

荞麦花叶提取物对 S180 荷瘤小鼠的辅助治疗作用

郭兰¹, 赵志宇², 姜妍¹, 高福佳¹, 邱旭¹, 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)对肿瘤的辅助治疗作用,并探讨其可能的机制。**方法:**建立小鼠 S180 肿瘤模型;分别 ig 荞麦花叶提取物 200,400 mg·kg⁻¹及与环磷酰胺(CTX)联合给药 14 d,实验重复 3 次。测定荷瘤小鼠的生存期、肿瘤抑制率、白细胞计数、胸腺指数、脾指数,同时测定荷瘤小鼠血清中白细胞介素-2(IL-2),肿瘤坏死因子-α(TNF-α)水平。**结果:**与模型组相比,EBFL 对肿瘤抑制作用不明显,但可使荷瘤小鼠生存期明显延长,25 d 生存率以 CTX + EBFL-H 组最高(35%),其次是 EBFL-H (25%)和 EBFL-L(20%);与 CTX 阳性对照组比较,EBFL 能明显抑制 CTX 所致白细胞数量减少及免疫器官指数降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);EBFL 可提高 IL-2 水平,但对 TNF-α 水平无影响。**结论:**EBFL 可改善荷瘤小鼠生存质量,延长生存期,减轻 CTX 的毒性,其机制可能是通过提高机体免疫力实现的。

[关键词] 荞麦花叶提取物;环磷酰胺;免疫;S180 肉瘤

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)19-0203-04

Assistant Therapeutic Effect of Buckwheat Flower and Leaf Extracts on Tumor Mice

GUO Lan¹, ZHAO Zhi-yu², JIANG Yan¹, GAO Fu-jia¹, QIU Xu¹, 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 observe the assistant effect of EBFL on S180 tumor mice and explore its possible mechanism. **Method:** Mice tumor model was applicated; the model groups were divided into EBFL-low dose group (20 mg·kg⁻¹), EBFL-high dose group (40 mg·kg⁻¹), and combined group with cyclophosphamide(CTX, 20 mg·kg⁻¹, 40 mg·kg⁻¹) ig for 2 weeks. Life span, the tumor growth inhibition rate, WBC count, and indexes of immunological functions, lymphocyte transformations, interleukin-2(IL-2) and tummor necrosis factor-α(TNF-α) levels were observed. **Result:** Compared with the model group, the EBFL could prolong life span but there was no obvious inhibition effect on S180 tumor. Compared with the CTX group, effect of high dose EBFL group was more obvious and could reverse inhibiting activity of weight, WBC count, immunological function indexes ($P < 0.05$, $P < 0.01$), EBFL could improve IL-2 levels($P < 0.05$, $P < 0.01$). The effect of high dose EBFL group was more obvious and could reverse the inhibiting activity of lymphocyte transformation($P < 0.01$). **Conclusion:** The EBFL can prolong life span, and attenuate the toxicity of CTX as well as adjust the immunity function.

[Key words] extraction of buckwheat flower and leaf; cyclophosphamide; Immunity; S180 tumor

[收稿日期] 20110311(010)

[基金项目] 河北省自然科学基金项目(C2010001795);唐山市“十一五”重点工程项目(072631B-1);河北联合大学青年基金项目(10101617)

[第一作者] 郭兰, 讲师, 硕士, 从事肿瘤药理研究, Tel: 15533575680, 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: 0315-3725870, E-mail: shuyinghan59@126.com

荞麦花叶提取物(extraction of buckwheat flower and leaf, EBFL)是从蓼科植物甜荞麦花叶中提取的活性成分。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^[1-4]。最近,有文献报道金荞麦提取物对小鼠黑色素瘤、S180 肉瘤、肝癌

等体外有抗侵袭活性和体内抗转移作用^[5]。但有关甜荞麦提取物抗肿瘤作用的实验研究目前尚未见报道。本实验通过建立 S180 小鼠实体瘤及腹水瘤模型,对荞麦花叶提取物延长荷瘤小鼠的生存期及与 CTX 联合应用的抗肿瘤作用进行实验研究。

1 材料

1.1 动物及瘤株 健康昆明种小鼠,SPF 级,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,合格证号医动字第 SCXK(京)2005-0013 号。饲料为中国医学科学院实验动物研究所提供,合格证号医动字第 SCXK(京)2006-0003 号。动物自由饮水、进食,在华北煤炭医学院实验动物中心[证号 SYXK(冀)2005-0038]饲养和实验。小鼠 S180 肉瘤腹水型细胞由我华北煤炭医学院预防医学系馈赠,每 7 d 传代 1 次。

1.2 药物 荞麦花叶(采自内蒙古库伦旗)为秋冬季因霜冻未结果的甜荞麦花和叶。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℃ 烤干即为荞麦花叶提取物(FBFL)。环磷酰胺(CTX,上海华联制药有限公司,批号 080612)。

