

# 无花果果实及乳浆对人黑色素瘤 A375 细胞的抑制作用及其作用机制研究

李保宏<sup>1</sup>, 李忠原<sup>1</sup>, 刘苗苗<sup>1</sup>, 田景振<sup>1</sup>, 张晓<sup>1</sup>, 崔清华<sup>2,3</sup>(1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355; 2. 山东中医药大学中医药创新研究院, 山东 济南 250355; 3. 山东中医药大学青岛中医药科学院, 山东 青岛 266112)

**摘要:** **目的** 考察无花果果实及乳浆不同极性部位的体外抗黑色素瘤活性, 并探讨其作用机制。**方法** 采用溶剂提取法制得无花果提取物, 系统溶剂萃取法得乳浆不同极性部位和醇沉纯化部位供试品; 采用 MTT 法、划痕实验、Transwell 侵袭实验和流式细胞仪凋亡检测考察供试品对人恶性黑色素瘤细胞 A375 的增殖、迁移、侵袭和凋亡影响; 构建 A375 细胞和人脐静脉内皮细胞 HUVEC 的共培养体系, 通过侵袭实验、成管实验体外模拟肿瘤细胞对内皮血管形成; ELISA 法测定相关细胞因子水平。**结果** 无花果提取物和乳浆乙酸乙酯部位抑制肿瘤细胞 A375 的迁移和侵袭( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ), 降低 A375 细胞的超氧化物歧化酶(SOD)及乳酸脱氢酶(LDH)含量( $P < 0.001$ ), 提高一氧化氮(NO)含量( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ); 乳浆醇沉部位抑制 A375 细胞迁移和侵袭( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ), 对 A375 细胞的直接抑杀和促凋亡效果较好; 共培养后 HUVEC 细胞侵袭能力提升, 血管内皮生长因子(VEGF)、血管内皮素 1(ET-1)、内皮型一氧化氮合酶(eNOs)分泌增多( $P < 0.001$ ), 且供试品( $200 \sim 400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )给药后可明显逆转( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ )。**结论** 无花果提取物及乳浆乙酸乙酯、醇沉部位具有抑制 A375 细胞增殖、迁移和侵袭作用, 从能量代谢方面抑制黑色素瘤生长, 并可能通过 eNOs/VEGF/ET-1 途径抑制肿瘤的新生血管形成。

**关键词:** 无花果; 无花果乳浆; 黑色素瘤; A375 细胞; 血管生成; eNOs/VEGF/ET-1

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2022)01-0039-11

**doi:** 10.19378/j. issn. 1003-9783.2022.01.007

## Inhibitory Activity and Mechanism of Fig Fruit and Latex on Human Melanoma A375 Cells

LI Baohong<sup>1</sup>, LI Zhongyuan<sup>1</sup>, LIU Miaomiao<sup>1</sup>, TIAN Jingzhen<sup>1</sup>, ZHANG Xiao<sup>1</sup>, CUI Qinghua<sup>2,3</sup>(1. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355 Shandong, China; 2. Innovation Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355 Shandong, China; 3. Qingdao Academy of Chinese Medicinal Sciences, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Qingdao 266112 Shandong, China)

**Abstract: Objective** To investigate the anti-melanoma activity of fig extract and different polar parts of its latex *in vitro* and explore the mechanism. **Methods** Fig extract was prepared by solvent extraction, different polar parts of latex and purified parts of alcohol-sedimentation fraction were obtained by systematic solvent extraction. The effects of extracts on the proliferation, migration, invasion, and apoptosis of A375 cells were investigated by MTT method, scratch test, Transwell invasion test and flow cytometer apoptosis experiment, respectively. The co-culture system of A375 cells and HUVEC cells was constructed. Endothelial angiogenesis of A375 cells was simulated by invasion test and tube formation assay *in vitro*, and the levels of related cytokines were measured by ELISA to investigate the mechanism of action. **Results** Fig extract and ethyl acetate fraction of latex inhibited the migration

收稿日期: 2021-07-02

作者简介: 李保宏, 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药新药研发。Email: libaohong1019@163.com。通信作者: 崔清华, 女, 副教授, 研究方向: 中药抗病毒。Email: cuiqinghua1122@163.com。

基金项目: 山东省自然科学基金面上项目(ZR2020MH383); 山东省重点研发计划(重大科技创新工程)项目(2020CXGC010505, 2021CXGC010511)。

and invasion of A375 cells in a concentration-dependent manner ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ), decreased the contents of SOD and LDH ( $P < 0.001$ ), and increased the content of NO in A375 cells ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ). Alcohol-sedimentation fraction of latex inhibited the migration and invasion of A375 cells ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ), had better effect on the direct inhibition and promotion of apoptosis of A375 cells. After co-culture, the invasive ability of HUVEC cells increased, the secretion of VEGF, ET-1 and eNOs increased ( $P < 0.001$ ), but it can be significantly reversed after administration of extracts ( $200\sim 400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ). **Conclusion** Fig extract, ethyl acetate fraction and alcohol-sedimentation fraction of latex can inhibit the proliferation, migration, and invasion of A375 cells, inhibit the growth of melanoma in terms of energy metabolism. Fig extract and ethyl acetate fraction of latex may inhibit tumor neovascularization through eNOs/VEGF/ET-1 pathway.

**Keywords:** Ficus carica; fig latex; melanoma; A375 cells; angiogenesis; eNOs/VEGF/ET-1

恶性黑色素瘤是一种源自黑素细胞或由黑素细胞发育而来的细胞肿瘤<sup>[1]</sup>,是最致命的皮肤癌之一,呈逐年高发态势,大约 20%~25%的恶性黑色素瘤患者死于转移<sup>[2]</sup>。控制黑色素瘤的转移是治疗的关键,此外,肿瘤血管是癌细胞从原发部位向远处器官转移的主要途径,其为肿瘤的生长和发展提供氧气和营养,故抑制肿瘤血管生成也是有效的抗癌手段<sup>[3]</sup>。

目前临床上常用于治疗人黑色素瘤的药物以西药为主,如达拉非尼、曲美替尼、纳武单抗、环磷酰胺、顺铂等,大多具有严重的不良反应<sup>[4-6]</sup>。无花果是桑科榕属植物无花果 *Ficus carica* L. 的果实,具有消肿解毒、润肺止咳、清热生津等功效<sup>[7]</sup>;无花果乳浆(Fig fruit latex, FFL)是无花果鲜果和茎秆挤出的乳白色粘稠乳汁。无花果、叶及其产物在中国均有广泛的应用。如民间常用无菌针头穿刺疣体,涂抹无花果乳浆,数月后疣体变小脱落,疗效良好<sup>[8-9]</sup>;F. Hemmatzade 等<sup>[10]</sup>用无花果乳浆和水杨酸对比治疗感染牛乳头瘤病毒的牛,发现两者治疗效果接近,但无花果乳浆对皮肤损伤更小;现代研究表明,无花果及无花果乳浆对 HCT-116 和 HT-29 人结直肠癌细胞<sup>[11]</sup>、人肝癌 HepG2 细胞<sup>[12]</sup>、多形性胶质母细胞瘤<sup>[13]</sup>和乳腺癌<sup>[14]</sup>等多种体内外肿瘤模型具有一定抗性,并可下调人乳头瘤状病毒(HPV)癌蛋白 E6、E7 的表达<sup>[15]</sup>。但目前,无花果及其乳浆抗黑色素瘤及抑制血管生成的研究较少。

基于此,本研究采用 MTT 法、划痕实验、Transwell 侵袭实验、凋亡分析和血管形成实验深入考察了无花果果实和乳浆中的不同极性供试品对人恶性黑色素瘤 A375 细胞的增殖、迁移、侵袭和血管生成抑制效果,并初步探讨其作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞系** 本研究所用人恶性黑色素瘤细胞 A375 (ATCC CRL-1619)和人脐静脉血管内皮细胞 HUVEC (ATCC CRL-1730),均购自武汉普诺赛生命科技有限公司。A375 细胞使用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基培养, HUVEC 细胞使用含 5%胎牛血清和 1%内皮生长因子的 ECM 培养基培养。

