

消癌解毒方对 H₂₂ 瘤荷小鼠 miRNAs 表达谱的影响

邱雯莉 陈海彬 姜泽群 周红光

摘要 目的 通过对 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤组织微小核糖核酸(miRNAs)表达谱的检测,探讨消癌解毒方抗肝癌的作用机制。**方法** 将 50 只 H₂₂ 荷瘤小鼠随机分为模型组、消癌解毒方低剂量组、中剂量组、高剂量组和顺铂组,每组 10 只。应用病理组织学技术,检测各组 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤组织光镜下的差异表现。应用 miRNA 芯片技术,检测各组 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤组织差异表达 miRNAs。应用统计学方法分析,找出与消癌解毒方作用机制相关的差异 miRNAs。**结果** 病理组织学检查结果显示,随着消癌解毒方剂量的增加,病理学核分裂像减少,癌细胞减小,抗癌效果增强。根据 miRNA 芯片的分析结果,消癌解毒方对 H₂₂ 瘤荷小鼠肿瘤组织内一些特异 miRNAs 如 miR-1298-5p、miR-874-3p、miR-721、miR-298-5p、miR-551b-5p、miR-346-5p、miR-105 表达显著上调;miR-24-3p、miR-3963、miR-127-3p、miR-434-5p、miR-1187、miR-468-3p、miR-221-5p、miR-6695-5p 表达显著下调。**结论** 消癌解毒方可能通过调控多种 miRNAs 的表达来发挥其抗肿瘤的作用。

关键词 消癌解毒方;H₂₂ 荷瘤小鼠;微小核糖核酸

Effect of Xiaoi Jiedu Recipe on miRNA Expression Profiles in H₂₂ Tumor-bearing Mice QIU Wen-li, CHEN Hai-bin, JIANG Ze-qun, and ZHOU Hong-guang Chinese Medicine Collaborative Innovation Center for Tumor Prevention and Treatment, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing (210023)

ABSTRACT Objective To observe the mechanism of Xiaoi Jiedu Recipe (XJR) for fighting against hepatoma by detecting tumor miRNAs expression profiles in H₂₂ tumor-bearing mice. **Methods** Totally 50 H₂₂ tumor-bearing mice were randomly divided into the model group, the low dose XJR group, the medium dose XJR group, the high dose XJR group, the Cisplatin group, 10 in each group. Different expressions of tumor tissues in H₂₂ tumor-bearing mice under light microscope were detected using histopathological technique. Differentially expressed miRNAs of tumor tissue in H₂₂ tumor-bearing mice were detected by using miRNA chip technique. Differentially expressed miRNAs associated with antitumor mechanism of XJR were found out by statistical analysis. **Results** Histopathological results showed that reduced pathologic mitosis, smaller cancer cells, and obviously enhanced anti-cancer effect along with increased XJP dose. Results of miRNA chip analyses indicated XJP could significantly up-regulate the expressions of miRNAs, such as miR-1298-5p, miR-874-3p, miR-721, miR-298-5p, miR-551b-5p, miR-346-5p, miR-105, and so on. It could also down-regulate the expressions of miR-24-3p, miR-3963, miR-127-3p, miR-434-5p, miR-1187, miR-468-3p, miR-221-5p, and miR-6695-5p. **Conclusion** XJP could fight against tumor possibly by regulating expressions of multiple miRNAs.

KEYWORDS Xiaoi Jiedu Recipe; H₂₂ tumor-bearing mouse; miRNA

肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一,其发展快,易转移,严重威胁患者的生活质量^[1]。我国著名国医大师

周仲瑛教授临证 60 余载,提出了“癌毒”的理论^[2]。消癌解毒方就是在“癌毒”理论指导下,经过长期临床实践总结的治疗恶性肿瘤有效的方剂。但该方具体的抗癌机制仍不清楚。本实验旨在通过研究消癌解毒方对 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤组织 miRNAs 表达的影响,探讨其可能的抗癌机制。

材料与方法

1 动物 清洁级 ICR 小鼠,共 52 只,购自上海

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81273717; 81473608; 81503535)

作者单位:南京中医药大学中医药防治肿瘤协同创新中心(南京 210023)

通讯作者:周红光, Tel: 13801586212, E-mail: zhouhong-guang2288@163.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2016. 09. 1112

斯莱克实验动物责任有限公司。雄性,体重(18 ± 2) g,实验动物使用许可证 SYXK (苏)2007-0030;实验动物生产许可证 SCXK (沪)2007-0005。 H_{22} 肝癌种鼠由南京市鼓楼医院动物房提供。

