

熊果酸抗小鼠 H22 肝癌移植瘤及对免疫功能的影响

方学辉, 吴倩, 韩雪梅, 任欣乐, 白星, 朱兵, 李金燕
(洛阳东方医院, 河南 洛阳 471003)

摘要: [目的] 研究熊果酸(UA)对小鼠 H22 肝癌移植瘤的抑制作用及免疫功能的影响。[方法] 采用移植性 H22 肝癌小鼠模型, 随机分为模型组(对照)、氟尿嘧啶(5-Fu)处理组、UA 高、低剂量组, 分别连续腹腔注射 5-Fu(25mg/kg)、UA(50mg/kg、25mg/kg) 14d 后, 处死小鼠, 计算抑瘤率、外周血白细胞数、脾脏指数、胸腺指数、白细胞介素 2(IL-2)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 等指标, 分析 UA 对小鼠 H22 肝癌移植瘤的生长抑制作用及免疫功能的影响。[结果] 与模型组相比, UA 高、低剂量组能显著减少移植瘤重量, 其抑瘤率分别为 51.03%、32.54%, 差异有显著性 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。UA 高剂量组与 5-Fu 组抑瘤率(71.33%)比较, 差异没有显著性 ($P > 0.05$)。UA 各组可不同程度地升高荷瘤小鼠的外周血白细胞数和脾脏指数、胸腺指数, 同时还能提高荷瘤小鼠血清中 TNF- α 的水平 ($P < 0.05$)。[结论] 熊果酸能明显抑制 H22 荷瘤小鼠的肿瘤生长, 其作用可能与增强机体的免疫功能有关。

关键词: 熊果酸; 氟尿嘧啶; 肝肿瘤; 免疫功能

中图分类号: R73-35 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)03-0199-03

Anti-tumor and Immune Effects of Ursolic Acid on H22 Xenograft Growth in Mice

FANG Xue-hui, WU Qian, HAN Xue-mei, et al.

(Luoyang Dongfang Hospital, Luoyang 471003, China)

Abstract: [Purpose] To study the anti-tumor and immune effects of ursolic acid on H22 xenograft growth in mice. [Methods] Transplanted H22 hepatoma model in mice were applied and randomly divided into model control group, 5-fluorouracil(5-Fu) treatment group, ursolic acid (UA) high-dose group and low-dose group. After 14d treatment of continuous intraperitoneal injection of 5-Fu (25mg/kg), UA (50mg/kg, 25mg/kg), mice were sacrificed. The tumor inhibition rate, the count of peripheral white blood cells, index of thymus and spleen were calculated. The level of interleukin-2 (IL-2) and tumor necrosis factor (TNF- α) in serum were measured by radioimmunoassay. [Results] Compared with the model group, UA high-dose group and low-dose group can significantly reduce the xenograft tumor weight. The tumor inhibition rates were 51.03% ($P < 0.01$), 32.54% ($P < 0.05$). Compared with UA high-dose group, the inhibition rate of 5-Fu group(71.33%) had no significant difference ($P > 0.05$). The UA groups can increase the white blood cell count, thymus index and spleen index at different degree, while improve the level of TNF- α in the serum of xenograft tumor mice ($P < 0.05$). [Conclusion] Ursolic acid can significantly inhibit tumor growth of H22 xenograft mice, which may correlate with the enhancement of immune function.

