

益肾化痰方对乳腺癌骨转移模型小鼠血液 PTHrP、TGF- β 、BSP 水平的影响及作用机制

李伟明 和瑞欣 朱梅 乔敏 王颖

【摘要】 目的 分析益肾化痰方对乳腺癌骨转移模型小鼠血液甲状旁腺激素相关蛋白(PTHrP)、转化生长因子 β (TGF- β)、骨唾液酸蛋白(BSP)水平的影响及作用机制。方法 雌性小鼠共90只,随机分为对照组、肾虚组及治疗组,各30只。对照组正常饲养,肾虚组及治疗组小鼠皮下注射醋酸氢化可的松注射液,制成肾虚模型。肾虚模型制成3d后将三组小鼠腹腔注射硫酸妥钠和腿部肌肉注射氯胺酮,使用29G注射器将 8×10^5 个肿瘤细胞注入小鼠左心室制作骨转移模型。对照组与肾虚组小鼠给予等量生理盐水灌胃,治疗组小鼠使用益肾化痰方浓缩药液灌胃。对比三组小鼠血液PTHrP、TGF- β 、BSP水平。结果 PTHrP情况:三组总阳性率无明显差异,肾虚组的强阳性率与阳性细胞的平均百分比高于对照组($P < 0.05$),治疗组的强阳性率与阳性细胞的平均百分比低于肾虚组($P < 0.05$);TGF- β 情况:肾虚组的细胞染色率与阳性系数高于对照组与治疗组($P < 0.05$);BSP情况:肾虚组的细胞染色率、强阳性率高于对照组但低于治疗组($P < 0.05$)。提示肾虚组的PTHrP、TGF- β 、BSP水平高于对照组,但治疗后PTHrP、TGF- β 、BSP得到控制。结论 使用益肾化痰方可通过充盈肾精,充壮骨髓与促进成骨细胞生殖分化、抑制肿瘤因子生长、提高机体免疫功能等方式对抗乳腺癌骨转移症状。

【关键词】 乳腺癌骨转移; 益肾化痰方; 甲状旁腺激素相关蛋白; 转化生长因子 β ; 骨唾液酸蛋白

【中图分类号】R285.6

【文献标识码】A

Effects of yishen huatan formula on the levels of blood PTHrP, TGF- β and BSP and the effect mechanism in the mice with breast cancer bone metastasis

LI Wei-ming, HE Rui-xin, ZHU Mei, QIAO Min, WANG Ying

(Third Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou Henan 450000)

【Abstract】 Objective To analyze the influence of yishen huatan formula on the levels of blood PTHrP (parathyroid hormone-related protein), TGF- β (transforming growth factor- β) and BSP (bone sialoprotein) and the effect mechanism in the mice with breast cancer bone metastasis. **Methods** A total of 90 female mice were collected and randomized into a control group, a kidney deficiency group and a treatment group, 30 mice in each one. In the control group, the mice were fed as usual. In the kidney deficiency group and the treatment group, the mice were injected subcutaneously with hydrocortisone acetate to prepare kidney deficiency model. In 3 days of modeling success of kidney deficiency, thiopental sodium was injected intraperitoneally and ketamine was injected muscularly in the legs of the mice in three groups. Using 29G syringe, tumor cells 8×10^5 were injected into the left ventricles of mice to prepare bone metastasis model. In the control group and the kidney deficiency group, the gavage with normal saline of same dose was given. In the treatment group, the gavage with the condensed yishen huatan decoction was used. The levels of PTHrP, TGF- β and BSP in blood were compared among the three groups. **Results** Regarding PTHrP, the total positive rates were not different significantly among three groups. The strong positive rate and the mean percentage of positive cell in the kidney deficiency group were higher than the control group ($P < 0.05$). The strong positive rate and the mean percentage of positive cell in the treatment group were lower than the kidney deficiency group ($P < 0.05$). Regarding TGF- β , the cell dyeing rate and positive coefficient in the kidney deficiency group were higher than the control group and the treatment group ($P < 0.05$). Regarding BSP, the cell dyeing rate and strong positive rate in the kidney deficiency group were higher than the control group but lower than the treatment group ($P < 0.05$). It is suggested that the levels of PTHrP, TGF- β and BSP in the kidney deficiency group were higher than the control group. But after treatment, PTHrP, TGF- β and BSP were controlled. **Conclusion** Yishen huatan formula confronts the symptoms of breast cancer bone metastasis through filling kidney essence and bone marrow, as well as promoting osteoblast reproduction and differentiation, inhibiting tumor factor growth and improving body immune function.

