

SRRS 方剂抑制消化道恶性肿瘤 P⁵³基因突变的实验研究

赵爱光 杨金坤 孝作祥 唐莱娣

摘要 目的:从分子水平探讨 SRRS 方剂治疗消化道癌的可能机制。方法:选用 Lovo 结肠腺癌细胞裸小鼠移植瘤模型,观察中药 SRRS 方剂抑制移植瘤生长的作用,并用 PCR-SSCP 银染色法研究 SRRS 方剂对 Lovo 移植瘤生长过程中 P⁵³ 基因突变的影响情况。结果:对照组有 50% (5/10)发生 P⁵³ 基因第七外显子突变,SRRS 方剂治疗组无(0/10)此现象($P < 0.05$)。结论:提示 SRRS 方剂能抑制 Lovo 移植瘤生长过程中 P⁵³ 基因的突变,即 SRRS 方剂可对肿瘤生长过程中肿瘤细胞的基因水平有影响作用。

关键词 SRRS 方剂; P⁵³基因; 抑制; PCR-SSCP

SRRS 复方是根据中医健脾理气、清热解毒、软坚散结等原理组成的中药方剂,临床和实验研究表明对胃癌、结直肠癌、肝癌等消化道恶性肿瘤有明显的治疗作用^[1~3];本课题在以往研究结果的基础上,通过裸小鼠 Lovo 移植瘤模型,观察 SRRS 抑制移植瘤生长的作用,并用 PCR-SSCP 银染法检测 SRRS 对 Lovo 移植瘤生长过程中 P⁵³ 基因突变的影响情况,从分子水平探讨 SRRS 治疗消化道癌的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 8~10 周龄雌性裸小鼠(BALB/C)20 只,体重 18~20g。由中科院上海药物所提供。

1.2 瘤种 Lovo 人结肠腺癌,裸鼠腹水型(第 217 代)。由中科院上海药物所提供。

1.3 分组及用药 将 20 只裸小鼠随机分为两组,每组 10 只,分笼按 SPF 级动物实验要求饲养与管理。治疗组每日予 SRRS 药饼,计量以生药计,每日 60g/Kg,空白对照组食不含药物的饲料饼。

1.4 模型制作 将瘤种裸小鼠(腹水型)传代,待续传第三代腹水长成后,无菌状态下抽取腹水,计数瘤细胞含量,用无菌生理盐水稀释至浓度为 $7.5 \times 10^6 / ml$ 于裸鼠颈背部皮下接种 0.1ml。

1.5 标本切取 所有实验动物均于致瘤后第 16 天处死,处死前用游标卡尺测量瘤块的长径与短径。处死后立即将瘤块组织剥离,取小块组织立刻 -80°C 保存。

1.6 PCR-SSCP 银染色法

1.6.1 基因组 DNA 分离 小块冰冻瘤块剪碎,加 40ul 裂解液,蛋白酶 K 20ul, 37°C 保温过夜。

1.6.2 DNA 纯化 上述经蛋白酶 K 消化后的

DNA 溶液沸水浴 5 分钟,15,000 转/分钟,离心 10 分钟后取上清液,用等体积酚/氯仿抽提,85%乙醇沉淀,加 TE10ul 溶解 DNA^[4]。

1.6.3 P⁵³ 基因第 7 外显子扩增反应 采用复旦大学复华生物医学工程有限公司的 FD—人类 P⁵³ 基因外显子 7 基因扩增试剂盒,引物碱基序列:5'—GTGT TGT CCT CAGG TTGG CTCTG—3', 5'—CA AGT GG CTC CTG ACCT GAG TC—3'。PCR 反应体系:PCR 反应液 27ul, DNA 多聚酶 1ul, DNA 溶液 2ul。扩增条件: 94°C 保温 90 秒后 $94^{\circ}\text{C} \times 30$ 秒 $\sim 63^{\circ}\text{C} \times 45$ 秒 $\sim 72^{\circ}\text{C} \times 30$ 秒, 32 个循环后 72°C 延伸 5 分钟。(DNA Thermal Cycler 480, PERKIN ELMER CETUS)。取 8ul 扩增产物加 2ul 溴酚兰和二甲苯青于 3% 琼脂糖电泳,紫外灯下观察,P⁵³ 第 7 外显子扩增长度为 139bp。

