

精元康胶囊对骨髓抑制小鼠骨髓细胞凋亡 相关基因表达水平的影响

蒋立峰¹, 桑锋¹, 蒋士卿², 刘延庆^{3*}

(1. 南京中医药大学, 南京 210046; 2. 河南中医学院, 郑州 450008;
3. 扬州大学, 江苏 扬州 225009)

[摘要] 目的: 通过观察精元康胶囊对骨髓细胞凋亡相关基因 Caspase-3, Fas, FasL 等 mRNA 表达水平的影响, 以深入研究、探讨该药的作用机制。方法: 60 只小鼠分为空白组、模型组、阳性对照利可君 32 mg·kg⁻¹ 组和贞芪扶正 3 g·kg⁻¹ 组、精元康 4 g·kg⁻¹ 组, 以环磷酰胺 100 mg·kg⁻¹, ip 连续 3 d 造模, 同时各组开始 ig 连续 7 d, 实时荧光定量 PCR 检测骨髓抑制模型小鼠骨髓细胞表达 Caspase-3, Fas, FasL mRNA 的情况。结果: Caspase-3, Fas, FasL mRNA 的表达水平精元康胶囊组最低, 模型组表达的 $\frac{1}{2}$ 与模型组比较有显著差异, 与空白组比较无明显差异。结论: 精元康胶囊降低促凋亡基因 Caspase-3, Fas, FasL 的表达, 对骨髓细胞凋亡相关通路产生影响, 可能是精元康胶囊对化疗致骨髓抑制影响的重要机制。

[关键词] 精元康胶囊; 骨髓抑制; 细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)12-0119-04

Effect of Jingyuankang Capsule on Expression of Apoptosis-related Genes in Bone Marrow Cells of Model Mice of Chemotherapy-induced Myelosuppression

JIANG Li-feng¹, SANG Feng¹, JIANG Shi-qing², LIU Yan-qing^{3*}

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046 China; 2. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China; 3. Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Jingyuankang capsule on the expression of apoptosis-related genes Caspase-3, Fas and FasL mRNA in bone marrow cells and make a study of the mechanism of the medicine. **Method:** Sixty mice were randomized into 5 groups: control group, model group, positive control group (Leucogen, 32 mg·kg⁻¹), Zhenqi Fuzheng group (3 g·kg⁻¹), Jingyuankang group (4 g·kg⁻¹). The model was induced by ip cyclophosphamide (100 mg·kg⁻¹) for 3 days. Mean while the above treatments were given for 7 days. The expression of Caspase-3, Fas and FasL mRNA in bone marrow cells of model mice with myelosuppression was measured by real-time fluorescence quantitative PCR. **Result:** The Jingyuankang group had the lowest expression of Caspase-3, Fas and FasL mRNA, compared with that of the model group, the difference was significant; while compared with the control group, there was no significant differences. **Conclusion:** These results confirmed preliminarily that Jingyuankang capsule could decrease the expression of apoptosis-related genes Caspase-3, Fas and FasL, through affecting the apoptosis-related pathway to prevent the blood cells from apoptosis caused by chemotherapy. This might be an important mechanism of Jingyuankang capsule treating the chemotherapy-induced myelosuppression.

[Key words] Jingyuankang capsule; myelosuppression; cell apoptosis

[收稿日期] 2011-03-04

[基金项目] 国家“十五”科技攻关计划项目(2004BA719A09-0203); 河南省自然科学基金研究项目(2010A360007)

[第一作者] 蒋立峰, 医学硕士, 中医师, 在读博士研究生, 从事恶性肿瘤的临床及研究, Tel: 13951720716, E-mail: Jlf_@126.com

[通讯作者] * 刘延庆, 教授, 主任医师, 博士生导师, 从事中西医结合肿瘤学以及镇痛中药的基础与临床研究, Tel: 13905278844, E-mail: Liuyq@yza.edu.cn

近年来对各种肿瘤治疗采用联合用药方式治疗 (combined modality therapy, CMT) 的趋势越来越明显。CMT 计划可增强肿瘤局部控制率,但较单一治疗措施发生骨髓抑制危险性更大。现在 CMT 计划在多种肿瘤的治疗中已广泛使用,而结果是骨髓抑制越来越常见。中医药在化疗致骨髓的抑制治疗方面具有较好的疗效,这源于中医独特的理论体系和辨证思维方式。根据中医“肾主骨,生髓”,脾为后天之本,气血生化之源的理论,精元康胶囊由人参、黄芪、女贞子、怀山药、熟地黄、砂仁、淫羊藿、当归等中药组成,具有益气养阴、健脾补肾等功能,用于治疗化疗致骨髓抑制的效果良好。本研究选取该药对骨髓细胞凋亡相关基因 Caspase-3, Fas, FasL 等 mRNA 表达水平的影响,以深入研究、探讨该药的作用机制。