1.3 仪器 电子天平(上海第二天平仪器厂),二氧化碳培养箱(Forma scientific company),UFX-ILA 倒置相差显微镜,生物显微镜(Olympus)、ELISA 试剂盒(R&D 公司产品),TGL-16G 台式离心机(上海安亭科学仪器厂),722 型分光光度计(北京市六一仪器厂),酶标仪(BIO-RAD company),日立 7150 全自动生化分析仪(日本日立公司)。

2 方法

2.1 动物模型的建立

2.1.1 实体瘤模型^[6-7] 无菌取小鼠腹腔内传代 7 d 的瘤细胞,用生理盐水洗涤、离心 2 次,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,建立小鼠实体瘤模型。正常组小鼠每只接种 0.2 mL 生理盐水。

2.1.2 腹水瘤模型^[8] 无菌取小鼠腹腔内传代 7 d 的瘤细胞,用生理盐水洗涤、离心 2 次,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 建立小鼠腹水瘤模型^[8]。

2.2 对 S180 腹水瘤小鼠的治疗作用 小鼠造模同

2.1.2,小鼠接种 S180 腹水瘤 24 h 内随机分为空白对照(生理盐水)、模型对照组(生理盐水)、CTX 阳性对照组(25 mg·kg⁻¹)、EBFL 低、高剂量组(200,400 mg·kg⁻¹)、CTX + EBFL-H 组(25 mg·kg⁻¹ + 400 mg·kg⁻¹)各组均每天 ig 1 次,连续给药 14 d。动态观察 S180 肉瘤小鼠生存质量和生存时间,每 5 d 称体重、测量腹围 1 次、记录各组小鼠死亡情况、生存日数,治疗组和对对照组观察时间结点为 25 d,计算各组小鼠生存率。

$$\text{生存率} = [\text{动物存活数} / \text{实验组动物数}] \times 100\%$$

2.3 对 S180 实体瘤小鼠肿瘤生长的抑制作用 小鼠造模同 2.1.1,分组、给药同 2.2。停药次日解剖剥离瘤组织,称重,计算肿瘤生长抑制率,实验重复 3 次。

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

2.4 对 S180 肉瘤小鼠胸腺(脾)指数及白细胞的影响 建立小鼠实体瘤模型,接种方法、分组、给药同 2.1.1,2.2。给药 14 d,次日称体重;摘眼球放血,按常规方法计数外周血白细胞数目;解剖取胸腺和脾脏用电子天平称质量,计算胸腺(脾)指数,实验重复 3 次。

$$\text{胸腺(脾脏)指数} = \text{胸腺(脾脏)质量(mg)} / \text{体重(g)}$$

2.5 对荷瘤小鼠细胞因子 IL-2, TNF-α 的影响 取小鼠血清,采用酶标仪以 ELISA 方法分别检测 IL-2, TNF-α 水平。各试剂稀释浓度和步骤按试剂盒操作说明进行。终止反应后即酶标仪均于 490 nm 处测定相应的吸光度(A)。绘制标准曲线,根据标准曲线方程求得样品中相关细胞因子浓度。

2.6 数据处理 实验数据用 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。 $P < 0.05$ 代表差异有显著性。

3 结果

3.1 对 S180 腹水瘤小鼠腹围和生存期的影响 荷瘤小鼠在接种 S180 腹水瘤株 6 d 左右,可见小鼠腹部逐渐增大,各给药组小鼠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。给予 FBFL400 mg·kg⁻¹ 剂量组与模型组相比,在瘤株接种的 15 d 内,腹围总增长(1.92 ± 0.35) cm,与模型组的总增长长度(3.03 ± 0.40) cm 相比亦有明显缩短($P < 0.05$)。荷瘤小鼠 25 d 生存率以 CTX + EBFL-H 组最高(35%),其次是 EBFL-H(25%)和 EBFL-L(20%),

CTX 组小鼠 25 d 全部死亡,结果见表 1。

表 1 荞麦花叶提取物对 S180 水瘤小鼠生存期的影响($n=20$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	生存数/只					生存率 /%
		5 d	10 d	15 d	20 d	25 d	
空白对照	-	20	20	20	20	20	100
模型	-	20	16	11	4	1	5
EBFL-L	200	20	17	13	8	4	20
EBFL-H	400	20	18	15	11	5	25
CTX	25	20	15	11	2	0	0
CTX + EBFL-H	25 + 400	20	19	17	12	7	35

3.2 EBFL 对 S180 荷瘤小鼠肿瘤抑制作用 由表 2 可见,重复 3 次试验结果,14 d 瘤重均以模型对照组最重,与模型对照组相比,CTX 和 CTX + EBFL-H 组瘤重明显减轻($P < 0.01$),CTX 和 CTX + EBFL-H 两组间瘤重无差异;EBFL 高、低剂量组对 S180 肉瘤的生长有一定的抑制作用,但无统计学意义;各给药

