

拟缺香茶菜水提物抗肿瘤作用的研究

李寅超, 富显祖, 石金金, 何永侠, 孙 曼, 陈慧芳, 李继成*

郑州大学药学院, 郑州 450001

摘要: 为了研究拟缺香茶菜水提物(以下简称拟水)对动物移植性肿瘤和对机体免疫功能的影响, 本实验采用动物移植性肿瘤艾氏腹水癌(EAC)、肉瘤 180(S₁₈₀)、肝癌(HCA)、Lewis 肺癌为模型, 以 5-氟尿嘧啶(5-Fu)为阳性对照, 以生理盐水(N.S)为阴性对照, 观察拟水(5g/kg)的抗肿瘤作用; 并通过小鼠溶血素实验和小鼠迟发性变态反应实验, 观察其对机体免疫状态的影响。与阴性对照组相比, 拟水在体外对 EAC 肿瘤细胞有较强的杀伤力, 在体内除对实体型 S₁₈₀(抑瘤率 38.83%)、HCA(抑瘤率 32.03%)、Lewis 肺癌(抑瘤率 30.97%)有些作用外, 对其他肿瘤作用不明显, 与对照组相比, 对机体免疫状态无明显影响。本实验得出拟水对腹水型肿瘤作用较弱, 对实体型肿瘤有一定作用, 且对机体免疫状态无明显影响。

关键词: 拟缺香茶菜水提物; 艾氏腹水癌; 肉瘤 180; 肝癌; Lewis 肺癌

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

Study on the Antitumor Effect of *Rabdosia excisoides* Water Extract

LI Yin-chao, FU Xian-zu, SHI Jin-jin, HE Yong-xia, SUN Man, CHEN Hui-fang, LI Ji-cheng*

School of Pharmacy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

Abstract: To study the effects of *Rabdosia excisoides* water extract on transplanted tumors and the immunological influence in mice. The antitumor effects of *Rabdosia excisoides* water extract in 5g/kg dosage on Ehrlich ascites carcinoma (EAC), Sarcoma 180(S₁₈₀), hepatoma carcinoma (HCA), and Lewis lung carcinoma were investigated by using the implanted tumor animal models. The immunological effects were observed by using hemolysin and delayed hypersensitive tests in mice. The 5-Fu was used as positive control and the normal saline as blank control. It showed that *Rabdosia excisoides* water extract had significant cytotoxicity against EAC cell *in vitro*, in addition to solid models S₁₈₀ (inhibition rate of 38.83%), hepatoma carcinoma (inhibition rate of 32.03%) and Lewis lung carcinoma (inhibition rate of 30.97%) had some effects *in vivo*, but on other tumor effect is not obvious, when compared with the control group, There was no prominent influence on immunological state of the animals. The experiment can show that *Rabdosia excisoides* water extract has a little antitumor effect on Ascites tumor and some antitumor effect on solid models tumors, there is no obvious influence on immunological state of the animals.

Key words: *Rabdosia excisoides* water extract; Ehrlich ascites carcinoma; Sarcoma 180; hepatoma carcinoma; Lewis lung carcinoma

拟缺香茶菜(*Rabdosia excisoides* (Sumex C. H. Hu) C. Y. Wuet H. W. Li) 是唇形科香茶菜属多年生草本植物, 广泛分布于河南、甘肃、山东、四川等地。民间用其入药, 具有清热解毒, 活血化瘀和治疗各种肝炎等功效^[1]。其与冬凌草(*Rabdosia rubescens*) 是同科同属植物, 冬凌草的抗肿瘤作用得到了广泛研究^[2], 拟缺香茶菜含有与冬凌草的类似抗肿瘤活性成分—冬凌草甲素、乙素, 齐墩果酸等等^[3-5], 但关于拟缺香茶菜的抗肿瘤作用研究甚少。为了解拟缺

香茶菜粗制剂的药理作用, 本课题对拟水进行了抗肿瘤作用研究, 采用多种动物移植性肿瘤模型, 观察其对动物肿瘤的抑制作用, 并对动物溶血素水平和迟发性超敏反应进行了检测, 观察其对机体免疫功能的影响。

