

绿蒜正己烷萃取物对 H22 荷瘤小鼠的影响

刘玮, 王京雅, 陈海霞

(天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072)

摘要: 为了探讨绿蒜 75%乙醇提取物的正己烷萃取物(简称绿蒜正己烷萃取物: GGHE)对 H22 荷瘤小鼠的抑瘤作用及其免疫功能的影响, 建立 H22 荷瘤小鼠模型。将 60 只小鼠平均分为 6 组: 空白对照组、模型组、阳性对照组(环磷酰胺 CTX, 20 mg/kg)、GGHE 低中高剂量组(L-GGHE: 75 mg/kg; M-GGHE: 150 mg/kg; H-GGHE: 300 mg/kg), 连续给药 14 d。测定小鼠体重、水食量、肝脏中 SOD、GSH-Px、CAT、ALT、AST 的活性和 MDA 的含量; 测定小鼠血清中细胞因子 TNF- α 、IL-2 和 VEGF 的含量; 计算水食效率、瘤体积、抑瘤率、脏器指数; 分析肿瘤组织的病理特征。实验结果表明: M-GGHE 的抑瘤率达 71.48%。与模型组相比, GGHE 能显著提高小鼠水食效率、胸腺及脾脏指数以及 IL-2、TNF- α 的水平, 降低 VEGF 的表达。不同程度的提高肝脏组织中抗氧化酶 SOD、GSH-Px 和 CAT 的活力、降低 MDA 的含量以及转氨酶 ALT 和 AST 的活力。结论: GGHE 对 H22 荷瘤小鼠的肿瘤生长有一定的抑制作用, 改善了荷瘤小鼠的生存质量, 提高了荷瘤小鼠的抗氧化水平和免疫功能。本实验提示可将绿蒜 75%乙醇提取物的正己烷萃取物开发成治疗肝癌的候选药物。

关键词: 绿蒜; 正己烷萃取物; 抗肿瘤; H22 荷瘤小鼠; 抗氧化; 免疫调节

文章编号: 1673-9078(2017)9-1-7

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.9.001

Effects of n-Hexane Extract of Green Garlic on H22 Tumor-bearing Mice

LIU Wei, WANG Jing-ya, CHEN Hai-xia

(School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: To study the antitumor effects of the hexane extract derived from 75% ethanol green garlic extract (hereafter referred to as green garlic n-hexane extracts: GGHE) and its effect on immune function in H22 tumor-bearing mice, H22 transplanted mouse models were established. Sixty mice were divided into six groups: blank control group, model group, positive control (cyclophosphamide (CTX): 20 mg/kg), and low-, medium-, and high-dose GGHE (L-GGHE: 75 mg/kg, M-GGHE: 150 mg/kg, and H-GGHE: 300 mg/kg) groups. The drugs were continuously administered for 14 days. Mouse body weight, food/water intake; the activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT), alanine transaminase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST); and the content of malondialdehyde (MDA) in liver tissue were determined. Moreover, the levels of tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-2, and vascular endothelial growth factor (VEGF) in serum were detected. The food and water efficiency, tumor volume, tumor inhibition rate, and spleen and thymus indices were calculated. The pathological characteristics of tumor tissues were also analyzed. The results showed that the tumor growth inhibition rate of M-GGHE was 71.48%. Compared with the model group, the treatment with GGHE significantly increased the food and water efficiency rate, spleen and thymus indices, increased the levels of IL-2 and TNF- α ; reduced the level of VEGF; increased the activities of SOD, GSH-Px, and CAT, and decreased the MDA content as well as the activities of ALT and AST. In conclusion, GGHE exhibited antitumor effects on H22 tumor-bearing mice, improved their quality of life, and improved the antioxidant level and immune function. The results suggest that GGHE could be used as a candidate drug for treating hepatocellular carcinoma.

Key words: green garlic; n-hexane extract, anti-tumor; H22 tumor-bearing mice; antioxidant; immune regulation

大蒜是百合科葱属植物, 几个世纪以来被广泛用于食品和香料, 因具备良好的药用价值成为国内外研究的热点。大蒜主要有抗菌、消炎、降低胆固醇、抑

收稿日期: 2017-03-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31371879)

作者简介: 刘玮(1991-), 女, 硕士, 从事天然产物与功能食品研究

通讯作者: 陈海霞(1974-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物化学,

功能食品的研究与开发

制血小板聚集和抗肿瘤等功效^[1,2]。大蒜中含硫化化合物是抗肿瘤的主要活性成分, 其作用机制主要包括化学预防肿瘤和化学治疗肿瘤两大方面^[3]。大蒜作为化学预防剂主要通过抑制致癌物活化, 诱导解毒酶, 加快致癌物排泄, 阻止 DNA 加合物的形成等发挥其良好的抗癌防癌作用^[4]。肝癌是常见的恶性肿瘤之一, 其死亡率在消化系统中列第三位, 仅次于胃癌和食管癌^[5]。已有报道证实经常食用大蒜显著降低前列腺癌、

