

辽东槲木叶总皂苷抗肿瘤作用研究进展

张秀萍¹, 孙达辰¹, 肖洪彬^{2*}

(1. 牡丹江医学院, 黑龙江 牡丹江 157011; 2. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

[摘要] 对辽东槲木叶总皂苷抗肿瘤的作用的研究已取得一定的进展,主要涉及人肺腺癌、人乳腺癌、小鼠腹水瘤相关细胞的体外移植瘤模型研究及人肝癌、人结肠癌、人胃癌、人卵巢癌、人红白血病细胞水平的研究。为了进一步了解辽东槲木叶总皂苷在抗肿瘤方面的研究现状并了解其抗肿瘤作用的效果,通过对比前人及课题组在肿瘤体外移植瘤模型制备时细胞密度、辽东槲木叶总皂苷使用剂量、使用时间及在细胞水平中辽东槲木叶总皂苷剂量使用情况,最终发现,辽东槲木叶总皂苷达 50 mg·kg⁻¹时,即达到一定肿瘤抑制率;100 mg·kg⁻¹时,可以有效抑制肿瘤组织中相关蛋白的表达;并通过抑制肿瘤大小及影响其形态学变化而有效抑制肿瘤的生长。其给药间隔时间及持续时间不同,对不同类型肿瘤模型的作用也有一定的差别。细胞研究时发现,不同浓度对不同细胞的增殖、凋亡有一定的作用,并对其蛋白表达有一定的影响。这些都为辽东槲木叶总皂苷抗肿瘤的药理作用及临床应用提供更可靠的实验依据。

[关键词] 辽东槲木叶总皂苷; 抗肿瘤作用; 研究进展

[中图分类号] R287 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)11-0232-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015110232

Anti-tumor Reasearch Progress of *Aralia eleta* Total Saponins ZHANG Xiu-ping¹, SUN Da-chen¹, XIAO Hong-bin^{2*} (1. *Mudanjiang University, Mudanjiang 157011, China*; 2. *Heilongjiang University of Chinese Medicine, Haerbin 150040, China*)

[Abstract] At present, the research on anti-tumor activity of the total saponins of *Aralia eleta* has made certain progress, which mainly related to transplantation tumor model of human lung adenocarcinoma, breast cancer, mouse ascites tumor *in vitro* and cell studies on human hepatocellular carcinoma, human colon cancer, gastric cancer, ovarian cancer and human erythroleukemia *in vivo*. In order to understand the research status of total saponin of *Aralia eleta* in anti-tumor activity, and investigate the anti-tumor effect, we compared our research to the previous research on cell concentration, the dose and the usage time of total saponins in tumor model *in vitro* and *in vivo*. Finally, we discovered that the total saponins were effective at a dosage of 50 mg·kg⁻¹ *in vitro*, and the different dose interval and duration have different effect. However, the different dose has different effect *in vivo* too. These researches provide the experimental basis for clinic application and pharmacological action for total saponins of *Aralia eleta*.

[Key words] *Aralia eleta* total saponins; anti-tumor; research progress

近年来,随着中国人口老龄化的加剧、生活方式及环境的改变,恶性肿瘤已成为严重危害中国居民健康的主要疾病之一,其死亡率及发病率呈持续增长趋势^[1]。辽东槲木又名刺老芽、龙牙葱木,是五加科槲木属植物。其根、根皮及叶都可入药,味苦、辛,性平。具有祛风除湿、益血、补气安神、强精滋肾的功效,可用于治疗风湿性关节炎、神经衰弱、肝炎、糖尿病及肿瘤等。其根、茎、叶及嫩枝等部位分离出 100 多种皂苷成分,这些成分的药理作用的研究主要集中于对心

血管系统、抗肿瘤、抗炎、降血糖、保肝等方面^[2]。课题组前期研究表明,其叶的总皂苷为抗肿瘤的有效部位^[3]。目前,课题组对辽东槲木叶总皂苷抗肿瘤的作用的研究已取得一定的进展,主要涉及人肺腺癌^[4-5]、人乳腺癌^[6]、小鼠腹水瘤相关细胞的体外移植瘤模型研究^[7-8]及人结肠癌^[9]、人胃癌^[10];前人研究主要涉及人肝癌^[11]、小鼠腹水瘤相关细胞的体外移植瘤模型研究^[12-13]人卵巢癌^[14-16]、人红白血病细胞水平^[11]的研究。但关于其在这些方面的研究现状及其抗

