

# 温下肠腑方对大鼠大肠癌细胞周期素 D1、增殖细胞核抗原表达的影响

季旭明 欧阳兵 于华芸 吴智春 王春燕

**【摘要】目的** 探讨温下肠腑方对二甲基胍诱导的大鼠大肠癌细胞周期素 D1( CyclinD1 )、增殖细胞核抗原( PCNA )表达的影响。**方法** 予以大鼠 1,2 - 二甲基胍腹腔注射,建立大鼠大肠癌模型,温下肠腑方灌胃给药干预,在第 15、20、23 周时间点,分别用免疫荧光组织化学法结合激光共聚焦显微镜扫描和免疫组织化学法观察中药对大鼠肠组织 CyclinD1 和 PCNA 表达的影响。**结果** 在第 15、20、23 周时间点,与对照组比较,模型组大鼠肠组织 CyclinD1 蛋白和 PCNA 蛋白表达均显著增高,差异有统计学意义(  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  );与模型组比较,温下方组 Cyclin D1 蛋白和 PCNA 蛋白表达显著降低,差异有统计学意义(  $P < 0.05$  )。**结论** 温下肠腑方能够显著降低肠癌动物模型肠组织 CyclinD1、PCNA 表达,提示温下肠腑方可能通过抑制 CyclinD1、PCNA 的表达而抑制肠癌细胞的增殖。

**【关键词】** 大肠癌;温下肠腑方;细胞周期素 D1( CyclinD1 );细胞核增殖抗原( PCNA )

## Effects of Wenxiachangfu Formula on the Expression of Cyclin D1, PCNA in Rats with Colorectal Cancer

Ji Xu - ming, OU Yang - bing, YU Hua - yun, WU Zhi - chun, WANG Chun - yan

( College of Basic Medical Sciences, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan Shandong 250035 )

**【 Abstract 】 Objective** To discuss the effects of wenxiachangfu formula on the expressions of cyclin D1 and proliferating cell nuclear antigen( PCNA ) in the rats with colorectal cancer induced with dimethyl hydrazine. **Methods** The intraperitoneal injection with 1,2 dimethyl hydrazine( DMH ) was applied to establish the model of colorectal cancer in rat. The medicinal intervention of wenxiachangfu formula was administrated through gastric infusion. On the time points of the 15th, 20th and 23rd weeks, the immunofluorescence histochemical method combined with confocal laser scanning microscopy and immunohistochemical method were used to observe the effects of Chinese herbal medicine on the expressions of cyclin D1 and PCNA in colorectal tissue of rats. **Results** On the time points of the 15th, 20th and 23rd weeks, compared with control group, the expressions of cyclin D1 protein and PCNA protein in the colorectal tissue of rat increased significantly in model group, presenting statistical significant difference(  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$  ). Compared with model group, the expressions of cyclinD1 and PCNA in wenxiachangfu formula decreased significantly, indicating significant difference(  $P < 0.05$  ). **Conclusion** Wenxiachangfu formula significantly reduces the expressions of cyclin D1 and PCNA in the colorectal tissue of the animal model with colorectal cancer. It is proposed that wenxiachangfu formula inhibits colorectal cancer cellular proliferation by down - regulating the expressions of cyclin D1 and PCNA.

**【 Key words 】** Colorectal cancer; Wenxiachangfu formula; Cyclin D; Proliferating cell nuclear antigen ( PCNA )

原发性大肠癌是肠道常见的恶性肿瘤之一,包括中医药在内的多学科综合疗法已显现成效。中医药以其辨证诊治、多靶点治疗的优势在大肠癌的治疗中发挥着不可替代的作用,提高了患者的生存质量。本实验通过腹腔注射 1,2 - 二甲基胍( DMH )建立大鼠大肠癌模型,观察温下肠腑方( 以

下简称温下方 )对大鼠大肠癌模型细胞周期素蛋白 D1( CyclinD1 )、增殖细胞核抗原( PCNA )表达的影响,以探讨其可能的作用机制。

### 材料和方法

#### 一、实验材料

1. 实验动物:清洁级健康成年 Wistar 大鼠 150 只,雌雄各半,体重 170 ~ 220 g,由山东大学实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK( 鲁 )20030004。