结肠癌等癌症的风险^[6,7]。大蒜在解除休眠状态后,在适当条件下,能绿变形成绿蒜^[8]。中国传统食物“腊八蒜”的制备,就是大蒜绿变的结果。国内外,有关绿蒜的研究已经有至少 60 年历史,主要集中在研究绿色素形成的机理以及影响色素产生的因素等问题上,已有报道指出大蒜绿变是经过一系列酶促和非酶反应而引起的含硫化合物之间的各种转化^[9,10]。但是对绿蒜的药理活性特别是抗肿瘤活性少有涉及,本实验采用肝癌 H22 荷瘤小鼠模型,观察绿蒜正己烷提取物对给药后 H22 荷瘤小鼠的抑瘤作用及免疫调节作用,为其进一步开发绿蒜功能食品提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 原料

大蒜购自天津市南开区市场。

1.2 实验动物及试剂

雄性昆明种小鼠,清洁级,体重 18~22 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证编号 SCXK(京)2014-0004;鼠源性 H22 肝癌细胞,购自上海细胞库。

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、10% 胎牛血清、PBS 缓冲液和噻唑兰 (MTT),购自天津百倍生物科技有限公司;肿瘤坏死因子 (TNF- α),产品编号 H052、白细胞介素 (IL-2),产品编号 H003、肿瘤坏死因子 (VEGF),产品编号 H044、超氧化物歧化酶 (SOD),产品编号 A001-3、丙二醛 (MDA),产品编号 A003-1、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px),产品编号 A005、过氧化氢酶 (CAT),产品编号 A007-2、谷丙转氨酶 (ALT),产品编号 C009-2、谷草转氨酶 (AST) 试剂盒,产品编号 C010-2,均购自南京建成生物科技有限公司;环磷酰胺,批号 15101225,购自江苏盛迪医药有限公司;0.9%氯化钠注射液 (生理盐水),批号 A15100801,购自河北天成药业股份有限公司;高效切片石蜡,购自上海华灵康复器械厂;苏木精染液 (H&E),购自天津百倍生物科技有限公司;二硫二硝基苯甲酸 (DTNB) 购自 sigma 公司;乙醇、正己烷和半胱氨酸等常规试剂均为分析纯级别,购自天津康科德试剂有限公司。

1.3 实验仪器

气相-质谱联用仪 (7820A-5977B): 美国安捷伦公司;电子天平: 北京赛多利斯仪器有限公司;CO₂ 培养箱 (BPN-80CW): 上海一恒科学仪器有限公司;

超净工作台 (SW-CJ-1FD): 苏州净化设备有限公司;倒置显微镜 (BDS-200): 重庆奥特光学仪器有限公司;酶标仪 (DNM-9602): 北京普朗医疗设备有限公司。

1.4 实验方法

1.4.1 绿蒜 75%乙醇提取物的正己烷萃取物的制备

大蒜鳞茎是主要的食用部分,一般每年 6~7 月采收,自然条件下,会有 2~3 个月生理休眠期,之后开始萌发。温度可以控制并影响大蒜的休眠进程,高温可以明显延长休眠期,30 °C 左右保存大蒜可以延长休眠期,使其长期保持较低的呼吸速率,降低代谢^[11]。S-丙烯基-L-半胱氨酸亚砷 (1-PECSO) 是大蒜绿变的前体物,温度与 1-PECSO 含量呈反比,即当温度升高时,1-PECSO 的含量降低,也就是说只有在较低温度下储存大蒜打破其生理休眠期,使得其 1-PECSO 含量增加,才能发生绿变^[12]。低温储藏来使大蒜打破休眠期,这也就是腊八蒜一定要在腊八时节制备的原因,北方腊月气温一般低于 5 °C。大蒜绿变的一个必要条件,就是打破其休眠期。

本实验用到的绿蒜区别于传统腊八蒜的制备方法,根据本实验室前期的研究方法^[13],快速制备绿蒜。取解除休眠的大蒜,用粉碎机处理成蒜渣,放置半小时后,加入 5%的冰醋酸混合均匀。放置在烘箱中,在 50 °C 加热 30 min,再升高温度至 75 °C,加热 60 min,得到绿蒜。绿蒜用 75%的乙醇冷浸提取 3 次,每次 24 h,提取液过滤后,55 °C 真空浓缩得到绿蒜乙醇提取物。绿蒜乙醇提取物与水按体积比 1:1 分散,加入 1 倍体积的正己烷萃取 3 次,将萃取液真空浓缩得到绿蒜 75%乙醇提取物的正己烷萃取物,以下简称绿蒜正己烷萃取物 (GGHE)。

