

张志恒,贾海燕,崔朝初,等. 龙胆苦苷对 H<sub>22</sub>肝癌小鼠肿瘤生长抑制及抗血管生成的分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31 (10): 42-47.

Zhang ZH, Jia HY, Cui CC, et al. Inhibitory effect of gentiopicroside on tumor growth and anti-angiogenesis in mice with H<sub>22</sub> hepatocellular carcinoma [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(10): 42-47.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2021. 10. 007

## 龙胆苦苷对 H<sub>22</sub> 肝癌小鼠肿瘤生长抑制及 抗血管生成的分析

张志恒<sup>1\*</sup>, 贾海燕<sup>1</sup>, 崔朝初<sup>2</sup>, 张莹雪<sup>3</sup>

(1.聊城市中医医院肿瘤科,山东 聊城 252000;2.河南科技大学医学院,河南 洛阳 471000;  
3.山东中医药大学药学院, 济南 250355)

**【摘要】 目的** 探讨龙胆苦苷对 H<sub>22</sub>肝癌小鼠肿瘤生长的抑制作用及抗血管生成机制。**方法** 右腋皮下注射 H<sub>22</sub>细胞悬液建立 H<sub>22</sub>肝癌小鼠模型,并随机分为模型组、龙胆苦苷低、高剂量组(50 mg/kg、100 mg/kg)及环磷酰胺组(20 mg/kg),每组 10 只;另选取 10 只健康小鼠,作为正常组;给药 14 d 后,检测体重、瘤重、抑瘤率、胸腺指数、脾指数、血清干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )、白细胞介素-2(IL-2)含量及瘤组织碱性成纤维生长因子(bFGF)、转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )、血管内皮生长因子(VEGF)、磷酸化磷脂酰肌醇-3 激酶(p-PI3K)及磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)表达水平。**结果** 与 H<sub>22</sub>肝癌模型组比较,龙胆苦苷低、高剂量组小鼠体重无明显变化( $P>0.05$ ),而瘤重明显降低( $P<0.01$ ),其抑瘤率分别为 30.43%及 42.93%;与 H<sub>22</sub>肝癌模型组比较,龙胆苦苷低、高剂量组小鼠胸腺指数、脾指数及血清 IFN- $\gamma$ 、IL-2 含量明显升高( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ),而瘤组织 bFGF、TGF- $\beta$ 、VEGF、p-PI3K 及 p-Akt 表达明显降低( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。**结论** 龙胆苦苷对 H<sub>22</sub>肝癌小鼠肿瘤生长及血管生成均有抑制作用,该作用与提高免疫力,增加血清 IFN- $\gamma$ 、IL-2 含量及抑制 PI3K/Akt 信号通路的活化有关。

**【关键词】** 龙胆苦苷;肿瘤生长;血管生成;肝癌

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 10-0042-06

## Inhibitory effect of gentiopicroside on tumor growth and anti-angiogenesis in mice with H<sub>22</sub> hepatocellular carcinoma

ZHANG Zhiheng<sup>1\*</sup>, JIA Haiyan<sup>1</sup>, CUI Chaochu<sup>2</sup>, ZHANG Yingxue<sup>3</sup>

(1. Department of Oncology in Liaocheng Traditional Chinese Medicine Hospital, Liaocheng 252000, China.

2. Medical College of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000. 3. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355 )

**【Abstract】 Objective** To study the inhibitory effects of gentiopicroside on tumor growth and anti-angiogenesis in mice with H<sub>22</sub> hepatocellular carcinoma. **Methods** A H<sub>22</sub> hepatocellular carcinoma mouse model was established by subcutaneous injection of a H<sub>22</sub> cell suspension into the right axilla. Mice with H<sub>22</sub> hepatocellular carcinoma were randomly divided into a model group, low and high dose gentiopicroside groups (50 and 100 mg/kg, respectively), and a cyclophosphamide group (20 mg/kg) with 10 mice in each group. Another 10 healthy mice were used as the normal group. After 14 days of administration, body weight, tumor weight, tumor inhibition rate, thymus index, spleen index, serum IFN- $\gamma$

[基金项目] 河南省科技重点攻关项目(102102310063);河南科技大学研究生创新基金(XJJ-YJS-Z027)。

[作者简介] 张志恒(1973—),男,副主任医师,研究方向:肿瘤的诊疗与治疗。E-mail:zhangzh6221@163.com

and IL-2 contents, and expression levels of bFGF, TGF- $\beta$ , VEGF, p-PI3K, and p-Akt were measured in tumor tissues.

