

健脾养正消癥方对裸鼠胃癌皮下移植瘤细胞凋亡的影响及自噬机制的实验研究

吴 坚¹ 刘沈林² 张星星³ 陈 敏⁴ 邹 玺²

摘要 **目的** 观察健脾养正消癥方对人胃癌 MGC-803 细胞 BALB/c 裸鼠皮下移植瘤抑瘤率的影响及可能的分子机制。**方法** 取胃癌 MGC-803 细胞接种于裸鼠皮下,制备裸鼠移植性胃癌模型。32 只 BALB/c 裸鼠按随机数字表法分为阴性对照组、阳性对照组和健脾养正消癥方高、低剂量组,每组 8 只。阴性对照组给予生理盐水灌胃,阳性对照组给予 5-氟尿嘧啶(5-Fu, 2.5 mg/kg)灌胃,健脾养正消癥方高、低剂量组分别以 85、43 g/kg 灌胃,每天 1 次,连续 10 天。观察健脾养正消癥方对裸鼠皮下移植瘤抑瘤率的影响;采用 RT-PCR 法观察该复方对移植瘤中 Bax、Bcl-2、Fas、Cyclin D1、Cyclin D2 和 Cyclin D3 基因表达的影响;采用 Western Blot 法观察该复方对移植瘤中 procaspase-3、procaspase-8 和 procaspase-9、cleaved-PARP、Beclin-1 和 LC3B 蛋白表达的影响。**结果** (1)与阴性对照组比较,阳性对照组和健脾养正消癥方高、低剂量组瘤重明显减轻($P < 0.05$),健脾养正消癥方高、低剂量组瘤重均高于阳性对照组($P < 0.05$)。(2)RT-PCR 显示:与阴性对照组比较,阳性对照组和健脾养正消癥方高、低剂量组 Bax 表达上调,Bcl-2、Cyclin D1、Cyclin D2 和 Cyclin D3 表达下调(均 $P < 0.05$),阳性对照组及健脾养正消癥方高剂量组 Fas 表达上调($P < 0.05$);与阳性对照组比较,健脾养正消癥方高、低剂量组 Fas、Bax 表达均下调,Bcl-2、Cyclin D2 和 Cyclin D3 表达上调(均 $P < 0.05$),健脾养正消癥方高剂量组 Cyclin D1 下调,低剂量组 Cyclin D1 上调(均 $P < 0.05$)。(3)Western blot 显示:与阴性对照组比较,健脾养正消癥方高、低剂量组 procaspase-3、procaspase-8、procaspase-9 蛋白表达下调,cleaved-PARP、Beclin-1、LC3B II 蛋白表达上调(均 $P < 0.05$);阳性对照组 procaspase-3、procaspase-8、procaspase-9 和 LC3B II 蛋白表达下调,cleaved-PARP、Beclin-1 和 LC3B I 蛋白表达上调(均 $P < 0.05$)。**结论** 健脾养正消癥方对胃癌 MGC-803 细胞裸鼠皮下移植瘤有显著的抑制作用,其作用可能与其激活凋亡、自噬相关因子有关。

关键词 健脾养正消癥方;胃癌 MGC-803 细胞;皮下移植瘤;凋亡;自噬

Effect of Jianpi Yangzheng Xiaozheng Recipe on Apoptosis and Autophagy of Subcutaneous Transplanted Tumor in Nude Mice: an Experimental Study on Mechanism WU Jian¹, LIU Shen-lin², ZHANG Xing-xing³, CHEN Min⁴, and ZOU Xi² 1 Central Lab, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing (210029); 2 Department of Oncology, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing (210029); 3 Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing (210029); 4 Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing (210029)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Jianpi Yangzheng Xiaozheng Recipe (JYXR) on the tumor inhibition rate of subcutaneous transplanted tumor gastric cancer cell line MGC-803 in BALB/c nude mice, and to study its molecular mechanism of apoptosis and autophagy. **Methods** Gastric cancer cell line MGC-803 was subcutaneously inoculated to nude mice for preparing transplanted gastric cancer

