

补肾化瘀解毒复方对小鼠肺癌转移及 nm23 mRNA 表达的影响[※]

● 严庆文¹ 曹 勇^{2▲} 许林利² 李 亮² 陈 璐²

摘 要 目的:探讨补肾化瘀解毒复方对动物肺癌肺转移的作用及机理。方法:以小鼠 Lewis 肺癌为模型,运用 RT-PCR 技术,观察补肾化瘀解毒复方对小鼠 Lewis 肺癌肺转移的抑制作用,以及瘤组织中 nm23(肿瘤转移抑制基因)mRNA 表达的影响。结果:补肾化瘀解毒复方高、低剂量组和复方高、低剂量加顺铂组对小鼠 Lewis 肺癌移植瘤及肺转移灶均有不同程度的抑制作用,并能增强 nm23 mRNA 的表达,与模型组比较,有显著性差异($P < 0.05$),其中补肾化瘀解毒复方高剂量加顺铂组的作用最为显著($P < 0.01$)。结论:补肾化瘀解毒复方能明显抑制小鼠 Lewis 肺癌的自发性转移,与化疗药有协同增效作用,其作用机制可能与促进 nm23 mRNA 的表达有关。

关键词 补肾化瘀解毒复方 Lewis 肺癌 肺转移 nm23 mRNA

补肾化瘀解毒复方是我们临床用于治疗肺癌的有效方药,具有抑瘤和对化疗增效解毒,提高生存质量和延长生存期作用。前期实验研究表明补肾化瘀解毒复方对肺癌细胞具有抑制杀伤和对肺癌耐药细胞具有耐药逆转作用^[1],为了进一步探讨补肾化瘀解毒复方对肺癌转移的作用及其机理,运用 RT-PCR 技术,观察补肾化瘀解毒复方对 Lewis 肺癌小鼠肺脏转移的抑制作用,以及瘤组织中 nm23 mRNA 表达的影响,以便为临床提供应用补肾化瘀解毒复方提供客观的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物 补肾化瘀解毒复方制备,取中药补肾化瘀解毒复方(由补骨脂、肉桂、莪术、大黄、粉防己、全瓜蒌等药物组成)免煎颗粒剂(深圳三九医药股份

※基金项目 广东省科技计划项目(No:73062);广东省中医药局项目(No:2040030)

▲通讯作者 曹勇,男,教授,医学博士。主要从事中西医结合治疗肿瘤及肺系疾病研究工作。E-mail:tcaoy@163.com。

•作者单位 1.广东省广州市萝岗区中医医院(510530);2.暨南大学医学院中医系(510632)

有限公司生产),用温蒸馏水配成相当于原生药材 2g/mL 的浓缩剂,装入药瓶高温高压灭菌后冷却,置 4℃ 冰箱备用。顺铂(DDP):锦州九泰药业有限公司生产。10mg/瓶,批号:0101002。

1.1.2 动物 实验动物用 SPF 级 C₅₇BL/6J 小鼠,体重 18~22g,由中山大学实验动物中心提供。合格证号:NO.0008701,SCXK(粤)2004-0011。

1.1.3 主要试剂 RT-PCR 提取试剂盒,购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.1.4 主要仪器 紫外线分光光度计(IF 型)为上海嘉鹏科技有限公司生产;凝胶成像系统为 BIO-RAD 公司生产;PCR 仪(Unit Block Assembly DNA Engine Systems ALS1296 型)为 BIO-BAD 公司生产;电泳仪(OYY-III-5 型)为北京六一仪器厂生产。

