

# 菝葜乙酸乙酯部位对H<sub>22</sub>荷瘤小鼠的抑瘤作用及其机制研究<sup>△</sup>

吴先闯<sup>1\*</sup>, 宋卫中<sup>2#</sup>, 宋晓勇<sup>1</sup>, 康文艺<sup>2</sup>, 侯彦涛<sup>3</sup>, 张永州<sup>1</sup>, 张晓坚<sup>4</sup>, 张凌云<sup>1</sup>, 卢红<sup>1</sup>, 刘瑜新<sup>1</sup>(1.河南大学淮河医院药学部, 河南开封 475001; 2.河南大学中药研究所, 河南开封 475004; 3.河南省医药学校基础教研室, 河南开封 475003; 4.郑州大学第一附属医院药学部, 郑州 450052)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)31-4370-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.31.15

**摘要** 目的:探讨菝葜乙酸乙酯部位对肝癌H<sub>22</sub>荷瘤小鼠的抑瘤作用及其机制。方法:将90只小鼠随机分为正常组、模型组、阳性对照组(环磷酰胺, 0.02 g/kg, 隔日 ip 给药1次)和菝葜乙酸乙酯部位低、中、高剂量组[1.0、2.0、4.0 g(生药)/kg, 每天 ig 给药2次]。除正常组外,其余各组小鼠复制移植性实体瘤模型。造模次日,各给药组小鼠给予相应药物,正常组和模型组小鼠 ig 等体积0.5%羧甲基纤维素钠溶液,持续14 d。观察给药后小鼠体质量、瘤质量变化,测定小鼠血清中血管内皮生长因子(VEGF)、一氧化氮合酶(NOS)水平及瘤组织血管通透性,并检测瘤组织中血小板内皮细胞黏附分子1(CD31)表达水平。结果:与模型组比较,阳性对照组小鼠的体质量、瘤质量显著减少,血清中VEGF、NOS水平显著升高,瘤组织血管通透性显著增强( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );菝葜乙酸乙酯部位中、高剂量组小鼠瘤质量显著减少,血清中VEGF、NOS水平显著升高,瘤组织的血管通透性显著增强、CD31表达水平降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );菝葜乙酸乙酯部位低剂量组小鼠瘤质量明显减少,瘤组织血管通透性增强( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。结论:菝葜乙酸乙酯部位对H<sub>22</sub>荷瘤小鼠有一定的抑瘤作用,其作用机制可能与降低荷瘤小鼠血清中VEGF与NOS水平、使肿瘤血管正常化和抑制肿瘤新生血管形成有关。

**关键词** 菝葜; 乙酸乙酯部位; 抑瘤作用; H<sub>22</sub>荷瘤小鼠; 血管内皮生长因子; 一氧化氮合酶

## Anti-tumor Effect of Ethyl Acetate Part of *Smilax china* on H<sub>22</sub> Liver Cancer-bearing Mice and Its Mechanism Study

WU Xianchuang<sup>1</sup>, SONG Weizhong<sup>2</sup>, SONG Xiaoyong<sup>1</sup>, KANG Wenyi<sup>2</sup>, HOU Yantao<sup>3</sup>, ZHANG Yongzhou<sup>1</sup>, ZHANG Xiaojian<sup>4</sup>, ZHANG Lingyun<sup>1</sup>, LU Hong<sup>1</sup>, LIU Yuxin<sup>1</sup>(1.Dept. of Pharmacy, Huaihe Hospital of Henan University, Henan Kaifeng 475001, China; 2.Institute of Traditional Chinese Medicine, Henan University, Henan Kaifeng 475004, China; 3.Basic Teaching and Research Section, Henan Pharmaceutical School, Henan Kaifeng 475003, China; 4.Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the anti-tumor effects of ethyl acetate part of *Smilax china* on H<sub>22</sub> liver cancer-bearing mice and its mechanism. METHODS: 90 mice were randomly divided into normal group, model group, positive control group (cytotoxic, 0.02 g/kg, ip, every 2 days) and ethyl acetate part of *S. china* low-dose, medium-dose and high-dose groups [1.0, 2.0, 4.0 g (crude drug)/kg, ig, twice a day]. Except for normal group, H<sub>22</sub> transplanted models of mice were established. The next day after modelation, treatment groups were given relevant medicine, and normal group and model group were given constant volume of 0.5% sodium carboxymethylcellulose solution intragastrically. The change of body weight and tumor weight were observed after medication; the serum levels of VEGF and neoangiogenesis (NOS) were determined as well as vascular permeability of tumor; the expression of CD31 was detected in tumor tissue. RESULTS: Compared with model group, body weight and tumor weight of positive control group were decreased significantly, while the serum levels of VEGF and NOS, vascular permeability of tumor were increased significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Tumor weight and the expression of CD31 were decreased significantly in ethyl acetate part of *S. china* medium-dose and high-dose groups, while serum levels of VEGF and NOS, vascular permeability of tumor were increased significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Tumor weight were decreased significantly in ethyl acetate part of *S. china* low-dose group, while vascular permeability of tumor was strengthened ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). CONCLUSIONS: The ethyl acetate part of *S. china* shows anti-tumor effects in H<sub>22</sub> liver cancer-bearing mice, and its mechanism might be associated with reducing the serum levels of VEGF and NOS, improving vascular permeability of tumor and inhibiting neovascularization.

