

本文引用:李琳霏,杨晓,王容容,潘博,蒋益兰,柏正平.疏肝健脾解毒方对乳腺癌前病变肝郁证大鼠模型乳腺组织血管生成的影响[J].湖南中医药大学学报,2019,39(10):1195-1199.

疏肝健脾解毒方对乳腺癌前病变肝郁证大鼠模型 乳腺组织血管生成的影响

李琳霏^{1,2},杨晓¹,王容容²,潘博²,蒋益兰²,柏正平^{1,2*}

(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.湖南省中医药研究院附属医院,湖南长沙 410006)

[摘要] 目的 研究中药疏肝健脾解毒方对乳腺癌前病变肝郁证大鼠模型乳腺组织微血管密度(microvessel density, MVD)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及乳腺组织结构的影响,探讨其防治乳腺癌的作用机制。方法 采用二甲基苯蒽灌胃及夹尾法制备乳腺癌前病变肝郁证大鼠模型,随机分为模型组(蒸馏水)、中药组(疏肝健脾解毒方 10.35 g/kg)、三苯氧胺组(2.0 mg/kg),另取 10 只为空白对照组,分别相应干预 4 周后,制备乳腺组织石蜡切片进行病理学观察,采用免疫组织化学方法及 Western-blot 法检测各组大鼠乳腺组织中 MVD 及 VEGF 表达情况。结果 免疫组化结果显示,与模型组比较,中药组及三苯氧胺组乳腺组织非典型增生现象减少,乳腺组织 MVD 及 VEGF 水平降低,差异有统计学意义($P<0.05$),中药组 MVD 及 VEGF 水平稍低于三苯氧胺组,差异无统计学意义($P>0.05$);Western-blot 结果显示:与模型组比较,中药组及三苯氧胺组乳腺组织非典型增生现象减少,乳腺组织 MVD 及 VEGF 水平降低,差异有统计学意义($P<0.05$),中药组 MVD 及 VEGF 水平与三苯氧胺组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 中药疏肝健脾解毒方可在一定程度上降低乳腺癌前病变乳腺组织非典型增生倾向,其机制可能与降低 VEGF 水平、抑制新生血管生成有关。

[关键词] 乳腺癌;癌前病变;疏肝健脾解毒方;血管生成;血管内皮生长因子

[中图分类号] R285.5;R737.9

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.10.005

Effects of Shugan Jianpi Jiedu Formula on Angiogenesis of Breast Tissue in Breast Cancer Rat Model with Precancerous Lesion of Liver Qi Stagnation Syndrome

LI Linpei^{1,2}, YANG Xiao¹, WANG Rongrong², PAN Bo², JIANG Yilan², BAI Zhengping^{1,2*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China)

[Abstract] **Objective** To study on effects of Shugan Jianpi Jiedu Formula on microvessel density (MVD), vascular endothelial growth factor (VEGF) and breast tissue structure in breast cancer rat model with precancerous lesion of liver Qi stagnation syndrome, so as to explore its mechanism in prevention and treatment of breast cancer. **Methods** The breast cancer rat model with precancerous lesion of liver Qi stagnation syndrome was prepared by intragastric administration of dimethyl benzantracene and tail clamping method. The rats were randomly divided into a model group (distilled water), a Chinese materia medica group (Shugan Jianpi Jiedu Formula 10.35 g/kg), a tamoxifen group (2.0 mg/kg) and a blank control group ($n=10$). Paraffin sections of breast tissue were prepared for pathological observation. MVD and VEGF expressions in breast tissue of rats were detected by immunohistochemical method and Western-blot. **Results** Immunohistochemical results showed that compared with the model group, atypical hyperplasia of breast tissue in the Chinese materia medica group and the