**1.2 药物及试剂** 新鲜采摘于广西玉林的无花果及无花果乳浆,由山东中医药大学中医药创新研究院崔清华副教授鉴定确认。胰蛋白酶(不含 EDTA)、DMEM 培养基、FBS、PBS,购自美国 Gibco 公司;Transwell 侵袭小室(批号:351157)、Matrigel 基质胶(批号:256234),购自美国康宁公司;ECM 培养基,购自美国 Sciencell 公司;Annexin V-FITC /PI 双染凋亡检测试剂盒(批号:556547),购自美国 BD 公司;超氧化物歧化酶(SOD,批号:ml063052)、乳酸脱氢酶(LDH,批号:ml024518)、一氧化氮(NO,批号:ml022390)ELISA 试剂盒,购自上海酶联生物科技有限公司;内皮生长因子(VEGF,批号:C18013036)、血管内皮素(ET-1,批号:C19013037)、一氧化氮合酶(eNOs,批号:C13013038)ELISA 试剂盒,购自武汉华美生物工程有限公司;无水乙醇、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、二甲亚砜均为分析纯,购自中国医药集团有限公司。

**1.3 仪器** N-1100 旋转蒸发器,东京理化器械株式会社;SCIENTZ-10N 冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司;safe-1200TE 生物安全柜、HF90 二氧化碳培养箱,上海力新仪器公司;Spectra Max M5 酶标仪,美国分子仪器公司;CKX41 倒置显微镜,日本奥林巴斯公司;CytoFLEX S 流式细胞仪,

美国贝克曼库尔特公司。

**1.4 供试品的制备** 取新鲜无花果，以 15 倍量水加热回流提取 2 次，每次 1 h，合并滤液，蒸发浓缩，冷冻干燥，得无花果提取物固体粉末，备用。取新鲜采集的无花果乳浆，搅拌加入乙醇至 60% 体系浓度，过夜沉淀。取上清液，搅拌加入乙醇至 95% 体系浓度，合并上清液，收集醇沉部位。取无醇上清

液进行溶剂系统萃取，经蒸发、浓缩、干燥，得石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、剩余水部位等不同极性萃取部位的固体产物。取醇沉部位加入热水，搅拌溶解，使用 Sevag 试剂去除蛋白，蒸发浓缩，冷冻干燥得纯化醇沉部位(经硫酸-苯酚法测定多糖含量约为 48.4%)，备用。流程见图 1。

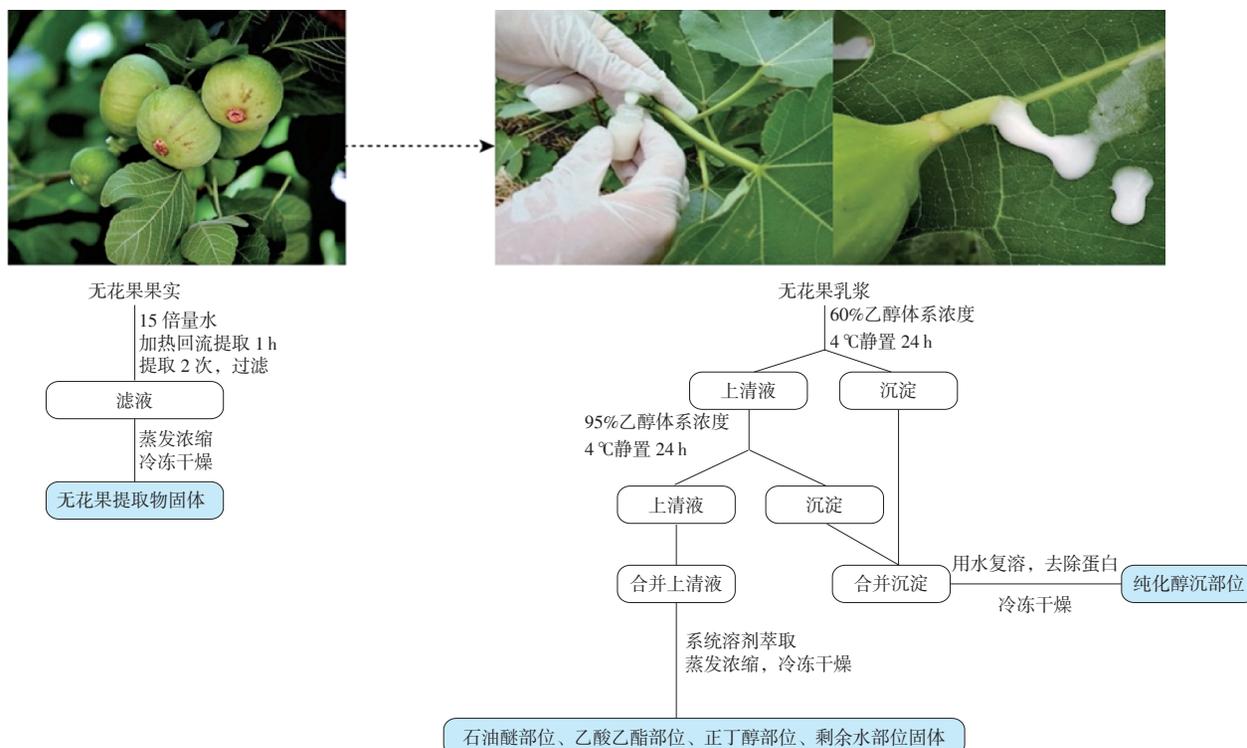


图 1 无花果果实及乳浆供试品的制备流程简图  
Figure 1 Preparation process diagram of the test samples

**1.5 MTT 法测定供试品对 A375 细胞和 HUVEC 细胞增殖的影响** 取 A375 细胞和 10 代以内的 HUVEC 细胞，胰酶消化，分别铺于不同 96 孔板内(每孔  $1 \times 10^5$  个细胞)，孵育过夜。在 A375 细胞、HUVEC 细胞 96 孔板内分别加入供试品含药培养基，再设置 A375 细胞的顺铂阳性对照组。供试品和顺铂的起始浓度均为  $3\ 000\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，2 倍比连续稀释 8 次，终浓度为  $23.44\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，每孔  $100\ \mu\text{L}$ ，每个浓度设 6 个复孔。另设置 A375 空白对照组(不加供试品，只有 A375 细胞)和 HUVEC 正常对照组(不加供试品，只有 HUVEC 细胞)作为对照组。孵育 48 h 后，每孔加入 MTT 溶液  $120\ \mu\text{L}$ ， $37\ ^\circ\text{C}$  孵育 4 h 后，加入 DMSO 溶液  $100\ \mu\text{L}$ ，放入酶标仪中于  $570\ \text{nm}$  处观察吸光度值(OD)。根据 OD 值计算出细胞存活率，通过 Graphpad prism 8 软件计算供试品的半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )。细胞存活率=实验组 OD 值/对照组 OD 值 $\times 100\%$ 。

**1.6 划痕实验考察供试品对 A375 细胞迁移的影响** 将 A375 细胞接种在 6 孔板中(每孔  $3 \times 10^5$  个)，待其生长融合至 90%，使用  $200\ \mu\text{L}$  枪头尖划痕，PBS 清洗，加入含供试品( $400$ 、 $200$ 、 $100\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )培养基，另设置空白对照组(不加供试品，只有 A375 细胞)，每个浓度设置 3 个复孔，孵育 48 h。在 0、24、48 h 用倒置显微镜在事先标记的固定位置拍照，以 0 h 划痕面积作为参照，使用 ImageJ 软件计算出每个时间点与 0 h 的愈合面积差，计算迁移率。迁移率=(0 h 划痕面积-t 时刻划痕面积)/0 h 划痕面积 $\times 100\%$ 。

**1.7 A375 细胞的 Transwell 侵袭实验** 用 24 孔、 $8\ \mu\text{m}$  孔径的 Transwell 板，分析评估供试品对 A375 细胞侵袭的影响。上室加入  $100\ \mu\text{L}$  Matrigel 基质胶， $37\ ^\circ\text{C}$  孵育 1 h。取对数生长期的 A375 细胞，胰酶消化，低血清培养基重悬，上室加入  $200\ \mu\text{L}$  细胞悬液

( $1 \times 10^5$  个), 下室分别加入 750  $\mu\text{L}$  供试品含药 (400、200、100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 培养基, 另设置空白对照组 (不加供试品, 只有 A375 细胞), 每个浓度设置 3 个复孔。将上室放入下室, 细胞培养箱孵育 48 h 后, 以 4% 甲醛、甲醇固定, 0.1% 结晶紫染色, 倒放在显微镜下拍摄侵袭细胞, 使用 ImageJ 软件计算侵袭率。侵袭率=结晶紫染色面积/小室面积 $\times 100\%$ 。

