

消瘦方抑制人乳腺癌裸鼠移植瘤血管内皮生长因子表达的实验研究

欧阳华强, 黄雯霞*, 宋明志, 刘鲁明, 沈晔华, 罗建民
(复旦大学附属肿瘤医院, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032)

[摘要] 目的: 研究消瘦方对人乳腺癌 MDA-MB-435 细胞株裸小鼠移植瘤中血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响。方法: 以体外培养的人乳腺癌 MDA-MB-435 细胞接种于裸小鼠右腋部位制造裸鼠皮下移植瘤模型, 随机分为生理盐水组、5-氟尿嘧啶组及消瘦方小、中、大剂量组, 每组小鼠予以相应药物治疗 6 周后脱颈处死, 称瘤重, 计算肿瘤生长抑制率, 并采用 RT-PCR 法、免疫组化法检测肿瘤组织中 VEGF mRNA 及蛋白的表达。结果: 消瘦方可抑制乳腺癌移植瘤生长, 降低瘤体内 VEGF mRNA 表达($P < 0.05$), 下调相应 VEGF 蛋白表达($P < 0.05$), 其中以中剂量组效果更明显。结论: 消瘦方的抑瘤作用与其下调瘤体内 VEGF 表达密切相关。

[关键词] 乳腺肿瘤; 消瘦方; 血管内皮生长因子

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)03-0044-04

Effects of Xiaojia Decoction on Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Transplantation Tumors of Breast Cancer in Nude Mice

OUYANG Hua-qiang, HUANG Wen-xia*, SONG Ming-zhi, LIU Lu-ming, SHEN Ye-hua, LUO Jian-min
(Cancer Hospital of Fudan University; Department of Oncology of Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of Xiaojia Decoction on expression of Vascular Endothelial Growth Factor in transplantation tumors of the breast cancer cell line MDA-MB-435 in nude mice. **Methods:** The MDA-MB-435 human breast cancer cells cultured in vitro were subcutaneously inoculated into BALB/c nude mice to establish the transplanted tumor model. The mice were then randomized into five groups and treated with Xiaojia Decoction or other remedies for 6 weeks. Then we sacrificed the mice and weighed the tumor, calculated the inhibitory rate of tumor weight, the expression of VEGF on mRNA and protein level was determined by means of RT-PCR and immunohistochemical assay. **Results:** Xiaojia Decoction could inhibit the growth of tumor conspicuously, lower the expression of both mRNA and protein level of VEGF ($P < 0.05$), especially for the medium-dose group. **Conclusion:** This Decoction's effects on down-regulating VEGF have close relation with its function of inhibiting the tumor growth.

[Key words] breast neoplasms; Xiaojia Decoction; vascular endothelial growth factor

乳腺癌是危害妇女健康的主要恶性肿瘤, 全球

每年新诊断病例超过 120 万, 死亡 50 万, 上海市乳腺癌发病率已居女性恶性肿瘤发病的首位。^[1] 乳腺癌术后复发、转移率高, 发生脏器转移者对化疗反应性差, 生存期短, 预后欠佳。消瘦方是复旦大学附属肿瘤医院中西医结合科临床经验方, 常用于乳腺癌复发和转移的治疗, 取得了良好的疗效^[2]。本实验

[收稿日期] 2008-09-27

[基金项目] 上海市卫生局中医药科研基金项目(2004Y003A)

[通讯作者] * 黄雯霞, Tel: (021) 64175590-1308; E-mail: huangwenxia1@yahoo.com.cn

拟通过观察消瘦方对人乳腺癌 MDA-MB-435 裸小鼠移植瘤的抑制作用, 以及对移植瘤中血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响, 阐述消瘦方防治乳腺癌的分子生物学机制。

1 材料

1.1 动物 BALB/C-nu/nu 裸小鼠, 雌性, 体重(18~22) g, 40 只, 饲养于中科院上海斯莱克动物实验中心。

1.2 药物 消瘦方颗粒剂、氟尿嘧啶注射液及生理盐水均由本院中心药房提供, 其中中药颗粒剂由江苏省江阴天江药业公司生产, 参照文献^[3]将消瘦方临床人常用剂量换算为裸鼠用药剂量, 按比例将方中免煎中药颗粒剂置锅中, 加水适量煎煮, 加工成煎剂, 根据实验要求分别配成不同浓度, 以塑料袋包装后冷藏。

