

- 14 Stroschein SL, Wang W, Zhou S, *et al*. Negative feed back regulation of TGF—B signaling by the SnoN oncoprotein [ J ]. Science, 1999, 286 ( 5440 ) : 771 — 774
- 15 王宁宁, 王笑云, 毛慧娟, 等. 小鼠肾组织中 SnoN 蛋白表达水平与肾小管上皮细胞转分化的关系 [ J ]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2006, 15 ( 1 ) : 25 — 29
- 16 Akarsu E, Pifim I, Capogh I, *et al*. Relationship between electroneurographic changes and serum ubiquitin levels in patients with type 2 diabets [ J ]. Diabetes Care, 2001, 24 ( 1 ) : 1 — 3
- 17 Adachi — Uehara N, Kato M, Nimura Y, *et al*. Up — regulation of genes for oxidative phosphorylation and protein turnover in diabetic mouse retina [ J ]. Exp Eye Res, 2006, 83 ( 4 ) : 849 — 857
- 18 Debigaré R, Price SR. Proteolysis, the ubiquitin — proteasome system, and renal diseases [ J ]. Am J Physiol Renal Physiol, 2003, 285 ( 1 ) : F1 — F8
- 19 Ohashi N, Yamamoto T, Uchida C, *et al*. Transcriptional induction of Smurf 2 ubiquitin ligase by TGF — beta [ J ]. FEBS Lettt, 2005, 579 ( 12 ) : 2557 — 2563
- 20 刘瑞霞, 郭兵. SnoN 蛋白在糖尿病大鼠肾组织中的表达及其意义 [ J ]. 中国病理生理杂志, 2008, 24 ( 6 ) : 1188 — 1192

( 收稿: 2011 — 03 — 22 )

( 修回: 2011 — 08 — 24 )

## 中药复方药物血清对 FADD 和 MCL — 1 基因在人卵巢癌细胞株 SKOV3 中表达的影响

王熙月 韩凤娟 于 燕 吴效科 侯丽辉

**摘 要** **目的** 研究 FADD 和 MCL — 1 基因在中药复方理冲生髓饮诱导人卵巢癌细胞株 SKOV3 细胞凋亡中的作用。**方法** Wistar 大鼠随机分组, 灌胃给药, 采血制备含药血清。提取生理盐水组及理冲生髓饮组肿瘤细胞 mRNA, 制备 DNA 探针并分别用 Cy3 和 Cy5 两种荧光染料标记, 与人细胞凋亡寡核苷酸微阵列芯片进行杂交, 经扫描、分析, 得出药物作用后表达有差异的基因。**结果** 共筛选出显著表达差异基因 66 种, 其中 20 种基因表达水平上调, 46 种基因表达水平下调。**结论** 理冲生髓饮能够抑制细胞增殖并诱导其凋亡, 其细胞凋亡机制与上调 FADD 基因和下调 MCL — 1 基因有关。

**关键词** 理冲生髓饮 药物血清 细胞凋亡 卵巢癌 基因芯片 SKOV3

**Effect of Chinese Herbal Compound Drug Serum on the Expression of FADD and MCL — 1 Gene in Ovarian Cancer Cell Line SKOV3.**

Wang Xiyue, Han Fengjuan, Yu Yan, Wu Xiaoke, Hou Lihui. Obstetrics and Gynecology Department of No. 1 Hospital Affiliated to Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang 150040, China

**Abstract Objective** To study the effect of the FADD and MCL — 1 gene in apoptosis of human ovarian cancer cell line SKOV3 induced by Lichongshengsui drink with the cDNA chip technique. **Methods** Wistar rats were divided into two group randomly and treated with drugs, then the drug serum samples were prepared. mRNA of tumor cells in physiological saline group and Lichongshengsui drink group were extracted. DNA probe was prepared and marked with two kinds of fluorescent dyes: Cy3 and Cy5, respectively, hybridized with human apoptosis oligonucleotide microarray, then the differentially expressed genes were obtained after scanning and analysis. **Results** Sixty — six differentially expressed genes were screened out, including 20 kinds of up regulation genes and 46 kinds of down regulation genes. **Conclusion** Lichongshengsui drink can inhibit cell proliferation and induce the apoptosis of ovarian cancer cell line SKOV3, which may be related to up — regulation FADD gene and down — regulation MCL — 1 gene.