2 药物 消癌解毒处方由白花蛇舌草 20 g 太子参 15 g 僵蚕 10 g 山慈菇 10 g 蜈蚣 3 条 八月札 12 g 麦冬 12 g 组成,中药制剂购自安徽省亳州市中西药有限公司,由南京中医药大学药理教研室煎制,先用 10 倍于药量的水大火煮开,小火煨 2 h,取滤液。药渣加 8 倍水煮 1.5 h,取滤液,并将两次滤液混匀。浓缩成药量为 2 g/mL 的滤液,保存备用。顺铂注射液 (20 mg/支,南京制药厂有限公司,批号 20091118);注射用生理盐水 (南京小营药业集团有限公司,批号 2009090403)。

3 试剂和仪器 Trizol (美国 Invitrogen 公司);miRCURYTM Array Power Labeling kit (丹麦 Exiqon 公司);RNasey Mini Kit (德国 Qiagen 公司);Wash buffer kit (丹麦 Exiqon);NanoDrop ND-1000 (美国 Agilent 公司);Agilent 2100 Bioanalyzer (美国 Agilent 公司);Axon GenePix 4000B Microarray Scan (荷兰 Axon 公司)。

4 实验方法

4.1 造模及分组 抽取 H_{22} 肝癌种鼠腹水 0.4 mL 接种于 2 只 ICR 小鼠腹腔内进行传代 (0.2 mL/只),每隔 7 天左右再次传代 1 次,用于连续实验。颈椎脱臼法处死种鼠,用碘酒、酒精消毒腹部,在无菌操作下,抽取种鼠腹水 5 mL,生理盐水洗涤 3 次,收集细胞,并稀释成 2×10^6 /mL 的细胞悬液。75% 酒精消毒小鼠右腋皮肤,按每鼠 0.2 mL (2×10^6 /mL) 瘤细胞悬液接种于小鼠右腋下。轻旋出针,无菌棉球按压 1 min,避免种液渗出,制成局灶型肿瘤细胞模型^[3]。并将小鼠随机分为 5 组,每组 10 只,即模型组,消癌解毒方低、中、高剂量组 (简称低、中、高剂量组),顺铂组。

4.2 给药方法 用量按人与小鼠体表面积等效剂量换算 (药物剂量换算按照人与小鼠每公斤体重用量 1:9 换算)^[3],以临床治疗量为实验低剂量,按 1:3:9 浓度给予消癌解毒方低、中、高剂量组和造模组 (生理盐水) 等容灌胃。根据浓缩药物换算 ($82 \text{ g}/70 \text{ kg} \times 9$),低剂量组为 10 g/(kg · d),中剂量组为 30 g/(kg · d),高剂量组为 90 g/(kg · d)。而小鼠顺铂最大耐受剂量为 9 mg/kg,腹腔注射 3.0 ~ 4.0 mg/kg 连续 5 天就可以引起明显的毒性反应,而 2 mg/kg 连续 5 天则对肾脏损害不明显^[4]。

故顺铂组腹腔注射通过预实验后确定为按 0.001 g/(kg · d) 给药。小鼠造模后第 2 天起每天给药 1 次,连续 10 天。各组动物禁食过夜,第 11 天断头处死小鼠,置冰碟上,快速剥离取下移植瘤组织,用无菌冰生理盐水清洗血污后,放入经 DEPC 水处理过的离心管中,置液氮罐中保存。

5 观察项目及检测方法

5.1 小鼠移植瘤组织病理组织学检查 取处死 H_{22} 小鼠移植瘤组织,将其用 10% 福尔马林固定,常规石蜡包埋,切片厚 4 ~ 5 μm ,HE 染色,光镜下观察消癌解毒方作用后 H_{22} 移植瘤细胞形态的变化,根据病变轻重程度,依次半定量为轻度坏死“+”,中度坏死“++”,重度坏死“+++”,无坏死组织标记为“-”。

5.2 miRNA 芯片表达

5.2.1 总 RNA 提取和质量控制 取各组肿瘤组织研磨,每 100 mg 组织中加入 1 mL Trizol,用匀浆仪进行匀浆处理,将匀浆样品在室温 (15 ~ 30 $^{\circ}\text{C}$) 放置 5 min,使核酸蛋白复合物完全分离,每 1 mL Trizol 加入 0.2 mL 氯仿抽提,离心,加异丙醇沉淀,用 75% 乙醇洗涤后再离心。使用 Trizol 法提取 RNA 后,用 RNasey Mini Kit 纯化样品。使用 NanoDrop ND-1000 测定 RNA 在 260、280、230 nm 的吸收值,测量纯化后的 RNA 浓度,电泳检测 RNA 完整性。

