

南蛇藤提取物对 Hepa 1-6 荷瘤小鼠肝癌移植瘤及血管生成的影响

钱亚云¹ 侯莹¹ 张华² 员林^{1,3} 刘延庆^{1*}

(1. 扬州大学中西医结合研究所, 江苏省扬州市淮海路 11 号, 225009;

2. 扬州大学医学院护理系; 3. 中国人民解放军第九七医院影像科)

基金项目: 国家中医药管理局中医药科学技术研究专项普通课题资助项目(04-05ZP35);

江苏省普通高校研究生创新工程项目(CX09B-321Z)

* 通讯作者: liuyq@yzu.edu.cn, 13905278844

[摘要] **目的** 观察南蛇藤乙酸乙酯提取物对 Hepa 1-6 细胞荷瘤小鼠肝癌移植瘤及血管生成的影响。 **方法** 将 C57BL/6 小鼠随机分为正常组、模型组、顺铂组及南蛇藤高、中、低剂量组, 每组 10 只。除正常组外, 其他各组于左前肢腋部皮下接种小鼠肝癌细胞株 Hepa 1-6 (1×10^6) 0.1 ml/只。接种后 2 周, 顺铂组腹腔注射顺铂 1 mg/kg, 南蛇藤低、中、高剂量组分别灌胃, 药液浓度为 10、20、40 mg/kg, 连续给药 28 d, 末次给药 24 h 后, 检测肿瘤重量、移植瘤组织内肿瘤细胞的凋亡, 检测移植瘤组织内血管内皮生长因子(VEGF)的表达。 **结果** 与模型组相比, 南蛇藤提取物高、中、低剂量组平均瘤重均有所减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 南蛇藤中、高剂量组移植瘤内凋亡的肿瘤细胞较模型组明显增多, 同时 VEGF 的表达较模型组明显减少。 **结论** 一定浓度的南蛇藤乙酸乙酯提取物有抑制肿瘤生长的作用, 其机制可能与促进肿瘤细胞凋亡及抑制肿瘤血管生成有关。

[关键词] 南蛇藤; 肝癌; 细胞凋亡; 肿瘤血管生成

Effect of Nansheteng Extract on Transplanted Hepatic Carcinoma and Angiogenesis in Hepa 1-6 Tumor Bearing Mice

QIAN Yayun¹, HOU Ying¹, ZHANG Hua², YUAN Lin^{1,3}, LIU Yanqing¹

(1. Institute of Chinese & Western Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009; 2. Medical College, Yangzhou University; 3. The 97th Hospital of People's Liberation Army)

ABSTRACT **Objective** To investigate the inhibitive effect and mechanism of Nansheteng (*Celastrus orbiculatus*) extract on transplanted hepatic carcinoma and angio genesis in the Hepa 1-6 tumor bearing mice. **Methods** Sixty C57BL/6 mice were randomized into normal control group, model group, cisplatin group, and Nansheteng extract large, middle, and small dosage groups, 10 mice in each group. Except the normal control group, Hepa 1-6 cells (1×10^6) 0.1 ml were inoculated subcutaneously in the axilla of left anterior limb of each mouse. Two weeks later, cisplatin group was given cisplatin 1 mg/kg by intraperitoneal injection, while Nansheteng large, middle, small dosage group was given Nansheteng extract of 10, 20, 40 mg/kg respectively by gastric perfusion. All the mice were medicated for 28 days in succession and were sacrificed 24 hours after the last medication. The weights of tumors and apoptosis in the transplanted tumor tissues were measured. The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the transplanted tumor tissues was determined. **Results** Compared with the model group, the average weight of tumors in the Nansheteng extract large, middle and low dosage groups was reduced ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The apoptosis in the transplanted tumor tissues of the medicated groups was significantly more than that of the model group, and at the same time the VEGF expression was significantly less. **Conclusion** Nansheteng ethyl acetate extract is effective in inhibiting the tumor growth. Its mechanism may be related to promoting the apoptosis and inhibiting the angiogenesis of tumor.

