

肝气郁结对结肠癌模型小鼠肝转移的影响

马梦雨 杨晓燕 赵璐 梁芳 张勇 徐可 樊瀛哲 许建华

【摘要】 目的 通过构建肝气郁结证模型,观察肝气郁结对结肠癌肝转移的影响并探讨 β -AR 信号通路在其中的作用机制。方法 通过束缚制动法构建肝气郁结证模型,将 BALB/C 裸小鼠随机分为空白对照组、普萘洛尔对照组、ICI118,551 对照组、空白肝郁组、普萘洛尔肝郁组、ICI118,551 肝郁组,共六组,每组 6 只。ELISA 法检测血清、脾种植瘤肾上腺素(epinephrine, E)、去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)含量; qRT-PCR 和 Western blot 法检测脾脏种植瘤组织转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和基质金属蛋白酶-9(matrix metalloprotein-9, MMP-9)表达情况;免疫组化法观察肝转移瘤组织 VEGF 和 CD31 蛋白表达情况。结果 与空白对照组相比,空白肝郁组小鼠肝脏重量明显升高($P < 0.01$),并能升高小鼠血清 NE、E 水平及脾脏 NE 水平($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.05$),差异具有统计学意义;与对照组相比,肝郁组小鼠脾脏肿瘤组织中 TGF- β 、IL-6、VEGF、MMP-9 蛋白以及 mRNA 的表达显著升高($P < 0.01$),而给予普萘洛尔或 ICI118,551 后表达降低($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$),差异具有统计学意义;肝郁组肝转移瘤 VEGF、CD31 表达明显高于对照组($P < 0.01$),给予普萘洛尔或 ICI118,551 后,则表达降低($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$),差异有统计学意义。结论 肝气郁结可通过介导 β 2-AR 信号通路促进结肠癌肝转移。

【关键词】 肝气郁结; 结肠癌; 肝转移; β -AR 信号通路

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.06.010

Effect of liver qi stagnation on liver metastasis of mouse model of colon cancer MA Mengyu, YANG Xiaoyan, ZHAO Lu, et al. Department of Oncology, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 201203, China

Corresponding author: XU Jianhua, E-mail: xujianhua50@126.com

【Abstract】 Objective The liver qi stagnation syndrome model was established to observe the effect of liver qi stagnation on liver metastasis of colon cancer and the role of β -AR signal pathway in it. **Methods** BALB/C mice were randomly divided into blank control group, propranolol control group, ICI118,551 control group, liver depression group, liver depression treated with propranolol group, liver depression treated with ICI118,551 group. The expressions of TGF- β , IL-6, VEGF and MMP-9 were detected by ELISA and Western blot. The expressions of VEGF and CD31 in liver metastatic tissues were observed by immunohistochemistry. **Results** Compared with the blank control group, the liver weight of the mice was significantly increased of liver depression group ($P < 0.01$), and the level of NE and E in blood was increased ($P < 0.01$, $P < 0.05$) and the level of NE in spleen was increased ($P < 0.05$). The expression of TGF- β , IL-6, VEGF, MMP-9 and mRNA in spleen tumor of liver depression group was significantly higher than those of control group ($P < 0.01$), and the expression was decreased after treated with propranolol or ICI118,551 ($P < 0.01$, $P < 0.05$). The expression of VEGF and CD31 in liver metastases

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81573940); 国家自然科学基金青年项目(81403350); 上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划(中医药专门人才计划项目)(ZY3-RCPY-3-1012)

作者单位: 200062 上海中医药大学附属普陀医院中医肿瘤科[马梦雨(博士研究生)、梁芳、张勇、徐可、樊瀛哲、许建华], 人事处(杨晓燕); 无锡市中医医院肿瘤科(赵璐)

作者简介: 马梦雨(1989-), 女, 2014 级在读博士研究生。研究方向: 中医内科学。E-mail: intercity@163.com

通信作者: 许建华(1962-), 博士, 主任医师, 博士生导师。研究方向: 中医肿瘤学。E-mail: xujianhua50@

126.com

of liver depression group was significantly higher than those in control group ($P < 0.01$), and the expression was decreased after treated with propranolol or ICI118,551 ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusion** Liver qi stagnation can promote liver metastasis of colorectal carcinoma by mediating β_2 -AR signal pathway.

