

低分子量地黄多糖对 p53 基因表达的影响

魏小龙¹, 茹祥斌 (军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850, 中国)

6285.5

Effects of low-molecular-weight *Rehmannia glutinosa* polysaccharides on p53 gene expression

WEI Xiao-Long, RU Xiang-Bin

(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

KEY WORDS *Rehmannia glutinosa*; polysaccharides; cyclophosphamide; phytoanticipin; lung neoplasms; p53 genes; polymerase chain reaction; autoradiography

AIM: To study the effect of low-molecular-weight *Rehmannia glutinosa* polysaccharides (LRPS) on p53 gene expression. **METHODS:** The level of p53 gene expression was determined by quantitative polymerase chain reaction and autoradiography. **RESULTS:** The levels of p53 mRNA in Lewis lung cancer tissue were 0.46, 1.52, 1.48, and 1.60 respectively after saline, LRPS 20 and 40 mg·kg⁻¹, and cyclophosphamide 10 mg·kg⁻¹, which were the effective doses inhibiting the growth of tumor tissue cells *in vivo*. LRPS markedly increased p53 gene expression. **CONCLUSION:** LRPS effect on p53 gene expression is one of the mechanisms of antitumor activity.

关键词 地黄; 多糖; 环磷酰胺; 植物源的抗肿瘤药; 肺肿瘤; p53 基因; 聚合酶链反应; 放射自显影术

目的: 研究低分子量地黄多糖(LRPS)对 p53 基因表达的影响。 **方法:** 利用定量 PCR 的方法检测 p53 基因表达的水平。 **结果:** LRPS 在最适抗肿瘤有效剂量 20 和 40 mg·kg⁻¹ 条件下, Lewis 肺癌组织内 p53 基因的表达水平分别是 1.52 和 1.48, 对照组为 0.46, 环磷酰胺组为 1.60。 LRPS 能使 Lewis 肺癌组织内 p53 基因的表达明显增加。 **结论:** LRPS 对抗癌基因 p53 表达的影响是其抗肿瘤

作用的机制之一。

玄参科植物地黄的块根是滋阴补肾的中药, 主要活性成份是地黄多糖, 地黄多糖具有明显的肿瘤生长抑制作用^[1,2]。在对地黄多糖抗肿瘤有效活性成份进行系统的追踪研究时发现, 其中的低分子量地黄多糖(low-molecular-weight *Rehmannia glutinosa* polysaccharides, LRPS)不同于分子量近 20 万的地黄多糖, 其分子量仅为 1 000-2 000, 对小鼠 Lewis 肺癌具有明显的生长抑制作用。抗癌基因 p53 参与调控正常细胞及肿瘤细胞的生理活动, 而且与肿瘤细胞形成, 发展和死亡密切相关^[3,4]。

本文旨在探讨 LRPS 的抗肿瘤作用与 p53 基因表达的关系。

MATERIALS AND METHODS

材料 C57 小鼠, 体重 18-22 g, ♀, (2 级, 京动字 8910M049 号), 中国医学科学院肿瘤研究所提供; LRPS, 主要由 60% 四糖和 30% 三糖组成, 为本所提取分离; 环磷酰胺(cyclophosphamide), 上海第 12 制药厂生产; Lewis 肺癌细胞, 中国医学科学院药物研究所提供; p53, β-actin 引物, 自行设计, 为军事医学科学院放射医学研究所合成; 总 RNA 提取试剂盒, 逆转录试剂盒, Taq DNA 聚合酶 (5000 u·L⁻¹), dNTP (10 mmol·L⁻¹), 琼脂糖为 Promega 公司产品; [^α-³²P]dATP (111 PBq·mol⁻¹) 为北京亚辉生物工程公司产品; 丙烯酰胺, 二次结晶, 为 Serve 公司产品。

小鼠试验 在 20 只小鼠右腋 sc 接种肺癌细胞 (2.5 × 10⁶ 个/鼠), 24 h 后随机分成生理盐水对照组, LRPS 20 和 40 mg·kg⁻¹ 组, 和环磷酰胺 10 mg·kg⁻¹ 组。连续给药 8 d, 到 d 9 处死, 在无 RNA 酶的情况下取肿瘤, 称重, 置液氮中保存。并计算抑瘤率, 实验重复 2 次。

