

草苡蓉联合长春瑞滨化疗对 VX2 移植瘤的抑瘤作用 及机制研究

许惠仙,徐俊萍,尹学哲*
(延边大学附属医院,吉林 延吉 133000)

[摘要] **目的:** 探讨草苡蓉提取物(BRE)联合长春瑞滨(NVB)化疗对兔 VX2 移植瘤的治疗作用和抗氧化能力的影响。**方法:** 建立兔 VX2 皮下移植瘤模型,将其分为模型组,BRE 组,NVB 组和 BRE + NVB 组(BRE 和 NVB 联合组)。于造模第 8 天开始给药,BRE 组和 BRE + NVB 组分别 ig 给药 $100\text{ mg}\cdot(\text{kg}\cdot\text{d})^{-1}$ BRE 共 21 d,NVB 组和 BRE + NVB 组于造模第 15,22 天静脉注射 $2.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ NVB 共 2 次。观察各组荷瘤兔的肿瘤生长情况。实验结束后,称瘤重和计算抑瘤率。提取瘤体标本,免疫组化法检测移植瘤细胞增殖细胞核抗原(PCNA)表达情况。比色法检测血清超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性及总抗氧化能力(TAOC)和丙二醛(MDA)含量。**结果:** 各治疗组对移植瘤生长和肿瘤细胞增殖有明显的抑制作用,其中 BRE + NVB 组肿瘤生长抑制率最高、增殖指数最小。同时,NVB 虽明显增高血清 CAT,GSH-Px 活性,但 SOD 活性和 TAOC 水平显著降低,MDA 水平明显增高。而 BRE 组和 BRE + NVB 组均可明显升高血清 SOD,CAT,GSH-Px 活性和 TAOC 水平,降低 MDA 水平。**结论:** BRE 对 VX2 移植瘤具有明显的抑制作用,且对长春瑞滨化疗有明显增强作用。其作用可能与其抑制细胞增殖和增高机体抗氧化能力有关。

[关键词] 草苡蓉;长春瑞滨;VX2;增殖;抗氧化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)06-0200-03

Inhibitory Effect and Mechanism of *Boschniakia rossica* Combined with Vinorelbine Chemotherapy on Growth of VX2 Transplanted Tumor

XU Hui-xian, XU Jun-ping, YIN Xue-zhe*
(Yanbian University Hospital, Yanji 133000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the therapeutic and antioxidative effect of *Boschniakia rossica* extract (BRE) combined with vinorelbine (NVB) chemotherapy in VX2-bearing rabbits. **Method:** The VX2 transplanted rabbit model was established and the rabbits were divided into 4 groups: model, BRE, NVB, BRE + NVB (BRE combined with NVB). Animals in BRE and BRE + NVB groups were treated with $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ BRE i. g. for 21 days from the 8th day, and animals in NVB and BRE + NVB groups were treated with $2.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ NVB i. v. twice on the 15th and 22st day. Then the size and weight of tumor were estimated and the growth inhibition ratio was calculated. The expression of proliferation cell nuclear antigen (PCNA) protein was determined with immunohistochemical method, and the serum activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), total antioxidant activity (TAOC), as well as the content of malondialdehyde (MDA) were detected by colorimetric method. **Result:** The administration with BRE and/or NVB inhibited the growth of transplanted tumor and the proliferation of tumor cell, while the BRE + NVB group showed the highest growth inhibition ratio and the lowest proliferation index. Furthermore, NVB treatment increased serum MDA content and reduced serum levels of SOD and TAOC despite of the increased activities of CAT and GSH-Px.

[收稿日期] 20101103(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30360113);吉林省科技发展计划项目(200705426)

[第一作者] 许惠仙,博士,研究方向:呼吸肿瘤学,E-mail:xuhuixian1982@sina.cn

[通讯作者] *尹学哲,博士,教授,研究方向:呼吸肿瘤学,E-mail:yinxz@ybu.edu.cn

However, BRE or BRE + NVB treatment increased the serum SOD, CAT, GSH-Px and TAOC, and reduced the serum MDA level in VX2-bearing rabbits. **Conclusion:** BRE exhibits an inhibitory effect on the growth of transplanted VX2 tumor, and enhances the therapeutic effect of NVB chemotherapy, probably *via* the inhibition of tumor cell proliferation and the improved antioxidative capability.

