

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.01.015

实验研究

复方浙贝颗粒药物血清对人结肠癌 HCT-116 细胞增殖与凋亡的影响

张 喆¹, 陈信义², 郑 智^{3*}

(1. 中日友好医院, 北京市朝阳区樱花东街 2 号, 100029; 2. 北京中医药大学东直门医院; 3. 江西省肿瘤医院)

摘要 目的 观察复方浙贝颗粒对人结肠癌 HCT-116 细胞增殖、凋亡的影响及其可能作用机制。方法 40 只 Wistar 大鼠随机分为对照组和复方浙贝颗粒高、中、低剂量组, 每组 10 只。复方浙贝颗粒高、中、低剂量组分别按 8、4、2 g/(kg·d) 灌胃, 对照组给予 0.1 ml/10 g 生理盐水灌胃, 连续 7 天。于末次灌胃后 1 h 制备各组药物血清。采用 MTT 法检测各组血清对人结肠癌 HCT-116 细胞抑制率, 经流式细胞仪定量检测各组血清诱导 HCT-116 细胞凋亡率, Western blot 方法检测各组血清对 HCT-116 细胞双微体-2 (MDM2)、p53、p21 蛋白表达的影响。结果 复方浙贝颗粒高、中、低剂量组对 HCT-116 细胞增殖抑制率分别为 40.00%、42.37% 和 29.15%, 凋亡率分别为 18.75%、20.00%、15.32%, 均高于对照组 ($P < 0.05$)。48 h 时复方浙贝颗粒高剂量组 HCT-116 细胞 MDM2、p53、p21 蛋白, 复方浙贝颗粒中剂量组 MDM2 蛋白, 复方浙贝颗粒低剂量组 MDM2、p53 蛋白表达均较对照组升高 ($P < 0.01$); 96 h 时复方浙贝颗粒各剂量组 MDM2 蛋白表达较本组 48 h 明显降低, p53 蛋白表达较本组 48 h 明显升高 ($P < 0.01$)。结论 复方浙贝颗粒能抑制人结肠癌 HCT-116 细胞增殖、促进凋亡, 其作用机制可能与调节增加 MDM2-p53 信号通路有关。

关键词 结肠癌; 复方浙贝颗粒; 细胞增殖; 细胞凋亡; MDM2-p53 信号通路

近年来随着我国人民生活水平的提高和饮食结构的变化, 结肠癌的发病率和死亡率均有逐年上升的趋势^[1]。既往研究发现复方浙贝颗粒能提高难治性急性白血病围化疗期的临床完全缓解率, 降低化疗毒性反应^[2], 因此我们采用复方浙贝颗粒干预结肠癌治疗, 观察复方浙贝药物血清对人结肠癌 HCT-116 细胞增殖、凋亡的影响, 并探索其可能作用机制。

1 材料及方法

1.1 细胞株及动物

人结肠癌细胞 HCT-116 由清华大学生命科学院提供; SPF 级 Wistar 大鼠 40 只, 雄性, 8 周龄, 体重 (250 ± 20) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物合格证号: SCXK (京) 2007-0001。饲养条件为温度 22 ~ 23℃, 湿度 50% ~ 55%。

1.2 主要药品、试剂与仪器

复方浙贝颗粒 (10 g/包) 由浙贝母、汉防己、川芎组成, 配伍比例为 4 : 3 : 3, 北京康仁堂药业有限公司提供。DMEM 培养基和胎牛血清 (FCS), Hyclone 产品, 批号: SH30022.01B; 3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT, 批号: M2128-10G)、二甲基亚砜 (DMSO, 批号: DO231) 均为 Sigma 产品; 鼠双微体-2 (MDM2, 批号: AM00224PU-T)、p53 (批号: sc-426)、p21 (批号: DCS-60) 蛋白一抗抗体、二抗兔抗鼠抗体均为 Santa-Cruz 产品; 蛋白冷裂解缓冲液, 南京凯基生物科技发展有限公司产品, 批号: KGP250/KGP2100; Annexin V/PI 细胞凋亡检测试剂盒, Centre-bio 产品, 批号: C1063。全自动酶标仪 450, Bio-Rad 公司; CO₂ 培养箱 BB5060, Heraeus 公司; 流式细胞仪 (FACS) Calibur E4242, Bio-Rad 公司; 凝胶图像分析系统, 美国 Bio-Rad 公司, Image Lab 3.0 系统。

