

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2020.20.011

## 临床研究

# 康复新液对乳腺腺病患者乳腺腺体组织脂筏结构蛋白 1 的影响

赵海军<sup>1</sup>, 杜倩倩<sup>1</sup>, 沈咏梅<sup>2</sup>, 王雪铭<sup>3</sup>, 母俊婷<sup>3</sup>, 高冲<sup>3</sup>, 李小龙<sup>1</sup>, 韩庆茹<sup>1\*</sup>

1. 石家庄市第四医院, 河北省石家庄市中山路 206 号, 050011; 2. 药用美洲大蠊四川省重点实验室; 3. 河北省乐亭县医院

**摘要** 目的 观察脂筏结构蛋白 1 (FLOT1) 在乳腺腺病患者乳腺腺体组织中的表达, 以及康复新液对其表达的影响。方法 采用干预观察性研究方法, 选取病理科标本库中 96 例正常乳腺标本作为空白对照组, 收集乳腺腺病患者 96 例为乳腺腺病组, 经康复新液口服治疗 1 年, 每次 10 ml, 每天 3 次。治疗前后采用放射免疫沉淀法、免疫印迹法检测乳腺腺病组患者及空白对照组乳腺腺体组织中 FLOT1 蛋白表达; 比较乳腺腺病组患者治疗前后 FLOT1 基因检测阳性率, 并行治疗前后乳腺彩超评分。结果 乳腺腺病组患者治疗 1 年后乳腺彩超评分明显低于治疗前 ( $P < 0.05$ )。乳腺腺病组患者治疗前乳腺腺体组织中 FLOT1 蛋白表达量、基因强度评分均高于空白对照组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 乳腺腺病组患者治疗后 FLOT1 蛋白表达量与空白对照组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。乳腺腺病组患者治疗后 FLOT1 基因检测阳性率为 43.75%, 明显低于治疗前的 97.92% ( $P < 0.01$ )。结论 口服康复新液可以改善乳腺腺病患者乳腺彩超评分, 并且抑制腺体中 FLOT1 的高表达。

**关键词** 康复新液; 乳腺腺病; 脂筏结构蛋白 1, 基因表达; 乳腺癌

乳腺腺病患者临床常表现为块状腺体、增生结节、乳腺囊肿等。有研究<sup>[1]</sup>认为, 乳腺增生-不典型增生-乳腺癌的发生是乳腺癌发生的“三部曲”, 因此对临床明确的乳腺腺病患者, 尤其在彩超观察调低增益后有明显血流信号的块状腺体、增生结节、乳腺囊肿者, 须密切观察, 必要时行穿刺病理活检。肿瘤发生过程中, 脂筏结构蛋白 1 (flotillin-1, FLOT1) 基因参与了细胞黏附、信号通路的传导、轴突的生长、异常蛋白成分的跨膜转运等过程<sup>[2]</sup>。近年来发现, FLOT1 基因在食管癌、肺癌、乳腺癌均呈现高表达<sup>[3]</sup>, 而且 FLOT1 基因的表达程度与癌症的生物学特性密切相关, 即表达程度高的患者发生远处转移的概率也高<sup>[4]</sup>。转染动物实验研究<sup>[5]</sup>表明, FLOT1 基因在肿瘤的早诊早治中有重要意义。康复新液被证实具有抗肿瘤生长的效果<sup>[6]</sup>, 对食管癌、贲门癌等都有明确的抑制作用<sup>[7]</sup>。因此, 本研究采集乳腺腺病患者标本, 对其 FLOT1 基因表达进行研究, 观察康复新液对其

表达的影响。

## 1 资料

### 1.1 诊断标准

参照《乳腺腺病的病理诊断标准》<sup>[8]</sup>中乳腺腺病诊断标准: 囊肿、乳管上皮增生、乳头状瘤病、腺管型腺病、大汗腺样变为本病组成部分, 病理切片能找到上述 3 种病变, 或者腺管型腺病和囊肿 2 种, 即可以诊断。

