

· 药理 ·

丹栀逍遥散对人乳腺癌 MCF-7 细胞株裸鼠移植瘤的影响

李然¹, 刘立萍¹, 王哲³, 潘嘉祥², 郭亚楠¹, 李雪峰¹, 李海波^{1*}

(1. 辽宁中医药大学基础医学院, 沈阳 110847;

2. 辽宁中医药大学第一临床学院, 沈阳 110847; 3. 辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110847)

[摘要] 目的:研究丹栀逍遥散对 MCF-7 乳腺癌细胞株裸鼠移植瘤的抑制作用及其机制。方法:体外培养 MCF-7 人乳腺癌细胞,将 MCF-7 细胞悬液接种于裸鼠腋下,建立裸鼠皮下移植瘤模型。雌性裸鼠分为 4 组,即模型组,丹栀逍遥散高、中、低剂量(17.98, 8.99, 4.50 g·kg⁻¹)组,每组 8 只,每日 ig 给予丹栀逍遥散连续 15 d,模型组 ig 等容积的生理盐水。比较给药各组肿瘤质量抑制率,采用苏木素和伊红(HE)染色法观察给药各组对肿瘤组织形态学影响,采用 Tunel 染色法观察给药各组对肿瘤细胞凋亡的影响。结果:与模型组比较,丹栀逍遥散高、中剂量组对肿瘤组织质量有显著抑制作用($P < 0.05$, $P < 0.01$),可改善肿瘤组织形态学,增加肿瘤组织被 Tunel 染色的细胞数目,增加肿瘤细胞凋亡率($P < 0.01$)。结论:丹栀逍遥散能够抑制 MCF-7 荷瘤裸鼠肿瘤组织生长,其作用机制可能与其促进肿瘤细胞凋亡有关。

[关键词] 丹栀逍遥散; 乳腺癌; MCF-7 细胞; 凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)02-0078-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016020078

Effect of Danzhi Xiaoyao San on Human Breast Cancer Cell Line MCF-7 in Nude Mice

LI Ran¹, LIU Li-ping¹, WANG Zhe³, PANG Jia-xiang², GUO Ya-nan¹, LI Xue-feng¹, LI Hai-bo^{1*}

(1. School of Basic Medical Sciences, Liaoning University of

Traditional Chinese Medicine (TCM), Shenyang 110847, China;

2. First Clinical College of Liaoning University of TCM, Shenyang 110847, China;

3. Affiliated Hospital of Liaoning University of TCM, Shenyang 110847, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effect and mechanism of Danzhi Xiaoyao San (DZXYS) on human breast cancer cell line MCF-7 in nude mice. **Method:** MCF-7 cells were inoculated in nude mice armpit to establish the subcutaneous tumor model. Female mice were divided to four groups randomly: model group, high-dose DZXYS group (17.98 g·kg⁻¹), middle-dose DZXYS group (8.99 g·kg⁻¹), and low-dose DZXYS group (4.50 g·kg⁻¹). Mice of high, middle and low-dose DZXYS groups were orally administrated with DZXYS and model groups with equivalent saline. The treatment course was 15 days. The tumor inhibition rate of tumor mass was observed. Tumor tissue morphology was observed by hematoxylin and eosin (HE) staining. Apoptosis of tumor tissue was observed by Tunel staining. **Result:** Compared with the model group, DZXYS was statistically significant in middle and high-dose group, and showed a notable tumor mass inhibition effect ($P < 0.05$, $P < 0.01$), improved tumor morphology, and increase in the number of cells in tumor tissues stained with

[收稿日期] 20150511(022)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81202640);中国博士后科学基金面上项目(2013M530944);辽宁省高等学校杰出青年学者成长计划项目(LJQ2015073);辽宁中医药大学大学生创新项目(50)

[第一作者] 李然,博士,副教授,硕士生导师,从事方剂配伍与作用机制研究,Tel:024-31207085,E-mail:lnliran@163.com

[通讯作者] *李海波,博士,教授,硕士生导师,从事中药抗肿瘤、抗氧化研究,Tel:024-31207308,E-mail:lnlhb@hotmail.com

Tunel and the tumor cell apoptosis rate ($P < 0.01$). **Conclusion:** DZXYS can inhibit the growth of MCF-7 tumor tissue in nude mice, and its mechanism may be related to promoting tumor cell apoptosis.

