

组比较,模型组干粪粒数明显减少($P < 0.01$),说明造模成功。与模型组比较,番泻叶各组干粪粒数明显增加($P < 0.05$, $P < 0.01$),且无不排便小鼠,但对稀粪点数影响不大,说明番泻叶对复方地芬诺酯致小鼠便秘模型具有一定的泻下作用,作用大小顺序依次为:番泻叶Ⅱ>番泻叶Ⅲ>番泻叶Ⅰ,见表3。

2.4 样品中番泻苷 A、B 含量测定 不同煎煮时间的番泻叶水提液中番泻苷 A 和番泻苷 B 的含量是有差别的。其中番泻苷 A+B 含量由高到低的顺序依次为:

表3 番泻叶水提液对药物致小鼠便秘的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 3 Effect of Folium Sennae water-extract on promoting defecation in drug-induced constipation mice

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	干粪粒数 / 粒	稀粪点数 / 点	不排便动物数 / 只
空白对照组		14.5 ± 6.8**	0.1 ± 0.3	0
模型组		7.1 ± 3.4	0.0 ± 0.0	2
番泻叶Ⅰ组	3	11.6 ± 5.3*	0.1 ± 0.2	0
番泻叶Ⅱ组	3	15.2 ± 7.9**	0.2 ± 0.4	0
番泻叶Ⅲ组	3	13.4 ± 7.5*	0.1 ± 0.2	0

注:与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

表4 番泻叶不同煎煮时间的水提液中番泻苷 A 与番泻苷 B 的含量(mg·mL⁻¹)

Table 4 Comparison of sennoside A and B contents in Folium Sennae water-extract

样品	番泻苷 A	番泻苷 B	番泻苷 A+B
番泻叶Ⅰ组	10.0	5.6	15.6
番泻叶Ⅱ组	16.0	8.8	24.8
番泻叶Ⅲ组	12.0	6.4	18.4

番泻叶Ⅱ>番泻叶Ⅲ>番泻叶Ⅰ,见表4。

3 讨论

番泻叶为全球应用最广的导泻药之一。作为一味后下药,煎药时如何适时加入,最大限度地保证其有效成分的煎出,同时尽量省时省力、节约能源是值得探究的问题。本文以正常小鼠及2种便秘小鼠模型为研究对象,着重观察番泻叶不同煎煮时间对其泻下作用的影响,并测定其主要有效成分的含量。结果表明,番泻叶不同煎煮时间的水提液均有泻下活性,泻下药理作用的大小顺序为:番泻叶Ⅱ(15 min)>番泻叶Ⅲ(20 min)>番泻叶Ⅰ(10 min)。泻下有效成分番泻苷 A 加番泻苷 B 的含量由高到低的顺序为:番泻叶Ⅱ>番泻叶Ⅲ>番泻叶Ⅰ,其含量高低与药理作用的强弱恰好吻合,说明药理作用与物质基础高度一致;泻下作用与番泻苷 A、B 含量和煎煮时间密切相关。本研究结果为番泻叶最佳煎煮时间确定提供了理效学依据。

参考文献:

- [1] 徐淑云,卞如瀛,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2006:1312.
- [2] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:331-333.
- [3] 曾锐,高宇明. 藏药六味能消胶囊润肠通便作用的实验研究[J]. 西南大学学报(自然科学版),2009,31(3):104-107.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:326-327.

(编辑:梁进权)

消癍系列口服液对大鼠乳腺癌前病变组织 MVD 及 VEGF 表达的影响

关若丹,陈前军,司徒红林,林毅,戴燕,徐飏,宋雪,丘嫦,郭倩倩(广州中医药大学第二附属医院大学城医院乳腺科,广东 广州 510006)

