

电针百会和长强穴对荷乳腺癌小鼠 SCN 部分输出信号分子水平的影响

李胜吾, 薛红*, 王俊娟, 刘文, 王子静, 吴佳, 张承舜

(成都中医药大学针灸推拿学院, 四川 成都 610075)

摘要:目的 观察荷乳腺癌小鼠电针后其视交叉上核(suprachiasmatic nucleus, SCN)及外周血清和肿瘤组织中 TGF α 和受体 EGFR 水平的变化,探讨电针对荷瘤动物自发性活动节律影响的输出信号分子调控机制。方法 将 18 只 C57BL/6J 雄性小鼠随机分为空白组、模型组、电针组 3 组,每组 6 只。LD 驯化 10 d 后关闭光源使动物处于自由运行状态,DD 驯化 10 d 后开始造模,造模成功继续监测节律 7 d 后进行电针干预。电针组在 CT4 针刺百会和长强穴,使用韩氏穴位神经刺激仪,频率 2/15 Hz,电流 0.5 mA,每次 15 min,每日 1 次,连续电针 3 次。空白组和模型组在相应时相点 CT4 用同样的方法抓取和固定。第三次电针后 2 h 立即断颈处死动物,在相应部位取材后使用酶联免疫吸附法(ELISA)对指标进行检测。结果 电针后各组小鼠 SCN 中 TGF α 水平比较无统计学差异;各组小鼠外周血清、瘤组织中 TGF α 水平分别比较,模型组均值均大于空白组,差异具有统计学意义($P < 0.05$);电针组均值均低于模型组,但差异无统计学意义。电针后各组小鼠 SPZ 中 EGFR 水平比较,模型组均值大于空白组,但差异无统计学意义;电针组均值小于模型组,其差异具有统计学意义($P < 0.05$);各组小鼠外周血清、瘤组织中 EGFR 水平分别比较,模型组均值均大于空白组,其差异具有统计学意义($P < 0.05$),电针组均值小于模型组,但差异无统计学意义。电针后各组小鼠 SCN 和外周血清中 PK2 水平分别比较,模型组均值均小于空白组,但差异无统计学意义;电针组均值均大于模型组,其差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论 荷乳腺癌小鼠外周血清和肿瘤组织中 TGF α 及 EGFR 水平较正常小鼠明显增高。电针可以明显降低荷乳腺癌小鼠 SPZ 中 EGFR 水平,增高 SCN 中枢和外周血清中 PK2 水平,提示电针干预可能通过直接调控中枢和外周 PK2 水平以及对 SPZ 中 EGFR 水平的直接调控间接影响 TGF α 水平从而影响荷瘤小鼠自发性活动节律。电针对荷瘤小鼠 SPZ 中 EGFR 水平的降低作用也提示电针干预具有一定的肿瘤抑制作用。

关键词:电针;荷瘤;TGF α ;EGFR;PK2;水平;影响

中图分类号:R285 文献标志码:A 文章编号:1672-0482(2012)05-0457-04

Influence of Electroacupuncture Changqiang (GV1) and Baihui (GV20) on SCN Output Signal Molecular of Mice Bearing Breast Cancer

LI Sheng-wu, XUE Hong*, WANG Jun-juan, LIU Wen, WANG Zi-jing, WU Jia, ZHANG Cheng-shun

(Acupuncture School of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, 610075, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE Observe the change of TGF α and EGFR level in SCN, serum and tumor tissues of mice bearing breast cancer after electroacupuncture for further discuss on the regulating mechanism of SCN output signal molecular of electroacupuncture on the spontaneous activity rhythm of animals bearing tumors. **METHODS** 18 male C57BL/6J mice were randomly divided into 3 groups with 6 in each group. LD domestication for 10 days, model establishment after DD domestication for 10 days and electroacupuncture after 7 days since model establishment succeed. Electroacupuncture on Changqiang (GV 1) and Baihui (GV 20) on CT4 with HANS Acupoint and Nerves Stimulator (HANS-200), 2/15 Hz, 0.5 mA, 15 min for each time. Electroacupuncture for three times with one time everyday. Animals were sacrificed after 2 hours in the third time. Extract the sample and detect the indexes by ELISA. **RESULTS** There was no significant differences in SCN TGF α level among 3 groups; In the serum and tumor tissues, the TGF α levels of model group were higher significantly than blank group ($P < 0.05$) while there was no significantly difference between electroacupuncture group and model group. There was no significantly difference in SPZ EGFR level between model group and blank group. The EGFR levels of electroacupuncture group were higher significantly than model group ($P < 0.05$). In the serum and tumor tissues, the EGFR levels of model group were higher significantly than blank group ($P < 0.05$) while there was no significantly difference between electroacupuncture group and model group. In SCN and serum, the PK2 levels of electroacupuncture group were higher significantly than model group ($P < 0.05$) while there was no significantly difference between blank group and model group. **CONCLUSION** TGF α and EGFR levels in serum and tumor tissues of mice bearing breast cancer were significantly higher than normal mice. Electroacupuncture can decrease EGFR levels in SPZ and increase PK2 levels in SCN and serum of mice bearing breast cancer which suggested that elec-

