

半夏泻心汤含药血清对胃癌腹膜转移细胞系 GC9811-P 增殖及侵袭转移的影响

刘喜平¹ 李沛清¹ 明海霞¹ 张 炜² 王 强¹ 陈彦文¹ 杨柏林¹

摘要 **目的** 观察半夏泻心汤含药血清对体外人胃癌腹膜高转移潜能细胞株 GC9811-P 增殖及侵袭转移的影响。**方法** 制备半夏泻心汤含药血清,在 E-Plate 96 及 CIM Plate16 检测板孔中接种 GC9811-P 细胞,并加入 0、25、50、100 $\mu\text{L/mL}$ 的半夏泻心汤含药血清,同时对 GC9811-P 细胞进行 Diff-Quik 染色,采用实时无标记细胞分析技术(real time cellular analysis, RTCA)结合 Diff-Quik 染色法,观察半夏泻心汤对 GC9811-P 增殖细胞指数(cell index, CI)及侵袭转移的抑制作用。**结果** 半夏泻心汤含药血清可明显抑制 GC9811-P 细胞增殖,70 h 后 CI 接近于 0, Diff-Quik 染色细胞大多死亡。细胞迁移曲线表明,25、50、100 $\mu\text{L/mL}$ 的半夏泻心汤含药血清能明显抑制 GC9811-P 细胞迁移能力,细胞迁移数目均较 0 $\mu\text{L/mL}$ 半夏泻心汤含药血清明显减少,且呈浓度依赖关系($P < 0.05$)。**结论** 半夏泻心汤含药血清可抑制体外人胃癌腹膜高转移潜能细胞株 GC9811-P 的增殖及侵袭转移,可能与其具有阻断胃癌腹膜转移的作用有关。

关键词 人胃癌腹膜高转移潜能细胞株 GC9811-P;半夏泻心汤;增殖;侵袭转移

Effects of Banxia Xiexin Decoction Containing Serum on Proliferation, Invasion and Metastasis of Gastric Cancer Peritoneal Metastasis Cell Line GC9811-P LIU Xi-ping¹, LI Pei-qing¹, MING Hai-xia¹, ZHANG Wei², WANG Qiang¹, CHEN Yan-wen¹, and YANG Bai-lin¹ 1 Basic Medical School, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou (730000); 2 Department of General Surgery, First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou (730000)

ABSTRACT **Objective** To observe the effects of Banxia Xiexin Decoction (BXD) containing serum on proliferation, invasion and metastasis of *in vitro* human gastric cancer peritoneum cell strain GC9811-P (which has high metastatic potential). **Methods** BXD containing serum was prepared. GC9811-P cells were inoculated in the E-Plate 96 and CIM Plate 16, and then 0, 25, 50, 100 $\mu\text{L/mL}$ BXD containing serums were added respectively. Meanwhile, GC9811-P cells were stained by Diff-Quik staining method. Inhibition of BXD containing serum on cell index (CI) for proliferation of GC9811-P cells, invasion and metastasis were observed by real time cellular analysis (RTCA) and Diff-Quik staining method. **Results** BXD containing serum could obviously inhibit the proliferation of GC9811-P cells. The CI approximated to 0 after 70 h. Most stained Diff-Quik cells died. Cell migration curve showed that 25, 50, 100 $\mu\text{L/mL}$ BXD containing serums could obviously inhibit the capacities for cell migration of GC9811-P cells in concentration dependent manner. The number of migration cells was reduced more obviously, as compared with 0 $\mu\text{L/mL}$ BXD containing serum ($P < 0.05$). **Conclusion** BXD containing serums could inhibit the proliferation, invasion and metastasis of GC9811-P cells, which might be associated with blocking peritoneal metastasis of gastric cancer.

