

槐耳颗粒联合 DC-CIK 细胞对乳腺癌 MDA-MB-231 干细胞体内外杀伤作用研究

李宏峰¹, 郝莎^{2#}, 宋林¹, 孙浩³, 孙雯雯⁴

1. 天津市中医药研究院 检验科, 天津 300020

2. 天津市中医药研究院附属医院 外科, 天津 300020

3. 天津市中医药研究院附属医院 药学部, 天津 300020

4. 天津市中医药研究院, 天津 300020

摘要:目的 观察槐耳颗粒联合树突细胞(DC)-细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK)对乳腺癌MDA-MB-231干细胞体内外杀伤效果。方法 用槐耳颗粒(500 mg/L)、槐耳颗粒(1 000 mg/L)与乳腺癌MDA-MB-231细胞作用后,荧光倒置显微镜观察MDA-MB-231细胞形态的变化,MTT比色法检测槐耳颗粒对MDA-MB-231细胞增殖的抑制情况,流式细胞仪检测乳腺癌MDA-MB-231细胞干细胞(CD44⁺CD24⁻细胞)所占的比例。采用乳酸脱氢酶(LDH)释放测定法检测DC-CIK细胞联合槐耳颗粒对乳腺癌MDA-MB-231细胞的杀伤作用。建立BalB/C荷MDA-MB-231乳腺癌干细胞裸鼠模型,随机分为模型组、槐耳颗粒组、DC-CIK组及槐耳颗粒与DC-CIK细胞联合组,槐耳颗粒组小鼠按0.33 g/kg ig给药,每天1次,连续3周;DC-CIK组小鼠尾iv DC-CIK细胞5×10⁵个/g,2次/周,连续3周;联合治疗组同时按照单药给药方法联合治疗,观察各组荷瘤裸鼠生存状态,比较各组裸鼠体质量和瘤体积。**结果** 槐耳颗粒(500 mg/L)、槐耳颗粒(1 000 mg/L)作用于乳腺癌MDA-MB-231细胞36 h后,可使乳腺癌MDA-MB-231细胞逐渐变小,核浓缩,抑制乳腺癌MDA-MB-231细胞的增殖,同时乳腺癌MDA-MB-231细胞中CD44⁺CD24⁻细胞比例明显降低。给予荷瘤裸鼠治疗结束后,联合治疗组的瘤质量明显低于2个单独治疗组。**结论** 槐耳颗粒联合DC-CIK细胞对乳腺癌MDA-MB-231干细胞体内外杀伤效果均好于单独使组。

关键词: 槐耳颗粒; DC-CIK细胞; 乳腺癌; 肿瘤干细胞; 杀伤效果

中图分类号: R969.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2021)07-1361-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.07.004

Study on killing effect of Huaier Granules combined with dendritic cells-cytokine-induced killer cells on breast cancer MDA-MB-231 stem cells *in vivo* and *in vitro*

LI Hong-feng¹, HAO Sha², SONG Lin¹, SUN Hao³, SUN Wen-wen⁴

1. Clinical Laboratory, Tianjin Academy of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300020, China

2. Surgery, Tianjin Academy of Traditional Chinese Medicine Affiliated Hospital, Tianjin 300020, China

3. Department of Pharmacy, Tianjin Academy of Traditional Chinese Medicine Affiliated Hospital, Tianjin 300020, China

4. Tianjin Academy of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300020, China

Abstract: Objective To study the killing effect of dendritic cells (DC cells)-cytokine-induced killer cells (CIK cells) combined with Huaier Granules on breast cancer MDA-MB-231 stem cells *in vivo* and *in vitro*. **Methods** After the action of the 500 mg/L and the 1 000 mg/L Huaier Granules on breast cancer MDA-MB-231 cells, the morphological changes of MDA-MB-231 cells were observed by fluorescence inverted microscope. The inhibition of the proliferation of MDA-MB-231 cells was detected by MTT colorimetry, and the proportion of MDA-MB-231 cell stem cells (CD44⁺CD24⁻ cells) in breast cancer was detected by flow cytometry. Lactate dehydrogenase (LDH) release assay was used to detect the killing effect of DC-CIK cells combined with Huaier Granules on breast cancer MDA-MB-231 cells. A nude mouse model of BalB/C bearing MDA-MB-231 breast cancer stem cells was established and randomly divided into four groups: model group, Huaier Granules group, DC-CIK group and the combination group of DC-CIK and

