

竹节香附素 A 对人肝癌细胞裸鼠移植瘤的抑制作用

马明¹, 李东良^{1*}, 赵丹云², 林小钦¹, 范敬静¹, 张志强¹, 方坚¹

1. 南京军区福州总医院 肝胆内科, 福建 福州 350025

2. 北京市中关村医院 消化科, 北京 100080

摘要: **目的** 探讨竹节香附素 A 对人肝癌细胞裸鼠移植瘤的抑制作用。**方法** 建立人肝癌裸鼠移植瘤模型, 随机将成瘤裸鼠分为 3 组, 即竹节香附素 A 治疗组、顺铂组及生理盐水对照组, 于种植瘤细胞后第 3 天开始 ip 药物, 治疗过程中隔天记录瘤体大小、各组抑瘤率及药物对裸鼠生存率的影响及瘤组织病理学改变。**结果** 竹节香附素 A 治疗组能明显抑制人肝癌细胞裸鼠移植瘤生长, 治疗 8 d 竹节香附素 A 组及顺铂组与对照组相比已有明显差异 ($F=5.579$, $P=0.015$), 抑瘤率分别达到 48.97% 和 53.71%, 随着治疗时间的延长差异更加显著; 治疗结束后竹节香附素 A 组和顺铂组平均瘤体质量较轻, 与对照组相比差异具有统计学意义 ($F=17.96$, $P=0.000$); 与化疗药顺铂组相比瘤体大小及抑瘤率均未见差异。竹节香附素 A 对裸鼠体质量影响较小, 治疗结束后竹节香附素 A 治疗组裸鼠存活率为 100%, 顺铂治疗组存活率仅为 62.5%, 两组存活率相比差异有显著性 ($P<0.05$)。病理学观察竹节香附素 A 治疗组瘤体小, 肿瘤细胞稀疏减少。**结论** 竹节香附素 A 对人肝癌裸鼠移植瘤生长具有明显抑制作用, 且竹节香附素 A 毒性低, 安全性好。

关键词: 竹节香附素 A; 肝细胞癌; 顺铂; HepG2 细胞; 裸鼠移植瘤

中图分类号: R965.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2015) 01-0040-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.01.007

Study the effect of raddeanin A on the proliferation of human hepatic cancer in nude mice

MA Ming¹, LI Dong-liang¹, ZHAO Dan-yun², LIN Xiao-qin¹, FAN Jing-jing¹, ZHANG Zhi-qiang¹, FANG Jian¹

1. Department of Hepatobiliary Medicine, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Area Command of China PLA, Fuzhou 350025, China

2. Department of Gastroenterology, Beijing Zhongguancun Hospital, Beijing 100080, China

Abstract: Objective To study the inhibiting effect of raddeanin A on xenograft tumor in nude mice with transplanted human hepatocellular carcinoma. **Methods** The xenograft tumor modes of human HCC were established in nude mice. These nude mice were randomly divided into three groups (raddeanin A, cisplatin, and normal saline). In all groups, intraperitoneal injection (1 time per day) of drugs will be given from the third day after transplanted human HCC. During the treatment, all groups' date of tumor size and tumor inhibition rate were recorded, every other day. To analyze drugs' impact on the survival rate and the histopathological changes of xenograft tumor. **Results** (1) This study finds that raddeanin A has significant inhibitive effect on xenograft tumor in nude mice. There was statistical significant difference among raddeanin A treatment group, cisplatin treatment group and normal saline control group on the 8th day ($F=5.579$, $P=0.015$). In the former two treatment groups, the tumor inhibition rate were 48.97% and 53.71% at that day. With the treatment prolonged, the differences was more significant. The average weight of tumor is lighter in raddeanin A group and Cisplatin group, Which have statistically significant compared with the normal saline control group after treatment ($F=17.96$, $P=0.000$). Whereas the difference in tumor size and tumor inhibition rate between raddeanin A treatment group and cisplatin treatment group had not statistical significance ($P>0.05$). (2) Raddeanin A had small bad effect on the nude mice physical: after treatment, survival rate of nude mice was 100% in raddeanin A treatment group and 62.5% in cisplatin treatment group, a significant difference between the two groups ($P<0.05$). (3) Pathological observation of raddeanin A treatment group showed that raddeanin A could shrink the tumors and make tumor cells were arranged loosely. **Conclusion** These finds reveal that raddeanin A, with the