[收稿日期] 20140928(006)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30772779);国家“重大新药创制”科技重大专项(2011ZX09102-001-18)

[第一作者] 张秀萍,博士,从事中药在心脑血管疾病机制研究,Tel:0453-6984380,E-mail:zxp0468@163.com

[通讯作者] *肖洪彬,硕士,教授,从事方剂作用机制研究,Tel:0451-82193409,E-mail:hrbxiaohongbin@126.com

肿瘤作用的效果尚未见相关文献综述。因此,本文通过对比前人及课题组在肿瘤体外移植瘤模型制备时细胞浓度、辽东楸木叶总皂苷使用剂量、使用时间及在细胞水平中辽东楸木叶总皂苷剂量使用情况等方面,对辽东楸木叶总皂苷抗肿瘤作用情况进行综述,从而为辽东楸木叶总皂苷抗肿瘤的药理作用及临床应用提供更可靠的实验依据及应用基础,可能为肿瘤的治疗提供新的治疗药物及治疗方案。

1 体内抗肿瘤作用

1.1 对人肺腺癌作用 王丽岩等^[4]采用裸鼠制备人 A549 肺腺癌模型,辽东楸木叶总皂苷按 100 mg·kg⁻¹灌胃给药,连续给药 6 d,间隔 1 d,共持续 10 周,10 周后取肿瘤组织,计算肿瘤抑制率、免疫组化检测肿瘤组织中 COX-2 表达及肿瘤组织内微血管密度,结果辽东楸木叶总皂苷对人肺腺癌 A549 荷瘤裸鼠的肿瘤具有明显抑制生长的作用,对 COX-2 表达亦有明显抑制效果,可以降低微血管密度。表明辽东楸木叶总皂苷可以通过抑制肿瘤组织中的 COX-2 的表达,并通过降低微血管密度,从而对肿瘤具有一定的抑制作用。

1.2 对人乳腺癌作用 李凤金等^[6]采用裸鼠建立人乳腺癌 MCF-7 荷瘤小鼠模型,细胞密度为 1×10⁷ 个/L,辽东楸木叶总皂苷按 75,150,300 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃给药,连续 14 d,计算肿瘤抑制率及脾脏指数,结果发现,其对肿瘤抑制率随浓度增加抑制率不断增加,而其对脾脏指数无明显影响。

1.3 对小鼠腹水瘤作用 尹丽颖等^[7]采用昆明种小鼠 H22 腹水瘤模型,按照 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 剂量灌胃给予辽东楸木叶总皂苷,于第 2 天开始用药,连续给药 10 d,末次给药 12 h 后,免疫组化法对 H22 荷瘤小鼠瘤组织中的 p53 及 PCNA 蛋白表达进行检测,结果发现,辽东楸木叶总皂苷能有效降低 H22 荷瘤小鼠 p53 及 PCNA 蛋白的阳性表达。表明辽东楸木叶总皂苷可能通过抑制突变型 p53 蛋白的表达,使 PCNA 蛋白表达下调,从而抑制肿瘤细胞增殖。任美萍等^[11]以小鼠肝癌 H22 和小鼠肉瘤 S180 为移植性肿瘤模型,细胞密度为 1×10⁷ 个/mL,检测楸木皂苷的体内抗肿瘤活性,分别以 50,100 mg·kg⁻¹进行灌胃给药,1 次/d,连续给药 10 d,末次给药 24 h 后取肿瘤组织,计算楸木皂苷的肿瘤抑制率,结果其对体内 H22 及 S180 的肿瘤抑制率随药物浓度增加而不断增大,表明楸木皂苷对肿瘤的抑制率呈一定的量效关系。尹丽颖等^[8]采用小鼠 H22 肝癌细胞实体瘤模型,以 100 mg·kg⁻¹剂量灌胃给予辽东楸木叶总皂苷,1 次/d,共给药 10 d,测定肿瘤生长抑制率,利用光镜、电镜等方法进行形态学观察,是否产生凋亡小体。结果其对小鼠的 H22 实体瘤生长具有明显的抑制作用,形态学观察显示,治疗组与对照组比较,肿瘤团块较小,异型性不明显,病理性核分裂和间质血管较少。淋巴细胞浸润明显。电镜下可见凋亡小体形成,其中以总皂苷组最明显。表明辽东楸木叶总皂苷对荷瘤小鼠具有较强的体内抗肿瘤作用,作用机制可能与其能够抑制肿瘤细胞分裂、增殖及能够诱导肿瘤细胞凋亡有关。李蓉等^[12-13]以小鼠肉瘤细胞 S180 为移植性肿瘤模型,细胞密度为 1×10¹⁰ 个/mL,以 100,200,400 mg·kg⁻¹ 剂量灌胃给予辽东楸木皂苷,每日 1 次,共给药 10 d,观察对小鼠肿瘤生长的影响,并采用小鼠腹腔巨噬细胞吞噬试验、淋巴细胞转化

