

六味地黄丸含药血清对自杀基因治疗黑色素瘤 增效作用的缝隙连接机制初探

杜标炎¹ 郭玉荣² 易 华¹ 谭宇蕙³ 吴映雅³

摘要 **目的** 探讨六味地黄丸含药血清对 HSV-tk/GCV 自杀基因系统杀伤小鼠黑色素细胞瘤 B16 细胞增效作用的缝隙连接机制。**方法** 制备六味地黄丸含药血清(分别为 2.5%、5.0%、10.0% 六味血清)及 10.0% 对照血清。采用 RT-PCR 法检测六味地黄丸含药血清对 B16 细胞株的缝隙连接蛋白(Cx)26 和 Cx43 mRNA 的影响,Western blot 法和间接免疫荧光法检测其对 B16 细胞 Cx26 和 Cx43 蛋白表达的影响;RT-PCR 检测 Cx26-309、Cx26-337、Cx26-367、Cx26-2098 SiRNA 对 Cx26 的干扰效率,选用干扰效率最高的 Cx26-2098 SiRNA 干扰 Cx26 基因后观察六味地黄丸联合 HSV-tk/GCV 的旁观者效应;MTT 法检测细胞间缝隙连接通讯功能(gap junctional intercellular communication, GJIC)抑制剂甘草次酸(GA)对六味地黄丸联合 tk/GCV 系统对 B16 细胞杀伤作用的影响,实验设为对照血清组、2.5%、5.0%、10.0% 六味血清组(简称低、中、高剂量组)及对照血清联合 GCV 组、低、中、高剂量联合 GCV 组、低、中、高剂量联合 GCV 加 GA 组。GCV 终浓度为 20 mol/L,GA 终浓度为 50 mol/L。**结果** 六味地黄丸含药血清能提高 B16 细胞中 Cx43 mRNA 及蛋白的表达,且具有量效依赖关系;对 Cx26 mRNA 与蛋白的表达具有双向调节作用,低剂量时具有抑制作用而高剂量是能上调其表达;SiRNA 干扰 Cx26 基因表达后,六味地黄丸联合自杀基因治疗的旁观者效应与没有干扰前比较无明显变化;低、中、高剂量联合 GCV 组在 GA 阻断前细胞抑制率(48.75%、59.39%、69.28%)与阻断后细胞抑制率(29.14%、38.71%、58.13%)比较,显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 六味地黄丸含药血清对 HSV-tk/GCV 自杀基因系统杀伤恶性黑色素瘤 B16 细胞的增效作用与缝隙连接机制有关,可能是通过提高 Cx26 和 Cx43 等缝隙连接蛋白表达而达到协同增效作用。

关键词 恶性黑色素瘤;基因治疗;自杀基因;六味地黄丸;血清药理学;缝隙连接

The Preliminary Research on the Gap Junction Mechanisms for Synergistic Effects of Liuwei Dihuang Pill Containing Serum on Suicide Gene Therapy of Melanoma DU Biao-yan¹, GUO Yu-rong², YI Hua¹, TAN Yu-hui³, and WU Ying-ya³ 1 Department of Pathology, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou (510006), China; 2 Liuzhou Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangxi (545001), China; 3 Department of Biochemistry, Basic Medical School, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou (510006), China

ABSTRACT **Objective** To study the gap junction mechanisms for synergistic effects of Liuwei Dihuang Pill (LDP) containing serum on HSV-tk/GCV suicide gene therapy of mouse malignant melanoma B16 cells. **Methods** The LDP containing serum (2.5% LDP serum group, 5.0% LDP serum group, and 10.0% LDP serum group) and the control serum group were set up. The effects of LDP on mRNA expressions of Cx26 and Cx43 in mouse malignant melanoma B16 cells were detected by RT-PCR assay. The effects of LDP on protein expressions of Cx26 and Cx43 in B16 cells were detected using Western blot and indirect immunofluorescence assay. The interference efficiencies of Cx26-309, Cx26-337, Cx26-367, Cx26-2098 SiRNA on Cx26 gene in B16 cells were detected using RT-PCR technique. Cx26-2098 SiRNA,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30572433;No. 81072906)

作者单位:1. 广州中医药大学基础医学院病理教研室(广州 510006);2. 广西柳州市中医院科教(广西 545001);3. 广州中医药大学基础医学院生化教研室(广州 510006)

通讯作者:杜标炎, Tel: 020-39358015, E-mail: dubybill@sohu.com

due to the optimal interference efficiency, was chosen to interfere Cx26 gene, and the bystander effect of LDP + HSV-tk/GCV was observed. The effects of the gap junctional intercellular communication (GJIC) inhibitor glycyrrhetic acid on the killing of LDP + HSV-tk/GCV system to B16 cells were detected by MTT assay. In this experiment, the control serum group, 2.5% LDP serum group, 5.0% LDP serum group, 10.0% LDP serum group, the control serum combined GCV group, 2.5% LDP serum combined GCV group, 5.0% LDP serum combined GCV group, 10.0% LDP serum combined GCV group, 2.5% LDP serum combined GCV + glycyrrhetic acid group, 5.0% LDP serum combined GCV + glycyrrhetic acid group, 10.0% LDP serum combined GCV + glycyrrhetic acid group were set up. The final concentration of GCV was 20 $\mu\text{mol/L}$. The final concentration of glycyrrhetic acid was 50 $\mu\text{mol/L}$. Results LDP containing serum could increase the protein and mRNA expressions of Cx43 in B16 cell in a dose-dependent manner. It had bi-directional regulation on the Cx26 protein and mRNA expressions. The low dose LDP had inhibition while high dose LDP could up-regulate its expression. After SiRNA interfered Cx26 gene, there was no obvious change in the bystander effect of LDP combined suicide gene therapy between before and after interference. There was significant reduction in the inhibition rate between before (48.75%, 59.39%, and 69.28%) and after blockage (29.14%, 38.71%, and 58.13%) of glycyrrhetic acid in the 2.5%, 5.0%, 10.0% LDP serum combined GCV groups ($P < 0.01$). Conclusion The synergistic effects of LDP containing serum on HSV-tk/GCV suicide gene therapy in mouse malignant melanoma B16 cells were correlated with the gap junction mechanisms, which might be achieved through increasing the expressions of Cx26 and Cx43.

