

乳宁 号方对小鼠 Ca761 乳腺癌移植瘤细胞周期及 p53 和 ras 表达的影响

陈前军¹, 王一安¹, 司徒红林¹, 陆德铭², 任黎萍¹, 赖熙雯¹, 刘鹏熙¹, 林 毅¹

(1 广州中医药大学广东省中医院乳腺科, 广东 广州 510120; 2. 上海中医药大学龙华医院乳腺科, 上海 200032)

[摘要] 目的:通过研究乳宁 号方对小鼠 Ca761 乳腺癌移植瘤细胞周期及 p53、ras 表达的影响,探讨乳宁 号方抑制乳腺癌生长的机制。方法:建立小鼠 Ca761 乳腺癌移植模型,小鼠造模后随机分成生理盐水对照组、环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)治疗组、乳宁 号方治疗组及乳宁 号方加 CTX 治疗组,每组 12 只。用流式细胞术检测经不同方法处理的荷瘤小鼠移植瘤细胞的细胞周期,同时运用免疫组化法测定移植瘤组织中 p53 和 ras 癌基因蛋白的表达,并进行组间比较。结果:乳宁 号方治疗组、CTX 治疗组与乳宁 号方加 CTX 治疗组 S 期肿瘤细胞与生理盐水对照组比较明显减少($P < 0.05$);乳宁 号方治疗组 G_0-G_1 期肿瘤细胞百分比低于 CTX 治疗组($P < 0.05$),而 G_2-M 期细胞百分比高于 CTX 治疗组($P < 0.05$);乳宁 号方治疗组与乳宁 号方加 CTX 治疗组 p53 的表达均显著低于生理盐水对照组($P < 0.05$),而 CTX 对 p53 表达的影响不显著($P > 0.05$);乳宁 号方治疗组、CTX 治疗组与乳宁 号方加 CTX 治疗组 ras 的表达均低于生理盐水对照组($P < 0.05$)。结论:乳宁 号方可通过调控小鼠 Ca761 乳腺癌移植瘤细胞的细胞周期来影响肿瘤的生长,这一作用与其调控肿瘤组织 p53 和 ras 基因表达有关。

[关键词] 中国医药学; 乳腺癌; 细胞分化; 癌基因蛋白类

[中图分类号] R289.91 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-1977(2005)03-0225-04

Effects of Runing Recipe on expressions of p53 and ras oncogene proteins and cell cycle of the transplanted Ca761 breast cancer in mice

CHEN Qian-Jun¹, WANG Yi-An¹, SITU Hong-Lin¹, LU De-Min², REN Li-Ping¹, LAI Xi-Wen¹, LIU Peng-Xi¹, LIN Yi¹

(1. Department of Breast Diseases, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong Province 510120, China; 2. Department of Breast Diseases, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

ABSTRACT Objective: To explore the mechanisms of Runing Recipe (a recipe composed of traditional Chinese herbs) in inhibiting the growth of breast cancer by observing its effects on the expressions of p53 and ras oncogene proteins and cell cycle of the transplanted Ca761 breast cancer in mice. Methods: We established the breast cancer model by transplanting Ca761 cells in mice. The mice were randomly divided into 4 groups: normal saline control group, CTX-treated group, Runing Recipe -treated group, and Runing Recipe and CTX-treated group, with 12 mice in each group. We detected the cell cycle of the cancer cells in the mice's transplanted tumor with flow cytometry and measured the expressions of p53 and ras oncogene proteins in the transplanted tumor with immunohistochemical methods. Results: The percentages of tumor cells in S-phase of the Runing Recipe -treated group, CTX-treated group and Runing Recipe and CTX-treated group were significantly lower than that of the normal saline control group respectively ($P < 0.05$). The percentage of tumor cells in G_0-G_1 phase of the Runing Recipe -treated group was lower than that of the

