

• 实验研究 •

3 种不同中医治法对大鼠肝脏癌细胞
半乳糖凝集素表达的影响胡 卫¹ 方肇勤^{2*} 梁 超² 管冬元² 吴中华²

(1. 三峡大学医学院, 湖北省宜昌市大学路 8 号, 443002; 2. 上海中医药大学基础医学院)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30672574, 30973703)

* 通讯作者: zqfang@sh163d sta net cn, (021)51322115

[摘要] 目的 观察 3 种不同中医治法对大鼠肝癌半乳糖凝集素(GAL-3)表达的调控差异以及 GAL-3 在人肝癌细胞增殖中的作用, 以探讨肝癌治疗的新靶点。方法 将 72 只雄性 Wistar 大鼠随机分为正常组、模型组、喃氟啶组(喃氟啶 8.33 mg/100 g)、清热解毒组(清热解毒方 1.5 g/100 g)、活血化瘀组(活血化瘀方 1.27 g/100 g)、健脾理气组(健脾理气方 1.75 g/100 g), 每组 12 只, 除正常组外, 其余各组大鼠采用二乙基亚硝胺(DEN)诱发大鼠肝癌, 各组均给药 6 周, 检测各组大鼠肝癌组织(正常组取肝组织)GAL-3 的表达。根据人 GAL-3 基因编码区设计 2 个 siRNA 靶点, 并构建重组质粒转染 SMMC-7721 人肝癌细胞株, 分为空白组、阴性组、GAL-3 RNAi 组, 实时定量 PCR 检测各组 GAL-3 mRNA 的表达, MTT 法检测各组转染后 24 h、72 h、144 h 细胞增殖。结果 模型组 GAL-3 基因表达显著增加, 健脾理气组能下调其表达; 转染 72 h 后 GAL-3 RNAi 组 GAL-3 mRNA 表达量明显降低; 转染 144 h 后, GAL-3 RNAi 组肝癌细胞的生长增殖得到了明显的抑制($P < 0.01$)。结论 GAL-3 基因在肝癌组织中高表达, 健脾理气方能显著下调该基因表达。

[关键词] GAL-3 基因; 肝癌; 健脾理气方; 清热解毒方; 活血化瘀方; 细胞增殖

Effects of Three Different Chinese Medical Therapies on the Expression of Galectin in Rat Hepatoma Cells

HU Wei¹, FANG Zhaoqin², LIANG Chao², GUAN Dongyuan², WU Zhonghua²

(1. Medical Science College of China Three Gorges University, Hubei Province 443002; 2. Shanghai University of TCM)

ABSTRACT Objective To observe the effect of different Chinese medical therapies on the expression and proliferation of Galectin-3 (GAL-3) in human hepatoma cells. **Methods** Seventy-two male Wistar rats were randomized into the normal group, model group, Tegafur group (8.33 mg/100 g Tegafur), Heat-Clearing Toxin-Resolving Formula group (1.5 g/100 g HCTRF), Blood-Quickening Stasis-Transforming Formula group (1.27 g/100 g BQSTF) and Spleen-Fortifying Qi-Regulating Formula group (1.75 g/100 g SFQRF), with 12 in each. Diethylnitrosamine (DEN) was used to induce the hepatic carcinoma rat models in each group except the normal group. The rats in the administration groups were gavaged 12 times daily for six weeks. The expression of GAL-3 in the rat hepatocellular carcinoma (HCC) tissues (liver tissues in the normal group) was detected. Two siRNA targets were designed according to human GAL-3 gene coding region and the recombinant plasmid transfection human hepatoma cell line SMMC-7721 was constructed. The gene expression was detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) and the cell proliferation was detected by 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay 24 h, 72 h, and 144 h after transfection. **Results** The expression of GAL-3 gene in the model group was significantly increased. SFQRF could down-regulate the expression of GAL-3 gene, the expression of GAL-3 mRNA was significantly decreased 72 h after transfection and the proliferation of hepatoma cells was significantly inhibited 144 h after transfection ($P < 0.01$). **Conclusion** The GAL-3 gene is highly expressed in HCC tissues and SFQRF can significantly down-regulate its expression.

