

凤丹籽油对小鼠 H22 肿瘤的抑制作用

李梅青^{1,2*}, 周鑫¹, 王增蕾¹

¹安徽农业大学茶与食品科技学院; ²合肥农产品加工研究院, 合肥 230036

摘要:探讨凤丹籽油对小鼠移植性肿瘤 H22 的抑瘤作用及机制。建立肝癌 H22 移植性肿瘤模型小鼠, 随机分为正常组、模型组、5-氟尿嘧啶(5-FU)阳性对照组、凤丹籽油高、中、低剂量组, 给药 10 d 后处死。结果表明: 低、中、高剂量组的抑瘤率分别是 18.4%、26.9%、34.7%, 具有较好量效关系。与模型组相比, 低、中、高剂量组能不同程度提高胸腺、脾脏指数, 降低 AST、ALT、ALP, 增加 WBC; 降低 TE 活性和 BCL-2 表达, 显著提高 BAX 表达。以上结果表明, 高剂量凤丹籽油对 H22 荷瘤小鼠有明显的抑瘤作用, 其机制可能是通过调节免疫功能和抑制 TE 活性、BCL-2 表达, 提高 BAX 表达而发挥肿瘤抑制作用。

关键词: 凤丹籽油; H22 荷瘤小鼠; 抑制作用; 机制

中图分类号: R730.52

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.3.022

Inhibitory Effect of *Paeonia ostii* Seed Oil on Hepatoma-22 Tumor Bearing Mice

LI Mei-qing^{1,2*}, ZHOU Xin¹, WANG Zeng-lei¹

¹School of Tea & Food Science & Technology, Anhui Agricultural University;

²Hefei Institute of Agricultural Products Processing, Hefei 230036, China

Abstract: To explore the inhibitory effect of *Paeonia ostii* seed oil on transplanted H22 tumor in mice and its mechanism. H22 tumor bearing mouse models were established by transplanting H22 tumor into normal mice. 48 mice were randomly divided into normal control, model, positive control, and low, medium, and high-dose *P. ostii* seed oil groups (at doses of 3.6, 1.8, 0.9 mL/kg, respectively) consisting of 8 mice each. Each mouse received intragastric administration for 10 consecutive days. The positive control group was administered intraperitoneally with 5-fluorouracil (5-FU) at doses of 20.0 mg/kg every day. After the last administration, all mice were sacrificed. The tumor growth inhibitory rate of low, medium and high-dose *P. ostii* seed oil groups were 18.4%, 26.9%, 34.7% respectively with a good dose-effect relationship. Compared with model group, the low, medium, and high-dose groups increased spleen and thymus indices at different degrees, decreased aspartate transaminase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) while improved white blood cell (WBC); suppressed the activity of telomerase (TE) and the expression of B-cell lymphoma-2 (BCL-2) while raised the expression of Bcl-2 associated X protein (BAX) obviously. These results showed that high-dose *P. ostii* seed had significant anti-tumor effect on transplanted H22 tumor in mice and the possible mechanisms may be related to the regulation of immune function, inhibition of TE activity and up-regulating the expression of BAX and down-regulating the expression of BCL-2.

Key words: *Paeonia ostii* seed oil; H22 tumor-bearing mice; anti-tumor; mechanisms

凤丹(*Paeonia ostii* T. Hong et J. X. Zhang), 即铜陵牡丹, 主要产于安徽省铜陵凤凰山和南陵西山一带。2011年3月, 国家卫生部批准牡丹籽油为新资源食品。而能榨油的牡丹籽只有两种: 凤丹、紫斑

牡丹。前期对牡丹籽油的研究, 大多集中在产自洛阳、菏泽的一些牡丹品种, 研究主要为脂肪酸组成、抗氧化、抑菌等^[1]。钱明月等^[2]采用 GC/MS 分析凤丹籽油发现, 不饱和脂肪酸相对含量占 89.00%, 其中多不饱和脂肪酸相对含量高达 88.31%, 亚油酸(33.34%)、亚麻酸(54.81%)占据大部分。亚麻酸及亚油酸具有降血脂^[3,4]、预防心血管疾病^[5,6]、抗肿瘤^[7]等多种重要生理功能, 是营养和保健功能

