

蝙蝠葛酚性碱对人胰腺癌荷瘤裸鼠移植瘤形态学的研究

刘宏¹, 仲丽丽^{2*}, 杜徽¹, 张维嘉³

(1. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江中医药大学附属第一医院, 哈尔滨 150040;
3. 哈尔滨市第一医院, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:观察蝙蝠葛酚性碱(PAMD)对人胰腺癌细胞 BxPC-3 裸鼠移植瘤的抑制作用及其病理形态学影响。方法:雌性的裸鼠 40 只,被接种人源性的胰腺癌细胞株 BxPC-3 于裸鼠的右腋皮下,主要用于建立人胰腺癌皮下异位移植瘤的实验动物模型。24 h 后用随机法将其分为 5 组,每组 8 只,分别为 PAMD 高、低剂量组(20, 10 mg·kg⁻¹)5-氟尿嘧啶(5-FU)组(20 mg·kg⁻¹),模型组和正常组。PAMD 与 5-Fu 组 ip 给药,模型组与正常组则给予同体积的生理盐水,但正常组不接种瘤株,给药 20 d 后,按照相关的公式计算其抑瘤率;在光镜和透射电镜下,观察 PAMD 对移植瘤组织病理形态学的影响。结果:与正常组比较,模型组瘤重明显增加($P < 0.01$),肿瘤组织的病理形态和超微结构瘤细胞胞体变大,核浆比例失调,病理性核分裂象增大,核浆比例增大;与模型组比较,PAMD 高、低剂量组和 5-Fu 组对胰腺癌 BxPC-3 荷瘤裸鼠的瘤组织生长都有一定的抑制作用($P < 0.05$),其抑瘤率分别为 51.67%, 37.26%, 33.58%,通过光镜和透射电镜显示,PAMD 对肿瘤组织的病理形态和超微结构均有一定的改善作用。结论:PAMD 能够有效的抑制胰腺癌细胞株 BxPC-3 荷瘤裸鼠肿瘤细胞的生长,PAMD 高、低剂量组对 BxPC-3 荷瘤裸鼠瘤组织的病理形态学变化,具有一定的改善作用。

[关键词] 蝙蝠葛酚性碱; 胰腺癌; BxPC-3; 形态学; 裸鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)15-0107-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015150107

Morphology Study of PAMD on Human Pancreatic Cancer Xenografts in Nude Mice LIU Hong¹, ZHONG Li-li^{2*}, DU Hui¹, ZHANG Wei-jia³, (1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 2. Affiliated Traditional Chinese Medicine the First Hospital of Heilongjiang Medical College, Harbin 150040, China; 3. The First Hospital of Harbin, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the anti-tumor effect and pathological morphology change of phenolic alkaloids of menispermum dauricum (PAMD) in pancreatic cancer cell line BxPC-3 transplanted into nude mice. **Method:** The 40 metastatic tumor model of tumor-bearing mice was established by injecting BxPC-3 cell line hypodermically at right oter. After 24 h, the mice were randomly divided into 5 groups: the normal group (normal saline), the model group (normal saline), the 5-FU group (20 mg·kg⁻¹), the high-and low-dose PAMD groups (20, 10 mg·kg⁻¹) of 8 mice each. The mice except the normal group received heterotopic tumor transplantation of pancreatic carcinoma cell BxPC-3 subcutaneously. The corresponding medicines were intraperitoneally administered to mice for 20 days. Histomorphology changes of transplanted tumor tissue were observed by using HE staining. The ultrastructure of areas was observed by using electronic microscopy. **Result:** Compared with the normal group the tumor growth of tumor-bearing mice increased, pathological morphology and ultrastructure had obvious changes in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the tumor growth inhibited, the inhibition rates were 51.67%, 37.26%, 33.58%, respectively, in the high-, low-dose PAMD and 5-FU groups ($P < 0.05$). Moreover, pathological morphology and ultrastructure had good improvement. **Conclusion:** PAMD could effectively suppress tumor-bearing nude mice tumor cell growth of pancreatic cancer cell line BxPC-3 and improve the morphology of transplanted tumor tissue.

