

# 槐耳浸膏联合化疗药物对人胃癌 MGC803 的体外抑制作用

周玲<sup>a</sup>, 乐涵波<sup>b</sup> (浙江省舟山医院 <sup>a</sup> 药剂科; <sup>b</sup> 胸外科, 浙江 舟山 316021)

**摘要:** 目的 筛选出槐耳浸膏与化疗药物的最佳组合并探讨槐耳浸膏和化疗药物 5-氟尿嘧啶诱导人胃癌 MGC803 细胞凋亡的机制。方法 以不同浓度槐耳浸膏和化疗药物(5-氟尿嘧啶, 紫杉醇)作用于体外培养的人胃癌细胞 MGC803, 通过 MTT 法检测槐耳浸膏对 MGC803 细胞增殖的作用, 倒置显微镜观察其形态的变化; 将 0.2 mg · mL<sup>-1</sup> 的槐耳浸膏分别与 5-FU(2.5 μg · mL<sup>-1</sup>) 或紫杉醇(0.5 μg · mL<sup>-1</sup>) 联合处理细胞, 比较存活率。流式细胞术检测 0.2 mg · mL<sup>-1</sup> 槐耳浸膏联合 5-FU(2.5 μg · mL<sup>-1</sup>) 干预 MGC803 细胞 24、48 h 后细胞的凋亡情况; Western Blot 法检测 0.2 mg · mL<sup>-1</sup> 槐耳浸膏联合 5-FU(2.5 μg · mL<sup>-1</sup>) 干预 MGC803 细胞 24、48 h 后细胞的 P53、T-Akt 和 P-Akt 蛋白的表达。结果 槐耳浸膏及化疗药物(5-氟尿嘧啶, 紫杉醇) 均能降低 MGC803 细胞存活率, 并呈时间和剂量依赖性; 倒置显微镜下可见细胞胞体缩小、核碎裂, 且呈浓度与时间依赖性 ( $P < 0.01$ )。相较于单独应用化疗药物, 联合用药能够显著降低细胞的生存率。槐耳浸膏联合 5-FU 联合给药上调人胃癌细胞 MGC803 T-Akt 及 P53 蛋白表达量, 同时下调 P-Akt 的表达量。结论 槐耳浸膏联合 5-FU 在体外诱导胃癌细胞 MGC803 凋亡作用可能是通过抑制 PI3K/Akt 信号通路来实现的。联合使用槐耳浸膏和化疗药物可能会更有效发挥槐耳抗肿瘤增殖的作用。

**关键词:** 槐耳; 紫杉醇; 人胃癌细胞 MGC803; 细胞凋亡; P53 蛋白; P-Akt 蛋白; T-Akt 蛋白

**doi:** 10.11669/cpj.2015.18.007 **中图分类号:** R969 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-2494(2015)18-1607-06

## Inhibition Effect of Extractum Robinia-living trametes Combined with Chemotherapy on Proliferation of Gastric Cancer Cell MGC803 *in Vitro*

ZHOU Ling<sup>a</sup>, YUE Han-bo<sup>b\*</sup> ( *a. Department of Pharmacy; b. Department of Thoracic surgery, Zhoushan Hospital, Zhoushan 316021, China* )

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To screen the best combination of extractum of Robinia-living trametes and chemotherapy and investigate the action mechanism of Robinia-living trametes against the apoptosis of human gastric cancer cell MGC803. **METHODS** MGC803 Cells were treated with different concentrations of Robinia-living trametes and chemotherapy drugs (5-Fu and paclitaxel) *in vitro*. The inhibitory rate of cells was measured by MTT assay. Morphological changes were observed with inverted microscope. The apoptosis rate of MGC803 cells which were treated with combination of Robinia-living trametes(0.2 mg · mL<sup>-1</sup>) and 5-Fu (2.5 μg · mL<sup>-1</sup>) was detected by FCM. The protein expression of P53 and p-Akt in MGC803 cells which were treated with combination of *Robinia-living trametes* (0.2 mg · mL<sup>-1</sup>) and 5-Fu (2.5 μg · mL<sup>-1</sup>) was detected by Western blot. **RESULTS** The viability of MGC803 cells was reduced by Robinia-living trametes and chemotherapy drugs (5-Fu and paclitaxel) in a concentration- and time-dependent manner ( $P < 0.01$ ). Under reverse microscopy, cell body shrinking, nuclear pyrosis, and nuclear fragmentation were observed. The higher concentration, the longer treatment time, the more cells died. Compared with monotherapy, the combination of Robinia-living trametes and chemotherapy could reduce the survival rate of MGC803 cells. The protein expressions of P53 in MGC803 cells treated with combination of drugs was up-regulated, while that of P-Akt was down-regulated. **CONCLUSION** The apoptosis of MGC803 cells *in vitro* may be induced by the inhibitory effect of the combination of Robinia-living trametes and 5-Fu on PI3K/Akt signaling pathway. Combination therapy of Robinia-living trametes and 5-Fu is potentially more effective in inhibition of tumor cells than monotherapy of Robinia-living trametes.

