

罗朝婧, 闫普普, 万鑫, 等. 清乳化石煎对动物乳腺肿瘤的保护作用及其机制研究 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (5): 127-137.

LUO Z J, YAN P P, WAN X, et al. Protective effect and mechanism of Qingruhuayan decoction on mammary tumor in animal [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (5): 127-137.

清乳化石煎对动物乳腺肿瘤的保护作用及其机制研究

罗朝婧¹, 闫普普¹, 万鑫^{2,3}, 韩一恒⁴, 周辉², 吴昱², 李梦², 郭大伟²,
孙文静⁵, 郭利伟^{1*}, 武毅^{2*}

(1. 长江大学动物科学技术学院, 湖北 荆州 434023;

2. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095;

3. 江西省野生动植物保护中心, 江西 南昌 330006;

4. 南京中医药大学常州附属医院, 江苏 常州 213000;

5. 玉林师范学院生物与制药学院/广西农产资源化学与生物技术重点实验室, 广西 玉林 537000)

摘要: 旨在探讨中药复方清乳化石煎 (QD) 对动物乳腺肿瘤的保护作用及机制。检测清乳化石煎对正常细胞 (HC11、RAW264.7、DC2.4) 的安全浓度, 探究其对乳腺癌细胞 (A27、CMT-U27、4T1) 体外增殖的抑制作用; 流式细胞术检测 4T1 细胞凋亡情况。将 BALB/c 小鼠分为空白对照组, 模型组及清乳化石煎低、中和高剂量组 (100、200 和 400 mg/kg), 除空白对照组外, 其余小鼠皮下注射 4T1 细胞建立乳腺癌转移瘤模型, 各组灌胃相应药物 14 d, 期间记录肿瘤体积和生长状况, 检测脾脏淋巴细胞增殖情况, 观察肿瘤组织病理变化, 缺口末端标记 (TUNEL) 法检测移植瘤细胞凋亡水平, 免疫组化 (IHC) 法检测肿瘤组织中基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 与热休克蛋白 70 (HSP70) 蛋白表达, ELISA 法测定肿瘤组织和血清中白细胞介素 2 (IL-2)、IL-4、IL-10、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、干扰素 γ (IFN- γ) 的含量。结果显示: 当清乳化石煎浓度大于或等于 5 mg/mL 时, 对 A27、4T1 细胞的增殖存在显著抑制 ($P < 0.001$); 浓度大于或等于 10 mg/mL 时, 对 CMT-U27 细胞呈现出显著性抑制 ($P < 0.001$); 不同浓度的清乳化石煎均可诱导 4T1 细胞凋亡 ($P < 0.001$)。与模型组相比, 清乳化石煎能够显著减小肿瘤体积 ($P < 0.001$), 促进肿瘤细胞坏死, 改善肿瘤对周围组织的影响, 促进脾脏淋巴细胞增殖 ($P < 0.001$), 促进肿瘤组织的细胞凋亡 ($P < 0.001$), 显著降低肿瘤组织中 MMP-9 和 HSP70 蛋白表达 ($P < 0.05$), 清乳化石煎组小鼠血清和肿瘤组织中 IFN- γ 和 TNF- α 水平显著上升 ($P < 0.05$), IL-10 含量显著下降 ($P < 0.05$)。研究表明, 清乳化石煎可通过调控细胞凋亡和增强机体免疫来抑制乳腺癌的发展, 为中药治疗动物乳腺癌提供理论依据。

关键词: 清乳化石煎; 乳腺癌; 凋亡; 免疫增强

中图分类号: S853.7 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)05-0127-11

Protective effect and mechanism of Qingruhuayan decoction on mammary tumor in animal

LUO Zhaojing¹, YAN Pupu¹, WAN Xin^{2,3}, HAN Yiheng⁴, ZHOU Hui², WU Yu², LI Meng², GUO Dawei²,
SUN Wenjing⁵, GUO Liwei^{1*}, WU Yi^{2*}

(1. College of Animal Science and Technology, Yangtze University, Jingzhou 434023, China;

2. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

3. Jiangxi Wildlife and Plant Protection Center, Nanchang 330006, China;

4. Changzhou Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Changzhou 213000, China;

5. College of Biology and Pharmacy, Yulin Normal University/Guangxi Key Laboratory of Agricultural Resource Chemistry and Biotechnology, Yulin 537000, China)

Abstract: This paper was to investigate the protective effect and mechanism of the Chinese traditional medicine prescription Qingruhuayan decoction (QD) on animals with breast cancer. The safe concentration of QD on normal cells (HC11, RAW264.7, DC2.4) was detected,

收稿日期: 2023-08-30; 修回日期: 2024-03-21

基金项目: 湖北省重点研发计划项目 (2023BBB045)

第一作者: 罗朝婧, 女, 硕士研究生

* 通信作者: 郭利伟, 博士, 教授, 研究方向为中兽医药学, E-mail: guolw@yangtzeu.edu.cn; 武毅, 博士, 副教授, 研究方向为中兽医药学, E-mail: wuyi2001cn@163.com。

and its inhibitory effect on the proliferation of breast cancer cells (A72, CMT-U27, 4T1) in vitro was explored. Flow cytometry was used to detect apoptosis in 4T1 cells. BALB/c mice were used and divided into the blank control group, the model group, and the low, medium, and high-dose groups of QD (100, 200, and 400 mg/kg). Except the blank control group, all the groups were injected with 4T1 cells subcutaneously to establish a breast cancer metastasis model. The corresponding drugs were administered to each group by gavage for 14 days. In this period, tumor volume and growth status in the animals were recorded, and the proliferation of spleen lymphocytes in them was examined. Pathological changes in the tumor tissue were observed, and the level of apoptosis in transplanted tumor cells was detected by TUNEL assay. Next, IHC was used to detect the expression of MMP-9 and HSP70 proteins in the tumor tissue. Finally, the levels of IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α and IFN- γ in the tumor tissue and serum were determined by ELISA. The results showed that QD significantly inhibited the proliferation of A27 and 4T1 cells at concentrations higher than or equal to 5 mg/mL ($P < 0.001$), and significantly inhibited CMT-U27 cells at concentrations higher than or equal to 10 mg/mL ($P < 0.001$). Different concentrations of QD all induced apoptosis in 4T1 cells ($P < 0.001$). Compared with the model group, QD significantly reduced tumor volume in the animals ($P < 0.001$), promoted tumor cell necrosis in them, improved the effect of the tumor on the surrounding tissues, and promoted the proliferation of their spleen lymphocytes ($P < 0.001$). QD also promoted apoptosis in tumor tissue of the animals ($P < 0.001$) and significantly reduced the expression of MMP-9 and HSP70 proteins in their tumor tissue ($P < 0.05$). The levels of IFN- γ and TNF- α in the serum and tumor tissue of the mice in the QD group were significantly raised ($P < 0.05$), while the levels of IL-10 were significantly reduced ($P < 0.05$). The present study indicated that QD inhibited the development of breast cancer by regulating cell apoptosis and enhancing the immune system, which provided a theoretical basis for the treatment of animal breast cancer with traditional Chinese medicine.

Keywords: Qingruhuayan decoction; breast cancer; apoptosis; immune enhancement

近年来,随着我国经济的发展和人民收入的提高,宠物的养殖量逐年增长,已日益成为人们生活的伴侣。据《2022年宠物行业白皮书》数据显示,中国宠物犬已超5 100万只,随着宠物逐渐进入老年,其乳腺癌的发病率逐年攀升,其中以中老年犬最为常见,其发病率约为人类的3倍。犬一旦罹患乳腺癌,外科手术是目前兽医临床主要的治疗方法。手术切除乳腺肿瘤,不仅需要承担麻醉风险,还容易出现癌细胞转移、肿瘤复发等情况。研究发现,即使进行手术治疗,犬恶性乳腺癌的术后复发率仍高达50%~90%^[1],还需要采用化疗、放疗或中药治疗等方法来抑制肿瘤的复发或转移。准确构建乳腺癌动物模型对筛选有效的抗肿瘤药物至关重要。动物乳腺肿瘤的发生、发展机制非常复杂,且这些机制与小鼠乳腺肿瘤的发生、发展机制类似^[2],因此通过小鼠乳腺肿瘤模型推测犬乳腺癌的相关机制已经成为科学界探讨的热点。目前,小鼠模型应用在动物和人乳腺癌新药临床研发上已较为成熟,而犬模型在灵长类动物模型受到越来越多限制的今天受到越来越多的重视,因此这两种动物模型在科学研究和临床研究上的应用越发广泛。

