

木蹄复方提取物体内抗肿瘤作用研究

何晓义¹,葛卫红¹,刘琮²,沈先荣^{2*},何颖²,蒋定文²,
陈伟²,莫琳芳²,刘玉明²,侯登勇²,王庆蓉²,钱甜甜²
(1. 浙江中医药大学中药体外代谢实验室,杭州 310053;
2. 海军医学研究所防护医学研究室,上海 200433)

[摘要] 目的:考察木蹄复方提取物(ECF)的体内抗肿瘤活性,并探讨部分作用机制。方法:制备 S 180 和 Lewis 肺癌实体瘤小鼠模型,接种次日将 2 种实体瘤模型小鼠均分为模型组,EFC 低、中、高剂量(0.05,0.1,0.15 g·kg⁻¹)组和环磷酰胺(CTX)阳性对照组,分别连续给药 8 和 15 d,观察 ECF 对荷瘤小鼠瘤质量、胸腺指数和脾脏指数、血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)水平的影响。结果:ECF 低、中、高 3 个剂量组对 S 180 荷瘤小鼠肿瘤抑制率分别为 11.8%、47.1% 和 58.8%;对 Lewis 肺癌实体瘤小鼠肿瘤抑制率分别为 7.1%、57.1% 和 28.6%。与模型组比较,ECF 高剂量组能抑制 S₁₈₀ 荷瘤小鼠肿瘤的生长($P < 0.05$),提高胸腺指数($P < 0.05$),降低血清中 M-CSF 水平;中剂量组可抑制 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肿瘤的生长($P < 0.05$),提高胸腺指数($P < 0.05$),降低血清中 M-CSF 水平,3 个剂量组均能提高血清中 TNF- α 水平($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:ECF 对 S 180 荷瘤小鼠和 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肿瘤的生长具有明显抑制作用,显示较强的体内抗肿瘤活性,其作用机制可能与提高免疫器官指数以及调节血清中 TNF- α 和 M-CSF 的表达有关。

[关键词] 木蹄复方; 体内; 抗肿瘤; 肿瘤坏死因子- α ; 巨噬细胞集落刺激因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0170-04

[doi] 10.11653/syfy2013150170

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130527.1142.008.html>

[网络出版时间] 2013-05-27 11:42

[收稿日期] 20130104(020)

[基金项目] 全军医学科技“十二五”重大项目(AS11J003)

[第一作者] 何晓义,硕士研究生,从事中药药理与新产品开发研究,Tel:13817429757,E-mail:hy062412@163.com

[通讯作者] * 沈先荣,博士生导师,研究员,从事海洋生物及中药研究,Tel:021-81883171,E-mail:xianrong_sh@yahoo.com

性物质减少所致,具体的原因有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] 常东,刘子志,李健,等. 大肠湿热型溃疡性结肠炎患者防御素和白细胞介素 8 表达及溃结灵的干预作用[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2010, 18(5):294.

[2] 唐立海,纪艳艳,杜群,等. 溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜 IB、IKK β 蛋白表达的作用[J]. 中药药理与临床, 2012, 28(1):135.

[3] 李燕舞,黄秋凌,杜群,等. 溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜 ITF、MUC2、TGF- α 动态变化的影响[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(6):68.

[4] 黄志新,劳绍贤,崔琦珍,等. 溃结灵颗粒治疗活动期溃疡性结肠炎的临床与实验研究[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2003, 11(3):141.

[5] 黄秋凌,李燕舞,巫燕莉,等. 溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜超微结构动态变化的影响[J]. 中药药理与临床, 2009, 25(5):86.

[6] 杜群,李红,王建华,等. 溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜 NF- κ B p65 蛋白表达及血清 TNF- α 含量的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2007, 24(5):396.

[7] 李燕舞,宋宁,杜群,等. 溃结灵对 UC 大鼠结肠黏膜 IL-1 β mRNA 表达的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(6):592.

[8] 吴慧丽,李慧. 白芍总苷对溃疡性结肠炎大鼠细胞因子影响的研究[J]. 中南药学, 2010, 8(2):128.

[9] 周燕红,刘毅飞. 银杏天冬对大鼠实验性溃疡性结肠炎 IFN- γ 、IL-4 的影响[J]. 咸宁学院学报, 2005, 19(3):164.