收稿日期:2012-05-14;修稿日期:2012-07-21

基金项目:国家自然科学基金面上项目(30873297)

作者简介:李胜吾(1985-),女,四川自贡人,成都中医药大学 2010 级博士研究生。*通信作者:cdxuehong@126.com

troacupuncture affect on the spontaneous activity rhythms probably through regulating PK2 levels in SCN and EGFR levels in SPZ which regulate TGF α levels indirectly. The effect on EGFR levels in SPZ of mice bearing tumors of electroacupuncture also suggested it play a part in the anti-tumor effect.

KEY WORDS :electroacupuncture; bearing tumor; TGF α ; EGFR; PK2; level; effect

在对生物钟系统的研究过程中发现,与肿瘤的发生发展过程密切相关的肽类物质即 EGFR 的配体 TGF α ,是生物钟的一种重要输出信号分子,它被认为是生物节律起抑制作用的因子之一^[1]。分布于下丘脑-亚室旁带(Subparaventricular zone, SPZ)的表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)与配体转化生长因子 α (transforming growth factor α , TGF α)结合后,EGFR 作为细胞生长信号的发放者,调控细胞的增殖、粘附、转移、分化等过程,从而引发肿瘤^[1]。所以 TGF α 是研究生物节律与肿瘤发生之间联系的关键环节。prokineticin2(PK2)是 SCN 另一种重要的节律输出信号分子,在 SCN 中协调下游振荡器,其相关分子转导机制在使局部振荡器节律同步化的过程中具有重要作用。PK2 作为 SCN 输出信号分子在神经中枢调节着躯体各种生理昼夜节律,敲除小鼠 PK2 基因或 PKR2 基因,动物行为和多种生理活动的昼夜节律被打乱^[2],而在小鼠脑室内注射 PK2,动物则处于安静或睡眠状态^[3]。

我们前期的研究结果发现,荷乳腺癌小鼠的自发性活动节律与正常小鼠比较,其节律振幅和总活动度下降,相位超前,电针“百会”和“长强”穴可以在一定程度上恢复荷瘤小鼠紊乱的节律,使振幅升高,超前的相位后移^[4]。基于多种节律的控制中枢视交叉上核(suprachiasmatic nucleus, SCN)中多种输出信号分子与肿瘤的发生发展关系密切,故本研究选择荷乳腺癌小鼠作为研究对象,通过电针荷瘤小鼠百会穴和长强穴,观察荷瘤动物 SCN 及外周血清和瘤组织中 SCN 输出信号分子 TGF α 及受体 EGFR、PK2 水平的变化特征以及电针对其水平的影响试揭示电针干预是否通过 SCN 输出信号分子这一环节对荷瘤动物产生节律调控和抗癌作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器

MA-782 小鼠乳腺癌细胞株,武汉大学中国典型培养物保藏中心。胎牛血清,美国 Gibco 公司。RPMI-1640 培养液,美国 Gibco 公司。Elisa 小鼠转移生长因子 α ELISA 试剂盒,小鼠表皮生长因子受体 ELISA 试剂盒,小鼠前动力蛋白 2ELISA 试剂

盒,上海蓝基生物科技有限公司。美国宝特 Bio-Tek ELX800 酶标仪。TGL-16G 高速台式离心机(Anke TGL-16G),上海安亭科学仪器厂。

1.2 实验动物选择与驯化

同批次的 6 周龄 C57BL/6J 近交系小鼠,考虑到雌性动物生理周期不同步对节律研究结果的影响故统一选择雄性^[4],购自四川大学华西医院实验动物中心,SPF 级[实验动物许可证号 SCXK(川)2009-09]。动物置于成都中医药大学时间医学测试室中隔离单元内含转轮的笼中,连续监测 3 d,其平均踏动转轮转数大于 10 000 次/d 的动物留用。隔音、避光、恒温(20 \pm 1) $^{\circ}$ C、通风、相对湿度 60%~65%,自由摄食饮水。实验开始时将动物的转轮活动与光暗同步 10 d(自动光-暗控制 L:D 为 12:12,07:00—19:00 为光期),10 d 后关闭光源使动物处于自由运行状态即 DD 状态。