[作者简介] 陈前军(1972-), 男, 博士, 副教授, 副主任医师。

Correspondence to: CHEN Qian-Jun, MD, Associate Professor. E-mail: cqj55@163.com

CTX-treated group ($P < 0.05$), while the percentage of tumor cells in G₂-M phase was higher than that of the CTX-treated group. The immunoreactive scores (IRSs) of p53 in the Runing Recipe-treated group and Runing Recipe and CTX-treated group were significantly lower than that in the normal saline control group respectively ($P < 0.05$). The effect of CTX on the expression of p53 was not significant. The IRSs of ras oncogene protein in the Recipe-treated group, CTX-treated group and Runing Recipe and CTX-treated group were lower than that in the normal saline control group respectively ($P < 0.05$). Conclusion: Runing Recipe can inhibit the growth of Ca761 breast cancer in mice by controlling the cell cycle of the transplanted tumor. This may be related to its effect on the gene expressions of p53 and ras in the tumor tissue.

KEY WORDS Chinese medicine and pharmacology; breast cancer; cell differentiation; oncoproteins

J Chin Integr Med, 2005, 3(3): 225-228

肿瘤细胞细胞周期失去有效控制是肿瘤增殖的主要机制之一。p53 与 ras 基因的变异是细胞周期失调的重要原因, p53 诱导 p21 表达共同参与细胞周期的调控^[1,2]。乳宁 号方是陆德铭教授根据多年防治乳腺癌的经验, 以益气养阴, 调冲任, 佐以解毒为大法研制而成。既往研究表明该药对小鼠乳腺癌细胞的生长具有抑制作用^[3,4], 本研究拟从该药对肿瘤细胞分化及 p53 和 ras 蛋白表达的影响探讨其抑制乳腺癌生长的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 615 系小鼠 48 只, 雌性, 体质量 20 g 左右, 6 周龄, 购自协和医科大学实验动物学部实验动物繁育场。

1.2 药物与试剂 乳宁 号方由生黄芪、枸杞子、仙灵脾、莪术等中药组成, 由上海中医药大学龙华医院制剂室制成含生药 3.2 g/ml 的水煎浓缩液。环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)由上海华联制药有限公司生产, 沪卫准字(1995)第 012034 号, 200 mg/瓶, 用生理盐水稀释成 4 mg/ml。免疫组化试剂 p53(工作浓度为 1:50)与 ras(工作浓度为 1:100)单抗购自丹麦 Dako 公司。

1.3 瘤株与造模 615 系小鼠乳腺癌细胞株 Ca761 由大连医科大学病理生理学教研室钱振超教授惠赠。将 2×10^6 个 Ca761 细胞移植于 615 系小鼠右腋皮下, 建立小鼠乳腺癌移植模型^[5]。接种次日开始用药, 用量按人与动物体表面积折算^[5]。

1.4 实验动物分组 造模后的小鼠随机分成 4 组, 每组 12 只。生理盐水对照组以生理盐水 0.2 ml/d 灌胃; CTX 治疗组以 CTX 40 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 腹腔注射; 乳宁 号方治疗组以乳宁 号方 30 g·kg⁻¹·d⁻¹ 灌胃; 乳宁 号方加 CTX 治疗组以乳宁 号方 30 g·kg⁻¹·d⁻¹ 灌胃和 CTX 40 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 腹腔注射。各组处理时间均为 21 d。

1.5 观察指标

1.5.1 细胞周期 每组取 8 个肿瘤组织标本, 运用流式细胞仪检测肿瘤组织细胞周期。

1.5.2 p53 及 ras 蛋白表达 每组取 10 个肿瘤组织标本, 用免疫组织化学 ABC 法。p53 检测以细胞核出现棕色颗粒者为阳性细胞, ras 检测以细胞浆出现棕色颗粒者为阳性细胞。结果判断采用免疫反应积分(immunoreactive score, IRS)标准^[6]。该计分法避免了单一阳性细胞数或阳性强度计分的缺点, 能较完整地反映免疫组化反应结果。具体计算方法如下。着色强度(staining intensity, SI)计分: 着色阴性为 0 分; 着色弱、中、强依次为 1、2、3 分。阳性细胞百分数(percentage of positive cells, PP)计分: 无阳性细胞为 0 分; 阳性细胞数 10% 为 1 分, 11%~50% 为 2 分, 51%~80% 为 3 分; >80% 为 4 分。总积分: $IRS = SI \times PP$ 。