总 RNA 提取 每组取液氮保存的肿瘤组织 0.5 g (每鼠取 0.1 g) 置 50-mL 离心管中, 加预冷的异硫氰酸胍变性溶液 6 mL, 匀浆。加 NaAc (2 mol·L⁻¹, pH 4.0) 0.6 mL, 酚-氯仿-异戊醇混合液 6 mL, 震荡, 4 °C, 10 000 × g 离心 20 min。吸取上清, 加等容积异丙醇, -20 °C 放置 2 h 以上, 0 °C, 10 000 × g 离心 15 min。吸去上清。向沉淀中加 2.5 mL 变性溶液, 搅拌至 RNA 溶解。加 NaAc (2 mol·

¹ Phn: 86-10-6688-7429, ext 68627. Fax: 86-10-6821-1656.

E-mail: zhangyx@nic.bmi.ac.cn

Received 1996-07-23

Accepted 1997-05-19

L⁻¹, pH 4.0) 0.25 mL, 酚-氯仿-异戊醇混合液 2 mL, 震荡, 4 °C, 10 000 × g 离心 20 min. 上层水相转移到 10-mL 离心管中, 加等容积异丙醇, -20 °C 放置 2 h 以上, 0 °C, 10 000 × g 离心 15 min, 以预冷的 75 % 乙醇 5 mL 洗涤沉淀, 并按前法离心. 吸去乙醇, 在真空干燥器中干燥沉淀 15 min, 用 0.5-2 mL 无 RNA 酶的水溶解沉淀, -20 °C 保存备用; 同时进行紫外定量, 用甲醛变性电泳鉴定 RNA 的质量.

引物设计 引物设计是 PCR 成败的关键, 只有当引物设计正确时, PCR 产物才是高度特异性的. 根据文献报道的序列^[5,6], 用 Godkey 软件分别在 5' 端和 3' 端分别设计 β -actin 和 p53 引物, β -actin 上下游引物分别是: 5' CTGTGC-TATGTTGCTCTAGACTTC3', 5' AACGCTCAGTAACAGTCC-GC3', 合成片段长度为 506 bp. p53 上下游引物分别是: 5' CACGTACTCTCCTCCCTCAATA3', 5' TCTTCCAGTG-TGATGATGGTAAGG3', 合成片段长度为 405 bp. 设计的引物用计算机进行引物之间以及引物与基因库之间同源性检验. 经检验引物的内部无发夹结构, 引物之间无二聚体形成, 引物与基因库之间无非特异性同源区域. 引物由军事医学科学院放射医学研究所合成.

逆转录反应^[7,8] 在 0.5 mL Eppendorf 管中加入 rRNasin (4×10^7 u · L⁻¹) 0.5 mL, Oligo (dt) 15 引物 (0.5 g · L⁻¹) 1 μ L, 总 RNA 2 μ g, MgCl₂ (25 mmol · L⁻¹) 4 μ L, 10 × 逆转录缓冲液 2 μ L, AMV 逆转录酶 (2.5×10^7 u · L⁻¹) 0.6 μ L, 补加无 RNA 酶的水至总反应容积为 20 μ L, 混匀, 42 °C 反应 1 h, 95 °C 5 min 终止反应, 冰浴冷却 5 min, -70 °C 保存.

PCR 条件的选择 取一样本的总 RNA 逆转录混合物 8 μ L 进行 PCR 扩增, 从第 21 循环起每间隔 3 个循环取样 10 μ L 至第 36 循环, 产物进行 10 % 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 压片, 放射自显影, 扫描, 以 p53 与 β -actin 吸收峰面积的比值对扩增循环数作图, 选择最适的扩增循环数. 取一样本的总 RNA 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 μ L, 分别作模板进行 PCR 扩增, 产物进行 10 % 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 压片, 放射自显影, 扫描, 以 p53 与 β -actin 吸收峰面积的比值对模板量作图, 选择最适的模板量.

PCR 反应^[8-10] 在 0.5 mL Eppendorf 管中依次加入灭菌水 32.5 μ L, 10 × 缓冲液 5 μ L, MgCl₂ (25 mmol · L⁻¹) 4 μ L, dNTP (10 mmol · L⁻¹) 1 μ L, p53 (2.5 μ mol · L⁻¹) 3' 和 5' 端引物各 4 μ L, β -actin (2.5 μ mol · L⁻¹) 3' 和 5' 端引物各 2 μ L, 逆转录产物 2 μ L, Taq DNA 聚合酶 (5000 u · L⁻¹) 0.25 μ L, [α -³²P]dATP (111 PBq · mol⁻¹) 0.5 μ L, 混匀. 覆盖石蜡油 50 μ L, 稍加离心, 95 °C 变性 3 min. 设置反应程序: 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min 30 s, 周期为 29 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min.

