

doi: 10.3969/j.issn1008-0392.2010.06.005

· 基础研究 ·

甘草黄酮体内抗胃癌作用的实验研究

张丽¹, 葛艳丽², 林永辉², 王志荣², 吴琼², 张俊杰²

(1. 同济大学附属同济医院分院内科, 上海 200092; 2. 同济大学附属同济医院消化内科, 上海 200065)

【摘要】目的 探讨甘草黄酮体内抗胃癌的作用, 为其在胃癌治疗中的新应用提供理论依据。**方法** 构建 BGC-823 裸鼠皮下移植瘤模型, 观察不同剂量的甘草黄酮对移植瘤生长的抑制作用, 并在实验结束后用免疫组化法检测各组瘤组织中增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 和肿瘤微血管密度 (microvessel density, MVD) 的表达情况。**结果** 甘草黄酮高剂量组具有抑制裸鼠胃癌移植瘤的生长的作用, 并能下调胃癌组织中 PCNA 的表达。**结论** 甘草黄酮体内具有一定的抗胃癌效果, 与其能抑制肿瘤细胞 PCNA 的表达有关。

【关键词】 甘草黄酮; 胃肿瘤; 治疗; 实验研究

【中图分类号】 R 73-36 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1008-0392(2010)06-0019-04

Experimental study of the effect of Glycyrrhiza flavonoids on gastric cancer *in vivo*

ZHANG Li¹, GE Yan-li², LIN Yong-hui², WANG Zhi-rong², WU Qiong², ZHANG Jun-jie²

(1. Dept. of Medical, Branch Hospital of Tongji Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200092, China; 2. Dept. of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200065, China)

【Abstract】Objective To study the effect of Glycyrrhiza flavonoids (GF) on gastric cancer *in vivo*, and to provide the theoretical evidence for clinical application. **Methods** The subcutaneous transplantable tumor models of human gastric cancer in nude mice were established and the anti-gastric cancer effect of GF with different doses were observed during the experiment. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and microvessel density (MVD) were detected by immunohistochemistry at the end of the experiment. **Results** High dose group of GF had effect of anti-gastric cancer and could reduce the expression of PCNA of tumor cells. **Conclusion** GF has effect of anti-gastric cancer *in vivo*, the mechanism may be related with its ability of reducing expression of PCNA of tumor cells.

【Key words】 Glycyrrhiza flavonoids; gastric cancer; treatment; experimental study

甘草黄酮 (Glycyrrhiza flavonoids, GF) 具有黄酮类物质主要结构, 是豆科多年生草本植物甘草、胀果甘草的根及根茎的主要有效成分, 目前已知其具有消炎、抗菌、降血脂、抗溃疡、解痉镇痛及抗氧化、

收稿日期: 2010-06-28

作者简介: 张丽 (1982-), 女, 住院医师, 硕士. E-mail: lizhang1031@163.com

抗自由基等多种生物活性^[1-5]。近年来的研究表明,甘草黄酮对多种癌细胞的生长有抑制作用,如肝癌^[6],前列腺癌^[7]等,也有研究表明其体外有抑制胃癌细胞生长的作用,但体内研究较少。为进一步临床应用提供理论依据,本研究进行了体内抑制胃癌细胞生长作用的实验研究。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

Balb/C 裸小鼠 25 只,4~6 周龄,雄性,体质量 18~22 g,购自第二军医大学动物实验中心[合格证号:SCXK(沪)2007-0003],饲养于同济大学附属同济医院 SPF (specific pathogen free condition) 级动物实验室;BGC-823 细胞株(中国科学院上海细胞研究所);RPMI-1640 培养液(Gibco BRL, USA);新生牛血清(杭州四季青生物工程公司);胰蛋白酶(Sigma, USA);5-氟尿嘧啶(5-fluorine urine metadiazine, 5-FU, 上海旭东药业有限公司);甘草黄酮(上海康九化工有限公司);兔抗小鼠 CD34, PCNA 多克隆一抗, SABC 免疫组化试剂盒, DAB 及苏木素染液,均购自武汉博士德生物技术有限公司;免疫组化图像分析仪器:MIQAS 医学图像定量分析系统及分析软件, JVC TK-C1481BEC 彩色摄像机, Olympus BH2 生物显微镜, Nikon 4500 数码相机;其他:恒温培养箱,超净工作台,游标卡尺,光学显微镜,电子天平,无菌解剖器械等。

1.2 实验方法

1.2.1 体外细胞的培养. 人胃癌细胞株 BGC823 用含 10% 新生牛血清的 RPMI-1640 培养液在 37℃、含 5% CO₂ 的饱和湿度的培养箱内培养,0.25% 胰蛋白酶消化传代。