**KEY WORDS:** Robinia-living trametes; paclitaxel; human gastric cancer cell MGC803; apoptosis; P53; P-Akt; T-Akt

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,在我国其发病率和死亡率高居各类恶性肿瘤之首<sup>[1]</sup>。目前针对胃癌主要采取综合治疗,方法有手术、化疗和生物治疗等。然而由于化疗药物本身对细胞有较强的毒性

副反应,加上胃癌细胞对化疗药物敏感性差,易产生多药耐药性,使得临床上治疗效果并不十分理想。磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B [phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) / protein kinase B (Akt)], PI3K/

作者简介:周玲,女,药师 研究方向:临床药学 \* 通讯作者:乐涵波,男,主任医师 研究方向:肺癌、食道贲门癌、胃癌手术与综合治疗 Tel: (0580) 2292992 E-mail: zhouling978@163.com

Akt]信号传导通路在促进细胞生长、增殖,促进血管生成,抵抗化疗和放疗等方面起重要作用。而关于PI3K/Akt信号通路与药物耐药性关系的研究越来越多,多种实验表明,化疗药物可增加Akt磷酸化水平,使肿瘤细胞产生化疗耐受,P-Akt与多药耐药增加有关。因此,如果能够在不增加化疗药物剂量的情况下,既能避免药物毒副作用,又能提高化疗疗效,联合使用一些抗肿瘤药物则是治疗胃癌的一个新方向。目前诱导肿瘤凋亡已成为抗肿瘤药物治疗的主要目标,也为抗肿瘤药物的筛选提供了有力的依据<sup>[2]</sup>。已有多项研究表明,槐耳可以体外抑制多种肿瘤细胞的增殖<sup>[3-4]</sup>,逆转部分耐药细胞株,同时对化疗亦有增敏作用。本实验选用人胃癌细胞MGC803为研究对象,确定槐耳诱导MGC803凋亡的剂量-效应、时间-效应关系,筛选槐耳与化疗药物最佳组合,确定剂量-效应关系进而探讨槐耳诱导MGC803细胞凋亡和逆转化疗耐药的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器和试剂

人胃癌细胞MGC803(南京凯基生物科技有限公司);槐耳浸膏(江苏盖天力药物有限公司);氟尿嘧啶(5-Fu,天津金耀氨基酸有限公司);紫杉醇注射液(深圳海王药业有限公司);RPMI-1640干粉(美国Gibco公司);小牛血清(杭州四季青公司);四甲基偶氮唑盐(MTT, Sigma公司);二甲基亚砜(江苏强盛化工有限公司);兔抗Akt、P-Akt、P53(Cell signaling公司);Annexin V-FITC/PI(南京碧波生物科技有限公司);CO<sub>2</sub>培养箱(HERAEUS公司);酶标仪(美国Bio-Rad公司);CKX41型倒置显微镜(Olympus公司);流式细胞仪(Bio-Rad公司, USA)。

### 1.2 槐耳浸膏储备液的配制

将2 g槐耳膏剂溶于20 mL培养基中并高压灭菌0.22 μm微孔滤膜过滤后于-20℃长期储存待用。

### 1.3 MGC803细胞培养

人胃癌细胞MGC803常规培养于含10%热灭活的小牛血清、100 u·mL<sup>-1</sup>青霉素、100 u·mL<sup>-1</sup>链霉素的RPMI-1640培养液中,于37℃、5%CO<sub>2</sub>及饱和湿度条件下培养,以0.25%胰蛋白酶(含0.02% EDTA)消化,按实验所需细胞密度接种,所有实验均在细胞对数生长期进行。

### 1.4 MTT测定

#### 1.4.1 不同浓度的槐耳干预不同时间对人胃癌细

胞MGC803增殖的影响 取对数生长期的胃癌细胞MGC803消化后,制成 $1 \times 10^5$ 个·mL<sup>-1</sup>细胞悬液,接种于96孔培养板中,每孔200 μL,培养24 h后,分别设空白对照组、药物组,每组12复孔,空白对照组为不加药物的培养基。药物组为不同浓度的槐耳,使其终质量浓度分别为0.2、1、2、3、4 mg·mL<sup>-1</sup>,置37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中分别培养12、24、48 h后每孔加MTT 20 μL,继续培养4 h后取出,吸弃培养基,每孔加150 μL DMSO,置摇床上低速振荡10 min,于酶标仪490 nm处测定其OD值,以正常组OD值为对照,计算各孔细胞抑制率(%) =  $(1 - OD_{\text{各孔}} / OD_{\text{正常}}) \times 100\%$ 。