**KEYWORDS** *Smilax china*; Ethyl acetate part; Anti-tumor effect; H<sub>22</sub> liver cancer-bearing mice; VEGF; NOS

菝葜(*Smilax china* L.)又名金刚藤,为百合科菝葜属植物菝葜的根茎,主要分布于我国长江以南,生长于灌木或中小乔木次生林地区。现代药理学研究表明,其具有解毒散瘀、祛风湿、镇痛、抗肿瘤等药理作用<sup>[1-2]</sup>。目前,中药菝葜在临床上主

要用于抑菌、抗炎、活血化瘀等,疗效显著<sup>[3-4]</sup>。据我国《本草纲目》记载:“中药菝葜具有治疗恶疮痈肿作用,常将其作为治疗肿瘤疾患的配伍药物”<sup>[5]</sup>。本课题前期研究也发现乙酸乙酯部位为菝葜主要抗肝癌细胞活性部位,但其具体的抗肿瘤机制尚不明确,尤其对肿瘤血管形成的作用尚未见报道。

肿瘤血管形成是肿瘤生长转移中的关键环节,肿瘤的发生、生长和转移与肿瘤新生血管的形成密切相关<sup>[6]</sup>。1971年, Folkman J<sup>[7]</sup>指出通过阻断实体肿瘤的血管生成,肿瘤组织的生长只能维持在1~2 mm<sup>3</sup>范围内。因此,肿瘤血管形成是肿瘤

△ 基金项目:河南省科技发展计划项目(No.144300510019)

\* 主管药师,硕士。研究方向:临床药学。电话:0371-23906849。

E-mail: wuxc128@163.com

# 通信作者:副教授。研究方向:中药教学与科研。电话:0371-22860159。E-mail: 15003781156@126.com

治疗领域的新作用靶点,也是抗肿瘤药物研究的热点。鉴于此,笔者拟通过复制肝癌 H<sub>22</sub> 移植瘤小鼠模型,观察菝葜乙酸酯部位对荷瘤小鼠血清中血管内皮生长因子(VEGF)和一氧化氮合酶(NOS)的影响以及对瘤组织血管通透性和新生血管形成标志物血小板内皮细胞黏附分子1(CD31)的作用,意在阐明菝葜乙酸酯部位抗肿瘤作用机制,为其临床用药提供实验基础。

## 1 材料

### 1.1 仪器

UV-2000型紫外-可见分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司);800型酶标仪(美国宝特仪器有限公司);XDS-500D型倒置荧光显微镜(上海蔡康光学仪器有限公司);BX43型生物显微镜(日本奥林巴斯公司)。

### 1.2 药材、药品与试剂

中药菝葜购于开封市天济堂药店(批号:130812),经河南大学药学院中药鉴定学从悦教授鉴定为百合科植物菝葜(*Smilax China* L.)的根茎;注射用环磷酰胺(CTX,江苏恒瑞医药股份有限公司,批号:14051524,纯度:98%);VEGF 酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号:140512);NOS 活性检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20140527);CD31 兔抗多克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司);辣根过氧化物(HRP)标记的羊抗兔抗体(美国 Proteintech 公司);其余试剂均为国产分析纯。

### 1.3 动物与瘤株

SPF级KM小鼠90只,体质量(20±2)g,♀♂各半,由河南省医学实验动物中心提供[实验动物生产许可证号:SCXK(豫)2010-0002]。小鼠H<sub>22</sub>肝癌瘤株由河南大学药学院杜钢军教授馈赠,由河南大学淮河医院实验中心定期在体接种传代保存。