的重要物质基础。近期实验研究显示^[8]膳食补充食品功能性脂质多不饱和脂肪酸能够预防和改善多种炎症和肿瘤疾病,并且对正常细胞和组织几乎不会造成损伤。

肝癌是病死率最高的恶性肿瘤之一。我国每年约有 38.3 万人死于肝癌,占全球肝癌死亡病例数的 51%^[9,10],因此有效预防肝癌的发生具有重大意义。课题组前期通过体外细胞实验研究发现,凤丹籽油体外能显著抑制人肝癌 HepG2 细胞增殖活性,为进一步验证凤丹籽油对肝癌的抑制作用,本研究利用荷瘤小鼠,观察其对移植性肿瘤 H22 的体内抑制肿瘤活性,并初步探究其作用机制,以期凤丹籽油作为预防肝癌保健食品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

BCL-2、BAX、TE 酶联免疫吸附测定试剂盒:伊莱瑞特生物科技有限公司;5-FU:上海瑞永生物科技有限公司;AST、ALT、ALP 检测试剂盒:利德曼生化股份有限公司。

酶标仪:美国 Bio-Rad 公司;SC-2556 低速离心机:安徽中科中佳科学仪器有限公司;AL104 型电子天平:梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。KM-23vet 全自动血细胞分析仪:上海康美医疗器械有限公司;AU680 全自动生化分析仪:贝克曼库尔特商贸有限公司。

1.2 实验动物

无特定病原体(SPF)级昆明小鼠,体重 18~22 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,实验动物合格证号:SCXK(沪)2012-0002。

1.3 瘤株

小鼠肝癌 H22 瘤株由安徽农业大学张劲松教授研究团队惠赠。

1.4 方法

1.4.1 凤丹籽油的制备

用 IBG Monforts CA 59 G 低温榨油机直接压榨凤丹籽,转速为 20 rpm、出口孔径大小为 5 mm、预热 1 min,得到的凤丹籽油静置过滤去除杂质,于 4 ℃ 低温贮藏。凤丹籽油得率 10.86%、酸值(KOH) 3.76 mg/g、碘值(I) 178.26 g/100 g、过氧化值 4.78 meq/kg。用大豆油稀释成实验所需灌胃体积。

1.4.2 实验分组和动物模型的建立

将 48 只小鼠随机分为正常组,模型组,阳性对

照组,凤丹籽油高、中、低剂量组,每组 8 只。无菌条件下抽取传代 7 d、生长良好的 H22 荷瘤小鼠腹水,用生理盐水稀释至细胞浓度为 2×10^7 个/mL,按 0.2 mL/只小鼠的右前肢腋部皮下接种(正常组除外)。接种后第 2 d 开始,连续灌胃 10 d。凤丹籽油高、中、低剂量组分别为 3.6、1.8、0.9 mL/kg(以体质量计);阳性对照组以 20.0 mg/kg 剂量腹腔注射 5-FU;正常组和模型组灌胃等体积大豆油。末次给药 24 h 后称重,麻醉取血,并剥取相应组织进行实验。

1.4.3 抑瘤实验

末次给药后 24 h 处死,称取小鼠体质量,摘眼球取血,脱椎处死小鼠。完整剥离肿瘤、脾脏、胸腺组织,称重,并计算抑瘤率、脾脏及胸腺指数。

$$\text{抑瘤率}/\% = \left(1 - \frac{\text{给药组平均瘤质量}/\text{g}}{\text{模型组平均瘤质量}/\text{g}} \right) \times 100 \quad (1)$$

$$\text{脾脏指数}/(\text{mg}/\text{g}) = \frac{\text{脾脏质量}/\text{mg}}{\text{体质量}/\text{g}} \quad (2)$$

$$\text{胸腺指数}/(\text{mg}/\text{g}) = \frac{\text{胸腺质量}/\text{mg}}{\text{体质量}/\text{g}} \quad (3)$$

