中图分类号：R965；R285　　文献标志码：A　　文章编号：1006－4931(2024)20－0034－05
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2024.20.008

蒽贝素对MCF－7乳腺癌细胞荷瘤裸鼠肿瘤生长的影响*

苏　华[1]，郑海平[1]，柴　玲[1]，甘彩玉[1]，曾宪彪[1]，刘　果[2]，周光宇[3△]

（1. 广西壮族自治区中医药研究院，广西 南宁　530022；2. 桂林医科大学，广西 桂林　541001；3. 广西中医药大学附属瑞康医院，广西 南宁　530000）

摘要：目的　探讨蒽贝素对7乳腺癌MCF－细胞荷瘤裸鼠肿瘤生长的影响。**方法**　取Balb/c－nu雌性裸鼠30只，随机分为模型组[等体积0.025%氨水溶液(pH 8.2)]，5－氟尿嘧啶组(20 mg/kg)，以及(蒽贝素)高、中、低剂量组(400，200，100 μg/kg)，各6只。取0.1 mL MCF－7细胞悬液皮下接种于裸鼠双侧腋下，以复制乳腺癌荷瘤裸鼠模型。建模成功后，各组裸鼠灌胃(或腹腔注射)相应药物或等体积0.025%氨水溶液(pH 8.2)，均每日1次，连续14 d。末次给药后，称定瘤体质量并计算抑瘤率；苏木素－伊红(HE)染色观察肿瘤细胞形态学，Tunel染色分析肿瘤细胞凋亡情况并计算凋亡率；采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测血清中肿瘤坏死因子－α(TNF－α)和白细胞介素6(IL－6)水平；免疫组化染色法检测Caspase－3蛋白表达水平。**结果**　与模型组比较，5－氟尿嘧啶组和高剂量组裸鼠瘤体质量显著减小($P<0.01$或$P<0.05$)；各给药组细胞凋亡率显著升高；5－氟尿嘧啶组和高、中剂量组裸鼠血清TNF－α水平显著升高($P<0.01$或$P<0.05$)；各给药组Caspase－3蛋白表达水平显著升高($P<0.01$)。**结论**　蒽贝素可促进荷瘤裸鼠MCF－7细胞凋亡，其机制可能与上调Caspase－3蛋白表达有关。

关键词：蒽贝素；MCF－7细胞；乳腺癌；雌性裸鼠；细胞凋亡；Caspase－3蛋白

Antitumor Effect of Embelin on MCF－7 Breast Cancer Xenograft in Nude Mice

SU Hua[1], ZHENG Haiping[1], CHAI Ling[1], GAN Caiyu[1], ZENG Xianbiao[1], LIU Guo[2], ZHOU Guangyu[3]

(1. Guangxi Institute of Chinese Medicine & Pharmaceutical Science, Nanning, Guangxi, China 530022; 2. Guilin Medical University, Guilin, Guangxi, China 541001; 3. Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, China 530000)

Abstract: Objective　To investigate the antitumor effect of embelin on the MCF－7 breast cancer xenograft in nude mice. **Methods**　Thirty female Balb/c－nu nude mice were selected and randomly divided into the model group [equal volume of 0.025% ammonia solution (pH 8.2)], the 5－fluorouracil group (20 mg/kg), the embelin high－, medium－, and low－dose groups (400, 200, 100 μg/kg), with six mice in each group. The MCF－7 cell suspension (0.1 mL) was subcutaneously inoculated into the bilateral armpits of nude mice to construct the breast cancer xenograft in nude mice. After successful modeling, the nude mice in each group were given corresponding drugs or an equal volume of 0.025% ammonia solution (pH 8.2) by gavage or intraperitoneal injection once a day for 14 d. After the last administration, the tumor mass was weighed, and the tumor inhibition rate was calculated; the hematoxylin－eosin (HE) staining was used to observe tumor cell morphology, the Tunel staining was used to analyze tumor cell apoptosis and calculate apoptosis rate; the enzyme－linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the tumor necrosis factor－α(TNF－α) and interleukin－6 (IL－6) levels in serum; the immunohistochemical staining was used to detect the expression level of Caspase－3 protein. **Results**　Compared with those in the model group, the tumor mass in the 5－fluorouracil group and embelin high－dose group significantly decreased ($P<0.01$ or $P<0.05$); the apoptosis rate in each drug group significantly increased; the serum TNF－α level in the 5－fluorouracil group and embelin high－ and medium－dose groups significantly increased ($P<0.01$ or $P<0.05$); the expression level of Caspase－3 protein in each drug group significantly increased ($P<0.01$). **Conclusion**　Embelin can promote the apoptosis of MCF－7 cells in nude mice, and its mechanism may be related to the upregulation of Caspase－3 protein expression.

