

草苈蓉环烯醚萜苷对 H₂₂ 小鼠肝癌移植瘤的抑瘤作用

金爱花¹, 朴 龙², 尹学哲², 全吉淑^{3*}

1. 延边大学附属医院 检验科, 吉林 延吉 133000

2. 延边大学附属医院 内科学教研室, 吉林 延吉 133000

3. 延边大学基础医学院 生物化学与分子生物学教研室, 吉林 延吉 133000

摘 要: **目的** 探讨草苈蓉环烯醚萜苷对小鼠 H₂₂ 移植瘤的生长抑制作用。**方法** 建立小鼠皮下 H₂₂ 移植瘤模型, 将实验动物分为模型组、草苈蓉环烯醚萜苷高、中、低剂量 (400、200、100 mg/kg) 组和 5-Fu (25 mg/kg) 组, 草苈蓉环烯醚萜苷组连续 ig 给药 10 d; 5-Fu 组隔日 ip 给药, 给药 5 次, 计算抑瘤率、胸腺指数和脾脏指数, 并以 ELISA 法检测血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-2 (IL-2), 比色法检测血清总抗氧化活力 (T-AOC) 和丙二醛 (MDA) 水平。**结果** 与模型组比较, 草苈蓉环烯醚萜苷能显著减轻移植瘤质量, 高、中、低剂量组抑瘤率分别为 38.05%、34.98%、26.95%。同时, 明显升高荷瘤小鼠的脾脏指数, 升高血清 IL-2 水平和降低 TNF- α 水平, 升高血清 T-AOC 和降低 MDA 水平。**结论** 草苈蓉环烯醚萜苷对 H₂₂ 移植瘤具有明显的抑制作用, 其作用机制可能与调节 IL-2 和 TNF- α 等细胞因子的表达以及增强荷瘤小鼠抗氧化能力有关。

关键词: 草苈蓉; 环烯醚萜苷; H₂₂; 抗肿瘤; 抗氧化

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)02-0332-04

Anti-tumor effect of iridoid glucosides from *Boschniakia rossica* in H₂₂-bearing mice

JIN Ai-hua¹, PIAO Long², YIN Xue-zhe², QUAN Ji-shu³

1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, China

2. Department of Internal Medicine, Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, China

3. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medicine, Yanbian University, Yanji 133000, China

Abstract: Objective To investigate the anti-tumor effect of iridoid glucosides from *Boschniakia rossica* (IGBR) in H₂₂-bearing mice. **Methods** The H₂₂ transplanted mouse models were established and randomly divided into five groups: model, high-, medium- and low-dose IGBR, and 5-Fu groups. Mice were ig treated with 400, 200, and 100 mg/kg IGBR once daily for 10 d, and with ip 5-Fu 25 mg/kg every other day for five times, then the inhibition ratios of tumor growth and indexes of spleen and thymus were calculated. The serum tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-2 (IL-2) were determined with ELISA method. The total anti-oxidant capacity (T-AOC) and malondialdehyde (MDA) level were detected by colorimetric method. **Results** The administration with 400, 200, and 100 mg/kg·d IGBR inhibited the growth of transplanted tumor with the inhibitory ratios of 38.05%, 34.98%, and 26.95%, respectively. In addition, IGBR treatment elevated the spleen index and serum IL-2 level, reduced the serum TNF- α level, increased the serum T-AOC, and decreased serum MDA level of H₂₂-bearing mice. **Conclusion** IGBR could exhibit an inhibitory effect on the growth of transplanted H₂₂ tumor, probably via the regulation of IL-2 and TNF- α expression as well as improvement of anti-oxidant capability of H₂₂-bearing mice.

