

力减弱使膝关节在负重时不稳定。通过训练可使一系列起促进作用的中枢神经系统的感觉传入和闸门控制对疼痛知觉的调节发生改变,促进了静脉和淋巴回流,有效改善关节软骨营养,增强了关节软骨的强度、厚度和弹性,使膝关节伸直位最大负荷量和膝关节的稳定性得到增强和恢复,因而可明显减轻疼痛并有益负重,从而使膝关节的稳定性和运动机能进一步稳固和提高^[13-14]。这也是本研究要求两组患者均进行功能训练的原因。KOA患者常因膝关节的疼痛而表现出步行能力和起坐能力的下降,而步行与起坐活动在日常生活活动中必不可少,因此,除VAS疼痛评分外,对这两种功能活动进行评价十分有意义。

参考文献

[1] 高解春,王耀平.老年骨关节炎的诊治进展[J].实用老年医学,2008,22(1):12—13.
[2] 曾庆余.骨关节炎[M].天津:天津科学技术出版社,1999.38—41.

[3] 杨清山口述,李荣华,张秀瑞整理.杨清山按摩经验集[M].山西:山西科学技术出版社,1999.95—110.
[4] 黄小静,窦祖林,丘卫红,等.动态姿态平衡仪训练对脑卒中偏瘫患者平衡功能的影响[J].中国康复医学杂志,2011,26(11):1031.
[5] 恽晓平.康复疗法评定学[M].北京:华夏出版社,2005.88—89.
[6] 卫荣.骨性关节炎的非药物治疗[J].中国康复理论与实践,2004,10(8):483—485.
[7] 陈键.个体化综合治疗老年膝骨关节炎127例[J].现代中西医结合杂志,2012,21(1):62—63.
[8] 张晓玲.骨关节炎——老龄化社会的重要医学问题[J].世界科学,2012,(1):45—46.
[9] Brandon SC, Deluzio KJ. Robust features of knee osteoarthritis in joint moments are independent of reference frame selection[J]. Clin Biomech (Bristol, Avon), 2011, 26(1):65—70.
[10] 唐玉秀,耿恩广.针灸学[M].北京:学苑出版社,1999.512—567.
[11] 中华医学会骨科学分会.骨关节炎诊治指南(2007年版)[J].中华骨科杂志,2007,27(10):793—796.
[12] Howe TE, Rafferty D. Quadriceps activity and physical activity profiles over long durations in patients with osteoarthritis of the knee and controls[J]. J Electromyogr Kinesiol, 2009, 19(2):e78—83.
[13] 刘克敏.PT训练股四头肌治疗膝骨性关节炎[J].中国康复理论与实践,2001,7(3):126—127.
[14] 姜淑云,褚立希,查建林,等.理筋手法结合功能训练治疗膝关节炎的步态特征研究[J].中国康复医学杂志,2011,26(11):1058.

·基础研究·

耐力运动对雌激素依赖性乳腺癌小鼠肿瘤血管生成的影响

韩冠宙¹ 曹国良² 韩江²

摘要

目的:探讨耐力运动对雌激素依赖性乳腺癌肿瘤血管生成的影响。

方法:40只雌性BALB/c小鼠随机分为2组,一组小鼠在跑台上进行8周持续耐力运动,另一组不进行运动。之后给予2组小鼠注射雌激素依赖性MC4L2癌细胞,肿瘤形成后,随机再将这两组小鼠以每组10只,分为4组,即:运动-肿瘤-运动组(A);运动-肿瘤-休息组(B);休息-肿瘤-运动组(C)和休息-肿瘤-休息组(D)。A、C组小鼠进行为期6周的耐力运动,每周运动5天。期间,每周测量肿瘤体积。最后,处死小鼠,摘除肿瘤组织,制成匀浆ELISA定量法测量细胞因子白细胞介素-6(IL-6)和血管内皮生长因子(VEGF)的表达水平。

结果:A、C组与B、D组相比,IL-6($P=0.001$)、VEGF($P=0.0001$)和肿瘤体积($P=0.0001$)显著降低。

结论:运动可致使乳腺癌细胞致瘤小鼠的肿瘤组织内促炎症细胞因子水平降低,抑制肿瘤血管生成因子表达增加。因此,运动对雌激素依赖的乳腺癌可能有一定的辅助治疗与预防作用。

