

方药研究

半夏泻心方配伍与诱导 BGC-823 细胞凋亡关系的血清药理学研究

刘喜平¹ 李沛清¹ 席时燕¹ 李雪萍² 梁涛²

摘要 目的:研究半夏泻心方不同配伍药组含药血清对 BGC-823 细胞凋亡的影响及其机制。方法:采用 MTT 法观察半夏泻心方配伍药组含药血清对 BGC-823 细胞增殖的影响,采用 DNA 凝胶电泳检测细胞凋亡、S-P 免疫组化法检测凋亡相关基因 bcl-2 的表达。结果:半夏泻心方配伍中辛开组、苦降组和由其组成的辛苦组可明显抑制 BGC-823 细胞的生长,显著优于辛甘组、苦甘组、甘补组和全方组,呈剂量-效应关系,其含药血清浓度在 10% 作用 48 小时后, DNA 琼脂糖凝胶电泳可见较典型的“梯状带”,可使 bcl-2 基因的表达下调。结论:半夏泻心方中辛开、苦降的配伍形式具有抑制 BGC-823 细胞增殖,诱导细胞凋亡作用,辛开、苦降配伍后(辛苦)有显著的协同增效趋势,而其他配伍药群可能存在拮抗作用。提示辛开苦降法可能是中医药防治胃癌的主要治则治法之一。

主题词 细胞凋亡/药物作用 半夏泻心汤/药理学 @ 血清药理学

Serum Pharmacological Study on Relationship between Different Combinations of Banxia Xiexin Recipe and Inducing Apoptosis of BGC-823 Cells

Liu Xiping, Li Peiqing, Xi Shiyan, et al.

(Basic Medical College, Gansu College of TCM, Lanzhou 720050)

Objective: To study the effects of medicine-containing serum for different combinations of Banxia Xiexin Recipe on BGC-823 cell apoptosis and its mechanisms. **Methods:** MTT method was used to observe effects of medicine-containing serum for different combinations of Banxia Xiexin Recipe on proliferation of BGC-823 cells, DNA gel electrophoresis used to detect cellular apoptosis, and S-P immunohistochemical method used to investigate expression of apoptosis-related gene bcl-2. **Results:** Growth of BGC-823 cells was significantly inhibited in the pungent-opening group, the bitter-descending group and the pungent-bitter group, which was significantly higher than that in the pungent-sweet group, bitter-sweet group, the sweet-invigorating group and the complete recipe group ($P < 0.05$), with a dose-effect relation. After action of 10% medicine-containing serum for 48 hours, a more typical "scalariform band" could be seen on the DNA agar gel electrophoresis, and bcl-2 gene expression was down-regulated. **Conclusion:** The combination of pungent-opening or bitter-descending components in the Banxia Xiexin Recipe has the actions of inhibiting proliferation of BGC-823 cells and inducing cell apoptosis, and after the combination of pungent-opening or bitter-descending components (Pungent-bitter) has a significant tendency to cooperatively increase the effect, but other combinations maybe have antagonism. It is suggested that pungent-opening and bitter-descending method is possibly one of main therapeutic principles and methods for prevention and treatment of gastric cancer with TCM.

Key Word Cell apoptosis/drug effect; Banxia Xiexin Decoction/pharmacology; @ Serum pharmacology

半夏泻心方是治疗脾胃病的代表方,其现代研究也显示出了多方面的消化系统作用机理^[1]。近年来,本方临床应用于胃癌的防治,取得了较好的疗效^[2~4]。为阐明本方抗胃肿瘤的作用机理及其与方剂配伍的关系,我们观察了半夏泻心方不同配伍药组含药血清对体外人胃癌 BGC-823 细胞诱导凋亡的作用,以期为中医药防治胃癌的组方用药提供一定的思路和科学

