

## 山药提取物联合树突细胞-细胞因子诱导的杀伤细胞对荷 MDA-MB-231 乳腺癌干细胞瘤裸鼠的治疗作用研究

孙 浩, 李宏峰, 宋 林, 张慧杰, 张 宇\*

天津市中医药研究院附属医院, 天津 300120

**摘要:** 目的 研究山药 *Dioscorea opposita* 提取物联合树突细胞-细胞因子诱导的杀伤细胞 (DC-CIK) 对荷 MDA-MB-231 乳腺癌干细胞瘤裸鼠的治疗效果。方法 制备荷 MDA-MB-231 乳腺癌干细胞 Balb/c 裸鼠模型, 随机分为 4 组, 每组 8 只: 对照组裸鼠尾 iv 生理盐水, 0.2 mL/次, 2 次/周; DC-CIK 组裸鼠在肿瘤干细胞接种 4 d 后尾 iv  $1 \times 10^6$  个 DC-CIK 细胞, 2 次/周, 给药 3 周; 山药提取物组裸鼠 ig 山药提取物 125 mg/kg, 0.2 mL/d, 给药 3 周; 山药提取物联合 DC-CIK 组裸鼠 ig 山药提取物 125 mg/kg, 0.2 mL/d, 同时尾 iv  $1 \times 10^6$  个 DC-CIK 细胞, 2 次/周, 给药 3 周。各组裸鼠在治疗 3 周期间每 2 天测量瘤体大小及裸鼠体质量, 治疗结束后处死裸鼠, 取出瘤体称质量; qRT-PCR 法检测瘤组织中 Akt 信号通路中关键原癌基因 c-Myc 表达水平。结果 治疗结束后, 各组裸鼠瘤体生长速率为山药提取物联合 DC-CIK 组 < DC-CIK 组和山药提取物组 < 对照组。山药提取物联合 DC-CIK 组、DC-CIK 组和山药提取物组的裸鼠情绪始终平稳, 进食进水正常, 活动自如; 对照组裸鼠精神萎靡, 活动减弱, 进食进水减少, 于第 3 周开始活动受阻, 瘤体破溃。各给药组裸鼠瘤体中 c-Myc 基因与对照组相比均有所下调。结论 对荷 MDA-MB-231 乳腺癌干细胞瘤裸鼠治疗效果中, 各给药组裸鼠肿瘤生长均受到明显抑制, 其中以山药提取物联合 DC-CIK 组效果最佳。

**关键词:** 山药提取物; 树突细胞; 细胞因子诱导的杀伤细胞; 乳腺癌; 肿瘤干细胞; c-Myc

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674 - 5515(2020)12 - 2312 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.12.004

## Therapeutic effect of *Dioscoreae Rhizoma* extract combined with dendritic cell-cytokine-induced killer cells on nude mice bearing MDA-MB-231 breast cancer stem cell tumor

SUN Hao, LI Hong-feng, SONG Lin, ZHANG Hui-jie, ZHANG Yu

Affiliated Hospital of Tianjin Academy of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300120, China

