

斗米虫蛋白对 4T1 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用

侯沛颖¹, 孙雯¹, 黄秀凤², 王毅¹, 鲍庆华², 欧阳东兴², 徐华潮^{1*}

(1. 浙江农林大学林业与生物技术学院, 浙江杭州 311300)

(2. 杭州富阳国有农林资产经营有限公司, 浙江杭州 311400)

摘要: 该研究探讨了斗米虫蛋白对乳腺癌(4T1)荷瘤小鼠的体内抗肿瘤作用。通过构建 BALB/c-4T1 荷瘤小鼠模型, 观测实验期内各组荷瘤小鼠体质量及肿瘤生长的变化, 利用活体生物发光成像仪观察各组小鼠体内 4T1 肿瘤细胞生长情况, 给药结束后处死小鼠, 计算抑瘤率和各主要脏器指数。结果显示: 与模型对照组相比, 斗米虫蛋白各剂量组荷瘤小鼠体重无显著变化, 主要脏器质量和脏器指数也无统计学差异性, 但肿瘤质量显著减小 ($p < 0.05$), 斗米虫蛋白低、中、高剂量组抑瘤率分别为 23.08%、36.06%、21.63%。经活体生物发光成像仪检测, 斗米虫蛋白各剂量组 4T1 肿瘤细胞的荧光信号相对模型对照组减弱, 与肿瘤生长情况相一致。实验表明斗米虫蛋白具备体内抗肿瘤活性且对 4T1 荷瘤小鼠机体及各主要脏器无明显毒副作用。

关键字: 斗米虫蛋白; 4T1 荷瘤小鼠; 体内抗肿瘤

文章编号: 1673-9078(2021)12-33-39

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.12.0157

In-vivo Anti-tumor Effects of the Proteins of *Apriona swainsoni* Larvae on 4T1 Tumor-bearing Mice

HOU Peiying¹, SUN Xu¹, HUANG Xiufeng², WANG Yi¹, BAO Qinghua², OUYANG Dongxing², XU Huachao^{1*}

(1. School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A & F University, Hangzhou 311300, China)

(2. Hangzhou Fuyang State-owned Agriculture and Forestry Assets Management Co. Ltd., Hangzhou 311400, China)

Abstract: 4T1 tumor-bearing mice models were established to examine the *in-vivo* anti-tumor effects of proteins extracted from *Apriona swainsoni* larvae. Changes in the body weight and tumor growth of the mice treated with different protein concentrations were observed during the experiments. The growth of the 4T1 tumor cells was detected by bioluminescence imaging. All mice were sacrificed after treatment administration, and the tumor inhibition rate and indexes of main organs were subsequently calculated. Compared with the tumor model control group, the tumor-bearing mice treated with different concentrations of proteins of *Apriona swainsoni* larvae showed no significant changes in their body weights or the weights and indexes of main organs, whereas the tumor weights significantly reduce ($p < 0.05$). The tumor inhibition rates in the groups treated with the *Apriona swainsoni* larval protein at low, medium, and high doses were 23.08%, 36.06%, and 21.63%, respectively. The fluorescence signals of the 4T1 tumor cells in these three treatment groups were attenuated in comparison with those of the control group. The result was consistent with the tumor growth observations. It was preliminarily concluded that the proteins of *Apriona swainsoni* larvae have certain *in-vivo* anti-tumor effects, and they have no obvious toxic and side effects on the body and the main organs of the 4T1 tumor-bearing mice.

Key words: proteins of *Apriona swainsoni* larvae; 4T1 tumor-bearing mice; *in-vivo* tumor inhibition

引文格式:

侯沛颖, 孙雯, 黄秀凤, 等. 斗米虫蛋白对 4T1 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用[J]. 现代食品科技, 2021, 37(12): 33-39

HOU Peiying, SUN Xu, HUANG Xiufeng, et al. *In-vivo* anti-tumor effects of the proteins of *Apriona swainsoni* Larvae on 4T1 tumor-bearing mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(12): 33-39

收稿日期: 2021-02-09

基金项目: 浙江省省院合作林业科技项目 (2019SY02; 2018SY01)

作者简介: 侯沛颖 (1996-), 女, 硕士研究生在读, 研究方向: 资源昆虫学,

E-mail: 2372896007@qq.com

通讯作者: 徐华潮 (1971-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 资源昆虫学,

E-mail: xhcinsect@zafu.edu.cn

斗米虫, 异名云实蛀虫, 主要是指寄生于豆科植物云实 (*Caesalpinia decapetala* (Roth) Alston) 树茎中的锈色粒肩天牛 (*Apriona swainsoni* Hope) 和桑天牛 (*Apriona germari*) 的天牛全虫幼虫^[1], 古人常用一斗米来换取一条虫, 故称此虫为斗米虫。早在《中华本草》中就记载了斗米虫有治疗劳伤、透疹和增强筋骨