Key words: embelin; MCF－7 cell; breast cancer; female nude mice; cell apoptosis; Caspase－3 protein

乳腺癌发病率逐年升高，临床多以西医治疗，但不良反应较明显[1]。蒽贝素是从紫金牛科酸藤子属植物酸藤子*Embelia laeta*(Linn.)Mez[2－3]夏季采收果实提取的纯结晶[4]。广西民间壮族医师用的“炮子”和西藏多地的藏医院使用的“夏嘎子”或“铁仔”，实际上就是酸藤子的干果。据《广西药用植物名录》《南宁市药物志》《常用中草药手册》《海南岛常用中草药手册》记载，酸藤子有补血调经、收敛止血功效，用其煎汤内服，主治闭经、血

*基金项目：广西壮族自治区中医药管理局自筹经费科研课题[GXZYZ20210335]；广西壮族自治区卫生健康委员会自筹经费科研课题[Z20211620]。

第一作者：苏华，女，硕士，副主任药师，研究方向为中药药理学，(电子信箱)67365146@qq.com。

△通信作者：周光宇，女，硕士，副主任药师，研究方向为中药临床药理学，(电子信箱)117992066@qq.com。

虚、产后虚弱等。以往研究报道，蒽贝素有较好的抗癌药理作用，如抗肺癌[5]、结肠癌[6]、乳腺癌等[7]，蒽贝素属X连锁凋亡抑制蛋白（XIAP）小分子抑制剂，目前尚无公认的最佳剂量。本研究中拟探讨不同剂量下蒽贝素对人源乳腺癌MCF－7细胞荷瘤裸鼠肿瘤生长的影响。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

仪器：FA1004型上皿电子天平（上海精科实业有限公司）；320R型台式冰冻型离心机（德国Hettich公司）；MultiskanGo型全波长全自动多功能酶标仪（美国Thermo Fisher Scientific公司）；EG150H＋C型自动组织包埋机、RM2255型全自动轮转切片机，均购自德国Leica公司；JK－6型生物组织摊烤片机（武汉俊杰电子有限公司）；EVOS FL型全自动细胞成像系统（美国Life公司）；CKS41型倒置显微镜（日本Olympus公司）；BC－J160型CO_2培养箱（上海迅博医疗生物仪器股份有限公司）。

试药：蒽贝素（广西中医药研究院药理所自制，批号为ZZYF2021，由刘布鸣研究员鉴定为正品）；5－氟尿嘧啶（5－FU，上海旭东海普药业有限公司，批号为210425）；DMEM高糖培养基（批号为2031106），胎牛血清（批号为181849），磷酸盐缓冲液（PBS，批号为2026067），胰酶（批号为0053919），青霉素－链霉素溶液（批号为2026068），均购自Biological Industries公司；CCK－8检测试剂盒（新赛美生物科技有限公司，批号为N9091085），肿瘤坏死因子－α（TNF－α）及白细胞介素6（IL－6）酶联免疫吸附试验（ELISA）试剂盒（上海泛柯实业有限公司，批号均为2021 Feb）；苏木素－伊红（HE）染色试剂盒（北京雷根生物技术有限公司，批号为0904A18）；Tunel细胞凋亡试剂盒（批号为091819191025），Proteinase K（批号为111318190402），均购自碧云天生物技术有限公司；Anti－caspase－3（艾博抗＜上海＞贸易有限公司，批号为00077110）；免疫组化兔二步法试剂盒（批号为2011E0609），封闭用山羊血清（批号为19110701），DAB显色试剂盒（批号为1922C1127），均购自北京中杉金桥生物技术有限公司；其余试剂均为分析纯。