[收稿日期] 2018-10-09

[基金项目] 湖南省自然科学基金项目(2016JJ6082);湖南省中医药管理局重点项目(201634)。

[作者简介] 李琳霏,女,硕士,主治医师,研究方向:肿瘤病中西医结合临床与实验研究。

[通讯作者] * 柏正平,男,主任医师,博士研究生导师,E-mail:Bzp121@163.com。

tamoxifen group was decreased, breast tissue MVD and VEGF levels were decreased, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The MVD and VEGF levels in the Chinese materia medica group were slightly lower than those in the tamoxifen group, and there was no statistical significance in the difference ($P > 0.05$). Western-blot results showed that compared with the model group, atypical hyperplasia of breast tissue in the Chinese materia medica group and the tamoxifen group was decreased, breast tissue MVD and VEGF levels were decreased, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The differences of MVD and VEGF levels between the Chinese materia medica group and the tamoxifen group were not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion** Shugan Jianpi Jiedu Formula can decrease atypical hyperplasia tendency in breast tissue for precancerous lesions of breast cancer to a certain extent, and the mechanism may be related to the decrease of VEGF level, and the inhibition of angiogenesis.

[**Keywords**] Shugan Jianpi Jiedu Formula; breast cancer; precancerous lesion; angiogenesis; vascular endothelial growth

乳腺癌已成为女性发病率最高的恶性肿瘤之一^[1],该病发病率和死亡率每年都在不断上升^[2]。对癌前病变进行早期干预治疗,可有效降低乳腺癌的发生。我院肿瘤科经过多年实验研究与临床实践,研制出“疏肝健脾解毒方”用于防治乳腺癌及乳腺癌癌前病变,并在临床应用中取得一定疗效。本研究该方对乳腺癌癌前病变肝郁证大鼠模型乳腺组织中微血管密度(microvessel density, MVD)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及乳腺组织结构的影响,进一步探索中药复方防治乳腺癌的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SPF级SD雌性大鼠41只,体质量(200±20)g,购自长沙斯莱科景达实验动物有限公司,动物许可证号:SCXK(湘)2017-0013,在SPF级实验动物房饲养适应1周后开始动物实验。

1.1.2 药物及试剂 疏肝健脾解毒方药物组成:郁金10g,柴胡10g,茯苓10g,白术10g,白花蛇舌草30g,半枝莲30g,蒲公英30g,饮片由湖南省中医药研究院附属医院中药房提供。阳性对照药:三苯氧胺(枸橼酸他莫昔芬片),规格:10mg/片,江苏扬子江药业集团有限公司。二甲基苯蒽(DMBA,美国Sigma公司,批号:35605-5G-F);ABC免疫组化试剂盒(武汉博士德,批号:SA1022);APS(批号:ST005)、TEMED(批号:ST728)均为上海碧云天;兔抗鼠VEGF抗体(批号:ab68334)、CD34抗体(批号:ab185732)均为英国Abcam;水合氯醛(上海展云化工有限公司,批号:302-17-0)。

1.1.3 主要仪器 石蜡切片机(杭州艾普仪器公司);倒置生物显微镜CKX41SF型(日本Olympus);XFS-280型压力蒸气灭菌锅(浙江新丰医疗器械公司)。

1.2 方法

1.2.1 药物制备 先将疏肝健脾解毒方饮片粉碎成粗颗粒,用8倍量温水浸泡30min,大火加热,水沸腾后继续小火加热30min,滤过。药渣再加6倍量水煎煮2次,每次30min,过滤。将3次水煎液混合均匀,过滤,减压浓缩为浓度为1g/mL的溶液保存于4℃;三苯氧胺用生理盐水溶解成0.2mg/mL的溶液备用;二甲基苯蒽按50g:500mL溶于芝麻油中备用。

1.2.2 造模及分组 将SD大鼠随机选取10只为空白对照组,实验第1天所有大鼠先用芝麻油2mL灌胃1次后自然饲养。乳腺癌癌前病变肝郁证模型制备参考文献[3]。模型大鼠实验第1天用溶解有二甲基苯蒽的芝麻油(10mg/mL),按10mg/kg给大鼠一次性灌胃处理。第4周开始,限制大鼠活动范围,用钳头缠有纱布的止血钳夹大鼠的尾巴,使其互相追咬、尖叫、保持激怒状态,每天夹尾激惹时间为45min,持续4周。4周后随机选取造模大鼠1只,切取乳腺组织,制备石蜡切片,HE染色,显微镜下观察腺泡细胞排列紊乱、核浆比增大、核异形性改变等不典型增生改变或显示腺泡或导管上皮增多等增生活跃改变,提示乳腺癌癌前病变模型造模成功。模型大鼠按随机数字表法随机分为3组,分别为模型组、中药组(疏肝健脾解毒方组)、三苯氧胺组,每组10只。干预如下,空白对照组:自然饲养,不做处理;模型组:蒸馏水灌胃10mL/kg,每天1次;中药组:疏肝健脾解毒方煎液灌胃,10.35g/kg,每天1次;三苯氧胺组:三苯氧胺生理盐水溶液2mg灌胃,每天1次。各组大鼠均连续灌胃4周。各组干预剂量均为临床等效剂量。

