

本文引用:郭秀彩,贺周扬,邓英光,张紫萍.蛹虫草多糖抗乳腺癌转移作用及机制研究[J].湖南中医药大学学报,2019,39(7):827-831.

蛹虫草多糖抗乳腺癌转移作用及机制研究

郭秀彩¹,贺周扬²,邓英光¹,张紫萍^{1*}

(1.广州市第十二人民医院,广东 广州 510620;2.广东嘉博制药有限公司,广东 清远 511500)

〔摘要〕目的 研究蛹虫草多糖抗乳腺癌转移的作用及机制。方法 30只小鼠随机分为3组,分别为模型组、蛹虫草多糖低剂量组(20 mg/kg)和蛹虫草多糖高剂量组(80 mg/kg),所有动物采用尾静脉接种4T1乳腺癌细胞建立乳腺癌肺转移模型,后2组接种后连续腹腔注射给予蛹虫草多糖15 d。以肺组织表面的肿瘤结节数、血清MMP-2和MMP-9含量、肺组织病理为检测指标;采用CCK8法检测蛹虫草多糖对4T1细胞增殖的影响;采用Caspase-3/7检测试剂盒测定细胞凋亡情况。结果 与模型组比较,蛹虫草多糖高剂量组能够明显降低小鼠肺部的肿瘤结节数($P<0.01$);与模型组比较,蛹虫草多糖高剂量组能够显著降低血清MMP-2和MMP-9的含量($P<0.01$);显微镜下发现,蛹虫草多糖高剂量组的肺组织肿瘤转移灶体积和数量均少于模型组。蛹虫草多糖对乳腺癌4T1细胞增殖具有浓度依赖性趋势的抑制作用,半数抑制浓度(IC_{50})为0.092 mg/mL;与溶媒组比较,0.10 mg/mL和0.20 mg/mL的蛹虫草多糖可以显著增加Caspase-3/7的表达($P<0.01$)。结论 蛹虫草多糖可抑制乳腺癌肺转移,其作用机制可能与抑制MMP-2和MMP-9的表达和直接的抗肿瘤作用有关。

〔关键词〕 蛹虫草多糖;乳腺癌;4T1乳腺癌细胞;肿瘤转移;细胞凋亡;MMP-2;MMP-9

〔中图分类号〕 R285.5;R737.9

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.07.008

Study on the Inhibitory Effects and Mechanisms of *Cordyceps Militaris* Polysaccharide on Breast Cancer Metastasis

GUO Xiucai¹, HE Zhouyang², DENG Yingguang¹, ZHANG Ziping^{1*}

(1. Guangzhou Twelfth People's Hospital, Guangzhou, Guangdong 510620, China; 2. Guangdong Jiabo Pharmaceutical Co. Ltd., Qingyuan, Guangdong 511500, China)

〔Abstract〕 Objective To study the effects and mechanisms of *Cordyceps Militaris* polysaccharide (CMP) on breast cancer metastasis. **Methods** A total of 30 mice were randomly divided into 3 groups, including a model group, CMP low dose (20 mg/kg) and high dose (80 mg/kg) groups. The model of lung metastasis from breast cancer was established after all of the animals were injected with 4T1 breast cancer cells via tail veins. After the inoculation, the mice were treated with intraperitoneal injection of CMP for 15 days. The tumor nodules on the surface of lung, the expression of MMP-2 and MMP-9 in serum, and pathology of lung tissue was observed. In vitro, the effect of CMP on the proliferation of 4T1 breast cancer cells was evaluated using cell counting kit-8 (CCK8) assay, and cell apoptosis was evaluated using Caspase-3/7 assay. **Results** In the CMP high dose group, the number of tumor nodules on the surface of lung and the expression of MMP-2 and MMP-9 in serum were significantly decreased compared with the model group ($P<0.01$). Under the microscope, the volume and number of lung metastatic foci in the CMP high dose group were decreased compared with the model group. In vitro, the CMP could inhibit the proliferation of 4T1 cells in a concentration-dependent manner, with an IC_{50} of 0.092 mg/mL. Compared with the vehicle group, the CMP at concentrations of

