

环磷酰胺联合柿叶乙酸乙酯部位对 H22 小鼠瘤组织 抗氧化能力及 Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响

陈丽¹, 张斌², 张艺¹, 张安文¹, 罗宇¹, 马新博^{1*}

(1. 广西科技大学, 广西 柳州 545006; 2. 广西科技大学第二附属医院, 广西 柳州 545006)

[摘要] **目的:**通过研究环磷酰胺 (CTX)联合柿叶乙酸乙酯部位 (PE)对 H22 荷瘤小鼠瘤组织的抗氧化作用和对瘤组织凋亡相关蛋白 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2)和 Bcl-2 相关 x 蛋白 (Bax)蛋白表达的影响,探讨两药联合应用的效果。**方法:**昆明种小鼠,取 H22 荷瘤鼠腹水接种于昆明种小鼠右前肢腋窝皮下,建立 H22 荷瘤小鼠模型,将荷瘤小鼠随机分为模型组,CTX 组 (0.1 g·kg⁻¹),CTX 联合 PE 高、中、低剂量组 (2,1,0.5 g·kg⁻¹),连续 ig 给药 10 d,处死小鼠后计算抑瘤率,采用金氏 q 值法判断两者合用的效果,检测瘤组织中超氧化物歧化酶 (SOD)活力,丙二醛 (MDA)含量,采用免疫组化法检测瘤组织中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达情况。**结果:**与模型组比较,各给药组抑瘤率明显升高,SOD 水平和 Bax 蛋白表达均明显升高,MDA 水平和 Bcl-2 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);CTX 联合 PE 各剂量组的抑瘤率均高于 CTX 组, $0.85 < q < 1.15$,两药合用作用相加;与 CTX 组比较,联合用药各剂量组 SOD 水平和 Bax 蛋白表达均升高,MDA 水平,Bcl-2 蛋白表达及 Bcl-2/Bax 均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:**CTX 联合 PE 能使抑瘤作用相加,其机制可能与两药合用能明显增强 H22 小鼠机体抗氧化能力,下调 Bcl-2 蛋白及上调 Bax 蛋白的表达有关。

[关键词] 柿叶; 乙酸乙酯部位; H22 荷瘤小鼠; 抗氧化; B 细胞淋巴瘤/白血病-2; Bcl-2 相关 x 蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2015)15-0120-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015150120

Effect of CTX Combined with Ethyl Acetate Extracts from Persimmon Leaves on Antioxidant Capacity and Bcl-2 and Bax Expressions in H22 Bearing Mice

CHEN Li¹, ZHANG Bin², ZHANG Yi¹, ZHANG An-wen¹, LUO Yu¹, MA Xin-bo^{1*} (1. Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou 545006, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou 545006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the antioxidant activity of cyclophosphamide (CTX) combined with ethyl acetate extracts from persimmon leaves (PE) on hepatoma H22 bearing mice and their effect on tumor tissue apoptosis-related proteins Bcl-2 and Bax expressions. **Method:** Kunming mice were selected and subcutaneously inoculated with H22 tumor at right fore armpit to establish the H22 bearing mouse model. The H22 bearing mice were randomly divided into the model group, the CTX group (0.1 g·kg⁻¹), the CTX combined with high, middle and low dose PE groups (2, 1, 0.5 g·kg⁻¹) and were orally given drugs for 10 days. After killing the rats, efforts were made to calculate the anti-tumor rate, detect the combined effect by Jin's formula q, superoxide dismutase (SOD) activity and malonaldehyde (MDA) content in tumor tissues, and analyze Bcl-2 and Bax protein expressions in tumor tissues by immunohistochemistry. **Result:** Compared with the model group, all treatment groups showed significantly higher tumor inhibition rate, SOD and Bax protein expression and lower MDA and Bcl-2 protein expression ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The tumor inhibition rate of CTX combined with PE in each dose group was higher than that of the CTX group, with the Jin's formula q between 0.85 and 1.15, indicating their combined effect. Compared with the CTX group, the SOD activity and bax expression of CTX combined with PE in each dose group increased, but the MAD content, Bcl-2 expression and Bcl-2/Bax ratio decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$).

