

· 药理 ·

## 消癌解毒方联合顺铂通过调控组蛋白去甲基化酶抑制4T1荷瘤小鼠肿瘤生长

孙浩<sup>1,2,3</sup>, 沈卫星<sup>3,4</sup>, 徐长亮<sup>3</sup>, 孙东东<sup>3,4</sup>, 谭佳妮<sup>3</sup>, 许惠琴<sup>1,2\*</sup>, 程海波<sup>3,4\*</sup>

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210023;

2. 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 南京 210023;

3. 南京中医药大学转化医学研究中心, 国家中医药管理局名医验方评价与转化重点研究室, 江苏省抗肿瘤验方与产业化工程实验室, 南京 210023;

4. 江苏省中医药防治肿瘤协同创新中心, 南京 210023)

**[摘要]** 目的:观察消癌解毒方联合顺铂抑制4T1荷瘤小鼠肿瘤生长的作用及机制。方法: BALB/c小鼠皮下接种4T1乳腺癌细胞形成荷瘤模型,分别单独给予顺铂( $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、消癌解毒方( $1\times 10^4\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )及两者联合用药进行治疗,给药期间称量并记录小鼠体质量和瘤体积,15 d后脱颈处死,剥离并称量瘤块质量,计算抑瘤率,苏木素-伊红(HE)染色观察心、肝、脾、肾和瘤块的病理情况,原位末端转移酶标记技术(TUNEL)观察肿瘤细胞凋亡情况并统计凋亡率,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肿瘤组织中B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2), Bcl-2相关X蛋白(Bax),组蛋白去甲基化酶1(LSD1),组蛋白H3(Histone H3),组蛋白H3第4位赖氨酸二甲基化(Histone H3K4me2),组蛋白H3第9位赖氨酸二甲基化(Histone H3K9me2)的表达水平。结果:与模型组相比,顺铂给药组小鼠体质量均有下降,其中消癌解毒方+顺铂组较单用顺铂组体质量增加( $P<0.01$ );消癌解毒方+顺铂较单用顺铂更能缩小移植瘤体积,提高抑瘤率( $P<0.01$ );更明显提高了肿瘤细胞凋亡率( $P<0.05, P<0.01$ );更明显下调肿瘤组织Bcl-2表达水平,上调Bax表达水平( $P<0.05, P<0.01$ );各给药组均能下调LSD1蛋白的表达,增加组蛋白H3K4, H3K9的二甲基化,消癌解毒方+顺铂组作用最为明显( $P<0.05, P<0.01$ )。结论:消癌解毒方+顺铂用药对于4T1荷瘤小鼠抑瘤作用明显,其机制可能与下调组蛋白去甲基化酶水平有关。

**[关键词]** 消癌解毒方; 4T1荷瘤小鼠; 顺铂; 组蛋白去甲基化酶

**[中图分类号]** R22; R242; R273; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)13-0078-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20181115

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180316.1834.005.html>

**[网络出版时间]** 2018-03-19 13:43

## Inhibitory Effect of Xiaoai Jiedu Decoction Combined with Cisplatin on Breast Cancer Cell Activity Through PI3K/Akt Pathway

SUN Hao<sup>1,2,3</sup>, SHEN Wei-xing<sup>3,4</sup>, XU Chang-liang<sup>3</sup>, SUN Dong-dong<sup>3,4</sup>,

TAN Jia-ni<sup>3</sup>, XU Hui-qin<sup>1,2\*</sup>, CHENG Hai-bo<sup>3,4\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;

2. Jiangsu Key Laboratory for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Materia Medica, Nanjing 210023, China; 3. Translational Medicine Research Center, Nanjing University of

**[收稿日期]** 20171017(010)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81373511, 81573910, 81673559, 81302829, 81403079);江苏省自然科学基金项目(BK20131416, BK20141467, BK20161045);江苏省高校自然科学研究面上项目(16KJB360001);江苏高校优势学科建设工程二期项目

**[第一作者]** 孙浩,在读硕士,从事中医药抗肿瘤研究, E-mail:675621195@qq.com

**[通信作者]** \*许惠琴,博士,教授,从事中药药理学研究, E-mail:hqxu309@sina.com;

\*程海波,博士,副教授,从事中医药抗肿瘤研究, Tel:025-85811005, E-mail:myyfcchb@163.com

*Chinese Medicine, Key Laboratory of Famous Doctors' Proved Recipe Evaluation and Transformation of State Administration of Traditional Chinese Medicine (TCM), Provincial Laboratory of Anticarcinoma Proved Recipe Research and Engineering Industrialization, Nanjing 210023, China; 4. Jiangsu Provincial Collaborative Innovation Center for Prevention and Treatment with TCM, Nanjing 210023, China)*

