

乳宁Ⅱ号对人乳腺癌 MDA-MB-435 裸小鼠移植瘤中血管内皮生长因子表达的影响

高尚璞¹ 阙华发¹ 牟明春² 贾喜花¹ 宋瑜¹ 指导:唐汉钧¹

摘要 目的:研究乳宁Ⅱ号对人乳腺癌 MDA-MB-435 细胞株裸小鼠移植瘤中血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响。方法:将体外培养的人乳腺癌 MDA-MB-435 细胞接种于裸小鼠右腋部皮下,造成小鼠移植瘤肺转移模型,同时予乳宁Ⅱ号治疗。结果:乳宁Ⅱ号可抑制移植瘤生长,减少肺转移的发生,降低肿瘤组织中 EVGF 蛋白($P<0.01$)及 VEGF mRNA 表达($P<0.05$)。结论:乳宁Ⅱ号可能是通过降低肿瘤组织中 VEGF 蛋白及 VEGF mRNA 表达,发挥抑瘤和抗转移作用。

主题词 乳腺肿瘤/中医药疗法 @ 乳宁Ⅱ号

乳宁Ⅱ号是上海中医药大学附属龙华医院中医外科临床经验方,长期应用于临床取得了良好的疗效。本实验试图通过观察乳宁Ⅱ号对人乳腺癌 MDA-MB-435 裸小鼠移植瘤及肺转移率的抑制,以及对移植瘤中血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响,阐明乳宁Ⅱ号防治乳腺癌复发转移的分子机制。

1 实验材料

1.1 动物: BALB/cA 雌性裸小鼠, SPF 级, 35~40 日龄, 体重 $20\pm 2\text{g}$, 由中国科学院上海药物研究所提供。合格证编号:沪动合证字 122 号。

1.2 药物来源与制剂加工:乳宁Ⅱ号由生黄芪 30g、枸杞子 15g、天冬 12g、生薏苡仁 15g 等组成,经水煎浓缩至每毫升含生药 2g,供实验用;环磷酰胺(CTX)、三苯氧胺(TAM)均由上海华联制药有限公司生产;生理盐水由上海市富民制药厂生产。

1.3 肿瘤细胞株:人乳腺癌细胞株 MDA-MB-435 由北京大学医学部病理教研室提供。

1.4 试剂及仪器:VEGF 多克隆抗体为 Santa Cruz Biotechnology Inc 产品,工作浓度 1:25~1:50;Envision 二抗为兔抗鼠 IgG;3,3'-二氨基联苯胺(DAB)为上海华美生物工程公司产品;异硫氰酸胍、SuperScript II (SS_{II})逆转录酶为 Gibco 公司产品;Oligo (dT)、dNTPs(4 种各 100mM)为 Promega 公司产品;TaqDNA 聚合酶由 Biostar 公司生产;引物由上海生工

公司合成。仪器:RNA/DNA 定量检测仪为 Pharmacia 公司产品;聚合酶链反应仪(PCR 仪)为 PE 公司产品;电泳仪及水平式电泳槽购自 Bio-Rad 公司;凝胶数码成像及分析系统购自 Alpha Innotech 公司。

2 方法

2.1 造模及实验分组设计:参照《中药药理研究方法学》^[1]计算人鼠等效剂量。BALB/cA 裸小鼠共 39 只,参照文献[2]方法,取体外培养的对数生长期 MDA-MB-435 人乳腺癌细胞,细胞浓度调整为 $1\times 10^7/\text{ml}$ 。无菌条件下,接种于裸小鼠左侧第二乳头下的脂肪垫,接种量为 0.1ml/只(细胞数为 $1\times 10^6/\text{只}$)。2 周后将动物随机分成 4 组,阴性对照组 15 只,给药组每组 8 只。乳宁Ⅱ号组每天口服给药 1 次,剂量为 48g/kg,每周给药 5 次;CTX 组每周口服给药 3 次,剂量为 30mg/kg;TAM 组每天口服给药 1 次,剂量为 2.7mg/kg,每周给药 5 次;阴性对照组口服等体积生理盐水,共 10 周。

