

多罗清泰颗粒对人肝癌细胞株信号转导基因表达的影响

谢佐福¹, 赵 轶^{2*}, 魏 莉¹, 卢 林³, 林 声³, 张君逸⁴

(1. 福建中医学院 中西医结合系, 福建 福州 350003; 2. 东南大学医学院附属江阴医院, 江苏 江阴 214400;
3. 福建省肿瘤医院肿瘤研究所, 福建 福州 350014; 4. 多罗国际科技股份有限公司, 福建 厦门 361009)

摘要:目的 观察多罗清泰颗粒对人肝癌细胞株 SMMC-7721 信号转导基因表达的影响。方法 体内抑瘤实验研究多罗清泰颗粒对小鼠肝癌移植瘤生长的影响; 采用中药血清药理学方法和基因芯片技术, 分析多罗清泰含药血清对人肝癌细胞株 SMMC-7721 信号转导基因表达的影响。结果 多罗清泰颗粒能显著抑制小鼠肝癌移植瘤生长, 抑制率为 63%~67.8%。多罗清泰颗粒对所检测的 99 条信号转导基因中的 68 条基因表达具有显著影响, 占所测基因的 69%。其中, 上调的基因为 42 条, 下调的基因为 36 条。在多罗清泰颗粒小剂量处理组和大剂量处理组之间, SMMC-7721 细胞信号转导基因表达则存在相当大的差异。结论 多罗清泰颗粒能显著抑制肝癌细胞的生长, 显著影响肝癌细胞信号转导基因的表达。

关键词:多罗清泰颗粒; 人肝癌细胞株; 血清药理学; 信号转导基因; 基因芯片

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)05-0720-06

Effect of Duoluoqingtai Granula on expression of sinal transduction gene in human hepatocellular carcinoma cell line

XIE Zuo-fu¹, ZHAO Tao², WEI Li¹, LU Lin³, LIN Sheng³, ZHANG Jun-yi⁴

(1. Department of Integrated Traditional and Western Medicine, Fujian College of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, China; 2. Jiangyin People's Hospital Affiliated of Southeast University, Jiangyin 214400, China; 3. Fujian Tumor Hospital and Fujian Tumor Institute, Fuzhou 350014, China;
4. Duoluo Technology Inc., Xiamen 361009, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Duoluoqingtai Granula (DLQTG) on gene expression in human hepatocellular carcinoma cell line (SMMC-7721). **Methods** Effect of DLQTG on the growth of mice-transplanted hepatocellular carcinoma was studied *in vivo* and on the expression of signal transduction genes of SMMC-7721 cell line with serum pharmacology and microarray. **Results** DLQTG was observed to significantly affect the growth of mice-transplanted hepatocellular carcinoma with inhibition rate from 63% to 67.8%, and the expression of signal transduction genes in 68 of 99 genes detected with up-regulation of 42 genes and down-regulation of 36 genes. There was obvious difference in the expression of signal transduction genes in SMMC-7721 cell line between low and high dosage of DLQTG-treated group. **Conclusion** DLQTG can be used to inhibit the growth of hepatocellular carcinoma and to affect the expression of signal transduction genes in human hepatocellular carcinoma significantly.

Key words: Duoluoqingtai Granula (DLQTG); human hepatic carcinoma cell line; serum pharmacology; signal transduction gene; microarray

多罗清泰颗粒是由女贞子、黄芪、灵芝、蒲公英、红景天、藏红花、半支莲、蛇舌草、茯苓、葛根等多味中药配伍而成的抗癌纯中药制剂。本实验研究多罗清泰颗粒对小鼠肝癌移植瘤的抑制作用, 采用中药血清药理学和基因芯片技术研究了该颗粒对人肝癌细胞株 SMMC-7721 信号转导基因表达的影响, 以

