

柿叶不同极性部位对 H22 腹水瘤 及 H22, S180 实体瘤小鼠的抑瘤作用

陈丽^{1*}, 张安文¹, 罗宇¹, 冯艺萍¹, 梁宇红²

(1. 广西科技大学, 广西 柳州 545006; 2. 柳州市工人医院, 广西 柳州 545005)

[摘要] **目的:**研究柿叶不同极性部位对小鼠 H22 及 S180 抑瘤作用的影响。**方法:**柿叶乙醇提取物分别用三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取,得到相应不同极性部位;乙醇提取后的柿叶晾干后水煮,得水提部位。分别建立 H22 腹水瘤小鼠模型和 H22, S180 实体瘤小鼠模型,将荷瘤小鼠随机分为空白组,模型组,环磷酰胺组(0.1 g·kg⁻¹),不同极性部位(柿叶三氯甲烷、柿叶水提、柿叶乙酸乙酯、柿叶正丁醇)高、中、低剂量组,连续 ig 10 d。观察各用药组对 H22 腹水瘤小鼠腹围、腹水抑制率和肝组织病理学形态的影响,以及对 H22 和 S180 实体瘤小鼠摄食量、体重、抑瘤率、生命延长率、胸腺和脾脏系数等的影响。**结果:**与模型组比较,柿叶乙酸乙酯部位、水提部位和正丁醇部位能明显减少 H22 腹水瘤小鼠的腹水量,不同程度改善肝细胞肿胀、溶解等状况;不影响 H22 和 S180 实体瘤小鼠的摄食量,能明显提高荷瘤小鼠的抑瘤率、延长生命延长率,增加胸腺系数和脾脏系数($P < 0.01, P < 0.05$)。**结论:**柿叶乙酸乙酯部位、水提部位和正丁醇部位对 H22 和 S180 荷瘤小鼠有不同程度的抑瘤作用,可为柿叶抑瘤作用的有效部位。柿叶乙酸乙酯部位对肝癌 H22 小鼠(包括实体瘤和腹水瘤)的影响比对肉瘤 S180 小鼠更显著。

[关键词] 柿叶; 极性部位; H22 肝癌; S180 肉瘤; 抗肿瘤作用

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)01-0167-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015010167

Antitumor Effects of Different Polarity Extracts from The Kaki Folium on Hepatoma H22 and Sarcoma H22, S180 Bearing Mice CHEN Li^{1*}, ZHANG An-wen¹, LUO Yu¹, FENG Yi-ping¹, LIANG Yu-hong²
(Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou 545006, China; 2. Liuzhou Worker's Hospital, Liuzhou 545005, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the antitumor effects of different polarity extracts from Kaki Folium on hepatoma H22 and sarcoma S180 bearing mice. **Method:** The the Kaki Folium were successively extracted with ethanol, chloroform, ethyl acetate and n-butanol, the ethanol extraction were extracted by water, and the different polarity extracts were obtained. Experimental H22 ascites tumor mice model, H22 and S180 solid tumor mice models were established, respectively. The experimental mice were randomly divided into a series of groups: blank control group, model group, cyclophosphamide group, low-, middle-and high-dosage groups of the various different polarity extracts. The mice were intragastrically administrated the corresponding drugs for 10 days. The abdominal circumference, inhibition rate of ascites and liver tissue physiological form were observed in H22 ascites tumor mice. The food intake, body weight, tumor inhibition rate, life prolongation rate, values of thymus coefficient and spleen coefficient were recorded. **Result:** Compared with the model group, the volume of ascites and ameliorate liver cell swelling, karyolysis on H22 ascites tumor mice were significantly reduced in ethyl acetate extract, water extract and n-butanol extract groups, while no significant effects on food intake and body weight in H22, S180solid tumor mice were found. The tumor inhibition rate, life prolongation rate, values of thymus coefficient and spleen coefficient were significantly increased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$) after treated with different polarity extracts and cyclophosphamide groups. **Conclusion:** The ethyl acetate extract, water extract and n-butanol from Kaki Folium

[收稿日期] 20140612(028)

[基金项目] 广西医学科学实验中心开放基金专项(KFJJ2011-17)

[通讯作者] * 陈丽, 硕士, 副教授, 从事药理学教学与科研工作, Tel:0772-2056086, E-mail: chenlilyz@163.com

possess have certain antitumor effects on hepatoma H22 and sarcoma S180 bearing mice, which may be the effective fractions of antitumor effects from persimmon leaves. The ethyl acetate-extracted fraction has better effects on hepatoma H22 bearing mice (included the solid and ascites tumor) than sarcoma S180 bearing mice.