KEYWORDS GC9811-P (*in vitro* human gastric cancer peritoneum cell strain with high metastatic potential); Banxia Xiexin Decoction; proliferation; invasion and metastasis

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81260525);甘肃省高校基本科研业务费专项基金资助项目(No.BH-2001-068)

作者单位:1.甘肃中医药大学基础医学院(兰州 730000); 2.兰州大学第一医院普外科(兰州 730000)

通讯作者:刘喜平, Tel:0931-8765406, E-mail: lxp257@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2016.10.1224

腹膜转移是胃癌根治术后最常见的复发和死亡因素^[1],防治胃癌腹膜转移在胃癌治疗中具有重要意义。本课题组前期研究表明,半夏泻心汤含药血清可诱导人胃癌细胞凋亡,抑制人胃癌细胞增殖^[2,3]。GC9811-P 细胞为胃癌腹膜高转移潜能细胞,其腹膜转移形成率为 100%^[4]。本课题组前期采用 MTT 法研究发现,半夏泻心汤含药血清对 GC9811-P 细胞有一定的抑制作用^[5]。为进一步证实半夏泻心汤含药血清对 GC9811-P 细胞增殖及迁移的影响,笔者采用实时无标记细胞分析技术(real time cellular analysis, RTCA)结合 Diff-Quik 染色法实时动态观察半夏泻心汤含药血清对 GC9811-P 细胞增殖及侵袭转移的影响,为半夏泻心汤防治胃癌腹膜转移提供依据。

材料与方法

1 动物及细胞株 SPF 级家兔 4 只,由甘肃中医药大学实验动物中心提供,体重 2.0~2.5 kg。实验动物质量合格证:SCXK(甘)2004—0006,实验动物使用许可证:SYXK(甘)2004—0006。GC9811-P 细胞由甘肃中医药大学中西医结合研究所引进并保存。

2 药物 半夏泻心汤(药物组成:半夏、干姜、黄芩、黄连、人参、大枣、甘草)药材饮片购自兰州复兴厚药材有限责任公司,经甘肃中医药大学中药鉴定教研室鉴定符合药典规定。

3 试剂及仪器 DMEM 培养基购自 Hyclone 公司(Cat No. SH30022.01B);PBS 及 FBS 消化液均购自 Hyclone 公司(Cat No. SH30256.01B, Cat No. 16000-044);0.05% Trypsin-EDTA 及 1% Penicilline-Streptomycin 均购自 GIBCO 公司(Cat No. 25300-054, Cat No. 25300-054);xCELLigence MP 实时无标记细胞功能分析仪由杭州艾森生物有限公司提供。Diff-Quik 染色法和改良巴氏染色法试剂盒均购自深圳华康生物医学工程有限公司。

4 半夏泻心汤含药血清制备 按原处方比例称取半夏 60 g 干姜 45 g 黄芩 45 g 黄连 15 g 人参 45 g 甘草 45 g 大枣 20 枚药材饮片,加水煎煮两次,第一次加 8 倍量水,煎煮 1.5 h,第二次加 6 倍量水,煎煮 1.0 h,合并两次煎液,离心滤过,滤液减压浓缩至含生药 2 g/mL 的浸膏。取 SPF 级家兔 4 只,将稀释的半夏泻心汤浸膏连续灌胃 3 次,第 1、2 次间隔 1 天,第 2、3 次间隔 3 h,每次 26 mL/kg(相当于 60 kg 成人日服用量的 10 倍);第 3 次灌胃后 2 h 无

菌条件下心脏采血。静置 4 h,以 3 500 r/min 离心 30 min,分离血清,56 ℃ 30 min 水浴灭活,-20℃冰箱保存备用^[6]。

5 GC9811-P 细胞增殖水平检测 采用含链、青霉素各 100 IU/mL 的 DMEM 培养基置于 CO₂, 37 ℃ 条件下的培养箱中培养,定期换液传代,选择对数生长期的 GC9811-P 细胞,用计数板计数,调整 A549 细胞悬液浓度为 5×10^4 cells/mL,在 E-Plate 96 细胞检测板孔中加入 100 μL 混合均匀的细胞悬液,使每孔中细胞数目达到 5×10^3 个。将 E-Plate 96 置于超净台中室温放置 30 min。采用 RTCA 实时动态检测 24 h 后,加入不同浓度梯度的半夏泻心汤含药血清(0、25、50、100 μL/mL),再将 E-Plate 96 检测板置于 RTCA 实时动态检测分析仪继续检测约 50 h,观察半夏泻心汤含药血清对细胞增殖的影响。50 h 后,取出 E-Plate 96 检测板,分别加入 1 mg/mL 尼罗蓝、0.2 mg/mL 焦宁 Y 及 1.5 mg/mL 亚甲基蓝进行 Diff-Quik 染色,计算细胞指数(cell index, CI),观察细胞增殖情况。

