

## 理冲汤对体外培养人子宫肌瘤细胞 p53 信号通路基因表达谱的影响

李冬华<sup>1\*</sup>, 谢小磊<sup>1</sup>, 张亚兰<sup>2</sup>, 耿建国<sup>1</sup>, 白霞<sup>1</sup>, 张炎<sup>1</sup>

(1. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069;

2. 首都医科大学附属北京妇产医院妇幼保健院, 北京 100026)

**[摘要]** **目的:**研究理冲汤对体外培养人子宫肌瘤细胞 p53 信号通路基因表达谱的影响。**方法:**体外原代培养子宫肌瘤细胞并传代后,加入理冲汤含药血清,继续培养。选用功能分类 PCR p53 信号通路基因芯片 (PCR p53 Signaling Pathway Microarray),从空白对照组、理冲汤组子宫肌瘤细胞中进行样品的 RNA 抽提及纯化,采用紫外吸收测定法及变性琼脂糖凝胶电泳进行 RNA 质量检测,合成 cDNA,最后进行实时定量 PCR。**结果:**所采用的 PCR p53 信号通路基因芯片共检测 96 条基因,理冲汤组与空白对照组比较,共 17 条 (17.7%) 基因表达发生明显变化,其中 10 条基因表达量明显下降 (Fold Down-Regulation < -2),7 条基因表达量上升 (Fold Up-Regulation > 2)。按功能将其进行大体分类,涉及到细胞凋亡、细胞周期、细胞生长增殖和分化、DNA 修复等多方面。**结论:**理冲汤对子宫肌瘤 p53 信号通路的细胞凋亡、细胞周期、细胞生长增殖和分化、DNA 修复等相关基因均有调节作用,提示细胞内外的信号传导是子宫肌瘤发病的关键环节,理冲汤对子宫肌瘤 p53 信号通路相关基因表达具有调控作用。

**[关键词]** 子宫肌瘤; p53 信号通路; 基因表达谱; 理冲汤

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)21-0147-05

**[DOI]** CNKI:11-3495/R.20110906.1107.003 **[网络出版时间]** 2011-09-06 11:07

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110906.1107.003.html>

## Effect of Lichong Decoction on p53 Signaling Pathway Gene Expression Profile in Human Uterine Leiomyoma Cells *in vitro*

LI Dong-hua<sup>1\*</sup>, XIE Xiao-lei<sup>1</sup>, ZHANG Ya-lan<sup>2</sup>, GENG Jian-guo<sup>1</sup>, BAI Xia<sup>1</sup>, ZHANG Yan<sup>1</sup>

(1. Capital Medical University School of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100069, China;

2. Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Capital Medical University Beijing  
Maternal and Child Health Care Hospital, Beijing 100026, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of Lichong decoction on p53 signaling pathway gene expression profile in human uterine leiomyoma cells *in vitro*. **Method:** The primary cultured uterine leiomyoma cells were treated with Lichong decoction. Using PCR p53 signaling pathway microarray, all RNA was gained and cleaned up from human uterine leiomyoma cells in blank control group and Lichong decoction group. RNA yield and quality were assessed by UV absorbance and denaturing agarose gel electrophoresis, first strand cDNA Synthesis, performing Real-Time PCR finally. **Result:** Lichong decoction group was compared with blank control group among 96 pieces genes in PCR p53 signaling pathway microarray, 17 in total (17.7%) genes expression had obviously

**[收稿日期]** 20110304(002)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81073096);北京市自然科学基金项目(7082015);北京市属高等学校人才强教深化计划“中青年骨干人才培养计划”项目(PHR201008403)

**[通讯作者]** \*李冬华,博士学位,副教授,研究生导师,从事中医治法研究,E-mail:dududocor@yahoo.com.cn

changed, 10 pieces went down obviously (Fold Down-Regulation  $< -2$ ), 7 piece significantly went up (Fold Up-Regulation  $> 2$ ). The genes were generally classified, according to their functions, into apoptosis, cell cycle, cell growth, proliferation and differentiation and DNA repair. **Conclusion:** Lichong decoction can regulate correlation genes of apoptosis, cell cycle, cell growth, proliferation and differentiation and DNA repair in p53 signaling pathway of uterine leiomyoma, which show that signal-transmit between in and out of cell is the key link in uterine leiomyoma process, Lichong decoction has the effect of regulation and control of p53 signaling pathway gene expression profile.

