

◆方药研究◆

健脾解毒方对胃癌细胞凋亡及基因调控机制的研究

魏征, 李亚峰, 梁瑞峰, 张俊萍

河南省中医药研究院, 河南 郑州 450004

[摘要] 目的: 研究健脾解毒方对胃癌细胞凋亡及基因调控机制。方法: 96 孔板接种对数生长期 SGC-7901 细胞, 接种浓度是 5×10^4 个/mL, 以 10、20、40 $\mu\text{g/mL}$ 健脾解毒方分别作用于胃癌 SGC-7901 细胞 24 h。倒置显微镜下察细胞形态; MTT 法检测细胞活力; Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率; JC-1 染色检测线粒体膜电位; 运用 Real-time PCR 检测 B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白 (Bax)、细胞色素 C (Cytochrome c)、自杀相关因子 (Fas)、半胱氨酸蛋白酶-8 (Caspase-8) 基因表达; Western-blot 检测 Bax、Cytochrome c、Fas、Caspase-8 蛋白表达。结果: 与对照组比较, 20、40 $\mu\text{g/mL}$ 健脾解毒方组细胞抑制率较高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 并且呈剂量依赖性。与对照组比较, 10 $\mu\text{g/mL}$ 的健脾解毒方处理 24 h 后, SGC-7901 细胞形态学未有明显改变; 20 $\mu\text{g/mL}$ 的健脾解毒方处理 24 h 后, SGC-7901 细胞形态学发生改变, 细胞变圆; 40 $\mu\text{g/mL}$ 处理后的细胞皱缩, 数目明显的减少。10、20、40 $\mu\text{g/mL}$ 健脾解毒方处理 SGC-7901 细胞后, 分别有 5.98%、14.94% 和 31.88% 细胞出现凋亡。与对照组比较, 10、20、40 $\mu\text{g/mL}$ 健脾解毒方组细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$), 并呈浓度依赖性。随着健脾解毒方浓度的增加, SGC-7901 细胞的线粒体膜电位呈浓度依赖性下降 ($P < 0.05$)。与对照组比较, 10、20、40 $\mu\text{g/mL}$ 健脾解毒方组处理 SGC-7901 细胞 24 h 后, SGC-7901 细胞中的 Bax、Cytochrome c、Fas、Caspase-8 的基因表达明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 并呈剂量依赖性。20、40 $\mu\text{g/mL}$ 健脾解毒方处理 SGC-7901 细胞 24 h 后, 随着药物浓度的增加, Bax、Cytochrome c、Fas、Caspase-8 蛋白表达含量也增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且呈浓度依赖性。结论: 健脾解毒方能够剂量依赖性的诱导细胞发生凋亡可能与影响细胞线粒体膜电位和 Bax、Cytochrome c、Fas、Caspase-8 蛋白的表达相关。

[关键词] 健脾解毒方; 胃癌细胞; 抗肿瘤; 细胞凋亡; 基因调控; 细胞实验

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2018) 11-0001-05

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.11.001

Study on the Mechanism of Jianpi Jiedu Prescription Inducing Apoptosis and Gene Regulation of Gastric Cancer Cells

