

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

张 洋¹ 刘晓菲² 王 楠¹ 朱 晴¹ 韩 笑¹

(1.山东中医药大学中医学院,山东济南250014; 2.山东中医药大学第一临床学院,山东济南250335)

摘 要 目的:观察阳和化岩汤联合曲妥珠体外对乳腺癌细胞株SK-BR-3(HER-2高表达型)PTEN-PI3K/Akt通路及血管内皮生长因子(VEGFC)的影响。方法:制备阳和化岩汤肠吸收液,将乳腺癌细胞株SK-BR-3随机分为对照组、中药组、曲妥珠组、中药+曲妥珠组,分别予相应药物干预72h后,应用western blot法及RT-PCR法检测人第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源物基因(PTEN)、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)、磷酸化丝氨酸/苏氨酸激酶(p-Akt)、血管内皮生长因子(VEGFC)蛋白及其mRNA表达。结果:与对照组比较,曲妥珠组、曲妥珠+中药组乳腺癌细胞株PTEN蛋白与mRNA表达明显升高,PI3K、p-Akt、VEGFC蛋白与mRNA表达明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);中药组p-Akt蛋白表达明显降低($P<0.05$),VEGFC蛋白与mRNA表达明显降低($P<0.05$)。与曲妥珠组比较,中药+曲妥珠组PTEN蛋白与mRNA表达明显升高($P<0.05$),PI3K、p-Akt蛋白与mRNA表达明显降低($P<0.05$),VEGFC蛋白表达明显降低($P<0.05$)。各药物组效果曲妥珠+中药组最佳,曲妥珠组次之,中药组作用稍弱。结论:阳和化岩汤肠吸收液联合曲妥珠能有效干预PTEN-PI3K/Akt通路,增强PTEN表达,降低PI3K、p-Akt、VEGFC表达,效果优于单用曲妥珠,提示温阳散结中药对曲妥珠在HER-2高表达型乳腺癌的治疗中可能存在辅助作用。

关键词 阳和化岩汤 乳腺癌 PTEN PI3K/Akt VEGFC 曲妥珠 培养的肿瘤细胞 基因表达调控

中图分类号 R737.9 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2018)06-0079-04

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81403408、81473687、81573989);山东省中医药科技发展计划项目(2013-ZDZK-024);山东省高等学校科技计划项目(J111LF53);山东省自然科学基金(ZR2013HM038)

HER-2阳性乳腺癌是一种原癌基因过度表达的疾病,具有高趋化、高侵袭、恶性程度高、预后较差且易复发的特点^[1]。从中医学角度,HER-2高表达型乳腺癌患者具备先天不足的病因,其肿瘤细胞低分化、增殖速度快、易复发转移、具有耐药性等符合正虚毒恋的病机。临床使用曲妥珠单抗治疗HER-2高表达型乳腺癌取得较好疗效,但成本高且耐药性增加^[2],遂从中医角度探索更好的解决方法。本实验采用的阳和化岩汤由《外科证治全生集》“阳和汤”化裁而来,课题组前期检测到阳和化岩汤在体内实验的caspase信号上游有PI3K的异常活化^[3],故本研究从HER-2介导的PI3K/Akt通路探讨阳和化岩汤联合曲妥珠对HER-2高表达乳腺癌的干预机制。

1 实验材料

1.1 动物及细胞系来源 乳腺癌细胞株SK-BR-3(HER-2高表达型:ERa66-/Era36-PR-/HER2+/EGFR+),中国科学院上海生科院细胞资源中心。出生后6周健康SD雄性大鼠15只,SPF级,体重(230±10)g,由

山东中医药大学实验动物中心提供并饲养,实验动物生产许可证号:SCXK(鲁)2016-0003,实验动物使用许可证号:SYXK(鲁)2016-0019。

1.2 药物与试剂

1.2.1 中药 阳和化岩汤,按鹿角霜-熟地-莪术-山慈菇-土贝片3:2:2:2:2称取各饮片共50g,按1:20比例加入95%乙醇溶液回流提取2h,自然冷却,抽滤,得滤液,56℃旋转蒸发至干,以每4g原生药材用25mL Tyrode缓冲盐溶液^[4],超声混匀后得阳和化岩汤供试液,-20℃冰箱保存,使用前置于室温自然解冻。中药饮片购于山东中医药大学附属医院中药房,经药学院鉴定后制剂。

