

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.05.023

陈月圆, 黄永林, 陈洁晶, 等. 醉鱼草苷Ⅳ对 H₂₂肝癌小鼠的抑瘤作用[J]. 广西植物, 2014, 34(5):710–713Chen YY, Huang YL, Chen JJ, et al. Inhibitory effect of buddlejasaponin Ⅳ on hepatocarcinoma 22 (H₂₂) in mice[J]. *Guihaia*, 2014, 34(5):710–713

醉鱼草苷Ⅳ对 H₂₂肝癌小鼠的抑瘤作用

陈月圆¹, 黄永林¹, 陈洁晶², 卢凤来¹, 李典鹏^{1*}

(1. 广西植物功能物质研究与利用重点实验室, 广西植物研究所, 广西 桂林 541006;

2. 广西代谢性疾病研究重点实验室, 广西 桂林 541002)

摘要: 为观察醉鱼草苷Ⅳ对 H₂₂肝癌小鼠的体内抑瘤作用, 取 H₂₂肝癌细胞接种于小鼠右腋下, H₂₂肝癌小鼠随机分为 5 组: 模型组、醉鱼草苷Ⅳ高、中、低(1.00、0.50、0.25 mg/kg) 3 个剂量组和阳性药(CTX, 20.0 mg/kg)对照组。每组 10 只, 治疗期间记录各组小鼠的体重变化并观察小鼠生存状态, 连续腹腔注射 10 d 后, 于第 11 天观测抑瘤率、脾脏指数、胸腺指数, 同时进行血清中 SOD、MDA、GGT 和 AKP 含量检测。结果表明: 与模型组比较, 醉鱼草苷Ⅳ高、中剂量组对小鼠 H₂₂移植性肝癌均有显著的抑瘤作用($P < 0.01$), 抑瘤率分别为 56.96% 和 50.63%; 与模型组相比, 醉鱼草苷Ⅳ高剂量组小鼠血清 SOD 活性增加($P < 0.05$), 醉鱼草苷Ⅳ各剂量组血清 MDA、GGT 和 AKP 水平均降低($P < 0.01$); 除 SOD 活性之外, 环磷酰胺组与模型组比较无显著差异。说明醉鱼草苷Ⅳ在体内具有抗肝癌作用, 其机理可能和机体的抗氧化能力有关, 有待于进一步研究。

关键词: 醉鱼草苷Ⅳ; H₂₂肝癌; 抑瘤率

中图分类号: Q946; R73-36 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2014)05-0710-04

Inhibitory effect of buddlejasaponin Ⅳ on hepatocarcinoma 22 (H₂₂) in mice

CHEN Yue-Yuan¹, HUANG Yong-Lin¹, CHEN Jie-Jing²,
LU Feng-Lai¹, LI Dian-Peng^{1*}(1. *Guangxi Key Laboratory of Functional Phytochemicals Research and Utilization, Guangxi Institute of Botany, Guilin 541006, China;* 2. *Guangxi Key Laboratory of Metabolic Diseases Research, Guilin 541002, China*)

Abstract: To observe the inhibitory effect of buddlejasaponin Ⅳ on tumor growth on murine transplanted hepatocarcinoma 22 (H₂₂) *in vivo*, tumor inhibitory activities were tested in experimental tumor H₂₂ mice. The tumor bearing mice were randomly divided into control group, CTX group (CTX, 20.0 mg/kg) and buddlejasaponin Ⅳ treatment groups (1.00, 0.50, 0.25 mg/kg). The body weight and survival of mice in all groups were recorded. After exposing to medications for 10 days, all the mice were killed on second day, the tumors were taken out and weighted with tumor inhibition rate, and the indexes of spleen and thymus were checked, and the SOD activity, MDA, GGT and AKP levels in serum in each group were detected. The results showed that the high and middle dosage buddlejasaponin Ⅳ treated groups could inhibit H₂₂ growth compared with the control group ($P < 0.01$), the inhibitory rate was 56.96%, 50.63% respectively. In the high dosage buddlejasaponin Ⅳ treated groups, the activity of serum SOD increased ($P < 0.05$), and in all the buddlejasaponin Ⅳ treated groups, serum MDA contents decreased ($P < 0.01$). Compared with the control group, in all the buddlejasaponin Ⅳ treated groups, serum GGT, AKP content compared were highly sig-

收稿日期: 2013-12-18 修回日期: 2014-02-07

基金项目: 广西科技重大专项(桂科重 1347001); 桂林市科技计划项目(20110201); 广西代谢性疾病研究重点实验室开放基金(181H2011-03)。

作者简介: 陈月圆(1978-), 女, 广西桂林人, 硕士, 副研究员, 主要从事天然产物化学与药理活性研究, (E-mail)chyy@gxib.cn。

*通讯作者: 李典鹏, 博士, 研究员, 硕士生导师, 从事天然产物化学与药理活性研究, (E-mail)ldp@gxib.cn。

nificant differences ($P < 0.01$), while the CTX group showed no significant difference. Buddlejasonin IV can inhibit hepatocarcinoma growth. The mechanism may regulate the body antioxidant capacity, and needs further study.

