

• 基础实验研究论著 •

三白草提取物抑瘤作用初步研究

郭凌霄¹, 苏国生^{2△}

(1. 广西壮族自治区民族医院, 广西南宁 530001; 2. 广西壮族自治区南宁市第四人民医院 530023)

摘要:目的 研究三白草提取物的抑瘤作用。方法 以不同剂量三白草提取物处理肝癌 H22、肉瘤 S180 实体瘤小鼠模型, 通过检测瘤组织质量的改变计算抑瘤率; 处理小鼠肝癌 H22 腹水瘤小鼠模型, 考察提取物对腹水瘤小鼠的生命延长率, 并观察其对胸腺和脾脏免疫器官质量的影响。结果 三白草提取物可抑制 H22、S180 实体瘤的生长 ($P < 0.05$), 并具有一定的免疫促进作用; 可延长 H22 腹水瘤小鼠的生存时间 ($P < 0.05$), 提高生命延长率。结论 三白草提取物对移植性肝癌 H22、肉瘤 S180 有抑制作用。

关键词: 三白草; 抗肿瘤; 肉瘤 S180; 肝癌 H22; 小鼠**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.06.002**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2012)06-0643-02

Primary studies on the anti-tumor effect of Saururus Chinensis

Guo Lingxiao¹, Su Guosheng^{2△}

(1. National Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning Guangxi 530001, China;

2. Fourth People's Hospital of Nanning, Nanning Guangxi 530023, China)

Abstract: Objective To observe the anti-tumor effect of Saururus Chinensis. Methods S180 entity tumor mice and H22 tumor-bearing mice models were established to observe the inhibitory rates of Saururus Chinensis by using tumor weight as evaluation index. The H22 mice models were treated for evaluate survival time, and the effects on spleen and thymus index to S180 entity tumor were observed. Results Saururus Chinensis had obvious anti-tumor effects in S180 and H22 mice moles ($P < 0.05$), could prolong the survival time in H22 mice models ($P < 0.05$) and improve the immune function in tumor-bearing mice models. Conclusion Saururus Chinensis could inhibit tumor growth and prolong the life time of tumor-bearing mice.

Key words: saururus chinensis; anti-tumor; sarcoma 180; Repatocarcinoma 22; mice

三白草(Saururus Chinensis)是三白草科多年生草本植物, 全草入药, 其味甘、辛, 性寒, 具有清热解毒、利尿消肿之功效; 主要分布在中国中南、西南地区, 四季均可采收, 资源丰富。国内、外对其进行了较多研究, 已分离出黄酮、木脂素、生物碱、鞣质等成分, 证实其具有抗炎、去毒、降糖、保肝、利尿等活性。关于三白草化学成分和药理活性已有报道^[1-3]。但对三白草的传统应用及其提取物体内、外抑瘤作用的研究未见报道。因此, 笔者以肉瘤 S180 及肝癌 H22 荷瘤小鼠为模型进行了体内抑瘤试验, 初步考察其抑瘤作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验药物 称取一定量的三白草药材(购自广西南宁医药公司, 经鉴定为三白草的干燥地上部分), 加 10 倍体积的 80% 乙醇溶液, 回流提取 2 次, 每次 120 min, 滤过, 合并滤液, 回收滤液经水浴浓缩至所需浓度, 冷藏备用。环磷酰胺(CTX) 购自山西普德药业有限公司(批号: 20090801, 规格: 200 毫克/支), 临用前以生理盐水配制成 30 mg/L 溶液。

1.1.2 肿瘤细胞株 S180、H22 细胞株由广西中医药研究院实验动物室提供, 经 SPF 级昆明种小鼠腹腔接种传代。

1.1.3 试验动物 SPF 级昆明种小鼠, 雌雄兼用, 体质量 (20±2) g, 由广西医科大学动物中心提供(动物生产许可证号: SCXK 桂 2003-0003)。

1.2 方法^[4]

