

DOI:CNKI:11-3495/R. 20110303. 1349. 008

复方青龙衣胶囊对胃癌细胞 SGC-7901 基因芯片表达的影响

许庆瑞¹, 张树明¹, 张俊威¹, 徐琛², 王伟明^{1*}

(1. 黑龙江省中医研究院, 哈尔滨 150036; 2. 南京大学生命科学院, 南京 210093)

[摘要] 目的: 研究复方青龙衣胶囊体外对人胃癌细胞 SGC-7901 基因表达谱的影响, 初步探讨其对胃癌细胞抑制作用的机制。方法: 设定 5 个不同药物浓度梯度 (0.8×10^{-3} , 1×10^{-3} , 1.2×10^{-3} , 1.4×10^{-3} , 1.6×10^{-3} g·L⁻¹) 预处理 24 h, 采用 MTT 法测定对人胃癌细胞 SGC-7901 的抑制作用; 以药物半数抑制浓度预处理 24 h, 全基因芯片技术研究对胃癌基因表达谱的影响, 并采用基因集合聚类分析法分析结果。结果: 以不同浓度的复方青龙衣处理胃癌细胞 SGC-7901 24 h, 结果显示该药对肿瘤细胞的生长呈现剂量依赖性的抑制作用, 半数抑制浓度为 1.27×10^{-3} g·L⁻¹; 芯片结果显示: 胃癌肿瘤细胞 SGC-7901 经药物处理后总共筛选出 78 个差异表达基因, 表达上调的基因有 23 个, 表达下调的基因有 55 个。结论: 复方青龙衣胶囊对人胃癌细胞 SGC-7901 具有显著的抑制作用, 并可能通过影响细胞周期基因的表达, 使肿瘤细胞停滞于 G₁/S 期发挥抗肿瘤作用。

[关键词] 胃癌; 基因芯片; 复方青龙衣胶囊

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)08-0180-04

Changes in Gene Expression Profiles of Gastric Carcinoma after Treatment of Compound Qinglongyi Capsule

XU Qing-rui¹, ZHANG Shu-ming¹, ZHANG Jun-wei¹, XU Chen², WANG Wei-ming^{1*}

(1. Heilongjiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Haerbin 150036, China;

2. School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

[Abstract] **Objective:** To study the changes in gene expression profiles of gastric carcinoma after treatment of Compound Qinglongyi Capsule and the potential mechanism of it. **Method:** MTT assay was used to observe the effect of Compound Qinglongyi Capsule at doses of 0.8×10^{-3} , 1×10^{-3} , 1.2×10^{-3} , 1.4×10^{-3} , 1.6×10^{-3} g·L⁻¹ accordingly on proliferation of SGC-7901 cells. The gene expression spectra were tested by gene chip technique, and the databases were analyzed by gene set analysis. **Result:** MTT results showed that after treated with different doses for 24 h, Compound Qinglongyi Capsule could obviously inhibit the proliferation of SGC-7901 cells in a dose-dependent manner. Compared with the untreated group, expressions of 78 genes were changed, among them 23 gene expression up-regulated, and 55 gene expression down-regulated. **Conclusion:** Cell proliferation in the carcinoma cell line SGC-7901 can be inhibited effectively by Compound Qinglongyi Capsule.

[Key words] gastric carcinoma; gene chip; Compound Qinglongyi Capsule

[收稿日期] 20101109(009)

[基金项目] “重大新药创制”国家科技重大专项课题(2009ZX09102-138); 黑龙江省发改委支持重大前期项目; 黑龙江省青年科学基金项目(QC2010043)

[第一作者] 许庆瑞, 助理研究员, 中药药理, Tel: 0451-55665478

[通讯作者] * 王伟明, 博士, 研究员, 博导, 主研方向为中药新药开发, Tel/Fax: 0451-55665478, E-mail: zyyjy@163.com

[网络出版时间] 2011-03-03 13:49

基因芯片是 20 世纪末发展起来的一项新的生物学技术,广泛应用于基因表达分析、基因型和多态性分析^[1]。中药尤其复方中药多成分及多靶点的作用特点,是导致其防病治病的机制不易阐明,束缚中医理论及中药现代化发展的瓶颈,基因芯片技术为阐明中药防治疾病的作用机制提供了可能。复方青龙衣胶囊作为医院制剂,20 世纪 80 年代以来临床用于治疗各种癌症,特别是消化道肿瘤,取得了显著的治疗效果^[2]。为了进一步明确其抗癌作用机制,本文采用全基因芯片技术,从基因学角度对该药的抗肿瘤作用进行了深入的探讨,并为抗癌中药新药研究提供科学的依据。