1.3 肿瘤细胞株 人乳腺癌 MDA-MB-435 细胞株购自美国 ATCC(American Type Culture Collection, 美国模式菌种收藏所), 由本院中心实验室保存并传代。用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基, 置 37 °C CO₂ 混合气体的培养箱中培养, 细胞换液时间为 2 d, 传代 3~5 d, 传代前用 0.25% 胰蛋白酶消化。

1.4 试剂及仪器 小鼠来源的 VEGF 抗体购自 Santa Cruz 公司(sc-57496), 工作浓度 1:50; 羊抗鼠抗体(二抗)HRP-conjugated anti-mouse IgG, 进口分装, 工作浓度 1:300; 总 RNA 抽提试剂盒(离心柱型)购自上海捷瑞生物公司; 逆转录试剂盒购自 Promega 公司; DNA Marker 购自北京时代天为公司; 引物由上海生工合成。仪器: PCR 仪(Eppendorf, 9600); 凝胶成像系统 ChemImager™ 5500(Alpha Innotech, San Leandro, CA); 电泳仪与水平式电泳槽(Bio-Rad, DYY212); 紫外分光光度计(Beckman, DU800)。

2 方法

2.1 造模 取对数生长期的 MDA-MB-435 乳腺癌细胞制成单细胞悬液, 0.4% Trypan Blue 染色计活细胞比率在 98% 以上, 将细胞调整浓度至 $1 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$, 取 0.1 mL 分别接种于 40 只裸小鼠右肩胛下皮下脂肪垫, 接种瘤块后 1 周, 裸小鼠乳腺移植瘤出现。

2.2 分组与处理 当裸小鼠乳腺部位出现直径约 0.5 cm 大小移植瘤时, 将其编号, 采用数字表法随机分为 5 组, 即阳性对照组(化疗药物 5-Fu)、阴性对照组(生理盐水)及消瘦方大、中、小 3 个剂量组, 每组 8

只。消瘦方大剂量组($72 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$): $2.4 \text{ g} \cdot 0.4 \text{ mL}^{-1}$, 中剂量组($36 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$): $1.2 \text{ g} \cdot 0.4 \text{ mL}^{-1}$, 小剂量组($18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$): $0.6 \text{ g} \cdot 0.4 \text{ mL}^{-1}$, 以上 3 组裸鼠均予以每日 ig 1 次, 连用 6 周, 同时给予生理盐水 0.4 mL/只 ip, 每日 1 次, 连续 5 d; 阴性对照组: 生理盐水 0.4 mL/只, 每日 ig 1 次, 连用 6 周, 并给予生理盐水 0.4 mL/只, ip, 每日 1 次, 连续 5 天; 阳性对照组予 5-Fu ip 20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (每小鼠 0.4 mL), 每日 1 次, 连续 5 d; 同时给予生理盐水 0.4 mL 每日 ig 1 次, 连用 6 周。上述治疗组均于随机分组当日起给药。

2.3 观察抑瘤作用 每隔 6 d 用游标卡尺测量肿瘤最大直径和横径, 估算肿瘤体积(V), 取各组平均值, 绘制生长曲线: $V = 1/2(\text{直径} \times \text{横径}^2)$ 。治疗结束后次日处死裸小鼠, 称瘤重。计算实体肿瘤生长抑制率(IR): $\text{IR}(\%) = (1 - \text{治疗组平均瘤重}/\text{对照组平均瘤重}) \times 100\%$ 。称计体重, 脱颈处死动物, 无菌条件下摘除肿瘤, 迅速称取瘤重, 每组取 2 例原位肿瘤, 去除中心坏死部分及纤维结缔组织, 切取小块瘤体, 装入冻存管, -80 °C 冻存, 余肿瘤(含部分肺转移瘤)用 10% 中性福尔马林溶液固定, 常规病理切片用于免疫组化检测。