期为其临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物、细胞株、药物及主要试剂: 抑瘤实验用小鼠为 ICR 清洁级小鼠, (20±2) g, 购自福建医科大学动物中心, 合格证号 SGXK(闽)2004-0002; 血清药理学实验用动物为 SD 大鼠, 雄性, (300±20)

收稿日期: 2006-11-02

作者简介: 谢佐福(1957—), 男, 重庆人, 硕士, 主任医师, 福建中医学院中西医结合系教授, 长期从事肿瘤免疫病理、肿瘤耐药的基础研究, 国内外发表论文 40 余篇, 曾获国家发明专利 2 项, 福建省科技奖 3 项。

Tel: (0591) 83637382 13960789839 E-mail: xiezuofo@sina.com; fishlucy@21cn.com

* 通讯作者 赵 轶 E-mail: fishlucy@21cn.com

g,合格证:SCXK(沪)2003—0001;实验动物许可证:福建省医学科学研究所动物房SYXK(闽)2005—0006;细胞株为人肝癌SMMC-7721细胞株,购自中国科学院上海生命科学研究院;药物多罗清泰颗粒由妙一(厦门)生物科技有限公司提供。人信号转导基因芯片为美国Super Array公司生产,能检测99个信号转导相关基因。配制水为蒸馏水。

1.2 抑瘤实验:无菌条件下抽取腹腔保种7~9 d生长旺盛的移植性动物肿瘤小鼠肝癌细胞。用生理盐水稀释成 $2 \times 10^6/\text{mL}$ 的细胞液,每只小鼠于右腋皮下接种肿瘤细胞液0.2 mL,小鼠随机分成5组,每组10~12只。对照组用注射用水20 mg/kg,阳性对照组用环磷酰胺(CTX)20 mg/kg,实验组用多罗清泰颗粒(4、8、16 g/kg),ig给药,连续10 d。于末次给药24 h后分别处死小鼠,称体重和瘤质量,计算抑瘤率。

抑瘤率 $= (1 - \text{给药组瘤质量} / \text{对照组瘤质量}) \times 100\%$

1.3 含药血清的制备:30只SD大鼠随机分成多罗清泰颗粒大、小剂量组,分别按生药量小剂量8 g/kg,大剂量16 g/kg(分别为生物等效剂量的4倍、8倍)ig给药,空白对照组(给等体积NS),每只大鼠给药量均为2 mL,每日1次,连续10 d,末次给药前12 h禁食不禁水,给药后1 h,摘眼球采血,室温静置1 h,4℃冰箱静置待血清析出,无菌分离血清,3 500 r/min,离心15 min。吸取上清液,0.22 μm微孔滤膜滤过除菌。56℃灭活30 min,-20℃冰箱冻存备用。

1.4 细胞样本处理:SMMC-7721肝癌细胞株常规传代培养,取对数生长期细胞,分为对照组、多罗清泰颗粒大、小剂量组,分别加入对照组和大小剂量多罗清泰颗粒组的含药血清,血清终体积分数为10%,加入RPMI-1640完全培养基补充,终体积为5 mL。37℃、5% CO₂孵箱继续孵育48 h收获细胞。调节细胞浓度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 。加入1 mL Trizol细胞裂解液中打匀。

1.5 芯片检测

1.5.1 总RNA提取及鉴定:按照Trizol试剂盒的方法提取细胞总RNA。RNA定量:测吸光度(A)值。用紫外分光光度计测定其在260 nm和280 nm的A值,以确定RNA的纯度。 A_{260}/A_{280} 为 ≥ 1.8 。琼脂糖凝胶电泳可见2条清晰的条带,分别对应28 S和18 S的核糖体RNAs(rRNA),28 S的亮度大概是18 S的2倍。小剂量和大剂量多罗清泰颗粒组总RNA各分为两份,一份用于基因芯片检测,另一份

