

DOI:10. 3971/j. issn. 1000-8578. 2009. 05. 002

# 皂角刺提取物对荷瘤小鼠肿瘤生长及细胞因子的影响

刘明华<sup>1</sup>,黄兴武<sup>1</sup>,肖顺汉<sup>1</sup>,钟琳<sup>1</sup>,任美萍<sup>1</sup>,田吉<sup>2</sup>

Effects of Extractive from Spina Gleditsiae (ESG) on Tumor Growth and Cytokines in Tumor-bearing Mice

LIU Ming-hua<sup>1</sup>,HUANG Xing-wu<sup>1</sup>,XIAO Shun-han<sup>1</sup>,ZHONG Lin<sup>1</sup>,REN Mei-ping<sup>1</sup>,TIAN Ji<sup>2</sup>

1. Department of Phamacology,Luzhou Medical College,Luzhou 646000,China;2. Pharmacy Research Institute

Corresponding Author:XIAO Shun-han,E-mail:liumhvip@sina.com

**Abstract: Objective** To study the effects of Extractive from Spina Gleditsiae (ESG) on the tumor growth and cytokines in tumor-bearing mice. **Methods** Antitumor activity of ESG *in vivo* was observed by the models of implanted H22 or S180 cell line in mice. The expression of TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6 and IL-12 in tumor-bearing mice was detected by ELISA assay. **Results** At dosage of 50, 100 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup>, inhibitory rate of ESG is 44. 59% and 53. 38% for S180, 39. 88% and 46. 63% for H22, respectively. ESG can increase the expression of TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6 and IL-12. **Conclusion** ESG exhibits anti-tumor effect obviously *in vivo* and enhances immune function by promoting the expression of cytokine.

**Key words:** Extractive from Spina Gleditsiae; Tumor-bearing mice; Cytokine; ELISA

**摘要:目的** 探讨皂角刺提取物对荷瘤小鼠肿瘤生长及细胞因子水平的影响。**方法** 建立小鼠肉瘤 S180 及小鼠肝癌 H22 移植性肿瘤模型,观察皂角刺提取物对荷瘤小鼠肿瘤生长的抑制作用;采用 ELISA 法测定白介素-2(IL-2)、白介素-6(IL-6)、白介素-12(IL-12)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的水平,探讨皂角刺提取物对荷瘤小鼠细胞因子的影响。**结果** 皂角刺提取物在 50、100 mg/kg 时对 S180 的生长抑制率分别为 44. 59%、53. 38%,对 H22 生长抑制率分别为 39. 88%、46. 63%,且能提高荷瘤小鼠的脾指数和胸腺指数;皂角刺提取物能提高荷瘤小鼠细胞因子 IL-2、IL-6、IL-12、TNF- $\alpha$  的表达水平。**结论** 皂角刺提取物有较强的体内抗肿瘤活性,且能促进细胞因子的表达,增强机体免疫功能。

**关键词:** 皂角刺提取物;荷瘤小鼠;细胞因子;ELISA

**中图分类号:**R285;R979. 1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8578(2009)05-0365-03

## 0 引言

皂角刺系豆科植物皂荚(Gleditsia sinensis lam)的棘刺,含黄酮类化合物、酚类、氨基酸,性味辛温,《纲目》载“辛、温、无毒”。功用主治为搜风、拔毒、消肿、排脓,现代医学研究<sup>[1-2]</sup>证实皂角刺黄酮类化合物具有抗癌作用。本研究探讨了皂角刺提取物的体内抗肿瘤活性及对荷瘤小鼠免疫功能的影响,旨在为皂角刺提取物临床应用于恶性肿瘤提供实验依据,亦可为从中药提取物中寻找安全有效的抗肿瘤药提供新的思路。

收稿日期:2008-04-28;修回日期:2008-06-20  
基金项目:四川省教育厅重点资助项目(2005A065)  
作者单位:1. 646000 四川泸州医学院药理学教研室;2. 药物研究所  
通信作者:肖顺汉,E-mail:liumhvip@sina.com  
作者简介:刘明华(1972-),男,硕士,副教授,主要从事抗肿瘤药物筛选及分子靶点研究

