

· 基础研究 ·

闽产重瓣铁线莲总皂苷对人食管癌 EC-9706
细胞荷瘤裸鼠抗肿瘤作用朱扶蓉¹ 邓元荣¹ 何舒澜¹ 徐驯宇²

摘要 目的 研究闽产重瓣铁线莲总皂苷 (CTS) 对人食管癌 EC-9706 细胞荷瘤裸鼠抗肿瘤活性。
方法 Bliss 法测定总皂苷半数致死量 (LD_{50})。采用人食管癌 EC-9706 细胞悬液 (2×10^6 个/mL) 移植于 BALB/c 裸鼠右前肢腋窝皮下建立移植性实体瘤实验动物模型, 取 BALB/c 小鼠 50 只, 随机分为 5 组, 即 CTS 高、中、低剂量组 (1.80、0.90、0.45 mg/kg), 模型组 (等体积生理盐水) 和环磷酰胺 (CTX) 组 (CTX, 20 mg/kg), 每组 10 只, 各组给药每日 1 次。闽产 CTS 连续给药 25 d 后处死动物, 以瘤重和抑瘤率为指标观察对肿瘤的抑制作用, 以免疫器官脏器指数为指标观察对荷瘤机体免疫功能的影响, 显微镜下观察瘤体组织病理改变。体外抗肿瘤观察采用 PI 染色法, 使用流式细胞仪检测实体瘤细胞周期和凋亡率。**结果** CTS LD_{50} 为 18.3 mg/kg, 能显著抑制荷瘤裸鼠的肿瘤生长, 抑瘤率最高达 42.46%, 可有效提高裸鼠脾脏指数 ($P < 0.05$), 但对胸腺指数无影响 ($P > 0.05$), 病理结果表明对肿瘤组织具有显著的抑制作用。流式观察结果表明, CTS 能显著抑制实体瘤细胞的增殖且呈剂量依赖性, 随着浓度增加, 实体瘤细胞凋亡率由 0 升高至 32.42% ($P < 0.05$)。**结论** 闽产 CTS 具有显著的体内抗肿瘤活性。

关键词 重瓣铁线莲; 总皂苷; 抗肿瘤; 人食管癌 EC-9706 细胞

Antitumor Effect of Total Saponins from *Clematis Florida* Var. *Plena* D. on Xenograft Tumors Derived from Human Esophageal Carcinoma Cell Line EC9706 in Nude Mice ZHU Fu-rong¹, DENG Yuan-rong¹, HE Shu-lan¹, and XU Xun-yu² 1 Department of Pharmacy, Fujian Health College, Fuzhou (350101); 2 Department of Thoracic Surgery, Fujian Provincial Hospital, Provincial Clinical Medical College of Fujian Medical University, Fuzhou (350001)

ABSTRACT Objective To study the anti-tumor activity of total saponins from *Clematis florida* var. *plena* D. (CTS) on xenograft tumors derived from human esophageal carcinoma cell line EC9706 in nude mice.
Methods The median lethal dose (LD_{50}) of total saponins on the mice was determined by Bliss method. EC-9706 cells (2×10^6 cells/mL) were transplanted into BALB/C nude mice to establish experimental animal models. Totally 50 BALB/C mice were selected and randomly divide into 5 groups, ie, CTS high, medium and low dose groups (1.80, 0.90, 0.45 mg/kg), model group (equal volume of saline) and cyclophosphamide (CTX) group (CTX, 20 mg/kg), 10 rats in each group, each group was administered once a day. The nude mice were sacrificed after continuous administration for 25 days, the tumor weight and inhibition rate were detected, the index of immune organs was used to evaluate immune function of CTS on tumor-bearing organisms, and the pathological changes of tumors were observed. The apoptotic rate of tumors cells was detected by flow cytometry. **Results** The LD_{50} of CTS on mice was 18.3 mg/kg. The growth of the xenograft tumors in nude mice were inhibited by CTS, with a inhibition rate of up to 42.46%. The spleen index of the CTS groups was increased ($P < 0.05$), while no significant difference was observed in the thymus index ($P > 0.05$). The results of

基金项目: 福建省卫计委中青年骨干人才培养项目 (No. 2016-ZQN-75)

