



散癖平胃方含药血清对人胃癌细胞 SGC-7901 基因表达的影响与验证

党晓燕¹, 董蕾^{1*}, 史海涛¹, 邹百仓¹, 任娟²

(1. 西安交通大学第二附属医院, 陕西 西安 710004;

2. 西安交通大学第一附属医院, 陕西 西安 710061)

[摘要] 目的:研究散癖平胃方(SPPW)对人胃癌细胞 SGC-7901 基因表达谱的影响,利用实时定量 PCR(Real-time quantitative PCR, RT-PCR)对相关基因加以验证。方法:24只SD大鼠随机分为4组,每组6只,分别给予SPPW方高、中、低剂量(中剂量组相当于人临床等效剂量,按 $18.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 给药,高剂量与低剂量则分别为中剂量组的2倍及1/2倍)及等剂量生理盐水(阴性对照组)灌胃给药,每日早晚各1次,每次2 mL,连续3 d。SPPW方组及阴性对照组在末次给药2 h后行水合氯醛麻醉,无菌条件下腔静脉取血,制备阴性对照组及SPPW方高、中、低剂量组大鼠含药血清。分别将SPPW方中剂量组含药血清及阴性对照组含药血清加入对数生长期胃癌细胞 SGC-7901 中(体积为培养液的10%),24 h后提取胃癌细胞 SGC-7901 mRNA,使用基因芯片技术筛选出SPPW方含药血清作用后表达有差异的基因。将高、中、低含药血清干预24 h后的人胃癌细胞 SGC-7901 提取总RNA的提取,使用RT-PCR验证涉及肿瘤增殖,凋亡及生长等相关基因。结果:基因芯片筛选出203个差异表达基因,上调141个,下调62个,涉及MAPK信号通路,Wnt信号通路,AK/STAT信号传导通路,VEGF信号通路及其他多种代谢通路。与阴性对照组相比,SPPW组STAT2 mRNA减少($P < 0.05$),MnSOD2, NDRG1, BNIP3 mRNA增加($P < 0.05$)。结论:RT-PCR证实SPPW含药血清显著下调STAT2表达,显著上调MnSOD2, NDRG1和BNIP3表达,从而在基因水平上探讨了SPPW方的抗癌作用及其具体机制。

[关键词] 胃癌;基因芯片;实时定量聚合酶链反应

临床研究证实中药复方在恶性肿瘤的治疗中具有一定的临床价值^[1]。使用基因芯片可探索中药复方作用肿瘤细胞基因表达水平的环节和靶点。消癖平胃方(SPPW)由13味药组成,其主要成分为半枝莲、乌骨藤、黄芪、甘草、姜半夏、制南星、枳实等。SPPW多个组分的提取物已被证实具有抑制肿瘤的作用,蝎毒抗癌多肽对人胃癌细胞株 MGC-803 有明显的细胞毒性和生长抑制作用^[2];蜈蚣组织提取物对胃癌细胞和肝癌细胞有生长抑制作用^[3];乌骨藤及半枝莲均有抗癌作用的相关研究^[4-5],其他中药组分具有提高机体免疫力,抑制肿瘤生长的作用。利用基因芯片和RT-PCR技术,筛选验证出中药SPPW方对人胃癌细胞 SGC-7901 可能影响的基因,探讨

SPPW方作用的环节,为阐明中药SPPW方作用机制及该复方中药抗肿瘤活性成分研究提供工作基础。

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌 SGC-7901 细胞(西安交通大学医学院中心实验室);RPMI1640(Hyclone,美国);胎牛血清 FBS(北京元亨金马生物技术开发有限公司);SYBR Green I 嵌合荧光法实时 RT-PCR 试剂盒购自 Takara 公司。RT-PCR 仪系 ABI 7500 Real-time PCR System,美国应用生物系统公司产品。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 中药 SPPW 含药血清的制备 中药 SPPW 由13味药组成,半枝莲15 g、乌骨藤30 g、黄芪30 g、甘草9 g、姜半夏12 g、制南星12 g、枳实12 g等,由西安交通大学医学院第二附属医院中药房提供。采用自动煎药机制成水煎液,32层纱布过滤,15 000 r·min⁻¹离心20 min,2次,取上清液,生药质量浓度为 $1.5\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,4℃冷藏保存。24只SD大鼠,体重(200±20)g,随机分为中药SPPW高、中、低剂量组

