

生酮饮食对人结肠癌裸鼠皮下移植瘤生长的影响

郝光伟 王海玉 何德明 陈榆升 吴国豪 张波

摘要 **目的:**观察生酮饮食对人结肠癌裸鼠皮下移植瘤生长的影响;探讨生酮饮食可能的作用机制。**方法:**24只雄性BALB/C裸鼠皮下注射人结肠癌HCT116细胞系后随机分成2组,分别给予正常饮食(standard diet, SD)及生酮饮食(ketogenic diet, KD),两组饮食均不限制总量。当肿瘤体积达到600~700 mm³时实验终止,并将接种当日至肿瘤达到目标体积的时间定义为肿瘤生长期。比较不同饮食对裸鼠重量、血糖、血酮体、血糖胰岛素水平以及肿瘤生长等的影响。**结果:**与SD组相比,KD组裸鼠肿瘤生长明显延缓,KD组及SD组皮下移植瘤达到目标体积的时间分别为(33.8±6.7)天和(24.8±3.1)天。KD组裸鼠血酮体水平显著升高,血糖胰岛素水平轻度下降,而血糖水平无明显变化,KD组肿瘤组织坏死面积明显增大,而血管密度则显著降低。**结论:**不限制总量的生酮饮食可明显延缓裸鼠人结肠癌细胞皮下移植瘤模型的生长。生酮饮食抗肿瘤治疗的作用机制及其对肿瘤其他特性如侵袭性和转移性等的影响有待进一步研究证实。

关键词 生酮饮食 结肠癌 碳水化合物 脂肪 酮体

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.20141361

Effect of ketogenic diet on growth of human colon cancer cells in nude mice

Guangwei HAO, Haiyu WANG, Deming HE, Yusheng CHEN, Guohao WU, Bo ZHANG

Correspondence to: Bo ZHANG; E-mail: zhangbopuwai@hotmail.com

Department of General Surgery, Zhongshan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200032, China

Abstract **Objective:** To observe the effect of ketogenic diet on the growth of human colon cancer cells in nude mice and to determine its possible mechanisms. **Methods:** A total of 24 male BALB/C nude mice were injected subcutaneously with the tumor cells of the colon cancer cell line HCT116. These animals were randomized into two feeding groups. One group was fed with a ketogenic diet (KD group; n=12), and the other group was given a standard diet (SD group; n=12) ad libitum. Experiments were completed upon attaining a target tumor volume of 600 mm³ to 700 mm³. The two diets were compared based on body weight, serum glucose, ketone body, insulin, tumor growth, and survival time, which is the interval between tumor cell injection and attainment of target tumor volume. **Results:** The tumor growth was significantly more delayed in the KD group than in the SD group. Tumors in the KD and SD groups reached the target tumor volume at 33.8 ± 6.7 days and 24.8 ± 3.1 days, respectively. The ketone body in the KD group was elevated with a slight reduction in serum insulin, and the difference in serum glucose in the two groups was insignificant. Importantly, the KD group had significantly larger necrotic areas and less vessel density than the SD group. **Conclusion:** The application of an unrestricted ketogenic diet delayed tumor growth in a mouse xenograft model. Further studies are needed to address the mechanism of this diet intervention and its effect on other tumor-relevant functions, such as invasive growth and metastasis.

Keywords: ketogenic diet, colon cancer, carbohydrate, fat, ketone body

由于缺乏利用酮体供能的一种或多种关键酶,如β-羟丁酸脱氢酶(β-hydroxybutyrate dehydrogenase, β-OHBDH)或琥珀酰辅酶A:3-酮酸辅酶A转移酶(succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase, SCOT),肿瘤细胞线粒体不能利用酮体供能。当机体葡萄糖供给不足而需要利用酮体供能时,肿瘤细胞的这一特性对其治疗来说就显得尤为重要。这为生酮饮食抗肿瘤治疗提供了理论依据。

结直肠癌是威胁人类健康的一大主要疾病,在过去的几十年里,由于操作技术、放疗以及系统治疗等方面的不断进步,结直肠癌的治疗取得了重大进

展。根治性手术是I~III期结肠癌的主要治疗手段,但很多患者仍需要进行术后化疗,而化疗往往带有明显的毒副作用。实验表明,以酮体作为主要能量来源的生酮饮食疗法对许多癌症均有效,如脑恶性肿瘤^[1]、前列腺癌^[2]以及胃癌^[3]等。大部分恶性肿瘤只能以葡萄糖作为能量来源,而不能利用酮体供能^[4]。生酮饮食在严格限制葡萄糖摄入的同时给机体以足够的脂肪,生成酮体作为能量来源。在酮症状态下,肝脏通过氧化分解脂肪酸生成乙酰辅酶A,最终转化成血浆内的主要酮体:乙酰乙酸和β-羟丁酸^[5]。肝脏储存的酮体再被转运到其他组织并重新

