

## 柴胡皂苷 D 对阿霉素治疗小鼠肝癌的靶向导引作用

许严伟<sup>1,2</sup>, 耿胜男<sup>1</sup>, 王梦琪<sup>3</sup>, 杜钢军<sup>1,3\*</sup>

1. 郑州工业应用技术学院, 河南 郑州 451150

2. 洛阳市第三人民医院, 河南 洛阳 471000

3. 河南大学药学院, 河南 开封 475000

**摘要:** **目的** 探讨柴胡皂苷 D 对阿霉素治疗小鼠肝癌可能的靶向导引作用。**方法** 以小鼠肝癌 H<sub>22</sub> 实体瘤模型评价柴胡皂苷 D 与阿霉素单独或联合对荷瘤小鼠的治疗效果。噻唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 检测细胞增殖情况, 激光全息系统分析细胞大小, 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐 (2',7'-dichlorodi-hydrofluorescein diacetate, DCFH-DA) 检测细胞活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平, 线粒体示踪绿检测细胞线粒体功能, 吖啶橙 (acridine orange, AO) 染色检测细胞自噬情况, Western blotting 印迹法检测细胞有机阴离子转运多肽 (organic aniontransporting polypeptide 1B1, Oatp1b1) 的表达情况。**结果** 0.5~16  $\mu\text{g/mL}$  柴胡皂苷 D 不影响 H<sub>22</sub> 细胞增殖, 但能增加 H<sub>22</sub> 细胞体积, 促进细胞摄取阿霉素, 增强阿霉素的细胞增殖抑制作用。柴胡皂苷 D 能降低 H<sub>22</sub> 细胞 ROS 水平, 促进细胞线粒体功能和细胞自噬, 增加细胞 Oatp1b1 的表达。柴胡皂苷 D 在 20 mg/kg 对小鼠肝癌 H<sub>22</sub> 皮下实体瘤生长无影响, 增加瘤组织阿霉素摄取, 提高阿霉素对肝肿瘤的治疗效果。柴胡皂苷 D 可改善瘤组织细胞外基质沉积, 降低转化生长因子- $\beta$ 1 (transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1) 水平和血管通透性。**结论** 柴胡皂苷 D 对阿霉素治疗小鼠肝癌有靶向导引作用, 其机制是促进细胞自噬及线粒体功能, 继而促进 Oatp1b1 表达, 减少细胞外基质沉积。

**关键词:** 柴胡皂苷 D; 阿霉素; 肝癌 H<sub>22</sub> 细胞; 导引作用; 靶向治疗

**中图分类号:** R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)03-0778-11

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.03.021

## Guiding role of saikosaponin D in targeted therapy of doxorubicin on mouse liver cancer

XU Yan-wei<sup>1,2</sup>, GENG Sheng-nan<sup>1</sup>, WANG Meng-qi<sup>3</sup>, DU Gang-jun<sup>1,3</sup>

1. Zhengzhou University of Industrial Technology, Zhengzhou 451150, China

2. Luoyang Third People's Hospital, Luoyang 471000, China

3. Pharmaceutic College of Henan University, Kaifeng 475000, China

**Abstract: Objective** To observe whether saikosaponin D has the guiding role in targeted therapy of doxorubicin for mouse liver cancer and explore its guiding mechanism of targeted therapy. **Methods** H<sub>22</sub> mouse liver solid tumor model was used to evaluate the therapeutic efficacy of saikosaponin D and doxorubicin alone or in combination on tumor-bearing mice. Cell proliferation was examined by MTT assay. Cell size was analyzed by laser holographic analysis system, cell reactive oxygen species (ROS) was tested by DCFH-DA, Mito-Tracker Green was used to examine mitochondrial function, AO staining was used to test cell autophagy, and cell Oatp1b1 expression was examined by Western blotting. **Results** Saikosaponin D at the experimental concentrations of 0.5—16  $\mu\text{g/mL}$  had no effect on H<sub>22</sub> cell proliferation, but could increase H<sub>22</sub> cell volume, promote cell to uptake doxorubicin and enhance the inhibitory action of doxorubicin on cell proliferation. Saikosaponin D could reduce ROS level of H<sub>22</sub> cell, promote cell mitochondrial function and cell autophagy, and increased cell Oatp1b1 expression. Saikosaponin D at the experimental doses of 20 mg/kg had no effect on subcutaneous solid tumors in H<sub>22</sub> liver cancer-bearing mice, could increase doxorubicin uptake in tumor tissues and the

收稿日期: 2020-08-22

基金项目: 河南省自然科学基金资助项目 (182300410310); 郑州工业应用技术学院校级科研项目 (2018YB021); 洛阳市医疗卫生科技计划项目 (1980002A)

作者简介: 许严伟 (1981—), 男, 硕士, 副主任药师, 研究方向为中药药理学与临床药理学。Tel: 15837919176 E-mail: xywvip118@163.com

\*通信作者: 杜钢军 (1971—), 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药药理学。Tel: 15037883506 E-mail: dgjlhh@163.com

therapeutic efficacy of doxorubicin on liver tumors. Saikosaponin D could improve the extracellular matrix deposition in tumor tissues, decrease TGF- $\beta$ 1 and vessel permeability. **Conclusion** Saikosaponin D had the guiding role in targeted therapy of doxorubicin for mouse liver cancer, its guiding mechanism was to maintain cell autophagy and mitochondrial function, then to promote Oatp1b1 expression and reduce extracellular matrix deposition.

**Key words:** saikosaponin D; doxorubicin; H<sub>22</sub> cells of liver cancer; guiding role; targeted therapy

肝癌是人类疾病死亡的重要原因之一,虽然近年来肝癌诊疗水平在不断提高,但多数肝癌患者临床确诊时已进入中晚期,肿瘤组织对药物治疗的敏感性差异较大,临床治疗效果不理想<sup>[1]</sup>。肿瘤靶向治疗主要是利用癌细胞特性或致癌基因设计的药物对肿瘤细胞进行特异性打击和杀伤,然而,肿瘤细胞快速突变一直是传统化疗药物和肿瘤新靶向治疗药物难以长期有效的主要障碍<sup>[2]</sup>。传统中医药治疗肿瘤与现代医学强调杀死肿瘤细胞的理念不同,主要是瓦解肿瘤周边支持肿瘤发生发展的微环境,从而使肿瘤失去生长的“土壤”,逐渐停止增殖,在延长肿瘤患者生存期和提高生存质量方面有独特优势<sup>[3]</sup>。

柴胡 *Bupleuri Radix* 在我国作为传统中药材,已有 2000 多年药用历史,很早就已认识到其引药入肝的特性,现代研究证明柴胡对拉米呋啶等药物治疗肝病具有引经报使的作用<sup>[4]</sup>。柴胡皂苷是柴胡中主要的药理活性成分,其中柴胡皂苷 D (saikosaponin D) 是控制柴胡药材及其制剂质量的重要指标,也是柴胡多种功效的物质基础<sup>[5]</sup>。本研究观察柴胡皂苷 D 对阿霉素治疗小鼠肝癌的靶向导引作用,并探究其可能的靶向导引机制。

## 1 材料

### 1.1 细胞

小鼠肝癌 H<sub>22</sub> 细胞,购于上海细胞研究所,本实验室传代保存。

### 1.2 动物

SPF 级昆明种雌性小鼠,体质量 (20±2) g,购自北京微通利华试验动物有限公司,实验动物许可证号: SCXK (京) 20090002,动物饲料合格证号: 41000100003159。光照/黑暗 (12 h/12 h)、温度 (23±3) °C 饲养于河南大学实验动物中心,自由饮食及饮水。动物使用经河南大学动物实验伦理委员会批准 (许可号为 HUSAM2016-288),严格遵守动物保护协会规定。