**Results** Compared with the H<sub>22</sub> hepatocellular carcinoma model group, the body weights of mice in low and high dose groups of gentiopicroside did not change significantly ( $P>0.05$ ), while the tumor weight was reduced significantly ( $P<0.01$ ), with the tumor inhibition rates of 30.43% and 42.93%, respectively. Compared with the H<sub>22</sub> hepatocellular carcinoma model group, the thymus index, spleen index, and serum IFN- $\gamma$  and IL-2 contents of mice in low and high dose gentiopicroside groups were increased significantly ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), while expression of bFGF, TGF- $\beta$ , VEGF, p-PI3K, and p-Akt in tumor tissues was decreased significantly ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). **Conclusions** Gentiopicroside has an inhibitory effect on tumor growth and anti-angiogenesis effect in H<sub>22</sub> hepatocellular carcinoma mice, which is related to improving immunity, increasing serum IFN- $\gamma$  and IL-2 levels, and inhibition of activation of the PI3K/Akt signaling pathway.

**【Keywords】** gentiopicroside; tumor growth; angiogenesis; hepatocellular carcinoma

肝癌在我国高发,具有预后差、易转移复发、生存时间较短及恶性程度高等特点,在肿瘤引起的相关死亡中高居第 2 位<sup>[1]</sup>。化学治疗是治疗肝癌的常用手段,但常导致消化道及肝、肾损伤、骨髓抑制,并出现白细胞减少、便秘、腹痛腹泻、食欲不振、恶心呕吐等不良反应<sup>[2]</sup>。龙胆苦苷是我国传统中药龙胆草及秦艽中的主要活性物质,属于环烯醚萜苷类化合物,具有健胃利胆、抗病原微生物、抗炎及保肝等多种药理作用<sup>[3]</sup>。体外实验发现<sup>[4-7]</sup>,龙胆苦苷对人卵巢癌及肝癌细胞等的增殖有抑制作用,但关于龙胆苦苷的体内抗肿瘤作用研究未见报道。因此,本研究以 H<sub>22</sub>肝癌小鼠为研究对象,主要探讨龙胆苦苷对 H<sub>22</sub>肝癌小鼠肿瘤生长抑制及抗血管生成分析,以期为进一步的临床应用奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验动物

SPF 级 KM 雄性小鼠 60 只,体重 20~22 g,来源于北京维通利华公司[SCXK(京)2017-0033]。无菌手术在山东大学实验动物中心进行[SYXK(鲁)2019-0005]。本实验获我院伦理委员会审批通过(LCZYYY2020012707),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

#### 1.1.2 细胞

肝癌 H<sub>22</sub>细胞,购于中国科学院上海细胞库。

### 1.2 主要试剂与仪器

龙胆苦苷为南京道斯夫公司产品,批号 181116A,纯度>95%;干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )、白细胞介素-2(IL-2)酶联免疫吸附法(ELISA)检测试剂盒,购于深圳达科为生物公司,批号分别为 20180516、20180427;兔抗鼠碱性成纤维生长因子(bFGF)、转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )、血管内皮生长因子

(VEGF)、磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)、磷酸化 PI3K(p-PI3K)、蛋白激酶 B(Akt)及磷酸化 Akt(p-Akt)抗体均购于美国 Abcam 公司,批号分别为 ab246354、ab229856、ab69479、ab154598、ab182651、ab8805、ab38449。Epoch 型酶标仪,美国 Bio-tek 公司;蛋白电泳及转膜仪,美国 Bio-Rad 公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 H<sub>22</sub>肝癌小鼠模型的建立

将培养至对数生长期的 H<sub>22</sub>细胞接种于 KM 小鼠,7 d 后抽取腹水,经 D-Hanks 液洗涤后离心,并调整细胞悬液密度为每毫升  $5.0 \times 10^6$  个。在小鼠右腋皮下注射上述细胞悬液 0.2 mL,建立 H<sub>22</sub>肝癌小鼠模型。

