

干、鲜壁虎冻干粉对小鼠H22肝癌体内外抑制作用

杨金霞, 王学美, 朱伟, 富宏, 刘庚信

杨金霞, 王学美, 朱伟, 富宏, 刘庚信, 北京大学第一医院中西医结合研究室 北京市 100034
国家自然科学基金资助项目, No. 30472137
国家中医药管理局资助项目, No. 04-05ZP04
通讯作者: 王学美, 100034, 北京市西城区西什库大街8号, 北京大学第一医院中西医结合研究室. wangxumei64@sohu.com
电话: 010-66551122-3053 传真: 010-66551328
收稿日期: 2006-08-21 接受日期: 2006-10-25

Anti-tumor effects of dry and fresh *Gekko Swinhonis* Gunther freeze-dried powders on mouse H22 hepatocellular carcinoma *in vivo* and *in vitro*

Jin-Xia Yang, Xue-Mei Wang, Wei Zhu, Hong Fu, Geng-Xin Liu

Jin-Xia Yang, Xue-Mei Wang, Wei Zhu, Hong Fu, Geng-Xin Liu, Department of Integrated Chinese Medicine and Western Medicine, the First Hospital of Peking University, Beijing 100034, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30472137, and the Fund from State Administration of Traditional Chinese Medicine, No. 04-05ZP04
Correspondence to: Xue-Mei Wang, Department of Integrated Chinese Medicine and Western Medicine, the First Hospital of Peking University, 8 Xishiku Street, Beijing 100034, China. wangxumei64@sohu.com
Received: 2006-08-21 Accepted: 2006-10-25

Abstract

AIM: To investigate the anti-tumor activity of dry and fresh *Gekko Swinhonis* Gunther freeze-dried powder (DGFP and FGFP) on mouse H22 hepatocellular carcinoma *in vivo* and *in vitro*.

METHODS: The mice bearing H22 tumor cells were used in this study. After treatment with DGFP and FGFP *in vivo* and *in vitro*, the anti-tumor effects as well as the weights of thymus and spleen were measured, and the proliferation of H22 cells was detected by MTT assay.

RESULTS: The tumor inhibition rates of low-, moderate- and high-dose DGFP were 25.6%, 40.0%, 48.5%, while those of FGFP were 20.7%, 27.4%, and respectively, *in vivo*. As compared with those in 5-FU group, the weights together with the indexes of thymus and spleen were

markedly increased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$) after DGFP or FGFP treatment. The serum containing DGFP and FGFP obviously restrained the proliferation of H22 cells *in vitro*, and the inhibition rates of low-, moderate- and high-dose DGFP were 17.4%, 21.0%, and 34.5%, while those of FGFP were 16.4%, 26.3%, and 43.2%, respectively.

CONCLUSION: DGFP and FGFP have conspicuous anti-tumor effects.

Key Words: *Gekko Swinhonis* Gunther; Anti-tumor activity; Hepatocellular carcinoma; Mouse

Yang JX, Wang XM, Zhu W, Fu H, Liu GX. Anti-tumor effects of dry and fresh *Gekko Swinhonis* Gunther freeze-dried powders on mouse H22 hepatocellular carcinoma *in vivo* and *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(2):157-160

摘要

目的: 研究干、鲜壁虎冻干粉对荷H22实体型移植瘤小鼠体内抑瘤作用及其含药血清体外对H22肝癌细胞的增殖抑制作用。

方法: 采用昆明小鼠H22移植瘤模型观察干、鲜壁虎冻干粉体内抑瘤活性及小鼠胸腺、脾脏指数变化; MTT法检测不同浓度干、鲜壁虎冻干粉含药血清对H22肝癌细胞体外杀伤作用。

结果: 干、鲜壁虎低、中、高3个剂量组的抑瘤率分别为25.6%, 40.0%, 48.5%和20.7%, 28.1%, 51.1%。各壁虎组与西药5-FU组相比, 不同程度提高了荷瘤小鼠的胸腺质量($P < 0.01$)、胸腺指数($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)和脾脏质量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)、脾脏指数($P < 0.05$)。含药血清在体外能够明显抑制H22细胞的增殖, 干、鲜壁虎低、中、高含药血清组的增殖抑制率为17.4%, 21.0%, 34.5%和16.4%, 26.3%, 43.2%。

结论: 干、鲜壁虎冻干粉均具有良好的抗肿瘤作用。

关键词: 壁虎; 抗肿瘤作用; H22肝癌; 小鼠

■背景资料

当今恶性肿瘤已成为严重危害人类健康的一大类疾病, 寻找有效的治疗方法有着重要的现实意义。大量的临床报道证明, 壁虎可用于治疗多种疾病, 特别是对肿瘤有独特的疗效。

■名词解释

中药血清药理学: 给实验动物灌服中药一定时间后, 取其血清进行实验的药理学研究. 中药血清药理学是研究和探索中药药效作用的一种体外实验方法, 对成分复杂的中药及粗提物制剂的药理实验提供了正确性、真实性和可靠性的保证.

