

内啡肽的水平；茺菀水提物、醇提物皆有不同程度降血糖作用，升高进食后胰岛素水平；川芎可抗血小板聚集、扩张小动脉、改善微循环；桃仁中含苦杏仁苷及挥发油，对子宫平滑肌有兴奋作用，可使其收缩力加强，二者调节卵巢酶系统作用于卵巢包膜，通过活血化瘀作用，使增大的卵巢恢复正常，还有降低血脂作用；赤芍能扩张冠状动脉、增加冠脉血流量；赤芍与甘草配伍应用，可使 SHBG 合成增加，使游离睾酮减少，致血睾酮活性降低。补肾中药被认为具有类激素样作用，可对女性性腺轴双向调节；补肾基础上加活血药物又能改善卵巢局部的血液循环，增加卵巢血流量，从而促进卵泡发育、诱发排卵及促黄体形成。本研究结果显示，补肾化痰方能使 PCOS 大鼠 T、LH、INS 明显下降，SHBG 升高，与前研究一致，且该方可以使 PCOS 大鼠的卵巢黄体组织数量增加，卵巢颗粒细胞层增厚，卵泡膜细胞变薄，减少囊状卵泡量，改善 PCOS 大鼠的卵巢形态学异常，从而调整其激素水平^[6]。本研究提示补肾化痰方对 PCOS 伴 IR 有一定的治疗作用，为补肾祛瘀方治疗 PCOS 伴 IR 提供一定的科学依据，但其确切的机理仍待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 彭敏, 郑少珍, 陈燕桢. 妈富隆联合罗格列酮治疗多囊卵巢综合征伴不孕的临床疗效观察[J]. 中国实用医刊, 2012, 39(12): 24-26.
- [2] 马晓玲. 补肾化痰调周法治疗高原地区多囊卵巢综合征 120 例疗效观察[J]. 中国药房, 2010, 24(3): 12-14.
- [3] Diamanti-Kandarakis E, Xyrafis X, Boutzios G, et al. Pancreatic beta cells dysfunction in polycystic ovary syndrome [J]. Panminerva Med, 2008, 50(4): 315-325.
- [4] Christopoulos P, Mastorakos G, Gazouli M, et al. Genetic variants in TCF7L2 and KCNJ11 genes in a Greek population with polycystic ovary Syndrome [J]. GynecolEndocrinol, 2008, 24(9): 486-490.
- [5] 杨正望, 张曾玲, 文炯. 补肾化痰方对 PCOS 大鼠卵巢颗粒细胞 FSHR、LHR 蛋白表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2009, 29(2): 17-19.

(责任编辑: 骆欢欢)

槐耳颗粒对乳腺癌动物模型 Ki67、p53、CerbB-2 蛋白表达的影响

周大为

杭州市中医院病理科, 浙江 杭州 310007

[摘要] 目的: 探讨槐耳颗粒对乳腺癌动物模型 Ki67、p53、CerbB-2 蛋白表达的影响。方法: 通过接种 MCF-7、ER⁺PR⁺乳腺癌细胞系构建乳腺癌裸鼠模型 40 只, 随机分为空白对照组 (安慰剂, 10 只)、槐耳颗粒组 (30 只), 肿瘤 0.5~1.0 cm 后开始给药, 均干预 21 天, 用药期间间隔 2 天测量肿瘤体积 1 次。处死裸鼠通过免疫组化方法测定 Ki67、p53、CerbB-2 等蛋白表达。结果: 槐耳颗粒组给药 7 天、14 天、21 天 PR、Ki67、p53、CerbB-2 蛋白表达明显低于空白对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 槐耳颗粒能明显降低 Ki67、p53、CerbB-2 蛋白表达, 对乳腺癌肿瘤生长有一定的抑制作用。

[关键词] 乳腺癌; 槐耳颗粒; 动物模型; 蛋白表达

[中图分类号] R737.9 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415(2015)12-0224-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.12.101

研究证明, Ki67、p53、CerbB-2 蛋白参与肿瘤生长、增殖、分化、转移, 为此可将上述蛋白表达作为乳腺癌发生、发展评估的重要指标^[1]。槐耳颗粒从槐耳菌质中提取, 不仅可直接抗肿瘤, 而且能增强机体免疫能力。目前, 临床关于 Ki67

