

· 基础研究 ·

乳癌术后方对 HER2/neu 转基因小鼠乳腺癌发生中免疫应答的影响

吴雪卿¹ 万 华¹ 李欣荣² 冯佳梅¹ 姜晓燕¹ 瞿文超¹ 高晴倩¹

摘要 目的 探讨癌基因人类表皮生长因子受体 2 (HER2/neu) 在乳腺癌发生中引发的免疫应答和乳癌术后方在防治乳腺癌中的免疫学机制。**方法** 选用 HER2/neu 转基因自发乳腺癌小鼠模型, 自 5 周龄起灌饲中药乳癌术后方, 观察小鼠的乳腺癌发生情况, 并在 15 及 25 周龄时检测小鼠肿瘤发生过程中 T 细胞免疫反应及相关细胞因子的变化。**结果** 乳癌术后方能够明显延缓和减少转基因小鼠原发乳腺癌的生成, 同时还能上调荷瘤小鼠脾淋巴细胞中 T 细胞含量, 促进荷瘤小鼠 T 淋巴细胞增殖作用, 并可诱导白细胞介素-2 (IL-2)、白细胞介素-12 (IL-12) 和干扰素- γ (IFN- γ) 等细胞因子的分泌。**结论** HER2/neu 转基因小鼠与正常同品系未转基因小鼠的免疫功能存在着明显的差别。乳癌术后方预防和延缓乳腺癌发生的作用可能是通过提高转基因小鼠的自身抗肿瘤免疫反应来实现的。

关键词 乳癌术后方; 乳腺癌; HER2/neu 癌基因

Effect of Ru'ai Shuhou Recipe on Immune Response in HER2/neu Transgenic Mice Undergoing Breast Cancer Carcinogenesis Process WU Xue-qing, WAN Hua, LI Xin-rong, et al Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (200021)

ABSTRACT Objective To explore the immune response induced by HER2/neu oncogene in the breast cancer (BC) carcinogenesis process and the immunological mechanism of Ru'ai Shuhou Recipe (RSR) in the prevention and treatment of BC. **Methods** HER2/neu transgenic spontaneous breast tumor model mice were fed with RSR from 5 weeks old, the occurrence of breast tumor in them was observed, and the changes of T cell-mediated immune response and associated cytokines were detected during the carcinogenesis process, i. e. when mice aged between 15 and 25 weeks. **Results** RSR showed significant effects in postponing and reducing the carcinogenesis of primary breast tumor, up-regulating the amount of T cell in splenic lymphocyte in tumor-bearing mice, promoting the proliferation of T lymphocyte, and inducing the secretion of cytokines such as interleukin-2, interleukin-12 and interferon- γ . **Conclusions** A serial immune response reveals in the carcinogenesis process. The immunologic function of HER-2/neu transgenic mice is significantly different to that of the same strain non-transgenic mice. Effect of RSR in preventing and postponing breast cancer carcinogenesis is possibly realized through enhancing the anti-tumor immune response of transgenic mice themselves.

KEYWORDS Ru'ai Shuhou Recipe; breast cancer; HER2/neu oncogene

随着近年来免疫学研究水平的飞速提高, 证实了恶性肿瘤的发生与免疫系统的发育或功能状态密切相关。目前癌基因人类表皮生长因子受体 2 (HER2/

neu) 的表达情况已作为乳腺癌独立预后指标和选择治疗的重要标准^[1]。乳癌术后方是上海市名中医陆德铭教授的经验方, 主要用于乳腺癌的治疗, 临床上收到良好疗效。本研究采用 HER2/neu 转基因自发乳腺癌小鼠 FVB/neu 为动物模型。通过观察乳癌术后方对 HER2/neu 转基因小鼠乳腺癌发生情况和 T 细胞亚群以及相关细胞因子的变化, 探讨乳腺癌在发生过程中免疫学变化和乳癌术后方防治乳腺癌的免疫学机制。

基金项目: 上海市科委青年科技启明星计划资助项目 (No. 04QMX1436)

