

乌骨藤总苷抑制肝癌细胞增殖和 AFP 分泌

邹渭洪, 付成效, 邓丽菁

(南华大学附属第一医院药剂科, 湖南 衡阳 421001)

摘要: **目的** 研究乌骨藤总苷对肝癌细胞增殖的作用及其机制。 **方法** 采用四甲基偶氮唑盐比色法 (MTT 比色法) 或移植瘤小鼠模型, 观察不同浓度乌骨藤总苷对人肝癌 Bel-7404、HepG2 细胞和小鼠肝癌 Hep1-6 细胞生长的影响; 研究乌骨藤总苷抑制 HepG2 细胞生长与调控甲胎蛋白 AFP 分泌的关系。 **结果** 乌骨藤总苷对人肝癌 Bel-7404、HepG2 细胞和小鼠肝癌 Hep1-6 细胞生长有显著的抑制作用, 能显著降低 AFP 的分泌。 **结论** 乌骨藤总苷抑制肝癌细胞增殖其机制可能与抑制 AFP 分泌有关。

关键词: 乌骨藤总苷; 肝癌细胞; 甲胎蛋白; 增殖

中图分类号: R961.1 **文献标识码:** A

Effects of Total Glycosides in Glaucous Fissistigma Root on the Proliferation of Hepatocarcinoma Cells and Secretion of AFP

ZOU Weihong, FU Chengxiao, DENG Lijing

(Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001 China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of total glycosides in glaucous fissistigma root on the proliferation of hepatocarcinoma cells. **Methods** MTT assay and hepatoma model in mice were used to observe the proliferation of hepatoma cells impacted by total glycosides in glaucous fissistigma root. Expression of AFP in HepG2 cells was analyzed by radio immunoassay. **Results** Total glycosides in glaucous fissistigma root can significantly inhibit the proliferation of human and murine hepatoma cancer cells, and significantly reduce the secretion of AFP in HepG2 cells. **Conclusion** Total glycosides in glaucous fissistigma root can inhibit the proliferation of liver cancer cells, which mechanism may be related to inhibit the secretion of AFP.

Key words: total glycosides in glaucous fissistigma root; hepatocarcinoma cell; AFP; proliferation

肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 其死亡率居各种恶性肿瘤的第三位^[1], 由于其病程短、危害大, 因而研究对肝癌的防治和及早降低其发病率和死亡率是目前医药界面临的一个重要课题^[2-3]。中医药在抑制肿瘤生长, 提高患者生存质量和延长患者生命等方面有着得天独厚的优势^[4-5]。乌骨藤为萝藦科通关藤 *Marsdenia tenacissima* (Roxb.) Wight et Arn. 的藤茎, 民间草医常用于治疗原发性肝癌等

消化系统肿瘤, 具有一定的疗效, 且安全性较好, 以其为原料制备的消癌平制剂抗肿瘤疗效确切, 而乌骨藤总苷为其主要有效成分, 本文拟研究乌骨藤总苷的抗肝癌效用, 为开发乌骨藤有效部位抗肝癌新药提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

乌骨藤总苷为本科室自制, 批号 20111106, 常温密封保存。5-氟胞嘧啶注射液: 天津金耀氨基酸有限公司, 批号 1005052。人肝癌细胞株 Bel-7404 细胞、人肝癌 HepG2 细胞、小鼠肝癌 Hep1-6 细胞株

由中国科学院上海分院细胞生物研究所提供。动物 SPF 级昆明小鼠, 雄性各半, 体重 18 ~ 22 g, 南华大学实验动物学部提供, 许可证号: SYXK(湘)2008-0011。细胞培养箱, 美国 SHEL-LAB 公司; 超净工作台, 苏州净化设备公司; 酶标仪, 美国 Bio-Rad 公司。

1.2 乌骨藤总苷对人肝癌 Bel-7404 细胞生长影响

采用 MTT 比色法, 观察不同浓度乌骨藤总苷 (0.9 mg/mL、1.2 mg/mL、1.5 mg/mL) 对肝癌 Bel-7404 细胞生长的影响, 同时设空白对照组。取对数生长的细胞计数, 用 RPMI-1640 培养液配制细胞悬液, 细胞数为 2.0×10^5 个/mL, 细胞液加入 96 孔板, 置于 37℃ CO₂ 培养箱, 药物作用 7 天, 加 MTT 作用液, 酶标仪测 OD 值, 计算药物对肿瘤细胞生长的抑制率。抑制率 = (空白对照组 OD₅₄₀ - 用药组 OD₅₄₀) / 空白对照组 OD₅₄₀ × 100%。

