

DOI: 10.19403/j.cnki.1671-1521.2021.02.003

# 鲜人参膏对 H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠抗肿瘤作用的初步研究

王文婷<sup>1</sup>, 王彦珺<sup>1</sup>, 林向辉<sup>2</sup>, 林晓熙<sup>2</sup>, 李 伟<sup>1</sup>, 任 坤<sup>1\*</sup>

(1. 吉林农业大学中药材学院, 长春 130118; 2. 辽宁熙峰药业集团有限公司, 桓仁 117000)

**摘 要:**目的 通过建立 H<sub>22</sub> 移植瘤小鼠模型, 探讨鲜人参膏(Fresh ginseng paste, FGP)对 H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用。方法 将 ICR 小鼠随机分成模型组、阳性对照组(环磷酰胺, CTX)、FGP 低剂量组(300 mg/kg)和高剂量组(600 mg/kg), 连续给药 15d 后, 计算抑瘤率和脏器指数, 检测血清中谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)水平; 并通过酶联免疫试剂盒测定小鼠血清中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )的含量。结果 FGP 能够明显改善 H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠的一般状况, 抑制肿瘤生长, 显著降低脾脏指数及胸腺指数( $P < 0.05$ ); 此外, 与模型组相比, FGP 能够明显改善肝功能的损伤, 并显著升高 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  的水平( $P < 0.05$ )。结论 FGP 对 H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠具有一定的抗肿瘤作用, 并能够减少肝损伤, 其作用机制可能与增强机体免疫力有关。

**关键词:** 鲜人参膏; H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠; 抗肿瘤; TNF- $\alpha$ ; IFN- $\gamma$

## Preliminary study on anti-tumor effect of Fresh Ginseng Paste on H<sub>22</sub> tumor-bearing mice

WANG Wen-ting<sup>1</sup>, WANG Yan-jun<sup>1</sup>, LIN Xiang-hui<sup>2</sup>, LIN Xiao-xi<sup>2</sup>, LI Wei<sup>1</sup>, REN Shen<sup>1\*</sup>

(1. College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. Liaoning Xifeng Pharmaceutical Group Co., Ltd., Liaoning Huanren 117000, China)

**Abstract:** Objective: To establish a mouse model of H<sub>22</sub> transplanted tumor to explore the anti-tumor effect of fresh ginseng paste (FGP) on H<sub>22</sub> tumor-bearing mice. Methods: ICR mice were randomly divided into model group, positive control group (cyclophosphamide, CTX), FGP low-dose group (300 mg/kg) and FGP high-dose group (600 mg/kg), after 15 days of continuous administration, calculate the tumor inhibition rate and organ index, and detect the levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in serum; and determine the tumor necrosis factor in mouse serum by enzyme-linked immunoassay kit - $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) content. Results: FGP can significantly improve the general condition of H<sub>22</sub> tumor-bearing mice, inhibit tumor growth, and significantly reduce the spleen index and thymus index ( $P < 0.05$ ); in addition, compared with the model group, FGP can significantly improve liver function damage, and significantly increased the levels of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  ( $P < 0.05$ ), and showed a dose-effect relationship. Conclusion: FGP has a certain anti-tumor effect on H<sub>22</sub> tumor-bearing mice, and can reduce liver damage. Its mechanism of action may be related to the enhancement of the body's immunity.

**Keywords:** Fresh ginseng paste; H<sub>22</sub> tumor-bearing mice; Anti-tumor activity; TNF- $\alpha$ ; IFN- $\gamma$

原发性肝细胞癌在世界上作为一种最常见的恶性肿瘤, 已成为全球第三大与癌症相关的死亡的主要原因<sup>[1]</sup>。肝癌治疗的选择取决于肿瘤的生物学行为, 目前

临床上治疗肝癌的方法众多, 主要包括化学治疗、放疗和手术切除等<sup>[2]</sup>。近年来, 大量科学研究表明, 由天然产物衍生的药物具有高效、低毒的功效, 因此被广泛应用