杨金霞, 王学美, 朱伟, 富宏, 刘庚信. 干、鲜壁虎冻干粉对小鼠H22肝癌体内抑制作用. 世界华人消化杂志 2007;15(2):157-160

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/157.asp>

0 引言

壁虎始载于《本草纲目》, 并记载: “咸, 寒, 有小毒”, 为壁虎科动物无蹼壁虎(*Gekko swinhonis* Gunther)或多痣壁虎(*Gekko japonicus* Cdumerit et Bi)及其他几种壁虎的干燥全体.

《四川中药志》关于壁虎的功效有“驱风, 破血积包块, 治肿瘤”的记录. 大量的临床报道证明, 壁虎对许多疾病疗效确切, 特别是对肿瘤有独特的疗效. 壁虎的炮制在《医学纲目》中有“烘干”的记载. 其使用方法分内服和外用两种. 近年来以鲜壁虎为主要原料的金龙胶囊应用于治疗多种肿瘤, 有较好的疗效, 能显著提高患者的生存质量^[1-9]. 我们就干、鲜壁虎冻干粉体内、外抗小鼠H22肝癌作用报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 干壁虎和鲜壁虎均购自河北祁澳中药饮片有限公司, 经中国科学院动物研究所两栖爬行类动物专家康景贵研究员鉴定为无蹼壁虎. 加工过程: 活体无蹼壁虎冷冻处死即为鲜壁虎, 体质量3 g左右; 用烤箱烘干冷冻处死的壁虎即为干壁虎, 每只约1 g左右. 干、鲜壁虎的体质量之比约为1:3. 干、鲜壁虎均用清水洗净, 粉碎匀浆冻融10次, 自然沉淀取上清, 低温离心10 000 r/min离心20 min, 取上清, 冷干机抽干上清成冻干粉, 保存于-20℃冰箱备用. 干、鲜壁虎的冻干粉获得率均为5%(冻干粉质量/壁虎原材料质量). 干、鲜壁虎液的配制: 用去离子水溶解干、鲜壁虎冻干粉制备干、鲜壁虎液, 其浓度以单位体积的溶液中含有的壁虎原材料的量来衡量. 配制的壁虎液经0.22 μm微孔滤膜过滤除菌, 保存于-20℃冰箱备用. 氟尿嘧啶注射液(上海旭东海普药业有限公司), 加适量的生理盐水配成3 g/L的浓度备用. RPMI1640培养液和胎牛血清(Gibco), 四甲基偶氮唑盐(MTT, Sigma), 二甲基亚砜(DMSO, Solarbio), 昆明小鼠, 体质量19-23 g, ♀♂各半, 112只; 昆明小鼠, 体质量30 g左右, ♀♂各半, 20只. H22肝癌的种鼠由北京大学肿瘤研究所提供. 江苏江阴周庄科研器械厂DS200高速度组织捣碎机, Du Pond company PC-5C低温高速离心机, Elela Freeze Dryer FD-1冷干机, Olympus CKX41光学显微镜, Shimadzu

AEU-210电子天平, Bio-Rad Model 1酶标仪.

1.2 方法

1.2.1 体内抑瘤实验 H22肝癌细胞7 d传代1次, 第2代用于实验. 无菌抽取7 d龄小鼠腹腔肿瘤细胞, 加入生理盐水调整肿瘤细胞密度至 4×10^9 /L. 后于每只小鼠的右腋下注射0.2 mL肿瘤细胞悬液. 24 h后, 随机将小鼠分为8组: 即对照组、5-FU组、干壁虎低、中、高组和鲜壁虎低、中、高组, 每组10只. 各组间体质量无差异($P > 0.05$). 模型组以生理盐水灌胃, 0.2 mL/d. 西药组以5-FU(浓度为3 g/L) 0.2 mL隔天ip. 壁虎给药组以相应浓度的干、鲜壁虎液灌胃给药, 每只小鼠灌胃量为0.2 mL/d. 连续给药12 d后引颈处死小鼠, 剥瘤、称质量、计算抑瘤率. 局部实体瘤生长的抑制率 = [(对照组平均瘤质量-实验组平均瘤质量)/对照组平均瘤质量] × 100%. 引颈处死小鼠后, 立即分离胸腺和脾脏, 剔除周围结缔组织和脂肪, 用滤纸吸干脏器表面水分, 称质量, 计算脏器指数. 胸腺(脾脏)指数 = 胸腺(脾脏)质量(mg)/体质量(g).

