

# 隐丹参酮对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 转移的影响及其分子机制

朱智杰<sup>1,2</sup>, 刘兆国<sup>1,2</sup>, 周梁<sup>1,2</sup>, 田超<sup>1,2</sup>, 陶丽<sup>1,2</sup>, 韦忠红<sup>1,2</sup>,  
陆茵<sup>1,2\*</sup>, 王爱云<sup>1,2</sup>, 陈文星<sup>1,2</sup>

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210046; 2. 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 南京 210046)

**[摘要]** **目的:**探究隐丹参酮对人乳腺癌细胞(MDA-MB-231)体内、外转移的影响及其作用机制。**方法:**体外采用溴脱氧尿苷(BrdU)掺入免疫荧光实验考察隐丹参酮(0.5~8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )作用24 h对MDA-MB-231细胞(密度 $5\times 10^5$ /孔)增殖的影响;应用划痕和Transwell实验观察隐丹参酮(0.5~8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )作用24 h对肿瘤细胞(密度 $1\times 10^5$ /孔)迁移的影响;采用Western blot的方法考察隐丹参酮(0.5~8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )作用24 h对上皮间质转化相关蛋白E-钙黏素和N-钙黏素表达的影响;利用荧光素酶报告基因系统观察隐丹参酮(0.5~8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )作用6 h对MDA-MB-231细胞(密度为 $1\times 10^5$ /孔)核因子- $\kappa\text{B}$ (NF- $\kappa\text{B}$ )转录活性的影响;体内再应用斑马鱼肿瘤转移模型研究隐丹参酮(0.125~2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )作用6天对人乳腺癌MDA-MB-231细胞转移数目及转移距离的作用来考察其对体内肿瘤转移的影响。**结果:**在体外,隐丹参酮在0.5~8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 可以剂量依赖性地抑制MDA-MB-231BrdU阳性细胞的比例,抑制划痕实验和Transwell实验中迁移细胞的数目,增加E-钙黏素的表达,同时降低N-钙黏素的表达,并抑制NF- $\kappa\text{B}$ 的相对启动子活性。在体内,隐丹参酮在0.125~2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 可以剂量依赖性地减少MDA-MB-231乳腺癌细胞远端转移的数目,降低转移的最远距离。**结论:**隐丹参酮在体内外均有显著的抗乳腺癌转移作用,在体外对肿瘤细胞增殖还有一定作用,其机制可能是通过抑制NF- $\kappa\text{B}$ 转录活性从而逆转MDA-MB-231细胞的上皮间质转化起作用的。

**[关键词]** 隐丹参酮; 乳腺癌; 肿瘤转移; 上皮间质转化; 核因子- $\kappa\text{B}$

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)11-0160-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014110160

## Anti-metastatic Effect of Cryptotanshinone on MDA-MB-231 Breast Cancer and Its Underlying Mechanism

ZHU Zhi-jie<sup>1,2</sup>, LIU Zhao-guo<sup>1,2</sup>, ZHOU Liang<sup>1,2</sup>, TIAN Chao<sup>1,2</sup>, TAO Li<sup>1,2</sup>,  
WEI Zhong-hong<sup>1,2</sup>, LU Yin<sup>1,2\*</sup>, WANG Ai-yun<sup>1,2</sup>, CHEN Wen-xing<sup>1,2</sup>

(1. School of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanjing University of TCM, Nanjing 210046, China;

2. Jiangsu Key Laboratory for Pharmacology and Security Evaluation of Chinese Materia Medica, Nanjing 210046, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the anti-metastatic effect of cryptotanshinone on human breast cancer and its possible mechanisms. **Method:** The ability of cryptotanshinone on proliferation was detected after labeling with bromodeoxyuridine (BrdU) by immunofluorescence staining. We further used wound healing assay and Transwell migration assay to investigate the effect of cryptotanshinone on cell mobility *in vitro*. Western blot was used to measure the protein expression related to epithelial mesenchymal transition (EMT). Effect of

