

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

邹志坚¹, 刘海云², 王晓敏^{2*}

(1. 南昌大学第四附属医院肿瘤科, 南昌 330002; 2. 江西中医药大学基础医学院, 南昌 330004)

[摘要] **目的:** 研究地锦草对移植性肝癌 H22 小鼠的抑制作用及对凋亡相关蛋白 Bcl-2, Bax 和 Caspase-3 表达的影响。**方法:** 复制小鼠移植性肝癌模型后, 随机分为模型组、地锦草组和环磷酰胺组。地锦草低、中、高剂量组分别以 66, 132, 264 mg·kg⁻¹ ig, 环磷酰胺组 1 mg·kg⁻¹ iv 1 次, 模型组和环磷酰胺组灌服同体积的蒸馏水, 14 d 后处死小鼠, 剥离瘤组织, 称肿瘤质量; 比色分析法检测血清超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量; 免疫组化法观察肿瘤组织 Bcl-2, Bax 和 Caspase-3 蛋白表达。**结果:** 与模型组比较, 地锦草治疗后肿瘤质量明显减轻($P < 0.05$); 地锦草各剂量组与环磷酰胺组小鼠血清 SOD 均升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), 血清 MDA 含量均下降($P < 0.05$, $P < 0.01$); 地锦草高、中剂量组及环磷酰胺组降低 Bcl-2 蛋白表达, 同时提高 Bax, Caspase-3 蛋白表达($P < 0.05$), 降低 Bcl-2/Bax。**结论:** 地锦草抗肿瘤机制可能是通过增强抗氧化防御系统抑制肿瘤细胞的生长, 纠正机体凋亡蛋白与抗凋亡蛋白失衡, 激活 Caspase-3 酶活性而诱导肿瘤细胞凋亡。

[关键词] 地锦草; 抗氧化; Bcl-2; Bax; Caspase-3

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)21-0241-05

[doi] 10.11653/syfy20131210241

Influence of Herba Euphorbiae Humifusae on Anti-tumor Effect and Apoptosis Protein Expression in Transplanted Liver Cancer Mice

ZOU Zhi-jian¹, LIU Hai-yun², WANG Xiao-min^{2*}

(1. Department of Oncology, the Fourth Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330002, China;
2. School of Basic Medical Sciences, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the influence of Euphorbiae Humifusae herb (EHH) on anti-tumor effect and the expression of apoptosis protein in transplanted liver cancer mice. **Method:** H22 liver cancer cells were inoculated in the right axilla to establish solid tumor models. The animal models were randomized into five groups, the model control group, cyclophosphamide (1 mg·kg⁻¹) group, the EHH (66, 132, 264 mg·kg⁻¹) group. The medication was given continuously for 14 days. The tumors were weighted. SOD activity and MDA content of serum were measured by the colorimetric analysis. The expression of Bcl-2, Bax and Caspase-3 in tumor tissues were determined by immunohistochemistry. **Result:** The size of tumor in EHH treat groups was significantly smaller than that in model control group ($P < 0.05$). EHH could significantly decrease MDA level and increase SOD level ($P < 0.05$). The expressions of Bcl-2 were decreased, while the expressions of Bax and Caspase-3 were increased in EHH high, middle dose groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** EHH can inhibit the growth of liver cancer cell and its mechanism is probably related to increased antioxidation, decreased Bcl-2 expression and increased Bax and Caspase-3 expression in transplanted liver cancer mice.

[Key words] herba Euphorbiae Humifusae; antioxidation; Bcl-2; Bax; Caspase-3

[收稿日期] 20130701(014)

[基金项目] 江西省卫生厅科技项目(20131104); 江西省自然科学基金项目(2008GZY0018)

[第一作者] 邹志坚, 硕士, 副主任医师, 从事肿瘤临床研究, Tel:0791-87024557, E-mail:857520364@qq.com

[通讯作者] * 王晓敏, 博士, 副教授, 从事中药肿瘤防治研究, Tel:0791-87118926, E-mail:wangxm2001@163.com

清热解毒中药——地锦草是常用中药材,中国各地均有分布,资源十分丰富,味苦、平、无毒^[1]。主要含黄酮类,如槲皮素及其单糖苷、异槲皮苷、黄芩苷等^[2]。地锦草能抑制肿瘤细胞凋亡^[3],但其具体机制尚不清楚,本课题研究地锦草抗氧化和对 Bcl-2/Bax 蛋白表达及 Caspase-3 酶活性的影响,进一步深入研究地锦草诱导肿瘤细胞凋亡的机制。