等蛋白在恶性肿瘤中表达、槐耳颗粒治疗乳腺癌效果研究较多, 但关于槐耳颗粒对乳腺癌 Ki67、p53、CerbB-2 等蛋白表达影响研究甚少。基于此, 本研究通过动物模型对照实验分析槐耳颗粒对 Ki67、p53、CerbB-2 蛋白表达的影响, 以为槐耳

[收稿日期] 2015-08-12

[作者简介] 周大为 (1973-), 男, 主管技师, 研究方向: 病理学。

颗粒治疗乳腺癌提供依据, 结果报道如下。

1 材料与试剂

1.1 实验动物及细胞株 取 40 只健康雌性裸鼠(中国科学院上海实验动物中心提供), 日龄 20~28 天, 平均(25.5±1.5)天; 体重 10~15 g, 平均(12.5±1.0)g。雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)、MCF-7 人乳腺癌细胞(上海生博生物医药科技有限公司提供)。

1.2 药物及试剂 鼠抗人一抗、二抗由北京中杉生物技术开发公司提供; p53、Ki-67、CerbB-2 等蛋白免疫组化检测试剂盒; 槐耳颗粒由启东盖天力药业有限公司生产提供。

2 方法

2.1 细菌培养 MCF-7、ER⁺、PR⁺ 细胞培养环境: 10% FCS-RPMI-1640 培养液, 温度维持 37℃, 二氧化碳浓度 5%, 湿度处于饱和状态。

2.2 动物模型建立 40 只雌性裸鼠 SPF 环境下饲养, 弱酸饮用水消毒灭菌后使用, 单独分笼喂养, 每天紫外线照射 4 h, 同时不限制自然光照射。保持裸鼠生活温度 23~28℃, 湿度 40%~60%, 饮用水 2 天更换 1 次, 垫料 7 天更换 1 次。

培养细胞处理。生长期细胞胰酶消化停止后 4℃ 环境下离心, 转速 1000 r/min, 8 min 左右, 去上清后 RPMI-1640 培养液离心, 温度、转速、时间同上, 洗涤 2 次后于一定量 PBS 中重新悬浮, 保持细胞密度 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ /mL, 冰盒中保存备用。裸鼠喂养 7 天后随机分组行 MCF-7、ER⁺/PR⁺ 细胞接种, 完成后继续喂养一段时间, 这个过程中密切观察裸鼠饮食、排便、精神等情况。10 天后裸鼠体内肿瘤结节开始形成, 肿瘤形成率 100%, 均纳入实验。

2.3 实验动物分组 随机分为 2 组: 空白对照组(安慰剂)10 只, 槐耳颗粒组 30 只, 肿瘤直径 0.5~1.0 cm 后开始给药, 20 g 槐耳颗粒(主要成分为槐耳菌质)灌胃, 根据裸鼠体重变化适当调整用药剂量。用药期间对饮食、饮水不限制, 同时加强营养, 饮用水、垫料每天更换。定期测定观察裸鼠肿块体积情况。用药 21 天后处死裸鼠, 将瘤块快速取出, 甲醛中固定, 行免疫组化测定。

3 观察指标与统计学方法

3.1 观察指标 观察记录裸鼠应用槐耳颗粒后不同时间点 ER、PR、Ki67、p53、CerbB-2 蛋白表达情况, 根据着色程度、阳性细胞比例评价免疫组化结果, 着色程度分为 0 分、1 分、2 分、3 分, 分别对应无色、浅黄色、棕黄色、棕褐色; 阳性细胞比例为 <10%、11%~25%、26%~50%、51%~75%、>75%, 对应 0 分、1 分、2 分、3 分、4 分, 两种评分相乘判断: 阴性 -0 分(-), 弱阳性 -1~4 分(+), 中度阳性 -5~8 分(++), 强阳性 -9~12 分(+++ 或 +++)。

3.2 统计学方法 运用 SPSS 19.0 统计软件分析数据, 计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 *t* 检验。

4 结果

4.1 槐耳颗粒干预前后免疫组化指标变化 见表 1。槐耳颗粒组用药不同时间点 ER 表达与空白对照组比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。槐耳颗粒组用药不同时间点 PR、Ki67、p53、CerbB-2 蛋白表达较空白对照组降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 槐耳颗粒干预前后免疫组化指标比较