**Abstract: Objective** To study the therapeutic effect of *Dioscoreae Rhizoma* extract combined with dendritic cell-cytokine-induced killer cells (DC-CIK) on nude mice bearing MDA-MB-231 breast cancer stem cell tumor. **Methods** A Balb/c nude mouse model bearing MDA-MB-231 breast cancer stem cells were prepared and randomly divided into 4 groups, 8 in each group: in control group, nude mouse were administrated with normal saline by tail iv, 0.2 mL/time, 2 times/week; Nude mice in DC-CIK group were administrated with  $1 \times 10^6$  DC-CIK cells by tail iv after 4 days of tumor stem cell inoculation, twice a week, for 3 weeks; nude mice in *Dioscoreae Rhizoma* extract group were administrated with *Dioscoreae Rhizoma* extract 125 mg/kg by ig, 0.2 mL/d, for 3 weeks; nude mice ig *Dioscoreae Rhizoma* extract + DC-CIK group were administrated with *Dioscoreae Rhizoma* extract 125 mg/kg by ig, simultaneously were administrated with  $1 \times 10^6$  DC-CIK cells by tail iv, twice a week, administration 3 weeks. The tumor volume and weight of nude mice in each group were measured every 2 days during treatment. After the treatment, the nude mice were sacrificed, and the tumors were taken out and weighed; qRT-PCR method was used to detect expression level of gene c-Myc, the key prototumor in the Akt signaling pathway in tumor tissues. **Results** After the treatment, the tumor growth rate of nude mice in each group were as follows: *Dioscoreae Rhizoma* extract + DC-CIK group < DC-CIK group and *Dioscoreae Rhizoma* extract group < control group. The nude mice in *Dioscoreae Rhizoma* extract + DC-CIK group, DC-CIK group and *Dioscoreae Rhizoma* extract + DC-CIK group always had stable mood, normal eating and drinking water, and free movement; nude mice in control group were

收稿日期: 2020-09-11

作者简介: 孙 浩 (1964—), 男, 副主任药师, 主要研究方向为临床中药学及中药鉴定学。E-mail: sunhao\_852@126.com

\*通信作者 张 宇 E-mail: niuniuzy7375@aliyun.com

lethargic, weakened in activity, and eating and drinking decreased. At 3 weeks, the activity was blocked and the tumor was ruptured. Compared with the control group, the c-Myc gene in the tumor of nude mice in each administration group was down-regulated. **Conclusion** In the treatment effect of nude mice bearing MDA-MB-231 breast cancer stem cell tumor, the tumor growth of nude mice in each administration group was significantly inhibited, and the *Dioscoreae Rhizoma* extract + DC-CIK group had the best effect.

**Key words:** *Dioscoreae Rhizoma* extract; dendritic cells; cytokine-induced killer cells; breast cancer; tumor stem cells; c-Myc

乳腺癌目前发病率呈逐年上升的趋势,在我国乃至全球已成为女性最常见的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>。以手术为基础,结合放、化疗的治疗方案在临床已广泛应用,如何提高复发转移性乳腺癌的患者生存率则一直是未解决的难题。成功的发现、鉴定与分离肿瘤干细胞对乳腺癌的诊断与临床治疗提供了新的思路。肿瘤干细胞被认为具有自我分化、更新能力,传统的放、化疗方法不能将其彻底的清除<sup>[2]</sup>。树突状细胞(dendritic cells, DC)在1973年首次被发现<sup>[3]</sup>,作为体内最主要的抗原提呈细胞,一直备受广泛关注,很多研究证实,DC细胞联合细胞因子诱导的杀伤(CIK)细胞对肿瘤干细胞具有一定的杀伤作用<sup>[4]</sup>。

山药 *Dioscorea opposita* Thunb. 味甘、平,归脾、肺、肾经,具有补脾养胃、生津益肺、补肾涩精的功效。研究<sup>[5-6]</sup>表明,山药具有增加T淋巴细胞活性,增强人体的免疫力,提高网状内皮系统的吞噬能力,杀伤肿瘤细胞的作用。研究表明,乳腺癌的发生、发展与Akt信号通路的激活有一定的相关性,其中关键的原癌基因c-Myc参与肿瘤细胞的增殖、分化和凋亡等过程<sup>[7]</sup>。本研究主要考察山药提取物联合DC-CIK细胞治疗对荷MDA-MB-231乳腺癌干细胞瘤裸鼠的效果,为临床上乳腺癌的治疗提供科学依据,为抗肿瘤新药开发提供参考。

## 1 材料

### 1.1 细胞、试剂与药物

乳腺癌MDA-MB-231细胞株为天津市第四中心医院惠赠。RPMI 1640培养基和青链霉素, Gibco公司。人淋巴细胞分离液,天津美德太平洋科技有限公司。CD44、CD24磁珠抗体, Miltenyi公司。山药饮片(产地河南,批号19122505),购于安徽协和成药业饮片有限公司,经天津市中医药研究院附属医院药学部梁颖主任药师鉴定为薯蓣科植物薯蓣 *Dioscorea opposita* Thunb. 的干燥根茎。

