

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.04.015

花椒根总生物碱抗肿瘤活性研究*

龙奕霄^{1,2}, 蒙永^{1,2}, 蒋霞^{1,3,△}

(1. 广西医科大学, 广西南宁 530021; 2. 广西壮族自治区梧州市红十字会医院, 广西梧州 543002;
3. 广西医科大学第一附属医院, 广西南宁 530021)

摘要:目的 探讨花椒根总生物碱的抗肿瘤活性。方法 实验分为6组,各10只,分别灌胃1 000,800,640,512,410,328 g/kg花椒根总生物碱1次(每10 g体重灌胃0.2 mL),计算半数致死浓度(LD_{50})。将60只KM小鼠随机分为正常对照组(A组,等体积生理盐水灌胃)、模型组(B组,等体积生理盐水灌胃)、阳性药物组(C组,氟尿嘧啶20 mg/kg腹腔注射)及花椒根总生物碱高、中、低剂量组(D_1 组、 D_2 组、 D_3 组,生药100,80,40 g/kg灌胃),各10只,右上肢腋窝皮下注射单细胞悬液0.2 mL以复制H22荷瘤小鼠模型,建模成功后分别给予相应药物或生理盐水,每天1次,连续10 d。采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测小鼠血清中白细胞介素2(IL-2)及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平;剥取瘤块,称定质量,计算抑瘤率;苏木素-伊红(HE)染色,观察瘤体组织病理形态学;Tunel染色,观察H22肿瘤细胞凋亡情况。结果 与B组比较,C组和 D_1 组小鼠瘤体质量显著减轻($P < 0.05$); D_1 组小鼠血清中IL-2和C组、 D_1 组、 D_2 组小鼠血清中TNF- α 水平均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);C组、 D_1 组、 D_2 组细胞凋亡率显著升高($P < 0.01$);C组、 D_1 组、 D_2 组、 D_3 组小鼠的抑瘤率分别为53.26%,36.85%,10.29%,2.18%。B组肿瘤细胞数目多;排列紧密;细胞核深染;C组和 D_1 组肿瘤细胞胞核固缩、胞质疏松,可见凋亡、坏死的肿瘤细胞。结论 花椒根总生物碱具有体内抗肿瘤作用,其机制可能与提高机体细胞免疫功能及促进肿瘤细胞凋亡有关。

关键词:花椒根;总生物碱;抗肿瘤;白细胞介素2;肿瘤坏死因子- α ;细胞凋亡;小鼠

中图分类号:R932;R285.5

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)04-0063-04

Anti-Tumor Activity of Total Alkaloids from Zanthoxyli Radix

LONG Yixiao^{1,2}, MENG Yong^{1,2}, JIANG Xia^{1,3}

(1. Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, China 530021; 2. Wuzhou Red Cross Hospital, Wuzhou, Guangxi, China 543002; 3. The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, China 530021)

Abstract: Objective To investigate the anti-tumor activity of total alkaloids from Zanthoxyli Radix. **Methods** Sixty SPF KM mice were randomly divided into six groups, with ten mice in each group. Mice in each group were gavaged with 1 000, 800, 640, 512, 410 and 328 g/kg of total alkaloids from Zanthoxyli Radix once (0.2 mL per 10 g of body weight). The median lethal concentration (LD_{50}) was calculated. Sixty KM mice were randomly divided into the normal control group (group A, intragastric administration of equal volume of normal saline), model group (group B, intragastric administration of equal volume of normal saline), positive drug group (group C, intraperitoneal injection of 20 mg/kg of fluorouracil), and high-, medium- and low-dose groups of total alkaloids from Zanthoxyli Radix (groups D_1 , D_2 and D_3 , intragastric administration of 40, 80, 100 g/kg of crude drug), with 10 mice in each group. H22 tumor-bearing mouse model was established by subcutaneous injection of 0.2 mL of single-cell suspension into the armpit of the right upper limb of mice. After successful modeling, the mice were given

*基金项目:国家中医药管理局全国中药特色技术传承人才培养项目[国中医药人教函[2018]204号];广西中医药适宜技术开发与推广项目[GZSY20-09];广西壮族自治区卫生健康委员会自筹经费科研课题[Z20190913]。