转化成乙酰辅酶A加以利用。在葡萄糖摄入不足的情况下,如禁食一个晚上,酮体可提供2%~6%机体所需能量,当禁食时间达到3 d以上时,酮体将提供30%~40%机体所需的能量。

为了比较生酮饮食对具有有氧糖酵解特性的恶性肿瘤生长的影响,本研究建立裸鼠人结肠癌皮下移植瘤模型,分别给予标准饮食和生酮饮食,比较两组裸鼠肿瘤生长情况。发现生酮饮食具有抑制裸鼠人结肠癌HCT116皮下移植瘤的作用,这种作用体现在肿瘤生长、坏死面积以及血管新生等方面。

1 材料与方法

1.1 实验动物

24只4~6周大雄性BALB/C裸鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司,每笼12只,饲养于层流洁净工作台上,饲养环境无特殊病原体。饲养过程中不限制进食量。本研究得到实验动物伦理委员会的批准。

1.2 方法

1.2.1 人结肠癌HCT116细胞系培养及接种 接种的细胞为人结肠癌HCT116细胞系,该细胞由中国科学院生物化学研究所提供。细胞培养基为McCoy's5A培养基,内含100 μg/mL青霉素,100 μg/mL链霉素以及10%胎牛血清。将冻存的细胞解冻后2周内体外培养至12瓶(75 mL培养瓶,1:6传代),然后接种至裸鼠皮下。接种部位为裸鼠右侧颈背交界处皮下,接种细胞数约 9×10^6 /只。接种后大约3~4 d可见小的肿瘤结节,所有数据均以这些肿瘤结节为基础。用游标卡尺测量肿瘤长短径并计算其体积,计算公式为椭圆体体积公式,即 $V=A^2 \cdot B \cdot \pi/6$,其中A代表较短径。当肿瘤体积达到目标体积(600~700 mm³)时终止实验,并将接种日期至终止实验的日期之间的天数定义为肿瘤生长期。

1.2.2 动物培养 在接种癌细胞之前所有裸鼠均食用由斯莱克实验动物有限公司提供的营养均衡料。这种标准化饲料呈颗粒状,每克提供14.7 KJ热量,主要成分为脂肪5.28%、蛋白质22.1%以及碳水化合物52%。生酮饮食由斯莱克实验动物有限公司配置,为新鲜高品质食物混合物,经过标准化程序同质加工处理后呈糊状,每克提供31.1 KJ能量。其主要营养成分为脂肪69%、蛋白质20%以及碳水化合物3%。所有饲料均经过辐射灭菌,生酮饲料在无特殊病原体环境中等分于培养皿中并保存于-20℃冰箱内。在喂食前一天晚上放入+4℃冰箱解冻。在接种当日将裸鼠随机分成2组,分别给予标准饮食(SD)及生酮饮食(KD),生酮饮食组进食量由标准饮食组前24 h进食量所能提供的热量决定,给予同等热量的生酮饮食。每3 d左右测量肿瘤体积及裸鼠重量一次。

1.2.3 血糖、血酮体、血胰岛素检测 接种当日检测血糖及血酮体水平,以后每7 d检测一次。检测方法为剪断尾巴取血,血糖约需2 μL,血酮体约5 μL,滴于相应试纸上,检测仪器为雅培超越立妥血糖仪(两用,可检测血糖及血酮体)。血胰岛素为处死当日心脏取血,送本院检验科检测。

1.2.4 肿瘤坏死面积测量 肿瘤坏死面积通过HE染色观察,用尼康D90单反相机拍照。将上述照片输入Photoshop,像素法测量坏死面积所占比例。在直方图选项中以数据形式显示坏死面积及总面积所占像素,进而计算坏死面积所占百分比。

1.2.5 微血管检验 微血管密度通过免疫组化并检测高倍镜($\times 200$)下富血管区来决定^[6]。在40倍和100倍视野下找到肿瘤切片内血管含量最丰富的3个非坏死区域,然后在200倍视野下计数该区域内所含微血管数量,并取其平均值作为该切片所含微血管数。

