

苗药血人参不同提取部位体内外对乳腺癌 4T1 细胞的影响

段 丽, 张永萍*, 缪艳燕, 傅 建

贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550000

摘要:目的 研究血人参提取物体内外对乳腺癌 4T1 细胞的影响。方法 采用 MTT 法检测血人参不同提取部位体外对 4T1 细胞的抗肿瘤活性, 计算细胞增殖抑制率及半数抑制浓度 (IC_{50}); 建立小鼠 4T1 实体瘤模型, 随机分为模型组、血人参不同提取部位(石油醚部位、醋酸乙酯部位、正丁醇部位、水部位、乙醇提取物)组、顺铂组, 给药 15 d 后观察小鼠脏器指数、体质量, 计算抑瘤率, 进行肿瘤病理切片, 观察病理改变。结果 血人参醋酸乙酯部位、正丁醇部位及乙醇提取物对 4T1 细胞的 IC_{50} 值分别为 228.9、323.4、322.6 $\mu\text{g/mL}$; 血人参石油醚部位组、醋酸乙酯部位组、正丁醇部位组、水部位组、乙醇提取物组及顺铂组对 4T1 荷瘤小鼠的抑瘤率分别为 $(55.88 \pm 6.68)\%$ 、 $(66.67 \pm 14.32)\%$ 、 $(65.71 \pm 12.38)\%$ 、 $(53.81 \pm 16.17)\%$ 、 $(43.73 \pm 25.73)\%$ 、 $(76.85 \pm 11.38)\%$; 血人参不同提取部位组中, 石油醚部位组具有降低脾指数、升高胸腺指数及白细胞介素 (IL-2) 水平的作用; 从肿瘤体积和抑瘤率结果来看是醋酸乙酯部位最好。HE 染色显示石油醚部位组肿瘤细胞明显比模型组少, 细胞排列松散, 病理性核分裂现象、肿瘤细胞浸润较模型组少, 有少量淋巴细胞、巨噬细胞浸润。结论 血人参提取物在体内外对 4T1 细胞生长具有一定的抑制作用, 其体内作用机制可能是增强机体的免疫力, 从而达到抑制肿瘤生长的效果。

关键词: 血人参提取物; 抗肿瘤; 乳腺癌 4T1 细胞; 增殖; 脏器指数; 免疫功能

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)12-2902-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.12.025

In vivo and in vitro effects of Miao Medicine Indigofera stachyoides extracts on breast cancer 4T1 cells

DUAN Li, ZHANG Yong-ping, MIAO Yan-yan, FU Jian

Guiyang University of Chinese Medicine, Guiyang 550000, China

Abstract: Objective To study the effects of *Indigofera stachyoides* extracts on the breast cancer cells (4T1) *in vivo* and *in vitro*. **Methods** MTT method was used to detect the antitumor activity of *I. stachyoides* extracts in 4T1 cells *in vitro*, the inhibition rate of cell proliferation, and half inhibition concentration (IC_{50}). The established mice model with 4T1 solid tumor were randomly divided into model, extracts of *I. stachyoides* (petroleum ether phase, ethyl acetate phase, *n*-butanol phase, water phase, and ethanol extracts) groups, and cisplatin group. After being administered for 15 d, mice body weight and viscera index were measured; The observation of tumor pathology and the calculation of tumor inhibition rate were performed. **Results** IC_{50} of ethyl acetate phase, *n*-butanol phase, ethanol extracts of *I. stachyoides* on 4T1 cells *in vitro* reached 228.9, 323.4, and 322.6 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The tumor inhibition rates of petroleum ether phase, ethyl acetate phase, *n*-butanol phase, water phase, and ethanol extract of *I. Stachyoides*, and cisplatin group on 4T1 mice were $(55.88 \pm 6.68)\%$, $(66.67 \pm 14.32)\%$, $(65.71 \pm 12.38)\%$, $(53.81 \pm 16.17)\%$, $(43.73 \pm 25.73)\%$, and $(76.85 \pm 11.38)\%$, respectively. In the different extraction parts of *I. stachyoides*, the petroleum ether group had the effects of reducing the spleen index, increasing the thymus index and IL-2 level, and the ethyl acetate part was the best part according to tumor volume and the tumor suppressor rate. HE staining showed that the tumor cells in petroleum ether extract group were less than that in the model group, the cell arrangement was loose, the pathological mitosis and tumor cell infiltration were less than those of model group, and there was a small amount of lymphocytes and macrophages infiltration. **Conclusion** The extracts of *I. stachyoides* can inhibit the growth of 4T1 tumor