[收稿日期] 20140912(013)

[基金项目] 广西医学科学实验中心开放基金专项项目 (KFJJ2011-17)

[第一作者] 陈丽, 硕士, 副教授, 从事生化药理学及中药新剂型研究, Tel:0772-2056086, E-mail:chenlilyz@163.com

[通讯作者] * 马新博, 硕士, 副教授, 从事肿瘤免疫研究, Tel:0772-2056086, E-mail:16869050@qq.com

Conclusion: CTX combined with PE had better antitumor effect. Its mechanism is probably related to their combined effect in notably strengthening the antioxidant capacity, down-regulating Bcl-2 expression and up-regulating bax expression of H22 bearing mice.

[**Key words**] persimmon leaf; ethyl acetate extract; H22 bearing mice; antioxidant capacity; Bcl-2; Bax

肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一,发病人数约占全球的 55%,年病死率仅次于肺癌,是全球癌症相关死亡的第三大原因^[1]。肝癌起病隐匿,进展迅速,生存质量差,生存期短。随着天然植物药回归的热潮,绿色抗肝癌植物药的研究越来越受到人们的关注^[2]。柿叶为柿树科柿树属植物柿 *Diospyros kaki* 的新鲜或干燥叶,性寒、味苦、无毒。本实验前期研究亦发现柿叶乙酸乙酯部位(PE)能有效抑制小鼠 H22 和 S180 实体瘤的生长,减少 H22 肝癌腹水的形成,延长荷瘤小鼠生存时间^[3]。本实验将环磷酰胺(cytosan,CTX)与 PE 联合作用于 H22 荷瘤小鼠,通过研究两药合用对 H22 荷瘤小鼠瘤组织抗氧化能力及 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响,探讨两药合用是否能起到增效作用。

1 材料

1.1 动物 健康昆明种小鼠,雌雄各半,6~8 周龄,体重 18~22 g,购自广西医科大学实验动物中心,动物合格证号 SCXK(桂)2009-0002,H22 荷瘤小鼠由广西中医药研究院惠赠。

1.2 药物及试剂 PE 由课题组自行制备:100 g 柿叶粗粉用 70% 乙醇回流提取,过滤,滤液减压浓缩回收乙醇后用乙酸乙酯萃取,萃取液减压浓缩,干燥粉碎后得乙酸乙酯部位 2.75 g,用时以聚山梨酯-80 增溶;空白溶剂:0.5 mL 聚山梨酯-80,加 50 mL 蒸馏水混匀即得,CTX(陕西普德药业股份有限公司,批号 04120703),超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、丙二醛(MDA)测试盒、考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20131018,20131019,20131020),鼠抗人 Bcl-2, Bax 单克隆抗体(福州迈新生物技术有限公司,批号分别为 MAB-0014, MAB-0254),即用型 EliVision™ plus 免疫组化试剂盒(福建迈新生物技术有限公司,批号 KIT-9902),DAB 显色试剂(福建迈新生物技术有限公司,批号 13120747F)。

1.3 仪器 TS-12F 型生物组织自动脱水机(孝感市电子仪器厂),NP-B 型生物组织包埋机(孝感市诺普电子科技有限公司),RM2235 型组织切片机(德国徕卡),NP-P 型生物组织摊片烤片机(孝感市

诺普电子科技有限公司),BX-53 型显微镜(日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 荷瘤小鼠模型建立、分组及给药 无菌条件下取接种 7 d 腹水饱满的 H22 荷瘤小鼠腹水,用生理盐水稀释瘤细胞至 1×10^7 个/mL,取 0.2 mL 接种于昆明小鼠右前肢腋窝皮下。接种 24 h 后将小鼠随机分为 5 组,每组 10 只,雌雄各半。分组后 ig 给药 10 d,每天 1 次,分组及给药情况为:模型组 ig 空白溶剂 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$;CTX 组 ig CTX $0.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$;PE 高、中、低剂量组分别 ig PE 2,1,0.5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$;CTX 联合 PE 高、中、低剂量组在分别 ig PE 2,1,0.5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的同时增加 CTX $0.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。实验用 2 批小鼠模型进行,第 1 批瘤组织用于抑瘤率,SOD 及 MDA 的检测,第 2 批瘤组织用于 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达情况的检测。

