

枸杞多糖对自发乳腺癌 MMTV-PyMT 小鼠肿瘤生长和转移的作用

李媛媛¹, 亓翠玲², 周芷晴¹, 杜标炎¹, 李嘉琳², 李梦诗², 何彦丽^{1*}

(1. 广州中医药大学, 广州 510006; 2. 广东药科大学, 广州 510006)

【摘要】 目的 以 MMTV-PyMT 小鼠为乳腺癌模型探讨枸杞多糖对乳腺癌生长和转移的作用。**方法** 扩群鉴定转基因自发乳腺癌 MMTV-PyMT 小鼠, 将阳性雌性小鼠随机分为 LBP 组和对照组, 每组 8 只, 小鼠 8 周龄时给药, LBP 组给予 LBP (50 mg/kg, 腹腔注射) 治疗, 对照组给予生理盐水, 每 2 d 给药一次测量肿瘤体积一次, 4 周后脱臼处死, 肺 Bouin's 溶液固定后观察肺表面转移结节数目, 肿瘤组织固定包埋后免疫组化法检测肿瘤细胞增殖及血管密度。**结果** MMTV-PyMT 阳性小鼠成瘤率 100%, 与对照组相比, LBP 组的肿瘤重量 (4.208 ± 0.4463 g) 明显地比对照组 (6.477 ± 0.3724 g) 轻, 肿瘤体积也明显比对照组小; LBP 组肺表面结节数目 (12 ± 1.155 个) 明显比对照组 (20 ± 2.745 个) 少, 免疫组化染色结果显示 LBP 组肿瘤组织中细胞增殖数目及微血管密度明显比对照组少。**结论** 枸杞多糖可通过抑制 MMTV-PyMT 小鼠乳腺癌的生长和转移, 并抑制肿瘤细胞增殖和血管新生, MMTV-PyMT 小鼠可作为乳腺癌肺转移模型运用于抗肿瘤药物研究。

【关键词】 MMTV-PyMT 小鼠; 枸杞多糖; 肿瘤转移; 肿瘤生长

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)06-0618-04

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.06.012

Inhibitory effect of *Lycium barbarum* polysaccharide on tumor growth and metastasis in MMTV-PyMT mouse model of breast cancer

LI Yuan-yuan¹, QI Cui-ling², ZHOU Zhi-qing¹, DU Biao-yan¹,
LI Jia-ling², LI Meng-shi², HE Yan-li^{1*}

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

【Abstract】 Objective To investigate the inhibitory effect of *Lycium barbarum* polysaccharide (LBP) on the tumor growth and metastasis in MMTV-PyMT mouse model of breast cancer. **Methods** The population of MMTV-PyMT transgenic mice was expanded and identified. 8-week old MMTV-PyMT-positive female mice were randomly divided into LBP group and control group, 8 mice in each group. The mice of LBP group were given LBP treatment (50 mg/kg, i. p.), and the control group was given normal saline in the same volume, once every 2 days for 4 weeks. The tumor size was measured every two days. The mice were killed at 4 weeks after treatment, the lungs were removed and fixed in Bouin's solution to observe the number of metastatic nodules, and tumor tissues were used for immunohistochemical examination of tumor cell proliferation and vascular density. **Results** The tumor formation rate was 100% in the MMTV-PyMT-positive mice. The tumor weight of LBP group was 4.208 ± 0.4463 g, significantly lower than the 6.477 ± 0.3724 g in the control group ($P < 0.005$). The number of pulmonary nodules of the LBP group was 12 ± 1.155 , significantly less than that of the control group (20 ± 2.745) ($P < 0.05$). The immunohistochemical examination using Ki67 and CD31 staining showed that tumor cell proliferation and microvessel density of the LBP group were significantly less than the NS group. **Conclusions** LBP

[基金项目] 广州中医药大学“薪火计划”资助项目 (XH20140102)。

[作者简介] 李媛媛, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药抗肿瘤药理。E-mail: yuanyuan_li108@163.com

[通讯作者] 何彦丽, E-mail: yanlihe16@163.com

inhibits breast cancer growth and metastasis through the inhibitory effect on tumor growth and metastasis, inhibition of tumor cell proliferation and angiogenesis in MMTV-PyMT mice. These mice can be used as an ideal model for studies on antitumor drug development for the treatment of breast cancer lung metastasis.