1.3 统计学分析

用SPSS 16.0以及GraphPad Prism 5.0软件进行数据分析。用Mann-Whitney U非参数检验法比较重量、肿瘤生长、血糖、血酮体水平、坏死面积及微血管密度, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 裸鼠重量变化

在不限制总量的情况下,两组裸鼠均伴有稳定的重量增长,直至实验结束。在接种当日,SD组及KD组平均重量分别为(19.5±0.9)g及(19.9±0.9)g($P > 0.05$)。第22天(SD组有1个以上裸鼠因肿瘤达到目标体积而被处死),两组重量分别为(24.6±1.2)g及(24.9±1.2)g($P > 0.05$)。

2.2 肿瘤生长

在接种当日,KD组裸鼠开始给予生酮饮食,SD组饮食不变,同时定期观测并测量肿瘤体积以观察成瘤及肿瘤生长情况。经过3 d的成瘤潜伏期后,SD组裸鼠开始成瘤,11 d内两组裸鼠全部成瘤。

SD组实验动物最长肿瘤生长期为29 d,此时,KD组只有3只裸鼠肿瘤达到目标体积。KD组实验动物最长肿瘤生长期为43 d。两组的平均生长时间分别为(24.8±3.1)d和(33.8±6.7)d。与SD组相比,KD组裸鼠肿瘤生长期明显延长($P < 0.05$)。

2.3 不同饮食对血糖、血酮体及血胰岛素水平的影响

如表1所示,在开始生酮饮食后7 d内,KD组裸鼠均达到酮症状态,此后,其血浆β-羟丁酸水平持续高于SD组,差异有统计学意义($P < 0.05$),而两组之间血糖水平无明显差异($P > 0.05$,表2)。在实验结束时,与SD组相比较,KD组血胰岛素水平略有下降,但

差别不明显[(528.4±157.5)pg/mL vs. (462.3±157.6)pg/mL, $P>0.05$)]。

表1 两组裸鼠皮下移植瘤模型血酮体水平(mmol/L)的变化
Table 1 Serum levels (mmol/L) of β -OHB in tumor-bearing animals in SD and KD groups

Item	SD	KD
Day 0	0.63±0.09	0.63±0.09
Day 7	0.62±0.12	1.92±0.23
Day 10	0.62±0.08	1.87±0.22
Day 18	0.61±0.09	2.04±0.25

表2 两组裸鼠皮下移植瘤模型血糖水平(mmol/L)的变化
Table 2 Serum levels (mmol/L) of glucose in tumor-bearing animals in SD and KD groups on different days after tumor cell injection

Item	SD	KD
Day 0	6.15±0.25	5.93±0.34
Day 7	6.34±0.28	6.14±0.29
Day 10	6.18±0.26	6.23±0.21
Day 18	6.18±0.23	6.09±0.27

2.4 不同饮食对裸鼠皮下移植瘤坏死面积的影响

如图1所示,与SD组相比较,KD组裸鼠人结肠癌皮下移植瘤内坏死面积明显增大,差异有统计学意义($P<0.05$),两组肿瘤坏死面积所占百分比中位数分别为26.4%和51.2%。

2.5 不同饮食对肿瘤新生血管的影响

为比较不同饮食对肿瘤新生血管的影响,本研究采用CD31免疫组织化学染色法观察裸鼠皮下移植瘤内新生血管密度,计数方法如前。如图2所示,SD组肿瘤内血管数明显多于KD组($P>0.05$)。

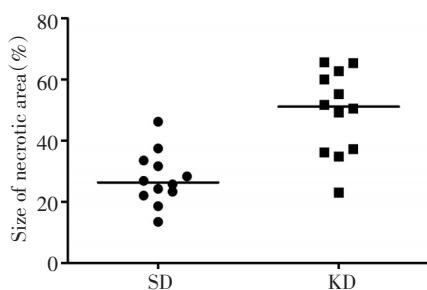
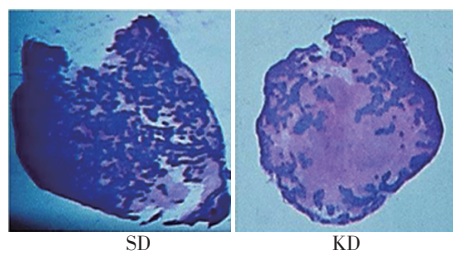


图1 不同饮食对裸鼠皮下移植瘤坏死面积的影响(H&E×4)
Figure 1 Influence of diet on tumor necrotic area (H&E×4)