1.4.4 血液生化指标的测定

摘小鼠眼球取血,用全自动血细胞分析仪即时分析小鼠血液样本,测定白细胞(WBC);离心收集血清,测定谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)。

1.4.5 B 细胞淋巴瘤因子(BCL-2)、BCL-2 相关蛋白(BAX)、端粒酶(TE)的测定

用预冷的 PBS(0.01 mol/L, pH = 7.4)冲洗肿瘤组织,去除残留血液。将组织剪碎,称取 0.1 g,与 9 mL 的 PBS 充分混合后,置于冰上以高速组织匀浆器组织匀浆。最后将匀浆液于 5000 rpm 离心 10 min,按照 ELISA 试剂盒说明书对肿瘤组织中 TE、BAX 和 BCL-2 的含量进行测定。

1.4.6 数据统计处理

实验数据采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。应用 SPSS21.0 进行单因素方差分析(One-way ANOVA)。

2 结果与讨论

2.1 凤丹籽油对荷瘤小鼠的抑瘤作用

本实验选择的凤丹籽油剂量是根据查阅文献资料确定一个剂量相应范围,通过预实验对相应范围内剂量的初筛,筛选出较为合适的高、中、低剂量 3.6、1.8、0.9 mL/kg(以体质量计)。

由表 1 可知,与模型组相比,不同剂量的凤丹籽

油对肿瘤生长均有不同程度的抑制作用,随着给药剂量的增加,对肿瘤的抑制也逐渐增强。阳性对照组的瘤重与模型组具有显著差异性($P < 0.01$),说

明阳性对照组明显抑制肿瘤的生长。但与阳性对照组相比,凤丹籽油高、中、低剂量均能不同程度增加小鼠体重。

表1 凤丹籽油对荷瘤小鼠的抑瘤作用($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Anti-tumor effect of *P. ostii* seed oil in mice($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别 Group	剂量 Dose	体重增长量 Weight gain (g)	瘤重 Tumor weight (g)	抑瘤率 Inhibition rate (%)
正常组 Normal control	-	10.38 ± 1.65	-	-
模型组 Model	-	11.52 ± 2.43 [#]	1.41 ± 0.25 ^{##}	-
5-FU 阳性对照组 Positive control	20.0 mg/kg	7.27 ± 1.49 [*]	0.54 ± 0.08 ^{**}	61.70
凤丹籽油 <i>P. ostii</i> seed oil	低剂量组 Low dose	0.9 mL/kg	1.15 ± 0.21 [#]	18.40
	中剂量组 Medium dose	1.8 mL/kg	1.03 ± 0.11 ^{**}	26.90
	高剂量组 High dose	3.6 mL/kg	13.13 ± 2.02 ^{##}	0.94 ± 0.27 ^{**}

注:与模型组比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与阳性对照组比,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。

Note: Compared with model, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$; Compared with positive control, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$.

根据《抗肿瘤药物药效学指导原则》,抑瘤率大于30%时为药物具有抑制肿瘤作用^[11]。由此可见,高剂量凤丹籽油与阳性药5-FU对小鼠H22肝癌的肿瘤生长具有显著的抑制作用。

2.2 凤丹籽油对荷瘤小鼠免疫器官的影响

由表2可知,与正常组比,模型组小鼠的胸腺指数显著降低($P < 0.01$),但高、中、低剂量组差异不显著($P > 0.05$);但模型组及高、中、低剂量组与正常组相比,小鼠脾脏指数均升高了,且高、中、低剂量

