

三叶青水提物及其含药血清对人胃腺癌细胞株的抑制作用

丁丽*, 纪其雄, 李鸿文

(浙江医药高等专科学校, 浙江 宁波 315100)

[摘要] 目的: 考察三叶青水提物及其含药血清对人胃腺癌细胞 AGS 体外增殖的影响。方法: 清洁级小鼠随机分为 5 组: 三叶青水提物高、中、低(20, 10, 5 g·kg⁻¹) 剂量组、环磷酰胺阳性对照(CTX, 5 g·kg⁻¹) 组及阴性对照组(蒸馏水)。各组均 ig 给药, 每次 20 mL·kg⁻¹, 每天 2 次, 连续给药 3 d, 最后 1 次给药后 1 h 断头取血, 4 ℃ 静置 4 h, 3 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 分离血清, 56 ℃ 灭活 30 min 后, 用 0.22 μm 的滤膜过滤除菌, -20 ℃ 保存备用。对数生长期的 AGS 细胞经 0.25% 胰蛋白酶消化后, 配成 2.5 × 10⁴/L 的细胞悬液接种于 96 孔培养板, 培养 24 h 后, 加入不同浓度的三叶青水提物溶液及其含药血清, 作用 48 h 后, 采用 MTT 比色法在 570 nm 波长下测定 A, 观察不同浓度三叶青水提物及其含药血清对 AGS 细胞的抑制作用。结果: 1~40 g·L⁻¹ 三叶青水提物对 AGS 细胞有显著的抑制作用(P < 0.01), IC₅₀ 为 13.15 g·L⁻¹; 三叶青水提物含药血清高、中、低(20, 10, 5 g·kg⁻¹) 剂量组也可显著地抑制 AGS 肿瘤细胞的增殖(P < 0.01), IC₅₀ 为 70.06 g·L⁻¹。二者均呈现出剂量依赖性。结论: 三叶青水提物及其含药血清对 AGS 细胞均有较强抑制作用。

[关键词] 三叶青; AGS 细胞; 含药血清; 体外增殖抑制作用

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0212-03

Effect of Water Extract of *Tetrastigmatis hemsleyani* and the Serum Containing it on the Proliferation of AGS Cells

DING Li*, JI Qi-xiong, LI Hong-wen

(Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315100, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of the water extract of *Tetrastigmatis hemsleyani* and the serum containing it on the proliferation *in vitro*. **Method:** The mice of clean grade were randomly assigned into 5 groups: high dose group (20 g·kg⁻¹), moderate dose group (10 g·kg⁻¹), low dose groups (5 g·kg⁻¹), positive control cyclophosphamide (CTX, 5 g·kg⁻¹) group and negative control group (distilled water). Every group was administered by intragastric administration 20 mL·kg⁻¹ each, twice a day within 3 successive days. One hour after the last administration on third day, blood was collected from every decapitated mouse. The blood was centrifugalized for 20 min at 3 000 r·min⁻¹ after standing at 4 ℃. The separated serum was filtered to remove bacteria by 0.22 μm sepatate film at 56 ℃ after inactivated for 30 min and stored at -20 ℃ for later use. The suspensions of AGS cells in logarithmic growth phase digested by 0.25% tripsin were inoculated in 96 well culture plate with a cell density of 2.5 × 10⁴/L. The different concentrations of the water extract of *T. hemsleyani* and the serum containing it were added into the culture after 24 h culture. MTT assay was used with determinating A value in the wavelength of 570 nm to evaluate the cell proliferation of the water extract of *T. hemsleyani* and the serum containing it for 48 h. **Result:** When the concentration of the water extract of *T. hemsleyani* was range from 1 g·L⁻¹ to 40 g·L⁻¹, a significant proliferation inhibiting (P < 0.01) was shown and its 50% inhibition concentration (IC₅₀) was 13.15 g·L⁻¹. High, moderate and low dose treatment groups (20, 10, 5 g·kg⁻¹) also significantly inhibited the proliferation of AGS cells and its IC₅₀ was 70.06 g·L⁻¹. Both of the proliferation inhibittings were shown in dose-dependent manner. **Conclusion:** The water extract of *T. hemsleyani* can strongly inhibit the AGS

[收稿日期] 20120222(010)

[基金项目] 浙江省教育厅 2010 年度科研项目(Y201019049)

[通讯作者] * 丁丽, 硕士, 讲师, 从事中药药效物质基础及中药药理研究, Tel: 0574-88221493, E-mail: nbncdl@163.com

cells proliferation.

