

夜香树甾体皂苷抗人肝癌裸鼠移植瘤的研究

赵世元¹, 张明艳², 李彩萍², 黄之虎¹, 叶海洪¹, 农智新^{1*}, 钟振国²
(1. 广西壮族自治区民族医院, 南宁 530001; 2. 广西中医药大学, 南宁 530001)

[摘要] **目的:**观察夜香树甾体皂苷(SSCN)对肝癌 HepG2 移植瘤的抑制作用,并探讨其抑瘤的可能机制。**方法:**从夜香树叶中提取并鉴定 SSCN;建立 BALB/c 裸鼠 HepG2 肝癌模型,建模成功后将荷人肝癌裸鼠随机分为 5 组:生理盐水组(NS)、沙利度胺组(TLD 200 mg·kg⁻¹),SSCN 低,中,高组(4,6,8 mg·kg⁻¹,ip,隔日 1 次,连续 30 d),观察 SSCN 的肿瘤抑制作用。治疗期间测量皮下移植瘤的长径和短径;30 d 后处死裸鼠,剖取肿瘤,行常规制片,HE 染色,镜下观察肿瘤病变;免疫组化染色,观察并检测移植瘤中增殖细胞核抗原 PCNA 和 Ki-67 蛋白的表达。**结果:**TLD 组裸鼠 ip 对肝癌 HepG2 BALB/c 裸鼠相对肿瘤增殖率为 42.19%,SSCN 4,6,8 mg·kg⁻¹的增殖率分别为 48.26%,42.94%,41.57%,随着剂量的增高其相对肿瘤增殖率逐渐下降,SSCN 抑制肿瘤生长的作用存在剂量依赖性。镜下观察,SSCN 高剂量组见到大量坏死细胞外,部分肿瘤细胞体积较小,细胞核浓染。NS 组荷瘤小鼠的肿瘤细胞中 PCNA 和 Ki-67 蛋白的表达率明显增高;而与 NS 组比较,TLD 组和 SSCN 高剂量组 PCNA 和 Ki-67 蛋白的表达显著下降($P < 0.05$)。**结论:**夜香树甾体皂苷体内对 BALB/c 小鼠肝癌移植瘤有一定的抑制作用,其作用机制可能是通过下调 PCNA 和 Ki-67 基因蛋白的表达,从而抑制肿瘤细胞的增殖。

[关键词] 夜香树甾体皂苷; 肝癌细胞 HepG2; 裸鼠; 增殖细胞核抗原; Ki-67

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0291-04

[doi] 10.11653/syfy2013170291

***In Vivo* Antitumor Effects of Steroidal Saponins from *Cestrum nocturnum* Linn. (SSCN) on Human Hepatocellular Carcinoma Xenografts in Nude Mice**

ZHAO Shi-yuan¹, ZHANG Ming-yan², LI Cai-ping², HUANG Zhi-hu¹,
YE Hai-hong¹, NONG Zhi-xin^{1*}, ZHONG Zhen-guo²

(Guangxi National Hospital, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the antitumor effects and its mechanism of steroidal saponins from *Cestrum nocturnum*, Linn (SSCN) on human hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice *in vivo*. **Method:** SSCN was separated and identified their structure. The animal model of human hepatocellular carcinoma xenografts was established by subcutaneous inoculation of hepatocellular carcinoma HepG2 cells into nude mice. The mice were randomly divided into five groups: NS group, thalidomide (TLD) group, and SSCN 4, 6, 8 mg·kg⁻¹·d⁻¹ group ip, every the other day for 30 days. During treatment, tumor size was measured. The mice were killed 30 days later to observe tumor morphology. The tumor samples were observed and analyzed using HE staining and immunohistochemical staining. The protein expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 in transplantation tumor was detected. **Result:** The relative proliferation rate in TLD group in tumor nude mice was 42.19%. The relative proliferation rate in SSCN high, middle and low dose in tumor nude mice was 48.26%, 42.94%, 41.57% accordingly. Along with the increase of the dose of SSCN the relative tumor proliferation rate decrease gradually, explaining the inhibition of tumor growth by SSCN in dose dependence manner. A large number of necrotic cells in tumor tissue sections could be viewed in SSCN 8 mg·kg⁻¹ group. Some tumor cells were

[收稿日期] 20121101(001)

[基金项目] 广西科技攻关项目(桂科攻 0816004-17);广西医疗卫生科研课题(Z2008029)