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect and mechanism of Xiaoi Jiedu decoction combined with cisplatin in inhibiting tumor growth of 4T1 tumor bearing mice. **Method:** BALB/c mice were subcutaneously inoculated with 4T1 breast cancer cells to establish the tumor bearing model. They were treated with cisplatin (CDDP,  $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) and Xiaoi Jiedu decoction (XJF,  $1 \times 10^4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) respectively, and the combination therapy. Body weight and tumor volume were quantified and recorded during drug treatment. The mice were put to death after 15 days, and tumor masses were stripped and weighed. The inhibition rate was calculated. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of heart, liver, spleen, kidney and tumor. The apoptosis of tumor cells was observed by TdT-mediated-dUTP nick end labeling (TUNEL) staining, and the apoptosis rate was counted. Western blot was used to detect the expressions of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 related X protein (Bax), lysine-specific demethylase 1 (LSD1), Histone H3, Histone H3K4me2 and Histone H3K9me2 in tumor tissues. **Result:** Compared with model group, the body weight of mice in the cisplatin group decreased, and the mice in the combined group had a higher body weight than those in cisplatin group ( $P < 0.01$ ). The combination therapy can further reduce the volume of transplanted tumor, improve the tumor inhibition rate, and promote the apoptosis rate of tumor cells significantly compared with cisplatin therapy ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The expression of Bcl-2 in tumor tissues was up-regulated, and Bax was up-regulated ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Each drug group could down regulate the protein expression of LSD1, and increase the methylation of histone H3K4 and H3K9, and the combination group showed the most significant effect on the protein expression ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Xiaoi Jiedu prescription combined with cisplatin can obviously inhibit the growth of 4T1 tumor in tumor bearing mice. Its mechanism may be related to the down-regulation of histone demethylation enzyme level.

**[Key words]** Xiaoi Jiedu decoction; 4T1 tumor bearing mice; cisplatin; histone demethylation enzyme

乳腺癌是严重危害女性健康的恶性肿瘤之一,近年来发病率及死亡率不断上升<sup>[1]</sup>。化学疗法作为延长患者生存期的有效手段,广泛运用于绝大多数乳腺癌患者的术前术后治疗方案中,但存在特异性弱,毒副作用明显等问题<sup>[2]</sup>。从传统中药中寻找开发疗效明确、毒性小的药物进行肿瘤治疗是新药开发的重要方向之一。国医大师周仲瑛根据多年临床经验创制了消癌解毒方,方由白花蛇舌草、半枝莲、山慈菇、莪术、太子参和麦冬组成,具有扶正祛邪,攻补兼施的功效<sup>[3]</sup>。临床研究发现消癌解毒方与化疗药物临床上的联合应用,对于乳腺癌、肝癌及消化道肿瘤均有可靠疗效,可以提高患者机体免疫力,对抗肿瘤<sup>[4-6]</sup>。前期的现代药理学研究也表明,消癌解毒方对肝癌、肺癌移植瘤模型均具有一定的治疗作用,体外可以通过抑制结肠癌细胞糖酵解过程抑制其增殖<sup>[7-9]</sup>。消癌解毒方针对乳腺癌的临床

疗效确切,但是缺乏相关机制的深入研究。本实验建立小鼠乳腺癌细胞 4T1 荷瘤模型,观察消癌解毒方联合顺铂抑制 4T1 荷瘤小鼠肿瘤生长发展的作用并探讨其可能的机制,为进一步开发消癌解毒方的临床价值奠定坚实的基础。

## 1 材料

**1.1 动物、细胞和药物** SPF 级 BALB/c 小鼠 40 只,雄性,体质量 18 ~ 20 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(苏)2016-0003,本实验经过南京中医药大学实验动物伦理委员会批准,编号 201606134。4T1 小鼠乳腺癌细胞购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,编号 ZQ0201。

消癌解毒方为周仲瑛教授原创组方,组方:白花蛇舌草 154 g,半枝莲 39 g,莪术 77 g,山慈菇 77 g,太子参 77 g,麦冬 77 g,药材全部购于亳州国苑中药