收稿日期: 2014-11-03

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (NO2012J01399)

作者简介: 马明 (1984—) 男, 硕士, 主治医师, 研究方向为肝癌基础与临床。

*通信作者 李东良, 主任医师, 教授, 硕士生导师。Tel: (0591)22858128 E-mail: dongliangli93@163.com

advantage of mild toxicity and high safety, has significant inhibitive effect on xenograft tumor in nude mice with transplanted human hepatocellular carcinoma.

Key words: raddeanin a; hepatocellular carcinoma; cisplatin; HepG₂; Apoptosis

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是世界上最常见的恶性肿瘤之一^[1], 严重危害人民群众的健康和生命。目前对 HCC 有多种治疗方法可供选择, 如手术切除、射频及冷冻消融、肝动脉介入栓塞化疗、肝移植等, 但迄今为止总体疗效不甚理想, 迫切需要探索和发展新的治疗手段和方法。近年来研究表明肿瘤致病机制主要是细胞过度增殖、凋亡不足和分化受阻, 因此寻找抑制肿瘤细胞恶性增殖、诱导分化和促进凋亡的药物受到研究者的广泛关注。同时, 从天然药物中寻找有效活性成分也是当今抗肿瘤药物研究的重要方向之一。

竹节香附又称两头尖, 为毛茛科银莲花属植物多被银莲花 *Anemone raddeana* Regel 的干燥根茎。20 世纪 80 年代以来先后从竹节香附中分离并鉴定出多种化学成分, 主要是三萜皂苷类, 药理活性研究发现三帖皂苷中的竹节香附素 A (raddeanin A) 在体外有细胞毒活性^[2-5], 对多种肿瘤细胞显示出较强抑制作用^[6-8]。本课题组在前期对该药的体外研究发现竹节香附素 A 对肝癌 HepG₂ 细胞有明显抑制作用, 且在一定剂量范围内随着药物浓度升高和作用时间延长抑制作用增强^[9]。因此, 有必要对竹节香附素 A 对体内肿瘤的抑制作用及其机制进行探讨。

1 材料与方法

1.1 药物及试剂

竹节香附素 A 为成都曼思特生物科技有限公司产品 (规格 20 mg/支, 质量分数 ≥ 98%, 批号 89412-79-3)。用二甲基亚砜 (DMSO) 配成 100 mg/mL 储存液, 置 -20 °C 冰箱备用。使用前用 RPMI1640 溶液稀释至所需浓度。注射用顺铂 (鲁南制药有限公司产品, 国药准字 H37021358, 10 mg/支), 用生理盐水溶解并稀释后使用。RPMI1640 培养基 (美国 Gibco 公司产品), 胎牛血清 (美国 HyClone 公司产品)。

1.2 细胞培养体系

人肝癌细胞株 HepG₂ (福建省血液病研究所细胞室提供) 复苏后用含体积分数为 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液, 于 37 °C、体积分数为 5% CO₂ 饱和湿度条件下培养, 2 d 传代一次, 2.5 g/L 胰酶/二乙胺四乙酸 (EDTA) 消化传代。实验用对数生

长期细胞, RPMI1640 培养液将细胞配制为 2×10^7 /mL 的细胞悬液备用。

1.3 裸鼠移植瘤模型的建立

BALB/c 裸鼠 (购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 动物质量合格证号 SCXH (沪) 2008-0005, 饲养于南京军区福州总医院动物中心二级动物室)。将制备好的 HepG₂ 细胞悬液, 使用前应用注射器吹吸充分混匀; 于每只裸鼠右前肢腋窝下用安尔碘消毒后接种 2×10^7 /mL 的细胞悬液 0.2 mL (每只 4×10^6 个细胞)。接种细胞后每日定时观察和记录裸鼠细胞接种部位的成瘤及饮食、活动等情况。

