

木鳖子抗肿瘤有效作用部位筛选及作用机制探讨

郑蕾*, 何昊, 方怡, 申旭霖, 张彦
(西安医学院药学院, 西安 710021)

[摘要] **目的:**观察中药木鳖子不同提取部位体内体外的抗肿瘤作用,并考察其中抗肿瘤效果显著的木鳖子乙酸乙酯提取部位的抗肿瘤作用机制。**方法:**采用索氏提取技术将中药木鳖子按照溶剂极性顺序依次提取,得到不同成分,采用细胞增殖实验结合动物抗肿瘤模型方法进行药效评价,运用现代分子生物学技术阐明其中最优化部位可能的抗肿瘤作用机制。**结果:**中药木鳖子乙酸乙酯提取部位在体外和体内实验中均可表现出明显的抑制肿瘤生长能力($P < 0.05$),且对实验动物无明显的毒副作用,本研究首次发现木鳖子乙酸乙酯提取部位可影响表皮生长因子(EGFR)激酶活性($P < 0.05$),并可明显抑制EGFR蛋白磷酸化表达($P < 0.05$),可明显抑制丝裂原活化蛋白激酶家族(mitogen activated protein kinase, MAPKs)通路上重要节点蛋白细胞外信号调节激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK1/2),氨基末端激酶(C-Jun N-terminal kinase, JNK)和丝裂原活化蛋白激酶p38的磷酸化水平($P < 0.05$),且具有浓度依赖关系。**结论:**中药木鳖子乙酸乙酯提取部位可通过抑制EGFR蛋白及相关通路蛋白活性,在体内外实验中显著抑制肿瘤的生长。

[关键词] 木鳖子; 抗肿瘤; 表皮生长因子; 丝裂原活化蛋白激酶家族; 磷酸化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)09-0152-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2017090152

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170215.0938.020.html>

[网络出版时间] 2017-02-15 9:38

Antitumor Effect and Mechanism of *Momordica cochinchinensis* Fructus

ZHENG Lei*, HE Hao, FANG Yi, SHEN Xu-ji, ZHANG Yan

(School of Pharmaceutical Sciences, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the antitumor activity of different solvent extracts of *Momordica cochinchinensis* Fructus *in vivo* and *in vitro*, and the action mechanism of ethyl acetate extracts of *M. cochinchinensis* with a significant antitumor effect. **Method:** In order to identify active components, *M. cochinchinensis* was extracted with solvents according to the sequence of polarities through the Soxhlet extraction method. This study assessed the potency and the underlying mechanisms of action of ethyl acetate extracts of *M. cochinchinensis* on cancer cells through animal experiments, and used modern biology experiment technologies to investigate its underlying mechanism. **Result:** Among various fractions, ethyl acetate extracts of *M. cochinchinensis* showed significant anti-proliferative effects *in vivo* and *in vitro* ($P < 0.05$), with no obvious toxic and side effect on experimental animals. This study found for the first time that ethyl acetate extracts of *M. cochinchinensis* could inhibit phosphorylation of epidermal growth factor (EGFR) tyrosine kinase and protein phosphorylation ($P < 0.05$), and expressions of phosphor-ERK1/2, phosphor-JNK and phosphor-p38 of mitogen activated protein kinase (MAPKs) in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). **Conclusion:** Ethyl acetate extracts of *M. cochinchinensis* could show a significant anti-cancer effect by inhibiting phosphorylation of EGFR tyrosine kinase.

[Key words] *Momordica cochinchinensis* Fructus; anti-cancer; epidermal growth factor (EGFR); mitogen activated protein kinase (MAPKs); phosphorylation

[收稿日期] 20161213(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81603265);陕西省教育厅专项科研项目(16JK1666);西安医学院博士科研启动基金项目(2015DOC18)