KEYWORDS malignant melanoma; gene therapy; suicide gene; Liuwei Dihuang Pill; serum pharmacology; gap junction

基因治疗,特别是自杀基因治疗,是肿瘤治疗的最新进展和发展方向,而中医中药在肿瘤的临床治疗中具有肯定的疗效,能调整机体免疫状态,调控细胞基因表达,因此开展中医中药对肿瘤基因治疗的增效减毒等方面的研究具有重要的意义。

课题组前期研究证实:六味地黄丸联合自杀基因系统 HSV-tk/GCV 对恶性黑色素瘤 B16 细胞的杀伤作用是一种协同效应,这种作用主要源于旁观者效应^[1,2],旁观者效应的机制主要包括:“缝隙连接(GJ)”、免疫介导、“细胞凋亡”、抗肿瘤血管生成机制等,其中 GJ 机制是体外旁观者效应的主要的机制之一,六味地黄丸是否通过这一机制介导旁观者效应从而发挥协同增效作用?课题组初步研究提示六味地黄丸能调控黑色素瘤 B16 细胞株的缝隙连接蛋白(connexin, Cx)表达^[3],本研究在前期工作的基础上探讨六味地黄丸对自杀基因旁观者效应的增效机制是否与改善缝隙连接通讯(gap junctional intercellular communication, GJIC)功能有关,为将中医药疗法与疾病基因治疗结合的可行性提供实验依据。

材料与方法

1 材料

1.1 动物 200 ~ 220 g 的 2 月龄雄性 SPF 级

SD 大鼠,购于广州中医药大学实验动物中心,动物合格证号 SCXK(粤)2003 ~ 0001。

1.2 细胞 小鼠恶性黑色素瘤细胞株 B16 购于中山大学动物中心细胞库, B16/tk 由本实验室构建并鉴定保存。

1.3 药物 六味地黄丸为北京同仁堂科技发展有限公司制药厂产品(批号:703428)。

1.4 试剂 细胞培养用 RPMI-1640 粉和 0.25% 含 EDTA 胰酶均为 GIBCO 公司产品;新生牛血清为奥地利 PAA 公司产品;18 α -甘草次酸(Glycyrrhetic acid, GA)、四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、过硫酸铵(AP)、丙烯酰胺、甘氨酸、 β -巯基乙醇、SDS、Tris、PMSF 均为 Sigma 公司产品;BCA 蛋白质定量检测试剂盒为申能博采生物科技有限公司产品;脱脂奶粉为内蒙古伊利股份有限公司产品;异丙醇为广东新宁化工厂产品;蛋白 marker(cat No.SM0431, Lot No.00023933)为 Fermentas 公司产品;抗体稀释液及 5.0% BSA、一抗兔抗鼠 Cx26 多克隆抗体(cat No.BA1591)、一抗兔抗鼠 Cx43 多克隆抗体、一抗小鼠抗鼠 β -actin 多克隆抗体(cat No.BM0627)均为武汉博士德生物工程有限公司产品;FITC 标记山羊抗兔二抗(cat No.02-15-06, Lot No.070492)为美国 KPL 公司产品;HRP 标

记的山羊抗兔二抗 (cat No. ZB- 2307, Lot No. 77928) 和山羊抗小鼠二抗 (cat No. ZB- 2305, Lot No. 78039) 为中杉金桥生物技术有限公司产品; 2 × Tap Mixture 为天根生物公司产品; Reverse Transcriptase M-MLV (Rnase H-) 为宝生物工程 (大连) 有限公司产品; Lipofectamine 2 000 为 Invitrogen 公司产品 (cat No. 11668 - 019); 细胞培养用培养板、培养瓶、培养皿、冻存管均为德国 Greiner Bio-one 公司产品; 一次性微孔滤膜为美国 Corning 公司产品。

1.5 仪器 CO₂ 培养箱 (BNA-3210 型, 日本 ESPEC); 超净工作台 (JH 型, 苏州净化设备厂); 倒置显微镜 (XDS-1B 型, 重庆 COIC); 荧光倒置显微镜及图像采集系统 (IX71-F22FL/PH 型, 日本 Olympus); 旋涡混合器 (QL-190 型, 江苏省海门其林医用仪器厂); 空气浴震荡器 (HZQ-C 型, 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司); 电泳仪 (PowerPac 300 型, 美国 Bio-Rad); 凝胶成像系统 (Gen Doc 1 000 型, 美国 Bio-Rad); PCR 仪 (TP 600 型, 大连 TaKaRa 公司); 紫外分光光度计 (80- 2103-98 型, 英国 Pharmacia Biotech); 酶标仪 (680 型, 美国 Bio-Rad); SDS-PAGE 蛋白垂直电泳系统和转膜系统 (20 型, 美国 Bio-Rad 公司); 脱色摇床 (TY-80B 型, 南京大学); 电动离心机 (XYJ-801 型, 江苏省金坛市医疗仪器厂); 磁力搅拌器 (JB-1 型, 上海雷磁仪器厂新泾分厂); pH 计 (HI 4212 型, 意大利 HANNA)。