[责任编辑 聂淑琴]

Antitumor Effect of Extracts from Compound *Fomes fomentarius* *in vivo*

HE Xiao-yi¹, GE Wei-hong¹, LIU Qiong², SHEN Xian-rong^{2*}, HE Ying², JIANG Ding-wen², CHEN Wei²,
MO Lin-fang², LIU Yu-ming², HOU Deng-yong², WANG Qing-rong², QIAN Tian-tian²

(1. Metabolism Laboratory of Traditional Chinese Medicine (TCM),

Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou 310053, China;

2. Department of Radiation Protection Medicine, Navy Medical Research Institute, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the anti-tumor activity *in vivo* of extract from compound *Fomes fomentarius* (ECF), and reveal the anti-tumor mechanism of ECF. **Method:** S180-bearing and Lewis tumor-bearing mice models were established. Mice were divided into five groups, model group, cyclophosphamide (CTX) group, high- (0.15 g·kg⁻¹), middle- (0.1 g·kg⁻¹) and low-dose (0.05 g·kg⁻¹) of ECF. The S180-bearing and Lewis tumor-bearing mice in every group received corresponding drugs for 10 and 15 days respectively, then the effects of ECF on tumor growth, thymus and spleen indexes, tumor necrosis factor (TNF- α) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) levels were determined. **Result:** The inhibition rate of the three groups (low-, middle-, and high-dose group) of ECF in S180-bearing mice was 11.8%, 47.1% and 58.8% respectively, and in Lewis tumor-bearing mice, the inhibition rate was 7.1%, 57.1% and 28.6% respectively. Compared with model group, high-dose group of ECF could inhibit tumor growth and reduce M-CSF levels of S180-bearing mice ($P < 0.05$), middle-dose group could inhibit tumor growth and reduce M-CSF levels of Lewis tumor-bearing mice ($P < 0.05$), high-dose group could increase thymus indexes, high-, middle-and low-dose groups of ECF could elevate TNF- α levels ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** ECF could exhibit effect on the growth of transplanted S180 and Lewis tumor, probably *via* increasing indexes of immune organ and the regulation of TNF- α and M-CSF expression.

[Key words] compound *Fomes fomentarius*; *in vivo*; antitumor; TNF- α ; M-CSF

木蹄层孔菌 *Fomes fomentarius* (L. ex. Fr.) Kickx. 又名火绒层孔菌,为多孔菌科、层孔菌属药用真菌^[1],松针层孔菌 *Phellinus igniarius* (L. ex. Fr.) Quel. 又名松木层孔菌,为多孔菌科、层孔菌属药用真菌^[2],赤芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex. Fr.) Karst. 为多孔菌科、灵芝属药用真菌^[3]。把三者组成复方进行抗肿瘤作用的研究,前期结果表明本复方提取物(ECF)对多种肿瘤细胞的生长具有较强的抑制作用,并可诱导肿瘤细胞凋亡,本研究进一步考察其体内抗肿瘤活性并初步探讨其可能作用机制。

1 材料

1.1 瘤株与动物 S180 腹水瘤种鼠和 Lewis 肺癌实体瘤种鼠购自上海医药工业研究院;C57BL/6 小鼠 40 只,SPF 级,雄性,18~22 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号 SCXK(沪)2007-0005;ICR 小鼠 40 只,SPF 级,雄性,18~22 g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,许可证号 SCXK(沪)2008-0016。

1.2 药物与试剂 木蹄复方提取物(ECF)为实验

室制备(批号 20120323)。复方组成药味和比例为木蹄层孔菌:赤芝:松针层孔菌 4:1:2。ECF 制备工艺如下:复方药材,粉碎,加水,100℃加热回流提取 3 次,每次 2 h,料液比分别为 1:20,1:15 和 1:10,过滤,合并滤液,9 000 r·min⁻¹离心 30 min,上清液减压浓缩,浓缩液加 95% 乙醇使乙醇体积分数为 80%,4℃静置 24 h,9 000 r·min⁻¹离心 30 min 后弃沉淀,上清液减压浓缩,真空干燥,即得 ECF。ECF 总糖含量在 13.1% 以上,总三萜含量在 5.5% 以上,总黄酮含量在 7.9% 以上。环磷酰胺(CTX)(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 11030621);肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)ELISA 试剂盒(达科为生物科技有限公司),其他试剂均为市售分析纯。