基金项目:国家中医药管理局资助项目(No. JDZX2012086, JDZX2012087);国家自然科学基金面上项目(No. 81473605);江苏省临床医学科科技专项(No. BL2014100)

作者单位:1.南京中医药大学附属医院中心实验室(南京 210029);2.南京中医药大学附属医院肿瘤科(南京 210029);3.南京中医药大学附属医院脾胃科(南京 210029);4.南京中医药大学附属医院普内科(南京 210029)

通讯作者:邹 玺, Tel:13601403528, E-mail:zxvery@126.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2015. 09. 1113

models. Totally 32 BALB/c nude mice were randomly divided into 4 groups according to random digit table, i.e., the negative control group, the positive control group, the high dose JYXR group, the low dose JYXR group, 8 in each group. Normal saline was administered to mice in the negative control group by gastrogavage. 5-fluorouracil (5-Fu) at 2.5 mg/kg was administered to mice in the positive control group by gastrogavage. JYXR at 85 and 43 g/kg was administered to mice in the high dose JYXR group and the low dose JYXR group by gastrogavage, once per day for 10 successive days. The effect of JYXR on the tumor inhibition rate of subcutaneous transplanted tumor was observed. Effects of JYXR on gene expression levels of Bax, Bcl-2, Fas, Cyclin D1, Cyclin D2, and Cyclin D3 in transplanted tumor were observed by real-time PCR. Effects of JYXR on protein expression levels of Procaspace-3, Procaspace-8, Procaspace-9, cleaved-PARP, Beclin-1, and LC3B were detected using Western blot. Results (1) Compared with the negative control group, the tumor weight was obviously reduced in the rest three groups ($P < 0.05$). The tumor weight was higher in the high dose JYXR group and the low dose JYXR group than in the positive control group ($P < 0.05$). (2) Results of RT-PCR indicated that, compared with the negative control group, expression levels of Bax were up-regulated, but expression levels of Bcl-2, Cyclin D1, Cyclin D2, and Cyclin D3 were down-regulated in the positive control group and JYXR groups ($P < 0.05$). The expression level of Fas was up-regulated in the positive control group and the high dose JYXR group ($P < 0.05$). Compared with the positive control group, expression levels of Fas, and Bax were all down-regulated, but expression levels of Bcl-2, Cyclin D2, and Cyclin D3 were all up-regulated in the high dose JYXR group and the low dose JYXR group (all $P < 0.05$). The expression level of Cyclin D1 was down-regulated in the high dose JYXR group, but it was up-regulated in the low dose JYXR group (both $P < 0.05$). (3) Results of Western blot showed, compared with the negative control group, expression levels of Procaspace-3, Procaspace-8, and Procaspace-9 were down-regulated, but expression levels of cleaved-PARP, Beclin-1, and LC3B II were up-regulated in the high dose JYXR group and the low dose JYXR group (all $P < 0.05$). Compared with the negative control group, expression levels of Procaspace-3, Procaspace-8, Procaspace-9, and LC3B II were down-regulated, but expression levels of cleaved-PARP, Beclin-1, and LC3B I were up-regulated in the positive control group (all $P < 0.05$). Conclusions JYXR showed significant inhibition on subcutaneous transplanted tumor gastric cancer cell line MGC-803 in BALB/c nude mice. Its mechanism might be associated with activating apoptosis and autophagy correlated factors.

KEYWORDS Jianpi Yangzheng Xiaozheng Recipe; gastric cancer cell MGC-803; subcutaneous transplanted tumor; apoptosis; autophagy

胃癌是世界范围内常见的消化道恶性肿瘤之一,其全球死亡率是所有恶性肿瘤的第二位^[1]。而我国胃癌死亡率更居恶性肿瘤的第一位^[2]。胃癌手术化疗结束后,目前西医治疗处于“空白期”,即患者定期复查,肿瘤复发后再行治疗。南京中医药大学附属医院著名中医刘沈林教授提出,“脾虚瘀毒”是胃癌手术化疗后的主要病机,“健脾益气”当为治疗胃癌术后复发转移取效的根本法则,并据此创立健脾养正消癥方作为治疗胃癌的主方。在前期临床试验表明:与对照组单纯化疗进行比较,该方改善生命质量、降低化疗6个月后的骨髓抑制的发生率及中医证候疗效均增高^[3]。同时,前期实验证实该方对胃癌 MGC-803 细胞有诱导凋亡,改变细胞周期的作用^[4]。为进一步研

