

# 蜂房提取物抑制 H<sub>22</sub> 小鼠移植瘤增殖的作用研究

姚 妮<sup>1</sup>, 刘艳红<sup>2</sup>, 张 红<sup>1</sup>, 刘 勇<sup>3</sup>, 贾爱明<sup>1</sup>, 鲍发臻<sup>1</sup>

(1. 大连医科大学附属第二医院, 辽宁 大连 116023; 2. 凌源市中医院, 辽宁 凌源 122500; 3. 大连医科大学附属第一医院, 辽宁 大连 116011)

**摘 要:** [目的] 探讨蜂房提取物对小鼠 H<sub>22</sub> 肿瘤细胞生长的影响及其抑瘤作用机制。[方法] 将 40 只小鼠随机分为盐水对照组、氟尿嘧啶组、蜂房高剂量组和蜂房低剂量组, 每组 10 只。测定荷瘤小鼠的瘤质量和抑瘤率, 观察蜂房提取物对肿瘤生长的影响, 同时采用免疫组化方法检测瘤组织中 C-Met 的表达。[结果] 蜂房高、低剂量组的抑瘤率分别为 31.96%、27.84%, 与盐水对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); C-Met 在 4 组中均呈阳性表达, 与盐水对照组比较, 蜂房高、低剂量组 C-Met 的表达减弱, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。[结论] 蜂房提取物对小鼠 H<sub>22</sub> 移植性实体瘤有明显的抑制作用, 其机制可能与降低肝癌细胞内 C-Met 的表达有关。  
**主题词:** 蜂房提取物; H<sub>22</sub> 肝癌; C-Met; 抑瘤作用  
**中图分类号:** R73-36\*2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)04-0270-04

## Study of the Inhibitory Effect of Nidus Vespae Extracts on Proliferation of H<sub>22</sub> Transplanted Tumor in Mice

YAO Wei<sup>1</sup>, LIU Yan-hong<sup>2</sup>, ZHANG Hong<sup>2</sup>, et al.

(1. The Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116023, China; 2. Traditional Chinese Medicine Hospital of Lingyuan City in Liaoning Province, Lingyuan 122500, China)

**Abstract:** [Purpose] To explore the antitumor effect of nidus vespae extracts on H<sub>22</sub> transplanted tumor cell in mice and its mechanism. [Methods] Forty mice were randomly divided into 4 groups: saline control group, 5-Fu group, high-dose nidus vespae group and low-dose nidus vespae group. The tumor weights and rates of tumor inhibition were compared among the groups. Then the expression of C-Met was detected by immunohistochemistry. [Results] The rates of tumor inhibition in high-dose nidus vespae group and low-dose nidus vespae group were 31.96% and 27.84% respectively, with significant difference compared to saline control group ( $P < 0.01$ ). The expression of C-Met decreased in both the high-dose nidus vespae group and low-dose nidus vespae group, and there was apparent difference with that in saline control group ( $P < 0.05$ ). [Conclusion] The inhibitory effects of nidus vespae extracts on H<sub>22</sub> transplanted tumor cells are significant and the mechanism may be related to reducing expression of C-Met.

**Subject words:** nidus vespae extracts; H<sub>22</sub> hepatoma; C-Met; antitumor effect

祖国医学以蜂房用药历史悠久, 蜂房(nidus vespae)为胡蜂科昆虫果马蜂(*Polistes olivaceous* DeGeer)、日本长脚胡蜂(*Polistes japonicus* Saussure)或异腹胡蜂(*Parapolybia varia* Fabricius)的巢。具有祛风、攻毒、杀虫、止痛的作用<sup>[1]</sup>。蜂房作为一种抗癌中

药, 对肺癌、胃癌、子宫癌、白血病等多种恶性肿瘤均有治疗作用<sup>[2]</sup>, 且毒副作用小。目前有研究表明, 蜂房乙醇提取物对 H<sub>22</sub> 肝癌荷瘤小鼠的放化疗有显著的增效作用<sup>[3]</sup>。C-Met 原癌基因过表达见于多种肿瘤, 如乳腺癌、前列腺癌、甲状腺癌、肝癌等, 与肿瘤的发生、发展及预后关系密切。本实验以小鼠 H<sub>22</sub> 移植性实体瘤为模型, 观察蜂房提取物对 H<sub>22</sub> 小鼠移植性实体瘤增殖的抑制作用及对 C-Met 表达的影

