

基因表达谱芯片对乌三颗粒抗 Lewis 肺癌 相关靶基因的分析研究*

石锦萍¹ 臧志和¹ 辛志伟¹ 周毅² 高丽元¹ 沈映君^{2△} 黄秀凤^{2△}

摘要 目的:在基因组水平上探讨乌三颗粒抗肿瘤的分子生物学机制。方法:抽提经乌三颗粒治疗的 Lewis 肺癌组织和未经治疗的对照组瘤组织总 RNA 并纯化 mRNA,分别逆转录并进行荧光标记,制作成 cDNA 探针,与小鼠 MGEC-20S 型基因芯片杂交,筛选出两组间差异表达基因。结果:两组间存在差异性表达基因 45 条,与对照组比较,中药组与恶性肿瘤浸润、转移相关的基因表达下调,与促进细胞凋亡的相关基因表达上调。结论:基因芯片技术能高通量分析中药乌三颗粒防治 Lewis 肺癌的相关靶基因,为进一步揭示中药抗肿瘤机制提供了新的思路和前沿性生物技术手段。

关键词 乌三颗粒 基因表达谱芯片 Lewis 肺癌 基因差异表达

Analysis of Anti-Lewis Lung Carcinoma Related Target-gene in Tumor Tissue Treated by Wusan Granule by cDNA Microarray SHI Jin-ping, ZANG Zhi-he, XIN Zhi-wei, et al Teaching & Research Section of Human Body Structure, Chengdu Military Medical College, Chengdu (610083)

Objective: To investigate the molecular biological mechanism, on genomic level, of using Wusan Granule in treating Lewis lung carcinoma. **Methods:** The total RNAs were isolated from carcinoma tissue of two groups, treated or un-treated by Wusan Granule. They were purified, both mRNA were reversely transcribed to the cDNAs and labelled with fluorescence to prepare the cDNA probe, which was hybridized with mouse MGEC-20S gene chip to screen the different expressed genes between the two groups. **Results:** There were 45 different expressed genes between the two groups. As compared with the group un-treated with Wusan Granule, in the treated group, the tumor infiltration and metastasis related gene expressions were down-regulated and the tumor cell apoptosis related gene expression up-regulated. **Conclusion:** The cDNA microarray technique is a high-throughout approach to screen the Wusan Granule anti-tumor related target genes, which provides new pathway and advanced biological means for studying of the scientific entity of Chinese herbal medicine in treating tumor.

Key words Wusan Granule, cDNA microarray, Lewis lung carcinoma, gene differential expression

基因表达谱芯片技术能在基因组水平上并行分析大量基因,从而迅速获得丰富、全面的生物学信息,这使进一步揭示肿瘤的发生机制,探索抗肿瘤药物的基因治疗机制成为可能。乌三颗粒为复方三类(中药)新药,于 2001 年获国家药品监督管理局新药临床研究批文。本课题采用基因芯片技术对经该药治疗后的 Lewis 肺癌组织和对照组瘤组织进行了差异基因表达的筛选,以期在基因组水平上研究该药抗肿瘤的分子生物学机制。

材料与方法

1 材料

1.1 Lewis 肺癌瘤株 四川省抗菌素工业研究所药理研究室提供。

1.2 药物 5-氟脲嘧啶(5-Fu, 100mg/支,批号 990502,上海海普制药厂产品);环磷酰胺(CTX, 80mg/支,批号 010711,上海华联制药有限公司产品);乌三颗粒(由制首乌、三七、红参、虫、大青叶组成,各药在方中比例为 2:1:1:1:1.5,每袋含生药 9g,批号 010632,重庆华森制药有限公司产品)。

1.3 动物 C₅₇BL/6 纯种小鼠,一级动物,雌性,体重 18~22g,鼠龄 6~8 周,四川省抗菌素工业研究所实验动物中心提供(动物合格证号:川实动管质第 99—30 号)。

* 重庆科委(1999)及四川省教委青年基金重点资助课题(2000-A71),博士生课题

1. 第三军医大学成都军医学院人体结构教研室(成都 610083);