试验和迟发型超敏反应观察其对小鼠免疫细胞功能的影响;结果发现,楸木总皂苷 400 mg·kg⁻¹时即对 S180 的肿瘤生长有一定的抑制作用;楸木总皂苷 200,400 mg·kg⁻¹能增强 S180 小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬能力提高 T 淋巴细胞的转化率和促进 DTH 反应($P < 0.05$, $P < 0.01$),且呈现出较好的量效关系,表明楸木总皂苷具有一定的体内抗肿瘤活性,且能增强荷瘤小鼠的免疫细胞功能。又以相同模型及给药方法,采用 Elisa 法测定对荷瘤小鼠细胞因子白细胞介素-2(IL-2),白细胞介素-6(IL-6),白细胞介素-12(IL-12),肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平的影响,结果发现,楸木总皂苷 400 mg·kg⁻¹能升高荷瘤小鼠细胞因子 IL-2,IL-6,IL-12 及 TNF- α 的水平。表明其抗肿瘤活性的机制可能与升高机体细胞因子水平有关。

以上研究表明,辽楸木叶总皂苷以 50 mg·kg⁻¹进行灌胃给药时,即达到一定肿瘤抑制率;100 mg·kg⁻¹进行灌胃给药时,可以有效抑制肿瘤组织中相关蛋白的表达;并通过抑制肿瘤大小及影响其形态学变化而有效抑制肿瘤的生长。但对比上述研究发现,其给药间隔时间及持续时间不同,对不同类型肿瘤模型的作用也有一定的差别。由于小鼠体外移植瘤对照组中 20% 小鼠的瘤体小于 400 mg 或平均质量小于 1 g,均为肿瘤生长不良的表现^[17],因此,造成其给药间隔时间、持续时间及药物使用剂量不同的原因可能是由于不同类型的肿瘤在不同动物体内的增长时间不同及模型制备时注射肿瘤细胞浓度造成的。

2 体外抗肿瘤作用

2.1 对卵巢癌细胞的作用 王春梅等^[14-16]采用 MTT 法,Annexin-VFITC/PI 法,RT-PCR 法,蛋白印迹法检测辽东楸木叶总皂苷对卵巢癌耐顺铂株 SKOV3-DDP 细胞的细胞活性,细胞凋亡,LRP mRNA 水平及 Phospho-iB-Phospho-i Phospho-NF-Bp65 蛋白质水平的表达,结果发现,辽东楸木叶总皂苷 100 mg·L⁻¹与顺铂可明显协同抑制 SKOV3-DDP 细胞生长,并诱导 SKOV3-DDP 细胞凋亡,同时下调耐药蛋白 LRP mRNA 水平的表达及 NF- κ B 信号传导通路关键蛋白 IB-INF-Bp65 磷酸化的水平。表明辽东楸木叶总皂苷与顺铂可协同抑制卵巢癌耐药细胞株的生长,这种作用可能与其诱导凋亡降低耐药因子的表达有关,其作用机制可能是通过对 NF- κ B 信号传导通路的阻断而实现的。作者又采用 MTT 法、TUNEL 法、蛋白印迹及流式细胞仪检测辽东楸木叶总皂苷对卵巢癌耐顺铂株 SKOV3-DDP 的细胞抑制、细胞凋亡、相关耐药蛋白表达及细胞周期进程的影响,结果发现,辽东楸木叶总皂苷 20 mg·L⁻¹可有效抑制 SKOV3-DDP 的生长,且这种抑制作用具有浓度-时间依赖性;50 mg·L⁻¹可诱导 SKOV3-DDP 细胞凋亡,且存在量效关系;100 mg·L⁻¹可降低细胞耐药蛋白的表达,表明辽东楸木叶总皂苷可抑制 SKOV3-DDP 细胞的生长,这种作用可能与其促使细胞周期停滞诱导细胞凋亡降低耐药蛋白的表达相关。作者还采用 MTT 法、Hoechst33258 染色及蛋白印迹检测辽东楸木叶总皂苷对卵巢癌 SKOV3 细胞的抑制作用,对细胞核形态的影响、线粒体凋亡通路中关键蛋白质的表达变化,结果发现,辽东楸木叶总皂苷 40 mg·L⁻¹时即对 SKOV3 细胞具有明显的抑