1 材料

1.1 拟缺香茶菜

采自河南栾川山区, 叶子晾干备用。拟缺香茶菜水提物由郑州大学药学院中药系制备。每 1 mL 水提物含有原生药材 1 g。

1.2 动物

SPF级昆明种小鼠, C57 纯系小鼠。体重均为 (20 ± 2) g, 雌雄各半。由河南省实验动物中心提供, 动物生产许可证号: SCXK(豫)2010-0002。饲料、饮水、垫料均符合卫生标准。小鼠饲养于郑州大学药学院 SPF 级实验动物房, 实验动物房使用许可证号: SYXK(豫)2007-0009。小鼠实验前先喂养一周, 为适应期。

1.3 瘤株

艾氏腹水瘤(EAC), 肉瘤 180(S_{180}) 实体型及腹水型, 肝癌(HCA) 实体型及腹水型, Lewis 肺癌实体型。以上各瘤株均由河南省医学科学研究所药理室保种, 按常规方法传代接种。

2 方法

2.1 拟水对体外培养的 EAC 瘤细胞生长的影响

无菌条件下, 抽取荷 EAC 肿瘤小鼠腹水, 混悬于 RPMI-1640 完全培养液中, 调细胞浓度为 $5 \times 10^5/\text{mL}$, 接种于培养瓶中, 每瓶接种细胞悬液 1.9 mL, 按拟定剂量加入药液 0.1 mL, 总体积 2 mL, 置体积分数 5% CO_2 培养箱中 37°C 培养, 24 h 后取出, 采用台盼兰拒染法测定细胞兰染率(即细胞杀伤率)^[6]。另用 N.S 作对照组。

2.2 拟水体内抗肿瘤作用实验^[7]

腹水型肿瘤实验组分为 S_{180} 、EAC 和 HCA 3 大组, 实体型肿瘤实验组分为 S_{180} 、HCA 和 Lewis 3 大组, 各大组又分为阴性对照组、阳性对照(5-Fu) 组和拟水组, 每组随机均分 8 只小鼠, 雌雄各半。其中 S_{180} 、EAC 和 HCA 实验组动物均为昆明种小鼠, lewis 肺癌实验组动物为 C57 纯种小鼠。阴性对照组, 给予 N.S 10 mL/kg; 阳性对照组, 给予 5-Fu 20 mg/kg; 拟水组给予拟水 5 g/kg(原生药材剂量)。实验按常规方法接种, 接种后次日按拟定剂量腹腔注射(ip) 给药, 每日 1 次, 连续 10 d。腹水型肿瘤以生命延长率为疗效指标, 停药后继续观察 60 d, 其间死亡动物以实际存活天数为生存天数, 长期存活动物以 60 d 为生存天数计算。实体型肿瘤以瘤重抑制率作为疗效指标, 于停药次日将肿瘤剖出精确称重, 计算对肿瘤的抑制率(抑瘤率)。实验结果用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。【生命延长率 = (试验组存活天数 - 阴性对照组存活天数) / 阴性对照组存活天数 $\times 100\%$; 抑瘤率 = (阴性对照组瘤质量 - 试验组瘤质量) / 阴性对照组瘤质量 $\times 100\%$ 】。

2.3 对机体免疫功能的影响^[8]

采用小鼠溶血素实验和小鼠迟发性超敏反应实验, 测定拟水对小鼠免疫状态的影响。

2.3.1 小鼠溶血素实验

用昆明种小鼠进行实验, 实验分为 3 组, 即阴性对照组, 5-Fu 组, 拟水组, 每组随机均分 8 只小鼠, 雌雄各半。以体积分数 20% 绵羊红细胞对小鼠致敏, 每鼠 0.5 mL, 于致敏后第 2 d ip 给药, 连用 5 d, 于致敏后的第 5 d 进行免疫试验, 取灭活的小鼠眼眶血清 2 mL, 以 2 倍稀释法加入每一试验管, 每试管加入体积分数 0.03% 绵羊红细胞 0.2 mL 及体积分数为 20% 豚鼠血清 0.2 mL。充分摇匀, 于 37°C 培养 30 min, 观察其最大溶血稀释度。