收稿日期: 2018-05-20

基金项目: 国家工程技术研究中心组建项目 (2014FM125Q09); 贵州省中药现代化科技产业研究开发专项项目 (黔科合中药字 [2013] 5009); 贵州省普通高等学校工程研究中心建设项目 (黔教合 KY 字 [2014] 22 号); 贵州省高层次创新型人才培养项目 (黔科合人才 [2015] 4030 号); 苗医药基本理论的深化、拓展及应用研究 (黔科合 J 重大字 [2015] 2002-3-5)

作者简介: 段 丽 (1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药、民族药新制剂与新剂型。Tel: 18285142073 E-mail: 2528022966@qq.com

***通信作者** 张永萍, 博士生导师, 教授, 主要从事中药、民族药新制剂与新剂型研究。Tel: (0851)5652056 E-mail: zgygpg@126.com

cells *in vivo* and *in vitro*, and its mechanism may enhance the body immunity, so as to inhibit the tumor growth.

Key words: extracts of *Indigofera stachyoides* Lindl.; antitumor; breast cancer 4T1 cell; proliferation; organ index; immunologic function

血人参为豆科木蓝属植物茸毛木蓝 *Indigofera stachyodes* Lindl. 的根, 为贵州的苗族药物, 又名铁刷子、雪人参、山红花、红苦刺, 味甘、微苦, 性温, 具有滋阴补虚、调经摄血、活血舒筋的功效, 主治崩漏、体虚久痢、肠风下血、溃疡不敛、风湿痹痛、跌打损伤、肝硬化、疳积等^[1]。血人参是《贵州省中药材、民族药材质量标准》2003年版收载品种。目前其资源分布、育种、化学成分、薄层鉴别及黄酮提取工艺等方面有少数的研究报告^[2]。血人参药效方面, 本课题组通过转基因斑马鱼急性炎症高通量筛选实验^[3]、二甲苯致小鼠耳廓肿胀实验、角叉菜胶致小鼠足趾肿胀实验、棉球肉芽肿实验以及对巨噬细胞 RAW264.7 生长及脂多糖 (LPS) 诱导损伤巨噬细胞的保护作用实验对血人参石油醚部位、醋酸乙酯部位、正丁醇及水层 4 个提取部位进行抗炎活性研究, 发现石油醚部位具有显著的抗炎作用。肿瘤的恶化发展为癌, 癌症的发生、发展、浸润及转移过程与炎症密切相关, 根据流行病学研究结果发现, 15% 的癌症由炎症发展而来。炎症不仅可能会促发癌症, 还可能与癌症发生及发展的多个环节相关, 包括癌细胞的形成、增生、浸润、血管生成、转移等^[4]。通过研究血人参不同提取部位对乳腺癌 4T1 细胞的体内外作用, 采用 BALB/c 小鼠皮下接种肿瘤细胞的方式复制肿瘤模型, 研究血人参不同提取部位对相应的实体瘤模型小鼠的作用, 探寻血人参药效及药效物质基础, 为血人参开发应用提供相关实验依据。

1 材料

1.1 药品及试剂

血人参 (贵州德昌祥制药有限公司, 批号 160211), 经过贵阳中医学院王祥培教授鉴定为豆科植物茸毛木蓝 *Indigofera stachyoides* Lindl. 的根; 胎牛血清 (FBS, 杭州四季青生物工程材料有限公司, 批号 20170315); 青链霉素混合液 (美国 Hyclone 公司, 批号 J130043); 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液 (美国 Hyclone 公司, 批号 J150021); 二甲基亚砜 (DMSO, 美国 Sigma 公司, 批号 67685TT); 磷酸盐缓冲溶液 (PBS, 美国 Hyclone 公司, 批号 AAH 205993); RPMI 1640、DMEM 培养基 [赛默飞世