〔收稿日期〕2018-05-08

〔基金项目〕广东省中医药局科研课题项目(20151054,20162108)。

〔作者简介〕郭秀彩,女,硕士,研究方向:药剂学、临床药学。

〔通讯作者〕*张紫萍,女,主任药师,E-mail:zyp08@126.com。

0.1 mg/mL and 0.2 mg/mL could significantly increase the expression of Caspase-3/7 ($P < 0.01$). **Conclusion** CMP have the effect of inhibition of lung metastasis from breast cancer, and the mechanisms may be related with the inhibition of the expression of MMP-2 and MMP-9 and the effect of direct anti-tumor.

[**Keywords**] *Cordyceps Militaris*; breast cancer; 4T1 breast cancer cells; tumor metastasis; cell apoptosis; MMP-2; MMP-9

在全球范围内,乳腺癌是目前女性中最常见的恶性肿瘤,也是女性最主要的死亡原因。乳腺癌在我国的发病率占全部恶性肿瘤的7%~10%,且其发病率有逐渐增高的趋势^[1]。肿瘤转移是乳腺癌患者死亡的主要原因^[2],虽然早期诊断的标记物和药物治疗取得了很大的进展,并降低了乳腺癌患者的死亡率,但目前仍然缺乏针对乳腺癌侵袭和转移的治疗药物,因此亟需开发有效的抗乳腺癌转移的药物。近年来,中医药的抗肿瘤转移方面的研究逐渐增多,尤其是补益类中药在这一领域的作用逐渐受到重视^[3]。本研究拟探讨传统补益类中药蛹虫草的主要活性成分蛹虫草多糖对乳腺癌肺转移的影响,为开发抗乳腺癌转移的药物提供实验依据。

1 材料与方

1.1 药物与试剂

蛹虫草购自上海食用菌有限公司,蛹虫草粉碎后参照文献方法^[4]制备蛹虫草多糖,苯酚-硫酸法测得制备的蛹虫草多糖样品的多糖含量为42.1%。4T1小鼠乳腺癌细胞株购自中国科学院上海细胞生物研究所。基质金属蛋白酶MMP-2和MMP-9 ELISA测定试剂盒购自美国R&D公司,CCK8检测试剂盒购自日本同仁化学研究所,Caspase-3/7检测试剂盒购自美国Promega公司。

1.2 实验动物

雌性BABL/C正常小鼠,18~22 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,许可证号:SCXK(湘)2016-0002。动物饲养于聚丙烯鼠盒中,动物自由采食,自由饮水。饮水瓶中动物饮用水每天更换。

1.3 仪器

MultiskanSpectrum酶标仪、Sorvall ST16R台式冷冻离心机均购自Thermo公司。

1.4 实验方法

1.4.1 蛹虫草多糖的制备及含量测定^[5] 蛹虫草粉碎后加入10倍体积的水,100℃水浴提取2 h,过

滤,滤渣用5倍体积的水100℃提取2 h后过滤(重复2次),合并全部滤出液,然后离心浓缩脱蛋白,加3倍体积95%乙醇进行醇沉,4℃静置过夜,弃去上清,将沉淀离心,冻干即为蛹虫草多糖。取蛹虫草多糖0.1 g用水溶解,定容转移至10 mL,作为样品储备溶液测定其吸光度后,将其稀释制成适当浓度的样品溶液以备测定。取供试液/对照液1 mL,加入1 mL苯酚溶液,再加入浓硫酸7 mL,摇匀,测定吸光度。使用改良苯酚-硫酸法测得制备的蛹虫草多糖样品的多糖含量为42.1%。

1.4.2 4T1乳腺癌肺转移模型建立^[6] 取对数生长期的4T1细胞,肿瘤接种当天,所有小鼠尾静脉接种4T1乳腺癌细胞悬液建立乳腺癌肺转移模型,接种密度为 1×10^6 /mL,每只接种100 μL细胞悬液,密切观察接种肿瘤后的动物状态。

