

乳移平调控前转移微环境抑制乳腺癌肺转移的实验研究

叶依依¹ 刘 胜^{1,2} 孙震平² 吴春宇²

摘要 目的 观察抗乳腺癌复发转移方剂乳移平对乳腺癌前转移肺微环境的影响,探讨其可能机制。
方法 动物实验分两部分,第一部分是乳腺癌前转移时间的确定,第二部分是乳移平对前转移微环境的影响。第一部分实验 24 只 BALB/c 小鼠,取对数生长期 4T1 细胞配成细胞悬液,血细胞计数板计数,细胞浓度调至 1×10^6 细胞/mL,无菌条件下接种于 24 只 BALB/c 小鼠胸壁右侧第四乳头的脂肪垫上,每只 0.1 mL。第二部分动物实验 60 只 BALB/c 小鼠,采用随机数字表法分成 5 组,分别为空白组、模型组、乳移平低、中、高剂量组,每组 12 只。造模方法同上,各组于接种次日开始给药。乳移平低、中、高剂量组给予 5.13、10.26 及 20.52 g/(kg·d) 生药量灌饲,每天给药 1 次,连续 14 天。空白组和模型组等体积生理盐水灌饲。动物实验第一部分于 10、14、18、22 天,每次脱颈处死 6 只,观察肺转移情况。动物实验第二部分观察各组肺组织的镜下形态(光镜)和肺血管超微结构(电镜),测定各组血管的通透性(依文思蓝法),研究乳移平对前转移微环境形成的影响。通过 Western blot 和 Real time PCR 法测定乳移平对前转移因子血管生成素(angiotensinogen, Angpt)2、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、白介素(Interleukin, IL)-6 和 IL-1 β 表达的影响。**结果** 肺转移还未发生的乳腺癌前转移时期的建模时间定为 14 天。与模型组比较,乳移平中、高剂量组对瘤重、瘤体积都有显著的抑制作用($P < 0.05$, $P < 0.01$),乳移平对肿瘤的重量和体积的抑制作用随着乳移平剂量的增加而增加,呈现明显的剂量依赖关系($P < 0.05$, $P < 0.01$)。模型组与乳移平低剂量组都有淋巴细胞浸润的发生,而乳移平中、高剂量组光镜结果发现肺组织形态与空白组无区别。肺部的血管网是由连续的、密集的毛细血管组成。空白组肺脏毛细血管结构正常。模型组血管壁不像空白组平整、规则,毛细血管扩张明显。乳移平给药后,血管的损伤情况得到改善,血管形态基本和空白组无异。与空白组比较,模型组肺组织中依文思蓝渗出量明显增加,Angpt2、VEGF、IL-6、IL-1 β 蛋白及 mRNA 表达明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组比较,乳移平各剂量组依文思蓝的渗出量均显著降低,且中药剂量越高,降低越明显,呈现剂量依赖关系($P < 0.01$),乳移平中剂量组 VEGF、乳移平高剂量组 Angpt2、VEGF、IL-6、IL-1 β 的蛋白及 mRNA 表达明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),乳移平中剂量组 IL-6 蛋白表达降低($P < 0.01$)。**结论** 乳移平对肿瘤的生长和前转移微环境的形成都有很好的调节作用,它可能通过抑制 Angpt2、VEGF、IL-6、IL-1 β 表达、保护脉管系统的完整性、阻碍前转移微环境的形成,最终抑制肺转移的发生。

关键词 乳移平;乳腺癌;肺转移;前转移微环境

Ruyiping Inhibited Pulmonary Metastasis of Breast Cancer by Regulating the Formation of Pre-metastasis Microenvironment YE Yi-yi¹, LIU Sheng^{1,2}, SUN Chen-ping², and WU Chun-yu² 1 Institute of TCM Surgery, Longhua Hospital, Shanghai University of TCM, Shanghai (200032); 2 7th Department of Surgery, Longhua Hospital, Shanghai University of TCM, Shanghai (200032)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Ruyiping (RYP, a recipe for fighting against recurrence and metastasis of breast cancer) on pre-metastatic microenvironment, and to study its possible mechanism. **Methods** The experiment was divided into two parts. The 1st part lies in setting the pre-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81102597)

作者单位:1. 上海中医药大学附属龙华医院中医外科研究所(上海 200032); 2. 上海中医药大学附属龙华医院外七科(上海 200032)

