

## 白屈菜碱对小鼠肺癌细胞皮下移植瘤生长和血管生成的抑制作用及其机制

金学军<sup>1</sup>, 卢楚沅<sup>2</sup>

(1. 延边大学分子药物研究中心, 吉林 延吉 133002; 2. 延边大学医学院口腔医学系, 吉林 延吉 133002)

**[摘要]** **目的:** 探讨白屈菜碱对肺癌移植瘤小鼠肿瘤生长和血管生成的影响, 并阐明其作用机制。**方法:** 选取 32 只健康 C57BL/6 小鼠, 制备 Lewis 肺癌移植瘤小鼠模型。将小鼠随机分为模型组 (0.9% 氯化钠)、低剂量白屈菜碱组 (25 mg·kg<sup>-1</sup> 白屈菜碱)、高剂量白屈菜碱组 (50 mg·kg<sup>-1</sup> 白屈菜碱) 和阳性对照组 (60 mg·kg<sup>-1</sup> 环磷酰胺), 每组 8 只。称量各组小鼠移植瘤质量并计算抑瘤率, 计算各组小鼠胸腺指数和脾脏指数, 采用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 法检测各组小鼠血清中白细胞介素 2 (IL-2)、 $\gamma$  干扰素 (INF- $\gamma$ ) 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 水平, 免疫组织化学法检测各组小鼠肿瘤组织中血管内皮生长因子 (VEGF) 蛋白表达情况并计算微血管密度 (MVD) 及 VEGF 蛋白表达评分, Western blotting 法检测各组小鼠肿瘤组织中核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 和缺氧诱导因子 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) 蛋白表达水平。**结果:** 与模型组比较, 低和高剂量白屈菜碱组及阳性对照组小鼠移植瘤质量均降低 ( $P < 0.05$ ); 与低剂量白屈菜碱组比较, 高剂量白屈菜碱组和阳性对照组小鼠移植瘤质量均降低 ( $P < 0.05$ ), 抑瘤率均升高 ( $P < 0.05$ ); 与高剂量白屈菜碱组比较, 阳性对照组小鼠移植瘤质量均降低 ( $P < 0.05$ ), 抑瘤率升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 低和高剂量白屈菜碱组及阳性对照组小鼠脾脏指数和胸腺指数均升高 ( $P < 0.05$ ); 与低剂量白屈菜碱组比较, 高剂量白屈菜碱组和阳性对照组小鼠脾脏指数及胸腺指数均升高 ( $P < 0.05$ ); 与高剂量白屈菜碱组比较, 阳性对照组小鼠脾脏指数和胸腺指数均升高 ( $P < 0.05$ )。ELISA 法, 与模型组比较, 低和高剂量白屈菜碱组及阳性对照组小鼠血清中 IL-2、INF- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  水平均升高 ( $P < 0.05$ ); 与低剂量白屈菜碱组比较, 高剂量白屈菜碱组和阳性对照组小鼠血清中 IL-2、INF- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  水平均升高 ( $P < 0.05$ ); 与高剂量白屈菜碱组比较, 阳性对照组小鼠血清中 IL-2、INF- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  水平均升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 低和高剂量白屈菜碱组及阳性对照组小鼠肿瘤组织 MVD 降低 ( $P < 0.05$ ); 与低剂量白屈菜碱组比较, 高剂量白屈菜碱组和阳性对照组小鼠肿瘤组织 MVD 降低 ( $P < 0.05$ ); 与高剂量白屈菜碱组比较, 阳性对照组小鼠肿瘤组织中 MVD 降低 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 低和高剂量白屈菜碱组及阳性对照组小鼠肿瘤组织中 VEGF 蛋白表达量减少; 与低剂量白屈菜碱组比较, 高剂量白屈菜碱组和阳性对照组小鼠肿瘤组织中 VEGF 蛋白表达量减少; 与高剂量白屈菜碱组比较, 阳性对照组小鼠肿瘤组织中 VEGF 蛋白表达量减少; 模型组、低剂量白屈菜碱组、高剂量白屈菜碱组和阳性对照组小鼠肿瘤组织 VEGF 蛋白表达评分比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。Western blotting 法, 与模型组比较, 低和高剂量白屈菜碱组及阳性对照组小鼠肿瘤组织中 NF- $\kappa$ B 和 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达水平降低 ( $P < 0.05$ ); 与低剂量白屈菜碱组比较, 高剂量白屈菜碱组和阳性对照组小鼠肿瘤组织中 NF- $\kappa$ B 和 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达水平降低 ( $P < 0.05$ ); 与高剂量白屈菜碱组比较, 阳性对照组小鼠肿瘤组织中 NF- $\kappa$ B 和 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达水平降低 ( $P < 0.05$ )。**结论:** 白屈菜碱能够抑制 Lewis 肺癌移植瘤小鼠肿瘤组织生长、保护免疫器官和抑制肿瘤血管生成, 可能通过靶向 NF- $\kappa$ B/HIF-1 $\alpha$  信号通路和下调 NF- $\kappa$ B 及 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达水平发挥治疗作用。

