银杏黄酮苷元对多柔比星治疗肝癌的增效减毒作用Δ

宋忠军[1,2*]，朱晓青[1,2]，何　艳[3]，李勇军[2,4]，陆　苑[1#]（1.贵州医科大学贵州省药物制剂重点实验室/省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室，贵阳　550004；2.贵州医科大学药学院，贵阳　550004；3.贵州医科大学附属医院临床试验研究中心，贵阳　550004；4.贵州医科大学民族药与中药开发应用教育部工程研究中心，贵阳　550004）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2022）16-1937-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2022.16.04

摘　要　目的 研究银杏黄酮苷元（GA）对多柔比星（DOX）治疗肝癌的增效减毒作用。**方法** 于ICR小鼠右腋皮下单次接种肝癌细胞H22以建立荷瘤模型，并将造模成功的小鼠随机分为模型对照组、DOX组（2.5 mg/kg，隔天尾静脉注射1次）、GA组（30 mg/kg，每天灌胃1次）和GA+DOX组（给药方法同单药组），每组6只。药物干预周期为15 d。观察各组小鼠的一般生长情况，称定其体质量、瘤体质量并计算抑瘤率，采用金氏公式评估联合用药的效果（Q）。检测各组小鼠血清中甲胎蛋白（AFP）水平，肿瘤组织的病理改变、细胞凋亡情况和血小板-内皮细胞黏附分子1（CD31）的表达水平，以及心脏指数、血清B型钠尿肽（BNP）和N末端脑钠肽前体（NT-pro BNP）水平、心脏病理改变和心肌纤维化情况。**结果** DOX组、GA组、GA+DOX组小鼠的体质量变化百分比（GA组除外）、瘤体质量均较模型对照组显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），且GA+DOX组的瘤体质量显著低于DOX组（$P<0.01$）；3个药物组的抑瘤率分别为54.29%、42.50%、89.29%，两药联合的Q为1.21。各药物组小鼠肿瘤组织均有不同程度坏死，血清AFP水平和肿瘤组织中CD31的表达水平均较模型对照组显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），肿瘤组织坏死面积百分比和细胞凋亡阳性率（单药组除外）均显著增高（$P<0.05$或$P<0.01$），且GA+DOX组的细胞凋亡阳性率显著高于DOX组（$P<0.05$）。DOX组小鼠的心脏指数显著低于模型对照组（$P<0.05$），DOX组、GA+DOX组小鼠的血清BNP、NT-pro BNP水平均显著高于模型对照组（$P<0.05$或$P<0.01$），GA+DOX组小鼠的心脏病理改变和心肌纤维化程度均较DOX组轻微。**结论** GA和DOX联用具有协同抑瘤作用；GA可增加DOX的促细胞凋亡作用，并有助于降低后者的心脏毒性。

关键词　银杏黄酮苷元；多柔比星；增效减毒；肝癌；H22荷瘤小鼠

Effects of increasing efficacy and decreasing toxicity of ginkgo flavone aglycone on doxorubicin in the treatment of liver cancer

SONG Zhongjun[1,2], ZHU Xiaoqing[1,2], HE Yan[3], LI Yongjun[2,4], LU Yuan[1] [1. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics/State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 3. Clinical Trial Research Center, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 4. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM (Ministry of Education), Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China]

ABSTRACT　OBJECTIVE To study the effects of increasing efficacy and decreasing toxicity of ginkgo flavone aglycone (GA) on doxorubicin (DOX) in the treatment of liver cancer. **METHODS** A tumor bearing model was established by inoculating liver cancer cell H22 into the right axillary skin of ICR mice. The successfully modeled mice were randomly divided into model control group, DOX group (2.5 mg/kg, once every other day, via tail vein), GA group (30 mg/kg, once a day, gavage) and GA+DOX group (the usage was the same as single drug groups), with 6 mice in each group. The administration cycle was 15 days. The general growth of mice in each group were observed, body weight and tumor weight were measured, and the inhibition rate of tumor was calculated. Jin's formula was used to evaluate the effect of combined medication (Q). The serum level of alpha-fetal protein (AFP), the pathological changes of tumor tissue, cell apoptosis and the expression of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) were detected in each group. The cardiac index, serum levels of B-type natriuretic peptide (BNP) and N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-pro BNP), pathological changes of heart and myocardial fibrosis degree were also detected. **RESULTS** The percentage of body weight change (except for GA group) and tumor weights of DOX group, GA group and GA+DOX group were all decreased significantly, compared with model control group ($P<0.05$ or

Δ **基金项目** 国家自然科学基金资助项目（No.U1812403）；贵州省科技计划项目（No.黔科合基础-ZK〔2022〕一般374，No.黔科合基础〔2020〕1Y381）；贵州医科大学国家自然科学基金培育项目（学术新苗）（No.19NSP056）

