

叶下珠水提物对裸鼠人肝癌移植瘤 HBx 和 VEGFR3 表达的影响

魏春山¹, 唐海鸿¹, 王宏艳², 邢宇锋¹, 童光东¹, 周大桥¹

(1. 深圳市中医院肝病科, 广东 深圳 518033; 2. 华中科技大学同济医学院感染科, 湖北 武汉 430074)

[摘要]目的 探讨乙型肝炎病毒 x 基因 (hepatitis B virus x gene, HBx) 和血管内皮生长因子受体 3 (vascular endothelial growth factor receptor 3, VEGFR3) 基因与乙型肝炎相关肝癌的相关性, 以及叶下珠水提物 (aqueous extract of *phyllanthus urinaria* L., AEP) 对 HBx 和 VEGFR3 蛋白表达的干预作用。方法 将 60 只 Balb/c-nu 裸鼠随机分为 10 组。分别复制转染 HBx、氯霉素乙酰转移酶 (chloramphenicol acetyltransferase, CAT) 和 VEGFR3 基因的 HepG2 肝癌细胞的裸鼠皮下移植瘤模型, 用 AEP 进行干预, 以生理盐水、环磷酰胺 (cyclophosphamide, CTX) 作为对照, 共治疗 6 周。观察模型复制后不同时间各组裸鼠的移植瘤生长状况, 采用酶联免疫吸附试验检测各组裸鼠血清甲胎蛋白 (alpha fetal protein, AFP) 水平, 采用 Western blot 方法检测移植瘤组织中 HBx 和 VEGFR3 蛋白表达水平。结果 肝癌移植瘤模型复制成功。各组裸鼠体质量均随着时间显著增长。实验结束时, 接种 HepG2-HBx 细胞的各组中, AEP 处理组肿瘤质量显著低于 CTX 处理组 ($P < 0.05$), 其 AFP 水平显著高于 NS 处理组 ($P < 0.05$), 其移植瘤组织中 HBx 表达水平显著低于 NS 组 ($P < 0.05$)。接种相同肝癌细胞的各组中, AEP 处理组 VEGFR3 表达水平最低, 但与 CTX 组 VEGFR3 表达水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); AEP 组和 CTX 组 VEGFR3 表达水平显著低于 NS 组 ($P < 0.05$)。对于相同的处理因素, 接种 HepG-HBx 细胞和 HepG-CAT 细胞的裸鼠移植瘤组织中 VEGFR3 表达水平均显著低于接种 HepG-VEGFR3 细胞的裸鼠 ($P < 0.01$)。结论 AEP 通过直接抑制 HBx 蛋白和 VEGFR3 蛋白表达, 及通过抑制 HBx 蛋白表达而间接抑制 VEGFR3 蛋白表达, 达到对肝癌移植瘤生长的抑制作用。

[关键词] 叶下珠; 乙型肝炎病毒 x 基因; 血管内皮生长因子受体 3; 肝癌

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[DOI]** 10.3969/j.issn.2095-7246.2014.04.025

目前认为, 乙型肝炎病毒 X 基因 (hepatitis B virus x gene, HBx) 对于乙型肝炎相关肝癌的形成和进展起到关键作用, 而肿瘤的生长和转移赖以血管内皮生长因子受体 (vascular endothelial growth factor receptors, VEGFRs), 其中 VEGFR3 主要作用于淋巴通路^[1], 其与 HBx 是否存在相互作用及其机制尚不得而知。本研究通过复制转染 HBx 基因、VEGFR3 基因和氯霉素乙酰转移酶 (chloramphenicol acetyltransferase, CAT) 基因的肝癌皮下移植瘤模型, 并用中药叶下珠水提物 (the aqueous extract of *phyllanthus urinaria* L., AEP) 进行干预, 拟探讨 HBx 和 VEGFR3 在乙型肝炎相关肝癌中的作用。

