

乳康饮含药血清对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞侵袭能力的作用

李湘奇 魏昌然 张 萌 王 莹 郭桂丽

摘 要 **目的** 探讨乳康饮及拆方各组含药血清对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞迁移侵袭能力的抑制作用。**方法** 乳康饮拆方为疏肝理气组和益气健脾组并制作动物含药血清,以各组含药血清处理三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞系,培养 48h 后,应用划痕实验和 Transwell 细胞侵袭实验分别测定乳康饮及拆方组含药血清对乳腺癌细胞迁移和侵袭能力的影响。**结果** 乳康饮及拆方含药血清能够显著抑制 MDA-MB-231 细胞迁移和侵袭,与空白血清对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),乳康饮全方组效果明显优于疏肝理气和益气健脾拆方组 (P 均 < 0.05)。**结论** 乳康饮及拆方含药血清能够显著抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的迁移和侵袭能力。

关键词 乳腺癌 乳康饮 拆方 含药血清 细胞侵袭

中图分类号 R737

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.02.014

Role of Serum Containing Rukangyin on Invasion of Breast Cancer MDA-MB-231 Cells. Li Xiangqi, Wei Changran, Zhang Meng, et al. The Second Affiliated Hospital of Shandong First Medical University, Shandong 271000, China

Abstract **Objective** To investigate the inhibitory effect of Rukangyin and Separated Prescriptions medicated serum on migration and invasion of breast cancer MDA-MB-231 cell. **Methods** MDA-MB-231 cells were treated with Rukangyin and Separated Prescriptions medicated serum for 48h. The separated Prescriptions included Shugan liqi Separated Prescription and Yiqi jianpi Separated Prescription. The effects of Rukangyin and Separated Prescriptions medicated serum on migration and invasion of MDA-MB-231 cells were detected by wound healing assay and Transwell test. **Results** Compared with the control group, Rukangyin and Separated Prescriptions medicated serum significantly inhibited the abilities of migration and invasion of MDA-MB-231 cells ($P < 0.05$). The overall effect of Rukangyin has better effect than Shugan liqi and Yiqi jianpi dividing groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Rukangyin and Separated Prescriptions medicated serum could inhibit the migration and invasion of breast cancer cells.

Key words Breast cancer; Rukangyin; Separated prescriptions; Medicated serum; Cell invasion

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,近年来严重威胁女性身心健康,目前每年全球约有 170 万女性被诊断为乳腺癌,发生率呈直线上升趋势,发病的年龄亦渐趋年轻化^[1]。肿瘤临床及基础研究认为,乳腺癌作为全身性疾病已被业内医学研究者共识,以手术为主的综合性治疗原则,可最大限度改善部分患者的预后,使无病生存期延长,这是不争的事实,但任何治疗均不能完全阻止乳腺癌的复发和转移,从而导致

乳腺癌患者的死亡。有研究资料显示,每年约有高达 40% 的乳腺癌患者出现复发转移,意味着在我国每年近 10 万乳腺癌病例出现新的复发转移,转移性乳腺癌预后很差,治疗棘手,平均存活时间只有 2 年,因此控制乳腺癌的复方转移是临床研究亟待解决的问题^[2]。

中医药治疗乳腺癌已经有了比较系统的理念,研究表明中医药可以对机体整体进行干预,通过促进机体内环境的优化和改善,降低乳腺癌的复发与转移率,从而进一步使病死率降低,提高患者的整体生存质量^[3]。中药治疗乳腺癌的优势表现为改变癌毒特性,最大限度的杀灭癌毒,并整体调控内环境,提高机体的抗癌能力,从病理上改善瘀滞状态,阻断转移途径。基本治疗理念是以辨证论治为基础,扶正培本为主,祛邪抗癌为辅,结合患者的疾病特征综合治疗,扶正培本的理念贯穿于乳腺癌治疗的全程。作为乳腺

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81473687);山东省自然科学基金资助项目(ZR2009CM039, ZR2013HM038);山东省中医药科技发展计划项目(2017-206, 2015-256);泰安市科技发展计划项目(2015NS2082)