1 材料

1.1 受试药物 复方青龙衣胶囊由黑龙江省中医研究院提供。主要制备工艺如下:将青龙衣粗粉 2 质量份加 70% 的乙醇进行渗漉提取,将提取液减压回收乙醇得清膏,再将清膏干燥得干浸膏 1,得率为 9.2%;取刺五加 1 质量份按《中国药典》2005 年版一部刺五加浸膏项下水提取浸膏制备方法,得刺五加浸膏,干燥得干浸膏 2,合并干浸膏 1 和干浸膏 2,将其粉碎成细粉;加入常规辅料,按照常规工艺,制成胶囊剂。用法与用量:口服,1 次 4 粒,一日 3 次。规格 0.4 g/粒。批号 081201。

1.2 细胞株 胃癌细胞 SGC-7901:由南京大学生命科学学院实验室提供,用含 10% 胎牛血清 RPMI-1640 培养液在 37 ℃,5% CO₂ 培养箱中培养。

1.3 试剂与仪器 胎牛血清(杭州四季清公司);Trizol 试剂 Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA; NucleoSpin® RNA clean-up 试剂盒 MACHERY-NAGEL, Germany; 晶芯® cRNA 扩增标记试剂盒,博奥生物有限公司;22K Human Genome Array 芯片,博奥生物有限公司。LuxScan 10KA 双通道激光扫描仪 CapitalBio 公司。

1.4 芯片送检 博奥生物有限公司生物芯片北京国家工程研究中心。

1.5 药液的制备 精确称取一定量的复方青龙衣胶囊内容物,加入适量无水乙醇充分溶解后,1 000 r·min⁻¹离心 10 min,之后取上清,无菌滤膜除菌,配制成初始浓度为相当生药 0.5 g·L⁻¹的溶液,4 ℃冰箱保存备用。

2 方法

2.1 MTT 测定药物对肿瘤细胞的抑制作用 取对

数生长期细胞,用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 细胞培养液配制成 4~5×10⁴/mL 密度的细胞悬液,然后按每孔 100 μL 接种于 96 孔板。5% CO₂,37 ℃ 培养 24 h 后弃上清,换含不同质量浓度青龙衣胶囊(0.8×10⁻³,1×10⁻³,1.2×10⁻³,1.4×10⁻³,1.6×10⁻³ g·L⁻¹)的完全培养基 100 μL,每个浓度设 6 个平行孔,分别培养 24 h。弃上清,D-Hanks 洗,弃去,每孔加入 100 μL 无血清培养液,再加入 20 μL 新鲜配制的 MTT(5 g·L⁻¹)无血清培养液,5% CO₂,37 ℃ 培养 4 h。弃去上清,每孔加入 DMSO 150 μL 溶解甲臞,室温避光震荡 15 min。用 ELX-800 酶标仪测定吸光度(A),检测波长为 570 nm。取 6 个复孔的均值,以未加药物的空白组做对照组,上述实验重复 3 次。计算抑制率和半数抑制浓度(IC₅₀)。

$$\text{抑制率} = (\text{对照组 } A - \text{给药组 } A) / \text{对照组 } A \times 100\%$$

$$\text{IC}_{50} = \lg - 1 [X_m - i(\sum p - 0.5)]$$

其中 X_m 为最大设计浓度的对数值,i 为各浓度倍比数的对数值,∑p 为各抑制率之和。

2.2 复方青龙衣对胃癌 SGC-7901 基因表达图谱的影响

2.2.1 样品的制备 取对数生长期细胞,按 1×10⁶ 细胞/皿接种 10 cm 平皿中。细胞培养 24 h 后加药处理,复方青龙衣终质量浓度为半数抑制浓度,对照加入相应药物剂量的溶媒。加药后,细胞置于 37 ℃,5% CO₂ 培养箱中孵育,之后弃去培养基,D-Hanks 洗涤细胞,吸去 D-Hanks 后,即可加入适量 Trizol 试剂,用移液器反复吹打细胞,使细胞充分裂解,溶解了细胞的 Trizol 在室温静置 10 min 后,转移到 1.5 mL 离心管中,保存在 -70 ℃ 冰箱中,备用。

2.2.2 总 RNA 的抽提、纯化及定量 用 Trizol 一步法提取细胞中的总 RNA,通过异丙醇沉淀法浓缩 RNA,并进一步采用 NucleoSpin® RNA clean-up 试剂盒对总 RNA 进行过柱纯化,最后用分光光度计定量,甲醛变性胶电泳质检。

2.2.3 样品 RNA 进行荧光标记、杂交与清洗 采用晶芯® cRNA 扩增标记试剂盒对样品 RNA 进行荧光标记,标记的 DNA 溶于 80 μL 杂交液中,42 ℃ 杂交过夜。杂交结束后,先在 42 ℃ 左右含 0.2% SDS,2×SSC 的液体中洗 5 min,而后在 0.2×SSC 中室温洗 5 min。玻片甩干后即可用于扫描。

