

南蛇藤提取物含药血清对小鼠肝癌 Hepa1-6 细胞的增殖能力和 VEGF-c 表达水平的影响

员林^{1,2}, 张华³, 钱亚云¹, 侯莹¹, 朱耀东¹, 马慧¹, 郭试瑜⁴, 久光正⁴, 刘延庆^{1*}

(1. 扬州大学 中西医结合研究所, 江苏 扬州 225009;

2. 中国人民解放军 97 医院 影像科, 江苏 徐州 221004;

3. 扬州大学医学院 护理系, 江苏 扬州 225009; 4. 昭和大学医学部第一生理学教室, 日本 东京 142)

[摘要] 目的: 制备南蛇藤提取物 (*Celastrus orbiculatus* extracts, COE) 兔含药血清, 初步研究其对小鼠肝癌 Hepa1-6 细胞株的增殖能力及血管内皮生长因子-c (VEGF-c) 表达水平的影响。方法: 取新西兰白兔, 以 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 南蛇藤提取物 ig, 按通法制备含药血清。设立低、中、高剂量组 (分别含有 10%、20%、30% 的南蛇藤提取物含药血清), 作用小鼠肝癌 Hepa1-6 细胞, 同时设阴性对照组及 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-Fu) 阳性对照组, 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 法检测含药血清对细胞增殖的影响, 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 法检测细胞培养上清 VEGF-c 的含量。结果: 形态学上, 3 组 COE 含药血清均使细胞发生典型的凋亡改变; MTT 结果显示 COE 中、高剂量组的含药血清能抑制 Hepa1-6 细胞增殖, 并呈明显的时效关系; ELISA 结果表明 COE 含药血清作用 24 h 后, 中、高剂量组 VEGF-c 水平降低, 与对照组相比有显著性差异。结论: COE 含药血清能够有效地抑制小鼠肝癌 Hepa1-6 细胞的增殖, 并降低细胞 VEGF-c 的表达水平。

[关键词] 南蛇藤提取物; 肝癌; 含药血清; 增殖; 血管内皮生长因子-c

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)11-0157-05

Effects of Serum Containing *Clastrus orbiculatus* Extracts on Proliferation and VEGF-c Expression in Hepatoma Cells of Mice

YUAN Lin^{1,2}, ZHANG Hua³, QIAN Ya-yun¹, HOU Ying¹, ZHU Yao-dong¹,

MA Hui¹, GUO Shi-yu⁴, Tadashi Hisamitsu⁴, LIU Yan-qing^{1*}

(1. Institute of Traditional Chinese Medicine & Western Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2. Department of Image, 97th Hospital of People's Liberation Army, Xuzhou 221000, China;

3. Department of Nursing, Medical College, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

4. 1st Department of Physiology, School of medicine, Showa of University, Tokyo 142, Japan)

[Abstract] **Objective:** Preparing rabbit serum containing *Clastrus orbiculatus* extracts (COE), to investigate preliminarily the effects on proliferation and vascular endothelial growth factor-c (VEGF-c) expression in hepatoma cells of mice (Hepa1-6). **Method:** The New Zealand white rabbits received COE with dose of $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ by gavage. The medicated rabbit serum was obtained using serum pharmacological approach. Hepa1-6 cells were cultured in media with different dosages of COE-containing serum (the low, medium, high dose groups containing 10%, 20%, 30% medicated serum respectively). At the same time, the negative control group and 5-fluorouracil (5-Fu) positive control group were set up. The proliferation inhibition effect of medicated serum containing COE on Hepa1-6 cells was detected by microculture tetrazolium (MTT) assay and the expression level of VEGF-c of Hepa1-6 cells

[收稿日期] 20101126(006)

[第一作者] 员林, 主治医师, 在读硕士研究生, 从事中西医结合介入治疗恶性肿瘤研究, Tel: 15861327625, E-mail: yuanlin97@163.com

[通讯作者] * 刘延庆, 教授, 博士研究生导师, 从事中西医结合肿瘤学研究, Tel: 13905278844, E-mail: 0Hliuyq@yzu.edu.cn

was tested by enzyme linked immunosorbent (ELISA). **Result:** The typical morphological changes of apoptosis were observed after incubation with COE-containing serum of each dose. The medium and high dose COE-containing serum could significantly inhibit the proliferation of Hepal-6 cells time-dependently. The VEGF-c expression level of Hepal-6 cells treating with medium and high dose COE-containing serum for 24 hours were significantly decreased compared with that of the negative control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** COE-containing serum can significantly inhibit proliferation and VEGF-c expression of Hepal-6 cells *in vitro*.

