

## 黄芪注射液对 H22 荷瘤小鼠瘤组织 Bax 及 Bcl-2 蛋白表达的影响

李连琨<sup>1</sup>, 黄云峰<sup>1</sup>, 谢早红<sup>1</sup>, 陈果<sup>1</sup>, 王滨容<sup>1</sup>, 匡文娟<sup>2</sup>, 万莉红<sup>2\*</sup>

(1. 中国人民武装警察部队四川总队成都医院, 成都 610041;

2. 四川大学华西基础与法医学院药理教研室, 成都 610041)

**[摘要]** 目的:研究黄芪注射液对 H22 荷瘤小鼠瘤组织 Bax 及 Bcl-2 蛋白表达的影响。方法:建立 H22 荷瘤小鼠模型进行体内抗肿瘤试验,将 50 只荷瘤小鼠随机分为空白对照组(模型组)、环磷酰胺组(CTX 组)、黄芪注射液(高、中、低剂量)组,连续 ip 给药 10 d,观察肿瘤生长情况以及小鼠一般情况,绘制肿瘤生长曲线。10 d 后处死小鼠,剥取瘤组织称重,计算抑瘤率;采用流式细胞术测定药物作用后肿瘤细胞凋亡率;免疫组化方法检测肿瘤组织 Bax 及 Bcl-2 的蛋白表达。结果:小鼠移植瘤 H22 试验结果显示,在 12,8,4 g·kg<sup>-1</sup> 的剂量下黄芪注射液的抑瘤率分别为 52.36%,33.68%,17.28%。流式细胞术及免疫组化结果表明黄芪注射液各剂量组均可明显增加肿瘤细胞凋亡率;增强 Bax 蛋白表达,降低 Bcl-2 蛋白表达,且 Bax/Bcl-2 明显增高( $P < 0.05$ )。结论:黄芪注射液通过促进 Bax 蛋白表达、抑制 Bcl-2 蛋白表达来诱导 H22 肿瘤细胞凋亡,进而发挥抑瘤效应。

**[关键词]** 黄芪注射液;抗肿瘤;H22 荷瘤小鼠;Bax;Bcl-2

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)17-0188-03

## Effects of Astragalus Injection on the Protein Expression of Bax and Bcl-2 in H22 Tumor Cells Bearing Mice

LI Lian-kun<sup>1</sup>, HUANG Yun-feng<sup>1</sup>, XIE Han-hong<sup>1</sup>, CHEN Guo<sup>1</sup>,

WANG Bin-rong<sup>1</sup>, KUANG Wen-juan<sup>2</sup>, WAN Li-hong<sup>2\*</sup>

(1. Sichuan General Hospital of Armed Police Force, Chengdu 610041, China;

2. Department of Pharmacology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of Astragalus injection on the protein expression of Bax and Bcl-2 in H22 tumor cells bearing mice. **Method:** Hepatic cancer H22 model in mice was performed to study anti-hepatocarcinoma activity of Astragalus injection *in vivo*. The growth curve and inhibitory rate of tumor growth were measured. Cell apoptosis of each group were measured by flow cytometry (FCM). Protein expression of Bax and Bcl-2 were analyzed by immunohistochemistry (IHC). **Result:** Under the treatment of 12,8,4 g·kg<sup>-1</sup> of Astragalus injection, the inhibitory rates of H22 transplanted tumor in mice were 52.36%, 33.68%, 17.28%, respectively. FCM and IHC showed the cell apoptosis rate and protein expression of Bax and Bax/Bcl-2 ratio of H22 transplanted tumor in Astragalus injection were significantly higher than that of in the control group ( $P < 0.05$ ). The protein expression of Bcl-2 was significantly lower than that in control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Astragalus injection has significant anti-tumor effects *in vivo* for inducing apoptosis of H22 tumor cells by promoting protein expression of Bax, decreasing protein expression of Bcl-2 gene, and marked increasing the Bax/Bcl-2 ratio.