[收稿日期] 20141104(027)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173599);国家自然科学基金青年基金项目(81403288);黑龙江中医药大学科研基金项目(201315);黑龙江省博士后课题项目(LBH-Z14196)

[第一作者] 刘宏,博士,讲师,从事病理学与病理生理学教学与科研工作,Tel:15845004517,E-mail:eyllh@163.com

[通讯作者] * 仲丽丽,博士,副主任医师,从事临床病理及中医药抗肿瘤的研究工作,Tel:18645009633,E-mail:zhll1979@126.com

[Key words] phenolic alkaloids of menispermum dauricum; pancreatic cancer; BxPC-3; morphology; nude mouse

胰腺癌通常指的是外分泌胰腺所发生的癌,在全世界呈上升的趋势^[1-2]。蝙蝠葛酚性碱(PAMD)为多种脂溶性生物碱的混合物,是从中药北豆根中提取出来的有效成分,主要含有蝙蝠葛苏林碱和蝙蝠葛碱^[3]。近年报道,其具有抗心律失常^[4]、抗血小板聚集^[5]、消炎止痛^[6-7]、改善脑缺血和心肌缺血^[8-9]、抗肿瘤等作用^[10-11],尤其其抗肿瘤作用受到医药界的广泛关注^[12]。本课题组自 2012 年 6 月至 12 月成功的将人胰腺癌细胞株 BxPC-3 移植到裸鼠体内,并建立人胰腺癌的裸鼠异位移植瘤的动物模型。在此模型的基础上,应用蝙蝠葛酚性碱对其进行中药的干预,发现蝙蝠葛酚性碱可促进肿瘤细胞的凋亡,并可抑制恶性肿瘤的转移^[13]。本文将总结蝙蝠葛酚性碱对裸鼠移植瘤形态结构的影响,并系统地观察其研究的结果。

1 材料

1.1 动物及瘤株 4~6 周龄 BALB/c 雌性裸鼠,由上海斯莱克动物实验有限公司提供,合格证号 SCXK(沪)2012-0002, SPF 级饲养环境。人胰腺癌细胞株 BxPC-3 购于上海生命科学院细胞资源中心。

1.2 药物及试剂 PAMD 购于黑龙江中医药大学药学院,用时先以 0.9% 的 NaCl 混悬,再用 1 mol·L⁻¹ HCl 将其溶解后,1 mol·L⁻¹ NaOH 调配 pH 值至中性,然后加生理盐水至所需的浓度。5-氟尿嘧啶(5-FU),购于美国 Sigma 公司,先用 1 mol·L⁻¹ NaOH 将其溶解,之后用 1 mol·L⁻¹ HCl 将其调配 pH 至中性,然后加生理盐水至所需要的浓度。苏木素染色液(福州迈新生物技术有限公司,批号 CTS-1090),伊红(上海化学试剂公司,批号 F 20011209)。

1.3 仪器 DM750 型双目显微镜, RM2245 型半自动轮转式切片机(均为德国 Leica 公司), JEM 1220 型透射电子显微镜(日本电子株式会社)。

2 方法

2.1 动物分组 40 只裸鼠,造模 24 h 后,随机将其分成 5 组,分别为模型组,正常组,5-FU 组, PAMD 低、高剂量组,每组各 8 只。

2.2 给药途径及剂量 模型组及正常组每天给予同等容积的生理盐水,正常组不接种瘤株;5-FU 组按 20 mg·kg⁻¹ ip 给药;PAMD 低、高剂量组按分别 10, 20 mg·kg⁻¹ ip 给药;各实验用药治疗组均连续