5.2.2 RNA 标记 抽提的 RNA 通过质检后,根据 Exiqon 提供的方法,使用 miRCURYTM Array Power Labeling kit (Cat #208032-A) 对 miRNAs 进行标记。

5.2.3 芯片杂交 标记完成后,根据 Exiqon 提供的方法,将样品与 miRCURYTMLNA Array (v. 18.0) 芯片在杂交盒中 56 $^{\circ}\text{C}$ 下杂交 16 ~ 20 h,杂交完成后使用 Wash buffer kit 清洗芯片。

5.2.4 图像扫描及数据采集 使用 Axon GenePix 4000B 芯片扫描仪扫描芯片,使用 GenePix Pro 6.0 读取芯片扫描图像,将其转为数字信号后提取探针的信号值。相同的探针取中值合并。保留在所有样品中均 ≥ 30.0 的探针,对全部芯片进行中值标准化,标准化的数据用 MEV 软件进行分层聚类,筛选差异表达探针。

5.2.5 差异表达分析 使用 Fold change 和 P 值筛选两组样品间 (有重复) 的差异表达 miRNA。

5.3 统计学方法 采用 Significance Analysis of Microarrays (SAM, version 2.1) 统计学软件挑选差异表达的 miRNAs,采用 Cluster 3.0 对差异表

达的 miRNAs 进行聚类分析。采用 pass volcano plot 软件,采用 t 检验,以 miRNAs 的相对表达量上调或下调 1.5 倍, $P < 0.05$ 为标准,挑选出显著差异表达的 miRNAs。

结 果

1 消癌解毒方对 H₂₂ 移植瘤细胞形态的影响 (图 1) 模型组 7 例肿瘤结节较大,癌细胞呈团分布,癌细胞排列不规则,形状多样,大小不一,异型性明显,体积大,胞浆丰富,可见较多的核分裂像;并可见轻度坏死。低剂量组 2 例异型性明显,癌细胞小,可见较少的核分裂像;并可见重度坏死。中剂量组 2 例异型性明显,癌细胞小,可见较少的核分裂像;并可见重度坏死。高剂量组 4 例异型性明显,癌细胞小,可见较少的核分裂像;并可见重度坏死。顺铂组 8 例肿瘤结节较大,癌细胞呈团分布,癌细胞排列不规则,癌细胞形状多样,大小不一,异型性明显,体积大,可见较多的核分裂像;并可见中度坏死。

2 RNA 抽提结果 抽提的 RNA 用分光光度计检测 A_{260}/A_{280} 的比值范围均为 1.8 ~ 2.1,接近 2.0, A_{260}/A_{280} 比值 > 1.8 (miRNA 的纯度高,完整性好)。

3 各组 miRNA 芯片扫描图结果 (图 2) 5 组 miRNA 检测扫描图上的点饱满圆润,背景均一,miRNA 点清晰可见,无 miRNA 漏点,点重叠以及不正常荧光的情况,符合数据分析的要求 (将荧光强度进行一系列的数据处理即可找出 2 个样品间的差异表达 miRNA)。

