

山绿茶中 illexgenin A 抗大鼠移植性肝癌的作用

程齐来*, 李洪亮

(赣南医学院药学院, 江西 赣州 341000)

[摘要] 目的:用大鼠 Walker-256 移植性肝癌模型研究 illexgenin A 抗肿瘤作用以及对肿瘤血管内皮生长因子(VEGF)和微血管密度(MVD)的影响,以探讨 illexgenin A 抗肝癌作用机制。方法:32 只大鼠移植性肝癌模型随机分为 4 组:illexgenin A 高、低剂量(100,500 mg·kg⁻¹·d⁻¹)组,5-Fu(5 mg·kg⁻¹,隔日 1 次)组,模型组。于造模成功后第 8 天 illexgenin A 治疗组及 5-Fu 组 ip 给药,模型组分别 ig 生理盐水 10 mL·kg⁻¹ 给药,连续用药 14 d 后停药 24 h,取血处死大鼠,取出瘤块称重,常规瘤体组织形态学观察,分离血清检测肝功能指标天冬氨酸转氨酶(AST),丙氨酸转氨酶(ALT),用免疫组化法检测瘤块中 VEGF 和 MVD 的表达情况;另设正常组饲养大鼠 8 只,不进行造模及给药,供实验结束时作空白对照用。结果:illexgenin A 给药组瘤重明显低于模型组(P<0.01);illexgenin A 给药组及 5-Fu 血管条数目密集程度较模型组比较明显减少,illexgenin A 对血清 AST,ALT 活性升高有明显的拮抗作用,AST 的含量与模型组比较差异显著(P<0.01);实验造模各组 VEGF 及 MVD 的表达水平均明显高于正常组(P<0.01);两者的表达均以模型组最高。结论:illexgenin A 可显著抑制大鼠体内癌细胞生长,对移植性肝癌所造成的肝功能损伤具有明显的保护作用,其作用机制可能与下调 VEGF 和 MVD 的表达水平有关。

[关键词] illexgenin A; 血管内皮生长因子; 微血管密度; 作用机制

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0196-04

[收稿日期] 20110528(002)

[基金项目] 江西省自然科学基金项目(2010GQY0010);江西省教育厅科技计划项目(GJJ11206)

[通讯作者] *程齐来,讲师,硕士研究生,从事生药学相关的教学与科研工作,Tel:18970786158,E-mail:cql_57@126.com

综上离体实验,提示小半夏加茯苓汤及其拆方提取物对家兔离体胃肠运动具有双向调节作用,复方优于拆方,即:小半夏加茯苓汤 > 小半夏汤 > 生姜 > 半夏。对离体胃肠运动的影响可概括为:胃缩肠舒,此结论与胃以降为顺、肠以通为用的理论相吻合,有利于胃肠正常活动。结果显示,该方及拆方除了对正常离体胃肠起作用,还能拮抗氯化乙酰胆碱引起的胃肠平滑肌强直痉挛,并且对阿托品引起的十二指肠平滑肌舒缩活动减弱具有协同作用,而对阿托品作用后的胃底和胃窦平滑肌有兴奋作用,揭示其对作用机制除了与 M 胆碱受体相关外,可能还与影响胃肠运动功能的其他因素有关,具体机制尚有待进一步深入研究。

[参考文献]

[1] 何前松,冯泳,时京珍,等.小半夏加茯苓颗粒抗顺铂所致家鸽呕吐的药效学观察[J].辽宁中医药大学学报,2009,11(4):209.
[2] 冯泳,何前松,时京珍,等.小半夏加茯苓汤的研究概

况[J].江苏中医药,2008,40(2):84.