**[收稿日期]** 20140226(011)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目资助(81173174);教育部博士点基金(20113237110008)

**[第一作者]** 朱智杰, 硕士生, E-mail: alexchu1210@163.com

**[通讯作者]** \* 陆茵, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药干预肿瘤转移分子机制研究, Tel: 025-86798154, E-mail: luyingreen@126.com

cryptotanshinone on nuclear factor (NF)  $\kappa$ B transcriptional activity was detected by Dual-Luciferase gene reporter assay system. Furthermore, we used transgenic zebrafish tumor model to illustrate the anti-metastatic effect of cryptotanshinone *in vivo*. **Result:** Cryptotanshinone showed a great inhibitory ability on cell proliferation and migration *in vitro*. Cryptotanshinone also dose-dependently increased the expression of E-cadherin but decreased the expression of N-cadherin. The transcriptional activity of NF- $\kappa$ B was prohibited by cryptotanshinone as well. Moreover, cryptotanshinone inhibited MDA-MB-231 tumor metastasis in a dose dependent manner in zebrafish embryos by decreasing the number of disseminated foci from tumor mass as well as maximal distance of metastasis. **Conclusion:** Cryptotanshinone showed both anti-metastatic effect *in vivo* and *in vitro*. The proliferation of MDA-MB-231 was also inhibited by cryptotanshinone. The underlying anti-metastatic mechanism of cryptotanshinone on MDA-MB-231 breast cancer cells involved reversion of EMT via downregulating transcriptional activity of NF- $\kappa$ B.

**[Key words]** cryptotanshinone; breast cancer; tumor metastasis; epithelial mesenchymal transition; nuclear factor- $\kappa$ B

丹参在中医治疗肿瘤的使用频率极高,但能否应用于肿瘤转移的防治还存在争议<sup>[1]</sup>。丹参与肿瘤转移之间到底存在什么样的关系?是抑制还是促进?这也一直是困惑中医药肿瘤研究者的难题。

本课题组多年来致力于活血化瘀中药丹参抗肿瘤转移的研究,前期探索发现水溶性成分丹参素对肿瘤血管生成和肿瘤细胞侵袭具有抑制作用<sup>[2]</sup>。除此之外,丹参脂溶性成分隐丹参酮(cryptotanshinone, CT)在体外也具有抗肿瘤生长的作用<sup>[3-4]</sup>,但其对于肿瘤转移的作用还需要进一步的探究。本论文选用高转移性人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞,体外观察隐丹参酮对乳腺癌细胞增殖、迁移能力的作用,探讨其作用机制,再利用斑马鱼肿瘤转移模型考察其对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞在体内转移的影响。本研究针对隐丹参酮对肿瘤转移的影响进行探究,为丹参脂溶性成分发挥抗肿瘤转移作用提供有力证据,也为中医临床肿瘤转移防治时丹参的应用提供重要参考。

## 1 材料

**1.1 试剂** 隐丹参酮(纯度为 98%,西安和霖生物工程公司,批号 YDST110905),DMEM 培养基(美国 Gibco 公司,批号 984716),胎牛血清(美国 Hyclone 公司,批号 AVC67186);色素抑制剂 1-苯基-2-硫脲(PTU,美国 Sigma 公司,批号 129K3079),1,1'-双酯-3,3',3'-高氯酸盐染料(DiI 染料,美国 Invitrogen 公司,批号 1004158),溴脱氧尿核苷(BrdU,美国 Sigma 公司,批号 B5002),lipofectamine-2000(美国 Invitrogen 公司,批号 1398929),双荧光素酶报告基因系统试剂盒(美国 Promega 公司,批号 0000026815),各种抗体如下:抗 BrdU(Millipore, # 05-633),E-钙黏素(E-cadherin, Cell Signaling, 货号

3195P),N-钙黏 N-cadherin, Cell Signaling, 货号 4061P),甘油醛磷酸脱氢酶(GAPDH, Bioworld, 货号 AP0063)。

