

# 鸡血藤黄酮类组分抗肿瘤活性研究

唐 勇<sup>1</sup>, 何 薇<sup>2</sup>, 王玉芝<sup>1</sup>, 张甘霖<sup>3</sup>, 王笑民<sup>1\*</sup>

(1. 首都医科大学附属北京中医医院肿瘤科, 北京 100010;  
2. 北京市中医研究所, 北京 100010; 3. 北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] 目的: 通过体外、体内实验研究鸡血藤黄酮类组分的抗肿瘤作用。方法: 采用 MTT 法, 观察鸡血藤黄酮类组分体外对人肺癌(A549)和人大肠癌(HT-29)细胞系的生长抑制率; 应用流式细胞术检测肿瘤细胞周期的改变。采用小鼠移植性 Lewis 肺癌模型, 观察鸡血藤黄酮类组分体内的抑瘤效应及对荷瘤小鼠造血功能的影响。结果: 鸡血藤黄酮类组分对人肺癌 A549 和人大肠癌 HT-29 细胞系有明显生长抑制作用, IC<sub>50</sub> 分别为 70.17 ± 12.17 μg·mL<sup>-1</sup> 和 126.81 ± 43.00 μg·mL<sup>-1</sup>。高剂量(0.6g·kg<sup>-1</sup>)灌胃时, 对小鼠 Lewis 肺癌的抑制率为 31.01%。该组分能促进红细胞生成, 高剂量组红细胞计数比对照组增加 40.52%。进一步研究发现, 鸡血藤黄酮类组分能阻滞肺癌细胞系 A549 于 S 和 G<sub>2</sub>/M 期, 阻滞肠癌细胞系 HT-29 于 G<sub>2</sub>/M 期。结论: 鸡血藤黄酮类组分具有直接抗肿瘤作用, 细胞周期阻滞是其药效作用机制之一。该组分无骨髓抑制作用, 对红细胞生成有一定促进作用。

[关键词] 鸡血藤; 黄酮; 抗肿瘤; 细胞周期

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)02-0051-04

## Studies on the Anti-tumor Activity of the Extract of *Spatholobus suberctus* Dunn

TANG Yong<sup>1</sup>, HE Wei<sup>2</sup>, WANG Yu-zhi<sup>1</sup>, ZHANG Gan-lin<sup>3</sup>, WANG Xiao-min<sup>1\*</sup>

(1. Beijing Affiliated Hospital of Chinese Medicine, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100010, China;  
2. Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100010, China;  
3. Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the anti-tumor effect of the extract rich in flavonoids of *Spatholobus suberctus* Dunn in vitro and in vivo. **Methods:** In vitro, the inhibitory effects of the extract on proliferation of human lung carcinoma cell line A549 and human colorectal adenocarcinoma cell line HT-29 were measured by MTT assay. Cell cycle were analyzed using flow cytometry. The mouse model of Lewis lung carcinoma was used to investigate the effects of the extract on tumor growth and the hematopoietic system. **Results:** The studies demonstrated that the extract of flavonoids of *Spatholobus suberctus* Dunn inhibited proliferation of A549 and HT-29, and the IC<sub>50</sub> values on them were (70.17 ± 12.17) μg·mL<sup>-1</sup> and (126.81 ± 43.00) μg·mL<sup>-1</sup> respectively. The tumor inhibitory rate of high dose of extract on Lewis lung cancer was 31.01%. The marrow-depression was not found and the peripheral blood red cell count increase to 40.82% in high dose group compared with the control. Furthermore, the extract arrests A549 cell in S and G<sub>2</sub>/M phase, but it induces HT-29 cell cycle arrest in G<sub>2</sub>/M phase only. **Conclusions:** The extract rich in flavonoids of *Spatholobus suberctus* Dunn exists direct anti-tumor effect and the mechanism of the anti-tumor activities may be the progression inhibition of cell

[收稿日期] 2006-07-25

[基金项目] 北京市科技项目(H010910190119)

[通讯作者] \* 王笑民, Tel: (010) 52176568; E-mail: ntxm100@sina.com

cycle. Moreover, this extract can stimulate red blood cell production.

[ **Key words** ] *Spatholobus suberctus* Dunn; Flavonoids; Anti-tumor; Cell cycle

鸡血藤是常用的养血活血药物, 中医临床用于治疗肿瘤中晚期病人的血瘀证<sup>[1]</sup>。国外有个别文献报道, 鸡血藤分离组分能诱导肿瘤细胞凋亡和抗肿瘤转移<sup>[2]</sup>。我科早先的实验也发现, 鸡血藤水提物体外对六种肿瘤细胞系具有抗增殖作用, 在此基础上, 进一步采用聚酰胺柱层析技术和梯度乙醇洗脱的方法, 从鸡血藤水提物中分离得到富含黄酮类化合物的组分, 观察该组分体内外的抗肿瘤效应, 并对药物作用机制进行初步探索。

## 1 仪器与材料

**1.1 仪器** 紫外可见分光光度计 UV-2201(日本岛津), 流式细胞仪 Calibur(美国 BD 公司), 恒温 CO<sub>2</sub> 培养箱(日本三洋), 血液分析仪 MEK-5216K(日本光电公司), SA1000 酶标仪(奥地利 ASYS HI TECH 公司)。

## 1.2 材料

**1.2.1 药品与试剂** 鸡血藤(*Spatholobus suberctus* Dunn) 饮片购自北京卫仁中药饮片厂(批号: 603305101)。聚酰胺(30~60目), 江苏临江试剂化工厂生产; 95%乙醇(AR), 北京化工厂; 黄芩苷对照品, 中国药品生物制品检定所, 批号 7159708; DMEM 培养基, GIBCO 公司; 新生牛血清, 奥地利 PAA 股份有限公司(Cat No: B15-001); 胰蛋白酶, GIBCO 公司; 噻唑蓝(MTT), 华美公司进口分装。