表 2 荞麦花叶提取物对 S180 实体瘤小鼠肿瘤抑制率的影响($\bar{x} \pm s, n=20$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	瘤重 /g	抑瘤率 /%
模型	-	3.25 ± 0.48 ⁴⁾	-
EBFL-L	200	3.01 ± 0.37 ⁴⁾	7.35 ± 1.77
EBFL-H	400	2.95 ± 0.46 ⁴⁾	9.25 ± 2.24
CTX	25	1.88 ± 0.32 ²⁾	42.65 ± 8.62
CTX + EBFL-L	25 + 200	2.53 ± 0.72	22.17 ± 6.13
CTX + EBFL-H	25 + 400	1.67 ± 0.39 ²⁾	46.65 ± 9.72
模型	-	2.86 ± 0.37 ⁴⁾	-
EBFL-L	200	2.58 ± 0.44 ⁴⁾	9.82 ± 3.16
EBFL-H	400	2.39 ± 0.42 ³⁾	16.45 ± 4.29
CTX	25	1.61 ± 0.30 ²⁾	43.72 ± 7.13
CTX + EBFL-L	25 + 200	2.15 ± 0.32	24.83 ± 6.14
CTX + EBFL-H	25 + 400	1.54 ± 0.38 ²⁾	46.18 ± 8.67
模型	-	3.18 ± 0.51 ⁴⁾	-
EBFL-L	200	2.89 ± 0.49 ³⁾	9.17 ± 3.68
EBFL-H	400	2.73 ± 0.45 ³⁾	14.27 ± 4.26
CTX	25	2.05 ± 0.34 ²⁾	35.55 ± 6.74
CTX + EBFL-L	25 + 200	2.89 ± 0.43	9.17 ± 3.65
CTX + EBFL-H	25 + 400	2.15 ± 0.36 ²⁾	32.39 ± 6.02

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 3 同)。

组 3 次平均抑瘤率由高至低分别为 CTX + EBFL-H (41.62%), CTX (40.51%), CTX + EBFL-L (21.25%), EBFL-H (13.27%), (EBFL-L 8.76%)。

3.3 对荷瘤小鼠胸腺(脾)指数及白细胞的影响 重复 3 次试验结果显示,EBFL 对 S180 肉瘤小鼠胸腺、脾指数较对照组有所增加,但无统计学差异;CTX 能明显降低胸腺、脾指数;而 EBFL 能明显抑制 CTX 所致的胸腺、脾指数的降低。与正常对照组比较,模型对照组小鼠白细胞降低;环磷酰胺可使白细胞数降低更明显;EBFL 能不同程度的升高白细胞,特别是高剂量 EBFL 能明显抑制环磷酰胺所致的荷瘤小鼠白细胞数量的降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),见表 3。

表 3 荞麦花叶提取物对荷瘤小鼠胸腺(脾)指数以及白细胞的影响($\bar{x} \pm s, n=30$)

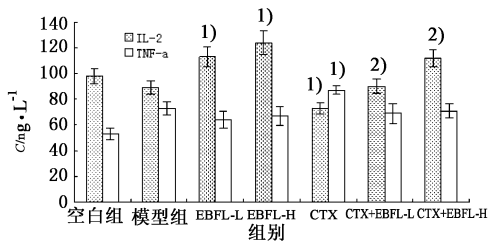
组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	胸腺指数 /mg·g ⁻¹	脾指数 /mg·g ⁻¹	白细胞 /×10 ⁹ /L
空白对照	-	2.09 ± 0.25	4.22 ± 0.33	11.10 ± 1.61
模型	-	2.11 ± 0.29	4.14 ± 0.31	9.69 ± 1.93 ⁵⁾
EBFL-L	200	2.20 ± 0.22 ³⁾	4.35 ± 0.41 ⁴⁾	10.03 ± 2.12 ⁴⁾
EBFL-H	400	2.27 ± 0.33 ⁴⁾	4.61 ± 0.51 ⁴⁾	11.21 ± 2.18 ^{3,4)}
CTX	25	1.52 ± 0.22 ^{2,6)}	3.41 ± 0.51 ^{2,6)}	3.50 ± 1.12 ^{2,6)}
CTX + EBFL-L	25 + 200	2.12 ± 0.32	4.15 ± 0.33	9.70 ± 1.93
CTX + EBFL-H	25 + 400	2.13 ± 0.41 ³⁾	3.83 ± 0.54 ^{3,6)}	8.82 ± 2.01 ^{4,6)}

