地黄管食通颗粒对放射治疗后食管癌模型大鼠 c-myc,TERT 表达的影响

王祥麒*,郑玉玲,王俊涛,韩倩倩
(河南中医学院,郑州 450008)

[摘要] **目的**:观察地黄管食通颗粒对食管癌造模大鼠细胞凋亡及放疗后原癌基因(c-myc),端粒酶逆转录酶(TERT)蛋白表达的影响,从分子生物学角度分析其作用机制。**方法**:选用清洁级 Wistar 大鼠,除空白对照组(正常组)外,其余大鼠均以甲基戊基亚硝胺 5 $mg \cdot kg^{-1}$ sc,每周 1 次,连续 18 周,确定造模成功后,除模型组大鼠外,余造模大鼠均以戊巴比妥钠麻醉,钴^{60}放射治疗机进行食管局部照射。末次照射 24 h 后,随机分为放疗组、地黄管食通高、中、低剂量组、六味地黄丸(阳性对照 4.5 $g \cdot kg^{-1}$)组,分别 ig,连续 35 d。应用 TUNEL 法检测对食管癌癌细胞凋亡的促进作用;免疫组化检测大鼠食管细胞中 c-myc,TERT 蛋白的表达。**结果**:①TUNEL 法检测各组均见有细胞凋亡,且药物治疗各组细胞凋亡指数明显增高,高剂量组细胞凋亡明显增多。②免疫组化结果显示 c-myc 蛋白在模型组、放疗组表达率及表达强度均明显增高,药物治疗组均有不同程度的降低,以高剂量组降低最明显($P<0.05$),高剂量组与放疗组比较有统计学意义($P<0.05$)。③与放疗组比较,各药物组 TERT 蛋白表达均呈递减趋势,高、中、低剂量组有统计学意义($P<0.01$,$P<0.05$)。**结论**:诱导细胞凋亡是地黄管食通颗粒在体内杀伤食管癌细胞的作用机制之一,而这一作用机制与抑制 c-myc,TERT 蛋白的表达相关;该药物还可有效改善食管癌化疗后副作用,并预防复发。

[关键词] 地黄管食通颗粒;食管癌;细胞凋亡;原癌基因;端粒酶逆转录酶
[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)18-0240-04

Effect of Dihuang Guanshitong Granules on c-myc, TERT Protein Expression in Esophageal Cancer Rat Model after Radiotherapy

*WANG Xiang-qi**, *ZHENG Yu-ling*, *WANG Jun-tao*, *HAN Qian-qian*
(*Henan University of Traditional Chinese Medicine*, *Zhengzhou* 450008, *Chian*)

[**Abstract**] **Objective**: To observe the effect of a combination of traditional Chinese herbs Dihuang Guanshitong Granules on the rat model of esophageal cancer after rradiotherapy for inducing apoptosis and the c-myc, TERT protein expression. **Method**: Wistar rats were randomly divided into 2 groups. They were treated with MANA 5 $mg \cdot kg^{-1}$ by subsutaneous injection except control group(the normal). After the model was successful, the model rats were treated with Intraperitoneal injection of sodium pentobarbital anesthesia and local esophageal radiation by cobalt^{60} except the model group rats. The rats were randomly divided into the radiotherapy group, the Dihuang Guanshitong high, middle, low dose(5, 10, 15 $g \cdot kg^{-1}$) groups, the Liuwei Dihuang Wan(4.5 $g \cdot kg^{-1}$) group after the last radiation. Then they were administered. TUNEL assay was used to examine the promotion on apoptosis of esophageal cancer cells. Immunohisto -chemistry (IHC) technique was used to measure the expression of c-myc and TERT protein in cells. **Result**: ① The esophageal cancer cells were apoptic according to the result of

[收稿日期] 2011-07-13
[基金项目] 国家中医药管理局科技公关项目(02-03JP25);河南省科学技术厅项目(9412011Y0762)
[通讯作者] * 王祥麒,副主任医师,医学博士,从事中医院治疗恶性肿瘤,Tel:13592667227,E-mail:wangxiangqi777@163.com