[3] 徐叔云,陈修,卞如濂.药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2001:1834.
[4] 郭延红,杜薇,王云峰,等.小半夏加茯苓汤复方及拆方的总生物碱含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(4):57.
[5] 冯果,刘文,张永萍,等.HPLC测定复方止呕颗粒剂中6-姜酚的含量[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(11):68.
[6] 杨长福,冯泳,何前松.小半夏加茯苓方含药血清抑制HepG2细胞增殖及促进凋亡[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(8):168.
[7] 冯泳,何前松,刘文,等.小半夏加茯苓颗粒对化疗呕吐家鸽胃动素的影响[J].辽宁中医药大学学报,2009,11(1):175.
[8] 冯泳,何前松,孟庆华,等.小半夏加茯苓颗粒对化疗呕吐家鸽血清胃泌素的影响[J].陕西中医学院学报,2010,33(6):70.

[责任编辑 聂淑琴]

Inhibition Action of Ilexgenin A from *Ilex hainanensis* on Transplanted Hepatoma in Rats

CHENG Qi-lai*, LI Hong-liang

(School of Pharmacy, Gannan Medical College, Ganzhou 341000, China)

[Abstract] Objective: To study the effect of ilexgenin A on vascular endothelial growth factor (VEGF) and microvessel density (MVD) of tumor in Walker-256 rat model to explore the mechanism. **Method:** Thirty two Walker-256 rats were randomly divided into 4 groups, and treated with the high dose of ilexgenin A (HD group), low dose of ilexgenin A, 5-Fu (positive group), and normal saline (NS group), respectively. After 8 days of modeling, corresponding drugs were administered by intraperitoneal injection for 14 days. Then, blood rats were executed to collect blood and remove tumors which were weighted, the morphological observation was performed, aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) levels were assayed, and the expression of VEGF and MVD in tumor was tested by immunohistochemical method. **Result:** In treatment group, the weight of tumor obviously decreased than that in model. In treatment group and 5-Fu, the vascular article number intensive degree, compared with model group, was obviously reduced, and ilexgenin A inhibited the elevated level of AST and ALT, the inhibition on AST level was more obvious ($P < 0.01$), the expression of VEGF and MVD levels was significantly decreased compared with model group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Ilexgenin A can significantly inhibit growth of tumor, the mechanism may be related to down-regulating the expression of VEGF and MVD.

[Key words] ilexgenin A; vascular endothelial growth factor; microvessel density; mechanism of action

山绿茶为冬青科植物海南冬青 *Ilex hainanensis* Merr. 的干燥叶经加工炮制而成,具有清热解毒,消肿止痛,活血通脉的功效。主要用于降血压、降血脂、降胆固醇及冠心病、脑血管意外所致的偏瘫,以及风热感冒、肺热咳嗽、咽喉水肿、扁桃体炎、痢疾等病症^[1]。山绿茶为广西少数民族民间中草药,使用历史悠久,目前主要作为生产降压制剂的原料药材使用。山绿茶主要化学成分为黄酮类、三萜苷类、三萜酸类及香豆素类等^[2]。本课题组通过前期的研究,已从山绿茶中分离鉴定出多个三萜类化合物,其中的 ilexgenin A (IA) 又名 $3\beta, 19\alpha$ -羟基乌苏-12-烯-24, 28-二羧酸,属于乌苏烷型三萜,而现代研究表明一些三萜和三萜皂苷特别是具有羧基的该类化合物具有抗肿瘤活性^[3],乌苏烷型三萜大多是乌苏酸的衍生物。本课题组针对 ilexgenin A 是否具有抗移植性肝癌作用及其抗肝癌作用的机制进行研究。

1 材料

1.1 动物 SD 雄性大鼠 40 只,体重(200 ± 20)g,取 32 只用于制作大鼠移植性肝癌模型;断奶 Wistar 雄性大鼠 4 只,体重 60 ~ 80 g,用于癌细胞增殖传代,购于江西中医学院实验动物中心(动物生产合格证号 JZDW2008-0281)。

1.2 瘤株 种鼠购于武汉大学中国典型培养物保藏

中心,为 Walker-256 腹水型 Wistar 大鼠,重约 80 g。

1.3 药物 ilexgenin A (IA,批号 091001,含量 100%,HPLC 法)自制;氟尿嘧啶(5-Fu)注射液(0.25 g/10 mL)由上海旭东海普药业公司生产。

