

•论 著•

槐耳清膏抑制 MCF-7 细胞裸鼠成瘤性实验研究

鲁明骞¹, 冯雪松¹, 孔庆志², 卢宏达², 卢忠心², 王纯², 周刚¹, 张蓉¹

(1. 三峡大学第一临床医学院 肿瘤防治中心, 宜昌市中心人民医院 肿瘤科, 湖北 宜昌 443000;
2. 武汉市中心医院 武汉市肿瘤研究所, 湖北 武汉 430061)

[摘要] 目的: 构建裸鼠异种乳腺癌移植瘤模型(裸鼠接种 MCF-7 细胞), 给予该模型鼠槐耳清膏处理, 观察移植瘤组织病理变化特点, 探讨其对裸鼠致瘤性的影响。方法: 将裸鼠随机分为实验组和对照组, 分别给予槐耳清膏(浓度 150 mg · ml⁻¹) 和 0.9% 生理盐水各 0.2 ml 灌胃, 每天两次, 共 30 d。观察裸鼠瘤体积及瘤体重的变化, 显微镜观察移植瘤组织病理变化特点。结果: 裸鼠在接种 MCF-7 细胞 3 周后, 接种部位均长出肿瘤, 成瘤率 100%。实验组和对照组移植瘤重分别为 (0.20 ± 0.07) g 和 (0.57 ± 0.32) g, 实验组裸鼠移植瘤体重明显低于对照组, 差异具有统计学意义 (P < 0.01), 两组移植瘤体积分别为 (0.32 ± 0.74) cm³ 与 (0.84 ± 0.62) cm³, 实验组移植瘤体积较对照组小, 具有统计学差异 (P < 0.01)。HE 染色后, 实验组裸鼠移植瘤镜下可见肿瘤组织细胞出现不同程度的退行性变, 中央及边缘细胞出现大片缺血坏死区, 在血供较丰富的区域表现尤为明显, 而在坏死灶周围可见残存的肿瘤细胞。对照组细胞生长旺盛, 有异型性, 形态不规则, 大小不等, 细胞核大、浓染, 可见病理性核分裂相, 无明显坏死区。结论: 在裸鼠体内, 槐耳清膏能抑制乳腺癌细胞 MCF-7 的成瘤性, 从而达到抑制乳腺癌细胞生长的作用。

[关键词] 乳腺癌; 槐耳清膏; MCF-7 细胞; 成瘤性

[中图分类号] R285.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-6264(2018)01-0018-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-6264.2018.01.004

Huaier cream inhibits the growth of MCF-7 breast cancer xenograft in nude mice

LU Ming-qian¹, FENG Xue-song¹, KONG Qing-zhi², LU Hong-da²,
LU Zhong-xin², WANG Chun², ZHOU Gang¹, ZHANG Rong¹

(1. Department of Oncology, Cancer Center, The First Clinical Medical College, Three Gorges University, Yichang Central People's Hospital, Yichang 443003, China; 2. Wuhan Central People's Hospital, Wuhan City Oncology Institute, Wuhan 430061, China)

[Abstract] Objective: The xenograft of breast cancer model in nude mice was reproduced to investigate the influences of Huaier cream on carcinogenicity in nude mice transplanted with MCF-7, so as to provide theoretical basis for clinical treatment. **Methods:** Nude mice were randomly divided into experimental group and control group, 4 mice in each group. Mice of the experimental group were lavaged with 0.2 mL of Huaier cream (150 mg · mL⁻¹),

[收稿日期] 2017-03-04 **[修回日期]** 2017-12-19

[基金项目] 湖北省自然科学基金面上项目(2014CFB675); 湖北省卫计委科研基金面上项目(WJ2015MB176)

[作者简介] 鲁明骞(1973-), 男, 湖北宜昌人, 主任医师, 博士, 主要从事肿瘤中西医结合临床及基础研究。E-mail: lumingqian001@163.com

[通信作者] 孔庆志 E-mail: whzlkz@sina.com

[引文格式] 鲁明骞, 冯雪松, 孔庆志, 等. 槐耳清膏抑制 MCF-7 细胞裸鼠成瘤性实验研究[J]. 东南大学学报: 医学版, 2018, 37(1): 18-21.