[**Key words**] uterine leiomyoma; p53 signaling pathway; gene expression profile; Lichong decoction

子宫肌瘤 (uterine leiomyoma) 是女性生殖系统最常见的良性肿瘤, 多见于 30 ~ 50 岁妇女, 发病率逐年增高, 虽恶变率低, 但其并发症严重影响妇女身心健康。子宫肌瘤的发病机制以及发生发展的分子生物学基础迄今未明, 较一致的看法是, 其发生、发展与正常子宫肌层的自身突变、性激素之间复杂的相互作用有关<sup>[1]</sup>, 近年来研究发现, 细胞信号传导系统是子宫肌瘤发生中的关键环节<sup>[2]</sup>。中医学认为子宫肌瘤的病机以正虚血瘀为主, 治疗常从扶正祛瘀论治, “补消结合”, 显现出中医药疗效好、副作用小的特点和优势。本研究采用血清药理学方法, 观察具有扶正祛瘀功效的理冲汤对体外培养人子宫肌瘤细胞 p53 信号通路基因表达谱的影响, 探讨理冲汤治疗子宫肌瘤可能的作用机制, 为临床治疗子宫肌瘤提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 组织来源** 取自北京妇产医院 2009 年 10 月 16 日行子宫肌瘤全切术的患者, 将切除的肌瘤组织部分送病理检查, 选择肌瘤组织中间部分做细胞培养。该患者在手术前 3 个月未接受过激素和其他药物治疗, 术后病理诊断为多发性子宫肌瘤。

**1.2 试剂** DMEM 培养基 (Gibco, USA); 胎牛血清 (Hyclone, USA); 0.25% 胰酶 (Hyclone, USA); PBS 液 (Hyclone, USA); TRIZOL 试剂 (Invitrogen life technologies, USA), RNeasy® MinElute™ 纯化试剂盒 (Qiagen, USA), SuperScript. III Reverse Transcriptase (Invitrogen life technologies, USA), 2X SuperArray PCR master mix (Superarray, USA)。

**1.3 仪器设备** ABI PRISM® 7900 型荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems, USA)。

**1.4 实验动物** 3 月龄 Wistar 大鼠 24 只, 雌性未孕, 体重 (220 ± 20) g, SPF 级。购自军事医学科学院, 合格证号为 SCXK (军) 2007-0004, 饲养在首都医科大学实验动物部 SPF 级动物室, 正常光照条件,

食、水可自由摄取, 室温控制在 18 ~ 22 °C。

**1.5 药物** 理冲汤出自清代名医张锡纯先生所著《医学衷中参西录》, 取中药饮片, 按原处方量折算并确定处方量如下: 生黄芪 9 g, 党参 6 g, 白术 6 g, 生山药 15 g, 天花粉 12 g, 知母 12 g, 三棱 9 g, 莪术 9 g, 生鸡内金 9 g。上述中药饮片均购自北京同仁堂饮片有限责任公司。按上述处方量取中药饮片, 先后水提 2 次, 配制含生药 3.3 g · mL<sup>-1</sup> 浓缩液, 低温 (0 ~ 4 °C) 保存, 用前摇匀。

## 2 方法

**2.1 血清制备** 实验动物分组方法: 将动物随机分为空白对照组、理冲汤组, 每组各 12 只。

药物制备及给药方法: 折算大鼠给药量为成人等效剂量的 2 倍。理冲汤组每日给药量为 22 g · kg<sup>-1</sup>, 每次 ig 治疗药物 10 mg · kg<sup>-1</sup>, 2 次/d, 间隔 6 h, 空白对照组, 每次灌胃蒸馏水 10 mg · kg<sup>-1</sup>, 2 次/d, 间隔 6 h。连续 2 d, 第 3 天给药 2 h 后再次给药, 1 h 后 4% 戊巴比妥 (10 mL · kg<sup>-1</sup>, ip) 麻醉, 经腹主动脉取血。采血后, 3 000 r · min<sup>-1</sup> 20 min 离心, 吸取上清, 56 °C 30 min 灭活, 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌分装, -20 °C 保存备用。

## 2.2 细胞培养及给药方法

**2.2.1 细胞原代培养** 子宫肌瘤患者行子宫切除术后, 立即在无菌条件下取其肌瘤组织的中间部位, 约 1 cm<sup>3</sup>, 置于含 3% 双抗 (青链霉素) 的 PBS 液中, 密闭冰浴送入细胞培养室。在含 3% 双抗的 PBS 液中漂洗。在含 1% 双抗的 DMEM 液中将组织剪碎, 约 1 mm<sup>3</sup>。用吸管将组织吸出, 均匀的贴在 25 mL 的细胞培养瓶中, 组织块摆好后, 轻轻将培养瓶翻转, 瓶底朝上, 向瓶内注入含 30% 胎牛血清的 DMEM 培养液 2 mL, 盖好瓶盖, 将培养瓶倒置放在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内。4 h 后, 将培养瓶慢慢翻转平放, 静置培养。隔夜再向每个细胞瓶中注入含 30% 胎牛血清的 DMEM 培养液 3 mL。约 2 d 换液 1 次。

