

芍药甘草汤对这些指标的影响均弱于阳性对照药物溴隐亭,但考虑到溴隐亭的副作用及其在精神科患者的使用限制,对其的深入研究与开发有良好的前景。

本项研究还只是初步的探索,尚存在大量值得研究的问题。首先,芍药甘草汤适用于哪些原因引起的 HPRL 患者,仍有待于研究。其次,芍药甘草汤的疗效机制尚有待细化。第三,本研究采用溴隐亭作为阳性对照药物,而随着研究的进展,不断出现更高效、更低副作用的药物。那么芍药甘草汤在低副作用方面的优势,尚需重新比较、评估。第四,PREB 可能是芍药甘草汤在代谢、炎症等多方面发挥疗效的基础,是非常值得进一步研究的课题。

#### [参考文献]

[1] 徐吉祥,王丽华,朱鸣琴.加味芍药甘草汤治疗高泌乳

素血症型男性不育症 67 例[J].中国中西医结合杂志,1997,17(11):693.

[2] 徐吉祥.芍药甘草汤治疗高泌乳素血症型女性不孕症临床观察[J].中国中西医结合杂志,2003,23(8):602.

[3] 朱广伟,张贵君,汪萌.配伍组分、配伍比例对芍药甘草汤抗炎镇痛作用的影响[J].药学与临床研究,2014,22(4):323-325.

[4] Amaral VC, Maciel GA, Carvalho KC, et al. Metoclopramide-induced hyperprolactinemia effects on the pituitary and uterine prolactin receptor expression[J]. Gen Comp Endocrinol, 2013, 189: 105-110.

(责任编辑:骆欢欢)

## 裸鼠阳虚证乳腺癌骨转移模型的建立

龚辉,黄立中,毛丹,冯磊,刘吉勇

湖南中医药大学,湖南 长沙 410007

**[摘要]** 目的:采用病、证复合模型的方法建立裸鼠阳虚证乳腺癌骨转移模型。方法:采用臀部肌肉注射氢化可的松的方法建立裸鼠阳虚证模型;采用左心室注射乳腺癌细胞 MDA-MB-231 悬液建立裸鼠乳腺癌骨转移模型;动态观察各组裸鼠生存情况、体重变化,进行 X 线摄像观察,测定环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)、血清甲状腺三碘原氨酸(T3)等值。结果:肌注氢化可的松后,裸鼠出现畏寒肢冷、活动减少、精神萎靡、皮毛少光泽、饮食减少、大便清稀等阳虚表现,且 cAMP 明显下降、cGMP 明显升高、cAMP/cGMP 值下降,T3 值明显升高;左心室注射乳腺癌细胞悬液后裸鼠出现不同程度的骨转移,且经 X 线摄像检查确诊。结论:对裸鼠肌注氢化可的松可成功建立阳虚证模型;左心室注射法建立乳腺癌骨转移模型的成功率较高。

**[关键词]** 乳腺癌;骨转移;阳虚证;裸鼠模型

**[中图分类号]** R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2015) 11-0200-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.11.089

## Establishment of Nude Mouse Model of Yang Deficiency and Bone Metastasis of Breast Cancer

GONG Hui, HUANG Lizhong, MAO Dan, FENG Lei, LIU Jiyong

**Abstract:** Objectives: To establish nude mouse model of Yang deficiency and bone metastasis of breast cancer by the combination of disease and syndrome method. Methods: Intramuscular injecting hydrocortisone to establish the Yang deficiency syndrome model, and injecting breast cancer MDA-MB-231 cells suspension into the left Ventricle to establish bone metastasis model. Nude mice survival, the body weight changes, the X-ray imaging, and the levels of cyclic adenosine monophosphate(cAMP), cyclic guanosine monophosphate(cGMP), testosterone(T3) were observed. Results: After injecting

