

DOI:CNKI:11-3495/R. 20110420. 0932. 011

· 药理 ·

基因治疗联合六味地黄丸对肝癌荷瘤小鼠 缝隙连接蛋白表达的影响

易华¹, 杜标炎^{1*}, 谭宇蕙¹, 刘爱军¹, 罗惠¹, 骆欢欢², 苏俊芳¹, 王慧峰¹

(1. 广州中医药大学基础医学院, 广州 510006; 2. 广州中医药大学《新中医》编辑部, 广州 510405)

[摘要] 目的:探讨六味地黄丸联合基因治疗对小鼠移植性肝癌缝隙连接蛋白(connexin, Cx)表达的影响,初步阐明六味地黄丸对肝癌 HSV-tk/GCV 自杀基因治疗的增效作用机制是否与缝隙连接相关。方法:昆明种小鼠 90 只,随机分为模型对照组、六味地黄丸治疗组(ig 六味地黄丸 10 g·kg⁻¹·d⁻¹)、自杀基因治疗组(ip 丙氧鸟苷 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、联合治疗组(ig 六味地黄丸 10 g·kg⁻¹·d⁻¹ + ip 丙氧鸟苷 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹);选用 H22 与 H22/tk 细胞株皮下接种建立小鼠肝癌模型,取荷瘤小鼠肿瘤组织进行常规病理制片,采用 SABC 免疫组化法检测各组肿瘤组织 Cx26, Cx32, Cx43 蛋白表达。结果:阳性表达定位于细胞浆和细胞膜, Cx43 在癌旁组织,特别是有纤维组织浸润部位表达呈强阳性,而在癌结节中肿瘤细胞表达相对较弱; Cx26, Cx32 在肿瘤细胞特别是脂肪组织浸润附近的癌组织中呈现强阳性表达。与肿瘤模型组相比,联合治疗组则能增强 Cx26, Cx43, Cx32 蛋白表达,差异有统计学意义(P<0.05);与单独六味地黄丸和自杀基因治疗组相比,联合治疗组能明显提高 Cx32 蛋白表达,差异有统计学意义(P<0.05, P<0.01)。结论:六味地黄丸联合自杀基因治疗能增强 Cx26, Cx43, Cx32 蛋白表达,尤其是促进 Cx32 的表达,提示六味地黄丸增强自杀基因旁观者效应的机制与缝隙连接相关。

[关键词] 六味地黄丸; 肝癌; 基因治疗; 缝隙连接

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)12-0114-05

Joint Therapeutic Effect of Hepatocarcinoma Suicide Gene Therapy Combined with Liuwei Dihuangwan on Expression of Connexin *in vitro*

YI Hua¹, DU Biao-yan^{1*}, TAN Yu-hui¹, LIU Ai-jun¹, LUO Hui¹,
LUO Huan-huan², SU Jun-fang¹, WANG Hui-feng¹

(1. College of Basic Medicine, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;
2. Editorial Board, Journal of New Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the joint therapeutic effect of Liuwei Dihuangwan (LD) combined with hepatocarcinoma HSV-tk/GCV suicide gene on the expression of connexin (Cx), clarity the therapeutic mechanism of LD. **Method:** Ninety Kunming mice were randomized into 4 groups: model group, LD group (10 g·kg⁻¹·d⁻¹), suicide gene therapy group (intraperitoneal injection of guanosine ganciclovior) and the combined group. The transplanted tumor mice model of H22 hepatocarcinoma was established by subcutaneous inoculation of H22 and H22/tk cells.

[收稿日期] 20100604(013)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30572433)

[第一作者] 易华, 博士, 讲师, 中西医结合防治肿瘤, E-mail: yihuayi-027@163.com

[通讯作者] * 杜标炎, 博士, 教授, 中西医结合防治肿瘤, E-mail: dubybill@sohu.com.