1.2.2 含药血清体外抑瘤实验 取体质量约30 g的昆明小鼠20只, 随机分为两组, 每组10只, ♀♂各半. 分别灌服2 kg/L的鲜壁虎液和0.67 kg/L的干壁虎液各0.3 mL, Bid. 连续给药3 d后, 摘除小鼠眼球取血, 于4℃静置3 h后, 3000 r/min离心20 min, 取上清, 56℃, 30 min灭活血清, 0.22 μm无菌滤器过滤除菌, 置于-20℃冰箱备用. 另H22肝癌细胞7 d传代1次, 第2代用于实验. 无菌抽取7 d龄小鼠腹腔肿瘤细胞, 用含100 mL/L胎牛血清的RPMI1640培养液调整肿瘤细胞浓度至 5×10^7 /L. 接种于96孔板, 每孔100 μL. 实验设对照组、干、鲜壁虎含药血清低、中、高组. 干、鲜壁虎低、中、高组分别加入相应的含药血清6.3, 12.5, 25 μL, 使血清的浓度分别为50, 100, 200 mL/L. 调整板内各孔液体总量, 使其均为125 μL. 不足者补以含100 mL/L胎牛血清的RPMI1640培养液. 培养板置于37℃, 50 mL/L CO₂的孵箱中培养72 h后, 每孔加入5 g/L的MTT液(现用现配) 25 μL. 37℃, 50 mL/L CO₂饱和继续孵育4 h后中止培养. 离心弃上清, 每孔加入DMSO 200 μL, 振荡10 min溶解沉淀, 混匀后以酶标仪于570 nm波长处读取各孔吸光度(A_{570nm}), 计算肿瘤细胞生长抑制率 = [(对照孔 A_{570nm} 均值-实验组 A_{570nm} 均值)/对照 A_{570nm} 均值] × 100%.

统计学处理 采用SPSS11.5统计软件, 数据形式采用mean ± SD的形式表示. 组间比较采用

表 1 各组荷瘤小鼠体质量及抑瘤率的比较(mean ± SD, $n = 14$)

分组	D(mg/d)	体质量 (g)		瘤质量(g)	抑瘤率(%)
		给药前	给药后		
对照组	—	21.8 ± 1.4	33.9 ± 4.7 ^d	1.9 ± 0.7 ^d	0
5-FU组	0.6	21.8 ± 1.2	28.86 ± 2.00 ^b	0.74 ± 0.53 ^b	61.9
干低组	67	21.9 ± 1.2	33.20 ± 3.50 ^d	1.44 ± 1.16 ^c	25.6
干中组	133	21.98 ± 0.98	31.29 ± 1.59	1.16 ± 0.72 ^a	40.0
干高组	267	21.91 ± 1.04	31.19 ± 1.50	0.99 ± 0.57 ^b	48.5
鲜低组	200	21.91 ± 0.93	33.76 ± 3.19 ^d	1.52 ± 1.11 ^c	20.7
鲜中组	400	21.9 ± 1.2	32.25 ± 5.84 ^c	1.39 ± 0.94	28.1
鲜高组	800	21.9 ± 1.2	30.3 ± 2.5 ^a	0.9 ± 1.0 ^b	51.1

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 5-FU组.

表 2 各组荷瘤小鼠胸腺指数和脾脏指数的比较(mean ± SD, $n = 14$)

分组	D(mg/d)	胸腺质量 (mg)	胸腺指数 (mg/g)	脾质量 (mg)	脾脏指数 (mg/g)
对照组	—	81.05 ± 34.53 ^d	2.37 ± 0.99 ^c	275.36 ± 93.48 ^d	7.93 ± 2.01 ^d
5-FU组	0.6	35.94 ± 13.29 ^b	1.25 ± 0.49 ^a	165.99 ± 59.98 ^b	5.70 ± 1.86 ^b
干低组	67	72.21 ± 29.40 ^d	2.22 ± 1.04 ^d	246.91 ± 43.60 ^d	7.45 ± 1.14 ^c
干中组	133	80.04 ± 31.40 ^d	2.58 ± 1.09 ^d	221.30 ± 78.76	7.08 ± 2.53
干高组	267	67.28 ± 33.15 ^d	2.17 ± 1.08 ^c	204.84 ± 39.68 ^a	6.57 ± 1.26
鲜低组	200	67.21 ± 16.71 ^d	2.01 ± 0.52 ^c	250.64 ± 82.84 ^d	7.42 ± 2.32 ^c
鲜中组	400	64.33 ± 21.11 ^d	2.03 ± 0.78 ^c	235.74 ± 109.70 ^c	7.16 ± 2.75
鲜高组	800	69.29 ± 32.93 ^d	2.31 ± 1.14 ^d	201.91 ± 70.55 ^a	6.63 ± 2.05

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 5-FU组.