第一作者:龙奕霄,女,在读硕士研究生,主管药师,研究方向为临床药学,(电子信箱)longyixiao54321@163.com。

△通信作者:蒋霞,女,博士研究生,主任药师,研究方向为中药药理学,(电子信箱)jiangxia771@sina.com。

- model of focal cerebral ischemia - reperfusion injury [J]. Molecul Med Reports, 2015, 11(4): 3122 - 3128.
- [15] LUO SP, YU ZJ, XIAO CL, et al. The expression of β -catenin, CyclinD1 in mouse hippocampus following cerebral ischemia reperfusion [J]. J Qiannan Med Coll National, 2013, 26(1): 9 - 13.
- [16] WANG W, LI MC, WANG YF, et al. GSK - 3 β inhibitor TWS119 attenuates rtPA - induced hemorrhagic transformation and activates the Wnt / β - catenin signaling pathway after acute ischemic stroke in rats [J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(10): 7028 - 7036.
- [17] CHEN XP, YU J, SHI JS, et al. Management of diabetes mellitus with puerarin, a natural isoflavone from pueraria lobata [J]. Am J Chin Med, 2018, 46(8): 1771 - 1789.
- [18] LING CL, LIANG JM, ZHANG C, et al. Synergistic Effects of Salvianolic Acid B and Puerarin on Cerebral Ischemia Reperfusion Injury [J]. Molecules, 2018, 23(3): 564.
- [19] ZHOU SJ, ZHU WQ, ZHANG Y, et al. S100B promotes microglia M1 polarization and migration to aggravate cerebral ischemia [J]. Inflamm Res, 2018, 67(11 / 12): 937 - 949.
- [20] PARK DW, PARK SH, HWANG SK, et al. Serial measurement of S100B and NSE in pediatric traumatic brain injury [J]. Childs Nerv Syst, 2019, 35(2): 343 - 348.

(收稿日期:2021-02-25;修回日期:2021-09-28)

corresponding drugs or normal saline once a day for 10 d. The levels of interleukin-2 (IL-2) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum were measured by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The tumor was stripped and weighed, and the tumor inhibition rate was calculated. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the histopathology of tumor tissue. TUNEL staining was used to observe the apoptosis of H22 tumor cells. **Results** Compared with those in the group B, the weight of tumor in the groups C and D₁ decreased significantly ($P < 0.05$), the levels of serum IL-2 in the group D₁ and serum TNF- α in the groups D₁ and D₂ increased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the apoptosis rate in groups C, D₁ and D₂ increased significantly ($P < 0.01$), the tumor inhibition rates of mice in groups C, D₁, D₂ and D₃ were 53.26%, 36.85%, 10.29% and 2.18%, respectively. The tumor cells in group B were numerous and closely arranged, and the nuclei were deeply stained. In the groups C and D₁, the nuclei of tumor cells were pyknosis, the cytoplasm was loose, and apoptotic and necrotic tumor cells were observed. **Conclusion** The total alkaloids from Zanthoxyli Radix have an anti-tumor effect *in vivo*, and its mechanism may be related to improving cellular immune function and promoting the apoptosis of tumor cells.

Key words: Zanthoxyli Radix; total alkaloids; anti-tumor; interleukin-2; tumor necrosis factor- α ; apoptosis; mice

花椒根为芸香科花椒属植物花椒 *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. 的根, 收录于《本草纲目》《中华本草》《本草从新》等中药名著, 有散寒、除湿、止痛、杀虫等功效, 主治虚寒血淋、风湿痹痛、胃痛、牙痛、痔疮、湿疮、脚气、蛔虫病等症^[1]。花椒根含有多种生物碱类成分^[2-5], 民间曾用于宫颈癌的治疗。本研究中探讨了花椒根总生物碱对肿瘤细胞生长的抑制作用。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

仪器: DHG-9053A 型电热鼓风干燥箱(无锡玛瑞特科技有限公司); UV-8000 型紫外-可见分光光度计(上海元析仪器有限公司); Synergy H1 型多功能检测仪(美国 Biotek 公司); DMi8 型显微镜成像系统、EG150H+C 型自动组织包埋机、RM2255 型半自动轮转切片机(德国 Leica 公司); Multiskan Go 型全波长全自动多功能酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司); JK-6 型生物组织摊烤片机(武汉俊杰电子有限公司)。