**Key words** Lichongshengsui drink; Drug serum; Apoptotic; Ovarian cancer; DNA chip; SKOV3

卵巢癌是一种多基因、多阶段作用的疾病, 癌基

因的激活表达与抑癌基因的失活是卵巢癌的发病机制之一, 其中细胞增殖异常及细胞凋亡抑制是癌变的关键<sup>[1]</sup>。中医药是除放、化疗和手术治疗之外的另一治疗肿瘤的主要措施, 中药抗肿瘤药物相当部分是通过诱导肿瘤细胞凋亡而显示疗效。FADD 是一种死亡域蛋白, 在细胞凋亡死亡受体通路中起着非常重要的衔接作用<sup>[2]</sup>。FADD 作为一种凋亡蛋白, 在恶性

基金项目: 教育部春晖计划基金资助项目 ( Z2007 — 1 — 15001 ); 黑龙江省自然科学基金面上项目 ( D200816 ); 黑龙江中医药大学杰出人才培养基金资助项目 ( 200703 )

作者单位: 150040 哈尔滨, 黑龙江中医药大学附属第一医院妇产科

通讯作者: 韩凤娟, 博士后, 主任医师, 硕士生导师, 电子信箱: hanfengjuan2004@163.com

胶质瘤、类风湿关节炎等疾病中的治疗已有一定的研究<sup>[3]</sup>。MCL-1 是 BCL-2 家族蛋白的一个抗凋亡的成员,在凋亡的调控中具有重要作用。MCL-1 过表达可以抑制细胞凋亡,延长细胞寿命,使细胞获得生存优势,从而导致恶性行为的发生<sup>[4]</sup>。目前有关 FADD 基因和 MCL-1 基因在卵巢癌中的表达国内外报道均很少。本实验将通过研究中药复方理冲生髓饮对 FADD 和 MCL-1 基因表达的影响,探讨理冲生髓饮诱导人卵巢癌细胞株 SKOV3 细胞凋亡的作用机制。

### 材料与方 法

1. 材料:(1)动物:Wista 大鼠,雌性,体重:200 ± 20g,购自黑龙江中医药大学实验动物中心。在通风、湿度、温度适宜的动物室内常规饲养。(2)肿瘤细胞株:SKOV3 细胞系(人卵巢浆液性乳头状囊腺癌):购自哈尔滨医科大学实验中心。(3)药物制备:理冲生髓饮由三棱、莪术、水蛭、红参、鹿茸、海马等组成,中药材购自于黑龙江中医药大学门诊部,经生药鉴定。将中药浸泡 30min,煮沸后文火煎 30min,纱布过滤取汁,药渣加水再煎 20min,两次药汁混合,水浴 80℃,浓缩药液浓度为 32.5g/kg,相当于 60kg 体重成人日用量的 2.5 倍,置 4℃ 冰箱保存。