twice a day for a total of 30 days. The control group was given lavage with 0.2 mL of 0.9% saline, twice a day for a total of 30 days. The changes of tumor size and weights in nude mice were observed, the changes of pathological characteristics of transplanted tumor were observed under microscope. **Results:** In nude mouse tumorigenicity assay, each nude mouse developed tumor at the transplant site 3 weeks after inoculation with MCF-7 cells, with a tumor formation rate of 100%. The transplant tumors were (0.20 ± 0.07) g and (0.57 ± 0.32) g in the experimental groups after the experiment. And the transplant tumor was significantly lighter in the experimental groups than that of the control group, with statistically significant differences ($P < 0.01$). Tumor volumes were (0.32 ± 0.74) cm³ and (0.84 ± 0.62) cm³, and those of the experimental groups were smaller than those of the control group, with statistically significance differences ($P < 0.01$). HE staining showed in the nude mice of the experimental groups, there were different degrees of degeneration in the tumor cells, and large necrotic area in the central and the margin cells, especially in the area rich in blood supply, and residual tumor cells were visible around the necrosis focal; while in the control group, the cells were well grown, with atypia, in irregular shape and size, and the nuclei were large and densely dyed, pathological karyokinesis phase was seen, but no obvious necrotic area was found. **Conclusion:** In nude mice, Huaier cream can inhibit the tumor formation of MCF-7 cells, possibly due to the function of Huaier cream inhibiting the growth of breast cancer cells.

[Key words] breast cancer; huaier cream; MCF-7; tumorigenicity

乳腺癌是世界上女性健康的主要杀手之一,虽然手术及放化疗在很大程度上改善了患者生存率,但治疗中或治疗后因不良反应或复发,在一定程度上严重影响了乳腺癌治疗的进展^[1]。恶性肿瘤的发生和发展是肿瘤细胞无限制的增殖过程,主要是细胞的过度生长和细胞凋亡受到抑制,因此恶性肿瘤的治疗除了局部手术和放疗,以及使用直接杀伤肿瘤细胞、或抑制其增殖和分化的药物外,还应在增强患者免疫功能,诱导肿瘤细胞凋亡上给予治疗。中药除取材方便、价格低廉和毒副作用小而受到人们的广泛重视,而且能改善临床症状,提高患者生存质量,防止肿瘤复发转移,延长生存期,提高患者免疫力,增强放、化疗敏感性和减轻放、化疗不良反应等很多方面发挥着重要作用^[2]。槐耳的主要成分为多糖蛋白(PS-T),研究表明,槐耳清膏不仅能增强患者机体免疫调节作用,还可诱导多种恶性肿瘤细胞的凋亡^[3-6]。本研究将以 MCF-7 细胞为研究对象,复制裸鼠异种乳腺癌移植瘤模型,探讨槐耳清膏对接种 MCF-7 细胞后致瘤性的影响,显微镜观察移植瘤组织病理变化特点,为槐耳清膏治疗乳腺癌提供一种理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株及裸鼠 人乳腺癌细胞(MCF-7)购自美国 American Type Culture Collection(ATCC)。裸鼠 8 只 3~5 周龄,雌性,体重 16~20 g,SPF 级。

1.1.2 实验药物与试剂 槐耳清膏由江苏启东盖天力药业有限公司提供。10% 胎牛血清(美国 HyClone),RPLMI-1640 培养液(美国 Gibco 公司)。

1.2 人乳腺癌细胞裸鼠抑制瘤模型的构建

人乳腺癌 MCF-7 细胞在 10% 的胎牛血清和 RPLMI-1640 培养液中进行培养,通过传代,扩增,收集呈对数生长期的细胞制成单细胞悬液,SPF 环境下在每只裸鼠背部皮下接种细胞悬液 5×10^6 个细胞/0.2 ml。接种第 2 天,将裸鼠随机分为实验组和对照组。实验组:根据人正常服用金克颗粒药物剂量,按体表面积折算成裸鼠剂量,槐耳清膏浓度 $150 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$,每组 4 只,每次灌胃 0.2 ml,分两次灌胃,共 30 d。对照组:每只裸鼠每次灌胃 0.9% 生理盐水 0.2 ml,每天两次,共 30 d。