2.3.2 小鼠迟发性超敏反应实验

实验分为 4 组, 即阴性对照组, 5-Fu 组, 拟水低剂量组和拟水高剂量组, 每组随机均分 8 只小鼠, 雌雄各半。各用药组动物按拟定剂量连续 ip 用药 10 d, 于实验的第 5 d 将小鼠腹部用新鲜配制的 10 g/L 的 2,4-二硝基氯苯(DNCB) 丙酮-麻油 50 μL 致敏, (丙酮: 麻油 = 1:1), 第 11 天再以新鲜配制的 10 g/L 的 DNCB 丙酮-麻油 10 μL 涂于小鼠右耳进行攻击, 24 h 处死动物, 剪下小鼠左右两耳壳, 用打孔器打下直径为 8 mm 的耳片精确称重, 以左右两耳重量之差为肿胀度, 同时取其胸腺、脾脏精确称重。计算其脾脏指数和胸腺指数, 实验结果用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 拟水对体外培养的 EAC 瘤细胞生长的影响, 见表 1。

表 1 拟水对体外培养的 EAC 瘤细胞生长的影响($n = 3$)
Table 1 Effect of Rabdosia excisoides water extract on EAC cells growth *in vitro* ($n = 3$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/mL)	细胞杀伤率 Cell killing rate (%)
对照 Control	N.S 0.1mL	0~5
拟水-1	5	50
拟水-2	10	95

由表 1 可以看出, 拟水 5 mg/mL 及 10 mg/mL 浓度其细胞杀伤率分别为 50% 及 95%; 对照组杀伤率为 0~5%。结果显示, 拟水在规定浓度下, 有一定的细胞毒作用, 且随剂量增大作用增强。

3.2 拟水体内抗肿瘤作用, 见表 2~表 3。

表2 拟水对小鼠腹水型 S₁₈₀、EAC、HCA 的作用($\bar{x} \pm s, n=8$)Table 2 Effect of Rabdosia excisoides water extract on ascities S₁₈₀, EAC, and HCA in mice($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	数量 Number (只)	S ₁₈₀				EAC				HCA							
			体质量 Bodyweight (g)		存活 时间 Survival time (d)	生命 延长率 Rate of life extension (%)	数量 Number (只)		体质量 Bodyweight (g)		存活 时间 Survival time (d)	生命 延长率 Rate of life extension (%)	数量 Number (只)		体质量 Bodyweight (g)		存活 时间 Survival time (d)	生命 延长率 Rate of life extension (%)
			始	末			始	末	始	末			始	末	始	末		
对照 Control	N. S 0.1 mL 8	3	19.39 ± 28.22 ± 12.01 ± 0.75	28.22 ± 5.61	12.01 ± 2.14	-	8	1	20.00 ± 1.93	39.3 ± 1.68	11.75 ± 2.32	-	8	2	18.86 ± 0.69	26.37 ± 2.67	12.75 ± 2.93	-
5-Fu	20	8	20.13 ± 1.13	24.62 ± 3.84	36.25 ± 7.46 *	202.00	8	2	20.63 ± 0.84	25.14 ± 1.78	35.38 ± 7.01 *	201.00	8	0	21.01 ± 0.92	26.38 ± 2.97	33.87 ± 7.08 *	165.66
拟水	5g	8	18.14 ± 0.85	28.38 ± 2.45	17.00 ± 3.86 *	41.66	8	0	20.57 ± 0.79	28.37 ± 2.79	16.64 ± 4.10 *	41.53	8	0	20.38 ± 0.52	28.00 ± 3.29	17.63 ± 3.99 *	38.28

注:与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compare with control, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