### 1.2 实验动物

SPF级32只雌性Balb/c裸鼠,3~4周龄,体质量16~18g,北京维通利华实验动物技术有限公

司提供,动物合格证号为11400500018046。

### 1.3 仪器

IX71荧光倒置显微镜,日本Olympus公司;生物安全柜和细胞培养箱,美国Thermo公司;流式细胞仪,美国BD公司;磁珠分选仪,德国Miltenyi公司;全自动细胞计数分析仪,韩国Count star公司。

## 2 方法

### 2.1 山药提取物的制备

山药饮片用8倍量的水提取3次,每次2h,合并滤液,浓缩,后转移至蒸发皿中于70℃真空至干,得到山药提取物,提取率为2.78%;山药提取物中主要成分为多糖,多糖质量分数为(324.90±0.82)mg/g。

### 2.2 细胞培养

**2.2.1 乳腺癌细胞培养** 乳腺癌MDA-MB-231细胞培养于含10%胎牛血清,1%青链霉素的RPMI 1640培养基中,于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱培养。

**2.2.2 DC-CIK细胞培养** 用淋巴细胞分离液分离出健康人(自愿捐献)外周血中的单个核细胞,收集贴壁细胞,置于含有重组人白细胞介素-4(rhIL-4)和重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)的RPMI 1640培养基中培养,培养出成熟DC细胞。上述悬浮细胞加入含有γ干扰素(IFN-γ)的RPMI 1640培养基培养出成熟的CIK细胞。

### 2.3 MDA-MB-231肿瘤干细胞分选

收集对数生长期的MDA-MB-231细胞,冰预冷的PBS洗涤1次后计数,将1×10<sup>7</sup>个细胞重悬于40μL PBS中,加入10μL CD24<sup>-</sup>生物素,混匀于4℃孵育15min。加入1~2mL PBS 300×g离心10min,洗涤细胞1次,用80μL PBS重悬细胞备用。向上述细胞悬液中加入20μL抗生物素微球,混匀于4℃孵育15min。向上述细胞悬液中加入400μL PBS。在磁力架上装好LS柱,以3mL PBS致敏柱子,待液体流干后加入细胞悬液,收集未结合的细胞(CD24<sup>-</sup>),300×g离心10min收集细胞。加入20μL CD44 beads混匀于4℃孵育15min。加入1~2mL PBS,300×g离心10min洗涤细胞1次,用500μL

PBS 重悬细胞备用。可重复上柱 1 次。用 PBS 3 mL × 3 次, 洗去未结合的细胞。从磁力架上取下 LS 柱, 加入 5 mL PBS, 立即推下细胞。收集 CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> 细胞。

#### 2.4 乳腺癌干细胞荷瘤裸鼠模型的制备

收集 MDA-MB-231 肿瘤干细胞 (即 CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> 细胞), 用无血清培养基调整细胞浓度至  $5 \times 10^5$  /mL, 与 matrigel 混匀, 比例为 1:1, 将 0.2 mL 细胞接种于 Balb/c 裸鼠的右侧腋下, 于接种后第 3~4 天, 接种部位出现了硬结节, 可认定为成瘤。

