

八月札抗肝癌活性部位的筛选

王春玲, 郑作文* (广西中医药大学药学院, 南宁 530200)

摘要: 目的 筛选出八月札抗肝癌的活性部位。方法 利用 H22 小鼠肝癌皮下移植瘤模型对八月札乙醇提取物及其石油醚萃取物、氯仿萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物 and 将乙醇提取后的药渣进行水提得到的水提物进行抗肝癌活性部位筛选, 剂量均为生药 20 g·kg⁻¹; 采用人肝癌细胞 BEL-7404 裸鼠皮下移植瘤模型研究乙醇提取物的抗肝癌作用。结果 八月札乙醇提取物以及正丁醇萃取部位对 H22 小鼠肝癌皮下移植瘤模型具有明显的抑瘤作用, 抑瘤率分别为 46.87% 和 45.31%, 其他部位无明显的抑瘤作用; 八月札乙醇提取物的高剂量组(生药 20 g·kg⁻¹)和中剂量组(生药 10 g·kg⁻¹)对人肝癌细胞 BEL-7404 裸鼠移植瘤模型具有明显的抑瘤作用, 抑瘤率分别为 57.5% 和 40.0%。结论 乙醇提取物及其正丁醇萃取物部位为八月札抗肝癌活性部位。

关键词: 八月札; 有效部位筛选; 抗肿瘤

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)07-0784-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.07.003

引用本文: 王春玲, 郑作文. 八月札抗肝癌活性部位的筛选[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(7): 784-789.

Screening of Anti-hepatocarcinoma Active Fractions from Akebiae Fructus

WANG Chunling, ZHEN Zuowen* (School of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To select anti-hepatocarcinoma effective parts of Akebiae Fructus. **METHODS** The H22 subcutaneously transplanted tumor in mice was applied to screen the anti-hepatocarcinoma active fractions from the ethanol extract, petroleum ether extract, chloroform extract, ethyl acetate extract, *n*-butanol extract and the water extract from residue extracted from ethanol, the dosage was crude 20 g drug·kg⁻¹; the anti-hepatocarcinoma effect of ethanol extract on the nude mice model of human hepatoma line BEL-7404 cell subcutaneously transplanted tumor was studied. **RESULTS** The results showed that the ethanol extract and *n*-butanol extract of Akebiae Fructus had obvious anti-tumor effect on H22 mice model of subcutaneous transplantation of liver cancer, the inhibition rates were 46.87% and 45.31%, respectively. The other parts had no obvious antitumor effect; the high-dose group(crude drug 20 g·kg⁻¹) and the medium dose group(crude drug 10 g·kg⁻¹) of the ethanol extract of Akebiae Fructus had obvious antitumor effect on BEL-7404 transplanted tumor model in nude mice, and the inhibition rates were 57.5% and 40.0%, respectively. **CONCLUSION** The ethanol extract and its *n*-butanol extract are the antitumor active fractions of Akebiae Fructus.

KEYWORDS: Akebiae Fructus; active fraction screening; anti-tumor

肝癌是病死率最高的恶性肿瘤之一。中国每年约有 38.3 万人死于肝癌, 占全球肝癌死亡病例数的 51%^[1-2]。临床上治疗肿瘤的主要方法是应用药物治疗。中药是具有中国特色、切实可行的抗肿瘤药物来源, 具有抗肿瘤效果好、不良反应小等优点。从中药中筛选出高效、低毒的抗肿瘤药物一直是抗肿瘤新药物研发的重要方向。八月札是广西民间传统抗肝癌的中药^[3-4], 为木通科植物木通 *Akebia quinata* (Thunb.) Decne.、三叶木通 *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz. 或白木通 *Akebiatrifoliata* (Thunb.) Koidz. var. *australis* (Diels) Rehd. 的干燥近成熟果实, 具有疏肝和胃、活血止痛、软坚散结、利小便的功效。目前仅有八月札水提物对免

疫功能、抗氧化作用的报道^[5-6], 本课题组前期研究发现八月札具有较好的抗肿瘤作用^[7], 但未见其有效部位筛选及体内抗肿瘤的文献报道。本研究选取民间具有良好用药基础同时药理学初筛具有抗肿瘤活性的八月札作为研究对象, 对采用溶剂法分离得到的八月札乙醇提取物、乙醇提取后的药渣进行水提得到的水提物及乙醇提取物经萃取后得到的石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取物部位应用 H22 肝癌移植瘤模型进行抗肝癌活性筛选, 明确其抗肝癌活性部位, 考察乙醇提取物对人肝癌细胞 BEL-7404 移植瘤裸鼠肿瘤生长的抑制作用, 旨在为进一步研究八月札的抗肝癌治疗提供实验依据。