[**Key words**] Danzhi Xiaoyao San; breast cancer; MCF-7 cell; apoptosis

丹栀逍遥散出自《内科摘要》，以《太平惠民和剂局方》之逍遥散为基础方加牡丹皮和栀子组成，具有疏肝清热，养血健脾之功。孙桂芝教授^[1]认为乳腺癌的发生多与肝郁脾虚有关^[2]，故常予丹栀逍遥散等化裁，疗效确实。乳腺癌患者的内分泌综合征属于中医郁证范畴，丹栀逍遥散临床能有效改善乳腺癌患者的内分泌综合征，可见以丹栀逍遥散防治乳腺癌符合中医基本理论^[3]。为了探讨丹栀逍遥散抗乳腺癌的作用机制，开展了丹栀逍遥散对乳腺癌影响的实验研究。

1 材料

1.1 动物 6 周龄 SPF 级 BALB/c-nu 雌性裸鼠 32 只，体重(15 ± 2) g，由北京维通利华实验动物技术有限公司提供，合格证号 SCXK(京)2012-0001。

1.2 细胞培养 人乳腺癌 MCF-7 细胞系，由中国科学院上海生物科学院细胞资源中心提供。MCF-7 细胞用含 10% FBS RPMI-1640 培养液培养，24 ~ 48 h 换 1 次培养液，传代 1 次，37 °C，5% CO₂ 饱和湿度培养箱内常规培养。

1.3 药品 丹栀逍遥散原方用当归 15 g，白芍 15 g，茯苓 15 g，炒白术 15 g，柴胡 15 g，牡丹皮 7.5 g，栀子 7.5 g，炙甘草 7.5 g，上述药物均购于辽宁中医药大学附属医院。药物常规煎煮水提，原方剂量为中剂量，原方剂量 2 倍量为高剂量，原方剂量 1/2 量为低剂量，丹栀逍遥散高、中、低剂量(17.98, 8.99, 4.50 g·kg⁻¹)的药液分别浓缩成含生药质量浓度为 1.5, 0.75, 0.375 g·mL⁻¹ 备用。

1.4 试剂 胎牛血清(Hyclone, 批号 H30601), RPMI-1640 培养基(Hyclone, 批号 NZC1097), Tunel 细胞凋亡原位检测试剂盒(南京凯基, 批号 KGA7022-B)。

1.5 仪器 3111 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司), Eclipse Ci-E 型生物显微镜(日本 Nikon 公司), CM69001 型 -30 °C 恒冷低温切片仪(德国 Cleica 公司)。

2 方法

2.1 建立裸鼠 MCF-7 移植瘤模型 取对数生长期的 MCF-7 细胞，用无血清培养基调整密度至 1 × 10⁸/mL 细胞悬液。将细胞悬液接种于裸鼠腋窝处皮下，每只 sc 0.2 mL 细胞悬液，接种细胞数为 2 ×

10⁷ 个。观察成瘤时间，接种 MCF-7 细胞悬液后 10 d，将成瘤裸鼠随机分为 4 组，即模型组，丹栀逍遥散高、中、低剂量(17.98, 8.99, 4.50 g·kg⁻¹)组，各组 $n = 8$ ，药物按人与小鼠体表面积比换算给药等效剂量，分别按 17.98, 8.99, 4.50 g·kg⁻¹·d⁻¹ ig 给予丹栀逍遥散 2 次/d，连续给药 15 d，ig 容量为 10 mL·kg⁻¹，模型组 ig 等容积的生理盐水。末次给药 1 h 后，脱颈椎处死裸鼠，剥离裸鼠腋窝处皮下肿瘤组织，-80 °C 保存备用。