### 1.3 药品和试剂

柴胡皂苷 D (质量分数>98%,湖北万得化工

有限公司); RPMI1640 培养基 (美国 Gibco-BRL 公司); 羧甲基纤维素钠 (carboxymethylcellulose sodium, CMC-Na)、噻唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT), 美国 Sigma 公司; 吖啶橙 (acridine orange, AO, 北京索莱宝科技有限公司); 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐 (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA)、Mito-Tracker Green 探针 (碧云天生物技术公司); 胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料研究所); 抗小鼠有机阴离子转运多肽 (organic aniontransporting polypeptide 1B1, Oatp1b1) 抗体、抗小鼠  $\beta$ -actin 抗体、FITC 标记的羊抗兔二抗 (武汉三鹰生物技术有限公司); ECL 发光液、RIPA 裂解液、PVDF 膜、甘氨酸 (北京索莱宝科技有限公司); 小鼠转化生长因子- $\beta$ 1 (transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1) ELISA 试剂盒、小鼠前胶原蛋白 I (procollagen I, PCol-I) ELISA 试剂盒、胶原蛋白 IV (collagen IV, Col-IV) ELISA 试剂盒、小鼠层黏连蛋白 (laminin, LN) ELISA 试剂盒、小鼠透明质酸 (hyaluronic acid, HA) ELISA 试剂盒 (R&D Systems 公司); 免疫组化试剂盒 (Histostain-Plus, 上海麦约尔生物科技有限公司); RIPA (强) 细胞裂解液 (上海碧云天生物技术研究产品); BCA 蛋白定量试剂盒 (北京赛默生物科技有限公司)。

### 1.4 仪器

TU-1901 双光束紫外可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司); LGR16-W 型高速冷冻离心机 (北京京立离心机有限公司); ELX-800UV 型酶标仪 (美国 BIO-IEK 公司); LDZX-75KBS 型立式压力蒸汽灭菌器 (上海申安医疗器械有限公司); 二氧化碳细胞培养箱 (Thermo Fisher Scientific 公司); BX43 显微图像分析仪 (日本 Olympus 公司); IX53 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); M4 激光全息细胞成像及分析系统 (瑞典 Phiab 公司)。

## 2 方法

### 2.1 细胞增殖和摄取阿霉素的检测

取对数生长期的 H<sub>22</sub> 细胞,以 5×10<sup>4</sup>/mL 接种

于 96 孔板, 100  $\mu\text{L}$ /孔, 每组设 6 个平行孔。细胞于含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^\circ\text{C}$  培养箱内培养 24 h 后, 分别单独添加含不同质量浓度 (0.5、1、2、4、8、16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的柴胡皂苷 D 或阿霉素以及阿霉素 (0.5、1、2、4、8、16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 联合柴胡皂苷 D (2、4、8、16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的同一培养基, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 继续培养 48 h。同时设置对照组 (添加空白培养基)。吸弃培养基, 每孔加含 MTT 0.5  $\text{mg}/\text{mL}$  的 PBS (pH 6.8) 100  $\mu\text{L}$ , 培养 4 h 后弃上清液, 每孔加入二甲基亚砜 100  $\mu\text{L}$ , 振摇 5 min, 用多功能酶标仪 570 nm 测定各孔吸光度 ( $A$ )。计算细胞增殖率、生长抑制率以及阿霉素对  $\text{H}_{22}$  细胞的半数抑制浓度 (median inhibitory concentration,  $\text{IC}_{50}$ )。  $\text{IC}_{50}$  根据药物浓度-生长抑制率半对数曲线采用 GraphPad Prism 8 计算获得生长抑制率 50% 对应的药物浓度。

细胞增殖率 = 给药组  $A$  值 / 对照组  $A$  值

生长抑制率 = (对照组  $A$  值 - 给药组  $A$  值) / 对照组  $A$  值

对于细胞摄取阿霉素的检测, 细胞于含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^\circ\text{C}$  培养箱内培养 24 h 后, 添加含不同质量浓度柴胡皂苷 D (0、2、4、8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 和阿霉素 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的同一培养基, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 继续培养 24 h。吸取培养基, 5000 r/min 离心 20 min, 取上清用荧光分光光度计测定  $A$  (激发波长 485 nm、发射波长 590 nm), 计算阿霉素含量 (以与无柴胡皂苷 D 干预的上清的比值表示)。

阿霉素摄取 = 1 - 阿霉素含量

## 2.2 激光全息检测细胞大小

取对数生长期  $\text{H}_{22}$  细胞, 调整细胞悬液浓度, 加入 6 孔板中 3 mL, 使每孔细胞数为  $1 \times 10^6$  个。分别单独加入终质量浓度为 2、4、8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的柴胡皂苷 D 或阿霉素 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 及阿霉素 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 联合柴胡皂苷 D (2、4、8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 同时设置未经药物处理的对照组。于 37  $^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱内培养 48 h, 用激光全息细胞系统分析细胞大小。

## 2.3 AO 染色法检测细胞自噬

取对数生长期  $\text{H}_{22}$  细胞, 调整细胞悬液浓度, 在 48 孔板中加入细胞使待测细胞数为  $1 \times 10^5$ /孔, 分别单独加入终质量浓度为 2、4、8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的柴胡皂苷 D 或阿霉素 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 及阿霉素 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 联合柴胡皂苷 D (2、4、8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 同时设置未经药物处理的对照组, 每组设 3 个复孔, 各组均用 2%

血清诱导自噬, 37  $^\circ\text{C}$  培养 24 h 后, 弃去培养基, PBS 洗 2 遍。每孔加入 100  $\mu\text{L}$  含 AO (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 染色液, 37  $^\circ\text{C}$  避光孵育 30 min, 倒置荧光显微镜观察并拍照。用 Image-pro Plus 5.0 图像分析系统对橙红色信号积分光密度 (integral optical density, IOD) 值进行分析, 以累积 IOD 代表细胞自噬水平。

## 2.4 DCFH-DA 检测细胞 ROS 水平

取对数生长期  $\text{H}_{22}$  细胞, 调整细胞悬液浓度, 在 48 孔板中加入细胞使待测细胞数为  $1 \times 10^5$ /孔, 分别单独加入终质量浓度为 2、4、8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的柴胡皂苷 D 或阿霉素 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 及阿霉素 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 联合柴胡皂苷 D (2、4、8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 同时设置未经药物处理的对照组, 每组设 3 个复孔。37  $^\circ\text{C}$  培养 48 h 后, 弃去培养基, 每孔加入终浓度为 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  DCFH-DA 1 mL, 37  $^\circ\text{C}$  避光孵育 20 min, 荧光分光光度计测定 ROS 含量。

## 2.5 Mito-Tracker Green 检测细胞线粒体功能

取对数生长期  $\text{H}_{22}$  细胞, 调整细胞悬液浓度, 在 48 孔板中加入细胞使待测细胞数为  $1 \times 10^4$ /孔, 分别单独加入终质量浓度为 2、4、8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的柴胡皂苷 D 或阿霉素 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 及阿霉素 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 联合柴胡皂苷 D (2、4、8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 同时设置未经药物处理的对照组, 每组设 3 个复孔, 37  $^\circ\text{C}$  培养 48 h, 弃去培养基, 每孔加入终浓度为 50 nmol/L Mito-Tracker Green, 37  $^\circ\text{C}$  避光孵育 1 h, 倒置荧光显微镜观察并拍照。用 Image-pro Plus 5.0 图像分析系统对荧光信号 IOD 值进行分析, 以累积 IOD 代表细胞线粒体功能。