[**Key words**] *Celastrus orbiculatus* extracts; hepatoma; drug-containing serum; proliferation; vascular endothelial growth factor-c

南蛇藤 *Celastrus orbiculatus* 系卫矛科南蛇藤属植物,又名过山风、降龙草、黄藤、地南蛇等,在我国分布广泛。体内外研究表明南蛇藤有效成分能够抑制多种肿瘤细胞的增殖,在抑制肿瘤细胞黏附、侵袭,诱导肿瘤细胞凋亡和抗血管生成方面表现出良好的活性^[1-2]。本研究首次制备南蛇藤提取物含药血清,运用血清药理学方法观察其对小鼠肝癌 Hepal-6 细胞的增殖能力和 VEGF-c 分泌水平的影响。

1 材料

1.1 动物和瘤株 新西兰白兔 16 只,雌雄各半,体重(2.5 ± 0.5) kg,由扬州大学医学院实验动物中心提供(扬医动字第 082005 号)。小鼠肝癌 Hepal-6 细胞株购自中国科学院上海生物科学细胞资源中心。

1.2 药品、试剂和器材 南蛇藤 *Celastrus orbiculatus* 购自广州致信药业股份有限公司,经中国药科大学中药资源研究室秦民坚教授鉴定为卫矛科南蛇藤属南蛇藤的藤茎,5-氟尿嘧啶注射液(5-Fu),上海旭东海普药业有限公司,胎牛血清,杭州四季青, RPMI 1640 培养基,美国 Gibco 公司,四甲基偶氮唑盐(MTT),美国 Sigma 公司,小鼠 VEGF-c ELISA 试剂套盒,美国 R&D 公司,酶标仪,美国 Bio-Rad 公司,其他试剂均为国产或进口分析纯。

2 方法

2.1 药品配制 将南蛇藤茎切断、粉碎成粉,烘干(15 kg),用 95% 乙醇(150 L)提取 3 h,重复 3 次,合并提取液,回收乙醇,浸膏(900 g)加水分散后,石油醚萃取 3 次,再用乙酸乙酯萃取 3 次,收集乙酸乙酯层,水洗涤 3 次,减压浓缩,真空冻干,得南蛇藤茎乙酸乙酯提取物(250 g),贮存于 4 ℃。每 1 g 提取物相当于 60 g 生药,使用前以含 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)的蒸馏水助悬。

2.2 药物血清制备 新西兰白兔 16 只,随机分成

药物组及溶媒对照组,灌药前禁食 4 h,自由饮水。药物组给予南蛇藤提取物 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,每天分 2 次给药,共 4 d。第 4 天 1 次给药,2 h 后无菌条件下心室采血, $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,共 3 次, 56 ℃, 30 min 灭活, $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌, 1.5 mL EP 管分装,于 -20 ℃ 保存备用。

2.3 细胞培养 小鼠肝癌 Hepal-6 细胞,加入含 10% 胎牛血清, $1 \times 10^5 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素和 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素的 RPMI 1640 完全培养基,于 37 ℃, 5% CO_2 培养。

2.4 小鼠肝癌 Hepal-6 细胞形态学改变 设低、中、高含药血清组(含药血清在培养体系中的体积比分别为 10%、20% 和 30%),同时设阴性对照组以及 5-Fu 阳性对照组(终浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。取 24 孔培养板,将对数生长期小鼠肝癌 Hepal-6 细胞浓度调整至 4×10^4 /孔,按需加入各组药物,分别于 24, 48, 72 h 观察细胞形态变化。

