

美洲大蠊提取物 C II -3 对 H₂₂ 肝癌小鼠血管生成作用的研究

Effect of *Periplaneta Americana* Extract C II -3 on Angiogenesis in H₂₂ Hepatoma-bearing Mice
CHEN Jun-ya, GENG Ling, ZHANG Xu-qiang, et al.

陈俊雅¹, 耿玲¹, 张旭强¹, 杨同堂¹, 李洪文², 何旭¹, 普小菲¹, 彭芳¹

(1.大理学院药化学院药理教研室, 云南大理 671000;

2.楚雄医药高等专科学校, 云南楚雄 675000)

摘要: [目的] 探讨美洲大蠊提取物 C II -3 对 H₂₂ 肝癌小鼠肿瘤生长的抑制作用及其机制。 [方法] 将 50 只昆明种小鼠接种 H₂₂ 肝癌细胞, 随机分为模型组、阳性组以及 C II -3 低、中、高剂量组, 比较各组抑瘤率、脏器指数以及 VEGF 含量。 [结果] 高剂量 C II -3 对 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤的生长有明显的抑制作用 (61.41%), 并且能降低小鼠血清中 VEGF 的含量 (361.72±101.84ng/L)。 [结论] C II -3 能抑制 H₂₂ 肝癌小鼠肿瘤的生长, 并对肝癌小鼠的免疫器官有一定程度的保护作用, 其机制可能与下调 VEGF 的表达而抑制肿瘤血管生成有关。

关键词: 美洲大蠊; 小鼠; 血管内皮生长因子; 肝肿瘤; H₂₂ 细胞

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)04-0274-03

美洲大蠊 (*Periplaneta americana*) 属昆虫纲蜚蠊目蜚蠊科, 俗称蟑螂、偷油婆等。原产于南美洲, 食性广泛, 喜食糖和淀粉等, 污染食物、传播病菌和寄生虫, 是世界性卫生害虫。而作为传统中药材, 美洲大蠊常以干燥或鲜成虫入药。之前对美洲大蠊的研究主要集中在抗菌等方面, 而我们的前期研究^[1-3]表明, 美洲大蠊提取物对多种肿瘤细胞都具有很好的抑制作用。本文旨在探讨美洲大蠊提取物 C II -3 对 H₂₂ 肝癌小鼠肿瘤生长的抑制作用及其机制。

1 材料与方 法

1.1 细胞株和动物

H₂₂ 小鼠肝癌细胞, 由昆明医学院重点实验室提供。昆明种小鼠, 体质量 (20±2)g, 雌雄各半, 由昆明医学院动物实验中心提供, 动物合格证号: SCXK (滇)2011-0004。

1.2 试剂与药品

C II -3 (大理学院药化学院刘光明教授提供, 批

号: 20110411), 总超氧化物歧化酶 (total superoxide dismutase, T-SOD) 测试盒 (南京建成生物工程研究所, 批号: 20110601), 丙二醛 (maleic dialdehyde, MDA) 测试盒 (南京建成生物工程研究所, 批号: 20110531), 小鼠血管内皮生长因子 (vascular endothelium growth factor, VEGF) 酶联免疫检测 (ELISA) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所), 环磷酰胺 (cytoxan, CTX) (江苏恒瑞医药股份有限公司, 批号: 10121821)。

1.3 仪 器

台式高速冷冻离心机 (上海市离心机械所, 型号: TL-16R), 二氧化碳培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司, 型号: BPN-80CRH), 艾柯超纯水机 (成都康宁实验专用纯水设备厂, 型号: KL-UP-UV-20KN-SY1059), 紫外可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司, 型号: T6 新世纪), 电动玻璃匀浆机 (宁波新芝生物科技股份有限公司, 型号: DY89-II 型), 电热恒温水浴锅 (北京长安科学仪器厂, 型号: HH-S11-1)。

1.4 实验方法

1.4.1 H₂₂ 肝癌移植瘤模型^[4]

取小鼠 H₂₂ 肝癌细胞, 在小鼠腹腔内保种传代成腹水瘤, 第 2 代无菌条件下抽取保种 7~10d 的小

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30860337)

通讯作者: 彭芳, 教授, 硕士生导师; 大理学院药化学院药理教研室, 云南省大理市万花路 (671000); E-mail: pengfang101@sohu.com。