1 材料

1.1 动物 6 周龄雄性 C57 小鼠 60 只,体重 18 ~ 22 g,由扬州大学比较医学中心提供,许可证号 SCXK(苏)2007-0001。

1.2 药物 精元康胶囊,河南省中医药研究院制剂室提供,批号 20100422;利可君片,江苏吉贝尔药业有限公司,批号 090702;注射用环磷酰胺 (CTX),江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 10042321;贞芪扶正胶囊,甘肃新兰药药业有限公司,批号 100327。

1.3 试剂和仪器 Trizol、逆转录试剂盒和实时荧

光定量 PCR 试剂盒购于大连宝生物工程有限公司;PCR 枪头和离心管均为一次性无 RNA 酶产品;其他试剂均为分析纯,购自南京化学试剂公司;高速冷冻离心机 (5810R Eppendorf);DNA 荧光定量分析仪 (LightCycle Roche 公司)。

2 方法

2.1 分组与给药 将 60 只 C57 小鼠随机均分为 5 组:空白组,模型组,西药对照组,中药对照组,精元康胶囊组,每组 12 只。前 3 d 每日上午注射环磷酰胺 100 mg·kg⁻¹ (空白组注射等量生理盐水),下午空白组、模型组 ig 0.5% CMC-Na 20 mL·kg⁻¹,西药对照组 ig 利可君 32 mg·kg⁻¹,中药对照组 ig 贞芪扶正胶囊 3 g·kg⁻¹,精元康胶囊组 ig 精元康胶囊混悬液 4 g·kg⁻¹。3 d 后,下午 ig 不同药物,再连续 4 d。

2.2 标本制备 全部小鼠末次给药后 24 h 后处死,取出股骨,常规制作骨髓单细胞悬液,离心去上清,放入 -80 °C 冰箱保存备检。

2.3 总 RNA 提取 参照试剂说明,每组样本细胞加入 Trizol 经氯仿、异丙醇提取总 RNA。Eppendorf 蛋白核酸测定仪及电泳分析 RNA 的量和纯度。所用 RNA 的 A_{260/280} 在 1.8 ~ 2.0,电泳均可见 18S 和 28S 条带。

2.4 引物设计、合成 根据 GenBank 发布序列进行引物设计,由上海生工生物工程有限公司合成。引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

引物名称	Sense primer	Antisense primer
Fas	5'-ACCAATGAATGCCTCAAATCTT-3'	5'-TCTTGCCCTCCTTGATGTTATT-3'
FasL	5'-GAAACTGGGTTGTACTIONCTGTT-3'	5'-AATGTCAGCATGTTAAGATT-3'
Caspase-3	5'-CAAAGAAACAGATCCCGTGTAT-3'	5'-AGTGTTAGCGTACAAAGACCAG-3'
β-actin	5'-GAGAAGATTGGCACCCACAC-3'	5'-GAGGCATACAGGGACAACAC-3'

2.5 逆转录 参照逆转录试剂盒操作说明进行 RNA 的逆转录反应。见表 2。

表 2 逆转录反应体系

试剂	使用量 /μL	终浓度 /pmol·L ⁻¹
5 × PrimeScript [®] Buffer (for Real Time)	2	1 ×
PrimeScript [®] RT Enzyme Mix I	0.5	
Oligo dT Primer (50 μmol·L ⁻¹) 1	0.5	25
Random 6 mers (100 μmol·L ⁻¹) 1	0.5	50
Total RNA	2.0	
RNase Free dH ₂ O	up to 10	

上述 RT 反应液配好后,在 Eppendorf PCR 仪上进行逆转录反应,条件为:37 °C 15 min (逆转录反应)、85 °C 5 s (逆转录酶的失活反应)。

2.6 实时荧光定量 PCR 检测 参照 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Perfect Real Time) 说明书进行实时 PCR 反应。

上述 PCR 反应液配好后,放入 LightCycle 实时荧光定量分析仪中,进行三步法 PCR 扩增反应:95 °C 5 s 变性、55 ~ 60 °C 10 s 退火、72 °C 15 s 延伸,45 个循环。

表3 荧光定量PCR反应体系

试剂	使用量	终浓度
	/μL	/μmol·L ⁻¹
SYBR® Premix Ex Taq™ II(2×)	10.0	1×
PCR Forward Primer(10 μmol·L ⁻¹)	0.8	0.4
PCR Reverse Primer(10 μmol·L ⁻¹)	0.8	0.4
DNA 模板	2.0	
dH ₂ O(灭菌蒸馏水)	6.4	
Total	20.0	