[第一作者] 赵世元,副主任技师,从事教学与中药新药的研究开发,Tel:08613978647518,E-mail:zhaoshiyuan_1105@163.com

[通讯作者] *农智新,硕士,副主任医师,从事肿瘤内科治疗;Tel:08615977739301,E-mail:jane9729@126.com

smaller, and nuclear staining was dense. The protein expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 in transplantation tumor was markedly higher. Compared with the NS group, the protein expression of PCNA and Ki-67 was markedly lower in TLD group and SSCN 8 mg·kg⁻¹ group ($P < 0.05$). **Conclusion:** SSCN show certain inhibitory effect on human hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice *in vivo*. The anti-tumor mechanism is probably related to down-regulation of the protein expression of PCNA and Ki-67 gene, thus inhibiting tumor cell proliferation.

[Key words] steroidal saponins from *Cestrum nocturnum*; human hepatocellular carcinoma cell line HepG2; nude mice; PCNA; Ki-67

夜香树为茄科植物 *Cestrum nocturnum*, 又名夜来香。原产热带美洲, 现广植于热带地区, 在我国主要分布在南方, 其性温、味辛, 具行气止痛、镇定之功效, 民间用于治疗胃脘痛; 课题组前期研究发现, 夜香树叶和嫩枝的正丁醇和乙醇提取物体内对人体几种不同来源的肿瘤细胞都有较好的抑制作用^[1-3, 5-6]。本实验从夜香树叶及嫩枝中提取纯化得到化合物甾体皂苷, 以肝癌细胞株 HepG2 在裸鼠体内的移植瘤为研究对象, 观察 SSCN 对 HepG2 裸鼠移植瘤的抑制作用, 并初步探讨其抗肿瘤作用机制。

1 材料

1.1 药物 参照文献[5-6], 实验前用生理盐水加到所需的浓度, 置 HV-50 型自动高压灭菌器 120 °C, 30 min, 冷却后将其置于超净工作台中(事先以紫外线灯消毒 30 min)分装。药品配好后置 4~8 °C 冰箱保存。

1.2 试剂和仪器 兔抗人 Ki-67 蛋白多克隆抗体、鼠抗人 PCNA 蛋白单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司)、SABC 免疫组化试剂盒、浓缩型 DAB 试剂盒、SABC 免疫组化试剂盒、浓缩型 DAB 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。381 型 CO₂ 培养箱(Thermo Forma 美国), TE2000-U 型倒置荧光显微镜(Nikon 日本), KHB, st360 型酶标仪(上海科华)。

1.3 细胞及动物 人肝癌细胞株 HepG2, 由上海中科院细胞库提供。昆明种小鼠, 体重 18~22 g, 动物许可证号 SCXK(桂)2009-0002, 广西医科大学实验动物中心提供。雄性 BALB/c 裸鼠, 动物许可证号 SCXK(京)2006-0009, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, SPF 级。裸小鼠饲养于广西中医药大学实验动物中心 SPF 级条件下, 12 h 采光, 12 h 黑暗, 恒温 24 °C, 饲料和水经消毒后方能使用, 实验均严格按照动物实验室有关条例进行。

2 方法

2.1 小鼠急性毒性 预实验先探索小鼠 ip 引起

20%~100% 的致死量。将昆明种小鼠随机分成 5 组, 每组 10 只, 禁食 14 h 后, 小鼠按分组剂量 1 次性腹腔注射 SSCN, 立即观察动物反应, 以动物死亡为阳性指标。最后根据所给药物剂量及记录的动物死亡数, 采用 LD₅₀ 的综合计算法^[4] 计算 LD₅₀。

2.2 肝癌 HepG2 裸小鼠移植瘤模型的建立 HepG2 细胞生长于含 10% 灭活小牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 于 37 °C, 5% CO₂, 饱和湿度培养箱中培养, 每 2~3 d 用 0.25% 胰酶消化传代。取 2 × 10⁶ 个对数生长期的 HepG2 细胞, 接种于 BALB/c 裸鼠腋下, 1 d 后在注射处局部出现明显皮丘, 1 周后出现小结节, 1 个月后瘤块长成约黄豆大小后, 即可进行肿瘤组织块移植。处死 HepG2 荷瘤鼠, 在无菌条件下取下荷瘤鼠瘤块, 完整取出肿瘤, 立即放入含 100 U·mL⁻¹ 青霉素、链霉素的生理盐水中。剔除周围结缔组织, 取肿瘤边缘生长旺盛的组织, 切成约 1 mm³ 瘤组织块。用体重(20 ± 2) g 左右的 BALB/c 裸鼠 40 只, 5% 戊巴比妥 0.2 mL, ip 麻醉, 将肿瘤组织移植到右前肢腋部皮下, 5 d 后拆线。2 周后可见皮下有 0.3~0.5 cm 大小的肿瘤生成, 剔除瘤块未生成的和过大的瘤块移植瘤裸鼠。

