

补气通络解毒方对胰腺癌模型小鼠 Shh 信号通路调节机制的研究

胡波¹ 万细丛¹ 邱幸凡² 张六通²

(1 湖北省鄂州市中医院 鄂州 436000; 2 湖北中医学院 武汉 430000)

摘要:目的:研究补气通络解毒方对胰腺癌模型小鼠 Shh 信号通路的影响。方法:采用移植癌细胞的方法,将 24 只裸小鼠制作成胰腺癌模型,并随机分为治疗组和对照组,每组 12 只,治疗组采用补气通络解毒方灌胃。对照组采用生理盐水灌胃;治疗结束后,处死各组小鼠,采用 RT-PCR 法检测小鼠瘤组织 ShhmRNA 的表达。结果:治疗组小鼠 ShhmRNA 表达情况明显低于对照组。结论:补气通络解毒方能阻断 Shh 信号通路,这也可能是该方治疗胰腺癌的生物学机制之一。

关键词:胰腺癌;补气通络解毒方;Shh 信号;实验研究

中图分类号:R 285.5

文献标识码:B

doi:10.3969/j.issn.1671-4040.2010.05.073

Sonic hedgehog(Shh)信号通路是在动物胚胎发育过程中调节细胞间相互作用的重要信号分子之一。最近研究发现 Shh 信号通路在多种肿瘤组织中呈激活状态,因此该途径可能在促使干细胞向肿瘤干细胞的转化过程中发挥关键作用^[1,2]。胡伟国等通过实验研究发现:Shh 信号分子对胰腺癌细胞的增殖起维持作用,通过特异性阻断该信号通路,可以抑制胰腺癌细胞增殖,并促进细胞凋亡^[3]。

笔者师从邱幸凡教授多年,根据邱师关于“脏虚络痹毒结”的肿瘤发病机制,结合临床,自拟补气通络解毒方治疗胰腺癌,取得了良好的临床疗效。为了进一步探索该方产生疗效的分子生物学机制,我们应用补气通络解毒方作用于胰腺癌模型小鼠,观察其对 Shh 信号通路的调节机制。

1 材料与造模

1.1 实验动物 SPF 级雄性裸小鼠(BALB/C)24 只,6~8 周龄,体重(20±2)g,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供,按 SPF 级动物实验要求进行饲养及管理。

1.2 细胞株 人胰腺癌细胞系 SUIT-2,由中国协和医科大学中国医学科学院肿瘤研究所提供。

1.3 细胞培养及处理 人胰腺癌细胞系 SUIT-2 复苏后,加入含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养液,置于 37℃、5%CO₂、饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养。

1.4 动物模型的建立 实验前观察 1 周,若裸鼠生长正常(死亡率不超过 10%),即分别于左后腿外侧皮内注射 SUIT-2 细胞 1×10⁶ 个,建立移植瘤模型。随机分为治疗组和对照组,每组 12 只。治疗组予补气通络解毒方灌胃,对照组予生理盐水灌胃。

1.5 药物及制备 补气通络解毒方(人参 5g、黄芪 30g、枳壳 10g、川芎 15g、地龙 10g、柴胡 8g、蜈蚣 3g、莪术 15g、龙葵 15g、炙甘草 6g 等),用 5 倍于药材的冷水浸泡 20min,武火煎至水沸,改用文火煎煮 40min,滤出药液加冷水适量,煎至水沸,改用文火

煎煮 30min,滤出药渣,将两次药液混匀浓缩成每毫升含生药 2g 的药液,置于冰箱 0~4℃ 保存。按人与实验动物体表面积折算法算得小鼠等效剂量为每公斤体重 60g 生药,即 3mL/100g 体重。

1.6 给药剂量与方法 移植瘤细胞后,待移植瘤肉眼可见时,对照组按 3mL/100g 体重给予生理盐水灌胃,治疗组按 3mL/100g 体重给予补气通络解毒方灌胃,每日 1 次,连续 14d。

