

二至丸对诱发性乳腺癌组织中 VEGF 和 MMP-9 表达的影响

尚广彬¹, 曾莉萍², 赵益¹, 张启云¹, 董伟¹, 汤喜兰¹, 徐国良¹, 朱卫丰¹, 刘红宁^{1*}

(1. 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004;

2. 江西护理职业技术学院, 南昌 330029)

[摘要] **目的:** 研究滋阴方二至丸对二甲基苯蒽(DMBA)诱发性乳腺癌大鼠肿瘤组织中血管内皮生长因子(VEGF)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)表达的影响。**方法:** 60 只雌性 SD 大鼠随机分为空白对照组、DMBA 模型组、二至丸高、中、低(6.4, 3.2, 1.6 g·kg⁻¹)剂量组和三苯氧胺(TAM)组。除空白对照组外,每只大鼠均以致癌剂 DMBA 诱导(剂量 100 mg·kg⁻¹, 2 次, 间隔 1 周)乳腺癌。诱导第 2 天开始给予药物干预,每周触诊所有大鼠乳腺肿瘤发生情况并记录体重变化;15 周后处死动物,统计各组大鼠乳腺肿瘤的发病率,并采用 SP 免疫组化法检测各组动物肿瘤组织中 VEGF, MMP-9 的表达情况。**结果:** 与 DMBA 模型组比较,二至丸中剂量组和 TAM 组大鼠乳腺肿瘤平均潜伏期延长($P < 0.05$),平均肿瘤直径、平均肿瘤体积、平均瘤重显著降低($P < 0.05$);二至丸中、高剂量组 VEGF 和 MMP-9 强阳性率显著性降低($P < 0.05$),且 VEGF 与 MMP-9 的表达呈正相关。**结论:** 滋阴方药二至丸可能通过干预乳腺癌组织中 VEGF 和 MMP-9 的表达,抑制乳腺癌生长恶化。

[关键词] 乳腺癌; 二甲基苯蒽; 血管内皮生长因子; 基质金属蛋白酶-9

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0270-04

[doi] 10.11653/syfy2013130270

Effect of Erzhi Pills on Expressions of VEGF and MMP-9 in Induced Rat Breast Cancer

SHANG Guang-bin¹, ZENG Li-ping², ZHAO Yi¹, ZHANG Qi-yun¹, DONG Wei¹,
TANG Xi-lan¹, XU Guang-liang¹, ZHU Wei-feng¹, LIU Hong-ning^{1*}

(1. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ministry
of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China;

2. Jiangxi Care Vocational and Technical College, Nanchang 330029, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of Erzhi pills on expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in breast cancer induced by 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene (DMBA) in rats. **Method:** Sixty female SD rats were randomly divided into 6 groups: the blank control group, the DMBA model group, the high, middle, low dose (6.4, 3.2, 1.6 g·kg⁻¹, respectively) Erzhi Pills group and tamoxifen (TAM) group. All model rats were induced by DMBA (100 mg·kg⁻¹, twice, every two weeks), palpated weekly to monitor the progress of the tumor and body weight were also recorded weekly. At the end of trial, the incidence of breast tumors in each group was calculated. And the expressions of VEGF and MMP-9 in breast cancer tissues were detected using immunohistochemical SP method. **Result:** Comparing with the DMBA model group, the breast cancer incidence, number and volume of tumor in the middle dose of Erzhi pills

[收稿日期] 20120911(005)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2010CB530603);江西省教育厅基金(GJJ10549, GJJ10556);江西省卫生厅基金(2009Z01);江西中医学院博士启动基金(Y028)

[第一作者] 尚广彬, 博士, 讲师, 从事中药药理研究, Tel: 0791-87118793, E-mail: shanggb107@126.com

[通讯作者] *刘红宁, 博士, 教授, 从事中医理论基础研究, Tel: 0791-87119011, E-mail: lhongning@yahoo.com.cn

group and TAM group decreased significantly ($P < 0.05$). The strong-positive rates of VEGF and MMP-9 were significantly higher in the group treated with middle and high dose of Erzhi pills than DMBA model group ($P < 0.05$), and VEGF expression was positively correlated with MMP-9 expression in breast cancer. **Conclusion:** Erzhi pills might inhibit the progress and deterioration of breast cancer through regulating the expressions of VEGF and MMP-9.

