

藤黄联合卡培他滨治疗肠癌肝转移的活性研究

张东^{1,2}, 祖元刚¹, 熊彬^{1,2}, 魏亮^{1,2}, 张思艳^{1,2}, 姜守刚^{1,2*}

(1. 东北林业大学, 森林植物生态学教育部重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150040; 2. 东北林业大学化学化工与资源利用学院, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要 [目的] 通过向 BALB/c 小鼠脾脏内注入 CT26.WT 细胞, 建立小鼠结肠癌肝转移模型, 研究藤黄联合卡培他滨时对肠癌肝转移的抑制作用。[方法] 脾脏种植法将 CT26.WT 细胞注射到 BALB/c 雄性小鼠体内建立肠癌肝转移模型后, 通过比较各组小鼠的体重变化、生存期、抑瘤率及肝脏病理切片, 探究藤黄联合卡培他滨对肠癌肝转移的体内抑制作用。[结果] 对照组、藤黄组、卡培他滨组、藤黄与卡培他滨联合给药组的平均生存期分别为 (18.00±1.41)、(23.33±3.08)、(27.17±3.66)、(30.83±3.06) d。与对照组和单独给药组相比较, 联合给药组的小鼠平均生存期显著延长 ($P<0.05$), 小鼠肝脏肿瘤的转移数量明显减少, 对肿瘤组织造成了一定程度的破坏。[结论] 藤黄与卡培他滨联合给药对肠癌肝转移具有显著的抑制作用, 该研究为肠癌肝转移的治疗提供了新的联合给药方法。

关键词 藤黄; 卡培他滨; 联合用药; 肠癌肝转移

中图分类号 R 285 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2022)14-0149-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.14.036



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Research on the Activity of Gamboge Combined with Capecitabine in the Treatment of Liver Metastasis of Colorectal Cancer
ZHANG Dong^{1,2}, ZU Yuan-gang¹, XIONG Bin^{1,2} et al (1 Key Laboratory of Forest Plant Ecology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040; 2. College of Chemistry, Chemical Engineering and Resource Utilization, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040)

Abstract [Objective] CT26.WT cells were injected into the spleen of BALB/c mice to establish a mouse model of liver metastasis from colon cancer, and to study the inhibitory effect of combined administration of gamboge and capecitabine on liver metastasis from colon cancer. [Method] After CT26.WT cells were injected into BALB/c male mice by spleen implantation method to establish the liver metastasis model of colorectal cancer, the *in vivo* inhibitory effect of gamboge combined with capecitabine on liver metastasis of colorectal cancer was investigated by comparing body weight change, survival period, tumor inhibition rate and liver pathological section of each group. [Result] The mean survival time of control group, gamboge group, capecitabine group, gamboge and capecitabine combined administration group were (18.00±1.41) d, (23.33±3.08) d, (27.17±3.66) d, (30.83±3.06) d, respectively. The mean survival time of mice in the combined administration group was significantly longer than that in the control group and the single administration group ($P<0.05$), the number of liver tumor metastasis in mice was significantly reduced, and the tumor tissue was damaged to a certain extent. [Conclusion] The combined administration of gamboge and capecitabine has a significant inhibitory effect on liver metastasis of colorectal cancer. This study provides a new combined administration method for the treatment of liver metastasis of colorectal cancer.

Key words Gamboge; Capecitabine; Drug combination; Liver metastasis of colorectal cancer

肠癌(colorectal cancer, CRC)是目前发病率较高的恶性肿瘤之一, 由于早期症状不明显, 大多数患者确诊后多已处于晚期^[1]。肠癌患者术后易发生肿瘤转移, 且主要转移部位为肝脏^[2], 在后续的治疗过程中, 化疗成为主要手段^[3]。目前以卡培他滨为基础的三联药物(卡培他滨+奥沙利铂+亚叶酸)是肠癌肝转移疾病治疗时的一线药物^[4], 但其毒副作用大, 且易耐药, 一旦耐药, 患者预后极差^[5], 因此, 急需发展新的高效低毒且不易耐药的药物组合。

