

· 药理 ·

阳和化岩汤通过ER/PI3K/Akt/mTOR通路逆转乳腺癌他莫昔芬耐药

徐茜茜¹, 王蕾², 刘志勇², 孙雪¹, 罗润佳³, 王星宇³, 刘晓菲³, 李静蔚^{2*}

(1. 山东中医药大学中医学院, 济南 250014; 2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250014;
3. 山东中医药大学第一临床医学院, 济南 250014)

[摘要] 目的:通过观察阳和化岩汤对他莫昔芬(TAM)耐药型乳腺癌移植瘤的作用,及对雌激素受体(ER)/磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)交互通路的影响,探讨阳和化岩汤逆转乳腺癌TAM耐药的可能机制。方法:50只小鼠随机分为5组,空白组、模型组、阳和化岩汤组、依维莫司组以及阳和化岩汤+依维莫司组。通过切除双侧卵巢建立肾虚模型,其中空白组行假手术处理。造模后恢复3 d,5组小鼠均通过皮下肿瘤接种乳腺癌TAM耐药细胞(MCF-7/TAM)建立乳腺癌TAM耐药型移植瘤模型。建模成功后,阳和化岩汤组给予阳和化岩汤灌胃(给药剂量为中药制剂20 mL·kg⁻¹),依维莫司组给予依维莫司腹腔注射(10 mg·kg⁻¹),阳和化岩汤+依维莫司组给予阳和化岩汤灌胃+依维莫司腹腔注射,空白组、模型组给予磷酸盐缓冲液(PBS)灌胃+腹腔注射;均连续给药28 d,1次/d。给药结束后分离肿瘤组织、称质量,计算抑瘤率;苏木素-伊红(HE)染色观察肿瘤组织病理学改变;免疫荧光和实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)分别检测肿瘤组织PI3K, Akt, mTOR, ER蛋白和mRNA表达情况。结果:与模型组比较,阳和化岩汤组d12, d20, d28肿瘤体积、瘤质量显著降低($P<0.01$),抑瘤率显著增加($P<0.01$);阳和化岩汤组能明显降低肿瘤细胞密度,引起肿瘤细胞坏死;与模型组比较,阳和化岩汤组、依维莫司组和阳和化岩汤+依维莫司组均能抑制PI3K, Akt, mTOR蛋白及mRNA的表达($P<0.05$, $P<0.01$);与空白组比较,阳和化岩汤组、依维莫司组和阳和化岩汤+依维莫司组均能抑制ER蛋白及mRNA的表达($P<0.01$);与模型组比较,阳和化岩汤+依维莫司组ER mRNA表达量显著减少($P<0.01$)。结论:阳和化岩汤可抑制TAM耐药型乳腺癌移植瘤生长,其机制可能是通过下调ER/PI3K/Akt/mTOR交互信号通路关键分子的表达,从而达到逆转乳腺癌TAM耐药的作用。

[关键词] 阳和化岩汤; 雌激素受体/磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路; 乳腺癌; 他莫昔芬; 依维莫司

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)07-0034-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210621

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210120.0920.001.html>

[网络出版日期] 2021-1-20 9:32

Yanghe Huayangtang Reverses Tamoxifen Resistance in Breast Cancer Through ER/PI3K/Akt/mTOR Pathway

XU Qian-qian¹, WANG Lei², LIU Zhi-yong², SUN Xue¹, LUO Run-jia³, WANG Xing-yu³,
LIU Xiao-fei³, LI Jing-wei^{2*}

(1. College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shandong University of TCM, Ji'nan 250014, China; 2. Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Ji'nan 250014, China;
3. The First Clinical Medical College of Shandong University of TCM, Ji'nan 250014, China)

[收稿日期] 20200826(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81573989,81403408);山东省齐鲁卫生与健康领军人才项目(鲁卫人字[2020]3号);全国中医临床特色技术传承骨干人才项目(全国中医药人教函[2019]36号)

[第一作者] 徐茜茜, 硕士, 从事中医外科学乳腺、甲状腺研究, E-mail: xixixu1994@163.com

[通信作者] *李静蔚, 博士, 主任医师, 从事乳腺、甲状腺外科的中医及中西医结合临床教学及科研工作, E-mail: weilandetan2000@163.com

