

半夏泻心汤不同有效部位对人胃癌耐药 AGS/DDP 细胞化疗敏感性的增敏作用

施丽娟^{1,2}, 张艳美^{1,2}, 朱中博^{1,2}, 杨玉洁^{1,2}, 刘喜平^{1*}

(1. 甘肃中医药大学甘肃省中药新产品创制工程实验室, 甘肃 兰州 730000; 2. 甘肃中医药大学甘肃省中医方药挖掘与创新转化重点实验室, 甘肃 兰州 730000)

摘要: **目的** 筛选半夏泻心汤增敏人胃癌耐药 AGS/DDP 细胞化疗敏感性的最佳有效部位并探究其化学成分和作用机制。**方法** 采用加热回流方法提取半夏泻心汤水提液, 并利用有机溶剂萃取法将半夏泻心汤水提液分离为醇沉、石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇和水部位。CCK8 法检测半夏泻心汤及不同极性部位对 AGS/DDP 细胞活力的影响; 采用超高效液相色谱串联质谱 (UPLC-MS/MS) 对半夏泻心汤最佳有效部位的化学成分进行定性和相对定量分析; 流式细胞术及 Western blot 法检测空白组 (AGS/DDP 细胞)、最佳有效部位 (部位Ⅳ) 组、DDP 组及联合组 (部位Ⅳ+DDP) 各组中 AGS/DDP 细胞凋亡率及耐药蛋白 MRP1 和 LRP1 表达; 使用 PI3K 抑制剂 LY294002 干预 AGS/DDP 细胞, Western blot 法检测 AGS 组、AGS/DDP 组、部位Ⅳ组、PI3K 抑制剂组中 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 的表达。**结果** CCK8 结果显示, 二氯甲烷部位 (部位Ⅳ) 为半夏泻心汤增敏人胃癌耐药 AGS/DDP 细胞化疗敏感性的最佳有效部位。UPLC-MS/MS 结果显示, 部位Ⅳ主要含有黄酮类、生物碱类、酚酸类、类固醇、甾体类物质。与空白组比较, DDP 组 AGS/DDP 细胞凋亡率升高 ($P<0.05$); 与 DDP 组比较, 联合组 AGS/DDP 细胞凋亡率升高 ($P<0.01$)。与 AGS/DDP 组比较, 部位Ⅳ组和 LY294002 组细胞 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白表达均降低 ($P<0.05$)。**结论** 二氯甲烷部位 (部位Ⅳ) 为半夏泻心汤增敏人胃癌耐药 AGS/DDP 细胞化疗敏感性的最佳有效部位, 该部位主要为黄酮类物质, 其作用机制可能与抑制 PI3K/Akt 信号通路有关。

关键词: 半夏泻心汤; UPLC-MS/MS; 二氯甲烷部位; 胃癌; 化疗耐药; PI3K/Akt 信号通路

中图分类号: R285.5; R917 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2025)08-2737-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.08.041

半夏泻心汤首载于张仲景的《伤寒论》, 由半夏、干姜、黄芩、黄连、人参、大枣和炙甘草共 7 味药组成, 寒热并用, 具有散结除痞, 清解癌毒之功效^[1]。现代研究表明, 半夏泻心汤具有抑菌、抗炎、抗肿瘤作用^[2]。临床研究发现, 半夏泻心汤常用于恶性肿瘤的辅助治疗, 能够提高对化疗药物的敏感性, 降低不良反应, 改善患者生存质量^[3]。课题组前期研究发现, 半夏泻心汤可通过诱导胃癌细胞凋亡, 抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭, 保护腹膜间皮细胞, 阻抑胃癌细胞腹膜转移, 调节胃癌微环境, 抑制骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 的恶性转化等多种途径发挥防治胃癌的作用^[4]。

在接受传统化疗或新靶向药物治疗的胃癌患者中, 超过 90% 的死亡是由多药耐药性 (multidrug resistance, MDR) 造成的^[5-6]。探讨胃癌 MDR 的机制并寻找有效的逆转策略是当前胃癌研究中的热点和难点。半夏泻心汤具有明确的