**1.8 Annexin V-FITC /PI 双染法检测 A375 细胞凋亡率** 取 A375 细胞, 胰酶消化, 接种在 6 孔板中 (每孔  $3 \times 10^5$  个), 每孔加入供试品含药 (400、200、100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 培养基, 另设置空白对照组 (不含供试品, 只含 A375 细胞), 每个浓度设置 3 个复孔。孵育 48 h 后, 使用不含 EDTA 的胰酶消化, PBS 重悬细胞, 按照说明书加入 Annexin V-FITC、PI 染液, 室温避光显色 15 min, 加入 Buffer, 1 h 内在流式细胞仪中检测。

**1.9 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测 A375 细胞 LDH、SOD、NO 含量** 取 A375 细胞, 胰酶消化, 6 孔板内接种细胞 (每孔  $3 \times 10^5$  个), 放入细胞培养箱中过夜, 加入供试品含药 (400、200、100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 培养基, 另设置空白对照组 (不含供试品, 只含 A375 细胞), 每个浓度设置 3 个复孔。由于醇沉部位在此浓度范围内具有较大的直接细胞毒性, 干扰对 A375 细胞因子的定量考察, 故只设置无花果提取物和乳浆乙酸乙酯部位给药组。在细胞培养箱中孵育 48 h 后, 取超滤后细胞上清液,  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  保存, 备用, 严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行测定。消化 6 孔板内细胞, 离心, PBS 重悬, 匀浆后离心取上层液, 超滤,  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  保存, 备用。

**1.10 A375 细胞-HUVEC 细胞共培养体系条件培养基 (Conditioned Medium, CM) 的制备** 取 A375 细胞和 HUVEC 细胞分别铺于不同 6 孔板中 (每孔  $3 \times 10^5$  个细胞), 两种细胞皆用 ECM 培养基培养。A375 细胞培养板分别加入含供试品 (400、200、100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的 ECM 培养基; 另设置空白对照组 (不加供试品, 只有 A375 细胞, ECM 培养基培养) 和正常对照组 (不加供试品, 只有 HUVEC 细胞, ECM 培养基培养) 作为对照组, 每个浓度设置 3 个复孔。在细胞培养箱 ( $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$ ) 中孵育 48 h 后, 收集所有组别培养液, 离心, 取上清, 过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜, 得含药及不含药 (空白对照组和正常对照组) 条件培养基溶液,  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  保存备用。

**1.11 共培养体系的 Transwell 侵袭实验** 用 24 孔、

8  $\mu\text{m}$  孔径的 Transwell 板, 分析评估 “1.10” 项下的条件培养基对 HUVEC 细胞侵袭的影响, 模拟肿瘤血管生成。上室加入 100  $\mu\text{L}$  Matrigel 基质胶,  $37\text{ }^\circ\text{C}$  孵育 1 h。取 10 代以内的 HUVEC 细胞, 胰酶消化, 低血清培养基重悬, 上室加入 200  $\mu\text{L}$  HUVEC 细胞悬液 ( $1 \times 10^5$  个), 下室加入 750  $\mu\text{L}$  含药 A375 细胞条件培养基 (供试品浓度分别为 400、200、100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 并设置正常对照组 (下室加入正常对照组条件培养基) 和空白对照组 (下室加入空白对照组条件培养基), 每个浓度设置 3 个复孔, 其余操作和计算方法同 “1.7” 项。

**1.12 共培养体系的血管形成实验** 将枪头和 96 孔板  $4\text{ }^\circ\text{C}$  预冷, 每孔加入 50  $\mu\text{L}$  Matrigel 基质胶,  $37\text{ }^\circ\text{C}$  孵育 1 h 后, 每孔接种  $4 \times 10^5$  个 HUVEC 细胞、100  $\mu\text{L}$  的 “1.10” 项下 A375 细胞含药条件培养基 (供试品浓度分别为 400、200、100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 另设置正常对照组 (加入正常对照组条件培养基) 和空白对照组 (加入空白对照组条件培养基), 每个浓度设置 3 个复孔, 在细胞培养箱 ( $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$ ) 中孵育 6 h 后, 用倒置显微镜观察成管情况。

**1.13 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测共培养体系 VEGF、ET-1 和 eNOs 的含量** 取 10 代以内的 HUVEC 细胞, 胰酶消化, 另取 6 孔板接种细胞 (每孔  $3 \times 10^5$  个), 放入细胞培养箱中过夜, 加入 “1.10” 项中制备的 A375 细胞条件培养基 (供试品浓度分别为 400、200、100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 另设置正常对照组 (加入正常对照组条件培养基) 和空白对照组 (加入空白对照组条件培养基) 作为对照组, 每个浓度设置 3 个复孔。消化 6 孔板内细胞, 离心, PBS 重悬, 匀浆后离心取上层液, 超滤,  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  保存, 备用, 严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行测定。

**1.14 统计学处理方法** 实验数据采用 Graphpad prism 8.0 进行处理, 每次结果至少包含 3 次样本, 计量资料结果均以均数 $\pm$ 标准 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间均数比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 两两比较用 LSD 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 无花果提取物及乳浆乙酸乙酯、醇沉部位抑制 A375 细胞的增殖** 实验发现, 在所有供试品中仅有无花果提取物及乳浆乙酸乙酯部位、醇沉部位和阳性对照药顺铂能够抑制 A375 细胞的增殖, 具有浓度依赖性。表 1 显示, 与阳性药顺铂组比较, 乳浆醇

沉部位对 A375 细胞的抑制效果最好, 在 750  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  及以上浓度时二者的差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),  $\text{IC}_{50}$  值约为 214.72  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 无花果提取物和乳浆乙酸乙酯部位对 A375 细胞也具有一定的抑制效果, 但效果不如阳性药顺铂, 二者比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )。

表 1 供试品及阳性药顺铂对 A375 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

Table 1 Effects of samples and positive drug (cisplatin) on viability of A375 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	A375 细胞存活率/%			
	无花果提取物	无花果乳浆乙酸乙酯部位	无花果乳浆醇沉部位	顺铂对照组
0	100.0 $\pm$ 7.6	100.0 $\pm$ 1.8	100.0 $\pm$ 8.0	101.1 $\pm$ 3.4
23.44	116.0 $\pm$ 7.3**	101.6 $\pm$ 2.1*	92.9 $\pm$ 5.0	77.2 $\pm$ 0.5
46.875	117.8 $\pm$ 6.2***	94.8 $\pm$ 4.3**	88.5 $\pm$ 2.3*	72.7 $\pm$ 7.7
93.75	119.9 $\pm$ 8.6***	94.2 $\pm$ 2.9***	79.9 $\pm$ 2.8***	32.4 $\pm$ 8.6
187.5	114.3 $\pm$ 7.0***	84.2 $\pm$ 6.4***	58.8 $\pm$ 7.3*	15.8 $\pm$ 10.6
375	93.3 $\pm$ 3.8***	84.7 $\pm$ 3.9***	22.7 $\pm$ 2.7*	16.4 $\pm$ 0.01
750	53.6 $\pm$ 3.1***	82.6 $\pm$ 7.6***	14.1 $\pm$ 4.6	15.6 $\pm$ 2.4
1 500	53.3 $\pm$ 7.0***	82.0 $\pm$ 13.4***	12.7 $\pm$ 6.2	17.4 $\pm$ 2.7
3 000			16.5 $\pm$ 2.0	21.9 $\pm$ 4.3
$\text{IC}_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	1902.0	-	214.72	56.27

注: 与顺铂对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

此外, 无花果提取物和乳浆乙酸乙酯部位对正常细胞 HUVEC 无明显细胞毒性, 乳浆醇沉部位对 HUVEC 细胞具有较大的细胞毒性 ( $\text{IC}_{50}$  值约为

55.89  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 见表 2。所以, 本研究采用 400、200、100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的无花果提取物及乳浆乙酸乙酯部位、醇沉部位作为供试品进行进行 A375 细胞后续实验; 仅采用 400、200、100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的无花果提取物、乳浆乙酸乙酯部位进行 HUVEC 细胞的后续实验。