**[收稿日期]** 2015-04-12

**[基金项目]** 高等学校博士学科点专项科研基金(2011432311006);湖南省自然科学基金(12JJ5055);湖南省研究生创新课题(CX2014B353)

**[作者简介]** 龚辉(1986-),女,在读博士研究生,研究方向:中西医结合治疗肿瘤。

**[通讯作者]** 黄立中, E-mail: hlz992002@163.com

hydrocortisone, the nude mice represented Yang deficiency syndrome, such as being cold, reducing activity, being apathetic, less shiny fur, less eating, thin stool, and the levels of cAMP being decreased, cGMP being increased, cAMP/cGMP being decreased, T3 being increased obviously. After injecting breast cancer cells suspension into the left Ventricular, the nude mice appeared different degrees of bone metastasis, and the X-ray imaging examination and histopathological examination confirmed the diagnosis. Conclusion: Hydrocortisone injection can establish nude mouse model of Yang deficiency successfully. Injecting breast cancer cells suspension into the left Ventricular can establish the nude mouse model of bone metastasis of breast cancer in a high successful rate.

Keywords: Breast cancer; Bone metastasis; Yang deficiency syndrome; Nude mouse model

乳腺癌最容易远处转移到骨,其发生率达 65%~75%。目前,中医药在乳腺癌骨转移的综合治疗中起到了越来越重要的作用。为进一步研究探讨中医药辨证论治的效果和优势,笔者选择证候模型与疾病模型复合的方法,将“氢化可的松阳虚”裸鼠模型和“左心室注射乳腺癌细胞 MDA-MB-231 悬液”裸鼠乳腺癌骨转移模型有机的结合起来,建立裸鼠阳虚证乳腺癌骨转移模型,以便于将辨病与辨证结合,从而寻找中医病证的本质,助于更深入的认识和了解乳腺癌骨转移的发生、发展规律。

## 1 材料和方法

1.1 肿瘤细胞培养 人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞(由中南大学湘雅医学院现代实验中心细胞库提供)采用 35 mL 培养瓶培养。置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度的恒温培养箱中,用 RPMI-1640 完全培养液培养,每 2~3 天更换培养液。待细胞生长达 80%~90% 左右时传代,经 0.25% 胰蛋白酶溶液消化对数生长期的细胞,轻摇培养瓶,使消化液布满细胞表面,倒置显微镜下见细胞间质回缩,细胞间隙增大时,再加入 15 mL 完全培养液终止消化,轻柔吹打贴壁细胞成单细胞悬液,细胞计数板计数,细胞分装传代,倒置显微镜下观察细胞生长情况。

1.2 瘤细胞悬液制备 用 0.25% 胰蛋白酶溶液使贴壁生长的人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞脱壁、分散,轻摇培养瓶,使消化液布满细胞表面,倒置相差显微镜下见细胞间质回缩,细胞间隙增大时,用培养液终止消化,轻柔吹打贴壁细胞成单细胞悬液,接着用无血清的培养液离心(1200 r/min 离心 8 min)洗涤两次,细胞计数板计数,调整细胞密度为  $1 \times 10^7$ /mL,将细胞悬浮于生理盐水中备用。

1.3 实验动物 健康 BALB/c 6~8 周龄裸小鼠(购于湖南斯莱克实验动物有限公司)共 40 只,体重 18~22 g,雌性,随机分为空白对照组、阳虚组、骨转移组、阳虚骨转移组,每组 10 只。

1.4 主要试剂及仪器 胰蛋白酶、RPMI-1640 培养液(美国 INVITROGEN 公司),胎牛血清(北京雅安达生物技术有限公司),青霉素/链霉素溶液(北京康碧公司),PBS 缓冲液(南京森