#### 1.3.2 分组及给药

造模后将小鼠按体重随机分为 4 组,分别为模型组、龙胆苦苷低、高剂量组(50 mg/kg、100 mg/kg)及阳性药物环磷酰胺组(20 mg/kg),每组 10 只;另选取 10 只健康小鼠,作为正常组。分组后第 2 天开始给药,龙胆苦苷低、高剂量组灌胃给药,每天一次;环磷酰胺组腹腔注射给药,隔天一次;正常组及模型组灌胃等体积的生理盐水。给药周期为 14 d,记录造模前及治疗 14 d 后的各组小鼠体重。

#### 1.3.3 瘤重、抑瘤率、胸腺指数和脾指数测定

在末次给药后 24 h,各组小鼠采用颈椎脱臼法处死。剥离肿瘤组织及胸腺、脾,滤纸拭去表面残余血液后,电子天平精密称重。按下式分别计算抑瘤率、胸腺指数和脾指数。

抑瘤率(%) = (模型组瘤重 - 给药组瘤重 / 模型组瘤重)  $\times 100\%$

胸腺指数(mg/10 g) = 胸腺重 / 体重

脾指数(mg/10 g) = 脾重 / 体重

#### 1.3.4 ELISA 法测定各组小鼠血清 IFN- $\gamma$ 及 IL-2 含量

各组小鼠在处死前,取血,分离血清。按照

ELISA 检测试剂盒说明书中的操作步骤,分别检测各组小鼠血清 IFN- $\gamma$  及 IL-2 含量。

### 1.3.5 蛋白免疫印迹法测定各组小鼠瘤组织相关蛋白表达

采用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行目的蛋白的分离。电泳完成后,常规操作转膜,其中兔抗鼠 bFGF、TGF- $\beta$ 、VEGF、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 及  $\beta$ -actin 抗体,均为 1:1000 倍稀释,二抗为 1:2000 倍稀释。采用电化学发光法显色并拍照,蛋白条带灰度值经 Image J 软件分析后,计算各组目的蛋白相对表达量。

### 1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行分析与统计,所得数据均用“平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )”表示,独立样本  $t$  检验用于两组数据比较,单因素方差分析用于多组数据比较。 $P<0.05$ ,差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 龙胆苦苷对各组小鼠体重变化的影响

造模前各组小鼠体重无明显变化( $P>0.05$ );治疗 14 d 后,与正常组及 H<sub>22</sub> 肝癌模型组比较,龙胆苦苷低、高剂量组小鼠体重无明显变化( $P>0.05$ ),而环磷酰胺组小鼠体重明显降低( $P<0.01$ )。结果见表 1。

### 2.2 龙胆苦苷对各组小鼠瘤重及抑瘤率的影响

与 H<sub>22</sub> 肝癌模型组比较,龙胆苦苷低、高剂量组及环磷酰胺组小鼠瘤重均明显降低( $P<0.01$ ),龙胆苦苷低、高剂量组及环磷酰胺组小鼠的抑瘤率分别为 30.43%、42.93%及 69.2%。结果见表 2。

表 1 龙胆苦苷对各组小鼠体重变化的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

Table 1 Effects of gentiopicroside on body weight of mice in each group

| 组别<br>Groups                                | 剂量<br>(mg/kg)<br>Dose | 体重(g) Body weight                    |                                      |
|---------------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
|                                             |                       | 造模前<br>Before model<br>establishment | 治疗 14 d 后<br>After 14 d<br>treatment |
| 正常组<br>Normal group                         | /                     | 20.04 $\pm$ 2.42                     | 32.72 $\pm$ 3.57                     |
| 模型组<br>Model group                          | /                     | 19.86 $\pm$ 2.39                     | 33.53 $\pm$ 4.06                     |
| 龙胆苦苷低剂量组<br>Gentiopicroside low does group  | 50                    | 19.67 $\pm$ 1.87                     | 31.61 $\pm$ 3.32                     |
| 龙胆苦苷高剂量组<br>Gentiopicroside high does group | 100                   | 20.25 $\pm$ 2.18                     | 30.87 $\pm$ 3.13                     |
| 环磷酰胺组<br>Cyclophosphamide group             | 20                    | 20.13 $\pm$ 1.95                     | 22.41 $\pm$ 2.86 <sup>b,d</sup>      |

注:与正常组比较,<sup>b</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>d</sup> $P<0.01$ 。

Note. Compared with the normal group, <sup>b</sup> $P<0.01$ . Compared with the model group, <sup>d</sup> $P<0.01$ .