Key Words Nansheteng (*Celastrus orbiculatus*); hepatic carcinoma; apoptosis; angiogenesis of tumor

南蛇藤^[1](*Celastrus orbiculatus* Thunb.) 属卫矛科南蛇藤属植物, 又名过山风、黄藤、苦树皮等。在我国分布广泛, 药用价值的记载始于清代《植物名实图考》。现代药物化学研究证实, 南蛇藤植物体的蒽类、生物碱、黄酮类含量较高^[2]。前期研究发现, 南蛇

藤乙酸乙酯提取物能显著抑制多种肿瘤细胞的增殖^[3]; 明显降低小鼠肝癌细胞 Hepa 1-6 的血管内皮生长因子(VEGF)表达水平, 并且初步探明其机制是通过干扰 VEGF-mRNA 的转录, 进而降低 VEGF 蛋白的合成^[4]。VEGF 是肿瘤血管过度生成最关键

的因素之一,因此本实验进一步观察南蛇藤乙酸乙酯提取物对Hepa1-6 荷瘤小鼠的移植瘤及血管生成的影响。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

南蛇藤购自广州致信药业有限公司,经中国药科大学中药资源研究室秦民坚教授鉴定。将南蛇藤茎切断、粉碎成粉,烘干(15kg),用95%乙醇(150L)提取3h,重复3次,合并提取液,回收乙醇,浸膏(900g)加水分散后,石油醚萃取3次,再用乙酸乙酯萃取3次,收集乙酸乙酯层,水洗涤3次,减压浓缩,真空冻干,得南蛇藤茎乙酸乙酯提取物250g,含生药60g/g 提取物,4℃贮存。TUNEL 检测试剂盒,兔抗鼠VEGF 多克隆抗体,SABC 试剂盒及DAB 显色试剂盒,均购自武汉博士德生物有限公司。顺铂购自齐鲁制药有限公司,批准文号:国药准字H37021357。

1.2 细胞株和实验动物

小鼠肝癌细胞株Hepa1-6,购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。选用清洁级健康C57BL/6 小鼠60只,体重16~21g,雌雄各半,由扬州大学比较医学中心提供,许可证号:2007-0005,按随机数字表法分为6组:正常组、模型组、顺铂组、南蛇藤高、中、低剂量组,每组10只。

1.3 造模与给药

实验动物除正常组外,于左前肢腋部皮下注射Hepa1-6 细胞(1×10^6) 0.1ml/只。待肉眼见接种部位出现米粒大小肿瘤后给药,模型组灌胃含1% DMSO 的PBS,剂量为10ml/kg,顺铂组注射顺铂1mg/kg,南蛇藤低、中、高剂量组分别灌胃药液浓度为10、20、40mg/kg,给药量均为10ml/kg,连续28d。

1.4 观察指标及测定

末次给药24h 后,取肿瘤组织,称量肝脏、脾脏和胸腺,计算抑瘤率和脏器指数。抑瘤率=(对照组平均瘤重-给药组平均瘤重)/对照组平均瘤重 $\times$ 100%。肿瘤组织以4%中性甲醛固定后,常规切片,厚4μm,用于检测肿瘤细胞凋亡及VEGF 表达。肿瘤细胞凋亡检测采用TUNEL 法,具体操作步骤严格按试剂盒说明书进行,以细胞核呈紫黑色着色为阳性凋亡细胞。肿瘤组织VEGF 的表达采用SABC 法检测,抗体浓度为1:100,具体操作步骤严格按试剂盒说明书进行,按照Fromowitz 综合计分法^[5]进行结果判定。

1.5 统计学方法

采用SPSS 13.0 统计软件处理,计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 南蛇藤提取物对Hepa1-6 荷瘤小鼠抑瘤率的影响

表1 示,与模型组相比,南蛇藤高、中、低剂量组及顺铂组平均瘤重减轻,均能有效抑制肿瘤生长($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而且以高剂量组及顺铂组明显。

表1 南蛇藤提取物对Hepa1-6 荷瘤小鼠移植瘤的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	平均瘤重(g)	抑瘤率(%)
正常组	10	—	—
模型组	10	1.08 $\pm$ 0.10	—
南蛇藤高剂量组	10	0.51 $\pm$ 0.15**	52.91**
南蛇藤中剂量组	10	0.69 $\pm$ 0.10*	36.20*
南蛇藤低剂量组	10	0.83 $\pm$ 0.10*	23.46*
顺铂组	10	0.36 $\pm$ 0.19**	66.87**

