

复方蜥蜴散及其拆方 SD 大鼠含药血清 对人 BCG-823 胃癌细胞 P53、bax 的影响

李卫强^{1,2} 侯卓成¹ 关芳¹ 艾梦环¹ 朱西杰^{1,2}

(1.宁夏医科大学中医学学院,宁夏银川 750004; 2.宁夏医科大学回医药现代化教育部重点实验室,宁夏银川 750004)

摘要 目的:研究复方蜥蜴散及其拆方含药 SD 大鼠血清对人胃癌细胞 BCG-823 凋亡及 P53、bax 表达水平的影响,探索复方蜥蜴散干预胃癌细胞作用机制。方法:70 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为 7 组:生理盐水对照组、复方蜥蜴散组、补气组、养阴组、解毒通络组、华蟾素片对照组、5-FU 对照组,每组 10 只。各组分别给予相应药物灌胃或注射 1 周后处死,于腹主动脉处取血,离心,制备含药血清。将含药血清加于人胃癌细胞 BCG-823 培养 48h,MTT 法检测人胃癌细胞株的吸光度(OD 值)观察含药血清对胃癌细胞凋亡的影响,Western-Blot 检测胃癌细胞 P53、Bax 表达变化。结果:经复方蜥蜴散组、补气组、养阴组、解毒通络组、华蟾素片对照组、5-FU 对照组含药血清干预后人胃癌细胞株的吸光度(OD 值)均值明显小于生理盐水对照组($P<0.05$),复方蜥蜴散组及补气组、解毒通络组 OD 值均值明显小于华蟾素片对照组和 5-FU 对照组($P<0.05$),复方蜥蜴散组 OD 值明显小于补气组、养阴组、解毒通络组($P<0.05$);补气组、养阴组、解毒通络组之间 OD 值比较差异亦有统计学意义($P<0.05$),其中以补气组 OD 值最低,其次为解毒通络组。与生理盐水对照组比较,复方蜥蜴散组及补气组、养阴组、解毒通络组、华蟾素片对照组、5-FU 对照组 P53 表达明显降低,bax 表达明显增加($P<0.05$),各给药组中以复方蜥蜴散组改变最为明显,各拆方组中以补气组作用最强。结论:复方蜥蜴散可通过降低 P53、增加 Bax 表达水平,抑制肿瘤细胞增殖,促进凋亡,各拆方中以补气组作用最佳,说明扶正益气治法具有较好的抗癌作用。

关键词 复方蜥蜴散 含药血清 人胃癌细胞 实验研究 细胞凋亡

中图分类号 R735.2 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2017)07-0076-04

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,其致死率居各类肿瘤之首^[1],近年来在世界范围内胃癌发病率和死亡率有所下降,但患者 5 年生存率仍然很低^[2-3],故深入研究胃癌发病机制和防治方法,阻断胃癌发展具有迫切性和重要性。我们在前期研究中发现,胃癌前病变及原位胃癌中医证候以虚实关联证为主,毒瘀交阻、气阴不足为其主要病机,提出在毒瘀交阻、黏膜失养而致缺血缺氧的环境下细胞增殖、凋亡失常,可致胃癌发生。据此,结合多年应用宁夏密点麻蜥治疗胃肠病的经验,组成复方蜥蜴散治疗胃癌前病变及胃癌,取得较好效果^[4-10]。本实验进一步应用血清药理学方法,观察复方蜥蜴散及其拆方含药 SD 大鼠血清对人胃癌细胞 BCG-823 增殖凋亡的影响,阐明复方蜥蜴散干预胃癌细胞的作用机制,探索各拆方作用效果,为临床治疗和进一步研究提供依据。

1 实验材料

1.1 实验动物 70 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,6~7 周龄,体重 140~180g,动物合格证号:SCXX(宁)2011-0001。SPF 大鼠生长繁殖饲料(北京科澳协力饲料有

限公司,批号:12083123)由宁夏医科大学实验动物中心提供。

1.2 实验药物 复方蜥蜴散,药物组成:宁夏密点麻蜥 20g、半枝莲 20g、丹参 20g、三七粉 6g、黄芪 30g、太子参 20g、乌梅 10g、炒白芍 10g、炙甘草 6g,熬制药液浓度为 1.3g/mL;补气组,药物组成:黄芪 30g、太子参 20g、炙甘草 6g,药物浓度为 0.55g/mL;养阴组,药物组成:乌梅 10g、炒白芍 10g,药物浓度为 0.40g/mL;解毒通络组,药物组成:宁夏密点麻蜥 20g、半枝莲 20g、丹参 20g、三七粉 6g,药物浓度为 0.50g/mL。各组药物由宁夏医科大学附属回医中医医院制剂室提供,中药煎煮浓缩,装瓶备用。华蟾素(每瓶 0.3g×20 片,安徽金蟾生化公司,批号:151022),用蒸馏水配制为 9mg/mL 混悬液。5-FU(0.25g/10mL,天津金耀药业公司,批号:1511191),用生理盐水稀释 10 倍后备用。