2. 成都中医药大学;

△指导

通讯作者:石锦萍;Tel:028-6879129,13679005336;E-mail:

2 方法

2.1 抑瘤实验 取小鼠 50 只,随机分为 5 组,即对照组、阳性药组、中药大剂量组(中药大组)、中药中剂量组(中药中组)和中药小剂量组(中药小组),每组 10 只,每只小鼠右前腋下接种 0.2ml Lewis 肺癌瘤株。接种后 24h,阳性药组腹腔注射 5-Fu(25mg/kg),隔天 1 次,共 5 次;中药大、中、小剂量组小鼠按 16.2、8.1、2.7g/kg 体重等体积(0.4ml/次)给中药灌胃,每天 1 次,连续 10 天,末次给药后 24h 处死动物,剥离瘤块称重,计算肿瘤抑制率(实验重复 4 批)。第 4 批实验阳性药组为 CTX(30mg/kg),给药方法同中药组(考虑到第 4 批实验用做机理探讨,而前 3 批实验中药小剂量组未完全达到 30%抑制率,故在第 4 批实验中未设中药小剂量组)。

2.2 基因表达谱芯片样本收集 在第 4 批动物抑瘤实验中,随机选择中药大剂量组 and 对照组荷瘤小鼠各 3 只,脱颈处死,在超净台冰盘上,快速剥离肿瘤组织,RNase-free 液洗涤两次,迅速液氮冻存储用。

2.3 总 RNA 抽提及检测 按改良的一步法^[1]抽提上述两组瘤组织总 RNA,用 Lisc 沉淀方法纯化后,紫外分析及电泳检测显示获得高质量的总 RNA。

2.4 mRNA 纯化及探针标记 用 Oligotex A Midi kit 纯化 mRNA。参照 Schena 等^[2]方法逆转录标记 cDNA 及纯化 mRNA。用 Cy5-duTP 标记中药大剂量组,Cy3-duTP 标记对照组。经乙醇沉淀后将 Cy5-duTP 和 Cy3-duTP 标记的探针混合溶解在杂交液中。

2.5 芯片杂交和荧光扫描 基因表达谱芯片为小鼠 MGEC-20S 类型(由上海博星基因芯片有限责任公司提供,芯片含 2048 基因点)。在暗室条件下,将基因表达谱芯片和杂交探针分别在 95℃ 水溶液中变性 5min 后,置于杂交舱内,加入混合探针,用杂交密封舱加以密闭(不留气泡)。恒温杂交箱内 60℃ 杂交 16h。依次用 2×标准柠檬酸盐水(SSC)+0.2%十二烷基硫酸钠(SDS),0.1%×SSC+0.2%SDS,0.1%×SSC 洗涤 10min,室温晾干。用 General Scanning 公司 ScanArray 3000 扫描仪扫描芯片,用 Biodiscovery 公司 ImaGene 3.0 软件分析 Cy3 和 Cy5 两种荧光信号强度

和比值(Ratio=Cy5/Cy3)。

3 统计学方法 采用 SPSS 11.0 for Windows 统计软件进行,多组间比较用 One-way ANOVA 检验。基因表达谱芯片结果分析,经内参照基因标准化,基因显著性差异表达的判定标准为:Ratio>2 或 Ratio<0.5 有显著性意义,其中 Ratio>2 表示基因表达水平上调,Ratio<0.5 表示基因水平下调^[3]。

结 果

1 乌三颗粒对 Lewis 肺癌的抑瘤作用 见表 1。中药大、中剂量组对小鼠 Lewis 肺癌均有明显抑制作用,其抑瘤率为 39%~57%,符合国家药品监督管理局抗肿瘤新药的研究要求(抑瘤率>30%),但在 3 批中药小剂量组实验中,有 2 批基本符合国家要求,1 批抑瘤率未达到 30%(仅 28%)。