Key words: buddlejasonin IV; hepatocarcinoma 22; tumor inhibitory rate

醉鱼草苷 IV (buddlejasaponin IV, 简称 BJ-IV) 是一个具有 $\Delta^{11-13,28}$ -环氧齐墩果烯型结构的三萜皂苷。醉鱼草苷 IV 具有显著的抗炎和镇痛作用, 机制可能与抑制 NO、PGE₂ 和 TNF- α 等因子相关 (Won *et al.*, 2006); 具有显著的抑制高胆固醇血症和高脂血症的作用, 其效果与普罗布考相当 (Jung *et al.*, 2007); 具有体外抗肝纤维化活性 (陈月圆等, 2011) 等。对于醉鱼草苷 IV 在体内抗 H₂₂ 肝癌作用的研究鲜见报道。本文主要研究醉鱼草苷 IV 对小鼠移植性肝癌 H₂₂ 肿瘤生长的抑制作用, 腹腔注射给药, H₂₂ 肝癌细胞荷瘤小鼠为药效学模型, 肿瘤抑制率为指标, 初步探讨醉鱼草苷 IV 的抗肝癌作用; 同时测小鼠血清抗氧化酶活性, 探索醉鱼草苷 IV 体内抑制肿瘤生长的可能机制, 为开发醉鱼草苷 IV 提供药理学依据。

1 材料与方 法

1.1 动物、瘤株及试剂

SPF 级昆明种小白鼠, 50 只, 4~6 周龄, 18~22 g, 雌雄各半, 由广西医科大学动物实验中心提供, 证号 SCXK 桂 2003-0003。瘤株为小鼠肝癌腹水瘤细胞系 H₂₂, 购自中国典型培养物保藏中心 (武汉大学保藏中心), 本实验室传代培养。注射用环磷酰胺 (CTX), 江西恒瑞医药股份有限公司生产, 批号: 03110121。超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、谷酰转氨酶 (GGT) 和碱性磷酸酶 (AKP) 检测试剂盒, 南京建成生物公司生产, 批号: 20101228。醉鱼草苷 IV (纯度大于 99.8%) 由本课题组从风轮菜属植物中分离制备, 通过波谱方法 (¹H 和 ¹³C NMR) 并与文献 (Elsharkawy *et al.*, 2007) 对照确定其结构为醉鱼草苷 IV。

1.2 移植性 H₂₂ 肝癌细胞荷瘤鼠模型的建立

取传代后 7 d 的腹水型 H₂₂ 肝癌瘤株小鼠, 无菌条件下抽取适量的乳白色腹水, 用无菌生理盐水稀释, 1 000 r · min⁻¹ 离心 5 min, 洗涤细胞 3 次, 调整 H₂₂ 细胞浓度为每毫升 5×10^6 个 (计数活细胞数 > 95%), 于小鼠右腋部行皮下无菌接种, 接种量为每只 0.2 mL (1×10^6 个细胞/只)。

1.3 动物分组及处理

小鼠接种 H₂₂ 肝癌细胞, 24 h 后随机分成 5 组, 每组 10 只。模型对照组灌胃给予蒸馏水; 阳性药对照组: CTX ($20.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); 醉鱼草苷 IV 高、中、低剂量组 (1.00 、 0.50 、 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); 各组腹腔注射给药, 每天 1 次, 连续 10 d, 末次给药后次日小鼠称重并处死, 从眼球取血, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 分离血清, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰冻保存备用。剥取瘤组织、脾脏和胸腺, 电子天平称重, 按下列公式计算抑瘤率、胸腺指数、脾脏指数。

抑瘤率 = $[(\text{对照组瘤质量} - \text{给药组瘤质量}) / \text{对照组瘤质量}] \times 100\%$ 。

胸腺指数 = 胸腺重量 (mg) / 小鼠体重 (g)。

脾脏指数 = 脾脏重量 (mg) / 小鼠体重 (g)。

1.4 H₂₂ 荷瘤小鼠血清 SOD 活性, MDA、GGT 和 AKP 含量

采用黄嘌呤氧化酶法 (羟胺法) 测定 SOD 活力、硫代巴比妥酸法检测 MDA 的含量、化学比色法测定 GGT 和 AKP 含量, 以上测定均严格按照南京建成生物公司的测定试剂盒说明书进行, 使用 OPTI-ZEN2120 UV 型紫外分光光度计测定 SOD 活性, MDA、GGT 和 AKP 含量。