【Key words】 Liver qi stagnation; Colon cancer; Liver metastasis; β -AR signal pathway

结肠癌是临床最常见的恶性肿瘤之一,发病率逐年增高^[1]。肝脏作为结肠癌最常见的转移部位,约 50% ~ 60% 的患者会出现肝转移,其中 20% ~ 34% 的患者在初次就诊时已有肝转移^[2]。因此,防治结肠癌肝转移是目前临床亟需解决的关键问题。随着传统的生物学模式逐渐向“生物—心理—社会医学模式”发生转变,精神、心理因素与肿瘤的关系也日益得到重视,中医学也认为其在疾病发生发展中起到了重要的作用。肝气郁结是肿瘤患者常伴有的临床症状,本实验以结肠癌肝转移小鼠作为研究对象,并引入肝气郁结证模型,旨在观察肝气郁结对肿瘤转移的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 4 周龄 BALB/C 裸小鼠,雄性,体重 18 ~ 20 g,共 38 只,购自上海 SLAC 实验动物中心,合格证号:SCXK[沪]2012-0002。实验动物饲养在 SPF 及层流架中,环境温度(22±2)℃,照明时间 12 小时/天。

1.2 实验药物与试剂

盐酸普萘洛尔标准品(E4642, Sigma-Aldrich, 美国)、ICI118,551((±)-1-[2,3-(二氢-7-甲基 1H-茚-4-基)氧]-3-[(1-甲基乙基)氨基]-2-丁醇盐酸盐)(I127, Sigma, 美国); Anti-MMP9 antibody(ab119906)、Anti-VEGF antibody(ab1316)、Anti-IL-6 antibody(ab154367)、Anti-TGF- β antibody(ab28364)、Anti-CD31 antibody(ab31013),均购自美国 Abcam; FITC anti-mouse/human CD11bPE anti-mouse F4/80(123110、101206, BioLegend, 美国); Anti-GAPDH antibody(PB0141, 武汉博士德生物工程有限公司, 武汉); 小鼠去甲肾上腺素 ELISA Kit(2547, AMEKO, 日本), 小鼠肾上腺素 ELISA Kit(2998, AMEKO, 日本); PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser、PrimerScript™ RT reagent Kit、SYBR Premix Ex Taq™(RR047A, TaKaRa, 大连); TRIzol(15596-026, Thermo Scientific, 美国); 引物合成于上海生工生物工程股份有限公司。

1.3 实验仪器

37℃、5% CO₂ 细胞培养箱(7000), 购于美国

Napco 公司; 离心机(5810R), 购于德国 Eppendorf 公司; 超净工作台(SCZ-4A1), 购于新加坡 ESCO 公司; 荧光倒置显微镜(CKX41), 购于日本 Olympus 公司; 酶标仪(1100), 购于美国 Agilent 公司; 流式细胞仪(LSR II), 购于美国 BD 公司; 植入式胶囊渗透压泵(Model 1004), 购于 Alzet 公司。

1.4 肝气郁结模型建立

肝气郁结模型构建参照文献^[12], 随机取 19 只小鼠建立肝气郁结模型, 将小鼠放入小鼠固定器中, 以限制小鼠活动, 使其不能前进、后退及转身, 每天 6 小时, 每次时间随机, 共束缚 35 天。剩余 19 只不作处理, 但在肝郁组小鼠束缚制动期间, 同时断水断食。

1.5 结肠癌肝转移模型建立

在束缚刺激后第 7 天, 运用脾脏注射 HT-29 结肠癌细胞制作结肠癌肝转移模型。裸小鼠腹腔注射 2.5% 戊巴比妥钠麻醉, 将手术区消毒, 腹部切口平行于左肋下缘, 注射器将 HT-29(1×10^7) 细胞悬液注入脾脏, 按压 1 ~ 2 分钟后缝合, 造模过程中除空白肝郁组死亡 1 只, 剩余 18 只, 其余全部存活。