## 1 材料

1. 1 材料与方法  
1. 1. 1 药物 皂角刺提取物由泸州医学院药物研究所提供,临用前先用 DMSO 溶解,然后用生理盐水稀释,使 DMSO 与生理盐水比例为 1:100;顺铂注射液(cisplatin):云南个旧生物药业有限公司生产,批号 060701。  
1. 1. 2 试剂 二甲基亚砷(DMSO)为 Sigma 公司产品;小鼠 IL-2、IL-6、IL-12 和 TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒均购自晶美生物工程有限公司。  
1. 1. 3 瘤株和动物 小鼠肝癌细胞株 H22 和小鼠肉瘤细胞株 S180 由四川大学华西医学中心提供。健康昆明种小鼠,雌性,体重(20 $\pm$ 2)g,由泸州医学院实验动物科提供,合格证号:川实动证第 07-16 号。  
1. 2 方法  
1. 2. 1 皂角刺提取物对小鼠移植性肿瘤生长的作

用 参照文献[3]方法,分别取处对数生长期 H22、S180 瘤株,无菌生理盐水调细胞浓度为  $1 \times 10^7/\text{ml}$ ,每只小鼠右腋部皮下接种 0.2 ml。接种次日将荷瘤小鼠随机分为皂角刺提取物低、中、高剂量组(25、50、100 mg/kg)、阴性对照组(0.9% NaCl)、溶媒对照组(1% DMSO)和阳性对照组(DDP 1 mg/kg)。DDP 腹腔注射给药,其余均为灌胃给药,每日 1 次,连续给药 10 d。每日观察肿瘤生长情况,按荷瘤小鼠造模评价标准判断造模是否成功<sup>[4]</sup>。末次给药 24 h 后颈椎脱臼处死小鼠,剥取瘤块、胸腺和脾脏,计算抑瘤率、胸腺指数和脾指数。

1.2.2 ELISA 法测定细胞因子 按照 1.2.1 制备荷瘤小鼠、分组和给药,但增加正常对照组(不接种肿瘤细胞),末次给药 24 h 后摘眼球取血,收集血液,放置 4 h 后离心,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  备用。临用前平衡至室温,按照 ELISA 试剂盒说明书步骤进行操作,测定细胞因子 IL-2、IL-6、IL-12、TNF- $\alpha$  的水平。

1.3 统计学方法

数据处理结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析及组间两两比较。

2 结果

2.1 皂角刺提取物对小鼠移植性肿瘤生长的作用

皂角刺提取物能显著抑制小鼠肉瘤 S180 和小鼠肝癌 H22 的生长,提高荷瘤小鼠的胸腺指数和脾

指数,与阴性对照组比较,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。皂角刺提取物各剂量组给药后动物体重均有不同程度的增加,与阴性对照组及溶媒对照组比较差异均无统计学意义。阳性对照 DDP(1 mg/kg)明显抑制小鼠移植性肿瘤的生长,但动物体重、胸腺和脾指数明显降低,结果见表 1、2。

2.2 ELISA 法测定细胞因子

荷瘤小鼠细胞因子水平明显降低,与正常对照组比较, $P<0.01$ 或  $P<0.05$ 。灌胃给予皂角刺提取物 100 mg/kg 10 天后,明显升高小鼠血清中 IL-2、IL-6、IL-12 和 TNF- $\alpha$  的水平,与阴性对照组比较, $P<0.01$ 。阳性对照药 DDP 则降低小鼠血清中 IL-2 和 IL-12 水平,与阴性对照组比较, $P<0.05$ ,而对 IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平无明显影响,结果见表 3、4。

