

- PI3K/AKT/PTEN Pathway as a Target for Pharmaceutical Therapy[J]. Open Med Chem J, 2013, 7: 23- 29.
- [11] 石明隽, 肖瑛, 桂华珍, 等. 糖尿病大鼠肾组织中 AKT 的表达及意义[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(22): 4375- 4378.
- [12] Albury- Warren TM, Pandey V, Spinel LP, et al. Prediabetes linked to excess glucagon in transgenic mice with pancreatic active AKT1 [J]. J Endocrinol, 2016, 228(1): 49- 59.
- [13] 俞晓燕, 孙子林. GLUT1 的研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(30): 3411- 3414.
- [14] 叶林, 陆凯, 张冬颖, 等. 胰岛素激活 PI3K- AKT 通路而促进 H9c2 心肌细胞葡萄糖摄取[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(6): 538- 542.
- (责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)

## 活体成像动态观察黄芪多糖对裸鼠卵巢癌细胞休眠的维持作用

胡向丹<sup>1</sup>, 王爱爱<sup>1</sup>, 翟秋丽<sup>2</sup>, 肖静<sup>1</sup>

1. 广东省中医院大学城医院妇科, 广东 广州 510006; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510006

[摘要] 目的: 利用活体成像技术观察黄芪多糖对裸鼠卵巢癌细胞休眠的维持作用。方法: 选取建立成功的卵巢癌细胞休眠裸鼠模型 30 只随机分成 3 组: 即对照组、黄芪多糖组、顺铂组, 每组 10 只, 连续给药 14 天; 利用活体成像系统分别在给药前 1 天、给药后第 7 天、第 14 天监测各组裸鼠卵巢癌细胞休眠情况。结果: 与对照组比较, 黄芪多糖组给药后第 7 天、第 14 天, 裸鼠体质量无明显变化; 而顺铂组在给药后第 7 天、第 14 天, 体质量明显降低, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。对照组裸鼠卵巢癌细胞光子量随着时间而升高。与对照组比较, 黄芪多糖组和顺铂组在给药第 7 天、第 14 天时, 裸鼠肿瘤休眠细胞光子量明显降低, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结论: 黄芪多糖具有较好的维持裸鼠卵巢癌细胞休眠的作用, 活体成像技术可动态地观察肿瘤细胞休眠的情况, 为黄芪多糖应用于临床提供理论依据。

[关键词] 黄芪多糖; 卵巢癌; 人卵巢癌 SKOV3 细胞; 休眠; 活体成像; 维持作用; 动物实验; 裸鼠

[中图分类号] R737.31; R285.5 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415 (2017) 08-0004-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2017.08.002

## Astragalus Polysaccharide Has Good Effect on Maintaining Dormancy of Ovarian Cancer Cells in Nude Mice by Living Imaging System

HU Xiangdan, WANG Ai'ai, ZHAI Qiuli, XIAO Jing

Abstract: Objective: To observe the maintenance effect of Astragalus polysaccharide on the dormancy of ovarian cancer cells in nude mice by living imaging system. Methods: Thirty dormant nude model mice which was successfully established were randomly divided into three groups: the control group, astragalus polysaccharide group, cisplatin group, 10 cases in each. Continuous administration lasted for 14 days; detected dormancy of ovarian cancer cells in nude mice of each group by living imaging system in one day before medication, seven days and fourteen days after medication. Results: Compared with the control group, there was no significant change in the body weight of Astragalus polysaccharide group seven days and fourteenth days after medication, while body weight of Cisplatin group was decreased obviously ( $P < 0.01$ ). Photon amount in the dormant ovarian cancer cells in nude mice of the control group was increased over time. Compared with the control group, photon amount in the dormant ovarian cancer cells in nude mice of astragalus polysaccharide group and cisplatin group was decreased significantly seven days and fourteenth days after medication ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Conclusion: Astragalus polysaccharide has a good effect on maintaining the dormancy of ovarian cancer cells in nude mice. Living imaging technology can be used to observe the dormancy of tumor cells dynamically, so as to provide a theoretical basis for clinical application of Astragalus

[收稿日期] 2017-04-05

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81403422)

[作者简介] 胡向丹 (1977-), 女, 医学博士, 副主任医师, 主要从事中医药防治妇科恶性肿瘤的研究。

[通讯作者] 肖静, E-mail: xiaojingson\_2004@126.com。

Polysaccharide.