[稿件编号] 20110314008

[基金项目] 陕西省13115重大科技专项(2007ZDKG-73)

[通信作者] *董蕾, Tel: 13572560599, E-mail: dong556@126.com

[作者简介] 党晓燕, 博士研究生, 主治医师, E-mail: dxiaoyan1@163.com



及阴性对照组,每组6只。中剂量组灌胃量相当于人临床等效剂量,按每只动物 $18.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 给药,高剂量与低剂量则分别为中剂量组的2倍及1/2倍,阴性对照组给予等量的生理盐水。在实验前禁食不禁水12h,每天早晚各1次,每次灌胃2mL,连续3d。在末次给药2h后行水合氯醛麻醉,无菌条件下下腔静脉取血。全血静置4h, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $3000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心20min,分离血清,同种条件药物血清混匀, $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤器过滤除菌, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭活30min, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,备用。

1.3 细胞培养 人胃癌细胞SGC-7901于含10% FBS的RPMI1640培养基中,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养,2~3d后0.25%胰酶消化传代,取对数生长期细胞用于试验。

1.4 基因芯片分析DNA水平变化 将对数生长期的胃癌细胞随机分为2组,分别予以SPPW方中剂量组含药血清及阴性对照组含药血清干预24h,体积为培养液体积的10%。基因表达谱cDNA芯片由北京博奥生物公司提供,实验标记方法采用线性

放大后标记法,其中中剂量含药血清组RNA采用Cy3荧光标记,阴性对照组RNA采用荧光Cy5标记。RNA进行标记后利用等量的探针进行杂交,杂交方法采用 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$,16h杂交,并在 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 洗片。采用Agilent Axon扫描仪进行扫描软件读取数据,最后采用Genespring进行Normalize处理分析,最后Ratio Cy3/Cy5,即处理组/对照组。差异基因筛选标准为 $\text{Ratio}\geq 2.0$ 为上调基因, $\text{Ratio}\leq 0.5$ 为下调基因。

1.5 实时定量PCR检测各组中的NDRG1, BNIP3, SOD2, STAT2 mRNA的表达 对筛选出的差异基因中,选择3个上调基因(NDRG1, BNIP3, SOD2)及1个下调基因(STAT2)进行mRNA水平的验证。对3个不同浓度组含药血清干预24h后的人胃癌细胞SGC-7901采用Fastgen试剂盒进行总RNA的提取。cDNA合成按Fermentas逆转录试剂盒操作说明提取。根据基因库中的基因序列,设计NDRG1, BNIP3, SOD2, STAT2基因芯片筛选出的部分差异表达基因及内参基因 β -actin的上下游引物,并由Takara生物工程(大连)有限公司合成(表1)。

表1 RT-PCR所用基因引物序列及产物长度
Table 1 Primer sequences and length of RT-PCR

基因	引物序列	产物长度/bp
β -actin	上游5'-ATCCTGCGTGACATTAAGGAGAAG-3'	179
	下游5'-AGGAAGGAAGGCTGGAAGAGTG-3'	
NDRG1	上游5'-AATGCAGAGTAACGTGGAAGTGCTC-3'	127
	下游5'-TGCTCGCTCAATCTCCAGGTC-3'	
BNIP3	上游5'-GAGTCTGGACGGAGTAGCTCCAA-3'	108
	下游5'-TCCAATGCTATGGGTATCTGTTTCA-3'	
SOD2	上游5'-TCCAAATCAGGATCCACTGCAA-3'	75
	下游5'-TAAGCGTGCTCCACACATCA-3'	
STAT2	上游5'-TTGCTACAGCGTCTGCTCCAC-3'	97
	下游5'-TGCTGCCAGTCTTGAGGATGA-3'	

