

健脾理气方对人胃癌移植瘤小鼠 TP、DPD 和 CYP3A4 基因表达的影响

黄 挺 杨雪飞 李 勇 张志娣 黄 伶 张建刚 张晓丽

摘要 **目的** 研究中药健脾理气方对人胃癌移植瘤小鼠 5-氟尿嘧啶(5-FU)相关代谢酶及多种化疗药的共同代谢酶细胞色素 P450 酶(CYP3A4)基因调控的影响。**方法** 将 80 只小鼠随机分为模型组、化疗组、中药组及化疗加中药组,每组 20 只。小鼠左腋窝皮下接种 MKN-8 肿瘤细胞悬液,复制人胃癌移植瘤小鼠模型。模型组和中药组于接种瘤株 2 天后分别给予生理盐水或健脾理气方 0.25 mL 灌胃,均每天 2 次,连续 10 天。化疗组和化疗加中药组于接种 2 天后分别给予生理盐水或健脾理气方 0.25 mL 灌胃,每天 2 次,连续 5 天;接种 7 天后给予 5-FU 20 mg/(kg·d)腹腔注射,每天 1 次,连续 5 天。采用 RT-PCR 法检测各组移植瘤组织胸腺嘧啶磷酸化酶(thymidine phosphorylase, TP)、双氢嘧啶脱氢酶(dihydropyrimidine dehydrogenase, DPD)和 CYP3A4 的 mRNA 表达。**结果** 与模型组及化疗组比较,中药组及化疗加中药组小鼠移植瘤组织中 TP、CYP3A4 mRNA 表达水平明显升高,DPD mRNA 表达水平明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。化疗加中药组与中药组 TP、DPD、CYP3A4 mRNA 表达水平比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 健脾理气方能够通过上调小鼠移植瘤组织中 TP、CYP3A4 的 mRNA 表达水平,同时抑制 DPD 的 mRNA 表达水平,从而促进 5-FU 在肿瘤组织中的活化以及抑制 5-FU 的分解失活,提高化疗疗效。

关键词 健脾理气方;人胃癌移植瘤;胸腺嘧啶磷酸化酶;双氢嘧啶脱氢酶;细胞色素 P450 酶;5-氟尿嘧啶

Effect of Jianpi Liqi Recipe on mRNA Expressions of TP, DPD, and CYP3A4 in Mice with Human Gastric Cancer Transplanted Tumor HUANG Ting, YANG Xue-fei, LI Yong, ZHANG Zhi-di, HUANG Ling, ZHANG Jian-gang, and ZHANG Xiao-li Department of Oncology, Hangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou (310007), China

ABSTRACT **Objective** To study the effect of Jianpi Liqi Recipe (JLR) on 5-fluorouracil (5-FU) relevant metabolic enzymes and CYP3A4 (the same enzyme of many chemotherapeutics) of mice with human gastric cancer transplanted tumor. **Methods** Totally 80 mice were randomly divided into the model group, the chemotherapy group, the JLR group, and the combination group (using chemotherapy combined JLR), 20 in each group. The human gastric cancer transplanted tumor mouse model was duplicated by hypodermic inoculating MKN-8 tumor cell suspension from the left armpit. Physiological saline or JLR was given to those in the model group or the JLR group at 0.25 mL each time, twice daily by gastrogavage from the 2nd day after transplantation. Mice in the chemotherapy group were given 0.25 mL physiological saline, twice daily by gastrogavage 2 days after transplantation, for 5 days in succession, and then they were peritoneal injected with 5-FU at the daily dose of 20 mg/kg, once daily for 5 days in succession from the 7th day of transplantation. Those in the combination were given 0.25 mL JLR, twice daily by gastrogavage, for 5 days in succession, and then they were peritoneal injected with 5-FU at the daily dose of 20 mg/kg, once daily for 5 days in succession from the 7th day of transplantation. The mRNA expressions of thymidine phosphorylase (TP), dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), and CYP3A4 were detected using RT-PCR. **Results** Compared with the model group and the chemotherapy group, mRNA expressions of TP and CYP3A4 obviously increased, mRNA expression of DPD obviously decreased in the JLR group and the combination group ($P < 0.01$). There was no statistical difference in

mRNA expressions of TP, DPD, and CYP3A4 between the JLR group and the combination group ($P > 0.05$). Conclusion JLR could promote the activation of 5-FU, suppress the decomposition and inactivation of 5-FU in the tumor tissue of mice, and improve the chemotherapeutic efficacy through up-regulating mRNA expressions of TP and CYP3A4, and suppressing the mRNA expression of DPD.