临床胃癌化疗协同增效作用^[7-9]。半夏泻心汤含有多种化学成分, 主要包括黄酮类、生物碱类和皂苷类, 还有少量脂肪酸类、酚酸类、醇类、内酯等其他成分^[10-12]。课题组前期研究表明, 黄芩苷、人参皂苷 Rb、小檗碱、甘草酸为半夏泻心汤含药血清和含药肠吸收液的质量标志物^[13]。最新研究发现, 半夏泻心汤在提高胃癌化疗敏感性上发挥了重要作用^[14]。然而, 关于半夏泻心汤提高化疗敏感性的有效成分尚不明确。因此, 本研究从物质基础和耐药机制两个层面探讨半夏泻心汤增敏胃癌化疗耐药的机制。

1 材料

1.1 细胞 人源胃腺癌细胞系 AGS 细胞和人源 AGS/DDP 细胞购自誉弛 (上海) 生物科技有限公司, 细胞经 STR 鉴定, 符合要求, 来源背景清晰, 未受 Hela 细胞污染。

1.2 药物与试剂 半夏泻心汤由法半夏 12 g、黄芩 9 g、干姜 9 g、人参 9 g、黄连 3 g、大枣 9 g、炙甘草 9 g 组成,

收稿日期: 2024-08-30
基金项目: 国家自然科学基金项目 (82260895); 甘肃省青年科技基金 (23JRRA1729); 甘肃省中药新产品创制省级工程实验室开放基金 (ZYXCP-24-06)
作者简介: 施丽娟 (1991—), 女, 博士生, 从事方剂的临床应用及作用机制研究。Tel: 13919779110, E-mail: 458225757@qq.com
* 通信作者: 刘喜平 (1973—), 男, 博士, 教授, 从事方剂的临床应用及作用机制研究。Tel: 15095376681, E-mail: lxp-257@163.com

中药饮片购于甘肃中医药大学附属医院中药房，经甘肃中医药大学药学院中药药剂学教研室景明教授鉴定符合 2020 年版《中国药典》规定。顺铂（DDP，齐鲁制药有限公司，国药准字 H20023460，批号 2M0426B03）；PI3K 抑制剂 LY294002（美国 MCE 公司，批号 HY-10108）；乙醇、石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇 [天津市大茂化学试剂合伙企业（有限合伙），批号 20220607、20221005、20220607、20221005、20220301]；甲醇、乙腈（德国 Merck 公司，批号 822283、113212）；甲酸（上海阿拉丁生化科技股份有限公司，批号 822254）；1640 基础培养基、胰酶消化液（上海源培生物科技股份有限公司，批号 L210KJ、H120901）；胎牛血清（FBS，上海佰晔生物科技公司，批号 AB-FBS0500S）；CCK-8 试剂盒 [翌圣生物科技（上海）股份有限公司，批号 40203ES60]； β -actin、p-PI3K、Akt、p-Akt 抗体（武汉三鹰生物技术有限公司，批号 00104925、GTX132597、10176-2-AP、66444-1-Ig）；山羊抗兔免疫球蛋白（Ig）G、山羊抗鼠 IgG（成都正能生物技术有限公司，批号 KK2315、KK0315）。

1.3 仪器 ExionLC™ AD 超高效液相色谱仪、QTRAP 6500+液质联用仪（美国 SCIEX 公司）；SCIENITZ-100F/A 普通型硅油加热冷冻干燥机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；冷冻研磨仪（德国 Retsch 公司）；CRY-180 型 CO₂ 培养箱（天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司）；SpectraMax i3x 型全波长酶标仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；R21G 型高速冷冻离心机（日本日立公司）；DYCZ-24DH 型电泳仪、DYY-7C 型电转仪（北京六一生物科技有限公司）；GeLView 6000Plus 型化学发光成像系统（广州博鹭腾生物科技有限公司）；FACSVerse 型流式细胞仪（美国 BD 公司）

2 方法

2.1 半夏泻心汤不同极性部位制备 将所有饮片混合浸泡 30 min，煎煮 2 次，第 1 次加 8 倍量水，加热回流提取 2 h，第 2 次加 6 倍量水，加热回流提取 1.5 h，合并 2 次滤液，过 150 μ m 筛，减压浓缩，烘干成粉末置于干燥器备用，得到部位 I（半夏泻心汤水提液）。半夏泻心汤干燥水提物加入 80% 乙醇复溶后，静置过夜，析出不溶于乙醇的沉淀物，利用真空泵抽滤后将沉淀物挥干，得到部位 II（醇沉部位）。醇溶性部位挥干乙醇后采用系统溶剂萃取法^[15]，依次加入石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇有机溶剂，溶剂与滤液按 1：1 比例进行萃取，分别得到部位 III（石油醚部位）、部位 IV（二氯甲烷部位）、部位 V（乙酸乙酯部位）、部位 VI（正丁醇部位）、部位 VII（残余水部位）。