动物：SPF级Balb/c－nu裸鼠，雌性，18～22 g，4周龄，购自广西医科大学实验动物中心（实验动物生产许可证SCXK桂2009－0002）。相关动物实验已通过广西壮族自治区中医药研究院实验动物伦理委员会的伦理审查（受理号2020030301），并按实验动物使用3R原则操作。观察室温度24～26 ℃，相对湿度50%～70%，12 h明暗交替，适应性喂养1周。

细胞：人源乳腺癌MCF－7细胞株［美国典型培养物保藏中心（ATCC）］。

1.2 方法

细胞体外培养[8]：将MCF－7细胞置含10%胎牛血清、1%双抗的DMEM培养基，并在5% CO_2、相对湿度60%～80%、37 ℃条件下培养，待细胞汇合度为80%～90%时，用2.5 mg/L胰蛋白酶消化传代，取增殖期细胞进行后续实验。

模型建立[9－10]：调细胞密度至5×10^7个/mL，取裸鼠30只，随机分为模型组［等体积0.025%氨水溶液（pH 8.2）］、5－FU组（20 mg/kg）及（蒽贝素）高、中、低剂量组（400，200，100 μg/kg）各6只，将0.1 mL细胞悬液皮下接种于裸鼠双侧腋下，以复制MCF－7乳腺癌异位肿瘤模型（接种后7 d见双侧腋下长出肿瘤块为建模成功）[7]。建模成功后，各组裸鼠灌胃或腹腔注射相应药物或0.025%氨水溶液。每日1次，连续14 d。

1.3 观察指标

裸鼠及肿瘤生长：称定裸鼠体质量，连续14 d。末次给药后，取血，处死裸鼠，剥取并称量瘤体质量，计算抑瘤率（IR）。IR＝（模型组平均瘤体质量－用药组平均瘤体质量）/模型组平均瘤体质量×100%。

肿瘤形态学：称定肿瘤组织质量后置4%多聚甲醛固定24 h后换液，常规病理包埋，切4 μm厚片，HE染色，树胶封片，观察肿瘤组织形态学变化。

肿瘤细胞凋亡率：取上述4 μm厚石蜡切片，脱蜡复水，按Tunel试剂盒说明书操作染色，切片、脱水，树胶封片，检测肿瘤细胞凋亡情况并计算凋亡率。

血清炎性因子：采用ELISA法。末次给药后，摘眼球取血，4 ℃静置1 h，3 000 r/min离心15 min，分离，得血清，按试剂盒说明书操作，检测血清中炎性因子（TNF－α及IL－6）水平。

Caspase－3蛋白表达：取上述4 μm厚石蜡切片，脱蜡复水，加入柠檬酸修复液并置微波炉中中火修复2次，每次5 min，修复结束后在修复液中自然冷却。TBS冲洗3次，在切片上滴加3%过氧化氢灭活内源性过氧化物酶，室温放置10 min。TBS冲洗3次后用山羊血清封闭1 h。将1∶200比例稀释的Caspase－3抗体滴加至切片，室温孵育1 h，TBS冲洗3次，滴加抗兔/鼠HRP标记聚合物，37 ℃避光孵育30 min，TBS冲洗3次。最后滴加DAB显色后进行苏木素复染，即可将切片脱水封片。显微镜观察，应用Image J全自动图像分析系统统计阳性表达的平均光密度[10]。

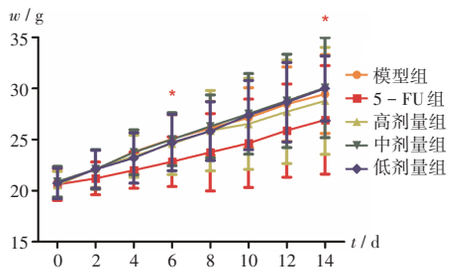
1.4 统计学处理

采用SPSS 16.0统计学软件分析。符合正态分布且方差齐的计量资料以$\overline{X}\pm s$表示，两组间比较行t检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 裸鼠体质量

与模型组比较，5－FU组裸鼠体质量增长缓慢，且第6天和14天显著降低（$P<0.05$）；蒽贝素各剂量组裸鼠体质量均无显著增长（$P>0.05$）。详见图1。



注：与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。表1、图4、图5、图7同。

图1 体质量增长情况（$n=6$）

Note: Compared with those in the model group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ (for Fig. 1, Tab. 1, Fig. 4, Fig. 5, Fig. 7).