KEYWORDS Jianpi Liqi Recipe; human gastric cancer transplanted tumor; thymidine phosphorylase; dihydropyrimidine dehydrogenase; cytochrome P450; 5-fluorouracil

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,5-氟尿嘧啶(5-FU)是晚期胃癌化疗的经典药物。胸腺嘧啶磷酸化酶(thymidine phosphorylase, TP)、双氢嘧啶脱氢酶(dihydropyrimidine dehydrogenase, DPD)和细胞色素 P450 酶(CYP3A4)基因是体内参与 5-FU 代谢的重要酶类和表达基因,TP、DPD 和 CYP3A4 基因的表达直接影响肿瘤组织对 5-FU 的敏感程度和毒性反应^[1,2]。健脾理气方是于尔辛教授多年临床经验的结晶,在晚期恶性肿瘤尤其是肝癌的治疗中取得了良好的疗效^[3]。本实验通过建立人胃癌移植瘤小鼠模型,观察并探讨健脾理气方对人胃癌移植瘤小鼠 5-FU 相关代谢酶与 CYP3A4 基因调控的影响。

材料与方法

1 动物及瘤株 动物:80 只昆明种小鼠,雄性,清洁级,5 周龄,体重 18~20 g,购于浙江大学实验动物中心,动物合格证号:SCXK(浙)2008-0033,基础饲料喂养于浙江中医药大学实验动物中心。瘤株:胃腺癌细胞株(MKN-8)荷瘤小鼠,购自中国科学院细胞生物研究所。

2 药物 健脾理气方(于尔辛教授拟方):党参 30 g 白术 10 g 茯苓 15 g 八月札 30 g 六曲 15 g 生山楂 15 g 生薏苡仁 30 g 炒谷、麦芽各 15 g 枳壳 10 g 川朴 10 g 白花蛇舌草 30 g 广木香 10 g。以上中药饮片均采购自浙江中医药大学中药饮片厂,加适量水煮沸后,文火煎 15 min,取汁;滤渣再加适量水,煮沸后,文火煎 20 min,合 2 次药汁用双层消毒纱布过滤 2 次,取汁再浓缩,含生药 0.40 g/mL,贮于 4℃ 冰箱备用。5-FU 注射液:0.25 g/10 mL,天津金耀氨基酸有限公司,批号:H12020959。

3 试剂 Trizol 碱、Taq DNA 聚合酶、溴化乙锭溶液(10 mg/mL)、Superscript II 逆转录试剂盒:美国 GIBCO BRL 公司;焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate, DEPC):美国 Sigma 公司;Oligo dT、M-MLV 逆转录酶:美国 GIBCO 公司;RT-PCR 10×反应缓冲液、4×dNTP(每种):大连宝生生物工程公司;CYP3A4、DPD、TP、GAPDH 引物:上海生工生物工

程公司;琼脂糖:北京鼎国生物技术有限公司;定影液、显影液:上海冠龙;氢氧化钠、硫酸铵、乙醚、异丙醇、氯仿、异丙醇、无水乙醇、丙酮均为国产试剂,为层析纯或分析纯等级。

4 仪器 电热恒温水槽(HH.W21.CU600 型):上海医疗器械总厂;超净工作台(YJ-875):苏州净化设备公司;倒置显微镜、显微镜照相装置(PM-10AD):日本 Olympus 公司;电泳槽(RT-PCR)、电泳仪(PowerPac300)、核酸定量分析仪:美国 Bio-RAD 公司;台式高速冷冻离心机(5417R):德国 Eppendorf 公司;PCR 热循环仪(PE480):美国 PE 公司。紫外分光光度计(UV-2401PC 13.0):日本津岛株式会社;凝胶成像处理系统:Kodak Digital-Science system;制冰机(AF10):意大利 Scotman 公司;低温冰箱(-86℃):美国 Thermo Forma 公司;低温冰箱(-30℃)MDF-U333 2.20:日本三洋公司。