采用SYBR(R)GreenI嵌合荧光法进行,置于荧光定量PCR仪中进行扩增,反应体系($10\text{ }\mu\text{L}$): SYBR Premix Ex Taq TM II $5\text{ }\mu\text{L}$, cDNA $4\text{ }\mu\text{L}$, 上游引物 $0.3\text{ }\mu\text{L}$, 下游引物 $0.3\text{ }\mu\text{L}$, 水 $0.4\text{ }\mu\text{L}$ 。反应条件为 $95.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性3min; $95.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性10s; $60.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火30s;共35个循环。 β -actin作为内参照, $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 表示样品中目的基因初始cDNA相对表达量,定量NDRG1, BNIP3, SOD2, STAT2 mRNA的相对表达水平。

1.6 统计学方法 采用SPSS 12.0统计软件进行

分析处理。计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。2组比较采用独立样本均数t检验。3组及3组以上比较,先进行方差齐性检验,若方差齐,采用单因素方差分析,认为组间均数按检验水准有差异者,进一步用LSD-t进行均数多重比较。

2 结果

2.1 基因芯片检测 基因芯片共筛选出203个差异表达基因,上调141个(表2),最高比值达17.8747,下调62个(表3),最低比值为0.0818,涉及MAPK信号通路, Wnt信号通路, 细胞周期, B细胞受体信号通路,



AK/STAT 信号传导通路, VEGF 信号通路, TGF- β 信号通路, 氧化磷酸化及其他多种代谢通路。

表2 基因芯片检测 SPPW 方中剂量含药血清组干预胃癌细胞后的上调基因(部分)

Table 2 SPPW-induced some upregulated genes in SGC-7901 cells by array analysis

GenBank 登录号	基因	Ratio
NM_006096	protein NDRG1 (<i>N</i> -myc downstream-regulated gene 1 protein) (NDRG1)	2.001 8
NM_004052	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3 (BNIP3)	2.345 2
NM_002620	platelet factor 4 variant precursor (PF4V1)	3.582 8
NM_001743	superoxide dismutase [Mn] (SOD2)	2.214 7
NM_001866	cytochrome c oxidase polypeptide VIIIb, mitochondrial precursor (EC 1.9.3.1). (COX)	2.146 3
NM_003932	Hsc70-interacting protein (Hip) (ST13)	2.245 5
NM_017059	Bax	2.365
NM_000546	protein 53	2.431

表3 基因芯片检测 SPPW 方中剂量含药血清组干预胃癌细胞后的下调基因(部分)

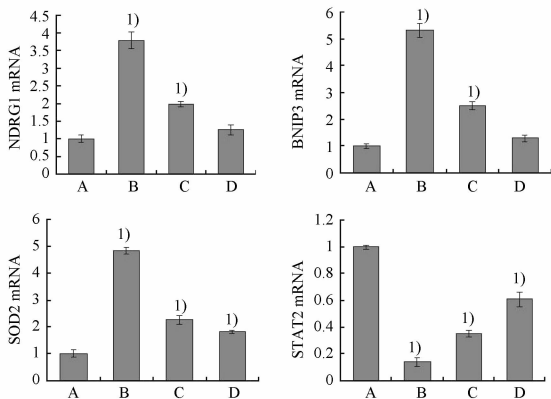
Table 3 SPPW-induced some downregulated genes in SGC-7901 cells by array analysis

GenBank 登录号	基因	Ratio
NM_005419	signal transducer and activator of transcription 2 (STAT2)	0.364 3
NM_004753	poly [ADP-ribose] polymerase 10 (PARP10)	0.484 4
NM_005101	interferon-induced 17 kDa protein precursor (ISG15)	0.121 5
NM_000633	BCL2	0.215