PCR 产物定量 PCR 反应产物 5 μ L 加 1.5 μ L 载样缓

冲液, 以 1 × TBE 为电泳缓冲液, 在 10 % 聚丙烯酰胺凝胶电泳上 100 V 电泳 3-5 h, 将聚丙烯酰胺凝胶与 X 片进行压片, -70 °C 放置 6-8 h. 将 X 光片显影、定影、薄层扫描仪扫描. 然后计算 p53 与 β -actin 吸收峰面积的比值, 比较各组间 p53/ β -actin 比值的大小.

RESULTS

LRPS 的抑瘤率 荷 Lewis 肺癌小鼠给药 8 d 后取肿瘤、称重, 计算抑瘤率. LRPS 在最适有效剂量 20 和 40 mg · kg⁻¹ 时的抑瘤率接近, 约为 46 %, 说明 LRPS 有明显的抗肿瘤作用 (Tab 1).

Tab 1. Influence of LRPS on Lewis lung cancer growth and on p53 gene expression in tumor. $n = 10$ tumor tissues of 5 mice, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.01$ vs saline.

Group/mg · kg ⁻¹	Inhibition rate/%	p53/ β -actin
Saline	0	0.46 ± 0.10
LRPS	20	46.0 ± 5.7 ^a
	40	46.4 ± 0.4 ^a
Cyclophosphamide	10	52.0 ± 1.3 ^c
		1.60 ± 0.15 ^c

LRPS 对 p53 基因表达的影响

1) 总 RNA 的鉴定 本实验提取的 RNA 经紫外测得 A260/A280 及 A260/A230 的比值分别为 1.81 及 2.25, 表明所提 RNA 纯度高, 污染低. 从甲醛变性凝胶电泳上可清晰看到 28 s 和 18 s 两条条带, 其亮度之比为 2:1, 并隐约可见 5 s 条带, 弥散的条带为 mRNA. 表明 RNA 带完整, 没有降解, 可作为逆转录反应的模板.

2) PCR 条件的选择 我们设了一个内对照 (内标 β -actin), 在同一反应管内同时逆转录-PCR 扩增 p53 和内对照 β -actin, 并以二者的比值 (p53/ β -actin) 来衡量 p53 基因的表达水平. 扩增产物进行凝胶电泳 (Fig 1).

p53 和 β -actin 的扩增动力学相似, 循环数小于 33 时, p53 基因表达水平与扩增循环数之间有很好的线性关系 (Fig 2); 本实验选定 29 作为实验的循环数.

当模板量小于 4 μ L 时, 与 p53/ β -actin 成线性关系 (Fig 3). 故本实验选定 2 μ L (约 1 μ g) 作为实验的模板量.

3) 实验样本的检测结果 利用 RT-PCR 技术和设定的两对引物, 在上述选定的实验条件下, 分

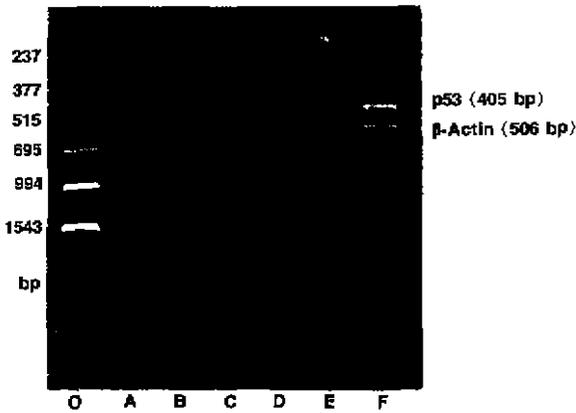


Fig 1. Agarose gel electrophoresis of PCR products performed on serial cycles. O: PCR markers; A, B, C, D, E, F: cDNA were respectively coamplified for 21, 24, 27, 30, 33, 36 cycles PCR.