[收稿日期] 2023-05-12

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81660608)

[作者简介] 金学军 (1970—), 吉林省延吉市人, 男, 教授, 医学博士, 主要从事肿瘤药理、免疫药理、中药药理、药物活性筛选和药效学方面的研究。

[通信作者] 金学军, 教授, 博士研究生导师 (E-mail: xjjin@ybu.edu.cn)

[关键词] 白屈菜碱; 核因子 $\kappa$ B; 缺氧诱导因子 $1\alpha$ ; 肺癌移植瘤; 血管生成  
[中图分类号] R392 [文献标志码] A

## Inhibitory effect of leucovorin on growth and angiogenesis of subcutaneous transplanted tumors in mouse lung cancer cells and its mechanism

JIN Xuejun<sup>1</sup>, LU Chuyuan<sup>2</sup>

(1. Center for Molecular Drug Research, Yanbian University, Yanji 133002, China; 2. Department of Dentistry, School of Medical Sciences, Yanbian University, Yanji 133002, China)

**ABSTRACT Objective:** To discuss the effects of leucovorin on tumor growth and angiogenesis in the mice with lung cancer transplantation tumor, and to elucidate its mechanism. **Methods:** Thirty-two healthy C57BL/6 mice were selected to prepare the Lewis lung cancer transplantation tumor models. The mice were randomly divided into model group (0.9% NaCl), low dose of leucovorin group (25 mg·kg<sup>-1</sup> leucovorin), high dose of leucovorin group (50 mg·kg<sup>-1</sup> leucovorin) and positive control group (60 mg·kg<sup>-1</sup> cyclophosphamide), and there were 8 mice in each group. The levels of interleukin-2 (IL-2), interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in serum of the mice in various groups were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) method; the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in tumor tissue of the mice in various groups were detected by immunohistochemistry, and the microvascular density (MVD) and VEGF protein expression scores were calculated; the expression levels of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and hypoxia inducible factor- $1\alpha$  (HIF- $1\alpha$ ) in tumor tissue of the mice in various groups were detected by Western blotting method. **Results:** Compared with model group, the transplantation tumor masses of the mice in low and high doses of leucovorin groups and positive control group were decreased ( $P < 0.05$ ); compared with low dose of leucovorin group, the transplantation tumor masses of the mice in high dose of leucovorin group and positive control group were decreased ( $P < 0.05$ ), and the tumor inhibitory rates were increased ( $P < 0.05$ ); compared with high dose of leucovorin group, the transplantation tumor mass of the mice in positive control group was decreased ( $P < 0.05$ ), and the tumor inhibitory rate was increased ( $P < 0.05$ ). Compared with model group, the spleen indexes and thymus indexes of the mice in low and high doses of leucovorin groups and positive control group were increased ( $P < 0.05$ ); compared with low dose of leucovorin group, the spleen indexes and thymus indexes of the mice in high dose of leucovorin group and positive control group were increased ( $P < 0.05$ ); compared with high dose of leucovorin group, the spleen index and thymus index of the mice in positive control group were increased ( $P < 0.05$ ). The ELISA method results showed that compared with model group, the levels of IL-2, INF- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in serum of the mice in low and high doses of leucovorin groups and positive control group were increased ( $P < 0.05$ ); compared with low dose of leucovorin group, the levels of IL-2, INF- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in serum of the mice in high dose of leucovorin group and positive control group were increased ( $P < 0.05$ ); compared with high dose of leucovorin group, the levels of IL-2, INF- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in serum of the mice in positive control group were increased ( $P < 0.05$ ). Compared with model group, the MVD in tumor tissue of the mice in low and high dose of leucovorin groups and positive control group was decreased ( $P < 0.05$ ); compared with low dose of leucovorin group, the MVD in tumor tissue of the mice in high dose of leucovorin group and positive control group was decreased ( $P < 0.05$ ); compared with high dose of leucovorin group, the MVD in tumor tissue of the mice in positive control group was decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with model group, the expression amounts of VEGF

protein in tumor tissue of the mice in low and high dose of leucovorin groups and positive control group were decreased; compared with low dose of leucovorin group, the expression amounts of VEGF protein in tumor tissue of the mice in high dose of leucovorin group and positive control group were decreased; compared with high dose of leucovorin group, the expression amount of VEGF protein in tumor tissue of the mice in positive control group was decreased. The differences in VEGF protein expression scores between model group, low dose of leucovorin group, high dose of leucovorin group and positive control group were statistically significant ( $P < 0.05$ ). Compared with model group, the expression levels of NF- $\kappa$ B and HIF-1 $\alpha$  in tumor tissue of the mice in low and high doses of leucovorin groups and positive control group were decreased ( $P < 0.05$ ); compared with low dose of leucovorin group, the expression levels of NF- $\kappa$ B and HIF-1 $\alpha$  in tumor tissue of the mice in high dose of leucovorin group and positive control group were decreased ( $P < 0.05$ ); compared with high dose of leucovorin group, the expression levels of NF- $\kappa$ B and HIF-1 $\alpha$  in tumor tissue of the mice in positive control group were decreased ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** Leucovorin can inhibit the tumor growth, protect the immune organs and suppress the tumor angiogenesis in the Lewis lung cancer transplantation tumor mice, and may exert the therapeutic effect by targeting NF- $\kappa$ B/HIF-1 $\alpha$  signaling pathway and down-regulating the expression levels of NF- $\kappa$ B and HIF-1 $\alpha$  proteins.