Keywords GAL-3 gene; liver cancer; Spleen-Fortifying Qi-Regulating Formula; Heat-Clearing Toxin-Resolving Formula; Blood-Quickening Stasis-Transforming Formula; cell proliferation

在肝癌的防治中, 中医药辨证论治发挥了重要的作用, 中医治疗肝癌常用治法有健脾理气、清热解毒、活血化瘀等^[1]。我们发现在二乙基亚硝胺(DEN)诱导大鼠肝癌发生与发展过程中存在着大

量的基因表达异常^[2]。本研究观察不同中医治法对肝癌组织 GAL-3 基因表达的作用, 并采用 RNA 干扰(RNAi)技术导致该基因在肝癌细胞中表达沉默, 观察肝癌细胞增殖的变化, 初步探讨其生物学功能。

1 材料与方法

1.1 动物及细胞

SPF 级雄性 Wistar 大鼠 72 只, 体重 100 ~ 120 g, 购自上海斯莱克实验动物有限公司, 动物许可证号: SCSK(沪)2003-2003。SMMC-7721 人肝癌细胞株细胞购自中国科学院上海细胞所。

1.2 药物

清热解毒方, 组成: 半枝莲 30 g, 白花蛇舌草 30 g, 蒲公英 30 g; 活血化瘀方, 组成: 丹参 15 g, 赤芍 15 g, 桃仁 10 g, 柴胡 6 g, 八月札 10 g, 茵陈 10 g, 郁金 10 g; 健脾理气方, 组成: 白术 10 g, 黄芪 30 g, 茯苓 15 g, 薏苡仁 15 g, 白芍 15 g, 神曲 10 g, 姜半夏 10 g。中药饮片购于上海市徐汇中药饮片厂, 药物水煎过滤浓缩至 2 g/ml 的浸膏。喃氟啉(FT-207) 购自上海华联制药有限公司, 批号: 001103。二乙基亚硝胺(DEN) 购自中国科学院南京土壤研究所, 批号: 20090818。MTT, Amresco 公司分装, 批号: 3407A790。二甲基亚砜(DMSO), Amresco 公司, 批号: SZBC0040V。

1.3 主要试剂和仪器

pSilencerT^m2.1-U6neo 质粒、BamH I 与 Hind III 限制性内切酶均为 Ambion 公司产品; 阳离子脂质体 lipo2000 为 Invitrogen 公司产品, 批号: 881610; 质粒纯化试剂盒 PureYieldTM Plasmid Midiprep System 为 Promega 公司产品, 批号: A2495 288884; 实时定量 PCR(RT-PCR) 试剂盒为 TAKARA 公司产品, 批号: KA1607。Rotor-Gene3000 实时荧光定量 PCR 仪(GENE 公司); ELX800 酶标仪(BIO-TEK 公司)。

1.4 模型建立及分组给药

采用随机数字表法将大鼠分为正常组、模型组、喃氟啉组、清热解毒组、活血化瘀组、健脾理气组, 每组 12 只。除正常组外, 其余各组大鼠自由饮用含 80 mg/L DEN 水溶液 20 周, HE 染色观察肝脏组织病理形态, 造模大鼠形成肝癌^[3]; 于造模开始 14 周后开始给药至第 20 周。喃氟啉组每天给予喃氟啉 8.33 mg/100 g(相当于成人剂量 5 倍, 成人按 60 kg 计), 生理盐水稀释后拌入颗粒饲料; 清热解毒组每天给予清热解毒方 1.5 g/100 g。活血化瘀组每天给予活血化瘀方 1.27 g/100 g, 健脾理气组每天给予健脾理气方 1.75 g/100 g, 中药各组给药量相当于成人剂量 10 倍, 成人按 60 kg 计, 生理盐水稀释拌入颗粒饲料。正常组及模型组大鼠正常饮食, 不予处理。

1.5 RNAi 技术处理

应用 Ambion 公司在线的 siRNA 设计软件得到人 GAL-3 基因 RNAi 靶序列(AACAATTCT-GGGCACGGTGAA; AAAGAGGGAATGATGT-TGCCT), 每个靶序列通过该软件可自动生成 2 条克隆入质粒的序列。合成单链 DNA 退火形成双链后, 重组到双酶切的 pSilencerT^m2.1-U6neo 质粒中, 并转染大肠杆菌 DH5 α 大量扩增。再从扩增的菌液制备纯化 RNA 干扰序列的重组质粒, DNA 测序后, 稀释备用。重组质粒通过阳离子脂质体 lipo2000 转染人 SMMC-7721 肝癌细胞株。