究其抑制胃癌增殖的机理,本次实验将以裸鼠皮下移植瘤为实验模型,观察该方对瘤生长的抑制作用,并从凋亡、自噬方面探讨其分子生物学机制。

材料与方法

1 细胞及动物 人胃癌 MGC-803 细胞(购自凯基生物公司,批号:KG030);BALB/c 裸鼠 32 只,雌雄各半,4 周龄,体重 18~22 g,由上海斯莱克动物中心提供,合格证号:SCXK(沪)2007-0005,南京中医药大学动物实验中心 SPF 动物房饲养。

2 药物 健脾养正消癥方水提液的制备:复方草药取自江苏省中医院(由党参 15 g 炒白术 10 g 茯苓 10 g 淮山药 15 g 生薏苡仁 20 g 陈皮 6 g

木香 10 g 当归 10 g 白芍 10 g 莪莢 30 g 石见穿 30 g 炙甘草 3 g 组成),10 倍蒸馏水加热回流提取 2 次,每次 1 h,合并提取的药液,水浴浓缩,灭菌备用。5-氟尿嘧啶(5-Fu)注射液(由天津金耀氨基酸有限公司提供,批号:1109161)。

3 试剂及仪器 试剂:RPMI-1640 培养液购自 GIBCO 公司,批号:12633012;小牛血清购自四季青公司,批号:140902;胰蛋白酶购自 Biosharp 公司,批号:BL501A;Trizol RNA 提取试剂购自 Invitrogen 公司,批号:15596018;PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司,批号:DRR420A;逆转录试剂盒购自 TaKaRa 公司,批号:DRR047A;DEPC 购自 Biosharp 公司,批号:BL510A;氯仿购自 SOLARBIO 公司,批号:P1012;鼠抗人 β -actin 单抗购自 Sigma 公司,批号:BTX82559;PCR 引物购自 invitrogen 公司;鼠抗人 caspase-9 单抗购自 Cell Signaling 公司,批号:9506;鼠抗人 caspase-8 单抗,购自 Cell Signaling 公司,批号:4927;兔抗人 caspase-3 单抗,购自 Cell Signaling 公司,批号:9664;兔抗人 PARP 单抗,购自 Cell Signaling 公司,批号:9532;兔抗人 Beclin-1 单抗,购自 Cell Signaling 公司,批号:3738;兔抗人 LC3B,购自 Cell Signaling 公司,批号:2775;二抗,购自中杉生物技术公司,批号:zdr5102。仪器:CO₂ 培养箱 (HERAcell 150i, Thermo 公司);生物安全柜,1300 A2, Thermo 公司;倒置显微镜,IX51, Olympus 公司;超纯水机,Milli Q, Millipore 公司;紫外分光光度仪,biophotometer plus, ABI 公司;PCR 扩增仪,2720 型,ABI 公司;荧光定量 PCR 仪,7500 fast, ABI 公司;涡旋混合器,Thermolyne 公司;电泳仪、转印槽,MP-4, BIORAD 公司;化学发光成像仪,XRS + , BIORAD 公司;冷冻离心机,5804R, eppendorf 公司;超低温冰箱,MDF-38, 三洋公司。

4 建立裸鼠皮下移植瘤模型 参照文献[5],人胃癌 MGC-803 细胞用含 10% 小牛血清的 1640 培养液常规培养,取对数生长期细胞制备细胞悬液,调整细胞浓度为 3×10^7 个/mL,每只裸鼠右侧腋下接种 0.2 mL 细胞悬液。当裸鼠右侧腋下出现直径为 5~7 mm 的硬结,造模成功,进入实验。本次造模成功率为 90%,无小鼠死亡。