### 2.3 龙胆苦苷对各组小鼠胸腺指数和脾指数的影响

与正常组比较,H<sub>22</sub>肝癌模型组小鼠胸腺指数及脾指数无明显变化( $P>0.05$ ),龙胆苦苷低、高剂量组小鼠胸腺指数及脾指数明显升高( $P<0.01$ ),而环磷酰胺组小鼠胸腺指数及脾指数明显降低( $P<0.01$ );与 H<sub>22</sub>肝癌模型组比较,龙胆苦苷低、高剂量组小鼠胸腺指数及脾指数明显升高( $P<0.01$ ),而环磷酰胺组小鼠胸腺指数及脾指数明显降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。结果见表 3。

### 2.4 龙胆苦苷对各组小鼠血清 IFN- $\gamma$ 及 IL-2 含量的影响

与正常组比较,H<sub>22</sub>肝癌模型组、龙胆苦苷低、高剂量组及环磷酰胺组小鼠血清 IFN- $\gamma$ 、IL-2 含量均明显降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );与 H<sub>22</sub>肝癌模型组比较,龙胆苦苷低、高剂量组小鼠血清 IFN- $\gamma$ 、IL-2 含量明显升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),而环磷酰胺组小鼠血清 IFN- $\gamma$ 、IL-2 含量明显降低( $P<0.01$ )。结果见表 4。

### 2.5 龙胆苦苷对各组小鼠瘤组织 bFGF、TGF- $\beta$ 及 VEGF 表达的影响

与 H<sub>22</sub>肝癌模型组比较,龙胆苦苷低、高剂量组及环磷酰胺组小鼠瘤组织 bFGF、TGF- $\beta$  及 VEGF 表达均明显降低( $P<0.01$ )。结果见图 1 和表 5。

### 2.6 龙胆苦苷对各组小鼠瘤组织 p-PI3K 及 p-Akt 表达的影响

与 H<sub>22</sub>肝癌模型组比较,龙胆苦苷低、高剂量组及环磷酰胺组小鼠 p-PI3K 及 p-Akt 表达均明显降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。结果见图 2 和表 6。

表 2 龙胆苦苷对各组小鼠瘤重及抑瘤率的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

Table 2 Effects of gentiopicroside on tumor weight and tumor inhibition rate of mice in each group

| 组别<br>Groups                                | 剂量<br>(mg/kg)<br>Dose | 瘤重(g)<br>Tumor<br>weight     | 抑瘤率(%)<br>Tumor inhibition<br>rate |
|---------------------------------------------|-----------------------|------------------------------|------------------------------------|
| 正常组<br>Normal group                         | /                     | /                            | /                                  |
| 模型组<br>Model group                          | /                     | 1.84 $\pm$ 0.23              | /                                  |
| 龙胆苦苷低剂量组<br>Gentiopicroside low does group  | 50                    | 1.28 $\pm$ 0.15 <sup>d</sup> | 30.43                              |
| 龙胆苦苷高剂量组<br>Gentiopicroside high does group | 100                   | 1.05 $\pm$ 0.12 <sup>d</sup> | 42.93                              |
| 环磷酰胺组<br>Cyclophosphamide group             | 20                    | 0.57 $\pm$ 0.06 <sup>d</sup> | 69.2                               |

注:与模型组比较,<sup>d</sup> $P<0.01$ 。

Note. Compared with the model group, <sup>d</sup> $P<0.01$ .

表 3 龙胆苦苷对各组小鼠胸腺指数和脾指数的影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 3 Effects of gentiopicroside on thymus index and spleen index of mice in each group

| 组别<br>Groups                                | 剂量<br>(mg/kg)<br>Dose | 胸腺指数<br>(mg/10 g)<br>Thymus index | 脾指数<br>(mg/10 g)<br>Spleen index |
|---------------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| 正常组<br>Normal group                         | /                     | 10.72±1.26                        | 43.53±5.15                       |
| 模型组<br>Model group                          | /                     | 9.26±1.10                         | 41.12±4.64                       |
| 龙胆苦苷低剂量组<br>Gentiopicroside low does group  | 50                    | 15.48±1.28 <sup>b,d</sup>         | 51.16±6.24 <sup>b,d</sup>        |
| 龙胆苦苷高剂量组<br>Gentiopicroside high does group | 100                   | 17.55±1.32 <sup>b,d</sup>         | 62.64±5.96 <sup>b,d</sup>        |
| 环磷酰胺组<br>Cyclophosphamide group             | 20                    | 5.31±0.67 <sup>b,d</sup>          | 36.19±4.03 <sup>b,c</sup>        |

注:与正常组比较, <sup>b</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较, <sup>c</sup> $P<0.05$ , <sup>d</sup> $P<0.01$ 。  
Note. Compared with the normal group, <sup>b</sup> $P<0.01$ . Compared with the model group, <sup>c</sup> $P<0.05$ , <sup>d</sup> $P<0.01$ .

