

臭牡丹总黄酮抑制小鼠 Lewis 肺癌实体瘤及其与 p53、bcl-2、bax 表达相关性研究

陈思勤 朱克俭 李勇敏 周 坚

(湖南省中医药研究院附属医院,长沙,410006)

摘要 目的:探讨臭牡丹总黄酮对 Lewis 肺癌小鼠的抑瘤作用及其与 p53、bcl-2、bax 基因表达的相关性。方法:取近交系雄性 C57BL/6 小鼠 50 只,造模,将造模成功的 Lewis 肺癌小鼠 40 只随机分成模型组,顺铂组,臭牡丹总黄酮高、低剂量组;另取 10 只无瘤小鼠作为空白对照组。腹腔注射给药,模型组给予生理盐水 0.01 mL/g,连续 14 d;顺铂组给予顺铂 0.4 mg/kg 连续 5 d;臭牡丹高、低剂量组分别予臭牡丹总黄酮提取物 0.6 g/kg、0.3 g/(kg·d),连续 14 d。给药结束后次日处死小鼠,称取瘤重,计算肿瘤抑制率,采用 Real-time PCR 法检测 p53、bcl-2 及 bax mRNA 的表达水平。结果:1)对瘤重影响:4 组瘤重结果如下($\bar{x} \pm s$):模型组(4.70 ± 1.29)g、顺铂组(2.24 ± 0.68)g、总黄酮高剂量组(3.26 ± 1.06)g、总黄酮低剂量组(3.99 ± 1.31)g;其中顺铂组、总黄酮高剂量组瘤重低于模型组($P < 0.05$),并且该 2 组瘤重无统计学意义($P > 0.05$)。2)肿瘤抑制率:顺铂组;53.4%;臭牡丹总黄酮高剂量组;30.6%,臭牡丹总黄酮低剂量组;15.1%。3)对基因表达影响:臭牡丹总黄酮高、低剂量组皆能上调 p53 和 bax mRNA 表达(高剂量组 $P < 0.01$,低剂量组 $P < 0.05$);顺铂组能下调 bcl-2($P < 0.05$)及上调 bax mRNA 表达($P < 0.01$)。结论:臭牡丹总黄酮能够改善 Lewis 肺癌小鼠生存状况,能有效抑制肿瘤生长;并且其抑制肿瘤生长的分子机制可能与上调 p53 和 bax mRNA 的表达以诱导肿瘤细胞凋亡有关。

关键词 臭牡丹;黄酮;Lewis 肺癌;Real-Time PCR

Inhibition Effect of Clerodendrum Bungei Flavonoids on Lewis Rats' Lung Tumor and its Correlation to the Expression of p53, bcl-2, and bax Gene

Chen Siqin, Zhu Kejian, Li Yongmin, Zhou Jian

(Affiliated Hospital of Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410006, China)

Abstract Objective: To explore the effect of clerodendrum bungei steud flavonoids (CBSF) on mice with Lewis lung cancer and its correlation to the expression of p53, bcl-2, and bax. **Methods:** To select 50 C57BL/6 male mice, after modelling, choose 40 with Lewis lung cancer and randomly divided them into four groups: model group, DDP group, CBSF high dose group, CBSF low dose group (with 10 in each), and 10 healthy mice into blank group. Drug administration: model group: intraperitoneal injection of physiological saline 0.01 mL/g for 14 days; DDP group: intraperitoneal injection of DDP 0.4 mg/kg for 5 days; CBSF high dose group: intraperitoneal injection of CBSF 0.6 g/kg for 14 days; CBSF low dose group: intraperitoneal injection of CBSF 0.3 g/kg for 14 days. Execute all mice after the medication, then weight up the tumors and calculate the tumor inhibition rate. Besides, using real-time PCR method to detect the expression of p53, bcl-2 and bax. **Results:** 1) The effect on tumor weight ($\bar{x} \pm s$). The tumor weight of four groups are as follow: model group (4.70 ± 1.29)g, DDP group (2.24 ± 0.68)g, CBSF high dose group (3.26 ± 1.06)g, CBSF low dose group (3.99 ± 1.31)g. The tumor weight of DDP group and CBSF high dose group are lighter than that of the model group ($P < 0.05$). Besides, there is no significant difference between these two groups ($P > 0.05$). 2) The tumor inhibition rate (IR). The IR of DDP group is 53.4%, CBSF high dose group is 30.6%, and CBSF high dose group is 15.1%. 3) The effect on gene expression. Both CBSF groups can up-regulate the expression of p53 mRNA and bax mRNA ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); DDP group can down-regulate the expression of bcl-2 mRNA ($P < 0.05$) and up-regulate the expression of bax mRNA ($P < 0.01$). **Conclusion:** Clerodendrum bungei flavonoids can improve the living quality of Lewis lung cancer mice and inhibit growth of tumor. Its antineoplastic mechanisms might be up-regulation of the expression of p53 mRNA and bax mRNA and induce apoptosis of tumor.