* **第一作者** 硕士研究生。研究方向：中药药效物质基础。E-mail：2360562849@qq.com

通信作者 副教授，硕士生导师，博士。研究方向：中药药效物质基础。E-mail：luyuan@gmc.edu.cn

$P<0.01$), while tumor weight of GA+DOX group was significantly lower than DOX group ($P<0.01$). Inhibitory rates of tumor in 3 administration groups were 54.29%, 42.50% and 89.29% respectively, and Q of two-drug combination was 1.21. The tumor tissues of mice in each administration group were necrotic to varying degrees; the serum level of AFP and the expression of CD31 in tumor tissue were decreased significantly, compared with model control group ($P<0.05$ or $P<0.01$); the percentage of necrosis area of tumor tissue and the positive rate of apoptosis (except for single drug groups) were significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$), while positive rate of apoptosis in GA+DOX group was significantly higher than DOX group ($P<0.05$). Cardiac index of mice in DOX group was significantly lower than model control group ($P<0.01$); serum levels of BNP and NT-pro BNP in DOX group and GA+DOX group were significantly higher than model control group ($P<0.05$ or $P<0.01$); pathological changes of heart and the degree of myocardial fibrosis in GA+DOX group were lower than DOX group. **CONCLUSIONS** GA combined with DOX show synergistic antitumor effect. GA can strengthen the apoptosis promoting effect of DOX, and can help to reduce the cardiotoxicity of DOX.

KEYWORDS ginkgo flavone aglycone; doxorubicin; efficacy enhancing and toxicity reducing; liver cancer; H22 tumor-bearing mice

银杏叶提取物是从银杏叶中提取的以黄酮类、萜内酯类等化合物为主要活性成分的天然药物[1]。研究表明，银杏叶提取物具有抗氧化、抗肿瘤、保护神经系统等药理作用，被广泛应用于心血管系统、神经系统、呼吸系统疾病和肿瘤的辅助治疗[1]。银杏黄酮苷元（ginkgo flavone aglycone，GA）是借助酶水解法除去银杏叶提取物中黄酮苷的糖基所获得的新型提取物，主要成分为槲皮素、山柰酚和异鼠李素[2]。与传统的银杏叶提取物相比，GA具有更高的生物利用度和更强的生物活性[3]。多柔比星（doxorubicin，DOX）又称阿霉素，是临床治疗肝癌、淋巴瘤、乳腺癌等恶性肿瘤的一线化疗药物，但该药具有明显的心脏毒性、肾毒性、骨髓抑制等毒副作用（尤以心脏毒性最为严重），且在治疗过程中易诱发多药耐药，已成为目前肿瘤临床治疗难以克服的瓶颈[4-5]。

中药对化疗药物的增效减毒作用是肿瘤治疗研究的热点之一[6]。相关研究表明，中药的介入可明显减少化疗药物所致不良反应，提高化疗有效率，改善肿瘤患者的生存质量[7]。有研究表明，在肿瘤治疗过程中，DOX的多药耐药性主要由P糖蛋白（P-glycoprotein，P-gp）介导，而DOX与P-gp抑制剂联合使用可增强DOX的抗肿瘤活性[8]。此外，DOX所致氧化损伤是其引发心脏毒性的主要原因[9]，而槲皮素、山柰酚和异鼠李素均具有抗肿瘤、抗氧化和保护心脑血管系统等多种药理活性[10-13]，且三者都是P-gp抑制剂[14]。基于此，本课题组推测GA对DOX具有一定的增效减毒作用，故本研究以H22荷瘤小鼠为对象，初步探讨GA的增效减毒作用，旨在为银杏资源的深度开发利用及临床抗肝癌联合用药方案的选择提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括680型酶标仪（美国Bio-Rad公司）、800DH型CO_2细胞培养箱（美国Thermo Fisher Scientific公司）、Eclipse E100型正置光学显微镜（日本Nikon公司）等。

1.2 主要药品与试剂

GA（槲皮素、山柰酚、异鼠李素含量分别为44.61%、44.23%、4.77%）由贵州省生化工程中心何珺副教授惠赠；盐酸多柔比星原料药（批号N1111A，纯度＞98%）购自大连美伦生物技术有限公司；甲胎蛋白（alpha-fetal protein，AFP）检测试剂盒（批号20210816）购自南京建成生物工程研究所；B型钠尿肽（B-type natriuretic peptide，BNP）、N末端脑钠肽前体（N-terminal probrain natriuretic peptide，NT-pro BNP）检测试剂盒（批号分别为08/2021、08/2021）均购自上海酶联生物科技有限公司；兔抗人血小板-内皮细胞黏附分子1（platelet-endothelial cell adhesion molecule-1，又名CD31）抗体（批号GB113151）、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗（批号GB23303）和苏木精-伊红（HE）染液、天狼星红染液、pH7.4的磷酸盐缓冲液（PBS）、TUNEL试剂盒、DAB显色试剂盒均购自武汉塞维尔生物科技有限公司；RPMI-1640培养基购自美国Gibco公司；其余试剂均为分析纯，水为超纯水。