材饮片有限公司,经南京中医药大学郭立玮教授鉴定为正品。称取一定量药材,加入10倍量水煎煮2 h,过滤,收集滤液,再加8倍量水煎煮1.5 h,收集并合并滤液,减压浓缩至生药质量浓度为 $2\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的药液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。顺铂购自南京制药厂有限公司,批号20150311。

胎牛血清(Capricorn Scientific 公司,批号1705124);DMEM高糖培养基(上海源培生物技术有限公司,批号F40403);二甲基亚砜(DMSO,Sigma公司,批号SHBH2446V);细胞裂解液(Biosharp公司,批号6503595);B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2),Bcl-2相关X蛋白(Bax),组蛋白H3(Histone H3),组蛋白H3第4位赖氨酸二甲基化(Histone H3K4me2),组蛋白H3第9位赖氨酸二甲基化(Histone H3K9me2),组蛋白去甲基化酶(KDM1/LSD1)抗体(Abcam公司,批号分别为GR95625-11,GR151406-40,GR244503-9,GR203823-2,GR149282-1,GR253788-10);磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)抗体(CST公司,批号5014);脱氧核苷酸末端转移酶(TdT)介导的dUTP缺口末端标记法(TUNEL)试剂盒(Roche公司,批号11684795910);4',6-二脒基-2-苯基吲哚 DAPI 染色液(碧云天生物技术公司,批号C1006);二喹啉甲酸(Bicinchoninic Acid,BCA)试剂盒,增强型化学发光ECL检测试剂盒(Thermo公司,批号分别为QI220551,QF218484)。

**1.2 仪器** SW-CJ-2FD型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司),HERAcell 150i型二氧化碳培养箱(美国Thermo公司),Ti型倒置荧光显微镜(日本尼康公司),Direct-Q超纯水系统(美国MilliPORE公司),PowerPac™ Basic型电泳、转膜仪(美国Bio-Rad公司),Tanon-5500型化学发光凝胶成像仪器(天能科技有限公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** 小鼠乳腺癌细胞4T1在含10%胎牛血清, $100\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青-链霉素的DMEM高糖培养基中,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中培养,倒置显微镜观察生长情况。细胞融合度约90%时用胰蛋白酶消化传代或种板,取对数生长期的细胞用于实验。

**2.2 移植瘤模型建立** BALB/c小鼠适应性饲养3 d后,取对数生长期细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗,胰蛋白酶消化并离心,PBS重悬,调整细胞密度为 $5\times 10^7$ 个/mL,每只小鼠腋下皮下注射0.2 mL细胞悬液接种肿瘤细胞,接种后第10天肉眼可见直径0.7~0.8 cm球形荷瘤形成<sup>[10]</sup>。

**2.3 分组、称重与给药** 接种肿瘤细胞10 d后,将荷瘤小鼠随机分为模型组、顺铂组( $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),消癌解毒方组( $1\times 10^4\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),消癌解毒方联合顺铂组,顺铂腹腔注射,消癌解毒方灌胃给药,每日1次,连续15 d,模型组给予相应体积的生理盐水。给药起,每3 d称体质量1次并记录。实验动物给药剂量参照动物剂量换算表,以标准体质量进行换算,换算公式为小鼠给药剂量( $D_b$ )=人临床给药剂量( $D_a$ ) $\times$ 折算系数( $R_{ab}$ ),人到小鼠的 $R_{ab}$ 为12.33<sup>[11]</sup>。

**2.4 移植瘤体积测量** 给药起每3 d测量皮下移植瘤的最大长径( $a$ )和横径( $b$ ),计算移植瘤体积。瘤体积= $a\times b^2/2$ <sup>[12]</sup>。

**2.5 移植瘤质量和抑瘤率检测** 给药结束后脱颈处死小鼠,取出肿瘤瘤块,各组移植瘤称质量,计算抑瘤率。抑瘤率=(1-给药组移植瘤均重/模型组移植瘤均重) $\times 100\%$ 。

**2.6 HE染色观察病理** 给药结束后脱颈处死小鼠,取出心、肝、脾、肾和瘤块,4%中性甲醛固定组织24 h,脱水、固定、透明,石蜡浸泡,包埋。切片进行苏木素-伊红(HE)染色,光学显微镜下观察各组织病理情况并拍照。

**2.7 TUNEL染色检测凋亡** 肿瘤切片脱蜡水化后0.3%加聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)通透,PBS漂洗后加TUNEL反应液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光反应1 h,PBS漂洗后再加DAPI染核,荧光显微镜下观察肿瘤细胞凋亡情况,每切片选择5个视野,绿色荧光标记凋亡细胞,蓝色荧光标记全部肿瘤细胞,计算视野中细胞凋亡率,重复3次,凋亡率=凋亡细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 。