Key Words Clerodendrum bungei; Flavonoids; Lewis lung cancer; Real-Time PCR

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.06.002

臭牡丹(Clerodendrum Bungei Steud)性平,味辛、苦,功能祛风除湿、解毒散瘀^[1]。作为治疗肿瘤

的常用中药,临床多年来广泛用于多种肿瘤尤其是肺部肿瘤的治疗,取得了较好的临床疗效^[2-5],为

此,笔者采用动物实验对其总黄酮提取物抗实体瘤作用进行了初步研究,结果报道如下。

1 材料

1.1 细胞株及动物 Lewis 肺癌细胞株;近交系 C57BL/6 雄性小鼠 60 只,体重(18±2)g,4 周周龄。

1.2 主要试剂及药物 TRIZOL 试剂:Invitrogen; SYBR Green qPCR Mix:TOYOBO;DEPC:Amresco;反转录试剂盒:美国 Fermentans 公司;三氯甲烷:上海化学试剂公司;异丙醇:上海化学试剂公司;无水乙醇:上海化学试剂公司;顺铂:规格:10 mg,山东齐鲁制药,批文号:国药准字 H20023460,批号:1110381DB。

臭牡丹总黄酮:由湖南省中医药研究院附属医院中药房提供臭牡丹生药,经湖南省中医药研究院中药研究所提取,总黄酮含量 65%,1 g 相当于生药 30 g,批号:20130720。

2 实验方法

2.1 Lewis 肺癌模型建立 将细胞浓度已调整至 1×10^7 /mL 的 Lewis 肺癌细胞悬液摇匀,接种至 5 只 C57BL/6 小鼠右侧腋下皮下,每只 0.2 mL。14 d 待肿瘤充分生长后(约 2.5 cm × 2.5 cm 大小)处死小鼠,在超净工作台上完整剥离右侧腋下瘤体,放置于培养皿内,用无菌生理盐水冲洗 2 遍后用 PBS 液冲洗 2 遍,取生长较好的鱼肉样组织约 4 g,放入 200 目过滤筛中,加少量 PBS 液,充分研磨 3 遍,将细胞悬液浓度调整至 1×10^7 /mL,使用台盼蓝染色观察,用细胞计数板记录活细胞数量(活细胞数量须大于 95%),并迅速接种至 50 只 C57BL/6 小鼠右侧腋下皮下,每只 0.2 mL,造模过程要求在 1 h 之内完成。

2.2 分组及给药 接种肿瘤 7 d 后,观察并选择接种肿瘤成功小鼠 40 只,随机分为模型组,顺铂阳性对照组,臭牡丹高剂量组和臭牡丹低剂量组 4 组,每组 10 只,另取正常小鼠 10 只作为空白对照组。分组后开始腹腔注射给药,给药剂量根据人体表面积折合法计算。模型组:生理盐水 0.01 mL/g,连续 14 d;顺铂组:顺铂 0.4 mg/kg 连续 5 d;臭牡丹高剂量组:总黄酮提取物 0.6 g/kg(相当于成人 1 日口服量 30 g 臭牡丹生药的 5 倍剂量,用生理盐水稀释),连续 14 d;臭牡丹低剂量组:总黄酮提取物 0.6 g/kg(相当于成人 1 日口服量 30 g 臭牡丹生药的 2 倍剂量,用生理盐水稀释),连续 14 d。

