

珍珠舌草胶囊全方对胃癌细胞增殖与凋亡的影响及机制研究*

谭 宝¹, 张 洁², 冯五金¹, 高丽萍¹, 智雪峰³, 苏娟萍^{1△}

(1. 山西省中医院, 山西 太原 030000; 2. 山西医科大学第二医院, 山西 太原 030000;

3. 山西中医药大学, 山西 太原 030000)

摘要: **目的** 珍珠舌草胶囊是对慢性萎缩性胃炎癌前病变具有良好临床疗效的中药复方制剂。通过珍珠舌草胶囊干预胃癌 AGS 细胞, 观察其对细胞增殖和凋亡的影响, 并对可能的作用机制进行初步探究, 从而证实珍珠舌草胶囊的抗肿瘤活性, 为临床更好地应用珍珠舌草胶囊提供理论和实验依据。**方法** 应用 MTT 法检测珍珠舌草胶囊对胃癌 AGS 细胞生长的影响; 应用流式细胞仪检测药物对胃癌 AGS 细胞周期和凋亡的影响; 比色法测定肿瘤细胞中 Caspase-3 活性水平; 药物干预期间观察细胞数量及形态变化。**结果** 珍珠舌草胶囊全方能显著抑制胃癌细胞 AGS 的生长, 并呈剂量和时间依赖性; 阻滞细胞周期于 G2/M 期, 明显促进胃癌细胞凋亡, 上调 Caspase-3 的活性水平。**结论** 珍珠舌草胶囊全方能够抑制 AGS 细胞增殖, 阻滞细胞周期于 G2/M 期, 促进细胞凋亡, 促凋亡作用可能通过提高 Caspase-3 的活性实现。

关键词: 珍珠舌草胶囊; AGS; 增殖; 凋亡; Caspase-3

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2020)03-0005-06

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2020.03.002

Effect and Mechanism of ZhenzhushECAO Capsule on Proliferation and Apoptosis of Gastric Cancer Cells

TAN Bao¹, ZHANG Jie², FENG Wujin¹, GAO Liping¹, ZHI Xuefeng³, SU Juanping¹

(1. Chinese Traditional Medicine Hospital of Shanxi Province, Taiyuan 030000, China;

2. The Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030000, China;

3. Shanxi University of Chinese Medicine, Taiyuan 030000, China)

ABSTRACT: **Objective** ZhenzhushECAO Capsule (ZZSCC), a complex prescription with clinical effect on chronic atrophic gastritis. The present study investigated the effect and mechanism of ZhenzhushECAO Capsule on proliferation and apoptosis of gastric cancer cell line AGS. **Methods** Cell viability was measured by MTT analysis. Cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry (FCM). Caspase-3 activity was measured by colorimetric method. The changes of cell morphologic appearance after treatment were observed. **Results** ZZSCC inhibited AGS cell proliferation in a dose-dependent manner, and blocked cell cycle progression at G2/M stage, and also induced cell apoptosis. ZZSCC significantly increased Caspase-3 activity after administration for 24, 48 h. **Conclusion** The whole prescription of ZZSCC could inhibit AGS cell growth, induce cell cycle arrest and apoptosis in an dose-independent manner. The apoptosis promotion effect may be related to increased Caspase-3 activity.

KEY WORDS: ZhenzhushECAO Capsule; AGS; proliferation; apoptosis; Caspase-3

收稿日期: 2020-03-16

* 基金项目: 山西省科学技术厅基础 Research 计划项目(2015011130); 山西省中医院院级课题(201401)

第一作者简介: 谭宝(1979-), 男, 副主任医师, 研究方向: 中医药防治脾胃病的临床与基础研究。

△通信作者: 苏娟萍, E-mail: sjp2861@163.com

胃癌是消化系统最常见的恶性肿瘤,全球每年新增确诊病例约 93.4 万,位居所有恶性肿瘤的第2位^[1]。胃癌是全球公认的高发病率的癌变疾病,虽然全球胃癌的发病率在下降,然而亚洲国家的胃癌致死率却仍在上升^[2],胃癌也是我国的高发疾病。研发高效、低毒的化疗新药和新的治疗方案对胃癌的治疗具有重要意义。

