

树舌灵芝提取物对三阴乳腺癌模型小鼠肿瘤抑制作用及其机理研究

亓子豪 孟 娇 王子良 孙会贞 杨 恭

摘要 **目的** 探讨树舌灵芝提取物在实验动物体内对三阴乳腺癌的抑制作用。**方法** 通过接种 MDA-MB-231-HM 细胞建立三阴乳腺癌荷瘤小鼠模型,将 20 只造模成功的小鼠按随机数字表法分为树舌灵芝组和阴性对照组,每组 10 只,树舌灵芝组腹腔注射 0.2 mL 树舌灵芝水提物(100 mg/mL),阴性对照组给相同剂量的生理盐水,每 3 天用药 1 次,45 天后停药。通过免疫组织化学法检测 CD34 表达,以计数微血管;同时通过免疫组化法检测凝血酶敏感蛋白 1(thrombospondin 1, TSP-1)及细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)表达。**结果** 树舌灵芝组小鼠瘤重[(0.33 ± 0.16)g]明显低于阴性对照组[(0.68 ± 0.37)g],两者差异有统计学意义($P < 0.05$);树舌灵芝提取物抑瘤率为 51.4%。树舌灵芝组移植瘤体积明显小于阴性对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。免疫组织化学染色结果显示:树舌灵芝组移植瘤中每个视野下微血管密度为(20.7 ± 2.1)个、TSP-1 阳性细胞数为(66.2 ± 9.2)个、Cyclin D1 阳性细胞数为(33.8 ± 16.4)个;阴性对照组依次为(34.0 ± 2.0)、(24.0 ± 6.6)及(168.2 ± 32.6)个。两组间比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 树舌灵芝提取物可能通过抑制肿瘤组织中血管的生成及调节细胞周期来抑制肿瘤细胞的过度增殖,从而实现对三阴乳腺癌的抑制作用。

关键词 树舌灵芝;三阴乳腺癌;抗肿瘤

Antitumor Effect of *Ganoderma lipsiense* Extract on Triple-negative Breast Cancer Model Mice and Mechanism Study QI Zi-hao, MENG Jiao, WANG Zi-liang, SUN Hui-zhen, and YANG Gong
Cancer Institute, Fudan University, Shanghai Cancer Center, Shanghai (200032)

ABSTRACT **Objective** To study the inhibitory effect and mechanism of *Ganoderma lipsiense* extract (GLE) on the growth of triple-negative breast cancer (TNBC) cell line MDA-MB-231-HM in a mouse model. **Methods** The mouse model of TNBC was established by subcutaneous injection of 1.5×10^6 of MDA-MB-231-HM cells into BALB/c-nu mouse. Twenty successfully modeled mice were divided into the GLE group and the negative control group according to random digit table, 10 in each group. GLE (0.2 mL 100 mg/mL) was peritoneally injected to mice in the GLE group, while equal dose of normal saline was peritoneally injected to mice in the negative control group. The medication was administered once per 3 days and discontinued after 45 days. The CD34 expression was detected using immunohistochemical assay for counting microvessels. Meanwhile, expressions of thrombospondin 1 (TSP-1) and cyclin D1 were detected using immunohistochemical assay. **Results** The average weight was obviously lower in the GLE group than in the negative control group [(0.33 ± 0.16)g vs (0.68 ± 0.37)g, $P < 0.05$]. The tumor inhibition rate was 51.4% in the GLE group. The volume of transplanted tumor was obviously lesser in the GLE group than in the negative control group ($P < 0.05$). Results of immunohistochemical staining showed, the microvessel density (MVD) under every field was (20.7 ± 2.1), TSP-1 positive cell count was (66.2 ± 9.2), cyclin D1 positive cell count was (33.8 ± 16.4) in the GLE group, and they were 34.0 ± 2.0, 24.0 ± 6.6, and 168.2 ± 32.6, respectively in the negative control group. There was statistical difference in all indices between the two groups ($P < 0.05$). **Conclusion** GLE could inhibit malignant proliferation of tumor cells by suppressing angiogenesis of blood vessels in tumor tissues and regulating

作者单位:复旦大学肿瘤研究所,复旦大学附属肿瘤医院(上海 200032)

通讯作者:杨恭, Tel:18017317271, E-mail:yanggong@fudan.edu.cn

DOI: 10.7661/CJIM.2016.03.0366

cell cycles, thereby inhibiting TNBC.