作者单位:271000 泰安,山东第一医科大学第二附属医院(李湘奇、王莹);250014 济南,山东中医药大学(魏昌然、张萌);山东第一医科大学药学院(郭桂丽)

通讯作者:李湘奇,教授,博士生导师,电子信箱:drlixqi@126.com

癌综合治疗的重要组成部分,中医药研究已经取得了令人瞩目的成绩。事实上乳腺癌转移是一个复杂的生物过程,由多个基因参与和调控,涉及到癌细胞的脱落、迁移与转移灶的生长,其转移的潜能与基因在不同患病个体肿瘤细胞内表达程度密切相关^[4]。

已有研究证实,肿瘤的转移与肿瘤细胞的上皮间质转化,迁移和侵袭能力增强有密切的关联,中药及其有效成分抑制肿瘤细胞迁移侵袭转移的作用机制主要包括调节对肿瘤细胞的杀伤作用,抑制肿瘤迁移、侵袭、转移相关基因的表达,抑制肿瘤血管生成,影响肿瘤细胞的黏附运动,调节体内免疫微环境^[5]。乳腺癌(肿瘤)本身并不致死,癌细胞转移,并引起其他器官的病变才是致命性的^[6]。因此以各种手段控制乳腺癌细胞的迁移,降低其恶性侵袭能力,将是阻断或逆转乳腺癌转移的关键之一。笔者前期的研究发现,乳康饮以疏肝健脾为基本治法组方,对乳腺癌及其淋巴转移有显著的治疗作用,乳康饮由黄芪、茯苓、青皮、柴胡、莪术、薏苡仁组成,基础研究按照功效拆方后,对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖有显著的抑制作用,各组方部分均能促进乳腺癌细胞的凋亡^[7]。在此研究的基础上,继续探讨乳康饮及拆方动物含药血清对乳腺癌细胞侵袭和迁移的抑制作用,能够进一步阐明乳康饮阻断乳腺癌转移的作用机制,为复方中药治疗乳腺癌抑制淋巴转移提供支持依据。

材料与方法

1. 实验动物及细胞:实验动物:SD 大鼠,雌性,3 月龄,体质量 250~300g,SPF 级,购于山东济南朋悦实验动物繁育有限公司,实验动物许可证号:SCXK(鲁)20140007。人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株,购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

2. 药物及试剂:乳康饮由黄芪、茯苓、薏苡仁、柴胡、青皮、莪术组成,乳康饮按照功效拆方为疏肝理气组(柴胡、青皮、莪术),益气健脾组(黄芪、茯苓、薏苡仁),将乳康饮及拆方组采用水提醇沉法制剂方法制成口服液剂型,各组药物终浓度分别为 1.08g/ml、0.75g/ml、0.33g/ml。DMEM 培养液(美国 HyClone 公司),胎牛血清(美国 Gibco 公司),Transwell 小室(美国 BD 公司 FALCON REF353097),DAPI(北京索莱宝科技有限公司 C0065)。

3. 仪器:超净工作台(苏州苏洁净化设备有限公司 SW-CJ-1D 型),CO₂ 培养箱(Thermo 371 型),荧光倒置显微镜(Ti-s Nikon 仪器有限公司),台式高速离心机(盐城市凯特实验仪器有限公司