[Key words] *Tetrastigmatis hemsleyani*; AGS cells; the serum containing *T. hemsleyani*; inhibition of proliferation *in vitro*

葡萄科植物三叶青,又名蛇附子,金线吊葫芦等,以块根或全草入药,味甘,性凉,具有清热解毒、祛风化痰、活血止痛的功效,临床用来治疗小儿惊厥高热、肺炎、支气管炎、咽喉炎、痢疾、肝炎、病毒性脑膜炎、癩疔、疔疮等症^[1]。现代药理研究证明,三叶青能抑制肿瘤细胞的增殖和诱导其凋亡^[2-6]。本课题组前期研究结果也表明,三叶青脂溶性提取部位对体外培养的人恶性黑色素瘤细胞 A375、人宫颈癌细胞株 Hela 229、人胃腺癌细胞株 AGS 及人膀胱癌细胞株 5637 表现出较强的抑制作用^[7]。但这些结论均来自于三叶青粗制剂的离体试验或体内抑瘤率试验,均不足以说明这些中药粗制剂经口服吸收后对肿瘤细胞确有细胞毒性。笔者研究了三叶青水提物及其小鼠含药血清对人胃腺癌细胞株 AGS 肿瘤细胞的体外抑制作用的影响。旨在为三叶青抗肿瘤的作用机制及活性成分的研究提供实验依据。

1 材料

1.1 药材 三叶青块根饮片购自宁波市鄞州医药药材公司,经浙江医药高等专科学校中药系杨雄志教授鉴定为 *Tetrastigmatis hemsleyani* Diels et. Gilg。

1.2 细胞株 人胃腺癌细胞株 AGS 购自中国科学院细胞生化所。

1.3 动物 清洁级小鼠,雄性,体重(22~26)g,购自浙江省实验动物中心,许可证号 SCXK(浙)20080033。

1.4 仪器与试剂 iMark 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),AE21 型倒置生物显微镜(Motic 中国公司),HF160W 型 CO₂ 培养箱(中国力申科学仪器有限公司)。MTT(美国,Amresco 公司),RPMI 1640 培养基(美国,Invitrogen 公司),胎牛血清(上海蓝季科技发展有限公司),胰岛素(上海蓝季科技发展有限公司),注射用环磷酰胺(CTX,山西普德药业有限公司)。

2 方法

2.1 药物配制

2.1.1 三叶青水提物制备 三叶青饮片 150 g,用蒸馏水浸泡过夜,加热回流提取 3 次,每次 1 h,合并提取液,过滤,滤液减压浓缩,离心 1 次,取上清液浓缩至 150 mL,获生药含量为 1.0 g·mL⁻¹ 三叶青水提物,调 pH 7.0~7.2,用含 10% 体积分数灭活新生

小牛血清 RPMI-1640 培养液稀释,分别配制成 1, 2.5, 5, 10, 20, 40 g·L⁻¹ 的溶液,无菌过滤,备用。

2.1.2 小鼠含药血清制备 将 50 只小鼠随机分组,每组 10 只,分别为三叶青水提物高、中、低(20, 10, 5 g·kg⁻¹)剂量组^[8](相对应水提物质量浓度分别为 1 000, 500, 250 g·L⁻¹) 阳性对照环磷酰胺(CTX, 5 g·kg⁻¹)组(相对应 CTX 质量浓度为 250 g·L⁻¹)及阴性对照组。各组均灌胃给药(阴性对照组给予蒸馏水^[9]),每次 20 mL·kg⁻¹,连续给药 3 d,每天 2 次,最后 1 次给药后 1 h(灌胃前禁食 12 h)断头取血,4℃ 静置 4 h,3 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,分离血清,56℃ 灭活 30 min 后,用 0.22 μm 的滤膜过滤除菌,-20℃ 保存备用。