表3 拟水对小鼠实体型 S₁₈₀、HCA、Lewis 肺癌的作用($\bar{x} \pm s, n=8$)Table 3 Effect of Rabdosia excisoides water extract on solid models S₁₈₀, HCA, and Lewis lung carcinoma in mice($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	数量 Number (只)	S ₁₈₀				EAC				HCA							
			体质量 Bodyweight (g)		瘤质量 Tumor weight (g)	抑瘤率 Tumor inhibition rate (%)	数量 Number (只)		体质量 Bodyweight (g)		瘤质量 Tumor weight (g)	抑瘤率 Tumor inhibition rate (%)	数量 Number (只)		体质量 Bodyweight (g)		瘤质量 Tumor weight (g)	抑瘤率 Tumor inhibition rate (%)
			始	末			始	末	始	末			始	末	始	末		
对照 Control	N. S 0.1 mL 8	8	20.88 ± 0.99	23.62 ± 1.93	2.55 ± 0.51	-	8	8	19.25 ± 1.05	27.63 ± 2.45	2.75 ± 0.61	-	8	8	18.37 ± 0.51	26.12 ± 2.35	2.81 ± 0.39	-
5-Fu	20	8	18.50 ± 0.54	24.37 ± 1.92	1.00 ± 0.51 *	58.44	8	8	20.50 ± 0.51	30.50 ± 3.82	1.25 ± 0.53 *	54.56	8	8	21.12 ± 0.84	29.87 ± 2.25	1.06 ± 0.48 **	62.27
拟水	5g	8	18.50 ± 0.53	24.01 ± 0.75	1.56 ± 0.48 *	38.83	8	8	19.87 ± 0.64	27.38 ± 2.65	1.87 ± 0.65 *	32.03	8	8	19.50 ± 1.21	26.50 ± 2.13	1.94 ± 0.66 **	30.97

注:与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compare with control, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

实验结果表明:拟水在剂量为 5 g/kg · d⁻¹ × 10 ip 在腹水癌方面,与阴性对照组相比,能提高小鼠存活时间,与 5-Fu 组相比,差异较显著,生命延长率明显缩短,表明拟水对腹水型 S₁₈₀、EAC、HCA 有较弱作用;在实体癌方面,对 S₁₈₀(抑瘤率 38.83%), HCA(抑瘤率 32.03%), Lewis(抑瘤率 30.97%) 有些作用,但较 5-Fu 组,作用不显著。

表4 拟水对小鼠溶血素的影响

Table 4 Effect of Rabdosia excisoides water extract on hemolysis of mice

组别 Group	剂量及用法 Dose and usage	最大稀释度 The maximum dilute concentration
对照 control	N. S 0.2 mL	1:512
5-Fu	20 mg/kg · d ⁻¹ × 4 ip	1:32 *
拟水	5 g/kg · d ⁻¹ × 4 ip	1:128

注:与对照组比较: * $P < 0.05$ 。

Note: Compare with control, * $P < 0.05$.

3.3 拟水对小鼠溶血素的影响,见表4。

由表4可以看出,阴性对照组的最大溶血稀释度为 1:512,拟水组(5g/kg)最大稀释度为 1:128,5-Fu 组(20 mg/kg)最大溶血稀释度为 1:32。5-Fu 组与阴性对照组比较,差异显著($P < 0.05$);拟水组与阴性对照组比较,有差异但不显著,表明拟水对以溶血素反应为指标的体液免疫可能有轻度抑制作用。

3.4 拟水 DNCB 诱导的小鼠迟发性超敏反应的影响,见表5。

由表5可以看出,拟水组与对照组相比,两剂量组的耳肿胀度,脾指数和胸腺指数均无差异($P > 0.05$),表明拟水对小鼠体内细胞免疫无明显影响。

4 讨论

我国唇形科香茶菜属植物资源丰富,研究发现其大都具有良好的的抗肿瘤活性,拟缺香茶菜是香

表5 拟水对 DNCB 诱导的小鼠迟发性超敏反应的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)Table 5 Effect of Rabdosia excisoides water extract on delayed hypersensitive test in mice induced by DNCB ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	耳肿胀度 Ear swelling degree (mg)	脾指数 Spleen index (mg/g)	胸腺指数 Thymus index (mg/g)
对照 control	-	1.51 ± 0.26	81.25 ± 7.35	42.38 ± 4.25
5-Fu	20	2.07 ± 0.27 [△]	41.51 ± 7.71 [△]	18.09 ± 3.19 [△]
拟水-1	2.5g	1.78 ± 1.31	74.14 ± 9.28	38.89 ± 5.42
拟水-2	5.0g	1.68 ± 1.52	75.13 ± 7.56	40.51 ± 3.34

注:与对照组比较: [△]P > 0.05。

Note: Compare with control, [△]P > 0.05.