TG16G),-80℃ 超低温冰箱(美国 Thermo 公司 705 型)。

4. 含药血清的制备及鉴定:SPF 级 SD 大鼠 20 只,随机分为 4 组,每组 5 只,分别为空白对照组、乳康饮组、益气健脾组、疏肝理气组,每组动物适应环境后,参照《抗癌药物研究与实验技术》附表“人和动物间按体表面积折算表”进行换算,计算出大鼠的等效灌胃剂量,分别予以 0.9% NaCl 溶液、乳康饮、益气健脾组、疏肝理气组药液,按大鼠的等效剂量灌胃,灌胃液体积量均为 0.4 毫升/(天·只),连续给药 15 天,末次给药 2h 后处死取血,静置后高速离心,以 0.22μm 微孔滤膜过滤除菌,留取各组含药血清,置于 -80℃ 分装冻存储备用。采用高效液相法鉴定乳康饮制剂及拆方组含药血清中各药物入血成分:选取青皮的主要成分橙皮苷为代表药品,吸取乳康饮制剂供试品溶液、橙皮苷对照品溶液 10μl 及含药血清、空白血清供试品溶液 20μl,注入高效液相色谱仪,记录色谱图。经 3 次以上重复实验后,读取结果显示,乳康饮含药血清中出现了与橙皮苷对照品、乳康饮制剂原液药物相同位置的波峰(A),通过对照品谱图比对,鉴定为橙皮苷,结果见图 1。组方中其他药物鉴定同上。

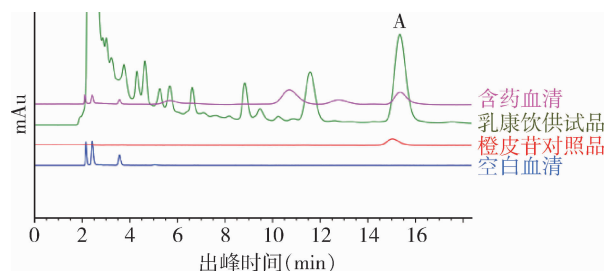


图1 空白血清、含药血清、对照品及乳康饮制剂
高效液相图谱比较

5. 细胞培养:人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株,置于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,以 37℃、5% CO₂ 条件下培养,待细胞贴壁生长,长满细胞单层后,用胰酶(1:1)进行消化传代,选取对数生长期的细胞供试验用。按照不同分组分别用 20% 中药含药血清和空白大鼠血清(空白对照组)继续培养。

6. 划痕实验和 Transwell 侵袭实验:(1)划痕实验:将处于对数生长期的 MDA-MB-231 乳腺癌细胞经胰酶消化后调整细胞密度为 3×10^5 个/毫升,接种于 24 孔板,每孔 500μl 细胞悬液,37℃、5% CO₂ 培养箱进行培养,细胞贴壁后,细胞的密度达 90% 以上

时,用 10 μ l 枪头垂直于细胞划痕,PBS 冲洗 3 次,分别加入含 20% 乳康饮组、益气健脾组、疏肝理气组含药血清的培养基 500 μ l 后,在 5% CO₂ 培养箱中再培养 48h,采用倒置显微镜观察细胞迁移及划痕宽度的变化,分别于划痕后 0h 和 48h 两个时点,倒置显微镜下拍照,观察划痕的愈合状态。由于 20% 乳康饮组、益气健脾组、疏肝理气组含药血清能够抑制细胞的增殖,诱导细胞的凋亡,但在干预 24h 内不明显,所以观察时点选择 0h 和 48h^[7]。(2) Transwell 侵袭实验:调整细胞密度为 3 $\times$ 10⁵ 个/毫升,上室加入不含血清的细胞悬液 200 μ l,下室加入 20% 各组含药血清的完全培养基 500 μ l,在 5% CO₂ 培养箱中培养 48h 后,以适量 PBS 将 Transwell 小室清洗洁净,去除上室的细胞和基质胶,4% 多聚甲醛固定 25min,DAPI 染色 20min,荧光显微镜下拍照,倒置显微镜观察 5 个视野,记数细胞后取平均值。

7. 统计学方法:采用 SPSS 20.0 统计学软件对数

据进行统计分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示,进行 *t* 检验和方差分析,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 乳康饮及拆方含药血清对乳腺癌 MDA - MB - 231 细胞迁移的影响:检测乳康饮及各拆方组含药血清对乳腺癌 MDA - MB - 231 细胞迁移的作用,进行了划痕实验,结果发现,乳康饮及拆方组含药血清对 MDA - MB - 231 细胞迁移均有不同程度的影响,在乳康饮及拆方含药血清作用 48h 后,各种细胞划痕均有不同程度的愈合,空白血清对照组愈合最佳,乳康饮组及两组拆方血清均能抑制细胞的划痕愈合,细胞迁移抑制率与空白血清对照组比较,差异有统计学意义(*P* < 0.05),乳康饮全方组抑制细胞划痕愈合效果明显优于疏肝理气、益气健脾拆方组(*P* 均 < 0.05)。结果见图 2、图 3、表 1。

