

## • 药理与临床 •

## 山慈菇水提物抗肝癌有效部位筛选及其对肝癌小鼠肿瘤血管生成的影响

芦艺凡, 王宇, 姜婷月, 李佳园, 范文昕, 张 鹤, 石晋丽\*

北京中医药大学中药学院, 北京 102488

**摘要:** 目的 明确山慈菇 *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus* 水提物的抗肝癌主要有效部位, 探讨其有效部位对肝癌小鼠肿瘤血管生成的作用及机制。方法 采用正交试验优化山慈菇水提物提取条件, 醇沉法将水提物分为醇沉部位与醇溶部位, 苯酚硫酸法检测各部位多糖含量, 在药效指导下进行有效部位筛选。将 60 只 balb/c 小鼠随机分为空白组、模型组、索拉非尼组 (30 mg/kg)、山慈菇水提物组、山慈菇醇沉物组及山慈菇醇溶物组 (均以生药量计 1.82 g/kg), 每组 10 只, 连续 ig 给药 16 d。通过计算抑瘤率及苏木精-伊红 (hematoxylin eosin, HE) 染色观察各组肿瘤组织病理变化综合评价药效; 取有效部位组小鼠肿瘤组织或血清, 原位末端标记 (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling, TUNEL) 法测定肿瘤细胞凋亡情况; 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测小鼠血清中血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 和 MMP-9 水平; 免疫组织化学法 (immunohistochemistry, IHC) 染色观察肿瘤组织微血管生成情况; Western blotting 法检测肿瘤组织 VEGF、MMP-2、MMP-9 以及 Wnt1、 $\beta$ -连环蛋白 ( $\beta$ -catenin) 的表达变化。结果 正交试验优化得山慈菇水提物最优提取条件为浸泡时间 90 min、料液比 1:30、提取时间 120 min、提取次数 2 次, 山慈菇水提物、醇沉物、醇溶物得率分别为 37.76%、28.00%、5.53%, 含量测定得多糖含量分别为 70.18%、95.19%、0.58%。动物实验结果显示, 山慈菇水提物组、山慈菇醇沉物组、山慈菇醇溶物组抑瘤率分别为 43.91%、43.39%、21.60%; 病理切片显示, 模型组肿瘤组织病变显著, 各给药组均有所改善, 以山慈菇水提物组与醇沉物组细胞核碎裂更为明显。与模型组比较, 山慈菇醇沉物组肿瘤细胞凋亡率显著增加 ( $P<0.01$ ); 小鼠血清与肿瘤组织中 VEGF、MMP-2、MMP-9 水平显著降低 ( $P<0.01$ 、 $0.001$ ); IHC 结果显示, 山慈菇醇沉物组较模型组微血管密度极显著降低 ( $P<0.001$ ); Western blotting 结果显示, 山慈菇醇沉物能抑制肿瘤组织中 Wnt1、 $\beta$ -catenin 蛋白表达 ( $P<0.001$ )。结论 山慈菇水提醇沉物是山慈菇水提物中发挥抗肝癌药效的主要有效部位, 其成分主要为山慈菇多糖, 作用机制可能与抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路激活, 进而抑制肿瘤血管生成有关。

**关键词:** 山慈菇; 山慈菇多糖; 肝细胞癌; 血管生成; Wnt/ $\beta$ -catenin 通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)05-1607-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.05.012

## Screening of anti-hepatocarcinoma active fraction from water extract of *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus* and its effect on tumor angiogenesis in mice with hepatocarcinoma

LU Yifan, WANG Yu, JIANG Tingyue, LI Jiayuan, FAN Wenxin, ZHANG Ge, SHI Jinli

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

**Abstract: Objective** To identify the primary anti-hepatocarcinoma active site in Shancigu (*Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus*) aqueous extract and investigate its effects and mechanisms on tumor angiogenesis in mice with liver cancer. **Methods** After optimizing the extraction conditions of *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus* aqueous extract through orthogonal

收稿日期: 2024-09-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82073971)

作者简介: 芦艺凡, 硕士研究生, 从事中药药效物质基础与作用机制研究。E-mail: asd12382022@163.com

\*通信作者: 石晋丽, 博士生导师, 教授, 从事中药药效物质基础与作用机制研究。E-mail: shijl@vip.sina.com

experiment, the aqueous extract was divided into alcohol precipitation and alcohol soluble parts using alcohol precipitation method, phenol-sulfuric acid method was used to detect the content of polysaccharides in each part, and effective parts were screened under the guidance of pharmacological effects. A total of 60 BALB/c mice were randomly assigned into a blank group, a model group, a sorafenib group (30 mg/kg), a *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus* aqueous extract group, a *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus* ethanol sediments group, and a *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus* alcohol soluble substance group (all calculated based on the amount of raw medicine 1.82 g/kg), with 10 mice in each group. The mice were intragastrically administered continuously for 16 d. The drug efficacy was comprehensively evaluated by calculating tumor inhibition rate and observing pathological changes in tumor tissues of each group through hematoxylin-eosin (HE) staining. Tumor tissue or mouse serum after effective site administration were selected, then terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay was performed to detect apoptosis in tumor cells. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the levels of vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), and MMP-9 in mice serum. Immunohistochemical (IHC) was used to observe micro vessel density (MVD) in tumor tissues. Western blotting was used to detect the expression changes of VEGF, MMP-2, MMP-9, Wnt1 and  $\beta$ -catenin. **Results** The optimal extraction conditions were 90 min of soaking time, a material-to-liquid ratio of 1:30, 120 min of extraction time, and two extraction cycles. The yields of water extract, alcohol precipitate, and alcohol soluble extract of *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus* were 37.76%, 28.00%, and 5.53%, respectively. The phenol sulfuric acid method determined that the polysaccharide content was 70.18%, 95.19%, and 0.58%, respectively. And the results of animal experiments showed that tumor inhibition rates were 43.91%, 43.39%, and 21.60% respectively. Pathological sections revealed significant tumor tissue lesions in the model group, while all treatment groups showed improvements, with more pronounced nuclear fragmentation in the *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus* aqueous extract and ethanol sediments groups. Compared with the model group, the apoptosis rate of tumor cells in the *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus* ethanol sediments group was significantly increased ( $P < 0.01$ ), and VEGF, MMP-2, and MMP-9 levels were significantly decreased in mouse serum and tumor tissues ( $P < 0.01, 0.001$ ). IHC results showed a significant reduction in MVD in the *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus* ethanol sediments group compared to the model group ( $P < 0.001$ ). Western blotting results indicated that *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus* ethanol sediments inhibited the expression of Wnt1 and  $\beta$ -catenin proteins in tumor tissues ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus* ethanol sediments are the main active site responsible for the anti-hepatocarcinoma effect of *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus* aqueous extract. Its main component is *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus* polysaccharide. The mechanism of action may be related to inhibiting the activation of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and thus inhibiting tumor angiogenesis.