## 2 方法

### 2.1 菝葜乙酸酯部位的制备<sup>[8]</sup>

取中药菝葜干燥根茎2kg,粉碎后分别用10倍量65%乙醇回流提取3次,每次1h,过滤,收集并合并3次提取液。将药渣再用10倍量50%乙醇回流提取3次,每次0.5h,过滤,收集并合并3次滤液。将2次不同体积分数乙醇提取液合并,减压回收溶剂浓缩至浸膏状,得菝葜乙醇总提物浸膏1240g。用适量蒸馏水将菝葜乙醇总提物浸膏进行分散,然后用等体积乙酸乙酯萃取3~5次,并减压回收萃取部位溶剂,浓缩后得乙酸乙酯部位萃取物浸膏(得率为2.79%),4℃保存,备用。

### 2.2 造模、分组与给药

取生长良好的H<sub>22</sub>肝癌腹水型荷瘤小鼠2只,颈椎脱臼处死,75%酒精浸泡消毒,无菌条件下抽取乳白色腹水,用无菌生理盐水将腹水按1:4的比例稀释成瘤细胞密度为2×10<sup>7</sup>个/ml的细胞悬液。以0.2ml/只接种于小鼠右腋窝皮下,复制H<sub>22</sub>肝癌实体瘤模型<sup>[8]</sup>。将造模小鼠随机分成5组,每组15只,分别为模型组、阳性对照组和菝葜乙酸酯部位低、中、高剂量组;另取15只正常小鼠作为正常组,平行饲养。肿瘤接种次日开始给药,菝葜乙酸酯部位组小鼠分别ig菝葜乙酸酯部位提取物1.0、2.0、4.0g(生药)/kg(分别为人临床用量的0.5、1、2倍剂量),每天2次,持续给药14d;阳性对照组小鼠隔日ipCTX1次,给药剂量为0.02g/kg(人临床用量的等效剂量),持续给药14d;正常组和模型组小鼠ig等体积0.5%羧甲基纤维素钠溶液(0.2ml/10g),每天2次,持续14d。给药期间每天称定小鼠体质量1次,并观察外观、精神状态等一般情况。

### 2.3 血清中VEGF、NOS水平及抑瘤率的检测

末次给药24h后,每组取10只小鼠,摘眼球取血约1ml,

置于加有0.02%乙二胺四乙酸(EDTA)的抗凝管中,以离心半径约5.36cm、3000r/min条件下冷冻离心15min,用移液管吸取上清液置于1ml离心管中,-20℃保存,备用。分别采用ELISA法和比色法检测血清中VEGF、NOS水平,具体操作按照相应试剂盒说明书进行。取血后颈椎脱臼处死小鼠,解剖剥离肿瘤,用滤纸吸干,称质量后计算抑瘤率[抑瘤率(%)=(模型组平均瘤质量-给药组平均瘤质量)/模型组平均瘤质量×100%]<sup>[9]</sup>;取部分瘤组织用4%多聚甲醛的磷酸盐缓冲液(PBS)固定,用于免疫组化检测瘤组织中CD31表达。

### 2.4 血管渗透性的检测

各组的剩余小鼠均尾iv2%伊文思蓝溶液(20mg/kg),30min后处死,解剖取出肿瘤,称质量后剪碎肿瘤组织,匀浆,以100mg瘤组织匀浆加2ml甲酰胺的比例混合,37℃水浴24h,离心取上清。以蒸馏水作空白对照,用酶标仪于620nm波长处测吸光度,通过标准曲线以单位组织中伊文思蓝提取量来反映肿瘤毛细血管渗透性。

### 2.5 瘤组织中CD31表达的检测

采用免疫组化法检测。取用4%多聚甲醛PBS溶液固定24h后的瘤组织,石蜡包埋,切片贴附于防脱载玻片上,常规脱蜡和水化,3%过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)溶液中室温孵育10min消除内源性过氧化物酶的活性;然后将切片放入柠檬酸缓冲液微波煮沸5min×2次修复抗原;5%牛血清白蛋白(BSA)室温封闭20min,倾去多余液体,滴加1:50稀释的CD31兔抗多克隆抗体,4℃过夜;PBS洗3次后,滴加HRP标记的羊抗兔IgG,37℃孵育20min;PBS冲洗3次后滴加链霉素和素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC),37℃孵育20min;PBS冲洗3次后以二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素轻度复染核,封片后在光镜下观察。采用半定量法进行结果分析,切片的染色强度记分如下:0分,染色为阴性;1分,染色为弱阳性(浅黄棕色);2分,染色为阳性(黄棕色);3分,染色为强阳性(深黄棕色)。染色阳性细胞比例评定标准如下:阳性细胞数为5%者,计0分;5%~25%者,计1分;26%~50%者,计2分;50%~75%者,计3分;>75%者,计4分。按以上2项得分之和判断结果:0分为阴性(-),1~2分为弱阳性(+),3~4分为中度阳性(++),5~7分为强阳性(+++),按综合评分的等级来评价切片CD31变化情况<sup>[9]</sup>。

