

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.02.017

不同功效中药对裸鼠肺癌皮下移植瘤及转移相关微小 RNA 的影响

王 芹^{1,2}, 焦丽静¹, 窦同海³, 王胜飞¹, 许 玲^{1*}

(1. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海市徐汇区宛平南路 725 号, 200032; 2. 上海市闵行区中医医院; 3. 复旦大学生物医学研究院)

摘要 目的 观察益气养阴、健脾温肾、软坚散结中药对裸鼠人肺癌 NCI-H460 细胞皮下移植瘤的影响及其可能作用机制。方法 将人非小细胞肺癌细胞株 NCI-H460 接种于 32 只裸鼠皮下, 成瘤后随机分为健脾温肾组、益气养阴组、软坚散结组和生理盐水组, 每组 8 只。接种 1 个月起各组小鼠分别灌胃给予相应药物, 健脾温肾方、益气养阴方、软坚散结方药物浓度分别为 1.1、1.9、1.8 g/ml, 每日 1 次, 每次 0.3 ml, 共 15 天。检测各组荷瘤小鼠肿瘤体积和重量, 计算抑瘤率, PCR 检测肺癌皮下移植瘤中 MicroRNA-21、MicroRNA-218 的表达。结果 给药 10 天时各组小鼠瘤体积均较给药前明显增大, 给药 15 天时益气养阴组、软坚散结组、生理盐水组小鼠瘤体积较给药前增大 ($P < 0.05$)。温肾健脾组、益气养阴组、软坚散结组肿瘤抑制率分别为 9.9%、16.3%、11.8%, 各组抑制率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。益气养阴组瘤重、MicroRNA-21 的表达量均明显低于生理盐水组 ($P < 0.05$)。结论 益气养阴方可以抑制裸鼠皮下移植瘤的生长, 下调致癌基因相关微小 RNA 的表达可能是其作用机制之一。

关键词 肺癌; 肿瘤转移; 益气养阴; 健脾温肾; 软坚散结; 微小 RNA

肿瘤转移是癌症患者死亡的主要原因。近年来, 国外肿瘤转移研究虽然阐明了某些环节和机理, 但至今尚无广泛用于临床预防肿瘤转移的药物。中医学以其独有的辨证论治体系, 在控制肿瘤转移方面的优势已有所体现^[1-2], 但针对中医辨证不同治法控制肿瘤转移的研究仍较少。本文主要研究益气养阴法、健脾温肾法、软坚散结法几种不同治法对裸鼠肺癌皮下移植瘤瘤体大小以及相关微小 RNA (MicroRNAs) 含量的影响。

1 材料与方法

1.1 动物

32 只 SPF 级 BALB/c 裸鼠, 雄性, 4~6 周龄, 体重 16~18 g, 购于上海斯莱克实验动物有限责任公司, 实验动物合格证号: SCXK (沪) 2012-0002。

1.2 瘤株

NCI-H460 冻存细胞由冷泉港生物科技股份有

限公司馈赠, 该细胞系为携带 K-ras 突变和野生型 p53 的大细胞肺癌细胞系, 其淋巴结及远处转移率相对较高^[3]。

1.3 药物

益气养阴方组成: 黄芪 30 g, 北沙参 15 g, 天冬 15 g, 麦冬 15 g, 女贞子 15 g, 牡蛎 30 g; 健脾温肾方组成: 黄芪 30 g, 党参 15 g, 白术 9 g, 茯苓 15 g, 菟丝子 15 g, 巴戟天 15 g, 淫羊藿 15 g; 软坚散结方组成: 牡蛎 30 g, 夏枯草 15 g, 山慈菇 30 g, 石上柏 30 g, 石见穿 30 g, 白花舌蛇草 30 g。所用中药均购自雷允上药店, 水煎并水浴浓缩, 由上海龙华医院制剂室制备。

1.4 主要试剂及仪器

胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司, 批号: 130126), RPMI1640 培养液 (美国 Thermo 公司, 批号: NZA1065), 胰酶 (美国 Gibco 公司, 批号: 13112101), 台盼蓝染液 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号: C0011); Trizol (美国 Invitrogen 公司, 批号: 15596018), Taq Man[®] MicroRNA 反转录试剂盒 (批号: 4366596)、TaqMan[®] Small RNA 试剂盒 (批号: 4398989)、

基金项目: 国家自然科学基金 (81072740); 上海高校青年教师培养资助计划

* 通讯作者: xulq67@gmail.com, (021) 33324000 转 8102

TaqMan® Universal PCR 混合物 II (批号: 440045) 均为美国 Applied Biosystems 公司产品。荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio RAD 公司, 型号: CFX96), RT-PCR 系统软件 (美国 Applied Biosystems 公司, 版本: stepone software version 2.1), 细胞培养箱 (日本 Sanyo 公司, 型号: MCO-18AIC)。