**2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测蛋白表达** 肿瘤组织匀浆后加入适当裂解液提取蛋白,BCA蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度,加上样缓冲液 $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,10 min变性。蛋白样品进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,80 V电泳30 min,120 V至溴酚蓝跑出分离胶。300 mA湿转转膜1 h,5%脱脂牛奶常温封闭1 h。按说明书比例稀释一抗结合膜上蛋白, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜。PBST洗膜后二抗(1:1万)室温孵育1 h,ECL试剂盒发光显色,Image J进行条带灰度值分析。

**2.9 统计学方法** 数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS 17.0统计学软件进行统计。组间比较采用方差分析和 $t$ 检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对荷瘤小鼠体质量和移植瘤体积的影响** 小

鼠 4T1 乳腺癌细胞接种 10 d 后,成瘤率达到 100%。与模型组相比,单用消癌解毒方对荷瘤小鼠体质量影响不大,顺铂组及消癌解毒方联合顺铂组小鼠体质量下降显著 ( $P < 0.01$ ),消癌解毒方合用顺铂组小鼠平均体质量较单用顺铂组有提升,差异不明显,见表 1。

与模型组相比,单用消癌解毒方对移植瘤体积影响不大,注射顺铂使小鼠平均瘤体体积增长缓慢,治疗 9 d 后,顺铂组及消癌解毒方联合顺铂组小鼠平均瘤体体积降低 ( $P < 0.01$ ),消癌解毒方联合顺铂组较顺铂组小鼠平均瘤体体积下降 ( $P < 0.01$ ),见表 1。

表 1 消癌解毒方对荷瘤小鼠体质量及肿瘤体积的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effect of Xiaoi Jiedu decoction on body weight and tumor volume in mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	体质量/g					
		0 d	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d
模型	-	19.14 ± 0.83	19.33 ± 0.92	19.52 ± 1.05	19.51 ± 0.94	19.51 ± 0.61	19.55 ± 0.49
顺铂	2	19.23 ± 0.81	19.20 ± 0.57	19.03 ± 0.79	18.68 ± 0.70 <sup>1)</sup>	18.07 ± 1.08 <sup>2)</sup>	17.68 ± 1.18 <sup>2)</sup>
消癌解毒方	1 × 10 <sup>4</sup>	19.15 ± 0.90	19.33 ± 0.69	19.64 ± 1.01	19.71 ± 0.60	19.74 ± 0.64	19.80 ± 0.61
消癌解毒方 + 顺铂	-	19.13 ± 0.54	19.22 ± 0.96	19.01 ± 0.59	18.77 ± 0.55 <sup>1)</sup>	18.44 ± 0.58 <sup>2)</sup>	18.10 ± 0.77 <sup>2)</sup>

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	瘤体积/cm <sup>3</sup>					
		0 d	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d
模型	-	0.21 ± 0.06	0.23 ± 0.06	0.35 ± 0.10	0.66 ± 0.08	0.93 ± 0.08	1.54 ± 0.04
顺铂	2	0.22 ± 0.07	0.22 ± 0.08	0.28 ± 0.08	0.41 ± 0.09 <sup>2)</sup>	0.60 ± 0.07 <sup>2)</sup>	0.86 ± 0.10 <sup>2)</sup>
消癌解毒方	1 × 10 <sup>4</sup>	0.21 ± 0.07	0.22 ± 0.08	0.30 ± 0.08	0.61 ± 0.09	0.85 ± 0.11	1.44 ± 0.07
消癌解毒方 + 顺铂	-	0.22 ± 0.05	0.23 ± 0.04	0.24 ± 0.07 <sup>2)</sup>	0.33 ± 0.03 <sup>2,3)</sup>	0.42 ± 0.06 <sup>2,3)</sup>	0.58 ± 0.08 <sup>2,3)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与顺铂组比较<sup>3)</sup> $P < 0.01$ 。

**3.2 对荷瘤小鼠肿瘤质量的影响** 治疗 15 d 后,与模型组相比,单用消癌解毒方对肿瘤质量影响不明显,顺铂组及消癌解毒方联合顺铂组可以降低荷瘤小鼠肿瘤质量 ( $P < 0.01$ ),消癌解毒方联合顺铂相较单用顺铂可以降低瘤质量 ( $P < 0.01$ ),见表 2。