5 动物分组及给药 将 32 只裸鼠按随机数字表法分为阴性对照组,阳性对照组,健脾养正消癥方高、低剂量组,每组 8 只。阴性对照组予生理盐水灌胃,每日 1 次;阳性对照组予 5-Fu (2.5 mg/kg)灌胃,每日 1 次;健脾养正消癥方高、低剂量组分别以

85 g/kg(相当于临床用量的 15 倍)、43 g/kg(相当于临床用量的 7.5 倍)灌胃,每日 1 次,连续用药 10 日,灌药结束后次日处死荷瘤裸鼠,剖瘤称重。

6 检测指标及检测方法

6.1 抗肿瘤效果 观察裸鼠的一般活动状态,移植瘤生长情况;末次处死给药,处死裸鼠后,剖瘤称重。根据肿瘤重量计算肿瘤抑制率:抑瘤率(%) = (1 - 给药组平均瘤重/对照组平均瘤重) $\times$ 100%。判断标准:肿瘤抑制率 > 30%,经统计学处理有差异者为有抗肿瘤作用。

6.2 瘤体中 Bax、Bcl-2、Fas、Cyclin D1、Cyclin D2 及 Cyclin D3 基因表达水平 采用 RT-PCR 检测法。液氮中取出各组瘤块,剪成 0.2 cm³ 大小,PBS 洗 2 次。按试剂盒要求,提取肿瘤组织中总 RNA,紫外分光光度仪测定 RNA 样品浓度及纯度,并逆转录。用 TaKaRa PCR 试剂盒,对 cDNA 进行 PCR 检测。引物序列见表 1。

表 1 相关引物序列

名称	引物序列	引物长度 (bp)
ACTB	上游: 5'-GGCCAACCGCGAGAAGAT-3'	134
	下游: 5'-CGTCACCGGAGTCCATCA-3'	
Bax	上游: 5'-TTTGCTTCAGGGTTTCATCC-3'	213
	下游: 5'-GCCACTCGGAAAAAGACCTC-3'	
Bcl-2	上游: 5'-TCGCCCTGTGGATGACTGAG-3'	209
	下游: 5'-CAGAGTCTTCAGAGACAGCCAGGA-3'	
Fas	上游: 5'-AATTCTGCCATAAGCCCTGTCCCT	117
	下游: 5'-GGGCTTTGTCTGTGTACTCCTTCC	
Cyclin D1	上游: 5'-GAAGTTGCAAAGTCCTGGAGC-3'	221
	下游: 5'-ATGGTTTCCACTTCGCAGCA-3'	
Cyclin D2	上游: 5'-CATCACGCTGCATCCCATTG-3'	175
	下游: 5'-AAATTCCCCTGCCCTCTTGG-3'	
Cyclin D3	上游: 5'-TGCACATGATTTCTGGCCT-3'	107
	下游: 5'-CTGTAGCACAGAGGGCCAAA-3'	

PCR 反应体系如下:SYBR Green Master Mix (2 $\times$), 5 μ L;上游引物 (10 μ mol/L), 0.2 μ L;下游引物 (10 μ mol/L), 0.2 μ L; cDNA, 1 μ L; 无酶水, 3.6 μ L。PCR 反应扩增条件:预变性:95 $^{\circ}$ C 30 s, 循环 1 次;PCR 反应:95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 循环 40 次;融解曲线分析:95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 循环 1 次。采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法对 qPCR 结果进行数据分析,计算 Δ Ct = 目的基因 Ct - 内参基因 Ct; $\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct (给药组) - Δ Ct (对照组);差别倍数 = 2^{- $\Delta\Delta$ Ct},其中正常对照组的数值均为 1。

6.3 健脾养正消癥方对移植瘤中 procaspase-3、procaspase-8 和 procaspase-9、cleaved-PARP、

Beclin-1、LC3B 蛋白表达的影响 将组织研磨成匀浆状,PIPA 中 4 ℃ 裂解 30 min。4 ℃,12 000 g,离心 15 min,上清即为细胞总蛋白。吸取上清,蛋白定量后分装,Bradford 法测蛋白浓度,每个样品取 20 μg 上样量进行 Western bolt 试验。经 SDS PAGE 分离后转到 PVDF 膜上,5 %脱脂奶粉溶液封闭 1 h,一抗 4 ℃ 过夜,次日二抗室温孵育后,经 PBST 漂洗,使用 ECL 液进行发光和条带分析。