用于RT-PCR验证。

1.5.2 探针制备、杂交和化学发光法检测:严格按照试剂盒说明书进行。采用Ampolabing-LRP方法,分别将实验标本和对照标本合成生物素标记的cDNA探针(用离心柱纯化标记的cDNA),然后将合成的探针与芯片模进行杂交,采用化学发光法并用X光片感光片记录实验标本和对照标本各自的基因信号表达强弱。取出芯片,放在干净的滤纸上以去除剩余的CPD-Star溶液,而后将其小心地转入干净的塑料袋中,用X-射线底片曝光。实验步骤重复一次。

1.6 数据分析:实验重复2次。结果用X-射线底片记录。使用芯片配套软件对原始数据进行去背景计算以及比较运算。每张芯片都点有阴性对照PUC18DNA和管家基因,包括β-actin, GAPDH, Cyclophilin A和核糖体蛋白L13a。原始数据将首先被减掉背景最小值,继而用管家基因来进行校正,校正后的数据用来进行样品间基因转录的相对丰度分析。实验组与对照组相比,其值 < 0.5 者为基因显著下调,而 ≥ 2 或为N/A者为显著上调。

1.7 RT-PCR验证基因芯片检测结果

1.7.1 cDNA合成:取变性的RNA 0.5 μg,加入5 μL AMV逆转录酶反应体系中,其中引物为随机引物,在37℃、10 min,42℃、30 min,合成cDNA。

1.7.2 引物设计及合成:由上海生工生物工程公司合成。MDR1引物:上游5'-CCCATCATTGCA-ATAGCAGG-3',下游5'-GTTCAA'ACTTCTGCTCCTGA-3',扩增片段为157 bp^[1];MMP-7引物,其序列为上游5'-AGATGTGGAGTGCCAGATGT-3',下游5'-TAGACTGCTACCATCC-GTCC-3',扩增片段365 bp^[2]。Bcl-2引物:上游5'-ATAAGCTGTCGCAGAGGG-3',下游:5'-AAA-GAAGGCCACAATCCTC-3',扩增片段382 bp^[3]。内对照β₂-mG,上游:5'-ACCCCCACTGAAAAA-GATGA-3' (1 543~1 562),5'-ATCTTCAAAC-CTCCATGATG-3',扩增片段为114 bp。

1.7.3 PCR反应体系:为25 μL,包括50 mmol/L MgCl₂ 0.8 μL,10×buffer 2.5 μL,dNTP 2.5 μL,5 pmol混合引物 2.5 μL,Taq DNA聚合酶(5 U/μL) 0.5 μL,cDNA模板 2.5 μL,余量用三蒸水补足混匀,94℃变性40 s,55℃退火40 s,72℃延伸60 s,扩增30个循环。

1.7.4 PCR产物分析:取PCR产物5 μL加1 μL载样缓冲液,在20 g/L琼脂糖凝胶上电泳(65 V,

2 h), 溴化乙锭染色, 紫外灯下观察结果并照相, 底片在光密度扫描仪上扫描定量, 用 MDR₁ cDNA 或 MMP-7 cDNA 或 Bcl-2 cDNA 与 β_2 -mG cDNA 的比值表示 mRNA 的表达水平。

2 结果

2.1 多罗清泰颗粒抑制肝癌移植瘤生长: 多罗清泰颗粒对肝癌移植瘤具有显著的抑制作用, 低、中、高剂量组的抑瘤率分别为 63.0%, 64.9% 和 67.8%, 与 CTX 组相比无显著差异, 3 个剂量组之间比较, 也无显著差异。见表 1。

2.2 差异基因表达的初步分析: 多罗清泰颗粒对所检测的 99 条信号转导基因中的 68 条基因表达具有显著影响, 占所测基因的 69%, 见表 2。其中引起上调的基因为 42 条, 包括 23 个凋亡相关基因, 3 个肿瘤浸润和转移相关基因, 5 个造血功能和免疫功能

