

## · 论 著 ·

## 消癌平注射液联合紫杉醇对人卵巢癌 SK-OV-3 细胞增殖及裸鼠异位移植瘤生长的作用

杨 姣, 陈君君, 张湘奇, 张婧娴, 韩永龙(上海健康医学院附属第六人民医院东院, 上海 201306)

**[摘要]** **目的** 研究消癌平(XAP)注射液和紫杉醇(PTX)联合应用对人卵巢癌 SK-OV-3 细胞增殖及裸鼠异位移植瘤的抑制作用。**方法** 将生长至对数期的人卵巢癌 SK-OV-3 细胞分为 6 组:对照组、紫杉醇组(10 nmol/L)、消癌平注射液低、高剂量组(20、80  $\mu$ l/ml)、消癌平注射液低、高剂量联合组(PTX 10 nmol/L+XAP 20  $\mu$ l/ml, PTX 10 nmol/L+XAP 80  $\mu$ l/ml), 各组分别加入药物干预 24 h 或 48 h 后, MTT 法测定并计算细胞存活率。将 36 只雌性荷人卵巢癌细胞 SK-OV-3 的异位移植瘤裸鼠随机分为 6 组, 包括对照组(G1:生理盐水)、紫杉醇组(G2:PTX 10 mg/kg)、消癌平注射液低、高剂量组(G3:XAP 20 ml/kg, G4:XAP 50 ml/kg)、低剂量联合组(G5:PTX 10 mg/kg+XAP 20 ml/kg)以及高剂量联合组(G6:PTX 10 mg/kg+XAP 50 ml/kg), 每组 6 只。各治疗组予相应药物治疗 18 d, 观察记录小鼠一般情况、体重、肿瘤体积, 并计算抑瘤率。**结果** SK-OV-3 细胞体外实验结果显示, 与对照组相比, 消癌平注射液、低剂量联合组和高剂量联合组的 SK-OV-3 细胞存活率均显著降低( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 且联合用药组与紫杉醇组相比, 也有显著差异( $P<0.05$ ), 并呈现剂量和时间依赖性。裸鼠异位移植瘤实验结果显示, 高剂量联合组的抑瘤率明显高于对照组和紫杉醇组, 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** 消癌平注射液和紫杉醇联用对人卵巢癌细胞 SK-OV-3 裸鼠异位移植瘤的抑制具有协同作用( $P<0.05$ )。

**[关键词]** 消癌平注射液;紫杉醇;人卵巢癌 SK-OV-3 细胞;裸鼠

**[中图分类号]** R287 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2017)06-0516-05

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.06.009

## Antitumor activity of Xiaoaiping injection combined with paclitaxel on ovarian cancer SK-OV-3 cells and nude mouse with ovarian cancer SK-OV-3 transplantation tumor

YANG Jiao, CHEN Junjun, ZHANG Xiangqi, ZHANG Jingxian, HAN Yonglong (Sixth People's Hospital East Branch Affiliated to Shanghai College of Medicine & Health Sciences, 201306 Shanghai, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the inhibitory effect of Xiaoaiping injection (XAP) combined with paclitaxel (PTX) on human ovarian cancer SK-OV-3 cells. **Methods** *In vitro* anti-proliferation activity study of XAP combined with PTX on human ovarian cancer SK-OV-3 cells was performed using optical microscope and MTT assay. Human ovarian cancer SK-OV-3 cells were treated with PTX, XAP, PTX combined XAP or vehicle control. Each group of cells was treated with drugs for 24 h or 48 h. SK-OV-3 cell morphology was observed with optical microscope. MTT assay was used to detect the A value and cell viability was calculated. *In vivo* effect of XAP combined with PTX on the growth of SK-OV-3 cells was determined in nude mice. In our study, thirty-six mice were randomly divided into six groups: G1 (NS), G2 (PTX, 10 mg/kg), G3 (XAP, 20 ml/kg), G4 (XAP, 50 ml/kg), G5 (PTX 10 mg/kg+XAP 20 ml/kg) and G6 (PTX 10 mg/kg+XAP 50 ml/kg). Animals were treated for 18 days. Body weight, tumor volume and tumor inhibition rate were recorded and calculated. The results were analyzed by the SPSS 19.0 software. **Results** *In vitro* study showed that SK-OV-3 cell viability decreased significantly in PTX combined XAP group compared to PTX group or XAP group, in a time and dose-dependent manner. *In vivo* study showed that the combination of PTX and XAP resulted in decreased tumor weight significantly compared to the control or the PTX alone. **Conclusion** The combination of XAP and paclitaxel exhibited a synergistic effect both *in vitro* and *in vivo* in nude mouse tumor xenograft model.