基金项目: 国家自然科学基金 (81260592)

* 通讯作者: zhengxia_2007@163.com, (0791) 88331492

1.3 药物血清制备

40 只 Wistar 大鼠采用随机数字表分为对照组和复方浙贝颗粒高、中、低剂量组, 每组 10 只。实验前大鼠禁食不禁水 12 h, 复方浙贝颗粒高、中、低剂量组分别按 8、4、2 g/(kg·d) 剂量 (分别相当成人临床给药剂量的 14、7、3.5 倍) 0.1 ml/10 g 灌胃; 对照组给予 0.1 ml/10 g 生理盐水灌胃。各组每日灌胃 2 次, 连续 7 天。于末次灌胃后 1 h 在无菌条件下自腹主动脉采血, 4℃ 下静置过夜, 3500 r/min 离心 30 min, 分离血清, 将同组血清混匀, 0.22 μm 微孔滤膜无菌过滤, 56℃ 灭活 30 min, 置 -20℃ 冰箱保存备用。

1.4 药物血清对 HCT-416 细胞增殖的影响

采用 MTT 法, 取处于对数培养期的 HCT-416 细胞, 调节细胞浓度至 5×10^4 /ml, 分别接种于 96 孔培养板, 200 μl/孔。37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养箱培养过夜, 分别加入复方浙贝颗粒高、中、低组药物血清, 对照组加入对照组血清各 20 μl, 调零组加入相应体积的培养液, 每组设 4 个平行孔。培养 72 h 后, 每孔加 5 mg/ml MTT 20 μl, 再培养 4 h 后弃上层培养液, 加 DMSO 200 μl/well 震荡 10 min, 待沉淀完全溶解后, 用全自动酶标仪在波长 570 nm 处读取吸光度 A_{570nm} 值。取 8 孔 A_{570nm} 值的均数按公式计算细胞抑制率 (IR), $IR = [1 - (\text{试验孔 } A_{570nm} \text{ 均值} / \text{对照孔 } A_{570nm} \text{ 均值})] \times 100\%$ 。

1.5 药物血清对 HCT-416 细胞凋亡的影响

取处于对数培养期的 HCT-416 细胞, 调节细胞浓度至 5×10^5 /ml, 接种于 6 孔培养板, 1 ml/孔, 分别加入复方浙贝颗粒高、中、低剂量组药物血清和对照组血清各 200 μl, 培养 96 h 后, 通过流式细胞仪 (FCM) 进行凋亡测试。

1.6 药物血清对 HCT-416 细胞 MDM2、p53、p21 蛋白表达的影响

采用 Western blot 法, 取处于对数培养期的 HCT-416 细胞, 调节细胞浓度至 5×10^5 /ml, 接种于 96 孔培养板, 1.5 ml/孔, 分别加入复方浙贝颗粒高、中、低剂量组血清和对照组血清各 300 μl, 每组设 4 个复孔, 培养 96 h 后, 胰酶消化后离心, 收集细胞, 加入 1 ml 冷裂解缓冲液, 冰浴条件下匀浆, 4℃、10000 r/min 离心, 取上清液, 采用 BCA 蛋白浓度测定法于给药后 48 h、96 h 进行 MDM2、p53、p21 蛋白定量, 样品分装, 贮存于 -80℃ 冰箱中待用。每孔加入等量蛋白样品, 12% 十二烷基

硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶恒压电泳, 电压积层胶 80V, 分离胶 120V, 电转印至硝酸纤维素膜。5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h 后, 加入 1:1000 稀释的一抗 4℃ 孵育过夜, 封闭液漂洗后加入 1:1000 稀释的二抗, 室温下摇床杂交 1 h, 漂洗后 ECL 化学发光法发光, 凝胶图像分析系统对扩增产物条带吸光度半定量, 计算待测条带的 A 值与内参照 A 值的比值。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件处理数据, 计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间均数比较用 *t* 检验, 多组间均数比较采用 LSD 检验。

2 结果

2.1 各组 HCT-416 细胞增殖比较

表 1 示, 与对照组比较, 复方浙贝颗粒高、中、低剂量组 A_{570nm} 值均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而各剂量组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。复方浙贝颗粒中剂量组对 HCT-416 细胞抑制作用最强, IR 为 42.37%。

