

松针石油醚提取物抗肿瘤及诱导凋亡作用

汤红琴¹, 周薇², 宁桃丽², 王小兰^{1,2}, 郑晓珂^{1,2*}

(1. 河南中医学院, 郑州 450008; 2. 河南省中药材开发工程技术研究中心, 郑州 450008)

[摘要] 目的: 探讨松针石油醚提取物抗肿瘤作用机制。方法: 建立荷 S 180 实体瘤小鼠模型, 考察松针石油醚提取物体内抗肿瘤作用。应用免疫组化法检测肿瘤组织中凋亡相关蛋白 Bax, Bcl-2 的表达。结果: 松针石油醚提取物 0.5, 1.0, 2.0 g · (kg · d)⁻¹ 3 个剂量组对 S 180 实体瘤的抑瘤率分别为 31.16%, 41.71%, 42.16%。各用药组肿瘤组织 Bax 表达显著增强, Bcl-2 表达显著降低。结论: 松针石油醚提取物具有一定的抗肿瘤活性, 诱导凋亡是其机制之一。

[关键词] 松针; 抗肿瘤; 作用机制; 凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)11-0177-03

Antitumor and Apoptosis Inducement Effects of Petroleum Ether Extract from Pine Needles

TANG Hong-qin¹, ZHOU Wei², NING Tao-li², WANG Xiao-lan^{1,2}, ZHENG Xiao-ke^{1,2*}

(1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;
2. Henan Engineering Research Center of Development of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To study the antitumor mechanism of petroleum ether extract of pine needles. **Method:** Antitumor activity of the petroleum ether extract was determined by means of transplantable tumor (S 180) in mice. Immunohistochemical methods were employed for detection of Bax, Bcl-2 in tumor tissues. **Result:** The inhibition rate of petroleum ether extract 2.0 g · (kg · d)⁻¹ on S 180-bearing mice was 42.16%. As for 1.0 g · (kg · d)⁻¹ and 0.5 g · (kg · d)⁻¹ groups, the inhibition rates were 41.71% and 31.16%. Expression of Bax in tumors was obviously increased and Bcl-2 was obviously decreased in all the therapy groups compared with the tumor control group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Petroleum ether extract from pine needles possesses definite antitumor effect. Apoptosis is one of its antitumor mechanisms.

[Key words] pine needles; antitumor; mechanism; apoptosis

本研究室在前期通过 MTT 法观察了松针不同提取部位(石油醚、乙酸乙酯、正丁醇及水部位)对人肝癌细胞株 SMMC-7721, HepG2, 人乳腺癌细胞株

MCF-7, 人前列腺癌细胞株 PC-3 细胞增殖的抑制作用, 确定石油醚部位为松针抗肿瘤活性部位, 其中 SMMC-7721 细胞对其最敏感。并通过流式细胞术 PI 单染法考察了该部位对 SMMC-7721 细胞的诱导凋亡作用, 结果显示在 24, 48, 72 h 检测时间点, 0.8 g · L⁻¹ 剂量组的凋亡率均较高, 分别为 15.43%, 20.73%, 13.47%^[1]。为验证其体内抗肿瘤作用, 本试验建立荷 S 180 实体瘤小鼠模型考察松针石油醚提取物体内抗肿瘤作用, 并考察肿瘤组织中凋亡相关蛋白 Bax, Bcl-2 的表达, 从诱导凋亡角度初探其作用机制。

[收稿日期] 2010-03-23

[第一作者] 汤红琴, 实验师, 主要从事中药机制研究, Tel: 13613803736, E-mail: thqtn@126.com

[通讯作者] * 郑晓珂, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事中药活性成分及其作用机制研究, Tel: 0371-65575963, Fax: 0371-65680011, E-mail: zhengxk.2006@yahoo.com.cn

1 材料与方 法

1.1 药物 松针采自河南省西峡县,经河南中医学 院药用植物教研室董诚明教授鉴定为松科(Pinaceae)松属(Pinus)植物油松 *Pinus tabulaeformis* Carr 的 针状叶。干燥松针 7.8 kg,粉碎后以 80% 乙醇 10 倍 量浸泡过夜,加热连续回流提取 2 次,每次 2 h,过 滤合并,减压浓缩至稠膏,得到总提取物 2.0 kg。将 稠膏悬浮于适量水中后以石油醚萃取,得到石油醚 提取物 284.0 g,得率(相对于总提物)为 14.2%;复方 环磷酰胺片(CTX,天津金世制药有限公司,批号 20080601)。

