

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.01.013

实验研究

阳和化岩汤对 HER-2 高表达型裸鼠荷瘤模型微淋巴管生成及 PI3K/Akt 交互调控通路的影响

刘晓菲¹, 李静蔚^{2*}, 孙庆颖², 李湘奇³, 张洋⁴, 王楠⁴

(1. 山东中医药大学第一临床学院, 山东省济南市经十路 16369 号, 250335; 2. 山东中医药大学附属医院; 3. 泰山医学院附属医院; 4. 山东中医药大学中医学院)

摘要 目的 探讨阳和化岩汤治疗乳腺癌的可能作用机制。方法 通过 SK-BR-3 细胞株接种建立 Balb/c 裸鼠荷瘤模型, 将 20 只成瘤阳性的裸鼠随机分为模型组、中药组、西药组、中西药组, 每组 5 只。模型组每天灌胃 0.4 ml 生理盐水; 中药组用阳和化岩汤 18 g/(kg·d) 灌胃; 西药组给予曲妥珠单抗 1 mg/kg, 每周 2 次, 腹腔注射; 中西药组给予阳和化岩汤和曲妥珠单抗, 用法同中药组和西药组。给药 4 周后观察各组淋巴转移抑制率, 检测肿瘤组织中磷脂酰肌醇-3 羟基激酶 (PI3K)、磷酸化丝氨酸/苏氨酸激酶 (p-Akt)、血管内皮生长因子 C (VEGFC) 的表达, 计数微淋巴管数量及 VEGFC 评分。结果 各组裸鼠乳腺原位均有实体肿瘤生长, 呈椭圆形或分叶状, 原位移植乳腺癌模型裸鼠均有腋窝淋巴结转移。与模型组比较, 各给药组淋巴转移抑制率均上升, VEGFC 评分及 PI3K、p-Akt、VEGFC mRNA 表达均降低, 微淋巴管数量减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与中药组、西药组比较, 中西药组淋巴转移抑制率明显升高, VEGFC 评分及 PI3K、p-Akt、VEGFC mRNA 表达均降低, 微淋巴管数量减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。VEGFC 评分与微淋巴管数量之间存在正相关关系 ($r = 0.894$, $P < 0.05$)。结论 阳和化岩汤能有效抑制 HER-2 高表达型裸鼠荷瘤模型微淋巴管生成, 抑制血管生成调控通路及 VEGFC 表达, 其机制可能与有效抑制 PI3K/Akt 交互调控通路活化有关。

关键词 乳腺癌; 阳和化岩汤; 曲妥珠单抗; PI3K/Akt 通路; 微淋巴管; 血管内皮生长因子 C

乳腺癌是一种生物学高度异质性的肿瘤, 临床分为不同分子亚型, 其中人表皮生长因子受体 2 (HER-2) 过表达型乳腺癌恶性程度较其他类型高, 预后较差且易复发。高趋化和高侵袭为该型反应特性, 表现为微淋巴管生成迅速, 脉管侵袭力强, 肿瘤生长速度快, 淋巴结转移率高^[1], 与磷脂酰肌醇-3 羟基激酶 (PI3K)/丝氨酸/苏氨酸激酶 (Akt) 交互调控通路密切相关^[2-3]。曲妥珠单抗为 HER-2 高表达的靶向治疗药物, 但存在耐药性, 影响了治疗效果。本实验主要研究阳和化岩汤联合曲妥珠单抗对 HER-2 高表达型裸鼠荷瘤模型微淋巴管表达及 PI3K/Akt 通路的影响, 并探讨阳和化岩汤是否对曲妥珠有增效作用。

基金项目: 国家自然科学基金(81403408, 81473687, 81573989); 山东省自然科学基金(ZR2011HL065); 山东省中医药科技发展计划(2013-ZDZK-024); 山东省高等学校科技计划(J11LF53)

* 通讯作者: weilandetan2000@163.com, (0531) 68617094

1 材料与方法

1.1 动物及细胞株

Balb/c 裸鼠, 雌性, 6 周龄, 体重(20 ± 3) g, 北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物许可证号: SCXK(京)2012-0001, 饲养于恒温恒湿、人工光照明暗各 12h 条件下, 适应环境 1 周后进行实验。