1.5 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计软件, 瘤质量、SOD、MDA、GGT 和 AKP 测定结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析进行组间比较, 采用 LSD 法进行两两比较。 $P < 0.05$ 表示有统计学差异, $P < 0.01$ 表示结果有极显著性差异。

2 结果与分析

2.1 小鼠及肿瘤生长情况

各组小鼠接种 H₂₂ 细胞, 第 2 天则可在右腋下接种部位扪及米粒大小、形状不规则、表面不平滑的瘤结节。模型对照组小鼠右腋下瘤肿块生长速度较快, 其次是醉鱼草苷 IV 低剂量组; 环磷酰胺组肿块生长相对较慢, 观察小鼠的饮食、活动及毛发色泽, 发现醉鱼草苷 IV 各组小鼠生存质量和生存状态明显高于环磷酰胺组。

2.2 醉鱼草苷 IV 对 H₂₂ 小鼠肝癌的抑瘤作用

体内抗肿瘤实验结果表明,醉鱼草苷 IV 高、中、低剂量组对小鼠 H₂₂ 移植性肝癌均有显著的抑瘤作用。由表 1 可以看出,醉鱼草苷 IV 高、中、低剂量组的抑瘤率分别为 56.96%、50.63%、35.44%。环磷酰胺(CTX)组对小鼠 H₂₂ 肝癌的抑瘤率为 69.49%。以上各组与模型对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。实验期间,各组的小鼠体质量都有不同程度的增加,其中环磷酰胺(CTX)组小鼠体质量增长缓慢;环磷酰胺(CTX)组小鼠胸腺指数有所减轻($P < 0.01$),说明环磷酰胺可使小鼠的胸腺受到抑制;与模型对照组比较,醉鱼草苷 IV 组对小鼠脾脏和胸腺质量无显著影响,提示对小鼠脾脏、胸腺等机体无明显免疫抑制作用。

表 1 醉鱼草苷 IV 对 H₂₂ 肝癌小鼠的抑瘤作用

Table 1 Inhibitory effect on hepatocarcinoma 22 (H₂₂) in mice of buddlejasaponin IV ($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	胸腺指数 Thymus index (mg/g)	脾腺指数 Spleen index (mg/g)	抑瘤率 Tumor inhibition rate (%)
模型对照组 Model control group	2.71±1.05	6.58±1.36	—
阳性药(CTX)对照组 CTX control group	1.33±0.70 **	7.03±1.97	69.49 **
醉鱼草苷 IV 高剂量组 BJ-IV high-dose group	2.18±0.76 ^{△△}	8.10±1.09	56.96 **
醉鱼草苷 IV 中剂量组 BJ-IV middle-dose group	2.11±0.54 [△]	8.22±2.01	50.63 **
醉鱼草苷 IV 低剂量组 BJ-IV low-dose group	2.09±0.64 [△]	8.66±2.18 [△]	35.44 **

注:与模型对照组比较,** $P < 0.01$;与阳性对照组比较,^{△△} $P < 0.01$,[△] $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the model control group, ** $P < 0.01$; Compared with the CTX control group,^{△△} $P < 0.01$,[△] $P < 0.05$.

2.3 醉鱼草苷 IV 对 H₂₂ 肝癌小鼠血清 SOD、MDA、GGT 和 AKP 活性的影响

与模型对照组比较,醉鱼草苷 IV 高、中剂量组小鼠血清 SOD 活性增加($P < 0.05$);醉鱼草苷 IV 各剂量组血清 MDA 水平降低($P < 0.01$);醉鱼草苷 IV 给药组血清中 GGT、AKP 含量与模型组比较都具有极显著差异($P < 0.01$);除 SOD 活性之外,而环磷酰胺组与模型组比较无显著差异。结果表明,醉鱼草苷 IV 具有清除荷瘤小鼠体内自由基的能力,可以上调机体的氧化应激状态,并能抑制肝脏功能的持续性损伤(表 2)。

