

· 方药研究 ·

乳宁Ⅱ号对乳腺癌小鼠移植瘤生长转移的防治作用及其机制

阙华发 陈红凤 高尚璞 陆德铭 唐汉钧 贾喜花 徐杰男

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

[摘要] **目的** 探讨乳宁Ⅱ号对乳腺癌 MA-891 TA² 小鼠移植瘤生长转移的作用及其机制。**方法** 建立乳腺癌 MA-891 细胞株 TA² 小鼠移植瘤肺转移模型, 观察药物对移植瘤生长转移的影响, 结合免疫组化法、图像分析法检测血管内皮生长因子(VEGF)、血管内皮生长因子受体(VEGFR)、微血管数(MVC)、微血管面积(MVA)的水平。**结果** 乳宁Ⅱ号组瘤重抑制率、肺转移抑制率分别为37.3%, 65.4%, 肿瘤的生长和肺转移受到明显的抑制; 乳宁Ⅱ号组 VEGF、VEGFR、MVC、MVA 的水平较荷瘤对照组水平明显降低($P < 0.05$)。**结论** 乳宁Ⅱ号能通过抑制新生血管形成发挥抑瘤抗转移的作用, 其机制可能与通过下调 VEGF、VEGFR 表达水平有关。

[关键词] 乳腺肿瘤; 血管生成; 血管内皮生长因子; 乳宁Ⅱ号

Effect of Runing Ⅱ on the Growth and Metastasis of Transplanted Tumor of Mammary Cancer Mice and its Mechanism

QUE Hua-fa, CHEN Hong-feng, GAO Shang-pu, et al.

(TCM Surgical Department of Longhua Hospital of Shanghai University of TCM, Shanghai 200032)

ABSTRACT **Objective** To study the effect of Runing Ⅱ (Herbal Formula for Mammary Cancer) on the growth and metastasis of transplanted tumor of mammary cancer MA-891 TA² mice and its mechanism. **Methods** The models of mammary cancer MA-891 cell strain of transplanted tumor of TA² mice with lung metastasis were made to observe the effect of Runing Ⅱ on the growth and metastasis of transplanted tumor. The immunohistochemical method and image analysis were adopted to test the level of vascular endothelial growth factor (VEGF), vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR), and microvessel count (MVC), and microvessel area (MVA). **Results** In the Runing Ⅱ group, the tumor weight inhibition rate and the lung metastasis inhibition rate were 37.3% and 65.4% respectively, the growth and metastasis were obviously inhibited; the level of VEGF, VEGFR, MVC and MVA was significantly lowered as compared with those of the tumor-control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The herbal formula Runing Ⅱ can inhibit the metastasis of tumor through inhibiting the angiogenesis, its mechanism may be related to lowering the level of VEGF and the expression of VEGFR.

Key Words Mammary tumor; Angiogenesis; Vascular endothelial growth factor (VEGF); Runing Ⅱ (Herbal Formula for Mammary Cancer)

乳腺癌是严重威胁妇女健康的恶性肿瘤, 其发病率已列居女性恶性肿瘤的首位, 并呈逐年上升趋势。尽管治疗方法有所进步, 然而乳腺癌远期生存率并未得到明显改善, 肿瘤侵袭性生长及转移是其最重要的原因及关键的因素。而肿瘤的血管生成是肿瘤生长侵袭、转移的基本条件。因此, 抑制肿瘤血管生成是阻止肿瘤发生发展、延长患者生命的有效途径^[1]。本研究从血管生成及其调节因子入手, 探讨具有益气养阴、调摄冲任、散结解毒的中药乳宁Ⅱ号对乳腺癌 MA-891 TA² 小鼠移植瘤肺转移模型抑瘤抗转移的作用机制。

1 材料

SPF 级津白Ⅱ号(TA²) 雌性小鼠60只, 体重(20±

2) g, 6~8周龄。购自天津医科大学实验动物部。小鼠乳腺癌细胞株 MA-891 由中国医学科学院肿瘤医院病理实验室罗利群教授提供。

乳宁Ⅱ号由生黄芪、山慈菇、太子参、枸杞子、菝葜、薏苡仁、淫羊藿、当归等组成, 剂量比例=1.67:1.67:1.33:1.33:1.33:1.33:1.33:1.33, 由龙华医院制剂室按传统工艺制备成水煎剂, 4℃冰箱保存备用; 环磷酰胺(CTX), 上海华联制药有限公司生产, 200mg/支, 批号981104; 三苯氧胺(TAM), 上海华联制药有限公司生产; 生理盐水, 上海市富民制药厂生产。