5 分组、造模与给药 将 80 只小鼠按照随机数字表法分为模型组、化疗组、中药组以及化疗加中药组,每组 20 只。取 MKN-8 荷瘤小鼠新鲜 MKN-8 癌块,剪碎研磨后,连续过 100、200 目不锈钢筛;在 200 目不锈钢筛网上收集肿瘤细胞制成 10^7 /mL 浓度的细胞悬液,每只小鼠左腋窝皮下接种 0.2 mL 肿瘤细胞(约 2×10^6 个)悬液。(1)模型组:接种瘤株 2 天后,以 0.25 mL 生理盐水灌胃,每天 2 次,连续 10 天。(2)化疗组:接种瘤株 2 天后,以 0.25 mL 生理盐水灌胃,每天 2 次,连续 5 天;接种瘤株 7 天后,给予 5-FU 20 mg/(kg·d)(相当于临床用量的 1.3 倍)腹腔注射,每天 1 次,连续 5 天。(3)中药组:接种瘤株 2 天后,以健脾理气方药液 0.25 mL(相当于临床用量的 1.3 倍)灌胃,每天 2 次,连续 10 天。(4)化疗加中药组:接种瘤株 2 天后,以健脾理气方药液 0.25 mL 灌胃,每天 2 次,连续 5 天;接种瘤株 7 天后,给予 5-FU 20 mg/(kg·d)腹腔注射,每天 1 次,连续 5 天。各组小鼠均予普通饲料及自来水,直至处死。

6 RT-PCR 法检测移植瘤组织 TP、DPD 和 CYP3A4 的 mRNA 表达 给药结束后 1 天用脱颈椎法处死小鼠,剥取肿瘤。取人胃癌移植瘤组织块 50~

100 mg, 用液氮在研钵中研磨成粉末, 移入玻璃匀浆器加入 1 mL Trizol 抽打匀浆, 用 Trizol 法提取 RNA, 行逆转录。搜索 GenBank 数据库 cDNA 序列, 利用 Primer 引物设计与分析软件设计, 3 段目标基因引物及内参 GAPDH 引物, 序列如下。CYP3A4 引物: 上游: 5'-CCACCCACCTATGATACTGT-3', 下游: 5'-ATCCCTTGACTCAACCTTTA-3', 目标长度: 301 bp。TP 酶引物: 上游: 5'-GCAGACGGCATTGT-TGAG-3', 下游: 5'-TCGGTGGGAGGACAAGTT-3', 目标长度: 289 bp。DPD 酶引物: 上游: 5'-ATGT-GCTCTGTCCGTTGT-3', 下游: 5'-TAATCTCCCTT TCCGTGT-3', 目标长度: 377 bp。 β -actin 引物: 上游: 5'-GTCGGTGTGAACGGATTT-3', 下游: 5'-GGACTCATCGTACTCCTGCT-3', 目标长度: 561 bp。分别取上述扩增产物 5 μ L, 加 1 μ L 1.7% 琼脂糖胶 (40 mL 0.5 $\times$ TBE 加 0.68 g 胶) 电泳染色液, 点样, 通电, 电压 100 V, 持续 4 h。将电泳好的琼脂糖凝胶放入紫外线灯下观察, 拍照。与内参照比较, 以 Koda Digital Science 1.0 DNA 分析软件系统对 PCR 产物进行半定量分析。结果以目标基因与对应的 GAPDH 密度积分比值作为基因的相对表达量。

7 统计学方法 应用 SPSS 17.0 统计软件包。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 若方差齐, 采用单因素方差分析, 组间及组内比较采用 LSD 检验; 若方差不齐, 用 Games-Howell 法进行分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

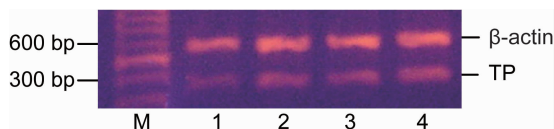
结 果

1 各组小鼠移植瘤组织 TP mRNA 表达水平比较 (表 1, 图 1) 中药组及化疗加中药组小鼠移植瘤

表 1 各组小鼠移植瘤组织 TP、DPD 和 CYP3A4 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TP	DPD	CYP3A4
模型	20	0.21 $\pm$ 0.02	0.66 $\pm$ 0.01	0.29 $\pm$ 0.04
化疗	20	0.29 $\pm$ 0.03	0.65 $\pm$ 0.04	0.38 $\pm$ 0.03
化疗加中药	20	0.36 $\pm$ 0.02 * Δ	0.47 $\pm$ 0.02 * Δ	0.51 $\pm$ 0.06 * Δ
中药	20	0.35 $\pm$ 0.07 * Δ	0.43 $\pm$ 0.04 * Δ	0.50 $\pm$ 0.04 * Δ

注: 与模型组比较, *P < 0.01; 与化疗组比较, Δ P < 0.01



注: M 为蛋白标准品 (Maker); 1 为模型组; 2 为化疗组; 3 为化疗加中药组; 4 为中药组; 下图同

图 1 各组 TP RT-PCR 电泳图比较

组织中 TP mRNA 相对表达水平明显高于模型组及化疗组, 差异有统计学意义 (P < 0.01)。化疗加中药组与中药组 TP mRNA 表达水平比较, 差异无统计学意义 (P > 0.05)。