[**Key words**] breast cancer; DMBA; VEGF; MMP-9

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和致死率已位居全球女性恶性肿瘤之首。目前,西医治疗乳腺癌以手术切除为主,同时结合放疗、化疗、内分泌疗法等。而中医药近年来在乳腺癌防治方面取得了长足的进步,已得到广泛的认可。恶性肿瘤的发生发展是组织细胞分裂与增生过亢、细胞凋亡减弱、增殖和凋亡失去平衡,最终导致肿瘤细胞和恶性组织的形成。根据中医阴阳学说理论,应归咎于阴不足。因此,应用滋阴方药滋阴敛阳,以期达到“阴平阳秘”的平衡状态来抑制肿瘤的发生发展。本文通过观察滋阴方二至丸对诱发性乳腺癌大鼠模型的抑瘤作用以及对乳腺癌组织中血管内皮生长因子(VEGF)和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)表达的影响,探讨滋阴疗法对乳腺癌防治作用及其机制。

1 材料

1.1 动物 SPF级4周龄健康雌性SD大鼠130只,体重(130 ± 10)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号SCXK(京)2006-0009。

1.2 试剂 二甲基苯蒽(DMBA, Sigma公司,批号D3254), MMP-9一抗(批号sc-6480)、VEGF一抗(批号sc-7269)、SP-9000免疫组化试剂盒(PV9003山羊超敏二步法免疫组化试剂盒),均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 药材 二至丸:墨旱莲(同仁堂,产地苏州,批号905090308);酒女贞子(同仁堂,产地浙江,批号905090221)。女贞子粉碎成细粉;与等量墨旱莲加6倍水浸泡1h,煎煮2次,每次2h,趁热滤过合并煎液,减压浓缩至含生药量 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 放置备用。枸橼酸他莫昔芬片(三苯氧胺, TAM), 扬子江药业集团有限公司,批号10022101。

1.4 仪器 PH140A型培养箱(上海一恒科学仪器有限公司), YT-6C型生物组织摊烤片机(湖北省孝感市亚光医用电子技术有限公司), RM2235型轮转式切片机(德国徕卡公司)。

2 方法

2.1 动物分组及诱发性乳腺癌模型的建立 大鼠

适应性喂养1周,按体重随机将60只大鼠分为空白对照组、DMBA模型组、二至丸高、中、低剂量组和三苯氧胺组,每组10只。除空白对照组外,每只大鼠给予2次DMBA作乳腺癌造模(DMBA经超声震荡溶于芝麻油,每次以 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ig, 间隔1周),空白对照组给予等量生理盐水。造模次日开始ig给药,二至丸高、中、低剂量组($6.4, 3.2, 1.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, (按2010年版《中国药典》用量根据体表面积法折算成大鼠用量的8, 4, 2倍)和三苯氧胺组($1.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 等效剂量), 对照组和模型组ig等量的生理盐水。连续15周。

2.2 肿瘤指标检测 自DMBA诱导后,每周2次触诊检查各大鼠乳腺肿瘤的出现情况,记录肿瘤出现时间,并以第2次诱导到各大鼠出现第1个体表可触及恶性肿瘤(经组织学证实)的时间为该大鼠诱发乳腺肿瘤的潜伏期。15周后处死动物,完整剥离肿瘤,测量并计算平均肿瘤数、肿瘤体积、平均潜伏期。

2.3 免疫组化样品制备及染色 化学诱导后15周,处死动物后迅速剥离肿瘤并将其切成 $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm} \times 0.3 \text{ cm}$ 小块,立即放入4%的多聚甲醛中固定24h;常规制成厚度 $4 \mu\text{m}$ 石蜡切片,切片常规脱蜡,高压煮沸抗原修复,3%过氧化氢 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育10min,以消除内源性过氧化物酶活性,PBS冲洗3次,每次3min。按照北京中杉金桥生物技术有限公司VEGF和MMP-9免疫组化试剂盒说明书操作,最后二甲苯透明,封片和镜检。

