

重楼皂苷Ⅶ对肝癌的体内抗肿瘤作用及机制研究

张超¹, 黄喜燕¹, 李祥², 李庆睿³, 张栋⁴, 李文芮⁵, 张翼¹, 张硕峰¹(1. 北京中医药大学, 北京 100102; 2. 北京市门头沟区医院/首都医科大学门头沟教学医院, 北京 102300; 3. 航天中心医院, 北京 100049; 4. 长春中医药大学, 吉林 长春 130117; 5. 吉林农业大学, 吉林 长春 130117)

摘要: **目的** 观察重楼皂苷Ⅶ(Polyphyllin Ⅶ, PP7)对斑马鱼 HepG2 移植瘤和小鼠 H₂₂ 肝癌移植瘤的体内抗肿瘤作用, 并探讨其可能的作用机制。 **方法** 采用 CM-DiI 荧光标记的人肝癌 HepG2 细胞显微注入斑马鱼卵黄囊内和将小鼠 H₂₂ 肝癌细胞悬液接种到小鼠的右腋窝皮下, 建立斑马鱼和小鼠肝癌移植瘤模型。采用不同浓度的 PP7(0.06、0.13、0.25、0.50、0.75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理斑马鱼胚胎; 将荷瘤小鼠分为模型组、氟尿嘧啶(5-Fu, 25 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组及 PP7 低、中、高剂量组(0.5、1、2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。测定给药后斑马鱼移植瘤荧光强度、面积, 以及小鼠瘤体质量、体积; 统计荷瘤小鼠生命延长率; 采用 HE 染色法对肿瘤组织进行病理形态学观察; 采用 TUNEL 法检测肿瘤细胞凋亡情况; 采用免疫组织化学法检测微血管密度(CD31)以及肿瘤细胞增殖(PCNA、Ki67)情况。 **结果** 与模型组比较, PP7 不同浓度均能够显著降低斑马鱼移植瘤荧光强度和面积($P<0.01$); PP7 低、中、高剂量均能明显降低小鼠瘤体质量和体积($P<0.05$, $P<0.01$), 促进移植瘤细胞凋亡($P<0.05$, $P<0.01$), 下调肿瘤组织中 CD31、PCNA、Ki67 的表达($P<0.05$, $P<0.01$), 并且能明显延长荷瘤小鼠生存时间($P<0.05$, $P<0.01$)。 **结论** PP7 具有明显的体内抗肝癌作用, 可能与其促进肿瘤细胞凋亡、降低微血管密度以及抑制肿瘤细胞增殖有关。

关键词: 重楼皂苷Ⅶ; 肝癌; 抗肿瘤; 细胞凋亡; 斑马鱼; 小鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2022)01-0007-07

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2022.01.002

Anti-tumor Effect of Polyphyllin Ⅶ on Hepatocellular Carcinoma Cells *in vivo*

ZHANG Chao¹, HUANG Xiyan¹, LI Xiang², LI Qingrui³, ZHANG Dong⁴, LI Wenrui⁵, ZHANG Yi¹, ZHANG Shuofeng¹(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China; 2. Beijing Mentougou District Hospital/Capital Medical University Mentougou Teaching Hospital, Beijing 102300, China; 3. Aerospace Central Hospital, Beijing 100049, China; 4. Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117 Jilin, China; 5. Jilin Agricultural University, Changchun 130117 Jilin, China)

Abstract: **Objective** In this study, the anti-tumor effect of polyphyllin Ⅶ (PP7) in zebrafish human tumor xenograft model and H₂₂ tumor-bearing mice, and the molecular mechanisms were evaluated and explored. **Methods** We establish zebrafish xenograft model by injecting human hepatocellular carcinoma HepG2 cells into the yolk sac of zebrafish and H₂₂ bearing mice model by subcutaneous inoculating mouse H₂₂ hepatocarcinoma cells to mice in the right axillary region. Transplanted zebrafish were treated with different concentrations of PP7 (0.06, 0.13, 0.25, 0.50, 0.75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and H₂₂ bearing mice were divided into five groups and were injected intraperitoneally with PP7 (0.5, 1, 2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 5-FU (25 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) or normal saline(model group). The fluorescence intensity and area of HepG2 cells in zebrafish xenograft model and the tumor weight, tumor size, and life extension in H₂₂ bearing

收稿日期: 2021-07-21

作者简介: 张超, 男, 博士, 讲师, 研究方向: 中医药防治肿瘤的应用基础研究。Email: zhangchao_0213@126.com。共同第一作者: 黄喜燕, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药药理学。Email: 1303195894@qq.com。通信作者: 张翼, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 中药防治代谢性疾病的药理研究。Email: yizhang714@163.com。张硕峰, 男, 博士, 教授, 研究方向: 中药药理学。Email: shuofengzhang@sina.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(82003972); 中央高校基本科研业务费专项资助项目(2020-JYB-XJSJJ-011)。