表 1 多罗清泰颗粒对小鼠肝癌移植瘤生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effect of DLQTG on growth of hepatocellular carcinoma of mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ (g · kg ⁻¹)	体重/g		瘤质量/ g	抑瘤率/ %
		开始	结束		
对照	—	20.0±0.40	27.9±1.96	1.74±0.35	—
CTX	0.02	19.9±0.30	27.3±1.96	0.55±0.22***	68.5
多罗清泰 颗粒	4	19.0±0.30	27.3±1.66	0.64±0.43***	63.0
	8	20.0±0.00	26.4±2.92	0.61±0.23***	64.9
	16	19.9±0.33	27.0±2.58	0.56±0.30***	67.8

与对照组比较: ***P<0.001

***P<0.001 vs control group

调节基因, 11 个其他基因; 下调的基因为 36 条, 包括 2 个耐药相关基因, 21 个细胞凋亡基因, 5 个造血功能和免疫功能调节基因, 4 个肿瘤浸润和转移相关基因, 4 个其他基因。

表 2 多罗清泰颗粒对人肝癌细胞 SMMC-7721 信号转导基因表达的影响

Table 2 Effect of DLQTG on expression of signal transduction genes in SMMC-7721 cells

基因库序号	基因描述	基因名称	低剂量组信号比值	高剂量组信号比值
NM 000014	alph-2-macroglobulin	A2M1	1.077E-1	3.889E-1
NM 000927	ATP-binding cassette	ABCB1	4.270E-3	3.011E-1
NM 000679	adrenergic, alpha-1B-, receptor	ADRA1B	3.528E-1	无显著变化
NM 005163	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	AKT1	2.617E+0	3.668E+0
NM 001880	activating transcription factor 2	ATF2	无显著变化	3.456E-1
NM 004324	BCL2-associated X protein	BAX	2.075E+0	无显著变化
NM 000633	B-cell CLL/lymphoma 2	Bcl-2	2.533E-1	3.133E-1
NM 004049	BCL2-related protein A1	BCL2A1	2.165E-1	3.199E-2
NM 004536	baculoviral IAP repeat-containing 1	BIRC1	4.097E-2	1.959E-1
NM 001165	baculoviral IAP repeat-containing 3	BIRC3	3.793E-1	1.997E-1
NM 001202	bone morphogenetic protein 4	BMP4	3.590E-1	4.779E-2
NM 007294	breast cancer 1, early onset	BRCA1	3.886E-1	2.212E-1
NM 053056	cyclin D1 (PRAD1; parathyroid adenomatosis 1)	CCND1	无显著变化	4.766E-1
NM 001798	cyclin-dependent kinase 2	CDK2	无显著变化	4.483E-1
NM 000389	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	CDKN2A	无显著变化	4.280E-1
NM 004064	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B	CDKN2B	无显著变化	2.936E-1
NM 078626	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C	CDKN2C	4.338E+0	2.144E+0
NM 001800	cyclin-dependent kinase inhibitor 2D	CDKN2D	无显著变化	2.013E-1
NM 000088	collagen, type 1, alpha 1	COL1A1	2.367E-1	0.000E+0
NM 001891	casein, beta	CSN2	2.162E-1	5.557E-3
NM 002416	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	CXCL9	无显著变化	1.209E-2
NM 001955	endothelin 1	EDN1	2.762E+0	1.314E-1
NM 001426	engrailed homolog 1	EN1	无显著变化	4.618E-1
NM 006209	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2	ENPP2	2.386E+0	2.879E+0
NM 000799	erythropoietin	EPO	2.457E+0	2.775E-2
NM 002026	fibronectin 1	FN1	5.484E+0	7.523E+0
NM 004476	folate hydrolase	FOLH1	无显著变化	2.707E-2
NM 005438	FOS-like antigen 1	FOSL1	无显著变化	1.396E-1
NM 021784	forkhead box A2	FOXA2	2.057E+0	3.230E+0
NM 022475	hedgehog interacting protein	HHIP	无显著变化	4.652E-2
NM 000188	hexokinase 1	HK1	7.406E+0	5.471E+0
NM 002133	heme oxygenase (decycling) 1	HMOX1	N/A	N/A
NM 005526	heat shock transcription factor 1	HSF1	2.969E+0	4.892E+0
NM 002166	inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein	ID2	N/A	N/A
NM 000586	interleukin 2	IL2	2.141E+0	无显著变化