1.6.4 SSCP 和银染 将 5% 的非变性聚丙烯酰胺(含甘油 5%)灌制于垂直电泳槽的两块玻璃板之间(Mini-PROTEAN II Cell, Bio-Rad)室温放置 1 小时以上直至凝固,于槽内加 1×TBE 缓冲液,取出梳子,冲洗加样孔,取 PCR 产物 8ul, 加 8ul 变性上样指示剂,沸水中变性 8 分钟,立即冰浴 3 分钟,上样电泳。电泳条件:0.5W/cm,常温下 2~3 小时。电泳结束后,凝胶在固定液(10%冰乙酸)中固定 20 分钟,超纯水漂洗 3 次,立即放入染色液(0.2%硝酸银,0.056%甲醛)中染色 30 分钟;超纯水漂洗 1 次立即放入显色液(3%碳酸钠,0.056%甲醛和 0.2% 硫代硫酸钠)中显色约 2~3 分钟至凝胶背面透明的淡黄色,置固定液中 2~3 分钟,超纯水漂洗 2 次,记录结果并照相。

2 结果

2.1 中药组和对照组瘤块表面积(长径×短径)和 P⁵³ 第 7 外显子突变情况结果见表 1、2,中药组瘤组织中未发现 P⁵³ 第 7 外显子突变,对照组有 5 例瘤组

织发现有突变,两组部分标本非变性聚丙烯酰胺电泳结果见图1。

表1 中药组瘤块表面积(长径×短径 cm²)和

P⁵³第七外显子突变情况

编号	瘤块表面(长径×短径)cm ²	P ⁵³ exon7 突变
1	1.0×0.7	—
2	0.9×0.65	—
3	1.0×0.9	—
4	1.6×1.2	—
5	1.4×1.4	—
6	2.0×0.9	—
7	1.3×0.7	—
8	1.7×0.8	—
9	1.1×1.0	—
10	1.1×0.9	—

表2 对照组瘤块表面积(长径×短径 cm²)和
P⁵³第七外显子突变情况

编号	瘤块表面(长径×短径)cm ²	P ⁵³ exon7 突变
11	1.2×1.0	—
12	1.8×1.8	+
13	2.1×1.3	+
14	2.0×1.2	—
15	2.1×1.7	+
16	1.9×0.9	—
17	2.5×1.0	—
18	1.7×1.5	+
19	2.0×1.3	+
20	1.7×1.3	—

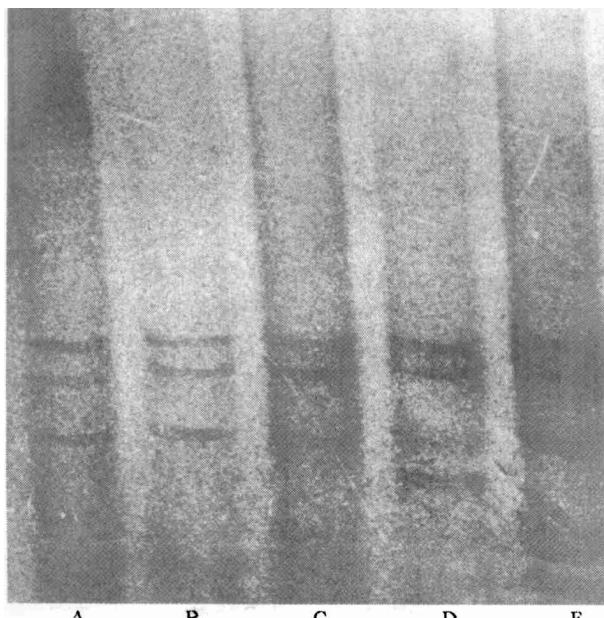


图1 PCR-SSCP 银染法检测P⁵³第7外显子突变情况,部分标本电泳结果;A:标准;正常P⁵³第7外显子条带;B、C:中药组;D、E:对照组。与标准比较,B、C均未出现异常泳动条带;D、E出现异常条带。