**基金项目:** 吉林省科技发展计划项目, 项目编号: 20191102051YY。

**作者简介:** 王文婷, 女, 硕士在读, 主要从事中药新产品开发研究。

**\* 通信作者:** 任坤, 女, 讲师, 博士, 硕士生导师, 主要从事中药产品开发研究。E-mail: rs0109@163.com。

于抗癌药物的使用<sup>[3]</sup>。

人参为五加科人参属 *Panax ginseng* C.A. Meyer 植物的干燥根及根茎,是我国一种集药用和营养双重价值的传统中草药,享有“中华神草”“百草之王”等美誉,具有大补元气、补脾益肺等功效,久服可轻身延年、增强免疫功能<sup>[4-5]</sup>。近年来,人参的食用营养价值得到人们广泛关注,因此人参系列产品也随之产生,例如人参糖果、人参饮料等。同时,通过利用人参精深加工得到的产品,来进一步提升人参的功效,增强机体免疫力,更符合现代“以食为养、以食为疗”的养生理念<sup>[6]</sup>。因此,开发人参功能性食品对于促进人参相关制品的深度开发具有显著的现实意义。

鲜人参膏(Fresh ginseng paste, FGP)是在原膏剂基础上引入的一种创新性的制备工艺,主要充分利用专利技术<sup>[7]</sup>,选用新鲜人参并利用其不同部位的加工方法,配以红枣精华,科学加工,转化稀有活性物质,成功富集出以 Rk1, Rg5, Rg3 为代表的 16 种稀有皂苷组分群,最大限度地保留了人参中所有活性成分和营养物质<sup>[6,8]</sup>,同时更富含精氨酸双糖苷 AFG、氨基酸、多糖、人参蛋白等多种有益物质<sup>[9]</sup>。

人参加工产品因其富含人参皂苷并具有丰富的药理活性,是一种独特的药食兼具的开发品。本文以人参的现代研究背景,初步探究人参新型加工品“鲜人参膏”对 H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用,以期为人参功能性食品的开发提供理论基础,进一步丰富人参系列深加工产品的开发利用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

雄性 ICR 小鼠, SPF 级, 5~6 周龄, 体重 20~22g, 购自长春市亿斯实验动物技术有限责任公司, 合格证号: SCXK(吉)2018-0007, 自由饮水, 适应性饲养 1 周后随机分成 4 组, 进行实验。

### 1.2 材料、试剂与仪器

小鼠 H<sub>22</sub> 肝癌细胞株, 购自中国科学院上海细胞所, 经本实验室传代并保存; 注射用环磷酰胺(CTX), 上海华联制药有限公司; 鲜人参膏(FGP), 五星级产品, 辽宁熙峰药业集团有限公司提供(SC10721052200667); 谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)试剂盒, 购自南京建成生物工程有限公司; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和

干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )试剂盒, 购自美国 R&D 公司。

VD-650 超净工作台, 上海苏净实业有限公司; 酶标仪 Spectra Max Plus 384, 美国分子生物仪器公司; Neofuge 1600R 高速离心机, 上海力新仪器有限公司; Leica DM 500 显微镜, 德国徕卡有限公司; AL 104 电子天平, 上海梅特勒-托利多仪器有限公司。

### 1.3 药物配制

准确称取鲜人参膏适量, 加 CMC-Na 混悬至所需给药浓度, 按 10 mL/kg 灌胃给药。准确称取环磷酰胺(CTX)适量, 用生理盐水配制成所需浓度, 采用腹腔注射给药形式。

### 1.4 移植瘤动物模型建立

将腹水型小鼠肿瘤 H<sub>22</sub> 细胞置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱, 用含 10% FBS 的 RPMI 1640 完全培养基悬浮培养。取最佳生长状态的小鼠肿瘤 H<sub>22</sub> 细胞, 浓度调为 5×10<sup>6</sup>/mL, 以 0.2 mL/只(1×10<sup>6</sup> 个细胞/只)无菌注入雄性 ICR 小鼠腹腔内, 进行接种传代, 于接种 7d 左右, 小鼠腹部膨隆, 出现血性腹水, 可用于小鼠皮下移植瘤的接种。于无菌条件下抽取 H<sub>22</sub> 腹水瘤小鼠的腹水, 用无菌生理盐水稀释后, 1500 r/min 离心 10 min, 洗涤细胞 3 次, 取 0.2 mL 瘤细胞悬液接种到雄性 ICR 小鼠的右肩皮下。