TUNEL assay in all the groups. The granules was more obvious and the high-dosage group was the most. ② Immunohistochemical results showed that c-myc protein expression in model group were increased than that in the radiation group. The drug therapy group were reduced by different degree and the high-dosage group were more obvious($P<0.05$). The comparison between the high-dosage groups and radiation therapy group was significant ($P<0.05$). ③TERT protein expression of each drug groups were tending to decrease compared with that in radiotherapy group. The high, middle, low dosage groups were significant($P<0.01$, $P<0.05$). **Conclusion**: Apoptosis is likely one of the mechanisms of Dihuang Guanshitong Granules to kill esophageal cancer cells. This is related with inhibiting c-myc, TERT protein expression. The granules can decrease side effects after chemotherapy and prevent of recurrence.

[**Key words**] Dihuang Guanshitong Granules; esophageal cancer; apoptosis; c-myc; TERT

我国是世界食管癌发病率和死亡率最高的国家,放射治疗是治疗食管癌的一种重要的方法,该方法对食管鳞状上皮细胞癌比较敏感 ,可以明显提高生存率,但放疗在杀伤癌细胞的同时,也损伤正常组织,降低机体免疫力,引起不良反应,且局部复发率高。中医药治疗食管癌放疗后易复发有潜在优势。地黄管食通能够明显地减轻患者的放疗反应而未发现任何毒副反应,改善生活质量、提高临床疗效[1-3];能调整患者紊乱的血清细胞因子及癌基因-抑癌基因表达失衡[4-13]。本研究进一步深入研究了其对放射治疗后食管癌模型大鼠原癌基因(c-myc)、端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)表达的影响。

1 材料

1.1 药物与试剂 地黄管食通颗粒(管食通):由熟地黄、山药、山茱萸、泽泻、牡丹皮、茯苓、山豆根、冬凌草等组成,10 g×10 袋/盒(每 1 g 相当于生药 2 g)。河南中医学院一附院制剂室提供。临床用量 30 $g\cdot d^{-1}$。实验时用 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)配成 1.5,1.0,0.5 $g\cdot mL^{-1}$。六味地黄丸(河南宛西制药股份有限公司,批号 20010691),临床用量 9 $g\cdot d^{-1}$。实验用 0.5% CMC-Na 配成 0.45 $g\cdot mL^{-1}$。甲基戊基亚硝胺(MANA),华西医科大学提供,实验时用玉米油配成 0.2% 甲基戊基亚硝胺溶液。TUNEL 凋亡试剂盒,华美生物工程公司。鼠抗人 c-myc,TERT 单克隆抗体,美国 Santa Cruz 公司。

1.2 动物 清洁级 Wistar 大鼠 130 只,雌雄各半,体重(120±10)g,6~8 周龄,由河南省动物实验中心提供,许可证号 SCXP(豫)2005-0001,动物质量合格证医动字第 0001615。

1.3 仪器 DT-30OA 型电子天平,上海医用激光仪器厂;双目光学显微镜,日本 Olympus;显微照相机,日本 Olympus 系列;透射电镜(CTEM)日立 H-7500,日本日立;钴^{60}照射治疗机,上海医疗设备厂。

2 方法

2.1 造模、分组与给药 除空白组大鼠外,余大鼠均 sc MANA 5 $mg\cdot kg^{-1}$,每周 1 次,连续 18 周。末次注射后,解剖模型组和空白组动物各 3 只,确认造模成功。除模型组大鼠外,余造模大鼠均以戊巴比妥钠 30 $mg\cdot kg^{-1}$ ip 麻醉,钴^{60}放射治疗机进行食管局部照射,2 Gy/d,连续 5 d。末次照射 24 h 后,分别给予相应受试药物。空白组:19 只,蒸馏水;模型组:19 只,蒸馏水;放疗组:18 只,蒸馏水;阳性药组:18 只,六味地黄丸混悬液 4.5 $g\cdot kg^{-1}$(相当于临床用量 30 倍);地黄管食道低剂量组:18 只,地黄管食通混悬液 5 $g\cdot kg^{-1}$(相当于临床用量的 10 倍);中剂量组:18 只,地黄管食通混悬液 10 $g\cdot kg^{-1}$;高剂量组:18 只,地黄管食通混悬液 15 $g\cdot kg^{-1}$。以上均 ig 给药,10 $mL\cdot kg^{-1}$,1 次/d,连续 35 d。