2.2 中药组和对照组瘤组织大小比较见表3,结果显示中药组瘤表面积较对照组小,两组呈显著性差异($P < 0.05$)。

表3 中药组和对照组瘤组织表面积(长径×短径 cm²)

组别	例数	瘤表面积(̄±s)
中药组	10	1.296±0.246
对照组	10	2.471±0.369

$$t = 4.545 \quad P < 0.05$$

2.3 对照组中P⁵³基因第7外显子突变与未突变的瘤组织大小比较见表4,对照组中有P⁵³基因第7外显子突变的5例瘤组织表面积较无突变的5例瘤表面积大,两组有显著性差异($P < 0.05$)。

表4 对照组P⁵³突变与未突变的瘤块表面积比较(cm²)

	P ⁵³ 突变	P ⁵³ 无突变
3.24	1.20	
2.73	2.40	
3.57	1.71	
2.55	2.50	
2.60	2.10	
平均值(̄±s)	2.94±0.45	2.00±0.54

$$t = 2.97 \quad P < 0.05$$

2.4 中药组和对照组P⁵³基因第7外显子突变率比较见表5。结果显示中药组无突变(0/10);对照组有50%(5/10)发生突变。两组比较有显著性差异($P < 0.05$)。

表5 中药组和对照组瘤块中P⁵³基因突变率

组别	突变例数	未突变例数	合计
中药组	0	10	10
对照组	5	5	10
合计	5	15	20

$$P < 0.05$$

3 讨论

本实验选用国际上通用的Lovo结肠癌细胞株接种裸小鼠皮下建立肿瘤模型,并予实验动物服用中药SRRS方剂所制药饼,观察其肿瘤病理及P⁵³基因的变化,病理结果示治疗组肿瘤生长缓慢,瘤块小,与不服用SRRS药饼的对照组比较有显著性差异,提示SRRS具有抑制Lovo瘤组织生长作用,与我们以往的实验结果一致。在此基础上,本实验进一步探讨SRRS抑制肿瘤生长的基因水平的机制。

肿瘤是多步骤多基因异常所致疾病³,其中P⁵³抑癌基因失活在人类肿瘤中最为常见。P⁵³基因在细胞增殖调控中起重要作用。野生型P⁵³基因其生物学功能主要有诱导细胞生长停滞于G1期;DNA损伤后诱导细胞程序性死亡;抑制肿瘤细胞生长和保护遗传稳定性等等。故被认为是一种抑癌基

因^[6]。突变后的P⁵³基因不仅丧失肿瘤抑制作用,而且具有癌基因的作用^[7]。P⁵³基因正常功能的丢失,最重要的方式是基因突变,点突变是导致P⁵³功能失活的最主要方式。约90%的点突变发生于P⁵³基因高度保守的第5~8外显子区域内。在大肠癌中突变的P⁵³基因可能提供选性的生长优势,促进大肠癌的发生,与其恶性进展和侵袭性行为密切相关^[6]。本实验运用近年来发展起来的新型、简便、可靠的检测基因突变的方法,PCR-SSCP银染色法^[8]检测了与消化道恶性肿瘤密切相关的P⁵³基因第7外显子的突变情况,观察SRRS方剂对肿瘤生长过程中肿瘤细胞基因水平的影响作用。结果显示对照组肿瘤组织中P⁵³基因第7外显子5例(5/10)有单链DNA异常泳动条带,病理结果亦示此五例瘤块较大($P<0.05$)。提示P⁵³基因突变在Lovo移植瘤生长过程中可能起作用。此结果与Pocard检测的体外培养的该细胞株P⁵³基因无突变的结果^[9]比较,提示本实验所发现的突变是在移植瘤生长过程中发生的。而在SRRS治疗组,结果未发现有目标DNA单链的泳动变位,即未发现治疗组在移植瘤生长过程中发生P⁵³基因第7外显子的突变。SRRS治疗组P⁵³基因第7外显子突变率低于对照组($P<0.05$),表明SRRS可能通过阻断移植瘤生长过程中P⁵³基因的突变而抑制肿瘤生长。