1.2.1 三白草提取物对小鼠实体瘤的抑制作用 分别取传代 9 d 的 S180、H22 腹水瘤小鼠, 断颈处死后固定于板上, 无菌条

件下消毒腹部皮肤, 用无菌空针抽吸腹水, 接种于受体小鼠右前肢腋部皮下, 每只注射 0.2 mL, 24 h 后称重并随机分为三白草高、中、低剂量组, CTX 阳性对照组, 模型组; 另取 10 只未处理小鼠作为空白组。提取物处理组腹腔注射相应浓度药液(见表 1), 1 次/天, 连续 10 d。阳性对照组小鼠按 30 mg/kg 隔日腹腔注射 CTX, 1 次/天, 连续 14 d。模型组腹腔注射相同体积生理盐水。用药 14 d 后停止给药, 停药次日断颈处死小鼠, 称取小鼠体质量, 分离肿瘤组织并称取其质量, 计算抑瘤率及胸腺(脾脏)指数: 抑瘤率 = (空白组瘤质量 - 用药组瘤质量) / 空白组瘤质量 × 100%; 胸腺(脾脏)指数 = 胸腺(脾脏)质量 (mg) / 体质量 (g)。

1.2.2 腹水型小鼠生命延长率试验 相同方法抽取传代 9 d 的 H22 腹水瘤小鼠的腹水, 从右下腹注入受体小鼠腹腔内, 每只注射 0.2 mL, 将已接种腹水瘤的小鼠随机分为三白草提取物高、中、低剂量组, CTX 阳性对照组, 模型组, 每组 10 只。提取物处理组以灌胃法给予相应浓度药液(见表 2), 1 次/天, 连续 10 d; 模型组灌胃法给予蒸馏水, 1 次/天, 连续 10 d; 阳性对照组按 30 mg/kg, 隔日腹腔注射 CTX。10 d 后停止给药并逐日记录小鼠的存活天数, 计算生命延长率: 生命延长率 (%) = (给药组平均存活天数 / 模型组平均存活天数 - 1) × 100%。

1.3 统计学处理 试验数据均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS10.0 统计软件进行组间方差分析, 检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 三白草提取物对实体瘤的抑制作用 各剂量三白草提取物对小鼠 S180、H22 实体瘤均有明显抑制作用, 抑瘤率大于

△ 通讯作者, E-mail: suguoshengv@sina.com。

30%，平均瘤质量与模型组比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。详见表 1。

表 1 三白草提取物对小鼠 S180、H22 实体瘤的抑制作用($n=10$)

组别	剂量(g/kg)	S180		H22	
		瘤质量(g)	抑瘤率(%)	瘤质量(g)	抑瘤率(%)
模型组	—	0.48±0.24	—	0.86±0.35	—
阳性对照组	0.3	0.22±0.16*	54.1	0.33±0.15*	61.6
低剂量组	2.0	0.23±0.23*	52.1	0.55±0.35*	36.0
中剂量组	4.0	0.19±0.20*	60.4	0.30±0.17*	65.1
高剂量组	8.0	0.16±0.14*	66.7	0.27±0.16*	68.6

*: $P<0.05$,与模型组比较;—:无数据。

2.2 三白草提取物对 H22 腹水瘤小鼠生存时间的影响 各剂量三白草提取物均能明显延长肝癌 H22 腹水瘤小鼠的生存期。详见表 2。

表 2 三白草提取物对肝癌 H22 腹水瘤小鼠生存时间的影响($n=10$)

组别	剂量(g/kg)	生存天数(d)	生命延长率(%)
模型组	—	12.5±5.74	—
阳性对照组	0.3	23.3±5.52*	86.4
低剂量组	2.0	17.3±4.85*#	38.4
中剂量组	4.0	18.4±6.49*#	47.2
高剂量组	8.0	19.8±5.28*#	58.4

*: $P<0.05$,与模型组比较;#: $P>0.05$,与阳性对照组比较;—:无数据。

2.3 三白草提取物对 S180 实体瘤小鼠胸腺指数和脾脏指数的影响 与空白组比较,阳性对照组小鼠胸腺指数和脾脏指数降低;与模型组比较,三白草不同剂量组小鼠存在不同程度的脾脏指数降低、胸腺指数升高。详见表 3。

