

◇ 药学研究 ◇

白花蛇舌草总黄酮的抗肿瘤作用

王宇翎 张 艳 李前进 林 杰

摘要 目的 研究白花蛇舌草总黄酮(FOD)的体内外抗肿瘤作用。方法 建立了小鼠肉瘤 S180、EAC 腹水型、肝癌 HepA 实体型移植肿瘤模型,观察 FOD (0.5、1.0、5.0、10.0 mg/kg)的体内抗肿瘤作用;采用体外试验观察 FOD 的体外抗肿瘤作用。结果 FOD (5.0、10.0 mg/kg)对 S180 小鼠肿瘤有明显的抑制作用,FOD (1.0、5.0、10.0 mg/kg)对小鼠 HepA 实体瘤有明显的抑制作用,FOD 对腹水型 EAC 小鼠无保护作用。FOD 半数抑制浓度(IC₅₀)均值分别为 MCF-7 细胞 92.8 μg/ml; BEL-7407 细胞 147.7 μg/ml; SMMC-7721 细胞 147.9 μg/ml; BGC-823 细胞 241.3 μg/ml; COLO-205 细胞 247.1 μg/ml; Hep-2 细胞 284.8 μg/ml; A549 细胞 323.4 μg/ml; HeLa 细胞 575.5 μg/ml。结论 FOD 具有一定的体内外抗肿瘤作用。

关键词 白花蛇舌草总黄酮;肿瘤

中图分类号 R 284;R 73

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)11-1622-04

白花蛇舌草系茜草科耳草属植物,现代药理学研究^[1-2]表明具有抗菌、消炎、抗肿瘤、增强免疫功能的作用。白花蛇舌草总黄酮(total flavones of *Oldenlandia diffusa* Willd, FOD)是从白花蛇舌草中提取的有效成分,课题组先前的动物实验已经证明其具有免疫增强、抗炎、抗菌作用^[3-4]。现进一步观察其是否亦具有体内外抗肿瘤作用,为其将来的开发应用提供一定的实验学基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性昆明种小鼠,清洁级,体重 19~22 g,由安徽医科大学实验动物中心提供。

1.2 药品 FOD 由合肥紫金医药科技有限公司提供,淡黄色粉末,易溶于水、甲醇、乙醇,不溶于氯仿,总黄酮含量达 56%,批号:20090306。

1.3 方法^[5-7]

1.3.1 对实体瘤 S180 的抑制作用 昆明种小鼠 120 只,♂,随机分为 6 组,即模型组、FOD 4 个剂量组(0.5、1.0、5.0、10.0 mg/kg)及阳性药香菇多糖注射液组(1.0 mg/kg),每组 20 只。小鼠肌肉注射给药 0.1 ml/10 g,每天 1 次,连续 7 d,第 8 天无菌接种 S180 小鼠 d8 腹水(无菌生理盐水稀释为 1×10^{10} /L 浓度的细胞悬液)于各小鼠右腋窝皮下,每鼠 0.2 ml (2×10^6 个细胞)。继续给药,连续 10 d。末次给药后次日称体重后,处死小鼠,剥离瘤块并称重量,抑瘤率 = (模型组瘤重 - 实验组瘤重) / 模型组瘤重 $\times 100\%$,本实验重复 3 次。

1.3.2 FOD 对腹水瘤 EAC 的影响 昆明种小鼠 120 只,♂,随机分为 6 组,即模型组、FOD 4 个剂量组(0.5、1.0、5.0 和 10.0 mg/kg)及阳性药香菇多糖注射液组(1.0 mg/kg),每组 20 只。小鼠肌肉注射给药 0.1 ml/10 g,每天 1 次,连续 7 d,第 8 天无菌接种 EAC 小鼠 d7 腹水,无菌生理盐水稀释为 1×10^8 /L 浓度的细胞悬液,每鼠腹腔注射 0.2 ml (2×10^4 个细胞)。继续给药,直至小鼠死亡,计算小鼠生存天数,以 30 d 为限,大于 30 d 以 30 d 计算。小鼠生命延长率(%) = (用药组生存天数 - 模型组生存天数) / 模型组生存天数 $\times 100\%$,本实验重复 3 次。