藤黄是藤黄科植物藤黄 [*Garcinia hanburyi* Hook. f. (clusiaceae)] 树干分泌出的干燥树脂, 其主要成分是以藤黄酸为代表的咕吨酮类化合物, 为治疗肿毒的临床用药^[6]。有研究表明, 藤黄作为一种中药可能通过促使肠癌细胞发生 G2/M、S 期阻滞, 调节 BAX、Bcl-2 和 p53 蛋白的表达, 来达到抗肠癌效果^[7]。目前, 随着中医药的发展, 我国多采用中西医结合的方法治疗结直肠癌^[1]。基于藤黄治疗肠癌具有高效低毒的优势, 该试验探讨了藤黄与卡培他滨联合用药

对肠癌肝转移的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 仪器。FA1204B 分析天平(济南爱来宝仪器设备有限公司); ST40R 型离心机(上海实维实验仪器技术有限公司); CX43 生物显微镜(南京瞭望光电技术有限公司); QP-80 型二氧化碳细胞培养箱(济南好宝来医疗器材有限公司); SW-CJ-3F 型生物工作台(上海沪净医疗器械有限公司); Zf11-01 型动物饲养柜(东北林业大学植物药工程研究中心设计监制)。

1.1.2 试材。藤黄(亳州仁益中药材销售有限公司); 卡培他滨(CAS 号 154361-50-9)、AAF 固定液(50%)、乌来糖(CAS 号 51-79-6), 上海源叶生物科技有限公司; RPMI 1640 培养基、青霉素-链霉素溶液、胰酶, HyClone 公司; DMSO(碧云天生物技术公司); 优级胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司); 结肠癌 CT26.WT 细胞(北京协和医院细胞中心); 清洁级 BALB/c 小鼠(哈尔滨医科大学附属二院动物中心)。

1.2 试验方法

1.2.1 肠癌肝转移模型的建立。将造模所用的 BALB/c 小鼠随机分组, 称重并记录。配制 20% 乌来糖溶液, 以 5 mL/kg 的麻醉剂量麻醉小鼠。待小鼠进入麻醉状态后, 手

基金项目 黑龙江省自然科学基金面上项目(H2018001); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(2572018BU03)。

作者简介 张东(1997—), 男, 山东济宁人, 硕士研究生, 研究方向: 植物药研究与开发。*通信作者, 副教授, 博士, 硕士生导师, 从事植物药提取及活性研究。

收稿日期 2021-09-22

术部位剃毛,将其放在超净台上。取对数生长期的 CT26.WT 细胞进行消化、离心,加入适量生理盐水制备成单细胞悬液,用细胞计数板计数细胞,调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL^[8]。采用脾脏种植法向小鼠脾脏内缓慢注入 CT26.WT 细胞悬液 0.1 mL,查看无出血后将小鼠脾脏纳回,用可吸收缝合针线全层缝合、包扎,待小鼠经过麻醉时间并恢复意识后,常规饲养^[9]。

1.2.2 分组及给药。将 4~6 周龄、体重 20 g 左右的雄性 BALB/c 小鼠随机分为对照组(生理盐水)、藤黄组、卡培他滨组、藤黄联合卡培他滨组,每组 6 只。造模后第 2 天开始,对照组和给药组全部采用灌胃的方式连续给药 7 d,藤黄组给药剂量为 20 mg/kg,卡培他滨组给药剂量为 60 mg/kg,联用组药物分别按上述剂量同时给药。

1.2.3 健康状况观察。观察造模前后小鼠的体重变化和生存情况,每 3 d 称重一次,分析不同药物对小鼠体重的影响,记录小鼠的死亡时间,计算平均生存期,绘制生存曲线。

1.2.4 协同作用测定。待各组小鼠自然死亡后,解剖观察肝脏表面及切面的转移灶及肿瘤结节。由于转移性肿瘤不易从肝脏剥离,称重肝脏也可以间接反映肿瘤的重量,计算肿瘤抑制率,公式如下:抑瘤率=(对照组肝重-给药组肝重)/(对照组肝重-正常组肝重) $\times 100\%$ ^[10]。