组比模型组更高。有研究发现^[12],荷瘤小鼠的胸腺常出现萎缩,而免疫促进剂可使其重量恢复至正常水平。在癌变过程中,因肝脏正常血管结构被破坏,门脉高压形成及机体免疫应答反应的影响,最终会造成脾脏增大。本实验结果表明,凤丹籽油能够增大小鼠免疫器官的质量,增强小鼠的免疫功能。与模型组相比,阳性对照组小鼠给药后,胸腺指数和脾脏指数均有明显下降,说明5-FU对小鼠的胸腺和脾脏有显著的免疫抑制作用。

表2 各组小鼠胸腺及脾脏指数比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Comparison of thymus and spleen indices of mice($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别 Group	剂量 Dose	胸腺指数 Thymus index (mg/g)	脾脏指数 Spleen index (mg/g)
正常组 Normal control	-	3.24 ± 0.63 ^{**}	3.85 ± 1.04 [*]
模型组 Model	-	1.88 ± 0.61 ^{▲▲}	5.71 ± 1.39 [▲]
5-FU 阳性对照组 Positive control	20.0 mg/kg	0.93 ± 0.26 ^{**}	3.56 ± 1.18 [*]
凤丹籽油 <i>P. ostii</i> seed oil	低剂量组 Low dose	0.9 mL/kg	2.64 ± 0.38
	中剂量组 Medium dose	1.8 mL/kg	2.43 ± 0.45
	高剂量组 High dose	3.6 mL/kg	2.00 ± 0.56 [▲]

注:与模型组比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与正常组比,[▲] $P < 0.05$,^{▲▲} $P < 0.01$ 。表3同。

Note: Compared with model, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$; Compared with normal, [▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.01$. Same as Table 3.

2.3 凤丹籽油对荷瘤小鼠血液生化指标的影响

血清中AST、ALT和ALP含量的升高常作为肝脏功能受损的特异性指标^[13]。WBC是体内最重要的抗炎细胞,它与机体免疫能力密切相关。白细胞的数量和质量是机体免疫力的特殊表现形式^[14]。

与正常组比较,模型组小鼠AST、ALT和ALP

均显著上升($P < 0.01$)。与模型组比较,凤丹籽油高、中、低剂量均能使荷瘤小鼠AST、ALT和ALP不同程度下降,WBC显著上升,说明凤丹籽油能改善荷瘤小鼠因肿瘤导致的肝脏损伤,并且在抑制肝癌细胞生长同时,对小鼠的免疫系统具有一定的保护作用。而阳性对照组荷瘤小鼠AST、ALT、ALP都明

显升高($P < 0.01$), WBC 显著下降($P < 0.01$), 表明 5-FU 在治疗同时对小鼠的肝脏和肾脏有明显的损害作用, 对免疫系统有一定的损伤。

表 3 各组小鼠血液生化指标变化($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Haematological examination and blood chemistry of mice($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Group	AST(U/L)	ALT(U/L)	ALP(U/L)	WBC($10^9/L$)
正常组 Normal control	102.88 ± 17.13 **	46.38 ± 7.34 **	165.50 ± 21.74 **	5.13 ± 0.35
模型组 Model	242.50 ± 32.76 ▲▲	177.00 ± 22.59 ▲▲	356.13 ± 34.31 ▲▲	5.73 ± 0.81
阳性对照组 Positive control	423.13 ± 29.88 * * ▲▲	338.63 ± 32.33 * * ▲▲	618.88 ± 46.23 * * ▲▲	2.94 ± 0.52 * * ▲▲
凤丹籽油 <i>P. ostii</i> seed oil 低剂量组 Low dose	201.88 ± 21.30 ▲▲	142.38 ± 27.64 ▲▲	327.13 ± 29.36 ▲▲	7.01 ± 0.69 ▲
中剂量组 Medium dose	186.38 ± 13.08 * * ▲▲	125.63 ± 16.47 * * ▲▲	270.63 ± 31.42 * * ▲▲	7.88 ± 0.57 * * ▲▲
高剂量组 High dose	157.63 ± 18.57 * * ▲	102.88 ± 12.69 * * ▲▲	237.38 ± 19.87 * * ▲	7.61 ± 1.16 * * ▲▲