1.6 统计学方法 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间数据比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 乳宁 号方对小鼠 Ca761 乳腺癌移植瘤细胞周期的影响 CTX 治疗组、乳宁 号方治疗组和乳宁 号方加 CTX 治疗组 S 期肿瘤细胞百分比(S-phase fraction, SPF)明显低于生理盐水对照组 ($P < 0.05$), 其中乳宁 号方加 CTX 治疗组低于 CTX 治疗组 ($P < 0.05$), 提示乳宁 号方与 CTX 有抑制肿瘤增殖的作用, 且乳宁 号方与 CTX 有协同抑制肿瘤增殖的作用。乳宁 号方治疗组 G₀-G₁ 期肿瘤细胞百分比低于 CTX 治疗组 ($P < 0.05$), 而乳宁 号方治疗组 G₂-M 期肿瘤细胞百分比高于 CTX 治疗组 ($P < 0.05$), 提示乳宁 号方与 CTX 干预细胞周期的时点并不一致。见表 1。

2.2 乳宁 号方对小鼠 Ca761 乳腺癌移植瘤 p53 和 ras 蛋白表达的影响 乳宁 号方治疗组与乳宁

号方加 CTX 治疗组 p53 IRS 平均值均显著低于生理盐水对照组 ($P < 0.05$); 而 CTX 治疗组与生理盐水对照组比较无统计学差异 ($P > 0.05$)。乳

宁号方治疗组、CTX 治疗组与乳宁号方加 CTX 治疗组 ras IRS 平均值均低于生理盐水对照组 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 乳宁号方对小鼠 Ca761 乳腺癌移植瘤细胞周期的影响

Tab 1 Percentages of cells in different cell cycles in 4 groups of mice with transplanted Ca761 breast cancer

($\bar{x} \pm s, \%$)

Group	n	G ₀ -G ₁ phase	S phase	G ₂ -M phase
Normal saline control	8	59.41 ± 4.69	25.43 ± 5.02	14.99 ± 3.42
CTX-treated	8	74.10 ± 4.98*	15.57 ± 3.96*	10.33 ± 3.72*
Runing Recipe -treated	8	66.25 ± 5.19*	18.60 ± 2.21*	15.16 ± 4.45
Runing Recipe and CTX-treated	8	78.19 ± 4.02*	13.03 ± 6.05*	8.78 ± 2.76*

* $P < 0.05$, vs normal saline control group; $P < 0.05$, vs CTX-treated group

表 2 乳宁号方对小鼠 Ca761 乳腺癌移植瘤 p53 和 ras 蛋白表达的影响

Tab 2 Expressions of p53 and ras oncogene proteins in 4 groups of mice with transplanted Ca761 breast cancer

($\bar{x} \pm s$)

Group	n	p53 IRS	ras IRS
Normal saline control	10	5.60 ± 2.76	4.70 ± 1.41
CTX-treated	10	4.20 ± 2.53	2.90 ± 0.88*
Runing Recipe -treated	10	2.40 ± 1.65*	2.70 ± 1.42*
Runing Recipe and CTX-treated	10	2.80 ± 2.30*	2.80 ± 1.03*

* $P < 0.05$, vs normal saline control group

3 讨论

细胞增殖按一定次序进行,称细胞周期。肿瘤细胞动力学特点是细胞群体主要分布于 DNA 合成活跃的 S 期。G₁ 期的后期,细胞开始合成 DNA 的前体物质,进入 S 期即开始 DNA 合成,细胞一旦进入此期,如无特殊干扰,便能按细胞周期的顺序发展下去,直至重新回到 G₁ 期。因此,在 G₁ 至 S 期或 G₂ 至 M 期进行阻断,便能有效控制肿瘤细胞周期,从而抑制肿瘤细胞增殖。另外,细胞周期也可停止于 G₁、G₂ 期^[7]。

