

# 利用构建的8505C-EGFP细胞研究蛹虫草 对甲状腺癌化疗的辅助治疗作用

陈岚<sup>1,2</sup> 高圆圆<sup>3</sup> 王玉涛<sup>1\*</sup> 张瑾<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>喀什大学生命与地理科学学院, 新疆帕米尔高原生物资源与生态重点实验室, 喀什 844000;

<sup>2</sup>嘉兴大学生物与化学工程学院, 嘉兴 314001; <sup>3</sup>嘉兴爱博生物科技有限公司, 嘉兴 314050)

**摘要** 该文构建了带有绿色荧光蛋白标记的甲状腺癌细胞系8505C-EGFP, 以用于探究蛹虫草辅助化疗药物顺铂治疗甲状腺癌的作用。首先, 将带有增强绿色荧光蛋白基因(EGFP)的质粒pEGFP-N2导入甲状腺癌细胞8505C, 通过G418筛选结合细胞流式分选, 获得稳定表达EGFP的甲状腺癌细胞系8505C-EGFP; 然后, 对比分析8505C和8505C-EGFP细胞的增殖能力、克隆形成能力和迁移能力, 明确8505C-EGFP细胞特性; 用8505C-EGFP评估顺铂(Cisplatin)和蛹虫草水提取物(CM)联合用药对甲状腺癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响; 最后利用8505C-EGFP细胞注射构建裸鼠皮下移植瘤模型, 在活体内验证顺铂和蛹虫草联合用药对甲状腺瘤的治疗效果。结果显示了8505C-EGFP细胞株的增殖、克隆形成和迁移能力与原始8505C细胞株相比无显著差异; 顺铂和蛹虫草均能抑制8505C-EGFP细胞在体外的增殖、迁移及侵袭, 但二者联合用药抑制作用显著优于二者单独使用; 利用裸鼠皮下移植瘤模型证明了8505C-EGFP细胞在活体内具有示踪作用, 并验证了在活体内顺铂和蛹虫草联合用药也能够显著抑制肿瘤的生长。综上所述, 该研究成功构建了8505C-EGFP甲状腺癌细胞, 利用该工具细胞证明了蛹虫草与顺铂联合用药对甲状腺瘤的显著抑制作用。

**关键词** 甲状腺癌; 8505C; 绿色荧光蛋白; 蛹虫草; 顺铂

## Study on the Adjuvant Therapeutic Effects of *Cordyceps militaris* on Thyroid Cancer Chemotherapy Using the Constructed 8505C-EGFP Cell Line

CHEN Lan<sup>1,2</sup>, GAO Yuanyuan<sup>3</sup>, WANG Yutao<sup>1\*</sup>, ZHANG Jin<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life and Geographic Sciences, Key Laboratory of Biological Resources and Ecology of Pamirs Plateau in Xinjiang Uygur Autonomous Region, Kashi University, Kashi 844000, China; <sup>2</sup>College of Biological and Chemical Engineering, Jiaxing University, Jiaxing 314001, China; <sup>3</sup>Jiaxing i-Bio Biotechnology Co., Ltd, Jiaxing 314050, China)

**Abstract** This study established the 8505C-EGFP thyroid cancer cell line, labeled with EGFP (enhanced green fluorescent protein), to investigate the effects of *Cordyceps militaris*-assisted chemotherapy with Cisplatin in thyroid cancer treatment. The pEGFP-N2 plasmid carrying the EGFP gene was introduced into 8505C thyroid cancer cells. After selection with G418 and FACS (fluorescence-activated cell sorting), a stable 8505C-EGFP cell line with consistent EGFP expression was successfully generated. Next, the article conducted a comparative analy-

收稿日期: 2024-11-11

接受日期: 2024-12-24

浙江省自然科学基金重点项目(批准号: LZ23C170002)和喀什大学科研创新团队培育计划资助的课题

\*通信作者。Tel: 13516831490, E-mail: wangytgs@163.com; zhangjin7688@163.com

Received: November 11, 2024

Accepted: December 24, 2024

This work was supported by the Key Project of Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (Grant No.LZ23C170002) and the Research and Innovation Team Cultivation Program of Kashi University

\*Corresponding authors. Tel: +86-13516831490, E-mail: wangytgs@163.com; zhangjin7688@163.com

sis of the proliferation, colony formation, and migration abilities of 8505C and 8505C-EGFP cells to characterize the properties of the 8505C-EGFP cell line. The 8505C-EGFP cells was used to evaluate the effects of combined treatment with Cisplatin and water extract of CM (*Cordyceps militaris*) on the proliferation, migration, and invasion of thyroid cancer cells. Finally, the subcutaneous xenograft model of nude mice was established by injecting 8505C-EGFP cells to validate the therapeutic efficacy of Cisplatin and *Cordyceps militaris* combination treatment on thyroid tumors *in vivo*. The results showed that the proliferation, colony formation, and migration abilities of the 8505C-EGFP cell line were not significantly different from those of the original 8505C cell line. Both Cisplatin and *Cordyceps militaris* inhibited the proliferation, migration, and invasion of 8505C-EGFP cells *in vitro*, but the combined treatment exhibited significantly stronger inhibitory effects compared with either treatment alone. Using the subcutaneous xenograft model in nude mice, 8505C-EGFP cells was demonstrated to have a tracer effect *in vivo* and the combined treatment of Cisplatin and *Cordyceps militaris* also significantly suppressed tumor growth *in vivo*. In conclusion, this study successfully established the 8505C-EGFP thyroid cancer cell line and used this tool to demonstrate that the combination of *Cordyceps militaris* and Cisplatin has a pronounced inhibitory effect on thyroid tumors.