表 4 龙胆苦苷对各组小鼠血清 IFN- $\gamma$  及 IL-2 含量的影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 4 Effects of gentiopicroside on serum IFN- $\gamma$  and IL-2 contents of mice in each group

| 组别<br>Groups                                | 剂量<br>(mg/kg)<br>Dose | 干扰- $\gamma$<br>(mmol/L)<br>IFN- $\gamma$ | 白细胞介素-2<br>(mmol/L)<br>IL-2 |
|---------------------------------------------|-----------------------|-------------------------------------------|-----------------------------|
| 正常组<br>Normal group                         | /                     | 57.94±6.74                                | 110.27±12.24                |
| 模型组<br>Model group                          | /                     | 40.53±4.06 <sup>b</sup>                   | 48.59±5.17 <sup>b</sup>     |
| 龙胆苦苷低剂量组<br>Gentiopicroside low does group  | 50                    | 46.56±5.48 <sup>b,c</sup>                 | 81.10±9.14 <sup>b,d</sup>   |
| 龙胆苦苷高剂量组<br>Gentiopicroside high does group | 100                   | 51.88±5.4 <sup>a,d</sup>                  | 94.31±11.83 <sup>b,d</sup>  |
| 环磷酰胺组<br>Cyclophosphamide group             | 20                    | 23.35±2.65 <sup>b,d</sup>                 | 36.08±4.52 <sup>b,d</sup>   |

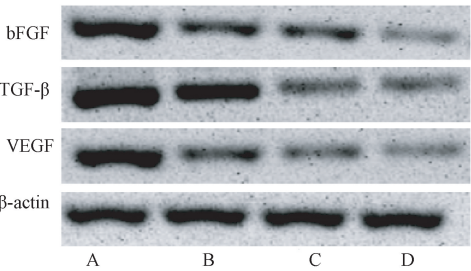
注:与正常组比较, <sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较, <sup>c</sup> $P<0.05$ , <sup>d</sup> $P<0.01$ 。  
Note. Compared with the normal group, <sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$ . Compared with the model group, <sup>c</sup> $P<0.05$ , <sup>d</sup> $P<0.01$ .

表 5 龙胆苦苷对各组小鼠瘤组织 bFGF、TGF- $\beta$  及 VEGF 表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 5 Effects of gentiopicroside on the expressions of bFGF, TGF- $\beta$  and VEGF in tumor tissues of mice in each group

| 组别<br>Groups                                | 剂量(mg/kg)<br>Dose | 碱性成纤维生长<br>因子/ $\beta$ -肌动蛋白<br>bFGF/ $\beta$ -actin | 转化生长因子- $\beta$ /<br>$\beta$ -肌动蛋白<br>TGF- $\beta$ / $\beta$ -actin | 血管内皮生长因子/<br>$\beta$ -肌动蛋白<br>VEGF/ $\beta$ -actin |
|---------------------------------------------|-------------------|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| 模型组 Model group                             | /                 | 1.08±0.11                                            | 1.12±0.14                                                           | 0.96±0.09                                          |
| 龙胆苦苷低剂量组<br>Gentiopicroside low does group  | 50                | 0.46±0.05 <sup>d</sup>                               | 0.81±0.10 <sup>d</sup>                                              | 0.73±0.08 <sup>d</sup>                             |
| 龙胆苦苷高剂量组<br>Gentiopicroside high does group | 100               | 0.38±0.04 <sup>d</sup>                               | 0.60±0.07 <sup>d</sup>                                              | 0.35±0.04 <sup>d</sup>                             |
| 环磷酰胺组<br>Cyclophosphamide group             | 20                | 0.21±0.02 <sup>d</sup>                               | 0.52±0.06 <sup>d</sup>                                              | 0.28±0.04 <sup>d</sup>                             |

注:与模型组比较, <sup>d</sup> $P<0.01$ 。  
Note. Compared with the model group, <sup>d</sup> $P<0.01$ .