血管内皮生长因子(VEGF) 多克隆抗体(工作浓度1:500~1:1000), 血管内皮生长因子受体(VEGFR) (工作浓度1:500~1:1000), FVIII Ag 多克隆抗体(工作浓度1:500), 均购自 Santa Cruz Biotechnology Inc 公司;

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目(39800154), 上海市

重点学科建设资助项目(T0304)

通讯作者: 阙华发, huaafaque@126.com, (021) 64385700 转3715

Envision 二抗, VEGF 为兔抗鼠 IgG, F8^{III}Ag、VEGFR 为羊抗兔 IgG, EnVision 试剂盒, 均购自丹麦 Dako 公司; 3, 3'-二氨基联苯胺(DAB), 购自上海华美生物工程公司。

2 方法

2.1 动物造模

参照文献[2, 3]方法, 取体外培养的对数生长期 MA-891 小鼠乳腺癌细胞, 细胞浓度调整为 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 。无菌条件下, 将 MA-891 小鼠乳腺癌细胞接种于 TA2 小鼠右腋部皮下, 接种量为 0.2ml/只(细胞数为 $2 \times 10^6/\text{只}$)。

2.2 实验动物分组与给药方法

接种两天后将动物随机分为4组, 每组15只, 给药时间为3周。(1) 荷瘤对照组: 生理盐水 0.4ml, 每天灌胃给药1次, 每周给药5次。(2) 乳宁 II 号组: 按《中药药理研究方法学》^[4]附表“人和动物间按体表面积折算表”计算出剂量为 $48\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 用生理盐水稀释, 使 0.4ml 相当于 $48\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的剂量, 每天灌胃给药1次, 每周给药5次。(3) CTX 对照组: 参照姜泊^[5]用量, 剂量为 $50\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 用生理盐水稀释, 使 0.4ml 相当于 $50\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的剂量, 隔日灌胃给药1次, 每周给药3次。(4) TAM 对照组: 剂量为 $2.7\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 用生理盐水稀释, 使 0.4ml 相当于 $2.7\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的剂量, 每天灌胃给药1次, 每周给药5次。

2.3 标本取材

各组用药后第22天小鼠脱颈处死, 称体重, 解剖取肿瘤瘤块和肺, 分别称重, 裸小鼠实际体重为所称体重减去瘤重。肉眼计数肺表面的灰白色结节, 即转移灶, 将肿瘤瘤块放入10%中性甲醛固定, 石蜡包埋, 超薄切片, 免疫组化 Envision 二步法染色, 进行 VEGF、VEGFR、微血管数(MVC)、微血管面积(MVA)的测定。

2.4 瘤重抑制率

计算公式: 抑瘤率(%) = (对照组治疗后平均瘤重 - 用药组治疗后平均瘤重) / 对照组治疗后平均瘤重 $\times 100\%$

2.5 肺转移抑制率

计算公式: 肺转移抑制率(%) = (对照组平均肺转移结节数 - 用药组平均肺转移结节数) / 对照组平均肺转移结节数 $\times 100\%$

2.6 免疫组化 Envision 二步法

取4 μm 石蜡切片, 二甲苯常规脱蜡, 梯度酒精脱水。PBS 洗涤, 5分钟 $\times$ 3次; 将切片浸入 0.01mol/L pH

6.0 柠檬酸盐缓冲液中, 微波 III 档(98 $^{\circ}\text{C}$) 10分钟, 进行抗原修复, 取出后在室温下自然冷却; 滴加一抗(分别为上述抗体及相应抗体稀释度), 37 $^{\circ}\text{C}$, 90分钟; PBS 洗涤, 5分钟 $\times$ 3次; 滴加 Envision 二抗, 室温下放置60分钟; PBS 洗涤, 5分钟 $\times$ 3次; 滴加新配制的 DAB 显色液, 显微镜下控制显色3~10分钟; 苏木素复染45秒, 自来水冲洗, 吹干, 中性树胶封片。检测均以胞浆出现棕黄色或棕褐色颗粒者判定为阳性细胞。用已知乳腺癌阳性切片作为阳性对照, 以 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照。

2.7 图像分析法

采用 ACE 摄像机(分辨率930线)、LEICA Q500W 图像分析仪, LEICA 全自动图像分析系统, 在200倍显微镜下, 每张切片随机选取2个视野(测定 VEGF) 或3个视野(测定 VEGFR、MVA), 测定各组阳性面积占整个视野面积的百分比。测定 MVC 时, 每张切片先在100倍视野下选出血管最丰富的5个区域, 然后在400倍视野下, 计数5个不重叠区中每个视野内的微血管数, 取均值作为该肿瘤的平均微血管数即表示 MVC 值。