1.3 乌骨藤总苷对人肝癌 HepG2 细胞生长及 AFP 分泌影响

细胞株置在无菌及含 15% 小牛血清的 DMEM 培养液中, 2 天更换 1 次培养液。取对数生长期细胞, 用 0.25% 胰酶消化传代和接种到培养板。设空白对照组和乌骨藤总苷组 (13.5 mg/mL), 观察乌骨藤总苷对 HepG2 细胞生长的影响。

AFP 含量测定采用放射免疫分析法。接种 10^4 个/mL 细胞于 24 孔培养板中, 设空白对照组和乌骨藤总苷组 (13.5 mg/mL)。培养液 24 h 更换 1 次, 每天收集细胞上清液, 测定细胞 24 h 的 AFP 分泌量, 结果换算成 ng/10⁴ 个细胞单位。

1.4 乌骨藤总苷对肝癌 Hep1-6 细胞生长抑制作用

将 Hep1-6 细胞于 DMEM-RPMI 1640 (1:1) 培养液中常规培养, 取对数生长期的细胞, 按 6×10^6 个/mL 细胞于 C57 BL/6J 小鼠右大腿根部外侧皮下接种 0.2 mL/每只, 接种肿瘤前剃毛, 应用碘酒、酒精消毒接种部位的皮肤。接种后次日将小鼠随机分成 7 组, 药物组腹腔注射药物 0.2 mL/只; 阴性对照组给予等体积的生理盐水, 阳性对照组给予相当剂量的 5-Fu, 0.2 mL/次, 每天 1 次, 连续给药 10 天。实验期间对照组动物死亡数不超过 20%。停药后 48 h 摘除小鼠眼球放血, 断颈处死, 75% 酒精浸泡消毒 5 min, 解剖剥离瘤块, 称瘤重。

肿瘤抑制率 = (C-T)/C × 100%。式中 T 为给药组平均瘤重; C 为对照组平均瘤重。

1.5 统计分析

实验数据以均数 ± 标准差表示, 两组标本计量

资料显著性分析用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结 果

2.1 乌骨藤总苷对人肝癌 Bel-7404 细胞生长的抑制作用

结果显示乌骨藤总苷浓度在 0.9 ~ 1.5 mg/mL 范围内能直接抑制体外培养的人肝癌 Bel-7404 细胞生长, 呈现量效关系。结果见表 1。

表 1 不同浓度乌骨藤总苷对人肝癌 Bel-7404 细胞生长的抑制率 (n=3)

乌骨藤总苷	抑制率 (%)
0 (mg/mL)	0
0.9 (mg/mL)	31.0 ± 3.3 ^a
1.2 (mg/mL)	66.0 ± 2.6 ^b
1.5 (mg/mL)	98.0 ± 2.1 ^b

与对照组 (0 μmol/L) 比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$

2.2 乌骨藤总苷对人肝癌 HepG2 细胞生长及 AFP 分泌的抑制作用

由表 2 所知, 同时对空白对照组和乌骨藤总苷组接种 1.5×10^4 /mL 人肝癌 HepG2 细胞, 随着接种天数的增加, 乌骨藤总苷组细胞生长速度明显慢于空白对照组。在接种后第 4 天乌骨藤总苷对 HepG2 细胞产生明显的抑制作用。在此浓度观察对肝癌细胞 AFP 分泌的影响, 结果显示乌骨藤总苷在接种后第 2 天对肝癌细胞 AFP 分泌有明显的抑制作用 (见表 3)。

表 2 乌骨藤总苷作用不同时间对人肝癌 HepG2 细胞生长的影响 (细胞数 × 10⁴ 个/mL)

药物作用天数	空白对照组	乌骨藤总苷组
0	1.5	1.5
1	2.2 ± 0.8	1.9 ± 0.4
2	1.7 ± 0.5	1.6 ± 0.5
3	5.3 ± 2.2	3.4 ± 1.6
4	10.1 ± 1.2	7.2 ± 1.4 ^a
5	21.6 ± 0.8	12.8 ± 0.8 ^b
6	45.2 ± 0.5	14.5 ± 0.4 ^b

与空白对照组比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$

2.3 乌骨藤总苷对肝癌 Hep1-6 细胞在小鼠体内生长的抑制作用

乌骨藤总苷体内对皮下接种的小鼠 Hep1-6 肝

癌的疗效见表4。结果表明,乌骨藤总苷的抑瘤率随剂量增加越来越高,且高剂量组(180 mg/kg)作用接近5-氟尿嘧啶(5-Fu)对照组。

表3 乌骨藤总苷作用不同时间对人肝癌 HepG2 细胞每天 AFP 分泌量的影响(ng/10⁴ 细胞, n = 10)

药物作用天数	空白对照组	乌骨藤总苷组
1	55.1 ± 2	50.1 ± 3
2	98.5 ± 2	37.5 ± 1 ^a
3	54.2 ± 1	38.1 ± 2 ^b
4	60.8 ± 5	28.3 ± 1 ^b
5	45.6 ± 4	17.9 ± 1 ^b