2.2 给药溶液制备 称取 50 mg 部位 I，置于 2 mL EP 管中，加入 100 μ L DMSO 溶液，涡旋、振荡、超声，得到储备液（0.5 mg/ μ L），取 10 μ L 储备液加入到 10 mL RPMI 1640 培养基中，得到母液（500 μ g/mL），依次稀释质量浓度为 50、100、150、200、250、300、350、400 μ g/mL 的给药溶液。其他部位溶液的制备方法同上。

2.3 CCK8 法检测细胞增殖活性 取对数生长期的 AGS 细胞和 AGS/DDP 细胞，以 5×10^3 个/孔的密度接种到 96 孔板，细胞培养至贴壁后，加入不同极性部位给药溶液，每个浓度重复 3 个孔，于培养箱继续培养 24 h。干预结束后，弃掉含药培养基，加入 100 μ L CCK8 溶液，于培养箱孵育 1~4 h。通过酶标仪检测各孔的光密度（OD）值，并计算细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率 = $(1 - OD_{\text{实验组}} / OD_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 。为了检测最佳有效部位能否逆转 AGS/DDP 细胞耐药，计算逆转指数，公式为逆转指数 = 使用逆转剂之前 IC₅₀/使用逆转剂之后 IC₅₀。用不同质量浓度（2.25、4.5、9 μ g/mL）的最佳有效部位和不同质量浓度（1、2、4、8、16、32、64、128 μ g/mL）的 DDP 共同处理 AGS/DDP 细胞 24 h，计算细胞增殖抑制率。

2.4 UPLC-MS/MS 法检测半夏泻心汤最佳有效部位的活性成分 称取部位 IV 的干燥粉末 50 mg，加入于 -20 $^{\circ}$ C 预冷的 70% 甲醇内标提取液 1 200 μ L，涡旋频率为 30 min/次，4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心后吸取上清，0.22 μ m 微孔滤膜过滤，保存于进样瓶中，进行 UPLC-MS/MS 检测。

2.4.1 色谱条件 Agilent SB-C₁₈ 色谱柱（1.8 μ m，2.1 mm $\times$ 100 mm）；流动性 0.1% 甲酸（A）-乙腈（B），梯度洗脱（0 min，5% B；0~9 min，5%~95% B；10~11 min，95%~5% B；12~14 min，5% B）；体积流量 0.35 mL/min；柱温 40 $^{\circ}$ C；进样量 2 μ L。

2.4.2 质谱条件 电喷雾离子源（ESI）；正负离子扫描；喷雾电压 5.5 kV、-4.5 kV；离子源温度 550 $^{\circ}$ C；离子源气体 I、气体 II、气帘气分别设置为 50、60 和 25 psi，碰撞诱导电离参数设置为高。使用 MRM 模式扫描，并将碰撞气体设置为中等。通过进一步的优化，完成各个 MRM 离子对的去簇电压和碰撞能。根据每个时期内洗脱的代谢物，定期监测一组特定的 MRM 离子对。

2.5 流式细胞术检测细胞凋亡 取对数生长期的 AGS/DDP 细胞接种在 6 孔板中，待细胞贴壁且密度生长至 80%~90% 时进行实验。空白组加入完全培养基；中药组加入 9 μ g/mL 的部位 IV；DDP 组加入 6 μ g/mL 的 DDP；联合组加入 9 μ g/mL 的部位 IV 和 6 μ g/mL 的 DDP。培养 24 h 后收集细胞，PBS 冲洗 2 次，利用 Binding buffer 重悬细胞，将细胞密度调整至 $5\times 10^5 \sim 1\times 10^6$ /mL。取 100 μ L 细胞悬液于流式上样管中，加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 10 μ L 碘化丙啶（PI）溶液，室温避光孵育 15 min，再加入 400 μ L 稀释的 Binding buffer 溶液，流式细胞仪上机检测细胞凋亡率。