1 材料

稳定人肝癌细胞株 HepG2-HBx, HepG2-CAT, HepG2-VEGFR3, 由本课题组前期通过逆转

录病毒转染法构建, 液氮冻存于本院中心实验室。AEP, 由本课题组采用乙醇水提取法制备^[2]。环磷酰胺 (cyclophosphamide, Cytoxan, CTX) 针剂 (江苏恒瑞医药股份有限公司, 国药准字号为 H32020857, 批号 11031921)。裸鼠 (Balb/c-nu 裸小鼠) 60 只, 购自南方医科大学实验动物中心 (实验动物生产合格证号: SCXK (粤) 2006-0015; 编号: 0083740), 4 周龄, 雄性, 体质量 10.87 ~ 17.21 g。VEGFR3 兔多抗、HBx 单抗 (Abcam) 等, 购自广州英韦创津生物科技有限公司, 按试剂盒说明书操作。其他实验材料由广州中医药大学基础医学院分子免疫研究所提供。

2 方法

2.1 细胞制备^[3] 将液氮冻存细胞 HepG2-HBx, HepG2-CAT, HepG2-VEGFR3 分别按常规复苏、传代、扩增, 检测细胞活力, 调细胞浓度至 1.0×10^7 /ml。

2.2 动物管理 裸鼠 (实验动物使用许可证号: SYXK (粤) 2008-0001) 在 3 种肝癌细胞扩增完成前 1 周购买, 立即进行编号、称体质量、分装, 饲养于广

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30873245); 广东省深圳市科技计划项目 (201202154)

作者简介: 魏春山 (1975-), 男, 博士, 主治医师

通信作者: 童光东, tg755@163.com

州中医药大学实验动物中心 SPF 实验室(编号 0058667), 25 ℃室内饲养, 以适应环境, 每周称体质量 1 次。

2.3 动物分组 通过 SPSS 17.0 随机数字法, 对动物进行随机分组, 每组 6 只, 共 10 组(G1—G10), 常规饲养 1 周后复制肝癌移植瘤模型, 模型复制成功后按照分组分别进行药物干预(见表 1)。

表 1 接种不同肝癌细胞的裸鼠分组及药物处理因素

分组	分组简称	n	接种细胞	处理因素
1	G1	6	0.9% NS	NS
2	G2	6	HepG2-HBx	NS
3	G3	6	HepG2-HBx	CTX
4	G4	6	HepG2-HBx	AEP
5	G5	6	HepG2-CAT	NS
6	G6	6	HepG2-CAT	CTX
7	G7	6	HepG2-CAT	AEP
8	G8	6	HepG2-VEGFR3	NS
9	G9	6	HepG2-VEGFR3	CTX
10	G10	6	HepG2-VEGFR3	AEP

注: NS(normal saline): 生理盐水。

2.4 模型复制方法 收集 1.0×10^7 /ml 的目的细胞悬液, 外包装灭菌后送入实验动物中心。模型复制前称量裸鼠体质量。G1 组每只颈背部皮下注射 0.2 ml 生理盐水。G2—G10 组每只颈背部皮下分别注射 1.0×10^7 /ml 轻轻摇匀的目的细胞 0.2 ml。注射后可见注射部位一圆形或椭圆形粟米大小皮丘状突起, 局部皮肤发白。

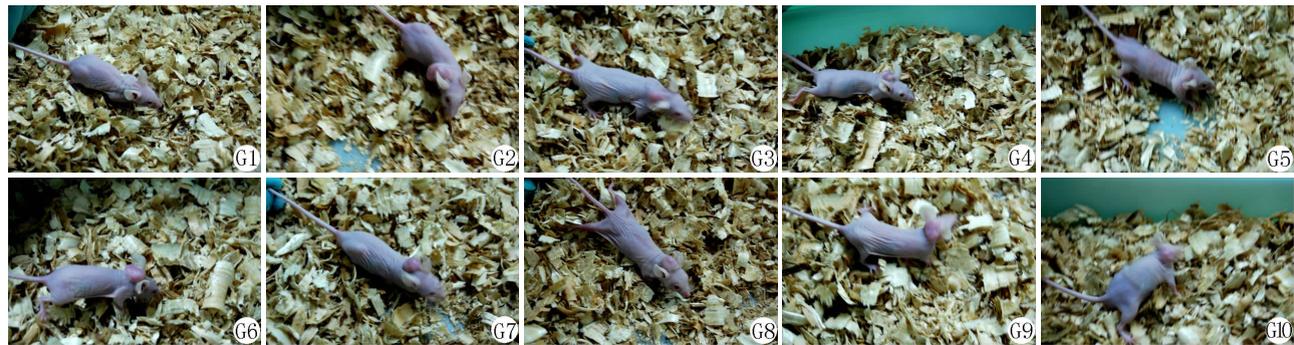


图 1 裸鼠移植瘤模型(示颈背部皮下移植瘤)