2.2.4 芯片扫描、图像的采集及数据分析 芯片用 Lux Scan 10KA 双通道激光扫描仪(CapitalBio 公司)

进行扫描。采用 LuxScan 3.0 图像分析软件 (CapitalBio 公司) 对芯片图像进行分析, 以 2 倍或 1.5 倍标准筛选差异表达基因。

2.2.5 细胞信号通路分析 采用基因集合聚类分析法, 分析复方青龙衣对胃癌细胞 SGC-7901 信号通路的影响。

3 结果

3.1 复方青龙衣对肿瘤细胞生长的影响 以不同浓度的复方青龙衣作用胃癌细胞 SGC-7901 24 h, 结果显示该药对肿瘤细胞的生长具有剂量依赖性的抑制作用 (图 1)。对胃癌细胞 SGC-7901 的半数抑制浓度为 $1.27 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

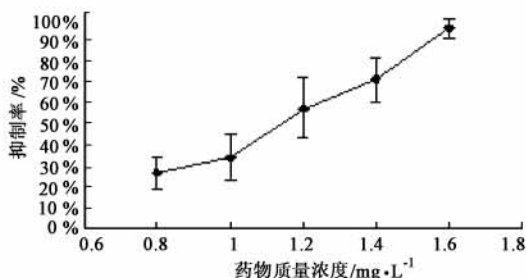


图 1 不同浓度复方青龙衣作用 24 h 后对 SGC-7901 细胞生长的抑制作用

3.2 总 RNA 提取质量分析 提取标本总 RNA 经紫外分光光度计检测 A_{260}/A_{280} 1.8 ~ 2.0, 证明所提取 RNA 无蛋白质污染。进行甲醛凝胶电泳, 所有样品 RNA 电泳条带清晰, 28S 比 18S rRNA 条带亮度接近 2:1, 证明所提取的 RNA 完整无降解, 可以进行芯片实验。见图 2。

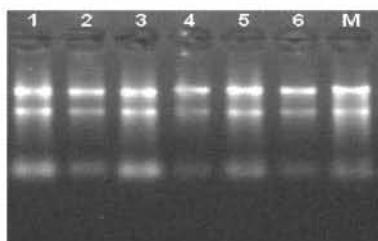


图 2 样品总 RNA 甲醛凝胶电泳

第 1~6 泳道为提供样本; 第 M 泳道为 HeLa 细胞 RNA

3.3 样本各项检测参数的质控 Hex、外标、内标等阳性对照信号正常, 阴性对照检测为阴性; 看家基因重复性好, Ratio 值 CV 不超过 0.3; 无影响数据的污染, 漏点率不超过 0.3%; 检测率正常。

3.4 差异表达基因筛选结果 按照设定的数据筛选标准, 从对照组细胞和处理组细胞中总共筛选出 78 个差异表达基因, 其中表达上调的基因有 23 个,

表达下调的基因有 55 个。芯片杂交信号强度散点图见图 3。

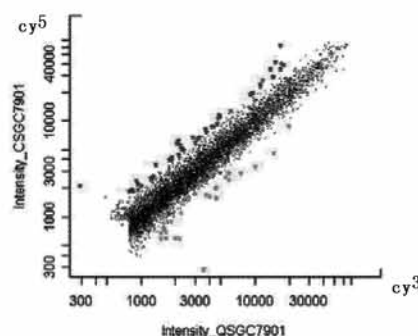


图 3 芯片杂交信号强度散点

基因集合聚类分析法对芯片数据进行分析, 结果显示: 在青龙衣胶囊作用下, SGC7901 细胞有 71 条生物信号通路发生变化, 信号通路中的基因整体表现下调趋势的有 15 条, 其中 12 条信号通路呈显著性变化 ($P < 0.05$); 信号通路中的基因整体表现上调趋势的有 7 条, 其中 4 条信号通路呈显著性的变化 ($P < 0.05$); 信号通路中的基因整体表现既有上升又有下降趋势的有 49 条。影响的信号通路涉及到细胞生长的各个方面, 包括细胞增生、细胞凋亡、细胞周期及细胞信号传导等。结果见表 1。

表 1 胃癌细胞 SGC-7901 在复方青龙衣作用下显著发生变化的生物路径

生物路径	P	范围	变化趋势
h sm Pathway	<0.001	10	↓
h tid Pathway	0.002	10	↓
h celcycle Pathway	0.007	17	↓
h carm-er Pathway	0.021	10	↓
h gl Pathway	0.022	17	↓
h p53 Pathway	0.023	10	↓
h ter Pathway	0.028	17	↓
h mitochondria Pathway	0.036	12	↓
h stress Pathway	0.041	10	↓
h biopeptides Pathway	0.042	15	↓
h caspase Pathway	0.046	13	↓
h illr Pathway	0.048	12	↓
h p38mapk Pathway	0.015	18	↑
h atrbrea Pathway	0.04	11	↑
h il2rb Pathway	0.041	12	↑
h agr Pathway	0.049	12	↑