2.6 Western blot 法检测细胞耐药蛋白表达及 PI3K/Akt 通路蛋白表达 为检测耐药蛋白表达，细胞分组干预同“2.5”项。为了检测最佳有效部位 IV 是否通过 PI3K/Akt 通路发挥作用，加入 PI3K 抑制剂 LY294002 和 AGS 细胞作为对照，AGS 细胞（完全培养基）；AGS/DDP 细胞（完全培养基）；部位 IV 组（9 μ g/mL 的部位 IV，AGS/DDP 细胞）；LY294002 组（80 μ mol/L 的 LY294002，AGS/DDP 细胞），培养 24 h 后收集细胞，用含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解

液提取细胞蛋白，用 BCA 法测定各组蛋白浓度，将蛋白与上样缓冲液混合，100 ℃下煮沸 10 min 使蛋白质变性。取等量各组蛋白上样、电泳，转移到 PVDF 膜上，室温下用 10% 脱脂奶粉溶液封闭 1 h，PBST 洗涤 3 次，加一抗（MRP1、LRP1、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、β-actin，1：1 000），4 ℃下孵育过夜，次日 PBST 洗涤 3 次，加入二抗（1：5 000）室温孵育 1.5 h，洗膜后滴加 ECL 发光液，曝光，用图像分析软件分析条带灰度值。

2.7 统计学分析 通过 GraphPad Prism 8.0 软件进行处理，实验数据以 ($\bar{x}\pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析，两组间比较采用 *t* 检验。*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 半夏泻心汤不同极性部位 半夏泻心汤不同极性部位得率最高的为残余水部位（16.478%），得率最低为二氯甲烷部位（0.432%），具体信息见表 1。

表 1 半夏泻心汤不同极性部位的重量、得率、性状信息

部位	质量/mg	得率/%	性状
醇沉部位 (部位Ⅱ)	2 302.8	3.838	棕色干浸膏
石油醚部位 (部位Ⅲ)	614.4	1.024	黄色油滴状
二氯甲烷部位 (部位Ⅳ)	259.2	0.432	棕色干浸膏
乙酸乙酯部位 (部位Ⅴ)	312.0	0.520	棕色干浸膏
正丁醇部位 (部位Ⅵ)	2 017.2	3.512	棕色干浸膏
残余水部位 (部位Ⅶ)	9 886.8	16.478	黑色干浸膏

3.2 半夏泻心汤干预 AGS/DDP 细胞的最佳有效部位 半夏泻心汤水提液和不同极性部位对 AGS/DDP 细胞均具有一定的抑制作用，根据 IC₅₀ 值，部位Ⅳ（15.090±1.582）μg/mL>部位Ⅵ（47.903±3.229）μg/mL>部位Ⅴ（48.280±

5.322）μg/mL>部位Ⅱ（57.600±4.595）μg/mL>部位Ⅰ（196.100±15.005）μg/mL>部位Ⅶ（318.900±6.785）μg/mL>部位Ⅲ（415.700±55.424）μg/mL。因此，部位Ⅳ为半夏泻心汤干预 AGS/DDP 细胞的最佳有效部位。

3.3 部位Ⅳ对 AGS/DDP 细胞增殖的影响 与单用 DDP 组比较，部位Ⅳ联合 DDP 组 AGS/DDP 细胞增殖抑制率呈剂量依赖性升高，见表 2。0、2.25、4.5、9 μg/mL 部位Ⅳ干预 AGS/DDP 细胞 24 h 后的 IC₅₀ 值分别 32.71、12.00、8.94 和 6.77 μg/mL。2.25、4.5、9 μg/mL 部位Ⅳ逆转指数分别为 2.73、3.66、4.83。根据逆转指数结果，选用 9.00 μg/mL 部位Ⅳ和 6.00 μg/mL DDP 作为后续实验的处理条件。