2. 实验方法:(1)药物血清制备:将健康雌性 Wistar 大鼠,随机分为理冲生髓饮组和生理盐水组,每组 10 只。理冲生髓饮组和生理盐水组分别灌胃给药,理冲生髓饮组按 32.5g/kg 剂量,相当于 60kg 体重成人日用量的 2.5 倍剂量给药。生理盐水组给等体积生理盐水。早晚各 1 次,连续 5 天,末次灌胃前 12h 禁食不禁水。末次给药后 1h 摘眼球取血,置无菌管内。血液在室温下静置 4h,待血清析出,吸取上清,3000r/min,离心 25min。再次吸取上清,56℃ 水浴锅灭活 30min,经 0.22μm 微孔滤膜过滤除菌,-20℃ 冰箱保存。(2)分组及药物血清培养液的制备:理冲生髓饮组大鼠含药血清与 DMEM 高糖培养液按 1:9 配制成血清浓度为 10% 的药物血清培养液。生理盐水组大鼠含药血清与 DMEM 高糖培养液按 1:9 配制成血清浓度为 10% 的药物血清培养液。(3)人卵巢癌 SKOV3 细胞株传代培养及含药血清干预:SKOV3 细胞株在 DMEM 高糖培养液,37℃,5% CO<sub>2</sub> 孵箱中常规培养,隔日传代 1 次,计数并调节细胞浓度为 1 × 10<sup>7</sup> 个/毫升。取对数生长期细胞,分为两组:生理盐水组和理冲生髓饮组,吸去原培养液,分别加入已制备的终浓度为 10% 的动物含药血清:生理盐水组加入生理盐水组含药血清,理冲生髓饮组加入理冲生髓饮组含药血清,终体积为 5ml,两组加药后置于 37℃,5% CO<sub>2</sub> 孵箱中继续培养,48h 收获细胞。(4)mRNA 抽提、标记、杂交和扫描检测:分别取两组细胞,加适量 Trizol 匀浆,3000r/min,离心 10min,取上清液加入氯仿,振荡后放置 3min,向上清液中加异丙醇充分混匀再 3000r/min,离心 10min,加入两次 75% 乙醇,离心弃上清,加入 Milli-Q (Rnase-free) 完全溶解 RNA 沉

淀,-80℃ 保存。经预杂交后加入反转录引物合成 cDNA,以 Cy5 标记理冲生髓饮组细胞,Cy3 标记生理盐水组细胞,cDNA 做探针,纯化后在人细胞凋亡寡核苷酸微阵列芯片上进行杂交。冲洗玻片晾干后以 LuxScan10KA 双通道激光扫描仪扫描芯片荧光信号图像。(5)图像采集和数据分析:采用 GenePix Pro 4.0 图像分析软件对芯片图像进行分析,把图像信号转化为数字信号,然后对芯片上的数据用 Lowess 方法进行归一化,最后以差异为 2 倍的标准来确定差异表达基因。

### 结 果

1. 总 RNA 提取结果:RNA 样品电泳条带清晰,见图 1,28S 比 18SrRNA 条带亮度接近 2:1。

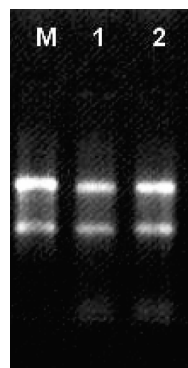


图 1 生理盐水组和理冲生髓饮组总 RNA 提取结果

第 M 泳道:marker;第 1 泳道:生理盐水组;

第 2 泳道:理冲生髓饮组

2. 散点图:X 轴(横坐标轴)和 Y 轴(纵坐标轴)分别以生理盐水组和理冲生髓饮组的荧光信号强度值为坐标,图中每一个数据点代表芯片上一个基因点的杂交信号,红色标记和绿色标记的数据点分别表示 Y/X 的 Ratio 值 ≥ 2 和 ≤ 0.5,是属于表达有差异的基因,黑色标记表示 Y/X 的 Ratio 值在 0.5 ~ 2,表达基本无差异,见图 2。