给药 21 d。

2.3 胰腺癌 BxPC-3 裸鼠移植瘤模型的建立方法 参照文献[14-16]。

2.4 光镜及透射电镜观察

2.4.1 光镜观察 取其胰腺癌裸鼠移植瘤组织标本,用 10% 中性的福尔马林固定,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片,HE 染色,光镜下观察,最后拍照。

2.4.2 电镜观察 取其胰腺癌裸鼠移植瘤组织标本,以 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双重固定,乙醇、丙酮逐级脱水,EPon-812 包埋,超薄切片,铀铅染色,透射电镜下观察。

3 结果

3.1 对 BxPC-3 荷瘤裸鼠瘤组织的影响 与正常组比较,模型组瘤重明显增加($P < 0.01$);与模型组比较,PAMD 高、低剂量组与 5-FU 组明显降低瘤重 $P < 0.05$, 其抑瘤率分别为 51.67%, 37.26%, 33.58%。见表 1。

表 1 PAMD 对人胰腺癌 BxPC-3 裸鼠瘤组织的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 1 Effects of PAMD on tumor tissue of pancreatic cancer BxPC-3 in nude mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	瘤重/g	抑瘤率/%
正常	-	0.00 ± 0.00	-
模型	-	0.40 ± 0.05 ²⁾	0.0
5-FU	20	0.28 ± 0.05 ³⁾	33.58
PAMD	10	0.26 ± 0.12 ³⁾	37.26
	20	0.18 ± 0.06 ⁴⁾	51.67

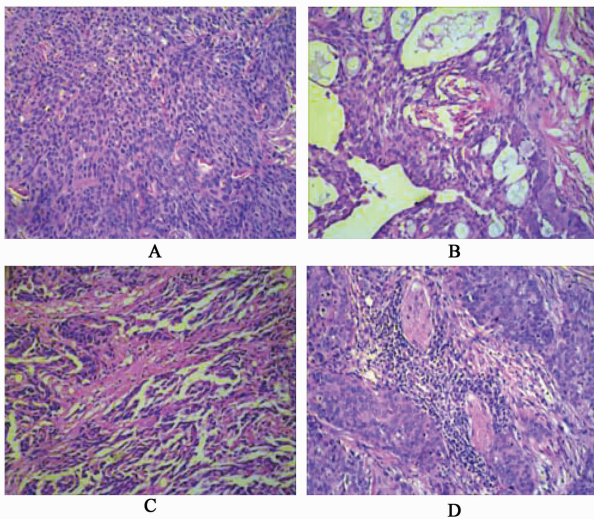
注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对 BxPC-3 荷瘤裸鼠肿瘤病理形态学的影响

3.2.1 大体观察 模型组灰粉色圆形或椭圆形肿瘤组织,每个瘤组织的体积大小约 1.5 ~ 2.5 cm × 1.5 cm × 1.5 cm。切面灰白、灰粉色、实性、质软。PAMD 高、低剂量组及 5-FU 组与模型组比较裸鼠移植瘤的体积明显缩小,肿瘤生长比较缓慢、局限。PAMD 高剂量组与低剂量组比较,移植瘤裸鼠移植瘤体积明显缩小,差异显著。PAMD 低剂量组与 5-FU 组的移植瘤增长体积比较,无显著的差别。

3.2.2 HE 染色观察 模型组肿瘤细胞呈泡巢状结构,瘤细胞胞体大,核大、深染,核浆比例失调,胞浆疏松淡染,胞膜界限不清,核染色质粗大、色深,核

内偶见有核仁,并且见较多的病理性核分裂象,可见多个病理性核分裂象呈多极分裂,肿瘤细胞广泛浸润肌组织内,其内见有较多的血管或增生的小血管。5-FU 组癌巢面积与模型组相比较缩小,病理性核分裂象少,瘤细胞向肌肉内侵袭也少,瘤组织周围有少许的纤维组织增生围绕肿瘤细胞周围,间质血管增多,而且瘤细胞周围或肌间有少许的淋巴细胞为主的炎细胞浸润及有坏死成分。PAMD 低、高剂量组与模型组比较,癌巢缩小,肌肉组织间或瘤细胞间质有较多的淋巴细胞浸润,病理性核分裂象也明显减少。PAMD 高剂量组与 PAMD 低剂量组比较,癌巢明显减小,PAMD 低剂量组与 5-FU 组比较,癌巢大小无明显区别。见图 1。