1.3.3 FOD 对实体瘤 HepA 的抑制作用 昆明种小鼠 120 只,♂,随机分为 6 组,即模型组、FOD 4 个剂量组(0.5、1.0、2.0、10.0 mg/kg)及阳性药香菇多糖注射液组(1.0 mg/kg),每组 20 只。小鼠肌肉注射给药 0.1 ml/10 g,每天 1 次,连续 7 d,第 8 天无菌接种 HepA 小鼠 d7 腹水(无菌生理盐水稀释为 1×10^{10} /L 浓度的细胞悬液),接种小鼠右腋窝皮下,每鼠 0.2 ml (2×10^6 个细胞)。继续给药,连续 10 d。末次给药后次日称体重后,处死小鼠,剥离瘤块并称重量,抑瘤率 = (模型组瘤重 - 实验组瘤重) / 模型组瘤重 $\times 100\%$,本实验重复 3 次。

1.3.4 FOD 体外抗肿瘤作用

1.3.4.1 Hep-2 细胞、A549 细胞和 HeLa 细胞传代

2014-05-26 接收

基金项目:高校省级自然科学基金项目(编号:KJ2010B396)

作者单位:安徽医科大学基础医学院药理学教研室,合肥 230032

作者简介:王宇翎,女,副教授,责任作者,E-mail: wangyuling1973@

126.com

培养 分别取 Hep-2、Hela 和 A549 细胞培养于含 10% 新生小牛血清 DMEM 培养液的培养瓶中,在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中孵育 1~2 d 传代,取对数生长期细胞用于实验。

1.3.4.2 SMMC-7721 细胞、BEL7407 细胞、BGC-823 细胞和 COLO-205 细胞传代培养 取 SMMC-7721 细胞、BEL7407 细胞、BGC-823 细胞和 COLO-205 细胞培养于 DMEM 完全营养液中,在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中孵育 2~3 d 传代,取对数生长期细胞用于实验。

1.3.4.3 MCF-7 细胞传代培养 取 MCF-7 细胞培养于含 0.2 单位/ml 的中效胰岛素的 DMEM 完全营养液中,在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中孵育 2~3 d 传代,取对数生长期细胞用于实验。

1.3.4.4 白花蛇舌草总黄酮对 8 种人肿瘤细胞的抑制作用 分别取对数生长期的 8 种人肿瘤细胞并调整细胞数至 5×10^4 /ml,接种于 96 孔板上,每孔 0.2 ml,置 37 °C、5% CO₂ 培养 24 h 后,弃原培养液,加入等量(根据预试验结果提示)含不同浓度 FOD 培养液(15.625、31.25、62.5、125.0、250.0、500.0、1000.0 μ g/ml)并且另设培养液对照组,每个浓度重复 4 孔。作用 72 h 后,每孔加 MTT 20 μ l(5 mg/

ml) 37 °C 孵 4 h 后,吸去上清液加入盐酸异丙醇 150 μ l/孔,轻轻振荡后,于自动酶标仪上 570 nm 处测 A 值,计算 FOD 对各种肿瘤细胞的半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用方差分析和两两比较的 LSD 法进行统计学处理。

2 结果

2.1 FOD 对实体瘤 S180 的抑制作用 FOD 对小鼠 S180 的抑瘤率 3 批结果分别为 17.26% ~ 37.56%、16.42% ~ 33.83%、19.28% ~ 35.54%,其中 FOD(5.0、10.0 mg/kg)对小鼠 S180 的抑瘤率 3 批结果均大于 30%,提示 FOD(5.0、10.0 mg/kg)对 S180 小鼠肿瘤有明显的抑制作用,见表 1。