2.3 观察指标与检测

2.3.1 肿瘤抑制率 给药完毕 24 h 后处死小鼠,在无菌操作下,完整剥离肿瘤瘤体,称取瘤重,肿瘤

生长抑制率(IR) = (1 - 实验组平均瘤重/对照组平均瘤重) × 100%。

2.3.2 Real-time PCR 法检测肿瘤 bcl-2、bax 和 p53 mRNA 的表达 RNA 提取:取生长良好的肿瘤组织 100 mg 入 1 mL Trizol 试剂,将组织置于冰上充分匀浆,细胞用移液枪轻轻吹打;将匀浆组织标本加入 EP 管中,剧烈震荡 30 s,静置 5 min;加入 0.2 mL 氯仿,充分混匀,室温静置 5 min;离心:4 °C,12 000 r/min,15 min;吸去上清液,转入新的 1.5 mL EP 管中,加入 0.5 mL 异丙醇,混匀,放置于 4 °C 冰箱 10 min;离心:4 °C,12 000 r/min,10 min;去上清液,留取沉淀,加入 1 mL 75% 乙醇(预冷),震荡洗涤 RNA 沉淀;离心:7 500 r/min,5 min;尽量吸去上清液,空气干燥 10 min;加入 20 μL 的 DEPC 水溶解。

检测 RNA 的完整性:1.5% 琼脂糖电泳:将琼脂糖 0.45 g + 0.5 × TBE 30 mL,用微波炉中火沸腾 2 次,防止挥发,融化的琼脂糖常温冷却至 60 °C 时加入 10 mg/mL 溴化乙锭(EB) 1.5 μL(含量为 0.5 μg/mL),充分混匀,将温热的凝胶倒入已置好梳子的胶膜中,在室温下放置 30 ~ 45 min;电泳槽中加入足量的 0.5 × TBE,垂直拔除梳子,琼脂糖凝胶放入电泳槽中,液面浸过胶 1 ~ 2 mm,点样,取 3 μL RNA,1 μL 6 × 溴酚蓝 buffer 在透明胶上混匀点样,开启电源,电压为 100V,电泳时间 15 min,后置于凝胶图像成像分析仪下扫描,若可见 28 s,18 s 条带,表示 RNA 完整。

消化 RNA 中的 DNA:总体积 100 μL(RNA 17 μL、DNase 3 μL、Rnase inhibitor 3 μL、10 × PCR Buffer 10 μL、25 mmol/L MgCl₂ 33 μL),步骤如下:37 °C 水浴 1 h;加等体积苯酚 50 μL 和氯仿 50 μL 抽提一次;4 °C,12 000 r/min,离心 10 min;取上清液,置于小 EP 管中,加 200 μL 异丙醇,充分混匀,放置 10 min;4 °C,12 000 r/min,离心 10 min;弃上清液,加 75% 乙醇 0.5 mL,充分溶解;4 °C,7 500 r/min,离心 5 min,弃乙醇,室温干燥 10 min,加入 20 μL DEPC 水,冰上放置 30 min, -20 °C 保存。

逆转录反应(cDNA 合成):将 1 μL Oligo dT (0.5 μg/μL)和 5.0 μg Total RNA 加入到 PCR 小管中,补充 DEPC 处理水至 12 μL;混匀后离心,65 °C 温浴 5 min,立即置于冰上;比例设置:5 × Reaction Buffer 1 μL、RNase Inhibitor 1 μL、Antisense 1 μL、10 mM dNTPs 10 μL、Reverse Transcriptase 7 μL、Total volume 20 μL(在 42 °C 反应 1 h,后在 70 °C 水浴锅中水浴 10 min 使 Reverse Transcriptase 失活)混匀,短