的药用价值,《本草纲目》一书中记载食用此虫可治疗小儿疳积、麻毒内陷、筋骨疼痛、肝硬化等疾病。江西上饶及浙江某些地区不少癌症病人长期食用斗米虫,病情都有所好转^[2]。

当前治疗肿瘤的主要手段是化疗,但经过化疗人体会产生许多毒副作用如损伤免疫功能、损害胃肠道、破坏肝功能和骨髓抑制等,这些毒副作用限制了化疗药物疗效的进一步提高和发展。中医认为肿瘤的发病根基是气血两亏,且在临床常常见到痰凝、血瘀等症状,因此中医治疗以活血化瘀、扶正培本、软坚散结、清热解毒、利湿逐水为主^[3]。目前药用昆虫在治疗肿瘤的研究中已发现有增效减毒作用,而且能增加肿瘤对化疗药物的敏感性^[4]。例如,斑蝥素对人低分化胃癌细胞有显著抑制作用,且对比于其他抗肿瘤药物可以显著激活骨髓的活性,以增强生物体自身的免疫力抵御肿瘤^[5];蟑螂提取物具有抗病毒、抗肿瘤、抗菌、增强肌体免疫力等作用^[6-7];蛴螬提取物对人胃癌细胞、人宫颈癌细胞具有诱导凋亡作用^[8-10]等。因此,越来越多的研究者开始关注新型抗肿瘤药物的研发,从天然药用昆虫中发现高效、低毒且特异性调节癌细胞增殖和转移的成分,利用药用昆虫治疗肿瘤或者辅助治疗肿瘤达到增效减毒的目的,则具有极其重要的意义。

鉴于其临床应用前景及广阔的市场前景,课题组前期对斗米虫开展了相关研究。首先关于斗米虫的人工饲养技术探究,基于虫体生长指标、营养成分、保护酶活性三方面筛选出了适合斗米虫生长的饲料配方,为人工大规模养殖斗米虫提供理论依据^[11]。其次关于食用斗米虫微生物安全性评价方面,基于高通量测序技术发现新鲜斗米虫存在多种潜在腐败细菌和食物病原体,但经过热处理等有微生物灭活效果的加工流程可避免或最小化食用昆虫带来的微生物风险,这可对食用昆虫卫生标准提供参考依据^[12]。对于斗米虫蛋白抗肿瘤功效方面的研究,已有体外抗肿瘤效果初探:斗米虫蛋白能抑制小鼠胃癌细胞(MFC)和小鼠乳腺癌细胞(4T1)的增殖,抑制4T1细胞的迁移率,且能诱导4T1及MFC细胞凋亡,斗米虫蛋白能促进小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7)细胞增殖,提高其吞噬活性,说明斗米虫蛋白具有较强的体外抗肿瘤活性及免疫调节活性^[13]。本实验以斗米虫蛋白为对象,通过构建BALB/c-4T1荷瘤小鼠模型来研究斗米虫蛋白的体内抗肿瘤作用,这将为斗米虫的蛋白活性价值研究及其保健食品的开发利用提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验材料与试剂

实验用斗米虫(经浙江农林大学徐华潮教授鉴定为锈色粒肩天牛幼虫)200条,购自江西省上饶市横峰县斗米虫养殖场。

RPMI1640、青-链霉素、胎牛血清(FBS)和胰蛋白酶均购自美国Gibco公司;荧光素钾盐购自上海普飞生物有限公司。

1.1.2 实验动物与供试瘤株

雌性SPF级BALB/c小鼠40只,18~22g,6~8周龄,由中国科学院上海实验动物中心/上海斯莱克实验动物有限公司提供,生产许可证号:SCXK(沪)2017-0005。

本实验BALB/c小鼠在浙江中医药大学动物实验研究中心SPF级小鼠饲养室饲养,使用许可证号:SYXK(浙)2018-0012,饲养条件:恒温(22±2℃),保湿(50%~60%),光照每12h明暗交替,换风次数15~20次/h。每日两次即8:00~9:00和15:00~16:00定时喂养试验小鼠。所有实验步骤均严格按照中国关于实验动物使用和护理的立法进行,经浙江中医药大学动物福利与伦理审查委员会批准,伦理审批号:20200706-08。

小鼠乳腺癌4T1细胞株,购自于中国科学院上海细胞研究所。

1.1.3 仪器设备

台式高速冷冻离心机(H1650R),湖南湘仪实验仪器开发有限公司;台式低速离心机(TD5A),湖南凯达实业发展有限公司;小动物麻醉呼吸机,美国Hallowell公司;IVISLuminaLT型小动物成像系统,美国Caliper公司。

1.2 方 法

1.2.1 斗米虫总蛋白提取

取200条,单头体质量为1.70g左右,虫龄为5龄的新鲜斗米虫,放入-80℃冰箱中冷冻处死,随后置于冷冻干燥机中,脱水干燥5d后取出幼虫。将冻干的虫体研磨成粉状,加入500mL预冷的PBS buffer。冰浴超声提取30min,4℃冰箱提取过夜。4℃,12000r/min离心15min,取上清,舍弃沉淀,冷冻干燥^[13]。