1.4.2 绿蒜正己烷萃取物 (GGHE) 中含硫化合物的含量测定

含硫化合物含量测定方法根据改良的 Lawson 法^[14]: (1) 用 50 mM 磷酸缓冲液 (pH 6.9) 制备 1.5 mM 的二硫二硝基苯甲酸 (DTNB) 溶液; (2) 用 50 mM 磷酸缓冲液 (pH 6.9) 制备 10 mM 左右的半胱氨酸溶液,半胱氨酸溶液的准确浓度通过测定与 DTNB 反应生成 2-硝基-5-硫代苯甲酸 (NTB),在 412 nm 下的吸光度值计算得到; (3) 取 5 mL 浓度为 10 mM 的半胱氨酸溶液与 1 mL 去离子水混合,取 1 mL 反应混合液于 100 mL 容量瓶并加水稀释至刻度。取稀释后的 4.5 mL 反应混合液与 0.5 mL DTNB 在 26 °C 下保温约 15 min 后,测定 412 nm 波长下的吸光度值 (A₀); (4) 取 5 mL 浓度为 10 mM 的半胱氨酸溶液与 1 mL 大蒜

样品混合,在 26 °C 下保温约 15 min,取 1 mL 反应混合液于 100 mL 容量瓶中,并加水至刻度。取稀释后的反应液 4.5 mL 与 0.5 mL DTNB 在 26 °C 下保温约 15 min 后,测定 412 nm 波长下的吸光度值(A)。

根据公式: $\Delta A_{412} = A_0 - A$; $C(\text{mmol/mL}) = (\Delta A_{412} \times \beta) / (2 \times 14150)$ 。

β -半胱氨酸溶液稀释倍数。

1.4.3 气相-质谱联用仪(GC-MS)对绿蒜正己烷萃取物(GGHE)的成分分析

色谱柱: Agilent HP-5 毛细管色谱柱(30 m×0.32 mm i.d.), 1 μm 膜厚; 载气: 高纯氦气(纯度大于 99.999%); 载气流速: 1.0 mL/min; 程序升温 50 °C, 保持 2 min, 以 25 °C/min 的速率升温至 180 °C, 保持 2 min; 进样口温度: 200 °C; 辅助加热区温度: 280 °C; 进样量: 1 μL ; 进样模式: 分流进样, 分流比 1:10; 离子源: 70 eV EI 源; 扫描模式: scan 全扫描质量范围 35~550 u。

1.4.4 绿蒜正己烷萃取物(GGHE)对荷瘤小鼠肿瘤生长状况,免疫器官指数以及水食效率的影响

将雄性昆明种小鼠置于恒温标准的饲养环境中,空气湿度 50±5%, 温度 20~25 °C, 并给与 12 h 的明暗循环, 允许小鼠自由饮水摄食。适应性喂养 7 d 后开始实验,所有操作符合实验动物伦理委员会的标准。

造模: 在无菌条件下取传代 6~7 d 的 H22 肝癌小鼠腹水,用生理盐水稀释成含量为 1×10^7 mL 的细胞悬液,于每只小鼠右侧腋窝皮下接种 0.2 mL。当肿瘤生长到 80~100 mm³ 时视为造模成功并进行以下实验。

分组和给药: 将荷瘤小鼠随机分成 5 组, 每组 10 只, 包括模型组(灌胃给予 0.9% 的生理盐水)、阳性对照组(腹腔注射环磷酰胺: 20 mg/kg)、绿蒜正己烷低中高剂量组(L-GGHE: 75 mg/kg; M-GGHE: 150 mg/kg; H-GGHE: 300 mg/kg), 绿蒜正己烷萃取物用 0.05% 的 CMCC-Na 水溶液混悬, 灌胃给药, 另取 10 只未接种肿瘤的正常小鼠作为空白对照, 灌胃给予 0.9% 的生理盐水。每天给药 1 次, 连续给药 14 d。

给药期间每日测定小鼠的体重, 摄食量及摄水量, 计算小鼠的水食效率: 摄食效率(%)=(增长的体重/摄食量)×100%; 摄水效率(%)=(增长的体重/摄水量)×100%。每隔 2~3 d 用游标卡尺测量并记录肿瘤长(L)和宽(W), 计算肿瘤体积 $V = LW^2/2$ 。观察不同剂量的 GGHE 对荷瘤小鼠的水食效率的影响和给药期间肿瘤生长体积的变化趋势并与模型组和阳性对照组进行对比。

