

文章编号 1006-8147(2017)01-0005-05

论著

膝关节机械加载改善小鼠乳腺癌肺转移的实验研究

赵灿,刘大全,王俊艳,张平

(天津医科大学人体解剖与组织胚胎学系,天津 300070)

摘要 目的:探讨脉冲式机械加载对小鼠乳腺癌肺转移的抑制作用。方法:30只4~6周龄BALB/c雌性小鼠随机分为模型组与治疗组,通过每只尾静脉注射鼠源性乳腺癌细胞(4T1),建立小鼠乳腺癌肺转移模型。治疗组小鼠每天接受膝关节机械加载治疗,治疗18d后处死。取肺脏,解剖显微镜下计数肺部转移瘤数目,TUNEL法分析肿瘤细胞凋亡情况,墨汁灌注肺脏切片观察转移灶周围血管生成情况,免疫组化分析细胞增殖和血管生成情况。结果:与模型组相比,治疗组肺部转移瘤数目明显减少($P<0.05$),TUNEL阳性细胞明显增多($P<0.01$),转移灶周围血管面积明显降低($P<0.05$)。结论:机械加载能够有效地抑制小鼠乳腺癌肺转移,该抑制作用可能与机械加载能够促进肿瘤细胞凋亡和抑制肿瘤血管生成有关。

关键词 乳腺癌;肺转移;细胞凋亡;血管生成;机械加载;小鼠

中图分类号 R737.9

文献标志码 A

Experimental study on knee loading to improves pulmonary metastasis of breast cancer in mice

ZHAO Can, LIU Da-quan, WANG Jun-yan, ZHANG Ping

(Department of Anatomy and Histology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To investigate whether knee loading can inhibit pulmonary metastasis of breast cancer in mouse model. **Methods:** Thirty BALB/c female mice were randomly divided into model group and treated group. Mice were conducted tail vein injection of 5×10^4 murine breast cancer cells to establish the small breast cancer pulmonary metastasis model. Knee loading was applied per day for 18 days. After the mice were sacrificed, lungs were taken and observed under a dissecting microscope. The number of pulmonary metastasis was counted, and TUNEL staining was used to analyze the apoptosis of tumor cell. Furthermore, ink perfusion was conducted to observe angiogenesis on pulmonary metastase. Immunohistochemical analysis was performed to observe proliferation and angiogenesis of tumor. **Results:** Compared with the model group, the number of pulmonary metastases was significantly reduced ($P<0.05$) in the treated group, and TUNEL-positive cells was significantly increased ($P<0.01$). Furthermore, compared with the model group, the treated mice showed a lower vascular area around lung tumor ($P<0.05$). **Conclusion:** Knee loading can effectively suppress pulmonary metastasis of breast cancer in mice model, and the loading effect may be associated with promotion of tumor cell apoptosis and inhibition of angiogenesis.

Key words breast cancer; pulmonary metastasis; apoptosis; angiogenesis; knee loading; mouse

乳腺癌是全球范围内女性中最常见的恶性肿瘤之一^[1]。乳腺癌肿瘤转移是造成病人死亡最常见的原因,且以肺转移多见^[2]。乳腺癌转移是一个极其复杂的过程,需要多种因素协同作用,其中肿瘤细胞增殖和血管生成是乳腺癌发生转移的两大关键性因素^[3]。目前临床数据表明,实体瘤占恶性肿瘤90%以上,而传统的治疗方式并不能取得令人满意的疗效^[4]。有研究表明,适度运动能增强免疫系统功能,降低癌症易发敏感性^[5]。机械加载能够在一定程度上模仿人体主动的物理运动,在前期实验中,机械加载已经被证实能够抑制机体的炎症反应,同时

还能够调节血管生成和骨的代谢等生理和病理过程^[6-8]。但有关机械加载调节肿瘤细胞凋亡和肿瘤血管生成等方面的作用目前未见报道。本研究通过建立小鼠乳腺癌肺转移模型,观察机械加载对乳腺癌肺转移及肿瘤血管生成的调节作用。

1 材料和方法

1.1 细胞系 BALB/c小鼠源性乳腺癌细胞(4T1),购自中国科学院细胞库。

1.2 实验动物 BALB/c雌性小鼠由中国人民解放军军事医学科学院动物中心提供,4~6周龄。实验动物的饲养与管理过程均严格遵守天津医科大学实验动物管理规定,本研究经天津医科大学伦理委员会批准。