作者单位: 1. 福建卫生职业技术学院药理学系 (福州 350101); 2. 福建省立医院胸外科, 福建医科大学省立临床医学院 (福州 350001)

通讯作者: 徐驯宇, Tel: 0591-88217453, E-mail: xunyu@126.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20210209.009

pathological section showed that CTS had a significant inhibitory effect on tumor tissues. Flow cytometry results showed that CTS could significantly inhibit tumor cell proliferation in a dose-dependent manner, with the increase in concentration, the apoptosis rate of CTS cells increased from 0 to 32.42% ($P < 0.05$). **Conclusion** CTS has significant anti-tumor activity *in vivo*.

KEYWORDS *Clematis florida* var. *plena* D; total saponins; anti-tumor; human esophageal squamous cell carcinoma

重瓣铁线莲 (*Clematis florida* var. *plena* D.) 又名“十二时辰”, 毛茛科铁线莲属, 属铁线莲属中的栽培变种, 盛产于福建省闽东区域^[1], 是畲族民族药, 常以根或根茎部入药, 《中华本草》记载重瓣铁线莲的根具有理气通络、利尿、通便、解毒等功效, 书中另载《滇南本草》最早记载“治反胃呕吐, 饮食胸膈饱胀, 胃口疼痛, 吞酸吐痰”的药学价值^[2]。植物化学成分包含氨基酸、蛋白质、糖类、皂苷类、生物碱、黄酮类、有机酸、挥发油等^[3], 药理基础研究发现其具有抗肿瘤等作用而使该属植物备受关注^[4]。闽产重瓣铁线莲提取物总皂苷 (total saponins from *Clematis florida* var. *plena* D, CTS) 对多种肿瘤细胞增殖有一定抑制作用^[5], 本研究采用人食管癌 EC-9706 细胞移植至裸鼠体内制成移植实体瘤实验动物模型, 观察 CTS 对荷瘤裸鼠的抗肿瘤作用, 并对其体内外抗肿瘤机制初步摸索, 为开发应用这一畲族民族药奠定良好基础。

材料与方 法

1 实验动物 清洁级 ICR 小鼠 100 只, 1.5 月龄, 雌雄各半, 体质量 18.0~22.0 g, 质量合格证号: 2015000528589; SPF 级 BALB/c 裸小鼠 50 只, 1.5 月龄, 雌雄各半, 体质量 18.0~22.0 g, 质量合格证号: 2015000524030。动物均购于上海斯莱克实验动物有限责任公司, 生产许可编号: SCXK (沪) 2012-0002, 饲养于福建卫生职业技术学院 SPF 级动物实验室, 使用许可证编号: SYXK (闽) 2012-0006, 温度 (20 ± 3) °C, 湿度 (55 ± 5) %, 雌雄分笼饲养, 自由饮食, 适应性饲养 3 d。本实验通过福建卫生职业技术学院实验动物伦理委员会审查 (No. DW2015-0006)。

2 人食管癌细胞株 人食管癌 EC-9706 细胞株购于北京北纳创联生物技术研究院 (货号: BNCC339892)。

3 药物 原药材重瓣铁线莲, 产于福建省宁德市福安赛岐镇大象村, 由福建卫生职业技术学院何舒澜副教授鉴定。分离提取 CTS 制备方法^[6]: 取重瓣

铁线莲粉末, 加入乙醇超声提取, 过滤并重复 2 次, 合并提取液减压浓缩乙醇成浸膏, 浸膏用蒸馏水混悬, 依次用石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯萃取 3 次, 去萃取液, 最后用水饱和的正丁醇多次萃取直至正丁醇层无色, 收集正丁醇层萃取液减压浓缩, 冷冻干燥得 CTS, 测定含量为 16.06 mg/g。