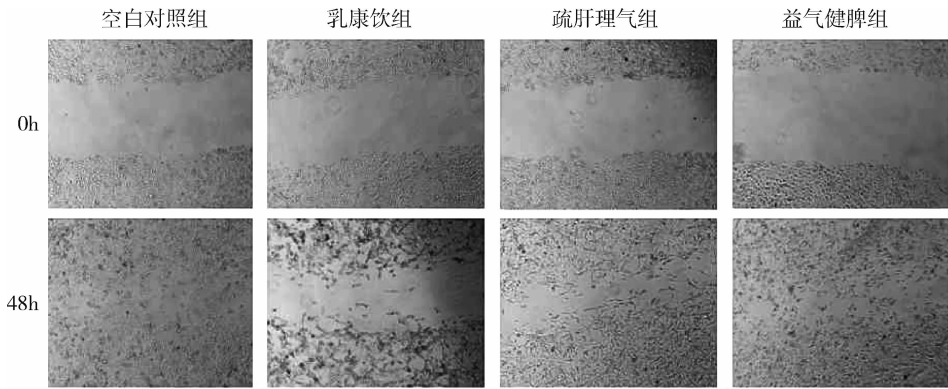


图 2 乳康饮及拆方含药血清对乳腺癌 MDA - MB - 231 细胞迁移能力的作用 ($\times$ 40)

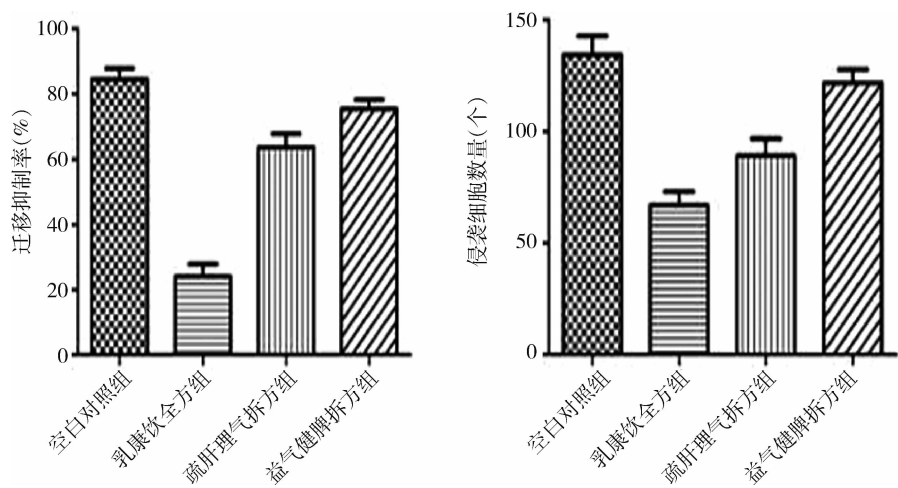


图 3 乳康饮及拆方含药血清对乳腺癌 MDA - MB - 231 细胞侵袭及迁移抑制率

2. 乳康饮及拆方含药血清对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞侵袭的影响: Transwell 侵袭实验结果显示, 乳康饮及各拆方组含药血清均能够明显抑制 MDA-MB-231 细胞的侵袭, 经过乳康饮及其拆方含药血清处理 MDA-MB-231 细胞后, 细胞体外侵袭能力明显降低, 侵袭穿过 Transwell 小室的细胞每个视野平均数与空白对照组比较, 显著降低 ($P < 0.01$), 乳康饮组效果最为明显, 优于益气健脾拆方组 ($P < 0.05$), 但与疏肝理气组比较, 差异无统计学意义。