1.5 造模方法

用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养、扩增 NCI-H460 细胞, 达到实验所需细胞数后, 用 0.25% 胰酶消化, 离心收集细胞, 用台盼蓝染色, 细胞成活率在 90% 以上, 将细胞悬液浓度调整为 1×10^7 /ml。取上述细胞悬液 0.2 ml (含瘤细胞数 2×10^6 个), 种植于 BALB/c 裸鼠左侧腋部皮下, 接种 1 个月 after 开始灌服中药。

1.6 动物分组与给药

将裸鼠按瘤体体积大小分层随机分为健脾温肾组、益气养阴组、软坚散结组和生理盐水组, 每组 8 只。各中药组给药剂量参照《中药药理实验方法学》^[4] 中人与动物剂量换算方式确定药物剂量, 健脾温肾方、益气养阴方、软坚散结方药物浓度分别为 1.1、1.9、1.8 g/ml。从造模后 1 个月起灌胃给药, 每日 1 次, 每次 0.3 ml, 共 15 天。

1.7 观察指标及方法

瘤体积: 每隔 4 天对裸鼠的生存状况进行监测, 使用游标卡尺测量肿瘤最长瘤径 (a) 以及最短瘤径 (b), 计算肿瘤瘤体体积大小 (V), $V = a \times b^2 / 2$ ^[5]。

瘤重及抑制率: 治疗第 15 天脱颈椎处死小鼠, 剥离瘤体, 剔除筋膜, 用电子天平称重, 计算各组瘤重及抑制率。抑制率 = (生理盐水组平均瘤重 - 各中药组平均瘤重) / 生理盐水组平均瘤重 × 100%。

MicroRNA-21 及 MicroRNA-218 表达量: 治疗第 15 天脱颈椎处死裸鼠, 剥离瘤体, 冻存于 -80℃ 冰箱, 使用实时荧光定量 PCR 法检测两种 MicroRNAs 的表达量。操作步骤严格按照试剂盒说明书进行, 在 CFX96 荧光定量 PCR 仪上使用 RT-PCR 系统软件, 以标准运行模式检测 20 μl 样品运行反应板。建立 PCR 产物扩增曲线。获得目标 MicroRNA 与内参 MicroRNA U6 的 Ct 值数据。每样本的目标 MicroRNA 的相对表达量采用与 U6 的比值, 即采用 $2^{-\Delta CT}$ 法进行分析。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件处理数据。计量资料

以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组间比较采用 *t* 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组裸鼠不同时间瘤体积比较

给药过程中由于瘤体负荷生理盐水组死亡 1 只, 益气养阴组死亡 3 只, 软坚散结组死亡 5 只。表 1 示, 软坚散结组给药 5、10、15 天时瘤体体积较给药前明显增大 ($P < 0.05$); 健脾温肾组给药 15 天时瘤体体积与给药前比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 益气养阴组和生理盐水组瘤体体积给药 10、15 天时较本组给药前增大 ($P < 0.05$)。各时间点各组瘤体体积组间比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组肺癌裸鼠不同时间瘤体积比较 (mm^3 , $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	鼠数	瘤体积
健脾温肾组	给药前	8	6343.58 ± 2230.07
	给药 5 天	8	6272.91 ± 1346.88
	给药 10 天	8	8590.00 ± 1547.61*
	给药 15 天	8	8436.61 ± 1264.55
益气养阴组	给药前	8	6382.22 ± 1145.87
	给药 5 天	8	6268.85 ± 1107.79
	给药 10 天	7	8250.61 ± 1667.09*
	给药 15 天	5	8754.31 ± 3452.58*
软坚散结组	给药前	8	5625.77 ± 779.93
	给药 5 天	8	7102.51 ± 1228.42*
	给药 10 天	7	7770.81 ± 1087.61*
	给药 15 天	3	8942.57 ± 4285.61*
生理盐水组	给药前	8	6273.61 ± 1206.12
	给药 5 天	8	6799.46 ± 1374.22
	给药 10 天	7	8920.42 ± 1192.93*
	给药 15 天	7	8939.21 ± 1348.42*

注: 与本组给药前比较, * $P < 0.05$

2.2 各组裸鼠治疗后瘤重及抑制率比较

表 2 示, 益气养阴方组瘤重明显低于生理盐水组 ($P < 0.05$), 抑制率高达 16.3%, 其余各组瘤重比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组肺癌裸鼠瘤重及抑制率比较

组别	鼠数	瘤重 (g , $\bar{x} \pm s$)	抑制率 (%)
健脾温肾组	8	8.69 ± 0.68	9.9
益气养阴组	5	8.08 ± 1.77*	16.3
软坚散结组	3	8.51 ± 0.85	11.8
生理盐水组	7	9.65 ± 1.10	0