依据。

1 材料

1.1 实验动物:家兔,体重 2.0~2.5kg,共 20 只,由兰州生物制品研究所实验动物中心提供(合格证号:14-004)。

1.2 药物及试剂:半夏泻心方药材由甘肃中医学院附属医院提供,经甘肃中医学院中药鉴定教研室鉴定符合《中华人民共和国药典》规定;培养液:含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液;消化液:0.25% 胰蛋白酶消化液;5-氟尿嘧啶(5-FU):临用时用 RPMI-1640 培养液稀释至所需浓度;RPMI-1640 由美国 GIBC

基金项目:甘肃省教育厅基金资助项目(01B-32)

1 甘肃中医学院基础医学院方剂学教研室,兰州市城关区定西路 35 号(730004)

2 甘肃省医学科学研究院药理毒理研究中心

收稿日期:2005-01-21;修回日期:2005-05-16

Laboratories 公司生产;人胃癌细胞株 BGC-823 细胞由兰州大学细胞室引进。

2 方法

2.1 药物制备:依据原方比例^[5],按中医理论及配伍规律分为 7 组:全方组(半夏 12g,干姜 9g,黄芩 9g,黄连 3g,人参 9g,大枣 4 枚,甘草 9g)、辛开组(半夏 12g,干姜 9g)、苦降组(黄芩 9g,黄连 3g)、辛苦组(半夏 12g,干姜 9g,黄芩 9g,黄连 3g)、甘补组(人参 9g,大枣 4 枚,甘草 9g)、辛甘组(半夏 12g,干姜 9g,人参 9g,大枣 4 枚,甘草 9g)、苦甘组(黄芩 9g,黄连 3g,人参 9g,大枣 4 枚,甘草 9g)。将各组药物饮片浸泡 30 分钟,煎煮 2 次,每次 30 分钟,纱布粗滤去渣,全方药液浓缩为含生药 2g/ml,其他配伍煎液中生药量同原方,煎法相同,煎后浓缩体积与全方煎液相同,使各配伍组合中组成药生药浓度与全方中各相应生药浓度相同,即辛开组:0.8g 生药/ml、苦降组:0.4g 生药/ml、辛苦组:1.2g 生药/ml、甘补组:0.8g 生药/ml、辛甘组:1.5g 生药/ml、苦甘组:1.2g 生药/ml。

2.2 含药血清的制备:参考文献^[6]方法,每组选家兔 2 只,实验前禁食 12 小时,灌胃给药,各药物组每只家兔灌服试验药物,对照组给予相同体积的生理盐水。给药剂量:每次 26ml/kg 体重,相当于 60kg 成人日服用量的 10 倍;给药方式:连续灌胃 3 次,第 1、2 次间隔 20 小时,第 2、3 次间隔 4 小时;采血时相:第 3 次给药后 2 小时无菌条件下心脏采血,静置 4 小时,3000 转/分钟离心 20 分钟,分离血清(药物血清,DS),同种条件下药物血清混匀,56℃、30 分钟水浴灭活,-20℃冰箱保存备用;经培养实验没有微生物生长。

2.3 BGC-823 细胞培养:参考文献^[7]方法将 BGC-823 细胞用含有青霉素、链霉素各 100U/ml、15%胎牛血清的 RPMI-1640 培养液培养。在 5%CO₂、37℃培养箱中培养 2~3 天后进行传代培养。

2.4 采用 MTT 法测定半夏泻心方及配伍药组含药血清对 BGC-823 细胞增殖的影响:参考文献^[8]方法,取对数生长期的 BGC-823 细胞,细胞存活率达 95%以上,先用 0.25%胰蛋白酶消化培养细胞,再用含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养液配成单个细胞悬液,以每孔 1×10^4 个细胞接种于 96 孔培养板中,每孔体积 200 μ l。在细胞液中加入最终浓度分别为 5%、10%的全方、辛开、苦降、辛苦、甘补、辛甘、苦甘的兔血清,各浓度设 3 个平行孔,并设正常兔血清对照组及 5-FU 阳性对照组,平行做 3 板,将培养板放入 CO₂ 培养箱,在 37℃、5%CO₂ 及饱和湿度条件下分别培养 24 小时、48 小时、72 小时,每孔加入 MTT 溶液(5mg/ml) 20 μ l,