1.2.2 细胞培养和收集

用含10%胎牛血清50IU/mL青霉素50μg/mL链霉素的RPMI1640培养基作为小鼠乳腺癌4T1细胞的培养液,置于5%CO₂、37℃细胞培养箱内培养细胞。待复苏后第3代细胞长至70%~80%融合,用0.25%胰

酶消化 3~5 min, 1000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, PBS 洗涤 3 次, 计数, 细胞浓度调整至 5×10^6 cells/mL。

1.2.3 BALB/c-4T1 荷瘤小鼠模型建立

参考相关文献^[14-16], 取体重为 18~22 g 的 BALB/c 雌性小鼠 40 只, 自由采食和饮水, 预适应一周后开始进行实验。小鼠用异氟烷呼吸麻醉, 仰卧固定, 在 BALB/c 小鼠右侧倒数第 2 对乳腺脂肪垫处, 注入 100 μ L 4T1 细胞悬液, 每只小鼠接种 5×10^5 cells, 制作 BALB/c-4T1 荷瘤小鼠模型, 注射后出现局部包块, 无细胞悬液渗出及出血, 每日观察小鼠和肿瘤生长情况, 接种后一周, 开始第一次给药。

1.2.4 分组及给药

40 只小鼠接种后按体重随机分为 5 组, 斗米虫蛋白低剂量组(50 mg/kg 体重, ig)、斗米虫蛋白中剂量组(100

$$\text{体重变化率}/\% = \frac{\text{给药后体重}-\text{开始给药时体重}}{\text{开始给药时体重}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{肿瘤体积 } V/\text{mm}^3 = \frac{\text{肿瘤最大长径} \times \text{肿瘤横径}^2}{2} \quad (2)$$

$$\text{肿瘤体积抑制率}/\% = \frac{\text{模型对照组瘤积均值}-\text{治疗组瘤积均值}}{\text{模型对照组瘤积均值}} \times 100\% \quad (3)$$

$$\text{抑瘤率}/\% = \frac{\text{模型对照组肿瘤质量均值}-\text{治疗组肿瘤质量均值}}{\text{模型对照组肿瘤质量均值}} \times 100\% \quad (4)$$

1.2.5.2 斗米虫蛋白对 4T1 荷瘤小鼠脏器质量及指数的影响

第 28 d 处死小鼠, 用电子天平给小鼠称重, 眼眶静脉采血, 颈椎脱臼处死小鼠后, 剥离肿瘤组织和各脏器, 用生理盐水洗涤, 然后用滤纸吸干称重。根据以下公式^[3,20], 计算荷瘤小鼠各主要脏器指数:

$$\text{脏器指数}/\% = \frac{\text{脏器质量}(100\text{g})}{\text{小鼠体质量}(\text{g})} \times 100\% \quad (5)$$

1.2.5.3 小动物成像系统检测体内 4T1 肿瘤细胞生长情况

给药第 7、14、21 d 时, 各组小鼠腹腔注射 100 μ L/10 g 的 15 mg/mL 荧光素钾盐酶底物 (剂量为 150 mg/kg), 底物腹腔注射 15 min 后, 用麻醉机进行异氟烷麻醉后, 置于小动物活体成像仪中观测小鼠乳腺癌肿瘤细胞生长情况。

1.2.6 统计学分析

运用 SPSS 21.0 软件对实验数据进行统计分析, 结果均采用以均值 \pm 标准误表示 (mean \pm SEM), 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), $p < 0.05$ 表示差异有统计学意义。统计数据采用 GraphPad prism 6 软件进行绘图。

2 结果与讨论

mg/kg 体重, ig)、斗米虫蛋白高剂量组 (200 mg/kg 体重, ig), 顺铂 (DDP) 阳性药对照组 (30 mg/kg, ip) 和模型对照组 (等体积生理盐水), 每组 8 只。按 0.1 mL/10 g 体重的给药体积配制为相应浓度, 斗米虫蛋白低、中、高试验组和模型对照组每日灌胃给药, 连续 27 d, 顺铂阳性药组每周三次 (隔日) 腹腔注射给药, 周期 27 d。每日观察小鼠饮食、活动及死亡情况。

1.2.5 指标测定

1.2.5.1 斗米虫蛋白对 4T1 荷瘤小鼠体重及肿瘤的影响

从给药后, 开始每周三次 (隔日) 用电子天平给荷瘤小鼠称重和用游标卡尺进行活体肿瘤大小测量 (包括肿瘤最大长径 a 和肿瘤横径 b)。参见相关文献^[17-19], 相关计算公式如下:

2.1 荷瘤小鼠一般情况

整个实验过程中, 各组别 BALB/c-4T1 荷瘤小鼠 (除阳性对照组) 饮水、进食均正常, 而阳性对照组给药一段时间后食欲表现欠佳; 各组别荷瘤小鼠均未见有竖毛、运动失调或活动受限、呼吸困难、烦躁等反应, 所有小鼠均能耐受实验。

2.2 斗米虫蛋白对 4T1 荷瘤小鼠体重的影响

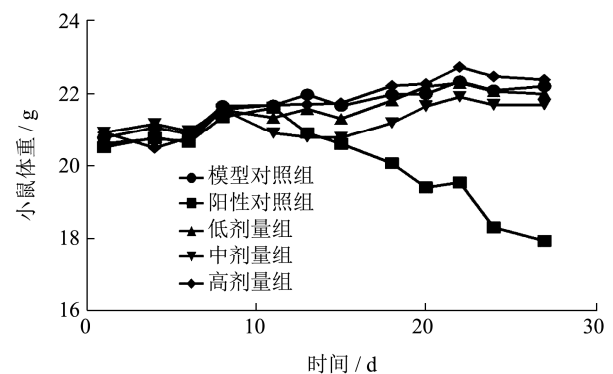


图 1 不同处理方式对 4T1 荷瘤小鼠体重的影响

Fig.1 Effect of different treatment methods on body weight in 4T1 tumor-bearing mice

小鼠的体重变化被认为是评价安全性的指标之一, 体质量呈缓慢增长趋势都是符合荷瘤小鼠的正常生长

情况的。由图 1 可知：模型对照组和斗米虫蛋白各剂量组，小鼠体重均呈现缓慢上升趋势，而阳性对照组在给药一段时间后，体重呈现下降趋势。如表 1 所示：给药前，与模型对照组相比，各组荷瘤小鼠体重均无统计学差异；给药后，与模型对照组相比，斗米虫蛋白各剂量组均无显著差异性，说明斗米虫蛋白对小鼠没有明显的药物毒性，而阳性对照组具有统计学差异 ($p < 0.05$)。荷

瘤小鼠体重增长量最大的是斗米虫蛋白高剂量组 (200 mg/kg)，体重变化率由大到小依次为：斗米虫蛋白高剂量组 (+8.96%) > 模型对照组 (+6.86%) > 低剂量组 (+6.67%) > 中剂量组 (+3.70%) > DDP 组 (-12.62%)。阳性对照组荷瘤小鼠体重呈负增长趋势，可能是因为化疗药物在抑制肿瘤过程中，会致使荷瘤小鼠食欲不振，对机体有较强的毒副作用。

表 1 不同处理方式对 4T1 荷瘤小鼠给药前后体重的影响 (mean ± SEM)

Table 1 Effect of different treatment methods on body weight before and after dosing in 4T1 tumor-bearing mice

分组	给药前体重/g	给药后体重/g	体重增长量/g	体重变化率/%
模型对照组	20.78±0.32	22.20±0.38	1.43±0.33	+6.86
阳性对照组	20.51±0.22	17.93±0.69*	-2.59±0.76*	-12.62
低剂量组	20.61±0.32	21.99±0.27	1.38±0.23	+6.67
中剂量组	20.93±0.17	21.70±0.38	0.78±0.34	+3.70
高剂量组	20.58±0.17	22.39±0.64	1.84±0.73	+8.96

注：* $p < 0.05$ vs. 模型对照组。

综合以上，表明斗米虫蛋白对 4T1 荷瘤小鼠体重无显著影响，小鼠生长环境适宜，与顺铂相比，不会引起小鼠食欲不振，具有对荷瘤小鼠体重无影响的优势。

2.3 斗米虫蛋白对 4T1 荷瘤小鼠肿瘤生长的影响

2.3.1 斗米虫蛋白对 4T1 荷瘤小鼠肿瘤体积的影响

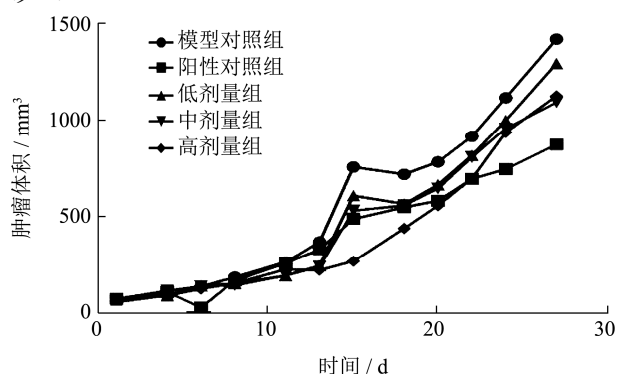


图 2 不同处理方式对 4T1 荷瘤小鼠肿瘤体积的影响

Fig.2 Effect of different treatment methods on tumor volume in 4T1 tumor-bearing mice