1.3 主要仪器与试剂 RPMI 1640培养基和胰蛋白酶购自美国Hyclone公司。胎牛血清购自美国Gibco公司。TUNEL反应液购自瑞士Roche公司(货

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81572100),天津市应用基础与前沿技术研究计划(重点项目)基金资助(14JCZDJC36500)

作者简介 赵灿(1990-),女,硕士在读,研究方向:乳腺癌转移;通信作者:张平, E-mail: pizhang2008@163.com; 王俊艳, E-mail: junyan73@hotmail.com。

号 12156792910), Ki67 抗体购自美国 Abcam 公司 (货号 ab15580), CD31 抗体购自北京中杉金桥生物有限公司, 其它化学品购自美国 Sigma 公司。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养 按常规贴壁细胞的培养方法, 4T1 细胞常规培养于含 10% 灭活胎牛血清, 1% 双抗和 1% NEAA 的 1640 培养液中。置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养, 2~3 d 传代 1 次, 取对数生长期细胞进行实验。

1.4.2 分组及处理 小鼠饲养 1 周后, 随机分为模型组 ($n=15$) 和治疗组 ($n=15$)。取体外培养对数生长期的鼠源性乳腺癌细胞 4T1, 用培养基调整细胞浓度为 $5 \times 10^6/\text{mL}$, 无菌条件下尾静脉注射 75 μL 细胞悬液。接种后第 2 天, 治疗组进行膝关节机械加载治疗。模型组动物实施相同的麻醉过程, 但是不进行机械加载。连续治疗 18 d 后, 动物经 10% 水合氯醛麻醉, 每组中取 10 只动物进行左心室灌注多聚甲醛固定后取肺脏进行 HE 染色、免疫组化染色和 TUNEL 实验, 取 5 只左心室墨汁灌注后取肺脏观察转移瘤结节数及血管生成情况。

1.4.3 机械加载治疗 在此研究中, 使用 2% 异氟烷 1.0~1.5 L/min 的流速诱导麻醉后再进行机械加载。机械加载定位于膝关节, 加载力由外侧向内侧的方向施加到小鼠膝关节, 加载频率为 5 Hz, 力度为 2 N, 时间为 5 min (图 1, 标尺=10 mm)。

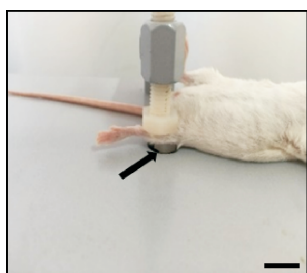


图 1 小鼠膝关节机械加载治疗图示

Fig 1 Schematic diagram illustrates knee loading treatment for mouse

1.4.4 左心室墨汁灌注 取 10 g 明胶置于 100 mL 的水中在 70 °C 溶解后, 再加入 100 mL 墨汁混合均匀。小鼠灌注前用 10% 水合氯醛麻醉, 开胸, 剪右心耳, 左室进针注入肝素生理盐水 20 mL, 随后注入墨汁灌注液 20 mL, 肺脏取材后放福尔马林溶液固定。

1.4.5 肺转移瘤测定及肿瘤血管观测 小鼠用墨汁灌注后, 在固定液中固定 24 h, 解剖显微镜下计数肺转移结节数目并记录, 石蜡包埋切片厚度为 20 μm , 光学显微镜下观察肿瘤血管生成情况, 肿瘤周围被墨汁充盈染成黑色的区域标记为血管。

1.4.6 左心室灌注多聚甲醛内固定 小鼠灌注前

用 10% 水合氯醛麻醉, 开胸, 剪右心耳, 左室进针注入肝素生理盐水 20 mL, 随后注入多聚甲醛灌注液 20 mL, 取材后放福尔马林溶液固定 48~72 h, 石蜡包埋切片。

1.4.7 肺脏 HE 染色 二甲苯脱蜡 10 min \times 2; 梯度酒精水化; 苏木精染色 20 min; 1% 盐酸分色数秒; 自来水蓝化 5 min; 伊红染色 15 min; 梯度酒精水化; 二甲苯透明 5 min \times 2; 中性树胶封片。