1.6 实验分组及治疗

将 18 只经过束缚及注射 HT-29 结肠癌细胞的小鼠随机分为空白肝郁组、普萘洛尔肝郁组、ICI118,551 肝郁组, 每组各 6 只。将 19 只经 HT-29 脾脏注射并未经束缚处理的小鼠随机分为空白对照组、普萘洛尔对照组、ICI118,551 对照组, 每组 6 只, 多余 1 只弃去。注射 HT-29 肿瘤细胞后 1 天开始给药, 普萘洛尔组给予植入式胶囊渗透压泵 10 mg/(kg·d), 持续给药, ICI118,551 组给予每日 30 μ L, 25 μ M ICI118,551 腹腔注射给药, 连续给药 27 天, 对照组给予等量生理盐水。注射肿瘤细胞后 28 天处死裸小鼠, 取外周血、脾原发瘤、肝转移瘤, 于 -80℃ 保存备用。

1.7 ELISA 法检测外周血、脾肿瘤组织 E、NE 含量

实验结束后, 眼球取血法取小鼠外周血 1 mL, 3000 r/min 离心 10 分钟, 取上清液, 于 -20℃ 冰箱冻存备用。处死小鼠, 无菌取出脾脏, 精确称量脾种植瘤重量, 加入 9 倍体积的冷生理盐水, 用捣杆研磨 6 ~ 8 分钟, 充分研碎, 使组织匀浆化。具体操作步骤严格按照 ELISA 试剂盒的说明书进行。试验后

运用 450 nm 酶标仪测光密度 (optical density, OD) 值。分别检测不同组小鼠血清以及脾脏肿瘤组织的 E、NE 的浓度。

1.8 RT-PCR 法检测 VEGF、MMP-9、TGF- β 、IL-6

采用实时荧光定量 PCR 法检测,将脾肿瘤组织从 -80°C 中取出,Trizol 一步法试剂盒提取组织细胞总 RNA,分光光度计测量 OD 260/280 值均在 1.8 ~ 2.0。用 20 μL 反应体系将 RNA 反转录成 cDNA,取 5 μL 总 RNA 逆转录为 cDNA。取所得的 cDNA 2 μL ,用 20 μL 反应体系进行 PCR 扩增。上述反应体系 94°C 预变性 1 分钟,然后进行 40 个循环扩增, 94°C 15 秒, 60°C 34 秒,最后 72°C 分钟。用相对定量 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算各个样本目的基因的表达变化。

表 1 引物序列

Target Gene		Sequence(5' - 3')
IL-6	Forward	TAGTCCTCCTACCCCAATTTCC
	Reverse	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
VEGF	Forward	GCCAGACAGGTTGCCATAC
	Reverse	GGAGTGGGATGGATGATGTCAG
MMP-9	Forward	CTGGACAGCCAGACACTAAAG
	Reverse	CTCGCGGCAAGTCTTCAGAG
TGF- β	Forward	AGACCACATCAGCATTGAGTG
	Reverse	GGTGGCAACGAATGTAGCTGT
GAPDH	Forward	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
	Reverse	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

1.9 Western Blot 法检测 VEGF、MMP-9、IL-6、TGF- β

从脾脏原发瘤组织 100 mg, 研磨后, 加入 RIPA 裂解液 200 μL 。BCA 蛋白浓度测定法检测蛋白浓度。样品蛋白变性后, 取 50 g 样品蛋白经 100 g/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并转移至硝酸纤维素膜上。封闭液封闭 1 小时, 分别加入 IL-6 (1 : 500)、VEGF (1 : 1000)、MMP-9 (1 : 500)、GAPDH (1 : 1000) 稀释抗体孵育, 4°C 过夜。用加入 1 : 10000 稀释的辣根过氧化物酶偶联物二抗, 室温孵育 1 小时, TBST 漂洗后 NBT/BCIP 显色, 用凝胶成像图像分析系统照相并记录结果, Image-lab 图像分析系统分析比较脾脏肿瘤组织中 VEGF、MMP-9、IL-6 的表达情况。

1.10 免疫组织化学法检测肝转移瘤中 VEGF、CD31 的表达

将肝转移瘤于 10 % 福尔马林中固定, 常规石蜡包埋、切片, 脱蜡、脱水, 根据 SABC 免疫组化试剂盒说明书进行: 滴加 5 % BAS, 室温孵育 20 分钟, 分

