

白背叶提取物芹菜素对裸鼠人胃癌细胞 移植瘤生长及凋亡的影响

郑作文*, 伦玉宁, 赵丽丽
(广西中医学院, 南宁 530001)

[摘要] 目的:研究白背叶提取物芹菜素对裸鼠人胃癌 SGC-7901 细胞移植瘤生长及凋亡的影响。方法:建立人胃癌裸鼠移植瘤模型,连续 11 d ig 给予芹菜素 600,300,150 mg·kg⁻¹或 ip 五氟尿嘧啶(5-FU)20 mg·kg⁻¹治疗,观察移植瘤重及药物对肿瘤生长的抑制率;透射电镜观察肿瘤组织细胞凋亡情况。结果:芹菜素 600,300 mg·kg⁻¹和 5-FU 均能明显抑制裸鼠移植瘤生长,抑瘤率分别为 31.78% ($P < 0.01$),25.66% ($P < 0.05$)和 49.03% ($P < 0.01$),且芹菜素可致裸鼠移植瘤大量细胞发生凋亡,可见典型的细胞凋亡形态学变化。结论:白背叶提取物芹菜素可能通过抑制肿瘤细胞增殖、诱导细胞凋亡而发挥抗肿瘤作用。

[关键词] 白背叶提取物芹菜素; SGC-7901 人胃癌细胞株; 细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)13-0214-03

Effect of Apigenin from *Mallotus apelta* on Proliferation and Apoptosis in Nude Mice Bearing Human Gastric Carcinoma

ZHENG Zuo-wen*, LUN Yu-ning, ZHAO Li-li
(Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the cytotoxic effects of apigenin from *Mallotus apelta*. on proliferation and apoptosis in nude mice bearing human gastric carcinoma. **Method:** The model of nude mice bearing developed xenografts of the SGC-7901 cell line was established, and mice were administered with apigenin at dose of 600, 300, 150 mg·kg⁻¹ by oral and 5-FU at dose of 20 mg·kg⁻¹ by intraperitoneal injection (ip) respectively for 11 days. The weights of the tumor and inhibitory rate of tumor of the nude mice were observed. The morphological changes of apoptosis were observed by transillumination electron microscope. **Result:** In tumor bearing mice, apigenin at dose of 600, 300 mg·kg⁻¹ and 5-FU could clearly prevented tumor growth in nude mice. The inhibitory rates were 31.78% ($P < 0.01$) and 25.66% ($P < 0.05$) and 49.03% ($P < 0.01$). The nude mice treated with apigenin showed significant morphological changes in different apoptotic phases. **Conclusion:** The apigenin from *M. apelta* has obvious antitumor effects and the mechanism may be related to inhibited proliferation and induction of apoptosis in cancer cells.

[Key words] apigenin from *Mallotus apelta*; human gastric carcinoma of SGC-7901; cell apoptosis

白背叶为大戟科植物白楸的叶,在我国分布广泛,可见于广西、广东、湖南等地,具有清热解毒、祛湿之功效,为民间常用草药^[1]。前期研究发现,白

背叶提取物芹菜素对体外培养的 SGC-7901 人胃癌细胞增殖有较强的抑制作用,其 IC₅₀ 为 27.14 mg·L⁻¹^[2]。为此本实验建立 SGC-7901 人胃癌细胞裸鼠动物模型,观察白背叶提取物芹菜素对体内肿瘤生长的影响,从而为临床应用芹菜素提供实验基础。

1 材料

1.1 药物 芹菜素由广西中医学院中化教研室从植物白背叶的叶中提取分离所得,为淡黄色单体成

[收稿日期] 20111024(006)

[基金项目] 广西科学基金课题(桂科基 0832007)

[通讯作者] *郑作文,硕士,教授,主要从事中药药理研究,
Tel:13877173116, E-mail: zzw_nn@163.com

分,纯度达95%以上。白背叶药材经广西中医学院药用植物教研室韦松基教授鉴定为大戟科植物白楸 *Mallotus apelta* (Lam.) Muell-Arg. 的叶。

1.2 肿瘤细胞株 SGC-7901 人胃癌细胞由广西中医学院药学院药理教研室所保存。

1.3 动物 BALB/CA-nu/nu 裸鼠,4~5 周龄,体重 16~18 g,雄性,购于上海斯莱克实验动物有限公司,合格证号 SCXK(沪)2007-0005。在无特定病原体(SPF)条件下饲养。

1.4 试剂 RPMI-1640 干粉(美国 Gibco 公司产品),新生牛血清(杭州四季青公司产品,批号 090312),二甲基亚砷(DMSO),博大泰克公司产品,0.25% 胰蛋白酶(美国 Hyclone Lab 公司产品),五氟尿嘧啶(5-FU)注射液(上海旭东海普药业有限公司,批号 090805)。

