

# 白花蛇舌草和半枝莲微粉配伍 对小鼠 H22 肝癌细胞周期及凋亡的影响

隋在云\*,王爱洁

(山东省中医药研究院, 济南 250014)

**[摘要]** 目的:通过研究白花蛇舌草和半枝莲微粉配伍对小鼠 H22 肝癌细胞周期及凋亡的影响,初步探讨其抗 H22 肝癌的作用机制。方法:昆明种小鼠 50 只,接种 H22 细胞 24 h 后,随机分为模型对照组,白花蛇舌草和半枝莲普通粉 15.6 g·kg<sup>-1</sup>组,白花蛇舌草和半枝莲微粉低、中、高剂量(7.8,11.7,15.6 g·kg<sup>-1</sup>)组 5 组。ig,模型组给予生理盐水 ig,10 d 后,流式细胞术观察药物对小鼠移植性肿瘤 H22 肝癌细胞周期、凋亡率、细胞增殖指数(PI)的影响。结果:白花蛇舌草和半枝莲微粉 15.6 g·kg<sup>-1</sup>剂量组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 细胞百分比,细胞增殖指数(PI)及凋亡指数(AI)分别为(58.72 ± 6.62)%,(41.28 ± 6.62)%,(36.11 ± 4.83)%(n = 10),与模型对照组(27.48 ± 1.75)%,(72.52 ± 1.75)%,(13.72 ± 4.56)%(n = 10)相比,有显著差异;与普通粉组(43.24 ± 4.30)%,(56.76 ± 4.30)%,(25.41 ± 4.00)%(n = 10)相比,也有统计学差异(P < 0.05)。结论:白花蛇舌草和半枝莲微粉配伍能够抑制小鼠 H22 肝癌移植瘤的生长,其机制可能与阻滞细胞于 G<sub>1</sub>→S 期,促进肿瘤细胞凋亡,减少增殖有关。

**[关键词]** 白花蛇舌草和半枝莲;微粉配伍;H22 肝癌;细胞周期;细胞凋亡

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2012)23-0290-03

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121012.0914.010.html>

**[网络出版时间]** 2012-10-12 9:14

原发性肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,每年约有 11 万人死于肝癌,肝癌的病机相当复杂,主要病因有乙型和丙型肝炎病毒感染、黄曲霉素以及饮水污染等,这些都属于中医“毒”的范畴,“毒”是肝癌的基本病机之一。白花蛇舌草、半枝莲具有较好的抗病毒作用<sup>[1]</sup>,在中药中属清热解毒之品。二者配伍属于相须相使配伍中同类配伍,符合中医“七情和合”理论和组合原则,具备复方的基本疗效。本实验旨在研究白花蛇舌草和半枝莲微粉配伍对小鼠 H22 肝癌细胞周期及凋亡的影响。

## 1 材料

**1.1 药物** 白花蛇舌草、半枝莲购于济南建联药店,经山东省中医药研究院中药资源室林惠彬教授鉴定,白花蛇舌草为茜草科植物 *Oldenlandia diffusa* (Willd.) Roxb. 的干燥全草,半枝莲为唇形科黄芩属植物 *Scutellaria barbata* D. Don 的干燥全草。按 1:1 处方配伍称取各药味,按相应 SOP 采用 FW-177 型粉碎机制备普通粉备用。采用贝利微粉粉碎机制

备超微粉备用。以沸水配成实验用药。

**1.2 动物与瘤株** 昆明种小鼠 60 只,体重 18 ~ 22 g,SPF 级,由山东大学实验动物中心提供。许可证号 SCXK(鲁)20030004,合格证号 0006203。H22 肝癌细胞株,由山东省医学科学院提供。

**1.3 试剂** 0.9% 氯化钠注射液(山东鲁抗辰欣药业有限公司生产,批号 20071011),碘化丙啶(PI, Sigma 公司,货号 037K3676),核糖核酸酶 A (Sigma,货号 015K7715)。

**1.4 仪器** FW-177 型中草药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司),BFM-6BI 型贝利微粉机(济南倍力粉技术工程有限公司),FACS Calibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司)。

