

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

郑里翔*, 刘红宁, 乔玉丹, 刘霞, 林栋美
(江西中医学院, 南昌 330004)

[摘要] 目的:探讨六味地黄丸对小鼠自发乳腺癌的影响。方法:以清洁级昆明小鼠雌性种鼠自发乳腺癌为模型,用六味地黄丸治疗直至濒死期,瘤块病理分析用 HE 染色,血管内皮生长因子(VEGF)和周期蛋白 D3(cyclin D3)基因表达的产物用 RT-PCR 及 Western blotting 方法。结果:六味地黄丸组的瘤组织分化优于对照组,瘤重明显低于对照组($P < 0.05$),瘤块中 VEGF 和 cyclin D3 基因表达产物也明显低于对照组($P < 0.05$)。结论:六味地黄丸抑制乳腺癌的生长,促进细胞分化,可能的机制是抑制 VEGF 和 cyclin D3 基因表达。ds

[关键词] 六味地黄丸;自发乳腺癌;瘤重;血管内皮生长因子;周期蛋白 D3;基因表达

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)11-0117-03

Effect of Liuwei Dihuang Wan on Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Cyclin D3 Gene in Spontaneous Breast Carcinoma in Mice

ZHENG Li-xiang*, LIU Hong-ning, QIAO Yu-dan, LIU Xia, LIN Dong-mei
(Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Liuwei Dihuang Wan on spontaneous breast carcinoma in mice. **Method:** The spontaneous breast carcinoma derived in kunming mice (clean class) was used as animal model. The mice were given Liuwei Dihuang Wan to their agonal stage. The cancer mass pathology was analyzed by HE staining. The mRNA and protein expressions of vascular endothelial growth factor(VEGF) and cyclin D3 were assayed by RT-PCR and Western blotting. **Result:** In Liuwei Dihuang Wan group, the tumor weight and expression of VEGF and cyclin D3 gene were obviously lower than that in the control groups ($P < 0.05$). The cell differentiation was also better than that in the control group. **Conclusion:** Liuwei Dihuang Wan can restrain the growth of cancer and promote the cancer cell differentiation. The possible mechanism is related with the retrained expression of VEGF and cyclin D3 gene.

[Key words] Liuwei Dihuang Wan; spontaneous breast carcinoma; weight of tumor; vascular endothelial growth factor; cyclin D3; gene expression

最新的流行病学调查研究表明:乳腺癌成为中国女性健康第一“杀手”,已引起各方的极大关注。在现代医疗手段存在严重缺陷的情况下,中医药治

疗由于发挥了其辨证施治、调补结合、处方灵活等独特优势,已得到广泛认可,并作为乳腺癌综合治疗的一部分,可以贯穿乳腺癌治疗的全过程^[1]。

乳腺癌祖国医学称之为“乳岩”等,明《外科正宗·乳痛论》对本病的论述较为详细,提出情志所伤为主要病因。从病因病机上将本病分为情志不畅、肝脾两伤和冲任失调、气血凝滞两大类,认为本病的发生与肝、脾、冲、任关系最为密切。在辨证方面,中

[收稿日期] 20100323(004)

[基金项目] 江西省自然科学基金资助(2008GZY0007);江西省教育厅基金项目(GJJ10528)

[通讯作者] *郑里翔,在职博士,教授,研究方向:中药抗肿瘤, Tel:0791-7118921, E-mail:zlx000168@sina.com

医认为正气不足、气血亏虚是乳腺癌发生的内因和根本,气虚不能卫外致使邪客于乳络而患本症。情志内伤,忧思郁怒又是本病发生发展的重要因素。因此,乳腺癌患者大多出现肝肾阴虚等证型^[2-3]。

由于六味地黄丸是滋补肝肾的名方,符合中医治疗乳腺癌证型。本实验室以自发乳腺癌为模型,将六味地黄丸对乳腺癌的瘤重、抑瘤率、肿瘤小鼠的生存期为观察对象,并对影响肿瘤生长的部分基因的表达产物进行分析,为六味地黄丸防治乳腺癌提供实验依据。

1 材料与方

1.1 仪器、试剂与药物 PCR 扩增仪(美国)、核酸电泳仪、蛋白电泳仪、DPG-900 型凝胶图像分析系统、净化台、DYY-5 型电泳仪、病理切片机。Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司,PCR 引物由上海生工合成,兔抗 VEGF, Cyclin D3 单克隆抗体购于北京博奥森公司,辣根过氧化物酶标山羊抗兔 IgG 单克隆抗体购于北京中杉金桥公司,其他化学试剂都是国产分析纯试剂。六味地黄丸购自北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂(批号 211021283)。

