

黄精多糖对肝癌 H₂₂ 移植瘤小鼠的抑瘤作用及机制研究

段 华¹, 王保奇², 张跃文² (1. 南阳市中心医院药剂科, 河南 南阳 475000; 2. 河南中医学院药学院, 河南 郑州 450046)

摘要: **目的** 研究黄精多糖对 H₂₂ 移植瘤小鼠的抑瘤作用, 并探讨其作用机制。**方法** 建立 H₂₂ 移植瘤小鼠模型。将模型小鼠随机分为 5 组: 模型组, 环磷酰胺组 (20 mg·kg⁻¹), 黄精多糖高、中、低剂量组 (400, 200, 100 mg·kg⁻¹), 连续灌胃给药 10 d。测定瘤体质量, 计算抑瘤率。新鲜瘤组织制备单细胞悬液, 流式细胞术分析细胞周期分布, 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测瘤组织中 Caspase-3, 8, 9 活性。**结果** 黄精多糖各剂量组均能显著抑制肿瘤生长, 高剂量组抑瘤率为 54.5 %, 其作用接近环磷酰胺组 (57.7 %)。黄精多糖各剂量组能显著提高肿瘤组织中 Caspase-3, 8, 9 活性, 与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。黄精多糖中、高剂量组可显著增加 G₀/G₁ 期细胞 ($P < 0.05$), 减少 G₂/M 期细胞 ($P < 0.01$), 高剂量组还可减少 S 期细胞 ($P < 0.05$)。**结论** 黄精多糖对肝癌 H₂₂ 移植瘤小鼠具有显著的抑瘤作用, 其作用机制可能是通过影响细胞周期分布, 将肿瘤细胞阻滞于 G₀/G₁ 期, 抑制细胞增殖, 并通过激活 Caspase 系统诱导肿瘤细胞凋亡。

关键词: 黄精多糖; H₂₂ 细胞株; 细胞凋亡; 细胞周期

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)01-0005-03

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.01.002

Anti-tumor Effects and Mechanism of Rhizoma Polygonati Polysaccharide on H₂₂ Tumor Bearing Mice

DUAN Hua¹, WANG Baoqi², ZHANG Yuewen² (1. Department of Pharmacy, Nanyang Central Hospital, Nanyang 475000 Henan, China; 2. College of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046 Henan, China)

Abstract: **Objective** To investigate the anti-tumor effects of Rhizoma Polygonati polysaccharide (RPP) on H₂₂ tumor bearing mice and to explore its mechanisms. **Methods** H₂₂ tumor bearing mice model was established and the model mice were divided into 5 groups, model group, cyclophosphamide (CTX) group (20 mg·kg⁻¹), and high-, middle- and low-dose (400, 200, 100 mg·kg⁻¹) RPP groups. After oral administration for successive 10 days, all mice were killed, and the tumor tissue was dissected and weighted. The tumor inhibition rate was calculated. The cell cycle was determined by flow cytometry, and the activity of Caspase-3, 8, 9 was detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** All doses of RPP significantly inhibited the tumor growth, and the tumor inhibition rate in high-dose RPP was 54.5 %, close to 57.7 % in the CTX group. Moreover, RPP significantly enhanced the activity of caspase-3, 8, 9 in the tumor tissue ($P < 0.01$ compared with that in the model group). The ratio of G₀/G₁ cells was significantly increased ($P < 0.05$), and the ratio of G₂/M cells was significantly reduced in middle- and high-dose RPP groups as compared with the control group ($P < 0.01$). Furthermore, 400 mg·kg⁻¹ RPP also reduced the S phase cells count ($P < 0.05$). **Conclusion** RPP has obvious anti-tumor effect on H₂₂ tumor bearing mice. The mechanism may be related to regulating the cell cycle distribution, arresting the tumor cell in G₀/G₁ phase, inhibiting the cell proliferation and activating the caspase system to induce apoptosis.