1.2 方法

1.2.1 补肾化瘀解毒复方对小鼠 Lewis 肺癌和肺转移的抑制作用

1.2.1.1 造模 在无菌条件下,取传代 10 天的 Lewis 肺癌瘤源小鼠,脱颈椎处死,无菌操作从腋部皮下剥取肿瘤组织,剔除纤维包膜和坏死组织,在平皿中剪碎,置玻璃组织匀浆器中研磨,按 1:3 比例加生理盐水稀释成瘤细胞悬液,调整细胞浓度为 1×10^7 /

mL,选取 C₅₇/6J 小鼠右前肢腋皮下注射。

1.2.1.2 分组及给药 接种 24 小时后,称重随机分组。设荷瘤模型对照组(模型组)。补肾化瘀解毒复方高、低剂量组(中药高、低剂量组),顺铂(DDP)组,补肾化瘀解毒复方高、低剂量加 DDP 组(中药高、低剂量加 DDP 组),每组 8 只,均为同一性别。分组后,化疗药 DDP 按 1mg/kg(相当于 1/10LD₅₀) ip,第 4、11、18 天各 1 次。中药高、低剂量组分别按 30g/kg、10g/kg(为临床成人日用量的 19.0 倍、6.4 倍)灌胃给药,模型组按等容积蒸馏水灌胃,每天 1 次,连续 21 天,第 22 天处死小鼠,解剖瘤体称重。剥取双肺用多聚甲醛固定,肺肿瘤放在液氮中保存。

1.2.1.3 计算抑瘤率及肺转移抑制率 肿瘤抑制率按平均瘤重计算,肿瘤抑制率=(对照组瘤重-给药组瘤重)/对照组瘤重×100%。肺转移抑制率以固定中的肺组织在解剖显微镜下观察肺表面转移灶计算,肺转移抑制率=(对照组肺转移个数-给药组肺转移个数)/对照组肺转移个数×100%。

1.2.2 补肾化瘀解毒复方对 nm23 基因 mRNA 的影响 nm23 基因 mRNA 表达的检测,参照王海峰等^[2]介绍的方法,采用 RT-PCR 法。

1.2.2.1 组织总 RNA 的提取 采用 Trizol (Invitrogen)提取总 RNA,按照说明书操作,100g/L 加入 Trizol(Invitrogen)提取总 RNA,用紫外分光光度计测定所提取 RNA 的浓度,并溶解于 20ul 的去 RNA 酶的灭菌双蒸水(DEPC 处理的 ddH₂O),用 1.5% 琼脂糖凝胶 120V 电泳约 30min,然后 RNA 电泳检测 RNA 的完整性。

1.2.2.2 mRNA 反转录 cDNA 的合成严格按照 TaKaRa RNA PCR Kit(AMV) Ver. 3.0 试剂盒上的说明书操作,摸定的反转录条件为 94℃ 25min,43℃ 5min,50℃ 5min 一个循环,放在 -200C 中保存。

1.2.2.3 反转录产物的 PCR 反应 检测试剂:TaKaRa RNA PCR Kit(AMV) Ver. 3.0(宝生物工程有限公司),引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,序列 nm23 上游:5-CTAGAATGACATCCGACTCC-3;nm23 下游:5-TTGAGAAGGTCCTCTGAAGC-3;扩增片段为 337bp。参照基因引物 β-actin 上游:5-GAGACCTTCAACACCCAGCC-3;β-actin 下游:5-AATGTCACGCACGATTTCCC-3;扩增片段为 266bp。反应管总体积为 50μL,扩增反应在 PCR 仪上进行(Unit Block Assembly DNA Engine Systems ALS1296 型为美国 BIO-RAD 公司生产)。反应条件

如下:94℃ 2 min,一个循环,94℃ 30 sec,56℃ 30 sec,72℃ 1 min,共循环 35 次;72℃ 延伸 4min。内参反应条件为:94℃ 30 sec,55℃ 30 sec,72℃ 1min,共循环 35 次;72℃ 延伸 4min。

1.2.2.4 产物的电泳分析 对 PCR 检测产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶 80 V 电泳约 60 min,用凝胶图像分析仪采集图像(BIO-RAD 公司生产),采用 Quantity One 分析软件,将扩增的 nm23 产物的光密度值与 b-actin 的扩增产物光密度值的比值的作为表达水平的参数。