mice were monitored. The histological evaluation was carried out by H&E staining of different tumor tissue samples, the immunohistochemical detection of CD31, PCNA and Ki67 in solid tumor sections was performed by standard immunohistochemical techniques, and the percentage of apoptotic cells in tissue section was determined by TUNEL staining. **Results** Compared with model group, PP7 markedly inhibited the proliferation of HepG2 cells in zebrafish xenograft model ($P < 0.01$), and decreased the tumor weight and volume at different dosages ($P < 0.05$, $P < 0.01$), induced cancer cell apoptosis of the tumor tissues ($P < 0.05$, $P < 0.01$), decreased the percentage of positive cells expressing PCNA, Ki67 and CD31 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in tumor tissue sections, and prolonged the survival period of tumor-bearing mice ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** This study demonstrates that PP7 possesses strong anti-tumor activity *in vivo* via suppression of cancer cell proliferation, decrease microvascular density of tumor, and induction of apoptosis in tumor tissues.

Keywords: Polyphyllin VII; liver cancer; anti-tumor; apoptosis; zebrafish; mice

肝癌是我国临床常见恶性肿瘤之一,死亡率居恶性肿瘤死亡率的第2位^[1]。目前临床上肝癌的治疗手段主要是采取手术及放化疗,但因肝癌起病隐匿,早期无明显症状,多数患者确诊时已发展到中晚期,失去手术机会。并且由于肝癌细胞对多数化疗药物不敏感,易产生毒副反应,当前国际上尚无标准化疗方案^[1-2]。近年来,随着中医药研究的不断深入,在控制肝癌病情进展、改善症状、延长生存期等方面体现了独特优势,使中药抗肿瘤的研究备受关注^[3]。中药重楼始载于《神农本草经》,为百合科植物云南重楼或七叶一枝花的干燥根茎,具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊之功效^[4]。民间用重楼治疗癌症的历史悠久,经现代研究^[5-6]证实,重楼对乳腺癌、肝癌、肺癌、卵巢癌等实体瘤均有一定的抑制作用。重楼皂苷Ⅶ(Polyphyllin VII, PP7)作为甾体皂苷是重楼抗肿瘤的主要活性成分之一。本课题组前期通过体外研究^[7-9]发现,PP7能够诱导肝癌细胞凋亡性及自噬性死亡,抑制肿瘤细胞增殖、转移和血管生成。故本研究拟通过建立肝癌 HepG2 移植瘤斑马鱼和 H₂₂ 移植瘤小鼠模型,观察 PP7 的体内抑瘤作用,并探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物及细胞株 野生型 AB 品系斑马鱼,由山东省科学院斑马鱼药物筛选平台保存。斑马鱼在 28 ℃、14 h 光照/10 h 黑暗的光周期条件下饲养,胚胎繁殖以自然成对交配的方式进行并在 28 ℃条件下用养鱼用水孵育^[10-11],饲养及管理符合国际 AAALAC 认证的要求。SPF 级 ICR 小鼠,雌雄各半,体质量 18~22 g,由吉林省长春市亿斯实验动物技术公司提

供,动物生产许可证号:SCXK-(吉)2017-0004。动物饲养条件为:基础饲料喂养,自由饮水,空气湿度为 44%~60%,温度:(22±2)℃,昼夜节律,实验前适应性饲养 3 d。小鼠 H₂₂ 肝癌细胞株和 HepG2 人肝癌细胞株,由吉林省肿瘤医院付勤教授惠赠,常规传代培养。

1.2 药物及试剂 PP7(纯度 98%),由中南民族大学梅之南教授提供;氟尿嘧啶(5-Fu)注射液(每支 250 mg),天津金耀药业有限公司,批号 1510181。PCNA 单克隆抗体(批号:WL0341c)、Ki67 抗体(批号:WL01384a),沈阳万类生物科技公司;CD31 抗体,上海生工生物工程公司,批号 D260721;CM-DiI 红色荧光染料,美国 Life Technologies 公司,批号 1779189。

1.3 主要仪器 SZX7 型解剖显微镜,日本 Olympus 公司;AZ100 型电动聚焦连续变倍荧光显微镜,日本 Nikon 公司;IM300 型显微注射仪,日本 Narishige 公司;CP214 型精密电子天平,美国 Ohaus 公司;RM2235 型石蜡切片机,德国 Leica 公司。

1.4 分组、模型复制及给药 使用活细胞红色荧光染色剂 CM-DiI 标记 HepG2 细胞,采用显微注射的方式移植到受精后 2 d 的斑马鱼卵黄囊内,建立斑马鱼 HepG2 移植瘤模型。将注射肝癌细胞的斑马鱼置于 35 ℃生化培养箱中培养 24 h,在荧光显微镜下挑选出移植瘤大小一致的斑马鱼,随机分为 5 组(每组 30 尾)。根据预实验结果,对 PP7 的抗肿瘤药效学实验选择 5 个不同浓度,分别为 0.06、0.13、0.25、0.50、0.75 μmol·L⁻¹。给药 3 d 后,各组随机选取 10 尾斑马鱼,麻醉后在荧光显微镜下拍照,测定斑马鱼移植瘤荧光强度和荧光面积。

