

白花蛇舌草和半枝莲配伍微粉对移植性小鼠肝癌肿瘤组织 Bcl-2, Bax 表达的影响

刘瑾*

(山东省中医药研究院, 济南 250014)

[摘要] 目的:观察白花蛇舌草和半枝莲微粉对移植性小鼠肝癌 H22 生长抑制作用及其对肿瘤组织中 Bcl-2 和 Bax 表达的影响。方法:建立移植性 H22 动物模型,并将模型动物随机分为模型对照、软坚口服液 $7.8 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、白花蛇舌草和半枝莲普通粉 $15.6 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、白花蛇舌草和半枝莲微粉高、中、低剂量 ($15.6, 11.7, 7.8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 6 组,给药 10 d 后处死模型小鼠分离肿瘤,检测肿瘤大小、称质量,计算肿瘤抑制率,并将肿瘤组织切片,免疫组化法检测 Bcl-2 和 Bax 基因。结果:白花蛇舌草和半枝莲微粉高剂量组肿瘤抑制率达 47.55%,与软坚口服液结果相近;白花蛇舌草和半枝莲微粉高、中、低剂量可降低肿瘤组织中 Bcl-2 蛋白基因表达,高、中剂量可升高 Bax 蛋白基因表达;与白花蛇舌草和半枝莲普通粉组相比,白花蛇舌草和半枝莲微粉高剂量组 Bcl-2 蛋白基因表达明显降低,Bax 蛋白基因表达明显升高。结论:白花蛇舌草和半枝莲微粉可抑制 H22 瘤体生长,且下调 Bcl-2 蛋白表达,上调 Bax 蛋白表达。

[关键词] 白花蛇舌草和半枝莲;微粉;H22 肝癌细胞;Bcl-2;Bax

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)21-0227-04

Effect of Combined *Hedyotis diffusa* and *Scutellariae Barbatae* Herba Superfine Powder on Expressions of Bcl-2 and Bax Proteins in Tumor Tissues of Transplanted Hepatocarcinoma in Mice

LIU Jin*

(Shandong Academy of Chinese Medicine, Jinan 250014, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of combined *Oldenlandia diffusa* and *Scutellariae Barbatae* Herba superfine powder on tumor growth of transplanted hepatocarcinoma in mice and expressions of Bcl-2 and Bax proteins in tumor tissues. **Method:** Sixty healthy Kunming mice, transplanted by H22 hepatocarcinoma cells, were divided into 6 groups, including model group, Ruanjian oral liquid group, combined *O. diffusa* and *Scutellariae Barbatae* Herba common grinding powder group and three groups of combined *O. diffusa* and *Scutellariae Barbatae* Herba superfine powder in high dose, medium dose and low dose. The mice were executed after ten days of treatment and tumor tissues were excised. The size of tumor tissues were measured and tumor inhibition rate was calculated. And expression of Bcl-2 and Bax was detected by using immunohistochemical method. **Result:** The tumor inhibition rate of Combined *O. diffusa* and *Scutellariae Barbatae* Herba superfine powder group in high dose was 47.55%, which was nearly same as Ruanjian Oral Liquid group. Compared with the model group, expression of Bcl-2 protein was decreased in the groups of Combined *O. diffusa* and *Scutellariae Barbatae* Herba superfine powder in high, medium and low dose; expression of Bax protein was increased in the groups of combined *O. diffusa* and *Scutellariae Barbatae* Herba superfine powder in high and medium dose. Compared with common grinding powder group, expression of Bcl-2 protein was increased and the expression of Bax Protein was decreased in the high group of

[收稿日期] 20110324(011)

[通讯作者] *刘瑾,副研究员,硕士,从事中药药理学研究, Tel:0531-82949836, E-mail:lj56@yahoo.cn

Combined *O. diffusa* and *Scutellariae Barbatae* Herba superfine powder. **Conclusion:** Combined *O. diffusa* and *Scutellariae Barbatae* Herba superfine powder can inhibit the growth of tumor of H22, reduce the expression of Bcl-2 protein and increase the expression of Bax, which is worth further studying in antitumor action.