37℃继续孵育 4 小时后,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液。每孔加入 150 μ l DMSO,振荡 10 分钟,使甲磺酸充分溶解,在 490nm 波长下,用酶联免疫检测仪测定各孔光吸收值(A),按下列公式求出细胞存活率,即细胞存活率(%) = 试验组光吸收值(A)/对照组光吸收值(A) $\times$ 100%。每个样品计数 3 次,根据其 3 次实验结果求平均值和标准差($\bar{x} \pm s, n=3$)。

2.5 BGC-823 细胞 DNA 的提取及琼脂糖凝胶电泳:取一瓶对数生长期的 BGC-823 细胞,细胞存活率达 95%以上。用含有青霉素、链霉素各 100U/ml、10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养液将细胞数调节为 2×10^6 个/ml,放在培养瓶中,置培养箱培养 24 小时细胞生长旺盛期,弃去原培养液,加入终浓度分别为 5%、10%的全方、辛开、苦降、辛苦、甘补、辛甘、苦甘的兔血清培养液作为实验组,不含药的兔血清培养液作为对照组,含 100 μ g/ml 5-FU 的培养液作为阳性对照组,置培养箱中培养 48 小时,弃去上清液,细胞用 0.25%的胰蛋白酶消化后,加 RPMI-1640 终止反应,离心,弃去上清。将上述细胞用 PBS 液洗涤 3 次,离心,弃去上清液,加 DNA 缓冲液孵育 10 分钟,离心,去上清,加入蛋白酶 K,SDS 过夜。第 2 天加入饱和酚,氯仿/异丙醇剧烈混匀,真空干燥,溶于 TE 液中,4℃冰箱保存。取提取的 DNA 液,在 0.5%琼脂糖凝胶中电泳 2 小时,溴化乙啶染色,紫外灯下观察,并摄影。

2.6 采用 S-P 免疫组化法测定半夏泻心方及配伍药组含药血清对 BGC-823 细胞 bcl-2 表达的影响:取 1 瓶对数生长期的细胞,细胞存活率达 95%以上。用含有青霉素、链霉素各 100U/ml、10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养液将细胞数调节为 2×10^4 个/ml,在直径为 5cm 培养皿中放置 3 小块玻片,将调好浓度的 BGC-823 细胞液接种于培养皿中,置培养箱中培养 24 小时,弃去原培养液,加入终浓度分别为 5%、10%的全方、辛开、苦降、辛苦、甘补、辛甘、苦甘兔血清的培养液作为实验组,不含药的细胞培养液作为对照组,置培养箱中继续培养 48 小时,取出玻片用 PBS 液冲洗 2~3 次,用 95%的酒精固定,室温干燥。

按文献^[9]方法(S-P 免疫组化法)将上述已固定的细胞用 PBS 液冲洗,加柠檬酸修复液高温修复抗原,再用 PBS 液冲洗,加过氧化酶阻断剂,室温孵育 10 分钟,用 PBS 液冲洗后,加非免疫性动物血清,室温孵育 10 分钟,甩去血清,加抗原(bcl-2),4℃冰箱过夜。再用 PBS 缓冲液冲洗,加生物素标记的二抗,室温孵育 10 分钟,PBS 缓冲液冲洗,加链亲和素-过氧化物酶溶液,室温孵育 10 分钟,用 DAB 显色液显色(5~15