中药具有安全性高、副作用小、作用缓和等特点,在抑制癌症的发展、改善机体免疫、减轻西医治疗的并发症及副作用等方面具有独特的优势,因此,中西医结合治疗乳腺癌成为国内外临床以及基础研究的重点研究方向之一^[3-4]。乳腺癌属于中医“乳岩”、“乳疔”、“乳石痈”的范畴,病位在乳房,与肝、脾、肾等脏腑的生理功能密切相关^[5-6]。中医治疗乳腺癌的基本治则为健脾益肾、清热解毒、疏肝解郁或

散瘀消积,通过健脾益肾扶助正气,以平衡气血阴阳,再通过清热解毒、疏肝解郁或化痰散瘀,实现化解癌肿并将病邪逐出体外^[7]。

清乳化岩煎由黄芪、当归、蒲公英、白花蛇舌草、金银花、山海螺、三叶青、蛇六谷、露蜂房组成,方中黄芪、当归能补气养血,匡扶正气,为主药;蒲公英、白花蛇舌草、金银花、山海螺、三叶青、蛇六谷共奏清热解毒、消肿散结、清化癌毒之功效,为臣药;露蜂房祛风攻毒,化瘀散结,为佐使药。本方扶正与祛邪兼顾,气血相生,化毒抗癌,体现了中医治疗乳腺癌“标本兼顾、补重于清”的治疗原则。

本试验以A72犬乳腺癌细胞、CMT-U27犬乳腺癌细胞和4T1小鼠乳腺癌细胞为模型探究清乳化岩煎的体外抗乳腺癌作用,体内接种4T1细胞构建小鼠乳腺肿瘤模型,通过观察肿瘤体积、肿瘤组织中癌细胞的凋亡情况以及药物对模型动物机体免疫的影响,探究清乳化岩煎对小鼠乳腺肿瘤的抑制作用和机制。本研究能够为临床上运用中兽医理论和中药复方治疗犬乳腺癌提供借鉴,为开发治疗犬乳腺肿瘤的中兽药制剂提供研究基础。

1 材料与方

1.1 主要材料与试剂

黄芪、当归、白花蛇舌草、金银花、山海螺、三叶青、蛇六谷、露蜂房、蒲公英,购自南京大华中药店;A72(犬源)乳腺癌细胞、CMT-U27(犬源)乳腺癌细胞,购自美国模式培养物集存库(ATCC);RAW264.7(鼠源)单核-巨噬细胞、DC2.4(鼠源)

树突状细胞、4T1 (鼠源) 乳腺癌细胞, 购自湖南丰晖生物科技有限公司; DMEM 基础培养基、RPMI-1640 基础培养基、胎牛血清、脂多糖 (LPS)、植物血凝素 (PHA), 购自美国 Gibco 公司; 牛血清白蛋白 (BSA)、EDTA、PBS、Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒、二氨基联苯胺 (DAB), 购自北京索莱宝生物科技有限公司; 细胞计数试剂-8 (CCK-8) 试剂盒, 购自美国 ZETA LIFE 公司; 小鼠白细胞介素 2 (IL-2)、IL-4、IL-10、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、干扰素 γ (IFN- γ) ELISA 试剂盒, 购自杭州联科生物科技股份有限公司; TUNEL 试剂盒, 购自瑞士 Roche 公司; 蛋白酶 K, 购自德国 Biofroxx 公司; 基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 抗体、热休克蛋白 70 (HSP70) 抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (二抗), 购自英国 Abcam 公司; 双氧水, 购自国药集团化学试剂有限公司; 其他化学试剂均为分析纯。

1.2 清乳化石煎的制备

将 9 味原药材 (黄芪 6 份, 当归 3 份, 蒲公英 6 份, 白花蛇舌草 3 份, 金银花 3 份, 山海螺 3 份, 三叶青 3 份, 蛇六谷 2 份, 露蜂房 2 份) 混合捣碎后倒入煎器内, 加入 3 L 双蒸水浸泡 1 h, 随后大火煮沸, 文火煎煮 1 h, 取上清液过滤, 重复煎煮滤渣 2 次, 合并 3 次滤液, 浓缩得 1 g/mL 中药液。

1.3 清乳化石煎的安全浓度

取对数生长期的 HC11、RAW264.7、DC2.4 细胞, 接种至 96 孔细胞培养板中, 置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养至贴壁。用药组分别加入不同浓度的清乳化石煎 (终浓度为 0.625、1.25、2.5、5、10、20、40 和 60 mg/mL, DMEM 完全培养基稀释), 空白对照组加入 DMEM 完全培养基, 放入细胞培养箱中继续培养 24 h。孵育结束后取出 96 孔板, 弃上清液, 用 PBS 冲洗 2 次, 然后每孔加入 90 μ L DMEM 完全培养基和 10 μ L CCK-8, 置于细胞培养箱中继续孵育 1~4 h。孵育结束后, 取出 96 孔板, 于酶标仪 450 nm 波长下测定各孔 OD 值, 记录结果, 同时计算细胞存活率, 对数据进行处理与统计分析。细胞存活率 = 药物组 OD 值/空白组 OD 值 \times 100%。

1.4 清乳化石煎对乳腺癌细胞增殖的影响

取对数生长期的犬 A72 细胞、犬 CMT-U27 细胞和小鼠 4T1 细胞接种于 96 孔板, 待细胞贴壁, 加入不同浓度的清乳化石煎 (终浓度为 0.625、1.25、2.5、5、10 和 20 mg/mL, 1640 完全培养基稀释), 37 °C, 5% CO₂ 条件下培养 23 h, 培养结束后每孔加入 20 μ L CCK-8, 于 37 °C, 5% CO₂ 条件下孵育 1 h, 孵育结束使用酶标仪在 450 nm 波长下测定各孔 OD 值, 计算细胞存活率。

1.5 清乳化石煎对 4T1 细胞凋亡的影响

采用胰酶消化并收集 4T1 细胞, 使用 RPMI-1640 基础培养基调节细胞浓度为 1×10^6 个/mL, 接种 24 孔板, 待细胞贴壁, 加入适量清乳化石煎, 使其终浓度分别达到 5 和 10 mg/mL。同时设置空白对照组, 37 °C, 5% CO₂ 条件下培养 24 h, 培养结束使用不含 EDTA 胰酶消化并收集细胞, 按照凋亡检测试剂盒说明书进行染色, 用流式细胞仪测定细胞凋亡情况。

1.6 乳腺癌转移瘤模型的建立及治疗

50 只 BALB/c 小鼠, 雌雄各半, (20 \pm 2) g, 购自扬州大学比较医学中心, 试验前适应性饲养 1 周 (动物饲养严格遵守试验动物福利伦理要求进行)。将 50 只小鼠随机分为空白对照 (Control) 组, 模型 (Model) 组以及清乳化石煎低 (L)、中 (M) 和高 (H) 剂量组 (100、200 和 400 mg/kg)。除空白组外, 对其余分组小鼠建立乳腺肿瘤模型: 消化并收集 4T1 细胞, 使用 0.9% 生理盐水重悬并调整细胞密度为 1×10^7 个/mL, 将小鼠固定, 去除在小鼠第 4 对与第 5 对乳头中间毛发, 使用 1 mL 注射器于乳头下方皮下脂肪垫缓慢注射 0.1 mL 细胞悬液。接种完成后, 每日观察小鼠肿瘤的生长速度, 以瘤体直径 ≥ 3 mm 判定成瘤阳性, 模型建立后各组小鼠按分组治疗, 隔天灌胃 1 次, 每次给药 0.5 mL, 连续治疗 14 d, 治疗期间每 2 d 对各组小鼠称重 1 次, 并绘制小鼠体重生长曲线。治疗结束, 使用乙醚麻醉并脱颈椎处死小鼠, 收集肿瘤、血清和脾脏。

1.7 肿瘤测量与抑瘤率计算

治疗期间, 隔天测量小鼠皮下肿瘤的体积, 来动态反映药物的抗肿瘤效果。使用游标卡尺测量瘤体最长径与最短径, 测量结束根据肿瘤体积计算公式计算瘤体体积。治疗结束后剥离肿瘤, 测量最终瘤体体积, 并称量瘤体重量, 根据如下公式计算移植瘤生长抑制率, 并绘制瘤体生长曲线。瘤体体积 = (长径 \times 短径 \times 短径) / 2, 药物抑瘤率 = (模型组平均瘤重 - 给药组平均瘤重) / 模型组平均瘤重 \times 100%。