#### 2.5 分组和给药

将上述荷 MDA-MB-231 肿瘤干细胞的裸鼠, 随机分为 4 组, 分别为对照组、DC-CIK 组、山药提取物组、山药提取物联合 DC-CIK 组, 每组 8 只。对照组裸鼠尾 iv 生理盐水, 0.2 mL/次, 2 次/周; DC-CIK 组裸鼠在肿瘤干细胞接种 4 d 后尾 iv  $1 \times 10^6$  个 DC-CIK 细胞, 2 次/周, 给药 3 周; 山药提取物组裸鼠 ig 山药提取物 125 mg/kg (根据《中国药典》人用日剂量换算成小鼠日剂量为生药 4.5 g/kg, 根据提取物的提取率换算为提取物剂量为 125 mg/kg), 0.2 mL/d, 给药 3 周; 山药提取物联合 DC-CIK 组裸鼠 ig 山药提取物 125 mg/kg, 0.2 mL/d, 同时尾 iv  $1 \times 10^6$  个 DC-CIK 细胞, 2 次/周, 给药 3 周。肿瘤干细胞接种 4 d 后, 各组进行首次治疗。各组在治疗 3 周期间, 每 2 天测量瘤体大小 1 次。瘤的长为移植瘤的最大直径, 瘤的宽为最小直径, 瘤体积 = 长 × 宽 × 宽 × 0.52。

#### 2.6 移植瘤 HE 染色

各组治疗后, 取出瘤体组织, 进行 HE 染色, 进行病理学检测。

#### 2.7 qRT-PCR 法检测 c-Myc 基因表达

称取储存于 -80 °C 的移植瘤组织 20 mg, 加入液氮研磨粉碎后转移至无 RNA EP 管中, 根据 Qiagen Rneasy mini kit 试剂盒说明书操作, 提取移植瘤总 RNA, 利用 TAKARA PrimeScript RT-PCR Kit 试剂盒, 将上述提取的 RNA 作为模板反转录合成移植瘤 cDNA。根据 NCBI 给出的 c-Myc 基因序列, 利用 Oligo 6 软件设计 RT-PCR 引物, 并在 NCBI 上进行 BLAST 验证其特异性。c-Myc 上游引物 5' - CCAACAGGAGCTATGACCTC-3', 下游引物 5' - TTGTACCTGCAGGATCTGAG-3', GAPDH 上游引物 5' - GGTGGTCTCTCTGACTTCAACA-3', 下游引物 5' - GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT-3'。

#### 2.8 统计学分析

应用统计学软件 SPSS 18.0 进行分析, 计量资料数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间相同指标用单因素方差分析进行 *F* 检验, 确定  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 DC-CIK 细胞鉴定

健康人外周血中的单个核细胞贴壁 2 h 以后, 即是 DC 细胞的前体细胞, 呈圆形, 聚集呈小型集落; 培养到第 5 天, 细胞表面可见树状突起, 第 8 天, DC 细胞成熟, 细胞表面可见大量的突起。初期的 CIK 细胞形态均一, 呈小圆形, 上述 2 种细胞培养到第 8 天, 混合培养, 第 15 天, 细胞聚集成大型悬浮集落 (图 1)。

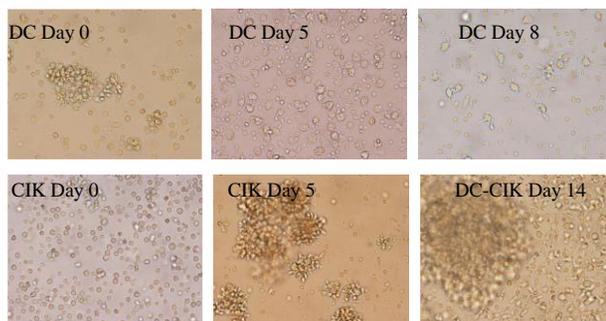


图 1 光学显微镜下 DC-CIK 细胞形态 (×400)

Fig. 1 Cells morphology of DC-CIK under an optical microscope (×400)

#### 3.2 荷瘤裸鼠移植瘤的 HE 染色

MDA-MB-231 肿瘤干细胞移植瘤组织切片为典型乳腺中分化腺癌。瘤细胞呈腺管状, 腺体不规则, 部分腺体呈角状。病理学检测结果: 对照组未见明显变性坏死, 显微镜下观察肿瘤细胞呈巢状生长, 细胞呈多角形, 彼此镶嵌, 呈铺砖状。DC-CIK 组中心区为小的肿瘤坏死灶, 可见坏死的核碎屑组织。山药提取物联合 DC-CIK 组坏死周围为筛状结构的肿瘤细胞 (图 2)。