2 各组小鼠移植瘤组织 DPD mRNA 表达水平比较 (表 1, 图 2) 中药组及化疗加中药组小鼠移植瘤组织中的 DPD mRNA 相对表达水平明显低于模型组及化疗组, 差异有统计学意义 (P < 0.01)。化疗加中药组与中药组 DPD mRNA 表达水平比较, 差异无统计学意义 (P > 0.05)。

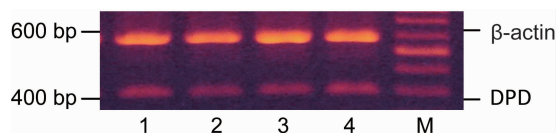


图 2 各组 DPD RT-PCR 电泳图比较

3 各组小鼠移植瘤组织 CYP3A4 mRNA 表达水平比较 (表 1, 图 3) 中药组及化疗加中药组小鼠移植瘤组织中的 CYP3A4 mRNA 相对表达水平明显高于模型组及化疗组, 差异有统计学意义 (P < 0.01)。化疗加中药组与中药组 CYP3A4 mRNA 表达水平比较, 差异无统计学意义 (P > 0.05)。

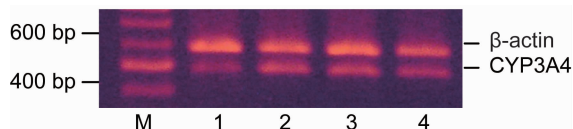


图 3 各组 CYP3A4 RT-PCR 电泳图比较

讨 论

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一。我国是胃癌高发区, 每年约有 40 万新发病例, 30 万人死于胃癌, 发病率和病死率居恶性肿瘤的第 3 位^[4,5]。5-FU 是通过特异性干扰核酸的代谢阻止细胞分裂和增殖, 属于 S 期细胞周期特异性的抗代谢类肿瘤药物, 是胃癌化疗的基础药物^[6]。该药物本身无生物学活性, 在体内经过 TP 催化转化为 5-氟-2-脱氧尿苷酸单磷酸 (5-fluoro-2p-deoxyuridine-5p-monophosphate, FdUMP), 后者与胸苷酸合成酶 (thymidylate synthase, TS) 和 5,10-亚甲基四氢叶酸 (5,10-methylenetetrahydrofolate, 5,10-CH₂THF) 形成稳定的三联复合物, 抑制 TS 活性, 阻碍 TS 催化脱氧尿苷酸 (deoxyuridylate, dUMP) 转化为脱氧胸苷酸 (deoxythymidylate, dTMP), 干扰 DNA 的合成和修复, 是 5-FU 抑制肿瘤的主要机制^[7]。

胃癌属中医学“胃脘痛”、“噎膈”、“呃逆”、“积聚”、“反胃”等范畴,《金匱要略》中记有“朝食暮吐,暮食朝吐,宿谷不化,名曰胃反”,指出其病机是“脾伤而不磨”。可见脾胃虚损为胃癌发病最重要的环节,故健脾理气是中医治疗胃癌的主要治则。上海复旦大学附属肿瘤医院于尔辛教授总结归纳多年中医临床经验所得健脾理气方已在多种晚期恶性肿瘤治疗中凸显疗效,特别在肝癌方面取得了显著疗效^[3]。方中党参、白术、茯苓、生薏苡仁、神曲、山楂、炒谷麦芽健脾渗湿消食,八月札、枳壳、川朴、广木香理气活血,白花蛇舌草清热解毒,全方融健脾、理气、消食、抗癌、解毒于一体,消补并重。

TP 是 5-FU 分解代谢的关键限速酶,其在肿瘤组织中的表达水平要高于正常组织,这一特异的组织分布特点,有着重要的临床意义。在胃肠道肿瘤中观察到,当 TP 表达水平较高时,其对 5-FU 的敏感性则相应提高。动物实验表明,诱导 TP 的生成能有效增加这类药物的细胞毒性^[8]。本实验表明健脾理气方能显著提高 TP 的表达,进而促进 5-FU 活性成分的转化,提高化疗的敏感性。

