

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.02.011

## 积雪草酸抗肿瘤机制初步研究\*

陈金元<sup>1</sup>, 徐宏<sup>1,2,Δ</sup>, 宫丽<sup>2</sup>, 苏华<sup>3</sup>, 曾宪彪<sup>3</sup>

(1. 广东省深圳市龙华区人民医院胃肠外科, 广东 深圳 518110; 2. 广东省深圳市龙华区人民医院药学部, 广东 深圳 518110; 3. 广西壮族自治区中医药研究院, 广西 南宁 530022)

**摘要:**目的 探讨积雪草酸的抗肿瘤机制。方法 制备0.2 mL瘤细胞悬液,分别接种于小鼠左下腹腹腔及右上肢腋部皮下以复制腹水瘤及实体瘤小鼠模型,建模成功后,均随机分为模型组(等体积生理盐水)、5-氟尿嘧啶组(123.3 mg/kg)及积雪草酸高、中、低剂量组(100,75,50 mg/kg)。灌胃生理盐水或相应药物(每10 g体质量0.2 mL),每天1次,连续10 d。记录腹水瘤模型实验中小鼠体质量增长情况,生存时间,计算体质量增长率及生命延长率;记录实体瘤模型实验中小鼠体质量、瘤体质量、脏器质量,计算抑瘤率(IR)、脾脏指数、肝脏指数及胸腺指数;苏木素-伊红染色,观察小鼠瘤体及脾脏组织病理形态,分别采用免疫组织化学法和Western blot法检测小鼠瘤体中热休克蛋白90(Hsp90)、血管内皮生长因子C(VEGF-C)、淋巴管内皮透明质酸受体1(LYVE-1)蛋白表达水平。**结果** 腹水瘤小鼠模型实验中,与模型组比较,各给药组小鼠体质量增长均较缓慢、生存时间均显著延长( $P < 0.05$ ),积雪草酸高剂量组尤为显著。实体瘤模型小鼠实验中,与模型组比较,5-氟尿嘧啶组和积雪草酸高剂量组小鼠脾脏质量均显著减轻,脾脏指数均显著降低,IR均超过70.00%,瘤体Hsp90,VEGF-C,LYVE-1蛋白表达水平均显著降低( $P < 0.05$ );各给药组小鼠瘤体质量均显著减轻( $P < 0.01$ );5-氟尿嘧啶组和积雪草酸高剂量组小鼠脾脏髓质结构完整,实体瘤细胞胞核固缩、胞质减少,可见凋亡、坏死的瘤细胞。**结论** 积雪草酸具有一定的抗肿瘤作用,其机制与调控Hsp90、LYVE-1、VEGF-C蛋白表达相关。

**关键词:**积雪草酸;腹水瘤;实体瘤;小鼠;抗肿瘤;作用机制

中图分类号:R932;R285.5

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2023)02-0043-05

### Anti-Tumor Mechanism of Asiatic Acid

CHEN Jinyuan<sup>1</sup>, XU Hong<sup>1,2</sup>, GONG Li<sup>2</sup>, SU Hua<sup>3</sup>, ZENG Xianbiao<sup>3</sup>

(1. Department of Gastrointestinal Surgery, Longhua District People's Hospital, Shenzhen, Guangdong, China 518110; 2. Department of Pharmacy, Longhua District People's Hospital, Shenzhen, Guangdong, China 518110; 3. Guangxi Institute of Chinese Medicine & Pharmaceutical Science, Nanning, Guangxi, China 530022)