#### 3.3 荷瘤裸鼠生存状态的比较

观察荷瘤裸鼠生存情况, 3 个给药组的荷瘤裸鼠情绪平稳, 能够自如的活动, 进食和进水情况均正常, 3 周治疗期间这些裸鼠生存状态无明显的变化; 对照组裸鼠精神萎靡, 活动减弱, 于第 3 周开始活动受阻, 处于濒死状态。治疗结束, 各给药组裸鼠体质量总体平稳, 后期略有下降, 而对照组裸

鼠体质量则显著下降(图3)。

### 3.4 荷瘤裸鼠肿瘤进展比较

治疗期间,3个给药组肿瘤体积增长速率缓慢,对照组则在治疗首周开始肿瘤体积不断增加,有的

出现濒死状态,有的瘤体出现不同程度的破溃。全部治疗结束后,4组裸鼠瘤体的大小和质量依次为山药提取物联合 DC-CIK 组<DC-CIK 组和山药提取物组<对照组(图4)。

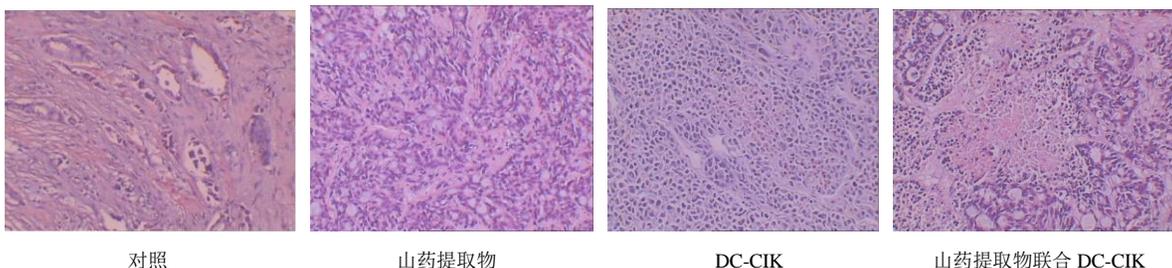


图2 移植瘤组织切片 HE 染色 (×200)

Fig. 2 Pathological HE staining under the optical microscope (×200)

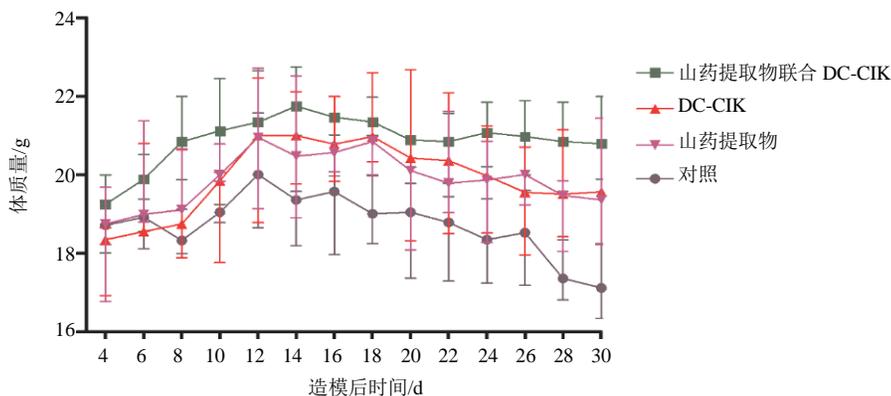
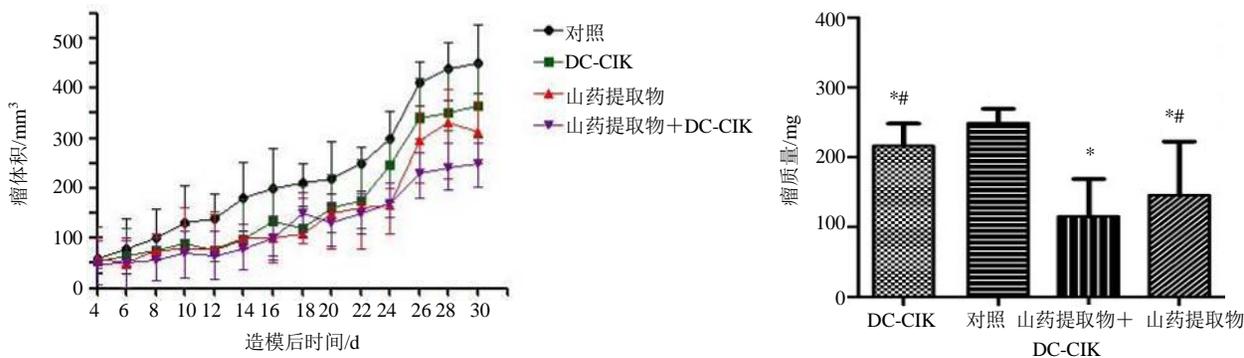