Fig. 1 Body mass growth ($n=6$)

2.2 肿瘤质量

与模型组比较，5－FU组及高剂量组裸鼠瘤质量显著降低（$P<0.01$或$P<0.05$）。详见表1。

2.3 肿瘤细胞病理形态

模型组MCF－7细胞核圆且饱满，单个肿瘤细胞呈不规则形态；5－FU组和高剂量组多见细胞核固缩深染，细胞质溶解，肿瘤细胞呈现凋亡坏死状态；中、低剂量组可见少量细胞凋亡坏死。详见图2。

表1 各组裸鼠实体肿瘤质量及抑瘤率情况（$n=6$）

Tab. 1 Mass and tumor inhibition rate of solid tumors in each group ($n=6$)

组别	瘤体质量（$\bar{X}\pm s$，g）	抑瘤率（%）	组别	瘤体质量（$\bar{X}\pm s$，g）	抑瘤率（%）
模型组	1.85±0.22		中剂量组	1.63±0.73	11.89
5－FU组	0.98±0.39**	47.03	低剂量组	1.80±0.54	2.70
高剂量组	1.24±0.67*	32.97			

2.4 肿瘤细胞凋亡情况

模型组存在少量肿瘤细胞凋亡。与模型组比较，各给药组细胞凋亡百分率显著升高（$P<0.01$）。详见图3、图4。

2.5 炎性因子

与模型组比较，5－氟尿嘧啶组和高、中剂量组裸鼠血清TNF－α水平显著升高（$P<0.01$或$P<0.05$），IL－6水平无显著变化（$P>0.05$）。详见图5。

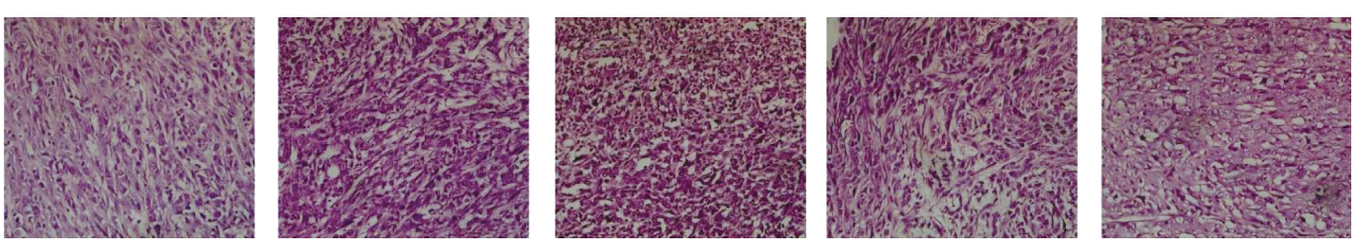
2.6 Caspase－3蛋白表达

模型组Caspase－3蛋白表达水平较低。与模型组比较，高、中、低剂量组Caspase－3蛋白表达水平显著升高（$P<0.01$）。详见图6、图7。

3 讨论

蒽贝素为XIAP的小分子抑制剂[11]，现代药理学研究显示，蒽贝素具有抗癌[12]（包括肺癌[13]、结肠癌、抗肝癌[14]等）作用，具有治疗糖尿病[15]及抗炎作用[16]。本课题组曾用蒽贝素进行小鼠单次给药毒性试验，未见毒性反应和心、脑、肝、肺、肾等重要器官器质性病理变化[17]。而目前尚未见蒽贝素单用抗乳腺癌的研究报道。