1.3 实验细胞与试剂 人胃癌细胞 BCG-823(中国科学院上海生科院细胞资源中心),DMEM 高糖培养基、胎牛血清(Gibco 公司),0.25g/L 胰蛋白酶(Hyclone 公司),总蛋白提取及定量试剂盒(南京凯

基金项目:国家自然科学基金(81560769);宁夏自然科学基金(NZ15089);宁夏高校科研项目(NGY2016110)

基生物科技有限公司),兔抗 P53、bax 多克隆抗体(武汉三鹰生物公司)。

1.4 主要仪器 超净工作台(美国 NUAIR 公司),恒温水浴锅、微型离心机(其林贝儿仪器制造公司),HealForce 二氧化碳培养箱(香港力康公司),显微镜 BH2-RFCA (OLYMPUS 公司),Germany 微量移液器,BCD-201/HC 超低温冰箱(广东科龙公司),C400 曝光仪(AZURE)。

2 实验方法

2.1 分组与给药 70 只 SD 雄性大鼠适应性饲养 1 周后,随机分为 7 组:生理盐水对照组、复方蜥蜴散组、补气组、养阴组、解毒通络组、华蟾素片对照组、5-FU 对照组,每组 10 只。大鼠中药给药量 2.5mL/100g,华蟾素混悬液给药量 1mL/100g,5-FU 尾静脉注射 0.8mL/100g,生理盐水对照组给予生理盐水 1mL/100g,每日 1 次,连续给药 7d。

2.2 含药血清制备 各组大鼠末次给药后 1h,腹腔麻醉,无菌条件下腹主动脉取血,3000r/min 离心 15min,封装,-20℃冷藏备用。

2.3 MTT 检测含药血清抗肿瘤活性 人胃癌细胞 BCG-823 接种于含 10%小牛血清 RPMI-1640 完全培养液,放置 37℃、5%CO₂ 饱和湿度恒温培养箱中培养 48~72h,每 24h 更换 1 次培养液。待胃癌细胞铺满瓶底后弃去培养液,PBS 清洗 2 次,0.25%胰蛋白酶消化胃癌细胞;含 10%小牛血清 RPMI-1640 培养液调整细胞浓度为 1.4×10⁶/mL,接种于 60mm 培养皿中。生理盐水对照组、复方蜥蜴散及其各拆方组、华蟾素片对照组、5-FU 对照组给予常规培养液的同时,分别加相应的含药大鼠血清,继续培养 48h,更换不含血清培养液,加入 10μL CCK-8,4h 后测吸光度(即 OD 值)。MTT 法所测定的吸光度值(OD 值)可间接反映活细胞数量,OD 值越小表明细胞凋亡越多。实验重复 3 次。

2.4 Western-Blot 检测肿瘤细胞 P53、bax 表达 在人胃癌 BCG-823 细胞培养瓶中分别加入各实验组大鼠含药血清,继续培养 48h 后,收集细胞提取蛋白,用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。取 20μL 样品上样于十二烷基硫酸钠-上样缓冲液(CSDS-PAGE),电泳至溴酚蓝移动至胶底部,转至硝酸纤维素膜(PVDF 膜)上,以 5%脱脂奶粉 4℃封闭 1h。分别加入 P53、bax 一抗,摇床孵育 3h,洗膜 3 次,每次 10min;分别加入辣根过氧化物酶标记的二抗(稀释比例均为 1:4000),摇床孵育 1h,洗膜 3 次;加入发光液,进行图像采集,计算 P53、bax 及灰度值比值。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件,数据以($\bar{x} \pm s$)表示,运用完全随机设计资料方差分析(One-Way

ANOVA)进行统计。组间经方差齐同性检验后采用 *t* 检验比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 经各组含药血清干预后人胃癌细胞 BCG-823 吸光度(OD)值比较 见表 1。经各给药组含药血清干预后人胃癌细胞 BCG-823 吸光度(OD)值明显低于生理盐水对照组($P < 0.05$);复方蜥蜴散组、补气组、解毒通络组 OD 值明显低于华蟾素对照组和 5-FU 对照组($P < 0.05$);补气组、养阴组、解毒通络组 OD 值明显高于复方蜥蜴散组($P < 0.05$);补气组、养阴组、解毒通络组 3 个拆方组组间比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),以补气组作用较佳,解毒通络组次之。

