

# 裂果薯醇提物对人肝癌裸鼠移植瘤生长与血管生成的影响

欧明春<sup>1</sup>, 孙悦文<sup>1</sup>, 刘布鸣<sup>2</sup>, 唐安洲<sup>3</sup>, 梁钢<sup>1\*</sup>

(1. 广西医科大学药学院, 南宁 530021; 2. 广西中药质量标准研究重点实验室, 南宁 530022;  
3. 广西医科大学第一附属医院, 南宁 530021)

**[摘要]** **目的:**探讨裂果薯乙醇提取物对人肝癌裸鼠移植瘤生长与肿瘤血管生成的影响及其抗肿瘤的作用机制。**方法:**采用80%乙醇回流提取制备裂果薯块茎醇提物;建立人肝癌细胞SMMC-7721裸鼠移植瘤模型,成瘤BALB/c裸鼠随机分为模型组、索拉非尼组和裂果薯醇提物高、中、低剂量组;裂果薯高、中、低剂量组和索拉非尼组给药量分别为107, 71, 54, 30 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,每日ig给药1次,连续给药21 d,模型组不给药,对比观察裂果薯醇提物对肿瘤生长的影响;免疫组化法测定裸鼠肿瘤中CD34,血管内皮生长因子(VEGF)的表达,观察裂果薯醇提物对肿瘤血管生成的影响。**结果:**与模型组相比,裂果薯醇提物高、中剂量组和索拉非尼组能够明显降低肿瘤瘤重和相对体积,其抑瘤率分别为47.71%, 21.27%, 51.75%;同时,裂果薯高剂量组、索拉非尼组能明显降低肿瘤微血管密度(MVD), ( $P < 0.01$ ),明显降低肿瘤组织中VEGF的表达( $P < 0.01$ );裂果薯中剂量组降低MVD( $P < 0.05$ )。**结论:**裂果薯醇提物可抑制SMMC-7721细胞裸鼠移植瘤和瘤组织中血管生长,其作用可能与下调VEGF的表达有关。

**[关键词]** 裂果薯; 抗肝癌; 血管生成; 血管内皮生长因子

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)08-0106-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015080106

## Effects of Ethanol Extract from *Schizocapsa plantaginea* on Growth and Angiogenesis of Human Hepatocellular Carcinoma Xenografts in Nude Mice

OU Ming-chun<sup>1</sup>, SUN Yue-wen<sup>1</sup>, LIU Bu-ming<sup>2</sup>, TANG An-zhou<sup>3</sup>, LIANG Gang<sup>1\*</sup> (1. School of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards, Nanning 530022, China; 3. The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of the ethanol extract from *Schizocapsa plantaginea* on the growth and angiogenesis of SMMC-7721 cell xenografts in nude mice and the antitumor mechanism of *S. plantaginea*. **Method:** *S. plantaginea* tubers were extracted by reflux in 80% ethanol. The human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cell model was established in BALB/c nude mice and the animals were randomly divided into model group, sorafenib group and high, medium, low dosage of *S. plantaginea* groups. The animals in *S. plantaginea* groups were administered 107, 71, 54 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> the ethanol extract and in sorafenib group were administered 30 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> sorafenib by gavage once daily for 21 days. The animals in model group did not perform any treatment. The tumor growth was observed in xenografts model in nude mice and angiogenesis was observed by examining the expression of CD34 and vascular endothelial growth factor (VEGF) in tumor tissues by immunohistochemistry. **Result:** The tumor weight and the relative tumor volume in high and medium dosage of *S. plantaginea* groups and sorafenib group was significantly lower than that in model group. And the tumor

**[收稿日期]** 20141030(012)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81460620);广西自然科学基金项目(2014GXNSFDA118025);广西中药质量标准研究重点实验室(广西壮族自治区中医药研究院)开放课题基金项目(桂中重开201105)