4 各组箱体图结果 (图 3) 所有样本基因芯片杂交数据成近似对

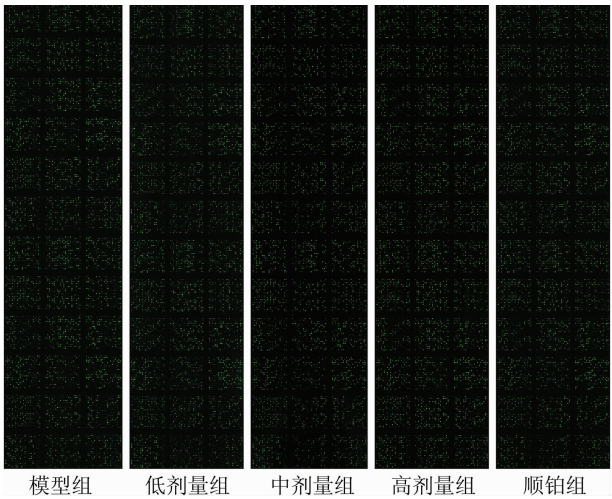
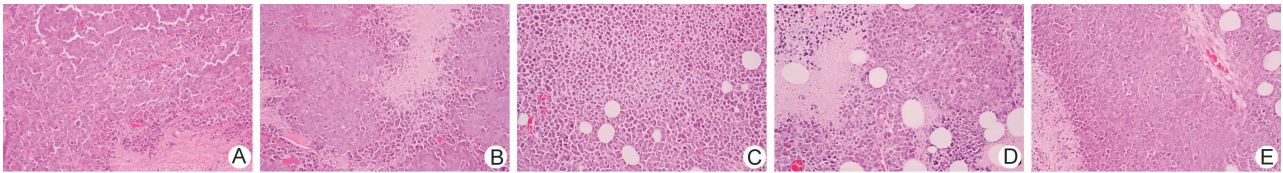
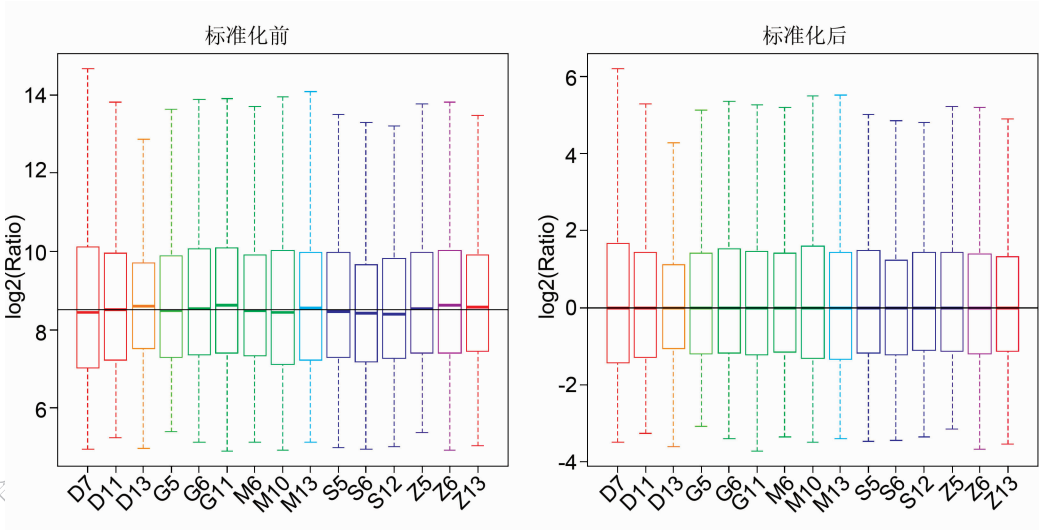


图 2 各组 miRNA 芯片扫描图



注:A 为模型组;B 为低剂量组;C 为中剂量组;D 为高剂量组;E 为顺铂组;箭头表示阳性结果
图 1 消癌解毒方对 H₂₂ 移植瘤细胞形态的影响 (HE, ×400)



注:D 为低剂量组;G 为高剂量组;M 为模型组;S 为顺铂组;Z 为中剂量组
图 3 各组箱体图

称性分布,信号分布技术是相同的,无明显差异,可用于进一步的数据分析。

5 各组散点图结果(图 4) 不同剂量用药组与模型组用软件进行对比分析后发现,相关系数接近 1,重复性好。

6 各组 miRNA 聚类图结果(图 5) 应用聚类分析方法,将 SAM 分析所得的差异 miRNA 数据导入 Cluster 3.0,得到聚类图(通过差异表达 miRNA 可以将不同剂量的消癌解毒方组及顺铂组与模型组区分开)。