1.3 肿瘤生长状况及病理形态学检测

SPF 环境下继续饲养裸鼠,给药后每 3 d 用游标卡尺测量裸鼠瘤体长(a)、宽(b)、高(c),移植瘤体积 $(V) = (\pi/6)(abc)$,取平均值,同时绘制移植瘤生长曲线图。约 4 周后,裸鼠皮下形成较大的肿瘤,处死裸鼠,取出皮下的肿瘤组织,称取瘤体重量。将裸鼠移植瘤取下,用 4% 的多聚甲醛溶液固定,常规石蜡包埋、切片、苏木精-伊红染色后光镜下观察。

1.4 统计学处理

所有数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,均采用 SPSS 18.0 软件统计分析,两独立样本采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 裸鼠成瘤性结果

在裸鼠成瘤实验中,每只裸鼠在接种 MCF-7 细胞 3 周后,接种部位均长出肿瘤(见图 1),成瘤率 100%。实验结束后实验组裸鼠体重(21.01 ± 1.19) g,对照组裸鼠体重(21.56 ± 0.73) g,移植瘤重分别为(0.57 ± 0.32) g 和(0.20 ± 0.07) g,实验组裸鼠移植瘤体重明显低于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。两组裸鼠移植瘤体积分别为(0.84 ± 0.62) cm³ 和(0.32 ± 0.74) cm³(见图 2),实验组移植瘤体积较对照组小,具有统计学差异($P < 0.01$)。

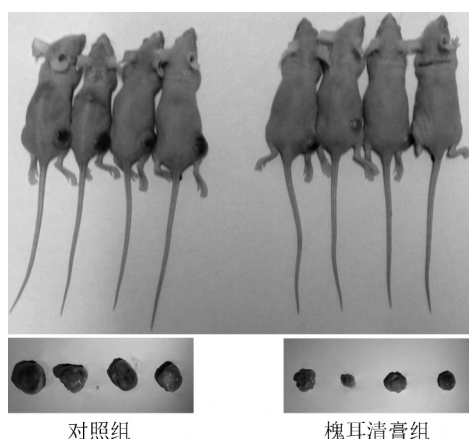


图 1 接种 MCF-7 细胞后裸鼠瘤肿瘤生长情况

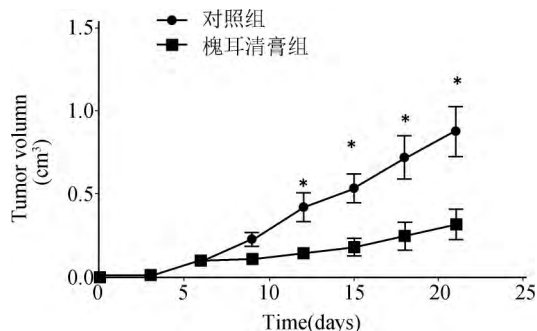


图 2 两组裸鼠瘤体变化情况

2.2 移植瘤组织病理学变化情况

肉眼观察瘤体呈圆形、椭圆形或分叶状包块,质地偏硬,包膜完整,与周围组织大多分界清楚,切面呈灰白色。经 HE 染色,实验组裸鼠移植瘤病理切片镜下可见肿瘤组织细胞出现不同程度的退行性变,中央及边缘细胞出现大片缺血坏死区,在血供较丰富的区域表现尤为明显,而在坏死灶周围可见残存的肿瘤细胞。对照组细胞生长旺盛,有异型性,形态不规则,大小不等,细胞核大、浓染,可见病理性核分裂相,无明显坏死区(见图 3)。

