

人工牛黄对小鼠乳腺癌肺转移的影响

吴志远¹, 李芳芳², 张 昆¹, 朱嫦琳¹, 汪 颖¹, 杜 君^{1*}

1. 中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所 分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021

2. 潍坊医学院附属医院 消化内科, 山东 潍坊 261052

摘 要: **目的** 研究人工牛黄单用或与环磷酰胺合用对小鼠乳腺癌肺转移的影响。**方法** 采用 BALB/c 小鼠乳腺癌细胞系 4T1, 制备稳定表达荧光素酶基因的小鼠乳腺癌细胞系 4T1-Luc, 每只小鼠尾 iv 2×10^5 4T1-Luc 细胞, 制备小鼠乳腺癌肺转移模型。注射后将小鼠随机分为模型组、环磷酰胺组、人工牛黄组、人工牛黄与环磷酰胺联合用药组, 每组 9 只。人工牛黄组每天 ig 人工牛黄 120 mg/kg 1 次, 连续给药 4 周; 环磷酰胺组每天 ip 环磷酰胺 30 mg/kg 1 次, 连续给药 1 周; 每组选取 3 只小鼠监测肿瘤转移情况。4 周后将小鼠断颈处死, 肺脏经 Bowin 氏液固定, 计数肺部转移瘤数目; HE 染色观察肺内转移灶大小。**结果** 与模型组相比, 肿瘤细胞接种 21 d 后, 人工牛黄与环磷酰胺联合用药组小鼠肺部发光强度降低, 但差异不显著; 接种肿瘤细胞 28 d 后, 人工牛黄组、人工牛黄与环磷酰胺联合用药组肺部转移瘤数目均显著减少 ($P < 0.05, 0.01$), 且联合用药组小鼠肺部转移灶数目明显少于模型组。**结论** 人工牛黄具有抑制小鼠乳腺癌细胞肺转移的潜在作用, 并与环磷酰胺有一定协同作用。

关键词: 人工牛黄; 乳腺癌; 肺转移; 环磷酰胺; 联合用药

中图分类号: R285.5; R979.17 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)10-2013-04

Effect of artificial *Bovis Calculus* on pulmonary metastasis from breast cancer of mice

WU Zhi-yuan¹, LI Fang-fang², ZHANG Kun¹, ZHU Chang-lin¹, WANG Ying¹, DU Jun¹

1. State Key Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute and Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China

2. Digestive System Department, Affiliate Hospital of Weifang Medical College, Weifang 261052, China

Key words: artificial *Bovis Calculus*; breast cancer; pulmonary metastasis; cyclophosphamide; drug combination

近年来乳腺癌发病率呈逐年增加的趋势。约有 10% 的乳腺癌患者在首次诊断后 3 年内发生远端转移, 这是导致乳腺癌患者死亡的首要因素, 且一旦发生远端转移, 病人的 5 年生存率只有 26%^[1-2]。清热解毒类中药能提高机体免疫力, 促进巨噬细胞功能, 从而在一定程度上控制肿瘤的发展^[3]。具有清热解毒功效的牛黄对多种肿瘤具有治疗作用, 对消化道肿瘤尤为有效^[4-5]。人工牛黄作为天然牛黄的替代品, 其性状、结构、成分、药效、临床疗效与天然牛黄几乎完全一致^[6]。研究发现, 体外培育牛黄可诱导人肝母细胞瘤 HepG2 细胞凋亡, 抑制肿瘤细胞生长^[4]。

本实验通过制备稳定表达荧光素酶基因的小鼠乳腺癌细胞 4T1-Luc, 建立小鼠乳腺癌肺转移模型, 利用小动物活体成像技术动态监测肿瘤肺转移情况, 计数肺部转移灶数目, HE 染色观察肺脏内部转移灶情况, 从而研究人工牛黄在乳腺癌肺转移中的潜在作用及其与环磷酰胺的协同作用。

