

益气补肾方对胃癌细胞侵袭转移能力的影响

阮叶萍^{1*} 刘云霞² 姚立¹

(1. 浙江中医药大学药学院, 杭州市滨江区滨文路 548 号, 310053; 2. 杭州市第三人民医院肿瘤科)

* 通讯作者: ruanyp@zjtcn.net, (0571)86613521

[摘要] 目的 探讨益气补肾方对胃癌细胞 SGC-7901 侵袭转移能力的影响。方法 将胃癌 SGC-7901 细胞接种于 RPMI-1640 培养液中, 益气补肾方水溶液配制成 1、2、4、8、16、32、64 mg/ml 7 个终浓度, 设肿瘤细胞为空白对照组, 在 96 孔板内每个剂量 6 个平行孔, 重复 3 次, 37℃、5%CO₂ 培养箱孵育 48h。采用 MTT 法检测不同浓度益气补肾方对 SGC-7901 细胞增殖的抑制率; 采用 RT-PCR 法检测其对 SGC-7901 细胞基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 和基质金属蛋白酶抑制酶-2 (TIMP-2) 的基因表达活性的影响。结果 不同浓度的益气补肾方对 SGC-7901 细胞都有一定的抑制作用, 以 16 mg/ml 和 32 mg/ml 浓度抑瘤作用较好, 抑制率分别为 53.17% 和 56.47%; MMP-2 mRNA 在 32 mg/ml 组同空白对照比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 并且 16 mg/ml 组也能下调 MMP-2 mRNA 的表达, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 益气补肾方能明显抑制胃癌细胞 SGC-7901 侵袭转移能力, 且以 32 mg/ml 浓度最好。

[关键词] 益气补肾方; 肿瘤转移; 胃癌细胞; 基质金属蛋白酶-2; 基质金属蛋白酶抑制酶-2

Influence of Yiqi Bushen Formula on the Ability of Invasion and Metastasis of Gastric Cancer Cells

RUAN Yeping¹, LIU Yunxia², YAO Li¹

(1. College of Pharmacy, Zhejiang University of Chinese Medicine, Hangzhou 310053; 2. the Third People's Hospital of Hangzhou City)

ABSTRACT **Objective** To discuss the influence of Yiqi Bushen Formula (Formula for replenishing qi and tonifying the kidney) on the ability of invasion and metastasis of gastric cancer cells SGC-7901. **Methods** The gastric cancer cells SGC-7901 were inoculated into the RPMI-1640 culture solution. Yiqi Bushen Formula decoction was prepared to 7 final concentrations as 1, 2, 4, 8, 16, 32, and 64 mg/ml. The cancer cells, taken as the blank control group, were put into the 96-hole plate. Each dose of the Formula decoction was applied to the 6 parallel holes of the plate. The procedure was repeated for 3 times. Cells were incubated in the incubator at 37℃ and 5%CO₂ for 48h. The inhibition rate of proliferation of SGC-7901 cells by the different concentrations of Yiqi Bushen Formula was detected with the MTT method. The activity of gene expressions of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its inhibitory enzyme-2 (TIMP-2) of SGC-7901 cells were measured with the RT-PCR method. **Results** The Formula decoction of different concentrations had certain inhibiting action on SGC-7901 cells, but the concentrations 16 mg/ml and 32 mg/ml functioned better, the inhibition rate being 53.17% and 56.47% respectively. Compared with blank control group, the difference was statistically significant in the MMP-2 of the 32 mg/ml group ($P < 0.05$), and the MMP-2 mRNA expression of the 16 mg/ml group was also down-regulated, but the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion** Yiqi Bushen Formula is effective in inhibiting the ability of invasion and metastasis of gastric cancer cells SGC-7901, and the result of concentration 32 mg/ml was the best.