**KEYWORDS** Leucovorin; Nuclear factor- $\kappa$ B; Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ ; Lung cancer transplantation tumor; Angiogenesis

肺癌是目前常见的恶性肿瘤,也是全球死亡率和发病率最高的恶性肿瘤,严重威胁患者的生命健康<sup>[1-3]</sup>。肺癌的发病机制复杂,与吸烟、空气污染、职业致癌因子、饮食和遗传等因素密切相关<sup>[4-5]</sup>。对于早期肺癌患者而言,手术切除是最佳治疗方法,但大部分患者就诊时病情已发展至中晚期,治疗手段有限,因此患者预后较差<sup>[6-7]</sup>。白屈菜为罂粟科白屈菜属多年生草本植物白屈菜全草,其化学成分主要包括白屈菜碱、白屈菜红碱和原阿片碱等,具有抗菌、镇痛和兴奋平滑肌的作用,在肠炎、慢性支气管炎和百日咳等疾病及多种恶性肿瘤中发挥重要作用<sup>[8-9]</sup>。本研究通过建立肺癌移植瘤小鼠模型,探讨白屈菜碱对肿瘤生长、免疫功能及血管生成的影响,并阐明其作用机制,为后续研究提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物、细胞、药物、主要试剂和仪器** 健康清洁级C57BL/6小鼠32只,雌雄各半,6~8周龄,体质量18~22 g,购自杭州子源实验动物科技有限公司,动物生产许可证号:SCXK(浙)2019-0004。Lewis肺腺癌细胞购自中国科学院细胞资源中心。白屈菜碱(批号150706,纯度 $\geq 98\%$ )购自成都普菲德生物技术有限公司。环磷酰胺购自美国Sigma-Aldrich公司,多聚甲醛购自武汉塞维尔生物科技有限公司,酶联免疫吸附测定(enzyme-linked

immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自江苏菲亚生物科技有限公司,SP试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,DAB显色试剂盒和苏木精染色剂购自武汉塞维尔生物科技有限公司。游标卡尺购自西安艾瑞泽商贸有限公司,101-1AB型恒温鼓风干燥箱购自北京伟科永兴有限公司,离心机购自湖南长沙湘仪仪器有限公司,电泳仪购自北京君意公司,凝胶成像系统购自法国VILBER BIO IMAGING公司。

**1.2 实验动物造模、分组和给药** 收集Lewis肺腺癌细胞,调整细胞悬液浓度至 $6 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ,每只小鼠右侧腋部皮下注射细胞悬液0.2 mL,建立皮下移植瘤小鼠模型。接种后8~10 d,可触摸到肿瘤,肿瘤直径约为2~3 mm,成瘤率为100%。将32只C57BL/6小鼠按照数字表法随机分为模型组、低剂量白屈菜碱组、高剂量白屈菜碱组和阳性对照组,每组8只。建模10 d后给药,模型组小鼠腹腔注射0.200 mL 0.9%氯化钠,低剂量白屈菜碱组和高剂量白屈菜碱组小鼠腹腔注射0.125 mL ( $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )和0.250 mL ( $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )白屈菜碱,阳性对照组小鼠腹腔注射0.300 mL ( $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )环磷酰胺,每日1次,连续给药14 d。给药结束7 d后处死小鼠,剥离小鼠肿瘤组织,部分组织置于4%多聚甲醛液中固定,剩余组织置于 $-80^\circ\text{C}$ 冰箱冻存备用。

**1.3 称量各组小鼠移植瘤质量并计算抑瘤率** 称量各组小鼠肿瘤组织质量, 并计算各组小鼠抑瘤率。抑瘤率 = (模型组小鼠肿瘤组织平均质量 - 给药组小鼠肿瘤组织平均质量) / 模型组小鼠肿瘤组织平均质量 × 100%。

**1.4 计算各组小鼠脾脏指数和胸腺指数** 剥离各组小鼠脾脏组织和胸腺组织, 计算各组小鼠脾脏指数和胸腺指数。脾脏指数 = 脾脏质量 (mg) / 小鼠体质量 (g); 胸腺指数 = 胸腺质量 (mg) / 小鼠体质量 (g)。

**1.5 采用ELISA法检测各组小鼠血清中白细胞介素2(interleukin-2, IL-2)、 $\gamma$ 干扰素(interferon- $\gamma$ , INF- $\gamma$ )和肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )水平** 小鼠处死后眼眶取血, 存放至无抗凝剂的试管中, 室温静置 30 min, 移液器吸取上层淡黄色血清, 转移至离心管中, 3 000 g 离心 15 min。取上清液, 采用ELISA法检测各组小鼠血清中IL-2、INF- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 水平。