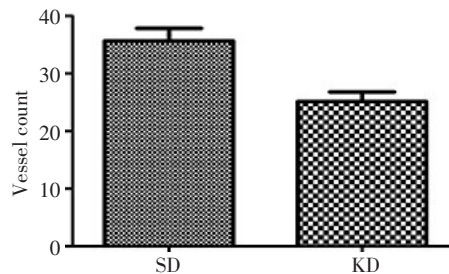
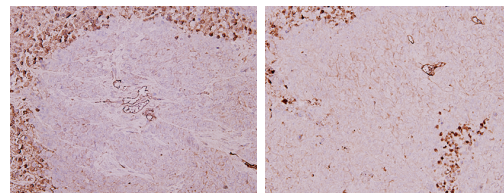


图2 不同饮食对裸鼠皮下移植瘤新生血管的影响(×200)
Figure 2 Influence of different diets on tumor vascularity (immunohistochemistry, ×200)

3 讨论

本实验用于验证生酮饮食是否具有延缓裸鼠人结肠癌 HCT116 细胞皮下移植瘤模型生长的作用。本文提供的生酮饮食具有高脂肪、适量蛋白质及低碳水化合物的特点。和西方标准化饮食相比,生酮饮食具有延缓肿瘤生长的作用,其肿瘤内部具有较大的坏死面积和较低的血管密度。与SD组相比较,KD组血糖水平无明显变化,但血酮体水平显著增高。传统化疗方法在杀伤肿瘤细胞的同时连同正常细胞也一并杀死,与之相比,生酮饮食是目前唯一的既杀伤肿瘤细胞又提高正常细胞生命活力的治疗方法^[7]。从这一点来看,生酮饮食较所有传统化疗方法均有优势。

本实验中,不限制总量的生酮饮食具有延缓肿瘤生长的作用,这一作用和另一种生酮饮食 KetoCal 相一致,KetoCal 是一种商业化的生酮饮食,最初用于儿童难治性癫痫的治疗^[8]。但只有在限制总量的情况下,KetoCal 才具有延缓裸鼠肿瘤生长的作用,而在限制总量情况下,裸鼠重量将在开始该种饮食 8 d 内下降约 20%~23%^[8]。和限制总量的 KetoCal 饮食相比,本实验中的生酮饮食既没有血糖水平下降,也不伴有重量丢失,但其抗肿瘤作用是相当可观的。因此,本文研究表明,通过代谢方法治疗癌症不一定要伴有血糖水平及重量的下降。生酮饮食具有抗肿瘤作用的原因可能是肿瘤细胞缺乏利用酮体供能的一种或多种关键酶,导致肿瘤细胞线粒体不能利用酮体供能^[9]。当机体葡萄糖供给量不足而需要利用酮体供能时,缺乏这些关键酶对肿瘤治疗来说就显得尤为重要。本实验再次证明了这种可能:在酮症状态下,KD组肿瘤生长明显延缓,主要原因可能是缺乏

β -羟丁酸脱氢酶和琥珀酰辅酶A:3酮酸辅酶A转移酶导致肿瘤细胞不能利用酮体作为替代能源,即通过代谢方法将肿瘤细胞从正常细胞中孤立出来。

晚期肿瘤患者的最终归宿是恶病质,以进食减少和代谢异常等因素共同引起的负氮平衡为特点,最终导致进行性重量下降^[10]。防止恶病质的发生对提高晚期肿瘤患者的生存质量和生存期至关重要,因此,限制总量的饮食疗法已不再适合这类患者的治疗。研究证实,提供高脂肪、适量蛋白质及低碳水化合物的生酮饮食可以阻止或限制骨骼肌蛋白的分解代谢^[11]。因此,在提供足够脂肪的情况下,不限制总量的生酮饮食确实可以改善恶病质患者的生活状况。本实验中,生酮饮食在延缓裸鼠皮下移植瘤生长的同时,伴有轻微的重量增长。

与SD组相比,KD组肿瘤坏死面积明显增大,这可能和KD组严格限制碳水化合物摄入有关。然而,本研究发现SD组与KD组血糖水平并无明显差别,这说明血糖并非由碳水化合物分解而来,而是通过糖异生由酮体转化而来。在血糖水平持续正常的情况下,生酮饮食仍具有延缓肿瘤生长的作用,其可能的解释是生酮饮食可显著降低血胰岛素水平^[12]。本实验中,尽管差别不明显,但生酮饮食组血胰岛素水平较SD组轻微降低。

