

骆驼刺提取物体内抗肿瘤作用及机制初探

马晓玲, 魏鸿雁*, 徐晓琴, 夏提古丽·阿不力孜

新疆维吾尔自治区中药民族药研究所, 乌鲁木齐 830002

摘要: 为了探讨骆驼刺提取物在体内对肿瘤细胞增殖的抑制作用, 应用 MTT 法考察骆驼刺提取物在体外对人胃癌 BGC-823、人食道癌 Eca-109、人结肠癌 HT-29 和人肝癌 HepG2 细胞株的抑制作用。为明确其体内抗肿瘤疗效, 建立 CT26 结肠癌小鼠模型, 通过比较各组小鼠的肿瘤增殖率、生长曲线和抑瘤率等指标考察体内抑瘤效果。结果表明骆驼刺提取物对 HepG2 和 HT-29 的 IC₅₀ 值小于 1.5 mg/mL, 在体内的抗肿瘤药效实验中仅高剂量组表现出明显的抗肿瘤活性。证明骆驼刺提取物对 HepG2 和 HT-29 表现出明显的体外抑瘤作用, 对 CT26 结肠癌实体瘤模型有一定敏感性。

关键词: 骆驼刺; 抗肿瘤; 结肠癌; 抑瘤率

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.03.030

Antitumor Activity of *Alhagi sparsifolia* Shap (L.) Extract *in vivo* and *in vitro*

MA Xiao-ling, WEI Hong-yan*, XU Xiao-qin, XIATIGULI Abulizi

Xinjiang Institute of Chinese Medicine and Medicine of National, Urumqi 830002, China

Abstract: To investigate the antitumor activities of *Alhagi sparsifolia* shap. extract, cell proliferation was determined using methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. BGC-823, Eca-109, HT-29 and HepG2 cancer cells were incubated in culture media containing *Alhagi sparsifolia* shap. extract. In order to determine the *in vivo* antitumor effect of *A. sparsifolia* extract, the CT26 colon cancer mice model was established. By comparing the relative tumor proliferation rate, growth curves, inhibition rate of different groups, the antitumor effect was evaluated. In the MTT assay, *A. sparsifolia* extract showed obvious antitumor effect on HepG2 and HT-29 cells. In the *in vivo* experiment, *A. sparsifolia* extract also exhibited significant antitumor effect. These results demonstrated that *A. sparsifolia* extract can inhibit the tumor of CT26 in mice, the drug had obvious anticancer effects against HepG2 and HT-29.

Key words: *Alhagi sparsifolia* shap.; antitumor; colon cancer; inhibition rate

恶性肿瘤是危害人类健康和生命的重大疾病, 从天然植物中寻找高效低毒的抗癌药物, 成为国内外抗癌药物研究的重点。骆驼刺 (*Alhagi sparsifolia* Shap.) 的刺蜜 (又名刺糖) 系野生骆驼刺分泌的一种天然果糖^[1]。维吾尔人群用于滋补强壮和平衡体液, 润肠通便, 调节内分泌的常见验方。《本草纲目》载: “甘平无毒, 清热解毒, 消肿止痛”, 主治“痰嗽下血。还可治腹胀腹痛、口舌生疮”。鉴于刺糖在肠道疾病方面的应用, 并且具有滋补强壮、抗过敏、抗感染等作用, 我们前期对刺糖 (含骆驼刺) 提取物进行药理研究基础工作, 发现刺糖提取物对大鼠急性溃疡性结肠炎有预防作用, 明显抑制离体豚

鼠回肠蠕动, 刺糖可明显抑制小鼠的肠蠕动速度, 减小肠推进^[2]。在前期的研究中发现, 该药材除去上述药理作用外, 具有一定的抗肿瘤活性^[3,4]。为进一步研究骆驼刺提取物的抗肿瘤活性, 扩宽其应用范围, 本实验对骆驼刺提取物进行了初步的抗肿瘤药效评价。

1 材料与方法

1.1 材料

骆驼刺提取物 (自制); 阳性对照: 注射用环磷酰胺 (CTX, 江苏恒瑞医药股份有限公司, 12020825)。BGC-823 (人胃癌) 购于新疆医科大学; Eca-109 (人食道癌) 购于中科院上海细胞库; HT-29 (人结肠癌) 购于新疆药物研究所; HepG2 (人肝癌) 购于中山大学; CT26 购于新疆华世丹药物研究有限责任公司。BALB/C 雌性小鼠, 由新疆实验动物中

收稿日期: 2013-07-26 接受日期: 2013-11-19

基金项目: 新疆维吾尔自治区科技成果转化专项资金 (201154129); 科技创新种子资金 (K111410001)