3.2 各组裸鼠体质量变化比较 裸鼠体质量均随时间增长, 经重复测量数据的方差分析, 结果显示不同观察时间的体质量差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。且不同观察时间与各分组之间也存在交互作用($P < 0.05$), 在接种肝癌细胞后第 8 周, G1 组裸鼠体质量显著高于 G2、G4、G5、G7、G8、G10 组($P < 0.05$, 或 $P < 0.01$)。见图 2。

3.3 接种不同肝癌细胞和接受不同处理因素的裸鼠移植瘤质量比较 经两因素析因设计的方差分析, 各组总体方差齐($P = 0.495$)。组间分析结果显

2.5 给药剂量和方法 AEP 口服给药剂量为 14.25 g/kg(相当于成人剂量的 12.5~18.0 倍), 采用灌胃法, 每周 6 次。CTX 给药剂量(注射剂量)为每只小鼠 46.57 mg/kg(相当于成人临床用量的 20 倍)。NS 用法: 与 AEP 等容积灌胃, 按每只小鼠 46.57 mg/kg 腹腔注射 CTX, 每周 5 次。按 CTX 使用疗程, 共使用 30 次(1 个疗程), 疗程结束时采集标本。

2.6 取材 疗程结束时称量裸鼠体质量, 常规摘除眼球取血, 颈椎脱臼法处死, 取肿瘤、肝脏等新鲜组织。

2.7 观察指标及检测 分别观察实验动物体质量; 瘤体质量、形态等; 酶联免疫吸附法测定血清甲胎蛋白(alpha fetal protein, AFP)水平; Western blot 检测瘤组织 HBx、VEGFR3 蛋白表达。

2.8 统计学方法 运用 SPSS 17.0 进行统计学分析。连续型变量采用“均数±标准差($\bar{x} \pm s$)”进行统计学描述。因素内和(或)因素间均数差异比较, 采用单因素方差分析、两因素析因设计的方差分析或重复测量设计的方差分析, 均数多重比较采用 LSD 法。显著性水准: $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 各组裸鼠移植瘤复制情况 模型复制后第 7 天, 接种 3 种肝癌细胞的各组裸鼠瘤体直径已达 0.5~0.8 cm, 质感稍韧, 可在皮下移动, 视为模型复制成功, 模型复制成功率为 100%。见图 1。

示, 接种细胞因素对肿瘤质量差异的主效应无统计学意义($P = 0.169$); 而处理因素(NS、CTX 及 AEP)间及处理因素与接种细胞间的交互作用均有统计学意义($P < 0.05$, 或 $P < 0.01$)。进一步将处理因素的主效应进行多重比较, 结果提示两治疗组(CTX 组与 AEP 组)与对照组(NS 组)肿瘤质量比较, 差异均有统计学意义($P < 0.01$), 但 AEP 组与 CTX 组之间肿瘤质量差异无统计学意义($P > 0.05$)。

按接种细胞进行分层, 对处理因素的效应进行

多重检验,结果显示,相同接种细胞组内,CTX组和AEP组与NS组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);接种HepG2-HBx细胞各组中,AEP组(G4)肿瘤生长最慢,且与CTX组比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$),提示AEP有更好的抑制HBx相关肿瘤生长的作用;而接种HepG2-CAT细胞与HepG2-VEGFR3细胞的各组中,AEP组和CTX组肿瘤质量比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表2。