1.8 检测脾脏淋巴细胞增殖情况

将各组小鼠脾脏用 RPMI-1640 完全培养基研磨制备细胞悬液, 接种于 96 孔板, 分别加入 LPS、PHA (终浓度为 5 和 10 ng/mL, RPMI-1640 完全培养基稀释) 刺激, 同时设立未刺激组, 置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中连续培养 24 h 后, 加入 CCK-8, 孵育 1 h, 结束后使用酶标仪在 450 nm 波长下测定各孔 OD 值, 计算细胞存活率。

1.9 病理组织学观察

肿瘤组织经不同浓度的乙醇逐级脱水, 二甲苯透

明、浸蜡和包埋，然后连续切片，脱蜡后制成切片，分别对切片进行 HE 染色，于显微镜下观察其病理变化。

1.10 TUNEL 法染色检测移植瘤细胞凋亡水平

石蜡切片脱蜡后严格按照 TUNEL 试剂盒的说明进行操作，用蛋白酶 K 进行组织修复，经破膜后，在组织上加混合试剂（末端脱氧核苷酸转移酶：脱氧尿苷三磷酸=1：9）进行恒温孵育，随后复染细胞核，清洗后用抗荧光淬灭剂封片。于荧光显微镜下观察拍照，以检测细胞凋亡情况。

1.11 免疫组化法检测肿瘤组织中 MMP-9 与 HSP70 的表达水平

石蜡切片脱蜡、水化，置于 EDTA 溶液中加热 10 min 进行抗原修复；自然冷却后 PBS 冲洗 3 遍，滴加 3% 双氧水溶液，室温孵育 25 min；冲洗后滴加 3% BSA 溶液封闭 30 min；冲洗，滴加一抗（MMP-9 1：1 000，HSP70 1：500，抗体稀释液稀释），4 ℃ 冰箱过夜；复温冲洗后滴加二抗（1：2 000，同上），孵育 50 min；冲洗后滴入 DAB 试剂显色、复染、脱水、透明、封片。于显微镜下观察分析并采集图像。

1.12 测定血清和癌组织细胞因子水平

分离血清并将采集的肿瘤组织充分研磨匀浆后，按照 ELISA 试剂盒提供的说明书测定肿瘤组织和血清中 IL-2、IL-4、IL-10、TNF- α 、IFN- γ 的含量。

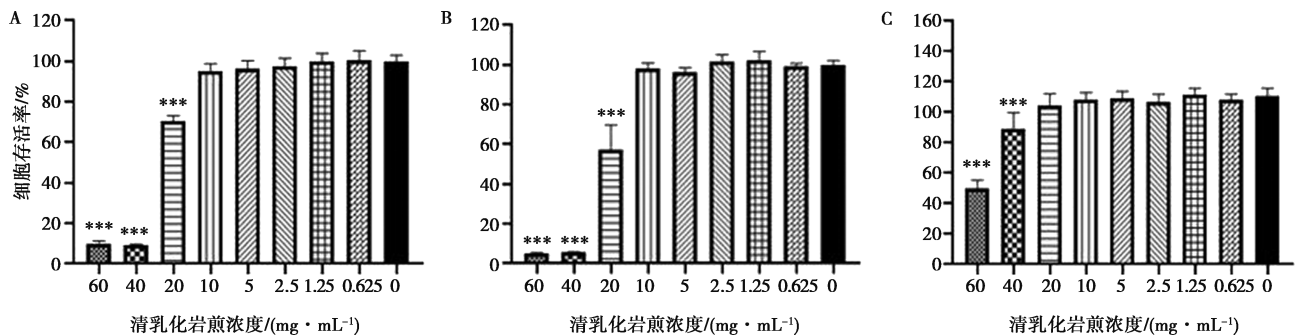
1.13 数据统计与分析

流式细胞术下机数据使用 Flowjo V10.1.8 软件进行分析，所得数据均使用 GraphPad Prism 6.0 软件作图分析，使用 SPSS 18.0 软件进行单因素方差分析（One-way ANOVA），采用 Duncan 氏法检验组间差异性，结果为“平均值 \pm 标准误”。 $P < 0.05$ 表示差异显著， $P < 0.01$ 表示差异非常显著。

2 结果与分析

2.1 清乳化石煎的安全浓度

不同浓度清乳化石煎对正常细胞增殖的影响如图 1 所示，与空白对照组相比，清乳化石煎对 HC11 细胞的安全浓度为 10 mg/mL，对 RAW264.7 细胞的安全浓度为 10 mg/mL，对 DC2.4 细胞的安全浓度为 20 mg/mL。



与空白对照组相比，***表示差异极显著（ $P < 0.001$ ）。下同。

A. HC11 细胞；B. RAW264.7 细胞；C. DC2.4 细胞。

图 1 不同浓度清乳化石煎对乳腺癌细胞活力的影响（ $n = 6$ ）

2.2 清乳化石煎对乳腺癌细胞增殖的影响

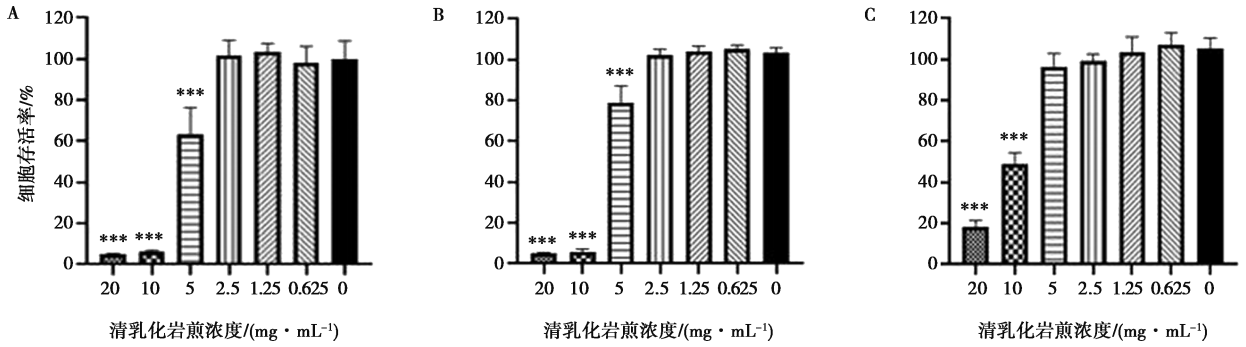
不同浓度清乳化石煎对乳腺癌细胞增殖的影响如图 2 所示，与空白对照组相比，清乳化石煎浓度在 0.625~2.5 mg/mL 范围内时，对 A72、4T1 细胞增殖无显著影响（ $P > 0.05$ ）；当清乳化石煎浓度大于或等于 5 mg/mL 时，对 A72、4T1 细胞呈现出显著增殖抑制作用（ $P < 0.001$ ）；当清乳化石煎浓度在 0.625~5 mg/mL 范围内时，对 CMT-U27 细胞的增殖无显著影响（ $P > 0.05$ ）；而当清乳化石煎浓度大于或等于 10 mg/mL 时，对 CMT-U27 细胞增殖呈现出显著性抑制作用（ $P < 0.001$ ）。

2.3 清乳化石煎对 4T1 细胞凋亡的影响

清乳化石煎 5 和 10 mg/mL 作用 4T1 细胞 24 h 后，采用 Annexin FITC/PI 法，通过流式细胞仪检测细胞凋亡率（早期凋亡率+晚期凋亡率）。细胞凋亡情况如图 3 所示，与空白对照组相比，用药组 4T1 细胞凋亡率显著性上升（图 3B、3C， $P < 0.001$ ）。

