膈俞穴注射4T1细胞构建小鼠乳腺癌模型的实验研究*

赵大尉[1**]，谢 甦[2***]，张 意[3]，管志敏[1]，贺 昀[1]，张雲杰[1]
(1. 贵州医科大学 研究生院，贵州 贵阳 550004；2. 贵州医科大学附院 中医科，贵州 贵阳 550004；3. 天津市静海区陈官屯医院 中医科，天津 静海 301600)

[摘 要] **目的**：探讨膈俞穴注射乳腺癌4T1细胞构建小鼠乳腺癌模型的可行性。**方法**：清洁级4～6周龄雌性BALB/c小鼠16只，随机分为膈俞穴组和右肩胛组各8只，膈俞穴组将小鼠乳腺癌4T1细胞悬液接种于BALB/c小鼠左侧膈俞穴，右肩胛组接种于右侧肩胛部作为对照，观察两组小鼠成模时间、成瘤率、小鼠的远期存活率以及肿瘤生长曲线。**结果**：膈俞穴组小鼠的成瘤时间快于右肩胛组，差异有统计学意义($P<0.05$)；肿瘤生长曲线显示膈俞穴组肿瘤生长速度明显高于右肩胛组，且后期两组之间的差距越来越明显($P<0.05$)，但两组成瘤率及远期存活率均无差异。**结论**：膈俞穴注射乳腺癌4T1细胞可成功复制小鼠乳腺癌模型，且成模时间短。

[关键词] 膈俞穴；乳腺肿瘤；4T1细胞；模型，动物；小鼠
[中图分类号] R73－351 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2016)03-0304-03

Experimental Study on Construction of Mice Breast Cancer Model By Geshu Acupoint Injection with 4T1 cells

ZHAO Dawei[1], XIE Su[2], ZHANG Yi[3], GUAN Zhimin[1], HE Yun[1], ZHANG Yunjie[1]
(*1. Graduate School, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Traditional Chinese Medicine, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Department of Traditional Chinese Medicine, the Chenguantun Hospital in Jinghai District, Tianjin 301600, China*)

[**Abstract**] **Objective**: To explore the feasibility of mouse breast cancer model construction by Geshu acupoint injection of breast cancer 4T1 cells. **Methods**: Sixty female SPF BALB/c mice of 4 to 6 weeks old were randomly divided into Geshu group and Shoulder blade group, 8 mice in each group. Geshu group was inoculated with breast cancer 4T1 cells suspension in left Geshu acupoint while Shoulder blade group inoculated with breast cancer 4T1 cells suspension in right shoulder blade. Tumor formation time, tumor formation rate, tumor growth curve and forward survival rate were compared between two groups. **Results**: Tumor formation time in Geshu group was significantly shorter than that of Shoulder blade group($P<0.05$). The tumor growth curve showed that tumor growth rate in Geshu group was significantly higher that that of Shoulder blade group, and the difference in tumor growth rate between the two groups was becoming more and more obvious($P<0.05$). Howerver, there was no difference in the tumor formation rate and the forward survival rate. **Conclusion**: GeShu acupoint injection of breast cancer 4T1 cells can successfully construct mouse breast cancer model in relatively short time.

[**Key words**] Geshu acupoint; breast cancer; 4T1 cells; model, animal; mice

*[基金项目]贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题基金(QZYY－2015－155)
**贵州医科大学2013级硕士研究生
***通信作者 E-mail:972254428@qq.com
网络出版时间:2016－03－17 网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20160317.1007.004.html

虽然我国女性乳腺癌的发病率和死亡率在世界范围处于中低水平，但是乳腺癌仍是我国女性最常见的癌症之一[1]，为深入研究本病的防治，建立高效、便捷、可靠的动物模型十分关键。在中医针灸理论中，膈俞穴为八会穴的血会，此处内应膈膜，膈膜之上有心，心主血；膈膜之下有肝，肝藏血。此外，手太阴肺经“上膈”，足太阴脾经“上贯膈”。膈膜与主血四脏均关系密切，可以调理气血，故为血会[2]。因膈俞穴气血旺盛，利于乳腺癌 4T1 细胞的生长，故本实验选用此穴作为构建动物乳腺癌模型的穴位。