2.3 动物分组及给药 30 只裸鼠按体重随机分成 5 组, 每组 6 只, 分为 SSCN 高、中、低剂量组(8, 6, 4 mg·kg⁻¹), 阳性对照组沙利度胺(200 mg·kg⁻¹), 阴性对照组(生理盐水)。均隔日给药, 连续 30 d。均按 10 mL·kg⁻¹ 容量 ip。

2.4 对肝癌 HepG2 裸小鼠移植瘤生长体积的影响 每天观察记录小鼠的自主活动、眼睛和毛色及瘤体积大小等情况, 30 d 后停止给药。待皮下移植瘤长至可测量度时, 用游标卡尺测量肿瘤最长径(a)和最短径(b), 以后分别于给药前 1 d, 给药后每 3 天以及处死前测量肿瘤体积。计算肿瘤体积(TV)、相对肿瘤体积(RTV)和相对肿瘤增殖率(T/C), 并绘出生长曲线。

$$TV = a \times b^2 / 2$$

$RTV = V_t/V_0$ (V_0 为分组给药时测量所得体积, V_t 为每次测量时的体积)

$T/C = \text{治疗组 RTV} / \text{阴性对照组 RTV} \times 100\%$

抑瘤效果评价:参照文献[7],用肿瘤生长抑制率或相对肿瘤增殖率评价药物抗肿瘤效果,疗效评价标准: $T/C > 60\%$ 为无效; $T/C \leq 60\%$,并且 $P < 0.05$ 为有效。

2.5 对瘤组织中增殖细胞核抗原 PCNA 和 Ki-67 蛋白表达的影响 取上述肿瘤边缘的肿瘤组织,连续切片,制成厚度 $4 \mu\text{m}$ 切片, 65°C 烘箱烤片 2 h,常规脱蜡,水化至蒸馏水,用蒸馏水冲洗 3 次,每次 3 min。微波修复抗原 20 min,冷却后 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 洗涤 3 次,每次 3 ~ 5 min; $3\% \text{ H}_2\text{O}_2$ 阻断内源性过氧化物酶 10 min, $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 洗涤 3 次,每次 3 ~ 5 min;加正常山羊血清封闭液封闭 20 min;加 1:50 稀释的兔抗人 Ki-67 蛋白多克隆抗体或鼠抗人 PCNA 蛋白单克隆抗体, 37°C 孵育 1 h, $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 洗涤 3 次;加生物素化二抗 (IgG/Bio), 37°C 孵育 20 min, $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 洗 3 次;加链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物 (SABC) 室温孵育 20 min,含 0.02% tween-20 的 PBS 洗涤 4 次,单纯 PBS 洗涤 2 次;DAB 显色,复染,脱水透明、封片。以 PBS 代替一抗做空白对照。结果判定:PCNA 及

Ki-67 蛋白表达阳性以细胞核染色呈棕黄色或棕黑色为准,由 2 位人员对免疫组化染色进行评估,计算标记指数,每 1 张切片随机观察不相重叠的 5 个高倍视野 ($\times 400$),计数 500 个细胞,计算阳性细胞率,标记指数 $< 5\%$ 为 -, $5\% \sim 25\%$ 为 +, $25\% \sim 50\%$ 为 ++, $\geq 50\%$ 为 +++。

2.6 数据处理 采用 SPSS 10.0 统计软件,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为有统计意义。

3 结果

3.1 对小鼠急性毒性 SSCN 小鼠 ip LD_{50} 为 $31.02 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,其 95% 平均可信区间为 $28.50 \sim 33.54 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