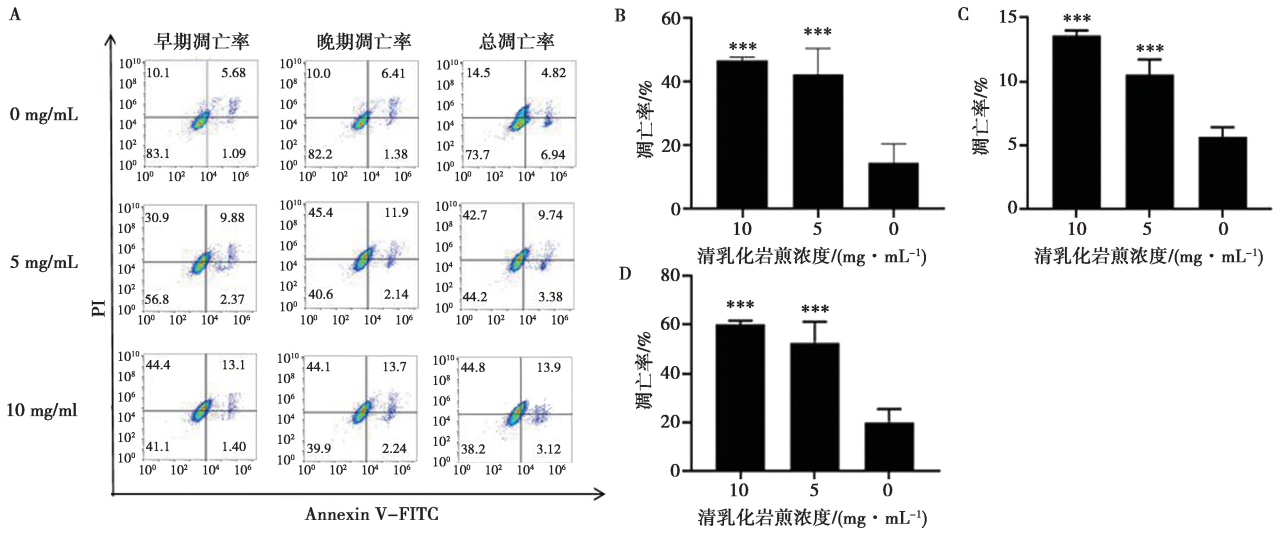
2.4 清乳化石煎对小鼠体重的影响

如图 4 所示，在给药治疗期间，空白对照组、高剂量与中剂量用药组小鼠体重呈稳定上升趋势，低剂量用药组与模型组小鼠体重呈不同程度先上升后下降趋势，各组小鼠最终体重无显著差异（ $P > 0.05$ ）。



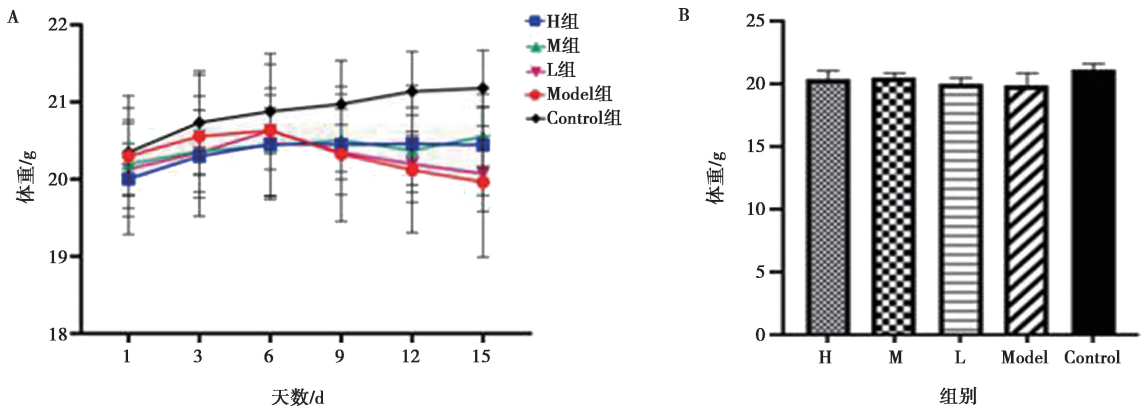
A. A72 细胞; B. 4T1 细胞; C. CMT-U27 细胞。

图 2 不同浓度清乳化岩煎对乳腺癌细胞活力的影响 (n=6)



A. 流式细胞术检测 4T1 细胞凋亡结果; B. 4T1 细胞早期凋亡率; C. 4T1 细胞晚期凋亡率; D. 4T1 细胞总凋亡率。

图 3 清乳化岩煎对 4T1 细胞凋亡的影响 (n=3)



A. 各组小鼠体重变化; B. 最终体重。

图 4 清乳化岩煎对小鼠体重影响 (n=10)

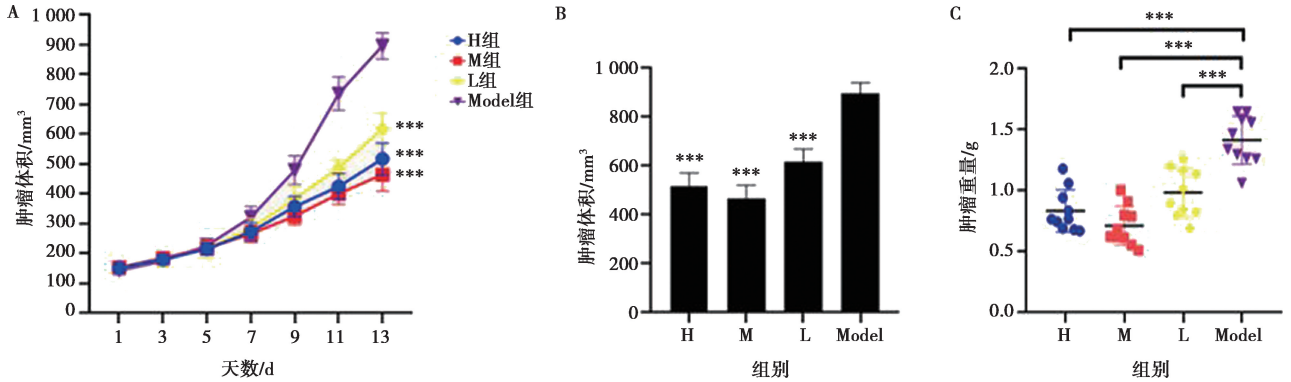
2.5 清乳化岩煎对小鼠移植瘤生长的影响

清乳化岩煎治疗期间小鼠肿瘤生长曲线如图 5A 所示,与模型组小鼠相比,用药组在第 9 天时减缓了肿瘤生长,且这种抑制作用一直持续至治疗周期结

束。治疗结束后,测量瘤体最终体积(图 5B),称量瘤体最终重量(图 5C),结果显示,与模型组相比,各用药组小鼠瘤体体积显著性减小 ($P < 0.001$),瘤体重量显著性降低 ($P < 0.001$),尤其是用药组中以

中剂量用药组治疗效果最为明显。小鼠抑瘤率结果显示, 各用药组对小鼠4T1 乳腺癌移植瘤均有不同程度

的抑制作用, 其中中剂量组抑制作用最为明显, 达49.63% (表1)。



与模型 (Model) 组相比: * 表示差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示差异非常显著 ($P < 0.01$), *** 表示差异极显著 ($P < 0.001$)。下同。

A. 小鼠肿瘤体积变化; B. 最终肿瘤体积; C. 肿瘤重量。

图5 清乳化岩煎对小鼠肿瘤的影响 ($n = 10$)

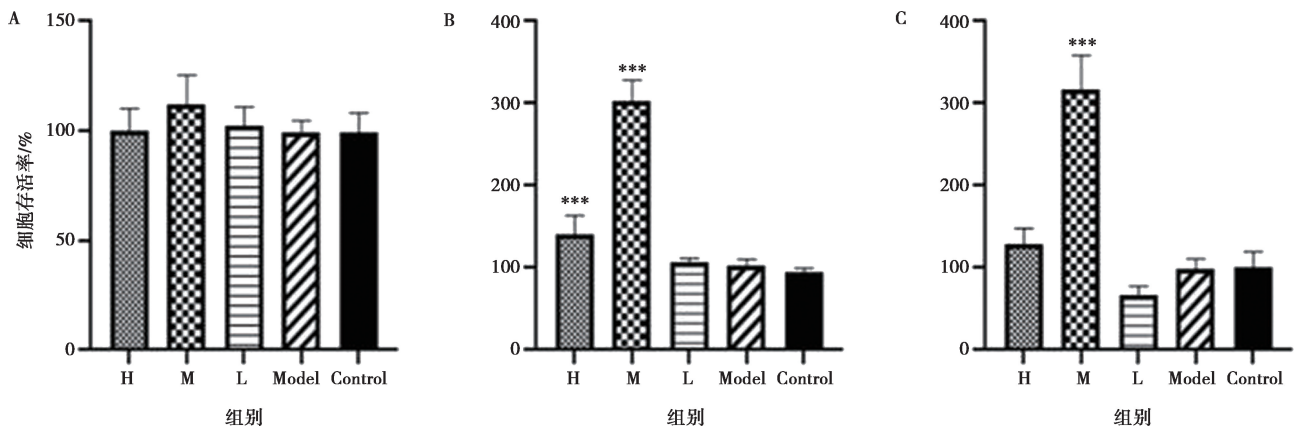
表1 药物干预后各组小鼠乳腺癌抑瘤率 ($n = 10$)