**Abstract: Objective** To investigate the anti-tumor mechanism of asiatic acid. **Methods** Tumor cell suspension (0.2 mL) was prepared and subcutaneously inoculated in the left lower abdominal cavity and right upper arm of mice to duplicate ascites tumor and solid tumor mice models. After successful modeling, the mice were randomly divided into the model group (equal volume of normal saline), 5-fluorouracil group (123.3 mg/kg) and high-, medium- and low-dose asiatic acid groups (100, 75, 50 mg/kg), the mice in each group were given normal saline or corresponding drugs (0.2 mL/10 g) by gavage once a day for 10 d. The growth of body mass and survival time of mice in the ascites tumor model experiment were recorded, and the growth rate of body mass and life extension rate were calculated. The body mass, tumor mass and organ mass of mice in the solid tumor model experiment were recorded, and the tumor inhibition rate (IR), and the spleen index, liver index and thymus indexes were calculated. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the pathological morphology of tumor body and spleen tissue of mice. The expression levels of heat shock protein 90 (Hsp90), vascular endothelial growth factor C (VEGF-C), and lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor 1 (LYVE-1) protein in the solid tumor were detected by immunohistochemistry and Western blot respectively. **Results** In the experiment of model mice with ascites tumors, compared with those in the model group, the body mass of mice increased slowly and the survival time of mice was significantly prolonged in each treatment group ( $P < 0.05$ ), especially in the high-dose asiatic acid group. In the experiment of model mice with solid tumors, compared with those in the model group, the spleen mass and spleen index of mice reduced significantly, the IR was more than 70.00%, and the levels of Hsp90, VEGF C, and LYVE-1 protein in the solid tumor reduced significantly in the 5-fluorouracil group and the high-dose asiatic acid group ( $P < 0.05$ ), the tumor mass of mice in each treatment group reduced significantly ( $P < 0.01$ ), the structure of spleen medulla of mice was complete, the nucleus of solid tumor cells was pyknotic, the cytoplasm reduced, and apoptotic and necrotic tumor cells were visible in 5-fluorouracil group and high-dose asiatic acid group. **Conclusion** Asiatic acid has a certain anti-tumor effect, and its mechanism is related to regulating the expression of Hsp90, LYVE-1 and VEGF-C proteins.

**Key words:** asiatic acid; ascites tumor; solid tumor; mice; anti-tumor; mechanism

\*基金项目:广东省深圳市龙华区医疗卫生机构区级科研项目[2020059]。

第一作者:陈金元,男,博士,副主任医师,研究方向为消化道肿瘤的诊治,(电子信箱)534898952@qq.com。

Δ通信作者:徐宏,女,硕士,主管药师,研究方向为肿瘤临床药学,(电子信箱)hxclx.cool@163.com。

积雪草酸属乌苏烷型五环三萜酸,存在于多种植物中,主要用于治疗皮肤创伤和慢性溃疡。随着对积雪草酸药理活性的深入研究,发现其在抗阿尔茨海默病<sup>[1]</sup>、护肝<sup>[2]</sup>和抗肝纤维化<sup>[3]</sup>、抗肿瘤<sup>[4-5]</sup>等方面也具有显著作用。目前对于积雪草酸抑制腹水癌S180细胞的靶点和机制理论研究尚未成熟。为此,本研究中以S180荷瘤小鼠为研究对象,观察肿瘤增殖相关的热休克蛋白90(Hsp90)和淋巴管相关蛋白血管内皮生长因子(VEGF-C)、淋巴管内皮透明质酸受体1(LYVE-1)的表达,初步探讨积雪草酸抑制肿瘤增殖及转移的作用机制。现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器、试剂与动物

仪器:FA1004型上皿电子天平(上海精科仪器有限公司);JCS-2000型电子天平(凯丰集团有限公司);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:积雪草酸(上海谱振生物科技有限公司,批号为KLM211106);5-氟尿嘧啶注射液(上海旭东海普药业有限公司,批号为20200902);Anti-LYVE1抗体(批号为ab218535)、Anti-Hsp90抗体(批号为ab203126)、Anti-VEGF-C抗体(批号为ab9546),均购自英国Abcam公司;羊血清(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号为20110601);苏木素-伊红(HE)染液(北京雷根生物技术有限公司,批号为0603A20);台盼蓝染液(美国Sigma公司,批号为T6146)。

动物:S180腹水型小鼠2只,雌性,9~10周龄,体质量25~30g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(京)2019-0008。SPF级KM小鼠110只,体质量18~22g,雌雄各半,购自长沙市天勤生物技术有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(湘)2019-0014,实验动物使用许可证号SYXK(桂)2016-0006。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 腹水瘤模型小鼠实验

瘤细胞悬液制备:抽取S180腹水型小鼠乳白色腹水0.5mL,加等量0.4%台盼蓝染液染色2~3min,用生理盐水稀释成细胞密度为 $1 \times 10^6$ /mL的瘤细胞悬液。