试剂: 白屈菜红碱对照品(中国食品药品检定研究院, 批号为 111718-201402, 供含量测定用); D113 型大孔弱酸性苯乙烯系阳离子交换树脂(天津市津达正源节能环保科技有限公司); 溴甲酚绿(天津博迪化工股份有限公司); 氟尿嘧啶注射液(上海旭东海普药业有限公司, 批号为 FA151117); 白细胞介素 2(IL-2)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)小鼠酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(北京科盈美公司, 批号分别为 19052511、19062513); TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(批号为 031819190506)、Proteinase K(批号为 111318190402)购自上海碧云天生物技术有限公司; 其余试剂均为分析纯, 水为纯化水。花椒根药材, 采自广西壮族自治区南宁市武鸣区大明山, 经梧州市红十字会医院梁海雄副主任中药师鉴定为正品。

动物: H22 腹腔积液型种鼠, 雌雄各半, 购自广东省医学实验动物中心, 实验动物生产许可证号为 SCXK

(粤)2013-0002; SPF 级 KM 小鼠, 体质量 18~22 g, 雌雄各半, 购自广西医科大学动物实验中心, 实验动物生产许可证号为 SCXK(桂)2014-0002, 实验动物使用许可证号为 SYXK(桂)2014-0003。饲养温度 24~27℃, 相对湿度 40%~70%, 自然光照, 自由摄食饮水, 实验动物饲养及处理符合实验动物伦理学要求。

1.2 方法

1.2.1 供试品溶液制备^[6-7]

取药材样品 5.0 kg, 粉碎, 过 60 目筛, 加氨水搅拌并使其充分浸润, 放置 12 h 后, 加 8 倍量氯仿回流提取 3 次, 每次 2 h, 滤过, 回收溶剂, 浓缩成浸膏, 加 2% 盐酸溶液溶解, 过滤后滤液加氯仿溶液萃取, 弃去氯仿液, 酸水液过弱酸性阳离子交换树脂, 水洗至洗脱液近无色, 弃去水洗液, 15% 醋酸-80% 乙醇洗脱, 洗脱液回收, 浓缩, 干燥, 得花椒根总生物碱提取物(54.57%)。

质量控制: 参考文献[4]配制溴甲酚绿磷酸缓冲液, 以白屈菜红碱质量浓度(C)为横坐标、吸光度(A)为纵坐标进行线性回归, 得回归方程。采用紫外-可见分光光度法, 以白屈菜红碱为对照, 测定并分离所得花椒根总生物碱提取物中的生物碱类成分含量, 计算样品中总生物碱含量。

1.2.2 小鼠急性毒性实验^[8]

实验分为①组、②组、③组、④组、⑤组、⑥组, 各 10 只, 分别灌胃 1 000, 800, 640, 512, 410, 328 g/kg 花椒根总生物碱 1 次(每 10 g 体质量灌胃 0.2 mL)。记录 24 h 内小鼠死亡数量及死亡表现症状(见表 1), 经 Bliss 拟合计算半数致死浓度(LD_{50})。未死亡小鼠观察 14 d, 记录饮食、行为及体格变化。

表 1 小鼠急性毒性实验观察项目

Tab. 1 Observation items of the acute toxicity test in mice			
观察项目	表现症状	观察项目	表现症状
自主活动	减少、不喜活动	肌肉	震颤、抽搐、共济失调
行为反应	反应迟钝	皮肤	毛发竖立、肤色发绀
呼吸	抑制	死亡	挣扎、角弓反张、口吐白沫、大小便失禁

1.2.3 抗肿瘤活性

分组及给药:无菌条件下抽取传代第7天H22小鼠的腹腔积液,用生理盐水稀释成密度为 $5 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 的单细胞悬液。将60只KM小鼠随机分为正常对照组(A组,等体积生理盐水灌胃)、模型组(B组,等体积生理盐水灌胃)、阳性药物组(C组,氟尿嘧啶 20 mg/kg 腹腔注射)及花椒根总生物碱高、中、低剂量组(D_1 组、 D_2 组、 D_3 组, $100, 80, 40 \text{ g/kg}$ 生药灌胃),各10只。右上肢腋窝皮下注射 0.2 mL 细胞悬液以复制荷瘤小鼠模型,建模成功后各组小鼠给予相应药物或生理盐水,每天1次,连续10 d。