注: 与生理盐水组比较, * $P < 0.05$

2.2 各组裸鼠瘤组织 MicroRNA-21、MicroRNA-218 含量比较

表 3 示, 益气养阴组 MicroRNA-21 的表达量明显低于生理盐水组 ($P < 0.05$); 其余各组 Micro

RNA-21 的表达量与生理盐水组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组 MicroRNA-218 的表达量与生理盐水组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 3 各组肺癌裸鼠瘤组织 MicroRNA-218、
MicroRNA-21 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	MicroRNA-218/U6	MicroRNA-21/U6
健脾温肾组	8	0.000566 ± 0.000324	2.30 ± 0.402
益气养阴组	5	0.000743 ± 0.000811	0.93 ± 0.456*
软坚散结组	3	0.000492 ± 0.000271	1.70 ± 0.767
生理盐水组	7	0.000410 ± 0.000244	1.65 ± 0.013

注: 与生理盐水组比较, * $P < 0.05$

3 讨论

MicroRNAs 是一组微小的 (平均长度约为 19 ~ 25 nt) 在转录后水平上调控基因转录、蛋白翻译的非编码 RNA, 对细胞的增殖、分化和凋亡有重要的调节作用^[6-7]。近年研究证实, MicroRNAs 在癌症患者中存在异常表达^[8-11]。研究表明, MicroRNA-218 在多种类型的实体肿瘤组织中发生下调或者缺失^[10-13]; 其表达恢复能够有效抑制肿瘤细胞的生长增殖^[14-16]。临床研究显示, 在脑转移与无脑转移患者中 MicroRNA-218 的表达有差异^[17]。所以其可用于预测生存期和复发转移, 而其表达水平降低预示生存期不佳和高复发转移风险^[18]。MicroRNA-21 是早期发现的 MicroRNAs 之一, 是在所分析实体瘤 (乳腺、结肠、肺、前列腺、胃和内分泌腺、恶性胶质瘤、子宫平滑肌瘤) 中唯一均有表达的 MicroRNAs^[19-21], 其通过与靶 mRNA 特异性位点结合从而在转录后或者翻译水平进行基因调控, 参与细胞分化、增殖和凋亡等重要的生理过程, 与肿瘤的发生发展密切相关。

刘嘉湘教授认为, 肿瘤正虚是根本, 阴阳失衡是正虚之本质^[22]。健脾温肾、益气养阴方为临床扶正基本方, 软坚散结方为肺癌常用抗肿瘤方。前期临床研究显示, 益气养阴方在治疗晚期原发性肺癌 (均未经手术或放疗) 有一定的优势^[23]。本研究结果显示, 益气养阴方可以下调 MicroRNA-21 的表达, 减慢裸鼠皮下移植瘤瘤重的增长, 提示益气养阴方可能通过该途径影响肿瘤的复发转移。健脾温肾方组裸鼠在实验过程中无死亡, 提示健脾温肾方在延长裸鼠生存时间方面可能有一定的优势。此外, 本实验因动物数量有限未进行总生存期相关研究, 后期将进一步补充。

参考文献

[1] 李涌健, 王明武, 刘敏, 等. 益气养阴法防治恶性肿瘤

转移 210 例临床研究 [J]. 江苏中医, 2001, 22(1): 10-11.

[2] 刘芑霜, 刘嘉湘, 李春杰, 等. 益气养阴解毒方治疗晚期非小细胞肺癌临床疗效观察 [J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28(4): 352-355.

[3] 王蓉, 束永前. 裸鼠荧光原位移植非小细胞肺癌模型转移相关 microRNAs 的研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2010, 17(8): 584-589.

[4] 李仪奎. 中药药理实验方法学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 119.

[5] Naito S, von Eschenbach AC, Giavazzi R, et al. Growth and metastasis of tumor cells isolated from a human renal cell carcinoma implanted into different organs of nude mice [J]. Cancer Res, 1986, 46(8): 4109-4115.

[6] Yamamoto N, Kinoshita T, Nohata N, et al. Tumor suppressive microRNA-218 inhibits cancer cell migration and invasion by targeting focal adhesion pathways in cervical squamous cell carcinoma [J]. Int J Oncol, 2013, 42(5): 1523-1532.

[7] Kiran C, Deepika P. Lung cancer: MicroRNA and target database [J]. Chin J Lung Cancer, 2012, 15(7): 429-434.

[8] Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in Cancer [J]. Annu Rev Med, 2009, 60: 167-179. doi: 10.1146/annurev.med.59.053006.104707.

[9] Davalos V, Esteller M. MicroRNAs and cancer epigenetics: a macroevolution [J]. Curr Opin Oncol, 2010, 22(1): 35-45.

[10] Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(7): 2257-2261.