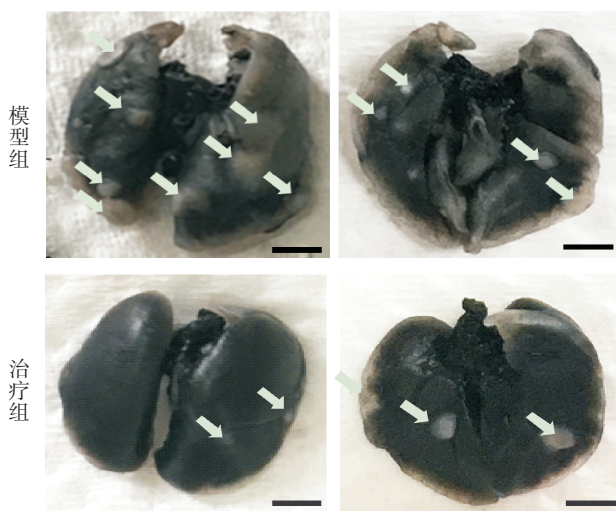
1.4.8 TUNEL 法检测肺转移瘤细胞凋亡 石蜡切片脱蜡, 梯度酒精水化, PBS 冲洗 3 \times 3 min/次, 滴加 20 μL TUNEL 反应液, PBS 冲洗 3 \times 5 min/次; 滴加 20 μL DAPI 液, 荧光显微镜下拍照, 显微镜下每张切片随机选取 5 个视野计数发红色荧光的凋亡细胞数量。

1.4.9 肺转移瘤组织 ki67 和 CD31 免疫组织化学检测 石蜡切片经 37 °C 烘片过夜; 梯度酒精水化; PBS 冲洗; 微波修复抗原 3 min \times 2 次; 试剂 A 孵育 15 min; 滴加一抗过夜; 试剂 B 孵育 15 min; 试剂 C 孵育 15 min; DAB 显色, 苏木素复染, 梯度酒精水化, 树胶封片, 显微镜下每张切片随机选取 5 个视野, 细胞核染为棕黄色为阳性。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 统计软件进行分析, 组间比较运用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 机械加载对乳腺癌肺转移结节个数的影响 实验期间, 对照组和治疗组小鼠接种 4T1 乳腺癌细胞后 18 d 内均无死亡。解剖显微镜观察可见, 模型组和治疗组肺部均有转移瘤, 转移率为 100%, 与模型组相比, 治疗组肺脏的结节个数明显减少 (12.75 ± 1.49 vs 6.75 ± 1.11 , $P < 0.05$), 见图 2。

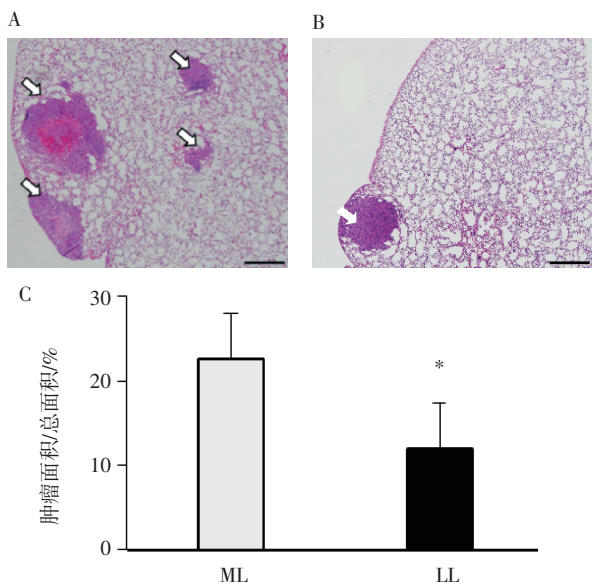


箭头表示肿瘤转移灶

图 2 小鼠乳腺癌肺转移灶

Fig 2 Pulmonary metastases of breast cancer in mice

2.2 机械加载对乳腺癌肺转移灶面积的影响 单个视野内,模型组中每个肺组织的肿瘤面积平均为(21.24 ± 7.53)%,而治疗组中肺组织的肿瘤面积为(11.20 ± 4.05)%,治疗组的阳性对照较模型组有显著下降($P < 0.05$),见图3。

