

# 蓝萼香茶菜二萜类物质对乳腺癌前病变肝郁肾虚证模型大鼠的干预作用

杨丽霞, 邓卫芳, 陈鸿, 孙琳\*  
(山西中医药大学, 太原 030024)

**[摘要]** 目的:通过加热回流的方法提取蓝萼香茶菜中二萜类物质,测定其含量,研究二萜类物质对乳腺癌前病变肝郁肾虚证模型大鼠的干预作用及其作用机制。方法:雌性SD大鼠随机分层分组为正常组、枸橼酸他莫昔芬片组、模型组、蓝萼组。除正常组外其他各组均用二甲基苯蒽(DMBA)结合慢性不可预见应激行为制备乳腺癌前病变肝郁肾虚证模型,造模结束后,观察记录各组大鼠的生物表征变化及病理变化验证模型。蓝萼组给予二萜类提取物水溶液 $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃,正常组和模型组给予蒸馏水 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃,各组均连续灌胃30 d。30 d后,记录各组大鼠肉眼可见肿瘤的发生情况;腹腔取血,使用酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒检测血清中雌二醇( $E_2$ ),孕激素(P)水平;采集乳腺组织,用苏木素-伊红(HE)染色观察乳腺组织病理学变化,实时荧光定量PCR(Real-time PCR)及蛋白免疫印迹法(Western blot)检测乳腺组织血管内皮生长因子(VEGF),趋化因子受体4(CXCR4)mRNA及蛋白表达水平。结果:提取得干燥品质量2.162 g,干燥品中二萜类质量分数为26.35%。与模型组比较,蓝萼组血清中 $E_2$ ,P水平明显降低( $P<0.05$ ),乳腺组织中VEGF,CXCR4蛋白及mRNA表达水平均明显降低( $P<0.05$ )。结论:蓝萼香茶菜二萜类物质有可能通过抑制VEGF,CXCR4蛋白及mRNA表达,抑制血管生成和趋化因子受体表达,调节大鼠激素水平,从而抑制大鼠乳腺癌前病变癌变的发生。

**[关键词]** 蓝萼香茶菜;二萜;乳腺癌前病变;肝郁肾虚模型;血管内皮生长因子;趋化因子受体

**[中图分类号]** R273;R22;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)02-0140-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2018020140

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171011.1432.054.html>

**[网络出版时间]** 2017-10-11 14:32

## Intervention Effect of *Rabdosia japonica* var. *glaucocalyx* Diterpenoids on Liver Qi Stagnation and Kidney Deficiency Model of Precancerous Breast Lesions

YANG Li-xia, DENG Wei-fang, CHEN Hong, SUN Lin\*  
(Shanxi University of Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China)

**[Abstract]** **Objective:** To extract *Rabdosia japonica* var. *glaucocalyx* diterpenes by heating reflux to determine the contents of diterpenes and study the effect of *R. japonica* var. *glaucocalyx* diterpenes on the liver Qi stagnation and kidney deficiency model of precancerous breast lesions. **Method:** Female SD rats were randomly divided into 4 groups, namely normal group, tamoxifen citrate group, model group, and *R. japonica* var. *glaucocalyx* diterpenes group. All of the groups except for normal group were given DMBA combined with multi-composite stress. Changes in biological characterizations of rats were observed and recorded after successful modeling. Diterpenes were given to *R. japonica* var. *glaucocalyx* diterpenes group, while distilled water was given to normal group and model group. Intragastric administration was performed for consecutively 30 days. Thirty days later, blood was collected from abdominal cavity and breast tissues for pathological examination. Incidence of

**[收稿日期]** 20170602(015)

**[基金项目]** 山西省中医药管理局科研项目(2016ZYCY28)

**[第一作者]** 杨丽霞,硕士,讲师,从事中草药化学成分及药理学研究,Tel:17703435340,E-mail:yanglixigao@163.com

**[通信作者]** \*孙琳,博士,讲师,从事心血管疾病的中医药防治研究,Tel:18335152100,E-mail:sunlin115@aliyun.com

tumors was recorded. Serum estradiol ( $E_2$ ) and progesterone (P) levels were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Hematoxylin-eosin (HE) staining was adopted for observing the pathological changes. Expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF), chemokine receptor (CXCR4) protein and mRNA were detected by Real-time PCR and Western blot. **Result:** The dried products weighed 2.162 g, including 26.35% of diterpenes. Compared with normal group, a series of biological changes were observed in model group. The levels of  $E_2$  and P in *R. japonica* var. *glaucocalyx* diterpenes group were lower than those of model group ( $P < 0.05$ ). VEGF and CXCR4 protein and mRNA expressions were lower than those in model group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** *R. japonica* var. *glaucocalyx* diterpenes can prohibit VEGF and CXCR4 mRNA and protein expressions, angiogenesis and chemokine receptor expressions, and regulate hormone levels in rats, so as to inhibit the carcinogenesis of precancerous breast lesions in rats.