1 材料

1.1 药品与试剂

人工牛黄 (批号 920418), 武汉大鹏药业有限公司, 胆红素质量分数 > 35%, 胆酸质量分数 > 10%, 去氧胆酸质量分数 5%, 使用前研磨成粉末状。环磷酰胺, 200 mg/支, 江苏恒瑞医药股份有限公司,

收稿日期: 2012-05-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81101857); Bio-MD International LLC 资助项目

作者简介: 吴志远 (1966—), 男, 北京人, 主要从事动物模型研究。E-mail: wuzhiyuan1004@yahoo.com.cn

*通讯作者 杜 君 Tel: (010)87788418 E-mail: dujun@cicams.ac.cn

批号 12030625。pTracer-Luc 表达质粒, 本实验室制备; RPMI 1640、DMEM、Opti-MEM 细胞培养基, 北京钮因华信公司; 脂质体 Lipofectamine 2000、Blasticidin 细胞转染试剂, Invitrogen 公司; HE 染色试剂, 世济合力生物科技有限公司; 牛血清白蛋白 (BSA), 中杉金桥公司; 磷酸盐缓冲液 (PBS) 由本实验室配制; Bowin 氏液 (苦味酸饱和水溶液 70 mL、冰醋酸 5 mL、甲醛 37%~40% 25 mL) 自制。

1.2 细胞

BALB/c 小鼠乳腺癌细胞 4T1, 购自中国协和医科大学基础医学细胞中心。

1.3 动物

清洁级 BALB/c 小鼠, 雌性, 18~20 g, 由中国医学科学院动物所繁育中心提供, 许可证号 SCXK (京) 2009-0007。

1.4 仪器

IVIS 200 小动物活体成像系统、荧光素酶底物、光源, 美国精诺真公司;

2 方法

2.1 4T1-Luc 细胞系制备

4T1 细胞株复苏后, 加入 10 倍以上 RPMI 1640 培养液, 混匀后以 1 000 r/min 离心 5 min, 除去上清液, 上述操作再重复 1 次后加入 10 mL RPMI 1640 培养液, 于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养, 细胞触角较短, 于第 2 天换相同培养液, 继续培养。传至 2~3 代后, 用于细胞转染。转染前 24 h, 将处于对数生长期的 2×10^5 4T1 细胞接种于 6 孔板中, 待细胞融合 90% 时, 按照 Lipofectamine 2000 说明书进行转染。转染后将细胞置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 4~6 h 后换新鲜培养基。转染 24 h 后更换含 10 µg/mL blasticidin 的新鲜培养基, 进行荧光素酶基因阳性细胞筛选, 筛选维持 4 周, 每 3~5 天更换培养基, 待单克隆形成后, 将单克隆转移至 96 孔板中, 继续使用筛选培养基进行培养。

2.2 乳腺癌肺转移模型制备

取对数期的 4T1-Luc 细胞, 以 0.25% 的胰酶消化后加入新鲜培养液重悬制成 1×10^6 /mL 细胞悬液, 1 000 r/min 离心 5 min 后重悬于含 0.2% BSA 的 PBS 溶液中, 调整细胞密度, 台盼蓝排除法检验细胞存活率大于 90% 的细胞悬液用于实验。2 只雌性小鼠尾 iv 接种上述细胞悬液, 每只 200 µL, 21 d 后用小动物活体成像系统进行活体成像检测, 以验证模型是否成功。

2.3 分组及给药

确认乳腺癌肺转移模型建立成功后, 按照“2.2”项方法, 36 只小鼠每只尾 iv 接种 4T1-Luc 细胞 2×10^5 个 (0.2 mL), 注射后随机分为模型组、环磷酸胺组、人工牛黄组、人工牛黄与环磷酸胺联合给药组, 每组 9 只。模型组小鼠每天 ig 生理盐水 1 次, 连续 ig 4 周; 人工牛黄组每天 ig 人工牛黄 120 mg/kg 水溶液 (根据人体用药剂量计算) 1 次, 连续给药 4 周; 环磷酸胺组每天 ip 环磷酸胺盐 (30 mg/kg^[7]) 水溶液 1 次, 持续给药 1 周; 联合给药组每天 ig 人工牛黄的同时 ip 环磷酸胺盐水溶液, 剂量同上, 持续给药 1 周。