单因素方差分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$.

2 结果

2.1 体内抑瘤实验 各组小鼠的体质量较对照组均有所减轻. 干、鲜壁虎各组小鼠的体质量与对照组相比, 只有鲜高组小鼠体质量明显减轻($P < 0.05$). 5-FU组小鼠体质量较对照组减轻更为显著($P < 0.01$, 表1). 干、鲜壁虎组的平均瘤质量均小于对照组, 以鲜高组抑瘤率最高51.1%, 5-FU组的抑瘤率61.9%, 干、鲜壁虎低、中、高3个剂量组的抑瘤率分别为25.6%, 40.0%, 48.5%, 和20.7%, 28.1%, 51.1%. 干中、干高组和鲜中、鲜高组与5-FU组的瘤质量相比较没有统计学差异(表1). 干、鲜壁虎各组与对照组小鼠的胸腺质量和胸腺指数没有明显差异. 而5-FU组胸腺质量和胸腺指数较对照组明显降低($P < 0.01$, 或 $P < 0.05$). 与5-FU组相比, 干、鲜壁虎各组小鼠的胸腺质量均显著升高($P < 0.01$), 胸腺指数也明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$). 与对照组相比, 各壁虎组仅干高、鲜高组小鼠的脾脏质量有明显减轻($P < 0.05$), 然脾脏指数均没有明显的统计学差异. 5-FU组不论在脾脏质量或是脾脏指数都较对照组明显降低($P < 0.01$). 干低、鲜低

■同行评价

本文研究了干、鲜壁虎冻干粉对荷H22实体型移植瘤小鼠体内抑瘤作用及其含药血清对体外H22肝癌细胞的增殖抑制作用, 发现干、鲜壁虎抑瘤率与西药5-FU组相近, 但干、鲜壁虎能不同程度提高了荷瘤小鼠的胸腺质量、胸腺指数和脾脏质量, 具有明显优势. 该研究对利用干、鲜壁虎抗肝癌研究具有指导意义.

表 3 壁虎含药血清对H22肝癌细胞的体外抑制增殖作用

分组	含药血清 (mL/L)	A_{570nm}	抑制增殖率 (%)
对照组	—	0.487 ± 0.062	0
干壁虎组	50	0.277 ± 0.019 ^b	17.4
	100	0.359 ± 0.017 ^b	21.0
	200	0.407 ± 0.014 ^b	34.5
鲜壁虎组	50	0.319 ± 0.044 ^b	16.4
	100	0.385 ± 0.021 ^b	26.3
	200	0.402 ± 0.025 ^b	43.2

^b $P < 0.01$ vs 对照组.

组的脾脏指数较5-FU组明显升高($P < 0.05$, 表2).

2.2 体外抑瘤实验结果 干、鲜壁虎的含药血清都可抑制H22细胞的体外增殖, 其抑制率分别为17.4%, 21.0%, 34.5%, 和16.4%, 26.3%, 43.2%, 呈现良好的剂量依赖关系. 各壁虎含药血清组的A值与对照组相比都有显著差异($P < 0.01$, 表3)

3 讨论

壁虎抗肿瘤效果显著, 其用法基本分鲜品直接入药和炮制烘干入药两类^[10]. 体内、外抑瘤实验表明, 干、鲜壁虎均有良好的抗肿瘤效果. 干壁虎各组 and 鲜壁虎各组瘤质量比较也无显著性差异. 说明干、鲜壁虎均有很好抗小鼠肝癌H22的