## 2 方法

**2.1 造模与分组** 无菌条件下,取传代 7 ~ 9 d 的腹水型 H22 肝癌小鼠,颈椎脱臼法处死,腹部皮肤消毒后剪开,剥去腹部皮肤,抽取腹水放入无菌容器中,生理盐水稀释成约含 1 × 10<sup>6</sup>/mL H22 瘤细胞的瘤细胞悬液备用,冰浴保存。健康昆明种小鼠,无菌条件下每只鼠右前肢腋窝皮下接种制备好的瘤细胞悬液 0.2 mL/只,制备实体瘤模型。24 h 后将接种 H22 瘤细胞悬液的小鼠随机分为模型组、白花蛇舌草和半枝莲普通粉 15.6 g·kg<sup>-1</sup>组,白花蛇舌草和半

**[收稿日期]** 20120517(004)

**[基金项目]** 山东省中医药科技发展计划项目(2007-106)

**[通讯作者]** \*隋在云,硕士,研究员,从事中药药理、毒理研究工作, Tel: 0531-82949836, E-mail: zy\_505@163.com

枝莲微粉低、中、高剂量(7.8, 11.7, 15.6 g·kg<sup>-1</sup>)组,共5组,每组10只。ig给药,1次/d,给药组ig给予相应药物20 mL·kg<sup>-1</sup>小鼠体重,模型组ig等容积的生理盐水,连续10 d。

**2.2 对肿瘤生长的影响** 于末次给药后24 h,颈椎脱臼法处死荷瘤小鼠,称体重,然后用手术剪钝性剥离肿瘤,精密天平称瘤质量,按下式计算抑瘤率<sup>[2]</sup>:

$$\text{抑瘤率} = (\text{模型组平均瘤质量} - \text{给药组平均瘤质量}) / \text{模型组平均瘤质量} \times 100\%$$

**2.3 肿瘤细胞周期及凋亡指数检测** 每鼠取适量剩余新鲜肿瘤组织,用眼科剪刀轻轻剪碎,用300目尼龙网过滤至离心管中,细胞经PBS液洗涤2次(1 000 r·min<sup>-1</sup>, 5 min),加70%冷乙醇4℃固定24 h, PBS液洗涤1次,然后加核糖核酸酶A(200 mg·L<sup>-1</sup>) 37℃ 1 h,再加PI(20 mg·L<sup>-1</sup>) 4℃避光染色30 min后流式细胞仪检测分析。其中凋亡指数(apoptosis index, AI) = 凋亡细胞数 / (凋亡细胞数 + 正常细胞数) × 100%; 细胞增殖指数(proliferation index, PI) = [S + (G<sub>2</sub> - M)] / [(G<sub>0</sub> - G<sub>1</sub>) + S + (G<sub>2</sub> - M)] × 100%<sup>[3]</sup>。

**2.4 数据处理** 所有数据用SPSS 13.0软件包进行处理,对所得计数资料进行方差分析,组间比较用t检验,分类资料进行Ridit分析。P < 0.05为有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对H22小鼠抑瘤率的影响** 与模型对照组相比,白花蛇舌草和半枝莲配伍各给药组H22肿瘤

瘤质量明显减轻,并且抑瘤率在35.87%~47.55%间。与白花蛇舌草和半枝莲普通粉组比较,微粉15.6 g·kg<sup>-1</sup>剂量组瘤质量明显减轻;微粉7.8 g·kg<sup>-1</sup>剂量组(普通粉1/2剂量)瘤质量也有减轻的趋势,但无统计学差异。见表1。

表1 白花蛇舌草和半枝莲微粉配伍对H22小鼠抑瘤率的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	瘤质量 /g	抑瘤率 /%
模型	-	2.004 ± 0.457	-
白花蛇舌草和半枝莲普通粉	15.6	1.285 ± 0.396 <sup>1)</sup>	35.87
白花蛇舌草和半枝莲微粉	7.8	1.147 ± 0.361 <sup>2)</sup>	42.78
	11.7	1.100 ± 0.427 <sup>2)</sup>	45.12
	15.6	1.051 ± 0.331 <sup>2,3)</sup>	47.55

注:与模型对照组比较<sup>1)</sup>P < 0.01, <sup>2)</sup>P < 0.001;与白花蛇舌草和半枝莲普通粉组比较<sup>3)</sup>P < 0.05。