## 2.6 Western blotting 印迹法检测细胞摄取体 Oatp1b1 蛋白的表达

取对数生长期  $\text{H}_{22}$  细胞, 调整细胞悬液浓度, 在 6 孔板中加入 3 mL, 使每孔细胞数为  $1 \times 10^6$  个。分别单独加入终质量浓度为 2、4、8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的柴胡皂苷 D 或阿霉素 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 及阿霉素 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 联合柴胡皂苷 D (2、4、8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 同时设置未经药物处理的对照组。于 37  $^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱内培养 48 h, 收集细胞, 提取细胞膜蛋白, 蛋白含量测定后与 Lodding buffer 按 1:4 混匀, 煮沸 10 min, 冷却至室温后上样到 12% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 根据蛋白 Marker 相对分子质量切割 Oatp1b1 蛋白胶带, 经转膜、抗原封闭、与一抗孵育及与二抗孵育后加入 ECL 发光液 (A 与 B 比例 1:1), 凝胶成像系统显影拍照并定量蛋白条带相对灰度值。

## 2.7 肝癌 H<sub>22</sub> 实体瘤小鼠模型制备、分组及给药

取腹水型肝癌 H<sub>22</sub> 小鼠腹水, 调细胞数  $5 \times 10^5/\text{mL}$ , 以 0.2 mL/只接种小鼠右侧腋部皮下建立小鼠肝癌实体瘤模型。将 110 只模型小鼠随即分成 4 组, 分别为模型组 (25 只)、阿霉素组 (30 只)、柴胡皂苷 D 组 (25 只)、阿霉素+柴胡皂苷 D 联合组 (30 只)。肿瘤接种后次日给药, 对照组 ig 0.5% 的 CMC-Na 0.2 mL/10 g, 每日 1 次; 阿霉素组尾 iv 给予阿霉素 8 mg/kg, 每周 1 次; 柴胡皂苷 D 组 ig 柴胡皂苷 D (0.5% CMC-Na 混悬) 20 mg/kg (根据药效学预试验结果得到的最佳剂量), 每日 1 次; 阿霉素+柴胡皂苷 D 联合组给予阿霉素和柴胡皂苷 D, 给药途径和剂量同相应单一药物组。治疗时间为 3 周。治疗期间各组每日监测小鼠体质量 1 次。第 22 天, 阿霉素组和联合给药组分别随机取 5 只小鼠用于检测瘤组织对阿霉素的摄取情况; 每组取 5 只小鼠用于检测瘤组织的血管通透性; 另每组颈椎脱臼处死小鼠 10 只, 剥离肿瘤, 称瘤质量, 取瘤组织制备组织匀浆, 检测 TGF- $\beta$ 1 水平和细胞外基质分泌水平; 每组剩余 10 只小鼠观察 90 d 内的小鼠存活情况。

肿瘤体积 = 长径  $\times$  宽径<sup>2</sup>/2

## 2.8 瘤组织对阿霉素摄取检测

阿霉素组和联合给药组小鼠尾 iv 阿霉素 30 min 后颈椎脱臼处死小鼠, 剥离肿瘤, 称质量后按组织质量与 PBS 容积比 1:5 研磨成组织匀浆, 5000 r/min 离心 20 min。组织沉淀按原始组织质量与酸性乙醇溶液 (0.3 mol/L 盐酸-无水乙醇比例 3:7) 容积比 1:3 混匀震荡 24 h, 5000 r/min 离心 20 min 取上清, 荧光分光光度计 (激发波长 485 nm、发射波长 590 nm) 测定 *A*, 计算阿霉素含量, 结果以每克瘤组织中阿霉素的含量表示阿霉素摄取情况。

## 2.9 瘤组织 TGF- $\beta$ 1 和细胞外基质分泌检测

称取各组肿瘤组织, 按组织质量与 PBS 容积比 1:5 研磨成组织匀浆, 5000 r/min 离心 20 min 取上清, 按 ELISA 试剂盒说明书操作, 测定 TGF- $\beta$ 1、PCol-I、Col-IV、LN 和 HA 的含量。

## 2.10 瘤组织血管通透性检测

各组肝癌 H<sub>22</sub> 实体瘤小鼠尾 iv 伊文斯兰 50 mg/kg 30 min 后颈椎脱臼处死, 剥离肿瘤, 称质量后按组织质量与 PBS 容积比 1:5 研磨成组织匀浆, 再按组织匀浆容积与 25% 的甲酰胺容积比 1:4 混匀震荡 24 h, 5000 r/min 离心 20 min 取上清, 紫外

分光光度计 620 nm 处测定 *A*, 按伊文斯兰标准线计算伊文斯兰组织含量, 结果以每克瘤组织中的伊文斯兰含量表示血管通透性。

## 2.11 统计方法

采用 GraphPad Prism 8 软件分析, 计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 *t* 检验; 生存时间采用 Kaplan-Meier 存活分析, *P* < 0.05 表示有显著性差异。

## 3 结果

### 3.1 柴胡皂苷 D 对 H<sub>22</sub> 细胞活性及阿霉素抑制细胞增殖的影响

与对照组 (未经药物处理) 比较, 阿霉素呈剂量相关性抑制 H<sub>22</sub> 细胞生长, 0.5~16  $\mu\text{g/mL}$  柴胡皂苷 D 不影响 H<sub>22</sub> 肝癌细胞增殖 (图 1-A), 但能增强阿霉素的细胞增殖抑制作用 (图 1-B、C), 促进细胞摄取阿霉素 (图 1-D), 增加 H<sub>22</sub> 细胞体积 (图 2), 阻止阿霉素诱导的细胞变小, 柴胡皂苷 D 质量浓度 8  $\mu\text{g/mL}$  作用最佳。

### 3.2 柴胡皂苷 D 对 H<sub>22</sub> 细胞 ROS 水平及线粒体功能的影响

与对照组比较, 1  $\mu\text{g/mL}$  阿霉素明显升高 H<sub>22</sub> 细胞 ROS 水平, 柴胡皂苷 D 在 2~8  $\mu\text{g/mL}$  内呈剂量相关性降低 H<sub>22</sub> 细胞 ROS 水平, 恢复阿霉素升高的细胞 ROS 水平 (图 3)。与对照组比较, 1  $\mu\text{g/mL}$  阿霉素明显降低 H<sub>22</sub> 细胞线粒体功能, 柴胡皂苷在 2~8  $\mu\text{g/mL}$  内呈剂量相关性增强 H<sub>22</sub> 细胞线粒体功能, 恢复阿霉素降低的细胞线粒体功能 (图 4)。

### 3.3 柴胡皂苷 D 对 H<sub>22</sub> 细胞自噬及摄取体蛋白 Oatp1b1 表达的影响

与对照组比较, 1  $\mu\text{g/mL}$  阿霉素明显抑制 AO 标记 (橙黄→红) 的 H<sub>22</sub> 细胞自噬; 柴胡皂苷 D 在 2~8  $\mu\text{g/mL}$  内呈剂量相关性抑制 H<sub>22</sub> 细胞自噬, 并可逆转阿霉素抑制 H<sub>22</sub> 细胞自噬的作用 (图 5)。与对照组比较, 1  $\mu\text{g/mL}$  阿霉素明显促进 H<sub>22</sub> 细胞摄取体蛋白 Oatp1b1 的表达; 柴胡皂苷 D 在 2~8  $\mu\text{g/mL}$  内呈剂量相关性增加 H<sub>22</sub> 细胞 Oatp1b1 的表达, 逆转阿霉素抑制 H<sub>22</sub> 细胞 Oatp1b1 的表达 (图 6)。

### 3.4 柴胡皂苷 D 对小鼠 H<sub>22</sub> 肝癌实体瘤生长及阿霉素治疗效果的影响

与模型组比较, 阿霉素明显抑制小鼠 H<sub>22</sub> 肝癌实体瘤生长, 柴胡皂苷 D 对小鼠 H<sub>22</sub> 肝癌实体瘤生长无明显影响, 但可增加瘤组织摄取阿霉素和阿霉素对肝癌实体瘤的治疗效果, 延长阿霉素治疗荷瘤小鼠的生存时间 (图 7)。

