

# 金克对乳腺癌裸鼠移植瘤模型生长转移和凋亡的影响

袁 鹏, 黄 韬, 田 元, 宋海平, 李 治, 宋 旗  
(华中科技大学协和医院, 湖北 武汉 430022)

**摘 要:** [目的] 观察金克(槐耳清膏)对人乳腺癌裸鼠移植瘤的抑制作用及其对肿瘤细胞增殖和凋亡的影响。[方法] 以 MCF-7 细胞复制裸鼠异种乳腺癌移植瘤模型, 30 只 BALB/c 荷瘤鼠随机分为对照组(15 只)、金克组(15 只)。分别用生理盐水(0.2ml/只)和金克(0.2ml/只)连续灌胃 30d, 观察各组的抑瘤效果及对裸鼠瘤体大小和生存时间的影响。采用光镜、Tunel 法行原位凋亡检测、流式细胞术观察肿瘤凋亡的形态学变化。[结果] 金克组肿瘤体积大小明显小于对照组( $4.62 \pm 1.86 \text{cm}^3$ ,  $6.35 \pm 2.73 \text{cm}^3$ ,  $P < 0.01$ ); 金克组生存期为明显长于对照组( $116.7 \pm 28.5 \text{d}$ ,  $95.3 \pm 26.7 \text{d}$ ,  $P < 0.01$ ); 原位凋亡检测移植瘤细胞凋亡指数(AI)明显金克组高于对照组, 差异有显著性( $19.32\%$  vs  $8.36\%$ ,  $P < 0.01$ ); 流式细胞术显示金克组凋亡比例与对照组差异有显著性( $18.21\%$  vs  $8.39\%$ ,  $P < 0.01$ )。[结论] 金克可抑制人乳腺癌细胞 MCF-7 移植瘤生长, 延长生存期。  
**关键词:** 金克; 乳腺肿瘤; 移植瘤; 凋亡  
中图分类号: R73-36\*1 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2007)05-0348-03

## Influence of JINKE on Cells Growth and Apoptosis in Nude Mice Breast Cancer Transplanted Model

YUAN Peng, HUANG Tao, TIAN Yuan, et al.

(Union Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

**Abstract:** [Purpose] To investigate the inhibition of JINKE(fungi of Huaier) on tumor growth and its influence of cell proliferation and apoptosis on transplanted human breast cancer in nude mice. [Methods] MCF-7 cells were inoculated into the mammary fatty pad of nude mice to establish breast cancer model, then thirty BALB/c nude mice with xenograft tumor were randomized into two groups: JINKE group with JINKE (15 mice) and control group with normal saline (15 mice) by gastrogavage in 0.2ml volume for 30 days respectively. Inhibition of JINKE on tumor growth, on influence of tumor volume and on survival were observed. Tumor slides were reviewed microscopically. Cell apoptosis in situ was examined by a Tunel assay. The morphological variation of apoptosis was detected by flow cytometry. [Results] The tumor volume of JINKE group reduced significantly than that of control group ( $4.62 \pm 1.86 \text{cm}^3$  vs.  $6.35 \pm 2.73 \text{cm}^3$ ,  $P < 0.01$ ). The survival of JINKE group was significantly longer than that of control group ( $116.7 \pm 28.5 \text{d}$  vs.  $95.3 \pm 26.7 \text{d}$ ,  $P < 0.01$ ). Detection of apoptosis in situ showed that apoptosis index (AI) of JINKE group was significantly higher than that of control group ( $19.32\%$  vs.  $8.36\%$ ,  $P < 0.01$ ). Apoptosis ratio of JINKE group was significantly higher than that of control group ( $18.21\%$  vs.  $8.39\%$ ,  $P < 0.01$ ). [Conclusion] JINKE could inhibit the growth of xenograft tumor of human breast cancer MCF-7 cells in nude mice and could prolong the survival.  
**Key words:** JINKE; breast neoplasms; transplantation tumor; apoptosis

金克—槐耳颗粒具有良好的促凋亡效果和免疫增强调节作用, 无明显毒副作用。对肝癌、肺癌、食管癌、胃癌等均有独特疗效<sup>[1]</sup>。本文主要观察金克对乳腺肿瘤生长的抑制作用, 对肿瘤细胞凋亡的影响。