**2.2 对肿瘤细胞周期及凋亡的影响** 与模型组相比,白花蛇舌草和半枝莲微粉15.6 g·kg<sup>-1</sup>剂量组G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞明显增多,G<sub>2</sub>/M、S期细胞明显减少,PI显著降低,AI升高;白花蛇舌草和半枝莲微粉11.7 g·kg<sup>-1</sup>剂量组G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞明显增多,S期细胞明显减少,PI显著降低,AI升高;白花蛇舌草和半枝莲微粉7.8 g·kg<sup>-1</sup>剂量组,S期细胞明显减少,AI升高。与普通粉组比较,白花蛇舌草和半枝莲微粉15.6 g·kg<sup>-1</sup>剂量组G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞明显增多,PI显著降低,AI上升。见表2。

表2 白花蛇舌草和半枝莲微粉对肿瘤细胞周期,PI,AI的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub> /M	S	PI	AI
模型	-	27.48 ± 1.75	44.16 ± 2.07	28.35 ± 0.45	72.52 ± 1.75	13.72 ± 4.56
白花蛇舌草和半枝莲普通粉	15.6	43.24 ± 4.30 <sup>2)</sup>	40.89 ± 9.58	15.86 ± 5.89 <sup>1)</sup>	56.76 ± 4.30 <sup>2)</sup>	25.41 ± 4.00 <sup>1)</sup>
白花蛇舌草和半枝莲微粉	7.8	32.08 ± 7.75	43.12 ± 4.43	19.29 ± 4.72 <sup>1)</sup>	62.41 ± 7.75	22.86 ± 2.40 <sup>1)</sup>
	11.7	41.40 ± 6.48 <sup>1)</sup>	42.25 ± 2.10	16.35 ± 5.31 <sup>1)</sup>	58.60 ± 6.48 <sup>1)</sup>	26.95 ± 1.32 <sup>2)</sup>
	15.6	58.72 ± 6.62 <sup>2,4)</sup>	28.15 ± 6.07 <sup>1)</sup>	13.13 ± 1.81 <sup>3)</sup>	41.28 ± 6.62 <sup>2,4)</sup>	36.11 ± 4.83 <sup>2,4)</sup>

注:与模型对照组比较<sup>1)</sup>P < 0.05, <sup>2)</sup>P < 0.01, <sup>3)</sup>P < 0.001;与白花蛇舌草和半枝莲普通粉组比较<sup>4)</sup>P < 0.05。

### 4 讨论

**4.1 微粉入药的意义** 复方是中医中药的重要组成部分,强调中药之间的配伍和全成分入药。中药活性成分或活性组分是中药药理作用的物质基础。超微粉碎可将细胞打碎,使中药材细胞破壁率达95%。细胞经破壁后,胞内有效成分可充分暴露出

来,使储存于细胞内和细胞间的有效成分直接接触提取用溶媒,或直接与机体受体结合,发挥治疗效果<sup>[4]</sup>。超微粉碎既提高了中药材的生物利用度,又保留了中药材的质、气、味,四气五味尤存<sup>[5]</sup>,有利于中药的全成分用药,为中药复方的应用与研究提供了更大的发展空间。

**4.2 白花蛇舌草和半枝莲配伍应用治疗肝癌** 周仲瑛教授认为癌毒是肿瘤发生发展的关键。是肿瘤患者在正虚的基础上因体内邪盛而生毒,癌毒与痰浊、瘀血、湿浊、热毒等病理因素同时胶结存在、互为因果,亦可兼夹转化、共同为病。在“癌毒”理论指导下,以“消癌解毒,益气养阴”为法,张玉等发现消癌解毒方(白花蛇舌草、半枝莲、漏芦等配伍方)对 H22 肿瘤有抑制作用,机制可能与其诱导肿瘤细胞凋亡,抑制 MMP-2 活性有关<sup>[6]</sup>。张赛丹等采用超声提取白花蛇舌草:半枝莲质量比 3:2 的多糖成分,培养人肝癌细胞系 7402 细胞株进行体外抑瘤实验,经测定其多糖有一定的抗肿瘤活性<sup>[7]</sup>。我们前期研究表明白花蛇舌草和半枝莲配伍在抗 H22 肝癌方面的应用中,较单用其中任一味药效果更好,1:1 配伍后的药效比任一味药简单的剂量加倍效果更好,可抑制 H22 瘤体生长,且下调 Bcl-2 蛋白表达,上调 Bax 蛋白表达<sup>[8]</sup>。