**1.6 免疫组织化学法检测各组小鼠肿瘤组织中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)蛋白表达情况和微血管密度(microvessel density, MVD)** 10%多聚甲醛固定小鼠肿瘤组织, 石蜡切片, 免疫组织化学染色按照SP试剂盒操作说明书进行。VEGF蛋白阳性表达为肿瘤细胞中细胞浆或细胞膜上的阳性物质呈棕黄色。采用Bresalier半定量法计算各组小鼠VEGF蛋白表达评分<sup>[10]</sup>。细胞染色程度评分: 0分为不显色, 1分为浅黄色, 2分为棕黄色, 3分为棕褐色; 阳性细胞数评分: 0分为阳性细胞数 $\leq 5\%$ , 1分为阳性细胞数 $> 5\%$ 且 $\leq 25\%$ , 2分为阳性细胞数 $> 25\%$ 且 $\leq 50\%$ , 3分为阳性细胞数 $> 51\%$ 且 $\leq 75\%$ , 4分为阳性细胞数 $> 75\%$ 。VEGF蛋白表达评分 = 细胞染色程度评分 + 阳性细胞数评分。VEGF蛋白表达评分0~1分为(-), 2~3分为(+), 4~5分为(++), 6~7分为(+++)。采用Weidner法计算各组小鼠肿瘤组织中微血管数, 在低倍镜( $\times 40$ )下选取小鼠组织切片中微血管数最多的3个区域, 并在高倍镜( $\times 400$ )下计数<sup>[11]</sup>。其中被CD34抗体染成棕黄色孤立的内皮细胞或内皮细胞簇团且与邻近微血管分开, 即为一个微血管, 以3个视野下微血管数平均值代表MVD。

**1.7 Western blotting法检测各组小鼠肿瘤组织中核因子 $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)和缺氧诱导因子1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )蛋白表达水平** 取各组小鼠肿瘤组织, 预冷RIPA裂解液提取细胞总蛋白, BCA法定量蛋白, 95℃震荡5 min变性, 10% SDS-PAGE分离, 转移至PVDF膜, 5%脱脂奶粉室温封闭膜1 h, 加入一抗NF- $\kappa$ B(1:500)、HIF-1 $\alpha$ (1:500)和 $\beta$ -actin(1:2500), 4℃孵育过夜, TBST溶液洗涤3次, 加入二抗(1:3000), 室温孵育2 h, TBST溶液洗涤3次, ECL显影, 采用Image J软件分析蛋白条带灰度值, 以 $\beta$ -actin为内参, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平 = 目的蛋白条带灰度值 / 内参蛋白条带灰度值。

**1.8 统计学分析** 采用SPSS 22.0统计软件进行统计学分析。各组小鼠移植瘤质量、抑瘤率、脾脏指数、胸腺指数、血清中IL-2、INF- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 水平、肿瘤组织中MVD、VEGF蛋白表达评分和NF- $\kappa$ B及HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达水平均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用独立样本 $t$ 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组小鼠移植瘤质量和抑瘤率** 与模型组比较, 低和高剂量白屈菜碱组及阳性对照组小鼠移植瘤质量均减小( $P < 0.05$ )。与低剂量白屈菜碱组比较, 高剂量白屈菜碱组和阳性对照组小鼠移植瘤质量均减小( $P < 0.05$ ), 抑瘤率均升高( $P < 0.05$ )。与高剂量白屈菜碱组比较, 阳性对照组小鼠移植瘤质量减小( $P < 0.05$ ), 抑瘤率升高( $P < 0.05$ )。见表1。

表1 各组小鼠移植瘤质量和抑瘤率

Tab. 1 Weights and tumor inhibitory rates of transplanted tumors of mice in various groups ( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

Group	Transplant Tumor weight (m/g)	Tumor inhibition rate( $\eta$ /%)
Model	2.58 $\pm$ 0.15	—
Low dose of leucovorin	2.21 $\pm$ 0.10*	14.34 $\pm$ 4.73
High dose of leucovorin	1.98 $\pm$ 0.08 $^{\Delta}$	23.26 $\pm$ 3.25 $^{\Delta}$
Positive control	1.76 $\pm$ 0.05 $^{\Delta\#}$	31.78 $\pm$ 2.87 $^{\Delta\#}$

“—”: No data. \* $P < 0.05$  vs model group;  $^{\Delta}P < 0.05$  vs low dose of leucovorin group;  $^{\#}P < 0.05$  vs high dose of leucovorin group.