表 3 三白草提取物对 S180 实体瘤小鼠免疫指标的影响($n=10$)

组别	剂量(g/kg)	脾脏指数	比率(%)	胸腺指数	比率(%)
空白组	—	6.52±0.60	—	2.68±0.57	—
模型组	—	14.80±0.52*	227.0	1.58±0.68*	58.9
阳性对照组	0.3	4.56±0.63*#	69.9	1.89±0.86*#	70.5
低剂量组	2.0	9.25±0.72	141.9	2.35±0.39#	87.7
中剂量组	4.0	8.69±0.75#	133.1	1.88±0.46*	70.1
高剂量组	8.0	7.75±0.69#	118.9	1.79±0.55#	66.8

*: $P<0.05$,与空白组比较;#: $P<0.05$,与模型组比较;—:无数据。

3 讨 论

肿瘤的发生、发展与机体的免疫功能密切相关。机体免疫功能包括体液免疫和细胞免疫。体液免疫由 B 细胞或者记忆细胞产生抗体而实现,通过形成抗原抗体复合物以中和病毒和其他病原体。在抗肿瘤免疫方面,细胞免疫占主导地位。细胞免疫主要由 T 淋巴细胞(简称 T 细胞)介导,T 细胞功能的正常发挥则有赖于其亚群间的相互协调,其数量、比例和功能的

改变都可能影响机体的免疫状态^[5-6]。T 细胞的激活是发挥细胞免疫效应的重要条件。T 细胞增殖率是能够代表机体免疫状态的重要指标。在肿瘤疾病的治疗中,化疗可改善患者临床症状、提高生存质量和延长生命^[7]。CTX 作为化疗药物广泛应用于肿瘤治疗,但其在杀伤肿瘤细胞的同时,对机体正常组织和细胞也有不同程度的损伤作用,主要引起骨髓抑制、免疫功能减退、胃肠道功能紊乱和免疫器官萎缩,还可造成正常淋巴细胞,特别是 T、B 细胞大量减少,产生一定的细胞毒性^[8-10]。

肿瘤患者免疫状态与肿瘤发生、发展有关,也是影响疗效的因素之一。细胞免疫是机体对肿瘤进行免疫监视的功能主体。S180 肿瘤细胞可分泌多种免疫抑制物,在肿瘤局部形成深度免疫抑制的“黑洞”区,使该区域范围内的免疫细胞功能被严重抑制,因此肿瘤可以逃逸免疫系统的排斥而不断生长^[11]。

从植物中寻找抑瘤药物是肿瘤治疗药物研究重要组成部分,其活性成分抗肿瘤作用及机制是肿瘤研究领域热点之一。本研究以体内抑瘤试验对三白草提取物抑瘤效应进行了分析。结果表明,三白草提取物具有良好的抑瘤作用,抑瘤率高于中药疗效评价中规定的指标(抑瘤率超过 30%)^[5,12],而且可提高荷瘤小鼠体质量、胸腺指数和脾脏指数,说明有一定的免疫调节作用。高、中、低剂量三白草提取物对 H22 荷瘤小鼠的生命延长率分别为 58.4%、47.2%、38.4%,与 CTX 处理组比较差异无统计学意义($P>0.05$),表现出较强的抗腹水瘤作用。

本研究初步证实三白草提取物在抑瘤的同时基本无不良反应,用药期间不影响受试动物正常生长发育,具有一定的开发前途,但其有效成分和作用机制有待进一步研究。

参考文献

[1] 文东旭.三白草中具保肝作用的非对映木脂素[J].国外医药植物药分册,2001,16(4):167.

[2] Hwang BY, Lee JH, Nam JB, et al. Two new furanoditerpenes from Saururus chinensis and their effects on the activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma[J]. J Nat Prod, 2002, 65(4): 616.

[3] 郭凌霄.三白草总黄酮的提取及抗氧化活性研究[J].齐齐哈尔医学院学报,2010,31(14):2192.