[Key words] Kaki Folium; polarity parts; hepatoma H22; sarcoma S180; anti-tumor activity

柿叶入药始见于明代《滇南本草》，记载“经霜叶敷臃疮”^[1]，其味苦、性寒，具有活血止血、止咳平喘、生津止渴、清热解毒等作用^[2]。现代药理学研究证明柿叶有多种作用，如具有保护心脑血管系统^[3-4]、抗氧化^[5]、抗菌^[6]、降脂^[7]、降糖^[8]等作用，柿叶体内抗肿瘤作用的报道较少，目前有唐秀能等^[9]、Moon^[10]报道柿叶水提物能延长 H22 及 S180 荷瘤小鼠生存天数，提高抑瘤率。故本实验通过复制 H22 及 S180 荷瘤小鼠模型，对柿叶不同极性的化学部位进行了体内抑瘤作用的研究，旨在筛选出其抗肿瘤的有效部位，为进一步开发和利用柿叶资源提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 健康昆明种小鼠，雌雄各半，体质量 18 ~ 23 g，广西医科大学实验动物中心提供，合格证号 SCXK(桂)2009-0002；H22 肝癌荷瘤小鼠及 S180 肉瘤荷瘤小鼠购自广西中医药研究院。

1.2 药品与试剂 柿叶，购自广西柳州市城站药材综合市场，柿叶各极性部位由实验室自行制备。石油醚(60 ~ 90 °C，分析纯，成都市科龙化工试剂厂，批号 20110926)，三氯甲烷(分析纯，西陇化工股份有限公司，批号 1203252)，乙酸乙酯(分析纯，成都市科龙化工试剂厂，批号 20110414)，正丁醇(分析纯，成都市科龙化工试剂厂，批号 20120308)，环磷酰胺(陕西普德药业股份有限公司，批号 04120703)。

1.3 仪器 RE-52 旋转式蒸发器(上海安亭实验仪器有限公司)，BSC-1300 II A2 生物安全柜(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)，SB-3200DTDN 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)，电子分析天平(塞多利斯科学仪器北京有限公司)，-80 °C 超低温冰箱(995, Thermo Scientific Forma)，TKY-TSH 生物组织智能脱水机(湖北泰康医疗设备有限公司)，TKY-BMB 型石蜡包埋机(湖北泰康医疗设备有限公司)，RM2235 轮转切片器(德国徕卡)；NP-P 型生物组织摊片烤片机(孝感市诺普电子科技有限公司)，BX-53F 显微镜(日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 柿叶不同极性部位的制备^[11] 柿叶粗粉

400 g 用 70% 乙醇回流提取，提取液减压浓缩后用石油醚萃取，石油醚萃取后的水相依次用三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取，萃取液减压浓缩、干燥、研碎，分别得：三氯甲烷萃取部位(得率为 1.63%)，乙酸乙酯萃取部位(得率为 2.75%)，正丁醇萃取部位(得率为 1.43%)；另将 70% 乙醇回流提取后的柿叶挥干，加蒸馏水煮沸，过滤后将滤液浓缩、离心、干燥，得柿叶水提部位(得率为 3.88%)。各极性部位使用时均以聚山梨酯-80 为增溶剂，加蒸馏水适量，即得不同浓度的受试物。

2.2 柿叶不同极性部位对 H22 腹水瘤小鼠的影响 将接种 7 d 腹水饱满的 H22 肝癌荷瘤小鼠颈椎脱臼处死，无菌条件下抽取乳白色腹水，用无菌生理盐水将瘤细胞稀释成 1×10^7 个/mL 的细胞悬液，小鼠 140 只，腹部皮肤消毒后腹腔注射 H22 腹水瘤细胞悬液，每只 0.2 mL。次日随机将小鼠分成 14 组，每组 10 只，雌雄各半。分组后立即 ig 给药，药量经预实验确定，每天用药 1 次，连续 10 d。分组及给药量分别为：模型组(蒸馏水 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)，环磷酰胺组($0.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)，柿叶三氯甲烷高、中、低剂量组($1.5, 0.75, 0.375 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)，柿叶水提高、中、低剂量组($4.0, 2.0, 1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)，柿叶乙酸乙酯高、中、低剂量组($2.0, 1.0, 0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)，柿叶正丁醇高、中、低剂量组($1.0, 0.5, 0.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。给药第 1, 4, 7, 10 天测量小鼠腹围，给药第 11 天处死小鼠，抽取全部腹水后计算腹水抑制率。抽取腹水后立即摘取小鼠肝脏肉眼观察并做病理切片。

$$\text{腹水抑制率} = \frac{\text{模型组腹水量} - \text{实验组平均腹水量}}{\text{模型组腹水量}} \times 100\%$$

2.3 柿叶不同极性部位对 H22 实体瘤小鼠的影响 选择接种 7 d 腹水饱满的 H22 肝癌荷瘤小鼠，颈椎脱臼处死，无菌条件下用一次性注射器抽取乳白色腹水，用无菌生理盐水稀释成 1×10^7 个/mL 的细胞悬液，接种于小鼠右前肢腋部皮下，每只 0.2 mL，共 280 只，雌雄各半。次日分组及给药，组别及给药方法同 2.2 项，每组 20 只，雌雄各半。给药期间小鼠自由饮水，定量喂食饲料，次日称量剩余饲料计算小鼠平均摄食量，于给药第 1, 5, 10 天称取小鼠体重。第 11 天各组随机处死 10 只小鼠，剩余小鼠