附表 半夏泻心方及配伍药组含药血清对 BGC-823 细胞敏感性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	剂量 (%)	24 小时		48 小时		72 小时	
			A	细胞存活率(%)	A	细胞存活率(%)	A	细胞存活率(%)
正常组(空白)	3	0	0.78±0.07	—	0.79±0.10	—	0.80±0.15	—
全方组	3	5	0.76±0.05*▲△	96.06	0.76±0.07*▲△	95.28	0.71±0.03*△	88.42
		10	0.64±0.11*	91.13	0.53±0.07**	82.98	0.58±0.05*	71.92
辛开组	3	5	0.45±0.04**	70.74	0.20±0.04**	28.24	0.20±0.09*	28.88
		10	0.40±0.08*	63.22	0.11±0.01*	15.86	0.16±0.06	23.40
苦降组	3	5	0.66±0.04**▽	84.37	0.64±0.05**▽	80.41	0.79±0.02**	97.04
		10	0.57±0.05**▽	80.99	0.49±0.10**▽	77.02	0.58±0.10**	81.98
辛苦组	3	5	0.18±0.03*	27.61	0.12±0.07**	14.91	0.13±0.02**	16.47
		10	0.17±0.05**	27.24	0.12±0.04**	14.35	0.12±0.07**	14.91
甘补组	3	5	0.77±0.06**▽	98.03	0.63±0.08**	89.90	0.78±0.06*▲△▽	97.00
		10	0.75±0.28*▲▽	95.34	0.40±0.10**▽	56.90	0.61±0.16**	76.41
苦甘组	3	5	0.66±0.02**	94.90	0.75±0.07*▲△	95.09	0.61±0.11**	75.75
		10	0.66±0.01**	94.06	0.49±0.16**▽	69.56	0.59±0.06**▽	73.30
辛甘组	3	5	0.52±0.07**▽	73.78	0.50±0.04**▽	72.35	0.59±0.07**▽	73.35
		10	0.35±0.06**	68.06	0.40±0.10**	56.90	0.48±0.08**	57.00
阳性对照组	3	100 μg/ml	0.11±0.04	16.73	0.05±0.03	8.37	0.01±0	0.52

与正常组(空白) 同项目比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与辛苦组同项目比较, △ $P<0.05$;与苦降组同项目比较, ▲ $P<0.05$;与辛开组同项目比较, ▽ $P<0.05$

分钟), 自来水冲洗后, 再用苏木素复染, 无水乙醇脱水, 用中性树胶封片后阅片, 并摄影。结果判断: bcl-2 阳性的肿瘤细胞胞膜、胞浆均呈棕色; 计数 100 个肿瘤细胞中阳性细胞百分率, 即阳性细胞百分率(%) = 阳性细胞数/计数的总细胞数 × 100%。

2.7 统计学方法: 采用方差分析(ANOVA) 后, 多组间比较采用 q 检验, 用 SPSS 10.0 统计软件处理。

3 结果

3.1 半夏泻心方及配伍药组对 BGC-823 细胞增殖的影响: 附表表示, 与正常组(空白) 比较, 半夏泻心方及各配伍药组含药血清对 BGC-823 细胞的存活率都有一定的影响, 且在 48 小时最为明显, 细胞存活率随含药血清浓度的上升而表现出显著的剂量-效应关系($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与阳性对照组(5-FU) 比较, 半夏泻心方及各配伍药组含药血清处理的 BGC-823 细胞存活率均较高, 但差异无显著性; 各配伍药组组间比较, 辛苦组显著低于全方组、苦甘组和甘补组($P<0.05$); 辛开组显著低于苦降组、辛甘组、苦甘组和甘补组($P<0.05$); 苦降组显著低于全方组、苦甘组和甘补组($P<0.05$)。半夏泻心方及各配伍药组含药血清药效总体表现为辛苦>辛开>苦降>辛甘>苦甘>全方>甘补。

3.2 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果: 与 MTT 实验基本一致, 全方、甘补及辛甘、苦甘组含药血清作用于 BGC-823 细胞 48 小时后, DNA 琼脂糖凝胶电泳未见明显的“梯状带”。而辛苦及辛开、苦降组含药血清浓度在 10% 作用 48 小时后, DNA 琼脂糖凝胶电泳可见典

