

# 余甘子总酚酸和总黄酮配伍抑制肝癌细胞增殖及对免疫功能的调节作用

朱英环, 孟宪生\*, 包永睿, 康廷国

(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

**[摘要]** 目的:观察余甘子总酚酸和总黄酮不同配伍比例对癌细胞的抑制作用及观察对免疫系统的影响。方法:在 96 孔培养板中,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  (含有 5 000 个/mL 肿瘤细胞) RPMI 1640 培养液,采用 MTT 法观察不同配伍比例的余甘子总黄酮和总酚酸对人肝癌细胞株 HepG2 的体外抑制作用;将 64 只小鼠随机分成 8 组,分别为正常对照组和余甘子总酚酸总黄酮配伍后的给药组,每天 ig 给药 1 次,连续 9 d,采用 MTT 法测定小鼠脾淋巴细胞的转化增殖,测定小鼠血清白介素-2(IL-2)和干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )含量,测定不同配伍比例的余甘子总酚酸和总黄酮的免疫调节作用。**结果:**MTT 法测定的结果均显示,不同比例余甘子总酚酸+总黄酮的配伍,对肝肿瘤细胞的抑制作用明显,其中以总黄酮比总酚酸 10:1(110  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ :11  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 时抑制率最高,抑制率为 60.35%。余甘子总黄酮与总酚酸配伍能促进小鼠脾淋巴细胞增殖,其中每天以总酚酸 329.5  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  总黄酮 228  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  对小鼠 ig 给药组脾淋巴细胞增殖率最高,刺激指数比空白组高了 0.786。并且促进小鼠淋巴细胞分泌因子的生成。**结论:**余甘子总酚酸和总黄酮对肝脏肿瘤细胞增殖有明显的抑制作用,并且能增强机体特异性免疫功能和非特异性免疫功能的作用。

**[关键词]** 抗肿瘤;免疫调节;余甘子总酚酸;余甘子总黄酮

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)03-0132-04

## The Inhibition of Cancer Cell Proliferation and Regulating the Immune Function by Compatibility of Ratio Emblica Total Phenolic Acids and Flavonoids

ZHU Ying-huan, MENG Xian-sheng\*, BAO Yong-rui, KANG Ting-guo

(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the inhibition of different compatibility ratio of emblica total phenolic acids and flavonoids on tumors and the effects on the immune system. **Method:** 100  $\mu\text{L}$  (containing 5 000 cells / mL of tumor cells) RPMI 1640 culture medium was added to each well of 96-well plate, the MTT method was used to observe inhibition of human liver cell lines HepG2 by different compatibility ratio of emblica total phenolic acids and flavonoids *in vitro*, 64 mice were randomly divided into eight groups, namely normal control group and the total phenolic flavonoids emblica compatibility treatment group, oral administration was performed, once daily, lasting 9 days. MTT was used to measure proliferation of mouse spleen lymphocyte transformation and determine the levels of serum interleukin (IL)-2 and interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) and immune function by different compatibility of emblica total phenolic acids and flavonoids ig 9 days. **Result:** The compatibility of different proportions of total phenolic flavonoids emblica significantly inhibited the liver tumor cells, when the ratio of flavonoids and the total acid was 10:1(110  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ :11  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) inhibiting rate was the highest. The compatibility of total Flavonoids(228  $\text{mg}$ ) and total phenolic acids (329.5  $\text{mg}$ ) promoted the proliferation of mouse spleen lymphocytes, and stimulation index

**[收稿日期]** 20110708(001)

**[基金项目]** 国家“十一五”重大新药创制科技重大专项(2010ZX09401-304-105C)

**[第一作者]** 朱英环, 硕士, 从事药物分析研究, Tel: 0411-87406496

**[通讯作者]** \* 孟宪生, 博士, 教授, 从事生药中药质量分析研究, Tel: 0411-87406496, E-mail: mxsvvv@126.com

was higher than the control group, promoting secretion of lymphocytes factors. Same results were found in the compatibility of total flavonoids (4.56 mg) and total phenolic acids (6.59 mg). **Conclusion:** Emblica total phenolic acids and flavonoids significantly can inhibit cell proliferation and enhance the body's specific immune function and non-specific immune function

[**Key words**] anti-tumor; immune regulation; emblica total phenolic acids; emblica total flavonoids

余甘子为大戟科叶下珠属植物余甘子的果实。《本草纲目》有云:“补益强气<sup>[1]</sup>,“延年长生<sup>[2]</sup>”。本品别名滇橄榄、久如拉(藏药)余甘子在养生、保健和治病方面的重要价值是有史可循。迄今为止,国内外现代药理学研究者发现余甘子有抗炎、抗菌、抗病毒、抗衰老、抗癌、抗突变、抗高血压、降低血脂、提高免疫力等功效<sup>[3]</sup>。