课题组根据传统中医理论及多年临床经验,研制出珍珠舌草胶囊,其由黄芪、枳实、白术、木香、砂仁、丹参、莪术、珍珠层粉、蒲公英、白花蛇舌草等组成,用于治疗胃癌前病变。经临床反复验证,累计治疗慢性萎缩性胃炎(CAG)患者近万例,发现其在改善慢性萎缩性胃炎临床症状,降低胃黏膜慢性炎症、肠上皮化生、异型增生、Hp 感染等方面作用显著^[3-7]。慢性萎缩性胃炎伴癌前病变和胃癌关系密切,查阅文献发现,慢性萎缩性胃炎伴癌前病变和胃癌的病因病机、治疗方法有许多相同之处^[8-10]。

珍珠舌草胶囊全方能有效治疗胃癌前病变,对胃癌可能有一定治疗效果,因此认为有必要针对珍珠舌草胶囊的抗肿瘤作用进行研究。珍珠舌草胶囊中的组成中药具有增强免疫力及抗肿瘤活性,应用珍珠舌草胶囊抗肿瘤研究具有现代药理学理论基础^[11-14]。故本研究在珍珠舌草胶囊有效治疗慢性萎缩性胃炎伴癌前病变基础上,进一步探讨其抗肿瘤作用,以期为其临床应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验细胞、试剂与仪器 AGS 细胞株购于中国科学院细胞库。Ham's/F-12 培养液购于北京鼎国昌盛生物技术有限公司;胎牛血清(FBS)购于杭州四季青生物工程有限公司;DMSO(二甲基亚砜)和 RNase A(核糖核酸酶 A)购于金科宏达生物公司;MTT 购于上海日初生物科技有限公司;PI(propidium iodide,碘化丙啉)购于美国 Sigma 公司;胰酶购于美国 Invitrogen 公司;33342/PI 试剂盒购于中国 Beyotime 公司;Annexin V 购于美国 BioVision 公司;SpectraMAX 190 微孔读板机购于美国分子仪器公司(MD, USA);FACScan 流式细胞仪购于美国 BD 公司(Becton Dickinson, USA);ModFitLT V3.0 软件和荧光显微镜

购于日本 Olympus 公司。

1.2 药物制备 珍珠舌草胶囊由黄芪、枳实、白术、木香、砂仁、丹参、莪术、珍珠层粉、蒲公英、白花蛇舌草等组成,药物由山西省中医药研究院中药房提供,生药鉴定由本研究中心完成并提供详实的鉴定报告。取珍珠舌草胶囊复方饮片 1 帖,加入 8 倍量 95%乙醇浸泡 12 h,武火煮沸后改用文火保持微沸 2 h,过滤,滤渣重新加入约 8 倍 95%乙醇,继续加热,重复提取 2 次,合并滤液,转移滤液至旋转蒸发仪,回收乙醇至不再蒸出,将提取物水浴挥干水分后转移至真空干燥箱减压低温干燥。待干燥后用研钵研成细粉备用。

1.3 胃癌 AGS 细胞培养 AGS 细胞培养在含 10% FBS、1%双抗的 Ham's/F12 完全培养基中,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。视培养液颜色和细胞生长状况决定是否换液,当细胞贴壁达 80%左右,用 0.25%胰酶溶液消化传代。

1.4 细胞活力检测 AGS 细胞以 1.0×10^4 个/mL 接种于 96 孔板内,每孔 200 μ L,贴壁 24 h 后,换上含药培养基,以含 DMSO 培养基做阴性对照,珍珠舌草胶囊药物浓度为 0.25、0.5、1.0 mg/mL,干预细胞生长 24、48 h,然后加入 20 μ L 5 mg/mL MTT 溶液,继续孵育 4 h,去除含 MTT 的培养液,加入 150 μ L DM-SO,振荡 15 min,570 nm 处测定吸光值(OD),根据公式(药物组/对照组 OD 值)*100%计算细胞活力。

1.5 细胞周期检测 AGS 细胞以 2.5×10^4 个/mL 接种于 6 孔培养板,每孔 3 mL,过夜待细胞贴壁后,将培养液换成不含血清的培养基,饥饿以同步,继续培养 24 h 后,换上不同浓度的含药培养基,珍珠舌草胶囊药物浓度为 0.25、0.5、1.0 mg/mL,细胞分别培养 24、48 h,0.25%的胰酶消化细胞,用预冷的 PBS 终止消化,吹打细胞,移入离心管中。弃上清,冷 PBS 洗 2 次,离心去 PBS,加入 1 mL PBS 重悬细胞,加入预冷的无水乙醇固定,4 ℃,6 h 以上。1 000 r/min 离心 5 min 弃去固定液,2 mL 冷 PBS 洗 2 次,离心后弃上清。4 ℃,PI 染液染色,避光孵育 30 min,流式细胞仪检测。