选择腹腔接种 H₂₂ 肝癌细胞 7 d 的小鼠，在无菌条件下抽取腹水，用生理盐水稀释，调整细胞密度为 $2 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$ 。取 0.2 mL 肝癌细胞悬液接种到小鼠的右腋窝皮下，制备 H₂₂ 移植瘤小鼠模型。接种后第 2 天，将 60 只造模小鼠随机分为 5 组（每组 12 只），分别为模型组、5-Fu 组 ($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 及 PP7 低、中、高剂量组 (0.5 、 1 、 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。PP7 各剂量组及 5-Fu 组按上述剂量腹腔注射给药，模型组腹腔注射生理盐水 ($0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$)，每日 1 次，连续给药 12 d。每天观察 H₂₂ 移植瘤体积，末次给药结束 24 h 后，每组取一半小鼠处死，测量 H₂₂ 移植瘤质量，另一半继续观察给药后小鼠的生存期。

1.5 H₂₂ 移植瘤质量测定 末次给药结束 24 h 后处死小鼠并分离肿瘤组织，称取瘤体质量，计算：抑瘤率 (%) = (模型组瘤体质量 - 给药组瘤体质量) / 模型组瘤体质量 $\times 100\%$ 。

1.6 H₂₂ 移植瘤体积测定 接种肿瘤达可触或肉眼可见程度后，每天用游标卡尺测量并记录肿瘤长径和短径，并计算肿瘤大小^[12]。肿瘤体积 (mm^3) = $0.52 \times \text{长径}(\text{mm}) \times \text{短径}(\text{mm})^2$ 。

1.7 H₂₂ 荷瘤小鼠生存期测定 给药后记录各组小鼠生存时间，计算平均生存时间和生命延长率^[13]。生命延长率 (%) = (给药组平均生存时间 / 模型组平均生存时间 - 1) $\times 100\%$ 。

1.8 H₂₂ 肝癌小鼠肿瘤组织相关指标检测 将剥离的肿瘤组织置于 10% 甲醛中固定 4 h 后，石蜡包埋，制成 $5 \mu\text{m}$ 切片进行常规 HE 染色，于光学显微镜下观

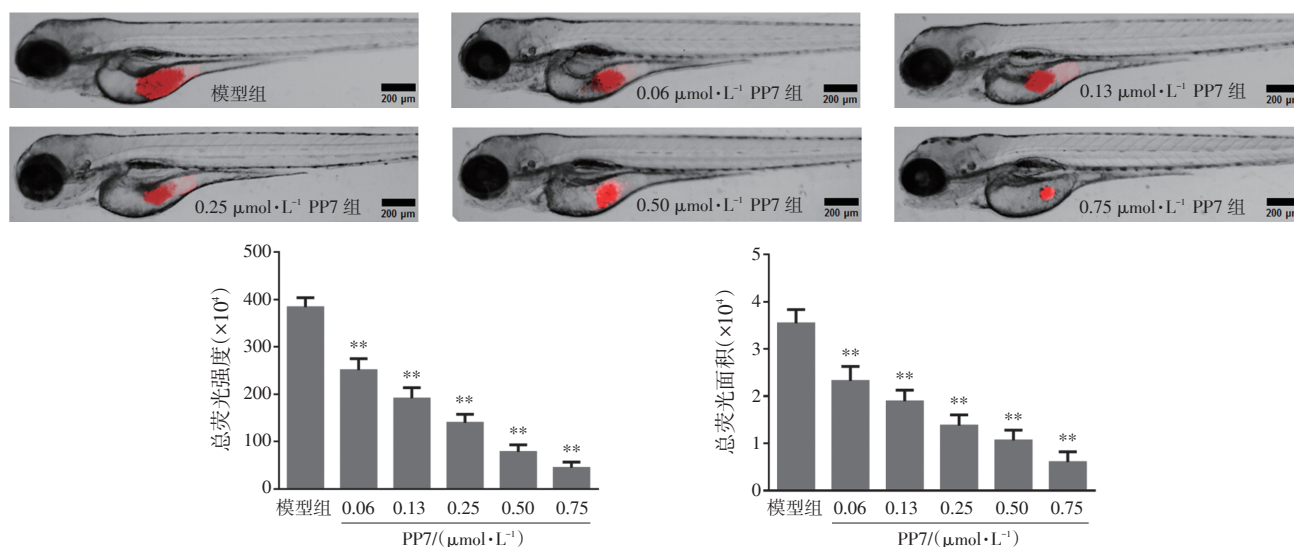
察肿瘤组织的病理形态，以及肿瘤细胞生长、坏死及对周围组织的浸润情况。采用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记测定法 (TUNEL) 检测肿瘤细胞的凋亡情况，显微镜下观察到呈现棕褐色的为阳性细胞 (凋亡细胞)，采用阳性细胞数占总细胞数的百分比来表示凋亡率。采用免疫组织化学法 (IHC) 检测肿瘤组织中 CD31、增殖细胞核抗原 (PCNA) 及 Ki67 的表达情况，采用阳性细胞数所占百分比来表示表达量或增殖指数。