图3 荷瘤裸鼠治疗期间体质量变化曲线 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 3 Curve of body weight changes in tumor-bearing nude mice during treatment ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )



与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与山药提取物+DC-CIK 组比较: # $P < 0.05$   
 \* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs *Dioscoreae Rhizoma* extract + DC-CIK group

图4 各组荷瘤裸鼠瘤体积和瘤质量比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 4 volume and weight of tumor in bearing-tumor nude mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

### 3.5 免疫治疗对 Akt 信号通路关键基因 c-Myc 表达的影响

与对照组相比,其他各组的 c-Myc mRNA 表达均有所下调,见图5、表1。

### 4 讨论

肿瘤生物治疗是继手术、放疗之后的一种肿瘤治疗技术,其中包括肿瘤免疫细胞治疗,肿瘤免疫治疗的核心是激活肿瘤患者 T 淋巴细胞的抗肿瘤反

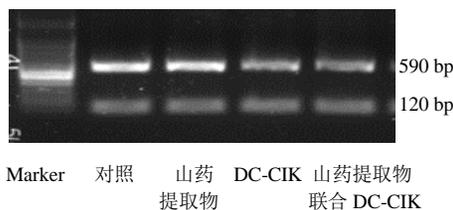


图 5 各组裸鼠瘤组织 c-Myc 表达差异

Fig. 5 Different expression levels of c-Myc in tumor tissue of nude mice in each group

表 1 Akt 信号通路关键基因 c-Myc 相对表达量 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )  
Table 1 Expression of mRNA of c-Myc in Akt signaling pathway ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	c-Myc 相对表达量
对照	—	58.11 ± 13.89
山药提取物	125	35.79 ± 6.85*
DC-CIK	1 × 10 <sup>6</sup> 个	33.26 ± 6.21*
山药提取物 + DC-CIK	125 + 1 × 10 <sup>6</sup> 个	14.27 ± 3.56* <sup>△</sup>

与对照组比较: \*P < 0.05; 与山药提取物组或 DC-CIK 组比较: <sup>△</sup>P < 0.05\*P < 0.05 vs control group; <sup>△</sup>P < 0.05 vs *Dioscorea Rhizoma* extract group or DC-CIK group

应, 进而增强其对肿瘤细胞的杀伤功能, DC-CIK 细胞疗法为免疫治疗其中的一种, 优势是在清除肿瘤的同时不损伤正常细胞<sup>[8]</sup>, 这也意味着生物免疫治疗在靶向治疗的同时, 也最大限度地降低了肿瘤治疗过程中对体细胞的毒副作用。本研究中 DC-CIK 组荷瘤裸鼠生存状况始终良好, 抑瘤效果和 c-Myc mRNA 表达变化均好于对照组。