2.2 细胞培养 人胃腺癌细胞株 AGS 用含 10% 体积分数灭活新生小牛血清 RPMI-1640 培养液在 37℃ 5% CO₂ 饱和条件下培养。

2.3 体外肿瘤抑制试验

2.3.1 三叶青水提液对 AGS 细胞的体外抑制作用 取对数生长期人胃腺癌细胞株 AGS 细胞用 0.25% 的胰蛋白酶进行消化后,配成 2.5×10⁴/L 的细胞悬液接种于 96 孔培养板,每孔加细胞悬液 200 μL;培养 24 h 后,除去培养液,加入不同浓度的三叶青水提物溶液各 200 μL,空白对照组加 200 μL 培养液,阳性对照组分别加入不同浓度的 CTX 溶液 200 μL,培养 48 h 后,每孔加入 5 g·L⁻¹ 的 MTT 20 μL,培养 4 h 后,弃去上清液,加入 150 μL DMSO 震荡 10 min,570 nm 波长下测定 A 值,每剂量组设 6 复孔。

2.3.2 三叶青水提物含药血清对 AGS 细胞的体外抑制作用 取对数生长期人胃腺癌细胞株 AGS 细胞用 0.25% 的胰蛋白酶进行消化后,配成 2.5×10⁴/L 的细胞悬液接种于 96 孔培养板,每孔加细胞悬液 200 μL;培养 24 h 后,除去培养液,更换无血清的培养液及含药血清。三叶青水提物高、中、低剂量组及阳性对照组、阴性对照组各含 10% 相应含药血清的 RPMI-1640 培养液 200 μL,空白对照组含 10% 阴性对照组血清但不含细胞的 RPMI-1640 培养液 200 μL,培养 48 h 后,每孔加入 5 g·L⁻¹ 的 MTT 20 μL,培养 4 h 后,弃去上清液,加入 150 μL DMSO 震荡 10 min,570 nm 测定 A 值,每剂量组设 6 复孔。

按下式计算药物对肿瘤细胞生长的抑制率。

$$\text{细胞生长抑制率} = (1 - A_{\text{实验组平均}} / A_{\text{对照组平均}}) \times 100\%$$

2.4 统计方法 本实验数据采用 SPSS 17.0 进行处理,结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 Dunnett *t* 检验对结果进行统计分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 三叶青水提物对 AGS 细胞体外抑制作用 与阴性对照组比较,1 ~ 40 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 三叶青水提物作用 AGS 细胞 48 h 后,对 AGS 肿瘤细胞有显著地体外抑制作用($P < 0.01$),并且随着药物浓度的增加,对细胞体外生长的抑制率增加,呈现出剂量依赖性,见表 1。

表 1 三叶青水提物对 AGS 细胞的体外抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度 $/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	A	抑制率 $/\%$	IC ₅₀ $/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
阴性对照	0	1.464	0	0
水提物	1	1.215 ± 0.16 ¹⁾	19.54 ± 10.58 ¹⁾	13.15
	2.5	1.173 ± 0.13 ¹⁾	22.85 ± 9.87 ¹⁾	
	5	1.023 ± 0.10 ¹⁾	34.59 ± 9.07 ¹⁾	
	10	0.755 ± 0.08 ¹⁾	55.62 ± 6.65 ¹⁾	
	20	0.553 ± 0.20 ¹⁾	71.44 ± 10.25 ¹⁾	
CTX	40	0.249 ± 0.04 ¹⁾	95.25 ± 3.29 ¹⁾	1.25
	1	0.705 ± 0.04 ¹⁾	59.53 ± 3.10 ¹⁾	
	2.5	0.670 ± 0.04 ¹⁾	62.21 ± 3.52 ¹⁾	
	5	0.633 ± 0.07 ¹⁾	65.16 ± 3.57 ¹⁾	
	10	0.588 ± 0.07 ¹⁾	68.67 ± 5.19 ¹⁾	
	20	0.499 ± 0.07 ¹⁾	75.62 ± 4.56 ¹⁾	
	40	0.216 ± 0.01 ¹⁾	97.83 ± 0.91 ¹⁾	