Keywords: Astragalus polysaccharide; Ovarian cancer; Human ovarian cancer SKOV3 cell; Dormancy; Living imaging system; Maintenance; Animal experiment; Nude mice

卵巢上皮性癌(Epithelial ovarian cancer, 简称卵巢癌)在卵巢恶性肿瘤中所占比例高达90%,是生殖道恶性肿瘤中死亡率最高的疾病<sup>[1]</sup>。目前,临床上大多数卵巢癌患者经过满意的肿瘤细胞减灭术及术后采用含铂类药物的联合化疗后,虽有相当长的完全缓解期,但仍有70%的患者在几年甚至十几年内复发<sup>[2]</sup>,这一现象可以用肿瘤休眠来进行解释<sup>[3]</sup>。肿瘤细胞早期分散并进入休眠状态而且具有异质性<sup>[4]</sup>,早期分散的肿瘤细胞群可以逃避抗肿瘤药物而生存下来<sup>[5]</sup>,成为晚期肿瘤转移的源头。这些细胞从休眠中被唤醒后,在周围微环境条件的改变下,可能成为诱发肿瘤复发的根源。如果分散的肿瘤细胞能够一直保持休眠状态或在休眠状态下将其杀灭,这将成为新的预防肿瘤转移的战略性思维,但是,这种思维缺乏足够的研究数据支持,继续保持或诱导肿瘤细胞休眠<sup>[6-7]</sup>或在肿瘤细胞休眠下进行消灭才是创新的治疗战略。本研究利用活体成像系统进行荧光观测,对卵巢癌休眠模型裸鼠体内休眠细胞荧光光子量进行监测、分析,研究黄芪多糖对卵巢癌细胞休眠的维持作用。

## 1 材料与方 法

1.1 实验动物和细胞 实验动物为雌性 BALB/c 裸鼠 36 只,5~6 周龄,体质量 18~20 g,购于北京利华维通公司,动物质量合格证号:11400700148773,动物实验证号:00128520。动物饲养于广东省中医院科学研究所动物实验中心 SPF 级屏障系统内,采取自由采食、自由饮水的喂养方式,实验前适应性喂养 1 周。所有动物实验操作过程均遵照国际动物委员会制定的伦理道德规范。人卵巢癌 SKOV3 细胞株由中山大学附属第二医院实验室赠送,在体外用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液进行常规培养。

1.2 药物和试剂 黄芪多糖粉,25 g/瓶,购自美伦生物股份有限公司,批号:00801A;顺铂(DDP),100 mg/瓶,购自美伦生物股份有限公司,批号:M0501A;荧光素酶底物购自 promega,批号:0000177837;异氟烷购自上海恒瑞医药有限公司,批号:16021831;0.9%氯化钠注射液由广东省中医院提供,批号:C16042107-1;胎牛血清(批号:NsF0050)、DMEM1640 培养基(批号:8116027)、0.25%胰酶(批号:1713949)等均购自 GIBCO 公司;培养皿及培养板等购自 Corning 公司。

1.3 仪器设备 小动物麻醉机(美国 Summit);IVIS·Lumina LT 小动物活体成像系统(美国 Perkin Elmer);Living Image 4.3 图像分析软件(美国 Perkin Elmer);Allegra X-15R 大容量离心

机(美国贝克曼);725 型 -86℃低温冰箱(美国 FORMA);3111 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Forma);超净工作台(苏州苏杭);高压灭菌锅(日本三洋);AG204- 电子分析天平(瑞士 METTLER)。

1.4 细胞转染 转染前 1 天将人卵巢癌 SKOV3 细胞接种至 24 孔板中,每孔含  $1 \times 10^5$  个细胞,使细胞达到 90% 以上汇合,取 4 mL 含荧光素酶(luciferase)标记的逆转录病毒的培养基,加入 40  $\mu$ L(10 mg/mL)的 polybrene 混合,以 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤后加入 SKOV3 细胞中,37℃ 孵育过夜后更换为完全培养基。加入 8  $\mu$ g/mL 的 Blasticidin 来筛选稳定感染的克隆细胞(简称人 SKOV3/luc),2 周后建成抗性单克隆。在荧光显微镜下挑选抗性单克隆,传代 10 代以上建立稳定表达荧光素酶基因的人卵巢癌细胞株(SKOV3/luc)。

1.5 细胞培养和收集 采用含 10% 胎牛血清和 1% 双抗(100  $\mu$ g/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 链霉素)的 1640 培养基作为 skov-3/luc 细胞的培养液,置于 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 细胞培养箱内培养,待复苏后第 3 代细胞长至 80%~90% 汇合,用 0.25% 胰酶消化 3~5 min,800 r/min 离心 5 min,弃去上清液,PBS 洗涤 3 次,计数,然后将收集的细胞配置成浓度为  $1 \times 10^7$  个/mL 的细胞悬液。