乳腺癌细胞株 SK-BR-3 (HER-2 高表达型: ERa66-/Era36-PR-/HER2+/EGFR+), 购自中国科学院上海生命科学院细胞资源中心。

1.2 药物

阳和化岩汤组成: 鹿角霜 12 g, 熟地黄 9 g, 肉桂 6 g, 白芥子 3 g, 莪术 12 g, 山慈菇 15 g, 浙贝母 9 g, 甘草 6 g。购于山东中医药大学附属医院中药房, 经山东中医药大学药学院鉴定后制剂。加入 10 倍量的水提取挥发油 6 h, 收集挥发油, 药液

滤过,将药材药液比浓缩至 1 : 1.5,加入乙醇使含醇量达到 60%,取上清液,沉淀部分离心,合并提取液,减压回收乙醇后浓缩提取液至相对密度 1.18。另将挥发油与吐温-80 混匀,加入上述药物提取液中,混匀,再加入蔗糖、山梨酸,调节 pH 值并用水调整至浓度 2 g/ml。曲妥珠单抗,上海罗氏制药有限公司,批号: LST1189。

1.3 主要试剂与仪器

RPIM 1640 培养基 (批号 80625)、M199 培养基 (批号 72568)、青霉素 (批号 374428)、链霉素 (批号 99806),均为美国 Hyclone 公司产品; 优级胎牛血清 (美国 Gibco 公司,批号 ss11245); PI3K-p85 (批号 S3926)、磷酸化丝氨酸/苏氨酸激酶 (p-Akt,批号 S3853)、蛋白 Marker (批号 S4625)、血管内皮生长因子 C (VEGFC,批号 S8317)、抗 β -actin 抗体 (批号 S4216)、山羊抗小鼠抗体 (批号 S3673),均为博士德公司产品; HE 染色试剂盒 (批号 kg2274)、DAB 显色试剂盒 (批号 k6496),均为北京中山金桥生物技术有限公司产品; ECL 发光剂 (批号 473276)、一抗稀释液 (批号 283575)、蛋白上样缓冲液 (批号 22789)、反转录试剂盒 (批号 22378),均为碧云天生物科技公司产品; 蛋白酶抑制剂 (Merck 公司,批号 88769); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (南京凯基生物科技公司,批号 77865); Trizol 试剂 (南京凯基生物科技公司,批号 16673)。

CO₂ 培养箱 (美国 Precision 公司,型号 P3824); 冷冻超速离心机 (美国 Beckman 公司,型号 SD31424); 酶标仪 (美国 Biotek 公司,型号 39201); 石蜡包埋机 (英国 Shandon Histocentre,型号 S9204); 凝胶成像分析系统 (深圳天能公司,型号 SZ4457); 显影机 (日本柯达公司,型号 KD2345); IQTMS 多重荧光定量 PCR 仪 (日本柯达公司,型号 ABI7500); 隔水式电热恒温培养箱 (上海跃进医疗器械厂,型号 QJ2429); 紫外线透射仪 (深圳天能公司,型号 22367); 光学显微镜 (Olympus 公司,型号 BX50F4)。

1.4 动物造模、分组与给药

将 SK-BR-3 细胞株于培养基中培养传代后,调整密度为 1×10^7 个/ml,沿裸鼠第二乳垫下注射 0.2 ml^[4]。观察裸鼠肿瘤移植情况,在接种部位乳垫处出现肿瘤结节,质地较硬,且逐渐增大,迅速生长,认为造模成功^[4]。造模成功后,将 20 只成瘤阳性的裸鼠用抽签法随机分为模型组、中药组、西药

组、中西药组,每组 5 只。模型组每天灌胃 0.4 ml 生理盐水; 中药组用阳和化岩汤 18 g/(kg · d) 灌胃; 西药组给予曲妥珠单抗 1 mg/kg,每周 2 次,腹腔注射; 中西药组给予阳和化岩汤和曲妥珠单抗,用法同中药组和西药组。各组均连续 4 周给药。所有药物剂量均按人和动物间按体表面积折算表^[4]折算。