组织病理形态学:取瘤块,称定质量,置10%甲醛溶液中固定,常规病理包埋,切 $4 \mu\text{m}$ 厚片,苏木素-伊红(HE)染色,显微镜下观察组织病理形态学。细胞凋亡率计算:上述切片以Tunel法观察细胞凋亡情况。每组每个移植瘤组织随机拍摄3个视野,各视野图片用Image-Pro Plus 6.0软件统计,视野内细胞凋亡阳性表达占全视野的百分比为每张图片的细胞凋亡率^[9]。抑瘤率计算:摘眼球取血后颈椎脱臼处死小鼠,剥取瘤块,称定质量,计算抑瘤率(IR)。IR = (模型组平均瘤体质量 - 用药组平均瘤体质量) / 模型组平均瘤体质量 $\times 100\%$ 。

细胞因子水平:末次给药后24 h,记录各组小鼠体重,摘眼球取血, $3\,500 \text{ r/min}$ 离心 10 min ,分离,得血

清。以ELISA法检测小鼠血清中的IL-2和TNF- α 水平。

1.3 统计学处理

采用SPSS 16.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,行 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 急性毒性实验

①组、②组、③组、④组、⑤组、⑥组小鼠分别死亡7, 6, 2, 1, 0, 0只, LD_{50} 为 778.21 g/kg 。后续实验中的高、中、低剂量根据 $1/5, 1/10, 1/20 LD_{50}$ 设定,按调凑整原则生药量分别设定为 $100, 80, 40 \text{ g/kg}$ 。剩余未死亡小鼠继续观察14 d,各动物体表毛色正常,摄食、饮水、排泄及活动正常。

2.2 组织病理形态学

B组肿瘤细胞数目多,排列紧密,细胞核深染;C组、 D_1 组、 D_2 组、 D_3 组肿瘤细胞核固缩、胞质疏松,可见凋亡、坏死的肿瘤细胞。详见图1。

2.3 细胞凋亡

B组移植瘤凋亡细胞核呈棕色或黑色阳性表达,细胞核突出于细胞边缘,未凋亡细胞核为蓝色;C组、 D_1 组、 D_2 组移植瘤组织凋亡细胞显著增多,凋亡率显著升高($P < 0.01$)。详见表2和图2。

2.4 抑瘤率

与B组比较,C组及 D_1 组荷瘤小鼠瘤体质量显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);各用药组抑瘤率见表2。

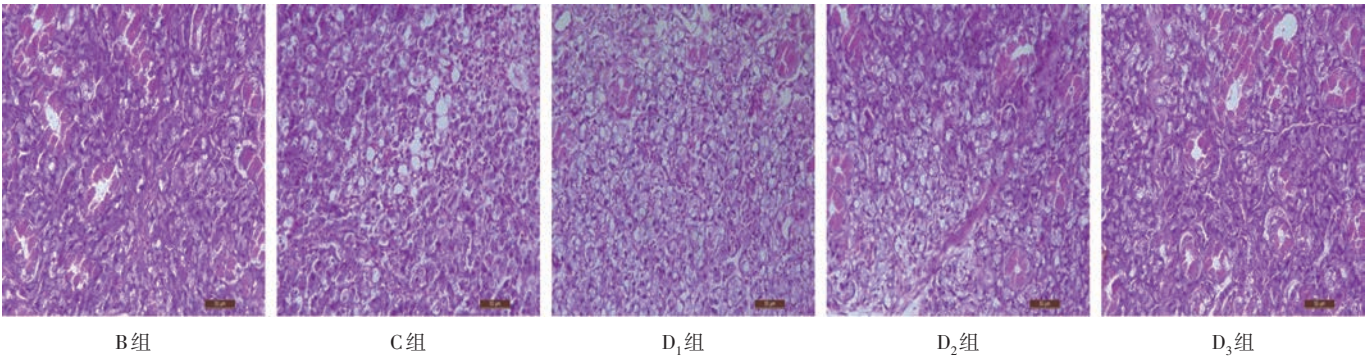


图1 各组小鼠肿瘤组织病理形态学变化(HE, $\times 200$)

