

独角莲水提取物对肝癌细胞 SMMC-7721 基因表达的影响

王顺启^{1,2}, 倪 虹¹, 王同顺¹, 陈 力^{1*}

(1. 南开大学生命科学学院, 天津 300071; 2. 南昌大学生命科学学院, 江西 南昌 330047)

独角莲是一味传统中药, 在中医临床中被广泛用于治疗多种恶性肿瘤疾病, 显示出较好的临床疗效。不仅动物模型的研究显示独角莲可明显抑制肿瘤生长^[1,2], 研究还发现独角莲具有阻滞肝癌细胞 SMMC-7721 生长于 S 期, 并诱导肿瘤细胞发生凋亡^[3]。为进一步研究独角莲这一作用的分子机制, 本实验利用肝癌 cDNA 抑制性消减文库构建的肝癌相关基因微阵列, 对独角莲作用于肝癌细胞 SMMC-7721 后基因表达的变化进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 药材及其处理: 本实验所用药材为河北迁西人工种植, 一年生根茎, 经本室陈瑞阳教授鉴定为天南星科犁头尖属植物独角莲 *Typhonium giganteum* Engl. 的根茎。新鲜独角莲根茎洗净去皮, 切成厚度 1 mm 左右的薄片, 20~30 °C 阴干, 粉碎后用研钵研成粉末。用双蒸水配成 30 g/L 的水溶液, 液面上部充 N₂ 密封, 4 °C 浸泡 1 个月。0.22 μm 微孔滤膜滤过, 4 °C 保存备用。

1.2 细胞培养: 肝癌细胞系 SMMC-7721 由天津市第三中心医院朱争艳医师惠赠。细胞培养用 DMEM 培养基 (购自美国 Gibco 公司), 含 10% 胎牛血清 (购自天津 TBD 公司), 100 mg/L 链霉素 (购自美国 HyClone 公司), 1.0×10⁵ U/L 青霉素 (购自美国 HyClone 公司); 于 37 °C、5% CO₂ 进行细胞培养。细胞以 5×10⁵~6×10⁵/mL 密度接种于 75 cm² 的细胞培养瓶 (购自挪威 NUNC 公司), 每瓶 27 mL 细胞悬液, 预培养 12 h 后, 对照组细胞每瓶加入 3.0 mL 灭菌双蒸水, 加药组细胞每瓶加入 30 g/L 的独角莲水提取物 3.0 mL (前期研究表明此剂量作用明显)。继续培养 36 h, 提取两组细胞的 RNA。

1.3 微阵列膜制备

1.3.1 微阵列设计: 本实验室前期构建了肝癌组织相对于癌旁组织的 cDNA 抑制性消减文库^[4], 取其

中 504 个为检测基因, 另设 1 个参考点 (GAPDH 基因), 共计 505 个点。

1.3.2 微阵列制作: 使用自行开发的 Microarray III 型点样仪 (专利号: 1322609) 制作微阵列 (膜尺寸: 2.7 cm×3.6 cm)。

1.4 探针制备

1.4.1 RNA 提取: 依照 TRIzol 试剂 (购自美国 Invitrogen 公司) 的方法提取细胞 RNA。并分别利用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测 RNA 的完整性及质量。

1.4.2 mRNA 纯化: 按 mRNA 纯化试剂盒 (PolyATtract® mRNA Isolation Systems III, 购自美国 Clontech 公司) 的说明书进行。纯化后用紫外分光光度计检测 mRNA 浓度, 并计算 mRNA 产率。

1.4.3 反转录: 取 2 μg mRNA 加入 1 μL Oligo (dT)₁₈ (1 μg/μL, 购自上海生工生物公司), 按照 AMV 反转录酶 (购自美国 Promega 公司) 的说明进行反转录。

1.4.4 探针标记: 取 3 μL cDNA 加入 3 μL ddH₂O 混合, 95 °C 热变性 5 min, 然后立即冰浴 3 min。加入 3 μL RP Mix (购自美国 Clontech 公司), 1 μL Klenow 酶 (4 U/μL, 购自美国 Clontech 公司), 于 37 °C 水浴过夜。