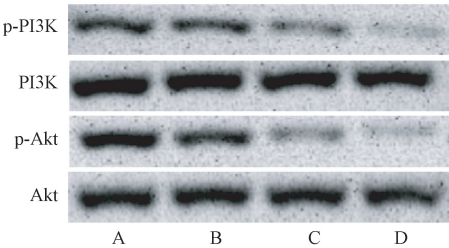
注:A:模型组;B:龙胆苦苷低剂量组;C:龙胆苦苷高剂量组;D:环磷酰胺组。

图 1 蛋白免疫印迹法检测龙胆苦苷对

各组小鼠瘤组织 bFGF、TGF- $\beta$  及 VEGF 表达的影响

Note. A, Model group. B, Gentiopicroside low does group. C, Gentiopicroside high does group. D, Cyclophosphamide group.

Figure 1 Effects of gentiopicroside on the expressions of bFGF, TGF- $\beta$  and VEGF in tumor tissues of mice in each group by Western blot



注:A:模型组;B:龙胆苦苷低剂量组;C:龙胆苦苷高剂量组;D:环磷酰胺组。

图 2 蛋白免疫印迹法检测龙胆苦苷对各组

小鼠瘤组织 p-PI3K 及 p-Akt 表达的影响

Note. A, Model group. B, Gentiopicroside low does group. C, Gentiopicroside high does group. D, Cyclophosphamide group.

Figure 2 Effects of gentiopicroside on the expressions of p-PI3K and p-Akt in tumor tissues of mice in each group by Western blot

表 6 龙胆苦苷对各组小鼠瘤组织 p-PI3K 及 p-Akt 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 6 Effects of gentiopicroside on the expressions of p-PI3K and p-Akt in tumor tissues of mice in each group

| 组别<br>Groups                                | 剂量 (mg/kg)<br>Dose | 磷酸化磷脂酰肌醇-3 激酶/磷脂酰肌醇-3 激酶<br>p-PI3K/PI3K | 磷酸化蛋白激酶 B/蛋白激酶 B<br>p-Akt/Akt |
|---------------------------------------------|--------------------|-----------------------------------------|-------------------------------|
| 模型组<br>Model group                          | /                  | 0.84±0.09                               | 1.27±0.14                     |
| 龙胆苦苷低剂量组<br>Gentiopicroside low does group  | 50                 | 0.72±0.08 <sup>c</sup>                  | 0.95±0.11 <sup>d</sup>        |
| 龙胆苦苷高剂量组<br>Gentiopicroside high does group | 100                | 0.43±0.05 <sup>d</sup>                  | 0.56±0.06 <sup>d</sup>        |
| 环磷酰胺组<br>Cyclophosphamide group             | 20                 | 0.31±0.03 <sup>d</sup>                  | 0.35±0.04 <sup>d</sup>        |

注:与模型组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ,<sup>d</sup> $P < 0.01$ 。Note. Compared with the model group, <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$ .

### 3 讨论

肝癌起病隐匿,多数患者被确诊时已处于晚期,失去了手术治疗的良机。传统中药由于毒副作用低、疗效确切,具有多靶点、多途径等优势,在肝癌治疗领域逐渐引起了人们的关注<sup>[8]</sup>。本研究选择的阳性药物环磷酰胺为临床治疗肝癌常用的化疗药物,具有抑制肿瘤生长及抗血管生成作用,免疫抑制、骨髓抑制等毒副作用较常见<sup>[9]</sup>。本研究结果发现,与 H<sub>22</sub> 肝癌模型组比较,龙胆苦苷低、高剂量组及环磷酰胺组小鼠的瘤重均降低,提示龙胆苦苷对 H<sub>22</sub> 肝癌小鼠的肿瘤生长具有抑制作用;同时,龙胆苦苷低、高剂量组小鼠胸腺指数及脾指数升高,而环磷酰胺组小鼠胸腺指数及脾指数降低,提示龙胆苦苷的抗肿瘤作用与提高免疫力有关。IFN- $\gamma$  与 IL-2 等细胞因子在调节免疫以及肿瘤免疫反应调节中起重要作用,与非特异性免疫系统中的 NK 细胞关系密切<sup>[10]</sup>。INF- $\gamma$  具有广泛的免疫调节作用,是一种高效的抗肿瘤生物活性物质,可由活化的 T 淋巴细胞产生<sup>[11]</sup>。IL-2 能诱导机体抗肿瘤免疫反应,是肿瘤免疫治疗的重要细胞因子;IL-2 也可以直接使瘤体消退或停止生长,从而达到抗肿瘤作用<sup>[12]</sup>。H<sub>22</sub> 肝癌小鼠经治疗后,与 H<sub>22</sub> 肝癌模型组比较,龙胆苦苷组小鼠血清 IFN- $\gamma$  及 IL-2 含量均升高,而环磷酰胺组小鼠血清 IFN- $\gamma$  及 IL-2 含量降低,上述结果进一步表明,龙胆苦苷对 H<sub>22</sub> 肝癌小鼠肿瘤生长的抑制作用与增加血清 IFN- $\gamma$ 、IL-2 含量有关。