### 1.5 动物分组与给药处理

ICR 小鼠适应性饲养 1 周, 接种后第 2d, 小鼠随机分成共 4 组, 即模型组(Model), 阳性对照组(CTX, 30 mg/kg), FGP 低剂量组(FGP-L, 300 mg/kg)和高剂量(FGP-H, 600 mg/kg)组, 每组 10 只。CTX 采用腹腔注射方式给药, FGP 组采用灌胃给药, 模型组以等量的生理盐水代替, 每日 1 次, 连续 15d。末次给药后禁食不禁水, 16 h 后眼球取血断颈处死, 收集血液及组织做相关分析。

### 1.6 抑瘤率和免疫器官指数测定

分别称取小鼠体质量、瘤质量, 计算抑瘤率。并称取脾脏、胸腺质量, 计算脏器指数。眼球取血后颈椎脱臼处死, 完整剥离瘤块, 分离血清。

抑瘤率=(模型组瘤质量-药物组瘤质量)/模型组瘤质量

胸腺(肝脏、脾脏)指数=胸腺(肝脏、脾脏)质量/体质量

### 1.7 转氨酶与细胞因子测定

依照南京建成生物工程有限公司提供的试剂盒说明书,采用微板法检测血清中肝功能指标,包括 ALT 和 AST。依照试剂盒说明书,将小鼠血清稀释后,分别采用 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  的 ELISA 试剂盒利用双抗体夹心法测定血清中二者含量。

### 1.8 统计分析

通过 t 检验或利用 SPSS 19.0 软件 ANOVA 进行统计分析,各项数据以 Mean  $\pm$  SD 表示,用 GraphPad Prism 8.0.4 软件进行方差分析并绘图。 $P < 0.05$  或  $P <$

0.01 认为有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 对 H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠肿瘤生长的影响

结果表明:模型组小鼠状态萎靡,毛色暗淡,FGP 给药组小鼠状态改善明显,较为活泼。由表 1 可知,CTX 组及 FGP 低、高剂量组的平均瘤质量均显著低于模型组( $P < 0.05$ ),且 FGP 低、高剂量组的平均瘤质量显著高于 CTX 组( $P < 0.05$ );肿瘤抑制率以 CTX 组达到最高,为 60.18%,FGP 高、低剂量组次之。

表 1 FGP 对 H<sub>22</sub> 移植瘤小鼠肿瘤生长的影响 (n=10, Mean  $\pm$  S.D)

Table 1 The effect of FGP on tumor growth of H<sub>22</sub> transplanted tumor mice (n=10, Mean  $\pm$  S.D)

组别 (Groups)	剂量/mg·kg <sup>-1</sup> (Dosage/mg·kg <sup>-1</sup> )	动物数量 Animal number(n)	瘤重量/g (Tumor weight/g)	抑瘤率/% (Tumor Inhibition rate/%)
模型组 Model		10	1.13 $\pm$ 0.38	
阳性对照组 CTX	30	10	0.45 $\pm$ 0.19*	60.18
FGP 低剂量组 FGP-L	300	10	0.96 $\pm$ 0.33#	15.04
FGP 高剂量组 FGP-H	600	10	0.87 $\pm$ 0.41#	23.01

注:\*表示与模型组(M)差异显著( $P < 0.05$ );#表示与阳性对照组(CTX)差异显著( $P < 0.05$ )。

Note: \* indicates a significant difference from the model group (M) ( $P < 0.05$ ); # indicates a significant difference from the positive control group (CTX) ( $P < 0.05$ ).

