

“通膈汤”含药血清对食管癌细胞增殖和凋亡的影响研究

乔红¹ 何世仪² 钱峻² 霍介格³

(1.宝应县中医院,江苏宝应225800;2.南京中医药大学,江苏南京210023;

3.江苏省中西医结合医院,江苏南京210028)

摘要 目的:观察中药复方通膈汤含药血清对食管癌Eca-109细胞增殖和凋亡的影响。方法:将大鼠分为空白血清组和通膈汤低、中、高剂量组,分别灌胃给予蒸馏水和通膈汤不同剂量水溶液。连续灌胃10d后,腹主动脉取血,离心并收集血清。食管癌Eca-109细胞培养,经消化、计数,制成细胞悬液,接种,置于培养箱中,每孔加入含相应浓度含药血清的培养基。CCK-8法(CCK试剂盒)检测通膈汤含药血清对Eca-109细胞增殖能力的影响,流式细胞术检测含药血清对Eca-109细胞周期和凋亡的影响,细胞黏附试验和transwell(转移)侵袭试验检测含药血清对细胞黏附能力及侵袭能力的影响。结果:10%和20%通膈汤各剂量含药血清对Eca-109细胞的增殖有明显抑制作用,该作用随时间延长而增强。20%通膈汤低、中剂量含药血清组细胞G1期(DNA合成前期)比例明显高于空白血清组($P<0.05$),G2+S期(DNA合成期+DNA合成后期)比例明显低于空白血清组($P<0.05$)。与空白血清组比较,20%通膈汤各剂量含药血清组细胞凋亡率显著增大。20%、10%、5%含药血清能显著降低Eca-109细胞的黏附能力及侵袭能力。结论:通膈汤含药血清可以抑制食管癌Eca-109细胞增殖,诱导其凋亡并降低细胞黏附及侵袭能力。

关键词 通膈汤 食管癌 细胞增殖 细胞凋亡 大鼠 实验研究

中图分类号 R735.1

文献标志码 A

文章编号 1672-397X(2017)10-0075-04

食管癌是一种常见的消化道恶性肿瘤,死亡率在我国恶性肿瘤中居第四位^[1]。通过根治性手术,早期食管癌患者5年生存率可达30%~35%,而进展期患者生存时间较少超过5年,80%患者死于局部浸润和转移^[2-3]。中医药在改善恶性肿瘤患者体质、减轻副作用、提高生活质量等方面具有重要的临床应用价值^[4]。我们在临床中观察到食管癌的主要病证为痰瘀阻滞、津亏气损,由此拟定了具有化痰行瘀、生津益气作用的中药复方“通膈汤”,经临床应用表明该药可以改善中晚期食管癌患者的恶心呕吐、便秘等胃肠道症状,提高免疫力,但其机制尚不明确。本研究通过观察通膈汤含药血清对人食管癌Eca-109细胞增殖、凋亡、黏附能力及侵袭作用的影响,探讨通膈汤的抗食管癌机制,为临床应用通膈汤治疗食管癌提供实验依据。

1 实验材料

1.1 通膈颗粒 由北沙参颗粒10g(批号:1512123)、姜半夏颗粒12g(批号:1603094)、丹参颗粒10g(批号:1605181)、急性子颗粒10g(批号:1505073)、菝葜颗粒15g(批号:1511089)、茯苓颗粒10g(批号:

1605044)、川贝母粉3g(批号:1512074)、升麻颗粒6g(批号:1511156)组成,江阴天江药业有限公司生产。

1.2 细胞 人食管癌细胞Eca-109,购于中国科学院上海细胞库,在含有10%胎牛血清的 α -MEM培养基中将细胞置于37℃、5%CO₂培养箱中培养,待细胞融合度达80%~90%时,用0.25%胰酶消化传代培养。

1.3 动物 SD大鼠,180~200g,北京维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(苏)2016-0003。

1.4 仪器与试剂 二氧化碳培养箱,日本三洋SANYO,型号:MCO-15AC;荧光倒置生物显微镜,南京江南永新光学有限公司,型号:XD-202;台式高速离心机,SCILOGEX,型号:D2012;流式细胞仪,美国BD公司,型号:Accuri™ C6;酶标仪,Thermo scientific,型号:MUTISKAN MK3;低温离心机,SCILOGEX,型号:D3024R;96孔细胞培养板、24孔细胞培养板购自Costar公司;RPMI1640培养基购自Gibco公司;胎牛血清购自Gibco公司;

基金项目:江苏省中医药局面上项目(PY201514)