Key words: *Boschniakia rossica* (Cham. et Schlecht.) Fedtsch.; iridoid glucosides; H₂₂; anti-tumor; anti-oxidant

草苈蓉 *Boschniakia rossica* (Cham. et Schlecht.) Fedtsch. 为列当科草本植物, 具有补肾壮阳、润肠止血等功效, 主治肾虚阳痿、腰膝冷痛、肠燥便秘、功能性子宫出血等。主要分布于我国东北长白山

区, 在民间被誉为“不老草”。近年研究结果表明, 草苈蓉具有清除自由基和抗脂质过氧化作用^[1], 能提高肝枯否细胞的免疫活性^[2], 抑制大鼠肝脏化学致癌过程^[3]。本研究通过建立 H₂₂ 肝癌移植瘤模型,

收稿日期: 2011-08-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30360113); 吉林省科技发展计划资助项目 (200705426)

作者简介: 金爱花 (1984—), 女, 吉林龙井人, 硕士研究生, 医师, 研究方向为分子肿瘤学。E-mail: aihua1028@sina.com

*通讯作者 全吉淑 E-mail: quanjs@ybu.edu.cn

观察草苳蓉环烯醚萜苷对 H₂₂ 肝癌小鼠的抑瘤作用及免疫增强作用, 为其临床应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性昆明种小鼠, 体质量为 18~22 g, 普通级, 合格证号: SCXK (吉) 2007-0004, 由延边大学医学院动物科提供; 小鼠 H₂₂ 肝癌细胞株由延边大学基础医学院预防医学教研部韩春姬教授惠赠。5-氟尿嘧啶 (5-Fu) 购自上海旭东海普药业有限公司, 批号为 20090512; 小鼠白细胞介素-2 (IL-2)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA 试剂盒购自北京世都行生物科技开发中心; 蛋白质测试盒、丙二醛 (MDA) 测试盒和总抗氧化活力 (T-AOC) 测试盒购自南京建成生物技术研究所。草苳蓉 *Boschniakia rossica* (Cham. et Schlecht.) Fedtsch. 采自吉林省长白山, 由延边大学药学院刘勇镇教授鉴定。

1.2 方法

1.2.1 草苳蓉环烯醚萜苷的制备 将 10 kg 草苳蓉全草切碎后用 90% 乙醇提取, 将提取液减压浓缩, 获草苳蓉醇提取物 1.86 kg。将醇提取物加水溶解, 在等体积二氯甲烷中进行萃取分离。取其水层提取物, 过 MCI-gel CHP20P 凝胶柱 (Mitsubishi Chemical Co.), 用 10%~100% 甲醇梯度洗脱, 收集 50% 甲醇洗脱部分, 经高效液相色谱分离得到草苳蓉环烯醚萜苷, 其主要成分为草苳蓉纳拉苷 (boschnaloside, 49.1%) 和 7-脱氧表马钱子酸 (30.3%)。

1.2.2 H₂₂ 皮下移植瘤模型制备 常规方法复苏 H₂₂ 小鼠肝癌细胞, 取 0.2 mL 细胞悬液注射到雄性昆明小鼠腹腔内, 连续传两代。无菌操作取第 2 代腹水, 用无菌生理盐水稀释, 调整细胞密度为 1×10^7 个/mL, 取 0.2 mL 瘤细胞悬液接种到雄性昆明小鼠的右腋窝皮下^[4]。

1.2.3 动物分组及处理 接种后第 2 天, 小鼠随机分成模型组, 草苳蓉环烯醚萜苷高、中、低剂量 (400、200、100 mg/kg) 组和 5-Fu 组, 每组 10 只。草苳蓉环烯醚萜苷各给药组 ig 给药, 每日 1 次, 共 10 次; 5-Fu 组按 25 mg/kg 剂量隔日 ip 给药 1 次, 共 5 次; 模型组则以生理盐水替代药物 ig 给以小鼠药。各组动物给药第 10 天停药, 禁食不禁水 16 h 后处死。另取 10 只正常小鼠设为对照组, 每天 ig 生理盐水, 共 10 d。

1.2.4 小鼠 H₂₂ 肝癌皮下移植瘤的抑瘤率、免疫器官指数以及血清相关指标的测定 分别称取小鼠体

质量、瘤质量, 计算抑瘤率。并称取胸腺、脾脏质量, 计算胸腺指数和脾脏指数。眼眶取血, 分离血清, ELISA 法检测血清 TNF- α 和 IL-2, 比色法检测血清 T-AOC 和 MDA 水平。