停药正常饲养并记录生存天数以计算生命延长率;处死的小鼠将其瘤组织、胸腺及脾脏剥离后称重,计算抑瘤率、胸腺系数和脾脏系数。

$$\text{生命延长率} = (\text{治疗组生存天数} - \text{对照组生存天数}) / \text{对照组生存天数} \times 100\%$$

$$\text{抑瘤率} = (\text{模型组瘤重} - \text{实验组瘤重}) / \text{模型组瘤重} \times 100\%$$

$$\text{脏器系数} = \frac{\text{脏器质量}(\text{mg})}{\text{体重}(\text{g})}$$

2.4 柿叶不同极性部位对 S180 实体瘤小鼠的影响 选择接种 7 d 腹水饱满的 S180 肝癌荷瘤小鼠,颈椎脱臼处死,无菌条件下用一次性注射器抽取乳白色腹水,用无菌生理盐水稀释成 1×10^7 个/mL 的细胞悬液,接种于小鼠右前肢腋部皮下,每只 0.2 mL,共 280 只,雌雄各半。次日分组及给药,组别、给药方法及检测指标同 2.3 项。

2.5 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件分析,组间均数比较用单因素方差分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 柿叶不同极性部位对 H22 腹水瘤小鼠的影响

3.1.1 对 H22 腹水瘤小鼠腹围和腹水量的影响 给药第 4 天,模型组的腹围与环磷酰胺组的比较增加明显,柿叶乙酸乙酯部位、水提部位各剂量组及正丁醇高剂量组的腹围均明显小于模型组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。给药第 10 天,柿叶乙酸乙酯部位、水提部位及正丁醇部位各剂量组的腹围均明显小于模型组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。第 11 天处死小鼠抽取腹水,发现柿叶乙酸乙酯部位、水提部位及正丁醇部位各剂量组腹水量均明显低于模型组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),其中乙酸乙酯部位腹水量最少,其次是水提部位,最后是正丁醇部位;柿叶三氯甲烷高、中、低剂量组小鼠的腹水量与模型组比较无显著性差异。柿叶乙酸乙酯部位腹水抑制率最高,但与环磷酰胺组(腹水抑制率为 72.7%)比较仍有一定差距。结果见表 1。

表 1 柿叶不同极性部位对 H22 腹水瘤小鼠腹围和腹水抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 The influence of different polarity extracts from Kaki Folium on abdominal circumference and ascites inhibition rate in H22 ascites tumor mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

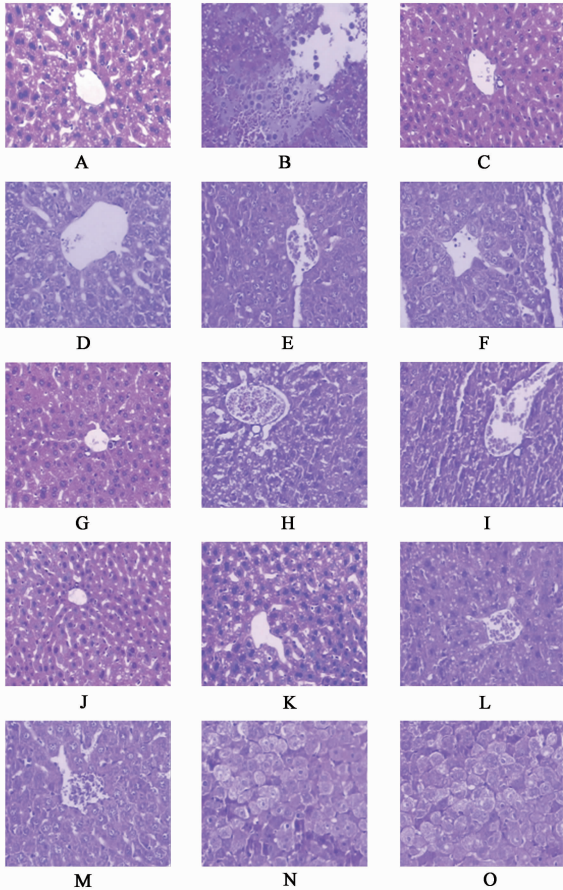
组别	剂量 /g·kg ⁻¹	腹围/mm				腹水量 /mL	腹水抑制率 /%
		第 1 天	第 4 天	第 7 天	第 10 天		
空白	-	69.4 ± 0.8	70.6 ± 1.8	71.4 ± 1.9	72.2 ± 1.6	-	-
模型	-	69.2 ± 1.6	74.5 ± 1.9 ¹⁾	83.1 ± 1.4 ¹⁾	91.7 ± 2.0 ¹⁾	4.3 ± 0.4	-
环磷酰胺	0.1	69.3 ± 1.1	71.6 ± 2.5 ³⁾	74.7 ± 1.8 ³⁾	79.6 ± 1.8 ³⁾	1.2 ± 0.3 ³⁾	72.7
柿叶三氯甲烷	1.5	68.9 ± 1.2	73.6 ± 2.3 ⁵⁾	81.7 ± 2.4 ^{4,5)}	90.7 ± 2.0 ⁵⁾	4.2 ± 0.4 ⁵⁾	1.2
	0.75	69.3 ± 1.2	74.7 ± 2.1 ⁵⁾	82.3 ± 1.4 ⁵⁾	92.2 ± 1.7 ⁵⁾	4.3 ± 0.4 ⁵⁾	-0.7
	0.375	69.2 ± 2.2	74.8 ± 2.0 ⁵⁾	82.7 ± 2.1 ⁵⁾	92.0 ± 2.1 ⁵⁾	4.3 ± 0.4 ⁵⁾	-0.9
柿叶水提	4.0	68.9 ± 2.2	72.4 ± 1.4 ³⁾	78.8 ± 2.2 ^{3,5)}	83.0 ± 2.0 ^{3,5)}	2.3 ± 0.4 ^{3,5)}	46.5
	2.0	69.0 ± 1.4	72.5 ± 2.1 ³⁾	79.9 ± 1.7 ^{3,5)}	84.5 ± 2.1 ^{3,5)}	2.7 ± 0.6 ^{3,5)}	37.6
	1.0	69.1 ± 2.3	73.1 ± 1.3 ^{4,6)}	80.8 ± 2.3 ^{3,5)}	88.1 ± 1.5 ^{3,5)}	3.3 ± 0.6 ^{3,5)}	22.0
柿叶乙酸乙酯	2.0	68.9 ± 1.2	71.8 ± 2.0 ³⁾	76.8 ± 2.0 ^{3,5)}	82.0 ± 2.3 ^{3,5)}	2.1 ± 0.2 ^{3,5)}	50.5
	1.0	69.1 ± 2.1	73.0 ± 1.8 ^{4,6)}	78.9 ± 2.4 ^{3,5)}	83.2 ± 2.3 ^{3,5)}	2.3 ± 0.3 ^{3,5)}	45.8
	0.5	69.2 ± 2.1	73.2 ± 2.4 ^{4,5)}	81.0 ± 1.5 ^{3,5)}	85.4 ± 1.5 ^{3,5)}	2.8 ± 0.4 ^{3,5)}	35.3
柿叶正丁醇	1.0	69.0 ± 2.6	73.1 ± 1.7 ^{4,6)}	79.7 ± 2.3 ^{3,5)}	88.1 ± 2.4 ^{3,5)}	3.6 ± 0.4 ^{3,5)}	16.4
	0.5	69.2 ± 1.3	74.0 ± 2.5 ⁵⁾	81.2 ± 1.5 ^{3,5)}	89.4 ± 2.4 ^{3,5)}	3.8 ± 0.3 ^{3,5)}	11.9
	0.25	68.8 ± 1.5	74.1 ± 1.7 ⁵⁾	83.1 ± 1.4 ⁵⁾	90.0 ± 1.8 ^{4,5)}	4.0 ± 0.3 ^{3,5)}	6.3