**2.2 各组小鼠脾脏指数和胸腺指数** 与模型组比较, 低和高剂量白屈菜碱组及阳性对照组小鼠脾脏指数和胸腺指数均升高 ( $P < 0.05$ )。与低剂量白屈菜碱组比较, 高剂量白屈菜碱组和阳性对照组小鼠脾脏指数及胸腺指数均升高 ( $P < 0.05$ )。与高剂量白屈菜碱组比较, 阳性对照组小鼠脾脏指数和胸腺指数均升高 ( $P < 0.05$ )。见表2。

### 2.3 各组小鼠血清中 IL-2、INF- $\gamma$ 和 TNF- $\alpha$ 水平

与模型组比较, 低和高剂量白屈菜碱组及阳性对照组小鼠血清中 IL-2、INF- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  水平均升高 ( $P < 0.05$ )。与低剂量白屈菜碱组比较, 高剂量白屈菜碱组和阳性对照组小鼠血清中 IL-2、INF- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  水平均升高 ( $P < 0.05$ )。与高剂

表2 各组小鼠脾脏指数和胸腺指数

Tab. 2 Spleen indexes and thymus indexes of mice in various groups [n=8,  $\bar{x} \pm s, \omega_B / (\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$ ]

Group	Spleen index	Thymus index
Model	4.24 ± 0.18	1.72 ± 0.23
Low dose of leucovorin	4.68 ± 0.25*	2.13 ± 0.25*
High dose of leucovorin	5.12 ± 0.31 <sup>△</sup>	2.61 ± 0.29 <sup>△</sup>
Positive control	5.66 ± 0.33 <sup>△#</sup>	3.22 ± 0.31 <sup>△#</sup>

\* $P < 0.05$  vs model group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  vs low dose of leucovorin group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs high dose of leucovorin group.

量白屈菜碱组比较, 阳性对照组小鼠血清中 IL-2、INF- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  水平均升高 ( $P < 0.05$ )。见表3。

表3 各组小鼠血清中 IL-2、INF- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  水平

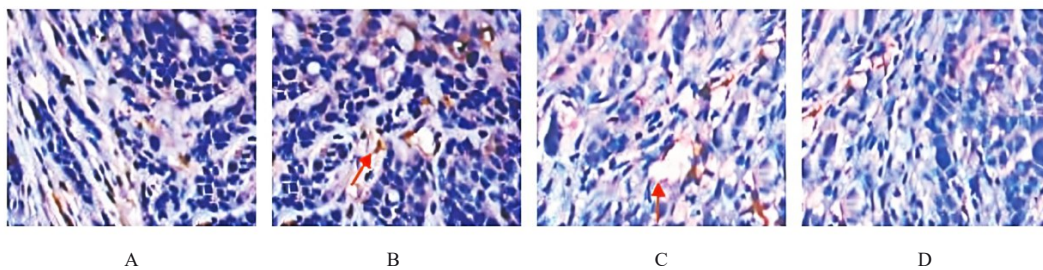
Tab. 3 Levels of IL-2, INF- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$  in serum of mice in various groups [n=8,  $\bar{x} \pm s, \rho_B / (\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$ ]

Group	IL-2	INF- $\gamma$	TNF- $\alpha$
Model	14.56 ± 0.33	152.33 ± 2.65	69.53 ± 2.16
Low dose of leucovorin	15.53 ± 0.51*	158.43 ± 3.03*	75.58 ± 2.62*
High dose of leucovorin	16.08 ± 0.53 <sup>△</sup>	163.12 ± 3.58 <sup>△</sup>	79.64 ± 3.08 <sup>△</sup>
Positive control	16.92 ± 0.61 <sup>△#</sup>	168.02 ± 3.77 <sup>△#</sup>	83.57 ± 3.36 <sup>△#</sup>

\* $P < 0.05$  vs model group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  vs low dose of leucovorin group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs high dose of leucovorin group.

**2.4 各组小鼠肿瘤组织 MVD** 与模型组比较, 低和高剂量白屈菜碱组及阳性对照组小鼠肿瘤组织 MVD 降低 ( $P < 0.05$ )。与低剂量白屈菜碱组比较, 高剂量白屈菜碱组和阳性对照组小鼠肿瘤组织

MVD 降低 ( $P < 0.05$ )。与高剂量白屈菜碱组比较, 阳性对照组小鼠肿瘤组织 MVD 降低 ( $P < 0.05$ )。见图1和表4。



A: Model group; B: Low dose of leucovorin group; C: High dose of leucovorin group; D: Positive control group.

图1 免疫组织化学染色观察各组小鼠肿瘤组织微血管( $\times 40$ )

Fig. 1 Microvessel of tumor tissue of mice in various groups detected by immunohistochemistry ( $\times 40$ )

**2.5 各组小鼠肿瘤组织中 VEGF 蛋白表达情况和 VEGF 蛋白表达评分** 与模型组比较, 低和高剂量白屈菜碱组及阳性对照组小鼠肿瘤组织中 VEGF 蛋白表达量减少。与低剂量白屈菜碱组比较, 高剂量白屈菜碱组和阳性对照组小鼠肿瘤组织中 VEGF 蛋白表达量减少。与高剂量白屈菜碱组比较, 阳性

对照组小鼠肿瘤组织中 VEGF 蛋白表达量减少。模型组、低剂量白屈菜碱组、高剂量白屈菜碱组和阳性对照组小鼠肿瘤组织 VEGF 蛋白表达评分比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图2和表5。

**2.6 各组小鼠肿瘤组织中 NF- $\kappa$ B 和 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达水平** 与模型组比较, 低和高剂量白屈菜碱组及

表4 各组小鼠肿瘤组织MVD

Tab. 4 MVD of tumor tissue of mice in various groups  
( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

