

罗仙子提取物对肝癌的体内外抑制作用研究

郑晓亮^{1,2}, 屠凌岚^{1,2}, 颜冬梅^{1,2}, 马臻¹, 彭小英^{1*}

¹浙江省医学科学院 药物研究所; ²浙江省医学科学院 分子医学中心, 杭州 310013

摘要: 本文观察中药罗仙子提取物在离体细胞水平以及整体动物模型中对肝癌的治疗作用。在罗仙子提取物干预人肝癌 SMMC-7721 细胞 24 h 后, 采用 MTT 法检测细胞活率; 采用光学显微镜、荧光显微镜、透射电镜观察细胞形态学改变, 流式细胞仪检测细胞凋亡率; 以 Heps 肝癌小鼠模型观察罗仙子提取物体内对肿瘤生长的抑制作用。研究发现不同浓度罗仙子提取物可抑制 SMMC-7721 细胞增殖同时诱导典型的细胞凋亡形态学变化, 与对照组相比细胞凋亡率显著升高, 且具有浓度依赖性; 不同浓度罗仙子提取物可显著抑制 Heps 肝癌小鼠体内肿瘤生长。实验证明罗仙子提取物可显著抑制 Heps 肝癌小鼠体内肿瘤生长, 该作用可能与罗仙子提取物抑制肝癌细胞增殖、诱导细胞凋亡有关。

关键词: 罗仙子提取物; 肝癌; 细胞凋亡

中图分类号: R932

文献标识码: A

Protective Effects of *Chrysomya megacephala* (Fab.) Extracts on Hepatic Carcinoma *in vitro* and *in vivo*

ZHENG Xiao-liang^{1,2}, TU Ling-lan^{1,2}, YAN Dong-mei^{1,2}, MA Zhen¹, PENG Xiao-ying^{1*}

¹Institute of Materia Medica, Zhejiang Academy of Medical Sciences;

²Center for Translational Molecular Medicine, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China

Abstract: To observe the protective effects of *Chrysomya megacephala* (Fab.) extracts LXZ-1A on Hepatic carcinoma *in vitro* and *in vivo*. Cell viability of SMMC-7721 cells treated with LXZ-1A was measured by MTT assay. LXZ-1A-induced cell morphological changes were observed with the light microscope, fluorescence microscope and transmission electron microscope. Cell apoptosis rate was determined by flow cytometric analysis. The hepatoma model was established by subcutaneously inoculating Heps cells to ICR mice to evaluate the protective effect of LXZ-1A *in vivo*. The IC₅₀ (24 h) of LXZ-1A for inhibiting SMMC-7721 cell proliferation was 2.05 ± 0.11 mg/mL. The cell treated with LXZ-1A (0.3-1.0 mg/mL) showed typical morphological changes of apoptosis and the apoptotic rate was 28% to 50% for 24 h. The tumor growth in mice bearing Heps cells was significantly inhibited by intraperitoneal injection of 0.16-1.0 g/kg LXZ-1A for 9 days. *C. megacephala* (Fab.) extracts LXZ-1A repressed the growth of xenograft tumours in Heps cell tumor-bearing mice by inhibiting cell proliferation and inducing cell apoptosis.

Key words: *Chrysomya megacephala* (Fab.) extracts; hepatic carcinoma; cell apoptosis

原发性肝癌死亡率在各种恶性肿瘤中位居第二位, 5 年死亡率超过 95%。我国为肝癌高发国家。近年来我国每年新增肿瘤患者 160 ~ 170 万, 其中肝癌患者约占 18%, 仅次于胃癌(23%)。治愈性切除手术是肝癌首选的治疗方法, 然而在我国等肝癌高发国家, 新诊断出的肝癌病人只有 10% ~ 15% 适于手术, 而实际接受真正治愈性切除手术的数字可能