余甘子抗肿瘤药效显著,有文献报道,余甘子抗癌活性组分统称为多酚,多酚被分为黄酮类成分,酚酸类成分,余甘子对机体 DNA 损伤有明显的保护作用,并有文献证明其在提高机体免疫力方面具有很好的调节作用,余甘子作为较有前途的抗肿瘤的免疫调节剂,值得进一步验证开发。为了解余甘子总酚酸,总黄酮配伍是否具有抗肿瘤及免疫调节作用,本实验将余甘子总酚酸和总黄酮配伍在体外进行了抗癌活性研究,同时对小鼠细胞免疫功能的影响进行了初步研究。

## 1 材料

**1.1 药品与试剂** 四甲基偶氮唑盐(美国 Gibco 公司),二甲基亚砜(科密公司),RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司),小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),刀豆蛋白 A(美国 Gibco 公司),脂多糖(美国 GIBCO 公司出品)ELLSA 试剂盒(美国 R & D 公司)余甘子(批号 20090601)产于贵州省,经辽宁中医药大学翟延君教授鉴定为 *Phyllanthus emblica* L.。

**1.2 仪器** NUAIRETM US AUTOFLOW 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(德国 Nuair 公司),HD2-BCN-1360B 型生物洁净工作台(哈尔滨东联电子技术开发有限公司),ACCULAB ALC-11C4 型电子天平(德国赛多利斯集团),SunriseE 酶标仪(瑞士 TECAN 公司)。

**1.3 动物** 健康昆明种小鼠,雌性,体重 18 ~ 22 g,购自大连医科大学实验动物中心,许可证号 SCXX(辽)2011-0002。

## 2 方法

**2.1 动物分组与处理** 将 64 只小鼠随机分成 8 组,分别为正常对照组和余甘子总酚酸 + 总黄酮配伍后的给药组,每天 ig 给药 1 次,连续 9 d。剂量见

表 1。

表 1 各组小鼠给药剂量

组别	余甘子总酚酸 /mg·kg <sup>-1</sup>	余甘子总黄酮 /mg·kg <sup>-1</sup>
1	0	228
2	109.8	228
3	329.5	228
4	659	228
5	1 098	228
6	1 098	22.8
7	1 098	0
对照	0	0

**2.2 余甘子总酚酸制备** 将余甘子药材粉碎,过 16 目筛,得药材余甘子粉末,精密称取 30 g,加 330 mL 70% 乙醇,提取 3 次,每次 1.5 h,过滤,合并滤液,回收溶剂至无醇味,定容至 200 mL,得质量浓度为 0.15 g·mL<sup>-1</sup>的药材提取液。取浸泡好的聚酰胺树脂,过聚酰胺树脂,然后用 900 mL 水以 1.5 mL·min<sup>-1</sup>的速度洗脱柱子,收集洗脱液,将洗脱液水浴蒸干,得到总酚酸提取物。总酚酸的提取率为 28.3%,纯化后的纯度为 71.5%。

**2.3 余甘子总黄酮制备** 将上述制备完过总酚酸的树脂柱,用 1 050 mL 的 50% 乙醇以 0.5 mL·min<sup>-1</sup>的速度洗脱柱子,收集洗脱液,将洗脱液水浴蒸干,得到总黄酮提取物。总黄酮的提取率为 6.1%,纯化后的纯度为 41.3%。

**2.4 对肝癌 HepG2 细胞的抑制作用<sup>[4]</sup>** 在 96 孔培养板中,每孔加入 100 μL (含有肿瘤细胞 5 000 个/mL) RPMI1640 培养液,置 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 12 h 后,吸去原培养液后,实验组重新加入 1640 培养液 150 μL/孔及不同浓度余甘子总酚酸、余甘子总黄酮及总酚酸和总黄酮不同比例混合物 50 μL/孔,使终浓度分别为第 1 组为总酚酸 110 mg·L<sup>-1</sup>,第 2 组为总黄酮 110 mg·L<sup>-1</sup>,第 3 组(总黄酮:总酚酸 110 mg·L<sup>-1</sup>: 11 mg·L<sup>-1</sup>),第 4 组(总黄酮:总酚酸 110 mg·L<sup>-1</sup>: 33 mg·L<sup>-1</sup>),第 5 组(总黄酮:总酚酸 110 mg·L<sup>-1</sup>: 66 mg·L<sup>-1</sup>),第 6 组(总黄