暂离心;cDNA 置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

Real-Time PCR 扩增:引物合成与设计:参照 GenBank 上的 bax、bcl-2、p53 及 GAPDH 基因序列,使用 Primer Premier 5.0 软件设计 PCR 扩增引物,并在 GenBank 上进行 BLAST 比对检测其特异性。如表 1。

表 1 引物设计表

名称	引物设计	片段长度
p53	Sense 5' GCACATGACCGAGGTCGTGAGA 3'	260bp
	Antisense 5' GGTAAGGATAGGTCGGCGGTTTC 3'	
bcl-2	Sense 5' TCGTACCCTCGTGACTTCGC 3'	273bp
	Antisense 5' GCATCCCAGCCTCCGTTATCC 3'	
bax	Sense 5' CCAGGATGCGTCCACCAAGAA 3'	197bp
	Antisense 5' CAAAGTAGAAGAGGGCAACCAC 3'	
GAPDH	Sense 5' CCTCAACCTCGGTGTGAACG 3'	233bp
	Antisense 5' CTCGCTCCTGGAAGATGGTG 3'	

反应体系:cDNA $1\text{ }\mu\text{L}$ 、Sense $1\text{ }\mu\text{L}$ 、Antisense $1\text{ }\mu\text{L}$ 、 $2\times\text{SYBR Green qPCR Mix } 10\text{ }\mu\text{L}$ 、 $\text{H}_2\text{O } 7\text{ }\mu\text{L}$ 、Total $20\text{ }\mu\text{L}$ 。

反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3 min 一个循环, ($95\text{ }^{\circ}\text{C } 15\text{ s}$, $62\text{ }^{\circ}\text{C}$ (p53)、 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (bcl-2)、 $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ (bax) 30 s , PCR 仪采集荧光信号) 40 个循环。

数据分析:采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法对 Real-Time PCR 结果进行数据分析: $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{目的基因}} - \text{Ct}_{\text{内参基因}}$; $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{给药组}} - \Delta\text{Ct}_{\text{对照组}}$; 差别倍数 $= 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, 其中模型组的数值均为 1; $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 数值若大于 1 则说明该目的基因较模型组上调, 若小于 1 则说明该目的基因较模型组下调。

2.4 统计学处理 使用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计分析, 计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较若方差齐则用单因素方差分析, 方差不齐则用秩和检验。

3 结果

3.1 臭牡丹总黄酮对 Lewis 肺癌实体瘤小鼠肿瘤生长抑制作用 顺铂组、臭牡丹总黄酮高剂量组瘤体重量均低于模型组 ($P < 0.05$), 其中顺铂组较模型组瘤重差异最为明显 ($P < 0.01$); 臭牡丹低剂量瘤重较模型组稍低, 但 $P > 0.05$; 多重比较中臭牡丹总黄酮高剂量瘤重组较顺铂组无统计学意义 ($P = 0.259$), 提示两药抑制肿瘤效果近似, 臭牡丹总黄酮对 Lewis 肺癌移植瘤具有明显抑制作用, 其中高剂量组抑瘤率为 30.6% 。见表 2。

3.2 臭牡丹总黄酮对 Lewis 肺癌小鼠 p53、bcl-2 和 bax mRNA 表达的影响 如表 3 所示, 相较模型组, 臭牡丹总黄酮高剂量组 p53、bax mRNA 的表达水平

显著上调, 并且低剂量组 p53、bax mRNA 的表达水平明显上调, 而这 2 组的 bcl-2 mRNA 表达水平有下调趋势, 但 $P > 0.05$; 顺铂组 bax mRNA 的表达水平显著下调, bcl-2 mRNA 表达水平也明显下调, 但 p53 mRNA 的表达水平下调趋势不明显。

表 2 各组 Lewis 肺癌实体瘤小鼠瘤重及肿瘤抑制率 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(n)	瘤重(g)	抑瘤率(%)
模型组	8	4.70 \pm 1.29	
顺铂组	8	2.24 \pm 0.68 *	53.4%
总黄酮高剂量组	9	3.26 \pm 1.06 **	30.6%
总黄酮低剂量组	8	3.99 \pm 1.31	15.1%