### 2.2 对 H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠免疫器官指数的影响

结果表明:如表 2 所示,与模型组相比,CTX 组胸腺指数显著下降 ( $P < 0.05$ ),FGP 低、高剂量组与 CTX

组相比显著升高( $P < 0.05$ )。CTX 组的脾脏指数明显低于模型组 ( $P < 0.05$ ),随着 FGP 给药剂量的增加,与 CTX 组相比,脾脏指数显著升高( $P < 0.05$ )。

表 2. FGP 对 H<sub>22</sub> 移植瘤小鼠免疫器官指数的影响(n=10, Mean  $\pm$  S.D)

Table 2. The effect of FGP on immune organ index of H<sub>22</sub> transplanted tumor mice (n=10, Mean  $\pm$  S.D)

组别(Groups)	剂量/mg·kg <sup>-1</sup> (Dosage/ mg·kg <sup>-1</sup> )	动物数量 Animal number(n)	脾脏指数/mg·g <sup>-1</sup> (Spleen index)	胸腺指数/mg·g <sup>-1</sup> (Thymus index)
模型组 Model		10	14.43 $\pm$ 2.56	1.78 $\pm$ 0.49
阳性对照组 CTX	30	10	9.22 $\pm$ 2.10*	1.45 $\pm$ 0.44*
FGP 低剂量组 FGP-L	300	10	11.11 $\pm$ 1.77#	1.76 $\pm$ 0.67#
FGP 高剂量组 FGP-H	600	10	10.89 $\pm$ 2.01#	1.81 $\pm$ 0.81#

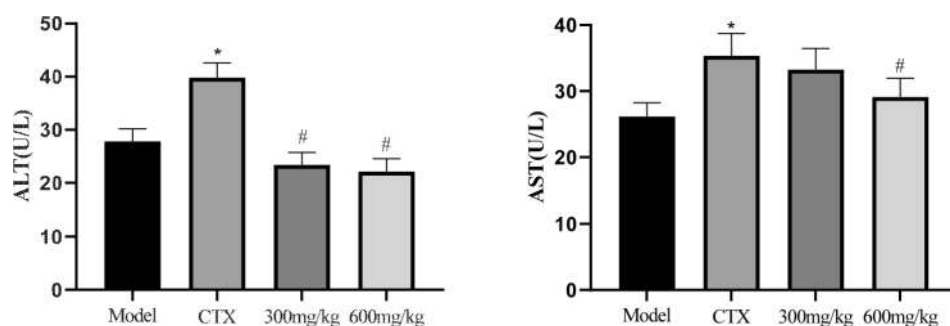
注:\*表示与模型组(M)差异显著( $P < 0.05$ );#表示与阳性对照组(CTX)差异显著( $P < 0.05$ )。

Note: \* indicates a significant difference from the model group (M) ( $P < 0.05$ ); # indicates a significant difference from the positive control group (CTX) ( $P < 0.05$ ).

### 2.3 对 H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠肝功能的影响

如图 1 所示,与模型组比较,CTX 组小鼠血清中 ALT 和 AST 的水平显著升高 ( $P < 0.05$ ),与 CTX 组相

比,FGP 低、高剂量组能够明显抑制血清中 ALT 和 AST 水平的升高( $P < 0.05$ ),初步证明了 FGP 对 H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠肝功能具有一定的保护作用。



注:\*表示与模型组(M)差异显著( $P<0.05$ );#表示与阳性对照组(CTX)差异显著( $P<0.05$ )。

Note: \* indicates a significant difference from the model group (M) ( $P<0.05$ ); # indicates a significant difference from the positive control group (CTX) ( $P<0.05$ ).

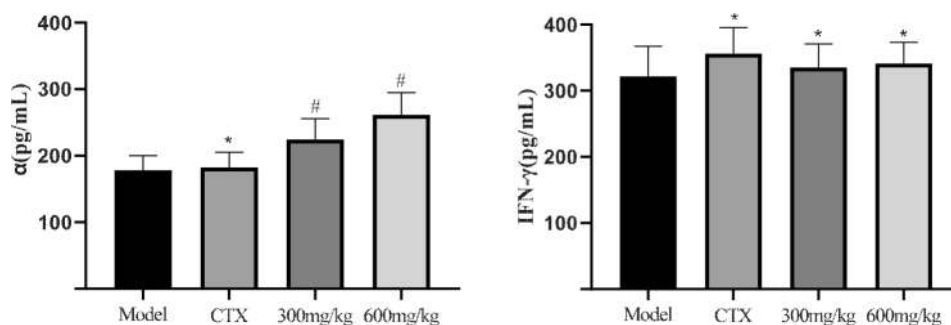
图 1 FGP 对  $H_{22}$  荷瘤小鼠肝功能 ALT 和 AST 的影响( $n=10$ , Mean  $\pm$  S.D)

