

噎膈证方对人表皮生长因子刺激的食管癌 EC9706 细胞生长信号转导的影响

贾永森^{1*}, 王媛媛², 司富春³

(1. 华北煤炭医学院中医学系, 河北 唐山 063000; 2. 北京中医药大学人体形态系, 北京 100029;
3. 河南中医学院基础医学院, 郑州 450008)

[摘要] 目的: 研究噎膈病辨证施方在不同浓度下对食管癌细胞生长的影响; 从生长信号转导角度探讨启膈散等对人表皮生长因子(hEGF)刺激的食管癌 EC9706 细胞生长抑制机理。方法: 体外培养人表皮生长因子(hEGF)刺激的 EC9706 食管鳞癌细胞株, 分别加入启膈散等 4 方提取液, 通过 MTT 染色、流式细胞技术等观察细胞增殖变化; 以 western blot 法检测 PLC- γ 1 介导的生长信号通路蛋白表达。结果: 启膈散(Q)、沙参麦冬汤(S)、通幽汤(T) IC₅₀ 值分别为 849, 1004, 1 615 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 可抑制 PLC- γ 1 信号通路相关蛋白表达, 抑制作用强度: T > Q > S; 结论: 除补气运脾汤外, 噎膈证方可抑制 hEGF 刺激的 EC9706 细胞的生长; 启膈散等 3 方可通过抑制 PLC- γ 1 介导的生长信号转导而抑制 EC9706 细胞生长。

[关键词] 食管癌; 人表皮生长因子; 启膈散; 沙参麦冬汤; 通幽汤; 补气运脾汤

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)03-0100-05

Influence of Prescriptions for Esophageal Carcinoma on Growth Signal Transduction in hEGF-Stimulated Cell Line EC9706

JIA Yong-sen^{1*}, WANG Yuan-yuan², SI Fu-chun³

(1. North China Coal Medical University, Tangshan 063000, China; 2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 3. Henan College of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] Objective: To discuss effects of prescriptions for esophageal carcinoma in different concentrations on the proliferation of esophageal carcinoma cell line EC9706 stimulated by hEGF; to discuss inhibition mechanism of the prescriptions on esophageal carcinoma EC9706 cells stimulated by hEGF from the view of growth signal transduction. **Methods:** Human esophageal carcinoma cell line EC9706 cultured in vitro treated with hEGF and Qigesan(Q), Shashenmaidongtang(S), Tongyoutang(T) and Buqiyunpitang(B), cells proliferation is assayed by MTT, cells proliferation and cells cycle are measured by FCM. Associated proteins within growth signal pathway mediated by PLC- γ 1 were determined by western blot. **Results:** The half maximum inhibition rates(IC₅₀) of Q, S and T are 849, 1 004, 1 615 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}$. These 3 prescriptions could inhibit associated proteins expression within signal pathway mediated by PLC- γ 1, the effects of T and Q were better than S. **Conclusion:** Q S and T could inhibit cells proliferation stimulated by hEGF. The inhibition of B is very weak. The prescriptions influence EC9706 cells proliferation by inhibiting proteins expression associated with growth signal pathway mediated by PLC- γ 1.

[Key words] esophageal carcinoma; hEGF; Qigesan; Shashenmaidongtang; Tongyoutang; Buqiyunpitang

根据文献记载,噎膈的表现与食管癌十分相似。噎膈的发生是本虚标实,本虚是指阴血亏虚,标实是指瘀血、痰阻、逆气^[1]。根据虚实标本,临证分为痰气交阻、津亏热结、瘀血内结和气虚阳微,分别运用启膈散、沙参麦冬汤、通幽汤和补气运脾汤等^[2]辨证施治。通过我们之前的系统研究,已经表明人表皮生长因子(hEGF)可以刺激 EC9706 细胞增殖^[3],本研究观察了启膈散等方干预 hEGF 刺激的食管癌 EC9706 细胞生长及其可能存在的生长信号转导机制。