收稿日期: 2021-01-11

基金项目: 天津市卫生健康委、天津市中医药管理局中、西医结合科研课题(2019035)

作者简介: 李宏峰(1976—), 硕士, 副主任技师, 研究方向为基础免疫学。E-mail: 13920060605@126.com

#共同第一作者: 郝莎(1987—), 本科, 主管护师, 主要从事肿瘤分子生物学研究。

Huaier Granules. The mice in the Huaier Granules group were administrated with Huaier Granules by ig at 0.33 g/kg, one time a day for 3 weeks. In DC-CIK group, DC-CIK cells were intravenously injected into the tail of mice $1 \times 10^5/g$, twice a week for 3 weeks; The survival status of tumor bearing nude mice in each group was observed, and the body weight and tumor volume of nude mice in each group were compared. **Results** After Huaier Granules (500 mg/L) and Huai Er granule (1 000 mg/L) treated on breast cancer MDA-MB-231 cells for 36 h, breast cancer MDA-MB-231 cells were gradually reduced, nuclear concentration, proliferation of breast cancer MDA-MB-231 cells were inhibited, and the proportion of CD44⁺CD24⁻ cells in MDA-MB-231 cells of breast cancer were significantly reduced. After treatment, the tumor weight of nude mice bearing MDA-MB-231 breast cancer stem cells in the combined treatment group were significantly lower than that of the two separate treatment groups. **Conclusion** The effect of the combination of DC-CIK and MDA-MB-231 on the breast cancer stem cells *in vitro* and *in vivo* is better than that in the separate group.

Key words: Huaier Granules; DC-CIK cells; breast cancer; stem cells; killing effect

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一，目前发病率逐年上升^[1]。提高转移性复发性乳腺癌患者生存率则一直是待解决的难题。乳腺癌目前治疗的主要手段有外科手术、化疗、放疗，乳腺癌虽然是常见病，早期病人可以通过根治性手术进行治疗，但已处于中晚期确诊患者，在为患者进行化疗和放疗的同时，会严重降低患者的自身免疫力。肿瘤干细胞具有自我分化、更新的特点，而传统的放化疗方法只能杀伤肿瘤细胞，不能彻底清除肿瘤干细胞^[2]。因此，肿瘤免疫治疗和中药治疗由于其在临床治疗中毒副作用小和特异性高等优势，被广泛认为是绿色的治疗手段。肿瘤的细胞免疫治疗是肿瘤免疫治疗的一种治疗方法，是指将自身或同种异体的免疫细胞，在体外激活，然后回输给患者，从而达到杀伤患者体内的肿瘤细胞的目的，这些免疫细胞包括细胞因子诱导的杀伤细胞（cytokine induced killer cells, CIK 细胞）、淋巴因子激活的杀伤细胞、自然杀伤细胞（natural killer, NK cell）、肿瘤浸润性淋巴细胞等。作为抗原提呈细胞的树突状 DC 细胞，和 CIK 共同培养，可以杀伤肿瘤干细胞，同时不损伤正常细胞^[3]。槐耳颗粒是由药用真菌槐耳的提取物（槐耳清膏）制成的中成药，槐耳性平，味苦、辛，具有抗癌^[4]等作用。槐耳含有多种有机成分和矿物质元素，其主要活性成分为蛋白多糖^[5]。据研究报告，槐耳具有杀伤多种肿瘤细胞，使其凋亡并抑制血管的再生，如肝癌细胞、胃癌细胞、肺癌细胞和乳腺癌细胞等；同时槐耳能够提高机体的免疫力^[6-7]。有研究报告，槐耳颗粒联合 DC-CIK 对荷结肠癌 HT29 干细胞瘤裸鼠的抑瘤率明显优于各自单独给药组，并与 PI3K/Akt、Wnt/ β -catenin 和 Notch 通路中关键基因 PI3KR1、Wnt1 和 Notch1 的表达下调有关^[8]。故本研究探讨 DC-CIK 细胞联合槐耳颗粒对乳腺癌 MDA-MB-231 干细胞体内外杀伤效果，