[网络出版时间] 2011-04-20 09:32

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110420.0932.011.html>

We selected the tumor tissue of hepatocarcinoma tumor-bearing mice for conventional preparation, carried out biopsy of DAB immunohistochemical staining, and used the SABC immunohistochemical assay to detect the expression of Cx26, Cx43, Cx32. **Result:** The positive expression was found in cytoplasm and cell membrane under the microscope. Cx43 expression appeared in tumor adjacent tissues, especially where infiltrated by fibrous tissue had strongly positive expression, but cancer cells in the tumor nodules had relatively weak expression. We found the expression of Cx26 and Cx32 were in tumor cell, especially near the tumor tissues where infiltrated by adipose tissue showed strong positive expression. The expression of connexin in LDB treatment group and suicide gene therapy combined with LD treatment group was obviously stronger than that in tumor model group. The differences of expression of Cx between suicide gene therapy combined with LDB treatment group and showed statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion:** Suicide gene therapy combined with LD in treatment group can significantly improve the expression of Cx26, Cx43, Cx32, especially Cx32. It indicates that the enhancing effect of LD on suicide gene bystander is related to gap junction.

[**Key words**] Liuwei Dihuangwan; hepatocarcinoma; gene therapy; gap junction

细胞缝隙连接通讯 (gap junction intercellular communication, GJIC) 介导的缝隙连接机制被认为是自杀基因旁观者效应的主要机制之一。缝隙连接蛋白 (connexin, Cx) 为 GJIC 的结构基础, 其表达可因组织来源及细胞种类不同有所差异, 在正常肝组织中主要存在 Cx26, Cx32, Cx43 的表达^[1], 它们维持着正常肝细胞间的 GJIC。

课题组前期研究以小鼠移植性肝癌为治疗对象, 探讨了自杀基因联合六味地黄丸 (Liuwei Dihuangwan, LD) 治疗方案的抗肿瘤效应, 结果表明联合治疗组能显著抑制肿瘤的生长, 其增效作用与六味地黄丸改善肿瘤局部免疫微环境有关^[2-3]。鉴于中药复方多靶点的特点, 推测其增效机制还可能与增强细胞缝隙连接通讯有关。本实验以 Cx26, Cx43, Cx32 蛋白为检测指标, 初步探究六味地黄丸对自杀基因治疗的增效作用与缝隙连接的关系。

1 材料

1.1 试剂 细胞培养瓶、培养板、滤膜、冻存管 (美国 Coming 公司和丹麦 Nunc 公司), Polybrene, G418 (Sigma 公司); DMEM, RPMI-1640, 胎牛血清 (Gibco 公司), 新生牛血清 (杭州四季青公司), 兔抗大鼠 Cx26 多克隆抗体 (批号 BA1591)、兔抗大鼠 Cx43 多克隆抗体 (批号 BA1591)、抗体稀释液及 SABC 试剂盒、DAB 染色试剂 (武汉博士德生物工程有限公司), 小鼠抗大鼠 Cx32 单克隆抗体 (批号 60907210R, Invitrogen 公司)。

1.2 仪器 BNA-3210 型 CO₂ 培养箱 (日本 ESEC); 亿鸣 200 病理图像分析系统 (中国亿鸣); 烤

片机 (CS-IV 型, 孝感市电子仪器厂); 恒温水浴箱 (北京长源实验设备厂); 微波炉 (日本 National); 纯水器 (韩国 Human Corp); 荧光倒置显微镜 (Olympus, IX71-F22FL/PH 型) 及图像采集系统 (Image Pro Plus 5.01)。

1.3 动物 昆明种小鼠, 18 ~ 22 g, 雄性占 2/3, 雌性占 1/3, 健康, 清洁级, 由广州中医药大学实验动物中心提供 (合格证号 2003A008)。

1.4 细胞株 病毒包装细胞 P T 6 7 购自美国 Clontech 公司, 已于前期将重组 pLXSN-*tk* 质粒转入 PT67 细胞内记为 PT67/*tk*^[4]; 小鼠肝细胞癌细胞株 H22 购自中山大学实验动物中心细胞库。

1.5 药物及配制 六味地黄丸 (北京同仁堂, 批号 4030098), 于无菌室内用消毒研钵加少许消毒蒸馏水研磨后, 配成质量浓度为 500 g·L⁻¹ 的药液, 小鼠给药剂量为生药 10 g·kg⁻¹; 丙氧鸟苷 (GCV) (丽珠集团湖北科益药业有限公司, 批号 040701), 于无菌室以注射用生理盐水 25 mL 溶解, 质量浓度为 10 g·L⁻¹, 小鼠给药剂量为 100 mg·kg⁻¹。