建模、分组及给药:取60只KM小鼠,将0.2mL瘤细胞悬液接种于小鼠左下腹腹腔以复制腹水瘤模型小鼠;建模成功后,随机分为模型组(A组,等体积生理盐水),

5-氟尿嘧啶组(B组,123.3mg/kg),积雪草酸高、中、低剂量组(C<sub>1</sub>,C<sub>2</sub>,C<sub>3</sub>组,100,75,50mg/kg),各12只。灌胃给予生理盐水或相应药物(每10g体质量0.2mL),每天1次,连续10d。

观察指标:自建模成功起,隔天记录小鼠体质量,分析小鼠体质量增长情况,并记录各组小鼠的生存时间、中位生存时间,计算体质量增长率及生命延长率。体质量增长率(%)=(实验末小鼠体质量-实验初小鼠体质量)/实验初小鼠体质量×100%;生命延长率(%)=(给药组小鼠生存时间-模型组小鼠生存时间)/模型组小鼠生存时间×100%。

#### 1.2.2 实体瘤模型小鼠实验

建模、分组及给药:取50只KM小鼠,将0.2mL上述瘤细胞悬液接种于小鼠右上肢腋部皮下以复制实体瘤模型小鼠,建模成功后,按1.2.1项下方法分组(分为D组,E组,F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>、F<sub>3</sub>组)及给药,每组10只。

观察指标:1)末次给药后1h眼球取血后颈椎脱臼处死小鼠,摘取其实体瘤、胸腺、脾脏、肝脏并称定质量,计算胸腺、脾脏、肝脏的脏器指数,并计算抑瘤率(IR)。脏器指数=脏器质量/处死前小鼠体质量×100%;IR(%)=(模型组小鼠瘤质量-给药组小鼠瘤质量)/模型组小鼠平均瘤质量×100%。2)取小鼠瘤体及脾脏组织,置10%福尔马林中固定,常规包埋,切片(4μm厚),脱蜡复水,HE染色,显微镜下观察其病理形态变化。3)采用免疫组织化学法(IHC)检测小鼠瘤体中Hsp90(抗体稀释比1:500,V/V)、LYVE-1(抗体稀释比1:500,V/V)、VEGF-C(抗体稀释比1:1000,V/V)蛋白表达水平。常规病理切片(4μm),脱蜡复水,放入0.01mol/L柠檬酸钠缓冲液中,以微波中火抗原修复2次(每次5min),冷却至室温,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗3次(每次2min),5%山羊血清室温封闭1h后,4℃一抗孵育过夜,用PBS冲洗3次,室温孵育二抗0.5h,PBS冲洗3次,DAB显色、水洗,Mayer苏木素复染、水洗,梯度脱水过二甲苯后树胶封片,显微镜下观察其病理形态。4)采用Western blot法检测小鼠瘤体中Hsp90(1:10000,V/V)、LYVE-1(1:1000,V/V)、VEGF-C(1:2000,V/V)蛋白表达水平。提取总蛋白,以BCA法测定蛋白含量。每孔取30μg总蛋白,经SDS-PAGE电泳分离后转至PVDF膜。5%脱脂奶粉室温封闭1h后,4℃一抗孵育过夜,三乙醇胺缓冲盐溶液+吐温20(TBST)洗膜,室温孵育二抗1h。ECL化学发光,成像后用Image J分析各条带吸光度值,计算各条带与内参(GAPDH)条带吸光度的比值。

### 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;计数资料以率(%)表示,行 $\chi^2$ 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 腹水瘤小鼠模型实验结果

小鼠体质量增长情况:A组小鼠腹部增大较快,体质量因腹水增加增长也较快。各给药组小鼠腹水增加较缓慢,故体质量增长较缓,当小鼠体质量达到平台期后不再继续增长,个别小鼠甚至出现体质量减轻现象。详见图1。

