

鲜壁虎不同部位提取液对小鼠H22肝癌体内外抑制作用

杨丽华, 杨金霞, 王学美, 富宏, 刘庚信

■背景资料

肝癌在我国发病率高, 预后差, 寻找有效的抗肝癌药物具有重大的现实意义。大量基础、临床研究证实壁虎具有良好的抗癌作用, 探究其有效部位可指导临床用药。

杨丽华, 杨金霞, 王学美, 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. wangxuemei64@sohu.com
电话: 010-66551122-3053 传真: 010-66551328
收稿日期: 2007-09-10 修回日期: 2007-10-30

Anti-tumor effects of fresh extracts from different parts of gecko on mouse H22 hepatocellular carcinoma *in vivo* and *in vitro*

Li-Hua Yang, Jin-Xia Yang, Xue-Mei Wang, Hong Fu, Geng-Xin Liu

Li-Hua Yang, Jin-Xia Yang, Xue-Mei Wang, 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; the 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, Xicheng District, Beijing 100034, China. wangxuemei64@sohu.com
Received: 2007-09-10 Revised: 2007-10-30

Abstract

AIM: To research the anti-proliferation effects of fresh extracts from different parts of gecko on cultured H22 hepatoma cells *in vitro*, and the tumor-inhibiting effects of these extracts on mice with transplanted H22 tumors *in vivo*, to identify the active components.

METHODS: MTT assay was used to evaluate the anti-proliferation effects of fresh extracts from different parts of gecko, such as the skin, head, muscle and bone, internal organs, tail and whole gecko, on cultured H22 hepatoma cells *in vitro*. Transplanted H22 tumor-bearing mice were used as a model for observing the anti-tumor effects of extracts from gecko internal organs, geckos without internal organs and whole geckos. The mice were divided into two groups and given each type of extract, with one group receiving a high dose and the other a low dose.

RESULTS: High doses of gecko internal organ extract revealed an obvious anti-proliferation effect on H22 cells in the *in vitro* experiment, the inhibition rate was 61.6%. Compared with other extracts, the inhibitory effect was significant ($P < 0.01$). In the *in vivo* experiment, the level of inhibition in the 5-FU group was 65.3%. The levels of inhibition of low and high doses of extracts from gecko internal organs extract were 8.4% and 16.8%, respectively. Those seen with low and high doses of extracts from geckos without internal organ were 26.3% and 42.1%, respectively, while those low and high doses of extract from whole gecko were 31.6% and 52.1%, respectively. Compared with the model group, there were statistical differences in tumor weights of mice treated with extract from geckos without internal organs and whole gecko ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). However, compared with the tumor weights of the 5-FU group, only the high-dose of extract from whole gecko showed no difference ($P > 0.05$). There were no differences in thymus weight, thymus index, spleen weight, or spleen index all gecko groups and the model group. However, these four observed items were all significantly lower in the 5-FU group than those in the model group and whole gecko group ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Gecko extracts have good anti-tumor effects.

Key Words: *Gecko Swinhonis Gunther*; Anti-tumor Activity; MTT assay

Yang LH, Yang JX, Wang XM, Fu H, Liu GX. Anti-tumor effects of fresh extracts from different parts of gecko on mouse H22 hepatocellular carcinoma *in vivo* and *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(35): 3734-3737