1 材料

1.1 药材与试剂 地锦草购自安徽亳州市永刚饮片厂有限公司,由江西中医药大学中药鉴定教研室张寿文教授鉴定为 Herba Euphorbiae Humifusae。环磷酸胺注射液(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 12060125)。超氧化物歧化酶(SOD)(批号 20121208)、丙二醛(MDA)测试盒(批号 20121121)均购于南京建成生物工程研究所。Bcl-2(批号 B2208)和 Bax 一抗(批号 J2407)均购于 Santa cruz 公司,Caspase-3 一抗(Anbo 公司,批号 B0835)。SP 免疫组织化学检测试剂盒及 DAB 显色盒(北京中杉生物试剂公司,批号 K133319D)。

1.2 动物 H22 腹水瘤小鼠(中科院细胞库提供);昆明种近交系雄性小鼠,SPF 级,体重(28 ± 2)g,江西中医药大学实验动物中心提供,许可证号 SCXK(赣)2011-0001。

1.3 仪器 电子秤(上海精科公司天平仪器厂),UV-2102 型紫外分光光度计(尤尼柯仪器有限公司),徕卡 DL2500 型显微镜(德国徕卡),徕卡 CCD 图像采集系统(德国徕卡),Image-Pro Plus 6.0(美国冷泉公司)。

2 方法

2.1 H22 移植性肝癌建立 将接种 H22 瘤种 7 d 的腹水瘤小鼠以脱颈法处死,无菌条件下抽取腹水瘤细胞悬液 5 mL 离心,用生理盐水重新悬浮细胞,细胞悬液密度为 1 × 10⁶/mL。以 0.2 mL/只接种于昆明种小鼠右腋下,建立移植性肝癌模型^[4]。

2.2 地锦草水提液的制备和分组、给药 地锦草 100 g 加入 1 000 mL 大烧杯中,加 2 次水 400 mL,煮沸 20 min,过滤。滤渣加 2 次水 200 mL,煮沸 20 min,过滤。合并 2 次滤液浓缩成 1.5 g · mL⁻¹。移植性肝癌小鼠随机分成 5 组:模型组(生理盐水,ig,连续 14 d)、环磷酸胺组(1 mg · kg⁻¹,iv 1 次后,生理盐水,ig,连续 14 d)、地锦草低、中、高剂量组(66,132,264 mg · kg⁻¹,ig,1 次/d,连续 14 d)。

2.3 观测指标

2.3.1 移植性肝癌小鼠体重、瘤重 给药 14 d 称

体重后处死小鼠,剖取皮下肿瘤,仔细剥离干净周围组织后称瘤重。

2.3.2 超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量 小鼠摘眼球取血备用,各指标采用比色法按试剂盒说明进行检测。

2.3.3 Bcl-2, Bax 和 Caspase-3 蛋白表达 用免疫组化法检测。肿瘤组织标本常规石蜡包埋,切片,厚度约 2 μm。脱蜡、水化后以 3% H₂O₂ 室温孵育 10 min,消除内源性过氧化物酶的活性,热修复抗原 5 min。滴加抗体 Bcl-2(1:100),Bax(1:100)和 Caspase-3(1:50)37℃孵育 2 h,DAB 室温下显色。苏木素复染,脱水、透明、中性树胶封片。并设阳性对照和阴性对照,用已知的阳性切片为阳性对照;以 PBS 代替一抗,作为阴性对照。Bcl-2, Bax 和 Caspase-3 蛋白均在胞浆中表达,呈现不同程度的黄色或棕褐色颗粒,每张切片选取 5 个 400 倍视野,采用 Image-Pro Plus(IPP)6.0 图像分析系统,以阳性区域内的吸光度(A)/阳性区域的面积(area)比值作为阳性表达的强度。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 13.0 软件包处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较方差齐时用 LSD 检验,方差不齐时用 Dunnett's T3 检验, P < 0.05 为有统计意义。

3 结果

3.1 对移植性肝癌 H22 小鼠体重与瘤重的影响 给药 2 周后,各组体重无统计学差异。地锦草高、中剂量组和环磷酸胺组瘤体积明显缩小,瘤重与模型组比较差异显著(P < 0.05),高剂量组其抑制作用不如环磷酸胺组,但无统计学差异;低剂量组与模型组无显著性差异,中、低剂量组与环磷酸胺组比较有显著性差异(P < 0.05)。见表 1。