2.7 统计学处理 采用比较 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析骨髓细胞表达 Caspase-3, Fas, FasL mRNA 的含量:即以管家基因 β -actin 作为内参基因相对定量,以空白组小鼠作为对照组,计算各组小鼠 Caspase-3, Fas, FasL 的 $\Delta\Delta Ct$ 值。 $\Delta\Delta Ct = \text{实验组}(Ct \text{ 目的基因} - Ct \text{ 管家基因}) - \text{对照组}(Ct \text{ 目的基因} - Ct \text{ 管家基因})$,以 $\Delta\Delta Ct$ 值为定量结果进行统计分析,则目的基因的量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。参照基因表达谱芯片分析,当目的基

表4 小鼠骨髓细胞凋亡相关基因 Fas, FasL, Caspase-3 mRNA 的表达($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	$2^{-\Delta\Delta Ct}$		
		Fas	FasL	Caspase-3
空白	-	1	1	1
模型	-	6.54 ± 1.75	9.02 ± 2.44	5.37 ± 1.95
利可君	3.2 × 10 ⁻²	3.11 ± 0.84 ¹⁾	3.10 ± 0.89 ¹⁾	2.02 ± 0.42 ¹⁾
贞芪扶正	3	2.19 ± 0.39 ¹⁾	2.60 ± 1.05 ¹⁾	2.34 ± 0.53 ¹⁾
精元康	4	1.51 ± 0.92 ^{1,2)}	1.50 ± 0.36 ^{1,2)}	1.60 ± 0.68 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$;与利可君组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

精元康胶囊由人参、黄芪、女贞子、怀山药、熟地黄、砂仁、淫羊藿、当归等中药组成,方中人参、黄芪大补元气,女贞子滋阴生精,补肾养肝,怀山药、熟地黄健脾补肾,砂仁理气化痰,淫羊藿温阳滋肾以固本,当归补血活血。诸药合用,共奏益气养阴、健脾补肾、理气化痰、活血通络之功。实验研究和临床观察表明:精元康胶囊具有抗骨髓细胞凋亡作用,能有效改善化疗致骨髓抑制的临床症状。精元康胶囊配合化疗临床治疗 32 例非小细胞肺癌患者,且与 32 例单纯化疗病人对照观察疗效发现:较之单纯化疗,精元康胶囊能明显改善化疗患者临床症状、提高患者生活质量,尤其在减轻化疗后骨髓抑制方面疗效显著^[1-2]。化疗药物容易引发骨髓造血细胞凋亡,进而影响造血细胞的正常发育成熟和造血系统的稳定。对骨髓细胞凋亡相关基因变化的观察是研究细胞凋亡的重要指标。细胞凋亡是由基因控制的细胞

因表达 ≥ 2 倍,认为该基因表达增高,若 ≤ 0.5 倍认为基因表达降低。

3 结果

比较各组 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值显示:骨髓细胞凋亡相关基因 Caspase-3, Fas, FasL mRNA 表达水平,组间存在差异。模型组与空白组比较, Caspase-3, Fas, FasL mRNA 的表达 ≥ 2 倍,基因表达增高,有显著性差异;与模型组比较,利可君组,贞芪扶正组,精元康组 Caspase-3, Fas, FasL mRNA 的表达 $\leq 1/2$ 倍,基因表达降低,有显著性差异。3组之间比较, Caspase-3 mRNA 的表达水平精元康组 $<$ 利可君组 $<$ 贞芪扶正组,但无显著性差异; Fas, FasL mRNA 的表达水平精元康组 $<$ 贞芪扶正组 $<$ 利可君组,精元康组与利可君组比较, Fas, FasL mRNA 表达 $\leq 1/2$ 倍,基因表达降低,有显著性差异。见表4。

自主有序的死亡,它涉及一系列基因的激活、表达以及调控等作用。研究凋亡可能的通路、调控及相互关系,对进一步认识和治疗凋亡相关疾病有重要意义。细胞凋亡存在三条通路:死亡受体通路、线粒体通路和内质网通路,三条通路间相互密切相关,它们构成一个复杂的网络对凋亡进行精细的调控。三条凋亡通路最后都有 Caspase 的激活,这说明 Caspase 是诸多调控通路的关键。细胞凋亡的死亡受体通路是一条主要的细胞凋亡调控通路。Fas/FasL 是死亡受体通路中最受关注的相关受体和配体,他们结合后使受体胞质区的“死亡区域”相互聚集,在接头蛋白 FADD 的作用下 Caspase-8 (和 Caspase-10) 聚集,形成大分子复合物-凋亡酶体,凋亡酶体产生的 Caspase-酶切割 Caspase-3 酶原产生 Caspase-3,引起凋亡^[3]。凋亡信号传导途径及其下游效应分子 Caspase-3 是活化诱导细胞死亡的核心。Caspase-3 是 Fas/FasL 介导的凋亡信号途径下游的关键性效