表 2 供试品对 HUVEC 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

Table 2 Effect of samples on viability of HUVEC cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	HUVEC 细胞存活率/%		
	无花果提取物	无花果乳浆乙酸乙酯部位	无花果乳浆醇沉部位
0	100.0 $\pm$ 2.1	107.1 $\pm$ 6.4	100.0 $\pm$ 4.7
23.44	96.8 $\pm$ 2.8	129.8 $\pm$ 3.6	113.3 $\pm$ 2.8
46.875	100.3 $\pm$ 3.1	127.3 $\pm$ 0.2	80.2 $\pm$ 3.0
93.75	96.4 $\pm$ 6.4	126.5 $\pm$ 4.7	31.5 $\pm$ 29.6
187.5	97.7 $\pm$ 4.5	112.4 $\pm$ 14.4	20.7 $\pm$ 13.7
375	94.3 $\pm$ 5.5	122.6 $\pm$ 4.0	18.1 $\pm$ 5.7
750	89.6 $\pm$ 2.5	114.6 $\pm$ 6.4	17.6 $\pm$ 2.6
1 500	92.2 $\pm$ 2.7	110.8 $\pm$ 2.2	18.5 $\pm$ 1.9
3 000	95.4 $\pm$ 5.1	117.4 $\pm$ 2.2	19.1 $\pm$ 2.4
$\text{IC}_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	-	-	55.89

## 2.2 无花果提取物及乳浆乙酸乙酯、醇沉部位抑制 A375 细胞的迁移

显微镜观察结果见图 2; 采用 ImageJ 量化数据, 结果见图 3。与空白对照组比较, 在 24 h, 各浓度无花果提取物和乳浆醇沉部位 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ) 及 200、400  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  乳浆乙酸乙酯部位可明显抑制 A375 细胞的迁移 ( $P < 0.05$ ,  $P <$

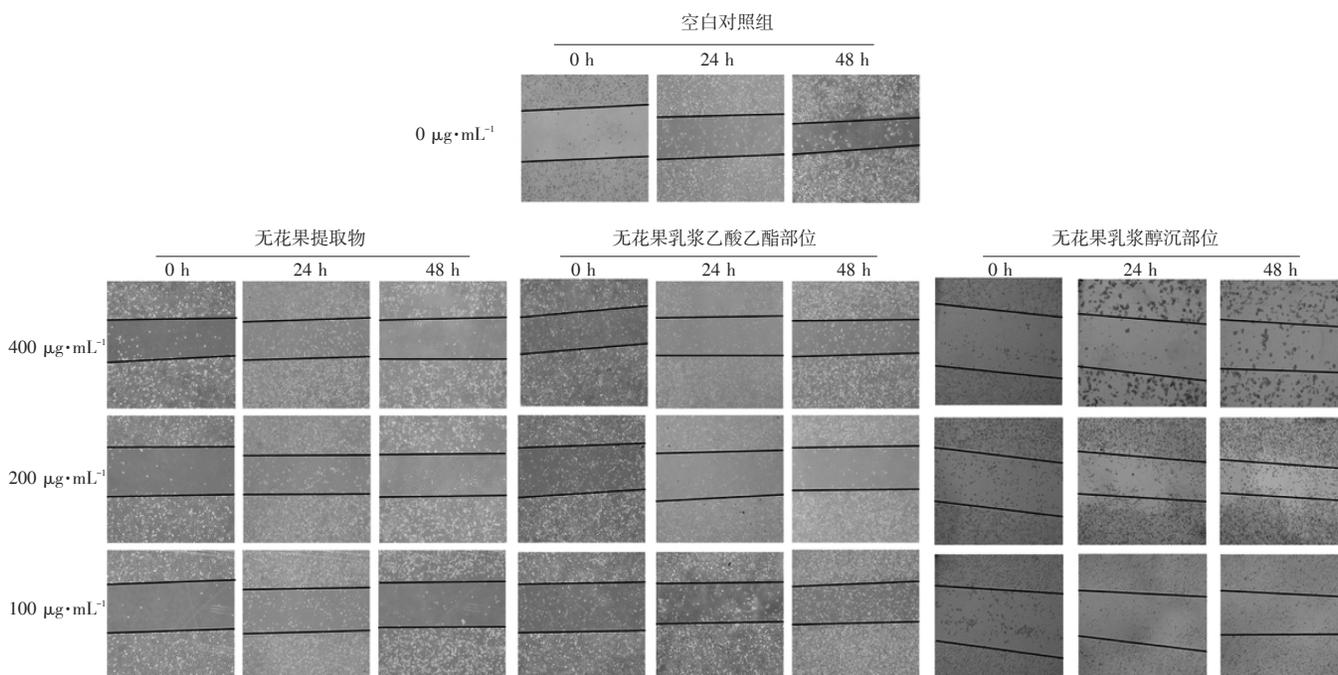
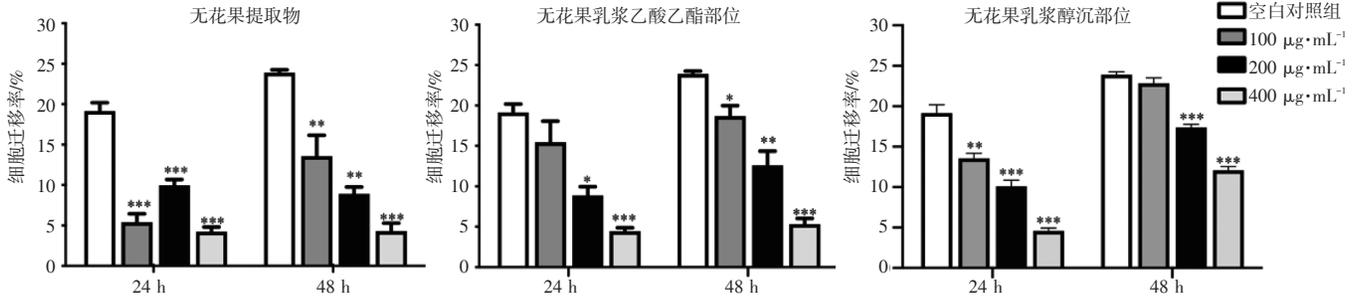


图 2 显微镜观察供试品对 A375 细胞的迁移抑制效果 ( $\times 40$ )

Figure 2 Micrographs of the migration inhibition effect of samples on A375 cells ( $\times 40$ )



注：与空白对照组比较，\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001

图3 供试品对 A375 细胞 48 h 迁移率的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Figure 3 Effect of samples on the migration rate of A375 cells at 48 h( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

0.001); 在 48 h 内, 各浓度无花果提取物、乳浆乙酸酯部位 (*P* < 0.05, *P* < 0.01, *P* < 0.001) 及 200、400 µg·mL<sup>-1</sup> 乳浆醇沉部位 (*P* < 0.001) 可明显抑制 A375 细胞的迁移。结合图 2、图 3 结果, 总体来说, 在此浓度范围, 无花果提取物的迁移抑制效果好于乳浆乙酸酯部位; 乳浆醇沉部位具有细胞毒性。

**2.3 无花果提取物及乳浆乙酸酯、醇沉部位抑制 A375 细胞的侵袭** 显微镜观察结果见图 4; 采用 ImageJ 软件进行量化, 结果见图 5。在不考虑共培养体系的条件下, 与只含有 A375 细胞的空白对照组比较, 各浓度无花果提取物及乳浆乙酸酯、醇沉部位均可明显抑制 A375 细胞的侵袭 (*P* < 0.01, *P* < 0.001), 且均呈浓度依赖性, 其中醇沉部位抑制效果较好。

**2.4 无花果提取物及乳浆乙酸酯、醇沉部位促进 A375 细胞凋亡** 经 Flowjo7.6 软件分析和量化结果见图 6、图 7。与只含有 A375 细胞的空白对照组比较, 200、400 µg·mL<sup>-1</sup> 乳浆乙酸酯部位和 400 µg·mL<sup>-1</sup> 醇沉部位均可以明显促进 A375 细胞的凋亡 (*P* < 0.001) 且以早期凋亡为主, 乳浆醇沉部位效果较好, 这可能与直接抑杀作用相关。此外, 无花果提取