2.4 检测指标

接种肿瘤细胞后, 每天测小鼠体质量 1 次, 调整给药剂量; 每组选取 3 只小鼠定期用小动物活体成像系统监测肿瘤转移情况; 接种肿瘤细胞 4 周后将小鼠断颈处死, 肺脏经 Bowin 氏液固定, 计数肺部转移瘤数目; 固定于甲醛中, 制成石蜡切片后进行 HE 染色, 光学显微镜 (×400) 下观察肿瘤肺转移灶大小。

2.5 统计学处理

采用 SPSS 15 统计软件, 两样本均数比较采用双尾 *t* 检验。

3 结果

3.1 活体成像验证乳腺癌肺转移小鼠模型

将荧光素酶表达载体 pTracer-Luc 转染至 4T1 细胞, 并经 10 µg/mL blasticidin 筛选 4 周, 成功获得单克隆化细胞株, 对不同细胞克隆中荧光素酶活性进行检测, 筛选得到能够稳定高表达荧光素酶基因的细胞克隆 4T1-Luc, 2×10^5 个细胞 5 s 所发生的光子数为 1.41×10^9 , 即每个细胞每秒约 1 400 个光子, 满足体内活体成像检测要求。接种肿瘤细胞 21 d 后, 活体成像检测结果显示, 2 只小鼠胸部可见明显发光, 且发光强度较为一致 (图 1-A), 平均发光强度为 1.538×10^8 光子 $s^{-1} \cdot cm^{-2} \cdot sr^{-1}$ 。小鼠肺组织经 Bowin 氏液染色、观察可见, 模型小鼠肺部表面白色转移灶, 而正常小鼠肺部组织光滑无异常 (图 1-B), 表明成功制备适用于活体成像的小鼠乳腺癌肺转移模型。

3.2 对小鼠乳腺癌肺转移模型的影响

接种肿瘤细胞 21 d 后, 人工牛黄组和环磷酸胺组小鼠肿瘤生长与模型组相比无显著差异 ($P > 0.05$); 而人工牛黄与环磷酸胺联合给药组小鼠肺部

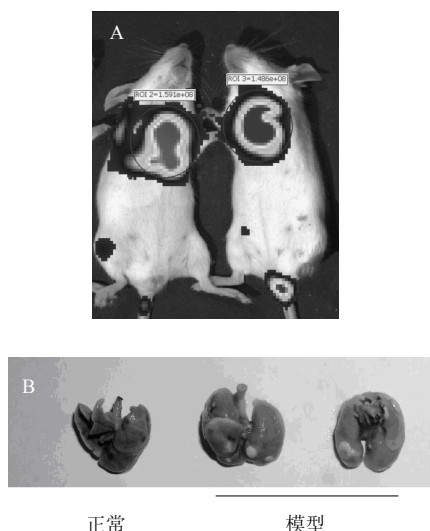


图 1 小鼠乳腺癌肺转移活体成像 (A) 与肺转移灶 (B)

Fig. 1 *In vivo* imaging of pulmonary metastasis (A) and pulmonary metastases (B) from breast cancer of mice

