

· 方药研究 ·

肺岩宁方对转移性肺癌小鼠上皮标志因子表达的影响

赵晓珍¹ 徐振晔¹ 吴中华²

(1. 上海中医药大学附属龙华医院浦东分院肿瘤二科, 上海市浦东上钢二村45号, 200126; 2. 上海中医药大学科研实验中心)

[摘要] **目的** 研究上皮-间质细胞转化相关上皮细胞标志因子在 C57 小鼠 Lewis 肺癌中的表达以及肺岩宁方对其 mRNA 表达的影响。**方法** 采用实时 PCR 观察 C57 小鼠 Lewis 肺癌右腋下移植瘤和远处转移灶发生的肺组织中上皮型钙黏附蛋白(E-cadherin)、 α 连环蛋白(α catenin)、 β 连环蛋白(β catenin) mRNA 表达及肺岩宁方对其表达的影响。**结果** 肺岩宁治疗组较模型组肺转移率明显降低($P < 0.01$); 对于各组移植瘤组织中, 肺岩宁治疗组及化疗阳性对照组的移植瘤组织中 E-cadherin、 α catenin 及 β catenin 均较模型组升高($P < 0.01$); 模型组肺组织中 E-cadherin、 α catenin、 β catenin 表达明显低于正常肺组织中的表达($P < 0.05$), 而经过肺岩宁方治疗后, 三个标志因子均有显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 肺岩宁方具有上调上皮细胞标志因子的作用, 其可能通过抑制上皮-间质细胞转化过程的发生而达到抗肿瘤转移的作用。

[关键词] 肺岩宁方; 上皮-间质细胞转化; 上皮标志因子; 肿瘤转移

Study on the Influence of Feiyanning Decoction on Expression of E-cadherin, α catenin and β catenin of Mice with Metastatic Lung Cancer

ZHAO Xiao-zhen¹, XU Zhen-ye¹, WU Zhong-hua²

(1. Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200126; 2. Scientific Research Laboratory Center of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT **Objective** To study the expressions of epithelial symbol factors including E-cadherin, α catenin, and β catenin related to epithelial-mesenchymal transition (EMT) in C57 mice Lewis lung cancer and its mRNA expression affected by Feiyanning Decoction (Decoction for lung cancer). **Methods** The Real-Time PCR method was adopted to observe the E-cadherin, α catenin, β catenin mRNA expression of C57 mice with transplanted tumor in the right armpit and distal metastases and the affection of Feiyanning Decoction on the expression. **Results** The lung transplanted rate in the Feiyanning group was clearly lower than that in the model group ($P < 0.01$). In the transplanted tumor tissues of all groups, the expression of E-cadherin, α catenin and β catenin of Feiyanning group and chemotherapy positive control group was all higher than that of model group ($P < 0.01$). As in the lung tissues of all groups, the expression of E-cadherin, α catenin and β catenin of model group was clearly lower than that of normal lung tissues ($P < 0.05$), but with treatment of Feiyanning Decoction, these 3 symbol factors were all clearly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Feiyanning Decoction functions to up-regulate the epithelial symbol factors, playing a role in anti-metastasis of tumors maybe through inhibiting the occurrence of EMT.

Key Words Feiyanning Decoction (Decoction for lung cancer); Epithelial-mesenchymal transition (EMT); Epithelial symbol factor; Metastasis of tumors

肿瘤转移是导致肺癌死亡和手术失败的主要原因^[1,2]。最新研究表明,在癌症转移的过程中上皮细胞会暂时丧失其细胞特性,并且表现出具有移行能力的间质细胞的特性(即上皮-间质细胞转化),从而导致癌症转移的发生^[3,4]。上皮型钙黏附蛋白(E-cadherin)、 α 连环蛋白(α catenin)、 β 连环蛋白(β catenin)是上皮细胞标志因子,本研究通过观察在肿瘤组织和转移的

肺组织中 E-cadherin、 α catenin、 β catenin 的 mRNA 的表达,探讨其在肺癌转移中的作用和意义及中药肺岩宁方对其的影响。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