2.2 肿瘤质量抑制率测定 摘取瘤体，称取新鲜的裸鼠肿瘤瘤体质量，计算质量抑制率。

$$\text{肿瘤质量抑制率} = \frac{(\text{模型组平均瘤质量} - \text{给药组平均瘤质量})}{\text{模型组平均瘤质量}} \times 100\%$$

2.3 肿瘤组织形态学观察 按文献[4]方法将肿瘤组织标本固定于 4% 多聚甲醛溶液中，20% 蔗糖脱水，石蜡包埋，切片，脱蜡，苏木素和伊红(HE)染色，脱水，透明，封片，光学显微镜下观察肿瘤组织形态并采集图像。

2.4 肿瘤组织细胞凋亡测定 按文献[5]方法将肿瘤组织标本石蜡切片，Tunel 细胞凋亡检测，按试剂盒说明书操作处理，显微镜下观察并采集图像，采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件统计 8 个视野细胞总数和凋亡细胞数，计算凋亡率。

2.5 统计分析 采用 SPSS 13.0 进行统计分析，计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组数据之间比较采用单因素方差分析， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对荷瘤裸鼠肿瘤组织生长情况的影响 人乳腺癌 MCF-7 细胞接种后裸鼠成瘤率为 100%，与模型组比较，丹栀逍遥散高、中剂量对肿瘤组织生长均有不同程度的抑制作用($P < 0.05$, $P < 0.01$)，见表 1。

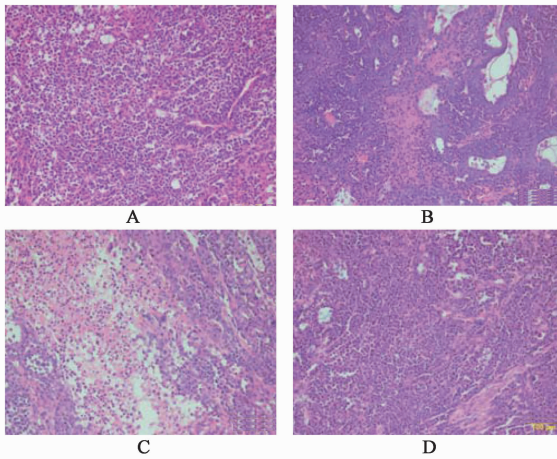
3.2 对肿瘤组织形态学的影响 分离后的裸鼠肿瘤结节呈类圆形、椭圆形或呈不规则形，肿瘤结节剖面苍白，部分肿瘤组织累及皮肤，但未见淋巴结和脏器转移。光学显微镜下见模型组细胞排列密集呈团索状，细胞核增大，呈深染，异型性明显，散在分布少量细胞坏死灶。与模型组比较，丹栀逍遥散高、中剂量组见坏死灶显著增加，胞浆淡染；而低剂量组与模型组无明显差异，见图 1。

表 1 丹栀逍遥散对荷瘤裸鼠肿瘤质量、抑制率和细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of Danzhi Xiaoyao San on tumor mass, inhibition rate and apoptosis of tumor-bearing nude mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	肿瘤质量 /g	抑制率 /%	细胞凋亡率 /%
模型	-	2.61 ± 0.20	-	8.10 ± 3.06
丹栀逍遥散	17.98	1.83 ± 0.43 ²⁾	29.89	22.45 ± 7.55 ²⁾
	8.99	1.36 ± 0.26 ¹⁾	47.89	30.41 ± 10.01 ²⁾
	4.50	2.28 ± 0.33	12.64	11.63 ± 5.71