【Key words】 Breast Cancer Bone Metastasis; Yishen Huatan Formula; PTHrP; TGF- β ; BSP

DOI: 10.13935/j.cnki.sjzx.190313

基金项目: 河南省科技攻关计划项目(162102310457)

作者单位: 河南中医药大学第三附属医院, 河南 郑州 450000

通讯作者: 和瑞欣, Email: 835109846@qq.com

乳腺癌的骨转发生率为65%~75%,其中首发症状为骨转移者占27%~50%,疼痛为骨转移最常见症状,对患者生活质量影响巨大,同时疼痛也对

机体免疫功能产生影响而促进肿瘤细胞的生长与转移^[1-3]。有研究证实骨转移机制与甲状旁腺激素相关蛋白(PTHrP)、转化生长因子 β (TGF- β)、骨唾液酸蛋白(BSP)水平联系密切。“肾主骨”为中医学经典理论,癌症日久、手术、放化疗等损伤正气,耗竭肾精,肾精亏虚则骨空髓枯,邪气便趁机而入,凝结于骨,组织经络而发为骨转移^[4-5]。本研究通过制作小鼠模型行对照实验的方式分析益肾化痰方对乳腺癌骨转移模型小鼠血液 PTHrP、TGF- β 、BSP 水平的影响与作用机制,现总结如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 7~8 周龄,质量 20~24 g 的雌性小鼠共 90 只,在无特异病原菌(specific pathogen-free, SPF)级条件下饲养。来源:河南省实验动物中心,许可证号:SCXK(豫)2010-0002,合格证号:1000142。

1.1.2 药品与试剂 醋酸氢化可的松注射液(北京紫竹药业有限公司,药品批次:C14202271880,规格:5 ml:0.125 g/支);注射用硫酸妥钠(上海新亚药业有限公司,药品批次:P20170507130032644,规格:1 g/支);盐酸氯胺酮注射液(西安汉丰药业有限责任公司,药品批次:C20170724325 2 ml:0.1 g/支)。带荧光标记的人乳腺癌骨高转移细胞株,MDA-MB-231BO.RS-SP-0023 免疫组织化学染色试剂,上海瑞齐生物科技有限公司。益肾化痰方,药物组成:熟地黄 30 g,杜仲 15 g,怀牛膝 15 g,桑寄生 12 g,白芍 12 g,山慈菇 12 g,白芥子 15 g,生牡蛎 30 g,浙贝母 12 g,皂角刺 12 g,片姜黄 12 g,苏木 15 g。上述中药材均自亳州百川药业购入。

1.1.3 仪器设备 动物化学发光活体成像系统,PerkinElmer,型号:IVIS® Spectrum BL。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组 90 只雌性小鼠随机分为对照组、肾虚组及治疗组,各 30 只。

1.2.2 模型建立 小鼠适应环境后,对照组小鼠正常饲养,治疗组及肾虚组小鼠皮下注射醋酸氢化可的松注射液 38 mg/kg,1 次/d,连用 8 d,制成肾虚模型。建模当天用平衡盐溶液(PBS)调整细胞株密度为 1×10^7 /ml 的单细胞悬液。肾虚模型制成 3 d 后将三组小鼠腹腔注射硫酸妥钠(0.9 mg/只,37.5 mg/kg)和腿部肌肉注射氯胺酮(1.8 mg/只,75 mg/kg),麻醉后呈仰卧位,消毒小鼠腹面皮肤,使用 29G 注射器