### 1.2 纳入标准

1) 符合上述诊断标准; 2) 女性; 3) 自愿进行乳腺癌早诊早治, 未经其他基础治疗。

### 1.3 排除标准

患有抑郁症等精神障碍者。

### 1.4 病例及标本来源

收集 2016 年 1 月至 2018 年 1 月在石家庄市第四医院乳腺科就诊的乳腺腺病患者 96 例作为乳腺腺病组, 均为女性, 年龄 31 ~ 56 岁, 平均年龄 (42.2 ± 11.1) 岁, 病程 3 ~ 7 年, 平均病程 (4.3 ± 1.2) 年。其中 55 例为肿块状腺体, 彩超观察到腺体组织回声严重不均匀, 但未形成有形状的肿块, 调低

基金项目: 石家庄市科学技术研究与发展指导计划 (181461433)

\* 通讯作者: zhj651212@sina.com

增益后血流信号明显; 26 例为乳腺增生结节, BI-RADS 分级<sup>[8]</sup>为 3 类; 15 例为乳腺囊肿, BI-RADS 分级为 3 类。通过病理科标本库选取 96 例正常乳腺标本作为空白对照组, 标本来源患者均为女性, 年龄 31 ~ 57 岁, 平均年龄 (43.3 ± 11.8) 岁, 病程 3 ~ 7 年, 平均病程 (4.4 ± 1.3) 年, BI-RADS 分级为 3 类。

## 2 方法

### 2.1 治疗方法

乳腺腺病组患者给予康复新液 (四川好医生攀西药业有限公司生产, 国药准字 Z51021834, 批号: 180133, 规格 100 ml/瓶) 口服, 每天 3 次, 每次 10 ml, 服用 1 年。

### 2.2 观察指标及方法

2.2.1 乳腺彩超评分 乳腺腺病组患者于首次就诊并月经结束后 3 ~ 7 天、口服康复新液 1 年后月经结束后 3 ~ 7 天, 进行腺体肿块/结节/囊肿彩超 (西门子 ACUSONSC2000 彩色多普勒超声, 复星医药乐谱医疗公司) 评分, 以调低增益后显示血流信号作为评分标准, 单点血流信号为 1 分; 1 ~ 3 个闪烁血流点为 2 分; 超过 3 个闪烁血流点为 3 分。

2.2.2 FLOT1 蛋白表达量检测 分别采用放射免疫沉淀法、免疫印迹法进行检测。把乳腺腺体组织 100 mg 研磨粉末状后, 加入 100  $\mu$ l RIPA 蛋白裂解液 (上海碧云天生物有限公司, 批号 P-0025), 充分搅拌, 使之混合均匀。置于冰上孵育 20 min 后, 在 4  $^{\circ}$ C 条件下, 以 12 000 r/min、半径 7 cm 离心 20 min。取上清液体于 EP 管中, 置于 -20  $^{\circ}$ C 下保存备用。分别取标准 BSA 样品蛋白 (上海碧云天生物有限公司, 批号 P-0023) 0、2、4、8、12、16  $\mu$ l 加入 96 孔板, PBS 定容至 20  $\mu$ l, 配制不同浓度的 BSA 蛋白标准液; 取待检测的蛋白 4  $\mu$ l 用 PBS 定容至 20 ml, 按照试剂盒说明书配制成 BCA 液, 取 200  $\mu$ l BCA 液分别加入标准蛋白液和待检测蛋白中, 置于 37  $^{\circ}$ C 中水浴, 测定 A570 nm 波长下的分光光度值 (实时荧光定量 PCR 分析仪, 型号 9700, 美国 ABI 公司), 测定蛋白浓度。然后提取切片细胞总蛋白, 通过二喹啉甲酸法对蛋白定量, 将蛋白以 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 电转移至聚偏氟乙烯膜, 5% 脱脂奶粉封闭转好的膜, 1 h 后洗膜, 再加稀释好的一抗 (上海洁浩生物公司, 批号: 0511), 在 4  $^{\circ}$ C 条件下摇床孵育过夜, 再洗膜后加 1 : 2000 稀释的

