

# 六味地黄汤对小鼠诱发性肺腺瘤 P53 基因表达的影响

李 惠 金亚宏 姜廷良(中国中医研究院中药研究所 100700)

**摘 要** 六味地黄汤能够显著降低氨基甲酸乙酯所致小鼠肺腺瘤的诱发率,且这种抑制作用在甲状腺素“阴虚”小鼠中表现得更为明显。诱发肺腺瘤小鼠的肺组织中,肿瘤抑制基因 P53 mRNA 表达比正常肺组织明显下降,给予六味地黄汤后,P53 基因表达明显回升;在甲状腺素“阴虚”小鼠中,六味地黄汤也具有同样作用。

**关键词** 六味地黄汤 肿瘤抑制基因 P53 肺腺瘤 T<sub>3</sub> 性“阴虚”

## Effect of Liuwei Dihuang Decoction(LWDH) on the Expression of P53 Gene in Lung Adenomas Induced in Mice

*Li Hui, Jin Yahong, Jiang Tingliang*

*(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of TCM, Beijing, 100700)*

**Abstract:** Liuwei Dihuang Decoction (LWDH) was found to decrease the incidences of lung adenoma induced by urethan in mice. The effect of LWDH appeared more significant in the mice with Yin-deficiency induced by thyroxine (T<sub>3</sub>). As compared with healthy mice as a control, the expression of tumor suppressor gene P53 mRNA in the lungs with adenomas was noticeably reduced, which could be reversed by treatment of LWDH. The same effect of LWDH had been found in Yin-deficiency mice.

**Key Words:** Liuwei Dihuang Decoction, tumor suppressor gene P53, lung adenomas, Yin-deficiency treated with thyroxine

六味地黄汤是滋阴补肾的代表方剂,在临床上有着广泛的用途。以往我们的研究表明,六味地黄丸可以治疗食管上皮重度增生,减少癌变发生率,抑制小鼠自发性肿瘤及某些化学物质诱发的小鼠肿瘤的发生,能对抗诱变剂环磷酰胺的致突变作用<sup>[1]</sup>,降低瘤细胞蛋白质合成,提高 cAMP 含量,改善荷瘤机体的免疫、代谢、造血和甲状腺功能,延长存活时间。

近年来的研究结果说明,癌基因和癌抑制基因的表达与肿瘤的发生发展密切相关,其中肿瘤抑制基因 P53 参与了细胞生存的负调节过程,此种基因功能的丧失与肿瘤的

形成密切相关<sup>[2,3]</sup>。为了进一步探讨六味地黄汤防治肿瘤的作用机制,我们观察了六味地黄汤对氨基甲酸乙酯诱发小鼠肺腺瘤的抑制作用,并利用 Northern blot 方法<sup>[4,5]</sup>检测了 P53 基因表达的变化情况。

### 1 材料和方法

**1.1 动物及分组** 昆明小鼠 224 只,体重 18~20g(中国医学科学院实验动物中心提供),常规喂养,自由取食。动物分组及处理情况如表 1。

投药期间对动物定期称重,每天进行一般的行为症状观察、对异常动物隔离饲养。给予 T<sub>3</sub> 的动物出现身体瘦长、躁动不安等症

状,被认为造模成功。

表 1 实验动物分组及处理情况

组别	第 1~6 天	第 7 天	第 8 天	第 8~128 天
正常对照组	蒸馏水	蒸馏水	生理盐水	蒸馏水
正常给药组	蒸馏水	六味	生理盐水	六味
诱瘤对照组	蒸馏水	蒸馏水	氨基甲酸乙酯	蒸馏水
诱瘤给药组	蒸馏水	六味	氨基甲酸乙酯	六味
T <sub>3</sub> 对照组	T <sub>3</sub>	蒸馏水	生理盐水	蒸馏水
T <sub>3</sub> 给药组	T <sub>3</sub>	六味	生理盐水	六味
T <sub>3</sub> 诱瘤对照组	T <sub>3</sub>	蒸馏水	氨基甲酸乙酯	蒸馏水
T <sub>3</sub> 诱瘤给药组	T <sub>3</sub>	六味	氨基甲酸乙酯	六味

蒸馏水:灌胃 0.2ml/只天。T<sub>3</sub>:灌胃 T<sub>3</sub> 混悬液 0.7mg/kg 体重/天。氨基甲酸乙酯:腹腔注射,1mg/g 体重。六味:灌胃六味地黄汤,7g/kg 体重/天。