表 1 各组人结肠癌 HCT-416 细胞增殖情况比较

组别	样本数	A_{570nm} 值 ($\bar{x} \pm s$)	IR (%)
对照组	5	0.590 ± 0.102	0
复方浙贝颗粒高剂量组	5	0.354 ± 0.111 **	40.00
复方浙贝颗粒中剂量组	5	0.340 ± 0.134 **	42.37
复方浙贝颗粒低剂量组	5	0.418 ± 0.186 *	29.15

注: IR, 细胞抑制率; 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 各组 HCT-416 细胞凋亡比较

表 2 示, 复方浙贝颗粒高、中、低剂量组的细胞凋亡率均高于对照组 ($P < 0.05$); 而复方浙贝颗粒高、中、低剂量组组间比较, 复方浙贝颗粒中剂量组细胞凋亡率最高, 但两两比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组人结肠癌 HCT-416 细胞凋亡情况比较 (%)

组别	凋亡细胞	死亡细胞	活细胞
对照组	5.19	6.93	87.88
复方浙贝颗粒高剂量组	18.75	26.12	55.13
复方浙贝颗粒中剂量组	20.00	23.52	56.48
复方浙贝颗粒低剂量组	15.32	18.18	66.50

2.3 各组 HCT-416 细胞 MDM2、p53、p21 蛋白表达比较

表 3 示, 加入不同剂量复方浙贝颗粒药物血清作用 48 h 后, HCT-416 细胞的 MDM2 蛋白表达较对照组升高 ($P < 0.01$); 而 96 h 后复方浙贝颗粒各剂量组 MDM2 蛋白均较本组 48 h 明显降低 ($P <$

表 3 各组人结肠癌 HCT-116 细胞不同时间 MDM2、p53、p21 蛋白表达比较 (IOD, $\bar{x} \pm s$)

组别	作用时间	样本数	MDM2/ β -actin	p53/ β -actin	p21/ β -actin
对照组	48 h	5	0.20 $\pm$ 0.11	0.36 $\pm$ 0.38	0.54 $\pm$ 0.32
复方浙贝颗粒低剂量组	48 h	5	1.22 $\pm$ 0.56*	1.22 $\pm$ 0.56*	0.78 $\pm$ 0.50
	96 h	5	0.01 $\pm$ 0.00 $\Delta\Delta$	1.95 $\pm$ 0.38 $\Delta\Delta$	1.50 $\pm$ 0.38 $\Delta\Delta$
复方浙贝颗粒中剂量组	48 h	5	4.32 $\pm$ 1.12*	0.37 $\pm$ 0.39	0.58 $\pm$ 0.29
	96 h	5	0.01 $\pm$ 0.00 $\Delta\Delta$	1.29 $\pm$ 0.57 $\Delta\Delta$	0.83 $\pm$ 0.57 Δ
复方浙贝颗粒高剂量组	48 h	5	1.87 $\pm$ 0.38*	1.42 $\pm$ 0.68*	1.74 $\pm$ 0.68*
	96 h	5	0.01 $\pm$ 0.00 $\Delta\Delta$	1.95 $\pm$ 0.80 $\Delta\Delta$	0.86 $\pm$ 0.40 $\Delta\Delta$

注: MDM2, 细胞双微体-2; 与对照组 48 h 比较, * $P < 0.01$; 与本组 48 h 比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

0.01)。复方浙贝颗粒低、高剂量组 48 h 时 HCT-116 细胞的 p53 蛋白表达较对照组升高 ($P < 0.01$); 96 h 时各剂量组 p53 蛋白表达较本组 48 h 时明显升高 ($P < 0.01$)。复方浙贝颗粒高剂量组 48 h 时 HCT-116 细胞的 p21 蛋白表达较对照组升高 ($P < 0.01$); 96 h 时各剂量组与本组 48 h 时 p21 蛋白表达比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