摘要

目的: 探讨鲜壁虎不同部位提取液对培养的H22肝癌细胞体外抑制增殖作用和对H22实体型移植瘤小鼠的体内抑制作用, 寻找有效的抗肿瘤活性成分。

方法: MTT法检测高、低剂量的壁虎皮肤、头部、肌肉骨骼、内脏、尾部及全壁虎的提取液对H22肝癌细胞的体外杀伤作用。采用

昆明小鼠H22移植瘤模型观察壁虎内脏高、低剂量组, 去内脏壁虎高、低剂量组, 全壁虎高、低剂量组的体内抑瘤活性及荷瘤小鼠胸腺和脾脏指数的变化。

结果: 体外实验结果显示, 壁虎内脏提取液高剂量可显著抑制H22细胞的增殖, 抑制率为61.6%, 与其他部位的提取液相比有显著差异($P<0.01$)。体内抑瘤实验, 5-FU组的抑瘤率为65.3%, 内脏低剂量和高剂量组的抑瘤率为8.4%和16.8%, 去内脏为26.3%和42.1%, 全壁虎为31.6%和52.1%。去内脏壁虎的高、低剂量组和全壁虎的高、低剂量组的瘤重与模型组比较有统计学差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。全壁虎高剂量组与5-FU组的瘤重相比较无统计学差异。各壁虎组与模型组小鼠的胸腺重、胸腺指数, 脾脏重、脾脏指数相比均没有明显差异。而5-FU组胸腺重、胸腺指数, 脾脏重、脾脏指数较模型组和各壁虎组均明显降低($P<0.01$)。

结论: 壁虎具有良好的抗肝癌效果。

关键词: 壁虎; 抗肝癌作用; MTT法

杨丽华, 杨金霞, 王学美, 富宏, 刘庚信. 鲜壁虎不同部位提取液对小鼠H22肝癌体内外抑制作用. 世界华人消化杂志 2007; 15(35): 3734-3737

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3734.asp>

0 引言

大量研究报道, 壁虎有显著的抗肿瘤作用(尤其对消化道肿瘤)^[1-7]。本课题组前期实验也证实, 干、鲜壁虎冻干粉对小鼠H22肝癌具有确切的抑制作用^[8]。如何进一步寻找壁虎抗肿瘤的活性成分, 成为研究的关键问题。对此我们进行如下探讨。

1 材料和方法

1.1 材料 鲜壁虎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(*Gekko swinhonis gunther*)。加工过程: 活体无蹼壁虎冷冻处死即为鲜壁虎。用清水洗净若干只鲜壁虎, 将壁虎分成皮肤、头部、肌肉骨骼、内脏、尾部五部分。另取若干只壁虎, 分成内脏和去除内脏两部分, 以及全壁虎若干。均各加入等2倍重量的去离子水, 粉碎匀浆冻融10次, 低温离心10000 g 20 min。取上清, -20℃冰箱保存备用。氟尿嘧啶注射液(上海旭东海普药业有限公司, 批号050510), 加入适量的生理盐水中配至3 g/L, 备用。用于细

表 1 壁虎不同部位提取液对H22肝癌细胞的体外抑制增殖作用(mean ± SD, $n = 8$)

分组	A_{570nm}	抑制增殖率(%)
对照组	1.029 ± 0.154 ^d	0
西药组	0.394 ± 0.037 ^b	61.7
头部低剂量	0.865 ± 0.117 ^{bd}	15.9
头部高剂量	0.838 ± 0.112 ^{bd}	18.6
内脏低剂量	0.594 ± 0.057 ^{bd}	42.3
内脏高剂量	0.395 ± 0.066 ^b	61.6
尾部低剂量	0.877 ± 0.125 ^{bd}	14.7
尾部高剂量	0.842 ± 0.119 ^{bd}	18.2
皮肤低剂量	0.757 ± 0.082 ^{bd}	26.5
皮肤高剂量	0.738 ± 0.097 ^{bd}	28.3
肌肉低剂量	0.745 ± 0.079 ^{bd}	27.6
肌肉高剂量	0.667 ± 0.070 ^{bd}	35.2
全壁虎低剂量	0.693 ± 0.096 ^{bd}	32.7
全壁虎高剂量	0.535 ± 0.031 ^{bd}	48.0

^b $P<0.01$ vs 对照组, ^d $P<0.01$ vs 西药组。

胞培养体外实验的药物另需用0.22 μm微孔无菌过滤器过滤除菌。RPMI 1640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22-30 g, 96只, 雌雄各半, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司(许可证号: SCXK(京)2002-2003)。小鼠H22肝癌种鼠购自中国医学科学院中国协和医科大学药物研究所。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, OLYMPUS CKX41光学显微镜, Shimadzu AEU-210电子天平, Bio-Rad Model L 1酶标仪, 低速离心机。