续表 2

基因库序号	基因描述	基因名称	低剂量组信号比值	高剂量组信号比值
NM 000589	interleukin 4	IL4	3.162E+0	4.692E+0
NM 000418	interleukin 4 receptor	IL4R	1.064E-1	1.377E+1
NM 002198	interferon regulatory factor 1	IRF1	5.085E-2	9.183E+0
NM 002228	V-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog	JUN	无显著变化	2.027E+0
NM 005551	kallikrein 2, prostatic	KLK2	6.943E+0	2.795E+2
NM 001648	kallikrein 3, (prostate specific antigen)	KLK3	1.250E+2	5.451E+2
NM 000595	lymphotoxin alpha	LTA	N/A	N/A
NM 021960	myeloid cell leukemia sequence 1	MCL1	3.191E+0	无显著变化
NM 002425	matrix metalloproteinase 10	MMP-10	0.000E+0	2.307E+0
NM 002423	matrix metalloproteinase 7	MMP-7	6.151E-2	2.202E+0
NM 003998	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	NFKB1	3.596E-1	3.001E+0
NM 020529	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	NFKBIA	6.850E+0	6.323E+0
NM 000625	nitric oxide synthase 2A	NOS2A	N/A	N/A
NM 000442	platelet/endothelial cell adhesion molecule	PECAM1	N/A	N/A
NM 000926	progesterone receptor	PGR	N/A	N/A
NM 004881	tumor protein p53 inducible protein 3	TP53I3	4.629E-2	无显著变化
NM 003738	patched homolog 2	PTCH2	7.093E-2	6.292E+0
NM 000963	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	PTGS2	3.420E-1	3.016E+1
NM 006516	solute carrier family 2	SLC2A1	2.158E+0	2.494E+0
NM 001063	transferrin	TF	无显著变化	2.465E+0
NM 020182	transmembrane, prostate androgen induced RNA	TMEPAI	2.929E-2	3.663E-2
NM 000594	tumor necrosis factor	TNF	5.746E+0	0.000E+0
NM 006290	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	TNFAIP3	5.746E+0	3.969E+1
NM 000043	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6	TNFRSF6	5.746E+0	1.132E+1
NM 000043	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6	TNFRSF6	2.804E+0	1.132E+1
NM 003810	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	TNFS10	2.185E+0	2.003E-1
NM 005658	TNF receptor-associated factor 1	TRAF1	3.270E+0	3.760E+0
NM 003376	vascular cell adhesion molecule 1	VCAM1	2.128E-1	0.000E+0
NM 003376	vascular endothelial growth factor	VEGF	3.288E+0	3.982E+0
NM 003882	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	WISP1	无显著变化	6.098E+0
NM 005430	wingless-type MMTV integration site family, member 1	WNT1	6.320E+0	8.976E+0
NM 003391	wingless-type MMTV integration site family, member 2	WNT2	4.435E+0	5.804E+0
NM 015626	SOCS box-containing WD protein SWIP-1	WSB1	无显著变化	3.331E+0
NM 002046	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPD		8.934E-1
NM 001101	actin, beta	ACTB		9.356E-1
NM 012423	ribosomal protein L13a	RPL13A		9.577E-1
	PUC18 Plasmid DNA	PUC18	N/A	N/A
	blank control		N/A	N/A

N/A 表示加药组有表达,对照组无表达,加药组与对照组相比为无穷大

N/A showed gene expression in SMMC-7721 cells treated with DLQTG group but no in control cells. Ratio of former to latter is infinite