由图 2 可知：模型对照组荷瘤小鼠肿瘤生长正常，而阳性对照组和斗米虫各剂量组荷瘤小鼠肿瘤体积增长速度变慢。从图 3 可以看出：模型对照组肿瘤体积增长量最大，阳性对照组肿瘤体积增长量最小，斗米虫蛋白各剂量组则介于中间；给药前，与模型对照组相比，各组别荷瘤小鼠肿瘤体积均无统计学差异；给药后，与模型对照组相比，阳性对照组和斗米虫蛋白

中浓度剂量组 (100 mg/kg) 的肿瘤体积增长量具有统计学差异性 ($p < 0.05$)，肿瘤体积抑制率分别为 38.57% 和 23.08%。

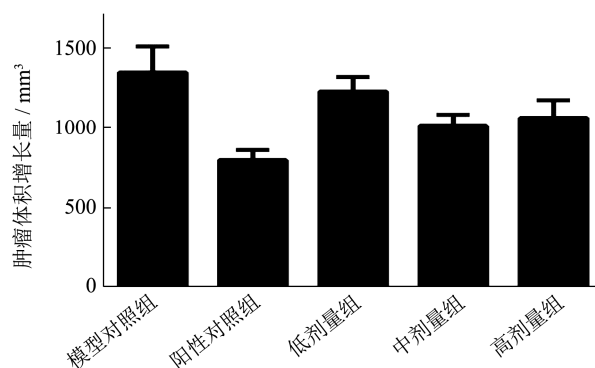


图 3 不同处理方式对 4T1 荷瘤小鼠肿瘤体积增长量的影响

Fig.3 Effect of different treatment methods on tumor volume growth in 4T1 tumor-bearing mice

2.3.2 斗米虫蛋白对 4T1 荷瘤小鼠肿瘤质量的影响

实验结束后，脱颈处死小鼠，摘取肿瘤称重并拍照，肿瘤实物图见图 4。

结合表 2 可发现，阳性对照组肿瘤质量最小，斗米虫蛋白中剂量组次之，且与模型对照组相比，均有显著差异性 ($p < 0.05$)，而中剂量组与阳性对照组相比，肿瘤质量无统计学差异性 ($p > 0.05$)，表明斗米虫蛋白中剂量组 (100 mg/kg) 在体内对 4T1 肿瘤有较强的抑制效果，这与孙雯等^[13]研究结果相互印证。孙雯等研究发现，斗米虫蛋白体外可以抑制 4T1 细胞的迁移，诱导 4T1 细胞的凋亡，能显著抑制 4T1 细胞的增殖作用 ($p < 0.05$)，体外 4T1 细胞增值抑制率最高能达到 53%。本实验肿瘤质量抑制率从高到低依次为：阳性

对照组 (48.08%) > 斗米虫蛋白中剂量组 (36.06%) > 低剂量组 (23.08%) > 高剂量组 (21.63%)。

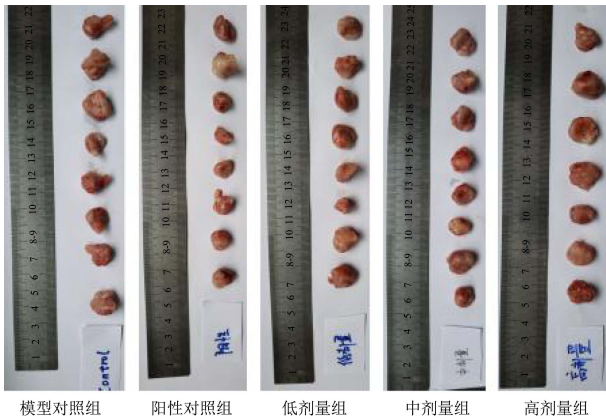


图4 不同处理方式4T1 荷瘤小鼠肿瘤实物图

Fig.4 Tumor images of different treatment methods on 4T1 tumor-bearing mice

表2 不同处理方式对4T1 荷瘤小鼠肿瘤质量的影响 (mean±SEM)

Table 2 Effect of different treatment methods on tumor weight in 4T1 tumor-bearing mice (mean±SEM)

分组	剂量/(mg/kg)	瘤重/g	抑瘤率/%
模型对照组	-	1.04±0.09	-
阳性对照组	-	0.54±0.07*	48.08
低剂量组	50	0.80±0.01*	23.08
中剂量组	100	0.67±0.07*	36.06
高剂量组	200	0.82±0.05	21.63

注: * $p < 0.05$ vs. 模型对照组。

综合以上, 表明斗米虫蛋白在体内对4T1 肿瘤生长

表3 不同处理方式对4T1 荷瘤小鼠主要脏器指数的影响 (mean±SEM)

Table 3 Effects of different treatment methods on the main viscera index of 4T1 tumor-bearing mice (mean±SEM)