[通讯作者] *郑蕾,博士,讲师,从事中药抗肿瘤研究, Tel:029-86177545, E-mail:zhengleixa@163.com

恶性肿瘤严重威胁人类生命健康,其发病率和死亡率逐年上升^[1-2]。目前抗癌中药及其制剂的开发已成为我国抗癌药物研究的重要方向,从植物中寻找药物,已成为抗肿瘤药物研究的重要来源,研究表明很多天然植物的提取物具有良好的抗肿瘤的活性,天然产物或其化合物结构改性已进入临床研究范围^[3-5]。木鳖子主要分布于中国西南各省份,味苦、微甘,有毒,入肝、脾、胃经,具散结消肿、攻毒疗疮功效。用于疮疡肿毒、乳痈、瘰疬、痔漏、干癣、秃疮。古时多外用,少内服。已报道的木鳖子的化学成分包括三萜及其苷类、甾体类、烯炔类、氨基酸类和有机酸类等,药理活性主要集中在降血糖、抗癌、抗菌、抗过敏、镇痛方面^[6-8]。本研究首次采用索氏提取技术将中药木鳖子按照溶剂极性顺序依次提取,通过细胞和动物水平进行筛选评价,发现其中抗肿瘤效果最优成分为其乙酸乙酯提取部位,探讨其抑制肿瘤生长能力,及对实验动物的毒副作用,探讨木鳖子乙酸乙酯提取部位抑制表皮生长因子(EGFR)酪氨酸激酶的磷酸化作用,及抑制 EGFR 蛋白磷酸化表达的作用,抑制丝裂原活化蛋白激酶家族(mitogen activated protein kinase, MAPKs)通路上重要节点蛋白细胞外信号调节激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK1/2),氨基末端激酶(C-jun N-terminal kinase, JNK)和丝裂原活化蛋白激酶 p38 的磷酸化水平的作用,对中药木鳖子乙酸乙酯提取部位的抗肿瘤作用机制进行探讨。

1 材料

1.1 细胞 人乳腺癌 MCF-7,人乳腺癌 MDA-MB-231,人乳腺癌 ZR-75-30,人肝癌 SMMC-7721,人非小细胞肺癌 A549,人结肠癌 LoVo,人胃癌 SGC-7901,人宫颈癌 Hela 均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,在含 10% 胎牛血清的培养基(含 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素和链霉素)中,置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中进行培养,每隔 2~3 d 传代 1 次。小鼠 S180 腹水瘤来源于陕西中医药研究所实验动物中心。

1.2 动物 健康 SPF 级昆明种小鼠,雌雄各半,体重 18~22 g,由西安交通大学实验动物中心提供,许可证号 SYXK(陕)2012-0003。小鼠自由摄取食物和水,培养于 $22 \sim 24 \text{ }^\circ\text{C}$,湿度 50%~70%,12 h/12 h 光照-黑暗循环的洁净动物房。实验经西安交通大学实验动物伦理委员会(编号 XJTULAC2016-278)批准,符合实验动物伦理指导原则。

1.3 药材 木鳖子购自西安市万寿路药材市场,经

西安医学院张彦副教授鉴定为葫芦科苦瓜属植物木鳖 *Momordica cochinchinensis* 的干燥成熟果实。

1.4 试剂 噻唑蓝(MTT, Sigma 公司,批号 M5655);胎牛血清,DMEM 和 RPMI 1640 培养基(Hyclone 公司,批号分别为 NZE1145,AAK208933,AAK208935);EGFR, ERK, JNK, p38 抗体(Proteintech 公司,批号分别为 18986-1-AP,16443-1-AP,51151-1-AP,14064-1-AP);p-EGFR, p-ERK, p-JNK, p-p38 抗体(Cell Signaling Technology 公司,批号分别为 1512,4370,4668,4511);二抗(Proteintech 公司,批号 SA00001-2);HTRF[®] 试剂盒(Cisbio 公司,批号 64ERKPEG)。

1.5 仪器 MCO-15AC 型 CO_2 恒温培养箱(日本 Sanyo 公司);Ti-u 型倒置显微镜(日本 Nikon 公司);SW-CJ-1F 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);VICTOR[™] X 型多标记微孔板检测仪(美国 Perkin-Elmer 公司);680 型酶联免疫检测仪,Mini-PROTEAN Tetra 型蛋白电泳仪,1703940 型电泳转膜仪,GelDoc 2000 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 药物制备 木鳖子药材 2 份,50 g/份,粉碎,1 份用蒸馏水提取,1 份用 70% 乙醇提取。每次用 5 倍体积溶剂量提取,各提取 3 次,滤液合并,旋干,收膏率 20%。在 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 真空干燥箱烘干至粉末状,1 g 提取物相当于生药材 5 g。各提取物均用二甲基亚砜(DMSO)超声溶解,配置成饱和溶液作为储备液,储备液质量浓度为 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