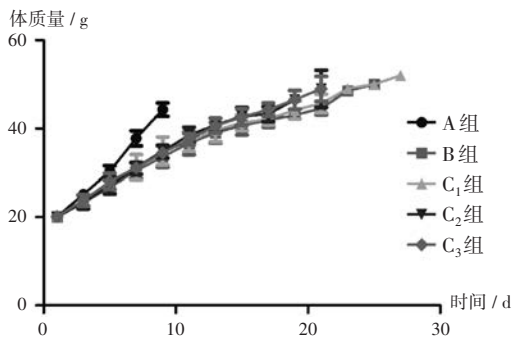


图1 小鼠体质量增长情况

Fig.1 Growth of body mass in mice

小鼠生存时间及生命延长率:A组小鼠最先出现个体死亡。与A组比较,各给药组小鼠生存时间显著延长( $P < 0.05$ );其中,C<sub>1</sub>组小鼠的生存时间和中位生存时间最长,生命延长率最高。详见图2、表1。

### 2.2 实体瘤小鼠模型实验结果

小鼠脏器、实体瘤指数:D组小鼠脾脏肥大,脾脏指数较高。与D组比较,E组和F<sub>1</sub>组小鼠脾脏质量均显著减轻,脾脏指数均显著降低( $P < 0.05$ );E组和F<sub>1</sub>,F<sub>2</sub>,F<sub>3</sub>组小鼠瘤体质量均显著减轻( $P < 0.01$ )。5-氟尿嘧啶和高剂量积雪草酸的IR达71.21%及70.36%。详见表2、图3。

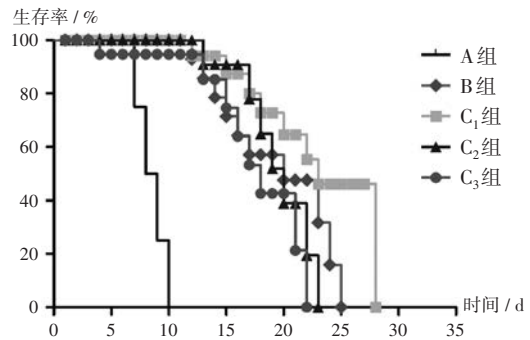


图2 小鼠生存情况分析

Fig.2 Survival status of mice

表1 各组小鼠生存时间及生命延长率比较( $n = 12$ )

Tab.1 Comparison of survival time and life extension rate of mice in each group ( $n = 12$ )

组别	生存时间( $\bar{X} \pm s, d$ )	中位生存时间(d)	生命延长率(%)
A组	8.00 ± 1.13	8.5	
B组	18.83 ± 4.84**	20.0	135.42
C <sub>1</sub> 组	20.08 ± 4.34**	23.0	151.04
C <sub>2</sub> 组	18.17 ± 3.04**	20.0	127.08
C <sub>3</sub> 组	16.08 ± 4.54**	18.0	101.04

注:与A组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

Note:Compared with those in group A,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ .

表2 各组小鼠脏器指数及抑瘤率比较( $\bar{X} \pm s, n = 10$ )

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

组别	脾脏指数	胸腺指数	肝脏指数	瘤体质量(g)	IR(%)
D组	0.44 ± 0.11	0.11 ± 0.02	4.57 ± 0.27	1.50 ± 0.24	
E组	0.36 ± 0.04*	0.13 ± 0.03	4.73 ± 0.51	0.43 ± 0.13##	71.21
F <sub>1</sub> 组	0.36 ± 0.04*	0.12 ± 0.02	4.58 ± 0.39	0.44 ± 0.08##	70.36
F <sub>2</sub> 组	0.39 ± 0.09	0.13 ± 0.04	4.56 ± 0.65	0.76 ± 0.24##	48.99
F <sub>3</sub> 组	0.39 ± 0.07	0.13 ± 0.04	4.65 ± 0.33	0.89 ± 0.17##	40.32

注:与D组比较,\* $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$ 。图9同。

Note:Compared with those in group D,\* $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$  (for Tab.2 and Fig.9).