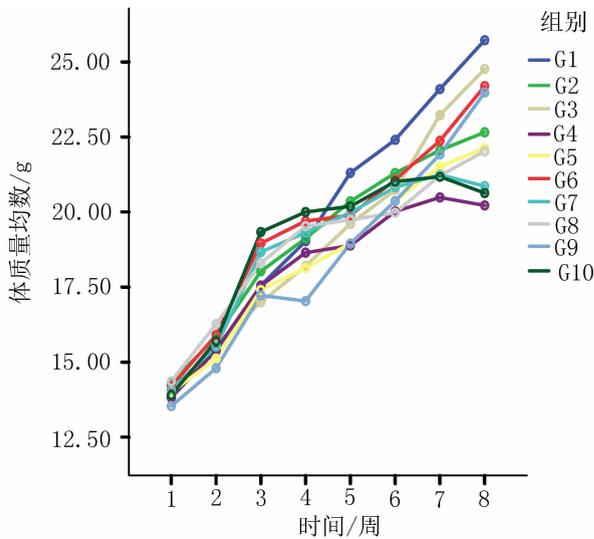


图2 接种肝癌细胞后不同时间
各组裸鼠体质量比较($n=6$)

表2 接种不同肝癌细胞和接受不同处理
因素的裸鼠移植瘤质量比较($\bar{x} \pm s$)

接种细胞	处理因素	组别	n	移植瘤质量/g
HepG2-HBx	NS	G2	6	3.17 ± 0.35
	CTX	G3	6	2.23 ± 0.29*
	AEP	G4	6	1.60 ± 0.37* [△]
HepG2-CAT	NS	G5	6	2.87 ± 0.19
	CTX	G6	6	1.82 ± 0.19*
	AEP	G7	6	1.89 ± 0.26*
HepG2-VEGFR3	NS	G8	6	3.04 ± 0.22
	CTX	G9	6	2.00 ± 0.31*
	AEP	G10	6	2.08 ± 0.39*

注:与接种同一肝癌细胞、接受NS处理组比较,* $P < 0.05$;与接种同一肝癌细胞、接受CTX处理组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

3.4 各组裸鼠血清AFP水平比较 两因素析因设计的方差分析结果显示,各组总体方差齐($P > 0.05$)。接种细胞因素与处理因素的主效应差异均无统计学意义($P > 0.05$);而处理因素与接种细胞间的交互作用有统计学意义($P < 0.05$)。按接种细胞进行分层,对处理因素的效应进行多重比较,结果显示,接种HepG2-HBx细胞的各组中,NS组与CTX组、AEP组AFP水平比较,差异均有统计学

意义($P < 0.05$)。见表3。

表3 各组裸鼠血清AFP水平比较($\bar{x} \pm s$)

接种细胞	处理因素	组别	n	AFP/(ng/ml)
HepG2-HBx	NS	G1	6	3.08 ± 1.59
	NS	G2	6	2.90 ± 2.35
	CTX	G3	6	4.90 ± 1.26*
HepG2-CAT	AEP	G4	6	4.38 ± 2.55*
	NS	G5	6	5.00 ± 1.51
	CTX	G6	6	2.70 ± 1.23
HepG2-VEGFR3	AEP	G7	6	2.83 ± 1.92
	NS	G8	6	2.62 ± 1.80
	CTX	G9	6	3.78 ± 1.02
	AEP	G10	6	2.73 ± 1.91

注:与接种HepG2-HBx细胞、接受NS处理组比较,* $P < 0.05$ 。

3.5 接种HepG2-HBx肝癌细胞的各组裸鼠移植瘤组织HBx表达水平 单因素方差分析及事后多重比较结果显示,AEP组与CTX组移植瘤组织中HBx表达水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);与NS组比较,AEP组和CTX组移植瘤组织中HBx表达水平均显著降低($P < 0.05$)。结果表明AEP和CTX均具有显著抑制移植瘤组织中HBx表达的作用。见图3和表4。