1.4 试剂 即用型二步法免疫组化检测试剂盒,产品编号 PV-6002;鼠抗人 VEGF 单克隆抗体,产品编号 ZM-0264;鼠抗人 CD-34 单克隆抗体,产品编号 ZM-0045,均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.5 仪器 LEICA-RM2135 石蜡切片机(德国产)、ZMN-6802 漂烘处理仪、ZMN-7803 全自动组织包埋机、ZMN-9802 全自动组织脱水机、Olympus 显微镜等。

2 方法

2.1 造模 SD 雄性大鼠 40 只,按比随机留 8 只为正常饲养组,其余 32 只进行造模。参照文献方法^[4]用 1 mL 注射器吸取 Walker-256 荷瘤鼠腹水,注入幼年 Wistar 大鼠皮下,长出皮下实体瘤,取瘤体边缘鱼肉状、质地稍韧的瘤组织切成约 2 mm 小块,SD 大鼠麻醉后打开腹腔,暴露肝脏,在肝左外叶表面切一长 2 mm 的切口,将备用瘤块完全埋入,用可吸凝胶海绵填塞压迫,防止瘤块脱出及出血,肝叶送入腹腔,缝合腹壁。大鼠接种肿瘤 7 d 后肝脏中形成直径 8 ~ 10 mm 大小的实体瘤。

2.2 分组及给药 模型动物按比例随机分为 5 组, IA 高、低剂量组, 5-Fu 组(阳性对照组), 模型组, 每组 8 只。正常组 8 只, 不进行造模及给药, 正常饲养供实验结束时取肝脏组织作空白对照用。于造模后第 8 天开始给药, IA 高、低剂量组分别以 100, 50 mg·kg⁻¹ ip 给药, 每日 1 次, 模型组以生理盐水 10 mL·kg⁻¹ ig, 每日给药 1 次, 连续给药 14 d, 5-Fu 组以 5-Fu 注射液 5 mg·kg⁻¹ ip 给药, 隔日 1 次, 共给 7 次。

2.3 肝肾功能检测及瘤体病理组织学观察 第 14 天给药后 24 h, 心脏取血检测肝功能指标 AST, ALT, 处死所有动物, 给药组、模型组取出瘤块称重, 计算肿瘤抑制率。

$$\text{肿瘤抑制率} = (1 - \text{实验组平均瘤重} / \text{对照组平均瘤重}) \times 100\%$$

正常组取肝组织, 以生理盐水冲洗后, 10% 中性福尔马林液固定, 石蜡包埋, 进行连续石蜡切片, 厚度 4 μm, 常规病理组织学观察。

2.4 免疫组化染色^[5] 病理切片观察后, 取瘤体血管周围组织, 进行连续石蜡切片, 厚度 4 μm 分别进行 VEGF 及 CD-34 单抗的免疫组化染色, 具体操作按试剂盒说明书进行。主要染色步骤如下: 切片脱蜡至无水, 3% H₂O₂ 孵育消除内源性过氧化物酶的活性, 高压抗原修复, 非免疫性动物血清孵育, 滴加一抗, 滴加山羊抗小鼠 IgG 抗体-HRP 多聚体, 以上各步骤间均以 PBS 冲洗 3 次。DAB 显色、苏木素精复染、乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 显微镜观察。

2.5 免疫组化结果判定^[5] VEGF 结果判定标准:

选择切片中染色反应最强的区域。在 400 倍显微镜下, 每例计数 10 个视野, 以细胞浆内出现棕黄色颗粒为阳性, 染色结果综合染色程度及阳性细胞百分比两方面进行综合计分, 以二者积分和记分。染色程度计分为: 细胞无染色为 0 分, 染色较弱但明显高于背景者为 1 分, 染色清晰计为 2 分, 染色强计为 3 分。阳性细胞百分比计分: 阳性细胞数: ≤ 10% (0 分), 10% ~ ≤ 25% (1 分), 25% ~ ≤ 50% (2 分), > 50% (3 分)。MVD 计数按文献报道^[4]的方法进行: 先用 40 倍光镜扫视整个切片, 寻找血管高密度区, 即“热点”, 再在 200 倍光镜下计数被 CD-34 抗体染成棕黄色的血管环(条)数目, 每张片记数 3 个视野区, 取其平均数, 同一组大鼠肿瘤的平均 MVD 作为该组的 MVD。

