

· 基础研究 ·

维康颗粒对乳腺癌小鼠肿瘤相关性疲劳的影响及代谢机制研究

欧阳明子¹ 林丽珠¹ 刘艳艳² 谭 为³ 赵晓山² 罗 仁²

摘要 目的 探讨维康颗粒(Weikang Granule, WG)对乳腺癌小鼠肿瘤相关性疲劳的影响及代谢机制。**方法** 将 40 只成功接种 4T1 乳腺肿瘤细胞的小鼠分为肿瘤对照 TC 组(生理盐水灌胃, 20 mL/kg, 1 次/日)、维康颗粒(WG)组、紫杉醇(PTX)组、维康颗粒+紫杉醇(WG+PTX)组, 每组 10 只, 给药组分别给予相应 WG(6 g/kg, 灌胃, 1 次/日)及 PTX(10 mg/kg, 腹腔注射, 隔日 1 次), 连续干预 21 日。观察干预前及干预第 10、20 日力竭游泳时间。干预结束后取血, 应用核磁共振氢谱(¹H-NMR)技术获取小鼠代谢指纹图谱信息, 采用 PCA、PLS-DA、OPLS-DA 进行数据处理, 观察各组血浆差异代谢物。**结果** 与 TC 组比较, PTX 组力竭游泳时间减少($P < 0.01$), 瓜氨酸水平升高, 肌醇、磷酸胆碱、异柠檬酸、甘油磷酸酯、亚油酸、谷氨酰胺、辅酶 A、天冬氨酸、丝氨酸、高半胱氨酸、赤藓糖水平下降($P < 0.01$, $P < 0.05$); WG 组力竭游泳时间延长($P < 0.01$, $P < 0.05$), 甘油磷酸酯水平升高($P < 0.01$)。与 PTX 组比较, WG+PTX 组力竭游泳时间延长($P < 0.01$), 神经酸、辅酶 A、磷酸烯醇丙酮酸、肌醇、赤藓糖水平升高($P < 0.01$, $P < 0.05$)。**结论** 维康颗粒具有减轻化疗相关性疲劳的作用, 其机制与促进 ATP 生成, 并加强磷酸戊糖途径、脂肪酸代谢、糖异生相关。

关键词 乳腺癌; 肿瘤相关性疲劳; 维康颗粒; 代谢组学

Metabolic Mechanism of Weikang Granule on Cancer Related Fatigue in Mice with Breast Cancer OUYANG Ming-zi¹, LIN li-zhu¹, LIU yan-yan², TAN Wei³, ZHAO Xiao-shan², and LUO Ren² 1 *Oncology Department, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou (510405)*; 2 *School of Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou (510515)*; 3 *TCM Department, Guangdong General Hospital, Guangzhou (510080)*

ABSTRACT Objective To explore the metabolic mechanism of Weikang Granule (WG) on cancer related fatigue in mice with breast cancer. **Methods** Forty successfully modeled mice established by subcutaneous injection of 4T1 breast tumor cells were divided into four groups according to the tumor volume, tumor control (TC) group (NS, 20 mL/kg, gastrogavage, qd), PTX group (paclitaxel, 10 mg/kg, intraperitoneal injection, qod), WG group (WG, 6 g/kg, gastrogavage, qd) and WG + PTX group (WG, 6 g/kg gastrogavage, qd; paclitaxel, intraperitoneal injection, 10 mg/kg, qod), 10 in each group, all intervention lasted for 21 days. The exhausting swimming time (EST) was observed before intervention, at day 10 and 20 of intervention. Blood was collected after intervention, the metabolic fingerprint was acquired by ¹H-NMR, the differential metabolites in the plasma were identified by PCA, PLS-DA, and OPLS-DA. **Results** Compared with TC group, the levels of citrulline were increased in PTX group, EST and the levels of inositol, choline phosphate, isocitric acid, glycerol phosphate, linoleic acid, glutamine, coenzyme A, aspartic acid, serine, homocysteine, erythrose were decreased in PTX group ($P < 0.01$, $P < 0.05$); EST and levels of glycerol phosphate were increased in WG group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Compared with PTX group, EST and levels of nervonic acid, coenzyme A, phosphoenolpyruvate, inositol and erythrose were increased in WG + PTX group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusions** WG can alleviate the chemotherapy related fatigue, the mechanism might be related to promoting ATP production, and strengthening the pentose

