

## 附件2

### 消癍颗粒已取得的基础研究结果（摘要）

（以下基础实验研究为王志宇研究员于2014年在香港大学李嘉诚医学院完成）

#### 一、消癍颗粒阻断乳腺癌前病变作用

为检测消癍颗粒乳腺癌预防作用，我们将MMTV-PyVT<sup>+</sup>乳腺癌自发转基因小鼠分为对照组和消癍颗粒组(n=10)，消癍颗粒以1g/kg/d 的剂量从小鼠出生后第三周起予以灌胃给药，对照组予以施加生理盐水灌胃干预。每周两次检测肿瘤发生情况，记录肿瘤发生时间、数目、大小及体重变化。结果显示消癍颗粒喂药组肿瘤发生时间显著延迟1 周，同时肿瘤发生数目显著低于对照组(Figure 2A & B)。体重观察表明消癍颗粒对小鼠体重变化无显著影响(Figure 2B)，同时对照组肿瘤增长速度显著快于消癍颗粒组(Figure 2D)，每只小鼠荷瘤数目也远高于消癍颗粒组(Figure 2E)，提示消癍颗粒在抑制肿瘤发生和生长的同时，也无显著的毒副作用。乳腺组织胭脂红染色也提示消癍颗粒可显著延迟乳腺癌发生时间及病灶数目(Figure 2F)。