1.2.2 肠吸收液 大鼠禁食12h后,脱颈椎处死,剖开腹腔,取出小肠,自回盲瓣以上5cm起向上选取14cm肠段,用Tyrode缓冲液冲洗,硅胶套管软端插入肠管,丝线结扎,翻转肠道,暴露黏膜层,Tyrode缓冲液冲洗表面,另一端用丝线结扎成囊状,将25mL中药药液预先加入麦氏浴管,通入混合气体(95%O₂,

5%CO₂), 37℃恒温, 肠管中注入2mL Tyrode缓冲液后放入麦氏浴管, 3h后取样40μL, 同时补充等体积Tyrode缓冲液, 标记后-20℃保存^[5]。

1.2.3 供试液 用氮气将所得阳和化岩汤肠吸收液吹干, 加入1mL 80%甲醇复溶, 超声3min, 涡旋30s, 0.2μm滤膜过滤。肠吸收液混匀后无菌滤膜滤过除菌, 将所得样品分装于无菌EP管中, -20℃保存待用。实验用药时加入以无血清培养基稀释的阳和化岩汤肠吸收液125mg/L。

1.2.4 曲妥珠单抗 曲妥珠单抗以完全培养基稀释, 浓度为150μg/mL, 上海罗氏制药有限公司提供。

1.2.5 其他试剂 RPMI1640培养基, M199培养基, 青、链霉素 (Hyclone公司, USA), 优级胎牛血清 (Gibco公司, USA), 平衡盐溶液 (Solarbio), 蛋白Marker, 血管内皮生长因子C, 抗Maker小鼠抗β-actin抗体, DAB显色试剂盒、ECL发光剂、一抗稀释液、Western及IP细胞裂解液、蛋白上样缓冲液 (碧云天生物科技有限公司), 蛋白酶抑制剂 (Merck公司), 脱脂奶粉 (Sigma), 所有引物 (上海桑尼生物科技有限公司), BCA蛋白浓度测定试剂盒 (南京凯基生物科技有限公司)。

1.3 主要仪器 CO₂培养箱 (美国Precision公司), 冷冻超速离心机 (美国Beckman公司), 酶标仪 (美国Biotek公司), 石蜡包埋机 (英国Shandon Histocentre), 天能凝胶成像分析系统 (深圳天能公司), 显影机 (日本柯达公司), 梯度PCR仪 (iCycler型, 美国biorad公司), 隔水式电热恒温培养箱 (上海跃进医疗器械厂)。

2 实验方法

2.1 细胞分组与培养 用含10%胎牛血清和1%青、链霉素双抗的高糖DMEM细胞培养液在37℃、5%CO₂培养箱中孵育乳腺癌SK-BR-3细胞, 每24h换液传代, 随机选取对数期生长的乳腺癌细胞株, 分成4组: 对照组, 中药组, 曲妥珠组, 中药+曲妥珠组。在96孔板中加入细胞200μL/孔 (约2×10⁵个细胞), 于37℃、5%CO₂、100%湿度的培养箱内培养24h, 待细胞贴壁后加入不同药物处理细胞, 对照组加入10μL PBS, 药物干预组分别加入10μL阳和化岩汤肠吸收液、曲妥珠、阳和化岩汤肠吸收液+曲妥珠。

2.2 Western blot法检测相关因子蛋白表达 各组细胞培养72h, 收集细胞, 冷PBS洗涤2次, 各加入200μL预冷裂解缓冲液, 混匀后冰浴30min, 离心, 留取上清液并将其稀释到50μg/mL, 取等

量蛋白 (70μg/泳道) 上样。电泳条件: 浓缩胶恒压60V约20min, 分离胶80V约80min。凝胶电泳结束后, 将分离到的蛋白条带转移电泳转印至PVDF膜, 5%脱脂奶粉封闭1h, 分别孵育PTEN、p-Akt、PI3K、VEGFC抗体, 4℃过夜。用1×TBST洗涤3次, 洗净未结合的一抗, 孵育二抗室温1.5h, 用1×TBST洗膜, 洗去游离二抗, 曝光显影。对胶片进行扫描, 以目的蛋白质条带的灰度值与内参GAPDH蛋白条带灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达水平。