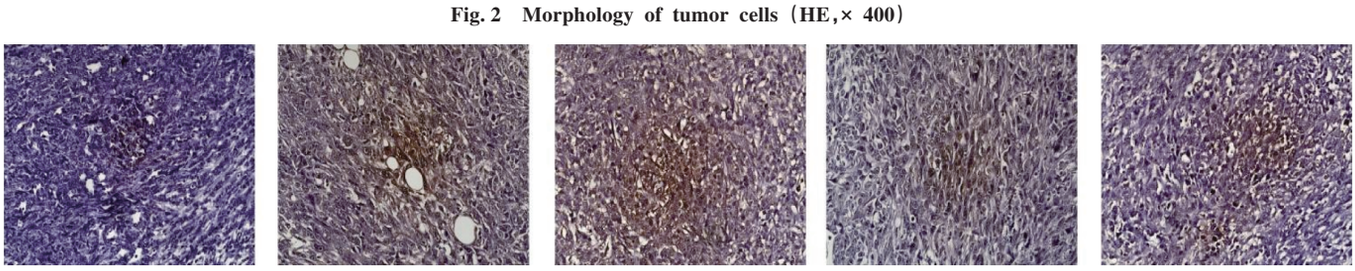
本研究结果显示，蒽贝素（高、中剂量）与5－FU均能显著抑制肿瘤生长，促进TNF－α水平显著升高，但对IL－6水平无显著影响。IL－6为主要由单核细胞、T细胞及其他细胞产生的细胞因子，参与细胞增殖、分化及介导免疫反应，生物学活性非常广泛。由此推测，蒽贝素在促进肿瘤细胞凋亡的同时，不影响机体免疫系统。



模型组　5－FU组　高剂量组　中剂量组　低剂量组

图2 组织肿瘤细胞形态（HE，×400）

Fig. 2 Morphology of tumor cells (HE, × 400)



模型组　5－FU组　高剂量组　中剂量组　低剂量组

图3 肿瘤细胞凋亡情况（Tunel，×400）

Fig. 3 Apoptosis of tumor cells (Tunel, × 400)

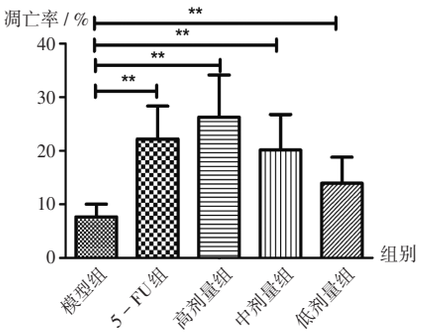


图4 肿瘤细胞凋亡率

Fig. 4 Apoptosis rate of tumor cells

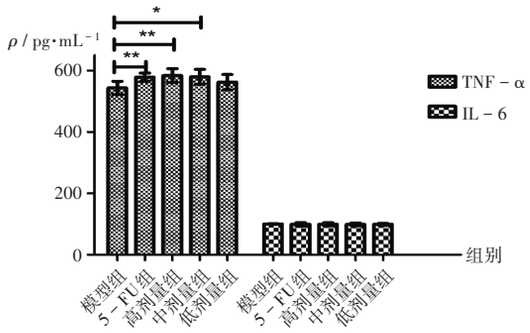


图5 血清炎性因子水平(n = 6)

Fig. 5 Levels of serum inflammatory factors (n = 6)

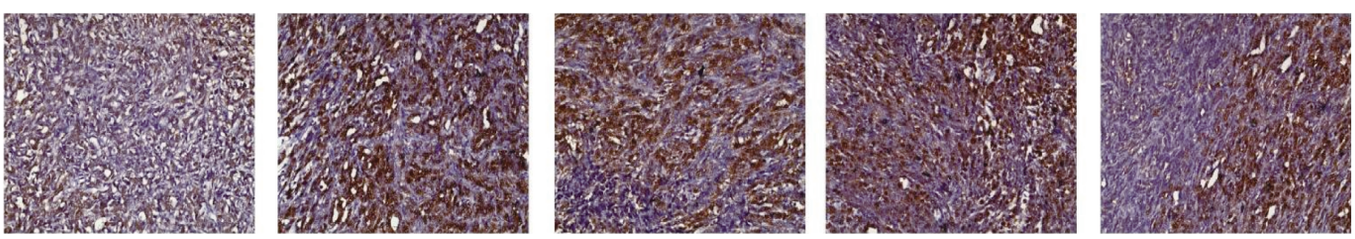


图6 Caspase－3蛋白表达情况(×400)