表 1 地锦草对移植性肝癌小鼠体重与瘤重的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$) g

| 组别 | 剂量 /mg · kg ⁻¹ | 体重 | | 瘤重 |
|------|------------------------------|--------------|--------------|---------------------------|
| | | 给药前 | 给药后 | |
| 模型 | - | 28.93 ± 3.63 | 32.18 ± 6.53 | 4.41 ± 2.72 |
| 环磷酸胺 | 1 | 28.37 ± 2.99 | 33.03 ± 4.62 | 1.22 ± 1.02 ¹⁾ |
| 地锦草 | 264 | 29.40 ± 2.76 | 30.80 ± 5.24 | 1.78 ± 0.76 ¹⁾ |
| | 132 | 28.76 ± 3.00 | 33.51 ± 2.90 | 4.02 ± 2.60 ³⁾ |
| | 66 | 30.37 ± 4.48 | 34.51 ± 5.39 | 3.67 ± 1.99 ³⁾ |

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

3.2 对移植性肝癌小鼠血清 SOD, MDA 的影响 与模型组比较,地锦草各剂量组与环磷酸胺组小鼠 SOD 均明显升高(P < 0.01, P < 0.05),MDA 均下降

($P < 0.05$),见表2。

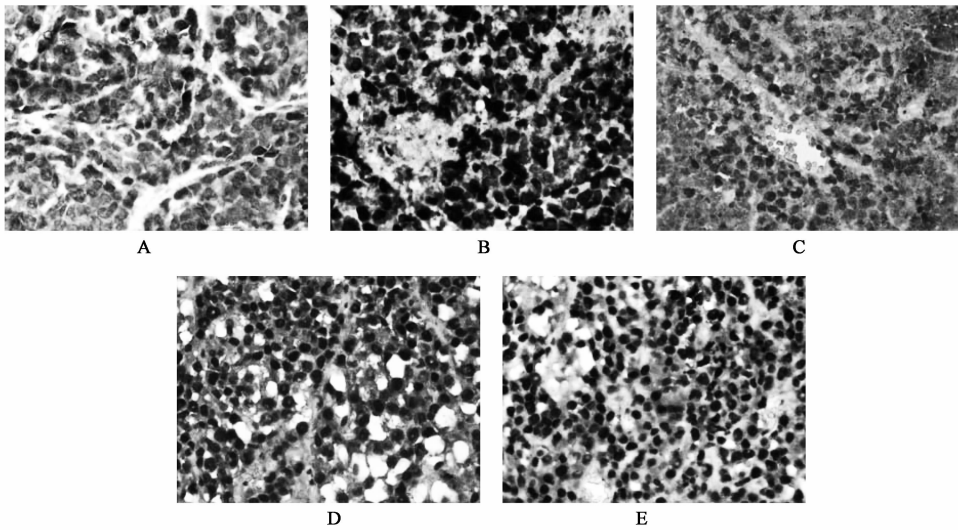
表2 地锦草对移植性肝癌 H22 小鼠血清 SOD 和 MDA 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ | SOD/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ | MDA/ $\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ |
|------|--------------------------------------|--------------------------------------|---|
| 模型 | - | 73.82 ± 7.15 | 19.72 ± 3.09 |
| 环磷酰胺 | 1 | $89.04 \pm 7.01^{2)}$ | $15.83 \pm 2.15^{2)}$ |
| 地锦草 | 264 | $93.94 \pm 9.69^{2)}$ | $14.56 \pm 3.94^{2)}$ |
| | 132 | $86.28 \pm 7.94^{1)}$ | $15.42 \pm 2.21^{1)}$ |
| | 66 | $87.25 \pm 6.53^{1)}$ | $16.93 \pm 2.52^{1)}$ |