**1.2 药物与试剂** 六味地黄汤按传统配伍将熟地黄(玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch 的根茎加酒反复蒸晒炮制品)、山萸肉(山茱萸科植物山茱萸 *Corus officinalis* Siebst Euv 的果实)、淮山药(薯蓣科植物薯蓣 *Dioscorea opposita* Thunb 的块茎)、牡丹皮(毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr 的根皮)、白茯苓(多孔菌科植物茯苓 *Poria cocos* Wolf 的干燥菌核),泽泻(泽泻科植物 *Alisma orientale* Juzep 的根茎)以 8:4:4:3:3:3 的重量比例制成煎剂,水浴浓缩药液,使 1ml 含 1g 生药。以上诸药均为炮制后的饮片入药,购自北京药材公司,并经生药鉴定。氨基甲酸乙酯 250g/瓶,北京化工厂批号 870125。三碘甲状腺氨酸(T<sub>3</sub>):Sigma 公司。P53 cDNA 探针(1.7Kb):华美生物工程公司。 $\alpha^{32}$ P-dCTP:北京亚辉生物医学工程公司。Prime- $\alpha$ -Gene Labeling System:美国 Promega 公司。

**1.3 实验方法** 注射氨基甲酸乙酯诱发肿瘤后的第 120 天,处死动物,取出肺脏,检视并记录肺腺瘤发生数,部分肺组织用于石蜡切片,其余组织投入液氮,做 Northern blot 分析:异硫氰酸胍一步法提取组织总 RNA,紫外分光光度计定量后,20 $\mu$ g RNA 样品经甲醛琼脂糖凝胶变性电泳、转膜、预杂交后,与经 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP 随机引物标记的 P53 (1.7Kb)DNA 片段杂交,洗膜、放射自显影,

并做灰度扫描。

## 2 结果

**2.1 六味地黄汤对氨基甲酸乙酯诱发小鼠肺腺瘤的影响** 肉眼观察小鼠肺腺瘤呈乳白色边缘清晰的圆形结节,直径约 1~2mm。光镜下可见瘤组织与正常组织界限清晰,瘤细胞为圆形或卵圆形,腺样排列,细胞分化好。在病变程度上,给药组与对照组无明显差异。

表 2 六味地黄汤对氨基甲酸乙酯诱发小鼠肺腺瘤的影响

组别	检查鼠数	患瘤鼠数	肿瘤发生率(%)
正常对照组	28	2	7.1
正常给药组	28	1	3.6
诱瘤对照组	20	16	80.0
诱瘤给药组	27	11	40.7*
T <sub>3</sub> 对照组	25	4	16.0
T <sub>3</sub> 给药组	27	2	7.4
T <sub>3</sub> 诱瘤对照组	25	23	92.0
T <sub>3</sub> 诱瘤给药组	22	6	27.3**

\* 与相应对照组比 \*P<0.05, \*\*P<0.01

由表 2 可见,在我们的饲养环境下,正常对照组小鼠肺腺瘤自发率较低;腹腔注射氨基甲酸乙酯可以诱发小鼠肺腺瘤,而口饲给予 7g/kg/日剂量的六味地黄汤后,肺腺瘤诱发率较诱瘤对照组显著降低。在小鼠 T<sub>3</sub> 性“阴虚”状态下,氨基甲酸乙酯的诱发率似略高于正常小鼠,给六味地黄汤后,肺腺瘤的发生率较 T<sub>3</sub> 性“阴虚”诱瘤对照组有显著降低。

**2.2 六味地黄汤对氨基甲酸乙酯诱发小鼠肺腺瘤肺组织中 P53 基因表达的影响** 表 3 显示了不同处理情况下,动物肺组织中肿瘤

表 3 六味地黄汤对小鼠肺组织中 P53 表达的影响(IOD 值)

实验次数	正常		诱瘤		T <sub>3</sub> 造模		T <sub>3</sub> 造模诱瘤	
	对照	给药	对照	给药	对照	给药	对照	给药
1	430.0	445.7						
2	454.3		229.0	340.8				
3	570.0				531.8	574.4	287.3	462.5

抑制基因 P53 mRNA 的表达情况。正常对照组与正常给药组 P53 基因表达无明显差异(图 1);诱瘤对照组比正常对照组 P53 基因表达下降 49.6%,诱瘤给药组比诱瘤对照组升高 48.8%(图 2);正常对照组、T<sub>3</sub> 性“阴