[**Key words**] combined *O. diffusa* and *Scutellariae Barbatae* Herba; superfine powder; H22 hepatocarcinoma cell; Bcl-2; Bax

白花蛇舌草和半枝莲分别为茜草科植物白花蛇舌草 *Oldenlandia diffusa* (Willd.) Roxb. 的全草和唇形科植物半枝莲 *Scutellaria barbata* D. Don 的全草, 均具有扶正祛毒及清热解毒抗癌之功。在临床应用中, 常以药对形式出现在各经典名方中, 对肿瘤、炎症等疗效确切。我们的前期研究表明, 白花蛇舌草和半枝莲超微粉 1:1 配伍应用能抑制移植性小鼠肝癌 H22 的生长。本实验以肝癌 H22 荷瘤小鼠为模型, 观察白花蛇舌草和半枝莲微粉对瘤体组织细胞内凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响, 进一步探讨白花蛇舌草和半枝莲微粉抗肿瘤作用机制。

1 材料

1.1 动物与细胞株 SPF 级昆明种小鼠, 雄性, 体重 18 ~ 22 g, 由山东省医学科学院实验动物中心提供, 许可证号 SCXK (鲁) 20030004, 合格证号: 0006203。H22 细胞株, 由山东省医学科学院药物研究所药理室提供。

1.2 药物与试剂 白花蛇舌草 *Oldenlandia diffusa* (Willd.) Roxb. 和半枝莲 *Scutellaria barbata* D. Don 微粉, 经山东省中医药研究院中药资源室林惠彬教授鉴定。微粉制备方法如下: 将分拣、精选后的白花蛇舌草和半枝莲饮片以 1:1 配伍, 放在超声清洗器中, 以水为清洗介质, 清洗 3 ~ 5 min, 清洗干净。然后烘 (晾) 干至水分约为 6%, 粉碎成细粉 (过 80 目), 置于真空干燥炉中, 持续不断抽真空, 真空度为 0.094 MPa, 调节温度为 60 ℃, 干燥 1 h。收集中药细粉, 留出适量作为普通粉组。将剩余干燥的中药细粉加入贝利微粉机料斗中粉碎 1 h 左右, 收集微粉 (300 目筛通过率 ≥ 95%), 出料温度 35 ~ 40 ℃。对白花蛇舌草、半枝莲微粉进行粒度测定, 将合格的白花蛇舌草、半枝莲微粉用于进一步实验。软坚口服液, 南京东方制药有限公司生产; 0.9% 氯化钠注射液, 山东鲁抗辰欣药业有限公司生产; 碘伏, 山东德州安捷高科消毒制品有限公司生产; 无水乙醇, 天津市化学试剂一厂生产; 甲醛溶液, 烟台三和化学试剂有限公司生产; 抗小鼠 Bcl-2, Bax 单克隆抗体免疫组

化试剂盒, 武汉博士德生物工程有限公司生产。

1.3 仪器 LC-350 型超声波中药处理机, 济宁市中区鲁超仪器厂; DHG-9146A 型鼓风干燥箱, 上海贺德实验设备有限公司; FW-177 型中草药粉碎机, 天津市泰斯特仪器有限公司; BFM-6BI 型贝利微粉机, 济南倍力粉技术工程有限公司; M-35FA 显微镜, 日本 Nikon 公司; GB303 型电子天平, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司; YB-6D 型生物组织石蜡包埋机、TY-6B 型生物组织摊烤片机、LEITZ-40420 型生物组织切片机、ZT-12G 型生物组织自动脱水机, 湖北省孝感市亚光医用电子技术研究所。

2 方法

2.1 H22 荷瘤小鼠模型的建立 选择腹腔接种 7 ~ 9 d 生长良好的 H22 肝癌小鼠, 无菌抽取腹水, 以生理盐水稀释, 调整细胞数为 1×10^7 /mL, 0.2% 台盼蓝染色, 计算活细胞数 > 95%。每只小鼠右前肢腋窝皮下接种瘤液 0.2 mL^[1]。