将 8×10^5 个肿瘤细胞注射入小鼠左心室制作骨转移模型。

1.2.3 给药方法 治疗组于心室注射细胞株后 48 h 开始给予益肾化痰方灌胃,将生药用 5 倍体积量水浸泡 2 h,煮沸 30 min,过滤分离药液及药渣,药渣再加入 3 倍体积量一级水煎煮 20 min,过滤后留药液,合并两次药液于 70 °C 水浴中浓缩至 30 ml,平均每只小鼠每天取中药药液 0.2 ml 灌胃。对照组与肾虚组灌胃等量生理盐水,连续灌胃 2 周。

1.3 观察指标^[6]

1.3.1 取材方法 小鼠用异氟烷和高压氧气的混合气体麻醉,然后放入活体显像仪中,摆成仰卧位,四肢伸展,固定好后进行检测。发射波长 520 nm,激发波长 480 nm,曝光时间为 1 s。图像处理软件为 IVIS 自带的 Living Image 活体图像分析系统。通过影像学检测发现肿瘤骨转移灶后处死小鼠,在无菌条件下取可疑的肿瘤转移灶如骨、心、肺、肝、脑、肾、肾上腺和淋巴结等,取瘤称重,各组织以 10% 甲醛溶液固定,石蜡包埋,切片,苏木精-伊红染色,光学显微镜下观察小鼠肿瘤转移情况。

1.3.2 PTHrP 表达检测^[7] 采用常规 ABC 法进行 PTHrP 的免疫组织化学染色。PTHrP 的阳性细胞染色为棕黄或棕褐色,定位于胞质,连续计数 >10 个高倍视野,每个高倍视野计数 100 个腺上皮细胞,计算阳性细胞的平均百分率,阳性细胞数 <25% 为阴性,25%~80% 为弱阳性(+),>80% 为强阳性(++)。

1.3.3 TGF- β 检测^[8] TGF- β 染色阳性者在细胞浆有棕黄色颗粒沉着,部分细胞同时存在核染色。为精确判断蛋白的表达程度及减少假阳性率,制定免疫组化半定量标准。每张切片随机观察 10 个高倍视野,每个视野计数 100 个癌细胞,根据细胞浆的着色程度及着色细胞的百分率进行评分并计算阳性系数。基本不着色者为 0 分,着色淡者为 1 分,着色适中者为 2 分,着色深者为 3 分。计算着色细胞率,着色细胞率=着色性细胞数量/总细胞数量 $\times 100\%$ 。着色细胞占计数细胞百分率 $\leq 5\%$ 为 0 分,6%~25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分, $\geq 51\%$ 为 3 分。将每张切片着色程度得分与着色细胞百分率得分各自相乘,即为阳性系数。阳性系数 0、1 分为阴性(-),2、3 分为弱阳性(+),4、6 分为阳性(++),9 分为强阳性(+++)

1.3.4 BSP 检测^[9] 采用免疫组织化学染色对组织标本处理,固定、脱水、透明、浸蜡、包埋、切片。在光学显微镜下观察,根据棕色反应的阳性强度及

阳性细胞数判断结果。BSP 每张切片观察 5 个高倍视野, 阳性细胞染色为胞浆棕黄或棕褐色, 计算阳性细胞率, 阳性细胞率 = 阳性细胞数量 / 总细胞数量 × 100%, 阳性细胞率 < 25% 为阴性; 25% ~ 75% 为弱阳性 (+); > 75% 为强阳性 (++)。

1.4 统计学方法

用 Excel 建立数据库, 采用 SPSS18.0 for Windows 统计分析软件对有关数据进行分析。计量资料所有数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较先确定样本是否符合正态分布, 再进行方差齐性检验, 方差齐性则采用单因素方差分析; 方差不齐, 先校正方差, 再进行方差分析。检验标准取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 三组小鼠 PTHrP 表达检测结果对比