表3 地锦草对肿瘤组织 Bcl-2, Bax, Bcl-2/Bax, Caspase-3 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ | Bcl-2/A/area | Bax/A/area | Bcl-2/Bax | Caspase-3/A/area |
|------|--------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 模型 | - | 0.766 ± 0.218 | 0.411 ± 0.087 | 1.914 ± 0.708 | 0.463 ± 0.037 |
| 环磷酰胺 | 1 | 0.846 ± 0.113 | $0.549 \pm 0.102^{1)}$ | $1.169 \pm 0.089^{1)}$ | $0.535 \pm 0.079^{1)}$ |
| 地锦草 | 264 | $0.545 \pm 0.200^{1)}$ | $0.652 \pm 0.035^{1)}$ | $0.931 \pm 0.304^{1)}$ | $0.504 \pm 0.081^{1)}$ |
| | 132 | $0.614 \pm 0.103^{1)}$ | $0.585 \pm 0.169^{1)}$ | $1.358 \pm 0.310^{1)}$ | 0.499 ± 0.063 |
| | 66 | 0.850 ± 0.113 | $0.576 \pm 0.174^{1)}$ | $1.269 \pm 0.295^{1)}$ | 0.471 ± 0.070 |

3.3 对移植性肝癌肿瘤组织蛋白表达的影响 与模型组比较,各给药组 Bcl-2 蛋白表达均下降,其中地锦草高、中剂量组明显下降($P < 0.05$);各给药组 Bax 蛋白均升高,与模型组比较差异显著($P < 0.05$),各剂量组之间无统计学差异。各给药组 Bcl-2/Bax 比值均下降,与模型组比较差异显著($P < 0.05$),提示地锦草可纠正凋亡与抗凋亡蛋白的失衡。地锦草高剂量组和环磷酰胺组 Caspase-3 蛋白表达明显高于模型组 ($P < 0.05$),见表3和图1~3。



A. 模型组;B. 环磷酰胺组;C. 地锦草 264 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;D. 地锦草 132 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;E. 地锦草 66 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组(图2~3同)

图1 地锦草对肿瘤组织 Bcl-2 蛋白表达的影响(免疫组化, $\times 400$)

4 讨论

细胞凋亡是细胞内外环境变化或死亡信号触发,在基因调控下引起细胞主动死亡的过程。细胞凋亡是机体在生长、发育和受到外来刺激时清除多余、衰老和受损细胞,保持内环境平衡和维持正常生理活动过程的一种自我调节机制^[5-6],细胞凋亡严重失衡对机体具有破坏作用,细胞凋亡异常在许多人类恶性肿瘤的发生、发展中起重要作用。如果细胞凋亡受到抑制,细胞增殖与凋亡的平衡被破坏,将导致细胞数量增加,表现出生长优势,是肿瘤形成重

要基础。选择地诱导肿瘤细胞凋亡成为治疗肿瘤的主要策略之一^[7]。

氧自由基可刺激细胞增生,也是一种生长信号,参与细胞的生长增殖以及癌变过程,是原癌基因生长信号传导途径的重要环节^[8]。本实验结果表明,地锦草水提液能明显减轻移植性肝癌小鼠肿瘤质量。同时可降低移植性肝癌小鼠血清 MDA 水平和提高 SOD 活性,提示其可能通过增强抗氧化防御系统来抑制肿瘤细胞的生长,达到其抗肿瘤作用。