1.5 观察指标和方法

1.5.1 肿瘤组织阳性淋巴结个数及淋巴结抑制率

最后 1 次给药后第 2 天处死裸鼠,完整切除肿瘤组织及腋下淋巴结,滤纸吸干水分,将肿瘤标本分为 2 份,1 份装入冻存管中放入冰箱内保存,另 1 份肿瘤标本及淋巴结以 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,4 μ m 切片,HE 染色进行病理检测,判断乳腺癌淋巴转移情况,计算淋巴结转移抑制率。淋巴结转移抑制率 = $[(\text{总淋巴结个数} - \text{阳性淋巴结个数}) / \text{总淋巴结个数}] \times 100\%$ 。

1.5.2 肿瘤组织中 VEGFC 表达及微淋巴管数量

免疫组化法检测。裸鼠肿瘤标本石蜡包埋,连续 4 μ m 切片,二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,抗原修复后滴加稀释一抗,DAB 显色,苏木素复染,梯度乙醇脱水,中性树胶封片,光学显微镜下镜检。结果判定: VEGFC 阳性细胞为细胞浆内深染棕黄色颗粒。先在 100 倍光镜下选择密集区域观察 5 个视野,然后在 400 倍光镜下观察切片的显色反应,每张载玻片随机选择 5 个视野,每个视野计数 100 个细胞,阳性信号表现为棕黄色颗粒,计算阳性细胞数百分比 (阳性细胞数百分比 = 阳性细胞数 / 100 $\times 100\%$) 的平均值。免疫组织化学结果根据染色阳性细胞数和染色强度分别评分^[4],两者乘积 0 ~ 1 分为阴性 (-); 2 ~ 3 分为阳性 (+ ~ ++); 4 分及以上为强阳性 (+++)。

石蜡切片脱蜡,梯度乙醇脱水,抗原修复,滴加淋巴管抗体的一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,滴加生物素标记二抗工作液,DAB 显色,苏木精复染,中性树胶封片,镜检。结果判定: 淋巴管抗体的一抗染色阳性为淋巴管内皮细胞膜呈棕黄色颗粒。阳性淋巴管通常形状不规则呈扩张状,管壁薄无平滑肌。微淋巴管计数方法为先在低倍镜下选取肿瘤浸润边缘区和肿瘤中心脉管最丰富的区域,然后在 200 倍视野下分别计数微淋巴管数,每例计数 5 个视野,取其平均值。

1.5.3 肿瘤组织中 PI3K、p-Akt、VEGFC mRNA 表达 RT-PCR 法检测。将 500 μ l 的 Trizol 试剂分别加入各组组织,提取总 RNA,进行 RNA 完整性

及纯度的鉴定, 当 $D(260)/D(280)$ 为 $1.8 \sim 2.0$ 时用于实验。使用反转录试剂盒, 合成 cDNA。每个标本重复 3 次, 紫外透射仪下拍照。采用图像分析软件分析电泳条带的光密度值, 各目标条带光密度值与内参照 β -actin 光密度值的比值为目标基因的相对光表达量。以 β -actin 作为内参照, 引物由上海桑尼生物科技有限公司合成。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行数据分析, 计量资料数据用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD- t 检验, 相关性分析采用 Pearson 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组裸鼠肿瘤组织淋巴结抑制率比较

各组裸鼠乳腺原位均有实体肿瘤生长, 呈椭圆形或分叶状, 原位移植乳腺癌模型各组均有腋窝淋巴结转移。表 1 示, 与模型组比较, 各给药组淋巴

结抑制率均不同程度上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与中药组、西药组比较, 中西药组淋巴结抑制率明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.2 各组裸鼠肿瘤组织中 VEGFC 表达及微淋巴管数量比较