1.6 细胞凋亡检测 AGS 细胞以 2.5×10^4 个/mL 接种于 6 孔培养板,每孔 3 mL,贴壁 24 h 后,将培养液

换成不含血清的培养基,饥饿以同步,继续培养 24 h 后,换上不同浓度的含药培养基,珍珠舌草胶囊药物浓度为 0.25、0.5、1.0 mg/mL,细胞培养 24、48 h,到作用时间后,收集细胞上清,加 0.125%胰酶消化细胞,37 ℃约 1 min,加细胞培养液终止消化,轻柔吹打细胞,并收集细胞与上清一起,切忌损伤细胞。冰冷 PBS (4 mL)中离心,300×g,5 min,弃上清,旋涡振荡器点动分散细胞后,加入 4 mL Annexin V 结合缓冲液再次洗涤细胞,弃上清。加入 500 μL Annexin V 结合缓冲液重悬细胞,随后加入 FITC 标记的 Annexin V 1 μL(终浓度 1 μg/mL),再次点动混匀,随后冰浴 30 min,中间取出再混匀一次。染色结束后,加入 4 mL Annexin V 结合缓冲液洗涤细胞,弃上清,加入 500 μL Annexin V 结合缓冲液重悬细胞,置于冰浴中保存。上机前加入 PI(终浓度 5 μg/mL),并立即上机检测。

1.7 Caspase-3 活性检测 AGS 细胞以 2.5×10^4 个/mL 接种于 6 孔培养板,每孔 3 mL,贴壁过夜,换上不同浓度的含药培养基,珍珠舌草胶囊药物浓度为 0.25、0.5 mg/mL,细胞培养 24、48 h,0.25%胰酶消化,细胞数需达 $1 \sim 5 \times 10^6$ 个,1 500 r/min,离心 5 min,悬浮细胞于 50 μL 冰冷细胞裂解液中裂解 10 min,10 000×g 离心 1 min,收集上清,冰上放置,然后进行蛋白浓度测定,将 50~200 μg 蛋白用细胞裂解液补充至 50 μL,加入 50 μL 的 2×反应缓冲液(含 10 mM DTT),加入 5 μL 4 mM 的 DEVD-pNA (200 μM 终浓度),37 ℃孵育 1~2 h,405 nm 处测定吸光值(OD)。

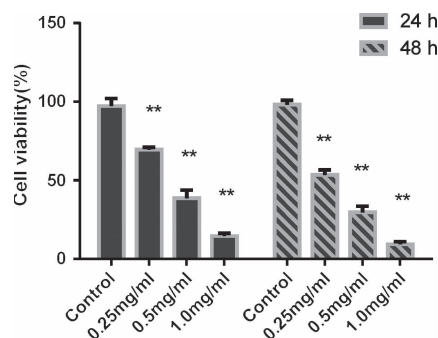
1.8 统计分析 实验数据以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用 GraphPad Prism 5.0 软件进行数据处理与分析。采用 Oneway Analysis Of Variance (One-way ANOVA)进行各组间差异比较。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 珍珠舌草胶囊全方对 AGS 细胞活力的影响

珍珠舌草胶囊干预胃癌细胞后,通过显微镜下观察,细胞数量明显减少,形态学也发生一定变化,部分细胞发生脱落、变圆,细胞壁边缘毛糙。从 MTT 结果可见,珍珠舌草胶囊干预胃癌细胞 24、48 h,能呈剂量和时间依赖性的抑制 AGS 细胞生长。与 DMSO 对照

组相比,0.25、0.5、1.0 mg/mL 的珍珠舌草胶囊干预细胞 24 h,可使 AGS 细胞活力从 69.5%下降至 14.5%;干预细胞 48 h,可使 AGS 细胞活力从 53.4%下降至 9.26%,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 1。



注:与 Control 组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 1 珍珠舌草胶囊全方对 AGS 细胞活力的影响