2 方法

2.1 六味地黄丸含药血清制备及对 B16 细胞 Cx26、Cx43 mRNA 表达的影响 将 SD 大鼠 30 只, 随机分为六味地黄丸组与对照组, 每组 15 只, 分别灌服六味地黄丸研磨液 8 mL (含生药 4 g) 和等容积的蒸馏水, 连续灌胃 4 d, 末次给药后 1 h 腹主动脉取血, 制备血清, -70 °C 冰箱保存备用。常规消化 B16 细胞, 6 × 10⁴ 个/孔接种 60 mm 培养皿, 培养 24 h 后换新鲜的无血清培养基, 设为 10.0% (体积分数, 下同) 对照血清组 (简称对照血清组)、2.5% 六味血清组 (2.5% 六味血清 + 7.5% 对照血清, 简称低剂量组)、5.0% 六味血清组 (5.0% 六味血清 + 5.0% 对照血清, 简称中剂量组)、10.0% 六味血清组 (简称高剂量组), 37 °C, 5.0% CO₂ 培养箱培养 48 h 后各组细胞样品应用 Trizol Reagent 试剂盒提取 RNA, 经琼脂糖凝胶电泳鉴定, -70 °C 保存待用。

检索基因文库找到小鼠 Cx26、Cx43、β-actin 基因的基因序列, 应用 PRIMER 5.0 软件设计小鼠各引

物序列, 内参 β-actin 上游: 5'-TAAAGACCTCTAT-GCCAACACAGT-3' 下游: 5'-CACGATGGAGGGG CCGGACTCATC-3', 扩增片段长度为 240bp; Cx26 上游: 5'-CGGAAGTTCATGAAGGGAGAGAT-3', 下游: 5'-GGTCTTTTGGACTTTCCTGAGCA-3', 扩增片段长度为 364bp; Cx43 上游: 5'-TGCTGGTGGTGT-GCTTGGTG-3', 下游: 5'-AGGGAAATCAAACGG CTGGG-3', 扩增片段长度为 369 bp; Cx26、Cx43、β-actin 的 cDNA 合成反应体系中含模板 RNA/引物变性溶液 6 μL, 5 × M-MLV Buffer 2 μL, dNTP Mixture 0.5 μL, RNase Inhibitor 0.25 μL, RTase M-MLV 0.25 μL, DEPC 水补足至 10 μL; PCR 反应体系为 cDNA 0.5 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 0.25 μL, 2 × Tap PCR MasterMix 5 μL, 用 ddH₂O 补足体积至 10 μL。PCR 循环条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 62 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 7 min。扩增结束后 2% 琼脂糖凝胶电泳拍照, 用 Image-pro plus 5.1 软件对 PCR 产物条带进行分析: Cx26 和 Cx43 条带的综合灰度除以空白对照组条带的综合灰度值即为相对表达量。

2.2 六味地黄丸含药血清对 B16 细胞 Cx26 和 Cx43 蛋白表达的影响

2.2.1 间接免疫荧光法 对数期生长的 B16 细胞, 1 × 10⁴ 个/孔接种 24 孔板, 设阴性对照组, 其余 4 组分组同前, 37 °C, 5.0% CO₂ 培养箱培养, 每组设 3 个复孔; 48 h 后对板内细胞进行固定、封闭以及间接免疫荧光法染色。具体步骤如下: 吸弃培养液, 滴加 PBS (0.01 mol/L, pH 7.4, 每次加 1 mL 轻微震荡 5 min) 漂洗标本 3 次, 4% 多聚甲醛室温固定 20 min; PBS 浸洗, 5.0% BSA 150 μL 室温下封闭 30 min; 滤纸吸去多余水分, 但不使标本干燥, 实验组每孔滴加用抗体稀释液 1:100 稀释的一抗 (兔抗鼠 Cx26 多克隆抗体和兔抗鼠 Cx43 多克隆抗体) 150 μL, 阴性对照组每孔滴加 PBS (0.01 mol/L, pH 7.4) 150 μL 代替一抗。将样品置于湿盒内, 4 °C 孵育过夜; PBS 漂洗后滴加 1:100 稀释的荧光二抗 (在暗室中进行); 湿盒内室温孵育 1 h; PBS 浸洗后滴加 PI 复染核, 在倒置荧光显微镜下观察并采集图片, 细胞核均染为红色, 胞膜和胞浆见绿色荧光者判定为阳性细胞。每个样本随机抽取 5 个高倍视野 (×400), 盲法摄取图像后, 采用盲法评分, 根据荧光表达的亮度分为 +、++、+++、++++ 4 个等级, 具体标准由观察者掌握。

2.2.2 Western blot 检测法 对数期生长的

B16 细胞, 6×10^4 个/孔接种 60 mm 培养皿, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5.0% CO_2 培养箱培养 24 h 换新鲜的无血清培养基, 分组加药同前, 继续培养 48 h 后弃去培养液, 细胞悬液转移至 1.5 mL EP 管, PBS(0.01 mol/L, pH7.4) 洗 2 次; 各组均加入 500 μL 蛋白抽提液, 在冰上细胞完全裂解后于冷冻高速离心机中离心 10 min (12 000 r/min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), 取上清测定所提蛋白含量 (按照上海申能博彩蛋白定量试剂盒说明书操作), 并将抽提好的蛋白质溶解于等量样品缓冲液中分装保存备用; 取样进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 电泳后电转移至硝酸纤维素膜上, 丽春红染色验证蛋白转移成功; 以 5.0% 的脱脂奶粉封闭 2 h 后, 依次加入 Cx26、Cx43 一抗 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBS/T 漂洗 2 次, TBS 漂洗 1 次)、HRP 标记二抗 (室温 2 h, TBS/T 漂洗 2 次, TBS 漂洗 1 次) 进行免疫检测, 最后于暗室内加入 HRP-ECL 发光液, X 光胶片曝光、显影、定影。X 光胶片扫描后, 用 Image pro-plus 5.1 软件对蛋白条带进行分析。计算方法为: 所得 Cx26 和 Cx43 蛋白条带的综合灰度除以空白对照组蛋白条带的综合灰度值即为相对表达量。

