

## 康力欣胶囊对胃癌细胞株细胞周期和细胞凋亡的影响\*

刘学芳<sup>1</sup>, 董浩然<sup>1</sup>, 张 娜<sup>2△</sup>, 冯素香<sup>1</sup>

(1. 河南中医药大学中医内科学重点学科开放实验室, 河南 郑州 450046;

2. 河南中医药大学基础医学院人体解剖与组织胚胎学学科, 河南 郑州 450046)

**摘要:** 目的 研究抗肿瘤药康力欣胶囊对胃腺癌细胞株 SGC-7901 细胞增殖、细胞周期和细胞凋亡的影响。方法 以康力欣胶囊 2, 1, 0.1 mg·mL<sup>-1</sup> 接种于细胞 12, 24, 36, 48h 后, 采用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 法测定细胞抑制率, 采用流式细胞仪检测细胞周期各时相比率的变化, 荧光显微镜观察法检测各组细胞凋亡的形态变化。结果 MTT 检查结果显示, 康力欣胶囊抑制率呈明显的时间-剂量-效应关系; 细胞周期检测结果显示, 康力欣胶囊作用 SGC-7901 细胞后将细胞周期阻滞在 G1 期, 同时下调 S 期和 G2 期细胞比例。荧光显微镜观察结果显示, 康力欣胶囊组 SGC-7901 出现大量激发绿色荧光的早期凋亡细胞和同时激发红色荧光的晚期凋亡细胞。结论 康力欣胶囊对 SGC-7901 的抑制作用可以通过阻滞细胞周期和诱导细胞凋亡来实现。

**关键词:** 康力欣胶囊; 胃癌细胞株; 体外抑制; 细胞周期; 细胞凋亡

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2016)06-0010-04

**DOI:** 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2016.06.003

在人类恶性肿瘤中, 胃癌的发病率与病死率始终居于前列, 根据《2012 年中国肿瘤登记年报》显示, 在全国肿瘤登记地区肺癌、胃癌、结直肠癌、肝癌、食管癌等, 已经成为发病前 10 位的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>, 在针对胃癌的防治中药复方的研发是当今的研究热点, 可作为手术治疗或者放化疗技术的有效补充手段。康力欣胶囊是国家准字号药品 (Z20025075), 由云南名扬药业有限公司生产, 是临床治疗消化道癌症的常用药。它是基于藏族民间药方开发的一种新型中药复方制剂, 主要组成包括阿魏、九香虫、大黄、姜黄、诃子、木香、丁香、冬虫夏草等 8 味中药。可扶正去邪, 软坚散结, 对胃癌具有良好的治疗作用<sup>[2-3]</sup>。本研究通过体外实验, 探讨康力欣胶囊对人胃腺癌细胞 SGC-7901 的增殖的影响、对细胞周期的调节和以及对细胞凋亡的影响。

### 1 材料

#### 1.1 试剂及细胞株

人胃腺癌细胞株 SGC-7901, 由河南中医药大学基础医学院科研实验中心提供, RPMI 1640 (so-

larbio 公司, 批号 31800-500), 无支原体胎牛血清 (浙江天杭生物科技有限公司, 批号 150212), 胰蛋白酶-EDTA 消化液 (solarbio 公司, 批号 T1320), 康力欣胶囊 (云南名扬药业有限公司, 国药准字: Z20025075); 氟脲嘧啶注射液 (上海旭东海普药业有限公司, 批号 FA150112); 四甲基偶氮唑盐 (MTT, Solarbio 公司, 批号 M8180); 二甲基亚砜 (DMSO, 天津市富宇精细化工有限公司, 批号 20131222); 细胞周期检测试剂盒 (凯基生物公司, 批号 KGA512), 细胞凋亡检测试剂盒 (凯基生物公司, 批号 KGA107)

#### 1.2 仪器

1510 型全波长酶标仪 (Thermo Scientific 公司), BX53 荧光显微镜 (Olympus 公司), Calibur 型流式细胞仪 (BD 公司), 3111 型二氧化碳培养箱 (Thermo Scientific 公司), HVE-50 型高压蒸汽灭菌锅 (HIRAYAMA 公司)。

### 2 方法

#### 2.1 药物配制

精确称量康力欣胶囊内容物, 溶于 RPMI 1640

\* 基金项目: 河南省教育厅科学技术研究重点项目 (14B310011)