[Abstract] **Objective:** To explore the possible mechanism of Yanghe Huayangtang in reversing the drug resistance of breast cancer by observing the effect of Yanghe Huayangtang on the transplant tumor of tamoxifen (TAM)-resistant breast cancer and its influences on the interaction pathway of estrogen receptor (ER)/phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/mammalian rapamycin target protein (mTOR). **Method:** Fifty mice were randomly divided into 5 groups: blank group, model group, Yanghe Huayangtang group, everolimus group, and Yanghe Huayangtang+everolimus group. The model of kidney deficiency was established by bilateral ovariectomy, and the blank group was treated with sham operation. Three days after the establishment of the model, all the five groups of mice were inoculated with breast cancer TAM drug-resistant cells (MCF-7/TAM^r) to establish breast cancer TAM-resistant transplanted tumor model. After successful modeling, Yanghe Huayangtang group received intragastric administration of Yanghe Huayangtang (traditional Chinese medicine preparation 20 mL·kg⁻¹), everolimus group received intraperitoneal injection of everolimus (10 mg·kg⁻¹). Yanghe Huayangtang + everolimus group received Yanghe Huayangtang by intragastric administration and everolimus by intraperitoneal injection. The blank group and model group received intragastric administration and intraperitoneal injection of phosphate buffer (PBS). Drug administration was lasted for 28 days in all groups, once a day. After administration, the tumor tissue was separated and weighed, and the tumor inhibition rate was calculated. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of tumor tissue. Immunofluorescence and Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) were used to detect the expression of PI3K, Akt, mTOR, ER protein and mRNA in tumor tissue. **Result:** Compared with the model group, the tumor volume and tumor weight of Yanghe Huayangtang group decreased significantly on the 12th, 20th and 28th days ($P<0.01$), and the tumor inhibition rate increased significantly ($P<0.01$). Yanghe Huayangtang group significantly reduced the density of tumor cells and caused tumor cell necrosis. Compared with the model group, Yanghe Huayangtang group, everolimus group and Yanghe Huayangtang+everolimus group inhibited the expression of PI3K, Akt, mTOR protein and mRNA ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the blank group, Yanghe Huayangtang group, everolimus group and Yanghe Huayangtang+everolimus group all inhibited the protein and mRNA expression of ER, and mRNA expression of ER in Yanghe Huayangtang+everolimus group was significantly lower than that in the model group ($P<0.01$). **Conclusion:** Yanghe Huayangtang can inhibit the growth of TAM-resistant breast cancer. The mechanism may be that Yanghe Huayangtang can reverse the TAM resistance of breast cancer by down-regulating the expression of key molecules of ER/PI3K/Akt/mTOR cross-signal pathway.

[Key words] Yanghe Huayangtang; estrogen receptor(ER)/phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K)/protein kinase B(Akt)/rapamycin target(mTOR) protein signaling pathway; breast cancer; tamoxifen; everolimus

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,近年来,发病率上升,且呈现年轻化趋势。其中约有75%的乳腺癌患者为雌激素受体(ER)阳性^[1],内分泌治疗是该类乳腺癌的重要治疗策略,他莫昔芬(TAM)是内分泌治疗常用药。但TAM耐药严重影响了乳腺癌的远期疗效^[2],成为乳腺癌治疗中亟待解决的临床难题。阳和化岩汤出自清·高思敬《外科医镜》,功效温阳化痰,临床上已证实阳和化岩汤联合化疗可以显著改善患者生活质量,减轻化疗导致的毒副反应^[3];阳和化岩汤可通过调控磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)通路抑制乳腺癌细胞生长、促进癌细胞凋亡,抑制乳腺癌脉管生成和侵袭

等作用,从而达到抑制乳腺癌的作用^[4-6],但对乳腺癌TAM耐药的作用机制尚未阐明。近期研究发现,PI3K/Akt/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路异常激活能下调人第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因(PTEN)水平,上调P-糖蛋白(P-gp)水平,活化信号因子,产生耐药性^[7-8]。其与ER通路间的互通是产生耐药的关键。因此本研究拟在建立肾虚型TAM耐药乳腺癌小鼠模型基础上,通过观察阳和化岩汤对ER/PI3K/Akt/mTOR交互信号通路的影响,阐明阳和化岩汤逆转乳腺癌TAM耐药的分子机制,为中医药治疗乳腺癌TAM耐药提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞株与动物 人乳腺癌细胞株 MCF-7, 购自中国科学院上海生命科学院细胞资源中心。采用低浓度持续诱导法建立 TAM 耐药的乳腺癌内分泌耐药细胞(MCF-7/TAM^r), 在本实验室传至第5代后使用。

雌性 SPF 级 BALB/c-nu 小鼠, 4~5 周龄, 体质量 (18±3)g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号 1100112011001948, 饲养于恒温恒湿、人工光照明暗各 12 h 条件下, 适应环境 1 周后进行实验。本研究动物实验获山东中医药大学附属医院实验动物伦理委员会批准, 批号 AWE-2019-006。

1.2 药物 阳和化岩汤: 鹿角霜 15 g, 土贝母 9 g, 白芥子 6 g, 肉桂 3 g, 炮姜 3 g, 麻黄 9 g, 胡桃肉 6 g, 生甘草 6 g。购于山东中医药大学附属医院中药房。经山东中医药大学附属医院张学顺教授鉴定均为正品。加入 10 倍药材质量的水, 提取挥发油 6 h, 收集, 得率 5.26%。将提取挥发油后药液与煎液合并滤过, 浓缩至药液-药材 1.5:1 后加入乙醇, 使乙醇体积分数达到 60%, 静置 24 h, 取上清液, 将沉淀部分离心, 合并提取液。减压回收乙醇, 浓缩至 1.18 g·cm⁻³ (60 °C)。另混匀聚山梨酯-80 与挥发油, 加入上述提取液中, 混匀后再加入山梨酸及蔗糖, 调节 pH, 用水调整质量浓度为 0.84 g·mL⁻¹。依维莫司 (Novartis Pharma Stein AG 公司, 批号 H20130064)。他莫昔芬 (上海旭东海普药业有限公司, 批号 H32021472)。