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$,²⁾ $P < 0.05$;与模型组比较³⁾ $P < 0.01$,⁴⁾ $P < 0.05$;与环磷酰胺组比较⁵⁾ $P < 0.01$,⁶⁾ $P < 0.05$ (表 2 ~ 5 同)。

3.1.2 肝组织病理学观察 肉眼观察:模型组有 7 只小鼠的肝脏局部颜色偏暗红,有不同程度肿胀;柿叶三氯甲烷部位组 8 只小鼠的肝脏略有肿胀;其他用药组肝脏未见异常。HE 染色病理学检查:模型组肝细胞排列不整齐,疏松,肿胀,可见大片肝细胞溶解,未见细胞核;脉管内可见癌细胞浸润,癌细胞

异型性明显,核大且深染,可见脂肪变性;空白组和环磷酰胺组肝细胞排列整齐,肝小叶结构正常,肝索、肝窦结构清晰,环磷酰胺组未见癌细胞浸润;乙酸乙酯部位高、中、低剂量组及水提部位高、中剂量组肝组织病理学改变情况与环磷酰胺组相似,但胞浆淡染,细胞变大,胞界不清晰;水提部位低剂量组

和正丁醇部位高剂量组肝小叶结构完整,部分肝细胞肿胀,核膜可见但核仁变淡;其他部位各剂量组肝细胞排列紊乱,细胞肿胀明显,核膜不清,甚至肝细胞溶解,未见核仁;各用药组均未见癌细胞浸润。见图 1。



A. 空白组;B. 模型组;C. 环磷酰胺 $0.1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;D. 三氯甲烷部位 $1.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;E. 三氯甲烷部位 $0.75 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;F. 三氯甲烷部位 $0.375 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;G. 水提部位 $4.0 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;H. 水提部位 $2.0 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;I. 水提部位 $1.0 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;J. 乙酸乙酯部位 $2.0 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;K. 乙酸乙酯部位 $1.0 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;L. 乙酸乙酯部位 $0.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;M. 正丁醇部位 $1.0 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;N. 正丁醇部位 $0.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;O. 正丁醇部位 $0.25 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组

图 1 柿叶不同极性部位对 H22 腹水瘤小鼠肝组织形态的影响
Fig. 1 Effects of different polarity extracts from Kaki Folium on pathological sections of liver tissue in H22 solid tumor mice (HE, $\times 200$)

3.2 柿叶不同极性部位对 H22 实体瘤小鼠的影响 给药期间,多组小鼠摄食量逐日减少,环磷酰胺组平均摄食量最低,柿叶乙酸乙酯高剂量组平均摄食量最高,水提高剂量组次之,与模型组比较均有显著差异($P < 0.05, P < 0.01$),说明柿叶乙酸乙酯部位及水提部位对小鼠食欲抑制不明显。用药 10 d

后,柿叶乙酸乙酯部位和水提部位各剂量组体重明显比模型组和环磷酰胺组重($P < 0.01$)。其他各用药组由于摄食量的减少和肉瘤的影响,体重与模型组比较无显著性差异,见表 2。与模型组比较,除柿叶三氯甲烷部位对小鼠肿瘤无抑制作用外,柿叶其他极性部位均有不同程度的抑瘤作用,其中乙酸乙酯部位高剂量组抑瘤效果最明显,抑瘤率为 46.8%,生命延长率为 43.9%。柿叶乙酸乙酯部位、水提部位和正丁醇部位都能不同程度提高胸腺系数和脾脏系数,见表 3。