1.3 细胞

H22小鼠肝癌细胞株购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.4 实验动物

SPF级雄性ICR小鼠，体质量为16～20 g，购自辽宁长生生物技术股份有限公司，生产许可证号为SCXK（辽）2020-0001。所有小鼠均饲养于温度18～25 ℃、相对湿度50%～70%的动物房内，自由摄食、饮水，适应性饲养1周开始后续实验。本研究经贵州医科大学实验动物伦理委员会批准，伦理批件号为NO2101200。

2 方法

2.1 细胞培养

将H22细胞接种于含10%胎牛血清和1%青-链霉素的RPMI-1640培养基中，在37 ℃、5%CO_2细胞培养箱中培养，每2～3天传代1次，共传代2次。收集对数生长期细胞，经台盼蓝染色并待细胞存活率大于95%后，用PBS稀释得1×10^7个/mL的细胞悬液，备用。

2.2 H22荷瘤小鼠模型建立

取“2.1”项下H22细胞悬液经2次腹水传代后，用PBS稀释，制成2×10^7个/mL的肿瘤细胞悬液。取上述肿瘤细胞悬液0.2 mL于小鼠右腋皮下单次接种，以接种后小鼠右腋出现肉眼可见瘤体为造模成功。

2.3 动物分组与给药

造模成功后，将小鼠随机分为模型对照组、DOX组、GA组、GA+DOX组，每组6只。模型对照组小鼠每天腹腔注射生理盐水0.25 mL，DOX组小鼠隔天（即第1、3、5、7、9、11、13、15天）尾静脉注射DOX药液（以生理盐水为溶剂）2.5 mg/kg，GA组小鼠每天灌胃GA混悬液（以0.5%羧甲基纤维素钠溶液为溶剂）30 mg/kg，GA+DOX组小鼠每天灌胃GA混悬液30 mg/kg+隔天（同DOX组）尾静脉注射DOX药液2.5 mg/kg，连续给药15 d。各药物组剂量均依据本课题组前期预实验结果设置。

2.4 小鼠一般生长状况检测

实验期间，观察各组小鼠的一般生长状况，称定其体质量并绘制体质量变化曲线；同时，计算各组小鼠的体质量变化百分比：体质量变化百分比（%）=（最终体质量－最初体质量）/最初体质量×100%。

2.5 小鼠肿瘤组织生长情况检测

治疗期间，每2天测量并计算肿瘤体积（V）：$V=(a\times b^2)\times 0.5$（式中，$a$为瘤体长度，$b$为瘤体宽度），同时绘制肿瘤生长曲线。末次给药2 h后，于眼球取血并处死小鼠，完整剥离肿瘤组织，称取瘤体质量并计算抑瘤率：抑瘤率（%）=$(C-T)/C\times 100\%$（式中，C为模型对照组小鼠的平均瘤体质量，T为各药物组小鼠的平均瘤体质量）。使用金氏公式来评估药物联合使用的效果（Q）：$Q=E_{GA+DOX}/[E_{GA}+(1-E_{GA})E_{DOX}]$（式中，$E_{GA}$、$E_{DOX}$和$E_{GA+DOX}$分别表示GA、DOX单药及其联合使用的抑瘤率）。当$Q<0.85$时，表示两药作用拮抗；当Q为0.85～1.15时，表示两药作用相加；当$Q>1.15$时，表示两药作用协同[15]。

2.6 小鼠血清AFP水平检测

末次给药后，取各组小鼠血样，制备血清。取血清适量，采用酶联免疫吸附测定法以酶标仪测定AFP水平，严格按照相应试剂盒说明书方法操作。

2.7 小鼠肿瘤组织病理观察及细胞凋亡情况检测

末次给药后，取各组小鼠肿瘤组织适量，在4%甲醛溶液中固定72 h后，常规石蜡包埋、脱水、切片。取组织切片进行HE染色，观察肿瘤组织病理改变情况并计算肿瘤组织坏死面积百分比：肿瘤组织坏死面积百分比（%）=肿瘤组织坏死面积/肿瘤总面积×100%。同时，取组织切片进行TUNEL染色，观察肿瘤组织中细胞的凋亡情况并分析凋亡阳性率：凋亡阳性率（%）=凋亡阳性细胞数/总细胞数×100%。