1　材料与方法

1.1　材料

16 只清洁级 4 ~ 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠由贵州医科大学动物中心购入，体重(20 ± 2) g；4T1 乳腺癌细胞株购自中科院细胞库，1640 培养基购自美国 GIBCO 公司，胎牛血清及胰蛋白酶购自北京索来宝公司，青霉素及链霉素为华北制药集团公司产品；超净台购自美国 BIOLOGICAL 公司，恒温水浴箱(HH-W420)由江苏省金坛市医疗仪器厂生产，CO_2 恒温培养箱购自 TC-2323 型美国 SHELDON 公司，－80 ℃超低温冰箱由日本 SANYO 公司生产、台式离心机(Anke TDL-40B)由上海安亭科学仪器厂生产。

1.2　乳腺癌 4T1 细胞悬液的制备

传代培养小鼠乳腺癌 4T1 细胞，收集处于对数生长期的 4T1 细胞，用 PBS 润洗 2 次，吸弃 PBS 后加入适量全培养基调整细胞浓度，制备成 1×10^7/mL 的 4T1 细胞悬液备用。

1.3　动物模型的建立

16 只 BALB/c 小鼠予以正常饮食适应性喂养 1 周后，随机分为膈俞穴组和右肩胛组，每组 8 只，膈俞穴组将 4T1 细胞悬液注射于 BALB/c 小鼠左侧膈俞穴(小鼠膈俞穴定位第 7 胸椎下两旁肋间)[2]，右肩胛组参照文献[3]将 4T1 细胞悬液注射于 BALB/c 小鼠右侧肩胛部处。

1.4　观察指标

注射 4T1 细胞后，每天观察小鼠生活饮食及接种部位瘤块的生长情况，包括瘤块出现时间、瘤块大小、成瘤率和远期(30 d)存活率。每隔 5 d 用游标卡尺测量瘤块的长径(a)和短径(b)，并根据 $V = ab^2/2$ 计算瘤块体积[4]，绘制生长曲线。第 30 天时脱颈处死两组小鼠，取出肿瘤组织，用带表游标卡尺测量肿瘤长短径，送贵州医科大学附院病理科 HE 染色，观察肿瘤细胞形态。

1.5　统计学方法

所得数据采用 SPSS 17. 0 统计软件处理，组间比较采用单因素方差分析，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　肿瘤生长状况和病理检查结果

膈俞穴组小鼠接种 4T1 细胞 2 ~ 6 d 后接种部位均出现肿块，右肩胛组于 4 ~ 8 d 后长出肿块，两组肿块均质硬、增长迅速、活动度不高，10 d 后两组小鼠中均有部分出现瘤块破溃现象。接种后第 30 天时脱颈处死小鼠，解剖可见瘤体呈粉白色，大部分出现胸腔、腹腔或淋巴结转移且与周围组织高度粘连；病理检查显示肿瘤细胞多呈圆形，核浆比率大，核仁和染色质染色深，细胞分裂活跃，细胞排列无序，癌细胞呈实性片状弥漫性分布，少数呈腺腔样，浸入周围组织及横纹肌，部分伴坏死，见图 1。

2.2　成瘤时间、成瘤率及存活时间

膈俞穴组小鼠的成瘤时间、远期存活率均优于右肩胛组，差别具有统计学意义($P < 0.05$)，见表 1。

表 1　小鼠膈俞穴或右肩胛接种乳腺癌 4T1 细胞成瘤情况

Tab. 1　Comparison of tumor formation condition between Geshu acupoint injection and right shoulder blade injection with breast cancer 4T1 cell

接种部位	n	成瘤时间(d)	成瘤(%)	远期存活(%)
右肩胛	8	4.28 ± 0.32	100	75
膈俞穴	8	2.95 ± 0.30(1)	100	100(1)