2.2 珍珠舌草胶囊全方对 AGS 细胞周期的影响

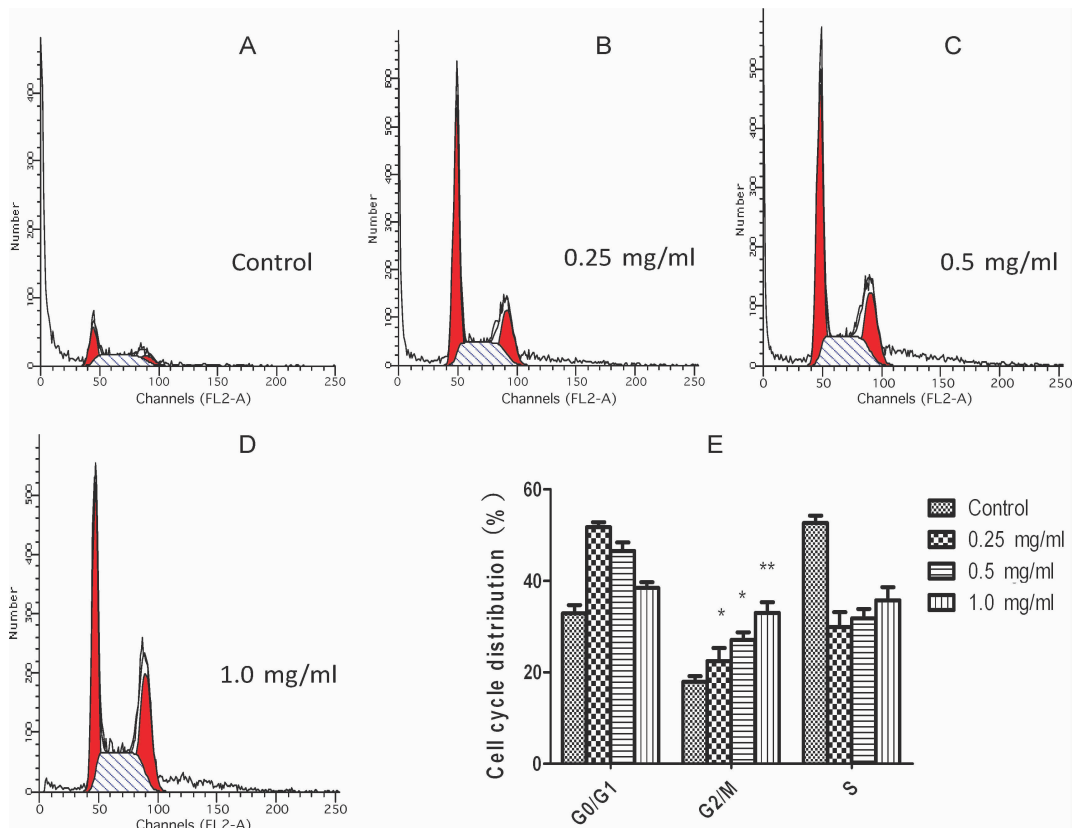
为了探讨珍珠舌草胶囊全方抑制胃癌细胞增殖的可能机制,检测了其干预胃癌细胞 24、48 h 后细胞周期的变化。结果表明,珍珠舌草胶囊全方能阻滞胃癌细胞周期于 G2/M 期,能显著增加处于 G2/M 期的细胞数,细胞数从 16.29% 上升至 29.02%,而干预胃癌细胞 48 h,G2/M 期的细胞数从 21.15% 增加到 37.67%。表明珍珠舌草胶囊全方干预细胞 24、48 h 均能阻滞胃癌细胞周期于 G2/M 期,见图 2、图 3。

2.3 珍珠舌草胶囊全方对 AGS 细胞凋亡的影响

细胞凋亡检测结果表明,珍珠舌草胶囊全方 0.25、0.5、1.0 mg/mL 干预胃癌细胞 24 h 后,早期凋亡率分别为 3.4%、10.0%、16.1%,干预 48 h 后,早期凋亡率分别为 5.4%、11.3%、20.2%,提示珍珠舌草胶囊全方促细胞凋亡有时间和剂量依赖性,与对照组相比,0.5、1.0 mg/mL 组差异具有统计学意义($P < 0.01$),见图 4、图 5。