1.3 实验分组

按照 SPSS16.0 软件产生的随机数字表将筛选出的动物随机分为以下 3 组:空白组、模型组、电针组,每组 6 只。

1.4 造模方法及模型评价

动物在 DD 状态下驯化 10 d 后开始造模。将购自武汉大学中国典型培养物保藏中心的 MA-782 小鼠乳腺癌细胞株复苏,置于含 10% 胎牛血清(美国 Gibco 公司生产)的 RPMI-1640 培养液(美国 Gibco 公司生产)中,37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养箱中培养,隔日换液 1 次,3~4 d 传代 1 次。取指数生长期细胞予 PBS 洗涤,胰酶适度消化,吹打成细胞悬液,离心,PBS 重悬细胞,调整细胞浓度至 1 \times 10⁷ mL⁻¹(活细胞占细胞总数 90%),将细胞悬液 0.2 mL 皮下接种于小鼠左侧腋下。注射细胞悬液后隔日开始观察小鼠左侧腋下肿瘤的生长情况,当肿瘤大小为 2 mm \times 2 mm 时,判断为模型建立成功;任选已成瘤小鼠 1 只,麻醉处死并解剖采集原位肿瘤,用 10% 甲醛固定,石蜡切片,HE 染色,显微镜下拍片并观察肿瘤模型构建情况。

1.5 干预方法

造模成功后继续自由运行状态 7 d 后开始电针。将电针组动物提前 5 min 使用滚筒法固定,于

上述特定时相点,参照李仲仁主编的《实验针灸学》选取动物“百会”、“长强”2 个穴位进行针刺。针灸针采用中国苏州医疗用品有限公司生产的华佗牌针灸针(GB2024-1994),规格 $\Phi 0.30 \text{ mm} \times 13 \text{ mm}$ 。针尖向后平刺百会穴约 0.5 寸;针尖向前平刺长强穴约 0.5 寸。针刺后连接电针仪,百会穴连接正极,长强穴连接负极。电针仪采用南京济生医疗科技有限公司所生产的韩氏穴位神经刺激仪 HANS-200 (YZB/苏 0362-2007),选择经针模式,频率 2/15 Hz,电流 0.5 mA,每次 15 min,每天 1 次共电针 3 次。非电针组动物均接受与电针组动物相同的捆绑固定,以平衡捆绑刺激的影响。

1.6 观察指标

①SCN 内 $\text{TGF}\alpha$ 含量、SPZ 内 EGFR 水平检测:取组织充分剪碎或研磨,加入适量的 0.9% NaCl,充分混匀,离心 $6\,000 \text{ r/min} \times 15 \text{ min}$,取上清约 $300 \mu\text{L}$, -20°C 保存待检。②瘤组织(或正常乳腺组织) $\text{TGF}\alpha$ 和 EGFR 水平检测:组织处理方法同“①”项。③血清 $\text{TGF}\alpha$ 和 EGFR 水平检测:采集血液后静置 30 min,离心 $3\,000 \text{ r/min} \times 15 \text{ min}$ 分离,取上清约 $300 \mu\text{L}$, -20°C 保存待测。检测采用酶联免疫吸附法,具体操作按照试剂盒步骤进行。

1.7 统计分析

应用 SPSS16.0 对各项指标进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 的形式显示,符合正态分布者组间比较采用单因素方差分析,方差齐选用 LSD 法,方差不齐选用 Tamhane's T_2 检验;不符合正态分布者组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验。 $P < 0.05$ 认为差异显著,具有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠乳腺癌模型构建情况

2.1.1 肿瘤生长情况

乳腺癌细胞悬液注射后约 5~7 d 在小鼠接种部位可触及肿瘤结节,呈圆形、椭圆形或分叶状生长,质地较硬,成瘤率 100%。

2.1.2 病理形态学观察

HE 染色下,动物肿瘤细胞呈小团状,条索状,腺腔样分布,有明显坏死,间质较少,肿瘤细胞向横纹肌、脂肪组织浸润,瘤细胞丰富,排列拥挤,瘤细胞大小不等,相互各异,胞浆较丰富,红染边界不清,瘤细胞核大小不等,圆形、卵圆形、三角形、多边形等,核膜较厚,清楚,染色质粗颗粒状,分布不均,可见 1~2 个较明显的核仁,核染色深,可见核分裂象,见