3 讨论

恶性肿瘤患者随着病程的发展和病情的恶化,往往伴有免疫功能的下降。这种免疫功能的降低在接受放疗、化疗的患者更为明显,常影响疗效,甚至使治疗难以继续。抗肿瘤药物正从传统的细胞毒性药物,向多环节、多靶点的新型抗肿瘤药物发展<sup>[5]</sup>。生物反应调节剂和生物疗法就是适应这一发展趋势而提出的一种新颖的肿瘤药物治疗方法。其治疗的思路是把“杀伤杀死癌细胞”和“调整人体的免疫功能”有机结合,从调动人体自身的抗癌能力出发,通

表 1 皂角刺提取物对 S180 荷瘤小鼠肿瘤生长的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effects of ESG on tumor growth of implanted S180 in mice( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| Group            | Body weight(g)   |                  | Tumor weight(g)   | Inhibitory rate(%) | Spleen index(mg/g) | Thymus index(mg/g) |
|------------------|------------------|------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                  | Pre-treatment    | Post-treatment   |                   |                    |                    |                    |
| Negative control | 20.64 $\pm$ 1.77 | 22.36 $\pm$ 2.11 | 1.48 $\pm$ 0.25   |                    | 64.03 $\pm$ 16.41  | 29.41 $\pm$ 8.23   |
| 1%DMSO           | 19.81 $\pm$ 1.05 | 21.28 $\pm$ 1.66 | 1.42 $\pm$ 0.36   | 4.05               | 62.35 $\pm$ 15.14  | 27.28 $\pm$ 6.26   |
| DDP              | 19.96 $\pm$ 1.21 | 18.88 $\pm$ 1.32 | 0.41 $\pm$ 0.12** | 72.29              | 24.09 $\pm$ 8.78** | 8.68 $\pm$ 2.78**  |
| ESG              |                  |                  |                   |                    |                    |                    |
| 25 mg/kg         | 20.18 $\pm$ 1.29 | 22.89 $\pm$ 1.97 | 0.97 $\pm$ 0.18*  | 34.46              | 69.90 $\pm$ 14.18  | 25.91 $\pm$ 4.2    |
| 50 mg/kg         | 19.96 $\pm$ 1.31 | 21.98 $\pm$ 1.77 | 0.82 $\pm$ 0.15** | 44.59              | 74.06 $\pm$ 28.57  | 28.47 $\pm$ 8.34   |
| 100 mg/kg        | 20.13 $\pm$ 1.24 | 22.95 $\pm$ 1.93 | 0.69 $\pm$ 0.13** | 53.38              | 86.75 $\pm$ 23.36* | 30.68 $\pm$ 4.14** |

Compared with negative control group, \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$

表 2 皂角刺提取物对 H22 荷瘤小鼠肿瘤生长的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effects of ESG on tumor growth of implanted H22 in mice( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| Group            | Body weight(g)   |                  | Tumor weight(g)   | Inhibitory rate(%) | Spleen index(mg/g) | Thymus index(mg/g) |
|------------------|------------------|------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                  | Pre-treatment    | Post-treatment   |                   |                    |                    |                    |
| Negative control | 20.27 $\pm$ 1.65 | 22.89 $\pm$ 2.57 | 1.78 $\pm$ 0.74   |                    | 52.90 $\pm$ 10.98  | 37.01 $\pm$ 6.80   |
| 1%DMSO           | 19.87 $\pm$ 1.05 | 22.32 $\pm$ 1.79 | 1.62 $\pm$ 0.58   | 8.99               | 47.59 $\pm$ 7.65   | 38.53 $\pm$ 8.37   |
| DDP              | 20.16 $\pm$ 1.74 | 18.75 $\pm$ 1.48 | 0.49 $\pm$ 0.13** | 72.47              | 19.98 $\pm$ 4.80** | 7.65 $\pm$ 1.62**  |
| ESG              |                  |                  |                   |                    |                    |                    |
| 25 mg/kg         | 20.34 $\pm$ 1.69 | 21.89 $\pm$ 1.93 | 1.29 $\pm$ 0.16*  | 29.76              | 48.41 $\pm$ 6.35   | 40.34 $\pm$ 6.87   |
| 50 mg/kg         | 19.76 $\pm$ 1.36 | 22.93 $\pm$ 1.84 | 1.07 $\pm$ 0.14** | 39.88              | 62.10 $\pm$ 11.61* | 43.74 $\pm$ 9.46** |
| 100 mg/kg        | 20.46 $\pm$ 1.48 | 21.75 $\pm$ 1.78 | 0.95 $\pm$ 0.15** | 46.63              | 63.18 $\pm$ 15.08* | 48.69 $\pm$ 8.71** |