**[Key words]** Astragalus injection; anti-tumor; H22 tumor cells bearing mice; Bax; Bcl-2

**[收稿日期]** 20110117(001)

**[第一作者]** 李连琨, 本科, 副主任医师, 从事内科学的临床和基础研究, Tel:13981866383, E-mail:1395880475@qq.com

**[通讯作者]** \* 万莉红, 博士, 讲师, 从事中药药理学基础研究, Tel:028-85501278, E-mail:wanylihong1976@sina.com

细胞凋亡调控失调是肿瘤发生的重要原因之一,而抗肿瘤治疗的多种方法其机制均在不同程度上与诱导凋亡有关<sup>[1]</sup>。黄芪是豆科多年生草本植物荚膜黄芪和内蒙黄芪的根,具有补气升阳、益卫固表等功效<sup>[2]</sup>。近年来有研究显示,黄芪注射液在体外能抑制多种肿瘤细胞的生长,其机制与抑制肿瘤细胞增殖并诱导其凋亡相关<sup>[3]</sup>。本研究通过建立小鼠肝癌 H22 移植瘤模型,观察黄芪注射液对小鼠肝癌 H22 移植瘤生长的抑制作用,并通过流式细胞术及免疫组化法研究黄芪注射液对移植瘤凋亡率以及组织中凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 表达的影响,以初步探讨黄芪注射液对小鼠肝癌 H22 抑瘤作用的机制。

## 1 材料

**1.1 药物** 黄芪注射液(astragalus injection, AI),黄色的澄明液体,批号 1001066,10 mL/支,每支相当于含生药 20 g,成都地奥九泓制药厂生产;环磷酰胺,白色粉状针剂,批号 08122621,0.2 g/支,江苏恒瑞医药股份有限公司生产。

**1.2 动物及瘤株** 昆明小鼠 50 只,雌雄各半,6~8 周龄,体重(20±2)g,由四川大学实验动物中心提供,动物合格证号 SCXK(川)2002-0010。小鼠肝癌 H22 由四川大学华西基础与法医学院药理教研室提供。

**1.3 试剂** Bax(批号 H0105)以及 Bcl-2(批号 10205)抗小鼠单克隆抗体,均购自美国 Santa Cruz 公司。

**1.4 仪器** FACSCaliburxi 流式细胞仪(Becton Dickinson 公司);超净工作台(日本 NUAIR 公司),倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司)。

## 2 方法

**2.1 荷瘤鼠模型的建立** 小鼠肝癌 H22 瘤株,腹腔传代接种。待腹水生长旺盛时,抽出腹水,细胞计数,调整细胞密度为  $2 \times 10^7$ /mL,小鼠腋下 sc 肝癌 H22 细胞,每只接种 0.2 mL。

**2.2 治疗及分组** 接种后次日(d2),将 50 只小鼠随机分为 5 组,即模型对照组(模型组)、环磷酰胺组(CTX 组)、黄芪注射液高、中、低剂量(12, 8, 4 g·kg<sup>-1</sup>)干预组,每组 10 只。黄芪注射液连续 ip 给药 10 d(d2~d11),0.2 mL/只,环磷酰胺组 ip 6 mg·kg<sup>-1</sup>,在接种后 24 h 注射 1 次。空白对照组 ip 等容积生理盐水(NS)治疗,连续 10 d(d2~d11)。10 d 后处死小鼠,剥离瘤体称重,按公式计算抑瘤率:抑

瘤率=(对照组平均瘤质量-实验组平均瘤质量)/对照组平均瘤质量×100%;移植瘤体积:用游标卡尺测量移植瘤大小,按公式  $V=(长 \times 宽)^2/2$  计算肿瘤体积(cm<sup>3</sup>)。

**2.3 凋亡率检测** 取肿瘤组织冰冻 PBS 液中剪碎成小块,经吹打、过滤,1 500 r·min<sup>-1</sup>离心 5 min 洗涤等过程后,加入冰冻 70%乙醇封口于 4℃冰箱中固定 24 h,PI 染液染色 30 min,流式细胞仪检测,应用流式细胞学软件分析凋亡率。

**2.4 免疫组化测定肿瘤组织 Bax 及 Bcl-2 蛋白表达** Bax 及 Bcl-2 抗体用时均按 1:100 用 PBS 稀释,免疫组织化学方法采用 ABC 法。其过程如下:切片常规脱蜡水化,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 灭活内源性酶 10 min,微波修复抗原 5 min,间隔重复 1 次;然后依次滴加山羊血清、一抗、生物素化山羊抗兔;滴加 SABC, DAB 显色,苏木素复染,梯度脱水,透明后封片,显微镜下观察。结果判定:以胞浆中出现棕黄色颗粒为阳性。应用图像分析系统记录各自的积分吸光度(IA),作为蛋白表达的量化指标。