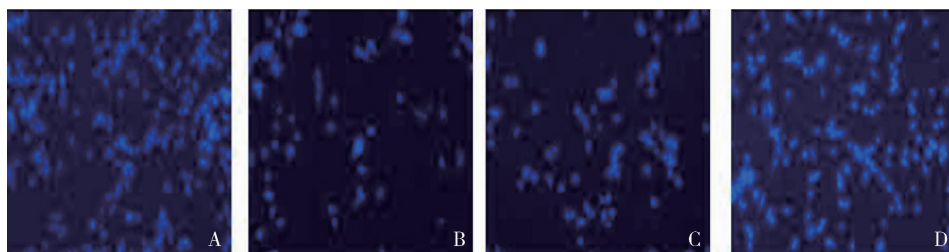


图4 乳康饮及拆方含药血清对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞侵袭能力的影响 ($\times 100$)

A. 空白对照组; B. 乳康饮组; C. 疏肝理气组; D. 益气健脾组

讨 论

乳腺癌的早期诊断、早期治疗及适时的预后判断是临床关注的热点问题之一, 随着分子生物学及免疫治疗学的发展, 已认识到乳腺癌发生、发展本质上是由多种基因变化引起的, 细胞内原癌基因的激活和(或)抑癌基因的失活是诱发乳腺癌的主要原因。由于远处转移导致了乳腺癌治疗的失败和患者死亡, 乳腺癌转移是由多种基因参与和调控的复杂的生物学行为, 各种基因在不同患病个体肿瘤细胞内表达差异, 决定了不同患者或不同亚型肿瘤转移的潜能, 这种差异严重影响了乳腺癌的治疗效果和预后。

乳腺癌的治疗除根治性手术外, 化疗、放疗、内分泌治疗及生物靶向治疗等方法密切配合, 能够显著延长患者的生存期, 但药物治疗中的毒性不良反应及相关并发症, 会严重地影响到患者的生存质量。研究证实, 中医药在缓解乳腺癌手术的并发症及减轻放、化疗及内分泌治疗、生物靶向药物的毒性不良反应, 降低复发转移, 提高患者的综合治疗效果及生活质量方面有着独特的优势^[8]。

中医药的文献虽无“乳腺癌”的病名, 但可见“乳岩”、“乳疔”等类似记载, 对乳腺癌病因病机认识多责之于肝脾二经, 如《格致余论》指出: “忧怒抑郁, 脾气消阻, 肝气横逆, 遂成隐核”。《医宗金鉴》论乳岩: “……皆缘抑郁不舒, 或性急多怒, 伤损肝脾所致”。认为乳腺癌的发生、发展与肝脾二伤、邪毒留

义。结果见表 1、图 3、图 4。

表 1 乳康饮及拆方含药血清对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞迁移侵袭能力的影响

组别	侵袭细胞数(个)	侵袭抑制(%)	迁移抑制率(%)
空白对照组	134 ± 15	—	—
乳康饮组	73 ± 11 **	45.52 *	66.31 *
疏肝理气组	89 ± 13 **	33.58 *	24.12 **
益气健脾组	101 ± 10 **△	24.63 *	15.03 **

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与乳康饮组比较, # $P < 0.05$

滞有关。有研究者综合整理分析了中医药抗乳腺癌术后复发和转移方面的临床研究成果, 系统归纳总结了诸多医家有关乳腺癌治疗后复发和转移的病因病机, 认为导致患者乳腺癌复发转移的决定因素是机体正气虚损, 归结为脾肾亏虚、冲任失调为乳腺癌发病之本, 气机不畅、瘀血痰浊、热毒内蕴等为发病之标^[9]。皆因正气虚弱, 外邪乘虚内侵, 内外之邪阻塞乳络, 而致气血失和, 运行不畅; 或情志不遂, 内伤脏腑, 肝气郁结; 或饮食不节, 脾胃受损, 痰湿内伤; 脏腑功能失调, 导致气机郁结, 瘀血停留、痰浊内生, 又进一步损伤正气。至于乳腺癌转移的病机还没有形成理论体系, 现代中医学研究也不充分, 有研究者通过总结临床经验, 阐述了“正气亏虚, 余毒未尽”的学术观点, 认为乳腺癌复发转移由“伏邪”、“余毒”而引发, 提出了“余毒旁窜”核心病机理论^[10]。