给药第 14 d, 摘除眼球取血, 离心收集血清用于

后面的生化实验。颈椎脱臼处死小鼠, 剥离胸腺、脾、肝脏、肿瘤并称重。计算抑瘤率(%)=1-(治疗组小鼠的瘤重/模型组小鼠的瘤重)×100%; 胸腺指数(mg/g)=胸腺质量/体重; 脾指数=脾质量/体重。分析 GGHE 对肿瘤生长的抑制率和对荷瘤小鼠自身免疫的影响。

1.4.5 绿蒜正己烷萃取物(GGHE)对荷瘤小鼠血清中细胞因子水平的影响

取 1.4.4 中收集的血清, 按试剂盒说明书的指导测定各组荷瘤小鼠血清中肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素(IL-2)和血管内皮生长因子(VEGF)的含量。分析 GGHE 对荷瘤小鼠血清中细胞因子水平的影响, 考察荷瘤小鼠在给药后免疫水平的变化情况。

1.4.6 绿蒜正己烷萃取物(GGHE)对荷瘤小鼠肝脏中抗氧化酶和转氨酶的影响

取 1.4.4 中剥离的肝脏, 制备 10% 肝匀浆液, 按试剂盒说明书的指导测定各组荷瘤小鼠肝脏中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)的活力以及丙二醛(MDA)的含量。

1.4.7 肿瘤组织病理学检验

取 1.4.4 中剥离的肿瘤, 用 10% 福尔马林固定, 经石蜡包埋、切片、常规苏木素伊红 H&E 染色, 在光学显微镜放大 400 倍下观察并拍照, 分析给药前后肿瘤组织的病理学变化。

1.4.8 数据分析

实验数据采用 SPSS 20.0 进行统计分析。各项指标以平均数±标准差表示, $p < 0.05$ 为显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 绿蒜正己烷萃取物(GGHE)中含硫化合物的含量

绿蒜和传统腊八蒜制备工艺不同, 腊八蒜正己烷萃取物和绿蒜正己烷萃取物中含硫化合物的质量百分含量分别为(71.17±1.93)%和(75.28±2.76)%。

2.2 绿蒜正己烷萃取物(GGHE)的 GC-MS 分析

GGHE 的成分分析结果见表 1 示。分析鉴定了 10 种含硫化合物。其中 Diallyl disulphides 的含量最高, 达到了 50.93%。相关研究报告指出有机硫化物中的二烯丙基二硫化物(Diallyl disulphides)可通过不同信号途径作用于肿瘤, 如调节药物代谢酶、癌基因

表1 气相-质谱联用仪 (GC-MS) 对 GGHE 的成分分析

Table 1 GC-MS analysis of GGHE

保留时间/min	化合物	分子量	分子式	相对含量/%
4.95	Thiirane, methyl	74	C ₃ H ₆ S	0.13
5.461	Allyl methyl sulfide	88	C ₄ H ₈ S	1.55
5.718	Allyl methyl trisulfide	152	C ₄ H ₈ S ₃	6.58
6.875	1-propene-3,3-thiobis	114	C ₆ H ₁₀ S	3.82
6.695	Diallyl trisulfide	178	C ₆ H ₁₀ S ₃	4.03
8.328	Diallyl tetrasulfide	210	C ₆ H ₁₀ S ₄	2.52
8.978	2,4-dimethyl thiophene	112	C ₆ H ₈ S	0.12
10.690	3-vinyl-1,2-di-thiacyclohex-4-ene	144	C ₆ H ₈ S ₂	4.03
12.47	Diallyl disulphides	146	C ₆ H ₁₀ S ₂	50.93
17.23	Trisulfide, di-2-propenyl	178	C ₆ H ₁₀ S ₃	4.22

H-ras、GJIC、p53 依赖型和非依赖型途径、细胞氧化应激、细胞内钙平衡等，调控肿瘤细胞增殖^[15]。

2.3 绿蒜正己烷萃取物 (GGHE) 对荷瘤小鼠肿瘤生长状况，免疫器官指数以及水食效率的影响

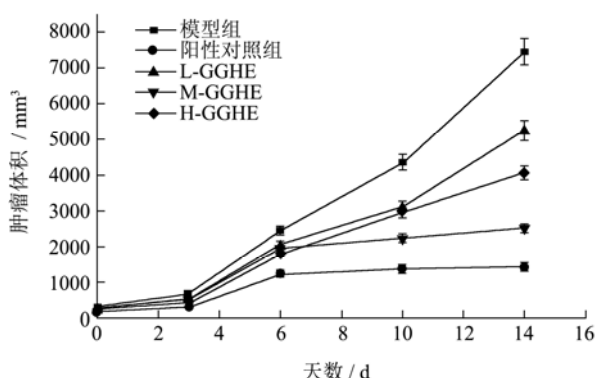


图1 给予 GGHE14 天内荷瘤小鼠的肿瘤体积变化情况

Fig. 1 Change in tumor volume during the administration of GGHE for 14 days

GGHE 用药后对肿瘤的生长抑制率分别为 42.21%、71.48%和 52.09% (表 2)。给予 GGHE 的 14 d 内，荷瘤小鼠的肿瘤生长速度明显比模型组缓慢