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

2.2 南蛇藤提取物对荷瘤小鼠肝脾及胸腺指数的影响

表2 示,与模型组比较,顺铂组和南蛇藤高剂量组脾脏指数明显提高($P<0.01$)。与模型组比较,顺铂组胸腺指数明显降低($P<0.01$),南蛇藤高剂量组提高($P<0.05$)。

表2 南蛇藤提取物对Hepa1-6 荷瘤小鼠各脏器指数的影响(mg/g, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	肝脏指数	脾脏指数	胸腺指数
正常组	10	56.34 $\pm$ 5.71	3.06 $\pm$ 0.32	2.70 $\pm$ 0.32
模型组	10	53.44 $\pm$ 5.72	3.10 $\pm$ 0.75	2.53 $\pm$ 0.76
南蛇藤高剂量组	10	51.89 $\pm$ 4.77	3.93 $\pm$ 0.90**	2.98 $\pm$ 0.44*
南蛇藤中剂量组	10	51.53 $\pm$ 3.43	3.41 $\pm$ 0.44	2.76 $\pm$ 0.90
南蛇藤低剂量组	10	50.75 $\pm$ 2.31	3.36 $\pm$ 0.69	2.60 $\pm$ 0.69
顺铂组	10	44.81 $\pm$ 6.72	3.71 $\pm$ 0.58**	1.46 $\pm$ 0.58**

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

2.3 南蛇藤提取物对移植瘤内肿瘤细胞凋亡的影响

图1 示,正常组和模型组细胞状态良好,细胞圆形或类圆形,细胞质形状规则,极少数细胞核被染成紫黑色。顺铂组见较多凋亡细胞,细胞缩小,细胞间隙增大,核呈紫黑色;细胞凋亡晚期可见凋亡小体,细胞膜损伤或裂解成碎片。南蛇藤低剂量组偶见散在凋亡细胞,数量与模型组相比没有显著性差异。南

蛇藤中、高剂量组可见较多凋亡细胞,并有明显形态改变,细胞染色质浓缩、靠近核膜,出现核着边现象;细胞周围可见完整膜包裹的凋亡小体;南蛇藤高剂量组可见坏死细胞,细胞肿胀崩解,形态不规则。

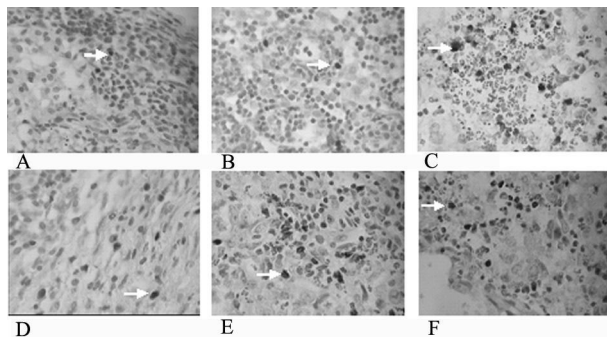


图1 Hepa1-6 移植瘤内肿瘤细胞的凋亡(×400)

A. 正常组;B. 模型组;C. 顺铂组;D. 南蛇藤低剂量组;E. 南蛇藤中剂量组;F. 南蛇藤高剂量组

2.4 南蛇藤提取物对肿瘤细胞VEGF表达的影响

VEGF主要表达于细胞浆中,以出现棕色或棕黄色颗粒为阳性细胞。图2示,正常肝组织中VEGF阴性表达,少数出现弱阳性表达。模型组肝癌组织中阳性细胞呈散在片状或团巢样分布,癌巢边缘VEGF表达较强。另外,癌旁间质细胞和部分血管基底膜上皮内细胞的胞质中也有表达。各治疗组小鼠肿瘤细胞VEGF均有阳性表达,但与模型组比较,顺铂组和南蛇藤中、高剂量组肿瘤组织VEGF阳性着色细胞均明显减少,表达水平明显降低。