密度明显稀疏,肿瘤细胞部分破碎,细胞体积较小,着色较浅,肿瘤组织成不同程度的坏死,在两药合用组上尤为明显,见图 1。观察各组荷瘤小鼠的心、肝、脾、肾组织染色切片,未见明显差异。

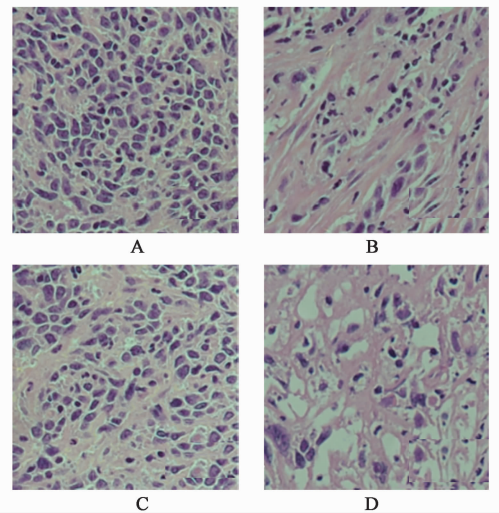
表 2 消癌解毒方对 4T1 荷瘤小鼠肿瘤质量和抑瘤率的影响

Table 2 Effect of Xiaoi Jiedu decoction on tumor weight and tumor inhibitory rate in 4T1 tumor bearing mice

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	肿瘤质量 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ ) /g	抑瘤率 /%
模型	-	1.49 ± 0.14	-
顺铂	2	0.73 ± 0.17 <sup>1)</sup>	50.88
消癌解毒方	1 × 10 <sup>4</sup>	1.42 ± 0.10	4.40
消癌解毒方 + 顺铂	-	0.45 ± 0.11 <sup>1,2)</sup>	69.40

注:与模型组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与顺铂组比较<sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

**3.3 对荷瘤小鼠组织病理学的影响** 分离后的移植瘤呈类椭圆形或圆形,剖面苍白,部分肿瘤组织累及皮肤,未见其他脏器转移。模型组细胞排列密集弥散状分布,细胞核明显较大,染色较深,少见细胞坏死灶。与模型组比较,单用消癌解毒方组无明显差异,而单用顺铂以及消癌解毒方合用顺铂组细胞



A. 模型组; B. 顺铂组; C. 消癌解毒方组; D. 顺铂 + 消癌解毒方组 (图 2~5 同)

图 1 消癌解毒方对 4T1 荷瘤小鼠肿瘤组织病理的影响 (HE, ×200)

Fig.1 Effect of Xiaoi Jiedu decoction on tumor tissue pathology in 4T1 tumor bearing mice (HE, ×200)