2.2 取材方法:停药后 11 天处死动物,将动物随机分成两批进行取材,第一批每组 3 只,共 12 只,脱颈处死,称体重;解剖取下瘤块和肺,迅速称瘤重、肺重,裸小鼠实际体重为所称体重减去瘤重。取肿瘤组织 $1\text{cm}\times 0.5\text{cm}\times 0.5\text{cm}$,放入冻存管,迅速投入液氮罐,用以检测 VEGF mRNA。第二批称体重、肺重和瘤重,将肺组织于固定液(饱和苦味酸:甲醛:冰醋酸=75:25:5)中固定 24 小时,再用无水乙醇浸泡至肺组织颜色恢复,转移灶为白色结节。在显微镜下计数肺转移结节个数。将瘤块 $1.0\text{cm}\times 1.0\text{cm}\times 0.3\text{cm}$ 放入 10% 中性甲醛固定。第一批肺组织的处理同第二批。

2.3 VEGF 蛋白表达的检测:(1)检测方法:取 MDA-MB-435 裸小鼠移植瘤新鲜标本固定于 10% 中性甲醛,经脱水、透明、渗蜡、包埋,连续切片,每例分别进行 HE 染色(用以对照病理诊断),以免疫组化 Envision 二步法测定 VEGF。(2)图像分析:选择 200 倍视野,每张免疫组化片任选 2 个视野,分析视野中免疫组化阳性面积占整个视野面积的百分比。

2.4 VEGF mRNA 基因表达的检测:用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法,取乳宁Ⅱ号组、CTX 组、TAM 组、生理盐水组分别冻存瘤块标本,每组 3 个。

基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(39800194)

1 上海中医药大学附属龙华医院中医外科,上海市宛平南路 725 号(200032)

2 河北省沧州市中心医院超声中心

收稿日期:2002-11-04;修回日期:2003-01-14

表1 各组人乳腺癌MDA-MB-435细胞裸小鼠移植瘤及肺转移情况比较($\bar{x} \pm s$)

组别	给药剂量	鼠数	体重(g)	肺重(g)	瘤重(g)	肺转移结节(个)	转移抑制率(%)
生理盐水组	0.5ml/只	15	23.0 $\pm$ 3.4	0.29 $\pm$ 0.09	4.1 $\pm$ 2.1	11.5 $\pm$ 7.7	—
CTX组	30mg/kg	7	22.4 $\pm$ 1.8	0.32 $\pm$ 0.25	2.1 $\pm$ 1.5 Δ	8.6 $\pm$ 6.5	25.2
TAM组	2.7mg/kg	7	24.4 $\pm$ 2.9	0.24 $\pm$ 0.08	3.6 $\pm$ 1.8 Δ	12.3 $\pm$ 11.8	—
乳宁Ⅱ号组	48g/kg	8	23.6 $\pm$ 1.2	0.24 $\pm$ 0.04	1.9 $\pm$ 0.9 Δ^*	8.4 $\pm$ 7.0	27.0

与生理盐水组比较, $\Delta P < 0.05$; 与 TAM 组比较, $* P < 0.05$

表2 各组乳腺癌MDA-MB-435裸小鼠移植瘤中

VEGF蛋白的表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	给药剂量	鼠数	VEGF阳性面积(%)
生理盐水组	0.5ml/只	10	27.1 $\pm$ 3.7
CTX组	2.7mg/kg	12	15.4 $\pm$ 3.6 Δ
TAM组	48g/kg	12	18.1 $\pm$ 5.5 Δ
乳宁Ⅱ号组	30mg/kg	10	8.8 $\pm$ 1.8 $\Delta\Delta\blacklozenge$

与生理盐水组比较, $\Delta P < 0.01$; 与 TAM 组比较, $\blacklozenge P < 0.01$; 与 CTX 组比较, $\blacktriangle P < 0.01$

表3 各组乳腺癌MDA-MB-435裸小鼠移植瘤中

VEGF mRNA的表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	给药剂量	鼠数	VEGF mRNA
生理盐水组	0.5ml/只	3	1.008 $\pm$ 0.092
乳宁Ⅱ号组	30mg/kg	3	0.735 $\pm$ 0.073 $\Delta\blacktriangle$
CTX组	2.7mg/kg	3	0.521 $\pm$ 0.095 $\Delta\Delta$
TAM组	48g/kg	3	0.791 $\pm$ 0.117

与生理盐水组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 CTX 组比较, $\blacktriangle P < 0.05$

组织标本总RNA抽提:异硫氰酸胍法——参见《分子生物学常用实验方法》^[3]。抽提好的总RNA测定OD260/OD280光密度值定量,并用电泳法鉴定其分子完整性。