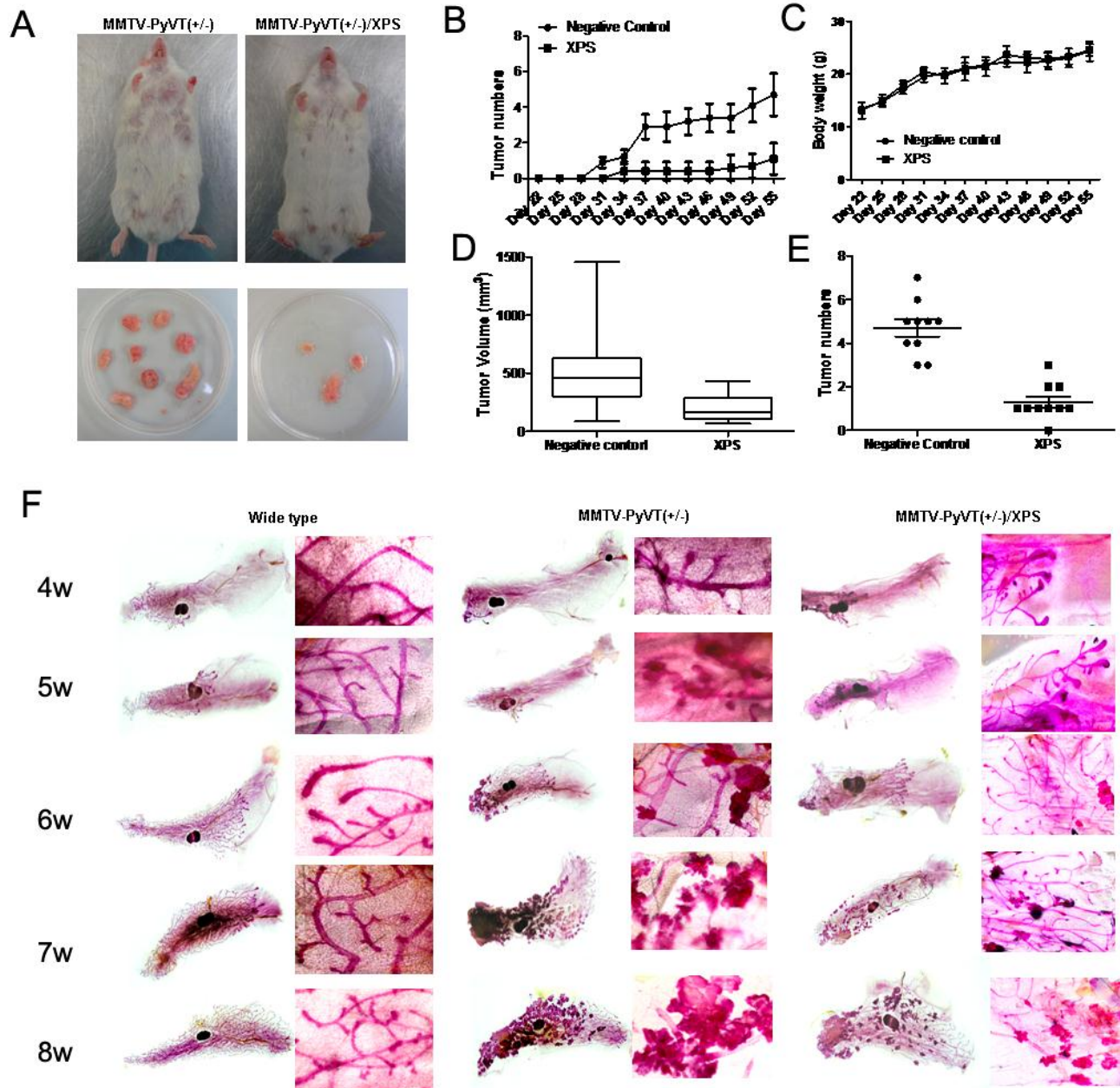