2 方法

2.1 小鼠肝癌细胞株 H22 的感染 复苏包装细胞 PT67/*tk*, 吸取其培养上清液, 加入 H22 的培养液中, 上清液病毒感染 H22 细胞后用 G418 (800 mg·L⁻¹) 筛选, 获得抗性细胞克隆, 命名为 H22/*tk*。

2.2 小鼠移植性肝癌的造模 将 H22/*tk* 和野生型 H22 按 1:4 混合 (模拟临床体内病毒感染肿瘤细胞比率 10% ~ 20%)。混合后的细胞制备成 1 × 10¹⁰/L 的细胞悬液, 台盼蓝活细胞计数 > 90%; 按 10 mL·kg⁻¹

(含 2×10^6 个肿瘤细胞)细胞悬液接种于小鼠的皮下。

2.3 分组及治疗 昆明种小鼠 90 只,随机分为 5 组:正常对照组,模型对照组、六味地黄丸治疗组、自杀基因治疗组、联合治疗组(自杀基因联合六味地黄丸),正常对照组 10 只,其他组各 20 只。正常对照组右前肢腋下注射生理盐水 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,其他各组右前肢腋下接种等量肝癌细胞悬液。正常对照组和模型对照组第 2~16 天蒸馏水 ig , $25 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,第 6~16 天 ip 生理盐水 $12.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$;六味地黄丸治疗组第 2~16 天六味地黄丸悬液 ig 每天 $25 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,小鼠给药剂量为生药 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}$ 第 6~16 天 ip 生理盐水每天 $12.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$;自杀基因治疗组第 2~16 天蒸馏水 ig 每天 $25 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,第 6~16 天 ip GCV 每天 $12.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$;联合治疗组 2~16 天六味地黄丸悬液 ig 每天 $25 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,小鼠给药剂量为生药 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,第 6~16 天 ip GCV 每天 $12.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

2.4 肿瘤质量及抑瘤率 实验结束后处死动物,用眼科剪分离剥取肿瘤,电子天平称质量,计算抑瘤率。

$$P_{\text{抑瘤}} = (m_{\text{模型组}} - m_{\text{治疗组}}) / m_{\text{模型组}} \times 100\%$$

2.5 各组肿瘤组织缝隙连接蛋白表达

2.5.1 病理制片及免疫组化染色 取小鼠肿瘤组织,每组选取 18 个左右动物肿瘤组织,常规切片后, DAB 免疫组化染色,具体方法按 SABC 试剂盒说明书进行。

2.5.2 免疫组化染色评价标准^[4] 实验结果判定以胞质内和胞膜上出现棕黄色颗粒为阳性,每例切片在 40×10 显微镜下随机选取 5 个高倍视野计数,根据显色强度和阳性细胞数两项指标判断阳性等级。按显色强度分为无色、黄色、棕黄色、棕黑色分别计为 0~3 分;按阳性细胞比例分为 0, $<1/3$, $1/3 \sim 2/3$, $>2/3$, 分别计为 0~3 分。将两项积分相乘,确定 0 分为阴性,1~3 分为弱阳性,4~6 分为中等阳性,7~9 分为强阳性,分别计为 -, +, ++, +++。阴性(-),无染色信号;弱阳性(+),染色信号呈细颗粒状,棕黄色,阳性细胞占总细胞数 50% 以下;中等阳性(++),染色信号呈细颗粒状,棕黄色,阳性细胞占总细胞数 50% 以上;或染色信号呈粗颗粒状、块状,棕黑色,阳性细胞占总细胞数 50% 以下;强阳性(+++),染色信号呈粗颗粒状或块状,棕黑色,阳性细胞占总细胞数 50% 以上。

2.6 统计学处理 数据应用 SPSS 11.5 统计软件分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析;多组等级资料按 Kruskal-walls Test 法进行统计。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 肿瘤质量及抑瘤率 各组肿瘤质量及抑瘤率见表 1。

