

胡桃楸茎枝含药鸡蛋对小鼠 H22 肝癌实体瘤的抑制作用

王添敏¹, 俞文婕¹, 付莹¹, 邸学¹, 翟延君^{1*}, 张慧¹, 陈虎彪^{2*}

1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600

2. 香港浸会大学 中医药学院, 香港

摘要: 目的 研究胡桃楸 *Juglans mandshurica* Maxim. 茎枝含药鸡蛋 (与胡桃楸茎枝同煮的鸡蛋) 对小鼠体内 H22 肝癌实体瘤的抗肿瘤活性。方法 采用荷 H22 肝癌实体瘤小鼠模型, 以肿瘤质量、抑瘤率为指标研究胡桃楸茎枝含药鸡蛋对肿瘤生长的抑制作用, 以免疫器官指数、外周血象为指标考察对荷瘤机体生存质量的影响。结果 胡桃楸茎枝含药鸡蛋在 0.64、1.28、2.56 g/kg 剂量下对小鼠肝癌 H22 实体瘤的生长均有较好的抑制作用, 呈一定的量效关系。实验结束时, 对照组、模型组和各含药鸡蛋组小鼠的体质量均增加。胡桃楸含药鸡蛋组胸腺指数、脾脏指数明显升高, 外周红细胞数、血红蛋白含量提高, 总白细胞数降低。结论 胡桃楸茎枝含药鸡蛋对 H22 细胞具有较好的抗肿瘤作用。

关键词: 胡桃楸茎枝; 含药鸡蛋; H22 细胞; 抗肿瘤

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2017)03-0365-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.03.002

Inhibitory effect of the eggs decocted with branches of *Juglans mandshurica* on solid tumor of murine H22 hepatocarcinoma cell in mice

WANG Tian-min¹, YU Wen-jie¹, FU Ying¹, Di Xue¹, ZHAI Yan-jun¹, ZHANG Hui¹, CHEN Hu-biao²

1. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

2. School of Chinese Medicine, Hong Kong Baptist University, Hong Kong, China

Abstract: Objective To evaluate the anti-tumor activity of the eggs decocted with branches of *Juglans mandshurica* against murine H22 hepatocarcinoma cell in mice. **Methods** Mice bearing H22 tumor models were set up. Tumor weight and inhibition ratio of tumor growth were obtained for the evaluation of the anti-tumor activity. And immune organ index and hematological parameters were determined to estimate the protective effects on these functions of H22 tumor bearing mouse. **Results** The eggs decocted with branches of *J. mandshurica* at dose of 0.64, 1.28, and 2.56 g/kg showed inhibitory effect on the growth of tumor tissues, in a dose-and time-dependent manner. Body weights of mice in control group, model group, and eggs decocted with branches of *J. mandshurica* group were increased after treatment. The thymus index and spleen index in eggs decocted with branches of *J. mandshurica* group were significantly increased, the number of peripheral red blood cells and hemoglobin were improved, but the numbers of white blood cells were decreased. **Conclusion** The eggs decocted with branches of *J. mandshurica* has good anti-tumor effect against H22 cell.

Key words: branch of *Juglans mandshurica* Maxim.; eggs decocted with drugs; H22 cell; anti-tumor activity

胡桃楸 *Juglans mandshurica* Maxim. 又称核桃楸, 为胡桃科植物^[1], 属落叶乔木, 在我国东北、华北地区资源丰富。胡桃楸的根、枝、青果皮均可入药^[2], 民间常用其水煎液与鸡蛋同煮治

疗肿瘤, 轻者可只吃鸡蛋, 重者蛋汤同吃。“轻者可只吃鸡蛋”提示与胡桃楸同煮的鸡蛋 (含药鸡蛋) 也具有与水煎液相同的抗肿瘤作用。实验研究表明, 胡桃楸根、枝和果在体内外均显示一定