【Key words】 MMTV-PyMT mouse; *Lycium barbarum* polysaccharide; Tumor metastasis, lung; Tumor growth

Corresponding author: HE Yan-li. E-mail: yanlihe16@163.com

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,并且其发病率逐年上升。乳腺癌癌细胞易穿透基底膜进入血液和淋巴道,发生远端转移,并导致术后复发,严重威胁乳腺癌患者生命健康。乳腺癌 MMTV-PyMT 转基因小鼠为浸润性导管癌小鼠^[1],12 周龄时出现肺转移,其肿瘤病理进程与乳腺癌患者相似^[2]。本实验根据 MMTV-PyMT 转基因小鼠乳腺癌发病情况及组织病理学的特点,观察枸杞多糖对乳腺癌及乳腺癌肺转移的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

MMTV-PyMT 小鼠购自美国 Jackson 实验室,品系名称为 FVB/N-Tg (MMTV-PyMT) 634Mul/J, 共 3 只(1 雄,2 雌),8~12 周龄用于扩群。

1.1.2 饲养环境

饲养于广州市广东药科大学动物中心【SYXK (粤)2012-0125】SPF 的环境中,饲养密度 ≤ 6 只/笼,室温 22~28℃,相对湿度 50%~70%,昼夜明暗光照时间(12 h 明/12 h 暗)。饲料购自广东省动物中心,经⁶⁰Co 辐照灭菌;饮用水为城市普通居民用水,经高压灭菌。

1.1.3 主要药物及试剂

枸杞多糖(质量分数为 60%)购自中国西安开来生物工程有限公司;CD31 抗体(ab28364)购于美国 Abcam 公司;Ki67 抗体,抗鼠二抗、抗兔二抗购自中国北京中杉金桥生物技术公司;PCR 引物由中国广州英潍捷基公司合成;PCR Mix(K1082)购自美国 Thermo 公司;DAB(8059p)购自美国 CST 公司。

1.1.4 主要仪器

石蜡切片机购于徕卡公司,Olympus 显微镜、显微数码图像技术购于 Olympus 公司,VMC64S7 型独立送回风净化笼具购于苏杭实验动物设备厂;PCR 仪购于美国应用生物系统公司。

1.2 方法

1.2.1 MMTV-PyMT 小鼠繁育

用引种的乳腺癌 MMTV-PyMT 转基因雄性小鼠,目的基因为杂合子(+/-)和正常雌性成年小

鼠 FVB(+/-)以 1:2 的比例杂交,F1 代中既有 MMTV-PyMT 小鼠,也有正常 FVB 小鼠,进行全同胞兄妹交配,扩大种群。

1.2.2 转基因检测

小鼠 4 周时剪取小鼠足趾进行编号并提取 DNA,用 PCR 法进行基因检测,阳性小鼠扩增条带在 556 bp,详细引物序列及反应条件见文献^[2],反应同时设阴性对照组及阳性组。

1.2.3 小鼠给药及一般情况观察

将 MMTV-PyMT 小鼠随机分为给药组(LBP)和对照组(NS),每组各 8 只。小鼠从 8 周给予枸杞多糖(50 mg/kg)(根据本实验室之前治疗小鼠肝癌的剂量)^[3]和生理盐水治疗,1 次/2 日,治疗 4 周,每隔 1 d 用游标卡尺测量肿块的长径 A(mm)及短径 B(mm),计算肿瘤体积,并绘制肿瘤生长曲线,治疗 4 周后将小鼠乙醚麻醉并脱臼处死,分离肿瘤,取出各脏器。

1.2.4 组织病理学改变观察

各组切取部分肿瘤组织,4% 中性甲醛固定,常规石蜡包埋,HE 染色,观察肿瘤组织病理学改变。

1.2.5 免疫组化染色

①常规切片、脱蜡,PBS 洗 3 次,每次 5 min;②柠檬酸钠(pH 6.0)高温高压修复 8 min;③放入 3% H₂O₂ 甲醇溶液 37℃ 浸泡 30 min,PBS 再洗 3 次,每次 5 min;④组织上加 10% BSA 于 37℃ 进行封闭 60 min 后;⑤加一抗 CD31 或 Ki67 置于 4℃ 过夜;⑥第 2 天将组织切片从封闭盒中拿出,PBS 洗 3 次,每次 5 min;⑦于组织上加上二抗于室温孵育 1 h,然后 PBS 洗 3 次,每次 5 min;⑧DAB 显色,苏木素复染 30 s,流水返蓝,常规脱水;⑨晾干后组织上滴加适量中性树胶,盖上盖玻片,自然晾干。