6 GC9811-P 细胞侵袭及转移水平检测 取专用 CIM-Plate16 检测板,上室加入 30 μL 无血清培养基,置于 37 ℃,CO₂ 浓度为 5% 的 CO₂ 培养箱平衡 1 h,按照每孔 1.3×10^5 细胞密度接种 GC9811-P 细胞,并依次加入不同浓度的半夏泻心汤含药血清(0、3.125、6.25、12.5、25、50、100 μL/mL),下室加 10% FBS 作为趋化因子,同时设 SF (serum free) 组,即下室不加血清为对照组。将 CIM-Plate 16 置于 RTCA DP 仪器上实时动态检测约 65 h。细胞迁移约 65 h 时,取出 CIM-Plate 检测板,参照上述方法 5 进行 Diff-Quik 染色。高倍镜下(×200)计算细胞数目,迁移细胞呈蓝紫色,随机观察 12 个高倍视野,每两个细胞取均值后的细胞数,每组实验重复 3 次。

7 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,相关性分析采用非参数秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 不同浓度半夏泻心汤含药血清对 GC9811-P 细胞增殖的抑制作用(图 1、2) RTCA 检测结果表明,GC9811-P 细胞经不同浓度(0、25、50、100 μL/mL)的半夏泻心汤含药血清处理后,细胞增殖受到明显抑制,且含药血清浓度与细胞增殖抑制能力呈正相关($r = 0.92$),70 h 后 CI 接近 0。Diff-Quik

染色检测表明,不同浓度的半夏泻心汤含药血清作用 GC9811-P 细胞后,细胞大多死亡,不同浓度半夏泻心汤含药血清对 GC9811-P 细胞增殖均呈显著抑制作用。

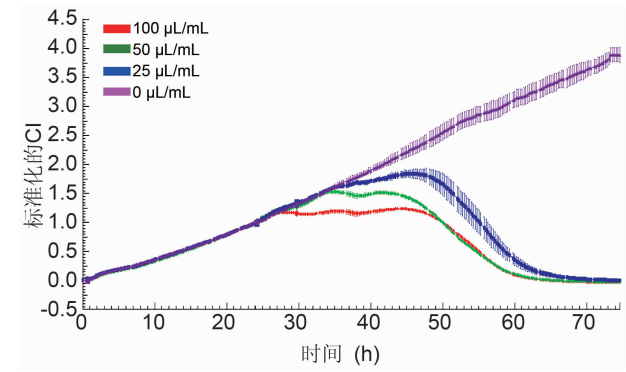


图 1 RTCA 检测 GC9811-P 细胞增殖抑制曲线

2 不同浓度半夏泻心方含药血清干预下 GC9811-P 细胞迁移情况比较(图 3~5) RTCA 检测结果表明,对照组 GC9811-P 细胞基本未发生迁移。经不同浓度半夏泻心汤含药血清(0、3.125、6.25、

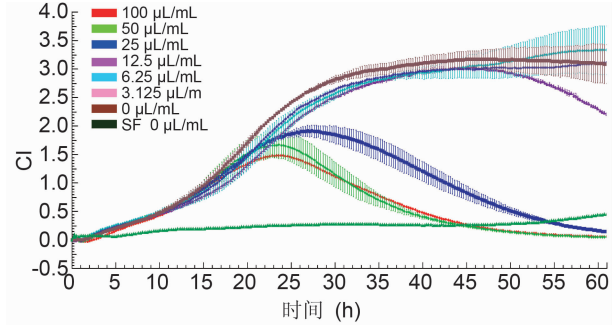
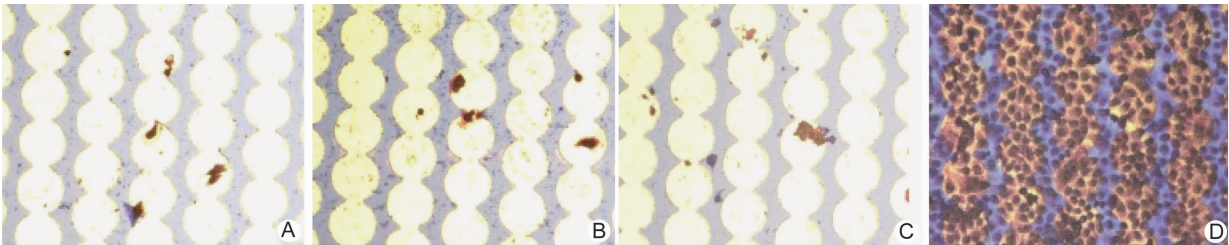