4 主要试剂及仪器 环磷酰胺 (cyclophosphamide, CTX, 0.2 g/瓶, 德国 Baxter Oncoiogy GmbH 公司, 货号: 6C103A), 生理盐水注射液配制为 100 mg/kg 溶液, 现配现用; 胰蛋白酶 (10 g, 生工生物工程 (上海) 有限公司, 货号: 25300-054); 胎牛血清 [200 mL, 生工生物工程 (上海) 有限公司, 货号: E510002-0200]; RPMI1640 培养基 (100 mL, 美国 Gibco 公司, 货号: 11875101); 碘化丙啶 PI (10 mg, 美国 Sigma 公司, 货号: P4170)。双筒生物显微镜 (厦门麦克奥迪公司, 型号: MoticBA300); 高清晰度彩色病理图文软件 (厦门麦克奥迪公司, 型号: Motic Images Advanced 3.2); 恒温培养箱 (上海齐欣科学仪器有限公司, 型号: HH.CP-T CO₂); 流式细胞仪 (美国 BD 公司, 型号: FACScan); 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司, 型号: KQ-250DE); 双人单面超净工作台 (苏州净化设备有限公司, 型号: SW-CJ-2FD); 电子天平 (赛多利斯科学仪器有限公司, 型号: BSA224S)。

5 半数致死量测定 预实验^[7]: 探索剂量范围, ICR 小鼠 20 只, 按剂量等差分为 5 组, 每组 4 只, 雌雄各半, CTS 灌胃给药 (0.4 mL/10 g), 观察 7 d 内动物出现的中毒症状及死亡数, 记录 100% 死亡的最大剂量 (maximum tolerated dose, Dm) 和 0% 死亡的最小剂量 (minimum tolerated dose, Dn) 的估值范围。正式实验: ICR 小鼠 80 只, 体质量 18.0~22.0 g, 平均 (20.3 ± 1.1) g, 实验前禁食给水 12 h, 按体质量随机分为 8 组, 每组 10 只, 雌雄各半, 分笼饲养。根据预实验确定各实验组剂量, 组间剂量比值 (1:K) 为 0.8, 即 CTS 剂量组 (mg/kg) 为 40.0、32.0、25.6、20.5、16.4、13.1、10.5

和生理盐水对照组, 各组按等容积 (0.4 mL/10 g) 灌胃给药。密切观察动物给药后 4 h 内的反应, 持续观察 14 d, 观察的指标包括一般指标 (如动物行为、外观、对刺激的反应、分泌物、排泄物等)、动物体质量变化 (给药前、实验结束处死动物前各称重 1 次)、动物中毒症状 (症状起始时间、严重程度、持续时间等)、动物死亡情况 (死亡时间、濒死前反应等)。存活动物于 14 d 脱颈椎处死并解剖, 尸检观察各脏器均未见明显病变, 采用 Bliss 法测定总皂苷半数致死量 (median lethal dose, LD₅₀)。

6 模型制备、分组及干预方法 对数生长期的人食管癌 EC-9706 细胞消化、计数, RPMI-1640 完全培养基调整细胞浓度至 5×10^6 个/mL。取 5 只 BALB/C 裸小鼠, 每只于右前肢腋窝皮下接种 0.2 mL EC-9706 细胞悬液 (约含 1×10^6 个细胞), 成瘤第 7 d 在无菌环境中将生长良好荷瘤小鼠的肿瘤小心剥离, 剪取生长状态好的肿瘤组织加入适量生理盐水, 制成活瘤细胞单细胞悬液备用。移植性实体瘤实验动物模型造模方法^[8]: 0.2% 台盼蓝染色计数悬液活细胞率 $\geq 95\%$, 用注射用生理盐水按 1:4 比例稀释、计数, 调整至浓度为 $5 \sim 20 \times 10^6$ 个/mL 活瘤细胞单细胞悬液, 在无菌环境中, 每只小鼠右腋窝皮下接种 0.2 mL 悬液建立荷瘤动物模型。