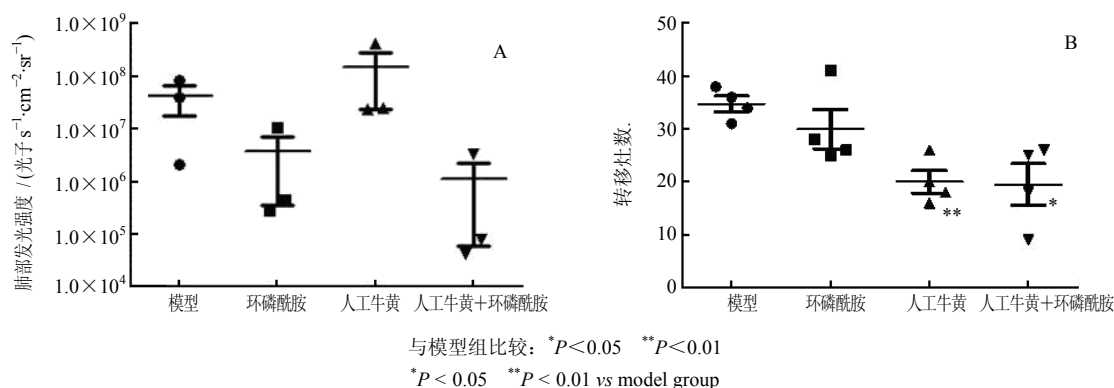


图 2 小鼠接种 4T1-Luc 细胞 21 d (A) 和 28 d (B) 后肺部转移情况

Fig. 2 Pulmonary metastasis in mice after 4T1-Luc vaccination in 21 d (A) and 28 d (B)

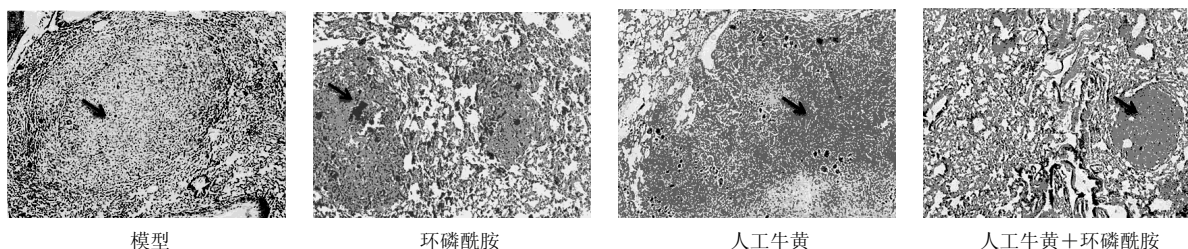


图 3 各组小鼠乳腺癌肺转移灶病理观察 (箭头所指示处为肺内转移灶)

Fig. 3 Observation of pulmonary metastases from breast cancer of mice in each group (arrows indicated location of pulmonary metastasis)

用, 药理实验证实其可诱导人肝癌细胞系 HepG2 的凋亡。本实验用人工牛黄是根据人体胆石形成的原理, 通过物理、化学、生物学的方法及静电效应

肿瘤生长较缓慢, 肺部发光强度低于模型组, 但尚无统计学差异 ($P > 0.05$)。接种肿瘤 28 d 后, 与模型组相比, 人工牛黄组和人工牛黄与环磷酰胺联合给药组小鼠肺部转移瘤数目均有显著减少 ($P < 0.05$ 、 0.01), 表明人工牛黄具有抑制小鼠乳腺癌细胞肺转移的作用, 并与临床常用药物环磷酰胺有一定协同作用, 结果见图 2。接种肿瘤细胞 28 d 后, HE 染色可见, 与模型组相比, 人工牛黄联合环磷酰胺组肺内转移灶体积较小, 而环磷酰胺组和人工牛黄组则与模型组相比无显著差异, 结果见图 3。

4 讨论

在对乳腺癌的综合治疗中, 天然药物的作用日益凸显。中医理论认为肿瘤的发病机制可归纳为气滞血瘀、痰结湿聚、热毒内蕴、气血亏虚、经络瘀阻。牛黄主要针对恶性肿瘤患者的热证, 具有消炎、杀菌、抑癌、退热、解毒和增强机体免疫功能等作