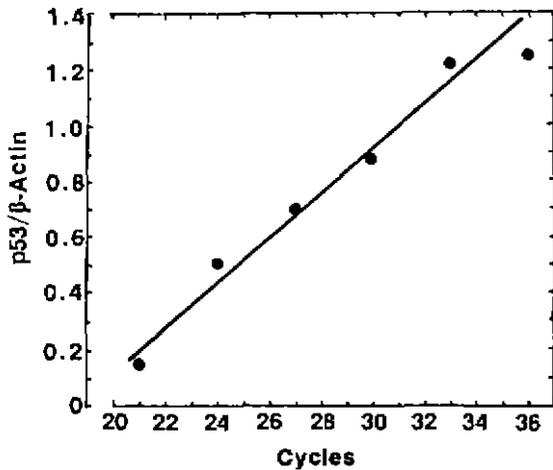


Fig 2. Influence of serial cycles on p53 gene expression.

别得到 p53 (405 bp) 和 β -actin (506 bp) 的扩增产物, 各实验组中均有 p53 和 β -actin 表达 (Fig 4).

然后对 X 光片上 p53 与 β -actin 两条带进行扫描, 计算 p53 与 β -actin 吸收峰面积之比值. LRPS 体内给药后能使肿瘤组织内的抗癌基因 p53 表达明显增加, 与对照组相比, 有显著差异 ($P < 0.01$) (Tab 1).

DISCUSSION

LRPS 体内对小鼠 Lewis 肺癌有明显的抑制作用. 为了探讨 LRPS 抗肿瘤作用与癌基因表达的关

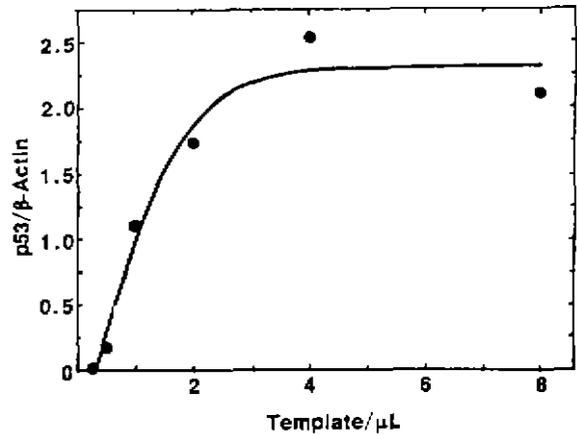


Fig 3. Influence of serial templates on p53 gene expression.

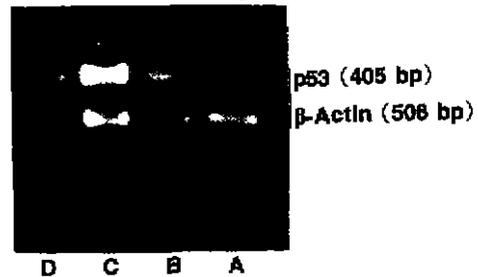


Fig 4. Autoradiograph of PCR products. A) Saline, B) LRPS $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, C) LRPS $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, D) Cyclophosphamide $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

系, 我们采用了定量 PCR 方法检测了 LRPS 对 Lewis 肺癌 p53 基因表达水平的影响. 与经典的检测基因表达的方法, 即 Northern 杂交和狭线杂交相比, 本方法灵敏度高, 专一性好, 简便快速. 尤适合于定量检测表达水平较低的基因.

本实验选择了在大多数细胞内呈高表达的 β -actin 作为内对照 (内标)^[8,10], 并以比值 p53/ β -actin 反应 p53 基因的表达水平, 使设定的比较标准更加合理, 避免了许多因素的干扰, 从而使测定的结果更加准确, 可靠.

