

草苈蓉环烯醚萜苷对移植鳞癌 VX2 荷瘤兔的抑瘤作用

尹学哲^{1*}, 许惠仙¹, 金爱花², 汪霞¹, 全吉淑²

(1. 延边大学医院, 吉林 延吉 133000; 2. 延边大学基础医学院, 吉林 延吉 133000)

[摘要] **目的:**探讨草苈蓉环烯醚萜苷(IGBR)对兔 VX2 移植瘤的生长抑制作用和血清抗氧化活性的影响。**方法:**建立兔皮下 VX2 移植瘤模型,将实验动物分为模型组、IGBR 高、低剂量组和氟尿嘧啶(5-Fu)组,观察各组荷瘤兔的生存情况。另选一批实验动物,连续 ig 给药 21 d 后处死动物,剥离肿瘤组织,称瘤重和计算抑瘤率,并比色法检测血清谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活性及丙二醛(MDA)含量。**结果:**与模型组相比,IGBR 能显著延长 VX2 荷瘤兔生存时间,提高其生命延长度;显著减小移植瘤瘤重,提高抑瘤率。同时,IGBR 可明显升高血清 SOD, CAT 和 GSH-PX 活性,降低 MDA 水平。**结论:**IGBR 可提高 VX2 荷瘤兔生存时间,对 VX2 移植瘤具有明显的抑制作用,其作用可能与其增高机体抗氧化能力有关。

[关键词] 草苈蓉;环烯醚萜;VX2 肿瘤细胞株;抗氧化

[中图分类号] R 285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)06-0134-04

Anti-tumor Effect of Iridoid Glucosides from *Boschniakia rossica* in VX2-bearing Rabbits

YIN Xue-zhe^{1*}, XU Hui-xian¹, JIN Ai-hua², WANG Xia¹, QUAN Ji-shu²

(1. Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, China;

2. College of Basic Medicine, Yanbian University, Yanji 133000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the anti-tumor and antioxidative effect of iridoid glucosides from *Boschniakia rossica* (IGBR) in VX2-bearing rabbits. **Method:** The VX2 transplanted rabbit model was established and the rabbits were randomly divided into 4 groups: model, high and low dose IGBR, and 5-Fu. Animals were treated with IGBR and the survival times of rabbits were recorded. In additional groups of rabbits treated with IGBR for 21 days, then the tumor weights were estimated and the growth inhibition ratios were calculated, and the serum activities of glutathione S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-PX), as well as the content of malondialdehyde (MDA) were detected by colorimetric method. **Result:** The administration with IGBR prolonged the survival time, inhibited the growth of transplanted tumor, increased the serum activities of SOD, CAT and GSH-PX, and reduced the serum MDA level in VX2-bearing rabbits. **Conclusion:** IGBR could prolong the survival time of VX2-bearing rabbits, exhibit an inhibitory effect on the growth of transplanted VX2 tumor, probably *via* the improved anti-oxidative capability.

[Key words] *Boschniakia rossica*; iridoids; VX2; antioxidative

草苈蓉 *Boschniakia rossica* Fedtsch. et Flerov 为

列当科草本植物,全草是寄生于赤杨属 *Alnus* 植物根上的草本植物^[1]。具有补肾壮阳、润肠止血、滋补强身及延年益寿的功效,在民间被誉为“不老草”。研究证明草苈蓉具有清除自由基、抗脂质过氧化、抗肿瘤、抗炎及增强免疫功能^[2-4]等作用。VX2 肿瘤细胞株起源于 Shope 病毒诱发的兔乳头状瘤衍生的鳞

[收稿日期] 20100125(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30360113);吉林省科技发展计划资助项目(200705426)

[通讯作者] * 尹学哲, Tel: 15526770004; E-mail: yinxz@ybu.edu.cn

癌,经过 72 次传代后正式建株。它是一种可移植的瘤株,生物学性质稳定,并具有高转移的特性,其形态学、生化和生物学特性与人类癌相似,是目前具有自身瘤株的最大动物品系,是一种较稳定的兔肿瘤细胞株。本文主要探讨草苈蓉环烯醚萜苷(iridoid glucosides from *Boschniakia rossica*, IGBR)对兔 VX2 移植瘤的生长抑制作用,旨在为肿瘤的预防和早期治疗提供科学依据。