1 材料与方法

1.1 材料 启膈散(Q),沙参麦冬汤(S),通幽汤(T),补气运脾汤(B)。各单味药物均购自河南中医学院第三附属医院;人食管癌细胞株 EC9706 由中国协和医科大学肿瘤医院分子肿瘤学国家重点实验室惠赠;人表皮生长因子(hEGF)(sigma 公司);RPMI 1640 培养基(GIBCO 公司);小牛血清(GIBCO 公司);胰蛋白酶(华美公司);MTT(Amresco 公司);DMSO(Amresco 公司);RNase A(sigma 公司);碘化丙(Pi)(sigma 公司);磷脂酶 C γ 1(PLC- γ 1)单克隆抗体(韩国浦项科技大学国家信号转导网络实验室惠赠);蛋白激酶 C α (PKC α)兔多克隆抗体(Santa Cruz 公司产品);表皮生长因子受体(EGFR)多克隆抗体(Santa Cruz 公司产品);酪氨酸磷酸化(P-Tyr)单克隆抗体(韩国浦项科技大学国家信号转导网络实验室惠赠);磷酸化蛋白 MARCKS(Ser152/156)多克隆抗体(Cell Signal 公司产品)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 以 10% 小牛血清 RPMI1640 培养液 10 mL,接种 EC9706 细胞于 Φ 100 mm 培养皿中,置于 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂,饱和湿度的 CO₂ 培养箱培养。每 2~3 d 传代 1 次。

1.2.2 方药配制 启膈散、沙参麦冬汤、通幽汤和补气运脾汤均以原方用量,以纱布过滤掉药物杂质,并加入 30 倍体积去离子水,浸泡 30 min,武火煮沸,文火煎煮 40 min,收集药液,入烧杯中浓缩 4 方药至 200 mL,5 000 r $\cdot$ min⁻¹ $\times$ 30 min 离心,取上清,计算各方药提取物浓度,以不含血清 RPMI1640 培养液配制浓度至 400 mg $\cdot$ mL⁻¹,超净工作台过滤除菌,1.5 mL 离心管分装,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.3 MTT 实验 以 1 $\times$ 10⁴ 个细胞/孔的密度接种于 96 孔平面培养板,含小牛血清培养液使细胞贴

壁 24 h,饥饿细胞 24 h,分别加入含 Q、S、T、B 提取物的培养液,45 min 后以 hEGF 工作液加入上述加药各孔中,调整药物浓度为:50,100,200,400,800,1 600,3 200,6 400 μ g $\cdot$ mL⁻¹;hEGF 浓度为 200 ng $\cdot$ mL⁻¹;hEGF 对照组加入 200 ng $\cdot$ mL⁻¹ hEGF,空白对照组加入不含血清培养液,继续培养 24 h。MTT 染色 4 h 后加入 DMSO,在酶标仪上以 570nm/630 nm 测定光密度值(OD 值)。实验重复 3 次。按照公式:

肿瘤细胞生长抑制率% = (1 - 实验组 OD 值/对照组 OD 值) $\times$ 100%

计算各药物组对肿瘤细胞增殖的抑制率。

用 SPSS 软件 F 检验,绘制量效关系曲线图,作拟合曲线,求出各方半数有效量(IC₅₀)。

1.2.4 流式细胞术分析 4 方对 hEGF 刺激的食管癌 EC9706 细胞增殖和形态的影响 以 1 $\times$ 10⁶/皿细胞密度接种 EC9706 细胞于 100 mm 培养皿中,贴壁 24 h,饥饿细胞。24 h 后,加入含有 4 方 IC₅₀ 浓度值的药物提取液,45 min 后加入 200 ng $\cdot$ mL⁻¹ hEGF;继续培养 24 h,收集入 15 mL 离心管中,PBS 2 mL 重悬细胞,加入 70% 乙醇固定细胞,4 $^{\circ}$ C 过夜。弃乙醇,并在 3 mL 预冷的 PBS 中重悬细胞,静息 1 min,再离心。弃 PBS,依次加入 PBS 850 μ L,10 mg $\cdot$ mL⁻¹ RNase A 10 μ L,1% TritonX-100 100 μ L,1 mg $\cdot$ mL⁻¹ PI 40 μ L,37 $^{\circ}$ C 下避光孵育 5 min。400 目筛网过滤细胞,上流式细胞仪分析细胞周期,并用 Modifit LT 软件分析结果,得出不同组别细胞在各细胞周期的百分比率。

1.2.5 蛋白提取 将各组细胞冰上收集,离心,裂解细胞;15 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 20 min;取上清。Bradford 法测蛋白浓度,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。配制 8% SDS-PAGE(分离胶)和积层胶。

1.2.6 Western blot 分析方法 灌胶、上样、电泳,转移过夜,转移结束后,加丽春红染料染色,标记标准蛋白分子量。加封闭液在摇床上振摇 1 h,阻断膜上的非特异性结合位点;抗原抗体反应;加入 ECL 显色液,X 光摄片。

2 结果

2.1 噎膈证方对 hEGF 刺激的人食管癌 EC9706 细胞增殖的影响 各组不同浓度药物 + hEGF(200 ng $\cdot$ mL⁻¹) 处理细胞 24 h 后,MTT 法测定,结果见表 1。