2.2 分组及给药 小鼠接种 24 h 后, 随机分为模型对照组、软坚口服液组、白花蛇舌草和半枝莲普通粉组、白花蛇舌草和半枝莲微粉高、中、低剂量组, 每组 10 只。模型对照组 ig 给予相应剂量的生理盐水, 每日 1 次。连续给药 10 d。

2.3 一般情况观察及指标检测 实验期间观察小鼠体重、活动度等一般情况。于末次给药 24 h 后, 处死动物, 完整剥离瘤块称重并记录, 计算抑瘤率。每组新鲜肿瘤组织切取约总体积的 3/4, 以 10% 中性福尔马林固定, 常规石蜡包埋, 5 μm 连续切片, 贴于经 APES 防脱片胶处理的载玻片上备染, 免疫组织化学法检测肿瘤组织 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达: 免疫组化染色采用 SP 法, 所有标本均在同一条件下进行染色, 操作步骤严格按试剂盒说明书进行。Bcl-2 (或 Bax) 以胞质染棕褐色为阳性结果, 切片内阳性细胞率 < 20% 为阴性显色, > 20% 为阳性显色。阳性显色按细胞着色的强度和范围分: 20% ~ 25% 为弱阳性 (+), 26% ~ 50% 为中等阳性 (++) , 51% ~ 75% 为强阳性 (+++) ^[2]。以 Ridit 分析进行统计。

2.4 统计学处理 所有数据用 SPSS 13.0 软件包进行处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示;对所得计数资料进行方差分析、*t* 检验,分类资料进行 Ridit 分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 白花蛇舌草和半枝莲微粉对小鼠 H22 移植性肿瘤的抑制作用 与模型对照组比较,白花蛇舌草和半枝莲微粉各组小鼠平均瘤重均显著性降低 ($P < 0.001$);与白花蛇舌草和半枝莲普通粉组比较,微粉高剂量组小鼠平均瘤重明显降低 ($P < 0.05$)。以上结果表明白花蛇舌草和半枝莲微粉具有较好的抗肿瘤活性,且微粉较同剂量普通粉作用显著。见表 1。

3.2 白花蛇舌草和半枝莲微粉对荷瘤 H22 小鼠肿瘤组织 Bcl-2 表达的影响 与模型对照组相比,白花蛇舌草和半枝莲微粉 3 个剂量组小鼠肿瘤组织中 Bcl-2 蛋白的阳性表达显著降低;与白花蛇舌草和半枝莲普通粉组相比,白花蛇舌草和半枝莲微粉高剂量组 Bcl-2 蛋白阳性表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。提示白花蛇舌草和半枝莲微粉配伍应用可抑制肿瘤组织中 Bcl-2 蛋白表达,且微粉较同剂量普通粉作用显著。见表 2。

表 1 白花蛇舌草和半枝莲微粉对小鼠 H22 移植性肿瘤的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	平均瘤重/g	抑瘤率 /%
模型对照	-	2.00 ± 0.46	-
软坚口服液 ⁴⁾	7.8	1.08 ± 0.39 ²⁾	45.97
白花蛇舌草和半枝莲普通粉	15.6	1.29 ± 0.40 ¹⁾	35.87
白花蛇舌草和半枝莲微粉	15.6	1.05 ± 0.33 ^{2,3)}	47.55
	11.7	1.10 ± 0.43 ²⁾	45.12
	7.8	1.15 ± 0.36 ²⁾	42.78

注:与模型对照组比较¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.001$;与白花蛇舌草和半枝莲普通粉组比较³⁾ $P < 0.05$; ⁴⁾ 软坚口服液剂量为 mL·kg⁻¹。

3.3 白花蛇舌草和半枝莲微粉对荷瘤 H22 小鼠肿瘤组织 Bax 表达的影响 白花蛇舌草和半枝莲微粉中、高剂量组小鼠肿瘤组织中 Bax 蛋白阳性表达水平较模型对照组显著增高;与白花蛇舌草和半枝莲普通粉组相比,白花蛇舌草和半枝莲微粉高剂量组 Bax 蛋白阳性表达水平显著增高 ($P < 0.01$)。提示白花蛇舌草和半枝莲微粉配伍有上调肿瘤组织 Bax 蛋白表达的作用,且微粉较同剂量普通粉作用显著。见表 3。