更低。临床检查表明肝内病变而收入外科的病人中, 45% ~ 60% 因肝内多发病灶、肝外转移或肝储备功能不佳而不能行手术切除。同时临床资料显示, 常规剂量化疗并未显著改善肝癌病人的预后。这可能与化疗药物毒性反应限制其临床治疗剂量以及肝癌细胞对多种抗癌药物的原发性耐药有关。因此寻找安全有效的新的肝癌治疗药物显得更为重要。

天然抗肿瘤药物研究已成为当前新药研发的热点, 许多天然药物本身具有很强的生物活性, 同时还可为设计更理想的新药提供独特的化学结构, 成为创制新药的先导化合物。目前已上市的天然药物来

收稿日期: 2013-08-02 接受日期: 2013-12-21

基金项目: 浙江省科技厅省属科研院所专项项目(2007F10030); 浙江省中医药科技计划项目(2006C042); 浙江省医学重点学科群建设项目(XKQ-010-001)

* 通讯作者 Tel: 86-571-88215627; E-mail: pxy8122@163.com

源的抗肿瘤药物包括紫杉醇、三尖杉酯碱、康莱特等^[1]。中药材罗仙子,即蝇蛆,为丽蝇科大头金蝇(*Chrysomya megacephala*, Fab.)的幼虫。作为药用,明朝李时珍的《本草纲目》中就有记载:“蛆,又称‘五谷虫’、‘罗仙子’、‘水仙子’,可治小儿甘热、为治甘疾之良药。”经过特殊培养的罗仙子是一种新型、廉价、具有很好开发前景的天然药物资源。民间常用于治疗小儿疳积,近年研究表明罗仙子还具有抗菌、消炎、活化上皮细胞等活性,其体内凝集素、抗菌肽等活性成分还具有抗菌、抗癌、抗病毒等多种作用^[2-5]。本文观察罗仙子提取物在离体细胞水平以及整体动物模型中对肝癌的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 药品

特种养殖的罗仙子由杭州光大生物技术研究所提供。

1.2 细胞株及培养条件

人肝癌 SMMC-7721 细胞购自中科院上海细胞库,用含 10% 胎牛血清、100 U/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养液,于 37 °C、5% CO₂ 和饱和湿度的培养箱中传代培养,取对数生长期细胞用于实验。

1.3 细胞活率检测

取对数生长期 SMMC-7721 细胞,调整细胞悬液浓度为 5×10^4 /mL,每孔 100 μ L 细胞悬液接种于 96 孔细胞培养板中,接种 24 h 后给药(100 μ L/孔),分别设空白对照组、细胞对照组以及 4 个浓度受试药物组。继续培养 24 h 后每孔加入 100 μ L MTT(1 mg/mL,以 DMEM 培养液溶解),37 °C 培养 4 h,弃去各孔内液体后加入 150 μ L 酸化异丙醇(含 0.04 mol/L HCl),避光放置 30 min,酶标仪测定 570 nm 处吸光度,计算受试药物对 SMMC-7721 细胞活率的影响,并以 GraphPad Prism software(GraphPad™ Software Inc)计算机程序拟合抑制曲线计算受试物对 SMMC-7721 细胞增殖(24 h)的半数抑制浓度(IC₅₀)^[6]。

1.4 光学显微镜观察

取对数生长期肿瘤细胞,调整细胞悬液浓度,每孔 3 mL 细胞悬液接种于 6 孔细胞培养板中,接种 24 h 后给药(3 mL/孔),分别设细胞对照组及不同浓度受试药物处理组,继续培养 24 h 后光学显微镜下观察细胞形态变化并拍照^[7]。

1.5 AO/EB 荧光双染观察

药物处理细胞过程同上,收集细胞后 3000 rpm \times 1 min 离心,PBS(pH 4.8)洗 1 次,弃上清,加入混合荧光染料 AO/EB(AO 2 μ g/mL,EB 2 μ g/mL,PBS 溶液,pH 4.8),室温避光孵育 1 min,即刻在荧光显微镜下观察并拍照^[6]。

