

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.16.014

实验研究

健脾温肾方对皮下移植瘤术后模型裸鼠肺转移瘤体中 miRNAs 及相关靶基因 mRNA 表达的影响

王芹¹, 焦丽静¹, 李嘉旗¹, 窦同海², 许玲^{*k}

(1. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院, 上海市甘河路 110 号, 200437; 2. 复旦大学生命科学学院)

摘要 目的 探讨健脾温肾方对肺癌术后复发转移的预防作用及可能机制。方法 建立 NCI-H460-Luci 细胞皮下移植瘤术后裸鼠模型, 随机分为健脾温肾组、化疗组、对照组, 每组 16 只。健脾温肾组术后第 1 天开始给予健脾温肾方溶液 (1.1 g/ml) 0.3 ml/d 灌胃, 每日 1 次, 干预 13 周; 化疗组给予紫杉醇注射液 15 mg/kg, 每隔 5 天腹腔注射 1 次, 共用 3 次; 对照组给予生理盐水 0.3 ml/d 灌胃, 每日 1 次, 干预 13 周。每周 1 次至术后 13 周, 采用活体成像观察裸鼠肿瘤转移情况, 分析各组术后无瘤转移生存时间; 术后第 6 周, 采用实时荧光定量 PCR 法检测瘤体中 miR-48a-5p、miR182-5p、miR21、miR106b-5p 及相关靶基因乳腺癌易感基因 1 (BRCA1)、重组人磷酸酶及张力蛋白同源体 (PTEN)、P53 肿瘤蛋白 (TP53)、表皮生长因子受体 (EGFR) mRNA 表达量。结果 与对照组比较, 健脾温肾组、化疗组裸鼠瘤体中 miR-48a-5p、miR182-5p 表达降低, BRCA1 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 化疗组裸鼠瘤体中 miR21、miR106b-5p 表达亦较对照组降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组裸鼠瘤体中 EGFR、PTEN、TP53 mRNA 表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。健脾温肾组和对照组无瘤转移生存时间比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 化疗组与健脾温肾组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 健脾温肾方在预防肺癌术后转移方面有一定作用, 其机制可能与调节 miRNAs 及相关靶基因 mRNA 有关。

关键词 肺癌; 健脾温肾方; 肿瘤转移; miRNA; 靶基因; 生存时间

肺癌是最常见的癌症, 全球每年超过 160 万肺癌患者死亡, I 期肺癌五年生存率为 35%, 但 III 期肺癌五年生存率仅为 6%^[1]。早期肺癌首选手术治疗, 但术后出现的局部复发和远处转移, 使得肺癌的临床疗效欠佳^[2]。肿瘤转移是一个复杂的生物学过程, 临床指南推荐的术后辅助含铂双药化疗也仅能得到 5% 的生存获益^[3]。中医学认为, 癌瘤乃五脏瘀血浊气痰滞而成, 因此, 我们临床应用健脾温肾法预防肺癌的复发转移。既往研究显示, 健脾温肾法治疗中晚期肺癌能够稳定瘤体、调节相关免疫功能及激素水平^[4-6], 能够联合术后化疗改善患者临床症状及肿瘤指标, 并减轻化疗不良反应^[7]。本研究探讨健脾温肾方对肺癌术后复发转移的预防作用及可能的机制, 为健脾温肾法指导肺癌的临床治疗提供依据。

基金项目: 国家自然科学基金 (81704035)

* 通讯作者: xulq67@aliyun.com

1 材料与方法

1.1 动物及瘤株

SPF 级雄性 BALB/c 裸鼠 48 只, 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。非小细胞肺癌细胞株 NCI-H460-Luci 冻存细胞由冷泉港生物科技股份有限公司馈赠, 该细胞为转染了荧光素酶基因的细胞。

1.2 实验药物

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 等, 水煎并浓缩, 浓度为 1.1 g/ml, 由上海中医药大学附属龙华医院制剂室制备。紫杉醇注射液 (国药准字 H20043045), 海南海药股份有限公司海口市制药厂。