近年随着我国生活水平的提升和饮食习惯的改变, 大肠癌的发生率呈逐年上升的趋势, 但与此形成鲜明对比的是由于其特有的生物学特征, 其对化疗药物的敏感性反而越来越低, 尤其是一些无法手术或术后复发的患者, 由于耐药甚至可能导致主要治疗方法药物化疗的失败^[9]。从中医学方面来看, 尤其是晚期结肠癌, 痰、瘀是其主要的病理特征, 患者常常表现为面色黯淡、肌肤甲错、痰核瘰癧、癥积肿块、舌质暗淡、舌下络脉迂曲、舌苔黄腻或白腻、脉象滑数或细滑等特征^[9]。复方浙贝颗粒方中浙贝母为君药, 其味苦、性寒, 具有化痰消瘰、清火散结功效, 开泄力大, 清火散结力强, 除了能止咳化痰之外, 还长于治瘰癧、瘰癧、疮痛等症的治疗; 川芎为臣药, 其味辛、性温, 可活血行气、祛风止痛, 与君药配伍以发挥行气、化痰、活血、止痛效果; 佐以汉防己, 既可祛湿、利水配合浙贝母阻截生痰之源, 又可止痛配合川芎消除瘀滞、舒缓疼痛, 三药配伍共奏化痰散结、活血化瘀之功效。既往研究发现复方浙贝颗粒可以显著减少化疗耐药^[9], 但是对其是否可直接抑制肿瘤细胞生长缺乏深入的研究。

本研究结果显示, 复方浙贝颗粒高、中、低剂量组对体外大肠癌 HCT-116 细胞增殖抑制率分别为 40.00%、42.38% 和 29.15%, 中剂量组抑制作用最强, 但各剂量组比较差异无统计学意义。另外, 复方浙贝颗粒高、中、低剂量组的细胞凋亡率

分别为 18.75%、20.00%、15.32%, 均高于对照组的 5.19% ($P < 0.05$), 说明复方浙贝颗粒药物血清能明显诱导细胞凋亡, 并且中剂量组疗效较高。因此本研究结果证明, 复方浙贝颗粒对大肠癌 HCT-116 细胞增殖存在抑制作用, 而对其细胞凋亡有促进作用, 综合来看中剂量组抑制增殖和促进凋亡效果最佳。

p53 基因是一种抑癌基因, 它与细胞周期调控、细胞凋亡有密切的关系^[9]。而 p53 主要被 MDM2 蛋白所调节^[9], MDM2 可泛素化和降解 p53, 而其自身通过靶定 p53 从而降解^[9]。本研究结果显示, 加入不同剂量复方浙贝颗粒药物血清作用 48 h 后, HCT-116 细胞的 p53 蛋白表达及 MDM2 蛋白表达均有所升高, 96 h 后 p53 蛋白表达增强、MDM2 蛋白表达降低, 因此认为复方浙贝颗粒可通过初期提高 MDM2 的表达, 从而提高 p53 的表达、抑制肿瘤细胞生长, 而后由于与 p53 结合而降解, 因此 96 h 后表达基本消失。p21 是细胞周期依赖性激酶抑制剂蛋白家族成员, p53 作为转录因子可以诱导其表达^[9], 但本实验结果中复方浙贝颗粒各剂量组间比较规律不同, 48 h 对 MDM2 的表达的影响, 中剂量最强, 而对于 p53 和 p21 蛋白的表达则是高剂量最强, 有可能由于 MDM2 和 p53 降解-反式激活结构有关; 而 96 h 后则是中剂量 p53、p21 表达最低, p53 低剂量与高剂量相当, 而 p21 则是低剂量最高, 说明不同蛋白表达同一时间对不同剂量中药的应答不同, 也可能与不同剂量影响 MDM2-p53-p21 中间转录等过程影响不同有关。但是总体来看, 复方浙贝颗粒可能是通过降解肿瘤细胞内的 MDM2 而活化 p53 信号通路, 增强 p21 的表达, 从而实现其抗肿瘤的作用。至于是否有其他的凋亡机制也参与了 MDM2-p53 信号通路的调控作用, 而复方浙贝颗粒是否能通过该机制增强 HCT-116 肿瘤细胞对化疗药物的敏感性, 还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 张喆, 刘瑜, 张挽澜, 等. 加味三香颗粒治疗结肠癌术后胃肠功能障碍 32 例 [J]. 中医杂志, 2013, 54(11): 966-967.
- [2] 李冬云, 田劭丹, 叶需智, 等. 复方浙贝颗粒辅助化疗提高难治性急性白血病临床疗效研究 [J]. 北京中医, 2007, 26(2): 72-74.
- [3] 王瑞平, 邹玺, 黄舒然. 克瘤丸对结肠癌细胞 HT-29 细胞凋亡及细胞周期的影响 [J]. 中医杂志, 2012, 53(21): 1852-1855.
- [4] 余文燕, 王国娟, 许建华, 等. 肠胃清颗粒协同卡铂对人结肠癌耐药细胞增殖及凋亡的影响 [J]. 中医杂志, 2013, 54(21): 1854-1858.
- [5] 李冬云, 郑智, 侯丽, 等. 复方浙贝颗粒联合阿霉素对 K562/A02 移植瘤细胞膜转运蛋白表达的影响 [J]. 中国实验血液学杂志, 2010, 18(1): 45-48.
- [6] 张蕴超, 贾英杰, 杨佩颖, 等. 消岩汤对肺癌恶病质小鼠肿瘤生长的影响 [J]. 中医杂志, 2013, 54(6): 509-511.
- [7] Rigatti MJ, Verma R, Belinsky GS, et al. Pharmacological inhibition of MDM2 triggers growth arrest and promotes DNA breakage in mouse colon tumors and human colon cancer cells [J]. Mol Carcinog, 2012, 51(5): 363-378.
- [8] Nyiraneza C, Sempoux C, Detry R, et al. Hypermethylation of the 5' CpG island of the p14ARF flanking exon 1β in human colorectal cancer displaying a restricted pattern of p53 overexpression concomitant with increased MDM2 expression [J]. Clin Epigenetics, 2012, 4(1): 9. doi: 10.1186/1868-7083-4-9.
- [9] Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities [J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(6): 400-414.

