

# 参附注射液抗癌恶病质基因芯片研究

杨宇飞, 吴煜, 邬冬华

(中国中医研究院西苑医院肿瘤科, 北京 100091)

**摘要:** 目的: 探讨参附注射液治疗肿瘤恶病质的作用机制。方法: 应用 T739 恶病质动物模型的血细胞和瘤组织提取 mRNA, 分别在 20S 芯片上杂交, 对差异表达基因进行分析探讨。结果: 血细胞和瘤组织芯片各得到 56 条差异表达基因, 分别有 57.1% 和 55.4% 是小鼠肌 cDNA 文库中的基因, 其中相交叉的基因有 9 条, 均呈同一的上调或下调趋势, 有 4 条是小鼠肌 cDNA 文库中的基因。讨论: 1. 本结果提示肌 cDNA 文库的基因片段可能引起肌肉组织的过度消耗, 导致恶病质状态。2. 研究已证实, 炎性细胞因子与恶病质密切相关, ADAMTS-1 基因与炎症的进程相关, 本实验显示该基因呈上调趋势, 值得深入研究; 3. SCD2 在本实验中呈上调趋势, 推测其表达与脂肪组织的代谢与功能相关。4. 本实验中 FKBP51 显著下调, 与同期进行的甲孕酮抗癌恶病质基因芯片实验得到的趋势相同, 提示 FKBP51 在调节恶病质发生发展方面有与之相近的作用。5. PTA 是胸腺激素家族的成员, 该基因表达为显著上调。提示了参附注射液在治疗恶病质状态的免疫调节作用。

**关键词:** 参附注射液; 恶病质; 基因组学

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2004)02-0022-05

## Anti-Cancer Cachexia of Shenfu Injection by Gene Chip Study

YANG Yufei, WU Yu, WU Dong-hua

(Department of Oncology, XiYuan Hospital, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100091, China)

**Abstract:** Purpose: To explore the mechanism of Shenfu Injection in treating cancer cachexia (C. C.) Method: mRNA was extracted from the blood cells and tumor tissue of T739 animal model of C. C., hybridized respectively on 20S gene chip. Analysis on differential expression genes was carried out. Result: 56 differential expression genes were obtained from each chip of blood cell and tumor tissue, 57.1% and 55.4% of which belongs to mouse musculus cDNA library. 9 cross-genes were obtained from each chip of blood cell and tumor tissue, showing the same tendency of up-regulation or down-regulation. 4 of them belongs to mouse musculus cDNA library. Discussion: 1. The result suggests The gene segment of mouse musculus cDNA library might cause over-consumption of muscular tissue and results in C. C.; 2. Previous studies confirmed that inflammatory cytokines, such as IL-1 and IL-6 are closely related to C. C. Gene expression of ADAMTS-1 is correlated with inflammatory proceeding. The result showed that ADAMTS-1 of cross-genes showed a tendency of up-regulation, which is worth further studying; 3. The gene SCD2 showed a tendency of up-regulation. It was inferred that its expression was correlated with metabolism and function of adipose tissue, which further affected malnutrition in C. C. stage; 4. Described as progesterone receptor-associated immunophilin, FKBP51 displays interactions with progesterone receptor. The gene showed the same tendency as the gene chip study of medroxyprogesterone anti-C. C. at the same stage. As medroxyprogesterone was a confirmed effective drug for C. C., FKBP51 was deduced to have the same function as medroxyprogesterone. 5. PTA is the member of thymosin family and has immune regulatory effect. The gene expression showed a tendency of up-regulation after Shenfu Injection treatment. Shenfu Injection was thought to stimulate T cell immunity and further improve symptoms through elevating immune ability.

**Key words:** Shenfu Injection; cancer cachexia; genomics

本实验选择广泛用于肿瘤临床的能够正性影响机体免疫功能、增强机体非特异抵抗力、防治放化疗毒副作用<sup>[1-2]</sup>的中药制剂参附注射液(SF)作为切入