有研究认为“痰毒瘀结、癌毒内生”是乳腺癌发生、发展的核心病机, 而“从化”现象的存在, 是导致乳腺癌术后复发转移的主要原因^[11]。由此可见, 乳腺癌的复发转移是因虚致实(癌)、因实(癌)更虚、虚实夹杂的过程; 正虚邪盛, 邪毒走窜旁流, 则导致乳腺癌的复发转移。根据其病机变化, 临床治疗常选用疏肝理气、化痰散结、活血祛瘀、清热解毒诸治法, 祛除邪毒以抗癌; 以健脾补肾、益气养血、调补冲任而扶正固本, 扶正治法贯穿整个治疗过程。扶正药既增强机体的抗癌能力, 又为祛邪抗癌创造必要条件。因

此,扶正固本法对于协助乳腺癌手术、放疗、化疗、内分泌治疗以及生物靶向治疗等尤其重要,能起到增效减毒,改善患者的自觉症状,缓解稳定病情,延长生存期,提高生存质量等作用。临床采用辨病辨证互参,扶正与祛邪结合,虚实主次分清,邪正盛衰慎重权衡,做到“扶正以祛邪”,“祛邪以扶正”,扶正祛邪并施。所以中医药治疗乳腺癌从整体观念出发,调整平衡机体阴阳、气血、脏腑功能,在乳腺癌的临床治疗具体应用中进一步系统地观察,并客观评价,奠定中医药治疗乳腺癌的地位。

笔者从乳腺癌的病因病机入手,采用疏肝健脾为主的治则治法,结合中药药理组方乳康饮,全方以黄芪、茯苓益气健脾,扶正固本,柴胡、青皮疏肝解郁,调达肝气,莪术、薏苡仁化痰软坚、活血化瘀,以祛邪治标。前期乳康饮及其拆方的研究结果,全方及各拆方组的含药血清均能够显著抑制三阴性乳腺 MDA - MB - 231 细胞和 MDA - MB - 435S 细胞的增殖,诱导细胞的凋亡^[7,12]。动物模型研究发现,乳康饮能够能下调乳腺癌组织淋巴管生成相关因子 VEGF - C、VEGFR - 3、Ang - 2 蛋白水平的表达,干扰乳腺癌组织的淋巴管生成,降低微淋巴管密度,抑制乳腺癌的淋巴转移^[13,14]。文献报道乳康饮组成中的单药,大多数对乳腺癌的治疗有肯定的作用,如黄芪注射液在体外对乳腺癌 MCF - 7 可起到抑制肿瘤细胞生长和迁移的作用^[15]。莪术的主要活性成分莪术醇对乳腺癌细胞增殖有明显的抑制作用,对 MDA - MB - 231 细胞的侵袭能力亦有较强影响,且具有一定的浓度依赖性,莪术提取物莪术石油醚也能抑制乳腺癌细胞的转移侵袭能力,作用机制可能与上调细胞黏附因子 E - cadherin 有关^[16]。

莪术二酮能明显抑制人乳腺癌 HCC1937 细胞的迁移和侵袭能力,其机制可能与通过下调 MAPK 和 Akt 信号通路上关键蛋白 ERK、JNK、Akt 的磷酸化水平,进而使 MMP - 2、MMP - 9 表达量下降有关^[17]。柴胡皂苷 D 也能呈时间及浓度依赖性地抑制 MDA - MB - 231 细胞的增殖、迁移和侵袭能力,下调与细胞黏附、迁移、侵袭相关基因 vimentin 和 N - cadherin 蛋白和 mRNA 的表达水平。茯苓的有效成分茯苓三萜可通过抑制 MAPK 信号通路的激活,从而抑制肿瘤细胞的 EMT,进一步抑制乳腺癌细胞的迁移和侵袭能力,发挥抑制乳腺癌生长和转移的作用。