1.2 动物与分组 清洁级昆明小鼠 340 只,雌性种鼠,鼠龄约 11.5 月,平均体重 22g,由江西中医学院实验动物中心提供(合格证号 ZDW-NO. 2007-170),在开放条件下饲养,每 3 d 触诊乳腺部位 1 次,发现肿块,随机分成六味地黄丸组(4.6, 2.3 g · kg⁻¹ · d⁻¹ 2 个剂量组,六味地黄丸配制的浓度为 0.24 g · mL⁻¹)及对照组,六味地黄丸组 ig 给药,对照组 ig 生理盐水,直至肿瘤小鼠濒死期(对照组给生理盐水平均时间为 59 d;低剂量组给药时间为 83 d;高剂量组给药时间为 80.7 d),处死,记录发瘤至濒死期时间,剥离瘤块,称重。

1.3 病理分析、乳腺癌的确定 肿瘤组织置 10% 的中性甲醛中固定 24 h,流水充分冲洗,经 70%, 80%, 90%, 95%, 100% 乙醇逐步脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片,HE 染色,×400 观察并拍照。

1.4 半定量的 RT-PCR 按照 TRIZOL 试剂说明书提取总 RNA,在 20 μL 反转录反应体积中进行反转录,合成 cDNA。取上述逆转录产物 PCR 扩增 VEGF, Cyclin D3。

VEGF: Forward primer: 5'-TTATTCATACTTCGG TTGC3-', Reverse Primer: 5'-ATGGGATTACACATTG GTCTC-3', 产物长度 547bp; CyclinD3: Forward

primer: 5'-GGAGATGGCTCTGTGCTACT-3', Reverse primer: 5'-CCTTAGGTTTGGCTTCTA-3', 产物长度 376 bp, 产物长度 148 bp。25 μL PCR 反应体系中进行 PCR 反应(BDNFmRNA: 95 °C 5 min, 94 °C 30 s, 53 °C 20 s, 72 °C 30 s, 30 个循环, 72 °C 终延伸 5 min; GAP-43mRNA: 95 °C 5 min, 94 °C 30 s, 55 °C 20 s, 72 °C 30 s, 30 个循环, 72 °C 终延伸 5 min)。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶溴化乙锭电泳分离,用凝胶图形分析系统进行拍照,观察结果并测定灰度值,以扩增的目的条带和同时扩增的 β-actin 的灰度值比对各基因转录水平进行衡量。

1.5 蛋白印迹 取 20 mg 海马组织剪碎后加入 0.5 mL 裂解液,放入匀浆器中充分混匀,然后加入 1 mL 抽提试剂充分混匀,室温静置 10 min, 10 000 × g 低温离心 10 min, 吸除上下层液体保留中间层蛋白膜,干燥后加入 1% SDS 溶解紫外光吸收法测定蛋白浓度。取 80 μg 总蛋白与等体积的 2 × 蛋白质上样缓冲液,混合后煮沸 5 min,然后置于冰上快速冷却, 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,分离胶 150 V 90 min,蛋白分离后转膜,100 mA 40 min,转移至硝酸纤维素膜上,5% 脱脂奶粉封闭液室温摇床封闭 2 h,加入 1: 500 兔抗 VEGF 单克隆抗体, 1: 500 兔抗 Cyclin D3 单克隆抗体,室温摇床孵育 2 h,洗膜 3 次, 10 min/次, 1: 2 500 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体孵育 1 h,洗膜, DAB 显色。凝胶成像仪测定灰度值,与 β-actin 的灰度比值衡量 VEGF, Cyclin D3 的蛋白质水平。

1.6 统计学处理 应用 SPSS15.0 统计软件,进行 LSD 检验,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 乳腺癌的鉴定及病理切片分析 经 HE 染色后,病理分析为典型的乳腺癌组织。经六味地黄丸治疗的肿瘤小鼠,肿瘤细胞的分化明显好于未给药组的肿瘤细胞(图 1)。

2.2 整个瘤体组织的观察 经六味地黄丸治疗后的肿瘤小鼠在濒死期处死后,剥离整个瘤块,发现:六味地黄丸治疗组瘤块边缘清晰,表面血管少,瘤体呈现白色,而对照组瘤块边缘不清晰,瘤块内外血管丰富,瘤体呈现肝紫色,说明六味地黄丸可抑制肿瘤组织中血管的生成。

2.3 六味地黄丸对肿瘤生长的影响 经六味地黄丸治疗后,瘤重明显下降($P < 0.01$),说明六味地黄

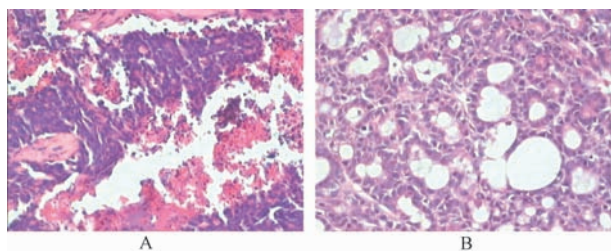


图 1 小鼠乳腺癌的病理切片(HE 染色 ×400)