尔 (苏州) 仪器有限公司, 批号 8116498、8117131]; 小鼠白细胞介素 (IL-2) ELISA 试剂盒 (批号 20171010)、小鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α) ELISA 试剂盒 (批号 20171010), 深圳子科生物科技有限公司。

1.2 动物与细胞

健康 SPF 级 BALB/c 小鼠 50 只, 体质量 16~20 g, 购于重庆腾鑫生物科技发展有限公司, 许可证号 STXK (军) 2012-0011。小鼠乳腺癌 4T1 细胞株由贵州医科大学再生医学重点实验室提供。

1.3 仪器

二氧化碳培养箱 (美国 Thermo 公司); OLYMPUSIX51 奥林巴斯倒置荧光显微镜 (Olympus 公司); JB-CJ-1FXS 型洁净工作台 (苏州佳宝净化工程设备有限公司); 5702 型离心沉淀器 (德国 Eppendorf 公司); ELX800 型酶联免疫检测仪 (美国 GE 公司); 移液器 (德国 Eppendorf 公司); AL204 电子天平 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。

2 方法

2.1 血人参提取物各部位的制备

血人参药材 30.2 kg, 粉碎成粗粉, 依次用 90%、60% 乙醇加热回流, 均提取 3 次, 提取时间分别为 2、1.5、1 h, 合并提取液, 减压回收溶剂至无醇味, 得血人参乙醇提取物 11 500 mL, 加等体积蒸馏水溶解分散, 依次用 2 倍量的石油醚、醋酸乙酯、正丁醇充分振摇萃取 5 次, 加压回收各溶剂, 收集各萃取部分置真空干燥箱干燥, 并记录质量, 得到石油醚部位 210.3 g、醋酸乙酯部位 1 196.0 g、正丁醇部位 1 957.3 g、水部位 1 164.8 g。

2.2 MTT 法检测 4T1 细胞增殖抑制率

参照文献方法^[5-6], 收集生长对数期的 4T1 细胞, 常规消化, 离心, 计数, 用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液调整其密度为 5×10^4 个/mL。取 96 孔板, 每孔加入细胞混悬液 100 μ L, 在细胞培养箱中培养 24 h。取血人参乙醇提取物、石油醚部位、醋酸乙酯部位、正丁醇部位、水部位, 以无菌 DMSO 助溶后用 0.22 μ m 微孔滤膜滤过后用培养液逐级稀释成 800、400、200、100 μ g/mL。给药组每孔分别

加入 100 μL 含药物的培养液, 每组设 3 个复孔, 培养箱中常规培养, 并设调零组 (加入培养液、MTT、DMSO)、对照组 (加入细胞、相同质量浓度的药物溶解介质、培养液、MTT、DMSO)。24 h 后记录细胞生长情况, 弃去 96 孔板中上清液, 加入含 20% MTT 的 RPMI 1640 培养液, 每孔 100 μL , 置于培养箱中孵育 4 h。弃去上清后, 加入 DMSO, 每孔 100 μL , 振摇 5 min 后, 酶标仪检测吸光度 (A) 值, 波长为 570 nm, 计算细胞增殖抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{给药}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{调零}})$$

2.3 4T1 实体瘤体内实验

2.3.1 实体瘤小鼠模型制备及分组 取健康 BALB/c 小鼠, 体质量 16~20 g, 雌性, 收集生长状态良好的 4T1 细胞, 1 000 r/min 离心 3 min, 弃去上清液, 加生理盐水稀释洗涤 3 次并以生理盐水稀释, 调整细胞密度为 1×10^5 个/mL, 无菌接种于小鼠右侧腹股沟皮下, 每只小鼠接种 0.2 mL, 将长出肿瘤块的小鼠随机分为模型组, 顺铂组, 血人参乙醇提取物、石油醚部位、醋酸乙酯部位、正丁醇部位、水部位组, 每组 5 只, 各给药组根据小鼠体质量 ig 给药, 血人参各提取部位给药剂量根据生药量和提取率换算而得, 分别给予血人参石油醚部位 0.058 g/kg、醋酸乙酯部位 0.330 g/kg、正丁醇部位 0.540 g/kg、水部位 0.321 g/kg、乙醇提取物 1.249 g/kg。顺铂以无菌生理盐水稀释后 ip 给药, 剂量为 2 mg/kg, 每隔 2 d 给药 1 次。另取 5 只正常小鼠设为对照组, 小鼠右侧腹股沟皮下无菌接种生理盐水, 给药时 ig 等剂量生理盐水, 模型组 ig 给予相应剂量生理盐水。每天称小鼠体质量, 连续给药 15 d, 从给药第 1 天开始, 每 3 天用游标卡尺量取肿瘤长、宽、厚, 记录数据, 计算肿瘤体积。