**通讯作者:** 刘 勇, 主治医师, 硕士; 大连医科大学附属第一医院, 辽宁省大连市西岗区中山路 222 号 (116011); E-mail: fuwa5.2008@yahoo.com.cn。  
**收稿日期:** 2011-10-27; **修回日期:** 2011-12-17

响,以探讨蜂房提取物的体内抗肿瘤机制,为其进一步开发和临床应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

6~8 周龄 BALB/c 小鼠,雌雄各半,体质量 18~22g,共 40 只,购自大连医科大学动物实验中心,动物合格证号:SCXK(辽)2008-0002。瘤株为小鼠肝癌腹水瘤细胞系 H<sub>22</sub>,由大连医科大学病理教研室提供。蜂房生药购于大连医科大学附属第二医院,经专家鉴定为正品。氟尿嘧啶注射剂由天津金陵氨基酸有限公司生产,购自大连医科大学附属第二医院,批号:1007142。SP 免疫组织化学检测试剂盒、DAB 显色试剂盒、C-Met 抗体均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。BH-2 Olympus 光学显微镜由日本 Olympus 公司生产、滑台切片机为日本樱花牌、恒温干燥箱由上海精密仪器仪表有限公司生产、台式高速离心机 LDZ5-2 型由北京医用离心机厂生产、电热恒温水浴箱 HWS-20 型由江苏太仓市实验设备厂生产。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 蜂房水提取液的制备

参考文献[4]方法,将蜂房生药 250g 用清水洗净、粉碎,置煎药机内,加适量水浸没药材。浸泡充分后加热煮沸,保持微沸 1h,分离煎出液,收集残渣。对残渣依同法煎煮 3 次,收集各次煎出液,得到约 1000ml 的汤剂煎出液,通过加热浓缩至 500ml,沉降过滤并降至常温。浓缩液内加入无水乙醇至乙醇浓度为 60%(V/V),装入密封容器内,在 0℃条件下静置沉淀 2~3d,取上清液通过水浴蒸馏罐蒸去乙醇,得到蜂房水提取物约 62.5ml。其外观呈深棕褐色、黏稠、透明、无味,药物浓度按生药量计算为 4g/ml,冰箱保存。使用前用生理盐水配成浓度分别为 0.12g/ml、0.06g/ml。

#### 1.2.2 动物模型建立及给药

在无菌条件下,抽取传代 7d 的腹水型 H<sub>22</sub> 小鼠腹水,用生理盐水调至细胞浓度为  $5 \times 10^6$  个/ml。40 只小鼠右前腋窝下以 75%乙醇消毒,皮下注射配制好的 H<sub>22</sub> 肝癌细胞悬液 0.1ml,细胞总数约为  $5 \times 10^5$  个,以出现皮丘为接种成功。将 40 只小鼠随机分为

盐水对照组、氟尿嘧啶组、蜂房高剂量组和蜂房低剂量组,每组 10 只。24h 后称重,盐水对照组以生理盐水 10ml/kg 灌胃,氟尿嘧啶组以 20mg/kg 腹腔注射,蜂房高剂量组以 2.0g/kg 灌胃,蜂房低剂量组以 1.0g/kg 灌胃,以上各组每天给药 1 次,连续给药 14d。