2.3 SiRNA 下调 Cx26 基因表达对自杀基因系统联合六味地黄丸含药血清杀伤 B16 细胞作用的影响。

2.3.1 RT-PCR 检测 SiRNA 干扰效率 针对 Cx26 基因设计 4 条特异性和 1 条非特异性 SiRNA (表 1), 由上海吉玛生物公司设计与合成。

2.3.2 细胞培养与 SiRNA 转染 转染前 1 天, 常规消化 B16 细胞制成密度为 2×10^4 个/mL 的细胞悬液, 接种 60 mm 培养皿, 每孔加细胞悬液 5 mL (细胞约 1×10^5 个), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5.0% CO_2 培养箱培养, 转染前用 PBS(0.01 mol/L, pH7.2) 轻洗并换 2 mL 的无血清 RPMI-1640 培养基。

按 10 μL /皿吸取 Lipofectamine 2 000, 以 500 μL 无血清 RPMI-1640 培养基稀释, 轻轻混匀室温孵育 5 min; 设阴性对照 (B16 细胞)、NC-siRNA、Cx26-309、Cx26-337、Cx26-367、Cx26-2098 SiRNA 6 组, 各组取 20 μL 细胞; 用 500 μL 无血清 RPMI-1640 培养基稀释, 室温混匀; 将上述稀释的 Lipofectamine 2 000 与稀释的 SiRNA 轻轻混匀, 室温静置 20 min, 制备 SiRNA-转染试剂混合物; 另设一组只有转染试剂无 SiRNA 的用于对照。将 SiRNA-转染试剂混合物加入含有细胞及无血清培养液 (2 mL) 的皿中, 轻轻混匀; $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5.0% CO_2 培养箱培养, 4 h 后换新鲜的含血清的完全培养基, 转染 48 h 提取总 RNA 用于 RT-PCR 法检测干扰效率。

表 1 Cx26-SiRNA 序列

序号	基因序列
Cx26-309	正向: 5'-GGA AGU UCA UGA AGG GAG ATT-3'
	反向: 5'-UCU CCC UUC AUG AAC UUC CGT -3'
Cx26-337	正向: 5'-CGA GUU UAA GGA CAU CGA ATT-3'
	反向: 5'-UUC GAU GUC CUU AAA CUC GTT -3'
Cx26-367	正向: 5'-CCA GAA GGU CCG UAU CGA ATT-3'
	反向: 5'-UUC GAU ACG GAC CUU CUG GGT-3'
Cx26-2098	正向: 5'-AGU UUA GGU CAG UAU GUA ATT-3'
	反向: 5'-UUA CAU ACU GAC CUA AAC UAG-3'
阴性对照	正向: 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3'
	反向: 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3'

2.3.3 特异性 SiRNA 干扰 Cx26 基因后对自杀基因系统联合六味地黄丸含药血清杀伤 B16 细胞作用的影响 将转染 Cx26-2098、阴性对照 SiRNA 后的 B16 细胞, 未转染的 SiRNA 的 B16 细胞分别与 B16/tk 混合成 20% B16/tk 细胞悬液, 制成 2×10^4 个/mL, 接种 96 孔板, 每孔加细胞悬液 100 μL (2×10^3 个/孔), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5.0% CO_2 培养箱培养 24 h 后换新鲜的无血清培养基, 设对照血清组、低剂量组、中剂量组、高剂量组、对照血清联合 GCV (20 $\mu\text{mol/L}$) 组, 低剂量组联合 GCV 组, 中剂量组联合 GCV 组、高剂量组联合 GCV 组。96 孔板置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5.0% CO_2 培养箱内培养 48 h 后, 采用 MTT 法检测, 并计算抑制率。

2.4 GA 对自杀基因系统联合六味地黄丸含药血清杀伤 B16 细胞作用的影响 常规消化 B16、B16/tk 细胞, 计数并制成密度为 2×10^4 个/mL 的细胞悬液, 按 B16/tk 占总细胞数的 20% 比例混合 B16 与 B16/tk 细胞, 分别接种 96 孔板, 每孔加细胞悬液 100 μL (2×10^3 个/孔), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5.0% CO_2 培养箱培养 24 h 换新鲜的无血清培养基, 设对照血清组、低剂量组、中剂量组、高剂量组、对照血清联合 GCV 组、低剂量联合 GCV 组、中剂量联合 GCV 组、高剂量联合 GCV 组、对照血清联合 GCV 加 GA 组、低剂量联合 GCV 加 GA 组、中剂量联合 GCV 加 GA 组、高剂量联合 GCV 加 GA 组。GCV 的终浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$, GA 终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$, 每组设 6 个复孔。按照上述分组添加相应的血清与药物每孔培养液总体积 200 μL , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5.0% CO_2 培养箱培养 48 h 后 MTT 检测杀伤效应。

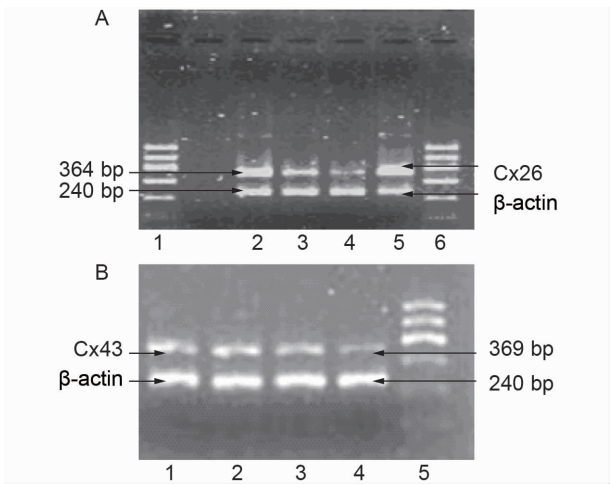
2.5 统计学方法 数据统计采用 SPSS 13.0 软件处理, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间实验数据的比较采用单因素方差分析, 等级资料采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 六味地黄丸含药血清对 B16 细胞 Cx26 和 Cx43 mRNA 表达的影响

