

# 青天葵中黄酮类化合物的体外抗肿瘤实验研究

甄汉深\*, 周燕园, 袁叶飞, 梁臣艳, 丘 琴, 钟振国, 张薇薇

(广西中医学院, 广西 南宁 530001)

[摘要] 目的: 观察青天葵中黄酮类化合物鼠李柠檬素和鼠李秦素对 7 种肿瘤细胞的抑制作用。方法: 采用 MTT 法测定了它们各自对白血病细胞株 L1210 和 P388D1、宫颈癌细胞株 HeLa、人胃癌细胞株 SGC7901、黑色素瘤细胞株 B16、神经性肿瘤细胞株 NG108-15、人肝癌细胞株 Hele7404 的生长抑制情况。结果: 鼠李柠檬素对 L1210, P388D1, HeLa, B16, NG108-15 和 Hele7404 6 种瘤株都有直接抑制作用, 而且都随着浓度的增加, 抑制作用增强。但鼠李柠檬素对瘤株 SGC7901 基本无抑制作用, 鼠李秦素对 7 种瘤株均无抑制作用。结论: 鼠李柠檬素具有一定的体外抗肿瘤作用, 初步确定鼠李柠檬素为青天葵抗肿瘤的活性成分之一。鼠李秦素基本无抗肿瘤作用。

[关键词] 黄酮; 鼠李柠檬素; 鼠李秦素; 体外抗肿瘤作用

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)03-0036-03

## Study on the Anticancer Effect in Vitro of Flavonoids Compounds Obtained from *Nervilia fordii*(Hance) Schltr.

ZHEN Han-shen\*, ZHOU Yan-yuan, YUAN Yefei, LIANG Chen-yan,

QIU Qin, ZHONG Zhen-guo, ZHANG Wei-wei

(Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning, Guangxi 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To assay the inhibitive effect on seven kinds of human tumor cells of rhamnocitrin and rhamnazin flavonoids compounds obtained from *Nervilia fordii*(Hance) Schltr. **Methods:** Anticancer experiment in vitro was done by applying MTT method to investigation of rhamnocitrin and rhamnazin on human leukemia L1210 and P388D1, uterine carcinoma HeLa, gastric adenocarcinoma SGC7901, inhibiting cell B16, neuromas NG108-15, Human hepatoma Hele7404. **Results:** Rhamnocitrin inhibited the growth of L1210, P388D1, HeLa, B16, NG108-15 and Hele7404 human tumor cells. With the concentration elevated, inhibiting action increased. But rhamnocitrin had no effects on SGC7901, and rhamnazin had no effects on seven kinds of human tumor cells. **Conclusion:** Rhamnocitrin, one of the active principles of *Nervilia fordii*(Hance) Schltr, inhibited the growth of human tumor cells in vitro. However, rhamnazin had no effects.

[Key words] flavonoids; rhamnocitrin; rhamnazin; anticancer effect in vitro

青天葵主产于广西、广东和海南。是广西特产

药材<sup>[1,2]</sup>。具有清肺止咳、健脾消积、镇痛止痛、散瘀消肿、清热解毒之功效。近来用含有青天葵复方制剂治疗鼻咽癌以缓解症状<sup>[3]</sup>, 但未发现国内外对其抗肿瘤有效成分及其药理作用进行研究。黄酮类化合物是一类存在于多种植物中的多酚化合物, 具有多种潜在的药用价值, 其中抗肿瘤作用是一个研究热点<sup>[4]</sup>。为此, 我们对前期经实验证实的抗肿瘤活性部位即石油醚和乙酸乙酯部位, 通过柱色谱分离、

[收稿日期] 2007-07-03

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30160095)与地区联合资助; 国家人事部留学回国人员资助项目(人发[2002]99号); 广西人事厅广西“新世纪十百千人才工程”资助项目(2001209)。

[通讯作者] \* 甄汉深, Tel: (0771) 2219867; E-mail: 8zhen@163.com

纯化得到的两个黄酮化合物鼠李柠檬素(rhamnocitrin)和鼠李秦素(rhamnazin)进行体外抗肿瘤试验。为阐明青天葵的抗肿瘤作用,并筛选出有效物质打下基础。

