

黄芪解毒方对胃癌 SGC-7901 细胞增殖、凋亡及 C-myc 基因表达的影响

宋 魏 崔 云 张建波 孙淼淼 夏庆欣

(郑州大学附属肿瘤医院, 郑州, 450008)

摘要 目的:探讨黄芪解毒方对胃癌 SGC-7901 细胞增殖、凋亡及 C-myc 基因表达的影响。方法:胃癌细胞 SGC7901 分别用黄芪解毒汤浓缩液(实验组)及阿霉素溶液(阳性对照组)干预,无任何药物处理的胃癌细胞 SGC7901 细胞为对照组。应用 MTT 法及流式细胞法分别检测胃癌细胞 SGC7901 的增殖及凋亡情况,RT-PCR 法检测细胞中 C-myc 基因表达。结果:实验组和阳性对照组随培养时间的延长细胞增殖抑制率均升高($P < 0.01$),且实验组细胞培养 48 h、72 h 细胞增殖抑制率高于阳性对照组($P < 0.05$)。实验组和阳性对照组细胞凋亡率明显高于对照组($P < 0.01$),实验组和阳性对照组 2 组间细胞凋亡率差异无统计学意义($P > 0.05$)。对照组、实验组和阳性对照组 C-myc mRNA 相对表达量分别为(1.69 ± 0.63)、(0.68 ± 0.37)、(0.86 ± 0.28),实验组和阳性对照组 C-myc mRNA 相对表达量低于对照组($P < 0.01$),且实验组低于阳性对照组($P < 0.05$)。结论:黄芪解毒方可有效抑制胃癌 SGC-7901 细胞增殖,并促其凋亡,其作用机制可能与下调 C-myc 基因表达相关。

关键词 胃癌;黄芪解毒方;SGC-7901 细胞;增殖;凋亡;C-myc 基因;阿霉素;表达;恶性肿瘤;Wnt/ β -catenin 信号通路

Effects of Huangqi Jiedu Decoction on Proliferation, Apoptosis and C-myc Gene Expression of Gastric Cancer SGC-7901 Cells

Song Wei, Cui Yun, Zhang Jianbo, Sun Miaomiao, Xia Qingxin

(Tumor Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450008, China)

Abstract Objective: To investigate the effects of Huangqi Jiedu Decoction on proliferation, apoptosis and C-myc gene expression of gastric cancer SGC-7901 cells. **Methods:** SGC7901 gastric cancer cells were intervened respectively with Huangqi Jiedu Decoction concentrate (experimental group) and adriacin solution (positive control group), and SGC7901 cells without any drug treatment were for control group. MTT assay and flow cytometry were used to detect the proliferation and apoptosis of SGC7901 cells, C-myc gene expression in cells was detected by RT-PCR. **Results:** The inhibitory rate of cell proliferation in experimental group and positive control group increased with the prolongation of culture time ($P < 0.01$), and the inhibition rate of cell proliferation in experimental group 48 hours and 72 hours after cell culture was higher than those in positive control group ($P < 0.05$). The apoptosis rate of experimental group and positive control group was significantly higher than that of control group ($P < 0.01$), but there was no significant difference between experimental group and positive control group ($P > 0.05$). The relative expression of C-myc mRNA in control group, experimental group and positive control group were (1.69 ± 0.63), (0.68 ± 0.37), (0.86 ± 0.28) respectively. The relative expression of C-myc mRNA in experimental group and positive control group was lower than that in control group ($P < 0.01$), and experimental group was lower than positive control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Huangqi Jiedu Decoction can effectively inhibit the proliferation and promote the apoptosis of gastric cancer SGC-7901 cells, which may be related to the down-regulation of C-myc gene expression.

