

清热、活血、健脾等不同中医治法 对癌基因 ras 转录调节的实验研究[※]

□ 管冬元 方肇勤 (上海中医药大学基础医学院 上海 201203)

摘 要 目的: 研究原发性肝癌中清热解毒、活血化瘀、健脾理气等常用不同中医治法对大鼠肝癌的作用机理及其差异。方法: 采用二乙基亚硝胺 (DEN) 水溶液诱发大鼠肝癌模型, 分别观察这些不同治法对肝癌大鼠肝组织 AFP 及三个 Ras 基因的转录调节作用。结果: (1) 不同治法能够针对性地调节癌基因 Ras 的转录水平, 其中清热解毒法和活血化瘀法对 N-ras 基因、健脾理气法对 H-ras 和 K-ras 基因的转录水平都有显著的下调作用; (2) 不同治法对大鼠肝组织 AFP 基因转录有不同程度的下调作用, 其中, 清热解毒法作用最强。结论: 不同中医治法能够不同程度地调节肝癌发生发展过程中一些重要癌基因的转录, 并且这些治法有着明显的作用选择性, 其中清热解毒法、活血化瘀法对肿瘤的直接抑制作用较好, 而健脾理气法可能对肿瘤的转移与复发有效。

关键词 肝癌 AFP Ras 癌基因 治则治法

原发性肝癌 (PLC) 是我国最常见的恶性肿瘤之一, 死亡率甚高, 已跃居恶性肿瘤死亡率的第二位^[1]。我们课题组通过对近 20 年大量的有关中医药治疗肝癌的文献调研, 发现清热解毒、活血化瘀、健脾理气, 以及此三法的综合疗法最为常见^[2], 并且我们已多次实验, 一再证实这四种不同治法均能够不同程度地提高肝癌大鼠的生存率, 降低大鼠肝癌组织中 N-ras 癌基因的转录水平^[3-5]。本文报道了我们在以往研究的基础上, 进一步观察这些不同中医治法方药对 Ras 家族中另两个基因 H-ras 及 K-ras 转录的调控作用, 探讨比较这些不同治法的作用机理, 给临床辨证治疗提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 雄性 Wistar 大鼠, 体重 100 ~ 120 克, 清洁级, 总共 77 只。共分 7 组, 每组动物 11 只。

1.2 大鼠肝癌模型制备 除正常组以外的实验大鼠均自由饮用 60 ~ 80 ppm DEN 水溶液, 至实验模型制备结束共 20 周。

1.3 药物制备及给药方法

1.3.1 治疗原则与方案: 清热组用清热解毒法, 用由半枝莲、白花蛇舌草、蒲公英 3 味组成的清热方; 活血组用活血化瘀法, 用由丹参、桃仁等 4 味药组成的活血方; 健脾组用健脾理气法, 用由黄芪、白术等

※基金项目 上海市教委资助项目 (项目号: 2000QN90)

4 味药组成的健脾方；抑癌组是以上三方的合方；西药组用喃氟啉（FT-207）；模型组不用药。

1.3.2 药物制备：中药购自上海市徐汇区中药饮片厂。各组中药分别经煎煮、取汁、过滤、醇沉、蒸馏提取至 1 毫升含 2 克生药，4. 0℃ 保存备用。西药对照组用喃氟啉片。待造模结束进行治疗时，各组备用药物加蒸馏水溶解稀释，加入大鼠饮水瓶中自由饮用，剂量为成人单位公斤体重的 10 倍。各治疗组从 20 周造模实验结束后开始给药，连续 4 周至实验结束。

1.4 主要试剂

二乙基亚硝胺（Diethylnitrosamine，DEN）：购自中国科学院南京土壤研究所。逆转录酶（M-MLV 200 U/ul）、Taq DNA 聚合酶（5 U/μl）、DNA Marker（each 100bp）：购自华美生物工程公司。

1.5 主要仪器

PCR 基因扩增仪（PE 公司 9600 型）、计算机图象分析系统（ZEISS 公司 KS400 型）

1.6 Ras 及 AFP 基因的 RT-PCR 检测

1.6.1 肝组织总 RNA 抽提

动物处死后，无菌情况下取出大鼠肝脏，称重，统一于右肝内缘切下一块大约 0.1 g 的肝组织，按异硫氰酸胍-苯酚-氯仿一步法，抽提肝组织总 RNA。

1.6.2 基因引物的合成

AFP、三个 Ras 基因及大鼠参照基因 β-actin 的 cDNA 检索自 GenBank，由引物设计软件设计引物序列，最后由上海生工生物工程公司合成。这些引物的上、下游序列参见表 1：