#### 1.4.2 不同浓度化疗药物(5-FU、紫杉醇)对MGC803细胞增殖的影响

设化疗药物组(5-FU与紫杉醇),5-FU使其分别为2.5、5、10、20、40 μg·mL<sup>-1</sup>。紫杉醇使其分别为0.5、1、2、4、5 μg·mL<sup>-1</sup>。其余实验步骤同步骤“1.4.1”。

#### 1.4.3 槐耳分别与紫杉醇、5-FU联合干预不同时间对MGC803细胞增殖的影响

取对数生长期的MGC803细胞消化后,制成 $1 \times 10^5$ 个·mL<sup>-1</sup>细胞悬液,接种于96孔培养板中,每孔200 μL,培养24 h后,根据“1.3.1”与“1.3.2”的实验结果,最终选用槐耳0.2 mg·mL<sup>-1</sup>,5-FU 2.5 μg·mL<sup>-1</sup>,紫杉醇0.5 μg·mL<sup>-1</sup>。分别设空白对照组、联合给药组(0.2 mg·mL<sup>-1</sup>槐耳 + 0.5 μg·mL<sup>-1</sup>紫杉醇)、(0.2 mg·mL<sup>-1</sup>槐耳 + 2.5 μg·mL<sup>-1</sup>5-FU)。其余实验步骤同步骤“1.4.1”。

### 1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡

MGC803正常培养24 h后,以0.2 mg·mL<sup>-1</sup>的槐耳 + 2.5 μg·mL<sup>-1</sup>5-FU分别干预24、48 h后,PBS清洗,加入1 μL Annexin V-FITC,5 μL碘化丙啶(PI)至细胞悬液中,轻轻摇匀,置冰浴中避光反应10 min,加入400 μL预冷的10×binding buffer至样品中,1 h内上机检测。

### 1.6 Western blot检测

取对数生长期的MGC803细胞,消化离心重悬,调整细胞密度至 $1 \times 10^6$ 个·mL<sup>-1</sup>接种于25 cm<sup>2</sup>细胞培养瓶中,0.2 mg·mL<sup>-1</sup>槐耳 + 2.5 μg·mL<sup>-1</sup>5-FU作用24、48 h后提取各组细胞总蛋白,BCA试剂盒进行蛋白定量,用裂解液提取蛋白样品作SDS-PAGE,电泳分离转至PVDF膜,4℃封闭过夜,加入一抗,PBST洗膜3次,每次10 min;加入二抗工作液,室温孵育1 h,TBST洗涤3次,每次10 min,浸入二氨基联苯胺中显色3 min,洗片,成像仪摄片。

## 1.7 数据处理

采用 SPSS13.0 版统计软件进行数据分析,实验结果以平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,数据比较采用两独立样品 *t* 检验,  $P < 0.05$  差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 药物对 MGC803 细胞形态的影响

倒置显微镜下观察正常组细胞贴壁生长,细胞数量多,边缘清晰,核居中,与正常组相比,槐耳作用于 MGC803 细胞 12 h 后部分细胞变圆,体积变小,折光率减弱,形态开始变得不规则,且随着作用时间的延长,药物浓度的增高,部分细胞破裂,细胞死亡比例增多;当槐耳质量浓度达  $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  并培养 48 h 后,大半细胞脱落并漂浮于培养基中,呈坏死状(图 1)。与槐耳相类似,经不同浓度的 5-FU 或紫杉醇处理后的细胞形态也发生了以上改变。

### 2.2 不同浓度槐耳作用不同时间对 MGC803 细胞增殖的影响

实验结果表明,槐耳可抑制 MGC80 细胞增殖 ( $P < 0.01$ ),且随着槐耳浓度的升高、作用时间的延

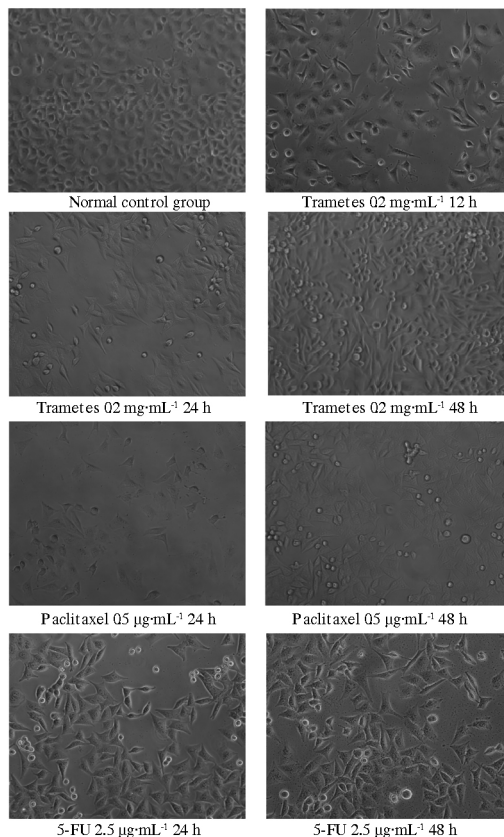


图 1 显微镜下药物对 MGC803 细胞形态的影响( $\times 200$ )