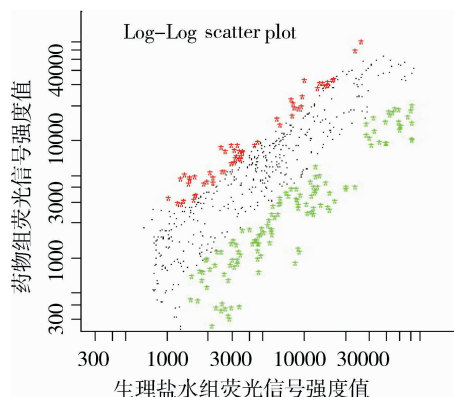


图 2 生理盐水组和理冲生髓饮组荧光杂交信号强度散点图

3. 人细胞凋亡寡核苷酸微阵列芯片筛选出 SK-OV3 的差异表达基因:以 Cy5/Cy3 比值  $\geq 2$  或  $\leq 0.5$  判定为基因表达有显著性差异。分析这些基因功能涉及细胞周期(4 条)、p53 信号转导通路(3 条)、细胞凋亡(3 条)、Toll-like 受体信号转导通路(3 条)、ErbB 信号转导通路(2 条)、Wnt 信号转导通路(2 条)、Cytokine-cytokine 相应受体(2 条)、MAPK 信号转导通路(2 条)、核苷酸切除修复(1 条)、病灶粘连(2 条)、TGF- $\beta$  信号转导通路(1 条)、GnRH 信号转导通路(1 条)、T 细胞受体信号转导通路(1 条)、胰岛素信号转导通路(1 条)、抗原处理和显示(1 条)等多个细胞凋亡相关基因。表达有显著性差异的基因有 66 个,其中表达上调的有 20 个,其中包括 LMNA、FADD、BCL-3 等;表达下调的有 46 个,其中包括 CTNNB1、RPS3A、MCL-1 等。

### 讨 论

药物血清概念最早由日本昭和药科大学田代真一教授提出。中药血清药理学是利用含药血清代替中药复方或其提取物而供实验研究使用的一种非单体药物药理研究的方法<sup>[5]</sup>。现此方法已被广泛用于抗肿瘤的研究中,研究层面已涉及细胞增殖、分化、凋亡与细胞周期的调节以及基因表达和端粒酶活性调控等方面。本实验选用了 5 天早晚各 1 次连续给药,于末次给药后 1h 取血清方法,考虑到动物血清内含有各种活性物质,如激素、酶、抗体等,可能对培养细胞产生毒性及干扰作用,56℃ 水浴锅灭活 30min 方法来消除干扰物质。旨在尽可能地模拟和反映人或动物服药后药物与机体相互作用的过程,增加中药经体内胃肠吸收、生物转化后应用于体外实验的准确性和可靠性。

理冲生髓饮源于张锡纯《医学衷中参西录》治疗妇科癥瘕方“理冲丸”,本方破血消癥、软坚散结、补气养血、填精益髓,不仅切中卵巢癌的病因病机,而且结合临床实际,体现了祛邪与扶正并用,攻补兼施之意。本实验采用人细胞凋亡寡核苷酸微阵列芯片对含药血清及生理盐水干预后的 SKOV3 细胞的差异表达基因进行筛选,实验结果显示,表达有显著差异的基因有 66 个,其中表达上调 20 个,表达下调 46 个。

表达上调的基因中有代表性的是 FADD 基因。人 FADD 基因是一个相对分子质量为 23kDa 的胞质蛋白,位于人 11 号染色体长臂上(11q13.3),编码 208 个氨基酸残基,由两个结构域组成,即死亡效应结构域(death effect domain, DED)和死亡结构域

DD<sup>[6]</sup>。FADD 基因所编码的蛋白称为 Fas 相关死亡域蛋白,作为 Fas 系统的信号连接蛋白<sup>[7]</sup>。在 Fas 系统引导下,FADD 以其 DD 直接与 Fas 的死亡结构域结合,相互作用后显露出其死亡效应域(FADD-DED),随即与无活性的 caspase-8 酶原发生同嗜性交联,使之活化,进而引起 caspase 级联反应,导致细胞凋亡<sup>[8]</sup>。