**Keywords** thyroid cancer; 8505C; green fluorescent protein; *Cordyceps militaris*; Cisplatin

甲状腺癌是一种常见的内分泌系统恶性肿瘤<sup>[1]</sup>, 根据世界卫生组织的病理分型可分为4种类型: 乳头状甲状腺癌 (papillary thyroid carcinoma, PTC, 约占85%)、滤泡性甲状腺癌 (follicular thyroid carcinoma, FTC, 约占15%)、低分化甲状腺癌 (poorly differentiated thyroid carcinoma, 占比小于2%) 和间变性甲状腺癌 (anaplastic thyroid carcinoma, 占比小于2%)<sup>[2]</sup>。据国家癌症中心发布的2024年全国癌症报告, 甲状腺癌发病数位列各癌种第3, 但死亡人数位列第21, 因为大多数患者可通过手术切除, 较少危及生命<sup>[3]</sup>。然而间变性甲状腺癌具有发展迅速、侵袭性强等特点, 占甲状腺癌致死人数的近50%<sup>[4-5]</sup>。研究表明间变性甲状腺癌患者中约有75%出现转移, 包括肺、骨或脑等部位<sup>[6]</sup>。人源8505C细胞系属于间变性甲状腺癌<sup>[7]</sup>, 恶性程度高, 易转移, 具有较好的裸鼠成瘤性, 是深入研究甲状腺癌的发生、转移、药物敏感性 & 治疗策略的重要细胞模型<sup>[8]</sup>。

绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 是由 SHIMOMURA 等<sup>[9]</sup>发现的水母发光蛋白的伴生蛋白, 用于细胞示踪、细胞器定位、蛋白表达标签等多方面研究<sup>[9-11]</sup>。增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 是经过改良优化的 GFP 变体, 具有荧光强度更高、光稳定性更好、成熟时间更短等特点, 作为分子标签已广泛应用于生命科学相关研究中<sup>[12]</sup>。早在1999年就有了通过构建带有荧光的肿瘤细胞进行癌症转移的研究<sup>[13]</sup>, 但迄

今为止, 尚未见到带有绿色荧光蛋白标记的甲状腺癌细胞的构建。

顺铂 (Cisplatin) 是一种应用于多种恶性肿瘤化疗的铂类药物, 尤其在卵巢癌、肺癌和睾丸癌的治疗中显示出了显著的疗效。其主要作用机制是与肿瘤细胞基因组DNA的碱基发生交联, 影响DNA转录和复制等重要过程<sup>[14]</sup>。虽然临床上顺铂尚未应用于甲状腺癌的治疗, 但多篇文献报道了顺铂在恶性甲状腺癌中的效应和潜在的治疗作用<sup>[15-18]</sup>。顺铂作为化疗药物的另一个问题是伴随着一定的副作用, 如肾毒性、恶心呕吐和耳毒性等<sup>[19]</sup>。因此, 探索联合用药、减轻副作用是顺铂抗肿瘤治疗的重要研究方向。蛹虫草 (*Cordyceps militaris*) 又称北冬虫夏草或北虫草, 是隶属于麦角菌科虫草属的药用真菌, 富含多种活性成分, 如虫草素、虫草酸、甾醇、核苷和多糖等<sup>[20]</sup>, 大量验证表明, 蛹虫草具有抗氧化<sup>[21]</sup>、抗炎<sup>[22]</sup>、免疫调节<sup>[23]</sup>以及对某些肿瘤的抑制作用, 有学者认为蛹虫草的免疫调节作用, 可增强化疗效果<sup>[24]</sup>。

为了深入研究间变性甲状腺癌转移规律及机制, 本文构建了带有绿色荧光蛋白标记的甲状腺癌细胞8505C-EGFP, 明确了此细胞增殖、克隆形成和迁移特性, 并探讨了顺铂与蛹虫草联合用药对该细胞增殖、迁移、侵袭的抑制作用; 最后, 我们利用8505C-EGFP细胞构建了皮下移植瘤的小鼠模型, 确认了该细胞在小鼠体内具有较好的示踪性, 并验证

了顺铂与蛹虫草联合用药对肿瘤生长的抑制作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

1.1.1 细胞及质粒 人甲状腺癌细胞株8505C购自浙江百迪生物科技有限公司; 增强型绿色荧光蛋白(EGFP)的表达质粒pEGFP-N2购自TaKaRa公司。

1.1.2 动物来源 雄性Nude裸小鼠8只, SPF级, 年龄6周, 体质量20~22 g, 购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司。本实验经嘉兴大学实验动物伦理委员会审查通过, 伦理审查批准号JUMC2024-125。

1.1.3 主要试剂 DMEM基础培养基、转染试剂Lipofectamine<sup>TM</sup>2000购自ThermoFisher Scientific公司; 磷酸盐缓冲液(PBS)购自塞维尔生物科技有限公司; 胎牛血清(FBS)购自Biological Industries公司; 胰蛋白酶、4%多聚甲醛购自北京索莱宝生物科技股份有限公司; CCK-8试剂盒购自碧云天生物技术股份有限公司; 顺铂购自Selleck公司。

