

华蟾素注射液对 H22 荷瘤小鼠体内 β -内啡肽的影响

巩仔鹏, 陈涛*, 邓李蓉, 胡月琴, 余雪琴
(三峡大学医学院, 湖北 宜昌 443002)

[摘要] 目的: 探讨华蟾素注射液对 H22 荷瘤小鼠体内 β -内啡肽的影响。方法: 24 只昆明小鼠右腋皮下注射小鼠 H22 肝癌细胞建立荷瘤模型, 随机分设为模型组和华蟾素组, 另设正常组, 每组 12 只。用 ELISA 法测定各组小鼠肿瘤周围组织(正常组在相同部位)和血浆中的 β -内啡肽的含量。结果: 华蟾素组的小鼠肿瘤周围组织中的 β -内啡肽的含量高于模型组和对照组, 差异具有显著性; 而在血浆中, 模型组的小鼠的 β -内啡肽的含量高于华蟾素组和正常组。结论: 华蟾素注射液能够显著的升高 H22 荷瘤小鼠肿瘤周围组织中 β -内啡肽的含量, 而对其血浆中的含量影响较小。

[关键词] 华蟾素; 荷瘤小鼠; β -内啡肽

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)09-0180-02

华蟾素注射液 (Cinobufagin injection) 是我国自行研制与开发的二类新药, 它是从中药中华大蟾蜍 (*Bufo Gargarizans Cantor*) 全皮中提取的主要有效成分, 目前已广泛用于肝癌、肺癌等多种恶性肿瘤的治疗及肿瘤相关并发症的辅助治疗^[1]。近年来大量的临床研究表明^[2-3], 华蟾素不仅治疗恶性肿瘤的效果显著, 而且改善癌痛患者的生活质量作用也十分突出。从目前已有的药理学研究来看, 华蟾素发挥缓解癌痛的作用并非仅仅是因为能够缩小瘤体以减少对组织神经压迫和侵蚀来减轻疼痛, 而有其它的途径。王加真等^[4]人发现华蟾素的镇痛作用是通过阿片受体介导的。而临床报道华蟾素注射液虽有缓解癌痛的作用, 但却没有发现阿片类药物引起的中枢副作用, 诸如呼吸抑制、成瘾、耐受等, 从而说明其镇痛作用可能是通过作用于外周的阿片受体介导的。而 β -内啡肽 (β -endorphin, β -END) 肽链不易受酶裂解, 较其它种类的内啡肽更易于与受体结合, 镇痛作用强而持久^[5]。因此, 本研究观察了华蟾素注射液对 H₂₂ 荷瘤小鼠体内 β -内啡肽的影响, 以期阐明其镇痛机制提供一定的线索。

1 材料

1.1 动物与细胞株 本试验使用的动物全部为雌

性昆明小鼠(体重 18 ~20 g), 清洁级, 由湖北省实验动物中心提供[合格证号 SCXK(鄂) 2008-0005]。实验期间动物分笼饲养, 光暗周期 12 h/12 h, 自由取食和饮水。小鼠肝癌 H₂₂ 细胞由本校免疫教研室保存, 以腹水型传代保种, 第 3 代用于实验。

1.2 药品与试剂 华蟾素注射液(安徽金蟾生化股份有限公司生产, 生产批号 080908-2), 注射时用 0.9% 氯化钠按 1:2 稀释, 配制成浓度为含原生药 0.25 g · mL⁻¹ 的溶液。 β -END 的 ELISA 试剂盒 (R&D, USA)。

1.3 主要仪器 电子分析天平 (MP200A 型), 上海良平仪器厂生产; 三用恒温水箱 (DK-600S 型), 上海精宏实验设备有限公司。

2 方法

2.1 H22 肝癌细胞悬液的制备 肝癌 H22 细胞株昆明小鼠体内连续传代 3 代后, 取接种 7 d 的 H22 肝癌腹水型荷瘤小鼠, 用无菌注射器无菌条件下抽腹水放入小烧杯置于冰盒上。取少量腹水台酚蓝染色后, 光镜下观察活瘤细胞数 (>95%), 以生理盐水稀释, 调整细胞浓度为细胞计数板下瘤细胞数为 5 × 10⁶ 个/mL。

2.2 肿瘤动物模型制作 于无菌条件下每只鼠于右腋部 sc 0.2 mL (约含瘤细胞数 1 × 10⁶ 个) H22 肝癌细胞悬液制成 H22 荷实体瘤小鼠模型。全程严格无菌操作, 1 h 内完成。

2.3 试验分组及给药 小鼠造模后第 3 天, 随机分为 2 组, 模型组和华蟾素组, 另设正常组(不造模), 每组 12 只。第 8 天, 开始给药。正常组和模型组每

[收稿日期] 20100329(003)

[基金项目] 三峡大学硕士学位论文培优基金(2010PY067)

[第一作者] 巩仔鹏, 在读硕士研究生, E-mail: gzp4012607@126.com

[通讯作者] * 陈涛, 教授, 博士, Tel: 0717-6397378, E-mail: chentao@ctgu.edu.cn

只小鼠 ip 生理盐水 0.2 mL, 华蟾素组每只小鼠 ip 华蟾素 0.2 mL^[6] 按原生药量计为 2 500 mg · kg⁻¹。以上给药均为 1 次/天, 连续 3 d。