3 讨 论

目前治疗乳腺癌仍是以手术治疗为主,术后给予辅助性放疗、化疗、内分泌治疗、靶向药物治疗等,因化

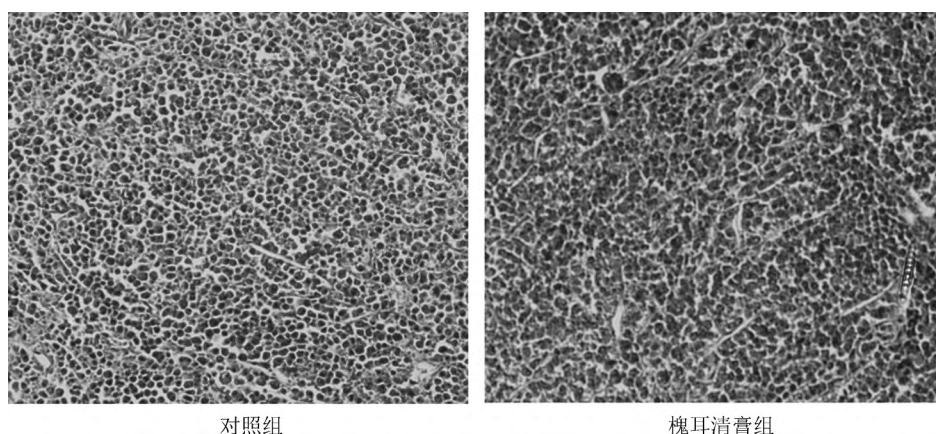


图 3 两组裸鼠病理学变化情况(HE × 200)

疗药物除直接杀伤恶性肿瘤细胞外,对患者机体免疫细胞也会产生不同程度的损伤,随着中医药的不断发展和进步,许多药物的药理作用和药物成份不断被人们了解,在临床上越来越受到医务人员和患者的青睐。多糖在抗肿瘤方面的作用已被证实,不仅能直接抑制恶性肿瘤细胞的生长和增殖,还可以增强患者免疫功

能,促使恶性肿瘤细胞的凋亡而达到抑制恶性肿瘤细胞的目的^[7]。既往研究发现,槐耳清膏能诱导 K562 细胞凋亡^[8],进一步研究证明槐耳清膏可协同羟基脲抑制 K562 细胞增殖和诱导凋亡,其机理可能下调 K562 细胞 bcl-abl 和 bxl-xl mRNA 的表达和上调 bax mRNA 的表达有关^[9]。刘学军等^[10]在研究槐耳清膏

对荷鼠瘤细胞 Bcl-2、Bax 的表达时发现槐耳清膏抑制肿瘤生长作用是通过下调 Bcl-2 和上调 Bax 蛋白的表达而促使肿瘤细胞的凋亡。余安平^[11]用槐耳颗粒联合沙利度胺抑制鼠肝癌 H22 细胞移植瘤的研究中发现,两者联合具有协调作用,能明显抑制肿瘤的生长,其机制可能是下调 VEGF 蛋白表达,并降低微血管密度,促进细胞凋亡。在体外实验研究发现,槐耳颗粒作用于 MCF-7 和 MCF-7/Adr 细胞系后,且随着药物浓度的升高和作用时间的延长,其细胞毒性作用不断增强,但药物剂量在 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 以上时再增加药物浓度其效果增加并不明显^[12]。也有实验证实槐耳颗粒 ($0.01 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) 能增强 ADM 对 MCF-7/A 细胞的毒性作用,降低了耐药细胞 MCF-7/A 对 ADM 的产生,证明槐耳不仅是一种抗肿瘤药,同时是一种耐药逆转剂^[13]。

本研究发现在裸鼠成瘤实验中,当裸鼠在接种 MCF-7 细胞 3 周后,接种部位均形成瘤体,成瘤率达 100%。实验结束后称取裸鼠的重量,实验组体重为 (21.01 ± 1.19) g,对照组体重 (21.56 ± 0.73) g。处死裸鼠后,切下裸鼠移植瘤,其重分别为 (0.57 ± 0.32) g 和 (0.20 ± 0.07) g,实验组裸鼠移植瘤体重明显低于对照组,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。两组裸鼠移植瘤体积分别为 (0.84 ± 0.62) cm^3 和 (0.32 ± 0.74) cm^3 ,实验组移植瘤体积较对照组小,具有统计学差异 ($P < 0.01$)。本动物实验证明了槐耳清膏能抑制乳腺癌肿瘤的生长,与袁鹏等^[14]研究结果一致。既往研究结果表明,在经槐耳颗粒处理的雌激素受体 α 阳性的 MCF-7 细胞系中发现 mRNA 及蛋白水平下调,其机制可能是通过削弱雌激素的刺激作用从而抑制细胞的增殖效应^[15]。周大为研究认为槐耳清膏还能明显延长肿瘤小鼠生命期限^[16]。