多罗清泰颗粒所用剂量不同,对 SMMC-7721 细胞信号转导基因表达的影响则存在相当大的差异。低剂量和高剂量对 36 条信号转导基因影响是一致的,即都显著上调或都显著下调的基因,占表达显著变化基因的 53% (36/68)。高低剂量影响不一致的基因有 32 条,其中,14 条基因表达在低剂量无显著变化,而高剂量组出现显著上调或下调;6 条基因表达在高剂量组无显著变化,而在低剂量组出现显著上调或下调;7 条基因在低剂量组表达显著下降,而在高剂量组则表达升高;4 条基因在低剂量组表达显著升高,而在高剂量组则表达显著下降。

2.3 RT-PCR 验证芯片检测结果:采用 RT-PCR 法检测多罗清泰颗粒低剂量组和高剂量组 Bcl-2、MDR1 和 MMP-7 mRNA 表达水平,结果全部与基因芯片检测结果一致,见图 1。

3 讨论

目前,肝癌的治疗强调综合治疗,中医药是一个重要的组成部分,具有直接抑制肿瘤细胞生长、对放化疗药的减毒增效以及提高病人生存质量等作用。中药以整体观念根据患者的全身特点辩证论治,具有改善临床症状、缩小或稳定瘤体的作用。多罗清泰颗粒是由女贞子、黄芪、灵芝、蒲公英、红景天等多味

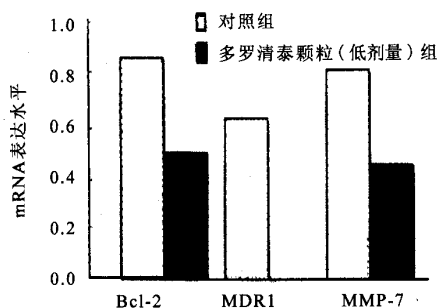


图1 多罗清泰颗粒与对照组 Bcl-2、MDR1、MMP-7 的 mRNA 表达水平比较

Fig. 1 Comparison of mRNA expression level of Bcl-2, MDR1, and MMP-7 between DLQTG group and control group

中药配伍而成,针对人体五脏六腑系统致病因素,运用最新科技量子共振检测仪 QRS,根据量子医学的理论,从人体各种原子及由原子构成的分子和分子团的振动频谱,从原子到分子,从分子到细胞,再从细胞到器官,通过微弱的信号处理,建立正常组织和器官与肿瘤的振动频率进行对比、分析,并使之量化,先分阴阳(后多罗清泰颗粒阴阳值对比为 18:18),后分虚实,归纳为 48 个类象而配成 24 组对药,再依十大恶性肿瘤病理学组成寒、凉、平、温、热等 5 种药性,分别加入引经药而导向十二经络,从而达到治疗癌症的目的。结果表明,多罗清泰颗粒能显著抑制小鼠肝癌移植瘤的生长,其抑制率为 63%~78%,与 CTX 相当。大量研究表明,肝癌的生长涉及大量的细胞增殖或凋亡相关基因表达的异常,是癌细胞增殖大于凋亡的结果。在人类肝癌细胞系 Hep3B 中证明 Bax 表达增高,介导凋亡^[4]。Terada 等^[5]在肝癌中发现有 Bcl-2 的表达,并且观察到 bcl-2 阳性的细胞不表现为凋亡,证明肝细胞癌与凋亡有关。bcl-2 的超表达,抑制了 Bax 蛋白的断裂、细胞色素的释放和细胞凋亡。结果表明,多罗清泰颗粒可使 43 条凋亡基因的表达发生显著性改变,其中使 7 条凋亡诱导或促进基因显著上调,这些基因包括 bax, CDKN2C, HSF1, TNF, TNFAIP3, HK1, KLK2, KLK3, MCL1, NFKBLA 和 SLC2A;使 14 条凋亡抑制基因显著下调,这些基因包括 A2M, bcl-2, bcl2A1, BIRC1, BIRC3, BRCA1, CCND1, CDK, CSN2, EDN1, FOSL1, FOSLH1, ID2, PGR。尽管多罗清泰颗粒同时也显著下调 7 条促凋亡基因的表达,但它对凋亡相关基因表达总的影 响是有利于凋亡的相关基因表达占优