2 基因差异性表达结果 见表 2。中药组与对照组两组间有基因差异性表达 45 条,其中表达下调有 25 条,表达上调有 20 条;未知基因 28 条,已知基因 17 条。初步对 17 条已知基因进行功能分析,发现与肿瘤发生、发展关系密切的基因差异性表达如下:(1)与细胞骨架相关的基因(M13444,比值为 0.465;L49467,比值为 0.494;X03672,比值为 0.473)表达下调;(2)与肿瘤细胞快速增殖相关基因(Z31399,比值为 0.451)表达下调;(3)与恶性肿瘤细胞浸润转移相关基因(X52886,比值为 0.468)表达下调;(4)与激活死亡蛋白酶(caspase-3),促进细胞凋亡的相关基因(X01756,比值为 2.075)表达上调;(5)与刺激 IL-2 和 TNF 分泌相关基因(U38967,比值为 2.097)表达上调;(6)与肿瘤发生呈负相关标志的基因(M16356,比值为 11.709,M27608,比值为 12.597)表达上调。

讨 论

本研究表明乌三颗粒大、中剂量组有明显抑制 Lewis 肺癌的作用,抑制率达到了国家药品监督管理局抗肿瘤新药的研究要求,中药小剂量组基本符合国家要求。然而,该方药抗肿瘤的分子生物学机理尚需深入研究。本课题通过对 17 条已知基因的功能分析,

表 1 乌三颗粒对 Lewis 肺癌的抑瘤作用

组别	剂量 (g/kg)	鼠数	第 1 批		第 2 批		第 3 批		第 4 批	
			瘤重(g, $\bar{x} \pm s$)	抑瘤率(%)	瘤重(g, $\bar{x} \pm s$)	抑瘤率(%)	瘤重(g, $\bar{x} \pm s$)	抑瘤率(%)	瘤重(g, $\bar{x} \pm s$)	抑瘤率(%)
对照	—	10	2.05±0.61	—	1.79±0.66	—	1.83±0.60	—	1.15±0.37	—
5-Fu	0.025	10	0.58±0.40**	72	0.46±0.29**	74	0.48±0.30**	74	—	—
CTX	0.030	10	—	—	—	—	—	—	0.37±0.15**	83
中药大	16.2	10	0.87±0.53**	57	0.81±0.36**	55	0.79±0.37**	56	0.51±0.24**	53
中	8.1	10	1.14±0.47*	44	1.05±0.50*	41	1.10±0.19*	39	0.69±0.30*	39
小	2.7	10	1.49±0.55*	28	1.24±0.54*	30	1.26±0.51*	31	—	—

注:与对照组比较,*P<0.05,**P<0.01

初步认为乌三颗粒抗肿瘤的基因途径可能是多环节、多层次的结果。主要体现在以下几方面 (1) 该方药有下调与细胞骨架有关的基因表达: 构成细胞骨架的主要成分为微管, 它除了维持细胞形状外, 更为重要的是参与细胞有丝分裂和肿瘤细胞的粘附、侵袭过程^[4], 微管干扰剂已成为抗肿瘤化疗药物的筛选靶标, 如长春新碱、秋水仙素、紫杉醇均是通过干扰微管蛋白结构和功能发挥抗肿瘤作用^[5]。(2) 下调与肿瘤细胞快速增殖相关基因(chaperonin containing T, CCT) 的表达: CCT 是一种辅助蛋白质正确折叠的低聚物伴随分子, Yokota 等^[6]比较了正常肝组织与肝癌、结肠癌组织中 CCT 的表达, 发现在肿瘤组织中的表达显著高于正常肝组织, 认为 CCT 在快速增殖的肿瘤细胞中的表达上调利于满足肿瘤增殖所需的蛋白质供给, CCT 可以作为肿瘤的标志物。(3) 下调与恶性肿瘤细胞浸润、转移相关的蛋白水解酶, 即组织蛋白酶 D (Cathepsin D, CD) 基因表达: CD 除了有助于肿瘤细胞碱性纤维母细胞生长因子(bFGF) 的释放和刺激新生血管形成^[7]外, 更为重要的是 CD 作为蛋白水解酶, 可降解细胞外基质、基底膜的多种组织成分, 从而促进恶性肿瘤的浸润和转移。因此, CD 已作为多种恶性肿瘤预后判断的独立指标^[8]。(4) 上调促进细胞凋亡的相关基因细胞色素 C 的表达: 近年发现细胞色素 C 与细胞凋亡密切相关, 能使凋亡蛋白家族中系列死亡蛋白酶(caspase) 激活, 最终导致整个细胞结构破坏, 凋亡小体产生, 细胞死亡^[9]。(5) 上调与免疫相关的基因胸腺素(原)- β_4 的表达: 胸腺素- β_4 主要功能是调节胸腺 T 淋巴细胞分化, 刺激 IL-2 和 TNF 分泌, 是免疫细胞的分化标志物。Low TL 等发现胸腺素- β_4 在胸腺癌低表达, 甚至无表达, 他认为可将胸腺素- β_4 作为胸腺癌的病因病理诊断的新参数^[10]。然而, Clark EA 等在研究肿瘤转移基因中发现胸腺素- β_4 与肿瘤转移密切相关^[11], 对这种既参与机体免疫又促进肿瘤转移的因子, 在肿瘤中的不协调性如何评价, 尚需进一步探索。(6) 最为值得注意的是乌三颗粒能显著上调 major urinary protein (MUP) 基因表达: 目前 MUP 功能尚不清楚, Lin L 等研究发现肺癌组织中 MUP 过低表达, 甚至缺失表达^[12]。Dragani TA 等研究发现 MUP 在肝癌早期阶段就出现低表达, 认为 MUP 可以作为肝癌负相关标记物^[13]。似乎可以推测, MUP 可能是一个抑癌基因, 在