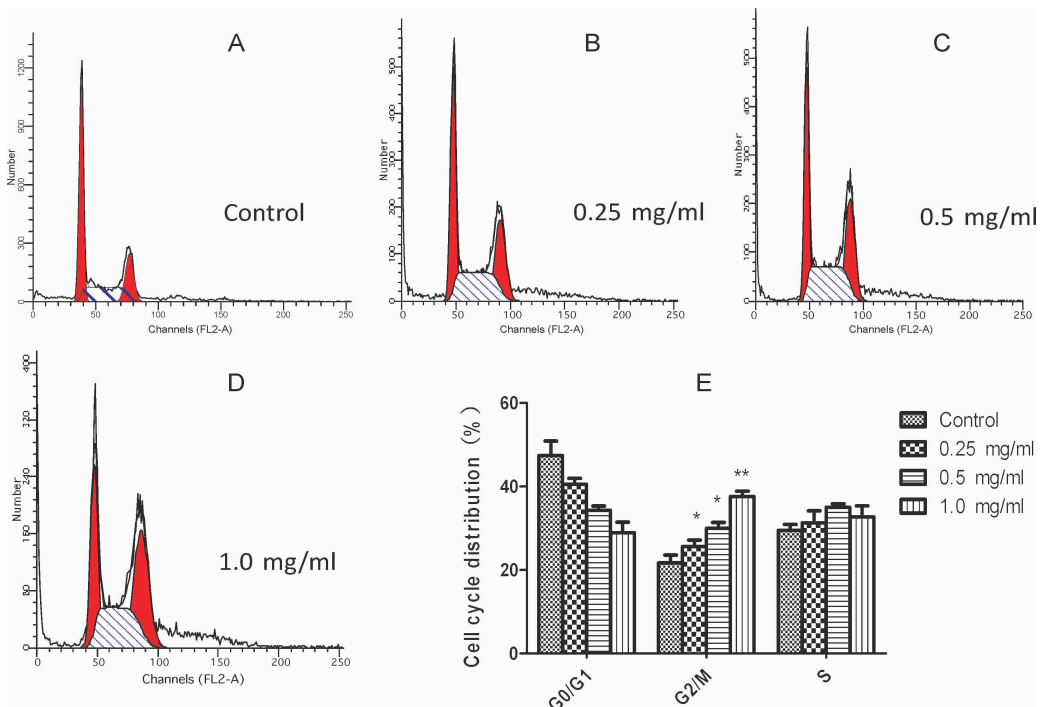
2.4 珍珠舌草胶囊全方对 Caspase-3 活性的影响

珍珠舌草胶囊全方干预 AGS 细胞 24 h,0.25、0.5 mg/mL 组 Caspase-3 的活性分别是对照组的 2.56 倍和 3.69 倍,干预 48 h 后,是对照组的 2.73 倍和 7.32 倍。提示珍珠舌草胶囊全方能呈时间和剂量依赖性地增加 Caspase-3 的活性,与对照组比较,差异具有统计学意义($P < 0.01$),见图 6。



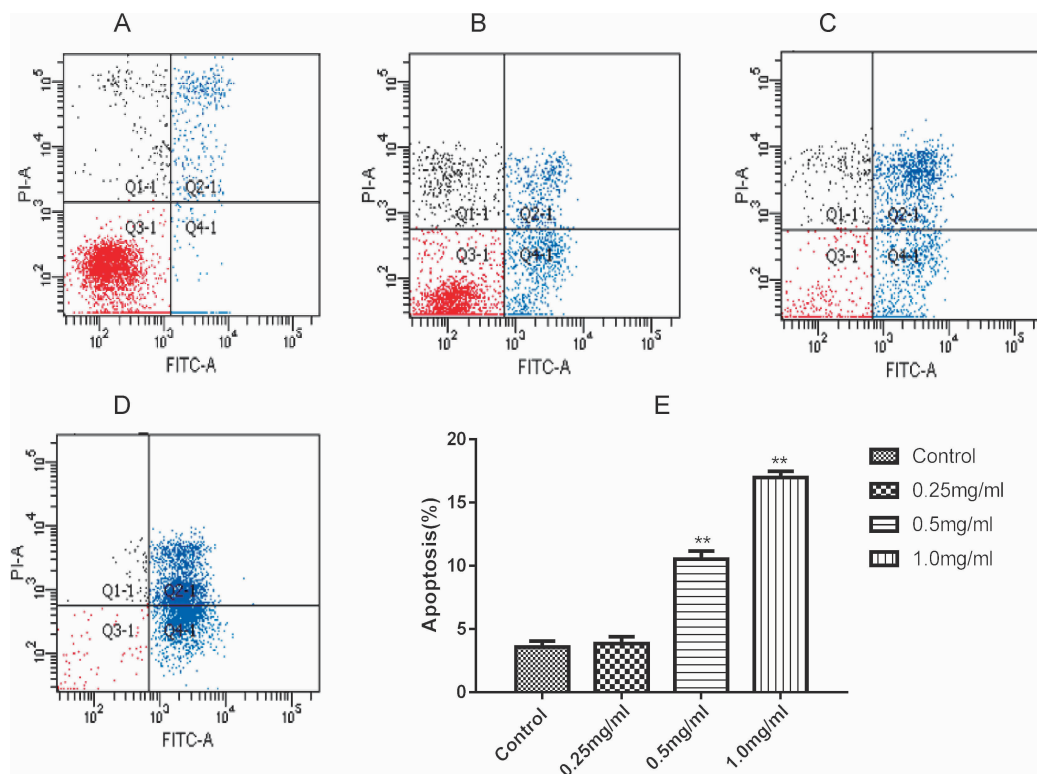
注:A. Control 组;B~D 分别为珍珠舌草胶囊全方 0.25、0.5、1.0 mg/mL 组;E. 对 A~D 的数据统计。与 Control 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图 2 珍珠舌草胶囊全方对胃癌细胞周期的影响(24 h)