辣根过氧化物酶标记抗体 (上海洁浩生物公司, 批号: 2013), 先室温孵育, 1 h 后再洗膜, 电化学发光显影、定影。经过化学发光成像系统及配套的软件采集图像将显影后所得条带扫描并保存为电脑文件, 对条带的灰度值进行分析, 蛋白表达量以目的条带的灰度值与内参条带的比值代表目的蛋白的相对表达水平。实验重复 3 次。

2.2.3 FLOT1 基因强度检测 FLOT1 抗原血清购自美国 Gibco 公司, 批号: 0362; FLOT1 抗体购自美国 CST 公司, 批号: 1032。Annexin V-异硫氰酸荧光素由上海通蔚生物公司提供, 批号 20180061。基因表达量检测采用免疫印迹法: 阴性计 1 分; FLOT1 基因检测弱阳性 (+) 计 2 分; FLOT1 基因检测阳性 (++) 计 3 分; FLOT1 基因检测强阳性 (+++) 计 4 分。FLOT1 基因检测阳性率 = FLOT1 基因检测阳性 (++) 例数 + FLOT1 基因检测强阳性 (+++) 例数 / 总例数  $\times$  100%。

### 2.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件分析数据, FLOT1 表达量采用单因素方差分析、SNK- $q$  检验, 彩超评分指标中计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较用  $t$  检验; FLOT1 表达阳性率的计数资料以百分数表示, 组间比较用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 乳腺腺病组患者治疗前后乳腺彩超评分比较

表 1 示, 经康复新液治疗 1 年后, 乳腺腺病患者腺体肿块/结节/囊肿的彩超评分明显低于治疗前 ( $t = 4.052$ ,  $P < 0.05$ )。

表 1 乳腺腺病组患者治疗前后  
乳腺彩超评分比较 (分,  $\bar{x} \pm s$ )

| 时间  | 例数 | 彩超评分             |
|-----|----|------------------|
| 治疗前 | 96 | 2.26 $\pm$ 1.01  |
| 治疗后 | 96 | 1.21 $\pm$ 0.28* |

注: 与治疗前比较, \*  $P < 0.05$

### 3.2 治疗前后乳腺腺病组患者乳腺组织中 FLOT1 蛋白表达量与空白对照组对比

表 2 示, 治疗前乳腺腺病患者腺体肿块、结节、囊肿的 FLOT1 蛋白表达量均高于正常乳腺细胞表达量, 差异均有统计学意义 ( $F = 72.914$ ,  $F = 79.211$ ,  $F = 74.042$ ,  $P < 0.05$ ); 治疗后, 乳腺腺病患者腺体肿块、结节、囊肿的 FLOT1 蛋白表达量与正常乳腺细胞 FLOT1 蛋白表达量差异无统计学

意义(  $F = 0.967, F = 0.986, F = 0.991, P > 0.05$  )。

表 2 乳腺腺病组患者治疗前后乳腺组织 FLOT1 蛋白表达量与空白对照组比较 ( AU,  $\bar{x} \pm s$  )

| 组别           | 时间  | 例数 | FLOT1 蛋白表达量    |
|--------------|-----|----|----------------|
| 空白对照组        | -   | 96 | 0.201 ± 0.015  |
| 乳腺腺病组 ( 肿块 ) | 治疗前 | 55 | 0.402 ± 0.034* |
|              | 治疗后 | 55 | 0.235 ± 0.022  |
| 乳腺腺病组 ( 结节 ) | 治疗前 | 26 | 0.504 ± 0.044* |
|              | 治疗后 | 26 | 0.301 ± 0.022  |
| 乳腺腺病组 ( 囊肿 ) | 治疗前 | 15 | 0.448 ± 0.040* |
|              | 治疗后 | 15 | 0.302 ± 0.024  |

