

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2019.20181374

槐耳清膏能抑制裸鼠肺癌细胞的增殖活性

童琳, 常美佳, 胡洁, 周建*, 白春学*

复旦大学附属中山医院呼吸科, 上海市呼吸病研究所, 上海 200032

[摘要] **目的:**探讨槐耳清膏对裸鼠异种肺癌移植瘤模型的抑瘤作用。**方法:**构建裸鼠异种肺癌移植瘤模型, 给予该模型鼠槐耳清膏处理。将裸鼠随机分为实验组和对照组, 分别给予槐耳清膏(剂量分别为1、3、5、7 g/kg)、0.9% NaCl溶液各0.2 mL灌胃, 每3 d给药1次, 持续给药3周。观察裸鼠肿瘤体积的变化及裸鼠体质量变化, 比较瘤体质量, 显微镜观察移植瘤组织病理变化和Ki-67阳性细胞比率。**结果:**裸鼠接种肺癌细胞14 d后, 接种部位均出现肿瘤生长。槐耳清膏1、3、5、7 g/kg剂量组抑瘤率分别为(1.73±12.99)%、(6.68±11.34)%、(46.24±9.17)%、(35.05±12.15)%。与对照组相比, 槐耳清膏5 g/kg($P=0.0044$)和7 g/kg($P=0.0215$)剂量组抑瘤率显著升高。槐耳清膏5 g/kg体质量组瘤重较对照组有降低趋势, 但差异无统计学意义。Ki-67免疫组化染色显示, 与对照组相比, 槐耳清膏3、5、7 g/kg剂量组肿瘤细胞增殖率显著下降, 其中7 g/kg组Ki-67阳性率最低(24.8%, $P<0.001$)。**结论:**槐耳清膏能抑制裸鼠体内肺癌细胞的增殖活性, 从而抑制肿瘤生长。

[关键词] 肺癌; 槐耳; 裸鼠; 抑瘤率**[中图分类号]** R 734.2; R 28 **[文献标志码]** A

Experimental research of Huaier aqueous extract on lung cancer tumor growth inhibition in nude mice

TONG Lin, CHANG Mei-jia, HU Jie, ZHOU Jian*, BAI Chun-xue*

Department of Pulmonary Medicine, Zhongshan Hospital, Fudan University; Shanghai Respiratory Research Institute, Shanghai 200032, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the antitumor effect of Huaier aqueous extract on xenografted lung cancer in nude mice. **Methods:** Xenograft model of lung cancer was constructed in nude mice, and the mice were treated with Huaier aqueous extract. Nude mice were randomly divided into experimental group and control group, and were treated with 0.2 mL Huaier aqueous extract (with the dose of 1 g/kg, 3 g/kg, 5 g/kg, and 7 g/kg, respectively) or 0.9% saline intragastrically once every 3 days for 3 weeks. The tumor volume and the changes of body weight of nude mice were observed, and the tumor weight was compared. The pathological changes of tumors and the ratio of Ki-67 positive cells were observed under microscopy. **Results:** After inoculation of lung cancer cells in nude mice for 14 days, tumor growth occurred in all inoculated sites. The tumor growth inhibition rates in the 1 g/kg, 3 g/kg, 5 g/kg, and 7 g/kg groups were (1.73±12.99)%, (6.68±11.34)%, (46.24±9.17)%, and (35.05±12.15)%, respectively. Compared with the control group, the tumor growth inhibition rate was significantly increased in the groups of 5 g/kg ($P=0.0044$) and 7 g/kg ($P=0.0215$). The tumor weight in the 5 g/kg group was lower than that in the control group, but there was no statistical difference. Ki-67 immunohistochemistry staining showed that the proliferation rate of tumor cells in the groups of 3 g/kg, 5 g/kg, and 7 g/kg was significantly lower than that in the control group, and Ki-67 positive rate in 7 g/kg group was the lowest (24.8%, $P<0.001$). **Conclusions:** In nude mice, Huaier aqueous extract can inhibit the proliferation activity of lung cancer cells, thereby inhibiting tumor growth.