Group	MVD
Model	20.56±2.15
Low dose of leucovorin	17.38±1.86*
High dose of leucovorin	13.69±1.55* <sup>△</sup>
Positive control	10.23±1.21* <sup>△#</sup>

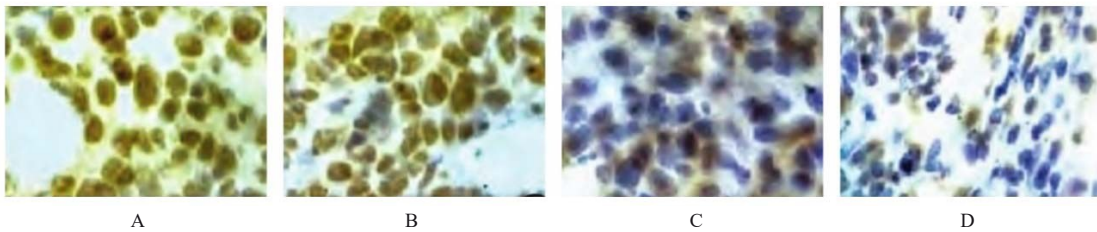
\* $P<0.05$  vs model group; <sup>△</sup> $P<0.05$  vs low dose of leucovorin group; <sup>#</sup> $P<0.05$  vs high dose of leucovorin group.

阳性对照组小鼠肿瘤组织中NF- $\kappa$ B和HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达水平降低 ( $P<0.05$ )。与低剂量白屈菜碱组

比较, 高剂量白屈菜碱组和阳性对照组小鼠肿瘤组织中NF- $\kappa$ B和HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达水平降低 ( $P<0.05$ )。与高剂量白屈菜碱组比较, 阳性对照组小鼠肿瘤组织中NF- $\kappa$ B和HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达水平降低 ( $P<0.05$ )。见图3和表6。

### 3 讨论

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一, 近年来世界范围内肺癌的发病率和死亡率逐年升高, 给人类的健康及生命安全带来巨大威胁。目前, 常见的放疗、化疗和分子靶向治疗等方法虽能够改善肺癌患者病情, 但毒性和不良反应显著, 因此发现有效治疗肺癌的药用植物材料具有重要的研究价值<sup>[12]</sup>。



A: Model group; B: Low dose of leucovorin group; C: High dose of leucovorin group; D: Positive control group.

图2 各组小鼠肿瘤组织VEGF蛋白表达情况(免疫组织化学染色,  $\times 400$ )Fig. 2 Expressions of VEGF protein of tumor tissue of mice in various groups(Immunohistochemistry,  $\times 400$ )

表5 各组小鼠肿瘤组织中VEGF蛋白表达评分

Tab. 5 Scores of expression of VEGF protein in tumor tissue of mice in various groups  
( $n=8$ )

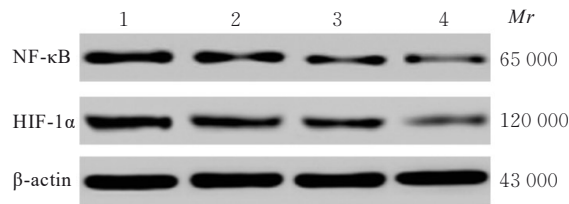
Group	—	+	++	+++
Model	0	0	1	7
Low dose of leucovorin	0	2	2	4
High dose of leucovorin	1	3	2	2
Positive control	2	5	1	0
<i>F</i>	17.764			
<i>P</i>	0.038			

白屈菜是罂粟科白屈菜属种, 全草入药有镇痛、止咳、利尿和解毒等功效, 白屈菜中具有药理活性的主要有效成分是次生代谢产物中的生物碱类, 如白屈菜碱、白屈菜红碱、血根碱、小檗碱和黄连碱等<sup>[13]</sup>。其中白屈菜碱在治疗直肠癌、胰腺癌和乳腺癌等多种癌症中通过不同的机制发挥抗肿瘤作用, 具有较好的临床效果<sup>[14-15]</sup>。

研究<sup>[16]</sup>显示: 白屈菜碱对恶性肿瘤有特异性抑制作用, 白屈菜碱可以抑制肿瘤细胞增殖, 且白屈菜碱可作为抑制剂治疗非小细胞肺癌的毒性。恶

性肿瘤患者的病情进展与肿瘤细胞的浸润生长密切相关。本研究结果显示: 不同剂量的白屈菜碱均具有明显抑制Lewis肺癌移植瘤小鼠移植瘤发展的作用, 其移植瘤质量减小且抑瘤率升高。提示白屈菜碱可以抑制Lewis肺癌的发展, 具有一定的抑瘤作用且呈现剂量依赖性。

