

- quencing by specific capture of multiple genomic loci using low - volume microfluidic DNA arrays[J]. Anal Bioanal Chem, 2009, 393(1): 171 - 175
- 5 Trick M, Long Y, Meng J, *et al.* Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery in the polyploid Brassica napus using Solexa transcriptome sequencing[J]. Plant Biotechnol J, 2009, 7 (4): 334 - 346
- 6 Hanriot L, Keime C, Gay N, *et al.* A combination of LongSAGE with Solexa sequencing is well suited to explore the depth and the complexity of transcriptome[J]. BMC Genomics, 2008, 9: 418 - 426
- 7 Euskirchen GM, Rozowsky JS, Wei CL, *et al.* Mapping of transcription factor binding regions in mammalian cells by ChIP: comparison of array - and sequencing - based technologies[J]. Genome Res, 2007, 17: 898 - 909
- (收稿: 2011 - 09 - 30)
(修回: 2011 - 11 - 02)

蔡氏扶正消癥汤联合奥沙利铂抑制胃癌生长的研究

王海波 蔡慎初 徐晓峰 吴式琇 黄庆科

摘要 目的 探讨蔡氏扶正消癥汤联合奥沙利铂对体内外胃癌生长的影响及其机制。**方法** 奥沙利铂、蔡氏扶正消癥汤及联合用药作用人胃癌细胞株 SGC - 7901 后, CCK - 8 法检测细胞增殖; 流式细胞术检测细胞凋亡; Western blotting 检测胃癌细胞中 Bax 和 Bcl - 2 的表达; 建立裸鼠胃癌皮下移植瘤模型, 分别给予奥沙利铂、蔡氏扶正消癥汤及联合治疗, 实验结束后分别测量各组裸鼠皮下移植瘤重量后计算抑瘤率; 免疫组织化学法检测各组裸鼠肿瘤组织中 Bax 和 Bcl - 2 的表达。**结果** 蔡氏扶正消癥汤可明显增强奥沙利铂对体外胃癌细胞的增殖抑制和凋亡诱导作用; 同时蔡氏扶正消癥汤联合奥沙利铂可显著抑制裸鼠胃癌皮下移植瘤生长, 与对照组和奥沙利铂组相比较均有显著性差异 ($P < 0.05$); 蔡氏扶正消癥汤联合奥沙利铂可分别上调和下调 Bax 和 Bcl - 2 在体内外胃癌中的表达。**结论** 蔡氏扶正消癥汤可增强奥沙利铂对体内外胃癌生长的抑制作用, 该作用可能通过上调 Bax 表达和下调 Bcl - 2 表达而实现。

关键词 胃癌 奥沙利铂 蔡氏扶正消癥汤 Bax Bcl - 2

Cai's - fu - zheng - xiao - zheng Decoction Potentiates Antitumor Activity of Oxaliplatin in Gastric Cancer *in vitro* and *in vivo*. Wang Hai-bo, Wu Shixiu, Huang Qingke. The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To investigate the effect and the mechanism of cai's - fu - zheng - xiao - zheng decoction in the growth inhibition of gastric cancer by oxaliplatin. **Methods** After human gastric cancer cell line SGC - 7901 was treated with cai's - fu - zheng - xiao - zheng decoction, oxaliplatin and cai's - fu - zheng - xiao - zheng decoction combined oxaliplatin, the cellular proliferation was detected by Cell Counting Kit - 8 (CCK - 8) assay. The flow cytometry (FCM) was used to determine apoptosis in gastric cancer cells. Western blotting was used to detect the protein expression of Bax and Bcl - 2. SGC - 7901 cells were injected subcutaneously into nude mice to establish gastric xenograft tumors. Tumor weight and inhibition rate were evaluated respectively after the mice were sacrificed. Immunohistochemistry was used to detect the positive expression of Bax and Bcl - 2 in the xenograft tumors. **Results** Cai's - fu - zheng - xiao - zheng decoction combined with oxaliplatin induced a higher percentage of growth inhibition and apoptosis in gastric cancer cell line SGC - 7901 than that of oxaliplatin alone. The expression of Bax and Bcl - 2 were up - regulated and down - regulated, respectively in human gastric cancer SGC - 7901 cells after co - treatment of cai's - fu - zheng - xiao - zheng decoction plus oxaliplatin. The final tumor volumors showed significant decrease in the cai's - fu - zheng - xiao - zheng decoction plus oxaliplatin group compared with control or with oxaliplatin alone. Compared with the control and oxaliplatin alone, being treated with combination significantly increased the expression of Bax in tumor tissues, but the positive expression of Bcl - 2 was decreased. **Conclusion** Cai's - fu - zheng - xiao - zheng decoction could potentiate the growth inhibition of gastric cancer induced by oxaliplatin, which may be related to up - regulation of Bax and down - regulation of Bcl - 2.