2.3 半定量RT-PCR法检测相关因子mRNA表达 将500μL Trizol试剂分别加入各组细胞, 提取总RNA, 检验RNA完整性及纯度, 当OD_{260/280}比值在1.8~2.0时用于试验。取总RNA为模板逆转录合成cDNA。每个标本重复3遍, 以β-actin作为内参照, PCR反应所用引物序列见表1。于紫外透射反射分析仪下拍照, 采用图像分析软件分析各电泳条带的积分光密度值, 各目标条带积分光密度值与内参照β-actin光密度值的比值为目标基因的相对光表达量。

表1 引物序列

名称	序列 (5' ~ 3')
β-actin	F: CTG GGA CGA CAT GGA GAA AA R: AAG GAA GGC TGG AAG AGT GC
PTEN	F: GGA CGA ACT GGT GTA ATG AAT R: TCT ACT GTT GTG AAG TAC AGG
p-Akt	F: ACT CCA GTT GCC AGT GAT R: GAC TTC GGC TGA TAG ACA
PI3K	F: GGG TAC GAT AAC CGG GAG ATA R: CAG CCA GGA GAA ATC AAA CAG
VEGFC	F: CTC CTC AGC ATC TTA TCC GAG T R: GCT GTT CCG TCC CAG TAG ATT A

2.4 统计学方法 所有数据均以($\bar{x} \pm s$)表示, 采用SPSS 19.0统计软件分析, 多组均数比较采用单因素方差分析, 两两比较采用LSD-t检验, 以P<0.05为差异具有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组相关因子蛋白表达比较 见表2。

3.2 各组相关因子mRNA表达比较 见表3。

表2 各组相关因子蛋白表达比较

组别	PTEN相对表达量	PI3K相对表达量	p-Akt相对表达量	VEGFC相对表达量
对照组	0.917±0.042	0.878±0.116	0.889±0.074	0.874±0.049
中药组	1.121±0.167	0.686±0.073	0.723±0.066*	0.700±0.057*
曲妥珠组	1.366±0.140**△	0.681±0.024*	0.592±0.064**△△	0.600±0.093*△△
中药+曲妥珠组	2.814±0.320**△▲	0.468±0.031**△▲	0.457±0.056**△△▲	0.401±0.040**△△▲

注: 与对照组比较, *P<0.05, **P<0.01; 与中药组比较, △P<0.05, △△P<0.01; 与曲妥珠组比较, ▲P<0.05。

表3 各组相关因子mRNA表达比较

组别	PTEN 相对表达量	PI3K 相对表达量	p-Akt 相对表达量	VEGFC 相对表达量
对照组	1.103±0.079	0.847±0.057	0.779±0.024	0.807±0.037
中药组	1.510±0.390	0.779±0.108	0.703±0.057	0.631±0.098 [*]
曲妥珠组	2.044±0.298 ^{△**}	0.607±0.040 ^{**△}	0.531±0.018 ^{**△△}	0.503±0.092 ^{**}
中药+曲妥珠组	2.858±0.264 ^{**△△▲}	0.504±0.037 ^{**△△▲}	0.269±0.008 ^{**△△▲}	0.390±0.077 ^{**△△}

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与中药组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与曲妥珠组比较, $\Delta P<0.05$ 。

4 讨论

曲妥珠单抗作为一种人源化单克隆抗体对HER-2过表达的肿瘤细胞具有特异性的靶向治疗作用^[6],有研究表明临床应用曲妥珠靶向治疗1年内发生耐药现象,PI3K/Akt通路的持续激活是导致耐药的重要原因,因此对于具有耐药现象的乳腺癌患者,考虑增加中药治疗或许可以提高机体对曲妥珠的敏感性^[7]。

明代陈实功《外科正宗》记载:“初如豆大,渐若棋……日后肿如覆碗……其时五脏俱衰,四大不救,名曰乳岩。”乳岩形成,以“癌毒”为标志,即有形之实邪搏结于乳络,病因乃“阴极阳衰”,肾阳不足,阴寒内生,冲任失调,复感六淫之邪或伤于饮食情志,气机不畅而致痰凝血瘀,当温补肾阳、调摄冲任、行气活血、化痰散结,故选用温阳散结中药阳和化岩汤。方中君药鹿角霜与熟地温补肝肾,填精补髓;土贝化痰散结、排痈消肿,《本草从新》曰其“治外科痰毒”,莪术破血行气、消积止痛,山慈菇解毒化痰散结,三药并用温阳通脉、化痰活血,共为臣药。全方温阳与填精并用,祛痰与通络相伍,阳虚得补,寒痰凝滞得通。

