

木瓜总黄酮抗肿瘤活性研究

刘爱华*, 田慧群, 覃晓琳, 覃玉娥(三峡大学医学院, 湖北宜昌 443002)

中图分类号 R285;R979 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)07-0599-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.07.08

摘要 目的:研究木瓜总黄酮抗肿瘤活性。方法:通过乙醇-正丁醇萃取方法提取木瓜总黄酮;通过分子药物筛选模型、酶联免疫法检测木瓜总黄酮对免疫共刺激分子程序性死亡因子(PD)-1与其配体(PD-L1)结合的抑制作用。通过H22肿瘤细胞模型小鼠,观察木瓜总黄酮对模型小鼠体内肿瘤体积与存活时间的影响;流式细胞仪测定小鼠腹水中肿瘤细胞及淋巴细胞表面相关分子的表达。结果:正丁醇馏分中木瓜总黄酮占85%。木瓜总黄酮具有抑制PD-1和PD-L1结合的作用,且抑制效率具有剂量依赖性。木瓜总黄酮在复制模型10 d后对模型小鼠体内肿瘤有明显抑制作用;对S180细胞表面PD-L1表达具有明显抑制作用,对体内淋巴细胞浸润有明显增强作用。结论:木瓜总黄酮可以抑制PD-1与PD-L1的结合,同时可降低肿瘤细胞表面PD-L1的表达从而促进机体对肿瘤的免疫应答,最终达到抑制肿瘤生长,提高肿瘤鼠存活率的作用。

关键词 木瓜总黄酮;免疫共刺激分子程序性死亡因子;免疫共刺激分子程序性死亡因子配体;抗肿瘤

Study on Anti-tumor Activity Total Flavonoids from *Chaenomeles speciosa*

LIU Ai-hua, TIAN Hui-qun, QIN Xiao-lin, QIN Yu-e(Medical Science College of China Three Gorges University, Hubei Yichang 443002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study anti-tumor activity of total flavonoids from *Chaenomeles speciosa*. METHODS: Total flavonoids was extracted from *C. speciosa* with ethanol-n-butyl alcohol extraction method; by using molecular medicine selection model, ELISA assay was used to detect inhibitory effects of *C. speciosa* total flavonoids on the combination of PD-1 and PD-L1. The influence of *C. speciosa* on tumor volume and survival time in H22 tumor cell model mice were observed. Flow cytometry was adopted to detect the expression of associated molecules of tumor cell or lymphocyte's surface which obtained from ascites of experimental mice. RESULTS: *C. speciosa* total flavonoids accounted for 85% in n-butyl alcohol fraction. *C. speciosa* total flavonoids could inhibit the combination of PD-1 and PD-L1, in dose-dependant manner. *C. speciosa* total flavonoids significantly inhibited tumor of model mice *in vivo* 10 d after modeling; *C. speciosa* total flavonoids significantly inhibited the expression of PD-L1 in S180 cell surface, while enhanced lymphocyte infiltration. CONCLUSIONS: *C. speciosa* total flavonoids can inhibit the growth of tumor and improve survival rate of tumor bearing mice by inhibiting the combination of PD-1 and PD-L1 and reducing the expression of PD-L1 so as to promote immune response.

KEYWORDS Total flavonoids of *Chaenomeles speciosa*; PD-1; PD-L1; Anti-tumor

程序性死亡-1(Programmed death1, PD-1)及其配体PD-L1(Ligand 1 of programmed death-1)属于B7/CD28家族分子,能负向调控T细胞的活化和细胞因子的分泌。PD1/PD-L1信号通路在正常机体内的生理功能是保持免疫细胞的活化得到有效的控制^[1-3]。而在肿瘤细胞发生逃逸时,肿瘤细胞表面高表达的PD-L1与活化的淋巴细胞表面高表达的PD-1结合,从而抑制淋巴细胞的活化增殖,介导肿瘤细胞的逃逸^[4-6]。通过阻断PD-1/PD-L1信号通路将成为肿瘤治疗的新靶点,从天然产物中寻找PD-1/PD-L1信号通路的抑制剂将是肿瘤免疫治疗的重要研究方向。

木瓜(*Chaenomeles speciosa*(Sweet) Nakai)为蔷薇科木瓜属植物贴梗海棠的果实,又名皱皮木瓜、铁脚梨、贴梗海棠、酸木瓜、空心瓜、木瓜实,呈椭圆形,长约10 cm,皮黄色,质坚硬,外表面有褶皱^[7]。木瓜具食、药、观赏多种用途,作为一种传统中药,其味酸,性温,入肝、脾经,有平肝舒筋、和胃化湿之功效,同时它富含黄酮,而黄酮具有抗氧化、抗肿瘤的作用^[8]。因此,在本研究中,笔者首先检测肿瘤小鼠模型用木瓜总黄酮