1 材料

1.1 药品和试剂 草苈蓉采自吉林省长白山,由延边大学药学院刘永镇教授鉴定。RPMI 1640 培养基,美国 GIBCO 公司;氟尿嘧啶注射液(5-Fu),上海旭东海普药业有限公司;谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)及丙二醛(MDA)试剂盒,南京建成生物工程研究所。

1.2 荷瘤种兔和动物 荷 VX2 鳞癌新西兰大白兔由第四军医大学附属唐都医院介入放射科张洪新副教授惠赠。日本大耳白兔,4 月龄,体重 2.0 ~ 2.5 kg,雌雄不限,由延边大学医学部动物科提供。基础饲料由延边大学医学部动物科提供。

1.3 仪器 HITACHI U-2010 型紫外分光光度仪,日本日立公司;OLYMPUS 倒置显微镜,日本奥林巴斯公司;MCI-gel CHP20P 凝胶柱,日本三菱化学公司。

2 方法

2.1 IGBR 的制备 将草苈蓉全草切碎后用 80% 甲醇提取,将提取液减压浓缩,获草苈蓉甲醇粗提取物。将甲醇粗提取物在等量的 CH₂Cl₂ 和 H₂O 中进行萃取分离,取其 H₂O 层提取物。上 MCI-gel CHP20P 凝胶柱(Mitsubishi Chemical Co.),用 10%, 30%, 50%, 70%, 100% 甲醇梯度洗脱,收集 50% 甲醇洗脱成分,经高效液相层析得到 IGBR。其主要成分为草苈蓉纳拉苷(49.1%)和 7-脱氧表马钱子酸(30.3%)。

2.2 动物模型的建立^[5] 将传种的种兔处死后立即无菌条件下剥离种兔后腿皮下实体瘤,选取鱼肉状组织用眼科剪剪碎,用生理盐水反复吹打,200 目筛过滤制成 VX2 瘤细胞悬液,台盼蓝染色计活细胞数,配成 1 × 10⁷ 个/mL 浓度的 VX2 瘤细胞悬液。按 0.5 mL 剂量接种于日本大耳白兔右侧后腿皮下。种植 VX2 肿瘤组织悬液后按 40 万单位/日剂量 im

青霉素预防感染。1 周后长成直径约 1.0 cm 大小生长旺盛的实体瘤,即完成一次传代。

2.3 动物分组与及指标测定

2.3.1 VX2 荷瘤兔生命延长度的测定 将 32 只荷瘤兔随机分为模型组、5-Fu 组和 IGBR 高、低剂量组,每组 8 只,雌雄各半。所有实验组于造模术后第 4 d 开始给药。模型组每日 ig 给予生理盐水;5-Fu 组注射 25 mg · (kg · d)⁻¹ 5-Fu,隔日 ip,共给药 3 次;IGBR 高、低剂量组分别 ig 100, 50 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ IGBR,连续给药 21 d。停药后继续饲养至自然死亡,记录各组荷瘤兔的存活天数。按公式计算各组荷瘤兔生命延长度。生命延长度 = (治疗组平均存活天数 - 模型组平均存活天数) / 模型组平均存活天数 × 100%。

2.3.2 兔 VX2 移植瘤的抑制作用以及抗氧化指标的测定 另设 4 组荷瘤兔,第 4 d 开始给药,给药剂量及途径同 2.3.1。另取 8 只正常兔 ig 给予生理盐水作正常组。连续给药 21 d,末次给药 20 h 后,经耳静脉取血,分离血清,按试剂盒的操作方法测定血清 GST, SOD, CAT, GSH-PX 活性以及 MDA 含量。处死动物,完整剥离瘤体,滤纸吸干后电子天平称取瘤重。实验期间自然死亡的动物属于有效标本,剥离瘤体,称瘤重。按公式计算各组肿瘤生长抑制率。肿瘤增长抑制率 = (模型组平均瘤重 - 治疗组平均瘤重) / 模型组平均瘤重 × 100%。