2.2 抑瘤情况 治疗期间观察小鼠活动及精神状态,第 1 天和第 10 天称量小鼠体重,以观察各药对小鼠体重的影响。治疗 10 d 停药,24 h 后以颈椎脱臼法处死各组小鼠,小心剥离瘤组织、称重,计算抑瘤率。按照金氏 q 值法^[4],用抑瘤率计算 CTX 与 PE 合用的 q 值。根据 q 值判断两药合用是否有增效作用。 E_a 代表 CTX 单用时的抑瘤率, E_b 代表 PE 单用时的抑瘤率, E_{ab} 代表 CTX 与 PE 联合应用的抑瘤率,当 $0.85 < q < 1.15$ 表示两药合作用相加,当 $q > 1.15$ 表示两药合用有协同作用。

$$q = \frac{E_{a+b}}{E_a + E_b - E_a \times E_b}$$

$$\text{抑瘤率} = \frac{\text{模型组平均瘤重(g)} - \text{实验组平均瘤重(g)}}{\text{模型组平均瘤重(g)}} \times 100\%$$

2.3 SOD,MDA 的测定 取剥离的新鲜非坏死肿瘤组织 0.5 g,以 4 ℃ 生理盐水制成 10% 组织匀浆,分别严格按照考马斯亮蓝蛋白,SOD 及 MDA 试剂盒说明书要求进行测定和计算。

2.4 免疫组化测定瘤组织 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达 采用免疫组化 SP 法检测。福尔马林固定剥离的瘤组织,梯度脱水,石蜡包埋,切片,按试剂盒说明书进行染色。按文献[5-6]对 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达结果进行判定,且结果由病理教研室教师协助分

析。采用半定量计数法,每例连续切 3 片,每片于上、中、下、左、右各随机选取一个 400 倍区域,每个区域计数 100 个细胞,计数阳性细胞数和阴性细胞数,计算阳性表达率。根据阳性表达率计分,0 分为阴性;1 分为阳性表达率 < 10%;2 分为阳性表达率 11% ~ 50%;3 分为阳性表达率 51% ~ 75%;4 分为阳性表达率 > 75%。染色强度计分:0 分为无黄色;1 分为淡黄色,细颗粒状;2 分为棕黄色,粗颗粒状;3 分为棕褐色,小块状。阳性表达率计分与染色强度计分的乘积 > 3 分表示免疫组化结果为阳性(+)。

$$\text{阳性表达率} = \frac{\text{阳性细胞数}}{\text{观察细胞总数}} \times 100\%$$

2.5 统计学分析 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用

单因素方差分析;移植瘤 Bcl-2 和 Bax 蛋白阳性表达率组间比较采用卡方检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 H22 荷瘤小鼠肿瘤生长的影响 治疗期间,各组均未出现小鼠死亡现象,但治疗 1 周后发现模型组和 CTX 组小鼠体形消瘦,反应迟钝。治疗前各组小鼠体重无显著差异,治疗结束后,联合用药组与模型组及 CTX 组比较体重都显著增加($P < 0.01$, $P < 0.05$),说明 CTX 联合 PE 对 H22 荷瘤小鼠的体重无抑制作用。联合用药高、中、低剂量组与模型组比较能明显抑制肿瘤重($P < 0.01$),但与 CTX 组比较无显著性差异。联合用药组的 q 值均在 0.85 ~ 1.15,表明两药合用可起到作用相加的效果。见表 1。

表 1 CTX 联合 PE 对 H22 荷瘤小鼠肿瘤生长的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of CTX combined with PE on tumor growth in H22 hepatoma-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	体重/g		瘤重 /g	抑瘤率 /%	q 值
		治疗前	治疗后			
模型	-	20.47 ± 0.93	23.81 ± 1.01	2.22 ± 0.40 ³⁾	-	-
CTX	0.1	20.39 ± 1.55	23.32 ± 1.00	0.59 ± 0.18 ¹⁾	73.62	-
CTX + PE	0.1 + 2	19.86 ± 1.34	26.21 ± 1.78 ^{1,3)}	0.48 ± 0.18 ¹⁾	78.54	0.91
	0.1 + 1	20.51 ± 1.40	25.47 ± 1.73 ^{2,3)}	0.56 ± 0.13 ¹⁾	75.03	0.89
	0.1 + 0.5	19.83 ± 1.52	25.09 ± 1.57 ^{2,3)}	0.58 ± 0.12 ¹⁾	74.47	0.93

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$,²⁾ $P < 0.05$;与环磷酰胺组比较³⁾ $P < 0.01$,⁴⁾ $P < 0.05$ (表 2 ~ 3 同)。

3.2 对 H22 荷瘤小鼠瘤组织 SOD 及 MDA 的影响 与模型组比较,联合用药各剂量组 SOD 水平明显升高,MDA 水平明显下降($P < 0.01$)。联合用药高剂量组 SOD 水平升高及 MDA 水平下降均比 CTX 组显著($P < 0.05$)。见表 2。