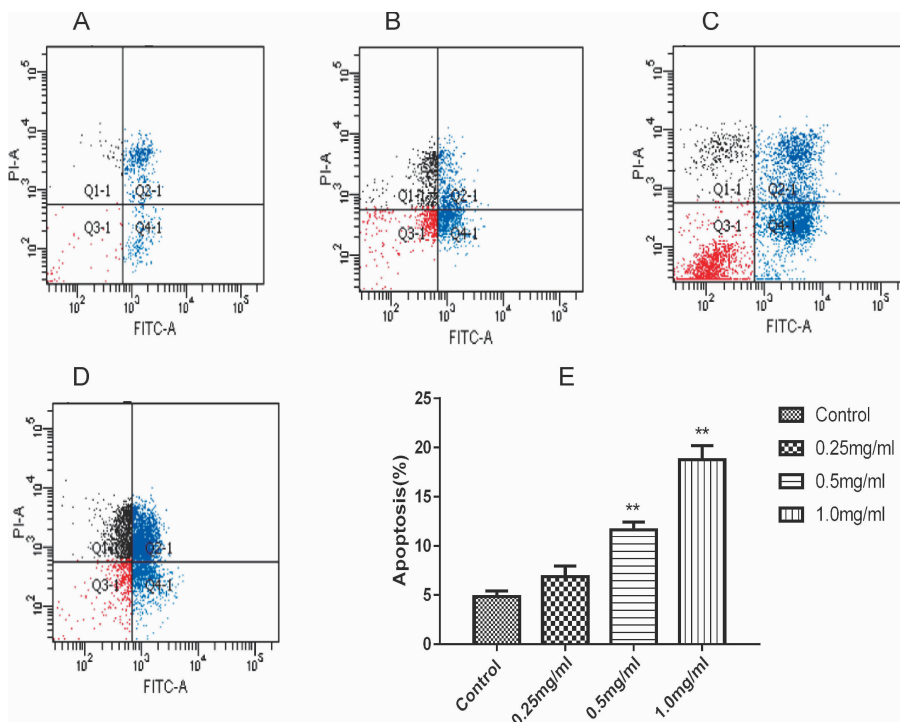
注:A. Control 组;B~D 分别为珍珠舌草胶囊全方 0.25、0.5、1.0 mg/mL 组;E. 对 A~D 的数据统计。与 Control 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图 3 珍珠舌草胶囊对胃癌细胞周期的影响(48 h)



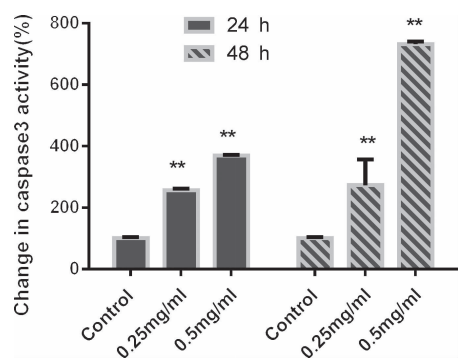
注:A. Control 组;B~D 分别为珍珠舌草胶囊全方 0.25、0.5、1.0 mg/mL 组;E. 对 A~D 的数据统计。与 Control 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图4 珍珠舌草胶囊全方醇提物对胃癌细胞早期凋亡的影响(24 h)