组别	清乳化岩煎剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	抑瘤率/%
Model	0	0
H	400	40.98
M	200	49.63
L	100	30.42

2.6 清乳化岩煎对脾脏淋巴细胞的影响

清乳化岩煎对小鼠脾脏淋巴细胞增殖的影响结果如图6所示。未刺激组中, 各用药组小鼠脾脏淋巴细胞活性与模型组、空白组相比均无显著性差异 ($P >$

0.05, 图6A)。在LPS刺激剂中, 相较模型组, 高剂量与中剂量用药组联合LPS刺激小鼠脾脏B淋巴细胞增殖效果显著 ($P < 0.001$), 低剂量用药组联合LPS刺激效果无显著差异 ($P > 0.05$), 模型组与空白对照组小鼠脾脏B淋巴细胞增殖无显著差异 ($P > 0.05$, 图6B)。在PHA刺激剂中, 相较模型组, 高剂量与低剂量用药组小鼠脾脏T淋巴细胞活性均无明显变化 ($P > 0.05$, 图6C), 而中剂量组联合PHA刺激可显著促进脾脏T淋巴细胞增殖 ($P < 0.001$)。由此可见, 中剂量清乳化岩煎对促进小鼠脾脏淋巴细胞增殖效果最好。



A. 未刺激; B. LPS 刺激; C. PHA 刺激。

图6 清乳化岩煎对小鼠脾脏淋巴细胞增殖的影响 ($n = 10$)

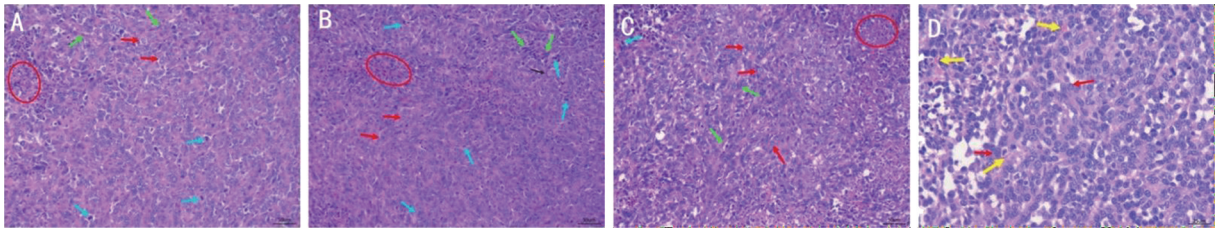
2.7 小鼠乳腺肿瘤组织病理学变化

清乳化岩煎对小鼠乳腺肿瘤组织结构的影响如图7所示。模型组中可见肿瘤细胞呈椭圆形分布, 细胞

形态完好, 细胞核较大, 核仁可见, 肿瘤细胞数量较多, 坏死区域较少见, 间质血管区域较多, 血管丰富, 可为肿瘤细胞提供生长所需的营养, 提示肿瘤细

胞生长活性较好；与模型组相比，用药组肿瘤细胞数量减少，细胞形态不完整，其中高剂量组与中剂量组肿瘤细胞出现较大程度的核溶解与细胞核深染，同时

出现细胞核碎片与核分裂象，肿瘤细胞坏死区域较大。



红色圆圈区域为肿瘤细胞坏死区，红色箭头区域为乳腺肿瘤细胞，蓝色箭头区域为核分裂象，黄色箭头区域为间质血管，绿色箭头区域为细胞核碎片，黑色箭头指示成纤维细胞。

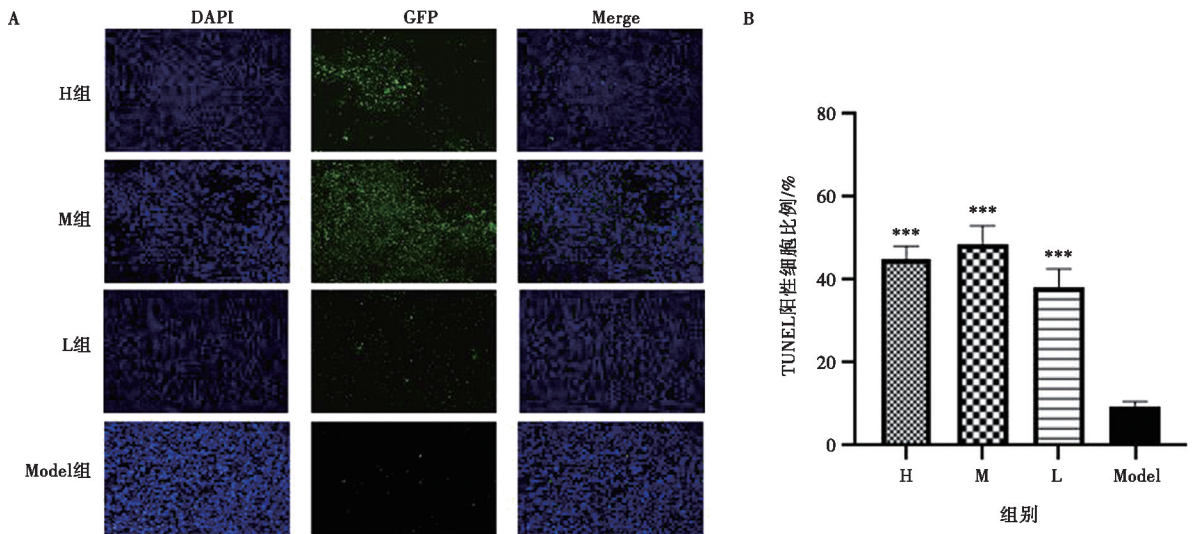
A. H组；B. M组；C. L组；D. Model组。

图7 小鼠乳腺肿瘤组织病理切片（HE染色，200×）

2.8 清乳化岩煎对移植瘤细胞凋亡的影响

为进一步探讨清乳化岩煎对4T1乳腺癌移植瘤的影响，采用TUNEL法检测移植瘤中细胞凋亡情况。结果如图8A所示。其中，细胞核被标记为蓝色，凋亡阳性肿瘤细胞表达为绿色荧光。模型组和用药组的肿瘤细胞表现的蓝色荧光强度基本一致，模型组偶有极少量绿色荧光，细胞凋亡数量少，细胞凋亡率为6.69%。与模型组相比，用药组乳腺肿瘤细胞绿色荧光强度明显增强，肿瘤细胞破碎成点片状，凋亡数量

显著性增多，差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)，高剂量组和中剂量组最为明显，平均细胞凋亡率分别达71.91%、74.85%，低剂量组平均细胞凋亡率为61.39%。定量分析结果如图8B所示，模型组阳性细胞比例最低，用药组的阳性细胞比例均显著性升高 ($P < 0.001$)，其中，中剂量组凋亡细胞比例最高。以上结果表明，清乳化岩煎能够抑制乳腺癌并促进乳腺癌细胞的凋亡。



A. 各组移植瘤中TUNEL染色（200×）；B. TUNEL阳性细胞比例。

图8 清乳化岩煎对乳腺肿瘤细胞凋亡的影响

2.9 肿瘤组织中MMP-9与HSP70的表达

2.9.1 肿瘤组织中MMP-9的表达

各组移植瘤免疫组化染色情况如图9A所示，DAB显示的阳性表达为棕黄色。与模型组相比，用

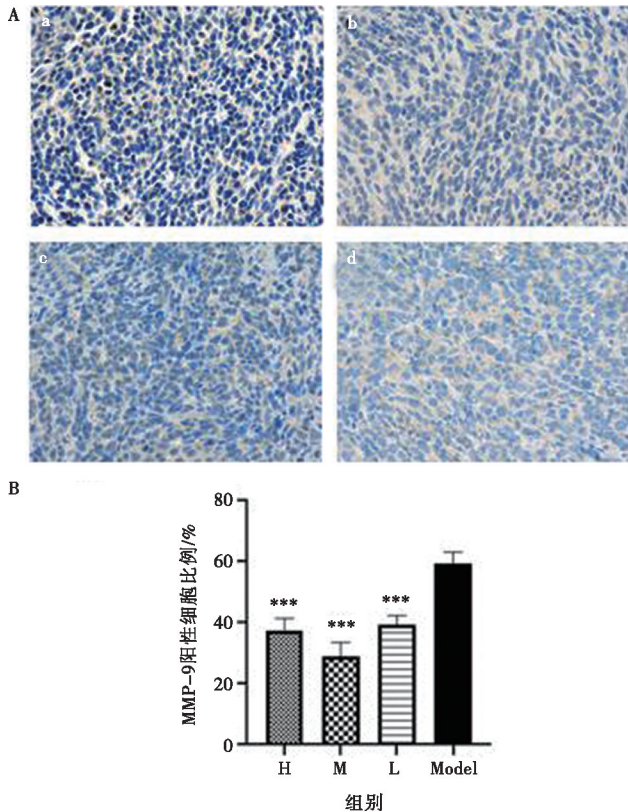
药组细胞着色减弱，MMP-9阳性表达减少。定量分析结果如图9B所示，用药组MMP-9阳性细胞表达水平显著减少 ($P < 0.001$)，高、中、低剂量组MMP-9阳性细胞平均百分比分别为37.22%、