1.6 Hoechst 33342/PI 荧光双染观察

药物处理细胞过程同上,收集细胞后 3000 rpm \times 1 min 离心,PBS 洗 1 次,弃上清,加入荧光染料 Hoechst 33342(10 μ g/mL),37 °C 避光孵育 10 min,3000 rpm \times 1 min 离心,弃上清,加入 PI(50 μ g/mL),37 °C 避光孵育 10 min,3000 rpm \times 1 min 离心,弃上清,PBS 重悬后即刻在荧光显微镜下观察并拍照^[7]。

1.7 透射电镜观察

药物处理细胞过程同上,收集细胞后 1000 rpm \times 10 min 离心,弃上清,细胞沉淀以 4 °C 预冷 PBS 重悬后转入 1.5 mL 离心管中,3000 rpm \times 15 min 离心,弃上清,滴加 4 °C 预冷 2.5% 戊二醛磷酸缓冲液 1 mL,4 °C 固定过夜,1% 锇酸 4 °C 固定,丙酮脱水,Epon812 包埋后超薄切片,常规染色,H-600A 型透射电镜下观察并拍照^[7]。

1.8 Annexin V 染色荧光显微镜观察

药物处理细胞过程同上,收集细胞后 3000 rpm \times 1 min 离心,按试剂盒建议的实验流程操作,结合缓冲液洗 1 次,弃上清,加入混合染液(90 μ L 结合缓冲液 + 5 μ L Annexin V 工作液 + 5 μ L PI 工作液)重悬细胞,室温避光孵育 15 min,3000 rpm \times 1 min 离心,以结合缓冲液重悬细胞后即刻在荧光显微镜下观察并拍照^[8]。

1.9 流式细胞仪检测

药物处理细胞过程同上,收集细胞后 2000 rpm \times 5 min 离心,按试剂盒建议的实验流程操作,以结合缓冲液重悬细胞,调整细胞悬液浓度为 1×10^6 /mL,100 μ L 细胞悬液加入 Annexin V 工作液 5 μ L,PI 工作液 15 μ L,室温孵育 15 min,再加入 400 μ L 结合缓冲液混合均匀后上机检测^[8]。

1.10 瘤株及动物

小鼠 Heps 肝癌细胞由本实验室传代保存。ICR 小鼠,清洁级,雌雄各半,体重 18 ~ 22 g,由浙江省实验动物中心提供,实验动物生产许可证 SCXK(浙)2008-0033;动物饲料由浙江省实验动物中心提供,执行标准:GB14924.1-2001;饲养条件每笼 5 只

(同剂量组),自由进食、饮水,温度 19 ~ 25 °C,相对湿度 30% ~ 70%,人工光照,12 h 光照和 12 h 无光照交替,医学实验动物设施环境合格证号 SYXK(浙)2005-0074。

1.11 体内肿瘤抑制试验

无菌抽取 Heps 小鼠腹水,显微镜下计数,调整细胞悬液浓度为 4×10^7 /mL,于小鼠右侧腋窝皮下无菌接种上述腹水瘤液 0.2 mL(每鼠接种细胞数为 8×10^6 个),次日按体重随机分组,分别为荷瘤模型组、阳性对照组(顺铂)以及不同剂量受试药物组。各组每日腹腔注射给药 1 次,连续 9 d。末次给药 24 h 后处死动物,称体重,解剖瘤块称重,计算抑瘤率,并取胸腺和脾脏称重,计算胸腺指数和脾脏指数。

1.12 数据统计

所有计量数据均表示为均数 \pm 标准差(Mean \pm SD),采用 SPSS Statistics 17.0 软件进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为统计学差异有显著性。