Bcl-2 是一种关键细胞凋亡的抑制基因,主要分

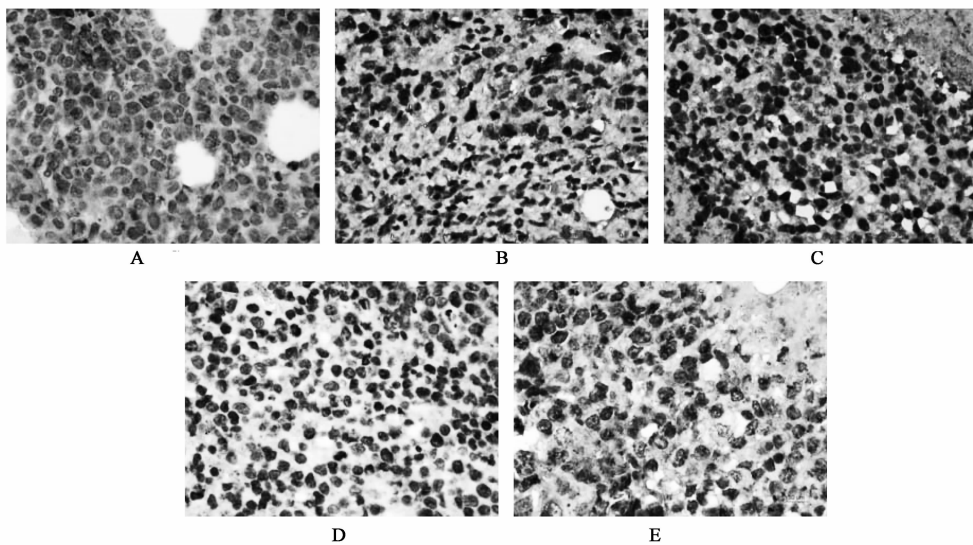


图 2 地锦草对肿瘤组织 Bax 蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

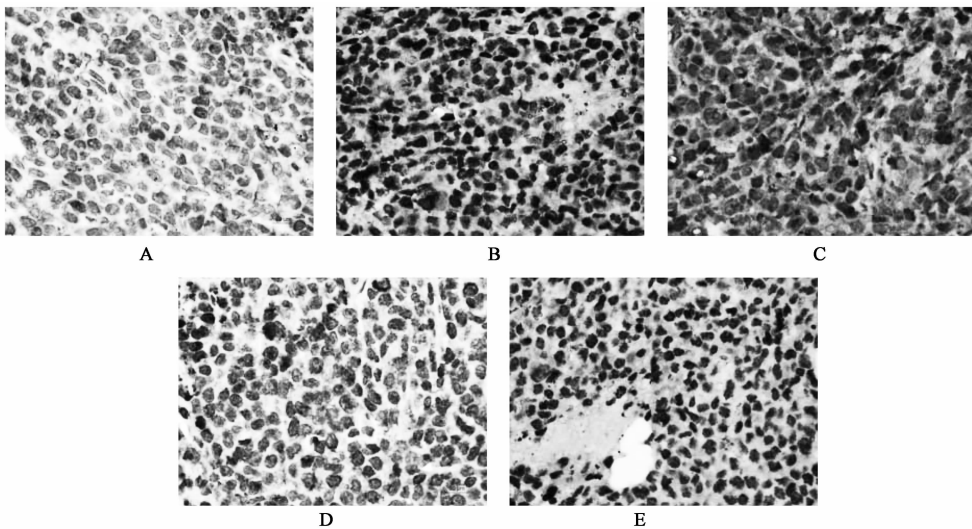


图 3 地锦草对肿瘤组织 Caspase-3 蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

布在线粒体外膜,可以调节膜通透性,促进细胞生存,抑制细胞凋亡^[9]。Bax 位于胞质中,是细胞凋亡的促进基因,当 Bax 高表达时,可以从胞质转位至线粒体膜,与 Bcl-2 结合形成异二聚体,使之灭活,改变线粒体膜的通透性,引起线粒体损伤,促进细胞凋亡^[10]。Caspase-3 是 Caspase 家族蛋白酶中最重要的成员之一,它被合成后通常以无活性的酶原形式存在于细胞质中,在多种凋亡信号刺激下经蛋白水解作用被激活,是凋亡级联反应中的关键步骤^[11]。一旦 Caspase-3 被激活,则细胞凋亡不可逆。抑制 Caspase-3 的活性或拮抗其功能可使细胞凋亡受抑制^[12]。

本研究结果表明,地锦草高剂量能使移植性肝癌的瘤重减轻,可降低抗凋亡 Bcl-2 蛋白表达,同时

提高凋亡 Bax 蛋白表达,纠正失衡的 Bcl-2/Bax,提高凋亡级联反应关键蛋白 Caspase-3 活性。其可能机制是地锦草通过阻止 Bcl-2 家族的 Bax 与 Bcl-2 结合,开启线粒体外膜上的特异性通道关闭使细胞色素 C 释放出来。释放到细胞质的细胞色素 C 在 ATP/dATP 存在的条件下,与凋亡相关因子(Apaf-1)结合,使其多聚化而激活,继而招募前体 Caspase-9。活化后的 Caspase-9 继续活化前体 Caspase-3,活化 Caspase-3 能继续活化其他 Caspase,该活化链形成可以剪切各种死亡底物产生凋亡。

综上,地锦草能阻止移植性肝癌的生长,其抗肿瘤机制可能与纠正机体凋亡蛋白与抗凋亡蛋白失衡,激活 Caspase-3 酶活性诱导肿瘤细胞凋亡有关,但地锦草抑制肿瘤凋亡的具体化学成分有待深入研究。