Fig. 1 The effect of FGP on ALT and AST of liver function in  $H_{22}$  tumor-bearing mice ( $n=10$ , Mean  $\pm$  S.D)

#### 2.4 对 $H_{22}$ 荷瘤小鼠相关细胞因子的影响

由图 2 所示,与模型组相比,CTX 组小鼠血清中 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  含量明显增高,差异显著( $P<0.05$ );与 CTX 组相比,FGP 低、高剂量组小鼠血清中 TNF- $\alpha$

水平显著升高;小鼠血清中 IFN- $\gamma$  水平随着 FGP 给药剂量的增加也随之增加,其中 FGP 高剂量组与模型组相比显著升高。



注:\*表示与模型组(M)差异显著( $P<0.05$ );#表示与阳性对照组(CTX)差异显著( $P<0.05$ )。

Note: \* indicates a significant difference from the model group (M) ( $P<0.05$ ); # indicates a significant difference from the positive control group (CTX) ( $P<0.05$ ).

图 2. FGP 对  $H_{22}$  荷瘤小鼠细胞因子 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  水平的影响( $n=10$ , Mean  $\pm$  S.D)

Fig. 2. The effect of FGP on the levels of cytokines TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  in  $H_{22}$  tumor-bearing mice ( $n=10$ , Mean  $\pm$  S.D)

### 3 讨论

近年来,原发性肝癌的病死率已居我国恶性肿瘤中的第二位<sup>[10]</sup>,因此引起人们的广泛关注,该研究结果表明,FGP 能够有效抑制  $H_{22}$  荷瘤小鼠的肿瘤生长,增强其肿瘤抑制率,具有一定的抗肿瘤作用。当机体受到损伤时,其脏器质量和指数发生改变。在本研究中,随着 FGP 给药剂量的增加,脾脏指数明显下降,且与 CTX 组相比具有显著性;FGP 低、高剂量组与 CTX 组差异显著,说明 FGP 可以有效的对荷瘤小鼠的免疫脏器发挥保护作用。

血清中 ALT 和 AST 水平是反应肝功能的两个重要指标,当机体肝功能受到损伤时,两者水平会显著升高<sup>[11]</sup>。本研究通过建立  $H_{22}$  皮下移植瘤模型小鼠,并通

过 CTX 腹腔注射给药及 FGP 灌胃给药的方式探讨其抗肿瘤作用。结果显示,与模型组相比,CTX 组小鼠血清中的 ALT 和 AST 水平均显著升高;与 CTX 组相比,FGP 低、高剂量组小鼠血清中 ALT 和 AST 水平均有明显的降低,表明肝损伤的程度被明显改善,说明 FGP 对  $H_{22}$  荷瘤小鼠起到一定的抗肿瘤作用。

大量研究表明,肿瘤的发生与机体免疫功能下降及失调有关,CTX 作为临床上常用的一种广谱抗肿瘤药物,主要通过免疫抑制来发挥抗肿瘤作用<sup>[12]</sup>。在治疗过程中,与模型组比较,CTX 组小鼠肿瘤平均质量显著下降,胸腺指数及其脾脏指数也显著降低。脾脏是一种重要的机体免疫器官,胸腺是 T 淋巴细胞分化成熟的场所,当恶性肿瘤发生是,T 淋巴细胞会增殖分裂释

放出多种细胞因子,细胞因子在机体内起到相互促进或相互抑制的作用,从而来调节机体的免疫系统,同时作为评价机体免疫功能的重要指标<sup>[13]</sup>。TNF- $\alpha$ 是一种促炎因子,能够直接杀死肿瘤细胞且对正常细胞不产生明显的毒害作用的一种细胞因子<sup>[14]</sup>。FGP可以使小鼠血清中TNF- $\alpha$ 水平显著上升,可能是通过增加血清中肿瘤坏死因子的含量从而增强机体的抗肿瘤作用。IFN- $\gamma$ 主要由活化的Th细胞和NK细胞产生,能够促进Th1细胞发育并且抑制Th2细胞活化与增殖,刺激B细胞产生的抗体类型向调理素方向转变,具有抗病毒,抗肿瘤和免疫调控的作用<sup>[15]</sup>。FGP可以使小鼠血清中IFN- $\gamma$ 水平明显升高,说明FGP是通过促进机体产生免疫因子增强其抗肿瘤作用。