1.4 动物分组处理

接种瘤细胞后第 3 天确认成瘤后, 挑选肿块大小相近的荷瘤裸鼠 24 只, 以成瘤体积为标准按随机区组法将荷瘤裸鼠分为 3 组, 每组 8 只。竹节香附素 A 治疗组, 每日 ip 竹节香附素 A 15 mg/kg^[9]、顺铂组每日 ip 顺铂 5 mg/kg、对照组每日 ip 等体积生理盐水。治疗过程中隔日测量瘤体积及荷瘤鼠的体质量。治疗结束测量裸鼠荷瘤体质量及离体肿瘤质量。

1.5 瘤体积及质量测量

在体肿瘤大小的测量使用游标卡尺, 按照下列公式计算肿瘤的相对体积。实验结束后脱颈椎处死动物, 立即剥离瘤块称质量, 计算各组平均肿瘤质量及抑瘤率。

$$V = L \times W^2 \times 0.52^{[10]}$$

式中 V 为肿瘤体积, W 和 L 分别为肿瘤最长和最短的两个直径 (mm)

$$\text{抑瘤率} = (V_{\text{对照组}} - V_{\text{治疗组}}) / V_{\text{对照组}}^{[10]}$$

1.6 统计分析方法

采用 SPSS13.0 软件包进行处理, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 行单因素方差分析 (one-way ANOVA), 组间比较用 LSD- t 检验, 如果方差不齐, 则采用 Fisher 精确概率法。两样本间比较采用配对 t 检验, 抑制率用 Spearman 秩相关分析。

2 结果

2.1 竹节香附素 A 对人肝癌细胞裸鼠移植瘤的抑制作用

裸小鼠在接种瘤细胞后第 3 天, 即可触及瘤块

生长,随机分组后开始 ip 药物治疗。对照组瘤体生长迅速,竹节香附素 A 组及顺铂组瘤体生长相对缓慢,在治疗 8 d 时测量瘤体体积竹节香附素 A 组及顺铂组与对照组相比已有明显差异 ($F=5.579$, $P=0.015$),抑瘤率分别达到 48.97%和 53.71%,随着治疗时间的延长差异更加显著;与阳性对照药物顺铂治疗组相比瘤体大小及抑瘤率均未见差异,具体见表 1 和图 1。治疗结束后竹节香附素 A 组和顺铂组平均瘤体重量较轻,与对照组相比差异具有统计学

意义 ($F=17.96$, $P=0.000$)。

2.2 竹节香附素 A 对荷瘤裸鼠生存率的影响

对照组荷瘤鼠瘤体体积迅速增大,14 d 时巨大的瘤块使小鼠活动严重受限,竹节香附素 A 组和顺铂组瘤体生长相对较慢,体积较小,但顺铂治疗组可能由于药物的毒性作用较大,荷瘤裸鼠消瘦,体质量下降,并在治疗过程中出现部分荷瘤鼠死亡,存活率明显低于竹节香附素 A 治疗组(图 2)。其差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

表 1 竹节香附素 A 对 HepG₂ 细胞裸鼠移植瘤的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 1 Inhibition of raddeanin A on xenograft tumor in nude mice with transplanted HepG₂ cells ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	肿瘤体积/mm ³						肿瘤质量/g
		4 d	6 d	8 d	10 d	12 d	14 d	
对照	—	75.58±57.59	69.23±77.46	108.75±95.0	175.92±101.96	227.13±111.65	491.92±214.85	10.01±1.20
顺铂	15	88.3±55.07	51.06±29.91	50.34±16.32	64.86±16.4*	76.94±17.66**	113.78±25.2**	5.14±1.25
竹节香附素 A	5	69.53±40.75	52.03±26.58	55.5±28.49	55.28±27.78*	72.08±38.66**	143.94±28.6**	5.05±0.87