($p < 0.05$) (图 1)，M-GGHE 对小鼠肿瘤生长的抑制效果甚至高于高剂量组，原因可能是 H-GGHE 会带来一定的副作用和不良反应，含硫化物是 GGHE 的主要成分，有机硫化物在机体有一定的耐受剂量，副作用是会产生异臭，人体对新鲜大蒜水提取物的最大耐受量是 25 mL，更大量时可在食管和胃有烧灼感，导致呕吐并刺激口腔黏膜，高剂量的 GGHE 因超过荷瘤小鼠的耐受程度，刺激小鼠的消化道粘膜，在溶解性、吸收和代谢方面的表现不佳是其不如中剂量 GGHE 效果好的原因，更深入的作用机制还有待于研究^[15]。

虽然 M-GGHE 对肿瘤生长的抑制效果与阳性对照药 CTX 相比略差，但是，与 CTX 相比，经过 M-GGHE 治疗后荷瘤小鼠的脾脏指数和胸腺指数显著提高 ($p < 0.001$) (表 2)，说明 M-GGHE 可以增强自身免疫力。另外，用水食效率来评价荷瘤小鼠生存质量。与 GGHE 相比，经 CTX 治疗后的荷瘤小鼠的水食效率显著降低 ($p < 0.001$) (图 2)，说明 CTX 对小鼠的健康状况有很大的伤害，化疗药 CTX 的使用虽然能够抑制肿瘤的生长，但却严重影响了荷瘤小鼠的生存质量。本部分实验结果表明 CTX 和 GGHE 可以不同程度的抑制 H22 荷瘤小鼠的肿瘤生长，且相对于 CTX，GGHE 能够提高荷瘤小鼠的自身免疫力和生存质量，表现出高效低毒的作用效果。

表2 GGHE 对 H22 荷瘤小鼠的瘤重及脏器指数的影响

Table 2 Effects of GGHE on tumor weight and organ index of H22 tumor-bearing mice

组别	瘤重/g	抑瘤率/%	脾脏指数/(mg/g)	胸腺指数/(mg/g)
模型组	8.12±0.93	-	8.72±0.88	5.05±0.33
阳性对照组	1.55±0.23 ^{###}	82.23±2.51	7.65±0.22	2.66±0.45 ^{###}
L-GGHE 组	4.64±0.31 ^{***}	42.21±2.05 ^{**}	8.54±0.91	4.91±0.62 ^{**}
M-GGHE 组	2.27±0.59 ^{***}	71.48±3.39 [*]	12.38±1.03 ^{***###}	6.33±0.71 ^{***}
H-GGHE 组	3.86±0.61 ^{***}	52.09±2.68 ^{**}	8.92±1.05	6.28±0.58 ^{***}

注: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs 阳性对照组; # $p < 0.05$, ### $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs 模型组。

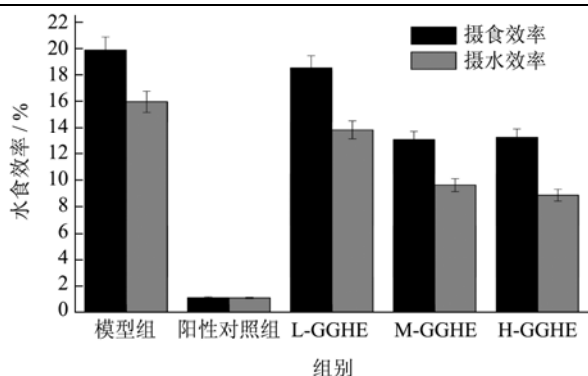


图 2 GGHE 对 H22 荷瘤小鼠水食效率的影响

Fig. 2 Effects of GGHE on the food and water efficiency rate of H22 tumor-bearing mice

2.4 绿蒜正己烷萃取物 (GGHE) 对荷瘤

小鼠血清中细胞因子水平的影响

实验结果表明：与模型组相比，GGHE 三个剂量组的 IL-2 和 TNF- α 的表达水平都有所提高 ($p < 0.05$)，

表 3 GGHE 对 H22 荷瘤小鼠血清中 VEGF、IL-2 和 TNF- α 表达水平的影响

Table 3 Effects of GGHE on the VEGF, IL-2, and TNF- α levels in the sera of H22 tumor-bearing mice