刘俊宝等<sup>[1]</sup>研究发现,正常卵巢及卵巢良性肿瘤中,FADD 的阳性表达率较高,而在卵巢癌中阳性表达率较低,正常卵巢及卵巢良性肿瘤 FADD 的阳性表达率与卵巢癌中的阳性表达率差异均有高度显著性,充分符合 FADD 蛋白可在多种细胞系中诱导凋亡的发生,抑制细胞高度增殖,从而减少了恶性肿瘤细胞的发生。杨琴等<sup>[9]</sup>检测 FADD 基因在非小细胞肺癌(NSCLC)组织中的表达及突变情况,结果显示 FADD 蛋白表达水平与癌细胞凋亡呈显著正相关( $r_s = 0.599, P < 0.001$ ),说明 FADD 在影响 NSCLC 细胞凋亡过程中起重要作用。理冲生髓饮作用后人卵巢癌细胞 FADD 基因表达上调,提示中药复方理冲生髓饮可能通过上调 FADD 基因,启动 Fas 相关死亡域蛋白并激活 caspase 级联反应,从而诱导 SKOV3 细胞株凋亡。

表达下调的基因中有代表性的是 MCL-1 基因。人 MCL-1 基因定位于染色体 1q21,编码蛋白相对分子质量为 42kDa,含有 350 个氨基酸,MCL-1 表达上调提示了肿瘤的发生<sup>[10]</sup>。MCL-1 属于 BCL-2 家族成员之一。通过 RT-PCR 方法,证实 MCL-1 基因在转录过程中存在短拼接变异,可转录生成两种 mRNA。由 3 个外显子拼接而成的全长 MCL-1 mRNA 长 1155bp,可翻译为含 350 个氨基酸的 MCL-1L (MCL-1 Long)活性蛋白,相对分子质量为 42kDa,与 BCL-2 蛋白质具有 35% 的同源性。该蛋白具有 BCL-2 同源区域(BCL-2 homology domain, BH)BH1、BH2、BH3 及 C-末端转膜区,功能与 BCL-2 蛋白相似,抑制细胞凋亡<sup>[11]</sup>。近年来,已发现 MCL-1 在多种癌组织中呈高表达,而在癌旁组织中呈低表达状态,抑制 MCL-1 基因的表达,或者阻断调节 MCL-1 基因表达的信号途径能有效地诱导细胞凋亡<sup>[12]</sup>,抑制肿瘤细胞的增殖并导致其细胞周期阻滞,并提高肿瘤细胞对放疗及化疗的敏感性,同时也为临床肿瘤治疗提供了新的药物干预靶点<sup>[13]</sup>。

Sieghart 等<sup>[14]</sup>采用反义技术抑制 MCL-1 基因的表达可直接促进肝癌细胞的凋亡,而敲除 MCL-1

基因并不影响正常肝细胞的生长。用免疫组化方法研究卵巢癌中 BCL-2 基因家族的表达情况发现, 53% 3 期卵巢癌组织表达 MCL-1, 且 MCL-1 的表达与卵巢癌的预后不良有关<sup>[15]</sup>。本研究发现 MCL-1 基因表达下调, 理冲生髓饮可能通过下调 MCL-1 基因的表达有关, 从而抑制肿瘤细胞的增殖并导致其细胞周期阻滞。

综上所述, 通过对有代表性的差异表达基因进行分析, 我们发现中药复方理冲生髓饮以多个基因为作用靶点, 能够抑制卵巢癌细胞增殖并诱导其凋亡。理冲生髓饮可能通过上调 FADD 基因和下调 MCL-1 基因, 从而激活 Fas 凋亡信号通路, 阻滞细胞周期等达到其诱导细胞凋亡的作用。理冲生髓饮的这种多靶点作用初步阐明了其抗肿瘤促进细胞凋亡的分子生物学机制, 也为以后进一步研究提供了理论依据。同时, 为中药复方在基因水平研究提供了新思路新方法。