Keywords: Rhizoma Polygonati Polysaccharide; H₂₂ cell line; Apoptosis; Cell cycle

收稿日期: 2013-06-20

作者简介: 段华, 女, 主管药师, 研究方向: 临床药学。Email: Dh761111@sina.com。通讯作者: 王保奇, 副教授, 博士研究生, 研究方向: 中药药理学。Email: wangbqi@126.com。

黄精是多年生草本姜形黄精的干燥根茎,具有补气养阴、健脾润肺益肾之功效。黄精多糖是黄精的主要活性成分,具有降血糖、降血脂、免疫调节等作用^[1-2]。近年来,黄精多糖抗肿瘤研究日益增多,江华等^[3]发现黄精多糖能明显抑制 Heps 和 Eac 移植瘤。张峰等^[4]发现黄精多糖对 H₂₂ 实体瘤和 S₁₈₀ 腹水瘤小鼠具有显著的抗肿瘤作用,但具体作用机制均未见报道。本研究以肝癌 H₂₂ 移植瘤小鼠为模型,观察黄精多糖的体内抑瘤作用,并探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞及试剂 小鼠 H₂₂ 细胞株由上海药物研究所提供。黄精购自郑州市张仲景大药房,经河南中医学院生药学科董诚明教授鉴定为多年生草本姜形黄精 (*Polygonatum cyrtoneura* Hua)。环磷酰胺 (CTX),上海华联制药有限公司,批号: 120706; Caspase-3, 8, 9 活性检测试剂盒,深圳晶美生物工程有限公司,批号: 20130407。碘化丙啶 (PI),上海生工生物技术有限公司,批号: 130109。

1.2 动物 清洁级 ICR 小鼠,雌雄各半,8 周龄,体质量 18~22 g,北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号: SCXK(京)-2007-0001。

1.3 黄精多糖的制备 称取干燥黄精 1 kg,烘干粉碎后按 1:10 加水煎煮 2 次,第 1 次 1 h,第 2 次 30 min,合并滤液。3000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取出上清液。浓缩后真空干燥,得黄精粗多糖。经蒽酮-硫酸比色法检测,多糖含量为 17.2 %。

1.4 H₂₂ 移植瘤小鼠模型的建立 取腹腔接种 H₂₂ 细胞 6~7 d 的肝癌 H₂₂ 小鼠,无菌条件下抽取腹腔积液,采用无血清培养基混匀制成单细胞悬液,调整细胞浓度至 1×10⁷ mL⁻¹。取 0.2 mL 细胞液,接种于 ICR 小鼠右前肢腋窝皮下,制备 H₂₂ 移植瘤小鼠模型^[5]。

1.5 分组及给药 接种 24 h 后,将模型小鼠随机分为 5 组($n=10$): 模型组,CTX 组,黄精多糖低、中、高剂量组。其中黄精多糖低、中、高剂量分别为 100, 200, 400 mg·kg⁻¹, CTX 剂量为 20 mg·kg⁻¹,均灌胃给药,连续 10 d,模型组灌胃等体积生理盐水。

1.6 对 H₂₂ 移植瘤的抑制作用 停药 24 h 后处死小鼠并分离肿瘤组织,称瘤体质量,计算抑瘤率。将新鲜肿瘤组织分为 2 份,分别用于测定 Caspase 活性和细胞周期分布。

1.7 Caspase-3, 8, 9 活性的测定 肿瘤组织按 1:10 加入裂解液,匀浆后 12000 g 离心 20 min,取上清液。采用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度,采用酶联免

疫吸附法 (ELISA) 试剂盒测定 Caspase-3, 8, 9 活性。

1.8 细胞周期的测定^[6] 瘤组织剪碎并研磨,采用 200 目过滤网过滤后制成单细胞悬液。PBS 漂洗,1000 g 离心后弃上清。细胞重悬于预冷的 75 %乙醇中,置于 -20 ℃ 下固定 24 h。常规 PI 染色后,采用流式细胞术检测细胞周期分布。

1.9 统计学处理方法 实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS18.0 统计软件,用单因素方差分析方法进行统计分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄精多糖的抑瘤作用 黄精多糖低、中、高剂量组的瘤体质量均显著低于模型组($P < 0.05$, $P < 0.01$),抑瘤率分别为 29.3 %、39.8 %和 54.5 %,表明黄精多糖的抑瘤作用呈剂量依赖性,其中高剂量黄精多糖的抑瘤率与 CTX 接近,见表 1。