**1.2 动物** 斑马鱼来自南京大学模式动物研究所斑马鱼实验室,品系为 Tg (flk-1; GFP),根据 Westerfield 的方法进行饲养<sup>[5]</sup>。

**1.3 仪器** HF90 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(上海 Li Shen 公司),DFC450 C 型倒置显微镜(德国 Leica 公司),YB-DX30/0.09 型电动吸引器(天津市医疗器械二厂),Centrifuge 5415R 型冰冻离心机(德国 Eppendorf 公司),KUBOTA 3300 型低速离心机(美国 Thermo 公司),MATRIX Cell Mate II 型精密移液器(美国 Thermo 公司),spx-150 型隔水培养箱(宁波海曙赛福实验仪器厂),MVX10 型荧光体式解剖显微镜(日本 Olympus 公司),IM-31 型显微注射仪(日本 Narishige),FV10-MCPSU 型激光共聚焦显微镜(日本 Olympus),MiniPROTEAN 3 型电泳装置(美国 Bio-Rad)。

**1.4 细胞系** 人乳腺癌细胞(MDA-MB-231),从 ATCC 细胞库获得。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** MDA-MB-231 人乳腺癌细胞培养于含 10% 胎牛血清以及 100 g·L<sup>-1</sup>链霉素和 100 U·L<sup>-1</sup>青霉素的 DMEM 培养基中,37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中进行常规培养。

**2.2 检测掺入 BrdU 的 MDA-MB-231 细胞比例**<sup>[3]</sup>

将 MDA-MB-231 细胞种入使用 100 μg·L<sup>-1</sup>多聚赖氨酸包被过的盖玻片于 6 孔板中进行细胞爬片,待到细胞长到 70% ~ 80% 时分别给予不同浓度的隐丹参酮或等体积的 DMSO,使终浓度为 0,0.5,2,8 μmol·L<sup>-1</sup>。培养 24 h 后将 BrdU 加入细胞培养基

中,终质量浓度是  $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,继续培养 30 min 后,进行抗 BrdU 免疫荧光染色,在激光共聚焦显微镜下随机拍摄上下左右中共 5 个视野。结果以 BrdU + 细胞百分比衡量。BrdU 阳性细胞比 = BrdU 阳性细胞数/总细胞数  $\times 100\%$ ,对照组定义为  $100\%$ ,取这 5 个视野中的平均值统计分析。

### 2.3 检测 MDA-MB-231 细胞迁移的数目(划痕法)

将 MDA-MB-231 细胞种入 6 孔板中,培养至 90% 融合时经无血清的 DMEM 饥饿 24 h 后进行划痕。更换新鲜无血清培养基并予以不同浓度的隐丹参酮或等体积的 DMSO,使终浓度为  $0, 0.5, 2, 8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,并拍照(0 h)。继续培养 24 h 后,用 4% 多聚甲醛固定并用考马斯亮蓝进行染色后置于倒置显微镜下随机选取上下左右中 5 个视野进行拍摄进行拍照(24 h),取这 5 个视野中超过划线细胞数目进行统计分析。

### 2.4 检测 MDA-MB-231 细胞迁移的数目(Transwell 小室法)

将细胞 Transwell 小室放入 24 孔板中,取生长 80% ~ 90% 汇合并且进行过无血清饥饿处理 24 h 的 MDA-MB-231 细胞以  $1 \times 10^5$  个细胞/孔的密度,  $100 \mu\text{L}$ /孔的体积接种于上室,下室中加入  $600 \mu\text{L}$ /孔并含 20% 胎牛血清的培养基,并于上室后加入终浓度为  $0, 0.5, 2, 8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的隐丹参酮或等体积 DMSO 溶剂对照,继续培养 24 h 后,用棉签小心拭去上室膜上细胞,下室膜上细胞用 0.1% 结晶紫染液染色,倒置显微镜下拍照观察细胞跨膜迁移程度,随机拍摄上下左右中共 5 个视野,取这 5 个视野中穿过膜的细胞数目进行统计分析。