收稿日期: 2016-11-14

作者简介: 刘学芳 (1979-), 男, 河南邓州人, 硕士, 实验师, 研究方向: 药物配伍规律及其作用基础研究。

△通信作者: 张娜, E-mail: 616621312@qq.com

培养基中,震荡混匀,90℃水浴 30min,超声提取 15min,1 000r/min 离心 5min,配制成 10mg/mL 含药培养基,-20℃保存备用,使用时用 RPMI 1640 培养基调整所需溶液浓度。

## 2.2 细胞培养

复苏 SGC-7901 细胞,接种于含有 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中,置于 37℃,5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中孵育,每天观察 1 次,待长满后,胰蛋白酶消化法传代培养,待细胞生长稳定后,供检测使用。

## 2.3 康力欣胶囊对 SGC-7901 体外抑制作用

取对数生长期细胞常规胰蛋白酶消化,调整细胞密度至  $5 \times 10^4$  个/mL,接种于 96 孔培养板中孔内 (100μL/孔),于细胞培养箱中孵育大约 24h,细胞贴壁生长至约 80%取出,随机分为 5 组,康力欣高、中、低浓度组,分别加入含药培养基 2,1,0.1mg/mL,阳性对照组加入氟尿嘧啶 0.05mg/mL,阴性对照组加入 RPMI1640 培养基,另设空白调零组,每孔均为 200μL,每组设 6 个复孔。将培养板置于培养箱中再孵育 12,24,36,48h 后,每孔加入 5mg/mL MTT 溶液 20μL,继续孵育 4h 后吸弃孔内液体,每孔加入 150μL DMSO,打开酶联免疫检测仪,设定程序为振动 10min,检测波长为 490nm 检测每孔吸光度(OD 值),并计算抑制率。

抑制率=(OD 阴性对照组-OD 用药组)/OD 阴性对照组×100%

## 2.4 康力欣胶囊对 SGC-7901 周期影响测定

取对数生长期 SGC-7901 细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞 1 次,分别加入空白培养基(阴性对照组),氟尿嘧啶 0.025mg/mL 的培养基(阳性对照组),康力欣药物 0.1mg/mL 的培养基(给药组),作用 48h 后,弃上清,胰蛋白酶消化法收集细胞,用

PBS 洗涤细胞 1 次(1 000r/min,5min),用适量 PBS 调整细胞密度为  $1 \times 10^6$  个/mL,单细胞悬液含 70%的乙醇以达到固定效果,4℃保存,染色前用 PBS (1 000r/min,5min)洗去固定液,加入 100μL RNase A 37℃水浴 30min,再加入碘化丙啶(PI)400μL 染色混匀,4℃避光 30min 后,上流式细胞仪检测 G1 期、G2 期和 S 期细胞百分含量,分析数据,从而得出康力欣胶囊对 SGC-7901 细胞周期的影响。

## 2.5 荧光染色法观察细胞凋亡

细胞飞片法在 6 孔细胞板中培养 SGC-7901 细胞,待长成单层后,分别加入空白培养基(阴性对照组),氟尿嘧啶 0.05mg/mL 的培养基(阳性对照组),康力欣药物 1mg/mL 的培养基(给药组),孵育 24h,弃上清,先用 PBS 洗涤细胞 2 次,按照细胞凋亡检测试剂盒的步骤在 500μL 的 Bing Buffer 中加入 5μL Annexin V-FITC,5μL PI 混匀,将上述溶液滴加在盖玻片,均匀覆盖,避光作用 5min,取出盖玻片倒置于载玻片上,于荧光显微镜下,双色滤光片观察拍照记录。其中 Annexin V-FITC 荧光信号为绿色,PI 荧光信号为红色。

## 2.6 统计学分析

采用 SPSS18.0 统计软件,数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素的方差分析,两两比较采用 LSD 分析,以  $P < 0.05$  为有统计意义。

## 3 结果

### 3.1 康力欣胶囊对 SGC-7901 细胞的体外抑制作用

MTT 检测结果显示康力欣各组对 SGC-7901 细胞均具有明显的抑制作用,其中 2mg/mL 组在 12、24、36h 抑制率随着给药时间的延长而增大,48h 后不再升高;康力欣 1mg/mL 组在 12、24、36、48h,抑制率随着给药时间的延长而增大;康力欣 0.1mg/mL 组在 24、36、48h,抑制率随着给药时间的延长而