### 1.2 8505C-EGFP细胞系建立

1.2.1 8505C细胞药物浓度筛选 将8505C细胞接种至6孔板中, 每孔 $1 \times 10^5$ 个细胞, 细胞贴壁后分别加入浓度为300  $\mu\text{g/mL}$ 、400  $\mu\text{g/mL}$ 、500  $\mu\text{g/mL}$ 、600  $\mu\text{g/mL}$ 、700  $\mu\text{g/mL}$ 、800  $\mu\text{g/mL}$ 的含G418的DMEM培养基, 于37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 细胞培养箱中连续培养7天, 观察细胞生长状态, 以细胞全部死亡的最低G418浓度为8505C细胞的筛选浓度。

1.2.2 构建8505C-EGFP细胞株 将8505C细胞培养于含10%血清的DMEM培养基中, 待细胞生长汇合率达到60%~80%时, 通过转染试剂Lipofectamine<sup>TM</sup>2000将pEGFP-N2加入细胞, 4~6 h后弃去培养基, 换为正常细胞培养基。24~48 h后于荧光显微镜下观察细胞中绿色荧光蛋白的表达情况。利用G418进行阳性细胞筛选以及细胞流式分选, 最终得到8505C-EGFP细胞稳转株。

1.2.3 细胞增殖曲线 将8505C细胞和8505C-EGFP细胞分别接种至24孔细胞培养板中, 每孔约5 000个细胞, 并设计3个复孔, 细胞贴壁后利用细胞计数板计算得出每天细胞数目, 连续计数8天, 获得细胞增殖曲线。

1.2.4 CCK-8细胞增殖实验 将8505C细胞和8505C-EGFP细胞分别接种至96孔细胞培养板中, 细胞接种量为5 000个/孔, 并设计3~6个复孔, 待细胞贴

壁后向每孔中加入10  $\mu\text{L}$  CCK-8溶液, 放入37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 细胞培养箱中孵育1~4 h, 用酶标仪测定波长为450 nm处的吸光度( $D$ )值, 连续计数5天, 获得CCK-8细胞增殖曲线。

1.2.5 平板克隆形成实验 取8505C细胞和8505C-EGFP细胞接种于6孔细胞培养板中, 各实验组接种700个细胞/孔, 置于37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 细胞培养箱中连续培养到14天或绝大多数单个克隆中细胞数大于50个为止, 中途每隔3天进行换液并观察细胞状态。克隆完成后, 用PBS洗涤2次, 每孔加入1 mL 4%多聚甲醛室温固定30 min, PBS洗涤2次; 再向每孔加入结晶紫染液1 mL, 室温下染细胞15 min, PBS洗涤细胞数次, 晾干。

1.2.6 细胞平板划痕实验 用马克笔在6孔板背后画标记线, 接着将8505C细胞和8505C-EGFP细胞分别接种至6孔板中, 每孔 $5 \times 10^5$ 个细胞, 第2天细胞长满后用200  $\mu\text{L}$ 枪头垂直标记线划线, 划线完成后, 将细胞放入培养箱中培养, 在适当的时间点记录细胞图像。

### 1.3 蛹虫草水提物(CM)联合顺铂药物处理

1.3.1 蛹虫草核苷类物质含量测定 称量腺苷、尿苷、肌苷、鸟苷、胸苷、腺苷、虫草素标准品各0.005 g, 去离子水定容至50 mL, 制成浓度为0.1 mg/mL的母液; 取1 mL、2 mL、4 mL、6 mL、7 mL上述各标准母液定容至50 mL, 分别配制成0.002 mg/mL、0.004 mg/mL、0.008 mg/mL、0.012 mg/mL、0.014 mg/mL的各标准品溶液。过0.22  $\mu\text{m}$ 滤膜, 再用高效液相色谱仪分别测定胞苷、尿苷、肌苷、鸟苷、胸苷、腺苷、虫草素含量。

1.3.2 CCK-8 将8505C-EGFP细胞接种至96孔细胞培养板中, 细胞接种量为1 000个/孔, 培养24 h, 分组加药, 分别为NC组、Cisplatin组(3  $\mu\text{g/mL}$ )、CM组(600  $\mu\text{g/mL}$ )、Cisplatin+CM组(3  $\mu\text{g/mL}$  Cisplatin+600  $\mu\text{g/mL}$  CM), 继续培养24 h; 随后利用CCK-8试剂盒参照产品说明书进行 $D$ 值检测。

1.3.3 细胞平板划痕实验 用马克笔在6孔板背后画标记线, 接着将8505C-EGFP细胞接种至6孔板中, 每孔约 $5 \times 10^5$ 个细胞, 培养24 h后, 按照NC组、Cisplatin组、CM组、Cisplatin+CM组分别加药, 继续培养24 h, 待细胞长满后用200  $\mu\text{L}$ 枪头垂直标记线划线, 划线完成后, 将细胞放入培养箱中培养, 在适当的时间点记录细胞图像。

**1.3.4 Transwell侵袭实验** 将8505C-EGFP细胞用无血清培养基重悬。调整细胞密度至 $1 \times 10^5$ 个/mL。取细胞悬液200  $\mu$ L加入Transwell小室中, 24孔板下室加入700  $\mu$ L含10% FBS的培养基, 培养6~8 h, 按照NC组、Cisplatin组、CM组、Cisplatin+CM组分别加药, 继续培养24 h, 取出Transwell小室, 弃去孔中培养液, PBS清洗细胞, 室温下用4%多聚甲醛固定15 min后, 0.1%结晶紫染色20 min, 用棉签轻轻擦掉上层未迁移细胞, PBS洗3次后, 显微镜观察细胞, 计数。