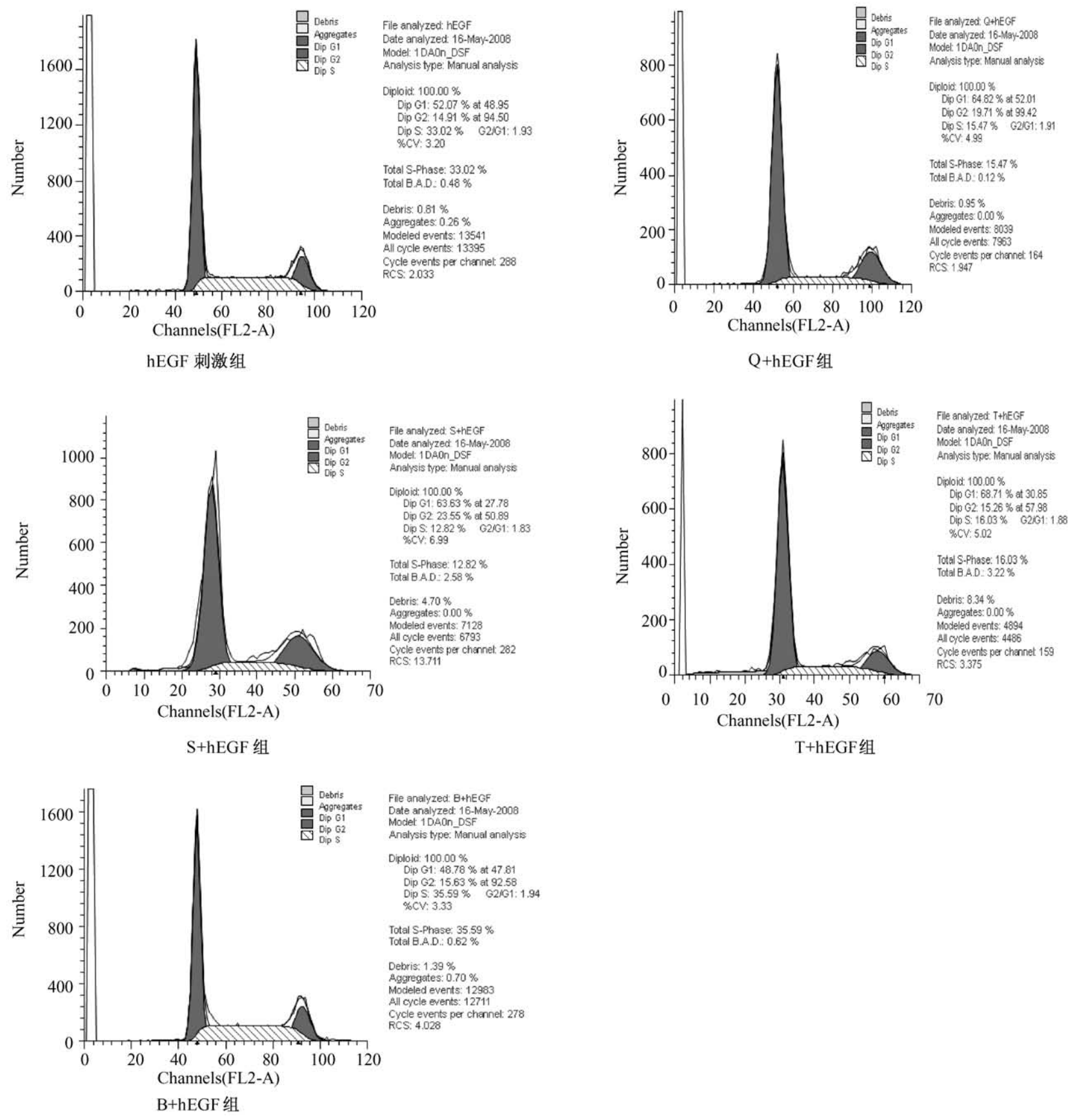


图 1 流式细胞仪 Modifit LT 分析噎膈证方对细胞周期的影响图

注: 每组细胞计数 5 万, 以美国 BD 公司 FACSCalibur 流式细胞仪分析

表 1 各方对 hEGF 刺激的 EC9706 细胞增殖的抑制作用(珣±s, n = 3)