制作用,且呈现时-量依赖性;100 mg·L⁻¹时,SKOV3 细胞核出现核固缩、核碎裂等变化;100 mg·L⁻¹时,Bcl-2 蛋白表达下降,Bax,Apaf-1,Cyt-c 蛋白质表达水平升高,且具有浓度依赖性。表明辽东槲木叶总皂苷可促使 SKOV3 细胞发生凋亡,其作用机制可能与其激活线粒体凋亡途径有关。

2.2 对结肠癌细胞作用 尹丽颖等^[9]采用 MTT 法、流式细胞仪及蛋白印迹检测辽东槲木叶总皂苷对结肠癌 HT-29 细胞增殖的抑制作用、细胞周期和细胞凋亡及 PLK1 蛋白表达变化,结果发现,辽东槲木叶总皂苷在 6.25 mg·L⁻¹时即对 HT-29 细胞增殖有抑制作用;在 10~40 mg·L⁻¹剂量作用下,可剂量依赖性诱导 HT-29 细胞凋亡、细胞增殖及 PLK1 蛋白的表达,表明辽东槲木叶总皂苷体外可明显抑制 HT-29 细胞的生长,其抗肿瘤作用与细胞凋亡及抑制 PLK1 蛋白表达有关。

2.3 对人胃癌细胞作用 尹丽颖等^[10]采用 MTT 法及 FITC-AnnexinV/PI 双染法测定辽东槲木叶总皂苷对人胃癌 BGC 细胞增殖及细胞凋亡形态特征的影响,结果表明,辽东槲木叶总皂苷 25 mg·L⁻¹时即可抑制 BGC 细胞的增殖并诱导细胞凋亡,并随着剂量增加其作用不断增强,100 mg·L⁻¹时效果最佳。表明辽东槲木叶总皂苷能够有效抑制癌细胞增殖并诱导凋亡,具有明显的抗肿瘤作用。

2.4 对人乳腺癌细胞作用 李凤金等^[6]采用 MTT 法、Annexin V-FITC 双染法和 PI 单染法检测辽东槲木叶总皂苷对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖抑制、细胞凋亡和细胞周期的影响,结果发现,辽东槲木叶总皂苷 6.25 μg·L⁻¹即对 MCF-7 细胞的增殖有抑制作用,10 mg·L⁻¹可诱导细胞凋亡并影响细胞周期分布,并呈现明显的量效关系,其抗肿瘤作用可能与诱导细胞凋亡、改变细胞周期分布有关。

此外,任美萍等^[11]采用人红白血病细胞株 K₅₆₂、人肝癌细胞株 HepG2,人结肠癌细胞株 LOVO 和人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 为模型,采用 CCK-8 试剂盒检测槲木皂苷的体外抗肿瘤活性,结果发现,槲木皂苷质量浓度大于 30 mg·L⁻¹时,可抑制 K562,HepG2,LOVO 和 MDA-MB-231 的增殖,但其活性不强。张秀萍等^[17]采用 SRB 法检测辽东槲木叶总皂苷对人肺腺癌细胞 A549,人肝癌细胞 BEL-7402,人胃癌细胞 BGC 及人结肠癌细胞 HCT-8 的抑制作用,结果发现,对 A549,BGC 及 BEL-7402 质量浓度达 31.25 mg·L⁻¹时即有 50% 生长抑制作用,62.5 mg·L⁻¹对 HCT-8 有 50% 生长抑制作用;125 mg·L⁻¹对 BGC 及 BEL-7402 有 50% 杀死作用,500 mg·L⁻¹对 HCT-8 有 50% 杀死作用,而对 A549 未测出 50% 杀死作用的浓度。