#### 1.4 小鼠肿瘤模型构建

将处于对数生长期的8505C-EGFP细胞用胰酶消化、计数, 再用PBS重悬细胞。按 $5 \times 10^6$ 个/200  $\mu$ L接种于裸小鼠后肢腹股沟皮下, 饲养28天, 观察8505C-EGFP细胞的成瘤能力。当肿瘤直径增大到5 mm后, 小鼠被随机分为生理盐水组和Cisplatin+CM组, 每组4只, 每5天通过腹腔注射生理盐水或Cisplatin+CM (3  $\mu$ g/mL Cisplatin+600  $\mu$ g/mL CM), 共治疗2次, 初次注射10天后, 处死小鼠, 剥离肿瘤组织并称重。

#### 1.5 数据处理

数据分析主要通过GraphPad prism 9.5和ImageJ 8.0软件进行。数据以平均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 使用*t*检验或单因素方差分析(ANOVA)方法来比较不同组之间的差异, 使用Pearson相关分析确定相关程度,  $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 8505C-EGFP细胞的构建

利用300~800  $\mu$ g/mL的G418处理8505C细胞, 7天后显微镜观察发现, 700  $\mu$ g/mL处理导致无活细胞存活。因此, 利用700  $\mu$ g/mL G418筛选pEGFP-N2感染后的细胞, 获得存活的细胞克隆后, 通过DAPI染色并在激光共聚焦显微镜下观察发现, 细胞呈现出强烈的荧光信号(图1A), 即获得了8505C-EGFP细胞。

为了明确8505C-EGFP与原始株8505C细胞特性有无差别, 通过细胞计数法、CCK-8细胞增殖实验、平板划痕实验和平板克隆形成实验等分析, 发现二者在增殖(图1B和图1C)、克隆形成(图1D和图1E)和迁移(图1F和图1G)等方面, 均无显著差异。

### 2.2 顺铂与蛹虫草对8505C-EGFP细胞的影响

通过向体外培养的细胞分别添加顺铂、蛹虫草水提物或二者联用, 明确构建的8505C-EGFP细

胞的药物反应以及两种药物对甲状腺癌细胞的作用。

通过对蛹虫草水提物进行分析, 发现蛹虫草(CM)中含有多种生物活性成分, 如核苷、虫草素和多糖。为评估CM样品的质量, 我们采用高效液相色谱法(high-performance liquid chromatography, HPLC)对核苷和虫草素的含量进行定量分析。分别确定了胞苷(7.1 min)、尿苷(8.1 min)、肌苷(9.6 min)、鸟苷(10.2 min)、胸苷(13.3 min)、腺苷(17.6 min)、虫草素(21.3 min)的标准峰(图2)。在样品中, 除肌苷外的其他成分均被检测到, 其浓度如下: 尿苷(845.67 mg/kg)、胞苷(9 445.87 mg/kg)、鸟苷(1 828.88 mg/kg)、胸苷(636 mg/kg)、腺苷(2 178.05 mg/kg)和虫草素(15 904.70 mg/kg)。

利用CCK-8试剂盒检测联合用药对细胞活性的影响, 检测结果显示, 与空白对照相比, 单独使用顺铂(Cisplatin)和CM均能降低细胞活力, 而联合使用顺铂(Cisplatin)和CM对8505C-EGFP细胞增殖活性的抑制作用更为显著(图3A)。

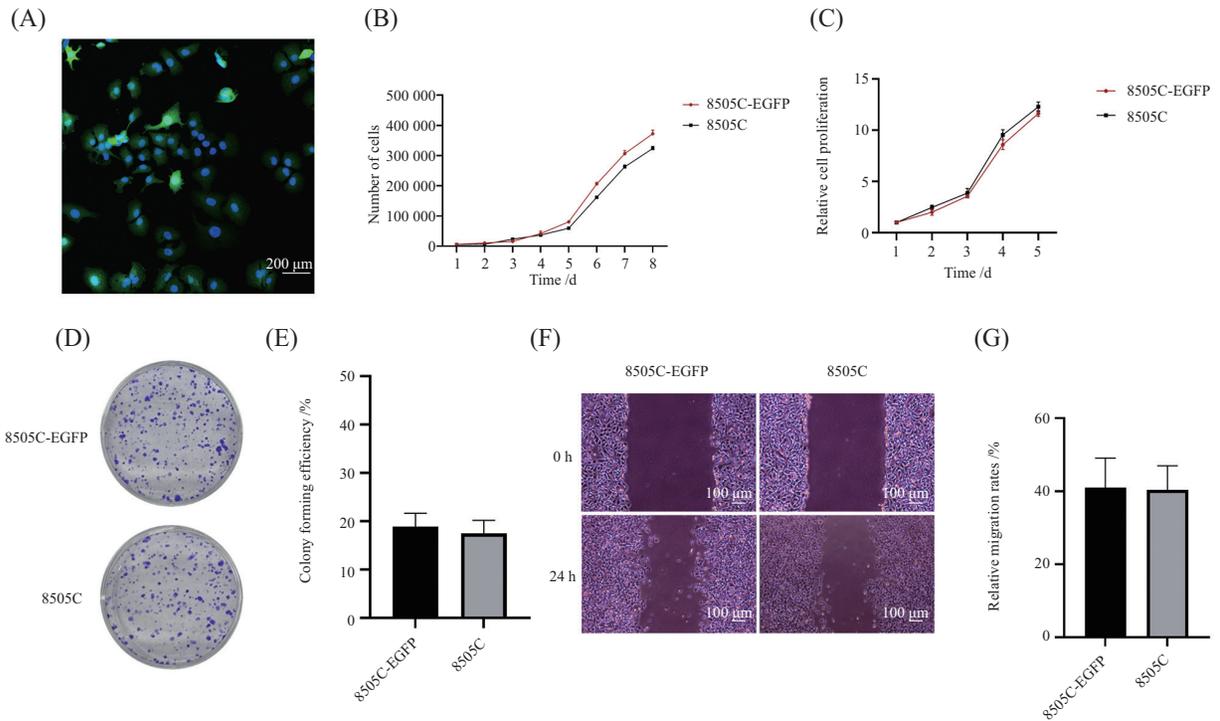
细胞平板划痕实验结果显示, 与对照组相比, 单独使用顺铂(Cisplatin)或CM处理后, 8505C-EGFP细胞的迁移距离显著减小。此外, 联合用药对细胞迁移的抑制作用更为明显(图3B和图3C)。