2.2 取材 停药时,各组大鼠存活数:空白组 19 只,模型组 16 只,放疗组 16 只,对照组 17 只,管食通低、中、高剂量组均 18 只。停药次日称体重,目内眦采血液,脱颈椎处死取瘤,每组随机取 10 只,24 h 内常规石蜡包埋、切片。剩余食管癌组织液氮保存备用。

2.3 指标检测

2.3.1 原位末端标记法(TUNEL)检测食管癌细胞凋亡 ①石蜡切片 4 μm 厚,常规脱蜡、脱水、PBS 洗涤。②20 $\mu g\cdot mL^{-1}$ 蛋白酶室温消化 15 min,冲洗 4 次。冰浴下配制 TDT 反应液(TDT 与缓冲液之比为 1:2),37 ℃温箱预温终止液。③H_2O_2 阻断 5 min,PBS 洗涤 2 次。④加入 1×平衡缓冲液 75 μL,室温

缓冲 20 min。⑤加 TDT 反应液 9~10 μL/cm²(阴性对照不加),加盖塑料盖片,37 ℃湿盒内反应 2 h。⑥移去塑料盖片,滴加终止液,摇动 15 s,室温静置 10 min,PBS 洗涤 3 次。⑦滴加地高辛-过氧化物酶交联物 2 滴,37 ℃湿盒内孵育 30 min。⑧PBS 洗涤 4 次。⑨加入 75 μL 过氧化物酶底物,室温静置 5 min。蒸馏水冲洗 3 次。⑩苏木精复染、脱水、透明、封片。阳性细胞判断:在光镜下观察到凋亡细胞核呈棕褐色着染,核染色质分布不均,染色深浅大小不一,核周有空晕。每张切片观察 5 个视野,每个视野计数 100 个细胞核,计数细胞凋亡百分率为凋亡指数(apoptotic index,AI)。

2.3.2 免疫组化法(SABC 法)检测 c-myc,TERT 蛋白表达 操作严格按说明书进行。①石蜡切片脱蜡和水化,PBS 冲洗 3 次;②加 H_2O_2 阻断 10 min;③加试剂 A 室温孵育 10 min,倾去,不洗。滴加一抗,37 ℃孵育 3 h;④PBS 漂洗 10 min;⑤滴加试剂 B,37 ℃孵育 15 min;⑥PBS 漂洗 10 min。⑦滴加试剂 C 37 ℃孵育 15 min;⑧PBS 漂洗 10 min;⑨显色剂显色(DAB),显微镜下观察;⑩蒸馏水漂洗,苏木素复染,中性树胶封片,以 PBS 置换一抗作空白对照,用已知阳性切片作阳性对照。

判定标准:c-myc,TERT 蛋白阳性反应位于细胞核内,呈棕黄色颗粒,按显色有无及阳性细胞多少分为 4 个等级。-:整个切片未见阳性染色;+:阳性细胞数 <25%;++ 阳性细胞数 25% ~50%;+++ 阳性细胞数 >50%。

2.4 统计学处理 应用 SPSS 15.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 t 检验,计数资料采用秩和检验,方差不齐时进行变量转换。以 $P<0.05$ 有显著性差异。

3 结果

3.1 对细胞凋亡的影响 TUNEL 法检测各组均见有细胞凋亡,与模型组比较药物治疗各组细胞凋亡指数明显增高($P<0.05$),以管食通高剂量组最高。反映了地黄管食通颗粒诱导细胞凋亡的浓度依赖性。六味地黄组与放疗组无统计学差异。管食通中、高剂量组与模型组、放疗组、六味地黄组、管食通低剂量组比较均有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

3.2 对 c-myc 蛋白表达的影响 与空白组比较 c-myc蛋白在模型组、放疗组表达率及表达强度上均明显增高,与模型组比较,药物治疗组均有不同程度的降低,其表达强度有所下降,以管食通高剂量组降低最为明显($P<0.01$),管食通高剂量组与放疗组比较有统计学意义($P<0.05$),管食通中、高剂量组与空白组比较无统计学意义。提示管食通对食管癌放疗后大鼠 c-myc 蛋白表达有抑制效果。见表 2。