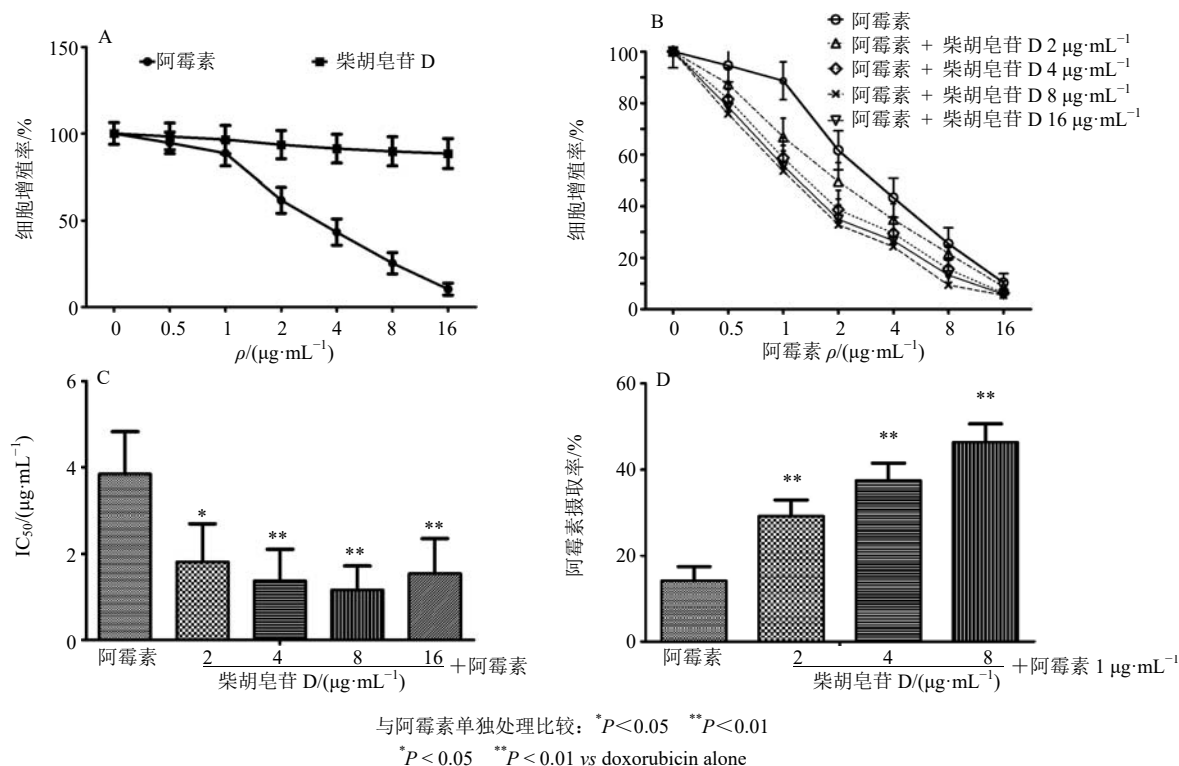


图 1 柴胡皂苷 D 对 H<sub>22</sub> 细胞增殖 (A)、阿霉素的细胞增殖抑制作用 (B、C) 及细胞摄取阿霉素 (D) 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
Fig. 1 Effects of saponin D on H<sub>22</sub> cell proliferation (A), proliferation inhibition of adriamycin (B, C) and cell uptake of adriamycin (D) ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

### 3.5 柴胡皂苷 D 对小鼠 H<sub>22</sub> 肝癌实体瘤细胞外基质的影响

与模型组比较,阿霉素明显增加小鼠 H<sub>22</sub> 肝癌实体瘤 HA、LN、PCol-I、Col-IV 等细胞外基质的分泌;柴胡皂苷 D 明显降低小鼠 H<sub>22</sub> 肝癌实体瘤以上细胞外基质的产生,改善阿霉素组 H<sub>22</sub> 肝癌实体瘤细胞外基质沉积(图 8)。

### 3.6 柴胡皂苷 D 对小鼠 H<sub>22</sub> 肝癌实体瘤组织 TGF- $\beta$ 1 分泌及血管通透性的影响

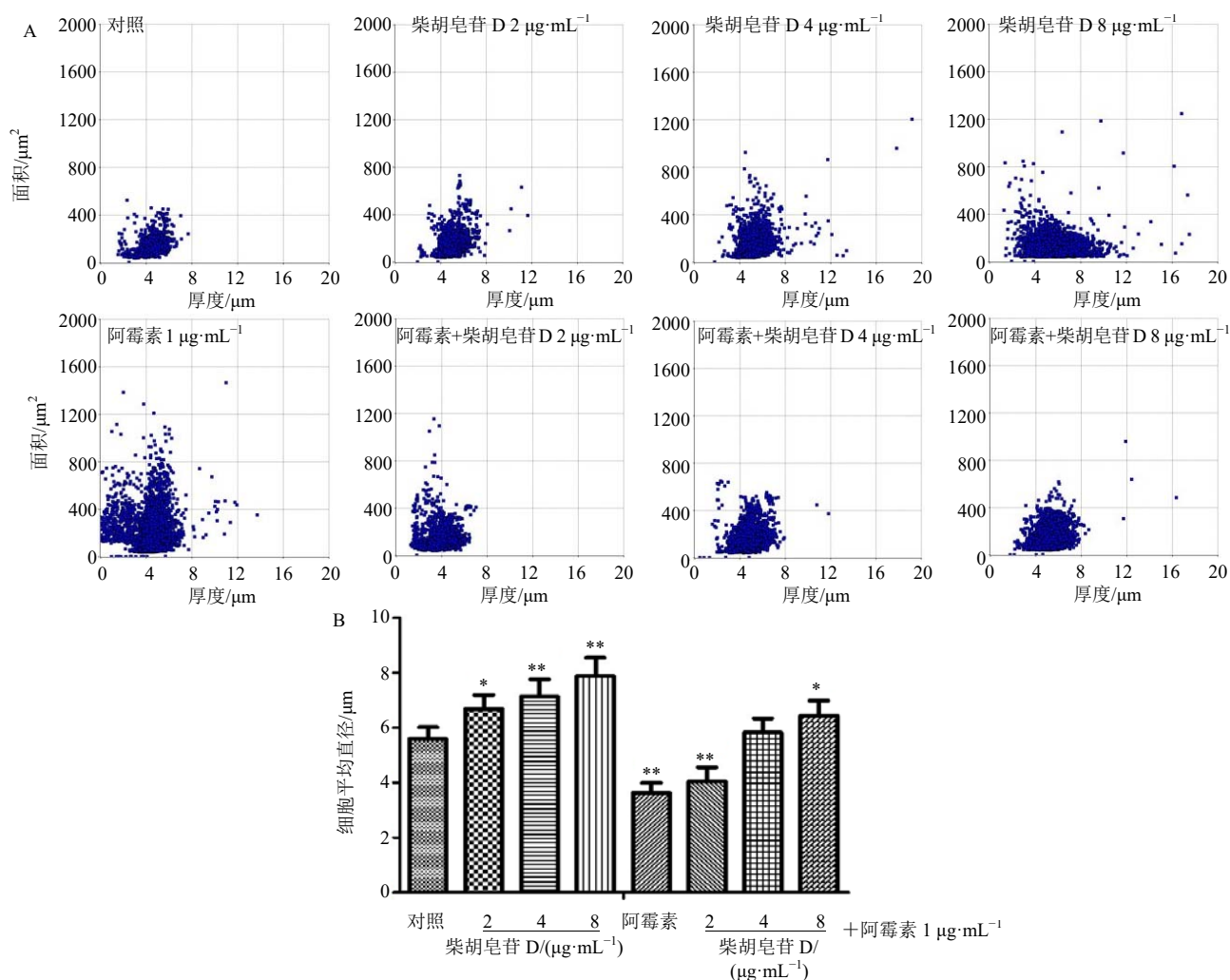
与模型组比较,阿霉素明显增加小鼠 H<sub>22</sub> 肝癌实体瘤组织 TGF- $\beta$ 1 的分泌;柴胡皂苷 D 可明显减少 H<sub>22</sub> 肝癌实体瘤组织 TGF- $\beta$ 1 的分泌,逆转阿霉素组 H<sub>22</sub> 肝癌实体瘤组织 TGF- $\beta$ 1 分泌的增加。与模型组比较,阿霉素明显增加小鼠 H<sub>22</sub> 肝癌实体瘤血管通透性;柴胡皂苷 D 可明显降低小鼠 H<sub>22</sub> 肝癌实体瘤血管通透性,逆转阿霉素组小鼠 H<sub>22</sub> 肝癌实体瘤血管通透性的增加(图 9)。