1.3 仪器 354 型酶标仪(美国 Thermo 公司);TB-214 型电子天平(北京赛多利斯分析系统有限公司);超净工作台(苏净集团安泰公司)。

2 方法

2.1 S180 荷瘤小鼠肿瘤模型的制备与分组给

药^[4-5] 取肿瘤生长良好的 S 180 腹水瘤 ICR 小鼠, 无菌条件下取腹水, 用生理盐水 1:8 稀释, 接种在同种异体小鼠右前肢腋下皮下, 每只 0.2 mL, 接种 24 h 后按体重随机分为 5 组, 每组 8 只, 分别为模型组, ECF 低、中、高剂量组(0.05, 0.1, 0.15 g·kg⁻¹) 和阳性对照组 (CTX, 0.03 g·kg⁻¹)。模型组每天 ip 0.2 mL 生理盐水, 给药组每天 ip 0.2 mL 不同浓度的 ECF, 阳性对照组每天 ip 0.2 mL 环磷酰胺溶液, 连续给药 8 d。

2.2 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肿瘤模型的制备与分组给药^[6] 取肿瘤生长良好的 Lewis 肺癌 C57BL/6 小鼠, 无菌条件下取瘤块, 剔除包膜和坏死部分, 加生理盐水(1:4)匀浆。接种在同种异体小鼠右前肢腋下皮下, 每只 0.2 mL, 接种 24 h 后按体重随机分组, 分组和给药方法同 2.1, 连续给药 15 d。

2.3 ECF 对荷瘤小鼠肿瘤的抑制率、免疫器官指数及血清中 TNF-α 和 M-CSF 水平的影响 末次给药 24 h 后, 分别称取小鼠体重, 各组动物摘眼球取血, 分离血清, ELISA 法检测血清 TNF-α 和 M-CSF 含量。剥取瘤块、胸腺和脾脏, 称重, 计算抑瘤率和胸腺(脾)指数。

$$\text{抑瘤率} = (\text{模型组瘤质量} - \text{给药组瘤质量}) / \text{模型组瘤质量} \times 100\%$$

$$\text{胸腺(脾)指数} = \text{胸腺(脾)质量(mg)} / \text{体重(g)}$$

2.4 统计学处理 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 经 SPSS 17.0 统计软件处理并进行 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对 S180 荷瘤小鼠肿瘤的抑制作用 ECF 低、中、高 3 个剂量对 S180 荷瘤小鼠肿瘤均有一定的抑制作用, 呈现剂量依赖关系, 与模型组比较, ECF 高剂量组小鼠瘤质量显著减轻 ($P < 0.05$)。与阳性对照组比较, ECF 3 个剂量组小鼠肿瘤质量增加, 低剂量组差异显著, 抑瘤率明显低于阳性对照组 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 ECF 对 S180 荷瘤小鼠肿瘤的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 瘤重/g | 抑瘤率/% |
|-----|-----------------------|---------------------------|-------|
| 模型 | - | 1.65 ± 0.93 | 0 |
| ECF | 0.05 | 1.48 ± 0.60 ³⁾ | 10.56 |
| | 0.10 | 0.92 ± 0.61 | 44.00 |
| | 0.15 | 0.70 ± 0.33 ¹⁾ | 7.67 |
| CTX | 0.03 | 0.48 ± 0.17 ²⁾ | 71.20 |

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 CTX 组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

3.2 对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肿瘤的抑制作用 ECF 低、中、高 3 个剂量组对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肿瘤均有一定的抑制作用, 但没有剂量依赖关系, 与模型组比较, ECF 中剂量组抑瘤率显著 ($P < 0.05$)。与阳性对照组比较, ECF 3 个剂量组抑瘤率明显低于阳性对照组 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 ECF 对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肿瘤的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 瘤重/g | 抑瘤率/% |
|-----|-----------------------|-----------------------------|-------|
| 模型 | - | 1.44 ± 0.70 | 0 |
| ECF | 0.05 | 1.28 ± 1.27 ³⁾ | 11.56 |
| | 0.10 | 0.6 ± 0.7 ^{1,3)} | 56.51 |
| | 0.15 | 1.00 ± 0.92 ^{2,3)} | 31.01 |
| CTX | 0.03 | 0 ± 0 ²⁾ | 100 |