Key words Gastric neoplasm; Oxaliplatin; Cai's - fu - zheng - xiao - zheng decoction; Bax; Bcl - 2

基金项目: 浙江省中医药管理局基金资助项目 (2009CA074)

作者单位: 325000 浙江省温州医学院附属第一医院

通讯作者: 王海波, 电子信箱: hosrml@163.com

当前我国胃癌的防治现状是“三高三低”: 发病率、病死率高、转移率高, 早期诊断率低、手术根治率低、5 年生存率低。化疗作为治疗胃癌重要的治疗

方式,特别是对无法切除的胃癌病人中占主导地位,虽然近 10 年来胃癌的化疗效果得到长足的进步,但至今仍无国际统一的“金标准”方案,与此同时,肿瘤耐药、免疫抑制等因素使多数体质虚弱的患者无法按期进行化疗,而中医药在治疗胃癌上有抑瘤、调节免疫、延长带瘤生存期、提高生存质量、减轻化疗不良反应等优势^[1-3]。

蔡氏扶正消癥汤系国家级名老中医蔡慎初教授所创。本课题组前期研究发现,蔡氏扶正消癥汤能有效抑制人胃癌 SGC-7901 细胞增殖^[4]。本研究拟进一步探讨蔡氏扶正消癥汤单独及联合奥沙利铂对体内外胃癌生长的抑制作用,并初步探讨其可能机制,为蔡氏扶正消癥汤的临床应用提供一定的实验参考。

材料与方法

1. 材料:奥沙利铂(江苏恒瑞公司);胎牛血清、RPMI-1640 培养基和含 EDTA 胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒和 CCK-8 试剂盒(上海碧云天生物技术研究所);Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物发展有限公司);Bax、Bcl-2 和 β -actin 抗体(美国 Abcam 公司);免疫组化 SP 试剂盒(北京中山金桥公司)。

2. 细胞培养:人胃癌细胞株 SGC-7901 购自中国科学院上海生化和细胞生物研究所。将 SGC-7901 细胞接种于含 10% 胎牛血清、100 μ g/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 RPMI-1640 培养液中,置 37℃、体积分数 5% 的 CO₂、饱和湿度的培养箱中培养,每 2 天换液 1 次,生长至 70%~80% 培养瓶面积时胰蛋白酶消化传代。

3. 实验动物:BALB/c 裸鼠 40 只,雄性,体重 18~22g,鼠龄 4~5 周,温州医学院动物实验中心提供,饲养于该动物实验中心 SPF 屏障系统洁净层流架内。

4. 蔡氏扶正消癥汤水煎剂的制备:蔡氏扶正消癥汤由黄芪、人参、温莪术、藤梨根、露蜂房、八月札、白毛根、徐长卿、全蝎等药物组成。药材经三蒸水漂洗 3 次,置烧杯中煎煮 30min 去渣,8 层纱布过滤,60~80℃ 隔水蒸,浓缩成生药 1g/ml,并调节 pH 值 7.0~7.2 后 4℃ 保存备用,临用前再以 3000r/min 离心 5min 去渣。