表 1 康力欣不同时间点对 SGC-7901 细胞的抑制率( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

| 组别   | 剂量<br>(mg·mL <sup>-1</sup> ) | 抑制率/%                       |                              |                                |                                |
|------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
|      |                              | 12h                         | 24h                          | 36h                            | 48h                            |
| 阴性对照 | -                            | -                           | -                            | -                              | -                              |
| 氟尿嘧啶 | 0.05                         | 0.16±0.11 <sup>6)</sup>     | 23.54±0.85 <sup>2,6,8)</sup> | 40.86±2.5 <sup>2,6,8)</sup>    | 61.71±3.81 <sup>2,6)</sup>     |
| 康力欣  | 2                            | 21.77±1.49 <sup>2,4)</sup>  | 40.38±1.08 <sup>2,4,8)</sup> | 90.86±0.43 <sup>2,4,8)</sup>   | 90.49±0.68 <sup>2,4,8)</sup>   |
| 康力欣  | 1                            | 11.69±1.5 <sup>2,4,6)</sup> | 25.03±1.19 <sup>2,4,6)</sup> | 49.25±1.16 <sup>2,4,6)</sup>   | 61.97±3.09 <sup>2,6)</sup>     |
| 康力欣  | 0.1                          | 0.03±0.02 <sup>6)</sup>     | 8.5±0.72 <sup>2,4,6,8)</sup> | 33.23±3.53 <sup>2,4,6,8)</sup> | 47.16±5.97 <sup>2,4,6,8)</sup> |

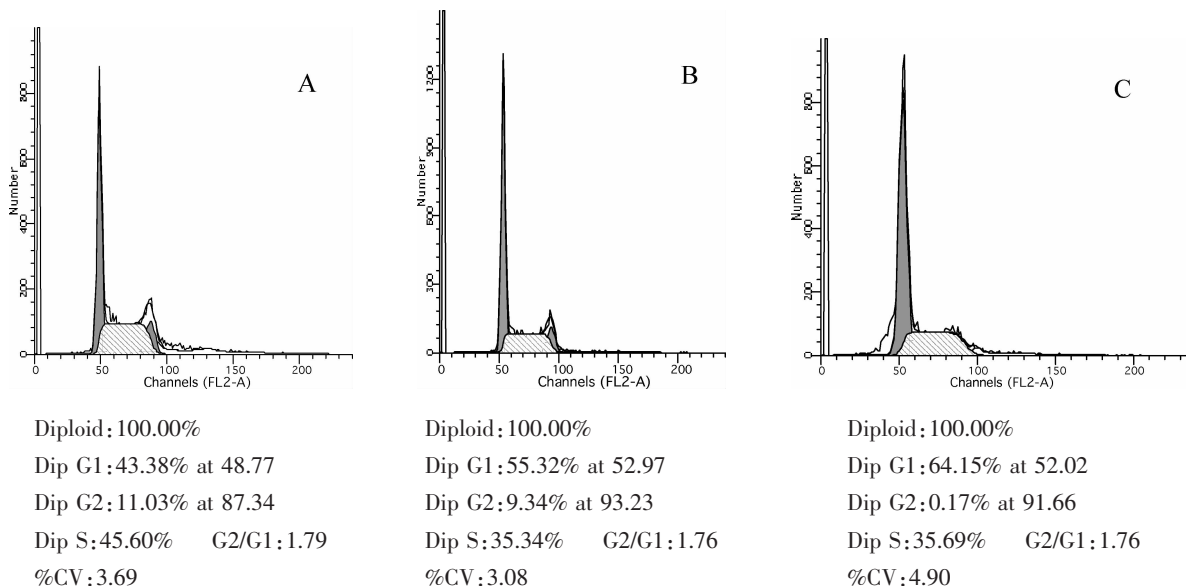
注:与阴性对照比较,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与氟尿嘧啶组比较,<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup> $P < 0.01$ ;与康力欣 2mg/mL 比较,<sup>5)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>6)</sup> $P < 0.01$ ;与康力欣 1mg/mL 比较,<sup>7)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>8)</sup> $P < 0.01$

增大,与阴性对照组比较有显著差异( $P<0.01$ )。整体结果显示随着药物剂量增加和作用时间的延长,细胞生长抑制明显增强,细胞存活率明显下降,呈明显的时间-剂量-效应关系。见表 1。

### 3.2 康力欣胶囊对 SGC-7901 周期影响测定

加药培养后 48h, 康力欣组和氟尿嘧啶组 G1

期细胞比例分别为 55.32% 和 64.15%, 与阴性对照组相比分别增加了 11.94% 和 20.77%, G2 期的细胞分别下降至 9.34% 和 0.17%, S 期的细胞分别下降至 35.34% 和 35.69%, 细胞周期检测结果显示康力欣胶囊可以将 SGC-7901 细胞阻滞在 G1 期, 如图 1 所示。