为临床上治疗乳腺癌提供科学的依据和方案。

1 材料

1.1 药品与试剂

RPMI 1640 培养基和青链霉素为美国 Gibco 公司产品；人淋巴细胞分离液为天津美德太平洋科技有限公司产品；CD44、CD24 磁珠抗体为德国 Miltenyi 公司产品；重组人粒细胞集落刺激因子（RhGM-CSF）、重组人白细胞介素-4（RhIL-4）、重组人白细胞介素-2（RhIL-2）、重组人白细胞介素-1 α （RhIL-1 α ）、重组人 γ -干扰素（rhIFN- γ ）为美国 Peprotech 公司产品。槐耳颗粒（国药准字 Z20000109，生产批号为 AA21，规格为每袋装 20 g，主要成分为槐耳菌质）为启东盖天力药业有限公司产品。

1.2 细胞

乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株为天津市肿瘤医院惠赠。

1.3 实验动物

32 只 SPF 级 3~4 周龄雌性 Balb/c 裸鼠，体重 16~18 g，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 11400500018047，动物使用许可证号为 SCXK（京）2014-0013。动物实验符合伦理要求。

1.4 仪器

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

2 方法

2.1 细胞培养

2.1.1 乳腺癌细胞培养 在含有 1%青链霉素和 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中培养乳腺癌 MDA-MB-231 细胞。

2.1.2 DC 细胞的培养 用淋巴细胞分离液分离健康自愿捐献成人白细胞, 收集单个核细胞中的贴壁细胞。加入 1 000 U/mL rhIL-4、1 000 U/mL rhGM-CSF 到含 10%新生小牛血清的 RPMI 1640 培养基中培养。

2.1.3 CIK 细胞的培养 用淋巴细胞分离液分离健康成人白细胞, 收集单个核细胞中的非黏附细胞。加 500 U/mL rhIL-2、5 ng/mL IL-1 α 及 50 ng/mL CD3、50 ng/mL rhIFN- γ 到含用 10%小牛血清的 RPMI 1640 完全培养基中培养。第 8 天将 DC 和 CIK 细胞在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中混合培养 1~2 d, 制备 DC-CIK 细胞。

2.2 MDA-MB-231 肿瘤干细胞分选

收集 MDA-MB-231 细胞, 加入 10 μ L CD24⁻生物素, 孵育, 收集未结合的细胞 (CD24⁻), 300 \times g 离心 10 min, 收集细胞。加入 20 μ L CD44 beads 磁珠孵育。用 500 μ L PBS 重悬细胞备用。收集 CD44⁺CD24⁻细胞^[9]。

2.3 细胞毒实验

用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 将 MDA-MB-231 原代癌细胞制成 5 \times 10⁴ 个/mL 单细胞悬液, 接种于 96 孔培养板中, 每孔加入 180 μ L。培养 24 h 后, 加入受试药物。实验共分 3 组: 对照组加入等体积分含 DMSO 生理盐水; 槐耳颗粒低剂量组, 将槐耳颗粒用纯净水溶解, 调节终质量浓度为 500 mg/L; 槐耳颗粒高剂量组, 调节终质量浓度 1 000 mg/L^[10]。将平板在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的温箱中孵育 36 h, 去除培养液。用荧光显微镜观察各组细胞的形态, 每孔加入含 0.5 mg/mL MTT 的 PBS 液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 温育 4 h。弃去上清液, 每孔加入 100 μ L DMSO, 置于全自动酶标仪 490 nm 处测定吸光度 (A) 值, 计算细胞增殖抑制率。实验重复 5 次。

$$\text{细胞增殖抑制率} = 1 - A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.4 MDA-MB-231 细胞干细胞比例的检测

取 MDA-MB-231 细胞, 用胰酶/EDTA 消化液消化, 将细胞悬液吸入离心管, 400 \times g 离心 5 min, 弃去培养液, 用 80 μ L 缓冲液 (0.5% BSA、2 mmol/L EDTA、0.01 mmol/L PBS) 洗涤, 重悬。加入 FC 受体阻断剂, 加入鼠抗人 CD24 单抗和 CD44。实验分组及加药同“2.3”项, 各组加入相应的药物, 4 $^{\circ}$ C 避光, 放置 30 min, PBS 洗 2 次, 除去未结合一抗, 400 \times g 离心 5 min, 去除上清液, 各管加入 500 μ L PBS 重悬; 标记好的细胞悬液经 200 目筛网