组别	VEGF/(pg/mL)	IF-2/(pg/mL)	TNF- α /(pg/mL)
空白组	20.73 \pm 0.43	5.22 \pm 0.34*** ^{###}	45.24 \pm 2.38*** ^{###}
模型组	75.87 \pm 1.79 ^{▲▲▲} ***	2.86 \pm 0.22 ^{▲▲}	17.10 \pm 1.64 ^{▲▲▲}
阳性对照组	22.15 \pm 0.66 ^{###}	2.11 \pm 0.37 ^{▲▲▲}	16.77 \pm 1.05 ^{▲▲▲}
L-GGHE 组	22.68 \pm 1.20 ^{###}	6.38 \pm 0.94*** ^{###}	25.13 \pm 1.82 ^{▲▲▲} *** ^{###}
M-GGHE 组	21.59 \pm 0.48 ^{###}	8.38 \pm 0.86 ^{▲▲▲} *** ^{###}	59.86 \pm 2.15 ^{▲▲▲} *** ^{###}
H-GGHE 组	22.70 \pm 0.75 ^{###}	4.59 \pm 0.35 ^{**#}	48.62 \pm 2.69 ^{▲▲▲} *** ^{###}

注：▲ $p < 0.05$ ，▲▲ $p < 0.01$ ，▲▲▲ $p < 0.001$ vs 空白组；* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ vs 阳性对照组；# $p < 0.05$ ，## $p < 0.01$ ，### $p < 0.001$ vs 模型组。

2.5 绿蒜正己烷萃取物 (GGHE) 对荷瘤小鼠

肝脏中抗氧化酶和转氨酶的影响

药物、酒精造成的肝损伤伴随着氧化应激反应的发生^[19]。脂质过氧化损伤产生的丙二醛含量可作为评价肝损伤的重要指标。丙二醛的含量越高，说明肝损伤越严重。实验结果表明：与模型组相比，三个剂量组的 MDA 含量显著降低 ($p < 0.001$)。GSH-Px, CAT 和 SOD 是哺乳动物细胞中的关键抗氧化酶^[20]。GGHE 能够增加肝脏中 GSH-Px, CAT 和 SOD 的活力，M-GGHE 用药后，GSH-Px 和 SOD 的活力比其他两个剂量更强 (表 4)。

结果证明 GGHE 用药后，肝脏氧化应激水平降

M-GGHE 对这两种细胞因子的表达水平的提高效果最为显著 ($p < 0.001$) (表 3)；在肿瘤血管内皮生长因子 VEGF 的表达上，与模型组相比，三个剂量浓度的 GGHE 都能够显著降低 VEGF 的表达 ($p < 0.001$) (表 3)。结果表明，GGHE 可以促进白细胞介素和肿瘤坏死因子的分泌，抑制肿瘤血管内皮生长因子的表达，提高机体免疫水平。

白细胞介素，肿瘤坏死因子超家族和生长因子是细胞因子的重要组成部分。细胞因子对细胞间相互作用、细胞的增殖分化和效应功能有重要的调节作用。到目前为止，许多动物肿瘤模型实验研究结果表明，调节细胞因子的水平成为癌症治疗的重要方法之一^[16]。当机体免疫功能较差时，会导致肿瘤的形成和恶化。反过来，一旦肿瘤形成，又能造成机体免疫功能衰退以免疫器官的退化^[17,18]。本实验结果证明了 GGHE 不仅对肿瘤细胞生长的直接抑制作用，还能通过调节 VEGF、TNF- α 和 IL-2 来提高机体的免疫水平，发挥其间接抗癌作用，有增效减毒的作用效果。

低，表现出肝脏保护的效果。环磷酰胺 CTX 是常用的化疗药，虽然能够显著地抑制肿瘤生长，但是会产生严重的副作用，实验结果表明，与模型组相比，CTX 组的 ALT 和 AST 的水平显著提高 ($p < 0.001$)，而 GGHE 组转氨酶降低，对肝脏具有保护作用 (表 4)。以上实验结果充分证明 GGHE 是一种治疗肝癌的理想药物，既能抑制肿瘤的生长和增殖，又提高抗氧化水平，减少肝脏炎症的发生。

GGHE 显示出较好的抗氧化活性和免疫促进作用。抗氧化和免疫水平之间相互关联，抗氧化活性可以通过氧化监管作用和刺激自然杀伤 NK 细胞和淋巴细胞进而增强免疫功能^[21]。以上研究结果表明，GGHE 用药可以通过提高抗氧化活性和增强免疫力的双通道共同发挥肿瘤治疗作用。

表 4 GGHE 对 H22 荷瘤小鼠肝脏中 CAT、GSH-Px、SOD、ALT、AST 活力和 MDA 含量的影响

Table 4 Effects of GGHE on the CAT, GSH-Px, SOD, ALT, and AST activities, and MDA content in livers of H22 tumor-bearing mice