表1 各组人胃癌细胞 BCG-823 吸光度(OD)值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	OD 值
生理盐水对照组	1.49±0.03
复方蜥蜴散组	0.43±0.06 ^{*#}
补气组	0.55±0.03 ^{*#☆}
养阴组	0.73±0.04 ^{*☆}
解毒通络组	0.64±0.02 ^{*#☆}
华蟾素对照组	0.81±0.03 [*]
5-FU 对照组	0.74±0.04 [*]

注:*与生理盐水对照组比较, $P < 0.05$;#与华蟾素对照组、5-FU 对照组比较, $P < 0.05$;☆与复方蜥蜴散组比较, $P < 0.05$ 。

3.2 经各组含药血清干预后人胃癌 BCG-823 细胞凋亡蛋白 P53、bax 表达比较 见表 2。经各组含药血清干预后人胃癌 BCG-823 细胞凋亡蛋白 P53 表达均明显低于生理盐水对照组($P < 0.05$)、bax 表达明显高于生理盐水对照组($P < 0.05$);与华蟾素对照组、5-FU 对照组比较,复方蜥蜴散组、补气组、解毒通络组 P53 表达明显降低,bax 表达明显升高($P < 0.05$);与复方蜥蜴散组比较,补气组、养阴组、解毒通络组 P53 表达明显升高,bax 表达明显降低($P < 0.05$);补气组、养阴组、解毒通络组 P53、bax 水平组间比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),以补气组作用较佳,解毒通络组次之。

表2 各组人胃癌 BCG-823 凋亡蛋白 P53、bax 表达比较

组别	P53	bax
生理盐水对照组	1.47±0.03	0.20±0.02
复方蜥蜴散组	0.49±0.04 ^{*#}	0.48±0.06 ^{*#}
补气组	0.65±0.04 ^{*#☆}	0.41±0.01 ^{*#☆}
养阴组	0.80±0.06 ^{*☆}	0.23±0.04 ^{*☆}
解毒通络组	0.69±0.02 ^{*#☆}	0.35±0.02 ^{*#☆}
华蟾素对照组	0.72±0.03 [*]	0.31±0.03 [*]
5-FU 对照组	0.75±0.01 [*]	0.22±0.04 [*]

注:*与生理盐水对照组比较, $P < 0.05$;#与华蟾素对照组、5-FU 对照组比较, $P < 0.05$;☆与复方蜥蜴散组比较, $P < 0.05$ 。

4 讨论

肿瘤微环境(tumor micro environment)指肿瘤在发生发展过程中所处的内环境,细胞缺血缺氧微环境的改变是胃癌发展过程中的普遍现象。研究表明,胃黏膜细胞在缺血缺氧微环境改变的情况下,激活缺氧诱导因子 HIF-1 α ,引起细胞增殖凋亡失常^[9]、黏膜增生肠化而致癌变。胃癌属中医“伏梁”“积聚”“胃脘痛”等范畴。中医学认为,饮食、情绪失调及 Hp 湿热“虫”毒感染等因素致脾胃运化功能失常,不能升清降浊,气血化源不足,久则浊毒稽留,络脉瘀阻,胃燥失养而致癥瘕。可见,胃癌形成的中西医病机基本一致。因此,我们提出,毒瘀交阻、气阴不足是胃癌主要病机,而改善缺血缺氧微环境,促进细胞凋亡是防治胃癌的关键环节。

本研究结果表明,各含药血清干预组人胃癌细胞 BCG-823 吸光度值均明显小于生理盐水对照组,表明经含药大鼠血清干预后,胃癌细胞株凋亡增加,其中以复方蜥蜴散组 OD 值最低。各含药血清组组间比较,复方蜥蜴散组、补气组、解毒通络组 OD 值均明显小于华蟾素、5-FU 对照组,复方蜥蜴散组 OD 值又明显小于补气、养阴、解毒通络组,各拆方组间比较以补气组作用较好,其次为解毒通络组。设置拆方组为验证中医不同治法对胃癌细胞株的影响,结果表明补气组作用较好,“正气存内,邪不可干”,扶正益气具有较好的抗癌作用;解毒通络药物可以有效改善肿瘤细胞缺血缺氧的微环境,促进细胞凋亡,但因其整体药性偏于苦寒,易伤阳气,故其效差于补气组;而养阴组药性阴柔滋腻,改善肿瘤细胞缺血缺氧微环境的作用较差,故作用次于补气和解毒通络组。