物在 100 ~ 400 µg·mL<sup>-1</sup> 的浓度范围内均对凋亡无明显影响 (*P* > 0.05)。

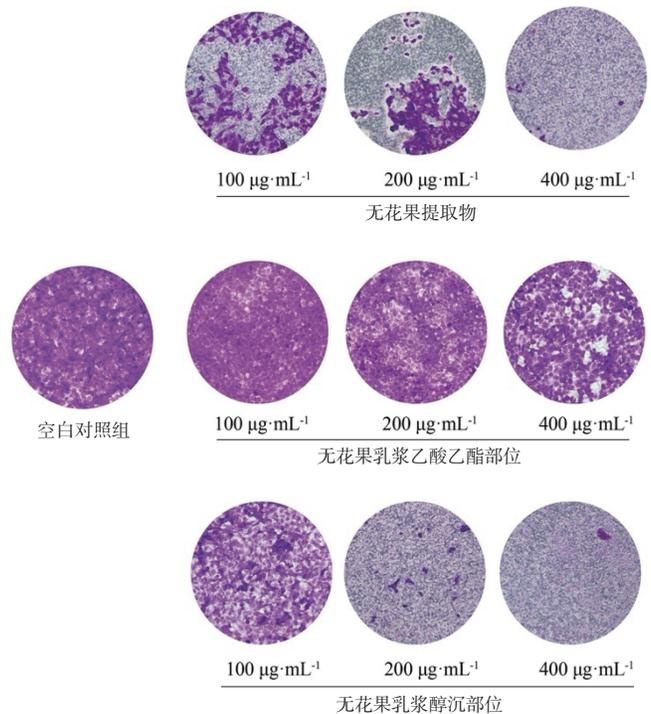
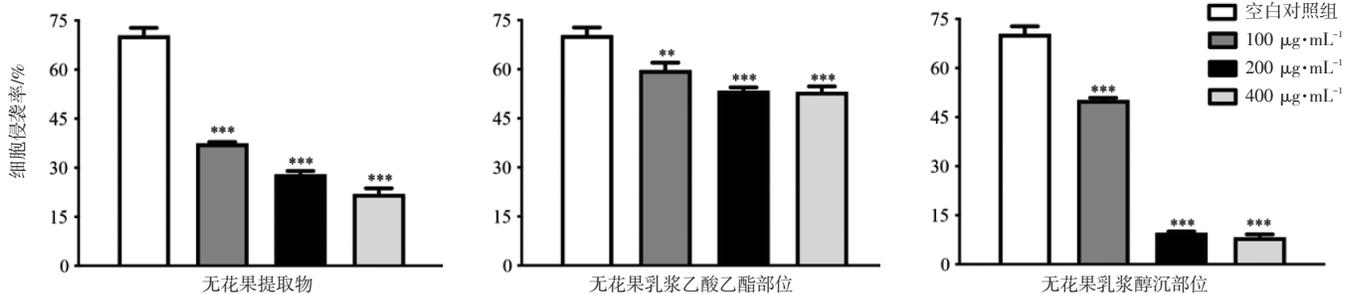


图4 显微镜观察供试品对 A375 细胞的侵袭抑制效果(×200)

Figure 4 Micrographs of the invasion inhibition effect of the samples on A375 cells(×200)



注：与空白对照组比较，\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001

图5 不同供试品的 A375 细胞的侵袭率( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Figure 5 Invasion rate of to A375 cells after treatment with different samples( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

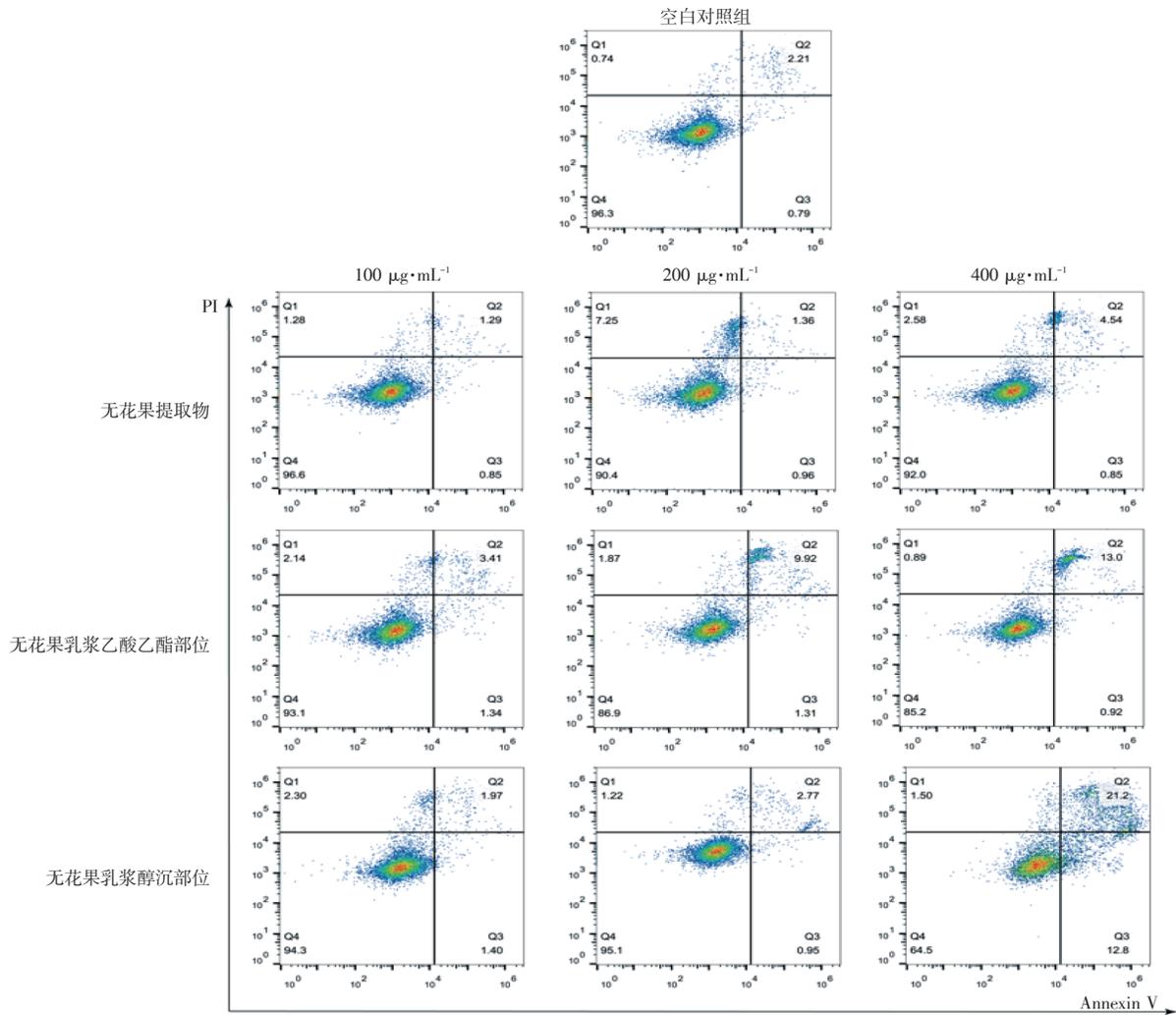
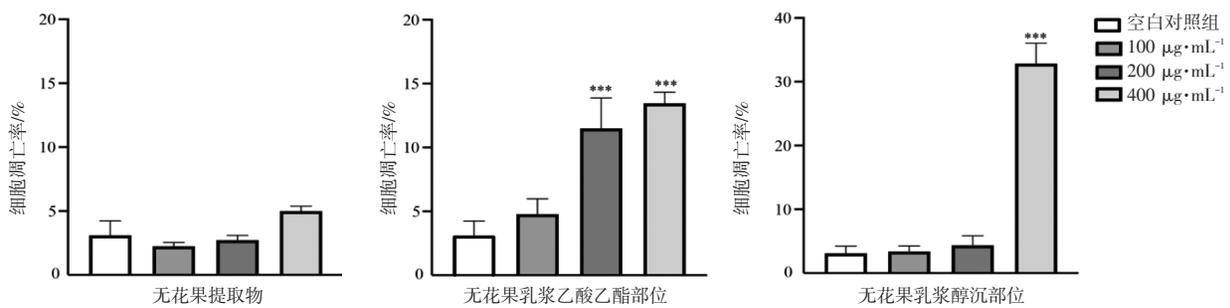