型的“梯状带”, 尤以辛开苦降组明显, 可能是由于低浓度的辛苦及辛开、苦降组含药血清处理的 BGC-823 细胞 DNA 断裂不够充分。

3.3 半夏泻心方及配伍药组含药血清对 BGC-823 细胞 bcl-2 基因表达的影响: 显色结果示, bcl-2 在单纯细胞培养液组(对照组) 呈现高表达(细胞膜、胞浆均呈深棕色), 全方、甘补组显色较单纯细胞培养液组稍弱, 但不明显; 辛苦、辛开、苦降组显色明显较单纯细胞培养液组淡, 呈现低表达, 其中浓度为 10% 的辛苦组可使 bcl-2 阳性细胞百分率降至 36.5%; 辛甘、苦甘与辛苦、苦降组显色比较有一定的差异, 但不显著。提示辛苦及辛开、苦降的配伍形式诱导 BGC-823 细胞凋亡的作用机理与下调 bcl-2 表达有关。

4 讨论

胃癌属中医痞证、反胃、噎膈、胃脘痛、症瘕、积聚等范畴, 目前中医学对胃癌的发病机制尚无明确统一的认识^[10,11]。通过大样本的临床证候分析, 并参考相关临床资料, 我们认为, 胃癌的中医基本病理机制为脾胃虚弱, 寒热阻结, 中焦升降失调, 即其病机以正虚兼邪实(寒湿、痰浊和热毒) 为多见, 总体呈现本虚标实的特点, 这是胃癌的中医病机关键所在。分析其原因, 可能由于饮食不节, 寒温不适, 恣食生冷, 饥饱不匀, 引起脾胃功能失调, 运化失司, 寒湿痰浊阻滞中焦, 久郁不去, 化生热毒; 寒热错杂, 阻结中焦, 反而又加重了中焦升降功能的失调, 渐而形成症瘕积聚。

半夏泻心方出自《伤寒论》, 主治寒热错杂之痞证, 为辛开苦降的代表方剂, 升降同调, 以复中焦之升降。

同时益气健脾,调理脾胃以扶正,具有寒热并用,温而不燥,寒而不遏之特点。全方由辛开、苦降、甘补 3 组药物配伍构成,结构严谨,药少力专,十分符合胃癌的中医病机。实验表明,半夏泻心方中对 BGC-823 细胞增殖主要起抑制作用的药组为辛开、苦降的配伍形式。辛开、苦降配伍后(辛苦)有显著的协同增效趋势,而其他配伍药群(辛甘、苦甘、全方)均较辛苦、辛开、苦降的抑制率低,提示这些配伍形式可能存在拮抗作用。

细胞凋亡过程中有一系列特征性的形态学、生物化学、细胞学及分子生物学的改变。其中最重要和最具特征性的改变是染色质 DNA 在核小体连接部位的断裂,形成以 180~200bp 为最小单位、整倍数的单体或寡聚体片段,因而常作为细胞凋亡特异性的生化指标被采用,故其电泳图谱呈现典型的“梯状带”^[12]。本研究中 DNA 琼脂糖凝胶电泳证实,辛苦及辛开、苦降组含药血清诱导 BGC-823 细胞凋亡的机理与促使 DNA 在核小体连接部位的断裂有关。

肿瘤发生、发展的根本原因是基因的改变,表现为许多相关基因的丢失、失活、突变或过度表达。在正常胃黏膜中 bcl-2 主要表达于黏膜腺颈部及体部,在肠化生及不典型增生组织中 bcl-2 阳性表达可见于黏膜表层,而胃癌的 bcl-2 表达分布紊乱。研究发现,从正常胃黏膜→萎缩性胃炎→肠化生→不典型增生→胃癌, bcl-2 表达逐渐增强,而细胞凋亡指数却逐渐降低,提示 bcl-2 蛋白表达与细胞凋亡指数呈负相关^[13],即 bcl-2 基因高表达可提高细胞凋亡的阈值,抑制细胞凋亡。本研究结果表明, BGC-823 细胞 bcl-2 的确存在高表达现象。半夏泻心方中辛苦及辛开、苦降组含药血清可