1.2.2 人胃癌裸鼠动物模型的建立 将预先培养的对数生长期的 BGC-823 细胞消化后,悬浮于 PBS 中,制备成浓度为 1.0×10^7 /ml 的单细胞悬液,在裸鼠左腋窝皮下注射此悬液 0.2 ml,大约 6~7 d 后,待肿瘤体积达到 100~300 mm³ 时,进行下一步实验。

1.2.3 实验分组及给药 将造模成功、腋下长出瘤块的 25 只裸鼠编号后,按随机数字表法分为如下 5 组并给药,每组 5 只,分别为阴性对照组(normal saline 组, NS 组),阳性对照组(5-FU 组),GF 低剂量组(15.0 mg/kg),GF 中剂量组(30.0 mg/kg)和

GF 高剂量组(60.0 mg/kg)。阴性对照组给予 0.2 ml NS 腹腔注射。全部裸鼠均在分组当天开始给药,此后每天给药一次。

1.2.4 观察指标及方法

(1) 裸鼠一般状况观察,给药后每日观察肿瘤的生长状况,观察裸鼠的反应,食欲,活动度,精神状态等。

(2) 肿瘤生长体积、肿瘤生长曲线和相对肿瘤增殖率 T/C (%)。给药后,每隔一日测量肿瘤体积,根据所测肿瘤体积,绘制肿瘤生长曲线图。肿瘤体积(tumor volume, TV)的计算公式为: $V = 1/2 \times a \times b^2$,其中 a、b 表示长和宽。根据测量结果计算出相对肿瘤体积(relative tumor volume, RTV), $RTV = V_t / V_0$ 。其中 V₀ 为分组给药时(即 d₀)测量所得肿瘤体积, V_t 为每一次测量时的肿瘤体积。抗肿瘤活性评价指标为相对肿瘤增殖率 T/C (%), $T/C (%) = TRTV / CRTV \times 100\%$ TRTV: 治疗组 RTV; CRTV: 阴性对照组 RTV。

(3) MVD 的检测,实验结束后剥离肿瘤组织,并将完整剥离的瘤体用 10% 福尔马林固定,石蜡包埋、切片、免疫组化染色,一抗为兔抗小鼠 CD34 多克隆抗体。具体步骤为:①将组织切片经二甲苯脱蜡,酒精梯度水化;PBS 冲洗 5 min × 3;②3% H₂O₂ 室温孵育 30 min,消除内源性过氧化物酶的影响;PBS 冲洗 5 min × 3;③应用 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)进行抗原修复;④10% 正常山羊血清封闭,37℃孵育 30 min;⑤滴加兔抗小鼠多克隆 CD34 抗体,4℃过夜,PBS 冲洗 5 min,连续 3 次;⑥滴加 1:100 稀释的生物素化二抗,37℃孵育 30 min;PBS 冲洗 5 min,连续 3 次;⑦滴加 1:200 稀释的过氧化物酶标记的链酶亲和素,37℃孵育 30 min;PBS 冲洗 5 min,连续 3 次;⑧DAB 显色 10 min;⑨苏木素复染,酒精梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

MVD 读片标准:先在低倍镜下(×100)全面观察切片以确定肿瘤内血管密度最高处,再在高倍镜下(×250),以与周围肿瘤细胞和结缔组织成分明显区别的任何一个棕黄色染色的内皮细胞或细胞丛作为一个血管,只要结构不相连,其分支结构也作为一个血管计数。计数 5 个视野内的微血管数,取其平均数作为该标本的 MVD 值。

(4) 肿瘤组织 PCNA 的测定。将完整剥离的瘤体用 10% 福尔马林固定,石蜡包埋、切片、行免疫组

化染色,一抗为兔抗小鼠 PCNA 多克隆抗体,免疫组化步骤同 MVD 的测定。

图像分析步骤:(1)图像采集:通过显微镜,图像采集卡,数码相机或 CCD 摄像机采集数字图像,数字图像为标准的 BMP(位图)文件格式;(2)选取物镜倍数:低倍 $\times 10$,高倍 $\times 25$,目镜 $\times 10$;(3)消除背景:利用消除背景命令把免疫组化中的紫蓝色背景从图像上去除;(4)选阳性区域:操作时用鼠标器选择棕黄色或棕褐色阳性区域,处理后有效阳性区域用红色表示;(5)测量:测量方式选用全场测量。测量结果以阳性指数(positive index, PI)表示,阳性指数=阳性区域面积 \times 光密度值。每张切片分析3个视野,每组数据至少18个。