Fig. 1 Effects of drug on MGC803 cells morphology under the microscope( $\times 200$ )

长, MGC80 细胞的存活率显著降低,呈剂量、时间依赖性。与正常组相比较,作用 48 h 后当槐耳质量浓度达  $4.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, MGC803 的存活率达到最低,仅为 19.9%。槐耳质量浓度为  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,随着作用时间的延长, MGC803 的存活率逐步降低,最终达到 67.4%(表 1)。可以发现随着槐耳浓度的增加及作用时间的延长, MGC803 细胞的损伤程度越明显。

### 2.3 不同浓度化疗药物干预不同时间对 MGC803 细胞增殖的影响

随着化疗药物(5-Fu, 紫杉醇)浓度的增加以及作用时间的延长, MGC803 的存活率逐渐降低,  $5.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  紫杉醇作用 48 h 后, MGC803 的存活率仅为 25.6%。  $40.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  5-FU 作用 48 h 后, MGC803 的存活率仅为 26.8%, 呈剂量、时间依赖性(表 2、3)。

### 2.4 槐耳分别与紫杉醇、5-Fu 分别联合干预不同时间对 MGC803 细胞增殖的影响

槐耳 ( $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 与紫杉醇 ( $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 或 5-Fu ( $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 联合作用于 MGC803 细胞,随着作用时间的延长, MGC803 的存活率显著降低,且相较于单独应用槐耳或化疗药物(5-Fu, 紫杉醇)联合用药展现出了显著的优势(表 4)。

### 2.5 药物对 MGC803 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测,据 FITC 和 PI 荧光作双参数散点图,可获得由 4 个象限组成的双参数图。左下象限为活细胞: Annexin V-FITC(-), PI(-); 右下象限为早期凋亡细胞: Annexin V-FITC(+), PI(-); 右上象限为晚期凋亡细胞和坏死细胞: Annexin V-FITC(+), PI(+); 左上象限为细胞收集过程中产生的坏死细胞: Annexin V-FITC(-), PI(+)。槐耳 ( $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 与 5-Fu ( $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 联合作用于 MGC803 细胞 24、48 h 后,正常组与药物组相比,联合用药能显著诱导 MGC803 细胞发生凋亡,且随着作用时间的延长,晚期凋亡的细胞逐渐增多,呈时间依赖性(图 2)。

### 2.6 药物对 MGC803 细胞 T-Akt、P-Akt 及 P53 蛋白水平的影响

槐耳联合 5-Fu 分别作用于 MGC803 细胞 24、48 h 后,提取总蛋白,Western Blot 法检测 T-Akt、P-Akt 及 P53 蛋白表达情况。结果表明,与单独用药组相比,联合给药组 T-Akt、P53 的表达随着药物作用时间的延长而逐渐增强; P-Akt 表达随着药物作用时间逐渐减弱,呈时间依赖性趋势,具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ) (图 3)。

表 1 不同浓度槐耳作用不同时间 MGC803 细胞的存活率.  $n = 12 \bar{x} \pm s$

Tab. 1 The survival rates of different concentration of trametes on growth of MGC803 cells under different time.  $n = 12 \bar{x} \pm s$

Group	12 h		24 h		48 h	
	A value	Survival rate/%	A value	Survival rate/%	A value	Survival rate/%
Blank group	1.000 ± 0.000	100	1.000 ± 0.000	100	1.000 ± 0.000	100
Trametes group						
0.2 mg · mL <sup>-1</sup>	0.863 ± 0.042 <sup>1)</sup>	86.3	0.812 ± 0.022 <sup>1)</sup>	81.2	0.674 ± 0.024	67.4
1.0 mg · mL <sup>-1</sup>	0.630 ± 0.046 <sup>1)</sup>	63.0	0.522 ± 0.049 <sup>1)</sup>	52.2	0.302 ± 0.028 <sup>2)</sup>	30.2
2.0 mg · mL <sup>-1</sup>	0.504 ± 0.018 <sup>2)</sup>	50.4	0.419 ± 0.080 <sup>2)</sup>	41.9	0.267 ± 0.002 <sup>2)</sup>	26.7
3.0 mg · mL <sup>-1</sup>	0.466 ± 0.041 <sup>2)</sup>	46.6	0.359 ± 0.062 <sup>1)</sup>	35.9	0.201 ± 0.026 <sup>2)</sup>	20.1
4.0 mg · mL <sup>-1</sup>	0.400 ± 0.052 <sup>2)</sup>	40.0	0.302 ± 0.045 <sup>2)</sup>	30.2	0.199 ± 0.057 <sup>2)</sup>	19.9