(Flavonoids from *C. speciosa*(Sweet) Nakai, FLC)治疗后体内肿瘤体积变化,而后运用分子药物筛选模型对FLC在体内抑制PD-L1以及PD-1/PD-L1结合的作用进行研究,以探究FLC的抗肿瘤活性。

1 材料

1.1 仪器

2690型高效液相色谱(HPLC)仪(美国Waters美国);台式超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);UV-8453型紫外-可见分光光度计(美国Bechman Coulter公司);SHZ-D型循环水式真空泵(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);万分之一电子分析天平(德国Sartorius公司);抽滤瓶(美国Pall Gelman公司);FACSC a libur流式细胞仪(美国BD公司)。

1.2 药材

木瓜,购自湖北长阳资丘木瓜基地,由三峡大学天然产物研究与利用湖北省重点实验室汪璠植教授鉴定为真品。

1.3 药品与试剂

顺铂(江苏豪森药业股份有限公司,批号:20120316,规格:20 ml:20 mg);芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号:0080-9504);其余试剂均为分析纯。

*主管技师。研究方向:肿瘤学。电话:0717-6397979。E-mail:756972975@qq.com

1.4 动物与细胞株

SPF级KM种小鼠30只,♀,体质量20~24g,由湖北省疾病控制动物中心提供[实验动物使用许可证号:SCXK(鄂)2003-0005];小鼠肝癌H22细胞株、肉瘤S180细胞株均购自武汉大学典型培养物保藏中心。

2 方法

2.1 FLC的提取

木瓜片烘干,粉碎,过40目筛,将样品粉末置于500ml圆底烧瓶中,用70%乙醇溶液70℃水浴中回流提取3次,每次1h,合并提取液。然后将提取液于常压下浓缩。将所得木瓜浓缩液分别用水饱和的正丁醇溶液萃取3次,合并正丁醇层。将样品的正丁醇溶液分别减压浓缩至膏状,然后置于蒸发皿中蒸干,即得到粉末状供试品,得率为11.5%。

2.2 总黄酮含量测定

2.2.1 标准曲线的制备 精密称取120℃下干燥至恒质量的芦丁对照品2.5mg,置于25ml量瓶中,取10ml甲醇溶解,用蒸馏水定容至25ml,摇匀。精密吸取对照品溶液0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0ml,分别置于25ml量瓶中,用70%乙醇定容至10ml。加5%亚硝酸钠溶液1.0ml,摇匀,放置6min;加10%硝酸铝溶液1.0ml,摇匀,放置6min;加4%氢氧化钠溶液10.0ml,用蒸馏水稀释至刻度,摇匀,放置15min。以不加芦丁对照品溶液为空白,采用分光光度法在510nm波长处测定吸光度(A)。以芦丁质量浓度(x,mg/ml)为横坐标,吸光度(y)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程为 $y=21.7126x+0.0038$ ($r=0.9998$)。结果表明,芦丁质量浓度在6~45μg/ml范围内与吸光度呈良好线性关系。

2.2.2 总黄酮含量测定方法 提取液稀释至合适质量浓度后,按“2.2.1”项下方法测定。

2.3 酶链免疫吸附(ELISA)法检测FLC对PD1与PD-L1结合的影响

根据分子药物筛选模型^[9],将纯化的蛋白mPD-1(1μg/孔)4℃包被过夜,用1%牛血清白蛋白(BSA)封闭(37℃,1h),分别加入不同质量浓度(10、30、100、300、1000、3000ng/ml)的FLC与纯化的mPD-L1蛋白(带His标签,500ng/孔)的混合液,室温孵育2h,同时作阳性对照(加入mPD-L1)及阴性对照(不加入mPD-L1),磷酸盐吐温缓冲液(PBST)洗3遍后加入抗His标记的鼠单抗(0.1μg/孔),37℃孵育1h,用PBST洗后加入HRP标记的羊抗鼠IgG,室温孵育1h,PBST洗后加入底物,于450nm波长处测定A,记录分析结果,计算抑制率(IR): $IR(\%)=(A_{模型}-A_{FLC})/A_{模型}\times 100\%$ 。

2.4 FLC在模型小鼠体内抗肿瘤效应的检测

无菌抽取接种H22细胞的小鼠腹水适量,细胞计数后,调细胞密度至 $2.5\times 10^6\text{ ml}^{-1}$,每只小鼠接种0.2ml细胞至腹腔。实验分为3组,即模型(等容生理盐水)组、FLC(100mg/kg)组、顺铂(5mg/kg)组,给药每周2次,连续给药5次,同时测量小鼠腹围(1次/4d),记录存活时间。