摘要:目的 观察消癍系列口服液对乳腺癌前病变大鼠血管生成的影响,探讨其阻断或逆转乳腺癌前病变发展的可能机制。**方法** 1,7,12-二甲基苯并蒽(DMBA)联合雌孕激素序贯法复制大鼠乳腺癌前病变模型,观察消癍口服液组、他莫昔芬组和模型组大鼠乳腺组织微血管密度(microvessel density, MVD)及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达。**结果** 消癍口服液可降低乳腺癌前病变大鼠的乳腺癌发生率,显著降低大鼠乳腺癌前病变组织的 MVD 值,但对 VEGF 无明显抑制作用。**结论** 消癍系列口服液能抑制大鼠乳腺癌前病变组织内血管的生成,从而阻断大鼠乳腺癌前病变的发展,但这并不是通过抑制 VEGF 通路实现的。

关键词: 消癍系列口服液;微血管密度;血管内皮生长因子;乳腺癌前病变

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)05-0451-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.05.005

收稿日期: 2013-04-25

作者简介: 关若丹,女,主治医师,博士研究生,研究方向:临床流行病学,中西医结合防治乳腺疾病。Email: 13631314137@163.com。

Effect of Xiaopi Oral Liquid on MVD and VEGF Expression in Breast Precancerous Lesion Rats

GUAN Ruodan, CHEN Qianjun, SITU Honglin, LIN Yi, DAI Yan, XU Biao, SONG Xue, QIU Chang, GUO Qianqian (Department of Mammary Disease, the Second Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of *Xiaopi* oral solution on angiogenesis in breast precancerous lesion rats, and to explore its possible reversing mechanism for breast precancerous lesion. **Methods** The rat model of breast precancerous lesion was established by 1, 7, 12-dimethyl-benzanthracene (DMBA) combined with estrogen and progesterone sequential method. After modeling and treatment, we compared microvessel density (MVD) and the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the mammary gland of *Xiaopi* oral liquid group, tamoxifen group and the model group. **Results** *Xiaopi* oral liquid could reduce the incidence of breast cancer in breast precancerous lesion rats, significantly lower MVD, but had no inhibitory effect on the expression level of VEGF in the mammary gland of breast precancerous lesion rats. **Conclusion** *Xiaopi* oral liquid can inhibit the angiogenesis in precancerous lesion rats, thus to block the development of breast cancer, but its mechanism is not through the inhibition of the VEGF pathway.

Keywords: *Xiaopi* oral solution; Microvessel density; Vascular endothelial growth factor; Breast precancerous lesions

消癖系列口服液是全国名老中医林毅教授基于中医周期疗法理论开发研制而成,用于治疗乳腺增生的中药复方制剂。前期临床研究证实^[1-2],消癖系列口服液能阻断乳腺癌前病变的发展,但是其作用机制尚不明确。本研究以血管生成与乳腺癌发生的相关性作为切入点,探讨消癖系列口服液阻断或逆转乳腺癌前病变发展的机制。

1 材料与方法

1.1 药物 贞蓉消癖口服液、金柴消癖口服液,广东省中医院制备,批号分别为 130704, 130714;枸橼酸他莫昔芬,扬子江药业集团有限公司;苯甲酸雌二醇注射液,宁波第二激素厂;黄体酮注射液,浙江仙琚制药股份有限公司;1, 7, 12-二甲基苯并蒽(DMBA),上海晶纯试剂有限公司,批号:200806057。

1.2 动物 SD 大鼠, SPF 级, 体质量 40 ~ 50 g, 雌性, 广州中医药大学实验动物中心, 许可证号: SCXK(粤)2008-0020。

1.3 仪器 YP3001N 电子天平, 上海精密科学仪器有限公司; TP10206 脱水机、EG1140H 包埋机、RM2255 切片机、Leica Autostainer XL 染色机, 德国莱卡公司; AxioStar Plus 显微镜, 德国蔡司公司; BX50 显微镜, 奥林巴斯公司。

1.4 大鼠乳腺癌前病变模型复制 采用 DMBA 联合雌孕激素序贯 5 d 法复制大鼠乳腺癌前病变模型^[3]。

1.5 分组及治疗 大鼠随机分为 3 组, 每组 15 只。模型组, 给予等量的 0.9 % 氯化钠注射液; 消癖口服液组, 给予金柴消癖口服液(在大鼠动情前期及动情