* 通讯作者 E-mail: 284762528@qq.com

心提供,合格证号:SCXK(新)2003-0002。RP-MI1640培养基;MTT、HEPES、DMSO;胎牛血清;胰酶工作液;细胞冻存液;D-Hanks平衡盐溶液;PBS液。

1.2 方法

1.2.1 骆驼刺提取物的制备

取骆驼刺药材 1000 g,粉碎过 8 号筛,用 35% 至 45% 的乙醇(料液比为 1:15)80~90℃回流提取 2 至 3 次,每次 2~3 h,合并提取液,放冷至室温、过滤,取上清液浓缩得到每毫升含生药 0.1~0.5 g 浓缩液。取上述浓缩液 4BV(BV 为树脂柱体积)经 HPD100 大孔吸附树脂柱(柱径高比为 1:6 至 1:10)进行纯化,上样流速 2 BV/h(1 BV = 130 L 至 150 L),上样后静置 30 min,用 5 BV 纯化水洗脱,再用 6BV 95% 乙醇洗脱,接收乙醇洗脱液,减压干燥(0.08 MPa、60℃、4 h),粉碎即得骆驼刺提取物。

1.2.2 体外抗肿瘤试验

取样品约 50 mg,精密称定,用 4% DMSO 溶解,再用蒸馏水定容至 5 mL。配制一定浓度梯度的样品溶液是将之前配制好的样品溶液用 4% DMSO 溶液进行稀释,浓度倍数比为 2 或 4,即 10、5、2.5、1.25、0.625、0.156、0.039 mg/mL。

取对数生长期细胞以约 5×10^4 个/mL 的密度接种于 96 孔板,每孔接种 100 μ L(96 孔板右下角 3 个孔为空白对照),置 CO₂ 培养箱中培养 24 h。加入 60 μ L 培养液,然后按预设的浓度梯度加入不同浓度待测样品 40 μ L,另设 DMSO 对照组和阳性药对照组,阳性药为顺铂,每组 3 个重复。继续培养 48 h 后,每孔加入 20 μ L 的 MTT(5 mg/mL),然后置于 37℃温育 4 h。小心除去上清后,每孔加入 100 μ L 的 DMSO,振荡约 10 min 溶解沉淀,随后用酶标仪检测 OD 值,波长 490 nm。用下式求出每一样品浓度下的细胞存活率:

$$\text{存活率}\% = (\text{样品组平均 OD 值} - \text{空白孔}) / (\text{对照组平均 OD 值} - \text{空白孔}) \times 100\%$$

以细胞存活率对药物浓度对数作图,按作图法求出每个样品的 IC₅₀ 值。重复测定 3 次,以保证 IC₅₀ 值的准确性。

1.2.3 体内抗肿瘤试验

单次灌胃给药的最大耐受剂量 10 g/kg,以最大耐受剂量的 1/10、1/50、1/100 作为药效试验的高、中、低剂量组,溶剂为纯化水。

BALB/C 雌性小鼠适应性饲养 5 d 后按体重随

机分为 5 组,每组 10 只。灌胃给药,每天 1 次,连续 14 d,于末次给药后第 2 d 统一处死小鼠。阴性对照给以等体积的相应溶剂。阳性对照 CTX 按 50 mg/kg 的剂量,腹腔注射给药,每天 1 次,连续 14 天。

体内抗肿瘤腋皮下接种模型:无菌条件下取生长旺盛的瘤源,制备成约 1×10^7 /mL 的细胞悬液,于相应宿主腋皮下接种 0.2 mL/鼠,次日起按实验设计方案给药,给药结束后,处死各组动物,剖取肿瘤称重,按下式计算抑瘤率:

$$\text{抑瘤率}\% = [(\text{阴性对照组平均瘤重} - \text{给药组平均瘤重}) / \text{阴性对照组平均瘤重}] \times 100\%$$

实验过程中,每天根据动物体重灌胃给药,并记录动物体重,每天观察给药前后动物的行为学变化。实验结束后,解剖肿瘤,称重,计算抑瘤率,并对肿瘤进行拍照。

1.2.4 对荷瘤小鼠血清中 IL-2 水平的影响

各组小鼠于末次给药 24 h 后,采用眼球摘除法取血,3000 rpm 离心 5 min,取血清置于 -20℃保存,检测 IL-2 含量。IL-2 测定采用酶联免疫检测法,操作步骤严格按说明书进行。

1.2.5 统计学处理

所有数据均用 SPSS17.0 统计软件包进行处理,数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,资料进行正态性检验;多组计量资料采用 one-way ANOVA,方差齐时采用 Tamhane's T2 或 Dunnett's T3 法。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 实验结果