2.4 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 Prism 5.0 统计软件处理,以单因素方差分析进行统计。**3 结果**

3.1 IGBR 对生命延长度的影响 见表 1。与模型组比较,各治疗组荷瘤兔平均生存时间均有延长,各治疗组兔生命延长度明显增高($P < 0.05$),但 IGBR 组与 5-Fu 组之间差异却无统计学意义。

表 1 IGBR 对 VX2 荷瘤兔生命延长度的影响
($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg · kg ⁻¹	生存时间/d	生命延长度/%
模型	—	43.7 ± 5.9	—
IGBR	50	57.0 ± 6.7 ¹⁾	30.4
IGBR	100	61.4 ± 7.6 ¹⁾	40.5
5-Fu	25	59.8 ± 5.2 ¹⁾	36.8

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 IGBR 对实体瘤生长的影响 如表 2,用药后 IGBR 高、低剂量组和 5-Fu 组移植瘤增长缓慢,瘤重

均显著小于模型组 ($P < 0.05$), 但 IGBR 治疗组与 5-Fu 治疗组之间差异无统计学意义。21 d 实验结束时, 模型组兔存活只数为 5/8, IGBR 高、低剂量组与 5-Fu 组兔存活只数分别为 8/8、8/8 和 6/8, 各治疗组兔存活只数均多于模型组。

3.3 IGBR 对血清抗氧化和解毒相关酶活性的影响
见表 3。模型组兔血清 SOD 和 GSH-PX 活性明显低于对照组 ($P < 0.05$), GST 活性和 MDA 水平却明显高于对照组 ($P < 0.05$)。模型组血清 CAT 活性虽

有下降趋势, 但差异不具有统计学意义。IGBR 治疗可明显升高各组兔血清 SOD、CAT 和 GSH-PX 活性 ($P < 0.05$), 降低血清 MDA 水平 ($P < 0.05$), 说明 IGBR 可增高荷瘤兔血清抗氧化能力。与模型组相比, 5-Fu 组血清 CAT 和 GSH-Px 活性虽显著升高 ($P < 0.05$), 但 SOD 活性明显下降 ($P < 0.05$), 血清 MDA 水平也明显降低 ($P < 0.05$)。与模型相比, 各治疗组 GST 活性均没有显著改变。

表 2 IGBR 对兔 VX2 移植瘤的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	存活只数	体重/g	瘤重/g	抑瘤率/%
模型	—	5	2.73 ± 0.24	21.1 ± 3.8	—
IGBR	50	8	2.46 ± 0.21	16.2 ± 2.4 ¹⁾	23.2
IGBR	100	8	2.63 ± 0.21	14.1 ± 2.1 ¹⁾	33.2
5-Fu	25	6	2.33 ± 0.19 ¹⁾	14.4 ± 2.6 ¹⁾	31.8

表 3 IGBR 对 VX2 荷瘤兔血清 GST, SOD, CAT, GSH-PX 及 MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	n	GST/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	SOD/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	GSH-PX/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	CAT/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	MDA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	—	8	98.0 ± 13.2	182.2 ± 14.6	351.5 ± 27.0	9.3 ± 3.0	19.1 ± 0.9
模型	—	5	139.1 ± 27.8 ¹⁾	152.2 ± 12.4 ¹⁾	114.7 ± 15.8 ¹⁾	6.0 ± 3.7	25.7 ± 3.6 ¹⁾
IGBR	100	8	137.2 ± 23.4	166.0 ± 17.7	174.4 ± 18.7 ²⁾	15.6 ± 2.8 ²⁾	22.0 ± 2.1
IGBR	200	8	147.9 ± 32.3	197.3 ± 15.5 ²⁾	214.8 ± 25.6 ^{2,3)}	16.9 ± 4.5 ²⁾	19.1 ± 2.4 ^{2,3)}
5-Fu	25	6	129.4 ± 13.6	126.2 ± 12.3 ²⁾	205.8 ± 30.3 ²⁾	21.3 ± 4.7 ²⁾	34.0 ± 4.5 ²⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$; 与低剂量比较³⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