收稿日期: 2016-11-09

基金项目: 辽宁省自然科学基金资助项目 (2015020711); 辽宁省高等学校杰出青年学者成长计划项目 (LJQ2014099); 辽宁中医药大学杏林学者青蓝工程项目 (2015)

作者简介: 王添敏 (1980—), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 中药药效物质基础。E-mail: wang_tm@163.com

*通信作者 翟延君 (1956—), 女, 博士, 教授, 研究方向: 中药品质评价。E-mail: lnzyzyj@sohu.com

陈虎彪 (1962—), 男, 博士, 教授, 研究方向: 中药资源开发。E-mail: hbchen@hkbu.edu.hk

的抗肿瘤作用^[3-6]。为了明确胡桃楸含药鸡蛋是否具有抗肿瘤作用,为胡桃楸与鸡蛋同煮的传统用法做出科学解释,本实验将鸡蛋与胡桃楸茎枝同煮制备了胡桃楸茎枝的含药鸡蛋,以荷瘤小鼠为模型,对含药鸡蛋的体内抗肿瘤作用以及对机体正常功能的影响进行了研究。

1 材料

1.1 试药

胡桃楸茎枝于 2011 年 7 月采自辽宁省普兰店市莲山镇老白山,经辽宁中医药大学翟延君教授鉴定为胡桃科植物胡桃楸 *Juglans mandshurica* Maxim. 的茎枝。凭证标本编号 201107ZHI01,保存于辽宁中医药大学研发中心 F205。市售新鲜鸡蛋,用时购买。环磷酸胺,质量分数 >98%,批号 20130326,购于大连美仑生物有限公司,临用前在无菌条件下采用灭菌的生理盐水配制成 3 mg/mL 的溶液。

1.2 实验动物及细胞株

实验用 SPF 级 ICR 小鼠,体质量 18~22 g,雌雄各半,购于大连医科大学实验动物中心,动物使用合格证号 SCXX(辽)2012-0002,实验前在实验室环境适应 1 周。肿瘤细胞为小鼠肝癌腹水细胞系 H22,购于南京凯基生物科技发展有限公司,经本实验室传代冷冻保存。

1.3 试剂与仪器

生理盐水(吉林省都邦药业股份有限公司),娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈纯净水有限公司)。万分之一电子分析天平(德国赛多利斯公司),电热恒温水浴锅(上海博迅实业有限公司),TDZ4-WS 低速台式离心机(湖南湘仪实验仪器有限公司),倒置显微镜(日本 Olympus 公司)、FD-1-50 真空冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司),BC-2600vet 全自动血液分析仪(迈瑞公司),7020 全自动生化分析仪(株式会社日立制作所)。

2 方法

2.1 胡桃楸茎枝含药鸡蛋和空白鸡蛋的制备

胡桃楸茎枝样品切片后冷冻干燥、粉碎、过 40 目筛。取 2 枚鸡蛋,称定质量,加入等质量的胡桃楸茎枝粉末,10 倍量水煎煮。约煮沸 5 min,鸡蛋蛋白质稍凝固后,将鸡蛋打碎继续煎煮,共煎煮 4 h。取出鸡蛋,置于搅拌机中,加入适量水搅拌粉碎,制成鸡蛋的水混悬液,-20℃预冻后,放入冷冻干燥仪中在-50℃、6 Pa 的条件下冷冻干燥,得到胡桃楸茎枝含药鸡蛋粉末,得率为 18.3%,密封避光

保存于 4℃冰箱中。临用前采用蒸馏水超声混悬,配制成 32、64、128 g/L 的含药鸡蛋混悬液。

按照上述方法不加胡桃楸茎枝样品粉末,制备空白鸡蛋粉末。临用前采用蒸馏水超声混悬,配制成 128 g/L 空白鸡蛋混悬液。

2.2 小鼠 H22 肝癌实体瘤模型的建立

参考文献报道方法^[7-8],将传至 3~4 代、生长 7~10 d 的 H22 腹水小鼠脱颈椎处死,无菌条件下吸取乳白色的腹水,并用生理盐水按一定比例稀释成瘤细胞悬液,台盼蓝拒染法计数活 H22 细胞浓度为 5×10^6 /mL。随机取健康 ICR 小鼠 60 只,将瘤细胞悬液按 0.2 mL/只接种于小鼠右腋窝皮下。实验结束时(10 d 后),模型组平均瘤质量应大于 1 g。