1.4.3 动物分组及给药^[7] 30只小鼠,按体质量随机分为3组,分别为模型组、蛹虫草多糖低剂量组和蛹虫草多糖高剂量组,每组10只动物。接种当天,模型组和给药组动物均尾静脉接种4T1细胞。接种当天即开始腹腔注射给药,模型组腹腔注射给予生理盐水,给药组分别给予20 mg/kg和80 mg/kg的蛹虫草多糖,每日给药1次,共给药15 d。

1.4.4 蛹虫草多糖对乳腺癌肺转移的抑制作用 接种后第15天,摘眼球采全血,颈椎脱臼处死动物,解剖取出肺脏,用生理盐水漂洗后,计数肺表面的肿瘤结节数,计数完后称量肺脏质量。

1.4.5 小鼠血清MMP-2和MMP-9含量测定 全血离心取血清,ELISA试剂盒检测金属基质蛋白酶MMP-2和MMP-9的含量。

1.4.6 肿瘤病理组织观察 将肺组织浸泡在4%的多聚甲醛中固定,常规制作病理切片。显微镜下观察肺组织中的肿瘤转移程度。

1.4.7 蛹虫草多糖对乳腺癌4T1细胞增殖的影响 体外传代培养乳腺癌4T1细胞,收集对数生长期细胞,

计数,用含 10%FBS 的 RPMI-1640 完全培养基重新悬浮细胞,调整细胞浓度至 $2 \times 10^5/\text{mL}$,接种 100 μL 每孔于 96 孔板。在 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 条件下孵育 24 h,待细胞贴壁后,按 100 μL /孔加入一系列浓度梯度的蛹虫草多糖药物溶液,溶媒组仅加入等体积的培养基。加完药之后,置于 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中,孵育 72 h。加入 CCK-8,每孔 20 μL ,置于 37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中孵育 2 h,酶标仪 450 nm 处检测吸光度(A)值。

$$\text{抑制率} = (\text{A}_{\text{溶媒}} - \text{A}_{\text{药物}}) / \text{A}_{\text{溶媒}} \times 100\%$$

1.4.8 蛹虫草多糖对乳腺癌 4T1 细胞凋亡的影响 体外传代培养乳腺癌 4T1 细胞,调整乳腺癌 4T1 细胞浓度至 $2 \times 10^5/\text{mL}$,接种 100 μL 每孔于 96 孔板,置于 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中,孵育 24 h 后,按 100 μL /孔加入不同浓度的蛹虫草多糖药物溶液,溶媒组仅加入等体积的培养基。加完药之后,继续孵育 48 h,将 Caspase-3/7 底物溶液用缓冲液稀释 100 倍,混合均匀后得到 Caspase-3/7 试剂溶液,取 100 μL 试剂溶液加入经过处理的细胞中,混匀后,继续室温孵育 2 h,于激发波长 485 nm 和发射波长 520 nm 处测定荧光值。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件对数据进行统计分析,实验数据使用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,采用 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计意义。

2 结果

2.1 蛹虫草多糖对乳腺癌肺转移的抑制作用

对肺组织进行大体观察发现,全部动物发生了肺转移。与模型组比较,蛹虫草多糖高剂量组能明显降低肺转移肿瘤结节数($P < 0.01$)。另外,与模型组比较,蛹虫草多糖高剂量组还能显著降低肺组织质量($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 蛹虫草多糖对血清 MMP-2 和 MMP-9 含量的影响

与模型组比较,蛹虫草多糖高剂量组能明显降低血清 MMP-2 和 MMP-9 的含量($P < 0.01$),而低剂量组无明显降低作用。见表 2。

2.3 肿瘤病理组织观察

小鼠肺组织病理切片结果显示,模型组肺组织

表 1 蛹虫草多糖对乳腺癌肺转移的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	肺转移肿瘤结节数	肺质量/g
模型组	-	55.30 \pm 9.97	0.32 \pm 0.041
低剂量组	20	56.10 \pm 10.02	0.33 \pm 0.042
高剂量组	80	33.30 \pm 9.31**	0.28 \pm 0.039*