茶菜属的一个新种^[9],为了从该种植物中寻找抗肿瘤活性强,毒性低的药用成分,我们对拟水进行了研究,发现拟水存在一定的抗肿瘤活性,这为后续进行更为深入的研究奠定了良好的基础。本实验中拟水具有多方面的药理活性,在抗肿瘤作用方面显示了一定的药用前景。

肿瘤严重威胁着人类的健康,肿瘤患者往往免疫功能紊乱^[10],可以说,肿瘤与机体的免疫状态是密不可分的。小鼠 EAC, S₁₈₀, HCA, lewis 肺癌均为抗肿瘤药物筛选实验中常用的动物移植性肿瘤模型^[11],本实验采用瘤株进行了拟水的抗肿瘤作用研究,用小鼠溶血素实验和 DNCB 诱导的小鼠迟发性超敏反应实验观察拟水对小鼠的机体免疫状态的影响。

其抗肿瘤作用从体外实验结果来看,对培养的荷 EAC 瘤细胞,有较强细胞毒作用;从体内实验结果来看,本实验拟水 5g/kg · d⁻¹ × 10 (ip) 对小鼠腹水型 S₁₈₀、EAC、HCA,能稍微提高小鼠存活时间,但生命延长率较 5-Fu 低,表明拟水抗腹水型肿瘤作用较弱;在实体瘤方面,对 S₁₈₀ (抑瘤率 38.83%), HCA (抑瘤率 32.03%), Lewis (抑瘤率 30.97%) 有些作用,但较 5-Fu 组,作用也不是特别显著。

从对机体免疫机能影响的实验结果来看,拟水对小鼠溶血素水平有较轻微影响,表明对小鼠的体液免疫可能有较轻微的抑制。但对小鼠细胞免疫无明显影响。

本实验采用拟水对拟缺香茶菜抗肿瘤活性进行了初步研究,拟水显示了一定抗肿瘤活性,表明拟缺香茶菜可作为一种有前途的抗肿瘤药物,值得进一步研究与开发。

参考文献

1 Wang Q(王勤), Zhou ZP(周至品), Li AY(李爱媛). 香茶

菜属药理活性研究进展. *Mod Med Heal*(现代医药卫生), 2008, 24:362-363.

2 Xue J(薛健), Song J(宋洁), Shen CX(沈彩霞). 冬凌草的抗肿瘤作用研究. *LiShizhen Med Mater Med Res*(时珍国医药学), 2007, 18:2277-2278.

3 Li JX(李吉学), Yang LJ(杨丽嘉), Li YJ(李燕杰), et al. Research on the chemical ingredients of Rabdosia. *Hennan J of Oncology*(河南肿瘤学杂志), 2005, 18:117-118.

4 Dai Y(戴一), Sun LR(孙隆儒). Progress on Rubescensine A and B. *Food and Drug*(食品与药品), 2008, 10(9):72-73.

5 Li JC(李继成), Yang LJ(杨丽嘉), Su JL(苏金玲), et al. Chemical constituents in Rabdosia excisoides. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2007, 38:1141-1143.

6 Peng B(彭彬), Wu JJ(吴晶晶). A methodological study of trypan blue exclusion test for cultured adherent cells. *Acta Laser Biology Sinica*(激光生物学报), 2011, 20:269-270.

7 Wu XY(伍小燕), Tang AC(唐爱存), Lu QY(卢秋玉). Study on antitumor effect of the extract from *Christia vesper-tilionis in vivo*. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2012, (8):202-204.

8 Xu SY(徐叔云), Bian RL(汴如濂), Chen X(陈修). Experimental Methodology Pharmacology(药理实验方法学). Beijing: People's Medical Publishing House(北京人民卫生出版社), 2006. 1429-1437.

9 Su Y(宿玉), Cui J(崔佳), Shi WW(施务务), et al. 中药香茶菜研究进展. *Asia-Pacific Tradit Med*(亚太传统医药), 2011, 7:155-158.

10 Chen LL(陈良良), Liang H(梁华). 中医药免疫调节治疗恶性肿瘤研究进展. *Chin J Inform on Tradit Chin Med*(中国中医药信息杂志), 2004, 11:839-841.

11 Li YK(李仪奎), Jin RM(金若敏), Wang XM(王欣茂). Experimental Methodology of Traditional Chinese Medicine Pharmacology(中药药理实验方法学). Shanghai Science and Technology Press 上, 2006. 784-788.