[11] Martinez I, Gardiner AS, Board KF, et al. Human papillomavirus type 16 reduces the expression of microRNA-218 in cervical carcinoma cells [J]. Oncogene, 2008, 27(18): 2575-2582.

[12] Petrocca F, Visone R, Onelli MR, et al. E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer [J]. Cancer Cell, 2008, 13(3): 272-286.

[13] Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis [J]. Cancer Cell, 2006, 9(3): 189-198.

[14] Song L, Huang Q, Chen K, et al. MiR-218 inhibits the invasive ability of glioma cells by direct downregulation of IKK-β [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 402(1): 135-140.

[15] Alajez NM, Lenarduzzi M, Ito E, et al. MiR-218 suppresses nasopharyngeal cancer progression through

- downregulation of survivin and the SLIT2-ROBO1 pathway [J]. Cancer Res, 2011, 71(6): 2381-2391.
- [6] Uesugi A, Kozaki K, Tsuruta T, et al. The tumor suppressive microRNA miR-218 targets the mTOR component Rictor and inhibits AKT phosphorylation in oral cancer [J]. Cancer Res, 2011, 71(17): 5765-5778.
- [7] Lu Y, Govindan R, Wang L, et al. MicroRNA profiling and prediction of recurrence/relapse-free survival in stage I lung cancer [J]. Carcinogenesis, 2012, 33 (5): 1046-1054.
- [8] Wu DW, Cheng YW, Wang J, et al. Paxillin predicts survival and relapse in non-small cell lung cancer by microRNA-218 targeting [J]. Cancer Res, 2010, 70(24): 10392-10401.
- [9] Ciafrè SA, Galardi S, Mangiola A, et al. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 334 (4): 1351-1358.
- [20] Krichevsky AM, King KS, Donahue CP, et al. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development [J]. RNA, 2003, 9(10): 1274-1281.
- [21] Wang T, Zhang X, Obijuru L, et al. A micro-RNA signature associated with race, tumor size, and target gene activity in human uterine leiomyomas [J]. Genes Chromosomes Cancer, 2007, 46(4): 336-347.
- [2] 李春杰. 刘嘉湘“平衡阴阳”思想在扶正治癌理论中的应用 [J]. 上海中医药杂志, 2010, 44(3): 4-6.
- [3] 刘嘉湘, 施志明, 徐振晔, 等. 滋阴生津益气温阳法治疗晚期原发性肺腺癌的临床研究 [J]. 中医杂志, 1995, 36(3): 155-158.

Influence of Chinese Medicines with Different Effects on Subcutaneous Tumors Generated from Lung Cancer Cells and Metastasis Associated MicroRNAs in Nude Mice

WANG Qin^{1,2}, JIAO Lijing¹, DOU Tonghai³, WANG Shengfei¹, XU Ling¹

(1. Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 200032; 2. Shanghai Minhang Traditional Chinese Medicine Hospital; 3. Institute of Biomedical Sciences, Fudan University)

ABSTRACT Objective To observe the impact of Chinese medicines with function to tonify qi and nourish yin (YQYY), strengthen spleen and warm kidney (JPWS), and soften hardness and disperse nodules (RJSJ) on subcutaneous tumor transplanted from human lung cancer NCI-H460 cells in nude mice, and to discuss its possible mechanism. **Methods** The human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line H460 was inoculated subcutaneously into 32 nude mice. After tumor formation, all mice were randomly divided into a JPWS group, a YQYY group, a RJSJ group, and a saline group, with 8 in each. The concentration of JPWS, YQYY, and RJSJ were 1.1 g/ml, 1.9 g/ml, and 1.8 g/ml, respectively. One month after inoculation all mice were given corresponding medicinals by gastric administration, 0.3 ml each time, once a day, for 15 days. Tumor volume and weight in tumor-bearing mice were measured, inhibition rate was calculated, and expression of MicroRNA21 and MicroRNA218 was detected by PCR in each group. **Results** On Day 10 after administration, the tumor volume of mice in all group increased significantly compared with before medication, and on Day 15 the tumor volume of mice in the YQYY group, RJSJ group, and saline group increased compared with before treatment ($P < 0.05$). The tumor inhibition rates in the JPWS group, YQYY group, and RJSJ group were 9.9%, 16.3%, and 11.8%, respectively, with no significant differences among groups ($P > 0.05$). The tumor weight and MicroRNA-21 expression levels in the YQYY group were significantly lower than that in the saline group ($P < 0.05$). **Conclusion** Medicines with the effect of tonifying qi and nourishing yin can inhibit tumor growth in nude mice. Down-regulating the expression of oncogenes related MicroRNA may be one of the possible mechanisms.

Keywords lung cancer; tumor metastasis; tonify qi and nourish yin; strengthen spleen and warm kidney; soften hardness and disperse nodules; MicroRNA

(收稿日期: 2014-04-04; 修回日期: 2014-08-19)

编辑: 王利芬