期使用)、贞蓉消癖口服液(在大鼠动情后期及动情间期使用), 均为 20 mL·kg⁻¹(为成药量, 为人用剂量的 20 倍); 他莫昔芬组, 给予枸橼酸他莫昔芬片 6.5 mg·kg⁻¹(为人用剂量的 20 倍)。3 组均每天灌胃给药 1 次, 连续 9 周。大鼠性周期判断采用阴道涂片法^[4]。

1.6 观察指标

1.6.1 乳腺癌发生率 给药结束后以过量麻醉法处死所有大鼠, 取整块腹部皮肤皮下乳腺组织, 10 % 福尔马林液固定, 石蜡包埋, 切片, HE 染色, 光镜观察组织学变化。大鼠组织病理学诊断标准参考 2003 年 WHO 乳腺肿瘤学分类标准^[5]。

1.6.2 微血管密度(microvessel density, MVD) 采用抗 F-Ⅷ相关抗原抗体标记血管, 计数标准参考 Weidner 方法^[6], 先用低倍物镜(4 倍)观察, 寻找微血管最多的区域, 然后用中倍物镜(20 倍)计数 3 个视野, 求其平均值作为 MVD 值。

1.6.3 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 经免疫组织化学染色法染色后, 细胞相应部位(细胞核、细胞浆、细胞膜等)出现黄色反应为阳性, 采用半定量积分法判定结果^[7], 染色强度 PU 值 ≤ 5 % 为 0 分, 6 % ~ 25 % 为 1 分, 26 % ~ 50 % 为 2 分, 51 % ~ 75 % 为 3 分, > 75 % 为 4 分; 0 ~ 1 分为阴性, 2 分以上为阳性。

1.7 统计学处理方法 采用 PASW Statistics 17.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)或中位数(M)表示, 组间比较采用秩和检验; 计数资料组间比较采用 χ^2 检验或精确概率法, 检验水平 = 0.05。

2 结果

2.1 消癥系列口服液对癌前病变大鼠乳腺癌发生率的影响 消癥系列口服液和他莫昔芬均能显著降低乳腺癌前病变大鼠的乳腺癌发生率($P<0.05$), 两组组间比较无统计学意义($P>0.05$), 见表 1。

表 1 消癥系列口服液对癌前病变大鼠乳腺癌发生率的影响

Table 1 The breast cancer incidence in the three groups

组别	<i>n</i>	乳腺癌发生率 / %	<i>P</i>
模型组	9	33.33	
消癥口服液组	14	0.00	0.023
他莫昔芬组	11	0.00	0.043

注: *P* 为与模型组比较的结果。

2.2 消癥系列口服液对大鼠癌前病变组织 MVD 的影响 消癥系列口服液和他莫昔芬均能显著降低大鼠癌前病变组织内 MVD($P<0.01$), 抑制血管生成; 两组组间比较无统计学意义($P>0.05$), 见表 2。

表 2 消癥系列口服液对大鼠癌前病变组织 MVD 的影响

Table 2 MVD in precancerous lesions tissues of rats in the three groups

组别	<i>n</i>	M	<i>Z</i>	<i>P</i>
模型组	9	21.00		
消癥口服液组	14	11.00	-2.654	0.008
他莫昔芬组	11	11.00	-3.273	0.001

注: *P* 为与模型组比较结果。

2.3 消癥系列口服液对大鼠癌前病变组织 VEGF 的影响 消癥系列口服液组 VEGF 阳性率与模型组、他莫昔芬组比较均无统计学意义($P>0.05$), 见表 3。

表 3 消癥系列口服液对大鼠癌前病变组织 VEGF 的影响

Table 3 VEGF expression in precancerous lesions tissues of rats in the three groups