2.3 分组和给药

接种 24 h 后,随机将小鼠分为 6 组,分别为对照组、模型组、环磷酸胺(30 mg/kg)组、空白鸡蛋(2.56 g/kg)组以及胡桃楸含药鸡蛋(0.64、1.28、2.56 g/kg)组,每组 10 只,另随机取 10 只小鼠,右腋下注射 0.2 mL/只生理盐水作为对照组。各组分笼喂养,自由饮水和摄食。以 20 mL/kg ig 或 10 mL/kg ip 给予不同药物,1 次/d,连续 10 d。对照组、模型组 ig 蒸馏水,胡桃楸含药鸡蛋组分别 ig 32、64、128 g/L 胡桃楸含药鸡蛋混悬液,空白鸡蛋组 ig 128 g/L 空白鸡蛋混悬液,环磷酸胺组 ip 3 g/L 环磷酸胺生理盐水溶液。

胡桃楸含药鸡蛋的剂量参照等效剂量折算法^[7]进行换算,以人每天服用胡桃楸生药量为 50 g,体质量为 60 kg;小鼠体质量为 20 g,换算得到小鼠每天给药剂量以生药计为 7 g/kg。含药鸡蛋粉末的得率为 18.3%,折算小鼠每天 ig 含药鸡蛋粉末的剂量为 1.28 g/kg,以此作为中剂量组,按 1:2 的比例分别向上和向下设置高、低剂量组。

2.4 血液样品的处理

末次给药 24 h 后,称小鼠体质量,眼眶静脉采血。采集的血液收集于吸附有 EDTA-二钾的 EP 管,采用全自动血液分析仪检测小鼠红细胞数、白细胞数、血小板数和血红蛋白含量等指标。

2.5 组织样品的处理

小鼠采血后,颈椎脱臼处死,剥离肿瘤,剖取胸腺、脾脏,分析天平称量、记录各组织质量。计算各组抑瘤率、10 g 体质量胸腺指数和 10 g 体质量脾脏指数。

抑瘤率 = (模型组瘤质量 - 实验组瘤质量) / 模型组瘤质量

胸腺指数 = 10 × 胸腺质量 (mg) / 体质量 (g)

脾脏指数 = 10 × 脾脏质量 (mg) / 体质量 (g)

2.6 数据分析

使用 SPSS 19.0 软件对数据进行分析, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析组间的差异。

3 结果

3.1 一般行为学观察

模型组、含药鸡蛋组和空白鸡蛋组小鼠在接种肿瘤细胞 3~5 d 后, 于腋下明显见到肿瘤组织, 饮食、饮水量与对照组无明显差异, 但模型组活动减少, 1 只小鼠死亡; 胡桃楸含药鸡蛋各剂量组小鼠反应状态与对照组无明显差异, 均未死亡; 空白鸡蛋组小鼠反应状态与对照组无明显差异, 3 只小鼠死亡。环磷酰胺组小鼠一直未在腋下见到明显的肿瘤组织, 该组小鼠精神状态和反应尚可, 饮食量显著低于对照组, 无小鼠死亡。见表 1。

3.2 胡桃楸茎枝含药鸡蛋对荷 H22 肝癌小鼠肿瘤生长的抑制作用

模型组肿瘤平均质量为 1.47 g, 提示实验模型建立成功。胡桃楸茎枝含药鸡蛋在 0.64、1.28、2.56 g/kg 剂量下对小鼠肝癌 H22 实体瘤的生长均有较好的抑制作用, 各给药组的肿瘤质量均显著低于模型组, 其抑瘤率分别为 31.11%、47.19%、60.80%, 呈一定的量效关系。空白鸡蛋组给药剂量 (2.56 g/kg) 与含药鸡蛋 2.56 g/kg 组给药剂量相同, 抑瘤率为 48.98%, 低于含药鸡蛋 2.56 g/kg 组。环磷酰胺组的抑瘤率为 91.53%, 明显高于各含药鸡蛋组。见表 1。