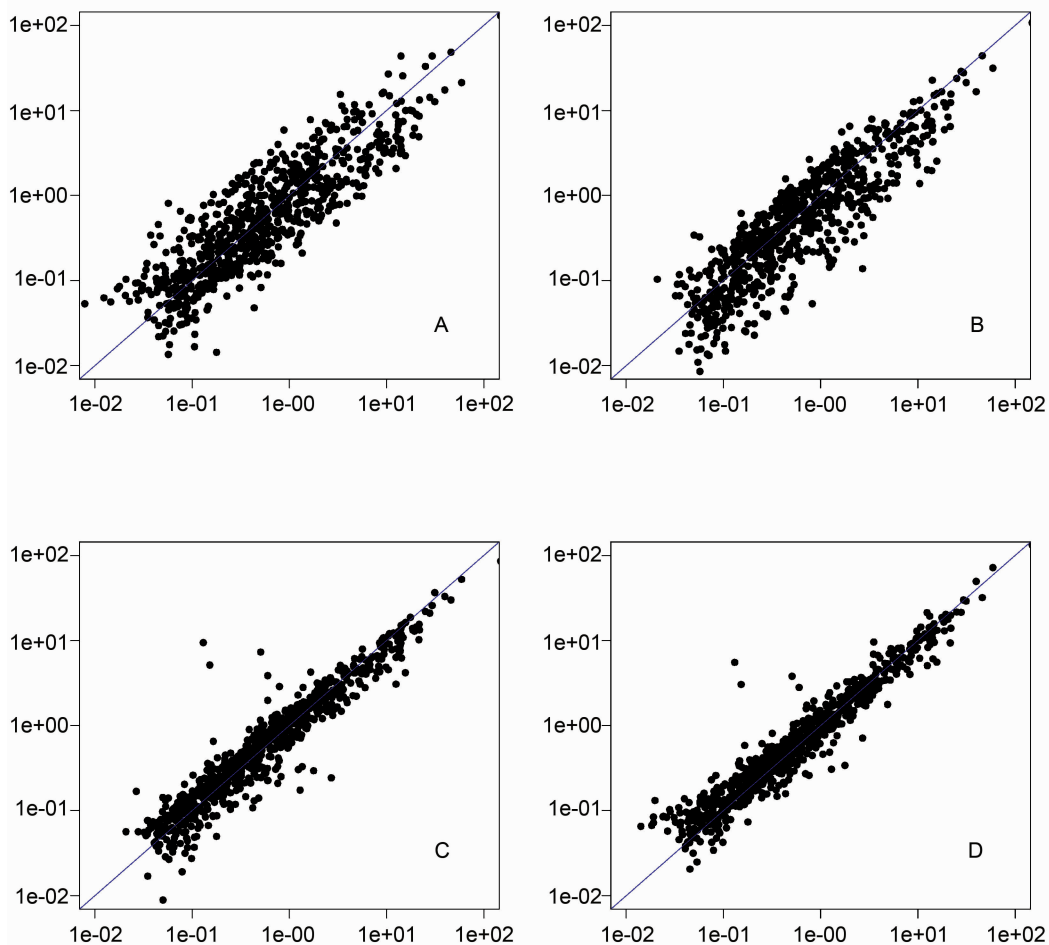
7 各组火山图结果(图 6) 即各组药物组与模型组差异 miRNAs 的 P 值和差异倍数(Fold change)联合分布情况(红色点代表 $\text{Fold change} \geq 1.5, P < 0.05$ 的 miRNAs)。

8 高剂量组与模型组差异表达 miRNAs 结果比较(表 1,2) 根据 pass volcano plot 软件分析结

果,根据 Fold change 和 P 值筛选两组样品间的差异表达 miRNAs(默认 $\text{Fold change} \geq 1.5, P < 0.05$ 为有统计学意义)上调 7 个,下调 8 个。