作者单位: 1. 上海中医药大学附属曙光医院中医乳腺外科 (上海 200232); 2. 上海市复旦大学附属妇产科医院

通讯作者: 吴雪卿, Tel: 021 - 53821650 转 342, E-mail: snow_zi@hotmail.com

材料与方法

1 材料

1.1 实验动物 HER2/neu 转基因自发乳腺癌小鼠 FVB/neu, 为本实验室从上海斯莱克实验动物有限公司引进, 自行繁殖, 将 5 周龄、雌性、体重 20 g 左右小鼠, 随机分组用于实验研究。FVB 品系正常小鼠, 5 周龄, 雌性, 体重 20 g 左右, 上海斯莱克实验动物有限公司提供, 同时饲养, 作为正常对照。

1.2 实验药物 中药复方乳腺癌术后方由生黄芪、白术、仙灵脾、莪术等药组成。中药饮片均由上海虹桥饮片厂提供, 产地固定, 批号明确。药物采用常规煎煮方法, 冷水浸泡 1 h 后武火煮沸, 文火再煎煮 30 min, 取药汁, 减压浓缩后备用。生药浓度为 2 g/mL。

1.3 主要试剂 FACS 荧光染色试剂均为 PharMingen 公司 (San Jose, CA) 产品。[甲基 3H]-胸腺嘧啶脱氧核苷 (thymidine, [methyl-3H]) 购自上海原子能研究所。细胞因子酶联免疫吸附检测试剂, 纯化的兔抗鼠白细胞介素-2 (IL-2)、白细胞介素-12 (IL-12)p60、干扰素- γ (IFN- γ) 一抗 (purified rat anti-mouse IL-2、IL-12p60、IFN- γ); 生物素化的兔抗鼠 IL-2、IL-12p60、IFN- γ 二抗 (biotinylated rat anti-mouse IL-2、IL-12p60、IFN- γ); 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP), 以上抗体均为 Pharmin Gen 公司 (San Jose, CA) 产品。刀豆蛋白 A (concanavalin A, ConA) 为 Sigma 公司产品。

1.4 主要仪器 流式细胞仪 FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose CA)。Beta 记数仪 (1450 MicroBeta Trilux, PerkinElmer Life Sciences, USA)。酶标测试仪 (Bio-rad Model 550 microplate reader, USA)。

2 方法

2.1 动物分组及给药方法 5 周龄 FVB/neu 转基因自发乳腺癌小鼠随机分为 2 组, 模型组 31 只, 每天生理盐水 0.2 mL 灌胃; 中药组 30 只, 乳腺癌术后每天 0.2 mL (2 g/mL) 灌胃。每组再随机分为 3 小组, 每组 10 只, 分别在 15 周龄和 25 周龄时各取 1 小组检测各项免疫功能指标; 发瘤率观察至 35 周。同时常规饲养 FVB 同品系正常小鼠 10 只, 作对照观察。

2.2 实验观察及检测指标

2.2.1 小鼠肿瘤的发生情况 每周 2 次检测肿瘤的发生情况, 记录小鼠肿瘤发生时间及发展状况。

2.2.2 淋巴细胞表型分析 摘取小鼠脾脏称重后, 制备小鼠脾脏淋巴细胞, 流式细胞术检测小鼠脾脏淋巴细胞的表面分型, 数据则用 Cell Quest TM software

(Becton Dickinson, San Jose CA) 处理分析。

2.2.3 T 淋巴细胞增殖功能检测 采用 3H-TdR 掺入法。

2.2.4 细胞因子检测 各组小鼠脾脏淋巴细胞浓度为 5×10^6 /mL, 于 24 孔培养板中每孔加入 1 mL 细胞悬液, 0.5 mL Sac 溶液 (终浓度 1:10 000) 或 ConA 溶液 (终浓度 5 μ g/mL) 和 0.5 mL RPMI-1640 溶液。每组均设一孔不加刺激剂作为阴性对照, 总体积 2 mL。细胞于含 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养 48 h 后, 离心收取上清液, 按照细胞因子检测试剂盒操作说明分别测定 IL-2、IL-12 和 IFN- γ 的含量。在酶标测试仪上测定 450 nm 和 570 nm 处吸光度值。根据标准曲线计算出培养上清液中细胞因子含量。

3 统计学方法 统计软件用 SPSS 11.5, 两组间差异用 Student's *t*-test 检验, 各组间两两比较采用单因素方差分析和 LSD 法, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