2.5 南蛇藤提取物含药血清对小鼠肝癌 Hepal-6 细胞增殖的影响 取 24 孔培养板,将对数生长期小鼠肝癌 Hepal-6 细胞密度调整至 1×10^4 个/孔,按需加入各组药物(实验分组同 2.4)。每组设 6 个复孔,同时设置调零孔。检测前,于每孔加入 20 μL 的 MTT,继续孵育 4 h,弃上清,加入 150 μL 二甲基亚砜(DMSO)。微量振荡仪振荡 10 min 后,使甲臞结晶充分溶解,酶标仪检测 490 nm 波长处每孔的吸光度(A)。分别于药物作用 24, 48, 72 h 检测,并按以下公式计算细胞生长抑制率(IR)。

$$\text{IR} = [(\text{空白组 } A - \text{处理组 } A) / \text{空白组 } A] \times 100\%$$

2.6 南蛇藤提取物含药血清对小鼠肝癌 Hepal-6 细胞分泌 VEGF-c 的影响 取 24 孔培养板,将对数生长期小鼠肝癌 Hepal-6 细胞浓度调整至 4×10^4 /孔,按需加入各组药物(实验分组同 2.5),作用 24 h 后收集培养上清,严格按照 VEGF-c 检测试剂盒推

荐方法进行的操作,并计算 VEGF-c 的浓度。

2.7 统计学处理 应用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 南蛇藤提取物含药血清培养小鼠肝癌 Hepal-6 细胞的形态学改变 南蛇藤提取物含药血清作用细

胞 72 h 后,倒置显微镜观察形态学变化。未经南蛇藤提取物含药血清处理的细胞,形态完整,分布均匀,呈梭形贴壁生长。各含药血清处理的细胞(图 1),形态不规则,体积变小,胞质中出现空泡,有凋亡小体形成;细胞贴壁能力下降,液面中漂有死亡细胞及碎片;随着含药血清浓度的增加,细胞数目减少,异常细胞比例增加。

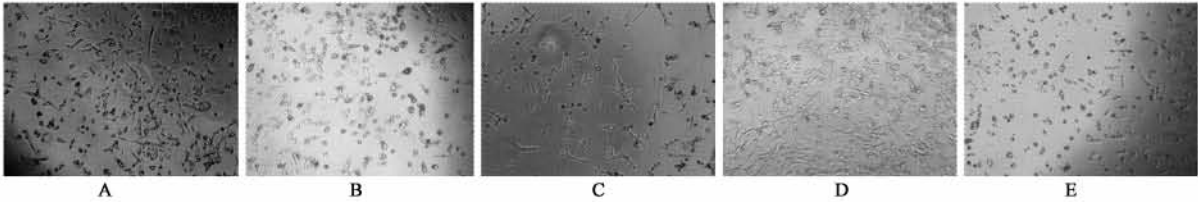


图 1 南蛇藤提取物含药血清培养小鼠肝癌 Hepal-6 细胞 72 h 的形态学改变 (×200)
A - C. 分别为南蛇藤提取物含药血清低剂量组(10%),中剂量组(20%),高剂量组(30%);
D. 为阴性对照组;E. 为阳性对照组 5-Fu(10 mg·L⁻¹)

3.2 南蛇藤提取物含药血清对小鼠肝癌 Hepal-6 细胞增殖能力的影响 南蛇藤提取物含药血清作用 24 h 后,Hepal-6 细胞的增殖能力无明显改变。随着作用时间的增加,含药血清对 Hepal-6 细胞的增殖抑制作用呈现明显的时间剂量依赖性,在 72 h 时,低、中、高 3 组含药血清对 Hepal-6 细胞增殖的抑制率分别达到了 18.2%, 41.8% 和

