

“消癖颗粒”阻断SD大鼠乳腺癌变及其对EGFR-STAT3通路影响研究

陈前军,徐彪,司徒红林,戴燕,关若丹,林毅

(广州中医药大学附属广东省中医院大学城医院乳腺科,广东 广州 510006)

摘要 目的 通过观察消癖颗粒对二甲基苯并蒽(DMBA)诱导的大鼠乳腺癌变及其对EGFR、STAT3等表达的影响,探讨其预防乳腺癌前病变的作用及其可能机制。方法 将24只SD雌性大鼠随机分为空白对照组(N组)、消癖颗粒治疗组(X组)、三苯氧胺组(T组),均采用DMBA+己烯雌酚(DES)造模,分别在干预后的第26周采集乳腺组织标本进行病理学及免疫组织化学检测,检测不同组间癌变率及血管生长因子受体(EGFR)与STAT3表达率并进行比较。结果 T组、X组大鼠乳腺癌变率较N组明显降低($P<0.05$),3组分别是25%、37.5%与87.5%。3组间大鼠乳腺组织中EGFR、STAT3表达率均无统计学差异($P>0.05$)。结论 消癖颗粒对大鼠乳腺癌变有一定的预防作用。其作用机制可能与EGFR-STAT3通路中相关蛋白表达无关,是否与调控该通路的其它相关因子有关需进一步研究。

关键词 中医 乳腺癌 EGFR STAT3

中图分类号 R289.5

文献标识码 A

文章编号 1673-842X(2012)08-0019-03

Effect of Xiaopi Granule on SD Rat Pre-Cancerosis
Model and on the Pathway of EGFR-STAT3

CHEN Qian-jun, XU Biao, SITU Hong-lin, DAI Yan, GUAN Ruo-dan, LIN Yi

(Department of Breast, University Town Hospital of Guangdong Provincial Hospital
of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, Guangdong, China)

Abstract: *Objective* To investigate the role of Xiaopi Granule in preventing breast precancerosis and its mechanism, we observed the effect of Xiaopi Granule on DMBA-induced pre-cancerosis in SD rat models, and the influence on the expressions of EGFR and STAT3. *Methods* 24 SD rats were randomly divided into three groups, including control group (N group), Xiaopi Granule group (X group) and TAM group (T group). At the 26th week after being treated with DMBA and DES, the specimens of rats' breast were collected and assayed with the incidence of cancer and the expressions of EGFR and STAT3. And statistical analysis was performed among the three groups. *Results* Compared with N group, the incidence of cancer in X group, T group significantly decreased, which were 25%, 37.5% and 87.5% respectively ($P<0.05$). Among three groups, no difference was found on the expressions of both EGFR and STAT3 ($P>0.05$). *Conclusion* Xiaopi Granule may prevent breast cancer. The mechanism of its action may be not associated with the expressions of EGFR and STAT3, and further studies should be performed to explore whether its action is associated with the other related factors in the pathway of EGFR-STAT3.

Key words: traditional Chinese medicine breast cancer EGFR STAT3

乳腺癌是激素依赖性肿瘤,雌激素作为刺激乳腺组织分裂增殖的重要因子,在乳腺癌癌变过程中扮演重要角色^[1],特别是“增殖/凋亡”平衡的打破是其参与这一过程的重要机制之一。目前一个为大多数学者认可的观点认为雌激素的促上皮增殖效应是通过乳腺组织自分泌/旁分泌因子间接实现的,雌激素先刺激乳腺基质分泌生长因子,这些生长因子再刺激上皮细胞发生增殖^[2]。生长因子可通过上皮生长因子受体-信号转导与转录激活因子3(EGFR-STAT3)信号传导通路参与肿瘤的发生、生长与发展^[3]。因此,干扰Stat3通路,抑制肿瘤细胞增殖、促其凋亡有可能成为乳腺癌治疗的新方向。补肾活血调冲任是防治乳腺癌发生的重要方法之一,“消癖颗粒”是基于这一治法研制的复方制剂,临床