KEYWORDS *Ganoderma lipsiense*; triple-negative breast cancer; antineoplastic agent

灵芝作为一种传统中药材,在中医学中被用来治疗多种疾病,已有 2 000 多年的历史了。近年来,国内外许多研究者对灵芝的抗肿瘤作用做了大量研究,证实灵芝提取物在体外及体内均有较强的抗肿瘤作用^[1]。乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,其中雌激素受体、孕激素受体及人表皮生长因子受体 2 均为阴性的一类称为三阴乳腺癌^[2]。三阴乳腺癌占乳腺癌的 15%~20%,其发展迅速,侵袭性强,易发生局部复发及远处转移,且内分泌治疗和曲妥珠单抗靶向治疗无效,因此预后较差^[2]。针对三阴乳腺癌的更有效的疗法是近年来乳腺癌研究探索的热点。树舌灵芝(*Ganoderma lipsiense*)为灵芝属(*Ganoderma* Karst.)的真菌。据相关文献报道,树舌灵芝粗提物在体外对乳腺癌细胞具有抑制作用^[3]。该项研究主要通过人乳腺癌细胞系(MDA-MB-231-HM 细胞)建立三阴乳腺癌荷瘤小鼠模型,探讨及评价树舌灵芝提取物在实验动物体内对三阴乳腺癌的作用。

材料与方法

1 细胞株 MDA-MB-231-HM 细胞系(由 MDA-MB-231 细胞体内传代筛选出的具有肺高转移倾向的细胞),由复旦大学附属肿瘤医院中心实验室所构建^[4],裸鼠皮下接种可生成瘤。培养条件:贴壁生长于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中(含青霉素 100 U/mL,链霉素 100 mg/L),放置于 5% CO₂, 37 °C 培养箱中常规培养。1~2 天换液 1 次,3~4 天传代。

2 实验动物 SPF 级裸鼠 20 只(品系为 BALB/C-nu),雌性,5~6 周龄,体重 18~20 g,由复旦大学上海医学院实验动物中心购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司[许可证号:SYXK(沪)2008-0016]。饲养于复旦大学上海医学院大学实验动物中心 SPF 级环境中,实验前饲养 1 周,室温保持在 25 °C。

3 药物 树舌灵芝提取物由海南吉祥草野生灵芝真菌生物科技有限公司提供(批号:20120816)。树舌灵芝提取物是由树舌灵芝粉碎、煮沸后取上清液冻干而得的黑褐色药粉。用 PBS 溶液将树舌灵芝提取物配成 100 mg/mL 溶液,0.22 μm 滤器过滤除菌,4 °C 冰箱保存备用。

4 试剂及仪器 DMEM 培养基(Hyclone 公司),胎牛血清(Hyclone 公司),免疫组织化学抗体(Santa Cruz 公司),二甲基亚砜、无水乙醇等(所用试剂均为分

析纯)。生物安全柜(Thermo Scientific 公司, 1300 A2)、CO₂ 恒温培养箱(Thermo Scientific 公司, HERA-cell 2401)、超净工作台(苏净公司, BHC-1300IIA2)、显微镜(Olympus 公司, CKX41)、离心机(Eppendorf 公司, 5810)、细胞培养皿(Axygen 公司)、96 孔细胞培养板(Axygen 公司)、微量移液器(Eppendorf 公司)、振荡器(IKA 公司 MS3)、酶标仪(Biotek 公司, SynergyHTX)、游标卡尺(Pro skit 公司, PD-151)、电子天平(Sartorius 公司, CPA224S)、液氮罐(Thermo Scientific 公司, Locator 6 PLUS)等。

5 荷瘤小鼠模型的建立 将 MDA-MB-231-HM 细胞培养于含体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,置于 37 °C、含 5% CO₂ 的培养箱内。取贴壁生长的对数期细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化,吹打成细胞悬液, PBS 洗涤 2 次,每次 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,用无菌 PBS 溶液稀释,调整到 1.5×10^7 /mL 个瘤细胞,用 1 mL 注射器在每只小鼠胸部皮下脂肪垫各接种 0.1 mL (150 万个细胞)^[5]。共接种 20 只小鼠。移植瘤接种后第 2 天可见接种部位有结节,大小约 5 mm × 5 mm,随后结节逐渐减小,至第 6 天大小约 1 mm × 1 mm,此后结节稳定增长,第 10 天结节大小为 5 mm × 5 mm。20 只裸鼠全部成瘤,成瘤率 100%。