**[基金项目]** 上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划项目(ZY3-RCPY-3-1036);上海健康医学院种子基金项目(HMSF-17-22-020, HMSF-17-22-018)

**[作者简介]** 杨 姣, 硕士, 副主任药师, 研究方向: 肿瘤药理学, Tel: (021)38297594, Email: 744094851@qq.com

**[通讯作者]** 韩永龙, 博士, 主任药师, 硕士生导师, 研究方向: 临床药理学, Tel: (021)38297594, Email: yonglongh@163.com

[Key words] Xiaoaiping injection; paclitaxel; human ovarian cancer SK-OV-3 cell; nude mouse

卵巢癌(ovarian cancer)在女性生殖器恶性肿瘤中发病率位居第二,其病死率在妇科肿瘤中居于首位,通过手术和术后一线化疗药物(如紫杉醇、铂类等)进行综合治疗的患者5年生存率不足30%,且此类药物治疗往往存在严重的毒副作用和患者对药物耐受性差等缺陷。因此,开发新的高效、低毒的药物或新的治疗方法以增强对卵巢癌的疗效、降低毒副作用具有重要的临床意义。荷卵巢癌裸鼠移植瘤模型采用源性卵巢癌组织移植于裸鼠皮下,所形成的实体瘤与人体组织学形态极其相似,可以很好地模拟患者肿瘤的发生与发展过程,相对于体外细胞培养,本方法更接近机体环境,已经成为研究卵巢癌及药物干预机制的重要方法<sup>[1]</sup>。紫杉醇(paclitaxel, PTX)是一种具有抗微管解聚作用的细胞毒类天然抗肿瘤药物,是卵巢癌的一线治疗药物<sup>[2]</sup>。消癌平(XAP)注射液是一种由通关藤制成的中药注射剂,其功效为清热解毒,化痰软坚,用于治疗食道癌、胃癌、肺癌、肝癌、卵巢癌等,并可配合放疗、化疗的辅助治疗。目前,在临床上消癌平注射液用于治疗卵巢癌已有报道<sup>[3,4]</sup>,但关于消癌平注射液和紫杉醇联用治疗卵巢癌的研究还未见报道。本研究采用消癌平和紫杉醇联合干预人卵巢癌SK-OV-3细胞,并建立荷人卵巢癌SK-OV-3细胞裸鼠异种移植瘤模型,比较联合用药对人卵巢癌SK-OV-3细胞存活率及荷卵巢癌裸小鼠异位移植瘤生长的抑制作用。

## 1 材料与方 法

**1.1 药品与试剂** 消癌平注射液(南京圣和药业,批号:Z20025868)、紫杉醇注射剂(海口市制药厂有限公司,批号:150322)、生理盐水(安徽双鹤药业有限公司)、McCoy's 5A培养基(GIBCO)、胎牛血清(FBS, GIBCO)、75%乙醇(Sinopharma公司)、二甲基亚砜(DMSO, Sigma公司)、台盼蓝(Sigma公司)、胰酶-EDTA (Invitrogen公司)、四甲基偶氮唑盐试剂盒(MTT, Sigma公司)。

**1.2 实验动物和细胞** 人卵巢癌细胞SK-OV-3购自中科院上海细胞库。健康清洁级雌性BALB/c裸小鼠(体重18~22g)购自上海灵畅生物科技有限公司,许可证号:SCXK(沪)2013-0018;动物实验在澎立生物动物房,许可证号:SYXK(沪)2014-0012。实验动物环境与设施符合《中华人民共和国实验动物规范》(GB14925-95)。实验动物常规饲养,自由摄食、饮水。温度保持在20~26℃之间,相对湿度

为40%~70%。照明条件为每天12h(8:00—20:00)日光灯照射和12h黑暗。

**1.3 SK-OV-3细胞培养与分组** 人卵巢癌细胞SK-OV-3,以McCoy's 5A培养基添加10% FBS和100 U/ml青霉素、100 μg/ml链霉素培养于5% CO<sub>2</sub>的37℃培养箱。待细胞形成致密单层时,用0.25%胰酶消化,调整细胞密度至5×10<sup>4</sup>/ml接种于96孔板中,培养24h待细胞生长至对数期,分为6组:对照组、紫杉醇组(10 nmol/L)、消癌平低浓度组(20 μl/ml)、消癌平高浓度组(80 μl/ml)、低浓度联合组(PTX 10 nmol/L+XAP 20 μl/ml)和高浓度联合组(PTX 10 nmol/L+XAP 80 μl/ml),各组分别加入相应药物干预24h或48h。