实验取 BALB/c 小鼠 50 只, 雌雄各半, 按体质量随机分为 5 组, 即 CTS 高、中、低剂量组 (1.80、0.90、0.45 mg/kg, 分别为 1/10、1/20 和 1/40 LD₅₀)^[9], 模型组 (等体积的生理盐水) 和 CTX 组 (20 mg/kg), 每组 10 只, 各组给药每日 1 次, 灌胃给药容积 0.2 mL/10 g。接种操作前各剂量组先给 CTS, 模型组和 CTX 组给生理盐水, 灌胃给药, 连续 6 d。按造模方法建模成瘤, 接种当日记为第 1 d, 第 1 d 动物均不给药, 次日起 CTS 各剂量组持续给药, 模型组给生理盐水, CTX 组于第 2、6 d 腹腔注射 CTX (其他时间点给予生理盐水)。治疗过程中死亡裸鼠均行解剖以明确死因。本实验建模成瘤率为 100%, 连续给药 25 d 后模型组动物平均瘤重大致达到 1.0 g 结束给药, 选择肿瘤生长旺盛且无溃破的荷瘤小鼠, 于末次给药 24 h 后脱颈椎处死, 取各标本进行指标观察。

7 检测指标及方法

7.1 抑瘤率及脏器指数观察 观察荷瘤小鼠生长情况, 并肉眼观察肿瘤生长情况。处死动物后小心剥离瘤块并分离胸腺和脾脏, 用过滤纸吸净黏附的残血, 精密称重, 分别计算抑瘤率、胸腺指数和脾脏指

数。抑瘤率 (%) = $[(\text{模型组平均瘤重} - \text{给药组平均瘤重}) / \text{模型组平均瘤重}] \times 100\%$, 脏器指数 = 脏器质量 (mg) / 体质量 (g)。

7.2 移植瘤组织病理分析 取新鲜肿瘤组织在 10% 福尔马林溶液中固定, 乙醇梯度脱水, 二甲苯浸泡至组织透明, 石蜡包埋, 切成 2 μm 厚度的切片, HE 染色, 200 倍显微镜观察镜下病理改变。

7.3 实体瘤细胞周期检测 采用 PI 染色法, 各实验组取 1 只小鼠的肿瘤组织进行研磨, 过滤后取肿瘤细胞研磨液 100 μL , 用预冷的 70% 乙醇固定过夜, PBS 缓冲液洗涤离心 (1 000 r/min, 5 min) 2 次后除去乙醇, 用 500 μL Buffer A 将细胞进行重悬, 加入 RNase A, 使其终浓度为 0.25 mg/mL, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中反应 30 min, 于室温下加入 PI 溶液 5 μL 避光染色 30 min。(采用流式细胞仪进行检测实体瘤细胞周期, 设置 3 重复孔, 激发波长为 488 nm。

8 统计学方法 流式细胞术检测实体瘤细胞周期数据采用 Modfit LT 软件分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 由 SPSS 11.5 统计软件进行, 若各组数据符合正态分布和方差齐性则进行单因素方差分析, 组间比较采用 LSD 检验, 若方差不齐则采用 Kruskal-Wallis 单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 LD₅₀ 测定结果 LD₅₀ 测定实验 CTS 各剂量组 ICR 小鼠灌胃给药 2 h 后, 部分出现精神差、肢体乏力、静伏少动、活动时腹部拖地、步态蹒跚等中毒症状, 12 h 内动物出现死亡, 濒死时精神差, 呼吸频率加快、张口呼吸、鼻翼扇动, 尸检未见明显异常, 2 d 左右各组存活小鼠活动渐恢复正常, 饮食增加, 毛发顺泽, 14 d 各组存活小鼠体质量组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。生理盐水对照组小鼠未见前述中毒症状。CTS LD₅₀ = 18.3 mg/kg。

2 各组荷瘤小鼠一般状态及肿瘤生长情况比较 (表 1, 图 1) 建立荷瘤动物模型实验各组 BALB/c 裸小鼠接种后 4 d 内均出现精神稍差、静伏少动等症状。CTX 组持续表现觅食减少、活动倦怠、体质量下降和毛发失去光泽等现象, 与模型组比较, 体质量降低 ($P < 0.05$)。CTS 各剂量组 5~7 d 后活动渐恢复正常。与模型组比较, 干预后各剂量组体质量无增加 ($P > 0.05$)。