**[第一作者]** 欧明春, 硕士, 从事抗肿瘤分子药理学和天然药化研究, E-mail: oumingchun2012@163.com

**[通讯作者]** \* 梁钢, 博士, 教授, 博士生导师, 从事天然药物抗肿瘤分子药理学及其新药研究, Tel: 0771-5302271, E-mail: lianggang22@aliyun.com

inhibitory rates of those three groups were 47.71%, 21.27% and 51.75%. The levels of microvessel density (MVD) and VEGF in tumor tissue were also significantly lower ( $P < 0.01$ ) in high dosage of *S. plantaginea* group and sorafenib group than in model group. The MVD in medium dosage of *S. plantaginea* group was less ( $P < 0.05$ ) than that in model group. **Conclusion:** The ethanol extract from *S. plantaginea* can inhibit the growth of SMMC-7721 cell xenografts in nude mice and angiogenesis in tumor tissue, and its underlying mechanism is maybe due to its ability to reduce the expression of VEGF.

**[Key words]** *Schizocapsa plantaginea*; anti-hepatic carcinoma; angiogenesis; vascular endothelial growth factor

裂果薯别名水田七、屈头鸡等,是一种广西特色中草药,也属壮族、瑶族药等民族医药。药用其块茎,具有清热解毒、散瘀消肿、理气止痛等功效<sup>[1]</sup>;民间除用于跌打肿痛外,亦用于肿瘤治疗,但其相关抗肿瘤研究报道甚少,主要为某一成分对个别瘤株的体外活性检测<sup>[2]</sup>,体内抗肿瘤,尤其是抗人肝癌作用及其机制的研究还未见报道。目前,国内外也有裂果薯相关研究<sup>[3]</sup>,但是其在抑制肿瘤生长和血管生成等方面的作用未见报道。易转移和对化疗药物敏感性差是肝癌治疗两大难点,导致肝癌治疗一直不理想。从中草药活性成分中寻找抗肝癌作用强,同时又有抗转移且毒性低的药物显得十分必要。为此笔者以临床证实有效的酪氨酸蛋白激酶为靶向作用点,结合观察对人肝癌细胞和血管生长的抑制作用,对多种广西特色中草药提取物进行了筛选研究,从中发现裂果薯醇提物在体外对多株肝癌细胞增殖和鸡胚绒毛尿囊血管生成有明显抑制,而对人的原代肝细胞无明显抑制<sup>[4]</sup>。本研究进一步验证裂果薯醇提物的体内抗肿瘤和抑制瘤组织血管生长及其作用机制。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 人肝癌 SMMC-7721 细胞株购自中国科学院细胞库。

**1.2 动物** 4~5 周龄的 BALB/c 裸鼠 15~18 g,雌雄各半,SPF 级,由广西医科大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(桂)2009-0002。

**1.3 药物、试剂** 裂果薯块茎采自广西桂林市资源县瓜里乡,经广西中医药研究院中药研究所赖茂祥研究员鉴定为裂果薯 *Schizocapsa plantaginea*。索拉非尼(拜耳公司,批号 H20060296),索拉非尼用 0.5% 无菌羧甲基纤维素钠制成质量浓度为  $3.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的混悬液。兔抗人 CD34 多克隆抗体、兔抗人血管内皮生长因子(VEGF)多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号 BA0532, PB0084)。

**1.4 仪器** DMR + Q550 型病理图像分析仪(德国

莱卡), DG-401 型恒温箱(天津市实验仪器厂), 1X70 型倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司),游标卡尺(上海计量制品厂), MotiC Med 6.0 型数码医学图像分析系统(北京麦克奥迪仪器仪表有限公司)。

## 2 方法

**2.1 裂果薯醇提物制备** 裂果薯块茎晒干后粉碎,取 7 kg,加 5~8 倍体积的 80% 乙醇回流提取 3 次,每次提取 2 h,过滤,合并提取液,旋转蒸发回收溶剂,得浸膏。将浸膏置于 60 °C 烘箱烘干,得裂果薯乙醇提取物干膏 965 g,得率为 13.78%。用前以抗菌生理盐水配成质量浓度为  $10.7, 7.1, 5.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  溶液备用。