虚”对照组和 T<sub>3</sub> 性“阴虚”给药组 P53 基因表达差别不明显,而 T<sub>3</sub> 性“阴虚”诱瘤组 P53 基因表达比正常对照组下降 49.6%,给药后表达回升 61.0%(图 3)。由此可见,肿瘤抑制基因 P53 在诱发肺腺瘤小鼠的肺组织中表

达量明显下降,给予六味地黄汤后 P53 基因表达的这种变化可被明显逆转;在实验性“阴虚”小鼠中,六味地黄汤同样具有使肺腺瘤小鼠肺组织中 P53 基因表达回升的作用。

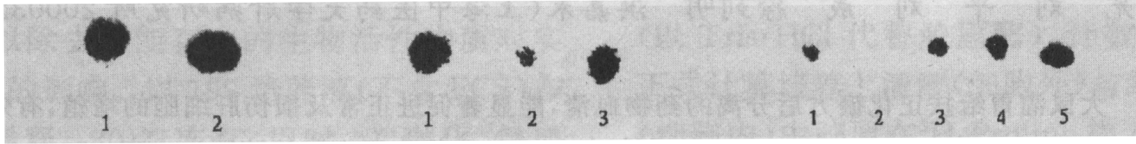


图1 六味地黄汤对正常小鼠肺组织中 P53 表达的影响

1. 正常对照组 2. 正常给药组

图2 六味地黄汤对诱发性肺腺瘤肺组织中 P53 表达的影响

1. 正常对照组 2. 诱瘤对照组  
3. 诱瘤给药组

图3 T<sub>3</sub> 性“阴虚”情况下,六味地黄汤对诱发性肺腺瘤肺组织 P53 表达的影响

1. 正常对照组 2. T<sub>3</sub> 诱瘤对照组 3. T<sub>3</sub> 诱瘤给药组 4. T<sub>3</sub> 对照组 5. T<sub>3</sub> 给药组

### 3 讨论

六味地黄汤是滋补肾阴的经典方剂,在食管癌高发区现场发现,具有肾阴虚见证的食管上皮重度增生患者癌变率高,而六味地黄丸的防治效果亦佳。为了探讨和印证这种结果,本实验以 T<sub>3</sub> 造型进行实验。关于中医“证”的模型,国内外曾做过很多探索,对之也有不同的认识和看法。我们鉴于肾阴虚有五心烦热等症候,酷似甲状腺机能亢进的某些症状,因而选用 T<sub>3</sub> 造型模拟中医肾阴虚状态。

本实验结果表明,氨基甲酸乙酯可以诱发小鼠肺腺瘤,六味地黄汤明显抑制肺腺瘤的发生率,这与本实验室以往的研究结果相一致。另外,本实验还表明在 T<sub>3</sub> 性“阴虚”小鼠中,氨基甲酸乙酯诱瘤率有上升趋势,六味地黄汤在此种情况下的抑瘤作用似更加明显。中医认为肿瘤的发病与“正气不足”有关,正气虚损,抗病能力下降,增加了机体对外界化学诱瘤物质的敏感性,在“肾阴虚”情况下,肿瘤发生率有所提高可能与阴阳平衡失调有关。而给予六味地黄汤使肺腺瘤发生率较正常小鼠的诱瘤组更有所降低,这似符合六味

地黄汤的用药指征。

从 Northern blot 分析结果来看,无论是在正常状态还是在实验性“阴虚”状态下,诱瘤小鼠肺组织中肿瘤抑制基因 P53 表达均下降,给予六味地黄汤后,P53 表达明显回升。提示 P53 基因表达下降可能是氨基甲酸乙酯诱发小鼠肺腺瘤的机制之一,而六味地黄汤能够通过一定的途径维持 P53 基因的表达,从而降低氨基甲酸乙酯对小鼠肺腺瘤的诱发率。这也可能是六味地黄汤预防肿瘤发生的作用机制之一。

### 参考文献

[1]Jiang TL, et al. Journal of Traditionel Chinese Medicine 1984;4(1) : 59  
 [2]Vogelstein B, et al. Cell 1992;70 : 523  
 [3]Lane DP. Nature 1992;358 : 15  
 [4]萨姆,布鲁克,J(美)等. 金冬雁,黎孟枫等译. 分子克隆实验指南(第二版),科学出版社.  
 [5]Friderick MA, et al. Short Protocols in Molecular Biology(2nd ed). Published by Gene Publishing Associates and John Wiley & Sons.

(收稿:1996-10-30)