**Key words:** *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus*; *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus* polysaccharides; hepatocellular carcinoma; angiogenesis; Wnt/ $\beta$ -catenin pathway

肝细胞癌是发病率最高的原发性恶性肿瘤之一，其死亡率在全球肿瘤相关死亡中高居第4位<sup>[1]</sup>。目前肝细胞癌发病率一直居高不下，甚至呈上升趋势，患者在被诊断时通常已经处于中晚期，因此，只能采用化疗药物进行治疗，但这常常导致严重的不良反应，复发转移率较高<sup>[2]</sup>。目前，肝细胞癌已成为预后最差的实体肿瘤之一<sup>[3]</sup>，由于较高的发病率和复发率以及治疗方案存在的局限性，肝细胞癌已成为人类面临的主要公共卫生问题之一<sup>[4]</sup>，因此，寻求新的安全高效的治疗方式具有重大的临床价值<sup>[5]</sup>。

肝细胞癌是一种含有大量血管的恶性肿瘤<sup>[6]</sup>，血管的生成在其发展和转移中发挥了关键作用，目前抗肿瘤血管生成治疗已在肝细胞癌中取得显著疗效。研究表明肝细胞癌受多种途径调控，其中 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白 ( $\beta$ -catenin) 信号通路是肝癌发生的

重要驱动因素，80%以上的肝癌患者中发现了该通路成分的基因突变<sup>[7]</sup>，其通常在肝细胞癌中过度活跃从而诱导肿瘤发生、生长和侵袭<sup>[8]</sup>，研究发现 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路通过调控下游靶基因基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 参与多种肿瘤进展，如细胞迁移、血管生成等<sup>[9]</sup>，抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路激活可以抑制肝癌细胞的迁移、血管生成等<sup>[10]</sup>，因此调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路对治疗肝细胞癌具有重要意义。

在恶性肿瘤的治疗中，中医药具有不良反应较小、多靶点、多途径治疗等优势<sup>[11]</sup>，山慈菇入肝、脾经，具有清热解毒、化痰散结的功效。国医大师周仲瑛教授根据癌毒病机理论及多年临床经验提出的消癌解毒方中便以山慈菇作为臣药<sup>[12]</sup>，而山慈菇在复方中的作用机制并不清晰，对山慈菇进行研究有

助于深入了解其抗肿瘤药理活性及治疗机制,更清晰地剖析其在方剂中的贡献,为理解方剂的整体作用提供重要线索。有研究通过体外实验初步表明,山慈菇水煎液能通过诱导肝癌细胞凋亡并抑制其上皮间质转化而发挥抗肝癌作用<sup>[3]</sup>,但山慈菇水提物能否在体内发挥抗肝癌作用及其主要有效部位仍不清晰。本研究旨在明确山慈菇水提物的体内抗肝癌作用,并明确其发挥作用的主要有效部位,探究其有效部位对肿瘤血管生成的影响并进一步研究其能否通过调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路而发挥作用。

## 1 材料

### 1.1 细胞株与动物

小鼠肝癌细胞系 H22 (批号 BNCC350760) 购自廊坊北纳生物有限公司。

SPF 级 KM 雄性小鼠 3 只,体质量 18~22 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号 SCXK (京) 2021-0011; SPF 级健康雌性 Balb/c 小鼠 60 只,体质量 18~22 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK (京) 2021-0006。所有动物均在北京中医药大学实验动物中心的标准屏障环境中饲养,适应性饲养 1 周后用于实验。本研究动物实验经北京中医药大学伦理委员会批准 (批准号 BUCM-2024022904-1204)。

### 1.2 药品与试剂

山慈菇中药饮片 (批号 2106019) 购自北京市双桥燕京中药饮片厂,经北京中医药大学中药资源与鉴定系中药资源教研室石晋丽教授鉴定为兰科杜鹃兰属植物杜鹃兰 *Cremastra appendiculata* (D. Don) Akino 的干燥假鳞茎; 甲苯磺酸索拉非尼片 (批号 H20203403, 国药准字 H20203403) 购自重庆药友制药有限公司; 乌拉坦 (批号 C10821103) 购自上海麦克林生化科技有限公司; 苏木素-伊红 (hematoxylin eosin, HE) 染液 (批号 B1002) 购自武汉百仟度生物科技有限公司; 原位细胞凋亡 (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling, TUNEL) 检测试剂盒 (批号 11684817910) 购自瑞士霍夫曼-拉罗氏公司。二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 显色试剂盒 (批号 2005289) 购自丹麦 DAKO 公司; 乙二胺四乙酸 (EDTA) (PH9.0) 抗原修复液 (批号 B2002) 购自武汉百仟度生物; 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、基质金属蛋白酶-2 (matrix

metallopeptidase-2, MMP-2) 和 MMP-9 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测试剂盒 (批号分别为 2407036E、240702FC、240703UI) 均购自江苏酶免实业有限公司; 柠檬酸 (pH 6.0) 抗原修复液 (批号 B2010) 购自武汉百仟度生物公司; CD34 抗体 (批号 BM4082) 购自美国博士德生物公司; HRP 标记的山羊抗兔二抗 (批号 5220-0336) 购自美国 SeraCare 公司; VEGF、MMP-2、MMP-9、Wnt1、 $\beta$ -catenin、内参  $\beta$ -Actin 的一抗 (批号分别为 10373-2-AP、10375-2-AP、19003-1-AP、27935-1-AP、51067-2-AP、UM4001) 均购自武汉三鹰生物技术有限公司; IgG-HRP 标记的羊抗兔二抗 (批号 S0001) 购自美国 Affinity 公司; gG-HRP 标记的羊抗小鼠二抗 (批号 S0002) 购自美国 Affinity 公司; 娃哈哈纯净水。

