

荞麦花叶提取物抗氧化活性与抑瘤作用的实验研究

郭兰¹, 赵志宇², 韩淑英^{1*}

(1. 河北联合大学, 河北 唐山 063000; 2. 河北联合大学附属医院, 河北 唐山 063000)

[摘要] 目的:研究荞麦花叶提取物(extraction of buckwheat flower and leaf, EBFL)对肿瘤的抑制作用及其对荷瘤鼠体内抗氧化能力的影响。方法:建立 S180 小鼠实体瘤和腹水瘤模型,80 只昆明种小鼠随机分为 4 组:模型组、EBFL 200,400 mg·kg⁻¹剂量组 ig 给药、环磷酰胺(CTX,25 mg·kg⁻¹)ip 组。所有动物每日给药 1 次,连续给药 20 d,测定 EBFL 给药后各处理组小鼠实体瘤重,腹水瘤小鼠体重和腹围增长速度,治疗组和对对照组观察时间结点为 25 d,计算各组平均生存率,以及全血谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)及血浆超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量。结果:EBFL 处理 15 d,荷瘤小鼠腹水增长、体重增长明显减慢,与模型组比较 $P<0.05$ 。EBFL 处理组腹水瘤小鼠生存率达 25%。EBFL 对肿瘤的生长有一定的抑制作用,但仍未达到 CTX 的水平。与对照组相比,EBFL(L,H)均可升高荷瘤小鼠血清中 GSH-Px 活性($P<0.05$, $P<0.01$);EBFL(H)组小鼠血清 SOD 活性与对照组相比显著升高($P<0.05$),作用效果与 CTX 相似;与对照组相比,EBFL(L,H)处理均可以显著降低小鼠血清 MDA 水平($P<0.05$)。结论:荞麦花叶提取物对 S180 荷瘤小鼠有一定的抑制作用,能抑制荷瘤小鼠腹水生长,延长荷瘤小鼠生存率,这可能与提高实验小鼠体内的 GSH-Px 和 SOD 的活性,降低 MDA 含量有关。

[关键词] 荞麦花叶提取物; 抗肿瘤; 抗氧化; 自由基

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)23-0176-04

Study on Antioxidative and Antitumor Effect
of Extraction of Buckwheat Flower and Leaf

GUO Lan¹, ZHAO Zhi-yu², HAN Shu-ying^{1*}

(1. Department of Pharmacology, Hebei United University, Tangshan 063000, China;

2. The Affiliated Hospital of Hebei United University, Tangshan 063000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the antioxidative and antitumor effects of buckwheat flower and leaf extracts on S180 tumor-bearing mice. **Method:** The mice S180 tumor model was established; the model groups were divided into extraction of buckwheat flower and leaf (EBFL) -low group (200 mg·kg⁻¹), EBFL-high group (400 mg·kg⁻¹), and combined with cydophosphamide (CTX, 25 mg·kg⁻¹). The solid tumor weight, ascites tumor weight and abdominal circumference growth rate and survival rate were measured after administration. glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content were determined. **Result:** After EBFL treatment for 15 d, the symptom of body weight loss was ameliorated and the growth of tumor was inhibited in tumor-bearing mice. EBFL (L, H) treatment could increase the levels of serum GSH-Px ($P<0.05$, $P<0.01$) and the activity of SOD in EBFL (H) group was obviously increased ($P<0.05$) compared with those of control group. The effect was similar to CTX. Compared with control group, the level of MDA was decreased significantly in tumor-bearing mice. **Conclusion:** EBFL can inhibit the growth of S180 mouse in a certain extent, which may be related to the increasing GSH-Px and SOD activity and decreased MDA content.