注: 与空白组比较, <sup>1)</sup>  $P < 0.05$  <sup>2)</sup>  $P < 0.01$

Note: <sup>1)</sup>  $P < 0.05$  <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  vs blank group

表 2 不同浓度紫杉醇作用不同时间 MGC803 细胞的存活率.  $n = 12 \bar{x} \pm s$

Tab. 2 The survival rates of different concentration of paclitaxel on growth of MGC803 cells under different time.  $n = 12 \bar{x} \pm s$

Group	12 h		24 h		48 h	
	A value	Survival rate/%	A value	Survival rate/%	A value	Survival rate/%
Blank group	1.000 ± 0.000	100	1.000 ± 0.000	100	1.000 ± 0.000	100
Paclitaxel group						
0.5 μg · mL <sup>-1</sup>	0.864 ± 0.022 <sup>2)</sup>	84.4	0.813 ± 0.024 <sup>1)</sup>	81.3	0.695 ± 0.047 <sup>1)</sup>	69.5
1.0 μg · mL <sup>-1</sup>	0.712 ± 0.052 <sup>1)</sup>	71.2	0.692 ± 0.069 <sup>1)</sup>	69.2	0.588 ± 0.046 <sup>1)</sup>	58.8
2.0 μg · mL <sup>-1</sup>	0.588 ± 0.056 <sup>1)</sup>	58.8	0.548 ± 0.037 <sup>2)</sup>	54.8	0.362 ± 0.037	36.2
4.0 μg · mL <sup>-1</sup>	0.429 ± 0.014 <sup>2)</sup>	42.9	0.428 ± 0.024 <sup>2)</sup>	42.8	0.288 ± 0.022 <sup>2)</sup>	28.8
5.0 μg · mL <sup>-1</sup>	0.387 ± 0.019 <sup>2)</sup>	38.7	0.339 ± 0.037 <sup>2)</sup>	33.9	0.256 ± 0.036 <sup>2)</sup>	25.6

注: 与空白组比较, <sup>1)</sup>  $P < 0.05$  <sup>2)</sup>  $P < 0.01$

Note: <sup>1)</sup>  $P < 0.05$  <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  vs blank group

表 3 不同浓度 5-Fu 作用不同时间 MGC803 细胞的存活率.  $n = 12 \bar{x} \pm s$

Tab. 3 The survival rates of different concentration of 5-Fu on growth of MGC803 cells under different time.  $n = 12 \bar{x} \pm s$

Group	12 h		24 h		48 h	
	A value	Survival rate/%	A value	Survival rate/%	A value	Survival rate/%
Blank group	1.000 ± 0.000	100	1.000 ± 0.000	100	1.000 ± 0.000	100
5-Fu group						
2.5 μg · mL <sup>-1</sup>	0.921 ± 0.026	92.1	0.826 ± 0.032 <sup>1)</sup>	82.6	0.572 ± 0.062	57.2
5.0 μg · mL <sup>-1</sup>	0.873 ± 0.024 <sup>1)</sup>	87.3	0.797 ± 0.135 <sup>1)</sup>	79.7	0.480 ± 0.110 <sup>1)</sup>	48.0
10.0 μg · mL <sup>-1</sup>	0.713 ± 0.021 <sup>1)</sup>	71.3	0.623 ± 0.037 <sup>1)</sup>	62.3	0.380 ± 0.008	38.0
20.0 μg · mL <sup>-1</sup>	0.646 ± 0.012 <sup>2)</sup>	64.6	0.553 ± 0.043 <sup>1)</sup>	55.3	0.302 ± 0.007 <sup>2)</sup>	30.2
40.0 μg · mL <sup>-1</sup>	0.582 ± 0.130 <sup>2)</sup>	58.2	0.508 ± 0.040 <sup>2)</sup>	50.8	0.268 ± 0.012 <sup>2)</sup>	26.8

注: 与空白组比较, <sup>1)</sup>  $P < 0.05$  <sup>2)</sup>  $P < 0.01$

Note: <sup>1)</sup>  $P < 0.05$  <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  vs blank group

表 4 槐耳分别与紫杉醇、5-Fu 联合干预不同时间 MGC803 细胞的存活率.  $n = 12 \bar{x} \pm s$

Tab. 4 The survival rates of combination of trametes and paclitaxel/5-Fu on growth of MGC803 cells under different time.  $n = 12 \bar{x} \pm s$