[**Key words**] *Rabdosia japonica* var. *glaucocalyx*; diterpenoids; precancerous breast lesion; liver Qi stagnation and kidney deficiency model vascular; endothelial growth factor (VEGF); chemokine receptor (CXCR4)

临床发现,长期处于空调办公环境中且工作压力大的乳腺增生病、乳腺癌前疾病女性患者在辨证中不仅肝郁证明显,还表现出系列肾虚证,即早期多辨证为肝郁肾虚证,日久则成毒瘀互结之证,导致乳腺癌发生<sup>[1-2]</sup>。因此,对乳腺癌前病变肝郁肾虚证的治疗成为逆转其向乳腺癌发展的有效途径。目前关于乳腺癌前病变的造模方式很难将社会因素、环境因素、心理因素等一并考虑在内,更难对模型进行辨证。本实验采用二甲基苯蒽(DMBA)诱导乳腺癌前病变<sup>[3]</sup>与慢性不可预见应激<sup>[4]</sup>(模拟患者在环境中所受的负性应激)相结合建立了肝郁肾虚病证模型。

蓝萼香茶菜味苦、甘,归肝、肾经,具有清热利尿、活血散瘀,解毒消肿之功效,用于感冒、咽喉肿痛、胃炎、肝炎、乳腺炎、癌症(食道癌、贲门癌、肝癌、乳腺癌)初起、闭经、跌打损伤等<sup>[5]</sup>。前期研究发现蓝萼香茶菜二萜类物质具有抗凝血<sup>[6-7]</sup>,抑菌<sup>[8]</sup>,保护脏器<sup>[9]</sup>,抗肿瘤作用<sup>[10-11]</sup>,同时也证实了 $\alpha$ -亚甲基环戊酮结构单元是蓝萼香茶菜中二萜类物质抗肿瘤活性的药效基团,具有较强的细胞增殖抑制活性<sup>[12]</sup>。但是本药就乳腺癌前病变的干预尚未见报道。本实验选取蓝萼香茶菜提取物蓝萼香茶菜二萜类物质对乳腺癌前病变肝郁肾虚病证模型进行干预,并观察其对引起乳腺癌前病变血管内皮生长因子(VEGF)及细胞趋化改变的趋化因子受体 4(CXCR4)的影响,探讨其干预乳腺癌前病变作用及作用机制,为蓝萼香茶菜二萜类物质干预乳腺癌前病变提供实验基础。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康 SPF 级雌性 SD 大鼠 40 只,体重 100 ~ 130 g,由中国人民解放军第四军医大学实验

动物中心提供,合格证号 SCKX(军)2016-0007,在陕西省实验动物检测中心检验合格。本实验研究获得山西中医药大学实验动物伦理委员会批准,实验均符合中国伦理委员会有关动物研究指导原则。

**1.2 药物及试剂** 蓝萼香茶菜药材采自辽宁抚顺新宾地区,经解放军第二军医大学郑汉臣教授鉴定为唇形科植物蓝萼香茶菜 *Rabdosia japonica* var. *glaucocalyx* 的地上部分。蓝萼甲素(自制,高效液相色谱,面积归一化法测纯度为 99%);枸橼酸他莫昔芬片(扬子江药业集团有限公司,批号 09060401);7,12-二甲基苯并[a]蒽(东京化成工业株式会社,批号 R8JWN-HJ);VEGF, CXCR4, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体(美国 Abcam 公司,批号分别为 20170425, 20171021, 20170822);全蛋白提取试剂盒,辣根过氧化物酶(HRP)试剂盒(南京凯基生物科技有限公司,批号分别为 20170623, 20170502);辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗(北京中杉金桥生物科技有限公司,批号 20170812);RNA 提取试剂盒, cDNA 合成试剂盒(北京全式金生物技术有限公司,批号分别为 20170406, 20170627);定量 PCR 检测试剂盒(上海吉凯基因化学技术有限公司,批号 20170524)。