**1.4 MTT法测定细胞增殖抑制率** 各组药物干预24h或48h后,弃掉原培养基,每孔加入100 μl含有MTT终浓度为5 mg/ml的新鲜McCoy's 5A培养基,于5% CO<sub>2</sub>的37℃培养箱中继续培养4h后,弃去上清液,每孔加入150 μl DMSO,震荡10 min以溶解沉淀,采用酶标仪于570 nm/L波长处,以空白孔调零,测定各孔的吸光度(A)值,根据A值计算细胞的存活率:细胞存活率(%)=[(给药组A值-空白组A值)/(对照组A值-空白组A值)]×100%。

**1.5 动物建模与分组** BALB/c裸鼠用3%~4%异氟烷麻醉,SK-OV-3细胞连续培养十代,细胞与基底膜基质(matrigel)以1:1体积比混匀后放在冰盒内低温保存使用,每只裸鼠接种约1×10<sup>7</sup> SK-OV-3细胞于右前腋皮下,接种体积为200 μl。当平均肿瘤体积达到约144 mm<sup>3</sup>时(接种后7d),将36只造模成功、肿瘤大小合适的小鼠随机分为6组:对照组G1(生理盐水)、紫杉醇组G2(PTX, 10 mg/kg)、消癌平低剂量组G3(XAP, 20 ml/kg)、消癌平高剂量组G4(XAP, 50 ml/kg)、低剂量联合组G5(PTX 10 mg/kg+XAP 20 ml/kg)以及高剂量联合组G6(PTX 10 mg/kg+XAP 50 ml/kg),每组6只。紫杉醇为尾静脉注射给药,每3d给药一次。消癌平为腹腔注射给药,每天给药一次。对照组每天静脉注射对应体积的生理盐水(0.1 ml/20g)。给药持续18d,每天观察并记录裸鼠的状态。

**1.6 相对肿瘤体积、瘤重和抑瘤率** 每周测量并记录裸鼠体重和肿瘤体积2次。实验结束后,对动物进行安乐死处理。所有裸鼠用CO<sub>2</sub>窒息,然后脱颈

椎处死。采集肿瘤组织、称重并拍照。

肿瘤体积  $V = (\text{长} \times \text{宽}^2) / 2$

肿瘤相对体积  $RTV = V_t / V_0$ ,  $V_t$ : 测量时的肿瘤体积,  $V_0$ : 给药初期肿瘤的体积

抑瘤率  $(TGI) = (1 - \text{治疗组平均瘤重} / \text{对照组平均瘤重}) \times 100\%$

**1.7 统计方法** 统计数据以  $(\bar{x} \pm s)$  表示。组间的两两比较采用 Dunnett's multi-comparison 方法, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 SK-OV-3 细胞存活率的变化** 采用 MTT 法分别检测各组药物作用 24 h 和 48 h 对 SK-OV-3 细胞存活率的影响, 结果显示: 药物作用 24 h 时, 与对照组相比, 消癌平高剂量组和高剂量联合组 SK-OV-3 细胞存活率均显著降低 ( $P < 0.05$ ), 细胞的存活率分别为 78.1% 和 45.4%; 其他各药物干预组与对照组相比, 细胞存活率均有所降低, 但差异无统计学意义。药物作用 48 h 时, 与对照组相比, 消癌平低剂量组、消癌平高剂量组、低剂量联合组和高剂量联合组的 SK-OV-3 细胞存活率均显著降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 细胞的存活率分别为 63.4%、66.6%、48.1% 和 38.1%, 且消癌平注射液低、高剂量联合组 (PTX 10 nmol/L + XAP 20  $\mu$ l/ml, PTX 10 nmol/L + XAP 80  $\mu$ l/ml) 的 SK-OV-3 细胞存活率与对照组相比, 差异更为显著 ( $P < 0.01$ ), 而与紫杉醇组相比, 消癌平注射液低、高剂量联合组的细胞存活率均显著降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 1。