表 2 不同质量浓度部位Ⅳ与 DDP 联用对 AGS/DDP 细胞增殖抑制率的影响（%， $\bar{x}\pm s$ ，*n*=3）

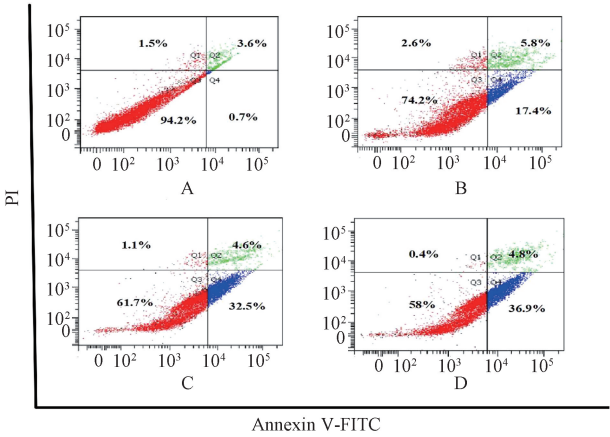
DDP/(μg·mL ⁻¹)	部位Ⅳ/(μg·mL ⁻¹)			
	0	2.25	4.5	9
0	—	—	—	—
1	6.02	7.17	6.10	7.44
2	8.63	15.90	13.74	22.51
4	12.95	27.49	25.31	40.55
8	19.03	34.25	44.57	55.32
16	24.46	53.33	66.45	67.74
32	39.70	71.24	87.64	79.05
64	73.98	96.50	98.15	95.95
128	97.11	97.31	98.51	98.21

3.4 半夏泻心汤活性部位的化学成分分析 部位Ⅳ主要有 30 种化合物，其中包括 20 种黄酮类化合物，6 种酚酸类化合物，以及少量生物碱和萜类，详见表 3。

表 3 半夏泻心汤部位Ⅳ的化学成分信息

化合物	分子式	<i>t</i> _R /min	离子模式	二级碎片离子	类别
小檗浸碱	C ₂₀ H ₁₇ NO ₅	5.91	[M+H] ⁺	337.096 0、352.120 3、322.071 8	生物碱类
甘草黄酮 A	C ₂₀ H ₁₈ O ₄	7.08	[M+H] ⁺	267.066 5、323.128 4、149.023 0	黄酮类
六氢姜黄素	C ₂₁ H ₂₆ O ₆	6.91	[M+H] ⁺	137.060 2、177.091 9、131.049 1	酚酸类
汉黄芩素	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	5.34	[M+H] ⁺	270.057 5、285.080 6、252.042 7	黄酮类
黄芩黄酮Ⅱ	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	4.82	[M+H] ⁺	375.111 6、345.067 4、327.050 2、360.085 4、227.055 7	黄酮类
八氢姜黄素	C ₂₁ H ₂₈ O ₆	6.70	[M+H] ⁺	137.059 8、163.074 7、217.123 9、131.048 4	酚酸类
甘草苷异黄酮 A	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	7.90	[M+H] ⁺	283.061 5、339.124 6	黄酮类
甘草宁 Q	C ₂₅ H ₂₆ O ₅	7.64	[M+H] ⁺	351.125 2、295.061 6、407.186 8、283.061 1	黄酮类
甘草黄酮 C	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	7.16	[M+H] ⁺	283.061 7、271.061 9、339.126 0	黄酮类
甘草异黄烷酮	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	7.50	[M+H] ⁺	299.056 1、217.050 7、355.122 3	黄酮类
甘草异黄酮 A	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	7.05	[M+H] ⁺	191.107 4、153.055 0、149.060 4、215.107 1、173.095 9	黄酮类
柚皮素	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	7.43	[M-H] ⁻	119.050 5、151.003 5、271.061 3、107.014 1、177.018 8	黄酮类
甘草查耳酮 A	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	7.43	[M+H] ⁺	121.029 1、339.160 6、297.150 1、271.097 9	黄酮类
甘草查耳酮 B	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	6.76	[M+H] ⁺	121.028 7、107.048 9、193.049 8、287.059 5、245.081 2	黄酮类
甘草苷元	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	10.31	[M-H] ⁻	119.054 8、135.014 1、91.022 4	黄酮类
甘草黄酮	C ₂₀ H ₂₀ O ₄	6.94	[M+H] ⁺	189.091 2、123.044 0、137.059 5、149.059 5	黄酮类
甘草查耳酮 D	C ₂₁ H ₂₂ O ₅	5.55	[M+H] ⁺	193.050 4、313.145 5、189.091 8、355.154 9、299.092 1	黄酮类
[6]-姜酚	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	5.31	[M-H] ⁻	57.034 9、99.081 9、193.087 5	酚酸类
[8]-姜酚	C ₁₉ H ₃₀ O ₄	9.35	[M-H] ⁻	57.035 1、127.113 3、193.087 7	酚酸类
[12]-姜烯酚	C ₂₃ H ₃₆ O ₃	4.29	[M+H] ⁺	177.091 4、145.064 8、137.058 9、117.069 8	酚酸类
千层纸素 A	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	6.99	[M+H] ⁺	270.054 5、285.075 7、168.006 5	黄酮类
黄芩素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	4.58	[M+H] ⁺	271.070 8、123.008 2、253.050 8	黄酮类
甘草酸	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	5.88	[M+H] ⁺	453.338 1、647.380 9、471.347 5	萜类
异野黄芩素	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	5.01	[M+H] ⁺	287.056 9、153.018 6	黄酮类
[10]-姜酚	C ₂₁ H ₃₄ O ₄	5.60	[M-H] ⁻	57.034 9、155.144 8、193.087 6	酚酸类
人参皂苷 Rk3	C ₃₆ H ₆₀ O ₈	6.91	[M+H] ⁺	621.439 0、423.359 8、405.351 2、203.179 6、621.185 6	萜类
甘草苷 C2	C ₃₆ H ₃₈ O ₁₆	8.13	[M+H] ⁺	291.087 5、257.081 5、167.034 1、727.249 9	黄酮类
人参皂苷 RG4	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	6.39	[M+H] ⁺	425.381 4、407.370 0、767.496 0、163.057 9、325.111 4	萜类
黄芩苷	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	9.26	[M+H] ⁺	271.063 2、447.094 3	黄酮类
槲皮素	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	7.35	[M-H] ⁻	299.021 9、314.045 5、329.068 6	黄酮类