通讯作者:刘胜, Tel: 021-64385700, E-mail: yige823@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2017.01.0086

cancerous transfer, and the 2nd part lies in the effect of RYP on pre-metastatic microenvironment. There were 24 BALB/c mice in the 1st part. Logarithmic phase 4T1 cells were dispensed into cell suspension. Blood cells were counted by blood cell counter. Then they were injected into the 4th mammary fat pad of the 24 BALB/c mice under aseptic condition (1×10^6 cells/mL, 0.1 mL for each mouse). There were 60 BALB/c mice in the 2nd part. They were divided into the blank group, the model group, low, middle, high dose RYP groups by random digit table, 12 in each group. The modeling method was the same as mentioned above. Medication was started from the 2nd day of inoculation. Mice in low, middle, high dose RYP groups were administered with 5.13, 10.26, 20.52 g/kg RYP crude drugs per day by gastrogavage, once per day for 14 successive days. Equal volume of normal saline was administered by gastrogavage to mice in the blank group and the model group. Six mice were sacrificed at day 10, 14, 18, and 22, respectively in the 1st part of the experiment. The pulmonary metastasis was observed. The histology and micro-morphology of lung tissues were observed under light microscope and electron microscope/transmission electron microscopy (TEM) in the 2nd part of the experiment. The relative pulmonary vascular permeability was determined by Evans blue. The effect of RYP on the formation of pre-metastatic microenvironment was observed. The levels of angiogenin2 (Angpt2), vascular endothelial growth factor (VEGF), IL6 and IL1 β were detected by Western blot and Real time PCR. Results The period from day 0 to day 14 was considered to be the pre-metastatic phase. Compared with the model group, significant inhibition on the tumor weight and tumor volume were shown in middle and high dose RYP groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). RYP dose-dependently inhibited the tumor weight and tumor volume ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Infiltration of lymphocytes occurred in the model group and the low dose RYP group. But there was no statistical difference in the morphology of lung tissue in light microscopic results between middle/high dose RYP groups and the blank group. The pulmonary blood vessel net was consisted of continuously densely capillaries. The structure of pulmonary capillaries was normal in the blank group. The blood vessel walls were not regular and even in the model group, with obviously distended capillaries. After treated by RYP, the injury was improved, with normal basic morphology of blood vessels. Compared with the blank group, the exudate in Evans blue was obviously increased, protein and mRNA expressions of Angpt2, VEGF, IL6, and IL1 β were increased in the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, the exudate in Evans blue was obviously decreased in each YRP group. The reduction of the exudate was dose-dependently with the dose of YRP ($P < 0.01$). Protein and mRNA expressions of VEGF in the middle dose RYP group, protein and mRNA expressions of Angpt2, VEGF, IL6, and IL1 β were decreased in middle and high dose RYP groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Protein expressions of IL6 were decreased in the middle dose RYP group ($P < 0.01$). Conclusions RYP had favorable regulation in the tumor growth and the formation of pre-metastatic microenvironment. It could protect the integrity of vascular system, inhibit the formation of pre-metastatic microenvironment possibly through inhibiting the expressions of Angpt2, VEGF, IL6, and IL1 β , and finally inhibiting the occurrence of pulmonary metastasis of breast cancer.

KEYWORDS Ruyping; breast cancer; pulmonary metastasis; pre-metastatic microenvironment

乳腺癌是严重威胁女性健康的恶性肿瘤,据世界卫生组织国际癌症研究中心(International Agency for Research on Cancer, IARC)统计,2008年全球乳腺癌新发病例为138万,死亡例数为46万,占有女性恶性肿瘤死亡的13.7%^[1,2]。我国每年女性乳腺癌发病16.9万,是女性第2位最常见恶性肿瘤;我国女性每年乳腺癌死亡约4.5万,是女性第6位最常见的恶性肿瘤死亡原因^[3]。根据第3次全国死亡流行病学调查分析结果,乳腺癌的病死率在过去

30年上升了96%,预计未来10年无论发病率还是病死率都将呈上升趋势^[4]。

肺转移是乳腺癌最为常见的远端脏器转移,也是患者最主要的致死原因^[5]。Paget S^[6]的“种子-土壤”转移理论提出已经超过一个世纪,但到目前为止肿瘤细胞转移到某一特定靶器官的具体机制还未完全明朗。近年来的研究显示肿瘤前转移微环境(pre-metastatic niche)在肿瘤转移到特定器官过程中起了重要的作用^[7,8]。有关“前转移微环境学说”新的一

系列证据表明在肿瘤细胞到达靶器官之前,肿瘤细胞和靶器官微环境之间的就已经发生一系列相互作用,原发灶肿瘤分泌各种各样的细胞因子、趋化因子招募造血祖细胞、肿瘤相关巨噬细胞和骨髓来源细胞到肺中,参与前转移微环境的形成^[9,10]。

根据“痰毒瘀结”病机,课题组提出了“活血化瘀、化痰软坚、清热解毒,截断扭转杜旁窜”的指导原则防治乳腺癌肺转移,拟定了基于痰毒瘀结病机和散结解毒治则的乳移平。建立乳腺癌前转移动物模型,观察乳移平对肺前转移微环境的调控作用,进一步从分子水平探讨其调控机制,从而为中医药预防乳腺癌肺转移提供有意义的指导。

材料与方 法

1 动物 健康雌性 SPF 级 BALB/c 小鼠,4~6 周龄,体重 17~22 g,购自施莱克动物实验动物中心,饲养于 SPF 级条件下。许可证号:SCXK(沪)2012-0002,合格证号:2007000560788。