A. 模型组;B. 5-FU 组;C. PAMD 10 mg·kg⁻¹组;D. PAMD 20 mg·kg⁻¹组(图 2 同)

图 1 PAMD 对胰腺癌细胞株 BxPC-3 裸鼠瘤病理改变的影响 (HE, ×100)

Fig. 1 Effects of PAMD on tumor pathological changes of pancreatic cancer BxPC-3 in nude mice (HE, ×100)

3.2.3 透射电镜观察 模型组可见大多数的肿瘤细胞呈梭形或椭圆形,而且排列十分紧密,间隙正常,核浆比例增大,核异形性明显,其结构完整,核膜较清晰,核仁明显。细胞胞浆内线粒体、粗面内质网结构清晰,游离核糖体丰富;5-FU 组细胞的体积明显变小,细胞膜凹陷不完整,细胞间隙增大,核染色质高度凝集、固缩于核膜下,部分细胞核碎裂、崩解,细胞质密度增高,可见有凋亡小体样团块形成;PAMD 低、高剂量组细胞核碎裂、崩解,核染色质高度浓缩边集,细胞膜融合,细胞边界不清,线粒体空泡状改变,部分细胞器结构消失,微绒毛脱落。见图 2。

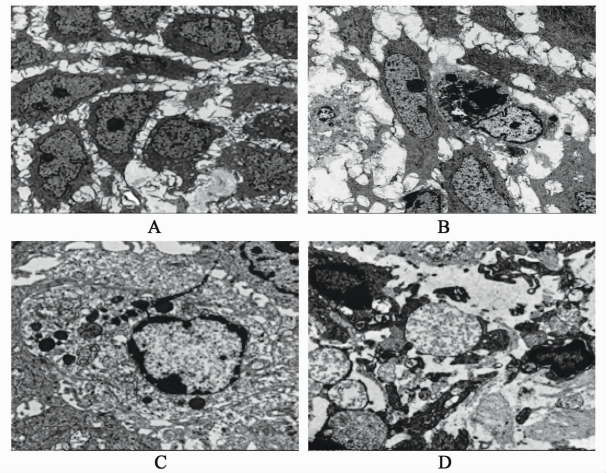


图 2 PAMD 对胰腺癌细胞株 BxPC-3 裸鼠移植瘤超微结构改变的影响 (EM, ×16 500)

Fig. 2 Effects of PAMD on tumor pathological changes of pancreatic cancer BxPC-3 in nude mice (EM, ×16 500)

4 讨论

裸鼠移植瘤模型是人癌症实验研究中较为理想的模型^[17],为抗癌药物的筛选及临床疗效的评定提供了良好的动物模型。本实验是以人源性的胰腺癌 BxPC-3 细胞株移植到裸鼠体内而造成皮下异位瘤体模型,在此基础上再进行有关疾病的发生、发展的作用机制以及药物筛选等研究。