EGF200 ng · mL ⁻¹ + 药物浓度 /(μg · mL ⁻¹)	抑制率 / %			
	启膈散 (Q)	沙参麦冬汤 (S)	通幽汤 (T)	补气运脾汤 (B)
50	26.59 ±1.33	19.78 ±1.15	21.52 ±1.51	- 4.43 ±0.14
100	33.75 ±2.03	20.66 ±1.46	25.89 ±1.66	- 3.07 ±0.43
200	37.30 ±1.02	26.68 ±1.19	30.40 ±0.46	- 2.86 ±0.95
400	47.53 ±1.27	33.58 ±1.83	38.46 ±1.06	- 2.59 ±0.15
800	48.66 ±1.53	42.69 ±0.43	44.21 ±1.14	2.07 ±0.34
1 600	49.84 ±1.41	50.37 ±0.41	50.07 ±0.25	7.75 ±0.27
3 200	51.02 ±0.42	52.87 ±0.49	51.14 ±0.46	8.34 ±0.24
6 400	50.69 ±0.22	55.61 ±0.36	54.91 ±1.37	14.74 ±2.32

Q、S 和 T 可不同程度地抑制 hEGF 刺激的 EC9706 细胞增殖, 且抑制率随药物浓度增加而上升, 呈量效依赖关系, 在药物浓度为 3 200 μg · mL⁻¹ 时, Q、S、T 的抑制率均超过 50%。根据生长抑制作用量效关系拟合曲线方程求出各组 IC₅₀ 值, 分别是: Q IC₅₀ = 849 μg · mL⁻¹, S IC₅₀ = 1 004 μg · mL⁻¹, T IC₅₀ = 1 615 μg · mL⁻¹。B 对 hEGF 刺激的 EC9706 增殖无明显抑制作用, 在较低药物浓度时, 抑制率为负值, 说明甚至与 hEGF 有协同促增殖作用, 即使达到 6400 μg · mL⁻¹, 抑制率也只有 14.74%。

2.2 噎膈证方对 hEGF 刺激的人食管癌 EC9706 细

胞周期的影响 见图 1 ~2。

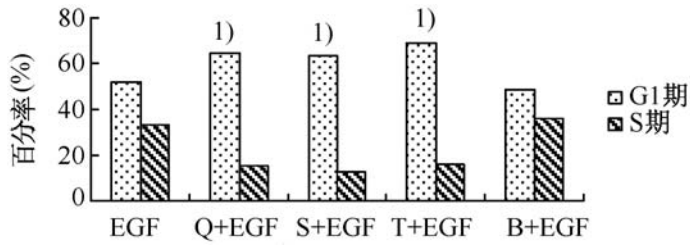


图 2 噎膈证方对 hEGF 刺激的 EC9706 细胞 G1 期、S 期的影响
EGF 为对照组, 各组与 EGF 组比较, 细胞 G1 期、S 期所占百分比, 配对 *t* 检验, ¹⁾ *P* < 0. 05

从图 2 柱形图可以看出, 四方对 hEGF 刺激的细胞周期有明显影响, 4 药物组细胞的 G1 期所占百分比率分别为 64. 82%, 63. 63%, 68. 71% 和 48. 78%, G1 期细胞百分率一定程度上反应了细胞生长受抑制的情况, S 期启膈散、沙参麦冬汤和通幽汤组与 hEGF 组比较, 均有显著下降, FCM 结果显示, 除补气运脾汤之外, 3 个方剂对 hEGF 刺激的 EC9706 细胞抑制强弱依次为: T > Q > S。