2. 实验药物:温下肠腑方由人参 12 g,大黄 9 g,

基金项目:山东省自然科学基金资助课题( No. Y2003C47 )

作者单位:山东中医药大学,山东 济南 250355

通讯作者:欧阳兵,Email:doctoroy@sina.com

附子 6 g, 当归 12 g 组成。人参为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的根; 大黄为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 的根; 附子为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 的旁生块根; 当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. 的根。经山东中医药大学中药鉴定教研室鉴定为正品。方中人参、大黄、附子用乙醇提取 2 次, 当归水提挥发油后与余 3 味药共同浓缩, 煎药浓度为  $0.6 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冷藏备用。

3. 试剂和仪器: 1, 2 - 二甲胍 (DMH) 购自美国 Aldrich 公司, 注射前于含有乙二胺四乙酸 (EDTA) 的生理盐水中配制。兔抗鼠 PCNA 单克隆抗体 (批号: ZM - 2154)、兔抗鼠 CyclinD1 单克隆抗体 (批号: ZM - 0385) 购于北京中杉金桥生物技术有限公司; LSM510 型激光共聚焦显微镜 (德国 Zeiss 公司)。

## 二、实验方法

1. 动物分组和给药: 实验动物随机分为对照组、模型组和温下脏腑方组 (简称温下方组), 每组 50 只。对照组按  $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  腹腔注射  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA, 每周 1 次; 其余各组按  $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  腹腔注射 DMH, 每周 1 次, 连续 23 周。温下方组从造模开始按生药  $9.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  以温下方水煎液灌胃, 模型组与正常组予等容积生理盐水灌胃, 每周连续 6 d。

2. 实验动物处理及取材: 各组动物分别于第 5 周、第 10 周、第 15 周、第 20 周和第 23 周各处死 10 只, 分离大肠, 纵行剪开, 用预冷的生理盐水冲洗干净, 分别在距离肛端  $1.5 \sim 3.5 \text{ cm}$ ,  $9 \sim 11 \text{ cm}$  及距回盲肠部  $2 \sim 4 \text{ cm}$  处 (有肿块或病变明显的不定位) 取材, 置于 10% 甲醛溶液中固定, 石蜡包埋。

3. CyclinD1 蛋白表达的检测: 采用免疫荧光组织化学法结合激光共聚焦显微镜检测肠组织 CyclinD1 蛋白表达。石蜡切片  $5 \text{ }\mu\text{m}$  厚, 脱蜡至水, 微波修复抗原, PBS 冲洗 2 次, 山羊血清封闭, 滴加一抗, 入湿盒  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  过夜, PBS 冲洗 3 次, 滴加 FITC 标记的二抗,  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  温育, PBS 冲洗, 浸泡后镜下观察。激发光  $488 \text{ nm}$ , 发射光  $510 \text{ nm}$ , 激光共聚焦显微镜观察, 计算平均荧光值表示 CyclinD1 蛋白的表达。

4. PCNA 蛋白表达的检测: 采用免疫组织化学法检测。石蜡切片  $4 \text{ }\mu\text{m}$  厚。脱蜡至水, 过氧化氢室温灭活内源性酶, 柠檬酸盐溶液微波修复抗原, 山羊血清封闭抗原, 滴加适当稀释的一抗,  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  过夜。PBS 漂洗, 滴加生物素化二抗,  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  温育, PBS 漂洗, DAB 显色。脱水, 透明, 封片。图像分析仪上

检测平均光密度值。以 PBS 代替一抗作阴性对照。PCNA 阳性细胞为细胞核染色成棕黄色、细胞浆不着色。

## 三、统计学处理

采用 SPSS14.0 统计学软件进行分析, 数据用均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 两组间比较用独立样本  $t$  检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. 温下方对大鼠肠癌变过程中 CyclinD1 蛋白表达的影响: 镜下观察显示, CyclinD1 蛋白阳性表达在细胞核内。在第 5 周、第 10 周时间点, 各组大鼠肠组织 CyclinD1 表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 与对照组比较, 模型组 CyclinD1 表达在第 15、20、23 周时间点显著增高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 温下方组 CyclinD1 表达在第 15、20、23 周时间点显著降低 ( $P < 0.05$ )。结果见表 1。