1.3 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; RPMI 1640 培养液, 美国 Thermo 公司, 批号: NZA1065; 胰酶, 美国 Gibco 公司, 批号: 13112101; Trizol, 美国 Invitrogen 公司, 批号: 15596018; D 荧光素钾, 美国 Biotium 公司, 批号: 115144; 异氟烷, 深圳 RWD 公司, 批号: R510-22; Taq Man MicroRNA 反转录试剂盒 (批号: 4366596)、Taq Man Small RNA 试剂盒 (批号: 4398989)、Taq Man Universal PCR 混合物 II (批号: 440045), 美国 Applied Biosystems 公司。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-48AIC; 小动物活体成像仪, Berthold Technologies 公司, 型号: Berthold LB983。

1.4 造模方法

用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液培养 NCI-H460-Luci 细胞于 25 cm² 的培养瓶中, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 取对数生长期细胞, 0.2 ml 3.5 × 10⁶/ml 浓度细胞接种于裸鼠左侧腋下, 待皮下移植瘤直径为 1.5 cm 时手术剥离瘤体及包膜, 缝合皮肤, 术后 1 天采用活体成像系统检测未见肿瘤残存, 皮下移植瘤术后模型造模成功^[8]。

1.5 分组与干预方法

将造模成功裸鼠按随机数字表法分为健脾温肾组、化疗组、对照组, 每组 16 只。健脾温肾组术后第 1 天开始给予健脾温肾方溶液 0.3 ml/d 灌胃, 每日 1 次, 干预 13 周; 化疗组给予紫杉醇注射液 15 mg/kg, 每隔 5 天腹腔注射 1 次, 共用 3 次; 对照组给予生理盐水 0.3 ml/d 灌胃, 每日 1 次, 干预 13 周。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 瘤体中 miRNA 及相关靶基因 mRNA 表达 各组裸鼠第 6 周处死 8 只, 取出肺组织剔除瘤体, 液氮冰冻后冻存于 -80℃ 冰箱。采用实时荧光定量 PCR 法检测 PmiR-18a-5p、miR182-5p、miR21、

miR106b-5p 及相关靶基因乳腺癌易感基因 1 (BRCA1)、重组人磷酸酶及张力蛋白同源体 (PTEN)、P53 肿瘤蛋白 (TP53)、表皮生长因子受体 (EGFR) mRNA 的表达量。BRCA1 正向引物: CTGAGTTTGTGTGTGAACGGACA, 反向引物: TTTGGACCTTGGTGGTTTCTTC, 扩增 172bp; PTEN 正向引物: ATTCCTCCAATTCAGGACCCA, 反向引物: GGTTCCTCTGGTCTGGTATG, 扩增 185bp; TP53 正向引物: GGTAATCTACTGGGACGGAA-CAGC, 反向引物: TATTCTCCATCCAGTGGTTTCT-TCTT, 扩增 197bp; EGFR 正向引物: GTGATC-CAAGCTGTCCCAATG, 反向引物: GGGTTG-TAGAGCATGAGTGGG, 扩增 247bp。引物由复旦大学生命科学院合成。操作步骤严格按照试剂盒说明书进行, 建立 PCR 产物扩增曲线, 获得目标 miRNA、mRNA 与内参 U6 的 miRNA、mRNA Ct 值数据。目标基因的相对表达量采用与 U6 的比值, 即采用 2^{-ΔΔCt} 法进行分析。

1.6.2 活体成像 剩余裸鼠继续采用活体成像观察转移瘤个数情况, 每周 1 次至术后 13 周, 腹腔注射 150 mg/kg D 荧光素钾, 代谢 10 min, 异氟烷气体麻醉后, 放入成像仓, 设置自动曝光时间动态观察肿瘤生长及转移情况, 记录转移时间, 计算无远处转移率 = (1 - 转移裸鼠个数/总数) × 100%。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据统计处理。计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD, 远处转移时间采用寿命表法、Log-Rank 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组裸鼠瘤体中 miRNA 及相关靶基因 mRNA 表达比较

表 1 示, 与对照组比较, 健脾温肾组、化疗组裸鼠瘤体中 miR-18a-5p 表达量降低 ($P = 0.017$, $P = 0.012$), miR182-5p 表达亦降低 ($P = 0.035$,