3.5 半夏泻心汤部位Ⅳ对 AGS/DDP 细胞凋亡的影响 与空白组比较, DDP 组、部位Ⅳ组和联合组 AGS/DDP 细胞总凋亡率均升高 ($P<0.01$); 与 DDP 组比较, 部位Ⅳ组和联合组 AGS/DDP 细胞总凋亡率均升高 ($P<0.05$), 见图 1、表 4。

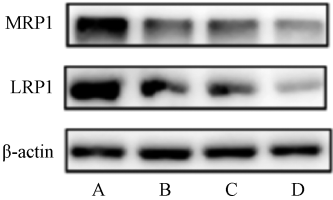


注: A 为空白组, B 为 DDP 组, C 为部位Ⅳ组, D 为联合组。
图 1 各组 AGS/DDP 细胞凋亡流式图

表 4 部位Ⅳ对 AGS/DDP 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	总凋亡率/%
空白组	4.133±1.756
DDP 组	23.967±2.635 **
部位Ⅳ组	33.167±3.900 ** #
联合组	41.600±0.557 ** #

注: 与空白组比较, ** $P<0.01$; 与 DDP 组比较, # $P<0.05$ 。
3.6 半夏泻心汤部位Ⅳ对 AGS/DDP 细胞耐药蛋白表达的影响 与空白组比较, DDP 组、部位Ⅳ组和联合组 AGS/DDP 细胞耐药蛋白 LRP1 和 MRP1 表达均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与 DDP 组比较, 联合组 AGS/DDP 细胞 LRP1 和 MRP1 蛋白表达均降低 ($P<0.01$), 见图 2、表 5。



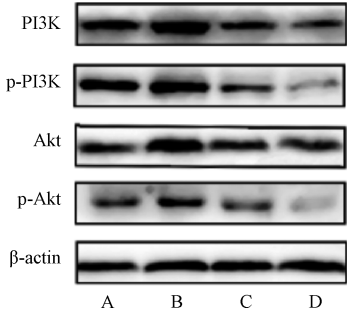
注: A 为空白组, B 为 DDP 组, C 为部位Ⅳ组, D 为联合组。
图 2 各组 AGS/DDP 细胞 LRP1 和 MRP1 蛋白条带图

表 5 部位Ⅳ对 AGS/DDP 细胞 LRP1 和 MRP1 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	MRP1/β-actin	LRP1/β-actin
空白组	1.176±0.093	1.154±0.116
DDP 组	0.852±0.106 *	0.827±0.131 *
部位Ⅳ组	0.721±0.045 **	0.609±0.084 **
联合组	0.406±0.119 ** #	0.300±0.119 ** #

注: 与空白组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 DDP 组比较, ## $P<0.01$ 。
3.7 半夏泻心汤部位Ⅳ对 AGS/DDP 细胞 PI3K/Akt 通路蛋

