

doi:10.3969/j.issn.1671-038X.2018.05.07

藤龙补中汤对大肠癌 RKO 细胞转移 相关基因表达影响

胡 兵¹, 安红梅², 郑佳露¹, 闫 霞¹, 黄晓伟¹, 李 森¹

(¹ 上海中医药大学附属龙华医院 中医肿瘤研究所 肿瘤科, 上海 200032;

² 上海中医药大学附属龙华医院 科技处, 上海 200032)

摘要:[目的]观察藤龙补中汤对人大肠癌 RKO 细胞转移相关基因表达影响。[方法]藤龙补中汤处理 RKO 细胞, TRIzol 试剂提取 RNA, 试剂盒纯化 RNA, 肿瘤转移 PCR 芯片(Tumor metastasis PCR array)检测基因表达。[结果]藤龙补中汤作用 RKO 细胞后, CD82、CDH1、CDKN2a、KISS1、SSTR2 和 TIMP2 表达升高, FLT4、CD44、FGFR4、ITGB3、MMP3、MMP9、SMAD2 和 TGFB1 表达降低, 涉及细胞粘附、移动、侵袭、基质重构、上皮-间质转化和淋巴管生成等与转移相关的生物过程, CD44 还与大肠癌干细胞和循环大肠癌细胞相关。[结论]藤龙补中汤可调控 RKO 细胞多个转移相关基因表达, 并可能对上皮-间质转化、大肠癌干细胞、循环大肠癌细胞和淋巴管生成有抑制作用。

关键词: 大肠癌; 中医药; 藤龙补中汤; 转移; 基因表达

中图分类号: R735.3

文献标志码: A

文章编号: 1671-038X(2018)05-0416-04

Effects of Teng-Long-Bu-Zhong-Tang on metastasis related genes expression in colorectal carcinoma RKO cells

HU Bing¹, AN Hong-mei², ZHENG Jia-lu¹, YAN Xia¹, HUANG Xiao-wei¹, LI Miao¹

(¹Institute of Traditional Chinese Medicine in Oncology, Department of Oncology, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China; ²Department of Science & Technology, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

Corresponding author: HU Bing, E-mail: beearhu@hotmail.com

Abstract: [Objective] To observe the effect of Teng-Long-Bu-Zhong-Tang (TLBZT) on metastasis related genes expression in human colorectal carcinoma RKO cells. [Methods] RKO cells were treated with TLBZT. RNA were extracted by TRIzol reagent and purified with commercial kit. Gene expressions were detected by tumor metastasis PCR array. [Results] After TLBZT treatment, CD82, CDH1, CDKN2a, KISS1, SSTR2 and TIMP2 were up-regulated, FLT4, CD44, FGFR4, ITGB3, MMP3, MMP9, SMAD2 and TGFB1 were down-regulated in RKO cells. These genes involve metastasis related bioprocesses, such as cell adhesion, migration, invasion, extracellular matrix (ECM) remodeling, epithelial-mesenchymal transition(EMT) and lymphangiogenesis. CD44 also related to colorectal cancer stem cells and circulating colorectal cancer cells. [Conclusion] TLBZT regulates multiple metastasis related genes expression in RKO cells, and may inhibit EMT, colorectal cancer stem cells and circulating colorectal cancer cells.

Key words: Colorectal cancer; Traditional Chinese Medicine; Teng-Long-Bu-Zhong-Tang; Metstasis; Gene expression

收稿日期: 2018-01-10

基金资助: 国家自然科学基金(No: 81473625), 上海市科技支撑项目(No: 16401902500), 龙华医院科技创新项目(No: CX201756)

通讯作者: 胡 兵, E-mail: beearhu@hotmail.com

大肠癌是全球常见恶性肿瘤,晚期大肠癌的临床疗效欠佳。中医药在大肠癌治疗中发挥了重要的作用,中医药联合手术、化疗、靶向治疗或单独治疗已成为中国大肠癌治疗的特色;中医药治疗可以改善患者临床症候,提高生活质量,改善免疫功能,抑制肿瘤生长,并可预防大肠癌转移^[1-3]。藤龙补中汤(专利号:ZL200910197565.2)是本课题组研发的治疗大肠癌的抗癌中药复方,可以抑制肿瘤相关巨噬细胞,下调 LOX、HIF-1 α 、整合素 α V 和 β 3 表达,抑制 FAK 磷酸化,从而抑制大肠癌转移^[4-5]。本研究采用 PCR 芯片检测了藤龙补中汤对大肠癌转移相关基因表达影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM 培养液、胎牛血清和胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司,TRIzol 试剂和逆转录酶为美国 Invitrogen 公司产品,RNeasy[®] MinElute[™] 纯化试剂盒购自德国 Qiagen 公司,肿瘤转移 PCR 芯片(Tumor Metastasis PCR Array)和 RT[™] SYBR[®] Green qPCR Mastermix 购自丹麦 SABiosciences 公司。其他试剂均为中国产分析纯试剂。