点,运用基因芯片技术,结合生物信息学手段,研究中药抗肿瘤恶病质的基因表达谱,从分子生物学水平探讨其药效作用的物质基础及作用机理。

## 1 材料

### 1.1 动物

**1.1.1 动物与瘤株** T739 小鼠,雌雄各半,体重  $18 \pm 2$ g,由中国医学科学院肿瘤研究所提供。瘤株:LA795(小鼠肺腺癌),由中国医学科学院肿瘤研究所提供。

**1.1.2 药物** 参附注射液(SF)由雅安三九药业有限公司提供,ZZ-5399-川卫药准字(1998)第 013619 号,专利号 ZL97307760.3。

### 2 方法

**2.1 动物实验<sup>[4]</sup>** 实验动物选用 T739 小鼠,雌雄各半,共 40 只,每组各 20 只。肿瘤瘤株选小鼠肺腺癌 LA795,由北京中国医学科学院肿瘤所提供。

无菌条件下取接种 10d 的新鲜无坏死癌块组织,制成单细胞悬液,用生理盐水将悬液稀释成  $6 \times 10^6$ /ml 癌细胞原液。取 0.1ml 细胞原液,接种于小鼠的左腿后侧。接种第 4d 随机分为 2 组。A 组:接种第 4d 开始腹腔注射,25mg/kg 体重。一日 1 次,连用 14 次。B 组:对照组以同样生理盐水腹腔注射。接种后 4d,接种部位长出肿瘤结节,此时开始记录瘤体积。第 8d,约 8mm 大小,第 14d 进入恶病质状态。第 20d,杀鼠,取瘤组织及全血。

### 2.2 基因实验

**2.2.1 探针制备** 按一步法抽提总 RNA<sup>[5]</sup>。用 Oligotex mRNA Midi kit (Quagen 公司)纯化 mRNA。每一份探针取 4 $\mu$ g mRNA,参照 Schena 方法逆转录标记 cDNA 探针并纯化。在一链合成中掺入荧光标记 dUTP,用 Cy3-dUTP 标记对照组织的 mRNA,用 Cy5-dUTP 标记参附、甲孕酮组的 mRNA。

**2.2.2 芯片杂交** cDNA 芯片由博道公司提供。探针溶解在 20 $\mu$  15 $\times$ SSC+ 0.2% SDS 杂交液中。基因芯片和杂交探针分别置于 95 $^{\circ}$ C 水浴中变性 5min,立即将探针加在基因芯片上,盖玻片封片,置于密封舱内 60 $^{\circ}$ C 杂交 15~17h。然后揭开盖玻片,用 SSC 和 SDS 溶液洗涤 10min,室温晾干。

**2.2.3 检测与分析** 用 ScanArray 3000 扫描仪扫描芯片,提取基因表达的荧光信号的强度和比值。用预先选定的内参照基因对 Cy3 和 Cy5 的原始提取信号进行均衡和修正。用 ImaGene3.0 软件分析 Cy3 和 Cy5 两种荧光信号的强度和比值。

**2.2.4 数据处理** 以 40 个看家基因作参照对原始数据进行标准化处理,剔除 Cy3 和 Cy5 信号强度均小于 400 的基因表达数据。基因显著性差异表达的

判定标准为: Ratio > 2 或 Ratio < 0.5 (Ratio = Cy5/ Cy3)。

### 3 结果

**3.1 总 RNA 抽提结果** 对照组血细胞和瘤组织 D260/280 值分别为 2.139 和 2.101,参附组血细胞和瘤组织的 D260/280 值分别达 2.084 和 2.094,电泳结果证实已抽提高纯化的总 RNA。

**3.2 基因表达差异比较** 用基因芯片筛选对照组和给药组血细胞的差异表达的基因,发现参附与对照组的差异表达基因有 56 条,32 条显示信号下调 (Ratio < 0.5),占表达差异基因总数的 57.1%,24 条信号上调 (Ratio > 2),占 42.9%;瘤组织芯片的差异表达基因有 56 条,27 条信号下调,占表达差异基因总数的 48.2%,29 条信号上调,占 51.8%。有 9 条基因在两张芯片中均有差异表达。

### 3.3 基因表达谱图示

**3.3.1 血细胞芯片** 基因芯片杂交结果分散试验显示 Cy3 和 Cy5 荧光标记值在对称轴直线两侧的狭窄区域中,说明 97.2% 的克隆(红色)信号差异在 0.5~2 倍区间内,而少量的黄色克隆(2.73%)在瘤组织对照试验信号差异大于 2 倍或小于 0.5 倍。见散点图 1。