白表达的影响 与 AGS 组 (AGS 细胞) 比较, 空白组 AGS/DDP 细胞 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与 AGS/DDP 组比较, 部位Ⅳ组和 LY294002 组 AGS/DDP 细胞 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白表达均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 见图 3、表 6。



注: A 为 AGS 组 (AGS 细胞), B 为 AGS/DDP 组 (AGS/DDP 细胞), C 为部位Ⅳ组 (AGS/DDP 细胞), D 为 LY294002 组 (AGS/DDP 细胞)。

图 3 各组 AGS/DDP 细胞 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白条带图

表 6 部位Ⅳ对 AGS/DDP 细胞 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt
AGS 组	0.809±0.064	0.932±0.059
AGS/DDP 组	0.954±0.044 *	1.056±0.030 **
部位Ⅳ组	0.771±0.042 #	0.877±0.029 ##
LY294002 组	0.590±0.077 ** ##	0.240±0.020 ##

注: 与 AGS 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与空白组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

4 讨论

本研究根据耐药细胞抑制率选出半夏泻心汤二氯甲烷部位为最佳有效部位 (部位Ⅳ)。本研究还发现, 部位Ⅳ可促进 AGS/DDP 细胞凋亡, 证明在 DDP 耐药性的情况下, 部位Ⅳ和 DDP 在抑制细胞增殖和诱导 AGS/DDP 凋亡有协同作用, 进一步说明部位Ⅳ能增强 AGS/DDP 细胞对 DDP 的敏感性。

基于 UPLC-MS/MS 技术对最佳有效部位Ⅳ的化学成分进行检测, 共分析和鉴定了 30 种主要化合物, 其中包括 20 种黄酮类化合物, 6 种酚酸类化合物, 以及少量生物碱和萜类。其中含量较高的成分主要有光甘草酮、汉黄芩素、黄芩素、黄芩苷、槲皮素等。研究发现, 黄芩素、汉黄芩素可通过 PI3K/Akt 通路促进细胞凋亡, 提升化疗药物敏感性^[16-18]; 黄芩苷可抑制胃癌细胞的生长, 并通过促进胃癌细胞中 ROS 相关的铁下垂作用增强 5-氟尿嘧啶的敏感性^[19]; 槲皮素能减少谷胱甘肽的合成, 通过增加 MRP1 对谷胱甘肽的亲合力来刺激 MRP1 介导的谷胱甘肽转运, 并下调 Akt 的磷酸化, 逆转多药耐药^[20]。耐药蛋白的检测能够判断二氯甲烷部位在抑制 AGS/DDP 细胞增长的同时是否降低耐药的发生^[21]。本研究结果显示, 与空白组比较, DDP 组、部位Ⅳ组与联合组耐药蛋白 MRP1 和 LRP1 表达

均呈不同程度降低,说明最佳有效部位Ⅳ能够逆转人胃癌耐药 AGS/DDP 细胞的耐药性。相关研究表明,Akt1 在肺癌耐药细胞中高表达,Akt1 被抑制后促使 DDP 耐药细胞逆转为 DDP 敏感细胞^[22]。PI3K/Akt 信号通路是抑制细胞凋亡、促进细胞存活、调节肿瘤多药耐药的重要生物学机制^[23-25]。有研究指出半夏泻心汤含药血清可增加人胃癌耐药细胞株 SGC-7901/ADR 化疗敏感性,可能与抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路有关^[14]。本研究结果显示,与 AGS 细胞组比较,AGS/DDP 细胞中 PI3K、Akt 蛋白表达升高,提示人胃癌耐药 AGS/DDP 细胞 PI3K/Akt 通路处于激活状态;给药干预后,半夏泻心汤最佳活性部位Ⅳ降低了 AGS/DDP 细胞中 PI3K、Akt 蛋白及磷酸化的表达,PI3K 抑制剂也同样抑制了这些蛋白表达,提示半夏泻心汤活性部位Ⅳ逆转人胃癌耐药 AGS/DDP 细胞的表达与抑制 PI3K/Akt 通路相关。

综上所述,二氯甲烷部位(部位Ⅳ)为半夏泻心汤增敏人胃癌耐药 AGS/DDP 细胞化疗敏感性的最佳有效部位,其作用机制可能与抑制 PI3K/Akt 信号通路有关。

参考文献:

[1] 董俊刚,刘喜平,崔国宁,等.半夏泻心汤治疗胃癌研究[J].中国中医基础医学杂志,2021,27(12):1990-1994.