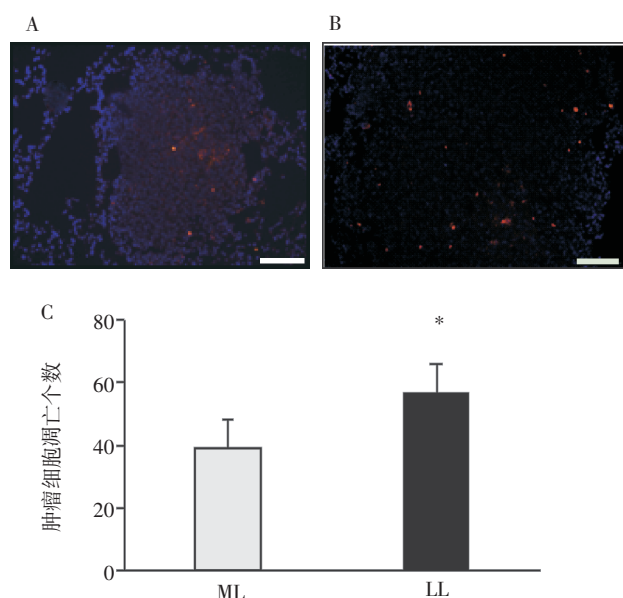


A. 模型组;B. 治疗组(箭头所指示处为肺内转移灶);C. 两组肿瘤面积比较, $*P < 0.05$ 。ML: 模型组;LL: 治疗组

图3 小鼠乳腺癌肺转移灶病理观察($\times 40$)

Fig 3 Pathological observation on pulmonary metastases of breast cancer in mice($\times 40$)

2.3 机械加载对肿瘤细胞凋亡率的影响 TUNEL结果显示,治疗组肺转移瘤凋亡细胞数显著高于模型组($P < 0.01$),见图4。

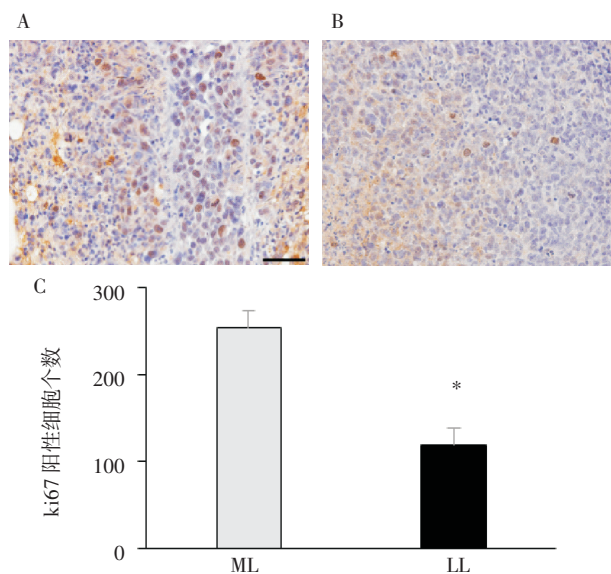


A. 模型组;B. 治疗组;C. 两组肿瘤细胞凋亡个数比较, $*P < 0.05$ 。ML: 模型组;LL: 治疗组

图4 肿瘤细胞凋亡的比较($\times 200$)

Fig 4 Comparison of the tumor cell apoptosis($\times 200$)

2.4 机械加载对肿瘤细胞增殖的影响 肺部转移瘤切片 Ki-67 免疫组化染色结果显示,与模型组相比,治疗组单个视野内 Ki-67 阳性细胞数明显降低($P < 0.05$),见图5。

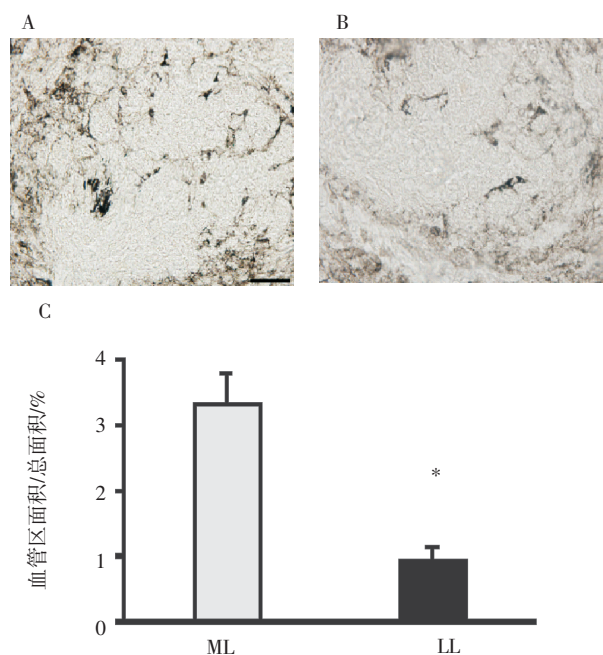


A. 模型组;B. 治疗组;C. 两组 ki67 阳性细胞表达比较, $*P < 0.05$ 。ML: 模型组;LL: 治疗组

图5 肿瘤细胞增殖个数的比较($\times 200$)