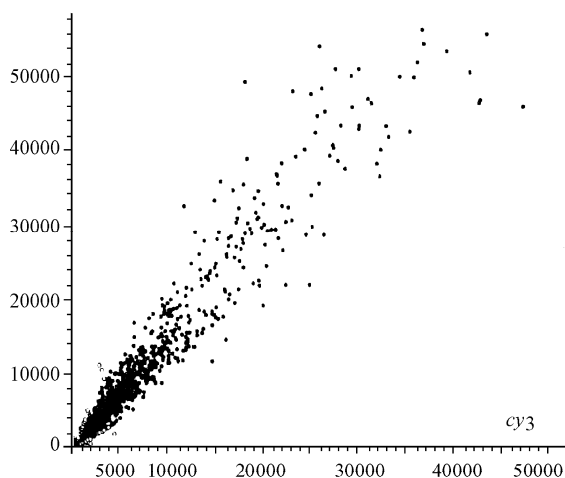


图 1

**3.3.2 瘤组织芯片** 分散试验显示也有 97.2% 克隆(红色克隆)信号差异在 0.5~2 倍区间内,而少量的黄色克隆(2.73%)在瘤组织对照试验信号差异大于 2 倍或小于 0.5 倍。见散点图 2。

在远离对称轴直线的克隆中,有 8 个黄色克隆是相同克隆。

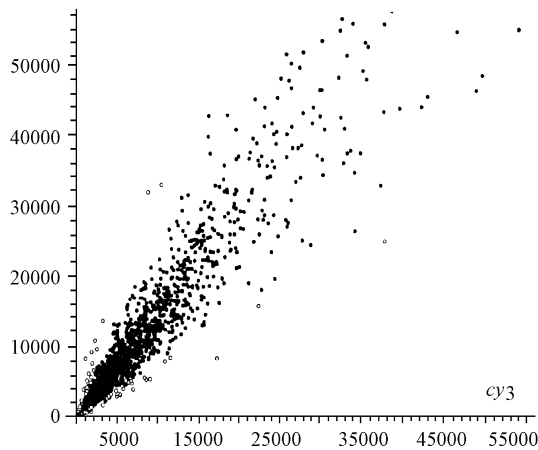


图 2

**3.3.3 结果分析** 运用生物信息学手段初步分析发现,血细胞芯片所得 56 条差异表达基因中,57.1% 是小鼠肌 cDNA 文库 (cDNA library) 中的基因,其余 42.9% 中,包括少量肿瘤相关基因 (NM-008520)、与能量代谢有关的酶的基因 (M26270, M80251) 以及与免疫相关的基因 (X56135, X04653)。Ratio < 0.2 者 1 条: AV259297; Ratio > 4 者 1 条: M26270。瘤组织芯片所得 56 条差异表达基因中,55.4% 是小鼠肌 cDNA 文库中的基因,其余 44.6% 包括丝氨酸激酶类 (D00725)、细胞癌基因类 (MHC-I 型抗原基因) 等肿瘤相关基因和锌指蛋白 (AB013097)、代谢相关基因 (M27796, M26270, NM-007482, NM-007840) 及免疫相关基因 (X56135)。Ratio < 0.3 者 2 条: X58077, M75721; Ratio > 5 者 1 条: X56135。2 张芯片共同存在的 9 条差异表达基因均呈相同表达趋势,即均上调或均下调,其中 4 条是小鼠肌 cDNA 文库中的基因 (表 1)。

表 1

序号	Genbank-号	瘤 ratio 值	血 ratio 值	描述
1	AB001735	2.243	2.265	具有凋亡识别的整合素金属蛋白酶
2	A1314618	2.036	2.065	小鼠肌 cDNA 文库
3	A1875540	2.854	2.301	小鼠肌 cDNA 文库
4	M26270	2.059	4.514	硬脂酰基辅酶 A 脱氢酶
5	M27608	0.494	0.498	主要泌尿蛋白 1
6	NM-007482	2.170	2.149	小鼠精氨酸酶, mRNA
7	U36220	0.406	0.498	FK506 结合蛋白 51
8	W14314	2.095	3.050	小鼠肌 cDNA 文库
9	X56135	5.181	2.424	前胸腺素 α

#### 4 讨论

生命科学进入功能基因组学时代,基因芯片 (microarray) 为中医药研究的大量信息分析提供了技

术手段,能够解决高通量基因表达平行分析问题。中药与机体的相互作用可能为多途径、多环节、多靶点的作用方式,中药调理作用的发挥可能在功能性基因的整合性表达这样更深入的层次上,功能基因组学很可能是中医药现代化的一个切入点。本研究的特点是大量检测,检测对象不是单一基因,而是大量基因,包括已知和未知基因,大大提高了检测效率和结果的全面性和可靠性。研究的初步结果显示:部分基因出现了差异表达,其中多数是小鼠肌 cDNA 文库中的基因片段,其余包括肿瘤相关基因,代谢相关基因和免疫相关基因。恶病质的机制尚不明确,但主要表现为极度消瘦、衰竭,糖、脂和蛋白质代谢异常,肠内肠外高营养支持并不能阻止肌肉的消耗。本实验中 KLT 与 JYT 共同得到的差异表达基因中 80% 是肌 cDNA 文库中的基因片段,关于肌 cDNA 文库中的基因研究报道不多,不能肯定是否与恶病质发生、发展有关。根据生物信息学方法检索结果,就几条有代表性的非肌 cDNA 文库中的基因进行讨论:

**4.1 AB001735 (A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs)** 具有凋亡识别基序的整合素金属蛋白酶 该基因编码的蛋白是 ADAM 基因家族。鼠的 ADAMTS-1 基因由 9 个外显子组成,存在于 9.2kb 区域之内。这 9 个外显子中,第 1、5、6 个分别编码 ADAMTS-1 蛋白的前蛋白区域、整合素样区域和凋亡识别 I 型区域,提示这 3 个外显子可能是功能区域。ADAMTS-1 是由凋亡识别 I 型基序编码的基因,它与炎症的进程相关<sup>[6]</sup>。该基因在经参附治疗的癌症恶病质小鼠无论是血细胞还是瘤组织中都呈上调趋势,Ratio 值分别是 2.243 和 2.265。文献报道恶病质过程与 IL-1、IL-6 等炎性因子有关<sup>[7]</sup>,恶病质小鼠的 IL-1、IL-6 水平升高,目前没有检索到 ADAMTS-1 与细胞因子的关系,但这些因子在恶病质过程中是否与 ADAMTS-1 引起相同或相类的生化反应还有待于进一步研究。

**4.2 M26270 (Stearoyl-coenzyme A desaturase 2, SCD2)** 硬脂酰基辅酶 A 脱氢酶 小鼠的 3T3-L1 前脂肪细胞中分离出编码硬脂酰基辅酶 A 脱氢酶的差异表达基因<sup>[8]</sup>: SCD1。经过对邻近的相关基因进行 DNA 印迹分析,在 3T3-L1 前脂肪细胞中发现了编码 SCD2 相关的 DNA。SCD2 基因长约 15000 个碱基对,由 6 个外显子 5 个内含子组成,内含子与外显子的连接与 SCD1 相类。将小鼠的含不饱和脂肪酸的食物变

成无脂食物,发现 SCD2 在脑组织中高水平表达,在肝脏中不表达,而在肾脏、脂肪组织和肺组织中的表达升高。SCD2 启动子富含 GC 序列,这与核转录因子的结合位点相似,都是糖皮质激素调整因素的核心共有序列。SCD 基因家族对于引起分化和组织特异性代谢物控制基因表达提供了一个新的研究体系<sup>[9]</sup>。在本研究中,血细胞和瘤组织芯片都得到了 SCD2 基因水平上调的结果,而在该基因是小鼠的前脂肪组织中分离的,恶病质主要表现在营养不良和肌肉脂肪组织的极度消耗,对本试验结果的讨论推测有二:1. 该基因的表达对维系脂肪组织的代谢与功能起积极作用,在恶病质状态下,该基因水平下调使脂肪代谢紊乱,参附注射液的应用改善了这种情况,使其显著上调,进而改变恶病质症状;2. 该基因的表达与脂肪代谢呈正相关,过高水平使脂肪分解速度异常加快,加重恶病质阶段的营养不良,而参附注射液的使用已影响此进程的发展,只是尚未使之完全降低到正常水平。尽管具体机制尚不明了,但已初步揭示了参附注射液与恶病质阶段脂肪代谢的关系。

**4.3 U36220 (FK506 binding protein 5, 51 kDa, FKBP51) FK506 结合蛋白 51 鼠的 cDNA 序列克隆** 无论是在体外还是在细菌内都有蛋白产物的表达,推论出的氨基酸序列与人的 FKBP51 有 90% 的相似性,FKBP52 与人有 55% 的相似性。人的 FKBP51 在很多组织中都有表达,与 FKBP52 相似,作为热休克蛋白 90(Hsp90) 结合蛋白而被描述为孕酮受体相关免疫活性物质。它与 Hsp90 和 p23 一起,都是功能成熟的类固醇受体复合物。FKBP51 与 FKBP52 各自在孕酮受体间引起相互作用,并且比 Hsp90 受体间的相互作用更具活性。然而在一个纯粹体系中,FKBP51 与 FKBP52 对抗性的与 Hsp90 结合<sup>[10]</sup>。本实验结果显示在 2 张芯片中该基因均呈显著下调趋势,在同期进行的关于甲孕酮抗癌恶病质基因芯片实验中发现,经甲孕酮治疗后,该基因亦呈下调趋势,Ratio 值为 0.489,与本研究结果十分接近,在一定程度上验证了 FKBP51 与孕酮受体之间的关系。由于甲孕酮是目前被认为明确对恶病质有效的药物<sup>[11]</sup>,所以推测 FKBP51 在调节恶病质发生发展方面有特异性作用,但其作用机制仍不明了。

