

# 黄芪注射液对人鼻咽癌 CNE2 裸鼠移植瘤的抑制作用

刘成军<sup>1</sup>, 桑国优<sup>2</sup>, 韦世秀<sup>2</sup>, 李壮艳<sup>2</sup>, 吴 华<sup>2</sup>

(1 广西壮族自治区江滨医院, 广西 南宁 530021; 2 广西医科大学医学科学实验中心, 广西 南宁 530021)

**摘要:**目的 探讨黄芪注射液对人鼻咽癌 CNE2 荷瘤裸鼠的抑瘤作用及其作用机制。方法 建立人鼻咽癌 CNE2 裸鼠多植瘤模型, 随机分为对照组, 顺铂组, 黄芪注射液高、中、低剂量组, 分别 ip 生理盐水, 顺铂, 10 40、5 20、2 60 g/kg 黄芪注射液, 4 周后处死 CNE2 荷瘤裸鼠。通过移植瘤生长曲线、终末瘤质量, 计算黄芪注射液的抑瘤率; 采用 HE 染色, 于光镜下观察各组移植瘤组织细胞病理形态学变化; 采用免疫组化法检测黄芪注射液对各组裸鼠移植瘤组织中凋亡相关蛋白 p53、Bcl 2 和 Bax 表达的影响。结果 黄芪注射液高、中剂量组移植瘤体积明显低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 瘤质量明显低于对照组 ( $P < 0.01$ ), 抑瘤率分别为 39.90%、30.77%; 黄芪注射液高、中剂量组移植瘤组织中 p53、Bcl 2 蛋白的表达低于对照组 ( $P < 0.01$ ); 各组移植瘤组织中 Bax 蛋白表达均呈阴性。结论 黄芪注射液对人鼻咽癌 CNE2 荷瘤裸鼠移植瘤具有抑制作用, 其机制可能与诱导肿瘤细胞凋亡, 降低肿瘤组织中 p53 和 Bcl 2 蛋白的表达有关。

**关键词:** 黄芪注射液; CNE2; 鼻咽癌; 移植瘤; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)06-0968-03

多年生豆科植物黄芪是一味传统中药, 有广泛的生物学效应和药理活性。近年来有研究显示, 黄芪注射液在体外能抑制多种肿瘤细胞的生长, 并可抑制人鼻咽癌 CNE2 细胞增殖并诱导其凋亡<sup>[1]</sup>。本研究通过建立人鼻咽癌 CNE2 裸鼠移植瘤模型, 观察黄芪注射液对人鼻咽癌 CNE2 裸鼠移植瘤生长的抑制作用, 并通过免疫组化法考察黄芪注射液对移植瘤组织中凋亡相关蛋白 p53、Bcl 2 和 Bax 表达的影响, 以初步探讨黄芪注射液对人鼻咽癌 CNE2 抑瘤作用的机制。

## 1 材料与方

1.1 药物与试剂: 黄芪注射液为成都地奥九泓制药厂产品, 10 mL/支 (相当于原药材 20 g, 批号 0711049); 注射用顺铂 (冻干型) 为齐鲁制药有限公司产品, 10 mg/支 (批号 7120151DB)。胎牛血清为天津灏洋生物制品科技有限责任公司产品; RPMI 1640 培养基为海克隆生物化学制品 (北京) 有限公司产品; PBS, 鼠抗人 p53、Bax、Bcl 2 免疫组化单克隆抗体, 即用型免疫组织化学超敏 UltraSensitive TM SP 试剂盒, DAB, 免疫组化阳性切片均为福州迈新生物技术开发有限公司产品。

1.2 动物与瘤株: SPF 级 Balb/c (nu/nu) 裸小鼠, 35 只, 雄性, 4 周龄, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 动物质量合格证号: SCXK (沪) 2007-

0005。人鼻咽癌 CNE2 细胞株为广西医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科实验室惠赠。

1.3 仪器: 水套式 CO<sub>2</sub> 培养箱 (美国 Forma 公司); 医用超净工作台 (上海跃进医疗器械厂); 倒置相差显微镜 (德国 Zeiss 公司); 病理图像分析仪 (德国 Leica 公司); YB202 型电子天平 (上海海康电子仪器厂); LD<sub>4</sub>-2A 型台式低速离心机 (北京医用离心机厂)。

1.4 细胞培养: 将 CNE-2 细胞接种于含 10% 灭活胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基中, 置 37 °C、饱和湿度、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养, 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 取对数生长期的细胞进行实验。