Key Words Gastric cancer; Huangqi Jiedu Decoction; SGC-7901 cells; Proliferation; Apoptosis; C-myc gene; Doxorubicin; Expression; Malignant tumor; Wnt/ β -catenin signaling pathway

中图分类号:R273 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.03.042

胃癌是一种恶性程度较高的消化系统肿瘤疾病,病情进展迅速,随着生活方式及周围环境的变化,其在临床发病率及死亡率均呈升高趋势,严重威胁患者生命安全。胃癌发病隐匿,早期易出现局部

浸润或远处转移,确诊难度较大,就诊时 50% 的患者已进展至中晚期或发生肿瘤的转移^[1-2]。Wnt/ β -catenin 信号通路在胚胎发育过程中发挥重要作用,异常激活后将导致细胞生长异常,C-myc 是该信号

转导通路下游的一个重要的靶基因,与肿瘤的发生、侵袭转移及患者预后密切相关^[3]。本研究采用黄芪解毒方剂干预胃癌 SGC-7901 细胞,观察其对胃癌 SGC-7901 细胞增殖、凋亡的影响以及 C-myc 基因的表达情况。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 胃癌细胞 SGC7901,购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.1.2 药物 黄芪解毒方汤剂(方中黄芪、半枝莲、薏苡仁、白花蛇舌草各 30 g,太子参、玄参、女贞子、龙葵各 15 g,浙贝母、白术、茯苓、麦冬、山慈菇各 10 g,甘草 6 g,药物浸泡后武火煮沸,文火煎煮 30 min,煎煮 2 次合并药液,采用旋转蒸发仪浓缩至 5 倍左右,生药浓度 1.467 g/mL,离心将上清过滤后备用);阿霉素(深圳万乐药业有限公司,生产批号:1307E1,生理盐水配制成 1 mg/mL)。

1.1.3 试剂与仪器 RPMI-1640 培养基、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶,均购于美国 Gibco 公司;噻唑蓝(MTT)和二甲基亚砷购于美国 Sigma 公司;RNA 提取试剂盒、SYBP® Premix ExTaq™ 及所涉及引物,均购于日本 TakaRa 公司及其设计合成。SW-CJ 型超净工作台,购于苏州净化集团安泰公司;Model 311 型 CO₂ 培养箱,购自美国 Thermo Forma 公司;DNM-9602G 自动酶标仪,购于北京普朗新技术有限公司;ROTOR-GEN 3000 型实时定量 PCR 仪,购于澳大利亚 Cobette 公司;Heal ForeNeofuge13 台式高速冷冻离心机,购于上海力申科学仪器有限公司;CKX41 型倒置显微镜,购于日本 Olympus 公司等。

1.2 方法

1.2.1 胃癌 SGC7901 细胞培养 胃癌细胞 SGC7901 用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基于 37 °C,5% CO₂ 培养箱中培养,3~4 d 按照 1:3 比例传代 1 次,取对数生长期细胞进行相关试验。

1.2.2 MTT 法检测黄芪解毒方对胃癌 SGC7901 细胞增殖的影响 取对数生长期的胃癌细胞 SGC7901,0.25% 胰蛋白酶消化后,按 3×10^4 个/mL 接种于 96 孔细胞培养板中,分别加入黄芪解毒汤浓缩液及阿霉素溶液,8 复孔对照,为实验组和阳性对照组,另设对照组(胃癌细胞 SGC7901 200 μ L/孔),在 37 °C,5% CO₂ 培养箱中培养^[4]。细胞培养第 24、48、72 h,分别加入 5 mg/mL MTT 溶液,20 μ L/孔,继续培养 4 h 后吸去培养液,加二甲基亚砷,150 μ L/孔,振荡 10 min,用自动酶标仪测定 OD_{492 nm} 值。

增殖抑制率 = $(OD_{492 \text{ nm对照}} - OD_{492 \text{ nm实验}}) / OD_{492 \text{ nm对照}} \times 100\%$ 。

1.2.3 流式细胞仪检测黄芪解毒方对胃癌 SGC7901 细胞凋亡的影响 取对数生长期的胃癌细胞 SGC7901,0.25% 胰蛋白酶消化后,按 3×10^4 个/mL 接种于 12 孔细胞培养板中,分别加入黄芪解毒汤浓缩液及阿霉素溶液,3 复孔对照,为实验组和阳性对照组,对照组加等量生理盐水,48 h 后收集每孔细胞,4 °C PBS 洗 3 次,依次加入结合缓冲液 500 μ L、Alexa Fluor 488 Annexin V 和 PI 5 μ L,避光染色 10 min,经流式细胞仪检测细胞凋亡情况^[5]。