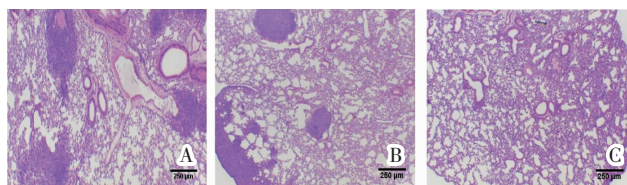
注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

表 2 蛹虫草多糖对血清 MMP-2 和 MMP-9 含量的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	MMP-2/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	MMP-9/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
模型组	-	76.50 \pm 15.20	353.89 \pm 122.53
低剂量组	20	68.90 \pm 8.17	327.63 \pm 112.13
高剂量组	80	42.30 \pm 12.60**	194.30 \pm 61.20**

注:与模型组比较,** $P < 0.01$

出现较大的肿瘤转移灶,而蛹虫草多糖中高剂量治疗组肺组织肿瘤转移灶的数量和体积均少于模型组。见图 1。

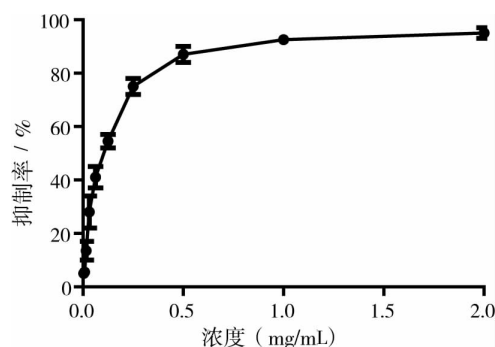


注:A.模型对照组;B.蛹虫草低剂量组;C.蛹虫草高剂量组

图 1 肺组织染色病理切片显微镜图(HE, $\times 40$)

2.4 蛹虫草多糖对乳腺癌 4T1 细胞增殖的影响

在测试浓度范围内,蛹虫草多糖对乳腺癌 4T1 细胞增殖具有浓度依赖性的抑制作用,半数抑制浓度(IC_{50})为 0.092 mg/mL ,结果提示蛹虫草多糖对 4T1 细胞的增殖具有直接的抑制作用。见图 2。



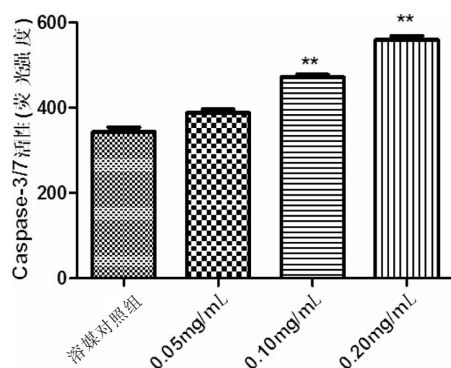
注: $n=3$

图 2 蛹虫草多糖对乳腺癌 4T1 细胞增殖的影响

2.5 蛹虫草多糖对乳腺癌 4T1 细胞凋亡的影响

Caspase-3/7 的表达与细胞凋亡程度呈正相关,因此其含量可以反映细胞凋亡的情况。实验结果显

示,蛹虫草多糖具有浓度依赖性的增加乳腺癌 4T1 细胞中 Caspase-3/7 表达量的作用,且 0.10 mg/mL 和 0.20 mg/mL 的蛹虫草多糖较溶媒组可以显著增加 Caspase-3/7 的含量,结果提示蛹虫草多糖可促进乳腺癌 4T1 细胞的凋亡。见图 3。