$$\text{肿瘤体积} = \pi \times a \times b^2 / 2$$

a 为瘤长, b 为瘤宽

2.3.2 荷瘤小鼠胸腺指数、脾脏指数、肿瘤体积、抑瘤率的测定 停药次日, 称取小鼠体质量, 用游标卡尺量取肿瘤大小, 眼球采血, 3 000 r/min 离心 5 min, 分离血清, 留取血清放于 -80°C 备用。迅速剥取皮下实体瘤瘤块、胸腺、脾脏, 用吸水纸吸干组织上水分, 分别称定质量, 计算胸腺指数、脾指数和抑瘤率。肿瘤组织浸泡在 10% 中性福尔马林溶液中固定, 备用。

$$\text{脾指数} = \text{脾质量} / \text{体质量} \times 1\,000$$

$$\text{胸腺指数} = \text{胸腺质量} / \text{体质量} \times 1\,000$$

$$\text{抑瘤率} = (\text{模型组平均瘤质量} - \text{给药组平均瘤质量}) / \text{模型组平均瘤质量}$$

2.3.3 荷瘤小鼠外周血血清 IL-2 和 TNF- α 的测定 根据 IL-2 和 TNF- α 试剂盒说明书方法进行操作。

2.3.4 肿瘤组织的 HE 染色 肿瘤组织标本依次分别放入 70% 乙醇 2 h、80% 乙醇 2 h、90% 乙醇 1.5 h、95% 乙醇 2 h、100% 乙醇 1 h; 分别置于二甲苯中 30 min 进行透明, 将水浴锅加热到 54°C 使低熔点石蜡熔融, 并将组织标本浸润 3 h, 浸蜡标本于室温下自然凝固为蜡块。将蜡块包埋的实体组织制成 4 μm 的石蜡切片, 依次在 30%~40% 乙醇和 38°C 的水中展开, 捞取切片。将捞取到切片的载玻片放置于 37°C 的烘箱中过夜。将切片连续 3 次浸入二甲苯各进行 15 min 脱蜡; 连续 2 次在 100% 乙醇中各 2 min, 95% 乙醇 2 min, 80% 乙醇 2 min, 蒸馏水冲洗。浸入苏木精中染色 6 min, 蒸馏水冲洗; 0.1% 盐酸乙醇中分色数秒钟, 蒸馏水冲洗; 0.5% 氨水返蓝, 蒸馏水冲洗 3 次; 再浸入伊红染液数秒钟, 蒸馏水冲洗。最后分置于 80% 乙醇数秒钟, 95% 乙醇数秒钟, 100% 乙醇数秒钟, 100% 乙醇 2 min 脱水。 64°C 烤箱内干燥 10 min 后, 滴加中性树胶, 盖上盖玻片, 晾干封固。光学显微镜下观察肿瘤组织^[7]。

2.4 统计方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析, 数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 血人参提取物对 4T1 细胞增殖的影响

结果显示, 各组随着药物质量浓度的增加, A 值都逐渐减小, 增殖抑制率同药物质量浓度呈一定依赖关系, 结果见表 1。石油醚部位组、水部位组增殖抑制率均低于 50%, 采用 GraphPad Prism 5.0 软件计算各部位的半数抑制浓度 (IC_{50}) 值, 结果血人参醋酸乙酯部位、正丁醇部位及乙醇提取物的 IC_{50} 值分别为 228.9、323.4、322.6 $\mu\text{g/mL}$ 。