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。



A. 模型组; B. 丹栀逍遥散 17.98 g·kg⁻¹ 组; C. 丹栀逍遥散 8.99 g·kg⁻¹ 组; D. 丹栀逍遥散 4.50 g·kg⁻¹ 组(图 2 同)
图 1 丹栀逍遥散对肿瘤组织形态学的影响(HE, ×200)

Fig.1 Morphologic change of tumor tissues treated with Danzhi Xiaoyao San (HE, ×200)

3.3 对肿瘤组织细胞凋亡的影响 Tunel 染色结果提示,模型组可见少量细胞凋亡;与模型组比较,丹栀逍遥散高、中剂量组肿瘤组织细胞 Tunel 染色明显增加($P < 0.01$),凋亡细胞的胞核呈棕色或棕褐色,不均匀散在分布,说明细胞加速进入凋亡状态。见表 1,图 2。

4 讨论

乳腺癌是导致女性患者死亡的重要原因之一,日益为人们所关注。乳腺癌与中医“乳岩”等有相似的病因病机,其发生和发展与肝和脾关系密切。情志不畅,肝气不疏,气郁化火,肝郁脾虚,气血失调,痰气凝结,瘀血阻滞,痰、瘀、热互结,日久发病。正如宋·陈自明《妇人大全良方》云:“乳岩由于忧思郁结,所愿不遂,肝脾气逆,以致经络闭塞,结积成核。”治疗时当重视肝和脾,疏肝健脾,调理气血。逍遥散、丹栀逍遥散、柴胡疏肝散等为临床常用有效

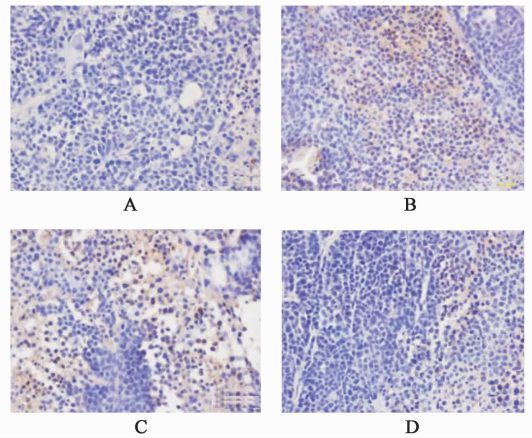


图 2 丹栀逍遥散对肿瘤组织细胞凋亡的影响(Tunel, ×400)

Fig.2 Effect of Danzhi Xiaoyao San on tumor cell apoptosis rate in tumor tissues (Tunel, ×400)

复方,能够减轻放、化疗引起的毒副作用,降低肿瘤转移的可能性,增强机体免疫力,提高患者的生活质量和生存率^[6]。国医大师段富津教授临证治疗乳腺癌的主要经验包括气郁化火证以丹栀逍遥散为基础方、肝脾不和证以逍遥散为基础方、肝郁气滞证以柴胡疏肝散为基础方等^[7]。

细胞凋亡,是细胞在一定的生理或病理条件下,遵循自身的程序,自己结束其生命的过程,最后细胞脱落离体或裂解为若干凋亡小体,被其他细胞吞噬。经典的凋亡途径是指死亡受体途径和线粒体途径,其调控可通过死亡受体、线粒体、凋亡抑制蛋白等多个水平实现,也受相关传导通路信号的调节。凋亡与肿瘤的发生、发展和治疗密切相关,利用有关的凋亡诱导和调控机制诱导肿瘤细胞凋亡已经成为治疗肿瘤的一个重要途径^[8-10]。

建立的人乳腺癌 MCF-7 细胞系移植型裸鼠模型基本保持了人乳腺癌细胞的组织学特性^[11],其发生、发展和治疗与细胞凋亡密切相关。人乳腺癌细胞广泛存在抗凋亡 Bcl-2 家族成员的高表达,线粒体功能与细胞凋亡为抗癌作用机制^[12],抗凋亡成员可能成为治疗乳腺癌的新靶点^[13]。但也有学者研究^[14]表明,自噬通过 Bcl-2 的下调促进 MCF7 乳腺癌细胞的生长,而与其抑制细胞凋亡无关。亦有学者研究^[15]认为,自噬和凋亡在人乳腺癌细胞 MCF7 介导之间存在相互作用。