1.5 微阵列膜杂交、洗涤、显影

1.5.1 杂交: 65 °C 预杂交 30 min, 加入探针于 65 °C 杂交 16 h。

1.5.2 洗涤: 2×SSC/0.5% SDS 和 0.2×SSC/0.5% SDS 各洗 2 次, TNT 溶液洗 1 次。

1.5.3 显影: 加封阻液 37 °C 温浴 30 min; 加入抗体 (购自美国 Roche 公司) 37 °C 温浴 30 min; TNT 溶液洗 2 次; 加显色剂 (购自美国 Roche 公司) 显色 2 h; 显色结束用 1×PBS 终止反应。

1.6 图像分析: 将微阵列杂交膜上的杂交信号扫描

收稿日期: 2005-12-03

基金项目: 天津市科委重点项目 (003803411)

作者简介: 王顺启 (1978—), 男, 博士, 讲师, 主要从事天然药物抗癌机制研究。

* 通讯作者 陈 力 Tel: (022) 23500208 Fax: (022) 23497010 E-mail: lichen16@eyou.com

入计算机,用软件 Chip-8. 25 对杂交信号结果进行数字化检测与分析。

2 结果

2.1 RNA 及 mRNA 质量:用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测表明 RNA 质量很高。如图 1 所示,28 S 与 18 S 能够达到 2:1,5 S 比较弱,mRNA 比较完整。RNA、mRNA 在 260、280 nm 的吸光度(A)比值比较理想 (RNA $A_{260nm}/A_{280nm}=2.0$, mRNA $A_{260nm}/A_{280nm}=2.0$); mRNA 产率 4.0%。

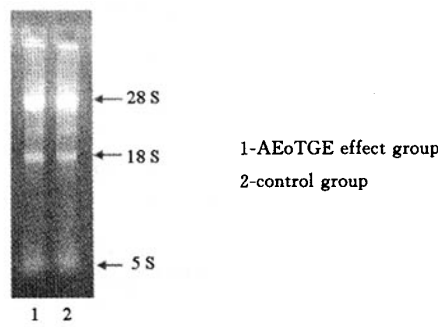


图 1 RNA 的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoretogram of RNA

2.2 微阵列稳定性验证:将肝癌细胞系 SMMC-7721 细胞培养 36 h 后提取的 mRNA 反转录为 cDNA,利用随机引物法检测记 cDNA 为检测探针,随后与两张微阵列膜进行平行杂交,微阵列杂交结果如图 2 所示。在对数据进行分析时,分别以相对灰度值相差 1.5、2.0、2.3、3.0 倍为评判阳性标准,对所构建的微阵列膜的稳定性(假阳性率)进行统计(表 1)。

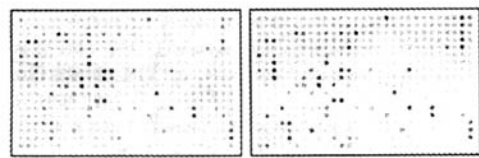


图 2 微阵列膜平行杂交

Fig. 2 Parallel hybridization on microarray membrane

表 1 不同标准下的假阳性率

Table 1 False positive rate under different standards

差异倍数	阳性点个数	假阳性率/%
1.5	96	19.01
2.0	17	3.37
2.3	12	2.38
3.0	6	1.19

2.3 杂交结果:将培养 36 h 后的对照组细胞和独角莲组细胞的 mRNA 分别反转录成 cDNA 后,用随机引物标记法进行标记,分别与微阵列膜杂交,进

行洗膜和显色反应。其杂交结果如图 3 所示。将重复杂交实验结果进行数据分析,以基因表达变化在 2.3 以上为差异表达的标准;比较两次数据,当两次杂交实验中差异都在 2.3 以上时假阳性率降低至不足 0.06% ($2.38\% \times 2.38\%$)。此时的结果表明:共有 18 个基因的表达发生明显变化,其中 16 个基因表达上调,2 个基因表达下调。具体基因及其相关功能如表 2 所示。

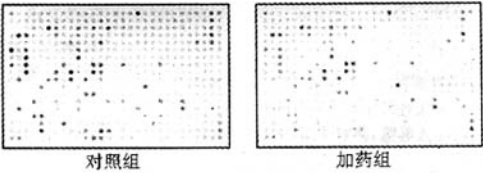


图 3 肝癌细胞 cDNA 与微阵列膜杂交

Fig. 3 Hybridization on microarray membrane by hepatocarcinoma cells cDNA

表 2 独角莲提取物作用肝癌细胞 SMMC-7721 36 h 后差异表达的基因

Table 2 Differentially expressed genes in SMMC-7721 cells treated by *T. giganteum* extract for 36 h