3.3 柿叶不同极性部位对 S180 实体瘤小鼠的影响 给药期间,模型组和环磷酰胺组小鼠摄食量减少最明显,但柿叶乙酸乙酯部位高剂量组和水提部位高剂量组摄食量减少不明显。除柿叶三氯甲烷部位各剂量组,其他用药组体重增加明显,与模型组和环磷酰胺组比较有显著差异($P < 0.05, P < 0.01$)。说明除柿叶三氯甲烷部位,柿叶其他极性部位对 S180 实体瘤小鼠食欲的抑制程度轻,对体重影响少,结果见表 4。柿叶乙酸乙酯部位、水提部位和正丁醇部位都能不同程度抑制小鼠 S180 实体瘤的生长,延长小鼠生存时间,提高胸腺系数,其中柿叶乙酸乙酯部位高剂量组抑瘤效果最明显,抑瘤率为 38.2%,生命延长率为 36.2%,结果见表 5。从数据上看,柿叶各有效极性部位对小鼠 H22 实体瘤的抑瘤效果比 S180 实体瘤更明显。

4 讨论

恶性腹腔积液常见于各种晚期肿瘤患者,它使患者生活质量下降,生存期缩短。目前临床采用的穿刺放液、化疗等治疗方法达不到满意疗效,表现为副作用多,病人无法耐受,复发快,感染机会增多等^[12],故应积极寻找新的治疗方法。近年来有报道柿叶提取物对 HeLa 细胞、H22 细胞及人肝癌 SMMC-7721 细胞形态有一定的诱变及抑制增生的作用^[13-14]。本实验观察了柿叶不同极性部位对 H22 腹水瘤小鼠的影响:给药第 4 天,模型组小鼠腹围与柿叶乙酸乙酯部位、水提部位各剂量组比较增加明显;给药第 7 天后,柿叶正丁醇部位各剂量组亦能抑制荷瘤小鼠腹围的增加;给药第 10 天,柿叶乙酸乙酯部位、水提部位及正丁醇部位各剂量组与模型组比较能明显减少 H22 腹水瘤小鼠腹围及腹水量,其中柿叶乙酸乙酯部位效果最明显,其次为水提部位,最后为正丁醇部位,且各有效极性部位腹水抑制率与剂量有正相关性。各用药组肝组织病理切片与模型组比较,三氯甲烷部位高、中、低剂量组与模型组

表 2 柿叶不同极性部位对 H22 实体瘤小鼠体重和摄食量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 2 Effect of different polarity extracts from Kaki Folium on food intake and body weight in H22 solid tumor mice ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	小鼠体重/g			小鼠摄食量/g			10 d 平均摄食量 /g
		第 1 天	第 5 天	第 10 天	第 1 天	第 5 天	第 10 天	
空白	-	20.8 ± 1.1	23.8 ± 1.9	26.2 ± 1.6	27.9	25.8	28.8	26.7 ± 1.5
模型	-	20.5 ± 2.0	22.5 ± 1.8 ²⁾	23.8 ± 2.0 ¹⁾	27.5	18.2	17.7	20.5 ± 3.4 ¹⁾
环磷酰胺	0.1	20.4 ± 1.6	21.6 ± 2.2	23.3 ± 2.0	26.8	14.8	12.3	15.8 ± 5.5 ³⁾
柿叶三氯甲烷	1.5	20.0 ± 2.2	22.1 ± 1.9 ⁴⁾	24.3 ± 2.1	26.8	18.4	18.3	21.0 ± 3.3 ⁵⁾
	0.75	20.0 ± 1.5	21.3 ± 2.3	23.4 ± 1.4	25.9	18.6	18.8	20.2 ± 3.6 ⁵⁾
	0.375	20.5 ± 2.0	21.7 ± 2.1	23.9 ± 2.0	27.9	20.3	15.8	20.8 ± 3.9 ⁵⁾
柿叶水提	4.0	20.5 ± 1.3	23.2 ± 2.0 ⁶⁾	26.4 ± 1.3 ^{3,5)}	28.4	23.4	21.1	23.6 ± 2.3 ^{4,5)}
	2.0	19.6 ± 2.0	22.0 ± 2.2	25.5 ± 2.4 ^{3,5)}	27.6	21.5	20.4	23.1 ± 2.6 ⁵⁾
	1.0	19.7 ± 2.0	21.9 ± 1.9	25.4 ± 2.3 ^{3,5)}	26.8	20.5	19.4	23.3 ± 3.5 ⁵⁾
柿叶乙酸乙酯	2.0	20.6 ± 1.3	23.4 ± 2.0 ⁵⁾	26.0 ± 2.2 ^{3,5)}	27.6	24.6	21.7	24.6 ± 1.8 ³⁾
	1.0	20.0 ± 1.3	23.1 ± 1.2 ⁶⁾	25.7 ± 2.2 ^{3,5)}	28.1	23.3	21.9	23.3 ± 2.9 ⁵⁾
	0.5	20.1 ± 2.2	23.0 ± 1.5 ⁶⁾	25.8 ± 2.2 ^{3,5)}	26.5	22.9	20.8	22.9 ± 1.8 ⁵⁾
柿叶正丁醇	1.0	19.9 ± 1.5	22.1 ± 1.6	24.7 ± 1.5 ⁶⁾	26.7	21.7	19.5	22.1 ± 2.7 ⁵⁾
	0.5	20.3 ± 1.4	22.7 ± 2.3 ⁶⁾	24.7 ± 2.1 ⁶⁾	26.9	20.6	19.0	22.0 ± 2.8 ⁵⁾
	0.25	20.1 ± 2.2	22.0 ± 1.6	24.4 ± 1.4 ⁶⁾	28.7	19.6	16.9	21.6 ± 4.1 ⁵⁾