64.5% (表 1)。

3.3 对小鼠肝癌细胞株 Hepal-6 分泌 VEGF-c 的影响 南蛇藤提取物含药血清作用 Hepal-6 细胞 24 h 后,细胞培养上清中 VEGF-c 的含量逐步减少,存在一定的量效关系(表 2)。与阴性对照组相比,中、高剂量组能够明显降低血清中 VEGF-C 的含量,并具有显著性差异($P < 0.05$)。

表 1 南蛇藤提取物含药血清 48,72 h 对 Hepal-6 增殖的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分组	血清体积 /%	48 h		72 h	
		/A	抑制率/%	/A	抑制率/%
阴性对照	10 ~ 30	0.105 ± 0.010	-	0.119 ± 0.014	-
含 COE 血清	10	0.098 ± 0.013 ¹⁾	7.0	0.097 ± 0.007 ²⁾	18.2
	20	0.083 ± 0.021 ¹⁾	21.4	0.069 ± 0.010 ²⁾	41.8
	30	0.056 ± 0.013 ¹⁾	46.4	0.042 ± 0.007 ²⁾	64.5
5-Fu ³⁾	10	0.067 ± 0.012 ¹⁾	35.9	0.063 ± 0.015 ¹⁾	47.2

注:与阴性对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; ³⁾ 5-Fu 终质量浓度为 10 mg·L⁻¹ (表 2 同)。

表 2 南蛇藤提取物含药血清 24 h 对 Hepal-6 表达 VEGF-c 的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分组	血清体积 /%	FI	VEGF-c /ng·L ⁻¹
阴性对照	10 ~ 30	0.123 ± 0.005	17.64
含 COE 血清	10	0.122 ± 0.002	17.51
	20	0.114 ± 0.003 ¹⁾	16.73
	30	0.097 ± 0.005 ¹⁾	15.20
5-Fu ³⁾	10	0.104 ± 0.010 ¹⁾	15.85

4 讨论

国内外研究表明,从中药南蛇藤中提取的多种有效成分,多为二萜类和三萜类化合物及生物碱类,

都有很好的抗肿瘤活性。毛建山^[5]等发现,不同浓度的粉背南蛇藤中三萜齐墩果-12-烯-3β,6α-五醇能够抑制结肠癌细胞系 PKO 细胞株的增殖,并存在量效关系。徐银海^[6]等报道,南蛇藤素可以诱导人白血病 HL-60 细胞凋亡,凋亡率与药物浓度和时间存在正相关,与对照组比较存在显著性差异。同时可以上调 Fas, FasL 基因的表达,这与细胞内在凋亡通路中的某些环节存在相关性。Kim^[7]等从南蛇藤根中分离出倍半萜烯酯类和新的沉香呔喃类,这些化合物可以逆转阿霉素和长春新碱耐药细胞株 KB-V1,其逆转活性明显高于维拉帕米。本课题组前期研究显示:南蛇藤乙酸乙酯提取物能够诱导体外培

养的人胃癌 SGC-7901 细胞及宫颈癌 Hela 细胞的凋亡,上调细胞中 p53 基因的表达可能是其抗肿瘤作用的重要机制之一^[8-9];杨庆伟^[2]在研究中发现南蛇藤提取物在抑制肿瘤细胞黏附、侵袭和抗肿瘤血管生成方面表现出很好的活性,推测其作用机制与“p53-VEGF-VEGFR”通路有关。随后,钱亚云^[10]通过研究证实,南蛇藤提取物对小鼠肝癌细胞株 Hepal-6 在 mRNA 和蛋白水平的 VEGF 表达有显著抑制作用。对南蛇藤提取物进行的体内抑瘤实验表明,南蛇藤醋酸乙酯、正丁醇提取物能明显抑制 S180 和 Heps 移植性肿瘤,提高荷瘤小鼠血清中超氧化物歧化酶(SOD)活力及降低丙二醛(MDA)的含量,增强体内抗氧化酶活性和清除自由基,对肿瘤的发生和预后起到一定的保护作用^[11]。