3.3 对 S180 荷瘤小鼠胸腺指数和脾指数及血清中 TNF-α 和 M-CSF 水平的影响 和模型组比较, ECF 高剂量组能明显增加 S180 荷瘤小鼠的胸腺指数 ($P < 0.05$), 但 ECF 各剂量组脾指数无明显变化, 阳性对照组胸腺指数和脾指数均显著低于模型组 ($P < 0.01$), 也显著低于 ECF 各剂量组 ($P < 0.01$)。ECF 各剂量组和模型组比较可显著升高荷瘤小鼠血清中 TNF-α 水平 ($P < 0.05, P < 0.01$), 也显著高于阳性对照组。血清中 M-CSF 水平各组间没有显著差异。见表 3。

3.4 对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠胸腺指数和脾指数及血清中 TNF-α 和 M-CSF 水平的影响 和模型组比较, ECF 高剂量组明显增加荷瘤小鼠胸腺指数 ($P < 0.05$), 但 ECF 各剂量组脾指数无明显变化, 阳性对照组胸腺指数和脾指数均显著低于模型组 ($P < 0.01$)。ECF 各剂量组和模型组比较可显著升高荷瘤小鼠血清中 TNF-α 水平 ($P < 0.05, P < 0.01$); ECF 3 个剂量组小鼠血清中 M-CSF 水平与模型组比没有显著差异。见表 4。

4 讨论

恶性肿瘤的发生、发展、转移都与机体的免疫状态有密切关系。当宿主免疫功能低下或受抑制时, 肿瘤发生率增高, 而在肿瘤进行性生长时肿瘤患者的免疫功能受抑制, 二者也互为因果。机体抗肿瘤的免疫机制主要包括细胞免疫和体液免疫两方面, 其中以 T 细胞介导的细胞免疫为主导。细胞因子是由活化的淋巴细胞、单核巨噬细胞等产生的一类活性物质, 近年来 TNF-α, M-CSF 等细胞因子的抗肿瘤作用越来越引起重视。

表3 ECF对S180荷瘤小鼠胸腺指数和脾指数及血清中TNF- α 和M-CSF水平的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

| 组别 | 给药剂量/g·kg ⁻¹ | 胸腺指数/mg·g ⁻¹ | 脾指数/mg·g ⁻¹ | TNF- α /ng·L ⁻¹ | M-CSF/mg·L ⁻¹ |
|-----|-------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| 模型 | - | 2.36 \pm 0.42 | 8.07 \pm 1.04 | 33.47 \pm 3.42 | 1.70 \pm 0.17 |
| ECF | 0.05 | 2.33 \pm 0.33 ⁴⁾ | 8.33 \pm 1.02 ⁴⁾ | 41.42 \pm 1.33 ^{1,4)} | 1.92 \pm 0.22 |
| | 0.10 | 2.55 \pm 0.37 ⁴⁾ | 7.75 \pm 1.22 ⁴⁾ | 57.33 \pm 7.45 ^{2,4)} | 1.90 \pm 0.20 |
| | 0.15 | 2.69 \pm 0.29 ^{1,4)} | 7.99 \pm 1.36 ⁴⁾ | 67.45 \pm 7.69 ^{2,4)} | 1.68 \pm 0.10 |
| CTX | 0.03 | 1.36 \pm 0.52 ²⁾ | 3.67 \pm 0.60 ²⁾ | 27.69 \pm 7.47 | 1.58 \pm 0.16 |