## 4 讨论

柴胡为伞形科草本植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 或狭叶柴胡 *B. scorzonifolium* Willd. 的干燥根,入肝胆经,有解表退热、疏肝解

郁、升阳举陷的功能,主治以胸胁胀痛、寒热往来、头痛目眩等为主的外感和内伤病证,其引药入肝作用自古就被中医药界所认识<sup>[6]</sup>。柴胡气味俱薄,能引胃气上升发散表热;同时柴胡味薄兼苦,可通可泄,有疏通肠胃的功能,是调节机体气机升降的重要药物,《本经》谓其与大黄一样有“推陈致新”之功<sup>[7]</sup>。葛文静等<sup>[8]</sup>发现,将柴胡加入到肝病治疗药物组方中能将药物引入肝脏,因而增强肝病治疗效果。曾有研究证明,柴胡皂苷 D 能抑制人乳腺癌 SK-BR-3 细胞<sup>[9]</sup>、人结直肠癌 SW480 细胞<sup>[10]</sup>和人肝癌 HepG2 细胞<sup>[11]</sup>增殖,诱导细胞周期阻滞<sup>[12]</sup>。本研究发现柴胡皂苷 D 对抗肿瘤药阿霉素治疗小鼠肝癌体内均有促进细胞摄取阿霉素的靶向导引作用,为柴胡皂苷 D 作为柴胡引经作用的物质基础提供了依据。

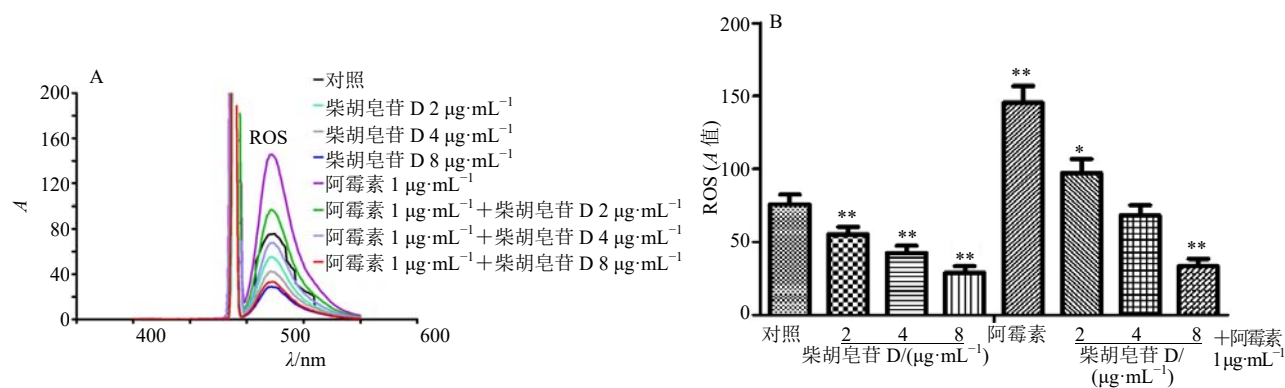
肝癌在中医学古籍中属于“肝积”“黄疸”“鼓胀”等范畴,其症状描述与现代医学中的肝癌临床表现有诸多类似之处,同时认为肝郁气滞是其基本病机<sup>[13]</sup>。我国学者基于中医理论的“十一脏皆取决于胆”和“胆主枢机”提出“少阳枢机不利为导致肝癌的核心病机”的观点,主张肝癌当从少阳论



A-H<sub>22</sub> 细胞大小散射图 B-H<sub>22</sub> 细胞平均直径 与对照组比较: \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$   
 A-scatter diagram of H<sub>22</sub> cell size B-average diameter of H<sub>22</sub> cells \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$  vs control group

图 2 柴胡皂苷 D 对 H<sub>22</sub> 细胞大小的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 2 Effect of saikosaponin D on H<sub>22</sub> cell size ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

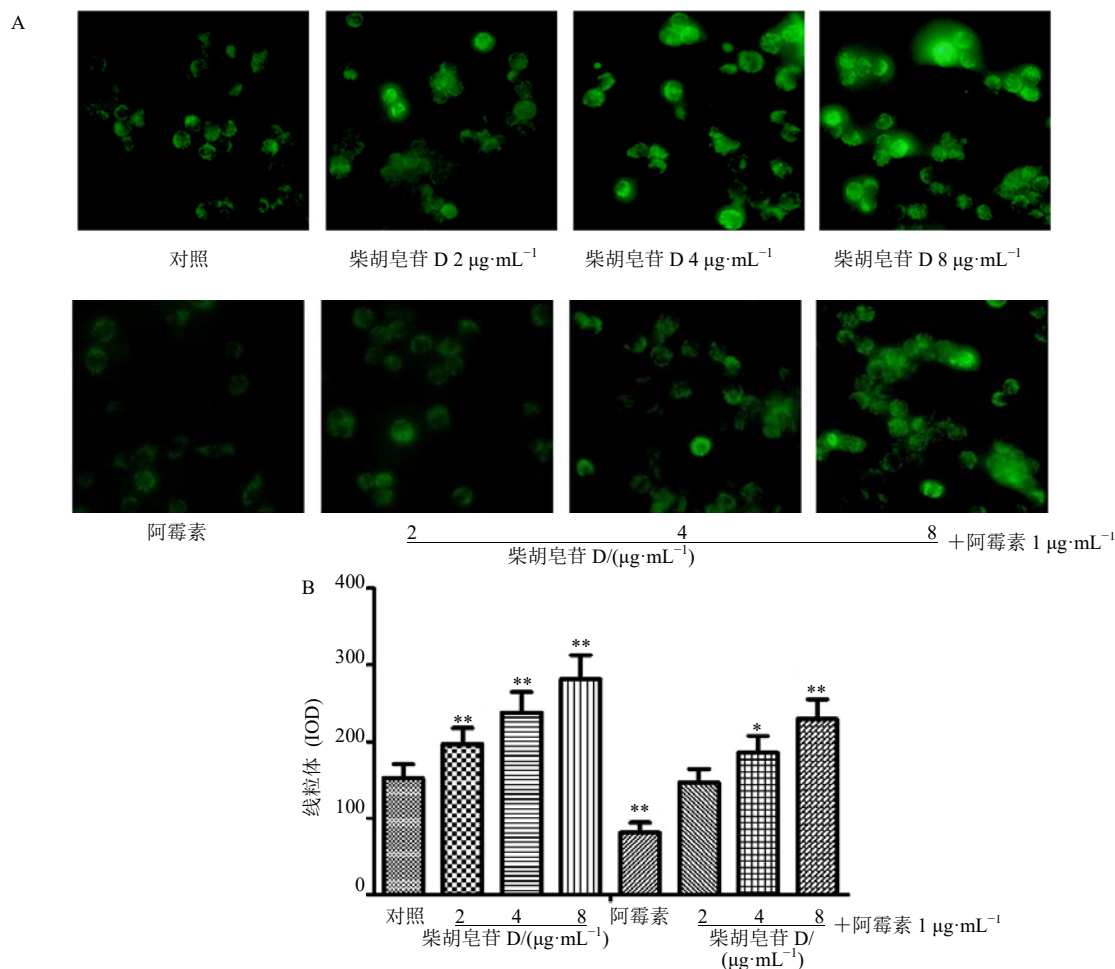


A-ROS 波长扫描吸收图 B-ROS (A 值) 与对照组比较: \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$   
 A-wavelength scanning absorption diagram of ROS B-A value of ROS \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$  vs control group