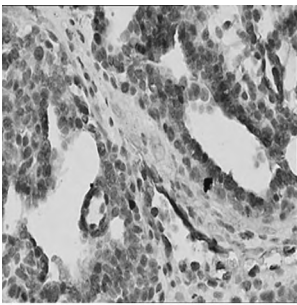
图 1 示, 模型组 VEGFC 为胞浆内深染的棕黄色颗粒, 数量多且排列密集有序, 各给药组 VEGFC 染色较弱, 数量减少且分布不均呈离散状。中西药组 VEGFC 着色最弱, 表达不明显。表 1 示, 与模型组比较, 其余各组 VEGFC 评分均降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 中药组与西药组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 与中药组、西药组比较, 中西药组 VEGFC 评分降低 ($P < 0.05$)。

图 2 示, 模型组微淋巴管数量增多, 微淋巴管管腔结构扩张、扭曲, 集中在肿瘤边缘及间质区, 各给药组微淋巴管个数减少, 管腔结构扩张程度降低。表 1 示, 与模型组比较, 各组微淋巴管数量呈

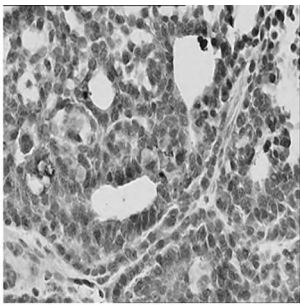
表 1 各组裸鼠肿瘤组织淋巴结抑制率、VEGFC 评分、微淋巴管数量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	淋巴结抑制率 (%)	VEGFC 评分 (分)	微淋巴管数 (个)
模型组	5	0	5.50 ± 0.50	26.33 ± 1.53
中药组	5	$0.23 \pm 0.09^*$	$3.67 \pm 0.58^*$	$23.33 \pm 0.58^*$
西药组	5	$0.34 \pm 0.15^*$	$2.50 \pm 0.50^{**}$	$20.83 \pm 0.76^{**\Delta}$
中西药组	5	$0.59 \pm 0.09^{**\Delta\Delta\Delta}$	$1.67 \pm 0.29^{**\Delta\Delta}$	$17.50 \pm 0.87^{**\Delta\Delta}$

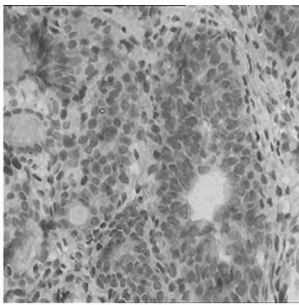
注: VEGFC, 血管内皮生长因子 C; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与中药组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与西药组比较, $\Delta\Delta P < 0.05$



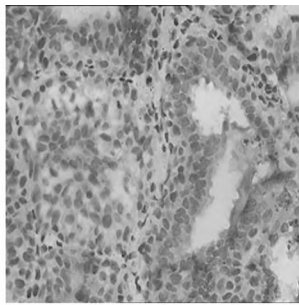
模型组



中药组

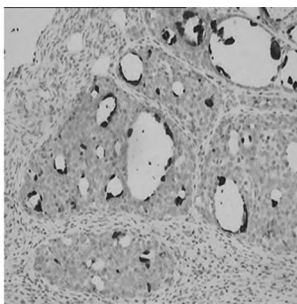


西药组

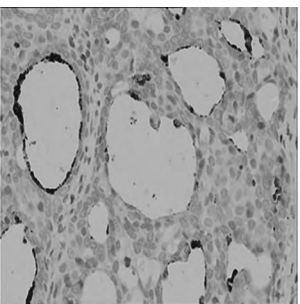


中西药组

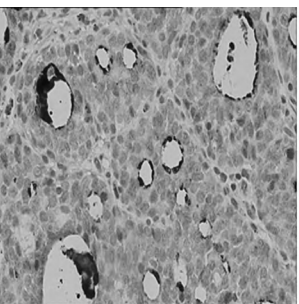
图 1 各组裸鼠肿瘤组织血管内皮生长因子 C 表达 ($\times 400$)