**2.2.2 细胞传代** 待细胞贴至瓶底达 80% 后,传代。每个细胞瓶注入 1 mL 的 0.25% 的胰酶,待细胞收缩后,倒出胰酶,盖好瓶盖,静置 1 min,再用 PBS 液清洗,之后向瓶中注入含 30% 胎牛血清的 DMEM 培养液,反复吹打,分装 2 瓶,再向每瓶中补足培养液至 5 mL。

**2.2.3 含药血清干预** 待第二代细胞生长贴至达 80% 后给药。先将细胞密度调整至  $1 \times 10^7/L$ , 1 mL/孔接种于 24 孔细胞培养板内,分为空白对照组、理冲汤组。待细胞贴壁,吸出培养液,PBS 液清洗,空白对照组各孔加入含 20% 无药血清培养液 1 mL,理冲汤组各孔分别加入含 20% 含理冲汤药物血清的培养液 1 mL。放置于 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

**2.3 取材** 培养至 48 h 后,弃去培养液。PBS 清洗,每孔加入 100 μL 的 Trizol,反复吹打,目视细胞层溶解完全,吸入至冻存管中,-20 °C 保存。

**2.4 测定方法** 本实验所用芯片系美国 SuperArray 公司生产的功能分类 PCR p53 信号通路基因芯片 (PCR p53 Signaling Pathway Microarray)。取代测样品进行 RNA 抽提及纯化,采用紫外吸收测定法及变性琼脂糖凝胶电泳进行 RNA 质量检测,合成 cDNA,最后进行实时定量 PCR。

**2.5 数据分析** 采用  $\Delta\Delta Ct$  方法

**2.5.1** 计算每个处理组中的每个通路相关基因的  $\Delta Ct$ 。

$\Delta Ct$  (理冲汤组) = average  $Ct$ -average of HK genes'  $Ct$  for 理冲汤组 array

$\Delta Ct$  (空白对照组) = average  $Ct$ -average of HK genes'  $Ct$  for 空白对照组 array

**2.5.2** 计算 2 组 PCR Array 中每个基因的  $\Delta\Delta Ct$

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  (空白对照组) -  $\Delta Ct$  (理冲汤组)

通过  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算空白对照组与理冲汤组对应基因的表达差异。

### 3 结果

**3.1 RNA 质量检测** 子宫肌瘤细胞总 RNA 提取的样品经紫外吸收测定法定量检测,理冲汤组和空白对照组样品 RNA 溶液的  $A_{260}/A_{280}$  的比值均为 1.8 ~ 2.1,各样品中蛋白质杂质少。变性琼脂糖凝胶电泳分析,各组 28S 和 18S 核糖体 RNA 的带非常亮而浓,上面一条带的密度大约是下面一条带的 2 倍,无其他大分子条带,表明总 RNA 无蛋白质污染,无降解。结果见表 1,图 1。

表 1 各组 RNA 纯化后测的浓度

样本	$A_{260}$	$A_{280}$	$A_{260}/A_{280}$	质量浓度/ $mg \cdot L^{-1}$
空白对照	6.472	3.523	1.84	258.89
理冲汤	6.478	3.445	1.88	259.14

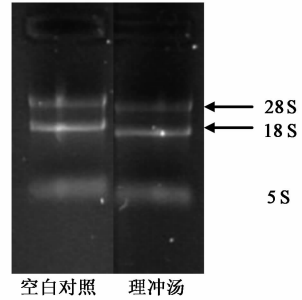


图 1 各组变性琼脂糖凝胶电泳

**3.2 基因表达图谱分析** 图 2 是理冲汤组与空白对照组比较的基因表达谱散点图,基因表达量明显下降或明显上升的基因位于散点图基线以外。图 3 是两组比较的基因表达谱 3D 立体剖面图,基因表达量上升的基因位于 3D 立体剖面图上部,基因表达量下降的基因位于 3D 立体剖面图下部。