1.7 仪器试剂 PCR 仪:MG96G,杭州朗基科学仪器有限公司;凝胶图像分析系统:JY04S-3D,北京君意东方电泳设备有限公司;电泳槽:JY-SCZ2,北京君意东方电泳设备有限公司;超净工作台:SW-CJ-2FD,双人平面净化工作台,苏州净化设备有限公司;电泳仪:JY300+ 型多用途电泳仪,北京君意东方电泳设备有限公司;高速冷冻离心机:GL21M,长沙湘智离心机仪器有限公司;制冰机:FM50,北京长流科学仪器有限公司;超低温冰箱:DW-HL218,中科美菱;Gel-Pro4.5 System:图像分析系统;离心机:80-2,上海手术器械厂;DNA Marker、DNA Marker DL2000:批号 20091123,天根生化科技(北京)有限公司;Rnasin:批号 20091212,宝生物工程(大连)有限公司;dNTP 酶:批号 20091223,Fermentas life sciences;二乙基焦磷酸胺(diethylpyrocarbonate, DEPC):批号 20091209, Sigma;β-actin 引物:批号 20091224,上海生工生物工程技术有限公司;Shh 引物:批号 20071226,上海生工生物工程技术有限公司;Trizol:批号 20091129, Omega。

2 实验方法

2.1 标本采集 治疗结束后,颈椎脱臼法处死小鼠,尽快取出瘤体,并投入液氮冻存以作进一步研究。

2.2 瘤组织 ShhmRNA 水平测定

2.2.1 瘤组织总 RNA 提取和质量鉴定 用 Trizol 试剂提取瘤组织总 RNA。取 50~100 mg 瘤组织加入 1 mL Trizol,匀浆器中匀浆至液态,转移至 1.5 mL

离心管,室温静置 3 min,然后 12 000 γ 、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,转移上清至新的离心管中,弃掉不溶的组织沉淀。上清液中加入 200 μ L 氯仿,反复颠倒混匀 15s,室温静置 3min,12 000 γ 、4 $^{\circ}$ C 离心 15 min。小心吸取上清至新的离心管,加入 500 μ L 异丙醇,混匀,室温静置 10 min,12 000 γ 、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,弃掉上清,用 75%乙醇 1mL 洗涤 RNA 沉淀,混悬混匀后 7 500 γ 、4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,充分弃掉上清,室温干燥 RNA 沉淀 5~10 min,用 50 μ L 二乙基焦磷酸胺处理过的无菌水溶解 RNA,55 $^{\circ}$ C 水浴 10min 助溶。取 5 μ L 用于琼脂糖甲醛变性胶电泳鉴定完整性,另取 5 μ L 加 45 μ L DEPC 无菌水用紫外分光光度计测定含量,其余 RNA 保存于 -85 $^{\circ}$ C 备用。瘤组织 RNA 的琼脂糖甲醛变性胶电泳显示 28S、18S、5S 三条带,28S、18S 条带有较强的荧光信号,5S 条带较弱。紫外分光光度计测得 RNA 光吸收比值(A_{260}/A_{280})均在 1.8~1.9 之间,说明 RNA 纯度可靠。

2.2.2 CRHmRNA 基因扩增方法 采用 RT-PCR 法对 ShhmRNA 水平进行半定量分析,操作严格按试剂盒说明书进行。RT-PCR 反应:在 20 μ L 反转录反应体系中进行反转录。0.5 μ L AMV 反转录酶 (10U/ μ L)、0.7 μ L RNasin (30U/ μ L)、2 μ L 10mM dNTP (10mM),42 $^{\circ}$ C、45min,95 $^{\circ}$ C 变性 5min。在 50 μ L PCR 反应体系中进行 PCR 反应。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C、50s,55 $^{\circ}$ C、1min,72 $^{\circ}$ C、1min,循环 30 次,72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。并在互联网上搜索 GENE BANK 中小鼠 Shh 基因,确定 CRH 引物序列为:上游 5' -CGGAGCGAGGAAGGGAAAG-3',下游 5' -TTGGGGATAAACTGCTTGTTAGGC-3',扩增长度 262bp。内参照基因 β -actin 引物序列为:上游引物 5' -AGAAGATGACCCAGATCATGTT-3',下游引物 5' -CTTAATGTCACGCACGATTTCC-3',扩增片段的长度为 290bp。