表4 ECF对Lewis肺癌荷瘤小鼠胸腺指数、脾指数以及血清中TNF- α 生成的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

| 组别 | 给药剂量/g·kg ⁻¹ | 胸腺指数/mg·g ⁻¹ | 脾指数/mg·g ⁻¹ | TNF- α /ng·L ⁻¹ | M-CSF/mg·L ⁻¹ |
|-----|-------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| 模型 | - | 1.83 \pm 0.12 | 15.69 \pm 4.15 | 19.74 \pm 9.03 | 1.48 \pm 0.18 |
| ECF | 0.05 | 1.98 \pm 0.33 ⁴⁾ | 13.08 \pm 4.65 ⁴⁾ | 32.03 \pm 2.87 ^{1,4)} | 1.62 \pm 0.22 |
| | 0.10 | 2.14 \pm 0.37 ⁴⁾ | 11.40 \pm 4.11 ⁴⁾ | 42.87 \pm 2.86 ^{2,4)} | 1.38 \pm 0.23 |
| | 0.15 | 2.30 \pm 0.39 ^{1,4)} | 11.40 \pm 4.11 ⁴⁾ | 29.86 \pm 9.63 ^{1,4)} | 1.57 \pm 0.15 |
| CTX | 0.03 | 0.78 \pm 0.21 ²⁾ | 7.24 \pm 1.20 ²⁾ | 22.63 \pm 2.74 | 1.32 \pm 0.22 |

TNF- α 是一种由多核巨细胞产生的有广泛生物学活性的细胞因子,可调节机体的免疫功能,促进T细胞及其他杀伤细胞对肿瘤细胞的杀伤,也可作用于血管内皮细胞,损伤内皮细胞或导致血管功能紊乱使血管损伤和血栓形成,造成肿瘤组织的局部血流阻断而发生出血、缺氧坏死^[7]。目前有研究表明中药的抗肿瘤活性和增强机体免疫作用与其诱生TNF- α 有关^[8],本研究结果表明木蹄复方提取物可显著升高荷瘤小鼠血清中TNF- α 水平,显示较强的抗肿瘤活性。

M-CSF是由多种细胞产生的一种具有谱系特异性的细胞因子^[9],研究发现许多实体肿瘤细胞能够分泌M-CSF和(或)表达受体,使其表达异常,肿瘤中发现M-CSF的水平升高,且血清中循环的M-CSF已成为这些恶性肿瘤的分子标记物,M-CSF参与了肿瘤的发生发展过程,对肿瘤的生长、侵袭和转移以及新生血管的形成均有重要的作用^[10-11]。本研究发现ECF抑瘤率最高的剂量组和阳性对照组M-CSF水平均下降,提示ECF的抗肿瘤作用可能与调节荷瘤小鼠M-CSF的表达有关。

综上,ECF可提高荷瘤小鼠的胸腺指数,调节TNF- α 和M-CSF的表达,增强和调节机体免疫功能,从而达到抑制肿瘤细胞生长的作用,但其抑瘤作用确切机制还有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 卯晓岚,蒋长坪,欧珠次忘. 西藏大型经济真菌[M]. 北京:北京科学技术出版社,1993:464.

- [2] 黄年来. 中国大型真菌原色图鉴[M]. 北京:中国农业出版社,1998:73.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:174.
- [4] 伍小燕,唐爱存,卢秋玉. 蝴蝶草提取物体内抗肿瘤作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(8):202.
- [5] 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.
- [6] 郭斌,申洪波,李智. 苦参碱对小鼠Lewis肺癌的影响[J]. 中草药,2010,41(12):2037.
- [7] 李卫,刘佳,白家媛,等. α 肿瘤坏死因子的研究进展[J]. 动物医学进展,2010,31(12):108.
- [8] 肖顺汉,刘明华,钟琳,等. 克癌新对荷瘤小鼠IL-2、IL-6、IL-12、TNF- α 水平的影响[J]. 中药药理与临床,2008,24(2):82.
- [9] Csar X F, Wilson N J, Mc Mahon K A, et al. Proteomic analysis of macrophage differentiation. p46/52 (Shc) Tyrosine phosphorylation is required for CSF-1-mediated macrophage differentiation[J]. J Biol Chem, 2001, 276(28):26211.
- [10] 刘磊玉. 巨噬细胞集落刺激因子与肿瘤[J]. 国外医学:肿瘤学分册,2005,32(7):499.
- [11] Mc Dermott R S, Deneux L, Mosseri V, et al. Circulating macrophage colony-stimulating factor as a marker of tumor progression[J]. Eur Cytokine Netw, 2002, 13(1):121.

[责任编辑 聂淑琴]