**2.2 人肝癌细胞 SMMC-7721 裸鼠移植瘤模型的建立**<sup>[5-6]</sup> 将处于对数生长期 SMMC-7721 细胞用 0.5% 的胰蛋白酶消化,吹打均匀制成密度为  $5 \times 10^7/\text{mL}$  的单细胞悬液,接种于体重为 16~18 g 的裸鼠左前肢腋窝皮下,每只裸鼠接种 0.2 mL。接种后第 15 d 观察接种成功情况。将成功接种的裸鼠随机分为模型组、索拉非尼阳性药组和裂果薯醇提物高、中、低剂量组,每组 6 只且雌雄各半。裂果薯高、中、低剂量组和索拉非尼组给药量分别为 107, 71, 54, 30  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。每日 ig 给药 1 次,连续给药 21 d,模型组不给药。从第 1 天给药起,裸鼠隔天称重并用游标卡尺测量肿瘤最长径(A)和与最长径垂直的径长(B),计算其体积及肿瘤相对体积(RTV)。

$$V(\text{肿瘤体积}) = \pi \cdot A \cdot B / 3$$

$$\text{RTV} = V_1 / V_0$$

$V_0$  为治疗开始时瘤体体积,  $V_1$  为治疗结束后瘤体体积。

21 d 后颈椎脱臼处死各组裸鼠,取出瘤组织称量瘤重,计算药物抑瘤率。将取出的肿瘤组织浸入 10% 甲醛溶液固定,石蜡包埋,连续切片,免疫组化染色。

$$\text{抑瘤率} = (\text{模型组平均瘤重} - \text{药物处理组平均瘤重}) / \text{模型组平均瘤重} \times 100\%$$

### 2.3 免疫组化法测定肿瘤中 CD34, VEGF 的表达

**2.3.1 SP 免疫组化染色** 操作方法按试剂盒说明书进行。每个实验组均设有阴性、阳性对照染色,以 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照,以肝癌切片作为阳性对照。

**2.3.2 MVD 计数** CD34 位于血管内皮细胞的胞膜和胞浆,胞膜和胞浆呈棕黄色为阳性染色。参照 Weidner 的方法<sup>[7]</sup>,在低倍镜下( $\times 100$ )全面观察 CD34 染色阳性的血管,选取肿瘤微血管密集区域,然后在高倍镜下( $\times 400$ )选取 5 个不重复视野进行计数,将其平均数作为 MVD。微血管的统计标准:与周围细胞有明确分界呈棕黄色的单个内皮细胞或内皮细胞团,计数为 1 个微血管;肌层较厚及管腔大于 8 个红细胞直径的血管不被计数;排除纤维化及边缘反应区、出血区域等<sup>[8]</sup>。

**2.3.3 VEGF 表达结果判定** VEGF 是肿瘤细胞胞浆抗原,阳性表达为染色后胞浆出现棕黄色弥漫或散在的颗粒。根据染色强度及阳性细胞数占总细胞的百分率进行综合计分。染色强度:未染色为 0 分,轻度染色为 1 分,中度染色为 2 分,重度染色为 3 分。阳性细胞数:阳性细胞数  $\leq 5\%$  为 0 分,  $6\% \sim 25\%$  为 1 分,  $26\% \sim 50\%$  为 2 分,  $\geq 51\%$  为 3 分。VEGF 表达分值:染色强度得分与阳性细胞数得分之和。VEGF 表达情况:0 分为阴性(-), 1~2 分为低度表达(+), 3~4 分为中度表达(++), 5~6 分为高度表达(+++)。每张切片选取 5 个不重复视野( $\times 100$ )进行结果判定<sup>[9]</sup>。

**2.4 统计学方法** 所有数据采用 SPSS 13.0 统计软件进行处理。数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。选择单因素方差分析对不同药物组进行方差齐性检验,多重比较选择 LSD 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 裸鼠一般状况和成瘤情况** 造模过程中,裸鼠精神状态均良好,活动正常,反应灵敏,皮肤颜色正常,未有明显的不安、多动或拒食现象。32 只裸鼠中有 30 只裸鼠成瘤,成瘤率 93.75%。实验过程中,随着肿瘤不断增大,各组裸鼠都出现一定的身体活动限制,全部裸鼠存活至实验结束。