## 1 实验材料

**1.1 受试样品** 鼠李柠檬素(纯度:98.1%)和鼠李秦素(纯度:99.0%),由青天葵进行提取、分离、纯化得到,均用含有DMSO的培养液溶解,配成浓度为 $320 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱密闭避光保存。临用前用不含血清和抗生素的RPMI1640(NG108-15用DEME)液稀释至所需浓度,DMSO终浓度在0.01%水平。

### 1.2 培养液

**1.2.1 RPMI完全培养液** 含RPMI1640培养基(GIBCO)3%谷氨酰胺、卡那霉素 $750 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、10%FBS(临用前加)。

**1.2.2 DEME完全培养液** 含DEME培养基(GIBCO)、卡那霉素 $750 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、10%FBS(临用前加)。

**1.3 细胞株** 白血病细胞株L1210和P388D1、宫颈癌细胞株Hela、人胃癌细胞株SGC7901、黑色素瘤细胞株B16、神经肿瘤细胞株NG108-15等均购自上海细胞生物研究所细胞库,人肝癌细胞株Hele7404由广西医科大学药理教研室提供。

**1.4 试剂** MTT(四甲基噻唑蓝)为德国Sigma公司产品,批号:020609;FBS(胎牛血清)为美国Hyclone公司产品,批号:0405;RPMI1640和DEME培养基为GIBCO公司产品,批号:1120708和0311;Trypsin(胰蛋白酶)由天津市灏洋生物制品有限责任公司提供,批号:200503;DMSO(二甲亚砜)由天津汇英化学试剂有限公司提供,批号:20030526。

**1.5 细胞培养** 肿瘤细胞用含10%灭活新生小牛血清的RPMI1640(NG108-15肿瘤细胞用DEME)培养基在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、15% $\text{CO}_2$ 条件下培养,取对数生长期细胞用于实验。

**1.6 实验仪器** Thermo Forma型 $\text{CO}_2$ 培养箱,美国产。Olympus型倒置显微镜,日本产。Biocell型酶标仪,奥地利产。AG135型电子天平,瑞士产。培养瓶,美国产。3072型96孔板,丹麦产。3001型培养皿,美国产。DLF560型超净工作台,荷兰产。HV-50自动高压灭菌器,日本产。

## 2 实验方法

**2.1 体外抗肿瘤试验(MTT法)** 取对数生长期细胞以0.25%胰蛋白酶和0.02%EDTA消化后,用培养液稀释。在96孔培养板(NUNC)中每孔加入200 $\mu\text{L}$ (含有 $5000\text{个}\cdot\text{mL}^{-1}$ 肿瘤细胞)含10%FBS的RPMI1640培养液,NG108-15细胞则用含10%FBS的DEME培养液,细胞置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、10% $\text{CO}_2$ 培养24h后,实验组分别加入最终浓度为10,20,40,80,160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 提取物的培养液,对照组则加入等体积溶剂的培养液,每组4孔,重复4次。置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、10% $\text{CO}_2$ 培养5d后,弃去上清液,加入200 $\mu\text{L}$ /孔新鲜配置的含 $0.2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MTT的无血清培养液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 继续培养4h,弃上清液,加入200 $\mu\text{L}$ DMSO,振荡混匀后,在酶标仪上以波长为550nm,参比波长为450nm,测定OD值。

**2.2 药物对肿瘤细胞生长的抑制率的计算方法**<sup>[5]</sup> 肿瘤细胞生长抑制率% = (1 - 实验组平均OD值/对照组平均OD值) × 100%

### 2.3 半数抑制浓度 $\text{IC}_{50}$ 的计算

**2.3.1 直线回归法**<sup>[6]</sup> 当细胞生长抑制率与药物浓度有对数关系时,以各个不同药物的对数浓度为横坐标,相应的细胞生长抑制率为纵坐标,求出直线回归方程,根据该方程计算出 $\text{IC}_{50}$ 。

**2.3.2 改良寇氏法**<sup>[7]</sup> 当细胞生长抑制率与药物浓度不存在对数关系时,采用寇氏法计算 $\text{IC}_{50}$ 。药物 $\text{IC}_{50}$ 值的公式为:  $\text{IC}_{50} = \lg^{-1} [X_m - i(\sum p - 0.5)]$ 。式中 $X_m$ :设计的最大浓度的对数值; $i$ :相邻两组浓度对数值之差; $\sum p$ :各组生长抑制率之和;0.5:经验常数。