表 1 各组裸鼠瘤体中 miR-18a-5p、miR182-5p、miR21、miR106b-5p 及 BRCA1、PTEN、TP53、EGFR mRNA 表达比较 (2^{-ΔΔCt}, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	miR-18a-5p	miR182-5p	miR21	miR106b-5p	BRCA1 ($\times 10^{-3}$)	PTEN ($\times 10^{-1}$)	TP53 ($\times 10^{-2}$)	EGFR ($\times 10^{-3}$)
对照组	8	2.75 ± 1.30	0.62 ± 0.17	348.89 ± 133.42	17.04 ± 4.70	4.29 ± 1.21	1.19 ± 0.76	1.23 ± 0.28	2.97 ± 0.93
健脾温肾组	8	1.41 ± 0.43*	0.39 ± 0.18*	312.15 ± 181.04	14.33 ± 6.08	7.21 ± 2.34*	3.62 ± 2.94	1.30 ± 0.15	2.82 ± 1.27
化疗组	8	0.60 ± 0.21*	0.13 ± 0.09**	158.53 ± 31.22*	6.40 ± 2.84**	9.46 ± 1.12*	2.98 ± 3.76	2.44 ± 3.20	3.31 ± 2.56

注: BRCA1, 乳腺癌易感基因; PTEN, 重组人磷酸酶及张力蛋白同源体; TP53, P53 肿瘤蛋白; EGFR, 表皮生长因子受体; 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

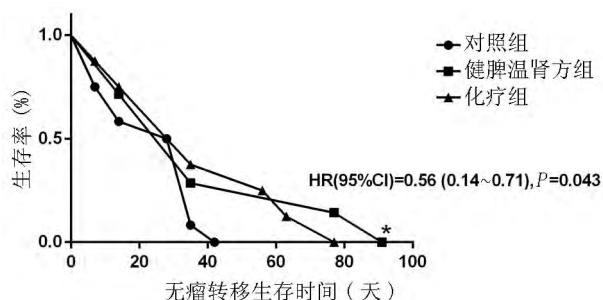
$P=0.001$), BRCA1 mRNA 表达升高 ($P=0.030$, $P=0.011$); 化疗组裸鼠瘤体中 miR21、miR106b-5p 表达亦较对照组降低 ($P=0.025$, $P=0.004$)。各组裸鼠瘤体中 EGFR、PTEN、TP53 mRNA 表达比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.2 各组裸鼠肺自发转移瘤个数比较

对照组平均转移瘤为 (6.3 ± 0.2) 个, 健脾温肾组为 (3.6 ± 0.4) 个, 化疗组为 (1.3 ± 0.5) 个, 各组转移瘤数目比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.3 各组裸鼠无瘤转移生存时间比较

皮下移植瘤术后 1 周内 3 组中有 4 只裸鼠出现死亡, 2 只为自残死亡, 2 只为手术影响上肢功能无法生存死亡。进入统计的对照组 7 只, 健脾温肾组 7 只, 化疗组 6 只。对照组第 6 周无远处转移率为 0, 健脾温肾组、化疗组第 6 周无远处转移率分别为 28%、38%。健脾温肾组第 13 周全部出现转移, 化疗组第 11 周全部出现转移。图 1 示, 健脾温肾组和对照组无瘤转移生存时间比较差异具有统计学意义 ($P=0.043$), 化疗组与对照组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 化疗组与健脾温肾组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 提示健脾温肾方可能具有一定的减慢术后肺转移的疗效。



注: * 与对照组比较, $P<0.05$

图 1 各组裸鼠无瘤转移生存时间 Log-Rank 检验

3 讨论

肿瘤发生转移是肿瘤疾病最重要的致死原因。中医学认为, 正虚邪盛则病进, 脾为后天之本、肾为先天之本, 人体脏腑、气血、经络等防御调节功能的正常发挥都有赖于脾肾的滋生推动。健脾温肾方中黄芪、党参、白术、茯苓健脾利湿, 菟丝子、巴戟天、淫羊藿温肾阳、滋肾阴, 是中医“未病先防”及“先安未受邪之地”重要思想的主要体现。