组别	<i>n</i>	VEGF 阳性率 / %	<i>P</i>
模型组	9	11.1	
消癥口服液组	14	0.0	0.391
他莫昔芬组	11	27.3	0.591

注: *P* 为与模型组比较的结果。

3 讨论

乳腺癌前病变属于中医“乳癖”范畴。林毅教授对乳癖的治疗提出中医周期疗法, 即顺应女性冲任的生理变化, 调整阴阳平衡, 从而预防乳房疾病的发生和发展。消癥系列口服液^[9]是在中医周期疗法理论上研制而成, 经前服用金柴消癥口服液以疏肝活血、消滞散结治标, 经后服用贞蓉消癥口服液以温

肾助阳、调摄冲任治本。前期临床研究发现^[1], 消癥系列口服液能阻断 / 逆转乳腺癌前病变的发展, 对乳腺癌前病变患者钼靶 X 线影像的改善率达 91.80 %, 但其作用机制尚缺乏深入研究。

肿瘤血管的生成是大多数肿瘤生长和转移的基础^[9]。研究发现, 乳腺增生病变的发生过程中, 血管大小和数量都较正常乳腺组织增多^[10-11]。在乳腺良性增生性病变中, 微血管密度的增加与继发乳腺癌风险的增加有关^[12-13]。血管内皮生长因子(VEGF)及其受体(VEGFR)是肿瘤血管生成启动最为重要的靶分子, 也是目前研究最多最深入的肿瘤新生血管标志分子。2004 年, 第一个抑制肿瘤血管生成的药物靶向血管内皮生长因子抗体贝伐珠单抗(Avastin)在美国上市, 且其疗效令人鼓舞, 使人们认识到抑制肿瘤血管生成是阻止肿瘤发生发展的重要途径。

本研究以血管生成作为切入点, 探讨消癥系列口服液阻断或逆转乳腺癌前病变发展的作用机制, 结果发现消癥系列口服液能显著抑制大鼠乳腺癌前病变组织的 MVD, 并且疗效与他莫昔芬比较无统计学意义。说明抑制血管生成是消癥系列口服液阻断或逆转大鼠乳腺癌前病变发展的可能机制。但是, 消癥系列口服液并不能影响大鼠乳腺癌前病变组织中 VEGF 的表达, 说明消癥系列口服液抑制血管生成并不是通过阻断 VEGF 通路而实现的。

参考文献:

- [1] 司徒红林, 周幼志, 卓睿, 等. 消癥口服液治疗乳腺良性病变不典型增生的临床研究[J]. 甘肃中医, 2001, 14(2): 53-57.
- [2] 司徒红林, 陈前军. 消癥 1~6 号口服液干预治疗乳腺癌前病变的研究[J]. 肿瘤防治杂志, 2002, 9(2): 176-179.
- [3] 王峰, 马忠兵, 方允治, 等. 乳腺癌前病变大鼠模型的建立[J]. 中国现代普通外科进展, 2009, 12(5): 38-41.
- [4] 孙敬方. 动物实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 424-426.
- [5] Tavassoli FA, Devilee P. WHO classification of tumors. Pathology & genetic tumors of the breast and female genital organs[J]. Lyon IARC Press, 2003, 10(5): 129.
- [6] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors[J]. Breast Cancer Res Treat, 1995, 36: 169.
- [7] Tanaka K, Iwamoto S, Con G, et al. Expression of surviving and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(1), 127-134.
- [8] 林毅, 唐汉均. 现代中医乳房病学[M]. 人民卫生出版社, 2003: 122-123.
- [9] Folkman J. What is the evidence that tumours are angiogenesis

- dependent[J]. J Natl Cancer Inst, 1990, 82: 4-6.
- [10] Ottinetti A, Sapino A. Morphometric evaluation of microvessels surrounding hyperplastic and neoplastic mammary lesions[J]. Breast Cancer Res Treat, 1988, 11: 241-248.
- [11] Fregene TA, Kellog C, Pienta KJ. Microvessel quantitation as a measure of angiogenic activity in benign breast tissues lesions: a marker for precancerous disease[J]. Int J Oncol 1994, 4: 1199-1202.
- [12] Guidi A, Fischer L, Harris J, et al. Microvessel density and distribution in ductal carcinomas in situ of the breast[J]. J Natl Cancer Inst, 1994, 86: 614-619.
- [13] Engels K, Fox SB, Whitehouse RM, et al. Up-regulation of thymidine phosphorylase expression is associated with high-grade in situ ductal carcinomas of the breast[J]. J Pathol, 1997, 181: 207-212.