**1.3 仪器** Synergy H1 型微孔板检测仪, ABI7500 型定量 PCR 仪(美国 Bio-Tek 公司);Minisub cell 型电泳系统, Trans-blotsd semi-dry transfer cell 型电转膜系统(美国 Bio-Rad 公司);Fluor Chem HD2 型凝胶成像分析系统(美国 Protein Simple 公司);UV-6100S 型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);EX324 型分析天平(美国 Ohaus 公司)。

## 2 方法

**2.1 蓝萼香茶菜二萜类物质的提取** 将蓝萼香茶

菜药材按照 2015 年版《中国药典》<sup>[13]</sup> 一部规定进行干燥,粉碎,过 30 目筛等预处理。精密称取蓝萼香茶菜粉末 50 g,置于 500 mL 圆底烧瓶中,加入 10 倍量的 95% 乙醇使其没过药材,80 ℃ 加热回流提取 3 次,提取时间分别为 8,6,6 h,粗滤,合并滤液,减压旋转蒸发得到浸膏。用甲醇将浸膏溶解后过滤,向滤液中加入 1/80 活性炭脱色,多次过滤后将滤液减压旋转蒸发得到浸膏。将浸膏放入烘箱中 100 ℃ 烘干并粉碎以供备用。

**2.2 蓝萼香茶菜二萜类物质含量的测定** 精密称取蓝萼甲素对照品 3 mg,置于 10 mL 量瓶中,95% 乙醇定容得到对照品溶液;分别精密量取对照品溶液 0.1,0.3,0.5,0.8,1.0,1.5 mL 于 10 mL 量瓶中,95% 乙醇定容,得到系列梯度溶液;以 95% 乙醇作为空白溶剂,在 238 nm 波长处测定各系列梯度溶液的吸光度  $A$ ,按照  $A$  与浓度建立标准曲线<sup>[14]</sup>。称取蓝萼香茶菜提取物 0.104 g 置于 10 mL 量瓶中,95% 乙醇定容;量取 1 mL 置于 50 mL 量瓶中,95% 乙醇稀释定容,得到供试品试液;以 95% 乙醇为空白溶剂,在 238 nm 波长下测定  $A$ ,代入标准曲线计算蓝萼香茶菜二萜类物质的含量<sup>[14]</sup>。

**2.3 分组造模与给药** 常规饲养大鼠 1 周后,根据体重分层随机分组为正常组、模型组、枸橼酸他莫昔芬片组、蓝萼香茶菜二萜类物质组(蓝萼组),每组 10 只。正常组给予普通饮食喂养,直至实验结束。枸橼酸他莫昔芬片组、模型组、蓝萼组参照文献[15-17],于实验第 1 周第 1 天,灌胃 DMBA(芝麻油溶解)0.1 g·kg<sup>-1</sup>,常规饲养 4 周,第 4 周第 1 天进行 DMBA 0.1 g·kg<sup>-1</sup> 第 2 次灌胃,常规饲养 5 周,建造大鼠乳腺癌前病变模型。模型组及蓝萼组从实验第 2 周的第 1 天开始,给予连续 8 周慢性不可预见应激,应激模式包括昼夜倒置,禁食 24 h,热应激 15 min(60 ℃ 电吹风刺激),禁水 24 h。9 周后,蓝萼组给予蓝萼香茶菜提取物(水溶)每天 5.0 mg·kg<sup>-1</sup> 灌胃,枸橼酸他莫昔芬片组给予枸橼酸他莫昔芬水溶液 1.8 mg·kg<sup>-1</sup> 灌胃,正常组、模型组给予蒸馏水 10 mL·kg<sup>-1</sup> 灌胃。以上各组均连续灌胃 30 d。干预结束后,模型组大鼠死亡 3 只,枸橼酸他莫昔芬片组死亡 2 只,蓝萼组死亡 2 只。然后给予各组大鼠 1% 戊巴比妥钠 40 mg·kg<sup>-1</sup> 腹腔注射麻醉,无菌条件下取大鼠胸部第 2 对乳腺及其周围皮肤、皮下组织装入冻存管中,迅速置于液氮内冷冻,储存于 -80 ℃ 冰箱备用。