注:与模型组相比: * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$ 。

表 3 各组 Lewis 肺癌小鼠 p53、bcl-2、bax mRNA 含量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	p53 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$	bcl-2 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$	bax $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$
模型组	1	1	1
顺铂组	1.094 \pm 0.16	0.657 \pm 0.19 *	1.513 \pm 0.22 **
总黄酮高剂量组	2.363 \pm 0.33 **	0.835 \pm 0.12	2.315 \pm 0.17 **
总黄酮低剂量组	1.556 \pm 0.35 *	0.972 \pm 0.11	1.398 \pm 0.25 *

注:与模型组相比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

4 讨论

原发性支气管肺癌(肺癌), 是目前恶性肿瘤肿瘤死亡的主要原因。其中, 非小细胞肺癌占肺癌总人数的 $75\% \sim 80\%$ 。2010 年美国的肺癌新发病例估计有 222 500 例, 因肺癌死亡的有 157 300 例^[6]。中医药治疗是目前中晚期非小细胞肺癌患者的主要方法之一。与化疗相比, 中医药治疗对实体瘤的疗效不及化疗, 但在症状改善和中位生存期方面较化疗有明显优势^[7]。

细胞凋亡是一种细胞内在的程序性自杀机制, 导致细胞可控制的崩解为凋亡小体, 后被周围细胞和吞噬细胞识别并且吞噬。细胞凋亡失调、细胞凋亡机制出现异常, 则细胞无限增殖化而无法坏死凋亡, 导致肿瘤的形成。并且放疗及生物治疗等亦能通过诱导细胞凋亡以达到治疗肿瘤的目的^[8]。细胞凋亡相关基因包括: Fas 受体与 Fas 配体、Caspase 家族、Apaf-1、bcl-2 家族、p53 等。bcl-2 基因是 1985 年 Tsujimoto 等从大多数滤泡型非霍奇金 B 淋巴瘤中发现的原癌基因, 1988 年 Vaux 证实 bcl-2 基因高表达可明显维持细胞存活, 而不影响细胞增殖。其高表达会抑制放、化疗诱导的凋亡; 抑制其表达则可能增加放、化疗敏感性^[9-10]。bax 基因是 1993 年 Oltvai 等从表达 bcl-2 的人 B 细胞系 RLT 中分离出的蛋白质分子, 有研究表明^[11-12] bax 基因表达下调或缺失可导致肿瘤发生, 并与肿瘤放化疗疗效不好相关。p53 基因是定位于 17 号染色体短臂

(17p13.1), 编码分子量 53kd 的和磷酸蛋白。在正常情况下, 细胞中 p53 的含量很低, 在 DNA 损伤或其他条件的刺激下, 细胞中的 p53 含量会增加。当 p53 发生突变后, 则丧失抑癌功能, 转为促进细胞恶变的癌基因。现明确 p53 是细胞生长周期中的负调控因子, 与细胞周期的调控、DNA 修复、细胞分化、细胞凋亡等重要的生物学功能有关, 在抑制癌细胞生长过程中有重要作用^[13]。p53 为 bcl-2 和 bax 的上游调控基因, 可与 bcl-2、Bax 共同作用完成对细胞凋亡的调控, 野生型 p53 可下调 bcl-2 和上调 bax 基因的表达, 从而调控细胞凋亡^[14]。