新生血管的生成一方面可以为肿瘤细胞的转移提供通道,另一方面也可以为肿瘤的持续生长提供营养支持,对肿瘤的发生、发展及转移具有重要意义<sup>[13]</sup>。血管生成是一个多因子参与的复杂调控

过程,抑制血管生成是抗肿瘤药物研究的重要方向,羟基红花黄色素 A 及人参皂苷 Rg3 等均可以抑制 H<sub>22</sub> 肝癌小鼠血管生成,进而发挥抗肝癌作用<sup>[14-15]</sup>。bFGF、TGF- $\beta$  及 VEGF 等是肿瘤新生血管形成的标志蛋白,其中 bFGF 能够刺激内皮细胞内纤维蛋白酶和胶原蛋白酶的生成,进而促进新血管的生成;TGF- $\beta$  主要的作用为促进内皮细胞的增殖与分化,是肿瘤恶化的重要指标;VEGF 是最有效的促血管生成因子,对淋巴管的形成、血管的渗漏以及内皮细胞的增殖均有促进作用<sup>[16-17]</sup>。多项研究已证实<sup>[18-19]</sup>,降低 bFGF、TGF- $\beta$  及 VEGF 表达可以有效抑制血管生成。本研究结果同样发现,与 H<sub>22</sub> 肝癌模型组比较,龙胆苦苷低、高剂量组及环磷酰胺组小鼠瘤组织 bFGF、TGF- $\beta$  及 VEGF 表达均降低,提示龙胆苦苷对 H<sub>22</sub> 肝癌小鼠血管生成具有抑制作用。PI3K/Akt 信号通路是细胞内重要的信号转导途径,阻断该通路的激活可以下调 bFGF、TGF- $\beta$  及 VEGF 的表达,进而抑制血管新生<sup>[20-22]</sup>。本研究结果发现,与 H<sub>22</sub> 肝癌模型组比较,龙胆苦苷低、高剂量组及环磷酰胺组小鼠瘤组织 p-PI3K 及 p-Akt 表达均降低,表明龙胆苦苷对 H<sub>22</sub> 肝癌小鼠血管生成的抑制作用与抑制 PI3K/Akt 信号通路的活化有关。

综上所述,本研究证实龙胆苦苷对 H<sub>22</sub> 肝癌小鼠肿瘤生长及血管生成均有抑制作用,该作用与提高免疫力,增加血清 IFN- $\gamma$ 、IL-2 含量及抑制 PI3K/Akt 信号通路的活化有关。

### 参考文献:

- [1] 朱笑生,刘文超.原发性肝癌全球流行情况和危险因素的新进展[J].现代肿瘤医学,2018,26(14):2297-2301.
- [2] 白芸,李永臻,祁艳娟,等.黄芪多糖联合 5-FU 对肝癌 HepG2 细胞 EMT 转化的影响[J].中国比较医学杂志,2021,

