

消癌解毒方对 H₂₂ 荷瘤小鼠基因表达谱的影响

吴勉华 李 黎

摘要 目的 通过对 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤组织基因表达谱的检测,探讨消癌解毒方抗肿瘤的作用机制。**方法** H₂₂ 荷瘤小鼠随机分为空白对照组,消癌解毒方低、中、高剂量组和顺铂组。应用基因芯片技术,检测各组 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤组织的差异表达基因;应用 pathway 分析,找出与消癌解毒方抗癌机制相关的信号通路和基因,并针对趋化因子信号通路进行分析。**结果** 消癌解毒方能显著影响多个与肿瘤生长、凋亡和免疫相关的信号通路,并能下调趋化因子信号通路中 CCL3、CXCL2 等基因的表达。**结论** 消癌解毒方可能通过影响趋化因子信号通路中的某些基因的表达来发挥抗肿瘤生长和侵袭的作用。

关键词 消癌解毒方;H₂₂ 荷瘤小鼠;基因表达谱;趋化因子信号通路

Effect of Xiaoi Jiedu Recipe on Gene Expression Profiles in H₂₂ Tumor-bearing Mice WU Mian-hua and LI Li First Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing (210046), China

ABSTRACT Objective To explore the mechanism of Xiaoi Jiedu Recipe (XJR) for fighting against tumors by detecting tumor gene expression profiles of H₂₂ tumor-bearing mice. **Methods** H₂₂ tumor-bearing mice were randomly divided into the normal control group, the low dose XJR group, the medium dose XJR group, the high dose XJR group, and the Cisplatin group. The differentially expressed genes of tumor tissues in H₂₂ tumor-bearing mice were detected by using gene chip technique. The antitumor mechanism of XJR associated signaling pathways and gene expressions were found out by pathway analysis. The chemokine signaling pathways were analyzed. **Results** XJP could significantly affect multiple signaling pathways associated with tumor growth, apoptosis, and immunity. XJP also could decrease expressions of CCL3 and CXCL2 in the chemokine signaling pathway. **Conclusion** XJP could inhibit the growth and invasion of tumor cells possibly by affecting expressions of some genes in the chemokine signaling pathway.

KEYWORDS Xiaoi Jiedu Recipe; H₂₂ tumor-bearing mouse; gene expression profile; chemokine signaling pathway

我国著名中医学家、国医大师周仲瑛教授临证 60 余载,擅长恶性肿瘤诊治,从“癌毒”辨治恶性肿瘤取得了突出的疗效。消癌解毒方是在周仲瑛教授“癌毒”理论指导下经长期临床实践经验总结的有效抗癌方药^[1]。本实验以 H₂₂ 荷瘤小鼠为研究对象,通过对 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤组织基因表达谱的检测,来探讨消癌解毒方抗肿瘤的作用机制。

材料与方

1 动物 清洁级 ICR 小鼠,雄性,体重(18 ±

2) g。购自上海斯莱克实验动物责任有限公司,实验动物生产许可证:SCXK(沪)2007-0005;实验动物使用许可证:SYXK(苏)2007-0030。饲料均购自南京市江宁区青龙山动物繁殖场;H₂₂ 瘤株的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、僵蚕、蜈蚣、太子参、麦冬等组成,中药购自安徽省亳州市中药有限公司,由南京中医药大学药理教研室煎制,浓缩成生药量为 2 g/mL 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 试剂及仪器 Trizol(美国 Invitrogen 公司);RNeasy kit(德国 Qiagen 公司);Agilent Gene Expression Hybridization Kit(美国 Agilent 公司);Nanodrop ND-1000(美国 Agilent 公司);Agilent Mi-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30973742/C190201);江苏省中医药局科技资助项目(No. LB09032)。

作者单位:南京中医药大学第一临床医学院(南京 210046)