3.3 胡桃楸茎枝含药鸡蛋对荷 H22 肝癌小鼠体质量和免疫功能的影响

实验结束时, 对照组、模型组和各含药鸡蛋组小鼠的体质量均增加, 但环磷酰胺组小鼠体质量反而减轻, 见表 2, 提示环磷酰胺的副作用明显。

表 1 胡桃楸茎枝含药鸡蛋对荷 H22 肝癌细胞小鼠肿瘤生长的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Inhibition of eggs decocted with branches of *Juglans mandshurica* against growth of H22 cell in mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	动物数量/只		肿瘤质量/g	抑瘤率/%
		开始	结束		
对照	—	10	10	—	—
模型	—	10	9	1.47 ± 0.20	—
环磷酰胺	0.03	10	10	0.10 ± 0.02***	91.53
空白鸡蛋	2.56	10	7	0.72 ± 0.19**	48.98
含药鸡蛋	0.64	10	10	1.01 ± 0.25**	31.11
	1.28	10	10	0.78 ± 0.33**	47.19
	2.56	10	10	0.58 ± 0.19***	60.80

与模型组比较: **P < 0.01 ***P < 0.001

P < 0.01 *P < 0.001 vs model group

表 2 胡桃楸茎枝含药鸡蛋对荷 H22 肝癌细胞小鼠体质量和免疫功能的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of eggs decocted with branches of *Juglans mandshurica* on body weight and immune organs of mice bearing H22 hepatocarcinoma cell ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂 量/ (g·kg ⁻¹)	体质量/g			胸腺指数/ (mg·10 g ⁻¹)	脾脏指数/ (mg·10 g ⁻¹)
		开始	结束	增重		
对照	—	17.60 ± 2.29	21.25 ± 2.15	3.99 ± 0.91	21.45 ± 0.90	37.75 ± 1.27
模型	—	19.43 ± 1.45	25.96 ± 3.89	8.09 ± 2.22	12.32 ± 5.39**	49.01 ± 16.95
环磷酰胺	0.03	18.06 ± 2.12	17.19 ± 1.99	-1.25 ± 0.96▲▲▲	2.72 ± 0.38▲▲	23.34 ± 1.32▲▲▲
空白鸡蛋	2.56	20.46 ± 1.65	24.63 ± 2.07	4.89 ± 2.05	14.89 ± 8.04*	55.87 ± 21.40
含药鸡蛋	0.64	19.84 ± 0.83	25.08 ± 2.93	6.00 ± 2.15	16.74 ± 7.74	62.78 ± 17.59▲
	1.28	19.06 ± 0.83	25.08 ± 2.93	4.59 ± 1.32	15.04 ± 7.34	56.48 ± 7.34
	2.56	19.38 ± 2.09	25.90 ± 3.40	4.27 ± 1.04	10.50 ± 5.94	50.80 ± 10.14

与对照组比较: *P < 0.05 **P < 0.01; 与模型组比较: ▲P < 0.05 ▲▲P < 0.01 ▲▲▲P < 0.001

*P < 0.05 **P < 0.01 vs control group; ▲P < 0.05 ▲▲P < 0.01 ▲▲▲P < 0.001 vs model group

胡桃楸茎枝含药鸡蛋对荷 H22 肝癌小鼠胸腺指数的影响见表 2。与对照组比较,模型组小鼠的胸腺指数显著下降 ($P < 0.01$); 给予含药鸡蛋后,含药鸡蛋 0.64 g/kg 组胸腺指数明显升高,与对照组小鼠的胸腺指数无显著差异。

