

广西甜茶总黄酮的体外抗肿瘤作用

吴燕春¹, 吴冬², 谢金鲜^{1*}, 陈晶¹

(1. 广西中医学院, 南宁 530001; 2. 北海市中医院, 广西 北海 536000)

[摘要] 目的: 研究广西甜茶总黄酮(RSTF)体外抗肿瘤作用。方法: 广西甜茶总黄酮经 60% 的乙醇提取, 聚酰胺柱分离后, 用化学反应、薄层层析法及高效液相法进行鉴定; 采用 MIT 法对肿瘤株 S 180(小鼠移植性肉瘤细胞)、H 22(小鼠腹水型肝癌细胞)、L 1210(小鼠白血病细胞)进行 RSTF 体外抗肿瘤作用筛选。结果: 广西甜茶总黄酮在体外对肿瘤株 S 180, H 22, L 1210 的增殖具有一定的抑制作用, 其中对 H₂₂ 抑制作用最强(IC₅₀ 46. 31 μg · mL⁻¹); 对 S 180 抑制作用次之(IC₅₀ 71. 48 μg · mL⁻¹), 对 L 1210 抑制作用最弱(IC₅₀ 163. 59 μg · mL⁻¹)。结论: 广西甜茶总黄酮在体外可抑制 S 180, H 22 和 L 1210 肿瘤株的增殖。

[关键词] 广西甜茶; 总黄酮; 抗肿瘤作用

[中图分类号] R285. 5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010) 07-0165-03

Anti-tumor Effect *in Vitro* of Total Flavone from *Rubus Suavissimus*

WU Yan-chun¹, WU Dong², XIE Jin-xian^{1*}, CHEN Jin¹

(1. Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China;

2. Traditional Chinese Medical Hospital of Beihai, Beihai 536000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the anti-tumor effect *in vitro* of total flavone from *rubus suavissimus* (RSTF). **Method:** RSTF was extracted with 60% alcohol, separated by polyamide column, determined by chemical reaction, TLC and HPLC. MTT method was adopted to screen for mouse tumor cells S 180(transplanted sarcoma cell in mice), H 22 (transplanted ascitic type of liver cancer cell in mice) and L 1210(leukemia cells in mice). **Results:** RSTF could inhibit the proliferation on S 180, H 22 and L 1210 *in vitro*, while the best inhibitory effect on H 22(IC₅₀ 46. 31 μg · mL⁻¹) and the better inhibitory effect on S 180(IC₅₀ 71. 48 μg · mL⁻¹). **Conclusion:** The results show that RSTF can inhibit the growth of S 180, H 22 and L 1210.

[Key words] *rubus suavissimus*; total flavone; anti-tumor effect

广西甜茶 *Rubus suavissimus* S. Lee 是蔷薇科悬钩子属的一种落叶有刺灌木, 为我国广西特产植物, 主产于广西桂林、金秀、桂平等县。广西甜茶民间应用历史悠久, 长期以来除当茶饮用外, 还可药用。本研究从广西甜茶中提取出总黄酮, 采用 MTT 法在体外对肿瘤株 S 180, H 22, L 1210 进行体外抗肿瘤作用的筛选, 期望从中找出对广西甜茶总黄酮(RSTF)

敏感的瘤株, 为下一步进行体内实验研究提供依据。

1 材料

1.1 药材 广西甜茶购于广西南宁中药材批发站, 经广西中医学院中药鉴定学教研室廖月葵高级实验师鉴定为蔷薇科悬钩子属甜茶 *R. suavissimus* 的干燥树叶。

1.2 试剂 95% 的乙醇(广东汕头市西陇化工厂, 批号 0508042); 盐酸(分析纯, 北京化工厂, 批号 20040516); 聚酰胺(浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂, 批号 20050602); 甲醇(色谱纯, 天津市四友生物医学技术有限公司, 批号 050528101); 槲皮素标准品(中国药品生物制品检定所, 批号 050621); 薄层层析硅胶(青岛海洋化工厂, 批号 04504012) RP-

[收稿日期] 2010-02-21

[基金项目] 广西中医学院研究生导师课题(Y2005058)