DMSO购自Sigma公司; CCK8细胞活力检测试剂盒由南京恩晶生物科技有限公司提供; Transwell小室, pore size 8.0 μ m, REF 3422, LOT: 14416045; BD Matrigel Matrix (Basement Membrane), BD Biosciences, 356234; 组织裂解液、牛血清白蛋白(BSA)、显影液、定影液, 均购自南京恩晶生物科技有限公司。

2 实验方法

2.1 含药血清的制备 通膈汤颗粒人用量为76g生药/d, 剂量为1.267g/kg, 换算成大鼠剂量为7.98g/kg(临床等效量), 将此剂量设置为中剂量, 高剂量为15.96g/kg, 低剂量为3.99g/kg。将通膈汤颗粒各组分混合, 并用蒸馏水充分溶解。SD大鼠随机分为空白血清组和通膈汤低、中、高剂量组, 空白血清组灌胃给予等体积蒸馏水, 通膈汤低、中、高剂量组大鼠灌胃给予不同剂量通膈汤颗粒溶液, 给药体积均为0.8mL/100g, 连续给药10d。末次给药前12h, 各组大鼠禁食不禁水, 末次给药1h后, 大鼠经戊巴比妥钠麻醉, 腹主动脉取血, 室温静置2h后离心(3000r/min, 15min), 收集血清。血清经过滤除菌后分装并于-20℃保存, 备用。

2.2 细胞增殖抑制实验 取对数生长期Eca-109细胞进行实验。细胞经消化、计数, 制成 1×10^5 个/mL的细胞悬液, 接种于96孔板中(100 μ L/孔), 置于37℃、5%CO₂培养箱中培养24h; 每孔加入含相应浓度含药血清的培养基(含药血清含量分别为20%、10%、5%、2.5%、1.25%), 同时设立空白血清组及正常组, 每组3个复孔; 将板置于培养箱中分别培养12、24、48、72h后, 显微镜下观察各组细胞形态, 每孔加入10 μ L CCK8溶液, 在细胞培养箱内继续孵育2h, 450nm下测定吸光值, 并计算增殖抑制率。细胞增殖抑制率=(1-实验组OD值/对照组OD值)×100%。

2.3 PI染色法流式细胞仪检测细胞周期 细胞以 1×10^5 个/mL密度接种于96孔板中, 每孔100 μ L, 置于37℃、5%CO₂培养箱中培养24h。每孔加入20%各剂量组含药血清, 同时设立空白血清组及正常组。将板置于培养箱中培养48h后收集细胞, 用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤1次, 吸尽上清后, 加入0.2mL PBS重新悬浮细胞, 把制备好的单细胞悬液全部缓慢转移至0.8mL -20℃无水乙醇中, 充分吹匀后放置-20℃冰箱中过夜。离心(2000r/min, 5min), 吸尽上清后, 加入1.0mL PBS重新悬浮细胞, 室温放置15min; 离心(2000r/min, 5min), 吸尽上清后, 加100 μ L RNase A 37℃水浴30min; 再加入400 μ L PI (50 μ g/mL) 染色混匀, 4℃避光30min。

流式细胞仪检测, 记录激发波长488nm处红色荧光, 分析细胞周期变化。

2.4 Annexin V-EGFP荧光染色法流式细胞仪检测细胞凋亡 细胞以 1×10^5 个/mL密度接种于96孔板中, 每孔加入20%各剂量组含药血清, 同时设立空白血清组及正常组。将板置于培养箱中培养48h后收集细胞(包括培养基中悬浮的凋亡细胞), 离心(2000r/min, 5min), 收集细胞沉淀, 并用PBS洗涤1次, 加入500 μ L结合液重悬细胞, 加入5 μ L Annexin V-EGFP、5 μ L PI, 同时设立全阴管及单阳管, 充分混匀。室温(20~25℃)避光孵育10~30min后, 流式细胞仪检测细胞凋亡百分率。

2.5 细胞黏附能力检测 实验前取出Matrigel Matrix胶于4℃下融化, 并将枪头及离心管放置于冰箱中预冷。用预冷枪头吸取Matrigel Matrix胶于预冷离心管中, 并用预冷1640稀释50倍, 充分吹匀, 将96孔板置于冰盒上, 各孔加30 μ L Matrigel胶稀释液, 注意使胶平铺于整个孔底, 避免气泡产生。铺胶完成后将96孔板放置37℃、30min后转4℃保存。种板及加药: 取出包被好的96孔板, 吸出孔中多余液体, 超净台中晾干。取对数生长期Eca-109细胞进行实验。细胞经消化、计数, 制成 2×10^5 个/mL的细胞悬液, 接种于96孔板中(80 μ L/孔), 加入20 μ L不同浓度的中剂量含药血清及空白血清, 使血清终浓度分别为20%、10%及5%, 同时设立正常组, 各组5复孔, 将板置于培养箱中培养, 分别于30、60、90、120min于显微镜下观察细胞形态及贴壁状态, 拍摄照片并加入CCK8试剂(10 μ L/孔), 于37℃孵育4h, 450nm下检测各孔吸光度并统计分析。