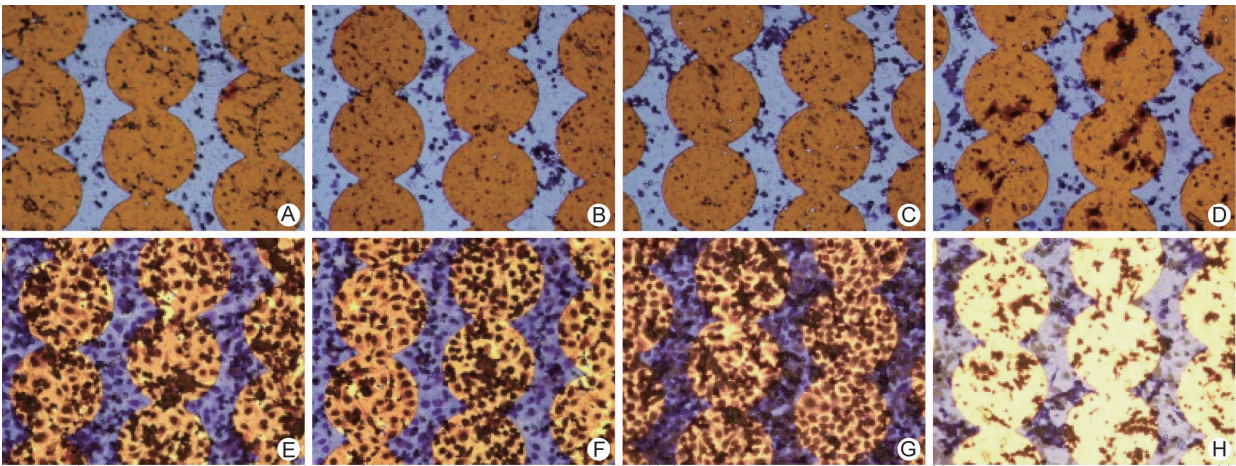
图 3 RTCA 检测 GC9811-P 细胞迁移曲线

12.5、25、50、100 $\mu\text{L/mL}$) 干预后,各组 GC9811-P 细胞均发生迁移,至 23 h 时,迁移能力未见明显差异 ($P>0.05$);23 h 后,25、50、100 $\mu\text{L/mL}$ 的半夏泻心汤含药血清能显著抑制其迁移能力,且呈浓度依赖性 ($P<0.05$);至 55 h 时,25、50、100 $\mu\text{L/mL}$ 的半夏泻心汤含药血清抑制 GC9811-P 细胞迁移能力,且呈浓度依赖关系 ($P<0.05$)。Diff-Quik 染色表明,经 25、50、100 $\mu\text{L/mL}$ 半夏泻心汤含药血清干预的 GC9811-P 细胞其迁移细胞数目明显减少,且呈浓度依赖性 ($P<0.05$)。



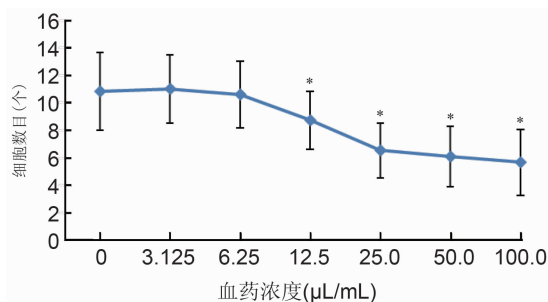
注:A 为 0 $\mu\text{L/mL}$;B 为 25 $\mu\text{L/mL}$;C 为 50 $\mu\text{L/mL}$;D 为 100 $\mu\text{L/mL}$

图 2 不同浓度半夏泻心汤含药血清干预下 GC9811-P 细胞增殖状态比较 (×200, Diff-Quik 染色)



注:A~G 分别为 100、50、25、12.5、6.25、3.125、0 $\mu\text{L/mL}$ 的半夏泻心汤含药血清;H 为 0 $\mu\text{L/mL}$ 的 SF

图 4 不同浓度半夏泻心汤含药血清干预下 GC9811-P 细胞迁移状态比较 (×200, Diff-Quik 染色)



注:与 0 μL/mL 组比较, * $P < 0.05$

图 5 不同半夏泻心汤含药血清干预下细胞迁移计数比较 (Diff-Quik 染色)