山药活性成分包括尿囊素、薯蓣皂苷、山药多糖、山药黏液蛋白、黄酮、微量元素等<sup>[9-10]</sup>。本实验结果表明以 ig 的方式给予山药提取物治疗荷 MDA-MB-231 乳腺癌干细胞瘤裸鼠, 山药提取物可改善荷瘤裸鼠的生存状态, 抑制肿瘤生长。山药也是常见食品, 对于肿瘤患者可从饮食中增加山药的摄入量, 达到有效的治疗效果。

在肿瘤的发生和发展进程中, PI3K/Akt 信号通路起到了一定作用, c-Myc 作为其中的原癌基因, 主要作用是抑制凋亡, 在正常组织中不表达或仅有极少的基础表达量, 而在乳腺癌、结肠癌、前列腺癌等肿瘤中过度表达<sup>[11-12]</sup>。在本研究中检测到山药提取物联合 DC-CIK 细胞组的 c-Myc mRNA 表达下

调较为明显, DC-CIK 细胞组及山药提取物组略有下调, 而对照组表达变化不显著, 这一结果与抑瘤治疗效果相吻合。

本研究表明, 山药提取物联合 DC-CIK 细胞免疫疗法对荷乳腺癌 MDA-MB-231 肿瘤干细胞的裸鼠的生存状态、肿瘤生长和 c-Myc mRNA 的表达均有较好的治疗效果, 为临床乳腺癌的治疗提供了科学的依据。

## 参考文献

- [1] 王启俊, 祝伟星, 邢秀梅. 北京城区女性乳腺癌发病死亡和生存情况 20 年监测分析 [J]. 中华肿瘤杂志, 2006, 28(3): 208-210.
- [2] Alamgeer M, Peacock C D, Matsui W, et al. Cancer stem cells in lung cancer: Evidence and controversies [J]. *Respirology*, 2013, 18(5): 757-764.
- [3] Duriancik D M, Hoag K A. The identification and enumeration of dendritic cell populations from individual mouse spleen and Peyer's patches using flow cytometric analysis [J]. *Cytometry*, 2009, 75A(11): 951-959.
- [4] Ning N, Pan Q, Zheng F, et al. Cancer stem cell vaccination confers significant antitumor immunity [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(7): 1853-1864.
- [5] 赵宏, 谢晓玲, 万金志, 等. 山药的化学成分及药理研究进展 [J]. 今日药学, 2009, 19(3): 49-52.
- [6] 孙雯雯, 窦金霞, 张琳, 等. 山药提取物联合 DC-CIK 细胞疗法对结肠癌 HT29 干细胞荷瘤裸鼠的体内抗肿瘤研究 [J]. 中草药, 2017, 48(7): 1362-1368.
- [7] Corzo C, Corominas J M, Tusquets I, et al. The MYC oncogene in breast cancer progression: From benign epithelium to invasive carcinoma [J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2006, 165(2): 151-156.
- [8] Gasch C, Ffrench B, O'Leary J J, et al. Catching moving targets: Cancer stem cell hierarchies, therapy-resistance & considerations for clinical intervention [J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 43.
- [9] Yang W F, Wang Y, Li X P, et al. Purification and structural characterization of Chinese yam polysaccharide and its activities [J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 117: 1021-1027.
- [10] Liu Y X, Li H F, Fan Y Y, et al. Antioxidant and antitumor activities of the extracts from Chinese yam (*Dioscorea oppositifolia* Thunb.) flesh and peel and the effective compounds [J]. *J Food Sci*, 2016, 81(6): H1553-H1564.
- [11] Li C M, Margolin A A, Salas M, et al. PEG10 is a c-MYC target gene in cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(2): 665-672.
- [12] Galmozzi E, Casalini P, Iorio M V, et al. HER2 signaling enhances 5'UTR-mediated translation of c-Myc mRNA [J]. *J Cell Physiol*, 2004, 200(1): 82-88.