

消痰散结方对 MKN-45 人胃癌裸鼠原位移植瘤微卫星不稳定的抑制作用观察

叶 敏 孙大志 魏品康

摘要 **目的** 观察消痰散结方对 MKN-45 人胃癌裸鼠原位移植瘤微卫星不稳定的抑制作用。方法 采用 MKN-45 人胃癌细胞株建立裸鼠皮下瘤模型皮下传 3 代作为实验模型的瘤源,采用 OB 胶粘合法建立人胃癌裸鼠原位移植瘤模型。30 只模型裸鼠分为模型组、中药组和化疗组,每组 10 只。中药组给予消痰散结方(0.4 mL/天)灌胃,化疗组给予喃氟啶 0.4 mL/天灌胃,模型组无干预措施。用药 6 周后,测瘤质量、计算抑瘤率,检测 5 个微卫星不稳定位点(D17S250、D2S123、D5 S346、Bat-25 和 BAT26)的大小、峰高度及峰面积。**结果** 中药组抑瘤率为 40.84%,中药组的瘤质量明显低于模型组($P < 0.01$),与化疗组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。模型组高度微卫星不稳定发生率为 70%,低度微卫星不稳定发生率为 30%,使用消痰散结方治疗 6 周后,微卫星位点趋于稳定,均表现为微卫星稳定。**结论** 消痰散结方对微卫星不稳定 MKN-45 人胃癌裸鼠原位移植瘤有抑制作用。

关键词 消痰散结方;微卫星不稳定;喃氟啶;胃癌

Inhibitory Effect of Xiaotan Sanjie Recipe on the Microsatellite Instability of Orthotopic Transplantation Tumor in MKN-45 Human Gastric Cancer Nude Mice YE Min, SUN Da-zhi, and WEI Pin-kang
Department of Traditional Chinese Medicine, Shanghai Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai (200003), China

ABSTRACT **Objective** To study the inhibitory effect of Xiaotan Sanjie Recipe (XSR) on the microsatellite instability of orthotopic transplantation tumor in MKN-45 human gastric cancer nude mice. **Methods** The 3rd passage subcutaneous transplantation tumor was taken as the origin of the model by using MKN-45 human gastric cancer cell lines. MKN-45 human gastric cancer nude mouse model was established using OB glue adhesive method. Then 30 nude mice were divided into the model group, the XSR group, and the chemotherapy group. Mice in the XSR group were intragastrically given XSR at the daily dose of 0.4 mL. Mice in the chemotherapy group were intragastrically given Fluorouracil at the daily dose of 0.4 mL. No intervention was given to mice in the model group. After 6 weeks of medication, the tumor weight was measured, and the tumor inhibition rate calculated. The size, the peak height, and the peak area of 5 microsatellite instability sites were detected. **Results** The tumor inhibition rate was 40.84% in the XSR group. The tumor weight was significantly lower in the XSR group than in the model group ($P < 0.01$), showing no statistical difference when compared with the chemotherapy group ($P > 0.05$). The incidence of high microsatellite instability (MSI-H) in the model group was 70%, and the incidence of low microsatellite instability (MSI-L) was 30%. Microsatellite stable site tended be stable after 6 weeks of XSR treatment. **Conclusion** XSR showed inhibition on microsatellite instable orthotopic transplantation tumor in MKN-45 human gastric cancer nude mice.

KEYWORDS Xiaotan Sanjie Recipe; microsatellite instability; Fluorouracil; gastric cancer

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81273910)

作者单位:第二军医大学长征医院中医科(上海 200003)

通讯作者:魏品康, Tel:13564643706, E-mail:sunda-zhi@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.05.0592

微卫星(microsatellite, MS)主要存在于生物基因种系中的非编码区及内含子中,是简单串列重复序列,由数个核苷酸重复单位组成的基因片段,当 DNA 复制过程中出现基因片段的增加或减少,导致细胞恶变,称之为微卫星不稳定(microsatellite instability, MSI)^[1,2],目前已经被证实为肿瘤发生的重要原因之一^[3]。前期实验研究证明,消痰散结方对裸鼠胃癌有明显的抑瘤作用,可以降低胃癌的增殖活性^[4],本研究通过作用靶点,进一步求证消痰散结方干预胃癌的作用。