3.2 血人参提取物对 4T1 实体瘤小鼠体质量、脾指数、胸腺指数的影响

实验结果显示, 与对照组比较, 模型组小鼠脾指数显著增加 ($P < 0.01$), 血人参各给药组脾指数明显增大 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 血人参醋酸乙酯部位组、正丁醇部位组和乙醇提取物组小鼠脾指数显著降低 ($P < 0.01$), 血人参石油醚部位组和水部位组小鼠脾指数无显著差异, 顺铂组小鼠脾指数显著降低 ($P < 0.01$); 与顺铂组比较, 血人参各

表 1 血人参提取物对 4T1 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of *I. stachyoides* extracts on 4T1 cell proliferation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	增殖抑制率/%
模型组	—	10.63 ± 0.35
石油醚部位	400	8.56 ± 1.31
	200	2.23 ± 0.33
	100	7.86 ± 4.02
	50	25.51 ± 9.28
醋酸乙酯部位	400	46.60 ± 9.82
	200	47.12 ± 7.59
	100	61.14 ± 3.11
	50	12.72 ± 5.62
正丁醇部位	400	41.97 ± 1.58
	200	56.00 ± 1.77
	100	66.09 ± 4.46
	50	62.34 ± 2.66
水部位	400	25.78 ± 8.94
	200	14.10 ± 1.44
	100	11.77 ± 1.20
	50	14.57 ± 3.45
乙醇提取物	400	71.53 ± 1.77
	200	16.05 ± 9.22
	100	42.67 ± 4.51
	50	28.65 ± 11.47

提取部位组小鼠脾指数均较大, 其中石油醚部位组和水部位组差异显著 ($P < 0.05, 0.01$)。与对照组比较, 模型组小鼠胸腺指数有降低趋势, 血人参醋酸乙酯部位组、正丁醇部位组及顺铂组小鼠胸腺指数显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 血人参各提取物组小鼠胸腺指数均无显著差异, 其中血人参石油醚部位组、水部位组和乙醇提取物组小鼠胸腺指数有增加趋势, 醋酸乙酯部位组及正丁醇部位组小鼠胸腺指数有下降趋势; 与顺铂组比较, 血人参石油醚部位组小鼠胸腺指数显著增加 ($P < 0.01$, 结果见表 2)。

3.3 血人参提取物对 4T1 实体瘤小鼠肿瘤生长阶段肿瘤体积变化的影响

随着时间的推移, 模型组小鼠腋下肿瘤体积呈倍数增长, 血人参提取物各组及阳性药组与模型组相比, 小鼠肿瘤增长较缓慢, 其中阳性药组瘤体增长最为缓慢, 给药 15 d 后, 除血人参乙醇提取物组外, 其余各组肿瘤体积均显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)。与顺铂组比较, 血人参提取物各组小鼠肿瘤体积均较大 ($P < 0.05, 0.01$)。结果见表 3。

3.4 血人参提取物对实体瘤质量的影响

实验结果显示, 小鼠接瘤后, 于第 5 天腹股沟皮下接种部位出现明显瘤体, 15 d 后瘤体显著增大, 表明实验造模成功。顺铂组瘤体质量与模型组比较,

表 2 血人参提取物对 4T1 荷瘤小鼠脾指数和胸腺指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Effects of *I. stachyoides* extracts on spleen index and thymus index in 4T1 tumor mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	脾指数/(mg·g ⁻¹)	胸腺指数/(mg·g ⁻¹)
对照	—	4.53 ± 0.75	1.80 ± 0.32
模型	—	23.45 ± 3.99**	1.22 ± 0.75
顺铂	0.002	14.92 ± 6.72****	0.85 ± 0.54**
石油醚部位	0.058	20.86 ± 2.74▲▲	1.86 ± 0.51▲▲
醋酸乙酯部位	0.330	17.92 ± 7.10****	1.00 ± 0.49**
正丁醇部位	0.540	15.38 ± 3.53****	0.94 ± 0.43**
水部位	0.321	24.72 ± 5.35▲▲▲	1.28 ± 0.26
乙醇提取物	1.249	17.44 ± 3.89****	1.37 ± 0.57