别滴加一抗: VEGF (1 : 1000)、CD31 (1 : 1000), 37°C 孵育 60 分钟, 并用含有靶抗原的病理组织切片进行阳性对照, PBS 冲洗; 滴加已生物素化的羊抗兔 IgG 二抗 (1 : 100), 37°C 孵育 20 分钟, PBS 冲洗; 滴加 SABC, 37°C 孵育 20 分钟, PBS 冲洗; 滴加 DAB 溶液, 镜下观察 35 秒后终止反应, 蒸馏水冲洗。乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片结果判读, 染色强度由 Image-Pro 6.0 进行。随机选取 3 个不重叠的代表性视野, 计算平均光密度值 (mean density), 比较各组肝转移瘤 VEGF、CD31 表达情况。

1.11 统计学处理

采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析, 计量资料均采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 数据满足正态分布, 经方差齐性检验, 各组方差齐, 故两样本比较采用 Student's *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠肝转移情况比较

对小鼠施加肝郁刺激后, 脾脏重量较其相应对照组增大, 但未达到统计学意义。各肝郁组小鼠肝转移灶较其相应对照组均显著增多, 肝郁组小鼠给予普萘洛尔或 ICI118,551 治疗后, 肝转移较空白肝郁组均减少, 普萘洛尔肝郁组和 ICI118,551 肝郁组分别与空白肝郁组相比脾脏重量减轻, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 不同药物处理后小鼠脾脏、肝脏重量比较 ($\bar{x} \pm s, n=6, g$)

组别	脾脏重量	肝脏重量
空白对照组	0.152 \pm 0.012	2.637 \pm 0.172
普萘洛尔对照组	0.147 \pm 0.015	2.577 \pm 0.188
ICI118,551 对照组	0.140 \pm 0.012	2.514 \pm 0.179
空白肝郁组	0.165 \pm 0.013	4.169 \pm 0.276 ^a
普萘洛尔肝郁组	0.156 \pm 0.016	3.373 \pm 0.276 ^b
ICI118,551 肝郁组	0.163 \pm 0.016	3.316 \pm 0.280 ^b

注: 与空白对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与空白肝郁组比较, ^b $P < 0.05$ 。

2.2 空白对照组、空白肝郁组小鼠血清及脾脏种植瘤中 E、NE 含量变化

肝郁组小鼠血清 NE、E 水平较对照组均显著升高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。脾脏种植瘤 NE 较对照组显著升高 ($P < 0.01$), 同时脾脏种植瘤组织中 E 也较对照组升高, 但未达到统计学差异, 提示慢性束缚制动能提高模型动物外周血、荷瘤组织中儿茶酚胺类物质水平。见表 3。

2.3 各组小鼠脾脏肿瘤组织中 IL-6、VEGF、MMP-9、TGF-β mRNA 表达的变化

通过 RT-PCR 检测脾脏种植瘤中 TGF-β、IL-6、VEGF 和 MMP-9 的 mRNA 表达量,结果显示,空白肝郁组小鼠 TGF-β、IL-6、VEGF 和 MMP-9 mRNA 表达水平较空白对照组明显上调,差异具有统计学意义($P<0.05$)。与空白肝郁组相比,普萘洛尔肝郁组和 ICI118,551 肝郁组小鼠脾脏肿瘤组织中 TGF-β、IL-6、VEGF 和 MMP-9 mRNA 表达水平均显著下降,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。见表 4。

2.4 各组小鼠脾脏肿瘤组织中 IL-6、VEGF、MMP-9、TGF-β 蛋白表达的变化

通过 Western blot 法检测 TGF-β、IL-6、VEGF 和 MMP-9 的蛋白表达水平,结果显示:空白肝郁组小鼠脾脏种植瘤组织中 TGF-β、IL-6、MMP-9 和 VEGF 蛋白表达较空白对照组显著增加($P<0.01$)。普萘洛尔肝郁组和 ICI118,551 肝郁组分别与空白肝郁组相比,TGF-β、IL-6、MMP-9 和 VEGF 蛋白表达均减

少,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 5。

2.5 各组小鼠肝转移瘤中 VEGF、CD31 表达情况比较

结果显示,空白肝郁组小鼠肝转移瘤组织 VEGF 和 CD31 蛋白表达较空白对照组显著增多($P<0.01$)。对肝郁组小鼠给予普萘洛尔或 ICI118,551 后,与空白肝郁组相比,普萘洛尔肝郁组和 ICI118,551 肝郁组小鼠肝转移瘤组织中 VEGF 和 CD31 蛋白阳性表达均减少,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表 6。