Group	24 h		48 h	
	OD value	Survival rate/%	OD value	Survival rate/%
Blank group	1.000 ± 0.000	100	1.000 ± 0.000	100
Trametes group	0.812 ± 0.022 <sup>1)</sup>	81.2	0.674 ± 0.024	67.4
5-Fu group	0.826 ± 0.032 <sup>1)</sup>	82.6	0.572 ± 0.062	57.2
Combination of trametes and 5-Fu	0.619 ± 0.052 <sup>2)</sup> <sup>3)</sup> <sup>5)</sup>	61.9	0.368 ± 0.011 <sup>2)</sup> <sup>4)</sup> <sup>5)</sup>	36.8
Paclitaxel group	0.813 ± 0.024 <sup>1)</sup>	81.3	0.695 ± 0.047 <sup>1)</sup>	69.5
Combination of trametes and Paclitaxel	0.603 ± 0.037 <sup>2)</sup> <sup>4)</sup> <sup>6)</sup>	60.3	0.482 ± 0.020 <sup>2)</sup> <sup>4)</sup> <sup>6)</sup>	48.2

注: 与空白组比较, <sup>1)</sup>  $P < 0.05$  <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与槐耳组比较, <sup>3)</sup>  $P < 0.05$  <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ ; 与 5-Fu 组比较, <sup>5)</sup>  $P < 0.01$ ; 与紫杉醇组比较, <sup>6)</sup>  $P < 0.01$

Note: <sup>1)</sup>  $P < 0.05$  <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  vs blank group; <sup>3)</sup>  $P < 0.05$  <sup>4)</sup>  $P < 0.01$  vs robinia-living trametes group; <sup>5)</sup>  $P < 0.01$  vs 5-Fu group; <sup>6)</sup>  $P < 0.01$  vs paclitaxel group

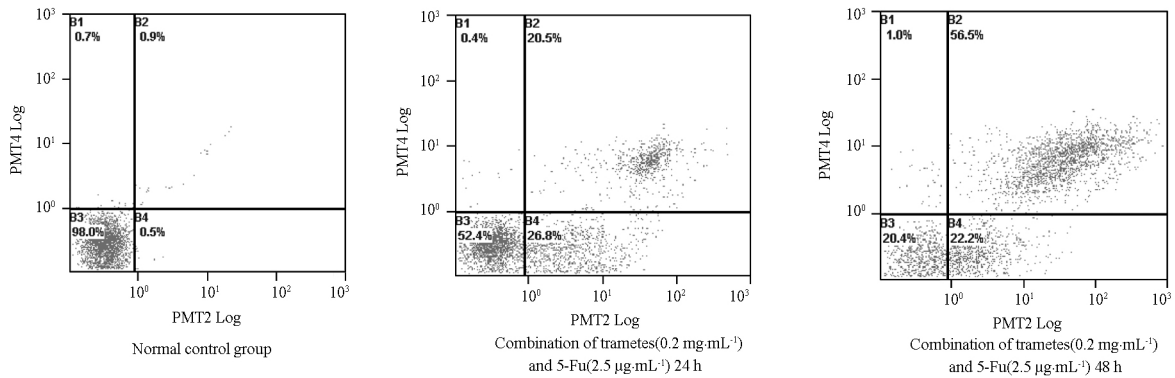


图2 槐耳与5-Fu对MGC803细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effects of apoptosis on MGC803 cells after combination of trametes and 5-Fu treatments

表5 槐耳联合5-Fu作用后细胞蛋白的表达.  $n = 12 \bar{x} \pm s$

Tab. 5 Expressions of proteins of MGC803 cells after combination of trametes and 5-Fu treatment.  $n = 12 \bar{x} \pm s$

Group	T-Akt	P-Akt	P53
Trametes group	15.45 ± 0.33	26.78 ± 0.13	31.28 ± 0.18
5-Fu group	16.88 ± 0.12	25.92 ± 0.45	34.56 ± 0.52
Combination of trametes and 5-Fu 24 h group	18.23 ± 0.10 <sup>1)</sup>	25.69 ± 0.26 <sup>1)2)</sup>	37.02 ± 0.94 <sup>1)2)</sup>
Combination of trametes and 5-Fu 48 h group	25.98 ± 0.21 <sup>1)2)</sup>	18.37 ± 0.35 <sup>1)3)</sup>	47.81 ± 0.88 <sup>1)3)</sup>

注:与槐耳组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与5-Fu组比较,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup> $P < 0.01$

Note: <sup>1)</sup> $P < 0.01$  vs robinia-living trametes group; <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$ , vs 5-Fu group