2.8 小鼠肿瘤组织中CD31表达水平检测

采用免疫组化法进行检测。取各组小鼠肿瘤组织适量，常规石蜡包埋、脱水、切片，切片脱蜡并经乙醇梯度水化、抗原修复后，用3%过氧化氢溶液孵育以阻断内源性过氧化物酶；用3%牛血清白蛋白在室温下孵育，加入CD31一抗（稀释比例为1∶500），4 ℃孵育过夜；加入相应二抗（稀释比例为1∶200），室温孵育50 min，用PBS清洗3次，以DAB试剂显色，经水洗、苏木精复染、脱水、封片后，使用显微镜观察并采集图像（苏木精染细胞核呈蓝色，DAB染CD31阳性表达细胞呈棕黄色），通过分析蛋白表达阳性率来反映CD31蛋白的表达水平。

2.9 小鼠心脏病理改变及心肌纤维化情况检测

末次给药后，取各组小鼠心脏，用生理盐水冲洗并用滤纸吸干，称定心脏质量并计算心脏指数：心脏指数=心脏质量/最终体质量。取心脏组织适量，于4%甲醛溶液中固定72 h后，常规石蜡包埋、脱水、切片。采用酶联免疫吸附测定法以酶标仪检测其血清BNP、NT-pro BNP水平，严格按照相应试剂盒说明书方法操作；取组织切片进行HE和天狼星红染色，分别观察其心脏病理改变和心肌纤维化情况。

2.10 统计学方法

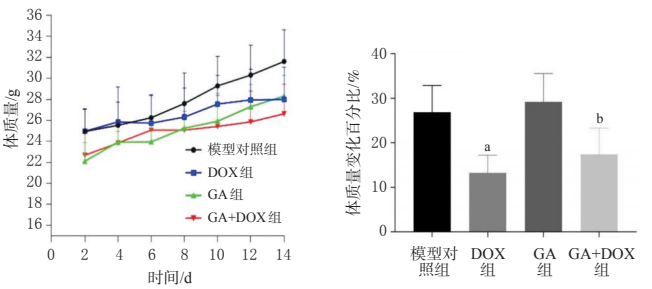
采用SPSS 22.0软件对数据进行统计分析。数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 GA联合DOX对小鼠一般生长状况的影响

H22荷瘤小鼠的造模成功率为100%。实验期间，各组小鼠饮食正常，除模型对照组和DOX组小鼠出现精神萎靡外，其余各组小鼠的精神状况良好。

实验期间，各组小鼠体质量均有所增加；与模型对照组比较，GA组小鼠体质量变化百分比无明显变化（$P>0.05$），DOX组小鼠体质量变化百分比显著降低（$P<0.01$），GA+DOX组上述指标介于DOX组和GA组之间，但仍显著低于模型对照组（$P<0.05$）。结果见图1。



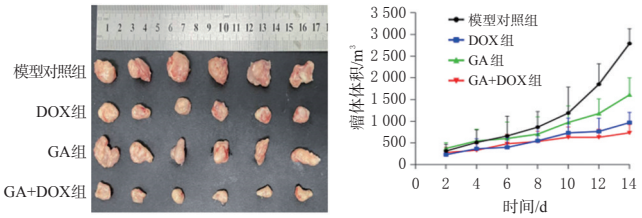
A.体质量变化曲线　　B.体质量变化百分比

a：与模型对照组比较，$P<0.01$；b：与模型对照组比较，$P<0.05$

图1 各组小鼠的体质量变化（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

3.2 GA联合DOX对小鼠肿瘤组织生长的影响

实验期间，各组小鼠的肿瘤生长速度依次为：模型对照组＞GA组＞DOX组＞GA+DOX组。经过15 d的干预后，各药物组小鼠的瘤体体积和质量（$P<0.01$）均小于/低于模型对照组；与DOX组比较，GA+DOX组小鼠的瘤体质量均显著降低（$P<0.01$）。结果见图2、表1。DOX组、GA组、GA+DOX组的抑瘤率分别为54.29%、42.50%和89.29%；GA与DOX联用的Q为1.21，提示两药联用表现为协同的抑瘤作用。