滤过, 用流式细胞仪检测 CD44⁺CD24⁻细胞的比例。

2.5 DC-CIK 细胞联合槐耳颗粒对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞杀伤作用的检测

采用乳酸脱氢酶 (LDH) 释放测定法, 按照 Cytotox96non-radioactive cytotoxicity assay 说明进行操作, 以 MDA-MB-231 细胞为靶细胞, 调整靶细胞浓度为 1 \times 10⁵ 个/mL, 实验共分 2 组: DC-CIK 组, DC-CIK 细胞为效应细胞, 浓度为 1 \times 10⁶ 个/mL; 联合治疗组, DC-CIK 细胞浓度为 1 \times 10⁶ 个/mL, 加入槐耳颗粒, 终质量浓度 1 000 mg/L。按不同效靶比 10:1、20:1 的比例加到 96 孔板中, 在每一效靶比下, 均设 3 个复孔。混匀上述细胞, 在 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 的 CO₂ 培养箱中培养 4 h, 收集培养后的上清液, 在 490 nm 波长下, 用酶标仪检测其 A 值。重复实验 5 次。计算细胞杀伤率^[11]。

$$\text{杀伤率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{效应细胞自然释放}} - A_{\text{靶细胞自然释放}}) / (A_{\text{靶细胞最大释放}} - A_{\text{靶细胞自然释放}})$$

2.6 荷 MDA-MB-231 干细胞裸鼠模型的制备

收集“2.2”项中分选的 CD44⁺CD24⁻细胞, 用无血清培养基调整细胞浓度至 5 \times 10⁵ 个/mL, 按 1:1 比例与 matrigel 混匀, 在 Balb/c 裸鼠右侧腋下接种 0.2 mL 细胞, 接种部位出现了结节, 即认定为移植瘤模型成功。

2.7 MDA-MB-231 干细胞荷瘤裸鼠的治疗

将上述荷 MDA-MB-231 肿瘤干细胞裸鼠, 随机分 4 组, 每组 8 只裸鼠。模型组: 尾 iv 生理盐水 0.2 mL/次, 2 次/周; 槐耳颗粒组: 用 600 mL 纯净水将 20 g 槐耳颗粒溶解, 将配制好的溶液, 每天按 0.2 mL ig 给药 1 次 (剂量为 0.33 g/kg), 连续 3 周^[7]; DC-CIK 组, 尾 iv DC-CIK 细胞, 按小鼠 5 \times 10⁵ 个细胞/g, 0.2 mL/次, 2 次/周, 最终细胞数量为 1 \times 10⁶ 个, 连续 3 周; 联合治疗组: 小鼠同时按照槐耳颗粒组和 DC-CIK 组方法给药。肿瘤干细胞接种成瘤后, 各组开始第 1 次治疗。治疗期间, 2 d 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 \times 宽 \times 宽 \times 0.52。

2.8 移植瘤 HE 染色

各组治疗后, 取出移植瘤组织, 进行 HE 染色, 观察病理学改变。

2.9 统计学分析

应用 SPSS 20.0 统计学软件包进行数据分析。计量资料数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间相同指标比较采用 F 检验进行单因素方差分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 槐耳颗粒对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞形态的影响

荧光倒置显微镜下可见对照组的乳腺癌 MDA-MB-231 细胞贴壁生长, 成梭形或多边形, 有折光性, 胞体大, 成团生长, 核仁清楚, 胞质均匀透明。槐耳颗粒 (500 mg/L) 组和槐耳颗粒 (1 000

mg/L) 组细胞无折光性, 无立体感, 核浓缩, 部分裂解, 见图 1。

3.2 槐耳颗粒对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖抑制作用

与对照组相比, 槐耳颗粒 (500 mg/L) 组和槐耳颗粒 (1 000 mg/L) 组乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖受到明显抑制 ($P < 0.05$), 见表 1。