1 乳腺癌术后对 HER2/neu 转基因小鼠肿瘤发生的影响 (表 1) 模型组 HER2/neu 转基因小鼠在 15 周龄时开始发生乳腺癌, 35 周龄时发瘤率为 81.8% (9/11)。中药组在 24 周龄时发生乳腺癌, 35 周龄时发瘤率为 20% (2/11)。可见乳腺癌术后方能推迟 HER2/neu 转基因小鼠自发乳腺癌的发生时间, 降低乳腺癌的发生率, 与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 1 HER2/neu 转基因小鼠的发瘤率 [只 (%)]

组别	n	发瘤率					
		9	15	18	24	25	35 (w)
模型	11	0	1 (9.0)	2 (18.2)	6 (54.5)	6 (54.5)	9 (81.8)
中药	10	0	0	0	1 (10.0)*	2 (20.0)*	2 (20.0)*

注: 与模型组同期比较, * $P < 0.01$

2 乳腺癌术后对 HER2/neu 转基因小鼠脾脏重量的影响 25 周龄时模型组脾脏重量 [(0.30 $\pm$ 0.18) g] 明显高于正常组 [(0.19 $\pm$ 0.15) g], 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。中药组脾脏重量 [(0.41 $\pm$ 0.23) g] 明显高于模型组 ($P < 0.05$)。

3 乳腺癌术后对 HER2/neu 转基因小鼠 T 淋巴细胞表型的影响 (表 2) 15 及 25 周龄时模型组 CD4/CD8 比值及 CD25 均低于正常组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 中药组此 2 项高于模型组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

4 乳腺癌术后对 HER2/neu 转基因小鼠脾脏淋巴细胞增殖能力影响 (图 1) 在 ConA 刺激 72 h 后可见, 各组 15 周龄小鼠脾淋巴细胞增殖均较明显, 模型组与正常组比较、中药组与模型组比较差异均有统计

表 2 HER2/neu 转基因小鼠 15 及 25 周龄时 T 淋巴细胞表型的变化 (x±s)

组别	n	时间	CD4(%)	CD8(%)	CD4/CD8	CD25(%)
正常	10	15 周龄	33.21±5.70	10.15±0.30	3.28±0.62	2.30±0.04
		25 周龄	25.10±3.53	13.22±4.23	2.07±0.73	1.95±1.82
模型	10	15 周龄	28.23±8.88	11.24±1.24	2.48±0.64*	1.84±0.58*
		25 周龄	16.26±2.09	8.84±2.65	1.93±0.39*	1.13±0.38*
中药	10	15 周龄	30.45±0.57	9.26±0.47	3.29±0.11△	1.78±0.29△
		25 周龄	17.24±3.79	7.92±3.45	2.39±0.64△	0.90±0.45△▲

注:与正常组同期比较,*P<0.05;与模型组同期比较,△P<0.05;与同组 15 周龄相比,▲P<0.05

学意义(P<0.05);25 周龄时模型组 T 淋巴细胞增殖较正常组有明显降低,而中药组仍保持着较好的促增殖作用,且增殖水平接近正常小鼠,与模型组比较差异有统计学意义(P<0.05)。

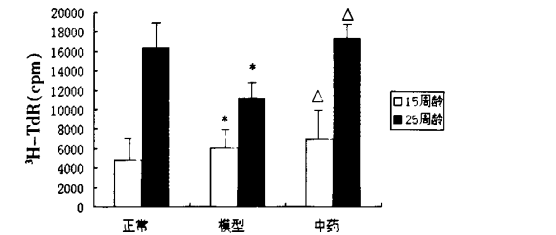


图 1 15 及 25 周龄各组小鼠脾淋巴细胞增殖能力比较

5 各组小鼠脾淋巴细胞在抗原刺激下产生细胞因子的比较(表 3) 各周龄模型组小鼠 IL-2 及 IFN-γ 明显低于正常组,差异有统计学意义(P<0.05);中药组各周龄小鼠 IL-2 及 IL-12 较模型组均有上调,差异有统计学意义(P<0.05)。25 周龄时,中药组 IFN-γ 明显提高,与模型组同期比较差异有统计学意义(P<0.05)。

表 3 各组小鼠 15 及 25 周龄脾淋巴细胞经 ConA 刺激后产生细胞因子的比较 (ng/L, x±s)

组别	n	时间	IL-2	IL-12	IFN-γ
正常	10	15 周龄	3 862±1 092	82±84	79 781±56 761
		25 周龄	2 543±774	28±4	65 364±77 150
模型	10	15 周龄	1 859±209*	114±125	52 982±16 635*
		25 周龄	1 023±974*	24±15	37 593±38 397*
中药	10	15 周龄	3 687±1 035△	180±199△	56 298±47 762
		25 周龄	2 273±964△	176±138△	72 779±24 455△