关键词 乳腺癌;耐力运动;肿瘤血管生成

中图分类号:R493 文献标识码:B 文章编号:1001-1242(2015)-06-0584-03

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2015.06.014

1 安徽省巢湖学院体育系,238024; 2 上海交通大学医学院附属第三人民医院

作者简介:韩冠宙,男,教授; 收稿日期:2014-10-25

乳腺癌是影响全世界女性身体健康的危险因素之一。有研究报道,在西方国家的所有癌症中,乳腺癌约占三分之一左右^[1]。乳腺癌同样也是影响中国女性一个重大的健康问题,近些年在我国的发病率有呈逐年增加的趋势。乳腺癌分为雌激素依赖型和非依赖型。大多数乳腺癌是起源于乳腺管或小叶细胞系的上皮癌^[2]。而运动训练被公认为是预防慢性炎症疾病的一个有效因素^[3]。适度的身体活动在预防炎症疾病包括乳腺癌中起重要作用。本实验旨在探讨规律的身体活动与乳腺癌肿瘤血管生成的关系,从而为研究身体活动抑制肿瘤生长功效提供思路。

1 资料与方法

1.1 实验方案

40只BALB/c小鼠(3—5周龄,体重14—15g),购于中科院上海动物实验中心,分笼饲养。适应环境1周后(光照、温度和湿度),小鼠随机分为2组。一组依据表1在跑台上进行8周耐力运动,另一组不进行运动。所有小鼠接受肿瘤细胞注射,肿瘤形成后,随机选择训练组一半小鼠和未训练组一半小鼠,接着这些小鼠进行跑台耐力运动。因此,研究中小鼠分为4组,每组10只。即运动-肿瘤-运动组(A组);运动-肿瘤-静息组(B组);静息-肿瘤-运动组(C组)和静息-肿瘤-静息组(D组)。运动频率为每周5天。实验于2014年2月1日在上海交通大学医学院附属第三人民医院进行,2014年5月6日结束。

1.2 细胞培养

雌激素受体阳性(ER+)乳腺导管癌MC4-L2细胞购于上海亿欣生物科技有限公司。MC4-L2细胞培养于包含15mM HEPES、谷氨酰胺、100μg/ml青霉素、100μg/ml链霉素和10%FBS的DMEM/介质的T75烧瓶中。细胞填充烧瓶90%后,倒出介质中上清液。用0.025%胰蛋白酶分离烧瓶底部细胞,用PBS冲洗后和用10%FBS酶中和,所有烧瓶内容物导入离心管中,1200r/min离心3—5min。倒出上清液,细胞板溶入含有10% FBS介质中。用台盼蓝测定细胞活力,用血细胞计数器计数细胞。

1.3 肿瘤形成

细胞培养和计数后,适当计量氯胺酮和甲苯噻嗪麻醉雌性BALB/c小鼠,小鼠右前肢皮下注射 1×10^7 个细胞。大约10—14天后,注射部位出现明显的肿瘤。

1.4 肿瘤体积的测量

两个维度测量肿瘤大小。较大的肿瘤维度作为长度(L),与之垂直的维度作为宽度(W)。用数字测径仪每周测量一次肿瘤的长度和宽度。用公式: $V = \pi/6(w \times L^2)^{[10]}$ 计算肿瘤体积。最后一天测量值除以第一天测量值,决定最后肿瘤体积。

表1 跑台运动方案

组别	速度(m/min)	时间(min)
适应阶段	6—12	20
肿瘤细胞种植前		
第一个2周	14	30
第二个2周	A组	35
第三个2周	B组	35
第四个2周	20	40
肿瘤形成后		
第一个2周	14	25
第二个2周	A组	30
第三个2周	C组	30

1.5 IL-6和VEGF的测量

处死小鼠后,立即摘除肿瘤组织,清除中心坏死部分。肿瘤外部-70℃液氮冷冻。肿瘤组织用lyses溶液匀浆,Bradford法提取总蛋白,上清液用于ELISA。测量变量,用ELISA定量。用Ab100713 ELISA试剂盒和 ab100752试剂盒分别测量IL-6和VEGF。