2.5 FLC对S180细胞表面PD-L1表达及体内淋巴细胞浸润作用的影响

抽取“2.4”项下各组小鼠的腹水适量,用FACS(PBS+5%FBS)buffer洗2次,分别用FITC标记的PD-L1单抗、CD3的单抗以及同型对照的抗体4℃孵育30min,离心洗涤后在流式细胞仪上检测腹水中PD-L1⁺及淋巴细胞CD3⁺T的数量。

2.6 统计学方法

实验数据均采用SPSS13.0统计软件进行分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,后以LSD法进行统计;存活率的分析采用卡普兰Meier方法计算并采用秩和检验;不同时间点测定同一数据采用重复测量方差分析法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 总黄酮的分离和纯化

乙醇提取的木瓜总黄酮类化合物,其正丁醇馏分中FLC占85%。HPLC分析表明,芦丁在正丁醇抽提的FLC中质量分数为0.29%。FLC的HPLC图见图1。

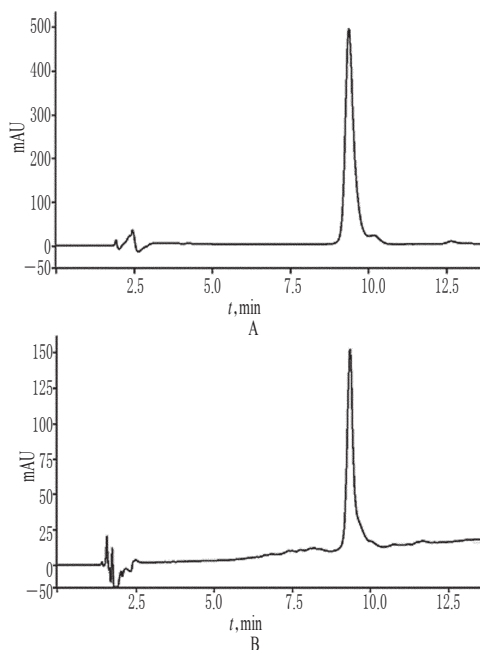


图1 FLC的HPLC图

A. 芦丁对照品; B. 木瓜总黄酮提取物

Fig 1 HPLC chromatography of FLC

A. rutin control; B. total flavonoids from *C. speciosa*

3.2 FLC对PD-1与PD-L1结合的影响

FLC具有抑制PD-1和PD-L1结合的作用,且抑制率具有剂量依赖性。FLC对PD-1与PD-L1结合的抑制作用见表1。

表1 FLC对PD-1与PD-L1结合的抑制作用($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 The inhibitory effect of FLC on PD-1 and PD-L1 binding($\bar{x}\pm s$)

质量浓度,ng/ml	A	IR,%
0	0.23 ± 0.01	0
10	2.31 ± 0.25	9.11 ± 1.13
30	2.23 ± 0.36	12.24 ± 1.30
100	2.25 ± 0.26	11.45 ± 1.18
300	1.99 ± 0.21	23.06 ± 2.88
1000	1.79 ± 0.22	31.49 ± 3.88
3000	1.72 ± 0.19	34.58 ± 2.45
阳性对照	2.51 ± 0.22	100

3.3 FLC在模型小鼠体内抗肿瘤效应的检测

与模型组比较,给药10d后,FLC组小鼠肿瘤体积减小,且与顺铂组效果相当,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$),表明FLC具有体内抗肿瘤作用。经FLC处理的小鼠的

存活率明显高于模型组。小鼠体内肿瘤体积的测定见表2;小鼠存活率的测定见图2(图中PBS为模型组,N为正常对照)。

表2 小鼠体内肿瘤体积的测定(cm^3 , $\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab 2 Determination of tumor volume in mice (cm^3 , $\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	天数,d				
	2	6	10	14	18
模型组	0.15±0.02	0.65±0.08	1.90±0.24	2.10±0.33	2.66±0.22
顺铂组	0.13±0.03	0.57±0.07	0.69±0.09**	1.15±0.14*	1.84±0.24*
FLC组	0.14±0.02	0.48±0.06	0.79±0.10**	1.15±0.14*	1.40±0.16*

与模型组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

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

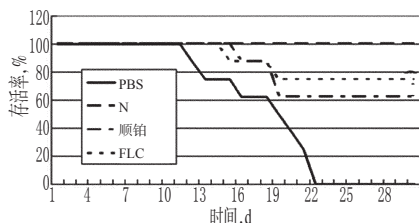


图2 小鼠存活率的测定

Fig 2 The survival rate of mice

3.4 FLC对模型小鼠S180细胞表面PD-L1表达及体内淋巴细胞浸润作用的影响

与模型组比较,FLC组小鼠腹水中 $\text{CD3}^+\text{T}$ 细胞数量增加, PD-L1^+ 细胞数量减少,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。小鼠腹水中 $\text{CD3}^+\text{T}$ 及 PD-L1^+ 细胞数量的测定见表3。