与空白对照组比较, a: P < 0.05, b: P < 0.01

表4 乌骨藤总苷体内对皮下接种的小鼠 Hep1-6 肝癌的疗效(n = 10)

组别	剂量(mg/kg)	肿瘤重量(g)	抑瘤率(%)
NS 组		0.75 ± 0.15	0
5-Fu 组	20	0.42 ± 0.11 ^b	44.12 ^b
乌骨藤总苷组	60	0.62 ± 0.09 ^a	17.68 ^a
	120	0.47 ± 0.08 ^b	38.04 ^b
	180	0.44 ± 0.05 ^b	41.85 ^b

NS:生理盐水组;与空白对照组比较,a:P < 0.05, b:P < 0.01

3 讨 论

据《中药大辞典》^[6]记载:乌骨藤性平,味温,入肝经。乌骨藤又名通光藤,具有消炎、清热解毒、止咳平喘、散结止痛等功效。乌骨藤含有多种甾体酯苷、生物碱、有机酸、多糖、树脂及色素等化学成分^[7],传统用于咳嗽喘,主治气管炎,支气管哮喘等。民间草医在临床诊疗中发现其具有较好的抗肿瘤作用,曾用于治疗肝癌等消化系统肿瘤,具有一定的疗效,引起了肿瘤学界的高度关注。现代药理研究及临床表明,乌骨藤具有明显的抗肿瘤活性,是一种很有开发前途的中药,目前临床已有以乌骨藤为原药材制成的消癌平胶囊、消癌平片和消癌平注射液等药用于食道癌、胃癌、肺癌、肝癌的治疗^[8-9]。为进一步开发、有效地利用中药乌骨藤制剂来抗肿瘤治疗,我们应用多种人和小鼠的肝癌细胞株,采用离体和在体结合,进行了乌骨藤总苷抗肝癌作用的实验研究。

本实验结果表明乌骨藤总苷对体外培养的人肝癌 Bel-7404 细胞生长有直接抑制作用,13.5 mg/ml 乌骨藤总苷对人肝癌 HepG2 细胞生长

产生明显的抑制作用,接种后第4天乌骨藤总苷细胞数与空白对照组比较有显著差异。同时乌骨藤总苷能显著降低人肝癌 HepG2 细胞 AFP 的分泌,AFP 是一种癌胚蛋白,临床上 AFP 的血浓度及动态曲线与肝癌病人的病情变化、肝癌细胞增殖及分化程度密切相关,AFP 是肝癌细胞增殖的“自我需要”,临床上 AFP 升高者,肝癌的恶性程度往往较高,分化程度也较低^[10]。以上结果表明:乌骨藤总苷在抑制肝癌细胞增殖的同时,能使 AFP 分泌量降低,可能使肝癌细胞向正常方向分化。小鼠抑瘤试验结果表明乌骨藤总苷能显著抑制肿瘤生长,高剂量组疗效接近于 5-Fu。总之,乌骨藤总苷具有显著的抑制肝癌细胞增殖的效用,有望开发成治疗肝癌的有效部位新药。

参考文献:

- [1] Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma [J]. Lancet, 2012, 379(9822): 1245-1255.
- [2] Marquardt JU, Galle PR, Teufel A. Hepatocellular carcinoma: molecular pathogenesis and novel targets for therapy [J]. Dtsch Med Wochenschr, 2012, 137(16): 855-860.
- [3] Cao H, Phan H, Yang LX. Improved chemotherapy for hepatocellular carcinoma [J]. Anticancer Res, 2012, 32(4): 1379-1386.
- [4] Qi F, Li A, Inagaki Y, et al. Chinese herbal medicines as adjuvant treatment during chemo- or radio-therapy for cancer [J]. Biosci Trends, 2010, 4(6): 297-307.
- [5] Jiang Z, Hua H. Progress on prevention and treatment of Chinese medicine to molecular mechanism of liver cancer [J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2009, 34(10): 1310-1313.
- [6] 江苏医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 470.
- [7] 旺兴, 陈斌. 通光藤中两个新 C21 甾体苷类成分 [J]. 药学学报, 2004, 39(4): 272-275.
- [8] 孙珏, 沈建华, 朱美华, 等. 中药消癌平针剂经肝动脉介入治疗转移性肝癌的临床研究 [J]. 上海中医药杂志, 2000, 34(1): 14-17.
- [9] 王文荣, 崔生达, 曾黎明. 中药消癌平配合超声引导经皮射频治疗中晚期肝癌的临床观察 [J]. 中国中西医结合杂志, 2003, 23(1): 19-21.
- [10] 汤钊猷, 余业勤. 原发性肝癌 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 123-124.

(此文编辑:秦旭平)