表 2 白花蛇舌草和半枝莲微粉对肿瘤组织 Bcl-2 表达的影响 ($n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	-	+	++	+++	R1	R2	R3
模型对照	-	1	1	2	6	0.5	0.80 ³⁾	0.74 ⁵⁾
软坚口服液 ⁶⁾	7.8	2	3	5	0	0.21 ²⁾	0.50	0.44
白花蛇舌草和半枝莲普通粉	15.6	2	2	5	1	0.26 ²⁾	0.57	0.50
白花蛇舌草和半枝莲微粉	15.6	3	5	2	0	0.15 ²⁾	0.36	0.31 ⁴⁾
	11.7	3	3	3	1	0.22 ²⁾	0.46	0.41
	7.8	2	4	1	3	0.31 ¹⁾	0.54	0.49

注:R1:与模型对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;R2:与软坚口服液组比较³⁾ $P < 0.01$;R3:与白花蛇舌草和半枝莲普通粉组比较⁴⁾ $P < 0.05$, ⁵⁾ $P < 0.01$; ⁶⁾ 软坚口服液剂量为 mL·kg⁻¹。

表 3 白花蛇舌草和半枝莲微粉对肿瘤组织 Bax 表达的影响 ($n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	-	+	++	+++	R1	R2	R3
模型对照	-	5	3	2	0	0.5	0.20 ⁴⁾	0.40
软坚口服液 ⁷⁾	7.8	1	2	5	2	0.81 ²⁾	0.50	0.69 ⁵⁾
白花蛇舌草和半枝莲普通粉	15.6	4	2	3	1	0.60	0.32 ³⁾	0.50
白花蛇舌草和半枝莲微粉	15.6	0	2	4	4	0.89 ²⁾	0.62	0.78 ⁶⁾
	11.7	2	3	4	1	0.71 ¹⁾	0.38	0.59
	7.8	3	2	5	0	0.66	0.33	0.54

注:R1:与模型对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;R2:与软坚口服液组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$;R3:与白花蛇舌草和半枝莲普通粉组比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$; ⁷⁾ 软坚口服液剂量为 mL·kg⁻¹。

4 讨论

4.1 白花蛇舌草和半枝莲配伍应用治疗肝癌 在治疗肝癌方面,临床上多以白花蛇舌草和半枝莲配伍组成复方用于多种肿瘤的治疗。潮州和汕头等地居民则用白花蛇舌草加半枝莲煲水饮,有抗癌、消炎解毒功效。潘敏求等对建国以来中医药治疗肝癌的主要临床文献进行了调研总共收集 234 个方,共用药 280 余味,其中用药频次在 50 次以上者 25 味,归纳结果表明:白花蛇舌草、半枝莲各使用 86 次,频率 36.8%^[3]。(日)游雪秋探讨了白花蛇舌草和半枝莲对癌细胞株以及自发性肝肿瘤的抗癌体外及活体内抗癌作用,结果表明:两者同用能显著抑制癌细胞增殖并延长荷瘤动物存活期^[4]。张赛丹等采用超声提取白花蛇舌草:半枝莲质量比 3:2 的多糖成分,培养人肝癌细胞系 7402 细胞株进行体外抑瘤实验,经测定其多糖有一定的抗肿瘤活性^[5]。白花蛇舌草和半枝莲在复方中配伍用于临床的研究较多,但对两者的配伍剂量及抗肿瘤作用机理的研究极少,我们前期研究表明白花蛇舌草和半枝莲配伍在抗 H22 肝癌方面的应用中,较单用其中任一味药效果更好,1:1 配伍后的药效比任一味药简单的剂量加倍效果更好,配伍应用更有价值。