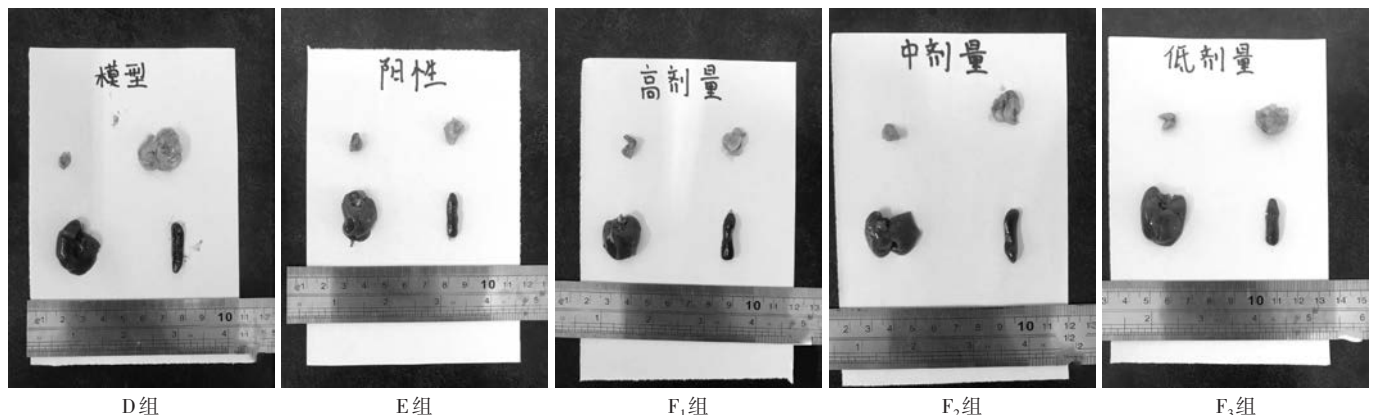


图3 小鼠脏器及实体瘤形态

Fig.3 Morphology of organs and solid tumors in mice

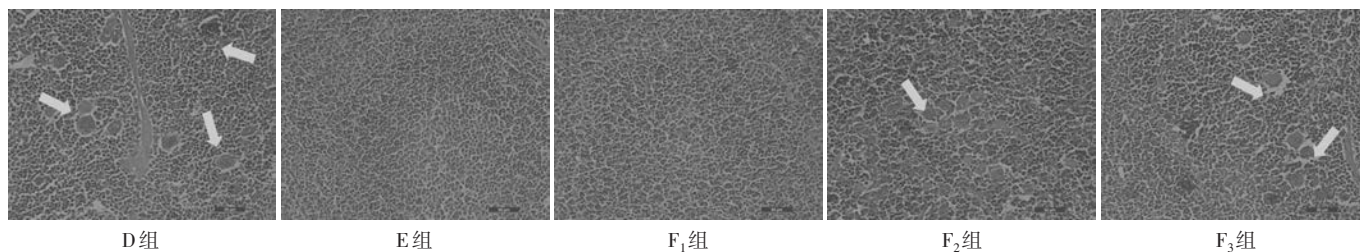


图4 小鼠脾脏组织形态(HE, × 200)

Fig. 4 Histomorphology of spleen in mice (HE, × 200)

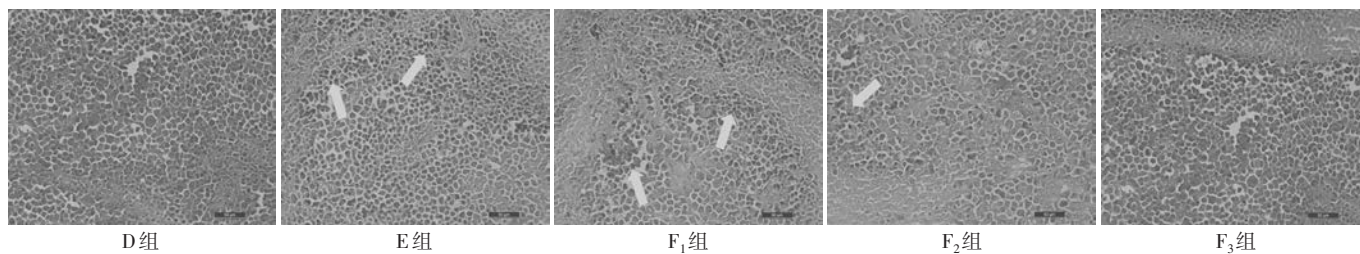


图5 小鼠实体瘤组织形态(HE, × 200)

Fig. 5 Histomorphology of solid tumor in mice (HE, × 200)