2.4 结果判断标准 VEGF和MMP-9均为以细胞膜或细胞浆内出现棕色、棕黄色染色颗粒为阳性细胞信号。显微镜下每个切片随机取5个视野($\times 400$),计算200个肿瘤细胞免疫反应阳性的细胞百分比,根据半定量免疫组织化学方法,对VEGF及MMP-9反应细胞显色强度及范围进行评价:无阳性细胞染色为阴性(-);阳性细胞 $< 25\%$ 或显色浅为弱阳性(+);阳性细胞在 $26\% \sim 50\%$ 或染色略深为中度阳性(++) ;阳性细胞 $> 50\%$ 或显色深为强阳性(+++)。计算阳性率及强阳性率。

2.5 统计方法 采用 SPSS 16.0 软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,组间肿瘤发生率采用 Fisher 确切概率检验;分析两指标的相关性采用 Spearman 等级相关检验, $P < 0.05$ 为有统计意义。

3 结果

3.1 对 DMBA 诱发大鼠肿瘤发生的影响 经 DMBA 诱导的各组大鼠体重与空白对照组比较均出现增长缓慢,但无统计学意义。其中二至丸高剂量组有 1 只大鼠在 DMBA 诱导后 8 d 后死亡,经解剖

未见肿块,肺部感染、肝脏坏死,可能与 DMBA 毒性和灌胃所致气管损伤有关,未计入统计数据。

从第 2 次 DMBA 诱导后第 45 天开始,经 DMBA 诱导的各组大鼠陆续出现肿瘤,15 周实验结束时与模型组比较,二至丸中剂量组大鼠乳腺肿瘤平均潜伏期延长 ($P < 0.05$);二至丸中剂量及三苯氧胺组平均肿瘤直径、平均肿瘤体积、平均瘤重均比模型组显著降低 ($P < 0.01$),说明二至丸能抑制 DMBA 诱发乳腺癌的发生发展,见表 1。

表 1 二至丸对 DMBA 诱发大鼠乳腺癌情况的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	出瘤动物数/只	诱发率/%	潜伏期/d	瘤体积/ mm^3	瘤重/g
对照	-	-	-	-	-	-
模型	-	7	70.0	57.3 ± 6.6	$4\,992.52 \pm 1\,484.21$	5.62 ± 3.91
二至丸	1.6	6	60.0	64.8 ± 13.8	$3\,384.73 \pm 3\,003.44$	4.72 ± 3.89
	3.2	7	70.0	$66.0 \pm 7.6^{1)}$	$1\,068.11 \pm 776.57^{2)}$	$1.47 \pm 0.91^{2)}$
	6.4	7	77.8	59.1 ± 12.0	$3\,173.98 \pm 2\,598.72$	4.21 ± 2.70
三苯氧胺	1.9×10^{-3}	3	$30.0^{1)}$	$67.7 \pm 2.9^{1)}$	$1\,588.74 \pm 769.21^{2)}$	$1.33 \pm 0.77^{2)}$

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

3.2 对诱发性乳腺癌组织中 VEGF 和 MMP-9 表达的影响 与 DMBA 模型组比较,二至丸中、高剂量组和三苯氧胺组乳腺癌组织中 VEGF 和 MMP-9 强阳性率均显著降低 ($P < 0.01, P < 0.05$),而 VEGF 和 MMP-9 的总阳性率虽有降低,但与模型组比较差异都无统计学意义。说明二至丸对 VEGF 和 MMP-9 的高表达均无明显抑制作用。见表 2,图 1,2。