**3.2 对裸鼠移植瘤生长的影响** 与模型组相比,给药治疗后,裂果薯醇提取物高、中剂量组和索拉非尼组的瘤重及肿瘤相对体积明显下降,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。见表 1。

**3.3 对 SMMC-7721 细胞裸鼠移植瘤组织中 MVD 的影响** 裂果薯醇提取物高、中剂量组及索拉非尼组

表 1 裂果薯醇提取物对人肝癌细胞 SMMC-7721 裸鼠移植瘤的生长抑制作用( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 Inhibitory effects of ethanol extract from *S. plantaginea* on growth of SMMC-7721 cell xenografts in nude mice( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	瘤重 /mg	抑瘤率 /%	RTV
模型	-	521.87 ± 18.61	-	7.27 ± 0.55
索拉非尼	30	251.80 ± 25.11 <sup>1)</sup>	51.75	3.56 ± 0.59 <sup>1)</sup>
裂果薯醇提取物	107	272.90 ± 30.35 <sup>1)</sup>	47.71	3.83 ± 0.62 <sup>1)</sup>
	71	410.85 ± 22.87 <sup>1)</sup>	21.27	5.21 ± 0.77 <sup>1)</sup>
	54	557.91 ± 25.56	-6.91	7.39 ± 0.69

注:与模型组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ (表 3 同)。

的 MVD 与模型组 MVD 相比明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.01, P < 0.05$ ),且微血管分布较稀疏,形态和大小有较明显差异,局部出现条索状或环状。见表 2,图 1。

表 2 裂果薯醇提取物对 SMMC-7721 细胞裸鼠移植瘤 MVD 的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Effects of ethanol extract from *S. plantaginea* on MVD in SMMC-7721 cell xenografts in nude mice( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

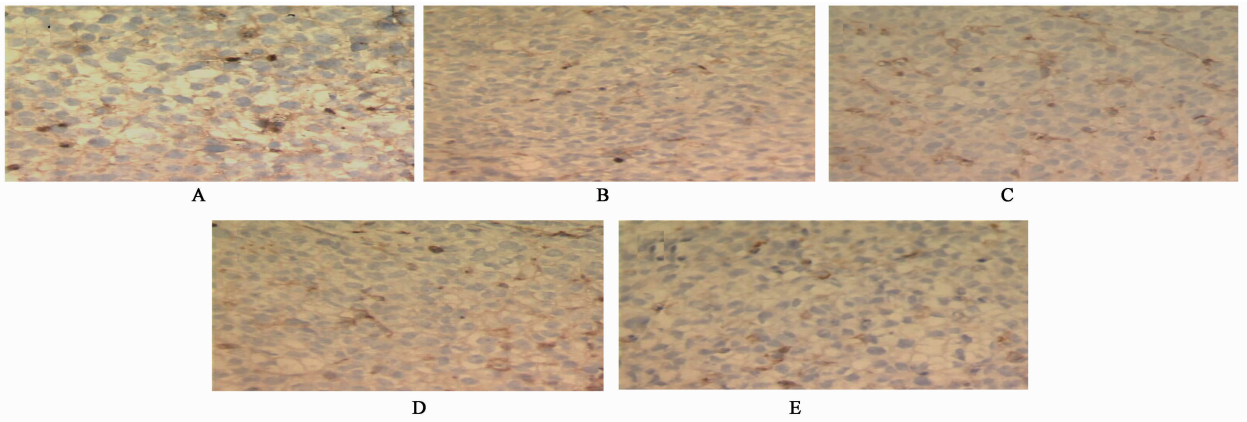
组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	MVD/个/高倍视野
模型	-	46.40 ± 1.30
索拉非尼	30	19.03 ± 1.63 <sup>2)</sup>
裂果薯醇提取物	107	26.40 ± 1.25 <sup>2)</sup>
	71	41.03 ± 1.63 <sup>1)</sup>
	54	42.60 ± 1.64