2.4 RT-PCR 法检测 VEGF mRNA 表达 取以上冻存乳腺肿瘤标本每组各 2 例, Trizol 离心柱法抽提总 RNA, 紫外分光光度计定量, 取总 RNA 作为反转录模板, 反转录体系按试剂盒要求进行。VEGF 采用文献引物:^[4] Up $5'-\text{CTACCTCCACCATGCCAAGT}-3'$, Down $5'-\text{TCTCTCCTATGTGCTGGCCT}-3'$, 扩增片段 311 bp。以 GAPDH 作为内参照, 其引物序列: Up $5'-\text{CTCATGACCACAGTCCATGCCATG}-3'$, Down $5'-\text{CTGCTTACCACCTTCTTGATGTC}-3'$, 扩增片段 274 bp。PCR 反应体系为: cDNA 模板及 MgCl₂ 均为 2 μL , 10 × Taq buffer 2.5 μL , 10 mM dNTP mix 上下游引物均为 0.5 μL , Taq 酶 0.2 μL , 加 MQ 水至 25 μL 。扩增条件: 95 °C 5 min 预变性, 继以 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 扩增 29 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。反应结束后取扩增产物 10 μL 上样电泳, 经凝胶自动成像系统检测 VEGF 表达, 每个实验组重复 3 次。

2.5 免疫组化法检测 VEGF 蛋白表达 制作石蜡切片后, 采用 S-P 法测定乳腺肿瘤的 VEGF 表达, 在普通显微镜下观察并摄片。

参照文献方法^[5]评价 VEGF 表达强度: (1) 染色

强度: 无色(阴性)为 0 分, 淡黄色(弱阳性)为 1 分, 棕黄色(阳性)为 2 分, 棕褐色(强阳性)为 3 分。(2) 阳性细胞百分率: 阳性细胞 0% 为 0; < 25% 为 1; 25%~50% 为 2; 阳性细胞 > 50% 为 3。(1) + (2) 之和 0~3 为低表达, 4~6 为高表达。

图像分析: 选择 200 倍视野。每张免疫组化片任选 2 个视野, 测定各组在统一光度下阳性细胞的面积(Area)和光密度(ID)值, 计算免疫组化指数(IA)。计算公式: $IA = Area \times ID \times 0.28$ 。

2.6 统计方法 实验数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 Stata 8.0 软件进行统计分析, 以 χ^2 检验分析不同治疗组之间的差异。

3 结果

3.1 消瘦方对乳腺癌裸小鼠移植瘤的抑瘤作用

给药后到第 6 周出现 4 只小鼠死亡, 其中生理盐水组死亡 2 只, 中药大剂量组及 5-Fu 对照组均死亡 1 只, 中药组动物在毛发、食欲、大小便、呼吸、活动能力、精神状态、行为方式等方面, 与其他各对照组无明显差异。消瘦方各个剂量组对 MDA-MB-435 裸小鼠移植瘤均有一定抑制作用, 但无明显量效关系, 以中剂量组肿瘤增长较为缓慢(图 1)。

表 1 提示, 5-Fu、消瘦方各剂量组的平均瘤重均小于生理盐水组, 以中剂量组的抑瘤率最高(38.6%), 与生理盐水组比较有统计学意义($P < 0.05$), 但与其他治疗组间的差异不明显, 未出现剂量-效应关系。对肿瘤体积的抑制率亦以中药中剂量组为最高, 但各剂量组间亦无显著性差异, 未出现剂量-效应关系。

3.2 消瘦方对乳腺癌裸小鼠移植瘤中 VEGF mRNA 表达的影响(图 2) 从电泳图中可见看家基因 GAPDH 在各组裸小鼠乳腺原位肿瘤中的表达基本一致, VEGF 在生理盐水组、消瘦方小剂量和大剂量组表达较高, 中剂量组中表达较低, 5-氟尿嘧啶组表达最低。

3.3 消瘦方对乳腺癌裸小鼠移植瘤中 VEGF 蛋白表达的影响(表 2) 与生理盐水组相比, 消瘦方中, 小剂量组及 5-氟尿嘧啶组 VEGF 蛋白表达(IA)水平下调显著, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 中药各剂量组与 5-氟尿嘧啶组相比, 差异不显著。提示中, 小剂量的消瘦方可以下调 VEGF 蛋白的表达, 该调控效应与其 mRNA 水平的结果基本一致。