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(No. 81403340); 广东省自然科学基金项目 - 博士启动项目(No. 2014A030310063)

作者单位: 1. 广州中医药大学第一附属医院肿瘤中心(广州 510405); 2. 南方医科大学中医药学院(广州 510515); 3. 广东省人民医院中医科(广州 510080)

通讯作者: 罗 仁, Tel: 020 - 61641671, E-mail: luoren41671@yahoo.com.cn

DOI: 10.7661/j. cjm. 20170713. 179

phosphate pathway, fatty acid metabolism, and gluconeogenesis.

KEYWORDS breast cancer; cancer related fatigue; Weikang Granule; metabolomics

肿瘤相关性疲劳(cancer related fatigue, CRF)是肿瘤患者经历的常见的不适症状之一^[1]。但由于缺乏相对客观的实验室诊断与评价指标,目前,ICD-10 对 CRF 的诊断标准仍主要通过一些主观性指标进行评价进行。本课题组研制出防治 CRF 的中药复方——维康颗粒^[2],从肺、脾、肝、肾着手,既可以滋补肝肾、健脾润肺,益气养阴,又具有行气祛邪之功效,可通过多种途径改善疲劳,提高患者的生活质量^[3-5]。基于核磁共振技术的代谢组学研究,是近些年发展起来的一种新的代谢组学技术,目前广泛应用于肿瘤的早期诊断、判断预后、研究肿瘤代谢过程以及评价治疗药物的效果^[6,7]等方面。本实验拟从代谢组学的角度进行研究,以探讨维康颗粒对由肿瘤及化疗所引起的乳腺癌小鼠疲劳的影响机制。

材料与方法

1 药物 维康颗粒由熟地、黄精、山萸肉、淮山药、党参、陈皮组成,10 g/袋,灌胃使用前用生理盐水常温溶解。南方医科大学南方医院制备,批号:Z07022802。

2 细胞 4T1 乳腺癌细胞株购于中科院上海细胞所。

3 动物 7 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠 40 只,体重 16~20 g,由广东医学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(粤)2008-0002。实验前全部小鼠适应性喂养 7 天,室温 22~26℃,相对湿度 40%~60%,明暗交替 12 h,自由饮水、采食。动物室保持安静,实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。

4 主要试剂及仪器 RPMI-1640 培养液(吉诺生物公司产品,批号:10111202);胎牛血清(Hyclon 公司产品,批号:nvj0316);0.25%胰蛋白酶(Solarbio 公司产品,批号:20121012);紫杉醇注射液(哈尔滨三联药业有限公司,批号:100302C05),戊巴比妥钠(北京化学试剂公司,批号:061207)。二氧化碳培养箱(美国 Thermo Forma 公司);超净工作台(Air Tech 公司);倒置显微镜(德国 Leica 公司);细胞培养瓶(加拿大 BioFil 公司);微量移液器(法国 Gilson 公司);低温冷冻离心机(美国 Sigma 公司);Mettler Toledo PL303 电子天平;Avance 500 MHz 超导核磁共振波谱仪(Bruker 公司);负重用铅坠自制;恒温游泳箱(高 30 cm,直径 25 cm)自制。

5 模型建立、分组及给药方法

5.1 细胞培养 4T1 细胞用含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养液培养。取对数生长期细胞,用 0.25%胰酶消化,1:3 传代。置 37℃,5%CO₂ 培养箱中培养。