1.3 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 统计学软件进行分析,多样本均数比较采用方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般状况观察

接种肿瘤悬液3~4 d后,裸鼠腋下即可触及绿豆大小的瘤块,6~7 d左右便可见到黄豆大小的肿瘤结节。第9 d开始给药,给药过程中观察到 NS 组、甘草黄酮低剂量和中剂量组肿瘤生长始终较快,高剂量组和 5-FU 组生长较慢。但是随着给药时间的延长,5-FU 组裸鼠饮食逐渐下降,活动逐渐迟缓,精神状态欠佳且消瘦严重,皮肤无光泽,常拥挤在一起,给药3 d后部分裸鼠开始出现腹泻。NS 组和甘草黄酮各组明显比 5-FU 组活泼,体重减轻不明显,皮肤有光泽。用药第9 d将各组裸鼠引颈处死,解剖全部裸鼠,可见肿瘤生长于裸鼠腋窝皮下,呈灰白色结节,无明显远处浸润现象。切面灰白色,部分肿瘤中央坏死,有黄色液体流出,未见明显出血。

2.2 各组肿瘤体积变化及相对肿瘤增殖率 T/C(%) 的比较

5-FU 组的肿瘤体积明显低于 NS 组,其 T/C(%) $< 60\%$ 且与 NS 组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。GF 高剂量组肿瘤体积也比 NS 组小,两组相比有统计学意义,但与 5-FU 组相比,也具有统计学差异($P < 0.05$),说明其效果尚不如 5-FU 明显。

甘草黄酮低,中剂量组肿瘤体积与 NS 组相比,差异无统计学意义,(表1)。

表1 各组肿瘤体积变化及相对肿瘤增殖率
Tab.1 Comparison of tumor volume and T/C in different groups

组别	肿瘤体积/mm ³	相对肿瘤体积	相对肿瘤增殖率
阴性对照组	1 517.95 \pm 312.38	8.19 \pm 3.17	—
阳性对照组	729.80 \pm 299.95 *	4.37 \pm 1.30	53.36% *
GF 低剂量组	1 454.02 \pm 379.44	9.23 \pm 2.77	100.13%
GF 中剂量组	1 306.09 \pm 173.88	8.20 \pm 3.68	100.00%
GF 高剂量组	1 087.51 \pm 538.81 *	6.79 \pm 2.34	82.90% *

注:与对照组比较,* $P < 0.05$

2.3 肿瘤生长曲线图

以肿瘤体积测量次数为横坐标,以肿瘤体积为纵坐标,做一肿瘤生长曲线图,见图1。从曲线图可以看出,5-FU 组抑瘤效果最佳,其次为甘草黄酮高剂量组,而甘草黄酮低剂量组和中剂量组抑瘤效果不佳,说明其抑瘤效果可能有一定量浓度依赖的特点。

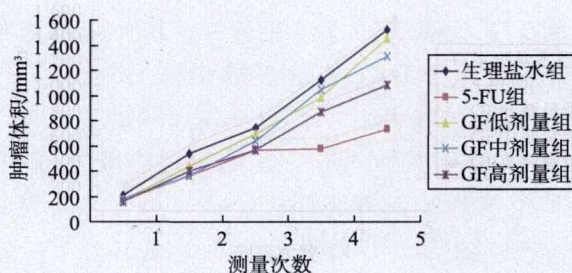


图1 肿瘤生长曲线图
Fig.1 Growth curve of tumor

2.4 MVD及PCNA 测量结果

实验结果显示:PCNA 阳性表达的棕黄色或棕褐色颗粒位于细胞核,5-FU 组、GF 中剂量组、GF 高剂量组各组的阳性指数与 NS 组相比具有统计学差异, $P < 0.05$,说明 5-FU 组和 GF 中高剂量组均可下调 PCNA 的表达。但是 GF 中高剂量组与 5-FU 组相比也有统计学差异,说明 GF 下调 PCNA 表达的能力不如 5-FU。经 CD34 染色后的胃癌组织中微血管呈棕黄色,切片背景清晰无色,胃癌组织中所有毛细血管、小动脉与小静脉内皮细胞均被相关抗原染色,可见肿瘤微血管形态不规整,分布呈异质性,在肿瘤边缘区呈簇状分布,部分呈出芽状和花蕾状。