2 细胞及药物 小鼠肺高转移乳腺癌 4T1 细胞,购于上海中科院细胞研究所。乳移平:山慈菇 12 g 莪术 12 g 露蜂房 12 g 生薏苡仁 12 g 八月札 9 g。山慈菇购自上海华宇药业有限公司,莪术、蜂房(露蜂房)、生薏苡仁(薏苡仁)购自上海康桥中药饮片,八月札(预知子)购自上海虹桥中药饮片有限公司。乳移平水煎,浓缩至 2 g/mL,4℃ 保存。

3 试剂与仪器 胎牛血清(购自杭州四季青生物工程材料有限公司)。青霉素、链霉素(美国 Thermo Fisher SCIENTIFIC 公司)。苏木精伊红染色试剂盒(C0105,碧云天生物科技有限公司)。依文思蓝(E2129-1G,上海前尘生物科技有限公司)。总蛋白裂解液(P0013,碧云天生物科技有限公司)。蛋白浓度测定试剂盒(500-0006,美国 Bio-Rad 公司)。Anti-Angpt2(ab8452)、anti-VEGF(ab69479)、anti-IL6(ab7737)、anti-IL1 β (ab9722)和 anti- β -actin(ab8226)购自 Abcam 公司。IRDye 800 二抗(926-32211 和 926-32210)购自美国 LI-COR 公司。Trizol Regent(15596026,美国 Invitrogen 公司)。PrimeScriptTM RT reagent Kit 试剂盒(RR036A)和 SYBR[®] Premix Ex TaqTM 试剂盒(RR420Q)购自 Takara 公司。引物(上海皓嘉科技发展有限公司)。正置显微镜(BX43, Olympus)。Philip 透射电镜(Tecna 12,荷兰飞利浦公司)。Odyssey 红外荧光成像系统(LI-COR Biosciences 公司)。核酸蛋白分析仪(DU800,美国贝克曼库尔特公

司)。实时荧光定量 PCR 仪(RG-3000A, Corbett Research 公司)。

4 细胞培养 细胞在 1640 培养液中含 10% 胎牛血清,100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素,37℃、5% CO₂ 以及饱和湿度下进行培养。

5 造模、分组及给药方法

动物实验分两部分,第一部分是乳腺癌前转移时间的确定,第二部分是乳移平对前转移微环境的影响。第一部分实验 24 只 BALB/c 小鼠,取对数生长期 4T1 细胞配成细胞悬液,血细胞计数板计数,细胞浓度调 1×10^6 细胞/mL,无菌条件下接种于 24 只 BALB/c 小鼠胸壁右侧第四乳头的脂肪垫上,每只 0.1 mL^[11]。第二部分动物实验 60 只 BALB/c 小鼠,采用随机数字表法分成 5 组,分别为空白组、模型组、乳移平低、中、高剂量组,每组 12 只。造模方法同上,各组于接种次日开始给药。按人鼠等效剂量^[12]换算,乳移平低剂量组 5.13 g/(kg·d)生药量(0.5 倍等效剂量),乳移平中剂量组 10.26 g/(kg·d)生药量(1 倍等效剂量),乳移平高剂量组 20.52 g/(kg·d)生药量(2 倍等效剂量),每天给药 1 次,连续 14 天。空白组和模型组等体积生理盐水灌饲。

6 乳腺癌前转移时间确定 实验第一部分每天观察肿瘤的生长情况。分别于接种后 10、14、18、22 天,脱颈处死 6 只,剥离肺组织,Bouin's 液(苦味酸饱和液 75 mL,40% 甲醛 25 mL,冰醋酸 5 mL)固定 24 h,观察肺转移情况。

7 乳移平对前转移微环境的影响 给药结束后,取空白组、模型组、乳移平组小鼠各 6 只,尾静脉注射 20 mg/kg 依文思蓝,30 min 后脱颈处死开胸取部分左肺和肿瘤,肿瘤用于称重和测量,肺脏用于肺血管通透性检测实验。每组剩余的 6 只小鼠脱颈处死,摘取肿瘤和肺脏,肿瘤用于称重和测量,肺脏用于前转移肺形态观察及分子生物学实验。

7.1 肿瘤生长情况检测 电子天平称量瘤重,游标卡尺测量瘤长短径,根据公式 $V = 1/2ab^2$ (a 为长径, b 为短径),计算瘤体积。

7.2 光镜观察乳移平对前转移肺形态的影响 取部分肺组织,置于 4% 多聚甲醛中固定,逐级脱水,石蜡包埋,切 5 μ m 薄片,苏木精伊红染色试剂盒染色后在光镜下观察。

7.3 透射电镜观察乳移平对前转移肺血管形态的影响 取部分肺组织,置于 3% 戊二醛中固定,4℃ 保存,按照透射电镜样品制备程序制成超薄切片,电子染色后在透射电镜下观察(上海中医药大学