表 3 柿叶不同极性部位对 H22 实体瘤小鼠抑瘤率、生命延长率、胸腺系数和脾脏系数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 3 Effect of different polarity extracts from Kaki Folium on tumor inhibition rate, life prolongation rate, thymus coefficient and spleen coefficient in H22 solid tumor mice ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	瘤重 /g	抑瘤率 /%	生存天数 /d	生命延长率 /%	胸腺系数 /mg·10 g ⁻¹	脾脏系数 /mg·10 g ⁻¹
模型	-	2.2 ± 0.4 ⁵⁾	-	17.1 ± 1.5	-	21.0 ± 3.9 ¹⁾	70.3 ± 8.0 ¹⁾
环磷酰胺	0.1	0.6 ± 0.2 ^{3,5)}	73.6	26.6 ± 1.7	55.6	18.8 ± 2.7	65.8 ± 4.9
柿叶三氯甲烷	1.5	2.3 ± 0.5 ⁵⁾	-3.0	17.6 ± 1.9	2.9	22.7 ± 2.2 ⁴⁾	71.6 ± 4.8
	0.75	2.2 ± 0.4 ⁵⁾	-0.2	17.4 ± 1.5	1.8	22.6 ± 2.7	70.4 ± 6.1
	0.375	2.3 ± 0.5 ⁵⁾	-2.2	17.3 ± 1.8	1.2	22.4 ± 2.3	69.3 ± 4.8
柿叶水提	4.0	1.4 ± 0.3 ^{3,5)}	35.1	21.3 ± 2.4	24.6	29.5 ± 6.0 ^{3,5)}	77.1 ± 6.4 ^{4,5)}
	2.0	1.6 ± 0.4 ^{3,5)}	28.6	19.5 ± 1.8	14.0	28.0 ± 6.0 ^{3,5)}	75.5 ± 7.1 ⁵⁾
	1.0	1.8 ± 0.3 ^{4,5)}	17.3	18.6 ± 1.4	8.8	25.9 ± 3.6 ^{4,5)}	74.2 ± 8.4 ⁵⁾
柿叶乙酸乙酯	2.0	1.2 ± 0.3 ^{3,5)}	46.8	24.6 ± 1.9	43.9	30.0 ± 5.3 ^{3,5)}	81.7 ± 7.3 ^{3,5)}
	1.0	1.4 ± 0.3 ^{3,5)}	38.7	22.5 ± 2.6	31.6	29.0 ± 4.7 ^{3,5)}	79.3 ± 8.2 ^{3,5)}
	0.5	1.7 ± 0.4 ^{3,5)}	23.9	20.7 ± 3.6	21.1	27.7 ± 4.5 ^{3,5)}	77.2 ± 5.3 ^{4,5)}
柿叶正丁醇	1.0	1.3 ± 0.3 ^{3,5)}	39.8	21.6 ± 2.6	26.3	29.0 ± 6.6 ^{3,5)}	74.9 ± 7.6 ⁵⁾
	0.5	1.7 ± 0.4 ^{3,5)}	24.1	18.6 ± 1.1	8.8	27.0 ± 4.5 ^{3,5)}	72.5 ± 5.2 ⁶⁾
	0.25	1.8 ± 0.4 ^{4,5)}	19.6	18.3 ± 2.2	7.0	26.1 ± 2.7 ^{3,5)}	71.2 ± 8.7 ⁶⁾