2.8 统计学方法

采用 SPSS8.0 软件, 率的比较用卡方检验, 均数比较用 t 检验或单因素方差分析。

3 结果

3.1 乳宁 II 号对乳腺癌 MA-891 TA2 小鼠移植瘤的抑瘤抗转移作用

表1示, 乳宁 II 号组及 CTX 对照组瘤重抑制率分别为37.3%、86.2%, 两组抑瘤率均 $> 30\%$, 与荷瘤对照组及 TAM 对照组比较 P 均 < 0.05 , 提示乳宁 II 号及 CTX 均有一定的抑瘤疗效。而且, 乳宁 II 号组与 CTX 对照组比较, $P < 0.05$, 提示乳宁 II 号抑瘤作用不及 CTX。乳宁 II 号组及 CTX 对照组肺转移抑制率分别为65.4%、43.9%, 与荷瘤对照组及 TAM 对照组比较 P 均 < 0.05 , 提示乳宁 II 号及 CTX 均有一定的抑制癌转移作用。乳宁 II 号组与 CTX 对照组比较, $P < 0.05$, 提示乳宁 II 号抗转移作用优于 CTX。

3.2 乳宁 II 号对 MA-891 TA2 小鼠移植瘤中 VEGF 及 VEGFR 表达的影响

表2示, 乳宁 II 号组和 CTX 对照组 VEGF、VEGFR 的表达水平均低于荷瘤对照组, 差异有显著性意义($P < 0.05$); 乳宁 II 号组 VEGF、VEGFR 的表达水平与 CTX 组比较, 差异无显著性意义($P > 0.05$); 乳宁 II 号组 VEGF 的表达水平低于 TAM 对照组($P < 0.05$), VEGFR 的表达水平与 TAM 对照组

表1 乳宁Ⅱ号对各组小鼠移植瘤抑瘤及抗转移作用比较($\bar{x} \pm s$)

组别/项目	动物数	瘤重(g)	抑瘤率(%)	肺转移灶数(个)	转移抑制率(%)
荷瘤对照组	10	3.45±1.27▲	—	12.70±2.41	—
乳宁Ⅱ号组	10	2.16±1.50▲▲*	37.3%▲▲*	4.40±1.58▲▲*	65.4%▲▲*
CTX 对照组	8	0.48±0.22△*	86.2%△*	7.13±3.23△*	43.9%△*
TAM 对照组	9	5.47±2.20	—	12.22±3.15	—

与荷瘤对照组比较,△ $P<0.05$;与CTX 对照组比较,▲ $P<0.05$;与TAM 对照组比较,* $P<0.05$

相近($P>0.05$),CTX 对照组 VEGF、VEGFR 的表达水平均低于 TAM 对照组;TAM 对照组 VEGF 的表达水平与荷瘤对照组相近($P>0.05$),VEGFR 的表达水平低于 TAM 对照组($P<0.05$)。

表2 各组小鼠移植瘤中 VEGF、VEGFR 表达情况比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	VEGF(%)	VEGFR(%)
荷瘤对照组	20.3±7.9(7)	14.64±3.67(8)
乳宁Ⅱ号组	13.7±6.4(8)△*	7.90±3.88(8)△
CTX 对照组	13.6±5.4(7)△*	5.93±5.23(6)△*
TAM 对照组	25.7±10.0(9)▲	10.19±4.16(7)△▲

与荷瘤对照组比较,△ $P<0.05$;与CTX 对照组比较,▲ $P<0.05$;与TAM 对照组比较,* $P<0.05$;括号内为本标本数

3.3 乳宁Ⅱ号对 MA-891TA2小鼠移植瘤 MVA、MVC 的影响

表3示,各用药组移植瘤中 MVA、MVC 的水平均低于荷瘤对照组,差异有显著性意义($P<0.05$);乳宁Ⅱ号组 MVA、MVC 的水平均高于 CTX 对照组($P<0.05$),MVC 的水平均低于 TAM 对照组($P<0.05$),MVA 的水平与 TAM 对照组相近($P>0.05$)。

表3 各组小鼠移植瘤 MVC、MVA 的比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	MVC(%)	MVA(%)
荷瘤对照组	37.73±10.26(8)	15.08±1.12(8)
乳宁Ⅱ号组	16.00±2.78(9)▲▲*	6.68±2.13(8)▲▲*
CTX 对照组	9.21±3.53(5)△	4.87±2.23(6)△
TAM 对照组	26.83±11.77(8)△▲	10.59±2.93(7)△▲