注: FLOT1, 脂筏结构蛋白 1; 与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$

### 3.3 乳腺腺病组患者治疗前标本与空白对照组标本 FLOT1 基因强度检测比较

表 3 示, 乳腺腺病组治疗前标本 FLOT1 基因强度显著高于空白对照组, 差异有统计学意义 (  $t = 9.057, P < 0.001$  )。

表 3 乳腺腺病组患者治疗前标本与空白对照组标本 FLOT1 基因强度比较 ( 分,  $\bar{x} \pm s$  )

| 组别    | 例数 | 阳性强度         |
|-------|----|--------------|
| 乳腺腺病组 | 96 | 3.96 ± 1.05* |
| 空白对照组 | 96 | 1.25 ± 0.37  |

注: FLOT1, 脂筏结构蛋白 1; 与空白对照组比较, \*  $P < 0.001$

### 3.4 治疗前后乳腺腺病组标本 FLOT1 基因检测阳性率比较

表 4 示, 乳腺腺病组治疗后 FLOT1 基因检测阳性率为 43.75%, 明显低于治疗前的 97.92%, 差异有统计学意义 (  $\chi^2 = 11.246, P < 0.001$  )。

表 4 乳腺腺病组患者治疗前后乳腺组织 FLOT1 基因检测阳性率比较

| 时间  | 例数 | 弱阳性例(%)    | 阳性例(%)     | 强阳性例(%)    | 阳性率    |
|-----|----|------------|------------|------------|--------|
| 治疗前 | 96 | 2 (2.08)   | 24 (25.00) | 70 (72.92) | 97.92  |
| 治疗后 | 96 | 54 (56.25) | 22 (22.92) | 20 (20.83) | 43.75* |

注: FLOT1, 脂筏结构蛋白 1; 与空白对照组比较, \*  $P < 0.001$

## 4 讨论

乳腺癌是常见的女性恶性肿瘤之一, 近些年发病率呈现上升趋势。基因诊治乳腺癌已成为研究热点<sup>[1]</sup>, 脂筏结构蛋白 ( FLOT ) 也逐渐被临床认识<sup>[1]</sup>。FLOT 广泛存在于活的生物体中, 该基因平时表现高度保守, 在生物活动中参与细胞黏附, 也在多种信号通路中出现, 与轴突生长有关, 还参与跨膜转运等, 该结构蛋白包含两种同源亚型, 即 FLOT1 和脂筏结构蛋白 2 ( FLOT2 )。近年实验结果<sup>[2]</sup>显示, 许多肿瘤, 特别是恶性度高的肿瘤中

FLOT1 表达上调, 包括食管腺癌、肺小细胞癌、乳腺癌硬癌等, FLOT1 在这些肿瘤中的表达有明显的侵袭性, 即与进展快、预后差的肿瘤密切相关<sup>[3]</sup>。对乳腺癌的研究<sup>[4]</sup>表明, 通过抑制乳腺腺体细胞 FLOT1 表达, 可有效抑制乳腺癌细胞生长和扩散, 以 miR-124 对乳腺腺体细胞 FLOT1 进行靶向抑制, 发现大大降低了乳腺癌细胞的侵袭能力, 无论增殖还是迁移能力均被削弱<sup>[5]</sup>; 而把乳腺腺体细胞中的 FLOT1 敲除, 则完全没有了乳腺癌细胞的增殖及成瘤能力<sup>[6]</sup>。当前, RNA 干扰 ( RNAi ) 技术广泛用于肿瘤增殖实验中<sup>[7]</sup>, 这是通过转录后抑制基因表达的方法判断肿瘤的生长、转移能力。