2 实验结果

2.1 罗仙子提取物 LXZ-1A 制备

50 g 罗仙子中加入 250 mL 石油醚(60 ~ 90 °C),室温搅拌 6 h;过滤,减压除去石油醚,得到脱脂后的罗仙子原粉。在脱脂后的罗仙子原粉中加入 10 倍体积量的水间隔超声提取 3 次,每次超声提取 10 min,过滤;滤渣再用 8 倍体积量的水超声提取 3 次,每次超声提取 10 min,过滤,合并二次滤液;于 5 °C 16000 rpm \times 30 min 离心,经超滤膜超滤后的超滤液冷冻干燥,得到棕黄色罗仙子水提物 9.6 g,提取率 19.2%。经 Lowry 法测定水提物中水溶性蛋白含量为 59.3%;苯酚硫酸法测定水提物中糖含量为 1.0%。

2.2 罗仙子提取物 LXZ-1A 体外对肝癌细胞活率的影响

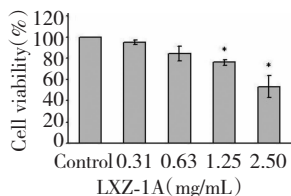


图 1 不同浓度罗仙子提取物 LXZ-1A 对人肝癌 SMMC-7721 细胞活率的影响

Fig. 1 The viability of SMMC-7721 cells treated with different concentration of LXZ-1A

* $P < 0.01$ vs control group

实验中罗仙子提取物 LXZ-1A 给药浓度均以生药量计算,1.25 ~ 2.5 mg/mL 罗仙子提取物 LXZ-1A 可显著抑制人肝癌 SMMC-7721 细胞活率(图 1), IC_{50} 值为 2.05 ± 0.11 mg/mL。

2.3 罗仙子提取物 LXZ-1A 诱导肝癌细胞凋亡的形态学观察结果

光学显微镜(图 2)、荧光显微镜(图 3、4)、透射电镜(图 5)观察不同浓度 LXZ-1A 诱导 SMMC-7721 细胞形态学改变。AO/EB 染色后荧光显微镜下对照组细胞显均匀的绿色荧光(图 3B), LXZ-1A 处理组细胞内可见致密的黄绿色荧光(图 3D、F、H),呈现典型的细胞凋亡的形态学变化,坏死细胞呈红色荧光。Hoechst33342/PI 染色后荧光显微镜下对照组细胞核显均匀的蓝色荧光(图 4B),形态正常; LXZ-1A 处理组细胞核内可见高亮度蓝荧光(图 4E、

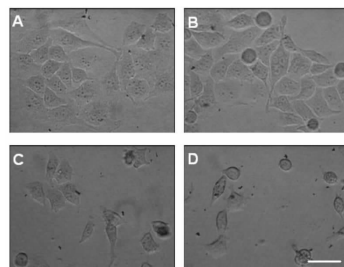


图 2 光学显微镜下观察不同浓度 LXZ-1A 引起人肝癌 SMMC-7721 细胞的形态学变化

Fig. 2 The morphological changes of SMMC-7721 cells treated with different concentration of LXZ-1A under the light microscope

A: Control; B: LXZ-1A 0.3 mg/mL; C: LXZ-1A 1.0 mg/mL; D: LXZ-1A 3.0 mg/mL (Bar = 50 μ m)

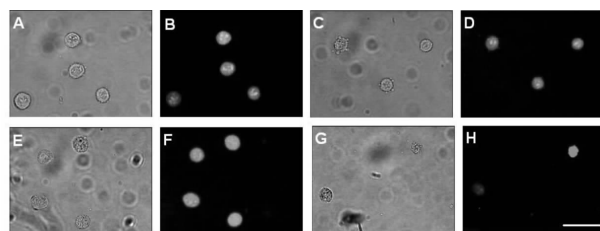


图 3 AO/EB 荧光双染后荧光显微镜下观察不同浓度 LXZ-1A 引起人肝癌 SMMC-7721 细胞的形态学变化

Fig. 3 The morphological changes of SMMC-7721 cells treated with different concentration of LXZ-1A stained with AO/EB under fluorescence microscope