2.2 FOD 对实体瘤 HepA 小鼠的抑制作用 FOD 对小鼠实体瘤 HepA 的抑瘤率 3 批结果分别为 20.72% ~ 34.85%、18.70% ~ 35.65%、30.85% ~ 38.31%,其中 FOD(1.0、5.0、10.0 mg/kg)组对小鼠 HepA 的抑瘤率 3 批结果均在 30% 以上,提示 FOD(1.0、5.0、10.0 mg/kg)对小鼠 HepA 实体瘤有明显的抑制作用,见表 2。

表 1 FOD 对小鼠实体瘤 S₁₈₀ 的抑制作用($\bar{x} \pm s$)

实验次数	组别	剂量 (mg/kg)	n		体重(g)		瘤重 (g)	抑瘤率 (%)
			前	后	前	后		
I	模型		20	20	14.15	29.51	1.97 ± 0.38	
	FOD	10.0	20	20	14.25	29.22	1.23 ± 0.33*	37.56
		5.0	20	20	14.05	29.64	1.32 ± 0.27*	32.99
		1.0	20	20	14.20	29.86	1.50 ± 0.36*	23.86
		0.5	20	20	14.25	29.66	1.63 ± 0.42*	17.26
		香菇多糖注射液	1.0	20	18	14.10	29.98	1.40 ± 0.54*
<i>F</i> = 9.163 <i>P</i> < 0.05								
II	模型		20	19	14.45	30.34	2.01 ± 0.40	
	FOD	10.0	20	20	14.50	30.15	1.33 ± 0.49*	33.83
		5.0	20	20	14.45	30.50	1.32 ± 0.57*	34.33
		1.0	20	20	14.10	30.70	1.47 ± 0.65*	26.87
		0.5	20	20	14.40	30.57	1.68 ± 0.58*	16.42
		香菇多糖注射液	1.0	20	20	14.40	30.68	1.28 ± 0.41*
<i>F</i> = 5.837 <i>P</i> < 0.05								
III	模型		20	20	13.50	29.53	1.66 ± 0.63	
	FOD	10.0	20	20	13.35	29.49	1.07 ± 0.46*	35.54
		5.0	20	20	13.55	29.56	1.11 ± 0.56*	33.13
		1.0	20	20	13.40	29.61	1.34 ± 0.53	19.28
		0.5	20	20	13.50	29.88	1.34 ± 0.52	19.28
		香菇多糖注射	1.0	20	20	13.38	29.82	1.13 ± 0.43*
<i>F</i> = 3.574 <i>P</i> < 0.05								

与模型组比较: * *P* < 0.05

表2 FOD对小鼠实体瘤HepA的抑制作用($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(mg/kg)	n		体重(g)		瘤重(g)	抑瘤率(%)	
		前	后	前	后			
I	模型	-	20	19	14.40	28.87	1.98 ± 0.53	
	FOD	10.0	20	20	14.45	28.77	1.31 ± 0.36*	33.84
		5.0	20	19	14.35	29.13	1.29 ± 0.30*	34.85
		1.0	20	20	14.45	29.15	1.38 ± 0.43*	30.30
		0.5	20	20	14.50	29.29	1.53 ± 0.46*	20.72
		香菇多糖注射液	1.0	20	20	14.55	29.30	1.22 ± 0.42*
<i>F</i> = 8.726 <i>P</i> < 0.05								
II	模型	-	20	18	15.15	31.82	2.30 ± 0.59	
	FOD	10.0	20	20	15.25	31.56	1.48 ± 0.47*	35.65
		5.0	20	20	15.35	32.12	1.57 ± 0.48*	31.74
		1.0	20	20	15.70	32.08	1.56 ± 0.51*	32.17
		0.5	20	20	15.35	32.40	1.87 ± 0.24*	18.70
		香菇多糖注射液	1.0	20	19	15.65	32.61	1.50 ± 0.37*
<i>F</i> = 9.813 <i>P</i> < 0.05								
III	模型	-	20	19	13.95	30.95	2.01 ± 0.41	
	FOD	10.0	20	20	13.80	30.75	1.24 ± 0.30*	38.31
		5.0	20	20	13.95	30.33	1.34 ± 0.37*	33.33
		1.0	20	20	14.15	31.26	1.36 ± 0.36*	32.84
		0.5	20	20	13.80	30.96	1.39 ± 0.37*	30.85
		香菇多糖注射液	1.0	20	20	13.90	31.49	1.35 ± 0.24*
<i>F</i> = 13.066 <i>P</i> < 0.05								