透射电镜室)。透射电镜样品制备程序:2%戊二醛前固定,1%锇酸后固定,漂洗后不同浓度的乙醇逐级脱水,环氧丙烷置换,环氧树脂 618 浸透,包埋,切 0.5 μm 薄片,枸橼酸铅电子染色后用透射电镜观察并拍照。

7.4 乳移平对前转移微环境中肺血管通透性影响 吸干肺组织表面水分及血液,按 100 mg 肺/3 mL 甲酰胺的比例浸泡于甲酰胺溶液中,60 $^{\circ}\text{C}$ 抽提 24 h,1 000 r/min 离心 5 min,取上清液,620 nm 测吸光度值,根据依文思蓝的标准曲线计算各组小鼠肺组织中依文思蓝的渗出量。

7.5 乳移平对前转移微环境中血管生成素(angiotenin, Angpt) 2、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、白介素(Interleukin, IL)-6 和 IL-1 β 蛋白表达检测 取部分肺组织研磨,用总蛋白裂解液抽提总蛋白,蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白定量。抽提的总蛋白于 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min 使其充分变性,取 10 μg 样品上样于 10% SDS-PAGE 胶,80 V 20 min 更换电压到 120 V,直到溴酚蓝跑到胶的底部。恒流 350 mA,1~2 h(根据蛋白分子量的大小)转移到硝酸纤维素膜上。将该膜浸于含 5% 脱脂奶粉中封闭 1 h,之后一抗用封闭液按照 1:1 000 稀释(anti-Angpt2、anti-VEGF、anti-IL6、anti-IL1 β 、anti- β -actin),孵育过夜。PBST 洗膜后,将 IRDye 800 二抗用封闭液按照 1:500 稀释,孵育 1 h。红外荧光成像系统扫描并分析数据。

7.6 乳移平对前转移微环境中 Angpt2、VEGF、IL-6 和 IL-1 β mRNA 表达的影响 取部分肺组织研磨,加入 Trizol,用酚-氯仿法抽提总 RNA,并用核酸蛋白分析仪测定 OD₂₆₀ 及 OD₂₈₀ 值,分析其纯度,同时进行定量。

逆转录按照 Takara 公司提供的 PrimeScript™ RT reagent Kit 试剂盒说明书操作,逆转录体系:5 \times PrimeScript™ Buffer 2 μL , PrimeScript™ RT Enzyme Mix I 0.5 μL , Oligo dT Primer (50 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , Random 6 mers (100 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , 总 RNA 200 ng,并补加 RNase Free dH₂O 至 10 μL 充分混合;逆转录条件:37 $^{\circ}\text{C}$ 逆转录 15 min,85 $^{\circ}\text{C}$ 逆转录酶灭活 5 s, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存 cDNA。

实时荧光定量 PCR 按照 Takara 公司提供的 SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒说明书进行操作,扩增体系:SYBR® Premix Ex Taq™ 10 μL , PCR Forward Primer (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , PCR Reverse Primer (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , DNA 模板 1 μL , dH₂O 至

20 μL 充分混合;PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 15 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s, 循环 40 次。PCR 扩增用引物序列采用 Primer 5.0 进行设计,引物序列 VEGF: 5'-GAGAGAGGC-CGAAGTCCTTT-3', 5'-TTGGAACCGGCATCTT-TATC-3', 产物长度 163 bp; Angpt2: 5'-TCA-GAAGCAGCAGCATGACCTA-3', 5'-GCACAGTC TCTGAAGGTGGTTTG-3', 产物长度 123 bp; IL-6: 5'-CCTCTCTGCAAGAGACTTCCAT-3', 5'-AGTCT CCTCTCCGACTTGT-3', 产物长度 110 bp; IL-1 β : 5'-CAGGATGAGGACATGAGCACC-3'; 5'-CTCTGCAGACTCAAACCTCCAC-3', 产物长度 153 bp; GAPDH: 5'-AAATGGTGAAGGTCCGGTGAAC-3', 5'-CAACAATCTCCACTTTGCCACTG-3', 产物长度 90 bp。

采用 Ct 值计算基因表达情况^[13]。2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} : 反映药物处理组的某一待测基因相对于空白对照组的基因表达变化情况。 $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{待测基因}} - \text{Ct}_{\text{GAPDH}}$ 。 $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{处理组}} - \Delta\text{Ct}_{\text{对照组}}$ 。

8 统计学方法 采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据处理,结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异用单因素方差分析,组间两两比较用 SNK 检验,实验重复 3 次或 3 次以上, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 乳腺癌前转移模型建模时间的确定 接种 10、14 天 6 只小鼠均未见肺转移灶,18 天发现 1 只有肺转移灶,另外 5 只未见明显肺转移灶,22 天发现 4 只小鼠有肺转移灶,另外 2 只未见明显肺转移灶。根据实验结果,肺转移还未发生的乳腺癌前转移时期的建模时间定为 14 天。