胡桃楸茎枝含药鸡蛋对荷 H22 肝癌小鼠脾脏指数的影响见表 2。荷瘤小鼠的脾脏指数有升高的趋势,但与对照组无显著差异。给予含药鸡蛋后,各组小鼠的脾脏指数仍较模型组有升高趋势,其中含药鸡蛋 0.64 g/kg 组显著高于模型组; 并且各含药鸡蛋组均显著高于对照组。含药鸡蛋组小鼠肿瘤较小,未出现死亡现象,生存状态较好。推测各含药鸡蛋组小鼠脾脏指数的增加可能是由于机体免疫功能的提高。

3.4 胡桃楸茎枝含药鸡蛋对荷 H22 肝癌小鼠血常规的影响

与对照组比较,模型组小鼠外周血总红细胞数降低、血红蛋白含量显著降低。给药后,含药鸡蛋 2.56 g/kg 组能够提高小鼠外周红细胞数和血红蛋白含量,与对照组相比无显著性差异。模型组小鼠的总白细胞数显著升高,给予胡桃楸茎枝含药鸡蛋后,2.56、1.28 g/kg 组的总白细胞数较模型组显著降低,已经与对照组无显著差异。含药鸡蛋 0.64 g/kg 组和空白鸡蛋组小鼠的总白细胞数仍较高。模型组小鼠血小板数目显著高于对照组,给予不同剂量的含药鸡蛋后,未能改善荷瘤小鼠血小板数目升高的现象。环磷酰胺组小鼠白细胞数目显著低于模型组和对照组,证明了环磷酰胺对白细胞的杀伤作用。见表 3。

表 3 胡桃楸茎枝含药鸡蛋对荷 H22 肝癌小鼠血常规的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effects of the eggs decocted with branches of *J. mandshurica* on hematological parameters of H22 hepatocarcinoma bearing mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂 量/ (g·kg ⁻¹)	总红细胞数/ ($\times 10^{12} \cdot L^{-1}$)	总白细胞数/ ($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	血红蛋白/(g·L ⁻¹)	血小板数/ ($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)
对照	—	9.83 ± 0.44	8.14 ± 1.45	145.44 ± 7.18	879.78 ± 171.86
模型	—	8.84 ± 0.73	12.31 ± 3.12**	130.11 ± 9.80*	1 476.00 ± 524.67*
环磷酰胺	0.03	8.52 ± 1.17	1.87 ± 0.40▲▲▲	122.30 ± 16.57	991.56 ± 250.73▲
空白鸡蛋	2.56	9.10 ± 1.11	10.79 ± 2.45	133.13 ± 18.25	1 699.25 ± 469.43
含药鸡蛋	0.64	8.40 ± 0.56	11.82 ± 3.70	125.25 ± 6.54	1 440.00 ± 439.85
	1.28	8.70 ± 0.90	7.18 ± 1.42▲▲▲	129.25 ± 13.70	1 447.00 ± 275.69
	2.56	9.95 ± 1.07	8.74 ± 2.51▲▲	143.78 ± 15.66▲	1 397.00 ± 328.72

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ ▲▲▲ $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ ▲▲▲ $P < 0.001$ vs model group

4 讨论

由于胡桃楸的抗肿瘤作用较好,关于胡桃楸的抗肿瘤作用及有效成分的研究较多^[9-11],但目前仍未能明确胡桃楸的抗肿瘤药效物质基础。在寻找中药的药效物质基础时不能忽视传统用法,青蒿素即是基于传统用法而被发现的^[12]。胡桃楸的传统用法是与鸡蛋同煮,轻者只吃鸡蛋,重者蛋汤同吃。基于此传统用法,本实验研究了与胡桃楸同煮的含药鸡蛋的体内抗肿瘤活性,以期明确胡桃楸含药鸡蛋的抗肿瘤作用,为胡桃楸与鸡蛋同煮的传统用法做出科学的解释。