1.3 试剂 DMEM/High Glucose (1×), 磷酸盐缓冲液 (PBS) (美国 Hyclone 公司, 批号分别为 SH3002 2.01B, SH30256.01); 胎牛血清 (德国 Sera&Pro 公司, 批号 S601S-500); 胰酶 Trypsin (美国 Amresco 公司, 批号 0457); Matrigel (美国 Corning 公司, 批号 356234); RNA 提取液 [天根生化科技 (北京) 有限公司, 批号 DP424]; FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (瑞士 Roche 公司, 批号 04913914001); 苏木素染液套装, 抗荧光淬灭封片剂 (武汉谷歌生物科技有限公司, 批号分别为 G1401, G1005); PI3K, Akt, mTOR, ER 一抗 (英国 Abcam 公司, 批号分别为 ab32089, ab179463, ab134903, ab32063); 二抗 CY3 山羊抗兔, 488 山羊抗小鼠 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 批号分别为 GB21303, GB25301); 各引物由武汉擎科创新生物科技有限公司合成, 见表 1。

1.4 仪器 MCO-18AC 型 CO₂ 恒温培养箱 (日本 Panasonic 公司); SW-CJ-1FD 型超净工作台 (江苏苏

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
PI3K	上游 GCAGTTTTGGAAGCAGTCACA	233
	下游 ATTCAGTTCAATTGCAGAAGGAG	
Akt	上游 TACGAGATGATGTGCGGTCG	132
	下游 CAGCCCTGAAAGCAAGGACT	
mTOR	上游 CTTAGAGGACAGCGGGGAAG	222
	下游 TGGTTTCCTCATTCCGGCTC	
ER	上游 GTTATACTGGTGTCCGATGTGAA	121
	下游 GTGGAACCGACGACTGTGA	
GAPDH	上游 GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	197
	下游 GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG	

州安泰空气技术有限公司); XDS-18 型生物倒置显微镜 (重庆水电仪器总公司); Bead Ruptor 12 型多样品研磨珠均质仪 (美国 Omni 公司); D3024R 型台式高速冷冻型微量离心机 (大龙兴创实验仪器股份公司); LightCycler[®] 480 II 型荧光定量聚合酶链式反应 (PCR) 仪 (瑞士 Roche 公司); NanoDrop2000 型微量分光光度计 (美国 Thermo 公司); ECLIPSE C1 型正置荧光显微镜 (日本 NIKON 公司)。

2 方法

2.1 动物造模及分组给药 50 只小鼠随机分出 10 只做为空白组, 余 40 只小鼠 1% 戊巴比妥钠麻醉后切除双侧卵巢建立肾虚模型^[9], 空白组小鼠行假手术处理。造模后恢复 3 d, 50 只小鼠建立乳腺癌 TAM 耐药型移植瘤模型。收集指数生长期 MCF-7/TAM^r 细胞, 用预冷的无血清培养基重悬至 1×10⁸ 个/mL, 与基质胶 Matrigel 1:1 混和至 5×10⁷ 个/mL, 用于小鼠皮下肿瘤接种, 每只小鼠 0.1 mL 原位注射于右侧第二对乳垫下。定期观察肿瘤生长情况, 以造模后第 5 天小鼠接种部位可触摸到结节为造模成功标准^[10], 50 只小鼠全部成瘤, 成瘤率 100%。将空白组以外的 40 只小鼠随机分为模型组、阳和化岩汤组、依维莫司组、阳和化岩汤+依维莫司组, 每组 10 只。从第 5 天开始给药治疗, 剂量根据人与小鼠等效剂量折算方法^[11] 计算。阳和化岩汤组给予阳和化岩汤灌胃 (含生药 16.8 g·kg⁻¹, 20 mL·kg⁻¹), 依维莫司组给予依维莫司腹腔注射 (10 mg·kg⁻¹), 阳和化岩汤+依维莫司组给予相同剂量阳和化岩汤灌胃联合依维莫司腹腔注射, 空白组、模型组给予等量 PBS 灌胃+腹腔注射, 每组均连续给药 28 d。末次给药当晚禁食, 第 29 天脱颈处死

小鼠, 无菌剥离肿瘤组织、称质量、迅速包埋、冻存。

2.2 测量小鼠肿瘤体积、质量并计算抑瘤率 肿瘤形成后, 每4 d用游标卡尺测量肿瘤的长径(*a*)和短径(*b*)计算肿瘤体积 $V=a \times b^2/2$ 。处死小鼠后完整剥离肿瘤组织, 称取肿瘤质量并计算抑瘤率。抑瘤率=(空白组肿瘤质量-模型组或各药物组瘤质量)/空白组瘤质量 $\times 100\%$ 。

2.3 苏木素-伊红(HE)染色观察肿瘤组织病理学变化 将部分肿瘤组织于4%多聚甲醛溶液中固定, 石蜡包埋、切片, 常规HE染色, 切片脱水、透明、封片, 显微镜观察肿瘤组织细胞病理形态学变化。