组别	CAT/(U/mg prot)	GSH-Px/(U/mg prot)	SOD/(U/mg prot)
空白组	46.17±1.03***	205.16±8.19####	423.62±8.83
模型组	22.65±2.84▲▲▲***	100.22±6.11▲▲▲**	321.29±8.20▲▲▲***
阳性对照组	33.72±2.63▲▲▲###	128.99±8.12▲▲▲###	402.48±5.79▲▲▲###
L-GGHE 组	45.26±2.59***###	225.23±9.04***###	456.71±7.33▲▲▲***###
M-GGHE 组	53.61±1.64▲▲▲***###	267.52±7.46▲▲▲***###	674.84±9.84▲▲▲***###
H-GGHE 组	55.09±0.75▲▲▲***###	248.71±6.25▲▲▲***###	624.35±7.62▲▲▲***###

组别	MDA/(nmol/mg prot)	ALT/(U/g prot)	AST/(U/g prot)
空白组	3.71±0.24####	160.05±8.27####***	401.28±6.38***###
模型组	5.64±0.66▲▲▲***	206.72±4.31▲▲▲	452.36±6.23▲▲▲***
阳性对照组	3.53±0.37###	272.65±5.23▲▲▲***###	688.09±5.86▲▲▲***###
L-GGHE 组	2.88±0.19###	170.55±7.04***###	424.11±5.17▲▲▲***
M-GGHE 组	2.05±0.25▲▲▲***###	124.33±4.89▲▲▲***###	387.03±8.34***###
H-GGHE 组	2.63±0.17▲###	146.21±5.28***###	412.80±8.29***###

注: ▲*p*<0.05, ▲▲*p*<0.01, ▲▲▲*p*<0.001 vs 空白组; **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001 vs 阳性对照组; #*p*<0.05, ##*p*<0.01, ###*p*<0.001 vs 模型组。

2.6 肿瘤组织病理学分析

H&E 染色的肿瘤组织病理分析结果表明给药后大量的细胞呈现出坏死的状态(图 3)。与模型组相比,给药组的肿瘤细胞表现出稀疏的粉红色的细胞质,细胞缩小或消失,细胞核染色变浅且排列疏松。肿瘤周边可见血管,纤维组织增生;少量炎细胞浸润。

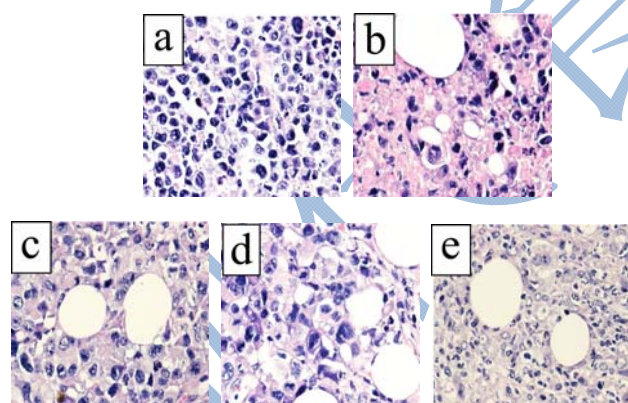


图 3 肿瘤组织的病理切片

Fig. 3 Histopathological studies of the tumor tissues (H&E stain 400x)

注: a 表示模型组; b 表示阳性对照组; c 表示 L-GGHE; d 表示 M-GGHE; e 表示 H-GGHE。

3 结论

本研究首次发现绿蒜 75%乙醇提取物的正己烷萃取物(GGHE)对 H22 荷瘤小鼠有一定的抗肿瘤作用,中剂量作用效果最强,抑瘤率达到了 71.48%。此

外,GGHE 改善了荷瘤小鼠的生存质量,不仅增加肝脏中 GSH-Px, CAT 和 SOD 的活力,降低 MDA 的含量,还能调节一些细胞因子水平,增强机体免疫力和抗氧化水平,且对肝脏的损害相较化疗药较低。绿蒜作为一种功能食品,不仅具有传统大蒜的功效,并且也具有有良好的抗肿瘤作用。所以,可将绿蒜 75%乙醇提取物的正己烷萃取物开发成治疗肝癌的候选药物。

参考文献

- [1] Santhosha S G, Jamuna P, Prabhavathi S N. Bioactive components of garlic and their physiological role in health maintenance: a review [J]. Food Bioscience, 2013, 3: 59-74
- [2] 李文清,周华,胡兴鹏,等.大蒜素和有机溶剂对蒜氨酸酶活性及大蒜油组成的影响[J].现代食品科技,2014, 30(11): 79-83
LI Wen-qing, ZHOU Hua, HU Xing-peng, et al. Effects of allicin and organic solvents on the alliinase activity and composition of garlic oil [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(11): 79-83
- [3] 王颖钰,陆茵,钱文慧,等.大蒜有机硫化物抗肿瘤机制及应用前景探讨[J].安徽农业科学,2011,39(19):11454-11457
WANG Ying-yu, LU Yin, QIAN Wen-hui, et al. The anti-tumor mechanism and application prospects of garlic-derived organosulfur compounds [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011, 39(19): 11454-11457
- [4] Omar S H, Al Wabel N A. Organosulfur compounds and possible mechanism of garlic in cancer [J]. Saudi