材料与方法

1 细胞株及细胞培养 人 MKN-45 胃癌细胞株,购自中科院细胞所。MKN-45 细胞以含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基,37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 24 h。0.25% 胰酶-乙二胺四乙酸消化后, PBS 洗 2 次,调整细胞浓度为 1×10^7 个/mL 细胞悬液。

2 实验动物 SPF 级雄性裸小鼠,7 周龄。实验动物饲养在中科院上海实验动物中心动物房的空气层流架内,饲养条件为 SPF 级。体质量 18~20 g。购自上海斯莱克实验动物有限公司,生产许可证号: SYXK(沪)2007-0005,使用许可证号: SYXK(沪)2007-0006。

3 药物 消痰散结方:由南星、半夏、全蝎、蜈蚣、鸡内金、茯苓、山慈菇、炙甘草等 12 味药物组成,中药饮片购自上海雷允上公司,长征医院制剂室制备,生药浓度为 3.35 g/mL。喃氟啉, 50 mg/片,上海医药集团公司华联制药厂,批号: 060102,溶液制备方法:将喃氟啉片研磨分粉末,溶于生理盐水,浓度为 7.8 mg/mL。

4 试剂及仪器 动物组织基因组小量抽提试剂盒: High Pure PCR Template Preparation Kit, 规格: 1 kit (100 purifications), 购自上海罗氏制药有限公司。测序仪试剂: Bigdye V3.1, 批号: 4323161, 购自美国 ABI 公司。3130 测序仪, 购自美国 ABI 公司; 9700PCR 仪, 购自美国 ABI 公司。

5 裸鼠皮下瘤模型建立 参照文献^[5],取 0.2 mL 细胞悬液接种于裸小鼠右侧近腋部皮下,当皮下移植瘤长至直径约 1 cm 时剥取移植瘤,切成 1 mm×1 mm×1 mm 瘤块,再经套管针转种至另一只裸小鼠腋部皮下,如此反复进行鼠间传代,以第 3 代皮下移植瘤为实验模型的瘤源。

6 人胃癌裸鼠皮下移植瘤模型的建立 参照文献^[6],在操作台上,从腋皮下剥取肿瘤组织,剪成

1 mm×1 mm×1 mm 瘤块备用。实验动物禁食 12 h,腹腔注射 10% 水合氯醛(0.03 mL/10 g)麻醉,常规手术,在胃大弯近胃窦处用 1 mL 无菌空针头划破胃壁浆膜层,用无齿镊将破损处向内推压,使局部胃壁形成凹窝,植入一块瘤组织于凹窝内,并在瘤块表面滴 OB 胶 1 滴,40 s 凝固后将胃壁回纳入腹腔,0 号丝线缝合腹膜及皮肤,关腹,复苏。30 只荷瘤鼠均复制成功并存活^[6]。造模成功后 48 h 开始用药干预 6 周。脱颈处死裸鼠荷瘤小鼠,分别取每只小鼠的胃肿瘤组织。

7 分组及干预方法 选择 MKN-45 人胃癌皮下移植瘤裸鼠 30 只,分为模型组、中药组、化疗组,每组 10 只。中药组给予消痰散结方(0.4 mL/天)灌胃;化疗组给予喃氟啉(0.4 mL/天)灌胃,均相当与临床人用药剂量 10 倍;模型组正常饮食喂养 6 周,无药物干预。各组均连续干预 6 周。

8 检测指标及方法

8.1 瘤重及抑瘤率计算 各组灌胃结束麻醉后脱颈处死小鼠,分离肿瘤,称取瘤重。各组计算抑瘤率,公式: 抑瘤率(%) = (各组平均瘤重 - 模型组平均瘤重) / 模型组平均瘤重 × 100%。

8.2 MSI 判定标准 根据 Bethesda CR 等^[7]标准进行 PCR 检测 5 个微卫星位点,将 MSI 阳性分为以下 3 种情况: 2 个及以上位点不稳定判定为高度微卫星不稳定(high microsatellite instability, MSI-H); 1 个位点不稳定判定为低度微卫星不稳定(low microsatellite instability, MSI-L); 无位点不稳定判定为微卫星稳定(microsatellite stable, MSS)。MSI 发生率(%) = 基因出现位移的标本数量/标本总数 × 100%。