2.1 体外试验结果

经过试验,样品对肿瘤细胞株 BGC-823(人胃癌)、Eca-109(人食道癌)、HT-29(人结肠癌)和 HepG2(人肝癌)细胞的 IC₅₀ 值见下表。

表 1 骆驼刺提取物对 HepG2、HT-29、BGC-823 和 Eca-109 的 IC₅₀ 值

Table 1 Effect of *A. sparsifolia* extract on proliferation of human HepG2, HT-29, BGC-823 and Eca-109 cancer cells

样品名称 Sample name	IC ₅₀ (mg/mL)			
	HepG2	HT-29	BGC-823	Eca-109
骆驼刺提取物 <i>A. sparsifolia</i> extract	1.62	1.32	1.55	1.45
顺铂 cis-DDP	0.019	0.204	0.0858	0.0392

2.2 体内试验结果

2.2.1 样品对动物行为学影响

实验过程中,每次给药前后对动物进行观察,结果发现,BALB/C小鼠在给予骆驼刺提取物后,没有明显的行为学改变。

2.2.2 样品对体重的影响

实验过程中,每天根据动物体重灌胃给药,并记录给药前动物体重,绘制体重生长曲线,结果显示,骆驼刺提取物对动物体重没有明显影响。体重曲线见图1。

2.2.3 样品对CT26结肠癌模型的抑制作用

骆驼刺提取物对体内CT26结肠癌(腋皮下接种)模型的抑瘤率试验,结果发现,骆驼刺提取物对小鼠CT26结肠癌模型没有表现出明显的抗肿瘤活

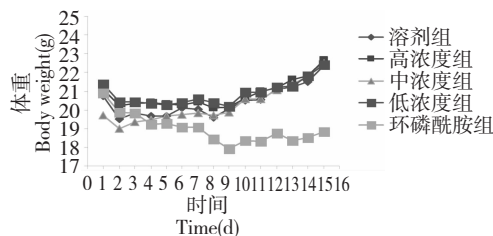


图1 体重生长曲线

Fig. 1 Growth curve of body weight

性。骆驼刺提取物高浓度组 $1 \text{ g/kg ig} \times 14\text{qd}$ 抑瘤率为 24.8% ;骆驼刺提取物中浓度组 $200 \text{ mg/kg ig} \times 14\text{qd}$ 抑瘤率为 0.06% ;骆驼刺提取物低浓度组 $100 \text{ mg/kg ig} \times 14\text{qd}$ 抑瘤率为 -0.05% 。具体结果见表2,瘤重图见图2。

表2 骆驼刺提取物对CT26结肠癌模型体内试验结果 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Inhibitory activity of *A. sparsifolia* extract on tumor growth of CT26 colon cancer mice model ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	动物始(终) Animal start(end)	体重始(终) Body weight start/end (g)	瘤重 Tumor weight (g)	抑瘤率 Inhibition rate (%)
空白对照 Control	纯化水	10/10	20.7/22.4	1.53 ± 0.41	-
骆驼刺提取物高剂量 <i>A. sparsifolia</i> extract-H	1000	10/10	21.3/22.4	$1.15 \pm 0.45^*$	24.8^*
骆驼刺提取物中剂量 <i>A. sparsifolia</i> extract-M	200	10/10	21.1/22.6	1.44 ± 0.58	0.06
骆驼刺提取物低剂量 <i>A. sparsifolia</i> extract-L	100	10/10	19.7/22.4	1.61 ± 0.74	-0.05
环磷酰胺 Cyclophosphamide	50	10/10	20.9/18.8	$0.03 \pm 0.02^{**}$	98.0^{**}

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

Note: Compare with blank control, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

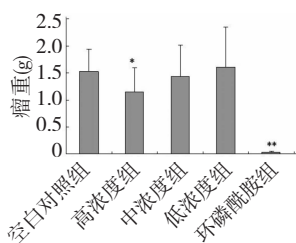


图2 骆驼刺提取物对CT-26结肠癌模型瘤重影响

Fig. 2 Effect of *A. sparsifolia* extract on tumor growth of CT26 colon tumor mice model

2.2.4 样品对荷瘤小鼠合成与分泌IL-2的影响

ELISA法测定各组小鼠血清中IL-2水平,结果发现,与阴性对照组相比,骆驼刺提取物高剂量组小鼠血清IL-2水平显著升高,中、低剂量组IL-2水平未见明显变化,结果如表3所示。

3 讨论

体外抗肿瘤实验具有可控性强、重复性好等优

点,是中药抗肿瘤机理研究的重要方法之一,但药物在体内经过吸收、分布的代谢过程后,药效物质的质和量上又会产生一定的变化,因此体内、体外抗肿瘤实验相结合更具现实意义^[5]。