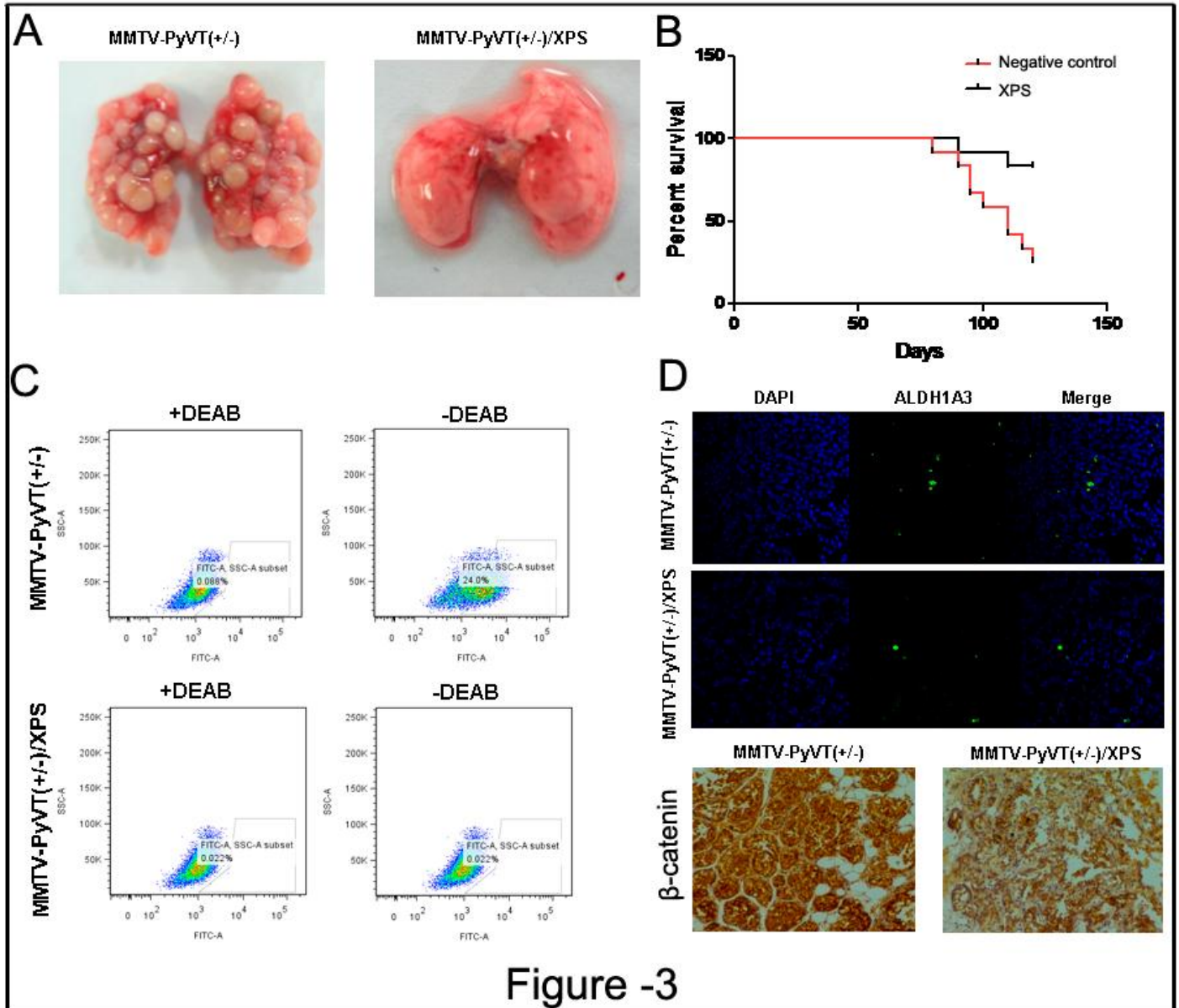