5.2 荷瘤小鼠模型的建立与分组 参照参考文献[8]。取对数生长期的 4T1 乳腺癌细胞,经胰酶消化后,用 PBS 调整细胞浓度为 1×10^6 cells/mL 在小鼠右侧腹壁第 4 对乳房脂肪垫区域的皮下接种肿瘤细胞 0.1 mL,相当于 10^5 cells/只小鼠。当瘤块长到 50~100 mm³(接种后第 7 日)的时候,造模成功率 100%,无小鼠死亡,按瘤体体积随机分为 4 组,每组 10 只。分别为肿瘤对照(TC)组、维康颗粒(WG)组、紫杉醇(PTX)组、维康颗粒+紫杉醇(WG+PTX)组。

5.3 给药剂量与方法 参照参考文献[8],设定维康颗粒的给药剂量为 6 g/kg,灌胃,每日 1 次。紫杉醇的给药剂量为 10 mg/kg,腹腔注射,每 2 日 1 次。每天 9:00 给药,给药体积为 20 mL/kg,连续 21 日。TC 组给予等体积生理盐水。

6 检测指标及方法

6.1 力竭游泳时间检测 于给药前及给药后第 10、20 日,用 7%体重的铅坠系于小鼠尾部,将小鼠放入水温(25±1)℃的游泳箱(高 30 cm,直径 25 cm)中进行力竭游泳测试,并记录力竭游泳时间。

6.2 样品预处理 在末次给药 1 h 后,用 3%戊巴比妥钠麻醉小鼠,摘眼球采血。加入肝素抗凝,室温静置 2 h,3 000 r/min 离心 10 min,取血浆,置 -80℃保存备用。取出冷冻血浆,室温下解冻,离心(10 000 r/min, 10 min,4℃),取 300 μL 上清加入核磁共振管(5 mm)中,再加入 0.2 mol/L 磷酸缓冲溶液 100 μL(Na₂HPO₄, pH 7.4)和 100 μL 重水,振荡混匀。

6.3 核磁共振氢谱(¹H-NMR)实验 ¹H-NMR 实验采用超导核磁共振波谱仪,实验温度为 298 K。采用 Carr-Purcell-Meiboom-Gill(CPMG)T2 滤波脉冲序列,回波时间 2nτ=100 ms,谱宽 10 kHz,等待时间 3 s,64 K 数据点,采集次数为 128。

7 数据预处理和统计学方法 采用 MestReNova 5.3 软件对所有 ¹H CPMG 谱进行调相、基线校正,化学位移以乳酸甲基双重峰 δ1.33 进行定标,自动积分,积分区间 δ0.5~9.0 ppm,积分间隔为 0.04 ppm。为了消除残余水峰引起的影响,将积分区

间 $\delta 4.7 \sim 5.2$ ppm 的积分值设为零。此外,为了消除样本间因浓度不同而带来的分析误差,在进行主成分分析之前对各分段积分值进行归一化处理。所得数据输出并转换到 Excel 格式文件保存,用于数据分析。

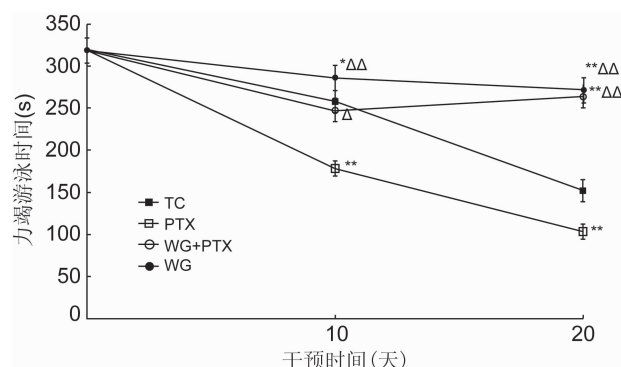
将 Excel 格式数据导入软件 Simca-P 12.0.1.0 Demo (Umetrics AB, Sweden) 中进行多元统计分析。数据采用平均中心化(mean centering)或 Pareto 标度化(Pareto scaling)进行预处理后,采用正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA),提取 VIP 值最大的前 40 个变量,进一步进行统计学分析,发掘出组间特异性代谢物,结合代谢物的 VIP 值和归一化积分值的统计分析的结果进行鉴定。