7 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差齐性检验后,组间比较用方差分析检验,两两比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组裸鼠一般情况 阴性对照组裸鼠后期活动下降。阳性对照组便溏、食量减少。健脾养正消癥方高、低剂量组裸鼠与阴性对照组相比精神活动度较好。

2 各组裸鼠体重、皮下移植瘤重及抑瘤率比较 (表 2) 与阴性对照组比较,阳性对照组、健脾养正消癥方高、低剂量组小鼠瘤重明显减轻($P < 0.05$);与阳性对照组比较,健脾养正消癥方高、低剂量组小鼠瘤重增加($P < 0.05$)。各组裸鼠体重及抑瘤率比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

3 各组移植瘤中 Fas、Bax、Bcl-2、Cyclin D1、

Cyclin D2 及 Cyclin D3 表达比较(表 3) 与阴性对照组比较,阳性对照组、健脾养正消癥方高、低剂量组 Bax 表达均上调($P < 0.05$),Bcl-2、Cyclin D1、Cyclin D2 和 Cyclin D3 表达均下调($P < 0.05$),阳性对照组及健脾养正消癥方高剂量组 Fas 表达上调($P < 0.05$);与阳性对照组比较,健脾养正消癥方高、低剂量组 Fas 和 Bax 表达均下调($P < 0.05$),Bcl-2、Cyclin D2 和 Cyclin D3 表达均上调($P < 0.05$),健脾养正消癥高剂量组 Cyclin D1 下调($P < 0.05$),低剂量组 Cyclin D1 上调($P < 0.05$)。

4 各组移植瘤中 procaspase-8 和 procaspase-9、procaspase-3、cleaved-PARP、Beclin-1 及 LC3B 蛋白表达比较(表 4、5,图 1、2) 与阴性对照组比较,阳性对照组、健脾养正消癥方高、低剂量组 procaspase-3、procaspase-8、procaspase-9 蛋白表达下调($P < 0.05$),cleaved-PARP、Beclin-1、LC3B I 蛋白表达上调($P < 0.05$);健脾养正消癥方高、低剂量组 LC3B II 表达上调($P < 0.05$),阳性对照组 LC3B II 表达下调($P < 0.05$)。与阳性对照组比较,健脾养正消癥方高、低剂量组 procaspase-3、procaspase-8、procaspase-9 表达下调($P < 0.05$),cleaved-PARP、LC3B II 表达上调($P < 0.05$),健脾养正消癥方高剂量组 LC3B I 表达上调($P < 0.05$),低剂量组 LC3B I 表达下调($P < 0.05$)。

表 2 各组裸鼠体重、皮下移植瘤重及抑瘤率比较

组别	n	体重(g, $\bar{x} \pm s$)		瘤重(g, $\bar{x} \pm s$)	抑瘤率(%)
		给药前	给药后		
阴性对照	8	23.29 ± 0.06	25.54 ± 1.25	1.01 ± 0.32	—
阳性对照	8	23.67 ± 1.42	24.87 ± 1.39	0.41 ± 0.18 *	58.42
健脾养正消癥方低剂量	8	23.10 ± 2.31	25.32 ± 2.58	0.68 ± 0.11 *△	31.68
健脾养正消癥方高剂量	8	22.60 ± 2.09	24.67 ± 1.87	0.61 ± 0.41 *△	38.62