基金项目: 中药学广西一流学科(桂教科研〔2018〕12号); 广西高校中药药理重点实验室(J14045)

作者简介: 王春玲, 女, 博士, 助理研究员 Tel: 18169648732 E-mail: clingwang1216@163.com *通信作者: 郑作文, 男, 硕士, 教授 Tel: 18169648732 E-mail: 409116325@qq.com

1 试剂与仪器

Arium 611UFG3 型旋转蒸发器(德国 Heidolph); BB15 型 CO₂ 培养箱(美国 ThermoForma); DLE560 型超净工作台(荷兰 Clean Air); DMIRB 倒置显微镜(德国 Leica 公司); TDZ4-WS 型低速台式离心机(湘仪离心机仪器有限公司)。

RPMI1640 培养液(美国 Hyclone, 批号: SH30809.01B); 胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司, 批号: 0016998); 0.25%胰蛋白酶(美国 Gibco, 批号: JI40040); 95%工业乙醇(南京南试化学试剂有限公司, 批号: 64-17-5); 石油醚(bp 60~90 °C, 分析纯, 批号: 20180926)、乙酸乙酯(分析纯, 批号: 20180414)、正丁醇(分析纯, 批号: 20180308)均购自成都市科龙化工试剂厂; 氯仿(分析纯, 西陇化工股份有限公司, 批号: 1203252)。腹水型肝癌 H22 细胞株、人肝癌细胞 BEL-7404 细胞株均购自中国科学院上海细胞库, 由广西中医药大学药理学教研室保存并传代培养。八月札购于广西国医国药大药房, 八月札由广西中医药大学中药鉴定教研室韦松基教授鉴定为三叶木通 *A.trifoliata* (Thunb.) Koidz. 的果实。5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU, 上海旭东海普药业有限公司, 批号: 20180512)。昆明种小鼠, 体质量(20±2) g, 由广西医科大学实验动物中心提供, 动物生产许可证号: SCXK(桂)2003-0003; 4~5 周龄 ♂ BALB/CA-nu/nu 裸鼠, 购于上海斯莱克实验动物有限责任公司, 动物生产许可证号: SCXK(沪)2003-0003。

2 方法

2.1 八月札乙醇提取物、水提物及各萃取物部位的制备

2.1.1 乙醇提取物的制备 经干燥、粉碎的八月札共 2.1 kg, 称取粉末每包 30 g, 用滤纸套袋装好后放入索氏提取器的提取筒中, 分别使用 95%乙醇、50%乙醇连续提取 3 h, 合并提取液, 滤液减压回收乙醇, 并浓缩成浸膏(得膏率为 25.1%, 每 1 g 浸膏相当于 3.98 g 生药)。

2.1.2 水提物的制备 将经乙醇提取后的八月札药渣干燥, 挥尽乙醇, 纯水回流提取 3 次, 合并滤液浓缩、干燥, 得水提部位(得膏率为 14.70%, 每 1 g 浸膏相当于 6.80 g 生药)。

2.1.3 各萃取物部位的制备 取“2.1.1”项下制备的乙醇浸膏用 10 倍量纯水溶解完全, 依次用 5

倍量石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取, 各部分萃取液经减压浓缩至干, 分别得石油醚萃取物部位(得膏率为 0.032%, 每 1 g 浸膏相当于 3.125 g 生药)、氯仿萃取物部位(得膏率为 4.01%, 每 1 g 浸膏相当于 24.94 g 生药)、乙酸乙酯萃取物部位(得膏率为 1.41%, 每 1 g 浸膏相当于 70.92 g 生药)、正丁醇萃取物部位(得膏率为 10.50%, 每 1 g 浸膏相当于 9.52 g 生药)。