[Key Words] lung cancer; Huaier; nude mice; tumor growth inhibition rate

近年来,随着对肺癌发病机制研究的进一步深入,新兴的治疗手段不断涌现,使得晚期肺癌患者

[收稿日期] 2018-12-07**[接受日期]** 2019-04-24**[基金项目]** 国家自然科学基金(81490533, 81400018, 81570028, 81770039), 复旦大学附属中山医院临床研究专项基金(2016ZSLC05), 北京医卫健康公益基金会医学科学研究基金(F2037E-中山医院). Supported by National Natural Science Foundation of China (81490533, 81400018, 81570028, 81770039), Clinical Research Foundation of Zhongshan Hospital, Fudan University (2016ZSLC05), and Medical Science Research Foundation of Beijing Medical and Health Public Welfare Foundation (F2037E-Zhongshan Hospital).**[作者简介]** 童琳, 博士, 主治医师. E-mail: tong.lin@zs-hospital.sh.cn

* 通信作者 (Corresponding authors). Tel: 021-64041990; E-mail: zhou.jian@fudan.edu.cn. Tel: 021-64041990; E-mail: bai.chunxue@zs-hospital.sh.cn

的预后得到较大改善。然而,老年晚期肺癌患者常无法耐受放化疗、靶向等治疗引起的不良反应。因此,应用不良反应小而具有良好免疫增强和抗肿瘤作用的药物是晚期肺癌治疗的理想手段。

槐耳是生长在中国古槐树上的一种天然菌,1500余年前已作为药物治疗多种疾病。槐耳清膏是槐耳菌质的提取物,具有诱导肿瘤细胞分化和凋亡、逆转肿瘤细胞耐药性、提高免疫细胞杀伤能力、抑制肿瘤细胞迁移和侵袭能力等多靶位抗肿瘤功效^[1]。体外研究^[2]发现,槐耳清膏能诱导人肺腺癌细胞凋亡,逆转肺腺癌细胞对顺铂的耐药性,增强顺铂的化疗作用。本研究通过探讨槐耳清膏对裸鼠肺癌移植瘤的抑瘤作用,分析其对肺癌的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 材料 槐耳清膏制剂由启东盖天力药业有限公司提供。将槐耳清膏溶于0.9% NaCl溶液,分别制成100、300、500、700 mg/mL的含药溶液,用于槐耳清膏组裸鼠灌胃。SPF级裸鼠由复旦大学附属中山医院中心实验室提供,雄性25只,鼠龄4~6周。

1.2 动物实验 将PC9R肺癌细胞等量(1×10^7)接种到25只裸鼠皮下,待接种14 d接种部位肿瘤长出后,将其随机分为5组,每组5只(实验过程中有裸鼠死亡情况,因此实验终点取瘤体时每组裸鼠为4~5只)。第1组每3 d给予槐耳清膏1 g/kg;第2组每3 d给予槐耳清膏3 g/kg;第3组每3 d给予槐耳清膏5 g/kg;第4组每3 d给予槐耳清膏7 g/kg;对照组每3 d给予0.9% NaCl溶液0.2 mL。接种前、接种14 d后以及给药期间每周称裸鼠体质量。喂养3周后颈椎脱臼处死,完整取出瘤体,比较各组瘤重和瘤体积,计算抑瘤率。抑瘤率的计算方

法如下:用游标卡尺测量肿瘤最长径(a)和最短径(b),肿瘤体积 $V=ab^2/2$;肿瘤相对体积(RTV)=某时间点肿瘤体积/分组时肿瘤体积;抑瘤率=(1-RTV 槐耳清膏组/RTV 对照组) $\times 100\%$ 。

1.3 组织病理学检查 肿瘤组织进行常规石蜡包埋切片,切片厚5 μm ,进行常规苏木精-伊红(H-E)染色,显微镜下观察肿瘤组织的病理学改变。肿瘤组织经Ki-67(DAKO公司提供)免疫组化染色,计算肿瘤组织Ki-67阳性细胞比率。