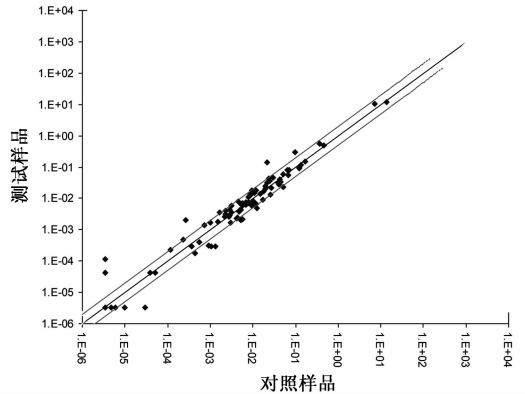


图 2 基因表达谱散点图

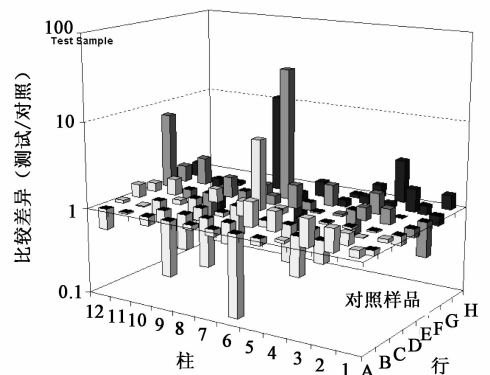


图 3 基因表达谱 3D 立体剖面图

**3.3 人子宫肌瘤细胞差异表达的基因** 本研究采用的 PCR p53 Signaling Pathway Microarray 共检测 96

条基因,理冲汤组与空白对照组比较,共 17 条 (17.7%) 基因表达发生明显变化,其中 10 条基因表达量明显下降 (Fold Down-Regulation < -2), 7 条基因表达量上升 (Fold Up-Regulation > 2), 见表 2 ~ 3。

表 2 理冲汤组明显下调的基因

基因库	基因缩写	基因名称	下调
NM_000633	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	-9.00
NM_001168	BIRC5	Baculoviral IAP repeat-containing 5	-4.41
NM_057749	CCNE2	Cyclin E2	-2.88
NM_001789	CDC25A	Cell division cycle 25 homolog A (S. pombe)	-3.66
NM_001790	CDC25C	Cell division cycle 25 homolog C (S. pombe)	-2.57
NM_005225	E2F1	E2F transcription factor 1	-2.69
NM_002228	JUN	Jun oncogene	-2.23
NM_003981	PRC1	Protein regulator of cytokinesis 1	-2.53
NM_005427	TP73	Tumor protein p73	-2.98
NM_000378	WT1	Wilms tumor 1	-2.50

表 3 理冲汤组明显上调的基因

基因库	基因缩写	基因名称	上调
NM_001184	ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related	2.08
NM_000600	IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)	6.56
NM_003620	PPM1D	Protein phosphatase 1D magnesium-dependent, delta isoform	7.40
NM_019845	RPRM	Reprimo, TP53 dependent G2 arrest mediator candidate	33.04
NM_003722	TP63	Tumor protein p63	12.84
NM_012423	RPL13A	Ribosomal protein L13a	3.08
NM_012238	SIRT1	Sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1 (S. cerevisiae)	2.09

#### 4 讨论

本研究所采用的 PCR p53 Signaling Pathway Microarray 属 SuperArray 公司第二代功能分类基因芯片 (Real-time PCR 芯片), 是进行基因表达研究的理想工具, 具有灵敏度高, 准确可靠, 重复性好的特点。功能分类基因芯片克服了传统的高通量基因表达谱芯片耗费大、结果数据繁多的缺陷, 可反映一些功能相关的基因或基因家族基因的表达变化, 成为后基因组时代更系统、更有效的分析工具。

本研究共检测 96 条基因, 理冲汤组与空白对照组比较, 共 17 条 (17.7%) 基因表达发生明显变化, 其中 10 条基因表达量明显下降 (Fold Down-Regulation < -2), 7 条基因表达量上升 (Fold Up-Regulation > 2)。按功能将其进行大体分类, 涉及到细胞凋亡、细胞周期、细胞生长增殖和分化、DNA 修复等多方面。