Keywords Yiqi Bushen Formula (Formula for replenishing qi and tonifying the kidney); gastric cancer cells; metastasis of cancer; matrix metalloproteinase-2 (MMP-2); matrix metalloproteinase inhibitory enzyme-2 (TIMP-2)

我国每年恶性肿瘤发病人数约 160 万, 已超过心脑血管病成为致死原因的第 1 位, 90% 的肿瘤患者死于转移^[1], 肿瘤转移是肿瘤恶性行为的特征性表现, 也是临床治疗失败的主要原因。益气补肾方是著名老中医金亚城根据肿瘤手术、化疗、放疗后正气亏虚之病机特点组方而成, 前期实验研究证明^[2], 该制剂具有较好的抗肿瘤作用, 本文在前期研究基础上观察益气补肾方对胃癌细胞 SGC-7901 侵袭转移能力的影响。

1 材料

1.1 试剂

胎牛血清: 杭州四季青生物工程材料研究所 (批号: 090712), 细胞培养基 RPMI-1640: 美国 GIBCO-BRL 公司 (批号: 090814), 二苯基四氮唑溴盐 (MTT): 华美生物工程公司进口分装, 青霉素钠盐: 华北制药有限公司 (批号: C0803802), 链霉素: 华北制药有限公司 (批号: Y0908203), AMV 逆转录酶、Taq 酶、RNase Inhibitor 和 dNTP 等: 宝生物工程

(大连)有限公司。基质金属蛋白酶-2(MMP-2):上游引物:5'-CACCTACACCAAGAACTTCC-3';下游引物:5'-AACACAGCCTTCTCCTCCTG-3';扩增长度:327bp。基质金属蛋白酶抑制酶-2(TIM-2):上游引物:5'-GTTCCCCACGAATCAACGA-GA-3';下游引物:5'-GCAAAGTGACGGCTCTG-GTAG-3';扩增长度:434bp。 β -Actin:上游引物:5'-ATGCCATCCTGCGTCTG-3';下游引物:5'-ACTCCTGCTTGCTGATCCACAT-3';扩增长度:578bp。

1.2 药材及瘤株

益气补肾方组成:黄芪 20g,茯苓 12g,女贞子 12g,枸杞子 12g,猪苓 12g,莪术 10g,半枝莲 30g,藤梨根 30g,薏苡仁 30g,八月札 10g,大枣 30g,炙甘草 6g。购自浙江中医药大学饮片厂。人胃癌细胞株 SGC-7901,由中国科学院上海细胞生物学研究所提供。

1.3 试剂配制

D-Hanks 液配制:称取 NaCl 8.00g, KCl 0.40g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.06g, KH_2PO_4 0.06g, NaHCO_3 0.35g,酚红 0.02g,依次溶于约 700ml 双蒸水中,定容至 1L,充分混匀,分装入瓶,包扎 121℃ 高压灭菌 30min。胰蛋白酶溶液配制:称取 1:250 胰蛋白酶 3.0g,溶解于 1000ml 高压灭菌过的 D-Hanks 液中,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,无菌条件分装入瓶, -20℃ 保存备用。用时根据不同细胞株配制成 0.1%、0.15% 浓度使用。细胞培养液的配制:将粉状培养基 RPMI-1640 缓慢加入约 400ml 双蒸水中,水温需在 15℃ 左右,并不时搅拌使之溶解,同时加入 2g 的 NaHCO_3 ,加入双抗(终浓度为青霉素 100U/ml 和链霉素 100U/ml),最后定溶至 1L,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,无菌条件下分装入瓶, -20℃ 保存备用。使用时加入胎牛血清。

1.4 仪器

细胞培养板与细胞培养皿,由丹麦 NUNCLON 公司生产;HEPA CLASS100 型细胞 CO_2 培养箱,由美国 THERMO 公司生产;倒置显微镜,由日本 OLYMPUS 公司生产;DGG-9420A 电热恒温鼓风干燥箱,由上海森信实验仪器有限公司;DK-S24 型水浴锅,由上海森信实验仪器有限公司生产;D1810C 自动双重纯水蒸馏仪,由上海申胜生物技术有限公司生产;UR-4100 型酶标仪,由美国 Dyn-

atech 公司生产。

2 方法

2.1 药物制备及剂量

将购得的中药饮片置砂锅中加相当于药材量 5 倍的冷水浸泡 1h,煮沸 30min;再加 3 倍量水继续煎煮 20min,过滤,合并 2 次滤液,将煎得的水煎液采用旋转蒸发仪浓缩后,加入酒精调节乙醇浓度到 70%,沉淀过夜后离心去沉淀,浓缩至 1g/ml 的生药水煎剂,调 pH 值 7.0~7.2,分装,0.22 μm 过滤除菌灭菌,4℃ 保存备用。