WEI Zheng, LI Yafeng, LIANG Ruifeng, ZHANG Junping

Abstract: **Objective:** To study the mechanism of Jianpi Jiedu prescription for cell apoptosis of gastric cancer cells and gene regulation. **Methods:** Inoculated a 96-well plate with SGC-7901 cells in logarithmic growth phase at a concentration of 5×10^4 cells/mL. The gastric cancer SGC-7901 cells were respectively treated with 10, 20, 40 $\mu\text{g/mL}$ of Jianpi Jiedu prescription for 24 h. Observed the cell morphology under the inverted microscope; detected cell viability by MTT method; detected cell apoptosis rate by Annexin V-FITC/PI double staining; detected mitochondrial membrane potential by JC-1 staining; detected gene expression of B lymphocyte tumor-2 associated X protein (Bax), cytochrome C (Cytochrome c), Factor associated suicide (Fas) and caspase-8 (Caspase-8) by Real-time PCR; detected protein expression of Bax, Cytochrome c, Fas and Caspase-8 by Western-blot. **Results:** Compared with the control group, the inhibitory rates of cells treated with 20 and 40 $\mu\text{g/mL}$ of Jianpi Jiedu prescription were higher and showed a dose-dependent manner, differences being significant ($P < 0.05$). Compared with the control group, the cytomorphology of SGC-7901 cells did not change significantly after being treated by 10 $\mu\text{g/mL}$ of Jianpi Jiedu prescription for 24 h; the cytomorphology of SGC-7901 cells

[收稿日期] 2017-11-23

[基金项目] 国家临床重点专科建设项目 (ZJ1601ZL041); 河南省科技攻关项目 (182102311164)

[作者简介] 魏征 (1983-), 男, 副主任医师, 研究方向: 中西医防治恶性肿瘤。

[通信作者] 张俊萍, E-mail: zhangjunping888@163.com。

changed and turned round after being treated by 20 $\mu\text{g/mL}$ of Jianpi Jiedu prescription for 24 h; cells treated with 40 $\mu\text{g/mL}$ of Jianpi Jiedu prescription shrunk and the number was significantly reduced 5.98%, 14.94% and 31.88% of the cells respectively showed apoptosis after SGC-7901 cells were treated by 10, 20, 40 $\mu\text{g/mL}$ of Jianpi Jiedu prescription. Compared with the control group, the apoptosis rates of cells in the groups of 10, 20 and 40 $\mu\text{g/mL}$ of Jianpi Jiedu prescription were significantly increased ($P < 0.05$), and they were concentration-dependent. With the increase of the concentration of Jianpi Jiedu prescription, the mitochondrial membrane potential of SGC-7901 cells were decreased in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$). Compared with the control group, the gene expressions of Bax, Cytochrome c, Fas and Caspase-8 in SGC-7901 cells were significantly increased after the cells were treated by 10, 20, 40 $\mu\text{g/mL}$ of Jianpi Jiedu prescription for 24 h ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and they showed a dose dependent manner. After the cells were treated by 20 and 40 $\mu\text{g/mL}$ of Jianpi Jiedu prescription for 24 h, the content of expressions of Bax, Cytochrome c, Fas and Caspase-8 proteins was increased with the increase of drug concentration ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and showed a concentration-dependent manner. **Conclusion:** The mechanism of Jianpi Jiedu prescription inducing cell apoptosis in a dose-dependent manner may be related to its influence on mitochondrial membrane potential and the expressions of Bax, Cytochrome c, Fas and Caspase-8 proteins.

Keywords: Jianpi Jiedu prescription; Gastric cancer cell; Antitumor; Cell apoptosis; Gene regulation; Cell experiment

流行病学调查研究表明我国胃癌患者发病及死亡人数已占全球胃癌病患总人数的 50%，其发病率和死亡率分别位于我国恶性肿瘤疾病的第二位和第三位^[1]，我国每年新发病例约 40 万例，占世界总发病例数的 42%。据报道，至 2015 年胃癌成为中国癌症发病率和死亡率首位的恶性肿瘤^[2]。因此，探讨胃癌凋亡机理，寻找治疗胃癌有效途径是目前胃癌研究的一项重要课题。中药治疗肿瘤有疗效确切、副作用少等无可比拟的优势^[3]。中医治疗胃癌也由单纯临床报道进入了较为系统的临床与实验相结合的前瞻性研究，并且开始从分子机制揭示中药治疗胃癌的机制。随着分子生物学的进展，国内外在肿瘤凋亡研究上取得了较大进展，凋亡受抑制是肿瘤发生发展中重要的病理现象，与肿瘤的治疗密切相关^[4-5]。因此，诱导肿瘤细胞凋亡是设计治疗方案的重要思路。然而健脾解毒中药能否参与凋亡相关线粒体通路与死亡受体通路这一科学问题仍未解决，因此这也是本课题将要探索的方向。