图 3 柴胡皂苷 D 对 H<sub>22</sub> 细胞 ROS 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 3 Effect of saikosaponin D on ROS in H<sub>22</sub> cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )





A-H<sub>22</sub>细胞中的线粒体示踪绿 ( $\times 40$ ) B-线粒体功能 与未加药物的对照比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$

A-mitochondrial tracer green in H<sub>22</sub> cells ( $\times 40$ ) B-mitochondrial function \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group

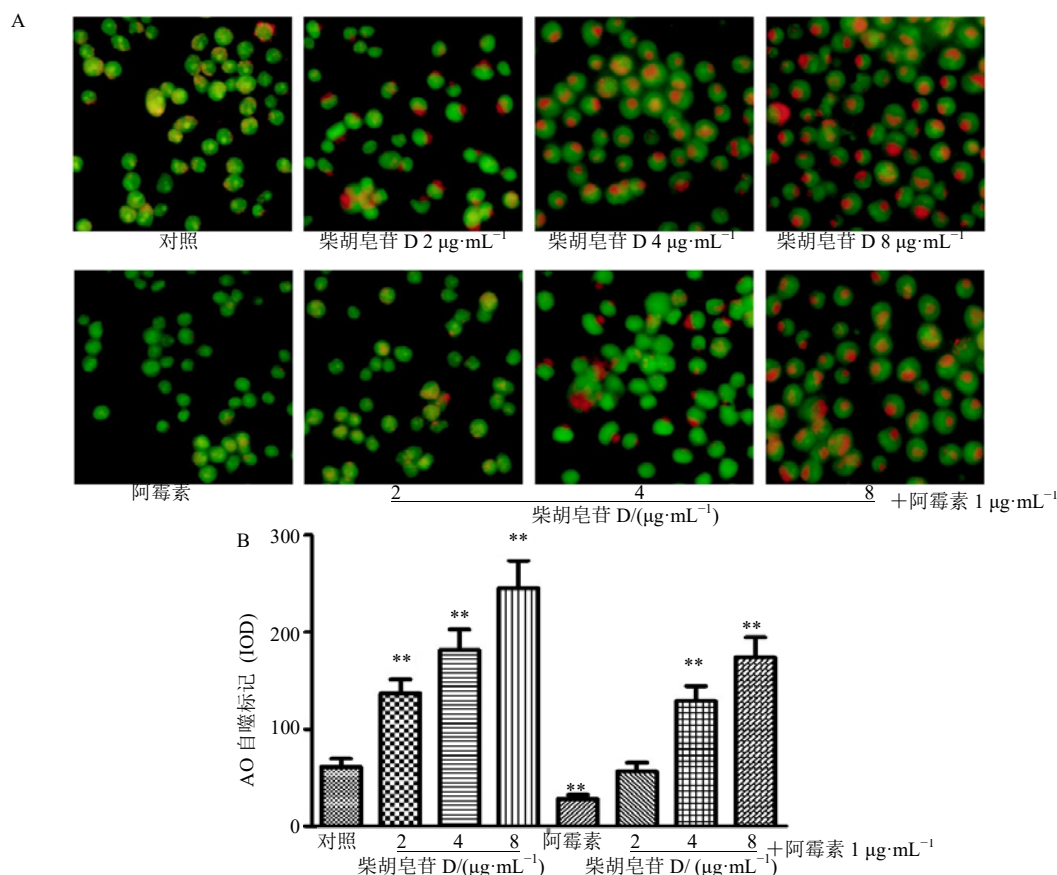
图 4 柴胡皂苷 D 对 H<sub>22</sub> 细胞线粒体功能的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Effect of saikosaponin D on mitochondrial function in H<sub>22</sub> cell ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

治<sup>[14]</sup>。临床观察证实了疏肝解郁治疗方法能够提高肝癌患者的有效率和生存率,减轻放疗化疗给肝癌患者带来的不良反应及心理抑郁,兼有改善肝功能和调节免疫功能等作用<sup>[15]</sup>。周仲瑛教授基于临床实践提出“癌毒蓄积是肝癌发生、发展及加重的关键”,认为肝气郁结是肝癌发病的起始,继而形成湿、热、瘀互结的肝脾肾亏虚局面,最终导致癌毒蓄积引发肝癌<sup>[16]</sup>。临床上“虚-郁-滞”病机贯穿肝癌全程,肝癌患者常出现口苦、咽干、心烦喜呕、胸胁苦满、不欲饮食等肝郁气滞的“正虚、邪实”现象<sup>[17]</sup>。因此,肝癌治疗的关键应首重理气解郁,同时运用清热利湿、活血化瘀等抗癌解毒之法。柴胡为最常用疏肝解郁中药,兼备畅通气机功能,与中医肝癌治疗原则非常符合。有研究表明,柴胡皂苷能调节

Th17/Treg 细胞的失衡和抑制炎性细胞因子分泌减轻大鼠抑郁症状<sup>[18]</sup>,证实了柴胡及其活性成分柴胡皂苷的解郁作用。本研究发现,柴胡皂苷 D 可减少肝癌实体瘤小鼠瘤组织 TGF- $\beta 1$  的分泌、降低小鼠肿瘤血管通透性,在本实验剂量范围内体内外对肝癌细胞生长均无影响,但能增加阿霉素对荷瘤小鼠的治疗效果,提示柴胡皂苷 D 与一般疏肝解郁药物一样,单独治疗癌症难以显效,需与抗癌药物联用才能发挥作用。

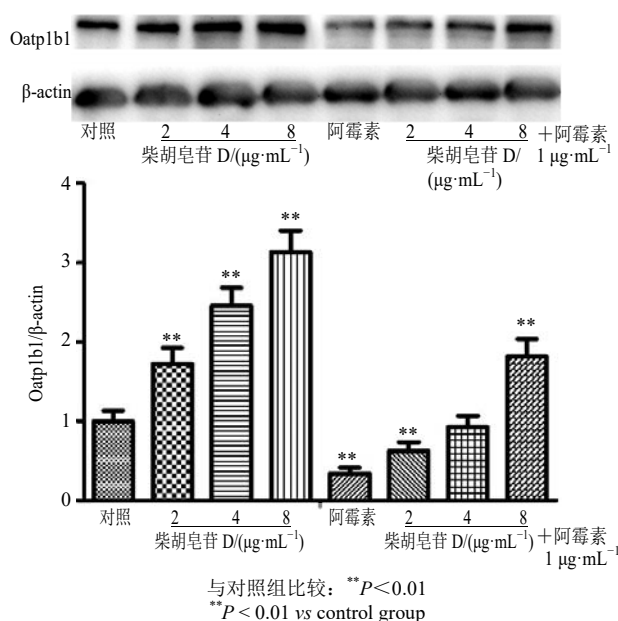
靶向治疗理念对肝癌治疗药物的研发起了很大推动作用,由于癌症发病机制复杂,目前已发现的癌症驱动基因已达 500 多种,即使同一种癌症也很难定位统一的驱动基因<sup>[19]</sup>,传统化疗仍是肝癌等肿瘤的主要治疗方法。通过中药引经药及其活性成分