近年来, 国内外对多糖类的研究有较大的进展, 但从基因水平去阐明多糖尤其是中药多糖的抗癌作用机制尚未见文献报道. 我们的工作说明, 在体内抗肿瘤有效剂量下, 低分子量地黄多糖可使小鼠 Lewis 肺癌细胞内的 p53 基因表达明显增加, 这一结果使我们对地黄多糖的抗肿瘤机理从基因水平上找到了依据, 因 p53 是一个公认

的抗癌基因,其表达产物的增多即意味着癌细胞活性的丧失,此外,p53基因是一个与程序性细胞死亡有密切关系的基因^[11-13]。从我们的上述实验结果推测,p53基因可能抑制与Lewis肺癌细胞增殖相关的基因,激活与Lewis肺癌细胞分化和程序性细胞死亡相关的基因,最终使肿瘤的增殖停滞,或使肿瘤细胞向正常细胞分化,或诱发肿瘤细胞的程序性细胞死亡,从而产生抗肿瘤作用。总之,LRPS对抗癌基因p53表达的影响可能是其抗肿瘤作用的机制之一。

REFERENCES

- 1 Chen LZ, Feng XW, Zhou JH, Tang JF. Immuno-tumoricidal effect of *Rehmannia glutinosa* polysaccharide b and its mechanism. *Chin J Pharmacol Toxicol* 1993; 7: 153-6.
- 2 Liu FJ, Tang JF, Zhao XN, Ru XB, Feng XW, Gu GM. Effects of *Rehmannia glutinosa* polysaccharides on the transplantation tumor in mice. *Chin Pharm J* 1995; 30 Suppl: 87-8.
- 3 Oren M. The p53 cellular tumour antigen: gene structure, expression and protein properties. *Biochim Biophys Acta* 1985; 823: 67-78.
- 4 Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-6.
- 5 Tokunaga K, Taniguchi H, Yoda K, Shimizu M, Sakiyama S. Nucleotide sequence of a full-length cDNA for mouse cytoskeletal β -actin mRNA. *Nucleic Acids Res* 1986; 14: 2829-33.
- 6 Arai N, Nomura D, Yokota K, Wolf D, Brill E, Shohat O, et al. Immunologically distinct p53 molecules generated by alternative splicing. *Mol Cell Biol* 1986; 6: 3232-9.
- 7 Kevin PF. Quantitation of RNA using the polymerase chain reaction. *Techniques* 1993; 9: 380-4.
- 8 Dukas K, Sarfati P, Vaysse N, Pradayrol L. Quantitation of changes in the expression of multiple genes by simultaneous polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1993; 215: 66-72.
- 9 Apostolakis MJ, Schuermann WHT, Frampton MW, Utell MJ, Willey JC. Measurement of gene expression by multiplex competitive polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1993; 213: 277-84.
- 10 Babu JS, Kanangat S, Rouse BT. Limitations and modifications of quantitative polymerase chain reaction. Application to measurement of multiple mRNAs present in small amounts of sample RNA. *J Immunol Methods* 1993; 165: 207-16.
- 11 Mercer WE. Cell cycle regulation and the p53 tumor suppressor protein. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1992; 2: 251-63.
- 12 Lee JM, Bernstein A. Apoptosis, cancer and the p53 tumour suppressor gene. *Cancer Metastasis Rev* 1995; 14: 149-61.
- 13 Kastan MB, Canman CE, Leonard CJ. p53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer. *Cancer Metastasis Rev* 1995; 14: 3-15.

474-477

26

生长抑素和电针抑制关节炎大鼠脊髓 c-fos 的表达

阮怀珍, 李希成, 黎海蒂, 赵邦云 (第三军医大学生理教研室, 重庆 630038, 中国)

R 274.943

R 684.305

Somatostatin and electroacupuncture inhibited c-fos expression in spinal cord of arthritic rats

RUAN Huai-Zhen, LI Xi-Cheng, LI Hai-Di, ZHAO Bang-Yun

(Department of Physiology, Third Military Medical College, Chongqing 630038, China)

KEY WORDS somatostatin; electroacupuncture; adjuvant arthritis; spinal cord; proto-oncogene proteins c-fos; immunohistochemistry

AIM: To observe the effect of intrathecal injection of

somatostatin (Som) associated with electroacupuncture (EA) at "Jiaji" points on c-fos protein expression of spinal cord in pain rats. **METHODS:** Rats with adjuvant arthritis were used as pain model and the c-fos-like immunoreactivity (FLI) was detected by immunohistochemistry. **RESULTS:** The c-fos protein expression induced by arthritis were found in all of the I - X laminae of the ipsilateral spinal cord of rats, and most of the labeled cells were located in the laminae I - II and V - VI. Som and EA suppressed the c-fos expression and the lessening of FLI cells in the spinal cord. **CONCLUSION:** Pathological pain following arthritis activated pain sensitive neurons (PSN) and evoked c-fos expression in spinal cord,