表 2 二至丸对 VEGF 和 MMP-9 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$) %

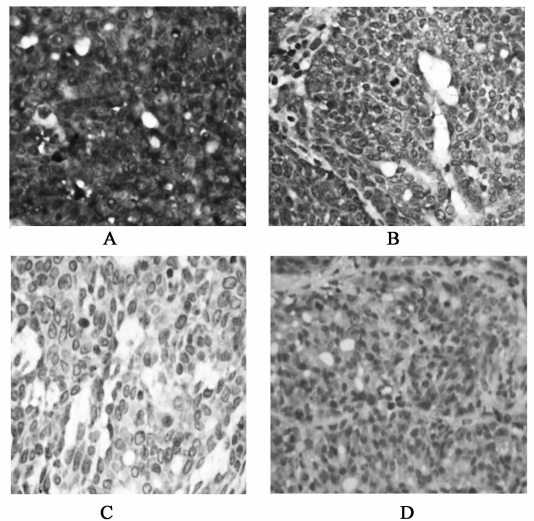
组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	VEGF		MMP-9	
		强阳性	总阳性	强阳性	总阳性
对照	-	-	-	-	-
模型	-	71.4	100.0	57.1	100.0
二至丸	1.6	33.3	100.0	33.3	100.0
	3.2	$0.0^{2)}$	71.4	$0.0^{1)}$	71.4
	6.4	$14.3^{1)}$	85.7	$0.0^{1)}$	85.7
三苯氧胺	1.9×10^{-3}	$0.0^{1)}$	100.0	$0.0^{1)}$	66.7

采用 Spearman 等级相关分析法分析 VEGF 与 MMP-9 表达的相关性,结果显示 VEGF 与 MMP-9 的表达呈正相关 ($r = 0.879, P < 0.01$),有统计学意义。

4 讨论

化学致癌剂 DMBA 诱发大鼠乳腺癌的性质和人体乳腺癌病变过程类似,对于研究癌变过程、采取措施预防、治疗乳腺癌等具有重要意义^[1]。二至丸为平补肝肾之经典方,现代研究发现它在肿瘤防治

方面也起重要作用^[2]。本研究利用此模型研究二至丸防治乳腺癌的作用,通过对大鼠乳腺肿瘤诱发率、潜伏期以及肿瘤大小、质量等的方面评价药物抑制乳腺癌发生发展的效果。结果显示虽然二至丸对乳腺癌诱发率没有影响,但中剂量明显延长乳腺癌诱发潜伏期,显著减小了肿瘤体积和质量,抑制了乳腺癌的生长恶化,和付雪松等疏肝方抑制乳腺癌细胞增殖的观点一致^[3]。这与郑里翔等用滋阴名方六味地



A. 模型组; B. 二至丸 $1.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;
C. 二至丸 $3.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; D. 二至丸 $6.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组(图 2 同)

图 1 二至丸对大鼠乳腺瘤组织 VEGF 表达的影响
(免疫组化 SP 法, $\times 400$)

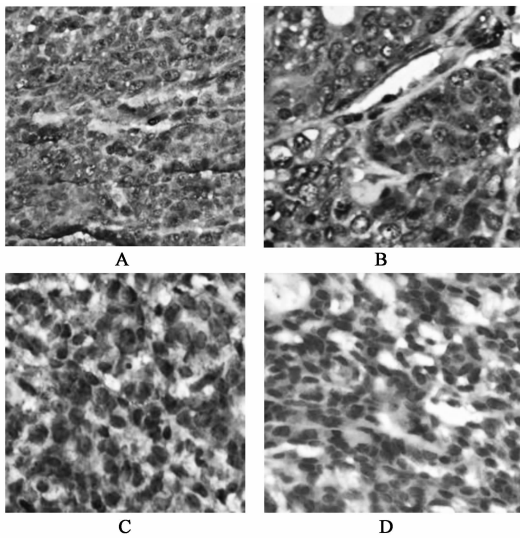


图2 二至丸对大鼠乳腺癌组织 MMP-9 表达的影响
(免疫组化 SP 法, ×400)

黄丸抑制自发性乳腺癌生长的结果相互印证^[4-5]。

VEGF 是 1 个具有高度保守性、由 2 个相同亚基以二硫键交联结合成的二聚体糖蛋白,是目前所知最强的直接作用于血管内皮细胞的生长因子,它参与了肿瘤组织内血管的新生过程,而这些血管为肿瘤的生长提供了充足的营养,对肿瘤的发生、生长、转移有着密切的关系^[6]。同时,肿瘤组织中 VEGF 表达水平与肿瘤恶性程度呈正相关^[7],有临床研究表明 VEGF 阳性者预后不良,可作为判断乳腺癌预后的 1 个指标^[8]。本研究中二至丸可以降低乳腺癌组织中 VEGF 的表达,可以通过抑制肿瘤新血管生成,切断肿瘤的内部血液供应,达到抑制肿瘤细胞的生长和增殖。