1.6 肿瘤皮下接种建立休眠模型 取上述细胞悬液,用 1 mL 的注射器以每只 0.2 mL 接种于小鼠右侧腋部皮下,每天观察并记录裸鼠肿瘤生长情况,游标卡尺测定肿瘤大小。待表皮肿瘤直径生长至大于 0.2 cm 时进行活体成像荧光观测。选取荧光成像清晰、光感较强的裸鼠做肿瘤切除手术,将肉眼可见的肿瘤组织全部切除,同时进行荧光观测,荧光成像为阴性者即为符合临床手术切缘阴性的要求,则可纳入休眠观察的对象当中,荧光阳性者则予以剔除。手术后的裸鼠再常规喂养 8 周,8 周后选取经过手术切除后接种肿瘤处肉眼未见肿瘤组织生长的裸鼠进行荧光活体成像观察,活体成像显示接种处肿瘤细胞荧光阳性者,即认为裸鼠卵巢癌休眠模型建立成功(按照平均寿命折算,小鼠生存期 8 周,即相当于人类寿命 5 年)<sup>[8]</sup>。

1.7 分组与给药 选取休眠成功的裸鼠模型 30 只,根据裸鼠体质量和肿瘤细胞光子量数值随机分成 3 组:即对照组、黄芪多糖组、顺铂组,每组 10 只,全部小鼠于分组后第 2 天开始给药,同时每隔 2 天全部小鼠给予截尾 2 mm 作为外伤刺激,以打破肿瘤休眠状态<sup>[9]</sup>。黄芪多糖组:每只裸鼠分别给予黄芪多糖 0.8 g/(kg·d)灌胃(用蒸馏水稀释成 0.5 mL/d),每天 1 次,连续 2 周;对照组:每只小鼠分别给予蒸馏水灌胃,0.5 mL/d,每天 1 次,连续 2 周;顺铂组:每只小鼠分别给予

DDP 4 mg/kg 腹腔注射治疗, 每周 2 次, 连续 2 周。分别于给药前 1 天、给药后第 7 天、第 14 天称量裸鼠体质量。

1.8 活体成像系统进行荧光观测 利用活体成像系统分别在给药前 1 天、给药后第 7 天、第 14 天进行荧光成像观测。每只裸鼠腹腔注射 100 μL 浓度为 10 mg/mL 的荧光素酶底物 (D-luc), 腹腔注射底物 10 min 后, 用麻醉机对裸鼠进行异氟烷麻醉, 并将麻醉好的裸鼠置于小动物活体成像仪中进行休眠细胞荧光成像检测, 监测各组裸鼠卵巢癌细胞休眠情况; 同时用 LT Living Image 4.3 软件进行图像分析, 计算各组裸鼠卵巢癌细胞光子量。

1.9 统计学方法 数据分析采用统计学软件 SPSS17.0, 计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示, 计量资料应用 ANOVA 方差分析评价试验结果, 两两比较采用 LSD 检验。

2 结果

2.1 各组裸鼠卵巢癌细胞荧光面积和荧光强度结果比较 见图 1。对照组裸鼠肿瘤休眠细胞荧光面积和荧光强度随时间呈增大的趋势。与对照组比较, 黄芪多糖组在给药第 7 d、14 d 时肿瘤休眠细胞荧光面积和强度明显减小; 顺铂组给药后肿瘤休眠细胞荧光面积和强度显著减小, 说明黄芪多糖、顺铂均具有维持卵巢癌细胞休眠的作用, 但黄芪多糖作用弱于顺铂。