Compared with negative control group, \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$

表 3 皂角刺提取物对 S180 荷瘤小鼠细胞因子水平的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Effects of ESG on cytokines of implanted S180 in mice( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| Group            | Dose<br>(mg/kg) | Cytokine(pg/ml)    |                    |                     |                    |
|------------------|-----------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
|                  |                 | IL-2               | IL-6               | IL-12               | TNF- $\alpha$      |
| Normal control   | 0.9%Nacl        | 9.85 $\pm$ 2.07    | 62.08 $\pm$ 8.58   | 45.56 $\pm$ 9.98    | 12.28 $\pm$ 2.69   |
| Negative control | 0.9%Nacl        | 5.37 $\pm$ 1.63**  | 31.36 $\pm$ 9.75** | 27.31 $\pm$ 8.23**  | 6.15 $\pm$ 2.33**  |
| DMSO             | 1%              | 5.64 $\pm$ 1.78**  | 29.37 $\pm$ 8.50** | 29.78 $\pm$ 7.23**  | 6.94 $\pm$ 1.59**  |
| DDP              | 1               | 3.34 $\pm$ 1.35**# | 27.28 $\pm$ 7.98** | 19.89 $\pm$ 6.73**# | 5.96 $\pm$ 1.81**  |
| ESG              | 25              | 5.69 $\pm$ 1.39**  | 28.43 $\pm$ 7.41** | 29.00 $\pm$ 6.37**  | 7.27 $\pm$ 2.37**  |
| ESG              | 50              | 7.37 $\pm$ 2.11*#  | 43.72 $\pm$ 9.87** | 32.61 $\pm$ 9.59**# | 7.69 $\pm$ 2.58**  |
| ESG              | 100             | 8.03 $\pm$ 1.74*#  | 56.45 $\pm$ 7.76*# | 39.66 $\pm$ 8.49*#  | 8.96 $\pm$ 2.14**# |

Compared with normal control group, \* : $P < 0.05$ , \*\* : $P < 0.01$ ; compared with negative control group, # : $P < 0.05$ ; ## : $P < 0.01$

表 4 皂角刺提取物对 H22 荷瘤小鼠血清中细胞因子水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 4 Effects of ESG on cytokines of implanted H22 in mice( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| Group            | Dose<br>(mg/kg) | Cytokine (pg/ml)   |                      |                     |                   |
|------------------|-----------------|--------------------|----------------------|---------------------|-------------------|
|                  |                 | IL-2               | IL-6                 | IL-12               | TNF- $\alpha$     |
| Normal control   | 0.9%Nacl        | 10.28 $\pm$ 2.35   | 63.17 $\pm$ 9.87     | 45.45 $\pm$ 8.48    | 11.79 $\pm$ 2.13  |
| Negative control | 0.9%Nacl        | 6.94 $\pm$ 1.73**  | 36.50 $\pm$ 12.01**  | 27.84 $\pm$ 6.94**  | 6.26 $\pm$ 2.53** |
| DMSO             | 1%              | 7.67 $\pm$ 1.62**  | 37.19 $\pm$ 11.19**  | 29.23 $\pm$ 7.49**  | 6.05 $\pm$ 1.94** |
| DDP              | 1               | 4.08 $\pm$ 1.17**# | 34.70 $\pm$ 9.74**   | 17.24 $\pm$ 3.21**# | 5.97 $\pm$ 1.45** |
| ESG              | 25              | 6.83 $\pm$ 1.18**  | 37.93 $\pm$ 14.16**  | 27.91 $\pm$ 6.37**  | 5.39 $\pm$ 2.33** |
| ESG              | 50              | 7.26 $\pm$ 1.38**  | 42.77 $\pm$ 12.75**# | 32.46 $\pm$ 8.68**# | 7.74 $\pm$ 2.34** |
| ESG              | 100             | 9.25 $\pm$ 1.87*#  | 58.19 $\pm$ 11.86*#  | 39.46 $\pm$ 5.64*#  | 9.66 $\pm$ 2.62*# |