1.6 指标检测与方法

1.6.1 肝癌组织 GAL-3 基因检测 实验结束后, 取各组大鼠肝组织, 用 Trizol 试剂盒提取组织总 RNA, 将同组 RNA 样本分别取 10 μ g 混合, RNA 经反转录后, 进行 Affymetrix rat 230A GeneChip 检测(共 6 张芯片)。

1.6.2 RNAi 效率检测 RNAi 实验设立空白组(SMMC-7721 细胞常规培养)、阴性组(SMMC-7721 细胞转染阴性质粒)、GAL-3 RNAi 组(SMMC-7721 细胞转染含 GAL-3 RNAi 干扰序列质粒), 各组细胞均于转染 24 h 后换用含 G418(浓度 400 μ g/ μ l) 培养液进行培养。转染后 72 h 收集各组细胞, RT-PCR 检测基因相对表达量。GAL-3 基因上下游引物分别为: GGCCACTGATTGTGCCTTAT, TCTTTCTTCCCTTCCCCAGT, 扩增产物长度为 224 bp。内参 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH) 基因上下游引物分别为: GAGTCAACGGATTTG-GTCGT, TTGATTTTGGAGGGATCTCG, 扩增产物长度为 238 bp。扩增反应体系(终体积 25 μ l) 上、下游引物(5 μ mol/L) 2 μ l, RT 产物 1 μ l。扩增反应条件: 95 $^{\circ}$ C (30 s)、95 $^{\circ}$ C (5 s)、60 $^{\circ}$ C (30 s), 40 个循环。结果以空白对照组为参照, GAPDH 基因为内参, 进行 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析。

1.6.3 肝癌细胞增殖检测 细胞分组同 RNAi 实验, 各组细胞均于转染 24 h 后换用含 G418(浓度 400 μ g/ μ l) 培养液进行培养。MTT 检测各组细胞 24 h、72 h、144 h 生长增殖情况。分别于 20 h、68 h、140 h 选取 96 孔板每孔加 MTT 溶液(5 mg/ml) 20 μ l, 4 h 后吸取上清, 每孔加 DMSO 150 μ l 并震荡使其充分溶解, 490 nm 检测各孔的吸光度值。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 计量资料

以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用 t 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠肝癌组织 GAL-3 基因表达比较

表 1 示,正常组 GAL-3 基因表达量为 456,模型组表达量为正常组 9 倍左右;与模型组比较,清热解毒组、活血化瘀组和喃氟啉组一定程度上上调该基因表达,健脾理气组明显下调其表达。

表 1 各组大鼠 GAL-3 基因表达比较

组别	鼠数	GAL-3 基因
正常组	12	456
模型组	12	3590
喃氟啉组	12	4424
清热解毒组	12	5079
活血化瘀组	12	3763
健脾理气组	12	2738

注:每组只做 1 张芯片,数据差异以倍数和绝对值表示

2.2 各组细胞 GAL-3 mRNA 表达比较

表 2 示,转染后 72 h, GAL-3 RNAi 组的 GAL-3 mRNA 相对表达量较空白组显著下降,提示 RNAi 后该基因出现表达沉默。

表 2 各组细胞 GAL-3 mRNA 表达比较

组别	样本数	GAL-3 mRNA 相对表达量
空白组	1	1
阴性组	1	0.80
GAL-3 RNAi 组	1	0.37

2.3 各组肝癌细胞增殖比较

表 3 示,随着 G418 对空白组 SMMC-7721 的增殖抑制,72 h 后吸光度值逐渐下降;阴性组细胞含有 G418 耐药基因,细胞保持生长增殖现象。144 h 时与阴性组比较,空白组和 GAL-3 RNAi 组吸光度值显著降低($P < 0.01$)。

表 3 各组不同时间肝癌细胞增殖比较(吸光度值, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	24 h	72 h	144 h
空白组	4	0.742 ± 0.026	1.651 ± 0.106	0.974 ± 0.098*
阴性组	4	0.769 ± 0.020	1.464 ± 0.030	1.857 ± 0.048
GAL-3 RNAi 组	4	0.798 ± 0.007	1.126 ± 0.017	0.909 ± 0.087*

注:与阴性组同时比较,* $P < 0.01$

3 讨论

前期研究发现^[4],不同中医治法对 DEN 诱发的肝癌治疗作用并不相同。为了进一步研究不同治法的机理,课题组采用基因芯片技术,检测了 3 种常用中医治法对 DEN 诱发大鼠肝癌基因表达谱的影响。与正常组大鼠比较,模型组 GAL-3 基因表达明