肉眼观察模型组肿瘤生长迅速, CTX 组肿瘤生长缓慢, CTS 各剂量组介于两组之间。与模型组比

表 1 各组各时间点体质量、瘤重及抑瘤率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/kg)	时间点	n	体质量 (g)	瘤重 (g)	抑瘤率 (%)
模型组	—	干预前	10	17.9 ± 0.6		
		干预后	9	26.7 ± 1.8	1.59 ± 0.34	—
CTX	20.00	干预前	10	17.5 ± 1.0		
		干预后	10	23.5 ± 2.9*	0.59 ± 0.35*	63.01
CTS 低剂量	0.45	干预前	10	17.6 ± 0.9		
		干预后	9	26.7 ± 1.9 [△]	1.15 ± 0.32* [△]	27.92
CTS 中剂量	0.90	干预前	10	17.8 ± 0.9		
		干预后	9	25.1 ± 2.6	0.96 ± 0.26* [△]	39.67
CTS 高剂量	1.80	干预前	10	17.6 ± 0.9		
		干预后	8	26.7 ± 2.2 [△]	0.92 ± 0.18* [△]	42.46

注：与模型组同期比较，* $P < 0.05$ ；与 CTX 组同期比较，[△] $P < 0.05$

表 2 各组荷瘤小鼠脏器指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/kg)	n	脾脏		胸腺	
			重量 (mg)	脾脏指数 (mg/g)	重量 (mg)	胸腺指数 (mg/g)
模型组	—	9	177.5 ± 12.0	6.68 ± 0.62	8.8 ± 1.9	0.33 ± 0.07
CTX	20	10	124.0 ± 14.5*	5.31 ± 0.69*	8.0 ± 1.1	0.34 ± 0.06
CTS 低剂量	0.45	9	173.2 ± 17.1 [△]	6.52 ± 0.73 [△]	8.3 ± 2.6	0.31 ± 0.09
CTS 中剂量	0.9	9	196.3 ± 19.2* [△]	7.90 ± 1.10* [△]	8.0 ± 3.1	0.32 ± 0.14
CTS 高剂量	1.8	8	212.3 ± 32.3* [△]	8.00 ± 1.40* [△]	6.9 ± 3.5	0.26 ± 0.12

注：与模型组比较，* $P < 0.05$ ；与 CTX 组比较，[△] $P < 0.05$

较，CTX 组及 CTS 各剂量组瘤重降低 ($P < 0.05$)。与 CTX 组比较，CTS 各剂量组瘤重升高 ($P < 0.05$)。CTX 组抑瘤率为 63.01%，CTS 低、中、高剂量组抑瘤率分别为 27.92%、39.67%、42.46%。各组荷瘤小鼠移植瘤瘤块大小图示也可以发现以上瘤重差异变化，CTS 各剂量组随剂量的升高，瘤块体积变小。

3 各组荷瘤小鼠脏器指数比较 (表 2) 与模

型组比较，CTX 组脾脏指数降低 ($P < 0.05$)，而胸腺指数差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，CTS 高、中剂量组脾脏重量及脾脏指数均升高 ($P < 0.05$)，CTS 各剂量组胸腺重量及胸腺指数均降低 ($P > 0.05$)。与 CTX 组比较，CTS 各剂量组脾脏重量及脾脏指数升高 ($P < 0.05$)，而胸腺重量及胸腺指数差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

4 各组荷瘤小鼠肿瘤组织病理学观察结果比较 (图 2) 肉眼观察各组荷瘤小鼠移植瘤组织呈结节状，肿瘤供血丰富，组织切面呈鱼肉样，可见局灶性坏死，以 CTX 组及 CTS 高剂量组明显。光镜下可见模型组移植瘤肿瘤细胞排列密集，细胞形态正常，出血坏死区域少见 (图 2A)；CTX 组肿瘤细胞密度稀疏，细胞呈不规则变形，出现细胞消融、坏死，肿瘤组织中可见坏死灶 (图 2B)；CTS 各剂量组肿瘤细胞呈弥散性分布、细胞扭曲变形、坏死，有多