XW-80A 旋涡振荡器(Vortex)(上海青浦沪西仪器厂);K10CD 干式恒温器(杭州蓝焰科技有限公司);伊莱克斯 BDC-280e 冷藏冰箱(湖南长沙);Sigma 1-3KJ15 低温冷冻离心机(美国);Sigma TYPE/B2 生物安全柜;Sigma 紫外杀菌车 ZXC 型;7300 Sequence Detec-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30701114),上海市重点学科资助

项目(Y0302)

通讯作者:赵晓珍, zhxxzhtiger2001@yahoo.com.cn, (021) 58835753

转116

tion System Real-time 检测仪 ABI-7300 ABI(美国)。鼠抗人 E-cadherin IgG(批号:D0907)、兔抗人 α catenin IgG(批号:F1107)、羊抗人 β catenin IgG(批号:B0108),均购于 Santa Cruz 公司;SP 免疫组化试剂盒(美国 Zymed 公司,批号:030408);DAB 显色试剂盒(北京中山生物技术有限公司,批号:20973559) SYBR Green I 定量 PCR 试剂盒(购于上海生物工程技术服务有限公司,批号:BK3101)

1.2 药物

肺岩宁方组成:生黄芪40g、女贞子15g、露蜂房9g、七叶一枝花15g、山慈菇15g、黄精30g等,由龙华医院中药房提供。常规水煎,水浴浓缩至生药含量为2.0g/ml,4℃保存备用。顺铂(DDP):20mg/瓶,齐鲁制药厂产品,批号:057023,使用时配制成0.1mg/ml。

1.3 实验动物及瘤株

C57BL-6纯系10周龄雄性小鼠40只,体重(20±2)g,购置于中外合资上海普尔必凯实验动物有限公司,许可证号:SYXK(沪)2005-0002。C57BL-6 Lewis 肺癌细胞株种鼠由上海医药工程研究院中心任文龙馈赠。实验动物饲养于上海中医药大学中心动物房,室温25℃,自由饮食和进水。

1.4 模型制作

取传代后第14天的 C57BL-6 Lewis 肺癌细胞株种鼠脱颈椎处死,从小鼠皮肤下剥取肿瘤组织,剔去纤维组织,用剪刀将肿瘤块剪碎,置于研磨器中加4ml 生理盐水轻轻研磨,过滤于试管中,制成瘤细胞悬液;少量悬液滴于玻璃计数板上,台盼蓝染色,双筒显微镜下计癌细胞数目,生理盐水调整肿瘤细胞浓度为 1×10^7 /ml;用1ml 注射器取上述悬液0.2ml,注射于小鼠右腋部皮下,完成小鼠肿瘤接种。

1.5 实验分组及治疗方法

将40只 C57BL-6纯系10周龄雄性小鼠采用随机数字排列表的方法随机分为4组,每组10只。正常组:予正常饲养;模型组:造模后予生理盐水0.4ml 灌胃21天;肺岩宁治疗组:在造模后第5天开始给药,肺岩宁方药液0.4ml(相当于生药量为36.1g/kg)灌胃21天;化疗阳性对照组:在造模后第5、7、9天予 DDP 溶液1ml(含DDP0.1mg)腹腔注射,生理盐水0.4ml 灌胃21天。

1.6 肺转移灶发生率的观察

将小鼠用拉颈断髓方法处死,剪取左肺组织备用(用于肺组织总 RNA 提取)。然后用磨钝的61/2号针头插入主气管内,注入10%甲醛液1ml,使右肺充分膨胀后结扎主气管下端,拔出针头,小心地将主气管及整个右肺取下,固定于10%的甲醛液中24小时。采用铁苏

木素大体染色透明计数法,在解剖显微镜下分叶计数染成黑色的肺转移瘤灶的数目,并按下式计算肺转移灶发生率:肺转移灶发生率=[每组发生肺转移灶数目(个)/对照组肺转移灶数目(个)]×100%