A.瘤体解剖图　　B.肿瘤生长曲线

图2　GA联合DOX对小鼠肿瘤组织生长的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

表1　GA联合DOX对小鼠肿瘤组织生长和血清AFP水平的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	瘤体质量/g	AFP/（ng/mL）
模型对照组	2.80±0.25	3.34±0.19
DOX组	1.28±0.09[a]	2.77±0.12[a]
GA组	1.61±0.22[a]	3.03±0.18[b]
GA+DOX组	0.30±0.05[ac]	2.63±0.18[a]

a：与模型对照组比较，$P<0.01$；b：与模型对照组比较，$P<0.05$；c：与DOX组比较，$P<0.01$

3.3　GA联合DOX对小鼠血清AFP水平的影响

与模型对照组比较，各药物组小鼠血清AFP水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）；与DOX组比较，GA+DOX组小鼠血清中AFP水平虽有所降低，但组间比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。结果见表1。

3.4　GA联合DOX对小鼠肿瘤组织病理学及细胞凋亡情况的影响

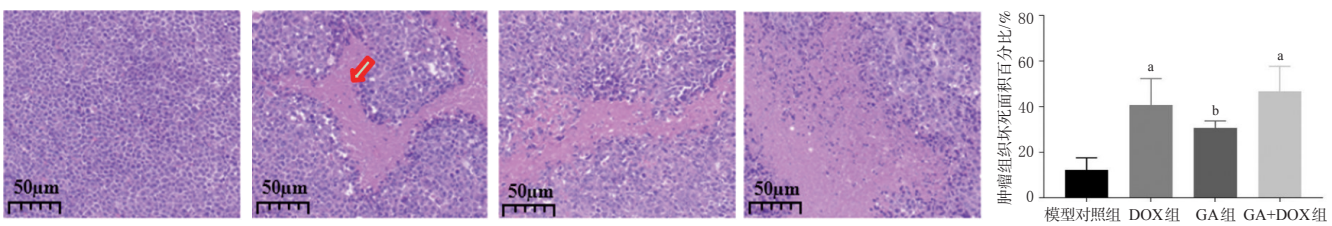
HE染色肿瘤组织病理学检查结果见图3。由图3可知，模型对照组小鼠肿瘤组织中细胞数量较多，无明显坏死细胞，细胞形态特征明显，呈明显的球形、梭形且有大核，表明组织内细胞处于快速增殖状态。各药物组小鼠肿瘤组织出现不同程度坏死，细胞分布不规则，胞核固缩、碎裂，其肿瘤组织坏死面积百分比均显著高于模型对照组（$P<0.05$或$P<0.01$）；与DOX组比较，GA+DOX组小鼠肿瘤组织坏死面积虽有增大趋势，但组间比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。肿瘤组织TUNEL染色结果见图4。由图4可知，与模型对照组比较，各药物组小鼠肿瘤组织中的凋亡细胞均有所增多，且GA+DOX组小鼠肿瘤组织中细胞的凋亡阳性率均显著高于模型对照组和DOX组（$P<0.05$）。

3.5　GA联合DOX对小鼠肿瘤组织中CD31表达水平的影响

与模型对照组比较，各药物组小鼠肿瘤组织中CD31的表达水平均显著降低（$P<0.01$）；与DOX组比较，GA+DOX组CD31的表达水平虽有降低趋势，但组间比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。结果见图5。

3.6　GA联合DOX对小鼠心脏病理改变及心肌纤维化情况的影响

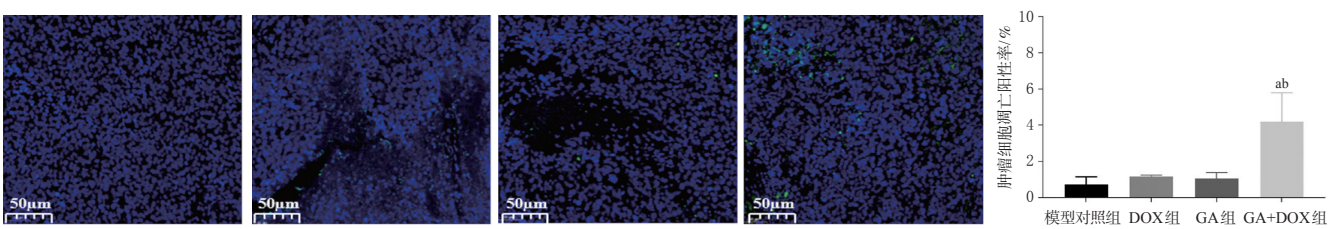
与模型对照组比较，DOX组小鼠的心脏指数显著降低（$P<0.05$）；与DOX比较，GA组和GA+DOX组小鼠的心脏指数均有增加的趋势，但组间比较差异均无统计学意义（$P>0.05$）。此外，与模型对照组比较，DOX组和GA+DOX组小鼠血清BNP、NT-pro BNP水平均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）；与DOX组比较，GA+DOX组小鼠血清BNP、NT-pro BNP水平虽有降低的趋势，但组间比较差异均无统计学意义（$P>0.05$）。结果见表2。