Subject words: ursolic acid; 5-fluorouracil; hepatocellular neoplasms; immune function

熊果酸(ursolic acid, UA) 又名乌索酸, 是存在于许多植物中的一种天然三萜类化合物, 主要来源于木犀科植物女贞的叶, 唇形科植物夏枯草的全草, 杜鹃花科植物熊果的叶和果实, 蔷薇科植物枇杷的叶, 玄参科植物毛泡桐的叶, 通常以游离或与糖结合成苷的形式存在^[1-3]。现已证实 UA 具有多种生物

学活性, 如抗菌、抗炎及对中枢神经系统的安定作用等。近年来发现熊果酸不仅对多种致癌、促癌物有抵抗作用, 而且对多种恶性肿瘤细胞有抑制生长作用^[4,5]。本研究拟通过建立小鼠 H22 肝癌移植瘤模型, 探讨 UA 对小鼠 H22 肝癌移植瘤的生长抑制作用及免疫功能的影响, 为辅助临床肝癌治疗提供实验依据。

收稿日期: 2012-12-10; 修回日期: 2013-02-18

1 材料与方法

1.1 实验药物与试剂

原料 UA,白色粉末,由武汉利元亨药物技术有限公司提供,批号:050601,用二甲基亚砷溶解后,无菌注射用水稀释至所需浓度。氟尿嘧啶(5-Fu)针剂,10ml/支,上海旭东海普药业有限公司生产。白细胞介素 2(IL-2)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)放免试剂盒购于北京鼎国有限公司。

1.2 实验动物

昆明小鼠 40 只,体重(20 $\pm$ 2)g,由河南科技大学实验动物中心提供,合格证号:SCXK(鄂)2010-0007。小鼠肝癌 H22 瘤株由河南省医药科学研究院提供。

1.3 模型的建立

小鼠肝癌 H22 瘤株,腹腔接种传代。待腹水生长旺盛时,抽出腹水,细胞计数,调整细胞浓度为 5 $\times$ 10⁶个/ml,小鼠腋下皮下接种肝癌 H22 细胞,每只接种 0.2ml。

1.4 分组

接种后第 2d,将 40 只小鼠随机分为 4 组,即模型组(对照),实验组:5-Fu 组、UA 高剂量组(50mg/kg)、UA 低剂量组(25mg/kg),每组 10 只,通过腹腔注射给药,连续 14d,模型组给予等容积生理盐水。

1.5 指标检测

停药后摘除眼球取血 0.5~1.0ml,少数采用常规方法进行白细胞计数,其余部分置于离心管内,3 000r/min 离心 10min,取血清置于-80℃保存。采用放免分析法测定 IL-2 和 TNF- α 的水平,操作步骤按照放射免疫分析试剂盒使用说明书进行。

处死小鼠,剥离瘤体称重,抑瘤率=(模型组平均瘤重-实验组平均瘤重)/模型组平均瘤重 $\times$ 100%;剖取各组小鼠的胸腺和脾脏分别称重,检测各组小鼠脾脏指数和胸腺指数。脾脏(胸腺)指数=脾脏(胸腺)重量(mg)/[小鼠体重(g) $\times$ 10]。

1.6 统计学处理

实验数据均以均值 $\pm$ 标准差表示,应用 SPSS17.0 分析软件进行统

计分析,多组间比较采用单因素分析,组间两两比较采用 SNK(或者 LSD)分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 UA 对小鼠 H22 移植瘤的抑制作用

UA 高、低剂量组均可抑制移植瘤的生长,抑制率分别为 51.03%、32.54%,高剂量组与模型组比较,瘤重减轻更加明显($P<0.01$)(Table 1)。

2.2 UA 对小鼠白细胞数及胸腺、脾脏指数影响

与模型组相比,5-Fu 组白细胞数、胸腺指数、脾脏指数均有显著性降低($P<0.05$)。UA 各剂量组的白细胞数、脾脏指数和胸腺指数与 5-Fu 组相比均有不同程度的升高,且具有显著性差异($P<0.05$)(Table 2)。

2.3 UA 对小鼠血清 IL-2 和 TNF- α 的影响

与模型组相比,5-Fu 组血清 IL-2 含量明显增高,TNF- α 含量明显降低($P<0.05$)。而 UA 高剂量组与 5-Fu 组相比血清 IL-2 含量明显降低,TNF- α 含量明显增高,有显著性差异($P<0.05$)(Table 3)。