1.5 人鼻咽癌裸鼠移植瘤模型制备: 裸鼠饲养于超净生物层流架内, 环境定期紫外线消毒, 保持恒温 (25±2) °C、恒湿 (45%~50%), 笼具、饮水均经高压蒸汽灭菌, 实验操作均在无菌罩内进行。取处于对数生长期的 CNE2 细胞, 消化后用无血清培养液离心洗涤 2 次, 并用无血清培养液调整细胞浓度为 1×10<sup>7</sup> 个/mL。0.4% 台盼蓝染色, 活细胞计数 > 98%。无菌条件下用带 6 号针头的注射器抽取细胞悬液接种于裸鼠背侧靠右腋窝皮下, 每只裸鼠接种 0.2 mL。注射局部出现明显皮丘, 5 d 后 35 只被接种裸鼠皮下均出现结节, 裸鼠移植瘤模型建立。

①收稿日期: 2009-09-21

基金项目: 广西科学基金资助项目 (桂科基 0663031)

作者简介: 刘成军 (1954-), 男, 广西南宁人, 主任中医师, 研究方向为中药抗肿瘤研究。

Tel: (0771) 2114384 E-mail: chengjun542003@yahoo.com.cn

\* 通讯作者 韦世秀 Tel: (0771) 5358216 E-mail: axiu56@yahoo.com.cn

1.6 体内抑瘤实验:用游标卡尺测量上述荷瘤裸鼠肿瘤的长径 ( $a$ )、短径 ( $b$ ),按公式计算肿瘤体积:  $V=ab^2\pi/6$ 。荷瘤裸鼠随机分成 5 组:对照组,顺铂组,黄芪注射液高、中、低剂量组。每组 7 只,各组均以 ip 给药。对照组 ip 生理盐水 0.2 mL/d;顺铂组的用药剂量为 10.00 mg/kg,生理盐水稀释至 0.2 mL,于第 1 天、第 15 天分别给药 1 次,其余时间给予生理盐水 0.2 mL/d;黄芪注射液高、中、低剂量组分别给予 10.40、5.20、2.60 g/kg,给药 4 周。每天称体质量,每隔 7 天测量肿瘤体积,各组按平均瘤体积做生长曲线图。停药次日称裸鼠体质量、量瘤体积,处死裸鼠,剥取瘤块称瘤质量,按公式计算抑瘤率。

抑瘤率=(1-实验组平均瘤质量/对照组平均瘤质量)×100%

1.7 肿瘤组织病理学检查:将取出的肿瘤组织以 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液固定,石蜡包埋,切片,HE 染色,光镜下观察肿瘤细胞形态。

1.8 免疫组化法检测移植瘤 p53、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达:石蜡切片脱蜡和水化后,按照免疫组织化学试剂盒说明书的步骤进行免疫组化 SP 染色,以 PBS 代替一抗作为阴性对照,购买的阳性切片做阳性对照。封片后于光镜下观察,p53 阳性细胞标志为细胞核呈现棕黄色或黄色颗粒状着色,而 Bax、Bcl-2 阳性细胞标志为胞浆和(或)胞膜着色。免疫组化结果判定:每例切片观察 10 个高倍视野,计数 1 000 个细胞中蛋白表达为阳性的细胞所占比率。

1.9 统计学处理:用 SPSS 10.0 统计分析软件进行统计分析,组间差异选用  $t$  检验。

2 结果

2.1 黄芪注射液抑制裸鼠移植瘤的生长及抑瘤率:各组裸鼠移植瘤的生长曲线见图 1,与对照组相比,各实验组在用药后均对移植瘤生长产生不同程度的抑制作用。实验结束时,各组裸鼠的体质量、瘤体积、瘤质量见表 1。用药后顺铂组的裸鼠体质量明显比对照组小 ( $P<0.01$ ),而黄芪注射液高、中剂量组的裸鼠体质量明显比对照组的大 ( $P<0.01$ );顺铂组的瘤体积及瘤质量明显低于对照组 ( $P<0.01$ );黄芪注射液高、中剂量组裸鼠移植瘤的瘤体积低于对照组 ( $P<0.05$ ),瘤质量明显低于对照组 ( $P<0.01$ )。顺铂组,黄芪注射液高、中、低剂量组的移植瘤抑制率分别为 72.12%、39.90%、30.77% 和 11.54%。

2.2 黄芪注射液对裸鼠移植瘤组织学的影响:光镜

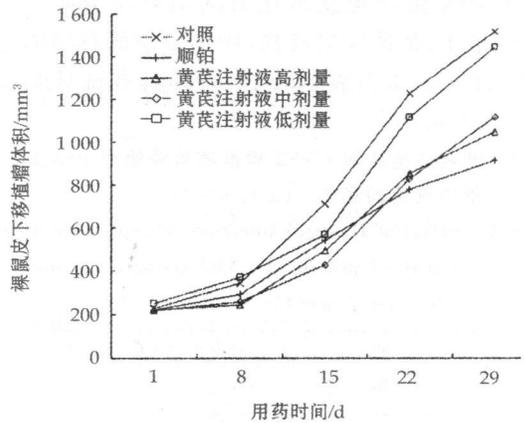


图 1 各组裸鼠移植瘤的生长曲线 ( $\bar{x}\pm s, n=7$ )