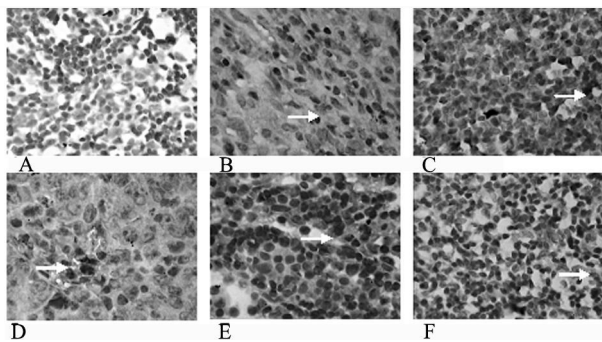


图2 Hepa1-6 移植瘤内VEGF的表达(×400)

A. 正常组;B. 模型组;C. 顺铂组;D. 南蛇藤低剂量组;E. 南蛇藤中剂量组;F. 南蛇藤高剂量组

3 讨论

诱导肿瘤细胞凋亡及明确药物作用靶点是天然抗肿瘤药物筛选的基本条件^[6]。本研究结果显示,南蛇藤乙酸乙酯提取物对Hepa1-6荷瘤小鼠有较好的抑瘤作用,抗肿瘤作用呈现量效关系。TUNEL结果揭示南蛇藤提取物通过促进肝癌细胞凋亡机制发挥

抑瘤作用。

本研究中,南蛇藤中、高剂量组均可以下调荷瘤机体VEGF表达水平,提示南蛇藤提取物以VEGF为作用靶点抑制肿瘤血管生成。同时,高剂量组能明显提高荷瘤小鼠胸腺和脾脏指数,提示南蛇藤提取物可以增强机体免疫功能。可能由于VEGF信号转导通路除了特异性刺激血管内皮细胞增殖和迁移,促进肝癌血管构建外^[7],还存在于免疫系统的树突状细胞和淋巴细胞中,影响着肿瘤特异性细胞免疫效应^[8]。本研究可为进一步阐明南蛇藤的抗肝癌机制及开发新型抗肝癌药物提供一定的科学依据。但是,无论是肿瘤的凋亡还是血管生成,均受多种基因、细胞因子及信号转导通路协同调控,南蛇藤提取物对肝癌模型有效干预作用还有待深入研究。

参考文献

- [1] 黄太康. 现代本草纲目[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2001: 1859.
- [2] 张舰, 刘延庆. 南蛇藤的研究进展[J]. 国外医学中医中药分册, 2004, 26(6): 335-338, 342.
- [3] 王维民, 刘延庆, 戴小军. 南蛇藤提取物诱导SGC-7901胃癌细胞凋亡及其机制[J]. 中国生物制品学杂志, 2010, 23(2): 154-156.
- [4] Qian YY, Liu YQ. Inhibition of *Celastrus orbiculatus* Extracts on VEGF Expression in Hepatoma Cells of Mice [J]. Chinese Herbal Medicines. 2010, 2(1): 72.
- [5] Fromowitz FB, Viola MV, Chao S, et al. Ras p21 expression in the progression of breast cancer [J]. Hum Pathol, 1987, 18(12): 1268-1275.
- [6] 孟祥林, 刘明华. 诱导肿瘤细胞凋亡的天然药物研究进展[J]. 四川生理科学杂志. 2010, 32(4): 169.
- [7] Leppanen VM, Prota AE, Jeltsch M, et al. Structural determinants of growth factor binding and specificity by VEGF receptor 2 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(6): 2425-2430.
- [8] Laxmanan S, Robertson SW, Wang E, et al. Vascular endothelial growth factor impairs the functional ability of dendritic cells through Id pathways [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 334(1): 193-198.

(收稿日期: 2010-08-01; 修回日期: 2011-02-22)

[编辑: 行之]

欢迎邮购《中医杂志》光盘合订本

1951~1986年(4张光盘)480元; 1987~1994年(1张光盘)260元; 1995~2004年(1张光盘)280元。光盘合订本为计算机用数据光盘, 收入了同期出版的全部《中医杂志》的内容, 可对所有文章进行任意检索, 方便实用。汇款地址: 北京东直门内南小街16号中医杂志北京医海林音像书店, 邮政编码: 100700, 电话: (010) 64035632。网址: <http://www.jtem.net.cn>。