表 1 黄精多糖对 H₂₂ 移植瘤小鼠的抑瘤作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 The anti-tumor effects of Rhizoma Polygonati polysaccharide on H₂₂ tumor bearing mice

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	瘤体质量/g	抑瘤率/%
模型组	-	1.23 ± 0.21	
黄精多糖低剂量组	100	0.87 ± 0.16*	29.3
黄精多糖中剂量组	200	0.74 ± 0.19*	39.8
黄精多糖高剂量组	400	0.56 ± 0.13**	54.5
CTX 组	20	0.52 ± 0.14**	57.7

注:与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.2 黄精多糖对 Caspase-3, 8, 9 活性的影响 与模型组比较,黄精多糖各剂量组、CTX 组 Caspase-3, 8, 9 活性均显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$),表明黄精多糖可提高 Caspase 系统活性,见表 2。

表 2 黄精多糖对 H₂₂ 移植瘤组织中 Caspase-3, 8, 9 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, U·mg⁻¹, $n=10$)

Table 2 Effects of Rhizoma Polygonati polysaccharide on Caspase-3, 8, 9 activity in H₂₂ tumor tissue of the bearing mice

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Caspase-3	Caspase-8	Caspase-9
模型组	-	0.175 ± 0.043	0.368 ± 0.057	0.141 ± 0.022
黄精多糖低剂量组	100	0.863 ± 0.132**	0.747 ± 0.089**	1.362 ± 0.275**
黄精多糖中剂量组	200	1.169 ± 0.178**	0.985 ± 0.121**	2.189 ± 0.344**
黄精多糖高剂量组	400	1.382 ± 0.295**	1.209 ± 0.178**	2.851 ± 0.386**
CTX 组	20	1.517 ± 0.365**	1.764 ± 0.233**	2.213 ± 0.305**

注:与模型组比较, ** $P < 0.01$ 。

2.3 黄精多糖对肿瘤细胞周期分布的影响 与模型组比较,黄精多糖中、高剂量组 G₀/G₁ 期细胞显著增加

($P < 0.05$)，高剂量组 S 期细胞显著减少($P < 0.05$)，低、中、高剂量组 G₂/M 期细胞显著减少($P < 0.01$ ， $P < 0.05$)。CTX 组 G₀/G₁ 期细胞显著减少($P < 0.01$)，而增加 G₂/M 期细胞($P < 0.01$)。表明黄精多糖可改变肿瘤细胞周期分布，但与 CTX 对肿瘤细胞周期的影响有不同，见表3。

表 3 黄精多糖对 H₂₂ 移植瘤小鼠肿瘤细胞周期的影响($\bar{x} \pm s$ ，%， $n=10$)

Table 3 Effects of Rhizoma Polygonati polysaccharide on cell cycle of H₂₂ tumor bearing mice

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期
模型组	-	51.3 ± 7.2	26.4 ± 3.8	22.3 ± 3.3
黄精多糖低剂量组	100	54.8 ± 9.1	26.1 ± 4.2	19.1 ± 3.2*
黄精多糖中剂量组	200	58.5 ± 7.3*	24.3 ± 2.9	17.2 ± 2.7**
黄精多糖高剂量组	400	59.7 ± 9.4*	22.8 ± 3.1*	17.5 ± 2.4**
CTX 组	20	32.8 ± 4.3**	27.6 ± 3.4	39.6 ± 3.8**

注：与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

3 讨论

本实验以 H₂₂ 肝癌移植瘤小鼠为模型，探讨黄精多糖的抗肿瘤效应及机制。结果表明，黄精多糖呈剂量依赖性地抑制 H₂₂ 移植瘤的生长，其中高剂量组的抑瘤率达到 54.5 %，与 CTX 接近，提示黄精多糖具有良好的抗肿瘤效应。