与对照组相比: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$; ** $P<0.01$ vs control group

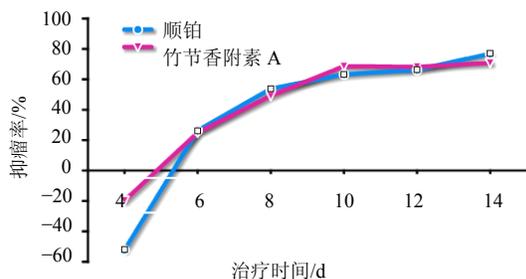


图 1 竹节香附素 A 对 HepG₂ 细胞裸鼠移植瘤的生长抑制作用

Fig. 1 Inhibition of raddeanin A on xenograft tumor in nude mice with transplanted HepG₂ cells

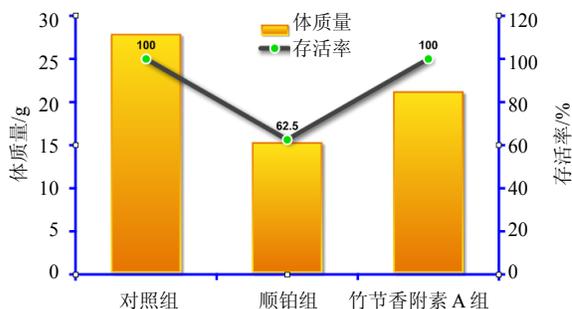


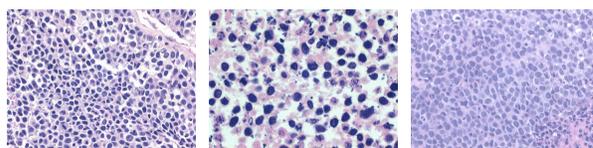
图 2 竹节香附素 A 对荷瘤鼠体质量及存活率的影响

Fig. 2 Effect of raddeanin A on body weight and survival rate of tumor-bearing nude mice

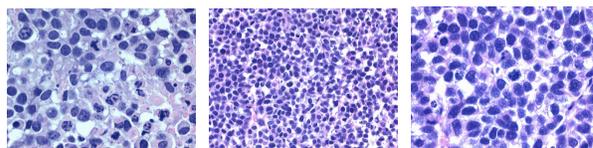
2.3 竹节香附素 A 对肿瘤组织病理学影响

对照组移植瘤呈皮下生长的单个瘤块,明显突

出体表,与皮肤粘连,切面中心坏死,镜下瘤体为密集排列的瘤细胞组成,间质较少,瘤细胞呈不规则圆形,核浆比例大,核仁不明显。竹节香附素 A 治疗组及 DDP 治疗组瘤体小,瘤细胞明显减少,细胞核固缩(图 3)。



竹节香附素 A 组(×200) 竹节香附素 A 组(×400) 顺铂组(×200)



顺铂组(×400) 对照组(×200) 对照组(×400)

图 3 瘤体病理学改变

Fig. 3 Histological change of tumor pathology

3 讨论

竹节香附载于明朝刘文泰所著《本草品汇精要》,早在清代,王旭高的“定癌散”曾以两头尖治疗乳癌。近年来,对竹节香附素活性成分研究发现其对人肝癌细胞 HepG₂、胃癌细胞 BGC823、宫颈癌细胞 HeLa,肺癌细胞 LAX、乳腺癌 Bre-04、肠癌 Col-6 细胞及小鼠 L929 成纤维细胞株等多种肿瘤细胞均有增殖抑制作用^[6-10]。但这些研究都是针对体外试验,其体内抗肿瘤作用效果如何尚不明确。

