,可导致 DNA 受损的细胞持续生存、突变产物聚集,从而促进肿瘤的发生发展<sup>[20-21]</sup>。本实验研究发现加味四君子汤含药血清可明显增加 c-Myc mRNA 及蛋白的表达水平,降低 Bcl-2 mRNA 及蛋白的表达水平,进一步诱导 SGC-7901 胃癌细胞凋亡。

Caspase-3 是 Caspase 家族中参与细胞凋亡的关键蛋白酶之一,其位于细胞凋亡信号传导通路的中心位置,激活后直接参与切割或降解细胞的多种结构和功能蛋白,引起细胞功能障碍,产生凋亡小体,

诱导凋亡发生<sup>[22]</sup>。肿瘤细胞的凋亡过程主要依赖线粒体通路和凋亡受体通路两种方式。p53蛋白分子作为转录因子能够上调线粒体表面促凋亡因子Bax的表达,从而对抗Bcl-2的抗凋亡作用<sup>[23]</sup>。本实验研究发现加味四君子汤含药血清能明显上调Caspase-3, p53 mRNA及蛋白表达水平,且存在一定的量效关系。

本研究结果表明加味四君子汤能显著增加凋亡相关分子c-Myc, Caspase-3, p53 mRNA及蛋白表达水平,降低抗凋亡分子Bcl-2 mRNA及蛋白表达水平,为临床防治胃癌开辟了新途径。

[参考文献]

[1] Sano T, Coit D G, Kim H H, et al. Proposal of a new stage grouping of gastric cancer for TNM classification; International Gastric Cancer Association Staging Project [J]. *Gastric Cancer*, 2017, 20(2): 217-225.

[2] Mocellin S, Verdi D, Pooley K A, et al. Genetic variation and gastric cancer risk: a field synopsis and Meta-analysis [J]. *Gut*, 2015, 64(8): 1209-1219.

[3] Iveson T, Donehower R C, Davidenko I, et al. Rilotumumab in combination with epirubicin, cisplatin, and capecitabine as first-line treatment for gastric or oesophagogastric junction adenocarcinoma: an open-label, dose de-escalation phase 1b study and a double-blind, randomised phase 2 study [J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(9): 1007-1018.

[4] Qi F, Li A, Inagaki Y, et al. Chinese herbal medicines as adjuvant treatment during chemo-or radio-therapy for cancer [J]. *Biosci Trends*, 2011, 4(6): 297-307.

[5] Pedersen B, Koktved D P, Nielsen L L. Living with side effects from cancer treatment—a challenge to target information [J]. *Scand J Caring Sci*, 2013, 27(3): 715-723.

[6] 高启龙, 朱亚楠, 石变, 等. 青龙衣含药血清抑制胃癌SGC-7901细胞生长和诱导凋亡 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(13): 111-115.

[7] 邹超, 杨宇飞. 四君子汤加减降低胃肠肿瘤患者术后复发转移的研究进展 [J]. *世界中医药*, 2015, 10(2): 297-300, 303.

[8] 张俊杰. 四君子汤加味辅助治疗胃癌53例疗效观察 [J]. *国医论坛*, 2015, 30(6): 48-49.

[9] WU B, XUAN Z R. Progress in research on applying Sijunzi decoction in treating digestive malignant tumor [J]. *Chin J Integr Med*, 2007, 13(2): 156-159.

[10] JIE Y, HE W, YANG X, et al. Kruppel-like factor 4 acts as a potential therapeutic target of Sijunzi decoction for treatment of colorectal cancer [J]. *Cancer Gene Ther*, 2017, 24(9): 361-366.

[11] QIAN J, XIE H, GUO C X, et al. Si Jun Zi decoction demolition parties inhibit proliferation and induce apoptosis of human gastric cancer BGC823 side population [J]. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2015, 12(6): 77-89.

[12] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学 [M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 70-73.

[13] 陈皎皎, 胡陵静, 张国铎, 等. 四君子汤加味对肺癌化疗骨髓抑制的作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(2): 180-185.

[14] Kim E, Moon A. Ursolic acid inhibits the invasive phenotype of SNU-484 human gastric cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2015, 9(2): 897-902.

[15] 张志敏, 秦传蓉, 章必成, 等. 小檗碱对肝癌HepG2细胞增殖和凋亡的调节作用 [J]. *医药导报*, 2018, 37(5): 512-518.

[16] 刘倩, 傅纓, 资晓飞, 等. 小檗碱对高糖环境下HCCLM3细胞凋亡与自噬的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(2): 68-73.

[17] 丁大伟, 章永红. 以细胞凋亡通路为靶点的抗肿瘤中药研究进展 [J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(1): 239-241.

[18] 白阳, 叶健, 王敬泽. c-Myc功能及其下游靶点 [J]. *细胞生物学杂志*, 2007, 29(2): 191-196.

[19] 徐媛辉, 唐丹凤, 潘小玲, 等. 原癌基因c-Myc的生物学功能及在卵泡发育中的作用 [J]. *南昌大学学报: 医学版*, 2010, 50(11): 97-101.

[20] 李雪莉, 郝远瑞, 邹建湘, 等. C-myc, Bcl-2与胃癌生物学行为和细胞凋亡 [J]. *新消化病学杂志*, 1997, 5(12): 28-29.

[21] Um H D. Bcl-2 family proteins as regulators of cancer cell invasion and metastasis: a review focusing on mitochondrial respiration and reactive oxygen species [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(5): 5193-5203.

[22] 陈伟, 马磊, 杨立山. 甘草次酸对哮喘大鼠气道重塑及肺组织Caspase-3、Bax、Bcl-2表达的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2016, 32(4): 16-19.

[23] 于曼, 胡图强. 姜黄素通过P53通路诱导人舌鳞癌细胞的凋亡 [J]. *湖北医药学院学报*, 2018, 37(2): 132-135.

[责任编辑 张丰丰]