Fig. 1 Histopathology of tumor tissue of mice in each group (HE staining, $\times 200$)

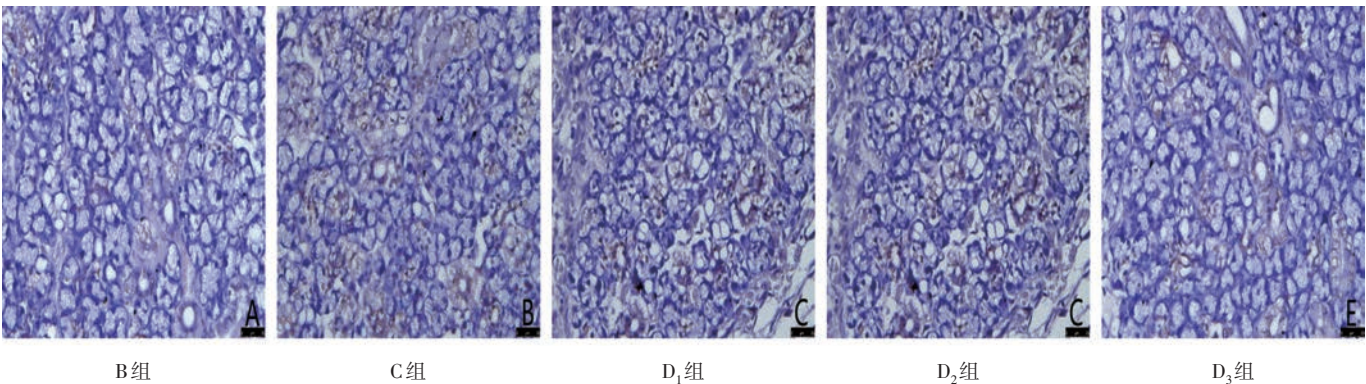


图2 各组小鼠移植瘤细胞凋亡情况(Tunel, $\times 400$)

Fig. 2 Apoptosis of transplanted tumor in each group (Tunel staining, $\times 400$)

表2 各组抑瘤率及细胞凋亡率比较($\bar{X} \pm s, n = 10$)

Tab. 2 Comparison of tumor inhibition rate and apoptosis rate in each group ($\bar{X} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (g/kg)	体质量(g)		瘤体质量 (g)	抑瘤率 (%)	细胞凋亡率 (%)
		实验前	实验后			
B组		21.03 ± 1.16	29.46 ± 4.80	1.87 ± 0.21		5.21 ± 1.16
C组	0.02	21.62 ± 2.05	26.37 ± 5.13 [*]	0.87 ± 0.38 ^{**}	53.26	18.57 ± 2.42 ^{**}
D ₁ 组	100	20.65 ± 1.37	29.75 ± 6.20	1.18 ± 0.64 [*]	36.85	17.66 ± 2.81 ^{**}
D ₂ 组	80	20.73 ± 1.21	30.08 ± 4.90	1.68 ± 0.71	10.29	10.08 ± 1.95 ^{**}
D ₃ 组	40	20.27 ± 1.33	30.71 ± 3.17	1.83 ± 0.59	2.18	6.47 ± 1.20

注:与B组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。表3同。

Note: Compared with those in group B, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (for Tab. 2 - 3).

表3 各组小鼠血清中IL-2和TNF- α 水平比较($\bar{X} \pm s, \text{pg/mL}, n = 10$)

Tab. 3 Comparison of serum IL-2 and TNF- α levels in each group ($\bar{X} \pm s, \text{pg/mL}, n = 10$)

组别	剂量(g/kg)	IL-2	TNF- α
A组		208.54 ± 24.55	101.33 ± 12.55
B组		132.37 ± 20.16 [#]	79.25 ± 5.81 [#]
C组	0.02	116.72 ± 22.34	103.57 ± 6.74 ^{**}
D ₁ 组	100	177.53 ± 21.68 [*]	118.05 ± 10.26 ^{**}
D ₂ 组	80	140.61 ± 20.04	109.23 ± 11.17 ^{**}
D ₃ 组	40	145.28 ± 21.36	88.46 ± 9.25

注:与A组比较,* $P < 0.01$ 。

Note: Compared with those in group A, * $P < 0.01$.