5. CCK-8 法检测细胞增殖:收集处于对数生长期的 SGC-7901 细胞,在 96 孔培养板每孔接种 4×10^3 个细胞,过夜贴壁后分别加入 25 μ g/ml 的奥沙利铂、20mg/ml 的蔡氏扶正消癥汤生药及两药联合作用,每组 6 个复孔,继续培养 24 h,同时设置空白调零组(不加细胞加入等量的 PBS)。按照试剂盒说明各孔加入 CCK-8 溶液 10 μ l,酶标仪测各组 A450 值后计算细胞存活率。细胞存活率(%)=(实验组 A450 值-空白调零 A450 值)/(对照组 A450 值-空白调零 A450 值) $\times$ 100%。

6. Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡:收集处于对数生长期 SGC-7901 细胞,药物处理同上,按试剂盒说明用

500 μ l Binging Buffer 重悬细胞,分别加入 5 μ l Annexin V-FITC 和 5 μ l PI 后混匀,室温下避光 10 min 后流式细胞仪检测细胞早期凋亡率。

7. Western blotting 检测细胞中 Bax 和 Bcl-2 表达:25 μ g/ml 的奥沙利铂、20 mg/ml 的蔡氏扶正消癥汤生药及两药联合处理对数生长期的 SGC-7901 细胞 24h 后,胰酶消化,4℃ 下 1000r/min 离心 5min 收集细胞,加入细胞裂解液(含 50mmol/L Tris pH 8.0,150mmol/L NaCl,1mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA) pH 8.0,0.1% 十二烷基酸钠(SDS),1% Triton X-100)在冰上裂解细胞 30min,4℃ 下 12000r/min 离心 15min,收集细胞裂解液,以 Bradford 比色法测定蛋白质浓度。取等量蛋白质(30 微克/孔)以 12% 分离胶电泳分离蛋白,5% 脱脂奶 4℃ 封闭过夜后滴加兔抗人 Bax 和 Bcl-2 抗体为第一抗体,HRP 标记的羊抗兔 IgG 为第二抗体,ECL 显色,X 线胶片曝光。

8. 人胃癌裸鼠移植瘤的建立和给药方案:取 5×10^6 个对数生长期的 SGC-7901 细胞悬浮于 0.2ml 无血清 1640 培养基中,注射到裸鼠腋部皮下建立人胃癌裸鼠移植瘤模型,共制备 40 只胃癌皮下移植瘤模型,将荷瘤裸鼠随机分为对照组、奥沙利铂组、蔡氏扶正消癥汤组和联合组($n=10$):对照组每只裸鼠腹腔内注射生理盐水 0.2ml;蔡氏扶正消癥汤给药采用灌胃,剂量为 10g/kg 体重,相当于人体给药剂量的 5 倍,每日 1 次,连续使用 30 天;奥沙利铂给药采用腹腔内注射,剂量为 5mg/kg 体重,隔天给药 1 次,连用 7 次。蔡氏扶正消癥汤给药结束后 14 天,处死动物并仔细剥离肿瘤组织,称重后计算抑瘤率。抑瘤率(%)=(1-治疗组平均瘤重/对照组平均瘤重) $\times$ 100%

9. 免疫组织化学法检测肿瘤组织中 Bax 和 Bcl-2 表达:所有标本均经 10% 甲醛常规固定、石蜡包埋,5 μ m 厚度连续切片。按照免疫组化 SP 试剂盒说明书进行免疫组化染色,并以 PBS 代替一抗作为阴性对照。高倍镜($\times 400$)下随机选择 5 个视野,每个视野计数 200 个细胞,共计数 1000 个细胞。结果判定标准为:无阳性细胞为阴性(-),阳性细胞数 < 10% 为弱阳性(+),10%~50% 为中度阳性(++),> 50% 为强阳性(+++)。Bcl-2 以细胞质或胞膜呈棕黄色颗粒为阳性,Bax 蛋白以细胞质有棕黄色颗粒为阳性。

10. 统计学方法:实验所得计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示,应用 SPSS 11.0 统计软件进行方差检验、秩和检验和 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 蔡氏扶正消癥汤和奥沙利铂对 SGC-7901 细胞增殖和凋亡的变化:25 μ g/ml 的奥沙利铂、20mg/ml 的蔡氏扶正消癥汤生药及两药联合处理 SGC-7901 细胞 24h 后,细胞存活率分别为 81.26% $\pm$ 10.26%、75.12% $\pm$ 8.95% 和 57.56% $\pm$ 5.56%,联合用药组与各单药组以及对照组相比较,均有显著性差异($P < 0.05$);蔡氏扶正消癥汤联合奥沙利铂作用 24h 诱