1.9 统计学处理方法 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析；计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示；多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)，两两比较采用 LSD 检验；以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PP7 对斑马鱼 HepG2 移植瘤的影响 结果见图 1。与模型组比较，PP7 0.06 、 0.13 、 0.25 、 0.50 、 $0.75 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 5 个剂量组的斑马鱼 HepG2 移植瘤的荧光强度和荧光面积均明显减弱或缩小，差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。结果表明，PP7 对斑马鱼 HepG2 肝癌移植瘤有明显的增殖抑制作用。

2.2 PP7 对 H₂₂ 荷瘤小鼠瘤体质量及抑瘤率的影响 结果见表 1。与模型组比较，PP7 高、中、低剂量组及 5-Fu 组荷瘤小鼠的瘤体质量均明显减轻，差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ ， $P < 0.01$)，抑瘤率分别为 65.8% 、 54.2% 、 40.8% 、 62.5% 。结果表明，PP7 能有效地降低 H₂₂ 荷瘤小鼠的瘤体质量。



注：与模型组比较，** $P < 0.01$

图 1 重楼皂苷 VII (PP7) 对斑马鱼 HepG2 移植瘤的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Figure 1 Effect of polyphyllin VII (PP7) on the proliferation of HepG2 cells in zebrafish tumor xenografts ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

表 1 重楼皂苷Ⅶ(PP7)对 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤质量及抑瘤率的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

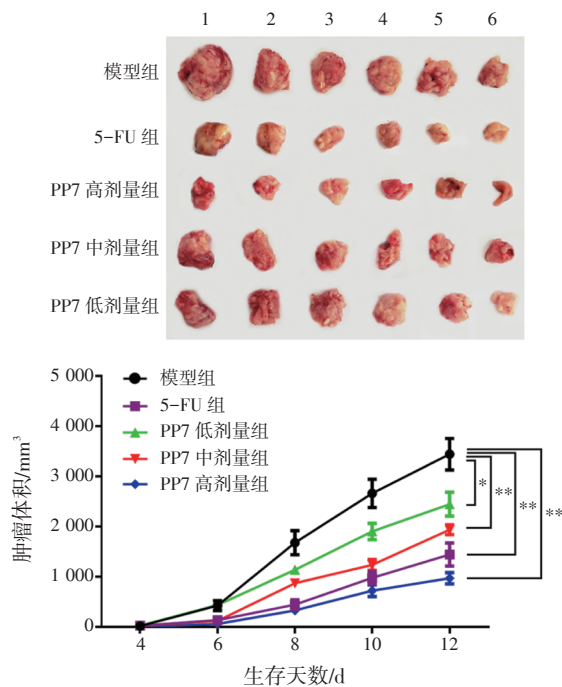
Table 1 Effect of polyphyllin Ⅶ (PP7) on the tumor weight of H₂₂-bearing mice($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	瘤体质量/g	抑瘤率/%
模型组	—	1.20 ± 0.25	—
5-FU 组	25	0.45 ± 0.11**	62.5
PP7 高剂量组	2	0.41 ± 0.12**	65.8
PP7 中剂量组	1	0.55 ± 0.13**	54.2
PP7 低剂量组	0.5	0.71 ± 0.13*	40.8

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

2.3 PP7 对 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤体积的影响 结果见图 2。模型组、5-Fu 组及 PP7 中、低剂量组小鼠在给药后的第 4 天可触及大小不一的皮下结节,PP7 高剂量组于第 6 天可触及有结节。2 周末时,模型组肿瘤体积增长趋势最大,5-Fu 组和 PP7 高剂量组的肿瘤生长趋势较模型组明显减缓。与模型组比较,PP7 高、中、低剂量组及 5-Fu 组荷瘤小鼠的肿瘤体积明显减小,差异均有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。结果表明,PP7 能够有效缩小 H₂₂ 荷瘤小鼠的肿瘤体积。

2.4 PP7 对 H₂₂ 荷瘤小鼠生存期的影响 结果见表 2。与模型组比较,5-Fu 组和 PP7 高、中、低剂量组 H₂₂



注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

图 2 重楼皂苷Ⅶ(PP7)对 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤体积的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Figure 2 Effect of polyphyllin Ⅶ (PP7) on the tumor volume of H₂₂-bearing mice($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

表 2 重楼皂苷Ⅶ(PP7)对 H₂₂ 荷瘤小鼠生存期的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 2 Effect of polyphyllin Ⅶ (PP7) on the survival time of H₂₂-bearing mice($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	平均生存时间/d	生命延长率/%
模型组	—	13.67 ± 1.61	—
5-FU 组	25	19.33 ± 1.53**	41.4
PP7 高剂量组	2	21.83 ± 1.26**	59.7
PP7 中剂量组	1	20.50 ± 1.21**	49.9
PP7 低剂量组	0.5	17.33 ± 1.24*	26.8

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

荷瘤小鼠的自然生存时间明显延长,差异均有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$),生命延长率分别为 41.4%、59.7%、49.9%、26.8%。结果表明,PP7 能有效地延长 H₂₂ 荷瘤小鼠的生存期。