1 材料与方法

1.1 细胞株 人胃癌细胞株 SGC-7901 购于中科院上海细胞库。

1.2 试剂和仪器 健脾解毒方，药物组成：党参 15 g，白术、半枝莲、八月札各 10 g，当归 8 g，薏苡仁 12 g，甘草 5 g，生黄芪 36 g。由河南省中医药研究院自制为片剂，用研钵捣成粉末，用 DMSO 配置浓度为 100 mg/mL 的母液备用。Thermo CO₂ 培养箱；荧光定量 PCR 仪 Roto-gene 6000(Corbett Research)，PCR 扩增仪 2720 Thermal Cycler(Appplied Biosystem)；3-(4, 5- 二甲基噻唑 -2)-2, 5- 二苯基四氮唑溴盐(MTT, 美国 Sigma 公司)；DMEM 培养基(杭州四季青公司)；B 淋巴瘤细胞瘤 -2 相关 X 蛋白(Bax)、细胞色素 C(Cytochrome c)、自杀相关因子(Factor associated suicide, Fas)、半胱氨酸蛋白酶 -8 (Caspase-8)兔抗鼠抗体(SantaCruz 公司)；总 RNA 提取试剂

Trizol(Invitrogen 公司)；逆转录试剂盒(日本 Takara 公司)；Bax、Cytochrome c、Fas、Caspase-8 引物(上海生工生物工程有限公司)；化学发光试剂盒、化学发光成像仪(Tanon 公司)。

1.3 MTT 法检测细胞活性 96 孔板接种对数生长期 SGC-7901 细胞，接种浓度是 5×10^4 个 /mL，以 10、20、40 $\mu\text{g/mL}$ 健脾解毒方分别作用于胃癌 SGC-7901 细胞 24 h，加入 MTT (1 mg/mL)，37℃，4 h，加入 100 μL DMSO，酶标仪于 570 nm 处测吸光度。相对抑制率(%)=(1- 给药组吸光值 / 对照组吸光值) $\times 100\%$ 。

1.4 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率 6 孔板培养 SGC-7901 细胞，24 h 后加入健脾解毒方(浓度分别为 10、20、40 $\mu\text{g/mL}$)，加药 24 h 后，收集细胞，Annexin V/PI 染色，室温下 30 min，流式细胞仪检测。

1.5 JC-1 染色检测线粒体膜电位 酶标仪检测方法：将对数生长期的 SGC-7901 细胞，用 0.25% 的胰蛋白酶消化、计数，按每孔 5×10^4 个 /mL 的细胞密度接种于 96 孔培养板中，每孔 100 μL ，培养 24 h 后，以 10、20、40 $\mu\text{g/mL}$ 的健脾解毒方处理 SGC-7901 细胞 24 h，用 PBS 清洗细胞 2 次，5 $\mu\text{g/mL}$ JC-1 染料 37℃ 孵育细胞 30 min。然后用 PBS 清洗细胞 2 次，用荧光酶标仪定量分析。JC-1 染料的激发光波长为 488 nm，发射光波长为 535 nm 和 595 nm。

1.6 qRT-PCR 检测 SGC-7901 中的 Bax、Cytochrome c、Fas、Caspase-8 mRNA 的表达 用 6 孔板培养 SGC-7901 细胞，24 h 后加入健脾解毒方(浓度分别为 10、20、40 $\mu\text{g/mL}$)，加药 24 h 后，吸掉培养基，PBS 洗 3 次，加入 500 μL /孔的 Trizol，摇晃均匀，静置 5 min 后反复吹打，收集细胞后转移至 1.5 mL 离心管中加入 Trizol 反复抽吸均匀，离心管中加入 Trizol 总体积的 1/5 量的氯仿，振荡混匀 30 s，室温下静置 5 min，4℃ 条件下 $12\ 000 \times g$ 离心 15 min，分相为三层，上层