8.3 肿瘤组织基因组 DNA 提取及 PCR 扩增 采用 PT-PCR 法。取肿瘤组织,按试剂盒说明书进行染色体抽提,然后进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 20 μL。采用美国国立癌症研究所(NCI)^[7,8]推荐的 5 个微卫星检测基因片段(D2S123、D3S1067、D3S1577、D17S250 和 BAT26)设计引物。所有引物序列查自 NCBI uniSTS 数据库,引物合成自上海英俊生物技术有限公司。PCR 产物经纯化后添加内标后直接在 3130 测序仪中进行毛细管电泳。Data Collection 软件自动进行数据收集和处理,并生成原始的样品数据文件。反应体系为: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 1 min, 退火 1 min (D17S250、D2S123、D5 S346、Bat-25 56℃, Bat26 54℃), 72℃ 延伸 30 s, 共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 1 min。引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列

位点	引物编号	引物序列	产物长度
D17S250	D17S250. F	GGAAGAATCAAATAGACAAT	151 bp
	D17S250. R	GCTGGCCATATATATATTTA	
D2S123	D2S123. F	AAACAGGATGCCTGCCTTTA	211 bp
	D2S123. R	GGACTTTCCACCTATGGGAC	
D5S346	D5S346. F	GGTTGTTCCGTAGTATATGG	295 bp
	D5S346. R	TTGGGAAAGAAGACTAAATCA	
Bat-25	Bat-25. F	TCGCCTCCAAGAAATGTAAGT	126 bp
	Bat-25. R	ATTCTGCATTTTAACTATGGCTCT	
Bat-26	BAT-26. F	TCACTGTCTGCGGTAATCAAG	400 bp
	BAT-26. R	TAGAGTGGGCTGAGATTGTGC	

9 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件,计量资料数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。首先用 Levene 检验进行方差齐性检验,数据资料均方差齐,多个均数比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠瘤重的比较(表 2) 与模型组比较,两个给药组瘤重均明显降低($P < 0.01$);中药组瘤重与化疗组比较,差异无统计学意义。化疗组抑瘤率(45.0%)高于中药组(40.8%)。

表 2 各组小鼠瘤重比较

组别	<i>n</i>	瘤重(g, $\bar{x} \pm s$)	抑瘤率(%)
模型	10	1.9 ± 0.5	—
化疗	10	1.0 ± 0.5 *	45.0
中药	10	1.1 ± 0.5 *	40.8

注:与模型组比较, * $P < 0.01$

2 各组 MSI 发生率及 5 个位点产物大小、峰高度及峰面积比较(表 3) 模型组胃癌组织标本 D17S250、D2S123、D5 S346、Bat-25 和 BAT26 位点上,MSI 在 D5S346 位点发生的频率为 100%(10/10),D2S123 位点发生的频率为 70%(7/10),100%发生微卫星不稳定,其中高度不稳定(MSI-H)发生率 70%,低

度不稳定(MSI-L)发生率 30%。中药组与化疗药物组 D2S123、D5S346 位点基因峰未出现位移。

讨 论

近年来尽管胃癌发病率和病死率呈下降趋势,但目前依然是导致恶性肿瘤相关死亡的第 2 位疾病。胃癌的发生机制复杂,牵涉一系列分子遗传学的改变,如癌基因的激活和抑癌基因的失活。近年来,越来越多的研究证明微卫星不稳定是胃癌发生的又一重要机制,MSI 在胃癌的发生率大约为 14.0%~45.0%,个别高达 90.0%^[9-11]。

消痰散结方是魏品康教授临床治疗胃癌 40 余年的经验方,在临床对 104 例晚期胃癌失去化疗条件的患者进行疗效观察,消痰散结方改善晚期症状的有效率达 82.9%,卡氏评分提高率达 84.4%,中位生存期为 12.25 个月,3 年生存率为 22.10%,获得明显的疗效^[12]。前期基础研究证明,消痰散结方对胃癌细胞间质多种物质均有调控作用,包括对肿瘤血管生成、基质金属蛋白酶的影响等多方位、多角度干预肿瘤的复发转移^[13-16]。对照药物选用喃氟啉,属于抗代谢抗肿瘤药,能抑制胸腺嘧啶核苷酸合成酶,阻断脱氧嘧啶核苷酸转换成胸腺嘧啶核苷核,干扰 DNA 合成,临床运用于胃癌^[17]、结肠癌^[18]、乳腺癌^[19],抗肿瘤作用明确。近年研究认为微卫星不稳定与胃癌患者的预后相关,并且提出 MSI 状态与喃氟啉敏感性存在关联^[20],但究竟喃氟啉在治疗 MSI-H、MSI-L 及 MSS 3 种不同的 MSI 状态时,哪一种 MSI 状态对其疗效更为敏感,目前尚有争议。An JY 等^[21]观察 2005—2008 年接受 R0 切除的 1990 例胃癌患者后,发现给予 5-Fu 为基础的辅助化疗,MSS/ MSI-L 组较 MSI-H 组有更长的无病生存期,MSS / MSI-L 肿瘤患者可以从 5-Fu 为基础的辅助化疗中获益。Ok i E 等^[22]则认为给予 5-Fu