[Key words] extraction of buckwheat flower and leaf; antioxidative; free radical; antitumor

[收稿日期] 20120418(010)
[基金项目] 河北省卫生厅 2012 年度医学科学重点项目(20120402);河北省中医药管理局科研计划项目(2012045);唐山市科技攻关项目(111302025b)
[第一作者] 郭兰, 硕士, 讲师, 从事肿瘤药理研究, Tel:15531583007, E-mail:guolanuser@163.com
[通讯作者] * 韩淑英, 教授, 硕士生导师, 从事中药药理研究, Tel:0315-3726472, E-mail:shuyinghan59@163.com

随着自由基生物化学和自由基生物学的发展,自由基与肿瘤的关系越来越引起人们的关注,不少资料证明,肿瘤的发生发展与自由基关系密切^[1-2],肿瘤组织内自由基含量与相应健康组织相比,也有很大的差异。因此人们试图从自由基角度探索肿瘤防治的新途径,用中草药和天然植物作为抗氧化剂来清除自由基,提高自身保护能力,防治肿瘤的发生发展,已成为抗肿瘤研究的一个重点^[3-4]。有研究表明,荞麦中的生物活性物质具有显著的降血脂、降血糖功能,有降低血管脆性及异常的通透性、抑制血小板聚集、抗氧化、影响血管活性物质、抗炎、强心、解痉等作用^[5-8]。但有关甜荞麦提取物抗肿瘤作用及机制的研究国内外尚未见过报道。本研究以S180实体瘤及腹水瘤小鼠为研究对象,观察荞麦花叶提取物(EBFL)对S180荷瘤小鼠肿瘤的抑制作用及对体内抗氧化功能的影响,进一步探讨EBFL抗肿瘤的可能机制。

1 材料

1.1 药品和试剂 荞麦花叶取秋冬霜冻未结果的甜荞麦花和叶(采自内蒙古季因库伦旗)。用10倍量700 mL·L⁻¹乙醇回流提取3次(时间依次为60,30,30 min,温度70℃),合并3次滤液,用旋转蒸发器回收乙醇,并浓缩成膏状,经70℃烘干即为荞麦花叶提取物(EBFL),批号0090-1006。环磷酰胺(CTX,上海华联制药有限公司,批号080612)。超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒、丙二醛(MDA)测定试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒购自南京建成生物科技发展公司(批号110712)。

1.2 动物及瘤株 SPF级健康昆明种小鼠,雌雄各半,体重(19±3)g,由中国医学科学院实验动物研究所提供,动物许可证号SCXK(京)2009-0004。饲料为中国医学科学院实验动物研究所提供。小鼠S180细胞由河北联合大学预防医学院馈赠。

1.3 仪器 电子天平(上海第二天平仪器厂)、皮尺(自备)。

2 方法

2.1 动物荷瘤造模

2.1.1 复制腹水型荷瘤小鼠模型^[9-10] 取小鼠腹腔内传代7d的瘤细胞,生理盐水稀释后计数并调细胞数到1×10⁷个/mL,接种于小鼠腹腔,每只小鼠接种上述细胞悬液0.2 mL。

2.1.2 复制实体瘤小鼠模型^[11]:取小鼠腹腔内传代7d的瘤细胞,计数并调细胞到1×10⁷个/mL,接种于小鼠右前肢腋下皮下,每只鼠接种细胞量为2×

10⁶个。

2.2 动物的分组和处理 腹水型建模后将小鼠随机分为4组,每组10只,分别为:模型对照组(生理盐水)、CTX阳性对照组(25 mg·kg⁻¹)ip给药、EBFL低、高剂量组(200,400 mg·kg⁻¹)。均采用灌胃给药。所有动物每日给药1次,连续给药20 d。腹水型小鼠一般观察:小鼠食量、行为表现、外观体征、精神状态、粪便性状等生存质量;每5 d称体重、测量腹围一次、记录各组小鼠死亡情况、生存日数,治疗组和对照组观察时间结点为25 d,计算各组平均生存率。