[2] Zhou Z H, An R, You L S, *et al.* Banxia Xiexin decoction: a review on phytochemical, pharmacological, clinical and pharmacokinetic investigations[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2023, 102(35): e34891.

[3] 黎秀娟,马超北,王玉燕,等.半夏泻心汤治疗胃病的研究进展[J].辽宁中医杂志,2024,51(8):202-208.

[4] 张艳美,魏晶晶,朱中博,等.半夏泻心汤防治 GC 作用机制研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2023,29(10):65-72.

[5] Thrift A P, El-Serag H B. Burden of gastric cancer[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2020, 18(3):534-542.

[6] Bukowski K, Kciuk M, Kontek R. Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(9):3233.

[7] 张艳美,魏晶晶,朱中博,等.半夏泻心汤防治 GC 作用机制研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2023,29(10):65-72.

[8] 董俊刚,刘喜平,崔国宁,等.半夏泻心汤治疗胃癌研究[J].中国中医基础医学杂志,2021,27(12):1990-1994.

[9] 冯桂阳,张素平.半夏泻心汤联合 SOX 方案治疗胃癌患者的临床效果[J].深圳中西医结合杂志,2022,32(13):22-25.

[10] 王若玲,霍静娴,张辉兰,等.半夏泻心汤化学成分、药理作用的研究进展及质量标志物的预测[J].世界中医药,2024,19(5):719-726.

[11] 纪万里,周泽华,王婷婷,等.基于 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 方法分析半夏泻心汤化学成分[J].药物分析杂志,2020,40(10):1736-1750.

[12] Wang W W, Gu W L, He C, *et al.* Bioactive components of Banxia Xiexin Decoction for the treatment of gastrointestinal diseases based on flavor-oriented analysis[J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 291: 115085.

[13] 朱中博,魏晶晶,董俊刚,等.基于 LC-MS 测定半夏泻心汤含药肠吸收液及含药血清中 4 种成分含量[J].中华中医药杂志,2022,37(11):6714-6718.

[14] 伍建新,甘培尚,甘海苹,等.半夏泻心汤含药血清对人胃癌耐药细胞株 SGC7901/ADR 化疗敏感性的作用[J].遵义医科大学学报,2022,45(6):719-726.

[15] 卢泰龙,邹正燃,李增光,等.胆木树干乙酸乙酯部位化学成分研究[J].中药材,2023,46(9):2206-2209.

[16] Yu M L, Qi B Q, Wu X X, *et al.* Baicalein increases cisplatin sensitivity of A549 lung adenocarcinoma cells *via* PI3K/Akt/NF-κB pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 90: 677-685.

[17] Zhang T L, Liu M M, Liu Q, *et al.* Wogonin increases gemcitabine sensitivity in pancreatic cancer by inhibiting Akt pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1068855.

[18] 曹晓乎,孟路华,闫春章.黄酮类化合物逆转肿瘤多药耐药的研究进展[J].中国医院药学杂志,2018,38(5):570-574.

[19] Yuan J W, Khan S U, Yan J F, *et al.* Baicalin enhances the efficacy of 5-fluorouracil in gastric cancer by promoting ROS-mediated ferroptosis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 164: 114986.

[20] Leslie E M, Deeley R G, Cole S P C. Bioflavonoid stimulation of glutathione transport by the 190-kDa multidrug resistance protein 1 (MRP1) [J]. *Drug Metab Dispos*, 2003, 31(1): 11-5.

[21] 程翻娥,白 星,李 铮,等.密点麻蜥不同部位调控 NF-κB/SNAIL 通路干预胃癌顺铂耐药研究[J].中草药,2023,54(15):4920-4927.

[22] Liu L Z, Zhou X D, Qian G S, *et al.* Akt1 amplification regulates cisplatin resistance in human lung cancer cells through the mammalian target of rapamycin/p70S6K1 pathway[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(13): 6325-6332.

[23] Pollak M. The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update[J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(3): 159-169.

[24] Noorolayi S, Shajari N, Baghbani E, *et al.* The relation between PI3K/Akt signalling pathway and cancer[J]. *Gene*, 2019, 698: 120-128.

[25] Mu C, Peng R K, Guo C L, *et al.* Discovery of sertraline and its derivatives able to combat drug-resistant gastric cancer cell *via* inducing apoptosis[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2021, 41: 127997.