抑瘤率 = (模型组瘤质量 - 药物组瘤质量) / 模型组瘤质量

胸腺 (脾脏) 指数 = 胸腺 (脾脏) 质量 / 体质量

1.2.5 统计学分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数比较采用单因素方差分析, 以 SPSS 11.5 统计软件进行统计学处理。

2 结果

2.1 对荷瘤小鼠肿瘤生长的影响

草苳蓉环烯醚萜苷低、中、高剂量组小鼠肝癌 H₂₂ 移植瘤的生长明显受到抑制, 与模型组比较, 草苳蓉环烯醚萜苷低、中、高剂量组和 5-Fu 组荷瘤小鼠瘤质量显著减轻 ($P < 0.05$); 而草苳蓉环烯醚萜苷低、中、高剂量组之间无显著差异 ($P > 0.05$)。与 5-Fu 组比较, 草苳蓉环烯醚萜苷各剂量组小鼠瘤质量均显著增加 ($P < 0.05$), 草苳蓉环烯醚萜苷各剂量组抑瘤率明显低于 5-Fu 组。结果见表 1。

表 1 草苳蓉环烯醚萜苷对肝癌 H₂₂ 移植瘤小鼠肿瘤生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组 别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	瘤质量 / g	抑瘤率 / %
模型	—	1.83 ± 0.32	—
5-Fu	25	0.52 ± 0.25*	71.25
草苳蓉环烯醚萜苷	100	1.24 ± 0.39* [#]	32.09
	200	1.22 ± 0.37* [#]	33.48
	400	1.19 ± 0.26* [#]	35.08

与模型组比较: * $P < 0.05$; 与 5-Fu 组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs model group; [#] $P < 0.05$ vs 5-Fu group

2.2 对荷瘤小鼠体质量及免疫器官指数的影响

实验末期草苳蓉环烯醚萜苷高剂量组小鼠脾脏指数与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$), 与草苳蓉环烯醚萜苷低、中剂量组比较差异显著 ($P < 0.05$)。但草苳蓉环烯醚萜苷各剂量组小鼠体质量和胸腺指数与模型组比较无明显变化 ($P > 0.05$)。5-Fu 组小鼠体质量、胸腺指数和脾脏指数均低于模型组 ($P < 0.05$), 也低于草苳蓉环烯醚萜苷各组 ($P < 0.05$)。结果见表 2。

2.3 对荷瘤小鼠血清 TNF- α 和 IL-2 水平的影响

与对照组比较, 模型组小鼠 TNF- α 水平显著升

高 ($P<0.05$), IL-2 水平显著降低 ($P<0.05$)。与模型组比较, 草苳蓉环烯醚萜苷低、高剂量组和 5-Fu 组 TNF- α 水平显著降低 ($P<0.05$), 而草苳蓉环烯醚萜苷各剂量组和 5-Fu 组 IL-2 水平显著升高 ($P<0.05$)。结果见表 3。

2.4 对荷瘤小鼠血清抗氧化指标的影响

与对照组比较, 模型组小鼠 MDA 水平显著升

高 ($P<0.05$), 但 T-AOC 无显著性差异。与模型组比较, 草苳蓉环烯醚萜苷各剂量组小鼠血清 MDA 水平显著降低 ($P<0.05$), 血清 T-AOC 水平显著升高 ($P<0.05$); 草苳蓉环烯醚萜苷各剂量组小鼠血清 T-AOC 也明显高于 5-Fu 组 ($P<0.05$); 草苳蓉环烯醚萜苷高剂量组 T-AOC 与其低、中剂量组比较差异显著 ($P<0.05$)。结果见表 3。