Transwell侵袭实验结果表明, 单独使用顺铂(Cisplatin)或CM均能减弱细胞的侵袭能力, 而联合用药后, 8505C-EGFP细胞穿过基质胶的数量显著减少, 显示出更强的侵袭抑制效果(图3D和图3E)。

### 2.3 裸鼠成瘤及荧光成像情况

根据药物处理结果, 顺铂(Cisplatin)和CM联合用药显著抑制了8505C-EGFP细胞在体外的增殖、迁移和侵袭。为了验证联合治疗在体内的效果, 我们在构建小鼠皮下移植瘤模型时, 将小鼠随机分为Cisplatin+CM组和生理盐水组。

初次药物注射10天后, 通过颈椎脱臼法处死裸鼠, Cisplatin+CM组皮下移植瘤的生长速度、肿瘤大小明显小于生理盐水组(图4A和图4B)。荧光成像显示, Cisplatin+CM组的肿瘤组织荧光强度低于生理盐水组(图4C)。从裸鼠皮下取出的肿瘤组织经HE染色后, 观察到细胞核大且染色深, 细胞形态多样(图4D)。另外, 裸鼠皮下移植瘤的荧光强度与肿瘤实际重量的相关性高于与直尺测量计算出的肿瘤体积的相关性(图4E和图4F)。



A: 8505C-EGFP细胞在显微镜下显示出绿色荧光; B: 细胞计数法连续8天检测得到的细胞增殖曲线; C: 使用CCK-8试剂盒连续5天检测得到的细胞增殖曲线; D: 细胞克隆形成情况; E: 两种细胞的克隆形成率比较; F: 划痕实验评估细胞迁移能力; G: 8505C-EGFP细胞和8505C细胞的相对迁移率。

A: the 8505C-EGFP cells showed green fluorescence under the microscope; B: cell proliferation curve obtained by cell counting method for eight consecutive days; C: the cell proliferation curve was detected by CCK-8 for five days; D: cell cloning situation; E: comparison of clonal formation rate between two kinds of cells; F: cell migration ability was detected by scratch assay; G: relative mobility of 8505C-EGFP cells and 8505C cells.

图1 8505C-EGFP细胞与8505C细胞生长增殖特性

Fig.1 Growth and proliferation characteristics of 8505C-EGFP cells and 8505C cells

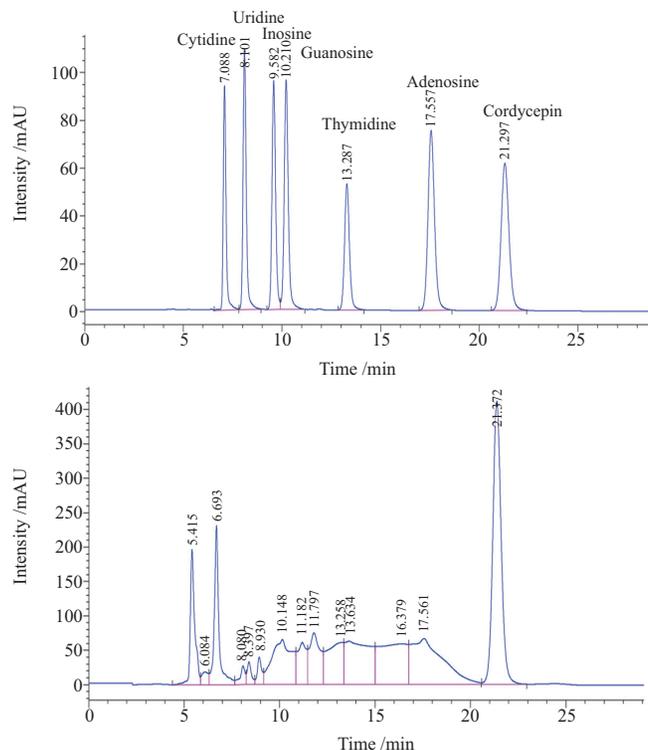
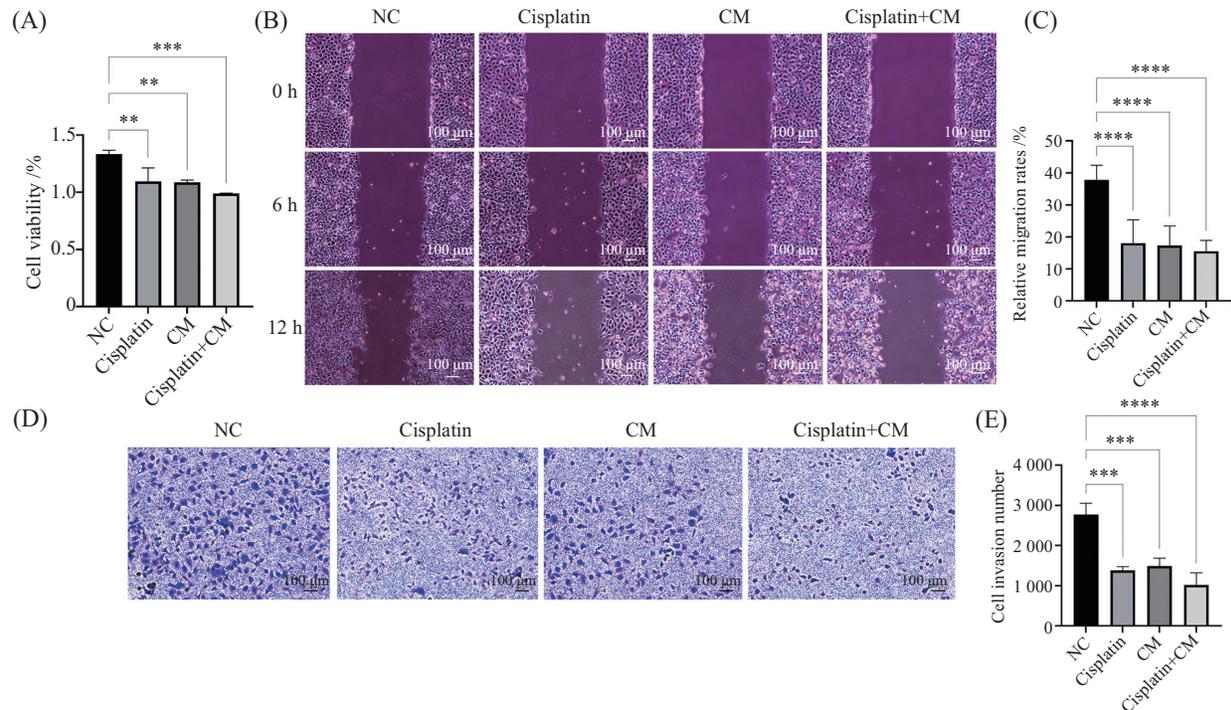