1.6 统计学分析

使用SPSS18.0进行数据分析。单因素方差分析和Tukey post hoc检验用于测定变量间的显著差异。数据表达为平均值±标准差。

2 结果

IL-6和VEGF水平见表2。依据研究结果,A组的IL-6和VEGF水平最低,在完成耐力运动的2个组(A和C组)IL-6和VEGF水平显著降低。

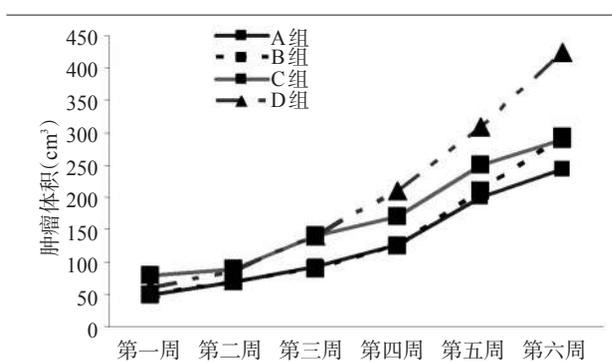
单因素方差分析和Tukey post hoc检验结果表明组间IL-6($P=0.001$)、VEGF($P=0.0001$)和肿瘤体积($P=0.0001$)有显著差异。事实上,运动能引起测量变量的静息值,A组与B组和D组的研究参数有显著差异。C组与D组也有显著差异,表明耐力运动有辅助效应。C组与B组的VEGF差异显著($P=0.001$),但IL-6水平没有差异,表明耐力运动对肿瘤生长有阻碍作用。图1显示,4组6周内肿瘤体积的变化,但A组和C组的生长回归曲线较平缓。C组与B组相比,肿瘤体积较大。应该注意到C组平均原发肿瘤体积比其他组大,但其生长回归小于D组和B组。肿瘤体积与IL-6 ($r=0.729 P=0.0001$)和VEGF ($r=0.45 P=0.01$)强烈相关。

表2 各组IL-6的组织浓度比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

组别	IL-6组织浓度	VEGF组织浓度
A组	75.1±25.7	246±60.2
B组	158.3±32.2 ^①	768±58.6 ^②
C组	124.7±25.6	341±25.6
D组	195.8±30.5 ^②	739±123.5 ^②

注:①与A组相比 $P<0.05$;②与C组相比 $P<0.05$

图1 各组肿瘤体积的变化



D组和B组肿瘤生长率较高,但最后生长率降低。

3 讨论

血管发生是肿瘤持续生长和扩散的先决条件。达到特定的程度后,实体瘤中心形成若干个缺氧区,氧气和养分不能满足代谢的需要。缺氧和坏死应激时肿瘤组织可以表达和产生几种蛋白质因子。这些蛋白质因子实际上是一系列血管生成肽。细胞因子如IL-6和IL-8激活广泛的信号转导通路,调节血管发生过程。研究表明,这些细胞因子导致NF-κB、JNK、ERK和P38信号通路活化^[1],最后刺激血管内皮细胞产生VEGF。IL-6能上调肿瘤细胞内血管发生和抗凋亡蛋白而加速肿瘤生长。IL-6在血管生成过程中与其他细胞因子一起起关键作用,刺激血管内皮细胞产生VEGF。VEGF不仅是血管内皮细胞的一个有效丝裂原,而且是一个血管渗透因子,引起纤维蛋白和纤连蛋白的持续产生,促进组织基质的产生^[2]。研究中观察到,肿瘤形成后,完成耐力运动组的肿瘤组织的IL-6和VEGF水平显著降低。规律运动降低肿瘤组内促炎症细胞因子如IL-6水平。IL-6通过刺激缺氧诱导因子-α,运动组IL-6降低表明规律身体活动通过抑制促炎症细胞因子的产生而降低肿瘤组织内血管发生的明显作用。这些结果与肿瘤生长率,即运动组肿瘤生长抑制一致。

实验中运动组肿瘤体积降低,说明IL-6水平与肿瘤体积强烈相关($r=0.729$),运动组肿瘤体积降低归因于肿瘤内炎症因子水平降低。就这点来说,研究结果能够更好的证实炎症因子与肿瘤体积变化间的关系,那么肿瘤微环境中的细胞因子水平比全身性和循环细胞因子更有效。