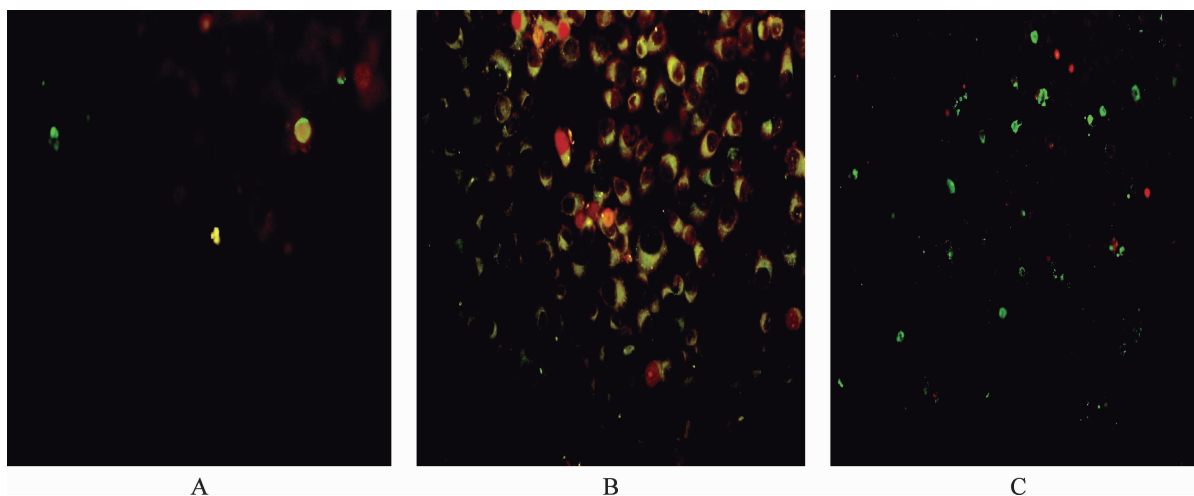
A. 阴性对照组; B. 康力欣胶囊 0.1mg/mL 组; C. 氟尿嘧啶 0.025mg/mL 组

图 1 康力欣胶囊对 SGC-7901 细胞周期的影响

### 3.3 康力欣胶囊诱导 SGC-7901 细胞凋亡的荧光染色观察

细胞凋亡荧光染色结果显示, 对照组细胞绝大多数为阴性染色, 只有零星细胞激发绿色和红色荧光(图 2A); 康力欣药物作用组可见大量细胞表达

绿色、红色荧光信号, 其中绿色荧光主要集中在细胞膜, 仅表达该信号的细胞为早期凋亡细胞, 红色荧光出现在细胞核(图 2B)同时表达两种荧光信号的细胞为晚期凋亡细胞; 氟尿嘧啶药物组仅出现少量绿色和红色荧光信号表达(图 2C)。



A. 阴性对照组; B. 康力欣胶囊 1mg/mL 组; C. 氟尿嘧啶 0.05mg/mL 组

图 2 康力欣胶囊诱导 SGC-7901 细胞凋亡的荧光染色结果

#### 4 讨论

胃癌属于中医“胃脘痛”“噎膈”“反胃”“积聚”等范畴,现代医家认为胃癌是本虚标实之证,脾胃肾虚为本,气滞、血瘀、邪热、痰凝为标<sup>[4-5]</sup>。康力欣胶囊可扶正去邪,软坚散结,对胃癌具有良好的治疗作用<sup>[3]</sup>,该药包括阿魏、九香虫、大黄、姜黄、诃子、木香、丁香、冬虫夏草等八味中药,多项研究已经证实,阿魏、九香虫、大黄、姜黄、冬虫夏草具有较好的抗肿瘤活性,能够调节机体免疫力<sup>[6-8]</sup>,同时丁香和木香具有理气止痛之功效,有利于缓解肿瘤患者疼痛<sup>[9]</sup>。