分组	心脏指数/(100 g/g)	肝脏指数/(100 g/g)	脾脏指数/(100 g/g)	肺脏指数/(100 g/g)	肾脏指数/(100 g/g)
模型对照组	0.54±0.02	6.63±0.18	5.06±0.15	1.04±0.07	1.43±0.03
阳性对照组	0.59±0.03	5.59±0.22*	1.91±0.18*	0.90±0.04	1.42±0.02
低剂量组	0.58±0.02	6.65±0.11 [△]	4.82±0.23 [△]	0.98±0.04	1.41±0.04
中剂量组	0.56±0.02	6.76±0.13 [△]	4.85±0.11 [△]	1.05±0.12	1.37±0.02
高剂量组	0.58±0.02	6.25±0.11 [△]	4.48±0.15 [△]	1.01±0.14	1.41±0.02

注: * $p < 0.05$ vs. 模型对照组; [△] $p < 0.05$ vs. 阳性对照组。

如表3所示: 就心脏指数、肺脏指数、肾脏指数而言, 各处理组之间均无统计学差异性; 与模型对照组相比, 阳性对照组的肝脏指数和脾脏指数显著降低 (* $p < 0.05$), 而斗米虫蛋白各剂量组均无显著差异性, 说明顺铂对脏器有一定的毒害作用, 而斗米虫蛋白组未表现明显毒副作用。

脾脏属于免疫器官, 其与机体免疫反应的发生息息相关。本实验结果显示, 阳性对照组的脾脏质量和脾脏系数与模型对照组相比均显著减小 ($p < 0.05$),

有一定抑制作用, 且斗米虫蛋白中剂量组 (100 mg/kg) 体内抑制4T1 肿瘤效果最显著, 抑瘤率达到36.06%。

2.4 斗米虫蛋白对4T1 荷瘤小鼠脏器质量及脏器指数的影响

从图5可看出, 阳性对照组荷瘤小鼠的各主要脏器质量最小, 斗米虫蛋白各剂量组与模型对照组的各主要脏器质量相比没有显著差异性, 而与阳性对照组相比具有统计学差异性 ($^{\Delta}p < 0.05$); 与模型对照组相比, 仅有阳性对照组荷瘤小鼠的肝脏、脾脏、肺脏、肾脏质量明显降低, 具有统计学差异性 (* $p < 0.05$), 说明顺铂会对荷瘤小鼠各主要脏器表现出一定的毒副作用, 而斗米虫蛋白则未表现出明显毒副作用。

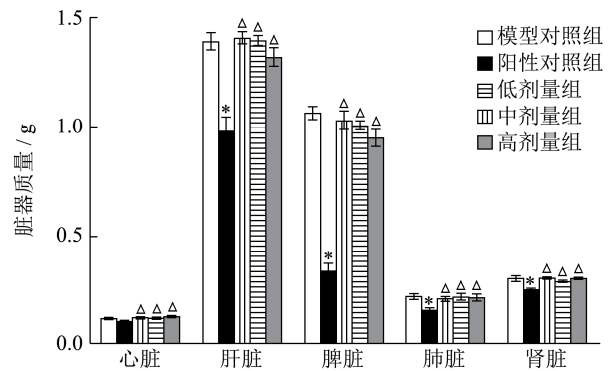


图5 不同处理方式对4T1 荷瘤小鼠主要脏器质量的影响

Fig.5 Effects of different treatment methods on the main viscera weight in 4T1 tumor-bearing mice

注: * $p < 0.05$ vs. 模型对照组; [△] $p < 0.05$ vs. 阳性对照组。

说明顺铂在一定程度上抑制了荷瘤小鼠机体免疫作用。而斗米虫蛋白各剂量组的脾脏质量和脾脏指数与模型对照组相比虽均无统计学差异, 但有减小的趋势, 推测斗米虫蛋白可能通过免疫调节的方式发挥体内抗肿瘤作用。孙雯等^[13]体外试验表明: 斗米虫蛋白能促进巨噬细胞 (RAW264.7) 的细胞增殖作用 ($p < 0.05$), 提高 RAW264.7 吞噬活性、NO 释放量、TNF- α 、1L-1 β 和 IL-6 分泌量及 TNF- α 、IL-1、TLR4、MIR-7、IFN- γ 和 IL-6 细胞因子的 mRNA 水平以及能

显著下调 4T1 细胞中 MMP2、MMP9、STAT3、c-Myc 和 Sdf1mRNA 水平 ($p < 0.05$, $p < 0.01$), 斗米虫蛋白还能明显增加 RAW264.7 细胞 MyD88 和 TRIF 蛋白的表达量, 证实了斗米虫蛋白在体外具有潜在免疫调节作用。而关于斗米虫蛋白体内是否通过免疫调控的途径以参与抗肿瘤的过程, 还需进行下一步的探讨和补充。