1.2.4 实时荧光定量-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 C-myc mRNA 表达水平 细胞培养基处理同 1.2.2,细胞培养 48 h 后,用 Trizol 提取细胞总 RNA,各样本取总 RNA 5 μ g,合成 cDNA,取 2 μ L cDNA 行 PCR 反应^[6]。PCR 扩增体系为 25 μ L。PCR 产物经含 4 ng/mL 溴乙锭的 TAE 琼脂糖凝胶电泳鉴定,结果分析采用紫外光凝胶成像系统,目的基因 C-myc IOD 值/ β -actin IOD 值为 mRNA 的相对表达量。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间比较进行 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄芪解毒方对胃癌 SGC7901 细胞增殖抑制率及细胞形态的影响 实验组和阳性对照组 24 h 细胞增殖抑制率(%)分别为(40.56 \pm 1.68)、(39.95 \pm 2.77),48 h 细胞增殖抑制率(%)分别为(48.67 \pm 2.35)、(46.57 \pm 2.96),72 h 细胞增殖抑制率(%)分别为(55.67 \pm 3.24)、(53.85 \pm 2.87)。实验组和阳性对照组随培养时间的延长细胞增殖抑制率均升高($F = 12.334, 8.231, P < 0.01$),且实验组细胞培养 48 h、72 h 细胞增殖抑制率高于阳性对照组($P < 0.05$)。见表 1。对照组胃癌 SGC7901 细胞形态规则,数量较多,而实验组和阳性对照组胃癌 SGC7901 细胞变圆,皱缩,且有凋亡小体形成。见图 1。

表 1 黄芪解毒方对胃癌 SGC7901 细胞增殖抑制率的影响($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	株数	24 h	48 h	72 h
对照组	8	-	-	-
实验组	8	40.56 \pm 1.68	48.67 \pm 2.35	55.67 \pm 3.24
阳性对照组	8	39.95 \pm 2.77	46.57 \pm 2.96*	53.85 \pm 2.87*

注:与阳性对照组比较,* $P < 0.05$

2.2 黄芪解毒方对胃癌细胞 SGC7901 凋亡率的影响 胃癌细胞 SGC7901 培养 48 h 后,经流式细胞仪检测,对照组、实验组和阳性对照组细胞凋亡率(%)分别为(1.56 ± 0.18)、(41.23 ± 1.26)、(40.15 ± 1.87),实验组和阳性对照组细胞凋亡率明显高于对照组($P < 0.01$),实验组和阳性对照组 2 组间细胞凋亡率差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

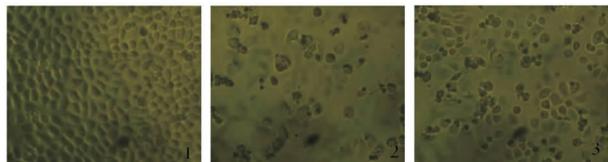


图1 显微镜观察黄芪解毒方对胃癌 SGC7901 细胞形态的影响

注: ×100, 1: 对照组, 2: 实验组, 3: 阳性对照组

表2 黄芪解毒方对胃癌 SGC7901 细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	株数	凋亡率
对照组	3	1.56 ± 0.18
实验组	3	41.23 ± 1.26 **
阳性对照组	3	40.15 ± 1.87 **

注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$

2.3 黄芪解毒方对胃癌细胞 SGC7901 C-myc mRNA 表达的影响 RT-PCR 检测结果可见,对照组、实验组和阳性对照组 C-myc mRNA 相对表达量分别为(1.69 ± 0.63)、(0.68 ± 0.37)、(0.86 ± 0.28),实验组和阳性对照组 C-myc mRNA 相对表达量低于对照组($P < 0.01$),且实验组低于阳性对照组($P < 0.05$)。见图 2。

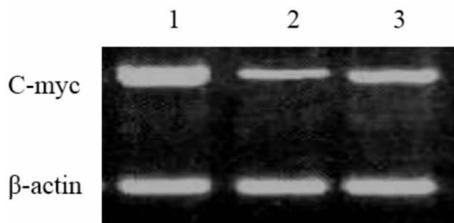


图2 黄芪解毒方对胃癌细胞 SGC7901 C-myc mRNA 表达的影响

注: 1: 对照组; 2: 实验组; 3: 阳性对照组

3 讨论

手术切除及术后放化疗治疗胃癌在临床已得到普遍应用,虽取得一定进展,但并未明显提高总体治疗水平。中医药在我国肿瘤的防治中有着悠久的历史,近年来中药有效成份抗肿瘤作用的研究也逐渐增多,张少楠等^[7]研究表明,姜黄素可抑制膀胱癌 T24 细胞的增殖和侵袭能力。谢军等^[8]研究发现,苦参碱可改变肝癌 HepG2 细胞线粒体膜电位诱导