表 1 地黄管食通颗粒对细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/g·kg⁻¹	AI/%
空白	-	6.06 ± 0.66
模型	-	7.44 ± 0.41
放疗	-	10.94 ± 0.47[1,2)]
地黄管食通	5	13.12 ± 0.38[1,2,3,4)]
	10	13.12 ± 0.38[1,2,3,4)]
	15	17.20 ± 0.59[1,2,3,4,5)]
六味地黄	4.5	11.10 ± 0.41[1,2)]

注:与空白组比较[1)] $P<0.05$;与模型组比较[2)] $P<0.05$;与放疗组比较[3)] $P<0.05$;与六味地黄组比较[4)] $P<0.05$;与管食通低剂量组比较[5)] $P<0.05$(表 2 同)。

表 2 地黄管食通颗粒对 c-myc 蛋白表达的影响($n=10$)

组别	剂量/g·kg⁻¹	-	+	++	+++	阳性率/%
空白	-	9	1	0	0	10
模型	-	2	2	3	3	80[1)]
放疗	-	3	2	3	2	70[1)]
地黄管食通	5	6	1	2	2	40
	10	7	1	2	1	30[2)]
	15	8	1	1	1	20[2,3]
六味地黄	4.5	5	1	1	0	50

3.3 对 TERT 蛋白表达的影响 与空白组比较,管食通高剂量组 TERT 蛋白表达有显著性($P<0.05$),其余组均有极显著性($P<0.01$);各药物治疗组与模型组比均有显著性降低($P<0.01$);与放疗组比较,地黄管食通各组呈递减趋势,管食通低、中剂量组 $P<0.05$,管食通高剂量组 $P<0.01$;各剂量组间相比无统计学意义。见表 3。

表 3 地黄管食通颗粒对 TERT 蛋白表达的影响

组别	n	剂量/g·kg⁻¹	-	+	++	+++	阳性率/%
空白	18	-	17	1	0	0	5
模型	16	-	1	3	4	8	94[2)]
放疗	16	-	5	3	4	4	69[2)]
地黄管食通	18	5	9	5	3	1	44[2,3,4)]
	18	10	10	5	3	0	44[2,3,4)]
	18	15	12	5	1	0	33[1,3,5)]
六味地黄	17	4.5	9	3	4	1	47[2,3)]

注:与空白组比较[1)] $P<0.05$,[2)] $P<0.01$;与模型组比较[3)] $P<0.01$;与放疗组比较[4)] $P<0.05$,[5)] $P<0.01$。

4 讨论

研究食管癌的关键在于建立合理的动物模型,

在理论上应建立与人类食管癌发生机制相似、易于指标检测和观察的动物模型。我们在对现有食管癌动物造模方法对比研究的基础上，采用模拟人类的饮食结构——高亚硝酸盐饮食成功地诱发了大鼠食管癌。经病理证实，病变形成过程与人类相似，该实验模型能较好地反映人类食管癌的发生机制，被认为是较为理想的研究食管癌的动物模型。

TUNEL 法检测表明，随着地黄管食通颗粒剂量的增加，食管癌组织细胞凋亡指数亦增加。进一步证实诱导细胞凋亡是地黄管食通颗粒在体内杀伤食管癌细胞的作用机制之一。c-myc 是原癌基因，属于"不死性"或"永生性"癌基因，其过度表达可改变细胞内的基因调控，使细胞易于转化为恶性表型，当与其他癌基因的活化或抑癌基因的失活协同作用时可加速或启动肿瘤发生。端粒位于染色体末端，丢失到一定程度可导致细胞凋亡。端粒酶是一种自带模板的逆转录酶，可通过维持端粒的长度不变使细胞获得永生化或癌变。端粒酶的基因调控研究表明，对 hTERT 转录水平的调控，可能是端粒酶基因调控的主要途径，TERT 与细胞端粒酶的活性密切相关[14-15]，而 c-myc 则是调节 ETRT 转录的重要转录因子[16]。免疫组化结果显示，经地黄管食通颗粒治疗后，食管癌组织 c-myc，TERT 蛋白的表达减弱，提示该药物可抑制 c-myc，TERT 蛋白的表达，进而诱导细胞凋亡。