2. 3 噎膈证方对 hEGF 刺激的食管癌 EC9706 细胞 PLC-γ1 介导的生长信号转导相关蛋白的影响

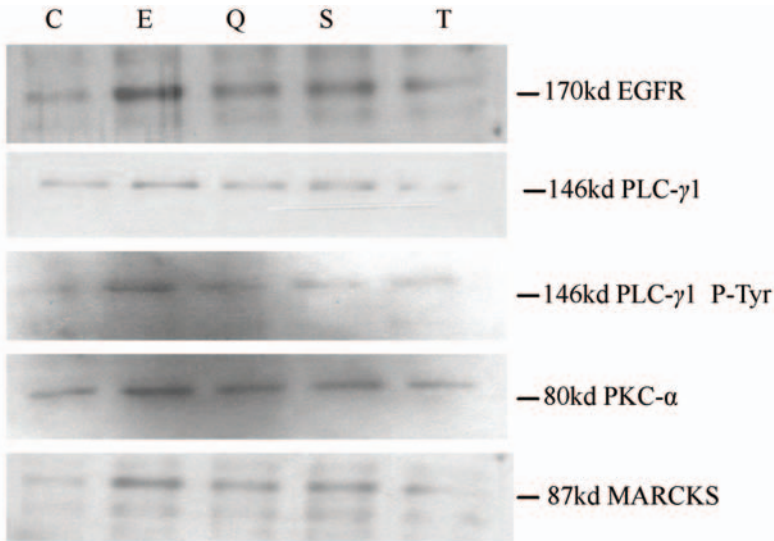


图 3 噎膈证方对 hEGF 刺激的 EC9706 细胞 PLC-γ1 通路蛋白的影响
注: C: 空白对照组 E: hEGF 对照组; Q: 启膈散组; S: 沙参麦冬汤组; T: 通幽汤组

10 μg/孔样品, 8% SDS-PAGE, 100V 电泳 90 min, 20 V 转移 8 h, 特异性一抗抗体反应 4 h, 洗涤 30 min, 加入二抗反应 2 h, 洗涤 30 min, 用增强化学发光(ECL)试剂显影、定影、洗片。

Western blot 法分析表明, 在测定的 5 组蛋白中, hEGF 对照组比空白无血清对照组蛋白条带明显增强。应用 Q、S 和 T 处理的 EC9706 细胞 EGFR 蛋白条带与 hEGF 对照组相比显著减弱, 说明对其表达具有明显抑制作用, 抑制作用强弱依次为 T > Q > S。

3 讨论

我们运用 MTT 比色法观察到启膈散、沙参麦冬

汤和通幽汤可使 hEGF 刺激的 EC9706 细胞生长受到抑制。

细胞周期中的 G1 期代表了细胞生长处于抑制状态, 其所占整个细胞百分比率就成为衡量细胞生长受抑制情况的重要指标^[4]。我们在使用启膈散等 4 个方剂作用于 hEGF 刺激的 EC9706 细胞后, 发现通幽汤组 G1 期占 68. 71%, 对细胞抑制最强, 其后依次是启膈散、沙参麦冬汤。通过研究表明, 启膈散、沙参麦冬汤和通幽汤通过抑制 EC9706 细胞从 G1 期进入 S、G2M 增殖期, 从而抑制了细胞的生长。

PLC-γ1 是多种细胞生长因子信号传导的细胞内效应分子, 其超量表达或活性增强可导致肿瘤的发生^[5], 并在生长因子信号通路中起着重要作用^[6]。酪氨酸磷酸化(P-Tyr)是指细胞内蛋白质在外界信号刺激下, 分子中的酪氨酸发生活性改变, 参与细胞内信号转导的蛋白将依次激活下游各级信号分子。许多证据表明 PKCα 参与多种正常和异常细胞的增殖和分化, 其异常表达和活性增高在肿瘤的形成和转移过程中起着重要作用, 是细胞信号传导通路中的一个关键分子^[7, 8]。MARCKS 分布于各种细胞中, 包含磷酸化位点的 MARCKS 合成肽是 PKC 的重要底物。现在 MARCKS 已广泛应用于对细胞 PKC 活性的检测。

在本次实验中我们用 Western blot 法检测 hEGF 组和药物组中 EGFR、PLC-γ1、P-tyr、PKCα 及 MARCKS 蛋白表达。结果显示 hEGF 组中各蛋白表达均超量, 提示 hEGF 通过增强 PLC-γ1 介导的生长信号转导而使细胞明显增殖。应用启膈散、沙参麦冬汤和通幽汤处理 EC9706 细胞后, 与 hEGF 对照组相比, 各蛋白表达有不同程度地减弱, 说明 3 个辨证施方可不同程度地抑制各蛋白表达, 通过 PLC-γ1 途径抑制了细胞增殖。

本研究发现, 在 hEGF 刺激的细胞中加入启膈散、沙参麦冬汤和通幽汤后, 肿瘤细胞生长受到显著抑制。这种强效抑制作用不仅直观地反映出上述信号通路对食管癌细胞的生长增殖起着重要作用, 而且提示相关信号转导通路的关键组分有望成为食管癌癌生物治疗领域很有价值的候选靶点, 而中医药抗肿瘤的部分机理在于抑制了肿瘤细胞相关信号通路的关键蛋白。通过研究, 可以看出启膈散、沙参麦冬汤和通幽汤不同程度地抑制了 EC9706 细胞生长信号转导, 从而达到抑制肿瘤生长的效应。

(下转第 108 页)