表 1 各组肿瘤质量

组别	n	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	肿瘤质量 / g	抑瘤率 /%
肿瘤模型	19	-	1.58 ± 1.24	-
六味地黄丸	19	10	0.85 ± 0.72	46.3
自杀基因	20	0.1	0.99 ± 0.98	37.4
联合治疗	18	LD10 + GCV0.1	$0.59 \pm 0.38^{1)}$	63.0

注:与肿瘤模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

3.2 镜下观察 Cx26, Cx43, Cx32 蛋白表达 阳性表达定位于细胞浆和细胞膜, Cx43 在癌旁组织,特别是有纤维组织浸润部位表达呈强阳性,而在癌结节中肿瘤细胞表达相对较弱; Cx26, Cx32 在肿瘤细胞特别是脂肪组织浸润附近的癌组织中呈现强阳性表达。统计分析显示,与肿瘤模型组相比,联合自杀基因治疗组能增强 Cx26, Cx43, Cx32 蛋白表达,差异有统计学意义($P < 0.05$);与单独六味地黄丸治疗组和自杀基因组比较,联合组能增强 Cx32 蛋白表达,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$),结果见表 2~4 和图 1~3。

表 2 各组肿瘤细胞表达 Cx26 蛋白阳性等级评分 只

组别	n	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	+	++	+++
肿瘤模型	18	-	7	9	2
六味地黄丸	18	10	5	8	5
自杀基因	19	0.1	3	13	3
联合治疗	20	LD10 + GCV0.1	2	11	7 ¹⁾

表 3 各组肿瘤细胞表达 Cx32 阳性等级评分 只

组别	n	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	+	++	+++
肿瘤模型	18	-	9	8	1
六味地黄丸	19	10	5	11	3
自杀基因	18	0.1	6	10	2
联合治疗	20	LD10 + GCV0.1	1	10	9 ^{2,3,4)}

注:与肿瘤模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与六味地黄丸组比较³⁾ $P < 0.05$;与自杀基因组比较⁴⁾ $P < 0.01$ (表 4 同)。

表 4 各组肿瘤细胞表达 cx43 阳性等级评分 只

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	+	++	+++
肿瘤模型	18	-	12	6	0
六味地黄丸	18	10	7	10	1
自杀基因	19	0.1	8	11	0
联合治疗	20	LD10 + GCV0.1	5	13	2 ¹⁾

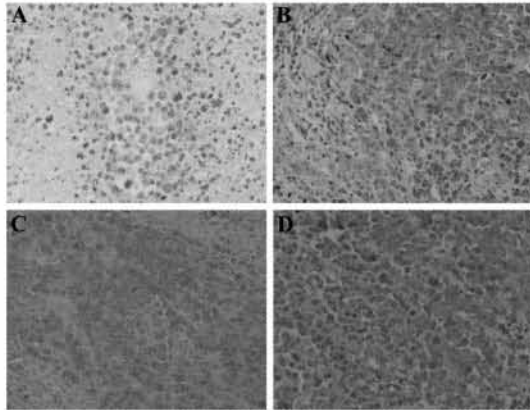


图 1 各组肿瘤组织 Cx26 免疫组化图片 (SABC × 200)

A. 肿瘤模型组 (蒸馏水 25 mL·kg⁻¹ ig + 生理盐水 12.5 mL·kg⁻¹ ip); B. 六味地黄丸治疗组 (LD10 g·kg⁻¹ ig + 生理盐水 12.5 mL·kg⁻¹ ip); C. 自杀基因治疗组 (蒸馏水 25 mL·kg⁻¹ ig + GCV100 mg·kg⁻¹ ip); D. 联合治疗组 (LD10 g·kg⁻¹ ig + GCV100 mg·kg⁻¹ ip)。(图 2~3 同)

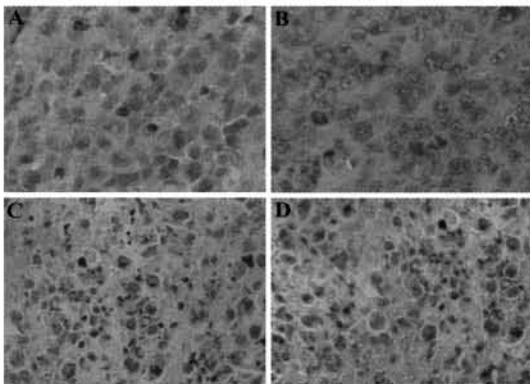


图 2 各组肿瘤组织 Cx32 免疫组化图片 (SABC × 400)