### 1.3 仪器

LGJ-10 型冷冻干燥机 (北京利德恒达科技有限公司); ME155DU 型精密电子天平 (十万分之一, 美国梅特勒-托利多公司); Nikon Eclipse CI 型正置光学显微镜 (日本尼康公司); TYXH-II 型涡旋混合器 (南京天悦电子科技有限公司); MicroPublisher 型成像系统 (加拿大 Q-IMAGING 公司); RM2016 型病理切片机 (上海徕卡仪器有限公司); KD-P 型组织摊片机 (浙江省金华市科迪仪器设备有限公司); WD-9405A 型脱色摇床 (北京市六一仪器厂); JB-P5 型包埋机 (武汉俊杰电子有限公司); M5 型酶标仪 (美谷分子仪器有限公司); Trans-Blot SD 型转膜仪 (美国伯乐公司); Tanon 5200 型全自动化学发光图像分析系统 (上海天能科技有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 提取条件优化

称取山慈菇粉末 27 份, 分为 9 组, 每份 5 g, 每组平行 3 份, 设定浸泡时间 (A)、料液比 (B)、提取时间 (C)、提取次数 (D) 为考察因素, 以提取率为考察指标, 每个因素设定 3 个水平, 采用  $L^9(3^4)$  正交设计试验对其提取工艺进行优化, 得到最优提取条件后平行 3 次进行验证, 计算水提物提取率。

提取率 = 冻干粉质量 / 药材质量

### 2.2 山慈菇水提物、山慈菇醇沉物、山慈菇醇溶物的制备

**2.2.1 山慈菇水提物的制备** 根据正交试验结果采用回流提取法制备山慈菇水提物。取山慈菇粉末适量, 加入 3 倍量去离子水浸泡 1.5 h, 回流提取 2

次, 2 h/次, 合并滤液, 取部分滤液冻干后保存至 4 °C 冰箱备用。称定质量, 计算得率为 37.76%。

**2.2.2 山慈菇醇沉物及醇溶物的制备** 取剩余滤液冷却后加入 80%乙醇, 置 4 °C 冰箱保存 12 h 后, 4 500 r/min 离心 30 min。取沉淀复溶于去离子水后 -80 °C 冰箱保存过夜, 冻干即得山慈菇水提醇沉物; 取上清液, 浓缩后置于 50 °C 水浴锅蒸干, -80 °C 冰箱保存过夜后冻干得山慈菇水提醇溶物。称定质量, 计算山慈菇醇沉物得率为 28.00%, 山慈菇醇溶物得率为 5.53%。

**2.2.3 山慈菇多糖含量测定** 采用苯酚-硫酸法测定各样品中多糖含量, 使用不同浓度的葡萄糖标准品, 采用紫外可见分光光度计于 490 nm 处测定吸光度 ( $A$ ) 值, 以葡萄糖质量浓度为横坐标 ( $x$ ),  $A$  值为纵坐标 ( $y$ ), 绘制标准曲线, 配制 0.05 mg/mL 山慈菇水提物、醇沉部位与醇溶部位溶液, 测定山慈菇多糖含量。

### 2.3 H22 荷瘤小鼠模型的建立、分组及给药

将 H22 细胞培养于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱, 将密度调整至  $1 \times 10^7$  个/mL, 对昆明小鼠进行 ip, 每只 0.1 mL, 7 d 后无菌抽取腹水, 纯化得 H22 原代细胞。将 H22 原代细胞以  $4 \times 10^5$  个/mL 接种于 T75 瓶, 于培养箱培养 24 h 后密度调整为  $1 \times 10^7$  个/mL, 并 sc 于 Balb/c 小鼠右上肢腋下, 每只 0.1 mL。将小鼠随机分为空白组 (未接种细胞)、模型组、索拉菲尼 (30 mg/kg) 组、山慈菇水提物 (1.82 g/kg, 以生药量计) 组、山慈菇醇沉物 (1.82 g/kg, 以生药量计) 组及山慈菇醇溶物 (1.82 g/kg, 以生药量计) 组。造模 24 h 后, 各给药组 ig 相应药物 (0.2 mL), 空白组及模型组 ig 等量生理盐水, 每天 1 次, 连续 16 d。每 3 天测量 1 次小鼠体质量, 成瘤后每 3 天测量 1 次肿瘤长短径, 计算肿瘤体积。

$$\text{肿瘤体积} = 1/2 \times \text{长直径} \times \text{短直径}^2$$

### 2.4 组织取材

小鼠末次给药 0.5 h 后 ip 20%乌拉坦 (0.1 mL), 摘眼球取血, 3 500 r/min 离心 15 min, 取上清, 于 -80 °C 保存。剥取肿瘤组织, 称定肿瘤质量, 计算抑瘤率。

$$\text{抑瘤率} = (\text{模型组肿瘤质量} - \text{给药组肿瘤质量}) / \text{模型组肿瘤质量}$$

### 2.5 肿瘤组织病理形态学观察

采用 4%多聚甲醛固定肿瘤组织, 经石蜡包埋、

切片后进行 HE 染色, 光学显微镜下对各组小鼠的肿瘤进行病理学检查。

### 2.6 肿瘤细胞 TUNEL 凋亡

取模型组、索拉菲尼组、山慈菇醇沉物组肿瘤组织, 石蜡切片脱水, 抗原修复, 用 TUNEL 反应液避光孵育 2 h, DAPI 复染封片后, 在倒置荧光显微镜下观察并采集图像。每张切片至少从 200 倍视野中随机挑选 3 处进行拍照, 使用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行分析并求出阳性细胞百分比, 即为肿瘤细胞凋亡率。