2.1.4 受试物的制备 各部位加适量 95%乙醇溶解(乙醇终浓度≤2%), 再加生理盐水稀释制成混悬液, 配成生药 1.0 g·mL⁻¹ 的受试物。

2.2 H22 小鼠肝癌皮下移植瘤模型的建立及分组给药

H22 小鼠皮下移植瘤模型的建立方法参考文献[8]改进, 取对数生长期的 H22 细胞悬液稀释浓度至每毫升 1.0×10⁷ 个, 每只小鼠腹腔注射 0.2 mL 细胞悬液。7~10 d 小鼠腹腔变大, 无菌条件下抽取小鼠腹水, 台盼蓝染色计数, 活细胞率为 97%。调整细胞浓度为每毫升 1.0×10⁷ 个, 皮下注射每只 0.2 mL 于右侧腋窝部。将已成模小鼠随机分为 8 组: 模型组(生理盐水, 20 mL·kg⁻¹, 灌胃给药)、5-FU 组(0.02 g·kg⁻¹, 腹腔注射)、八月札乙醇提取物组、石油醚萃取物部位组、氯仿萃取物部位组、乙酸乙酯萃取物部位组、水提物组、正丁醇萃取物部位组, ♂♀各半, 每组 12 只。水提物组、八月札乙醇提取物组及其萃取部位组均按照生药 20 g·kg⁻¹ 灌胃给药。腹腔注射、灌胃的给药体积均为 0.2 mL·(10 g)⁻¹, 每日 1 次, 连续给药 10 d。每 3 d 称 1 次体质量, 每天观察并记录荷瘤小鼠的一般状况及死亡情况, 末次给药 12 h 后, 称体质量, 处死小鼠, 剥离瘤块, 称量瘤质量, 按下面公式计算抑制率: 抑制率=(模型组平均瘤质量-给药组平均瘤质量)/模型组平均瘤质量×100%。

2.3 八月札乙醇提取物、正丁醇萃取物部位对 H22 小鼠肝癌皮下移植瘤的比较研究

按“2.2”项下条件重构 H22 小鼠肝癌皮下移植瘤模型, 将已成模的小鼠按体质量随机分为模型组(生理盐水, 灌胃给药)、5-FU 组(0.02 g·kg⁻¹, 腹腔注射)、八月札乙醇提取物高、中、低剂量组(生药 20, 10 和 5 g·kg⁻¹, 灌胃给药)、正丁醇萃取物部位高、中、低剂量组(生药 20, 10 和 5 g·kg⁻¹, 灌胃给药)。♂♀各半, 每组 12 只。连续给药 10 d。末次给药后处死小鼠, 剥离肿瘤, 称量瘤质量, 计算抑瘤率。同时将肿瘤组织放入 4%多聚甲醛中

固定待用。

2.4 人肝癌 BEL-7404 细胞裸鼠移植瘤模型的建立及分组给药

荷瘤裸鼠模型的建立方法参考文献[9]进行改进,取对数生长期且生长状况良好的人肝癌 BEL-7404 细胞液,经消化、离心、计数,用 PBS 配成每毫升 1.0×10^7 个的细胞悬液,每只皮下注射 0.2 mL 于裸鼠右上肢腋下。1 周后裸鼠腋下肉眼可见黄豆大小肿瘤,处死裸鼠,切下瘤块除去坏死部分,选用淡黄色瘤组织置于 PBS 中剪成直径约为 1 mm 的瘤块,加入适量的培养液,制成匀浆液后过 200 目细胞筛。细胞混悬液经离心后转移至细胞培养瓶培养。收集对数生长期的 BEL-7404 人肝癌细胞,在无菌条件下将密度为每毫升 1.0×10^7 个的细胞悬液皮下注射于裸鼠右上肢腋下,每只 0.2 mL,2 周后可见明显结节。将荷瘤裸鼠按体质量随机分为 5 组,分别为模型组(生理盐水,灌胃给药)、5-FU 组($0.02 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,腹腔注射)、八月札乙醇提取物高、中、低剂量组(生药 20, 10 和 $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,灌胃给药),每组 8 只,连续给药 10 d。末次给药 12 h 后处死小鼠,剥离肿瘤,称量瘤质量,计算抑瘤率。

2.5 H22 小鼠肝癌皮下移植瘤肿瘤组织病理学检查

剥离肿瘤组织用 4%多聚甲醛固定,脱水后用石蜡包埋,制成 $5 \mu\text{m}$ 厚的切片,苏木精-伊红染色,显微镜下观察肿瘤组织结构的变化,拍照^[10]。低倍镜下($100\times$)观察坏死面积,按坏死面积大小分级判断为灶状坏死、小片状坏死、大片状坏死。