2.2 细胞增殖检测 通过 MTT 实验^[9],检测木鳖子总提取物对多种肿瘤细胞(MCF-7,MDA-MB-231,ZR-75-30, SMMC-7721, A549, LoVo, SGC-7901, Hela)增殖的影响。将处于指数级增长期的肿瘤细胞,消化,计数,接种到 96 孔培养板中。待细胞贴壁后,加入不同质量浓度($2, 10, 50, 250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的本鳖子提取物,分别作用 48 h 后终止培养,每孔加入 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT $20 \text{ } \mu\text{L}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光孵育 4 h,加入 DMSO $150 \text{ } \mu\text{L}$,震荡 15 min,使结晶物充分溶解,在酶标仪 490 nm 波长下测定细胞吸光度 A,计算细胞生长抑制率。

2.3 小鼠 S180 肉瘤模型建立 复苏 S180 细胞,接种于健康昆明种小鼠的腹腔内,7 d 后从肿瘤生长旺盛且无破溃的小鼠腹腔内吸取白色的浓稠腹水,稀释至细胞密度为 2×10^7 个/mL,接种于小鼠右腋窝皮下,每只 0.2 mL。接种后第 2 天随机分

组, 每组 12 只, 雌雄各半, 根据木鳖子乙酸乙酯提取部位半数致死量 (LD_{50} , 木鳖子灌胃给药 LD_{50} $3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 木鳖子腹腔注射 LD_{50} $120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 设计剂量梯度 (灌胃给药剂量 9.41, 7.08, 5.32, 4.00, 3.01, 2.26, 1.70, 1.28 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 腹腔注射给药剂量 375, 282, 212, 159, 120, 90, 68, 51 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 进行给药, 连续给药 10 d。处死, 剥离肿瘤, 称重, 计算小鼠 S180 肉瘤生长的抑制率^[10]。

2.4 木鳖子抗肿瘤有效成分分离 将木鳖子的果仁和果壳分离, 粉碎, 分别称取 30 g, 安装好索氏提取装置^[11], 正己烷浸泡药材过夜, 加热回流 6 h, 收集提取液。提取液依次用乙酸乙酯、丙酮、乙醇、水提取, 每次提取 6 h, 收集相应部分的提取液, 旋转蒸发仪干燥, 得到 10 个部位的固形物, 得率依次为 1.2%, 1.5%, 2.1%, 2.6%, 1.0%, 1.5%, 3.6%, 4.3%, 1.5%, 1.7%。用肿瘤细胞对不同提取部位进行药效筛选。

2.5 Lance™ assay 检测木鳖子对 EGFR 激酶活力 采用酶催化反应, 将不同质量浓度 ($1.6, 3.2 \times 10^{-1}, 6.4 \times 10^{-2}, 1.28 \times 10^{-2}, 2.56 \times 10^{-3}, 5.12 \times 10^{-4}, 1.02 \times 10^{-5}, 2.05 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 待测药物 4 μL 按顺序加入 384 孔板, 再依次向每孔中加入 TK 底物-生物素工作液 2 μL , EGFR 激酶工作液 2 μL , ATP 工作液 2 μL , 每组设 3 个平行孔, 将 384 孔板放入甩板机中使得孔板中溶液混匀, 再将 384 孔板放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中孵育 30 min。终止反应, 将 384 孔板从 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中取出, 避光加入 Sa-XL665 工作液 5 μL 和

Eu^{3+} -TK-抗体工作液 5 μL , 将 384 孔板放入甩板机中使溶液混匀后, 放入室温孵育 1 h。选择 320 nm 为激发波长, 615, 665 nm 为发射波长, 在多功能酶标仪上测定各孔 A, 每组实验均重复 3 次^[12]。

2.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测蛋白表达 将处于对数增长期的人乳腺癌细胞 MCF-7, 接种于 6 孔板, 加入不同质量浓度 ($40, 80, 160 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 木鳖子乙酸乙酯提取物, 作用 48 h, 收集细胞并裂解, $12\,000 \times g, 4^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 取上清, 测定各样本蛋白浓度。按比例与上样缓冲液混匀, 煮沸变性 5 min。制胶, 行 10% 丙烯酰胺凝胶电泳, 切胶, 转膜, 封闭, 一抗 (1:1 000) 孵育, 二抗反应, 显影, 定影, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 为内参, 用凝胶成像系统拍照并分析各条带灰度值。