图2 采用高效液相色谱法分析蛹虫草生物活性成分

Fig.2 Analysis of bioactive constituents in *Cordyceps militaris* using HPLC



A: CCK-8试剂盒检测细胞增殖; B: 划痕实验评估细胞迁移能力; C: 细胞迁移率量化分析; D: Transwell侵袭实验检测细胞侵袭能力; E: 细胞侵袭率量化分析。n=3, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, \*\*\*\*P<0.0001。

A: cell proliferation was examined using CCK-8 kit; B: cell migration ability was detected by scratch assay; C: quantification of cell mobility; D: Transwell invasion assay was used to detect cell invasion ability; E: quantification of the rate of cell invasion. n=3, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, \*\*\*\*P<0.0001.

图3 联合用药抑制8505C-EGFP细胞的增殖、迁移及侵袭

Fig.3 Combination of drugs inhibited the proliferation, migration and invasion of 8505C-EGFP cells

### 3 分析与讨论

甲状腺癌是一种相对少见但愈发引起关注的恶性肿瘤, 根据全球癌症统计数据, 甲状腺癌的年发病率约为3.6/10万人, 并呈现逐年上升的趋势<sup>[25]</sup>。这一趋势促使研究者们积极探索更加有效的治疗手段。

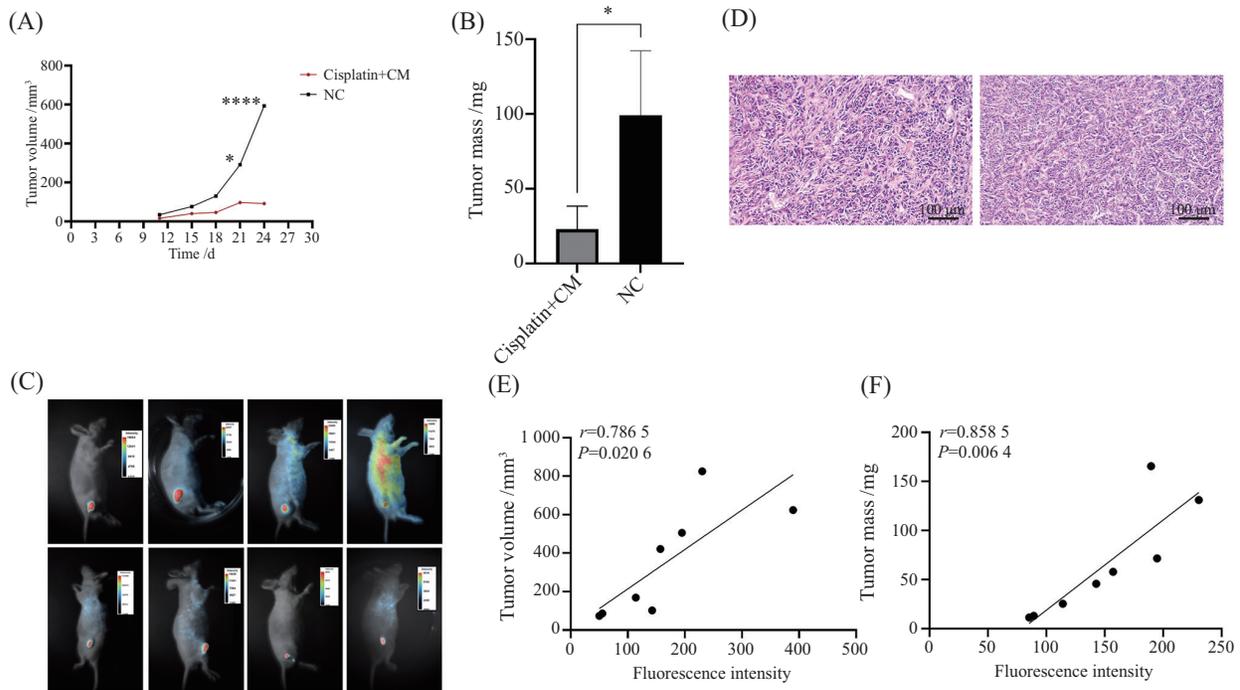
顺铂(Cisplatin)作为一种常用的化疗药物, 尽管在多种肿瘤的治疗中表现出良好的疗效, 但其抗肿瘤效果常受到药物耐受性的影响。因此, 探索其他辅助治疗方式, 以提高顺铂的疗效显得尤为重要。蛹虫草作为一种传统中药, 近年来受到越来越多的关注, 研究表明其具备抗肿瘤、免疫调节等多重生物学活性<sup>[26]</sup>。在本研究中, 我们结合蛹虫草水提物(CM)与顺铂进行联合治疗, 并通过腹腔注射的方法, 探讨这种联合治疗对肿瘤的治疗效果及其作用机制。