收稿日期: 2006-09-18; 修回日期: 2007-02-03  
通讯作者: 黄 韬

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

金克(槐耳清膏)由江苏启东盖天力药业有限公司提供。人乳腺癌细胞株 MCF-7 购于上海生命科学院。细胞培养于含血清培养液中, 呈贴壁生长。培养

细胞置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中, 每 3~5 天传代 1 次。实验动物: 健康雌性纯种裸鼠, 4~6 周龄, 体重 12g~20g, 购自湖北省实验动物研究中心(合格证号: SCXK(鄂)2003-0005), 饲养于华中科技大学同济医学院实验动物中心。裸鼠置于恒温层流箱中, 于无特定病原体(SPF)环境下饲养, 12h 光照和 12h 黑夜交替。喂养符合卫生部颁布的“医学实验动物全价营养饲料标准”。

## 1.2 方法

人乳腺癌细胞裸鼠移植瘤的建立: 人乳腺癌细胞株 MCF-7 在含 10% 的胎牛血清及 160U/L 胰岛素的 RPMI-1640 培养液中培养, 传代扩增, 收集对数生长期细胞制备悬液, 活细胞浓度为  $1 \times 10^7$ /ml。台盼蓝染色计数活细胞占 95% 以上。SPF 环境下进行实验操作, 在每只裸鼠背部皮下接种细胞悬液 0.1ml/只(含细胞数约  $0.5 \times 10^7$  个)<sup>[2,3]</sup>。

动物分组及用药: 接种 4 周后, 将裸鼠随机分为对照组和金克组。对照组: 15 只, 采用灌胃法给药, 每天灌注 0.9% 生理盐水 0.2ml/只, 共 30d。金克组 15 只, 每天灌注药物 0.2ml/只, 其浓度为 150mg/ml, 共 30d。金克组药物剂量相当于人体正常服用金克剂量根据体表面积比值进行换算折合成裸鼠的剂量<sup>[4]</sup>。

移植瘤生长情况及药物抑瘤效果: 给药后每隔 3d 用游标卡尺测量肿瘤最大长径(a)、横径(b)。计算移植瘤的体积= $(a \times b^2) / 2$ <sup>[5]</sup>, 绘制移植瘤生长曲线。

移植瘤组织病理学观察: 取移植瘤用 4% 多聚甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋、切片、HE 染色, 光镜观察。

裸鼠主要脏器组织学观察: 将裸鼠的肝、肺固定, 石蜡包埋、切片、HE 染色, 光镜下观察有无脏器转移。

生存期观察: 待各组裸鼠衰竭时处死或自然死亡, 记录死亡时间, 按公式计算生命延长率: 生命延长率 (%) = (金克组平均存活时间 - 对照组平均存活时间) / 对照组平均存活时间  $\times 100\%$ 。

凋亡指数(AI): 原位凋亡检测 Tunel 法荧光显微镜下初步分析, 光镜下避开坏死区, 选 10 个高倍视野( $\times 400$  倍)凋亡典型区域, 计数 1 000 个细胞, 其中阳性细胞数百分比即为 AI。

流式细胞术: 待裸鼠衰竭时处死或自然死亡, 剥取肿块, 用剪刀取部分瘤块, 将瘤组织剪碎, 并用 0.1M PBS 液反复冲洗, 用 200 目金属网过滤成单细胞悬液, 离心后去掉上清液, 再加入 0.1M PBS 液冲洗, 再离心, 去掉上清液, 加入 70% 乙醇 1ml, 边加边振荡。然后上流式细胞仪(FACScan Becton Dickinson, 美国), 做细胞周期采样分析, 检测各组细胞凋亡比例及主要作用细胞分裂的哪个周期。

## 1.3 统计学处理

结果以均数  $\pm$  标准差表示, 采用 SPSS 12.0 统计软件处理,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

# 2 结果

## 2.1 裸鼠移植瘤生长情况

30 只裸鼠皮下接种 MCF-7 细胞悬液 10d 左右, 于接种部位皮下均可触及直径约 2mm~3mm 的瘤块, 致瘤率 100%。其后肿瘤逐渐长大, 28d 后移植瘤长径长至 0.8cm 左右, 再分组给予不同的药物处理, 此后每 3d 检测 1 次移植瘤最大长径和横径, 计算移植瘤体积, 裸鼠治疗第 30d 移植瘤平均体积对照组为  $6.35 \pm 2.73 \text{cm}^3$ ; 金克组为  $4.62 \pm 1.86 \text{cm}^3$ , 差异有显著性( $P < 0.01$ )。显示金克对移植瘤生长有明显的抑制作用。