势,这可能是多罗清泰颗粒能抑制肝癌生长的部分机制。

已有研究表明,细胞黏附分子和基质金属蛋白酶在肿瘤转移中起着重要作用,能预测肝癌的转移和进展^[6]。肝癌组织中存在 MMP-7、PECAM1 过表达^[7,8],VECAM 直接或间接参与血管形成,促进肝细胞癌转移和复发^[9]。低剂量多罗清泰颗粒能显著抑制 MMP-7、MMP-10、PECAM1、VECAM 表达,提示可能具有抗肝癌浸润和转移的作用。此外,多罗清泰颗粒也能显著下调多药耐药基因 MDR1 和 HMOX 的表达,显著上调促红细胞生成素(EPO)以及细胞因子基因 IL-2、IL-4 和 LTA,提示多罗清泰颗粒可能具有一定的对肿瘤化疗的减毒增效的作用。

不论是低剂量还是高剂量,多罗清泰颗粒对人肝癌细胞株 SMMC-7721 的部分信号转导基因具有显著的调节作用。总的来说,这种对信号转导基因网络的整体调节作用,总的趋势是有利于抑制人肝癌细胞株 SMMC-7721 的生长,有利于降低其耐药性和浸润及转移潜力。本实验研究还提示,多罗清泰颗粒低剂量比高剂量更好,因为与低剂量相比,高剂量会使更多的促进细胞生长、浸润和转移的基因表达。多罗清泰颗粒的抗癌作用可能部分与其对凋亡信号转导基因表达的调节有关。

值得注意的是,多罗清泰颗粒在低剂量时和高剂量时对 SMMC-7721 信号转导基因的表达存在明显差异。在所检测的 99 条基因中,有近一半的基因表达在低剂量时和高剂量时差异显著,甚至出现表达相反。如低剂量多罗清泰颗粒能抑制 MDR1、MMP-7、MMP-10、PECAM1,而高剂量时这些基因表达出现显著上调。促凋亡基因 TNF 和 TNFSF10 等在低剂量多罗清泰时出现上调,而在高剂量时则出现显著下调。EPO、IL-2 等细胞因子基因在低剂量多罗清泰时出现上调,而在高剂量时则出现下调或无显著变化。这些实验结果提示,随着多罗清泰剂量的增加,可能其减毒增效的作用会降低,而不良反应则会增加。

致谢:广东中山肿瘤防治研究所陈小君教授。

References:

- [1] Noonan K E, Beck C, Holzmayer T A, *et al.* Quantitation analysis of mdr1 (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 7160-7164.
- [2] Yoshimoto M, Itoh F, Yamamoto H, *et al.* Expression of MMP-7 (PUMP-1) in human colorectal cancers [J]. *Int J Cancer*, 1993, 54(4): 614.
- [3] Tilly J L, Tilly K I, Kerton M L, *et al.* Expression of members of the bcl-2 gene family in the immature rat ovary:

- equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-x long messenger ribonucleic acid levels [J]. *J Endoc*, 1995, 136(1): 232-241.
- [4] Mitry R R, Sarraf C E, Wu C G, et al. p53 Induces in Hep3B through up-regulation of bax expression [J]. *Lab Invest*, 1997, 77: 369-378.
- [5] Terada T, Nakanuma Y. Expression of apoptosis, proliferating cell nuclear antigen, and apoptosis-related antigen (bcl-2, c-myc, Fas, Lewis (y) and p53) in human cholangiocarc in omas and hepatocellular carcinomas [J]. *Pathol Int*, 1996, 46: 764-770.
- [6] Zu-hua G, Maria S T, Wen-hua L, et al. Association of E-cadherin, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitors of metalloproteinases with the progression and metastasis of hepatocellular carcinoma [J]. *Mod Pathol*, 2006, 19: 533-540.
- [7] Ozaki I, Mizuta T, Zhao G, et al. Induction of multiple matrix metalloproteinase genes in human hepatocellular carcinoma by hepatocyte growth factor via a transcription factor Ets-1 [J]. *Hepatol Res*, 2003, 27: 289-301.
- [8] Zhang T, Sun H C, Xu Y, et al. Overexpression of platelet-derived growth factor receptor alpha in endothelial cells of hepatocellular carcinoma associated with high metastatic potential [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11: 8557-8563.
- [9] Saito K, Takeha S, Shiba K, et al. Clinicopathologic significance of urokinase receptor and MMP-9-positive stromal cells in human colorectal cancer functional multiplicity of matrix degradation on hematogenous metastasis [J]. *Int J Cancer*, 2000, 86(1): 24.

小檗碱对胰岛素分泌缺陷型糖尿病大鼠葡萄糖激酶相关糖代谢的影响

荣太梓, 陆付耳*, 陈 广, 徐丽君, 王开富, 邹 欣

(华中科技大学同济医学院附属同济医院中西医结合研究所, 湖北 武汉 430030)

摘要:目的 探讨小檗碱对胰岛素分泌缺陷型糖尿病大鼠肝脏葡萄糖激酶(GK)相关糖代谢的影响。方法 观察小檗碱对实验性胰岛素分泌缺陷型糖尿病大鼠空腹血糖、血清胰岛素(INS)、糖原、肝脏乳酸(LA)、GK活性及其蛋白表达的影响。结果 与模型组比较,小檗碱组大鼠血清空腹血糖水平明显降低,而INS、肝脏LA无明显变化,肝糖原合成增多、GK活性及其蛋白表达明显增高。结论 小檗碱能调节胰岛素分泌缺陷型糖尿病大鼠糖代谢,这可能与促进GK活性及其蛋白表达有关。

关键词:小檗碱; 胰岛素分泌缺陷; 葡萄糖激酶; 糖原

中图分类号:R286.72

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)05-0725-04

Effect of berberine on glucokinase and its related glucose metabolism in rats with insulin-secretion deficiency

RONG Tai-zi, LU Fu-er, CHEN Guang, XU Li-jun, WANG Kai-fu, ZOU Xin

(Institute of Integrative Traditional Chinese and Western Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: Objective To study the effect of berberine on glucose metabolism in rats with insulin-secretion deficiency. **Methods** The fasting blood glucose (FBG) was observed before and after treatment, insulin (INS), hepatic glycogen, lactic acid (LA), and the activity of hepatic glucokinase (GK) were detected after two weeks of treatment. At the same time the protein expression of hepatic GK was determined using Western blotting. **Results** In comparison with the model control, the FBG level of berberine group was obviously lowered, and the levels of hepatic glycogen and GK significantly were raised, while the level of INS and hepatic LA showed no evident difference. **Conclusion** It is suggested that berberine has the significant effect on improving glucose metabolism in rats with insulin-secretion deficiency, which might be closely correlated with the effects on activating the activity and the expression of GK that is a key enzyme of glucose metabolism.

Key words: berberine; insulin secretion deficiency; glucokinase (GK); glycogen

收稿日期:2006-09-14

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30472254)

作者简介:荣太梓(1979—),男,河北唐山市人,硕士,从事中西医结合临床与科研工作。

Tel: (027) 83663304 (027) 63991563 E-mail: tz_r2006@yahoo.com.cn

* 通讯作者 陆付耳 Tel: (027) 83662220 E-mail: felu@tjh.tjmu.edu.cn