2.2 细胞培养

将 SGC-7901 细胞接种于含 10% 胎牛血清、青霉素 100U/ml、链霉素 100U/ml 的 RPMI-1640 培养液中,在 37℃、5% CO_2 培养箱中培养,每 1 或 2 天换液 1 次,长满后常规胰蛋白酶消化法传代培养^[3]。

2.3 MTT 法检测益气补肾方对 SGC-7901 细胞增殖的影响

将对数生长期的 SGC-7901 制成 5×10^4 个/ml 的细胞悬液,每孔 200 μl 接种于 96 孔培养板内。实验设肿瘤细胞空白对照组、经预实验益气补肾方水溶液选取 1、2、4、8、16、32、64mg/ml 7 个终浓度。分别加在 96 孔板内,每个剂量 6 个平行孔,重复 3 次。37℃、5% CO_2 培养箱孵育 48h。吸弃上清,每孔加 RPMI-1640 100 μl 、MTT 20 μl ,再孵育 4h,离心、弃上清。每孔加 DMSO 200 μl ,酶标仪 490nm 处测每孔吸光度(A 值)。

细胞增殖抑制率(IR%) = (1 - 试验组 A 值/对照组 A 值) × 100%。

2.4 RT-PCR 法检测益气补肾方对 SGC-7901 细胞 MMP-2 和 TIMP-2 的基因表达

参考文献[4-5],将空白对照组和不同浓度的益气补肾方处理(16mg/ml 和 32mg/ml)组胃癌细胞收集。严格按说明书操作,测定 MMP-2、TIMP-2 的表达情况。具体方法如下:①RNA 提取:收集胃癌细胞转移到 1.5ml Eppendorf 管→加入 1ml 的 Trizol→用移液枪轻轻吸打使细胞破碎→加 200 μl 氯剧烈振荡混匀 30s→离心→上清液转移到无 RNase 的 1.5ml 离心管中→加入与上清等体积的异丙醇,放置 5min→离心→弃去上清→白色沉淀用 70% 乙醇洗涤两次→离心→真空离心干燥→沉淀用 40 μl DEPC- H_2O 溶解。②电泳检测 RNA 提取质量:制备胶板→将已加入上样缓冲液的 RNA 样品

加入加样孔→电泳→分析结果,验证 RNA 完整性。

③测量 RNA 提取的浓度:微量核酸测量仪测定每个 RNA 样品的浓度并定量,保证做 RT-PCR 时上样量的一致。

④RNA 逆转录成 cDNA:逆转录以 $1\mu\text{g}$ 总 RNA 为模板,按照 AMV 逆转录酶提供的标准体系,在 PCR 管中配制逆转录反应液,于 42°C 恒温槽中进行逆转录反应 60min → 99°C 终止反应,冰水中冷却→所得到的反应液即可用于 PCR 反应。