讨 论

胃癌腹膜转移过程中,胃癌细胞首先黏附浸透于胃壁浆膜层,后透过浆膜层落入腹腔,黏附破坏正常的腹膜后通过形成新的毛细血管种植于腹膜,并沿着新生的毛细血管不断增殖,形成胃癌腹膜转移。GC9811-P 细胞为胃癌腹膜高转移潜能细胞,具有潜伏期短、成瘤快、细胞增殖时间短、转移能力强的特点,成为研究胃癌腹膜转移的理想细胞株^[4]。

胃癌腹膜转移属中医学“胃脘痛”、“噎膈”、“痞满”、“呃逆”、“积聚”、“反胃”等范畴。本课题组对胃癌腹膜转移证治规律进行研究,提出“辛开苦降法”是中医药防治胃癌腹膜转移的关键治法之一^[7]。半夏泻心汤由半夏、干姜、黄连、黄芩、人参、大枣、甘草组成,方中半夏、干姜辛开以化痰滞;黄连、黄芩苦降以祛癌毒;人参、大枣、甘草健脾和胃,扶助正气,是辛开苦降法的代表方。临床用于防治胃癌有一定的疗效^[8]。研究表明,半夏泻心汤中的半夏、人参、黄芩、黄连等药物具有抗肿瘤作用^[9-12]。

RTCA 可实时、动态、定量跟踪生长增殖、迁移趋化等细胞的生物学特性。本研究采用 RTCA 技术结合 Diff-Quik 染色法实时动态观察半夏泻心汤含药血清对 GC9811-P 细胞增殖及侵袭转移的影响。细胞生长曲线显示,经 25、50、100 μL/mL 的半夏泻心汤含药血清干预后,GC9811-P 细胞增殖受到明显抑制,存在剂量一效应关系,Diff-Quik 染色检测也印证了这一结果,至 70 h 后细胞大多死亡,这与本课题组前期研究结果^[5]基本一致,表明 25、50、100 μL/mL 的半夏泻心汤含药血清均具有显著的细胞毒作用,可导致 GC9811-P 细胞增殖性死亡。药代动力学表明,半夏泻心汤经口服灌胃后,血清中含有黄酮(黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、甘草苷、甘草素等)、生物碱(黄连碱、小檗碱等)、皂苷(人参皂苷、

甘草酸、甘草次酸)等多种药效成分^[13],这些成分中的黄芩黄酮类化合物^[14]、人参皂苷^[15]、黄连碱^[16]均已证明对肿瘤细胞具有显著的细胞毒作用,可抑制肿瘤细胞生长增殖。但由于浓度梯度设置过少,无法计算药物作用的半数抑制浓度(IC₅₀)。而细胞迁移曲线表明,细胞干预 23 h 时后,25、50、100 μL/mL 的半夏泻心汤含药血清能显著抑制其迁移能力,且呈浓度依赖关系($P < 0.05$)。Diff-Quik 染色表明,经 25、50、100 μL/mL 半夏泻心汤含药血清干预的 GC9811-P 细胞迁移细胞数目显著减少,且呈浓度依赖关系($P < 0.05$)。

综上,本研究证实了半夏泻心汤对 GC9811-P 细胞增殖及侵袭转移有一定的干预作用,提示辛开苦降法在防治胃癌腹膜转方面具有一定研究价值,为中医药防治胃癌腹膜转移提供了重要的思路与方法。半夏泻心汤抑制 GC9811-P 细胞生长增殖及侵袭转移的相关机制及在体内对胃癌腹膜转移的抑制作用,有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Yonemura Y, Banou E, Kawamura T, et al. Quantitative prognostic indicators peritoneal dissemination of gastric cancer[J]. Eur J Surg Oncol, 2006, 32(6): 602-606.
- [2] 李沛清,刘喜平,席时燕.半夏泻心方及其配伍药组含药血清对人胃癌 BGC823 细胞生长抑制作用及 p53 表达的影响[J]. 中药药理与临床, 2005, 21(5): 5-7.
- [3] 刘喜平,李沛清,席时燕,等.半夏泻心方配伍与诱导 BGC-823 细胞凋亡关系的血清药理学研究[J]. 中医杂志, 2006, 47(2): 134-137.
- [4] 白飞虎,李来生,郭新宁,等.胃癌腹膜高转移潜能细胞系的建立及其生物学特性[J]. 肿瘤防治研究, 2006, 33(3): 145-147.
- [5] 李东峰,赵闻平,刘喜平,等.半夏泻心汤含药血清对人胃癌腹膜转移细胞增殖的影响[J]. 西部中医药, 2014, 27(1): 14-16.
- [6] 李振光,王净净.关于中药血清药理学方法的思考[J]. 中国中医药信息杂志, 2002, 9(2): 5-6.
- [7] 刘喜平,李沛清,张伟.中医药防治胃癌腹膜转移的思路与方法[J]. 中医杂志, 2012, 53(4): 172-175.
- [8] 张秀玲.半夏泻心汤临床应用近况[J]. 实用中医内科杂志, 2014, 28(12): 183-185.
- [9] 武峰,秦志丰,李勇进,等.半夏化学成分抗肿瘤研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2013, 32(2): 270-272.
- [10] 任莉莉,魏影非,杜惠兰.人参抗肿瘤作用研究进展[J]. 中成药, 2005, 27(8): 947-950.