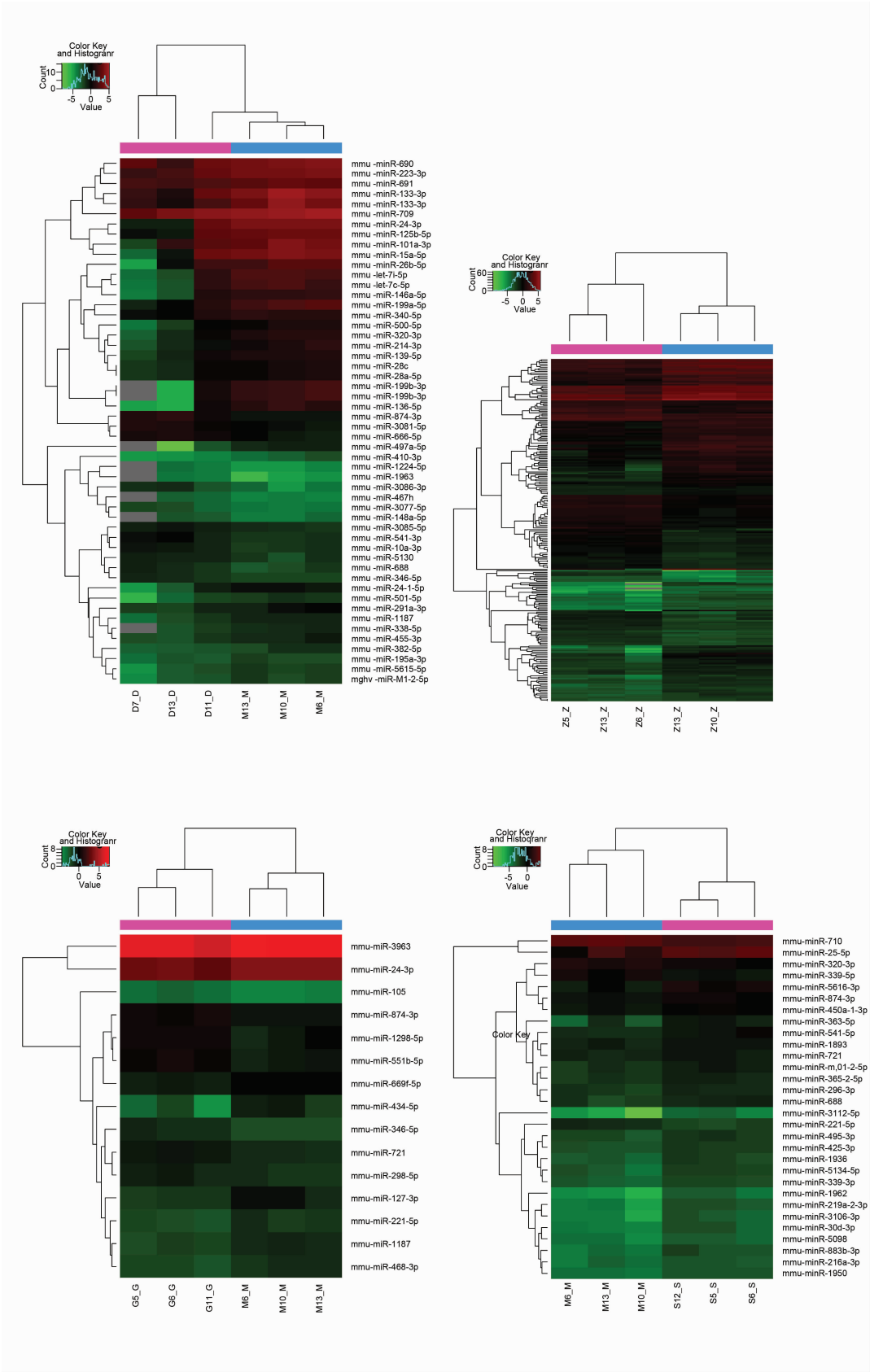
讨 论

肝癌是常见的恶性肿瘤,病死率在恶性肿瘤中排名第 2,随着治疗方案的不断更新和诊疗手段的不断提高,肝癌患者的疗效日益显著,但其生存率并未明显提高^[5]。探索预防和治疗的有效方案,成为当代抗肿瘤的迫切任务。我国著名中医学家、国医大师周仲瑛教授认为癌病为患,必夹毒伤人,具有难治性,从而提出了“癌毒”学说。癌毒的存在是恶性肿瘤的先决条件也是肿瘤所特有的,它是恶性肿瘤不同于其他疾病的根本所在。癌毒及其产物随血液、淋巴流窜走注,并与气痰瘀热等结合在一起,形成肿块。癌毒是导致