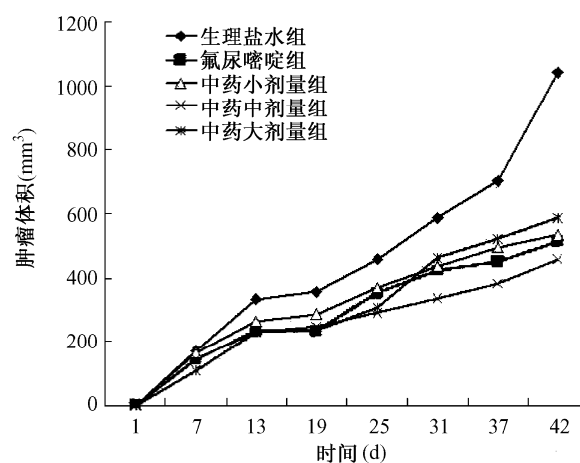


图 1 MDA-MB-435 裸鼠移植瘤生长曲线

表 1 消瘦方对 MDA-MB-435 移植瘤生长的抑制作用($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 ($g \cdot kg^{-1}$)	n	肿瘤平均体积 (mm^3)	瘤重 (g)	抑瘤率 (%)
生理盐水组	—	6	1040.58 ± 618.89	0.99 ± 0.73	—
5-氟尿嘧啶组	0.02	7	514.12 ± 103.38 ¹⁾	0.56 ± 0.24	33.5
消瘦方组	18	8	534.64 ± 146.55	0.61 ± 0.22	28.2
消瘦方组	36	8	458.28 ± 149.42 ¹⁾	0.52 ± 0.14 ¹⁾	38.6
消瘦方组	72	7	587.63 ± 234.93	0.77 ± 0.89	20.9

注: 与生理盐水组比较¹⁾ $P < 0.05$ (下同)。

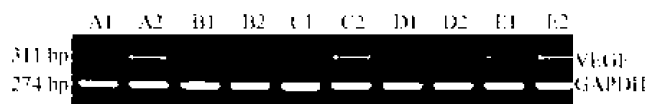


图 2 各组乳腺肿瘤中的 VEGF mRNA 表达

注: A1/A2: 生理盐水组; B1/B2: 氟尿嘧啶组; C1/C2: 消瘦方小剂量组; D1/D2: 消瘦方中剂量组; E1/E2: 消瘦方大剂量组。

表 2 各组对 MDA-MB-435 裸鼠移植瘤 VEGF 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, \times 10^3$)

组别	剂量 ($g \cdot kg^{-1}$)	n	免疫组化指数(IA)
生理盐水组	—	6	188.46 ± 41.31
5-氟尿嘧啶组	0.02	7	135.72 ± 30.09 ¹⁾
消瘦方组	18	8	135.42 ± 38.76 ¹⁾
消瘦方组	36	8	124.06 ± 21.32 ¹⁾
消瘦方组	72	7	159.97 ± 34.09

4 讨论

在肿瘤的发生发展过程中, 新生毛细血管的形成对原位癌细胞本身的增殖和生长是必不可少的, 同时也是肿瘤侵袭转移的必备条件。^[6] 侵袭前期(肿瘤直径小于 2 mm) 肿瘤细胞呈单克隆性增殖, 主要

靠局部扩散获得营养;当肿瘤直径达到 2 mm 时,各类血管生成抑制因子合成和分泌减少,肿瘤的生长需要由血管来提供,这就导致向肿瘤提供养料的新生血管逐步形成,瘤体积随之迅速增大。因此,微血管的形成是肿瘤侵袭和转移的基础环节。

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是目前已知的作用最强的促血管生成因子之一。VEGF 能够特异性地与内皮细胞表面的 II 型酪氨酸激酶受体 Flt1 和 KDR/Flk1 结合,促进内皮细胞分裂、增殖并增加血管通透性;同时上调凋亡抑制基因 Bcl-2 表达,从而通过抑制癌细胞凋亡,间接促使其增殖和生长。VEGF 高表达对癌细胞生长、转移有明显的促进作用。^[7]许多肿瘤细胞可分泌 VEGF,诱导肿瘤血管形成,协助肿瘤细胞进入脉管系统,促进肿瘤侵袭转移。^[8]