注:和阴性组比较¹⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 三叶青水提物含药血清对 AGS 细胞体外抑制作用 三叶青水提物高、中、低剂量组含药血清作用 AGS 细胞 48 h 后的抑制作用,与阴性对照组比较,含药血清对 AGS 肿瘤细胞有显著地抑制作用($P < 0.01$),并且随着剂量的增加,对细胞体外生长的抑制率增加,呈现出剂量依赖性。见表 2。

表 2 10%三叶青含药血清对 AGS 细胞的体外抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 $/\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	A	抑制率 $/\%$	IC ₅₀ $/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
阴性对照	0	1.020	0	0
水提物含药血清	5	0.886 ± 0.08 ¹⁾	17.69 ± 10.91 ¹⁾	70.06
	10	0.804 ± 0.15 ¹⁾	28.60 ± 9.09 ¹⁾	
	20	0.729 ± 0.06 ¹⁾	38.51 ± 8.33 ¹⁾	
CTX	5	0.626 ± 0.04 ¹⁾	52.05 ± 5.47 ¹⁾	-

4 讨论

中药粗制剂中含有大量的杂质(如鞣质、无机盐等)、酸碱度及渗透性等,直接加入体外反应系统,可能会产生假阳性或假阴性结果,因此,中药粗

制剂直接作用于体外实验的结果的可信度难以客观评价。中药血清药理学是指将中药或中药复方经口给动物灌服一定时间后采集动物血液、分离血清,以含药血清代替中药粗提物作为药物源加入离体反应系统中从而研究其药理作用的一种半体内实验方法^[10]。此方法可以排除中药中杂质等因素的干扰,其实验结果与在体实验相一致,较为客观地反映了中药的药效^[11]。

本实验表明,三叶青水提物及其含药血清对 AGS 细胞均有较强抑制作用,并且其抑制作用呈现出剂量依赖性。试验结果同时显示三叶青水提物在体外直接作用 AGS 肿瘤细胞作用较强,IC₅₀ 为 13.15 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,而其含药血清 IC₅₀ 为 70.06 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。笔者认为,三叶青经口服后,其在体内可能经过吸收、代谢或受血清中各种因子的影响,所以,在体外对 AGS 肿瘤细胞的抑制作用减弱。三叶青在生物体内作用机制有待于进一步探究。

【参考文献】

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 下册. 上海:上海人民出版社,1977,2133.

[2] 丁钢强,郑军献,魏克民,等. 三叶青提取物对肝癌细胞 Hep G2 及原代大鼠肝细胞的体外毒作用研究[J]. 浙江预防医学,2005,17(9):1.

[3] 冯正权,倪克锋,何煜,等. 三叶青黄酮诱导 SGC-7901 胃癌细胞凋亡的实验研究[J]. 中国临床药理学与治疗学,2006,11(6):669.

[4] 汪珍,冯健,王晓华,等. 三叶青提取物对人结肠癌细胞系 RKO 细胞凋亡的影响[J]. 浙江中医药大学学报,2008,32(3):321.

[5] 倪克锋,丁志山,黄挺,等. 三叶青黄酮对 H-22 荷瘤小鼠瘤体的抑制作用及其机理研究[J]. 浙江中医药大学学报,2008,32(6):732.

[6] 程伟,陆曙梅. 三叶青提取物对肺癌 A549 细胞的体外抑制作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(10):53.

[7] 丁丽,纪其雄. 三叶青抗肿瘤活性部位的筛选研究[J]. 海峡药学,2011,23(12):46.

[8] 江月仙,郭伟娣. 三叶青的毒理学研究[J]. 中华医学研究杂志,2005,5(8):774.

[9] 郭咏霞,吴正治,张继平,等. 补阳还五汤含药血清对缺氧损伤 PC12 细胞的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(10):80.

[10] 黄臣虎,陆茵,高骁君. 中药血清药理学研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(10):266.

[11] 罗芬,池玉梅,吴皓. 中药代谢动力研究概述[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(14):284.

[责任编辑 聂淑琴]