表3 小鼠腹水中 $\text{CD3}^+\text{T}$ 及 PD-L1^+ 细胞数量的测定($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Tab 3 The number of $\text{CD3}^+\text{T}$ and PD-L1^+ in ascites of mice ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	$\text{CD3}^+\text{T}$, %	PD-L1^+ , %
模型组	2.55±0.43	21.37±4.73
顺铂组	10.56±0.26	13.40±3.56*
FLC组	9.83±0.64**	16.30±2.72*

与模型组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

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

4 讨论

已有研究表明,黄酮类化合物具有抗氧化、抗肿瘤的生物化学效应,其机制可能与促进淋巴细胞增殖及诱导干扰素(IFN)- γ 和肿瘤坏死因子(TNF)- α 等产生有关^[10],因此用乙醇-正丁醇提取木瓜总黄酮。为了进一步探究FLC的抗肿瘤效应及其分子机制,本研究建立了肿瘤小鼠模型,并从体内、外两个方面研究FLC的抗肿瘤活性。

为了探究FLC是否可以通过阻断PD-1/PD-L1这一免疫抑制性信号通路发挥抗肿瘤的生物化学效应^[11],本研究首先在体外用ELISA法检测FLC对PD-1与PD-L1结合的抑制率。结果显示,FLC对PD1/PD-L1结合有明显的抑制作用,且具有剂量依赖趋势。随后对FLC在体内的抗肿瘤效果进行进一步检测。结果表明,FLC可以达到和化疗药物顺铂一样的抗肿瘤效果且可以提高肿瘤小鼠的存活率。同时,FLC处理后的肿瘤小鼠腹水中肿瘤细胞表面的PD-L1⁺细胞表达明显低于模型组,腹水中 $\text{CD3}^+\text{T}$ 细胞数目明显高于模型组,由此说明FLC是从以下三方面来发挥抗肿瘤效应的:(1)阻断PD1/PD-L1信号

通路;(2)抑制肿瘤细胞表面PD-L1⁺的表达;(3)增加 $\text{CD3}^+\text{T}$ 细胞的数目。

目前,临床上普遍使用的化疗药物如顺铂在杀伤肿瘤细胞的同时对机体的免疫系统具有较大副作用^[12],而FLC是通过阻断抑制性信号通路来发挥抗肿瘤作用,具有正向免疫调节作用,这可为临床上开发低副作用的新型抗肿瘤药物奠定基础。

参考文献

- [1] Amarnath S, Mangus CW, Wang JC, et al. The PDL1-PD1 axis converts human Th1 cells into regulatory T cells [J]. *Sci Transl Med*, 2011, 30(111):111.
- [2] Yang J, Riella LV, Chock S, et al. The novel costimulatory programmed death ligand 1/B7.1 pathway is functional in inhibiting alloimmune responses in vivo[J]. *J Immunol*, 2011, 187(3):1 113.
- [3] Bu DX, Tarrío M, Maganto-García E, et al. Impairment of the PD-1 pathway increases atherosclerotic lesion development and inflammation[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(5):1 100.
- [4] Topfer K, Kempe S, Müller N, et al. Tumor Evasion from T cell surveillance[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 20(11):9 171.
- [5] Sharma P, Wagner K, Wolchok JD, et al. Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: recent successes and next steps[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(11): 805.
- [6] Wang SF, Fouquet S, Chapon M, et al. Early T cell signalling is reversibly altered in PD-1⁺T lymphocytes infiltrating human tumors[J]. *PLoS One*, 2011, 6(3):e17 621.
- [7] 章永红.抗癌中药大全[M].南京:江苏科学技术出版社, 2000:84-85.
- [8] Segev A, Badani H, Kapulnik Y, et al. Determination of polyphenols, flavonoids, and antioxidant capacity in colored chickpea (*Cicer arietinum* L.)[J]. *J Food Sci*, 2010, 75(2):S115.
- [9] Qin X, Liu C, Zhou Y, et al. Cisplatin induces programmed death-1-ligand 1 (PD-L1) over-expression in hepatoma H22 cells via Erk/MAPK signaling pathway[J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2010, 5(6):366.
- [10] Aljanci I, Stankovi M, Tesevi V, et al. Protective effect on human lymphocytes of some flavonoids isolated from two *Achillea* species[J]. *Nat Prod Commun*, 2010, 5(5): 729.
- [11] Sapoznik S, Hammer O, Ortenberg R, et al. Novel anti-melanoma immunotherapies: disarming tumor escape mechanisms[J]. *Clin Dev Immunol*, 2012, 8(18):214.
- [12] Chen G, Emens LA. Chemoimmunotherapy: reengineering tumor immunity[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2013, 62(2):203.

(收稿日期:2013-09-19 修回日期:2013-11-01)