1.4 统计学处理 采用SPSS 19.0统计软件,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各实验组与对照组间比较采用 t 检验,检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 槐耳清膏对裸鼠皮下接种肺癌细胞成瘤的影响 25只裸鼠在接种PC9R肺癌细胞14 d后,接种部位均长出肿瘤,其他部位和器官均未见肿瘤生长。对肿瘤生长的抑制作用以槐耳清膏5 g/kg和7 g/kg剂量组的作用较强,槐耳清膏3 g/kg组和1 g/kg组较弱。其中,5 g/kg体质量($P=0.0044$)和7 g/kg剂量组($P=0.0215$)抑瘤率与对照组差异有统计学意义(表1);槐耳清膏7 g/kg组与5 g/kg组抑瘤率差异无统计学意义。喂养3周后取出移植瘤,称重,显示槐耳清膏5 g/kg组瘤重较对照组降低,但差异无统计学意义(图1)。

表1 槐耳清膏对裸鼠肺癌的抑瘤率

组别	抑瘤率/%
对照组	1
槐耳清膏组	
1 g/kg	1.73 \pm 12.99
3 g/kg	6.68 \pm 11.34
5 g/kg	46.24 \pm 9.17**
7 g/kg	35.05 \pm 12.15*

** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 与对照组相比

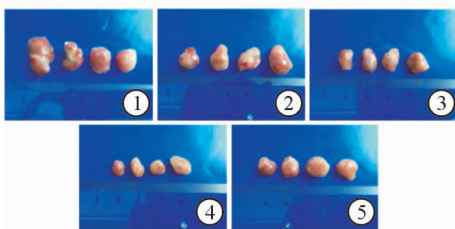
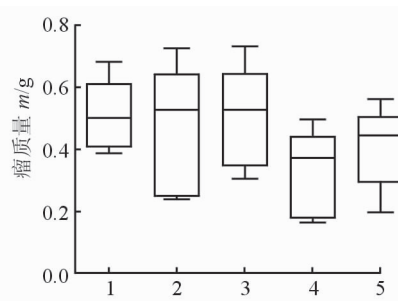


图1 槐耳清膏对裸鼠肺癌移植瘤质量的影响

1:对照组;2:槐耳清膏1 g/kg;3:槐耳清膏3 g/kg;4:槐耳清膏5 g/kg;5:槐耳清膏7 g/kg



2.2 槐耳清膏对皮下接种肺癌裸鼠体质量的影响 分别于肿瘤前、肿瘤后 14 d、喂养期间每周称裸鼠体质量,结果(图 2)显示:对照组裸鼠体质量在喂养前 2 周逐步增长,在喂养第 3 周较前有所减轻;槐耳清膏 3 g/kg、5 g/kg 和 7 g/kg 组裸鼠体质量在喂养第 3 周仍呈增长趋势,但差异无统计学意义。

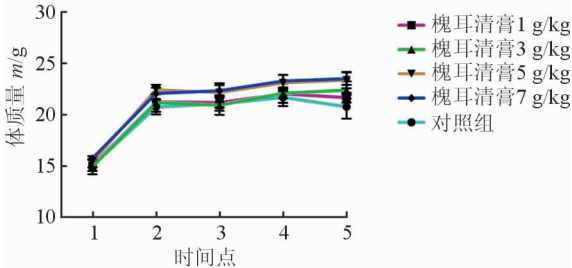


图 2 槐耳清膏对肺癌移植瘤裸鼠体质量的影响

1:肿瘤前;2:肿瘤后 14 d;3:给药 1 周后;4:给药 2 周后;5:给药 3 周后

2.3 槐耳清膏对裸鼠皮下接种肺癌细胞的组织病理学影响 H-E 染色结果(图 3)显示:对照组肿瘤细

胞生长旺盛,有异型性,形态不规则,大小不等,细胞核大、浓染,可见病理性核分裂相,无明显坏死区。槐耳清膏组肿瘤细胞出现不同程度退行性变,局部出现缺血坏死区,坏死灶周围可见残存肿瘤细胞。