2.6 统计学方法

所得数据结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 20.0 统计软件进行分析,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 八月札乙醇提取物、水提物及各萃取物部位对 H22 肝癌皮下移植瘤小鼠一般状况的影响

各组小鼠接种前自主活动正常,反应敏捷,毛色顺滑光亮,进食饮水、呼吸、大小便均正常。接种后第 5 天各组小鼠腋下肉眼可见黄豆大小瘤块,成瘤率 100%。各组瘤块均逐渐增大,模型组小鼠最先出现饮食饮水明显减少,自主活动显著减少,掉毛,毛变得稀疏、灰暗无光泽,呼吸频率加快,大小便减少,肿瘤体积增长最快;5-FU 组自主活动显著减少,动作迟缓,饮食饮水减少,

体质量显著降低并伴有呼吸微弱。八月札乙醇提取物组、正丁醇萃取物部位组与模型组比较,自主活动、饮食饮水、呼吸、大小便均正常,瘤体生长较慢。石油醚萃取物部位组、氯仿萃取物部位组、乙酸乙酯萃取物部位组、水提物组与模型组比较,饮食、饮水、呼吸、反应度及活动尚可,但无显著性差异。给药过程中模型组、5-FU 组、氯仿萃取物部位组、水提物组给药过程各有 1 只死亡,死亡时身体瘦弱,但尸检肉眼未见脏器异常。结果见表 1。

表 1 八月札水提物、乙醇提取物及其各萃取物部位对 H22 肝癌皮下移植瘤小鼠一般状况的影响

Tab. 1 Effects of water extract, alcohol extract and its extracts from Akebiae Fructus on the general condition of mice with H22 liver cancer subcutaneously transplanted tumor

组别	自主活动减少	饮食饮水减少	呼吸异常	毛色灰暗、稀疏	大小便	动物数(死亡数)/n
模型组	++	++	++	++	+	12(1)
5-FU 组	+	+	+	++	+++	12(1)
乙醇提取物组	-	-	-	-	-	12(0)
石油醚萃取物部位组	+	+	+	++	-	12(0)
氯仿萃取物部位组	+	+	++	++	++	12(1)
乙酸乙酯萃取物部位组	+	+	+	++	+	12(0)
正丁醇萃取物部位组	-	-	-	-	-	12(0)
水提物组	+	+	+	++	+	12(1)

注:“+~+++”表示作用的强弱,“-”表示无作用。

Note: “+~+++” meant the strength of the function, “-” meant no action.

3.2 八月札水提物、乙醇提取物及其各萃取物部位对 H22 肝癌皮下移植瘤小鼠肿瘤生长的影响

分组时各组小鼠的体质量无差异,各组均长出肿瘤,说明造模成功。与模型组比较,5-FU 组小鼠体质量明显降低($P < 0.01$),其他各组体质量增加无显著性差异。与模型组比较,5-FU 组、八月札乙醇提取物组、正丁醇萃取部位组的瘤质量明显下降($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),抑瘤率分别为 85.93%, 46.87%, 45.31%。八月札乙醇提取物组与正丁醇萃取部位组比较(均生药 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),瘤质量降低无统计学差异。与模型组比较,石油醚萃取物部位组、氯仿萃取物部位组、乙酸乙酯萃取物部位组、水提物组对小鼠的瘤质量均无明显的影响。结果见表 2。以上结果表明,八月札乙醇提取物、正丁醇萃取物部位具有较好的体内抗肿瘤活性,而石油醚、氯仿、乙酸乙酯萃取物部位和水提物均无明显的体内抗肿瘤活性。

表 2 八月札水提取物、乙醇提取物及其各萃取物部位对 H22 肝癌皮下移植瘤小鼠肿瘤生长的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Effects of water extract, alcohol extract and its extracts from Akebiae Fructus on tumor growth of H22 liver cancer subcutaneously transplanted tumor mice