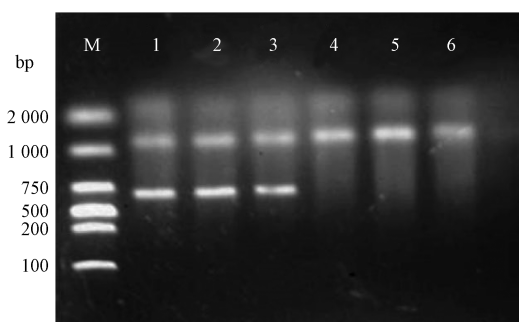
1.2.6 统计学方法处理

采用 Image-Pro Plus 6.0 (IPP) 统计软件包和 Graph-Pad 软件包处理,计量资料间比较采用两独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠鉴定结果

MMTV-PyMT 小鼠在 556 bp 条带处出现阳性条带,对照 FVB 为阴性,结果见图 1。



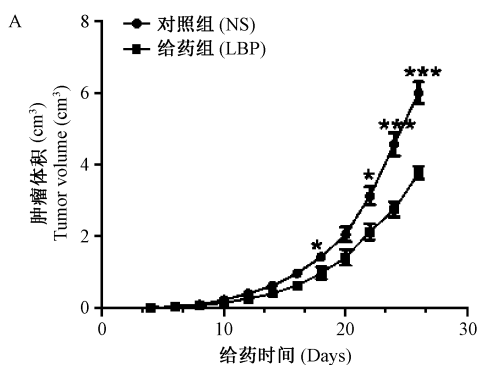
注:1-3 为 MMTV-PyMT 阳性小鼠(556 bp),4-6 号为阴性 FVB 鼠。

图 1 MMTV-PyMT 小鼠鉴定电泳图

Note. Line 1,2,3 are MMTV-PyMT-positive mice,

Line 4,5,6 are FVB-negative mice.

Fig.1 Electrophoretic identification of the MMTV-PyMT mice.



注:LBP 组相对于 NS 组 * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。(下同)。

图 2 LBP 对 MMTV 小鼠肿瘤的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Note. Compared the LBP group with NS group, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. (The same as in the following figures).

Fig.2 Influence of LBP on the tumor of MMTV mice

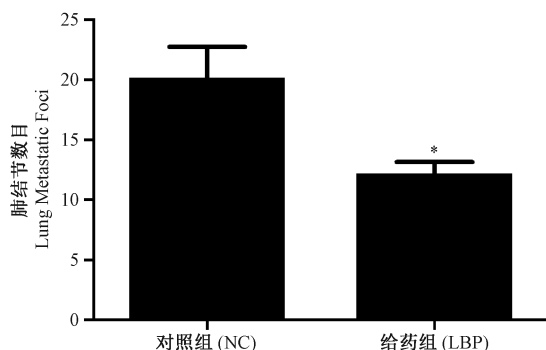


图 3 LBP 给药组和 NC 组转移肺结节数($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig.3 The numbers of lung metastatic foci in the NC and LBP groups.

2.5 LBP 对 MMTV 小鼠肿瘤血管形成的作用

通过 Ki67 免疫组化染色结果,初步判断 LBP

2.2 LBP 对 MMTV-PyMT 小鼠肿瘤体积及重量的影响

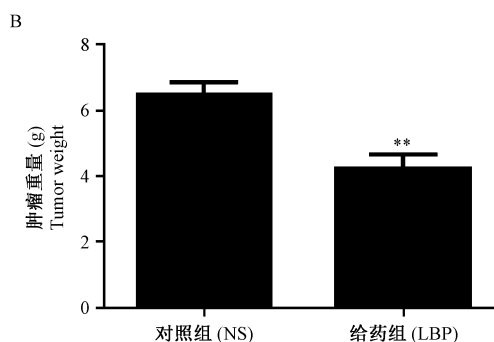
治疗期间,小鼠无死亡,成瘤率 100%。与模型组相比,结果显示:LBP 组肿瘤体积小于 NS 组(图 2A),LBP 组肿瘤重量(4.208 ± 0.4463 g)明显低于 NS 组(6.477 ± 0.3724 g)(图 2B)。