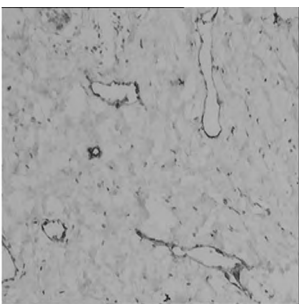
模型组



中药组



西药组



中西药组

图 2 各组裸鼠肿瘤组织微淋巴管分布 ($\times 200$)

表 2 各组裸鼠肿瘤组织 PI3K、p-Akt、VEGFC mRNA 表达比较 (相对表达量, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	PI3K	p-Akt	VEGFC
模型组	5	0.71 ± 0.08	0.81 ± 0.09	0.75 ± 0.05
中药组	5	0.55 ± 0.03 [*]	0.64 ± 0.06 [*]	0.54 ± 0.12 [*]
西药组	5	0.44 ± 0.06 [*]	0.51 ± 0.06 ^{**△}	0.49 ± 0.11 [*]
中西药组	5	0.35 ± 0.03 ^{**△▲}	0.36 ± 0.06 ^{**△▲}	0.28 ± 0.01 ^{**△▲}

注: PI3K, 磷脂酰肌醇-3 羟基激酶; p-Akt, 磷酸化丝氨酸/苏氨酸激酶; VEGFC, 血管内皮生长因子 C; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与中药组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$; 与西药组比较, ▲ $P < 0.05$

不同程度减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与中药组比较, 西药组和中西药组微淋巴管数量减少, 且中西药组微淋巴管数量少于西药组 ($P < 0.05$)。

运用 Pearson 相关法分析 VEGFC 表达与微淋巴管数量之间的相关性, 结果显示二者之间存在正相关关系 ($r = 0.894$, $P < 0.05$)。

2.3 各组裸鼠肿瘤组织中 PI3K、p-Akt、VEGFC mRNA 表达比较

表 2 示, 与模型组比较, 中药组、西药组及中西药组均能够不同程度抑制 PI3K、p-Akt、VEGFC mRNA 表达 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与中药组、西药组比较, 中西药组对 PI3K、p-Akt、VEGFC mRNA 的抑制作用进一步增强, 西药组 p-Akt mRNA 表达亦低于中药组 ($P < 0.05$)。

3 讨论

乳腺癌在中医学中称为“乳岩”。宋代医家窦汉卿在《疮疡经验全书》中指出“乳岩, 此毒阴极阳衰”, 揭示了乳岩主要病机为阳衰阴盛。肾阳不足, 阴寒内生, 感受六淫之邪, 或伤于饮食情志, 气机不畅而致痰凝血瘀, 有形之实邪搏结于乳络而成。治疗当温肾助阳, 调摄冲任, 行气活血, 化痰散结。本实验采用清代高思敬《外科医镜》中阳和化岩汤进行加减治疗, 方中鹿角霜、熟地黄温补肾阳与肾精; 浙贝母化痰散结, 排脓消肿; 肉桂补火助阳散寒、温通血脉; 莪术性温、味辛苦, 破血行气、消积止痛; 山慈菇化痰散结; 甘草调和药性。全方温肾助阳与活血祛瘀并用, 补虚为本、祛邪为标, 攻补兼施。现代药理学研究证实, 鹿角霜对抗戊酸雌二醇性小鼠乳腺增生有显著疗效, 并可促进小鼠体内巨噬细胞的吞噬功能, 刺激血液中 T 淋巴细胞的增殖, 大剂量鹿角霜还能明显抑制小鼠乳腺癌的生长^[8]; 山慈菇含有大量秋水仙碱, 能抑制有丝分裂, 破坏纺锤体, 使染色体停滞在分裂中期, 抑制癌细胞的增殖^[9]; 肉桂中的肉桂醛可通过参与细胞内 PI3K/Akt/mTOR 信号通路调节肿瘤细胞的增殖和凋亡^[10], 临床用以治疗癌症有