**2.4 肿瘤发生情况观察** 实验第 6 周开始,每周

观察大鼠肉眼可见肿瘤发生情况,详细记录每组肉眼可见肿瘤大鼠数,并记录单发、多发肿瘤数目。

**2.5 苏木素-伊红(HE)染色观察乳腺组织病理变化** 将多聚甲醛溶液固定的乳腺组织,用梯度乙醇脱水,制作切片,HE 染色,光镜下观察病理学情况。根据 2012 年新版 WTO 乳腺肿瘤分类标准<sup>[18]</sup>,诊断大鼠乳腺组织病理学情况。

**2.6 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清中雌二醇(E<sub>2</sub>),孕激素(P)水平** 试剂取出平衡至室温,洗涤液稀释备用;将预包被板从密封袋中取出,设 1 个空白孔,不加任何液体,每个标准孔设置 2 个复孔,每孔加入对应对照品 50 μL,其余每孔直接加入待测样本 50 μL;将对照品和样品加完后,立即加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的孕酮抗原 50 μL,空白孔除外;再按相同的加样顺序每孔加入检测抗体 50 μL,充分混匀,贴上覆膜,置于 37 ℃ 水浴锅中温育 60 min;温育结束后弃去孔内液体,甩干,用稀释后的洗涤液清洗 3 次,甩干并在吸水纸上轻拍,将孔内液体拍干;将底物溶液 A-底物溶液 B 1:1 混匀,每孔加入底物混合液 100 μL,置于 37 ℃ 避光显色 15 min;每孔加入反应终止液 50 μL,终止反应,立即用微孔板检测仪在 450 nm 处测量各孔  $A$ ,并记录。

**2.7 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测乳腺组织中 VEGF, CXCR4 mRNA 表达** 取液氮中的乳腺组织,提取乳腺组织总 RNA,用微量紫外分光光度计测定其浓度和纯度,以 RNA 为模板,用 TransScript® RT/RI Enzyme Mix, 2 × TS Reaction Mix 高效合成第一链 cDNA。以 GAPDH 作为内参进行 PCR 扩增。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,VEGF(162 bp):上游 5'-ACGTCGGAGAGCAACGTCAC-3',下游 5'-ACCGGATTCTTGGCTTTTCGT-3';CXCR4(105 bp):上游 5'-ATCATCTCCAAGCTGTCACACTCC-3',下游 5'-GTGATGGAGATCCACTTGTGCAC-3';GAPDH(128 bp):上游 5'-AGGGAAATCGTGCGTGACAT-3',下游 5'-AACCGCTCATTGCCGATAGT-3'。反应体系为 cDNA 2 μL, Forward Primer 1 μL, Reverse Primer 1 μL, 10 × buffer II 5 μL, 2.5 mmol·L<sup>-1</sup> dNTPs 4 μL, TransScript® RT/RI DNA Polymerase 0.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 50 μL。反应条件为 94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 变性 30 s, 60 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 39 次扩增循环, 72 ℃ 补循环 10 min, 终止反应。最后根据 PCR 仪产生的荧光信号进行数据处理得出  $C_t$ , 采用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 法对目的基因进行相对定量分析。

**2.8 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测乳腺组织中 VEGF, CXCR4 蛋白表达** 取液氮中的乳腺组织, 提取组织总蛋白, 测定总蛋白含量。配制 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶, 将凝胶玻璃板置入含电泳缓冲液的电泳槽内, 用移液枪将蛋白 marker 和蛋白样品按顺序注入上样孔内, 各样品的蛋白上样量保持一致 (10  $\mu$ L), 电泳为恒压模式, 积层胶为 80 V, 分离胶为 100 V。采用半干转模式, 电压 10 V, 转膜时间为 20 min, 将凝胶中的目的蛋白转移至 PVDF 膜上, 将膜浸入 5% 脱脂牛奶中室温封闭 1 h, 根据各抗体说明书, 以合适的比例稀释一抗 (1:200), 与相应的膜于 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, 将洗涤后的一抗反应膜放入二抗工作液 (1:5 000) 中, 室温、避光缓慢摇动作用 60 min, 用 1  $\times$  TBST 洗膜, HRP 试剂盒显色, 拍照。应用 IPP 6.0 软件分析目的条带灰度值, 经内参 GAPDH 校正后进行统计学分析。