表 3 各组 5 个位点产物大小、峰高度及峰面积比较

组别	<i>n</i>	项目	Bat-25	Bat-26	D2S123		D5S346		D17S250
			Peak 1	Peak 1	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1
模型	10	产物大小(bp)	124.11	394.77	206.28	210.27	284.77	286.81	146.45
		峰高度(RFU)	3 618 ± 627	611 ± 298	1 768 ± 634	1 831 ± 454	1 463 ± 392	2116 ± 607	4 881 ± 1 857
		峰面积(RFU · Sec)	28 111 ± 5 352	30 639 ± 16 291	37 651 ± 13 879	20 303 ± 5 800	17 212 ± 4 563	24 795 ± 6741	75 619 ± 40 472
化疗	10	产物大小(bp)	122.96	394.52	—	209.81	285.50	—	146.97
		峰高度(RFU)	1 353 ± 585	221 ± 92	—	846 ± 312	534 ± 193	—	2 095 ± 731
		峰面积(RFU · Sec)	9647 ± 4 138	8 228 ± 3 293	—	9 724 ± 3 914	5 696 ± 1 798	—	15 175 ± 5 436
中药	10	产物大小(bp)	125.17	394.43	—	209.70	285.63	—	146.92
		峰高度(RFU)	1 499 ± 638	183 ± 50	—	956 ± 131	263 ± 81	—	2 326 ± 219
		峰面积(RFU · Sec)	10 724 ± 4 785	7 487 ± 2 048	—	11 365 ± 1 911	3 117 ± 1 177	—	17 323 ± 1 425

化疗后, MSI-H 和 MSS / MSI-L 组之间的生活质量没有差异。本研究发现消痰散结方对肿瘤有明显的抑制作用, 中药组瘤重明显低于模型组 ($P < 0.01$), 中药组与化疗药物组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。中药组抑瘤率为 40.84%, 本研究发现模型组中人胃癌裸鼠原位移植瘤标本高度不稳定 (MSI-H) 发生率为 70%, 低度不稳定 (MSI-L) 为发生率 30%。喃氟啉干预后, 10 例标本均变为微卫星稳定, 可以从电泳图谱中发现, 干预后 D5S346、D2S123 两个位点出现的峰位移消失; 采用消痰散结方干预, 可以达到喃氟啉相同的疗效。据此可以推断, MKN-45 人胃癌细胞株对喃氟啉的干预敏感, 且对 MSI-H/L 状态的干预效果良好, 消痰散结方亦可达到相似的疗效, 为临床治疗胃癌提供了一种新思路。

本研究对消痰散结方对 MKN-45 人胃癌裸鼠原位移植瘤的微卫星不稳定进行了动物的体内实验, 初步评价了其药效作用, 后续可在细胞水平进一步明确其作用机制, 还可在临床进一步探究其治疗的靶点和途径。本研究仅对 MKN-45 人胃癌细胞株进行了实验研究, 并且标本数量较少, 消痰散结方是否对其他种类的胃癌细胞株具有相同的疗效, 这些有待于在将来的研究工作中进一步完善。