显升高;与模型组比较,健脾理气组 GAL-3 基因表达下降。

GAL-3 基因定位人染色体 14q22,该基因编码产物半乳糖凝集素属于 S 型凝集素、半乳糖凝集素-3 亚家族,能专一识别 β -半乳糖苷。作为一种肿瘤标志物,已用于诊断癌症预后^[4]。GAL-3 通过与胞内和胞外多种配基相互作用,广泛参与肿瘤凋亡和转移等重要环节,涉及机制有细胞-细胞间黏附、细胞-基质相互作用、凋亡、血管生成,激活 K-Ras、N-Ras 和 H-Ras 途径、mRNA 拼接和肿瘤抗药性等^[5-9]。为了进一步研究 GAL-3 基因在人肝癌的发生和发展作用,采用 RNAi 干扰技术,构建含目的基因的质粒并转染人肝癌 SMMC-7721 细胞株,转染 72 h 后通过实时荧光定量 PCR 检测,显示 GAL-3 基因 mRNA 表达明显降低, RNAi 作用显著。随着 G418 对空白组 SMMC-7721 的增殖抑制,72 h 后吸光度下降;阴性组细胞含有 G418 耐药基因,保持增殖。144 h 与阴性组比较,空白组和 GAL-3 RNAi 组增殖显著降低($P < 0.01$)。表明 GAL-3 基因在人肝癌细胞 SMMC-7721 的增殖方面起重要作用,因此当该基因被 RNA 干扰表达下调后,细胞增殖明显减缓。这对于进一步研究不同中医治法方药对于肝癌细胞的作用及机制提供了新的靶点和方向。

综上所述,不论在 DEN 诱发的大鼠肝癌模型中,还是在人肝癌细胞 SMMC-7721 中, GAL-3 均扮演着重要的角色,促进肝癌细胞的增殖,可能是肝癌难治的重要原因之一。喃氟啉、清热解毒方、活血化瘀方对 GAL-3 无显著的调节作用,健脾理气方明显下调其表达,该方剂由白术、茯苓、黄芪、薏苡仁、白芍、神曲、姜半夏等组成。处方中发挥作用的中药或其有效成分及其发挥作用的途径将是我们今后研究的方向。

参考文献

- [1]Guan D, Fang Z. Advances in TCM Treatment of Primary Hepatocarcinoma[J]. J Tradit Chin Med, 2000, 20 (3):223-226.
- [2]阚卫兵,方肇勤,管冬元,等. 二乙基亚硝胺所诱导大鼠肝癌表达上调的基因[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13 (20):2420-2426.
- [3]管冬元,方肇勤,代小平,等. MT1E 在肝癌形成过程中的表达及其在肝癌细胞中的作用[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(17):1707-1712.

(下转第 1425 页)

诊:溴吡斯的明用量减半后症状控制未发,继以上方出入调治半年后停用西药,经随访未再复发。

按:脾主肌肉,患者眼睑下垂,睁眼乏力,提示脾气亏虚,清气不升,睑肌不得清阳充实而痿弱无力;餐后腹胀为脾虚失运、气机壅滞之象。而肝肾不足,精血亏虚,不能上奉目则睑肌也可导致睁眼无力。腰为肾之府,肾虚不能充填肾府,则腰酸腿软;阴虚不能涵阳,肝阳上亢则目珠发胀,头昏;阴虚筋脉失于濡养,虚风内动,则小腿抽筋;疲劳乏力为精气亏虚之证。据证分析当属肝肾精血亏虚,脾气清阳不升。治以健脾益气升清、滋补肝肾精血。方中重用黄芪,《本草正义》谓“补益中土,温养脾胃,凡中气不振,脾土虚弱,清气下陷者最宜”,与升麻、陈皮、甘草相合,仿补中益气汤义,益气升清,升阳举陷。用生地、熟地、山萸肉、何首乌、枸杞子、黄精补益肝肾,肾强则五脏皆充,精血旺盛,目得其养而且眼肌受益,从而提睑有力^[1]。用白芍、木瓜养阴柔肝缓急,濡养筋脉。服药 2 周,诸证明显好转,唯目珠发胀未减,并见头昏,为阴虚肝阳上亢之象,故加决明子养肝明目,加石决明、钩藤平肝潜阳。