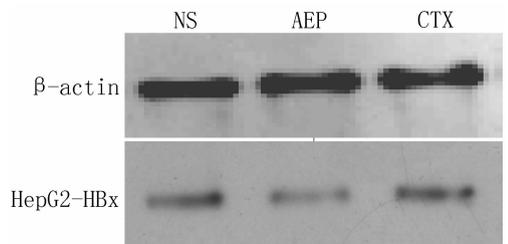


图3 接种HepG2-HBx肝癌细胞的各组裸鼠
移植瘤组织HBx表达水平(Western Blot法)

表4 接种HepG2-HBx肝癌细胞的各组裸鼠
移植瘤组织HBx表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

处理因素	组别	n	HBx相对表达水平
NS	G2	6	0.0367 ± 0.0045
CTX	G3	6	0.0323 ± 0.0031*
AEP	G4	6	0.0320 ± 0.0019*

注:与NS组比较,* $P < 0.05$ 。

3.6 接种不同肝癌细胞的各组裸鼠移植瘤组织中VEGFR3表达水平比较 两因素析因设计的方差分析结果显示,各组总体方差齐($P > 0.05$)。接种细胞因素及处理因素的主效应差异均有统计学意义($P < 0.01$);而处理因素与接种细胞间的交互作用无统计学意义($P > 0.05$)。且接种细胞较处理因素对总变异的贡献更大(0.785 vs 0.465)。

按接种细胞进行分层,对处理因素的效应进行多重比较,结果显示,接种相同肝癌细胞的各组中,

AEP 组 VEGFR3 表达水平最低,但与 CTX 组表达水平比较,差异无统计学差异($P>0.05$);AEP 组和 CTX 组 VEGFR3 表达水平显著低于 NS 组($P<0.05$)。结果表明 AEP 具有较好的抑制肝癌细胞中 VEGFR3 表达的作用。

按处理因素进行分层,对接种细胞的效应进行多重比较,结果显示,对于相同的处理因素,接种 HepG-VEGFR3 细胞的裸鼠移植瘤组织中 VEGFR3 表达水平最高,接种 HepG-CAT 细胞的裸鼠移植瘤组织中 VEGFR3 表达水平最低,接种 HepG-HBx 细胞和 HepG-CAT 细胞的裸鼠移植瘤组织中 VEGFR3 表达水平均显著低于接种 HepG-VEGFR3 细胞的裸鼠移植瘤组织中 VEGFR3 表达水平($P<0.01$)。提示 HBx 蛋白可能具有上调肝癌细胞中 VEGFR3 表达的作用,AEP 可抑制接种 3 种肝癌细胞的裸鼠移植瘤组织中 VEGFR3 的表达,AEP 抑制肝癌移植瘤组织中 VEGFR3 表达的作用与 HBx 蛋白的表达具有一定关联。见图 4 和表 5。

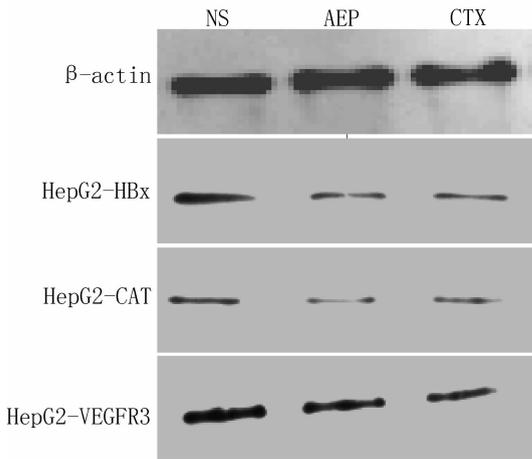


图 4 接种不同肝癌细胞的各组裸鼠移植瘤组织中 VEGFR3 表达水平(Western Blot 法)

表 5 接种不同肝癌细胞的各组裸鼠移植瘤组织中 VEGFR3 表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

接种细胞	处理因素	组别	n	VEGFR3 相对表达水平
HepG2-HBx	NS	G2	6	0.130 3±0.017 4
	CTX	G3	6	0.112 5±0.014 1*
	AEP	G4	6	0.106 7±0.010 3*
HepG2-CAT	NS	G5	6	0.119 7±0.009 2
	CTX	G6	6	0.101 3±0.010 5*
	AEP	G7	6	0.093 7±0.006 6*
HepG2-VEGFR3	NS	G8	6	0.161 7±0.011 5
	CTX	G9	6	0.147 7±0.010 6*
	AEP	G10	6	0.143 7±0.006 6*