表 2 各组小鼠血清中 SOD、MDA、GGT 和 AKP 活性

Table 2 The activity of SOD,MDA,GGT and AKP in the serum of each mice

组别 Group	SOD (U/mL)	MDA (nmol/mL)	GGT (U/L)	AKP (U/L)
正常组 Normal group	145.47±19.91	11.84±3.25	14.00±1.13	11.46±0.80
模型组 Model control group	143.20±24.56	15.26±6.14	42.05±2.24	18.44±1.84
环磷酰胺组 CTX control group	153.53±27.09 *	14.85±4.03	42.27±4.36	18.12±1.63
醉鱼草苷 IV 高剂量组 BJ-IV high-dose group	160.56±24.51 *	12.58±1.94 **	33.92±3.51 **	12.01±0.99 **
醉鱼草苷 IV 中剂量组 BJ-IV middle-dose group	151.54±26.12 *	12.19±1.52 **	32.18±3.42 **	13.62±2.82 **
醉鱼草苷 IV 低剂量组 BJ-IV low-dose group	129.01±24.18	10.91±2.73 **	32.71±2.81 **	13.95±1.84 **

注:与模型组相比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the model control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3 讨论与结论

醉鱼草苷 IV 是一个具有 $\Delta^{11-13,28}$ -环氧齐墩果烯型结构的三萜皂苷。文献资料表明:与其结构类似的三萜皂苷类化合物具有一定的抗肿瘤活性(Motoo *et al.*, 1994; Yano *et al.*, 1994),同时也具有一定的提高免疫调节作用(吴皓等, 2006; 马春玲等, 1999)。环磷酰胺是广谱抗肿瘤药物,同时又可作为小鼠免疫抑制动物模型(齐丽娟等, 2010),所以我们选用环磷酰胺作为阳性对照进行醉鱼草苷 IV 对 H₂₂ 肝癌小鼠的抑瘤作用研究。

我国抗肿瘤药物药效学指导原则为:体内抗肿瘤实验结果是评价抗肿瘤药物有效性的重要指标(郭健等, 2008)。李海燕等(2000)和陈润涛等(2008)的研究表明,药物抗肿瘤作用及机制的一个公认的肿瘤模型是 H₂₂ 荷瘤小鼠肝癌细胞皮下移植小鼠模型。氧化应激是肿瘤发生的重要机制(李俊峰等, 2013),寻找体内有效的抗氧化物已成为当今抗肿瘤药研究的新方向。SOD 是动物机体内重要的抗氧化酶,可保护机体免受自由基的损伤,机体清除自由基的能力可以用 SOD 活性测定反映。MDA 是细胞脂质过氧化物的终产物,测定 MDA 水平可以表达机体内脂质氧化的程度,间接地推断细胞的损伤程度。本研究结果表明:阳性对照组和醉鱼草苷 IV 中、高剂量组 SOD 活性与模型组比较,均表现具有显著提高 SOD 活性($P < 0.05$);醉鱼草苷 IV

可明显上调由于 H₂₂ 肿瘤生长引起的 SOD 活性; 提高机体免疫力。醉鱼草苷 IV 给药组 MDA 生成量极显著的低于模型组 ($P < 0.01$), 而阳性对照组 MDA 生成量与模型组比较, 无显著差异。MDA 水平的降低意味着自由基的减少以及肝脏损伤的减轻。碱性磷酸酶 (AKP) 广泛存在人体各脏器官中, 其中以肝脏含量最高。由于肝损伤与自由基引起生物膜脂质过氧化而导致细胞膜结构损伤及功能失活, 进而引起细胞膜通透性增高, AKP 等肝脏中的细胞内酶随通透性增高流入血液, 导致血液中含量增高 (郑荣梁, 1996; 翁玉椿, 1995)。血清中谷酰转氨酶 (GGT) 主要来自肝胆系统。肝癌时由于肝内阻塞, 诱使肝细胞产生多量 GGT 同时, 癌细胞也合成 GGT, 两者产生的 GGT 导致血清中 GGT 明显升高。本研究表明: AKP、GGT 含量检测结果显示, 模型组血清中 AKP、GGT 含量都极显著高于空白组, 说明 H₂₂ 小鼠移植性肝癌转移成功, 癌细胞的侵袭, 导致机体细胞膜结构损伤及功能失活, 使得血液中 AKP 含量增高。在醉鱼草苷 IV 对血清酶类 GGT、AKP 等改善方面, 与模型组相比较, 醉鱼草苷 IV 给药组血清中 AKP、GGT 含量都具有极显著差异, 而环磷酰胺组的血清检测指标无显著差异, 说明醉鱼草苷 IV 具有一定的肝细胞保护作用。

醉鱼草苷 IV 在体内具有一定的抗肝癌作用, 机理可能与调节机体的抗氧化能力有关联, 但醉鱼草苷 IV 是否还有其他方面的抗肿瘤作用以及作用机制如何, 有待我们深入研究。