2.4 免疫荧光法检测肿瘤组织中PI3K, Akt, mTOR, ER蛋白的表达 石蜡切片脱蜡后置于盛满EDTA抗原修复缓冲液(pH 8.0)的修复盒中于微波炉内进行抗原修复。自然冷却后, PBS洗涤切片3次, 每次5 min。切片稍甩干后用组化笔在组织周围画圈, 在圈内加入自发荧光淬灭剂5 min, 流水冲洗10 min。在圈内滴加BSA孵育30 min。加入PI3K, ER抗体(1:1 000), Akt, mTOR抗体(1:1万), 4℃孵育过夜, PBS洗涤切片3次, 每次5 min。加入CY3山羊抗兔(1:300), 488山羊抗小鼠(1:400), 于避光的环境中室温孵育50 min, PBS洗涤切片3次, 每次5 min, 加入DAPI染料于避光的环境中室温孵育10 min, PBS漂洗3次, 每次5 min, 滴加适量抗荧光猝灭封片剂封片, 在避光的环境中将切片于荧光显微镜下观察并采集图像。DAPI染出来的细胞核在紫外的激发下为蓝色, 阳性表达为相应荧光素标记的红光。每组内随机选取3张切片随机挑选200倍视野进行拍照。拍照时尽量让组织充满整个视野, 保证每张照片的背景光一致。应用Image-Pro

Plus 6.0软件, 将绿色/红色荧光单色照片转换为黑白图片然后选取相同的黑色作为判断所有照片阳性的统一标准, 进行分析, 得出每张照片阳性的积分吸光度值以及组织的像素面积。并求出面密度。

2.5 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测肿瘤组织PI3K, Akt, mTOR, ER mRNA表达 取冻存肿瘤组织100 mg, 剪碎后放于匀浆器外筒, 加入trizol溶液1 mL, 于冰上充分研磨组织成匀浆, 提取总RNA, 使用超微量分光光度计测量总RNA的纯度和浓度。按照试剂盒说明书将上述提取的总RNA逆转录为cDNA第一链, 配制PCR反应体系(2 \times PCR Mix 12.5 μ L, 7.5 μ mol \cdot L⁻¹基因引物2.0 μ L, 反转录产物2.5 μ L, ddH₂O 8.0 μ L), 进行引物扩增, 扩增条件: 95℃预变性5 min, 95℃变性15 s, 56℃退火30 s, 72℃延伸20 s, 44个循环, 于75~95℃生成溶解曲线, 每个基因设置3个复孔, 以GAPDH为内参, 采用2^{- $\Delta\Delta$ C_t}计算。

2.6 统计学方法 实验数据采用SPSS 25.0软件分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对乳腺癌荷瘤小鼠抑瘤的影响 与空白组比较, 模型组 d20, d28 肿瘤体积降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与模型组比较, 阳和化岩汤组、依维莫司组、阳和化岩汤+依维莫司组第12, 20, 28天肿瘤体积降低 ($P < 0.01$)。见表2。与空白组比较, 模型组瘤质量降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 阳和化岩汤组、依维莫司组、阳和化岩汤+依维莫司组瘤质量降低 ($P < 0.01$), 且阳和化岩汤组、依维莫司组、阳和化岩汤+依维莫司组抑瘤率升高 ($P < 0.01$)。见表3。

表2 阳和化岩汤对乳腺癌荷瘤小鼠肿瘤体积的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 2 Effect of Yanghe Huayang on tumor volume of breast cancer-bearing mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

mm³

组别	剂量/g \cdot kg ⁻¹	第12天	第20天	第28天
空白		349.37 \pm 67.29	1 006.42 \pm 221.65	2 243.89 \pm 246.08
模型		312.58 \pm 57.52	830.23 \pm 165.44 ¹⁾	1 744.42 \pm 313.69 ²⁾
阳和化岩汤	16.8	252.75 \pm 34.04 ⁴⁾	555.91 \pm 88.22 ⁴⁾	1 234.52 \pm 176.66 ⁴⁾
依维莫司	0.01	213.65 \pm 24.79 ⁴⁾	440.03 \pm 77.85 ⁴⁾	1 040.82 \pm 229.24 ⁴⁾
阳和化岩汤+依维莫司	16.8+0.01	146.81 \pm 15.55 ⁴⁾	244.15 \pm 29.49 ⁴⁾	437.84 \pm 74.40 ⁴⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表3~5同)。

3.2 对乳腺癌荷瘤小鼠肿瘤组织病理的影响 空白组肿瘤组织中的肿瘤细胞密集, 未见明显肿瘤坏死灶; 与模型组比较, 阳和化岩汤组、依维莫司组和阳和化岩汤+依维莫司组肿瘤组织中肿瘤细胞密度

明显减少, 可见更为明显的肿瘤坏死灶。见图1。

3.3 对乳腺癌荷瘤小鼠肿瘤组织中PI3K, Akt, mTOR, ER蛋白表达的影响 与空白组比较, 模型组Akt蛋白表达明显减少 ($P < 0.05$), ER蛋白表达显