通讯作者:吴勉华, Tel: 025-85811001, E-mail: littlehappyily@

163.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2013. 09. 1232

croarray Scanner G2565BA(美国 Agilent 公司)。

4 方法

4.1 分组方法 抽取种鼠腹水 0.4 mL 接种于 2 只 ICR 小鼠腹腔内进行传代(腹水不稀释,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,抽取种鼠腹水 5 mL,加入 10 mL 的生理盐水稀释。75%酒精消毒小鼠右腋皮肤,按每鼠 0.2 mL 接种于小鼠右腋下。并随机分为空白对照组,消癌解毒方低、中、高剂量组及顺铂组,每组 10 只。

4.2 给药方法 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、高剂量组和空白对照组(生理盐水)等容灌胃(0.9 mL/只),用量均按人与小鼠体表面积等效剂量换算。根据浓缩药物换算,消癌解毒方低、中、高剂量组为每天 10、30、90 g/kg。顺铂组腹腔注射按每天 1 mg/kg 给药。小鼠造模后第 2 天每天给药 1 次,连续 10 天。取各组动物禁食过夜,次日晨 9:00 断头处死小鼠,置冰碟上,快速取下肿瘤组织,用无菌冰生理盐水清洗血污后,放入用 DEPC 水处理过的离心管,封口后置液氮罐中保存。每组取 1 个标本送上海康成生物工程有限公司进行全基因组表达谱芯片检测。

4.3 全基因组表达谱芯片主要实验流程 (1)总 RNA 的抽提及质量检测:取各组肿瘤组织各 100 mg,用 Trizol 和 RNeasy kit 抽提 RNA,使用 Nanodrop 测定 RNA 在 260、280、230 nm 的吸收值,以计算浓度并评估纯度。用甲醛电泳试剂进行变性琼脂糖凝胶电泳,检测 RNA 纯度及完整性。(2)cDNA 样品合成和标记:取 1 μ g 总 RNA,反转录成 cDNA 并用 Cy3 标记。(3)标记扩增后的 cDNA 并质检:用 NanoDrop 检测 cRNA 产量和特异活性。(4)芯片杂交:在标准条件下将标记好的探针和高密度基因组芯片在杂交盒中 65 $^{\circ}$ C 滚动杂交 17 h,依次用相应的洗涤液洗涤芯片,室温晾干。(5)图像扫描及数据处理:用 Agilent Microarray Scanner 扫描芯片,以 Agilent Genepix GX 软件进行数据分析,数据经过标准化后得出实验组与对照标记的信号比值(fold change),即为该基因组在实验组与对照组中变化情况。

5 判定标准 Fold change ≥ 2 的基因为表达显著上调基因,fold change ≤ 0.5 为表达显著下调基因。

结 果

1 各组基因芯片扫描图结果(图 1) 5 组基因检测扫描图上的点饱满圆润,背景均一,基因点清晰可

见,没有基因漏点、点重叠以及不正常荧光的情况,符合数据分析的要求。图 1 中每个亮点是结合在 cDNA 上的 Cy3 发出的荧光,将荧光强度进行一系列数据处理即可找出两个样品间的差异表达基因。