$$\text{细胞凋亡率} = \text{凋亡细胞数} / \text{总细胞数}$$

### 2.7 ELISA 法测定小鼠血清中 VEGF、MMP-2、MMP-9 的含量

ELISA 试剂盒说明书步骤测定小鼠血清中 VEGF、MMP-2、MMP-9 含量, 显色终止后检测吸光度 ( $A$ ) 值。

### 2.8 免疫组织化学法 (immunohistochemistry, IHC) 观察肿瘤组织微血管生成

肿瘤组织切片脱蜡至水, 抗原修复, 阻断后血清封闭, 4 °C 一抗孵育过夜, 二抗避光室温孵育 50 min, DAB 显色, 复染, 脱水, 镜检拍照。

### 2.9 Western blotting 检测肿瘤组织中 VEGF、MMP-2、MMP-9、Wnt1、 $\beta$ -catenin 蛋白表达

将 RIPA 裂解液加入肿瘤组织中, 离心取上清后测定 BCA 蛋白含量。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 封闭后加入一抗 (1:1 000), 待 4 °C 摇床孵育过夜后加入二抗 (1:3 000), 成像后通过灰度值软件 Gelpro32 对条带进行分析并以  $\beta$ -actin 为对照计算目的蛋白的相对灰度值。

### 2.10 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9.0.0 软件进行图形绘制。采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析, 所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。对符合正态分布的数据, 满足方差齐性时采用单因素方差分析 (ANOVA), 不满足方差齐性则采用 Tamhane's T2 分析; 对不符合正态分布的数据采用非参数检验的 Kruskal-Wallis 分析。

## 3 结果

### 3.1 正交试验优化结果

本实验选取浸泡时间 (A)、料液比 (B)、提取时间 (C)、提取次数 (D) 为 4 个因子, 根据表 1 进行 4 因素 3 水平正交试验, 实验结果显示, 各因素对提取率的影响排序依次为提取次数 > 料液比 >

表 1 正交试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素			
	A/min	B/(g·mL <sup>-1</sup> )	C/min	D/次
1	30	1:10	60	1
2	60	1:20	90	2
3	90	1:30	120	3

表 2 正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal test

试验	A/min	B/(g·mL <sup>-1</sup> )	C/min	D/次	提取率/%
1	30	1:10	60	1	16.65
2	30	1:20	90	2	29.77
3	30	1:30	120	3	31.32
4	60	1:10	90	3	19.02
5	60	1:20	120	1	25.93
6	60	1:30	60	2	35.30
7	90	1:10	120	2	29.79
8	90	1:20	60	3	31.19
9	90	1:30	90	1	22.22
k <sub>1</sub>	25.91	21.82	28.45	21.60	
k <sub>2</sub>	27.49	28.96	23.67	32.36	
k <sub>3</sub>	27.73	30.35	29.01	27.18	
R	1.82	8.53	5.34	10.76	

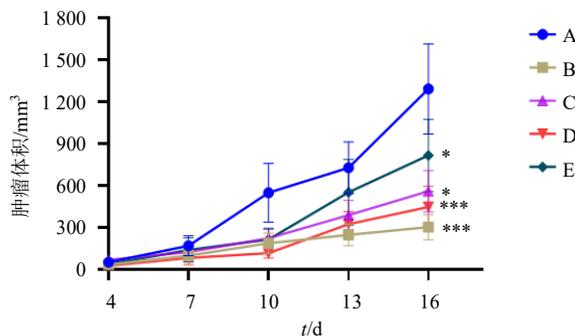
提取时间>浸泡时间, 最优提取工艺为 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>, 即为浸泡时间 90 min、料液比 1:30 (g/mL)、提取时间 120 min、提取次数 2 次, 试验结果见表 2。按最优工艺进行 3 次平行验证试验, 山慈菇水提物得率分别为 37.52%、36.02%、39.75%, 因此最终得率为 37.76%。

### 3.2 山慈菇多糖含量测定

葡萄糖标准曲线线性方程为  $y=7.81x-0.0007$  ( $R^2=0.9996$ ), 葡萄糖质量浓度为 0.02~0.10 mg/mL, A 值与质量浓度呈现良好的线性关系, 得山慈菇水提物中山慈菇多糖质量分数为 70.18%, 醇沉物中山慈菇多糖质量分数为 95.19%, 醇溶物中山慈菇多糖质量分数为 0.58%。

### 3.3 山慈菇对小鼠肿瘤体积生长曲线、肿瘤质量及抑瘤率的影响

山慈菇对各组小鼠肿瘤体积影响如图 1 所示。接种第 4 天时各组肿瘤体积可测量且无显著差异; 接种第 10 天, 与模型组比较, 索拉非尼组、山慈菇醇沉物组及山慈菇醇溶物组小鼠肿瘤体积均有所下降, 接种第 16 天, 各给药组小鼠肿瘤体积均显著减小 ( $P<0.05$ 、 $0.001$ )。山慈菇对小鼠肿瘤质量及抑瘤率的影响如表 3 所示, 与模型组比较, 各给药组小鼠肿瘤质量有不同程度下降, 其中索拉非尼组、山慈菇水提物组、山慈菇醇沉物组肿瘤质量显著降低 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )。山慈菇各给药组中, 醇沉物组与水提物组小鼠肿瘤质量、抑瘤率较为接近, 抑瘤率高于醇溶物组。此外, 分析小鼠肿瘤体积变化可知山慈菇醇沉物组较醇溶物组抑瘤效果更好。



A-模型; B-索拉非尼; C-山慈菇水提物; D-山慈菇醇沉物; E-山慈菇醇溶物 (图 2~7 同); 与模型组比较: \* $P<0.05$  \*\*\* $P<0.001$ 。

A-model group; B-sorafenib group; C-Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus water extract group; D-Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus ethanol sediments group; E-Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus alcohol soluble substance group (the same as Fig. 2 to 7); \* $P<0.05$  \*\*\* $P<0.001$  vs model group.