一定疗效。既往研究证实, 温阳化痰法能有效延长乳腺癌患者生存期, 能够减毒增效、减缓乳腺癌细胞增殖及阻断相关通路活化进而抑制癌变进程^[11]。

曲妥珠单抗是特异性拮抗 HER-2 受体的分子靶向治疗药物, 目前已作为 HER-2 过表达乳腺癌早期和晚期转移的规范化治疗方法之一。本研究结果显示, 各给药组对淋巴结转移及微淋巴管均有抑制作用, 表现在各组淋巴结抑制率升高与微淋巴管数量减少, 在淋巴结抑制率方面阳和化岩汤显示出逊于曲妥珠单抗的疗效, 阳和化岩汤与曲妥珠单抗联用效果优于阳和化岩汤、曲妥珠单抗单独使用。

课题组前期研究显示, 阳和化岩汤能够抑制细胞增殖、促进细胞凋亡, 检测到 caspase 信号的上游 PI3K/Akt 信号通路有 PI3K 的异常活化, HER-2 蛋白高表达并伴随脉管系统生成, 而中药干预能抑制 PI3K 的活化、降低淋巴管的表达^[8]。同时研究表明, HER-2 通过自身激活其受体二聚化可诱导酪氨酸激酶活化, 从而激发细胞内信号级联反应, 激活下游 PI3K/Akt 信号通路, HER-2 能够活化细胞内的 PI3K, 在细胞膜内侧生成磷脂酰肌醇三磷酸 (PIP₃) 与磷脂酰肌醇二磷酸 (PIP₂)^[12-14]。Akt 和 PIP₃ 结合后被激活, 激活的 Akt 通过磷酸化作用 (p-Akt) 激活或抑制其下游靶蛋白, 从而调控细胞周期, 干预细胞的增殖、凋亡和迁移, 诱导细胞癌变。

VEGFC 为 PI3K/Akt 通路下游重要靶点, 参与调控细胞的生长、增殖、分化、凋亡、侵袭转移等过程, 具有促进血管通透性增加、细胞外基质变性、血管内皮细胞迁移、增殖和血管形成等作用, 并与肿瘤间质淋巴管生成和淋巴结转移等密切相关^[15]。本研究结果显示, 模型组肿瘤组织 VEGFC 分布广泛, 而各用药组 VEGFC 表达水平均显著下调, VEGFC 的表达与微淋巴管数量相关性分析结果显示两者之间存在正相关关系, 验证了药物能够通过抑制 VEGFC 表达从而降低微淋巴管生成数量, 而中西药组微淋巴管数量最少, 提示阳和化岩

汤联合曲妥珠单抗能有效抑制微淋巴管生成,二者联用增效明显。

PI3K/Akt 通路在抑制肿瘤细胞生成的过程中发挥重要作用,而淋巴结转移是乳腺癌常见的转移方式,VEGFC 是血管内皮生长因子家族中最强的促淋巴管生成因子,与微淋巴管数显著相关^[16-18]。因此,PI3K、p-Akt 和 VEGFC 是实验中被检测药物是否发挥作用的常用指标。本实验用 RT-PCR 法检测 PI3K、p-Akt 及 VEGFC mRNA 表达,结果显示中药组、西药组、中西药组均能够抑制 PI3K、p-Akt 及 VEGFC mRNA 表达,PI3K 和 VEGFC mRNA 的抑制效果中药和西药差异无统计学意义,说明中药作用不弱于西药,p-Akt mRNA 表达方面西药组优于中药组,而中西药组对 PI3K、p-Akt 及 VEGFC mRNA 的抑制作用效果最佳。以上结果可以看出,阳和化岩汤能够通过干预 PI3K/Akt 通路,抑制 VEGFC 在组织中的表达,从而减少微淋巴管生成。阳和化岩汤虽不能完全替代曲妥珠单抗对于 HER-2 高表达乳腺癌的靶向治疗作用,但在临床中可根据患者情况加用中药以增加协同效果,达到减毒增效的目的。