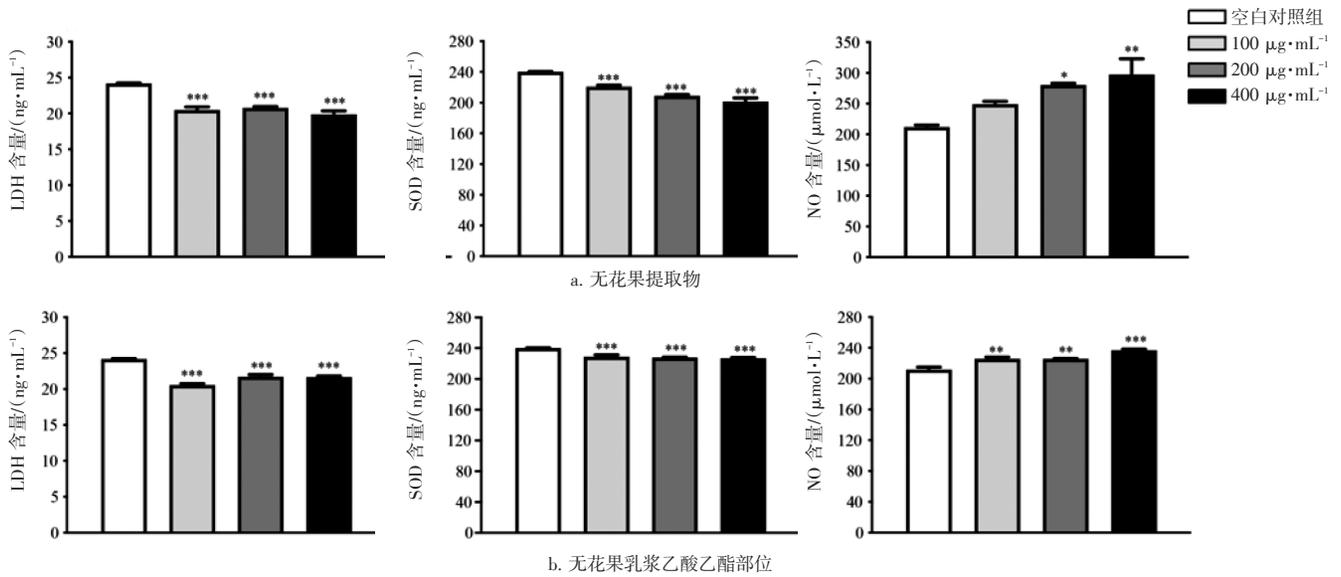
图 6 供试品对 A375 细胞凋亡的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
Figure 6 Effect of the samples on apoptosis of A375 cells( $\bar{x} \pm s, n=3$ )



注：与空白对照组比较，\*\*\* $P < 0.001$   
图 7 供试品对 A375 细胞的凋亡率的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
Figure 7 Effect of the samples on the apoptosis rate of A375 cells( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

**2.5 无花果提取物及乳浆乙酸乙酯部位对 A375 细胞 LDH、SOD、NO 因子含量的影响** 见图 8。乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)和一氧化氮(NO)是影响肿瘤自身能量代谢和增殖的重要因子。与只含有 A375 细胞的空白对照组比较, 无花果提取物可以明显降低 A375 细胞的 LDH 和 SOD 水平( $P <$

0.001), 但仅在 200、400  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  浓度下增加细胞 NO 含量( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 具有浓度依赖性。乳浆乙酸乙酯部位可以明显降低 A375 细胞的 LDH 和 SOD 水平( $P < 0.001$ ), 增加 NO 水平( $P < 0.01, P < 0.001$ )。  
**2.6 无花果提取物及乳浆乙酸乙酯部位抑制共培养体系 HUVEC 细胞的侵袭能力** 显微镜观察结果



注：与空白对照组比较，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ ，\*\*\* $P < 0.001$

图 8 A375 细胞内 LDH、SOD、NO 含量的变化( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Figure 8 Content changes of LDH, SOD and NO in A375 cells( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

见图 9, ImageJ 量化结果见图 10。通过“1.10”项下构建的共培养体系, 体外模拟肿瘤转移扩散和血管生成。正常对照组 HUVEC 细胞, 用“1.10”项下 HUVEC 细胞的正常对照组条件培养基培养; 空白对照组 HUVEC 细胞, 用“1.10”项下 A375 细胞的空白对照组条件培养基培养; 其余各组 HUVEC 细胞, 用“1.10”项下 A375 细胞的各含药条件培养基培养。与正常对照组比较, 空白对照组 HUVEC 细胞的侵袭能力明显提升( $P < 0.05$ ); 与空白对照组比较, 无花果提取物和乳浆乙酸乙酯部位各浓度均可抑制本组 HUVEC 细胞的侵袭能力( $P < 0.001$ ), 400  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  无花果提取物对 HUVEC 细胞的侵袭能力抑制较好。

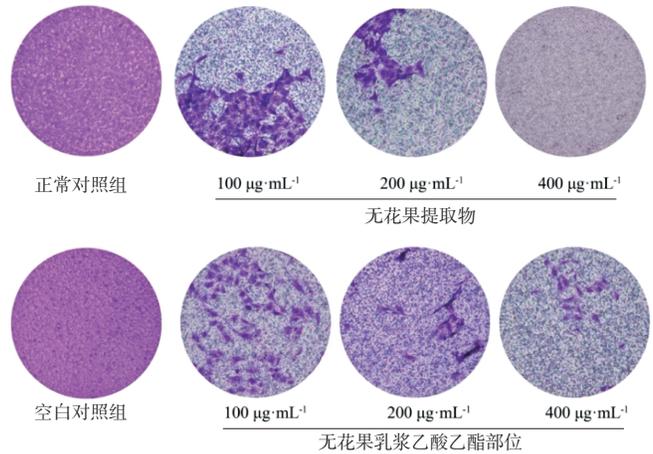
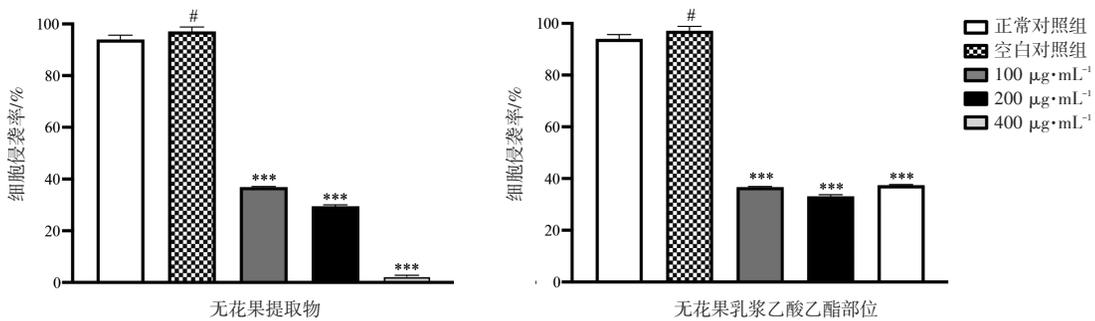


图 9 显微镜观察供试品抑制共培养体系 HUVEC 细胞的侵袭( $\times 200$ )

Figure 9 Micrographs of the invasion of the samples on HUVEC cells in co-culture system( $\times 200$ )



注：与正常对照组比较，\* $P < 0.05$ ；与空白对照组比较，\*\*\* $P < 0.001$

图 10 不同共培养体系 HUVEC 细胞的侵袭率( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Figure 10 Invasion rate of HUVEC cells in different co-culture systems( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

**2.7 无花果提取物及乳浆乙酸乙酯部位体外抑制肿瘤血管的形成能力** 如图 11 所示, 与正常对照组比较, 空白对照组 HUVEC 细胞经“1.10”项下 A375 细胞空白对照组条件培养基培养后明显提升了血管的形成能力, HUVEC 细胞呈现线性排列、延伸并形成管腔样结构, 形成连贯, 具有粗壮管状细胞集合体, 模拟了肿瘤血管的体内新生过程。各浓度无花果提取物和乳浆乙酸乙酯部位可以呈剂量依赖性地降低本组的血管形成的能力, 如血管受损, 变细不连续, 形成中断, 表观形状不规则等。基于“2.6”项侵袭和本结果, 下面将初步探究抑制血管形成能力的作用机制。

**2.8 无花果提取物及乳浆乙酸乙酯部位降低共培养体系中 VEGF、ET-1 和 eNOs 的含量** 见图 12。血管内皮生长因子(VEGF)和血管内皮素(ET-1)是肿瘤血管生成的关键调控和必需因子, 直接影响着血管内皮细胞的生长延伸, 内皮型一氧化氮合酶(eNOs)也是 VEGF 和 NO 分泌的重要调控因子。与正常对照组比较, 空白对照组 HUVEC 细胞经“1.10”项下 A375 细胞空白对照组条件培养基培养后, HUVEC 细胞中 VEGF、ET-1、eNOs 含量明显上升( $P < 0.001$ ), 说明肿瘤细胞具有高度转移和促血管生成的潜力。与空白对照组比较, 无花果提取物可明显下调 HUVEC 细胞中 ET-1 和 VEGF 的含量, 并在