VEGF-c 是 VEGF 家族的成员之一,定位于 4q34,是目前已知的最为重要的淋巴管生成诱导因子,在许多恶性肿瘤如乳腺癌、甲状腺癌、头颈部癌、胃癌、结肠癌中都有表达^[11]。当肿瘤细胞分泌的 VEGF-c 与其位于内皮细胞膜上的受体 VEGFR-2 (KDR)和 VEGFR-3 (L14)结合,促使淋巴管内皮细胞增殖、迁徙和新生,诱导淋巴管之间、淋巴管与血管之间的相互融合,促进肿瘤的淋巴和血行转移^[12-13]。研究表明,VEGF-c 在肿瘤细胞的表达强度与肿瘤的进展、转移正相关^[14]。降低肿瘤细胞 VEGF-c 的表达,阻断 VEGF-c/VEGFR-3, VEGFR-2 信号通路有可能成为抑制肿瘤转移复发的新靶点。

20 世纪 80 年代日本学者 Iwana H 等^[15]提出了“血清药理学方法”,将中药或复方经口给动物灌服一定时间后获取含药血清,进行体外试验。血清药理学方法能排除中药复方成分的不确定性带来的研究瓶颈,更接近药物在体内环境产生的真实过程^[16],因而广泛应用于中药抗肿瘤机制研究,涉及肿瘤细胞增殖与细胞周期调节、肿瘤细胞凋亡与诱导分化、肿瘤细胞基因表达及端粒酶活性的调控等诸多方面。

本研究成功制备了南蛇藤提取物含药血清,并初步证明其在明显抑制小鼠肝癌 Hepal-6 细胞的增殖的同时,有效降低淋巴管生成调节因子 VEGF-c 的分泌。提示南蛇藤提取物含药血清可能通过对 VEGF-c/VEGFR-3, VEGFR-2 信号通路的干预,发挥降低肿瘤转移、改善预后的效用,其作用机制值得深入研究。

[参考文献]

- [1] 张舰,许运明,王维民,等.南蛇藤提取物体内抗肿瘤作用的实验研究[J].中国中药杂志,2006,31(18):1514.
- [2] 杨庆伟,刘延庆,刘丽,等.南蛇藤提取物对肝癌 7721 细胞侵袭转移能力的影响[J].中草药,2009,40(3):434.
- [3] 黄太康,丁志遵,赵守训,等.现代本草纲目[M].北京:中国医药科技出版社,2001:1859.
- [4] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学.3 版[M].北京:人民卫生出版社,2003:203.
- [5] 毛建山,王奎武,郑树,等.粉背南蛇藤中新三萜化合物对 RKO 细胞体外抗癌作用的研究[J].中国中药杂志,2006,31(17):1450.
- [6] 徐银海,严杰.雷公藤红素诱导人急性髓系白血病 HL-60 细胞凋亡及其机制的研究[J].浙江大学学报,2008,35(3):311.
- [7] Kim S E, Kim H S, Hong Y S, et al. Sesquiterpene eers from *Celastrus orbiculatus* and their structure-activity relationship on the modulation of multidrug resistance [J]. Nat Prod, 1999, 62(5):697.
- [8] 王维民,刘延庆,戴小军.南蛇藤提取物诱导 SGC-7901 胃癌细胞凋亡及其机制[J].中国生物制品学杂志,2010,23(2):154.
- [9] 王维民,刘延庆,戴小军.南蛇藤提取物诱导宫颈癌 Hela 细胞凋亡[J].肿瘤学杂志,2009,15(11):985.
- [10] QIAN Ya-yun, LIU Yan-qing. Inhibition of *Celastrus orbiculatus* extracts on VEGF expression in hepatoma cells of mice [J]. Chinese Herbal Medicines, 2010, 2(1):72.
- [11] McXarter M D, Clarke J H, Harken A H. Lymphangiogenesis is pivotal to the trials of a successful cancer metastasis [J]. Surgery, 2004, 135:121.
- [12] 陈文明.血管内皮生长因子的生物学及其在临床的初步应用[J].基础医学与临床,2003,23(5):471.
- [13] Padera T P, Kadambi A, Dito maso E, et al. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics [J]. Science, 2002, 296 (5547):1883.
- [14] Skobe M, Hawighorst T, Jackson D G, et al. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis [J]. Nat Med, 2001, 7 (2):192.
- [15] Iwama H. Effect of shosai koto, a Japanese and Chinese traditional herbal medicinal mixture on the mitogenic activity of lipopolysaccharide; A new pharmacology testing method [J]. J Ethno Pharmacol, 1987, 211:45.
- [16] Klagsbrun M, Eichmann A. A role for axon guidance receptors and ligands in blood vessel development and tumor angiogenesis [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2005, 16 (4/5):535.