### 2.5 分析 MDA-MB-231 细胞中 E-钙黏素和 N-钙黏素

MDA-MB-231 细胞经终浓度为  $0, 0.5, 2, 8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的隐丹参酮或等体积 DMSO 处理 24 h 后提取蛋白,进行免疫印迹分析<sup>[6]</sup>。

### 2.6 报告基因分析<sup>[7]</sup> MDA-MB-231 细胞中 NF- $\kappa$ B

的相对启动子活性 MDA-MB-231 细胞于转染前 1 d 将细胞使用不含双抗的培养基接种到 24 孔板中培养,细胞生长面积达 70% 左右。按照 Lipofectamine-2000 的转染说明将  $100 \text{ ng}$  的 pNF $\kappa$ B-TA-luc 和  $4 \text{ ng}$  的 Renilla 进行瞬时转染,6 h 后更换新鲜的培养基继续培养 24 h。给予终浓度为  $0, 0.5, 2, 8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的隐丹参酮或等体积 DMSO 溶剂对照 6 h 后,每孔加入  $100 \mu\text{L}$  的被动裂解液后,取  $20 \mu\text{L}$  细胞裂解产物检测荧光素酶活性。所有转染均用 Renilla 荧光素酶作为转染效率对照,结果以 pNF- $\kappa$ B-TA-luc 与 Renilla 的报告基因活性的比值进

行统计分析。

### 2.7 斑马鱼肿瘤转移模型<sup>[8]</sup>

将生长对数期的 MDA-MB-231 使用  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 DiI 进行染色,次日收集细胞,调整细胞密度到  $2 \times 10^7$  个/mL,显微注射  $150 \sim 200$  个细胞到受精后 48 h 的斑马鱼胚胎的卵黄囊周围。在荧光显微镜下对胚胎进行挑选,保证肿瘤细胞只定位在卵黄囊周围。将斑马鱼胚胎随机分组后移到含有 PTU 的养鱼水中,分别予以不同浓度的隐丹参酮或等体积的 DMSO,使终浓度为  $0, 0.125, 0.5, 2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  于  $28.5 \text{ }^\circ\text{C}$  继续培养 6 d ( $n = 10$ )。荧光显微镜下进行观察和拍照,488 nm 激发扫描全身血管(绿色,GF),543 nm 激发 DiI 染料标记的 MDA-MB-231 细胞(红色,RF)。

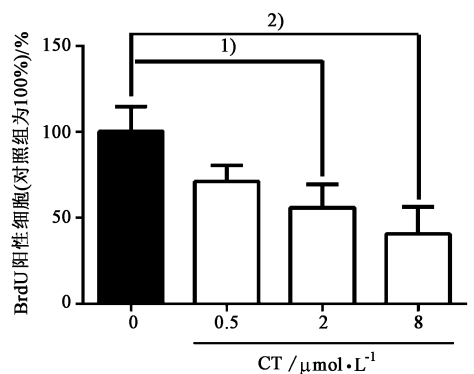
### 2.8 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件包对所得进行统计学处理,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,各组间的比较采用单因素方差分析,样本均数间的比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$  具有统计学意义; $P < 0.01$  具有显著性差异。

## 3 结果

### 3.1 隐丹参酮对 MDA-MB-231 肿瘤细胞增殖的影响

对各组中 BrdU 阳性的细胞和 DAPI 阳性的总细胞计数。如图 1 所示,与对照组比较,隐丹参酮给药组 BrdU 阳性的数目比例显著的减少, $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  处理组与对照组相比其差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), $8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  处理组与对照组相比差异具有显著性 ( $P < 0.01$ ),表明隐丹参酮在体外可以剂量依赖性地抑制 MDA-MB-231 肿瘤细胞的增殖。



与对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  (图 2, 4 ~ 5 同)

图 1 隐丹参酮对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

### 3.2 隐丹参酮对 MDA-MB-231 肿瘤细胞迁移的影响

划痕实验中,肿瘤细胞向中央发生迁移运动,给予隐丹参酮后可以显著抑制肿瘤细胞的迁移运动(图 2A-B),从  $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  开始处理组与对照组相比具有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。与划痕实验的结