P53 是目前研究最多的抑癌基因。正常 P53 基因为野生型,可监护细胞基因完整性,引导凋亡程序,阻止细胞向恶性转化等;发生变异者为突变体,不但丧失了抑癌活性,反而具有促进恶性转化的作用,P53 则由抑癌基因转变为癌基因。研究证实,P53 蛋白表达与多种恶性肿瘤的发生发展、转移及预后有关^[11-12],同时 P53 过度表达又可致肿瘤血管生成增加,是与血瘀证相关的重要因子^[13]。bax 是与 bcl-2 同源的水溶性相关蛋白,是 bcl-2 基因家族中细胞凋亡促进基因,也是人体最主要的抗凋亡基因,bax 过度表达可拮抗 bcl-2 保护效应而使细胞趋于死亡^[14]。研究发现,bax、bcl-2 蛋白之间的比例关系是决定对细胞凋亡(Apoptosis)抑制作用强弱的关键因素,因此认为 bax 是极重要的促细胞凋亡(Apoptosis)基因之一。

本实验研究表明,各含药大鼠血清干预组 P53 水平低于生理盐水对照组,以复方蜥蜴散组为著,其后依次为补气组、解毒通络组、华蟾素片对照组、5-FU 对照组、养阴组;各含药大鼠血清干预组 bax 水平高于生理盐水对照组,以复方蜥蜴散组为著,其后依次为补气组、解毒通络组、华蟾素片对照组、5-FU 对照组、养阴组。张仲景在《金匱要略·脏腑经络先后病脉证第一》中指出:“五脏元真通畅,人即安和”,疾病发生是机体阳气受损的结果,正如《内经》所言的“邪之所凑,其气必虚”,继之阳损及阴,阴阳、气血失调,邪毒稽留而病症发生。因此,实验结果显示以益气养阴、解毒通络立法的复方蜥蜴散疗效最佳,其次为补气组、解毒通络组、养阴组,此与中医理论不谋而合。实验结果表明复方蜥蜴散可通过降低 P53、增加 bax 表达水平,有效诱导胃癌细胞凋亡,抑制细胞增殖,具有较好的抗癌作用。

复方蜥蜴散方中宁夏密点麻蜥始载于《中国药用动物志》,蜥蜴在《本草纲目》言其可“消水饮阴瘕,滑窍破血”,《全国中草药汇编》载蜥蜴性寒味咸,归肾、肝、肺经,可养血活血、消癥散结,亦为动物类血肉有情之品。现代研究表明,蜥蜴含蛋白质、氨基酸及 Fe、Zn 等多种微量元素^[15],可提高机体免疫力,有较好的抗癌作用。半枝莲解毒杀“虫”,丹参、三七粉养血活血通络,黄芪、太子参、甘草健脾补气,乌梅、炒白芍酸敛止痛、柔肝养阴。诸药合用,益气养阴、解毒通络,通过改善胃黏膜细胞缺血缺氧微环境,增加细胞血氧供给,抑制 P53,增加 bax 表达而具有较好的抗癌作用。下一步拟进行复方蜥蜴散体内抗癌机制研究,以促进有效抗癌方药的研发。

参考文献

- [1] 刘晨晨,张振玉.胃内微生态与胃癌关系的研究进展[J].胃肠病学和肝病学杂志,2015,24(10):1175.
- [2] KIM J,CHO Y A,CHOI W J,et al.Gene-diet interactions in gastric cancer risk:a systematic review[J].World J Gastroenterol,2014,20(28):9600.
- [3] WAND Z K,YANK Y S.Relationship between gastric microbiota and gastric disease[J].Chin J Dig,2014,34(3):210.
- [4] 李卫强,朱西杰,蔡根深.基于 Stat3 通路复方蜥蜴散不同微粒组合剂干预大鼠胃癌前病变的分析[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(13):142.
- [5] 李卫强,魏雪红,朱西杰,等.复方蜥蜴散不同微粒组合剂干预胃癌前病变模型大鼠 Wnt 通路研究[J].中华中医药杂志,2015,30(9):3130.
- [6] 李卫强,朱西杰,魏雪红.胃癌前病变中医证型与甲皱微循环的相关性研究[J].实用中医内科杂志,2012,26(12):8.