本研究结果表明,丹栀逍遥散可以抑制荷瘤裸鼠肿瘤组织生长,其抑制程度与剂量相关,丹栀逍遥散中剂量组抑瘤效果最好;其作用机制可能与其能够诱导肿瘤细胞凋亡有关。丹栀逍遥散可能是通过促进肿瘤组织细胞凋亡使人乳腺癌 MCF-7 细胞死

亡以抑制肿瘤细胞生长,但丹栀逍遥散对线粒体功能及复杂凋亡信号系统的影响有待于进一步深入研究。

[参考文献]

[1] 何立丽,孙桂芝. 孙桂芝治疗乳腺癌经验[J]. 北京中医药,2009,28(1):18-19.

[2] 陈建华. 孙桂芝教授病证结合治疗乳腺癌经验整理与临床研究[D]. 北京:中国中医科学院,2012.

[3] 徐咏梅,杨国旺,王笑民,等. 丹栀逍遥散加减治疗乳腺癌内分泌综合征 65 例临床观察[J]. 河北中医,2005,27(9):676.

[4] 吴小华,张彩虹,曹琴英,等. 顺铂低剂量节拍化疗对荷人卵巢癌裸鼠及其移植瘤生长的影响[J]. 肿瘤,2015,35(1):31-37.

[5] Li H, Gong J, Jiang X, et al. arsenic trioxide treatment of rabbit liver vx-2 carcinoma via hepatic arterial cannulation-induced apoptosis and decreased levels of survivin in the tumor tissue[J]. Croat Med J,2013,54(1):12-16.

[6] 李想. 贾英杰运用疏肝健脾法治疗乳腺癌经验[J]. 湖南中医杂志,2014,30(4):27-28.

[7] 徐慧馨. 段富津教授治疗乳癖的经验研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2013.

[8] 汤睿,朱正纲. 凋亡途径与肿瘤治疗[J]. 世界华人消化杂志,2005,13(20):2469-2472.

[9] Ferreira D M, Afonso M B, Rodrigues P M, et al. c-Jun N-terminal kinase 1/c-Jun activation of the p53/microRNA 34a/sirtuin 1 pathway contributes to apoptosis induced by deoxycholic acid in rat liver[J]. Mol Cell Biol,2014,34(6):1100-1120.

[10] Zhao G, Zhu Y, Eno C O, et al. Activation of the proapoptotic Bcl-2 protein Bax by a small molecule induces tumor cell apoptosis[J]. Mol Cell Biol,2014,34(7):1198-1207.

[11] 齐殿君,刘冰,张清富,等. BALB/C 小鼠 MCF-7 和 MDA-MB-231 乳腺癌移植模型的建立和评价[J]. 中国慢性病预防与控制,2014,22(1):84-85.

[12] Le V, Esposito D, Grace M H, et al. Cytotoxic effects of ellagitannins isolated from walnuts in human cancer cells[J]. Nutr Cancer,2014,66(8):1304-1314.

[13] 蔡晨,刘婷婷,张永凤. BH3 类似物对乳腺癌细胞的促凋亡作用[J]. 复旦学报:自然科学版,2015,54(1):8-15.

[14] Oh S, Xiaofei E, Ni D, et al. Downregulation of autophagy by bcl-2 promotes mcf7 breast cancer cell growth independent of its inhibition of apoptosis[J]. Cell Death Differ, 2011,18(3):452-464.

[15] Laha D, Pramanik A, Maity J, et al. Interplay between autophagy and apoptosis mediated by copper oxide nanoparticles in human breast cancer cells MCF7[J]. Biochim Biophys Acta, 2014,1840(1):1-9.

[责任编辑 聂淑琴]