草苈蓉是长白山名贵药材, 其提取物具有多方面的药理活性。草苈蓉的化学成分因产地和药用部位的不同, 存在一定的差异。作者经多次萃取和反相吸附层析从长白山草苈蓉分离 IGBR, 并研究其对兔 VX2 移植瘤的生长抑制作用。

实验结果表明, IGBR 能显著延长 VX2 荷瘤兔生存时间, 提高其生命延长度, 显著减少 VX2 移植瘤瘤重, 提高抑瘤率。生命延长度和抑瘤率是抗肿瘤药物研究在药效学研究方面的重要和基础性指标, 生命延长度是验证一种药物是否有效的一个药效学的整体评估指标。抑制肿瘤的生长速度, 或使肿瘤的瘤体缩小, 也是评估某种抗肿瘤药物对肿瘤治疗是否有效的重要的客观指标。一种药物是否能够抗肿瘤首先表现在这两个方面。IGBR 可显著抑制肿瘤生长, 延长其生存时间, 说明 IGBR 对 VX2 荷瘤兔具有一定的抗肿瘤作用。

国内外大量研究结果表明, 肿瘤的发生发展与

宿主的自由基水平及其代谢产物有关。生物体内代谢过程中产生大量的活性氧, 主要包括超氧阴离子、单线氧态、过氧化氢及羟自由基等, 这些有害的活性氧可直接损伤 DNA, 也可通过脂质过氧化间接损伤 DNA, 最终引起癌变。该实验中观察到, IGBR 组兔血清 SOD, CAT 和 GSH-PX 活性显著高于模型组, MDA 含量却明显低于模型组。提示其抗肿瘤作用可能与抗氧化作用有关。该研究发现 5-Fu 抑制兔 VX2 移植瘤生长效果好, 但兔体重显著减轻, 部分血清抗氧化指标下降, 说明 5-Fu 对机体有毒副作用。与 5-Fu 相比, IGBR 明显提高机体抗氧化能力, 不妨碍荷瘤兔正常生长, 对机体毒副作用小。可见, IGBR 是一类非常有潜力的预防肿瘤的天然活性物质。

GST 是一组具有多种生理功能的同工酶家族, 是机体的 II 相解毒酶。许多非亲水性药物及毒物, 通过 GST 与亲水性物质结合, 水溶性增加, 易从细

(下转第 140 页)

抑制率分别为:8.25%,13.67%,53.70%,62.86%,65.06%,而且这种抑制反应具有浓度依赖性。研究已表明:消化道的平滑肌细胞具有自主收缩的特性,它的这种特性是由一种慢波电信号所介导的。当这种慢波传导到平滑肌细胞时会使细胞产生去极化,激活膜上的钙通道,使胞外的钙内流,最终引起平滑肌的自主收缩。藿香正气水能抑制平滑肌的这种自主收缩,说明它能够直接或间接地影响平滑肌细胞膜上钙通道的开放。

在孵育液中加入某种抑制剂孵育一段时间,如神经冲动抑制剂 TTX, $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, PGE 合成抑制剂吲哚美辛, P2Y 受体抑制剂 RB-2 和 NO 合成的抑制剂 L-NNA, 再加入 $4 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的藿香正气水, 发现这些抑制剂都不能明显阻断藿香正气水的效果。这说明藿香正气水抑制结肠的自主收缩不是通过神经起作用, 也不是通过产生常见的舒张因子 (PGE, ATP 和 NO) 起作用。