与荷瘤对照组比较,△ $P<0.05$;与CTX 对照组比较,▲ $P<0.05$;与TAM 对照组比较,* $P<0.05$;括号内为本标本数

4 讨论

中医学认为,肿瘤的发生发展是内因和外因综合作用的结果,在强调外因(邪毒蕴聚于经络、脏腑)的同时,更强调内因(正气虚弱、脏腑功能失调等)在肿瘤发生发展中作用。如《素问》有“邪之所凑,其气必虚”,《灵枢·百病始生》云:“是故虚邪之中人也。留而不去,则传舍于络脉……留而不去,传舍于肠胃之之外,募原之间。留著于脉,稽留而不去,息而成积。……邪气淫溢,不可胜论……”。《医宗必读》更进一步提出“积之成也,正气不足,而后邪气踞之”之论,《景岳全书》云“肝肾不

足及虚弱失调之人,多有积聚之病”。结合我们以往临床研究,陆德铭、唐汉钧教授认为,正气内虚,肝肾不足,冲任失调,机体内环境稳定性及内外平衡性失调,邪毒内侵,内外合邪,致使气滞痰瘀交阻,癌毒侵袭为乳腺癌发生的主要原因,病久耗散正气,导致正气不固,癌毒走窜传舍形成转移。其中正气内虚,冲任失调为肿瘤发生的主要原因,癌毒内侵旁窜传舍为乳腺癌生长转移的重要条件^[6]。据此,治疗上主张“养正积自除”。乳宁Ⅱ号正是在扶正为主,祛邪为辅的治疗原则下,经多年临床实践总结而成的中药方剂,方中生黄芪、太子参、枸杞子、淫羊藿等为主药,意在益气养阴、调摄冲任,符合临床乳腺癌以气阴两虚、冲任失调为多见的临床特征,在临床取得了延长患者生存期、提高生命质量、稳定瘤灶、防止癌瘤转移的明显效果。

本研究建立乳腺癌细胞株 MA-891TA2小鼠移植瘤肺转移模型,观察乳宁Ⅱ号抑制实体瘤生长及肺转移情况,发现乳宁Ⅱ号组抑瘤率及肺转移抑制率与荷瘤对照组相比差异有显著性意义;与CTX 对照组相比差异有显著性意义,显示出乳宁Ⅱ号有明显的抑瘤抗转移作用。此外,三苯氧胺对模型鼠抑瘤抗转移作用不明显,此结果与 MA-891为 ER-乳腺癌细胞株及国外所报道的低浓度 TAM 的直接作用相似^[7]。

肿瘤是典型的血管依赖性病变,肿瘤的生长、浸润与转移依赖于血管生成。同时新生血管又提供了肿瘤细胞的转移通道,为肿瘤生长、转移扩散创造了有利条件^[8,9]。VEGF 是一种作用最强,且唯一一特异性作用于血管内皮细胞的促进血管生成因子,许多肿瘤细胞可分泌 VEGF,它通过与 VEGF 的受体作用,既可提高血管通透性,又可直接作用于血管内皮细胞,刺激其分裂增殖,诱导肿瘤血管生成并影响微血管的量,从而促进肿瘤的生长和转移^[10,11]。大多数肿瘤细胞均表达高水平的 VEGF,而正常组织中仅肾、卵巢等少数脏器有较高水平的表达,因此,有学者认为,VEGF 可作为肿瘤代谢和转移的标志^[12]以及阻断肿瘤新生血管生成的比较理想的靶部位^[13],对肿瘤血管调控因子及其作用环节进行干预,调节血管生成因子的表达,抑制血管生成,可能控制肿瘤生长转移。

研究表明,乳宁Ⅱ号可通过下调 VEGF 及 VEGFR 表达,从而可能阻断 VEGF 诱导的内皮细胞迁移和增殖的信号传导,进一步抑制肿瘤新生血管生成,发挥其抑瘤抗转移作用。

以往研究表明,恶性肿瘤在生长过程中,由于组织生长过快必然会造成局部组织严重缺氧,而缺氧可刺激 VEGF mRNA 合成及减缓 VEGF mRNA 降解,从而诱导局部大量的新生毛细血管生成等^[14,15]。在观察免疫组化呈阳性染色的细胞时,我们发现 VEGF 在濒临坏死的肿瘤细胞胞浆中表达明显,增生活跃的肿瘤细胞中反而表达较少或根本不表达,它可能与肿瘤细胞中有较高水平的缺氧诱导因子有关,与文献报道相符^[16]。乳宁Ⅱ号中包括当归、莪术、生薏苡仁、山慈菇等活血化瘀祛浊成分,可能通过改善肿瘤局部微循环,增加肿瘤细胞供氧,从而抑制了其合成与分泌 VEGF 而达到抑瘤和抗转移目的。

参考文献

[1]颜春洪,韩锐.肿瘤血管生成和抗转移研究.见:曹世龙主编.肿瘤学新理论与新技术.上海:上海科技教育出版社,1997:477~481.