研究显示其具有阻断乳腺癌癌前病变的作用^[4]。本课题试图通过实验了解其阻断乳腺癌癌前病变的部分机制,为临床运用补肾活血调冲任法预防乳腺癌癌前病变提供理论依据。

1 材料与仪器

1.1 药物 消癖颗粒方提取液 由全国著名中医乳腺病专家林毅教授研制的消癖颗粒方配方煎制而成。方药组成 淫羊藿、肉苁蓉、郁金等,煎制后药液浓度为2g/mL,每克相当于生药量5g。7,12-二甲基苯并蒽 上海晶纯试剂有限公司生产,批号 200806057。己烯雌酚片(DES) 合肥久联制药有限公司生产,批号 20080104。枸橼酸他莫昔芬片(TAM) 扬子江药业集团有限公司,批号:08022501。氯化钠注射液 丽珠集团丽珠制药厂,

收稿日期 2012-02-10

基金项目 广东省自然科学基金课题(06024110)

作者简介 陈前军(1972-)男,江苏淮安人,主任医师,博士,研究方向 中西医结合防治乳腺疾病。

批号 080311。

1.2 试剂 EGFR 免疫组化试剂盒、TAT3 免疫组化试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司,批号:20081100。ER 免疫组化测定试剂盒 NeoMarkers 公司产品,REF MS-750-SO,LOT 750S808D。

1.3 实验仪器 电子天平 YP3001N 精度 0.1g,上海精密科学仪器有限公司。电子天平 BS223S 精度 0.01g,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司。荧光成像系统显微镜 奥林巴斯,型号 BX41。游标卡尺 上海台海工量具有限公司产品,型号 炉制 01120028。

1.4 试验动物 SPF 级 SD (Sprague-Dawley)大鼠,24 只,雌性,80~100g,由广东省医学实验动物中心提供,实验动物合格证号 粤监证字 2008A020,实验动物使用许可证号 SYXK(粤)2008-0002。

2 方法

2.1 造模与分组 SPF 级 SD 大鼠 24 只,雌性,随机分为模型组(N 组)、TAM 治疗组(T 组)和消癥颗粒组(X 组),每组 8 只。大鼠按照 100mg/kg 一次性灌服 7,12-二甲苯并蒽(DMBA),每天喂给含有己烯雌酚的饲料。模型组给予生理盐水,TAM 组按 4mg/(kg·d)灌服三苯氧胺,消癥颗粒组按照 10 倍成人剂量,给予 1mL/100g 灌服药液 2 次/d。

2.2 标本采集与处理 于造模后第 26 周给药期结束前一天用脱毛剂将大鼠胸部鼠毛去除,给药期结束当日将动物麻醉,处死实验动物,将颈部至腹股沟备皮后,整块腹部皮肤皮下乳腺组织取下,自乳头部对半切开乳腺大体观察、计数肿块数量、形态及大小。10%福尔马林固定,在肿瘤明显处和其余各乳腺结节处取材,组织行石蜡包埋,切片厚度 5μm,进行 HE 染色,光学显微镜下观察,检测不同类型的病变发生率。

2.3 EGFR 以及 STAT3 蛋白检测 采用通用型二步法免疫组化法。染色结果判断 EGFR 阳性表达的细胞为被染成棕黄色至棕褐色的细胞,STAT3 阳性表达的细胞为细胞质被染成棕黄色至棕褐色,颗粒状或小块状染色的细胞,选择有代表性的 5 个高倍视野,每个视野计算 100 个细胞中的阳性细胞数,计算上诉指标阳性细胞率(%)。

2.4 统计方法 采用 SPSS11.0 统计软件包进行分析及显著性检验,以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性统计学意义。

3 结果

3.1 第 26 周大鼠乳腺组织病理检测结果 模型组乳腺组织 8 例,镜下可见原位癌 1 例,乳腺浸润性癌 7 例,乳腺癌发生率为 87.5%。TAM 治疗组乳腺组织 8 例,镜下可见导管上皮一般增生 1 例,非典型增生 4 例,纤维腺瘤 1 例,乳腺浸润性癌 2 例,乳腺癌发生率为 25%。消癥颗粒治疗组乳腺组织 8 例,镜下可见乳腺导管上皮一般增生 0 例,上皮非典型增生 4 例,导管原位癌 1 例,乳腺浸润性癌 3 例,乳腺癌发生率为 37.5%。TAM 组、消癥颗粒组与模型组比较,乳腺癌发生率降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而 TAM 组与消癥颗粒组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 第 26 周大鼠乳腺组织 HE 病理诊断结果