注:与接种相同细胞、接受 NS 处理组比较,* $P<0.05$ 。

4 讨论

肿瘤血管和淋巴管生成是肿瘤转移过程中的重要条件,VEGF 及各 VEGFR 发挥着各自不同的作用^[4],其中 VEGFR3 参与促进新生血管的生长,特别是肿瘤淋巴管的生长和发育,对肿瘤的生长和转移起着独特的作用^[1]。而在乙型肝炎患者肿瘤形成过程中,HBx 蛋白是一种多功能的调节蛋白,具有广泛的反式激活功能,在肝癌的发生、发展到侵袭转移中发挥着不可忽视的作用^[5],两者是否对肝癌的生长和转移具有协同作用尚不明确^[6]。

叶下珠(*Phyllanthus urinaria* L)为大戟科叶下珠属植物,含有生物碱类、多酚类等多种成分^[7],全草入药,具有抗乙型肝炎病毒和抗肿瘤等作用^[8]。目前从叶下珠中分离出没食子酸、鞣花酸等多种化合物,其中多酚和可水解鞣质为叶下珠的主要活性成分,没食子酸的含量最高,没食子酸是可水解鞣质的单体,具有抗病毒、抗肿瘤^[2, 5]、抗血管生成^[9]等作用,还有直接抗病毒作用^[10]。而在目前研究中,尚无叶下珠对肝癌 VEGFR3 表达作用的相关报道。

此前,笔者以扶正祛邪为纲,拟定了复方叶下珠作为防治肝癌的协定方,并主要用于治疗肝癌及癌前病变^[11],以及 HBxAg 致肝癌的研究,证实复方叶下株可通过抑制 HBxAg 表达发挥抗肿瘤效应^[12],阻止肝癌前病灶生长及肝癌的形成^[13],但两者机制并不明确。在对叶下珠单体的研究中,进一步发现两种新的乙酰化黄酮苷化合物,可能发挥主要药用价值^[14]。

本研究中,各组动物体质量均随时间增长,实验结束时,接种 HepG2-HBx 细胞的各组中,AEP 组(G4)肿瘤质量及 HBx 表达水平均较 CTX 组更低,也与前期结果一致^[12]。按处理因素进行分层,对接种细胞因素的效应进行多重比较,结果显示,在接受 NS 处理的各移植瘤模型中,接种 HepG2-HBx 细胞和 HepG2-VEGFR3 细胞的裸鼠移植瘤组织中 VEGFR3 表达水平均显著高于接种 HepG2-CAT 细胞组($P<0.05$),表明 VEGFR3 在接种 HepG2-HBx 细胞和 HepG2-VEGFR3 细胞的 Balb/c 裸鼠皮下移植瘤组织中均有较强表达,HBx 可能上调肝癌细胞中 VEGFR3 表达水平。按接种细胞因素进行分层,对于接种相同肝癌细胞的各组裸鼠,AEP 处理组 VEGFR3 表达水平均显著低于 NS 和 CTX 处理组,表明 AEP 具有较好的抑制肝癌细胞 VEGFR3 表达水平的作用。

综上所述,AEP 不仅对肝癌移植瘤中 HBx 表达具有直接抑制作用,同时也直接抑制肝癌移植瘤

中 VEGFR3 蛋白表达,并可能通过抑制 HBx 蛋白表达间接抑制 VEGFR3 蛋白表达,实现对乙型肝炎相关性肝癌的抑制作用。同时,AEP 对 HBx 阴性肝癌的抑制作用,可能也是通过 VEGFR3 途径得以实现的。由于乙型肝炎相关肝癌的机制尚未完全明了,其携带 HBx 或 VEGF 及相关 VEGFR 的水平可能也与外源性转染基因存在较大差异,因此,对其相关性尚有待进一步探讨和确认。

参考文献:

- [1] Matsumoto M, Roufail S, Inder R, et al. Signaling for lymphangiogenesis via VEGFR-3 is required for the early events of metastasis[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2013, 30(6):819-832.
- [2] 彭立生,贺劲松,童光东,等. 叶下珠提取物抗乙肝病病毒及乙型肝炎 X 基因的研究[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2006,16(6):340-343.
- [3] 魏春山. 叶下珠及其复方对 HBx 介导肝癌 VEGFR3 表达的影响[D]. 广州:广州中医药大学, 2012.
- [4] Shibuya M. VEGF-VEGFR signals in health and disease[J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2014,22(1):1-9.
- [5] 段昌虎,郇升. HBx 与肝细胞癌发病机制的研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2013(24):2397-2402.
- [6] 刘凯歌,高红艳,赵慧,等. HBx 和 VEGF 与乙肝相关性肝癌组织血管生成及转移的关系[J]. *吉林大学学报:医学版*, 2010,36(2):372-376.

- [7] 孙伟. 苦味叶下珠的化学成分研究[J]. *中草药*, 2012, 43(1):23-26.
- [8] Huang ST, Pang JH, Yang RC. Anti-cancer effects of *Phyllanthus urinaria* and relevant mechanisms [J]. *Chang Gung Med J*, 2010,33(5):477-487.
- [9] 季秀海. 中药叶下珠抗血管生成作用的筛选及机理研究[D]. 南京:南京中医药大学, 2010.
- [10] 窦志芳,冯前进,周爱香. 苦味叶下珠总多酚-壳聚糖复合物体外抗病毒作用研究[J]. *中药药理与临床*, 2007,23(2):30-32.
- [11] 童光东,张希,周大桥,等. 乙型肝炎相关肝癌的癌前病变早期干预的临床研究[J]. *中华肝脏病杂志*, 2008,16(10):781-782.
- [12] 周大桥,童光东,贺劲松,等. 复方叶下珠对人 HepG2. 2. 15 细胞移植裸鼠 HBxAg 表达的影响[J]. *中国中药杂志*, 2006,31(19):1649-1651.
- [13] 周小舟,邱光清,贺劲松,等. 抗癌方阻止大鼠肝癌前病灶生长及肝癌形成的研究[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2007,17(2):92-93.
- [14] Wu C, Wei CS, Yu SF, et al. Two new acetylated flavonoid glycosides from *Phyllanthus urinaria* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2013,15(7):703-707.

(收稿日期:2014-05-19)

Effects of Aqueous Extract of *Phyllanthus urinaria* L. on Expression of Hepatitis B Virux X Gene and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 in Nude Mice Transplanted with Human Hepatoma Cells

WEI Chun-shan¹, TANG Hai-hong¹, WANG Hong-yan², XING Yu-feng¹; TONG Guang-dong¹, ZHOU Da-qiao¹

(1. Department of Hepatopathy, Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital, Guangdong Shenzhen 518033, China; 2. Department of Infectious Diseases, Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science & Technology, Hubei Wuhan 430074, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship of hepatitis B virux x gene (HBx) and vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR3) gene with hepatitis B-related liver cancer and the effects of aqueous extract of *Phyllanthus urinaria* L. (AEP) on the expression of HBx and VEGFR3. **Methods** Sixty Balb/c nude mice were randomly assigned to ten groups. A subcutaneous xenograft tumor model was induced by transplanting these nude mice with HepG2-HBx cells, HepG2-chloramphenicol acetyltransferase (CAT) cells, or HepG2-VEGFR3 cells. The treated mice were given AEP, normal saline (NS), or cyclophosphamide (CTX) for six weeks. The growth of xenograft tumor was evaluated at different time points after the model was induced. Serum alpha-fetoprotein (AFP) levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. The protein expression of HBx and VEGFR3 in xenograft tumor was measured by Western blot. **Results** The hepatoma xenograft model was successfully induced in nude mice. Each group showed a significant increase in body weight over time. At the end of the experiment, among all mice transplanted with HepG2-HBx cells, the AEP group had a significantly lower tumor weight than the CTX

· 方药研究 ·

延胡索块茎生长发育过程观察

胡珂, 韦佳玉

(安徽中医药大学药学院 现代中药安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230031)