清液为 RNA(约为 Trizol 的 60%)。小心吸取上清液, 转移到另一个 1.5 mL 离心管中, 有机相和中间层含有 DNA 和蛋白质, 避免触及, 上清液加入与上清液等体积的异丙醇, 上下颠倒混匀 30 s。4℃ 静置 30 min, 4℃ 条件下 14 000 × g 离心 15 min, RNA 沉淀将在离心管底部形成。小心弃去上清液, 离心管加入 1 mL 预冷的 75%乙醇-25%DEPC-H₂O 振荡混匀 30 s, 使沉淀振荡起来, 4℃ 条件下 16 000 × g 离心 15 min。小心弃去上清液, 防止 RNA 沉淀丢失, 倒置离心管于滤纸上, 干燥 RNA, 但不能完全干燥(10~20 min)。用 DEPC 水 10 μL 溶解沉淀, 反复吹打使其溶解。(注: RNA 干燥后呈无色透明片状, 用水溶解后注意仔细淋洗离心管底部), 测量 OD 值后, 样品放置 -70℃ 保存, 保质期一个月用逆转录酶逆转录得到 cDNA。PCR 引物委托上海生工生物工程技术有限公司合成(见表 1)。PCR 扩增反应条件为: Bax、Cytochrome c、Fas、Caspase 8 95℃, 预变性 5 min; 95℃, 变性 10 s; 60℃, 退火 30 s, 72℃, 延伸 30 s, 重复 40 个循环。数据处理采用 2^{-ΔΔCt} 法, 分析目的基因 mRNA 的相对表达量。

表 1 检测引物序列

引物名称	引物序列	长度(bp)
β-actin	F: 5'-CTCTGGGGATGGGGTC-3'	294
	R: 5'-TTGCCGATGGTGATGA-3'	
Bax	F: 5'-GATTTCATTACGAGCGGGTGCGGC-3'	238
	R: 5'-CGCCGCACCCGCTCGTAAATGAAAT-3'	
Cytochrome c	F: 5'-TGATGTTGAGAAGGGAAA-3'	336
	R: 5'-GCAGTGTTGTGGGTAAGTTGATGG-3'	
Fas	F: 5'-CAGATGTTGACTTGGGTA-3'	228
	R: 5'-CTTTTGGGAGATTTTAG-3'	
Caspase-8	F: 5'-TCCCAGGAAAAAGGCA-3'	358
	R: 5'-ATCCAGCAGCAGACGG-3'	

1.7 Western-blot 检测 Bax、Cytochrome c、Fas、Caspase-8 蛋白表达 6 孔板培养 SGC-7901 细胞, 用健脾解毒方(浓度分别为 10、20、40 μg/mL)处理 SGC-7901 细胞 24 h, 收集细胞, 离心 5 min, PBS 洗 3 次, 每毫升加入 100 μL 的细胞裂解液, 置冰上裂解 20 min, 12 000 × g 离心 6 min, 取上清液, 取等量总蛋白上样进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后, 将分离的蛋白转移到 PVNF 膜上, 封闭液封闭 1 h 后, 加入 1 抗于室温 2 h 后, 用 TBST 洗涤 3 次, 加入 2 抗温育 1 h, 最后用化学发光试剂盒显色, 发光成像仪记录结果。

1.8 统计学方法 数据分析采用 Graphpad Prism 6.0 数据统计软件, 单因素方差分析(one-way ANOVA), 计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度健脾解毒方对胃癌 SGC-7901 细胞的抑制作用 见表 2, 图 1。与对照组比较, 20、40 μg/mL 健脾解毒方细胞