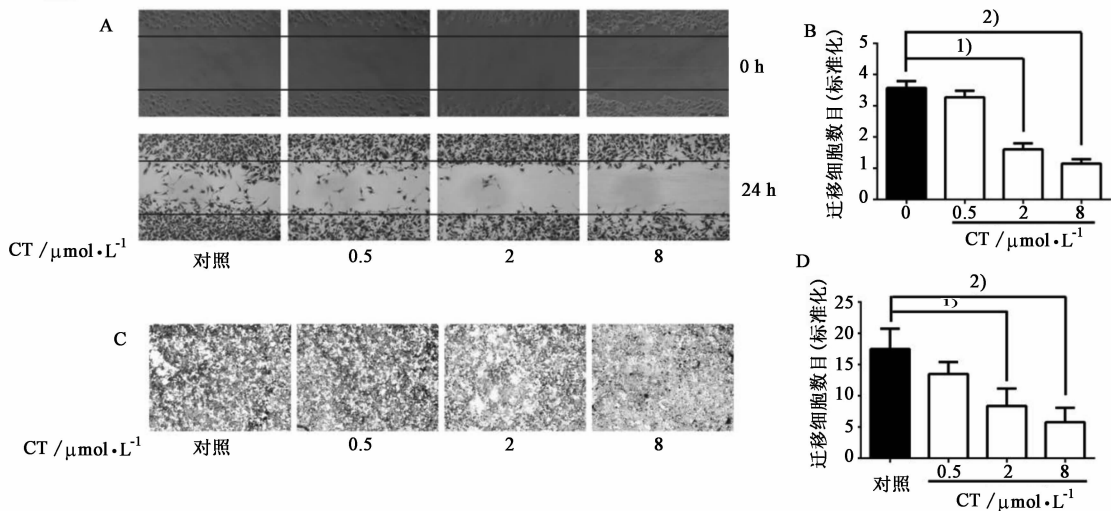


图2 隐丹参酮对 MDA-MB-231 细胞迁移的影响

果一致,隐丹参酮也可以在 Transwell 实验中显著抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移(图 2C-D), $2\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  处理组与对照组相比其差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ), $8\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  处理组与对照组相比差异具有显著性( $P < 0.01$ )。表明隐丹参酮在体外可显著抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移。

**3.3 隐丹参酮对 MDA-MB-231 肿瘤细胞的上皮间质转化相关蛋白的表达的影响** 隐丹参酮可以上调上皮型的蛋白 E-钙黏素蛋白的表达,同时下调间质型蛋白 N-钙黏素的表达(图 3),其中 $2, 8\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  作用效果非常明显,提示隐丹参酮可抑制 MDA-MB-231 肿瘤细胞的上皮间质转化。

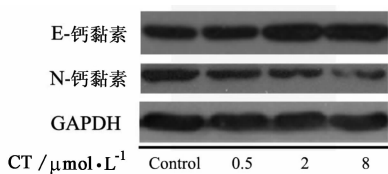
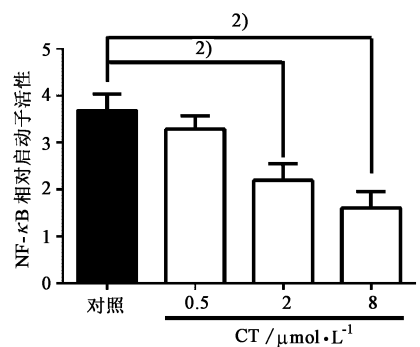


图3 隐丹参酮对 MDA-MB-231 细胞上皮间质转化相关蛋白表达的影响

**3.4 隐丹参酮对 NF- $\kappa$ B 在 MDA-MB-231 肿瘤细胞中转录活性的影响** 隐丹参酮剂量依赖性地抑制 NF- $\kappa$ B 的相对启动子活性,从 $2\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  开始表现出很好的效应,处理组的报告基因活性与对照组相比具有显著性差异( $P < 0.01$ ),说明隐丹参酮对 NF- $\kappa$ B 的转录活性具有抑制作用(图 4)。