3.2 对人肝癌 HepG2 细胞裸鼠皮下移植瘤生长体积的影响 治疗前各组裸鼠肿瘤大小无明显差异,有可比性。在治疗过程中,模型组裸鼠肿瘤生长较快,个别肿瘤表面有破溃倾向,而 SSCN 及 TLD 组裸鼠肿瘤生长相对缓慢。治疗结束后复测肿瘤大小,结果显示,SSCN 各组及 TLD 组肿瘤体积明显小于生理盐水组 ($P < 0.01$),其中 SSCN 各组随着给药剂量的增大其相对肿瘤增殖率逐渐下降,存在剂量依赖性,与 TLD 组比较无统计学差异,见表 1。

表 1 SSCN 对人肝癌裸鼠移植瘤体积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	TV/ mm^3		RTV	T/C/%
		治疗前	治疗后		
NS	-	62.08 ± 27.65	1 068.68 ± 104.98	17.21 ± 1.21	100.00
SSCN	4	53.27 ± 25.54	442.67 ± 96.81 ²⁾	8.31 ± 1.47 ²⁾	48.26
	6	56.90 ± 27.47	420.49 ± 164.93 ²⁾	7.39 ± 0.30 ²⁾	42.94
	8	55.09 ± 15.63	393.89 ± 89.32 ²⁾	7.15 ± 0.92 ²⁾	41.57
TLD	200	58.82 ± 11.67	427.03 ± 79.15 ²⁾	7.26 ± 0.32 ²⁾	42.19

注:与 NS 组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.3 对肿瘤组织形态学变化的影响 镜下见 NS 组肿瘤细胞多呈团灶状分布,细胞核浆比例增大,核分裂像多见,有的呈腺样排列,间质血管扩张充血;TLD 组肿瘤细胞有的沿骨骼肌呈浸润性生长,将骨骼肌分离,肿瘤组织可见片状坏死。SSCN $8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组处理组部分肿瘤细胞体积变小,细胞核浓染,肿瘤组织坏死严重。见图 1。

3.4 对瘤组织中增殖细胞核抗原 PCNA 和 Ki-67 蛋白表达的影响 NS 组荷瘤小鼠的肿瘤细胞中 PCNA 和 Ki-67 蛋白的表达率明显增高;与 NS 组比较,TLD 和 SSCN 高剂量组 PCNA 和 Ki-67 蛋白表达显著下降 ($P < 0.05$)。见表 2。

3.5 对瘤组织切片中 PCNA 和 Ki-67 蛋白表达的

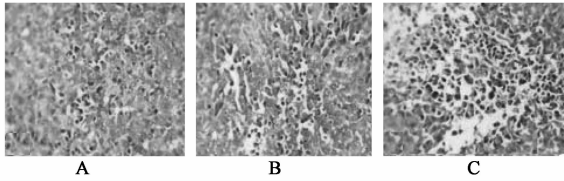
影响 PCNA 和 Ki-67 在肿瘤组织细胞核中表达,免疫组化染色后生理盐水组大部分细胞核浓染,呈现棕黄色或棕黑色;而 TLD 组和 SSCN $8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组肿瘤组织细胞核只有小部分浓染或染色淡。可以看出沙利度胺组和夜香树皂苷 $8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组的 PCNA 和 Ki-67 表达明显下降。见图 2 ~ 3。

4 讨论

研究发现甾体皂苷有很多生理学和药理学活性,如抗肿瘤、抗炎,抗心血管系统疾病和细胞毒活性等^[8]。本实验采用人肝癌 HepG2 裸小鼠移植瘤模型评价 SSCN 的体内抗肝癌作用。研究结果表明 SSCN 各剂量组的 T/C 明显低于生理盐水组,SSCN 各剂量组与 TLD 组比较没有显著差异;可认为

表 2 SSCN 对肿瘤细胞 PCNA 和 Ki-67 蛋白表达的影响

组别	n	PCNA					Ki-67				
		阳性/例(%)	-	+	++	+++	阳性/例/%	-	+	++	+++
NS	22	17(77.2)	5	4	3	4	14(63.6)	8	4	5	5
SSCN	22	15(68.2) ¹⁾	7	4	4	5	10(45.5) ¹⁾	12	2	4	4
TLD	22	14(63.6) ¹⁾	8	2	2	3	11(50.0) ¹⁾	11	3	3	5



A. NS 组; B. TLD200 mg·kg⁻¹ 组; C. SSCN8 mg·kg⁻¹ 组(图 3~4 同)

图 1 SSCN 对肿瘤组织细胞的影响(HE, ×400)