从SRRS方剂具有阻断Lovo移植瘤生长过程中P⁵³基因突变的实验结果推测:SRRS方剂可能作用于某些基因(如本实验的P⁵³基因),阻断其突变的发生;或作用于已有突变基因的始发细胞克隆后继续增殖的过程,即阻断其启动而达到抑制肿瘤生长的作用,这与以往的研究结果:中药复方SRRS在致癌剂致大鼠肝癌、胃癌以及胃癌细胞裸小鼠转移模型等在体实验研究中发现其组分具有阻断致癌的某

些环节和预防癌的转移的作用^[3];在细胞介导突变和细胞突变等体外实验中证明其主要组分具有明确的反突变、反启动作用一致^[10]。

本实验研究结果从一个局部提示中药可对肿瘤生长过程中肿瘤细胞的基因水平有影响。肿瘤是多基因异常所致疾病,SRRS方剂抑制肿瘤生长在基因水平的作用是对P⁵³基因特异性的作用,抑或是对多种癌基因和抑癌基因非特异作用有待进一步的研究。(本文蒙邱佳信指导,特此致谢)

参 考 文 献

- 邱佳信,等.晚期恶性肿瘤的异病同治——健脾法在消化道恶性肿瘤中的应用.上海中医药杂志,1984,1:2~4
- 邱佳信,等.健脾法为主治疗晚期胃癌的探讨.中医杂志,1992,8:23
- 邱佳信,等.中医中药对肿瘤预防作用的探讨.中医杂志,1993,9:560~561
- Sambrook J, et al. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 954~961
- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumor genesis. Cell, 1990, 61: 759~767
- Levine AJ, et al. The P⁵³ tumor suppressor gene. Nature, 1991, 351: 453
- Greenblatt MS, et al. Mutations in the P⁵³ tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. Cancer Res, 1994, 54: 1855~1878
- Sugano K, et al. Methods in laboratory investigation rapid and simple detection of c-ki-ras 2 gene codon 12 mutations by nonradioisotopic single-strand conformation polymorphism analysis. Laboratory Investigation, 1993, 68: 361~366
- Pocard M, et al. Different P⁵³ mutations produce distinct effects on the ability of colon carcinoma cells to become locked at the G1/S boundary after irradiation. Oncogene, 1996, 12(4): 875~882
- 邱佳信,等.健脾补肾中药对肿瘤成因多阶段学说中起始和启动的影响.中国医药学报,1993,8(5): 16~19

The Effect of SRRS Preventing P⁵³ Gene from Mutation

Zhao Aiguang, Yang Jinkun, Xiao Zhuoxiang, et al

Department of Oncology, Longhua Hospital Affiliated of Shanghai

University of Traditional Chinese Medicine and Pharmacology, Shanghai 200032

In order to study the mechanism of the tumor suppressor effect of the "SRRS", a recipe composed of some Chinese herbs, the mutation of P⁵³ gene exon 7 in the tumor tissue was observed by PCR-SSCP in the nude mice Lovo transplantation tumors. The important observation of this study was that none of the samples(0/10) was shown to have P⁵³ gene exon 7 mutation in the experimental group which SRRS was taken. After all, 50%(5/10) of the samples were shown to have P⁵³ mutation in the control group. This result suggested that SRRS could prevent P⁵³ gene from mutating during the Lovo transplastion tumors growing.

Key words: SRRS; P⁵³; suppressor; PCR-SSCP