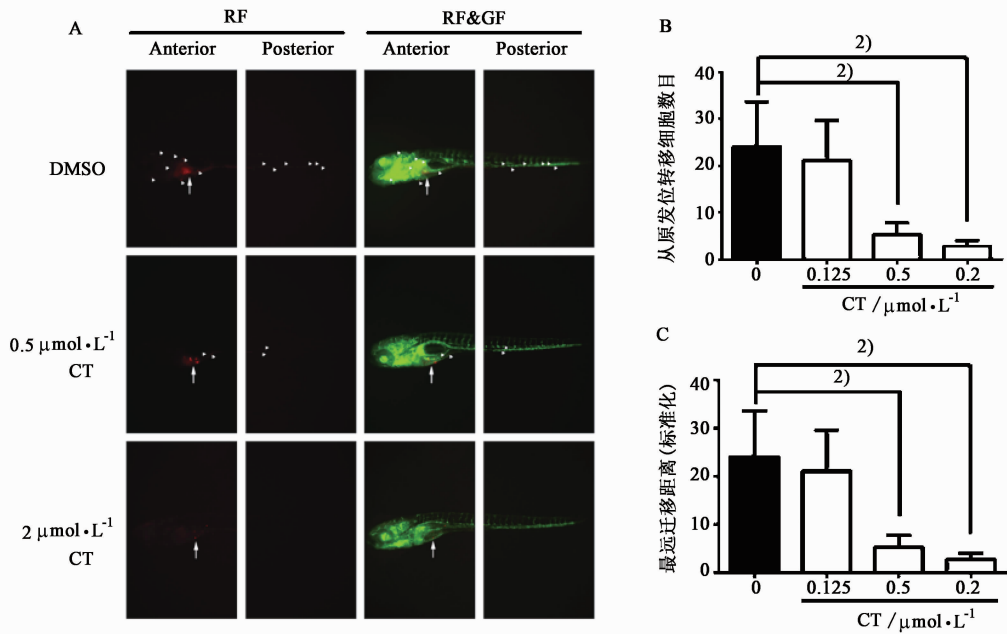
**3.5 隐丹参酮对 MDA-MB-231 肿瘤细胞在斑马鱼中转移的影响** 给予不同剂量的隐丹参酮治疗 6 d 后,对照组的中大量肿瘤细胞散布到头部(anterior)和尾部(posterior),在给予 $0.125\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的隐丹

图4 隐丹参酮对 MDA-MB-231 细胞 NF- $\kappa$ B 转录活性的影响

参酮后,对肿瘤细胞的最远迁移距离没有明显作用;虽然可以减少转移的肿瘤细胞数目,但这种减少并没有统计学差异(图 5A)。在 $0.5, 2\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  作用下不仅可以显著性减少转移的肿瘤细胞数目,还能缩短肿瘤细胞的最远迁移距离(图 5B-C),处理组与对照组相比差异具有显著性( $P < 0.01$ )。由此,隐丹参酮可以显著抑制 MDA-MB-231 肿瘤细胞斑马鱼体内的转移。

#### 4 讨论

本研究将目光定位于丹参中的脂溶性成分隐丹参酮,利用新型的斑马鱼肿瘤转移模型验证隐丹参酮体内肿瘤转移的效应,该模型实时、可视、动态地观察药物对肿瘤转移的作用,并具有给药周期短、给药方便且药物用量少等诸多优势。结合经典的体外细胞实验发现隐丹参酮在体内外都具有一定的抗肿瘤转移作用。进一步研究发现隐丹参酮可以通过抑制 NF- $\kappa$ B 转录活性从而逆转 MDA-MB-231 细胞的上皮间质转化发挥抗肿瘤转移的作用。



RF 代表肿瘤细胞(红色),GF 代表血管(绿色),白色长箭头指示原发肿瘤,三角箭头指示转移细胞

图 5 隐丹参酮对人乳腺癌 MDA-MB-231 肿瘤转移的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