1.5 仪器 311 型二氧化碳培养箱(美国 Thermo Forma 公司产品),DLF560 型超净工作台(荷兰 Clear Air Techniek bv 公司产品),细胞培养瓶(加拿大 BIOFIL 公司产品),倒置显微镜(德国 Leica 公司产品),微量移液器(法国 Pipetman 公司产品),1/10 万电子天平(德国赛多利斯产品),日立 H500 型透射电镜。

2 方法^[3]

2.1 肿瘤细胞培养 细胞培养采用含有 10% 新生牛血清的 RPMI-1640 培养液,含青霉素 100 U·mL⁻¹、链霉素 100 U·mL⁻¹。在 37 ℃,5% CO₂ 培养箱培养。

2.2 裸鼠模型的建立 取对数生长期细胞制成单细胞悬液,调细胞密度为 1×10⁷ 个/mL。接种于裸鼠右前肢皮下(0.2 mL/只),每日观察并测量肿瘤直径,待肿瘤直径大约为 1 cm 左右时,挑选肿瘤生长良好且无破溃的裸鼠,取下瘤块,置于含双抗的 1640 培养液中,去除包膜和坏死组织,研磨成细胞,200 目细胞筛滤过,将细胞悬液放入培养瓶内培养,传代 2~3 次,待其生长至对数期时,收集细胞制备成密度为 1×10⁷ 个/mL 的单细胞悬液,在超净工作台内于裸鼠右侧腋下皮下注射 0.2 mL 的单细胞悬液,注射局部出现明显皮丘。当肿瘤平均体积达到 100 mm³ 左右时,标号分组。

2.3 动物分组及给药 接种 18 d 时选取瘤体大小均一的 30 只裸鼠随机分成 5 组,每组 6 只,分别为 DMSO 对照组、5-FU(20 mg·kg⁻¹)组、芹菜素高、中、低剂量(600,300,150 mg·kg⁻¹)组。芹菜素用 3% DMSO 助溶后,加 97% 无菌超纯水配成溶液。以上

5 组除 5-FU 组 ip 给药外,其余各组均 ig 给药(给药容量为 20 mL·kg⁻¹),每天 1 次,连续 11 d。

2.4 样本采集及检测 每日观察小鼠的一般情况,体重变化,每隔 1 日使用游标卡尺测量 1 次裸鼠瘤体积。于末次给药后 24 h 脱颈椎处死,剥离肿瘤,称瘤质量,计算肿瘤生长抑制率^[3]。

$$\text{肿瘤生长抑制率} = (\text{对照组平均瘤质量} - \text{实验组平均瘤质量}) / \text{对照组平均瘤质量} \times 100\%$$

将取出的肿瘤组织立刻放到 2.5% 戊二醛 4 ℃ 预固定 4 h,制成电镜切片,进行透射电镜观察并拍照。

2.5 统计学处理 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 软件进行统计分析,组间比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况 实验过程中,无裸鼠死亡。5-FU 组裸鼠活动减少,精神不佳,便秘,体重下降明显。溶媒对照组、芹菜素各剂量组的裸鼠饮水、进食均正常,均无腹泻、活动异常等。实验期间除 5-FU 组裸鼠外,其余各组裸鼠体重均有增加,且与对照组比较无明显差异,提示芹菜素对裸鼠无明显毒副作用。见表 1。

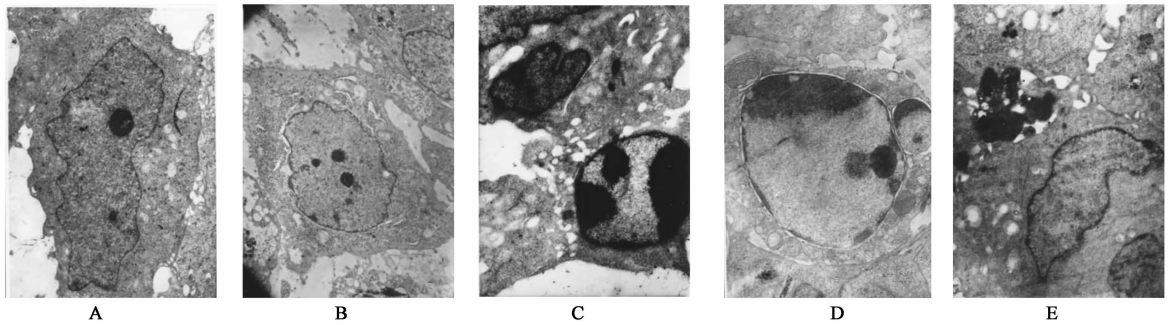
3.2 对荷瘤裸鼠肿瘤生长的影响 连续给药 11 d 后,5-FU 对照组和芹菜素的高、中剂量组的瘤重均小于溶媒对照组,差异有显著性($P < 0.01$, $P < 0.05$)。见表 1。