贝伽生物科技有限公司),无水乙醇(深圳朗尔迅公司)。超净工作台 SW-CJ-1CV(苏净安泰公司),CO<sub>2</sub> 培养箱 SHEL-LAB(日本 Hitachi 公司),光学显微镜(日本 Olympus 公司),倒置显微镜、采图显微镜(重庆光学仪器厂),血球计数板(上海求精仪器公司),台式离心机 TDZ5-40(长沙天创仪器公司),恒温水浴箱 GG112-10B(上海医疗器械厂),移液枪(大龙医疗设备有限公司),电子天平(Sartorius 公司),恒温干燥箱 101B-2(上海亚明公司),高压蒸汽消毒器 ZDX-35B(上海申安器械厂),医用 X 线诊断系统(德国 SIEMENS 公司),RM2235 切片机、HI1210 摊片机(德国 LEICA 公司)。

1.5 阳虚模型的建立 参照《实用中医证候动物模型》<sup>[1]</sup>。阳虚组和阳虚骨转移组采用氢化可的松注射液(天津药业集团新郑股份有限公司)每次 25 mg/kg 肌肉注射,每天 1 次,连续 15 天。空白对照组和骨转移组采用同法注射等体积生理盐水,每天 1 次,连续 15 天。

1.6 乳腺癌骨转移模型的建立 造模第 16 天,骨转移组、阳虚骨转移组运用左心室注射法对 20 只裸鼠进行乳腺癌骨转移模型的制作:所有裸鼠接种前,用 4.5% 的水合氯醛(天津科密欧试剂公司)腹腔注射麻醉裸鼠(2 mL/100 g),75% 酒精消毒皮肤,裸鼠取仰卧位,头端朝向实验者,再次反复吹打细胞悬液,以 29 G 针头和 1 mL 注射器吸取 0.08 mL 细胞悬液(细胞数为  $8 \times 10^5$ /mL)<sup>[2]</sup>,于裸鼠左侧第 2 肋间胸旁 2~3 mm 处进针,进针方向斜向内下,与裸鼠纵轴及横轴均成 45° 角,进针约 5~6 mm,轻轻回抽,如有鲜红色血液进入注射器,提示左心室穿刺成功,保持空针稳定,在 30~60 s 内缓慢且均匀地向左心室注入细胞悬液。裸鼠左心室注射造模两周后隔天称重,体重 < 16 g 时严密观察<sup>[3-4]</sup>。

1.7 裸鼠整体状态及体重的变化 阳虚造模后观察裸鼠畏寒肢冷、活动减少、精神萎靡、皮毛少光泽、饮食减少、大便清稀等症状<sup>[5]</sup>,制定阳虚证裸鼠症状量化积分表。每项症状轻度为 1 分,中度为 2 分,重度为 3 分,最高 18 分。其中总分 1~6 分为轻度阳虚证表现,7~12 分为中度阳虚证表现,13~18 分为重度阳虚证表现。未出现上述症状者计为 0 分。左心室注射肿瘤细胞后 24 h 内密切观察裸鼠麻醉恢复及生存

状态，记录左心室穿刺注射肿瘤细胞致裸鼠死亡情况。此后每天观察裸鼠生存情况和肿瘤生长情况。于阳虚造模第 0、5、10、15、20 天称量各组裸鼠的体重，并统计各组裸鼠不同时间的平均体重。

1.8 环磷酸腺苷 (cAMP)、环磷酸鸟苷 (cGMP)、血清甲状腺三碘原氨酸 (T3) 测定 裸鼠于阳虚造模第 20 天称重后摘眼球取血，采用放射免疫分析法检测 cAMP、cGMP 及 T3，并计算 cAMP/cGMP 值。

1.9 骨转移情况 X 线摄片检查：骨转移组和阳虚骨转移组裸鼠于左心室注射肿瘤细胞 25 天后行全身骨骼 X 线摄片。摄片条件：40 kV，2 mA，3 s，H：28 cm<sup>kl</sup>。骨转移组和阳虚骨转移组裸鼠行 X 线摄片检查后，脊椎脱臼法处死后解剖，肉眼观察骨转移形成情况及骨转移病灶数量，将骨转移病灶和可疑骨转移病灶以 10% 甲醛固定 24 h 后，10% 盐酸脱钙，酒精脱水，常规石蜡包埋，制作 4 μm 切片，行苏木精 - 伊红染色，显微镜下观察裸鼠骨转移情况。各组裸鼠骨转移程度从以下几方面综合判断<sup>6</sup>：经病理证实各组裸鼠骨转移率；经病理证实的各组骨转移裸鼠的转移部位数量。