1.2 动物和瘤株 健康昆明种小鼠,体重 18~22 g,雌雄各半,购自河南省实验动物中心,合格证号 医 动字第 19-020。荷 S 180 腹水瘤小鼠,购自河南省医 药科学研究院。

1.3 试剂及仪器 兔抗鼠 Bax, Bcl-2 多克隆抗体、 生物素化二抗均购自北京中杉金桥生物技术有限 公司;Ultrasensitive™ S-P 免疫组化染色试剂盒,福州迈 新生物技术开发有限公司。TS100 倒置显微镜,日 本 Nikon 公司;超净工作台,江苏苏净集团;KDC- 160HR 高速冷冻离心机,科大创新股份有限公司中 佳分公司。

1.4 方 法

1.4.1 实体瘤小鼠模型建立 无菌抽取传代后 8 d 生长良好的荷 S 180 腹水瘤小鼠腹水,以无菌生理盐 水稀释细胞至 1×10^7 个/mL,于每只小鼠右前肢腋 窝 sc 接种 0.2 mL。

1.4.2 动物分组与给药方法 将造模小鼠随机分 为模型组、阳性组和给药组,每组 10 只,模型组给予 生理盐水;阳性组给予 CTX $0.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;松针 石油醚提取物高、中、低剂量组予 $2.0, 1.0, 0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,均 ig,1 次/d,连续 10 d。

1.4.3 抑瘤率 给药 10 d 后脱臼处死小鼠,取出 肿瘤称重,计算抑瘤率。

1.4.4 免疫组化法检测 Bax, Bcl-2 表达^[2] 肿瘤组 织用 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋后制成连续石蜡 切片,入 60 ℃ 烤箱过夜。切片采用亲和免疫组织化 学法(S-P 法)染色。每张切片随机选取 4 个视野 (10×20),计算 400 个细胞中阳性细胞率,最后求得 平均阳性细胞率。

1.4.5 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件分 析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分

析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 松针石油醚提取物对实体瘤小鼠的肿瘤抑制 作用 表 1 显示 CTX 组抑瘤率为 78.44%;松针石 油醚提取物各组随用药剂量的增加其抑瘤效果逐渐 增强,低、中、高剂量组的抑瘤率分别为 31.16%, 41.71%, 42.16%,虽然其抑瘤作用不及 CTX,但作 为粗提物已显示出对 S 180 实体瘤具有明显的抑制 作用。

表 1 松针石油醚提取物对实体瘤小鼠的肿瘤抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | 瘤重/g | 抑瘤率/% |
|----------|--------------------------------------|-----------------------|------------------------|
| 模型 | - | 2.32 ± 0.55 | - |
| CTX | 0.4 | $0.50 \pm 0.18^{2)}$ | $78.44 \pm 7.80^{2)}$ |
| 松针石油醚提取物 | 0.5 | $1.60 \pm 0.36^{2)}$ | $31.16 \pm 15.46^{2)}$ |
| | 1.0 | $1.36 \pm 0.21^{1)}$ | $41.71 \pm 9.20^{2)}$ |
| | 2.0 | $1.34 \pm 0.252^{1)}$ | $42.16 \pm 10.93^{2)}$ |

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (图 1~2 同)

2.2 松针石油醚提取物对肿瘤组织中 Bax, Bcl-2 表 达的影响 各用药组 Bax 表达显著高于模型组($P < 0.01$),但随着用药剂量的增大 Bax 蛋白表达水平 有降低的趋势,提示松针提取物抗肿瘤作用机制可 能与诱导凋亡作用有关,其与用药剂量间的关系还 有待进一步考察(图 1)。各用药组 Bcl-2 表达显著 降低,与模型组相比差异显著($P < 0.01$,图 2)。

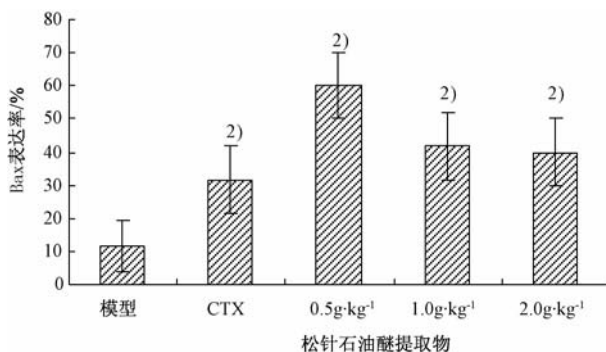


图 1 松针石油醚提取物对肿瘤组织 Bax 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3 讨 论

增殖失控或细胞凋亡受阻都会导致肿瘤的发 生,通过诱导凋亡,人工启动肿瘤细胞死亡来治疗或 消除肿瘤是目前许多抗肿瘤药物的主要机制之一。 为验证其体内抗肿瘤作用,本试验建立荷 S 180 实体 瘤模型考察松针石油醚提取物体内抗肿瘤作用。