**2.9 统计学方法** 应用 SPSS 19.0 统计软件进行分析。计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间差异用单因素方差分析, LSD 检验, 以  $P < 0.05$  表示差异有统计学

意义。

### 3 结果

**3.1 标准曲线的绘制** 以浓度 C 为横坐标, A 为纵坐标, 绘制标准曲线。结果显示, 标样在 3 ~ 35  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内, A 与 C 之间具有良好的线性关系, 回归方程  $Y = 0.0275X + 0.007 (R^2 = 0.9995)$ 。

**3.2 蓝萼香茶菜提取干燥品中二萜类物质含量测定** 经 95% 乙醇加热回流提取的蓝萼香茶菜干燥品中二萜类物质为 26.35%, 二萜类物质生药质量分数为 11.158  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。结合文献中蓝萼香茶菜二萜类物质急性毒性实验结果<sup>[14]</sup>, 确定造模结束后蓝萼组给予蓝萼香茶菜提取物 (二萜类物质) 每天 5.0  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  灌胃, 连续灌胃 30 d。

**3.3 对大鼠肉眼可见肿瘤发生情况的影响** 与正常组比较, 模型组大鼠肉眼可见肿瘤发生率显著增高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 枸橼酸他莫昔芬片组、蓝萼组大鼠肉眼可见肿瘤发生率显著降低 ( $P < 0.01$ )。提示蓝萼香茶菜二萜类物质可以降低大鼠肉眼可见肿瘤发生率。见表 1。

表 1 蓝萼香茶菜二萜类物质对大鼠肉眼可见肿瘤发生率的影响

Table 1 Effect of *Rabdosia japonica* var. *glaucoalyx* diterpenoids on incidence of tumors in rats

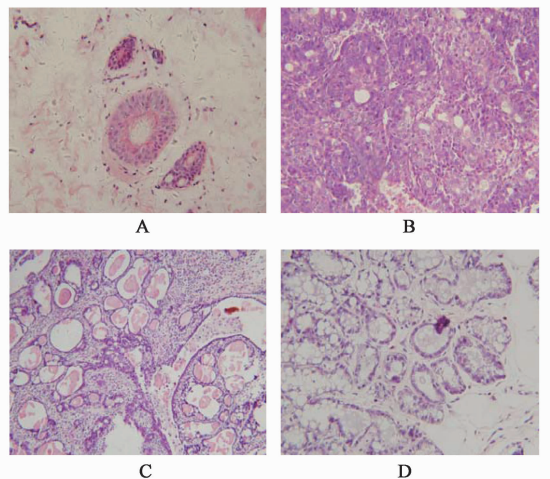
组别	n	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	出现肿瘤大鼠			
			单发/只	多发/只	合计/只	比率/%
正常	10	-	0	0	0	0
模型	7	-	1	6 <sup>2)</sup>	7	100 <sup>2)</sup>
枸橼酸他莫昔芬片	8	1.8	2	3 <sup>4)</sup>	5	62.5 <sup>4)</sup>
蓝萼	8	5.0	2	2 <sup>4)</sup>	4	50 <sup>4)</sup>

注: 与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$  (表 2~4 同)。

**3.4 对大鼠乳腺组织病理学形态的影响** 正常组全部为正常腺体; 与正常组比较, 模型组增生的细胞大小不一, 形状多样, 核大而浓染, 核浆比例增大, 非典型性增生的细胞已达上皮的 2/3, 以 II ~ III 型非典型增生为主, 同时伴有原位癌; 与模型组比较, 枸橼酸他莫昔芬片组以中度增生, I 型非典型增生为主, 蓝萼组以一般增生, I 型非典型增生为主。提示蓝萼香茶菜二萜类物质可以明显抑制大鼠乳腺组织增生。见图 1。

**3.5 对大鼠激素水平的影响** 与正常组比较, 模型组大鼠  $E_2, P$  水平明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 枸橼酸他莫昔芬片组、蓝萼组大鼠  $E_2, P$  水平明显降低 ( $P < 0.05$ )。提示蓝萼香茶菜二萜类物质可以明显抑制大鼠  $E_2, P$  激素水平。见表 2。