2.3 LBP 对 MMTV 小鼠肺表面转移结节数目的影响

MMTV 小鼠治疗结束后,乙醚麻醉处死,取出肺,Bouin's 溶液固定 24 h,观察并记录肺表面的肿瘤转移灶数目,LBP 组肺转移结节数(12 ± 1.155 个)少于 NS 组(20 ± 2.745 个)。(见图 3)。

2.4 LBP 对 MMTV 小鼠肿瘤细胞增殖的作用

肿瘤组织包埋后,切片做 Ki67 免疫组化染色,检测 LBP 对肿瘤细胞增殖活性的影响,Ki67 阳性部位为细胞核着色,每个组织随机挑选 5 个视野,每个视野内阳性细胞个数与总细胞个数比值为该区域的肿瘤细胞增殖率,NS 组肿瘤细胞增殖率为(48.58 ± 3.051)%($n = 8$),LBP 组为(30.32 ± 4.218)%($n = 8$),LBP 组肿瘤细胞增殖明显少于 NS 组,差异有显著性($P < 0.005$)。(见图 4)。



可抑制自发乳腺癌细胞增殖活性,为进一步了解 LBP 对肿瘤组织间质血管生成是否产生影响,随机对乳腺癌组织切片进行了 CD31 免疫组化染色,每个肿瘤组织随机选取 5 个视野,由同一人数出每个视野中血管数目,LBP 组肿瘤的微血管密度为(32.0 ± 4.342)%($n = 8$),NS 组减低为(15.63 ± 3.56)%($n = 8$),两组间比较差异具有显著性($P < 0.05$)。(见图 5)。

3 讨论

枸杞多糖是从枸杞中提取而得到的水溶性多糖,由阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖、甘露糖、木糖、鼠李糖等六种单糖组成,具有增强免疫力、降血糖、降血脂、抗肿瘤、抗衰老等多种药理作用和生理功能^[4]。

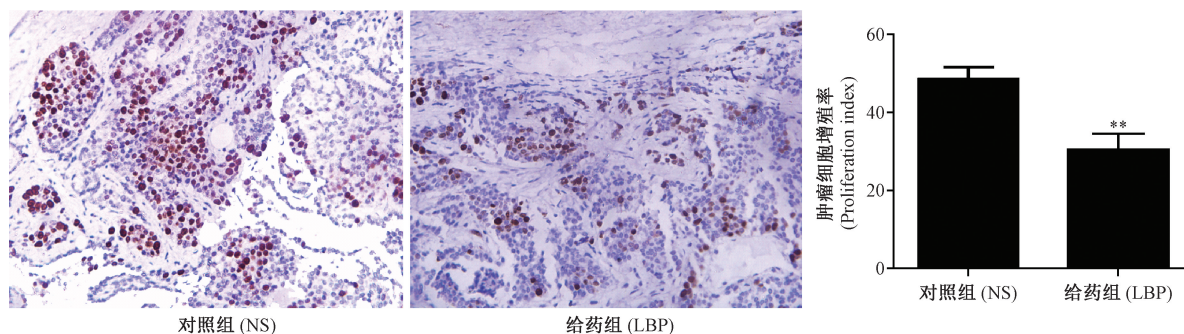


图 4 LBP 组和 NS 组肿瘤细胞增殖的病理学表现 (Ki67, ×400)

Fig. 4 Pathological changes of tumor cell proliferation in the LBP and NS groups

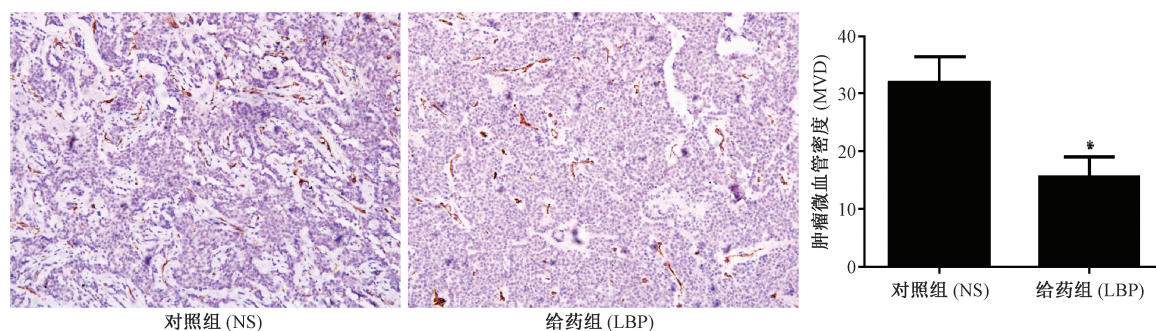


图 5 LBP 组和 NS 组肿瘤微血管形成病理表现 (CD31, ×200)