3 结论

机体的免疫功能与肿瘤的发生有密切关系,当宿主免疫功能低下或受抑制时,肿瘤发生率增高。因此,抗肿瘤治疗必须依靠机体自身免疫功能的增强

Table 1 The anti-tumor effects of UA on H22 xenograft mice (n=10)

Groups	Dose (mg/kg)	Tumor weight(g)	The tumor inhibitory rate (%)
Model group	-	1.75 $\pm$ 0.29	
5-Fu group	25	0.50 $\pm$ 0.11 ^a	71.33
UA high dose group	50	0.86 $\pm$ 0.19 ^a	51.03
UA low dose group	25	1.18 $\pm$ 0.21 ^b	32.54

Note:compared with model group:^a $P<0.01$,^b $P<0.05$.

Table 2 The effects of UA for white blood cells count,index of thymus and spleen (n=10)

Groups	Dose (mg/kg)	White blood cell count($\times 10^9$ /L)	Spleen index (mg/10g)	Thymus index (mg/10g)
Model group	-	14.76 $\pm$ 2.35	150.11 $\pm$ 23.89	17.32 $\pm$ 5.30
5-Fu group	25	7.57 $\pm$ 1.51 ^a	80.56 $\pm$ 16.37 ^a	7.65 $\pm$ 3.03 ^a
UA high dose group	50	11.86 $\pm$ 2.19 ^b	145.36 $\pm$ 21.59 ^b	16.38 $\pm$ 4.65 ^b
UA low dose group	25	9.18 $\pm$ 1.22 ^a	98.55 $\pm$ 20.98 ^a	10.45 $\pm$ 3.89 ^a

Note:compared with model group:^a $P<0.05$; compared with 5-Fu group:^b $P<0.05$.

Table 3 The effects of UA for the level of IL-2 and TNF- α in serum

Groups	Dose (mg/kg)	IL-2(pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
Model group	—	19.36 $\pm$ 3.88	42.96 $\pm$ 7.36
5-Fu group	25	26.88 $\pm$ 5.30 ^a	23.56 $\pm$ 4.65 ^a
UA high dose group	50	16.23 $\pm$ 3.19 ^b	38.32 $\pm$ 6.54 ^b
UA low dose group	25	23.75 $\pm$ 4.23	25.63 $\pm$ 5.32 ^a

Note:compared with model group:^a $P<0.05$; compared with 5-Fu group:^b $P<0.05$.

或者恢复。胸腺是 T 淋巴细胞分化和成熟的场所,脾脏是免疫细胞定居和发生免疫应答的场所。胸腺指数和脾脏指数的大小可直接反映机体免疫水平的高低^[6]。此外,IL-2 能激活多种免疫细胞,促进淋巴细胞有丝分裂;TNF- α 能够激活 T 细胞和刺激 B 细胞产生抗体、刺激单核细胞等产生细胞因子、促进白细胞杀死微生物及杀灭肿瘤细胞等细胞因子,因此它们对调节机体免疫应答起着重要的作用。

大多数中药都具有明显增强机体免疫功能的作用^[7],现代医学研究表明,UA 具有多种药理活性,尤其是抗肿瘤活性。它不仅对多种致癌、促癌物有抵抗作用,而且对多种恶性肿瘤有抑制和细胞毒作用^[8,9]。