[Key words] *Boschniakia rossica*; vinorelbine; VX2; proliferation; antioxidation

草苈蓉 *Boschniakia rossica* Fedtsch. et Flerov 为列当科草本植物,主要分布于中国长白山地区、日本富士山及朝鲜北部山区以及俄罗斯部分地区。具有滋补强身及延年益寿的功效,用于治疗肾虚阳痿、膀胱炎及肾炎及等,在民间被誉为“不老草”,多作为抗衰老保健品服用^[1]。研究证明草苈蓉具有抗氧化、抗肿瘤、保肝及调节免疫功能^[2-4]等作用。本文观察了草苈蓉提取物 (*Boschniakia rossica* extract, BRE)对兔 VX2 鳞癌移植瘤的生长抑制作用和荷瘤兔抗氧化能力的影响,旨在为肿瘤的预防和早期治疗提供科学依据。

1 材料

1.1 BRE 的制备 草苈蓉采自吉林省长白山,由延边大学药学院刘勇镇教授鉴定。将 10 kg 草苈蓉全草切碎后用 90% 乙醇提取,将提取液减压浓缩,获草苈蓉醇提取物 1.86 kg。将醇提取物加水溶解,在等体积二氯甲烷中进行萃取,取二氯甲烷提取物。经减压蒸馏、冷冻干燥即得 BRE 2.56 kg,得率为 25.6%。

1.2 动物和细胞株 日本大耳白兔,普通级,4 月龄,体重 2.0 ~ 2.5 kg,雌雄不限,由延边大学医学部动物科提供,合格证号 SCKK(吉)2007-0004。基础饲料由延边大学医学部动物科提供。兔 VX2 鳞癌细胞由第四军医大学附属唐都医院介入放射科张洪新副教授惠赠。

1.3 药品和试剂 RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司);酒石酸长春瑞滨(NVB)(江苏豪森药业股份有限公司,批号 H199902);总抗氧化能力(TAOC)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)及丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20100319)。

1.4 仪器 Hitachi himac cp 100α 超速离心机(日本日立公司);U-2010 型紫外分光光度仪(日本岛津公司);Olympus 倒置显微镜(日本奥林巴斯公司);YPS2000 真彩色病理图像分析仪(上海华岩仪器设备有限公司)。

2 方法

2.1 VX2 鳞癌移植瘤动物模型的建立^[5] 剥离种兔皮下实体瘤,剪碎后制备 VX2 瘤细胞悬液。台盼蓝染色计活细胞数,配成 1×10^7 /mL VX2 瘤细胞悬液。取 0.5 mL 接种于兔右侧后腿皮下,并肌注青霉素预防感染。1 周后长成直径约 1.0 cm 大小生长旺盛的实体瘤。

2.2 动物分组与处理 将 40 只荷瘤兔随机分为模型组, BRE 组, NVB 组和 BRE + NVB 组, 每组 10 只, 雌雄各半。于造模术后第 8 天开始给药, 模型组和 NVB 组每日 ig 生理盐水 21 d, BRE 组和 BRE + NVB 组分别 ig $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ BRE 共 21 d, NVB 组和 BRE + NVB 组于造模第 15, 22 天 iv $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ NVB 共 2 次。记录各组移植瘤瘤体长径(a)和短径(b), 计算瘤体体积(V)。 $V = a \times b^2 \pi / 6$ 。停药 20 h 后, 处死动物。实验末期自然死亡的动物属于有效标本。

2.3 取材及指标测定 剥离瘤体, 称瘤质量(m), 计算各组肿瘤增长抑制率。

$$\text{肿瘤生长抑制率} = (\bar{m}_{\text{模型组}} - \bar{m}_{\text{治疗组}}) / \bar{m}_{\text{模型组}} \times 100\%。$$

将瘤组织于 10% 中性福尔马林溶液中固定, 免疫组化法检测肿瘤组织中 PCNA 蛋白的表达情况。在光镜下观察免疫组织化学染色结果, PCNA 表达于胞核, 染色阳性信号呈棕黄色颗粒。每例切片在显微镜下随机选取 5 个高倍镜($\times 400$ 倍)视野计数, 每个区域计数 200 个瘤细胞, 取其平均值作为阳性细胞的百分数。以阳性细胞数超过 10% 判断为阳性。分离血清, 按试剂盒操作方法测定血清 GST, SOD, CAT, GSH-Px 活性以及 MDA 含量。

2.4 统计学方法 用 Prism 5.0 统计软件处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以单因素方差分析进行统计, $P < 0.05$ 有显著性差异。

3 结果

3.1 BRE 对实体瘤生长的影响 如表 1, 各治疗组瘤质量、瘤体积和长径均有减小趋势, 实验结束时, 较模型组相比均显著降低($P < 0.05$), 根据瘤质量、瘤体积和长径计算的抑瘤率基本一致。

3.2 BRE 对肿瘤细胞增殖的影响 见表 1。结果

显示,模型组 PCNA 呈强阳性,细胞核呈棕黄色,PCNA 阳性细胞呈弥漫性、片状或散在分布。与模型组相比,NVB 组和 BRE + NVB 组 PCNA 阳性表达率分别均有不同程度的下降($P < 0.05$)。