克隆编号	基因名称	表达变化
1-20	真核转录延伸因子, (eukaryotic translation elongation factor 1)	上调
1-53	血清淀粉样蛋白 A (human serum amyloid A, SAA)	上调
1-58	纤维蛋白原 γ 多肽 (fibrinogen gamma polypeptide, FGG)	上调
1-63	造血干细胞相关基因 (hematopoietic stem and progenitor cell 126, HSPC126)	下调
2-23	铁蛋白重链多肽 1 (ferritin heavy polypeptide 1, FTH1)	上调
2-31	微粒体环氧化物酶 1 (microsomal Epoxide Hydrolase 1, mEH1)	下调
2-101	线粒体基因 (mitochondrion gene)	上调
2-107	补体因子 B (complement factor B)	上调
3-31	ATP 合成酶 F_0 亚单位 6 (ATP synthase F_0 subunit 6, APT 6)	上调
3-74	蛋白酶体亚单位 $\alpha 5$ (proteasome subunit alphas 5, PSMA5)	上调
4-5	线粒体 NADH 脱氢酶辅酶 Fe-S 蛋白亚单位 (mitochondrial NADH dehydrogenase-ubiquinone Fe-S protein 8)	上调
4-7	血清淀粉样蛋白 A1 (human serum amyloid A1, SAA1)	上调
4-15	细胞色素 C 氧化酶 II (cytochrome C oxidase subunit II)	上调
5-26	富含组氨酸的糖蛋白 (histidine-rich glycoprotein, HRG)	上调
7-67	Cu/Zn 超氧化物歧化酶 (Cu/Zn superoxide dismutase, SOD1)	上调
7-76	ATP 合成酶 F_1 复合体 α 亚单位 (ATP synthase H^+ transporting, mitochondrial F_1 complex, alpha subunit)	上调
8-65	假定蛋白 DKFZp564K0822 (hypothetical protein DKFZp564K0822)	上调
10-28	造血干细胞相关基因 134 (hematopoietic stem and progenitor cell 134, HSPC134)	上调

3 讨论

3.1 肝癌相关基因微阵列:本实验所用肝癌相关基因微阵列的支持载体为尼龙膜,与目前商售基因微阵列(高密度的又称基因芯片)相比,具有成本低廉,操作与检测简单,不需要昂贵的荧光分析系统等优点。目前商售基因芯片主要以密度差异 2 倍为基因差异表达的标准,差异大于 2 倍的基因被认为表达水平是有明显差异的。本研究所用微阵列的假阳性率如表 1 所示,当差异倍数为 2.0 时,假阳性率为 3.37%,略高于商售芯片的假阳性率($\leq 3\%$)^[5]。当差异倍数定为 2.3 时,假阳性率为 2.38%,低于文献通常报道的 2.5% 的假阳性率。多次实验结果表明假阳性点的出现具有随机性,两次重复试验假阳性率不到 0.06%,可确保差异表达基因的结果可靠。

3.2 独角莲作用后表达下调的基因:微粒体环氧化物酶(microsomal epoxide hydrolase, mEH)是下调基因中的一个。mEH 是癌变的诱因之一:在原发性肝癌细胞培养中 mEH 水平受普通化学诱导的影响;在啮齿动物中,原发性化学物可诱导 mEH 的高表达;在敲除 mEH 的动物模型实验中,致癌物对动物的致癌性明显减弱^[6]。mEH 底物广泛,参与化学致癌剂、诱变剂及抗癌药物的代谢,与癌细胞的抗药性有关,表达下调可增加癌细胞对抗癌药物的敏感性,增强抗癌药物对癌细胞的生长抑制作用^[6,7]。

另一个下调的基因是造血干细胞相关基因 126(hematopoietic stem and progenitor cell 126, HSPC 126),该基因是研究造血干细胞时分离出来的,其具体功能还有待进一步的研究。

3.3 独角莲作用后表达上调的基因:上调基因中的部分属于急性期反应蛋白,如纤维蛋白原(γ 多肽),血清淀粉样蛋白 A,血清淀粉样蛋白 A1,补体因子 B 等,这些蛋白的上调是细胞培养时加入异源物质后,细胞应答的一种表现。