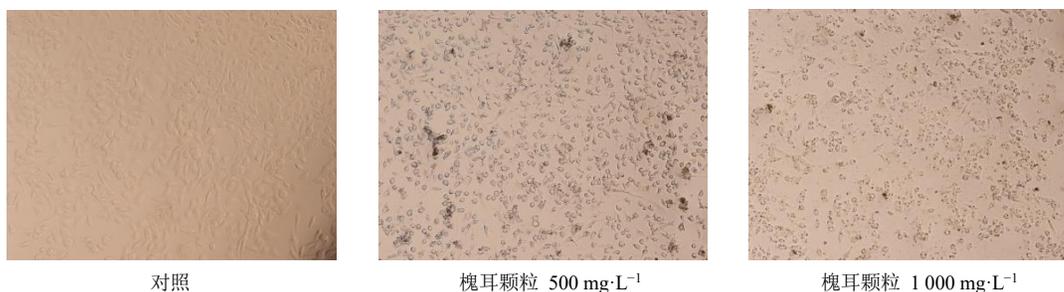


图 1 槐耳颗粒对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞形态的影响 (×100)

Fig. 1 Effect of Huaier Granules on the morphology of breast cancer MDA-MB-231 cells (× 100)

表 1 槐耳颗粒对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Inhibition of Huaier Granules on proliferation of breast cancer MDA-MB-231 cell ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	$\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	A 值	增殖抑制率/%
对照	—	1.267 ± 0.178	—
槐耳颗粒	500	1.038 ± 0.112*	18.07
	1 000	0.997 ± 0.109*	21.31

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

3.3 槐耳颗粒对 CD44⁺CD24⁻细胞表达的影响

流式细胞术检测结果显示: 对照组、槐耳颗粒 (500 mg/L) 组和槐耳颗粒 (1 000 mg/L) 组乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中 CD44⁺CD24⁻细胞比例分别为 (30.56 ± 5.78)%、(22.34 ± 4.01)%、(20.98 ± 3.89)%、

槐耳颗粒 (500 mg/L) 组和槐耳颗粒 (1 000 mg/L) 组中 CD44⁺CD24⁻细胞比例明显低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2。

3.4 DC-CIK 细胞形态

收集外周血单个核细胞中的贴壁细胞, 2 h 后细胞呈圆形, 呈小型集落聚集, 为 DC 细胞, 5~8 d, DC 细胞成熟, 细胞表面有大量的突起, 为典型的树突细胞形态 (图 3)。收集外周血单个核细胞中的贴壁细胞, 初期细胞呈小圆形, 为 CIK 细胞, 随着培养天数的增加, 细胞呈大型悬浮集落 (图 3)。

3.5 DC-CIK 细胞联合槐耳颗粒对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞杀伤作用

以 MDA-MB-231 细胞为靶细胞, DC-CIK 细胞为效应细胞, 采用 LDH 释放法, 进行杀伤实验, 随着效靶比的增加, DC-CIK 细胞组及 DC-CIK 细

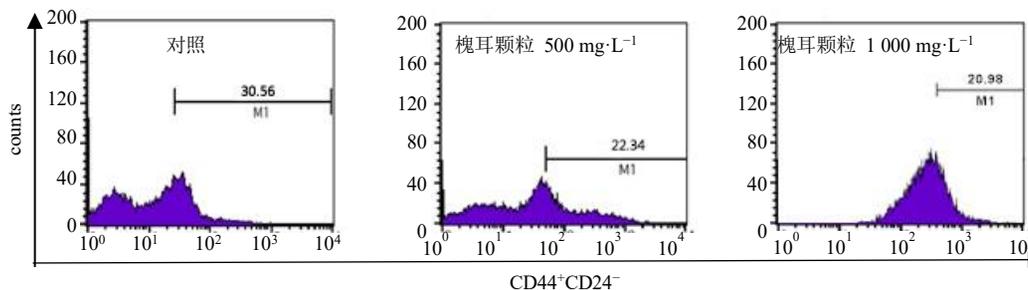


图 2 流式细胞仪检测乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中 CD44⁺CD24⁻细胞的比例

Fig. 2 Detection of CD44⁺CD24⁻ cell ratio in breast cancer MDA-MB-231 cells by flow cytometry