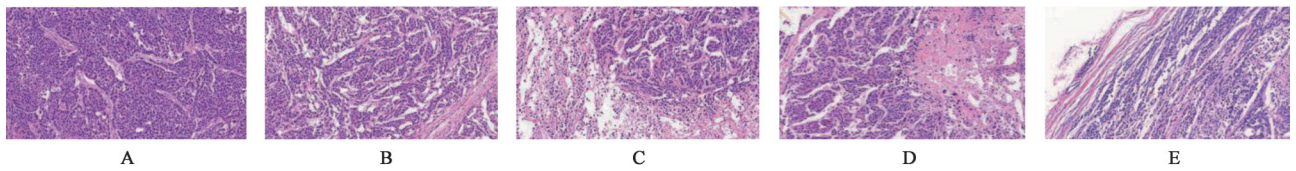
表3 阳和化岩汤对乳腺癌荷瘤小鼠肿瘤质量及抑瘤率的影响
($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of Yanghe Huayatang on tumor weight and tumor inhibition rate of breast cancer tumor-bearing mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	瘤质量/g	抑瘤率/%
空白		1.73±0.23	-
模型		1.34±0.32 ²⁾	22.52±17.33
阳和化岩汤	16.8	0.92±0.15 ⁴⁾	46.78±8.31 ⁴⁾
依维莫司	0.01	0.93±0.21 ⁴⁾	46.27±11.49 ⁴⁾
阳和化岩汤+依维莫司	16.8+0.01	0.41±0.13 ⁴⁾	76.39±6.93 ⁴⁾

著减少($P<0.01$)。与模型组比较,阳和化岩汤组、依维莫司组、阳和化岩汤+依维莫司组 PI3K, mTOR, Akt 蛋白表达明显减少($P<0.05, P<0.01$)。见图2,表4。

3.4 对乳腺癌荷瘤小鼠肿瘤组织中 PI3K, Akt, mTOR, ER mRNA 表达的影响 与空白组比较,模型组 ER mRNA 表达显著减少($P<0.01$)。与模型组比较,阳和化岩汤组、依维莫司组和阳和化岩汤+依维莫司组 PI3K, Akt, Mtor mRNA 表达显著减少($P<0.01$)。见表5。



A. 空白组; B. 模型组; C. 阳和化岩汤组; D. 依维莫司组; E. 阳和化岩汤+依维莫司组(图2同)

图1 阳和化岩汤对乳腺癌荷瘤小鼠肿瘤组织病理学的影响(HE, ×200)

Fig. 1 Effect of Yanghe Huayatang on tumor histopathology in breast cancer-bearing mice(HE, ×200)

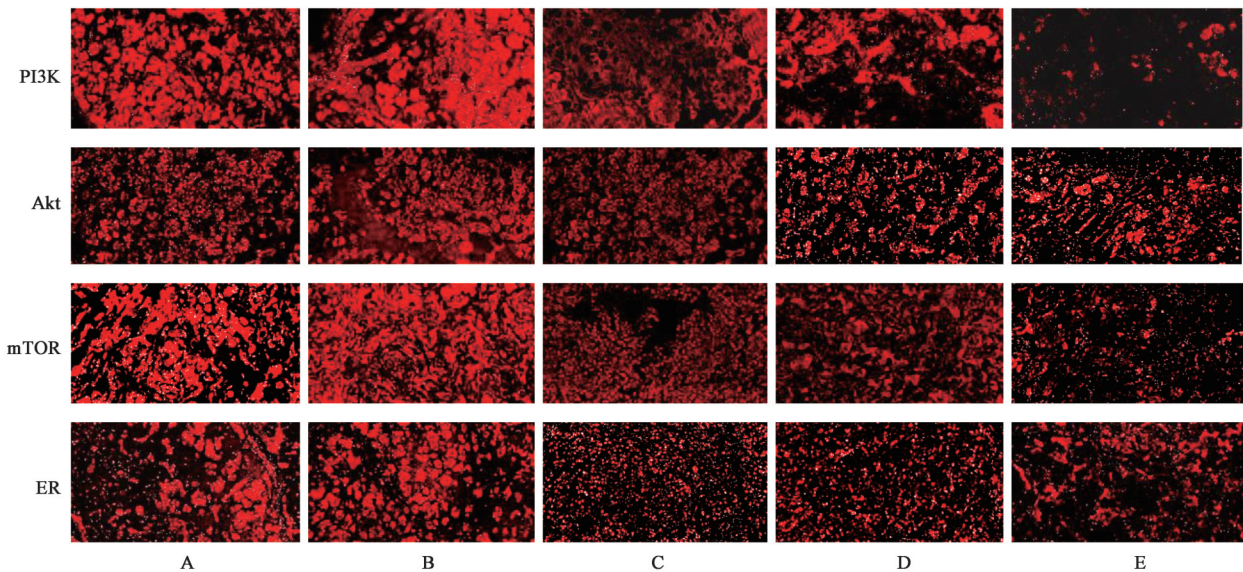


图2 阳和化岩汤对乳腺癌荷瘤小鼠肿瘤组织 PI3K, Akt, mTOR, ER 蛋白表达的影响(免疫荧光, ×200)