抑制率较高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 并且呈剂量依赖性。倒置相差显微镜观察细胞的生长情况, 与对照组比较, 10 μg/mL 的健脾解毒方处理 24 h 后, SGC-7901 细胞形态学未有明显改变; 20 μg/mL 的健脾解毒方处理 24 h 后, SGC-7901 细胞形态学发生改变, 细胞变圆; 40 μg/mL 的健脾解毒方处理后的细胞皱缩, 数目明显减少。

表 2 不同浓度健脾解毒方对胃癌 SGC-7901 细胞的抑制作用($\bar{x} \pm s$)

组别	n	抑制率(%)
对照组	3	—
健脾解毒方(10 μg/mL)	3	20.92 ± 1.42
健脾解毒方(20 μg/mL)	3	51.65 ± 0.52 ^①
健脾解毒方(40 μg/mL)	3	67.75 ± 1.02 ^①

与对照组比较, ① $P < 0.05$

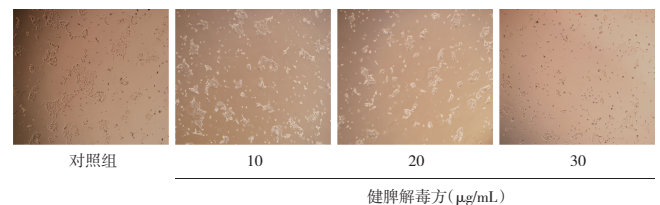


图 1 不同浓度健脾解毒方对 SGC-7901 细胞 24 h 形态的改变(×100)

2.2 不同浓度健脾解毒方对 SGC-7901 细胞凋亡的影响 见表 3, 图 2。10、20、40 μg/mL 健脾解毒方处理 SGC-7901 细胞后, 分别有 5.98%、14.94% 和 31.88% 细胞出现凋亡。与对照组比较, 10、20、40 μg/mL 健脾解毒方组细胞凋亡率显著升高($P < 0.05$), 并呈浓度依赖性, 表明健脾解毒方能够诱导 SGC-7901 细胞发生凋亡。

表 3 不同浓度健脾解毒方对 SGC-7901 细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞凋亡率(%)
对照组	3	2.52 ± 0.62
健脾解毒方(10 μg/mL)	3	5.98 ± 1.09 ^①
健脾解毒方(20 μg/mL)	3	14.94 ± 0.62 ^①
健脾解毒方(40 μg/mL)	3	31.88 ± 0.31 ^①

与对照组比较, ① $P < 0.05$

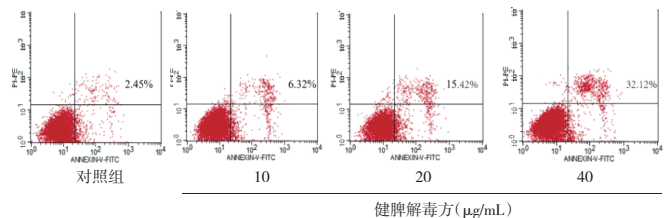


图 2 细胞凋亡率流式细胞仪检测结果

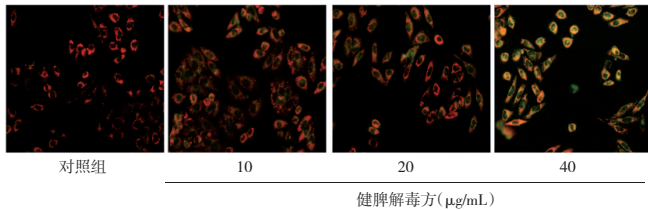
2.3 不同浓度健脾解毒方作用 24 h 后对线粒体膜电位的影响

见表 4, 图 3。随着健脾解毒方浓度的增加, SGC-7901 细胞的线粒体膜电位呈浓度依赖性下降($P < 0.05$)。荧光酶标仪测定结果显示, 不同浓度健脾解毒方给药处理 24 h 后能够降低细胞线粒体红绿荧光比值。与对照组比较, 不同浓度健脾解毒方处理 SGC-7901 细胞 24 h 后, 细胞中 JC-1 单体形式逐渐增多, 说明了线粒体膜电位下降, 在 40 $\mu\text{g/mL}$ 健脾解毒方处理时线粒体膜电位下降最明显。