1.2.3 乳腺组织病理学观察 各组大鼠均切取第3对乳腺,用4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片,HE染色。利用光学显微镜观察各组大鼠乳腺组织结构。

1.2.4 免疫组化 IHC 法检测乳腺组织 MVD 最后一次灌胃后 2 h,处死大鼠,切除大鼠第 2 对乳房,取乳腺组织石蜡包埋后制成 4 μm 厚的石蜡切片,常规脱蜡水化,加兔抗鼠 CD34、VEGF 的单克隆抗体,使用免疫组织化学通用型试剂盒,DAB 显色,苏木精复染,常规脱水,中性树胶封片。根据 CD34 表达情况,计算 MVD,计算方法:光镜下 CD34 免疫组化染色呈棕黄色、淡黄色或棕褐色。将 CD34 染色阳性的切片,在低倍镜($\times 100$)下确定 3 个血管最密集部分,再在高倍镜($\times 200$)下计数每个密集区中 1 个视野的微血管数,以 3 个区域微血管数的平均数作为 MVD,并在高倍镜($\times 400$)下拍照。

1.2.5 乳腺组织 VEGF 蛋白表达检测 各组大鼠取 0.1 g 乳腺组织,用 PBS 洗涤 1 次后加入 200 μL RIPA 蛋白裂解液,提取细胞总蛋白,苯二甲基氯化铵(BCA)蛋白浓度测定法进行蛋白定量,聚丙烯酰胺电泳按分子量大小分离蛋白,再将蛋白转移到杂交膜上,加入 5 mL 封闭液,封闭 60 min 后,加入 VEGF 一抗(稀释比例 1:5 000),放入摇床,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,用 TBST 洗涤蛋白条带 3 次后用稀释后的二抗(稀释比例 1:5 000)与膜共同孵育 45~60 min。再用 TBST 洗涤 3 次,加入化学发光试剂后曝光显影,扫描底片,采用 Image J 软件进行蛋白条带灰度分析,目的蛋白与内参蛋白灰度比值为蛋白相对含量。

1.2.6 统计学分析 实验数据采用 SPSS 20.0 统计分析软件进行统计分析。计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,数据符合正态分布及方差齐性时,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,多重比较采用 LSD 法;数据不符合正态分布或方差不齐时,则采用非参数检验中多个独立样本 Kruskal-Wallis H 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

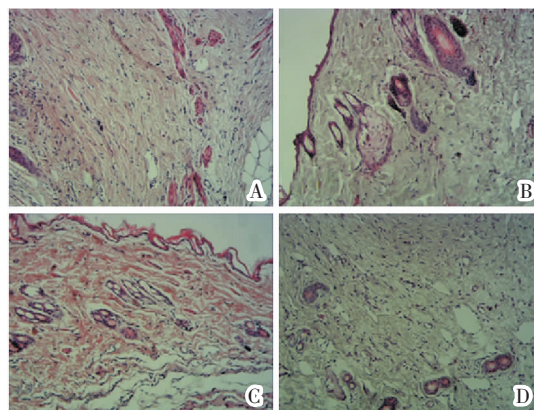
2 结果

用药过程中,模型组大鼠死亡 2 只,三苯氧胺组死亡 1 只,中药组死亡 0 只。经解剖,大鼠死亡原因为肝腹水,肝细胞坏死。

2.1 疏肝健脾解毒方对乳腺癌前病变肝郁证大鼠模型乳腺组织结构的影响

与空白组比较,模型组乳腺导管高度扩张,上皮层增多,细胞间推挤及重叠现象等乳腺非典型增生

现象明显,三苯氧胺组及中药组乳腺组织非典型增生现象较模型组少。见图 1。



注:A.空白对照组;B.模型组;C.三苯氧胺组;D.中药组

图 1 疏肝健脾解毒方对乳腺癌前病变肝郁证大鼠模型乳腺组织结构影响的光镜图(HE, $\times 400$)