参考文献

- [1] PEROU CM, SORLIE T, EISEN MB, et al. Molecular portraits of human breast tumors [J]. Nature, 2000, 406 (6797): 747-753.
- [2] BURRIS HA 3RD. Overcoming acquired resistance to anticancer therapy: focus on the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2013, 71 (4): 829-842.
- [3] MAKINEN T, VEIKKOLA T, MUSTJOKI S, et al. Isolated lymphatic; endothelial cells transduce the growth, survival and migratory signals via the VEGFC/D receptor VEGFR-3-3-3 [J]. EMBO J, 2001, 20(17): 4765-4774.
- [4] 赵欣. 清毒颗粒抑制血管新生防治乳腺癌的药理机制 [J]. 北京: 北京协和医学院, 2014: 84-87.
- [5] 刘晓菲, 李静蔚, 李湘奇, 等. 阳和化岩汤对 HER-2 高表达型裸鼠荷瘤模型肿瘤血管生成的影响及机制的研究 [J]. 中药材, 2018, 41(6): 1468-1471.

- [6] 韩锐. 抗癌药物研究与实验技术 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1997: 440-441.
- [7] KINOSHITA J, KITAMURA K, KABASHIMA A, et al. Clinical significance of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) in breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2001, 66(2): 159-164.
- [8] 鲍悦, 高久堂, 孙佳明, 等. 中药鹿角胶的研究进展 [J]. 吉林中医药, 2016, 36(2): 173-175, 204.
- [9] 袁理春, 陈保生, 吕丽芬. 丽江山慈菇栽培技术研究初报 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28(6): 575-576.
- [10] 尹兴忠, 赵冬梅, 刘蕾, 等. 肉桂醛对小鼠 U14 宫颈癌组织中 PI3K 表达的影响 [J]. 中成药, 2017, 39(1): 188-191.
- [11] 侯公楷. 中医药防治乳腺癌进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(5): 249-253.
- [12] GARCIA C, LBRAHIM YH, SERRA V, et al. Dual mTORC1/2 and HER-2 blockade results in antitumor activity in Preclinical models of breast cancer resistant to anti-HER-2 therapy [J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(9): 2603-2612.
- [13] MARMOR MD, SKARIA KB, YARDEN Y. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004, 58(3): 903-913.
- [14] LONGVA KE, PEDERSEN NM, HASLEK C, et al. Herceptin-induced inhibition of ErbB2 signaling involves reduced phosphorylation of Akt but not endocytic down regulation of ErbB2 [J]. Int J Cancer, 2005, 116(3): 359-367.
- [15] 梁法清, 何阳君, 杜正贵. 乳腺癌患者 PTEN, p-AKT 蛋白表达情况变化及相关性 [J]. 中国医药导报, 2017, 14(14): 12-15.
- [16] 马文慧. siRNA 靶向 survivin 和 VEGF-C 对小鼠乳腺癌的治疗作用及 M2 巨噬细胞对 4T1 细胞转移的影响 [J]. 青岛: 青岛大学, 2014.
- [17] 迟婷, 姜晓燕. 乳腺癌组织中 miR-34a 与 VEGF 的关系及临床意义 [J]. 中国普通外科杂志, 2016, 25(5): 680-685.
- [18] 孙敏. Survivin 和 VEGF 在乳腺癌中的表达及其临床意义 [J]. 临床医学, 2015, 35(5): 83-84.

Effects of Yanghe Huanyan Decoction (阳和化岩汤) on the Microlymphangiogenesis and the Interaction Regulatory Pathway of PI3K/Akt in HER-2-Overexpressing Nude Mice

LIU Xiaofei¹, LI Jingwei², SUN Qingying², LI Xiangqi³, ZHANG Yang⁴, WANG Nan⁴

(1. First Clinical College, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250335; 2. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine; 3. Affiliated Hospital of Taishan Medical College; 4. School of Traditional Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To study the possible mechanism of Yanghe Huanyan Decoction (阳和化岩汤) in the treatment of breast cancer. **Methods** The tumor bearing model of Balb/c nude mice was established by inoculation