参 考 文 献

- [1] Hong SJ, Choi SW, Lee KH, et al. Preoperative genetic diagnosis of gastric carcinoma based on chromosomal loss and microsatellite instability [J]. *Int J Cancer*, 2005, 113(2): 249–258.
- [2] Bacani J, Zwingerman R, Di Nicola N, et al. Tumor microsatellite instability in early onset gastric cancer [J]. *J Mol Diagn*, 2005, 7(4): 465–477.
- [3] Hamelin R, Chalastanis A, Colas C, et al. Clinical and molecular consequences of microsatellite instability in human cancers [J]. *Bull Cancer*, 2008, 95(1): 121–132.
- [4] 郭晓冬, 魏品康, 许玲. 消痰散结方对裸鼠 MKN-45 胃癌组织中 PCNA 表达的影响 [J]. *广州中医药大学学报*, 2000, 17(2): 152–154.
- [5] Blumenthal RD. Chemosensitivity. Volume 2. *In vivo* models, imaging, and molecular regulators (Methods in Molecular Medicine) [M]. Totowa: Humana Press, 2005: 323–335.
- [6] Shi J, Wei PK, Zhang S, et al. OB glue paste technique for establishing nude mouse human gastric cancer orthotopic transplantation models [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(30): 4800–4804.
- [7] Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(22): 5248–5257.
- [8] Falchetti M, Saieva C, Lupi R, et al. Gastric cancer with high-level microsatellite instability: target gene mutations, clinicopathologic features, and long-term survival [J]. *Hum Pathol*, 2008, 39(6): 925–932.
- [9] Kim MS, Kwon MS, Hong SJ, et al. Genetic classification of intestinal-type and diffuse-type gastric cancers based on chromosomal loss and microsatellite instability [J]. *Virchows Arch*, 2003, 443(4): 491–500.
- [10] Wu M, Semba S, Oue N, et al. BRAF/K-ras mutation, microsatellite instability, and promoter hypermethylation of Hmlh1/MGMT in human gastric carcinomas [J]. *Gastric Cancer*, 2004, 7(4): 246–253.
- [11] Mizoshita T, Tsukamoto T, Cao X, et al. Microsatellite instability is linked to loss of Hmlh1 expression in advanced gastric cancers: lack of relationship with the histological type and phenotype [J]. *Gastric Cancer*, 2005, 8(3): 164–172.
- [12] 李相勇, 魏品康. 金龙蛇口服液治疗晚期胃癌的疗效观察 [J]. *湖北中医杂志*, 2001, 23(11): 3–5.
- [13] 苏晓妹, 李峻, 许玲, 等. 消痰散结方对鸡胚绒毛尿囊膜血管生成及胃癌组织中 VEGF 表达的影响 [J]. *山东中医药大学学报*, 2003, 27(4): 296–297.
- [14] 肖艳, 魏品康, 许玲, 等. 消痰散结方对裸鼠 MKN-45 人胃癌组织中 MMP2 表达的影响 [J]. *成都中医药大学学报*, 2002, 25(4): 32–33.
- [15] 肖艳, 魏品康, 尤清波, 等. 消痰散结方对裸鼠 MKN-45 人胃癌组织中 MT1-MMP 表达的影响 [J]. *辽宁中医学院学报*, 2003, 5(3): 271–272.
- [16] 李峻, 魏品康, 许玲. 消痰散结方对血管内皮细胞小管形成的影响 [J]. *成都中医药大学学报*, 2003, 26(4): 25–26.
- [17] Meng C, Chen X, Luo Z. Inhibitive effect of celecoxib combined with tegafur gimeracil oteracil potassium on the growth of xenograft tumor of gastric cancer in nude mice [J]. *Chin J Cancer Res*, 2013, 29(5): 458–461.
- [18] Hong KD, Lee SI, Moon HY. The efficacy of oral

- tegafur-uracil as maintenance therapy following intravenous 5-fluorouracil chemotherapy in stage III colon cancer [J]. Hepatogastroenterology, 2012, 59(113): 104-107.
- [19] Watanabe T. Evidence produced in Japan: tegafur-based preparations for postoperative chemotherapy in breast cancer [J]. Breast Cancer, 2013, 20(4): 302-309.
- [20] Fang WL, Chang SC, Lan YT, et al. Microsatellite instability is associated with a better prognosis for gastric cancer patients after curative surgery [J]. World J Surg, 2012, 36(9): 2131-2138.
- [21] An JY, Kim H, Cheong JH, et al. Microsatellite instability in sporadic gastric cancer: its prognostic role and guidance for 5-Fu based chemotherapy after R0 resection [J]. Int J Cancer, 2012, 131(2): 505-511.
- [22] Oki E, Kakeji Y, Zhao Y, et al. Chemosensitivity and survival in gastric cancer patients with microsatellite instability [J]. Ann Surg Oncol, 2009, 16(9): 2510-2515.

(收稿:2013-05-23 修回:2014-02-12)

《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)