

金边瑞香正丁醇提取物抗肿瘤作用及机制的研究

徐静, 陈水亲, 黎晓, 李加林, 宋涛, 吴小云
(赣南医学院, 江西 赣州 341000)

[摘要] 目的: 探讨金边瑞香正丁醇提取物的抗肿瘤作用及其机制。方法: 采用萃取法对金边瑞香浸膏进行提取, 利用小鼠皮下移植性肿瘤模型观察不同浓度金边瑞香正丁醇提取物的体内抗肿瘤作用; 采用 MTT 比色法测定 NK 细胞活性; ELISA 法测定小鼠脾细胞分泌 IL-2 的量。结果: 1. 金边瑞香正丁醇提取物对荷 S180 小鼠的肿瘤生长有抑制作用, 10, 20, 40 g·kg⁻¹·d⁻¹ 剂量组抑瘤率分别达到 34.90%, 47.16%, 29.72%。2. 金边瑞香正丁醇提取物各剂量组的小鼠脾细胞分泌的 IL-2 均有提高, 其中 20 g·Kg⁻¹·d⁻¹ 剂量组 IL-2 为 (5.26 ± 0.61) pg·mL⁻¹ 显著高于生理盐水组并明显增强 NK 细胞活性。结论: 金边瑞香正丁醇提取物在体内具有显著的抗肿瘤活性, 且可促进脾细胞分泌 IL-2 和增强 NK 细胞活性。

[关键词] 金边瑞香; 正丁醇; 抗肿瘤

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)08-0148-03

Anti-tumor Effect of *N*-Butanol Extract of *Daphne odora* var. *Marginata* and its Mechanism

XU Jing, CHEN Shui-qin, LI Xiao, LI Jia-lin, SONG Tao, WU Xiao-yun
(Gannan Medical College, Ganzhou 341000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate anti-tumor effect and possible mechanism of *N*-butanol extract of *Daphne odora* Var. *Marginata* *in vivo*. **Method:** Solvent extraction method was used for obtaining extraction from *D. odora*. Mouse model of transplanting tumor was used to study the *in vivo* anti-tumor effect of *N*-butanol extract of *D. odora* at different concentrations. MTT method was used to examine the effect of NK cell. ELISA method was used to examine IL-2 secreted by spleen cell. **Result:** *N*-butanol extract of *D. odora* could decrease the tumor weight in S180-bearing mice. It could raise IL-2 secreted by spleen cell, and obviously enhance the effect of NK cell. **Conclusion:** *N*-butanol extract of *D. odora* has anti-tumor activity *in vivo* and promote spleen cell secrete IL-2 and enhance the effect of NK cell.

[Key words] *Daphne odora* Var. *Marginata*; *N*-butanol extract; anti-tumor effect

金边瑞香 *Daphne odora* Var. *Marginata* 是瑞香的变种, 属瑞香科瑞香属常绿小灌木, 为我国传统名花^[1], 具有很高的观赏价值, 此外还具有较高的药用价值。金边瑞香含有瑞香苷, 其根、茎、叶、花均可入药, 性甘无毒, 具有清热解毒、消炎去肿、活血化瘀、散结止痛之功效。瑞香叶能治疮疡、风痛; 花可治咽喉

牙齿肿痛; 根茎能治毒蛇咬伤、跌打损伤等。近年来研究表明金边瑞香具有抗炎症^[2]、抑菌、抗脂质过氧化、抗衰老^[3]作用, 对正常小鼠和荷瘤小鼠的细胞免疫、非特异性免疫、红细胞免疫功能有均促进作用^[4-5], 且前期研究已表明金边瑞香浸膏具有体内外抗肿瘤作用^[6], 但其抗肿瘤有效成分及其作用机制尚未见文献报道。本研究主要探讨金边瑞香正丁醇提取物的抗肿瘤作用及其可能的作用机制, 为金边瑞香作为抗肿瘤新药的进一步研制开发提供实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂 金边瑞香浸膏由江西省中医药

[收稿日期] 20100207(001)

[基金项目] 江西省教育厅科技计划项目(GJJ08398)