Effect of Fufang Zhebei Granules Drug-Containing Serum on Proliferation and Apoptosis of Human Colorectal Cancer HCT-116 Cells

ZHANG Zhe¹, CHEN Xinyi², ZHENG Zhi³

(1. China-Japan Friendship Hospital, Beijing, 100029; 2. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine; 3. Cancer Hospital of Jiangxi Province)

ABSTRACT Objective To observe influence of *Fufang Zhebei Granules* (FFZBG) on proliferation and apoptosis of human colorectal cancer HCT-116 cells and discuss the possible mechanism. **Methods** A total of 40 Wistar rats were randomly assigned to control group and high, middle, low-dose FFZBG group, with 10 in each. For 7 days, high, middle, low-dose FFZBG group were given 8, 4, 2 g/(kg·d) drug solution by gavage, while the control group was given 0.1 ml/10 g normal saline. One hour after the last gavage, drug-containing serum was prepared. MTT method was applied to detect cell inhibitory rate of HCT-116 cells intervened by drug-containing serum of different dosage. The apoptosis rates of HCT-116 cells were detected qualitatively by flow cytometry. Western blot was used to examine the influence on expression of MDM2, p53, p21 proteins. **Results** The cell inhibitory rates of high, middle, low-dose FFZBG group were 40.00%, 42.37% and 26.78% respectively, while apoptosis rates were 18.75%, 20.00% and 15.32% respectively, which were higher than that of the control group ($P < 0.05$). At 48h, the expression of MDM2, p53, p21 protein in high-dose FFZBG group, MDM2 protein in middle-dose FFZBG group and MDM2, p53 protein in low-dose FFZBG group were higher than that of the control group ($P < 0.01$). At 96h, the expression of MDM2 protein of high, middle, low-dose FFZBG group was significantly lower than that at 48h, while the expression of p53 protein was higher ($P < 0.01$). **Conclusion** *Fufang Zhebei Granules* can inhibit the proliferation of HCT-116 cells and promote apoptosis, with the possible mechanism of up-regulating the MDM2-p53 signal pathway.

Keywords colorectal cancer; *Fufang Zhebei Granules*; cell proliferation; cell apoptosis; MDM2-p53 signal pathway
(收稿日期: 2014-03-31; 修回日期: 2014-07-01)

编辑: 邓 媛

欢迎邮购医学光盘

四大经典 VCD 《黄帝内经》《伤寒论》《金匱要略》《温病学》全套 2500 元, 其中《金匱要略》单套 800 元, 其余每套 600 元。四大基础 VCD 《中医基础理论》、《中医诊断学》、《中药学》、《方剂学》全套 2700 元, 单套 700 元。

汇款地址: 北京东直门内南小街 16 号中医杂志社; 收款人: 北京医海林音像书店, 邮编: 100700, 联系人: 张伟平, (010) 64014411-3036; 叶晨, (010) 64013162。