恶性肿瘤是一种细胞周期性疾病，细胞周期的异常导致肿瘤细胞恶性增殖。细胞周期循环中有许多调控点，每个调控点由一系列相互作用的蛋白及调节因子组成的复杂网络，从而保证基因组在每一个细胞周期内仅复制一次，对维持遗传物质的稳定性和完整性起着至关重要的作用。其中 G₁ 和 G₂/M 是细胞有丝分裂的两个关键调节检测点，这两个检测点分别决定着细胞 DNA 复制和有丝分裂的起始^[7]。抗肿瘤药物可通过作用于某个调节点，使细胞周期阻滞于某一阶段，进而抑制 DNA 复制或有丝分裂，抑制细胞增殖并促进凋亡。本研究结果显示，与模型组比较，黄精多糖和 CTX 均能影响肿瘤细胞的周期分布。黄精多糖使 G₀/G₁ 期细胞增多，而 G₂/M 期细胞减少，表明黄精多糖可将肿瘤细胞阻滞于 G₀/G₁ 期，使之不能进入 S 期进行 DNA 复制，且该作用随剂量增大而逐渐增强。与之不同的是，CTX 减少了 G₀/G₁ 期细胞百分比，而增加了 G₂/M 期细胞，这与刘东玉等^[8]研究结果

一致，表明 CTX 可将肿瘤细胞阻滞于有丝分裂后期。这也提示了黄精多糖和 CTX 抗肿瘤机制的不同。

Caspases 家族的蛋白水解功能是细胞凋亡机制中的核心。Caspase 蛋白可分为两类：一类是位于上游的引发者，如 Caspase-8，9，10；另一类是位于下游的执行者，如 Caspase-3，6，7。细胞凋亡中最关键的步骤是 Caspase-3 的激活^[9]，其中 Caspase-8 和 Caspase-9 是 Caspase-3 的重要上游激活因子。Caspase-8 可通过死亡受体途径激活 Caspase-3，而 Caspase-9 可通过线粒体途径活化 Caspase-3。活化后的 Caspase-3 可诱导肿瘤细胞凋亡^[10-11]。本研究结果表明，黄精多糖可显著提高 Caspase-3，8，9 的活性，进而促进细胞凋亡。提示黄精多糖诱导肿瘤细胞凋亡的机制可能与激活线粒体和死亡受体途径，导致 caspase 家族的级联效应，最终活化 Caspase-3 有关。

参考文献：

[1] 陈晔，孙晓生. 黄精的药理研究进展 [J]. 中药新药与临床药理，2010，21(3)：328-330.

[2] 吴焱荣，李友元，肖洒. 黄精多糖调脂作用的实验研究[J]. 中国新药杂志，2003，12(2)：108-110.

[3] 江华. 黄精多糖的抗肿瘤活性研究[J]. 南京中医药大学学报，2010，26(6)：479-480.

[4] 张峰，高群，孔令雷. 黄精多糖抗肿瘤作用的实验研究[J]. 中国实用医药，2007，2(21)：95-96.

[5] 古学文，胡玲，唐纯志，等. 白花蛇舌草诱导 HSP70 表达对 H₂₂ 肝癌细胞移植瘤 T 淋巴细胞的影响[J]. 中药新药与临床药理，2010，21(4)：393-395.

[6] 贾磊，聂秀娟，方梅. 黄参多糖对癌细胞 HepG2 和 P388 增殖抑制与细胞凋亡的影响[J]. 食品科学，2011，32(19)：227-231.

[7] 傅涛，徐永华. 细胞凋亡的信号转导研究进展[J]. 细胞生物学杂志，1996，18(4)：153-157.

[8] 刘东玉，孔晶，刘凤仪，等. 化疗药环磷酰胺对癌细胞的细胞周期影响和诱导凋亡作用的研究[J]. 实验动物科学与管理，2005，22(1)：12-14.

[9] Clark RS, Kochanek PM, Watkins SC, et al. Caspase-3 mediated neuronal death after traumatic brain injury in rats [J]. J Neurochem, 2000，74(2)：740-753.

[10] Fan TJ, Han LH, Cong RS, et al. Caspase family proteases and apoptosis [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2005，37(11)：710-727.

[11] Zeiss CJ, Neal J, Johnson EA. Caspase-3 in postnatal retinal development and degeneration[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004，45(3)：964-970.

(编辑：梁进权)