6 分组及给药方法 将 20 只造模成功的小鼠采用随机数表法随机分为树舌灵芝组和阴性对照组,每组 10 只。树舌灵芝组腹腔注射 0.2 mL 树舌灵芝水提物(100 mg/mL),阴性对照组给相同剂量的生理盐水,每 3 天用药 1 次,每次用药前测量小鼠体重,45 天后停药。

7 观测指标及方法

7.1 肿瘤成长曲线及抑瘤率测定 给药期间,每 3 天用游标卡尺由体外测出瘤体的长径(a)和短径(b),然后根据体积 $V = 0.52 \times a \times b^2$,绘出肿瘤生长曲线图。停药后,颈椎脱臼法处死小鼠,剥离瘤块,称取瘤重。计算抑瘤率。抑瘤率(%) = (阴性对照组平均瘤重 - 树舌灵芝组平均瘤重) / (阴性对照组平均瘤重) × 100%。

7.2 微血管计数检测 肿瘤标本乙醇脱水,4% 甲醛固定,石蜡包埋切片,厚度为 5 μm,行 CD34 免疫组织化学染色。CD34 阳性产物呈棕色颗粒,定位于血管内皮细胞膜及胞质。CD34 可标记微血管,阳性脉管主要为棕黄色管腔样结构。光镜下计数时,先在 100 倍视野下选取 3 个微血管最丰富的区域,然后

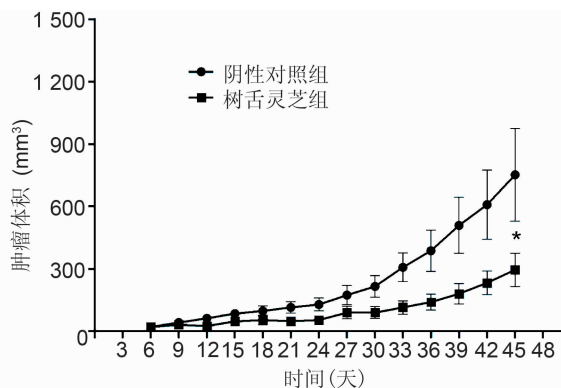
再在 400 倍视野下计数每一区域中的微血管数量,取其平均值。计数时,将与邻近的微血管、肿瘤细胞和周围结缔组织分界清晰的 CD34 阳性内皮细胞或内皮细胞簇计为一个微血管^[6,7]。

7.3 凝血酶敏感蛋白 1 (thrombospondin 1, TSP-1) 及细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1) 检测 肿瘤标本乙醇脱水,4% 甲醛固定,石蜡包埋后做免疫组织化学染色。先在 100 倍视野下选取 5 个棕黄色颗粒最丰富的区域,然后再在 400 倍视野下计数一个视野中阳性细胞的数量,取其平均值。

8 统计学方法 实验采集的数据采用 SPSS 10.0 统计软件统计分析。检验方法采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

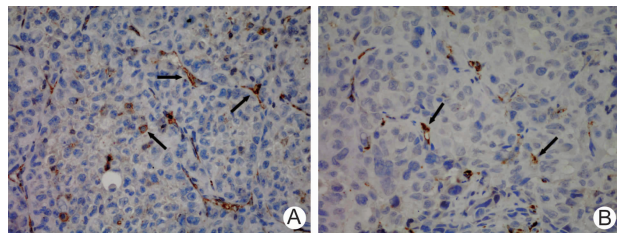
1 两组裸鼠移植瘤生长曲线及抑瘤率结果比较 (图 1) 用药 45 天后,树舌灵芝组小鼠瘤重 $[(0.33 \pm 0.16)g]$ 明显低于阴性对照组 $[(0.68 \pm 0.37)g]$,两者差异有统计学意义($P < 0.05$),树舌灵芝提取物抑瘤率为 51.4%。小鼠移植瘤生长曲线显示树舌灵芝组移植瘤体积明显小于阴性对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。