酮:总酚酸 $110\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ : $110\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),第 7 组(总黄酮:总酚酸 $11\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ : $110\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),共 7 个浓度。对照孔则加入  $200\ \mu\text{L}$ /孔新的培养液。每组 4 平行孔,置  $37\text{ }^\circ\text{C}$ , $5\%$   $\text{CO}_2$  培养液培养 72 h 后,弃去上清液,加入  $100\ \mu\text{L}$ /孔新鲜培养液及  $20\ \mu\text{L}$  MTT, $37\text{ }^\circ\text{C}$  继续培养 4 h。4 h 后弃上清液,加入  $150\ \mu\text{L}$ /孔 DMSO,振荡混匀后,用酶标仪(波长为  $492\text{ nm}$ )测定吸光度(A),按下式计算药物对肿瘤细胞生长的抑制率。

$$\text{抑制率} = [(1 - \text{实验组 } A) / \text{对照组 } A] \times 100\%$$

**2.5** 对小鼠脾淋巴细胞增殖反应的影响<sup>[4]</sup> 将 64 只小鼠随机分成 8 组,分别为正常对照组和余甘子总酚酸总黄酮配伍后的给药组,每天 ig 给药 1 次,连续 9 d,剂量见表 1,第 10 天取血后,处死浸没于 75% 乙醇中,无菌取出脾脏,置于 200 目细胞筛上,制备成单脾细胞悬液,离心  $10\text{ min}$ ( $2\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ ),弃上清液。加入 5 mL 红细胞裂解液  $37\text{ }^\circ\text{C}$  水浴 3 min,使红细胞裂解后离心  $10\text{ min}$ ( $2\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ ),弃上清液,目的是去除红细胞,加入适量 PBS 缓冲液吹吸混匀,离心  $10\text{ min}$ ( $2\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ ),弃上清液。加入 RPMI-1640 培养液调整细胞浓度  $2 \times 10^6$  个/mL,铺板。将脾细胞悬液加入 96 孔板,每孔  $100\ \mu\text{L}$ ,按实验要求,共加 3 块板,每组小鼠的脾细胞悬液,分别加 15 个孔,分为 3 组。1~5 孔为对照孔,观察淋巴细胞自然增殖反应;6~10 孔为 LPS 孔,观察 B 淋巴细胞增殖,11~15 孔为 ConA 孔,反应观察 T 淋巴细胞增殖反应<sup>[5]</sup>。给药组 7 组,正常空白组 1 组,共 8 组。①对照孔: $100\ \mu\text{L}$  脾细胞悬液 +  $100\ \mu\text{L}$  完全 RPMI-1640 培养液。②ConA 孔: $100\ \mu\text{L}$  脾细胞悬液 +  $10\ \mu\text{L}$  ConA 溶液(终浓度  $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) +  $90\ \mu\text{L}$  完全 RPMI 1640 培养液。③LPS 孔: $100\ \mu\text{L}$  脾细胞悬液 +  $10\ \mu\text{L}$  LPS 溶液(终浓度  $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) +  $90\ \mu\text{L}$  完全 RPMI 1640 培养液。把 96 孔培养板置于  $37\text{ }^\circ\text{C}$   $5\%$   $\text{CO}_2$  培养箱中温育 72 h,培养结束前 4 h 每孔加入  $5\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  MTT 溶液  $20\ \mu\text{L}$ ,继续培养 4 h,弃去上清液,每孔加入 DMSO  $150\ \mu\text{L}$ ,于振荡器振荡  $10\text{ min}$ ,使甲臞充分溶解,于酶标仪测  $A_{492}$ ,减空白对照,计算刺激指数(SI)。

$$\text{SI} = \text{刺激孔 } A(\text{加 ConA 或 LPS 孔}) / \text{对照孔 } A$$

**2.6** 对小鼠淋巴细胞分泌细胞因子 IL-2,IFN- $\gamma$  的影响<sup>[6]</sup> 采用小鼠血清 IL-2,IFN- $\gamma$  ELISA 试剂盒,按照试剂盒使用说明书测定。待测血清作 1:5 稀释。经酶标仪  $450\text{ nm}$  波长测定 A,据对照品 A 绘制标准曲线,计算其含量。

**2.7 统计学方法** 数据经统计学软件 SPSS 16.0 计算,所有实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,各组数据均进行正态检验及 F 方差齐性检验。两样本均数采用 t 检验。 $P < 0.05$  有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对肝癌 HepG2 细胞的抑制作用** 由表 2 可知余甘子总酚酸和总黄酮配伍后有明显抑癌作用,其中第 1,2,3,4 组对肝癌细胞都有明显的抑制作用,其中以总黄酮:总酚酸( $110:11$ )  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时抑制率最高,抑制率达 60.3%。从结果可见,总黄酮内加入的总酚酸越多,对肝癌 HepG2 细胞的抑制率越低,尤其第 6 组二者( $110:110$ )  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,抑制率更低。