注:与溶媒对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

图 3 蛹虫草多糖对乳腺癌 4T1 细胞凋亡的影响

3 讨论

乳腺癌是女性发病率较高的恶性肿瘤之一,而肿瘤转移是造成乳腺癌患者死亡的主要原因。肿瘤转移是指恶性肿瘤细胞通过各种方式,脱离原发肿瘤组织,经过血管或淋巴管达到继发组织后得以继续生长,形成继发性肿瘤的全过程^[8]。乳腺癌是伴有远端组织转移的最常见的恶性肿瘤之一,其中最常见的转移组织为骨、肺、肝及脑^[9]。目前,尚缺乏抑制乳腺癌转移的药物,因此寻找阻断乳腺癌转移的治疗药物具有重要意义。

蛹虫草又称北冬虫夏草,是珍贵的中草药,在我国已被使用近千年。蛹虫草中含有多种具有生物活性的成分^[10],包括蛹虫草多糖、腺苷衍生物、麦角固醇等有效成分。现代药理研究表明,蛹虫草在体外和体内均有明显的抗肿瘤作用^[11-12],临床研究也证实放疗化疗的过程中其对晚期肿瘤患者具有明显的扶正减毒作用^[13]。蛹虫草多糖是蛹虫草的主要活性成分之一,已有大量文献报道其增强免疫力和抗肿瘤作用^[4,14],但对肿瘤转移的抑制作用的报道较为少见,因此,本研究拟对蛹虫草多糖的抗乳腺癌转移活性进行评价。

4T1 乳腺癌细胞在 BALB/c 小鼠中的生长与转

移特性与人乳腺癌细胞在人体中十分接近,是模拟人 IV 期乳腺癌的理想动物模型^[15]。乳腺癌转移动物模型可通过原位、静脉和皮下接种的方法建立,原位接种的乳腺癌转移模型最为接近人体内真实的肿瘤转移环境,但耗时较长,难以用于药效评价。静脉接种的乳腺癌转移模型具有操作简单、耗时短和易于定量评价肿瘤转移程度的优点,而且静脉造模后通过转移形成的肺部肿瘤细胞的基因表达谱与原位造模无明显差异^[16],故本研究采用静脉接种 4T1 乳腺癌细胞的方法建立乳腺癌肺转移模型,结果发现,蛹虫草多糖高剂量能够降低 4T1 乳腺癌肺转移模型动物肺部的肿瘤结节数,表明蛹虫草多糖具有明显的抑制 4T1 乳腺癌肺转移的作用。

肿瘤转移的机制极其复杂,受多种不同的因素调节。在多种影响肿瘤转移的因素中,基质金属蛋白酶 MMP 家族与肿瘤转移密切相关。MMP-2 和 MMP-9 是 MMP 家族中的重要成员,二者的高表达可促进乳腺癌细胞的转移^[17]。本实验中发现,蛹虫草多糖高剂量能够降低血清中 MMP-2 和 MMP-9 的表达,提示蛹虫草多糖对 4T1 乳腺癌肺转移的抑制作用可能与抑制 MMP-2 和 MMP-9 的表达有关。

肿瘤的发生不仅与细胞的增殖、分化异常有关,还与细胞凋亡的异常有关。细胞凋亡是乳腺癌治疗及预后研究中的重要领域^[18]。Caspase 是一组细胞凋亡过程中的重要的调控因子,Caspase-3 是 Fas 介导的细胞凋亡信号通路中的关键分子,又是多种凋亡途径共同作用的关键因子,其活性的高低决定着细胞凋亡程度^[19]。本研究发现,蛹虫草对 4T1 细胞的增殖具有直接抑制作用,同时还发现蛹虫草多糖能够通过上调 Caspase-3/7 的活性来诱导乳腺癌细胞的凋亡,从而发挥抑制乳腺癌生长和转移的作用。

综上所述,本研究利用静脉接种 4T1 细胞建立的小鼠乳腺癌转移评价了蛹虫草多糖抗乳腺癌肺转移的作用,结果表明,蛹虫草多糖具有明显的抗乳腺癌肺转移的作用,其作用机制可能与抑制 MMP-2 和 MMP-9 的表达和直接的抗肿瘤作用有关。本研究说