⑤PCR 检测 MMP-2 和 TIMP-2 的表达:PCR 扩增目的基因 MMP-2 和 TIMP-2,并以 β -Actin 基因为内参进行 PCR 反应,反应体系为 $50\mu\text{l}$ 。 $10\times$ Reaction Buffer $5\mu\text{l}$ 、4 种 dNTP (25mM) 的混合物 $2\mu\text{l}$ 、预测上游引物 ($12.5\text{pmol}/\mu\text{l}$)、预测下游引物 ($12.5\text{pmol}/\mu\text{l}$)、 β -Actin 上游引物、 β -Actin 下游引物各 $1\mu\text{l}$ 、逆转录反应液 $3\mu\text{l}$ 、Taq DNA Polymerase ($3\text{U}/\mu\text{l}$) $1\mu\text{l}$ 、 ddH_2O 定容至 $50\mu\text{l}$,PCR 扩增仪中扩增。扩增条件: 94°C 预变性 5min 后, $94^{\circ}\text{C}/30\text{s}$ 、 $55^{\circ}\text{C}/30\text{s}$ 、 $72^{\circ}\text{C}/30\text{s}$,反应 30 个循环,最后一轮 72°C 延伸 5min , 4°C 保存。扩增产物取 $5\mu\text{l}$ 在 1.0% 琼脂糖(含 EB, $5\text{ng}/\text{ml}$) 上电泳,凝胶成像仪观察结果并照相,每一个基因的表达量用 β -Actin 内参进行标准化,结果为基因表达量与 β -Actin 内参的比值,以上结果重复 3 次,取平均值。

3 结果

3.1 益气补肾方对 SGC-7901 细胞增殖的影响

表 1 示,不同浓度的益气补肾方对 SGC-7901 细胞都有一定的抑制作用,以 $16\text{mg}/\text{ml}$ 和 $32\text{mg}/\text{ml}$ 浓度抑瘤作用较好,抑制率分别为 53.17% 和 56.47% 。

表 1 不同浓度益气补肾方对 SGC-7901 细胞增殖作用的影响

组别	药物浓度 (mg/ml)	样本数	OD ₅₅₀ 值 ($\bar{x}\pm s$)	背景 OD ₅₅₀ 值	抑制率 (%)
药物组	64	6	0.684 ± 0.113	0.122	38.98
	32	6	0.488 ± 0.158	0.097	56.47
	16	6	0.525 ± 0.101	0.022	53.17
	8	6	0.589 ± 0.121	0.009	47.46
	4	6	0.769 ± 0.089	0.001	28.01
	2	6	0.962 ± 0.153	0	14.36
	1	6	1.097 ± 0.099	0	2.14
空白对照组		6	1.121 ± 0.109	0	0

3.2 益气补肾方对 MMP-2 和 TIMP-2 mRNA 表达活性的影响

图 1、图 2 示, MMP-2 mRNA 在空白对照组、 $16\text{mg}/\text{ml}$ 组和 $32\text{mg}/\text{ml}$ 组的表达量依次降低,而

TIMP-2 mRNA 表达则影响不大。表 2 示, MMP-2 mRNA 在 $32\text{mg}/\text{ml}$ 组同空白对照组比较,差异有统计学意义 ($P<0.05$); 并且 $16\text{mg}/\text{ml}$ 组也能下调 MMP-2 mRNA 的表达,但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 2 不同浓度益气补肾方对 MMP-2、TIMP-2 mRNA 表达活性的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	MMP-2	TIMP-2
空白对照组	0.759 ± 0.103	0.988 ± 0.102
$16\text{mg}/\text{ml}$ 组	0.703 ± 0.099	0.978 ± 0.105
$32\text{mg}/\text{ml}$ 组	$0.613\pm 0.089^*$	1.023 ± 0.116