平均生存期 = 实验组动物生存时间总和/实验组动物数
生存率 = [25 d动物存活数/实验组动物数] × 100%

实体瘤小鼠造膜、分组、给药同上,给药20 d,停药后解剖皮下瘤块,剥离瘤组织,称重,计算肿瘤生长抑制率(IR)。

抑瘤率 = [(对照组平均瘤重 - 给药组平均瘤重)/对照组平均瘤重] × 100%

2.3 GSH-Px, SOD活性及MDA含量测定 实体瘤小鼠于停药后次日称体重,将小鼠摘眼球放血眼眶采血加入抗凝试管中,按试剂盒方法测定全血GSH-Px活性,剩余抗凝血经离心分离血浆,按试剂盒方法测定SOD活性和MDA含量。

2.4 统计方法 实验数据整理后,Excel建库,用SPSS 11.5统计软件包进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较用方差分析检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对荷瘤小鼠腹水生长及体重的影响 荷瘤小鼠在接种S180腹水瘤株6 d左右,可见到小鼠腹部逐渐增大,各给药组小鼠体重和腹围增长速度较模型对照组为慢。用药过程中,用药组小鼠活动、饮食、精神状况较模型对照组佳。结果见表1~2。

3.2 对S180腹水瘤小鼠平均生存期和存活率的影响 小鼠25 d生存率以EBFL-H(58.33%)最高,EBFL-L(50%)其次,CTX组小鼠生存率最低(17.81%)。见表3。

3.3 对S180实体瘤小鼠抑瘤率的影响 与对照组相比,CTX组瘤重明显减轻($P < 0.01$),EBFL高、低剂量组对S180肉瘤的生长有一定的抑制作用,但与模型相比无统计学意义。见表4。

3.4 对荷瘤小鼠血清GSH-Px, SOD活性和MDA含量的影响 与对照组相比,EBFL(L, H)均可升高荷瘤小鼠血中GSH-Px活性($P < 0.05$, $P < 0.01$);

表 1 荞麦花叶提取物对荷瘤小鼠腹围的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)cm

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	治疗前	治疗后			
			5 d	10 d	15 d	20 d
模型	—	6. 80 ± 0. 47	8. 01 ± 0. 78	8. 92 ± 1. 15	9. 79 ± 1. 84	9. 95 ± 1. 74
EBFL	200	6. 78 ± 0. 50	7. 47 ± 0. 68 ¹⁾	8. 28 ± 0. 99 ⁴⁾	9. 15 ± 1. 36 ⁴⁾	9. 51 ± 1. 73 ⁴⁾
	400	6. 79 ± 0. 52	7. 23 ± 0. 81 ²⁾	7. 96 ± 1. 21 ¹⁾	8. 66 ± 1. 63 ¹⁾	9. 22 ± 1. 27 ³⁾
CTX	25	6. 82 ± 0. 48	7. 03 ± 0. 70 ²⁾	7. 38 ± 0. 96 ²⁾	7. 94 ± 1. 46 ²⁾	8. 27 ± 1. 53 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0. 05$, ²⁾ $P < 0. 01$;与环磷酰胺组比较³⁾ $P < 0. 05$, ⁴⁾ $P < 0. 01$ (表 2 ~ 4 同)。

表 2 荞麦花叶提取物对荷瘤小鼠体重的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)g

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	治疗前	治疗后			
			5 d	10 d	15 d	20 d
对照	—	20. 37 ± 2. 11	22. 97 ± 2. 13	28. 58 ± 3. 17	30. 47 ± 4. 17	33. 95 ± 3. 95
EBFL	200	20. 28 ± 1. 97	22. 52 ± 2. 16	27. 36 ± 3. 12 ⁴⁾	29. 13 ± 3. 44 ⁴⁾	32. 24 ± 4. 27 ⁴⁾
	400	20. 19 ± 2. 02	22. 40 ± 2. 31	26. 85 ± 3. 03 ³⁾	28. 56 ± 3. 53 ³⁾	31. 22 ± 3. 74 ³⁾
CTX	25	20. 32 ± 1. 95	21. 03 ± 1. 94 ¹⁾	24. 42 ± 1. 93 ²⁾	26. 28 ± 2. 73 ²⁾	27. 27 ± 3. 02 ²⁾

表 3 荞麦花叶提取物对 S180 腹水瘤小鼠
平均生存期和存活率的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	生存期/d	生存率/%
模型	—	18. 87 ± 6. 10 ⁴⁾	20. 83
EBFL	200	22. 00 ± 5. 54	50. 00
	400	23. 25 ± 4. 67 ²⁾	58. 33
CTX	25	15. 67 ± 4. 66 ¹⁾	17. 81