注:与正常组同期比较,*P<0.05;与模型组同期比较,△P<0.05

讨 论

现代研究表明,恶性肿瘤的发生、发展及预后与免疫系统的发育或功能状态密切相关。虽然机体具有严密的免疫监视机制,但在某些情况下恶变细胞也可能通过多种机制逃避机体的监视,从而导致肿瘤的发生^[2]。机体免疫力低下是肿瘤发生的原因之一,肿瘤发生又导致免疫力的降低。抗肿瘤免疫反应主要以 T

细胞免疫为主,外周血 T 淋巴细胞 CD4⁺/CD8⁺ 比值特异性地反映了 T 淋巴细胞功能^[3]。

HER2/neu 转基因小鼠可以模拟人体 HER2/neu 对乳腺组织的影响。在雌性转基因小鼠乳腺组织中可看到 HER2/neu 基因的过度表达。有文献报道^[4]此小鼠在组织学上最早 3 周就出现乳腺组织的过度增生,在约 20 周左右开始恶变发展成乳腺癌,在病理表现上也与 HER2/neu 阳性的人乳腺癌极为相似,是研究自发乳腺癌的良好模型。

本研究显示,在肿瘤发生过程中,HER2/neu 转基因小鼠与正常同品系未转基因小鼠的免疫功能存在着明显的差别。说明肿瘤发生过程中,机体存在着明显的抗肿瘤的免疫反应,或者是 HER2/neu 蛋白具有一定的抗原性,激发了机体的免疫反应。我们在临床研究中也发现乳腺癌患者同样存在着免疫功能异常现象^[5]。

乳腺癌后方是上海市名中医陆德铭教授的经验方,在乳腺癌的临床治疗上已取得了较好的疗效。以该方为基础治疗远处转移性乳腺癌可明显消除或缩小病灶,延长患者的生存期^[6,7],并可明显改善乳腺癌患者的生活质量^[8]。

本课题证实了乳腺癌后方能够明显延缓和减少转基因小鼠原发乳腺癌的发生,具有延缓乳腺癌发生和调节机体免疫功能的双重效应。乳腺癌后方能上调荷瘤小鼠脾淋巴细胞中 T 细胞含量,促进荷瘤小鼠 T 淋巴细胞增殖作用,提高小鼠脾 T 淋巴细胞 CD4/CD8 比值,抑制调节性 T 细胞产生(P<0.05),并可诱导 IL-2、IL-12 和 IFN-γ 等细胞因子的分泌,使转基因自发乳腺癌小鼠的免疫功能更接近于正常小鼠水平。由此可见,乳腺癌后方预防和延缓乳腺癌发生的作用可能是通过提高转基因小鼠的自身抗肿瘤免疫反应来实现的。

参 考 文 献

[1] Harbeck N, Jakesz R. Gallen 2007: breast cancer treatment consensus report[J]. Breast Care, 2007, (2):130-134.

[2] 龚非力. 医学免疫学[M]. 北京:科学出版社,2000:187-212.

Gong FL, editor. Medical immunology [M]. Beijing: Science Press, 2000:187-212.

[3] 徐从高,张茂宏,杨兴季,等. 癌-肿瘤学原理和实践[M]. 济南:山东科学技术出版社,2000:49-70.

Xu CG, Zhang MH, Yang XJ, et al. editors. Cancer-tumor theory and practice [M]. Jinan: Shandong Science and Technology Press, 2000:49-70.

(下转 756 页)