图 1 山慈菇对 H22 荷瘤小鼠肿瘤体积生长的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Fig. 1 Effect of *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus* on tumor volume growth of H22 mice ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

### 3.4 山慈菇对小鼠肿瘤组织病理形态的影响

由图 2 可知, 病理结果显示模型组肿瘤细胞形

表 3 山慈菇对 H22 荷瘤小鼠肿瘤质量及抑瘤率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 4 Effect of *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus* on tumor weight and inhibition rate of H22 mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	肿瘤质量/g	抑瘤率/%
空白	—	—	—
模型	—	1.27±0.42	—
索拉非尼	0.03	0.45±0.17**	64.70
山慈菇水提物	1.82	0.71±0.16*	43.91
山慈菇醇沉物	1.82	0.72±0.22*	43.39
山慈菇醇溶物	1.82	1.00±0.23	21.60

与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ 。

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs model group.

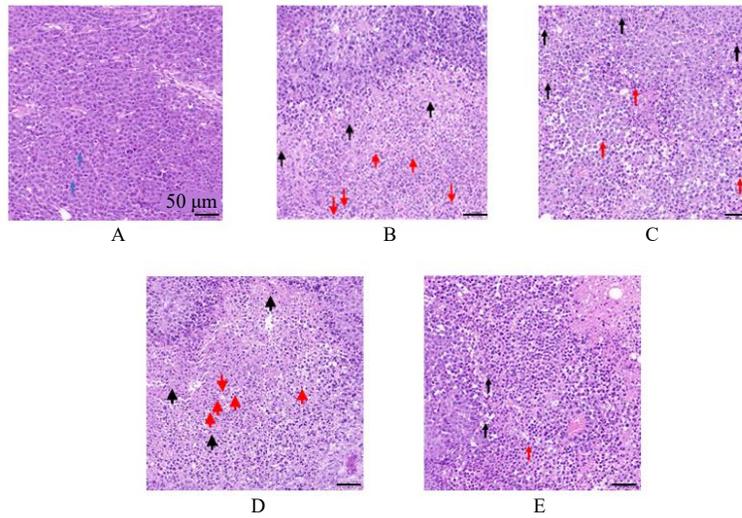


图 2 山慈菇对 H22 荷瘤小鼠肿瘤组织病理形态的影响 (HE, ×200)

Fig. 2 Effect of *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus* on pathological morphology of tumor tissue in H22 mice (HE, ×200)

态规则、分布密集,核分裂象少见,如蓝色箭头所示,组织内未见明显炎症细胞浸润;索拉非尼组可见大量瘤细胞坏死,胞核碎裂、消失(黑色箭头),且伴随少量炎症细胞浸润(红色箭头);与模型组比较,山慈菇各给药组肿瘤细胞形态缩小,坏死数量增多(黑色箭头),且伴随不同程度的炎症细胞浸润(红色箭头)。其中山慈菇水提物组及山慈菇醇沉物组细胞核破裂较为明显,表明其对肿瘤的抑制效果较为明显。通过分析病理变化可知山慈菇醇沉物对肿瘤细胞的杀伤作用优于醇溶物,因此综合抑瘤率结果选择山慈菇醇沉物组进行后续机制研究。

### 3.5 山慈菇醇沉物对肿瘤组织凋亡的影响

肿瘤细胞核为蓝色,而 TUNEL 阳性颗粒为绿色。如表 4、图 3 所示,模型组小鼠肿瘤组织中肿瘤细胞凋亡较少,与模型组相比,山慈菇醇沉物组

和索拉非尼组肿瘤组织中 TUNEL 阳性细胞数显著增加 ( $P < 0.05, 0.01$ )。

### 3.6 山慈菇醇沉物对小鼠血清 VEGF、MMP-2、MMP-9 含量水平的影响

与对照组比较,模型组小鼠血清中 VEGF、MMP-2、MMP-9 的水平显著上升 ( $P < 0.001$ )。与模型组比较,索拉非尼组、山慈菇醇沉物组 VEGF、MMP-2、MMP-9 均显著降低 ( $P < 0.001$ ),表明山慈菇醇沉物可以下调小鼠血清 VEGF、MMP-2、MMP-9 水平,见表 5。

### 3.7 山慈菇醇沉物对 H22 肝癌小鼠微血管密度的影响

IHC 染色结果(图 4)揭示了小鼠肿瘤组织微血管生成情况,模型组、索拉非尼组、山慈菇醇沉物组小鼠微血管密度(micro vessel density,

表 4 山慈菇醇沉物对 H22 荷瘤小鼠肿瘤组织凋亡的影响  
( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus* ethanol sediments on tumor tissue apoptosis in H22 mice ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	凋亡率/%
模型	—	1.58±0.29
索拉非尼	0.03	29.88±3.48*
山慈菇醇沉物	1.82	27.68±0.91**

与模型组比较: \*P<0.05 \*\*P<0.01。

\*P<0.05; \*\*P<0.01 vs model group.