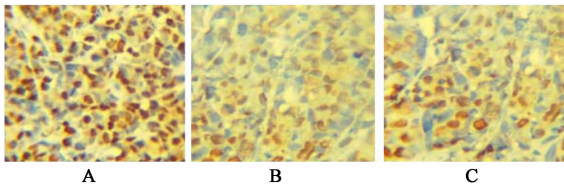


图 2 SSCN 对肿瘤组织切片中 PCNA 表达的影响
(免疫组化 DAB 染色, ×400)

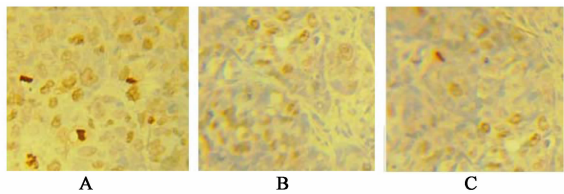


图 3 SSCN 对肿瘤组织切片中 Ki-67 蛋白表达的影响
(免疫组化 DAB 染色, ×400)

SSCN 对人肝癌 HepG2 裸小鼠移植瘤具有一定的治疗作用。

恶性肿瘤的发生在很大程度上取决于细胞的增殖与细胞凋亡的平衡和转化。当肿瘤细胞增殖、凋亡调控失常,即增殖大于凋亡时,肿瘤就可能发展。反之,肿瘤就会缩小甚至消亡。PCNA 是一种细胞周期蛋白,是 DNA 多聚酶 δ 的辅助蛋白,是增殖细胞 DNA 合成不可缺少的物质,在肿瘤细胞周期 S 期广泛表达。免疫荧光技术和流式细胞定量技术检测均已证实,在正常增殖的和转化的细胞中,PCNA 的量有明显的不同,表明 PCNA 与细胞增殖明显相关。PCNA 的出现与细胞周期中的 G₁ 期和 S 期存在密切联系^[9]。Ki-67 抗原是存在于增殖细胞核中的一种非蛋白性核蛋白,与细胞增殖有关,半衰期短,且不表达于 DNA 修复状态的细胞,能准确的反映肿瘤细胞的增殖活性。利用免疫组化法检测 PCNA 和

Ki-67 来评价细胞的增殖状态是一种较为有效的方法。可以作为判断和评价原发性肝癌的细胞增殖状态和生物学活性的指标^[10]。本结果显示,SSCN 高剂量组 PCNA 和 Ki-67 蛋白的表达显著下降($P < 0.05$)。提示 SSCN 的治疗降低了肝癌细胞的 DNA 合成速度,抑制了肿瘤细胞的增殖。

综上,SSCN 通过下调 PCNA 和 Ki-67 蛋白的表达,进而抑制 BALB/c HepG2 肝癌裸鼠移植瘤肿瘤细胞的增殖,可能是其抗肿瘤的机制之一。

[参考文献]

[1] 钟振国,赵世元,吕金,等.夜香树提取物体内抗肿瘤作用的实验研究[J].中药材,2008,31(11):1709.
 [2] 赵世元,钟振国,廖文,等.夜香树提取物体外抗肿瘤作用的实验研究[J].天然产物研究与开发,2008,20(1):12.
 [3] 黄燕,李鹏,罗雪菲,等.夜香树提取物对荷瘤小鼠免疫功能的影响[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(15):114.
 [4] 徐叔云,卞如谦,陈修.药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2002:1757.
 [5] 赵世元,农智新,叶海洪,等.夜香树叶甾体皂苷对人肝癌细胞株 BEL-7404 增殖抑制作用机制研究[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(7):212.
 [6] 赵世元,黄之虎,叶海洪.夜香树花甾体皂苷诱导 K562 细胞凋亡机制研究[J].中成药,2013,35(3):445.
 [7] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis[J]. Cell,1996,86(3):353.
 [8] Ravikumar P R, Hammesfahr P, Sih C J. Cytotoxic saponins from the Chinese herbal drug Yunnan Baiyao [J]. J Pharm Sci,1979,68(7):900.
 [9] 董敬东,王莉芬.原发性肝癌影像学特征与 PCNA、AFP 的表达[J].中国医药导报,2008,5(15):16.
 [10] 孙赫,钟进义,孟扬.明日叶查尔酮对小鼠肝癌细胞 PCNA 和 BCL-2 蛋白表达的影响[J].毒理学杂志,2011,25(1):33.

[责任编辑 李玉洁]