注:与阴性对照组比较,* $P < 0.05$;与阳性对照组比较,△ $P < 0.05$

表 3 各组移植瘤中凋亡和周期相关基因 mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

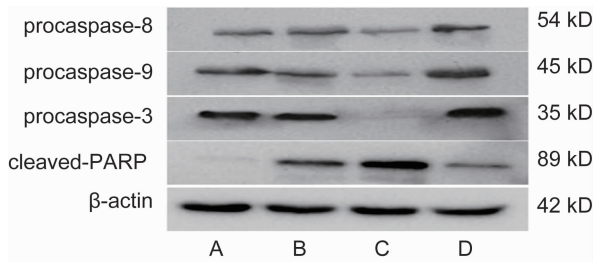
组别	n	Fas	Bax	Bcl-2	Cyclin D1	Cyclin D2	Cyclin D3
阴性对照	8	1.05 ± 0.06	1.04 ± 0.06	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.01	1.08 ± 0.01	1.02 ± 0.01
阳性对照	8	3.96 ± 0.19 *	3.49 ± 0.19 *	0.21 ± 0.09 *	0.38 ± 0.01 *	0.14 ± 0.01 *	0.26 ± 0.02 *
健脾养正消癥方低剂量	8	0.98 ± 0.05 △	1.23 ± 0.06 *△	0.79 ± 0.04 *△	0.64 ± 0.03 *△	0.45 ± 0.03 *△	0.52 ± 0.01 *△
健脾养正消癥方高剂量	8	2.07 ± 0.10 *△	2.21 ± 0.11 *△	0.45 ± 0.02 *△	0.20 ± 0.01 *△	0.25 ± 0.01 *△	0.56 ± 0.02 *△

注:与阴性对照组比较,* $P < 0.05$;与阳性对照组比较,△ $P < 0.05$

表 4 各组移植瘤中凋亡相关蛋白的表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	procaspase-8/β-actin	procaspase-9/β-actin	procaspase-3/β-actin	Cleaved-PARP/β-actin
阴性对照	8	0.20 ± 0.04	0.31 ± 0.06	0.55 ± 0.06	0.04 ± 0.03
阳性对照	8	0.25 ± 0.05 *	0.36 ± 0.08	0.62 ± 0.10 *	0.12 ± 0.03 *
健脾养正消癥方低剂量	8	0.17 ± 0.06 *△	0.21 ± 0.06 *△	0.51 ± 0.08 *△	0.30 ± 0.03 *△
健脾养正消癥方高剂量	8	0.11 ± 0.04 *△	0.12 ± 0.05 *△	0.05 ± 0.01 *△	0.68 ± 0.05 *△

注:与阴性对照组比较,* $P < 0.05$;与阳性对照组比较,△ $P < 0.05$



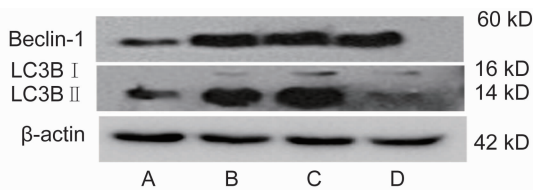
注:A 为阴性对照组;B 为健脾养正消癥方低剂量组;C 为健脾养正消癥方高剂量组;D 为阳性对照组

图 1 各组移植瘤中凋亡相关蛋白表达比较

表 5 各组移植瘤中自噬相关蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Beclin-1/ β-actin	LC3B I / β-actin	LC3B II / β-actin
阴性对照	8	0.56 ± 0.09	0.02 ± 0.01	0.42 ± 0.11
阳性对照	8	1.55 ± 0.2 *	0.06 ± 0.01 *	0.10 ± 0.03 *
健脾养正消癥方低剂量	8	1.48 ± 0.1 *	0.03 ± 0.01 *△	1.75 ± 0.08 *△
健脾养正消癥方高剂量	8	1.56 ± 0.17 *	0.10 ± 0.02 *△	2.00 ± 0.14 *△

注:与阴性对照组比较,* $P < 0.05$;与阳性对照组比较,△ $P < 0.05$



注:A 为阴性对照组;B 为健脾养正消癥方低剂量组;C 为健脾养正消癥方高剂量组;D 为阳性对照组

图 2 各组移植瘤中自噬相关蛋白表达比较

讨 论

健脾养正消癥汤是江苏省名中医刘沈林教授的经验方。该方以党参、炒白术、茯苓、淮山药、生薏苡仁、炙甘草益气健脾,淡渗利湿,补益中焦,以恢复其运化受纳之功;气虚之证常兼气滞,谓之“虚气留滞”,方用陈皮、木香行气化滞,斡旋气机,以助运化;当归、白芍养血柔肝,和营消瘀;菝葜、石见穿解毒抗癌,消癥化积。诸药合用,补其中气,渗其湿浊,行其气滞,养其营血,解其癌毒,恢复脾胃受纳与健运之职,共奏健脾益气,解毒消癥的作用。