统计分析采用 SPSS 13.0,对乳腺癌小鼠血浆中的几种代谢物的归一化积分值($\bar{x} \pm s$ 表示)做统计学处理(独立样本 t 检验),统计检验水平为 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 各组小鼠一般状态比较 干预前,4 组小鼠精神状态、活动情况、皮毛外观、饮食等一般情况无差异。各组小鼠皮毛光洁整齐,活泼好动,对食物敏感,逃避快。实验过程中,荷瘤小鼠均逐渐出现毛发稀疏、不活泼、行动迟缓 and 进食减少等现象。实验结束时,4 组荷瘤小鼠的一般情况从差到相对较好依次为 PTX 组、TC 组、WG + PTX 组、WG 组。

2 各组各时间点力竭游泳时间比较(图 1) 干预前,4 组小鼠的力竭游泳时间无差异。干预第 10 天时,与 TC 组比较,PTX 组力竭游泳时间减少($P < 0.01$),WG 组力竭游泳时间延长($P < 0.05$);与 PTX 组比较, WG 组、WG + PTX 组力竭游泳时间延长($P < 0.01$, $P < 0.05$)。干预 20 天时,与 TC 组比较,PTX 组力竭游

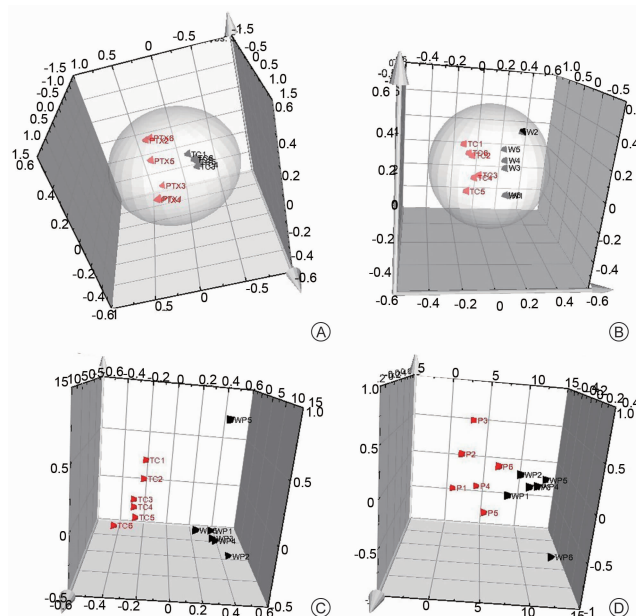


注: $n = 10$; 与 TC 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 PTX 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

图 1 各组小鼠力竭游泳时间比较

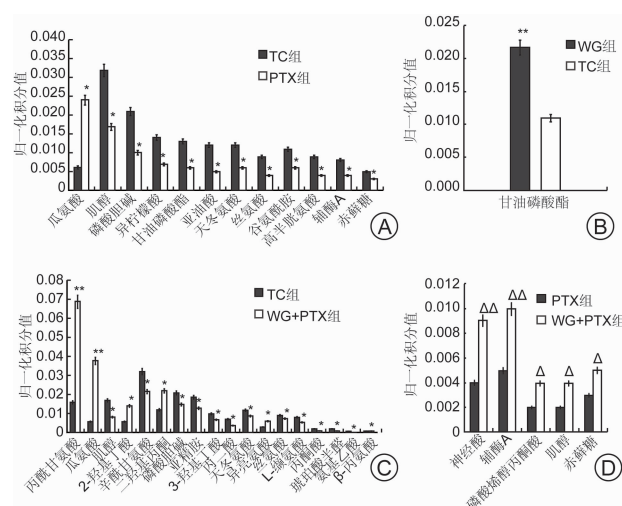
泳时间减少($P < 0.01$), WG 组、WG + PTX 组力竭游泳时间延长($P < 0.01$); 与 PTX 组比较, WG 组、WG + PTX 组小鼠的力竭游泳时间延长($P < 0.01$)。