2.7 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计学软件处理, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数的比较采用 t 检验, 组间两两比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 木鳖子对肿瘤细胞增殖的影响 细胞增殖实验表明, 木鳖子水提取物对多种肿瘤细胞增殖均表现出明显的抑制作用 (多数抑瘤率 $> 80\%$)。见表 1。与醇提取物组比较, 木鳖子水提取物的抗肿瘤效果更为明确。因此, 进一步对木鳖子水提取物进行了更深入的研究, 与空白组比较, 木鳖子提取物对于多种肿瘤细胞生长具有较好的抑制作用 ($P < 0.05$), 这种现象具有浓度依赖关系。见表 2。

表 1 木鳖子提取物对肿瘤细胞生长抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	SMMC-7721	A549	Hela	MCF-7	SGC-7901	LoVo	%
水提取物	78.76 \pm 7.11	68.21 \pm 5.31	82.70 \pm 6.21	87.96 \pm 4.12	82.24 \pm 7.74	90.58 \pm 3.23	
醇提取物	88.65 \pm 6.90	7.15 \pm 2.10	-22.96 \pm 10.56	85.80 \pm 5.21	-26.68 \pm 5.28	-67.37 \pm 9.09	

注: 质量浓度均为 250 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (表 5 同)。

表 2 木鳖子水提取物对肿瘤细胞生长抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	SMMC-7721	A549	MCF-7	LoVo	SGC-7901	Hela	%
木鳖子	250	78.18 \pm 6.83 ¹⁾	96.61 \pm 3.15 ¹⁾	96.10 \pm 4.09 ¹⁾	90.78 \pm 5.29 ¹⁾	96.24 \pm 4.86 ¹⁾	94.91 \pm 4.52 ¹⁾	
	50	41.27 \pm 4.98 ¹⁾	59.78 \pm 6.24 ¹⁾	83.27 \pm 5.12 ¹⁾	42.65 \pm 5.90 ¹⁾	55.65 \pm 6.90 ¹⁾	61.82 \pm 5.91 ¹⁾	
	10	28.67 \pm 4.21 ¹⁾	41.28 \pm 3.88 ¹⁾	29.52 \pm 4.87 ¹⁾	25.49 \pm 4.65 ¹⁾	16.61 \pm 3.27 ¹⁾	55.40 \pm 3.11 ¹⁾	
	2	12.31 \pm 4.05 ¹⁾	26.98 \pm 4.13 ¹⁾	1.64 \pm 0.78 ¹⁾	5.69 \pm 2.10 ¹⁾	13.57 \pm 4.78 ¹⁾	35.91 \pm 5.29 ¹⁾	
空白	-	0.64 \pm 0.18	0.86 \pm 0.15	0.35 \pm 0.11	0.24 \pm 0.18	1.12 \pm 0.45	2.55 \pm 0.78	

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$ (表 3 同)。

3.2 木鳖子对小鼠肉瘤生长作用的影响 将接种

S180 瘤株的小鼠根据体重分组, 每组 12 只, 雌雄

各半,根据半数致死量进行灌胃给药,连续 10 d,木鳖子提取物对小鼠 S180 移植瘤有一定的抑制作用,但与空白组比较,抑瘤效果不明显,见表 3。因此,本研究考虑改变给药途径。

与空白组比较,木鳖子提取物可以明显抑制小鼠 S180 肉瘤的生长情况 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 25,

50 mg · kg⁻¹ 木鳖子提取物组抑瘤率可分别达到 50.00% 和 68.97%,具有剂量依赖性。同时,连续给药降低小鼠肉瘤体积和瘤重的同时,与空白组比较,各药物组小鼠的体重并未出现明显的降低,说明此剂量对小鼠的生理状态没有明显的影响,未表现出对实验动物的毒副作用。见表 4。