(编辑: 梁进权)

益气除痰方对缺氧微环境下 A549 细胞上皮间质转化及 P4HB 表达的影响

孙玲玲, 林丽珠(广州中医药大学第一附属医院肿瘤科, 广东 广州 510405)

摘要: 目的 研究益气除痰方对缺氧条件下 A549 细胞上皮间质转化的影响并初步探讨其与脯氨酸 4-羟化酶 β 亚基(P4HB)、波形蛋白(Vimentin)表达的相关性。方法 将 A549 细胞分为 3 组培养: 常氧对照组(常规培养), 缺氧模型组(加入 CoCl_2 培养模拟缺氧微环境诱导 A549 细胞上皮间质转化), 益气除痰方含药血清组(在 CoCl_2 培养基础上加入益气除痰方含药血清培养)。相差显微镜下观察 3 组 A549 细胞形态的变化; RT-PCR 检测 3 组 A549 细胞 P4HB、Vimentin mRNA 的表达含量。结果 相差显微镜下常规培养的 A549 细胞呈不典型上皮细胞形态, 经 CoCl_2 刺激后, 大部分细胞形态明显拉长, 呈现明显的间质细胞形态。益气除痰方含药血清组与常氧对照组比较间质细胞形态的细胞增多, 较缺氧模型组间质细胞形态的细胞明显减少。缺氧模型组 A549 细胞 P4HB、Vimentin mRNA 的表达量较常氧对照组明显上调, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 益气除痰方含药血清组 P4HB、Vimentin mRNA 的表达量较缺氧模型组明显下调, 差异有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结论 益气除痰方可抑制缺氧诱导的上皮间质转化, 可能与其下调 P4HB mRNA 表达相关。

关键词: 益气除痰方; 脯氨酸 4-羟化酶 β 亚基; 上皮间质转化; 缺氧微环境

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2013)05-0454-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.05.006

Effects of *Yiqi Huata* Decoction on Epithelial-mesenchymal Transition and P4HB Expression in A549 Cells Under Hypoxia Microenvironment

SUN Lingling, LIN Lizhu (Oncology Department of the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of *Yiqi Huata* Decoction(YHD), a herbal recipe with the actions of invigorating qi and removing phlegm, on epithelial-mesenchymal transition (EMT) of A549 cells under the microenvironment of hypoxia, and to explore the correlation of EMT with prolyl 4-hydroxylase beta polypeptide (P4HB) expression. **Methods** Serum containing YHD was prepared. A549 cells were cultured under normal condition (normal group), or co-cultured with CoCl_2 to induce EMT(hypoxia model group), or co-cultured with CoCl_2 and serum containing YHD(medication group). Phase contrast microscopy was applied to observe the morphological change of A549 before and after medication. P4HB and Vimentin mRNA expression in A549 cells was detected by RT-PCR. **Results** Under phase contrast microscope, untreated A549 cells showed atypical features of epithelial cells, and after

收稿日期: 2013-06-20

作者简介: 孙玲玲, 女, 医师, 硕士, 研究方向: 中西医结合抗肿瘤基础及临床。Email: 1257173024@qq.com。通讯作者: 林丽珠, 教授, 博士生导师, 研究方向: 恶性肿瘤中西医结合临床和基础研究。Email: lizhulin903@21cn.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81273963); 广东省自然科学基金重点项目(S2012020010886); 广东省自然科学基金(101510407010000021)。