2.5 PP7 对 H₂₂ 荷瘤小鼠移植瘤组织病理形态的影响 结果见图 3。镜下观察可见,细胞核被苏木素染成蓝色,细胞质等被伊红染成红色。模型组小鼠的肿瘤

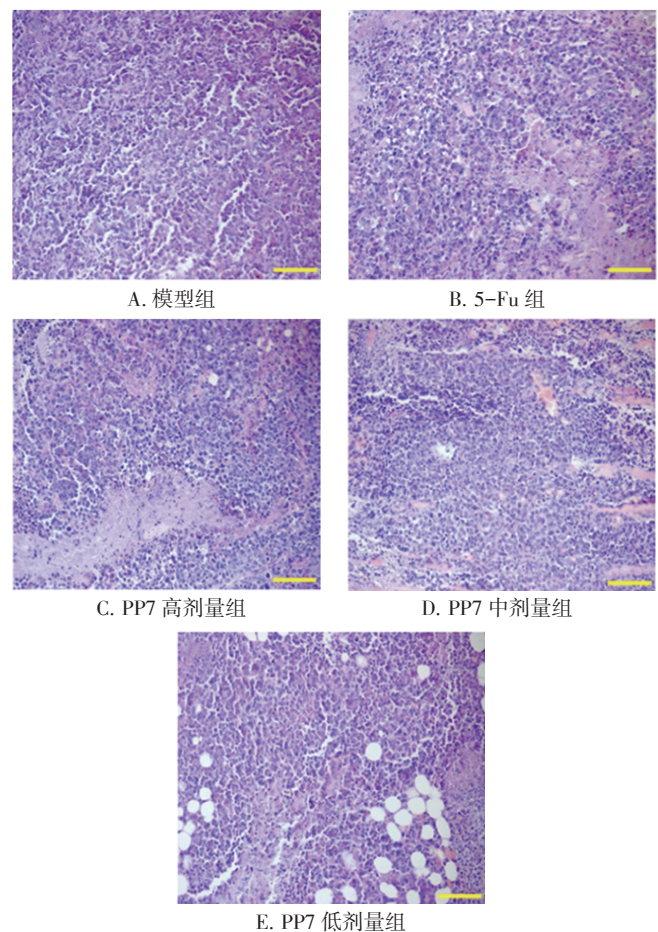


图 3 重楼皂苷Ⅶ(PP7)对 H₂₂ 荷瘤小鼠移植瘤组织病理形态的影响(HE 染色, ×400)

Figure 3 Effect of polyphyllin Ⅶ (PP7) on cancer histopathology in H₂₂-bearing mice(HE staining, ×400)

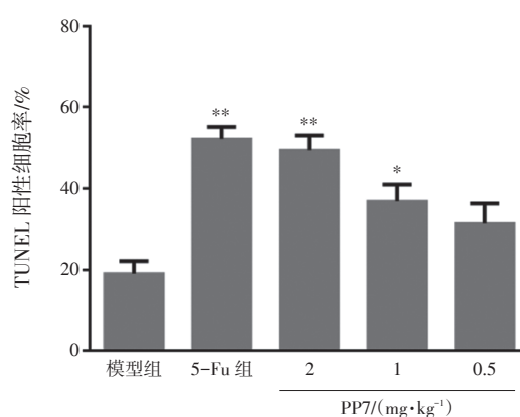
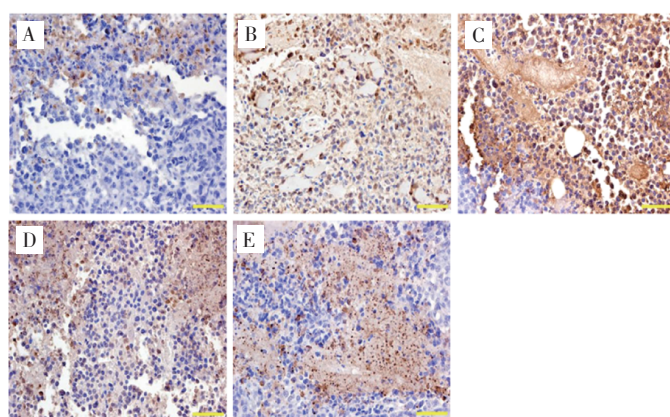
细胞较大，核大深染，部分癌细胞呈癌巢状排列。与模型组比较，各给药组小鼠可见肿瘤细胞减少，形态较模糊，排列较疏松，细胞体积变小，细胞核体积减小。

2.6 PP7 对 H₂₂ 荷瘤小鼠移植瘤组织细胞凋亡的影响
结果见图 4。棕褐色细胞为阳性凋亡细胞，与模型组比较，5-Fu 组及 PP7 高、中剂量组小鼠移植瘤组织的凋亡细胞阳性率明显升高，差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果表明，PP7 能够诱导 H₂₂