1.10 统计学方法 数据使用 SPSS19.0 统计软件进行处理。计量资料以( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，计数资料采用完全随机设计多样本比较的秩和检验。

2 结果

2.1 各组阳虚证量化评分比较 见表 1。阳虚组和阳虚骨转移组裸鼠于造模后出现不同程度的畏寒肢冷、活动减少、精神萎靡、皮毛少光泽、饮食减少、大便清稀的表现，且程度随造模时间延长而加重。初期阳虚症状加重明显，至第 15 天达到重度阳虚证，此后症状加重不明显。造模过程中未出现裸鼠死亡。2 组比较，差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 1 各组阳虚证量化评分比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 时 间    | 阳虚组(n = 10)  |      | 阳虚骨转移组(n = 10) |      |
|--------|--------------|------|----------------|------|
|        | 量化积分         | 阳虚程度 | 量化积分           | 阳虚程度 |
| 第 0 d  | 0.00 ± 0.00  | 无    | 0.00 ± 0.00    | 无    |
| 第 5 d  | 3.97 ± 1.25  | 轻度   | 3.86 ± 1.41    | 轻度   |
| 第 10 d | 7.03 ± 1.36  | 中度   | 7.12 ± 1.06    | 中度   |
| 第 15 d | 12.12 ± 1.74 | 重度   | 12.24 ± 1.98   | 重度   |
| 第 20 d | 14.50 ± 1.04 | 重度   | 14.31 ± 1.43   | 重度   |

2.2 各组体重变化比较 见表 2。各组裸鼠组内不同时间的体重比较，差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。阳虚组和阳虚骨转移组造模第 15 天、第 20 天与空白对照组及骨转移组同期比较均降低，差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

2.3 各组 cAMP、cGMP、cAMP/cGMP、T3 变化比较 见表 3。与空白对照组及骨转移组比较，阳虚组和阳虚骨转移组的 cAMP 明显下降、cGMP 明显升高、cAMP/cGMP 值下降，T3 值明显下降，差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 2 各组体重变化比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 时 间    | 空白对照组        | 阳虚组          | 骨转移组         | 阳虚骨转移组       |
|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|        | (n=10)       | (n=10)       | (n=10)       | (n=10)       |
| 第 0 d  | 19.15 ± 0.22 | 19.07 ± 0.30 | 19.19 ± 0.23 | 19.09 ± 0.06 |
| 第 5 d  | 19.39 ± 0.20 | 18.55 ± 0.30 | 19.34 ± 0.18 | 18.60 ± 0.23 |
| 第 10 d | 19.70 ± 0.22 | 18.28 ± 0.33 | 19.68 ± 0.09 | 18.17 ± 0.26 |
| 第 15 d | 19.90 ± 0.23 | 17.91 ± 0.19 | 19.93 ± 0.17 | 17.97 ± 0.05 |
| 第 20 d | 20.57 ± 0.28 | 18.26 ± 0.29 | 20.52 ± 0.26 | 18.29 ± 0.21 |

与空白对照组比较，① $P < 0.05$ ；与骨转移组比较，② $P < 0.05$

表 3 各组 cAMP、cGMP、cAMP/cGMP、T3 变化比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 检测指标          | 空白对照组         | 阳虚组           | 骨转移组          | 阳虚骨转移组        |
|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|               | (n=10)        | (n=10)        | (n=10)        | (n=10)        |
| cAMP(pmol/mL) | 0.496 ± 0.015 | 0.296 ± 0.011 | 0.506 ± 0.024 | 0.302 ± 0.036 |
| cGMP(pmol/mL) | 0.157 ± 0.051 | 0.204 ± 0.011 | 0.153 ± 0.047 | 0.227 ± 0.054 |
| cAMP/cGMP     | 3.161 ± 0.114 | 1.44 ± 0.76   | 3.175 ± 0.172 | 1.59 ± 0.59   |
| T3(ng/mL)     | 1.31 ± 0.040  | 0.58 ± 0.46   | 1.46 ± 0.031  | 0.70 ± 0.32   |