- Pharmaceutical Journal, 2010, 18(1): 51-58
- [5] Xi S, Peng Y, Minuk G Y, et al. The combination effects of Shen-Ling-Bai-Zhu on promoting apoptosis of transplanted H22 hepatocellular carcinoma in mice receiving chemotherapy [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2016, 190: 1-12
- [6] Pourfarzi F, Whelan A, Kaldor J, et al. The role of diet and other environmental factors in the causation of gastric cancer in Iran-a population based study [J]. International Journal of Cancer, 2009, 125(8): 1953-1960
- [7] Levi F, Pasche C, La Vecchia C, et al. Food groups and colorectal cancer risk [J]. British Journal of Cancer, 1999, 79(7-8): 1283
- [8] 王丹,张京生,赵广华.大蒜绿色素形成机理的研究进展[J].食品工业科技,2008,10:294-296
WANG Dan, ZHANG Jing-sheng, ZHAO Guang-hua. Review on mechanism of garlic greening [J]. Science and Technology of Food Industry, 2008, 10: 294-296
- [9] Bai B, Chen F, Wang Z, et al. Mechanism of the greening color formation of "Laba" garlic, a traditional homemade Chinese food product [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(18): 7103-7107
- [10] 李蕾,赵广华,胡小松,等.硫代亚磺酸酯参与大蒜绿变作用机理初探[J].中国调味品,2005,7:13-17
LI Lei, ZHAO Guang-hua, HU Xiao-song, et al. A preliminary study on the mechanism of the effect of thiosulfonic on garlic green transformation [J]. China Condiment, 2005, 7: 13-17
- [11] 邵莉楠,殷蔚意,李宪章,等.蒜瓣在温度调节下解除休眠前后的细胞化学观察[J].植物学报,1989,31(2):110-115
SHAO Li-tuo, YIN Wei-yi, LI Xian-zhang, et al. Cytochemical observation on garlic clove before and after temperature-modulated break of dormancy [J]. Acta Botanica Sinica, 1989, 31(2): 110-115
- [12] Lukes T M. Factors governing the greening of garlic puree [J]. Journal of Food Science, 1986, 51(6): 1577-1577
- [13] 陈海霞,邢利沙,王佳,等.一种制备绿色大蒜的方法:中国专利,CN104172002A[P]2014
CHEN Hai-xia, XING Li-sha, WANG Jia, et al. A quick method for preparing green garlic: Chinese patent, CN104172002A [P] 2014
- [14] 李瑜,许时婴.分光光度法测定大蒜提取物中硫代亚磺酸酯[J].食品与机械,2004,20(3):51-53
LI Yu, XU Shi-ying. A spectrophotometry to determine thiosulfates in garlic extract [J]. Food and Machinery, 2004, 20(3): 51-53
- [15] 黄琳琳,白勇,邹俊,等.从大蒜有机硫化物开发抗癌药的潜在可能[J].医药导报,2012,31(11):1463-1467
HUANG Lin-lin, BAI Yong, ZOU Jun, et al. The potential for developing anticancer drugs from garlic organic sulfur compounds [J]. Herald of Medicine, 2012, 31(11): 1463-1467
- [16] Liu J, Zhang L, Ren Y, et al. Anticancer and immunoregulatory activity of *Gynostemma pentaphyllum* polysaccharides in H22 tumor-bearing mice [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 69(6): 1-4
- [17] Ashraf A, Sarfraz R A, Mahmood A, et al. Chemical composition and in vitro antioxidant and antitumor activities of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. leaves [J]. Industrial Crops and Products, 2015, 74: 241-248
- [18] Huang Z, Lin H, Wang Y, et al. Studies on the anti-angiogenic effect of *Marsdenia tenacissima* extract in vitro and in vivo [J]. Oncology Letters, 2013, 5(3): 917-922
- [19] De la Rosa L C, Moshage H, Nieto N. Hepatocyte oxidant stress and alcoholic liver disease [J]. Revista Espanola de Enfermedades Digestivas, 2008, 100(3): 156
- [20] Wang Y, Han T, Xue L M, et al. Hepatotoxicity of kaurene glycosides from *Xanthium strumarium* L. fruits in mice [J]. Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011, 66(6): 445-449
- [21] Yuan C, Li Z, Peng F, et al. Combination of selenium-enriched green tea polysaccharides and Huo-ji polysaccharides synergistically enhances antioxidant and immune activity in mice [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2015, 95(15): 3211-3217