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与顺铂组比较: ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$, 下表同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group; ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs cisplatin group, same as below

明显减小 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 血人参各提取物组小鼠瘤质量显著降低 ($P < 0.01$); 与顺铂组比较, 血人参各提取物组小鼠瘤质量均较大, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。结果见表 4。

3.5 对 4T1 荷瘤小鼠外周血血清 IL-2 和 TNF- α 的影响

与对照组比较, 模型组小鼠外周血血清中 IL-2、TNF- α 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 血

人参石油醚部位组、醋酸乙酯部位组血清 IL-2 水平有升高趋势, 但差异不显著, 同时这 2 组血清 TNF- α 水平有降低趋势, 差异不显著, 而血人参水部位组和乙醇提取物组血清 IL-2 和 TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), 顺铂组血清 IL-2 和 TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.01$); 与顺铂组比较, 血人参石油醚部位组、醋酸乙酯部位组、正丁醇部位组小鼠血清 IL-2 和 TNF- α 水平显著升高 ($P < 0.01$)。结果见表 4。

表 3 血人参提取物对 4T1 荷瘤小鼠肿瘤生长阶段肿瘤体积变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Table 3 Effects of *I. stachyoides* extracts on volume change in tumor growth stage of 4T1 solid tumor mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	肿瘤体积/mm ³						
		第 0 天	第 3 天	第 6 天	第 9 天	第 12 天	第 15 天	
模型	—	58.34 ± 14.20	156.60 ± 50.02	166.27 ± 68.87	313.89 ± 125.96	443.76 ± 149.06	727.12 ± 90.74	
顺铂	0.002	51.03 ± 6.33	142.57 ± 53.63	102.26 ± 19.25	167.70 ± 51.74*	159.25 ± 26.13**	216.27 ± 45.52**	
石油醚部位	0.058	51.01 ± 7.54	128.15 ± 31.09	177.57 ± 43.59	316.27 ± 137.69 [▲]	373.28 ± 164.63 ^{▲▲}	541.94 ± 158.02 ^{▲▲▲}	
醋酸乙酯部位	0.330	57.97 ± 18.57	110.14 ± 34.83	183.68 ± 62.28 [▲]	292.23 ± 97.57 [▲]	355.50 ± 154.85 [▲]	442.19 ± 187.60 ^{▲▲}	
正丁醇部位	0.540	47.48 ± 4.78	139.12 ± 45.53	234.45 ± 59.65 [▲]	365.31 ± 100.43 [▲]	422.07 ± 132.03 ^{▲▲}	509.07 ± 169.20 ^{▲▲}	
水部位	0.321	62.52 ± 16.65	110.46 ± 15.33	169.67 ± 70.76	286.64 ± 73.77 [▲]	291.16 ± 93.08	430.30 ± 96.89 ^{▲▲}	
乙醇提取物	1.249	48.59 ± 10.43	76.39 ± 23.72 ^{▲▲}	173.29 ± 51.38	168.82 ± 58.38 [▲]	309.23 ± 86.43 ^{▲▲}	565.58 ± 138.96 ^{▲▲}	

表 4 血人参提取物对 4T1 荷瘤小鼠质量及血清中 IL-2 和 TNF-α 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Table 4 Effects of *I. stachyoides* extracts on tumor weight and IL-2 and TNF-α in serum of 4T1 tumor mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	平均瘤质量/g	抑瘤率/%	IL-2/(pg·mL ⁻¹)	TNF-α/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	—	—	117.85 ± 24.62	334.28 ± 43.79
模型	—	1.49 ± 0.13	—	258.37 ± 34.82**	605.59 ± 87.30**
顺铂	0.002	0.40 ± 0.19**	76.85 ± 11.38	123.41 ± 20.93**	351.06 ± 56.34**
石油醚部位	0.058	0.65 ± 0.09**	55.88 ± 6.68	268.52 ± 47.8 ^{▲▲▲}	553.72 ± 62.19 ^{▲▲▲}
醋酸乙酯部位	0.330	0.54 ± 0.24**	66.67 ± 14.32	292.83 ± 28.34 ^{▲▲▲}	573.77 ± 114.46 ^{▲▲▲}
正丁醇部位	0.540	0.52 ± 0.18**	65.71 ± 12.38	256.07 ± 40.99 ^{▲▲▲}	636.63 ± 111.54 ^{▲▲▲}
水部位	0.321	0.69 ± 0.24**	53.81 ± 16.17	157.29 ± 21.71**	488.16 ± 36.93 ^{▲▲▲}
乙醇提取物	1.249	0.65 ± 0.26**	43.73 ± 25.73	160.55 ± 29.06 ^{▲▲}	453.06 ± 54.75 ^{▲▲▲}