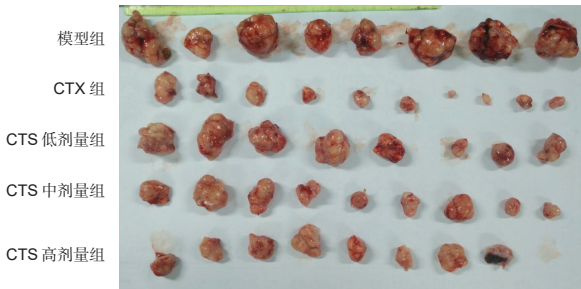
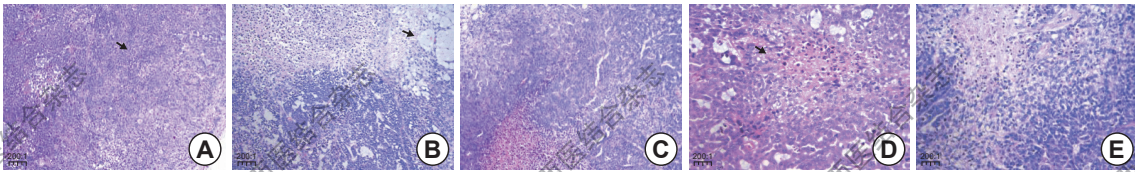


图 1 各组荷瘤小鼠移植瘤块大小比较



注：A 为模型组；B 为 CTX 组；C 为 CTS 低剂量组；D 为 CTS 中剂量组；E 为 CTS 高剂量组；箭头所指为肿瘤坏死细胞

图 2 各组荷瘤小鼠肿瘤组织病理观察结果 (HE, ×200)

表 3 各组 EC-9706 细胞周期分布及凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	浓度 (mg/kg)	n	细胞周期 (%)			凋亡率 (%)
			G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
模型	—	3	28.23 ± 0.95	56.25 ± 0.81	15.52 ± 0.23	0
CTS 低剂量	0.45	3	38.26 ± 1.36*	47.20 ± 1.24*	14.53 ± 0.51	15.51 ± 0.22*
CTS 中剂量	0.90	3	40.23 ± 1.28*	45.79 ± 1.44*	13.98 ± 0.36	28.13 ± 0.35*
CTS 高剂量	1.80	3	41.89 ± 1.33*	43.96 ± 1.63*	14.15 ± 0.41	32.42 ± 0.37*

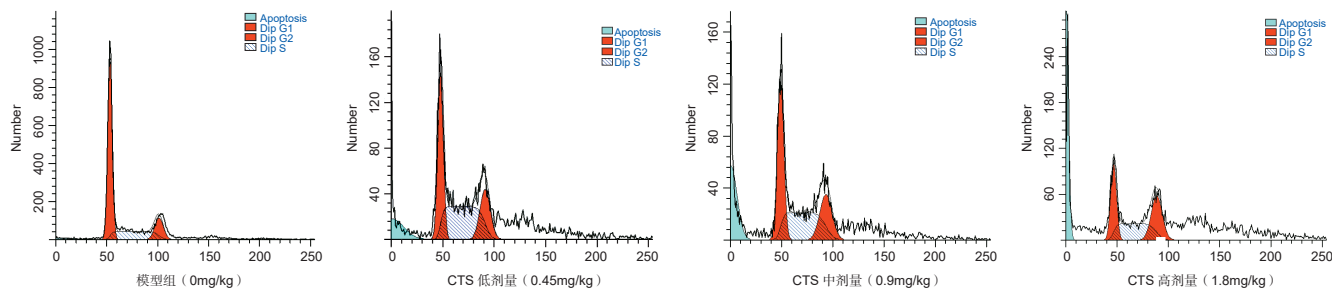
注: 与模型组比较, * $P < 0.05$ 

图 3 各组 EC-9706 细胞周期检测结果

处细胞坏死消融区域, 随给药剂量的增大, 肿瘤组织坏死区域呈逐渐增大趋势, 以 CTS 高剂量组变化最明显 (图 2C、D、E)。

5 各组 EC-9706 细胞周期分布及凋亡率比较 (表 3, 图 3) 随 CTS 浓度从 0 mg/kg 增高至 1.8 mg/kg, 与模型组比较, 实体瘤处于 G₀/G₁ 周期的细胞比例升高 ($P < 0.05$), S 期的细胞比例降低 ($P < 0.05$), 而 G₂/M 期的细胞比例变化不大 ($P > 0.05$)。在实体瘤细胞 G₀/G₁ 期正常 2 倍体 DNA 峰 (G₁) 之前出现一个 sub-G₁ 峰即细胞凋亡峰, 峰面积随浓度增大, 细胞凋亡率由 0 升高至 32.42% ($P < 0.05$)。