注: “↓”代表生物信号通路基因整体下调趋势; “↑”代表生物信号通路基因整体上调趋势。

4 讨论

青龙衣为胡桃科植物胡桃楸 *Juglans mandshurica*

Maxim. 的未成熟外果皮,多年来民间一直用青龙衣治疗癌症,经现代药理研究表明其抗肿瘤作用明显。刺五加为五加科植物刺五加 *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms 的干燥根及根茎或茎,具有益气健脾、补肾安神的功效。复方青龙衣胶囊采用青龙衣与刺五加配伍,青龙衣解癌毒主攻邪气,刺五加益脾肾扶助正气,二药共同发挥解毒扶正、消癥定痛的抗癌作用,符合中医理论“扶正祛邪”、“攻补兼施”的治疗原则,且经临床疗效验证,效果显著^[2],并为其后续抗癌中药新药研究提供了科学的依据。本实验结果显示:复方青龙衣胶囊具有抑制人胃癌细胞 SGC-7901 增殖作用,并且随着浓度的增加抑制作用亦明显增强,呈现一定的量效关系,当浓度达到 $1.2 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,抑制率达到 50% 左右。提示该药体外可显著抑制人胃癌细胞 SGC-7901 的增殖。

现代研究认为细胞周期的演进受到多种基因的调控。这个调控网络的核心就是细胞周期素依赖性激酶(cyclin-dependent kinases, CDKs)。以 CDKs 为核心,细胞周期素(cyclins)对其进行正性调控,细胞周期素依赖性激酶抑制子(cyclin-dependent kinase inhibitors, CKIs)对 CDKs 进行负性调节。当细胞受到生长信号的刺激时,cyclins 表达上调,激活相应的 CDK,通过一系列相关靶分子表达,促使细胞完成 DNA 复制。cyclin 家族成员中,cyclin D 和 cyclin E 主要调控 G₁/S 期转换,并分别与不同的 CDKs 形成复合物,如 cyclin D/CDK4, cyclin E/CDK2 等。此外,多种 CKIs 包括 p21, p27, p16, p15 等可通过抑制相应的 CDKs 激酶活性,发挥抑制细胞周期行进的功能^[3]。肿瘤的过度增殖与细胞周期调控因子紊乱有关^[4]。目前认为,在细胞周期中 G 末期向 S 期能否顺利过渡对于推进癌细胞周期进程具有重要意义^[5]。应用全基因芯片检测复方青龙衣胶囊处理胃癌肿瘤细胞 SGC-7901 后总共筛选出 78 个差异表达

基因,表达上调的基因有 23 个,表达下调的基因有 55 个。本文对影响细胞周期的基因予以重点分析,结果显示与细胞周期相关的基因中,上调的基因包括 TP53, CDKN2B 等;下调的基因包括 CDC2, CDK2, CDK4, CCNE1, CCNB1, CCND3, SKP2, Birc2, 等。通过基因集合聚类分析结果显示,复方青龙衣胶囊主要影响与细胞周期相关的信号通路,如 cell cycle; G₁/S check point 和 cyclins and cell cycle regulation,与不加药处理组比较具有显著差异。提示复方青龙衣胶囊可能影响细胞周期基因的表达,使肿瘤细胞停滞于 G₁/S 期,抑制其分裂、增殖及分化,最终导致肿瘤细胞的凋亡。

综上所述,复方青龙衣胶囊对肿瘤有显著的抑制作用,其作用机制可能与影响细胞周期相关基因的表达有着某种内在的联系,对其如何影响相关基因的表达来发挥抗肿瘤作用还需做进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Nambiar S, Mirmohammadsadegh A, Bar A, et al. Applications of array technology: melanoma research and diagnosis [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2004, 4(4): 549.
- [2] 张洪娟,桑树荣.高奎滨用青龙衣制剂治疗肿瘤用药经验[J].*黑龙江中医药*,2000,2:62.
- [3] 曹亚.细胞周期与肿瘤[J].*国外医学·生理、病理科学与临床分册*,2002,22(2):103.
- [4] Dekoj T, Lee S, Desai S, et al. G₂/M cell-cycle arrest and apoptosis by n-3 fatty acids in a pancreatic cancer model [J]. *J Surg Res*, 2007, 139(1):106.
- [5] Goodell J R, Ougolkov A V, Hiasa H, et al. Acridine-based agents with topoisomerase II activity inhibit pancreatic cancer cell proliferation and induce apoptosis[J]. *J Med Chem*, 2008, 51(2):179.

[责任编辑 聂淑琴]