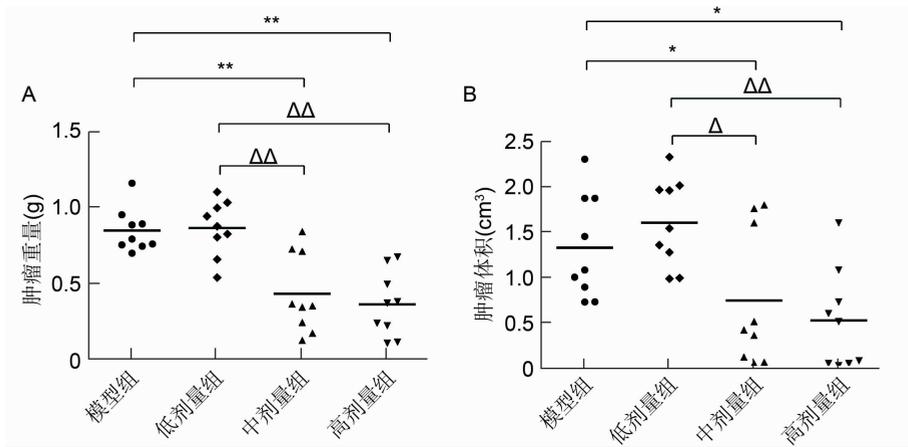
2 肿瘤生长结果比较(图 1) 接种 14 天后,接种部位出现肿瘤结节,呈圆形、椭圆形或分叶状生长,质地较硬。与模型组比较,乳移平中、高剂量组对瘤重、瘤体积都有显著的抑制作用($P < 0.05$, $P < 0.01$),而低剂量组对瘤重和瘤体积没有明显作用($P > 0.05$)。乳移平对肿瘤的重量和体积的抑制作用随着乳移平剂量的增加而增加,呈现明显的剂量依赖关系($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

3 乳移平对前转移肺血管形态学影响

3.1 光镜观察结果(图 2) 模型组(图 2B)与乳移平低剂量组(图 2C)都有淋巴细胞浸润(黑色箭头)的发生,而乳移平中、高剂量组光镜结果发现肺组织形态(图 2D、2E)与空白组无区别。中国

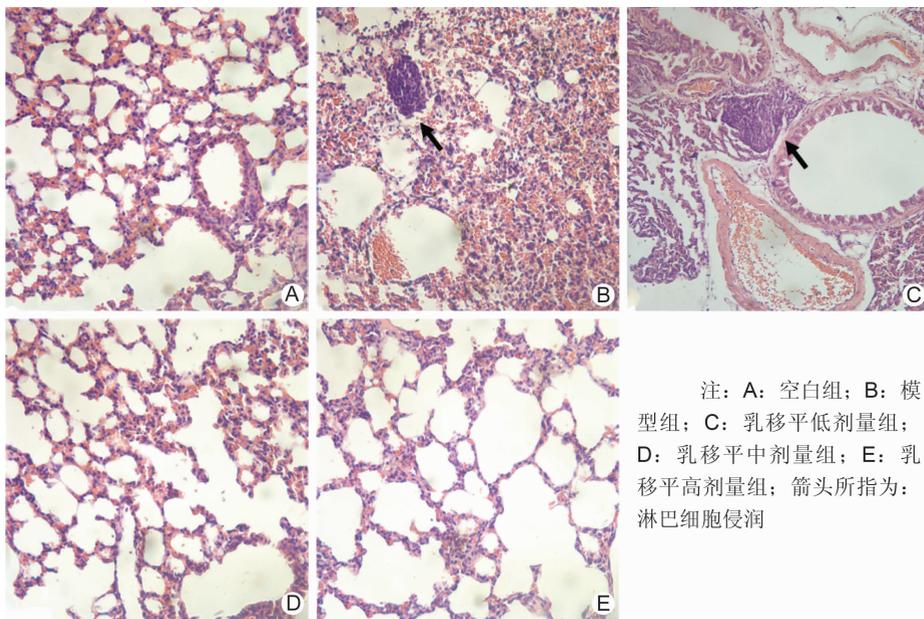
3.2 透射电镜观察结果(图 3) 肺部的血管网是由连续的、密集的毛细血管组成。空白组肺脏毛细血管结构正常(图 3A)。模型组血管壁不像空白组平

整、规则,毛细血管扩张明显,表明血管已经损伤(图 3B)。乳移平给药后,血管的损伤情况得到改善,血管形态基本和正常组无异(图 3C)。



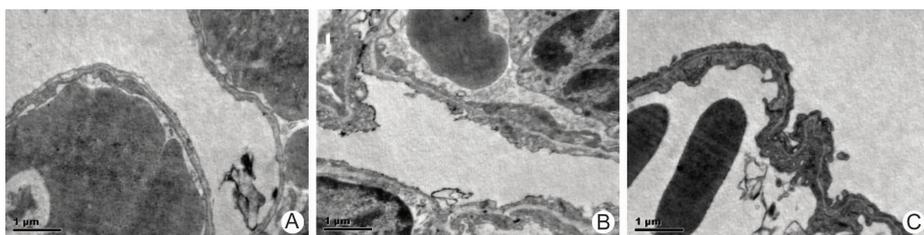
注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与乳移平低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;A:乳移平对瘤重的影响;B:乳移平对瘤体积的影响