#### 1.2.3 瘤质量、抑瘤率的测定

第 15d 颈椎脱臼法处死小鼠,剥离瘤组织称重备用,经病理证实瘤组织是肝癌腹水瘤细胞系细胞株所致的实体瘤,计算抑瘤率。

抑瘤率 (%) = (对照组平均瘤质量 - 实验组平均瘤质量) / 对照组平均瘤质量  $\times 100\%$

#### 1.2.4 免疫组化法检测肿瘤组织中 C-Met 的表达

将剥取的瘤组织用 10%福尔马林液固定,固定的标本进行脱水,常规石蜡包埋,于肿瘤组织最大横断面切片,厚度约 4 $\mu$ m,切片经二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水,0.01mol/L PBS 冲洗,置 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育 10min,阻断内源性过氧化物酶活性,PBS 冲洗。滴加 0.01mol/L 柠檬酸盐缓冲液,100℃微波修复抗原 10min,自然冷却 30min 左右,至室温 PBS 冲洗。加入封闭用正常山羊血清,室温孵育 10min,倾去血清勿洗,滴加适量一抗(C-Met 抗体),4℃过夜,PBS 冲洗,加入聚合物辅助剂(试剂 1),37℃孵育 20min,PBS 冲洗,滴加辣根酶标记抗兔 IgG 多聚体(试剂 2),37℃孵育 20min,PBS 冲洗,DAB 显色,苏木精复染,脱水,透明,中性树胶封片。以 PBS 替代一抗作阴性对照。

### 1.3 结果判定

免疫组织化学染色采用 IPP 图像分析软件半定量检测阳性染色物质的面积及积分光密度,求平均光密度,用平均光密度值代表组织中 C-Met 蛋白表达水平的高低。

### 1.4 统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计软件分析,数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析进行检验,组间比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 瘤质量、抑瘤率的测定

氟尿嘧啶组、蜂房高、低剂量组瘤质量与盐水对照组比较均有显著性差异( $P < 0.01$ ),蜂房高、低剂量

组与氟尿嘧啶组比较亦有显著性差异( $P<0.05$ )。氟尿嘧啶组、蜂房高、低剂量组抑瘤率分别为 52.06%、31.96%、27.84%。见表 1。

2.2 C-Met 的表达

免疫组化结果显示,4 组 C-Met 均呈阳性表达,C-Met 的阳性表达定位于细胞质或细胞膜上,呈棕黄色(图 1)。结果显示蜂房高、低剂量组和氟尿嘧啶组 C-Met 的表达均减弱,与盐水对照组比较均有显著性差异( $P<0.05$ ),蜂房高、低剂量组与氟尿嘧啶组比较亦有显著性差异( $P<0.05$ ),见表 2。

表 1 各组瘤质量及抑瘤率的比较

| 组别     | 剂量<br>[mg/(kg·d)] | 瘤质量<br>(g)              | 抑瘤率<br>(%) |
|--------|-------------------|-------------------------|------------|
| 盐水对照组  | —                 | 1.94±0.58               | —          |
| 氟尿嘧啶组  | 20.0              | 0.93±0.28 <sup>▲</sup>  | 52.06      |
| 蜂房高剂量组 | 2.0               | 1.32±0.28 <sup>▲*</sup> | 31.96      |
| 蜂房低剂量组 | 1.0               | 1.40±0.31 <sup>▲*</sup> | 27.84      |