应蛋白,细胞是否发生凋亡关键在于细胞质中活化的 Caspase-3 表达量^[4]。

研究发现,当归可降低骨髓抑制小鼠骨髓细胞 Fas 抗原的表达,减少细胞凋亡,间接促进造血^[5];进一步研究发现当归多糖可抵抗无血清培养诱导巨核细胞株 M-07e 细胞凋亡作用,其机制可能与减少 Caspase-3 的活化和稳定线粒体膜相关^[6]。还有研究表明:由黄芪、党参、熟地黄、女贞子等组成健脾补肾活血方通过降低 Caspase-3 酶活性,抑制细胞凋亡的信号传导进而减少骨髓细胞的凋亡^[7]。李静^[8]等研究发现:红景天多糖通过影响骨髓抑制小鼠骨髓细胞死亡受体 Fas 介导的 Fas/FasL-Caspase-3 凋亡信号通路,减少骨髓细胞凋亡,促使骨髓造血功能的恢复。

本实验通过实时荧光定量 PCR 检测了骨髓抑制模型小鼠骨髓细胞表达 Caspase-3, Fas, FasL mRNA 的情况。实验证实,精元康胶囊可明显降低促凋亡相关基因 Caspase-3, Fas, FasL 的表达,对骨髓细胞凋亡相关死亡受体通路产生影响,从而防止造血细胞因化疗药物引起的细胞凋亡。以上作用可能是精元康胶囊对化疗致骨髓抑制影响的重要机制。本研究属于初步从细胞凋亡通路方面探讨骨髓细胞凋亡的相关机制,细胞凋亡发生的具体过程非常复杂,除了以上这些基因蛋白在细胞凋亡过程中起到非常重要的作用外,还有许多基因蛋白在凋亡中也起着很重要的作用。因此,许多问题的阐明还

有待于今后的进一步研究。

[参考文献]

- [1] 蒋士卿,王红玲.精元康胶囊对骨髓抑制小鼠骨髓有核细胞表达抗凋亡蛋白的影响[J].中医学报,2009,24(6):8.
- [2] 蒋士卿,王红玲.精元康胶囊联合化疗治疗晚期非小细胞肺癌临床研究[J].中医学报,2010,25(3):385.
- [3] Stewart J H, Nguyen D, Chen G A, et al. Induction of apoptosis in malignant pleural mesothelioma cells by activation of the Fas (Apo-1/CD95) death signal pathway [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2002, 123 (2):295.
- [4] 陈月桥,王丽,武建华.细胞凋亡信号传导途径研究进展[J].中国实用医药,2007,33(2):186.
- [5] 李爱民,吴晓珊,尹忠钦.当归注射液对免疫诱导再生障碍性贫血小鼠骨髓细胞 CD34⁺ 及 Fas 抗原表达的影响[J].中国小儿血液与肿瘤杂志,2008,13(6):268.
- [6] 莫姝,于洁,杨默,等.当归多糖与血小板源性生长因子、血小板生成素对巨核细胞造血影响的比较研究[J].中华儿科杂志,2008,46(1):45.
- [7] 胡明辉,朱文伟,陆嘉惠.健脾补肾活血方对再生障碍性贫血患者骨髓造血细胞凋亡及 Caspase-3 酶活性的影响[J].山东中医杂志,2007,26(8):517.
- [8] 李静,祝彼得,黄安培.红景天多糖对骨髓抑制小鼠表达凋亡相关蛋白的影响[J].陕西中医学院学报,2008,31(3):52.

[责任编辑 何伟]

简 讯

据中国高等学校自然科学学报研究会、中国科学技术期刊编辑学会 2009 年统计结果报道,2008 年《中国实验方剂学杂志》登载的学术论文中,有 224 篇被美国化学文摘(CA)收录,标志着《中国实验方剂学杂志》已成为 CA 在国内的主要统计源期刊之一,也标志着该杂志的学术水平又迈上了一个新台阶。

在此,谨向热心于《中国实验方剂学杂志》审稿、组稿工作的人员表示衷心感谢,向各学术论文作者对《中国实验方剂学杂志》工作支持表示诚挚谢意!