注:与阴性对照组比较,* $P < 0.05$

图 1 MDA-MB-231-HM 细胞裸鼠移植瘤体积变化

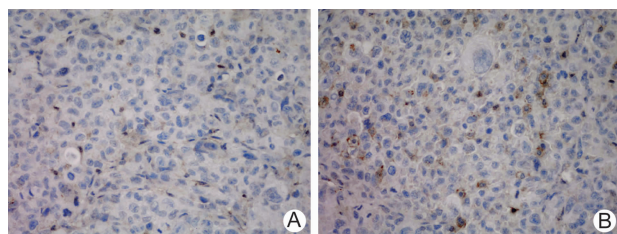
2 两组裸鼠移植瘤血管计数结果比较 (图 2) CD34 免疫组织化学染色结果显示:阴性对照组移植瘤组织内可见形态不规则,无明显管腔样结构的新生血管,血管多分布于肿瘤组织靠近边缘处。树舌灵芝组移植瘤组织中微血管密度低于对照组。微血管计数结果显示:树舌灵芝组移植瘤中微血管密度为 (20.7 ± 2.1) 个;对照组移植瘤中微血管密度为 (34.0 ± 2.0) 个,阴性对照组高于树舌灵芝组,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。



注:A 为阴性对照组;B 为树舌灵芝组;黑色箭头所指示的棕黄色管腔样结构为 CD34 标记的肿瘤微血管

图 2 两组细胞裸鼠移植瘤内微血管密度 (SP, $\times 400$)

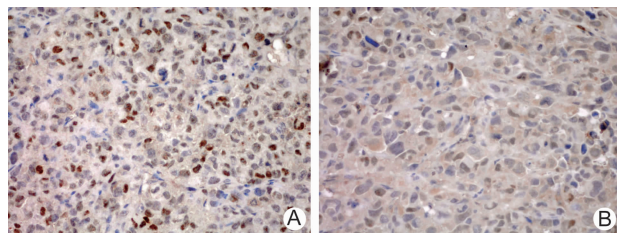
3 两组裸鼠移植瘤 TSP-1 表达结果比较 (图 3) TSP-1 免疫组织化学染色结果显示:树舌灵芝组和阴性对照组移植瘤组织中 TSP-1 表达均较低,但树舌灵芝组 TSP-1 表达高于阴性对照组。树舌灵芝组移植瘤中每个视野下中 TSP-1 阳性细胞数为 (66.2 ± 9.2) 个;阴性对照组移植瘤中每个视野下中 TSP-1 阳性细胞数为 (24.0 ± 6.6) 个,两组差异有统计学意义($P < 0.05$)。



注:A 为阴性对照组;B 为树舌灵芝组

图 3 两组裸鼠移植瘤中 TSP-1 表达 (SP, $\times 400$)

4 两组裸鼠移植瘤 Cyclin D1 表达结果比较 (图 4) 树舌灵芝组移植瘤中每个视野下中 Cyclin D1 阳性细胞数为 (33.8 ± 16.4) 个;阴性对照组移植瘤中每个视野下中 Cyclin D1 阳性细胞数为 (168.2 ± 32.6) 个。两组差异有统计学意义($P < 0.05$)。



注:A 为阴性对照组;B 为树舌灵芝组

图 4 两组裸鼠移植瘤中 Cyclin D1 表达 (SP, $\times 400$)

讨 论

据《神农本草经》中记载:灵芝“主胸中结,益心气,补中,增智慧,不忘,久食,轻身不老,延年神仙”。树舌灵芝 (*Ganoderma lipsiense*) 为灵芝属 (*Ganoderma*

Karst)的真菌。(1)在我国大部分省区均有分布,且广泛分布于欧洲、亚洲、北美洲等其他国家^[8]。临床多用于治疗乙型肝炎、食道癌、肺结核、神经衰弱等^[9]。在我国和日本民间作为抗癌药物应用已久^[1,3,9]。三阴乳腺癌占乳腺癌的 15%~20%,其雌激素受体、孕激素受体及人表皮生长因子受体 2 均为阴性,因此针对乳腺癌的常规激素治疗和曲妥珠单抗靶向治疗无效,预后较差^[2]。本实验以 BALB/C-nu 裸鼠为研究对象,将 MDA-MB-231-HM 细胞接种于裸鼠胸部皮下脂肪垫建立三阴乳腺癌荷瘤小鼠模型,探讨了树舌灵芝提取物在实验动物体内对三阴乳腺癌的作用。