注:A. Control 组;B~D 分别为珍珠舌草胶囊全方0.25、0.5、1.0 mg/mL 组;E. 对 A~D 的数据统计。与 Control 组比较,** $P<0.01$ 。

图5 珍珠舌草胶囊全方醇提物对胃癌细胞细胞凋亡的影响(48 h)



注:与 Control 组比较,** $P<0.01$ 。

图 6 珍珠舌草胶囊对 Caspase-3 活性的影响

3 讨论

本研究结果表明,珍珠舌草胶囊能够抑制胃癌细胞生长,阻滞胃癌细胞周期于 G2/M 期,促进细胞凋亡,明显增强 Caspase-3 的活性。细胞增殖与凋亡的平衡对于保持胃肠粘膜的完整性具有重要意义^[15-16]。一旦这种平衡被破坏,就会诱发慢性萎缩性胃炎或胃癌前病变甚至是肿瘤。慢性萎缩性胃炎伴癌前病变是胃癌的重要诱发因素,因为重症胃炎破坏了胃粘膜的上皮细胞,最终正常的胃粘膜上皮细胞被具有较高增殖率的肠上皮细胞和异型增生细胞取代,导致了慢性肠化生和异型增生的出现。肠化生和异型增生打破了正常胃粘膜细胞增殖与凋亡的平衡,增加了胃癌的发生机率^[17]。目前缺乏治疗胃癌伴癌前病变的有效药物,而中医药治疗该病取得了较好的临床效果。

珍珠舌草胶囊为临床经验方,可以有效治疗慢性萎缩性胃炎伴癌前病变,对胃癌前病变细胞的增殖有良好的阻断作用。周期阻滞和诱导凋亡是抑制细胞生长的两个重要因素^[18-19]。死亡受体和线粒体依赖途径是细胞凋亡的主要途径^[20]。Caspase-3 是这两条途径的一个主要环节,因此它在细胞凋亡中起到非常重要的作用。细胞凋亡是在基因控制下的细胞自我消亡过程,肿瘤的形成一方面是增殖分化异常,分化不良增殖过度,另一方面是诱导凋亡的基因突变,抑制凋亡的基因过度表达使得凋亡不足^[21]。珍珠舌草胶囊全方干预 AGS 细胞 24、48 h 后,Caspase-3 的活性均明显升高,并且作用呈现出一定的时间和剂量依赖性。提示珍珠舌草胶囊促进 AGS 细胞凋亡,可能与其增强了 Caspase-3 的活性有关。

分析以上结果可知,珍珠舌草胶囊全方能够抑制 ACS 细胞生长,其抑制细胞增殖的作用可能与阻滞细胞周期,促进胃癌细胞凋亡有关,而促凋亡作用可能通过升高 Caspase-3 的活性实现。上述结果说明,珍珠舌草胶囊在体外实验中具有一定的抗肿瘤活性,下一步将进行拆方研究,进一步明确抗肿瘤有效成分,为临床更好地应用珍珠舌草胶囊提供理论和实验依据。

参考文献:

- [1] PARKIN D M, BRAY F, FERLAY J, et al. Global cancer statistics,2002 [J]. CA Cancer J Clin,2005,55(2): 74-108.
- [2] HU P J, YU J, ZENG Z R, et al.Chemoprevention of gastric cancer by celecoxib in rats[J]. Gut,2004,53(2): 195-200.
- [3] 李聚林,冯五金.冯五金教授治疗慢性萎缩性胃炎癌前期病变经验探析[J].山西中医学院学报,2010,11(6): 41-42.
- [4] 冯五金,李玉莲,苏娟萍.中药治疗胃癌前期病变 61 例临床报告[J].中国医药学报,1997(6):26-28.
- [5] 斛丽梅,冯五金.珍珠蛇草胶囊防治胃癌前病变临床疗效观察[J].中医临床研究,2011,3(23):53-54.
- [6] 单崇武.珍珠舌草胶囊治疗慢性萎缩性胃炎 76 例临床观察[J].中医药通报,2011,10(4):53-55.
- [7] 王艳蓉.珍珠舌草胶囊对萎缩性胃炎胃蛋白酶原及胃泌素影响的临床研究 [D].太原:山西省中医药研究院,2014.
- [8] 张云桐,谢琪.慢性萎缩性胃炎癌前病变病因病机研究进展[J].世界最新医学信息文摘,2019,19(8):130-131.
- [9] 魏玮,史海霞,来要良.中医对慢性萎缩性胃炎及胃癌前病变的研究概况 [J].中华中医药杂志,2008(2): 151-153.
- [10] 赵彬.慢性萎缩性胃炎胃黏膜中医微观辨证与癌前病变的特征分析[J].新中医,2018,50(3):149-153.
- [11] 陈璇,东方.黄芪抗肿瘤机制研究进展及临床应用[J].黑龙江医药,2014,27(1):95-98.
- [12] 沈国庆.白术化学成分及抗肿瘤有效部位研究[D].北京:北京中医药大学,2008.