表 3 木鳖子提取物 S180 灌胃给药对小鼠肉瘤生长作用的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of extracts of *Momordica cochinchinensis* Fructus on S180 sarcoma tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/mg · kg ⁻¹	n	平均体重/g	平均瘤重/g	抑瘤率/%	给药前体重/g	体重增长率/%
空白	-	11	22.65 ± 2.19	2.78 ± 0.72	-	14.75 ± 4.41	53.57
木鳖子	750	11	20.97 ± 2.41	2.14 ± 0.38	22.93	15.40 ± 2.61	36.16
	1 500	11	23.14 ± 1.58	2.24 ± 1.02	19.46	14.50 ± 3.84	59.56
环磷酰胺	40	12	20.02 ± 2.52	0.87 ± 0.10	68.57 ¹⁾	14.37 ± 3.80	39.32

表 4 木鳖子提取物 S180 腹腔注射对小鼠肉瘤生长作用的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of extracts of *Momordica cochinchinensis* Fructus on S180 sarcoma tumor-bearing mouse ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/mg · kg ⁻¹	n	平均体重/g	平均瘤重/g	抑瘤率/%	给药前体重/g	体重增长率/%
空白	-	12	24.76 ± 3.92	2.00 ± 0.85	-	19.81 ± 3.21	19.99
木鳖子	25	12	19.23 ± 4.02	1.00 ± 0.67	50.00 ¹⁾	16.64 ± 4.12	15.51
	50	11	18.92 ± 2.78	0.63 ± 0.12	68.97 ²⁾	19.65 ± 2.92	-3.74
环磷酰胺	40	12	17.52 ± 3.11	0.76 ± 0.26	62.08 ²⁾	20.12 ± 2.07	-14.81

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 木鳖子活性部位筛选 将 5 种溶剂正己烷、乙酸乙酯、丙酮、乙醇、水提取木鳖子得到的 10 个组分进行生长抑制率检测,其中,3,4 两部分对肿瘤的

抑制率 (>65%) 明显高于其他部位。说明,木鳖子乙酸乙酯提取部位可能存在抗肿瘤活性成分。见表 5。

表 5 木鳖子各部位对肿瘤细胞生长抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 5)

Table 5 Effect of different solvent extracts of *Momordica cochinchinensis* Fructus on proliferation of cancer cells ($\bar{x} \pm s$, n = 5) %

组分	BEL-7402	SGC-7901	Hela	MCF7
1	-26.73 ± 7.84	25.25 ± 11.12	18.51 ± 10.77	23.03 ± 2.50
2	3.97 ± 2.76	11.35 ± 14.15	-46.79 ± 17.32	2.74 ± 1.42
3	66.96 ± 7.35	84.06 ± 3.29	76.67 ± 5.37	74.34 ± 8.84
4	84.66 ± 5.06	91.75 ± 8.41	103.06 ± 4.56	109.22 ± 3.71
5	10.61 ± 5.68	35.09 ± 6.13	24.36 ± 8.93	30.70 ± 6.11
6	62.83 ± 5.40	-124.91 ± 8.54	98.83 ± 4.93	-35.61 ± 13.74
7	20.29 ± 6.29	62.65 ± 5.75	36.31 ± 9.31	55.53 ± 9.80
8	11.01 ± 6.92	-65.97 ± 1.83	27.60 ± 8.03	-11.36 ± 14.73
9	17.98 ± 6.74	-15.22 ± 8.30	-	44.59 ± 10.74
10	37.62 ± 4.99	64.19 ± 1.89	-	86.60 ± 4.15

注:1,2. 正己烷提取果壳、果仁部分;3,4. 乙酸乙酯提取果壳、果仁部分;5,6. 丙酮提取果壳、果仁部分;7,8. 乙醇提取果壳、果仁部分;9,10. 水提取果壳、果仁部分。

3.4 木鳖子对 EGFR 激酶的影响 木鳖子提取物作用于 EGFR 激酶的 IC₅₀ 为 0.253 9 g · L⁻¹。说明

木鳖子乙酸乙酯提取物可以作用于 EGFR 酪氨酸激酶,有效地抑制 EGFR 酪氨酸激酶的磷酸化作用,且

具有浓度依赖性。

3.5 木鳖子对 MCF-7 细胞 EGFR 蛋白及 MAPKs 通路蛋白的影响 木鳖子乙酸乙酯提取物可明显抑制 EGFR 蛋白磷酸化表达,可明显抑制 MAPKs 通路上重要节点蛋白 ERK1/2, JNK 和 p38 的磷酸化水平 ($P < 0.05$), 且具有浓度依赖关系。见图 1, 2。