乳腺癌属中医“乳岩”病变,自古有之。中医认为,癌为阴毒,其性深伏,为病缠绵难愈。乳岩的发病与肝脾功能受损、气血亏虚有密切关系。结合现代医学对乳腺癌发病的认识,冲任失调所致肝肾不足,无以充养冲任,与体内雌激素水平失调基本一致。因此,益气养血,健脾疏肝,调理冲任应成为中医治疗乳腺癌的基本法则。消瘦方以党参、白术、茯苓、薏苡仁健脾益气,增强机体免疫功能;青皮、橘核、八月札疏肝理气散结,有助于调畅情志;熟地黄、白芍、鳖甲调理冲任,白花蛇舌草、山慈菇等解毒消肿以抗肿瘤。全方立足于扶正祛邪,注重消补兼施,补而不留邪,消而不伤正,临床疗效良好。

本实验发现 VEGF 在各治疗组的裸小鼠移植瘤中都有表达,其中以生理盐水组与消瘦方大剂量组表达水平最高,而消瘦方中剂量组 VEGF mRNA 与蛋白的表达反而较低,该结果与各组肿瘤抑制率基本一致,提示 VEGF 的表达水平可以大体反映肿瘤的浸润程度。实验同时观察了各治疗组的肺转移发生率,肉眼下仅发现生理盐水组有 2 例肺转移,并经病理切片证实,免疫组化法检测可见肺组织局部 VEGF 阳性表达,说明 VEGF 的表达与肿瘤转移关系密切。

此外,在本实验中,中药的抑瘤效应并未呈现类似化疗药物的剂量-效应关系。在合适剂量范围内,

消瘦方能起到较好的抑瘤作用,当剂量减小或增大时,疗效反而下降,此现象曾见于有关报道,^[9]表明中医药的抑瘤作用不同于常规化疗药物的细胞毒性反应,可能存在其独特的作用模式,值得深入探讨。

综上所述,本研究观察到消瘦方对人乳腺癌 MDA-MB-435 裸小鼠移植瘤的抑制作用,并发现其抑瘤效应与下调瘤体内 VEGF 表达密切相关,且与用药剂量有一定关系。进一步研究消瘦方抑瘤的分子生物学机制及量效关系,可以更好地指导临床用药,必将有利于乳腺癌整体疗效的提高。

[参考文献]

- [1] 上海市疾病预防控制中心. 2004 年上海市市区恶性肿瘤发病率[J]. 肿瘤, 2007, 27(7): 594.
- [2] 欧阳华强, 黄雯霞, 刘鲁明. 消瘦方联合介入治疗乳腺癌肝转移 42 例疗效观察[J]. 新中医, 2006, 38(11): 46-47.
- [3] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 33.
- [4] Da-Qiang Li, Yi-Feng Hou, Jiong Wu, et al. Gene expression profile analysis of an isogenic tumour metastasis model reveals a functional role for oncogene AF1Q in breast cancer metastasis[J]. Eur J Cancer, 2006, 42(18): 3274-3286.
- [5] Ioannis K, Petroula AD, Helen G, et al. Evaluation of the prognostic value of HER-2 and VEGF in breast cancer patients participating in a randomized study with dose-dense sequential adjuvant chemotherapy [J]. Breast Cancer Research and Treatment, 2006, 96: 251-261.
- [6] Augustin HG. Antiangiogenic tumour therapy: will it work [J]. Trends Pharmacol Sci, 1998, 19: 216.
- [7] 汤红平, 张雅洁, 顾莹莹, 等. VEGF-C 和 VEGF-D 在乳腺癌中的表达及作用[J]. 肿瘤, 2006, 26(6): 551-554.
- [8] Zhang L, Hannav JA, Liu J, et al. Vascular endothelial growth factor overexpression by soft tissue sarcoma cells: implications for tumor growth, metastasis and chemoresistance [J]. Cancer Res, 2006, 66(17): 8770-8778.
- [9] 沈晔华, 刘鲁明, 沈瑾, 等. 清胰消积方对实验性胰腺癌体内生长和细胞周期的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2006, 12(2): 97-99.