其凋亡,进而有效抑制肝癌 HepG2 细胞增殖。因此非常有必要探索恶性肿瘤新的治疗模型,使癌症患者从中获益。

胃癌术后属于中医“伤科”范畴,患者多正气亏损、气血虚弱,夹杂风寒湿邪等乘虚而入,应以活血化瘀为主要治疗原则,同时,术后患者需要进行常规化疗进一步防止恶性肿瘤的复发和转移,但化疗药物对机体造成的不良反应也不容小觑。本研究采用的黄芪解毒方中,黄芪健脾补中、益卫固表、升阳举陷、托毒生肌为君药,太子参补气健脾、生津润肺为臣,两者主扶正,共奏益气健脾养阴之功;白术温补脾气,茯苓渗湿健脾、补益心神、宁心安神,两者同用,加强益气健脾除湿之功;玄参滋阴、泻火解毒、清热凉血,薏苡仁渗湿健脾、利水消肿,麦冬养阴生津、润肺清心,半枝莲与白花蛇舌草清热解毒、利湿通淋消肿,女贞子滋补肝肾;龙葵利水,浙贝母清热,两者可用于散结,甘草养胃和中,调和诸药为使,全方共奏益气养阴解毒功效。本研究观察黄芪解毒方对胃癌细胞 SGC7901 体外的作用机制,采用 MTT 法观察其对细胞的增殖抑制作用,并观察其对细胞形态学方面的影响,结果显示,实验组和阳性对照组随培养时间的延长细胞增殖抑制率均升高,且实验组细胞培养 48 h、72 h 细胞增殖抑制率高于阳性对照组。对照组胃癌 SGC7901 细胞形态规则,数量较多,而实验组和阳性对照组胃癌 SGC7901 细胞变圆,皱缩,且有凋亡小体形成。表明黄芪解毒方和阿霉素均对胃癌 SGC7901 细胞生长有一定抑制作用,且可引起细胞形态学方面的变化,造成细胞坏死及凋亡的发生。细胞凋亡失衡是导致肿瘤细胞无限增殖的关键因素,促进肿瘤细胞凋亡是临床治疗肿瘤性疾病的有效手段之一^[9]。本研究采用流式细胞法进一步检测胃癌 SGC7901 细胞凋亡,结果显示,实验组和阳性对照组细胞凋亡率明显高于对照组,2 组间细胞凋亡率无明显统计学差异。提示黄芪解毒方可通过促进胃癌细胞凋亡的发生进而抑制肿瘤细胞的无限制增殖。

Wnt/ β -catenin 信号转导通路异常激活,致使 β -catenin 水平失控是恶性肿瘤发生发展的关键因素之一^[10-11]。封闭异常活化的 Wnt/ β -catenin 信号转导通路,进而达到抑制肿瘤细胞增殖的目的,目前已成为临床抗肿瘤治疗的热点方向。C-myc 是由原癌基因 myc 编码的一种转录因子,有研究^[12-13]显示,C-myc 蛋白的含量决定了细胞发生凋亡的速度及其对诱导因素的敏感性;C-myc 还可调控端粒酶活性,一

且 C-myc 水平升高将诱导端粒酶的活化进而导致肿瘤的发生^[14]。本研究采用 RT-PCR 法检测胃癌细胞 SGC7901 中 C-myc 基因表达情况,结果显示,实验组和阳性对照组 C-myc mRNA 相对表达量低于对照组,且实验组低于阳性对照组,提示黄芪解毒方可能是通过下调 C-myc 基因表达水平进而从多方面抑制肿瘤的增殖,诱导其凋亡,具有较好的抗肿瘤治疗作用。

综上所述,黄芪解毒方可有效抑制胃癌 SGC-7901 细胞增殖,并促其凋亡,其作用机制可能与下调 C-myc 基因表达相关,但是该方剂为中药煎剂,药物组成及成分较多,因此需要进一步实验研究探讨及具体作用机制,以更好的指导其在临床的应用。

参考文献

[1] 帅晓明,高金波,刘兴华,等. 新辅助化疗联合腹腔镜辅助胃癌根治术治疗进展期胃癌的疗效分析[J]. 中华消化外科杂志,2016, 15(3):241-246.