本研究采用流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 来分析乳宁号方及 CTX 对 615 系小鼠体内 Ca761 乳腺癌细胞增殖周期的影响,结果显示各治疗组 S 期肿瘤细胞与生理盐水对照组都存在显著差异 ($P < 0.05$), 其中乳宁号方加 CTX 治疗组低于 CTX 治疗组 ($P < 0.05$); 乳宁号方治疗组 G₀-G₁ 期肿瘤细胞百分比低于 CTX 治疗组 ($P < 0.05$); 乳宁号方治疗组 G₂-M 期肿瘤细胞百分比高于 CTX 治疗组 ($P < 0.05$)。提示乳宁号方、CTX 均可将 Ca761 小鼠乳腺癌细胞阻断于 G₁ 至 S 期,从而抑制了肿瘤细胞 DNA 合成和细胞增殖,但两者对该细胞周期的调控机制并不完全相同,前者可能侧重于 G₂/M 关卡效应,即控制 G₂ 向 M 期的转化,后者可能更侧重于阻断 G₁ 向 S 期的转化。

分子生物学研究证明 p21 基因是 p53 的作用靶点, p53 能够结合 p21 的启动子, 诱导 p21 基因的转录, 进而抑制细胞周期, 诱导细胞进入 G₁ 期。而在 p53 变异的细胞株中, p21 表达抑制, 细胞分裂次数增加约 20 次。此外, p53 基因尚可通过 Gas-1 及其它不明机制参与 G₂/M 关卡效应, 调控 G₀ 向 G₁ 期转移^[8]。因此, p53 与 ras 基因的变异是细胞周期失调的重要原因。本研究结果显示, CTX 对 Ca761 小鼠乳腺癌细胞 p53 基因表达的影响不显著, 对 ras 蛋白 p21 的表达有抑制作用, 这提示 CTX 可通过抑制突变型 p21 的表达来实现对该细胞株细胞周期的调控, 而乳宁号方对突变型 p53 和 p21 的表达均有抑制, 这可能是造成 CTX 治疗组与生理盐水对照组 S 期细胞数差异的一个重要原因。由此可见, 细胞周期的调控是多基因参与的复杂过程, 而乳宁号方可通过对多基因表达的影响来实现对细胞周期的调控。

[参考文献]

- 1 EI-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, et al. WAF₁/CIP₁ is induced in p53-mediated G₁ arrest and apoptosis [J]. Cancer Res, 1994, 54(5): 1169-1174.
- 2 Oda H, Nakatsuru Y, Ishikawa T. Mutations of the p53 gene and p53 protein overexpression are associated with sarcomatoid transformation in renal cell carcinomas [J]. Cancer Res, 1995, 55(3): 658-662.

3 陈前军, 陆德铭, 刘 胜, 等. 中药乳宁 号对 Ca761 小鼠移植性乳腺癌的抑制作用 [J]. 实用肿瘤学杂志, 1999, 13(4): 243-244 .

4 陈前军, 张 策, 陆德铭, 等. “乳宁 号”对 Ca761 小鼠移植性乳腺癌移植瘤细胞分化的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2001, 7(8): 34-36 .

5 韩 锐主编. 抗癌药物研究与实验技术 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1997. 439 .

6 Friedrichs K, Gluba S, Eidtmann H, *et al*. Overexpression of p53 and prognosis in breast cancer [J]. Cancer, 1993, 72(12): 3641-3647 .

7 高 慧, 傅松滨, 董 辉, 等. 肿瘤中 p16 基因的研究进展 [J]. 国外医学·遗传学分册, 1999, 22(2): 61-63 .

8 王志浩. p53 基因结构与功能研究的新进展 [J]. 国外医学·遗传学分册, 1999, 22(1): 25-29 .