表 4 EBFL 对 S180 实体瘤小鼠肿瘤
抑制率的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	瘤重/g	抑瘤率/%
模型	—	3. 25 ± 0. 48 ⁴⁾	—
EBFL	200	2. 64 ± 0. 37 ⁴⁾	18. 46
	400	2. 44 ± 0. 46 ⁴⁾	20. 90
CTX	25	1. 88 ± 0. 32 ²⁾	42. 65

EBFL(H)组小鼠血清 SOD 活性与对照组相比显著升高($P < 0. 05$) ;与对照组相比,EBFL(L,H)处理均可以显著降低小鼠血清 MDA 水平($P < 0. 05$)。见表 5。

4 讨论

机体内自由基含量与肿瘤的关系甚为密切,这已为众多的资料所证实,肿瘤的生长可激发和活跃

荷瘤机体的自由基代谢,产生大量的活性氧自由基,后者能导致荷瘤机体整体机能的紊乱。使与肿瘤生长密切相关的免疫机能低下,因为活性氧自由基能损伤 DNA,并阻止其修复而发生细胞突变;损伤核甘辅酶使细胞生化代谢紊乱;攻击细胞膜上多不饱和脂肪酸,引起过强的细胞膜脂质过氧化反应,从而氧化-SH 基,使酶失活,膜受损,干扰细胞功能。SOD 和 GSH-Px 是体内重要的抗氧化酶,可使超氧阴离子 O₂⁻、H₂O₂ 及脂质过氧化物等毒性自由基变成低毒性物质,这对保护机体免受自由基损伤十分重要。本实验结果提示荞麦花叶提取物具有提高机体抗氧化酶活性的作用,给药后荷瘤小鼠 SOD 和 GSH-Px 活性显著增加,并改善了荷瘤鼠抗氧化酶活性低下的状况,由于加强了抗氧化能力,使因肿瘤生长而激发的活跃的自由基代谢得到有效限制,过氧化反应减弱,减少了过多产生的自由基对机体的损伤,机体的总体状态和明显好于肿瘤对照组,故肿瘤的生长速度慢,瘤块小。通过实验我们认为,荞麦花叶提取物能有抑制荷瘤小鼠腹水生长,延长荷瘤小鼠生存期,提高荷瘤小鼠抗氧化酶活性,加强机体抗氧化能力,减少 MDA 的产生,这可能是其抑制 S180 生长的机制之一。

表 5 EBFL 对荷瘤小鼠 GSH-Px,SOD 活性和 MDA 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	SOD/U·mL ⁻¹	GSH-Px/U·mL ⁻¹	MDA/mmol·mL ⁻¹
模型	—	109. 22 ± 7. 61	324. 44 ± 81. 94	14. 26 ± 1. 67
EBFL	200	134. 46 ± 8. 21 ³⁾	436. 66 ± 56. 78 ^{1,3)}	9. 32 ± 0. 73 ^{1,3)}
	400	147. 67 ± 8. 57 ¹⁾	543. 99 ± 62. 16 ^{1,3)}	7. 91 ± 0. 68 ^{1,3)}
CTX	25	158. 95 ± 8. 82 ¹⁾	312. 35 ± 71. 74	10. 97 ± 0. 86

当归四逆汤对 BALB/c 硬皮病小鼠皮肤组织中 CTGF,TGF-β 含量的影响

王振亮*, 宋建平, 张晓艳, 贾丽丽, 崔庆安
(河南中医学院仲景医药研究所, 郑州 450008)