金氏公式是被用来评价联合用药作用强度的公式,公式如下:

$$q = \frac{E_{a+b}}{E_a + E_b - E_a \times E_b}$$

在该试验中, E_a 、 E_b 和 E_{a+b} 分别表示藤黄组、卡培他滨组和藤黄联合卡培他滨组对模型小鼠的肿瘤抑制率。当 $q > 1.15$ 时,说明藤黄和卡培他滨联用会产生协同作用,当 $0.85 \leq q \leq 1.15$ 时,说明藤黄和卡培他滨分别产生作用,当 $q < 0.85$ 时,说明藤黄和卡培他滨联用会产生拮抗作用^[11]。

1.2.5 病理学检测。给药 10 d 后,每组随机处死 1 只小鼠,解剖出完整肝脏并用生理盐水清洗,观察各组小鼠肝脏表面结肠癌转移情况并拍照。用 4% 的多聚甲醛溶液固定取出的小鼠肝脏 12~14 h,经过脱水、透明、石蜡包埋、切片、HE 染色、封片等一系列操作后,在显微镜下进行病理观察和分析,判断不同药物对结肠癌肝转移的抑制情况^[12]。

2 结果与分析

2.1 模型小鼠形态学观察 造模后第 1 天,小鼠进食、进水量明显减少,活动量也减小。术后第 3 天,小鼠的精神状态开始逐渐恢复。待术后 10 d 左右小鼠又出现了摄食量减少的现象,并且小鼠腹部开始隆起。术后第 15 天左右,小鼠开始出现萎靡不振的精神状态,行动缓慢且反应性降低,腹部隆起明显。

2.2 体重变化分析 建模后,每隔 3 d 测定并记录小鼠的体重,结果如图 1 所示。从图 1 可以看出,各组小鼠的体重在造模后前 3 d 均出现了减轻的情况,其中藤黄组体重减轻最少。第 3 天起各组小鼠体重开始逐渐增加,但是给药组小鼠体重的增长速度比对照组缓慢。卡培他滨组小鼠造模前后

体重有所降低,而藤黄联合卡培他滨组在造模期间体重变化不显著,表明藤黄联合卡培他滨组的毒副作用明显比卡培他滨组的低。在术后第 7 天至术后第 15 天,各组小鼠的平均体重表现出一定的增长,这是因为造模小鼠腹部开始出现血性腹水、体重增加^[13]。

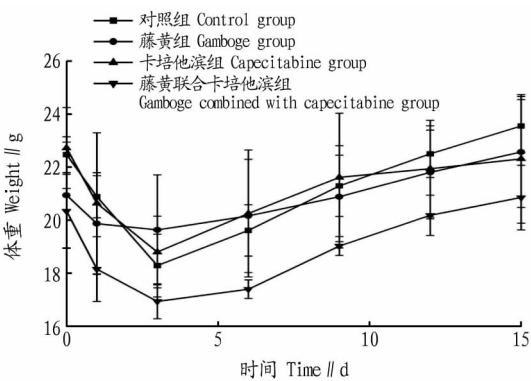


图 1 模型小鼠的体重变化
Fig.1 Weight change in model mice

2.3 生存期分析 各组小鼠均采用 SPSS 17.0 软件中 Kaplan-Meier 法进行生存期分析,结果如图 2 所示。结果显示,对照组、藤黄组、卡培他滨组、藤黄联合卡培他滨组的平均生存期分别为 (18.00 ± 1.41) 、 (23.33 ± 3.08) 、 (27.17 ± 3.66) 、 (30.83 ± 3.06) d。藤黄联合卡培他滨组与其他各组平均生存期均有显著差异($P < 0.05$)。这表明藤黄联合卡培他滨可以有效延长小鼠的生存期,有较好的抗结肠癌肝转移作用。