A&B: Control; C&D: LXZ-1A 0.3 mg/mL; E&F: LXZ-1A 1.0 mg/mL; G&H: LXZ-1A 3.0 mg/mL; A, C, E, G 为普通光源下细胞形态, B, D, F, H 为激发光下细胞内 AO/EB 荧光(Bar = 50 μ m)

H、K), 呈现典型的细胞凋亡的形态学变化, 坏死细胞显红色荧光(图 4I、L), 细胞核形态异常。透射电镜下 LXZ-1A 处理组细胞出现典型的凋亡超微结构变化(图 5), 表现为与对照组细胞相比细胞体积缩

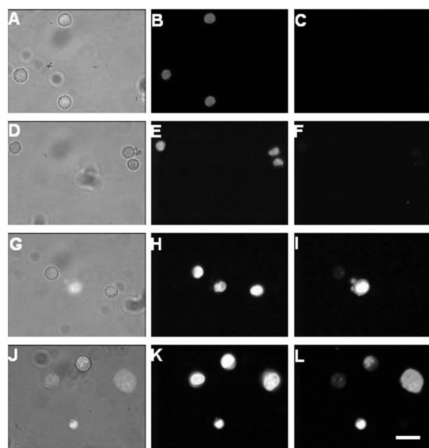


图 4 Hoechst/PI 荧光双染后荧光显微镜下观察不同浓度 LXZ-1A 引起人肝癌 SMMC-7721 细胞的形态学变化

Fig. 4 The morphological changes of SMMC-7721 cells treated with different concentration of LXZ-1A stained with Hoechst/PI under fluorescence microscope

A, B, C; Control; D, E, F; LXZ-1A 0.3 mg/mL; G, H, I; LXZ-1A 1.0 mg/mL; J, K, L; LXZ-1A 3.0 mg/mL。A, D, G, J 为普通光源下细胞形态; B, E, H, K 为激发光下细胞内 Hoechst 荧光; C, F, I, L 为激发光下细胞内 PI 荧光(Bar = 25 μm)。

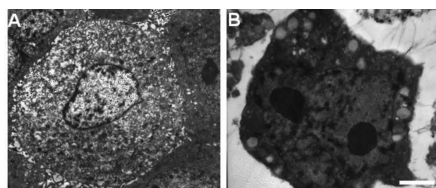


图 5 透射电镜下 LXZ-1A 引起人肝癌 SMMC-7721 细胞形态学变化

Fig. 5 Characteristic morphology of SMMC-7721 cells treated with LXZ-1A under electron microscope

A; Control; B; LXZ-1A 3.0 mg/mL (Bar = 5 μm)

表 1 不同浓度 LXZ-1A 处理人肝癌 SMMC7721 细胞 24h 后细胞凋亡率 (n = 3, x ± s)

Table 1 Apoptotic rate of SMMC-7721 cells treated with different concentration of LXZ-1A (n = 3, x ± s)

浓度 Concentration (mg/mL)	凋亡早期 Early apoptotic rate (%)	凋亡晚期 Late apoptotic rate (%)	总凋亡率 Total apoptotic rate (%)
Control	5.57 ± 3.88	1.32 ± 1.46	6.89 ± 4.78
0.3	22.07 ± 8.21 *	6.01 ± 4.18	28.08 ± 10.66 *
1.0	21.83 ± 11.44 *	7.52 ± 2.66 *	29.35 ± 10.76 *
3.0	30.47 ± 12.09 *	20.00 ± 14.07 *	50.47 ± 6.89 ***

注:与空白对照组比较, *P < 0.05; ***P < 0.001。

Note: Compare with control, *P < 0.05; ***P < 0.001.