**4.3 细胞周期与细胞凋亡** 在细胞周期中,周期因子(cyclins)调节依赖性激酶(cyclin dependent kinase, CDK)的活性,而 CDK 控制着细胞周期各时相之间的顺序转换<sup>[9]</sup>在细胞周期各时相之间的顺序转换中,真核细胞分裂必须通过 G<sub>1</sub>期至 S 期的转换开始进行 DNA 合成<sup>[10]</sup>。在 G<sub>1</sub>后期,“限制点”(restriction point)决定细胞是否增殖,一旦通过限制点进入 S 期,细胞就不能按自己的愿望停止增殖。细胞周期的理论认为,细胞周期如果失去控制,结果将导致肿瘤的发生<sup>[11]</sup>。细胞凋亡是指为维持内环境稳定,由基因控制的细胞自主的有序性死亡过程。本研究结果显示:与模型组相比,白花蛇舌草和半枝莲微粉 15.6 g·kg<sup>-1</sup>剂量组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞明显增多, G<sub>2</sub>/M, S 期细胞明显减少,PI 显著降低, AI 升高;白花蛇舌草和半枝莲微粉 11.7 g·kg<sup>-1</sup>剂量组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞明显增多, S 期细胞明显减少, PI 显著降低, AI 升高;白花蛇舌草和半枝莲微粉 7.8 g·kg<sup>-1</sup>剂量组, S 期细胞明显减少, AI 升高。与普通粉组比较,白花蛇舌草和半枝莲微粉 15.6 g·kg<sup>-1</sup>剂量组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞明显增多, PI 显著降低, AI 上升。且白花

蛇舌草和半枝莲配伍微粉 7.8 g·kg<sup>-1</sup>剂量组抑瘤效果与白花蛇舌草和半枝莲普通粉 15.6 g·kg<sup>-1</sup>组相当。表明白花蛇舌草和半枝莲微粉 1:1 配伍对小鼠肝癌 H22 细胞的生长有抑制作用,其机制可能与调节细胞周期,阻滞细胞于 G<sub>1</sub>→S 期,促进肿瘤细胞凋亡有关。

#### [参考文献]

- [1] 刘春英,王哲,郝宏宽,等. 肺癌平诱导 Lewis 肺癌小鼠肿瘤细胞凋亡的形态学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(2): 46.
- [2] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1991:513.
- [3] 张会军,阎蕴力,阴梅云,等. 川芎嗪对依托泊苷诱导小细胞肺癌细胞凋亡的增敏作用[J]. 实用肿瘤杂志, 2004, 19(3): 229.
- [4] 江一唱,刘云海. 超微粉碎对复方中药药效的影响[J]. 中国药师, 2011, 14(9): 1352.
- [5] 方邦江,陈浩,郭全,等. 中药超微粉的优势及应用前景[J]. 中国中医药现代远程教育, 2010, 8(18): 208.
- [6] 张玉,吴勉华,陈海彬,等. 消癌解毒方体内抑瘤作用机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11): 234.
- [7] 张赛丹,方岩雄,陈敏敏. 几种传统中药中多糖的提取及抗肿瘤活性研究[J]. 中药材, 2007, 30(2): 179.
- [8] 刘瑾. 白花蛇舌草和半枝莲配伍微粉对移植性小鼠肝癌组织 Bcl-2, Bax 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 227.
- [9] Santamaria D, Ortega S. Cyclins and CDKs in development and cancer: lessons from genetically modified mice[J]. Front Biosci, 2006, 11: 1164.
- [10] 钟声,徐永健,张珍祥. 外源 CC10 基因对肺腺癌 A549 细胞细胞周期蛋白 D1mRNA 表达的影响[J]. 实用医学杂志, 2008, 24(10): 1674.
- [11] Hartwell L H, Kastan M B. Cell cycle control and cancer[J]. Science, 1994, 266: 1821.

[责任编辑 聂淑琴]