**3.6 对大鼠 CXCR4, VEGF 蛋白表达水平的影响** 与正常组比较, 模型组大鼠 CXCR4, VEGF 蛋白表达



A. 正常组; B. 模型组; C. 枸橼酸他莫昔芬片组; D. 蓝萼组 (图 2 同)  
图 1 蓝萼香茶菜二萜类物质对大鼠乳腺组织病理学形态的影响 (HE,  $\times 400$ )

Fig. 1 Effect of *Rabdosia japonica* var. *glaucoalyx* diterpenoids on pathological morphology of mammary tissues in rats (HE,  $\times 400$ )

表 2 蓝萼香茶菜二萜类物质对大鼠 E<sub>2</sub>, P 激素水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 2 Effect of *Rabdosia japonica* var. *glaucoalyx* diterpenoids on levels of E<sub>2</sub> and P hormones in rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	E <sub>2</sub>	P
正常	10	-	107.78 ± 26.77	21.22 ± 2.84
模型	7	-	162.16 ± 42.32 <sup>1)</sup>	36.97 ± 8.94 <sup>1)</sup>
枸橼酸他莫昔芬片	8	1.8	140.24 ± 12.70 <sup>3)</sup>	23.26 ± 10.49 <sup>3)</sup>
蓝萼	8	5.0	109.68 ± 28.11 <sup>3)</sup>	21.27 ± 3.51 <sup>3)</sup>

水平明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 枸橼酸他莫昔芬片组、蓝萼组大鼠 CXCR4, VEGF 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ )。提示蓝萼香茶菜二萜类物质可以明显抑制大鼠 CXCR4, VEGF 蛋白表达水平。见图 2, 表 3。

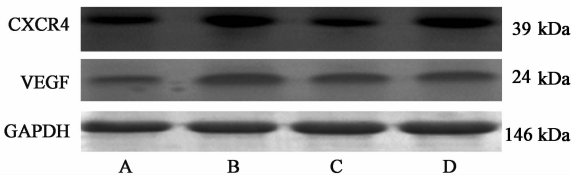


图 2 大鼠乳腺组织 CXCR4, VEGF 蛋白表达电泳  
Fig. 2 Electrophoresis of CXCR4, VEGF protein expressions in mammary tissues of rats

表 3 蓝萼香茶菜二萜类物质对大鼠乳腺组织 CXCR4, VEGF 蛋白表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of *Rabdosia japonica* var. *glaucoalyx* diterpenoids on CXCR4, VEGF protein expressions in mammary tissues of rats ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	CXCR4/GAPDH	VEGF/GAPDH
正常	-	0.910 ± 0.102	0.599 ± 0.098
模型	-	1.167 ± 0.082 <sup>1)</sup>	0.761 ± 0.078 <sup>1)</sup>
枸橼酸他莫昔芬片	1.8	0.732 ± 0.055 <sup>3)</sup>	0.607 ± 0.033 <sup>3)</sup>
蓝萼	5.0	0.844 ± 0.013 <sup>3)</sup>	0.585 ± 0.019 <sup>3)</sup>

### 3.7 对大鼠 CXCR4, VEGF mRNA 表达水平的影响

与正常组比较, 模型组大鼠 CXCR4, VEGF mRNA 表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 枸橼酸他莫昔芬片组、蓝萼组大鼠 CXCR4, VEGF mRNA 表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ )。提示蓝萼香茶菜二萜类物质可以明显抑制大鼠 CXCR4, VEGF mRNA 表达水平。见表 4。

## 4 讨论

本实验采用 DMBA 诱导乳腺癌前病变与慢性不可预见应激相结合建立肝郁肾虚病证模型。

表 4 蓝萼香茶菜二萜类物质对大鼠乳腺组织 CXCR4, VEGF mRNA 表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of *Rabdosia japonica* var. *glaucoalyx* diterpenoids on CXCR4 and VEGF mRNA expressions in mammary tissues of rats ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	CXCR4	VEGF
正常	-	0.724 ± 0.170	0.752 ± 0.103
模型	-	1.022 ± 0.221 <sup>1)</sup>	1.001 ± 0.082 <sup>1)</sup>
枸橼酸他莫昔芬片	1.8	0.535 ± 0.072 <sup>3)</sup>	0.654 ± 0.065 <sup>3)</sup>
蓝萼	5.0	0.683 ± 0.220 <sup>3)</sup>	0.711 ± 0.024 <sup>3)</sup>