表 2 余甘子总酚酸和总黄酮配伍后对肝癌 HepG2 细胞的抑制作用( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别(总酚酸: 总黄酮/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	A	抑制率 /%
1(110:0)	$0.459 \pm 0.048$	45.43 <sup>1)</sup>
2(0:110)	$0.434 \pm 0.035$	48.33 <sup>1)</sup>
3(11:110)	$0.333 \pm 0.036$	60.35 <sup>1)</sup>
4(33:110)	$0.517 \pm 0.030$	38.49 <sup>1)</sup>
5(66:110)	$0.616 \pm 0.050$	26.69
6(110:110)	$0.746 \pm 0.033$	11.25
7(110:11)	$0.786 \pm 0.035$	6.54
空白对照	$0.841 \pm 0.040$	-

注:与空白对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ (表 3~5 同)。

**3.2 对小鼠脾淋巴细胞增殖反应的影响** 由表 3 可知余甘子总酚酸与总黄酮配伍后对脾 T 淋巴细胞增殖有显著性提高,其中以配伍 3 最为显著。

表 3 余甘子总酚酸与总黄酮配伍后对脾 T 淋巴细胞增殖的影响( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别(总酚酸: 总黄酮/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	A		SI
	未加 Con A	加 Con A	
1(0:228)	$0.313 \pm 0.021$	$0.972 \pm 0.008$	$3.112 \pm 0.105$
2(109.8:228)	$0.357 \pm 0.092^{1)}$	$1.049 \pm 0.051^{1)}$	$2.989 \pm 0.012$
3(329.5:228)	$0.328 \pm 0.039$	$1.128 \pm 0.083^{1)}$	$3.439 \pm 0.103^{1)}$
4(659:228)	$0.342 \pm 0.046$	$0.981 \pm 0.102$	$2.914 \pm 0.026$
5(1 098:228)	$0.363 \pm 0.123^{1)}$	$1.207 \pm 0.075^{1)}$	$3.325 \pm 0.018$
6(1 098:22.8)	$0.332 \pm 0.083$	$1.085 \pm 0.052^{1)}$	$3.268 \pm 0.016$
7(1 098:0)	$0.318 \pm 0.064$	$0.943 \pm 0.025$	$2.983 \pm 0.034$
空白对照	$0.295 \pm 0.213$	$0.784 \pm 0.187$	$2.653 \pm 0.075$

由表 4 可知余甘子总酚酸与总黄酮配伍后对脾 B 淋巴细胞增殖有显著性提高,其中以配伍 1 和配伍 3 最为显著。

**3.3 对小鼠淋巴细胞分泌因子的影响** 本实验测定 IL-2 的标准曲线的回归方程  $Y = 0.002X + 0.187$ ,

表4 余甘子总酚酸总黄酮配伍后对脾  
B淋巴细胞增殖的影响( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别(总酚酸 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ : 总黄酮 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	A		SI
	未加 LPS	加 LPS	
1(0:228)	0.322 ± 0.018	0.526 ± 0.006	1.516 ± 0.329 <sup>1)</sup>
2(109.8:228)	0.336 ± 0.007	0.532 ± 0.005	1.473 ± 0.235
3(329.5:228)	0.340 ± 0.019	0.585 ± 0.006 <sup>1)</sup>	1.573 ± 0.299 <sup>1)</sup>
4(659:228)	0.326 ± 0.018	0.533 ± 0.007	1.504 ± 0.348
5(1 098:228)	0.324 ± 0.009	0.527 ± 0.006	1.520 ± 0.270
6(1 098:22.8)	0.338 ± 0.07	0.536 ± 0.006	1.492 ± 0.235
7(1 098:0)	0.313 ± 0.011	0.494 ± 0.012	1.447 ± 0.310
空白对照	0.296 ± 0.011	0.361 ± 0.006	1.201 ± 0.008

$R^2 = 0.997$ 。通过标准曲线及实验组的吸光度计算出实验组的 IL-2 值,余甘子总酚酸和总黄酮配伍在一起后的 3~6 组小鼠外周血清中的 IL-2 含量均有所提高,与阴性对照组比较,以第 4 组最为显著。本实验测定 IFN- $\gamma$  的标准曲线的回归方程  $Y = 0.001X + 0.469$ ,  $R^2 = 0.99$ ,通过标准曲线及实验组的吸光度计算出实验组的 IFN- $\gamma$ 。余甘子总酚酸与总黄酮配伍组小鼠外周血清中的 IFN- $\gamma$  含量只有第 5 组与第 2 组与对照组相比有变化。见表 5。