注:与模型组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.4 对裸鼠移植瘤组织血管生成相关蛋白 VEGF 表达的影响** 模型组着色深,出现大区域棕黄色染色,VEGF 表达高(+++);裂果薯醇提取物高剂量组、索拉非尼组着色淡,多数细胞核呈蓝色,只有个别细胞呈阳性染色,VEGF 表达低(+),与模型组相比差异明显,具有统计学意义( $P < 0.01$ )。裂果薯醇提取物中剂量组 VEGF 表达低于模型组,为(++),差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。裂果薯醇提取物低剂量组与模型组相比无明显差异。见表 3。

## 4 讨论

肝癌是我国常见的恶性肿瘤,不易早期发现,具有生长快、易转移、易耐药等特点。其瘤组织血供丰富,部分肿瘤存在双重血供,侧支循环较多,导致治疗效果不理想,因此从天然药用植物中寻找抗肝癌和抑制血管生成的新活性成分和研发新药显得非常重要。针对新靶点、提高选择性和针对常见实体瘤,



A. 模型组;B. 索拉非尼 30 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>组;C. 裂果薯 107 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>组;D. 裂果薯 71 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>组;E. 裂果薯 54 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>组  
图 1 裂果薯醇提物对 SMMC-7721 细胞裸鼠移植瘤 CD34 表达的影响(SP, ×400)

Fig.1 Effects ethanol extract from of *S. plantaginea* on expression of CD34 in SMMC-7721 cell xenografts in nude mice(SP, ×400)

表 3 裂果薯醇提物对 SMMC-7721 细胞裸鼠移植瘤 VEGF 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Effects of ethanol extract from *S. plantaginea* on expression of VEGF in SMMC-7721 cell xenografts in nude mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	VEGF 表达/分	表达情况
模型	-	5.67 ± 0.52	+++
索拉非尼	30	1.33 ± 0.52 <sup>1)</sup>	+
裂果薯	107	2.00 ± 0.63 <sup>1)</sup>	+
	71	4.50 ± 0.55 <sup>1)</sup>	++
	54	5.33 ± 0.52	+++

寻找新型的化学结构和新作用机制的药物研究是新趋势。目前新一代的针对特定肿瘤、特定靶点的非细胞毒类药物已经走向市场。1998 年,一种新型多靶点抗肿瘤药物索拉非尼(Sorafenib)上市,给“无药可治”的肝癌中晚期患者带来希望<sup>[10]</sup>。本研究证实裂果薯醇提物在体内既能抑制人肝癌细胞生长又能抑制瘤组织血管生成,与前期的体外研究<sup>[4]</sup>结果一致。其抑瘤率已明显大于《现代肿瘤治疗药理学》关于抗肿瘤中草药有效性的标准(抑瘤率 > 30%),且高剂量的抑瘤作用已接近肝癌靶向肿瘤药索拉非尼的抑瘤效果,也与目前其他具有较强体内抗肝癌中草药醇提物的抑瘤效果相当<sup>[11]</sup>。

血管生成是肿瘤生长和转移的基础<sup>[12]</sup>,抑制血管生成可作为恶性肿瘤的治疗手段之一。MVD 被认为是最能反映肿瘤血管生成的指标之一。CD34 是敏感的血管内皮细胞标志物,具有较高的抗原特异性和稳定性<sup>[13]</sup>,通过 CD34 抗体标记血管内皮细胞,是进行 MVD 计数的良好指标。本研究发现,与模型对照的 MVD 值相比,裂果薯高剂量和索拉非