蝙蝠葛酚性碱为多种脂溶性生物碱的混合物,是从中药北豆根中提取出来的有效成分。北豆根最早记载于《中国药志》^[18],其性味苦寒,具有清热解毒、祛风、消炎止痛的作用。但有小毒,主要归胃、肺、大肠经。现北豆根已经被广泛的应用,例如北豆根片、北豆根胶囊等治疗咽喉疼痛、肠炎痢疾以及风湿痹痛等病症。现代药理学研究表明,北豆根具有抑菌、清热镇痛、消炎和抗心律失常等方面的作用。有资料表明,PAMD 能够用于治疗恶性肿瘤^[19]。有报道,蝙蝠葛酚性碱可通过下调 EGFR 和 HER-2 抑制胃癌 MGC-803 细胞的增殖^[20]。苏云明等研究发现,蝙蝠葛酚性碱对体外培养人肿瘤细胞株的增殖是有明显的抑制和杀伤的作用^[21]。李环等观察到蝙蝠葛酚性碱对 BxPC-3 荷瘤裸鼠具有明显的抑瘤作用并且对裸鼠的一般状态和免疫器官无严重影响^[22]。杜永强等^[23]发现应用 PAMD 治疗后,S180 荷瘤小鼠外周血 TNF- α 含量明显增加。提示 PAMD 能够通过提高荷瘤小鼠外周血 TNF- α 含量,起到抗肿瘤作用。林洋等^[24]通过测定小鼠瘤重、证明了 PAMD 对胃癌荷瘤鼠具有抑制作用。

蝙蝠葛酚性碱在大鼠小肠各肠段均有一定的吸

收,但在回肠段被吸收的效果更好^[25],因此本实验选取腹腔注射给药。通过实验表明:PAMD高、低剂量组及5-FU组的人胰腺癌BxPC-3细胞株裸鼠移植瘤的平均瘤重与模型组比较,均低于模型组的瘤重。其中以PAMD高剂量组的治疗效果最好。根据中草药抗肿瘤有效性的标准(抑瘤率>30%),实验结果显示,各实验组的抑瘤率均>30%,这是完全符合《现代肿瘤治疗药理学》相关标准的。所以根据研究结果,初步可以认为PAMD对人胰腺癌BxPC-3细胞株裸鼠皮下异位移植瘤是有抑制作用的,进一步证明了PAMD是具有抗肿瘤作用的。

本实验通过光镜和透射电镜来观察PAMD对人胰腺癌细胞株BxPC-3裸鼠皮下异位移植瘤细胞形态的改变。经大体肉眼观察,模型组的肿瘤组织体积明显比PAMD的治疗组和5-FU组的肿瘤体积大,而治疗组的瘤体呈不同程度的缩小,而且局限。HE染色光镜下观察可见,PAMD高、低剂量组及5-FU组分别与模型组比较,在病理形态学上有不同程度的改变。肿瘤细胞的泡巢明显不规则地缩小,其见有较多的细胞坏死及白细胞碎片,而且肿瘤组织周围有纤维组织增生,肌肉组织间或瘤细胞间质有较多的以淋巴细胞为主的炎细胞浸润,其主要是发挥抗肿瘤的作用。

本课题组前期实验发现PAMD使肿瘤体积有不同程度的缩小,抑制肿瘤细胞的生长、增殖,而且通过保护裸鼠的免疫功能,降低毒副作用,并诱导肿瘤细胞凋亡以及发生大片坏死,从而起到抑制肿瘤的作用^[26]。可见,PAMD是治疗胰腺癌的一个不错的选择,其具体作用机制尚需进一步明确。

[参考文献]

[1] Haug U, Wente M N, Seiler C M, et al. Stool testing for the early detection of pancreatic cancer: rationale and current evidence [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2008, 8 (6): 753-759.

[2] Jemal A, Siegel R, Ward E. Cancer statistics [J]. *CA Cancer Clin*, 2009, 59: 225-249.

[3] 鲁美君, 苏云明. 蝙蝠葛酚性碱的药理作用研究进展 [J]. *中医药信息*, 2013, 30(3): 150-152.

[4] 龚培力, 杜佐华. 蝙蝠葛酚性碱的抗心律失常作用 [J]. *中药新药与临床药理*, 1995, 29(9): 647-651.

[5] 孔祥英, 杨晓燕, 龚培力. 蝙蝠葛酚性碱对血小板聚集的影响及其机制研究 [J]. *中国药学杂志*, 2006, 41 (12): 910-9131.

[6] 杜佐华, 刘汉官, 蔡从咏, 等. 北豆根总碱, 北豆根多羟基酚碱和北豆根非酚性总碱的抗炎作用 [J]. *中药通报*, 1987, 12(8): 431-433.