A-AO 指示的  $\text{H}_{22}$  细胞自噬小体 ( $\times 40$ ) B-AO 指示的细胞自噬水平 与对照组比较: \*\* $P < 0.01$   
A-AO indicated autophagosome in  $\text{H}_{22}$  cells ( $\times 40$ ) B-AO indicated autophagic level \*\* $P < 0.01$  vs control group

图 5 柴胡皂苷 D 对  $\text{H}_{22}$  细胞自噬的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 5 Effect of saikosaponin D on autophagy in  $\text{H}_{22}$  cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



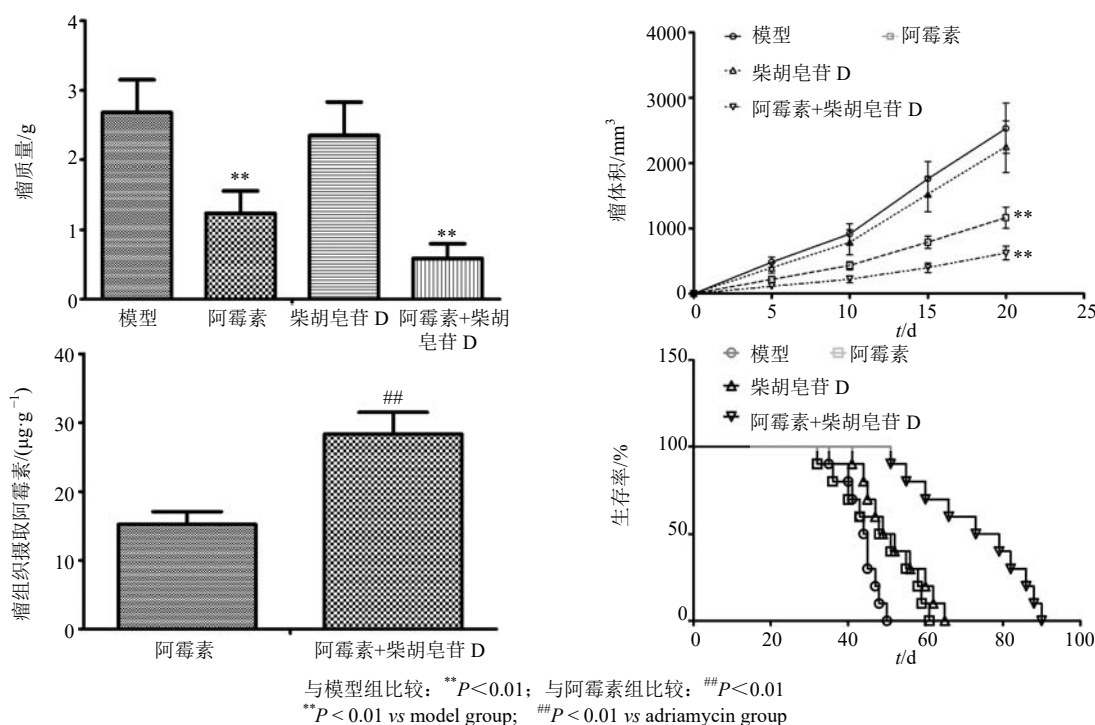
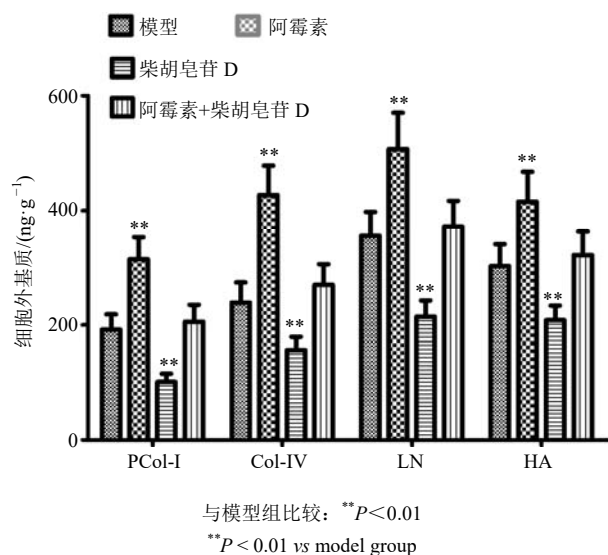
与对照组比较: \*\* $P < 0.01$   
\*\* $P < 0.01$  vs control group

图 6 柴胡皂苷 D 对  $\text{H}_{22}$  细胞 Oatp1b1 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 6 Effect of saikosaponin D on protein expression of Oatp1b1 in  $\text{H}_{22}$  cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

引导肿瘤化疗药物直达肿瘤部位,从而提高肿瘤化疗效果,避免了检测癌症驱动基因使用肿瘤靶向药物的麻烦和高额费用,为肿瘤靶向治疗提供了简便、有效的治疗方法。柴胡及其活性成分柴胡皂苷作为中药引经药的代成为肝病靶向导引研究的热点之一。有研究表明,柴胡能提高拉米呋啶对乙肝病毒的治疗效果,使肝细胞损伤明显恢复、病理改变趋于正常,且能减少肝脏网状纤维增生<sup>[20]</sup>。另有研究发现柴胡皂苷能增加肝内蛋白质合成,升高肝糖含量,降低大鼠血浆胆固醇、三酰甘油和磷脂水平,加速血液清除胆固醇,为柴胡及其活性成分柴胡皂苷作为肝病治疗的引经药提供了实验依据<sup>[21]</sup>。王宗明等<sup>[22]</sup>发现柴胡皂苷 D 可以抑制哺乳动物雷帕霉素靶基因 (mammalian target of rapamycin, mTORC) 信号传导通路诱发肝癌细胞自噬性死亡,党锋等<sup>[23]</sup>研究发现柴胡皂苷 D 能通过抑制上皮间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 和细胞干性阻止人结直肠癌细胞



图 7 柴胡皂苷 D 对 H<sub>22</sub> 肝癌实体瘤生长及阿霉素治疗效果的影响Fig. 7 Effect of saikosaponin D on tumor growth in H<sub>22</sub> solid tumor-bearing mice and therapeutic action of doxorubicin图 8 柴胡皂苷 D 对 H<sub>22</sub> 肝癌实体瘤细胞外基质的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Fig. 8 Effect of saikosaponin D on extracellular matrix of H<sub>22</sub> solid tumor ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

SW480 迁移和侵袭,从另一角度解释了柴胡引经作用的机制。本研究发现,柴胡皂苷 D 在体外呈剂量依赖性增加 H<sub>22</sub> 细胞 Oatp1b 的表达,逆转阿霉素诱导 H<sub>22</sub> 细胞 Oatp1b1 表达的降低;在体内抑制小鼠 H<sub>22</sub> 肝癌实体瘤 HA、LN、PColl-I、Col-IV 的分泌,改善阿霉素组 H<sub>22</sub> 肝癌实体瘤细胞外基质沉积,为

柴胡及其活性成分柴胡皂苷引经作用增加了新的机制。

肿瘤的发生发展和肿瘤微环境密不可分,细胞外基质(extracellular Matrix, ECM)可为肿瘤细胞提供结构支架及细胞因子和生长因子,从而促进肿瘤细胞增殖、迁移和分化,与临床不良预后相关<sup>[24]</sup>。自噬是细胞利用溶酶体对自身细胞器进行分解,从而回收利用大分子物质的一种高度保守细胞生物学行为,有利于细胞适应不利的生活环境、维持机体内环境稳态,虽然在已完成恶性转化的肿瘤细胞中对维持肿瘤细胞基础代谢和保持细胞活性起重要作用,其功能的维持也是机体阻止肿瘤发生的重要途径。有研究表明,自噬与 ECM 的合成和降解失衡密切相关,细胞自噬功能降低导致的线粒体功能受损是 ECM 累积的一个重要机制<sup>[25]</sup>。梁晓强等<sup>[26]</sup>证明了柴胡的引经作用与其抑制 ECM 纤维连接蛋白(fibronectin, FN)有关,为中药引经药靶向 ECM 提供了依据。结合体外研究发现柴胡皂苷 D 能增加细胞自噬和改善线粒体功能的结果,认为柴胡皂苷 D 维持自噬和线粒体功能,继而促进 Oatp1b1 的表达和降低肿瘤细胞外基质沉积,从而增加化疗药物在肿瘤部位的分布应该是其引经的重要机制。