2.6 细胞侵袭能力检测 铺胶: 低温下操作, 吸取Matrigel胶, 用无血清1640培养基将Matrigel胶进行8倍稀释, 充分吹匀后, 每个小室铺胶50 μ L, 共制作7个小室, 置37℃培养箱内30min使胶凝固。种板及加药: 用无血清1640培养基调整细胞密度为 5×10^5 /mL, 吸取160 μ L细胞悬液加入到侵袭小室内, 同时加入40 μ L不同浓度中剂量含药血清, 使血清终浓度为5%、10%、20%, 同时设置相应浓度的空白血清组及正常组, 下室加入含10%FBS的1640 500 μ L, 注意避免上室底部与下室培养基之间产生气泡, 培养箱中培养24h, 弃去小室内培养液, 用PBS洗2遍。用湿棉签擦尽上室面的Matrigel和细胞, 甲醇固定20min, 待完全挥干后, 用0.1%结晶紫染色15~20min, 用清水洗3遍。显微镜下观察并拍照, 每个小室随机选取5~6个视野。计数: 针对每个视野中细胞进行计数, 并计算平均值。

2.7 统计学方法 数据以 (mean±SD) 表示,应用 GraphPad Prism 5.0统计软件,组间比较采用t-test 检验,多组间比较采用One-way Anova (Dunnett), $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 通膈汤含药血清对Eca-109细胞体外增殖的影响 结果见表1。实验表明,各剂量含药血清组20%和10%含药血清对Eca-109的增殖有明显的抑制作用,该作用随时间延长而增强,提示通膈汤含药血清在一定浓度可以抑制食管癌Eca-109细胞增殖。

3.2 通膈汤含药血清对Eca-109细胞周期及凋亡的影响 实验表明,作用48h后,通膈汤低、中剂量含药血清组细胞G1期比例均明显高于空白血清组 ($P<0.05$),高剂量含药血清组与空白血清组细胞G1期比较无统计学差异;低、中剂量含药血清组细胞G2+S期比例均低于空白血清组 ($P<0.05$),高剂量含药血清组细胞G2+S期比例略高于空白血清组,但差异没有统计学意义 ($P>0.05$)。见表2。在对细胞凋亡的影响方面,食管癌Eca-109细胞的总凋亡率与通膈汤含药血清剂量呈正相关,随剂量的增加而增加,见图1。

3.3 通膈汤含药血清对Eca-109细胞黏附能力的影响 实验结果显示,不同浓度含药血清在各时间点能不同程度降低细胞黏附能力,其中20%、10%、5%通膈汤含药血清在培养90min时可显著降低细胞黏附能力,5%通膈汤含药血清在培养120min时可显著降低细胞黏附能力,与空白血清组比较有显著性差异 ($P<0.01$)。见图2。

3.4 通膈汤含药血清对Eca-109细胞侵袭能力的影响 实验结果显示,不同浓度通膈汤含药血清能不同程度降低细胞侵袭能力 ($P<0.05$, $P<0.001$),尤其以5%、20%通膈汤含药血清效果最显著。见图3。

4 讨论

中医认为食管癌的病机总属痰瘀阻滞、津亏气损,而以痰气瘀阻多见^[5]。基于这一认识,霍介格教授拟定了具有化痰行瘀、生津益气作用中药复方“通膈汤”。方中北沙参、川贝母滋阴润燥化痰,丹参、郁金化瘀散结,茯苓健脾化痰,急性子破血软坚、消积。