细胞凋亡分为外源性及内源性两种。在外源性凋亡中,死亡配体与细胞膜表面的死亡受体作用后,胞内结构域构象变化,招募胞质中的 procaspase-8,并活化为 caspase-8。caspase-8 可激活下游的效应 caspase,通过剪切胞浆和核底物,诱导凋亡^[6]。内源性凋亡是指细胞受到刺激时,促凋亡蛋白释放入胞

浆,招募 procaspase-9,并形成活化的 caspase-9,继而诱导下游 caspase-3、caspase-7 活化,引发凋亡^[7]。PARP 被认为是 DNA 损伤的感受器,其激活与 DNA 受损的程度呈正相关;同时,PARP 又是 caspase 家族的切割底物,因此它在 DNA 损伤修复与细胞凋亡中发挥着重要作用。Bcl-2 家族分为以 Bcl-2、Bcl-xL 为代表的抗凋亡蛋白;以 Bax、Bak 为代表的促凋亡蛋白^[8,9]。细胞内 Bcl-2 和 Bax 的平衡状态决定了细胞是否进入凋亡程序^[10]。细胞周期素 D (cyclin D) 与细胞周期素依赖激酶结合,通过磷酸化 Rb 而抑制其负性调控作用,引起细胞增殖^[11]。cyclin D1 普遍认为是一种癌基因^[12]。cyclin D2、cyclin D3 也被证实与肿瘤的发生、发展及预后有明显联系^[13,14]。

近年来,细胞自噬 (autophagy) 吸引了越来越多的注意,将其称为 II 型程序性细胞死亡^[15]。自噬性细胞是一个发生在真核细胞中的细胞初级溶酶体处理内源性底物的重要过程。该形式的细胞死亡表现为:胞浆中大量包裹着胞浆和细胞器的空泡结构和溶酶体对空泡内成分的降解。和凋亡一样,自噬也有望成为肿瘤治疗的靶标之一^[16]。在自噬体膜的延伸过程中,Atg8 脂化系统在自噬体形成后仍位于自噬体膜上,是研究自噬的很好的标记物。微管相关蛋白 1 轻链 3 (MAP 1-LC3) 是哺乳动物中 Atg8 的类似物。LC3 经过翻译、修饰后,形成主要位于胞浆的 LC3-I,LC3-I 也被 Atg7 活化,转运至 Atg3,并被修饰成膜结合形式 LC3-II,主要位于自噬体和自噬溶酶体膜上^[17],是自噬性细胞死亡的特异性分子标志物^[18]。Beclin-1 基因也称 BECN1 基因,是与酵母 Atg6 同一起源的人类基因并在自噬泡形成过程中起重要作用,其通过调节自噬活性,从而在胚胎的发展和抑制肿瘤中起着重要作用。

近期有研究发现 caspase-8 不仅可调节凋亡,还可抑制自噬性细胞死亡。caspase-8 抑制剂可通过调节 Beclin-1 来促进自噬^[18]。最近有报道称 Beclin-1 可通过增强 caspase-9 的活性加强化疗药物 CDDP 诱导的人胃癌细胞 MKN28 的凋亡,说明作为自噬的重要调控基因的 Beclin-1 也可参与细胞凋亡的调控^[19]。

在前期体外实验中发现健脾养正消癥方能抑制多种消化道肿瘤细胞的增殖,并证实其与诱导肿瘤细胞凋亡和/或自噬有关。本实验中健脾养正消癥方能明显抑制胃癌皮下移植瘤的生长,通过实时定量 PCR 和 Western blot 法证实,健脾养正消癥方高剂量组瘤