1.7 实时 PCR 实验

总 RNA 的制备:取各组的组织标本50mg,加入1ml Trizol 匀浆后按照说明书提取总 RNA,1μg 总 RNA 在20μl 体系中按照标准程序进行逆转录,逆转录酶采用 M-MuLV。E-cadherin、 α catenin、 β catenin mRNA 拷贝数检测采用实时定量 PCR,反应体积为50μl,扩增反应应用 SYBR Green I 定量 PCR 试剂盒,各反应管放入 ABI-7300定量 PCR 仪。引物由上海申友公司设计合成。上游引物:E-cadherin, 5'-GGAGGCAGAG-GCAGTCAGAT-3'; α catenin, 5'-TTATTCGGGCTCGTGTGTTG-3'; β catenin, 5'-CACCACCCTGGTGCTGACTA-3'; GAPDH, 5'-CC-GAGGGCCCCACTAAAGG-3'。下游引物:E-cadherin, 5'-GGTTTGCAGAGACAGGGTTTC-3'; α catenin, 5'-CAGGAAACACTGCGACGATT-3'; β catenin, 5'-ATCAAACCAGGCCAGCTGAT-3'; GAPDH, 5'-GCTGTTGAAGTCACAGGAGACAA-3'。扩增条件为95℃预变性1分钟,95℃ 15秒、55℃ 30秒、72℃ 15秒40循环。数据分析采用 Δ Ct 值表示^[4],即 Δ Ct=Ct 目的基因-CtGAPDH。

1.8 统计学方法

数据用($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.0统计软件包对数据进行分析,选择 F 检验、单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠死亡情况

模型组小鼠死亡2只,肺岩宁治疗组小鼠死亡1只,化疗阳性对照组小鼠死亡2只。

2.2 肺岩宁方对肺转移发生率的影响

表1示,除正常组外其余各组均出现肺转移灶,与模型组比较,肺岩宁治疗组肺转移率显著降低($P < 0.01$)。

表1 各组小鼠肺转移发生率比较

组别	鼠数	肺转移数(个, $\bar{x} \pm s$)	肺转移率(%)
正常组	10	0	0
模型组	8	1.63±0.52	100
肺岩宁治疗组	9	0.44±0.53*	30.77
化疗阳性对照组	8	1.25±0.71	76.92

与模型组比较, * $P < 0.01$

表2 各组小鼠肿瘤组织和肺组织中 E-cadherin、 α catenin、 β catenin 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	肿瘤组织			肺组织		
		E-cadherin	α catenin	β catenin	E-cadherin	α catenin	β catenin
正常组	10	—	—	—	4.16 $\pm$ 1.40	4.28 $\pm$ 1.67	5.44 $\pm$ 2.96
模型组	8	4.09 $\pm$ 1.16	2.25 $\pm$ 1.76	2.54 $\pm$ 1.80	2.31 $\pm$ 2.24*	2.05 $\pm$ 1.43*	3.07 $\pm$ 1.10*
肺岩宁治疗组	9	8.67 $\pm$ 1.72 $\triangle\triangle$	9.82 $\pm$ 2.48 $\triangle\triangle$	10.86 $\pm$ 2.63 $\triangle\triangle$	4.62 $\pm$ 1.63 $\triangle$	7.26 $\pm$ 4.15 $\triangle\triangle$	8.48 $\pm$ 3.06 $\triangle\triangle$
化疗阳性对照组	8	8.71 $\pm$ 1.44 $\triangle\triangle$	9.96 $\pm$ 2.64 $\triangle\triangle$	6.88 $\pm$ 4.28 $\triangle\triangle$	4.87 $\pm$ 1.46 $\triangle$	6.88 $\pm$ 4.28 $\triangle\triangle$	8.14 $\pm$ 3.32 $\triangle\triangle$

与正常组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, $\triangle P<0.05$, $\triangle\triangle P<0.01$

2.3 E-cadherin、 α catenin、 β catenin 在各组移植瘤组织中及远处转移的肺组织中的表达

表2示, 模型组肿瘤组织中 E-cadherin、 α catenin、 β catenin 的含量均在较低水平, 而肺岩宁治疗组和化疗阳性对照组的含量均较其明显升高, 差异有统计学意义($P<0.01$)。E-cadherin、 α catenin、 β catenin 在模型组肺组织的表达明显低于正常组肺组织中的表达($P<0.05$), 而经过肺岩宁方及化疗治疗后, 肺组织中 E-cadherin、 α catenin、 β catenin 与模型组比较显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