[作者简介] 徐静, 副教授, 硕士学位, 主要从事中药免疫研究工作, E-mail: jxu0120@126.com。

研究所熊学敏教授提供, 含生药量 $5\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 正丁醇为分析纯; RPMI1640, GIBCO 公司产品; 小牛血清, 杭州四季青生物工程材料有限公司; 四甲基偶氮唑蓝 (MTT), AMERSCO 公司产品; ConA, 美国 SIGMA 公司; DMSO, 苏州化工研究所。

1.2 动物及瘤株 健康昆明种小鼠, 由南昌大学医学院实验动物科学部提供, 6~8 周龄, 体重 18~22 g; 腹水型肉瘤 S180 小鼠由赣南医学院组胚教研室林卡莉教授惠赠; YAC-1 细胞为赣南医学院科研中心保种。

2 方法

2.1 金边瑞香正丁醇提取物的分离和配制 取金边瑞香浸膏加水热浴后, 用 3 倍量正丁醇萃取, 收集萃取液, 回收溶剂并减压浓缩, 得到正丁醇提取物。临用前金边瑞香正丁醇提取物用氯化钠注射液溶解配制成所需浓度。

2.2 金边瑞香正丁醇提取物对荷 S180 瘤小鼠体内抑瘤实验 取生长良好的小鼠移植性肿瘤细胞 S180, 用生理盐水稀释成 $1\times10^6/\text{mL}$, 于小鼠右腋部皮下接种 0.2 mL 瘤细胞悬液, 建立荷瘤小鼠模型。小鼠随机分为 5 组, 金边瑞香正丁醇提取物设高、中、低 3 个剂量组, 剂量分别为 10, 20, 40 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 每天 ig 给药 1 次, 对照组给予生理盐水, 每次 0.4 mL, 连续给药 10 d。环磷酰胺 (CTX) 阳性对照组分别于第 1, 5, 9 天 ip CTX 100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。停药次日处死小鼠, 解剖分离皮下瘤块, 称瘤重, 计算各组平均瘤重和抑瘤率。

2.3 MTT 比色法测定 NK 细胞的活性 颈椎脱位处死小鼠, 无菌取小鼠脾脏, 制成脾细胞悬液作为效应细胞, 用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液调整细胞浓度至 $1\times10^7/\text{mL}$; 取经 24 h 培养的 YAC-1 细胞作为靶细胞, 用 RPMI1640 培养液调整细胞密度至 $2\times10^5/\text{mL}$ 。96 孔细胞培养板中, 实验孔加效、靶细胞各 100 μL , 效应细胞对照孔加脾细胞、培养液各 100 μL , 靶细胞对照孔加 YAC-1 细胞、培养液各 100 μL , 均设 3 个复孔。充分混匀, 37℃ 5% CO_2 培养 24 h 后, 各孔加入 10 μL MTT 继续培养 4 h。弃上清, 各孔加入 DMSO 150 μL , 酶标仪 570 nm 波长处测 A。NK 细胞活性 = $1 - (\text{实验组 A} - \text{效应细胞 A}) / \text{靶细胞组 A} \times 100\%$

2.4 脾细胞分泌 IL-2 水平的测定 取 $8.0\times10^6/\text{mL}$ 脾细胞悬液 1 mL 加入 24 孔培养板, 再加 10 μg

$\cdot\text{mL}^{-1}$ ConA 1mL。37℃ 5% CO_2 培养 24 h, 收集上清, 即 IL-2 待测样品。按试剂说明用 ELISA 法测定 IL-2 的浓度。

2.5 统计方法 结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS11.5 软件进行统计分析, 多样本均数比较用单因素方差分析, 以 $P<0.05$ 为有统计学差异。

3 结果

3.1 金边瑞香正丁醇提取物体内抑瘤作用 给药后各组平均瘤重及抑瘤率见表 1。与生理盐水组比较, 金边瑞香正丁醇提取物高、中、低剂量组与环磷酰胺组瘤重降低差异有显著性, 其中 20 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 金边瑞香正丁醇提取物剂量组平均瘤重明显降低 ($P<0.01$); 环磷酰胺组与金边瑞香正丁醇提取物各剂量组之间差异亦有显著性。