注:与空白对照组比较, * $P<0.05$

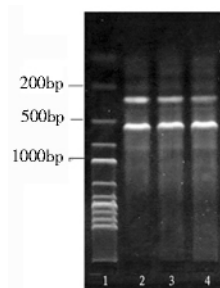


图 1 MMP-2 基因

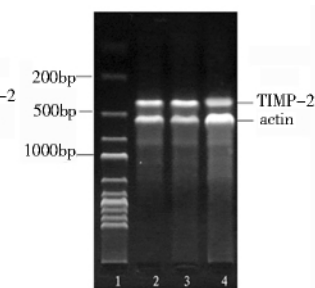


图 2 TIMP-2 基因

4 讨论

侵袭与转移是恶性肿瘤细胞最重要的生物学行为,与预后密切相关。肿瘤细胞的转移是多因素、多基因综合作用的结果,其机制十分复杂,除肿瘤细胞间的相互作用、肿瘤细胞与宿主细胞间的相互作用外,还包括细胞外基质在肿瘤细胞侵袭与转移过程中起到的防御作用^[6]。中医学认为,肿瘤发病就是全身性疾病的局部表现,治疗时通过观察局部消长,从而重视全身变化,中医理论将人体抵抗力称为“正气”,将肿瘤的侵害称为“邪气”。当正盛邪衰时,则肿瘤被控制或缩小,病情缓解;当正虚邪实时,则肿瘤进展或转移。益气补肾方由黄芪、茯苓、女贞子、枸杞子、猪苓、莪术、半枝莲、藤梨根、薏苡仁、八月札、大枣、炙甘草组成,具有补气固表、滋补肝肾、利水渗湿、活血止痛、败毒抗癌等作用,对于调整机体、增强抵抗力、改善症状、减轻痛苦具有较好的疗效。

肿瘤细胞通过自身或刺激宿主细胞分泌基质降解酶以改变基底膜结构,破坏其屏障作用,从而侵袭周围组织,转移至远处。肿瘤的转移与蛋白酶有关,尤其是肿瘤细胞分泌的 MMPs、TIMPs 在体内分布广泛,可调节基底膜降解过程,是 MMPs 的天然抑制剂,本实验中我们采用 MMT 法和 RT-PCR 法检

(下转第 159 页)

部分症状改善,减分率 $\geq 30\%$ 但 $< 50\%$;无效:症状无变化或加重,减分率 $< 30\%$ 。总有效率为临床痊愈、显效和有效之和。安全性观察治疗前后分别查血常规、尿常规、ALT、血肌酐(SCr)、尿素氮(BUN)、血糖、心电图。

3.2 两组临床疗效比较

治疗组 60 例,痊愈 4 例(6.7%),显效 45 例(75%),有效 11 例(18.3%),总有效率 100%;对照组 30 例,痊愈 0 例,显效 15 例(50%),有效 5 例(16.7%),无效 10 例(33.3%),总有效率为 66.7%。治疗组与对照组相比,显效率、总有效率差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3.3 两组治疗前后中医证候评分比较

表 1 示,治疗前两组中医证候评分差异无统计学意义($P > 0.05$);治疗组治疗后中医证候评分与

表 1 两组治疗前后中医证候评分比较(分, $\bar{x} \pm s$)

证候	治疗组(60 例)		对照组(30 例)	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
睡眠不安	5.21 $\pm$ 0.82	2.34 $\pm$ 0.67*	5.12 $\pm$ 0.87	4.82 $\pm$ 0.97*
心烦懊恼	4.64 $\pm$ 0.61	1.78 $\pm$ 0.47*	4.74 $\pm$ 0.92	4.34 $\pm$ 1.21*
胸闷	4.78 $\pm$ 0.68	2.15 $\pm$ 0.61*	4.64 $\pm$ 0.73	4.68 $\pm$ 0.98*
脘痞	4.28 $\pm$ 1.08	1.46 $\pm$ 0.61*	4.65 $\pm$ 1.10	3.97 $\pm$ 1.10*
咽中不适	4.08 $\pm$ 1.06	2.34 $\pm$ 0.48*	4.13 $\pm$ 1.21	4.78 $\pm$ 1.31*
痰多	3.78 $\pm$ 0.91	1.07 $\pm$ 0.22*	3.80 $\pm$ 0.92	3.68 $\pm$ 0.45*
头晕	3.92 $\pm$ 0.90	2.02 $\pm$ 0.42*	4.12 $\pm$ 0.77	3.80 $\pm$ 1.22*
目眩	3.90 $\pm$ 0.93	1.80 $\pm$ 0.52*	3.89 $\pm$ 0.95	3.56 $\pm$ 1.22*
苔黄腻	4.80 $\pm$ 0.90	3.80 $\pm$ 0.82*	4.84 $\pm$ 0.98	4.40 $\pm$ 0.62*
舌红	4.40 $\pm$ 0.92	3.82 $\pm$ 0.73*	4.30 $\pm$ 0.97	4.80 $\pm$ 0.98*
脉滑或数	5.38 $\pm$ 0.72	3.81 $\pm$ 1.02*	5.14 $\pm$ 1.02	5.32 $\pm$ 0.8*2