A　　B　　C　　D　　E

A：模型对照组显微图；B：DOX组显微图；C：GA组显微图；D：GA+DOX组显微图；E.各组小鼠肿瘤组织坏死面积百分比（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）；→：坏死区域；a：与模型对照组比较，$P<0.01$；b：与模型对照组比较，$P<0.05$

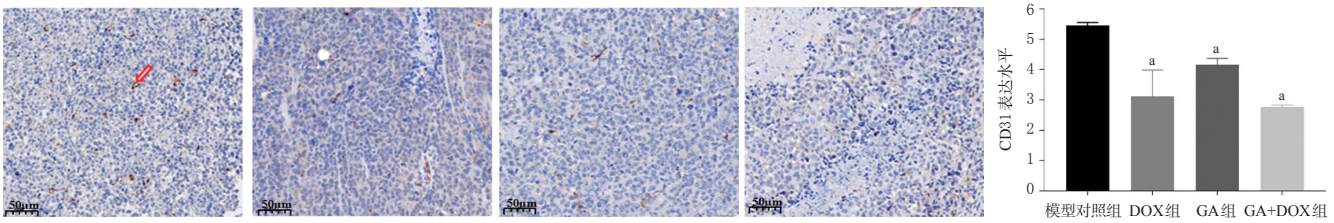
图3　各组小鼠肿瘤组织病理改变情况（HE染色）及肿瘤组织坏死面积百分比



A　　B　　C　　D　　E

A：模型对照组显微图；B：DOX组显微图；C：GA组显微图；D：GA+DOX组显微图；E：各组细胞凋亡阳性率（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）；a：与模型对照组比较，$P<0.05$；b：与DOX组比较，$P<0.05$

图4　各组小鼠肿瘤组织中细胞凋亡情况（TUNEL染色）及细胞凋亡阳性率



A　　B　　C　　D　　E

A：模型对照组显微图；B：DOX组显微图；C：GA组显微图；D：GA+DOX组显微图；E：各组小鼠肿瘤组织中CD31表达水平（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）；→：CD31阳性表达细胞；a：与模型对照组比较，$P<0.01$

图5　GA联合DOX对小鼠肿瘤组织中CD31表达水平的影响

表2　GA联合DOX对小鼠心脏指数和血清BNP、NT-pro BNP水平的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	心脏指数/(mg/g)	BNP/(ng/L)	NT-pro BNP/(ng/L)
模型对照组	3.98±0.22	93.46±5.97	1 229.29±70.21
DOX组	3.59±0.19[a]	110.03±9.67[b]	1 437.36±33.85[b]
GA组	4.39±0.36	93.88±6.81	1 260.24±71.57
GA+DOX组	3.79±0.19	100.73±2.71[a]	1 397.14±59.80[b]

a：与模型对照组比较，$P<0.05$；b：与模型对照组比较，$P<0.01$

小鼠心脏病理学观察结果见图6A。由图6A可见，模型对照组和GA组小鼠心肌纤维束排列整齐，横纹清晰，胞浆均匀，无空泡化，未见明显组织病变；DOX组小鼠心肌纤维排列紊乱，横纹消失，胞浆不均匀，可见节段性凝聚及溶解，空泡化严重；GA+DOX组小鼠心肌排列尚整齐，横纹尚清晰，心肌肌纤维断裂、胞浆空泡化及溶解情况均较DOX组明显减轻。这表明GA不会引起心脏组织病变，且可改善DOX所致的心脏组织病变。

小鼠心肌纤维化情况观察结果见图6B。由图6B可见，模型对照组与GA组小鼠心肌纤维排列规则，纤维化染色（红染）不明显；DOX组小鼠心肌纤维排列紊乱，纤维化（红染）严重；GA+DOX组小鼠心肌排列较规则，纤维化程度较DOX组明显减轻。这表明GA不会引起心肌纤维化，且可改善DOX所致的心肌纤维化。

4　讨论

恶性肿瘤是严重威胁人类健康及生命的疾病之一，2020年全球新增恶性肿瘤及死亡病例分别达到了1 930万例和1 000万例[16]。现有化疗药物在杀伤肿瘤细胞的同时也会对正常细胞造成损伤，引发包括免疫抑制、神经/心脏毒性、骨髓抑制在内的诸多不良反应，这些严重的不良反应不仅会影响化疗效果，而且会导致患者生存质量下降[17]。随着中药研究的不断深入，越来越多的研究表明部分中药成分具有抗肿瘤活性，与化疗药物联用不仅可增强化疗药物的疗效，还可降低后者的毒性和细胞耐药的发生率[18]。有文献报道，GA中的槲皮素、山柰酚、异鼠李素可通过阻滞细胞周期、抑制细胞增殖、促进细胞凋亡等多种途径来发挥抗肿瘤作用[10-11,19]；此外，槲皮素还可通过抑制血管生成等途径来发挥抗肿瘤作用[19]。基于此，本研究初步探讨了GA与DOX联合干预H22荷瘤小鼠的效果。