1.1 RT-PCR 法检测 Cx26 mRNA 的表达结果 (图 1A,表 2) 与对照血清组比较,低、中剂量组的产物条带较弱,高剂量组较强。经 Image pro-plus 5.1 软件对各条带的光密度值进行分析,计算 Cx26 mRNA 的相对表达量,提示低剂量组对恶性黑色素瘤细胞 Cx26 mRNA 的表达具有抑制作用,高剂量组对恶性黑色素瘤细胞的 Cx26 mRNA 的表达具有促进作用。

1.2 RT-PCR 法检测 Cx43 mRNA 的表达结果 (图 1B,表 2) 可见低、中、高剂量组的产物条带随含药血清浓度的增加依次增亮,对照血清组产物条带很弱。经 Image pro-plus 5.1 软件分析计算 Cx43 mRNA 的相对表达量,表明六味地黄丸含药血清对恶性黑色素瘤细胞 Cx43 mRNA 的表达具有促进作用,且具有量效依赖关系。



注:A 为 Cx26; 1、6:Marker;2:对照血清组;3:低剂量组;4:中剂量组;5:高剂量组;B 为 Cx43;1:高剂量组;2:中剂量组;3:低剂量组;4:对照血清组;5:Marker

图 1 各组 B16 细胞 Cx26、Cx43 mRNA 表达电泳图

表 2 六味地黄丸含药血清对 B16 细胞 Cx26、Cx43 mRNA 表达的影响

组别	Cx26 mRNA			Cx43 mRNA		
	β-actin 相对量	Cx26 相对量	Cx26/ β-actin	β-actin 相对量	Cx43 相对量	Cx43/ β-actin
对照血清	1	1	1	1	1	1
低剂量	0.96	0.68	0.71	0.92	1.27	1.38
中剂量	0.92	0.42	0.46	0.89	1.49	1.67
高剂量	0.86	0.91	1.06	0.92	1.47	1.81

2 六味地黄丸含药血清对 B16 细胞 Cx26 和 Cx43 蛋白表达的影响

2.1 间接免疫荧光检测 Cx26 蛋白的表达(图 2,表 3) 与对照血清组比较,低剂量组的荧光较弱,随含药血清浓度增加细胞绿色荧光强度依次增强。低剂量组荧光显著弱于对照血清组,差异有统计学意义($P < 0.01$),高剂量组荧光强于对照血清组($P < 0.01$)。

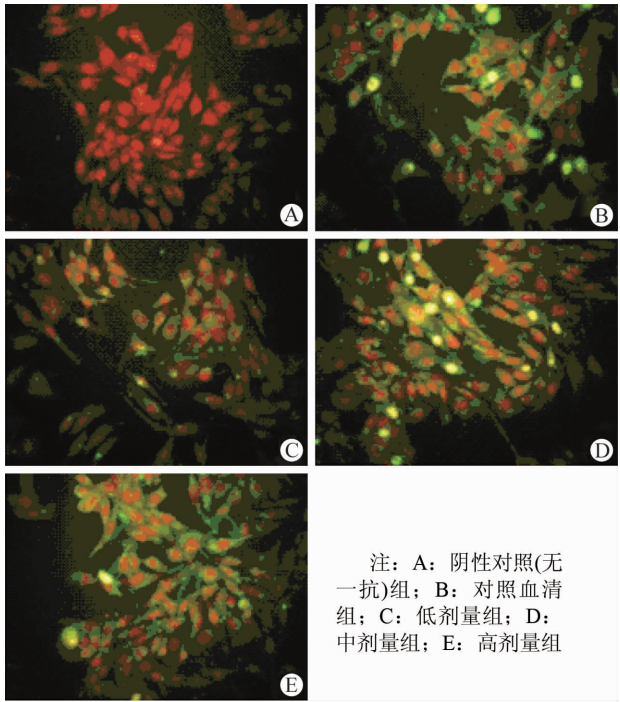


图 2 六味地黄丸含药血清对 B16 细胞 Cx26 蛋白表达的影响 (FITC-PI 染色, ×400)

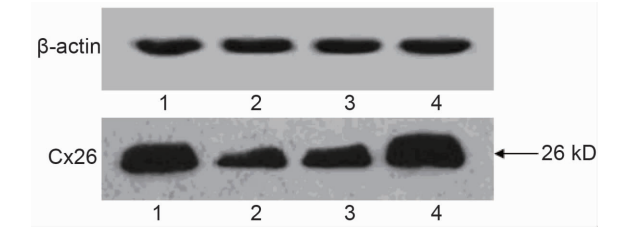
表 3 各组 B16 细胞 Cx26 荧光强度评分比较

组别	n	+	++	+++	++++	平均秩和值
对照血清	15	0	3	10	2	37.20
低剂量	15	11	4	0	0	9.20 *
中剂量	15	0	6	9	0	30.60
高剂量	15	0	0	10	5	45.00 *

注:与对照血清组比较, * $P < 0.01$

2.2 Western blot 测定 Cx26 蛋白的表达 (图 3,表 4) 低、中、高剂量组的蛋白表达条带随六味地黄丸含药血清浓度的增加而变宽、密度增大,但低、中剂量组的蛋白条带的表达弱于对照血清组。经 Image pro-plus 5.1 软件对各条带的灰度进行分析计算 Cx26 蛋白的相对表达量,提示低剂量组对恶性黑色素瘤细胞 Cx26 蛋白的表达具有抑制作用,而高剂量组能提高恶性黑色素瘤细胞 Cx26 蛋白水平的表达。