相似,肝细胞肿胀甚至溶解,用药后细胞形态未见改善;柿叶乙酸乙酯部位、水提部位及正丁醇部位肝细

胞排列整齐,胞界清晰,核仁明显,未见异型细胞,特别各部位高剂量组肝细胞形态接近环磷酰胺组。

表 4 柿叶不同极性部位对 S180 实体瘤小鼠体质量和摄食量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 4 Effect of different polarity extracts from Koki Folium on food intake and body weight in S180 solid tumor mice ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	小鼠体质量/g			小鼠摄食量/g			10 d 平均摄食量 /g
		第 1 天	第 5 天	第 10 天	第 1 天	第 5 天	第 10 天	
空白	-	20.5 ± 0.9	23.6 ± 1.2	26.3 ± 1.5	25.5	24.7	26.8	25.5 ± 3.4
模型	-	20.7 ± 1.0	22.9 ± 1.9 ¹⁾	24.1 ± 2.1 ¹⁾	26.8	18.7	15.4	19.7 ± 4.3 ¹⁾
环磷酰胺	0.1	20.5 ± 1.5	21.8 ± 1.3 ⁴⁾	23.5 ± 2.2	27.1	17.5	10.7	16.7 ± 6.7
柿叶三氯甲烷	1.5	19.9 ± 1.9	21.8 ± 1.9 ⁴⁾	23.3 ± 1.7	25.9	17.1	14.4	18.2 ± 3.9
	0.75	20.5 ± 2.2	21.9 ± 2.0	23.4 ± 2.0	26.4	17.6	12.2	18.9 ± 5.1
	0.375	20.1 ± 2.2	22.0 ± 2.0	23.2 ± 2.1	25.8	19.6	14.5	19.5 ± 3.8
柿叶水提	4.0	20.4 ± 1.5	22.5 ± 2.4	26.0 ± 2.0 ^{3,5)}	27.7	22.5	20.0	23.3 ± 2.3 ^{4,5)}
	2.0	19.9 ± 1.3	21.9 ± 1.4	25.9 ± 2.1 ^{3,5)}	26.5	21.3	19.1	22.4 ± 2.5 ⁵⁾
	1.0	20.6 ± 2.2	22.4 ± 2.3	24.6 ± 2.2	26.9	22.0	17.6	22.1 ± 3.1 ⁵⁾
柿叶乙酸乙酯	2.0	20.5 ± 1.4	22.2 ± 2.2 ⁶⁾	26.11 ± 1.4 ^{3,5)}	26.8	21.6	21.8	23.2 ± 1.9 ^{4,5)}
	1.0	20.9 ± 1.7	22.9 ± 1.5	25.4 ± 1.4 ^{4,5)}	24.7	24.5	20.4	22.9 ± 1.9 ⁵⁾
	0.5	20.2 ± 2.2	22.7 ± 1.4	25.1 ± 1.7 ^{4,5)}	26.7	24.8	18.5	22.6 ± 3.3 ⁵⁾
柿叶正丁醇	1.0	20.0 ± 2.2	22.0 ± 2.3	24.9 ± 1.8 ⁶⁾	25.6	21.5	15.1	20.4 ± 3.6 ⁶⁾
	0.5	20.3 ± 2.0	22.7 ± 2.0	25.9 ± 1.4 ^{3,5)}	26.5	21.9	16.4	20.9 ± 3.8 ⁶⁾
	0.25	20.4 ± 2.3	22.7 ± 1.2	25.7 ± 2.1 ^{3,5)}	25.4	20.8	15.3	20.2 ± 3.5 ⁶⁾

表 5 柿叶不同极性部位对 S180 实体瘤小鼠抑瘤率、生命延长率、胸腺系数和脾脏系数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 5 Effect of different polarity extracts from Koki Folium on tumor inhibition rate, life prolongation rate, thymus coefficient and spleen coefficient in S180 solid tumor mice ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	瘤重/g	抑瘤率%	生存天数/d	生命延长率 /%	胸腺系数 /mg·10 g ⁻¹	脾脏系数 /mg·10 g ⁻¹
空白	-	-	-	-	-	32.5 ± 2.2	81.7 ± 6.2
模型	-	2.2 ± 0.3 ⁵⁾	-	17.4 ± 1.6	-	21.2 ± 3.5 ¹⁾	69.7 ± 8.3 ¹⁾
环磷酰胺	0.1	0.6 ± 0.2 ^{3,5)}	74.2	26.8 ± 1.0	54.0	18.5 ± 2.9 ⁴⁾	65.3 ± 4.5
柿叶三氯甲烷	1.5	2.2 ± 0.6 ⁵⁾	-0.4	17.9 ± 1.6	2.9	24.2 ± 2.3 ^{4,5)}	70.5 ± 5.2
	0.75	2.2 ± 0.5 ⁵⁾	-1.2	17.6 ± 1.4	1.2	23.4 ± 2.3 ⁵⁾	69.4 ± 8.4
	0.375	2.2 ± 0.3 ⁵⁾	-1.1	17.5 ± 1.5	0.6	23.0 ± 1.5 ⁵⁾	68.2 ± 7.1
柿叶水提	4.0	1.6 ± 0.5 ^{3,5)}	26.5	20.5 ± 1.8	17.8	27.5 ± 4.7 ^{3,5)}	74.3 ± 4.7 ⁵⁾
	2.0	1.7 ± 0.5 ^{3,5)}	23.9	18.7 ± 1.3	7.5	26.1 ± 3.2 ³⁾	73.8 ± 2.5 ⁵⁾
	1.0	2.0 ± 0.3 ⁵⁾	6.7	18.4 ± 1.2	5.8	25.2 ± 1.7 ^{3,5)}	72.5 ± 8.1 ⁶⁾
柿叶乙酸乙酯	2.0	1.3 ± 0.3 ^{3,5)}	38.2	23.7 ± 1.2	36.2	28.4 ± 2.9 ^{3,5)}	79.4 ± 6.7 ^{3,5)}
	1.0	1.6 ± 0.5 ^{3,5)}	28.6	21.2 ± 1.8	21.8	27.9 ± 3.3 ^{3,5)}	78.0 ± 7.9 ^{3,5)}
	0.5	1.9 ± 0.4 ⁵⁾	12.5	18.7 ± 2.1	7.5	26.1 ± 2.1 ^{3,5)}	75.7 ± 6.1 ^{4,5)}
柿叶正丁醇	1.0	1.5 ± 0.3 ^{3,5)}	33.1	19.1 ± 2.8	9.8	25.5 ± 2.4 ^{3,5)}	71.8 ± 7.0 ⁶⁾
	0.5	1.9 ± 0.4 ⁵⁾	13.3	18.5 ± 1.3	6.3	25.2 ± 3.5 ^{3,5)}	69.9 ± 7.3
	0.25	2.0 ± 0.5 ⁵⁾	9.7	18.2 ± 1.9	4.6	24.8 ± 2.0 ^{3,5)}	70.3 ± 5.4