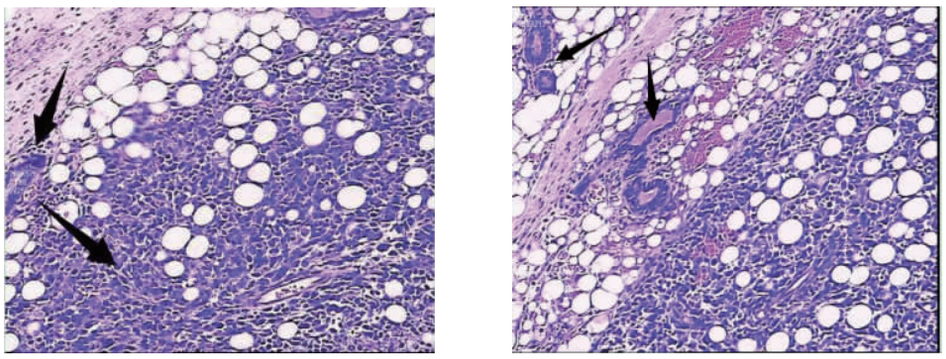
(1) 与对照组比较，$P < 0.05$

2.3　移植瘤的生长曲线

膈俞穴组平均肿瘤体积从第 5 天开始到第 30 天均明显高于右肩胛组，且后期两组之间的差距越来越明显，见图 2。

3　讨论

目前，比较成熟的乳腺癌动物模型复制方法有：(1)自发型，即采取近交繁殖的小鼠，培育到一定年龄则自发出现乳腺癌；(2)诱发型，多采用有致癌作用的化学物质，经不同方式作用于实验动



右肩胛组　　膈俞穴组

图 1　膈俞穴或右肩胛接种乳腺癌 4T1 细胞 30 d 时的肿瘤组织(HE, ×100)

Fig. 1　Tumor tissues in experimental group and control group

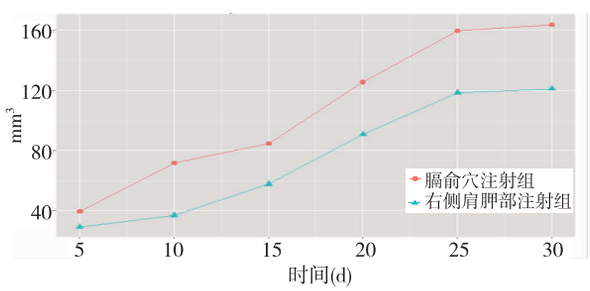


图 2　膈俞穴组和右肩胛组瘤体生长曲线

Fig. 2　Comparison of tumor growth curves between experimental group and control group

物,诱使其发生乳腺癌;(**3**)移植型,有同种和异种、原位和异位的区别,但都是将肿瘤组织或细胞种植于实验动物体内;(**4**)转基因型,即将特定的基因导入动物体内,并使其在宿主体内表达、遗传[5-6]。本实验采用了移植型复制方法。膈俞穴是八会穴中的血会,为全身气血汇聚之处。《类经图翼》中提到"足太阳穴,谷气由隔达于上焦,化精微为血之处,故曰血会。"曾经有人检索了大量文献,发现膈俞穴适应症广泛,长于治疗血证,有活血化瘀、通络止痛、养血止血的作用[7]。历代医家对膈俞穴也有独到的论述,如元代医家滑伯仁云:"膈俞是太阳脉气所发也,太阳多血,又血乃脉之象"。清代医家陈修园曰:"诸经之血,皆从膈膜上下,又心主血,肝藏血,心位于膈上。肝位膈下,交通于膈膜,故血会于膈膜也"[8]。气血是人体内的精微物质,是生命物质的本源,因而有形之邪在体内得以生长也离不开气血的滋养。另外,机体各脏腑的正常运行全赖气机健运、营血滋养,外来邪气会消耗机体的气血,若邪气占用大部分气血,将导致正气更虚,机体会出现邪盛正衰。如《医宗必读》中提到"积之成也,正气不足,而后邪气踞之"[9]。金代医家张元素在《活法机要》中曰"壮人无积,虚人则有之,脾胃虚弱,气血两衰,四时有感,皆能成积"[10]。故本实验选取膈俞穴注射小鼠乳腺癌 4T1 细胞悬液,一方面是将乳腺癌细胞种植于气血旺盛之处,易于肿瘤细胞在动物体内增殖生长;另一方面,肿瘤耗损气血,造成机体正气亏虚,防御功能减弱,从而更易于肿瘤的生长。另外,膈俞穴对应膈肌部位,在西医解剖学中认为,膈肌的上方是肺,肺通过肺动、静脉完成肺循环,从而完成血液中气体的交换;其下方是胃肠,此处完成营养物质与代谢产物的交换。血液在隔膜上下的两次新陈代谢构成了血液整体的以旧换新,加之隔膜主动脉与腔静脉裂孔的存在,使隔俞位于隔膜位置对于血的运化具有了一定意义[11]。