图 1。

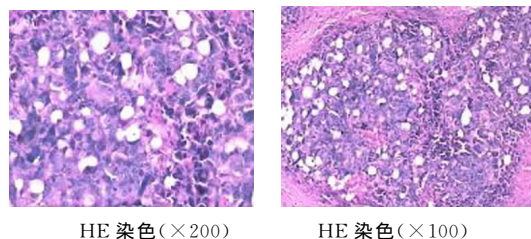


图 1 C57BL/6J 小鼠乳腺癌移植瘤 HE 染色照片

2.2 电针干预对荷乳腺癌小鼠 SCN 及外周血清、瘤组织中输出信号分子水平的影响

2.2.1 电针干预对荷乳腺癌小鼠 SCN 及外周血清、瘤组织中 $\text{TGF}\alpha$ 水平的影响

见表 1。

表 1 各组荷乳腺癌小鼠电针后不同部位 $\text{TGF}\alpha$ 水平比较($\bar{x} \pm s, \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}, n=6$)

组别	SCN	血清	瘤组织
空白组	611.90 ± 49.24	328.25 ± 64.89	446.88 ± 68.60
模型组	627.54 ± 18.32	$437.56 \pm 84.94^*$	$518.92 \pm 37.77^*$
电针组	620.10 ± 13.10	377.97 ± 88.77	477.1 ± 44.92

注:与空白组相比,* $P < 0.05$ 。

由表 1 可知,电针后各组 SCN 中 $\text{TGF}\alpha$ 水平两两比较 $P > 0.05$,各组间无统计学差异;模型组与空白组比较,模型组均值大于空白组,说明荷乳腺癌小鼠 SCN 中 $\text{TGF}\alpha$ 水平有增高趋势,但二者无统计学差异;电针组与模型组比较,电针组均值低于模型组,说明电针可以在一定程度上降低荷乳腺癌小鼠 SCN 中 $\text{TGF}\alpha$ 水平,但与模型组比较差异无统计学意义。电针后各组外周血清中 $\text{TGF}\alpha$ 水平比较,模型组均值大于空白组,差异具有统计学意义,说明荷乳腺癌小鼠外周血清中 $\text{TGF}\alpha$ 水平明显增高;电针组均值低于模型组,说明电针可以在一定程度上降低荷乳腺癌小鼠外周血清中 $\text{TGF}\alpha$ 水平,但与模型组比较差异无统计学意义。电针后各组瘤组织中 $\text{TGF}\alpha$ 水平比较,模型组均值大于空白组,差异具有统计学意义,说明荷乳腺癌小鼠瘤组织中 $\text{TGF}\alpha$ 水平明显增高;电针组均值低于模型组,说明电针可以在一定程度上降低荷乳腺癌小鼠瘤组织中 $\text{TGF}\alpha$ 水平,但与模型组比较差异无统计学意义。

2.2.2 电针干预对荷乳腺癌小鼠 SPZ 及外周血清、瘤组织中 EGFR 水平的影响

由表 2 可知,电针后各组小鼠 SPZ 中 EGFR 水平比较,模型组均值大于空白组,说明荷乳腺癌小鼠 SPZ 中 EGFR 水平有增高的趋势,但与正常小鼠比较无统计学差异;电针组均值小于模型组,其差异具

有统计学意义,说明电针可以明显降低荷乳腺癌小鼠 SPZ 中 EGFR 水平。电针后各组小鼠外周血清中 EGFR 水平比较,模型组均值大于空白组,其差异具有统计学意义,说明荷乳腺癌小鼠外周血清中 EGFR 水平明显增高;电针组均值小于模型组,说明电针干预可以在一定程度上降低荷乳腺癌小鼠外周血清中 EGFR 水平,但与模型组比较差异无统计学意义。电针后各组小鼠瘤组织中 EGFR 水平比较,模型组均值大于空白组,其差异具有统计学意义,说明荷乳腺癌小鼠瘤组织中 EGFR 水平明显增高;电针组均值小于模型组,说明电针干预可以在一定程度上降低荷乳腺癌小鼠瘤组织中 EGFR 水平,但与模型组比较差异无统计学意义。

表 2 各组荷乳腺癌小鼠电针后不同部位 EGFR 水平比较($\bar{x} \pm s, \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}, n=6$)

组别	SPZ	血清	瘤组织
空白组	29.24±1.33	22.67±5.88	20.37±3.56
模型组	30.56±1.34	34.71±6.89*	26.62±2.24**
电针组	28.86±1.39 [△]	29.60±9.79	24.35±3.22*

注:与空白组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组相比, $\Delta P<0.05$ 。