## 2.2 移植瘤组织病理学变化

肉眼观察, 肿瘤呈圆形、椭圆形或分叶状包块, 质地硬, 切面呈灰白色。大部分与周围组织分界清楚。对照组中可见 4 只有胸壁浸润。光镜下对照组移植瘤细胞仍保持培养状态下癌细胞原有的异型性, 形状不规则, 大小不一, 核大浓染, 核异型明显, 可见病理性核分裂相, 核质比例明显增大, 可见少量组织坏死区; 金克组肿瘤细胞呈现不同程度退行性变, 部分肿瘤组织出现明显坏死。提示金克组可显著促进癌细胞坏死。

## 2.3 裸鼠生活状况及主要脏器组织学检查

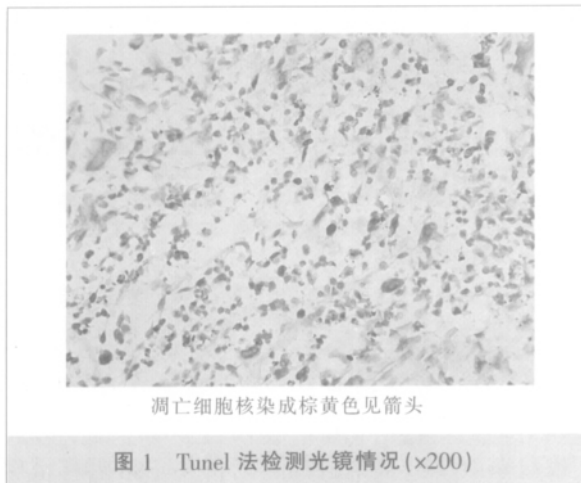
对照组裸鼠较金克组消瘦明显, 在光镜下对其肝、肺脏器组织学观察, 发现 3 只肝部有结节形成, 病理证实为移植瘤肝转移; 金克组状态良好, 光镜下对其肝、肺脏器组织学观察未见有病理学改变, 提示用药可以抑制肿瘤转移。

## 2.4 两组裸鼠生存期观察

待裸鼠饲养至衰竭时处死或自然死亡, 记录死亡时间对照组平均存活时间为  $95.3 \pm 26.7 \text{d}$ ; 金克组平均存活时间为  $116.7 \pm 28.5 \text{d}$ , 生命延长率为 22%, 金克组与对照组比较差异有显著性( $P < 0.01$ )。

## 2.5 两组癌细胞凋亡观察

原位凋亡检测 Tunel 法检测, 光镜下见凋亡细胞核染成棕黄色, 金克组 AI 为 19.32%, 而对照组 AI 为 8.36%。金克组凋亡指数明显高于对照组( $P < 0.01$ ), 提示金克可诱导乳腺癌细胞发生凋亡(见图 1)。



## 2.6 流式细胞检测

流式细胞检测分析结果显示, 对照组凋亡比例为 8.39%, 而金克组凋亡比例为 18.21%, 差异显著性 ( $P < 0.01$ ), 并且金克组的  $G_0/G_1$  期分布高于对照组, 提示金克可使细胞停滞于  $G_1$  期, 限制肿瘤细胞增殖并促进细胞凋亡的发生, 诱导乳腺癌细胞发生凋亡。

## 3 讨论

金克 (槐耳清膏) 其主要活性成分是多糖蛋白 (PST)。对肝癌、肺癌、食管癌、胃癌等均有独特疗效<sup>[6-11]</sup>。前期研究显示, 金克具有在体外抑制乳腺癌 MCF-7 细胞生长的作用。我们通过复制人乳腺癌细胞株 MCF-7 裸鼠移植瘤, 进一步观察金克抗癌作用。由于裸鼠无胸腺, 仅有胸腺残迹或异常上皮, 且这种上皮不能使 T 细胞正常分化, 因而裸鼠缺乏成熟的 T 淋巴细胞, NK 细胞活性亦很低<sup>[12]</sup>, 因此我们通过选取裸鼠为实验材料, 可以排除机体免疫调节作用对肿瘤的影响, 更好地探讨金克对肿瘤的直接作用。结果显示金克在体内具有明显抑制肿瘤生长的作用。尽管 MCF-7 细胞株不是高侵袭性的细胞株, 但我们仍然观察到对照组 4 只裸鼠有胸壁浸润, 并有 3 只发生了肝转移, 而金克组未发现肿瘤转移现象, 反映金克对乳腺癌的浸润生长和转移发生有抑制作用。