小, 胞膜完整, 表面微绒毛减少或消失; 胞浆浓缩, 胞浆内可见空泡增多; 细胞核染色体发生边集固缩, 在核膜周边聚集形成高电子密度的质块。

2.4 罗仙子提取物 LXZ-1A 对肝癌细胞膜磷脂酰丝氨酸的影响

2.4.1 荧光显微镜观察结果

经不同浓度 LXZ-1A 处理后, SMMC-7721 细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻, Annexin V 染色后荧光显微镜下细胞膜显示绿色荧光(图 6), 坏死细胞显示红色荧光; 对照组细胞未见明显荧光。

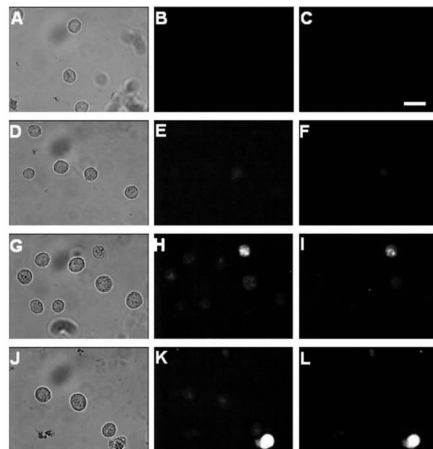


图 6 Annexin V/PI 荧光双染后荧光显微镜下观察不同浓度 LXZ-1A 引起人肝癌 SMMC-7721 细胞磷脂酰丝氨酸外翻情况

Fig. 6 The phosphatidylserine location of SMMC-7721 cells treated with different concentration of LXZ-1A stained with Annexin V/PI under fluorescence microscope

A, B, C; Control; D, E, F; LXZ-1A 0.3 mg/mL; G, H, I; LXZ-1A 1.0 mg/mL; J, K, L; LXZ-1A 3.0 mg/mL。A, D, G, J 为普通光源下细胞形态; B, E, H, K 为激发光下细胞 Annexin V 荧光; C, F, I, L 为激发光下细胞内 PI 荧光。(Bar = 50 μm)

2.4.2 流式细胞仪测定结果

不同浓度 LXZ-1A 引起人肝癌 SMMC-7721 细胞发生显著凋亡, 并具有浓度依赖性(表 1)。

2.5 罗仙子提取物 LXZ-1A 对小鼠 Heps 肝癌实体瘤的抑制作用

连续 9 d 腹腔注射 0.16 ~ 1.0 g/kg LXZ-1A 对小鼠 Heps 肝癌实体瘤有显著抑制作用,高剂量

LXZ-1A (1.0 g/kg) 的抑瘤率与阳性对照药物顺铂 (1.25 mg/kg) 相当,但与顺铂相比, LXZ-1A 对脾脏指数无抑制作用(表 2)。

表 2 样品 LXZ-1A 对小鼠 Heps 肝癌实体瘤的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Inhibitory effect of LXZ-1A on Heps tumor growth in ICR mice ($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	n	体重 body weight (g)		胸腺指数 Thymus index (g/g × 1000)	脾脏指数 Spleen index (g/g × 1000)	平均瘤重 Tumor weight (g)	抑瘤率 Inhibitory rate (%)
		d0	d9				
荷瘤模型 Model	12	21.2 ± 1.9	32.4 ± 5.1	1.74 ± 0.61	11.59 ± 3.0	2.69 ± 0.44	-
顺铂 1.25 mg/kg	10	20.7 ± 1.7	25.9 ± 3.2 **	2.01 ± 0.81	9.88 ± 1.89 ***	1.36 ± 0.55 ***	49.6
LXZ-1A 1.0 g/kg	11	20.8 ± 1.3	27.0 ± 1.9 **	1.51 ± 0.52	17.74 ± 3.04 ***	1.56 ± 0.28 ***	42.0
LXZ-1A 0.4 g/kg	10	20.6 ± 1.3	28.2 ± 2.3 *	2.51 ± 0.68 *	17.57 ± 2.43 ***	2.15 ± 0.40 **	20.2
LXZ-1A 0.16 g/kg	10	20.7 ± 1.7	30.9 ± 3.8	2.22 ± 0.56	15.05 ± 2.57 **	2.25 ± 0.33 **	16.5