1.2.3 统计学处理 以均数±标准差表示,用 t 值法进行组间差异显著性检验,统计方法采用 SPSS11.5 统计软件包。

2 结果

2.1 补肾化瘀解毒复方对小鼠 Lewis 肺癌的抑制作用 结果见表 1。补肾化瘀解毒复方高、低剂量组,以及高、低剂量加 DDP 组对小鼠 lewis 肺癌均有不同程度的抑制作用,与模型组比较差异显著($P < 0.05$),尤以补肾化瘀解毒复方高剂量加 DDP 组最为明显($P < 0.01$),并且补肾化瘀解毒复方高剂量与 DDP 合用后,抑瘤作用明显高于 DDP 组($P < 0.05$)。

表 1 补肾化瘀解毒复方对小鼠 Lewis 肺癌的抑制作用($\bar{x} \pm s$, n=8)

组别	瘤重(g)	抑瘤率(%)
模型组	4.01 ± 0.64	—
DDP 组	2.58 ± 1.03 [▲]	35.8
中药低剂量组	3.01 ± 0.80 [▲]	25.0
中药高剂量组	2.87 ± 0.95 [▲]	28.5
中药低剂量加 DDP 组	2.45 ± 0.81 [▲]	39.1
中药高剂量加 DDP 组	1.43 ± 0.43 ^{▲▲△}	61.5

注:与模型组比较:▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$;与 DDP 组比较:△ $P < 0.05$ 。

2.2 补肾化瘀解毒复方对小鼠 Lewis 肺癌肺转移的抑制作用:结果见表 2。补肾化瘀解毒复方高、低剂量组,以及高、低剂量组加 DDP 组和 DDP 组对小鼠 lewis 肺癌肺转移均有不同程度的抑制作用,与模型组比较差异显著($P < 0.05$),尤以补肾化瘀解毒复方高、低剂量加 DDP 组最为明显($P < 0.01$),并且高、低剂量加 DDP 组抑瘤作用明显高于 DDP 组($P < 0.05$)。

表 2 补肾化瘀解毒复方对小鼠 Lewis 肺癌肺转移的抑制作用
($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组	别肺转移灶数 (个)	肺转移抑制率 (%)
模型组	5.25 ± 2.19	—
DDP 组	2.50 ± 1.41▲▲	52.4
中药低剂量组	3.38 ± 1.40▲	35.6
中药高剂量组	3.13 ± 1.55▲	40.4
中药低剂量加 DDP 组	2.00 ± 1.60▲▲	61.9
中药高剂量加 DDP 组	1.88 ± 1.25▲▲△	64.2

注：与模型组比较：▲ $P < 0.05$ ，▲▲ $P < 0.01$ ；与 DDP 组比较：△ $P < 0.05$ 。

2.3 补肾化瘀解毒复方对小鼠 Lewis 肺癌 nm23mRNA 表达的影响：结果见表 3。补肾化瘀解毒复方高剂量组，以及高、低剂量加 DDP 组的 nm23 基因 mRNA 表达均有不同程度的提高，与模型组比较，差异显著($P < 0.05$)，低剂量组无显著性差($P > 0.05$)，并且补肾化瘀解毒复方高剂量组，以及高、低剂量加 DDP 组与 DDP 组比较，差异也显著($P < 0.05$)。

表 3 补肾化瘀解毒复方对小鼠 Lewis 肺癌 nm23 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组 别	nm23 mRNA
模型组	0.36 ± 0.04
DDP 组	0.47 ± 0.06
中药高剂量组	1.07 ± 0.12▲▲
中药低剂量组	0.45 ± 0.05
中药高剂量加 DDP 组	0.86 ± 0.16▲▲
中药低剂量加 DDP 组	0.89 ± 0.19▲▲