Compared with normal control group, \* : $P < 0.05$ , \*\* : $P < 0.01$ ; compared with negative control group, # : $P < 0.05$ , ## : $P < 0.01$

过增强机体固有的抗癌机制,提高免疫监视而抑制、杀灭肿瘤细胞,达到根治肿瘤的目的。

细胞因子在抗肿瘤免疫中起着重要的调节作用。IL-2 是 T 细胞在体外长期生长所必需的因子,它可促进已活化的 T 细胞增殖并分化成熟为效应迟发型超敏反应 T 细胞(TD)和细胞毒性 T 细胞(CTL) 并对 B 细胞、自然杀伤细胞(NK 细胞)和巨噬细胞的功能具有上调作用。从多种肿瘤中分离出的肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)往往对各种抗原没有反应,增殖活性低下,加入 IL-2 后可以逆转这种无反应状态<sup>[6]</sup>。IL-6 来源于多种组织细胞,可影响肿瘤细胞的黏附、迁移、分化和增殖,并涉及宿主对肿瘤的免疫反应。IL-12 具有增强 NK、T 细胞增殖和细胞毒活性,Kobayashi 研究<sup>[7]</sup>表明,IL-12 不仅能抑制肿瘤细胞的生长,而且能抑制肿瘤的转移,延长荷瘤动物的生存时间。此外,IL-12 还能直接抑制宿主肿瘤血管内皮细胞生成<sup>[8]</sup>。TNF- $\alpha$  是细菌脂多糖作用于单核巨噬细胞释放的一种多肽类物质,对肿瘤有直接溶解和抗肿瘤作用,还能增强炎症部位单核巨噬细胞系统活性及 NK 细胞的细胞毒作用。

本研究结果显示,皂角刺提取物对小鼠 S180、H22 移植性肿瘤均有抑制作用,且呈现出一定的剂量依赖性。与阳性对照 DDP 不同,皂角刺提取物各剂量组能提高荷瘤小鼠的胸腺指数和脾指数,给药

后动物体重均有不同程度的增加,一般状态良好,提示在本实验条件下,皂角刺提取物对正常机体影响较小,无明显毒副作用。皂角刺提取物能升高小鼠血中细胞因子 IL-2、IL-6、IL-12 和 TNF- $\alpha$  的水平,从而调节淋巴细胞的生长分化、激活巨噬细胞,在抗肿瘤免疫中起着重要的调节作用。

参考文献:

[1] 龙玲,耿果霞,李青旺. 皂角刺抑制小鼠宫颈癌 U 14 的生长及对增殖细胞核抗原和 p53 表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2006,31(2):150-152.

[2] Lim JC,Park JH,Budesinsky M,et al. Antimutagenic constituents from the thorns of Gleditsia sinensis[J]. Chem Pharm Bull,2005,53(5):561-564.

[3] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2002:1757-1779.

[4] 国家食品药品监督管理局. 抗肿瘤药物药效学研究指导原则[S]. 2004.

[5] 黄敏,丁健. 抗癌药物新靶点[J]. 中国处方药,2006,4(12):10-12.

[6] 高东梅,刘银坤. 基质金属蛋白酶及抑制剂的研究进展[J]. 实用肿瘤杂志,2001,19(1):83-87.

[7] Kobayashi T,Shiiba K,Satoh M,et al. Interleukin-12 administration is more effective for preventing metastasis than for inhibiting primary established tumors in a murine model of spontaneous hepatic meatstasis[J]. Surg Today,2002,32(3):236-242.

[8] Herbst RS. Targeted therapy using novel agents in the treatment of non-small cell lung cancer[J]. Clin Lung Cancer,2002,3(1):30-38.