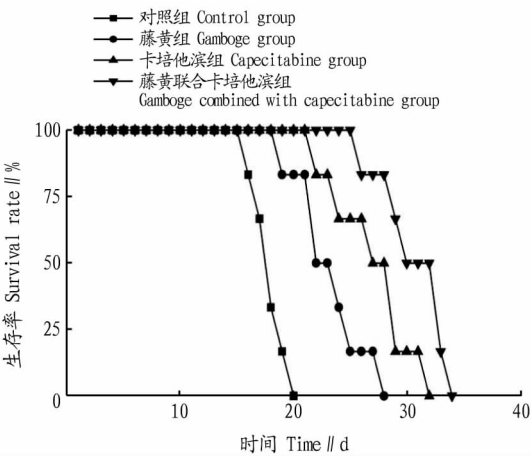


图 2 模型小鼠的生存期曲线
Fig.2 Survival curve of model mice

2.4 协同作用测定 待模型小鼠自然死亡后解剖,取出完整肝脏,计算各组小鼠的平均肝重,得到给药组的抑瘤率,结果如表 1 所示。藤黄联合卡培他滨组的平均肝重较藤黄组和卡培他滨组小($P < 0.01$)。藤黄组、卡培他滨组、藤黄联合卡培他滨组的肿瘤抑制率分别为 31.03%、40.52%、63.79%,经过金氏公示测定,得到协同作用结果 $q = 1.08$,说明藤黄与卡培他滨联合用药没有产生明显的协同作用,但与单一用药相比抑制结肠癌肝转移的效果比较显著。

表 1 各组小鼠肝脏重量、抑瘤率

Table 1 Liver weight and tumor inhibition rate of mice in each group

组别 Group	数量 Quantity	肝脏重量 Liver weight g	抑瘤率 Tumor inhibition rate // %
正常组 Normal group	6	0.72±0.03	
对照组 Control group	6	1.88±0.11	
藤黄组 Gamboge group	6	1.52±0.07 * *	31.03
卡培他滨组 Capecitabine group	6	1.41±0.03 * *	40.52
藤黄联合卡培他滨组 Gamboge combined with capecitabine group	6	1.14±0.04 * * #	63.79

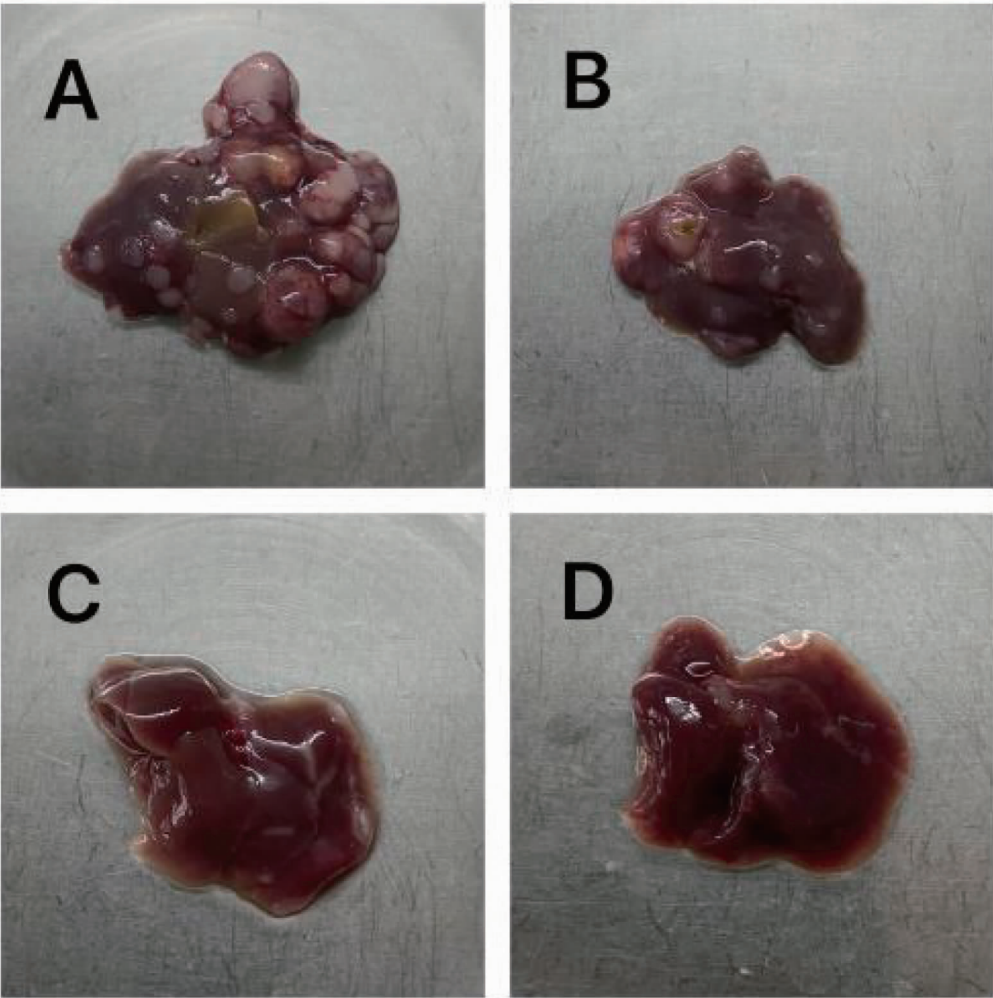
注:给药组与对照组相比, * * $P<0.01$;联合给药组与单一给药组相比, ## $P<0.01$