在体外利用牛胆汁培育而成, 与天然牛黄具有类似的组成和功效。本实验采用 BALB/c 小鼠自发乳腺癌细胞系 4T1, 制备稳定表达荧光素酶基因的

4T1-Luc 细胞系,再用 4T1-Luc 细胞系制备乳腺癌肺转移模型,结果表明该模型稳定性好、周期短、成本低,肿瘤生长速度较为一致,个体差异小,是良好的免疫功能正常的自发性肺转移小鼠乳腺癌模型。本研究结果显示,肿瘤细胞接种 21 d 后,人工牛黄与环磷酰胺联合给药组小鼠肺部肿瘤生长较慢,肺部发光强度低于模型组,但无显著差异;而接种后 28 d,人工牛黄组、人工牛黄与环磷酰胺联合给药组肺部转移瘤数目显著减少,且发现更小的肺内转移灶,提示人工牛黄可能具有抑制小鼠乳腺癌肺转移的作用,并与环磷酰胺具有一定协同作用。

大量研究证实,牛黄对多种肿瘤具有治疗作用。其可促进淋巴细胞转化,激发或增强淋巴细胞的细胞毒作用,增强或调整巨噬细胞吞噬作用,提高骨髓造血功能等^[5]。体外培育牛黄具有诱导人肝母细胞瘤 HepG2 细胞凋亡,抑制癌细胞生长的作用^[8]。牛黄还可能通过抗氧化、清除自由基的作用,保护 DNA 不受损伤,降低癌症发生的危险^[9]。

本研究发现人工牛黄单用具有抑制小鼠乳腺癌肺部转移的作用,与临床常用化疗药物环磷酰胺合用还具有明显改善小鼠的生存状态,减少肺部转移灶数目、抑制转移瘤体积的协同作用。人工牛黄可能以其清心、退热、化痰、通窍及消肿散结的功效,一方面调节机体的内环境、改善疾病状况,另一方面协助化疗药物更有效地发挥其杀伤癌细胞的作用,起到抗癌减毒的作用^[10]。

本研究结果初步表明人工牛黄对乳腺癌肺转移具有一定的治疗作用,但作用机制尚不清楚,可能

与其直接诱导肿瘤细胞凋亡或对自由基的清除有关,还需进行更深入和多途径研究进一步考察抗肿瘤转移作用及其机制,为其临床应用提供科学依据。

参考文献

- [1] Mego M, Mani S A, Cristofanilli M. Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer-clinical applications [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2010, 7(12): 693-701.
- [2] Weigelt B, Peterse J L, van't Veer L J. Breast cancer metastasis: markers and models [J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(8): 591-602.
- [3] 王羲明. 论中医药防治恶性肿瘤的优势 [J]. 山东中医杂志, 1994, 13(7): 309-312.
- [4] 李羚青, 赵映前. 牛黄在肝癌治疗中的作用机理及临床研究进展 [J]. 湖北中医杂志, 2009, 31(11): 77-78.
- [5] 汪世元, 陈孝平, 蔡红娇, 等. 体外培育牛黄诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡的实验研究 [J]. 华中科技大学学报, 2005, 34(6): 754-756.
- [6] 刘春安, 彭明. 抗癌中草药大辞典 [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1994.
- [7] 商澎, 杨铁虹, 贾敏, 等. 当归多糖 AP-0 对小鼠移植性肿瘤的抑制作用 [J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(11): 1299-1302.
- [8] 司维柯, 张广运, 马立强, 等. 苦参碱对 HepG2 细胞系增殖能力的影响 [J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(5): 451-458.
- [9] 王振宇, 刘秀林, 孙秀明. 牛黄为主的中药组方加减防治恶性肿瘤化疗毒副作用的临床观察 [J]. 北京中医药大学学报: 中医临床版, 2008, 15(5): 4-7.
- [10] 王芬. 培植牛黄抗氧化作用的研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2005, 32(1): 73-74.