有研究指出，黄酮类化合物槲皮素、山柰酚、异鼠李素具有水溶性差、易被氧化、口服生物利用度低、体内半衰期短等缺点[20]。基于上述原因，大多动物实验中这3个成分的给药剂量较大，为50～200 mg/kg。本研究曾在预实验中考察了30、60、100 mg/kg GA的抗肿瘤效果，结果显示，其药效随着剂量的增加而增强。随着纳米

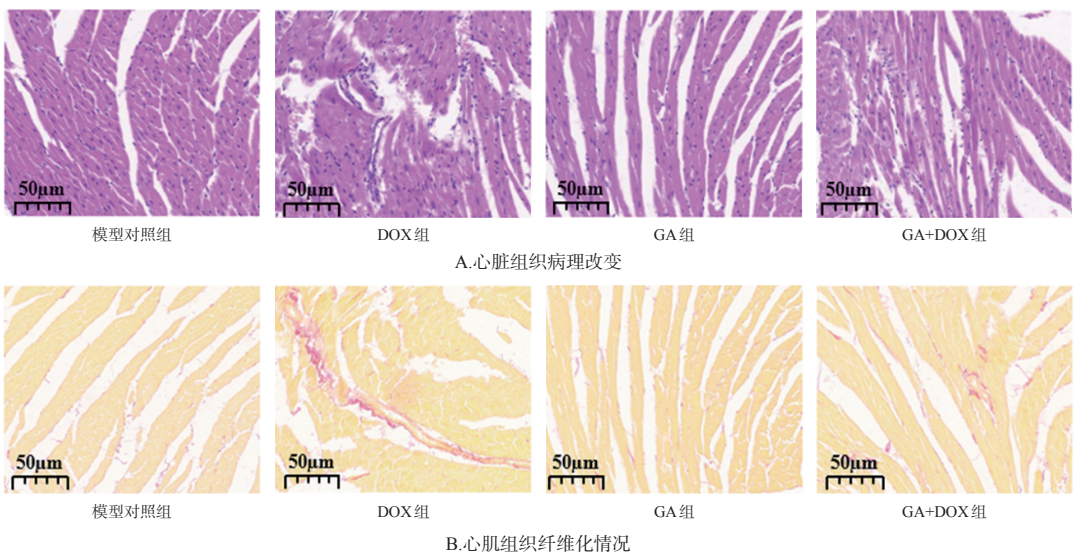


图6　GA联合DOX对小鼠心脏组织病理改变及心肌纤维化情况影响的显微图

粒、聚合物胶束、自微乳、前体脂质体等一系列药物新剂型及制剂新技术的出现，中药的开发与利用得以更进一步[21]。由于本课题组后期考虑采用聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米囊技术解决GA成药性差这一问题，以提高其口服生物利用度、延长其体内生物半衰期、放大其药理学效应，故本研究采用了具有药效学活性的较低剂量（30 mg/kg）。结果显示，GA组、DOX组和GA+DOX组小鼠体内肿瘤组织的生长均受到了不同程度的抑制，提示GA单用和与DOX联用均表现出一定的抑瘤活性；同时，当GA与DOX联用时，Q为1.21，提示两者联用具有协同抗肿瘤作用[15]。

癌症标志物AFP是一种糖蛋白分子，是目前临床诊断肝癌的常用血清肿瘤标志物，可用于原发性肝癌的诊断及疗效评价[22]。细胞凋亡在肿瘤的形成与发展中起着至关重要的作用，细胞凋亡失衡不仅是肿瘤发生和进展的原因，也是肿瘤细胞对治疗药物耐药的原因[23]。CD31是机体血管生成的重要标志物[24]。肝癌是一种血管依赖性恶性肿瘤，其生长和转移与血管生成密切相关[25]。本研究结果显示，各药物组小鼠血清AFP水平和肿瘤组织中CD31的表达水平均较模型对照组显著降低，且GA+DOX组上述指标均有低于DOX组的趋势；同时，各药物组小鼠的肿瘤组织坏死面积百分比和细胞凋亡阳性率均显著高于模型对照组，且GA+DOX组的细胞凋亡阳性率显著高于DOX组。这提示GA与DOX联用可能通过抑制肿瘤血管因子CD31的表达来促进细胞凋亡，从而发挥协同抗肝癌的作用。