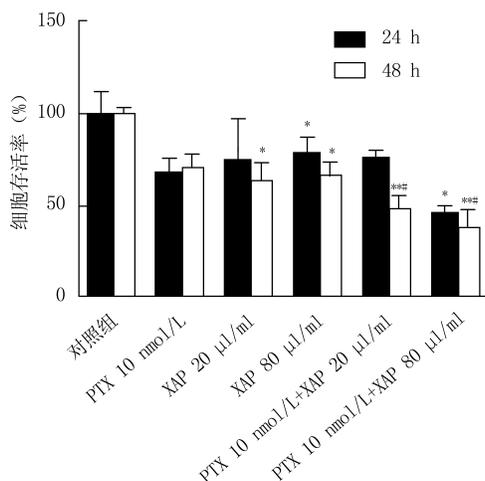


图 1 消癌平注射液和紫杉醇单药或联用对 SK-OV-3 细胞存活率的影响

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , 与对照组比较; #  $P < 0.05$ , 与紫杉醇 (PTX) 组比较

**2.2 裸鼠体重变化及状态** 自开始给药 1 周内, 所有组别的动物体重呈现下降趋势, 消癌平低剂量组 G3、消癌平高剂量组 G4、低剂量联合组 G5 以及高剂量联合组 G6 分别有部分动物体重下降接近 (或超过) 15%。自开始给药第 7 天起, 各组别动物体重均维持相对稳定或略有上升; 给药第 18 天, 各组动物体重下降均未达到 15%。各组裸鼠状态接近, 处死前均未出现自然死亡。

**2.3 相对肿瘤体积** 在给药第 4 天, 与对照组相比, 紫杉醇组、低剂量联合组和高剂量联合组的相对肿瘤体积均减小, 且差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 在给药第 7 天, 高剂量联合组的相对肿瘤体积与对照组比较有明显减小 ( $P < 0.05$ ), 且与紫杉醇组比较, 高剂量联合组的相对肿瘤体积减小, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。在给药第 12、14、18 天, 各组间的相对肿瘤体积差异无统计学意义。

**2.4 肿瘤重量和抑瘤率** 在给药第 18 天处死裸鼠, 剥离裸鼠腋下肿瘤, 并称重。G1~G6 的瘤重分别为  $(2.42 \pm 0.12)$ 、 $(1.89 \pm 0.20)$ 、 $(2.55 \pm 0.28)$ 、 $(2.63 \pm 0.32)$ 、 $(1.73 \pm 0.24)$  和  $(1.38 \pm 0.28)$  g。G2、G3、G4、G5、G6 的抑瘤率分别为 21.9%、-5.37%、-8.68%、28.51%、42.98%。经统计学分析, 与对照组及紫杉醇组比较, 高剂量联合组的瘤重均明显减小 ( $P < 0.05$ ), 见图 2。

**2.5 荷瘤小鼠的肿瘤体积比较** 高剂量联合组的肿瘤体积明显小于对照组和其他用药组 (图 3)。

## 3 讨论

体外细胞实验研究发现, 与对照组相比, 联合组的 SK-OV-3 细胞存活率显著降低, 且联合组与紫杉醇组相比, 差异更为显著, 并呈现浓度和时间依赖性。此结果表明, 在联合用药时, 各药物在较低浓度时即可有效抑制 SK-OV-3 细胞的增殖, 并随着时间的延长, 对细胞的抑制更加明显。在整体动物试验中, 消癌平低、高剂量组 (G3、G4) 对肿瘤无抑制作用; 与对照组和紫杉醇组相比, 高剂量联合组的抑瘤率明显升高。以上结果提示: 消癌平注射液与紫杉醇联合应用可起到协同增效作用。

据报道<sup>[5-7]</sup>, 紫杉醇主要通过 CYP2C8 和 CYP3A4/5 介导的连续羟基化反应消除, 其次还可通过 P-gp 参与的肝胆和肠分泌进行消除。Crommentuyn 等<sup>[8]</sup>的研究显示, 包括紫杉醇在内的紫杉烷类物质可通过诱导 CYP3A 和 CYP2C8 的表达来加速自身代谢, 降低疗效。而本课题组前期研究<sup>[9]</sup>发现在体外正常剂量下, 消癌平注射液可抑制人