注：与模型组比较：▲ $P < 0.05$ ；与 DDP 组比较△ $P < 0.05$ 。

3 讨论

肺癌是临床常见的恶性肿瘤，转移是导致其治疗失败和死亡的主要原因。我们根据中医理论和临床观察，认为肾虚是肺癌发生及转移的根本原因，气血凝滞、瘀毒互结是其形成的重要病理基础，拟定了具有补肾化瘀、解毒散结作用的补肾化瘀解毒方。方中肉桂功效如《日华子本草》所说：“破瘀癖癥瘕，消瘀血”；补骨脂能补肾助阳，并助温肺以布散津液、化痰除湿之功；莪术“破积聚”（《品汇精要》）；大黄之用，如《医学衷中参西录》所云：“大黄，……能入血分，破一切瘀血……，下一切癥瘕积聚”，以及《药征》曰：“大黄主通利结毒”。故诸药合用，共奏补肾化瘀、解毒散结之效。药理证实，肉桂中的肉桂酸对人肺腺癌 A549 细胞增殖有明显的抑制作用^[3]。补骨脂中的补骨脂素对人粘液表皮样癌和肺转移均有明显的抑制

作用，并能增强 nm23 和野生型 p53 的表达^[4]。莪术油对小鼠 Lewis 肺癌细胞具有杀伤作用，并能降低高转移黑色素瘤细胞外基质的粘附以及侵袭性和运动能力，抑制肺内转移^[5]。大黄中的大黄素可使细胞侵袭能力降低，抑制肿瘤细胞转移，并能诱导人肺癌 A549 细胞凋亡和下调端粒酶逆转录酶 mRNA 表达水平的作用^[6]。

本研究结果显示，补肾化瘀解毒复方对小鼠 lewis 肺癌具有显著的抑瘤作用，以及对化疗药物的协同增效作用，同时补肾化瘀解毒复方对小鼠 lewis 肺癌自发性肺转移有抑制作用，并能促进 nm23mRNA 的表达。表明补肾化瘀解毒复方对小鼠 lewis 肺癌肺转移的抑制，与提高 nm23mRNA 表达有关。

nm23 基因又称为肿瘤转移抑制基因，是 1988 年美国国立癌症研究所 Steeg^[7]等运用消减杂交法从小鼠黑色素瘤 K-1735 细胞株中分离出来的一种 cDNA 基因，研究发现 nm23 对癌细胞株的运动能力和转移潜能均有抑制作用。目前研究表明，nm23 基因与细胞的生长、分裂、转录、翻译调控、分化抑制、信号传导、微管组装，癌症发生、发展、转移等有关，并且具有抑制肺癌转移作用^[8]，由此推断补肾化瘀解毒复方抑制肺癌转移的机制可能是多途径、多机制综合作用的结果，但其确切的机理有待于进一步的研究。

参考文献

[1] 曹 勇,张 丹,郑广娟,等. 补肾化瘀解毒方对肺癌耐药细胞的耐药逆转及机制研究[J]. 山东中医杂志,2004,23(2):100-103.
[2] 王海峰,陈晓峰,丁嘉安,等. 转移抑制基因 nm23mRNA 表达水平与非小细胞肺癌临床病理特征及预后的关系[J]. 肿瘤,2006,26(10):920-923.
[3] 金 戈,张 婷,王 涛. 肉桂酸对 A549 人肺腺癌细胞增殖和核仁组成区的影响[J]. 河南医学研究,2002,11(2):124-125.
[4] 韩建勋,吴军正,李 峰,等. 8-甲氧基补骨脂素对 MEC-1 细胞癌基因/抑癌基因表达的影响[J]. 实用口腔医学杂志,1999,15(6):457-458.
[5] 夏卫军,程罗根,徐建亚,等. 莪术对黑色素瘤细胞转移相关能力的影响[J]. 中药药理与临床,2007,23(2):45-47.
[6] 宋永春,廖子军,陈晓泉,等. 大黄素对肺癌细胞株 A549 凋亡及端粒酶逆转录酶表达的影响[J]. 中国肿瘤临床,2006,33(23):1371-1373.
[7] Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, et al. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential[J]. J Natl Cancer Inst, 1988,80(3):200-204.
[8] 江志坚,王小平. nm23 与非小细胞肺癌关系的研究进展[J]. 四川肿瘤防治,2006,19(4):287-289.