表 2 草苳蓉环烯醚萜苷对肝癌 H₂₂ 移植瘤小鼠体质量及免疫器官指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of IGBR on body weight as well as spleen and thymus indexes of H₂₂-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组 别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	体质量 / g		胸腺指数 / (mg·g ⁻¹)	脾脏指数 / (mg·g ⁻¹)
		实验前	实验后		
模型	—	16.88 ± 1.34	30.20 ± 3.55	2.52 ± 0.84	5.10 ± 1.10
5-Fu	25	17.44 ± 1.27	25.32 ± 3.54 [*]	0.84 ± 0.34 [*]	3.00 ± 0.76 [*]
草苳蓉环烯醚萜苷	100	16.79 ± 1.49	31.43 ± 2.24 [#]	2.82 ± 0.57 [#]	6.03 ± 0.95 [#]
	200	16.34 ± 1.48	32.00 ± 4.02 [#]	2.52 ± 0.64 [#]	5.28 ± 1.00 [#]
	400	16.86 ± 1.54	32.57 ± 2.67 [#]	2.57 ± 0.47 [#]	7.14 ± 1.81 ^{*##△}

与模型组比较: ^{*} $P<0.05$; 与 5-Fu 组比较: [#] $P<0.05$; 与草苳蓉环烯醚萜苷 100、200 mg/kg 组比较: [△] $P<0.05$

^{*} $P<0.05$ vs model group; [#] $P<0.05$ vs 5-Fu group; [△] $P<0.05$ vs 100 and 200 mg/kg IGBR groups

表 3 草苳蓉环烯醚萜苷对肝癌 H₂₂ 移植瘤小鼠血清 TNF- α 、IL-2 水平和抗氧化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of IGBR on levels of TNF- α and IL-2, and anti-oxidant indexes of serum in H₂₂-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组 别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	TNF- α / (ng·L ⁻¹)	IL-2 / (ng·L ⁻¹)	T-AOC / (U·mL ⁻¹)	MDA / (nmol·mg ⁻¹)
对照	—	64.70 ± 1.41	242.71 ± 19.20	12.10 ± 1.22	6.23 ± 0.40
模型	—	83.97 ± 5.15 [▲]	181.49 ± 21.85 [▲]	11.10 ± 0.64	13.10 ± 0.98 [▲]
5-Fu	25	72.35 ± 2.75 ^{▲*}	217.32 ± 10.02 ^{▲*}	9.37 ± 1.60	8.11 ± 2.42 [*]
草苳蓉环烯醚萜苷	100	76.91 ± 5.6 ^{▲*}	217.32 ± 46.76 [*]	15.90 ± 1.36 ^{▲#}	8.8 ± 0.21 ^{▲*}
	200	81.17 ± 6.23 ^{▲#}	223.81 ± 14.19 ^{▲*}	15.30 ± 2.83 [#]	10.00 ± 2.01 ^{▲*}
	400	76.76 ± 4.6 ^{▲*}	222.63 ± 20.87 ^{▲*}	21.80 ± 2.56 ^{▲*##△}	8.93 ± 1.74 [*]

与对照组比较: [▲] $P<0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$; 与 5-Fu 组比较: [#] $P<0.05$; 与草苳蓉环烯醚萜苷 100、200 mg/kg 组比较: [△] $P<0.05$

[▲] $P<0.05$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ vs model group; [#] $P<0.05$ vs 5-Fu group; [△] $P<0.05$ vs 100 and 200 mg/kg IGBR groups

3 讨论

环烯醚萜类化合物是一类具有广泛药理活性的天然产物^[5]。本实验通过 H₂₂ 小鼠肝癌移植瘤模型, 证明了草苳蓉环烯醚萜苷的抗肿瘤作用。结果表明, 草苳蓉环烯醚萜苷对小鼠 H₂₂ 肝癌移植瘤生长有一定抑制作用, 其抑瘤率约为 35%, 虽然其抑瘤作用不如 5-Fu 强, 但能减少因化疗所致荷瘤小鼠体质量减轻和免疫力低下等不良反应, 能够提高荷瘤小鼠的脾脏指数, 增加体质量。

肿瘤发生和发展过程中, 体内免疫机制受到严重损害。而 IL-2 是重要的淋巴因子之一, 在调节免疫反应中起重要作用^[6]。IL-2 水平在某种程度上反映细胞免疫能力, 因此, IL-2 降低是肿瘤患者细胞