作用,且作用效果相近.自古有“采其鲜者,其力足耳”“生者尤良”的说法,然本实验结果提示,鲜壁虎抗肿瘤效果较干壁虎无明显优势.壁虎究竟如何炮制、采用何用法抗肿瘤疗效最好,有待于进一步深入研究.体内抑瘤实验表明,5-FU抑制肿瘤生长的作用最为显著,但他有明显的免疫抑制作用,其给药组小鼠的胸腺质量、胸腺指数和脾脏质量、脾脏指数较对照组明显降低.西药虽然能在较短时间有效杀伤肿瘤细胞,但是杀伤肿瘤的同时也严重损伤了机体的免疫功能,全身状态急剧恶化,不利于肿瘤的继续治疗,甚至加速了机体的死亡,副作用不容忽视.体内实验结果表明,各壁虎组小鼠的胸腺质量、胸腺指数和脾脏质量、脾脏指数4个指标较5-FU组均有不同程度升高,较对照组均没有明显差异.当免疫器官的重量减轻时,机体的免疫系统的功能受到破坏,肿瘤的生长速度加快^[1].与抗肿瘤西药相比,干、鲜壁虎能保护荷瘤小鼠的免疫功能,改善机体的整体状态,此为壁虎治疗肿瘤的优势之一.

血清药理学实验结果表明,含干、鲜壁虎的含药血清能显著抑制肿瘤细胞增殖.既往研究中药药理的离体实验多采用中药粗制剂直接体外给药,但由于中药粗提物并不能代表在体内真正发挥作用的有效成分,加之中药本身的理化性质也会干扰实验结果,因此对其可信度难以进行客观的评定.1989年日本学者田代真一提出了“血清药理学”和“血清药化学”的概念.血清药理学的具有能防止中药粗制剂本身理化性质对实验干扰,尤其是模拟药物的体内过程,实现体外实验的有效性等优点,被国内学者广泛采用并取得了很好的效果^[12-15].

我们采用血清药理学方法得出的实验结果进一步印证了壁虎的抗肿瘤效果,并且与体内抑瘤实验结果基本一致,这也印证了血清药理

学的实验方法是科学有效的.

中药在抗肿瘤方面有多途径、多靶点的特点,故可能干鲜壁虎抗肿瘤作用也是多途径共同发挥作用的结果.目前,对干、鲜壁虎抗肿瘤效果的比较研究及其抗肿瘤成分的研究较少.其抗肿瘤的有效成分为何,有待结合药物化学进行深入研究.此外,干、鲜壁虎的抗肿瘤作用靶点、作用途径也有待于进一步深入研究.

4 参考文献

- 1 杨金霞,王学美.壁虎治疗肿瘤的研究进展.世界华人消化杂志 2006; 14: 2428-2431
- 2 时水治.李建生治疗非霍奇金淋巴瘤临证举隅.北京中医 2005; 24: 83-85
- 3 梁铁军,秦成勇,张才擎,赵小茜.金龙胶囊联合肝动脉化疗栓塞治疗原发性肝癌疗效观察.中国肿瘤临床 2005; 32: 641-643
- 4 李俊,王三虎,范先基,张定进,石戍,王志祥,胡正刚.金龙胶囊配合辨证用药治疗中晚期恶性肿瘤40例.第四军医大学学报 2005; 26: 1667
- 5 张捷,王海,张咏梅.金龙胶囊联合HFL方案治疗晚期胃癌.首都医药 2005; 12: 33-34
- 6 陈熙.金龙胶囊合并化疗治疗晚期非小细胞肺癌的临床观察.实用肿瘤杂志 2006; 21: 267-268
- 7 孙建梅,杨水生,马燕凌.金龙胶囊对晚期肝癌生存质量及生存期的影响.湖北中医杂志 2006; 28: 34
- 8 崔永玲.金龙胶囊结合中药辨证治疗食管癌60例疗效观察.北京中医 2006; 25: 381-382
- 9 黄金昶.金龙胶囊结合辨证用药治疗原发性肝癌62例临床观察.医药产业咨询 2006; 3: 100-101
- 10 陈明,黄坚航.中药壁虎现代研究进展.世界科学技术—中药现代化 2001; 3: 53-56
- 11 Bu-Dong Zhu, Shou-Jun Yuan, Qi-Cheng Zhao, Xin Li, Yan Li, Qi-Ying Lu. Antitumor effect of Gefitinib, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, combined with cytotoxic agent on murine hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1382-1386
- 12 韩克起,凌昌全.中药体外抗肿瘤效应血清药理学研究现状与前景.中国中西医结合杂志 2003; 23: 717-719
- 13 张德付.中药血清药理学方法在肿瘤研究中存在的主要问题及对策.中医研究 2004; 17: 13-14
- 14 王喜军.中药血清药物化学的研究动态及发展趋势.中国中药杂志 2006; 31: 789-792
- 15 袁冬生,王新华,李常青,刘妮.复方肝癌宁含药血清诱导肝癌HepG-2细胞凋亡的实验研究.世界华人消化杂志 2006; 14: 522-525

电编 李琪 编辑 潘伯荣