表 4 不同浓度健脾解毒方作用 24 h 后

对线粒体膜电位的影响($\bar{x} \pm s$)			%
组别	n	JC-1 单体(red/green)	
对照组	3	100	
健脾解毒方(10 $\mu\text{g/mL}$)	3	97.72 \pm 0.59	
健脾解毒方(20 $\mu\text{g/mL}$)	3	79.64 \pm 0.55 ^①	
健脾解毒方(40 $\mu\text{g/mL}$)	3	45.12 \pm 1.01 ^①	

与对照组比较, ① $P < 0.05$

图 3 不同浓度健脾解毒方作用 24 h 后对线粒体膜电位的影响 ($\times 400$)

2.4 不同浓度健脾解毒方对 SGC-7901 中 Bax、Cytochrome c、Fas、Caspase-8 mRNA 表达的影响 见表 5。与对照组比较, 10、20、40 $\mu\text{g/mL}$ 健脾解毒方处理 SGC-7901 细胞 24 h 后, SGC-7901 细胞中的 Bax、Cytochrome c、Fas、Caspase-8 的基因表达明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), 并呈剂量依赖性。

表 5 不同浓度健脾解毒方对 SGC-7901 中 Bax、Cytochrome c、Fas、Caspase-8 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Bax	Cytochrome c	Fas	Caspase-8
对照组	3	1	1	1	1
健脾解毒方(10 $\mu\text{g/mL}$)	3	1.47 \pm 0.13 ^①	1.23 \pm 0.62 ^①	1.18 \pm 0.37 ^①	1.07 \pm 0.26 ^①
健脾解毒方(20 $\mu\text{g/mL}$)	3	1.66 \pm 0.32 ^①	2.37 \pm 0.57 ^①	1.92 \pm 0.58 ^①	2.36 \pm 0.51 ^①
健脾解毒方(40 $\mu\text{g/mL}$)	3	3.25 \pm 0.48 ^②	3.16 \pm 0.39 ^②	2.78 \pm 0.33 ^②	3.38 \pm 0.19 ^②

与对照组比较, ① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$

2.5 不同浓度健脾解毒方对 SGC-7901 中 Bax、Cytochrome c、Fas、Caspase-8 蛋白表达的影响 见表 6, 图 4。20、40 $\mu\text{g/mL}$ 健脾解毒方处理 SGC-7901 细胞 24 h 后, 随着药物浓度的增加, Bax、Cytochrome c、Fas、Caspase-8 蛋白表达含量也增加($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且呈浓度依赖性。说明该药物通过增加 Bax、Cytochrome c、Fas、Caspase-8 的蛋白表达, 来诱导细胞凋亡。

表 6 不同浓度健脾解毒方对 SGC-7901 中 Bax、Cytochrome c、Fas、Caspase-8 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Bax	Cytochrome c	Fas	Caspase-8
对照组	3	1	1	1	1
健脾解毒方(10 $\mu\text{g/mL}$)	3	1.18 \pm 0.21 ^①	1.34 \pm 0.76 ^①	1.38 \pm 0.41 ^①	1.07 \pm 0.26
健脾解毒方(20 $\mu\text{g/mL}$)	3	1.69 \pm 0.42 ^①	2.73 \pm 0.66 ^①	2.62 \pm 0.49 ^①	1.37 \pm 0.42 ^①
健脾解毒方(40 $\mu\text{g/mL}$)	3	2.41 \pm 0.55 ^②	4.57 \pm 0.53 ^②	3.82 \pm 0.58 ^②	1.63 \pm 0.26 ^①