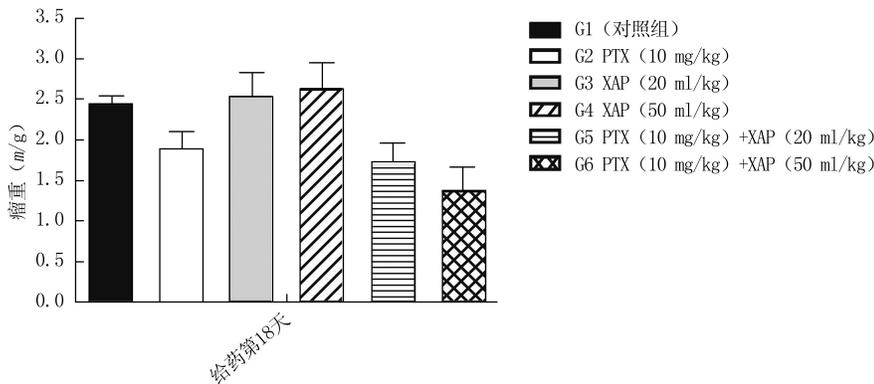


图2 消癌平注射液和紫杉醇单药或联用对瘤重的影响

\*  $P < 0.05$ , 与对照组比较; #  $P < 0.05$ , 与紫杉醇(PTX)组比较

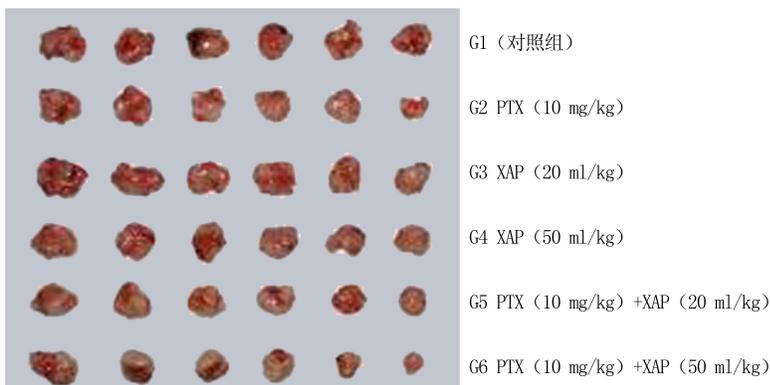


图3 消癌平注射液和紫杉醇单药或联用对肿瘤体积的影响

肝微粒体 CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19 及 CYP3A4/5 的活性。排除种属差异和微粒体来源差异后,我们的研究结果与谢丽艳<sup>[10]</sup>和曾庆花<sup>[11]</sup>的结果基本一致。因此,根据前期试验的研究结果我们推测,消癌平注射液可能通过影响紫杉醇代谢相关的酶类,如 CYP2C8 和 CYP3A4/5 的活性,而与紫杉醇发挥协同增效作用。其作用途径可能与抑制 CYP2C8 和 CYP3A4 的活性,影响紫杉醇的代谢,升高体内的紫杉醇浓度有关,但具体的作用机制还有待进一步的研究。本研究的体内、外试验结果为消癌平注射液与紫杉醇的联合应用提供了药效学依据,对优化紫杉醇的临床联合用药方案,提高临床用药的安全性和有效性具有重要意义,同时也为研究其他中西药物的协同增效作用和机制提供了新的思路。

【参考文献】

[1] Cowden Dahl K, Bobbs A, Cole J, et al. Emerging and evolving ovarian cancer animal models [J]. Cancer Growth Metast, 2015, 8(Suppl 1):29-36.  
[2] Shireen R, Brennan D, Flannelly G, et al. Survival in

women with ovarian cancer before and after the introduction of adjuvant paclitaxel; a 25-year, single institution review [J]. Ir Med J, 2012, 105(2): 47-50.  
[3] 王 淳, 李士怡, 王晓波, 等. 消癌平注射液抑制卵巢癌细胞(Caov-3)侵袭的作用及可能机制[J]. 解剖科学进展, 2011, 17(2): 144-146.  
[4] 李凤霞, 宋爱英, 唐 寅, 等. 消癌平注射液直肠给药联合常规化疗治疗上皮性卵巢癌的临床观察[J]. 中国药房, 2015, 26(20): 2815-2817.  
[5] Harris JW, Rahman A, Kim BR, et al. Metabolism of taxol by human hepatic microsomes and liver slices: participation of cytochrome P450 3A4 and an unknown P450 enzyme [J]. Cancer Res, 1994, 54(15): 4026-4035.  
[6] Backman JT, Filppula AM, Niemi M, et al. Role of Cytochrome P450 2C8 in drug metabolism and interactions [J]. Pharmacol Rev, 2016, 68(1): 168-241.  
[7] Sparreboom A, van Asperen J, Mayer U, et al. Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(5): 2031-2035.  
[8] Crommentuyn KM, Schellens JH, van den Berg JD, et al. In-vitro metabolism of anti-cancer drugs, methods and applications; paclitaxel, docetaxel, tamoxifen and ifosfamide [J]. Cancer Treat Rev, 1998, 24(5): 345-366.