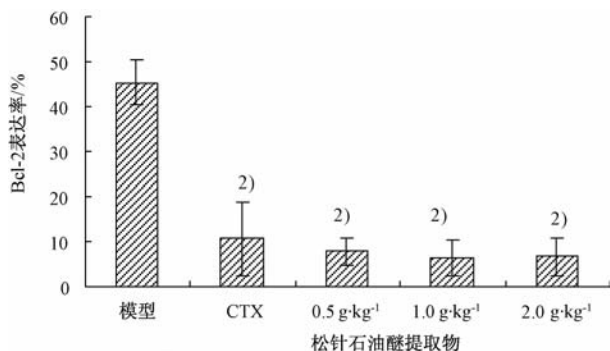


图 2 松针石油醚提取物对肿瘤组织 Bcl-2 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

本试验结果显示松针石油醚提取物 0.5, 1.0, 2.0 g · kg⁻¹ 对 S 180 肿瘤生长具有良好的抑制作用, 且随剂量增加抑瘤效果逐渐增强。

Bax 是典型的促凋亡蛋白, 通过与自身组成同源二聚体或与 Bcl-2, Bcl-XI 组成异源二聚体抑制 Bcl-2 或 Bcl-XI 活性而发挥其促进凋亡的作用。Bcl-2/Bax 异源二聚体形成的调节是细胞凋亡调控中一个非常重要的环节^[3-4]。在低分化或癌变的细胞中, Bcl-2 高表达, 一旦发生凋亡, Bcl-2 表达降低, 甚至完全消失。试验结果显示, 各用药组肿瘤组织 Bax 表达显著增强, Bcl-2 表达显著降低, 提示松针石油醚提取物可能是通过改变 Bcl-2/Bax 异源二聚

体的调控平衡来诱导肿瘤细胞凋亡的。

综上所述, 松针石油醚提取物抗肿瘤作用可能是通过选择性杀死肿瘤细胞、诱导肿瘤细胞凋亡来实现的, 在前期实验的基础上可以通过 FITC- Annexin V/PI 双染法进一步考察松针石油醚提取物的诱导凋亡情况, 其抗肿瘤最佳用药剂量、凋亡信号转导途径及其基因调控还有待进一步的考察。松针石油醚提取物仍是一个复合物, 其抗肿瘤活性成分、抗肿瘤谱、分子机制等还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 郑晓珂, 周微, 王小兰, 等. 松针不同提取部位体外抗肿瘤作用的实验研究[J]. 现代预防医学, 2009, 36(9): 1749.
- [2] 倪灿荣, 马大烈, 戴益民. 免疫组织化学实验技术及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- [3] 郑伟. 姜黄素对肺癌细胞增殖、凋亡、促血管生成和放射敏感性的作用及其机制的体外研究[D]. 北京: 中国医科大学博士论文, 2007.
- [4] 韩兵社. 亚硒酸诱导人急性早幼粒白血病 NB4 细胞凋亡作用机制研究[D]. 北京: 中国协和医科大学中国医学科学院博士学位论文, 2006.

[责任编辑 何伟]

(上接第 176 页)

求和检测方法。我国出口外销的中药常因 SO₂ 含量超标而受到很大程度的限制。可喜的是《中国药典》2005 年版一部删除了山药、葛根等加工方法的硫熏, 同时国家药典委员会的有关专家重申: 中药材及饮片以后将不再允许用硫磺熏, 并还在 2005 年版增补本中增加 SO₂ 残留的测定方法^[5]。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 1963.
- [2] 王兆基, 关锡耀, 汪洁, 等. 中药材中二氧化硫的含量测

定[J]. 中草药, 2000, 31(2): 97.

- [3] 陈奇. 中药药理研究实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 777.
- [4] 孟紫强, 张波, 秦国华, 等. 二氧化硫对小鼠不同脏器 DNA 的损伤作用[J]. 中国环境科学. 2005, 25(4): 424.
- [5] 陈成, 何顺志, 于娉婷. 中药加工炮制硫磺法的现状及思考[D]. 中华中医药学会学术会议论文集, 2007: 245.

[责任编辑 何伟]