3 讨论

肿瘤转移的机理一直是肿瘤研究领域的热点, 在肿瘤转移发生的过程中, 某些上皮细胞在与其周围间质的相互作用过程中, 逐渐获得了一些间质细胞的特有性状, 表现为丧失部分上皮细胞特征、获得部分间质细胞特征, 这种现象被称为上皮-间质转化(EMT)^[3]。黏附分子 E-cadherin、 α catenin 和 β catenin 是上皮细胞标志物, 它们表达的降低, 导致癌细胞转移能力的提高, 促进肿瘤转移的发生^[4~8]。

本实验以 C57BL-6小鼠 Lewis 肺癌转移肿瘤模型为研究对象, 研究结果证实上皮细胞标志因子不仅在原发的移植瘤组织中表达, 而且在转移灶发生的肺组织中也表达。而且转移的肺组织中的表达低于原发的移植瘤组织中。说明上皮细胞标志黏附分子表达的降低参与了肺癌转移的发生。肺岩宁方具有上调 E-cadherin、 α catenin 和 β catenin 表达的作用, 从而阻抑肿瘤细胞的转移。在此实验中, 模型组小鼠死亡2只, 主要

考虑由于瘤体增长过快导致;肺岩宁治疗组小鼠死亡1只是由于灌胃不当导致, 化疗阳性对照组小鼠死亡2只主要考虑由于化疗药物的毒副作用导致。因此, 肺岩宁方通过调控上皮细胞标志因子 E-cadherin、 α catenin 和 β catenin 的表达为阻抑肿瘤转移的发生机制之一。

参考文献

[1]林小平, 王庆生, 刘新民. 肺癌发病趋势及分析. 天津医科大学学报, 2000, 6(2) : 129~132.

[2]李连弟, 饶克勤, 张思维, 等. 中国12市县1993年~1997年肿瘤发病和死亡登记资料统计分析. 中国肿瘤, 2002, 11(19) : 497~507.

[3]Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. Acta Anat (Basel) . 1995, 154(1) : 8~20.

[4]Kang Y, Massague J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. Cell, 2004, 118(3) : 277~279.

[5]Guarino M, Rubino B, Ballabio G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. Pathology, 2007, 39(3) : 305~318.

[6]Becker KF, Rosivatz E, Blechschmidt K. Analysis of the E-cadherin repressor Snail in primary human cancers. Cells Tissues Organs, 2007, 185(1-3) : 204~212.

[7]Bagnato A, Rosano L. Epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer progression: a crucial role for the endothelin axis. Cells Tissues Organs, 2007, 185(1-3) : 85~94.

[8]Yang J, Mani SA, Donaher JL, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. Cell, 2004, 117(7) : 927~939.

(收稿日期:2008-01-14;修回日期:2008-03-24)

[编辑:邓媛]

汇编《中国传统医学技术研究》征稿通知

为促进传统医学技术的挖掘整理、发展创新及向广大医学爱好者、医务工作者提供参阅、研究传统医学技术的资料, 拟汇编《中国传统医学技术研究》。征文如下。运用传统医学技术(中医、中药、民族医药、针灸、推拿、外治法等) 治疗常见病、疑难病、危重病经验介绍及个案报道; 传统医学理论研究、临床研究、实验研究、文献研究; 中医药膏、丹、散、丸、民间偏方、验方等的临床应用与经验总结; 传统医学技术在传承、创新、发展等学术探讨与实践探索。欢迎德技双馨的医务人员投稿、预订, 请注明“传统医学”, 及附作者简历、电话。录用稿件将按《著作权法》发放稿酬, 细则请见录用通知。稿件请于2008年10月28日前寄至江苏南京市商埠街27号聚杰医药科技研究中心刘凤国收, 邮编: 210011。E-mail: tg@huaxia120.com。电话: (025) 86054929、86054939。

如何比长跑冠军先到? 借助快捷的交通工具! 如何比名医的疗效还好? 借助智能化“慈方名医”系统真的吗? 您可免费试用10例后, 自己来回答!

“慈方名医”系统是远程智能数字名医会诊系统。只要您是临床医生, 能上网, 通过简短培训, 借助这个系统, 您的疗效可以达到名医水平!

下载地址: www.cifang.com (慈方中医网)
电话: 010-89760081
QQ 307274548, UC 46605769。
网上培训在新浪 UC“慈方医学”房间!