表 1 金边瑞香正丁醇提取物对荷 S180 小鼠
肿瘤质量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	剂量 $/\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	平均瘤重 $/\text{g}$	抑瘤率 $/\%$
金边瑞香	10	$1.38\pm0.19^{2)}$	34.90
	20	$1.12\pm0.27^{2)}$	47.16
	40	$1.49\pm0.21^{1)}$	29.72
环磷酰胺	0.1	$0.81\pm0.20^{2)}$	61.79
生理盐水	—	2.12 ± 0.29	—

注: 与生理盐水组比较 $^{1)} P<0.05, ^{2)} P<0.01$ (表 2 同)。

3.2 金边瑞香正丁醇提取物对荷 S180 小鼠 NK 细胞活性、IL-2 的影响 金边瑞香正丁醇提取物对荷 S180 小鼠 NK 细胞活性、IL-2 的影响见表 2。

表 2 金边瑞香正丁醇提取物对荷 S180 小鼠 NK
细胞、IL-2 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	剂量 $/\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	NK 活性 $/\%$	IL-2 $/\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$
金边瑞香	10	22.45 ± 2.82	$4.28\pm0.52^{1)}$
	20	$23.78\pm2.44^{1)}$	$5.26\pm0.61^{2)}$
	40	21.17 ± 3.09	$4.35\pm0.44^{1)}$
环磷酰胺	0.1	$15.26\pm3.19^{1)}$	2.84 ± 0.53
生理盐水	—	19.51 ± 2.89	3.43 ± 0.69

4 讨论

从植物中寻找抗肿瘤药, 在国内外已成为抗肿瘤药物研究的重要组成部分, 其活性成分的抗肿瘤作用及其机制是肿瘤研究领域的一大热点。自 20 世纪 70 年代初, 就开始了对瑞香科瑞香属植物的植物化学和药学研究^[7], 金边瑞香为我国名贵花卉之一, 国内外研究不多, 本研究采用溶剂萃取法对金边瑞香浸膏进行提取及初步分离, 研究金边瑞香正丁

醇提取物的抗肿瘤作用及其机制, 对于筛选出金边瑞香的抗肿瘤有效部位, 探讨其抗肿瘤机制, 具有重要的研究价值。

NK 细胞是机体主要的非特异性肿瘤杀伤细胞, IL-2 可增强 NK 细胞的杀伤活性, 还可诱导淋巴细胞产生 TNF- α 。IL-2 是 T 细胞、NK 细胞产生的细胞因子, 在机体的免疫应答中起着重要作用, 其含量与机体细胞免疫功能密切相关。体内抑瘤实验结果表明, 金边瑞香正丁醇提取物对荷 S180 小鼠的肿瘤生长有抑制作用, 10, 20, 40 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 剂量组抑瘤率分别达到 34.90%, 47.16%, 29.72%。而金边瑞香正丁醇提取物各剂量组的脾细胞分泌的 IL-2 均有提高, 其中 20 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 剂量组 IL-2 明显提高, 同时, NK 细胞活性也明显增强, 而环磷酰胺组 NK 细胞活性下降。由此我们认为金边瑞香正丁醇提取物在体内具有显著的抗肿瘤活性, 且作用机制与促进淋巴细胞产生 IL-2 和增强 NK 细胞活性有关。金边瑞香的抗肿瘤成分和机制值得进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 熊学敏, 方裕华, 曹珏, 等. 金边瑞香鲜花中瑞香素的超临界萃取及条件的优化[J]. 中国新药杂志, 2003, 12(7): 534.
- [2] 叶和杨, 曾靖, 杨敬格, 等. 金边瑞香的抗炎症作用[J]. 赣南医学院学报, 2002, 22(1): 7.
- [3] 叶和杨, 周俐, 曾靖, 等. 金边瑞香对小鼠 SOD 活性及 MDA 含量的影响[J]. 赣南医学院学报, 2003, 23(3): 246.
- [4] 徐静, 傅颖媛. 金边瑞香对小鼠免疫功能影响的量效关系[J]. 中国临床康复, 2005, 9(43): 103.
- [5] 黄彬红, 傅颖媛, 徐静, 等. 金边瑞香对荷 S180 瘤小鼠免疫功能的影响[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(10): 2376.
- [6] 徐静, 傅颖媛, 黄彬红, 等. 金边瑞香浸膏体内外抗肿瘤作用[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(23): 2019.
- [7] 莫建初, 程家安. 瑞香属植物生物活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15(2): 167.

[责任编辑 聂淑琴]