29.20%、39.57%，而模型组 MMP-9 阳性细胞百分比为 59.45%，表明清乳化石煎可显著降低乳腺肿瘤组织中 MMP-9 的表达。

2.9.2 肿瘤组织中 HSP70 的表达

各组肿瘤组织中 HSP70 的表达情况如图 10A 所示。与模型组相比，用药组 HSP70 阳性表达与细胞

着色具有减弱的趋势，定量分析结果如图 10B 所示，高、中、低剂量组 HSP70 阳性细胞平均百分比分别为 33.95%、33.30%、39.80%，而模型组 HSP70 阳性细胞百分比为 52.22%。与模型组相比，用药组 HSP70 表达水平显著减少 ($P < 0.05$)，表明清乳化石煎可以降低乳腺肿瘤组织中 HSP70 的表达。



a. Model 组; b. H 组; c. M 组; d. L 组。

A. 各组移植瘤组织中 MMP-9 表达情况 (200×); B. MMP-9 阳性细胞百分比。

图 9 清乳化石煎对 MMP-9 的影响

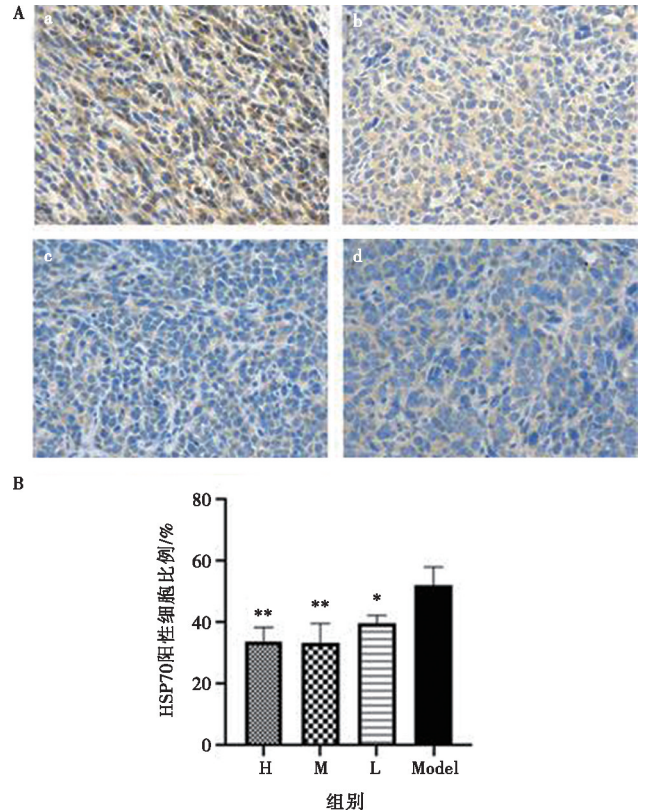
2.10 清乳化石煎对血清中细胞因子的影响

2.10.1 血清中辅助性 T 细胞 1 (Th1) 型细胞因子水平变化

清乳化石煎对小鼠 4T1 移植瘤血清中 IL-2、TNF- α 、IFN- γ 的影响如图 11 所示。与空白组相比，模型组各细胞因子的含量均无明显变化 ($P > 0.05$)，但 TNF- α 的含量具有上升的趋势。与模型组相比，用药组 IL-2 的含量无明显变化 ($P > 0.05$)，TNF- α 与 IFN- γ 的含量均显著性上升 ($P < 0.01$)，且中剂量组含量最高。以上结果说明，清乳化石煎可以促进肿瘤小鼠体内 Th1 型细胞因子的分泌。

2.10.2 血清中 Th2 型细胞因子水平变化

清乳化石煎对小鼠 4T1 移植瘤血清中 IL-4 与 IL-10 的影响如图 12 所示。与空白组相比，模型组 IL-4



a. Model 组; b. H 组; c. M 组; d. L 组。

A. 各组移植瘤组织中 HSP70 表达情况 (200×); B. HSP70 阳性细胞百分比。

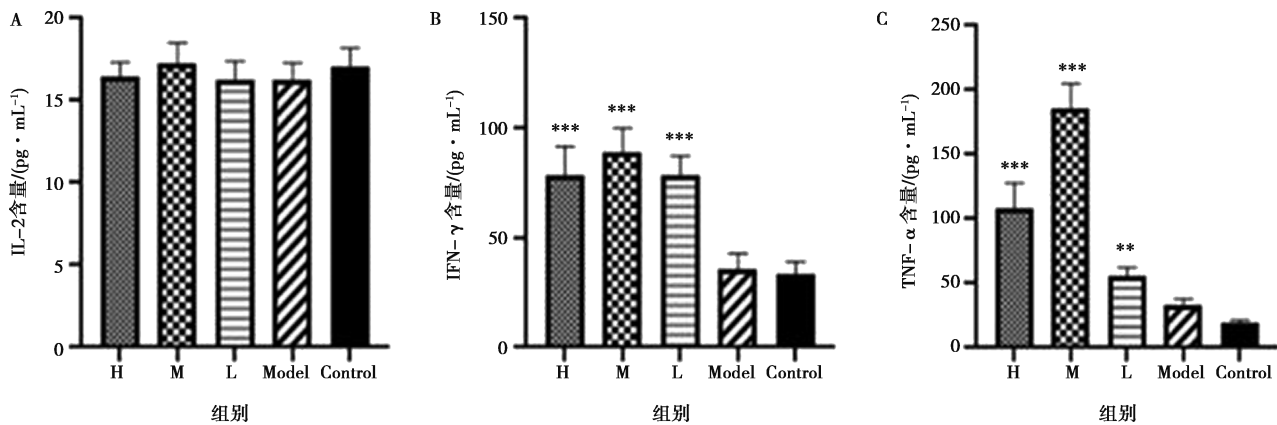
图 10 清乳化石煎对 HSP70 的影响

表达水平具有上升的趋势，但差异不显著 ($P > 0.05$)，IL-10 的表达显著性上升 ($P < 0.01$)。与模型组相比，IL-4 的含量具有下降的趋势，但差异不显著 ($P > 0.05$)；各用药组 IL-10 的含量显著性降低 ($P < 0.001$)，表明清乳化石煎可以抑制乳腺癌小鼠 Th2 型细胞因子分泌。

2.11 清乳化石煎对肿瘤组织中细胞因子的影响

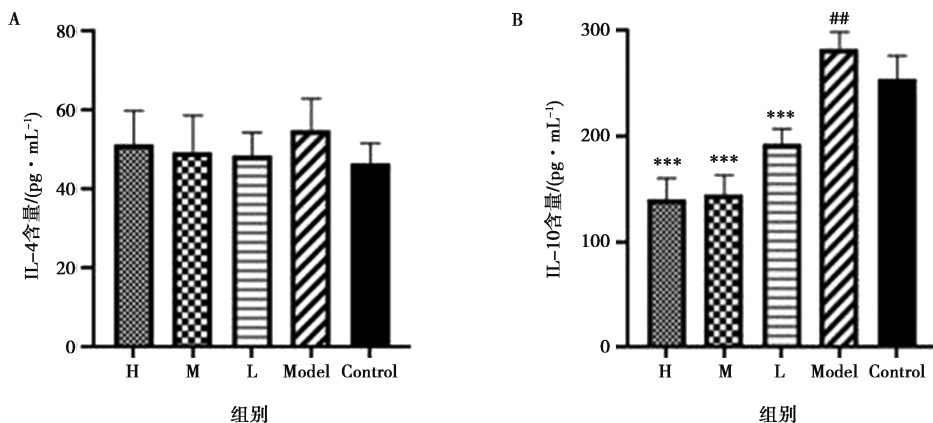
2.11.1 肿瘤组织中 Th1 型细胞因子水平变化

清乳化石煎对小鼠肿瘤组织 Th1 型细胞因子表达如图 13 所示，与模型组相比，清乳化石煎组 IL-2 含量无显著性差异 ($P > 0.05$)，但具有上升的趋势；各用药组 IFN- γ 与 TNF- α 的含量显著性上升 ($P < 0.05$)，其中高剂量组与中剂量组变化最显著 ($P < 0.001$)。