注:与盐水对照组比较, <sup>▲</sup> $P<0.01$ ;与氟尿嘧啶组比较, <sup>\*</sup> $P<0.05$ 。

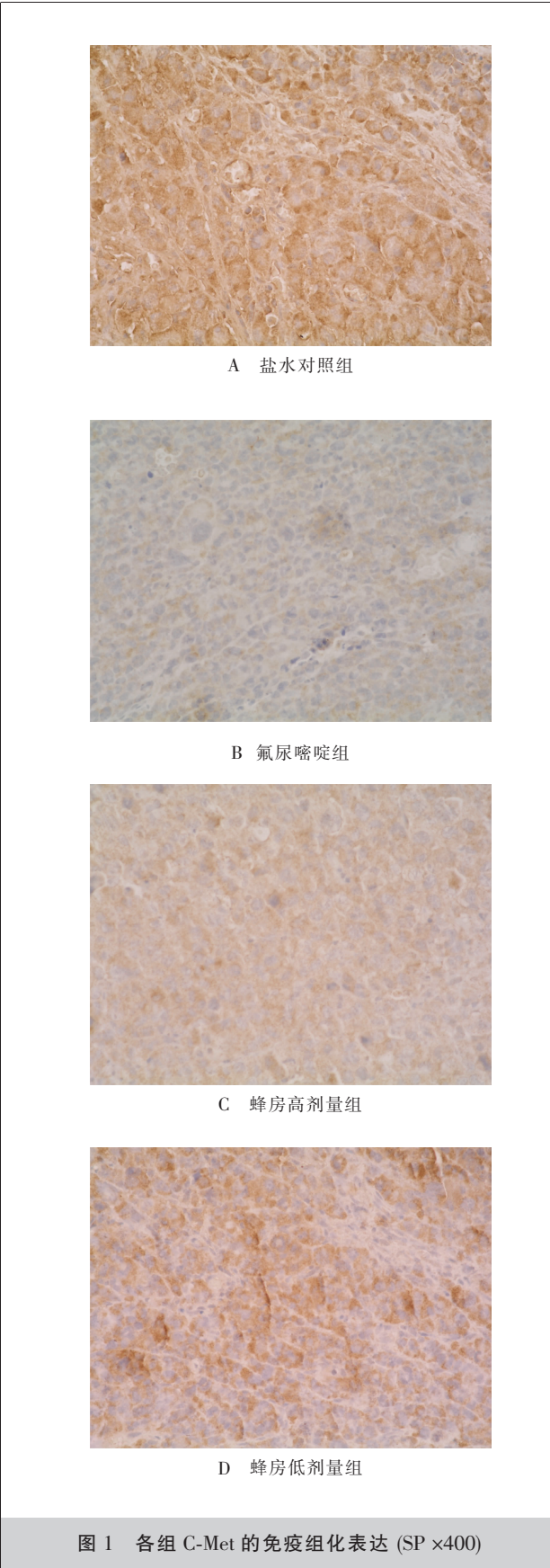
表 2 各组 C-Met 蛋白的表达情况

| 组别     | 平均光密度值( $\bar{x}\pm s$ )         |
|--------|----------------------------------|
| 盐水对照组  | 315372.30±45286.82               |
| 氟尿嘧啶组  | 227190.11±36589.20 <sup>▲</sup>  |
| 蜂房高剂量组 | 270279.83±34958.87 <sup>▲*</sup> |
| 蜂房低剂量组 | 278028.07±44090.26 <sup>▲*</sup> |

注:与盐水对照组比较, <sup>▲</sup> $P<0.05$ ;与氟尿嘧啶组比较, <sup>\*</sup> $P<0.05$ 。

3 讨 论

肿瘤的传统治疗以手术和放、化疗为主,这些方法确实能清除大部分的癌细胞,但其带来的副作用和对患者免疫功能的影响是不容忽视的<sup>[5]</sup>。蜂房为一传统中药,始载于《神农本草经》:“主惊痫疾,寒热邪气癰疾,肠痔”。《本草汇言》解其:“能驱风攻毒,散疔肿恶毒”。《本草求真》曾指出:“蜂房为清热软坚散结要药”。目前研究已发现其具有抗菌、抗炎、抗病毒、抗肿瘤、抗溃疡、镇静麻醉等作用<sup>[6]</sup>。目前对于蜂房抗肿瘤作用研究多局限于体外,蜂房提取物对活体肿瘤的抑制作用报道很少<sup>[3]</sup>。吴德全等<sup>[4]</sup>向淋巴细胞胰岛混合培养系统中加入 3 种不同浓度的蜂房水提取液,结果发现其对淋巴细胞胰岛混合培养系统中的淋巴细胞转化有抑制作用,且随浓度增加抑制作用增强,提示蜂房可以抑制 T 细胞介导的免疫功能。已有研究表明蜂房蛋白体外对白血病细胞增殖



有明显抑制作用,并可诱导其凋亡,并呈现典型的细胞凋亡形态学改变<sup>[7,8]</sup>。本实验结果表明蜂房提取物对 H<sub>22</sub> 小鼠移植性实体瘤增殖有明显的抑制作用,蜂房高、低剂量组抑瘤率分别为 31.96%和 27.84%,但与氟尿嘧啶组比较抑瘤作用还是具有一定差距( $P < 0.05$ )。氟尿嘧啶是临床上常用的肿瘤化疗药物,本实验中也显示出十分显著的抑瘤作用,但氟尿嘧啶组荷瘤小鼠用药期间体重下降、活动少、掉毛、精神、饮食都比较差。而蜂房各剂量组给药期间小鼠一般状况较好,未发生此现象,提示其毒性小,使用安全。