荷瘤小鼠移植瘤组织的细胞凋亡。

2.7 PP7 对 H₂₂ 荷瘤小鼠移植瘤内微血管密度的影响

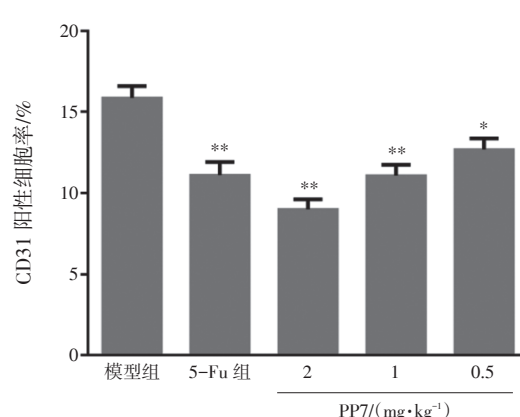
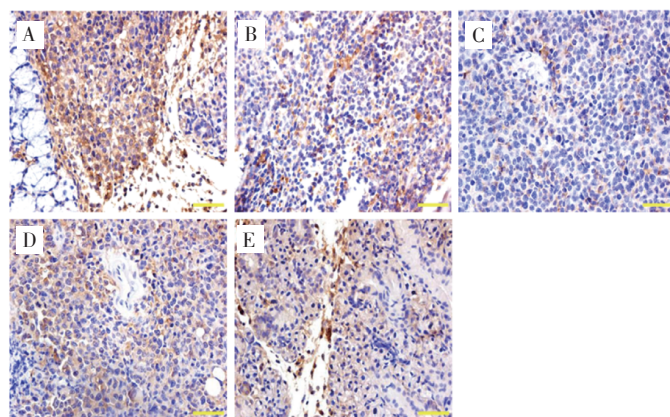
选择以 CD31 作为血管内皮细胞标志物来检测肿瘤组织的微血管密度，结果见图 5。与模型组比较，5-Fu 组及 PP7 高、中、低剂量组小鼠移植瘤组织的 CD31 阳性细胞率明显降低，差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果表明，PP7 能有效降低 H₂₂ 荷瘤小鼠的移植瘤内微血管密度。



注：A. 模型组；B. 5-Fu 组；C. PP7 高剂量组；D. PP7 中剂量组；E. PP7 低剂量组。与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

图 4 重楼皂苷 VII (PP7) 对 H₂₂ 荷瘤小鼠移植瘤组织细胞凋亡的影响 (TUNEL 染色, $\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 4 Effect of polyphyllin VII (PP7) on cancer cell apoptosis induction in H₂₂-bearing mice (TUNEL staining, $\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$)



注：A. 模型组；B. 5-Fu 组；C. PP7 高剂量组；D. PP7 中剂量组；E. PP7 低剂量组。与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

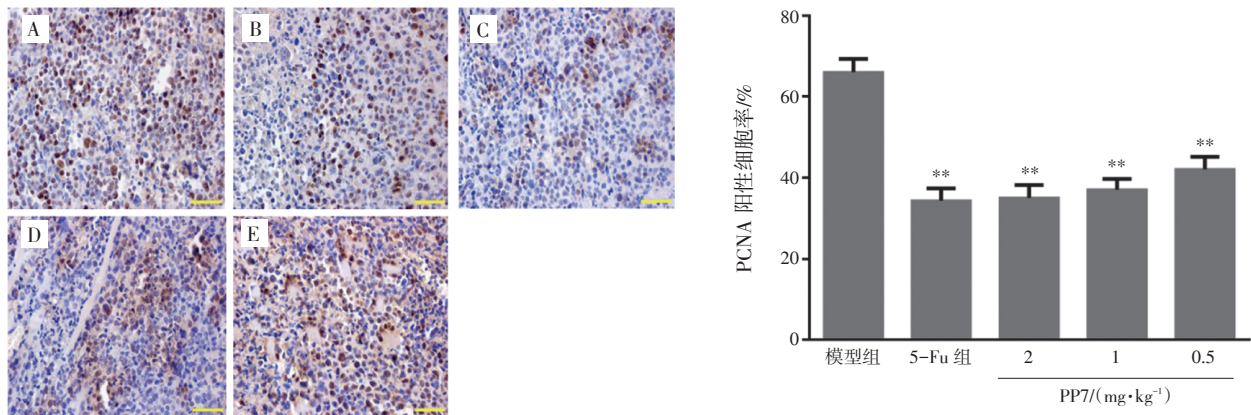
图 5 重楼皂苷 VII (PP7) 对 H₂₂ 荷瘤小鼠移植瘤内微血管密度的影响 (免疫组化, $\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 5 Effect of polyphyllin VII (PP7) on tumor angiogenesis in H₂₂-bearing mice (IHC, $\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.8 PP7 对 H₂₂ 荷瘤小鼠移植瘤细胞增殖的影响 结果见图 6、图 7。与模型组比较，5-Fu 组及 PP7 高、中、低剂量组小鼠移植瘤组织的 PCNA、Ki67 阳性细胞率明显降低，差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。结果表明，PP7 能有效抑制 H₂₂ 荷瘤小鼠移植瘤细胞的增殖。