同时, 在激动剂的实验中发现: 加入平滑肌收缩的激动剂-卡巴胆碱 ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 或 KCl ($40 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 都能促进平滑肌的收缩。现已证明, 卡巴胆碱促进收缩是其与胆碱能受体结合后, 兴奋神经肌肉接头的神经节使其释放促进收缩的激素, 这些激素作用于平滑肌细胞, 激活胞膜上的钙通道, 最终达到促进收缩的效果。KCl 促进收缩是由于当 KCl 加入到孵育液后, 会使胞外溶液中的 K^+ 离子浓度上升, 导致胞外 K^+ 离子内流, 使细胞去极化, 激活膜上的钙通道, 最终达到促进收缩的效果。经统计发现: 加

卡巴胆碱后 10 min 内曲线下面积/加药前 10 min 内曲线下面积的比率为 520%, 加 KCl 的比率为 360%; 而经过 $4 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的藿香正气水处理 3 min 后, 加卡巴胆碱的比率降为 200%, 加 KCl 的比率降为 190%。也就是说: 藿香正气水也能够抑制由激动剂卡巴胆碱 (CCH) 和 KCl 引起的收缩。这同样说明藿香正气水能够直接或间接地抑制平滑肌细胞膜上钙通道的开放, 达到抑制收缩的效果。

在胞内钙离子浓度测定的实验中发现: 先把细胞孵育在无钙的 PSS 溶液 (Ca^{2+} -free PSS) 中, 加入 thapsigargin ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 排空钙库后, 再把孵育细胞的无钙 PSS 溶液 (Ca^{2+} -free PSS) 换成正常 PSS 溶液 (NPSS), 这时会出现一个较长时程的由全容量钙内流引起的胞内钙离子浓度上升相。此时, 在上升相的平台期加入藿香正气水 ($4 \mu\text{L}/\text{mL}$) 后, 胞内的钙离子浓度明显下降。这说明藿香正气水能够抑制胞外钙离子的内流, 也就证明了藿香正气水能够抑制平滑肌细胞膜上钙通道的开放, 这与前面收缩结果相一致。至于它是通过哪种途径、直接还是间接作用于钙通道, 尚需要进一步的实验证明。

[参考文献]

[1] 陆蔚, 吴文金. 藿香正气方药理研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15(增刊): 82.
[2] 彭志辉, 陈立峰, 赵树慎. 正交设计法对藿香正气水组方的研究[J]. 湖南中医杂志, 1995, 11(2): 38.

[责任编辑 聂淑琴]

(上接第 136 页)

胞内移出, 解除抗癌药物对癌细胞的毒性作用。GST 还能使亚硝基药物脱亚硝基, 清除阿霉素和其它抗癌药物产生的过氧化物, 亦可自身结合细胞毒物质, 从而保护细胞。实验结果表明, 与正常组相比, VX2 荷瘤兔血清 GST 活性明显升高, 这可能是荷瘤兔对氧化应激作出的生物转化及抗氧化代谢代偿性升高结果。IGBR 和 5-Fu 治疗没有改变荷瘤兔 GST 活性, 其机制需进一步研究。

总之, IGBR 对兔 VX2 移植瘤具有生长抑制作用, 其作用机制部分与其增强机体抗氧化能力有关。

[参考文献]

[1] 肖培根, 金在信. 东洋传统药物原色图鉴[M]. 汉城: 永林社, 1995: 322.

[2] Tsuda T, Sugay A, Liu YZ. Radical scavenger effect of *Boschniakia rossica* [J]. J Ethnopharmacol, 1994, 41: 85.
[3] Yin ZZ, Jin HL, Shen MH, et al. Inhibitory effect of *Boschniakia rossica* on DEN induced precancerous hepatic foci and its antioxidative activities in rats [J]. Chin J Cancer Res, 1999; 11:169.
[4] Yin ZZ, Jin HL, Yin XZ, et al. Effect of *Boschniakia rossica* on expression of GST-P, p53 and p21^{ras} proteins in early stage of chemical hepatocarcinogenesis and its anti-inflammatory activities in rats [J]. World J Gastroenterol, 2000, 6(6): 812.
[5] 苏畅, 张惠中, 李文海, 等. 兔 VX2 肿瘤的离体培养及有关生物学特性 [J]. 第四军医大学学报, 2006, 27(9): 844.

[责任编辑 聂淑琴]