三组总阳性率无明显差异, 肾虚组的强阳性率与阳性细胞的平均百分比高于对照组 ($P < 0.05$), 治疗组的强阳性率与阳性细胞的平均百分比低于肾虚组 ($P < 0.05$)。结果见表 1。

表 1 三组小鼠 PTHrP 表达检测结果对比 [只 (%) $\bar{x} \pm s$]

组别	n	阳性细胞的平均百分比 (%)	强阳性率 (%)	弱阳性率 (%)	阴性率 (%)
对照组	30	67.32 ± 7.64	8(26.67)	22(73.33)	0(0.00)
肾虚组	30	75.34 ± 6.59 ^a	16(53.33) ^a	14(46.67)	0(0.00)
治疗组	30	58.47 ± 6.93 ^b	5(16.67) ^b	25(83.33)	0(0.00)

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与肾虚组比较, ^b $P < 0.05$

2.2 三组小鼠 TGF-β 检测结果对比

肾虚组的细胞染色率与阳性系数高于对照组与治疗组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果见表 2。

表 2 三组小鼠 TGF-β 检测结果对比 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞染色率 (%)	阳性系数 (分)
对照组	30	38.75 ± 12.23	1.97 ± 0.33
肾虚组	30	64.47 ± 13.97 ^a	2.16 ± 0.37 ^a
治疗组	30	54.45 ± 12.55 ^b	1.84 ± 0.42 ^b

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与肾虚组比较, ^b $P < 0.05$

2.3 三组小鼠 BSP 检测结果对比

肾虚组的细胞染色率、强阳性率高于对照组但低于治疗组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果见表 3。

表 3 三组小鼠 BSP 检测结果对比 [只 (%) $\bar{x} \pm s$]

组别	n	细胞染色率	强阳性率	弱阳性率	阴性率 (%)
对照组	30	55.43 ± 23.57	9(30.00)	21(70.00)	0
肾虚组	30	69.32 ± 15.37 ^a	17(56.67) ^a	13(43.33)	0
治疗组	30	57.56 ± 22.44 ^b	8(26.67) ^b	22(73.33)	0

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与肾虚组比较, ^b $P < 0.05$

3 讨论

乳腺癌进展中骨转移发生率较高, 患者痛感剧烈, 许多学者均进行骨转移相关研究^[10-11]。黄竹媛和甄俊平在其研究^[12]中提出肿瘤相关巨噬细胞为骨转移的重要参与者, 而在何玉峰等^[13]的研究中则提出人体雌激素受体、孕激素受体、人类表皮生长因子受体 2 表达的变化与乳腺癌骨转移具有临床相关性。笔者通过对照研究对骨转移机制进行研究, 发现肾虚或为乳腺癌骨转移的原因之一, 并以益肾化痰方实施治疗, 发现该方具有一定应用效果。对肾虚与乳腺癌骨转移关系的研究发现, 在相同的肿瘤细胞株作用下, 肾虚组小鼠的血液 PTHrP、TGF-β、BSP 测定阳性率较对照组小鼠高, 提示肾虚与血液 PTHrP、TGF-β、BSP 三项骨转移指标具有统计学相关性。