Fig 5 Comparison of tumor cell proliferations($\times 200$)

2.5 机械加载对乳腺癌肺转移中血管生成的影响 墨汁灌注结果显示,单个视野内,治疗组肺转移瘤周围血管面积占总面积的比例[(0.94 ± 0.31)%]
明显低于模型组[(3.33 ± 0.80)%]($P < 0.05$),见图6。

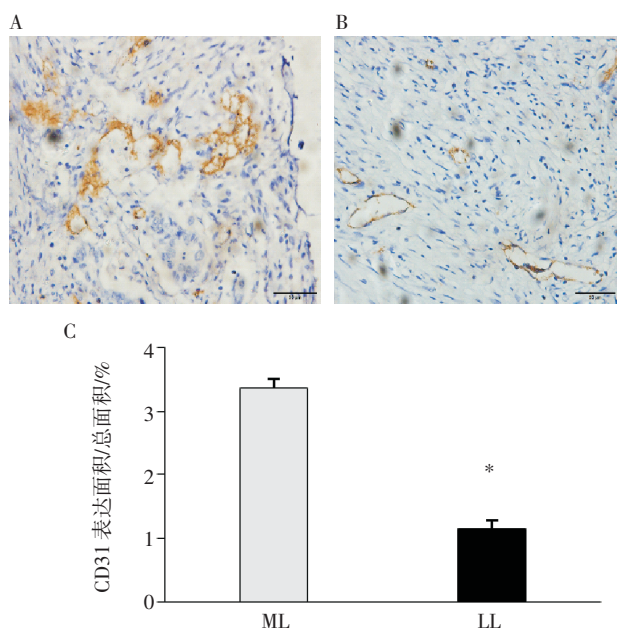


A. 模型组;B. 治疗组;C. 两组血管生成面积比较, $*P < 0.05$ 。ML: 模型组;LL: 治疗组

图6 血管生成的比较($\times 400$)

Fig 6 Comparison of angiogenesis($\times 400$)

2.6 机械加载对乳腺癌转移灶中 CD31 表达的影响 免疫组化 CD31 染色结果显示, 单个视野内, 治疗组肺转移瘤组织内部 CD31 阳性细胞总面积占视野总面积的比例 $[(1.16 \pm 0.24)\%]$ 明显低于模型组 $[(3.36 \pm 0.73)\%]$ $(P < 0.05)$, 见图 7。



A. 模型组; B. 治疗组; C. 两组 CD31 阳性细胞表达比较, $*P < 0.05$ 。
ML: 模型组; LL: 治疗组

图 7 CD31 阳性细胞表达的比较($\times 400$)

Fig 7 Comparison of CD31 positive expressions($\times 400$)

3 讨论

乳腺癌发病率在我国居高不下, 占我国女性恶性肿瘤首位^[11]。其中肺脏是乳腺癌转移较常见的靶器官。三阴性乳腺癌是一种雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)和人表皮生长因素受体(HER2)均为阴性的乳腺癌^[12]。据文献报道三阴性乳腺癌的预后最差, 局部复发和内脏转移率极高, 患此型乳腺癌的病人无法从内分泌治疗和抗 HER2 靶向治疗中获益。传统的治疗方法以手术治疗为主, 辅以放疗、化疗及生物免疫治疗等, 但是未能取得满意的疗效, 患者的生存率和生活质量没有得到显著改善。

本实验采用 BALB/c 小鼠尾静脉注射乳腺癌细胞模拟人三阴性乳腺癌转移模型, 从运动康复的角度观测机械加载对乳腺癌肺转移的影响。本研究结果初步显示, 同模型组相比, 治疗组在机械加载治疗后, 肺结节计数, HE, 免疫组化染色及 TUNEL 实验中均表现出对肿瘤细胞及血管生成的抑制作用。