3.4 对荷瘤小鼠肿瘤组织细胞凋亡的影响 与模型组比较, 单用消癌解毒方无明显差异, 顺铂组与消癌解毒方联合顺铂组均可以诱导细胞凋

亡率显著增加 ( $P < 0.01$ ), 消癌解毒方联合顺铂组凋亡率明显高于单用顺铂组 ( $P < 0.05$ ), 见图 2, 表 3。

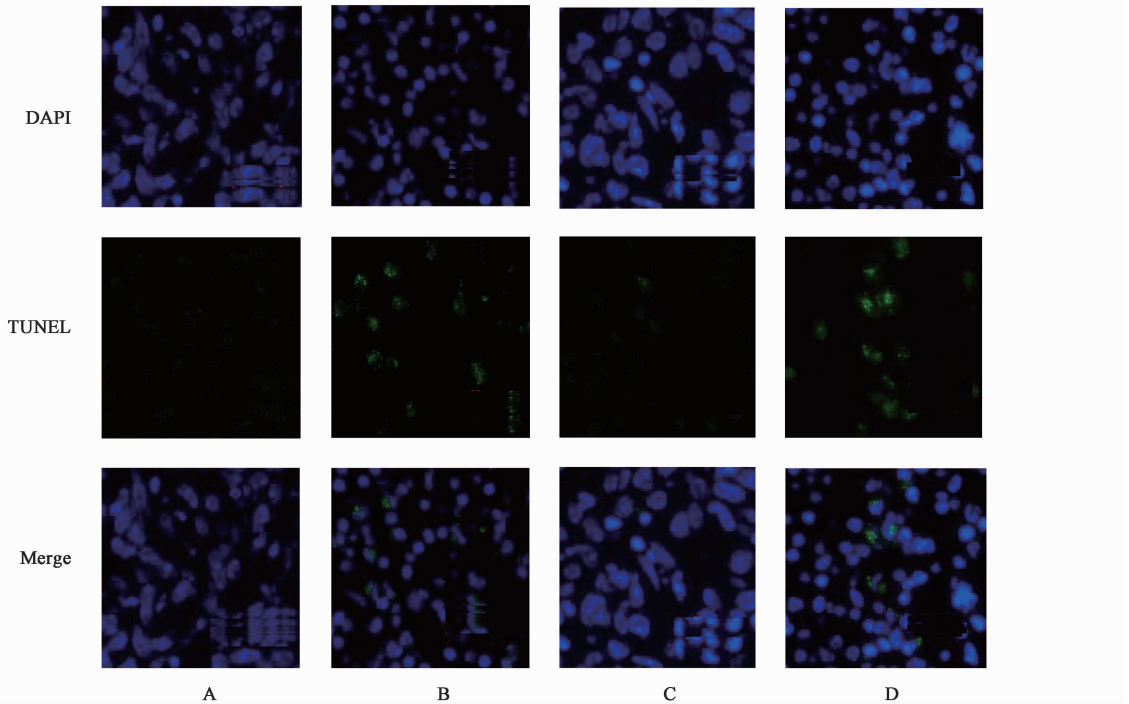


图 2 消癌解毒方对 4T1 荷瘤小鼠肿瘤组织细胞凋亡的影响 (TUNEL,  $\times 400$ )

Fig. 2 Effect of Xiaoi Jiedu decoction on apoptosis of 4T1 tumor cell in mice (TUNEL,  $\times 400$ )

表 3 消癌解毒方对 4T1 荷瘤小鼠肿瘤细胞凋亡率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Table 3 Effect of Xiaoi Jiedu decoction on apoptosis rate of 4T1 tumor cell in mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	凋亡率/%
模型	-	$2.70 \pm 0.13$
顺铂	2	$20.20 \pm 2.69^{1)}$
消癌解毒方	$1 \times 10^4$	$2.53 \pm 0.48$
消癌解毒方 + 顺铂	-	$26.76 \pm 2.42^{1,2)}$

注: 与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与顺铂组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ 。

3.5 对荷瘤小鼠肿瘤组织蛋白表达的影响 与模型组相比, 顺铂组均能下调 Bcl-2, 上调 Bax 的表达 ( $P < 0.01$ ); 与顺铂组比较, 消癌解毒方联合顺铂组 Bcl-2 蛋白下调与 Bax 蛋白上调更为明显 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 见图 3, 表 4。与模型组比较, 单用消癌解毒方和单用顺铂治疗都可以下调 LSD1 蛋白表达的水平, 上调 Histone H3K4, H3K9 二甲基化水平 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 与顺铂组比较, 消癌解毒方联合顺铂组蛋白变化水平更为明显 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 见图 4, 5, 表 5, 6。

#### 4 讨论

乳腺癌的发病率和死亡率居高不下, 严重危害

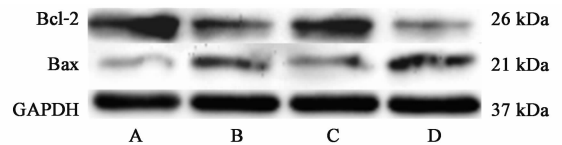


图 3 4T1 荷瘤小鼠肿瘤组织 Bcl-2, Bax 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of protein Bcl-2, Bax expression in 4T1 tumor bearing mice

表 4 消癌解毒方对 4T1 荷瘤小鼠肿瘤组织 LSD1 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of Xiaoi Jiedu decoction on LSD1 protein expression of tumor tissue in 4T1 tumor bearing mice ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Bcl-2/GAPDH	Bax/GAPDH
模型	-	$1.23 \pm 0.07$	$0.28 \pm 0.02$
顺铂	2	$0.53 \pm 0.07^{2)}$	$0.52 \pm 0.01^{2)}$
消癌解毒方	$1 \times 10^4$	$1.03 \pm 0.02$	$0.29 \pm 0.05$
消癌解毒方 + 顺铂	-	$0.29 \pm 0.08^{2,3)}$	$0.71 \pm 0.09^{2,3)}$

注: 与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与顺铂组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$  (表 5, 6 同)。