实验结果表明,胡桃楸茎枝含药鸡蛋对小鼠 H22 肝癌实体瘤的生长有抑制作用,且随着剂量的增加抑制率提高,0.64、1.28、2.56 g/kg 组对小鼠

H22 肝癌细胞的抑瘤率分别为 31.11%、47.19%、60.80%。说明胡桃楸茎枝含药鸡蛋在小鼠体内的抗肿瘤活性较好。胡桃楸茎枝含药鸡蛋能够提高荷瘤小鼠的胸腺和脾脏指数,改善荷瘤小鼠外周血白细胞数目和血红蛋白的异常。与环磷酰胺比较,胡桃楸茎枝含药鸡蛋的抑瘤率较低,但环磷酰胺在实验中表现出使小鼠体质量和免疫器官指数降低以及杀伤白细胞等副作用。

为了说明胡桃楸含药鸡蛋的抗肿瘤作用是由于鸡蛋吸收了胡桃楸中的成分而产生的,本实验设置了空白鸡蛋组,该组的剂量与含药鸡蛋高剂量组的剂量相当。在本实验中,空白鸡蛋组也能抑制肿瘤的生长,但抑瘤率明显低于含药鸡蛋 2.56 g/kg 组。并且空白鸡蛋组的小鼠有 3 只在实验过程中死亡,

另外空白鸡蛋对荷瘤小鼠的白细胞数升高、血红蛋白含量降低、胸腺指数降低和血小板数升高等异常无明显改善作用,而含药鸡蛋能在不同程度上改善上述异常,甚至使之接近正常水平。因此胡桃楸茎枝含药鸡蛋的抗肿瘤作用不是由鸡蛋本身产生的,而是由于其吸收了胡桃楸中的成分或是胡桃楸中的成分与鸡蛋中蛋白质共同作用的结果。

本研究证明了胡桃楸含药鸡蛋的抗肿瘤作用,为胡桃楸与鸡蛋同煮的传统用法做出了解释。将在此基础上进一步明确胡桃楸含药鸡蛋中吸收的成分,为寻找胡桃楸的抗肿瘤药效物质奠定基础。

参考文献

- [1] 匡可任,李沛琼.中国植物志[M].第21卷.北京:科学出版社,1982:33-34.
- [2] 辽宁省食品药品监督管理局.辽宁省中药标准[M].第1册.沈阳:辽宁科学技术出版社,2009:144-146.
- [3] 邹品文,赵春景,尹小燕,等.核桃楸树皮提取物的抗肿瘤作用[J].中国医院药学杂志,2010,30(4):308-310.
- [4] 杨凡.核桃楸根皮化学成分及其抗癌活性研究[D].长春:吉林大学,2007.
- [5] 于洋,于晓红.山核桃树枝水煎剂的抑瘤作用及其对S180荷瘤小鼠IL-2和IL-4影响的实验研究[J].中华中医药学刊,2008,26(12):2721-2722.
- [6] 季宇彬,马宏图,杨波,等.青龙衣不同提取部位的抗肿瘤作用研究[J].中草药,2004,35(10):1145-1147.
- [7] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].第3版.北京:人民卫生出版社,2002:178-179,203.
- [8] 郭圣奇,黄挺章,李远辉,等.薏苡茎水提取物对H22荷瘤小鼠的抗肿瘤作用研究[J].中国临床药理学杂志,2015,31(10):855-857.
- [9] 梁启超,邹桂华,刘爽,等.核桃楸皮多糖的分离纯化及抗癌活性研究[J].天然产物研究与开发,2015,27(8):1340-1345.
- [10] 沈广志,邹桂华,梁婷,等.核桃楸的化学成分研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(17):219-224.
- [11] Lin H, Zhang Y W, Hua Y, et al. Three new compounds from the stem bark of *Juglans mandshurica* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2014, 16(8): 819-824.
- [12] 郭宗儒.青蒿素类抗疟药的研制[J].药学学报,2016,51(1):157-164.