实验结果显示,膈俞穴组成瘤时间明显早于右肩胛组,且病理切片显示为癌变,说明膈俞穴注射 4T1 细胞确实可以复制小鼠乳腺癌模型,并可缩短成膜时间,对小鼠远期存活率无影响。实验过程中,选择膈俞穴注射小鼠乳腺癌 4T1 细胞悬液小鼠容易固定,一人即可完成操作,而传统的注射于右侧肩胛部,因部位接近头部,为防止咬伤需要一人固定小鼠,一人注射,不方便操作。且注射于肩胛部,肿瘤长大后会致颈部、耳背部均为肿瘤,此时抓取老鼠会刺激肿瘤产生疼痛,增加了抓取老鼠的难度,而注射于膈俞穴则无论肿瘤大小,均可轻松抓取。此外,在观察肿瘤、测量肿瘤大小时,膈俞穴也较肩胛部易于观察和测量,降低了测量误差。实验中,膈俞穴处肿瘤生长迅速,肿瘤大小适中,可以缩短造模时间,对远期存活率影响不大,实验小鼠可以存活至实验结束。实验的不足在于实验样本量较少,还需要后续大样本量的实验作为支撑。

(下转第 309 页)

PDCD4 通过促进肝癌、乳腺癌、胶质瘤、肾癌等肿瘤细胞的凋亡[6-7]，在多种恶性肿瘤组织包括肺癌、结肠癌、肝癌、胰腺癌等组织中的表达下调甚至缺失，且与肿瘤潜在恶性程度密切相关[8]。PDCD5 是由北京大学人类疾病基因中心在国际上首先报道的一个新的人类凋亡相关基因，该基因编码的蛋白由 125 个氨基酸组成，定位于胞质和胞核，在机体多种组织中呈现中高水平的表达[2,9]。PDCD5 表达异常与多种疾病的发生有关，在肿瘤细胞的表达明显低于正常细胞[10]，PDCD5 在肿瘤的发生发展过程中发挥一定作用[10]。但有关 PDCD4、PDCD5 与卵巢肿瘤关系的研究报道较少，其在卵巢肿瘤的表达水平及作用尚不明确[11-12]。

本组研究发现卵巢癌上皮性组织中 PDCD4、PDCD5 蛋白表达阳性率明显低于卵巢囊腺瘤和正常组织，差异有统计学意义（$P<0.05$）。卵巢上皮性癌Ⅰ期、Ⅱ期、Ⅲ期及Ⅳ期癌组织中的 PDCD4、PDCD5 蛋白表达阳性率逐渐降低，两两比较差异有统计学意义（$P<0.05$）。提示卵巢上皮性癌患者病情的发生、发展与 PDCD4、PDCD5 蛋白表达水水平降低有关。

4　参考文献

[1] 曹春明，孙震晓. 抑癌基因 PDCD4 的表达调控及产物泛素化研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展，2010（4）：353－357.

[2] 刘红涛，王玉刚，张颖妹，等. TF-1 细胞凋亡相关基因的研究[J]. 生物化学与生物物理进展，1999(1)：38－43.