本实验研究显示,乳康饮和拆方为疏肝理气组和益气健脾组的含药血清,均能够对乳腺癌 MDA -

MB - 231 细胞的迁移和侵袭发挥明显抑制作用,益气健脾组的抑制作用相对较弱,乳康饮全方组优于疏肝理气组和益气健脾组,提示全方配伍后,能够增强对乳腺癌细胞的抑制作用,具体的作用机制有待进一步深入研究。由于中医药防治乳腺癌复发与转移是多靶点与多途径的整合,具有整体观念的优势,又有辨证论治的灵活性,所以在以扶正培本为主、祛邪抗癌为辅的综合治疗基本治疗理念上,发挥了中医药辨证论治的优势,体现了乳腺癌的个体化治疗理念。

参考文献

- Ginsburg O, Bray F, Coleman MP, *et al.* The global burden of women's cancers: a grand challenge in global health [J]. *Lancet*, 2016, 389(10071):847
- 陈万青,郑荣寿.中国女性乳腺癌发病死亡和生存状况[J].*中国肿瘤临床*,2015,42(13):668-674
- 周思颖,张思杰,徐寒子,等.中医药治疗乳腺癌进展[J].*中国中医基础医学杂志*,2017,23(10):1489-1492
- 郭继雪,康欣梅,张清媛.乳腺癌转移形成的分子机制及器官转移性[J].*现代肿瘤医学*,2019,27(4):685-688
- Fidler IJ, Kripke ML. The challenge of targeting metastasis [J]. *Cancer Metastasis Rev*,2015,34(4):635-641
- Huang Y, Jin Q, Su M, *et al.* Leptin promotes the migration and invasion of breast cancer cells by upregulating ACAT2 [J]. *Cell Oncol (Dordr)*,2017,40(6):537-547
- 李凯,孙丽艳,许兴超,等.乳康饮及拆方对乳腺癌 MDA - MB - 231 细胞增殖及凋亡的影响[J].*医学研究杂志*,2016,45(12):31-35
- 孙飞,张楚,虞萍,等.中医药在乳腺癌综合疗法中的地位评价[J].*中华中医药杂志*,2010,25(8):1275-1280
- 彭湃,吴红彦,叶凯,等.扶正固本法治疗乳腺癌[J].*吉林中医药*,2018,38(2):137-139
- 戴金芳,赵益,孙有智.乳腺癌中医病因病机探析[J].*光明中医*,2017,32(7):1069-1072
- 张帅,刘胜.顾氏外科乳腺癌治验[J].*吉林中医药*,2017,37(3):241-244
- 李湘奇.乳康饮抑制乳腺癌 MDA - MB - 435S 细胞增殖和诱导凋亡的作用研究[J/CD].*中华临床医师杂志:电子版*,2011,5(7):2081-2084
- 孙喜波,李湘奇.乳康饮干预裸鼠乳腺癌组织 Ang - 2 表达抑制淋巴转移的作用[J].*医学研究杂志*,2013,42(9):70-74
- 孙喜波,李湘奇.乳康饮对裸鼠乳腺癌组织 VEGF - C/D、VEGFR - 3 mRNA 表达的影响[J].*中华中医药杂志*,2014,29(2):594-597
- 刘晓丽,梁羽茜,胡秀华.黄芪注射液对乳腺癌 MCF - 7 细胞增殖周期以及细胞凋亡、迁移影响的实验研究[J].*医学研究杂志*,2017,46(2):66-69
- 钱祥,甄宏德,李永峰,等.莪术石油醚提取物对三阴性乳腺癌细胞 MDA - MB - 231 转移相关基因影响的体外研究[J].*浙江中西医结合杂志*,2017,27(6):463-466
- 孙学然,杨克,吕玲玲,等.莪术二酮对乳腺癌 HCC1937 细胞迁移和侵袭的影响及机制[J].*中国实验方剂学杂志*,2019,25(3):74-81

(收稿日期:2019 - 05 - 09)

(修回日期:2019 - 06 - 15)