2.2 对 NDRG1, BNIP3, SOD2, STAT2 mRNA 表达的影响 与阴性对照组比较, 含药血清高、中剂量组 NDRG1, BNIP3, SOD2 mRNA 水平明显增高 ($P < 0.05$), 含药血清低剂量组 SOD2 mRNA 水平明显增高 ($P < 0.05$), 而含药血清高、中、低组 STAT2 mRNA 水平均明显降低 ($P < 0.05$) (图1)。

3 讨论

胃癌是消化系统最常见的恶性肿瘤。早期胃癌主要采用手术及内镜下治疗, 但胃癌起病隐匿, 临床发现多已进入中晚期。目前中医治疗胃癌是我国的胃癌治疗的特色。本实验采用基因芯片方法筛选了 SPPW 方含药血清干预后差异基因的表达, 共筛选出 203 个差异表达基因, 涉及肿瘤及细胞内信号转导的多个过程, 并用 RT-PCR 对涉及肿瘤细胞增殖, 凋亡及相关抑癌的基因加以验证, 表明 SPPW 方的抗肿瘤作用涉及多个因子表达水平的变化。正常情况下 MnSOD2 存在于细胞内的线粒体内, 保护细胞免受在细胞代谢过程中产生的自由基的损害。Mn-SOD2 高活性可下调多种肿瘤细胞的增殖活性, 但其中所涉及的分子机制尚未完全阐明^[6-8]。SPPW 方可上调 SOD2 表达, 可推测 SPPW 方可通过此途径保护细胞。



A. 对照组; B. 含药血清高剂量组; C. 含药血清中剂量组; D. 药血清低剂量组; 与对照组相比¹⁾ $P < 0.05$ 。

图1 各组 SPPW 方含药血清干预胃癌细胞后 NDRG1, BNIP3, STAT2, SOD2 mRNA 的表达水平

Fig. 1 SPPW-induced mRNA expression of NDRG1, BNIP3, STAT2, SOD2 in SGC-7901 cells

BNIP3 作为 Bcl2 家族中促凋亡成员, 主要通过线粒体途径诱导凋亡和自噬。应用小干扰 RNA, 靶向作用于小鼠乳腺癌细胞株中内源性 BNIP3, 可以阻止缺氧引起的细胞死亡, 使移植瘤体积增大, 且出现肝、肺、胸骨的转移^[9], 提示 BNIP3 和肿瘤的转移有关。三氧化二砷治疗恶性胶质瘤是由于可促进



BNIP3 及其同源物 BNIP3L 的表达,继而诱导细胞凋亡,抑制肿瘤生长^[10]。神经酰胺亦可促进 BNIP3 的 mRNA 和蛋白表达,抑制恶性胶质瘤的进展^[11]。通过诱导缺氧反应,上调 BNIP3 的表达促进凋亡可能是其延缓激素依赖性前列腺癌向非激素依赖性前列腺癌进展的机制之一^[12]。通过基因芯片研究表明 SPPW 方可上调 BNIP3 表达,且通过 RT-PCR 得到验证。因此本实验表明 SPPW 方可通过促凋亡作用而发挥抑制肿瘤作用。

NDRG1 基因作为新发现的有争议的抑癌基因,已证实多种组织中有表达。在体外实验中已证明可以抑制肿瘤生长。Kurdistani 等^[13]发现在多种肿瘤细胞株和肿瘤组织如乳腺癌、前列腺癌、结直肠癌、膀胱癌中,NDRG1 基因都呈低表达,而该基因的过表达则可抑制肿瘤细胞的生长。Bandyopadhyay 等^[14]在乳腺癌细胞中证实 NDRG1 基因蛋白表达显著降低有抑制肿瘤生长作用,同时证实 P53 和 PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) 可上调 NDRG1 的表达,因此推测 NDRG1 可能是 PTEN 和 P53 下游调节通路的一种蛋白酶基因,并推测抑制肿瘤转移^[15]。本实验基因芯片及 RT-PCR 均证实 SPPW 方可上调 NDRG1,为 SPPW 方抑制肿瘤细胞的转移提供理论依据。