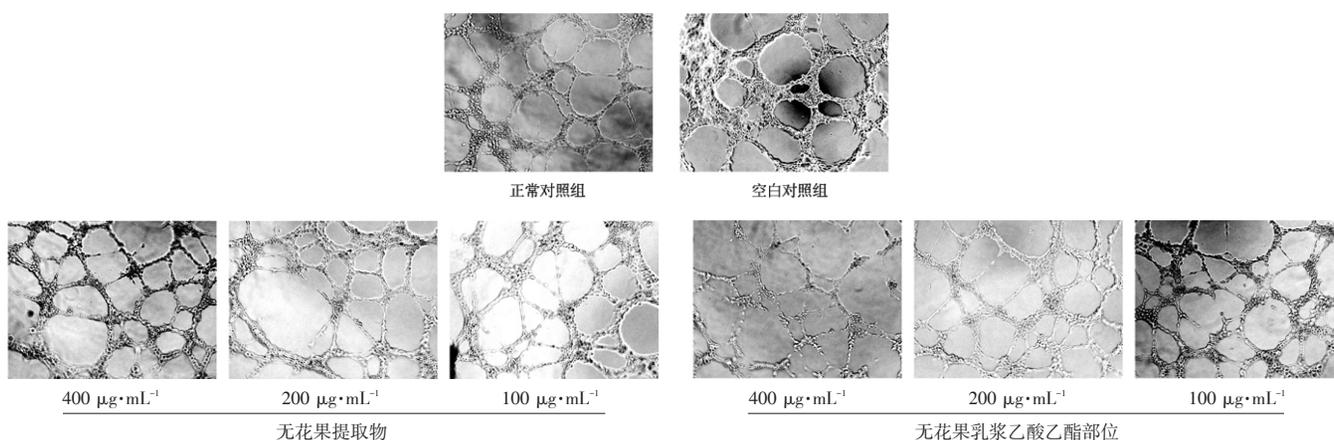
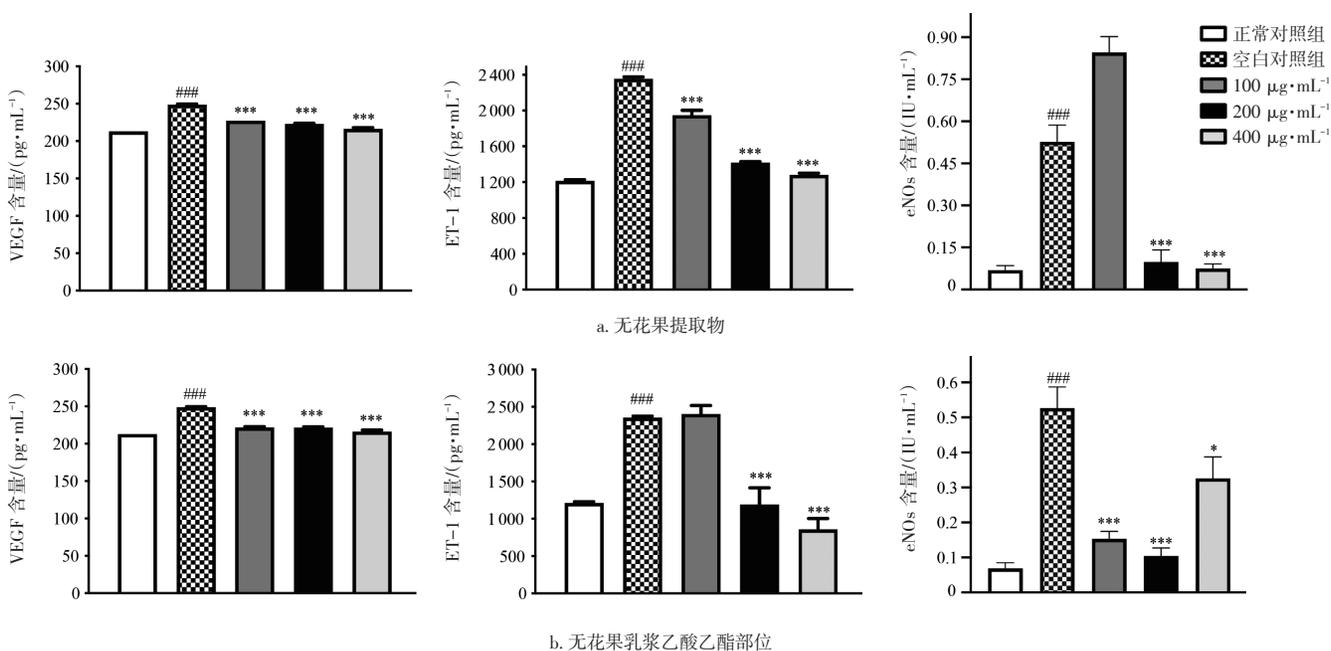


图 11 显微镜观察不同条件培养基(CM)对血管形成的影响(×100)

Figure 11 Micrographs of the influence of different culture medium(CM) on angiogenesis(×100)



注: 与正常对照组比较, ### $P < 0.001$ , 与空白对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$

图 12 不同条件培养基(CM)对 HUVEC 细胞因子的改变( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Figure 12 Changes in cytokines of HUVEC cells induced by different CM( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

200、400  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  浓度下降低 eNOs 水平 ( $P < 0.001$ ); 乳浆乙酸乙酯部位也可明显降低 VEGF 的分泌 ( $P < 0.001$ ); 200、400  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  乳浆乙酸乙酯部位对 ET-1 下调幅度最大 ( $P < 0.001$ ), 并在各浓度降低 eNOs 含量 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ )。总之, 无花果提取物和乳浆乙酸乙酯部位均可明显下调共培养体系中 HUVEC 细胞的 VEGF、ET-1 和 eNOs 因子的分泌。

### 3 讨论

无花果果实及乳浆在治疗皮肤病、抗肿瘤、免疫调节、抗菌等方面具有突出效果, 在民间具有广泛的应用<sup>[16]</sup>。本研究发现, 无花果乳浆的醇沉部位具有较大的细胞毒性, 其对 A375 细胞的增殖、迁移、侵袭及促凋亡可能是通过直接抑杀作用产生; 无花果提取物和乳浆乙酸乙酯部位可通过抑制 A375 细胞的迁移、侵袭, 降低肿瘤细胞的 LDH、SOD 水平, 增加 NO 水平来预防肿瘤的进一步发展。在肿瘤血管形成方面, 无花果提取物和乳浆乙酸乙酯部位均可抑制血管形成和侵袭, 可能是通过 eNOs/VEGF/ET-1 途径抑制肿瘤新生血管。这也表明, 无花果及无花果乳浆的不同部位可发挥协同作用对抗肿瘤的进展。

作用于肿瘤能量代谢环节是抗癌药物研发热点之一<sup>[17]</sup>。乳酸作为细胞糖酵解途径的重要产物, 参与肿瘤免疫微环境调控。LDH 是糖代谢途径的关键限速酶之一<sup>[18]</sup>。如同工酶 LDH5 由 LDHA 编码, 在许多肿瘤如非小细胞肺癌、结直肠癌等广泛过表达, 下调 LDHA 的表达可明显抑制肿瘤细胞生长, 并导致癌细胞增殖和凋亡<sup>[19-20]</sup>。LDHA 可能成为肿瘤治疗的预后因素和潜在靶点<sup>[21-22]</sup>。无花果乳浆主要酚类成分为原儿茶酸, 具有一定的抗氧化能力<sup>[13, 23]</sup>。SOD 能消除体内产生的氧自由基, 使细胞免受氧化损伤, 被认为是一种有价值的肿瘤学标志物<sup>[24]</sup>, 抑制 SOD 活性可能不利于肿瘤内环境, 有助于促进癌细胞的凋亡<sup>[25]</sup>。

抑制肿瘤血管生成是肿瘤治疗的重要方式, 肿瘤细胞分泌高水平的促血管生成因子, 有助于形成疏松、未成熟、高通透性的异常血管网络, 所造成的缺氧微环境促使肿瘤细胞迁移和侵袭<sup>[26]</sup>, 这也是 A375-HUVEC 细胞共培养体系构建的理论基础。VEGF 通过与内皮细胞结合并激活其受体(如 VEGFR2), 调控血管内皮细胞的萌发、迁移和增殖, 诱导血管生成, 增强微血管的通透性<sup>[27]</sup>。ET-1 对血管内皮细胞和血管周围细胞有直接的促血管生成作用, 还可以通过 HIF-1 增加 VEGF 的释放, 直接和间接的参