康复新液来源于美洲大蠊提取物, 能修复病损组织, 调节机体免疫力, 有改善微循环作用, 可激活处于惰性的免疫细胞, 抑制肿瘤逃避能力, 激活杀伤肿瘤机制, 恢复机体免疫功能<sup>[8]</sup>, 通过作用于细胞分裂 S 期, 激活功能减退的惰性细胞染色体分裂, 同时促进组织细胞对微量元素锌的利用, 发挥抗病毒及抗肿瘤的作用<sup>[9]</sup>。

本研结果证实, 乳腺腺病患者治疗前乳腺组织 FLOT1 基因检测阳性强度与阳性率均显著高于空白对照组, 提示 FLOT1 基因检测在乳腺癌早诊早治中的潜在价值, 而康复新液抑制乳腺腺病患者 FLOT1 基因表达, 说明了早期干预乳腺腺病, 预防乳腺癌发生的可行性。康复新液能够降低乳腺腺病患者乳腺彩超评分, 也从影像学方面支持了这个结论。另外, 临床采集的乳腺腺病标本进行常规 FLOT1 基因检测, 对强阳性的病例, 即使病理检查为良性肿瘤, 仍应视为乳腺癌发病的高风险因素, 并积极提出预防措施。本研究为干预观察性研究, 样本来源于病理资料库, 入组样本均为具有明显临床体征患者, 对没有明显临床体征的患者缺乏数据支持, 需要进一步完善研究结果。

## 参考文献

- [1] 胡一迪, 胡孝渠, 李权, 等. Survivin, caspase-8 在人体乳腺增生、乳腺癌癌前病变和乳腺癌中的表达程度分析 [J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35( 1 ): 100 - 102.
- [2] YE Z, HAOR, CAI Y, et al. Knockdown of mir-221 promotes the cisplatin-inducing apoptosis by targeting the BIM-Bax/Bak axis in breast cancer [J]. Tumour Biol, 2016, 37( 4 ): 4509 - 4515.
- [3] WEI S, MOON HG, ZHENG Y, et al. Flotillin-2 modulates fas signaling mediated apoptosis after hyperoxia in lung epithelial cells [J]. PLoS One, 2013, 8( 10 ): 517 - 519.

- [4] SONG L, GONG H, LIN C, et al. Flotillin-1 promotes tumor necrosis factor- $\alpha$  receptor signaling and activation of NF- $\kappa$ B in esophageal squamous cell carcinoma cells [J]. Gastroenterology, 2012, 143 ( 4 ): 995 - 1005.
- [5] QIN Y, MIN Z, ZI W, et al. 4. 1N is involved in a flotillin-1 /  $\beta$ -catenin / Wnt pathway and suppresses cell proliferation and migration in nonsmall cell lung cancer cell lines [J]. Tumor Biol, 2016, 37( 9 ): 1 - 11.
- [6] 霍燕. 康复新液治疗宫颈炎 HPV 阳性预防宫颈癌的临床分析 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17( 94 ): 86 - 87.
- [7] 李延军. 埃索美拉唑联合康复新液治疗食管癌、贲门癌术后胃食管反流病的疗效观察 [J]. 中国医学创新, 2013, 10( 29 ): 10.
- [8] 姚育修. 乳腺腺病的病理诊断标准 [J]. 临床外科杂志, 1994, 2( 3 ): 116 - 119.
- [9] 吴迎, 周庆华, 王怡. BI-RADS 分级在乳腺肿瘤临床诊断中的应用价值 [J]. 肿瘤, 2017, 37( 3 ): 281 - 285.
- [10] LIN C, WU Z, LIN X, et al. Knockdown of FLOT1 impairs cell proliferation and tumorigenicity in breast cancer through upregulation of FOXO3a [J]. Clin Cancer Res, 2011, 17( 10 ): 3089 - 3099.
- [11] 皮文, 于长华, 刘志标. 慢病毒表达系统介导的 RNAi 技术靶向沉默 Bi-1 基因对鼻咽癌细胞生物学特性的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2017, 37( 3 ): 555 - 557.
- [12] LI R, YANG HQ, XI HL, et al. Inhibition of CDH17 gene expression via RNA interference reduces proliferation and apoptosis of human MKN28 gastric cancer cells [J]. Int J Oncol, 2016, 50( 1 ): 15 - 22.
- [13] 邹金凯, 傅得兴. 康复新液的临床应用 [J]. 首都医药, 2008, 4( 2 ): 29 - 31.
- [14] KOH M, YONG HY, KIM ES, et al. A novel role for Flotillin-1 in H-Rasregulated breast cancer aggressiveness [J]. Int J Cancer, 2016, 138 ( 5 ): 1232 - 1245.
- [15] 李文晶. microRNA-424 抑制乳腺癌细胞生长的生物学意义 [J]. 南京: 南京医科大学, 2015.
- [16] GIORDANO C, VIZZA D, PANZA S, et al. Leptin increases HER2 protein levels through a STAT3-mediated up-regulation of Hsp90 in breast cancer cells [J]. Mol Oncol, 2013, 7( 3 ): 379 - 391.
- [17] JURÁKOVÁ M, DANIHEL L, POLÁK, et al. Ki67, PCNA, and MCM proteins: markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer [J]. Acta Histochem, 2016, 118( 5 ): 544 - 552.
- [18] 刘玉媛. 天然药物康复新液的临床应用 [J]. 天津药学, 2006, 18( 3 ): 55 - 56.
- [19] 陈新谦, 金有豫. 新编药理学 [M]. 14 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 88.