收稿日期: 2011-10-27; 修回日期: 2012-01-31

鼠腹水。加入一定量无菌生理盐水,混匀,用0.4%台盼蓝染液对细胞进行染色,然后于光学显微镜下计数活细胞的数量,选取活细胞>96%的进行动物实验。调整细胞浓度为 1×10^7 个/ml,每只小鼠右腋皮下接种0.2ml,共接种50只。

1.4.2 动物分组及给药

小鼠接种24h后,按体质量将小鼠随机分为5组:模型组、阳性组以及C II-3高、中、低剂量组,每组10只,另外再选取10只正常小鼠作为正常组,雌雄各半且分笼饲养。其中正常组、模型组用0.9%生理盐水灌胃;C II-3高、中、低剂量组分别给予200、100、50mg/kg的C II-3,灌胃剂量均为0.2ml/10g;阳性组腹腔注射30mg/kg的CTX,0.1ml/10g,隔日给药一次。各组小鼠均给药10d。

1.4.3 肿瘤抑制率和脏器指数的计算

在肿瘤生长的第11d,眼球取血后颈椎脱臼处死小鼠,剥取肿瘤,计算肿瘤抑制率。肿瘤抑制率计算公式为:

肿瘤抑制率(%)=(模型组瘤重-实验组瘤重)/模型组瘤重 $\times 100\%$

同时摘取小鼠肝脏、脾脏以及胸腺,并称重。计算各组小鼠脏器指数。脏器指数计算公式为:

脏器指数=脏器重量(mg)/小鼠体重(g)

1.4.4 血清VEGF含量的检测

小鼠眼球取血后,将血液置于冰浴中1~2h,然后在4℃、4 000r/min条件下离心10min,取上清。用小鼠VEGF ELISA试剂盒检测血清中VEGF含量。

1.5 统计学处理

采用SPSS 11.0软件进行统计学分析,数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组均数的比较用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 C II-3对H₂₂肝癌小鼠抑瘤率的影响

C II-3对H₂₂肝癌小鼠抑瘤率的影响见表1。C II-3可以明显抑制小鼠H₂₂实体瘤的生长,高剂量组的抑瘤率达到了61.41%,与

阳性组比较抑瘤效果相当,两者之间无明显统计学差异($P > 0.05$)。

2.2 C II-3对H₂₂肝癌小鼠脏器指数的影响

C II-3对H₂₂肝癌小鼠脏器指数的影响见表2。与模型组相比,阳性组及C II-3低、中、高剂量组均降低了胸腺指数。与阳性组比较,C II-3各剂量组均能增高胸腺指数、肝脏指数以及脾脏指数。

2.3 C II-3对H₂₂肝癌小鼠血清VEGF含量的影响

从表3可以看出,与模型组相比,阳性组、C II-3高、中、低剂量组均能降低H₂₂肝癌小鼠血清中VEGF的含量,但差异未达到统计学意义;与阳性组比较,C II-3高剂量组VEGF的表达量更低。

3 讨论

恶性肿瘤最常见的转移途径包括淋巴道转移和

表1 C II-3对H₂₂荷瘤小鼠瘤重及肿瘤生长抑制率的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

| 组别 | 剂量(mg/kg) | 瘤重(g) | 肿瘤抑制率(%) |
|------------|-----------|------------------------------|----------|
| 正常组 | - | - | - |
| 模型组 | - | 0.93 \pm 0.75 [▲] | - |
| 阳性组 | 30 | 0.24 \pm 0.28* | 74.09 |
| C II-3低剂量组 | 50 | 0.70 \pm 0.46 [▲] | 24.50 |
| C II-3中剂量组 | 100 | 0.74 \pm 0.47 [▲] | 20.31 |
| C II-3高剂量组 | 200 | 0.36 \pm 0.28* | 61.41 |