中医认为, 肾主骨, 肾脏的功能与人体骨骼的生理性改变密切相关, 当乳腺癌患者患癌日久, 接受手术与放化疗等治疗手段后其身体正气受损, 神经耗竭时肾精亏虚则骨空髓枯, 邪气乘虚入骨髓中并凝结组织经络, 进而形成骨转移^[14-15]。一些患者首发症状即为骨转移症状, 其原因在于该类患者平素饮食失节, 劳逸失度, 情志失调, 肾气因而损伤而使骨失其所养, 骨髓空虚时复感邪毒, 痰湿凝结于体内而发为癌肿, 癌肿先入骨中则作痛, 出现骨转移疼痛感。乳腺癌骨转移的发生以肾精亏虚, 骨失所养为基础病因, 谓之“不荣”; “癌毒”入骨阻滞经络为病发根源, 谓之“不通”。针对上述分析, 设计益肾化痰方, 使用熟地黄、杜仲、怀牛膝、桑寄生、白芍、山慈菇、白芥子、生牡蛎、浙贝母、皂角刺、片姜黄、苏木。方中熟地黄滋阴补血、益精填髓, 杜仲补肝肾、强筋骨共为君药, 桑寄生、怀牛膝补肝肾、强筋骨, 白芍柔肝缓急止痛共为臣药, 山慈菇、白芥子化痰, 生牡蛎软坚散结, 浙贝母、皂角刺共为佐药以化痰散结消积, 片姜黄活血定痛, 苏木引药归经, 共为使药。如是肾精充盛, 骨壮髓充, 无“容邪之处”, 甚可驱邪外出, 使“邪去正安”。

从骨转移学说分析, PTHrP 由肿瘤细胞分泌, 为破骨细胞活性介导因子之一, 刺激骨细胞或基质细胞 RANKL 合成增加, 诱导破骨细胞前体分化成熟而具有骨吸收活性^[15-16]。此外其可减少氧基聚明胶合成, 削弱其对骨吸收的抑制作用, 两者的叠加作用打破成骨与溶骨的动态平衡导致溶骨发生。TGF-β 主要由成骨细胞、破骨细胞以及软骨细胞

合成,其C端存在RGD序列与成骨细胞和破骨细胞表面的整合素 $\alpha v\beta 3$ 识别而导致肿瘤细胞与骨小梁的黏附,促进骨转移进程。此外BSP可参与信号的识别^[17-18]、细胞黏附与转移,且其可通过自分泌方式促进破骨细胞分化,促成乳腺癌的溶骨性转移。益肾化痰方4味君药中熟地黄可促进成骨细胞增殖与分化且可提高成骨细胞分泌类胰岛素一号生长因子的能力,对乳腺癌细胞具有一定抑制作用;杜仲总黄酮可优化缺氧条件下成骨细胞增殖能力,具有改善细胞代谢、抗氧化应激与血管调节能力。臣药中桑寄生中有效成分可作为促进细胞分裂免疫刺激剂控制与调整免疫系统而对抗乳腺癌肿瘤细胞;怀牛膝中甾体与皂苷部分具有提高血清碱性磷酸酶、血清骨钙素及 Ca^{2+} 水平,降低血清孕酮水平,优化血液黏度,对抗炎症反应效果;白芍总苷可抑制体内炎性介质PGE2含量的升高,增加第二信使环磷酸腺苷的含量而镇痛。佐药中山慈菇的衍生物秋水仙酰胺有抗癌活性,其对人乳腺癌T-47D细胞增殖和迁移具有抑制作用;浙贝母中的贝母甲素、贝母乙素、贝母辛对肿瘤耐药细胞均有逆转作用;皂角刺提取物对小鼠细胞因子白介素-2、白介素-6、白介素-12、肿瘤细胞坏死因子的表达水平具有改善作用,增强机体免疫功能而具有抗肿瘤活性。益肾化痰方可通过促进成骨细胞生殖分化、抑制肿瘤因子生长、提高机体免疫功能等方式对抗乳腺癌骨转移。

研究结果提示PTHrP情况三组总阳性率无明显差异,肾虚组的强阳性率与阳性细胞的平均百分比高于对照组($P < 0.05$),治疗组的强阳性率与阳性细胞的平均百分比低于肾虚组($P < 0.05$);TGF- β 情况:肾虚组的细胞染色率与阳性系数高于对照组与治疗组,差异有统计学意义($P < 0.05$);BPS情况:肾虚组的细胞染色率、强阳性率高于对照组但低于治疗组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。表明肾虚组在PTHrP、TGF- β 及BPS方面表达均高于对照组与治疗组,可证实肾虚为乳腺癌骨转移病因之一,且使用补肾益气方可优化模型小鼠的骨转移血清指标水平。