肿瘤的发生、发展及预后与带瘤机体的免疫状态密切相关。正常情况下体内的T淋巴细胞亚群处于一个相对稳定的平衡状态,维持机体正常的免疫功能。肿瘤患者由于出现自然杀伤细胞和其它T淋巴细胞亚群绝对数和相对数的变化,使机体处于免疫抑制状态^[6],这种免疫抑制现象在中晚期患者或经过长期化疗或放疗者中尤为明显。研究表明^[7]许多中草药可通过调节肿瘤患者的免疫力抑制肿瘤的发生发展,肿瘤患者免疫功能的下降与其细胞免疫和体液免疫的变化相伴随^[8]。

白介素-2(IL-2)是机体重要的免疫调节因子。在体内细胞因子网络中起着关键的作用,对多种免疫活性细胞均具有阳性促进作用。通过本次实验结果可以看出,与阴性对照组相比,骆驼刺提取物高剂

表3 骆驼刺提取物对荷瘤小鼠 IL-2 水平的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)Table 3 Effect of *A. sparsifolia* extract on the level of IL-2 of tumor-bearing mice($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	吸光度 Absorbance	IL-2 (pg/mL)
空白对照 Control	-	0.494 ± 0.029	160.69 ± 3.35
骆驼刺提取物高剂量 <i>A. sparsifolia</i> extract-H	1000	0.532 ± 0.066	177.64 ± 10.48 *
骆驼刺提取物中剂量 <i>A. sparsifolia</i> extract-M	200	0.501 ± 0.017	164.41 ± 2.11
骆驼刺提取物低剂量 <i>A. sparsifolia</i> extract-L	100	0.478 ± 0.059	153.98 ± 9.79
环磷酰胺 Cyclophosphamide	50	0.544 ± 0.036	181.83 ± 6.02 **

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

Note: Compare with control, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

量组小鼠血清 IL-2 水平显著升高,判断骆驼刺提取物抑制肿瘤细胞的生长,其作用机制可能与提高 IL-2 有关。

实验结果显示,骆驼刺提取物体内、体外都有抑制肿瘤增殖的作用,但敏感程度不同。骆驼刺提取物体外对肿瘤细胞株 BGC-823(人胃癌)、Eca-109(人食道癌)、HT-29(人结肠癌)和 HepG2(人肝癌)细胞都有较好抑制作用,IC₅₀ 分别为 1.62、1.32、1.55、1.45 mg/mL,说明骆驼刺提取物体外对 4 种瘤株均敏感。相对于体内 S180、MFC 抑瘤实验结果,骆驼刺提取物体外对肿瘤细胞株 BGC-823(人胃癌)、Eca-109(人食道癌)、HT-29(人结肠癌)和 HepG2(人肝癌)细胞抑制率差异不大。骆驼刺提取物体内实验对小鼠 CT26 肿瘤具有一定的敏感性,在本试验中,只有大剂量组的抑瘤率达到 24.8%,中、小剂量组抑瘤作用不明显,说明本方法制得的骆驼刺提取物具有部分抗肿瘤作用,但其主要作用组分未得到进一步处理和精制。

综合本实验可见骆驼刺提取物在体内和体外都有抗肿瘤作用,骆驼刺提取物的体内、体外药效物质基础及作用机制具有继续研究的价值,随研究的深入开展,将作进一步的报道。

参考文献

1 Zhang GJ, Li N, Xiong YJ, *et al.* Isolation and identification

of chemical constituents of Aerial parts of *Alhagi pseudalhagi*. *Mod Chin Med*, 2010, 12(5):16-19.

2 Xia TGL, Wei HY, Jia XG, *et al.* Study on the inhibition effects of *Alhagi pseudalhagi* extract on intestinal peristalsis. *Northwest Pharm J*, 2013, 28:161-163.

3 Zhang GJ, Li N, Xiong YJ, *et al.* Determination of acteoside in *Lamiophlomis rotata* by HPLC. *Drugs Clinic*, 2009, 24:225-226.

4 Bo LT, Xiong YJ, Jia XG, *et al.* Alhagi medium yellow ketone sugar, isoflavone chemistry research. *Xinjiang Tradit Chin Med*, 2010, 28(2):53-55.

5 Zhao Y. Anti-tumor Chinese medicine pharmacology research progress. *Mod J Integr Tradit Chin Western Med*, 2012, 21:3752-3753.

6 Niu FL. Traditional Chinese medicine immune regulating role in the antitumor application research. *J Tradit Chin Med*, 2001, 19:466-474.

7 Liu YB. Progress in the immune adjustment and anti-tumor of Chinese medicine polysaccharides. *Mod Hospital*, 2008, 8(2):1-3.

8 Hu ZT, Dong LY, Gao B, *et al.* Experimental study of antitumor effect of Sanlengqijia Heji. *Acta Univ Med Anhui*, 2009, 44(1):85-87.