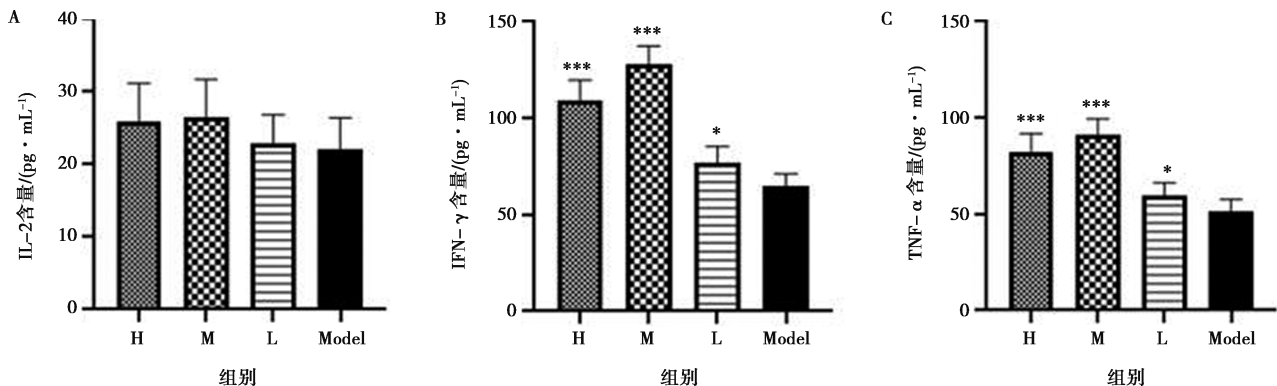
A. IL-2 含量; B. IFN-γ 含量; C. TNF-α 含量。

图 11 清乳化岩煎对小鼠血清中 Th1 型细胞因子的影响



A. IL-4 含量; B. IL-10 含量。##表示与 Control 组相比, 差异极显著 ($P < 0.01$)。

图 12 清乳化岩煎对小鼠血清中 Th2 型细胞因子的影响



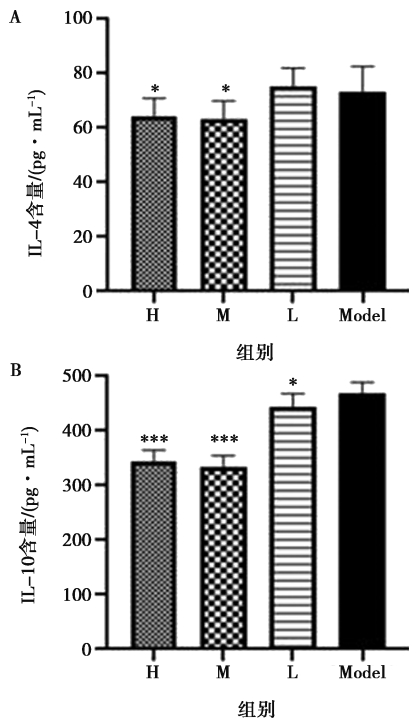
A. IL-2 含量; B. IFN-γ 含量; C. TNF-α 含量。

图 13 清乳化岩煎对小鼠肿瘤组织中 Th1 型细胞因子的影响

2.11.2 肿瘤组织中 Th2 型细胞因子水平变化

肿瘤组织中 Th2 型细胞因子水平变化如图 14 所示, 与模型组相比, 高剂量组与中剂量组癌组织中 IL-4 的含量显著性下降 ($P < 0.05$), 低剂量组 IL-4

的含量无明显变化 ($P > 0.05$); 各用药组 IL-10 的含量显著性下降 ($P < 0.05$), 其中高、中剂量组差异极显著 ($P < 0.001$)。



A. IL-4 含量; B. IL-10 含量。

图 14 清乳化石煎对小鼠肿瘤组织中 Th2 型细胞因子的影响

3 讨论

乳腺癌是最常见的、全球发病率最高的癌症之一，且发病率有逐年攀升的趋势^[8]。就宠物而言，乳腺肿瘤在雌性动物中发病率最高（16.8%）^[9]。在未绝育的雌性犬中，犬乳腺肿瘤是最常见的恶性肿瘤，其死亡率比人类乳腺癌高 3 倍^[10]。由于乳腺癌早期无症状，许多患者错过了最佳治疗时间，导致癌症进入恶性转移阶段^[11]。随着越来越多的化疗药物（如紫杉类药物和蒽环类药物）被用于临床治疗癌症，它们也因非选择性细胞毒性而产生了严重的副作用^[12]。因此，如何在抑制癌细胞增殖的同时不伤害正常细胞和组织，是减少化疗副作用的关键。

对于宠物而言，手术是临床治疗犬乳腺肿瘤的主要手段，也是控制局部肿瘤的最有效的方法。然而，由于局部和远处转移的概率较高，尤其是对于出现淋巴或血管转移的宠物，单纯的外科手术并不能完全治愈^[1]。因此，对乳腺癌患犬施加有效的辅助治疗方法，如放射治疗、抗 Cox-2 治疗、化学治疗、去氨加压素、激素治疗或抗血管生成治疗等^[13-14]，对患犬的术后恢复效果至关重要。中医在治疗乳腺癌方面积累了数千年的经验。现代中医学研究发现，中药不仅能够抑制癌细胞的生长，有效预防乳腺癌，而且能减轻乳腺癌患者术后的诸多不良反应，减少放疗与化疗带来的副作用，防止癌症的复发和转移，进而更好地提高乳腺癌患者生存率和生活质量^[4]。目前已有

研究证明本方中黄芪^[15]、当归^[16]、白花蛇舌草^[17]、金银花^[18]、山海螺^[19]、三叶青^[20]、蒲公英^[21]等中药均具有一定抗癌功效。结果表明，在安全浓度下，清乳化石煎不仅能抑制乳腺癌细胞增殖，还能显著诱导 4T1 细胞凋亡，这一结果也在体内试验中得到了验证。本试验使用小鼠 4T1 细胞进行原位接种，成功构建了小鼠乳腺癌移植瘤模型，采用灌胃给药的方式给予治疗。小鼠体重变化曲线与最终体重结果显示，在给药 6~9 d 后，与模型组相比，各用药组小鼠肿瘤体积均明显减小，肿瘤生长速度明显减慢，解剖发现瘤体重量也显著降低，说明清乳化石煎能够有效抑制乳腺肿瘤的生长，其中以中剂量组效果最佳。在观察乳腺肿瘤组织的病理切片时发现，相比模型组，用药组小鼠肿瘤细胞数量明显减少，坏死区域增多，血管区域较少，提示药物可能通过诱导肿瘤细胞的破裂与细胞核的溶解进而抑制肿瘤细胞的生长。

MMP-9 的表达水平通常与肿瘤大小呈正相关，MMP-9 内含子 DNA 区域中的表观遗传标记对 DNA 甲基化与基因表达调控机制，也与乳腺癌细胞转移密切相关^[22]。HSP70 是热休克蛋白家族中组重要的一员，热休克蛋白是生物体细胞在热诱导下合成的具有高度保守性的蛋白质，在应激状态下作为分子伴侣参与肿瘤的发生^[23]，Fahim 等^[24]通过免疫组化和 ELISA 法探究了 HSP70 在乳腺肿瘤组织及其血清中的表达水平，证实大多数乳腺癌患者的血清和肿瘤组织中都有 HSP70 的表达，且 HSP70 在恶性病例中的表达水平明显高于良性病例，并证明 HSP70 可以作为乳腺癌生物标记物，用于乳腺癌的筛查与肿瘤监测等方面。本试验结果发现，与模型组相比，用药组小鼠乳腺肿瘤组织中 MMP-9 和 HSP70 的表达水平显著降低，提示清乳化石煎可能通过调节机体 MMP-9 与 HSP70 的表达进而控制乳腺癌的生长与转移。