2.2.3 电针干预对荷乳腺癌小鼠 SCN 及外周血清 PK2 水平的影响

见表 3。

表 3 各组荷乳腺癌小鼠电针后不同部位 PK2 水平比较($\bar{x} \pm s, \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}, n=6$)

组别	SCN	血清
空白组	9.76±0.10	2.33±0.95
模型组	9.58±0.25	1.72±0.79
电针组	9.80±0.13 [△]	2.73±0.66 [△]

注:与模型组相比, $\Delta P<0.05$ 。

由表 3 可知,电针后各组小鼠 SCN 中 PK2 水平比较,模型组均值小于空白组,说明荷乳腺癌小鼠 SCN 中 PK2 水平有降低趋势,但与正常小鼠比较差异无统计学意义;电针组均值大于模型组,其差异具有统计学意义,说明电针可以明显增高乳腺癌小鼠 SCN 中 PK2 水平。

电针后各组小鼠外周血清中 PK2 水平比较,模型组均值小于空白组,说明荷乳腺癌小鼠外周血清中 PK2 水平有降低趋势,但与正常小鼠比较无统计学差异;电针组均值大于模型组,其差异具有统计学意义,说明电针可以明显增高乳腺癌小鼠 SCN 中 PK2 水平。

3 讨论

本研究中,荷乳腺癌小鼠 SCN 中 $\text{TGF}\alpha$ 及 SPZ 中 EGFR 水平较正常小鼠有增高趋势,但二者无显著性差异;荷乳腺癌小鼠瘤组织和外周血清中 $\text{TGF}\alpha$ 及 EGFR 水平较正常小鼠明显增高,说明荷乳腺癌小鼠 $\text{TGF}\alpha$ 和 EGFR 水平的增高主要在外周尤其是肿瘤组织,进一步证实 $\text{TGF}\alpha$ 和 EGFR 与肿瘤发生发展过程关系密切;而荷乳腺癌小鼠 SCN 中枢及外周血清中调控生理活动昼夜节律的输出信号分子 PK2 有降低的趋势,结果提示 PK2 与肿瘤的发生发展可能并无直接关系,之前也尚无关于 PK2 与肿瘤发生发展关系的研究报道。有文献表明 $\text{TGF}\alpha$ 是 SCN 控制动物自发性活动昼夜节律的重要输出信号,是动物自发性活动的重要抑制剂^[5],而 PK2 作为 SCN 另一种重要的输出信号分子在神经中枢调节着生物各种生理昼夜节律^[2],本研究结果提示荷瘤小鼠 SCN 中枢抑制动物自发性活动节律的 $\text{TGF}\alpha$ 水平增高和调控昼夜活动节律的 PK2 水平降低极可能是荷瘤动物自发性活动节律紊乱的一个重要机制。电针可以明显降低荷乳腺癌小鼠 SPZ 中 EGFR 水平,增高 SCN 中枢和外周血清中 PK2 水平,提示电针干预可能通过直接调控 SCN 输出信号分子 PK2 水平以及通过对 SPZ 中 EGFR 水平的直接调控间接影响 SCN 输出信号分子 $\text{TGF}\alpha$ 水平从而影响荷乳腺癌小鼠自发性活动节律,电针对荷瘤小鼠 SPZ 中 EGFR 水平的降低作用也提示了电针干预具有一定的肿瘤抑制作用。

参考文献:

[1] Burch JB, Yost MG, Johnson W, et al. Melatonin, sleep, and shift work adaptation[J]. J Occup Env Med, 2005, 47: 893-901.
 [2] Prosser HM, Bradley A, Chesham JE, et al. Prokineticin receptor 2 (Prokr2) is essential for the regulation of circadian behavior by the suprachiasmatic nuclei[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(2): 648-653.
 [3] Negri L, Lattanz R, Giannini E, et al. Bv8, the amphibian homologue of the mammalian prokineticins, modulates ingestive behaviour in rats[J]. Br J Pharmacol, 2004, 142(1): 141-151.
 [4] 李胜吾, 薛红, 王俊娟, 等. 荷乳腺癌小鼠自发性活动节律变化特征及不同时相电针对其效应的研究[J]. 成都中医药大学学报, 2012, 35(1): 9-13.
 Li SW, Xue H, Wang JJ, et al. Rhythm variation characteristics of spontaneous activity in mice with bearing breast cancer and study on the effects of electroacupuncture at different time [J]. J Chengdu Univ Tradit Chin Med, 2012, 35(1): 9-13.
 [5] Kraves S, Weitz CJ. A role for cardio trophin-like cytokine in the circadian control of mammalian locomotor activity[J]. Nat Neurosci, 2006, 9(2): 212-219. (编辑:董宇)