该项研究中树舌灵芝组每 3 天腹腔注射树舌灵芝水提取物 20 mg,用药 45 天后,树舌灵芝组小鼠瘤重明显低于阴性对照组,两者差异有统计学意义,树舌灵芝提取物抑瘤率为 51.4%。小鼠移植瘤生长曲线显示树舌灵芝组移植瘤体积明显小于对照组。这说明树舌灵芝提取物在实验动物体内能够抑制肿瘤的生长。通过免疫组织化学染色检测肿瘤组织血管密度,结果显示树舌灵芝提取物能够抑制移植瘤中微血管的形成。进一步的研究显示树舌灵芝对血管生成的抑制作用,可能是通过促进 TSP-1 的表达来实现的。TSP-1 是血管生成抑制因子,可抑制肿瘤血管生成,现已发现多种肿瘤中 TSP-1 表达减少^[10]。TSP-1 的高表达抑制了微血管的生成,从而进一步达到抑制肿瘤细胞生长的效果。这与张海英等^[11]发现灵芝能使肿瘤中微血管密度值降低,抑制血管新生,以此发挥抗肿瘤作用相一致。此外,Jiang J^[12]研究了含灵芝提取物对 MDA-MB-231 的作用,发现灵芝提取物可抑制细胞周期调节基因的表达,使细胞周期停滞在 G2/M 期,从而抑制细胞的分裂和增殖。此外,本研究还发现树舌灵芝提取物能够抑制 Cyclin D1 的表达。Cyclin D1 是细胞周期正性调节因子,其过度表达可使细胞 G1 期缩短,是多种人类原发性肿瘤的特征,与肿瘤的发生、转移和预后密切相关^[13]。抑制 Cyclin D1 的表达能够引起细胞周期 G1 期阻滞,从而抑制肿瘤细胞的增殖。这说明树舌灵芝提取物能够通过调节细胞周期来抑制肿瘤的生长。然而,本研究中所用树舌灵芝水提取物为树舌灵芝粗提物,成分复杂,其中何种成分发挥了抗肿瘤的作用,目前尚不明确,仍需进一步研究。

综上所述,树舌灵芝提取物在实验动物体内,可能通过抑制肿瘤组织中血管的生成并通过调节细胞周期来抑制肿瘤细胞的过度增殖,从而实现对三阴乳腺癌的抑制作用。

题的资助)

参 考 文 献

- [1] Jin X, Ruiz BJ, Sze DM, et al. *Ganoderma lucidum* (Reishi mushroom) for cancer treatment[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2012, 6: CD007731.
- [2] Metzger-Filho O, Tutt A, de Azambuja E, et al. Dissecting the heterogeneity of triple-negative breast cancer[J]. J Clin Oncol, 2012, 30(15): 1879-1887.
- [3] 周忠波, 马红霞, 图力古尔. 树舌灵芝粗提物体外抗肿瘤作用的研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(7): 1649-1650.
- [4] Xu WH, Liu ZB, Yang C, et al. Expression of dickkopf-1 and beta-catenin related to the prognosis of breast cancer patients with triple negative phenotype[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e37624.
- [5] Wyatt CA, Geoghegan JC, Brinckerhoff CE. Short hairpin RNA-mediated inhibition of matrix metalloproteinase-1 in MDA-231 cells: effects on matrix destruction and tumor growth[J]. Cancer Res, 2005, 65(23): 11101-11108.
- [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] Ajili F, Kacem M, Tounsi H, et al. Prognostic impact of angiogenesis in nonmuscle invasive bladder cancer as defined by microvessel density after immunohistochemical staining for CD34[J]. Ultrastruct Pathol, 2012, 36(5): 336-342.
- [8] 吴兴亮, 戴玉成, 林尤河. 中国灵芝科资源及其地理分布 III[J]. 贵州科学, 2004, 22(4): 36-40.
- [9] 谢宗万, 余友芹主编. 全国中草药名鉴(上册)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 16.
- [10] Clezardin P, Frappart L, Clerget M, et al. Expression of thrombospondin (TSP1) and its receptors (CD36 and CD51) in normal, hyperplastic, and neoplastic human breast[J]. Cancer Res, 1993, 53(6): 1421-1430.
- [11] 张海英, 何旭, 杨旭芳, 等. 桑黄灵芝 UE-1 对肿瘤生长及血管新生的抑制作用[J]. 肿瘤防治研究, 2010, 37(4): 369-372.
- [12] Jiang J, Sliva D. Novel medicinal mushroom blend suppresses growth and invasiveness of human breast cancer cells[J]. Int J Oncol, 2010, 37(6): 1529-1536.
- [13] Pervin S, Singh R, Chaudhuri G. Nitric oxide-induced cytostasis and cell cycle arrest of a human breast cancer cell line (MDA-MB-231): potential role of cyclin D1[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(6): 3583-3588.

(收稿:2013-11-13 修回:2015-07-10)

(致谢:海南吉祥草野生灵芝真菌生物科技有限公司对课