2.2 疏肝健脾解毒方对乳腺癌前病变肝郁证大鼠模型乳腺组织 MVD、VEGF 的影响

与空白对照组比较,模型组瘤体组织可见数量较多微血管,模型组 MVD 较高,差异有统计学意义($P<0.05$),三苯氧胺组及中药组 MVD 略低于空白对照组,但差异无统计学意义($P>0.05$);与模型组比较,三苯氧胺组及中药组 MVD 水平降低,差异均有显著统计学意义($P<0.01$);中药组 MVD 水平低于三苯氧胺组,二者差异无统计学意义($P>0.05$);与空白对照组比较,模型组 VEGF 较高,差异有统计学意义($P<0.05$),而三苯氧胺组及中药组 VEGF 水平与空白对照组间差异无统计学意义($P>0.05$);与模型组比较,三苯氧胺组及中药组 VEGF 水平降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);中药组 VEGF 水平稍低于三苯氧胺组,但差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1 及图 2-3。

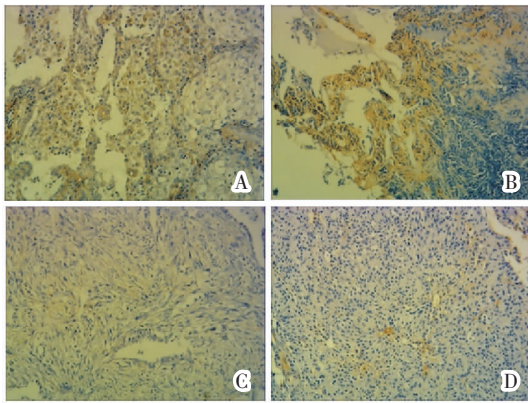
表 1 疏肝健脾解毒方对乳腺癌前病变肝郁证大鼠模型乳腺组织 MVD、VEGF 的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	MVD	VEGF/($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
空白对照组	10	0.313 \pm 0.025	0.345 \pm 0.069
模型组	8	0.476 \pm 0.038	0.442 \pm 0.019*
三苯氧胺组	9	0.310 \pm 0.021 $\Delta\Delta$ *	0.323 \pm 0.027 Δ
中药组	10	0.295 \pm 0.023 $\Delta\Delta$ *	0.318 \pm 0.030 Δ

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$

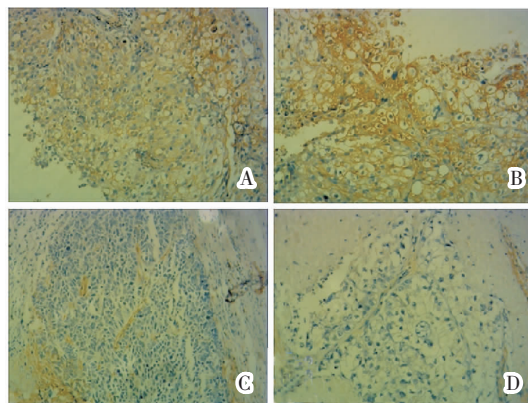
2.3 疏肝健脾解毒方对乳腺癌前病变肝郁证大鼠模型乳腺组织 VEGF 蛋白表达的影响

与空白对照组比较,模型组 VEGF 较高,差异有



注:A.空白对照组;B.模型组;C.三苯氧胺组;D.中药组

图2 疏肝健脾解毒方对乳腺癌前病变肝郁证大鼠模型乳腺组织 CD34 影响的光镜图(HE,×400)



注:A.空白对照组;B.模型组;C.三苯氧胺组;D.中药组

图3 疏肝健脾解毒方对乳腺癌前病变肝郁证大鼠模型乳腺组织 VEGF 影响的光镜图(HE,×400)