3 分析与讨论

现代医学研究发现,肝气郁结证是机体在抑郁、焦虑或悲痛等不良情绪作用下,以高级神经中枢调节紊乱为前提,使神经、分泌、免疫等多个系统出现病理改变的有机概括^[3]。本实验通过模具限制动物的自由活动,模拟人类心理郁怒不得发泄,压抑内心的愤恨,久而成肝气郁结的慢性心理应激

表 3 空白对照组、空白肝郁组小鼠血清、脾脏肿瘤组织 NE、E 水平($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	血清		脾脏	
	NE(ng/L)	E(μg/L)	NE(ng/L)	E(μg/L)
空白对照组	101.501±1.780	37.427±1.764	18.107±2.141	3.933±0.975
空白肝郁组	132.195±2.513 ^a	42.758±1.833 ^a	56.671±4.204 ^b	6.072±0.425

注:与空白对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。

表 4 RT-PCR 法检测不同药物处理后小鼠脾脏肿瘤组织 TGF-β、IL-6、VEGF、MMP-9 mRNA 相对表达量比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	TGF-β	IL-6	VEGF	MMP-9
空白对照组	1.113±0.180	1.007±0.142	1.061±0.172	1.128±0.228
普萘洛尔对照组	1.165±0.235	1.033±0.269	1.067±0.200	1.049±0.225
ICI118,551 对照组	1.062±0.195	1.177±0.345	1.044±0.189	1.077±0.251
空白肝郁组	9.242±3.629 ^a	7.426±1.983 ^a	7.451±1.945 ^a	9.216±3.559 ^a
普萘洛尔肝郁组	5.210±0.951 ^b	4.685±0.516 ^c	4.402±0.629 ^c	4.610±1.098 ^b
ICI118,551 肝郁组	4.598±0.565 ^b	5.417±0.947 ^b	3.683±1.301 ^c	4.535±1.035 ^b

注:与空白对照组比较,^a $P<0.01$;与空白肝郁组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$ 。

表 5 WB 法检测不同药物处理后小鼠脾脏肿瘤组织中 TGF-β、IL-6、VEGF、MMP-9 蛋白表达量比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	TGF-β	IL-6	VEGF	MMP-9
空白对照组	0.096±0.033	0.121±0.046	0.090±0.028	0.116±0.046
普萘洛尔对照组	1.103±0.034	0.138±0.055	0.081±0.026	0.122±0.049
ICI118,551 对照组	0.111±0.033	0.159±0.066	0.098±0.026	0.109±0.032
空白肝郁组	0.382±0.079 ^a	0.552±0.134 ^a	0.393±0.090 ^a	0.515±0.145 ^a
普萘洛尔肝郁组	0.221±0.100 ^b	0.424±0.020 ^b	0.254±0.115 ^b	0.379±0.018 ^b
ICI118,551 肝郁组	0.222±0.119 ^b	0.414±0.052 ^b	0.213±0.107 ^b	0.349±0.050 ^b

注:与空白对照组比较,^a $P<0.01$;与空白肝郁组比较,^b $P<0.05$ 。

表 6 不同药物处理后小鼠肝转移瘤 VEGF、CD31 平均光密度值表达的比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	VEGF	CD31
空白对照组	0.211±0.027	0.221±0.039
普萘洛尔对照组	0.206±0.034	0.200±0.030
ICI118,551 对照组	0.196±0.027	0.233±0.051
空白肝郁组	0.480±0.077 ^a	0.500±0.079 ^a
普萘洛尔肝郁组	0.247±0.070 ^c	0.311±0.158 ^b
ICI118,551 肝郁组	0.341±0.077 ^b	0.375±0.054 ^b

注:与空白对照组比较,^a $P<0.01$;与空白肝郁组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$

状态。同时,束缚制动法不会对动物造成躯体损害,从而排除由于其他因素对病因病机方面的干扰,与中医临床发病机制较为吻合。小鼠处于慢性应激状态下,机体为适应环境出现下丘脑—垂体—肾上腺轴功能增强的现象,产生的神经内分泌产物如肾上腺素、去甲肾上腺素能够激活 β -AR。近年来,大量临床研究发现 β -AR 阻断剂能显著降低乳腺癌、结肠癌、前列腺癌及恶性黑色素瘤患者的疾病复发率和死亡率^[4-11]。因此, β -AR 信号通路与肿瘤生物学行为之间的关系日益成为研究热点。本实验也发现,肝郁组小鼠外周血清、脾脏种植瘤中 NE 和 E 水平显著高于对照组小鼠,提示肝气郁结可造成模型动物单胺类神经递质的紊乱。