[4] 彭冰,何春年,许利嘉,等.三白草的化学成分研究[J].中草药,2010,41(12):1950-1952.

[5] 徐叔云,卞如谦,陈修.药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2001:1762-1764.

[6] Gurfinkel EP, Manos ET, Mejail RI, et al. Low molecular weight heparin versus regular heparin or aspirin in the treatment of Unstable angina and silent ischemia[J]. J Am Coll Cardiol, 1995, 26(2): 313-314.

[7] Hasegawa H, Suzuki R, Nagaoka T, et al. Prevention of growth and metastasis of murine melanoma through enhanced natural-killer cytotoxicity by fatty acid-conjugate of protopanaxatriol[J]. Biol Pharm Bull, 2002, 25(7): 861-866.

[8] Crall RJ, Tyson LB, Borden LB, et al. Antiemetic therapy: a review of recent studies and a report of a random assignment trial comparing metoclopramide with delta-9-tetrahydrocannabinol[J]. Cancer Treat Rep, 1984, 68(1): 163-172.

[9] Takeda K, Smyth MJ, Creteny E, et al. Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development[J]. J Exp Med, 2002, 195(2): 161-169.

[10] Motoyoshi Y, Kaminoda K, Saitoh O, et al. (下转第 647 页)

miRNA145 含量(见图 5)。在 BEAS-2B 与 A549 细胞中均可检出 U6、miR-145。采用图像处理分析软件计算图 5 各条带灰度值(见表 1)。根据 sRNA 含量计算公式计算 miR-145、U6 表达量。在 5 μ g BEAS-2B 细胞总 RNA 中,U6、miRNA-145 含

量为(2.59 $\pm$ 0.03)和(2.82 $\pm$ 0.04) pmol;在 5 μ g A549 细胞总 RNA 中,U6、miR-145 含量为(2.66 $\pm$ 0.44)和(2.28 $\pm$ 0.03)pmol。miRNA145/U6 比值在 BEAS-2B、A549 细胞分别是1.08、0.85,差异具有统计学意义($t=46.77,P<0.05$)。

表 1 根据图 5 计算的条带灰度值($\bar{x}\pm s$)

条带	U6		miR-145	
	BEAS-2B	A549	BEAS-2B	A549
杂交条带	1 159.81 $\pm$ 24.51	1 246.36 $\pm$ 91.01	2 396.35 $\pm$ 33.31	1 564.32 $\pm$ 15.28
未杂交条带	1 078.07 $\pm$ 6.80	1 098.75 $\pm$ 41.38	1 851.85 $\pm$ 41.69	1 861.05 $\pm$ 46.90

3 讨 论

生物体内存在的大量 sRNA 组成了细胞中高度复杂的 RNA 调控网络,对细胞增殖、周期、分化和凋亡等进行调控。因此,有必要建立快速、简单、可靠的 sRNA 检测方法。本研究建立检测方法的主要流程为:生物素标记探针→液相杂交→非变性 PAGE 电泳→转印至尼龙膜→HRP 耦联链霉素和素检测。

采用 Northern 印迹技术检测非编码 RNA 的原理是用已标记的寡核苷酸探针检测与寡核苷酸探针互补的未知 RNA。寡核苷酸探针可根据需要选择性合成,因此探针的标记是实现检测目的的关键。由于同位素标记法存在局限,具有较高敏感性 & 稳定性的生物素-亲和素系统得到广泛应用^[8]。本研究通过末端转移酶将 Biotin-11-dUTP 成功连接至合成的寡核苷酸 3' 末端,且随着寡核苷酸浓度增加,检测信号强度越强,10 μ mol/L 时达到最强,说明标记体系最好选用浓度为 10 μ mol/L 的寡核苷酸。