[责任编辑 聂淑琴]

旋覆代赭汤对胃动力低下大鼠血液及组织中胃动素, 胃泌素及血管活性肠肽含量的影响

税典奎*, 谢胜

(广西柳州市中医院, 广西 柳州 545001)

[摘要] 目的:观察旋覆代赭汤对胃动力低下大鼠血液及胃窦组织中胃动素(MTL)、胃泌素(GAS)及血管活性肠肽(VIP)含量的影响。方法:将70只大鼠随机分为正常组和模型组,正常组10只,模型组60只。模型组每只大鼠按 $10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体重的甘草煎剂ig后,随机分为模型3d组、模型7d组、旋覆代赭汤低、中、高剂量组及吗丁啉组。吗丁啉组予 $2.7\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的吗丁啉混悬液ig,中药低、中、高各剂量组分别予 $3.69, 7.38, 14.76\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的旋覆代赭汤ig,共给药5d。采用放免法观测各组大鼠血液及胃窦组织中MTL, GAS, VIP的含量。结果:旋覆代赭汤各剂量组与模型组7d组比较,可增加血液及组织中MTL含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),中、高剂量组比吗丁啉组的作用更明显;可使大鼠血液中GAS含量上升($P < 0.01$),中、高剂量组与吗丁啉组的作用相当;可降低血液及组织中VIP含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),高剂量组对血液中及各剂量组对组织中VIP含量的影响与吗丁啉相当。结论:旋覆代赭汤可通过调节脑肠肽在血液及组织中的含量达到促胃动力的作用。

[关键词] 胃动力低下;脑肠肽;胃动素;胃泌素;血管活性肠肽;旋覆代赭汤

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)11-0161-04

Effect of Xuanfu Daizhe Decoction on Motilin, Gastrin and Vasoactive Intestinal Peptide in Blood and Tissue in Rats with Low Gastric Motility

SHUI Dian-kui*, XIE Sheng

(Traditional Chinese Medicine Hospital in Liuzhou City of Guangxi Province, Liuzhou 545001, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect for Xuanfu Daizhe Decoction (XFDZD) on motilin (MTL), gastrin (GAS) and vasoactive intestinal peptide (VIP) content in blood and tissue in rats with low gastric motility. **Method:** Seventy Wistar rats were divided into normal group (10 rats) and model group (60 rats) at random. Each rat of model group was irritated stomach with liquorice decoction ($10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). After stomach irritation, model group were divided into model group of 3 days, model group of 7 days, low, medium, high dosage groups of XFDZD, and the group of domperidone. The stomach with low gastric motility was irritated with domperidone, and the treatment groups were treated with XFDZD at different doses. Then the content of MTL, GAS, VIP in blood and gastric antrum was tested with radioimmunoprecipitation. **Result:** Liquorice decoction could make rat model of low gastric motility. XFDZD could make MTL, GAS content increase in rat's blood and organization, at the same time make VIP content reduce, compared with model groups, there were all significance difference ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** XFDZD could treat disease of gastrointestinal dysmotility by regulating brain-gut peptides content in rat's blood or gastric antrum.

[Key words] low gastric motility; brain-gut peptide; motilin; gastrin; vasoactive intestinal peptide; Xuanfu Daizhe Decoction (XFDZD)

[收稿日期] 20101222(010)

[基金项目] 湖北省卫生厅课题(200415)

[通讯作者] * 税典奎, 副教授, 从事中西医结合消化临床研究, Tel:0772-2309492