- 31(2): 8-15.
- [ 3 ] 李生浩, 李俊义, 武昆利, 等. 龙胆苦苷的药理作用及分子机制研究进展 [J]. 昆明医科大学学报, 2020, 41(1): 158-162.
- [ 4 ] Li X, Yang C, Shen H. Gentiopicroside exerts convincing antitumor effects in human ovarian carcinoma cells (SKOV3) by inducing cell cycle arrest, mitochondrial mediated apoptosis and inhibition of cell migration [J]. J BUON, 2019, 24(1): 280-284.
- [ 5 ] 赵忠伟, 韩鹏. 龙胆苦苷对人肝癌 HepG2 细胞的抑制作用 [J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(24): 6082-6083.
- [ 6 ] 高天勤, 李欣, 董圣军, 等. 龙胆苦苷对人上皮性卵巢癌细胞增殖、凋亡、迁移的影响及机制 [J]. 山东医药, 2019, 59(11): 22-25.
- [ 7 ] Huang XJ, Li J, Mei ZY, et al. Gentiopicroside and sweroside from *Veratilla baillonii* Franch. induce phosphorylation of Akt and suppress Pck1 expression in hepatoma cells [J]. Biochem Cell Biol, 2016, 94(3): 270-278.
- [ 8 ] Ma L, Wang B, Long Y, et al. Effect of traditional Chinese medicine combined with western therapy on primary hepatic carcinoma: A systematic review with meta-analysis [J]. Front Med, 2017, 11(2): 191-202.
- [ 9 ] 黄天敏, 杨映霞, 张宏亮, 等. 蛞蝓提取物对环磷酰胺治疗肝癌的增效减毒作用 [J]. 中国药房, 2021, 32(1): 17-23.
- [ 10 ] 王小蔓, 卢玉婷, 潘虹虹. 人参提取液对妇科肿瘤患者的血清 IL-2、IFN- $\gamma$  浓度及淋巴细胞亚群的影响 [J]. 实用预防医学, 2017, 24(12): 1443-1445.
- [ 11 ] Li N, Jilisihan B, Wang W, et al. Soluble LAG3 acts as a potential prognostic marker of gastric cancer and its positive correlation with CD8<sup>+</sup>T cell frequency and secretion of IL-12 and INF- $\gamma$  in peripheral blood [J]. Cancer Biomark, 2018, 23(3): 341-351.
- [ 12 ] Wrangle JM, Patterson A, Johnson CB, et al. IL-2 and Beyond in cancer immunotherapy [J]. J Interferon Cytokine Res, 2018, 38(2): 45-68.
- [ 13 ] 平晓芳, 崔锡梅, 陈伟, 等. 木犀草素对黑色素瘤 B16 细胞系生长、转移及血管生成拟态形成的抑制作用研究 [J]. 中华皮肤科杂志, 2019, 52(6): 401-407.
- [ 14 ] 张静宇, 杨芳芳, 李京敏, 等. 羟基红花黄色素 A 抑制 H<sub>22</sub> 小鼠肝癌移植瘤血管生成及减少 MMP-3 的表达 [J]. 基础医学与临床, 2017, 37(1): 71-75.
- [ 15 ] 王爱红, 赵菊梅, 杜娟, 等. 人参皂苷 Rg3 联合顺铂抑制小鼠肝细胞癌转移及微血管生成的机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(12): 82-87.
- [ 16 ] Lund EL, Thorsen C, Pedersen MW, et al. Relationship between vessel density and expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in small cell lung cancer *in vivo* and *in vitro* [J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(11): 4287-4291.
- [ 17 ] Yang J, Wang Y, Zeng Z, et al. Smad4 deletion in blood vessel endothelial cells promotes ovarian cancer metastasis [J]. Int J Oncol, 2017, 50(5): 1693-1700.
- [ 18 ] 李黎, 吴勉华, 周红光, 等. 消癌解毒方对 H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠血管生成相关因子的影响 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2019, 21(7): 1378-1383.
- [ 19 ] 邢天容, 吕敬媛, 朴英兰, 等. 沙利度胺联合放疗对宫颈癌裸鼠移植瘤的 VEGF、bFGF、TNF- $\alpha$  表达的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2020, 20(16): 3038-3042.
- [ 20 ] Zhang J, Song H, Lu Y, et al. Effects of estradiol on VEGF and bFGF by Akt in endometrial cancer cells are mediated through the NF- $\kappa$ B pathway [J]. Oncol Rep, 2016, 36(2): 705-714.
- [ 21 ] Baek SH, Ko JH, Lee JH, et al. Ginkgolic acid inhibits invasion and migration and TGF- $\beta$ -Induced EMT of lung cancer cells through PI3K/Akt/mTOR inactivation [J]. J Cell Physiol, 2017, 232(2): 346-354.
- [ 22 ] 李磊, 高绚照, 马连萍, 等. 积雪草苷通过激活 PI3K/Akt 信号通路缓解局灶性脑梗死大鼠脑组织损伤和诱导血管新生 [J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(17): 2068-2072, 2078.

[ 收稿日期 ] 2020-12-24