3 讨论

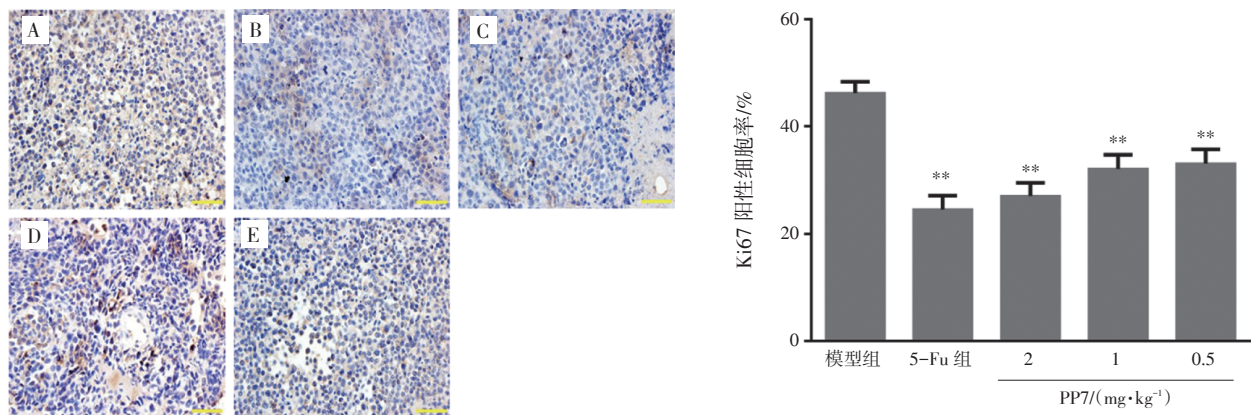
肝癌是病死率最高的恶性肿瘤之一，我国每年约有 38.3 万人死于肝癌，占全球肝癌死亡病例数的 51%，严峻形势给我国的社会和医疗带来了沉重的负担^[1-2]。目前临床上尚缺少安全可靠的抗肝癌药物。本研究在前期体外研究^[7-9]的基础上开展了重楼皂苷



注: A. 模型组; B. 5-Fu 组; C. PP7 高剂量组; D. PP7 中剂量组; E. PP7 低剂量组。与模型组比较, ** $P < 0.01$

图6 PP7 对 H_{22} 荷瘤小鼠移植瘤细胞增殖(PCNA)的影响(免疫组化, $\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 6 Effect of polyphyllin VII (PP7) on cancer cell proliferation (PCNA) in H_{22} -bearing mice (IHC, $\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$)



注: A. 模型组; B. 5-Fu 组; C. PP7 高剂量组; D. PP7 中剂量组; E. PP7 低剂量组。与模型组比较, ** $P < 0.01$

图7 重楼皂苷Ⅶ(PP7)对 H_{22} 荷瘤小鼠移植瘤细胞增殖(Ki67)的影响(免疫组化, $\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 7 Effect of polyphyllin VII (PP7) on cancer cell proliferation (Ki67) in H_{22} -bearing mice (IHC, $\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

VII (Polyphyllin VII, PP7) 对 H_{22} 荷瘤小鼠的抑瘤作用、生存时间及作用机制的研究, 结果显示腹腔注射 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PP7 对 H_{22} 荷瘤小鼠具有较好的抗肝癌和延长生存期的效果。同时, 研究结果还显示, 0.06 、 0.13 、 0.25 、 0.50 、 $0.75 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PP7 对斑马鱼 HepG2 移植瘤的增殖有明显抑制作用。

目前对重楼抗肿瘤作用机制的研究主要集中在诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞增殖等方面。恶性肿瘤的生长, 一方面是由于癌细胞的过度增殖与低分化; 另一方面则是由于细胞凋亡被抑制, 不能正常进行细胞死亡清除, 而使肿瘤细胞减少受阻。TUNEL 是目前应用广泛的检测细胞凋亡的技术, 是由 Gavriel 等^[14]在 1992 年提出来标记 DNA 断裂末端, 进而在单细胞水平上显现凋亡细胞的方法。本研究结果表明, 与模型组比较, PP7 按 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量腹腔注射能够显著提高肿瘤细胞凋亡率 ($P <$

0.01), 表明 PP7 可能通过促进肿瘤细胞凋亡, 起到抑制肿瘤细胞增殖的作用。PCNA 是真核细胞 DNA 合成所必须的一种核蛋白, 对 DNA 复制起着重要作用, 其合成和表达与细胞增殖有关。PCNA 的表达能反映细胞的增殖状态, 在快速生长的肿瘤组织中呈阳性反应^[15-16]。Ki67 是反映细胞增殖活性的重要指标, 其在肝癌、肺癌及恶性软组织肿瘤中均有过表达, Ki67 的表达水平能较全面客观地反映肿瘤细胞的增殖状态^[17]。因此, 本研究通过 IHC 法测定了肿瘤组织中 PCNA、Ki67 的表达水平以判断 PP7 能否起到抑制肿瘤增殖的作用。结果显示, 与模型组比较, PP7 以 2 、 1 、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量腹腔注射均能够显著降低肿瘤组织中 PCNA、Ki67 的表达水平 ($P < 0.01$), 在一定程度上降低了细胞增殖的活跃程度。肿瘤的生长和转移都依赖于新生血管的形成, 肿瘤组织的微血管密度 (Microvessel density, MVD) 可定量