Fig. 2 Effect of Yanghe Huayatang on PI3K, Akt, mTOR and ER protein expression in tumor tissue of breast cancer-bearing mice (immunofluorescence, ×200)

表4 阳和化岩汤对乳腺癌荷瘤小鼠肿瘤组织中 PI3K, Akt, mTOR, ER 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Yanghe Huayatang on protein expression of PI3K, Akt, mTOR and ER in tumor tissue of breast cancer-bearing mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PI3K	Akt	mTOR	ER
空白		0.046±0.016	0.014±0.002	0.034±0.005	0.028±0.037
模型		0.033±0.008	0.024±0.007 ¹⁾	0.038±0.005	0.012±0.003 ²⁾
阳和化岩汤	16.8	0.013±0.007 ³⁾	0.006±0.001 ⁴⁾	0.015±0.006 ⁴⁾	0.008±0.002
依维莫司	0.01	0.008±0.003 ³⁾	0.008±0.002 ⁴⁾	0.018±0.006 ⁴⁾	0.005±0.001
阳和化岩汤+依维莫司	16.8+0.01	0.004±0.001 ³⁾	0.008±0.004 ⁴⁾	0.008±0.002 ⁴⁾	0.006±0.002

表5 阳和化岩汤对乳腺癌荷瘤小鼠肿瘤组织中PI3K, Akt, mTOR, ER mRNA表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 5 Effect of Yanghe Huayangtang on mRNA expression of PI3K, Akt, mTOR and ER in tumor tissue of breast cancer-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PI3K	mTOR	Akt	ER
空白		0.95±0.14	1.00±0.07	1.00±0.08	1.00±0.10
模型		0.91±0.04	0.94±0.15	0.97±0.12	0.73±0.11 ²⁾
阳和化岩汤	16.8	0.81±0.06 ⁴⁾	0.75±0.15 ⁴⁾	0.78±0.08 ⁴⁾	0.72±0.08
依维莫司	0.01	0.70±0.04 ⁴⁾	0.57±0.10 ⁴⁾	0.44±0.04 ⁴⁾	0.72±0.10
阳和化岩汤+依维莫司	16.8+0.01	0.63±0.08 ⁴⁾	0.34±0.10 ⁴⁾	0.25±0.02 ⁴⁾	0.60±0.08 ⁴⁾

4 讨论

乳腺癌属于中医学“乳岩”“乳石痈”范畴,首见于《妇人良方大全》。乳腺癌内分泌治疗期常见以下不良反应,如烘热汗出、心悸、多梦、骨质疏松、腰膝酸软、倦怠乏力、烦躁易怒、五心烦热、阴道干涩等类似围绝经期综合征的症状,中医辨证多以肾虚为主^[12]。服用TAM的绝大多数患者是手术、化疗或(和)放疗后,元气大伤,会引发月经稀发甚至闭经的情况,从而导致“肾气衰,天癸竭”的生理现象病理性出现,天癸竭暗示着命门火衰,肾阳亏虚;同时雌激素有促进乳腺发育的作用,依据中医基础理论,可归属于“阳”的范畴;肾阳亏虚,由此往复,则形成正虚邪恋的状态。中药复方可从多靶点防治肿瘤发生与进展,且具有副作用小、提高机体免疫力等优势,逐渐被越来越多研究者关注^[13]。

本实验所用阳和化岩汤全方温肾助阳与活血祛瘀并用,补虚为本、祛邪为标,攻补兼施。其中鹿角霜性温,归肝肾经,温肾助阳以治其本,为君药。肉桂补火助阳,引火归元以阳中求阴;土贝母解毒散结;白芥子豁痰利气,散结通络,祛一切皮里膜外之痰;此三药共为臣药。炮姜守而不走,能燥脾胃寒湿,阳生阴长;麻黄可辛温走散,破癥坚积聚,使补而不滞且助阳气外达肌表;胡桃肉温补肺肾,此三药共为佐药。生甘草补益脾气,调和诸药为使药。现代药理研究证实,鹿角霜有类雄激素作用^[14],可抑制内源性雌激素的分泌,从而阻断乳腺癌进展;大剂量鹿角霜还能明显抑制小鼠乳腺癌的生长^[15];肉桂有效成分肉桂醛可通过抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路调节肿瘤细胞的增殖和凋亡^[16];土贝母有效成分三萜皂苷、香豆素类、紫草甙等,可抑制乳腺癌细胞增殖,阻滞细胞周期^[17];白芥子挥发油能够抑制H22荷瘤小鼠肿瘤细胞的生长^[18];胡桃肉中的胡桃醌抑制人乳腺癌MCF-7细胞增殖作用^[19]。本课题组前期研究显示,阳和化岩汤可明显降低大鼠乳腺癌的发生率^[20],从细胞增殖、凋亡及

肿瘤血管生成等方面抑制乳腺癌发生、发展^[21-24]。但目前关于阳和化岩汤防治乳腺癌TAM耐药的疗效尚未明确,故本研究通过建立肾虚型TAM耐药型乳腺癌荷瘤小鼠模型,探讨阳和化岩汤对乳腺癌荷瘤小鼠的抑瘤作用及机制,为阳和化岩汤治疗乳腺癌提供实验依据。