注:与荷瘤模型组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

Note: Compare with Model group, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

3 讨论

实验结果证明罗仙子提取物可显著抑制人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖,诱导 SMMC-7721 细胞发生典型的凋亡形态学变化,细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻,凋亡率达 28% ~ 50%,且具有剂量依赖性。实验中采用了光学显微镜、荧光显微镜、透射电镜、流式细胞仪等多种手段来验证罗仙子提取物对肝癌细胞的凋亡诱导作用。已有文献报道类似的提取物在体外对肿瘤细胞的抑制作用,如 2003 年集美大学邱晓燕等研究了舍蝇抗菌肽的提取及其对肿瘤细胞生长的抑制作用,表明提取的舍蝇抗菌肽能有效抑制人胃癌细胞 MGC80-3 和 BGC-823、人乳腺癌细胞 MCF-7 及人肺癌细胞 SPC-A-1 的体外增殖,并且呈浓度依赖关系^[9];2006 年天津科技大学曹小红等对工程蝇蛆体内活性物质及体外抗肿瘤作用的研究结果表明工程蝇蛆体内活性物质在体外对 K562 细胞具有抑制生长的作用^[3];2008 年浙江省医学科学院徐水祥等研究了大头金蝇蛆提取物中不饱和脂肪酸、粗脂肪、和蝇蛆干粉对白血病和肺癌细胞的抑制作用^[10]。本文的研究结果与上述报道一致,还进一步明确了该抑制作用与激活细胞凋亡通路有关。

体内实验结果表明罗仙子提取物对 Heps 肝癌小鼠肿瘤生长具有显著的抑制作用,该作用可能与其抑制肝癌细胞增殖、诱导细胞凋亡作用有关。罗仙子性寒无毒,是一种优质的动物蛋白源,蛋白质含量丰富,蛋白质中氨基酸组分合理,罗仙子干粉一般含蛋白质 62% 左右,脂肪 10% ~ 15%。由于天然药

用产物成分复杂,传统的研究模式以化学分离为主,忽略了活性组分间的协同作用和微量有效成分,致使活性成分的分离工作受阻。下一步拟采用二维生物液相色谱-串联质谱技术与蛋白组学技术相结合,通过体外细胞模型和荷瘤裸鼠模型,借助血清药理学和神经网络学的研究理念,对罗仙子抗肿瘤活性成分进行进一步分离、纯化,阐明其涵盖的功能领域、作用靶点、信号转导通路以及相互间协同作用,最终确定罗仙子中抗癌药效物质及作用机制。

参考文献

- Zheng XL(郑晓亮), Liu XL(刘雪莉), Qian BC(钱伯初). Progress in tumor cell apoptosis induced by plant extracts. *Chin Pharm Bull*(中国药理学通报), 2004, 20:1201-1205.
- Huang ZR(黄自然), Liao FP(廖富蘋), Zheng Q(郑青), et al. Insect cecropin used as a new antibiotic in medicine. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2001, 13:73-89.
- Cao XH(曹小红), Xu CJ(许程剑), Zeng B(曾斌), et al. Immunomodulation activity of lectin isolated from *Musca domestica*(housefly) Pupae. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2010, 22:20-23.
- Zhang QH(张庆华), Zhao RJ(赵瑞君), Luo JX(罗景星), et al. Efficacy of antimicrobial peptides extracted from *Musca domestica* larva against tumor cell. *Chin J Hygienic Insecticides Equipments*(中华卫生杀虫药械), 2007, 13:202-204.
- Guo ZY(过振宇), Shi YH(施用辉), Le GW(乐国伟). Adsorption and separation of *Musca domestica* antimicrobial peptide with macroporous adsorption resin. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2008, 20:969-973.