本实验基因芯片证实 SPPW 方下调 STAT2 的表达,RT-PCR 从 mRNA 水平证实了 SPPW 方下调 STAT2 mRNA 的表达。周钧^[16]等研究表明 STAT2 在癌肿的早期由于酪氨酸残基位点的点突变或缺失造成激活功能的丧失,不能使信号转位于核内,导致基因调控失调而致肿瘤的发生。Jacqueline 等^[17]通过研究发现 STATs 低活性表达易导致恶性肿瘤的生长。据此可推测 SPPW 方可通过下调 STAT2 而发挥抑制肿瘤作用。

综上所述,SPPW 方可上调 NDRG1, BNIP3, SOD2 的表达,下调 STAT2 的表达。根据现有的研究结果。可推测 SPPW 方通过保护细胞免受自由基的损害、促肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞的生长及转移而发挥抗癌作用。

[参考文献]

[1] 张军,周宝芹,王挺,等. 中医辨证施治配合六神丸治疗 70 例胃癌临床观察[J]. 实用肿瘤学杂志,1993,7(2):73.
[2] 董伟华,孔天翰,韩雪飞,等. 蝎毒抗癌多肽对 4 种人肿瘤细

胞系的作用[J]. 河南医科大学学报,1999,34(1):52.
[3] 曲爱兵,赵维诚,梁良,等. 蜈蚣组织提取物抗肿瘤活性的初步研究[J]. 实用肿瘤学杂志,2003,17(1):29.
[4] Yu J, Liu H, Lei J, et al. Antitumor activity of chloroform fraction of *Scutellaria barbata* and its active constituents [J]. *Phytother Res*, 2007, 21(9):817.
[5] Yin X, Zhou J, Jie C, et al. Anticancer activity and mechanism of *Scutellaria barbata* extract on human lung cancer cell line A549 [J]. *Life Sci*, 2004, 75(18):2233.
[6] Kim K H, Rodriguez A M, Carrico P M, et al. Potential mechanisms for the inhibition of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2001, 3(3):361.
[7] Li N, Oberley T D, Oberley L W, et al. Overexpression of manganese superoxide dismutase in DU145 human prostate carcinoma cells has multiple effects on cell phenotype [J]. *Prostate*, 1998, 35(3):221.
[8] Li Z, Khaletskiy A, Wang J, et al. Genes regulated in human breast cancer cells overexpressing manganese-containing superoxide dismutase [J]. *Free Radic Biol Med*, 2001, 30(3):260.
[9] Manka D, Spider Z, Millhorn D E. Bcl2 / Adenovirus E1B 19 kDa interacting protein3 knockdown enables growth of breast cancer metastases in the lung, liver and bone [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(24):11689.
[10] Kanzwa T, Zhang L, Xiao L, et al. Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3 [J]. *Oncogene*, 2005, 24(6):980.
[11] Daido S, Kanzawa T, Yamamoto A, et al. Pivotal role of the cell death factor BNIP3 in ceramide-induced autophagic cell death in malignant glioma cells [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(12):4286.
[12] Rothermund C A, Gopalakrishnan V K, Eudy J D, et al. Casodex treatment induces hypoxia-related gene expression in the LN-CaP prostate cancer progression model [J]. *BMC Urol*, 2005, 5(1):5.
[13] Kurdistani S K, Arizti P, Reimer C L, et al. Inhibition of tumor cell growth by RTP / rit42 and its responsiveness to p53 and DNA damage [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(19):4439.
[14] Bandyopadhyay S, Pai S K, Hirota S, et al. PTEN upregulates the tumor metastasis suppressor gene Drg1 in prostate and breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(21):7655.
[15] 庄利萍. NDRG1 基因与肿瘤的研究进展 [J]. 实用癌志, 2009, 24(2):211.
[16] 周钧,钟德,华颂文,等. 原发性肝癌中 STAT1, STAT2 与 hMLH1, hMSH2 的表达关系 [J]. 中国普通外科杂志, 2005, 14(20):100.
[17] Bromberg J. STAT proteins and oncogenesis [J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(9):1139.

[责任编辑 张宁宁]