〔摘要〕 目的:观察当归四逆汤对 BALB/c 硬皮病小鼠皮肤组织及其结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)、转化生长因子(transforming growth factor,TGF)β 含量的影响。方法:选 8 周龄近交系 BALB/c 小鼠 60 只,剃去背部中央区被毛,随机分为 5 组,每组 12 只。模型组和观察组小鼠背部皮内注射 100 μL (200 mg·L⁻¹)博来霉素(BLM)溶液,每天 1 次,连续 3 周。正常组小鼠用磷酸盐缓冲液(PBS)0.1 mL 做背部皮内注射。造模成功后,各组按 20 mL·kg⁻¹容量灌胃,连续 3 周。当归四逆汤高、中、低剂量组(39,23.4,7.8 g·kg⁻¹)。正常组和模型组给等容量生理盐水。实验结束处死动物,切取小鼠背部注射区皮组织,部分剪碎后与生理盐水研磨成 2% 组织浆,3 000 r·min 离心 10 min,取部分上清液,用 ELISA 法测定 CTGF,TGF-β 的含量。部分组织固定于 10% 甲醛液,石蜡包埋,苏木素 2 伊红(HE)染色和 Masson 三色染色,分别用彩色病理图像分析系统和细胞免疫组织化学定量分析系统测定皮肤厚度和纤维化指数。结果:当归四逆汤高、中、低剂量均能减轻 BLM 致硬皮病小鼠的真皮厚度高、中剂量组分别为(25.22±2.35),(29.13±2.03) μm,P<0.01;低剂量组为(29.95±2.85) μm,P<0.05);高、中剂量组能降低硬皮病小鼠皮肤纤维化指数,分别为(86 615±8 403),(103 174±18 439),P<0.01;皮肤组织中 CTGF 分别为(160.2±35.7),(109.5±28.6) ng·L⁻¹,P<0.01,TGF-β 的含量分别为(48.48±4.95),(63.30±7.32) ng·L⁻¹,P<0.01),而且存在明显的量效关系。结论:当归四逆汤能使模型小鼠的皮肤硬化得到改善,对其皮肤组织中的 CTGF,TGF-β 含量有降低作用。

〔关键词〕 硬皮病模型;当归四逆汤;小鼠;结缔组织生长因子、转化生长因子-β
〔中图分类号〕 R285.5 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2012)23-0179-04
〔网络出版地址〕 <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121012.0934.018.html>
〔网络出版时间〕 2012-10-12 9:34

〔收稿日期〕 20120322(009)
〔基金项目〕 国家自然科学基金项目(81072716)
〔通讯作者〕 *王振亮,医学博士,博士后,教授,主任医师,从事中西医结合风湿免疫病的研究,Tel:15936286885,E-mail:wazhli@sohu.com

〔参考文献〕

[1] 康鲁东,蔡景龙,胡国强,等.肿瘤患者血清超氧化物歧化酶活性及脂质过氧化物含量的测定[J].山东医科大学学报,1994,32(4):293.

[2] 莫简,吕问,孙淑芬,等.医用自由基生物学导论[M].北京:人民卫生出版社,1989.

[3] 张群豪,林志彬.灵芝多糖 GL-B 的抑瘤作用和机制研究[J].中国中西医结合杂志,1999,19(9):544.

[4] 李建恒,张杏红.抗肿瘤中药多糖研究进展[J].中医药学报,1998,26(4):46.

[5] 江苏新医学院.中药大辞典[M].上海:上海科学技术出版社,1995:1595.

[6] 韩淑英,刘淑梅,朱丽莎,等.荞麦花总黄酮对高脂血症大鼠血管活性物质和血液流变学的影响[J].西北药学杂志,2003,18(2):64.

[7] 韩淑英,朱丽莎,刘淑梅,等.荞麦叶总黄酮调血脂及抗脂质过氧化作用[J].中国煤炭医学杂志,2002,5(7):711.

[8] 韩淑英,吕华,朱丽莎,等.荞麦种子总黄酮降血脂、血糖及抗脂质过氧化作用的研究[J].中国药理学通报,2001,17(6):694.

[9] Bohle A,Jurczok A,Ardelt P,et al. Inhibition of bladder carcinoma cell adhesion by oligopeptide combinations *in vitro* and *in vivo*[J]. J Urol,2002,167(1):357.

[10] Xiao Z, McCallum T J, Brown K M, et al. Characterization of a novel transplantable or thotopic rat bladder transitional cell tumour model[J]. Br J Cancer,1999,81(4):638.

[11] 陈云.中药药理学研究方法[M].北京:人民卫生出版社,1993:1103.

〔责任编辑 聂淑琴〕