例 2:患者,女,30 岁,2012 年 4 月 7 日因左眼睁眼无力,上睑下垂 2 个月就诊。既往有甲状腺功能亢进症、甲状腺多发结节病史多年,经服药已控制。2 个月前,渐起左眼睁眼无力,午后明显,无复视,他院神经内科查胸部 CT,提示胸腺增生可能,抗乙酰胆碱突触前膜抗体、抗乙酰胆碱突触后膜抗体及胸腺瘤抗体阳性,确诊为眼肌型重症肌无力,患者拒绝西药治疗。刻诊:左眼上睑下垂,睁眼无力,伴有双目干涩,舌体颤动,舌质偏红,苔薄,脉小弦。证属肝肾不足、阴虚风动、气虚下陷。治以滋补肝肾、养阴熄风,兼以益气升清。药用:生地 10 g,熟地 10 g,山萸肉 10 g,黄精 10 g,石斛 10 g,白芍

10 g,枸杞子 10 g,密蒙花 10 g,黄芪 15 g,僵蚕 10 g,全蝎 3 g。水煎服,14 剂,每日 1 剂。4 月 21 日二诊:药后睑裂较前增宽,睁眼无力不显,双目干涩好转。上方再进 14 剂。5 月 5 日三诊:眼睑下垂基本消除,睁眼有力,舌体未见颤动,纳差,舌质偏红、苔薄,脉小弦。上方去全蝎,加陈皮 6 g、炒谷芽 10 g。14 剂。5 月 19 日四诊:食纳转佳,近因工作繁劳,久视银屏而自觉疲劳乏力,午后左目睁眼欠利,目干涩。2012 年 4 月 7 日方加减。黄芪用量加至 30 g,另加决明子 20 g,28 剂。6 月 16 日五诊:睁眼有力,双眼睑裂等大,无目涩,饮食、二便正常。复查乙酰胆碱突触前膜抗体及胸腺瘤抗体转阴,抗乙酰胆碱突触后膜抗体弱阳性。

按:患者以睑下垂、睁眼无力为主症,伴有双目干涩,舌体颤动,辨证当属肝肾亏虚,精血不足,水不涵木,肝风内动,治疗以滋补肝肾,养阴祛风为主,但眼肌痿软终与脾气虚弱,清阳不升有关,故兼以补益脾气。方中生地、熟地、山萸肉、黄精、石斛、白芍、枸杞子补益肝肾,滋养阴血,令精血充旺而目胞得养,提睑有力;石斛、枸杞子尤能养肝明目;密蒙花清热养肝明目;黄芪健脾益气,升举清阳,黄精气阴双补,配合黄芪加强益气升清之功;全蝎、僵蚕虫类药物搜风化痰,熄风止痉。二诊睁眼无力及目干涩明显好转。三诊眼睑下垂基本消除,舌体颤动控制,去全蝎,仅留僵蚕祛风化痰以图巩固。患者纳差,加用陈皮、炒谷芽理气消食。四诊时因疲劳及用眼过度,“险废”症状有所反复,增补气升提药黄芪用量至 30 g,另加决明子清热平肝,明目益精。

参考文献

- [1]魏良义.金锁固精丸加马钱子治愈眼肌型重症肌无力[J].四川中医,1988(6):38.

(收稿日期:2012-11-07;修回日期:2013-04-09)

[编辑:洪涛]

(上接第 1403 页)

- [4]方肇勤,管冬元,梁尚华,等.不同中医治法治疗 DEN 诱发大鼠肝癌的比较[J].中医杂志,2002,43(7):542-544.
- [5]Satelli A, Rao PS, Gupta PK, et al. Varied expression and localization of multiple galectins in different cancer cell lines [J]. Oncol Rep, 2008,19(3):587-594.
- [6]Inufusa H, Nakamura M, Adachi T, et al. Role of galectin-3 in adenocarcinoma liver metastasis[J]. Int J Oncol, 2001,19(5):913-919.
- [7]Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression[J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(1):

29-41.

- [8]Nakahara S, Raz A. Regulation of cancer-related gene expression by galectin-3 and the molecular mechanism of its nuclear import pathway[J]. Cancer Metastasis Rev, 2007, 26(3-4):605-610.
- [9]Cecchinelli B, Lavra L, Rinaldo C, et al. Repression of the antiapoptotic molecule galectin-3 by homeodomain-interacting protein kinase 2-activated p53 is required for p53-induced apoptosis[J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(12):4746-4757.

(收稿日期:2012-05-03;修回日期:2013-03-02)

[编辑:洪涛]