本实验以 H22 荷瘤小鼠为模型,通过与模型组和 5-Fu 组比较,观察 UA 高、低剂量组对 H22 移植瘤的抑制率以及对外周血白细胞数、胸腺指数、脾脏指数、血清细胞因子的影响,研究其对 H22 荷瘤小鼠的抑瘤作用以及免疫调节作用。结果发现,UA 高、低剂量组均可抑制移植瘤的生长,抑制率分别为 51.03%、32.54%。与模型组相比,5-Fu 组外周血白细胞数、胸腺指数、脾脏指数各项指标均有显著性降低,表明 5-Fu 可造成 H22 荷瘤小鼠免疫器官受损以及免疫功能抑制。而 UA 高剂量组外周血白细胞数、脾脏指数和胸腺指数与 5-Fu 组相比均有不同程度的升高,而 UA 低剂量组与 5-Fu 组相比,差异不显著,表明 UA 可促进胸腺和脾脏细胞的增殖分化,具有一定的免疫增强作用,但存在剂量依赖性。另外,本研究发现,5-Fu 化疗明显升高 H22 荷瘤小鼠外周血清 IL-2 含量,降低 TNF- α 含量,经 UA 治疗后,高剂量组 H22 荷瘤小鼠外周血清 IL-2 含量和 TNF- α 含量分别有不同程度的降低和升高,且与 5-Fu 相比有显著性差异,可见,UA 具有改善荷瘤小鼠细胞因子异常的作用,具有抗肿瘤及调节机体免疫功能的作用。综上所述,UA 能一定程度地抑制 H22 移植瘤小鼠的肿瘤生长,且能提高机体免疫功能。

参考文献:

- [1] Si FT,Li JJ,Zeng C. Research progress of the anti-tumor activity and mechanism of ursolic acid[J]. Chemistry & Bioengineering,2010,27(1):9-12. [司福亭,李靖靖,曾超.熊果酸的抗肿瘤活性及作用机理研究进展[J].化学与生物工程,2010,27(1):9-12.]
- [2] Wang T,Shao JW,Guo YH.The research progress of ursolic acid anti-tumor effect and mechanism[J]. Pharmaceutical Biotechnology,2008,15(2):148-151. [王涛,邵敬伟,郭养浩.熊果酸抗肿瘤作用及其机制研究进展[J].药物生物技术,2008,15(2):148-151.]
- [3] Zhou L,Liu ZG.Ursolic acid research progress of anti-tumor mechanism[J]. Progress in Pharmaceutical Sciences,2011,30(4):491-494. [周蕾,刘卓刚.熊果酸抗肿瘤作用机制的研究进展[J].药学进展,2011,30(4):491-494.]
- [4] Ramos AA,Pereira-Wilson C,Collins AR. Protective effects of ursolic acid and Luteolin against oxidative DNA damage include enhancement of DNA repair in Caco-2 cells[J]. Mutat Res,2010,692(1-2):6-11.
- [5] Tang C,Lu YH,Xie JH,et al. Downregulation of survivin and activation of caspase-3 through the PI3K/Akt pathway in ursolic acid-induced HepG2 cell apoptosis[J]. Anti-cancer Drugs,2009,20(4):249-258.
- [6] Liang YL,Wu YH,Yin YX.The Diarrhea spiritual mouse thymus,spleen weight and monocytes phagocytic function in rats [J]. Chinese Journal of Gerontology,2006,26(1):85-86.[梁永林,吴玉泓,殷银霞.久泻灵对小鼠胸腺、脾脏重量及单核细胞吞噬功能影响的实验研究[J].中国老年学杂志,2006,26(1):85-86.]
- [7] Li LK,Kuang WJ,Huang YF. The Astragalus injection of H22 liver tumor of the mice bearing and immune function [J]. Sichuan Journal of Physiological Sciences,2011,33(1):14-16.[李连琨,匡文娟,黄云峰.黄芪注射液对 H22 肝癌小鼠的抑瘤作用及免疫功能的影响[J].四川生理科学杂志,2011,33(1):14-16.]
- [8] Furtado RA,Rodrigue EP,Araújo FR,et al. Ursolic acid and oleanolic acid suppress preneoplastic lesions induced by 1,2-dimethylhydrazine in rat colon[J]. Toxicol Pathol,2008,36(4):576-580.
- [9] Achiwa Y,Hasegawa K,Udagawa Y. Regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt and the mitogen-activated protein kinase pathways by ursolic acid in human endometrial cancer cells[J]. Biosci Biotechnol Biochem,2007,71(1):31-37.