3.6 肿瘤组织的 HE 染色

实验结果显示,模型组细胞异型性较多,存在大量病理性核分裂,核浆比例失调,细胞排列结构松散,细胞呈现多量的空泡化,凋亡细胞含量较少。顺铂组肿瘤细胞异型性减少,出现部分细胞核固缩,胞核较多,细胞排列松散,出现部分凋亡细胞。血人参石油醚部位组细胞异型性明显减少,病理性核分裂减少,核浆比例较好,空泡化细胞大量减少,凋亡细胞明显增加,大量细胞出现核固缩溶解。醋酸乙酯部位组细

胞异型性较多,有病理性核分裂减少,核浆比例失调,细胞空泡化,少量细胞出现核固缩溶解,与周围组织分界较清。正丁醇组细胞异型性明显减少,病理性核分裂减少,空泡化细胞大量减少,凋亡细胞明显增加,大量细胞出现核固缩溶解。水部位组细胞异型性较多,有核分裂相存在,核浆比例失调,有部分细胞出现空泡化。乙醇提取物组存有细胞异型性,病理性核分裂相存在,少量细胞出现核固缩,细胞浆增多,有凋亡细胞存在。结果见图 1。

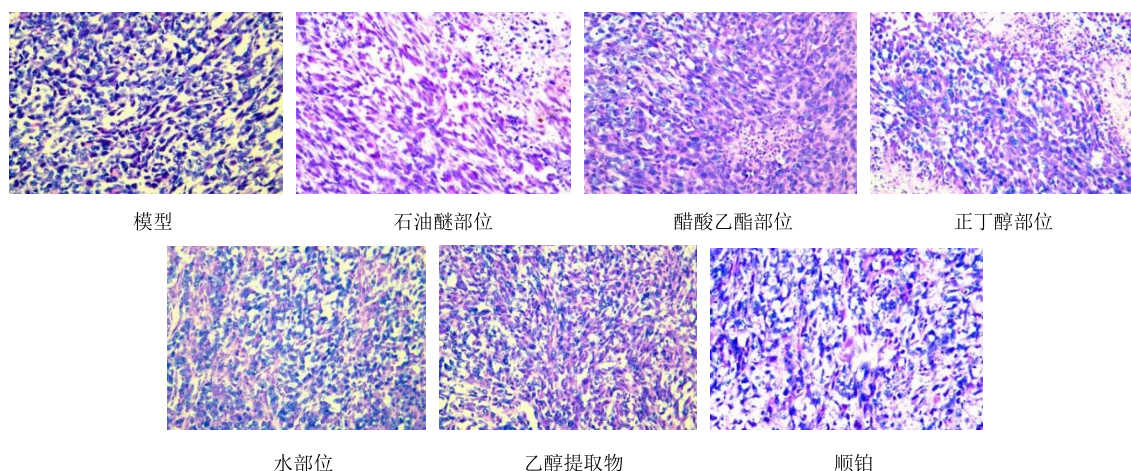


图 1 各组小鼠 4T1 肿瘤形态 (10×40, HE 染色法)

Fig. 1 Cellular morphology of 4T1 tumor-bearing mice in each group (10 × 40, HE staining)

4 讨论

肿瘤动物模型有自发性肿瘤动物模型、诱发性肿瘤动物模型、移植性肿瘤动物模型、人体肿瘤异体移植性肿瘤动物模型^[8]。其中移植性肿瘤动物模型在评价药物体内抗肿瘤作用时是常用的模型,本实验采用在动物皮下接种肿瘤细胞的方式建立荷4T1肿瘤模型,方法简便,稳定可行。血人参石油醚部位、醋酸乙酯部位、正丁醇部位、水部位及乙醇提取物均有一定抑制肿瘤生长的作用。其中以乙酸乙酯部位的作用最佳。