**4.4 X56135 (prothymosin alpha, PTA) 前胸腺素  $\alpha$**  其氨基酸序列与人和大鼠表现出高度的同一性,但是一级结构的主要差异决定了物种之间二级结构的

不同,而二级结构的差异能够解释其在免疫保护方面不同由来<sup>[12]</sup>。文献报道在  $c-myc$ 、 $c-neu$  和  $v-ras$  转基因鼠乳腺癌中出现了高水平的 PTA,PTA 在不同肿瘤中表达水平不同,它特殊的调节作用与鸟氨酸脱羧酶(ODC)等原癌基因  $c-myc$  的靶基因有关。然而 PTA 的表达并不是绝对依赖于  $c-myc$  的表达,正如在用反义寡核苷酸进行的  $myc$  缺失实验中显示的那样。PTA 在各种肿瘤中的调节是复杂的,不是只依赖于单一的有活性的癌基因<sup>[13]</sup>。PTA 是胸腺激素家族的成员,胸腺激素因具有免疫调节效应而被用于增强癌症患者的细胞免疫能力。目前认为 PTA 作为一种核蛋白参与刺激细胞增殖,能够缩短 G1 期的持续时间<sup>[14]</sup>。参附注射液治疗后该基因表达为显著上调,在瘤组织中 Ratio 高达 5.181。认为参附在恶病质状态可能通过提高机体免疫能力,更好的刺激 T cell 免疫而改善症状。

参考文献:

- [1] 薛燕,白金叶,程桂芳. 参附注射液对免疫功能的影响[J]. 中药药理与临床, 2001, 17(1): 8-9.
- [2] 陆跃美,季卫军. 参附注射液防治恶性肿瘤化疗毒副反应的临床观察[J]. 山西中医, 2000, 16(6): 21-22.
- [3] 王阶,王永炎. 复杂系统理论与中医方证研究[J]. 中国中医研究院院报, 2001, 9: 3.
- [4] 李同度,刘爱国,牛旗,等. 康莱特注射液抗癌恶病质实验研究[M]. 康莱特抗肿瘤的研究论文集,杭州:浙江大学出版社, 1998. 103.
- [5] 陈菊祥,范静平,应康,等. 基因表达谱芯片在胰腺癌相关基因筛选中的应用研究[J]. 第二军医大学学报, 2000, 21(9): 824.
- [6] Kuno K, Iizasa H, Ohno S, Matsushima K. The exon/intron organization and chromosomal mapping of the mouse ADAMTS-1 gene encoding an ADAM family protein with TSP motifs[J]. Genomics, 1997, 46(3): 466-71.
- [7] 孙君江. 细胞因子与癌症恶病质的研究进展[J]. 国外医学内科学分册, 1999, 26(12): 133.
- [8] Ntambi, J. M., Buhrow, S. A., Kaestner, K. H., et al. Differentiation induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. Characterization of a differentially expressed gene encoding stearoyl-CoA desaturase[J]. J Biol Chem, 1988, 25(33): 300.
- [9] Kaestner KH, Ntambi JM, Kelly TJ, et al. Differentiation induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. A second differentially expressed gene encoding stearoyl-CoA desaturase[J]. J Biol Chem, 1989, 5(25): 14755-61.
- [10] Nair SC, Rimerman RA, Toran EJ, et al. Molecular cloning of

- human FKBP51 and comparisons of immunophilin interactions with Hsp90 and progesterone receptor[ J]. *Mol Cell Biol* 1997, 17( 2) : 594-603.
- [ 11] 吴俊杰. 癌症恶病质的药物治疗[ J]. *国外医学药学分册*, 1999, 26( 2) : 77.
- [ 12] Schmidt G, Werner D. Nucleotide sequence of the murine prothymosin alpha cDNA and its deduced primary and secondary protein structure[ J]. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 26( 3) : 442-4.
- [ 13] Loidi L, Garcia Caballero T, Vidal A, et al. Complex regulation of prothymosin alpha in mammary tumors arising arising in transgenic mice[ J]. *Life Sci*, 1999, 64( 23) : 2125-33.
- [ 14] Domashenko AD, Latham KE, Hatton KS. Expression of myc family, myc interacting, and myc target genes during preimplantation mouse development [ J]. *Mol Reprod*, 1997, 47( 1) : 57-65.