综合以上, 表明斗米虫蛋白对荷瘤小鼠各主要脏器无明显毒副作用, 与顺铂相比, 具有对荷瘤小鼠各主要脏器无明显毒害的优势。

2.5 小动物成像系统检测体内 4T1 肿瘤细胞生长情况

小动物成像系统可以检测荷瘤小鼠 4T1 肿瘤细胞荧光信号。由图 6 可以看出: 模型对照组荷瘤裸小鼠随着接种时间的延长, 荧光信号也不断升高, 说明肿瘤生长良好。与模型对照组相比, 斗米虫蛋白各剂量组荧光信号相对减弱, 但不及阳性对照组, 与肿瘤生长情况相符合, 表明斗米虫蛋白在体内对 4T1 肿瘤细胞有一定的抑制作用。

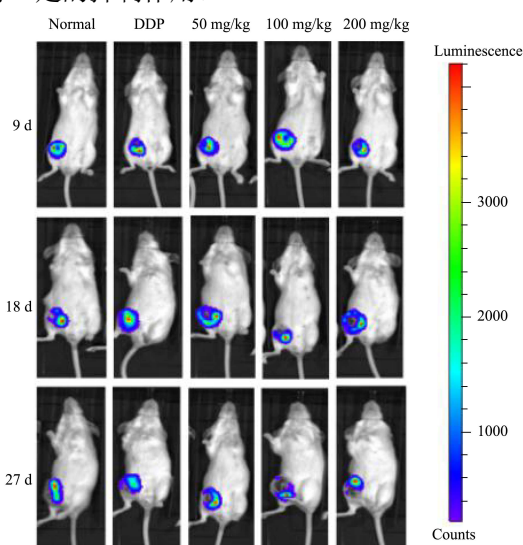


图 6 不同处理方式的荷瘤小鼠 IVIT 成像

Fig.6 IVIT imaging of 4T1 tumor-bearing mice treated with different treatment methods

3 结论

本实验表明: 斗米虫蛋白呈现出一定的体内抑制 4T1 肿瘤细胞作用, 且对 4T1 荷瘤小鼠机体或各主要脏器无明显毒副作用。斗米虫蛋白剂量为 100 mg/kg 时, 对体内肿瘤抑制效果最强, 抑瘤率达到 36.06%。但是针对其抗肿瘤机理, 是否是通过免疫调节能力来抵御肿瘤细胞, 还有待进一步探究。

参考文献

- [1] 叶苓, 林美熙, 黄泰康, 等. 虫类本草[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002
YE Ling, LIN Meixi, HUANG Taikang, et al. *Insect Medica* [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2002
- [2] 孙雯. 斗米虫蛋白体外抗肿瘤活性及其对小鼠巨噬细胞免疫调节作用[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2020
SUN Xu. *In vitro* antitumor activity and immunomodulatory effect on mouse macrophages of the proteins of *Apriona swainsoni* Larvae [D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2020
- [3] 迟淑萍, 白冰珂, 谢进, 等. 环磷酰胺在动物模型体内抗肿瘤影响及抑瘤机制的研究[J]. 中国医药导报, 2012, 9(14): 20-22
CHI Shuping, BAI Bingke, XIE Jing, et al. Study of the effect and mechanism of cyclophosphamide on antitumor in animal model [J]. *China Medical Herald*, 2012, 9(14): 20-22
- [4] Winkler G C, Barle E L, Galati G, et al. Functional differentiation of cytotoxic cancer drugs and targeted cancer therapeutics [J]. *Regulatory Toxicology & Pharmacology*, 2014, 70(1): 46-53
- [5] Shi Q H, Wang Y L, Song H R. Cantharidin and its analogues: anti-cancer and Ser/Thr protein phosphatase inhibitory activities [J]. *J Chin Phar Sci*, 2005, 14(4): 250-252
- [6] 欧红利. 美洲大蠊多肽抗肿瘤及免疫调节作用研究[D]. 大理: 大理大学, 2017
OU Hongli. Study on the anti-tumor effects and immunomodulatory function of *Periplaneta americana* peptide [D]. Dali: Dali University, 2017
- [7] Zhao Y, Yang A, Tu P F, et al. Anti-tumor effects of the American cockroach, *Periplaneta americana* [J]. *Chinese Medicine*, 2017, 12(1): 26
- [8] Hong J H, Kim S H, Lee Y C. The ethanol extract of *Holotrichia diomphalia* larvae, containing fatty acids and aminoacids, exerts anti-asthmatic effects through inhibition of the GATA-3/Th2 signaling pathway in asthmatic mice [J]. *Molecules*, 2019, 24: 852
- [9] Vogellbaum M A, Tong T X, Higashikubo R, et al. Transfection of glioma cells with the bax gene and increased sensitivity to treatment with cytosinamide [J]. *J Neurosurg*, 1998, 8(1): 99-105
- [10] 李香丹, 孙抒, 宋莲莲, 等. 蛭螬粗提物对人宫颈癌 HeLa 细胞诱导凋亡作用及其机制[J]. 肿瘤防治研究, 2008, 7: 491-494
LI Xiangdan, SUN Shu, SONG Lianlian, et al. Inducing apoptosis effects and mechanism on HeLa human cervical