# Effect of Kangfuxin Liquid on Flotillin - 1 in the Glandular Tissues in Patients with Adenosis of Breast

ZHAO Haijun<sup>1</sup>, DU Qianqian<sup>1</sup>, SHEN Yongmei<sup>2</sup>, WANG Xueming<sup>3</sup>, MU Juntong<sup>3</sup>, GAO Chong<sup>3</sup>, LI Xiaolong<sup>1</sup>, HAN Qingru<sup>1</sup>

1. The Fourth Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang, 050011; 2. Sichuan Key Laboratory of Medical American cockroach; 3. Laoting County Hospital, Hebei Province

**ABSTRACT Objective** To observe the expression of flotillin-1 ( FLOT1 ) in the breast glandular tissues in patients with adenosis of breast, and the effects of Kangfuxin Liquid on its expression. **Methods** In the inventive, observative study, 96 normal breast specimens collected from tissue bank of the department of pathology were set as blank control group, and 96 patients with adenosis of breast were set as adenosis group, in which Kangfuxin Liquid was orally administered, 10 ml each time, three times a day, for one year. Radioimmuno precipitation and western blotting were used to detect the expression of FLOT1 in the breast glandular tissues of patients in adenosis group and that of breast specimens in the blank control group before and after treatment. FLOT1 gene detection positive rate, as well as the breast color doppler ultrasound score before and after treatment in the adenosis group before treatment were compared. **Results** The breast color doppler ultrasound score was significantly lower after one-year treatment compared to that before treatment (  $P < 0.05$  ). The expression of FLOT1 protein and gene intensity score in adenosis group before treatment were higher than those in the blank control group (  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$  ). There was no statistical differences between two groups in expression of FLOT1 protein after treatment (  $P > 0.05$  ). The positive rate of FLOT1 gene detection in adenosis group was 43. 75% after treatment, significantly lower than 97. 92% before treatment (  $P < 0.01$  ). **Conclusion** Oral administration of Kangfuxin Liquid could increase color doppler ultrasound score and inhibit the over-expression of FLOT1 in the glandular tissue.

**Keywords** Kangfuxin Liquid; adenosis of breast; flotillin-1; gene expression; breast cancer

( 收稿日期: 2019 - 09 - 14; 修回日期: 2020 - 02 - 03 )

编辑: 柴倩云