### 2.6 统计学方法

采用SPSS 16.0软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,方差齐性则采用 $t$ 检验,若方差不齐性则采用Games-Howell分析;等级资料的分析采用Kruskal-wallis秩和检验,两两比较采用Nemenyi法。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 各组小鼠一般情况观察和抑瘤作用测定结果

给药前,各组间小鼠体质量差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。给药后,与正常组比较,模型组小鼠体质量随肿瘤生长而增加,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ );与模型组比较,菝葜乙酸酯部位各剂量组小鼠体质量差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),但外观和精神状态优于模型组;阳性对照组小鼠体质量明显下降,且低于正常组( $P < 0.01$ )。阳性对照组和菝葜乙酸酯部位组小鼠瘤质量较模型组明显减少( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),并呈现量-效关系,结果见表1。

### 3.2 各组小鼠血清中VEGF、NOS水平测定结果

与正常组比较,模型组和各给药组小鼠血清中VEGF、NOS水平显著升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。与模型组比较,阳性对照组和菝葜乙酸酯部位中、高剂量组小鼠血清中

VEGF、NOS水平显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );菝葜乙酸乙酯部位低剂量组小鼠血清中VEGF、NOS水平差异无统计学意义( $P>0.05$ ),结果见表2。

表1 各组小鼠体质量及瘤质量测定结果( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Tab 1 Body weight and tumor weight of mice in each group ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量,g/kg	体质量,g		瘤质量,g	抑瘤率,%
		给药前	给药后		
正常组		20.32±0.89	29.89±1.12		
模型组		20.12±0.99	30.34±2.89	0.612±0.231	
阳性对照组	0.02	20.20±1.09	26.97±1.76***	0.261±0.163**	57.42
菝葜乙酸乙酯部位低剂量组	1.0	20.16±1.21	30.62±2.52	0.481±0.126*	21.40
菝葜乙酸乙酯部位中剂量组	2.0	19.83±1.39	30.19±2.63	0.391±0.143**	36.11
菝葜乙酸乙酯部位高剂量组	4.0	20.19±1.51	29.03±2.03	0.312±0.154**	49.02

注:与正常组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,\* $P<0.05$ ,\*\*\* $P<0.01$

Note: vs. normal group, \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, \* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.01$

表2 各组小鼠血清中VEGF、NOS水平测定结果( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Tab 2 Serum levels of VEGF and NOS of mice in each group ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量,g/kg	VEGF,pg/ml	NOS,U/ml
正常组		30.57±13.14	18.1±1.10
模型组		87.57±18.92**	36.5±1.30**
阳性对照组	0.02	59.34±14.65***	20.7±1.70**
菝葜乙酸乙酯部位低剂量组	1.0	83.15±19.12**	35.2±1.40**
菝葜乙酸乙酯部位中剂量组	2.0	72.05±17.62***	25.5±0.98**
菝葜乙酸乙酯部位高剂量组	4.0	63.56±16.76***	23.6±1.20**

注:与正常组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,\* $P<0.05$ ,\*\*\* $P<0.01$

Note: vs. normal group, \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, \* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.01$

### 3.3 各组小鼠瘤组织血管通透性和CD31表达测定结果

与模型组比较,各给药组小鼠瘤组织血管通透性均不同程度增强、CD31表达水平均不同程度降低,除阳性对照组和菝葜乙酸乙酯部位低剂量组小鼠瘤组织中CD31表达水平降低不显著外,其余各组小鼠上述指标均明显改善( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),结果见表3。

表3 各组小鼠瘤组织血管通透性和CD31水平测定结果( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Tab 3 Vascular permeability and CD31 level in tumor of mice in each group ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	剂量,g/kg	伊文思蓝含量, $\mu\text{g/g}$	CD31评分
模型组		57.4±6.1	5.13±0.99
阳性对照组	0.02	62.3±7.3*	4.56±1.02
菝葜乙酸乙酯部位低剂量组	1.0	51.3±5.9*	4.44±1.18
菝葜乙酸乙酯部位中剂量组	2.0	40.2±5.7**	3.31±1.19**
菝葜乙酸乙酯部位高剂量组	4.0	34.3±4.9**	2.31±1.07**