脾脏和胸腺都是机体重要的免疫器官,脾脏参与机体特异性和非特异性免疫反应,当机体体液免疫应答发生时,脾小结增多、增大,巨噬细胞大量增多,吞噬活动增加,脾内的淋巴细胞增多^[9]。胸腺是免疫系统的中心器官,参与细胞免疫^[10]。通过测定胸腺指数不仅可以反映胸腺的功能,还可以间接反映机体的免疫功能。因此脏器指数一定程度上反映着机体免疫功能的强弱。接种肿瘤后,机体自身免疫系统发生作用,给予血人参石油醚部位、醋酸乙酯部位组、正丁醇部位、水部位及乙醇提取物干预后,与模型组比较,各部位对小鼠脾指数和胸腺指数的影响,差异不显著。

肿瘤的发生、发展与机体的免疫功能具有密切的关系。IL-2 又被称为 T 细胞生长因子,能促进 T 细胞生长、增殖及分化,调节 NK 细胞并保持它的自然杀伤力,诱导细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)的增殖和产生。而 CTL 能在体外有效破坏肿瘤细胞, NK 细胞可直接杀伤血液循环的肿瘤细胞及肿瘤组织。此外, IL-2 还能诱导产生特异性杀伤肿瘤细胞的 LAK 细胞^[11]。血人参石油醚部位组、醋酸乙酯部位组、正丁醇部位组均可通过提高 IL-2 的水平发挥抗肿瘤作用。

血人参作为我国民族传统用药,具有悠久的历史 and 潜在的开发价值,血人参石油醚部位在抑制肿

瘤生长方面略不及阳性药顺铂,但却没有在抑制肿瘤生长的同时对机体正常免疫功能产生负面影响,血人参醋酸乙酯、石油醚部位可能具有独特的辅助抗肿瘤的优势。

参考文献

- [1] 王小果, 张汝国. 苗药雪人参的研究进展 [J]. 中国民族民间医药, 2015, 24(20): 21-22.
- [2] 但成丽, 张艳焱, 张永萍, 等. 基于转基因斑马鱼炎症模型的血人参提取物抗炎活性筛选研究 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(11): 2617-2620.
- [3] 陈 香, 杨 伟, 胡相卡, 等. 芪胶升白胶囊对 S180 小鼠抗肿瘤作用及相关机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2016, 32(3): 132-136.
- [4] 窦莉伶, 付春云. “炎症与肿瘤”的研究进展及对肿瘤防治的启示 [J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(10): 1234-1246.
- [5] 柏玉冰, 李 春, 周亚敏, 等. 夏枯草的化学成分及其三萜成分的抗肿瘤活性研究 [J]. 中草药, 2015, 46(24): 3623-3629.
- [6] 程 卉, 彭代银, 王效山, 等. 新藤黄酸体内外抗肿瘤作用研究 [J]. 中草药, 2008, 39(2): 236-240.
- [7] 罗福祥, 卢 军, 张海英, 等. 新疆阿魏乙酸乙酯部位体内外对 CT-26.WT 细胞的影响 [J]. 中成药, 2017, 39(2): 238-243.
- [8] 万继英, 韩庶勇. 肿瘤学研究中实验动物的选择和应用 [J]. 医学综述, 2009, 15(19): 2059-2061.
- [9] 王晓敏, 高增光, 邹志坚. 地锦草对移植性肝癌 H22 小鼠抑瘤率和免疫功能的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(13): 3505-3507.
- [10] 王文龙, 孙子凯, 徐丽华, 等. 固本咳喘颗粒对实验性慢性阻塞性肺疾病大鼠胸腺指数及脾指数的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(11): 935-937.
- [11] Gruenbacher G, Gander H, Nussbaumer O, et al. IL-2 costimulation enables statin-mediated activation of human NK cells, preferentially through a mechanism involving CD56+ dendritic cells [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(23): 9611-9620.