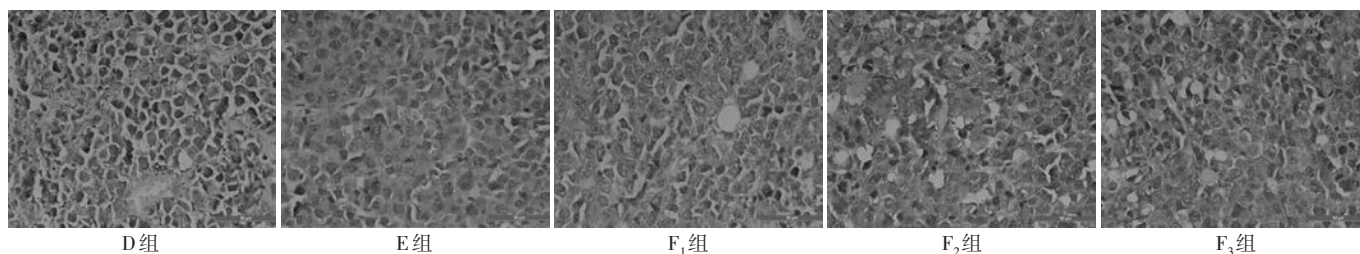


图6 小鼠Hsp90蛋白表达情况(× 400)

Fig. 6 Expression levels of Hsp90 protein in mice (× 400)

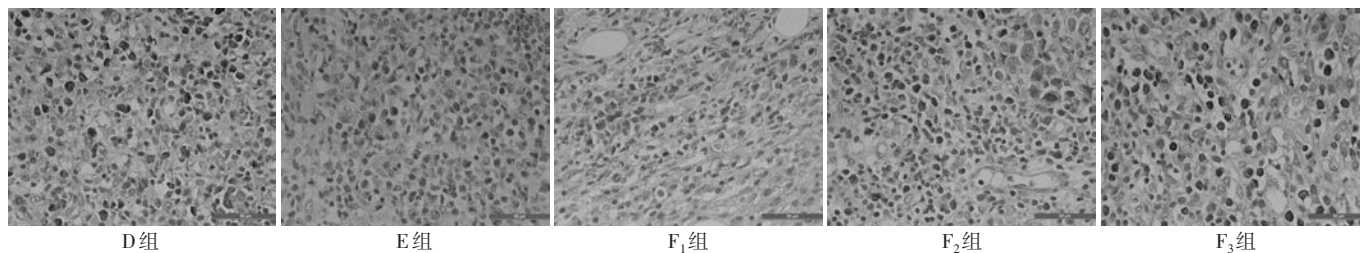


图7 小鼠VEGF-C蛋白表达情况(× 400)

Fig. 7 Expression levels of VEGF-C protein in mice (× 400)

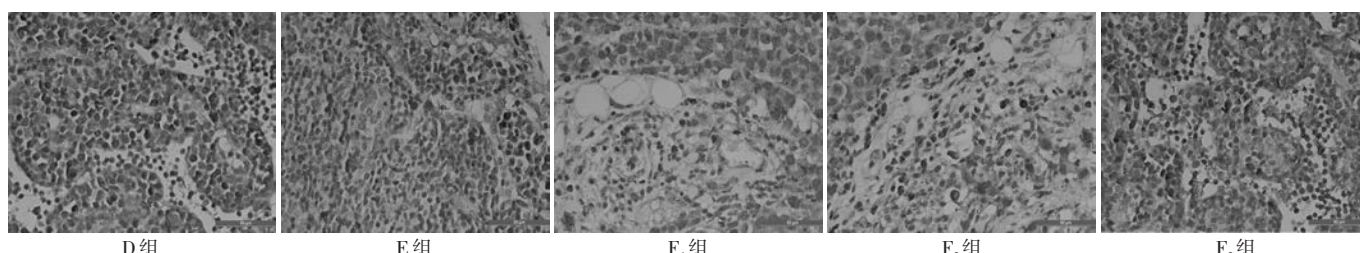


图8 小鼠LYVE-1蛋白表达情况(× 400)

Fig. 8 Expression levels of LYVE-1 protein in mice (× 400)