与模型组比较: * *P* < 0.05

2.3 FOD对腹水瘤EAC小鼠生命延长率的影响

FOD对腹水型EAC小鼠的生命延长率三次分别为12.42%~20.68%、11.09%~18.55%、8.78%~18.57% ,但生命延长率均小于30%。提示FOD对腹水型EAC小鼠无保护作用,见表3。

表3 FOD对小鼠腹水瘤EAC的影响($\bar{x} \pm s$)

实验次数	组别	剂量(mg/kg)	n	生存天数(d)	生命延长率(%)
I	模型	-	20	17.55 ± 4.84	
	FOD	10.0	20	19.73 ± 7.31	12.42
		5.0	20	20.53 ± 3.57	16.98
		1.0	20	21.18 ± 3.78	20.68
		0.5	20	20.65 ± 5.29	17.66
		香菇多糖注射液	1.0	20	21.83 ± 4.05**
<i>F</i> = 1.806 <i>P</i> > 0.05					
II	模型	-	20	18.03 ± 4.04	
	FOD	10.0	20	21.38 ± 4.05	18.55
		5.0	20	20.38 ± 5.45	13.03
		1.0	20	20.53 ± 5.16	13.87
		0.5	20	20.03 ± 4.80	11.09
		香菇多糖注射液	1.0	20	22.33 ± 5.37**
<i>F</i> = 1.778 <i>P</i> > 0.05					
III	模型	-	20	17.88 ± 2.67	
	FOD	10.0	20	21.12 ± 4.37	18.57
		5.0	20	20.58 ± 5.34	15.10
		1.0	20	19.45 ± 4.04	8.78
		0.5	20	19.50 ± 3.94	9.06
		香菇多糖注射液	1.0	20	23.56 ± 4.75*
<i>F</i> = 4.086 <i>P</i> < 0.05					

与模型组比较: * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01

2.4 FOD体外抗肿瘤作用 FOD IC₅₀值见表4。

表4 FOD体外抗肿瘤作用($n=3, \bar{x} \pm s$)

肿瘤细胞株	IC ₅₀ (μg/ml)
MCF-7	92.8 ± 33.3
BEL-7407	147.7 ± 79.0
SMMC-7721	147.9 ± 53.0
BGC-823	241.3 ± 8.78
COLO-205	247.1 ± 164.2
Hep-2	284.8 ± 109.6
A549	323.4 ± 94.9
Hela	575.5 ± 258.9

3 讨论

白花蛇舌草是一种民间常用中草药,归胃、大肠、小肠经,具有清热解毒、利尿消肿、活血止痛、抗癌之功效,其适应证为湿热蕴毒所致的呼吸道感染、扁桃体炎、肺炎、胆囊炎、阑尾炎、痈疔脓肿、手术后感染及癌症辅助治疗。多种文献资料^[8-11]均报道单独使用白花蛇舌草汤剂或者白花蛇舌草注射液对原发性肝癌、中晚期食管癌、肿瘤术后的腹腔内粘连等具有良好的治疗作用,如配合化疗药物则明显增强胃癌、肝癌、肺癌、食管癌、乳腺癌、结肠癌等患者的治疗效果和生存质量,并降低化疗药物的不良反应。国内外学者^[12-13]已从白花蛇舌草中分离出黄

酮类、多糖、挥发油、蒽醌类等三十多种化合物,其中具有抗肿瘤成分的主要为黄酮类、蒽醌类、甾醇类、多糖及微量元素,且认为其抗肿瘤作用机制与增强免疫功能、干扰肿瘤细胞能量代谢、诱导肿瘤细胞凋亡有关。