讨 论

重瓣铁线莲为毛茛科铁线莲属植物, 亲缘关系相近的种所含的化学成分相似, 同科同属植物均具有良好的抗肿瘤活性。吴兴铁线莲黄酮提取物对小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 增殖具有抑制作用^[10], 棉团铁线莲根的乙醇提取物对人肝癌细胞 Hep-G2 具有抑制作用^[11], 东北铁线莲的乙酸乙酯提取物对小鼠移植性肉瘤 S180 具有抑制作用^[12], 闽产重瓣铁线莲提取物 CTS 对人食管鳞癌细胞株 (EC9706)、人肝癌细胞株 (Hep-G2)、人口腔癌细胞株 (KB) 和人食管癌 EC-9706 细胞的增殖均有抑制活性但差异较大^[5], 但体内是否也具有抗肿瘤功效有待研究。本研究发现 CTS 对小鼠体内移植性人食管癌 EC-9706 瘤株的抑瘤呈一定量效关系, 抑瘤率最高达 42.46%, 肿瘤组织病理镜下观察结果也表明对肿瘤细胞具有抑

制、破坏效果, 其中高剂量组变化最明显, 根据国家食品药品监督管理局发布的《细胞毒类抗肿瘤药物非临床评价的技术指导原则》中评价一般抗肿瘤天然植物药物体内抑瘤率达 40% 以上即认可有效^[13], 表明 CTS 对 EC-9706 细胞瘤有一定的体内抑制作用。

肿瘤产生机制多是由于异常的细胞增殖或细胞凋亡相对减少^[14], CTS 抗肿瘤机制以常见的调节机体免疫, 促进细胞凋亡与阻断细胞增殖周期等途径进行初步探索。肿瘤的发生发展与机体免疫具有相关性, 胸腺和脾脏都是重要的免疫器官, 前者产生 T 淋巴细胞和分泌胸腺素, 主要参与细胞免疫, 后者有丰富的 B 淋巴细胞和巨噬细胞, 与体液免疫关系密切, 免疫器官功能及免疫细胞数量与腺体重量有关, 脏器指数可反映机体免疫功能的强弱^[15]。本研究结果发现, 荷瘤小鼠给予 CTS 后脾脏指数升高 ($P < 0.05$), 而胸腺指数差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 说明 CTS 可能通过影响脾脏而刺激调节体液免疫作用, 推测与促进脾脏产生 IL-2、IFN- γ 和血清抗原特异性抗体有关^[16], 同时在肿瘤状态下胸腺则可能出现萎缩, 胸腺指数下降^[17]。CTS 能促进细胞凋亡, 使荷瘤小鼠体外实体瘤细胞凋亡峰峰面积增大, 细胞出现不同程度的凋亡, 细胞早期凋亡率随剂量由 0 明显提高至 32.42%。细胞周期调控紊乱是恶性肿瘤的另一个重要生物学特征, CTS 以一定剂量依赖的方式抑制肿瘤细胞的增殖, 使 G₀/G₁ 期的细胞比例增高, S 期的细胞比例降低, G₂/M 期的细胞比例变化不大, 表明部分肿瘤细胞被阻滞在 G₀/G₁ 期不能顺利进入 S 期, 而处

于 S 期细胞能顺利进入 G₂/M 期, 说明 CTS 特异性识别并攻击肿瘤细胞, 将肿瘤细胞抑制在 G₀/G₁ 期, 并诱导肿瘤细胞发生凋亡, 从而控制体内肿瘤细胞的恶性增殖, 机制推测可能通过诱导肿瘤细胞凋亡^[18]、抑制肿瘤血管生成^[19] 和上调抑癌基因 P53^[20] 等多种途径发挥抗肿瘤作用, 但有待深入研究。实验还测定 CTS LD₅₀ 为 18.3 mg/kg, 小鼠灌胃 CTS 后出现精神稍差、静伏少动、皮毛失去光泽等中毒症状, 考虑 CTS 为皂苷类物质会对机体产生一定的毒性反应, 在后续的研究中须给予一定的关注。