恶性肿瘤发生发展过程中处于失活状态。乌三颗粒通过治疗小鼠 Lewis 肺癌, 能显著激活 MUP 基因表达, 这可能是该方药抗肿瘤中最引人注目的重要靶基因。

参 考 文 献

- Chomezynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1): 156—159.
- Schena M, Shalon D, Heller R, et al. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(20): 10613—10619.
- 黄达蕃, 戴建凉, 陈菊祥, 等. 肺癌相关基因的表达研究. 第二军医大学学报 2000; 21(9): 827—829.
- 邵开峰, 吴沛志, 王伯初, 等. 细胞骨架对肝癌细胞粘附性的影响. 重庆大学学报(自然科学版) 2000; 23(3): 9—11, 16.
- 李越中, 胡 玮, 周 璐. 具有促微管聚合活性的抗肿瘤天然化合物. 药学学报 2001; 36(2): 155—160.
- Yokota S, Yamamoto Y, Shimizu K, et al. Increased expression of cytosolic chaperonin CCT in human hepatocellular and colonic carcinoma. *Cell Stress Chaperones* 2001; 6(4): 345—350.
- Brizzio P, Badet J, Capony F, et al. MCF7 mammary cancer cells respond to bFGF and internalize it following its release from extracellular matrix: a permissive role of Cathepsin D. *Exp Cell Res* 1991; 194(2): 252—259.
- Matsuo K, Kobayashi I, Tsukuba T, et al. Immunohistochemical localization of Cathepsin D and E in human gastric cancer: a possible correlation with local invasive and metastatic activities of carcinoma cells. *Human Pathol* 1996; 27(2): 184—188.
- Hivotovsky B, Orrenius S, Brustugun OT, et al. Injected cytochrome C induces apoptosis. *Nature* 1998; 391(6666): 449—450.
- Low TL. Biochemical characterization of thymic hormones in thymoma tissue. *Thymus* 1990; 27(1—2): 1—5.
- Clark EA, Golub RT, Lander ES, et al. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for Rho C. *Nature* 2000; 406(6795): 532—535.
- Lin L, Wang Y, Bergman G, et al. Detection of differentially expressed genes in mouse lung adenocarcinomas. *Exp Lung Res* 2001; 27(3): 217—219.
- Dragani TA, Manenti G, Sauhi MR, et al. Major urinary protein as a tumor marker in mouse hepatocarcinogenesis. *Mol Carcinog* 1989; 2(6): 355—360.

(收稿 2002-06-16 修回 2002-11-20)