注:与模型组比较,* $P < 0.05$;与阳性组比较,[▲] $P < 0.05$ 。

表2 C II-3对H₂₂荷瘤小鼠脏器指数的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

| 组别 | 剂量(mg/kg) | 肝脏指数(mg/g) | 脾脏指数(mg/g) | 胸腺指数(mg/g) |
|------------|-----------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 正常组 | - | 43.42 \pm 2.27 [▲] | 2.70 \pm 0.48* | 2.54 \pm 1.00 [▲] |
| 模型组 | - | 50.68 \pm 4.30 | 4.57 \pm 1.48 [▲] | 2.29 \pm 1.07 [▲] |
| 阳性组 | 30 | 48.01 \pm 3.95 | 3.18 \pm 0.77* | 1.13 \pm 0.63* |
| C II-3低剂量组 | 50 | 48.91 \pm 3.17 | 4.58 \pm 1.00 [▲] | 2.17 \pm 0.81 [▲] |
| C II-3中剂量组 | 100 | 50.84 \pm 6.34 | 4.85 \pm 2.29 [▲] | 1.91 \pm 0.84 |
| C II-3高剂量组 | 200 | 50.32 \pm 6.52 | 4.62 \pm 2.08 [▲] | 1.97 \pm 1.07 [▲] |

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,与阳性组比较,[▲] $P < 0.05$ 。

表3 C II-3对H₂₂荷瘤小鼠血清VEGF的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

| 组别 | 剂量(mg/kg) | VEGF(ng/L) |
|------------|-----------|---------------------|
| 正常组 | - | 438.73 \pm 112.59 |
| 模型组 | - | 422.77 \pm 128.62 |
| 阳性组 | 30 | 385.95 \pm 125.43 |
| C II-3低剂量组 | 50 | 414.44 \pm 113.67 |
| C II-3中剂量组 | 100 | 385.98 \pm 153.31 |
| C II-3高剂量组 | 200 | 361.72 \pm 101.84 |

血行转移, 而血管生成是肿瘤生长和转移的关键因素。VEGF是目前已知作用最强的血管生成因子, 又称为血管通透因子, 是由肿瘤细胞分泌并特异性作用于血管内皮细胞的一种生长因子。VEGF可以通过与血管内皮细胞表面特异性受体结合从而发挥生物学效应。

肿瘤转移和血管生成在分子机制上有相似之处, 都要调节细胞黏附、基质降解和细胞运动以达到癌细胞转移和血管生成, 因而抗肿瘤血管生成与抗肿瘤转移是密切相关的^[5]。在抗肿瘤治疗中, 可以通过抑制血管内皮生成因子的表达而抑制肿瘤血管生成, 从而阻碍肿瘤的血行转移。本实验中阳性组与C II-3各剂量组的VEGF含量均低于模型组, 且高剂量组VEGF含量最低, 由此可以看出C II-3在某种程度上具有一定的抗肿瘤血管新生作用。

研究表明, 肿瘤的发生、发展、浸润及转移与机体的免疫功能也有很大关系。一旦受到外界抗原刺激, 机体内相应的免疫应答将会被激活, 但是随着肿瘤的不断生长, 又会对机体的免疫器官产生一定的抑制作用, 导致胸腺缩小^[6]。因此在本研究中, 与正常组相比, 其他各组的胸腺重量均有减轻。阳性组对H₂₂荷瘤小鼠的肿瘤抑制率达到74%, 与文献报道^[7]基本一致。但是CTX在抑制肿瘤生长的同时, 也对机体的免疫器官有一定毒性, 而各个剂量组的脏器

指数都大于阳性组, 充分说明C II-3对机体免疫器官有一定的保护作用。

本实验结果表明, C II-3对H₂₂肝癌移植瘤有一定的抑制作用, 其抑瘤机制可能与下调VEGF在荷瘤鼠体内的表达有关。至于是否还存在其他的抑瘤机制, 有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] 何正春, 王晓雨, 杨雷香, 等. 美洲大蠊提取物对3株消化系统肿瘤细胞的细胞毒性研究[J]. 药物研究, 2009, 18(9): 11-12.
- [2] 何正春, 王晓雨, 胡明辉, 等. 美洲大蠊提取物对3株人体呼吸系统肿瘤细胞的细胞毒性研究[J]. 中国现代药物应用, 2009, 3(7): 1-2.
- [3] 胡艳芬, 吕小满, 刘光明, 等. 美洲大蠊提取物对3株人肺癌细胞的体外抑制作用[J]. 大理学院学报, 2009, 8(12): 1-3.
- [4] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 1757-1759.
- [5] van Horssen R, Ten Hagen TL, Eggermont AM. TNF- α in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility[J]. Oncologist, 2006, 11(4): 397-408.
- [6] 郭青龙. 肿瘤药理学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007. 99-100.
- [7] 巫珊, 顾伟梁, 冯年平, 等. 冬凌草甲素自微乳对小鼠移植性肿瘤H₂₂的抑制作用[J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(6): 567-569.