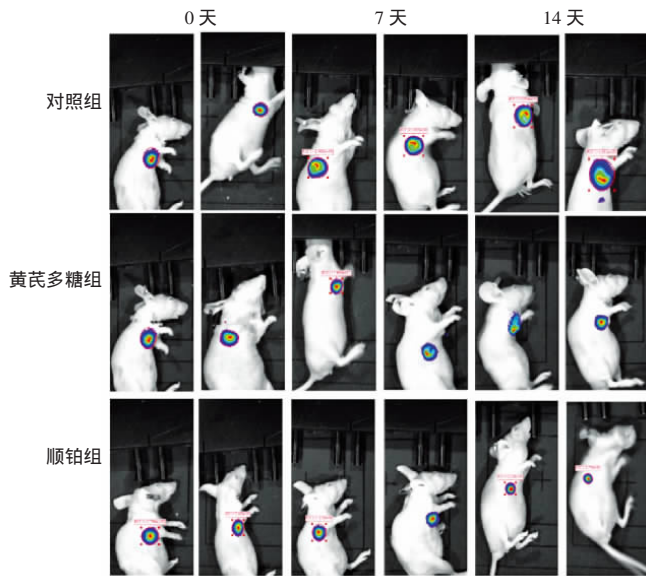


图 1 各组裸鼠卵巢癌细胞荧光面积和荧光强度成像图

2.2 各组裸鼠体质量结果比较 见表 1。与对照组比较, 黄芪多糖组给药后 7 d、14 d, 裸鼠体质量无明显变化; 而顺铂组在给药后 7 d、14 d, 体质量明显降低, 差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。

2.3 各组裸鼠肿瘤休眠细胞光子量结果比较 见表 2。对照组裸鼠卵巢癌细胞光子量随着时间而升高。与对照组比较, 黄芪多糖组和顺铂组在给药第 7 d、14 d 时, 裸鼠肿瘤休眠细胞光子量明显降低, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

表 1 各组裸鼠体质量结果比较( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ ) g

组别	0 d	7 d	14 d
对照组	23.00 ± 0.54	22.90 ± 0.53	22.70 ± 1.18
黄芪多糖组	22.87 ± 0.74	22.56 ± 0.82	22.20 ± 1.34
顺铂组	23.20 ± 0.82	22.10 ± 0.89	20.00 ± 1.15

与对照组比较, ① $P < 0.01$

表 2 各组裸鼠肿瘤休眠细胞光子量结果比较( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

组别	0 d	7 d	14 d
对照组	2 474.62 ± 178.15	2 528.98 ± 264.49	2 727.50 ± 310.41
黄芪多糖组	2 108.00 ± 738.96	1 649.20 ± 420.75	1 110.12 ± 31.74
顺铂组	2 372.00 ± 396.84	906.00 ± 383.10	232.12 ± 86.30

与对照组比较, ① $P < 0.05$ , ② $P < 0.01$

3 讨论

近年来, 在肿瘤防治领域中, 中药表现出了其独特的功效, 受到很多临床医师的青睐, 其中, 黄芪多糖是从黄芪中提取的一种主要生物活性成分, 也是目前研究较为深入、临床应用比较广泛的中药成分之一<sup>[9]</sup>, 具有调节免疫、抗肿瘤、抗氧化、保护血管等功能, 具有较好的调节机体免疫功能及抗肿瘤的作用, 它这一临床作用在学术界被普遍认可<sup>[10-13]</sup>。

活体成像技术是指生物体处于活体状态下, 在细胞和分子水平上应用多种成像模式对各种生物行为进行定性和定量分析研究的一种新技术, 在肿瘤研究中, 可采用活体成像技术无创地定量检测小动物整体的原位瘤、转移瘤及自发瘤的大小及转移情况, 以及对癌症治疗过程中癌细胞的变化进行实时、原位、活体的观测和评价<sup>[14-15]</sup>, 也可直接客观地评价抗肿瘤及维持肿瘤细胞休眠药物疗效。本研究利用活体成像系统, 对卵巢癌细胞休眠模型裸鼠体内休眠细胞荧光光子量进行监测、分析, 研究黄芪多糖对卵巢癌细胞休眠的维持作用, 为黄芪多糖应用于临床提供了实验依据, 也为进一步研究黄芪多糖促进和维持肿瘤细胞休眠的作用机制打下了基础。

本实验结果显示, 在给药后第 7 天和 14 天, 黄芪多糖组裸鼠体质量无明显变化, 肿瘤休眠细胞荧光面积和光子量明显降低; 顺铂组裸鼠在给药后第 7 天和 14 天, 体质量明显降低, 肿瘤休眠细胞荧光面积和光子量显著减小。结果表明, 顺铂和黄芪多糖均表现出较好的维持卵巢癌细胞休眠的作用, 虽然在维持卵巢癌细胞休眠的作用上, 黄芪多糖弱于顺铂, 但实验结果证实使用黄芪多糖对休眠裸鼠体质量无明显变化、体质量抑制率低, 可能与其副作用较小有关, 具有一定优势。