表 1 芹菜素对裸鼠人胃癌细胞移植瘤生长的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	瘤重 /g	抑瘤率 /%	体重 /g
DMSO 对照	-	1.879 ± 0.163	-	23.75 ± 0.89
5-FU	20	0.958 ± 0.166 ²⁾	49.03	15.87 ± 1.43 ²⁾
芹菜素	600	1.282 ± 0.159 ²⁾	31.78	24.22 ± 1.12
	300	1.397 ± 0.401 ¹⁾	25.66	23.20 ± 2.02
	150	1.477 ± 0.362	21.43	23.42 ± 1.45

注:与 DMSO 对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 对裸鼠肿瘤细胞凋亡的影响 裸鼠瘤组织电镜观察结果如图 1 所示,DMSO 对照组细胞形态相对规则,绒毛丰富,细胞器结构清晰;核形态不规则,核浆比大,核内异染色质丰富。芹菜素各浓度组移植瘤电镜下,可见典型的凋亡改变:细胞变小,结构尚完整,细胞质密度增高,空泡变性,核缩小,深染,细胞核内染色质浓缩并聚集成块,或新月状边集于核膜上,并逐渐形成凋亡小体。5-FU 对照组肿瘤细胞也可见细胞坏死和凋亡的不同过程。



A. DMSO 对照组; B. 5-FU 对照 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; C. 芍药素 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; D. 芍药素 $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; E. 芍药素 $600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组

图 1 裸鼠移植瘤超微结构改变(透射电镜, $\times 5\ 900$)

4 讨论

恶性肿瘤是严重危害人类健康的常见病。据估计,在世界范围内最常见的恶性肿瘤中,胃癌发病率排名第二,死亡率则位居第一^[4-5]。胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,占全部恶性肿瘤的第三位,占消化道肿瘤的首位。目前临床治疗肿瘤还是以传统的手术、放疗、化疗三者相结合的综合治疗。但由于手术在取得显著疗效的同时,许多患者在短期内出现了复发和转移,而放疗和化疗药物的各式毒副作用,常常给患者带来巨大的痛苦。天然中草药具有毒性低,来源广泛等优点,因此抗肿瘤中草药的开发越来越被人们所重视。

裸鼠为一种无毛、无胸腺的小鼠,它缺损 T 淋巴细胞, B 淋巴细胞正常但功能欠正常,因而表现为免疫缺陷。人体肿瘤移植于免疫缺陷动物,能保持其生物学特性^[6],用于研究人体肿瘤对药物的敏感性有很大帮助。裸鼠接种成活的肿瘤对化疗药物的敏感性与临床所见十分相近。本实验通过在体内建立人胃癌裸小鼠移植瘤模型,检测白背叶提取物芍药素体内抗肿瘤作用。结果显示,芍药素高、中剂量组的瘤重与溶媒对照组相比有显著性差异($P < 0.01$, $P < 0.05$),且有剂量依赖性,这一结果表明芍药素在体内有明显的抗肿瘤活性。相较于 5-FU 对照组,受试药物各组裸鼠的饮水、进食正常,均无腹泻、活动异常等不良反应,提示芍药素的毒副作用较小。

细胞凋亡^[7]是由体内外因素触发细胞内预存的死亡程序而导致的细胞死亡过程。细胞的增殖、分化和凋亡,维持着正常组织的生长平衡。如果打

破这种平衡,凋亡受抑,细胞死亡率降低,机体不能重新恢复调节,表现出生长优势最终形成肿瘤。细胞凋亡受到抑制则有可能导致肿瘤的发生,而促进肿瘤细胞的凋亡则可以促使肿瘤的消退。裸鼠瘤体电镜检测结果显示,芍药素各药物组的细胞发生典型的凋亡改变:细胞变小,结构尚完整,细胞质密度增高,空泡变性,核缩小,深染,细胞核内染色质浓缩并聚集成块,或新月状边集于核膜上,提示芍药素具有诱导肿瘤细胞凋亡的作用。

综上所述,白背叶提取物芍药素可能是通过抑制肿瘤增殖、诱导细胞凋亡发挥抗肿瘤作用。

[参考文献]

- [1] 朱华,蔡毅. 中国壮药原色图谱[M]. 南宁:广西民族出版社, 2003: 144.
- [2] 郑作文,伦玉宁,毛健. 白背叶芍药素对人肿瘤细胞增殖的抑制作用[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(12): 3029.
- [3] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 2005: 1762.
- [4] Eaton L. World cancer rates set to double by 2020 [J]. BMJ, 2003, 326: 728.
- [5] 孙秀娣,牧人,周有尚,等. 中国胃癌死亡率 20 年变化情况分析及其发展趋势预测 [J]. 中华肿瘤杂志, 2004, 26(1): 4.
- [6] 曾知真. 用裸鼠模型研究肿瘤生物学行为[J]. 上海第二医科大学学报, 1992, 12(2): 162.
- [7] 金惠铭. 病理生理学[M]. 5版. 北京:人民卫生出版社, 2002: 178.

[责任编辑 聂淑琴]