乙醇作为亲水性有机溶剂,溶解性能好,对中草药细胞的穿透能力较强,因此采用乙醇溶液提取中药成分并制备阳和化岩汤肠吸收液,经测定中药成分包括熟地黄多糖、5-羟甲基糠醛、土贝母皂苷、山慈菇多糖、莪术醇、 β -榄香烯、姜黄素等,采用肠囊外翻技术,较既往血清药理实验具有含药量高、干扰成分少、活性显著等特点^[8]。

PTEN为抑癌基因,相关实验将雌鼠PTEN剔除,结果显示小鼠乳腺癌发生概率升高,其机制与其诱导细胞周期阻滞促进细胞凋亡相关^[9]。本研究结果显示,与对照组比较,除中药组外其他治疗组均能明显增强PTEN表达,中药+曲妥珠组表达高于中药组、曲妥珠组,中药组效果不及曲妥珠组,RT-PCR结果相似,中药与曲妥珠联用效果优于单种用药,能够进一步增强PTEN表达,提示中药可能对曲妥珠存在辅助作用。

在抑制肿瘤生成的多种途径中,PI3K/Akt通路发挥了重要作用。Akt属于原癌基因,被PI3K和PDK

磷酸化,活化产物为p-Akt,可以通过调控细胞周期、促进血管生成和迁移等途径促进肿瘤的生长^[10]。PTEN可通过调节上述通路发挥其肿瘤抑制作用,使生长因子第二信使PIP3变成PIP2,能够特异性去除磷脂酰肌醇-3,4,5三磷酸肌醇环-3位磷酸根,关闭

PI3K/AKT及其下游诸多通路,阻碍细胞周期向S期过渡,使细胞在G1期阻滞,抑制肿瘤的生长^[11-12]。本实验各药物组均可抑制PI3K、p-Akt表达,中药组、曲妥珠组抑制PI3K、p-Akt效果不及中药+曲妥珠组,曲妥珠+中药组抑制PI3K/Akt信号通路的活化效果最佳,药物联合使用较单种药物作用更明显。

淋巴结转移是乳腺癌常见的转移方式,VEGFC是血管内皮生长因子家族中最强的促淋巴管生成因子,能够调节细胞生物学行为及细胞恶变的发生。VEGFC在乳腺癌组织中呈高表达,与淋巴管密度显著相关^[13-14]。本研究结果显示阳和化岩汤能够降低VEGFC表达,效果不及曲妥珠,而中药与曲妥珠联合使用能更好地降低VEGFC的表达。

本实验从PTEN-PI3K/Akt通路方面,重点探讨干预乳腺癌细胞生成的相关因子PTEN、PI3K、p-Akt以及与乳腺癌转移相关的VEGFC的表达,实验结果证明阳和化岩汤肠吸收液联合曲妥珠能够干预PTEN-PI3K/Akt通路活化,有效增强PTEN表达,降低PI3K、p-Akt及VEGFC的表达,从而抑制乳腺癌细胞生成与转移。虽然单纯使用中药效果不及曲妥珠,但中药与曲妥珠联用显示出更好的治疗效果,提示中药可能存在辅助作用,为后续体内实验微血管、淋巴管新生和脉管侵袭干预机制研究提供借鉴。

参考文献

- [1] PEROU C M, SØRLIE T, EISEN M B, et al. Molecular portraits of human breast tumours[J]. Nature, 2000, 406 (6797): 747.
- [2] 邵士珺, 吴雪卿. 中医药治疗HER2阳性乳腺癌的临床及实验研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44 (12): 2671.
- [3] 刘晓菲, 殷玉琨, 王蕾, 等. 阳和化岩汤对大鼠乳腺癌前病变的抑制作用研究[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32 (2): 284.
- [4] 李晓宇, 周尔君, 顾圣莹, 等. 荷叶碱大鼠肠道吸收特性研究[J]. 中国药理学杂志, 2011, 46 (18): 1417.
- [5] 黄斌, 李耿, 郭宇飞, 等. 脑心通胶囊中4个成分肠吸收研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38 (6): 889.
- [6] 刘丹, 刘彦君, 施明. 曲妥珠单抗的耐药机制及其逆转策略[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2016, 23 (4): 453.