MVD 各组间比较亦无统计学差异,说明 5-FU 和 GF 对肿瘤微血管的生成无影响,见表 2。

表 2 各组 MVD,PCNA 的表达情况

Tab. 2 Expressions of MVD and PCNA of different groups

组 别	肿瘤微血管密度	增殖细胞核抗原
阴性对照组	3.93 ± 1.79	358 071.8 ± 86 599.87 [△]
阳性对照组	4.47 ± 2.97	135 259.13 ± 68 146.11 [*]
GF 低剂量组	4.13 ± 2.77	300 909.87 ± 35 370.25 [△]
GF 中剂量组	5.13 ± 1.77	233 855.20 ± 41 918.68 ^{*△}
GF 高剂量组	4.47 ± 2.03	197 964.00 ± 97 284.35 ^{*△}

注:与生理盐水组比较,* $P < 0.05$;与 5-FU 组比较,[△] $P < 0.05$

3 讨 论

本实验采用人胃癌细胞 BGC-823 细胞株建立荷瘤裸小鼠模型,研究了 GF 的体内抑瘤作用。首先,从本研究结果中,可看出 GF 具有良好的安全性。在用药过程中,GF 对裸鼠体重及精神状态均无不良影响,而 5-FU 组则产生了严重的副反应,表现为裸鼠消瘦,精神状态欠佳,饮食减少及腹泻等胃肠道副反应,说明 GF 的安全性较好。其次,从各组肿瘤体积变化及 T/C(%) 的比较来看,GF 高剂量组肿瘤体积比 NS 组小,两组的 T/C(%) 相比有统计学意义,说明其体内有一定的抗胃癌效果,但与 5-FU 组相比,也具有统计学差异($P < 0.05$),说明 GF 高剂量组的治疗效果与 5-FU 组比还是有一定差距的。原因可能有如下几点:(1) 剂量足,若再增加剂量或许能达到治疗效果。(2) 有报道 GF 可增加荷瘤(S180)小鼠免疫细胞的数量,且 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比值明显高于生理盐水对照组,从而达到抗肿瘤作用^[8]。本研究所用模型为裸鼠,为 T 淋巴细胞免疫缺陷小鼠,故 GF 不能通过增加 T 淋巴细胞的数量而发挥作用,这可能是影响其抗肿瘤效果的原因之一。(3) 根据文献,用药方式既有腹腔注射,又有灌胃,但 4 周的裸鼠体积较小,灌胃存在一定困难,且为了与 5-FU 用药方式一致,本研究选取腹腔注射的方式,用药方式的差异也可能是导致效果不甚理想的原因。(4) 样本量不足。

研究资料显示,各种中医药作为一种辅助性治疗手段,能够有效抑制肿瘤的进展,改善患者生存质量,其治疗胃癌的作用机制包括如下几个方面:

(1) 抑制胃癌细胞的增殖及 DNA 的合成;(2) 诱导胃癌细胞凋亡;(3) 调节机体免疫功能;(4) 抑制胃癌血管生成;(5) 抑制端粒酶活性等。目前,关于甘草黄酮类化合物抗肿瘤的研究大部分只是体外研究,体内研究的甚少,且其抗胃癌的研究报道较少,其他植物黄酮类抗肿瘤作用的体内研究也较少。有报道沙苑子黄酮可明显下调 SMMC7721 裸鼠移植瘤中 PCNA 的表达,并诱导肿瘤细胞凋亡^[9];表没食子酸酯是来源于绿茶的黄酮类化合物,具有抑制裸鼠胃癌移植瘤生长的作用,可通过抑制血管内皮生长因子的表达起到影响肿瘤微血管生成的作用^[10]。黄酮类化合物是广泛存在于自然界的一类多酚化合物,具有黄酮类物质的主要结构,故而推测甘草黄酮抗肿瘤作用的机制可能与沙苑子黄酮及表没食子酸酯有相同之处。为了进一步探讨 GF 的体内抑瘤机制,选取了 PCNA 和 MVD 两个指标,观察其是否通过抑制肿瘤生长及影响肿瘤微血管的生成达到抑瘤的效果。

PCNA 是一种细胞增殖周期蛋白,可作为一项评估细胞增殖状态的指标,用于判断肿瘤恶性程度及预后。本实验免疫组化显示 PCNA 的阳性指数在 GF 高剂量组、中剂量组及低剂量组是逐渐下降的,且与 NS 组相比有统计学差异($P < 0.05$),说明 GF 体内抗胃癌的作用是通过下调 PCNA 的表达实现的。然而 GF 各个剂量组 PI 与 5-FU 相比亦有统计学差异,说明 GF 抗胃癌的效果不如 5-FU 明显,这也与前述肿瘤体积及 T/C(%) 的结果一致。