导 $19.65\% \pm 2.08\%$ 的胃癌细胞发生早期凋亡,与蔡氏扶正消癥汤单药组 $12.35\% \pm 1.67\%$ 和奥沙利铂组 $7.77\% \pm 1.21\%$ 以及对照组 $2.14\% \pm 0.56\%$ 相比较,均有显著性差异 ($P < 0.05$),蔡氏扶正消癥汤组和奥沙利铂组细胞早期凋亡率均明显高于对照组 ($P < 0.05$)。

2. 蔡氏扶正消癥汤和奥沙利铂对 SGC-7901 细胞中 Bax 和 Bcl-2 表达的影响:如图 1 所示,与对照组相比较,奥沙利铂和蔡氏扶正消癥汤均可上调 SGC-7901 细胞中 Bax 的表达水平,联合用药组中 Bax 蛋白表达升高更明显;而奥沙利铂对 SGC-7901 细胞中 Bcl-2 表达无明显抑制作用,但蔡氏扶正消癥汤单独及联合奥沙利铂可显著抑制 SGC-7901 细胞中 Bcl-2 蛋白的表达。

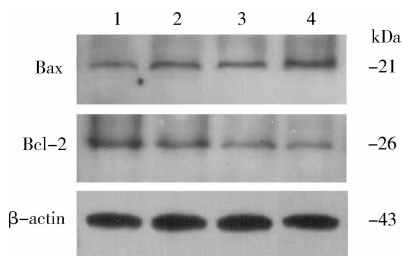


图 1 Western blotting 检测蔡氏扶正消癥汤和奥沙利铂对胃癌 SGC-7901 细胞中 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响以 β -actin 为内参;1. 对照组;2. 奥沙利铂组;3. 蔡氏扶正消癥汤组;4. 联合用药组

3. 奥沙利铂和蔡氏扶正消癥汤对裸鼠胃癌皮下

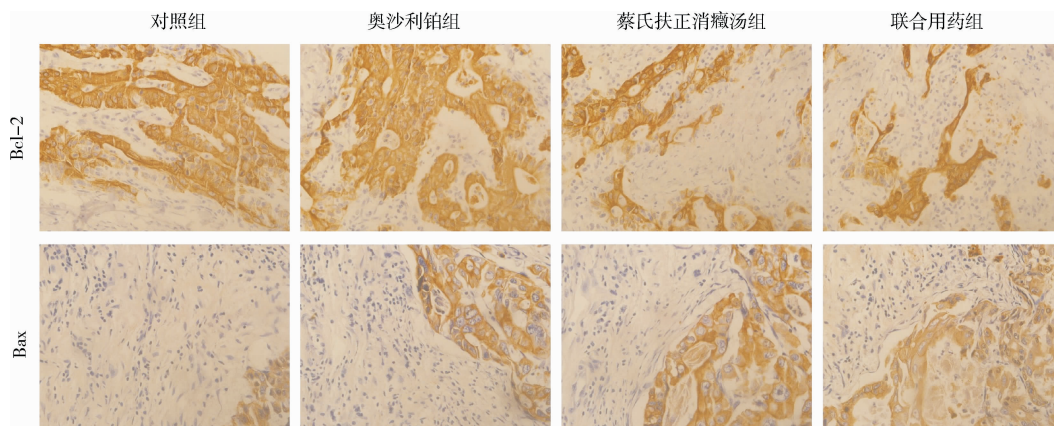


图 2 免疫组织化学法检测奥沙利铂和蔡氏扶正消癥汤对裸鼠胃癌皮下移植瘤中 Bax 和 Bcl-2 表达的影响 ($\times 400$)