上调基因中的部分属于能量代谢相关基因,主要是线粒体相关的许多基因。线粒体上的呼吸链和磷酸化系统由 5 个复合体构成:NADH 泛醌/辅酶 Q 氧化还原酶,琥珀酸盐/琥珀酸脂辅酶氧化还原酶,辅酶细胞色素 C 氧化还原酶,细胞色素 C 氧化酶和 ATP 合成酶;每一个复合体由多个酶体亚单位构成^[8]。其中有多个复合体的亚单位的基因表达上调,推测是由于独角莲将肝癌细胞阻抑在细胞周期的 S 期^[3],细胞需要较多能量用于合成代谢所致。Cu/Zn 超氧化物歧化酶表达升高可能与氧化代谢旺盛产生大量氧自由基有关^[9]。

上调基因中的部分属于蛋白代谢相关基因,如与蛋白质降解相关的蛋白酶体亚单位 α ,与 Fe 代谢、血红蛋白代谢及抗缺氧相关的铁蛋白重链多肽,与蛋白质合成相关的真核翻译延伸因子 1 等。这些基因的上调与独角莲阻滞癌细胞生长于 S 期具有相关性。

独角莲在将肝癌细胞阻抑在 S 期的同时,还诱导了细胞凋亡的发生^[3]。本研究中发现与代谢相关多个基因表达升高,如细胞色素 C 氧化酶 III 等,推测独角莲阻滞肝癌细胞于细胞周期 S 期和诱导肝癌细胞凋亡之间存在两种可能:一是将肿瘤细胞阻抑在 S 期,延长了 DNA 检查和修复时间,启动细胞凋亡机制;另一种可能是由于细胞被阻滞在 S 期后,代谢相关基因的长时间高表达,细胞内氧化损伤加重,引起细胞凋亡机制的激活。这些推测还需要今后进一步的研究给予验证。

独角莲诱导一些基因表达上调的同时,还抑制了一些基因的表达,这为独角莲影响肝癌细胞的多基因表达提供了有力证据;独角莲作用肝癌细胞 SMMC-7721 后,肝癌细胞生长被阻滞于 S 期,并被诱导发生细胞凋亡^[3],与本研究中发现的基因表达改变具有密切关系。本研究中发现的这些差异表达基因不仅为今后进一步研究独角莲作用肝癌细胞的分子机制提供了具体的线索;而且还可将这些差异表达的基因作为独角莲作用的效应基因,用于独角莲有效成分的筛选鉴定研究。

References:

- [1] Sun S F, Zeng Y, Zhao W C. Studies on the restrain of *Typhonium giganteum* Engl to malignant tumors [J]. *Tradit Chin Med Res* (中医研究), 1998, 11(6): 8-10.
- [2] Yin J Y, Pu C J, Yang J Z, et al. Studies on the restrain of Yu Bai Fu (*Typhonium giganteum* Engl) to tumors (I) [J]. *J Changchun Coll Tradit Chin Med* (长春中医学院学报), 2000, 16(2): 52-53.
- [3] Wang S Q, Ni H, Wang J, et al. Studies on the proliferation restrain of *Typhonium giganteum* Engl to Hepatocarcinoma Cell SMMC-7721 [J]. *Chine J Cell Biol* (细胞生物学杂志), 2003, 25(3): 185-188.
- [4] Wang S Q, Feng Z N, Liu G H, et al. Generation and analysis of a differentially express genes cDNA library of human primary hepatocellular carcinoma [J]. *Acta Sci Nat Univ Nankai: Nat Sci* (南开大学学报: 自然科学版), 2005, 38(4): 115-118.
- [5] Li Y, Qiu M Y, Wu C Q, et al. Detection of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma using DNA microarray [J]. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 2000, 27(12): 1042-1048.
- [6] Fretland A J, Omiecinski C J. Epoxide hydrolases: biochemistry and molecular biology [J]. *Chem Biol Interact*, 2000, 129(1-2): 41-59.
- [7] Murray G I, Paterson P J, Weaver R J, et al. The expression of cytochrome P-450, epoxide hydrolase and

- glutathione S-transferase in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer*, 1993, 71(1): 36-43.
- [8] Hyslop S J, Duncan A M, Pitkanen S, *et al*. Assignment of the PSST Subunit Gene of Human Mitochondrial Complex I to Chromosome 19 p13 [J]. *Genomics*, 1996, 37(3): 375-380.
- [9] Yoo H Y, Chang M S, Rho H M. Heavy metal-mediated activation of the rat Cu/Zn superoxide dismutase gene via a metal-responsive element [J]. *Mol Gen Genet*, 1999, 262(2): 310-313.