1.2 藤龙补中汤提取物的制备

藤龙补中汤(TLBZT)由藤梨根 30 g、龙葵 15 g、白术 9 g、薏苡仁 30 g 和槲寄生 15 g 等组成。按参考文献^[6]的方法煎制和浓缩藤龙补中汤,乙醇沉淀,PBS 溶解,0.22 μ m 滤器过滤除菌,分装后置于-20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

1.3 细胞及细胞培养

人大肠癌 RKO 细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库/中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。RKO 细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液,置于 37 $^{\circ}$ C、CO₂ 体积分数为 5%的饱和湿度培养箱中培养。

1.4 PCR 芯片检测

常规消化计数 RKO 细胞,接种于直径为 10 cm 的培养皿中(2 $\times$ 10⁶ 细胞/皿),细胞接种第 2 天加入

藤龙补中汤(500 μ g/ml)或等体积 PBS,每组设 3 个重复样本,作用 24 h 后,参考试剂盒说明书用 TRIzol 试剂提取 RNA,DNase I 消化 DNA,试剂盒纯化逆转录酶合成 cDNA,PCR 芯片检测基因表达,qPCR 扩增条件:95 $^{\circ}$ C 10 min;95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,收集荧光,共 40 循环;溶解曲线分析。以 2^{- Δ Ct} 值计算基因表达水平, Δ Ct=(目的基因 CT-内参基因 CT),最终结果以对照组倍数表示。

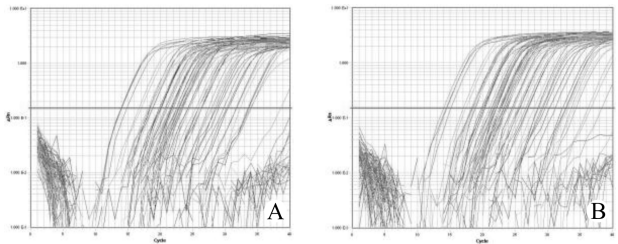
1.5 统计学处理

应用 SPSS 18.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,2 组间的比较采用 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基因表达概况

肿瘤转移 PCR 芯片是 96 孔板规格的实时荧光定量 PCR 体系,孔内预置包括 84 个转移相关基因、5 个内参照基因、1 个基因组 DNA 污染对照、3 个逆转录阴性对照和 3 个阳性对照基因的引物;代表性扩增曲线如图 1 所示,有 14 个差异表达基因。



A: 对照组;B:TLBZT。

图 1 qPCR 基因扩增曲线

2.2 藤龙补中汤对细胞粘附基因表达影响

PCR 芯片包括 20 个细胞粘附基因,qPCR 结果如表 1 所示,藤龙补中汤作用后有 3 个差异表达基因,CD44 和 ITGB3 表达降低,CDH1 表达升高,与对照组比较差异显著(*P*<0.01);其中 CD44 和 ITGB3 参与细胞粘附,CD44 同时也是肿瘤干细胞标志基因,CDH1(E-cadherin)是上皮标志基因。

表 1 藤龙补中汤对细胞粘附基因表达影响

基因	全称	序列号	基因表达	
			对照组	TLBZT
CD44	CD44 molecule(Indian blood group)	NM_000610	1.00 $\pm$ 0.06	0.62 $\pm$ 0.14 ¹⁾
CDH1	Cadherin 1,type 1,E-cadherin(epithelial)	NM_004360	1.00 $\pm$ 0.02	2.74 $\pm$ 0.50 ¹⁾
ITGB3	Integrin,beta 3(platelet glycoproteinIIIa,antigen CD61)	NM_000212	1.00 $\pm$ 0.04	0.62 $\pm$ 0.11 ¹⁾

与对照组比较,¹⁾*P*<0.01。

2.3 藤龙补中汤对胞外基质重构基因表达影响

PCR 芯片包括 12 个胞外基质重构基因,qPCR 结果如表 2 所示,藤龙补中汤作用后有 3 个差异表达基因,MMP3 和 MMP9 表达降低,TIMP2 表达升