注:与模型组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$

Note: vs. model group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

## 4 讨论

CTX为烷化剂类抗肿瘤药物,是目前临床作用最强、应用最多的药物之一,具有良好的临床疗效<sup>[10]</sup>,故本研究以其为阳性对照。结果显示,CTX和菝葜乙酸乙酯部位可不同程度地抑制小鼠H<sub>22</sub>移植瘤的生长,其中高剂量菝葜乙酸乙酯提取物抑瘤效果与CTX相当。与CTX不同的是,菝葜乙酸乙酯部位各剂量组小鼠体质量无明显减轻,表明菝葜乙酸乙酯部位对机体的毒性较小。

研究表明,新生的血管不仅为肿瘤的生长提供必要的营养物质和氧,而且为肿瘤细胞离开原发瘤进入血液提供了有效通道<sup>[11]</sup>。肿瘤血管形成是肿瘤生长转移中的关键环节,受多

种相关因子诱导和调节,VEGF和NOS即是重要的相关因子。VEGF是血管内皮生长因子家族中的重要一员,被认为是肿瘤组织中促血管生长的最主要的血管生长因子之一,其转录活性的增强和表达增加在肿瘤细胞的能量代谢、新血管生成、促进肿瘤增殖和转移中起重要作用<sup>[9]</sup>。一氧化氮(NO)具有广泛的生物学活性,与多种肿瘤的形成和发展有关;NOS是生成NO的关键限速酶,其活性的增高与肿瘤血管形成关系密切<sup>[12]</sup>。本实验结果显示,中、高剂量菝葜乙酸乙酯部位提取物能够显著降低小鼠血清中VEGF、NOS水平。

研究表明,肿瘤内部血管异常是造成肿瘤微环境异常的重要因素,而血管正常化的标志是毛细血管通透性<sup>[13]</sup>。本实验结果表明,菝葜乙酸乙酯部位提取物可降低荷瘤小鼠瘤内毛细血管通透性,显示出良好的肿瘤血管正常化作用。CD31即血小板-内皮细胞黏附分子,属于免疫球蛋白超家族成员,是一种新型微血管标记物,可以作为血管内皮细胞特异性标志,定量评价血管新生因子的作用<sup>[14]</sup>。研究发现,CD31分子可能参与肿瘤细胞黏附于内皮细胞并促进肿瘤组织血管的生成。本实验结果表明,菝葜乙酸乙酯部位可减少肿瘤组织CD31的表达。

综上所述,菝葜乙酸乙酯部位具有一定的抗肿瘤作用,其作用机制可能与其降低荷瘤小鼠血清VEGF和NOS水平、使肿瘤血管正常化及抑制肿瘤新生血管形成有关。

## 参考文献

- [1] 马恒,王威,董方言.菝葜属植物化学成分研究进展[J].中国药房,2009,20(15):1191.
- [2] 张晟,於小波,沈娟娟,等.菝葜药用植物的资源调查及品质分析[J].中国药房,2011,22(3):275.
- [3] 叶小春.菝葜提取物的制备工艺及质量控制研究[D].武汉:华中科技大学,2011.
- [4] 郝利君,冯芳,郝小芳.菝葜的研究进展[J].现代中药研究与实践,2010,24(1):70.
- [5] 邱千,戴琪,陈树和,等.菝葜体外抗非小细胞肺癌细胞活性物质研究[J].中国现代中药,2014,16(1):12.
- [6] 汤秀红.中药制剂抗肿瘤血管形成的基础研究现状与进展[J].吉林中医药,2010,30(9):825.
- [7] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications [J]. *N Engl J Med*, 1971, 285(21): 1182.
- [8] 吴先闯,杜钢军,郝海军,等.玉米须多糖对H22荷瘤小鼠的肿瘤抑制作用及其对小鼠免疫功能的影响[J].华西药理学杂志,2015,30(1):26.
- [9] 何素芳,王志刚,任爱农,等.红花多糖对H22荷瘤小鼠的抑瘤作用及瘤细胞VEGF、Ki67表达的影响[J].中国中药杂志,2009,34(6):795.
- [10] 韦凤华.环磷酰胺临床应用研究进展[J].中国药事,2013,27(3):324.
- [11] Folkman J. Antiangiogenesis in cancer therapy-endostatin and its mechanisms of action[J]. *Experimental Cell Research*, 2006, 312(5): 594.
- [12] 王鲁,汤钊猷,孙惠川,等.肝细胞癌中NOS和VEGF的表达及其与肿瘤血管形成的关系[J].中华肿瘤杂志,2000,22(4):301.
- [13] Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy[J]. *Science*, 2005, 307(5706): 58.
- [14] 卜岚,马毓梅,史淑芬,等. CD31、CD105和PTEN在宫颈癌中的表达及其临床病理意义[J].中国妇幼保健,2015,30(9):1446.

(收稿日期:2016-02-22 修回日期:2016-09-19)

(编辑:林静)