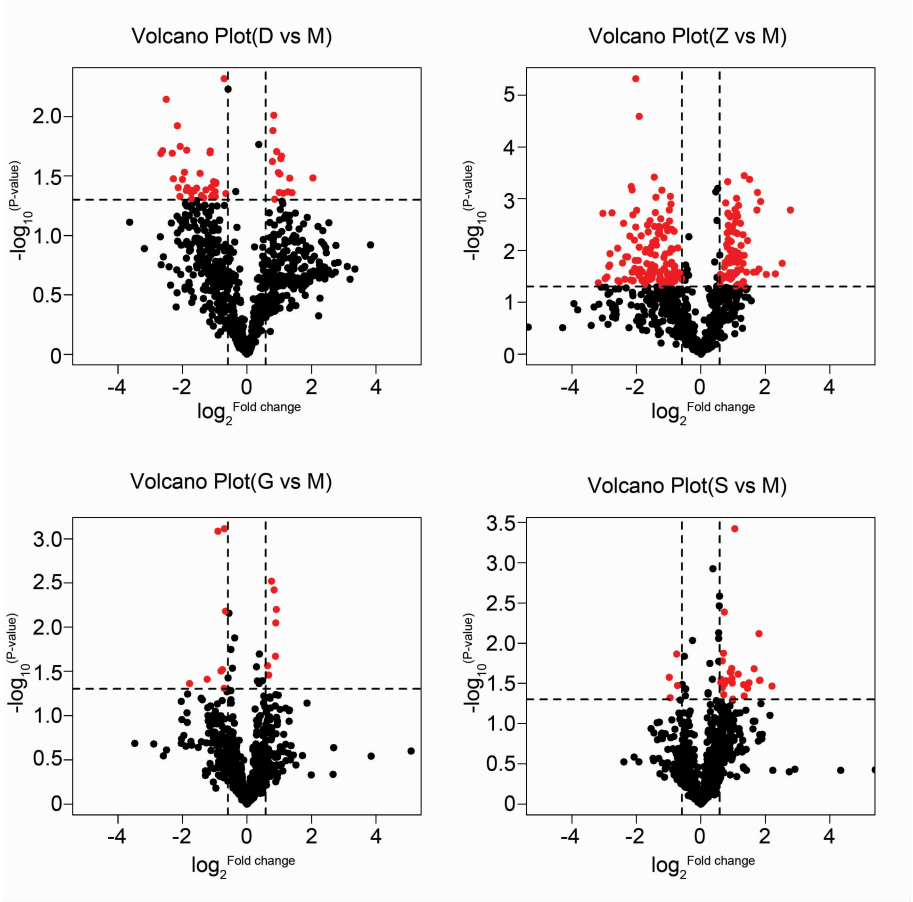
注:A 为消癌解毒方低剂量组与模型组比较;B 为消癌解毒方中剂量组与模型组比较;C 为消癌解毒方高剂量组与模型组比较;D 为顺铂组与模型组比较

图 4 各组散点图结果



注:M 为模型组, D 为低剂量组, Z 为中剂量组, G 为高剂量组, S 为顺铂组; 红色为高相对表达量, 绿色为低相对表达量, 灰色为缺失值

图 5 各组 miRNA 聚类图结果



注:M 为模型组; D 为低剂量组; Z 为中剂量组; G 为高剂量组; S 为顺铂组

图 6 各组火山图结果

表 1 高剂量与模型组差异表达 1.5 倍上调的 miRNAs			
ID	miRNA	差异倍数	P 值
46381	miR-1298-5p	1.847 00	0.021 35
42808	miR-874-3p	1.789 27	0.003 80
16681	miR-721	1.689 33	0.003 01
27572	miR-298-5p	1.598 82	0.034 69
148608	miR-551b-5p	1.874 29	0.006 34
42604	miR-346-5p	1.853 57	0.008 94
42851	miR-105	1.556 55	0.002 72

表 2 高剂量与模型组差异表达 1.5 倍下调的 miRNAs			
ID	miRNA	差异倍数	P 值
17506	miR-24-3p	0.632 95	0.006 60
169105	miR-3963	0.573 91	0.031 34
42829	miR-127-3p	0.424 90	0.038 94
11247	miR-434-5p	0.290 17	0.043 45
46310	miR-1187	0.534 46	0.000 83
11254	miR-468-3p	0.590 76	0.030 23
42475	miR-221-5p	0.613 40	0.049 22
148034	miR-669f-5p	0.616 54	0.000 77

肿瘤发生、发展以及加重的基础,消癌解毒应贯穿癌症治疗的始终^[6]。周仲瑛教授临症 60 余载,从“癌毒”

辨治恶性肿瘤中取得了明显的疗效。消癌解毒方是以“癌毒”理论为基础,总结出的有效抗癌验方^[7]。
miRNAs 是内源性约 21 ~ 25 nt 的非编码小 RNA,来源于体内 Pri-miRNAs 和 Pre-miRNAs。miRNAs 通过与靶标蛋白的 3'端非编码区(3'UTR)互补配对结合,从而在转录后水平调节基因表达。miRNAs 通过下调抑癌基因或者致癌基因的 mRNA 水平从而发挥致癌或者抑癌的生物学作用^[8]。miRNA 作为一类新型调节因子在肿瘤的发生和发展中起重要作用,有研究表明肝癌中存在异常表达的 miRNAs,在肿瘤的形成,转移^[9],细胞凋亡^[10],细胞周期^[11],血管生成^[12],细胞衰老^[13],物质代谢等方面起到重要作用。由于传统的药理研究很难深入全面讨论药物的作用机制,现代 miRNA 芯片技术,将药物与微观 miRNAs 联系在一起,能通过实验发现大量药物作用靶点,并且获得与药物作用机制相关的信息。通过 miRNA 芯片的现代技术手段,为阐明中药作用机制提供了一种新思路,有助于推进了中医学理论的现代化。随着分子生物学的进步,中药对