病理组织学显示:肉眼观察瘤体呈圆形、椭圆形或分叶状包块,质地偏硬,包膜完整,与周围组织大多分界清楚,切面呈灰白色。经 HE 染色后,实验组裸鼠移植瘤病理切片镜下可见肿瘤组织细胞出现不同程度的退行性变,中央及边缘细胞出现大片缺血坏死区,在血供较丰富的区域表现尤为明显,而在坏死灶周围可见残存的肿瘤细胞。对照组细胞生长旺盛,有异型性,形态不规则,大小不等,细胞核大、浓染,可见病理性核分裂相,无明显坏死区。可见槐耳清膏可抑制裸鼠乳腺癌生长,其机制可能与槐耳清膏能抑制 MCF-7 细胞的增殖,诱导细胞凋亡有关。

综上所述,槐耳清膏能抑制裸鼠移植瘤的生长,降低了 MCF-7 细胞成瘤能力和细胞生长成瘤性,为治疗

乳腺癌提供了一种新的临床依据。

[参考文献]

- [1] FAN L, STRASSER-WEIPPL K, LI J J, et al. Breast cancer in Chian [J]. Lancet Oncol 2014, 15(7): e279-e289.
- [2] LU M Q, KONG Q Z, XU X H, et al. Pectolinarigenin, a flavonoid compound from cirsium japonicum with potential anti-proliferation activity in MCF-7 breast cancer Cell [J]. Trop J Pharm Res 2014, 13(2): 225-228.
- [3] 鲁明骞, 孔庆志. 槐耳制剂治疗乳腺癌的作用及机理研究 [J]. 湖北中医药大学学报 2015, 17(5): 101-103.
- [4] ZHANG T, WANG K, ZHANG J, et al. Huaier aqueous extract inhibits colorectal cancer stem cell growth partially via down-regulation of the Wnt/beta-catenin pathway [J]. Oncol Lett, 2013, 5(4): 1171-1176.
- [5] ZHANG F, ZHANG Z, LIU Z. Effects of Huaier aqueous extract on proliferation and apoptosis in the melanoma cell line A875 [J]. Acta Histochem 2013, 115(7): 705-711.
- [6] 鲁明骞, 卢宏达, 卢忠心, 等. 槐耳清膏对人肺腺癌 A549/DDP 细胞增殖的影响及顺铂耐药逆转作用 [J]. 中华中医药学刊 2016, 34(9): 2185-2187.
- [7] 鲁明骞, 卢宏达, 孔庆志. 槐耳治疗恶性肿瘤的研究进展 [J]. 中国中医基础医学杂志 2015, 21(12): 1607-1609.
- [8] 王运玉, 吴柱国. 槐耳清膏对 K562 细胞体外作用的研究 [J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志 2008, 13(3): 104-107.
- [9] 王运玉, 吴柱国. 槐耳清膏联合羟基脲对 K562 细胞增殖、凋亡及相关基因表达的影响 [J]. 实用儿科临床杂志, 2009, 24(3): 190-195.
- [10] 刘学军, 杜娟. 槐耳清膏对荷瘤小鼠瘤细胞 Bcl-2、Bax 表达的影响 [J]. 安徽中医学院学报 2010, 29(2): 60-61.
- [11] 余安平, 李雄英, 李凌. 槐耳颗粒联合沙利度胺抑制鼠肝癌 H22 细胞种植瘤的实验 [J]. 肿瘤防治研究, 2013, 40(9): 834-838.
- [12] 宋海平, 黄韬. 槐耳清膏对乳腺癌细胞 MCF-7 的体外作用研究 [J]. 中华实用中西医杂志, 2005, 18(12): 1789-1791.
- [13] 邓艾平, 毛德莉. 槐耳颗粒治疗消化系统恶性肿瘤 74 例临床观察 [J]. 中国医院药学杂志 2005, 25(5): 453-454.
- [14] 袁鹏, 黄韬, 田元, 等. 金克对乳腺癌裸鼠移植瘤模型生长转移和凋亡的影响 [J]. 中国肿瘤 2007, 16(5): 248-350.
- [15] WANG X, ZHANG N, HUO S, et al. Huaier aqueous extract suppresses human breast cancer cell proliferation through inhibition of estrogen receptor α signaling [J]. Int J Oncol, 2013, 43(1): 321-328.
- [16] 周大为. 槐耳颗粒对乳腺癌动物模型 Ki67、p53、CerbB-2 蛋白表达的影响 [J]. 新中医 2015, 47(12): 224-226.