[收稿日期] 2005-03-18 [本文编辑] 周庆辉

(上接第 224 页)

无效:未达到上述标准。

1.5 统计学方法 资料采取 Ridit 分析进行比较。

2 结 果

2.1 症状和体征改善情况 骨折主要临床症状和

体征明显改善,经 Ridit 分析, $P < 0.01$, 存在显著性差异。见表 1。

2.2 骨痂生长情况的观察 骨折临床愈合显效 171 例(76%),有效 53 例(23.6%),无效 1 例(0.4%)。

2.3 副作用观察 225 例治疗前后肝功能、肾功能、血常规、尿常规无明显变化,无新的异常病症发生。

表 1 治疗前后症状体征观察

症状和体征	N	治疗前分级				治疗后分级				P
		+++	++	+	0	+++	++	+	0	
疼痛及压痛	225	169	52	4	0	0	5	220	< 0.01	
局部肿胀	225	207	17	1	0	4	28	193	< 0.01	
畸形	225	159	44	17	5	0	2	223	< 0.01	
异常活动	225	203	14	3	5	0	0	225	< 0.01	
骨擦音	225	217	3	0	5	0	0	225	< 0.01	
功能障碍	225	217	3	4	1	0	11	211	< 0.01	
神经损伤	7	4	2	1	0	0	1	6	< 0.01	
血管损伤	11	11	0	0	0	0	0	11	< 0.01	
肌腱损伤	28	28	0	0	0	1	3	20	< 0.01	
混合损伤	15	15	0	0	0	0	2	9	< 0.01	

3 讨 论

祖国传统医学认为骨折愈合的过程就是“瘀去、新生、骨合”的过程。这一过程是持续和渐进的,一般可分为血肿机化期、原始骨痂期和骨痂改造期。与之相应的是中医学的损伤三期辨证治法,即分为初、中、后三期,初期一般在伤后 1~2 周内,宜活血化瘀,消肿止痛为主;中期在伤后 3~6 周,此期瘀肿虽消而未尽,骨尚未连接,故治宜接骨续筋为主;后期为伤后 7 周以后,瘀肿已消但筋骨尚未坚实,功能尚未恢复,治宜壮筋骨,养气血,补肝肾为主。因损伤“专从血论”,故以往研究最多的是活血祛瘀法,并认为“瘀祛则骨生”。蓝旭等^[2]和周正新等^[3]研究认为中药可以抑制骨折后血液黏度升高并增加骨折局部血流量,改善全身血液流变状态和骨折局部微循环障碍,从而促进骨折的愈合。

舒筋壮骨片是遵循“活血祛瘀生新”的原则所组成的治疗骨折基本方,其主要药效机制集中在促进血液循环,重建破损的正常循环环境。临床观察,证

实舒筋壮骨片能明显改善掌骨骨折病人的临床症状,具有初期活血化瘀、中期接骨续筋之功效,可“疏其血气,令其调达,而致和平”,具有行气活血、消肿止痛、坚骨壮筋的作用,可改善局部血液循环,促进瘀血吸收,并具有较强的刺激骨痂生长的作用,能明显缩短骨折愈合时间,从而达到减轻患者痛苦、缩短骨折愈合时间的目的,因而是治疗骨伤的良方。本研究 225 例病例,治疗前后查肝肾功能、血常规、尿常规无明显变化。因此可以认为舒筋壮骨片治疗掌骨骨折是安全有效的,值得在临床推广应用。

[参考文献]

1 国家中医药管理局. 中医病症诊断疗效标准 [S]. 南京: 南京大学出版社, 1994. 165-172 .

2 蓝 旭, 刘雪梅, 葛宝丰, 等. 中药接骨片对骨折愈合的影响 [J]. 微循环杂志, 2001, 11(2): 38-39 .

3 周正新, 丁 镨, 李保泉, 等. 消瘀接骨散对骨折肢体血液循环的影响及其与骨折愈合的关系 [J]. 中医正骨, 1997, 9(4): 5-6 .

[收稿日期] 2005-03-28 [本文编辑] 周庆辉