在对 H22 和 S180 两种实体瘤小鼠的影响实验中,环磷酰胺组小鼠摄食量均明显比其他用药组少,体重增加不明显,胸腺系数和脾脏系数值最低,但抑

瘤率和生命延长率却是最高,说明环磷酰胺在抑制肿瘤的同时抑制了食欲,降低了机体的免疫能力,不良反应明显。柿叶三氯甲烷部位各剂量组小鼠摄

食量减少、体重增加不明显的同时瘤重并未减轻,甚至抑瘤率为负值,生存天数几乎与模型组相同,胸腺系数和脾脏系数增加不如其他用药组明显,说明柿叶三氯甲烷部位不仅无抑瘤作用,同时对机体有较明显的不良反应。柿叶乙酸乙酯部位组、正丁醇部位组及水提部位组与模型组和环磷酰胺组比较,能不同程度增加小鼠的摄食量和体重,延长生存时间,增加胸腺系数和脾脏系数。提示柿叶乙酸乙酯部位、正丁醇部位及水提部位对肿瘤有一定抑制作用,而且对机体免疫抑制作用较小。按照《现代肿瘤治疗药理学》关于抗肿瘤中草药有效性的标准,认为抑瘤率 > 30% 有效,对 H22 实体瘤的抑瘤率大于 30% 的有乙酸乙酯部位高、中剂量组,水提部位高剂量组和正丁醇部位高剂量组,对 S180 实体瘤的抑瘤率大于 30% 的只有乙酸乙酯部位高剂量组,且相同剂量的 3 个极性部位对 H22 实体瘤各方面的影响(包括摄食量、体重抑瘤率、生命延长率、胸腺系数等)均比对 S180 实体瘤的明显。

实验结果表明,柿叶乙酸乙酯部位、水提部位和正丁醇部位对 H22 和 S180 荷瘤小鼠有不同程度的抑瘤作用,可为柿叶抑瘤作用的有效部位,其中乙酸乙酯部位作用最明显,且在同等剂量下,各有效部位对小鼠 H22 实体瘤和腹水瘤的抑制作用比对 S180 实体瘤更显著。本实验处于柿叶抑瘤作用研究的初探阶段,需对有效部位进一步分离和纯化,应用高纯度的成分进行药效学实验,对其机制进行深入研究。

[参考文献]

[1] 姜红波,赵卫星,冯国栋,等. 柿叶的主要有效成分及药理作用研究进展[J]. 化工时刊,2010,24(6):38-44.
[2] 辛宁,丰杰,姚波. 柿叶黄酮类提取分离及药理作用研究概况[J]. 中医药学报,2007,35(2):49-51.

[3] Kalousova M, Skrha J, Zima T. Advanced glycation end products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus [J]. *Physiol Res*, 2002, 51(6):597-604.
[4] 欧阳平,张彬,贝伟剑,等. 柿叶黄酮对肿瘤坏死因子 α 诱导大鼠血管平滑肌细胞凋亡信号调节激酶 1 表达的影响[J]. 中药材,2007,30(7):819-821.
[5] 李凤英,李润丰,赵希艳,等. 60 种花卉多酚、黄酮含量及其抗氧化活性[J]. 经济林研究,2011,29(3):59-63.
[6] 纪莉莲,张强华,崔桂友. 柿叶抗菌活性的研究及活性成分的分离鉴定[J]. 食品科学,2003,24(3):129-131.
[7] 陈丽,梁宇红,马新博,等. 柿叶总黄酮对高脂血症大鼠血脂和血液流变学的影响[J]. 中成药,2011,33(8):1397-1400.
[8] 胡忠泽,王立克,杨久峰,等. 柿叶水提物对糖尿病小鼠降血糖作用的实验研究[J]. 中国中医药科技,2006,16(5):333-334.
[9] 唐秀能,张志伟,黄仁彬,等. 柿叶水提物抗肿瘤作用实验研究[J]. 中国药师,2009,12(1):31-33.
[10] Moon S H. Anti-tumor effect of persimmon leaves *in vivo* using sarcoma-180 [J]. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 1996, 25(5):865-870.
[11] 邓航,温庆伟,罗昱澜,等. 柿叶不同溶剂萃取物对糖尿病小鼠抗氧化能力的影响[J]. 中南大学学报:医学版,2012,37(5):469-473.
[12] 井小会,张灿珍,王羽丰. 人参皂甙 Rg3 对小鼠肝癌 H22 腹水瘤的治疗研究[J]. 临床肿瘤学杂志,2007,12(7):522-525.
[13] 牛凤兰,董卿,宋丽君,等. 柿叶提取物体外抑瘤作用初步研究[J]. 食品科学,2007,28(8):475.
[14] 马新博,唐荣兰,宫汝飞,等. 柿叶黄酮对人肝癌 SMMC-7721 细胞形态学影响的初步研究[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2012,33(12):1583.

[责任编辑 周冰冰]