**2.5 统计学处理** 所有计数资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析;组间比较采用 *t* 检验。*P* < 0.05 有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 黄芪注射液对 H22 荷瘤小鼠的肿瘤抑制作用** 给药期间各组小鼠一般状况良好,环磷酰胺组小鼠有轻度脱毛现象。黄芪注射液各剂量组实体瘤体积与模型组相比增长减缓,且呈一定的量效关系,环磷酰胺对细胞增殖有强的抑制作用,见表 1。

**3.2 黄芪注射液对 H22 荷瘤小鼠肿瘤细胞凋亡率以及 Bax 及 Bcl-2 蛋白表达的影响** 模型组肿瘤细胞凋亡率明显低下,经环磷酰胺以及黄芪注射液治疗后,H22 荷瘤小鼠肿瘤细胞凋亡率均显著高于模型组(*P* < 0.05),其中以环磷酰胺组凋亡率最高。黄芪注射液高、中、低剂量组肿瘤细胞凋亡率呈现剂量依赖的关系。经黄芪注射液处理后,瘤细胞 Bax 蛋白表达增强,Bcl-2 蛋白表达减弱,且 Bax/Bcl-2 明显增高(*P* < 0.05)。见表 2。

## 4 讨论

中草药作为我国传统药物,其提取物在抗肿瘤方面有着不容忽视的作用。黄芪注射液是从黄芪中提取的有效成分(皂苷、多糖、黄酮等)精制而成的中药注射液,其中主要成分为水溶性的黄芪总皂苷,

表 1 黄芪注射液对 H22 荷瘤小鼠的肿瘤抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	瘤重 /g	抑瘤率 /%	肿瘤体积/ $cm^3$			
				4 d	6 d	8 d	10 d
模型	-	1.91 ± 0.38	-	0.19 ± 0.05	0.28 ± 0.09	0.44 ± 0.11	0.66 ± 0.14
环磷酰胺	0.006	0.47 ± 0.15 <sup>1)</sup>	75.39	0.07 ± 0.04 <sup>1)</sup>	0.19 ± 0.06 <sup>1)</sup>	0.26 ± 0.07 <sup>1)</sup>	0.43 ± 0.09 <sup>1)</sup>
黄芪注射液	12	0.91 ± 0.10 <sup>1)</sup>	52.36	0.09 ± 0.07 <sup>1)</sup>	0.22 ± 0.05 <sup>1)</sup>	0.34 ± 0.09 <sup>1)</sup>	0.53 ± 0.09 <sup>1)</sup>
	8	1.27 ± 0.46 <sup>1)</sup>	33.68	0.13 ± 0.06 <sup>1)</sup>	0.22 ± 0.08 <sup>1)</sup>	0.39 ± 0.12 <sup>1)</sup>	0.5 ± 0.17 <sup>1)</sup>
	4	1.58 ± 0.59	17.28	0.14 ± 0.05 <sup>1)</sup>	0.27 ± 0.12 <sup>1)</sup>	0.40 ± 0.11 <sup>1)</sup>	0.58 ± 0.10 <sup>1)</sup>

注:与模型组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.05$  (表 2 同)。

表 2 黄芪注射液对 H22 荷瘤小鼠肿瘤组织凋亡率、Bax 及 Bcl-2 蛋白表达的影响 (1A,  $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	凋亡率/%	Bax/A	Bcl-2/A	Bax/Bcl-2
模型	-	5.18 ± 0.60	29.85 ± 1.76	852.25 ± 177.42	0.036 ± 0.007
环磷酰胺	0.006	12.16 ± 1.36 <sup>1)</sup>	359.85 ± 75.33 <sup>1)</sup>	152.20 ± 49.40 <sup>1)</sup>	2.533 ± 0.759 <sup>1)</sup>
黄芪注射液	12	8.88 ± 1.08 <sup>1)</sup>	406.17 ± 167.98 <sup>1)</sup>	220.27 ± 93.41 <sup>1)</sup>	2.049 ± 0.764 <sup>1)</sup>
	8	8.10 ± 1.02 <sup>1)</sup>	299.77 ± 112.52 <sup>1)</sup>	328.28 ± 63.45 <sup>1)</sup>	0.903 ± 0.253 <sup>1)</sup>
	4	7.28 ± 0.89 <sup>1)</sup>	118.09 ± 22.92 <sup>1)</sup>	446.33 ± 107.73 <sup>1)</sup>	0.272 ± 0.051 <sup>1)</sup>