Figure -2

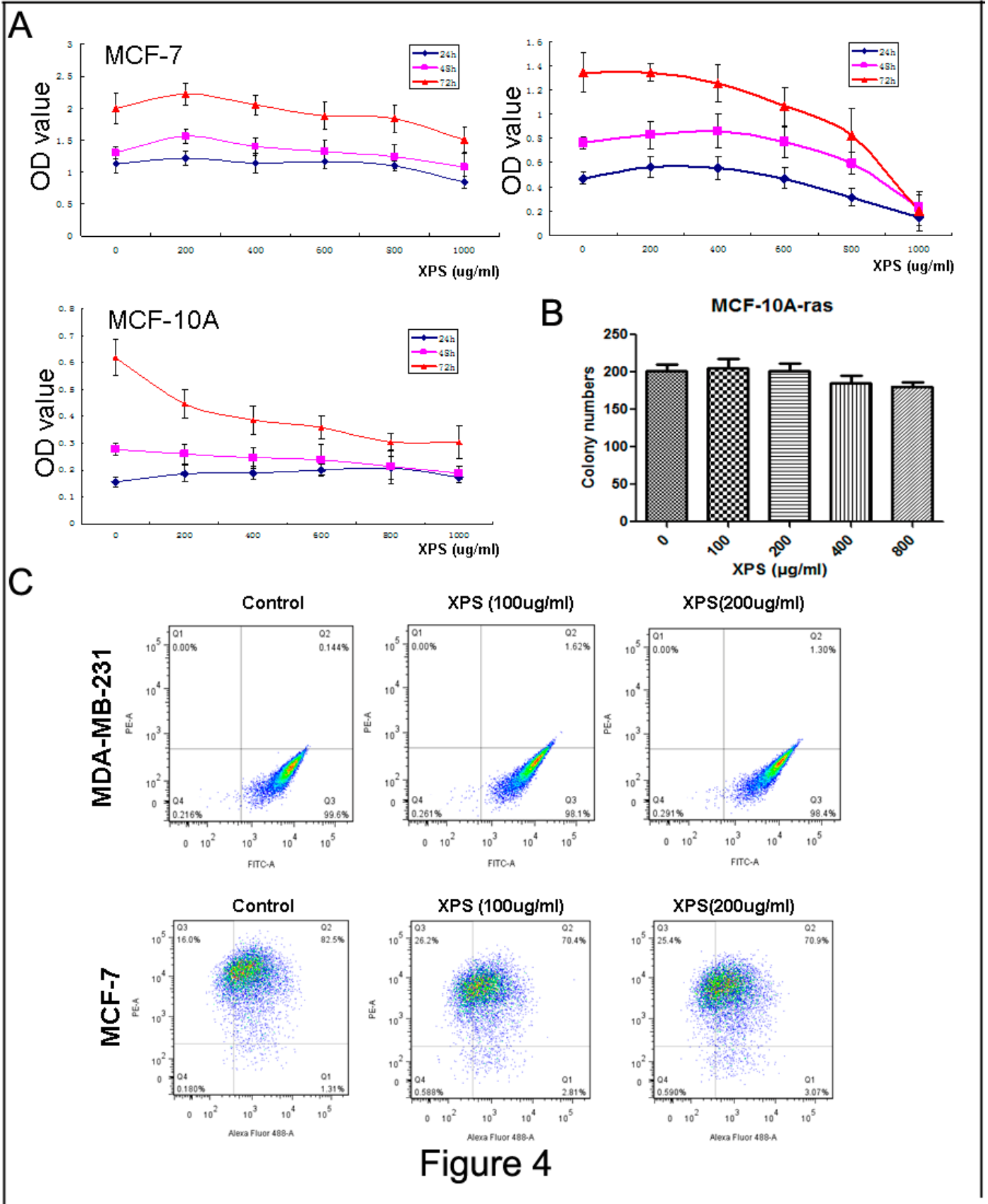
## 二、消癥颗粒预防乳腺癌转移作用

为检测消癥颗粒对MMTV-PyVT<sup>+</sup>乳腺癌自发转基因小鼠远处转移和生存期的影响，消癥颗粒予以持续喂药120天，取肺组织进行转移灶观察。结果显示与对照组转移灶数目和大小相比，消癥颗粒组未出现明显转移灶(Figure 3A)，生存期也显著优于对照组(Figure 3B)。为检测其生存优势是否与乳腺癌干细胞相关，我们采用ALDH法分别检测对照组和消癥颗粒组肿瘤组织中干细胞数量，结果提示消癥颗粒组乳腺癌干细胞含量显著低于对照组 (Figure 3C)。免疫荧光及组化实验结果也表明消癥颗粒组肿瘤组织中干细胞含量和 $\beta$ -catenin表达水平显著低于对照组(Figure 3D)，提示消癥颗粒抑制乳腺癌转移作用可能与调节肿瘤干细胞作用紧密相关。



### 三、消癥颗粒体外抑制乳腺癌细胞生长及恶性转化作用

为检测消癥颗粒对体外乳腺癌细胞生长抑制作用，我们采用MTT 法检测消癥颗粒对人雌激素受体阳性乳腺癌细胞系MCF-7、三阴性乳腺癌细胞系MDA-MB-231 以及人乳腺正常上皮细胞MCF-10A 的生长抑制作用。结果表明消癥颗粒对MCF-7 生长无显著抑制作用，而对三阴性乳腺癌细胞仅在大于800  $\mu\text{g/ml}$  的浓度时有抑制作用，同时对乳腺正常细胞MCF-10A 无显著抑制作用(Figure 4A)，提示消癥颗粒在体外对乳腺癌细胞生长抑制作用微弱，同时无显著细胞毒性作用。细胞恶性转化实验亦证实消癥颗粒对原癌基因Ras 转化的MCF-10A 细胞系克隆生长无显著抑制作用，提示消癥颗粒并不能直接抑制细胞恶性转化(Figure 4B)。同时乳腺癌干细胞群落分析实验也证明消癥颗粒在体外对乳腺癌干细胞的自我更新无显著抑制作用(Figure 4C)，提示消癥颗粒的乳腺癌体内预防作用的分子机制可能与肿瘤微环境调控相关。



#### 四、消癥颗粒调节肿瘤相关巨噬细胞作用

为证实消癥颗粒对乳腺癌生长微环境的作用和机制，我们首先采用流式分选技术从小鼠乳腺实体肿瘤中以CD11b 和CD206 为标记分选出肿瘤相关巨噬细胞TAMs，于体外传代培养(Figure 5A)。其次采用细胞因子阵列法分别研究消癥颗粒施加后对小鼠体内血浆中细胞因子和体外TAMs 培养上清中细胞因子的影响，综合体内外研究结果，消癥颗粒对4 种细胞因子（G-CSF、CCL2、CXCL-2、CXCL-1）的抑制作用在体内外具有一致性(Figure 5B)。因为这4 种细胞因子均与TAMs 紧密相关，我们采用免疫荧光法检测消癥颗粒对TAMs 的影响，结果提示CD11b/CD206 标记的TAMs 在消癥颗粒治疗组显著减少(Figure 5C)，同时qPCR 结果也证实在消癥颗粒治疗组肿瘤组织中CXCL-1 抑制作用最显著(\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , Figure 5C)，提示消癥颗粒可能通过CXCL-1 的调控降低乳腺癌干细胞数量，从而实现乳腺癌的预防作用。