3 各组小鼠血浆代谢比较(图 2、3) TC 组与 PTX 组小鼠血浆代谢数据显著分散,与 TC 组比较, PTX 组瓜氨酸水平升高,肌醇、磷酸胆碱、异柠檬酸、甘油磷酸酯、亚油酸、谷氨酰胺、辅酶 A、天冬氨酸、丝氨酸、高半胱氨酸、赤藓糖水平下降($P < 0.01$, $P < 0.05$)。TC 组和 WG 组小鼠血浆代谢数据显著分散,



注: A 为 TC 组与 PTX 组; B 为 TC 组与 WG 组; C 为 TC 组与 WG + PTX 组; D 为 PTX 组与 WG + PTX 组

图 2 各组 OPLS-DA 模型 3D 积分矩阵图



注: A 为 TC 组与 PTX 组比较; B 为 TC 组与 WG 组比较; C 为 TC 组与 WG + PTX 组比较; D 为 PTX 组与 WG + PTX 组比较; 与 TC 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 PTX 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; $n = 6$

图 3 各组小鼠血浆代谢物比较

与 TC 组小鼠比较, WG 组小鼠血浆中的甘油磷酸酯水平升高 ($P < 0.01$)。TC 组和 WG + PTX 组小鼠血浆代谢数据显著区分, 与 TC 组小鼠比较, WG + PTX 组小鼠血浆中的肌醇、辛酰甘氨酸、磷酸胆碱、亚精胺、3-羟基丁酸、丙二酸、天冬氨酸、丝氨酸、L-缬氨酸、丙酮酸、琥珀酸半醛、氨基己酸水平下降, 丙酰甘氨酸、瓜氨酸、二羟基丙酮、异亮氨酸、2-羟基丁酸、 β -丙氨酸水平升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。PTX 组与 WG + PTX 组小鼠血浆代谢数据显著分散, 与 PTX 组小鼠比较, WG + PTX 组小鼠血浆中神经酸、辅酶 A、磷酸烯醇丙酮酸、肌醇、赤藓糖水平升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

讨 论

中药复方维康颗粒是根据中医学理论及多年的临床经验研制出的防治疲劳药物, 现已取得广东省食品药品监督管理局院内制剂批号(粤药制字:07022802 号), 并获取国家发明专利 1 项(专利号:200710032738.6)。维康颗粒由熟地、党参、淮山药、山萸肉、黄精、陈皮组成。诸药合用共奏滋补肝肾, 健脾化湿, 益气养阴, 行气祛邪之功, 临床上治疗疲劳具有确切的疗效^[3-5]。本研究药理学部分的实验结果表明, 维康颗粒可以明显提高荷瘤小鼠及应用 PTX 化疗的荷瘤小鼠的力竭游泳时间, 对 4 组小鼠的血浆样本采集血浆代谢指纹图谱研究发现, 与 TC 组小鼠血浆代谢物相比, PTX 组的瓜氨酸水平升高, 肌醇、磷酸胆碱、异柠檬酸、甘油磷酸酯、亚油酸、谷氨酰胺、辅酶 A、天冬氨酸、丝氨酸、高半胱氨酸、赤藓糖水平下降。PTX 容易产生的神经毒性和肌肉关节疼痛, 是引起化疗相关性疲劳的重要原因^[9]。游离态的肌醇主要存在于肌肉、心脏、肝脏、肺脏中, 是磷脂的一种磷脂酰肌醇的组成成分, 在细胞形成和分化、脂质的合成、细胞膜构成和细胞的生长的过程中起着重要作用。肌醇—磷脂—钙信号转导系统调节多个细胞过程, 包括受精、细胞增殖和发展、分泌、收缩和神经活动^[10,11]。实验结果说明, PTX 组小鼠的血浆中显著下降的肌醇可能是 PTX 引起乳腺癌小鼠疲劳的原因之一。与 TC 组小鼠比较, WG 组小鼠血浆中的甘油磷酸酯水平升高。甘油磷酸酯主要参与甘油磷酸穿梭, 使在细胞质中由糖酵解所产生的 NADH 可以进入到线粒体中参加氧化磷酸化以生成 ATP。维康颗粒可能使得因小鼠乳腺癌本身所引起厌氧呼吸增强所产生的 NADH 可进入线粒体中的氧化磷酸化途径以生成 ATP, 为机体提供能量, 从而达到缓解乳腺癌小鼠 CRF 的作用。与 PTX 组小鼠血浆代谢物相比, WG + PTX 组小鼠血浆中的神经酸、辅酶 A、磷酸烯醇丙酮酸、肌醇、赤藓糖水平升高。由于联合