组别	剂量/生药 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	动物数/ n (始/终)	体质量/g		瘤质量/g	抑瘤率/%
			第 1 天	第 10 天		
模型组	—	12/10	18.30 $\pm$ 1.51	29.10 $\pm$ 3.43	1.28 $\pm$ 0.69	—
5-FU 组	0.02	12/10	18.70 $\pm$ 2.30	21.23 $\pm$ 0.70 ²⁾	0.18 $\pm$ 0.12 ²⁾	85.93
乙醇提取物组	20	12/12	18.30 $\pm$ 0.80	24.71 $\pm$ 1.31	0.68 $\pm$ 0.44 ¹⁾	46.87
石油醚萃取物部位组	20	12/12	18.90 $\pm$ 0.30	28.60 $\pm$ 2.30	1.57 $\pm$ 0.79	—
乙酸乙酯萃取物部位组	20	12/11	17.81 $\pm$ 1.70	27.53 $\pm$ 1.10	1.24 $\pm$ 0.47	3.10
氯仿萃取物部位组	20	12/11	19.30 $\pm$ 0.40	26.80 $\pm$ 0.83	1.33 $\pm$ 1.26	—
正丁醇萃取物部位组	20	12/11	18.61 $\pm$ 1.20	25.60 $\pm$ 0.54	0.70 $\pm$ 0.49 ¹⁾	45.31
水提取物组	20	12/10	18.71 $\pm$ 0.82	7.81 $\pm$ 1.40	1.19 $\pm$ 0.80	10.07

注：与模型组比较，¹⁾ $P < 0.05$ ，²⁾ $P < 0.01$ 。

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$.

3.3 八月札醇提取物、正丁醇萃取物部位对 H22 荷瘤小鼠瘤质量和抑制率的比较

与模型组比较，5-FU 组、八月札乙醇提取物高剂量组、正丁醇萃取物部位高剂量组的平均瘤质量明显下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，八月札乙醇提取物高、中、低剂量组分别与正丁醇萃取部位高、中、低剂量组比较，降低瘤质量的作用相当，均无明显差异。八月札醇提取物各剂量组的抑瘤率分别为 55.35%，48.21%，39.28%，正丁醇萃取物部位各剂量组的抑瘤率分别为 58.92%，35.71%，25.00%，结果见表 3。提示八月札乙醇提取物、正丁醇萃取物部位对 H22 荷瘤小鼠的肿瘤生长表现出较强的抑制作用，并且对肿瘤生长的抑制作用呈现一定剂量-效应关系。

表 3 八月札乙醇提取物及其正丁醇萃取物部位对肝癌 H22 移植瘤小鼠肿瘤生长的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Effects of alcohol extract of Akebiae Fructus and its *n*-butanol extract on tumor growth of H22 transplanted tumor mice($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/生药 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	动物数/ n (始/终)	瘤质量/g	抑瘤率/%
模型组	—	12/10	0.56 $\pm$ 0.42	—
5-FU 组	0.02	12/10	0.08 $\pm$ 0.03 ²⁾	85.71
乙醇提取物高剂量组	20	12/12	0.25 $\pm$ 0.21 ¹⁾	55.35
乙醇提取物中剂量组	10	12/12	0.29 $\pm$ 0.15	48.21
乙醇提取物低剂量组	5	12/12	0.34 $\pm$ 0.27	39.28
正丁醇萃取物部位高剂量组	20	12/12	0.23 $\pm$ 0.14 ¹⁾	58.92
正丁醇萃取物部位中剂量组	10	12/12	0.36 $\pm$ 0.70	35.71
正丁醇萃取物部位低剂量组	5	12/12	0.42 $\pm$ 0.44	25.00

注：与模型组比较，¹⁾ $P < 0.05$ ，²⁾ $P < 0.01$ 。

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$.

3.4 八月札乙醇提取物、正丁醇萃取物部位对肝癌 H22 移植瘤小鼠肿瘤组织病理学的影响

模型组中肿瘤细胞生长旺盛，细胞排列紧密，

细胞核大小不一，呈深紫色，染色均匀，组织中有小部分坏死灶。与模型组比较，5-FU 组、八月札乙醇提取物高剂量组、正丁醇萃取物部位高剂量组肿瘤组织排列疏松，肿瘤细胞数量少且染色整体较浅，细胞核染色不均匀且形状不规则，瘤内有大片状坏死，坏死面积较大，坏死区域周围有淋巴细胞浸润、部分细胞核消失。结果见图 1。经秩和检验，八月札乙醇提取物高剂量组与正丁醇萃取物部位高剂量组比较，坏死无明显差异，即对抑制肿瘤生长的抑制作用无显著性差异。