Note: Compared with the control group, the drug group * * $P<0.01$; compared with the single-dose group, the combined drug group ## $P<0.01$

2.5 肝脏标本观察 各组小鼠解剖后的肝脏标本结果如图

3 所示,与正常小鼠对比,可以观察到模型小鼠的肝脏中都分布了大小不等的灰白色肿瘤结节^[14]。对照组肝脏大部分被癌灶所浸润,藤黄组、卡培他滨组的肝脏的肿瘤结节数量远少于对照组,藤黄联合卡培他滨组的肝脏表面仅存在离散的转移结节,并且转移结节数目相对来说较少于其他各组,这表明藤黄与卡培他滨联用具有良好的抗肠癌肝转移作用。

2.6 肝脏病理学分析 将各组模型小鼠解剖后,对其肝脏进行病理切片分析,结果如图 4 所示。对照组癌细胞成团且数量较多,说明肿瘤细胞 DNA 复制剧烈,给药组肝组织中癌细胞团数量呈现不同程度的减少且大小明显减小,癌细胞较疏松^[15],说明药物在一定程度上抑制了肿瘤细胞的转移,其中藤黄联合卡培他滨组肝组织中肿瘤细胞的细胞核与正常肝细胞的细胞核大小相似,抑制肿瘤细胞 DNA 复制效果最好,即藤黄联合卡培他滨组抗结肠癌肝转移作用最明显。



注:A.对照组;B.藤黄组;C.卡培他滨组;D.藤黄联合卡培他滨组
Note: A. Control group; B. Gambogic group; C. Capecitabine group; D. Gamboge combined with Capecitabine group