本实验模拟临床术后转移状态, 在建立皮下移植瘤术后肺转移模型基础上, 采用活体成像技术动态观察肿瘤生长情况。活体动物体内光学成像技术

具有极高的灵敏度, 对疾病动物模型微小病灶的检测灵敏度极高^[8]。本研究结果显示, 对照组皮下移植瘤术后 6 周肺转移率为 100%, 而温肾健脾组和化疗组可降低肺转移率。健脾温肾组、化疗组、对照组转移瘤体数差异无统计学意义, 可能是由于实验样本数较少。

miRNA 是内源性非编码小单链 RNA, 有调节基因的表达结合的 3' 非翻译区 (3'UTR) mRNA 的作用。研究表明, miRNA 与肿瘤发生、侵袭、转移、耐药存在密切关系, 甚至能够预测肿瘤的基因表达变化^[9]。在肺癌研究中, miR-148a-5p 作为致癌基因有着诱导非小细胞肺癌细胞生长、转移和自噬的作用^[10]。miR106b-5p 及 miR-148a-5p 同属于 miRNA17 家族^[11]。miR21 是早期发现的 miRNAs 之一, 是在乳腺、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 miRNA^[12]。BRCA1 是一种多功能肿瘤抑制蛋白, 在 DNA 损伤反应与细胞凋亡等方面都发挥着一定作用^[13]。亦有研究发现, 转化生长因子 β (TGF- β) 可以通过 miR182-5p 来调节 BRCA1 基因的转录^[14]。EGFR、PTEN、TP53 为常见的肿瘤相关基因^[15]。本研究结果发现, 与对照组比较, 健脾温肾组、化疗组均可降低 miR-148a-5p、miR182-5p 的表达, 上调 BRCA1 mRNA 表达, 说明健脾温肾方可能是通过调节 miRNA 及其相关靶基因 mRNA 的表达而发挥作用, 从而对术后肺癌转移具有一定的预防作用, 为术后防转移治疗提供了新的依据。

参考文献

- [1] TORRE LA, SIEGEL RL, JEMAL A. Lung cancer statistics [J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 893: 1-49. doi: 10.1007/978-3-319-24223-1_1.
- [2] TORRE LA, BRAY F, SIEGEL RL, et al. Global Cancer Statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [3] PIGNON JP, TRIBODET H, SCAGLIOTTI GV, et al. Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group [J]. J Clin Oncol, 2008, 26(21): 3552-3559.
- [4] 阮广欣, 周蕾, 刘嘉湘. 健脾温肾解毒方对老年肺癌患者生存质量的影响 [J]. 四川中医, 2011, 29(5): 62-65.
- [5] 李春杰, 刘嘉湘, 刘苓霜, 等. 健脾温肾方联合化疗调节肺癌患者雌二醇水平的临床观察 [J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 29(1): 26-29.
- [6] 苏春雨, 宋卓, 徐竞男, 等. 健脾补肾法防治小细胞肺癌转移 [J]. 中医学报, 2016, 31(5): 621-624.
- [7] 周青. 健脾补肾方联合 DP 方案治疗术后非小细胞肺