体中 Bax 和 Fas 的表达上调,而 Bcl-2、Cyclin D1、Cyclin D2、Cyclin D3 的表达下调,procaspase-3、procaspase-8 和 procaspase-9 蛋白降低,PARP 降解产物蛋白增加,此为凋亡的生化改变的特征性表现。同时,健脾养正消癥方能上调 Beclin-1 和 LC3B 蛋白表达,促进肿瘤细胞自噬,说明健脾养正消癥方可能是从凋亡和自噬两个方面来发挥抑制胃癌生长作用的。

参 考 文 献

- [1] Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2011 [J]. *Ca Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69–90.
- [2] 罗盛,马峻岭,陈景武. 恶性肿瘤死亡率地域分布的趋势面分析[J]. *中国卫生统计*, 2008, 25(4): 357–359.
- [3] 舒鹏,武雯. 健脾养胃方联合化疗对胃癌Ⅱ、Ⅲ期术后干预作用的临床研究[J]. *实用临床医药杂志*, 2013, 17(3): 16–19.
- [4] 胡守友,刘沈林,吴坚. 健脾消癥方对人胃癌细胞 MGC-803 凋亡和细胞周期的影响[J]. *辽宁中医杂志*, 2012, 39(12): 2342–2344.
- [5] 陈奇主编. 中药药理研究方法学[M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 997–998.
- [6] Garg S, Narula J, Chandrashekhar Y. Apoptosis and heart failure: clinical relevance and therapeutic target[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2005, 38: 73–79.
- [7] Li Q, Guo YL, Li X, et al. The interference of picroside II on the expressions of Caspase-3 and PARP following cerebral ischemia reperfusion injury in rats [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2010, 26(3): 342–345.
- [8] Autret A, Martin SJ. Emerging role for members of the Bcl-2 family in mitochondrial morphogenesis[J]. *Mol Cell*, 2009, 36(3): 355–363.
- [9] Brooks C, Dong Z. Regulation of mitochondrial morphological dynamics during apoptosis by Bcl-2 family proteins: a key in Bak [J]. *Cell Cycle*, 2007, 6(24): 3043–3047.
- [10] Ghoneum M, Matsuura M, Braga M, et al. Cerivisiae induces apoptosis in human metastatic breast cancer cells by altering intracellular Ca^{2+} and the ratio of Bax and Bcl-2 [J]. *Int J Oncol*, 2008, 33(3): 533–539.
- [11] Moghaddam SJ, Haghighi EN, Samiee S, et al. Immunohistochemical analysis of p53, Cyclin D1, RB1, c-Fos and N-ras gene expression in hepatocellular carcinoma in Iran [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(4): 588–593.
- [12] John PA. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic intervention [J]. *Molec Cancer*, 2007, 6(24): 1375–1391.
- [13] Takano Y, Kato Y, Masuda M, et al. Cyclin D2, but not Cyclin D1, overexpression closely correlates with gastric cancer progression and prognosis [J]. *J Pathol*, 1999, 189(2): 194–200.
- [14] Zhang Y, Calderwood SK. Autophagy, protein aggregation and hyperthermia: a mini-review [J]. *Int J Hyperthermia*, 2011, 27(5): 409–414.
- [15] Kaza N, Kohli L, Roth KA. Autophagy in brain tumors: a new target for therapeutic intervention [J]. *Brain Pathol*, 2012, 22(1): 89–98.
- [16] Chen K, Cheng HH, Zhou RJ. Molecular mechanisms and functions of autophagy and the ubiquitin-proteasome pathway [J]. *Yi Chuan*, 2012, 34(1): 5–18.
- [17] Wang SY, Yu QJ, Zhang RD, et al. Core signaling pathways of survival/death in autophagy-related cancer networks [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43(9): 1263–1266.
- [18] Yu L, Alva A, Su H, et al. Regulation of an ATG7-beclin-1 program of autophagic cell death by Caspase-8 [J]. *Science*, 2004, 304(5676): 1500–1502.
- [19] Furuya D, Tsuji N, Yagihashi A, et al. Beclin-1 augmented cis-diammine dichloroplatinum induced apoptosis via enhancing Caspase-9 activity [J]. *Exp Cell Res*, 2005, 307(1): 26–40.

(收稿: 2014-06-09 修回: 2015-07-07)