与SD组相比,KD组肿瘤具有较大坏死面积的同时还具有较低的微血管密度。生酮饮食抑制血管新生作用可能和肿瘤组织内较低的乳酸盐/丙酮酸盐水平有关,因为乳酸盐/丙酮酸盐能刺激缺氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)的生成,从而使具有HIF-1活性的血管内皮生长因子表达增加^[13]。而抑制血管生成可以反过来限制肿瘤中心部位的葡萄糖摄取。侵袭性肿瘤细胞内这种严重的底物限制被称为“代谢灾难”,这种“代谢灾难”可以进一步加重坏死。最近,诱导“代谢灾难”的治疗方法常常被用来杀死“无法杀死”的肿瘤细胞^[14]。由于具有有氧糖酵解特性的肿瘤细胞对很多抗癌药物具有较强的抵抗力,生酮饮食疗法可能翻开抗癌治疗的新篇章。

综上所述,不限制总量的生酮饮食具有抑制人结肠癌裸鼠皮下移植瘤生长的作用,与西方标准饮食相比,生酮饮食组裸鼠肿瘤坏死面积明显增大,肿瘤新生血管数明显减少,其可能作用机制为通过代谢方法孤立肿瘤细胞,促进其死亡及减少肿瘤新生血管的形成。生酮饮食对肿瘤其他特性如侵袭性和转移性等的影响均有待进一步研究证实。

参考文献

- 1 Seyfried TN, Marsh J, Shelton LM, et al. Is the restricted ketogenic diet a viable alternative to the standard of care for managing malignant brain cancer[J]? *Epilepsy Res*, 2012, 100(3):310-326.
- 2 Masko EM, Thomas JA, Antonelli JA, et al. Low-carbohydrate diets and prostate cancer: how low is "low enough"[J]? *Cancer Prev Res (Phila)*, 2010, 3(9):1124-1131.
- 3 Otto C, Kaemmerer U, Illert B, et al. Growth of human gastric cancer cells in nude mice is delayed by a ketogenic diet supplemented with omega-3 fatty acids and medium-chain triglycerides[J]. *BMC Cancer*, 2008, 8:122.
- 4 Walenta S, Wetterling M, Lehrke M, et al. High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(4):916-921.
- 5 Veech RL. The therapeutic implications of ketone bodies: the effects of ketone bodies in pathological conditions: ketosis, ketogenic diet, redox states, insulin resistance, and mitochondrial metabolism [J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2004, 70(3):309-319.
- 6 Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al. Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 1991, 324(1):1-8.
- 7 Seyfried TN, Mukherjee P. Targeting energy metabolism in brain cancer: review and hypothesis[J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2005, 2:30.
- 8 Zhou W, Mukherjee P, Kiebish MA, et al. The calorically restricted ketogenic diet, an effective alternative therapy for malignant brain cancer[J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2007, 4:5.
- 9 Sawai M, Yashiro M, Nishiguchi Y, et al. Growth-inhibitory effects of the ketone body, monoacetoacetin, on human gastric cancer cells with succinyl-CoA: 3-oxoacid CoA-transferase (SCOT) deficiency[J]. *Anticancer Res*, 2004, 24(4):2213-2217.
- 10 Fearon K, Strasser F, Anker SD, et al. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus[J]. *Lancet Oncol*, 2011, 12(5):489-495.
- 11 Freeman JM, Kossoff EH, Hartman AL. The ketogenic diet: one decade later[J]. *Pediatrics*, 2007, 119(3):535-543.
- 12 Sharman MJ, Kraemer WJ, Love DM, et al. A ketogenic diet favorably affects serum biomarkers for cardiovascular disease in normal-weight men[J]. *J Nutr*, 2002, 132(7):1879-1885.
- 13 Yang SP, Morita I, Murota SI. Eicosapentaenoic acid attenuates vascular endothelial growth factor-induced proliferation via inhibiting Flk-1 receptor expression in bovine carotid artery endothelial cells [J]. *J Cell Physiol*, 1998, 176(2):342-349.
- 14 Jin S, DiPaola RS, Mathew R, et al. Metabolic catastrophe as a means to cancer cell death[J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 3):379-383.

(2014-07-20收稿)

(2014-08-20修回)

(本文编辑:贾树明)

作者简介

郝光伟 硕士生。专业方向为普通外科营养学。

E-mail: haoguangwei@126.com