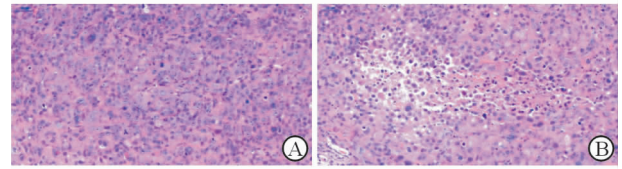


图 3 槐耳清膏对裸鼠肺癌肿瘤组织病理的影响 (H-E 染色)

A:对照组;B:槐耳清膏 5 g/kg 组. Original magnification: $\times 200$

2.4 槐耳清膏对裸鼠皮下接种肺癌细胞的增殖指数影响 对肺癌移植瘤组织进行 Ki-67 免疫组化染色,结果(图 4)显示:槐耳清膏 3、5、7 g/kg 组肿瘤细胞 Ki-67 阳性率均较对照组下降,其中 7 g/kg 组 Ki-67 阳性率最低(24.8%, $P < 0.001$),提示槐耳清膏对肿瘤细胞增殖活性有明显抑制作用。

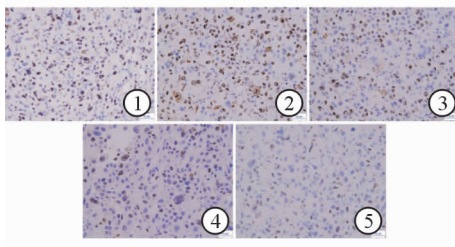
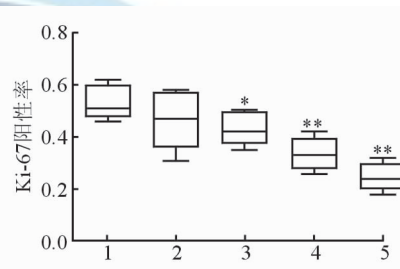


图 4 槐耳清膏对裸鼠肺癌肿瘤细胞 Ki-67 阳性率的影响

1:对照组;2:槐耳清膏 1 g/kg;3:槐耳清膏 3 g/kg;4:槐耳清膏 5 g/kg;5:槐耳清膏 7 g/kg. Original magnification: $\times 200$. ** $P < 0.01$,

* $P < 0.05$ 与对照组相比



3 讨论

肺癌已成为全球癌症相关死亡的首要病因,其死亡率占恶性肿瘤死亡率的第 1 位。目前肺癌的治疗采用以外科手术为主的综合疗法,但有一半以上的肺癌患者确诊时已是晚期,失去手术机会,可供选择的方案为化疗、放疗、靶向治疗、免疫治疗等的综合治疗,但总体预后仍欠佳,并且治疗的不良反应较大,较多患者无法耐受。因此,寻找对肺癌治疗有效而人体不良反应小的药物,一直是肺癌治疗的研究热点。槐耳清膏是槐耳菌质经热水提取物,含有多种有机成分,10 余种矿物质元素。槐耳多糖蛋白是槐耳清膏的主要活性成分,由 6 个单糖结合 18 种氨基酸组成,是一种活性很高的生物反应调节剂。槐耳清膏具有诱导肿瘤细胞分化和凋亡,提高免疫细胞杀伤能力,抑制肿瘤细胞迁移、侵袭能力

等多重抗肿瘤功效^[1]。槐耳清膏对正常细胞几乎没有损害。目前槐耳清膏已被制成槐耳颗粒应用于临床,对肺癌、结肠癌、肝癌、食管癌等肿瘤都有明显疗效^[1]。小样本的临床研究^[3-5]发现,槐耳能延长晚期肺癌患者的生存期,改善其生活质量和免疫功能。

既往研究^[6]显示,槐耳对体外培养的人大细胞肺癌 L9981 具有剂量依赖性的生长抑制作用,其机制可能与调控血管生成相关基因表达有关。槐耳处理后的肺癌 A549 细胞 miRNA 基因芯片检测结果显示,有 66 个 miRNA 异常表达,其中 miR-26b-5p 上调可抑制肺癌细胞 A549 增殖,诱导其凋亡,而特异性的抑制剂可逆转槐耳的作用。进一步机制研究发现,槐耳可能通过调控 miR-26b-5p 的作用靶点 EZH2 起到抗肿瘤作用;EZH2 可上调 wnt/ β -catenin 信号通路,进而上调 β -catenin 的表达,而