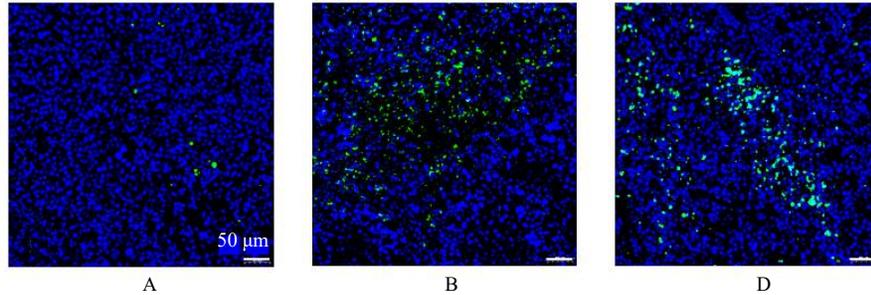


图 3 山慈菇醇沉物对 H22 荷瘤小鼠肿瘤组织凋亡的影响 (TUNEL, ×200)

Fig. 3 Effect of *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus* ethanol sediments on tumor tissue apoptosis in H22 mice (TUNEL, ×200)

表 5 山慈菇醇沉物对 H22 荷瘤小鼠血清 VEGF、MMP-2、MMP-9 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

Table 5 Effect of *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus* ethanol sediments on serum VEGF, MMP-2, MMP-9 in H22 mice ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	VEGF/(pg·mL <sup>-1</sup> )	MMP-2/(ng·mL <sup>-1</sup> )	MMP-9/(ng·mL <sup>-1</sup> )
空白	—	123.19±6.33	155.21±9.63	19.12±1.27
模型	—	340.00±8.19###	533.65±18.98###	73.83±1.55###
索拉非尼	0.03	164.10±7.42***	214.49±12.21***	30.56±2.44***
山慈菇醇沉物	1.82	194.22±10.15***	273.73±11.05***	40.80±20.80***

与空白组比较: ###P<0.001; 与模型组比较: \*\*\*P<0.001。

###P<0.001 vs blank group; \*\*\*P<0.01 vs model group.

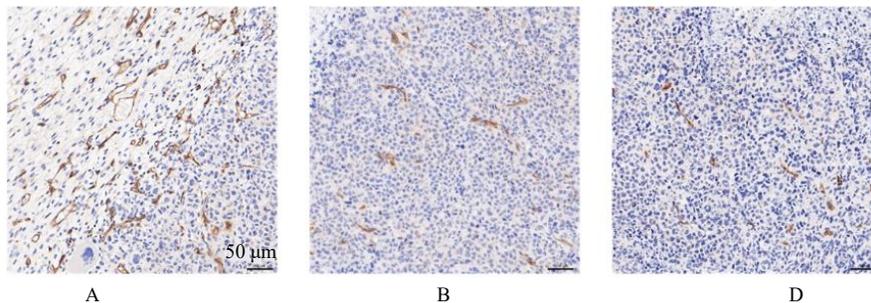


图 4 山慈菇醇沉物对 H22 荷瘤小鼠肿瘤组织 MVD 表达的影响 (IHC, ×200)

Fig. 4 Effect of *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus* ethanol sediments on MVD expression on tumor tissues in H22 mice (IHC, ×200)

及山慈菇醇沉物组小鼠肿瘤组织中 VEGF、MMP-2、MMP-9 蛋白表达均显著降低( $P<0.01$ 、 $0.001$ ); 山慈菇醇沉物组小鼠肿瘤组织中 VEGF、

MVD) 值分别为 ( $1.69 \pm 0.13$ )%、( $0.53 \pm 0.03$ )%、( $0.55 \pm 0.05$ )%。与模型组比较, 索拉非尼组、山慈菇醇沉物组 MVD 值均显著降低 ( $P<0.001$ ); 索拉非尼组与山慈菇醇沉物组小鼠 MVD 值相比无明显差异, 表明山慈菇醇沉物可抑制肝癌小鼠肿瘤组织微血管生成。

### 3.8 山慈菇醇沉物对小鼠肿瘤组织中 VEGF、MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平的影响

由图 5 及表 6 可知, 与模型组比较, 索拉非尼组

MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平与索拉非尼组相比无显著差异, 表明山慈菇醇沉物可以通过抑制 VEGF、MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平从而

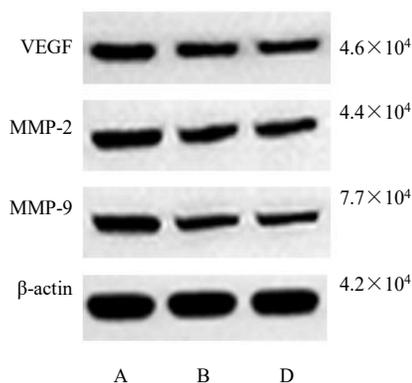


图5 各组小鼠肿瘤组织中 VEGF、MMP-2、MMP-9 蛋白条带

Fig. 5 Electrophoresis of VEGF, MMP-2, MMP-9 proteins in mice tumor tissues in each group

表6 山慈菇醇沉物对 H22 荷瘤小鼠肿瘤组织 VEGF、MMP-2、MMP-9 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 6 Effect of *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus* ethanol sediments on protein expression of VEGF, MMP-2, MMP-9 on tumor tissue in H22 mice ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	VEGF/ $\beta$ -actin	MMP-2/ $\beta$ -actin	MMP-9/ $\beta$ -actin
模型	—	0.68 ± 0.05	0.60 ± 0.02	0.53 ± 0.01
索拉非尼	0.03	0.43 ± 0.01**	0.47 ± 0.03**	0.27 ± 0.01***
山慈菇醇沉物	1.82	0.45 ± 0.01**	0.47 ± 0.02**	0.27 ± 0.01***

与模型组比较: \*\*P<0.01 \*\*\*P<0.001, 表7同。

\*\*P<0.01 \*\*\*P<0.001 vs model group, same as table 7.