瘤组织中 Bax 蛋白阳性表达率均显著上升($P < 0.01$),其中联合用药高、中剂量组与 CTX 组比较有显著性差异($P < 0.01$, $P < 0.05$),联合用药高、中、低剂量组的 Bcl-2/Bax 分别为 0.25, 0.34, 0.37,均比模型组和 CTX 组小。见表 3。

表 2 CTX 联合 PE 对 H22 荷瘤小鼠瘤组织 SOD 及 MDA 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of CTX combined with PE on SOD, MDA in tumor tissue of H22 hepatoma-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	SOD	MDA
		/ $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$	/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$
模型	-	195.27 ± 12.78 ³⁾	7.31 ± 0.56 ³⁾
CTX	0.1	220.94 ± 11.00 ¹⁾	6.31 ± 0.41 ¹⁾
CTX + PE	0.1 + 2	233.85 ± 9.05 ^{1,4)}	5.88 ± 0.48 ^{1,4)}
	0.1 + 1	223.89 ± 10.73 ¹⁾	6.14 ± 0.44 ¹⁾
	0.1 + 0.5	220.75 ± 15.97 ¹⁾	6.23 ± 0.57 ¹⁾

3.3 对 H22 荷瘤小鼠瘤组织 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响 与模型组比较,联合用药各剂量组瘤组织中 Bcl-2 蛋白阳性表达率均显著下降($P < 0.01$),其中联合用药高剂量组与 CTX 组比较有显著性差异($P < 0.01$)。与模型组比较,联合用药各剂量组

4 讨论

柿叶是传统药用植物,入药始载于《滇南本草》,具有抗菌消炎、生津止渴、清热解毒、润肺强心、镇咳止血等多种医疗保健功能。本实验研究了 CTX 联合 PE 对 H22 小鼠肿瘤的影响,结果表明,CTX 联合 PE 各剂量组的 q 值分别为 0.91, 0.89, 0.93,均在 0.85 ~ 1.15,故两药合作用相加。CTX 作为治疗恶性肿瘤的烷化剂代表药,虽具有较强的抑瘤作用,但亦有明显的抑制食欲、减轻体重等副作用^[7-8],本实验也证实了这一点:单独应用 CTX 后,荷瘤小鼠活动减少,食欲减退,体重增加不如各联合用药组;但 CTX 联合 PE 治疗,能在不抑制 H22 小鼠体重增长的同时更有效的抑制肿瘤的生长,提高抑瘤率。提示两药合用,具有一定的减毒增效作用。

自由基与肿瘤之间的关系密切,特别是活性

表 3 CTX 联合 PE 对 H22 荷瘤小鼠瘤组织 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响

Table 3 Effects of CTX combined with PE on Bcl-2, Bax Protein in tumor tissue of H22 hepatoma-bearing mice

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	切片数 /片	Bcl-2			Bax			Bcl-2 /Bax
			-	+	阳性表达率/%	-	+	阳性表达率/%	
模型	-	30	2	28	67.26	22	8	35.14	1.93
CTX	0.1	30	17	13	25.24 ¹⁾	14	16	66.46 ¹⁾	0.38
CTX + PE	0.1 + 2	30	23	7	18.28 ^{1,3)}	8	22	73.32 ^{1,3)}	0.25
	0.1 + 1	30	21	9	23.92 ¹⁾	11	19	70.16 ^{1,4)}	0.34
	0.1 + 0.5	30	18	12	24.88 ¹⁾	13	17	67.02 ¹⁾	0.37

氧^[9],有害的活性氧直接或间接损伤 DNA 而引起癌变。MDA 是由体内脂质过氧化反应形成,MDA 的浓度和 SOD 的活性间接反映了机体的损伤和抗损伤的程度,在肿瘤形成的过程中,SOD 保护作用减弱,脂质过氧化反应增强,MDA 增多。本实验中,模型组瘤组织中 SOD 水平最低,MDA 水平最高,各用药组与之比较 SOD 水平均显著提高,MDA 水平均显著下降,联合用药组 SOD 及 MDA 水平的改善与 PE 的剂量有关,剂量越大,SOD 水平越高,MDA 水平越低。联合用药高剂量组 SOD 水平升高及 MDA 水平下降均比 CTX 组显著。这提示 CTX 联合 PE 抑制 H22 荷瘤小鼠肿瘤的生长,其机制可能与两药合用能增强机体抗氧化作用有关。