与对照组比较, ① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$

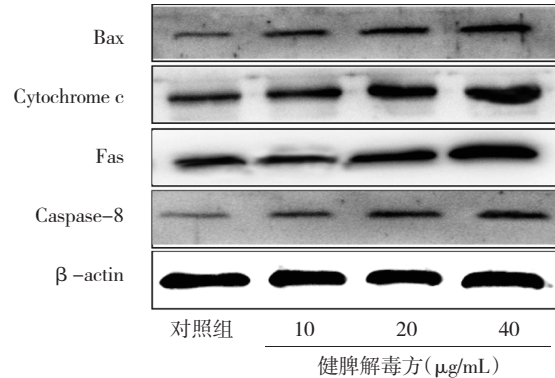


图 4 不同浓度健脾解毒方对 SGC-7901 细胞中蛋白表达的影响

3 讨论

目前对于胃癌不适于手术或放化疗治疗的患者, 采用保守治疗, 无论中药还是西药, 其作用机制的研究都已经取得了很大的进展, 总结起来主要有以下几个方面: 直接抑制肿瘤细胞的生长^[6]; 调节机体的免疫功能^[7]; 诱导肿瘤细胞凋亡和分化^[8]; 调控胃癌基因的表达^[9]; 活化肿瘤细胞信号通路^[10]。其中关于细胞凋亡与线粒体通路、死亡受体信号通路的研究是目前的研究热点, 众多治疗胃癌的有效中药的作用机制也与以上两方面有密切关系^[11-13]。由此可见, 线粒体通路、死亡受体信号通路参与细胞凋亡, 在胃癌的治疗上有举足轻重的地位。

细胞凋亡又称细胞程序性死亡, 是由机体内外环境变化或死亡信号触发, 在基因调控下引起细胞主动死亡的过程, 既是生物体维持自身稳定和平衡的一个重要机制, 也是消除异常增殖细胞的理想途径, 该途径紊乱将导致细胞发育异常和加速肿瘤的发生和恶化^[14]。目前认为细胞凋亡信号通路包括 2 条: (1) 线粒体信号通路: 许多凋亡信号通过进入线粒体, 诱导线粒体内的 Cytochrome c 等小分子释放到胞浆, 活化 Caspase-9, 活化的 Caspase-9 切割 pro-caspase-3 生成 Caspase-3, 从而诱导凋亡^[15]; (2) 死亡受体信号通路: 一些凋亡刺激因素激活细胞膜外死亡受体, 死亡受体进一步活化膜上 Fas 相关的死亡结构域, 结合并活化半活化 Caspase-8, 活化的 Caspase-8 进一步切割 pro-caspase-3 生成 Caspase-3, 从而诱导凋亡^[16]。在细胞凋亡通路中, 线粒体扮演着重要角色, 表现在: (1) 释放 Caspases 激活因子如 Cytochrome c^[17]; (2) 丧失电子传递链功能, ATP 生成减少, 细胞能量不平衡^[18]; (3) 线粒体膜电位消失, 诱

导细胞凋亡的产生^[19]；(4)承载 Bcl-2 家族蛋白调节细胞凋亡^[17]。其中线粒体释放 Cytochrome-c，是 Caspases 自身正反馈激活链中关键步骤。Fas 是该死亡区域的重要受体之一，FasL 是同源三聚体分子，活化后通过“死亡结构域”与接头分子 Fas 相关死亡域蛋白(Fas-associated death domain, FADD)结合而引起 FADD 构象变化，进而募集 Caspase-8、Caspase-10 形成复合物 DISC (death-inducing signaling complex) 引起 Caspase-8、Caspase-10 自身剪切激活，启动下游 Caspase 的级联反应，激活 Caspase-6、Caspase-3、Caspase-7 引发了细胞凋亡^[20]。本研究实验研究发现健脾解毒方能够通过增加 Bax、Cytochrome c、Fas、Caspase-8 的表达来诱导细胞凋亡。