近年来, 免疫系统在肿瘤微环境和癌症进展中的重要性逐渐被重视<sup>[17]</sup>。脾脏是重要的免疫器官, 是细胞免疫及体液免疫的中心, 其中含有大量淋巴细胞及巨噬细胞, 在抗肿瘤过程中发挥巨大作用。胸腺是中枢免疫器官, 具有调节机体免疫的作用, 是T淋巴细胞分化、发育和成熟的场所, 胸腺可以通过分泌胸腺激素调节T淋巴细胞<sup>[18]</sup>。本研究结果显示: 模型小鼠脾脏指数及胸腺指数升高且呈现剂量依赖性, 提示白屈菜碱可以保护Lewis肺癌小鼠的免疫器官。机体抗肿瘤免疫反应需要多种淋巴细胞参与, 而细胞因子在淋巴细胞成熟和功能中起重要作用, 已有多种细胞因子用于癌症患者治疗<sup>[19-20]</sup>。IL-2、INF- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 均具有广泛活性, 其中IL-2、INF- $\gamma$ 由辅助性T淋巴细胞1(helper



Lane 1: Model group; Lane 2: Low dose of leucovorin group; Lane 3: High dose of leucovorin group; Lane 4: Positive control group.

图3 各组小鼠肿瘤组织中NF-κB和HIF-1α蛋白表达电泳图

Fig. 3 Electrophoregram of NF-κB and HIF-1α proteins in tumor tissue of mice in various groups

表6 各组小鼠肿瘤组织中NF-κB和HIF-1α蛋白表达水平  
Tab. 6 Expression levels of NF-κB and HIF-1α proteins in tumor tissue of mice in various groups ( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

Group	NF-κB	HIF-1α
Model	0.68±0.10	0.50±0.05
Low dose of leucovorin	0.46±0.06*	0.31±0.03*
High dose of leucovorin	0.28±0.03* <sup>△</sup>	0.18±0.02* <sup>△</sup>
Positive control	0.12±0.01* <sup>△#</sup>	0.10±0.01* <sup>△#</sup>

\* $P<0.05$  vs model group; <sup>△</sup> $P<0.05$  vs low dose of leucovorin group; <sup>#</sup> $P<0.05$  vs high dose of leucovorin group.

T-lymphocytes 1, Th1) 分泌, 能够刺激 T 淋巴细胞增生增殖并增强其杀伤活性, 具有抗病毒、抗肿瘤和增强机体免疫功能等作用。TNF-α 主要由单核细胞和巨噬细胞产生, 是一种能够直接杀伤肿瘤细胞而对正常细胞无明显毒性的细胞因子<sup>[21]</sup>。本研究结果显示: 经白屈菜碱干预后, 小鼠模型的血清 IL-2、INF-γ 和 TNF-α 水平均升高, 提示白屈菜碱可通过升高血清 IL-2、INF-γ 和 TNF-α 水平调节免疫功能并发挥抗肿瘤作用。

肿瘤生长、扩散和转移与肿瘤新血管生成密切相关, 随着肿瘤体积增大, 需生成新血管为其提供营养物质及氧气, 而生成的新血管结构不完善, 因此易被肿瘤细胞侵犯从而产生血行转移, 严重威胁患者生命。阻断肿瘤新血管生成, 可抑制肿瘤细胞转移和侵袭, 对于肿瘤的治疗具有重要意义<sup>[22]</sup>。MVD 能够反映肿瘤的血管生成情况, VEGF 则是目前公认的最强的血管生成促进因子, 能够反应血管内皮细胞的生长状态<sup>[23-24]</sup>。本研究结果显示: 经白屈菜碱干预后, 各组小鼠 MVD 降低, 且 VEGF 蛋白表达评分降低, 提示白屈菜碱可以通过切断肿

瘤细胞的营养物质及氧气、抑制内皮细胞和抑制血管生成从而达到抗肿瘤作用。

NF-κB 蛋白是转录因子家族蛋白, 在众多生理过程中起重要作用, 可以作为炎症因子信号通路的开关, 调控 IL-2、INF-γ 和 TNF-α 等多个炎症因子水平参与炎症反应; HIF-1α 是缺氧应答因子, 能够让肿瘤细胞适应缺氧状态, 在肿瘤发生发展过程中扮演重要角色<sup>[23]</sup>。研究<sup>[24-25]</sup>显示: 白屈菜碱可能通过肝内磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 信号通路发挥抗乳腺癌的作用, 且在黑色素瘤中, 白屈菜碱通过激活 Wnt/β-catenin 信号通路抑制 B16 细胞增殖及诱导凋亡。本研究结果显示: 白屈菜碱可以降低小鼠模型 NF-κB 和 HIF-1α 蛋白表达水平, 提示白屈菜碱通过降低 NF-κB 和 HIF-1α 蛋白表达水平抑制肿瘤生长和新血管生成, 从而达到治疗作用。

综上所述, 白屈菜碱能够抑制 Lewis 肺癌移植瘤小鼠肿瘤组织生长, 保护免疫器官, 抑制肿瘤血管生成, 并降低小鼠模型中 NF-κB 和 HIF-1α 蛋白表达水平。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