与肿瘤血管的新生<sup>[28]</sup>。多项研究和临床结果<sup>[29-32]</sup>表明, VEGF、ET-1 可以促使肿瘤血管的生成和肿瘤的转移。此外, VEGF 的分泌可以诱导 eNOs 的产生, 调节血管生成<sup>[33-34]</sup>。eNOs 来源的 NO 低表达和高表达都能通过减少 VEGF 与其受体的结合, 抑制内皮祖细胞参与的肿瘤新生血管的生成和肿瘤的生长<sup>[35]</sup>。eNOS 诱导产生的 NO 对肿瘤有双重作用, 目前 NO 在肿瘤发生、发展中作用机制复杂, 且仍存在争议<sup>[36]</sup>。总之, 无花果提取物和乳浆乙酸乙酯部位可能是通过 eNOs/VEGF/ET-1 途径抑制肿瘤血管生成的。

本研究中尚未对无花果提取物的不同极性萃取部位进行研究报告, 下一步将针对抗肿瘤活性和物质基础进行深入研究。目前针对无花果及其产物(如无花果叶、根和乳浆等)的药理、药效学研究较少, 本研究在民间验方基础之上, 通过药效和药理学的验证, 以期为无花果及其附属产品的深入开发提供理论支持和机制探究, 进一步支持其基础研究和在临床上的使用。

### 参考文献:

- [1] KOZOVSKA Z, GABRISOVA V, KUCEROVA L. Malignant melanoma: diagnosis, treatment and cancer stem cells[J]. *Neoplasma*, 2016, 63(4): 510-517.
- [2] GASTMAN B R, GERAMI P, KURLEY S J, et al. Identification of patients at risk of metastasis using a prognostic 31-gene expression profile in subpopulations of melanoma patients with favorable outcomes by standard criteria[J]. *J Am Acad Dermatol*, 2019, 80(1): 149-157.e144.
- [3] PARK J Y, PARK D H, JEON Y, et al. Eupatilin inhibits angiogenesis-mediated human hepatocellular metastasis by reducing MMP-2 and VEGF signaling[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2018, 28(19): 3150-3154.
- [4] SHAPIRO C L. Highlights of recent findings on quality-of-life management for patients with cancer and their survivors[J]. *JAMA Oncol*, 2016, 2(11): 1401-1402.
- [5] 陈如兵, 丁宝月, 吴兆勇, 等. 抗恶性黑色素瘤的分子靶向治疗药物[J]. *中国当代医药*, 2016, 23(32): 11-13, 86.
- [6] J D R, ANDRE V D W, A B N. Metastatic melanoma treatment: combining old and new therapies[J]. *Critical reviews in oncology/hematology*, 2016, 98: 242-253.
- [7] 徐新春, 吴明光. 无花果本草考证[J]. *中国中药杂志*, 2001, (6): 32-33.
- [8] 秦东霞. 无花果汁治疗寻常疣10例[J]. *中国民族民间医药*, 2011, 20(23): 150.
- [9] 卢爱玉. 无花果枝汁外涂可治疗刺瘡[J]. *安徽中医临床杂志*, 2003, (4): 310.

- [10] HEMMATZADEH F, FATEMI A, AMINI F. Therapeutic effects of fig tree latex on bovine papillomatosis[J]. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 2003, 50(10): 473-476.
- [11] SOLTANA H, PINON A, LIMAMI Y, et al. Antitumoral activity of *Ficus carica* L. on colorectal cancer cell lines[J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2019, 65(6): 6-11.
- [12] JEIVAD F, YASSA N, OSTAD S N, et al. *Ficus Carica* L. Latex: possible chemo-preventive, apoptotic activity and safety assessment [J]. *Iran J Pharm Res*, 2020, 19(3): 231-240.
- [13] TEZCAN G, TUNCA B, BEKAR A, et al. *Ficus carica* latex prevents invasion through induction of let-7d expression in GBM cell lines[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2015, 35(2): 175-187.
- [14] GHANDEHARI F, FATEMI M. The effect of *Ficus carica* latex on 7, 12-dimethylbenz(a) anthracene-induced breast cancer in rats [J]. *Avicenna J Phytomed*, 2018, 8(4): 286-295.
- [15] GHANBARI A, LE GRESLEY A, NAUGHTON D, et al. Biological activities of *Ficus carica* latex for potential therapeutics in Human Papillomavirus (HPV) related cervical cancers[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 1013.
- [16] 柴金珍, 黄远英, 袁根良, 等. 无花果的药理作用研究进展[J]. *中成药*, 2016, 38(8): 1805-1810.
- [17] KEATING E, MARTEL F. Antimetabolic effects of polyphenols in breast cancer cells: focus on glucose uptake and metabolism[J]. *Front Nutr*, 2018, 5: 25.
- [18] LIBERTI M V, LOCASALE J W. The warburg effect: how does it benefit cancer cells?[J]. *Trends Biochem Sci*, 2016, 41(3): 211-218.
- [19] BRAND A, SINGER K, KOEHL G E, et al. LDHA-associated lactic acid production blunts tumor immunosurveillance by T and NK cells[J]. *Cell Metab*, 2016, 24(5): 657-671.
- [20] ZHAO J, HUANG X, XU Z, et al. LDHA promotes tumor metastasis by facilitating epithelial mesenchymal transition in renal cell carcinoma[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 8335-8344.
- [21] 娜仁, 贾永峰. 转运蛋白和乳酸脱氢酶在乳腺癌糖酵解中的作用 [J]. *疾病监测与控制*, 2020, 14(5): 410-414.
- [22] 周文丽, 缪明永. 乳酸脱氢酶与肿瘤免疫代谢研究进展[J]. *肿瘤代谢与营养电子杂志*, 2020, 7(4): 396-401.
- [23] SOLOMON A, GOLUBOWICZ S, YABLOWICZ Z, et al. Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (*Ficus carica* L.) [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(20): 7717-7723.
- [24] ROBBINS D, ZHAO Y. Manganese superoxide dismutase in cancer prevention[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(10): 1628-1645.
- [25] SUN P, ZHAO J M, LUO Z C, et al. Diluted povidone-iodine inhibits tumor growth through apoptosis-induction and suppression of SOD activity[J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(2): 383-388.
- [26] VIALARD C, LARRIVÉE B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets[J]. *Angiogenesis*, 2017, 20(4): 409-426.
- [27] HIDA K, MAISHI N, TORII C, et al. Tumor angiogenesis--characteristics of tumor endothelial cells[J]. *Int J Clin Oncol*, 2016, 21(2): 206-212.
- [28] KNOWLES J, LOIZIDOU M, TAYLOR I. Endothelin-1 and angiogenesis in cancer[J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2005, 3(4): 309-314.
- [29] CHOI S B, HAN H J, KIM W B, et al. VEGF overexpression predicts poor survival in hepatocellular carcinoma[J]. *Open Med (Wars)*, 2017, 12: 430-439.
- [30] MAO C S, YIN H, NING H B, et al. Levels of HBx, VEGF, and CEACAM1 in HBV-related hepatocellular carcinoma and their correlation with cancer prognosis[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(17): 3827-3833.
- [31] XIAO H, TONG R, DING C, et al.  $\gamma$ -H2AX promotes hepatocellular carcinoma angiogenesis via EGFR/HIF-1 $\alpha$ /VEGF pathways under hypoxic condition[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(4): 2180-2192.
- [32] MENG L, JI R, DONG X, et al. Antitumor activity of ginsenoside Rg3 in melanoma through downregulation of the ERK and Akt pathways[J]. *Int J Oncol*, 2019, 54(6): 2069-2079.
- [33] VILLAUME K, BLANC M, GOUYSSE G, et al. VEGF secretion by neuroendocrine tumor cells is inhibited by octreotide and by inhibitors of the PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. *Neuroendocrinology*, 2010, 91(3): 268-278.
- [34] DUDA D G, FUKUMURA D, JAIN R K. Role of eNOS in neovascularization: NO for endothelial progenitor cells[J]. *Trends Mol Med*, 2004, 10(4): 143-145.
- [35] 梅开, 蔡晓虹, 杜磊, 等. 内皮型一氧化氮合酶来源的NO调节肿瘤血管的生成[J]. *癌症*, 2010, 29(1): 32-37.
- [36] 高泽慧, 高伟, 皇甫辉. 诱导型一氧化氮合酶、一氧化氮与肿瘤的关系[J]. *肿瘤研究与临床*, 2019, 34(10): 714-717.

(编辑: 修春)