通过细胞稳定转染以及G418药物压力筛选和细胞流式分选, 本研究成功构建了稳定表达EGFP绿色荧光蛋白的8505C细胞株。8505C-EGFP细胞株在细胞形态、生长增殖速度、细胞周期、细胞克隆形

成率及细胞迁移能力等方面, 与亲本8505C细胞株无显著差异, 显示EGFP作为外源蛋白能够在8505C细胞中稳定表达且不影响细胞活性。该细胞系的建立不仅为研究甲状腺癌细胞的生物学特性提供了便利, 也为后续的实验提供了重要工具。

药物处理实验结果表明, 联合用药组在抑制肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力方面, 比单独使用顺铂或蛹虫草水提物的效果更为显著。这提示顺铂与蛹虫草联合使用能够克服单一药物治疗带来的耐药问题, 提高疗效。顺铂作为传统化疗药物通过损伤DNA发挥强大疗效, 而蛹虫草的多种生物活性成分可能促进细胞的凋亡或抑制肿瘤微环境中的促进因素, 从而提高抗肿瘤效果。

建立8505C-EGFP甲状腺癌细胞的裸鼠皮下移植瘤模型, 使得肿瘤组织能够在荧光成像系统下自发荧光。值得注意的是, 皮下肿瘤的位置可能影响卡尺测量的准确性, 实际大小与测量结果有所偏差。荧光成像系统成像后, 肿瘤组织荧光强度与肿瘤实际大小之间的相关性较强。荧光强度作为评估肿瘤大小的一种更精准的手段, 使得我们在监测肿瘤生



A: 肿瘤生长曲线; B: 两组小鼠取出肿瘤的实际质量; C: 在荧光成像系统下生成两组裸鼠皮下肿瘤组织的荧光热图, 上行为生理盐水组, 下行为Cisplatin+CM组; D: 肿瘤组织HE染色结果, 左侧为生理盐水组, 右侧为Cisplatin+CM组; E: 直尺测量计算的肿瘤体积和荧光强度的相关性 ( $r=0.7865$ ,  $P=0.0206$ ); F: 实际肿瘤体积与荧光强度的相关性 ( $r=0.8585$ ,  $P=0.0064$ )。\* $P<0.05$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ 。

A: relative growth curve of tumor; B: actual tumor weight of mice in both groups; C: fluorescent heat maps of two groups of subcutaneous tumor tissue in nude mice were generated under the fluorescence imaging system; the top line was normal saline group, and the bottom line was Cisplatin+CM group; D: HE staining of tumor tissue showed that the left group was normal saline group and the right group was Cisplatin+CM group; E: correlation between tumor volume and fluorescence intensity calculated by ruler measurement ( $r=0.7865$ ,  $P=0.0206$ ); F: correlation between actual tumor volume and fluorescence intensity ( $r=0.8585$ ,  $P=0.0064$ ). \* $P<0.05$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ .

图4 联合用药处理抑制裸鼠皮下移植瘤生长

Fig.4 Combined drug treatment inhibited the growth of subcutaneous transplanted tumors in nude mice

长和治疗效果时, 能够更加真实地反映肿瘤的实际状况。另外, 联合治疗组显示出显著的肿瘤生长抑制, 说明联合用药在体内环境中同样有效, 这些结果提示顺铂与蛹虫草水提物的联合使用可能成为甲状腺癌治疗的一种有效策略, 为未来的临床应用提供理论基础。

综上所述, 本研究通过构建 8505C-EGFP 细胞系, 为动物移植瘤模型的研究提供了新的工具。同时探讨了蛹虫草在甲状腺癌化疗中的辅助作用, 并且评估了其与传统化疗药物联合使用的潜力。联合使用蛹虫草与传统化疗药物顺铂能够促进肿瘤细胞凋亡、抑制细胞增殖及降低其迁移能力, 具有显著增强抗肿瘤的效果, 这种组合疗法不仅能够提高治疗效果, 还可能通过降低顺铂的用量, 从而减轻其毒副作用, 为患者提供更为安全的治疗方案。