1.2 方法

1.2.1 壁虎各部位提取液体外抑制H22肿瘤细胞增殖作用: H22荷瘤小鼠腹腔肿瘤细胞分别接种于小鼠腹腔连续传代, 无菌抽取出生7 d的小鼠腹腔肿瘤细胞, 用含100 g/L胎牛血清的RPMI 1640培养液调整肿瘤细胞浓度至 1×10^7 /L。接种于两张96孔板, 每孔100 μL。实验设对照组, 壁虎皮肤、头部、肌肉和骨骼、内脏、尾部五部分和全壁虎液的高低剂量组, 西药5-FU组, 共14组, 每组设8个复孔。壁虎皮肤、头部、肌肉骨骼、内脏、尾部、全壁虎的高、低剂量组, 以过滤除菌的各提取液, 加入相同体积的 2×1640 培养液, 后加入一定量的胎牛血清, 使血清终浓度为10%, 即配成实验所需的药液。各高剂量组每孔加入150 μL, 低剂量加入100 μL。西药5-FU组, 每孔加入浓度为3 g/L的5-FU液25 μL。调整板内各孔液体总量, 使其均为250 μL, 不足者补以含100 g/L

■研发前沿

壁虎具有良好的抗肿瘤作用, 但其成分十分复杂, 寻找有效部位成为亟待解决的问题。

■相关报道

杨金霞 *et al* 报道, 干鲜壁虎冻干粉含药血清, 能显著抑制肿瘤细胞增殖, 其抗肿瘤作用可能是多途径多靶点。

表 2 H22荷瘤小鼠各组小鼠体质量、抑瘤率、胸腺指数和脾脏指数的比较(mean \pm SD, $n = 12$)

分组	剂量 (mL/d)	体质量 (g)		瘤质量 (g)	抑瘤 率(%)	胸腺质量 (mg)	胸腺指数 (mg/g)	脾质量 (mg)	脾脏指数 (mg/g)
		给药前	给药后						
对照组	—	26.2 \pm 1.3	36.5 \pm 3.0 ^d	1.90 \pm 0.64 ^d	0	89.5 \pm 20.2 ^d	2.48 \pm 0.68 ^d	334.2 \pm 70.9 ^d	9.20 \pm 2.08 ^d
西药组		26.2 \pm 1.4	27.3 \pm 4.2 ^b	0.66 \pm 0.21 ^b	65.3	29.3 \pm 9.1 ^b	1.09 \pm 0.35 ^b	153.9 \pm 87.1 ^b	5.63 \pm 3.10 ^b
内脏组低剂量	0.2	26.1 \pm 0.9	34.2 \pm 2.9	1.74 \pm 0.64 ^d	8.4	74.6 \pm 20.6 ^d	2.17 \pm 0.66 ^d	292.3 \pm 83.6 ^d	8.41 \pm 2.27 ^d
内脏组高剂量	0.4	25.9 \pm 1.6	33.8 \pm 3.4	1.58 \pm 0.72 ^d	16.8	72.4 \pm 21.5 ^d	2.17 \pm 0.71 ^d	306.5 \pm 66.0 ^d	9.20 \pm 2.43 ^d
去内脏低剂量	0.2	26.1 \pm 1.3	33.5 \pm 3.1	1.40 \pm 0.58 ^{cd}	26.3	82.1 \pm 12.3 ^d	2.47 \pm 0.41 ^d	277.8 \pm 50.0 ^d	8.32 \pm 1.40 ^d
去内脏高剂量	0.4	26.1 \pm 1.1	33.3 \pm 4.1	1.10 \pm 0.63 ^{bc}	42.1	86.9 \pm 29.3 ^d	2.70 \pm 1.10 ^d	273.6 \pm 63.8 ^d	8.22 \pm 1.58 ^d
全壁虎低剂量	0.2	26.0 \pm 0.9	33.2 \pm 4.0	1.30 \pm 0.50 ^{bc}	31.6	85.5 \pm 21.5 ^d	2.57 \pm 0.65 ^d	281.8 \pm 82.0 ^d	8.76 \pm 3.45 ^d
全壁虎高剂量	0.4	26.2 \pm 2.0	34.0 \pm 3.4	0.91 \pm 0.44 ^b	52.1	89.5 \pm 21.5 ^d	2.68 \pm 1.09 ^d	278.2 \pm 74.6 ^d	8.26 \pm 2.34 ^d