A. 未给药小鼠肿瘤组织低分化,腺管结构消失,肿瘤细胞呈不规则的巢状排列,伴大量的坏死和部分玻璃样变;细胞核大深染,核多形性明显,层次增多,细胞异型性大(分化差);B. 给六味地黄丸组小鼠的肿瘤组织中等分化,可见大小不等、形状不同的腺管,腺管背靠背排列,管腔部分消失;细胞核浆比稍大,核多形性明显,细胞异型性较明显(分化较好)

表 1 六味地黄丸对自发乳腺癌小鼠瘤重及瘤体内 VEGF 及 CyclinsD3 基因表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	瘤重/g	mRNA 的表达量		蛋白表达量	
			VEGF	Cyclin D3	VEGF	Cyclin D3
对照	-	15.13 ± 6.63 (18)	1.07 ± 0.25 (14)	1.36 ± 0.20 (18)	1.42 ± 0.39 (18)	1.91 ± 0.26 (14)
六味地黄	2.3	8.86 ± 3.54 ²⁾ (18)	0.57 ± 0.33 ¹⁾ (14)	0.74 ± 0.11 ²⁾ (18)	0.78 ± 0.15 ¹⁾ (18)	0.67 ± 0.19 ²⁾ (14)
	4.6	8.83 ± 3.96 ²⁾ (17)	0.61 ± 0.15 ¹⁾ (15)	0.86 ± 0.11 ²⁾ (17)	0.78 ± 0.15 ¹⁾ (17)	0.53 ± 0.26 ²⁾ (14)

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;括号内数字为动物数。

床症状,提高患者的生存质量和延长患者的生存期^[2-3]。现代研究已经证实:熟地黄、山药、山茱萸酸能提高机体免疫机能、诱导干扰素产生、抗氧化,抑制肿瘤生长;牡丹皮有调节免疫细胞作用;茯苓具有抗炎的功能^[4],诸药合用达到抑制肿瘤生长的目的。

六味地黄丸能明显抑制肿瘤组织内的 VEGF 及 cycling D3 的基因表达 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),由于 VEGF 是最强烈的促新生血管形成因子,乳腺癌细胞通过分泌 VEGF,刺激血管的生成,以出芽的方式形成新生血管,新生血管数不仅与乳腺癌增殖的癌细胞的血供有关,还与乳腺癌的发生、发展紧密相关^[5-6]。而 cyclin D3 作为一种重要的细胞周期 G1/S 期正性调控分子,加快细胞周期进程,促进细胞增殖^[7-8]。故六味地黄丸通过抑制 VEGF, cycling D3 的基因表达,抑制肿瘤组织血管的生成,从而抑制了乳腺癌的生长。

因为动物自发性肿瘤从其发生发展来看与人类肿瘤更相似,因而更适用于研究人类肿瘤。该模型最大的特点是实验动物未经任何有意识的人工处理,生存到一定年龄便自然发生乳腺肿瘤,具有研究价值和前景。

丸能明显抑制肿瘤的生长(表 1)。

2.4 六味地黄丸对瘤体内 VEGF 和 CyclinD3 基因表达产物的影响 六味地黄丸能明显抑制瘤体内的 VEGF 和 Cyclins D3 基因的表达 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$) (表 1)。

3 讨论

当今乳腺癌的主要治疗方法包括手术、化疗、放疗、内分泌治疗、生物治疗及中医药治疗等综合治疗,乳腺癌手术创伤、化学药物的毒副作用、放疗的火毒伤害导致热耗过盛,伤阴耗气耗损真阴,所以容易出现肝肾阴虚等证型,而六味地黄丸正为该病症所设,临床实践已证实:它能改善乳腺癌患者的临

[参考文献]

- [1] 张勇. 乳腺癌的中医治疗[J]. 光明中医, 2009, 24(1):178.
- [2] 冯玉龙. 乳腺癌的中医药治疗集萃[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(5):180.
- [3] 张荣华, 李配富. 中医药治疗乳腺癌研究概况[J]. 现代中西医结合杂志, 2008, 17(16):2580.
- [4] 蔡焦生, 杨树明, 张爱萍. 六味地黄丸的临床应用机制[J]. 中国社区医生, 2008, 10(7):5.
- [5] 尤晓光. 血管内皮细胞生长因子的家族成员及作用[J]. 海南医学院学报 2008, 14(5):573.
- [6] Kallergi G, Markomanolaki H, Giannoukarakaki V, et al. Hypoxia-inducible factor-1 alpha and vascular endothelial growth factor expression in circulating tumor cells of breast cancer patients[J]. Breast Cancer Res, 2009, 11(6):R84.
- [7] Chen Q, Lin J, Jinno S, et al. Overexpression of Cdk6-cyclin D3 highly sensitizes cells to physical and chemical transformation[J]. Oncogene, 2003, 22(7):992.
- [8] 杨桂仙, 张大方. 乳腺癌动物模型的研究现状与评价[J]. 长春中医药大学学报, 2007, 23(2):82.

[责任编辑 聂淑琴]