4 讨论

自杀基因疗法因存在旁观者效应的独特机制而成为具有广泛应用前景的肿瘤治疗新方法,其在理论上能完全治愈肿瘤。但体内单纯自杀基因治疗因转染率低,靶向性不够而难以达到这一目标,因而寻找肿瘤自杀基因疗法增效药物及途径成为肿瘤自杀基因治疗研究的热点,旁观者效应则成为增效作用研究的最重要的靶点。我们以六味地黄丸对 Cx 蛋白表达的影响与肿瘤自杀基因疗法旁观者效应的缝隙连接机制之内在联系为研究的切入点,比较了六

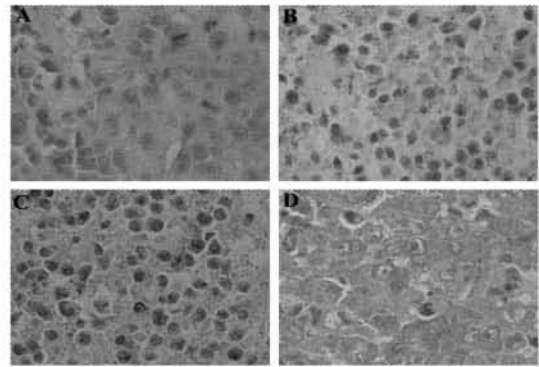


图 3 各组肿瘤组织 Cx43 免疫组化图片 (SABC × 400)

味地黄丸联合自杀基因疗法治疗与单纯六味地黄丸治疗或单纯自杀基因治疗的抗肿瘤效果,结果显示自杀基因疗法和六味地黄丸治疗抑瘤率与模型组比均无统计学意义,而联合治疗组显示了较好的疗效,提示单纯的中药并没有直接的抑瘤作用,自杀基因疗法未见明显的疗效则是基于为联合治疗留下杀伤肿瘤空间控制了药物浓度。

虽然自杀基因“旁观者效应”发生机制复杂,目前尚未完全阐明清楚,但 GJIC 介导的缝隙连接机制正受到越来越多学者的关注^[5]。Cx 作为 GJIC 的物质基础,由其介导的 GJIC 与 HSV-tk/GCV 自杀基因的旁观者效应密切相关^[6-7]。Cx 家族共有 13 个成员,它们在体内的分布与 GJIC 通路有关。其中 Cx26, Cx43 和 Cx32 是与肝细胞密切相关的缝隙连接蛋白,由其组成的连接子在质膜上常成簇出现形成缝隙连接斑 (gap junction plaque),其数量直接影响 GJIC 功能。大量研究发现^[8]:细胞恶性转化后普遍存在 Cx 表达缺陷和 GJIC 功能缺陷,GJIC 功能的缺陷使恶性化细胞逃离生长控制,在转移过程中逃避免疫监视,转移能力的强弱与 GJIC 呈负相关。

Mesnil 等^[1]总结了 GJIC 在旁观者效应中的作用,发现无论是体内还是体外,缝隙连接的表达高低与潜在的旁杀伤作用之间具有直接的相关性,特别是在使用 HSV-tk/GCV 作为自杀基因系统的情况下更是如此。因此,增加 Cx 的表达量,或转导 Cx 基因,或使用可增加 Cx 功能的代谢化合物 (如视黄醛或 cAMP) 均可提高自杀基因疗法的旁观者效应。中医药是一个伟大的宝库,目前已经证实三七总皂苷、白藜芦醇、姜黄素等多种中药有效成分可改善肝癌细胞 GJIC 功能,另有研究表明六味地黄丸可影响 CAMP 及 IL-2, TNF-α 等细胞因子的表达,而后者与 Cx 的表达及 GJIC 关系密切,由此可推测六味地黄