DPD 是一种内生嘧啶,是 5-FU 分解代谢的主要限速酶,通过将 5-FU 分解为无抗肿瘤活性的代谢产物 5-氟-5,6-二氢尿嘧啶(5-fluoro-5,6-dihydrouracil, 5-FDHU),从而影响 5-FU 的抗肿瘤活性及毒性反应。DPD 活性高低直接决定了 5-FU 进入合成代谢和产生核苷酸类似物的量。药代动力学研究也显示,DPD 活性缺乏可导致 5-FU 体内清除受阻,半衰期显著延长,分解减弱而合成增加,细胞毒性也相应增强;相反,当 DPD 高表达即活性增加时,5-FU 分解增加而合成减少从而导致了耐药^[9]。DPD 高表达与胃癌组织对化疗药物 5-FU 敏感性较低有关^[10]。DPD 缺失与临床表型改变引起的毒性密切相关,并有助于预测患者的肿瘤对 5-FU 的敏感性。如果正常组织中 DPD 水平低,预计可接受较高剂量的 5-FU^[11]。本实验表明健脾理气方能显著抑制 DPD 的表达,从而减缓 5-FU 活性成分在体内的代谢,增强化疗的敏感度,但可能会增加化疗的毒副反应。

CYP3A4 是人体中含量最丰富的酶,约占肝 P450 酶总量的 25%,参与了约 50% 的药物代谢。临床许多抗癌药本身是无活性的前体药,常需通过 CYP3A4 代谢活化后,产生毒性代谢物而有效发挥抗癌作用^[12]。因此,CYP3A4 基因的表达直接影响体内 5-FU 的活化。本实验表明健脾理气方能显著提高 CYP3A4 基因的表达,这可能与 5-FU 疗效的提高有关。

综上所述,本研究发现中药健脾理气方能够通过

上调小鼠移植瘤组织中 TP 及 CYP3A4 基因的表达水平,同时抑制小鼠移植瘤组织中 DPD 基因的表达水平,从而促进 5-FU 在肿瘤组织中的活化和抑制 5-FU 在肿瘤组织中的分解失活,提高化疗疗效。中药组和化疗加中药组中 TP、DPD 和 CYP3A4 基因表达水平比较,差异无统计学意义,可能与本实验样本量较小有关,有待进一步大样本实验研究证实。

参 考 文 献

- [1] 赵任,郁宝铭,于颖彦,等. 结直肠癌组织中 TP/DPD 表达的研究[J]. 中国癌症杂志, 2006, 16(3): 189-192.
- [2] 马韬,于颖彦,计骏,等. 二氢嘧啶脱氢酶(DPD)与胸苷酸合成酶(TS)在结直肠癌中的表达及预后价值[J]. 现代肿瘤医学, 2009, 17(7): 1292-1295.
- [3] 于尔辛. 肝癌的健脾理气方治疗[J]. 中国肿瘤, 2000, 9(8): 344.
- [4] Yang L. Incidence and mortality of gastric cancer in China[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(1): 17-20.
- [5] Yang L, Parkin DM, Ferlay J, et al. Estimates of cancer incidence in China for 2000 and projections for 2005[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005, 14(1): 243-250.
- [6] Fareed KR, Kaye P, Soomro IN, et al. Biomarkers of response to therapy in oesophago-gastric cancer[J]. Gut, 2009, 58(1): 127-143.
- [7] 钱小军,胡冰. TS 酶与 5-FU 的关系及在消化道肿瘤个体化治疗中的应用[J]. 安徽医药, 2010, 14(3): 252-254.
- [8] Tanaka-Nozaki M, Onda M, Tanaka N, et al. Variations in 5-fluorouracil concentrations of colorectal tissues as compared with dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) enzyme activities and DPD messenger RNA levels[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(9): 2783-2787.
- [9] Nakata B, Muguruma K, Yamagata S, et al. Differences in dihydropyrimidine dehydrogenase activities between gastric and colorectal cancer[J]. Dig Dis Sci, 2004, 49(1): 60-64.
- [10] Terashima M, Fujiwara H, Takagane A, et al. Prediction of sensitivity to fluoropyrimidines by metabolic and target enzyme activities in gastric cancer[J]. Gastric Cancer, 2003, 6(Suppl 1): 71-81.
- [11] Terashima M, Irinoda T, Fujiwara H, et al. Roles of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in tumor progression and sensitivity to 5-fluorouracil in human gastric cancer[J]. Anticancer Res, 2002, 22(2A): 761-768.
- [12] Kostubsky VE, Ramachandran V, Venkataramanan R, et al. The use of human hepatocyte cultures to study the induction of cytochrome P-450[J]. Drug Metab Dispos, 1999, 27(8): 887-894.

(收稿:2012-04-06 修回:2013-03-04)