与空白对照组比较，① $P < 0.05$ ；与骨转移组比较，② $P < 0.05$

2.4 各组骨转移造模后裸鼠死亡率比较 骨转移组及阳虚骨转移组裸鼠完成左心室注射肿瘤细胞悬液后 24 h 内共死亡 4 只。其中，骨转移组死亡 2 只(20%)，阳虚骨转移组死亡 2 只(20%)。2 组组间比较，差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

2.5 各组骨转移情况比较 见图 1、图 2。骨转移组发生骨转移的裸鼠有 6 只，骨转移发生率为 75.0%，阳虚骨转移组发生骨转移的裸鼠有 8 只，骨转移发生率为 100%。2 组比较，差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。骨转移组检出骨转移灶为 1 处者 2 只，2 处者 1 只，3 处者 2 只，3 处以上者 1 只；阳虚骨转移组检出骨转移灶为 1 处者 1 只，2 处者 1 只，3 处者 3 只，3 处以上者 3 只。2 组比较，骨转移灶出现 3 处以上者，差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。所有裸鼠出现骨转移最多者共出现 7 处骨转移灶，散在分布于脊柱、四肢、肋骨等处。骨转移组及阳虚骨转移组模型 X 线均可见不同程度的不连续性骨质破坏，局部可见虫蚀状骨质缺损，边缘不规则。



图 1 骨转移组 X 线摄像图

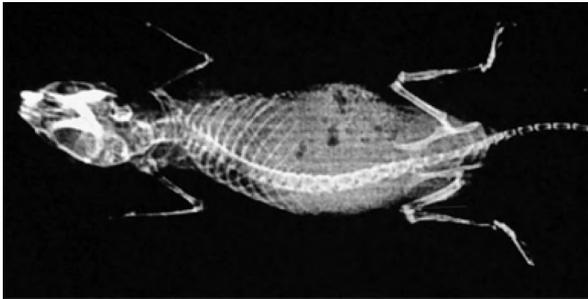


图2 阳虚骨转移组 X 线摄像图

### 3 讨论

阳虚证动物模型是我国最早建立的中医证候动物模型,在本实验中采用的是经典的“氢化可的松阳虚”动物模型法来建立裸鼠阳虚模型,并结合现代医学的检测手段来验证该方法的有效性和可行性。该方法的主要机制是使用一定量的外源性糖皮质激素,使垂体前叶的促肾上腺皮质激素(ACTH)释放抑制,转而使肾上腺皮质分泌类固醇激素的释放减少,动物出现一系列“阳虚”的病理状态。

cAMP、cGMP 是细胞内参与调节物质代谢和生物学功能的重要物质,是生命信息传递的“第二信使”,在细胞内发挥调节生理机能、物质代谢的作用,并能参与细胞增殖、分化。在正常情况下,cAMP、cGMP 水平主要由各自的环化酶和磷酸二酯酶的活性控制维持动态平衡,一旦平衡失调,机体神经、内分泌及免疫系统各器官和组织中的生化及生理功能也随之发生变化。cAMP 和 cGMP 在不同疾病虚证患者中的变化规律,与中医的阴阳学说非常相似<sup>[7]</sup>。甲状腺激素 T<sub>3</sub> 的主要作用是调节物质代谢,提高体内组织的耗氧量,使机体产热增加,基础代谢增高,从而使体温升高,食欲增加等。甲减患者大多具有阳虚证,以温肾补阳药治疗,临床症状好转,已有的实验研究也证实,阳虚模型动物的血清 T<sub>3</sub> 含量明显下降,抑制动物甲状腺功能造成的阳虚动物模型,可模拟人类的阳虚证<sup>[8]</sup>。