[2] 陈敬华,申维玺,夏俊贤,等. 多西他赛联合奥沙利铂和替吉奥与 DCF 方案一线治疗晚期胃癌的对比研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2015,22(2):134-137.

[3] 刘特彬,崔冀,李晓辉. Wnt/ β -catenin 通路及靶基因 c-myc 在肝细胞癌组织中的表达[J]. 中华实验外科杂志,2011, 28(6):923-925.

[4] 曾燕,周青霞,罗菊英,等. 2015 年咸宁市脑卒中患者主要照顾者疲劳状况及影响因素分析[J]. 实用预防医学,2017,24(2):172-176.

[5] 吴建勇,赵德璋. 流式细胞仪检测细胞凋亡的几种方法的比较 [J]. 重庆医科大学学报,2010,35(9):1386-1389.

[6] 赵连梅,冯佳,李燕,等. 胃癌研究中实时定量 PCR 实验内参基因的选择[J]. 肿瘤防治研究,2015,42(10):974-978.

[7] 张少楠,雍群,吴欣俐,等. 姜黄素与顺铂协同对 T24 膀胱癌细胞的抑制作用及相关机制研究[J]. 中药材,2014,37(11):2043-2046.

[8] 谢军,孟凡,刘永萍,等. 苦参碱对人肝癌细胞 HepG2 增殖及凋亡相关蛋白的影响[J]. 实用医学杂志,2015,31(24):4007-4009.

[9] 姜鹤,李苗,张岚. 核糖体蛋白 MPS-1 在多柔比星诱导胃癌细胞凋亡中的作用[J]. 肿瘤,2017,37(9):944-952.

[10] Lemieux E, Cagnol S, Beaudry K, et al. Oncogenic KRAS signalling promotes the Wnt/ β -catenin pathway through LRP6 in colorectal cancer[J]. Oncogene,2015,34(38):4914-4927.

[11] Chiacchiera F, Rossi A, Jammula S, et al. Polycomb Complex PRC1 Preserves Intestinal Stem Cell Identity by Sustaining Wnt/ β -Catenin Transcriptional Activity[J]. Cell Stem Cell,2016,18(1):91-103.

[12] Christensen JG, Goldsworthy TL, Cattley RC. Dysregulation of apoptosis by c-myc in transgenic hepatocytes and effects of growth factors and nongenotoxic carcinogens[J]. Mol Carcinog,1999,25(4):273-284.

[13] 亓磊,田辉,岳韦名,等. Siewert I 型食管胃结合部腺癌淋巴结转移特点及预后分析[J]. 中华消化外科杂志,2016,15(11):1075-1080.

[14] Dasgupta P, Sengupta SB. Role of diallyl disulfide-mediated cleavage of c-Myc and Sp-1 in the regulation of telomerase activity in human lymphoma cell line U937[J]. Nutrition,2015,31(7-8):1031-1037.

(2017-12-15 收稿 责任编辑:王明)

达标执共识 降压展未来 ——2018 高血压管理高峰论坛隆重举行

2018 年 3 月 2 日上午,由世界中医药学会联合会高血压专业委员会举办、山东中医药大学附属医院(山东省中医院)和高血压国家中医临床研究基地承办的“2018 高血压管理高峰论坛”在山东省中医院举行,吸引 150 余名专家学者参会。论坛由高血压专业委员会副会长兼秘书长陆峰主持。

本次论坛特别邀请了中国台湾高血压学会(THS)主任委员、台湾高血压治疗指南主席兼心房颤动治疗指南主席、

台北荣民总医院心内科江晨恩教授做主题报告。报告以“2017 年美国高血压指南”为着力点,应用大量最新的系统评价和 Meta 分析文献,结合实践,精辟分析了不同人群降压目标值的证据,形成突出亚洲本土特色、符合中国本地需求的降压达标学术共识。

与会专家在血压测量方法、降压药物个体化选择、特殊人群(慢性肾脏病合并高血压、糖尿病合并高血压、妊娠期高血压)降压目标值等热点问题进行了交流讨论。