2.3 间接免疫荧光检测 Cx43 荧光强度表达 (图 4,表 5) 对照血清组,低、中、高剂量组细胞绿色荧光强度依次增强,与对照血清组比较,各剂量组的荧光强度增强,差异有统计学意义($P < 0.01$),且荧光强度随六味地黄丸含药血清浓度的增加而增强。

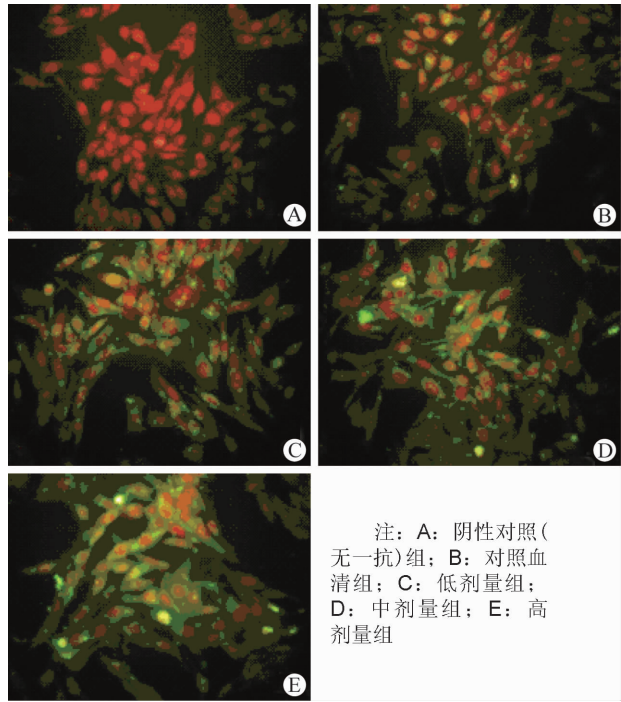


注:1:对照血清组;2:低剂量组;3:中剂量组;4:高剂量组

图 3 各组 B16 细胞 Cx26 表达蛋白印迹图

表 4 六味地黄丸含药血清对 B16 细胞 Cx26 蛋白表达的影响

组别	β-actin 相对量	Cx26 相对量	Cx26/β-actin
对照血清	1	1	1
低剂量	0.89	0.63	0.71
中剂量	1.00	0.66	0.66
高剂量	0.92	1.18	1.28



注: A: 阴性对照(无一抗)组; B: 对照血清组; C: 低剂量组; D: 中剂量组; E: 高剂量组

图 4 六味地黄丸含药血清对 B16 细胞 Cx43 蛋白表达的影响 (FITC-PI 染色, ×400)

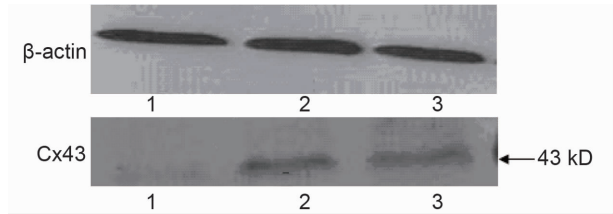
表 5 各组 B16 细胞 Cx43 荧光强度表达评分比较

组别	n	+	++	+++	++++	平均秩和值
对照血清	15	12	3	0	0	11.30
低剂量	15	3	10	2	0	23.93 *
中剂量	15	0	3	11	1	41.80 *
高剂量	15	0	2	10	3	44.97 *

注:与对照血清组比较, *P<0.01

2.4 Western blot 测定 B16 细胞 Cx43 蛋白表

达(图 5,表 6) 蛋白表达条带随六味地黄丸含药血清浓度的增加而变宽、密度增大,对照血清组蛋白表达条带较弱。经 Image pro-plus 5.1 软件分析,计算 Cx43 蛋白的相对表达量,表明六味地黄丸含药血清能提高恶性黑色素瘤细胞 Cx43 蛋白的表达,且表达量随六味地黄丸含药血清的浓度增加而增多。



注:1:对照血清组;2:中剂量组;3:高剂量组

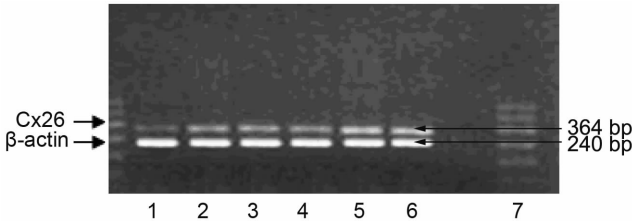
图 5 各组 B16 细胞 Cx43 蛋白表达印迹图

表 6 六味地黄丸含药血清对 B16 细胞 Cx43 蛋白表达的影响

组别	β-actin 相对量	Cx43 相对量	Cx43/β-actin
对照血清	1	1	1
中剂量	0.80	1.32	1.65
高剂量	0.79	1.65	2.09

3 SiRNA 干扰 Cx26 表达后对自杀基因系统联合六味地黄丸含药血清杀伤 B16 细胞作用的影响

3.1 RT-PCR 检测 SiRNA 干扰效率脂质体转染 SiRNA 48 h 后提取总 RNA,RT-PCR 检测其针对 Cx26 的干扰效率(图 6) 与未转染 SiRNA 比较,NC-SiRNA 条带没有变化,Cx26 - 309、Cx26 - 337、Cx26 - 367、Cx26 - 2098 Cx26 mRNA 表达有一定的减少,其中 Cx26 - 2098 减少最为明显。



注:1:Cx26 - 2098;2:Cx26 - 367;3:Cx26 - 337;4:Cx26 - 309;5:NC-SiRNA;6:阴性对照(B16);7:Marker