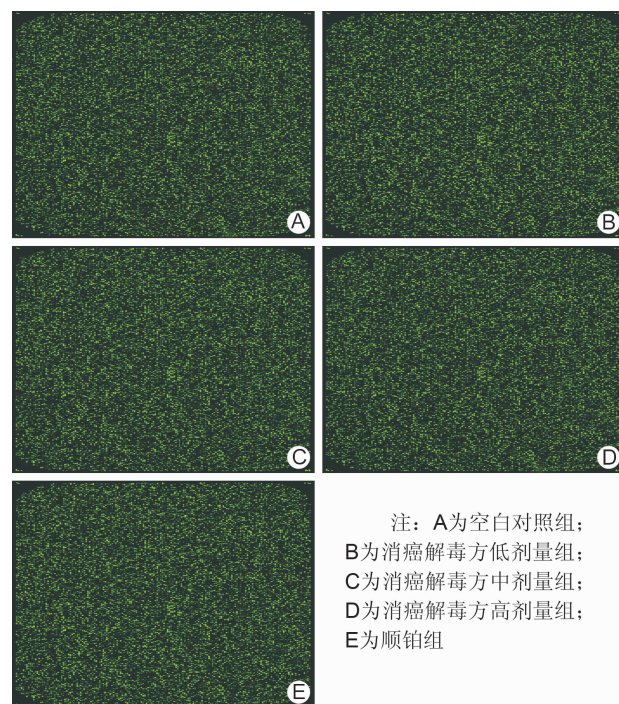
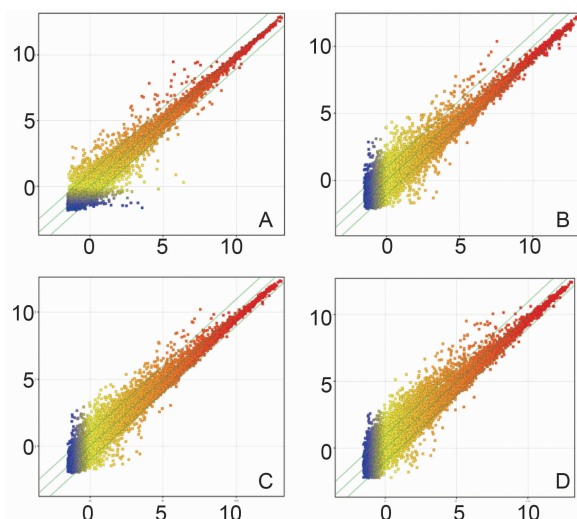


图 1 各组基因芯片扫描图

2 各组散点图结果(图 2) 将各用药组与空白对照组用软件进行对比分析,所得的散点图可以形象化评估组间的差异表达基因。X/Y 值是每个样本的标准化信号值(log2 形式),绿色线是折叠变化线,在顶



注:A为消癌解毒方低剂量组与空白对照组比较;B为消癌解毒方中剂量组与空白对照组比较;C为消癌解毒方高剂量组与空白对照组比较;D为顺铂组与空白对照组比较

图 2 各组散点图

面绿色线以上和底下绿色线以下的基因,代表差异显著的基因。

3 差异表达基因谱 通过分析,在 41 000 条被检测的基因中,与空白对照组比较,消癌解毒方低剂量组作用后,肿瘤组织的基因表达谱中有 351 个基因表达上调,224 个基因表达下调;消癌解毒方中剂量组作用后,肿瘤组织的基因表达谱中有 639 个基因表达上调,946 个基因表达下调;消癌解毒方高剂量组作用后,肿瘤组织的基因表达谱中有 639 个基因表达上调,228 个基因表达下调;顺铂组作用后,肿瘤组织的基因表达谱中有 1 118 个基因表达上调,402 个基因表达下调。

4 针对趋化因子信号通路基因表达的分析(表 1) 从基因芯片的分析结果可以看出,趋化因子信号通路在消癌解毒方各剂量组中,均发生了明显的改变。表 1 中为该信号通路中表达下调的部分基因。

表 1 各剂量组趋化因子信号通路中表达下调的部分基因

组别	n	基因名称	下调倍数
消癌解毒方低剂量	1	CCL3	4.64
		CCL4	2.39
		CX3CL1	2.50
		CXCL2	4.76
消癌解毒方中剂量	1	CCL3	3.72
		CCL5	2.41
		CXCL2	3.27
		CXCL9	3.47
消癌解毒方高剂量	1	CCL3	2.64
		CXCL2	3.19
顺铂	1	CCL3	2.25
		CXCL2	2.92