肿瘤细胞凋亡的能力和倾向降低,在许多人类恶性肿瘤的发生、发展中起重要作用^[10]。Bcl-2 家族在细胞凋亡的调控中扮演着举足轻重的角色,Bcl-2 和 Bax 分别是 Bcl-2 家族中最主要的抑制凋亡和促进凋亡蛋白。一般认为,Bcl-2 和 Bax 是通过形成同源或异源二聚体来调节细胞凋亡。当 Bax 形成同源二聚体时诱导细胞凋亡;Bax 与 Bcl-2 形成异源二聚体时则实现了 Bcl-2 抑制细胞凋亡的功能^[11]。在多数肿瘤中,Bcl-2 表达水平升高,而 Bax 表达下降。Bcl-2/Bax 增高,抑制细胞凋亡,Bcl-2/Bax 降低,则促进细胞凋亡^[12-13]。从本实验凋亡蛋白检测结果看,联合用药各剂量组与模型组比较,瘤组织中 Bcl-2 蛋白阳性表达率均显著降低,Bax 蛋白阳性表达率均显著升高,Bcl-2/Bax 均减小。单独使用 CTX 确实能降低肿瘤组织中 Bcl-2 蛋白的表达、增加 Bax 蛋白的表达、降低 Bcl-2/Bax,但效果不如 CTX 联合 PE,特别是与 PE 高剂量联合使用后,效果更明显,说明两药合用对肿瘤细胞的凋亡可起到促进作用。

综上所述,单独使用 CTX 能抑制 H22 荷瘤小鼠肿瘤的生长,但与 PE 联合使用效果更好,在提高抑瘤率的同时不影响小鼠的体重,其机制可能与两药合用更能增强 H22 小鼠机体抗氧化能力,下调 Bcl-2 蛋白及上调 Bax 蛋白的表达有关。

[参考文献]

[1] Mónica Enguita-Germán, Puri Fortes. Targeting the insulin-like growth factor pathway in hepatocellular carcinoma [J]. World J Hepatol, 2014, 6 (10): 716-737.

[2] 濮忠建, 华海清. 中药对肝癌细胞信号转导通路影响的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36 (7): 951-954.

[3] 陈丽, 张安文, 罗宇, 等. 柿叶不同极性部位对 H22 腹水瘤及 H22, S180 实体瘤小鼠的抑制作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21 (1): 167-173.

[4] 金正均. 合并用药中的相加 [J]. 中国药理学报, 1980, 1 (2): 70-76.

[5] 汤小军, 黄建春, 黄仁彬, 等. 六月青多糖对 S180 荷瘤小鼠免疫功能及 p53, Bcl-2, Bax 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19 (4): 250-253.

[6] 李润连. 丙氨瑞林联合 5-Fu 对人子宫内膜癌裸鼠移植瘤的抑制作用及对 Bcl-2, Bax 表达的影响 [D]. 太原: 山西医科大学, 2010: 3.

[7] 谢昊霖. 银耳多糖不同途径给药对环磷酰胺抗肿瘤的减毒增效作用研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2012: 3.

[8] 贾玉萍, 周东顺, 孙超, 等. 人参多糖对环磷酰胺的增效减毒作用 [J]. 中国实验动物学报, 2013, 21 (6): 61-65.

[9] 熊珊珊, 石英英, 石汉平, 等. 活性氧与肿瘤研究进展 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2014, 21 (13): 1045-1048.

[10] 邹志坚, 刘海云, 王晓敏. 地锦草水提液对移植性肝癌的抑制作用及对凋亡蛋白表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19 (21): 241-245.

[11] 刘瑾. 白花蛇舌草和半枝莲配伍微粉对移植性小鼠肝癌肿瘤组织 Bcl-2, Bax 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (21): 227-230.

[12] Burguillos M A, Hajji N, Englund E, et al. Apoptosis-inducing factor mediates dopaminergic cell death in response to LPS-induced inflammatory stimulus evidence in Parkinson's disease pafieum [J]. Neurobiol Dis, 2010, 9 (17): 1-12.

[13] 聂超, 朱莹莹, 刘沈林, 等. 黄芪多糖对人胃癌细胞移植瘤的抑制效应及对 Bcl2, Bax 表达的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2014, 32 (5): 1115-1117.

[责任编辑 周冰冰]