表 1 基因的引物情况表

基因	引物序列
β-actin	上游(845-874,30bp): 5'-TCATGAAGTCTGACGTTGACATCCGTAAG-3'
	下游(1129-1100,30bp): 5'-CCTAGAAGCATTTCGGTGCACGATGGAGG-3'
AFP	上游(431-450,20bp):5'-CTCTGTCCACCCCTCCACT-3'
	下游(880-861,20bp):5'-ACGCTTCCCATCTATAG-3'
H-ras	上游(426-445,20bp):5'-GACCCCACTCACATTCTCCA-3'
	下游(613-592,22bp):5'-CATCATCTGTCCATCGTTCATC-3'
N-ras	上游(128-150,23bp):5'-AAGTAGTAATTCATGAGAAACC-3'
	下游(473-452,22bp):5'-GTATAGAAGGCATCGTCAACAC-3'
K-ras	上游(62-85,24bp):5'-TCCAGCTAATCCAGAACCACTTTG-3'

1.6.3 逆转录-聚合酶链式反应（RT-PCR）

每组的每一个样本取总 RNA 5 μl，加双蒸水 1 ml，分别于分光光度计 260 nm 和 280 nm 处读取 OD 值，OD₂₆₀/OD₂₈₀在 1.8 以上者方可使用。总 RNA 浓度 = OD₂₆₀ × 8（μg/μl），用前调整浓度至 1 μg/μl，再每组各样品取 5 μg 混合，作逆转录反应。

RT 反应体系（20 μl）中含：dNTP（each 10mM）2 μl，5 * buffer 4 μl，DTT（100 mM）1 μl，RNAsin（40 U/μl）1 μl，随机引物（100 μM）1 μl，组织总 RNA 2 μg，加水至 18 μl；65℃ 5 min，冰上加入 RNAsin、M-MuLv 各 1 μl，37℃ 60 min，最后 94℃ 5 min 灭活逆转录酶。-20℃ 保存。

PCR 总反应体积为 40 μl，每个待测基因的每个组别设 2 个复管，将双蒸水 24 μl、4 μM 待测基因的上下游引物各 1 μl、dNTP（0.5 mM）2 μl、10 × Buffer 4 μl、MgCl \ - 2（25 mM）4 μl、RT 产物 4 μl、Tap DNA 聚合酶 0.4 μl 混合于 0.5 ml PCR 薄壁管中，再加入石蜡油 25 μl，然后放入 PCR 仪中，选定 94℃ 40 s、55℃ 1 min、72℃ 2 min 反应程序，共 30 个循环。最后对 PCR 结果进行琼脂糖凝胶电泳，电泳结果在紫外线透视反射分析仪上观察，并拍照，然后经计算机图象分析系统测算电泳条带的光密度值。

1.6.4 数据处理

取电泳凝胶的底片，用 KS400 型图象分析系统进行光密度扫描，以目的基因光密度值与对应样品内参基因 β-actin 光密度值的比值作为该样品中目的基因的相对转录量。最后以目的基因的相对转录量为参数进行分析。由于组内最少样本数为 3 个，因此每个目的基因的相对转录量只相当其均数，反映其趋势，不作统计。

2 结 果

2.1 各组大鼠肝组织 AFP 基因转录水平的比较

表 2 中，正常组 AFP 基因相对转录量很低，而模型组、西药组明显升高，各不同中医治疗组均能不同程度地抑制该基因在大鼠肝癌组织中的转录水平。

表 2 各组大鼠肝组织 AFP 基因转录水平

组 别	n	AFP
正常组	11	0.16
模型组	3	0.78
西药组	3	0.74
清热组	9	0.30
活血组	7	0.36
健脾组	6	0.30

2.2 不同治法对 Ras 癌基因转录水平的调节作用

表 3 中, 各造模组大鼠 H-ras、N-ras 及 K-ras 癌基因的转录量与正常组大鼠相比, 均有明显升高; 与模型组相比, 各治疗组对 3 个 Ras 基因的转录水平均有不同程度的下调作用。其中, 健脾组对 H-ras 癌基因转录水平的下调较为明显; 清热组、活血组对 N-ras 癌基因转录水平的下调更为明显, 其中活血组下调的结果几乎与正常组一样, 健脾组对它也有一定的下调作用; 治疗各组对 K-ras 癌基因的转录水平均有一定的下调作用, 其中以健脾组作用最好。