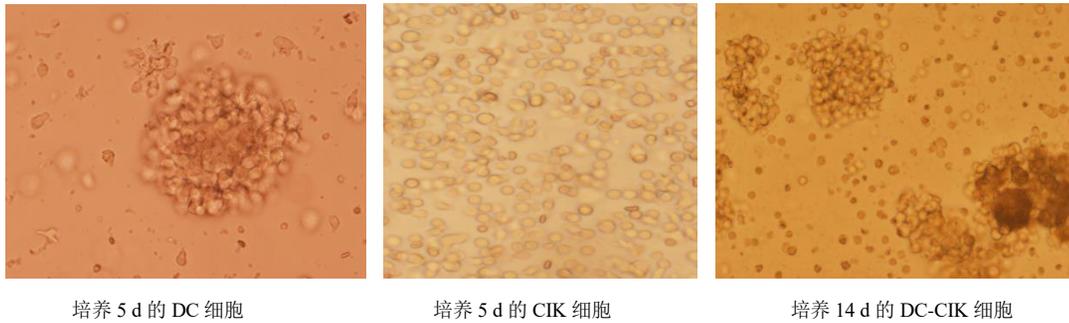


图3 光学显微镜下 DC-CIK 细胞形态 (×400)

Fig. 3 Cell morphology of DC-CIK under optical microscope (× 400)

胞联合槐耳颗粒 (1 000 mg/L) 组的杀伤作用均增强, 效靶比越高, 对 MDA-MB-231 细胞的杀伤率越高。在同样效靶比的情况下, 联合治疗组的杀伤率高于 DC-CIK 细胞组, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。见表 2。

3.6 荷 MDA-MB-231 干细胞裸鼠模型鉴定

裸鼠接种 MDA-MB-231 肿瘤干细胞后第 3~4 天, Balb/c 裸鼠的右侧腋下接种部位出现了有黄色包膜的结节, 即为移植瘤。光学显微镜下, 移植瘤病理切片检查为乳腺癌中分化腺癌, 见图 4。

表 2 DC-CIK 细胞联合槐耳颗粒对 MDA-MB-231 细胞杀伤作用 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Killing activity of DC-CIK cells combined with Huaier Granules on MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	杀伤率/%	
	效靶比 10:1	效靶比 20:1
DC-CIK	19.36 ± 1.89	22.54 ± 2.31 [#]
联合治疗	25.74 ± 2.73 [*]	29.94 ± 2.97 ^{**}

与同组效靶比 10:1 比较: [#] $P < 0.05$; 与 DC-CIK 组比较: ^{*} $P < 0.05$
[#] $P < 0.05$ vs effect-target ratio of 10:1 in the same group; ^{*} $P < 0.05$ vs DC-CIK group

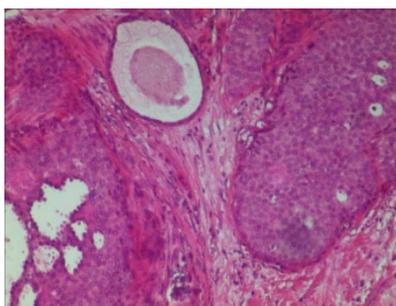


图4 裸鼠移植瘤组织切片 HE 染色 (×200)

Fig. 4 HE staining of transplanted tumor tissue sections in nude mice (× 200)

3.7 荷 MDA-MB-231 肿瘤干细胞裸鼠生存状态和体质量变化及瘤体大小的比较

观察各组荷瘤裸鼠生存情况, 3 个治疗组的荷瘤裸鼠情绪稳定, 活动自如, 能正常的进食和饮水, 这些裸鼠在 3 周治疗期间生存体征没有明显的变化; 模型组裸鼠精神萎靡, 活动减弱。治疗结束 3 个治疗组裸鼠体质量总体平稳, 后期略有下降, 联合治疗组裸鼠体质量稍大于槐耳颗粒组和 DC-CIK 组, 而模型组裸鼠体质量则显著下降, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。见表 3。