从生物表征变化、乳腺组织病理变化对模型进行辨证分析, 发现模型组大鼠出现皮毛松弛, 暗淡无光, 皮温低, 蜷缩少动, 扎堆眯眼, 倦怠淡漠, 对刺激敏感度降低, 饮食饮水减少, 大便多半湿, 小便量多色淡, 舌尖有瘀点, 苔湿润等一系列肝郁肾虚证的生物表征变化, 且模型组病理学形态与正常组比较存在明显差异, 与枸橼酸他莫昔芬片组比较无明显差异, 可见乳腺癌前病变仍属于疾病发展早期<sup>[1]</sup>。从肿瘤发生率变化及血清中 E<sub>2</sub>, P 水平, 组织中 VEGF, CXCR4 蛋白及 mRNA 表达水平变化等客观指标对模型进行验证, 发现与正常组和枸橼酸他莫昔芬片组比较, 模型组大鼠肉眼可见肿瘤数, E<sub>2</sub>, P 水平, VEGF, CXCR4 蛋白及 mRNA 表达水平, 均明显升高, 证明造模成功<sup>[3]</sup>。

临床研究发现, 乳腺癌前病变大多是在情志内伤、冲任失调的基础上肝气郁结、痰凝血瘀而发病<sup>[19]</sup>, 病变初期辨证以“肝郁肾虚”为主<sup>[1]</sup>, 而蓝萼香茶菜归肝、肾经, 具有清热解毒、疏肝活血、化痰散结之功效<sup>[5]</sup>, 因此蓝萼香茶菜二萜类提取物可用于乳腺癌前病变的治疗。

血管生成与乳腺良性疾病恶变、肿瘤的发生、发展、转移和预后均有密切的关系<sup>[20]</sup>, 因此, 研究乳腺非典型增生过程中新生血管的变化具有重要意义。VEGF 是目前所知的作用最强、选择性最高的内皮细胞丝裂原, 是肿瘤血管生成过程中的重要调节因子, 对乳腺癌的发生、发展、侵袭和转移起着非常重要的作用<sup>[21-22]</sup>。趋化因子受体尤其是 CXCR4, 与其配体 SDF-1 形成的 CXCR4/SDF-1 轴在肿瘤生长、侵袭和转移中也具有重要作用, 有研究证明 CXCR4 可以通过上调 VEGF 分泌量来促进肿瘤血管生成<sup>[23-24]</sup>。VEGF 能促进血管内皮细胞 CXCL12 的表达, 同时可以通过阻断 CXCL12/CXCR4 轴起到抑制

VEGF 依赖的血管形成作用, CXCL12 可诱导内皮细胞表达 VEGF, VEGF 反过来可上调内皮细胞表面的 CXCL12/CXCR4 表达, 提示 CXCR4 与 VEGF 在乳腺癌发生发展过程中可能有协同作用。因此, 在乳腺癌前病变阶段检测 VEGF 及 CXCR4 的表达, 不仅能反映乳腺癌前病变的预后及发展, 还能为其机制的研究及治疗靶点的选择提供依据。

本实验通过对大鼠乳腺组织中 VEGF, CXCR4 蛋白及 mRNA 表达水平的检测, 发现模型组大鼠 VEGF, CXCR4 蛋白及 mRNA 表达水平都要高于其他组, 蓝萼组大鼠 VEGF, CXCR4 蛋白及 mRNA 表达水平都要低于模型组。数据结果表明, 蓝萼香茶菜二萜类物质通过抑制 VEGF, CXCR4 蛋白及 mRNA 表达, 抑制血管生成和趋化因子受体表达, 调节大鼠激素水平, 从而抑制大鼠乳腺增生发生癌变。

乳腺癌前病变作为向乳腺癌发展的过渡阶段, 在此阶段采取积极有效的治疗, 对预防乳腺癌具有重要意义。蓝萼香茶菜二萜类物质对乳腺癌前病变肝郁肾虚病证模型大鼠的干预效果明显, 为预防乳腺癌提供了新的方法, 为治疗乳腺癌新药的开发提供了依据。但其作用机制及作用靶点尚未明确, 并且对于二萜类物质的体内分布还未见详细报道, 进一步探究其作用机制和靶点, 以及分析其在体内主要分布与代谢, 将成为今后的研究方向。

#### [参考文献]

[1] 邓卫芳, 裴晓华, 樊英怡, 等. 金贝乳康片对乳腺癌前病变肝郁肾虚模型大鼠的干预作用[J]. 中医杂志, 2012, 53(4): 327-330.