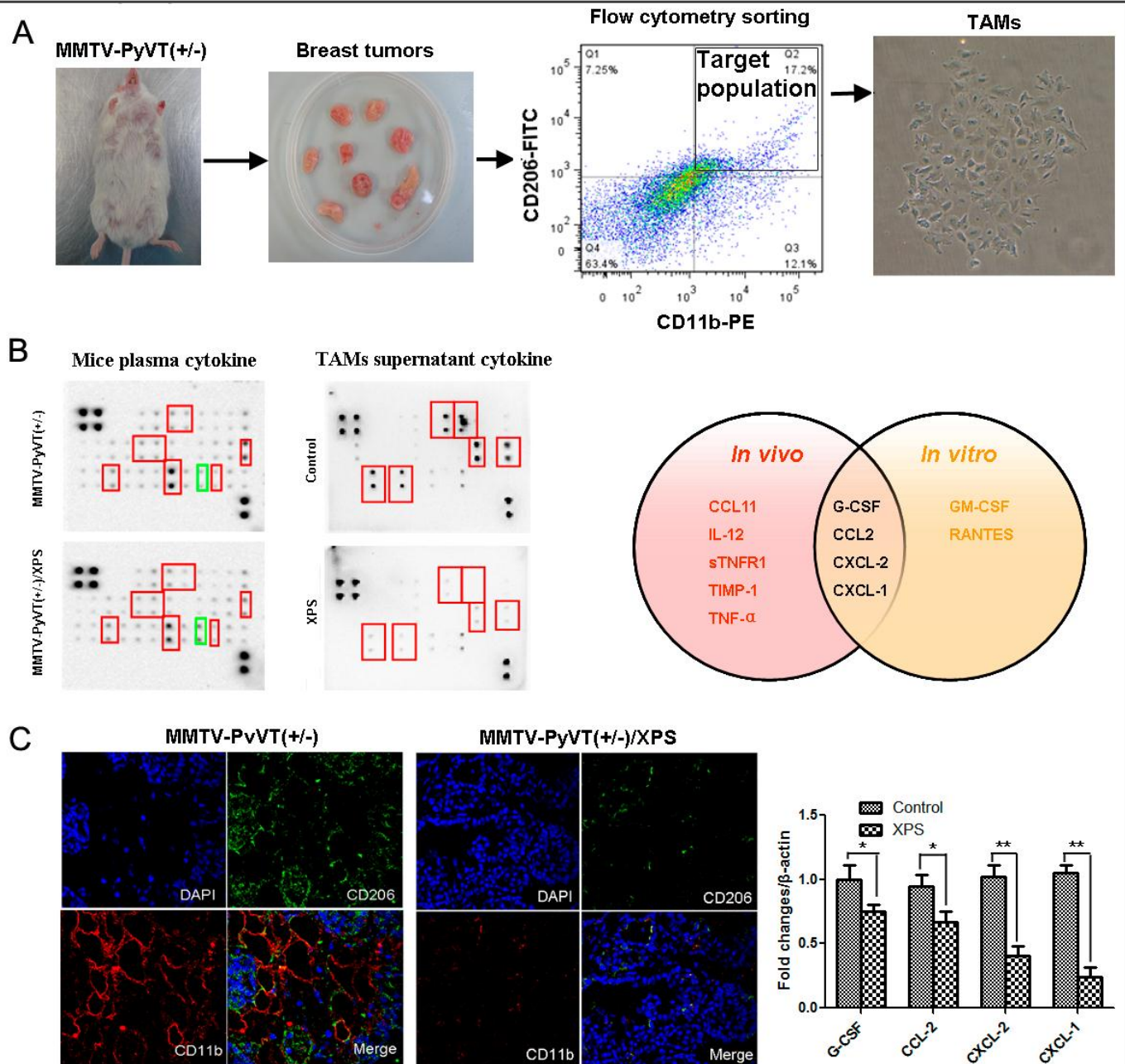


Figure-5