温先敏等<sup>[2]</sup>实验证实康力欣胶囊提取物的水溶液(0.05~0.2mg/mL)对肺癌细胞(GLC-82)、口腔鳞癌细胞(KB)、宫颈癌细胞(Hela)、胃腺癌(SGC-7901)、肝癌(BEL-7402),共5种肿瘤细胞均有生长抑制作用。本实验在此基础上针对康力欣药物对SGC-7901细胞的抑制作用进一步探讨,阐述该药抑制率与剂量、时间的效应关系,结果显示,康力欣胶囊药物各组(2、1、0.1mg/mL)作用于SGC-7901细胞12、24、36、48h后,抑制率随药物剂量增大而增加,同一剂量下抑制率随作用时间延长而增加,抑制率具有剂量、时间的依赖性。

细胞周期是细胞由一次分裂结束到下一次分裂结束的时期,包括有丝分裂期(M期)和分裂间期(G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub>)<sup>[10]</sup>,针对肿瘤细胞,一些药物因素可影响驱动细胞周期前进的因子,使细胞周期停止在某个检测点,称为细胞周期阻滞。本实验结果显示与对照组相比,康力欣胶囊可以将SGC-7901细胞周期阻滞在G<sub>1</sub>期,从而调节肿瘤细胞的增殖周期进程。

近年来多项研究证实,中药复方和单味药及其有效组分具有诱导肿瘤细胞凋亡的功能,如四君子汤、桂枝茯苓丸、大蒜素、刺五加皂苷等<sup>[11]</sup>。细胞凋亡是由基因控制的细胞自主的有序的死亡,在肿瘤的发生发展过程中发挥重要作用,肿瘤细胞是永生性细胞,肿瘤的发生不仅与细胞的异常增殖有关,也与细胞凋亡的异常有关<sup>[12]</sup>。对磷脂酰丝氨酸(PS)位于正常细胞细胞膜内侧,在细胞凋亡早期时,PS由细胞膜内侧向外翻,Annexin V为一种Ca<sup>2+</sup>依赖性磷脂结合蛋白,和PS具有高度亲和力,将Annexin V使用荧光素FITC标记后,可以作为探针检测PS,

发生凋亡的细胞激发绿色荧光,碘化丙啶(PI)为核酸染料,可通过不完整的细胞膜,对晚期凋亡细胞和死亡细胞的细胞核进行染色,激发红色荧光,本实验结果显示康力欣胶囊作用后SGC-7901细胞出现大量的凋亡细胞,凋亡细胞的比例明显高于阴性对照组。

本研究围绕康力欣胶囊对SGC-7901细胞的抑制作用展开,证实该药对SGC-7901细胞的抑制存在时间-剂量-效应关系,通过调节细胞周期和诱导细胞凋亡来实现抑制性调节,本研究的结果对今后更深层次地研究康力欣胶囊抗胃癌的作用机制,进一步挖掘该药治疗效果等方面,具有积极的指导意义。

#### 参考文献:

- [1] 郝捷,陈万青. 2012中国肿瘤登记年报[M].北京:军事医学科学出版社,2012. 10
- [2] 温先敏,杨绍南,段为钢,等. 康力欣胶囊抗肿瘤活性的实验研究[J]. 云南中医中药杂志,2009,30(1):48-49.
- [3] 郭利群,郭利华. 康力欣胶囊治疗中晚期恶性肿瘤临床疗效观察[J]. 中医临床研究,2015,7(20):21-23.
- [4] 王祥麒,史晓伟. 胃癌的中医治疗策略浅析[J]. 中医学报,2012,27(4):394-395.
- [5] 蒋时红,刘燕,吴耀松. 胃康舒宁对胃癌细胞株体外生长及细胞周期的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(11):191-193.
- [6] 肖辉,张月明,张琰,等. 阿魏蘑菇提取物抗肿瘤作用的实验研究[J]. 疾病控制杂志,2006,10(4):331-334.
- [7] 崔淑香,曲显俊,周玲,等. 姜黄素抗肿瘤作用的机制探讨[J]. 山东大学学报(医学版),2005,43(3):195-198.
- [8] 田劭丹,李冬云,侯丽,等. 冬虫夏草抗肿瘤研究进展[J]. 实用中医内科杂志,2006,20(1):7-9.
- [9] 吴承艳,李振彬,石建喜. 木香、丁香和威灵仙镇痛及胃肠动力作用的实验研究[J]. 江苏中医药,2005,26(12):61-63.
- [10] 王广良,倪虹,陈力. 细胞周期检测点与肿瘤发生[J]. 国外医学(肿瘤学分册),2004,31(6):406-409.
- [11] 杨志杰,李秀丽. 中医药诱导细胞凋亡治疗恶性肿瘤的研究进展[J]. 中医学报,2013,28(1):18-20.
- [12] 李娜,高俊岩,刘敏. 细胞凋亡和肿瘤的关系研究进展[J]. 当代医学,2009,15(16):13-14.