Fig. 5 Pathological changes of angiogenesis manifestation of the LBP and NS groups

有文献报道枸杞多糖能显著抑制人前列腺癌 PC-3 细胞的生长^[5], 而尹逊天等^[6]发现枸杞多糖能够抑制人脐静脉细胞的迁移和增殖, 并能够抑制血管形成。枸杞多糖对乳腺癌作用的研究报道并不多, 仅有的报道显示枸杞多糖通过下调乳腺癌细胞 MCF7 血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达, 从而抑制血管形成^[7]。

本研究采用 MMTV-PyMT 小鼠作为实验动物, 研究枸杞多糖对肿瘤生长及转移的影响。乳腺癌 MMTV-PyMT 转基因小鼠从第 9 周出现可触及的肿瘤, 随着小鼠周龄的增加, 肿瘤的数目和体积逐渐增多, 约 13 周时 5 对乳房全部发瘤, 11 周左右出现肺转移瘤, 14 周左右小鼠状态转差, 活动能力下降, 通常 15 周时大部分荷瘤鼠死亡, 到 17 周全部小鼠死亡; 组织病理学检查示 9 周龄 MMTV-PyMT 小鼠肺部未出现明显的乳腺癌肿瘤转移灶, 但其原位乳腺癌肿瘤细胞已突破基底膜, 12 周龄时肺表面及内部出现大量的乳腺癌肿瘤转移灶, 15 周龄时肺表面及内部的肿瘤转移灶更大, 且肿瘤转移灶内出现部分坏死^[2]。MMTV-PyMT 小鼠肿瘤病理进程与患者乳腺癌进程相似。

本课题组前期研究发现枸杞多糖可下调荷瘤小鼠血清及肿瘤组织中 VEGF 的表达^[8], 而本实验通过对自发性乳腺癌 MMTV-PyMT 小鼠的研究发现,

枸杞多糖体内给药能够抑制 MMTV-PyMT 小鼠肿瘤的生长, 降低肺转移结节数目; 免疫组化染色显示枸杞多糖可抑制肿瘤细胞的增殖和肿瘤间质血管的形成。MMTV-PyMT 小鼠可稳定自发乳腺肿瘤, 繁殖能力强, 为抗肿瘤药物提供了良好的动物模型。

参 考 文 献

- [1] Lopez JI, Camenisch TD, Stevens MV, et al. CD44 attenuates metastatic invasion during breast cancer progression [J]. Cancer Res, 2005, 65(15): 6755–6763.
- [2] 余锦雯, 亓翠玲, 杨永霞, 等. 乳腺癌 MMTV-PyMT 转基因小鼠模型的生物学特性及病理学研究 [J]. 广东药学院学报, 2011, 27(2): 178–182.
- [3] 胡妮, 杜标炎, 谭宇蕙, 等. 从诱导树突状细胞成熟角度探讨枸杞多糖联合 CXCL12 趋化因子配体 10 抗癌作用机制 [J]. 广州中医药大学学报 2015, 32(4): 641–646.
- [4] 孙桂菊, 左平国. 枸杞多糖功效研究及应用状况 [J]. 东南大学学报(医学版), 2010, 29(2): 209–215.
- [5] 崔晓燕, 罗琼, 杨明亮, 等. 枸杞多糖对人前列腺癌 PC-3 细胞凋亡的影响 [J]. 毒理学杂志, 2006, 20(4): 221–223.
- [6] 尹逊天, 王巍, 朱玉峰, 等. 枸杞多糖对人脐静脉血管内皮细胞的增殖、迁移及血管形成的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(4): 1819–1822.
- [7] 黄旭. 乳腺癌相关疲劳及枸杞多糖作用靶点和机制的研究 [D]. 哈尔滨医科大学 2011, 1–100.
- [8] 何彦丽, 应逸, 王斌, 等. 枸杞多糖对荷瘤小鼠免疫抑制因子 VEGF、TGF- β 1 水平的影响 [J]. 中药药理与临床, 2005, 21(5): 950–952.

[收稿日期] 2016-10-09