基质金属蛋白酶家族(MMPs)主要是由结缔组织细胞、肿瘤细胞等合成分泌的一组蛋白酶,其中 MMP-9 与肿瘤血管生成关系密切。孙丽君^[9]研究 MMP-9 与卵巢上皮性癌血管生成的关系时发现, MMP-9 表达增强,其血管生成能力显著增强。廖鸿等^[10]研究发现 MMP-9 表达与骨肉瘤临床分期及肿瘤微血管生成密切相关。同时 MMP-9 能促进肿瘤细胞 VEGF 表达上调,并能促进 VEGF 更有效的作用于其受体,从而诱导血管的生成^[11]; VEGF 也可以改变内皮细胞基因表达方式,促进纤维蛋白酶及 MMPs 的合成^[12-13]。可见 VEGF 和 MMP-9 在肿瘤血管生长环节中相互作用,共同发挥着重要作用。本实验结果显示,二至丸中、高剂量组 VEGF 与 MMP-9 表达均显著降低($P < 0.05$),故二至丸可抑制肿瘤细胞分泌 VEGF 和 MMP-9,继而对肿瘤血管生成造成障碍,从而抑制乳腺癌生长恶化。结果还

表明 VEGF 与 MMP-9 的表达呈正相关,有统计学意义,说明 VEGF 和 MMP-9 在乳腺癌组织中具有高表达,二者在乳腺癌生长发展过程中可能存在某种时间或空间上的协同作用,但二者之间的相互作用机制仍不明确,有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 贾艳华,吴荻. 乳腺癌动物模型建立与应用的进展[J]. 中国肿瘤,2009,18(11):900.
- [2] 卢雯平,姜翠红. 古方治疗乳腺癌的用药规律[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(3):133.
- [3] 付雪松,李萍萍. 疏肝凉血方对 MCF-7 和 T47D 细胞增殖及硫酸酯酶活性和表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(14):144.
- [4] 郑里翔,林栋美,刘红宁,等. 滋阴经方经 TGF- β 途径抑制小鼠自发乳腺癌生长的机理[J]. 中成药,2011,33(10):1793.
- [5] 郑里翔,刘红宁,乔玉丹,等. 六味地黄丸对自发乳腺癌小鼠瘤块中血管内皮生长因子和周期蛋白 D3 基因表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(11):117.
- [6] 李文广,颜海,张燕妮,等. 乳腺癌组织 ezrin、nm-23 和 VEGF 的表达及临床意义[J]. 江苏医药,2010,36(4):387.
- [7] 窦骏. 肿瘤干细胞[M]. 南京:东南大学出版社,2009:136.
- [8] 刘小青,李玉,刘念龙,等. 乳腺癌患者血清 IGF-1 含量及癌组织 Ki67 和 VEGF 表达的意义[J]. 江苏医药,2010,36(24):2887.
- [9] 孙丽君. 基质金属蛋白酶-9 及基质金属蛋白酶组织抑制物-1 与卵巢上皮性癌血管生成的关系[J]. 中国妇幼保健,2009,24(5):646.
- [10] 廖鸿,奉孝荣,毛显法. 骨肉瘤环氧酶-2 和基质金属蛋白酶-9 表达与肿瘤微血管密度关系[J]. 西南国防医药,2009,19(4):377.
- [11] Choe G, Park J K, Jonben-Steele L, et al. Active matrix metalloproteinase-9 expression is associated with primary glioblastoma subtype [J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(9):2894.
- [12] 郭璐,李贵新,路中,等. 乳腺癌细胞中 E1AF、MMP-2、VEGF 的表达及意义[J]. 山东医药,2010,50(27):37.
- [13] 王瑞才,李湘洲,张云香,等. MMP-13、VEGF 在三阴性乳腺癌中的表达及其临床意义[J]. 中国现代医学杂志,2010,20(6):872.

[责任编辑 李玉洁]