针灸在治疗心律失常中的应用研究进展

江磊磊¹ 许砚之² 吴文忠¹

(1.江苏省中医院,江苏南京 210029; 2.南京中医药大学第二临床医学院,江苏南京 210023)

摘要 心律失常是心血管科常见疾病,严重心律失常者可危及生命。历代古籍上记载针灸对心悸、怔忡等病症具有良好的疗效。针灸治疗心律失常在实验研究及临床研究方面均取得了一定进展,但尚存在以下不足:(1)样本量小,说服力不强;(2)疗效判定标准不统一,缺乏可比性;(3)临床选穴方法繁多,缺乏标准化治疗方案;(4)对于针灸治疗心律失常的机制缺乏深入的实验研究;(5)临床实验多以百分比描述有效与否,鲜有数据对比,缺乏说服力。在今后的研究中,应尽量按照国际标准,使用更为规范的研究方法,以增加针灸治疗的说服力。

关键词 心律失常 针灸疗法 综述

中图分类号 R259.417

文献标志码 A

文章编号 1672-397X(2017)07-0079-04

心律失常是指激动起源异位、频率改变、传导径路多变、传导障碍或起搏器引起的心电活动异常等,表现为窦性心律失常、期前收缩、房扑房颤、传导阻滞等^[1]。目前临床上使用的抗心律失常西药对心肌细胞的兴奋性、自律性、传导性及心肌收缩力有不同程度的抑制作用,从而治疗心律失常,但也常可诱发心律失常,且易产生耐药性等副作用,甚至引发严重的不良反应。如何发挥中医药尤其是针灸简、便、廉、验且副作用少的优势,研讨针灸对心律失常最佳的治疗方法和规律,成为目前研究的热点。现将针灸在治疗心律失常中的应用研究进展概述如下。

1 实验研究

尤行宏等^[2]将 40 只大鼠随机分为 4 组:空白对照组、生理盐水组、模型组和头针组,通过针刺氯化钡所致的室性心律失常模型大鼠头皮双侧“额旁 1 线”区域,观察头针治疗前、中、后不同时刻心率的变化。结果显示:与正常大鼠比较,氯化钡诱发室性心律失常时大鼠心率显著增快($P<0.01$),头针对实验性室性心律失常有显著的缓解作用($P<0.01$)。高俊虹等^[3]采用结扎和再灌注大鼠左冠状动脉前降支的方法建立实验型心肌缺血/再灌注(I/R)模型。40 只雄性大鼠随机分为正常对照组(NC)、缺血再灌注组(IR)、缺血再灌注加电针组(EA)和缺血再灌注加

- [7] 李卫强,魏雪红,朱西杰.复方蜥蜴散不同微粒组合剂治疗胃癌前病变阴虚络瘀证的临床疗效及与癌胚抗原的动态关系研究[J].时珍国医国药,2012,23(9):封三.
- [8] 李卫强,魏雪红,朱西杰.复方蜥蜴散不同微粒组合剂治疗慢性萎缩性胃炎临床研究[J].时珍国医国药,2012,23(4):842.
- [9] 张德英,侯卓成,李卫强.蜥蜴胃康基本方及其拆方对胃癌前病变模型大鼠 HIF-1 α 、VEGF 表达影响的实验研究[J].时珍国医国药,2016,27(6):1292.
- [10] 侯卓成,白鲁根,李卫强.宁夏密点麻蜥含药大鼠血清对人胃癌 BCG-823 细胞凋亡的影响[J].世界华人消化杂志,2017,25(1):43.
- [11] YU J,ZHANG L. PUMA, a potent killer with or without p53[J].Oncogene,2008,27(Suppl 1):S71.
- [12] BAO W,CHEN M,ZHAO X,et al.PRIMA-1Met/APR-246 induces wild-type p53-dependent suppression of

malignant melanoma tumor growth in 3D culture and in vivo[J].Cell Cycle,2011,10(2):301.

- [13] 任玲,徐力.胃癌中医证型与基因相关性研究进展[J].江苏中医药,2014,46(7):78.
- [14] XIE Z,KOYAMA T,SUZUKI J,et al.Coronary reperfusion following ischemia:different expression of bcl-2 and bax proteins,and cardiomyocyte apoptosis [J].Jpn Heart J,2001,42(6):759.
- [15] 朱西杰,李卫强,钱月慧.中华虫药——宁夏蜥蜴[M].北京:中国中医药出版社,2014:16.

第一作者:李卫强(1974—),男,医学硕士,副教授,副主任医师,硕士研究生导师,从事脾胃病基础与临床研究工作。lwq200309@163.com

收稿日期:2017-04-05

编辑:吴宁