- carcinoma cells by grub extract [J]. *Cancer Research on Prevention and Treatment*, 2008, 7: 491-494
- [11] 赵艺,徐华潮,马艳,等.虫酰肼和灭幼脲对锈色粒肩天牛氧化酶和解毒酶活性的影响[J].*浙江农林大学学报*,2018,35(1):174-177
ZHAO Yi, XU Huachao, MA Yan, et al. Oxidase and detoxifying enzyme activity of *Apriona swainsoni* (Hope) with diflubenzuron and flubenzuron [J]. *Journal of Zhejiang A & F University*, 2018, 35(1): 174-177
- [12] 蔡洪莲,邱凡,黄宽官,等.食用昆虫斗米虫的微生物安全性评价[J].*农业生物技术学报*,2020,28(9):1675-1687
CAI Yanglian, QIU Fan, HUANG Kuanguan, et al. Microbiological safety evaluation of edible bucket worms [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2020, 28(9): 1675-1687
- [13] 孙雯,侯沛颖,王毅,等.斗米虫蛋白体外抗肿瘤活性及其对小鼠巨噬细胞免疫调节作用[J].*中国细胞生物学学报*,2020, 42(2):263-275
SUN Xu, HOU Peiying, WANG Yi, et al. Anti-tumor activity of the protein of *Apriona swainsoni* larvae *in vitro* and its immunoregulatory effect on mouse macrophages [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2020, 42(2): 263-275
- [14] Lim E, Modi K D, Kim J. *In vivo* bioluminescent imaging of mammary tumors using IVIS spectrum [J]. *Vis Exp*, 2009, 29(26): 1210
- [15] 傅惠英,屠珏,凌云,等.活体生物发光示踪术观察中国被毛孢抑制小鼠 4T1-luc 乳腺癌肺转移作用[J].*浙江中医药大学学报*,2013,37(2):121-124
FU Huiying, TU Jue, LING Yun, et al. Effect of *Hirsutella sinensis* mycelium inhibiting lung metastasis by bioluminescent imaging in the 4T1-luc mouse breast cancer model [J]. *Journal of Zhejiang Chinese Medical University*, 2013, 37(2): 121-124
- [16] 王剑超,范丽萍,徐旭栋,等.活体成像技术动态观测华蟾素对裸小鼠 BxPC3-luc2 异体移植胰腺癌的抗肿瘤作用[J].*浙江中医药大学学报*,2015,39(9):695-699
WANG Jianchao, FAN Liping, XU Xudong, et al. Effect of cinobufotalin inhibiting pancreatic cancer by bioluminescent imaging in the BxPC3-luc2 cell xenograft nude mice [J]. *Journal of Zhejiang Chinese Medical University*, 2015, 39(9): 695-699
- [17] 张文超.黄腐酚调节 Th1/Th2 平衡促进小鼠抗肿瘤免疫[D].兰州:兰州大学,2016
ZHANG Wen-chao. Xanthohumol regulates Th1/Th2 balance and promotes anti-tumor immunity in mouse [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2016
- [18] 董春旻.君子扶正汤对 MFC 荷瘤小鼠的抑瘤作用及对巨噬细胞吞噬功能与溶血素水平的影响[D].长春:吉林大学,2013
DONG Chunmin. Junzifuzheng decoction for MFC mice tumor suppression function and effect of phagocytes and hemolysin [D]. Changchun: Jilin University, 2013
- [19] Liu Junjen, Huang Tienshang, Hsu Mingling, et al. Antitumor effects of the partially purified polysaccharides from *Antrodia camphorata* and the mechanism of its action [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2004, 201: 186-193
- [20] 陈义勇,黄友如,刘晶晶,等.桦褐孔菌多糖 IOP3a 体内抗肿瘤活性及其机制[J].*食品与生物技术学报*,2013,32(9):983-988
CHEN Yiyong, HUANG Youru, LIU Jingjing, et al. Studies on anti-tumor activity *in vivo* and its mechanism of a polysaccharide named IOP3a from *Inonotus obliquus* [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2013, 32(9): 983-988

(上接第 71 页)

- [13] 文杰宇.茯砖茶“发花”过程中微生物多样性研究[D].长沙:湖南农业大学,2011
WEN Jieyu. Study on microbial diversity in the process in Fuzhuan brick tea [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2011
- [14] 周红杰,龚加顺.普洱茶与微生物[M].昆明:云南出版集团公司云南科技出版社,2012
ZHOU Hong-jie, GONG Jia-shun. Pu'er Tea and Microbe [M]. Kunming: Yunnan Publishing Group Company, Yunnan Science and Technology Press, 2012
- [15] 傅冬和,赵淑娟,刘仲华.极细枝孢霉生物合成茶黄素粗提物的方法:中国专利,200810031030[P].2008-08-27
FU Donghe, ZHAO Shujuan, LIU Zhonghua. Method for biosynthesis of theaflavin crude extract by *Cladosporium parvum*: Chinese patent, 200810031030 [P]. 2008-08-27