统计学意义($P<0.05$),而三苯氧胺组及中药组 VEGF 水平与空白对照组间差异无统计学意义($P>0.05$);与模型组比较,三苯氧胺组及中药组 VEGF 水平降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);中药组 VEGF 水平与三苯氧胺组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2 及图 4。

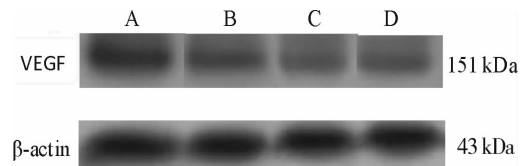
表 2 疏肝健脾解毒方对乳腺癌前病变肝郁证大鼠模型乳腺组织 VEGF 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	VEGF/(pg·mL ⁻¹)
空白对照组	10	0.900±0.011
模型组	8	1.208±0.013*
三苯氧胺组	9	0.913±0.020 [△]
中药组	10	0.955±0.017 [△]

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$

3 讨论

乳腺癌前病变与血管生成紧密相关。血管生



注:A.空白对照组;B.模型组;C.三苯氧胺组;D.中药组

图4 各组小鼠乳腺组织中 VEGF 蛋白表达电泳图

成与乳腺良性疾病恶变,肿瘤的发生、发展、转移和预后均有密切的关系。血管内皮细胞的增殖、侵袭、迁移和分化都受到 VEGF mRNA 的调控。VEGF 家族被认为是肿瘤发生的主要参与者^[4],也是最重要的血管形成促进因子^[5]。VEGF 是一种高度特异的内皮细胞有丝分裂素,它可以选择性促进内皮细胞进行有丝分裂,刺激内皮细胞增殖,促进血管生成,由其主导的信号通路参与到血管新生整个过程,发挥着不可替代的作用^[6]。

许多中草药已通过实验研究等被证明能够抑制肿瘤血管生成。如西黄丸有抗乳腺增生,逆转乳腺癌前病变的作用,其机制可能是通过抑制血管生成及其趋化因子受体表达来实现的^[7-8]。多项研究均证实人参皂苷 Rg₃ 具有诱导肿瘤细胞凋亡的作用^[9],同时能减少新生毛细血管生成,抑制肿瘤血管内皮细胞增殖,进而抑制肿瘤的复发和转移^[10-11]。

乳腺癌前病变从中医学来说,属于“乳癖”范畴^[12]。龚居中的《外科活人定本》中首次提出“乳癖”,“此症生于正乳之上,乃厥阴、阳明经之所属……何谓之癖,硬而不痛,如顽核之类,过久则成毒”,指出该病有可能恶变。多项研究都认为乳腺癌的发病多与情志相关。乳腺癌前病变阶段的基本病机变化在于肝郁气滞,中医辨证证候分布与癌前病变临床进程相参照,肝郁气滞证的症状在乳腺非典型性导管上皮增生、非典型小叶增生、硬化性腺病等多种乳腺癌前病变中体现。因此,我们认为肝郁脾虚、瘀毒内结是引起乳腺癌前病变的重要病机之一,即着重从“瘀、毒、虚”着手^[13]。而肝郁证是乳腺癌前病变中医病证结合造模的理想切入点。“疏肝健脾解毒方”为我院肿瘤科防治乳腺癌及乳腺癌前病变的核心经验方,白术、茯苓、郁金、柴胡健脾疏肝、行气解郁;蒲公英、白花蛇舌草、半枝莲清热解毒、消肿散结,该方扶正抗癌,标本同治。前期研究^[14-15]证实疏肝健脾解毒方对人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖有一定的抑制作用,可能通过诱导细胞凋亡实现,且可有效

降低乳腺癌前病变肝郁证大鼠模型血清中性激素水平。

本研究通过二甲基苯蒽灌胃联合夹尾法制备乳腺癌前病变肝郁证大鼠模型,为今后乳腺癌前病变的研究打下了坚实的基础。该方法制备的大鼠模型,神经内分泌学的改变和一般行为状况的改变符合中医学对肝郁证的认识。相关文献^[3]亦有报道利用这种方法构建乳腺癌前病变模型,造模后第 8 周即出现组织形态学的变化,乳腺癌前病变形成时间较传统雌激素造模方法提前。另外,此模型可以模拟乳腺癌前病变临床特点,符合中医学肝郁证辨证要求,为乳腺癌前病变的中西医结合临床与实验研究提供了有力的支持。