表5 余甘子总黄酮和总酚酸配伍后对小鼠细胞因子  
IL-2, IFN- $\gamma$  生成水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=5$ )  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

组别(总酚酸: 总黄酮/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	IL-2	IFN- $\gamma$
1(0:228)	315.5 ± 10.1	1.688 ± 0.094
2(109.8:228)	291 ± 17.1	1.722 ± 0.319
3(329.5:228)	302.1 ± 28.6	1.961 ± 0.163 <sup>1)</sup>
4(659:228)	325 ± 26.5 <sup>1)</sup>	1.682 ± 0.134
5(1 098:228)	331.5 ± 26.0	1.921 ± 0.092
6(1 098:22.8)	318.9 ± 17.9	1.952 ± 0.122 <sup>1)</sup>
7(1 098:0)	326.2 ± 29.6	1.701 ± 0.101
空白对照	305.2 ± 34.0	1.698 ± 0.083

#### 4 讨论

本实验通过采用几种不同的实验方法,研究不同配伍比例的余甘子总酚酸和总黄酮在体外抗肿瘤作用及对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响,和对小鼠淋巴细胞分泌因子的影响。结果显示余甘子总黄酮和总酚酸对肝肿瘤细胞株生长有明显的抑制作用,结果显示配伍组 3(总黄酮:总酚酸  $110 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ :  $11 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )抑制率最高。

本文结果表明,不同比例配伍的余甘子总酚酸和总黄酮可明显促进小鼠 LPS 和 ConA 诱导的脾细胞增殖反应,提高 T 淋巴细胞及 B 淋巴细胞转化能力;本研究结果显示配伍组 3 对 T 淋巴细胞和 B 淋

巴细胞的增殖力最强,配伍组 3 的总黄酮与总酚酸配伍比例为 5:7。

不同比例配伍的余甘子总酚酸和总黄酮有增强机体细胞免疫的作用,IL-2 是 T 淋巴细胞从细胞周期 G 期进入 S 期产生的细胞因子,介导和调节特异性免疫。IFN- $\gamma$  又称免疫干扰素是抗原或有丝分裂原等刺激 T 细胞而产生的具有免疫调节、抗病毒及抗肿瘤活性的糖蛋白,它能广泛地使各种类型的细胞表达 MHC II 类抗原,放大免疫应答的识别阶段,促进 T 和 B 淋巴细胞分化<sup>[7]</sup>。

本研究结果显示配伍组 3, 4, 6 组对小鼠 IL-2 的影响均非常明显;配伍组 2, 4, 5 组小鼠 IFN- $\gamma$  含量的变化显著。上述结果证明余甘子总酚酸总黄酮不同配伍比例给药能提高机体免疫力,机体免疫功能失常是肿瘤发生发展的重要因素,因此提高病人的免疫机能是肿瘤免疫治疗的重要方面。

综合本文实验结果,余甘子总酚酸和总黄酮配伍后不仅有抑瘤作用,而且还能增强机体免疫力,由于其明显的增强机体免疫的作用,为解释余甘子抗癌作用机制提供依据。经实验结果综合对比,确定余甘子总黄酮与余甘子总酚酸的比例为 5:7,时,其抗癌作用及提高机体免疫力作用均较强。可以作为一个有前景的抗癌药物研究。

#### [参考文献]

- [1] 明·李时珍.本草纲目[M].北京:中国中医药出版社,1997:774.
- [2] 杨顺楷,杨亚力,杨维力.余甘子资源植物的研究与开发进展[J].应用与环境生物学报,2008,14(6):846.
- [3] Nadkarni K M. Indian Materia Medica [M]. Bombay: Popular Book Depot,1994:481.
- [4] 钟振国,梁红,钟益宁,等.余甘子叶提取成分没食子酸的体外抗肿瘤实验研究[J].时珍国医国药,2009,20(8):1954.
- [5] 李江,谢明,甘媛.小柴胡汤及其药群配伍抗小鼠 H22 肝肿瘤及免疫调节作用[J].中国中药杂志,2008,33(9):1041.
- [6] 李国忠,郑咏秋.消风散颗粒免疫调节作用机理研究[J].中国实验方剂学杂志,2004,10(4):39.
- [7] 王宇翎,张艳,方明,等.白花蛇舌草总黄酮的免疫调节作用[J].中国药理学通报,2005,25(4):444.

[责任编辑 聂淑琴]