图 1 乳移平对肿瘤生长的影响($n=9$)



注:A:空白组;B:模型组;C:乳移平低剂量组;D:乳移平中剂量组;E:乳移平高剂量组;箭头所指为:淋巴细胞浸润

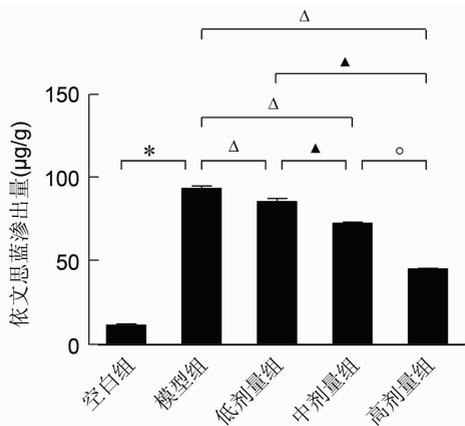
图 2 各组光镜观察结果 (×400)



A:空白组;B:模型组;C:乳移平高剂量组

图 3 各组透射电镜观察结果 (×11 500)

4 乳移平对前转移微环境中肺血管通透性影响 (图 4) 与空白组比较,模型组肺组织中依文思蓝渗



注:与空白组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$;与乳移平低剂量组比较, $\blacktriangle P < 0.01$;与乳移平中剂量组比较, $\circ P < 0.01$

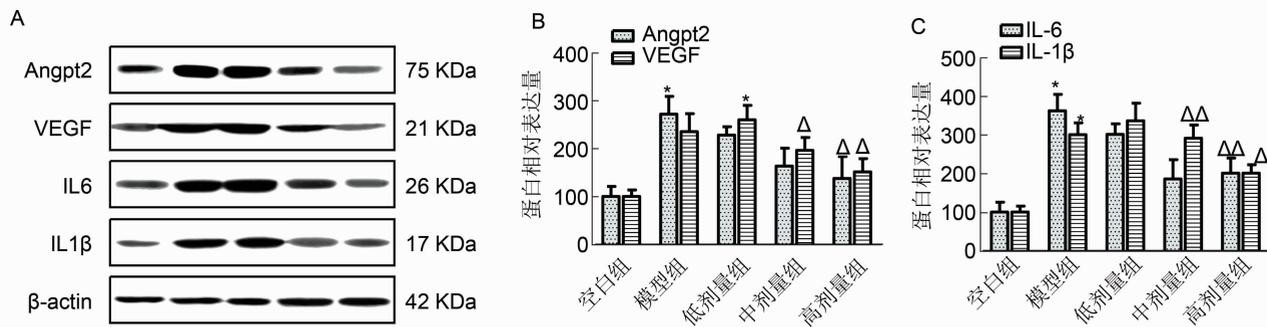
图 4 乳移平对前转移微环境中肺血管通透性影响 ($n = 6$)

出量明显增加($P < 0.01$)。与模型组比较,乳移平各剂量组依文思蓝的渗出量均显著降低,且中药剂量越高,降低越明显,呈现剂量依赖关系($P < 0.01$)。

5 乳移平对肺前转移微环境中 Angpt2、VEGF、IL-6、IL-1 β 蛋白及 mRNA 表达的影响(图 5 和图 6) 与空白组比较,模型组 Angpt2、VEGF、IL-6、IL-1 β 的蛋白及 mRNA 表达明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$)。与模型组比较,乳移平中剂量组 VEGF、乳移平高剂量组 Angpt2、VEGF、IL-6、IL-1 β 蛋白及 mRNA 表达明显降低($P < 0.05, P < 0.01$),乳移平中剂量组 IL-6 蛋白表达降低($P < 0.01$)

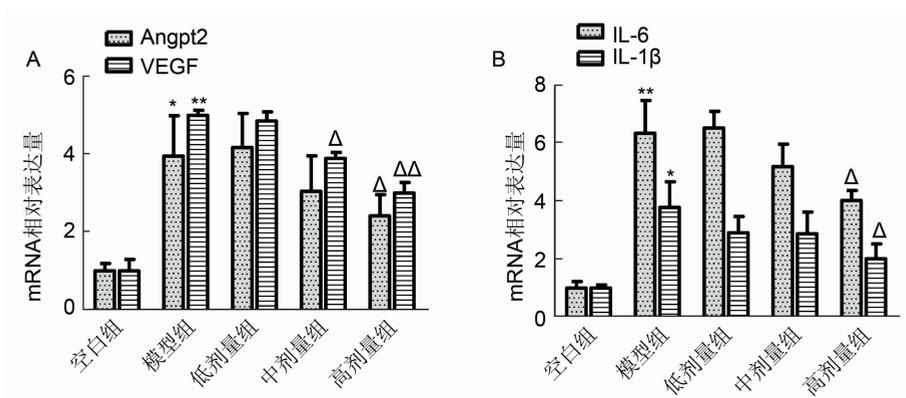
讨 论

肿瘤转移是一个极其复杂的过程,它包括肿瘤细胞从原位脱落、扩散到临近组织,侵入基底膜,进入循环系统,在另一个靶器官存活并最终形成转移瘤。在转移过程中,肿瘤和微环境都时时刻刻相互影响^[14]。