注:与空白对照组比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$ 。

3.4 对荷瘤小鼠血清中细胞因子 IL-2, TNF- α 的影响 与模型对照组比较,EBFL 高、低剂量组能增加 IL-2 分泌,有显著性差异($P < 0.05$),CTX 组的 IL-2 水平明显低于模型组($P < 0.05$),但与荞麦花叶提取物高剂量合用后,其 IL-2 水平有明显的升高($P < 0.05$)。CTX 组与模型对照组相比,能显著升高 TNF- α 的水平($P < 0.05$),但与高剂量组的荞麦花叶提取物合用,其 TNF- α 水平增加不明显。而单用荞麦花叶提取物其 TNF- α 水平无显著性变化,结果见图 1。

4 讨论

据大量的报道,一些中药和天然药物具有改善肿瘤患者症状、提高生存质量、延长生存期、在一定程度上稳定或缩小肿瘤的效果。有计划的把中药治疗和手术治疗、放疗、化疗、免疫疗法相结合,既可以增加疗效,又可减轻毒副作用。中药与天然药物不失为辅助治疗肿瘤的一个非常好的选择。而中药、



与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与 CTX 组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

图 1 荞麦花叶提取物对 S180 荷瘤小鼠血清中 IL-2, TNF-α 水平的影响

天然药物辅助治疗肿瘤又主要以调整机体免疫潜能、改善病人的生存质量、延长生存期的中药为主,但许多具有这种调节机体免疫作用的中药又往往带有提高放化疗效果的增敏作用或降低放化疗毒副反应的减毒作用^[9-11]。本实验通过观察 EBFL 对 S180 肉瘤小鼠的辅助治疗作用。证明实验药物对肿瘤抑制作用不明显,但可使荷瘤小鼠生存率明显延长;高剂量具有对抗化疗药物所致体重下降、胸腺和脾脏等免疫器官萎缩、白细胞降低和骨髓抑制等毒性反应,提高 CTX 的抗肿瘤效果。实验药物的抗肿瘤作用机制主要是通过增强机体免疫力,提高血清中 IL-2 水平等起作用,这也可能是其减毒、增效的机制之一。总之,EBFL 作为一种新型的生物反应调节剂可提高机体的免疫力,辅助化疗药物增强 CTX 的抗肿瘤作用,同时减轻 CTX 的毒性,是临床肿瘤综合治疗较为理想的辅助药物,具有广泛的应用前景。

[参考文献]

[1] 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.

[2] 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.

[3] 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.

[4] 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.

[5] 陈晓锋, 顾振纶. 金荞麦抗肿瘤作用研究进展[J]. 中草药, 2003, 31(9): 63.

[6] Bohle A, Jurezok 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.

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

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

[9] 李玉芳, 王杰. 中药多糖抗肿瘤机制研究进展[J]. 实用癌症杂志, 2007, 22(5): 546.

[10] 王大宪, 吴晓丰, 郑沁荣, 等. 化微丸抗小鼠 H22 肝癌的效应及对淋巴细胞转化率的影响[J]. 中西医结合肝病杂志, 2005, 15(2): 97.

[11] 刘明华, 章卓, 顾立, 等. 伍氏百叶散对荷瘤小鼠肿瘤生长及免疫功能的影响[J]. 中国新药杂志, 2006, 15(3): 201.

[责任编辑 聂淑琴]

《中国中药杂志》2012 年征订启事

《中国中药杂志》系中国科协主管, 中国药学会主办, 中国中医科学院中药研究所承办的综合性中药学术期刊。创刊于 1955 年 7 月, 是创刊最早、发行量最大的中药学术刊物。《中国中药杂志》全面反映我国中医科研最高学术水平, 主要报道该领域新成果、新技术、新方法与新思路, 内容包括栽培、资源与鉴定、炮制、药剂、化学、药理、不良反应、临床等。设有专论、综述、研究论文、研究报告、临床、学术探讨、药事管理、经验交流、信息等栏目。主要读者对象为医药领域各级管理部门、研究所、大专院校、企业以及医院等从事医药科研、管理、生产、医院制剂及临床研究等方面的专业人员。

《中国中药杂志》现为半月刊, 128 页, 2012 年定价每期 30 元, 全年 24 期定价为 720 元。国内刊号 11-2272/R, 国际刊号 1101-5302。

本刊现已全面实现网络编辑办公, 如欲投稿或联系本刊、获取本刊各种信息动态请登录中国中药杂志网站 www.cjcm.com.cn 或 www.中国中药杂志.com。

联系电话: 稿件查询 010-64045830 转 602; 主任电话 010-64058556; 资源与栽培栏编辑: 010-64048925; 制剂栏编辑: 010-64040392; 化学栏编辑: 010-64040113; 药理栏编辑: 010-84022522; 临床栏编辑: 010-64059766; 电子杂志制作发行及网上维护: 010-64030625。