本研究通过实验研究验证疏肝健脾解毒方对乳腺癌前病变肝郁证大鼠模型乳腺组织结构及微血管 MVD、VEGF 的影响。免疫组化及 Western-blot 结果显示,与模型组比较,中药组及三苯氧胺组乳腺组织非典型增生现象减少,乳腺组织 MVD 及 VEGF 水平下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),疏肝健脾解毒方组 MVD 及 VEGF 水平略低于三苯氧胺组,差异无统计学意义($P > 0.05$)。表明该方可有效改善乳腺癌前病变肝郁证大鼠模型乳腺组织结构改变,降低乳腺组织 MVD 及 VEGF 水平。提示中药疏肝健脾解毒方可在一定程度上降低乳腺癌前病变乳腺组织非典型增生倾向,其机制可能与降低 VEGF 水平、抑制新生血管生成有关。

参考文献

- [1] 索龙格,杨顺娥.双侧原发性乳腺癌发病的临床相关性因素分析[J].实用癌症杂志,2017,32(6):916-919.
- [2] 李华艳.加减逍遥散联合姑息性化疗治疗中晚期乳腺癌患者临床

疗效观察[J].当代医学,2017,23(15):122-124.

- [3] 宋爱莉,梁 栋,殷玉琨,等.大鼠乳腺癌前病变肝郁证造模的研究[J].中华中医药学刊,2010,28(1):5-7.
- [4] 赵 川,李俊萱,刘雪梅,等.肿瘤血管生成机制的研究进展[J].中华中医药学刊,2017,35(1):130-132.
- [5] LIANG J, WANG H, XIAO H. Relationship and Prognostic Significance of SPARC and VEGF Protein Expression in Colon Cancer [J]. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2010,29(1):1-11.
- [6] 向本旭,刘婷婷,孙芳玲,等.VEGF 相关信号通路在血管新生中的研究进展[J].中国比较医学杂志,2015,25(12):81-86.
- [7] 邓卫芳,裴晓华.乳腺癌前病变“毒瘀互结”模型大鼠生物表征变化及化瘀解毒法的调控[J].中华中医药杂志,2013,28(5):1508-1512.
- [8] 马 杰,王一尧,杨 伟,等.西黄丸抗肿瘤作用及其免疫清除功能的实验研究[J].中医中药杂志,2014,39(8):1499-1501.
- [9] 马 莉,李小静,宁金龙.人参皂苷 Rg3 抗肿瘤作用与病理性瘢痕关系研究进展[J].中国美容医学,2013,22(20):2077-2079.
- [10] GUO J V Q, ZHENG Q H, CHEN H, et al. Ginsenoside Rg3 inhibition of vasculogenic mimicry in pancreatic cancer through downregulation of V Ecadherin / EphA2 / MMP9 / MMP2 expression[J]. International Journal of Oncology, 2014,45(3):1065-1072.
- [11] 江 昌,缪雨青,周文丽,等.人参皂苷 Rg3 的抗肿瘤作用及研究进展[J].临床肿瘤学杂志,2017,22(7):664-667.
- [12] 张文娟,李 澜,贾 波.从温阳论治乳腺癌[J].亚太传统医药,2017,13(8):89-90.
- [13] 李琳霏,潘 博,杜小艳,等.潘敏求教授从“瘀、毒、虚”论治乳腺癌经验[J].湖南中医药大学学报,2017,36(4):38-40.
- [14] 李琳霏,杨 晓,潘 博,等.疏肝健脾解毒方对人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖及凋亡的影响[J].湖南中医药大学学报,2018,38(6):645-649.
- [15] 李琳霏,杨 晓,潘 博,等.疏肝健脾解毒方对乳腺癌前病变肝郁证模型大鼠血清性激素水平的影响[J].湖南中医药大学学报,2017,37(11):1200-1203.

(本文编辑 杨 瑛)