(编辑:徐建平)

(英文摘要见第20页)

- 药, 2015, 43(3): 237-240.
- [15] Du J, Zhou N, Liu H, et al. Arsenic induces functional re-expression of estrogen receptor  $\alpha$  by demethylation of DNA in estrogen receptor-negative human breast cancer[J]. Plos One, 2012, 7(4): e35957.
- [16] 石莹, 胡博, 郭侯, 等. 三氧化二砷抑制小鼠乳腺癌细胞 MA-891 生长作用及其对端粒酶活性的影响[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(5): 637-642.
- (编辑: 徐建平)

## Study of Scutellarin, Scutellarein and Tetraacetyl Scutellarein Combined with Arsenic Trioxide on Breast Cancer Cell Proliferation Inhibition

NI Guanghui<sup>1,2</sup>, HE Yuefeng<sup>3</sup>

- (1. College of Pharmaceutical Science, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China;  
2. Engineering Laboratory for National Healthcare Theories and Products of Yunnan Province, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China;  
3. School of Public Health, Kunming Medical University, Kunming 650500, China)

**ABSTRACT:** **Objective** To investigate the effects of scutellarin and its derivatives on breast cancer cells and the synergistic anti-tumor effects of scutellarin and its derivatives combined with arsenic trioxide. **Methods** Human breast cancer MDA-MB-23 cells were cultured in vitro and divided into control and test groups. Every group was set 6 wells. Test groups were treated with scutellarin and its derivatives alone and combined with 5 $\mu$ M arsenic trioxide. One of the derivatives of scutellarin is scutellarein, which is the glycone of scutellarin. Scutellarein is also the main metabolism product of scutellarin in vivo. The other derivatives of scutellarin is tetraacetyl scutellarein, which we synthesized to improve the low bioavailability of scutellarin. Inhibition of MDA-MB-23 cells proliferation was tested by MTS assays. **Results** Scutellarin alone inhibited cell proliferation in a dose-dependent manner, when scutellarein and tetraacetylscutellarein showed slight inhibition effect. It indicated that the glucuronic acid moiety of scutellarin played an important part in cell proliferation inhibition. Both scutellarin and scutellarein combined with arsenic trioxide exerted synergistic effects on proliferation inhibition in MDA-MB-231 cells in dose-dependent manners. Particularly, scutellarein did not inhibit cell proliferation alone but significantly enhance the proliferation inhibition of arsenic trioxide on MDA-MB-231 cells. **Conclusion** The combination of scutellarein and arsenic trioxide inhibits breast cancer development more effectively than each drug alone.

**KEY WORDS:** scutellarin; scutellarein; tetraacetyl scutellarein; arsenic trioxide; breast cancer

(原文见第 10 页)

## Effect of Kanglixin Capsules on Cell Cycle and Apoptosis of Gastric Cancer Cell Line

LIU Xuefang<sup>1</sup>, DONG Haoran<sup>1</sup>, ZHANG Na<sup>2</sup>, FENG Suxiang<sup>1</sup>

- (1. The Key Laboratory of Internal Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;  
2. Department of Human Anatomy and Embryology, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

**ABSTRACT:** **Objective** To observe the effects of the antitumor medicine-Kanglixin capsule on cell proliferation, cell cycle and apoptosis of the SGC-7901 cell. **Methods** After inoculated for 12, 24, 36, and 48 hours respectively, the action of Kanglixin capsule on growth inhibiting rate was detected by MTT, the DNA content of cell cycle in each phase was detected with flow cytometry and the morphologic change of cell apoptosis was observed through fluorescence microscope. **Results** The result of MTT method reveals that the inhibition rate of Kang Lixin capsule has a close time-dose-effect relationship; the flow cytometry result indicates that Kanglixin capsule can block cell cycle in G1 phase, meanwhile it decreases the percentage of cells in S phase and G2 phase; the fluorescence microscope observes that Kanglixin capsule could induce early apoptosis and late apoptosis of SGC-7901 cells. **Conclusion** The inhibition of Kanglixin capsule on SGC-7901 cell can be realized by means of blocking cell cycle and inducing the cell apoptosis.

**KEY WORDS:** Kanglixin capsule; gastric cancer cell line; inhibition in vitro; cell cycle; cell apoptosis.