免疫功能受损的一重要标志。本研究结果表明, 肝癌 H₂₂ 移植瘤小鼠血清 IL-2 较正常小鼠显著降低, 而草苳蓉环烯醚萜苷给药后荷瘤小鼠血清 IL-2 水平明显升高。结合脾脏指数和胸腺指数等相关指标可知, 草苳蓉环烯醚萜苷可能在肿瘤免疫中起着一定的调节作用。

肿瘤细胞还以自分泌和旁分泌方式表达多种细胞因子, 这些细胞因子可以调节肿瘤细胞的生长。如多种恶性肿瘤患者血清中 TNF- α 等细胞因子表达明显升高, 其表达上调与恶性肿瘤的治疗及预后密切相关^[7]。本研究中, 肝癌 H₂₂ 移植瘤小鼠血清 TNF- α 较正常小鼠升高, 而草苳蓉环烯醚萜苷给药后荷瘤小鼠血清 TNF- α 却降低, 趋向于正常水平。

这说明草苋蓉环烯醚萜苷抗肿瘤作用时,可通过诱导细胞凋亡等多种方式导致肿瘤细胞数目的减少,从而引起分泌到循环系统中TNF- α 等细胞因子水平相应降低。因此,TNF- α 变化可能反映了草苋蓉环烯醚萜苷抗肿瘤作用的药用效果,至于TNF- α 变化本身是否参与了其抗肿瘤的病生过程,尚需进一步探讨。目前也有研究表明中药的抗肿瘤活性和增强机体免疫作用与其能诱生TNF- α 有关^[8],这与本实验所测结果相矛盾。考虑到TNF- α 对肿瘤生长的双重作用,草苋蓉环烯醚萜苷对肿瘤免疫的影响仍需进一步探讨。

研究表明,自由基产生和消除失衡与肿瘤发生发展有密切关系。MDA是脂质过氧化物的主要分解产物,其水平常常反映组织脂质过氧化程度。本实验结果表明,草苋蓉环烯醚萜苷能降低H₂₂荷瘤小鼠血清MDA水平,提高血清总抗氧化能力,提示草苋蓉抗肿瘤作用可能还与其抗氧化作用有关。

总之,草苋蓉环烯醚萜苷对小鼠H₂₂移植瘤有一定的抗肿瘤作用,可调节IL-2和TNF- α 等细胞

因子的表达,提高机体抗氧化能力。此研究对草苋蓉的开发利用具有一定的指导意义。

参考文献

- [1] Tsuda T, Sugaya A, Liu Y Z, *et al.* Radical scavenger-effect of *Boschniaria rossica* [J]. *J Ethnopharmacol*, 1994, 41: 85-90.
- [2] 朴玉仁,姜玉顺,李英信,等.草苋蓉对损伤肝枯否细胞免疫活性的影响[J].中草药,1994,25(4): 200-201.
- [3] 汪霞,周微,李天,等.草苋蓉环烯醚萜对肝癌前病变大鼠血清标志酶及抗氧化酶活性的影响[J].食品科技,2010,35(7): 242-245.
- [4] 李坤星,朱学萍,张海林,等.桑黄云芝胶囊对小鼠肉瘤S₁₈₀及肝癌H₂₂移植性肿瘤生长的抑制作用[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(7): 83-84.
- [5] 郭建华,田成旺,刘 晓,等.中药环烯醚萜类化合物研究进展[J].药物评价研究,2011,34(4): 293-297.
- [6] 杨贵贞.边缘免疫学[M].北京:科学出版社,2002.
- [7] 熊术道,尹丽慧,李景荣,等.苦瓜蛋白抗肿瘤作用及其分子机制[J].中草药,2008,39(3): 408-411.
- [8] 肖顺汉,刘明华,钟琳,等.克癌新对荷瘤小鼠IL-2、IL-6、IL-12、TNF- α 水平的影响[J].中药药理与临床,2008,24(2): 82-86.