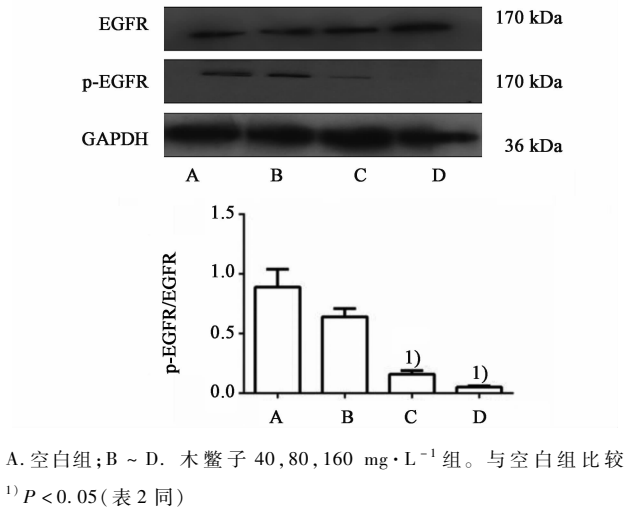


图 1 木鳖子乙酸乙酯提取物对 EGFR 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of ethyl acetate extracts of *Momordica cochinchinensis* Fructus on EGFR protein expression ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

范围内已成为抗肿瘤药物研究的一个重要组成来源,研究表明天然植物的提取物具有良好的抗肿瘤活性,很多天然产物或其结构改性化合物已进入临床研究范围,解决了中药使用中存在的物质基础不清,药理机制不明等问题。木鳖子作为传统中药材,药理活性研究较为缺欠。细胞筛选发现木鳖子提取物对于多种肿瘤细胞生长具有较好的抑制作用,这种现象具有浓度依赖和时间依赖的关系。木鳖子提取物通过小鼠腹腔给药途径,抑瘤效果显著,且木鳖子腹腔注射给药 $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (相当于 70 kg 人用量 175 mg) 组与空白组比较未表现出对实验动物的毒副作用。但是木鳖子提取物通过灌胃给药方式,抑瘤效果不明显,原因可能与有效成分的代谢过程变化有关,灌胃给药后胃肠道的消化吸收运动可能破坏了有效成分的结构,使得有效成分无法进入循环系统,到达肿瘤作用部位,因此动物实验抑瘤效果较差。

恶性肿瘤发生转移为治疗失败的主要原因,肿瘤转移是一个多步骤过程,从细胞的恶性转化、细胞的增殖与凋亡调控失衡,以及与细胞基质及黏附分子结构和表达异常等均涉及多条细胞信号传导通路的异常。上皮细胞间充质转化 (EMT) 是指上皮细胞通过特定程序转化为具有间质表型细胞的过程,EMT 使上皮细胞失去细胞极性及与基底膜连接等上皮表型特征,获得高迁移、易侵袭等间质表型特征。此过程中,EGF 对肿瘤转移起到关键调节作用,而 EGF 需激活相依赖的因子受体 EGFR 以发挥 EMT 的入侵效应。EGFR 是一种与肿瘤侵袭相关的原癌基因,能够与特定的配体结合,刺激其内在的细胞内蛋白质酪氨酸激酶活性,激活下游的信号级联反应,如 MAPK 信号通路,这些信号通路调控着重要的生物学进程,包括细胞增殖、凋亡、侵袭迁移和血管生成。为了更好地探寻其中的药效成分,本研究将木鳖子通过极性由小到大的一系列溶剂充分进行提取,对木鳖子所含成分进行分离。发现乙酸乙酯提取组分表现出明显的抑制多种肿瘤细胞增殖的作用,且具有浓度依赖关系。木鳖子乙酸乙酯提取物可作用于 EGFR,有效地抑制 EGFR 的磷酸化作用,且具有浓度依赖性,并可抑制 EGFR 蛋白磷酸化表达,抑制 MAPKs 通路上重要节点蛋白 ERK1/2, JNK 和 p38 的磷酸化水平。说明中药木鳖子乙酸乙酯提取部位可通过抑制 EGFR 蛋白及相关通路蛋白活性,发挥肿瘤抑制的作用。