图 3 模型小鼠肝脏标本
Fig.3 Liver samples from model mice

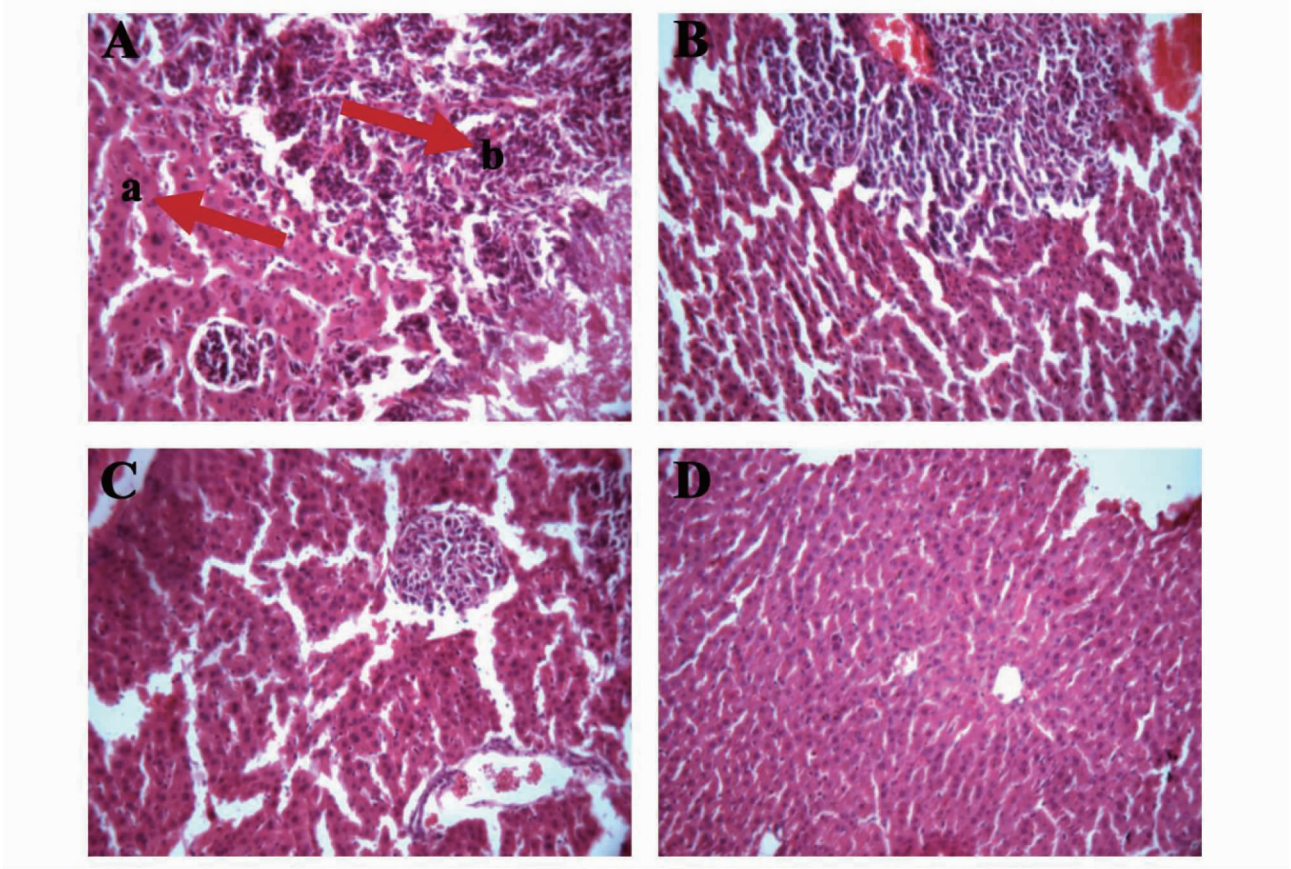
3 结论

该试验通过 BALB/c 小鼠脾脏种植 CT26.WT 细胞建立结肠癌肝转移模型,研究藤黄与卡培他滨联用时对小鼠肠癌

肝转移的抑制作用。通过比较对照组和给药组模型小鼠的体重变化、平均生存期、HE 染色肝脏病理切片,发现藤黄与卡培他滨联合使用时可以更好地抑制肿瘤细胞的生长和转

移,延长生存期。因此,当肠癌肝转移患者使用卡培他滨几个疗程产生耐药后,可以考虑将藤黄与卡培他滨联用,这为

治疗肠癌肝转移提供了新的联合给药方法,有望明显延长肠癌肝转移患者的生存期。



注:A.对照组;B.藤黄组;C.卡培他滨组;D.藤黄联合卡培他滨组。图中标有a区域的部分属于正常肝细胞,标有b区域的部分属于肿瘤细胞
Note:A.Control group;B.Gambogic group;C.Capecitabine group;D.Gamboge combined with Capecitabine group