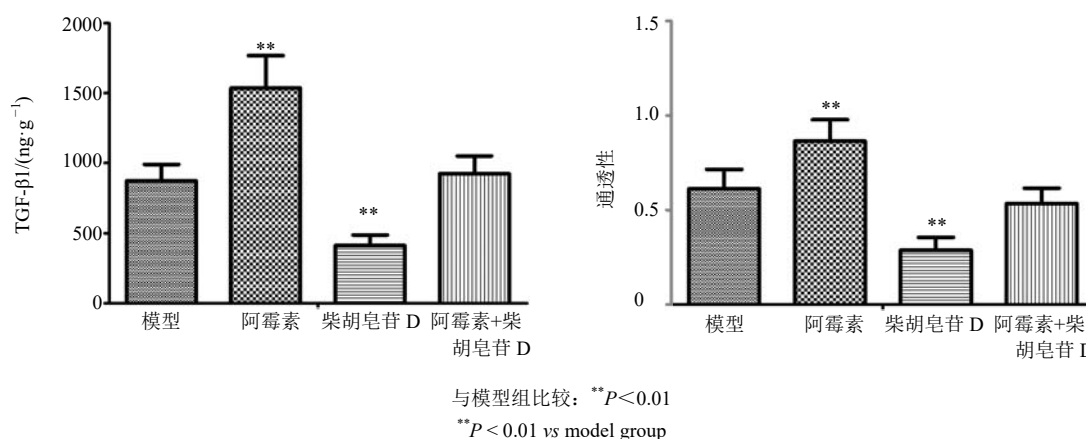


图 9 柴胡皂苷 D 对  $H_{22}$  肝癌实体瘤组织 TGF- $\beta 1$  分泌及血管通透性的影响

Fig. 9 Effect of saikosaponin D on TGF- $\beta 1$  secretion and vascular permeability in  $H_{22}$  solid tumor-bearing mice

综上所述,柴胡皂苷 D 能维持细胞自噬和线粒体功能,促进 Oatp1b1 的表达和降低肿瘤细胞外基质沉积,从而对阿霉素治疗小鼠肝癌起到靶向导引作用。柴胡皂苷 D 的这种靶向导引作用对肝癌化疗药物可能具有普遍性,有可能成为简单有效的肝癌化疗药物靶向导引工具与辅助材料。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Liu C Y, Chen K F, Chen P J. Treatment of liver cancer [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2015, 5(9): a021535.
- [2] Lee Y T, Tan Y J, Oon C E. Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 834: 188-196.
- [3] Xu J, Song Z, Guo Q, *et al.* Synergistic effect and molecular mechanisms of traditional Chinese medicine on regulating tumor microenvironment and cancer cells [J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 1490738.
- [4] 陆婷婷, 赵国平. 小柴胡汤防治肝病机制研究进展 [J]. *世界华人消化杂志*, 2008, 16(9): 971-974.
- [5] 沈霞, 赵振宇. 柴胡治疗肝病有效成分及药理作用研究进展 [J]. *生物技术世界*, 2014, 11(2): 100.
- [6] 王玉芝. 小柴胡汤治疗肝病的临床研究 [J]. *中成药*, 2000, 22(4): 296-298.
- [7] 于婷婷, 王均宁. 柴胡、大黄药对推陈致新作用探析 [J]. *亚太传统医药*, 2018, 14(9): 71-72.
- [8] 葛文静, 王慧森, 刘明, 等. 引经药柴胡配伍大黄-丹参药对抗大鼠肝纤维化作用的研究 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2018, 24(10): 1398-1401.

- [9] 王冰, 孙涛. 柴胡皂苷 D 对人乳腺癌 SK-BR-3 细胞株增殖与凋亡的影响 [J]. *河南中医*, 2020, 40(5): 735-737.
- [10] 党锋, 杨坤荣, 刘文聘, 等. 柴胡皂苷 D 通过抑制 EMT 和细胞干性抑制人结直肠癌细胞 SW480 的迁移和侵袭 [J]. *现代肿瘤医学*, 2020, 28(7): 1091-1096.
- [11] 吴勤祥, 李好朝, 乔泽强, 等. 柴胡皂苷 D 对人肝癌 HepG2 细胞系增殖和裸鼠肝癌形成的抑制作用 [J]. *中国免疫学杂志*, 2018, 34(11): 1664-1668.
- [12] 刘丹, 王佳贺. 柴胡皂苷抗肿瘤作用机制的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2018, 33(1): 203-212.
- [13] 肖跃红. 原发性肝癌的中医病机及防治探讨 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2013, 19(6): 617.
- [14] 郭文海, 张炯善, 黎少东, 等. 肝癌从少阳论治 [J]. *中医学报*, 2017, 32(9): 1580-1582.
- [15] 段桦, 周天, 胡凯文. 疏肝解郁法在原发性肝癌中的应用进展 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(1): 307-309.
- [16] 邢凤举, 李柳, 周仲瑛. 周仲瑛教授应用复法大方治疗肝癌 [J]. *吉林中医药*, 2014, 34(1): 22-25.
- [17] 吴泳蓉, 周婷, 田莎, 等. 从“虚-郁-滞”病机浅谈肝癌的发病机理 [J]. *环球中医药*, 2019, 12(12): 1796-1799.
- [18] 郭旭彤, 安继东, 梅建强. 柴胡皂苷 A 对抑郁症大鼠 Treg 和 Th17 免疫平衡的影响 [J]. *海南医学院学报*, 2020, 26(22): 1686-1690.
- [19] 李汛, 白仲添. 生物靶向分子在肝细胞癌治疗中的作用 [J]. *西部医学*, 2014, 26(7): 817-821.
- [20] 杨书兰, 黄正昌, 朱辨弦, 等. 柴胡和小柴胡汤对鸭乙型肝炎治疗作用的研究 [J]. *广州中医药大学学报*, 2003, 20(4): 289-293.
- [21] 阮君, 肖铁刚, 王兵. 柴胡皂苷 D 对非酒精性脂肪性肝

- 炎大鼠糖脂代谢紊乱的影响 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2019, 29(5): 399-401.
- [22] 王宗明, 王敏, 肖欢智. 柴胡皂苷 D 通过调控 mTORC 信号通路诱发肝癌细胞自噬的作用研究 [J]. 中国药理学杂志, 2018, 53(19): 1652-1657.
- [23] 党锋, 杨坤荣, 李峰, 等. 柴胡皂苷 D 抑制人结直肠癌细胞 SW480 增殖的分子机制探讨 [J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26(14): 2159-2162.
- [24] 方雪妮, 周天, 李泉旺, 等. 中药对肿瘤微环境各组分的调节作用 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(2): 631-634.
- [25] Chen W, Sun Y, Gu X, *et al.* Conditioned medium of mesenchymal stem cells delays osteoarthritis progression in a rat model by protecting subchondral bone, maintaining matrix homeostasis, and enhancing autophagy [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2019, 13(9): 1618-1628.
- [26] 梁晓强, 章学林, 马恩伟, 等. 引经药柴胡对胰腺纤维化大鼠细胞外基质合成调控增效的作用 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2012, 20(10): 433-437.

[责任编辑 潘明佳]