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 西药组。

胎牛血清的RPMI 1640培养液。培养板置于37℃, 50 mL/L CO₂的孵箱中培养72 h后, 每孔加入浓度为5 g/L的MTT液(现用现配)25 μ L。37℃, 5 mL/L CO₂饱和湿继续孵育4 h后终止培养。离心弃上清, 每孔加入200 μ L的DMSO, 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}), 计算抑制率。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) \times 100%。

1.2.2 壁虎各部位对H22荷瘤小鼠的影响: (1)体内抑瘤率的测定: H22荷瘤小鼠腹腔肿瘤细胞分别接种于小鼠腹腔连续传代, 无菌抽取出生7 d的小鼠腹腔肿瘤细胞, 加入生理盐水调整细胞悬液中肿瘤细胞浓度至 4×10^6 /L。于每只小鼠右腋下注射0.2 mL肿瘤细胞悬液, 24 h后, 随机将小鼠分为8组: 模型组, 5-FU组, 壁虎内脏高、低剂量组, 去内脏壁虎高、低剂量组, 全壁虎高、低剂量组, 每组12只小鼠。各组间体质量无差异($P > 0.05$)。模型组以生理盐水0.2 mL/d ig, 西药组以5-FU(浓度为3 g/L)0.2 mL隔天ip, 中药组以相应浓度的干、鲜壁虎液ig给药, 高剂量组每只小鼠ig量为0.4 mL/d, 低剂量组为0.2 mL/d。连续给药12 d后, 第13天引颈处死小鼠, 剥瘤、称质量、计算抑瘤率。局部实体瘤生长的抑制率 = [(模型组平均瘤质量-实验组平均瘤质量)/模型组平均瘤质量] \times 100%。(2)对免疫器官的影响: 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, 称量, 计算脏器指数。胸腺(脾脏)指数 = 胸腺(脾脏)质量(mg)/体质量(g)。

统计学处理 采用SPSS11.5统计软件, 数据形式采用mean \pm SD的形式表示。组间比较采用单因素方差分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 壁虎各部位提取液体体外抑瘤实验 壁虎各部位提取液体均可抑制H22细胞的体外增殖。其抑制率以内脏高剂量组最高, 为61.6%。与西药组的抑制率61.7%齐平, 与壁虎其他部位的提取液抑瘤率比较有显著统计学差异($P < 0.01$)。此实验重复3次, 重复性较好(表1)。

2.2 体内抑瘤实验

2.2.1 对H22荷瘤小鼠体质量的影响: 实验结果显示, 各组小鼠的体质量较对照组均有所减轻, 但无统计学差异。西药组小鼠体质量较对照组明显减轻($P < 0.01$, 表2)。

2.2.2 对H22荷瘤小鼠肿瘤生长的抑制作用及对胸腺脾脏的影响: 所有壁虎给药组的平均瘤质量均小于对照组。以全壁虎高剂量组抑瘤率最高, 为52.1%。5-FU组的抑瘤率为65.3%, 内脏低剂量和高剂量组的抑瘤率为8.4%、16.8%, 去内脏低剂量和高剂量组的抑瘤率为26.3%、42.1%, 全壁虎低剂量和高剂量组的抑瘤率为31.6%、52.1%。去内脏壁虎的低剂量与模型组比较有统计学差异($P < 0.05$)。去内脏壁虎高剂量和全壁虎的高、低剂量组的瘤质量, 与模型组比较差异更为显著($P < 0.01$)。仅全壁虎高剂量组与5-FU组的瘤质量相比较没有统计学差异($P > 0.05$)。所有壁虎给药组与对照组小鼠的胸腺质量、胸腺指数, 脾脏质量、脾脏指数均没有明显差异($P > 0.05$)。而西药组胸腺质量、胸腺指数, 脾脏质量和脾脏指数较对照组和壁虎各不同部分组明显降低($P < 0.01$)(表2)。

3 讨论

我们多年研究发现, 壁虎具有确切的抗肿瘤作用^[9-12]。寻找壁虎抗肿瘤活性成分, 具有重要意义。

鉴于动物药有效成分的分布具有不同部位成分含量差别很大的特点, 我们把壁虎分为皮肤、头部、肌肉骨骼、内脏、尾部并与全壁虎进行体外抗肝癌效果比较, 以期找到有效成分密集的部位, 以便进一步寻找壁虎抗肝癌的有效成分。