表1 通膈汤含药血清作用不同时间对Eca-109细胞的增殖抑制率 %

组别	血清含量	12h	24h	48h	72h
空白血清组	20%	28.88±3.63	30.80±0.97	28.14±1.71	51.15±2.09
	10%	14.71±2.59	12.41±2.41	7.49±1.56	44.36±1.38
	5%	13.78±1.40	7.52±2.14	5.17±1.08	11.62±1.65
	2.5%	-2.44±1.77	-5.62±2.52	1.44±1.08	0.59±0.55
通膈汤低剂量含药血清组	20%	28.43±0.75	55.50±1.29*	45.13±3.22*	48.03±1.66
	10%	10.88±1.00	18.26±1.69*	16.15±2.63*	41.24±1.56
	5%	-5.81±1.46	12.58±3.50	2.03±0.44	37.23±0.24
	2.5%	-8.37±1.9	1.18±4.52	-2.21±0.92	7.79±1.39
通膈汤中剂量含药血清组	1.25%	-10.41±2.76	-1.15±2.52	-2.25±0.93	-1.97±1.21
	20%	39.39±1.20	59.34±2.52*	48.88±0.77*	50.05±1.78
	10%	12.44±3.06	20.76±1.44*	16.59±0.21*	45.36±1.30
	5%	0.96±0.83	10.44±1.00	0.15±0.60	39.45±1.50
通膈汤高剂量含药血清组	2.5%	-2.41±1.77	1.38±3.76	-0.53±1.73	11.46±0.59
	1.25%	-9.90±2.84	1.58±1.55	-4.62±1.79	-1.49±1.05
	20%	41.68±1.30*	64.83±0.90*	55.95±0.50*	58.27±1.52
	10%	10.99±3.05	16.95±4.54*	18.64±2.05*	52.67±1.47*
通膈汤高剂量含药血清组	5%	-7.87±4.55	8.54±2.47	1.33±0.46	50.57±0.54
	2.5%	-11.39±2.98	-2.13±1.63	-2.67±1.33	11.59±1.10
	1.25%	-7.09±3.59	-3.78±1.13	-2.39±1.56	1.34±1.54

注: * 与同比例作用同样时间空白血清组比较, $P<0.05$ 。

表2 各组Eca-109细胞各期细胞比例

细胞周期	正常组	空白血清组	通膈汤低剂量含药血清组	通膈汤中剂量含药血清组	通膈汤高剂量含药血清组
G1 (%)	62.66±0.96	56.56±0.69	63.71±1.18*	61.71±1.16*	55.85±0.63
S (%)	19.69±0.36	27.42±0.59	23.31±0.31	23.91±0.33	27.54±0.80*
G2/M (%)	18.18±0.92	15.83±0.30	12.65±0.95	14.71±0.61	16.44±0.59

注: * 与空白血清组比较, $P<0.05$ 。

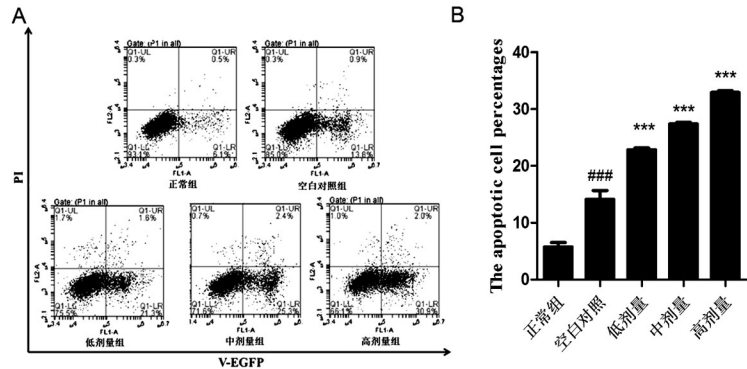


图1 各组Eca-109细胞凋亡情况

A: 流式细胞术检测20%含药血清对Eca-109细胞凋亡的影响; B: 作用48h后, 通膈汤低、中、高剂量含药血清组细胞凋亡比例。###与正常组比较, $P<0.001$; ***与空白血清组比较, $P<0.001$ 。

本研究结果表明,通膈汤含药血清对食管癌细胞的增殖有较好的抑制作用。20%和10%各剂量通膈汤含药血清对Eca-109的增殖有明显抑制作用,该作用随时间延长而增强。而5%、2.5%和1.25%含药血清对Eca-109的增殖抑制作用不明显,甚至是促进,可能原因是中药复方含药血清不同浓度对食管癌细胞的增殖抑制作用有差异,且复方内不同成分在不同时间相互影响,拟进一步研究。

细胞凋亡在肿瘤发生和发展中有重要意义,且化疗、放疗和生物治疗主要通过诱导细胞凋亡来治疗肿瘤^[6]。本研究结果发现食管癌Eca-109细胞的总凋亡率与通膈汤含药血清剂量呈正相关,随剂量的增加而增加。在对细胞周期影响方面,本研究结果表明通膈汤含药血清可能通过调控周期而影响细胞的增殖和凋亡。然而,通膈汤高剂量含药血清组细胞G1和G2+S期比例与空白血清组比较无统计学差异($P>0.05$),没有像对细胞凋亡影响那样表现出随剂量增加而增加的效应,考虑原因可能为中药复方含药血清不同浓度对食管癌细胞的复杂影响和复方中不同组分在体内代谢时间差异有关,具体原因有待进一步研究。