注:A:Western blot 条带图;B:Angpt2、VEGF 蛋白表达示意图;C:IL-6、IL-1 β 蛋白表达示意图;与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$

图 5 乳移平对肺组织中 Angpt2、VEGF、IL-6、IL-1 β 蛋白表达的影响 ($n = 6$)



注:A:Angpt2、VEGF mRNA 表达示意图;B:IL-6、IL-1 β mRNA 表达示意图;与空白对照组比较,* $P < 0.05, **P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$

图 6 乳移平对肺组织中 Angpt2、VEGF、IL-6、IL-1 β mRNA 表达的影响 ($n = 6$)

从中医学角度来看,肿瘤转移必须具备两个条件:一是癌症的邪气盛,邪气盛最主要的因素是癌毒毒力和瘀血阻滞;二是被转移的器官正气虚,“最虚之处,便是客邪之地”,正气虚的部位就建立了前转移微环境。癌毒内积日久伤及脏腑功能,导致津液不得正常输布代谢,滞留体内,凝聚而为痰,形成痰毒交结;余毒内积,阻滞气机,气不行血,血脉凝滞为瘀。痰瘀同源,相互影响,易凝聚成毒,痰滞体内,血行受阻,而成瘀血;瘀血乃有形之物,易滞气机,阻滞络道,致络中之津不能渗出脉外,络外之津亦不能入于脉中,而津液聚积化生痰浊,痰瘀互结,郁久腐化,久则凝聚成毒。痰、毒、瘀三邪相互影响,形成痰瘀毒相互交结,促进了乳腺癌的发展。前转移微环境是癌毒扩散和转移的适宜土壤与环境,“稽留而不去,息而成积也”,癌毒在沿经脉、络脉播散过程中,为诸邪所阻于“最虚”之地,气血失和,痰瘀毒聚,即可形成转移瘤。

乳移平全方由 5 味药组成,方中以山慈菇、蜂房共为君药,二者抗癌散结力强,且兼具“以毒攻毒”之意,同时蜂房还具有温肾的作用;以莪术为臣药,破瘀攻积,共奏消瘤散结之效;再以生薏苡仁、八月札为佐使,化痰理气,健脾疏肝,既能消积化痞,又使全方祛邪而不伤正,更好的发挥散结解毒之功。前期研究发现基于痰毒瘀结病机和散结解毒治则的临床有效方剂乳移平能抑制乳腺癌肺转移^[15-17],但乳移平对前转移微环境的影响还不得而知,有待深入研究。了解原位瘤如何推进肺前转移微环境的形成、乳移平如何阻断这个过程,不仅能为今后恶性肿瘤的临床和基础研究提供可靠的参考依据,同时也为乳腺癌肺转移的中医药预防和治理提供新思路。

血管渗透性的增加和炎性信号通路激活是肺前转移微环境形成的代表性起始事件^[18,19]。本实验发现与正常小鼠比较,4T1 荷瘤鼠肺血管渗透性增加,毛细血管腔扩张,且前转移肺组织中发生淋巴细胞浸润的情况。在炎症初期,炎症因子的激活会引发血管扩张,血管壁通透性升高^[20]。因此,笔者认为在前转移时期,炎症反应和炎症引起的血管高渗奠定了肺微环境异常的基础。

乳移平作为临床有效抗乳腺癌复发转移药物,不仅在抑制乳腺癌原位瘤生长上有很好的疗效,同时它又能够有效地改善前转移微环境的异常改变。乳移平对肿瘤的生长抑制以及对微环境的改善作用同样可以用现代药理学的研究结果来解释,方中的山慈菇主要有效成分秋水仙碱,在临床上用于抗肿瘤治疗已有悠久的历史^[21]。莪术的主要有效成分莪术油的抗肿瘤

作用也不容小觑^[22],但是莪术油属于挥发油类成分,在莪术水煎液中含量不多,因此笔者认为乳移平方药中起主要抗肿瘤作用的还是山慈菇。除此之外,现代药理学研究也证实山慈菇、莪术和露蜂房都有很好的消炎作用^[23],它们共同改善前转移时期的肺部炎症。

大量文献证实,肿瘤衍生因子,包括 Angpt2、VEGF、IL-6、IL-1 β 在前转移微环境形成和肿瘤转移过程都有重要作用。IL-6 和 IL-1 β 是重要的炎症调节因子,这两个蛋白也与肿瘤的生长转移有关。IL-6 控制肿瘤细胞的形态变化,参与上皮-间质转化,影响肿瘤细胞的迁移与侵袭^[24]。IL-1 β 是 IL-1 家族中最重要的成员之一,它介导了炎症的重要过程,同时它也是炎症微环境里的重要成分之一,与多种肿瘤的发生、发展、侵袭、转移密切相关^[25]。Angpt2 是由血管内皮分泌的血管原性生长因子,在血管新生、血管重塑中异常高表达。在 VEGF 的存在下,Angpt2 促肿瘤血管新生能力更强。Angpt2 同时也在前转移微环境的形成中发挥重要作用^[10]。因此,VEGF、Angpt2、IL-6、IL-1 β 统称为前转移因子。