世界女性的健康<sup>[1]</sup>。顺铂是临床上运用最广泛的化疗药物之一, 杀伤肿瘤细胞的同时也具有广泛的

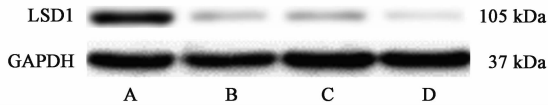


图 4 4T1 荷瘤小鼠肿瘤组织 LSD1 蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of protein LSD1 expression in 4T1 tumor bearing mice

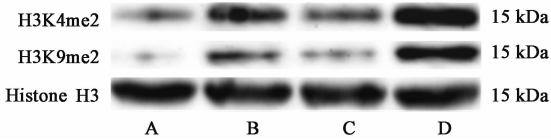


图 5 4T1 荷瘤小鼠肿瘤组织 Histone H3K4me2, Histone H3K9me2, Histone H3 蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of Histone H3K4me2, Histone H3K9me2, Histone H3 protein expressions in 4T1 tumor bearing mice

表 5 消癌解毒方对 4T1 荷瘤小鼠肿瘤组织 LSD1 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Effect of Xiaoi Jiedu decoction on LSD1 protein expression of tumor tissue in 4T1 tumor bearing mice ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	LSD1/GAPDH
模型	-	$0.85 \pm 0.06$
顺铂	2	$0.33 \pm 0.16^{2)}$
消癌解毒方	$1 \times 10^4$	$0.25 \pm 0.06^{2)}$
消癌解毒方 + 顺铂	-	$0.11 \pm 0.05^{2,3)}$

表 6 消癌解毒方对 4T1 荷瘤小鼠肿瘤组织蛋白 Histone H3K4me2, Histone H3K9me2, Histone H3 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 6 Effect of Xiaoi Jiedu decoction on Histone H3K4me2, Histone H3K9me2, Histone H3 protein expressions of tumor tissue in 4T1 tumor bearing mice ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Histone H3K4me2 /Histone H3	Histone H3K9me2 /Histone H3
模型	-	$0.24 \pm 0.04$	$0.15 \pm 0.03$
顺铂	2	$0.57 \pm 0.11^{2)}$	$0.54 \pm 0.04^{2)}$
消癌解毒方	$1 \times 10^4$	$0.40 \pm 0.04^{2)}$	$0.35 \pm 0.08^{1)}$
消癌解毒方 + 顺铂	-	$0.87 \pm 0.20^{2,3)}$	$0.92 \pm 0.14^{2,4)}$

细胞毒性, 长期治疗往往对免疫系统、肾脏、消化道产生严重副作用。中医药对于肿瘤的治疗应用于乳腺癌发生发展的各个阶段, 可以提高患者生活质量, 延长生存期<sup>[13]</sup>。临床上应用消癌解毒方联合化疗, 与单纯的化疗相比, 明显提高化疗患者生活质量, 是恶性肿瘤患者安全、有效的治疗用药<sup>[4]</sup>。本研究利用小鼠乳腺癌细胞 4T1 荷瘤模型, 采用国医大师周仲瑛教授配伍的消癌解毒方, 观察其联合顺铂治疗小鼠乳腺癌的疗效, 探讨其可能存在的机制。

研究结果显示, 顺铂可以显著抑制荷瘤小鼠肿瘤生长, 但毒副作用明显, 小鼠经治疗后体质量下降迅速, 毛发粗糙, 动作迟缓, 精神萎靡。而消癌解毒方 + 顺铂的小鼠体质量升高, 精神状态得到好转。消癌解毒方联合顺铂可以减小移植瘤体积, 减轻瘤块质量, 抑瘤率达到 69.40%, 超过了单用顺铂组的 50.88%。HE 染色以及 TUNEL 染色结果显示, 两药联用可以破坏肿瘤组织, 诱导肿瘤细胞凋亡, 不仅相较模型组作用显著, 凋亡率更超过了单用顺铂组, 且抗肿瘤作用显著的同时对于心、肝、脾、肾未见明显的毒副作用。