综上所述,FGP对H<sub>22</sub>荷瘤小鼠具有明显的抗肿瘤作用,其抑制肿瘤作用可能与增强机体免疫力,保护机体肝功能受损及升高血清中TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 水平有关。此外,与CTX组相比,FGP的抗肿瘤作用较好,并且其毒性较低。该研究阐述了FGP对H<sub>22</sub>荷瘤小鼠的抗肿瘤作用,初步揭示了鲜人参膏能够通过抑制肿瘤生长达到保护作用,具有预防肿瘤发生的作用,为人参及相关产品的深度开发提供理论依据。

## 参 考 文 献

- [1]Zhang QL, Du ZS, Zhang Y et al. Lentinus edodes Apoptosis induction activity of polysaccharide from in H<sub>22</sub>-bearing mice through ROS-mediated mitochondrial pathway and inhibition of tubulin polymerization [J]. Food Nutr Res, 2020, 64: undefined.
- [2]Kan XF, Zhang WL, You RX et al. Scutellaria barbata D. Don extract inhibits the tumor growth through down-regulating of Treg cells and manipulating Th1/Th17 immune response in hepatoma H<sub>22</sub>-bearing mice [J]. BMC Complement Altern Med, 2017, 17:41.
- [3]Liu YH, Qin HY, Zhong YY et al. Neutral polysaccharide from Panax notoginseng enhanced cyclophosphamide antitumor efficacy in hepatoma H<sub>22</sub>-bearing mice [J]. BMC Cancer, 2021, 21:37.
- [4]李伟,杨舸,胡俊男,等.人参热裂解皂苷研究进展,吉林农业大学学报,2018,2,127-134.
- [5]刘伟,林向辉,刘喜峰,等.“鲜人参膏”缓解小鼠运动疲劳作用的初步探究[J].人参研究,2019,31(3):5-8.
- [6]王文婷,施展,林向辉,等.基于环磷酰免疫抑制模型研究鲜人参膏增强小鼠免疫力的作用[J].特产研究,2020,42(03):30-34.
- [7]林向辉,刘喜峰,林晓熙,等.一种鲜人参膏的制备方法及应用:中国专利CN.201811133998.7.
- [8]李伟,王梓,赵立春,等.化合物20(R)-人参皂苷Rg3的制备方法及应用:中国专利ZL.201610599632.3.
- [9]李健豪,沙纪越,刘伟,等.“鲜人参膏”对顺铂致肾损伤小鼠的保护作用及机制[J].现代食品科技,2019,35(9):110-118.
- [10]王欢,关大朋,李伟,等.熟桔梗对H<sub>22</sub>荷瘤小鼠的抑瘤作用及皂苷类成分分析,毒理学杂志,2015,29(1):49-53.
- [11]彭静,陈曦.滨蒿内酯对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用研究[J].中国药房,2021,32(02):231-235.
- [12]张男男,侯瑞丽,李可欣,等.沙棘熊果酸对H<sub>22</sub>荷瘤小鼠抑瘤活性及其机制的探讨[J].食品研究与开发,2019,40(10):6-12.
- [13]王梓,许兴月,李琼,等.人参皂苷Rg1热裂解产物对H<sub>22</sub>荷瘤小鼠的抗肿瘤作用,中国药学杂志,2017,52(15):1319-1132.
- [14]安方玉,史旭锋,颜春鲁,等.黄芪水煎剂对荷H<sub>22</sub>肝癌小鼠瘤组织凋亡及肝损伤调控的作用机制[J].华西药学杂志,2020,35(04):392-396.
- [15]田雨弘,高鸽,刘颖,等.桔梗茎叶皂苷对H<sub>22</sub>荷瘤小鼠的抗肿瘤作用及机制研究,毒理学杂志,2016,30(1):45-48.