虑多方面因素,课题组更倾向于选择沙棘叶发酵茶作为一种辅助的保健饮品。

【参考文献】

[1] Li G, Du S, Guo K. Evaluation of limiting climatic factors and simulation of a climatically suitable habitat for Chinese Sea buckthorn[J]. PLoS one, 2015, 10(7): e0131659.  
 [2] 陈 维.青藏高原沙棘属植物资源与品质评价[D].成都:四川大学,2007.  
 [3] Wagner H, Ulrich-Merzenich G. Evidence and Rational Based Research on Chinese Drugs[M]. Germany :Springer Vienna, 2013: 181-236.  
 [4] Ganju L, Padwad Y, Singh R, et al. Anti-inflammatory activity of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaves[J]. Int Immunopharmacol, 2005, 5(12): 1675-1684.  
 [5] Yogendra Kumar MS, Tirpude RJ, Maheshwari DT, et al. Antioxidant and antimicrobial properties of phenolic rich fraction of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves *in vitro*[J]. Food Chem, 2013, 141(4): 3443-3450.  
 [6] Ni W, Gao T, Wang H, et al. Anti-fatigue activity of polysaccharides from the fruits of four Tibetan plateau indigenous medicinal plants[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 150(2): 529-535.

[7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(2015年版)一部[S].北京:中国医药科技出版社,2015:184-185.  
 [8] 李春英,王 微,赵春建,等.沙棘不同部位总黄酮含量的测定及比较[J].植物研究,2005, 25(4):453-456.  
 [9] 郁长治,郑永刚,吴旭东,等. RP-HPLC法测定沙棘叶中黄酮苷的含量[J].中国当代医药,2012, 19(11): 51-52.  
 [10] Zu Y, Li C, Fu Y, et al. Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD[J]. J Pharm Biomed Anal, 2006, 41(3): 714-719.  
 [11] 李 坤,王明芳,薛非非,等.荷叶炒炭过程中金丝桃苷,异槲皮苷与槲皮素含量变化规律研究[J].世界科学技术-中医药现代化,2016 (1): 112-117.  
 [12] 马志强,刘彬丽,刘 璐,等.不同厂家舒血宁注射液中芦丁和水仙苷的 HPLC 含量测定[J].北京中医药大学学报,2013, 36(11):768-770.  
 [13] Barreca D, Laganà G, Leuzzi U, et al. Evaluation of the nutraceutical, antioxidant and cytoprotective properties of ripe pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) hulls[J]. Food Chem, 2016, 196: 493-502.

[收稿日期] 2016-05-30 [修回日期] 2017-09-11  
 [本文编辑] 李睿旻

(上接第 498 页)

[27] Laskowitz DT, Mckenna SE, Song P, et al. COG1410, a novel apolipoprotein E-based peptide, improves functional recovery in a murine model of traumatic brain injury [J]. J Neurotr, 2007, 24(7): 1093-1107.  
 [28] 贺 杰,庞金伟,吴 越,等.载脂蛋白 E 短肽 COG1410 对蛛网膜下腔出血后早期脑水肿的影响[J].第三军医大学学报,

2016, 38(4): 350-355.

[29] Wu Y, Pang J, Peng J, et al. An apoE-derived mimic peptide, COG1410, alleviates early brain injury via reducing apoptosis and neuroinflammation in a mouse model of subarachnoid hemorrhage[J]. Neurosci Lett, 2016, 627: 92-99.

[收稿日期] 2017-07-17 [修回日期] 2017-10-17  
 [本文编辑] 陈盛新

(上接第 519 页)

[9] 刘丽雅,韩永龙,余 奇,等.消癌平注射液等 4 种抗肿瘤中药注射剂对人肝微粒体中 CYP450 酶 7 种亚型的体外抑制作用研究[J].中国临床药理学与治疗学,2014, 19(5): 522-527.  
 [10] 谢丽艳.消癌平注射液药物相互作用研究[D].南京:南京中

医药大学,2013.

[11] 曾庆花.消癌平注射液的药代动力学及相互作用研究[D].上海:第二军医大学,2013.

[收稿日期] 2017-01-04 [修回日期] 2017-05-19  
 [本文编辑] 李睿旻