本研究不仅为观察甲状腺癌细胞的生长提供了新的视角, 还探讨了蛹虫草在化疗中的辅助作用,

为进一步探索蛹虫草与传统化疗药物结合的治疗方案奠定了基础。未来的研究可以考虑更大规模的动物实验, 评估长期联合治疗对肿瘤复发率和生存率的影响。此外, 深入探讨联合治疗的分子机制将有助于阐明其对肿瘤细胞生物学行为的调控作用, 从而为甲状腺癌患者提供更为有效的个性化治疗方案。

## 参考文献 (References)

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-49.
- [2] CATALANO M G, POLI R, PUGLIESE M, et al. Emerging molecular therapies of advanced thyroid cancer [J]. Mol Aspects Med, 2010, 31(2): 215-26.
- [3] HAN B, ZHENG R, ZENG H, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022 [J]. J Natl Cancer Center, 2024, 4(1): 47-53.
- [4] SMALLRIDGE R C, COPLAND J A. Anaplastic thyroid carcinoma: pathogenesis and emerging therapies [J]. Clin Oncol,

- 2010, 22(6): 486-97.
- [5] LIM H, DEVESA S S, SOSA J A, et al. Trends in thyroid cancer incidence and mortality in the United States, 1974-2013 [J]. JAMA, 2017, 317(13): 1338-48.
- [6] WENDLER J, KROISS M, GAST K, et al. Clinical presentation, treatment and outcome of anaplastic thyroid carcinoma: results of a multicenter study in Germany [J]. Eur J Endocrinol, 2016, 175(6): 521-9.
- [7] ITO T, SEYAMA T, HAYASHI Y, et al. Establishment of 2 human thyroid-carcinoma cell-lines (8305c, 8505c) bearing p53 gene-mutations [J]. Int J Oncol, 1994, 4(3): 583-6.
- [8] NUCERA C, NEHS M A, MEKEL M, et al. A novel orthotopic mouse model of human anaplastic thyroid carcinoma [J]. Thyroid, 2009, 19(10): 1077-84.
- [9] SHIMOMURA O, JOHNSON F H, SAIGA Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea [J]. J Cell Comp Physiol, 1962, 59: 223-39.
- [10] CHALFIE M, TU Y, EUSKIRCHEN G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression [J]. Science, 1994, 263(5148): 802-5.
- [11] TSIEN R Y. The green fluorescent protein [J]. Annual Rev Biochem, 1998, 67(1): 509-44.
- [12] ZHANG J, CAMPBELL R E, TING A Y, et al. Creating new fluorescent probes for cell biology [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3(12): 906-18.
- [13] KAN Z, LIU T J. Video microscopy of tumor metastasis: using the green fluorescent protein (GFP) gene as a cancer-cell-labeling system [J]. Clin Exp Metastasis, 1999, 17(1): 49-55.
- [14] SHU X, XIONG X, SONG J, et al. Base-resolution analysis of cisplatin-DNA adducts at the genome scale [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2016, 55(46): 14246-9.
- [15] COHEN A M, ROSENBAUM J. Cisplatin and its potential in thyroid cancer treatment: a review [J]. J Endocrinol, 2010, 207(2): 171-6.
- [16] XU J, LI Z, SU Q, et al. Embryonic develop-associated gene 1 is overexpressed and acts as a tumor promoter in thyroid carcinoma [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 81: 86-92.
- [17] SCHNEIDER A B, BURMAN K D. The role of chemotherapy in the management of thyroid cancer [J]. Thyroid, 2006, 16(6): 551-8.
- [18] ZHANG Y, YANG W Q, ZHU H, et al. Regulation of autophagy by miR-30d impacts sensitivity of anaplastic thyroid carcinoma to cisplatin [J]. Biochem Pharmacol, 2014, 87(4): 562-70.
- [19] AYED W B, SAID A B, HAMDI A, et al. Toxicity, risk factors and management of cisplatin-induced toxicity: a prospective study [J]. J Oncol Pharm Pract, 2020, 26(7): 1621-9.
- [20] ZHANG J, WEN C, DUAN Y, et al. Advance in *Cordyceps militaris* (linn) link polysaccharides: isolation, structure, and bioactivities: a review [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 132: 906-14.
- [21] CHEN X, WU G, HUANG Z. Structural analysis and antioxidant activities of polysaccharides from cultured *Cordyceps militaris* [J]. Int J Biol Macromol, 2013, 58: 18-22.
- [22] PHULL A R, AHMED M, PARK H J. *Cordyceps militaris* as a bio functional food source: pharmacological potential, anti-inflammatory actions and related molecular mechanisms [J]. Microorganisms, 2022, 10(2): 405.
- [23] LIU J Y, FENG C P, LI X, et al. Immunomodulatory and antioxidative activity of *Cordyceps militaris* polysaccharides in mice [J]. Int J Bioll Macromol, 2016, 86: 594-8.
- [24] JEONG M K, YOO H S, KANG I C. The extract of *Cordyceps Militaris* inhibited the proliferation of cisplatin-resistant A549 lung cancer cells by downregulation of H-Ras [J]. J Med Food, 2019, 22(8): 823-32.
- [25] CABANILLAS M E, MCFADDEN D G, DURANTE C. Thyroid cancer [J]. Lancet, 2016, 388(10061): 2783-95.
- [26] SHWETA, SALIK A, KOMA L, et al. A brief review on the medicinal uses of *Cordyceps militaris* [J]. Pharmacol Res-Modern Chinese Med, 2023, 7: 100228.