金学军参与实验设计、论文撰写和修改, 卢楚沅参与实验研究、数据整理和统计学分析。

#### [参考文献]

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] 陈春苗, 田友清, 丁平, 等. 白藜芦醇联合顺铂对肺癌 A549/DDP 细胞的作用机制研究[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(5): 523-529.
- [3] ALANNI R, HOU J Y, AZZAWI H, et al. Cancer adjuvant chemotherapy prediction model for non-small cell lung cancer[J]. IET Syst Biol, 2019, 13(3): 129-135.
- [4] SABOUR S. Prediction of post-operative morbidity and mortality in patients with lung cancer: methodological issues[J]. Lung, 2018, 196(5): 499-500.
- [5] 宋帅, 赫丽杰, 韩彧佳, 等. 非小细胞肺癌放疗抵抗研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2019, 27(19): 3520-

- 3523.
- [6] BADE B C, DELA CRUZ C S. Lung cancer 2020: epidemiology, etiology, and prevention[J]. Clin Chest Med, 2020, 41(1): 1-24.
- [7] HOY H, LYNCH T, BECK M. Surgical treatment of lung cancer[J]. Crit Care Nurs Clin North Am, 2019, 31(3): 303-313.
- [8] 都姝麟, 李丽荣, 顾 硕, 等. 白屈菜药理作用综合研究进展[J]. 吉林中医药, 2022, 42(1): 84-87.
- [9] 何 曼, 陈 莉, 曾 沙, 等. 中药调控肿瘤细胞自噬的研究进展[J]. 中草药, 2021, 52(10): 3142-3150.
- [10] SUKSWAI N, KHOURY J D. Immunohistochemistry innovations for diagnosis and tissue-based biomarker detection[J]. Curr Hematol Malig Rep, 2019, 14(5): 368-375.
- [11] WEIDNER N, FOLKMAN J, POZZA F, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma[J]. J Natl Cancer Inst, 1992, 84(24): 1875-1887.
- [12] STEUER C E, BEHERA M, ERNANI V, et al. Comparison of concurrent use of thoracic radiation with either carboplatin-paclitaxel or cisplatin-etoposide for patients with stage III non-small-cell lung cancer: a systematic review[J]. JAMA Oncol, 2017, 3(8): 1120-1129.
- [13] 洪 波, 孟 琦, 江健梅, 等. 白屈菜生物碱研究进展[J]. 人参研究, 2022, 34(2): 58-62.
- [14] 林惠莹, 赵永兵, 李荣强, 等. 白屈菜药理作用及质量标志物预测分析[J]. 中兽医医药杂志, 2022, 41(2): 41-45.
- [15] 李云涛, 蒋姝亭, 苏忠周, 等. 白屈菜碱通过促进p53表达抑制胶质母细胞瘤细胞增殖[J]. 中华实验外科杂志, 2019, 36(11): 2049-2051.
- [16] WANG J, SONG Y, ZHANG N, et al. Using liposomes to alleviate the toxicity of chelerythrine, a natural PKC inhibitor, in treating non-small cell lung cancer[J]. Front Oncol, 2021, 11: 658543.
- [17] SABADO R L, BALAN S, BHARDWAJ N. Dendritic cell-based immunotherapy[J]. Cell Res, 2017, 27(1): 74-95.
- [18] 李华美, 浦锦宝, 郑军献, 等. 三叶青乙酸乙酯提取物对小鼠Lewis肺癌移植性肿瘤的抑制作用及免疫功能的影响[J]. 中国中医药科技, 2012, 19(3): 229-230.
- [19] 张 敏, 才让吉. 炎症细胞因子在肿瘤微环境中的作用[J]. 医学信息, 2023, 36(4): 179-182.
- [20] 张昱航, 许 鹏. 从肿瘤微环境角度探讨中晚期肺癌的中医治疗[J]. 吉林中医药, 2021, 41(10): 1387-1392.
- [21] 王晨亮, 张 菁, 刘浩茹, 等. 乌骨藤总苷对肺腺癌NCI-H1299细胞糖酵解、凋亡和自噬作用的影响[J]. 中国当代医药, 2022, 29(27): 15-19.
- [22] 韩品盛, 杨 龙, 崔 涛, 等. 肿瘤相关巨噬细胞在胆管细胞癌中的作用[J]. 临床肝胆病杂志, 2023, 39(2): 469-473.
- [23] 欧阳瑾, 曹志友, 王 爽, 等. 白桃汤剂抑制小鼠Lewis肺癌移植瘤的生长及其血管生成的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(10): 2476-2477.
- [24] 全星雨, 鄢 楠, 尹雄杰, 等. 基于网络药理学探讨东北椴木的抗肿瘤作用机制[J]. 延边大学医学学报, 2023, 46(1): 19-25.
- [25] 祁向争, 李慧臻, 闫志杰, 等. 五丹胃福颗粒对胃癌前病变大鼠炎症因子影响的实验研究[J]. 湖南中医杂志, 2018, 34(8): 185-187.
- [26] 张 蕾, 王 敏, 张新新, 等. 基于网络药理学和分子对接技术分析白屈菜红碱抗乳腺癌的作用机制[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2021, 42(4): 554-561.
- [27] 张步鑫, 赵献敏, 成 琼, 等. 白屈菜红碱对黑色素瘤B16细胞增殖抑制和凋亡诱导作用的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(4): 793-795.