地反映出肿瘤血管生长情况,已成为检测肿瘤血管生成的金标准^[18]。CD31 是血小板-内皮细胞黏附分子,主要表达于内皮细胞、血小板、单核细胞等细胞表面,是一种新型微血管标记物,可以作为血管内皮细胞特异性标志,具有定量评价血管新生因子的作用^[19]。本研究通过 IHC 法检测发现,PP7 以 $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 腹腔注射能够显著降低小鼠移植瘤组织的 CD31 阳性表达水平($P<0.01$),降低血管生成的活跃程度。

综上所述,PP7 对斑马鱼 HepG2 移植瘤及 H₂₂ 荷瘤小鼠移植瘤的增殖有明显抑制作用,能有效地延长 H₂₂ 荷瘤小鼠的生存期,可能与其促进肿瘤细胞凋亡、降低微血管密度以及抑制肿瘤细胞增殖有关,具体作用机制有待进一步深入探讨。

参考文献:

- [1] 孟庆娥,许尤琪,蒋晨露,等. 中医药防治肝癌术后复发转移研究进展[J]. 亚太传统医药, 2020, 16(1): 184-187.
- [2] 陈建杰. 肝癌中医药辨治思路[J]. 中西医结合肝病杂志, 2019, 29(2): 17-19.
- [3] 晏子,陈音. 中医药抗肿瘤作用研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(8): 97-98.
- [4] 何良艳,余美荣,陈建真. 重楼的研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2011, 25(6): 94-97.
- [5] 孟巍,杜娟,陈涛. 重楼的化学成分及其抗肿瘤机制[J]. 生命的化学, 2020, 40(1): 70-74.
- [6] 张勇,骆亮生,储华健,等. 重楼在抗肿瘤等方面的研究进展[J]. 全科口腔医学电子杂志, 2019, 6(9): 38-39.
- [7] ZHANG C, JIA X, WANG K, et al. Polyphyllin VII induces an autophagic cell death by activation of the JNK pathway and inhibition of PI3K/AKT/mTOR pathway in HepG2 cells[J]. Plos One, 2016, 11(1): e0147405.
- [8] ZHANG C, LI Q, QIN G, et al. Anti-angiogenesis and anti-metastasis effects of Polyphyllin VII on Hepatocellular carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*[J]. Chin Med, 2021, 16(1): 41.
- [9] ZHANG C, JIA X, BAO J, et al. Polyphyllin VII induces apoptosis in HepG2 cells through ROS-mediated mitochondrial dysfunction and MAPK pathways[J]. Bmc Complementary & Alternative Medicine, 2015, 16(1): 58-70.
- [10] 黄志军,兰小红,赵刚,等. 小金胶囊对斑马鱼移植瘤的抗肿瘤作用[J]. 中成药, 2016, 38(9): 1902-1906.
- [11] 王荣春,韩利文,陈锡强,等. 利用斑马鱼模型研究芦荟大黄素对宫颈癌细胞SiHa的抑制作用[J]. 山东科学, 2016, 29(2): 14-18.
- [12] 邹玺,王瑞平,吴坚,等. 复方乌梅散对H₂₂荷瘤小鼠的抑瘤作用和生存期影响的研究[J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(8): 1483-1485.
- [13] 吴勃岩,王雪,王君龙,等. 熟地黄多糖对H₂₂、S180荷瘤小鼠抑瘤作用及存活时间的影响[J]. 中医药信息, 2012, 29(6): 19-21.
- [14] GAVRIELI Y, SHERMAN Y, BEN-SASSON S A. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation[J]. Journal of Cell Biology, 1992, 119(3): 493-501.
- [15] 宋勇波,杨嗣星,赵战魁,等. VEGF和PCNA在肾细胞癌中的表达及意义[J]. 现代泌尿生殖肿瘤杂志, 2009, 1(6): 360-363.
- [16] 李昆珊,林亚莹,李灵杰,等. 艾灸对结肠炎相关性结肠癌大鼠细胞增殖相关蛋白PCNA, CyclinD1的影响[J]. 中医学, 2021, 10(2): 157-168.
- [17] MA Y L, PENG J Y, ZHANG P, et al. Immunohistochemical analysis revealed CD34 and Ki67 protein expression as significant prognostic factors in colorectal cancer[J]. Med Oncol, 2010, 27(2): 304-309.
- [18] FANELLI M, LOCOPO N, GATTUSO D, et al. Assessment of tumor vascularization: immunohistochemical and non-invasive methods[J]. International Journal of Biological Markers, 1999, 14(4): 218-231.
- [19] DEEPAK A V, SALIMATH B P. Antiangiogenic and proapoptotic activity of a novel glycoprotein from *U. indica* is mediated by NF- κ B and Caspase activated DNase in ascites tumor model[J]. Biochimie, 2006, 88(3-4): 297-307.

(编辑: 邹元平)