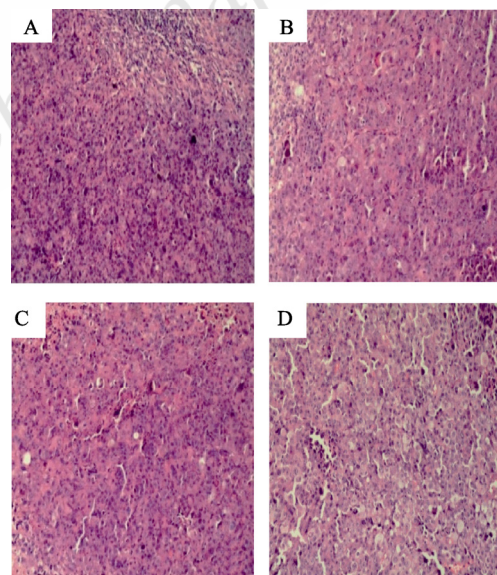


图 1 八月札对 H22 肝癌移植瘤小鼠肿瘤组织病理学的影响(HE, 100 $\times$)

A—模型组；B—5-FU 组；C—乙醇提取物组(生药 20 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)；D—正丁醇萃取物部位组(生药 20 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。

Fig. 1 Effect of Akebiae Fructus on the histopathology of H22 liver cancer transplanted tumor mice(HE, 100 $\times$)

A—model group; B—5-FU group; C—alcohol extract group(20 g crude drug $\cdot \text{kg}^{-1}$); D—*n*-butanol extract group(20 g crude drug $\cdot \text{kg}^{-1}$).

3.5 八月札乙醇提取物对人肝癌细胞 BEL-7404 裸鼠移植瘤肿瘤生长的影响

八月札乙醇提取物高、中剂量组和 5-FU 组的平均瘤质量较模型组明显减轻($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 抑瘤率分别为 57.5%, 40.0%, 67.5%。而低剂量组对移植瘤质量无明显影响, 抑瘤率仅为 10.0%, 结果见表 4。提示八月札乙醇提取物高、中剂量组可抑制肝癌 BEL-7404 细胞移植瘤生长。

表 4 八月札乙醇提取物对人肝癌细胞 BEL-7404 移植瘤裸鼠肿瘤生长的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Effect of alcohol extract of Akebiae Fructus on tumor growth of human hepatoma cell BEL-7404 transplanted tumor in nude mice($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/生药 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	动物数/ n (始/终)	瘤质量/g	抑瘤率/%
模型组	—	8/8	0.40±0.08	—
5-FU 组	0.02	8/7	0.13±0.04 ²⁾	67.5
乙醇提取物高剂量组	20	8/8	0.17±0.03 ¹⁾	57.5
乙醇提取物中剂量组	10	8/8	0.24±0.06 ¹⁾	40.0
乙醇提取物低剂量组	5	8/8	0.36±0.15	10.0

注: 与模型组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

4 讨论

4.1 八月札抗肝癌活性部位的筛选

H22 肝癌细胞小鼠皮下移植瘤模型是筛选抗肿瘤新药中最常用的模型之一^[11], 本研究利用该模型对乙醇提取物及其石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取部位和水提物进行抗肝癌活性筛选研究, 结果表明, 八月札乙醇提取物组和正丁醇萃取部位组的一般状况优于其他部位组, 瘤质量均低于模型组($P<0.05$), 其抑瘤率分别为 46.87%, 45.31%, 根据中药药理实验方法学中评价中草药抗肿瘤有效性评价标准: 当中草药的肿瘤抑制率 $>30\%$, 差异具有统计学意义, 则评定此药具有一定的抗肿瘤疗效^[12], 八月札乙醇提取物及正丁醇萃取部位的抑制率均 $>30\%$, 提示八月札的抗肝癌活性部位是乙醇提取物和正丁醇萃取部位。

4.2 八月札乙醇提取物及正丁醇萃取部位体内抗肿瘤作用比较研究

表 2 结果表明, 八月札乙醇提取物组与正丁醇萃取部位组(生药 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)的抑瘤率比较无显著性差异。重新构建 H22 荷瘤小鼠模型, 调整八月札乙醇提取物及正丁醇萃取部位给药剂量为生药 20, 10, $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 其余试验条件不变,