[第一作者] 吴燕春, 助教, 硕士, 研究方向: 中药药理, Tel: 13377186283, E-mail: wuyanchun_3333@126.com

[通讯作者] * 谢金鲜, 教授, 研究方向: 中药药理, Tel: (0771) 2279423, E-mail: xjx8115@126.com

MI1640 培养基(GIBICO 产品, 分装); 新生小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司); DMSO(Amresco 分装, 0231); MTT(Amresco 分装, N1075)。

1.3 仪器 RE 52-98 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); Agilent1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦技术公司); UV-520 紫外分光光度仪(北京普析技术公司); 96 孔细胞培养板(Coming 美国产); 倒置显微镜(德国 LEICA BMIRB 产); 二氧化碳培养箱(Thermo Forma); 酶标仪(奥地利 SUNRISE 产); 超净工作台(型号 DLE560, 荷兰 Clear Air 产); 高速低温离心机(德国 Biofuge Stoctos 产)。

1.4 肿瘤细胞株 小鼠 S180 肉瘤鼠, 购自广西中医药研究所, 由广西中医学院药理学实验室接种保存。H22 荷瘤鼠(腹水型)、小鼠白血病 L1210 细胞株由广西中医学院药理学细胞培养室体外细胞复苏后接种保存。

2 方法

2.1 RSTF 的提取、分离及鉴定 广西甜茶用 60% 的乙醇回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并滤液后回收乙醇得甜茶浓缩液, 再过聚酰胺柱, 依次用水、50% 的乙醇洗脱, 弃水洗脱液, 50% 的洗脱液出现盐酸镁粉反应阳性后开始收集, 直到无盐酸镁粉反应为止, 回收乙醇, 蒸干, 再用 100% 乙醇纯化, 得棕黄色粉末即 RSIF, 分别用显色反应、薄层层析色谱法和高效液相法对其进行鉴别。

2.2 体外抗肿瘤作用筛选 用 RPMI1640 将 S180, H22, L1210 细胞, 调至密度至 1×10^5 个/mL, 接种于 96 孔培养板在 37℃, 5% CO₂ 的培养箱培养 24 h。空白对照组加入无血清的 RPMI1640 培养液, 实验组将广西甜茶总黄酮分成 6 个浓度, 每个浓度做 4 个复管。每孔加入 100 μL 广西甜茶总黄酮, 使其终浓度分别为 15.62, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 μg · mL⁻¹, 在培养箱继续培养 48 h, 然后每孔加入 MTT 溶液 10 μL, 继续培养 4 h, 离心后吸弃上清液。每孔加入 200 μL 二甲基亚砷, 在酶标仪轻轻振荡 10 min 后, 570 nm 波长处测各孔吸光度(A)。计算抑制率, 通过抑瘤率对药物浓度作直线回归方程, 计算出 IC₅₀。肿瘤细胞生长抑制率 = (空白对照组 A - 药物处理 A) / 空白对照组 A × 100%。

2.3 统计学处理 采用 SPSS10.0 软件进行统计学分析, 数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为有显著意义。

3 结果

3.1 广西甜茶总黄酮的鉴别

3.1.1 显色反应 盐酸-镁粉反应: 阳性反应, 呈红色。

3.1.2 薄层层析色谱法 与对照品槲皮素在 R_f 相同位置在紫外灯下, 有紫色荧光斑点。

3.1.3 高效液相法 以槲皮素为标准品, 测出在 T = 4.838 min 时, 有一个最大吸收峰。而样品在 T = 4.883 min 有吸收峰, 即样品中出现与对照品保留时间相同的色谱峰, 证明广西甜茶总黄酮中含有槲皮素。

3.2 广西甜茶总黄酮对体外培养肿瘤细胞增殖的影响

MTT 法结果显示在 62.5 ~ 500 μg · mL⁻¹ 广西甜茶总黄酮对 3 种肿瘤细胞均有明显的抑制作用, 其中对 H₂₂ 抑制作用最强 (IC₅₀ 46.31 μg · mL⁻¹), 对 S₁₈₀ 抑制作用次之 (IC₅₀ 71.48 μg · mL⁻¹), 对 L₁₂₁₀ 抑制作用最弱 (IC₅₀ 163.59 μg · mL⁻¹)。结果见表 1 ~ 表 3。