以上研究表明,辽东槲木叶总皂苷在 6.25 mg·L⁻¹就对肿瘤细胞增殖有抑制作用,10 mg·L⁻¹便可以诱导肿瘤细胞凋亡,并对细胞中相关蛋白表达有一定的影响。对比以上研究发现,对某些肿瘤细胞产生上述效果需要更大浓度的辽东槲木叶总皂苷,以上原因可能由于辽东槲木叶总皂苷对不同肿瘤细胞作用效果不同造成的。

3 总结及展望

综上所述,辽东槲木叶总皂苷具有体内及体外抗肿瘤双重作用。其抗肿瘤作用效果良好,其在 50 mg·L⁻¹即对体外

移植肿瘤有一定的抑制作用,6.25 mg·L⁻¹就对肿瘤细胞增殖有一定的抑制作用。上述研究不仅为进一步研究其抗肿瘤的药理作用及临床应用提供更可靠的实验依据,也为抗肿瘤新药的研究与开发提供更好的基础和前景。

[参考文献]

[1] 陈万青,郑荣寿,张思维. 中国恶性肿瘤的动态变化[J]. 科技导报,2014,32(26):65-71.

[2] 张家鑫,田瑜,孙桂波,等. 龙牙槲木皂苷类成分及药理活性研究进展[J]. 中草药,2013,44(6):770-779.

[3] 肖洪彬,匡海学. 龙牙槲木叶抗肿瘤作用机制的实验研究[J]. 中药药理与临床,2000,30(增刊):6-9.

[4] 王丽岩,肖洪彬,张秀萍,等. 辽东槲木叶总皂苷(ETS)对裸鼠 A549 体外移植瘤抑制率及瘤体相关蛋白 COX-2 表达影响的实验研究[J]. 中医药学报,2010,38(6):30-32.

[5] 张秀萍,尹丽颖,牛雯颖,等. 辽东槲木叶总皂苷体外抗肿瘤作用的研究[J]. 时珍国医国药,2012,23(12):2966-2968.

[6] 李凤金,毕明刚,武爽,等. 辽东槲木叶总皂苷抗人乳腺癌作用的研究[J]. 中国药理学通报,2013,29(12):1663-1667.

[7] 尹丽颖,边晓燕,肖洪彬,等. 辽东槲木叶总皂苷对 H22 荷瘤小鼠 p53 及 PCNA 蛋白表达的影响[J]. 中医药学报,2010,38(1):18-20.

[8] 尹丽颖,边晓燕,肖洪彬. 辽东槲木叶总皂苷对荷瘤小鼠抑瘤作用的实验研究[J]. 中医药信息,2010,27(3):107-109.

[9] 尹丽颖,李凤金,边晓燕,等. 辽东槲木叶总皂苷对结肠癌 HT-29 细胞的生长抑制作用及机制研究[J]. 中国药理学通报,2013,29(11):1545-1548.

[10] 尹丽颖,仲丽丽,边晓燕,等. 辽东槲木叶总皂苷对人胃癌 BGC 细胞凋亡的影响[J]. 中医药学报,2012,40(3):12-14.

[11] 任美萍,刘明华,李蓉,等. 槲木皂苷抗肿瘤活性研究[J]. 时珍国医国药,2009,20(10):2417-2418.

[12] 李蓉,张潇,任美萍,等. 槲木总皂苷对 S180 小鼠肿瘤生长及免疫细胞功能的影响[J]. 重庆医科大学学报,2011,36(2):148-151.

[13] 李蓉,张潇,任美萍,等. 槲木总皂苷对荷瘤小鼠肿瘤生长和细胞因子的影响[J]. 时珍国医国药,2011,22(9):2199-2200.

[14] 王春梅,薛晓鸥,张广美. 辽东槲木协同顺铂抑制 SKOV3-DDP 生长的作用及机制[J]. 中医药信息,2013,30(3):24-28.

[15] 王春梅,张广美. 辽东槲木叶总皂苷对卵巢癌细胞的抑制作用及其对线粒体凋亡途径的影响[J]. 中医药学报,2011,39(1):17-19.

[16] 王春梅,张广美. 辽东槲木叶总皂苷逆转卵巢癌细胞耐药作用的实验研究[J]. 世界中西医结合杂志,2012,7(8):713-716.

[17] 徐叔云,卞如谦,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:1759.

[责任编辑 邹晓翠]