经裸鼠左心室注射肿瘤细胞形成骨转移是目前最常用的方法,该方法最大的优势在于能模拟肿瘤细胞经血道转移→趋化→黏附和侵袭→骨微环境中增殖→形成转移灶的过程,且其所形成的骨转移灶多为溶骨性转移,故可以比较准确、全面地再现乳腺癌细胞在体内侵袭和转移的过程。因此,本方法所建立的骨转移模型不论在转移部位、生长状况,还是在病理形态、影像学等方面的表现上都与临床极为相似。

阳气对机体的主要作用是温煦和生化,阳虚状态下,因为全身机能降低,代谢下降,则会出现各种衰退症状。本实验采用对裸鼠肌注射糖皮质激素氢化可的松后,裸鼠出现畏寒肢冷、活动减少、精神萎靡、皮毛少光泽、饮食减少、大便清稀等阳虚表现,并且出现 cAMP 明显下降、cGMP 明显升高、cAMP/cGMP 值下降,T<sub>3</sub> 值明显下降,结合阳虚组的阳虚证

量化积分情况以及裸鼠造模后的体重动态变化情况,显示本实验成功建立了阳虚证裸鼠模型。另一方面,本实验采用左心室注射肿瘤细胞悬液建立乳腺癌骨转移模型,骨转移组和阳虚骨转移组的死亡率分别为 10% 和 20%,骨转移组的骨转移发生率为 75.0%,阳虚骨转移组的骨转移发生率为 100%,明显高于骨转移组,且阳虚骨转移组发生 3 处以上骨转移病灶者明显增多。提示阳虚证动物模型更容易发生骨转移。

本实验提示左心室注射法建立乳腺癌骨转移模型的成功率较高,模型结果也与临床上所见的骨转移状况相类似<sup>[9]</sup>。本次实验填补了目前研究阳虚证骨转移模型的空白,为研究阳虚证乳腺癌骨转移动物模型提供了一个可实际操作的实验平台,为研究中医药辨证治疗乳腺癌骨转移提供了实验基础。

### [参考文献]

- [1] 陈小野. 实用中医证候动物模型[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1993: 1001.
- [2] 刘胜, 吴春宇, 程旭锋, 等. 从 OPG/RANKL/RANK 系统阐述补骨脂 - 蛇床子抑制乳腺癌骨转移的机制[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(5): 684-689.
- [3] Yang SF, Dong QG, Yao M, et al. Establishment and characterization of a human lung adenocarcinoma cell line SPC-A-1BM with high metastases potency [J]. Tumor, 2006, 26(12): 1059-1063.
- [4] Yang SF, Dong QG, Yao M, et al. Establishment of an ex-perimental human lung adenocarcinoma cell line SPC-A-1BM with highly bonemetastases potency by <sup>99m</sup>Tc-MDP bone scintigraphy [J]. Nucl Med Biol, 2009, 36(3): 313-321.
- [5] 陈英华, 欧阳轶强, 孙琪, 等. 肾阳虚证动物模型规范化研究中诊断指标选择的初步探讨[J]. 中国中医基础医学杂志, 2003, 9(10): 26-28.
- [6] Toshituki Y. A bone-seeking clone exhibits different biological properties from the MDA-MB-231 parental human breast cancer cells and a brain-seeking clone in vivo and in vitro [J]. Bone Miner Res, 2001, 16(8): 1486-1496.
- [7] 邝安堃. 阳虚(甲状腺功能减退)和阴虚(甲状腺功能亢进)病人血浆环核苷酸的对比[J]. 中医杂志, 1979(7): 21.
- [8] 梁汝圣, 徐宗佩. 大鼠肾阴阳虚模型建立方法[J]. 吉林中医药, 2008, 28(9): 685-687.
- [9] Rosol TJ, Tannehill L, Gregg SH, et al. Animal models of bone metastasis [J]. Cancer, 2003, 97(3): 748-757.

(责任编辑: 骆欢欢)