在细胞免疫中，T 细胞一方面可通过促进 TNF- α 、IFN- γ 等细胞因子的分泌，直接破坏肿瘤细胞的生长，还可促进肿瘤细胞中主要组织相容性复合体 I 类（MHC-I）类分子的表达，进而增强癌细胞对细胞毒性 T 淋巴细胞（CTL）杀伤的敏感性^[25]；另一方面可促进 B 细胞的增殖与分化，促进体液免疫，进而杀伤肿瘤^[26]。B 细胞可通过产生肿瘤特异性抗体，驱动抗体依赖性细胞介导的细胞毒性作用和吞噬作用等，发挥抗肿瘤作用^[27]。本试验中，观察到清乳化石煎可以显著促进脾脏淋巴细胞的增殖，结合 PHA 和 LPS 的试验结果，推测该药物具有促进 T、B 淋巴细胞增殖与分化的作用。

细胞因子在免疫应答与炎症反应中起着重要作用。相关研究显示，在乳腺癌动物模型和人乳腺癌

中, Th2 型免疫反应增强, 而 Th1 型免疫反应降低^[28], 推测 Th1 型细胞因子表达水平的升高与 Th2 型细胞因子表达水平的降低可增强机体的免疫调节功能, 发挥抗乳腺癌作用。本研究采用 ELISA 法测定清乳化石煎干预后小鼠肿瘤组织和血清中的 IL-2、IL-4、IL-10、TNF- α 、IFN- γ 的含量。与模型组相比, 清乳化石煎并未对血清 IL-2 与 IL-4 的表达产生显著性影响, 但 IL-10 的含量显著性降低, TNF- α 与 IFN- γ 的含量显著性上升。肿瘤组织中 IL-2 含量无明显变化, TNF- α 与 IFN- γ 的表达水平显著性上升, 且 IL-4 与 IL-10 的含量出现不同程度的显著性下降。以上结果表明, 在一定浓度范围内, 清乳化石煎可以增强 Th1 型细胞因子的分泌, 抑制 Th2 型细胞因子的释放水平, 进而增强机体的免疫作用。

综上, 清乳化石煎对乳腺癌细胞和小鼠 4T1 移植瘤模型具有良好的干预作用, 一方面, 能抑制乳腺癌细胞的增殖, 诱导 4T1 细胞发生凋亡, 控制乳腺癌组织的生长; 另一方面, 能够促进脾脏淋巴细胞的增殖, 调节 Th1 型和 Th2 型细胞因子的表达水平, 改善机体免疫功能, 有效抑制乳腺癌的生长与转移。本研究为探讨中药复方治疗乳腺癌的作用机制提供了借鉴, 也为开发治疗宠物和人类乳腺癌的中药复方提供依据。

参考文献:

- [1] STRATMANN N, FAILING K, RICHTER A, et al. Mammary tumor recurrence in bitches after regional mastectomy [J]. *Vet Surg*, 2008, 37 (1): 82-86.
- [2] LAMPREHT TRATAR U, HORVAT S, CEMAZAR M. Transgenic mouse models in cancerresearch [J]. *Front Oncol*, 2018, 8: 268.
- [3] 田劭丹, 陈信义. 中医药治疗恶性肿瘤特色与优势 [J]. *现代中医临床*, 2019, 26 (2): 8-17.
- [4] FAN Y, MA Z, ZHAO L, et al. Anti-tumor activities and mechanisms of Traditional Chinese Medicines formulas; a review [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 132: 110820.
- [5] 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.
- [6] 丁玲, 刘丽芳, 吴世婷, 等. 中医学对乳腺癌的认识及研究进展 [J]. *湖南中医杂志*, 2015, 31 (8): 186-188.
- [7] 李琳霏, 潘博, 杜小艳, 等. 潘敏求教授从“瘀、毒、虚”论治乳腺癌经验 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2016, 36 (4): 38-41.
- [8] LIBSON S, LIPPMAN M. A review of clinical aspects of breast cancer [J]. *Int Rev Psychiatry*, 2014, 26 (1): 4-15.
- [9] SALAS Y, MÁRQUEZ A, DIAZ D, et al. Epidemiological study of mammary tumors in female dogs diagnosed during the period 2002-2012: a growing animal health problem [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (5): e0127381.
- [10] EGENVALL A, BONNETT B N, OHAGEN P, et al. Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80 000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002 [J]. *Prev Vet Med*, 2005, 69 (1/2): 109-127.
- [11] TRAYES K P, COKENAKES S E H. Breast cancer treatment [J]. *Am Fam Physician*, 2021, 104 (2): 171-178.
- [12] YORULMAZ A, DOGAN M, ARTUZ F, et al. Comparison of pigmentary side effects of taxanes and anthracyclines; an onychoscopic evaluation [J]. *Cutan Ocul Toxicol*, 2017, 36 (2): 135-139.
- [13] CLEMENTE M, DE ANDRES P J, PENA L, et al. Survival time of dogs with inflammatory mammary cancer treated with palliative therapy alone or palliative therapy plus chemotherapy [J]. *Vet Rec*, 2009, 165 (3): 78-81.
- [14] SIMON D, SCHOENROCK D, BAUMGARTNER W, et al. Post-operative adjuvant treatment of invasive malignant mammary gland tumors in dogs with doxorubicin and docetaxel [J]. *J Vet Intern Med*, 2006, 20 (5): 1184-1190.
- [15] 叶懿祥, 陈冬梅, 贾立群, 等. 黄芪抗肿瘤药理作用机制与临床应用研究进展 [J]. *世界中医药*, 2023, 18 (11): 1615-1620.
- [16] 司娜娜. 基于数据挖掘和网络药理学探讨乳腺癌术后上肢淋巴水肿的用药规律和机制预测 [D]. 银川: 宁夏医科大学, 2022.
- [17] 单保恩, 张金艳, 杜肖娜, 等. 白花蛇舌草的免疫学调节活性和抗肿瘤活性 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2001 (5): 370-374.
- [18] 杨新建, 段素云, 宋琳琳. 金银花中总黄酮的提取及其抗氧化活性的研究 [J]. *安徽农业科学*, 2012, 40 (12): 7047-7049.
- [19] 张淑君, 李明, 王震寰, 等. 轮叶党参的化学成分及药理作用研究进展概述 [J]. *中国药师*, 2016, 19 (2): 347-350.
- [20] 罗梅秀, 马良, 林文俊, 等. 三叶青乙酸乙酯提取物对肝癌细胞 HepG2 凋亡的影响及机制 [J]. *武汉大学学报 (医学版)*, 2019, 40 (1): 37-41.
- [21] 齐绪林, 中药蒲公英抗肿瘤作用研究进展 [J]. *中国肿瘤*, 2015, 24 (1): 53-56.
- [22] 黄晓曦, 许东坡, 王力群, 等. MMP-2/MMP-9 在乳腺癌组织中的表达及其与肿瘤浸润转移的关系 [J]. *中国临床康复*, 2004, 8 (11): 2190-2192.
- [23] YANG Z, ZHUANG L, SZATMARY P, et al. Upregulation of heat shock proteins (HSPA12A, HSP90B1, HSPA4, HSPA5 and HSPA6) intumour tissues is associated with poor outcomes from HBV-related early-stage hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Med Sci*, 2015; 12 (3): 256-263.
- [24] FAHIM H H, MOHAMED G, SAFWAT G, et al. HSP70 as a diagnostic and prognostic marker inegyptian women with breast cancer [J]. *Clin Breast Cancer*, 2021, 21 (3): e177-e188.
- [25] PEZONE A, OLIVIERI F, NAPOLI M V, et al. Inflammation and DNA damage: cause, effect or both [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2023, 19: 200-211.
- [26] BUTCHER M J, ZHU J. Recent advances in understanding the Th1/Th2 effector choice [J]. *Fac Rev*, 2021, 10: 30.
- [27] RUBIN S J S, BLOOM M S, ROBINSON W H. B cell checkpoints in autoimmune rheumatic diseases [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2019, 15 (5): 303-315.
- [28] 段红洁. Th1/Th2 型细胞因子对乳腺癌细胞系 MCF-7 的生物学行为及 ER 表达的影响 [D]. 天津: 天津医科大学, 2015.