逆转录(RT,总体积20 μ l):VEGF-A扩增片段为VEGF189(638bp)VEGF165(566bp)VEGF121(434bp); β -肌动蛋白(β -actin)扩增片段:690bp。Oligo T,1 μ l;总RNA,1 μ g(根据OD260/OD280定量结果计算体积),H₂O补足体积至12 μ l;70℃解链反应10分钟立即置冰上(5 $\times$ buffer,4 μ l;0.1DTT,2 μ l;10mM dNTPs,1 μ l;SS,逆转录酶,1 μ l,200U/ μ l);42℃逆转录反应50分钟,70℃反应10分钟灭活逆转录酶。

聚合酶链反应(PCR,总体积20 μ l):H₂O,15 μ l;10 $\times$ buffer,2 μ l;10mM dNTPs,0.5 μ l;正反向引物各0.5 μ l(25 μ l/L);反转录产物1 μ l;Taq酶(Biostar),0.5 μ l(5U/ μ l)。试剂混匀后离心,置PCR仪上开始PCR反应。反应条件为:95℃预变性5分钟,94℃30秒、61℃30秒、72℃45秒,35个循环(β -actin为30个循环),72℃延伸15分钟,结束反应。

电泳分析结果:配制1.3%的琼脂糖电泳胶,VEGF产物5 μ l, β -actin产物4 μ l,6 $\times$ 溴酚蓝上样液

1.5 μ l,混匀后加入同一加样孔电泳。

2.5 统计方法:采用SPSS for Windows软件包完全随机设计资料的单因素方差分析及采用重复测量数据方差分析的统计方法进行统计, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

3 结果

3.1 乳宁Ⅱ号对乳腺癌MDA-MB-435裸小鼠移植瘤的抑瘤及抗转移作用:从表1可以看出,乳宁Ⅱ号组、CTX组的瘤重明显低于TAM组和生理盐水组($P < 0.05$),4组体重、肺重、肺转移灶个数均未见统计学差异($P > 0.05$)。

3.2 乳宁Ⅱ号对乳腺癌MDA-MB-435裸小鼠移植瘤中VEGF蛋白表达的影响:从表2可以看出,乳宁Ⅱ号组、CTX组和TAM组移植瘤中VEGF蛋白的阳性表达均较生理盐水组有显著下降($P < 0.01$),其中乳宁Ⅱ号组VEGF的表达明显低于CTX组和TAM组($P < 0.01$),而CTX组和TAM组VEGF的表达差异无显著性($P > 0.05$)。

3.3 乳宁Ⅱ号对乳腺癌MDA-MB-435裸小鼠移植瘤中VEGF mRNA基因表达的影响:本组结果VEGF mRNA为一半定量结果,由于例数较少未做统计学分析。表3数据显示,CTX可降低移植瘤中VEGF mRNA表达,与生理盐水组比较差异有显著性($P < 0.01$),乳宁Ⅱ号组在降低移植瘤VEGF mRNA的表达上也有一定的作用,与生理盐水组比较差异有显著性差异($P < 0.05$),但不及CTX组($P < 0.05$)。

4 讨论

我们认为,正气内虚为乳腺癌复发转移的内因,正虚邪实为乳腺癌复发转移的关键。强调控制乳腺癌的复发转移必须从扶正祛邪两个方面入手,扶正为主,祛邪为辅。一方面通过扶正调整机体阴阳、气血、脏腑、经络功能的平衡,调动机体内在的防御机制;另一方面,通过控制和消灭癌毒,阻断癌毒复发转移的潜在可能。我们在此认识的基础上拟定了益气扶正,调摄冲任,解毒化浊的乳宁Ⅱ号,作为防治乳腺癌复发转移的基础方,对乳腺癌术后患者具有改善症状、延长生存期、提高生活质量、缓解和稳定瘤灶、减少或防治复发转移等

作用。从动物实验中瘤重和肺转移抑制率结果可以看出,乳宁Ⅱ号有较好的抑瘤和抗转移作用。恶性肿瘤的生长、侵袭及转移过程受到多种因素影响,其中血管生成是肿瘤组织迅速增殖和转移扩散的重要条件之一,新生血管为肿瘤组织提供充足的养分,同时发育不完善的微血管也为肿瘤细胞进入循环转移扩散提供便利。