#### 参考文献

- 1 刘俊宝, 冷维春, 张爱臣, 等. FADD 在卵巢癌中的表达及其临床意义[J]. 中国妇幼保健, 2009, 24: 1911-1913
- 2 Thorburn A. Death receptor - induced cell killing[J]. Cell Signal, 2004, 16: 139-144
- 3 印安宁, 江应安, 张险峰. Fas 相关死亡结构域蛋白荧光真核表达载体的构建及其鉴定[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(10): 981-984
- 4 杨华强, 万楚成. Mcl-1 与血液恶性肿瘤[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2007, 14(6): 467-469
- 5 张军平, 张伯礼, 山本清高. 中药药物血清的制作方法探讨[J]. 天津中医药, 2004, 21(4): 274-276
- 6 Peter K, Amalia S, Dutra S, et al. Genomic structure and mapping of human FADD, an intracellular mediator of lymphocyte apoptosis[J]. J Immunol, 1996, 157: 5461
- 7 Yang X, Khoravi - Far R, Chang HY, et al. Daxx, a novel Fas - binding protein that activates JNK and apoptosis[J]. Cell, 1997, 89(7): 1067-1076
- 8 Fesik SW. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery [J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5: 876-885
- 9 杨琴, 朱润庆, 方忠, 等. 非小细胞肺癌组织中 FADD 基因的表达及突变分析[J]. 癌症, 2005, 24(3): 321-326
- 10 谭晖, 吉晓霞, 陆丽峰, 等. MCL1 蛋白在胃癌中的表达及临床意义[J]. 中国肿瘤临床, 2008, 35(24): 1399-1402
- 11 李智慧, 李惠民. Mcl-1 基因与血液系统肿瘤关系的研究进展[J]. 中国实验血液学杂志, 2009, 17(2): 509-512
- 12 冯楠, 张学军. Mcl-1 基因在肿瘤靶向治疗中的研究进展[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2009, 3(11): 1883-1887
- 13 Subramaniam D, Natarajan G, Ramalingam S, et al. Translation inhibition during cell cycle arrest and apoptosis: Mcl-1 is a novel target for RNA binding protein CUGBP2 [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008, 294(4): G1025-G1032
- 14 Sieghart W, Losert D, Strommer S, et al. Mcl-1 overexpression in hepatocellular carcinoma: a potential target for antisense therapy[J]. J Hepatol, 2006, 44(1): 151-157
- 15 陈霞, 李旭, 陈葳. MCL-1 基因研究新进展[J]. 国外医学遗传学分册, 2003, 26(3): 148-151

(收稿: 2011-01-18)

(修回: 2011-01-25)

## ERK 信号通路在大鼠低氧性肺动脉高压中的作用及 PNS 的干预

孙旦芹 梁瑛琦 潘 昱 邵飞飞 沈 洋 吴天添 王万铁

**摘要** **目的** 探讨丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)中的细胞外调节蛋白激酶(ERK)在低氧性肺动脉高压中的表达以及三七总皂苷(PNS)对慢性低氧性肺动脉高压(HPH)大鼠 ERK 表达的影响。**方法** 将 30 只 SD 大鼠随机分为 3 组: 正常对照组(N 组)、单纯低氧性肺动脉高压组(H 组)和低氧性肺动脉高压注射 PNS 组(HP 组)。观察各组大鼠平均肺动脉压(mPAP)及平均颈动脉压(mCAP), 免疫组化法检测肺组织中 p-ERK 蛋白的含量。**结果** H 组、HP 组 ERK 的表达高于 N 组( $P < 0.05$ ), 且 H 组高于 HP 组( $P < 0.05$ )。**结论** 预防性应用 PNS 可以降低低氧性肺动脉高压大鼠的肺动脉压, 其机制可能与抑制 p-ERK 的表达有关。

**关键词** 三七总皂苷 肺动脉高压 低氧 细胞外调节蛋白激酶

基金项目: 浙江省科技攻关项目(2006C33073)

作者单位: 325035 温州医学院

通讯作者: 王万铁, 教授, 硕士生导师, 电子信箱: wzwwt@tom.com