[3] 杨念念，严亚琼，龚洁，等. 中国 2003－2007 年卵巢癌发病与死亡分析[J]. 中国肿瘤，2012(6)：401－405.

[4] 林仲秋，谢玲玲，李晶. FIGO 2013 卵巢癌、输卵管癌、腹膜癌新分期解读[J]. 中国实用妇科与产科杂志，2013(12)：921－923.

[5] 潘玲，何常. 髓样细胞白血病-1 及染色质重塑 A 蛋白在卵巢上皮癌组织中的表[J]. 贵阳医学院学报，2016(2)：221－223.

[6] 李海艳. 促凋亡基因 PDCD5 在人胶质瘤中的表达及其对化疗敏感性的影响[D]. 山东：山东大学硕士研究生论文，2009.

[7] 谭万龙，熊林，郑少斌，等. 肾透明细胞癌 PDCD5 表达及与预后的关系[J]. 南方医科大学学报，2006(9)：1316－1318.

[8] 姜杨，张霞，王晓燕，等. PDCD4 转染卵巢癌细胞系基因表达谱的变化[J]. 山东大学学报：医学版，2010(1)：48－52.

[9] 郭辉，孙伟，马秀敏，等. 新的凋亡相关基因 PDCD5 在细胞凋亡中的作用及应用前景[J]. 现代肿瘤医学，2010(1)：179－182.

[10] 郭妮娜，刘竞. PDCD5 基因促进细胞凋亡机制的研究进展[J]. 阴山学刊，2012(1)：45－47.

[11] 王新华，刘晓兰，崔涌. PTEN、PDCD5 和 CyclinD1 在宫颈上皮内瘤变及宫颈癌的表达及意义[J]. 实用医技杂志，2013(2)：173－175.

[12] 朱峥艳，李文才. PDCD5 蛋白在卵巢浆液性交界性肿瘤中的表达与其诊断、鉴别诊断及预后的关系[J]. 医药论坛杂志，2015(2)：60－64.

（2015-12-03 收稿，2016-02-20 修回）
中文编辑：吴昌学；英文编辑：赵　毅

（上接第 306 页）

4　参考文献

[1] 黄哲宙，陈万青，吴春晓，等. 中国女性乳腺癌的发病和死亡现况—全国 32 个肿瘤登记点 2003－2007 年资料分析报告[J]. 肿瘤，2012(6)：435－439.

[2] 郭义. 实验针灸学[M]. 北京：中国中医药出版社，2008：417.

[3] 张海谱. 乳腺癌肿瘤干细胞的分离及其生物学特性研究[D]. 河北：河北医科大学硕士研究生论文，2010.

[4] 杨洋博君，陈蓉，李舒，等. 复方大七气汤对裸鼠卵巢癌皮下移植瘤生长及凋亡的影响[J]. 中国医院药学杂志，2014(34)：2102－2107.

[5] 唐宏涛，魏敏杰. 乳腺癌实验动物模型的制备与应用[J]. 中国实验动物学报，2007(3)：234－237.

[6] 杨桂仙，张大方. 乳腺癌动物模型的研究现状与评价[J]. 长春中医药大学学报，2007(23)：82－83.

[7] 陶晓雁，赵百孝，何姝霖，等. “血会膈俞”的临床研究进展[J]. 针灸临床杂志，2013(29)：65－69.

[8] 申定珠，熊芳丽，崔瑾. 膈俞穴临床应用[J]. 上海针灸杂志，2004(23)：46－48.

[9] 郭晓峰，赵延龙，张瑞卿，等. 从气血理论浅谈“虚瘀致衰”与“虚瘀致瘤”[J]. 中华中医药杂志，2014(29)：221－223.

[10] 王小寅. 电针隔俞穴和足三里穴治疗癌症化疗毒副反应的临床研究[D]. 广州：广州中医药大学，2005.

[11] 孙晶，李岩趋，李瑞超，等. 血会月高俞之自议[J]. 四川中医，2014(32)：20－21.

（2015-12-09 收稿，2016-02-21 修回）
中文编辑：戚　璐；英文编辑：刘　华