Fig. 6 Expression of Caspase－3 protein (×400)

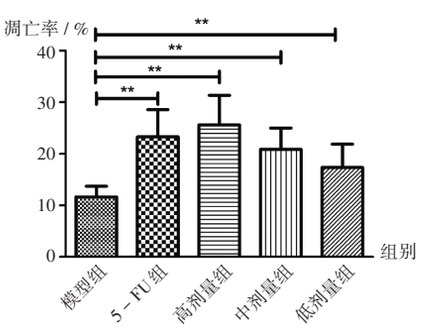


图7 Caspase－3蛋白表达水平

Fig. 7 Level of Caspase－3 protein expression

与模型组比较,蒽贝素高剂量组和5－FU组肿瘤细胞多发生核坏死、核固缩,中剂量和低剂量组偶见肿瘤细胞坏死与凋亡情况;高剂量组与5－FU组肿瘤组织细胞凋亡较多;各给药组Caspase－3蛋白表达显著增强。以上结果提示,蒽贝素单用可升高TNF－α水平,并通过上调Caspase－3的表达,诱导肿瘤细胞凋亡,从而抑制肿瘤生长,与李宗祥等[18]的研究报道相似,但本次研究能明确蒽贝素单用的效果。

凋亡抑制蛋白(IAP)是近年来备受关注的一类独立于Bcl－2的抗凋亡蛋白[19]。但是IAP中的某些蛋白异常高表达常阻碍细胞凋亡,这与肿瘤的发生息息相关。XIAP是凋亡抑制基因家族中最有效的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶抑制物,能选择性与Caspase－3、Caspase－7、Caspase－9直接结合,抑制其活性,从而抑制细胞凋亡[20]。

综上所述,蒽贝素作为XIAP的小分子抑制剂,能阻止XIAP与半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶抑制物结合,解除XIAP抑制细胞凋亡的作用,从而上调Caspase－3表达,诱导肿瘤细胞凋亡。本研究可为蒽贝素之后的抗肿瘤机制研究提供参考。

参考文献

[1] 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会. 中国乳腺癌筛查与早期诊断指南[J]. 中国癌症杂志,2022,32(4):363－372.

[2] 中国科学院《中国植物志》编写委会. 中国植物志(第58卷)[M]. 北京:科学出版社,1998:104－120.

[3] MAHENDRA S, BADAMI S, RAVI S, et al. Synthesis and Evaluation of Analgesic and Anti－inflammatory Activities of Most Active Free Radical Scavenging Relationship[J]. Chem Pharm Bull,2011,59(8):913－919.

[4] 曾宪彪,韦宝伟,韦桂宁. 用水溶助长剂从酸藤果制备富含蒽贝素提取物的方法[J]. 实用药物与临床,2014,17(11):1439－1441.

[5] 张春辉,孙 平. 蒽贝素联合紫杉醇抑制肺癌A549细胞的增殖和荷瘤裸鼠肿瘤的生长研究[J]. 中国生化药物杂志,2014,34(2):7－9.

[6] 赵秀梅,王 娟. 5－氟尿嘧啶联合蒽贝素对结肠癌小鼠Caspase－3/NF－κB活性表达的影响[J]. 现代消化及介入诊疗,2016,21(2):325－327.

[7] 张敏康,郭 浩,田庆忠,等. 蒽贝素协同增强肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体诱导乳腺癌细胞凋亡性死亡的实验[J]. 肿瘤防治研究,2014,41(11):1195－1199.

[8] CHEN GP, LIU W, YAN BF. Breast Cancer MCF－7 Cell Spheroid Culture for Drug Discovery and Development[J]. Journal of Cancer Therapy,2022,13(3):117－130.