组别	n	病理诊断结果(只)					癌发生率(%)
		一般增生	非典型增生	纤维腺瘤	原位癌	浸润性癌	
N 组	8	0	0	0	1	7	87.5
T 组	8	1	4	1	0	2	25.0
X 组	8	0	4	0	1	3	37.5

注 与模型组比较,* $P < 0.05$ 。

3.2 不同干预组大鼠乳腺组织 EGFR 表达情况 模型组可见部分上皮细胞 EGFR 弱表达,平均阳性细胞率 21.2%。TAM 治疗组 6 例可见部分上皮细胞 EGFR 强表达,平均阳性细胞率 23.4%。消癥颗粒治疗组 1 例可见部分上皮细胞 EGFR 强表达,平均阳性细胞率 22.0%。组间比较 TAM 组、消癥颗粒组大鼠乳腺组织中 EGFR 的平均阳性细胞率与模型组比较,无显著性差异($P > 0.05$)。消癥颗粒组大鼠乳腺组织中 EGFR 的平均阳性细胞率与 TAM 组比较无明显差异($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 第 26 周大鼠乳腺组织中 EGFR 表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量	平均阳性细胞率(%)
N 组	8	—	21.2 ± 14.9
T 组	8	4mg/kg	23.4 ± 12.9**
X 组	8	10mL/kg	22.0 ± 9.2**

注 与模型组比较,** $P > 0.05$ 。

3.3 第 26 周不同干预组间 STAT3 蛋白表达情况 模型组 3 例可见部分上皮细胞 STAT3 强表达,平均阳性细胞率 19.1%。TAM 治疗组 6 例可见部分上皮细胞 STAT3 强表达,平均阳性细胞率 22.0%。消癥颗粒治疗组 6 例可见部分上皮细胞 STAT3 强表达,平均阳性细胞率 16.6%。TAM 组、消癥颗粒组大鼠乳腺组织中 STAT3 的平均阳性细胞率与模型组比较,无显著性差异($P > 0.05$)。消癥颗粒组大鼠乳腺组织中 STAT3 的平均阳性细胞率与 TAM 组比较无明显差异($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 第 26 周大鼠乳腺组织中 STAT3 表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量	平均阳性细胞率(%)
N 组	8	—	19.1 ± 9.1
T 组	8	4mg/kg	22.0 ± 9.5
X 组	8	10mL/kg	16.6 ± 5.0

注 与 TAM 组、消癥颗粒组比较, $P > 0.05$ 。与 TAM 组、消癥颗粒组组间比较, $P > 0.05$ 。

4 讨论

乳腺从正常到乳腺非典型增生再到乳腺原位癌与乳腺浸润性癌,该过程已被多个动物实验证实。在临床上,中医学认为肾虚血瘀、冲任失调在此过程中扮演重要角色。补肾活血调冲任是防治乳腺癌发生的重要方法之一。“消癥颗粒”是基于这一治法研制的复方制剂,临床研究显示其具有阻断乳腺癌前病变的作用^[4]。本研究结果表明,补肾活血调冲任制剂消癥颗粒干预 DMBA 诱导的大鼠乳腺组织癌变过程中,在非典型增生率和乳癌发生率均较模型对照组降低,差异具有统计学意义,表明消癥颗粒制剂可以有效延缓化学致癌剂对大鼠乳腺组织的癌变速度,从而预防大鼠乳腺癌发生。而与 TAM 组比较,其非典型增生率和乳癌发生率无明显差异,提示其预防乳腺癌变的疗效与 TAM 组相当,提示消癥颗粒对大鼠乳腺癌变有一定的预防作用。

EGFR-STAT3 信号传导通路在乳腺癌发生发展中发挥重要作用,雌激素先刺激乳腺基质分泌生长因子,如 EGF、TGF- β 等,EGF、TGF- β 再与 EGFR

黄连温胆汤合左金丸治疗胆汁反流性胃炎临床研究

王道成^{1,2}, 屈长宏¹, 薛刚¹, 王少华³

(1. 江苏省扬州市中医院, 江苏 扬州 225009 2. 南京中医药大学, 江苏 南京 210029 3. 江苏省兴化市中医院, 江苏 兴化 225700)

摘要 目的 对胆汁反流性胃炎脾胃湿热的临床症状和疗效进行观察。方法 以黄连温胆汤合左金丸为基本方结合辨证治疗, 治疗组(30例)与单纯西药对照组(30例)治疗前后疗效比较, 观察症状、胃镜的变化。结果 治疗前后疗效比较 中药治疗组优于单纯西药对照组($P < 0.01$)。结论 抓住辨证要点实施中药治疗可以有效控制胆汁反流性胃炎。