近年来, 天然植物药物抗肿瘤应用开发取得快速进展, 特别是民间中草药临床实践证明都取得了较好的疗效, 可起到增效减毒的作用。畚族医药是一种宝贵的民族医药, 也应该对其加大保护和开发力度, 对重瓣铁线莲进行深入研究可为畚药临床用药提供研究依据, 并可促进民族医药的进步与发展。

利益冲突: 作者声明无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] 朱扶蓉, 何舒澜, 林贵灿. 闽产重瓣铁线莲的生药学鉴别研究 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25 (11): 2685-2687.
- [2] 中华本草编委会. 中华本草 (第三辑) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 198-200.
- [3] 李杨, 张伟, 赫雪锋, 等. 铁线莲属植物的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中南药学, 2018, 16 (3): 355-362.
- [4] 杨维雄, 常晓勇, 尹建华. 我国铁线莲属植物研究进展 [J]. 现代农业科技, 2020, 27 (9): 135-137.
- [5] 叶丽颖, 滕春福, 吴楠, 等. 畚药铁线莲提取物的生物活性初步研究 [J]. 海峡药学, 2015, 27 (2): 41-45.
- [6] 朱扶蓉, 滕春福, 李清禄. 响应面法优化畚药十二时辰总皂苷超声提取工艺的研究 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27 (12): 2874-2878.
- [7] 陈奇主编. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 112
- [8] 蔡云. 香菇多糖脂质体的药效学和药代动力学研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2009.
- [9] 魏伟, 吴希美, 李元建主编. 药理实验方法学 [M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 1585.
- [10] 张志荣, 吴文辉, 陶周超. 吴兴铁线莲总黄酮的提取及体外抗肿瘤活性研究 [J]. 中国现代应用药学, 2016, 33 (7): 879-883.
- [11] 杨林, 姚广玉, 薛鸿燕, 等. 棉团铁线莲总皂苷抗肿瘤作用研究 [J]. 中医药学报, 2011, 39 (2): 21-24.
- [12] 张昌浩. 东北铁线莲抗肿瘤活性成分的研究 [D]. 延吉: 延边大学, 2005.
- [13] 国家食品药品监督管理局. 细胞毒类抗肿瘤药物非临床研究技术指导原则 [M]. 中国新药与临床杂志, 2008, 27 (6): 462-465.
- [14] 罗燕, 蒋益兰, 李勇敏, 等. 柴胡皂苷 D 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖、周期及周期相关调控因子表达的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39 (5): 572-576.
- [15] 温利娟, 薛晓鸥, 米鑫, 等. 清热利湿外治法对宫颈癌荷瘤裸鼠抗肿瘤作用与 MARK 信号通路的关系 [J]. 天津中医药大学学报, 2019, 38 (6): 578-582.
- [16] Zhu FR, Li YN, He SL, et al. Cytotoxic activities of total saponins from plena clematis on human tumor cell lines *in vitro* [J]. Chin J Integr Med, 2018, 24 (10): 763-767.
- [17] 刘霖, 汤婧, 邢兵, 等. 肿瘤发生对小鼠胸腺发育及 T 细胞生成的影响 [J]. 生命科学研究, 2020, 24 (6): 459-465.
- [18] Kim YE, Cho CH, Kang H. Kiwifruit of Actinidia eriantha cv. Bidan has *in vitro* antioxidative, anti-inflammatory and immunomodulatory effects on macrophages and splenocytes isolated from male BALB/c mice [J]. Food Sci Biotechnol, 2018, 27 (5): 1503-1511.
- [19] 李娜, 邢书娟, 黄国友, 等. 抗肿瘤血管生成治疗的研究进展及应对策略 [J]. 生命科学研究, 2020, 24 (1): 62-67.
- [20] Mohammed A, Eman AS, Naravat P, et al. The roles of P53 and XP01 on colorectal cancer progression in Yemeni patients [J]. J Gastrointest Oncol, 2019, 10 (3): 437-444.

(收稿: 2020-03-26 在线: 2021-03-29)

责任编辑: 赵芳芳