心脏毒性（如心力衰竭）是DOX常见的不良反应之一[4-5]。当心脏功能受损时，心脏指数会有所降低[9]。BNP和NT-pro BNP由BNP前体经裂解产生，当心脏功能受损时，两者的血清水平将有所升高[26]。心肌纤维化是心血管疾病发展到一定阶段的结果，是以正常心肌组织中细胞增殖、细胞外基质过度堆积为主要表现的疾病，是心力衰竭的重要病理因素[27]。本研究结果表明，给予DOX后，H22荷瘤小鼠的心脏指数显著降低，血清BNP、NT-pro BNP水平均显著升高，心脏组织病变及心肌纤维化程度严重；而GA与DOX的联用对上述指标均有改善趋势。

综上所述，GA是一种有效的抗肿瘤天然提取物，具有一定的抑瘤作用，且与DOX联合具有协同作用，可增加DOX的促细胞凋亡作用，并有助于减轻后者的心脏毒性。

参考文献

[1] 张鹏飞，廖丽君，邓祯，等.银杏叶提取物的药理作用及其临床应用研究进展[J].辽宁中医杂志，2017，44(2)：426-429.

[2] 朱啟会.产水解银杏黄酮苷的β-葡萄糖苷酶的菌株筛选及酶学性质研究[D].贵阳：贵州大学，2017.

[3] 刘静波，陈晶晶，王二雷.黄酮苷元类化合物制备技术及功能活性研究进展[J].中国食品学报，2018，18(10)：276-285.

[4] 吴杰，叶娟，曾智，等.中药单体对阿霉素增效减毒作用研究进展[J].中医药学报，2021，49(9)：111-120.

[5] 吴金枝，马虎，曹云亮，等. miR-34a靶向调控Akt/Bcl-2对乳腺癌细胞多柔比星耐药性的影响[J].天津医药，2022，50(1)：41-45.

[6] 刘学伟，娄彦妮，冯哲，等.从国家自然科学基金资助项目浅谈中医药在恶性肿瘤治疗中的增效减毒作用研究现状[J].中国中药杂志，2022，47(1)：253-258.

[7] 李小江，邬明歆，孔凡铭，等.中药有效成分抗肿瘤活性及作用机制研究进展[J].中草药，2020，51(9)：2587-2592.

[8] 岳贵娟，王成祥，于梦琦，等.黄芪甲苷逆转人乳腺癌细胞MDA-MB-231对阿霉素多药耐药的体外研究[J].中草药，2020，51(20)：5237-5242.

[9] 彭琳，唐小海，严伟，等.果胶阿霉素对大鼠心脏毒性的研究[J].中国药理学通报，2016，32(8)：1075-1080.

[10] 马纳，李亚静，范吉平.槲皮素药理作用研究进展[J].辽宁中医药大学学报，2018，20(8)：221-224.

[11] ZHU L，XUE L J. Kaempferol suppresses proliferation and induces cell cycle arrest，apoptosis，and DNA damage in breast cancer cells[J]. Oncol Res，2019，27(6)：629-634.

[12] VISHWAKARMA A，SINGH T U，RUNGSUNG S，et al. Effect of kaempferol pretreatment on myocardial injury in rats[J]. Cardiovasc Toxicol，2018，18(4)：312-328.

[13] GONG G，GUAN Y Y，ZHANG Z L，et al. Isorhamnetin：a review of pharmacological effects[J]. Biomed Pharmacother，2020，128：110301.

[14] WANG Y，CAO J，ZENG S. Involvement of P-glycoprotein in regulating cellular levels of ginkgo flavonols：quercetin，kaempferol，and isorhamnetin[J]. J Pharm Pharmacol，2005，57(6)：751-758.

[15] 牟卫伟，许焕丽.半枝莲乙醇提取物对顺铂抗肝癌的增效作用研究[J].中华中医药杂志，2017，32(1)：306-308.

[16] SUNG H，FERLAY J，SIEGEL R L，et al. Global cancer statistics 2020：GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin，2021，71(3)：209-249.

[17] 王燕婷，戴媛媛，杨珺，等.细胞毒化疗药物不良反应支持治疗的指南进展及实践总结[J].中国药学杂志，2020，55(20)：1726-1735.

[18] 毕启瑞，李运，高敏，等.抗肿瘤中药研究进展[J].中医肿瘤学杂志，2021，3(4)：1-11.

[19] TANG S M，DENG X T，ZHOU J，et al. Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects[J]. Biomed Pharmacother，2020，121：109604.

[20] TIAN R，WANG H，XIAO Y，et al. Fabrication of nanosuspensions to improve the oral bioavailability of total flavones from *Hippophae rhamnoides* L. and their comparison with an inclusion complex[J]. AAPS PharmSciTech，2020，21(7)：249.

（下转第1949页）