Fig. 1 Growth trend curve of CNE2 xenograft in nude mice ( $\bar{x}\pm s, n=7$ )

表 1 黄芪注射液对 CNE2 裸鼠移植瘤的抑制作用 ( $\bar{x}\pm s, n=7$ )

Table 1 Anti-tumor effect of Huangqi Injection on CNE2 xenograft in nude mice ( $\bar{x}\pm s, n=7$ )

组别	剂量/ ( $g \cdot kg^{-1}$ )	体质量/ g	瘤体积/ $mm^3$	瘤质量/ g	抑瘤率/ %
对照	-	17.7±1.0	1 514.8±252.1	2.08±0.14	0
顺铂	10.00	14.1±0.6**	910.6±349.9**	0.58±0.06**	72.12
黄芪注射液	10.40	20.0±0.9**	1 043.7±507.2*	1.25±0.30**	39.90
	5.20	19.2±1.0**	1 113.2±365.3*	1.44±0.34**	30.77
	2.60	18.6±0.8	1 441.7±271.9	1.84±0.58	11.54

与对照组比较: \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$

\* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$  vs control group

下观察 HE 染色切片,可见瘤组织内有坏死,坏死灶与瘤组织界线较清晰。对照组移植瘤细胞生长旺盛、核异型性大、核仁体积大、核分裂像易见;黄芪注射液高、中剂量组移植瘤细胞生长旺盛程度弱于对照组,核异型性大,但细胞核仁体积较对照组小,并可见细胞凋亡,见图 2。

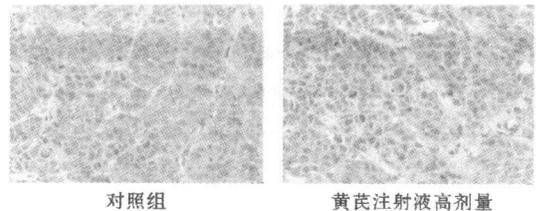


图 2 黄芪注射液对 CNE2 裸鼠移植瘤组织细胞形态学的影响  
Fig. 2 Effect of Huangqi Injection on cytomorphology of CNE2 xenograft in nude mice

2.3 黄芪注射液对裸鼠移植瘤组织中 p53、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响:各组移植瘤组织中 p53、Bcl-2 蛋白免疫组化检测结果见表 2。各组移植瘤

组织中 Bax 蛋白免疫组化检测结果均呈阴性。与对照组相比,黄芪注射液高、中剂量组的移植瘤组织中 p53、Bcl-2 蛋白表达较低,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05, 0.01$ )。

表 2 黄芪注射液对 CNE2 裸鼠移植瘤组织 p53、Bcl-2 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

Table 2 Effect of Huangqi Injection on expression of p53 and Bcl-2 protein of CNE2 xenograft in nude mice ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

组别	剂量/ (g · kg <sup>-1</sup> )	蛋白表达阳性细胞率/%	
		p53	Bcl-2
对照	—	49.63 ± 8.52	50.72 ± 7.87
顺铂	10.00	48.24 ± 9.65	46.39 ± 13.96
黄芪注射液	10.40	37.11 ± 9.47*	21.81 ± 5.54**
	5.20	40.43 ± 8.16*	26.27 ± 5.92**
	2.60	46.43 ± 7.13	37.21 ± 7.49

与对照组比较: \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$

\*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  vs control group

### 3 讨论

传统中药黄芪为多年生豆科植物,该属植物约 1 600 种,分布于除大洋洲外的亚热带和温带地区,我国有 130 种以上,主要产于东北,可充黄芪作药用者有 10 种左右<sup>[2]</sup>。黄芪具有广泛的生物学效应和药理活性,在体内外均有抗肿瘤作用<sup>[3]</sup>,且能够增强放疗肿瘤患者的免疫功能及改善症状<sup>[4,5]</sup>。本实验通过建立人鼻咽癌 CNE2 裸鼠移植瘤模型,观察黄芪注射液对人鼻咽癌 CNE2 裸鼠移植瘤生长的抑制作用。结果显示,用药结束后,与对照组相比,各用药组对移植瘤生长均有不同程度的抑制作用,黄芪注射液高、中剂量组移植瘤体积明显低于对照组 ( $P < 0.05$ ),瘤质量明显低于对照组 ( $P < 0.01$ ),抑瘤率分别为 39.9%、30.77%,表明高、中剂量的黄芪注射液可抑制人鼻咽癌 CNE2 的生长。