4.2 抑制凋亡基因 Bcl-2 及诱导凋亡基因 Bax 近年来的研究表明,凋亡在肿瘤的发生发展中起着不可替代的作用^[6-7],肿瘤的治疗效果与肿瘤细胞的凋亡密切相关。Bcl-2 家族是目前最受重视的与细胞凋亡密切相关的一类基因,其中包括凋亡抑制基因 Bcl-2 以及凋亡促进基因 Bax^[8]。一般认为,Bax 和 Bcl-2 通过形成同源或异源二聚体来调节细胞凋亡。当 Bax 形成同源二聚体时诱导细胞凋亡;Bax 与 Bcl-2 形成异源二聚体时则实现了 Bcl-2 抑制细胞凋亡的功能。1997 年 Koshida 等利用免疫组织化学和临床病理学方法研究胃癌细胞的凋亡,指出 Bcl-2 高表达,凋亡指数低,Bcl-2 低表达或不表达,则凋亡指数高;而在 Bax 则情况相反,Bax 高表达时,则凋亡指数高,Bax 低表达或不表达时凋亡指数低。Bcl-2 和 Bax 对细胞凋亡的调控,不仅取决于自身表达水平的高低,还与两者之间的比例有关。Bcl-2 的高表达及 Bax 的低表达,可导致 Bcl-2/Bax 比值升高,细胞

凋亡的敏感性降低,细胞凋亡减少,为肿瘤细胞的快速增长,减慢细胞的丢失提供优势条件^[9]。

本实验结果表明,与模型对照组比较,白花蛇舌草和半枝莲微粉配伍组作用于 H22 肿瘤组织后,Bcl-2 基因表达减弱,Bax 基因表达增强,说明,白花蛇舌草和半枝莲微粉配伍组可下调 Bcl-2,上调 Bax 表达,证明白花蛇舌草和半枝莲微粉配伍能够诱导 H22 肿瘤组织细胞凋亡。

4.3 研究的不足之处 本研究实验设计为在小鼠接种 24 h 后随机分组,很难保证动物在成瘤方面的随机性分组,对结果的评价有一定影响;另外阳性对照药的选择存在一定不足,并非公认的抑瘤药物,且本品的抑瘤率与之相仿,该实验结果的治疗学上的意义尚存在疑问。因此,为更加客观的评价本品抗肝癌作用及其机理,尚需完善实验方案,选择公认抑瘤药物进一步进行评价研究。

[参考文献]

- [1] 李坤星,朱学萍,张海林,等. 桑黄灵芝胶囊对小鼠肉瘤 S₁₈₀ 及肝癌 H22 移植性肿瘤生长的抑制作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(7):83.
- [2] 郭勇义. 温阳散郁法对小鼠 H22 肝癌细胞凋亡及增殖关系的实验研究[J]. 中医研究,2008,21(9):11.
- [3] 潘敏求,曾普华,潘博. 中医药治疗中晚期原发性肝癌的规律探析[J]. 中医学刊,2003,21(10):1641.
- [4] 游雪秋. 半枝莲与白花蛇舌草对癌细胞株以及自发性肝肿瘤的抗癌作用[J]. 和汉医药学杂志,2000,17(4):165.
- [5] 张赛丹,方岩雄,陈敏敏. 几种传统中药中多糖的提取及抗肿瘤活性研究[J]. 中药材,2007,30(2):179.
- [6] 应小平,陈捷,史迎丽,等. 山仙颗粒对小鼠 S₁₈₀ 肉瘤的抑瘤作用及 Bcl-2 基因表达影响的实验研究[J]. 陕西中医,2006,27(11):1441.
- [7] 王彦刘. 复方抗癌冲剂抑制小鼠 S₁₈₀ 肉瘤生长的机理研究[J]. 中国微循环,2002,6(6):335.
- [8] 李玉林. 病理学[M]. 北京:人民卫生出版社,2004:20.
- [9] 季红斌,翟琦巍,郑仲承. Bcl-2 基因的转录调控[J]. 生物化学与生物物理学报,2000,32(2):95.

[责任编辑 聂淑琴]