明蛹虫草多糖抗乳腺癌转移的作用较明显,具有潜在的治疗乳腺癌转移的临床价值。

参考文献

- [1] 崔玉凤,聂芳,刘淑杰,等.乳腺癌患者血清 CA-153、CEA 检测的临床价值[J].中国现代药物应用,2013,7(21):75-76.
- [2] 闫婉君,马兴聪,高晓燕,等.黄芩素与乳腺癌侵袭转移关系的研究新进展[J].现代肿瘤医学,2016,24(3):491-494.
- [3] 郑铭锋,包素珍,曹月娇.补益类药物对肿瘤转移的影响[J].中外医疗,2008(18):28-29.
- [4] 王米,张丽芳,费陈忠,等.蛹虫草多糖对小鼠腹腔巨噬细胞免疫功能的影响[J].中国生化药物杂志,2015,35(4):10-12.
- [5] 阴婉婷,李彤,马辰,等.改良的苯酚—硫酸法测定蛹虫草多糖含量[J].安徽农业科学,2015,43(4):117-118.
- [6] YANG Q, YIN Y L, YU G JJUN, et al. A novel protein with anti-metastasis activity on 4T1 carcinoma from medicinal fungus *Cordyceps militaris*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 80:385-391.
- [7] 郭丽新,冯哲,齐彦,等.蛹虫草子实体多糖对腹水型肝癌移植瘤超微结构的影响[J].食品工业科技,2014,8(35):139-141.
- [8] CHAFFER C L, WEINBERG R A. A perspective on cancer cell metastasis[J]. Science, 2011,331(6024):1559-1564.
- [9] BERMAN A T, THUKRAL D, HWANG W, et al. Incidence and patterns of distant metastases for patients with early-stage breast cancer after breast conservation treatment[J]. Clinical Breast Cancer, 2013, 13(2):88-94.
- [10] SHONKOR KUMAR DAS, MINA MASUDA, AKIHIKO SAKURAI. Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: Current state and prospects[J]. Fitoterapia, 2010,81(8):961-968.
- [11] 董祺,高志惠.蛹虫草子实体胶囊对 S180 小鼠抗肿瘤作用的实验研究[J].山东科学,2016,29(2):25-29.
- [12] 杜秀菊,张劲松,贾薇,等.蛹虫草抗肿瘤和免疫活性部位的体外筛选[J].食用菌学报,2011,18(1):41-45.
- [13] 汪宇,康万军,王振海,等.蛹虫草口服液的制备工艺研究和临床初步观察[J].中国保健营养,2013(10):464-465.
- [14] LEE J S, HONG E K. Immunostimulating activity of the polysaccharides isolated from *Cordyceps militaris*[J]. International Immunopharmacology, 2011,11(9):1226-1233.
- [15] 龚宏霞,林洪生,张英,等.小鼠乳腺癌 4T1-luc 细胞实验性肺转移模型的建立及其评价[J].现代肿瘤医学,2015,23(6):735-737.
- [16] RASHID O M, NAGAHASHI M, RAMACHANDRAN S, et al. Is tail vein injection a relevant breast cancer lung metastasis model[J]. Journal of Thoracic Disease, 2013, 5(4):385-392.
- [17] MIN K W, KIM D H, DO S I, et al. Expression patterns of stromal MMP-2 and tumoural MMP-2 and 9 are significant prognostic factors in invasive ductal carcinoma of the breast[J]. Journal of Pathology Microbiology and Immunology, 2014,122(12):1196-1206.
- [18] 张虹,季有波,杨琪,等.黄芪多糖诱导乳腺癌细胞凋亡的实验研究[J].中国社区医师,2017,33(34):5-5.
- [19] 王素云,杨晓阳,邓凯,等.青蒿琥酯对骨髓瘤 RPMI 8226 细胞增殖、凋亡及对 Survivin、Caspase-3、Caspase-7 的影响[J].中草药,2010,41(5):785-789.

(本文编辑 杨 瑛)