## 3 实验结果

**3.1 鼠李柠檬素的体外抗肿瘤作用** 鼠李柠檬素对白血病细胞株L1210和P388D1、宫颈癌细胞株Hela 3种瘤株都有直接抑制作用,而且随着浓度的增加抑制作用也增长。鼠李柠檬素对以上3种瘤株的生长抑制率与药液浓度不成对数关系,因而用寇氏法求 $\text{IC}_{50}$ ,其 $\text{IC}_{50}$ 分别为44.4、34.8和29.8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。鼠李柠檬素对黑色素瘤细胞株B16、神经肿瘤细胞株NG108-15、人肝癌细胞株Hele7404 3种瘤株都有直接抑制作用,而且随着浓度的增加抑制作用也增长。鼠李柠檬素对此3种瘤株的生长抑制率与药液浓度成对数关系,因而用曲线回归法求 $\text{IC}_{50}$ 。药液对它们的 $\text{IC}_{50}$ 分别为102.1、23.2和117.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

$\text{mL}^{-1}$  见表 1。

表 1 鼠李柠檬素体外抗肿瘤试验

瘤株	不同浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对肿瘤细胞的 生长抑制率(%)					$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
	10	20	40	80	160	
	L1210	0	30.7	54.1	71.3	
P388D1	19.6	42.3	50.6	75.4	82.3	34.8
Hela	28.6	46.2	64.3	75.7	84.9	29.8
B16	7.8	16.7	30.1	44.3	60.8	102.1
NG108-15	33.4	49.7	60.1	73.5	85.8	23.2
Hele7404	9.8	18.5	30.8	42.9	56.4	117.2
SGC7901	0	11.3	0	- 8.9	0	—

3.2 鼠李秦素的体外抗肿瘤试验结果 由表 2 可知, 鼠李秦素基本无抗癌活性。

表 2 鼠李秦素体外抗肿瘤试验

瘤株	不同浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对肿瘤细胞的 生长抑制率(%)					评价
	10	20	40	80	160	
	L1210	11.3	11.5	8.9	7.2	
P388D1	0	15.6	0	0	8.9	
Hela	7.8	0	4.3	9.9	11.2	
B16	15.6	8.9	20.1	18.9	15.6	基本无抗癌活性
NG108-15	7.5	0	0	5.9	8.8	
Hele7404	12.3	28.9	31.1	0	12.9	
SGC7901	5.6	11.3	8.9	17.8	8.4	

#### 4 讨论

鼠李柠檬素对不同瘤株的抑制作用不同,  $160 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时, 鼠李柠檬素对 L1210、P388D1、Hela、B16、

NG108-15、Hele7404 的抑制率分别为 84.5%、82.3%、84.9%、60.8%、85.8% 和 56.4%,  $\text{IC}_{50}$  分别为 44.4、34.8、29.8、102.1、23.2 和 117.2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。由  $\text{IC}_{50}$  知, 鼠李柠檬素对 Hela 和 NG108-15 的抑制作用比较强, 它们的  $\text{IC}_{50} < 30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。鼠李柠檬素对人胃癌细胞株 SGC7901 基本无活性。

鼠李秦素对瘤株 L1210、P388D1、Hela、B16、NG108-15、Hele7404 和 SGC7901 基本无抑制作用和抗肿瘤活性。

本课题为揭示青天葵抗肿瘤作用及其物质基础, 实现药材可持续开发利用及抗肿瘤中药开发提供了实验依据。

#### [参考文献]

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上册, 上海: 人民出版社, 1997. 1231.
- [2] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药志[M]. 南宁: 广西壮族自治区人民出版社, 1959. 328.
- [3] 周 洁, 李竹庭. 中药与肿瘤免疫[J]. 天津中医药, 2004, 21(3): 228-229.
- [4] 高 昕, 王喜军. 黄酮类化合物抗肿瘤作用研究进展[J]. 中医药信息, 2005, 22(5): 33.
- [5] 徐叔云, 卞如濂, 陈 修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 1441.
- [6] 王天山, 陆跃鸣, 马国祥, 等. 鼓槌石斛中化学成分对 K562 肿瘤细胞株生长抑制作用体外实验[J]. 天然产物研究与开发, 1997, 9(2): 1.
- [7] 刘 衡, 符仁义, 李丰益, 等. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂对 HL-60 细胞和 K562 细胞的抗肿瘤作用[J]. 中国实验血液学杂志, 2005, 13(6): 964.