讨 论

目前,化疗是治疗胃癌的主要手段之一,奥沙利铂作为治疗胃癌的一线化疗药物之一,但奥沙利铂单独治疗胃癌的效果不理想,同时化疗的不良反应较

移植瘤生长的抑制作用:治疗结束后,各组鼠重均有不同程度的降低,对照组、奥沙利铂组、蔡氏扶正消癥汤组和联合用药组裸鼠体重下降分别为 $0.26 \pm 0.11\text{g}$ 、 $1.1 \pm 0.34\text{g}$ 、 $0.35 \pm 0.06\text{g}$ 和 $0.46 \pm 0.16\text{g}$,联合用药组裸鼠体重下降明显低于奥沙利铂单药组 ($P < 0.05$);另外奥沙利铂组裸鼠治疗期间均出现不同程度腹泻和裸鼠脱水等不良反应,但疗程结束也随之停止,而蔡氏扶正消癥汤组和联合用药组裸鼠的胃肠道反应则较奥沙利铂组明显减轻,仅 30% 裸鼠出现少量稀便 ($P < 0.05$)。实验第 34 天处死动物,奥沙利铂组肿瘤平均重量为 $0.41 \pm 0.15\text{g}$,与对照组 $0.78 \pm 0.23\text{g}$ 相比较有统计学意义 ($P < 0.05$),抑瘤率为 47.43%;蔡氏扶正消癥汤组肿瘤平均重量为 $0.70 \pm 0.21\text{cm}^3$,与对照组相比较无统计学意义 ($P > 0.05$);联合用药组肿瘤平均重量为 $0.26 \pm 0.08\text{g}$,抑瘤率为 66.67%,与对照组和各单药组相比较,均有显著性差异 ($P < 0.05$)。

4. 奥沙利铂和蔡氏扶正消癥汤对裸鼠胃癌皮下移植瘤组织中 Bax 和 Bcl-2 表达的影响:免疫组织化学染色可见对照组中大量细胞 Bcl-2 呈阳性表达,少数细胞 Bax 呈阳性表达(图 2);与对照组相比较,奥沙利铂组中 Bax 蛋白阳性表达细胞比率增加,而 Bcl-2 阳性表达无明显影响;蔡氏扶正消癥汤组肿瘤组织中 Bax 和 Bcl-2 的表达相对对照组分别上调和下调;与对照组相比较,联合用药组中 Bcl-2 阳性表达细胞显著减少,而 Bax 阳性表达细胞明显增多。

大^[2]。因此寻求一种安全有效的方法增强传统化疗药物奥沙利铂在胃癌中的疗效受到越来越多的关注。祖国传统中医药在治疗胃癌方面有其自身的优点:症状改善显著,不良反应小,全身状态保持较好,病情发

展较慢,病人肿瘤相关指标可下降,肿瘤亦可缩小或带瘤较长期生存^[3]。因此中医药抗肿瘤研究成为当前研究的热点之一。

本课题组前期研究发现,蔡氏扶正消癥汤不仅能有效抑制人胃癌 SGC-7901 细胞增殖,还有抑制胃癌血管生成的作用^[4,5]。本研究中笔者发现蔡氏扶正消癥汤对人胃癌细胞株 SGC-7901 有明确的增殖抑制作用,同时流式细胞术结果表明蔡氏扶正消癥汤作用人胃癌 SGC-7901 细胞后诱导更多的早期凋亡细胞,从而表明蔡氏扶正消癥汤对人胃癌 SGC-7901 细胞生长抑制方式可能是以诱导细胞凋亡方式为主;同时本研究表明蔡氏扶正消癥汤可增强奥沙利铂对体外胃癌细胞的增殖抑制和凋亡诱导作用。为进一步验证蔡氏扶正消癥汤单独及联合奥沙利铂对体内胃癌生长抑制作用,笔者建立裸鼠胃癌皮下移植瘤模型,体内实验结果表明蔡氏扶正消癥汤单独对体内胃癌皮下移植瘤无明显生长抑制作用,考虑到中药抗肿瘤治疗起效较慢,可能与本次体内实验时间安排过短有一定关系;但蔡氏扶正消癥汤可显著增强奥沙利铂对体内胃癌生长抑制作用,表明蔡氏扶正消癥汤确切的抗体内胃癌生长的疗效;同时在本次体内实验期间,奥沙利铂表现出一定的不良反应,但蔡氏扶正消癥汤不仅对实验动物未表现出明显的不良反应,同时可削弱奥沙利铂对瘤荷裸鼠的不良反应,进一步表明蔡氏扶正消癥汤在增强传统化疗药物疗效的同时,还可提高传统化疗药物治疗上的安全性,显示出蔡氏扶正消癥汤应用于胃癌治疗中的可喜前景。