肿瘤转移的原因众多,肿瘤细胞发生上皮间质转化可以使肿瘤细胞失去极性,与周围细胞和基质的接触减少,运动和迁移能力增强,是肿瘤细胞发生远端转移的重要原因<sup>[9-10]</sup>。NF- $\kappa$ B 作为一个重要转录因子,在激活肿瘤上皮间质转化和肿瘤转移过程中都十分重要<sup>[11-12]</sup>。此外,间质化表型的肿瘤细胞除了具有很强的侵袭转移能力外还会导致肿瘤患者对治疗产生抵抗,对化疗药物失去敏感产生耐受,最终导致肿瘤的复发与转移<sup>[13-14]</sup>。隐丹参酮有抑制肿瘤细胞上皮间质转化作用提示我们隐丹参酮可能改善化疗药物耐受,或与化疗药物联合应用可达到增效减毒的效果,值得进一步的深入探索。本研究为丹参用于防治肿瘤转移展示了有力的证据,并且提供新的研究方法和研究模式。

#### [参考文献]

[ 1 ] Chen Xiuping, Jiajie Guo, Jiaolin Bao, et al. The anticancer properties of salvia miltiorrhiza bunge (Danshen): a systematic review [ J ]. Med Res Rev, 2013, dio:10. 1002/Med. 21304.

[ 2 ] Zhang Li-juan, Lei Chen, Yin Lu, et al. Danshensu has anti-tumor activity in B16F10 melanoma by inhibiting angiogenesis and tumor cell invasion [ J ]. Eur J Pharmacol, 2010, 643(2): 195.

[ 3 ] Chen Lei, Shi-zhong Zheng, Zhi-guang Sun, et al. Cryptotanshinone has diverse effects on cell cycle events in melanoma cell lines with different metastatic capacity

[ J ]. Cancer Chemoth Pharm, 2011, 68(1): 17.

[ 4 ] Chen Wenxing, Yan Luo, Lei Liu, et al. Cryptotanshinone inhibits cancer cell proliferation by suppressing mammalian target of rapamycin-mediated cyclin D1 expression and Rb phosphorylation [ J ]. Cancer Prev Res, 2010, 3(8): 1015.

[ 5 ] Westerfield Monte. The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish ( Brachydanio rerio ) [ M ]. Eugene: University of Oregon Press Eugene, 1993.

[ 6 ] Zhao Yang, Zhang Daohai, Wang Sheng, et al. Holothurian glycosaminoglycan inhibits metastasis and thrombosis via targeting of nuclear factor- $\kappa$ B/tissue factor/ Factor Xa pathway in melanoma B16F10 cells [ J ]. PLoS ONE, 2013, 8(2): e56557.

[ 7 ] Yuan Dexiao, Yan Pan, Jianghong Zhang, et al. Role of nuclear factor- $\kappa$ B and P53 in radioadaptive response in Chang live cells [ J ]. Mutat Res Fund Mol, 2010, 688(1): 66.

[ 8 ] Rouhi Pegah, Lasse D Jensen, Ziquan Cao, et al. Hypoxia-induced metastasis model in embryonic zebrafish [ J ]. Nature Protocols, 2010, 5(12): 1911.

[ 9 ] Scheel C, E N Eaton, S H Li, et al. Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast [ J ]. Cell, 2011, 145(6): 926.

[ 10 ] 朱智杰,阮君山,李尧,等. Wnt 信号通路诱导肿瘤细胞上皮间质转化的研究进展 [ J ]. 中国药理学通报, 2012, 28(7): 904.