综上所述, 既往对黄芪多糖的研究主要集中于其抗肿瘤的辅助性治疗作用, 对黄芪多糖维持肿瘤细胞休眠作用的研究尚缺乏, 本研究结果显示, 黄芪多糖对卵巢癌细胞的休眠有一定的维持作用, 且对体质量无明显影响和抑制, 不仅弥补了这一空缺, 而且还为黄芪多糖应用于临床维持卵巢癌细胞休眠和作为卵巢癌术后化疗的辅助性治疗提供了实验依据。

目前,活体成像技术主要用于单细胞水平动态观察药代动力学变化<sup>[14,16]</sup>、适时检测肿瘤生长和细胞衰老情况<sup>[17]</sup>、肿瘤细胞转移情况的监测<sup>[18]</sup>、挖掘病毒特异性靶向肿瘤细胞的基因治疗潜能等领域<sup>[19]</sup>,而利用活体成像技术观测药物对肿瘤休眠细胞的维持作用的研究还是空白,本研究利用活体成像技术建立的休眠动物模型能动态、连续、直观、实时的观测不同干预条件下休眠细胞的变化,填补了上述空白的同时,也为进一步研究黄芪多糖促进和维持肿瘤细胞休眠作用的机制提供了实验工具。

#### [参考文献]

- [1] Levanon K, Crum C, Drapkin R. New insights into the pathogenesis of serous ovarian cancer and its clinical impact[J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(32): 5284- 5293.
- [2] Thigpen JT, Aghajanian CA, Alberts DS, et al. Role of pegylated liposomal doxorubicin in ovarian cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2005, 96(1): 10- 18.
- [3] Goss PE, Chambers AF. Does tumour dormancy offer a therapeutic target[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(12): 871- 877.
- [4] White AC, Khuu JK, Dang CY, et al. Stem cell quiescence acts as a tumour suppressor in squamous tumours[J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(1): 99- 107.
- [5] 黄旭晖, 王昌俊, 张晓文, 等. 小鼠肝癌休眠模型的建立[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2013, 20(19): 1484- 1486.
- [6] 乔京京, 辛彦. 节律化疗诱导肿瘤休眠的研究进展[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2013, 18(8): 750- 754.
- [7] 王爱云, 樊贤超, 陆茵, 等. 以中药诱导肿瘤休眠作为肿瘤防治策略的探讨[J]. *中草药*, 2011, 42(3): 598- 601.
- [8] 苏广彦, 刘玉琴, 任乐荣, 等. 乳腺癌休眠动物模型的建立[J]. *中华病理学杂志*, 2007, 36(11): 760- 763.
- [9] 邓樱, 陈红风. 黄芪注射液及其有效成分对乳腺癌细胞增殖和 Akt 磷酸化的影响[J]. *中西医结合学报*, 2009, 7(12): 1174- 1180.
- [10] 许大辉, 崔乃强. 肿瘤的生物治疗进展[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2013, 19(4): 477- 479.
- [11] Choi EM, Kim AJ, Kim YO, et al. Immunomodulating activity of arabinogalactan and fucoidan in vitro [J]. *J Med Food*, 2005, 8(4): 446- 453.
- [12] 丁繁, 黄小虎. 中药黄芪抗肿瘤研究进展[J]. *肿瘤学杂志*, 2013, 19(1): 64- 68.
- [13] 骆殊, 邵佳. 黄芪多糖对肿瘤免疫调节作用的研究进展[J]. *河南中医学院学报*, 2009, 24(4): 112- 114.
- [14] 杨丽华, 沈星凯, 符丹, 等. 小动物活体成像技术在肿瘤研究中的应用[J]. *宁波大学学报: 理工版*, 2013, 26(4): 115- 118.
- [15] Dufort S, Sancey L, Wenk C, et al. Optical small animal imaging in the drug discovery process [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1798(12): 2266- 2273.
- [16] Thurber GM, Yang KS, Reiner T, et al. Single- cell and subcellular pharmacokinetic imaging allows insight into drug action in vivo [J]. *Nat Commun*, 2013(4): 1504- 1506.
- [17] Burd CE, Sorrentino JA, Clark KS, et al. Monitoring tumorigenesis and senescence in vivo with a p16(INK4a) - luciferase model[J]. *Cell*, 2013, 152(1/2): 340- 351.
- [18] Huang R, Vider J, Kovar JL, et al. Integrin  $\alpha$  v $\beta$  3- targeted IRDye 800CW near- infrared imaging of glioblastoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(20): 5731- 5740.
- [19] Tseng JC, Levin B, Hurtado A, et al. Systemic tumor targeting and killing by Sindbis viral vectors [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(1): 70- 77.

(责任编辑:冯天保,郑锋玲)