肿瘤不仅是增殖、分化异常的疾病, 更是凋亡异常的疾病<sup>[13, 14]</sup>, 调控细胞凋亡成为目前肿瘤治疗研究的一个新热点<sup>[15]</sup>。关于细胞凋亡的检测手段较多, 目前认为 Tunel 法结合了组织化学的方法, 定位准确, 特异性与敏感性高, 假阳性低, 可更准确地反映凋亡发生的程度<sup>[16]</sup>。本实验应用 Tunel 法可见到金克组

有典型的凋亡细胞、凋亡小体或出泡现象, 凋亡指数显著高于对照组, 说明金克可诱导乳腺癌细胞发生凋亡, 抑制肿瘤生长。用流式细胞仪分析两组细胞周期的结果显示金克组的  $G_0/G_1$  期分布高于对照组, 表明金克主要作用于  $G_1/S$  节点, 使细胞停滞于  $G_1$  期, 限制肿瘤细胞增殖并促进细胞凋亡的发生。

综上所述, 金克具有诱导乳腺癌细胞凋亡, 抑制乳腺癌肿瘤的生长和转移发生, 延长生存期的作用。但是由于中药的成分复杂, 金克的相关作用机制仍然需要进一步的研究和探讨。

## 参考文献:

- [1] 庄毅. 真菌抗癌药物槐耳颗粒的研制[J]. 中国肿瘤, 1998, 8(12):540-543.
- [2] Kyriazis AP, Di PL, Michael GJ, et al. Growth patterns and metastatic behavior of human tumors growing in athymic mice[J]. Cancer Research, 1978, 38(10):3186-3190.
- [3] 田庆锴, 李玛琳. 人肿瘤细胞悬液裸鼠皮下接种及影响移植成功的因素[J]. 实验动物科学与管理, 2004, 21(3):47-50.
- [4] Ovejera AA, Houchens DP, Barker AD. Chemotherapy of human tumor xenografts in genetically athymic mice [J]. Ann Clin Lab Sci, 1978, 8(1):50-56.
- [5] 贺石林, 陈修. 医学科研方法导论[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998. 50-56.
- [6] 周启康. 金克、噻替派和丝裂霉素 C 膀胱癌术后运用[J]. 浙江肿瘤, 1998, 49(4):249-250.
- [7] 姚亚民, 马智勇, 赵艳秋. 金克在原发性肝癌治疗中的应用[J]. 中国肿瘤, 2000, 9(8):封三.
- [8] 姚亚民, 马智勇, 赵艳秋. 金克冲剂合并化疗治疗非小细胞肺癌 41 例[J]. 中国肿瘤, 2001, 10(3):184-185.
- [9] 张铃, 韩风, 马洪波. 金克在原发性肝癌治疗中的应用[J]. 中国肿瘤, 2000, 9(8):封三.
- [10] 刘星野, 周默巍, 徐枫等. 金克槐耳颗粒配合 FAM 治疗晚期胃癌 38 例[J]. 浙江肿瘤, 1999, 5(3):189.
- [11] Nakazato H, Koike A, Saji S, et al. Efficacy of immunochemotherapy as adjuvant treatment after curative resection of gastric cancer. Study Group of Im-munochemotherapy with PSK for Gastric Cancer[J]. Lancet, 1994, 343(8906):1122-1126.
- [12] 陈主初, 吴端生. 实验动物学[M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 232-233.
- [13] Nomura M, Watari J, Yokota K, et al. Morphogenesis of nonpolyloid colorectal adenomas and early carcinomas assessed by cell proliferation and apoptosis [J]. Virchows Arch, 2000, 437(1):17-24.
- [14] Mullauer L, Gruber P, Seibinger D, et al. Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease [J]. Mutat Res, 2001, 488(3):211-231.
- [15] Brown JM, Wouters BG. Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. Cancer Res, 1999, 59(7):1391-1399.
- [16] Ikeda M, Shomori K, Endo K, et al. Frequent occurrence of apoptosis is an early event in the oncogenesis of human gastric carcinoma[J]. Virchows Arch, 1998, 432(1):43-47.