表 3 各组大鼠肝组织 Ras 基因的转录水平

组别	n	N-ras	H-ras	K-ras
正常组	11	0.40	0.31	0.11
模型组	3	1.00	0.87	0.86
西药组	3	0.89	0.85	0.44
清热组	9	0.51	0.72	0.50
活血组	7	0.35	0.85	0.59
健脾组	6	0.69	0.54	0.43

3 讨 论

研究表明, 原发性肝癌的发生是原癌基因的激活和抑癌基因失活的结果, 这必然会导致其编码的蛋白发生质和量的改变, 从而引起细胞恶变。Ras 癌基因是人们较早发现的存在于原发性肝癌中的一种癌基因, 美国 Barbacid 研究小组最早从事肝癌癌基因的研究, 并很早就证明了 ras 基因的存在。国内学者顾健人首次提出了肝癌癌基因谱这个概念, 并对该基因谱做了较系统的研究^[6]。国内外的大量研究都证明: 在原发性肝癌中, Ras 癌基因在 mRNA 水平及蛋白质水平均有明显升高^[7]。因此, 研究 Ras 癌基因能够很好地帮助我们深入探讨原发性肝癌的发病机理和治

疗途径。

癌基因 Ras 最初是从鼠肉瘤病毒中发现的, 它包括 H-ras、K-ras 和 N-ras。研究发现, 它是广泛存在于生物体内的高度保守的、调控正常细胞生长和分化的重要基因。Ras 基因编码一个分子量为 21KDa 的小蛋白, Ras p21 蛋白能与 GTP 或 GDP 结合, 是鸟嘌呤核苷酸结合蛋白, 具有 GTP 酶活性, 具有两种不同的构象, 即 GTP 结合和 GDP 结合两种形式。它位于细胞质膜内侧面, 胞外的多种刺激信号都可以激活 Ras, 激活的 Ras 就与其效应蛋白相互作用, 并主要通过 ras/MAPK 信号通路向细胞内传递信号, 故又叫信号转导蛋白, 起着分子开关的作用^[8,9]。研究表明, ras/MAPK 信号传导通路是细胞外刺激信号传递到细胞核内最基本最重要的途径^[10,11]。基于此, Ras p21 蛋白在各种细胞的代谢调节过程中特别是在肿瘤的发生中起着十分关键的作用。

研究证明, Ras 基因是原发性肝癌的重要癌基因, 在肝癌基因谱中占据十分重要的位置。它在肝癌组织或实验性肝癌细胞系中均经常处于高表达状态。近年来, 较多实验资料表明, H-ras、N-ras 等癌基因在自发性或化学诱发的肝癌过程中常呈激活或有异常表达, 这就提示它们在肝癌的发生过程中可能起着重要作用^[12]。

本实验结果表明, 模型组大鼠 H-ras、N-ras 及 K-ras 癌基因的转录量与正常组大鼠相比, 均有明显升高, 各治疗组 ras 基因的转录水平均有不同程度的下调作用, 这也与以前的实验结果相一致。但各种不同治法组对 3 个 Ras 基因的影响各不相同, 表明它们对不同的基因有不同的针对性调节作用, 影响最大的靶点互不相同。其中, 健脾理气法对 K-ras、H-ras 作用最强, 而这两个癌基因的高表达和肿瘤的复发与转移有着密切的关系。因此, 该法能有效地抗肿瘤的复发与转移, 这也进一步阐明该法多用于临床患者手术或放化疗后巩固治疗的原因。而清热解毒法与活血化瘀法对 N-ras 的作用较强, 而 N-ras 癌基因与肿瘤的增殖有关, 甚至有人^[6]认为在肝癌的治疗中只要能抑制该基因的表达便能抑制肿瘤的生长, 因此, 该两种治法有较强的抑瘤作用。

目前, 癌基因 Ras 已经成了现代医药学肿瘤靶向

性治疗的重要目标,是设计抗癌新药的重要靶点,这也就是最近几年发展起来的靶向信号传导分子的治疗概念^[13,14]。既然不同治法对 Ras 基因的转录有不同程度的调节作用,那么,近几年开展的基因芯片技术可以为中医药调节癌基因转录表达的分子机制研究提供便捷高效的手段,对于我们进一步探讨中医药如何调节基因活动、进一步研究不同中医治法对 Ras 基因的转录调节作用,从中筛选出疗效确切、针对性强的抗癌新药等都具有十分重要的意义。

参考文献

- [1] 汤钊猷,业余勤,周信达,等.小肝癌的研究及延伸—20 年工作概述.中国医学科学院学报,1997,19(5):395.
- [2] Guan Dongyuan, Fang Zhaoqin. Advances in TCM Treatment of Primary Hepatocarcinoma. JTCM (中医杂志英文版), 2000, 20(3): 223.
- [3] 方肇勤,管冬元.抑癌方与 FT-207 对二乙基亚硝胺诱发大鼠肝癌作用的比较.中西医结合肝病杂志,1999,9(5):19.
- [4] 方肇勤,管冬元,李海燕.不同中医治法对大鼠肝癌作用的比较.上海中医药大学学报,1999,13(1):57.
- [5] 方肇勤,管冬元.不同治法对大鼠肝癌组织基因转录的差异.第

二届国际肝癌会议论文汇编.2000.12.