[摘要]目的 观察延胡索不同生长期新生块茎和母块茎的特点。方法 用定点连续观察和石蜡切片法, 跟踪观察延胡索块茎形成过程及新生块茎、母块茎的生长变化。结果 由地下茎产生的新生块茎生长起点在母株的茎节处, 其形成需要某些必要的条件; 母块茎退化成更新块茎的周皮, 其脱落需要几个月的时间; 栽培品产生双生及多生块茎较野生品常见; 块茎中含有荧光生物碱。结论 新生块茎的形成方式具多样性; 退化的周皮对更新块茎具保护作用; 栽培品无性繁殖能力较强; 荧光生物碱在延胡索成熟块茎中的分布广泛, 没有聚集性。

[关键词]延胡索; 生长特点; 新生块茎; 母块茎

[中图分类号]R282 **[文献标志码]**A **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2014.04.026

常用中药延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 为多年生植物, 干燥的块茎入药, 有活血、止痛作用^[1]。笔者通过对安徽省合肥市大蜀山野生延胡索块茎以及安徽中医药大学药用植物园不同生长时期的栽培品块茎进行跟踪观察, 探讨新生块茎和母块茎生长过程中的特点, 研究延胡索块茎的形成方式, 以期为今后培育延胡索种块茎及提高其繁殖系数提供理论数据。

1 材料

1.1 材料 分别于2010年10月至2012年4月份采集安徽省合肥市大蜀山野生延胡索块茎, 以及安徽中医药大学药用植物园栽培的延胡索块茎, 经王德群教授鉴定为罂粟科植物延胡索 *Corydalis yan-*

husuo W. T. Wang 的块茎。

1.2 仪器 SL-58型数码相机: 普立尔科技有限公司; JY5002型电子天平: 上海良平仪器仪表有限公司; 奥林巴斯光学显微镜: 上海普赫光电科技有限公司; XSL-G显微摄像机: 上海长方光学仪器有限公司; 生物组织石蜡切片机: 上海创迅医疗器械有限公司; Leica CM1900型冰冻切片机: Leica Microsystems Nussloch GmbH 公司。

1.3 试剂 FAA固定液(38%甲醛5 ml, 冰醋酸5 ml, 70%乙醇90 ml): 上海谱振生物科技有限公司; 无水乙醇(分析纯): 上海试剂一厂; 二甲苯(分析纯): 上海谱振生物科技有限公司; 番红: 南京森贝伽生物科技有限公司; 固绿: 南京森贝伽生物科技有限公司; 切片石蜡: 上海懿洋仪器有限公司。

2 方法

2.1 由地下茎产生的新生块茎生长及形态观察 在每年的2—5月份新生块茎普遍产生的时期, 每10 d

基金项目:安徽高校省级自然科学基金项目(KJ 2009 B022);

安徽中医药大学自然科学基金项目(2013zr013)

作者简介:胡珂(1964-), 女, 硕士, 副教授

group ($P < 0.05$), and it had a significantly higher AFP level ($P < 0.05$) and a significantly lower expression of HBx in xenograft tumor ($P < 0.05$), as compared with the NS group. Among the mice transplanted with the same HepG2 cells, the AEP group had the lowest expression of VEGFR3, but there was no significant difference in VEGFR3 expression between the AEP group and CTX group ($P > 0.05$); the AEP group and CTX group had significantly lower VEGFR-3 expression levels than the NS group ($P < 0.05$). Among the mice receiving the same intervention, those transplanted with HepG2-HBx cells and HepG2-CAT cells had significantly lower expression of VEGFR3 in xenograft tumor than those transplanted with HepG2-VEGFR3 cells ($P < 0.01$). **Conclusion** AEP can directly suppress the protein expression of HBx and VEGFR3 in tumor tissues or indirectly suppress the protein expression of VEGFR3 by suppressing HBx expression, thus inhibiting the growth of hepatoma xenograft.

[Key words] *Phyllanthus urinaria* L.; hepatitis B virus x gene; vascular endothelial growth factor receptor 3; liver cancer