2.4 ELISA 法检测荷瘤小鼠的 TE 活性及 BCL-2、BAX 表达

TE 在维持癌细胞无限增殖的过程中发挥着重要的作用, 抑制端粒酶的活性有可能抑制癌的发生与发展, 因此, TE 被认为是预防和治理癌症新靶标^[15]。BCL-2 能使细胞长期存活, 抑制细胞凋亡, 而其相关蛋白 BAX 则在功能上与之相反, 促进细胞凋亡。BAX/BCL-2 的值决定肿瘤细胞生死, 可作为

肿瘤治疗效果的检验标准之一^[16]。

由表 4 可知, 与模型组比较, 阳性对照组和凤丹籽油高、中、低剂量组 TE 和 BCL-2 明显下降, BAX 显著上升。说明 5-FU 和凤丹籽油均能显著抑制 TE 活性, 减弱 BCL-2 蛋白表达而增强 BAX 蛋白的表达, 其中阳性对照组作用效果最为明显, 符合表 1 中抑瘤率测定结果。凤丹籽油的作用效果随浓度的增加而增强, 呈现出一定的剂量效应。

表 4 凤丹籽油对荷瘤小鼠的 TE 活性及 BCL-2、BAX 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effect of *P. ostii* seed oil on TE and Bax, Bcl-2 in tumor tissue($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Group	TE (ng/mL)	BCL-2 (pg/mL)	BAX (ng/mL)
模型组 Normal control	3011.607 ± 254.372	70.325 ± 5.301	2.337 ± 0.208
阳性对照组 Positive control	2041.621 ± 185.460 * *	54.589 ± 2.312 * *	3.726 ± 0.131 * *
凤丹籽油 <i>P. ostii</i> seed oil 低剂量组 Low dose	2504.333 ± 186.805 *	61.672 ± 4.286 *	3.094 ± 0.156 * *
中剂量组 Medium dose	2255.774 ± 212.208 * *	55.617 ± 2.343 * *	4.330 ± 0.259 * *
高剂量组 High dose	2199.091 ± 150.675 * *	51.951 ± 3.534 * *	5.525 ± 0.207 * *

注: 与模型组相比, * $P < 0.05$; * * $P < 0.01$ 。

Note: Compare with model, * $P < 0.05$; * * $P < 0.01$.

3 结论

本实验结果表明, 高剂量凤丹籽油和 5-FU 均能有效抑制移植性肿瘤 H22。但凤丹籽油能保护小鼠免疫器官, 提高其免疫功能; 显著增强小鼠肿瘤组织中 BAX 蛋白表达, 抑制 TE 活性、BCL-2 蛋白的表达。综上所述, 凤丹籽油能有效抑制移植性肿瘤 H22 生长, 其机制可能是调节机体的免疫功能或调节 H22 荷瘤小鼠肿瘤细胞中 TE、BCL-2 及 BAX 表达, 进而促使肿瘤细胞凋亡。

参考文献

- Li MQ(李梅青), Wu Y(吴悠), Sun Q(孙强), et al. The summarization of research of peony seed[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2012, 24: 182-184.
- Qian MY(钱明月), Li MQ(李梅青), Wu Y(吴悠), et al. Analysis of physicochemical properties and fatty acids of *Paeonia ostii* seed oil by GC-MS[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2014, 26: 380-383.
- Murase T, Aoki M, Tokimitsu I. Supplementation with alpha-linolenic acid-rich diacylglycerol suppresses fatty liver formation accompanied by an up-regulation of beta-oxidation in