表 1 广西甜茶总黄酮对体外培养肿瘤细胞 S180 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

剂量 / μg · mL ⁻¹	A	抑制率 / %	IC ₅₀ / μg · mL ⁻¹
0	2.337 ± 0.2231	-	
15.62	1.842 ± 0.274 1 ¹⁾	24.01	
31.25	1.504 ± 0.310 2 ¹⁾	35.73	
62.5	1.286 ± 0.121 2 ¹⁾	47.43	71.48
125	0.917 ± 0.137 3 ¹⁾	60.71	
250	0.626 ± 0.171 9 ²⁾	71.10	
500	0.336 ± 0.015 5 ²⁾	85.63	

注: 与空白组比较 ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (下同)

回归方程: $Y = 0.001091X + 0.240394, r = 0.911093$

表 2 广西甜茶总黄酮对体外培养肿瘤细胞 H22 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

剂量 / μg · mL ⁻¹	A	抑制率 / %	IC ₅₀ / μg · mL ⁻¹
0	2.143 ± 0.279	-	
15.62	1.631 ± 0.304 6 ¹⁾	23.71	
31.25	1.442 ± 0.407 ¹⁾	32.61	
62.5	0.724 ± 0.407 ¹⁾	66.26	46.31
125	0.433 ± 0.084 ²⁾	79.78	
250	0.346 ± 0.039 0 ²⁾	84.83	
500	0.251 ± 0.043 0 ²⁾	88.26	

回归方程: $Y = 0.005195X + 0.201503, r = 0.94005$ 。

表 3 广西甜茶总黄酮对体外培养肿瘤细胞 L 1210 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

剂量 / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	A	抑制率 / %	IC ₅₀ / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
0	1.855 ± 0.16	-	
15.62	1.804 ± 0.165	2.700	
31.25	1.712 ± 0.089	7.700	
62.5	1.517 ± 0.090 ¹⁾	18.24	163.59
125	1.124 4 ± 0.444 ¹⁾	39.38	
250	0.790 ± 0.171 9 ²⁾	57.43	
500	0.22 ± 0.011 ²⁾	88.14	

回归方程: $Y=0.001783X+0.054395, r=0.97616$

4 讨论

广西瑶山甜茶性平味甘, 具有清热、润肺、消肿止痛、祛痰和止咳等功效^[1-2], 其主要成分为广西甜茶素及黄酮类化合物^[3-4]。对广西甜茶素的药理研究已有文献报道, 但对广西甜茶黄酮类化合物的药理研究尚未见文献报道。本实验从广西甜茶中经乙醇提取, 聚酰胺柱分离后, 用化学反应、薄层层析法及高效液相法进行鉴定得到总黄酮, 采用 MTT 法对

肿瘤株 S 180, H 22, L 1210 进行 RSTF 体外抗肿瘤作用筛选。结果显示, 62.5 ~ 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 广西甜茶总黄酮对 S 180, H 22, L 1210 均有明显的抑制作用, 其中对 S 180, H 22 肿瘤细胞的 IC₅₀ 均小于 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。提示广西甜茶总黄酮在体外对肿瘤株 S 180, H 22, L 1210 的增殖具有较强抑制作用, 为今后进一步研究广西甜茶提供了前期研究信息。

[参考文献]

- [1] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准 [S]. 南宁: 广西科学技术出版社, 1990: 84.
- [2] 钟正贤, 周桂芬, 陈学芬, 等. 广西甜茶提取物药理研究 [J]. 时珍国医国药, 2000, 11(10): 867.
- [3] 卢昕, 张新申, 刘承伟. 反相高效液相色谱法测定广西甜茶中甜茶素 [J]. 色谱, 2003, 21(3): 260.
- [4] 杨大坚, 钟焜昌, 肖倬殷, 等. 甜茶化学成分研究. 黄酮类成分 [J]. 中草药, 1991, 22(5): 198.

[责任编辑 何伟]