肿瘤血管生成和肿瘤细胞增殖相互依赖、互相促进, 是肿瘤发生发展的两大关键性因素。肿瘤细胞的增殖和凋亡与肿瘤的产生及转移紧密相关, 增殖与凋亡之间的比率在调控肿瘤转移方面起着重

要的作用^[14]。Ki-67 与细胞增殖活性息息相关, 是检测肿瘤细胞增殖活性最常见的指标之一^[15]。本研究观察到机械加载能降低小鼠肺组织转移瘤 Ki-67 的表达, 抑制三阴性乳腺癌肺转移瘤的增殖。血管生成不仅为肿瘤生长转移提供有利条件, 同时也反映了肿瘤的浸润和转移能力, 是肿瘤生长、转移和复发的基础。CD31 即血小板内皮细胞黏附分子, 在血管和淋巴管内皮细胞均有表达, 是内皮细胞标记物, 它参与血管生成, 并与肿瘤转移有关^[16]。研究表明, 检测肿瘤组织中的淋巴管、微血管生成情况, 可作为判断肿瘤转移及预后的一个指标^[17]。笔者发现, 治疗组肺转移瘤内 CD31 微血管面积明显低于模型组, 说明本研究中机械加载抑制了转移瘤中的血管生成。

运动免疫学认为运动能够调控人体神经内分泌功能, 增强机体免疫能力, 降低癌症的易发敏感性, 进而起到抑制癌细胞生成的作用。运动在乳腺癌的康复治疗过程中作为一种治疗手段起着重要的作用^[5]。机械加载作为一种代替人体主动物理运动的新型运动康复治疗仪器, 以一定频率对小鼠滑膜关节如肘、膝和踝等关节进行的机械刺激以产生治疗作用。前期实验笔者使用 C57BL/6 雌性小鼠证实机械加载可以调节血管生成, 并通过 Wnt、PI3K、TGF- β 等相关信号通路, 能够加速手术伤口的愈合和骨形成, 治疗相关疾病^[6-10]。Wnt、PI3K 等相关信号传导通路是人类癌症中常见的通路, 通过下游多种效应分子的活化状态, 在细胞内发挥着抑制凋亡, 促进增殖的关键作用, 其有关靶基因, 与胚胎发育及细胞生长、分化和凋亡等密切相关, 这几条通路的激活或者抑制对肿瘤细胞凋亡和血管生成的发生发展都有重要作用^[13]。

临床中治疗乳腺癌的药物不仅价格昂贵, 众多癌症患者还不能负担, 而且患者身心遭受很大痛苦, 不能耐受。因此, 寻找一种机制明了、效果明确、价格低廉的治疗手段是目前这一领域所面临的重要任务。本实验结果显示, 机械加载对乳腺癌肺转移具有一定的抑制作用。该抑制作用可能与机械加载能够促进肿瘤细胞凋亡和抑制肿瘤血管生成有关。虽然机械加载抑制乳腺癌肺转移的具体分子机制还需要进一步实验进行研究, 但其疗效已经初步显现。因此, 机械加载为临床能够治疗乳腺癌肺转移提供了一个新的方向。

参考文献:

- [1] Hinestrosa C. Shaping the future of biomarker research in breast cancer to ensure clinical relevance[J]. Breast Cancer Res Treat, 2006, 100(1): S100