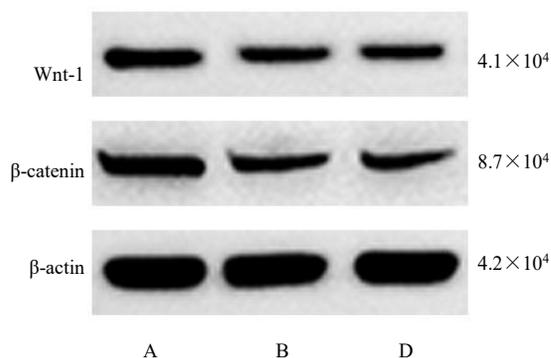


图6 各组小鼠肿瘤组织中 Wnt-1、 $\beta$ -catenin 蛋白条带

Fig. 6 Electrophoresis of Wnt-1,  $\beta$ -catenin proteins in mice tumor tissues in each group

表7 山慈菇醇沉物对 H22 荷瘤小鼠肿瘤组织 Wnt-1、 $\beta$ -catenin 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 7 Effect of *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus* ethanol sediments on protein expression of Wnt-1,  $\beta$ -catenin on tumor tissue in H22 mice ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	Wnt-1/ $\beta$ -actin	$\beta$ -catenin/ $\beta$ -actin
模型	—	0.54 ± 0.01	0.57 ± 0.01
索拉非尼	0.03	0.36 ± 0.01***	0.35 ± 0.01***
山慈菇醇沉物	1.82	0.36 ± 0.01***	0.35 ± 0.02***

抑制小鼠肿瘤血管生成, 进而抑制小鼠肿瘤生长。

### 3.9 山慈菇醇沉物对小鼠肿瘤组织 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路关键蛋白表达的影响

由图6及表7可知, 与模型组比较, 索拉非尼组及山慈菇醇沉物组治疗后的小鼠肿瘤组织中 Wnt1 蛋白、 $\beta$ -catenin 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.001$ ), 表明山慈菇醇沉物对 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路有一定的抑制作用。

## 4 讨论

肝癌临床表现多样, 可归属于中医“肝积”“肝胀”等范畴<sup>[14]</sup>, 其初期病机以肝失疏泄, 气机郁结为主, 而肝病易传于脾, 中期多为肝脾同病, 木郁土虚<sup>[15]</sup>。治疗时宜以益肾补肝, 健脾和胃为主, 同时

辅以清热化湿、消痰散结、逐瘀通络的治疗方法<sup>[16]</sup>。山慈菇归肝、脾经, 味甘、微辛, 性凉, 发挥清热解毒、化痰散结的功效, 契合肝癌中医病机, 且有研究表明在以山慈菇为佐药的方剂在临床上已取较好的治疗效果<sup>[17]</sup>。山慈菇传统用药方式为水煎煮, 但目前山慈菇水提物抗肝癌作用及机制仍然缺乏系统研究, 有效部位不明确, 因此筛选山慈菇抗肝癌有效部位并探讨其作用机制成为本研究的主要目的。

本研究建立 H22 荷瘤小鼠模型得出醇沉部位为山慈菇水提物发挥抗肝癌作用的主要部位。醇沉部位的含量测定结果显示其主要成分是多糖类化

合物,山慈菇多糖具有抗氧化、增强机体免疫力等功效,提示山慈菇醇沉物发挥抗肝癌作用的主要成分可能是多糖类,山慈菇多糖可能通过抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路激活进而抑制肿瘤血管生成,从而发挥抗肝癌作用。文献报道醇溶部位的主要成分为菲类、联苳类等<sup>[18]</sup>,且其具有一定的抗肿瘤活性<sup>[19]</sup>,但相同生药量下醇溶物中主要成分的提取率要远低于多糖类化合物,这可能是本研究中山慈菇醇溶部位的抗癌效果相比醇沉部位效果减弱的主要原因。

肿瘤血管生成是肝癌发生发展的重要因素,其中 VEGF 作为最高表达的促血管生成因子在肝癌的血管生成中发挥关键作用<sup>[20]</sup>,是诱导肿瘤血管生成的最重要分子。MVD 值是衡量血管生成的标准之一,研究表明肝癌组织中 MVD 值与 VEGF 成正相关且明显高于正常组织,因此可用 MVD 值结合 VEGF 检测作为肿瘤转移和复发的判断依据<sup>[21]</sup>。MMPs 会在癌症的发生发展中直接参与血管生成的控制,其对 VEGF 特异性受体的降解能促进血管生成<sup>[22]</sup>,为肿瘤提供营养支持和生长环境,MMP-2 和 MMP-9 同属于其中的明胶酶类,二者均与实体瘤的侵袭、转移和血管生成有关,研究指出 MMP-2、MMP-9 可作为评估癌症患者预后的参考指标<sup>[23-24]</sup>。杨雪威等<sup>[25]</sup>研究发现山慈菇提取液可以发挥抗乳腺癌作用,其机制可能与抑制 VEGF 和 MMP-9 的表达有关。本研究结果显示山慈菇醇沉物组小鼠肿瘤细胞凋亡率显著升高,其 MVD 值、血清及肿瘤组织中 VEGF 表达量及 MMP-2、MMP-9 表达量均显著低于模型组,表明山慈菇醇沉物能够抑制 H22 荷瘤小鼠皮下移植瘤的生长,降低肿瘤组织微血管密度,抑制肿瘤的供血和营养从而抑制肿瘤血管生成,具有抗肿瘤潜力。

Wnt/ $\beta$ -catenin 信号被称为经典的 Wnt 信号通路,其在肝细胞癌中高度活化,在肿瘤血管生成方面发挥重要作用。Goodwin 等<sup>[26]</sup>研究表明其通过转录调控 VEGF 的表达,Wnt 信号通路中的突变会导致 VEGF 的上调,而 VEGF 激活的内皮细胞可以增加促血管生成蛋白 MMPs 的表达<sup>[27]</sup>。QU 等<sup>[28]</sup>研究指出 Wnt 信号通路可能调节 VEGF、MMP-2 及 MMP-9 的蛋白表达,从而参与肝细胞癌血管生成、浸润和转移的调控。本研究通过 Western blotting 实验检测了 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路相关蛋白 Wnt-1、 $\beta$ -catenin 的表达水平,结果显示山慈菇醇沉物组肿

瘤组织中 Wnt-1、 $\beta$ -catenin 的表达水平极显著低于模型组,提示山慈菇醇沉物对 H22 荷瘤小鼠血管生成的抑制作用与抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的激活有关,山慈菇醇沉物可能是通过抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路激活而抑制肝癌小鼠肿瘤血管生成,从而发挥抗癌作用。