- Zucker fatty rats[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1733: 224-231.
- 4 Xu F(许凤), Dong DD(董迪迪), Zhou ZQ(周增群), et al. The antiproliferative properties of hylocereus *Undatus britt* seed oil[J]. *J Chin Cereals Oils Assoc* (中国粮油学报), 2015, 30(6): 84-87.
 - 5 Sala-vila A, Cofán M, Núñez I, et al. Carotid and femoral plaque burden is inversely associated with the α -linolenic acid proportion of serum phospholipids in Spanish subjects with primary dyslipidemia [J]. *Atherosclerosis*, 2011, 214: 209-214.
 - 6 Dong DD(董迪迪), Wang HF(王鸿飞), Zhou ZQ(周增群), et al. Fatty acid components and oxidation stability of *Myrica rubra* seed oil[J]. *J Chin Cereals Oils Assoc* (中国粮油学报), 2015, 30(2): 61-64.
 - 7 Ohmori H, Sasahira T, Fujii K, et al. Linoleic-acid-induced growth suppression induces quiescent cancer cell nests in nude mice[J]. *Pathobiol J Immunopathol Molecul Cellul Biol*, 2008, 75: 226-232.
 - 8 Wang LM(王莉梅), Liu RJ(刘睿杰), Jin QZ(金青哲), et al. Advance in mechanism of polyunsaturated fatty acids in cancer[J]. *China Oils Fats* (中国油脂), 2014, 39(8): 37-41.
 - 9 Wang F, Fan J, Zhang Z, et al. The global burden of liver disease; the major impact of China[J]. *Hepatology*, 2014, 60: 2099-2108.
 - 10 Lv GS(吕桂帅), Chen L(陈磊), Wang HY(王红阳). Research progress and prospect of liver cancer in China[J]. *Chin Bull Life Sci* (生命科学), 2015, 27: 237-248.
 - 11 Jin L(金玲), Liu JY(刘菊妍), Sun SY(孙升云), et al. Antitumor and immunoregulation effects of *Ganoderma* spore oil soft capsule on mice of hepatocarcinoma H22 cells-derived tumor[J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2011, 26: 715-718.
 - 12 Liu Y(刘媛), Wang J(王健), Mu JL(牟建楼), et al. Mechanism of inhibition by polypeptide from Bay scallop of H22 hepatocarcinoma transplanted into mice[J]. *Mod Food Sci Technol* (现代食品科技), 2014, 30(12): 1-6.
 - 13 Guang Z, Ying J, Huan S, et al. Immunopotentiating activities of the purified polysaccharide from evening primrose in H22 tumor-bearing mice[J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, 52: 280-285.
 - 14 Luo D(骆丹). Research on the antitumor compounds of anti-liver-cancer and strengthening body resistance decoction by screening the whole and decomposed recipes *in vivo* and *in vitro*[D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2009.
 - 15 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144: 646-674.
 - 16 Narayan S, Chandra J, Sharma M, et al. Expression of apoptosis regulators Bcl-2 and Bax in childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. *Hematology*, 2007, 12(1): 39-43.

《天然产物研究与开发》青年编委会

青年编委(以姓氏笔划为序)

Members

丁克	王红兵	戈惠明	尹文兵	尹胜	吕兆林
DING Ke	WANG Hongbing	GE Huiming	YIN Wenbing	YIN Sheng	LV Zhaolin
伍婉卿	刘相国	孙昊鹏	孙桂波	孙黔云	李芸霞
WU Wanqing	LIU Xiangguo	SUN Haopeng	SUN Guibo	SUN Qianyun	LI Yunxia
李良成	李国友	邱莉	汪海波	沐万孟	张炳火
LI Liangcheng	LI Guoyou	QIU Li	WANG Haibo	MU Wanmeng	ZHANG Binghuo
陈益华	林茂祥	林昌俊	欧阳杰	易华西	罗应刚
CHEN Yihua	LIN Maoxiang	LIN Changjun	OU Yangjie	YI Huaxi	LUO Yinggang
周文	胡友财	袁涛	夏永刚	高慧敏	唐金山
ZHOU Wen	HU Youcai	YUAN Tao	XIA Yonggang	GAO Huimin	TANG Jinshan
黄胜雄	韩淑燕	蓝蔚青	廖晨钟	潘卫东	薛永波
HUANG Shengxiong	HAN Shuyan	LAN Weiqing	LIAO Chenzhong	PAN Weidong	XUE Yongbo