肿瘤的发生、发展与很多因素相关,而细胞凋亡的减少是其中一个关键因素。p53、Bcl2 和 Bax 等基因在调节细胞凋亡的过程中相互联系、共同作用,在细胞凋亡的调控中扮演着重要角色<sup>[6]</sup>。然而,有

关 p53、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达与鼻咽癌的相互关系的文献报道结果不一<sup>[7,8]</sup>,这些结果的不一致可能与肿瘤基因发生调控的复杂性和多样性,以及所选研究材料的差异和统计方法的不同等因素有关。本实验通过免疫组化法考察黄芪注射液对移植瘤组织中凋亡相关 p53、Bcl2 和 Bax 蛋白表达的影响。结果显示,与对照组相比,黄芪注射液高、中剂量组移植瘤组织中的 p53、Bcl-2 蛋白的表达较低 ( $P < 0.05, 0.01$ ),而各组移植瘤组织中 Bax 蛋白免疫组化检测结果均呈阴性。这与刘宇<sup>[9]</sup>等报道 p53 蛋白过表达与 Bcl-2 蛋白过表达呈正相关一致。结合鼻咽癌组织中 p53、Bcl-2 基因表达水平与细胞自发凋亡率均呈负相关的报道<sup>[10]</sup>,提示大剂量黄芪注射液的抑瘤作用可能是通过降低 p53 蛋白以及 Bcl-2 蛋白的过表达,促进肿瘤细胞凋亡而实现的。以此认为,诱导细胞凋亡也是黄芪注射液体内抑制人鼻咽癌生长机制之一。

#### 参考文献:

- [1] 刘成军, 韦世秀, 李壮艳, 等. 黄芪注射液对人鼻咽癌 CNE-2 细胞株的抑制作用研究 [J]. 中国药房, 2005, 16(18): 1376-1378
- [2] 陈聪颖, 陆阳, 陈泽乃. 内蒙黄芪的研究概况 [J]. 中草药, 2001, 32(6): 567-569
- [3] Cho W C, Leung K N. *In vitro* and *in vivo* anti-tumor effects of *Astragalus membranaceus* [J]. *Cancer Lett*, 2007, 252(1): 43-54.
- [4] 金璋, 沈洁. 注射用黄芪多糖对 II-III 期非小细胞肺癌放疗患者免疫功能的影响 [J]. 中草药, 2009, 40(4): 611-612
- [5] 苏旭春, 梁傍顺, 邬晓东, 等. 黄芪多糖对化疗后气虚证患者青紫舌的改善作用 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 106-108
- [6] 徐丽丽, 高世勇, 李宇彬. 细胞凋亡相关蛋白的研究进展 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2008, 29(11): 1361-1363
- [7] 雷迅, 周英琼, 何晓松, 等. 抑癌基因 p16、p21 及 p53 在鼻咽癌的表达 [J]. 临床耳鼻咽喉科杂志, 1999, 13(9): 406-408
- [8] 李智, 宗永生. 鼻咽癌组织中 Bcl-2、Bax 和 p53 的表达及其与瘤细胞凋亡的关系 [J]. 临床与实验病理学杂志, 1999, 15(2): 127-129
- [9] 刘宇, 张幸平, 陈晓品, 等. p53、Bcl-2 蛋白和 p7gp 在鼻咽鳞癌中表达的研究 [J]. 肿瘤防治研究, 2004, 31(7): 415-417
- [10] 钟晓鸣, 张力, 邬蒙. 鼻咽癌组织中细胞自发凋亡与凋亡相关基因突变型 p53、Bcl-2 表达的关系 [J]. 实用临床医学, 2008, 9(10): 21-23.

## 天津中草药杂志社开通网上在线投稿系统

天津中草药杂志社编辑出版的 4 种期刊《中草药》、Chinese Herbal Medicines、《现代药物与临床》(原刊名《国外医药·植物药分册》)、《药物评价研究》(原刊名《中文科技资料目录·中草药》)为提高稿件处理效率,更好地为广大读者和作者服务,从 2010 年 1 月开始,中草药杂志社开通网上在线投稿系统。

1. 在线投稿请登陆天津中草药杂志社网站: [http // www. 中草药杂志社. 中国或 www. tipress. com](http://www.中草药杂志社.中国或www.tipress.com) 点击进入 4 刊网页,在页面左侧有“作者登录”链接,第一次登陆按操作说明注册后进行在线投稿;作者可通过点击“作者登录”进行稿件查询。

2. 原则上不再采用电子邮件、纸质投稿。

在此,对广大作者、读者和编委对本刊长期以来的支持表示深深的感谢!