综上所述,乳腺癌骨转移的发生与肾虚体质存在临床相关性,而使用益肾化痰方可通过充盛肾精,充壮骨髓与促进成骨细胞生殖分化、抑制肿瘤因子生长、提高机体免疫功能等方式对抗乳腺癌骨转移症状。

参 考 文 献

- [1]李振,陈阳阳,张夕凉.多项血清骨转换标志物对老年乳腺癌患者骨转移的诊断价值[J].中日友好医院学报,2018(1):15-18,22.
- [2]HU Ke-fei,KONG Xiang-ying,ZHONG Mi-cun,et al. Brucine Inhibits Bone Metastasis of Breast Cancer Cells by Suppressing Jagged1/Notch1 Signaling Pathways[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine 2017,23(2):110-116.
- [3]钟世洪,李文科.唑来膦酸治疗乳腺癌的研究[J].中国社区医师,2018(1):12.
- [4]邹燕鹏,孙宇,钱朋飞,等.乳腺癌骨转移患者血液OSC、OPG、NTX及与尿尿NTX水平相关性探讨[J].现代肿瘤医学,2018(4):534-537.
- [5]Li J,Sun Y,Ding G,et al. Persistent pain accelerates xenograft tumor growth of breast cancer in rat[J]. Biochem Biophys Res Commun,2018,495(4):2432-2438.
- [6]丛秋梅,丛波.乳腺癌骨转移患者放疗前后血清PINP、 β -CTX水平变化及其与疗效的关系[J].黑龙江医学,2017(12):1166-1167.
- [7]谢文贤.三阴性乳腺癌临床病理特征及其与预后的关系分析[J].心理医生,2018(3):11-13.
- [8]Liu B,Han S,Hedrick BP,et al. Perfusion applied to a 3D model of bone metastasis results in uniformly dispersed mechanical stimuli[J]. Biotechnol Bioeng 2018,115(4):1076-1085.
- [9]王喆,刘丽娜. Galectin-3在乳腺癌骨转移诊断中的应用价值[J].河南科技大学学报(医学版),2017(4):260-262.
- [10]Krishnan CK,Kim HS,Yun JY,et al. Factors associated with local recurrence after surgery for bone metastasis to the extremities[J]. J Surg Oncol 2018,117(4):797-804.
- [11]刘心悦,李学.骨转移癌疼痛的中医治疗进展[J].中日友好医院学报,2018(1):48-51.
- [12]黄竹媛,甄俊平.肿瘤相关巨噬细胞:乳腺癌骨转移的“参与者”[J].中国药物与临床,2018(1):45-46.
- [13]何玉峰,杨春华,丁玺,等.ER、PR、HER-2表达与乳腺癌骨转移的相关性研究[J].现代肿瘤医学,2017(24):3982-3985.
- [14]张亚峰,王鹏.卡培他滨单药或联合方案治疗乳腺癌骨转移的临床疗效观察[J].实用癌症杂志,2017(12):2045-2048.
- [15]秦雪. TEC方案与EC-T序贯化疗对乳腺癌患者的疗效及对白细胞水平的影响[J].实用癌症杂志,2018(1):127-129.
- [16]Xiong Z,Deng G,Huang X,et al. Bone metastasis pattern in initial metastatic breast cancer: a population-based study[J]. Cancer management and research 2018,10:287-295.
- [17]孙鑫,李平,张梅,等.马钱子碱对乳腺癌骨转移相关因子表达的影响[J].肿瘤学杂志,2017(12):1093-1097.
- [18]Kozma K,Mati B,Mala J,et al. Risk factors that influence the development of bone metastasis in breast cancer patients[J]. European Journal of Cancer 2018(92):s42.

(收稿日期:2018-12-18)