(下转第 33 页)

- 京:人民卫生出版社,2020:1-50.
- [12] 巴元明,李晓东,闵晓俊,等. 湖北省中医院新型冠状病毒肺炎中医药防治方案(第三版)[J]. 湖北中医杂志, 2020,42(2):7-8.
- [13] 丁丽丽,施松善,崔健,等. 麻黄化学成分与药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志,2006,31(20):1661-1664.
- [14] 李露,戴婷,李小龙,等. 苦杏仁苷药理作用的研究进展[J]. 吉林医药学院学报,2016,37(1):63-66.
- [15] 褚秀玲,苏建青,韦旭斌. 中草药抗病毒的研究动态及思路[J]. 湖北农业科学,2009,48(5):1253-1256.
- [16] 李连达,张金艳,李贻奎,等. 积极发挥中医中药治疗流感的优势[J]. 中医杂志,2009,50(11):970-972.
- [17] 国家卫生健康委员会办公厅, 国家中医药管理局办公室. 关于印发新型冠状病毒肺炎恢复期中医康复指导建
- 议(试行)的通知[EB/OL]. (2020-02-23). <http://yzs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2020-02-23/13319.html>.
- [18] 王宁.健康报独家专访全小林院士:中医治疗方案即将更新(附中医预防处方)[N/OL]. 健康报,(2020-01-26). <https://mp.weixin.qq.com/s/OSPjdLKu2Gjyxxh3-HfDdw>.
- [19] 张兰凤,陈建群,彭齐林,等. 新型冠状病毒肺炎疫情期间护理院的应急管理与防护措施[J]. 实用临床医药杂志,2020,24(3):121-123.
- [20] 张侠,李柳,戴广川,等. 南京地区42例新型冠状病毒肺炎临床特征及中医证候初探[J]. 南京中医药大学学报, 2020,36(2):145-148.
- [21] 任培华,李振球,朱汉平,等. 基于“温疫理论”探讨新型冠状病毒肺炎的中医证治规律[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版),2020,41(2):144-150.

(上接第10页)

- [13] 于莉. 白花蛇舌草抗肿瘤活性成分的研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学,2009.
- [14] 熊富良,吴珊珊,李心愿,等. 蒲公英抗肿瘤活性的研究进展[J]. 中国药师,2016,19(7):1363-1366.
- [15] EL-ZIMAITY H M, OTA H, GRAHAM D Y, et al. Patterns of gastric atrophy in intestinal type gastric carcinoma[J]. Cancer,2002,94(5):1428-1436.
- [16] EL-ZIMAITY H. Gastritis and gastric atrophy[J]. Curr Opin Gastroenterol,2008,24(6):682-686.
- [17] KUIPERS E J. Review article: relationship between *Helicobacter pylori*, atrophic gastritis and gastric cancer[J]. Aliment Pharmacol Ther,1998(Suppl .1):25-36.
- [18] TYSON J J, NOVAK B, CHEN K, et al. Checkpoints in the cell cycle from a modeler's perspective [J]. Prog Cell Cycle Res,1995,1:1-8.
- [19] CHOI M S, YUK D Y, OH J H, et al. Berberine inhibits human neuroblastoma cell growth through induction of p53-dependent apoptosis [J]. Anticancer Res, 2008, 28(6A):3777-3784.
- [20] 陈瑜. 死亡受体及线粒体途径与激活诱导T细胞凋亡[J]. 国外医学(免疫学分册),2003(1):27-30.
- [21] 孟捷. 慢性萎缩性胃炎证候规律探讨和消痞颗粒治疗慢性萎缩性胃炎癌前病变的机理研究[D]. 北京:北京中医药大学,2005.