- [10] 方积乾, 孙振球. 卫生统计学(第 5 版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005, 92-95.
Fang JQ, Sun ZQ, editors. Medical statistic (5th ed) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005: 92-95.
- [11] Culebras X, Corpataux JB, Gaggero G, et al. The antiemetic effect of droperidol added to morphine patient-controlled analgesia: a randomized, controlled, multicenter dose-finding study [J]. *Anesth Analg*, 2003, 97(3): 816-821.
- [12] 王黎明, 罗华, 王懿娜, 等. 中西医结合治疗急性重症胰腺炎 28 例[J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(25): 2747-2749.
Wang LM, Luo H, Wang YN, et al. Integrated traditional Chinese and Western medicine in treatment of severe acute pancreatitis: an analysis of 28 cases [J]. *World Chin J Dig*, 2007, 15(25): 2747-2749.
- [13] Altman DG. Confidence intervals for the number needed to treat [J]. *Br Med J*, 1998, 317(7): 1309-1312.
- [14] 郭建文, 刘明洁. 活血化瘀中药及复方治疗急性脑出血的 Meta 分析 [J]. *中日友好医院学报*, 2001, 15(5): 283-286.
Guo JW, Liu MJ. Meta-analysis of acute intracerebral hemorrhage treated with traditional Chinese medicine or/and composition of promoting blood circulation and removing blood stasis [J]. *J China-Japan Friendship Hosp*, 2001, 15(5): 283-286.
- [15] 金孟梓, 谢作群, 陈先威, 等. 刺络拔罐治疗中老年带状疱疹疗效观察 [J]. *上海针灸杂志*, 2008, 27(3): 20-21.
Jin MZ, Xie ZQ, Chen XW, et al. Observations on the efficacy of blood-letting puncture and cupping in treating middle-aged and senile herpes zoster [J]. *Shanghai J Acupunct Moxibust*, 2008, 27(3): 20-21.
- [16] 刘玲, 李钟灵. 中西医结合治疗带状疱疹疗效观察 [J]. *中华实用中西医杂志*, 2003, 3(16): 2088-2089.
Liu L, Li ZL. Curative effect observation on treating herpes zoster by integrated traditional and Western medicine [J]. *Chin J Pract Chin Mod Med*, 2003, 3(16): 2088-2089.
- [17] 中华人民共和国卫生部. 中药(新药)临床研究指导原则 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 186-188.
Ministry of Health of P. R. China. Guiding principle of clinical research on new drugs of traditional Chinese medicine [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1993: 186-188.
- [18] 强群科, 贺小龙. 中西医结合治疗慢性肾小球肾炎 30 例观察 [J]. *山西中医*, 2008, 24(10): 20-21.
Qiang QK, He XL. Clinical observation of integrative medicine for 30 patients with chronic glomerulonephritis [J]. *Shanxi J Tradit Chin Med*, 2008, 24(10): 20-21.
- [19] Rembold CM. Number needed to screen: development of a statistic for disease screening [J]. *Br Med J*, 1998, 317: 307-312.

(收稿: 2009-06-10 修回: 2010-04-26)

(上接 719 页)

- [4] Amici A, Venanzi FM, Concetti, A et al. Genetic immunization against neu/erbB2 transgenic breast cancer [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 1998, 47(4): 183-190.
- [5] 万华, 邹强, 董佳容, 等. 乳腺癌患者免疫指标检测及其临床意义 [J]. *肿瘤*, 2006, 26(3): 279-281.
Wan H, Zou Q, Dong JR, et al. Detection of anti-tumor immunity of patients with breast cancer and its clinical significance [J]. *Tumor*, 2006, 26(3): 279-281.
- [6] 万华, 吴雪卿, 董佳容, 等. “乳腺癌后方”抗高转移小鼠乳腺癌作用机制的研究 [J]. *肿瘤*, 2007, 27(9): 691-693.
Wan H, Wu XQ, Dong JR, et al. The action mechanism underlying the anti-tumor effects of “Ru'aishuhou herbs” against highly metastatic breast cancer [J]. *Tumor*, 2007, 27(9): 691-693.
- [7] 吴雪卿, 阙华发, 何春梅. 陆德铭教授治疗乳腺癌远处转移 37 例 [J]. *上海中医药大学学报*, 2000, 14(1): 24-26.
Wu XQ, Que HF, He CM. 37 cases of remote metastasis of mammary cancer treated by Prof. LU De-ming [J]. *Acta Univ Tradit Med Sin Pharm Shanghai*, 2000, 14(1): 24-26.
- [8] 万华, 吴雪卿, 傅勤慧, 等. “乳腺癌后方”对乳腺癌患者生活质量影响的临床研究 [J]. *上海中医药杂志*, 2004, 38(9): 28-31.
Wan H, Wu XQ, FU QH, et al. Clinical study on the impact of “Ru'aishuhou herbs” on life quality in breast cancer patients [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med*, 2004, 38(9): 28-31.

(收稿: 2009-04-15 修回: 2009-11-30)