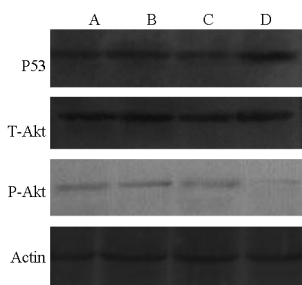


图3 槐耳联合5-Fu对T-Akt、P-Akt及P53蛋白表达量的影响

A - 槐耳组; B - 5-Fu组; C - 联合干预24 h; D - 联合干预48 h

Fig. 3 Expressions of P53, T-Akt and P-Akt proteins in MGC803 cells after combination of robinia-living trametes and 5-Fu treatments

A - trametes group; B - 5-Fu group; C - combination treatment for 24 h; D - combination treatment for 48 h

### 3 讨论

槐耳颗粒是槐耳菌质<sup>[5]</sup>的提取物,主要成分是多糖蛋白(PS-T),具有直接抗肿瘤和免疫增强调节的双重作用。前期很多报告已经证实,槐耳颗粒在临床上对肝癌、胃癌、胰腺癌、食道癌、肠癌等均有明

显疗效<sup>[6-8]</sup>。MTT比色分析法是根据活细胞能选择性地四甲基偶氮唑盐还原成蓝黑色的甲脒沉淀物的原理而建立的测定活细胞的方法,能直接反映药物毒性大小。关于PI3K/Akt信号通路与药物耐药性关系的研究越来越多,并被认为是化疗耐药治疗的新靶点。P-Akt是Akt的功能活化状态,Akt只有在活化状态时才具有生物学功能。研究表明,活化的PI3K-Akt信号通路在广泛的人类肿瘤谱中失调。主要是由于多种因素导致的Akt的过度活化,而激活的Akt可以通过磷酸化作用激活或抑制其下游靶蛋白,进而诱发细胞的增殖,经多种途径促进细胞存活<sup>[9]</sup>。多项实验表明,化疗药物可增加Akt磷酸化水平,使肿瘤细胞产生化疗耐受,深入研究其作用机制,可能为肿瘤的基因治疗、抗肿瘤药物开发提供新靶点。

本实验结果显示,随着槐耳浓度的升高,胃癌MGC803细胞存活率逐渐下降,且呈现时间-剂量依赖性关系,与细胞对照组比较有显著性差异( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。同样的,常用的化疗药物5-氟尿嘧啶、紫杉醇对胃癌MGC803细胞同样存在时间-剂量依赖性的抑制作用。另我们发现将槐耳分别与化疗药物联合使用,相较于单独使用化疗药物,MGC803细胞生存率显著降低。此结果表明,采用中药提取物联合化疗药物治疗癌症可作为之后临床上常规治疗癌症患者的一个很好的选择。Western Blot结果发现,槐耳联合5-Fu作用于人胃癌细胞MGC803能够上调p53蛋白的表达,下调P-Akt蛋白的表达。说明槐耳联合5-Fu给药可以通过上调P53及下调P-Akt促进细胞凋亡。

综上所述,槐耳作为一种新型的抗肿瘤药物,能够诱导胃癌细胞凋亡,且具有时间剂量依赖性,其途径可能与抑制Akt信号通路有关。而

通过将槐耳与临床上常用的化疗药物两者联合使用可增加抗肿瘤活性,这也为临床治疗恶性肿瘤提供新的策略。

## REFERENCES

- [1] XIE R J, ZHANG Y, CUI X L. Advances in gastric cancer prevention and control by traditional Chinese medicine [J]. *Inf Tradit Chin Med*( 中医药信息) 2008, 25( 5) : 15-16.
- [2] FANG X P. The treatment of apoptosis-inducing on gastric cancer [J]. *J China Tradit Chin Med Inf*( 中国中医药资讯) 2011, 3( 4) : 212.
- [3] WANG X, ZHANG N, HUO Q *et al.* Antiangiogenic and antitumor activities of Huaier aqueous extract [J]. *Oncol Rep* 2012, 28( 4) : 1167-1175.
- [4] ZHANG N, KONG X, YAN S *et al.* Huaier aqueous extract inhibits proliferation of breast cancer cells by inducing apoptosis [J]. *Cancer Sci* 2010, 101( 11) : 2375-2383.
- [5] ZHUANG Y. Characterization and textual criticism of huai er [J]. *Edib Fungi China*( 中国食用菌) 1993, 13( 6) : 22.
- [6] ZHENG Y H, LIU Y J, JING Q *et al.* The analysis of the therapeutic effects of jew ear parasitized granula to primary hepatic carcinoma ( PHC) [J]. *Med Inf*( 医学信息) 2006, 19( 10) : 1815-1817.
- [7] LI X B. Effects of Jinke Huaier granule on immune cell activity in patients with Stage III non-small cell lung cancer [J]. *J Clin Pulm Med*( 临床肺科杂志) 2006, 11( 4) : 472-473.
- [8] DENG A P, MAO D L. Seventy-four clinical researches of Huaier granules in the treatment of gastrointestinal cancers [J]. *Chin J Hosp Pharm*( 中国医院药学杂志) 2005, 25( 5) : 453-454.
- [9] SONG G, OUYANG G L, BAO S D. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival [J]. *J Cell Mol Med* 2005, 9( 1) : 59-71.