使 bcl-2 基因表达显著下降,全方、甘补组则仍为高表达状态;辛甘、苦甘组亦可使 bcl-2 下降,但与辛开、苦降组比较有一定的差异。因此,半夏泻心方诱导 BGC-823 细胞凋亡的最佳配伍是辛苦及辛开、苦降的配伍形式,其作用机理与下调 bcl-2 表达有关。但半夏泻心方各配伍药组含药血清诱导 BGC-823 细胞凋亡是否与其他癌基因或抑癌基因有关,值得进一步研究探讨。

参考文献

- 1 刘喜平,温志强.半夏泻心方方证及机理研究述评.中国中医药信息杂志,2000,8(7):23~25.
- 2 杨瑞合.半夏泻心汤调治消化道肿瘤三则.陕西中医,1998,12(4):171~172.
- 3 祝远之,贾崇花.半夏泻心汤治疗脾胃病新用.河北中医,1999,21(5):239.
- 4 丰素娟.半夏泻心汤防治胃癌前病变的实验与临床研究.中成药,2000,22(8):576~577.
- 5 邓中甲.方剂学.北京:中国中医药出版社,2003:88.
- 6 李振光,王净净.关于中药血清药理学方法的思考.中国中医药信息杂志,2002,9(2):5~6.
- 7 司徒镇强,吴军正,刘斌,等主编.细胞培养(修订版).北京:世界图书出版社,2004:24.
- 8 姜泊,张亚力,周殿元.分子生物学常用实验方法.北京:人民军医出版社,1996:174.
- 9 任占平.应用 S-P 免疫组化染色法的体会.诊断病理学杂志,1994,1(3):176~178.
- 10 刘成林,刘丽萍.胃癌的中医及中西医结合治疗进展.山东中医学院学报,1994,18(3):209.
- 11 刘友章,于向民.胃癌的中医药临床研究进展.新中医,1996,28(12):51.
- 12 彭黎明,王曾礼主编.细胞凋亡的基础与临床.北京:人民卫生出版社,2000:19.
- 13 刘海峰,刘为纹,房殿青,等.胃黏膜癌变过程中细胞凋亡及其与 Bcl-2 蛋白表达关系的研究.中华消化内镜杂志,1999,16(2):806.

全国中西医结合血瘀证及活血化瘀高层论坛 和继续医学教育班征文通知

中国中西医结合学会活血化瘀专业委员会拟于 2006 年 8 月中旬在贵州省贵阳市召开“全国中西医结合血瘀证及活血化瘀高层论坛(中西医结合防治心脑血管病峰会)和继续医学教育班”(授 I 类 15 学分)。届时将邀请国内外知名专家就血瘀证及活血化瘀研究新成果、新理论、新方法作讲演。征文内容包括活血化瘀方药的临床及实验研究、活血化瘀治疗疑难病及危重病、血瘀证诊断标准研讨、血瘀证及活血化瘀其它相关研究、中西医结合防治心脑血管病研究。

大会同时举办“银丹心脑通软胶囊”专题研讨会,并设立“银丹心脑通软胶囊杯”优秀学术论文奖。征文内容为该药在心脑血管等动脉粥样硬化性疾病、以及属于中医血瘀证的其他各科疾病的基础及临床研究。论文经大会专家评审委员会统一审稿评出特等奖 1 名,一等奖 2 名,二等奖 5 名,三等奖 10 名,分别给予 5000 元、3000 元、2000 元、1000 元的学术赞助。对优秀论文可向中国中西医结合杂志等推荐发表。(注:不到会者不参与评奖)

征文要求:(1)来稿请寄全文及 1000 字以内的摘要各 1 份,最好为电子版。(2)请自留底稿,恕不退稿。(3)截止日期:2006 年 6 月 30 日。无论文者,欢迎报名参加学习班。

来稿请寄:北京卫生部中日友好医院全国中西医结合心脑血管病中心,邮编:100029

联系人:杜金行、刘燕,联系电话:010-84203053,传真:010-84284945, E-mail:shizaixiang@163.com