中医辨证分型治疗桥本氏甲状腺炎研究进展

帅优优¹ 李惠林² 张学文³

(1.广州中医药大学附属深圳市中医院,广东深圳518000;2.深圳市中医院,广东深圳518000;

3.陕西中医药大学第一附属医院,陕西咸阳712000)

摘要 结合现代医学对桥本氏甲状腺炎(HT)的认识,认为疾病前期属“瘰病”“心悸”范畴,后期属“虚劳”“水肿”等范畴。肝郁、脾虚、肾虚为本病病机根本,气痰血瘀壅结颈前为标;辨证分型可分为两型、三型、四型、六型、八型、九型等。中医药在对本病病机的认识及治疗方面取得了一定的进展,弥补了西医治疗的短板,特别是“未病先防、既病防变、愈后防复”的“治未病”思想体现在HT中医治疗的各个阶段,更有利于掌握病程的进展,充分展示中医治疗本病的优越性。然而,由于本病病程较长,且病机复杂多变,临证时应深入分析各种致病因素在本病不同发展阶段中的主次和相互夹杂的问题,辨清正与邪主次矛盾的转换,同时还应全面地掌握其证型演变及证治规律,深入分析不同证型之间的内在联系,进而提高辨治水平。

关键词 桥本氏甲状腺炎 病因病机 辨证分型 综述

中图分类号 R259.814

文献标志码 A

文章编号 1672-397X(2018)06-0082-04

基金项目 深圳市医疗卫生三名工程项目:国医大师张学文团队(2015)(SZSM201512043)

桥本氏甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis,以下简称HT),是以自身甲状腺组织为抗原的慢性炎症性自身免疫性疾病,由遗传及环境因素共同作用所致^[1]。HT主要病理特点是甲状腺腺体呈现弥漫性增大,腺泡大量增生,后期腺体发生萎缩,大量浆细胞、淋巴细胞浸润充斥间质及淋巴滤泡形成,最终破坏甲状

腺组织功能,造成甲减^[2]。其主要临床表现为颈前肿大;疾病早期或合并甲状腺功能亢进时,可伴有眼球突出、心悸、烦躁、失眠、体重下降等症;病情持续发展至后期,部分患者或伴有甲状腺功能低下,此时可出现精神萎靡、记忆力减退、疲劳、皮肤苍白、怕冷等症状^[3]。结合现代医学对桥本氏甲状腺炎的认识,认

- [7] SCALTRITI M, NUCIFORO P, BRADBURY I, et al. High HER2 expression correlates with response to the combination of lapatinib and trastuzumab[J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(3): 569.
- [8] 陈晓鹏, 李昂, 褚扬, 等. 养血清脑颗粒中有效成分的肠外翻吸收研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(4): 159.
- [9] STAMBOLIC V, TSAO M S, MACPHERSON D, et al. High incidence of breast and endometrial neoplasia resembling human Cowden syndrome in pten+/- mice[J]. Cancer Res, 2000, 60(13): 3605.
- [10] TAPIA O, RIQUELME I, LEAL P, et al. The PI3K/AKT/mTOR pathway is activated in gastric cancer with potential prognostic and predictive significance[J]. Virchows Arch, 2014, 465(1): 25.
- [11] 张刚, 李中, 林晓萌, 等. 乳腺组织中PTEN表达及其与PI3K/Akt信号通路的关系[J]. 临床与实验病理学杂志,

2015, 31(9): 1037.

- [12] 王亚力, 李湘奇, 党相国. PI3K/AKT信号通路相关蛋白表达与乳腺癌淋巴转移相关性分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2013, 20(8): 600.
- [13] 汪春林, 黄盛鑫, 程小伟, 等. VEGF+936C/T多态性与乳腺癌易感性关系的Meta分析[J]. 肿瘤防治研究, 2013, 40(5): 489.
- [14] 靳钦, 张曙, 章建国, 等. 乳腺癌中血管内皮生长因子和环氧合酶-2蛋白表达与临床因素的关系[J]. 肿瘤研究与临床, 2011, 23(9): 591.

第一作者: 张洋(1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为乳腺、甲状腺外科。

通讯作者: 刘晓菲, 博士, 副教授, 副主任医师, 硕士研究生导师。drliuxf@126.com

修回日期: 2018-03-06

编辑: 吴 宁