观察壁虎不同部位提取液对体外培养的H22细胞的体外抑制增殖作用, 发现壁虎内脏提取液的作用最为显著。众所周知, 体外实验本身具有一定的局限性, 其实验结果有假阳性或假阴性的可能。为进一步验证体外实验结果的真实性, 我们做了体内实验。体内实验结果显示, 壁虎提取液对小鼠肿瘤组织的生长均有一定的抑制作用。其中以全壁虎的提取液抗肿瘤效果最佳, 其低、高剂量组的抑瘤率为31.6%和52.1%, 而内脏低、高剂量组的抑瘤率仅为8.4%和16.8%。体内实验的结果再一次证实了壁虎提取液具有良好的抗肿瘤作用, 但也表明体内、外实验结果差别很大, 单纯靠体外实验的方法得到的结论有一定的不足。此次体外实验出现假阳性结果的原因可能为壁虎内脏组织本身成分比较复杂, 其本身物理、化学性质不太适合细胞的生长。体内实验排出了体内实验的这些干扰。结合体内外实验结果, 我们认为, 内脏提取液作为抗肿瘤活性物质的来源基本可以排除。体内实验同时显示, 5-FU组小鼠的胸腺质量、胸腺指数和脾脏质量、脾脏指数较对照组和各壁虎组明显降低($P<0.01$), 各壁虎组的胸腺质量、胸腺指数和脾脏质量、脾脏指数较对照组没有明显差异。可见, 壁虎提取液对荷瘤小鼠免

疫功能有保护作用, 优于西药5-FU。

总之, 我们认为壁虎提取液具有良好的抗肿瘤效果, 寻找其抗肿瘤的有效成分需要进一步继续深入研究。在研究的过程中要坚持体内实验和体外实验相结合的方式, 避免实验出现假阳性或假阴性的结果。

4 参考文献

- 1 张才擎, 梁铁军, 袁孟彪. 金龙胶囊联合肝动脉化疗栓塞治疗原发性肝癌疗效观察. 北京医学 2005; 27: 357-359
- 2 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: 53-55
- 3 康建功, 张仕状, 李耀辉, 曲林涛. 鲜无蹼壁虎抗肿瘤活性成分抑制CT-26肿瘤细胞生长实验研究. 中国医院药学杂志 2007; 27: 441-444
- 4 崔永玲. 李建生治疗食管癌的经验. 北京中医 2005; 24: 269-270
- 5 刘玉琴, 高进, 李建生. 金龙胶囊抗肿瘤复发、转移的实验研究. 北京医学 2005; 27: 554-557
- 6 吴本端. 复方壁虎粉治疗中晚期食管癌105例临床观察. 中国中西医结合杂志 1999; 19: 502
- 7 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
- 8 杨金霞, 王学美, 朱伟, 富宏, 刘庚信. 干、鲜壁虎冻干粉对小鼠H22肝癌体内外抑制作用. 世界华人消化杂志 2007; 15: 157-160
- 9 谢爽, 王学美, 谢东泽. 鲜壁虎提取液抑制C6胶质瘤细胞增殖和诱导凋亡的研究. 肿瘤防治研究 2003; 30: 458-461
- 10 宋萍, 王学美, 谢爽, 卜定方, 富宏, 刘庚信. 鲜壁虎冻干粉诱导C6胶质瘤细胞凋亡的血清药理学研究. 中国中西医结合杂志 2004; 24: 919-921
- 11 宋萍, 王学美, 谢爽, 卜定方. 鲜壁虎冻干粉抑制H22肿瘤血管生成机理的实验研究. 中国中西医结合杂志 2006; 26: 58-62
- 12 杨金霞, 杨国生, 朱伟, 富宏, 刘庚信, 王学美. 干、鲜壁虎冻干粉对S180荷瘤小鼠的抑瘤作用及其急性毒性实验研究. 中国中药杂志 2007; 32: 238-241

■同行评价

本文层次清楚, 语句通顺, 有一定临床应用前景。

编辑 程剑侠 电编 李海寅