讨 论

周仲瑛教授认为癌毒是在脏腑功能失调、气血阴阳紊乱的基础上产生的。癌毒产生后继续损害脏腑功能,耗伤气血阴阳,酿生痰浊瘀血等病理产物。癌毒是导致恶性肿瘤发生的关键因素,也是导致恶性肿瘤进一步恶化的关键因素,祛除癌毒为肿瘤治疗之首要^[1]。消癌解毒方正是在“癌毒”理论指导下,选择白花蛇舌草、僵蚕、蜈蚣、八月札、太子参、麦冬、炙甘草等按特定比例组成,全方扶正祛邪,攻补兼施,已经由周教授在临床应用多年。但是中药复方组成成分多样,作用机制复杂,可能通过多途径通路、多靶点发挥作用,基因芯片大规模筛选的特点恰好满足中医药研究多样复杂性的要求,并且同时能获得大量的实验信息。

本实验通过对 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤组织基因表达谱

的检测,筛选出了消癌解毒方可能发生抗癌作用的信号通路。本实验针对趋化因子信号通路进行分析发现,消癌解毒方可以促进趋化因子信号通路中,部分基因表达下调。趋化因子是一类使细胞发生趋化运动的小分子促炎多肽细胞因子的超家族,具有趋化和激活白细胞的作用,许多疾病的发生、发展都需要趋化因子的参与。趋化因子信号通路在肿瘤发生、发展过程中的作用大致可归纳为以下 4 个方面:(1)对肿瘤免疫微环境的影响:部分与肿瘤相关的趋化因子可能在肿瘤内发挥调节炎症反应的作用,导致对肿瘤的免疫耐受。Bell D 等^[2] 研究发现许多肿瘤细胞分泌趋化因子 CCL20,通过未成熟树突状细胞上的趋化因子受体 CCR6 吸引成熟树突状细胞;在乳腺癌细胞内发现许多 CD1a⁺ 的未成熟树突状细胞(DC),只在肿瘤的边缘可见少量 CD83⁺ 的成熟树突状细胞;在体外的黏附实验证实,未成熟树突状细胞选择性黏附肿瘤细胞,而成熟树突状细胞分布于外围,这种分布在体内可能增加对癌细胞的免疫耐受。(2)对肿瘤细胞生长的影响:趋化因子能促进肿瘤细胞的生长,主要是 GRO 家族的趋化因子如: CXCL1、2、3 和 CXCL8 等。Orimo A 等^[3] 研究发现,外源性 CXCL12 可以诱导神经胶质瘤细胞的增殖,其机制可能与 ERK1/2 和 AKT 信号通路的激活有关。(3)对肿瘤血管生成的影响:趋化因子具有促进肿瘤血管生成的作用。CXC 类趋化因子分为两个亚家族,其中包含 ELR(谷-亮-精氨酸)基序的成员,往往具有诱导肿瘤血管生成的作用。在对乳腺癌细胞的研究中发现,间质成纤维细胞通过分泌 CXCL12,来诱导骨髓来源的内皮干细胞和前体细胞,作为肿瘤血管新生过程中所需血管内皮细胞的来源,参与肿瘤微环境中的血管生成;同时诱导浆细胞样树突状细胞(pDC),释放 IL-8 和 TNF-1 诱导肿瘤血管的新生^[4]。(4)趋化因子对肿瘤侵袭转移的影响:趋化因子及其受体在肿瘤侵袭转移过程中,发挥着重要且复杂的作用,其机制与白细胞归巢机制相似^[5]。有研究发现,卵巢癌癌性腹水诱导血管生成的作用是由 SDF-1 与 VEGF 协同诱导的,其机制可能是高表达 SDF-1 的卵巢癌实体组织释放大量的 SDF-1 进入腹水,而释放入腹水的 SDF-1 促进表达其特异性受体 CXCR4 的肿瘤细胞向腹水播散,提示卵巢癌的腹腔种植转移在某种程度上是依赖于 CXCR4/SDF-1 的相互作用。这种相互作用可能通过调节肌动蛋白的重排、血管生成、肿瘤细胞黏附能力参与了卵巢癌的腹腔种植转移^[6-8]。