图4 模型小鼠 HE 染色肝脏病理切片

Fig.4 HE-stained liver pathological sections of model mice

参考文献

[1] 李变丽,陈华国,赵超,等.中药抗结直肠癌的作用机制研究进展[J].天然产物研究与开发,2020,32(12):2132-2141.
[2] 侯文珍,裴丽霞,周锦勇,等.中医药防治大肠癌肝转移研究进展[J].辽宁中医杂志,2020,47(3):203-206.
[3] 竺平,谷云飞,杨柏霖,等.有毒中药对人结肠癌 HCT116 和 SW480 细胞的生长抑制作用[J].南京中医药大学学报,2013,29(4):351-354.
[4] 张成文.卡培他滨片联合介入治疗大肠癌肝转移疗效分析[J].现代肿瘤医学,2015,23(12):1705-1707.
[5] SOBRERO A,ACKLAND S,CLARKE S,et al.Phase IV study of bevacizumab in combination with infusional fluorouracil,leucovorin and irinotecan (FOLFIRI) in first-line metastatic colorectal Cancer[J].Oncology,2009,77(2):113-119.
[6] 竺平,谷云飞,杨柏霖,等.藤黄对人结肠癌 HCT116 细胞裸鼠原位移植模型的作用[J].世界华人消化杂志,2014,22(4):476-482.
[7] 魏建昌,张通,杨平,等.藤黄酸对人结肠癌细胞凋亡及 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 表达的影响[J].实用医学杂志,2016,32(11):1745-1748.
[8] 杜相宇,唐德才.芪术抗癌方及其联合 5-氟尿嘧啶对 CT26.WT 结肠癌

原位移植瘤模型小鼠肿瘤组织中凋亡相关蛋白表达的影响[J].中医杂志,2020,61(12):1090-1094.
[9] 宋大迁,熊盈,方金,等.活体成像下评价脾脏注射法大肠癌肝转移动物模型[J].现代肿瘤医学,2016,24(14):2187-2190.
[10] 王学良.抵当汤对小鼠结肠癌细胞脾种植肝转移模型影响的实验研究[D].广州:南方医科大学,2004.
[11] 张星垚.多西紫杉醇与藤黄酸联用抑制肺癌骨转移的研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2018.
[12] 冯冰玉,祖元刚,魏亮,等.青蒿素-β-环糊精包合物联合双硫仑抑制肠癌肝转移的体内活性研究[J].特产研究,2020,42(1):6-10.
[13] 胡艳.DHA 偶联牛血清白蛋白负载多西紫杉醇肿瘤靶向纳米粒的制备、表征及体内外活性评价[D].哈尔滨:东北林业大学,2016.
[14] XU J M,QIN X Y,WANG J P,et al.Chinese guidelines for the diagnosis and comprehensive treatment of hepatic metastasis of colorectal cancer[J].Journal of cancer research and clinical oncology,2011,137(9):1379-1396.
[15] OTCHY D,HYMAN N H,SIMMANG C,et al.Practice parameters for colon cancer[J].Diseases of the colon & rectum,2004,47(8):1269-1284.

(上接第 141 页)

[25] 申晓慧,郭伟,冯鹏,等.铜-锌复合胁迫对凤仙花萌发及幼苗生长的影响[J].农业灾害研究,2014,4(5):16-17.
[26] 孙金金,鱼小军,王金辉,等.重金属 Cu²⁺、Cd²⁺ 和 Pb²⁺ 对 8 种禾草种子萌发和幼苗生长的影响[J].草地学报,2018,26(3):673-683.
[27] 尹博,王秀峰,姜春辉,等.外源油菜素内酯对番茄铜胁迫的缓解效应[J].植物营养与肥料学报,2012,18(1):162-168.
[28] 张莹,魏安智,杨途熙,等.锌胁迫对灰杨幼苗生长和光合特性的影响[J].东北林业大学学报,2011,39(3):19-21.

[29] FARQUHAR G D,SHARKEY T D.Stomatal conductance and photosynthesis[J].Annual review of plant physiology,1982,33(1):317-345.
[30] 许大全.光合作用气孔限制分析中的一些问题[J].植物生理学通讯,1997,33(4):241-244.
[31] 关义新,戴俊英,林艳.水分胁迫下植物叶片光合的气孔和非气孔限制[J].植物生理学通讯,1995,31(4):293-297.
[32] 张义凯,韩小娇,金洪,等.外源 NO 对铜胁迫下番茄光合、生物发光特性及矿质元素吸收的影响[J].植物营养与肥料学报,2010,16(1):172-178.