组别	n	用药时间	ER ⁺	PR ⁺	Ki67	p53	CerbB-2
空白对照组	10		++++	++++	++++	+++	+++
		7 d	++++	+++ ^①	++ ^①	+ ^①	+ ^①
槐耳颗粒组	30	14 d	++++	++ ^①	+ ^①	+ ^①	+ ^①
		21 d	++++	++ ^①	+ ^①	+ ^①	+ ^①

与对照组比较, ① $P < 0.05$

4.2 槐耳颗粒干预后瘤体病理变化情况 见图 1~3。槐耳颗粒干预 7 天、14 天、21 天瘤体中心变化情况。

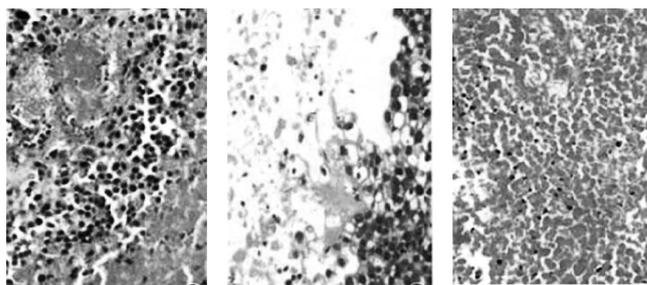


图 1 干预 7 天情况

图 2 干预 14 天情况

图 3 干预 21 天情况

5 讨论

有调查显示, 我国 2003—2009 年城市乳腺癌死亡率增加约 39%, 是导致女性死亡的高危因素之一。目前, 临床治疗乳腺癌方法较多, 包括手术、放化疗、中医药等, 但整体上来说乳腺癌术后 5 年复发转移率高, 尤其是术后 2 年, 远处脏器转移占早期复发转移的 50%~70%^[2], 预后差。为此选择一种有效方案降低乳腺癌复发转移率至关重要。

中医学认为, 乳腺癌属乳癖、乳岩等范畴, 与肝、脾、胃密切相关, 较多医书中提到乳腺癌发生其内因在于正气不足, 其外因与外邪入侵、情志不舒致使气血瘀滞、脾胃失和有关。相关报道称, 中医药可能是通过对癌细胞生长抑制、阻止诱变物和靶分子结合等对乳腺癌作用^[3]。槐耳颗粒主要成分为槐耳菌质(成分单一), 槐耳味苦, 辛且平, 归肝、脾经, 具有止血、抗癌功效。动物实验表明, 槐耳成分中药能明显延长肿瘤小鼠生命期限, 抗肿瘤作用较强。现代药理学研究表明, 槐耳能增强巨噬细胞吞噬能力, 提高机体免疫能力, 同时槐耳对血管内皮细胞增殖、迁移有一定的影响, 通过提高溶菌酶活性、增强巨噬细胞功能等以抑制肿瘤细胞株生长^[4]。关若丹等^[5]通过对对照实验表明槐耳颗粒在延长早期乳腺癌患者生存期、降低

其复发转移率有一定的优势。关于槐耳颗粒与乳腺癌研究着重于观察患者复发率及生存时间，而关于槐耳颗粒对乳腺癌肿瘤生长抑制作用机制研究相对少。近年来肿瘤标志物、相关蛋白表达在肿瘤疾病发生、发展、预后评估中起重要作用，如 p53、Ki67、CerbB-2 等，其中 p53 为抗癌基因，野生型 P53 基因对癌细胞生长、分裂及其他癌基因活性有抑制作用。Ki67 属于一种抗原，于增殖细胞核基质中存在，对肿瘤细胞增殖活性直接反映，且敏感性高，同时可有效反映增殖细胞数目，临床常用于肿瘤细胞增殖速度测定^[6]。CerbB-2 是存在于 17q21 区带上的一种酪氨酸蛋白，密切参与细胞生长，对细胞增殖、分化可有效反映^[7-8]。为此通过实验分析槐耳颗粒对乳腺癌细胞 p53、Ki67、CerbB-2 等蛋白表达的影响，了解槐耳颗粒作用机制，对乳腺癌诊治、预后评估有十分重要的意义。