肿瘤的生长和转移不仅依赖于肿瘤细胞的增殖,而且与肿瘤内新生血管的形成有密切的关系。越来越多的研究证实,人类各种肿瘤组织的 MVD 均与肿瘤病变的进展程度密切相关,因而 MVD 常用来作为肿瘤血管生成的评估标准。应用免疫组化技术采用特异性抗体标记肿瘤组织中的血管内皮细胞,计数单位面积中的微血管数目,即 MVD 的测定。本研究并未发现各组 MVD 有统计学差异,推测目前剂量的 GF 对肿瘤血管生成无影响。

综上所述,60.0 mg/kg 的 GF 对裸鼠胃癌移植瘤具有一定的抗肿瘤效果,且由于其具有良好的安全性,可开发为一种有前景的辅助治疗药物。

(下转第 27 页)

- [J]. Growth Factors, 2009,27(6): 377-383.
- [5] Yang B, Gong C, Qian Z, et al. Prevention of post-surgical abdominal adhesions by a novel biodegradable thermosensitive PECE hydrogel [J]. BMC Biotechnol, 2010,10(1): 65.
- [6] Liu CB, Gong CY, Huang MJ, et al. Thermoreversible gel-sol behavior of biodegradable PCL-PEG-PCL triblock copolymer in aqueous solutions [J]. J Biomed Mater Res B, 2008,84: 165-175.
- [7] Hwang MJ, Suh JM, Bae YH, et al. Caprolactonic poloxamer analog: PEG-PCL-PEG [J]. Biomacromolecules, 2005,6(2): 885-890.
- [8] Gong CY, Shi S, Dong PW, et al. Biodegradable in situ gel-forming controlled drug delivery system based on thermosensitive PCL-PEG-PCL hydrogel: part 1-synthesis, characterization, and acute toxicity evaluation [J]. J Pharm Sci, 2009,98(12): 4684-4694.
- [9] Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering-current challenges and expanding opportunities [J]. Science, 2002,295: 1009-1014.
- [10] Gong CY, Shi S, Dong PW, et al. Thermosensitive PEG-PCL-PEG hydrogel controlled drug delivery system: sol-gel-sol transition and in vitro drug release study [J]. J Pharm Sci, 2009,98(10): 3707-3717.

(上接第22页)

【参考文献】

- [1] Koleckar V, Brojerova E, Rehakova Z, et al. *In vitro* antiplatelet activity of flavonoids from *Leuzea carthamoides* [J]. Drug Chem Toxicol, 2008,31(1): 27-35.
- [2] Miura D, Miura Y, Yagasaki K. Effect of apple polyphenol extract on hepatoma proliferation and invasion in culture and on tumor growth, metastasis, and abnormal lipoprotein profiles in hepatoma-bearing rats [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2007,71(11): 2743-2750.
- [3] Sekine C, Sugihara T, Miyake S, et al. Successful treatment of animal models of rheumatoid arthritis with small-molecule cyclin-dependent kinase inhibitors [J]. J Immunol, 2008,180(3): 1954-1961.
- [4] Wittschier N, Lengsfeld C, Vortherms S, et al. Large molecules as anti-adhesive compounds against Pathogens [J]. J Pharmacy Pharmacol, 2007,59(6): 777-786.
- [5] Shin YW, Bae EA, Lee B, et al. *In vitro* and *in vivo* antiallergic effects of *Glycyrrhiza glabra* and its components [J]. Planta Medica, 2007,73(3): 257-261.
- [6] 张世蕻,周翌婧,刘艳,等.甘草黄酮诱导肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡及其对相关蛋白 survivin 表达的影响 [J].南京医科大学学报:自然科学版,2008,28(3): 330-334.
- [7] 王艾丽,郑航,郑新民,等.异甘草素对人前列腺癌细胞体外增殖的抑制作用 [J].临床泌尿外科杂志,2007,22(11): 867-868.
- [8] 刘强,陈兴兴,孙学刚,等.甘草黄酮对荷瘤(S180)小鼠免疫细胞数量的影响 [J].中华中医药杂志,2007,22(12): 904-906.
- [9] 刘春宇,顾振纶,杜宗民,等.沙苑子黄酮抗裸鼠人肝癌移植瘤的实验研究 [J].中国药理学通报,2007,23(6): 781-789.
- [10] Zhu BH, Zhan WH, Li ZR, et al. Epigallocatechin-3-gallate inhibits growth of gastric cancer by reducing VEGF production and angiogenesis [J]. World J Gastroenterol, 2007,13(8): 1162-1169.