2.6 统计学处理 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 14.0 统计软件进行单因素方差分析和 *q* 检验。P < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 肝肾功能检测及瘤体病理组织学观察 IA 给药组瘤重明显低于模型组, 差异显著(P < 0.01), IA 给药组与 5-Fu 组比较作用不及 5-Fu。实验各组大鼠瘤体病理组织学观察显示 IA 给药组及 5-Fu 血管条数目密集程度较模型组比较明显减少, 说明 IA 显著抑制了大鼠体内癌细胞的生长。实验各组大鼠肝功能指标 AST, ALT 检测结果来看, IA 对血清中 AST, ALT 活性升高有明显的拮抗作用, IA 给药组血清中 AST 的含量与模型组比较差异显著(P < 0.01)。见表 1 及图 1。

表 1 各组大鼠瘤体质量及肝肾功能指标的比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 / mg·kg ⁻¹	瘤体质量 / mg	抑瘤率 / %	AST / U·L ⁻¹	ALT / U·L ⁻¹
IA	100	1 211.1 ± 9.54 ^{1,2)}	59.42	121.84 ± 22.15 ²⁾	74.35 ± 2.24
	50	1 865.4 ± 23.54 ^{1,2)}	37.50	99.58 ± 32.05 ²⁾	65.14 ± 3.54
5-Fu	5	897.9 ± 26.33 ^{1,2)}	69.91	165.25 ± 18.24 ²⁾	70.24 ± 20.15
模型	-	2 984.5 ± 16.53 ¹⁾	-	221.88 ± 15.34 ¹⁾	86.15 ± 14.32
正常对照	-	0	-	74.65 ± 0.65	49.37 ± 7.05

注: 与正常组比较¹⁾ P < 0.01; 与模型组比较²⁾ P < 0.01。

3.2 各组瘤体 VEGF 及 MVD 免疫组化表达 造模各组 VEGF 及 MVD 表达的水平均高于正常组, 差异有非常显著性意义(P < 0.01); 两者的表达均以模型组最高。IA 高、低剂量组、5-Fu 与模型组比较, 差异有非常显著性意义(P < 0.01)。见表 2。

4 讨论

肿瘤是严重威胁人类健康的重大疾病之一。目前临床用于治疗肿瘤的化学类药物大多价格昂贵、

毒副作用大且易产生耐药, 因此, 从天然药物中获取有效成分并以此为先导化合物是抗肿瘤药物研究和开发的重要途径之一。山绿茶为冬青科植物海南冬青的干燥叶, 其主要化学成分有三萜类、黄酮类等, 现代研究表明一些三萜和三萜皂苷特别是具有羧基的该类化合物具有抗肿瘤活性, IA 属于这一类型的乌苏烷型三萜。本实验结果显示, 和正常组比较, 造模各组 VEGF 及 MVD 的表达明显增加, 以模型组最

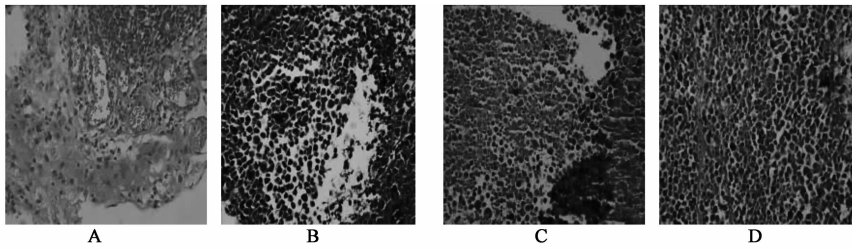
A. IA 100 mg·kg⁻¹组; B. IA 50 mg·kg⁻¹组; C. 5-Fu 5 mg·kg⁻¹组; D. 模型组

图1 实验各组大鼠瘤体组织形态学观察(HE×40)