β -catenin 能够上调 Bcl-2 的表达^[7-9]。此外,槐耳多糖蛋白对非小细胞肺癌患者 Th1/Th2 细胞的免疫反应状态具有调节作用^[10]。

槐耳对肺癌的治疗作用研究目前主要集中在体外细胞实验,尚无动物体内研究进一步证实其疗效。本研究通过建立裸鼠肺癌移植瘤模型,观察槐耳清膏对肺癌细胞体内成瘤的影响,发现槐耳清膏对裸鼠移植瘤肺癌细胞具有显著的抑瘤作用,其中 5 g/kg 和 7 g/kg 剂量下抑瘤率较高。Ki-67 染色显示,槐耳清膏组肿瘤细胞增殖活性明显降低,提示槐耳对肺癌细胞的增殖具有抑制作用。此外,与对照组相比,槐耳清膏组裸鼠体质量逐步增长,提示槐耳对裸鼠的进食消化吸收等胃肠道功能无明显影响,其抑制肿瘤生长的作用可逆转肿瘤生长引起的裸鼠体质量减小。槐耳清膏具有不良反应少、耐药性低、费用较其他治疗手段少的特点,为肺癌治疗的研究提供了新方向,但其具体作用机制有待进一步研究^[11]。

本文全体作者声明:本研究由国家自然科学基金(81490533, 81400018, 81570028, 81770039),复旦大学附属中山医院临床研究专项基金(2016ZSLC05),北京医卫健康公益基金会医学科学研究基金(F2037E-中山医院)支持,不受任何其他第3方的资金赞助,本研究结果无任何相关利益冲突。

参考文献

[1] 庄毅. 真菌抗癌药物槐耳颗粒的研制[J]. 中国肿瘤, 1999

(12):540-543.

- [2] 黄涛,孔庆志,卢宏达,等. 槐耳清膏诱导人肺腺癌细胞 A549 凋亡的实验研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2001, 24(8):503.
- [3] 王雪涛,王彦文,张丽华,等. 金克槐耳颗粒在小细胞肺癌中的应用[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2010, 4(7): 1136-1137.
- [4] 刘兰芳,李青山,高东奇,等. 槐耳颗粒对老年晚期非小细胞肺癌生活质量的影响[J]. 肿瘤学杂志, 2006, 12(1): 70-71.
- [5] 许剑扬,李建新,赵志龙,等. 槐耳颗粒联合吉非替尼治疗晚期肺腺癌的研究[J]. 医学与哲学, 2014(6):30-32.
- [6] 张芷旋,范羽,周清华,等. 槐耳清膏对人高转移大细胞肺癌细胞 L9981 血管生成相关基因表达的影响[J]. 中国肺癌杂志, 2006, 9(2):137-142.
- [7] WU T, CHEN W, LIU S, et al. Huaier suppresses proliferation and induces apoptosis in human pulmonary cancer cells via upregulation of miR-26b-5p[J]. FEBS Lett, 2014, 588(12):2107-2114.
- [8] 吴唐维,陈卫群,王卉,等. 槐耳清膏对肺癌细胞 microRNA 表达的影响[J]. 中国科技成果, 2013, (7): 14-17.
- [9] 王卉,吴唐维,刘水逸,等. 槐耳清膏对肺腺癌细胞增殖凋亡及相关基因表达的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2015, (11):1483-1485.
- [10] 游佳,胡成平,顾其华,等. EGCG 和金克槐耳对非小细胞肺癌患者 Th1/Th2 细胞的免疫调节作用[J]. 中国肺癌杂志, 2009, 12(6):543-548.
- [11] SONG X, LI Y, ZHANG H, et al. The anticancer effect of Huaier (Review)[J]. Oncol Rep, 2015, 34(1):12-21.

[本文编辑] 廖晓瑜,贾泽军