对荷瘤裸鼠的治疗期间, 模型组出现肿瘤体积不断增加的情况, 其他治疗组瘤体增长较缓慢, 治疗结束后, 3 个治疗组的瘤体的大小均小于模型组, 差异有显著性 ($P < 0.05, 0.01$); 联合治疗组又小于槐耳颗粒组和 DC-CIK 组, 差异有显著性 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 3 各组裸鼠体质量和瘤体大小比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Comparison of nude mice's body mass, tumor size in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	裸鼠体质量/g	瘤体大小/mm ³
模型	20.93 ± 0.54	303.10 ± 129.40
槐耳颗粒	22.07 ± 0.87 [*]	211.40 ± 80.70 [*]
DC-CIK	22.15 ± 0.84 [*]	213.40 ± 83.41 [*]
联合治疗	23.33 ± 0.69 ^{**#}	121.80 ± 28.04 ^{**#}

与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$; 与 DC-CIK 组或槐耳颗粒组比较: [#] $P < 0.05$

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group; [#] $P < 0.05$ vs DC-CIK group or Huaier Granules group

4 讨论

中医学认为肿瘤是因为人体正气不足, 外邪入侵等致病因素共同作用, 致使人体阴阳失衡, 经络阻滞, 脏腑失和, 气血失调, 积而成瘤^[12-13]。研究

发现中药对于肿瘤的治疗具有不易产生耐药性、安全性高、扶正祛邪、化瘀解毒等优点^[4]。中药应用于临床抗癌治疗历史悠久,随着对中药抗肿瘤不断深入的研究发现,中药可以提高患者机体的免疫力,抑制肿瘤细胞的生长,杀伤肿瘤细胞和肿瘤干细胞,使肿瘤细胞凋亡,防止肿瘤细胞转移等^[3, 15-17]。

槐耳颗粒是药用真菌槐耳的提取物,性状为棕黄色或棕褐色颗粒,其成分为槐耳菌质,其活性成分主要为蛋白多糖^[5]。具有扶正固本,活血消症、抗癌等作用,适用于瘀血阻滞,正气虚弱。据研究报道,槐耳具有杀伤肝癌细胞、肺癌细胞、胃癌细胞、肝癌细胞和乳腺癌细胞等多种肿瘤细胞,使肿瘤细胞凋亡,并抑制血管的再生,同时能够提高机体的免疫力,改善患者生活质量^[18-19]。本研究采用临床常用抗肿瘤药槐耳颗粒作为研究对象,发现其作用于乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 36 h 后可使乳腺癌 MDA-MB-231 细胞逐渐变小,核浓缩,进而抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖,同时乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中 CD44⁺CD24⁻细胞比例明显降低。本研究用槐耳颗粒对 MDA-MB-231 细胞增殖抑制效果与孙雯雯等^[8]研究的对结肠癌 HT29 杀伤效果是一致的。

采用 DC-CIK 细胞免疫治疗肿瘤,已成为国内外研究的热点。DC 细胞具有很强的抗原提呈功能,能激活初始 T 细胞,启动特异性免疫应答^[20-21]。将 DC 与 CIK 共培养,其增殖速度明显高于 CIK 细胞,两者具有共同的抑瘤效果。本研究发现,槐耳颗粒联合 DC-CIK 细胞对 MDA-MB-231 细胞杀伤作用比单独使用槐耳颗粒更强。

采用每周 2 次给荷瘤裸鼠输入 1×10^6 个 DC-CIK 细胞联合每天给予槐耳颗粒进行治疗,结果显示经过治疗的裸鼠生存状态良好,瘤体增长较模型组缓慢,同时其抑瘤率明显高于单独使用 DC-CIK 细胞组和槐耳颗粒组。体内动物实验与体外细胞实验均表明槐耳颗粒联合 DC-CIK 细胞对乳腺癌 MDA-MB-231 肿瘤干细胞具有较明显的抑瘤和杀伤作用,值得进一步深入研究,为临床治疗提供科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