# 益气解毒活络方对早期糖尿病肾病大鼠的防治作用

杨芳<sup>1,3</sup>, 李敬林<sup>2\*</sup>, 依秋霞<sup>1</sup>, 生生<sup>1</sup>

(1. 辽宁中医药大学, 沈阳 110847; 2. 辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110032;  
3. 辽宁中医药大学附属第二医院, 沈阳 110034)

**[摘要]** **目的:**观察益气解毒活络方对早期糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)大鼠血流变和纤维蛋白原(Fib)及前列腺素E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)的影响。**方法:**采用高脂高糖饲料喂养合并腹腔注射小剂量链尿佐菌素(streptozocin, STZ)方法建立糖尿病(DM)大鼠模型。以西药盐酸贝那普利作阳性对照, 中药干预以益气解毒活络中药复方(12.78 g·kg<sup>-1</sup>)分别灌胃治疗8, 10周。实验结束后, 检测大鼠空腹血糖(FBG)、糖化血红蛋白(HbA1c)、血β<sub>2</sub>微球蛋白(β<sub>2</sub>-MG)及尿微量白蛋白(MALB); 光镜观察肾组织形态结构变化(HE染色); 血流变仪测定全血黏度(高切、中切、低切); 凝血4项分析仪测定血浆Fib; 酶联免疫吸附实验(Elisa法)检测血浆及肾组织PGE<sub>2</sub>的含量。**结果:**模型组大鼠FBG, HbA1c及血β<sub>2</sub>-MG、全血黏度、血浆Fib、尿MALB较正常组明显升高(P<0.05), PGE<sub>2</sub>含量升高(P<0.05); 与模型组比较, 各治疗组大鼠FBG, HbA1c及血β<sub>2</sub>-MG、全血黏度、血浆Fib、尿MALB显著降低(P<0.05), PGE<sub>2</sub>含量下降(P<0.05); 模型组大鼠出现明显的肾脏形态学异常, 各治疗组肾脏病变明显减轻。**结论:**DN的发病机制可能与血流变、Fib的异常及PGE<sub>2</sub>密切相关, 益气解毒活络中药复方防治DN的发生发展可能是通过调节血流变、血浆Fib及纠正PGE<sub>2</sub>的异常实现的。

**[关键词]** 益气解毒活络方; 糖尿病肾病; 血流变; 纤维蛋白原; 尿微量白蛋白; 前列腺素E<sub>2</sub>

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)11-0165-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014110165

## Protective and Therapy Effect of Compound Chinese Medicine Yiqi Jiedu Huoluo Fang in Rats with Diabetes Nephropathy

YANG Fang<sup>1,3</sup>, LI Jing-lin<sup>2\*</sup>, YI Qiu-xia<sup>1</sup>, SHENG Sheng<sup>1</sup>

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shenyang 110847, China;  
2. Affiliated Hospital of Liaoning University of TCM, Shenyang 110032, China;  
3. The Second Affiliated Hospital of Liaoning University of TCM, Shenyang 110034, China)

**[收稿日期]** 20130702(007)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81173153)

**[第一作者]** 杨芳, 主治医师, 博士, 从事糖尿病肾病的基础与临床及老年病研究, Tel: 13940564751, E-mail: yf--000000@163.com

**[通讯作者]** \*李敬林, 主任医师, 博士研究生导师, 硕士, 从事糖尿病及其合并症的实验与临床及老年病研究, Tel: 13066655461, E-mail: jinglinli666@sina.com

[11] Huber Margit A, Ninel Azoitei, Bernd Baumann, et al. NF-κB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression [J]. J Clin Invest, 2004, 114(4): 569.

[12] Park B K, H Zhang, Q Zeng, et al. NF-kappa B in breast cancer cell promotes osteolytic bone metastasis by inducing osteoclastogenesis via GM-CSF [J]. Nat Med, 2007, 13(1): 62.

[13] Singh Anurag, Jeffrey Settleman. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the

war on cancer [J]. Oncogene, 2010, 29(34): 4741.

[14] Byers Lauren Averett, Lixia Diao, Jing Wang, et al. An epithelial-mesenchymal transition gene signature predicts resistance to EGFR and PI3K inhibitors and identifies Axl as a therapeutic target for overcoming EGFR inhibitor resistance [J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(1): 279.

[责任编辑 聂淑琴]