作为提高人体免疫力的药物,目前在临床上广泛运用与恶性肿瘤的辅助治疗。本实验以 H22 荷瘤小鼠为模型,通过绘制肿瘤生长曲线并计算抑瘤率,研究黄芪注射液的体内抗肿瘤作用。结果发现,黄芪注射液的低、中、高剂量组实体瘤体积与模型组相比增长减缓,呈一定的量效关系,抑瘤率分别为 17.28%、33.68%、52.36%,也随给药剂量的增加而增高。

研究发现,肿瘤的发生与细胞凋亡异常密切相关,因此,诱导细胞凋亡成为评估抗肿瘤药物疗效的一项新指标<sup>[4]</sup>,而中药治疗肿瘤的基础在于抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[5]</sup>。本实验研究发现,黄芪注射液的高、中、低剂量组以及环磷酰胺组均可明显提高 H22 荷瘤小鼠肿瘤细胞的凋亡率,且黄芪注射液呈现出一定的剂量依赖关系。可见,中药黄芪注射液的抗肿瘤基础是由于诱导肿瘤细胞凋亡。

Bcl-2 和 Bax 是近年研究发现的与肿瘤细胞凋亡明确相关的 2 个基因,在细胞凋亡的调控中扮演着重要角色<sup>[6]</sup>。Bcl-2 基因是 Bcl-2 基因家庭的一员,它能使细胞长期存活,抑制细胞凋亡,而其相关蛋白 Bax 则在功能上与之相反,促进细胞凋亡。近年研究表明,Bax 与 Bcl-2 调节细胞凋亡不仅取决于自身表达的高低,还与 Bax/Bcl-2 的比率有关。当比率大时,细胞趋于凋亡<sup>[7]</sup>。本实验研究发现,黄芪注射液的高、中、低剂量组以及环磷酰胺组中促凋亡基因 Bax 蛋白表达量明显高于模型组,抑凋亡基因 Bcl-2 蛋白表达量明显低于模型组,同时 Bax/Bcl-2

明显高于模型组,与模型组相比均有显著性差异 ( $P < 0.05$ ),说明黄芪注射液的各个剂量组均可促进 H22 肿瘤细胞凋亡。

综上所述,黄芪注射液具有一定的体内抗肝癌活性,其抗肿瘤作用主要通过增强 Bax 蛋白表达,减少 Bcl-2 蛋白表达,使 Bax/Bcl-2 降低,最终促使肿瘤细胞凋亡。

#### [参考文献]

- [1] 汤睿,朱正纲. 凋亡途径与肿瘤治疗[J]. 世界华人消化杂志,2005,13(20):2469.
- [2] 桑国优,韦世秀,刘成军. 黄芪抗肿瘤作用机制和临床应用研究进展[J]. 时珍国医国药,2008,19(12):3032.
- [3] 刘成军,韦世秀,李牡艳,等. 黄芪注射液对人鼻咽癌 CNE-2 细胞株的抑制作用研究[J]. 中国药房,2005,16(18):1376.
- [4] Duan X X, Ou J S, Li Y, et al. Dynamic expression of apoptosis-related genes during development of laboratory hepatocellular carcinoma and its relation to apoptosis[J]. World J Gastroenterol,2005,11(30):4740.
- [5] 张春玲,吴立军,田代真一,等. 冬凌草甲素通过激活 Caspase 诱导 HeLa 细胞凋亡[J]. 中国药理学通报,2003,19(5):521.
- [6] 徐丽丽,高世勇,季宇彬. 细胞凋亡相关蛋白的研究进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2008,29(11):1361.
- [7] 赵士福,蔡文琴. 脑缺血过程中 bcl-2 基因家族记忆内的表达及与细胞死亡的关系[J]. 解剖学报,1998,29(2):119.

[责任编辑 聂淑琴]