PI3K/Akt/mTOR信号传导通路是生长因子受体信号的关键调节因子,在细胞代谢、生长和存活及血管形成的调节中发挥着重要作用^[25],抑制细胞凋亡、促进细胞生长、调节细胞周期、促进肿瘤血管生成以及侵袭与转移。乳腺癌细胞PI3K/Akt活性的增强与内分泌耐药密切相关^[26]。研究发现加用PI3K抑制剂LY294002后,内分泌耐药ER阳性乳腺癌中Akt蛋白水平下调,同时总雌激素受体 α (ER α)和磷酸化ER α 特异性位点[丝氨酸(Ser)167位]蛋白质下调^[27]。另有研究表明ER α 与PI3K亚基结合后激活PI3K/Akt2,活化的Akt2能够磷酸化ER α 的丝氨酸残基,因此存在着ER α /PI3K/Akt2/ER α 通路^[28]。mTOR是PI3K/Akt下游通路中的一个主要靶点,被Akt磷酸化而激活^[29],mTOR的表达上调,调控了肿瘤细胞的增殖、分化和转移,导致继发性内分泌耐药^[30]。依维莫司是特异性抑制mTOR的分子靶向药物,是唯一被美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于晚期激素受体阳性乳腺癌患者的药物。关于依维莫司的临床研究BOLERO-2试验均表明,依维莫司联合内分泌治疗可使耐药性ER阳性乳腺癌患者显著获益,故本研究以依维莫司作为阳性药^[31]。

本研究结果表明,阳和化岩汤组对乳腺癌荷瘤小鼠不同时期肿瘤体积和瘤质量均较模型组降低,抑瘤率较模型组增加。肿瘤组织病理学显示,阳和化岩汤组肿瘤细胞密度较模型组降低,可见明显肿瘤坏死灶,提示阳和化岩汤可针对乳腺癌内分泌治疗耐药发挥温肾助阳、活血化瘀功效,抑制TAM耐药型肿瘤的生长。本研究基于ER/PI3K/Akt/mTOR

交互信号通路,探讨阳和化岩汤对 TAM 乳腺癌荷瘤小鼠可能的抑瘤作用机制。通过免疫荧光法和 Real-time PCR 分别检测肿瘤组织中 PI3K, Akt, mTOR 及 ER 蛋白和 mRNA 表达情况,结果表明,阳和化岩汤组,依维莫司组和阳和化岩汤+依维莫司组 PI3K, Akt, mTOR mRNA 和蛋白表达均较模型组下降。此外,阳和化岩汤组、依维莫司组和阳和化岩汤+依维莫司组 ER mRNA 和蛋白表达均较空白组下降,阳和化岩汤+依维莫司组较模型组 ER mRNA 表达减少。提示阳和化岩汤可能通过抑制 ER/PI3K/Akt/mTOR 信号通路关键分子 mRNA 和蛋白表达,从而抑制 TAM 耐药型乳腺癌荷瘤小鼠肿瘤的生长。

综上所述,阳和化岩汤可以抑制 TAM 耐药型乳腺癌移植瘤的生长,可能是通过抑制 ER/PI3K/Akt/mTOR 信号通路实现,这提示,阳和化岩汤有逆转乳腺癌 TAM 耐药的作用,在 TAM 治疗期间,可视情况加用中药,以抵抗内分泌耐药,达到增效减毒的疗效。

[参考文献]

[1] MASOUD V, PAGES G. Targeted therapies in breast cancer: new challenges to fight against resistance[J]. World J Clin Oncol, 2017, 8(2):120-134.

[2] 车焕莉. 疏肝益肾方对 TAM 耐药乳腺癌 HER2-MAPK-ER α 通路的作用[D]. 北京:北京中医药大学,2014.

[3] 张成. 阳和化岩汤联合化疗治疗乳腺癌疗效及对细胞免疫和血清肿瘤标记物的影响[J]. 四川中医, 2018,36(5):161-163.

[4] 王楠,刘晓菲,张洋,等. 阳和化岩汤对 HER-2 高表达型乳腺癌细胞 PI3K/Akt 通路 HER-2, PI3K, p-Akt 表达的机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(5): 98-104.

[5] 刘晓菲,李静蔚,孙庆颖,等. 阳和化岩汤对 HER-2 高表达型裸鼠荷瘤模型微淋巴管生成及 PI3K/Akt 交互调控通路的影响[J]. 中医杂志, 2019, 60(1):51-56.

[6] 刘晓菲,李静蔚,时光喜,等. 温阳散结中药干预乳腺癌细胞 SK-BR-3 的生长抑制及诱导凋亡研究[J]. 中国医药导报, 2018, 15(2):13-18.

[7] 韦立群,李婉婷,李通,等. 金雀异黄酮对三阴乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡及 EGFR/PI3K/Akt 通路的影响[J]. 中国药理学通报, 2017, 33(10):1376-1381.