- 癌的临床研究 [J]. 济南: 山东中医药大学, 2011.
- [8] 刘蕾, 姚明, 闫明霞, 等. 裸小鼠人肺癌术后转移模型的建立及动态观察 [J]. 肿瘤, 2007, 27(4): 265-268.
- [9] JIA D, YAN M, WANG X, et al. Development of a highly metastatic model that reveals a crucial role of fibronectin in lung cancer cell migration and invasion [J]. BMC Cancer, 2010, 10: 364. doi: 10.1186/1471-2407-10-364.
- [10] FLORCZUK M, SZPECHCINSKI A, CHOROSTOWSKA-WYNIMKO J. miRNAs as biomarkers and therapeutic targets in non-small cell lung cancer: current perspectives [J]. Target Oncol, 2017, 12(2): 179-200.
- [11] LIANG C, ZHANG X, WANG HM, et al. MicroRNA-18a-5p functions as an oncogene by directly targeting IRF2 in lung cancer [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(5): e2764. doi: 10.1038/cddis.2017.145.
- [12] GUINOT A, OEZTUERK-WINDER F, VENTURA JJ. miR-17-92/p38 α dysregulation enhances wnt signaling and selects Lgr6⁺ cancer stem-like cells during lung adenocarcinoma progression [J]. Cancer Res, 2016, 76(13): 4012-4022.
- [13] CIAFRE SA, GALARDI S, MANQIOLA A, et al. Extensive modulation of a set of micro RNAs in primary glioblastoma [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 334(4): 1351-1358.
- [14] MOSKWA P, BUFFA FM, PAN Y, et al. miR-182-mediated down regulation of BRCA1 impacts DNA repair and sensitivity to PARP inhibitors [J]. Mol Cell, 2011, 41(2): 210-220.
- [15] MARTINEZ-RUIZ H, ILLA-BOCHACA I, OMENE C, et al. A TGF β -miR-182-BRCA1 axis controls the mammary differentiation hierarchy [J]. Sci Signal, 2016, 9(457): ra118.
- [16] COUSIN S, GRELLETY T, TOULMONDE M, et al. Clinical impact of extensive molecular profiling in advanced cancer patients [J]. J Hematol Oncol, 2017, 10(1): 45. doi: 10.1186/s13045-017-0411-5.

Effects of *Jianpi Wenshen Fang* (健脾温肾方) on Expressions of miRNAs and Related Target Genes mRNA in Lung Metastases of Nude Mice after Subcutaneous Transplantation

WANG Qin¹, JIAO Lijing¹, LI Jiaqi¹, DOU Tonghai², XU Ling¹

(1. Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 200437; 2. College of Life Sciences, Fudan University)

ABSTRACT Objective To investigate the preventive effect of *Jianpi Wenshen Fang* (健脾温肾方) on the recurrence and metastasis of lung cancer and its possible mechanism. **Methods** NCI-H460-Luci cells were used to establish a nude mouse model after subcutaneous transplantation and were randomly divided into invigorating spleen and warming kidney group, chemotherapy group and control group, with 16 mice in each group. On the first postoperative day, the invigorating spleen and warming kidney group was given intragastric administration of *Jianpi Wenshen Fang* (1.1 g/ml) 0.3 ml/d, once a day for 13 weeks; the chemotherapy group was given paclitaxel 15 mg/kg. The rats were intraperitoneally injected once every 5 days totally for 3 times. The control group was given normal saline 0.3 ml/d orally once a day for 13 weeks. Until 13 weeks after operation, tumor metastasis of nude mice was observed by in vivo imaging once a week. The survival time of tumor-free metastasis in each group was analyzed. At the 6th week after operation, miR-18a-5p, miR182-5p, miR21, miR106b-5p and related target genes breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1), recombinant human phosphatase and tensin homology (PTEN), P53 tumor protein (TP53), epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA expression levels were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** Compared with the control group, the expression of miR-18a-5p and miR182-5p decreased and the expression of BRCA1 mRNA increased in the nude mice of the invigorating spleen and warming kidney group and the chemotherapy group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); The expression of miR21 and miR106b-5p in tumors of nude mice in the chemotherapy group was also lower than that in control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). There was no significant difference in the expression of EGFR, PTEN and TP53 mRNA in the tumors of each group ($P > 0.05$). The difference in the survival time of tumor-free metastasis between the invigorating spleen and warming kidney group and the control group was statistically significant ($P < 0.05$), and there was no significant difference between the chemotherapy group and the invigorating spleen and warming kidney group ($P > 0.05$). **Conclusion** *Jianpi Wenshen Fang* has a certain role in preventing postoperative metastasis of lung cancer, and its mechanism may be related to regulating miRNAs and related target gene mRNA.

Keywords lung cancer; *Jianpi Wenshen Fang* (健脾温肾方); tumor metastasis; miRNA; target gene; survival time (收稿日期: 2017-11-08; 修回日期: 2018-02-13)

编辑: 邓 媛