2.5 血清IL-2和TNF- α 水平

与A组比较,B组小鼠血清IL-2和TNF- α 水平均显著降低($P < 0.01$);与B组比较,D₁组小鼠血清IL-2水平显著升高($P < 0.05$),C组、D₁组及D₂组小鼠血清TNF- α 水平均显著升高($P < 0.01$)。详见表3。

3 讨论

本研究中计算出 LD_{50} ,为后续制剂研制剂量的设置提供了依据,其长期毒性还需进一步考察。抗肿瘤活性研究中,花椒根总生物碱高剂量组荷瘤小鼠瘤体质量显著减轻,结合HE及Tunel染色结果可见,花椒根总生物碱对H22移植瘤的生长有一定抑制作用。

IL-2是由辅助性T细胞1(Th1)分泌产生的参与免疫应答的重要细胞因子,对T细胞和自然杀伤细胞的增殖、活化具有良好的促进作用^[10];TNF- α 可促使肿瘤细胞的溶酶体破裂,释放出水解酶而使肿瘤细胞溶解,同时可参与IL-6,IL-8等细胞因子的激活而诱导肿瘤细胞凋亡^[11]。本研究结果显示,花椒根总生物碱高剂量组小鼠血清IL-2水平明显升高,花椒根总生物碱高、中剂量组小鼠血清TNF- α 水平均明显

升高,说明花椒根总生物碱可能通过调节血清中IL-2和TNF- α 水平来增强机体的免疫应答能力,促进其抗肿瘤活性。

肿瘤细胞增殖与凋亡失衡决定了肿瘤的生长速率。细胞凋亡即细胞程序性死亡,诱导肿瘤细胞凋亡是当前抗肿瘤药研发的重要策略之一^[12]。本研究中花椒根总生物碱干预后细胞凋亡率明显升高,表明花椒根总生物碱具有促进肿瘤细胞凋亡的作用,其激活凋亡途径而最终促进细胞凋亡的机制尚待进一步研究。

综上所述,花椒根总生物碱具有体内抗肿瘤作用,其机制可能与增强机体细胞免疫功能及促进肿瘤细胞凋亡有关。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局. 中华本草(第四册)[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:984.
- [2] 任丽娟,谢凤指. 花椒根的生物碱研究[J]. 药学报,1981,16(9):672-677.
- [3] PLAZAS E, HAGENOW S, MURILLO MA, et al. Isoquinoline alkaloids from the roots of *Zanthoxylum rigidum* as multi-target inhibitors of cholinesterase, monoamine oxidase A and A β 1-42 aggregation[J]. Bioorg Chem, 2020, 98(5): 103-109.
- [4] WANG C, FAN L, TIAN M, et al. Cytotoxicity of benzophenanthridine alkaloids from the roots of *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. var. *fastuosum* How ex Huang[J]. Nat Prod Res, 2015, 29(14): 1380-1383.
- [5] FU Y, GUO J, XIE Y, et al. Structural characterization, antiproliferative and anti-inflammatory activities of alkaloids from the roots of *Zanthoxylum austrosinense* [J]. Bioorg Chem, 2020, 102(1): 104-109.
- [6] 龙盛京,卢凌春. 阳离子交换树脂分离纯化氯化两面针碱的方法:中国,201010100732. X[P]. 2010-01-26.
- [7] 石雪萍,张宇思. 酸性染料比色法测定花椒总生物碱的含量[J]. 中国野生植物资源,2008,27(6):62-64.
- [8] 陈奇. 中药药理研究方法学(第三版)[M]. 北京:人民卫生出版社,2011:28.
- [9] 李亚玲,董娟娟,李俊杰,等. 敦煌平胃丸对人胃癌细胞株SCG-7901裸鼠移植瘤的抑制作用[J]. 中成药,2020,42(12):3289-3292.
- [10] SPOLSKI R, LI P, LEONARD WJ. Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy[J]. Nat Rev Immunol, 2018, 18(10): 648-659.
- [11] FERNÁNDEZ - RUIZ M, AGUADO JM. Risk of infection associated with anti-TNF- α therapy[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2018, 16(12): 939-956.
- [12] 周姝,白冰,张宗敏,等. 雌激素对人肝癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国老年学杂志,2020,40(18):3927-3932.

(收稿日期:2021-04-29;修回日期:2021-10-22)