表达量明显下降基因主要包括细胞凋亡相关基

因 BCL2, BIRC5, 细胞周期及细胞生长增殖和分化相关基因 CDC25A 等。BCL2 基因是细胞凋亡研究中最受重视的癌基因之一, BCL2 基因家族成员包括 BCL-2/Bax, BCL-XL/BCL-Xs, Bak 等 17 种, 它们相互作用, 共同参与调控细胞的凋亡过程, 其中以 BCL2/Bax 的作用尤为重要<sup>[3]</sup>。BCL2 蛋白主要定位于细胞膜的线粒体和粗面内质网上, 它的主要生物学功能为延长细胞的生命周期并增强细胞对凋亡刺激因素的耐受性而达到抗凋亡的作用。BIRC5 是凋亡抑制蛋白家族 (inhibitor of apoptosis proteins, IAPs) 中结构最简单、抗凋亡作用最强的蛋白分子<sup>[4-5]</sup>, 该基因含有 4 个外显子和 3 个内含子。BIRC5 主要涉及到 2 个重要的生物学功能: 促进细胞增殖以及调整细胞的生存时间。目前该基因也认为是一个癌基因, 研究表明, 在多种肿瘤组织中, BIRC5 表达上调, 并且与肿瘤的转移、复发、临床分期、病理分级及多药耐药呈明显的相关。CDC25A

导致肿瘤发生的机制目前并不十分清楚,较一致的有2种观点<sup>[6-7]</sup>:①促增殖:过表达的 CDC25A 蛋白会使细胞快速由 G<sub>1</sub> 期进入 S 期,从而导致细胞 DNA 的合成增加,进而肿瘤细胞获得高增殖活性引起肿瘤的发生。②抗凋亡: CDC25A 可以在细胞质中直接激活 AKT 生存途径而阻止细胞凋亡。因此促增殖作用可能主要与核蛋白的表达有关,而抗凋亡作用可能与细胞质的表达关系密切。

表达量明显上升的基因主要是细胞生长增殖和分化相关基因 IL6、细胞周期相关基因 TP63 等。白细胞介素 6 (IL6) 的生物学活性主要是通过激活 IL6 受体  $\beta$  链 gp130 信号和 STAT 信号传导链介导的,它可与 p53 共同通过对 p21 蛋白、Bcl -2 基因家族以及某些原癌基因的调节,参与细胞增殖与凋亡的调控<sup>[8]</sup>。p63 蛋白 (TP63) 与 p53 蛋白具有高度同源性<sup>[9]</sup>。p63 基因是 1998 年 Yang 等在人类及大鼠基因组中发现的一个与抑癌基因 p53 同源的基因家族新成员,定位于 3q27-3q29。p63 与 p53 具有十分相似的结构和功能,在遗传、生长发育和肿瘤消长等方面中起着广泛而重要的作用,在肿瘤的发生、发展中也扮演着十分特别的角色,既可以抑制肿瘤也可以促进肿瘤。

本研究利用功能分类基因芯片技术,研究理冲汤对体外培养人子宫肌瘤细胞 p53 信号通路基因表达谱的影响,结果表明理冲汤对子宫肌瘤 p53 信号通路的细胞凋亡、细胞周期、细胞生长增殖和分化、DNA 修复等相关基因均有调节作用,提示细胞内外的信号传导是子宫肌瘤发病的关键环节,理冲汤对子宫肌瘤 p53 信号通路相关基因表达具有调控作用。

## [参考文献]

- [1] Laughlin S K, Schroeder J C, Baird D D. New directions in the epidemiology of uterine fibroids[J]. *Semin Reprod Med*, 2010,28(3):204.
- [2] Awonuga A O, Shavell V I, Imudia A N, et al. Pathogenesis of benign metastasizing leiomyoma; a review [J]. *Obstet Gynecol Surv*, 2010,65(3):189.
- [3] Sabah M, Cummins R, Leader M, et al. Immunoreactivity of p53, Mdm2, p21(WAF1/CIP1) Bcl-2, and Bax in soft tissue sarcomas: correlation with histologic grade [J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*,2007,15(1):64.
- [4] Hector S, Prehn J H. Apoptosis signaling proteins as prognostic biomarkers in colorectal cancer; a review [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1795(2):117.
- [5] Hunter A M, La Casse E C, Korneluk R G. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets [J]. *Apoptosis*, 2007,12(9):1543.
- [6] Lavecchia A, Di Giovanni C, Novellino E. CDC25A and B dual-specificity phosphatase inhibitors: potential agents for cancer therapy [J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16(15):1831.
- [7] Fernandez Vidal A, Mazars A, Manenti S. CDC25A: a rebel within the CDC25 phosphatases family? [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2008,8(8):825.
- [8] Waldner M J, Neurath M F. Colitis-associated cancer; the role of T cells in tumor development [J]. *Semin Immunopathol*, 2009,31(2):249.
- [9] Collavin L, Lunardi A, Del Sal G. p53-family proteins and their regulators: hubs and spokes in tumor suppression [J]. *Cell Death Differ*, 2010,17(6):901.

[责任编辑 聂淑琴]