近年来, 表观遗传学与肿瘤的关系越来越得到重视, 组蛋白去甲基化酶 LSD1 在表观遗传学中起到重要作用, LSD1 是第一个发现的特异性去甲基化酶, 可以通过催化组蛋白 H3 第 4 位和第 9 位赖氨酸脱去甲基调控转录水平<sup>[14]</sup>。研究发现 LSD1 在乳腺癌患者肿瘤组织中存在高表达, 体外研究发现下调 LSD1 的表达可以抑制乳腺癌细胞的生长<sup>[15]</sup>。LSD1 抑制剂能诱导肿瘤细胞的凋亡, 导致异常沉默的基因恢复表达<sup>[16]</sup>。而沉默 LSD1 后, 组蛋白 H3K4 和 H3K9 的甲基化水平会得到增强<sup>[17-18]</sup>, 组蛋白甲基化可以通过 P53 途径激活凋亡基因, 细胞凋亡主要调控因子 Bcl-2/Bax 降低<sup>[19]</sup>。蛋白印迹法检测结果显示, 给予药物消癌解毒方联合顺铂可以显著抑制 LSD1 的表达, 增加组蛋白 H3K4, H3K9 二甲基化的水平, 上调促凋亡蛋白 Bax 的表达, 下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 作用均优于单用顺铂。

消癌解毒方联合顺铂通过调控组蛋白去甲基化酶, 对乳腺癌细胞 4T1 荷瘤小鼠的肿瘤有着良好的抑制效果, 而消癌解毒方中具体何种成分或哪类成分群与顺铂协同发挥调控去甲基化酶的作用尚不明确, 仍需继续关注。只有全方位、多角度地挖掘名老中医药方的疗效及机制, 才可以更好的开发中医药抗肿瘤的前景。

[参考文献]

[1] CHEN W, ZHENG R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.

[2] 夏月平. 中医药治疗恶性肿瘤临床研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2016, 12(12): 81-82.

[3] 程海波, 沈卫星, 姚志华, 等. 基于癌毒病机理论的消癌解毒方抗肿瘤研究进展 [J]. 南京中医药大学学报, 2014, 30(6): 593-595.

[4] 周红光, 陈海彬, 吴勉华, 等. 消癌解毒方配合化疗治

- 疗中晚期恶性肿瘤临床疗效观察[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(7): 1140-1143.
- [5] 陈海彬, 周红光, 程海波, 等. 消癌解毒方对中晚期恶性肿瘤患者免疫功能的影响[J]. 南京医科大学学报, 2009, 29(9): 1257-1259.
- [6] 郭海, 赵晓峰, 龚婕宁, 等. 运用周仲瑛教授“癌毒”理论治疗食管癌的疗效观察[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(2): 453-456.
- [7] 朱际平, 沈健, 晏婷婷. 消癌解毒方对肺癌 A549 细胞裸鼠移植瘤的抑制作用[J]. 四川中医, 2015, 33(5): 41-43.
- [8] 陈海彬, 沈波, 李黎, 等. 消癌解毒方抑制肝癌 H22 移植瘤的生长及其机制[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2011, 18(1): 28-32.
- [9] 石文静, 谭佳妮, 沈卫星, 等. 消癌解毒方含药血清对人结肠癌细胞增殖及糖酵解过程的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(20): 120-125.
- [10] 严丽, 李莉, 郝芳, 等. BALB/c 小鼠乳腺癌 4 T1 细胞株移植模型的建立[J]. 中国免疫学杂志, 2014, 30(6): 794-796.
- [11] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [12] Gyémánt N, Engi H, Schelz Z, et al. *In vitro* and *in vivo* multidrug resistance reversal activity by a Betti-base derivative of tylosin[J]. Br J Cancer, 2010, 103(2): 178-185.
- [13] 侯公楷. 中医药防治乳腺癌进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(5): 249-253.
- [14] SHI Y, LAN F, Matson C, et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1 [J]. Cell, 2004, 119(7): 941-953.
- [15] Lim S, Janzer A, Becker A, et al. Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) is highly expressed in ER-negative breast cancers and a biomarker predicting aggressive biology [J]. Carcinogenesis, 2010, 31(3): 512-520.
- [16] Huang Y, Greene E, Stewart T M, et al. Inhibition of lysine-specific demethylase 1 by polyamine analogues results in reexpression of aberrantly silenced genes [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(19): 8023-8028.
- [17] Nicholson T B, CHEN T. LSD1 demethylates histone and non-histone proteins [J]. Epigenetics, 2009, 4(3): 129-132.
- [18] LAN F, Nottke A C, SHI Y. Mechanisms involved in the regulation of histone lysine demethylases [J]. Curr Opin Cell Biol, 2008, 20(3): 316-325.
- [19] Kontaki H, Talianidis I. Lysine methylation regulates E2F1-induced cell death [J]. Mol Cell, 2010, 39(1): 152-160.

[责任编辑 张丰丰]