应用了维康颗粒, WG + PTX 组乳腺癌小鼠体内的磷酸戊糖途径、脂肪酸代谢、糖异生等途径得到了加强, 从而加大了能量供给, 使乳腺癌小鼠因应用 PTX 化疗而下降的血浆代谢物得到了提升。

综上所述, 维康颗粒具有减轻 CRF 的作用, 其作用机制可能与上升甘油磷酸酯、赤藓糖、神经酸、磷酸烯醇、丙酮酸、肌醇水平, 以促成 ATP 的生成, 并加强磷酸戊糖途径、脂肪酸代谢、糖异生等相关。代谢组学技术或能作为评价药物干预 CRF 的一种手段。

参 考 文 献

- [1] Jones JM, Olson K, Catton P, et al. Cancer-related fatigue and associated disability in post-treatment cancer survivors [J]. J Cancer Surviv, 2016, 10(1): 51–61.
- [2] 王羽伦, 侯连兵, 罗仁, 等. 维康六味颗粒质量标准研究[J]. 中国药业, 2008, 17(23): 12–13.
- [3] 刘艳艳, 陈淑娟, 余洁英, 等. 维康颗粒对亚健康疲劳小鼠不同组织氧化应激损伤的干预作用[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2017, 38(1): 20–24, 45.
- [4] 聂晓莉, 薛琪, 罗仁, 等. 维康颗粒对疲劳型亚健康大鼠骨骼肌脂质过氧化和 PGC-1 α 及 AMPK 表达的影响[J]. 广东医学, 2013, 34(11): 1654–1656.
- [5] 刘艳艳, 孙晓敏, 欧阳明子, 等. 维康颗粒对疲劳型亚健康小鼠免疫功能影响的实验研究[J]. 江苏中医药, 2013, 45(5): 73–75.
- [6] Hua Y, Hou Y, Wang S, et al. Comparison of chemical compositions in pseudostellariae radix from different cultivated fields and germplasms by NMR-based metabolomics [J]. Molecules, 2016, 21(11): 1538.
- [7] Eyob T, Ng T, Chan R, et al. Impact of chemotherapy on cancer-related fatigue and cytokines in 1312 patients: a systematic review of quantitative studies [J]. Curr Opin Support Palliat Care, 2016, 10(2): 165–179.
- [8] Luo T, Wang J, Yin Y, et al. (–)-Epigallocatechin gallate sensitizes breast cancer cells to paclitaxel in a murine model of breast carcinoma [J]. Breast Cancer Res, 2010, 12(1): R8.
- [9] Bertazzi DL, De Craene JO, Bär S, et al. Phosphoinositides: lipidic essential actors in the intracellular traffic [J]. Biol Aujourd'hui, 2015, 209(1): 97–109.
- [10] Papaleo E, Unfer V, Baillargeon JP, et al. Contribution of myo-inositol to reproduction [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2009, 147(2): 120–123.
- [11] Carlomagno G, Nordio M, Chiu TT, et al. Contribution of myo-inositol and melatonin to human reproduction [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2011, 159(2): 267–272.

(收稿: 2016-02-22 修回: 2017-07-04)

责任编辑: 赵芳芳