图 6 SiRNA 干扰后 Cx26 mRNA 表达电泳图

3.2 SiRNA 干扰 Cx26 表达后六味地黄丸含药血清联合 tk/GCV 系统对 B16 细胞杀伤作用的影响(表 7) 转染 Cx26 - 2098 SiRNA 后不同浓度的六味地黄丸含药血清联合 tk/GCV 对 B16 细胞的抑制率与转染阴性对照 SiRNA 后六味地黄丸含药血清联合 tk/GCV

时抑制率比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 7 SiRNA 干扰 Cx26 表达后各组 B16 细胞抑制率比较 (%, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	抑制率		
		未转染 SiRNA	NC-SiRNA	Cx26-2098
对照血清	6	0.00±2.50	0.00±0.85	0.00±1.22
低剂量	6	-1.87±0.92	-0.11±0.93	0.20±2.10
中剂量	6	-2.96±1.25	0.20±1.77	-0.36±0.98
高剂量	6	-3.64±1.71	0.67±0.62	-0.84±1.28
对照血清联合 GCV	6	32.43±1.24*	48.06±1.67*	47.96±1.42*
低剂量联合 GCV	6	46.70±1.57*	56.16±0.97*	54.48±0.85*
中剂量联合 GCV	6	53.44±1.27*	59.89±1.02*	60.25±0.61*
高剂量联合 GCV	6	58.75±0.96*	64.11±2.46*	65.40±0.80*

注:与对照血清组比较,* $P<0.01$

4 GA 阻断后不同浓度六味地黄丸含药血清联合 tk/GCV 系统对 B16 抑制率影响比较(表 8) 培养 48 h 后,对照血清组,低、中、高剂量组细胞增殖旺盛,细胞密度高,低、中、高剂量联合 GCV 组,大部分细胞脱落、变圆或成碎片状,贴壁细胞数目很少,中剂量联合 GCV 组与高剂量联合 GCV 组细胞死亡最为明显,在低、中、高剂量联合 GCV 加 GA 组基础上,上述的杀伤现象有所改善,存活细胞增多。低、中、高剂量联合 GCV(20 $\mu\text{mol/L}$)加 GA(50 $\mu\text{mol/L}$)组阻断后细胞抑制率分别与 GA 阻断前比较,差异均有统计学意义($P<0.01$)。

表 8 GA 阻断后不同浓度六味地黄丸含药血清联合 tk/GCV 系统对 B16 抑制率影响比较 (%, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	抑制率(%)
对照血清	6	0.00±2.06
低剂量	6	-0.04±3.15
中剂量	6	0.83±3.57
高剂量	6	2.85±2.15
对照血清联合 GCV	6	38.16±2.95
低剂量联合 GCV	6	48.75±2.30
中剂量联合 GCV	6	59.39±3.07
高剂量联合 GCV	6	69.28±2.80
对照血清联合 GCV 加 GA	6	17.59±2.64*
低剂量联合 GCV 加 GA	6	29.14±3.71*
中剂量联合 GCV 加 GA	6	38.71±1.89*
高剂量联合 GCV 加 GA	6	58.13±2.75*

注:与 GA 阻断前的对应组比较,* $P<0.01$

讨 论

自杀基因是指在一定条件下,可以引起细胞自动死亡的基因。HSV-tk/GCV 为目前研究最深入、最具有应用前景的肿瘤自杀基因治疗系统之一。HSV-tk

基因在肿瘤细胞内表达胸苷激酶,可催化核苷类似物,如丙氧鸟苷(GCV)等形成单磷酸化产物,并在细胞内磷酸激酶作用下形成三磷酸产物,干扰细胞分裂时 DNA 复制及蛋白质合成,从而导致细胞死亡^[4]。

自杀基因治疗中一个显著的优势即存在旁观者效应。所谓旁观者效应即为导入自杀基因的细胞不仅自身被杀死,其邻近未导入自杀基因的细胞也被杀死

的现象,而缝隙连接机制是旁观者效应的主要机制之一。GJ 是位于两细胞之间,含有通道的膜蛋白质成分,可非选择性通过小分子物质,但不允许蛋白和核酸大分子通过。GCV 的磷酸化产物不能自由通过细胞膜,但可通过 GJ 从 tk⁺细胞进入 tk⁻细胞,介导旁观者效应,故 GJIC 在自杀基因疗法效应中起关键作用。但学者们对许多肿瘤检测发现:(1)多数肿瘤细胞无 GJIC;(2)少数肿瘤细胞有脆弱的 GJIC,但是容易受到破坏,其间隙连接数量少;(3)少数肿瘤细胞有 GJIC,但是比正常细胞低,其间隙连接的数量也少。不但肿瘤细胞间隙连接少或无,而且两种类型的间隙连接即同型间隙连接(正常细胞之间或肿瘤细胞之间)和异型间隙连接(肿瘤细胞与周围正常细胞间)均减少或消失。构成 GJ 的物质是 Cx,无论是体外培养的肿瘤细胞还是肿瘤组织中,均发现 Cx 基因表达的异常^[5-7]。由于肿瘤 GJIC 功能的抑制和缺陷使自杀基因疗法的旁观者效应明显减弱,从而影响自杀基因治疗的疗效,因此改善和恢复细胞 GJIC 功能将对肿瘤的自杀基因治疗发挥十分重要的作用。不同的连接蛋白在不同的组织中发挥不同的作用,即 Cx 基因的组织特异性。在皮肤疾病与黑色素瘤细胞中研究最多的有 Cx26 和 Cx43。