小鼠脾脏及瘤体病理形态:D组、F<sub>2</sub>组及F<sub>3</sub>组小鼠脾脏内可见肿瘤细胞转移浸润,E组和F<sub>1</sub>组小鼠脾脏髓质结构完整,少/未见肿瘤细胞转移浸润。详见图4。D组小鼠实体瘤组织细胞核呈蓝色,细胞质呈玫红色,细胞形态规圆,数目多,排列紧密。E组和F<sub>1</sub>组小鼠实体瘤细胞胞核固

缩、胞质减少,可见凋亡、坏死的瘤细胞。详见图5。

小鼠瘤体Hsp90、LYVE-1、VEGF-C蛋白表达情况:D组小鼠瘤体Hsp90、VEGF-C、LYVE-1蛋白表达水平较高;与D组比较,E组和F<sub>1</sub>组小鼠瘤体Hsp90、VEGF-C、LYVE-1蛋白表达水平均显著降低

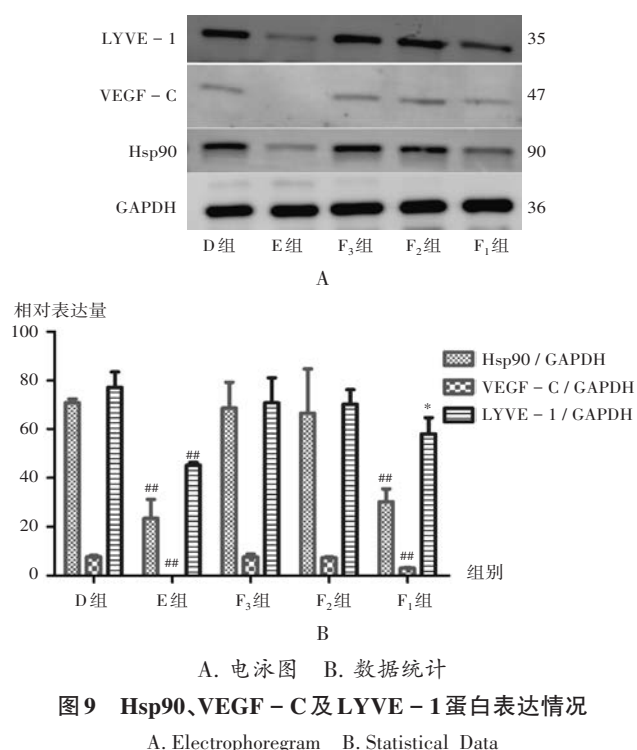


图9 Hsp90、VEGF - C及LYVE - 1蛋白表达情况

A. Electrophoregram B. Statistical Data

Fig. 9 Expression of Hsp90, VEGF - C and LYVE - 1 protein of mice ( $P < 0.05$ ). 详见图6至图9。

### 3 讨论

热休克蛋白是一类在应激状态下序列高度保守的蛋白质,按分子量大小分为不同家族,其中Hsp90是目前研究较广泛的成员之一<sup>[6]</sup>。有研究表明,Hsp90在多种恶性肿瘤中高度表达,其处于多种细胞信号通路的上游,通过改变下游蛋白的构象来调节靶蛋白的功能和活性,进而影响恶性肿瘤细胞的增殖<sup>[7]</sup>,与肿瘤发生发展及预后密切相关<sup>[8]</sup>,是现阶段恶性肿瘤治疗的靶标之一<sup>[9]</sup>。

小鼠脾脏病理形态结果显示,腋下接种S180细胞瘤细胞悬液后,脾脏呈肿瘤细胞转移浸润。肿瘤转移是指恶性肿瘤细胞从原发部位经淋巴管、血管或体腔等途径,到达其他部位继续生长,浸润和转移是恶性肿瘤的重要生物学特征,淋巴管生成是实体肿瘤转移的最早途径之一。有研究表明,VEGF家族参与了淋巴管的生长过程,其中VEGF - C是最先被确认为介导淋巴管新生的生长调节因子,与其受体相互作用后,可发挥脉管系统发生和维持的调节作用<sup>[10]</sup>。在肿瘤组织中,VEGF - C介导淋巴管生成,可促进肿瘤细胞的播散及向区域淋巴结转移,此外也能促进淋巴内皮细胞增殖,降低内皮细胞间的黏附力,从而增强淋巴管的通透性,为肿瘤细胞的侵入和浸润创造环境<sup>[11]</sup>。LYVE - 1是一种主要表达于淋巴管的新型透明质酸受体,特异性好,仅在淋巴管内皮表达,属较可靠的淋巴管内皮细胞标志物<sup>[12 - 13]</sup>。有研究显示,应用LYVE - 1多克隆抗体标记