综上,本研究结果表明山慈菇水提物具有一定的抗肝癌药效且醇沉物中多糖是其中发挥作用的有效部位,作用机制可能与抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路激活,进而抑制肿瘤血管生成有关。本研究以血管生成作为切入点,证明了山慈菇醇沉物有一定的抗肝癌潜力,为中医药抗肿瘤提供了思路。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Yang J D, Hainaut P, Gores G J, et al. A global view of hepatocellular carcinoma: Trends, risk, prevention and management [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(10): 589-604.
- [2] 覃木华, 农耀斌, 黄鸿娜, 等. 原发性肝癌的中医治疗研究进展 [J]. *云南中医中药杂志*, 2024, 45(3): 90-94.
- [3] 郭倩倩, 王若宇, 卢林竹, 等. 鼠妇 miRNA-2863 调控 Bcl-2/Bax/Caspase-3 信号通路抑制肝癌细胞增殖、迁移和侵袭 [J]. *中草药*, 2024, 55 (24): 8445-8456.
- [4] 张占栋, 马瑞, 李瑞芳, 等. 川芎嗪对 H22 肝癌小鼠血管生成及 KLF4/VEGF/ADAMTS1 通路的影响 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2023, 29(11): 1847-1850.
- [5] 李靖华, 杨丽惠, 胡凯文, 等. 肝细胞癌免疫治疗临床研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2022, 45(9): 1725-1734.
- [6] 金虹, 庞雪莹, 刘松江. 基于网络药理学探讨玉屏风散治疗肝细胞癌的作用机制 [J]. *世界中医药*, 2022, 17(17): 2416-2420, 2428.
- [7] Mohapatra P, Chandrasekaran N. Wnt/ $\beta$ -catenin targeting in liver carcinoma through nanotechnology-based drug repurposing: A review [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 155:113713.
- [8] 杨涛铨, 陈观源, 陈序, 等. Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路与肝癌 [J]. *中国生物工程杂志*, 2023, 43(4): 59-70.
- [9] 沈齐, 张玲芳, 胡翰, 等. Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在非小细胞肺癌中作用的研究进展 [J]. *现代肿瘤医学*, 2024, 32(3): 577-583.
- [10] Deldar A P M, Mirzaei S, Ashrafizadeh M, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling as a driver of hepatocellular carcinoma progression: An Emphasis on molecular pathways [J]. *J Hepatocell Carcinoma*, 2021, 8: 1415-1444.
- [11] 丘佩容, 陈泽山, 朱文琳, 等. 中药对肝细胞癌相关信号通路的影响及潜在机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*,

- 2022, 28(23): 264-272.
- [12] 朱恒舟, 季漪, 马艳霞, 等. 基于网络药理学试述消癌解毒方组方中君臣关系及其防治肝癌的研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2019, 21(11): 2356-2366.
- [13] 程清波, 杨艳萍, 王滢, 等. 山慈菇对肝癌细胞凋亡和上皮间质转化的影响 [J]. 中医学报, 2021, 36(10): 2202-2207.
- [14] 郑伟达, 郑东海. 中药为主整体调治晚期肝癌 102 例 [J]. 世界中西医结合杂志, 2007, 2(1): 39-40.
- [15] 张格松, 蒋士卿. 基于 MAPK 信号通路探讨中医药治疗肝癌的研究进展 [J]. 环球中医药, 2024, 17(4): 728-733.
- [16] 张诗军, 陈燕, 孙保国, 等. 肝癌的脾虚内环境本质研究 [J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(1): 7-9.
- [17] 项琼. 益气除瘤方对介入术后肝细胞癌的干预及诱导肿瘤细胞凋亡的机制研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2020.
- [18] 司函瑞, 司雨, 焦玉凤, 等. 山慈菇化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(5): 151-155.
- [19] 司函瑞. 山慈菇的化学成分及抗肝癌作用的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2022.
- [20] 胡雨婷, 田莎, 糕昭钦, 等. 肝癌血管生成与治疗研究进展 [J]. 医学理论与实践, 2024, 37(9): 1474-1476.
- [21] 李秀华, 张阳. 肿瘤血管生成评估研究进展 [J]. 大连医科大学学报, 2002, 1: 61-64.
- [22] 张永红, 赵奇, 陆昌瑞, 等. 基质金属蛋白酶在癌症中的作用 [J]. 生命的化学, 2024, 44 (7): 1151-1160.
- [23] Khalil H, Osman H, Teleb M, *et al.* Engineered-triazine-based dendrimer-honokiol conjugates as targeted MMP-2/9 inhibitors for halting hepatocellular carcinoma [J]. *Chem Med Chem*, 2021;16(24):3701-3719.
- [24] Zeng Y, Gao M, Lin D, *et al.* Prognostic and immunological roles of MMP-9 in pan-cancer [J]. *BioMed Res Int*, 2022, 2592962.
- [25] 杨雪威, 王思源, 赵佳, 等. 山慈菇提取液对乳腺癌大鼠肿瘤组织血管内皮生长因子和基质金属蛋白酶-9 表达的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(7): 838-840.
- [26] Goodwin A, Sullivan K, Damore P. Cultured endothelial cells display endogenous activation of the canonical Wnt signaling pathway and express multiple ligands, receptors, and secreted modulators of Wnt signaling [J]. *Dev Dyn*, 2006, 235(11): 3110-3120.
- [27] 王瑶瑶, 汪英男, 潘巍巍. Wnt 信号通路及其抑制因子 SFRPs 在肿瘤血管生成/重建中的研究进展 [J]. 包头医学院学报, 2019, 35(8): 131-133.
- [28] Qu B, Liu B R, DU Y J, *et al.* Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway may regulate the expression of angiogenic growth factors in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2014, 7(4): 1175-1178.

[责任编辑 罗 曦]