高,与对照组比较差异显著($P<0.05$);其中 MMP3 和 MMP9 参与胞外基质降解,TIMP2 可以抑制 MMPs 活性,可影响细胞粘附、移动和侵袭。

表 2 藤龙补中汤对胞外基质重构基因表达影响

基因	全称	序列号	基因表达	
			对照组	TLBZT
MMP3	Matrix metalloproteinase 3(stromelysin 1,progelatinase)	NM_002422	1.00±0.19	0.60±0.08 ¹⁾
MMP9	Matrix metalloproteinase 9(gelatinase B,92 kDa gelatinase,92 kDa type IV collagenase)	NM_004994	1.00±0.24	0.54±0.17 ¹⁾
TIMP2	TIMP metalloproteinase inhibitor 2	NM_003255	1.00±0.24	2.92±0.36 ²⁾

与对照组比较,¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ 。

2.4 藤龙补中汤对细胞生长与增殖相关基因表达影响

PCR 芯片包括 41 个生长与增殖相关基因,qPCR 结果如表 3 所示,藤龙补中汤作用后有 5 个差异表达基因,其中 CDKN2a 与其他 PCR 芯片重复,已于前期报道^[7];FGFR4、FLT4 和 TGFB1 表

达降低,SSTR2 表达升高,与对照组比较差异显著($P<0.05$);其中 FGFR4 是成纤维细胞生长因子(FGF)受体,可以促肿瘤转移;FLT4 亦 VEGFR3,是 VEGF-C 和 VEGF-D 的受体,与淋巴管生成相关;SSTR2 是生长抑素受体,可以抑制肿瘤。

表 3 藤龙补中汤对细胞生长与增殖相关基因表达影响

基因	全称	序列号	基因表达	
			对照组	TLBZT
FGFR4	Fibroblast growth factor receptor 4	NM_002011	1.00±0.25	0.43±0.07 ¹⁾
FLT4	Fms-related tyrosine kinase 4	NM_002020	1.00±0.08	0.75±0.09 ¹⁾
SSTR2	Somatostatin receptor 2	NM_001050	1.00±0.11	2.09±0.44 ²⁾
TGFB1	Transforming growth factor,beta 1	NM_000660	1.00±0.01	0.61±0.03 ²⁾

与对照组比较,¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ 。

2.5 藤龙补中汤对其他基因表达影响

qPCR 结果显示,藤龙补中汤还可以降低 SMAD2 表达,升高 CD82 和 KISS1 表达,与对照组

比较差异有统计学意义($P<0.05$);其中 SMAD2 是 TGFB1 的下游信号转导蛋白,CD82 和 KISS1 是肿瘤转移抑制蛋白。见表 4。

表 4 藤龙补中汤对其他基因表达影响

基因	全称	序列号	基因表达	
			对照组	TLBZT
CD82	CD82 molecule	NM_002231	1.00±0.05	2.31±0.28 ¹⁾
KISS1	KiSS-1 metastasis-suppressor	NM_002256	1.00±0.13	3.02±0.43 ¹⁾
SMAD2	SMAD family member 2	NM_005901	1.00±0.17	0.58±0.19 ²⁾

与对照组比较,¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ 。

3 讨 论

大肠癌归属于中医的“肠覃”、“脏毒”、“积聚”和

“肠癖”等范畴,毒聚、湿阻和脾虚是大肠癌的基本病机^[1-2];本课题组在临床实践基础上,以解毒、利湿、

健脾立法,引入了肿瘤生物学和抗癌中药研究成果,研发治疗大肠癌的抗癌中药复方,方中藤梨根和龙葵解毒利湿,是主要的抗癌中药;白术和薏苡仁健脾利湿,榧寄生可协同抗癌并抑制血管生成;根据药味组成和功效,命名为藤龙补中汤;前期研究显示,藤龙补中汤可以抑制大肠癌转移^[4-5]。

肿瘤转移是一个多步骤的复杂生物过程,涉及以下过程:①肿瘤细胞自原发灶脱离,降解并突破基底膜,侵入间质;②肿瘤细胞在间质中移行并接触脉管系统;③肿瘤细胞突破血管内皮及基底膜进入血液循环;④肿瘤细胞在血液循环中存活、移动;⑤肿瘤细胞逸出循环系统,与远处组织器官粘附、移动、侵袭、增殖,形成转移灶^[8]。本研究结果显示,藤龙补中汤可以调控 CD44、CDH1 (E-cadherin)、ITGB3、MMP3、MMP9、TIMP2 等基因表达,提示藤龙补中汤抑制大肠癌转移与多个生物过程相关,如细胞粘附、移动、侵袭和基质重构等。