实验研究结果显示：健脾解毒方在 40 $\mu\text{g/mL}$ 浓度能够有效的降低 SGC-7901 细胞线粒体膜电位，影响线粒体正常功能，并通过增加 Cytochrome c 的释放、刺激 Fas 蛋白的表达、激活 Caspase-8 的表达，促进促凋亡蛋白 Bax 的表达来诱导细胞发生凋亡，显示健脾解毒方可能通过线粒体介导细胞凋亡途径来发挥抗肿瘤的作用。

[参考文献]

- [1] 徐飏, 王建明. 胃癌流行病学研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2006, 13(1): 81-87.
- [2] 邹文斌, 李兆申. 中国胃癌发病率及死亡率研究进展[J]. 中国实用内科杂志, 2014, 34(4): 408-415.
- [3] 周微红. 胃癌患者中医体质与临床证型的调查研究[D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2013.
- [4] 张宁. 姜黄素联合维生素 C 对人胃癌 SGC-7901 细胞增殖和凋亡的影响[D]. 延安: 延安大学, 2014.
- [5] 林小雷. RNA 干扰沉默 G9a 基因对胃癌 MGC803 细胞增殖、凋亡及组蛋白 H3K9 甲基化的影响[D]. 福州: 福建医科大学, 2014.
- [6] 郭沛. 软坚散结胶囊调控 VEGF-ERK 信号通路影响胃癌 SGC79001 细胞增殖与凋亡的实验研究[D]. 太原: 山西省中医药研究院, 2015.
- [7] 许国彩, 赞梅. 参芪扶正注射液联合恩度治疗中晚期胃癌疗效及对患者免疫功能和生活质量的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2015, 23(7): 1130-1135.
- [8] 黄军祥. 环孢素 A 诱导胃癌 MGC80-3 细胞凋亡及其相关分子机制研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2013.
- [9] 林国彬. CTLA-4 基因多态性与胃癌易感性的 Meta 分析[D]. 福州: 福建医科大学, 2014.
- [10] 林贤东, 胡丹, 陈刚, 等. PI3K-AKT-mTOR 信号通路基因多态性与胃癌遗传易感相关性[J]. 临床与实验病理学杂志, 2016, 32(4): 361-365, 369.
- [11] 王艳, 赵上, 苏衍萍, 等. 亚硒酸钠通过线粒体途径诱导人胃癌 SGC-7901 细胞凋亡的机制[J]. 解剖学报, 2016, 47(3): 353-358.
- [12] 张伟. 线粒体突变及不稳定在胃癌中的研究[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2013, 22(9): 858-860.
- [13] 陈凤琴, 王宏伟, 李海龙, 等. 黄芩苷通过死亡受体通路诱导胃癌 MGC-803 和 BGC-823 细胞凋亡[J]. 肿瘤, 2015, 35(12): 1314-1321.
- [14] 李娜, 高俊岩, 刘敏. 细胞凋亡和肿瘤的关系研究进展[J]. 当代医学, 2009, 15(16): 13-14.
- [15] 马赛君. 线粒体凋亡途径参与褪黑素诱导胃癌细胞凋亡[D]. 福州: 福建医科大学, 2015.
- [16] 施鹏飞, 王冠林, 张宽仁. 死亡受体信号通路耐受机制及肿瘤治疗[J]. 生命的化学, 2015, 35(5): 615-621.
- [17] 夏士亮. 铝致大鼠淋巴细胞凋亡的线粒体/Caspase 依赖性途径机制[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013.
- [18] 崔铁忠, 卢康荣, 李银霞, 等. 线粒体电子传递链复合物 III 和线粒体疾病[J]. 科技视界, 2016(11): 38-40.
- [19] 胡海霞, 郑良朴, 陈文列, 等. 解毒消癥饮对 BGC-823 胃腺癌细胞线粒体膜电位与细胞凋亡的影响[J]. 中国肿瘤, 2010, 19(5): 338-342.
- [20] 孙浩, 杨加培, 毛勇, 等. Fas 途径参与大黄酸诱导 HK-2 细胞凋亡[J]. 中国药科大学学报, 2015, 46(4): 469-475.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)