表 1 温下方对大鼠肠癌变过程中 CyclinD1 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组 别	第 5 周	第 10 周	第 15 周	第 20 周	第 23 周
对照组	36.85 $\pm$ 8.69	41.37 $\pm$ 13.28	37.68 $\pm$ 12.38	39.41 $\pm$ 13.03	42.13 $\pm$ 15.37
模型组	42.37 $\pm$ 10.28	48.56 $\pm$ 11.59	87.62 $\pm$ 13.25 <sup>a</sup>	92.37 $\pm$ 11.29 <sup>a</sup>	99.42 $\pm$ 19.23 <sup>a</sup>
温下方组	38.79 $\pm$ 12.23	48.94 $\pm$ 13.21	59.07 $\pm$ 12.83 <sup>b</sup>	63.25 $\pm$ 18.26 <sup>b</sup>	65.87 $\pm$ 14.32 <sup>b</sup>

注: 与对照组同时时间点比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组同时时间点比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

2. 温下方对大鼠肠癌变过程 PCNA 蛋白表达的影响: 镜下观察显示, PCNA 表达在细胞核内。在第 5、10 周时间点, 对照组、模型组、温下方组大鼠 PCNA 表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 与对照组比较, 模型组 PCNA 表达在第 15、20、23 周时间点明显增高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 温下方组 CyclinD1 表达在第 15、20、23 周时间点明显降低 ( $P < 0.05$ )。

表 2 温下方对大鼠肠癌变过程中 PCNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组 别	第 5 周	第 10 周	第 15 周	第 20 周	第 23 周
对照组	0.285 $\pm$ 0.044	0.262 $\pm$ 0.029	0.243 $\pm$ 0.060	0.243 $\pm$ 0.028	0.251 $\pm$ 0.020
模型组	0.224 $\pm$ 0.056	0.312 $\pm$ 0.038	0.521 $\pm$ 0.082 <sup>a</sup>	0.622 $\pm$ 0.046 <sup>b</sup>	0.693 $\pm$ 0.058 <sup>b</sup>
温下方组	0.237 $\pm$ 0.031	0.309 $\pm$ 0.041	0.382 $\pm$ 0.073 <sup>c</sup>	0.405 $\pm$ 0.051 <sup>c</sup>	0.455 $\pm$ 0.039 <sup>c</sup>

注: 与对照组同时时间点比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组同时时间点比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$

## 讨 论

中医学对肠癌未有确切称谓, 但有如“积聚”“肠□”“肠风”“脏毒”“锁肛痔”等记载。肠癌病位在肠, 病因为阳虚内寒或寒邪内侵, 寒毒积滞是其主要病机之一。温以散寒、下以行滞的温下法, 是

防治大肠癌的有效思路及方法。

温下方由附子、大黄、人参、当归四药组成。附子补火助阳、温散寒凝、宣通冷积；大黄泻下通便、荡涤里实、活血 $\square$ 瘀。两药寒温同用，苦辛相合，能降能通，共奏温下之功，共为君药。臣以人参，大补元气、补脾益肺，与附子相合，温补阳气以解散寒凝。当归补血活血，与人参配伍气血双补，且能润燥滑肠，助大黄泻下逐瘀，为方中佐药。四药合用，寒温同用，辛苦并行，攻补兼施，温、补、下、消四法同施，相反相成，共成温通寒积之剂，使阳气复、寒邪祛、积滞下、瘀血通。现代药理研究结果表明，大黄、附子、人参、当归均有明显的抑瘤作用。前期研究证实<sup>[1-2]</sup>，温下方对肿瘤有抑制作用，且其含药血清能诱导肠癌细胞凋亡。

CyclinD1 即细胞周期素蛋白 D1，由定位于 11q13 的原癌基因 CCND1 基因编码。表达的 CyclinD1 蛋白激活细胞周期依赖性蛋白激酶( Cyclin dependent kinase, CDK )，进而通过下游的信号分子促进 DNA 合成，加快细胞由 G<sub>1</sub> 期进入 S 期，从而导致细胞失控性生长<sup>[3]</sup>，与多种肿瘤的发生有密切关系。有研究显示<sup>[4]</sup>，CyclinD1 对大肠癌进展、诊断和判断预后方面具有重要意义，可能是大肠癌发生过程中的早期分子事件。