从中医观点看，电离辐射（放射治疗）是一种热性杀伤物质，此热可化火灼津而造成阴虚证候；电离辐射之"火"与癌毒相搏，伤败之物与热互结，瘀积成毒。"阴虚"与"热毒"是放射治疗最常见的副反应。临床常见：鼻干咽干，口干舌燥，腰膝酸软，耳鸣耳聋，小便黄少，大便秘结，舌红少津，苔薄黄，脉细数等阴虚内热症状。故养阴清热法既能扶正抗癌与放疗起协同作用，又能保护正常组织预防放疗的副作用，起到增效减毒作用，预防放疗后复发和转移。

综上，地黄管食通颗粒具有滋养阴液、清热散结、扶正祛邪、诱导食管癌细胞凋亡、预防和治疗食管癌放疗后复发和转移的作用。

[参考文献]

[1] 杨旭初，郑玉玲，王鑫．地黄管食通联合 PD 方案治疗中晚期食管癌患者的疗效观察[J]．辽宁中医杂志，2010，37(6)：1061.

[2] 刘怀民．地黄管食通口服液治疗放射性食管炎 80 例[J]．河南中医，2007，27(2)：43.

[3] 郑玉玲，王新杰．放疗联合地黄管食通口服液治疗食管癌的临床观察[J]．中国中医药信息杂志，2003，10(8)：47.

[4] 王祥麒，郑玉玲．地黄管食通口服液对食管癌造模大鼠放疗后细胞因子 IFN-γ，TNF-α 影响的观察[J]．中医学报，2010，25(4)：616.

[5] 窦晶晶，杜萍，郑玉玲．地黄管食通口服液对食管癌大鼠放疗后血清 TGF-β_1 水平的影响[J]．江苏中医药，2009，41(2)：69.

[6] 窦晶晶，杜萍，郑玉玲．地黄管食通口服液对食管癌大鼠放疗后血清中 TGF-α 水平影响的实验研究[J]．中华中医药学刊，2009，27(7)：1376.

[7] 黄涛，郑玉玲，徐海瑛，等．地黄管食通口服液对食管癌大鼠上皮型钙黏蛋白表达的影响[J]．上海中医药杂志，2009，43(10)：72.

[8] 郑玉玲，孙太振．地黄管食通口服液对放射治疗食管癌细胞凋亡及相关调控基因蛋白的影响[J]．中国临床康复，2006，10(19)：111.

[9] 黄涛，郑玉玲．地黄管食通口服液对食管癌大鼠放疗后 β-catenin 表达的影响[J]．中医研究，2006，19(8)：16.

[10] 孙太振，郑玉玲．地黄管食通口服液诱导 Eca109 细胞凋亡的实验研究[J]．中医药学刊，2006，24(10)：1830.

[11] 孙太振，叶枫，郑玉玲．地黄管食通口服液对放射治疗后食管癌大鼠 β-catenin 蛋白及 c-myc mRNA 的影响[J]．中医药学报，2006，34(5)：34.

[12] 孙太振，郑玉玲，叶枫．地黄管食通口服液诱导放疗后大鼠食管癌组织细胞凋亡及对 β-catenin 和 c-myc 表达的影响[J]．中医药信息，2006，23(6)：41.

[13] 孙太振，叶枫，郑玉玲．地黄管食通口服液对放疗后食管癌大鼠细胞凋亡与相关调控基因的研究[J]．中医药学报，2007，35(3)：7.

[14] Nakamura T M，Linger J，Cech C，et al. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human [J]. Science，1997，277(5328)：955.

[15] 应建明，金燕燕，王衡，等．hTRT 催化功能区基因克隆及其在肿瘤中的表达[J]．中华病理学杂志，1999，28(2)：85.

[16] Wu K J，Grandori C，Amacker M，et al. Directactvation of TERT transcription by c-MYC[J]. Nat Genet，1999，21(2)：220.

[责任编辑　何伟]