- [2] 邵志敏.乳腺癌肺转移:机制研究和临床转化[J/CD].中华乳腺病杂志:电子版,2011,5(4):392
- [3] Chaffer C L, Weinberg R A. A perspective on cancer cell metastasis [J]. Science, 2011, 331(624): 1559
- [4] Buolamwini J K. Novel anticancer drug discovery[J]. Curr Opin Chem Biol, 1999, 3: 500
- [5] 罗贝贝,陈佩杰.运动免疫学研究的现状与展望[J].生理科学进展,2014,45(4):271
- [6] Zhang P, Yokota H. Knee loading stimulates healing of mouse bone wounds in a femur neck[J]. Bone, 2011, 49(4): 867
- [7] Zhang P, Tanaka S M, Jiang H, et al. Diaphyseal bone formation in murine tibiae in response to knee loading [J]. J Appl Physiol, 2006, 100(5): 1452
- [8] Liu D Q, Li X L, Li J, et al. Knee loading protects against osteonecrosis of the femoral head by enhancing vessel remodeling and bone healing[J]. Bone, 2015, 81(4): 620
- [9] Zhang P, Turner C H, Yokota H. Joint loading -driven bone formation and signaling pathways predicted from genome -wide expression profiles[J]. Bone, 2009, 44(5): 989
- [10] Zhang P, Sun Q W, Turner C H, et al. Knee loading accelerates bone healing in mice[J]. J Bone Mineral Res, 2007, 22(12): 1979
- [11] Fan L, Strasser-Weippl K, Li J J, et al. Breast cancer in China[J]. Lancet Oncol, 2014, 15(7): e279
- [12] Jiang P D, Zhao Y L, Deng X Q, et al. Antitumor and antimetastatic activities of chloroquine diphosphate in a murine model of breast cancer[J]. Bio Pharm, 2010, 64(9): 609
- [13] Pan K F, Liu W G. Mutations in components of the Wnt signaling pathway in gastric cancer[J]. World Gastroenterol, 2008, 14(10): 1570
- [14] Fernandes I, Faria A, Azevedo J, et al. Influence of anthocyanins, derivative pigments and other catechol and pyrogallol -type phenolics on breast cancer cell proliferation[J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(6): 3785
- [15] 冯仙明,庞燕,梁锦辉.宫颈病变组织中P53、Ki-67、CD34的表达及临床意义[J].肿瘤药,2015,10(6):449
- [16] Jacquemier J, Valtola R. Prognosis of breast carcinoma lymph angiogenesis evaluated by immunohistochemical investigation of vascular-endothelial-growth-factor receptor 3[J]. Int J Cancer, 2000, 89(1): 69
- [17] Gulubova M, Vlaykova T. Prognostic significance of mast cell number and microvascular density for the survival of patients with primary colorectal cancer[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2009, 24(7): 1265

(2016-06-27 收稿)

文章编号 1006-8147(2017)01-0009-02

个例报道

难治性原发性胆汁性胆管炎-自身免疫性肝炎重叠综合征 1 例

刘天宇,曹海龙,王邦茂

(天津医科大学总医院消化科,天津 300052)

关键词 原发性胆汁性胆管炎;自身免疫性肝炎;重叠综合征;茵栀黄

中图分类号 R575

文献标志码 B

原发性胆汁性胆管炎(primary biliary cholangitis, PBC)-自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)重叠综合征是指患者在同一时间段或病程中具备PBC和AIH的特征,发病机制尚未明确,尚无具体的治疗标准。现将天津医科大学总医院消化内科收治的1例难治性PBC-AIH患者报道如下。

1 病例

患者,女,65岁,1年前无明显诱因出现皮肤巩膜黄染,伴瘙痒,无腹痛、腹胀、发热及皮疹等,在我院行肝穿刺活组织检查示:肝细胞多灶性水变性

胞浆淤胆,点状及小灶性肝细胞坏死,界板炎及汇管区炎,可见毛细胆栓(图1),经过评分诊断为原发性胆汁性胆管炎-自身免疫性肝炎重叠综合征。先后入院3次,给予熊去氧胆酸(250 mg,每日3次)联合激素(1 mg/kg)治疗,疗效欠佳,此次因巩膜黄染加重于2015年7月第4次入院。查体:全身皮肤黄染,巩膜黄染,肝肋下2指。血常规检查:WBC: $8.64 \times 10^9/L$, Hb: 124 g/L, PLT: $125 \times 10^9/L$; 肝功能: ALT: 54 U/L, AST: 46 U/L, ALKP: 350 U/L, GGT: 392 U/L, TBIL: 129.5 $\mu\text{mol/L}$; DBTL: 111.5 $\mu\text{mol/L}$ 。免疫检查: IgG: 18 800.0 mg/L (7 510~1 5600 mg/L); IgM: 2 500 mg/L (460~3 040 mg/L, 首次住院: 3 270 mg/L)。自身抗体检测: 抗核抗体(ANA): 阳性 1:100, 胞浆颗粒型; M2型抗线粒体抗体(AMA-M2): 阴性(既

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81570478)

作者简介 刘天宇(1990-),男,硕士在读,研究方向:肠道疾病的防治;通信作者:王邦茂, E-mail: gi.tmu@yeah.net。