表 3 结果显示, 乙醇提取物高、中、低剂量组分别与正丁醇萃取部位高、中、低剂量组比较, 降低瘤质量的作用相当, 无显著性差异。HE 染色结果表明, 乙醇提取物高剂量组与正丁醇萃取部位高剂量组的抗肿瘤作用比较, 也无显著性差异。推测产生该结果的原因可能是这 2 个部位中存在极性相同(似)的化学成分, 而这种化学成分很可能就是发挥抑制肿瘤生长的活性成分。

比较表 2 与表 3 中模型组、5-FU 组、八月札乙醇提取物组(生药 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、正丁醇萃取部位组(生药 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)的瘤质量, 结果发现表 3 中上述各剂量组的瘤体质量比表 2 中的明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 5-FU 组的抑制率几乎不变, 乙醇提取物组、正丁醇萃取部位组的抑制率却相对增加, 提示该现象可能与八月札能够增强机体的免疫力有关, 从而抑制瘤体体积的快速增长, 其抗肿瘤机制需进一步研究。

4.3 八月札乙醇提取物对人肝癌细胞 BEL-7404 裸鼠移植瘤肿瘤生长的影响

H22 肝癌细胞小鼠皮下移植瘤模型虽生长速度快、增殖比率高, 但与人的实体瘤仍有差别。Rygaard^[13]通过实验研究证实了人肝癌裸鼠移植模型是除人体外最接近人肝癌的实验模型, 人肝癌 BEL-7404 细胞, 同样为 HCC 属, 特点是异种移植成瘤率高, 瘤块组织学病例与 HCC 类似。本研究选择得膏率较高的乙醇提取物作为研究对象, 观察其对肝癌细胞 BEL-7404 移植瘤裸鼠肿瘤生长的影响, 结果显示, 八月札乙醇提取物高、中剂量组均能够抑制人源性肝癌裸鼠异种移植模型肿瘤的生长。

本研究对具有广西特色的八月札进行抗肝癌作用研究, 筛选出具有抗肝癌作用的活性部位, 为促进八月札的开发利用及提高广西区域肝癌的防治水平提供实验依据。

REFERENCES

- [1] WANG F S, FAN J G, ZHANG Z, et al. The global burden of liver disease: The major impact of China[J]. Hepatology, 2014, 60(6): 2099-2108.
- [2] LV G S, CHEN L, WANG H Y. Research progress and prospect of liver cancer in China[J]. Chin Bull Life Sci, 2015(27): 237-248.
- [3] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草(1-10 卷)[M]. 上海: 上海科技教育出版社, 1999.

- [4] 广西壮族自治区革命委员会卫生局. 广西本草选编[M]. 南宁: 广西人民出版社, 1974.
- [5] 白雪, 关宝生, 孙艳男, 等. 八月札水提物对 H22 肝癌荷瘤鼠免疫功能的影响[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(7): 1946-1948.
- [6] 白雪, 关宝生, 魏晓东, 等. 八月札水提物对 H22 荷瘤鼠血清总抗氧化能力、超氧化物歧化酶活性和丙二醛含量的影响[J]. 社区医学杂志, 2010, 8(11): 4-5.
- [7] 张瑜, 郑作文. 八月札抗肿瘤作用的初步研究[J]. 广西中医药大学学报, 2016, 19(3): 9-10.
- [8] JIN A H, XU H X, LIU W J, et al. Studies on anti-tumor effect and mechanism of rhaponticum uniflorum in H22-bearing mice[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2011, 17(5): 165-167.
- [9] WANG N, YAO J Q, WANG Y, et al. Establishment of BALB/c nude mouse model bearing human BEL-7402 hepatoma cells by three different methods[J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med(广州中医药大学学报), 2019, 36(1): 119-123.
- [10] MAN S L, CHAI H Y, QIU P Y, et al. Turmeric enhancing anti-tumor effect of *Rhizoma Paridis* saponins by influencing their metabolic profiling in tumors of H22 hepatocarcinoma mice[J]. Pathol-Res Pract, 2015, 211(12): 948-954.
- [11] 汪谦. 现代医学实验方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997.
- [12] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991: 513-515.
- [13] RYGAARD J. Immunobiology of the mouse mutant "Nude" Preliminary investigations[J]. Acta Pathol Microbiol Scand, 1969, 77(4): 761-762.

收稿日期: 2020-02-11
(本文责编: 陈怡心)

中国现代应用药理学
http://www.chinjmap.com