of SK-BR-3 cell lines. The nude mice model of tumor was established and a total of 20 mice were randomly divided into model group, Chinese medicine (CM) group, trastuzumab group and trastuzumab + CM group, with 5 mice in each group. The model group was given 0.4 ml of normal saline every day; *Yanghe Huayan Decoction* 18 g/(kg · d) was used for gavage in CM group. Trastuzumab group was given trastuzumab 1 mg/kg, 2 times a week, intraperitoneal injection; *Yanghe Huayan Decoction* and trastuzumab were given to the trastuzumab + CM groups, and the usage was the same as that in the CM and trastuzumab groups. The inhibition rate of lymph node metastasis was observed after 4 weeks administration. The expression of key target proteins PI3K, p-Akt and vascular endothelial growth factor C (VEGFC) in the PI3K/Akt interaction pathway were detected by RT-PCR, and in tumor tissues was detected, and the number of lymphatic vessels and VEGFC score were counted. **Results** There were solid tumors in the mammary gland in each group, which were oval or lobulated, axillary lymph node metastasis was observed in nude mice with orthotopic breast cancer transplantation. Compared with the model group, the inhibition rate of lymph nodes increased in three treated group, VEGFC score and mRNA expression of PI3K, p-Akt and VEGFC were decreased, and the number of microlymphatic vessels was decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the CM group and the trastuzumab group, the lymph node inhibition rate was significantly increased in the trastuzumab + CM group, and VEGFC score, PI3K, p-Akt and VEGFC mRNA expression were all decreased, and the number of microlymphatic vessels was reduced ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). There was a positive correlation between VEGFC score and the number of microlymphatic vessels ($r = 0.894$, $P < 0.05$). **Conclusion** *Yanghe Huayan Decoction* can effectively inhibit the formation of microlymphangiogenesis and the regulation pathway of angiogenesis and VEGFC expression in the tumor bearing model of nude mice with high HER-2 expression, and the mechanism may be related to the effective inhibition of the activation of PI3K/Akt interactive regulation pathway.

Keywords breast cancer; *Yanghe Huayan Decoction*; trastuzumab; PI3k/Akt pathway; lymphatic microvessel; vascular endothelial growth factor-C

(收稿日期: 2018-04-17; 修回日期: 2018-09-15)

编辑: 王利芬

2019 年特色医疗分会暨聚医杰学术活动安排

中国民间中医药研究开发协会特色医疗分会、北京聚医杰医药科学研究院 2019 年学术活动安排通知如下, 欢迎各级中医药人员适时报名参会。

1. 第 40 次全国特色医疗名医学术交流暨老年病脾胃病论坛, 时间: 3 月 25 日—29 日 (24 日报到); 地点: 广东省深圳市; 规模 60 人;
2. 第 41 次全国特色医疗名医学术交流暨风湿骨病论坛, 时间: 4 月 24 日—27 日 (23 日报到); 地点: 浙江省宁波市; 规模 60 人;
3. 第 42 次全国特色医疗名医学术交流暨经方运用论坛, 时间: 6 月 11 日—14 日 (10 日报到); 地点: 陕西省西安市; 规模 60 人;
4. 第 43 次全国特色医疗名医学术交流暨肿瘤肾病论坛, 时间: 8 月 7 日—10 日 (6 日报到); 地点: 江西省庐山市; 规模 60 人;
5. 第七届全国中医疑难病学术研讨会暨当归黄芪论坛, 时间: 9 月 24 日—27 日 (23 日报到); 地点: 湖南省张家界市; 规模 80 人;
6. 第十三届全国中医百佳名医暨民间中医论坛 (2019 年聚医杰学术年会), 时间: 11 月 11 日—14 日 (10 日报到); 地点: 湖北省武汉市; 规模 150 人;
7. 第 44 次全国特色医疗名医学术交流暨不孕不育论坛, 时间: 12 月 24 日—28 日 (23 日报到); 地点: 海南省海口市; 规模 50 人。

以上学术会议请在召开日期前, 提前 15 天联系报名并邮寄交流论文 (无论文者也可以报名参会), 报名联系电话: 010-83210238、18511329528、18500577884。报名材料 (交流论文、个人登记像片 4 张、个人技术简介等) 寄北京 100036-98 信箱叶续宗收, 邮编 100036, 或加微信 j570405。