丸增强肝癌 HSV-tk/GCV 旁观者效应的机制与增强 Cx 蛋白的表达有关。

实验中发现 GCV 治疗组 3 种 Cx 蛋白的表达与肿瘤模型组水平差异不大,证实了虽然肿瘤细胞的缝隙连接表达异常,但自杀基因系统的旁观者效应仍然可以通过残存的缝隙连接发挥作用。而联合治疗组的 3 种 Cx 蛋白表达均高于肿瘤模型组。其可能性的机制在于:①肿瘤细胞在短时间被大量杀伤后,造成大量的组织间隙,从而为大量成熟缝隙连接在细胞间迁移和再组装创造良好条件。②六味地黄丸可以诱导肿瘤细胞 Cx 表达和功能增强。体外研究发现 cAMP、视黄酸、类胡萝卜素、类固醇激素及叶酸类物质通过诱导细胞 Cx 表达,可增强细胞 GJ 的功能^[9]。而动物实验研究结果也表明^[10],六味地黄汤可对抗环磷酰胺的诱变作用,增加子宫颈癌 V14 瘤细胞内的 cAMP 的含量,延长荷瘤小鼠的存活时间。各治疗组之间的比较中,联合治疗组能明显提高 Cx32 的表达,差异有统计学意义,而 Cx26 和 Cx43 的表达各组间差异无统计学意义,可能是因为 Cx 蛋白表达具有组织特异性。以上结果提示六味地黄丸可能是通过增加细胞内 cAMP 的含量或者其他细胞因子及可溶性因子从而间接增强 Cx 蛋白的表达,促进 HSV-tk/GCV 系统治疗小鼠肝癌中缝隙连接机制的效应,具体机制有待进一步研究。

此外,在前期工作中我们对各组肿瘤组织的病理检查发现联合治疗组肿瘤细胞密度相对较低,肿瘤周围纤维结缔组织增生更显著^[3]。本研究显示 Cx 蛋白阳性定位多位于肿瘤组织与纤维组织交界区域,在不少成纤维细胞也呈现阳性表达,六味地黄丸作用后这些成纤维细胞构成的微环境是否促进了肿瘤细胞缝隙连接蛋白的表达,值得进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Mesnil M, Yamasaki H. Bystander effect in herpes simplex virus-thymidine kinase ganciclovir cancer gene therapy: Role of gap-junctional intercellular communication[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(15):3989.
- [2] 杜标炎,张爱娟,谭宇蕙,等. 自杀基因系统联合六味地黄丸对肝癌细胞杀伤的协同作用[J]. *广州中医药大学学报*, 2008, 25(4):319.
- [3] 杜标炎,王慧峰,谭宇蕙,等. 六味地黄丸对小鼠移植性肝癌自杀基因治疗的增效作用[J]. *广州中医药大学学报*, 2007, 24(2):132.
- [4] Bamberger A M, Riethdorf L, Milde-Langosch K, et al. Strongly reduced expression of the cell cycle inhibitor p27 in endometrial neoplasia[J]. *Virchows Arch*, 1999, 434(5):423.
- [5] 刑毅飞,肖亚军,鲁功成. 连接蛋白介导的 GJIC 与肿瘤自杀基因治疗时旁观者效应的关系[J]. *国外医学·生理、理科学与临床分册*, 2001, 21(4):246.
- [6] Kumar N M, Gilula N B. The gap junction communication channel[J]. *Cell*, 1996, 84(3):381.
- [7] Mesnil M, Piccoli C, Tiraby G, et al. Bystander killing of cancer cells by herpes simplex virus thymidine kinase gene is mediated by connexins[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(5):1831.
- [8] 毛丽敏,王勤,王菊芳,等. 肿瘤细胞的间隙连接[J]. *国外医学·肿瘤学分册*, 2003, 30(4):264.
- [9] Zhang L X, Acevedo P, Guo H, et al. Upregulation of gap junctional communication and connexin43 gene expression by carotenoids in human dermal fibroblasts but not in human keratinocytes[J]. *Mol Carcinog*, 1995, 12(1):50.
- [10] 姜廷良,严述常,王素芬,等. 六味地黄丸防治肿瘤的实验研究[J]. *中药方剂研究*, 1983, 21(6):71

[责任编辑 聂淑琴]