综上,本研究首次发现中药木鳖子抗肿瘤有效

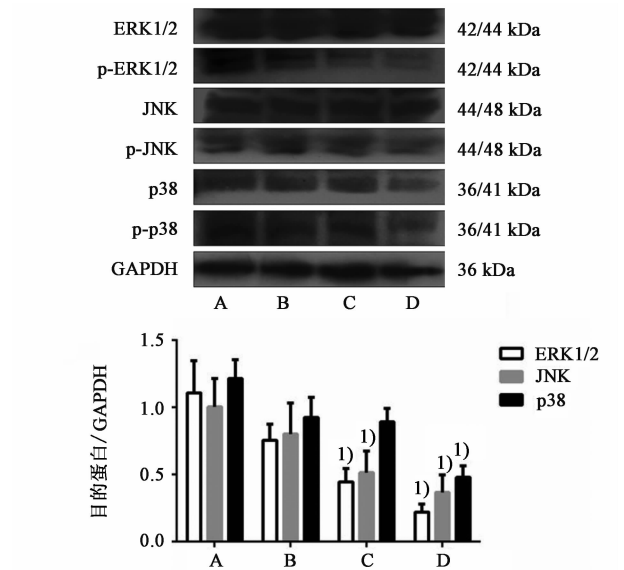


图 2 木鳖子乙酸乙酯提取物对 MAPKs 蛋白通路表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of ethyl acetate extracts of *Momordica cochinchinensis* Fructus on MAPKs pathway protein expression ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

目前化学药物对肿瘤的治疗尚不能满足临床使用需求,如何研究开发新的抗肿瘤药物成为当今科学界的重要课题。从植物中寻找药物,在世界

成分可能存在于其乙酸乙酯提取部位,并对该部位进行了激酶活性筛选分析,发现木鳖子乙酸乙酯提取部位可通过抑制 EGFR 激酶活性作用,在体内外实验中显著抑制肿瘤的生长,为今后该药材的分离鉴别以及机制的进一步阐明奠定了基础。

[参考文献]

[1] 游伟程. 癌症发病趋势和面临的挑战[J]. 中华预防医学杂志, 2008, 42(S1):62-64.

[2] Siegel R L, Miller K D, Jemal A, et al. Cancer statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1):7-30.

[3] Amin A R, Kucuk O, Khuri F R, et al. Perspectives for cancer prevention with natural compounds[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(16):2712-2725.

[4] 王海燕, 杨薇, 谢雁鸣, 等. 胃恶性肿瘤者常见合并疾病及中西药物使用特征的实效研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(18):3546-3550.

[5] 李杰, 林洪生, 孙桂芝. 中医药治疗肿瘤研究现状的反思及展望[J]. 中医药学刊, 2005, 23(6):1077-1079.

[6] 陈执中. 木鳖子大黄甘草及其复方制剂抗癌研究应用进展[J]. 中国民族民间医药杂志, 2007(2):63-66.

[7] 王铭章, 陈执中. 木鳖子及其活性成分的研究进展

[J]. 食品与药品, 2011, 13(9):364-365.

[8] 范戎, 许敏, 马晓霞, 等. 苦瓜属植物的化学成分与药理活性研究进展[J]. 云南中医学院学报, 2014, 37(6):93-100.

[9] ZHENG L, WANG X L, LUO W J, et al. Brucine, an effective natural compound derived from nux-vomica, induces G₁ phase arrest and apoptosis in LoVo cells[J]. Food Chem Toxicol, 2013, doi: 10.1016/j.fct.2013.05.011.

[10] 何旭, 普小菲, 李娇, 等. 美洲大蠊提取物对 S180 荷瘤小鼠肿瘤抑制作用及免疫功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15):179-182.

[11] Urbanová J, Pěncíková K, Gregorová J, et al. Isolation of quaternary benzo [c] phenanthridine alkaloids from *Macleaya microcarpa* (maxim.) fedde; comparison of maceration, soxhlet extraction and pressurised liquid extraction[J]. Phytochem Anal, 2012, 23(5):477-482.

[12] Bello E, Colella G, Scarlato V, et al. E-3810 is a potent dual inhibitor of VEGFR and FGFR that exerts antitumor activity in multiple preclinical models[J]. Cancer Res, 2011, 71(4):1396-1405.

[责任编辑 张丰丰]