小半夏汤对豚鼠离体肠管运动的影响

林艳艳, 聂克*, 卢燕, 张勇
(山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] 目的: 观察小半夏汤对豚鼠离体肠管收缩的影响, 初步探讨其止吐的作用机制。方法: 利用离体浴槽, 观察小半夏汤[(生药, 下同) 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 40 g·L⁻¹]对豚鼠离体肠管自主收缩平均张力、振幅和频率的影响; 以呕吐相关受体激动剂乙酰胆碱(Ach)、组胺(His)、五羟色胺(5-HT)、多巴胺(DA)为工具药, 观察小半夏汤 0, 2, 5, 10 g·L⁻¹对各工具药致豚鼠离体肠管收缩平均张力、振幅、频率和最大张力的影响。结果: 小半夏汤能剂量依赖性地抑制豚鼠离体肠管自主收缩, 降低其收缩平均张力、振幅和频率(与空白对照组相比, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 先加 Ach, His, 5-HT 再加小半夏汤 2, 5, 10 g·L⁻¹ 或小半夏汤 2, 5, 10 g·L⁻¹ 预处理均能明显抑制 3 种工具药所致肠管收缩, 减少肠管收缩平均张力、振幅、频率和最大张力(分别与给小半夏汤前和不给小半夏汤相比, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 小半夏汤能够增大 DA 致肠管收缩平均张力、振幅和频率(分别与给小半夏汤前和不给小半夏汤相比, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 但对肠管收缩最小张力无明显影响。结论: 小半夏汤能够抑制豚鼠离体肠管自主收缩, 其作用机制可能是通过阻断 M 受体、H₁ 受体、5-HT 受体和 D₂ 受体等呕吐相关受体而介导, 或直接作用于肠平滑肌而起作用, 其止呕机制有待进一步研究。

[关键词] 小半夏汤; 离体肠管; M 受体; H₁ 受体; 5-HT 受体; D₂ 受体

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)21-0245-05

[doi] 10.11653/syfy20131210245

[收稿日期] 20130318(003)

[基金项目] 山东省高等学校科技计划项目(J09LF07); 教育部留学回国人员科研启动基金(教外司留[2007]1108号)

[第一作者] 林艳艳, 硕士, 从事中药药理研究, Tel: 13583111022, E-mail: linyanyan1113@163.com

[通讯作者] * 聂克, 医学博士, 教授, 博士生导师, 从事中药药理研究, Tel: 0531-89628502, E-mail: nicknk@hotmail.com

[参考文献]

- [1] 徐良波, 欧阳松山, 王跃华. 地锦颗粒长期毒性实验[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2008, 16(6): 393.
- [2] 王婷婷, 文今福, 金松南. 地锦草的化学成分及药理作用研究进展[J]. 泰山医学院学报, 2012, 33(8): 629.
- [3] 玮罕, 耿果霞, 李青旺, 等. 地锦草抗宫颈癌活性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(3): 192.
- [4] 齐元富, 李慧杰, 李静. 六神丸对 H22 肝癌腹水移植瘤 PDGF 与 VEGF 表达的影响及相关机制探讨[J]. 世界中医药, 2013, 8(1): 69.
- [5] Nicholson D W, Thornberry N A. Apoptosis, life and death decisions[J]. Science, 2003, 299(5604): 214.
- [6] Strasser A O, Connor L, Dixit V M. Apoptosis signaling[J]. Annu Rev Biochem, 2000, 69(1): 217.
- [7] 李连琨, 黄云峰, 谢早红, 等. 黄芪注射液对 H22 荷瘤小鼠瘤组织 Bax 及 Bcl-2 蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17): 188.
- [8] Matés J M, Segura J A, Alonso F J, et al. Intracellular

redox status and oxidative stress: implications for cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis[J]. Arch Toxicol, 2008, 82(5): 273.

- [9] 冯泳, 孟庆华, 何前松, 等. 小半夏加茯苓颗粒含药血清对肝癌细胞凋亡及其 Bcl-2 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(16): 99.
- [10] 王恩军, 靳祎, 王哲, 等. 山茱萸多糖诱导宫颈癌细胞凋亡及 Bax 蛋白表达的变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10): 260.
- [11] Wolf B B, Schuler M, Echeverri F, et al. Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor45/inhibitor of caspase activated knase activation[J]. J Biol Chem, 1999, 274(43): 30651.
- [12] Krajewska M, Wang H G, Krajewski S, et al. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP3 (Caspase-3), a cell death protease[J]. Cancer Res, 1997, 57(8): 1605.

[责任编辑 李玉洁]