参麦注射液对休克大鼠肝脏 I- κ B α 和白细胞介素-18 mRNA 表达的影响

刘淑杰¹, 李洪岩², 吕文伟³, 袁兆新², 孙连坤^{2*}

(1. 白求恩医科大学 制药厂, 长春 吉林 130012; 2. 吉林大学基础医学院 病理生理学教研室, 吉林 长春 130021; 3. 吉林大学基础医学院 药理学教研室, 吉林 长春 130021)

肠黏膜在机体受到如失血性休克等严重损伤时, 正常的机械屏障结构或功能受损造成细菌移位, 细菌和毒素通过门脉循环后, 首先损伤肝细胞, 引起肝组织严重损伤和功能障碍^[1]。

人参和麦冬是我国经典中药, 对机体有着明显的保护作用, 具有毒性低等特点, 较易进入组织发挥作用。近些年的研究发现人参和麦冬合剂具有提高机体免疫力、降低血脂、保护细胞的功能。本实验建立大鼠“双击”模型(失血性休克+内毒素), 藉以模拟临床中病人失血性休克后发生的细菌移位过程, 通过测定血清中 NO 和一氧化氮合酶(NOS)水平和肝组织中 I- κ B α 和白细胞介素-18(IL-18) mRNA 的表达, 探讨参麦注射液的抗休克作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器: 参麦注射液(正大青春宝制药有限公司生产, 批号 031236); 大肠杆菌内毒素(LPS)购于 Sigma 公司, 血清型 O₁₁:B₄, 用生理盐水配制。PCR 相关试剂均购于 Takara 公司。

1.2 实验动物分组及模型复制: 健康 Wistar 大鼠, 由吉林大学基础医学院动物室提供, 体重(250±10)g, 雌雄不拘, 随机分为对照组, 模型组, 参麦注射液大、小剂量(14.4、7.2 mg/kg)组, 每组各 5 只。

大鼠用水合氯醛(350 mg/kg) ip 麻醉, 手术分离气管并插管, 分离左侧颈总动脉, 连接四导生理记录仪(日本光电公司)记录平均动脉血压(MAP), 分离左侧股动脉, 连接放血插管。复制失血性休克模型, 10~15 min 内经股动脉放血使 MAP 维持在 40

mmHg, 10 min 内血压不回升, 失血性休克模型建立, 称为“第一次打击”。随即经舌下 iv LPS 1.5 mg/kg, 称为“第 2 次打击”。参麦注射液组在模型建立后舌下 iv 给予参麦注射液, 剂量分别为 7.2、14.4 mg/kg。4 h 后处死动物, 取血分离血清, 并采集肝脏组织冻于液氮。实验过程中动态观察并记录血压变化。

1.3 血清 NOS 活性及 NO 水平的测定: 按 NOS、NO 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所提供, 批号 20030813、20030829)方法操作。

1.4 肝脏组织 I- κ B α 和 IL-18 mRNA 的检测: 参照 Ultraspec™- II RNA Isolation System (Biotecx Laboratories, INC)说明提取肝脏总 RNA, 逆转录成 cDNA, 进行 PCR 反应。I- κ B α 引物序列为正义链: 5'-GACGAGGATTACGAGCAGAT3', 反义链: 5'-GACGAGGATTACGAGCAGAT3', PCR 循环条件为变性 94℃、30 s; 退火 56℃、30 s; 延伸 72℃、45 s。共 35 个循环, PCR 产物为 634 bp。IL-18 引物序列为正义链: 5'-TGGAGACTTGAATCAGACC-3', 反义链: 5'-GGCAAGCTAGAAAGTGTCT-3', PCR 循环条件为变性 94℃、60 s; 退火 56℃、60 s; 延伸 72℃、60 s, 共 35 个循环, PCR 产物为 395 bp。GAPDH 引物序列为正义链: 5'-GGGTGATGCTGGTGTCTGAGTATGT3', 反义链: 5'-AAGAATGGGTGTTGCTGTTGAA-GTC3', PCR 循环条件为变性 94℃、30 s; 退火 58℃、30 s; 延伸 72℃、60 s, 共 25 个循环, PCR 产物为 700 bp。

收稿日期: 2006-01-10

作者简介: 刘淑杰(1964—), 女, 高级工程师, 主要从事药物研究。

* 通讯作者 孙连坤 E-mail: sunlk@jlu.edu.cn