- [6] 顾健人,陈渊卿,蒋惠秋,等.人原发性肝癌的癌基因谱.肿瘤,1988,8(6):289.
- [7] 李仁勇.大鼠肝癌癌变过程中细胞癌基因的表达.中国医学科学院学报,1990,12(2):121.
- [8] Mark S, Boguski, Frank McCormick. Proteins regulating Ras and its Relatives. Nature, 1993, 366(16):643.
- [9] Douglas R, Lowy. Function and regulation of ras. Annu. Rev. Biochem, 1993, 62:851.
- [10] Rony Seger, Edwin G, Kerbs. The MAPK signal cascade. FASEB J, 1995, 9:726.
- [11] Craig P. Webb, Linda Van Aelst, Michael H. Wigler, et al. Signaling pathways in Ras-mediated tumorigenicity and metastasis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95:8773.
- [12] Anna CH. Ras-proto-oncogene activation in dichloroacetic acid, tetrachloroethylene and tetrachloroethylene-induced liver tumors in B6C3F1 mice. Carcinogenesis, 1994, 15:2255.
- [13] 郭利.基于机制的癌症靶标确定和抗癌药物开发.国外医学药学分册 2000, 27(6):339.
- [14] Prevost GP, Pradines A, Viossat I, et al. Inhibition of human tumor cell growth in vitro and in vivo by a specific inhibitor of human Farnesyltransferase: BIM-46068. Int. J Cancer, 1999, 83(2):283.

《北京中医》2005 年征订启事

《北京中医》是中医、中西医结合综合性学术期刊,双月刊、大 16 开,为中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,中国期刊全文数据库全文收录期刊,中国自然科学核心期刊,北京市优秀科技期刊,由北京中医药学会、北京中西医结合学会主办。统一刊号 ISSN1000-4599/CN11-2258/R。设有京都名医、老中医经验、临床报道、中药方剂、针灸经络、学术探讨、文献综述、专题笔谈、京华中医医院、疑难病研治、科研动态、成药研究等栏目。国内定价每册 6.50 元,全年 39.00 元。国内代号 2-587,国外代号 BM668,中国国际图书贸易总公司(北京 399 信箱)订购。订阅不方便者,本编辑部代办邮购。编辑部地址:北京东单三条甲七号(100005)。电话:(010)65251589,传真:(010)65223477,电子信箱:bjTcm@public3.bta.net.CN。

《中医研究》杂志 2005 年改为月刊启事

《中医研究》是由中华中医药学会、河南省中医药研究院主办,国内外公开发行的综合性国家级学术刊物。为中国学术期刊综合评价数据来源期刊,并被中国期刊网、中国学术期刊光盘版全文收录。设有“学术探讨”、“发展论坛”,“经典研究”、“实验研究”、“临床研究”、“针灸经络”、“综述”等栏目。05 年改为月刊,开办有中西药物、医院特色介绍等广告业务,热情欢迎垂询。国内刊号:CN41-1124/R。邮发代号:36-130。地址:郑州市城北路 7 号《中医研究》杂志社(450004)。电话:0371-6322705。传真:0371-6349072。电子信箱:zgzyyj@yahoo.com.cn 或 zgzyyj@tom.com

《中国中医急症》杂志 2005 年征订启事

《中国中医急症》由中华中医药学会主办、国家中医药管理局主管,为中华中医药学会系列期刊、中国科技核心期刊、中国科技论文统计源期刊、中国中医药优秀期刊。设有专家论坛、临床研究、必备中成药、证治探讨、理论研讨、实验研究,述评、综述等栏目。杂志为月刊,国内外公开发行。开本为国际大 16 开,正文 80 页码,每期定价 6 元,全年定价 72 元,邮局订阅代号:78-98,也可直接汇款至编辑部订阅。联系人:安浚;地址:重庆市渝中区北区路 1 号;邮编:400013;电话:023-63521390,63534375;传真:023-63534372(自动)。