传统 Northern 印迹固相杂交反应过程繁琐,耗时费力,且 RNase 无处不在,进行多步操作增加了 sRNA 被降解的可能^[5-6]。液相杂交使杂交反应在溶液里完成,简化了步骤,缩短了时间,增加了特异性和敏感性^[9-12]。因此,本研究选择将探针与待杂交样品置于不同杂交缓冲液中,采用不同退火条件,探索 sRNA 最佳检测条件。结果显示液相杂交检测 sRNA 无需特殊试剂及仪器,采用磷酸盐缓冲液及水浴条件即可进行杂交反应。

生物素标记寡核苷酸探针稳定性较高,如在液相杂交体系中加入准确定量的寡核苷酸探针,便可根据最终的灰度值计算样品中的 sRNA 含量。本研究证实 5 μ g 肺支气管上皮细胞 BEAS-2B 与肺癌细胞 A549 总 RNA 中,U6 绝对含量相近($t=1.5,P=0.27$);miRNA145 在 BEAS-2 细胞中的含量高于 A549。说明本研究所建立的方法可用于 sRNA 的定量检测,甚至可直接检测目的 RNA,且无需设置内参。

综上所述,本研究在传统 Northern 印迹基础上建立并优化了检测 sRNA 的新方法,为简单、易行、可靠地检测 sRNA 提供了可能,也为 sRNA 基础及临床研究提供了有力地保障。

参考文献

[1] Garzon R,Calin GA,Croce CM. MicroRNAs in Cancer[J]. Annu

Rev Med,2009,60(1):167-179.
[2] Tang F,Hajkova P,Barton SC,et al. MicroRNA expression profiling of single whole embryonic stem cells[J/OL]. Nucleic Acids Res,2006-01-24[2012-01-14],http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1351374/? tool=pubmed.
[3] Chen C,Ridzon DA,Bromer AJ,et al. Real time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR[J/OL]. Nucleic Acids Res, 2005-11-27[2012-01-14],http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC16314309/? tool=pubmed.
[4] Castoldi M,Schmidt S,Benes V,et al. A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA)[J]. RNA,2006,12(5):913-920.
[5] Strit S,Michalisk CW,Erkan M,et al. Northern blot analysis for detecting and quatification of RNA in pancreatic cancer cells and tissues[J]. Nat Protoc,2009,4(1):37-43.
[6] 李善清,唐万兵,孙鹏,等. 全反式视磺酸及干扰素对胃癌细胞系 MNK45 中 p16,p21,cMyc 基因表达的影响[J]. 国际检验医学杂志,2011;32(2):159-162.
[7] Tran N. Fast and simple microRNA northern bots[J]. Methodology,2009,2(1):1-3.
[8] Duan Z,Choy E,Nielsen GP,et al. Differetial expression microRNAs in chordoma reveals a role for miRNA-1 in Met expression [J]. J Orthop Res,2010,28(6):746-752.
[9] Wang X,Tong Y,Wang S. Rapid and accurate detection of plant miRNAs by liquid northern hybridization[J]. Int J Mol Sci,2010,11(9):3138-3148.
[10] Yan F,Wu X,Crawford M,et al. The search for an optimal DNA, RNA,and protein detection by in situ hybridization,immunohistochemistry,and solution-based methods[J]. Methods,2010,52(4):281-286.
[11] 徐卫,李建勇,陆凤翔. 液相杂交检测 B 细胞淋巴瘤细胞系 miR-28 的表达[J]. 中国实验血液学杂志,2006,14(2):289-292.
[12] Chamnongpol S,Maroney PA,Nilsen TW. A rapid, quantitative assay for direct detection of microRNAs and other small RNAs using splinted ligation[J]. Methods Mol Biol,2010,667(1):3-17.

(收稿日期:2011-12-18)

(上接第 644 页)

Different mechanisms for anti-tumor effects of low-and high-dose cyclophosphamide[J]. Oncol Rep,2006,16(1):141-146.
[11] Teraoka H,Sawada T,Yamashita Y,et al. TGF-beta1 promotes liver metastasis of pancreatic cancer by modulating the capacity of cel-

lular invasion[J]. Int J Oncol,2001,19(4):709-715.
[12] 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,1997:271.

(收稿日期:2011-12-19)