随着分子生物学研究的进展,多项研究证实肿瘤细胞的发生、分化和转移与细胞间的信号传导有关。肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)是一种很强的刺激肝细胞增殖的丝裂原。C-Met 蛋白是 HGF 的特异膜受体,为一种跨膜蛋白,由原癌基因 *C-Met* 编码,具有酪氨酸激酶活性。HGF/C-Met 信号传导通路广泛存在于各种细胞中,对多种组织器官的生长发育具有重要的生理调节作用。但当细胞过度表达 HGF 或 C-Met 时,常常导致肿瘤细胞的侵袭、转移<sup>[9]</sup>。HGF 激活 C-Met,可导致 ras/致分裂素激活蛋白(MAP)激酶、磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 等信号转导途径的级联激活,细胞发生一系列生物学效应,如分散、细胞运动、侵袭、细胞迁移以及最终转移等。目前已明确,C-Met 在正常组织中表达很低,而在肝癌、胃癌、肺癌、结肠癌、乳腺癌和淋巴瘤等恶性肿瘤中则激活,并高水平表达<sup>[10]</sup>,与多种人类肿瘤的发生、发展有关。干预 HGF/C-Met 的信号表达能够抑制肿瘤的恶性转化、血管形成、癌性生长和浸润<sup>[11]</sup>。本实验结果显示,C-Met 在 4 组中均呈阳性表达,与盐水对照组比较,蜂房高、低剂量组 C-Met 的表达减弱,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),表明蜂房提取物能抑制 H<sub>22</sub> 小鼠移植性实体瘤 C-Met 的高表

达,具有抗肿瘤作用。抑制 C-Met 的高表达可能是蜂房提取物抗肿瘤主要作用机制之一,但有关蜂房的抗肿瘤作用机制及其与荷瘤机体免疫功能之间的关系,尚有待进一步分析。

## 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M].北京:化学工业出版社,2005.249.
- [2] 袁红宇,徐华娥,欧宁,等. MTT 法测定蜂房提取物对胃癌细胞 BGC823 增殖的影响[J]. 现代中药研究与实践, 2009,22(6):31-33.
- [3] 魏金荣,张坤,关一夫,等. 蜂房提取物对荷瘤鼠放化疗的增效作用[J]. 贵阳医学院学报,2008,33(5):462-464.
- [4] 吴德全,陈明,黄跃南,等. 露蜂房对淋巴细胞与胰岛混合培养系统中淋巴细胞转化的影响[J]. 中国普外基础与临床杂志,2007,14(2):168-170.
- [5] 蔡琨,冯泳,何前松,等. 小半夏加茯苓汤对 H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠的抑瘤及免疫调节作用 [J]. 实用医学杂志,2011,27(7):1290-1292.
- [6] 倪士峰,刘惠,李传珍,等. 蜂房药学研究现状[J]. 云南中医中药杂志,2009,30(5):71-73.
- [7] 时彦,张连双,赵伟,等.露蜂房纯化蛋白对白血病细胞形态学影响的研究 [J]. 滨州医学院学报,2009,32(3):177-180.
- [8] 张雪莉,张圣明,时彦,等.MTT 比色法检测露蜂房蛋白对白血病细胞增殖的影响[J].数理医药学杂志,2008,21(2):161-162.
- [9] 谢斌,董家鸿. 肝细胞生长因子及其受体信号系统与肝细胞癌转移研究进展[J]. 中华肝脏病杂志,2005,13(5):396-398.
- [10] 刘云燕,纪振钢,杨连甲,等.肝细胞生长因子受体 C-met 在骨肉瘤中的表达及其临床意义 [J]. 现代肿瘤医学, 2010,18(2):361-363.
- [11] Danikovitch-Miagkova A,Zbar B. Dysregulation of Met receptor tyrosion kinase activity in invasive tumors[J].J Clin Invest,2002,109(7):863-867.