体内 miRNAs 的调控已经成为目前新的研究热点,为肿瘤的治疗提供了新思路。

本实验通过 miRNA 芯片^[14],筛选出消癌解毒方高剂量组与模型组共有 228 个差异表达的 miRNAs,其中 98 个表达升高,130 个表达降低。显著上调 1.5 倍以上且 $P < 0.05$ 的有 miR-1298-5p, miR-874-3p, miR-721, miR-298-5p, miR-551b-5p, miR-346-5p, miR-105。显著下调 1.5 倍以上且 $P < 0.05$ 的有 miR-24-3p, miR-3963, miR-127-3p, miR-434-5p, miR-1187, miR-468-3p, miR-221-5p, miR-669f-5p。说明消癌解毒方能调控 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤组织内一些特异 miRNAs 的表达。

综上所述,消癌解毒方对 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤组织内一些 miRNAs 有明显道的调控作用,可能是其抗肿瘤的机制之一。但消癌解毒方通过调控 miRNA 而对肝癌起治疗作用的明确靶点还有待深入研究。本课题组后期将对重点 miRNA 进行深入研究,明确消癌解毒方对相关 miRNA 及其靶基因的调节作用,寻找消癌解毒方抗肿瘤作用靶标。

参 考 文 献

- [1] Sun J, Huang H, Xiao GX, et al. Spatial distribution of liver cancer incidence in Shenqiu County, Henan Province, China: a spatial analysis[J]. Biomed Environ Sci, 2015, 28(3): 214–218.
- [2] Tyagi N, Tyagi M, Pachauri M, et al. Potential therapeutic applications of plant toxin-ricin in cancer: challenges and advances[J]. Tumor Biol, 2015, 36(11): 8239–8246.
- [3] 李黎,吴勉华. 消癌解毒方对 H₂₂ 荷瘤小鼠基因表达谱的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(9): 1232–1235.
- [4] 孙贵范,李革新,陆春伟,等. 顺铂肾毒性的实验研究[J]. 中国工业医学杂志, 2004, 17(3): 186–187.
- [5] Wang YX, De Baere T, Idee JM, et al. Transcatheter embolization therapy in liver cancer: an update of clinical evidences[J]. Chin J Cancer Res, 2015, 27(2): 96–121.
- [6] 韦艾凌,王书杰. 肝癌“湿热伏邪”——“癌毒”发病机制及疗法探讨[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(2): 266–269.
- [7] Liao YH, Lin CC, Lai HC, et al. Adjunctive traditional Chinese medicine therapy improves survival of liver cancer patients[J]. Liver Int, 2015, 32(12): 2595–2602.
- [8] Huang FY, Wong DK, Seto WK, et al. Estradiol induces apoptosis via activation of miRNA-23a and p53: implication for gender difference in liver cancer development [J]. Oncotarget, 2015, 6(33): 34941–34952.
- [9] Li JT, Jia LT, Liu NN, et al. miRNA-101 inhibits breast cancer growth and metastasis by targeting CX chemokine receptor 7[J]. Oncotarget, 2015, 6(31): 30818–30830.
- [10] Xu C, Zhang L, Li H, et al. miRNA-1469 promotes lung cancer cells apoptosis through targeting STAT5a[J]. Am J Cancer Res, 2015, 5(3): 1180–1189.
- [11] Maj M, Schneider G, Ratajczak J, et al. The cell cycle- and insulin-signaling-inhibiting miRNA expression pattern of very small embryonic-like stem cells contributes to their quiescent state [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2015, 240(8): 1107–1111.
- [12] Babae N, Bourajjaj M, Liu Y, et al. Systemic miRNA-7 delivery inhibits tumor angiogenesis and growth in murine xenograft glioblastoma[J]. Oncotarget, 2014, 5(16): 6687–6700.
- [13] Teteloshvili N, Kluiver J, van der Geest KS, et al. Age-associated differences in miRNA signatures are restricted to CD45RO negative T cells and are associated with changes in the cellular composition, activation and cellular ageing [J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0137556.
- [14] Wang WX, Wilfred BR, Hu Y, et al. Anti-Argonaute RIP-Chip shows that miRNA transfections alter global patterns of mRNA recruitment to micro-ribonucleoprotein complexes [J]. RNA, 2010, 16(2): 394–404.

(收稿:2015-11-09 修回:2016-05-28)