在前一实验我们得出六味地黄丸对恶性黑色素瘤细胞自杀基因治疗具有协同增效作用,其协同作用可能源于旁观者效应。同时研究还发现六味地黄丸能促进 B16 细胞 GJIC 功能,而 GJ 机制为旁观者效应的主要机制之一^[1-3]。我们推测六味地黄丸能通过提高 GJIC 而达到协同增效。本实验采用 Western blot 和间接免疫荧光以及 RT-PCR 法检测 B16 细胞中 Cx26 和 Cx43 两种 Cx 的蛋白表达与相应基因 mRNA 表达,观察六味地黄丸含药血清对小鼠恶性黑色素瘤细胞中 Cx26 和 Cx43 表达的影响,结果提示六味地黄丸能提高 Cx43 mRNA 与蛋白的表达,且提高程度与六味含药血清呈量效依赖关系;对于 Cx26,若单看六味地黄丸含药血清组,10.0%含药血清组>5.0%含药血清组>2.5%含药血清组,说明六味地黄丸含药血清能够提高 B16 细胞 Cx26 mRNA 与蛋白

的表达。

六味地黄丸能提高肿瘤细胞 Cx 表达及 CJIC, 从一个方面提示六味地黄丸对肿瘤自杀基因治疗的增效作用与“缝隙连接机制”有关; 为了更进一步地论证六味地黄丸对肿瘤自杀基因治疗的增效作用与“缝隙连接机制”, 我们还研究了采用 RNA 干扰技术干扰 Cx 表达及 GJIC 功能阻断剂 GA 阻断 GJIC 功能, 对六味地黄丸肿瘤自杀基因治疗增效作用的影响。

RNA 干扰 (RNAi) 是由双链 RNA 引发的, 能够序列特异性诱导同源基因转录后沉默的现象, 这一现象广泛存在于自然界各级生物体当中, 是生物体清除病毒等外源性核酸或突变及异常表达内源性基因的一种自我保护机制。RNAi 是由外源或转基因、病毒感染等方式引入 dsRNA, 在细胞内被 RNA 酶 Dicer, 以 ATP 依赖的方式切割为 21 ~ 23 核苷酸的 3' 端有 2 个 nt 突出的小分子干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) [8-10], siRNA 同核酸酶结合而形成 RNA 诱导基因沉默复合物 (RNAs introduced-silencing complex, RISC)。RISC 在 ATP 的作用下由含双链 siRNA 的形式变为含单链 siRNA 的活化形式, 与同源靶基因表达的 mRNA 特异性结合, 在结合处 3' 端的 12 个 bp 处切割 mRNA, 诱发 mRNA 降解, 从而在 RNA 水平抑制靶基因的表达 [11]。在本实验发现六味血清对 Cx26 的影响较大, 故选择 Cx26 基因为靶基因对其进行干扰, 用干扰 Cx26 基因后的细胞进行联合杀伤实验, 观察发现干扰 Cx26 基因以后, 六味地黄丸含药血清联合 HSV-tk/GCV 系统的旁观者效应并没有明显降低。考虑到 Cx 是一个有 10 多种类型的蛋白家族, 当 Cx26 基因沉默后可能有其他的蛋白进行补偿, 仅仅干扰 Cx26 基因可能对 GJIC 影响不大。基于此, 本研究又对其通道的功能进行了阻断。已有许多研究表明, GA 为 GJ 的长效抑制剂。GA 能使连接蛋白发生去磷酸化, 使连接蛋白非磷酸化增多, 去组装, 引起蛋白构象改变, 使 Cx 磷酸化形式水平降低, 非磷酸化形式水平增加, 导致 GJ 数目减少。为了进一步观察六味地黄丸含药血清对 tk/GCV 系统治疗增效的作用机制, 在系统中加入了 GA (终浓度 50 $\mu\text{mol/L}$), MTT 法检测 B16 细胞生长的抑制率。结果显示, GA 对六味地黄丸含药血清/tk/GCV 三联系统的 B16 细胞杀伤效应有明显的抑制作用, 提示 GA 对该三联系统的旁观者效应具有下调作用。进一

步提示六味地黄丸含药血清对 tk/GCV 系统旁观者效应的增效作用机制可能与 GJIC 有关。

参 考 文 献

- [1] 杜标炎, 袁静, 谭宇蕙, 等. 六味地黄丸对自杀基因系统治疗黑色素瘤的增效作用[J]. 广州中医药大学学报, 2006, 23(5): 397-402.
- [2] 易华, 郭玉荣, 杜标炎, 等. 六味地黄丸增强黑色素瘤自杀基因系统旁观者效应的体外研究[J]. 广州中医药大学学报, 2010, 27(5): 498-502.
- [3] 杜标炎, 张小贺, 谭宇蕙, 等. 六味地黄丸含药血清调控黑色素瘤 B16 细胞株缝隙连接蛋白表达的作用[J]. 广州中医药大学学报, 2009, 26(2): 152-156.
- [4] 曹锐峰, 刘芳娥. 恶性肿瘤自杀基因疗法研究现状及展望[J]. 实用肿瘤杂志, 2002, 17(5): 75-78.
- [5] McLachlan E, Shao Q, Laird DW. Connexins and gap junctions in mammary gland development and breast cancer progression[J]. J Membr Biol, 2007, 218(1-3): 107-121.
- [6] Wu J, Zhou HF, Wang CH, et al. Decreased expression of Cx32 and Cx43 and their function of gap junction intercellular communication in gastric cancer[J]. Chin J Oncol, 2007, 29(10): 742-747.
- [7] Lee JR, Derosa AM, White TW. Connexin mutations causing skin disease and deafness increase hemi-channel activity and cell death when expressed in *Xenopus* oocytes[J]. J Invest Dermatol, 2009, 129(4): 870-878.
- [8] Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference[J]. Nature, 2001, 409(6818): 363-366.
- [9] Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs[J]. Gene Dev, 2001, 15(2): 188-200.
- [10] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells[J]. Nature, 2001, 411(6836): 494-498.
- [11] Hammond SM, Bernstein E, Beach D, et al. An RNA-directed nuclease mediates post transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells[J]. Nature, 2000, 404(6775): 293-296.

(收稿: 2012-05-18 修回: 2013-03-10)