本实验在肝气郁结的前提下,进一步通过皮下微泵持续性给予非选择性 β -AR 阻滞剂(普萘洛尔)以及 β_2 -AR 阻滞剂(ICI118,551)。结果发现,在阻断 β -AR 信号通路后,肝转移灶显著减少。本实验进一步从 mRNA 和蛋白水平两方面检测肝气郁结对肿瘤转移相关因子表达的影响。结果显示,肝郁组小鼠脾脏种植瘤组织中 TGF- β 、IL-6、VEGF 和 MMP-9 mRNA 和蛋白表达水平较对照组显著升高,而给予 β -AR 阻滞剂或 β_2 -AR 阻滞剂后逆转了肝气郁结的作用,提示 β -AR 信号通路介导肝气郁结促进结肠癌肝转移的机制还涉及上调肿瘤转移相关因子的表达。

在结肠癌发生肝转移的方式中,经门静脉转移是最主要的途径,故本实验采用脾内注射人结肠癌细胞株的方法,模拟肿瘤细胞通过门静脉进入肝脏并形成转移灶的过程,构建肝转移模型。因此,本实验运用免疫组化法对肝转移瘤组织中 VEGF 和 CD31 蛋白表达情况进行标记,观察肝气郁结对转移瘤新生血管形成的影响。结果显示,肝气郁结能

显著上调肝转移瘤组织中 VEGF 和 CD31 蛋白的阳性表达,在给予 β -AR 阻滞剂或 β_2 -AR 阻滞剂后,VEGF 和 CD31 蛋白阳性表达减弱,这提示 β -AR 信号通路同时能够介导肝气郁结促进转移瘤新生血管的形成。本实验结果表明,肝气郁结打破了机体内环境的平衡及稳定,并以 β -AR 信号通路作为桥梁,使各种神经递质及免疫抑制因子与肿瘤细胞相互作用,从而营造出有利于肿瘤侵袭转移的环境。

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] 汤钊猷. 现代肿瘤学[M]. 上海:复旦大学出版社, 2011: 954-1018.
- [3] 陈家旭, 杨维益. 神经-内分泌-免疫网络研究概括及其与中医脏关系的探讨[J]. 北京中医药大学学报, 1995, 18(4): 7-11.
- [4] Rodriguez C, Jacobs EJ, DeKa A, et al. Use of blood-pressure-lowering medication and risk of prostate cancer in the Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort[J]. Cancer Causes Control, 2009, 20(5):671-679.
- [5] Powe DG, Voss MJ, Zanker KS, et al. Beta-blocker drug therapy reduces secondary cancer formation in breast cancer and improves cancer specific survival[J]. Oncotarget, 2010, 1(7): 628-638.
- [6] Ganz PA, Habel LA, Weltzien EK, et al. Examining the influence of beta blockers and ACE inhibitors on the risk for breast cancer recurrence: results from the LACE cohort[J]. Breast Cancer Res Treat, 2011, 129(2):549-556.
- [7] Barron TI, Connolly RM, Sharp L, et al. Beta blockers and breast cancer mortality: a population-based study[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(19):2635-2644.
- [8] Melhem-Bertrandt A, Chavez-Macgregor M, Lei X, et al. Beta-blocker use is associated with improved relapse-free survival in patients with triple-negative breast cancer[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(19):2645-2652.
- [9] Lemeshow S, Sørensen HT, Phillips G, et al. β -Blockers and survival among Danish patients with malignant melanoma: a population-based cohort study[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2011, 20(10):2273-2279.
- [10] De Giorgi V, Grazzini M, Gandini S, et al. Treatment with β -blockers and reduced disease progression in patients with thick melanoma[J]. Arch Intern Med, 2011, 171(8):779-781.
- [11] Perron L, Bairati I, Harel F, et al. Antihypertensive drug use and the risk of prostate cancer (Canada)[J]. Cancer Causes Control, 2004, 15(6):535-541.
- [12] 徐建阳. 中医肝郁证的动物模型研究[J]. 广州中医药大学学报, 2004, 21(1):73-76.

(收稿日期: 2017-01-12)

(本文编辑: 韩虹娟)