本实验结果表明,在 4T1 乳腺癌细胞建立的前转移小鼠模型中,VEGF、Angpt2、IL-6、IL-1 β 蛋白表达和基因转录增强。采用乳移平给药干预后,以上 4 个因子的表达都有不同程度的下降,特别是高剂量组下降最明显,存在浓度依赖性。因此,笔者推测乳移平阻碍前转移微环境形成的潜在分子机制是通过抑制前转移因子的表达。

在实验中发现的前转移微环境中淋巴细胞浸润,到底是哪种类型的淋巴细胞?如何对其相应表面标志物进行检测?这些微环境中的淋巴细胞是否会分泌细胞因子或趋化因子,诱导肿瘤的发展?这些都不得而知,有待本课题组进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12): 2893-2917.
- [2] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.
- [3] 张敏璐,黄哲宙,郑莹. 中国 2008 年女性乳腺癌发病、死亡和患病情况的估计及预测 [J]. *中华流行病学杂志*, 2012, 33(10): 1049-1051.
- [4] 中华人民共和国卫生部. 第三次全国死因调查主要情况 [J]. *中国肿瘤*, 2008, 17(5): 344-345.
- [5] Lu X, Yan CH, Yuan M, et al. *In vivo* dynamics and distinct functions of hypoxia in primary tumor growth

- and organotropic metastasis of breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(10): 3905–3914.
- [6] Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 1989, 8(2): 98–101.
- [7] Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms [J]. *Cell*, 2011, 147(2): 275–292.
- [8] Psaila B, Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(4): 285–293.
- [9] Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis [J]. *Nat Med*, 2013, 19(11): 1423–1437.
- [10] Huang Y, Song N, Ding Y, et al. Pulmonary vascular destabilization in the premetastatic phase facilitates lung metastasis [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(19): 7529–7537.
- [11] Heppner GH, Miller FR, Shekhar PM. Nontransgenic models of breast cancer [J]. *Breast Cancer Res*, 2000, 2(5): 331–334.
- [12] 陈奇主编. 中药药理研究方法学 [M]. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 33.
- [13] Johnson MR, Wang K, Smith JB, et al. Quantitation of dihydropyrimidine dehydrogenase expression by real-time reverse transcription polymerase chain reaction [J]. *Anal Biochem*, 2000, 278(2): 175–184.
- [14] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646–674.
- [15] 刘玲琳, 刘胜. 乳移平配伍肺经引经药桔梗抗乳腺癌肺转移作用及机制的实验研究 [J]. *上海中医药杂志*, 2010, 44(10): 61–65.
- [16] 刘胜, 花永强, 孙虎平, 等. 乳移平抗乳腺癌术后复发转移的临床研究 [J]. *中西医结合学报*, 2007, 5(2): 147–149.
- [17] 刘胜, 花永强, 杨新伟, 等. 乳移平对不同乳腺癌肺转移动物模型 VEGF 蛋白表达和 MVD 计数影响的研究 [J]. *上海中医药杂志*, 2007, 41(3): 11–13.
- [18] Han M, Xu J, Bi Y, et al. Primary tumor regulates the pulmonary microenvironment in melanoma carcinoma model and facilitates lung metastasis [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2013, 139(1): 57–65.
- [19] Hood JL, San RS, Wickline SA. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(11): 3792–3801.
- [20] Nagy JA, Benjamin L, Zeng H, et al. Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis [J]. *Angiogenesis*, 2008, 11(2): 109–119.
- [21] 宫爽, 孙佳明, 田淋淋, 等. 天然药物中生物碱类成分抗肿瘤活性 [J]. *吉林中医药*, 2014, 34(9): 927–931.
- [22] 曾建红, 黄凤香, 廖迎. 莜术油的含量测定和抗肿瘤作用的新进展 [J]. *肿瘤药理学*, 2012, 2(1): 19–22.
- [23] 王斌, 张成桂, 高鹏飞, 等. 中药蜂房的化学成分及临床药理研究进展 [J]. *国际药学研究杂志*, 2014, 41(2): 184–189.
- [24] Osuala KO, Sameni M, Shah S, et al. IL-6 signaling between ductal carcinoma in situ cells and carcinoma-associated fibroblasts mediates tumor cell growth and migration [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 584.
- [25] Carmi Y, Dotan S, Rider P, et al. The role of IL-1 β in the early tumor cell-induced angiogenic response [J]. *J Immunol*, 2013, 190(7): 3500–3509.

(收稿:2015-12-02 修回:2016-10-10)