中医认为, 肺癌的病因主要有外邪侵淫、邪毒壅滞、正气虚弱、脏腑失调、痰湿内结、瘀毒内蕴等。痰瘀邪毒内结, 气阴耗伤, 肺失宣降为其主要病机。故临床多以化痰祛痰, 解毒散结, 益气养阴为治疗原则。欧阳锜研究员^[15]通过长期临床经验和科研实践, 所订制以“解毒抗癌”为主的通用方中, 用于肺癌之清肺解毒方即重用臭牡丹以清热解毒抗癌。潘敏求教授治疗肺癌常用之肺复方中重用臭牡丹, 与白花蛇舌草相配伍清热解毒、散瘀止痛, 以抗癌, 并获得了很好的临床疗效^[16]。有研究^[17-18]对欧阳锜经验方“保肺饮”(重用臭牡丹为君药)进行体内外的抗肿瘤实验观察中, 发现该方剂对新鲜肺鳞癌、恶性淋巴瘤组织细胞具有明显抑制作用; 在体内实验中, 发现该方可以明显减轻三甲基胆蒽诱生大鼠肺癌模型的癌性病变程度、炎症并发及体重下降。

本实验结果说明, 臭牡丹总黄酮能够抑制 Lewis 肺癌小鼠实体瘤生长, 改善实验动物生存状态, 可能是臭牡丹抗肿瘤有效部位之一。其机制可能与上调促细胞凋亡基因 p53 和 bax mRNA 的表达有关。该结果为臭牡丹作为临床应用提供了一定实验实依据。

参考文献

- [1] 谢宗万. 全国中草药汇编[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 730.
[2] 陶炼, 张悦红. 辨证分型治疗非小细胞肺癌术后 49 例临床小结[J]. 湖南中医杂志, 1999, 21(3): 10-11.

- [3] 蒋益兰, 潘博, 仇湘中, 等. 益肺败毒汤治疗中晚期非小细胞肺癌 56 例总结[J]. 湖南中医杂志, 2002, 18(2): 3-5.
[4] 潘博. 潘敏求主任医师治疗肺癌经验[J]. 湖南中医杂志. 2010, 26(3): 44-45.
[5] 周坚, 王其美, 陈思勤. 蒋益兰主任医师治疗肺癌经验[J]. 湖南中医杂志, 2011, 27(1): 30-31.
[6] Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010 [J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60: 277-300.
[7] 张培彤, 于明薇, 杨宗艳, 等. 中晚期非小细胞肺癌中西医疗效评价方法比较研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 7(30): 702-705.
[8] Nicholson DW, Thornberry NA. Apoptosis: Life and death decisions [J]. Science, 2003, 299(6504): 214-215.
[9] Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, et al. ABT-263: A potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor [J]. Cancer Res, 2008, 68(9): 3421-3428.
[10] Koty PP, Tyurina YY, Tyurin VA, et al. Depletion of Bcl-2 by an antisense oligonucleotide induces apoptosis accompanied by oxidation and externalization of phosphatidylserine in NCI-H226 lung carcinoma cells [J]. Mol Cell Biochem, 2002, 234-235(1/2): 125-133.
[11] Badillo-Almaraz I, Badillo-Salas C, Villalobos R, et al. Defective expression of FasL and Bax in human lung cancer [J]. Clin Exp Med, 2003, 3: 106-112.
[12] Kang SY, Han JH, Lee KJ, et al. Low expression of Bax predicts poor prognosis in patients with locally advanced esophageal cancer treated with definitive chemoradiotherapy [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13: 4146-4153.
[13] 王承红. p53 基因在肿瘤放疗中的研究进展 [J]. 医学综述, 2010, 16(2): 205-207.
[14] Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog Bax, that accelerates programmed cell death [J]. Cell, 1993, 74(4): 609-619.
[15] 朱克俭. 欧阳锜辨治恶性肿瘤学术特色 [J]. 中国医学报, 1993, 8(6): 40-42.
[16] 潘博. 潘敏求主任医师治疗肺癌经验 [J]. 湖南中医杂志. 2010, 26(3): 44-45.
[17] 刘亚利, 朱平亚, 吴泽知. 保肺饮抗肿瘤作用的研究 [J]. 湖南中医杂志, 1994, 10(5): 51-54.
[18] 孙兆全, 朱克俭, 刘礼意, 等. 保肺饮对诱生肺癌大鼠的影响 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 1998, 4(4): 198-201.

(2016-05-25 收稿 责任编辑: 洪志强)