( 收稿日期: 2015-01-13)

## 关于举办 2015 年中国药学会暨第十五届中国药师周的通知( 第二轮)

由中国药学会主办、天津药学会承办、天津天士力集团有限公司等协办的 2015 年中国药学会暨第十五届中国药师周定于 11 月 6 日至 8 日在天津市梅江会展中心举行。本次大会将深入贯彻党的十八大和十八届三中、四中、五中全会及习近平总书记系列重要讲话精神,按照“四个全面”战略布局和国家科技工作总体要求,紧紧抓住国家深化改革和政府职能转移契机,充分调动和激发广大医药卫生工作者积极性创造性,全面提高公众健康水平,为我国医药卫生事业科学发展贡献力量。

大会通过对中药和天然药物、药物化学、生化与生物技术药物、医院药学等 26 个药学专业领域广泛交流,分析研讨我国医药卫生事业发展前景,并围绕我国医药科技创新驱动发展战略、推进药学科技创新、推进健康产业发展等重大问题进行深入交流和研讨,努力促进药理学学科交叉融合,积极推动我国医药产业转型发展。大会将邀请国家医药卫生领域政府部门领导、两院院士围绕会议主题及前沿、热点问题作大会报告,同时进行 10 个专业会场及卫星会场专题报告;举办安全合理用药科普公益活动;同期召开 2015 年全国医药经济信息网工作会议、中国药学会 23 届理事会会议等。

### 1 征文范围和要求

- ①征文范围: 欢迎广大会员、药学及相关工作者积极投稿,征文范围包括药学领域学科即生化与生物技术药物、中药和天然药物、药物化学、海洋药物、制药工程、药剂、抗生素、药物分析、医院药学、老年药学、药事管理、军事药学、药物流行病学、应用药理、药物经济学、药学史、药物临床评价研究、药物安全评价研究、医药知识产权研究、生物药品与质量研究、中药资源、抗肿瘤药物、纳米药物、药物检测质量管理、毒性病理等相关内容。②征文要求: 请参会代表提交尚未在期刊发表的科研论文、专题报告或综述,每篇论文只能投一个分会场;每篇字数控制在 4 000 字以内,采用 Word 文档编辑,论文格式请参照中国药学会杂志等中国药学会主办期刊论文格式。作者及单位确保论文内容的真实性和客观性,文责自负。③论文提交方式: 请登录会议网站( <http://cpacn.cbpt.cnki.net> )注册报名信息后按照稿件所属专业上传提交论文全文或摘要,全部论文经专家评审后,符合要求的论文将收录在论文集光盘中。如果在会议网站提交论文确有困难的代表,也可以将论文以 word 文稿,发送至 [yx-hxs@vip.163.com](mailto:yx-hxs@vip.163.com)。请只选择其中一种方式提交论文即可,否则会编辑工作带来困扰。④注意事项: 为扩大会议学术成果影响,会将论文集光盘向有关我国论文收藏机构和检索机构( CNKI 等)推荐,未向大会作特殊声明者,视为同意授权推荐。⑤征文截止日期: 2015 年 9 月 30 日。

### 2 论文评奖

由我会专家组成论文评审委员会,遴选出 200 篇论文在各分会场报告交流。根据现场论文报告交流情况,各专业会场分别评出一等奖 1 名、二等奖 2 名、三等奖 3 名,奖励金额(含税)分别为 3000 元、2000 元、1000 元,并颁发获奖证书。获奖论文推荐在《中国药学会杂志》、《药学报》、《中国中药杂志》、《中国临床药理学杂志》、《中国新药杂志》、《中国医院药学杂志》等期刊发表。

### 3 报名方式

请登陆会议网站( <http://cpacn.cbpt.cnki.net> )和中国药学会网站( <http://www.cpa.org.cn> )查询大会情况。

### 4 联系方式

地址: 北京建外大街四号建外 SOHO 九号楼 1802 室,邮编: 100022,联系人: 孙文虹、朱凤昌,电话: ( 010) 58699280-819/820,传真: ( 010) 5869481, E-mail: [yxhxs@vip.163.com](mailto:yxhxs@vip.163.com)

doi: 10. 11669/cpj. 2015. 18. 008

[本刊讯]