尼降低的幅度较大,表明裂果薯与索拉非尼类似,可通过抑制肿瘤血管的生成,阻断营养的供给,从而发挥抗肿瘤作用,这与其他只单纯具有抑瘤作用的抗肿瘤药物不同。

VEGF 可以促进内皮细胞增殖,诱导新生血管生成,并可增加血管通透性<sup>[14]</sup>。在肿瘤微血管的生成过程中,VEGF 是主要的活性因子,肿瘤组织中可见其高度表达,肿瘤的生长、转移与 VEGF 密切相关<sup>[15]</sup>。实验中,与模型对照相比,裂果薯高剂量和索拉非尼能显著下调 VEGF 的表达。结果说明,裂果薯与索拉非尼类似,可通过抑制 VEGF 的表达,阻断肿瘤微血管的生成,从而抑制肿瘤的生长、侵袭和转移。

本研究提示,裂果薯醇提物中应含有抗肿瘤效果很好的某种或多种活性成分,具有较好的研究前景。鉴于索拉非尼是通过抑制酪氨酸激酶起到抗肿瘤作用的,裂果薯的抗肿瘤作用有可能与索拉非尼类似,也可能是通过抑制酪氨酸激酶完成的,其确切的抗肿瘤机制还有待后续的研究。后续的实验也将对醇提物进一步分离并进行药理学研究,以证实其抗肿瘤的活性成分。本实验表明,裂果薯醇提物在体内具有良好的抗肿瘤作用,可抑制新生血管的生成,其作用可能与下调 VEGF 的表达与抑制酪氨酸激酶有关。

[参考文献]

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1977:524.  
[2] Chen Z L, Wang B D, Chen M Q. Steroidal bitter principles from *tacca plantaginea* structures of

- taccalonolide A and B[J]. *Tetrahedron Letters*, 1987, 28(15):1673-1675.
- [3] 杨俊芸. 丫蕊花和裂果薯的化学成分研究以及 taccalonolide A 的化学结构修饰[D]. 昆明:云南中医药大学, 2008.
- [4] 孙悦文. 广西特色中草药靶向抗肿瘤筛选及裂果薯皂苷的分离与抗肿瘤作用研究[D]. 南宁:广西医科大学, 2013.
- [5] 陈逢生, 崔彦芝, 郑航, 等. 索拉非尼联合顺铂对人肝癌裸鼠移植瘤生长的抑制作用[J]. *山东医药*, 2009, 49(48):9-11.
- [6] 贺凯, 刘明华, 任美萍, 等. 槲皮素对裸鼠人肝癌细胞株 SMMC-7721 移植瘤生长的抑制作用[J]. *实用肿瘤杂志*, 2011, 26(5):493-496.
- [7] Weidner N. Intratumor or microvessel density as a prognostic factor in cancer[J]. *Am J Pathol*, 1995, 147(1):9.
- [8] 黎莉. 表没食子儿茶素没食子酸酯逆转人口腔鳞癌多药耐药性与其血管生长作用关系的实验研究[D]. 南宁:广西医科大学, 2007.
- [9] Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, et al. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells [J]. *Cell*, 1998, 94(6):715-725.
- [10] Yang E B, Zhang K, Cheng L Y, et al. Butein, a specific protein tyrosine kinase inhibitor[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 245(2):435-438.
- [11] 胡静, 钱晓萍, 刘宝瑞, 等. 重楼醇提物抗鼠 H22 移植瘤血管生成的体内实验研究[J]. *现代肿瘤医学*, 2010, 18(10):1886-1889.
- [12] 李春海, 李克勤. 肿瘤微血管生成的机制与肿瘤侵袭和转移[J]. *中华肿瘤杂志*, 2000, 22(3):181-183.
- [13] 吴秉铨, 刘彦仿. 免疫组织化学病理诊断[M]. 北京:北京科学技术出版社, 2007:274.
- [14] Harris S R, Schoeffner D J, Yoshiji H, et al. Tumor growth enhancing effects of vascular endothelial growth factor are associated with increased nitric oxide synthase activity and inhibition of apoptosis in human breast carcinoma xenografts[J]. *Cancer Letters*, 2002, 179(1):95-101.
- [15] Ellis L, Takahashi Y, Fenoglio C, et al. Vessel counts and vascular endothelial growth factor expression in pancreatic adenocarcinoma[J]. *Eur J Cancer*, 1998, 34(3):337-340.

[责任编辑 聂淑琴]