并计数淋巴管,可用于评价淋巴管密度与肿瘤淋巴转移的关系<sup>[14]</sup>。因此,检测淋巴管相关指标VEGF - C, LYVE - 1能说明积雪草酸抑制肿瘤转移的作用靶点。本研究中,与模型组比较,积雪草酸高剂量组瘤体Hsp90, VEGF - C, LYVE - 1蛋白表达水平均显著降低。

综上所述,积雪草酸具有一定的抗肿瘤作用,其机制与调控Hsp90、LYVE - 1、VEGF - C蛋白表达有关。

### 参考文献

- [1] 赵梦蝶,耿 骥,郭文洁,等. 积雪草酸对MPTP诱导小鼠帕金森样运动症状的影响[J]. 中成药,2018,40(1):33 - 39.
- [2] 赵 赶,吕淑娟,韦 刚,等. 委陵菜积雪草酸对大鼠酒精性肝损伤的保护作用[J]. 中国中药杂志,2015,40(14):2866 - 2870.
- [3] 杨 光,谭家驹,何瑞华,等. 积雪草酸阻断大鼠肝纤维化的实验研究[J]. 中国中医基础杂志,2009,15(7):540 - 542.
- [4] 吕婷婷,刘 芳,陈 燕,等. 积雪草酸对多发性骨髓瘤细胞增殖活性的影响及其机制探讨[J]. 中草药,2010,41(9):1484 - 1488.
- [5] 殷 悦,邹 勇,程彬彬. 积雪草酸对人肝癌SMMC - 7721细胞增殖、迁移及凋亡的影响[J]. 中医药导报,2019,25(20):80 - 83.
- [6] 孔德欣,黄 薇,杨 楠,等. 多肽P7对肿瘤组织的靶向识别与Hsp90表达水平相关[J]. 基础医学与临床,2021,41(7):982 - 987.
- [7] HOTER A, EL - SABBAN ME, NAIM HY. The HSP90 Family: Structure, Regulation, Function, and Implications in Health and Disease[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(9):2560.
- [8] SAINI J, SHARMA PK. Clinical, Prognostic and Therapeutic Significance of Heat Shock Proteins in Cancer[J]. Curr Drug Targets, 2018, 19(13):1478 - 1490.
- [9] DONG L, XUE L, ZHANG C, et al. HSP90 interacts with HMGCR and promotes the progression of hepatocellular carcinoma[J]. Mol Med Rep, 2019, 19(1):524 - 532.
- [10] XU Y, YUAN L, MAK J, et al. Neuropilin - 2 mediates VEGF - C - induced lymphatic sprouting together with VEGFR3 [J]. J Cell Biol, 2010, 188(1):115 - 130.
- [11] PAK KH, PARK KC, CHEONG JH. VEGF - C induced by TGF -  $\beta_1$  signaling in gastric cancer enhances tumor - induced lymphangiogenesis[J]. BMC Cancer, 2019, 19(1):799.
- [12] KARINEN S, HUJANEN R, SALO T, et al. The prognostic influence of lymphatic endothelium - specific hyaluronan receptor 1 in cancer: A systematic review[J]. Cancer Sci, 2022, 113(1):17 - 27.
- [13] HARA Y, TORII R, UEDA S, et al. Inhibition of tumor formation and metastasis by a monoclonal antibody against lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1 [J]. Cancer Sci, 2018, 109(10):3171 - 3182.
- [14] 吴 媛,郭俊俊,李恩孝,等. 乳腺癌患者血清与肿瘤组织VEGF - C表达和淋巴管密度的生物学意义[J]. 中华肿瘤防治杂志,2011,18(8):588 - 591.

(收稿日期:2022 - 04 - 25;修回日期:2022 - 08 - 12)