- [11] 马立, 龙汉安. 黄芩抗肿瘤作用的研究进展[J]. 泸州医学院学报, 2011, 34(2):200-201.
- [12] 吴柯, 周岐新. 黄连抗肿瘤作用研究进展[J]. 中国药房, 2007, 18(3):226-229.
- [13] 王莹, 肖娟, 蔡巧玲, 等. 半夏泻心汤中黄酮、生物碱及皂苷成分在大鼠体内的药代动力学研究[C]. 北京: 药物分析杂志优秀论文评选交流会论文集, 2013.
- [14] 赵梅, 周淑琴. 黄芩中黄酮类化合物抗肿瘤作用的研究进展[J]. 中国药房, 2013, 24(11):1050-1052.
- [15] 张翔, 叶宝东, 陈丹, 等. 人参皂苷 Rg3 抗肿瘤机制研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(2):328-330.
- [16] 张志辉, 邓安珺, 于金倩, 等. 黄连碱药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(17):2750-2754.
- (收稿:2015-05-07 修回:2016-06-16)

欢迎订阅 2017 年《中国中西医结合杂志》

《中国中西医结合杂志》是由中国科学技术协会主管、中国中西医结合学会和中国中医科学院主办的中西医结合综合性学术期刊。1981 年创刊, 由中国科学院院士陈可冀担任总编辑。设有述评、专家论坛、专题笔谈、临床论著、基础研究、临床报道、综述、学术探讨、思路与方法学、临床试验方法学、病例报告、中医英译、会议纪要等栏目。本刊多次获国家科委、中宣部、新闻出版署及国家中医药管理局颁发的全国优秀期刊奖; 2001 年被新闻出版署评为“双效期刊”, 列入中国期刊方阵; 2003—2014 年连续 12 年被评为“百种中国杰出学术期刊”; 3 次获中国科协择优支持基础性和高科技学术期刊专项资助; 4 次获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”资助; 4 次获“中国科协精品科技期刊工程项目期刊”; 2015 年 5 月荣获中国科协精品科技期刊 TOP 50 项目。并被多种国内外知名检索系统收录, 如: 中国科学引文数据库、中国生物医学文献数据库、美国医学索引(Medline)、美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、日本《科学技术文献速报》(JST)、美国《乌利希期刊指南》(Ulrich's PD)、波兰《哥白尼索引》(IC)、英国《国际农业与生物科学研究中心》(CABI)、WHO 西太平洋地区医学索引(WPRIM)等; 为中国科技论文统计源期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊, 被编入《中文核心期刊要目总览》, 每年影响因子及总被引频次在中医药类期刊中均名列前茅。

《中国中西医结合杂志》为大 16 开本, 月刊, 128 页; 铜版纸印刷, 彩色插图。国内定价: 25.00 元/期。全年定价: 300.00 元。国际标准刊号: ISSN 1003-5370, 国内统一刊号: CN 11-2787/R, 国内邮发代号: 2-52, 国外代号: M640。国内外公开发行人, 在各地邮局均可订阅, 也可直接汇款至本社邮购。

地址: 北京市海淀区西苑操场 1 号, 中国中西医结合杂志社, 邮政编码: 100091; 电话: 010-62886827, 62876547, 62876548; 传真: 010-62874291; E-mail: cjim@cjim.cn; 网址: <http://www.cjim.cn>。