[2]罗利群,张友会.干扰素促进小鼠乳腺癌的转移.中华肿瘤杂志,1994,16(4):251~254.

[3]高朋根,苏蕴诚,高友春,等.津白Ⅱ小鼠自发乳瘤(IVTA2 MA-891)高自发肺转移模型.中国医学科学院学报,1994,16(2):147~151.

[4]李仪奎主编.中药药理实验方法学.上海:上海科学技术出版社,1991:562.

[5]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,1996:57.

[6]阙华发,吴雪卿,陈前军.陆德铭扶正法为主防治乳腺癌复

发转移的经验.辽宁中医杂志,1998,25(7):297~298.

[7]王俊杰,申文江.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.

[8]Folkman J. Angiogenesis and breast cancer. J Clin Oncol, 1994,12(3):441~443.

[9]Folkman J. Angiogenesis research:from laboratory to clinic. Forum (Genova), 1999,9(3 Suppl):59~62.

[10]刘国津,郑得志,郑连举.乳腺癌血管内皮生长因子表达与血管生成及预后相关性研究.中国肿瘤临床,2001,28(5):381~382.

[11]Potgens AJ. Vascular permeability factor expression influences tumor angiogenesis in human melanoma lines xenografted to nude mice. Am J Pathol, 1995,146(1):197~209.

[12]Sauter ER, Nesbit M, Watson JC, et al. Vascular endothelial growth factor is a marker of tumor invasion and metastasis in squamous cell carcinomas of the head and neck. Clin Cancer Res, 1999,5(4):775~782.

[13]Warren RS, Yuan H, Matli MR, et al. Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental live metastasis. J Clin Invest, 1995,95(4):1789~1797.

[14]Levy AP, Levy NS, Goldberg MA. Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. J Biol Chem, 1996,271(5):2746~2753.

[15]朱元颖,阙华发.缺氧诱导因子1与祛瘀生新.中西医结合学报,2006,4(1):94~97.

[16]Talks KL, Turley H, Gatter KC, et al. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 alpha and HIF-2 alpha in normal human tissues, cancers and tumor-associated macrophages. Am J Pathol, 2000, 157(2):411~421.

(收稿日期:2006-06-19;修回日期:2006-10-09)

(上接第838页)

出现结节3例,其结节与下1/5有等同价值。在生理情况下,“耳者,宗脉之所聚也”(《灵枢·口问》)。在病理情况下,任何一个局部的病理改变都可能是整体的病理反映。尽管临床上望、触耳部诊断疾病的方法一直为很多医家所应用^[7],但是,结节形成的病理机制,包括结节的病理检查,还有待于深入的研究。

由于临床上对颈椎病认识上的模糊性,致使该病常与神经内科、耳鼻喉科及某些内科疾病相混淆,从而延误诊断和治疗,所以鉴别诊断亦特别重要^[2,8]。本研究表明了耳诊在颈椎病诊断方面的特征性意义,有助于临床上对该病的鉴别诊断。

参考文献

[1]朱文锋.中医学揭示的“生物全息律”.上海中医药杂志,

1982,(8):44~45.

[2]吴在德,吴肇汉主编.外科学.6版.北京:人民卫生出版社,2005:881~884.

[3]胡书孝,刘顺智,师建国.实用临床统计学.北京:军事医学科学出版社,2000:163~166.

[4]李建新,景宽,刘延男,等.颈椎病诊疗问答.长春:长春出版社,1994:1~20.

[5]周秉文,潘达德主编.简明骨科学.北京:人民卫生出版社,1999:508.

[6]张颖清.生物全息律简介.上海中医药杂志,1982,(8):45.

[7]孙国杰主编.针灸学.上海:上海科学技术出版社,1998:194~195.

[8]邵福元,邵华磊,薛爱荣主编.颈肩腰腿痛应用解剖学.郑州:河南科学技术出版社,2006:181.

(收稿日期:2006-07-17;修回日期:2006-09-11)