参考文献:

- Chen YY(陈月圆), Li DP(李典鹏), Huang YL(黄永林), *et al.* 2011. Effects of buddlejasaponin IV on proliferation and activation of hepatic stellate cells(醉鱼草苷 IV 对大鼠肝星状细胞增殖、活化的影响)[J]. *Chin J Expe Tral Med Formulae* (中国实验方剂学杂志), **17**(20):203-206
- Chen RT(陈润涛), Chen B(陈秉), Xia Y(夏源), *et al.* 2008. Sex effect on hepatocarcinoma 22(H₂₂) in mice(性别对荷 H₂₂ 肝癌小鼠肿瘤生长的影响)[J]. *Chin Occupa Med* (中国职业医学), **35**(4):283-285
- Elsharkawy AM, Mann DA. 2007. Nuclear factor-kappa B and the hepatic inflammation-fibrosis-canceraxis [J]. *Hepamlogy*, **46**(2):590
- Guo J(郭健), Gao FY(高福云), Hu P(胡萍), *et al.* 2008. Study on the anticancer effects of some Chinese herbs combined with trace element selenium(硒化合物与抗癌中药配伍的抗肿瘤作用)[J]. *Lab Anim Sci* (实验动物科学), **25**(2):10-12
- Hyun-Ju J, Jung-Hwan N, Hee-Juhn P, *et al.* 2007. The MeOH extract of pleurospermum kamtschaticum and its active component buddlejasaponin(IV) inhibits intrinsic and extrinsic hyperlipidemia and hype rcholesterolemia in the rat[J]. *J Ethno*, **112**(2):255-261
- Li HY(李海燕), Fang ZQ(方肇勤), Liang SH(梁尚华). 2000. Studies in mice transplanted liver cancer (H₂₂) model and its application in the anti-tumor medicine(小鼠移植性肝癌 H₂₂ 模型的研究及在中医药抗肿瘤中的应用)[J]. *Chin J Basic Med Trad Chin Med* (中国中医基础医学杂志), **6**(1):27-29
- Li JF(李俊峰), Zheng SJ(郑素军), Duan ZP(段钟平). 2013. Liver fibrosis: role of oxidative stress and thrrapeutic countermeasures(氧化应激在肝纤维化中的作用及治疗对策)[J]. *World Chin J Digestol* (世界华人消化杂志), **21**(17):1 573-1 578
- Jong-Heon W, Ho-Taek I, Yang-Hee K, *et al.* 2006. Anti-inflammatory effect of buddlejasaponin IV through the inhibition of iNOS and COX-2 expression in RAW 264.7 macrophages via the NF- κ B inactivation[J]. *Bri J Pharm*, **148**(2):216-225
- Motoo Y, Sawabu N. 1994. Antitumor effects of saikosaponins, baicalin and baicalein on human hepatoma celllines [J]. *Cancer Lett*, **86**(1):91-95
- Ma CL(马春玲), Zhang XQ(张西强), Wang FQ(王法权), *et al.* 1999. Experimental of reserch of the effect of South *Ernubupleurum* immune functions of mice(南柴胡对小鼠免疫功能影响的实验研究)[J]. *J Linyi Med Coll* (临沂医专学报), **21**(1):11-13
- Qi LJ(齐丽娟), Song Y(宋雁), Wang W(王伟), *et al.* 2010. Comparison of immunosupperession induced by different doses of cyclophosphamide in normal mice(用环磷酰胺建立小鼠免疫抑制动物模型)[J]. *J Hyg Res* (卫生研究), **39**(3):313-315
- Weng YC(翁玉椿). 1995. Determination of MDA in the cell and intracellular(细胞和细胞内 MDA 的测定)[J]. *Chin J Cell Biol* (细胞生物学杂志), **17**(3):142-145
- Wu H(吴皓), Lin HS(林洪生), Pei YX(裴迎霞), *et al.* 2006. Effect of ginsenosid Rg3 on themucosal immunity in tumor-bearing mice treated with Cyclophosphamide(人参皂甙 Rg3 对荷瘤及环磷酰胺化疗小鼠黏膜免疫力影响)[J]. *Chin Cancer* (中国肿瘤), **6**:369-371
- Yano H, Mizoguchi A, Fukuda K, *et al.* 1994. The herbalmedicine sho-saiko-to inhibits proliferation of cancer celllines by inducing apoptosis and arrest at the G0/G1 phase [J]. *Cancer Res*, **54**(2):448-454
- Zheng RL(郑荣梁). 1996. Free-radical Biology(自由基生物学) [M]. Beijing(北京): Higher Education Press(高等教育出版社):8-10