CDH1 (E-cadherin)是上皮标志基因,也是上皮-间质转化研究的标志基因,在上皮-间质转化中 CDH1 (E-cadherin)表达下调,N-cadherin 表达升高;TGFB1 可以诱导上皮-间质转化,其下游信号转导与 SMAD 相关^[9];本研究结果显示,藤龙补中汤可以上调 CDH1 (E-cadherin)表达,降低 TGFB1 和 SMAD2 表达,提示藤龙补中汤可能对大肠癌上皮-间质转化具有抑制作用。

藤龙补中汤可以调控 SSTR2、FGFR4、FLT4、CD82 和 KISS1 表达。SSTR2 是生长抑素受体,可以抑制肿瘤,与大肠癌侵袭行为负相关,与大肠癌患者远期存活正相关^[10]。FGFR4 是成纤维细胞生长因子受体,可以促肿瘤转移;FLT4 亦 VEGFR3,是 VEGF-C 和 VEGF-D 的受体,与淋巴管生成相关;CD82 和 KISS1 是肿瘤转移抑制蛋白;提示这些基因的表达改变也参与藤龙补中汤的作用。

CD44 是粘附因子家族的跨膜糖蛋白,是透明质酸受体,已证实为肿瘤干细胞和循环肿瘤细胞的标志基因,与大肠癌转移密切相关,可以作为大肠癌的预后因子;CD44 RNA 干扰可以抑制大肠癌增殖、移动和侵袭,并可促大肠癌细胞凋亡^[11-14];本研究结果显示,藤龙补中汤可以降低 CD44 表达,提示藤龙补中汤还可能对大肠癌干细胞和循环大肠癌细胞有作用,值得进一步研究。

综上所述,藤龙补中汤可调控 RKO 细胞多个转移相关基因表达,并可能对上皮-间质转化、大肠癌干细胞、循环大肠癌细胞和淋巴管生成有抑制作用。

参考文献

- [1] Deng S, Hu B, An H M. Traditional Chinese medicinal syndromes and treatment in colorectal cancer [J]. J Cancer Ther, 2012, 3(6):888—897.
- [2] 邓珊, 胡兵, 沈克平. 大肠癌中医病机与治疗研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2012, 14(4):1858—1862.
- [3] 王双双, 安红梅, 胡兵. 中医药防治大肠癌转移[J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(4):780—783.
- [4] 邓珊, 安红梅, 胡兵. 藤龙补中汤对大肠癌肺转移及肿瘤相关巨噬细胞作用[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2016, 24(7):515—519.
- [5] Wei M M, Wang S S, Zheng J L, et al. Herbal compound Teng-Long-Bu-Zhong-Tang inhibits metastasis of Human RKO colon carcinoma [J]. Oncol Lett, 2017, 14(6):7767—7772.
- [6] Hu B, An H M, Wang S S, et al. Teng-Long-Bu-Zhong-Tang induces p21-dependent cell senescence in colorectal carcinoma LS174 T cells via histone acetylation[J]. J Exp Pharmacol, 2017, 9:67—72.
- [7] 胡兵, 安红梅, 郑佳露, 等. 藤龙补中汤促人结肠癌 RKO 细胞衰老及其可能的作用机制[J]. 肿瘤, 2016, 36(12):1307—1311.
- [8] Zeeshan R, Mutahir Z. Cancer metastasis-tricks of the trade[J]. Bosn J Basic Med Sci, 2017, 17(3):172—182.
- [9] Liu Y, Kong D, Wu H, et al. Interplay of retinal determination gene network with TGF- β signaling pathway in epithelial-mesenchymal transition[J]. Stem Cell Investig, 2015, 2:12.
- [10] Evangelou I, Petraki C, Msaouel P, et al. Immunohistochemical expression of somatostatin receptor subtypes 2 and 5 in colorectal cancer[J]. Eur J Clin Invest, 2012, 42(7):777—783.
- [11] Jing F, Kim H J, Kim C H, et al. Colon cancer stem cell markers CD44 and CD133 in patients with colorectal cancer and synchronous hepatic metastases[J]. Int J Oncol, 2015, 46(4):1582—1588.
- [12] Fang C, Fan C, Wang C, et al. Prognostic value of CD133+ CD54+ CD44+ circulating tumor cells in colorectal cancer with liver metastasis [J]. Cancer Med, 2017, 6(12):2850—2857.
- [13] Lee S Y, Kim K A, Kim C H, et al. CD44-shRNA recombinant adenovirus inhibits cell proliferation, invasion, and migration, and promotes apoptosis in HCT116 colon cancer cells[J]. Int J Oncol, 2017, 50(1):329—336.
- [14] 汪金峰, 程津津, 石星, 等. 胃癌患者血清及癌组织中 CD44v6 表达及意义[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2012, 20(8):353—356.