2.2.3 结果分析 取 20 μ L 的 PCR 反应产物,与上样缓冲液混匀,在 1.5%的琼脂糖凝胶中进行恒压电泳 (100V、40min)。电泳结束后,将凝胶置于 JY04S-3D 凝胶图像分析仪上进行拍照分析。胶片进行灰度扫描,以目的条带的灰度值与 β -actin 条带的灰度值的比值进行半定量分析。

2.3 数据处理 实验结果均以 ($\bar{X} \pm S$) 表示,采用 SPSS10.0 软件包进行数据处理,采用小样本计量资料 t 检验。

3 实验结果

两组 ShhmRNA 表达见表 1。经 t 检验, $P < 0.01$,两组半定量结果有极显著性差异,治疗组小鼠 ShhmRNA 表达明显低于对照组,说明补气通络解

毒方能下调 ShhmRNA 表达。

动物分组	动物数目(只)	Shh 灰度值 / β -actin 灰度值
治疗组	12	0.32 \pm 0.17
对照组	12	0.64 \pm 0.21

4 讨论

Shh 是 Hedgehog 信号蛋白家族成员,在多种器官组织的发育过程中调节细胞间相互作用^[4]。Shh 信号途径由 Shh、2 个跨膜受体 Patched (Ptc) 和 Smoothed(Smo)组成的受体复合物、蛋白激酶 A 以及下游转录因子 Gli 家族(Gli1、Gli2、Gli3)等组成,在进化上高度保守^[5]。在正常胰腺的发育和胰腺癌的发生过程中,Shh 信号途径发挥着重要作用^[6、7]。Shh 信号通路在多种器官的成体干细胞的维持和自我更新中也发挥作用,而其中许多分子已被作为癌基因或抑癌基因所认识^[8]。因此 Shh 信号途径可能在促使干细胞向肿瘤干细胞的转化过程中具有重大意义。

自拟补气通络解毒方中人参味甘、微苦,微温,能大补元气,补脾益肺,为君药;黄芪味甘,性微温,能补气生阳、益卫固表,能增强人参的补气功效,为臣药;柴胡及枳壳味辛,性温,有行气之功效;川芎、莪术味辛,性温,有活血化瘀之功,故为佐药;地龙及蜈蚣辛温,能搜邪剔络,无血者走气,有血者走血,灵活迅速,与柴胡、枳壳、川芎、莪术配伍能引药入气络及血络,从而达到宣通络脉的功效,故为使药;龙葵性寒,味苦,微甘,具有小毒,有清热解毒之功,亦为佐药;炙甘草味甘,性微温,有调和诸药之功,故佐使药:全方合用,共奏补气通络、解毒消瘤之功。本研究结果显示,该方作用于胰腺癌模型小鼠,能有效抑制 ShhmRNA 基因的表达,从而起到阻断 Shh 信号通路的作用,这也可能是该方治疗胰腺癌的分子生物学机制之一。

参考文献

- [1]Ruizi Altaba A,Sanchez P,Dahmane N.Gliand hedgehog in cancer: tumours,embryos and stem cells [J].Nature Rev Cancer,2002,2(4): 361-372
- [2]Xie K,Abbruzzese D.Development albiology informs cancer:the emerging role of the hedgehog signaling pathway in upper gastrointestinal cancers[J].Cancer Cell,2003,4(4):245-247
- [3]胡伟国,王春友,刘涛,等.特异性阻断 Shh 信号通路对胰腺癌细胞系 SUIT-2 增殖和凋亡的影响[J].中国普通外科杂志,2006,15(6): 415-418
- [4]Ingham PW,Mcmahon AP.Hedgehog signaling in animal evelopment:paradigms and principles [J].Genes Dev,2001,15 (4): 3 059- 3 087
- [5]Mcmahon AP.More surprises in the hedgehog signaling pathway[J].Cell,2000,100(2):185-188
- [6]Hebrok M.Hedgehog signaling in pancreas development [J].Mech Dev,2003,120(2):45-57
- [7]Thayer SP,Dimagliano MP,Heiser PW,et al.Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumori genesis[J].Nature,2003,425 (7021):851-856

(收稿日期: 2010-05-13)