FOD是从白花蛇舌草中提取的有效部位,黄酮含量达56%。本研究显示FOD(5.0、10.0 mg/kg)对S180小鼠肿瘤有明显的抑制作用,FOD(1.0、5.0、10.0 mg/kg)对小鼠HepA实体瘤有明显的抑制作用,FOD体外有抗多种肿瘤细胞作用,从而显示FOD具有和白花蛇舌草汤剂或白花蛇舌草注射液相似的抗肿瘤作用。结合先前实验证实的FOD具有免疫增强作用^[3],同时增加机体特异性免疫功能和非特异性免疫功能,且对肿瘤化疗药物有一定的减毒作用,因此FOD将会是一种理想的新型抗肿瘤药物。

参考文献

- [1] 张创峰,杨友亮,刘普等. 白花蛇舌草化学成分和药理作用研究进展[J]. 西北药学杂志 2012 27(4):379-82.
- [2] 陈秀珍,朱大成,王艳辉. 白花蛇舌草药理作用及临床应用研究新进展[J]. 中药材 2009 32(1):157-60.
- [3] 王宇翎,张艳,李卫平等. 白花蛇舌草总黄酮的免疫调节作用[J]. 中国药理学通报 2005 21(3):348-50.
- [4] 王宇翎,张艳,李卫平等. 白花蛇舌草总黄酮的抗炎及抗菌作用[J]. 中国药理学通报 2005 21(4):444-7.
- [5] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社 2002:1757-84.
- [6] 韩锐. 抗癌药物研究与实验技术[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1997:67-79.
- [7] 胡宗涛,魏倩,董六一. 抗癌平颗粒的体内抗肿瘤作用[J]. 安徽医科大学学报 2011 46(3):245-8.
- [8] 唐立明,汪金华,周洪进. 静滴白花蛇舌草总注射液治疗中晚期食道癌106例临床观察[J]. 医药论坛杂志 2004 25(15):37-9.
- [9] 刘俊保,姚志伟. 白花蛇舌草注射液对原发性肝癌的临床作用[J]. 中国药理学通报 2005 21(4):444-7.
- [10] 李雁,黄景玉. 白花蛇舌草注射液配合化疗晚期非小细胞肺癌53例[J]. 河南中医药学刊 2000 15(4):45-6.
- [11] 文恰先,吕国强,张振勇等. 肠癌方联合化疗治疗晚期大肠癌的临床观察[J]. 实用医院临床杂志 2011 8(6):149-51.
- [12] 赵善黎,张肖晗. 白花蛇舌草注射液联合化疗治疗恶性肿瘤[J]. 医药论坛杂志 2007 28(10):74-5.
- [13] 孙岩,李洁. 白花蛇舌草抗肿瘤作用的研究进展[J]. 食品与药品 2012 14(5):210-2.

Antitumor effect of total flavones of *Oldenlandia diffusa* Willd

Wang Yuling, Zhang Yan, Li Qianjin, et al

(Dept of Pharmacology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the antitumor effects of total flavones of *Oldenlandia diffusa* Willd (FOD). **Methods** Mice sarcoma S180 model, EAC ascites model and liver tumor HepA entity model transplanted tumor model were established to observe the antitumor effect *in vivo* and *in vitro* through the experiment. **Results** *In vivo* tests, FOD in a dosage of 5 and 10 mg/kg inhibited the growth of S180 in mice with the tumor inhibitory rate (IR) more than 30%; FOD in a dosage of 1, 5 and 10 mg/kg inhibited the growth of HepA in mice with an IR more than 30% and FOD on EAC in mice with an IR less than 30%. *In vitro* tests, treatment of MCF-7 cells, BEL-7407 cells, SMMC-7721 cells, BGC-823 cells, COLO-205 cells, Hep-2 cells and A549 cells with FOD, with mean IC₅₀ values were 92.8 μg/ml, 147.7 μg/ml, 147.9 μg/ml, 241.3 μg/ml, 247.1 μg/ml, 284.8 μg/ml, 323.4 μg/ml, 575.5 μg/ml, respectively. **Conclusion** FOD shows significant antitumor effect experimentally *in vitro* and *in vivo*.

Key words total flavones of *Oldenlandia diffusa* Willd; tumor