表2 实验各组大鼠 VEGF 及 MVD 表达水平的比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	VEGF/分	MVD/条
IA	100	2.01 ± 0.18 ^{1,2,3)}	17.43 ± 2.21 ^{1,2,3)}
	50	2.61 ± 0.24 ^{1,2)}	21.82 ± 1.79 ^{1,2)}
5-Fu	5	1.26 ± 0.05 ^{1,2)}	16.47 ± 1.56 ^{1,2)}
模型	-	5.31 ± 1.20 ¹⁾	25.68 ± 1.32 ¹⁾
正常对照	-	0.87 ± 0.05	12.93 ± 0.37

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与 IA50 mg·kg⁻¹组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

高,与模型比较,IA 高、低剂量组和 5-Fu 组均可明显抑制肝癌细胞中 VEGF 及 MVD 的表达;在降低 VEGF 及 MVD 的表达作用上,IA 高剂量组和 5-Fu 组的作用相似,IA 高剂量组的作用优于 IA 低剂量组。IA 给药组瘤重明显低于模型组,与模型组比较差异显著,病理组织学观察显示 IA 给药组及 5-Fu 血管条数目密集程度较模型组比较明显减少,显著抑制了小鼠体内癌细胞的生长。IA 对血清中 AST、ALT 活性升高有明显的拮抗作用,IA 给药组血清中 AST 的含量与模型比较差异显著,这说明 IA 对移植性肝癌所造成的肝功能损伤具有明显的保护作用。

血管生成在实体肿瘤的生长、发展、转移等方面至关重要,血管生成受血管生成促进因子和血管生成抑制因子的共同调控^[5]。VEGF 被认为是作用最强的血管生成促进因子,它主要通过自分泌或旁分泌与内皮细胞上的相应受体(VEGFR)结合,促进内皮细胞分化、增殖、迁移,增加毛细血管通透性,刺激肿瘤新生血管生成。肝癌是典型的富有血管的恶性实体肿瘤,VEGF 在其生长及转移过程中起重要作用,研究表明在肝癌组织中常表现为 VEGF 的高表达,且癌组织明显高于癌周组织,VEGF 的过量表达与肝癌病人的预后密切相关。因此在基因水平抑制

VEGF 表达,阻断 VEGF 诱发的内皮细胞信号转导,可以抑制肿瘤血管生成^[6]。MVD 直接量化反映肿瘤血管生成的程度,不仅与肿瘤细胞的营养和供氧有关,而且反映了肿瘤的浸润和转移能力,MVD 高的肿瘤更易发生转移或潜在转移。国内外研究表明,运用抗血管生成因子如内皮抑素等可有效地抑制内皮细胞增殖,降低肿瘤组织 MVD,从而达到抑制肿瘤细胞的生长、侵袭和转移的目的^[7]。从而提示 IA 具有一定的抑制 Walker-256 移植性肝癌血管生成的作用,其抗肿瘤血管生成的机制可能与降低 VEGF 的表达有关,以高剂量组作用更为明显。

[参考文献]

- [1] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准 1990 年版 [M]. 南宁:广西科技出版社,1992:137.
- [2] 程齐来,李洪亮. 山绿茶化学成分的研究[J]. 光谱实验室,2010,27(1):131.
- [3] 陈会敏,张静. 熊果酸诱导胃癌细胞 BGC-823 凋亡机制的研究[J]. 武汉大学学报:医学版,2006,27(3):299.
- [4] 王锦波,吕毅,潘承恩,等. walker-256 大鼠肝癌模型的制作及传代保存[J]. 肝胆外科杂志,1995,3(2):121.
- [5] Evans J D, Stark A, Johnson C D, et al. A phase II trial of marimastatin advanced pancreatic cancer[J]. Br J Cancer, 2001, 85 (12): 1865.
- [6] Sherr C J, Roberts J M. CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G12phase progression [J]. Genes Dev, 1999, 13 (12): 1501.
- [7] Wu J, Grunstein M. 25 years after the nucleosome model: chromatin modifications[J]. Trends Biochem Sci, 2000, 25 (12): 619.

[责任编辑 聂淑琴]