关键词 黄连温胆汤 左金丸 胆汁反流性胃炎

中图分类号 R573.3 文献标识码 B 文章编号 1673-842X(2012)08-0021-02

Clinical Observation on Effect of Huanglian Wendan Decoction Combined with Zuojin Pill on Treating Bile-regurgital Gastritis :A Report of 30 Cases Observation

WANG Dao-cheng^{1,2}, QU Chang-hong¹, XUE Gang¹, WANG Shao-hua³

(1. Yangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yangzhou 225002, Jiangsu, China ;

2. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu, China 3. Xinghua

Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xinghua 225700, Jiangsu, China)

Abstract :Objective To investigate the clinical symptoms and therapeutic effect of bile-regurgital gastritis with spleen-stomach damp-heat symptom. Methods The treatment group ($n=30$) received TCM differential treatment with Huanglian Wendan Decoction combined with Zuojin Pill as the basic recipe. The control group ($n=30$) adopted simple western medicine treatment. After treatment, observe clinical curative effect and the changes of the clinical symptoms and gastroscopy. Results The treatment group is obviously more effective than the control group ($P < 0.01$). Conclusion TCM differential treatment can effectively control the bile-regurgital gastritis.

Key words :Huanglian Wendan Decoction Zuojin Pill bile-regurgital gastritis

自2002年以来,笔者运用黄连温胆汤合左金丸治疗胆汁返流性胃炎30例,取得较好的疗效,现报道如下。

1 临床资料

1.1 一般情况

共60例,其中门诊病人34例,住院病人26例,

随机分为中药治疗组30例,西药对照组30例。治疗组中,男18例,女12例,年龄19~59岁,平均44岁;病程2月~8年,伴浅表-萎缩性胃炎13例,伴胆道疾患19例,伴反流性食道炎5例,幽门螺杆菌(Hp)阳性11例。对照组中,男17例,女13例,年龄17~60岁,平均年龄43岁,病程1月~7年,伴浅表-萎缩性

结合使STAT的酪氨酸基团磷酸化,启动EGFR-STAT3通路,通过STAT的SH2功能区相互作用形成同源或异源二聚体,二聚体进入细胞核后识别特异的DNA片段并与之结合,作用于靶基因,调节细胞增殖、分化、凋亡^[5]。Stat3信号传导通路作为癌基因在人类恶性肿瘤中普遍存在,在乳腺癌发生发展中发挥重要作用^[6],近年来STAT3信号通路与肿瘤的关系备受关注,阻断Stat3通路,抑制肿瘤细胞增殖、促其凋亡有可能成为乳腺癌治疗的新方向。本研究结果T组、X组与N组间大鼠乳腺组织中EGFR、STAT3表达率均无统计学差异($P > 0.05$),提示消癥颗粒阻断大鼠乳腺癌变的机制EGFR-STAT3通路中EGFR与STAT3蛋白表达调控无关。但是否通过调控该通路的其它相关因子来实现其活性尚需进一

步研究。

参考文献

- [1] Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women : principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial[J]. JAMA 2002 288 (3) 321-333.
- [2] Wiesen JF, Young P, Werb Z, et al. Signaling through the stromal epidermal growth factor receptor is necessary for mammary ductal development[J]. Development, 1999, 126 (2) 335-344.
- [3] Ford A C, Grandis J R. Targeting epidermal growth factor receptor in head and neck cancer[J]. Head Neck 2003 25 (1) 67-73.
- [4] 司徒红林, 陈前军. 消癥1~6号口服液干预治疗乳腺癌癌前病变的研究[J]. 肿瘤防治杂志 2002 9 (2) 176-179.
- [5] 周庚寅, 刘洪琪, 张庆慧. 肿瘤组织病理诊断[M]. 济南 山东科学技术出版社 2002 552.
- [6] Cheng L, Wang S, Ye YJ, et al. The role of oncogene Stat3 in carcinogenesis and progression of human breast cancer[J]. Chin J Surg 2004 19 (3) 230-232.

收稿日期 2012-01-13

作者简介 王道成(1964-)男,江苏兴化人,教授、主任中医师,博士,研究方向 中西医结合治疗内科疾病及心血管疾病的临床研究。