本实验结果表明,与空白对照组比较,消癌解毒方

各剂量组均能降低趋化因子信号通路中 CCL3、CXCL2 的表达,并且与顺铂组比较效果更为明显;另外,消癌解毒方低剂量组还能明显降低 CCL4、CX3CL1 的表达,中剂量组能明显降低 CCL5、CXCL9 的表达,但顺铂组没有表现出相应基因的下调。说明消癌解毒方可能通过影响趋化因子信号通路中的某些基因的表达来发挥抗肿瘤生长和侵袭的作用。

参 考 文 献

[1] 程海波,吴勉华,周红光.周仲瑛从癌毒辨治恶性肿瘤的经验[J].北京中医药,2009,28(11):844-846.
[2] Bell D, Chomarat P, Broyles D, et al. In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peri-tumoral areas[J]. J Exp Med, 1999, 190(10): 1417-1426.
[3] Orimo A, Weinberg RA. Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type[J]. Cell Cycle, 2006, 5(15): 1597-1601.
[4] Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, et al. Stromal fibro-

blasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion[J]. Cell, 2005, 121(3): 335-348.

[5] Ben-Baruch A. Organ selectivity in metastasis: regulation by chemokines and their receptors[J]. Clin Exp Metastasis, 2008, 25(4): 345-356.
[6] Kryczek I, Lange A, Mottram P, et al. CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers[J]. Cancer Res, 2005, 65(2): 465-472.
[7] Perissinotto E, Cavalloni G, Leone F, et al. Involvement of chemokine receptor 4/stromal cell-derived factor 1 system during osteosarcoma tumor progression[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(2 Pt 1): 490-497.
[8] Yasumoto K, Koizumi K, Kawashima A, et al. Role of the CXCL12/CXCR4 axis in peritoneal carcinomatosis of gastric cancer[J]. Cancer Res, 2006, 66(4): 2181-2187.

(收稿:2012-09-19 修回:2013-06-27)

《中国中西医结合杂志》第八届编委会名单

总 编 辑 陈可冀

副总编辑 沈自尹 肖培根 雷 燕

顾 问 吴咸中 辛育龄 陈凯先 陈维养 邓铁涛 王永炎 侯 灿 曹洪欣

编辑委员(以姓氏笔画字母为序)

于德泉	马必生	王一涛	王卫霞	王文健	王宁生	王 伟	王 阶	王拥军	王昌恩
王学美	王宝恩	王硕仁	王 舒	车镇涛	尹光耀	叶文才	史大卓	史载祥	白彦萍
吕志平	吕爱平	吕维柏	朱 兵	朱明军	危北海	庄曾渊	刘干中	刘 平	刘 良
刘建平	刘建勋	刘猷枋	齐清会	阮新民	孙汉董	孙 燕	杨任民	杨宇飞	杨秀伟
李乃卿	李大金	李玉光	李廷谦	李军祥	李连达	李国栋	李国勤	李顺成	李 恩
李 涛	李焕荣	连 方	吴伟康	吴泰相	吴根诚	时毓民	邱 峰	张大钊	张永贤
张永祥	张伯礼	张荣华	张亭栋	张家庆	张敏州	陆付耳	陈士奎	陈小野	陈冬燕
陈香美	范维琥	林志彬	林求诚	林瑞超	郁仁存	果德安	周文泉	周 俊	周霭祥
赵一鸣	赵伟康	赵健雄	胡义扬	胡镜清	饶向荣	洪传岳	栗原 博(日本)	顾振纶	
徐治鸿	徐 浩	殷惠军	郭 军	郭赛珊	唐由之	唐旭东	凌昌全	黄光英	黄怡超
黄晓愚	黄 熙	曹小定	崔 红	麻 柔	梁晓春	葛秦生	董竞成	董福慧	韩济生
谢竹藩	谢明村	谢 恬	蔡定芳	裴正学	廖家桢	廖福龙	衡先培	戴瑞鸿	
Yung-chi CHENG(美国)	Sheng-xing MA(美国)	Qun-hao ZHANG(美国)							