增殖细胞核抗原( Proliferating cell nuclear antigen, PCNA )又称周期素，是由 261 个氨基酸组成的一种酸性核蛋白，是 DNA 聚合酶  $\delta$  的辅助蛋白，它的合成与 DNA 复制和细胞增殖直接相关<sup>[5]</sup>。在静

止期细胞中含量很少，G<sub>1</sub> 晚期开始增加，S 期达到高峰，G<sub>2</sub>、M 期明显下降，是控制 DNA 复制以及细胞分裂的关键因素，因此它的表达程度反映了细胞增殖活性的高低，目前已把它作为衡量细胞增殖状态的一个客观指标<sup>[6]</sup>。

实验结果显示，模型组大鼠在第 15、20、23 周时间点 CyclinD1 和 PCNA 蛋白表达均显著高于正常对照组(  $P < 0.05$  )；在上述时间点温下方组的 CyclinD1 和 PCNA 蛋白表达则较模型组显著降低(  $P < 0.05$  )。提示 CyclinD1 和 PCNA 蛋白的表达与大肠癌的发生发展有密切关系，而温下方可以通过下调大肠癌大鼠 CyclinD1 和 PCNA 蛋白的表达以抑制过度的细胞增殖，发挥治疗作用。

### 参 考 文 献

- [1] 季旭明, 欧阳兵, 李文华. 温下方对肿瘤的抑制作用及对免疫功能的影响[ J ]. 中医药信息, 2003, 20( 6 ): 48 - 49.
- [2] 欧阳兵, 季旭明. 温下方含药血清诱导肠癌细胞凋亡的实验研究[ J ]. 山东中医药大学学报, 2005, 29( 6 ): 467 - 469.
- [3] Yousef EM, Hasuma T, Morishima Y, et al. Overexpression of cyclinD1 in rat esophageal carcinogenesis model[ J ]. Cancer Res, 1997( 88 ): 18 - 25.
- [4] 焦学信, 任勇亚. 大肠癌 p16<sup>Ink4a</sup> 和周期素 D1 的表达及临床意义[ J ]. 江苏医药, 2008, 34( 11 ): 1104 - 1108.
- [5] 李世荣, 韩英, 张明智, 等. 大肠癌[ M ]. 北京: 科学技术出版社, 2000: 96.
- [6] 陈锋, 张桥. 螺旋藻对二甲胍诱导大肠变性隐窝的抑制作用[ J ]. 中华预防医学杂志, 1995, 29( 1 ): 13.

( 收稿日期: 2011 - 03 - 05 )

### · 信息 ·

## 全国中医“脑心同治”理论与临床应用学术交流征文通知

由中华中医药学会主办, 步长集团协办, 《世界中西医结合杂志》社承办的全国中医“脑心同治”理论与临床应用学术交流会将于 2011 年 10 月召开。征文细则如下:

一、征文内容: 与“脑心同治”理论有关的中医理论基础、文献研究、临床研究( 如步长脑心通的临床应用等 )、实验研究等学术论文均可参加本次征文活动。

二、征文要求: ( 1 ) 未正式公开发表过的论文; ( 2 ) 论文务求主题鲜明、论据充分、资料详实; ( 3 ) 请注明作者姓名、单位、通讯地址、联系电话、电子信箱、邮编, 以 Word 文档形式将稿件发送至 nztz\_zhengwen@126.com, 来稿注明“全国中医‘脑心同治’理论与临床应用学术交流征文”标题; ( 4 ) 截稿日期: 2011 年 9 月 1 日。

### 三、奖项设置

论文由中华中医药学会与《世界中西医结合杂志》社负责组织专家评审, 评出一等奖 3 篇, 每篇奖励 3000 元; 二等奖 5 篇, 每篇奖励 2000 元; 三等奖 10 篇, 每篇奖励 1000 元; 鼓励奖 50 名, 每篇奖励 500 元。推荐一、二等奖获奖论文在中国科技核心期刊《世界中西医结合杂志》上免费发表, 其他获奖论文可以优先发表。获奖者将被邀请参加学术交流活动及颁奖大会, 投稿作者也均有机会参加本次学术交流大会, 并获国家级中医药继续教育学分证书。

### 四、联系方式

联系人: 李晨 电话( 兼传真 ): 010 - 64822253

通讯地址: 北京市朝阳区北四环东路 115 号院 6 号楼 109 室, 邮编 100101