[2] 邓卫芳, 裴晓华, 金华, 等. 乳腺癌前病变“毒瘀互结”模型大鼠生物表征变化及化瘀解毒法的调控[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(5): 1508-1512.

[3] 宋爱莉, 梁栋, 殷玉琨, 等. 大鼠乳腺癌前病变肝郁证造模的研究[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(1): 5-7.

[4] 王文竹, 杨忠华, 徐志伟, 等. 逍遥散抗慢性心理应激海马神经元凋亡的机理研究[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(3): 295-298.

[5] 中科院“中国植物志”编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 2013: 429.

[6] 张冰月, 郎铁咏, 王强. 蓝萼甲素抗血小板聚集的研究[J]. 中医药信息, 2014, 31(6): 23-26.

[7] 朱晓红, 张冰月, 王莹莹, 等. 蓝萼香茶菜二萜类物质对小鼠抗凝血作用[J]. 中国公共卫生, 2013, 29(1): 86-87.

[8] 海广范, 张慧, 郭兰青. 二萜类物质药理作用研究进

展[J]. 中医药导报, 2015, 32(1): 77-80.

[9] 夏龙, 褚纯隽, 严彪, 等. 蓝萼甲素对血管内皮细胞的保护作用[J]. 中医药导报, 2014, 31(6): 22-24.

[10] 应娜, 徐长亮, 张健, 等. 蓝萼甲素对入肝癌细胞 HepG2 细胞株的作用[J]. 海峡药学, 2012, 24(1): 235-238.

[11] 李梦姣, 顾振纶, 董丽霞, 等. 蓝萼甲素对人肺癌 A549 细胞的作用及其机制[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(6): 882.

[12] 任茜茜, 周慧超, 贺爽, 等. 蓝萼香茶菜化学成分及抗肿瘤活性研究[J]. 新乡医学院学报, 2016, 33(4): 261-266.

[13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 四部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 凡例 XII-XV.

[14] 张冰月, 郎铁咏, 王强. 蓝萼香茶菜二萜类物质的提取工艺及其急毒实验的研究[J]. 中医药信息, 2014, 31(4): 57-60.

[15] 王峰, 马忠兵, 方允治, 等. 乳腺癌前病变大鼠模型的建立[J]. 中国现代普通外科进展, 2009, 12(5): 387-390.

[16] 赵玉斌, 张少华, 张积仁, 等. ER、PR 和 EphA2 在乳腺癌中的表达及临床意义[J]. 实用肿瘤杂志, 2010, 24(1): 41-44.

[17] 邓卫芳, 裴晓华, 樊英怡. 乳腺癌前病变毒瘀互结模型研究[J]. 中医学报, 2012, 27(4): 433-437.

[18] Lakhani S R, Ellis I O, Schnitt S J, et al. WHO Classification of Tumours of the Breast. World Health Organization Classification of Tumours[M]. Lyon: IARC Press, 2012: 240.

[19] 卢艳, 陈宝元. 乳痛灵胶囊治疗乳腺增生病气滞痰凝血瘀证的临床研究[J]. 云南中医中药杂志, 2012, 33(5): 15-17.

[20] 彭博, 贺蓉, 韩靖雅, 等. 筋骨草总环烯醚萜对乳腺癌干细胞特性的干预作用及其机制分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(18): 94-99.

[21] 潘宇祥, 周黎明. 血管内皮生长因子与肿瘤转移的研究进展[J]. 四川生理科学杂志, 2013, 35(2): 83-84.

[22] 杨瑞宁, 张倩. 血管内皮生长因子及其受体的生物学特点[J]. 临床血液学杂志, 2014, 27(6): 538-540.

[23] LIANG Z, Brooks J, Willard M, et al. CXCR4/CXCL12 axis promotes VEGF-mediated tumor angiogenesis through Akt signaling pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 359(3): 716-722.

[24] SUN X J, Charbonneau C, WEI L, et al. CXCR4-targeted therapy inhibits VEGF expression and chondrosarcoma angiogenesis and metastasis [J]. Chem Therapeut, 2013, 12(7): 1163-1170.

[责任编辑 张丰丰]