侵袭和转移是恶性肿瘤的特性,主要受肿瘤转移基因与肿瘤转移抑制基因、肿瘤血管生成、细胞外基质降解、细胞黏附、肿瘤微环境等因素影响^[7]。Transwell小室是当前测定肿瘤细胞体外侵袭能力较为理想的实验模型^[8],实验中我们采用Transwell小室侵袭模型体外观察通膈汤含药血清对Eca-109细胞侵袭、转移的影响,结果表明5%、20%通膈汤含药血清能够明显抑制食管癌Eca-109细胞侵袭转移运动能力,其可能的作用机制拟进一步研究。

参考文献

- [1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65 (2): 87.
- [2] KORN W M. Prevention and management of early esophageal cancer[J]. Curr Treat Options Oncol, 2004, 5 (5): 405.
- [3] SGOURAKIS G, COCKEL I, LANG H. Endoscopic and surgical resection of T1a/T1b esophageal neoplasms: a systematic review[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19 (9): 1424.

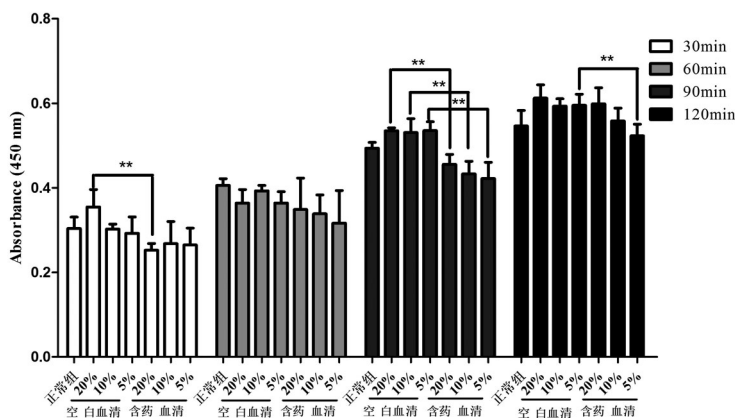


图2 通膈汤临床等效量含药血清对细胞黏附能力的影响

注: **与同浓度空白血清组比较, $P<0.01$ 。

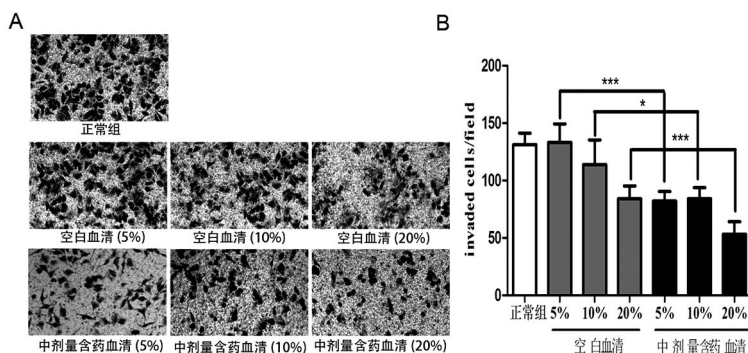


图3 不同浓度通膈汤中剂量含药血清对细胞侵袭能力的影响

A: 显微镜下观察各组细胞($\times 100$); B: 计数各组入侵细胞数目,与空白血清组比较, $*P<0.05$, $***P<0.001$ 。

- [4] LI F, ZHANG W. Role of traditional Chinese medicine and its chemical components in anti-tumor metastasis[J]. J Cancer Res Ther, 2014, 10 (Suppl 1): 20.
- [5] 杨联河, 赵雪艳, 郭彬, 等. 低氧条件下启膈散与顺铂抑制食管癌细胞EC9706增殖的协同效应[J]. 时珍国医国药, 2016, 27 (9): 2101.
- [6] WONG R S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2011, 30: 87.
- [7] ITATANI Y, KAWADA K, INAMOTO S, et al. The Role of Chemokines in Promoting Colorectal Cancer Invasion/Metastasis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17 (5): 643.
- [8] REPESH L A. A new in vitro assay for quantitating tumor cell invasion[J]. Invasion Metastasis, 1989, 9 (3): 192.

第一作者: 乔红(1972—), 女, 本科学历, 副主任医师, 主要从事中西医结合肿瘤的临床与科研工作。

通讯作者: 霍介格, 医学博士, 教授, 主任中医师, 博士研究生导师。hjj16688@126.com

收稿日期: 2017-06-22

编辑: 吴宁