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] Gasch C, Ffrench B, O'Leary J J, *et al.* Catching moving targets: cancer stem cell hierarchies, therapy-resistance & considerations for clinical intervention [J]. *Molecular Cancer*, 2017, 16(1): 43.
- [4] 吴迪,吴雨琼,乔轶才,等.槐耳颗粒抑制肺癌细胞增殖和迁移的机制研究 [J].皖南医学院学报,2020,39(1): 14-19.
- [5] 张蕴玉,陆艳,沈叶帆.槐耳冲剂主要成份的含量测定 [J].江苏药学与临床研究,1999,7(2): 39-40.
- [6] 冀学宁.槐耳浸膏对人胃癌细胞系 MKN-45 凋亡及侵袭转移的影响 [D].遵义:遵义医学院,2013.
- [7] 包海东.p38MAPK 在槐耳诱导肝癌细胞凋亡及自噬中的作用 [D].大连:大连医科大学,2013.
- [8] 孙雯雯,窦金霞,张琳,等.槐耳联合 DC-CIK 对荷结肠癌 HT29 干细胞瘤裸鼠的体内杀伤实验研究 [J].中国中药杂志,2018,43(1):168-173.
- [9] Chen Q, Cui X X, Liang P F, *et al.* Immunotherapy with dendritic cells and cytokine-induced killer cells for MDA-MB-231 breast cancer stem cells in nude mice [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(7): 2947-2955.
- [10] 吕赤.槐耳清膏对结肠癌细胞生长抑制作用及其机制研究 [D].沈阳:中国医科大学,2010.
- [11] 孙雯雯,沈娜,窦金霞,等.结肠癌 HT29 细胞干细胞诱导的树突状细胞-细胞因子诱导的杀伤细胞对结肠癌干细胞的体外杀伤实验研究 [J].中国慢性病预防与控制,2015,23(11): 832-825.
- [12] Lin H, Liu J, Zhang Y. Developments in cancer prevention and treatment using traditional Chinese medicine [J]. *Front Med*, 2011, 5(2): 127-133.
- [13] 林洪生,张英.从“扶正培本”到“固本清源”—中医药治疗肿瘤理论的传承与创新 [J].中医杂志,2016,57(4): 2958.
- [14] 曾艳兵,张妮娜,卜平.中药对恶性肿瘤细胞信号转导通路的影响及其作用机理研究的进展 [J].中国中西医结合,2004,24(7): 670-672.
- [15] 田颖颖,杨爱琳,陈孝男,等.槐耳清膏抑制人非小细胞肺癌 NCI-H1229 细胞生长和转移及其作用机制研究 [J].中国中医药,2020,45(15): 3700-3706.
- [16] 阙月一,王娅杰,李军,等.木鳖子羊霍合用配比筛选及机制研究 [J].中国中医药,2020,45(2): 374-382.
- [17] 何菊,杨涛,戴彩艳,等.基于复杂网络的名老中医治疗肺癌用药规律研究 [J].医学综述,2020,22(4): 1020-1024.

- [18] Zhanf T, Wang K, Zhang J, *et al.* Huaier aqueous extract inhibits colorectal cancer stem cell growth partially via downregulation of the Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Oncol Lett*, 2013, 5(4): 1171-1176.
- [19] Wang L, Yu Z, Wei C, *et al.* Huaier aqueous extract protects against dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice by inhibiting NLRP3 inflammasome activation [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(20): 32937-32945.
- [20] 杜海洲. 国际治疗性肿瘤疫苗的开发与研究进展 [J]. *药学进展*, 2018, 42(9): 685-696.
- [21] 邢俊丽, 李海春, 任伟宏. 树突状细胞疫苗联合抗PD-L1 抗体治疗小鼠肝癌的实验研究 [J]. *河南大学学报*, 2019, 38(1): 30-33.

[责任编辑 刘东博]

公益广告

不应接种新冠疫苗的情况

- ①对疫苗的活性成分、任何一种非活性成分、生产工艺中使用的物质过敏者，或以前接种同类疫苗时出现过敏者；
- ②既往发生过疫苗严重过敏反应者（如急性过敏反应、血管神经性水肿、呼吸困难等）；
- ③患有未控制的癫痫和其他严重神经系统疾病者（如横贯性脊髓炎、格林巴利综合征、脱髓鞘疾病等）；
- ④正在发热者，或患急性疾病，或慢性疾病的急性发作期，或未控制的严重慢性病患者；
- ⑤妊娠期妇女。

有些禁忌，比如正在发热等是暂时的，当导致禁忌的情况不再存在时，可以在晚些时候接种疫苗。