3.3 BRE 对血清抗氧化和解毒相关酶活性的影响
见表 2。NVB 单独用药虽明显增高血清 CAT,

GSH-Px 活性,但显著降低 SOD 活性和 TAOC 水平,增高 MDA 水平。而 BRE 单独用药和 BRE 联合 NVB 用药均可明显升高血清 SOD,CAT,GSH-Px 活性和 TAOC 水平,降低 MDA 水平,说明 BRE 可增高荷瘤兔血清抗氧化能力。

表 1 各组荷瘤兔肿瘤生长抑制率比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	瘤长径/cm	瘤体积/ cm^3	瘤质量/g	抑瘤率/%	PCNA/%
模型	—	8.3	357.4	14.2	—	78.7 ± 20.4
BRE	100	7.5 ¹⁾	281.4 ¹⁾	12.7 ¹⁾	10.6	64.7 ± 15.5
NVB	2.5	6.4 ¹⁾	256.9 ¹⁾	10.9 ¹⁾	23.2	50.2 ± 12.3 ¹⁾
BRE + NVB	100 + 2.5	5.8 ¹⁾	154.8 ^{1,2)}	9.3 ^{1,2)}	34.5	42.1 ± 11.7 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$;与 BRE 组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

表 2 各组荷瘤兔瘤组织 PCNA 及血清 TAOC,SOD,CAT,GSH-Px 及 MDA 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	TAOC / $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	SOD / $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	GSH-Px / $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	CAT / $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	MDA / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
模型	8	—	3.0 ± 1.2	156.2 ± 13.4	121.7 ± 14.7	6.5 ± 3.8	27.1 ± 3.4
BRE	10	100	4.1 ± 1.8	201.3 ± 16.7 ¹⁾	225.8 ± 27.1 ¹⁾	15.1 ± 4.0 ¹⁾	18.4 ± 2.8 ¹⁾
NVB	8	2.5	2.3 ± 1.1	134.1 ± 14.3 ¹⁾	197.8 ± 23.2 ¹⁾	13.3 ± 2.8 ¹⁾	32.5 ± 4.7 ¹⁾
BRE + NVB	9	100 + 2.5	4.9 ± 1.3 ²⁾	186.2 ± 17.3 ^{1,2)}	202.3 ± 30.4 ¹⁾	20.0 ± 4.9 ^{1,2)}	20.4 ± 3.2 ^{1,2)}

4 讨论

抑制肿瘤的生长速度,或使肿瘤的瘤体缩小,是评估某种抗肿瘤药物对肿瘤治疗是否有效的重要的客观指标。而 PCNA 与癌组织的增殖活性、转移及预后关系密切。本实验结果表明,BRE 和 NVB 单独或联合治疗均可明显抑制 VX2 移植瘤生长和抑制肿瘤细胞增殖,其中 BRE + NVB 组肿瘤生长抑制率最高、增殖指数最小。说明 BRE 对 VX2 移植瘤有生长抑制作用,并具有增强 NVB 化疗作用。

研究表明,肿瘤的发生发展与宿主的自由基水平及其代谢产物有关。本实验中观察到,BRE 组兔血清 TAOC,SOD,CAT 和 GSH-Px 活性显著高于模型组,MDA 含量却明显低于模型组。提示其抗肿瘤作用可能与抗氧化作用有关。本文研究发现 NVB 使部分血清抗氧化指标下降,说明 NVB 降低荷瘤兔抗氧化能力。与 NVB 单独用药相比,与 BRE 联合用药可明显提高血清抗氧化酶活性,抑制因 NVB 化疗而引起的抗氧化能力的下降。由此可见,BRE 是一类非常有潜力的预防肿瘤的中药之一。

综上所述,BRE 对 VX2 移植瘤具有明显的生长

抑制作用,且对长春瑞滨化疗有明显的增强作用。其作用机制可能与其抑制细胞增殖和增强机体抗氧化能力有关。

[参考文献]

[1] 刘景河,梁忠岩. 草苈蓉化学成分与药理研究进展[J]. 特产研究,2001, 24(4):55.
[2] 杨秀伟,楼之岑,严仲铠,等. 草苈蓉乙醇提取物对四氯化碳中毒小鼠肝组织的抗脂质过氧化作用[J]. 中国药学杂志,1995, 30(2):84.
[3] 汪霞,周微,李天,等. 草苈蓉环烯醚萜对二乙基亚硝胺诱发的肝癌前病变大鼠血清标志酶及抗氧化酶活性的影响[J]. 食品科技,2010, 35(7):242.
[4] Quan J S, Piao L, Xu H X, et al. Protective effect of iridoid glucosides from *Boschniakia rossica* on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in rats[J]. Biosci Biotech Bioch, 2009, 73(4):849.
[5] 尹学哲,许惠仙,金爱花,等. 草苈蓉环烯醚萜苷对移植鳞癌 VX2 荷瘤兔的抑瘤作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2010, 16(6):134.

[责任编辑 邹晓翠]