注:与本组治疗前比较,* $P < 0.05$

(上接第 150 页)

测益气补肾方对 SGC-7901 细胞 MMP-2 和 TIMP-2 的基因表达影响。实验结果也证明,益气补肾方对胃腺癌 SGC-7901 细胞有明显的抑制作用,且其作用浓度、时间与抑制率呈正相关,其中 16mg/ml 和 32mg/ml 浓度的抑制率分别为 53.17% 和 56.47%。益气补肾方对 MMP-2 和 TIMP-2 基因在空白对照组、16mg/ml 组和 32mg/ml 组的表达量依次降低,而 TIMP-2 mRNA 表达则影响不大,结果表明益气补肾方具有较好的抑制胃癌细胞 SGC-7901 侵袭转移能力的作用,且以 32mg/ml 浓度最好。

参考文献

- [1]常中飞,胡秀敏,陈培丰,等.运用中医理论探讨恶性肿瘤转移新学说——“经络转移学说”[J].中华中医药学刊,2008,26(1):134-135.

治疗前比较差异有统计学意义($P < 0.05$);对照组治疗后中医证候评分与治疗前比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

4 讨论

临床观察发现,肥胖为痰热内扰型患者的体型特点,饮食习惯偏于肥甘厚味;性格偏于急躁。临床见心烦不寐,或时寐时醒,或乱梦纷纭,胸闷痰多,头重目眩,口苦,暖气,泛恶,舌红、苔黄腻,脉滑数;治法为清化痰热、和中安神。温胆汤出自《三因极一病证方论》,由半夏、竹茹、枳实、橘皮、甘草、茯苓、生姜、大枣组成,有清胆和胃、理气化痰之功,主治“心胆虚怯,触事易惊,或梦寐不祥,或异象惑惑,遂致心惊胆慑,气郁生涎,涎与气转,变生诸症,或短气困乏,或复自汗,或四肢浮肿,饮食无味,心虚烦闷,坐卧不安”。我们经过长期的临床观察,发现痰热导致的失眠多挟有心胃郁热、肝阳上亢之候,因此,在原方基础上加(焦)栀子清心肝胃火,加珍珠母平肝镇静安神。

参考文献

- [1]中华医学会精神科分会.中国精神障碍分类与诊断标准(CCMD-3)[M].济南:山东科学技术出版社,2001:112—119.
- [2]上海市卫生局.上海市中医病证诊疗常规[M].上海:上海中医药大学出版社,2003:37—38.

(收稿日期:2011-09-28;修回日期:2011-11-04)

[编辑:黄健]

- [2]刘云霞,金亚城,中医药抗肿瘤转移机理的研究进展[J].中医药学刊,2005,23(10):1869—1872.
- [3]Jang M, Cai L, Udeani GO, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes[J]. Science, 1997, 275(5297): 218—220.
- [4]符慧群,曹培国,罗红,等.白藜芦醇对小鼠 Lewis 肺癌生长的影响及机制研究[J].肿瘤,2007,27(7):531—534.
- [5]Lu J, Ho CH, Ghai G, et al. Resveratrol analog, 3, 4, 5, 4'-tetrahydroxystilbene, differentially induces pro-apoptotic p53/Bax gene expression and inhibits the growth of transformed cells but not their normal counterparts[J]. Carcinogenesis, 2001, 22(2): 321—328.
- [6]陈艳芬,陈蔚文,李茹柳,等.左金丸和反左金对大鼠胃黏膜保护机制的比较研究[J].广州中医药大学学报,2003,20(2):133.
- [7]刘海兴.中医药治疗胃癌的研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2007,9(2):153.

(收稿日期:2011-03-24;修回日期:2011-09-06)

[编辑:邓媛]