本研究结果显示，槐耳颗粒组用药后不同时间点 Ki67、p53、CerbB-2 蛋白表达较空白对照组明显降低，差异有统计学意义($P < 0.05$)，提示槐耳颗粒对 Ki67、p53、CerbB-2 蛋白表达有明显抑制作用，具体来说，上述蛋白能抑制乳腺癌细胞生长、增殖，且有时间依赖性。临床常认为，药物抗肿瘤作用发育与抗孕激素密切相关，如米非司酮，本研究结果显示，槐耳颗粒组用药后不同时间点 PR 较空白对照组降低($P < 0.05$)，这可能与槐耳颗粒对孕激素受体阳性敏感性更高有关，因此用药期间阳性细胞被杀伤，用药后 PR 阳性率下降。

综上所述，槐耳颗粒可显著降低乳腺癌裸鼠模型 Ki67、p53、CerbB-2 蛋白表达，抑制乳腺癌肿瘤生长、增殖，这可能是槐耳颗粒对乳腺癌发挥疗效的作用机制，临床值得进一步研究。

[参考文献]

[1] 郭阿垚, 于鹏飞, 姚凡, 等. 新辅助化疗对乳腺癌 ER、PR、C-erbB2、p53 和 Ki67 表达的影响[J]. 中国医科大学学报, 2010, 39(12): 1051-1054.

[2] Mansell J, Monypenny LJ, Skene Aim, et al. Patterns and predictors of early recurrence in postmenopausal women with estrogen receptor-positive early breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2009, 117 (1): 91-98.

[3] 周平, 雷秋模, 曹亚丽, 等. 槐耳颗粒治疗老年乳腺癌的临床疗效[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(18): 3892-3893.

[4] 季春宜. 槐耳颗粒抗肿瘤机制及在乳腺癌治疗中的作用研究进展[J]. 医学临床研究, 2012, 29(7): 1404-1406.

[5] 关若丹, 郑远, 陈前军, 等. 槐耳颗粒防治可手术乳腺癌短期复发转移的回顾性队列研究[J]. 广东医学, 2011, 32(11): 1490-1492.

[6] 张视敏, 苗文红, 王华, 等. 复方霜蛎消结剂对小鼠乳腺癌的抑瘤作用及相关实验研究[J]. 现代检验医学杂志, 2010, 25(4): 81-83, 85.

[7] 徐峰, 唐中华. 金克槐耳对新辅助化疗乳腺癌患者细胞免疫功能的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2009, 18(5): 524-526.

[8] 陈焕清, 符少萍, 缪瑞明, 等. 新辅助化疗对乳腺癌 CerbB-2、P53、Ki67 和 Ca15-3 表达的影响及意义[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2011, 5(18): 5470-5472.

(责任编辑: 刘淑婷)

· 书讯 · 《血液科专病中医临床诊治》由人民卫生出版社出版。本书立足中医临床，侧重治疗，突出实用，对血液专科部分疾病的中医临床诊断治疗的经验及其研究成果进行认真总结，以现代医学病名为纲，收载临床常见、具有中医药优势、疗效较好的血液及造血系统疾病，如缺血性贫血、溶血性贫血、巨幼细胞性贫血、再生障碍性贫血、急性白血病、慢性白血病等共计 13 种，每个疾病分概述、病因病机、临床表现、实验室和其他辅助检查、诊断要点、鉴别诊断、治疗、难点与对策、经验与体会、现代研究、评述等内容介绍。本书特点之一为立足中医临床，侧重对治疗方法和经验的全面深入总结，即在明确西医诊断基础上介绍确实有效的中医、中西医结合及西医的综合治疗方法和经验，既突出中医药特色与优势，又不回避中西医结合及西医的长处，比较客观地反映了当前血液专科的中医临床实际，且内容丰富，临证治疗思路清晰，实用价值高。特色之二是本书的可读性强，为集中体现作者的临证经验和处理棘手问题的水平及独到见解，特在难点与对策、经验与体会中总结了作者多年临床的经验；为开阅读者临证思路，特汇集了中医血液专科前辈、专家们临床实践的精华，在医案精选、名医专家论坛栏目详细介绍给读者，以期能提高广大临床工作者的诊疗水平。因此，本书为一部深入总结该专科临床医疗和研究成果的高级参考读物，可供中医、中西医结合临床、教学、科研工作者学习参考，也可作为血液科培训专科专病技术人才的辅导读物。每册定价 58 元。需要者请汇款到广州市番禺区广州大学城环东路 232 号广州中医药大学《新中医》编辑部发行科收，邮政编码 510006，电话 020-39354129。