目前至少已发现 10 余种具有促进血管生成活性的肽类物质,其中尤以 VEGF 研究较多^[4]。VEGF 是一种由肿瘤细胞分泌的与肝素结合的二聚体分泌性糖蛋白,其前体 RNA 包括 8 个外显子和 7 个内含子,8 个外显子组成的单一基因转录后经剪切表达 5 种不同相对分子质量的 VEGF mRNA,其中 VEGF₁₆₅ 和 VEGF₁₂₁ (可溶性)变异体扩散力强,容易到达靶细胞,促进血管内皮细胞增殖,增加血管内皮细胞通透性,二者与 VEGF 的生物学活性密切相关。Brown 等^[5]报道浸润性乳腺癌 VEGF mRNA 的表达增强。还有研究发现,乳腺癌细胞中富含 VEGF 者,术后复发比含 VEGF 较少者出现早。

本文用 RT-PCR 方法检测 MDA-MB-435 裸小鼠移植瘤中 VEGF mRNA 的表达情况,发现移植瘤中均有 VEGF mRNA 的表达,对其表达作相对定量检测结

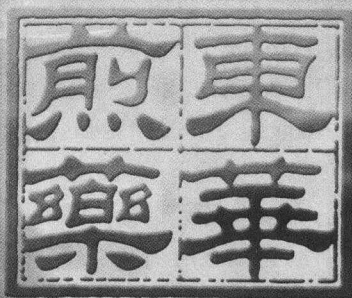
果显示,乳腺移植瘤中 VEGF mRNA 表达亚型有 VEGF₁₆₅、VEGF₁₂₁,且这两个低分子量亚型表达量较高,与文献报道相符。该结果还显示,乳宁Ⅱ号组 VEGF mRNA 表达明显减少,表明乳宁Ⅱ号有抑制乳腺癌 VEGF mRNA 表达的作用。我们进一步用抗人 VEGF 的多抗对移植瘤中 VEGF 的蛋白表达情况进行免疫组化检测,发现移植瘤中均有 VEGF 蛋白的表达,其中乳宁Ⅱ号组的表达量均较其余组降低,结果与 RT-PCR 检测结果一致,表明乳宁Ⅱ号通过抑制 VEGF 表达,抑制了肿瘤新生血管的形成,发挥了抗肿瘤和抗转移的作用。

参考文献

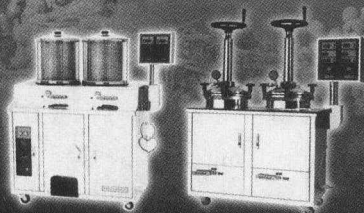
- 1 陈奇主编. 中药药理研究方法学. 北京:人民卫生出版社,1994:33.
- 2 Price JE, Polyzos A, Zhang RD, et al. Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice. *Cancer Res*, 1990, 50 (3): 717-721.
- 3 姜泊, 张亚历, 周殿元主编. 分子生物学常用实验方法. 北京:人民军医出版社, 1996:56-59.
- 4 王俊杰. 三苯氧胺抗肿瘤的分子生物学机制. 国外医学肿瘤学分册, 1997, 24(6): 335-338.
- 5 Liu Z, Brattain MG, Appert H, et al. Differential display of reticulocalbin in the highly invasive cell line, MDA-MB-435, versus the poorly invasive cell line, MCF-7. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 231(2): 283-289.

中药煎煮专家 撷取百草精华

您的病人会煎中药吗?



东华煎药包装设备



6大系列
25个品种
30个办事处
100位维修工程师
3,000家医院药店正在使用
10,000名终端用户见证了
东华10年的奋斗历程

中药煎煮除了费时费力之外,其科学的过程和方法也尤为重要。清代医学家徐灵胎曾说:“煎药之法最宜深讲,药之效与不效,全在于此”。药物浸泡和煎煮时间过长或过短,药汤过浓或过淡,都会极大影响中药的疗效并延长病患治愈的时间。

东华煎药包装设备可一次性完成浸泡、煎煮和自动包装成袋等全过程,时间的安排和火候的掌控完全符合中药理论的要求,不但充分撷取百草精华以发挥中药的药效,也省却了患者煎药的麻烦。

东华集团愿协助您共同推动中药现代化的步伐。

东华原医疗
DONGHUAYUAN MEDICAL

北京东华原医疗设备有限公司
电话: 010-89718013
邮编: 102200

地址: 北京市中关村昌平科技园区振超路1号
传真: 010-89718021
网址: www.donghuagroup.com

垂询热线: 800-810-0359