鉴于目前祖国传统中医药应用于恶性肿瘤治疗中鲜有机制探讨,本研究中,笔者探讨了 Bax/Bcl-2 在蔡氏扶正消癥汤联合奥沙利铂在治疗体内外胃癌中的作用。在细胞凋亡过程中,Bcl-2 家族起到重要的双重调节作用,凋亡抑制蛋白 Bcl-2 能阻止细胞通过线粒体通道途径发生凋亡,而另一 Bcl-2 家族蛋白成员 Bax 能对抗凋亡抑制蛋白 Bcl-2 的作用,从而诱导细胞发生凋亡^[6];最新研究表明,百里醌可通过抑制 Bcl-2 的表达从而增强奥沙利铂对恶性肿瘤细胞的增殖抑制作用,同时对正常细胞无明显

不良反应^[7]。在本试验中,蔡氏扶正消癥汤不仅能上调体外胃癌细胞中 Bax 表达水平,还能抑制 Bcl-2 的表达;另外蔡氏扶正消癥汤联合奥沙利铂后更显著上调 Bax 和下调 Bcl-2 在胃癌细胞中的表达;同时笔者在裸鼠胃癌皮下移植瘤中也观察到类似的结果,从而表明蔡氏扶正消癥汤能调控 Bcl-2 家族蛋白,从而发挥抑制体内外胃癌生长的效应。

综上所述,在本研究首次表明,蔡氏扶正消癥汤不仅可明显增强奥沙利铂对体外胃癌的生长抑制作用;同时体内实验也表明蔡氏扶正消癥汤应用于胃癌治疗的安全性和有效性;蔡氏扶正消癥汤单独或联合奥沙利铂还可上调 Bax 和下调 Bcl-2 在体外胃癌细胞以及体内胃癌皮下移植瘤组织中的表达。因此,笔者推断,蔡氏扶正消癥汤可靶向调节 Bax 和 Bcl-2 在胃癌中的表达,从而诱导胃癌细胞凋亡,进而增强奥沙利铂对体内外胃癌的抑制作用,而蔡氏扶正消癥汤联合奥沙利铂有望成为新的治疗方案应用于临床胃癌治疗。

参考文献

- 1 Jansen EP, Boot H, Dubbelman R, *et al.* Postoperative chemoradiotherapy in gastric cancer – a Phase I/II dose – finding study of radiotherapy with dose escalation of cisplatin and capecitabine chemotherapy [J]. *Br J Cancer*, 2007, 97(6):712–716
- 2 王婧,田劭丹,陈信义. 晚期胃癌治疗进展 [J]. *中国肿瘤临床*, 2010, 37(3):171–175
- 3 孙大志,许玲,姜林娣,等. 中医药治疗胃癌临床研究文献质量的调查评价 [J]. *中国临床医学*, 2003, 10(6):833–835
- 4 郎玮,谢泳冰,叶人,等. 扶正消癥方药液诱导胃癌细胞凋亡的实验研究 [J]. *中国中医药科技*, 2006, 13(5):296–298
- 5 王海波,叶人,郎玮,等. 蔡氏扶正消癥汤抑制胃癌血管生成的机制研究 [J]. *上海中医药大学学报*, 2006, 20(2):49–51
- 6 Su YT, Chang HL, Shyue SK, *et al.* Emodin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through a reactive oxygen species – dependent mitochondrial signaling pathway [J]. *Biochem Pharmacol*, 2005, 70(2):229–241
- 7 Banerjee S, Kaseb AO, Wang Z, *et al.* Antitumor activity of gemcitabine and oxaliplatin is augmented by thymoquinone in pancreatic cancer [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(13):5575–5583

(收稿:2011-04-07)

(修回:2011-04-12)

欢迎订阅

欢迎赐稿