[8] COSTA R, HAN H S, GRADISHAR W J. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in triple-negative breast cancer: a review[J]. Breast Cancer Res Treat, 2018, 169(3):397-406.

[9] 鞠大宏,张春英,徐世杰,等. 温补肾阳方对去卵巢大鼠骨质疏松症的治疗作用[J]. 中国中医基础医学杂志, 2000, 6(4):29-32.

[10] 江一鸣,苏亮,徐钰,等. 西黄丸调节 MEKK1/SEK1 通路抑制小鼠乳腺癌生长机制研究[J]. 现代中药研究与实践, 2019, 33(1):24-29.

[11] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社,2006.

[12] 赵娜. 乳腺癌内分泌治疗期中医证型分布及证候特点研究[D]. 济南:山东中医药大学,2018.

[13] 舍雅莉,赵晓文,李俊杰,等. 敦煌平胃丸及其拆方对 SCG-7901 胃癌荷瘤小鼠的抑瘤作用及对 PI3K/Akt/mTOR 信号通路分子表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, doi:10. 13422/j. cnki. syfjx. 20202229.

[14] 张菁菁,蔡心银,张紫佳,等. 中药的雄激素样作用研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2019, 33(3): 77-80.

[15] 鲍悦,高久堂,孙佳明,等. 中药鹿角胶的研究进展[J]. 吉林中医药, 2016, 36(2):173-175, 204.

[16] 尹兴忠,赵冬梅,刘蕾,等. 肉桂醛对小鼠 U14 宫颈癌组织中 PI3K 表达的影响[J]. 中成药, 2017, 39(1): 188-191.

[17] 张成. 阳和化岩汤联合化疗治疗乳腺癌疗效及对细胞免疫和血清肿瘤标记物的影响[J]. 四川中医, 2018, 36(5):161-163.

[18] 吴圣曦,吴国欣,何珊,等. 白芥子挥发油对小鼠肝癌 H22 移植性肿瘤的抑制作用及其机制研究[J]. 中草药, 2013, 44(21):3024-3029.

[19] 辛国松. 基于线粒体损伤胡桃醌抗乳腺癌作用机制研究[J]. 哈尔滨商业大学学报:自然科学版, 2018, 34(5):516-521, 559.

[20] 李静蔚,陈翰翰,时光喜,等. 阳和化岩汤对乳腺癌模型大鼠 Fas, FasL 和 Bcl-2 表达的影响[J]. 山东中医杂志, 2016, 35(9):819-823.

[21] LI J, LIU X, CHEN H, et al. Multi-targeting chemoprevention of Chinese herb formula Yanghe Huayan decoction on experimentally induced mammary tumorigenesis[J]. BMC Complement Altern Med, 2019, 19(1):48-62.

[22] LIU X F, LI J W, CHEN H Z, et al. Yanghe Huayan decoction inhibits the capability of trans-endothelium and angiogenesis of HER $^{2+}$ breast cancer via pAkt signaling[J]. Biosci Rep, 2019, 39(2):1-9.

[23] 刘晓菲,李静蔚,李湘奇,等. 阳和化岩汤对 HER-2 高表达型裸鼠荷瘤模型肿瘤血管生成的影响及机制研究[J]. 中药材, 2018, 41(6):1467-1470.

[24] 张洋,刘晓菲,王楠,等. 阳和化岩汤联合曲妥珠对

- HER-2高表达型乳腺癌细胞PTEN-PI3K/Akt通路及VEGFC的影响研究[J]. 江苏中医药, 2018, 50(6): 79-82.
- [25] SARBASSOV D D, GUERTIN D A, ALI S M, et al. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex[J]. Science, 2005, 307(5712): 1098-1101.
- [26] TOKUNAGA E, KATAOKA A, KIMURA Y, et al. The association between Akt activation and resistance to hormone therapy in metastatic breast cancer[J]. Eur J Cancer, 2006, 42(5): 629-635.
- [27] GHAYAD S E, VENDRELL J A, LARBI S B, et al. Endocrine resistance associated with activated ErbB system in breast cancer cells is reversed by inhibiting MAPK or PI3K/Akt signaling pathways [J]. Int J Cancer, 2010, 126(2): 545-562.
- [28] SUN M, PACIGA J E, FELDMAN R I, et al. Phosphatidylinositol-3-OH Kinase (PI3K)/Akt, activated in breast cancer, regulates and is induced by estrogen receptor alpha (ERalpha) via interaction between ERalpha and PI3K [J]. Cancer Res, 2001, 61(16): 5985-5991.
- [29] GHAYAD S E, BIECHE I, VENDRELL J A, et al. mTOR inhibition reverses acquired endocrine therapy resistance of breast cancer cells at the cell proliferation and gene-expression levels[J]. Cancer Sci, 2008, 99(10): 1992-2003.
- [30] PROVENZANO A, KURIAN S, ABRAHAM J. Overcoming endocrine resistance in breast cancer: role of the PI3K and the mTOR pathways[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2013, 13(2): 143-147.
- [31] BASELGA J, CAMPONE M, PICCART M, et al. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer [J]. N Engl J Med, 2012, 366(6): 520-529.

[责任编辑 张丰丰]