[7] 杜佐华, 刘汉官, 蔡从咏, 等. 蝙蝠葛碱的抗炎镇痛作

用 [J]. *中国药理学报*, 1986, 7(7): 419-422.

[8] 李英茜, 杨晓燕. 蝙蝠葛酚性碱对犬冠状动脉结扎形成心肌梗死的保护作用 [J]. *中国新药杂志*, 2003, 12 (7): 531-533.

[9] 吕青, 曲玲, 王芳, 等. 蝙蝠葛酚性碱对小鼠脑细胞缺血-再灌注脑组织 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响 [J]. *中草药*, 2004, 35(2): 185-187.

[10] 梁文杰. 中药北豆根提取物抗肿瘤抗突变及免疫学调节作用的实验研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2004.

[11] 李铭. 蝙蝠葛酚性碱对泌尿系统肿瘤作用的实验研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2006.

[12] 王德娟, 王栋. 蝙蝠葛酚性碱药理作用研究进展 [J]. *中医药学报*, 2008, 36(5): 44-45.

[13] 仲丽丽, 白云, 费洪新, 等. 蝙蝠葛酚性碱与胰腺癌研究 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2014, 16(6): 85-88.

[14] 苏云明, 肖佳音, 王志国, 等. 蝙蝠葛酚性碱对人肿瘤细胞 BxPC-3、BT6537 增殖的影响 [J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2007, 41(2): 129-131.

[15] 仲丽丽, 周忠光, 尹丽颖. 浅谈蝙蝠葛酚性碱对胰腺癌 BxPC-3 荷瘤抑制机理的研究 [J]. *中医药信息*, 2014, 31(2): 105-107.

[16] 赵大卓. 蝙蝠葛酚性碱对 BxPC-3 荷瘤小鼠细胞凋亡相关基因及蛋白表达的影响 [D]. 黑龙江: 黑龙江中医药大学, 2009.

[17] 李艳. 裸鼠荷人卵巢癌皮下移植瘤模型的建立及药效研究和基金突变的检测 [D]. 天津: 天津医科大学, 2012.

[18] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 92.

[19] 刘磊磊, 陈娟, 师彦平. 清热解毒中药抗肿瘤作用研究进展 [J]. *中草药*, 2012, 43(6): 1202-1212.

[20] 刘海艳, 穆永旭, 闫瑞强, 等. 蝙蝠葛酚性碱抑制人胃癌细胞株 MGC-803 增殖及对 EGFR 和 HER-2 表达的影响 [J]. *中药材*, 2014, 37(9): 1654-1657.

[21] 苏云明, 孟繁兴, 王欣, 等. 蝙蝠葛酚性碱对 K562、BxPC-3 增殖的影响 [J]. *甘肃中医学院学报*, 2008, 25(3): 1-4.

[22] 李环. 蝙蝠葛酚性碱对 BxPC-3 荷瘤裸鼠肿瘤组织中 MMP-2 和 MMP-9 表达的研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2009.

[23] 杜永强, 韩维维, 李姗姗, 等. 蝙蝠葛酚性碱对 S180 荷瘤小鼠外周血 TNF- α 含量的影响 [J]. *中国医药科学*, 2011, 1(16): 134-135.

[24] 林洋, 刘伟新. 蝙蝠葛酚性碱对胃癌荷瘤鼠抗肿瘤作用 [J]. *黑龙江医药科学*, 2012, 35(1): 78-80.

[25] 平丽, 徐兵勇, 富志军. 蝙蝠葛酚性碱在大鼠小肠吸收特性研究 [J]. *医药导报*, 2013, 32(2): 146-149.

[26] 冯大志, 白云, 闻喜英, 等. 蝙蝠葛酚性碱对胰腺癌组织 K-ras 蛋白表达的影响 [J]. *中医药信息*, 2010, 27(4): 112-114.

[责任编辑 周冰冰]