IL-6在肿瘤进程和破坏肿瘤细胞中起双重作用。其可以刺激自然杀伤细胞和T-细胞毒性细胞,与破坏肿瘤形成初期有关,但当肿瘤内IL-6产量长期增长或免疫细胞持续出现时,它们通过关于血管发生和抗凋亡活性在肿瘤进程而显得重要。IL-6通过上调肿瘤细胞中血管生成和抗凋亡蛋白而增加肿瘤生长。在雌激素受体依赖的乳腺癌,当雌激素与受体结合后能激活NF-κB,其导致IL-6水平增加,这导致程序

性细胞死亡因子4和原肌球蛋白1抑制和上调B细胞淋巴瘤蛋白,通过IL-6/STAT3通路,刺激诱导VEGF产生而使血管发生。所以,IL-6在乳腺癌中起到抗凋亡作用。研究显示A组和C组耐力运动降低乳腺癌中IL-6和VEGF水平。既然抑制肿瘤内IL-6^[13]和抑制VEGF^[14]是治疗预防肿瘤生长的靶点,而且规律的身体活动有这样的作用,可以证明耐力运动对抑制肿瘤生长有辅助效应,至少在雌激素受体依赖的乳腺癌中。

结果显示,A组IL-6和VEGF水平最低,A组与C组间比较虽无显著性差异,可能因A组成癌前、后运动的缘故,二项指标水平相对较低。规律的身体活动由于其抗炎、心理和代谢效应及其增强免疫系统而促进癌症的预防和治疗。根据测量因素,比较B组和C组,运动的预防和辅助作用是显而易见的。总之,研究数据提供了中等强度的耐力运动降低肿瘤内炎症和血管发生细胞因子水平,进而降低肿瘤体积。

参考文献

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics 2013 [J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1):11—30.
- [2] Hong DS, Angelo LS, Kurzrock R. Interleukin-6 and its receptor in cancer[J]. Cancer, 2007, 110(9):1911—1928.
- [3] 王治伟,迟琼,万利. 乳腺癌患者血清IL-6、IL-8、IL-10和TNF-α的水平变化及临床意义[J]. 广州医药,2012,03:45—47.
- [4] 刘艳波,蔡莲莲,赵志光. IL-6和VEGF在宫颈癌组织中的表达及其临床意义[J]. 现代肿瘤医学,2008,12:2173—2175.
- [5] Purohit A, Newman SP, Reed MJ. The role of cytokines in regulating estrogen synthesis: implications for the etiology of breast cancer[J]. Breast Cancer Res, 2002, 4:65—69.
- [6] Dethlefsen C, Højfeldt G, Hojman P. The role of intratumoral and systemic IL-6 in breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2013,138(3): 1—8.
- [7] Schneider BP, Miller KD. Angiogenesis of breast cancer[J]. J Clin Oncol, 2005, 23:1782—1790.
- [8] Ghaderi A, Hosseini A, Jaberipour M, et al. Os-13: VEGF, IL-8 and MMP2 expression profile in adipose-derived stem cells (ASCs) of breast cancer patients[J]. Cell J (Yakhteh), 2010:1—2.
- [9] Lee K, Qian DZ, Rey S, et al. Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells[J]. Proc Natl Acad Sci, 2009, 106:2353—2358.
- [10] Jones LW, Viglianti BL, Tashjian JA, et al. Effect of aerobic exercise on tumor physiology in an animal model of human breast cancer[J]. J Appl Physiol, 2010, 108:343—348.
- [11] Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K. An epigenetic switch involving NF-κB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 Links inflammation to cell transformation[J]. Cell, 2009, 139:693—706.
- [12] Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow?[J]. Lancet,2001, 357:539—545.
- [13] Paul-Pletzer K. Tocilizumab: blockade of interleukin-6 signaling pathway as a therapeutic strategy for inflammatory disorders[J]. Drugs Today, 2006, 42:559—576.
- [14] Benoy I, Salgado R, Colpaert C, et al. Serum interleukin 6, plasma VEGF, serum VEGF, and VEGF platelet load in breast cancer patients[J]. Clin Breast Cancer, 2002,2:311—315.