本研究在前期体外试验的基础上,重点观察了竹节香附A对人肝癌HepG₂细胞裸鼠移植瘤的治疗作用,结果发现竹节香附素A对裸鼠皮下移植瘤生长增殖具有明显抑制作用,于治疗第6天抑瘤率为24.84%;治疗早期就呈现出了抑制肿瘤生长的作用,并随着治疗时间的延长这种抑制作用进一步加强,呈时间相关性,对移植瘤生长抑制率与阳性对照药物顺铂具相似的效果。表明竹节香附素A在体内仍具有强效、快速的抗肿瘤作用,具有潜在的药用价值。但是当治疗至12d时抑制肿瘤作用趋势有所变缓,可能与治疗后期移植瘤皮下血流分布不均与供血减少,药物分布也相对减少有关。竹节香附素A在本研究中显示出了较好的抑制人肝癌裸鼠移植瘤生长的效果,虽然并没有达到使肿瘤彻底消除的效果。但在临床上可以针对肿瘤组织类型,配合介入、放疗有可能会延长中晚期肝癌患者的生存期。

在研究过程中还发现竹节香附素A治疗后,荷瘤裸鼠精神状况良好,活动较为频繁,饮食量未减少,形体较丰满,无死亡;而顺铂治疗组,裸鼠进食量明显减少,精神状况逐渐变差,消瘦,体重进行性下降,试验过程中就有较多(37.5%)裸鼠因逐渐衰竭而死亡。顺铂属细胞周期非特异性抗肿瘤药物,具有细胞毒性,可抑制癌细胞的DNA复制过程,并损伤其细胞膜上结构,有较强的广谱抗癌作用。临床用于多种实体肿瘤的治疗,也是目前肝癌肝动脉栓塞化疗中最常用的化疗药物。顺铂的药理机制主要与瘤细胞DNA的碱基作用变构DNA形成数种加合物,改变其作为正常复制模板的功能,引起DNA复制障碍,从而抑制瘤细胞分裂,发挥抗肿瘤细胞毒作用。但顺铂的这种作用并无特异性,在杀死肿瘤细胞的同时,也造成机体正常细胞的死

亡,因此对机体的毒性较严重。竹节香附素A作为一种植物中提取的抗肿瘤药物,副作用及不良反应较少,与细胞毒性药物相比具有更好的安全性。竹节香附素A抑制肿瘤生长的具体机制尚未完全阐明,从已有的研究结果来看,其抗肿瘤的作用机制主要是通过抑制肿瘤血管生长、促进肿瘤细胞凋亡,诱导肿瘤细胞分化等发挥抗肿瘤作用^[7-9]。其确切机制有待在以后的研究中进一步探讨,为竹节香附素A治疗恶性肿瘤提供更多的理论依据。

参考文献

- [1] 张思维,郑荣寿,李霓,等.中国肝癌发病趋势分析和预测[J].中华预防医学杂志,2012,46(7):587-592.
- [2] 中国药典[S].一部.2000.
- [3] 吴风镗,朱子清.中药竹节香附化学成分的研究[J].化学学报,1985,43:692-697.
- [4] 匡海学,田振坤,张宁,等.两头尖的化学成分研究[J].中草药,1996,27(6):328-330.
- [5] 刘大有,李向高,李树殿.两头尖有效成分三萜皂苷的分离与鉴定[J].中草药,1984,15(4):34.
- [6] 张嘉岷,曹莉,吴争鸣.竹节香附中三萜类成分的抗肿瘤活性研究[J].中国新药杂志,2003,12(3):191-193.
- [7] 薛刚,邹玺,王瑞平.竹节香附素A抗肿瘤研究进展[J].浙江中医药大学学报,2014,38(2):224-226.
- [8] 刘丹,张蕾,张彦飞,等.竹节香附素A的体外抗肿瘤活性研究[J].中药药理与临床,2014,(2):49-53.
- [9] 林小钦,李东良,杨才生,等.竹节香附素A对人肝癌细胞HepG₂增殖的抑制作用[J].现代药理与临床,2009,24(1):49-51.
- [10] 李东良,吕联煌,林锦娟,等.新型bcl-2反义寡核苷酸F951对人白血病裸鼠移植瘤的治疗作用[J].中国药理学通报,2009,25(2):230-234.