2.4 一般状况观察 在整个试验过程中观察各组小鼠的一般状况。

2.5 标本采集和制备 末次给药后, 眼球取血, 立即置入含有 EDTA-Na₂ (5 g · L⁻¹) 和抑肽酶 (500 KIU · mL⁻¹) 的试管中, 4 °C 离心 10 min, 取上层血浆置入 -40 °C 冰箱中待测。颈椎脱臼法处死小鼠, 然后再取肿瘤局部组织约 0.1 g (正常组在相同部位取组织), 然后在电子天平上称重, 按 1:2.5 倍加入 PBS, 于匀浆器中进行匀浆, 然后低温离心 (3 000 r · min⁻¹, 10 min), 取上清液置于低温冰箱中保存 (-40 °C) 待测。β-END 的含量用 ELISA 试剂盒测定, 操作严格按照试剂盒的说明进行。

2.6 统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计分析软件处理试验结果。试验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 小鼠一般状况的观察 接种 4 d 内, 小鼠外观无明显改变, 接种后第 5 天, 所有造模的小鼠可触及右腋皮下瘤块, 局部肿胀, 已有压迫症状, 但小鼠行动正常。第 7 天, 所有造模的小鼠局部肿胀明显, 压迫症状明显, 小鼠的右前肢行动迟缓, 且常见小鼠的右前肢不着地。第 10 天末次给药后, 所有造模的小鼠局部肿胀, 压迫症状依然明显, 模型组的小鼠右前肢几乎都不着地, 跛行, 而且非常少动。而华蟾素组的小鼠症状明显有所改善, 但偶见小鼠的右前肢不着地。正常组的小鼠状态未见异常。

3.2 华蟾素对 H22 荷瘤小鼠血浆中的 β-END 的影响 模型组的含量虽然高于正常组和华蟾素组, 但差异无统计学意义 (表 1)。

表 1 华蟾素对 H22 肝癌荷瘤小鼠血浆及肿瘤周围组织中 β-END 的影响 (n=12, $\bar{x} \pm s$) pg · mL⁻¹

组别	剂量 /mg · kg ⁻¹	血浆中 β-END	肿瘤周围组织中 β-END
正常	-	145.26 ± 32.52	176.01 ± 1.30 ¹⁾
模型	-	257.51 ± 105.90	282.69 ± 78.68
华蟾素	2 500	163.92 ± 11.96	455.76 ± 47.78 ²⁾

注: 与模型组比较 ¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01。

3.3 华蟾素对 H22 荷瘤小鼠肿瘤周围组织中的 β-END 的影响 从正常组到华蟾素组呈递增的趋势,

与正常组相比, 具有显著性差异 (P < 0.05, P < 0.01, 表 2), 华蟾素组与模型组的差异也具有显著性 (P < 0.01, 表 1)。

4 讨论

β-内啡肽属于众多内源性阿片肽 (Endogenous opioid peptides, EOP) 中的一种, 研究表明它是重要的镇痛物质, 而且与机体的免疫系统有关^[9]。它不仅存在于中枢神经系统中, 而且在外周也有分布。外周的 β-内啡肽主要合成于外周血的单核细胞中, 其中在 T 记忆细胞中含量较高^[10]。

本实验结果表明华蟾素能够显著的升高 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤周围组织中的 β-END 的含量, 而对其血浆中 β-END 的含量影响较小, 说明华蟾素的镇痛作用也许与升高外周的 β-END 的含量有关。关于华蟾素治疗癌性疼痛的确切机制, 还有待于做进一步的研究。

[参考文献]

[1] 王婷婷, 徐国兴. 华蟾素的药理作用研究及临床应用进展 [J]. 国际眼科杂志, 2009, 9(7): 1330.

[2] 张树梅, 孟秀华. 华蟾素治疗癌性疼痛临床疗效探讨 [J]. 中国中医药信息杂志, 2001, 8(3): 60.

[3] 王益秀, 黄伟, 张波. 中药华蟾素对晚期肿瘤患者生存质量与镇痛作用的临床观察 [J]. 中国民间疗法, 2006, 14(4): 46.

[4] 王加真, 闫家阁, 张军, 等. 华蟾素注射液的镇痛作用及其机制研究 [J]. 临沂医专学报, 2000, 22(2): 81.

[5] Mousa S A, Straub R H, Schafer M, et al. Beta-endorphin, Met-enkephalin and corresponding opioid receptors within synovium of patients with joint trauma osteoarthritis and rheumatoid arthritis [J]. Ann Rheum Dis, 2007, 66(7): 871.

[6] 邓李蓉, 陈涛, 巩仔鹏, 等. 中药华蟾素的镇痛实验研究 [J]. 安徽医药, 2010, 14(4): 397.

[7] 洪永锋, 钱红, 吴建贤. β-内啡肽与疼痛的临床研究 [C]. 中华医学会第九次全国物理医学与康复学学术会议, 2007, 676.

[8] Sitte N, Busch M, Mousa S A, et al. Lymphocytes up-regulate signal sequence-encoding proopiomelanocortin mRNA and bendorphin during painful inflammation *in vivo* [J]. J Neuroimmunol, 2007, 183(1/2): 133.

[责任编辑 聂淑琴]