**1.2.2 细胞系及细胞培养** 人肺腺癌 A549 和人大肠腺癌 HT-29 由本科中心实验室提供。细胞培养条件: 高糖 DMEM 培养基, 含 10% 小牛血清和双抗(青霉素 100 U·mL<sup>-1</sup>、链霉素 100 μg·mL<sup>-1</sup>), 置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的恒温箱中传代培养。

**1.2.3 动物与瘤株** 选用清洁级 C57BL/6 小鼠, 雄性, 18~20 g。中国医学科学院动物研究所生产, 许可证号: SCXK 京 2004-0001。Lewis 肺癌由中国医学科学院肿瘤医院提供。

## 2 方法

**2.1 试药的制备** 鸡血藤黄酮类组分由北京市中医研究所药理药化室提取。将药材碎成小块(1 kg), 加去离子水浸泡 1 h, 回流提取 2 次, 120 目筛滤过。合并提取液冷藏过夜, 取上清浓缩至稠膏, 真空干燥(温度 60℃、真空度 0.01 Pa、时间 6 h), 干膏称重(180 g)。取干膏水溶解, 上已处理好的聚酰胺柱

(柱直径 5 cm、柱高 40 cm, 水洗至流出液澄明后备用)。换不同浓度乙醇(0%、30%、95%)梯度洗脱, 收集 95%乙醇洗脱部分, 回收乙醇至无醇味, 经水浴蒸干, 真空干燥得洗脱物 3.89 g 备用。采用分光光度法, 以黄芩苷为对照品, 紫外分光光度计于 278 nm 处测定黄酮类化合物含量, 每 g 提取物约含 0.27 ± 0.04 g。

**2.2 MTT 比色法<sup>[3]</sup>** 将处于对数生长期的肿瘤细胞制成单细胞悬液, 调细胞浓度为 2.5 × 10<sup>7</sup>·L<sup>-1</sup>, 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μL, 于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中培养 24 h 后, 每孔加 100 μL 含药或无药培养液, 设空白及细胞对照组、各浓度用药组、各浓度药品调零组, 每组至少设 3 个复孔。继续培养 72 h 后, 每孔加入 MTT(5 g·L<sup>-1</sup>) 15 μL, 同等条件继续培养 4 h。弃培养液, 每孔加入 150 μL DMSO, 充分震荡混匀, 使结晶溶解, 在酶联仪上测 490 nm 处光吸收度(A 值), 并计算细胞增殖抑制率(IR)。实验重复 3 遍。

细胞增殖抑制率(%) = (1 - 实验组 OD 值/对照组 OD 值) × 100%

**2.3 体内抑瘤实验** 将荷瘤(Lewis 肺癌) 14 d 的小鼠(C57BL/6) 颈椎脱臼法处死, 无菌选取新鲜瘤组织, 剪碎研磨, 加生理盐水稀释成单细胞悬液并计数, 调整细胞浓度 5 × 10<sup>6</sup>·mL<sup>-1</sup>, 于每只小鼠右前肢腋部皮下接种 0.2 mL。接种后第 2 天称重, 将荷瘤小鼠随机分成对照组、环磷酰胺(CTX)组、鸡血藤黄酮类组分高、中、低剂量组, 每组 10 只。对照组每只每天纯净水灌胃 0.3 mL, 鸡血藤组分别按 0.6, 0.3, 0.15 g·kg<sup>-1</sup>灌胃给药, 每只每天 0.3 mL, 连续给药 12 d。CTX 组腹腔注射环磷酰胺 30 mg/kg, 隔日 1 次。于末次给药次日处死小鼠, 称体重及瘤重, 计算抑瘤率。实验重复 2 次, 合并统计。

抑瘤率(%) = (1 - 实验组平均瘤重/对照组平均瘤重) × 100%

**2.4 细胞周期测定<sup>[4]</sup>** 采用 50、100、200 μg·mL<sup>-1</sup>鸡血藤黄酮类组分作用细胞 24 h 后, 收集 1 × 10<sup>6</sup> 个细胞, 70% 冰乙醇 4℃固定 4 h 以上。离心弃乙醇, PBS 清洗, 加入 RNAase(1 mg·mL<sup>-1</sup>) 0.1 mL 于 37℃温育 0.5 h, 再加入 PI(50 μL·mL<sup>-1</sup>) 0.4 mL 室温避光染色

10 min。流式细胞仪检测细胞周期,采用 ModFit LT for Mac V3.0 软件进行数据分析。

**2.5 动物血象参数测量** 将荷瘤小鼠随机分成对照组、环磷酰胺(CTX)组、鸡血藤黄酮类组分高、中、低剂量组,每组 10 只。按抑瘤实验方法连续给药 12 d。各组小鼠眼眶取血,血液分析仪测量 WBC、RBC、PLT。实验重复 2 次,合并统计。

**2.6 统计方法** 所有数据采用 SAS 6.12 统计分析软件处理,以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间采用方差分析,以  $P < 0.05$  作为显著性差异。药物半数抑制浓度( $IC_{50}$ )应用 Origin 软件计算。

### 3 结果

**3.1 鸡血藤黄酮类组分体外对肿瘤细胞系的生长抑制作用** 鸡血藤黄酮类组分对人肺癌 A549 和人大肠癌 HT-29 细胞系有明显生长抑制作用, $IC_{50}$  分别为  $(70.17 \pm 12.17) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $(126.81 \pm 43.00) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (见图 1)。

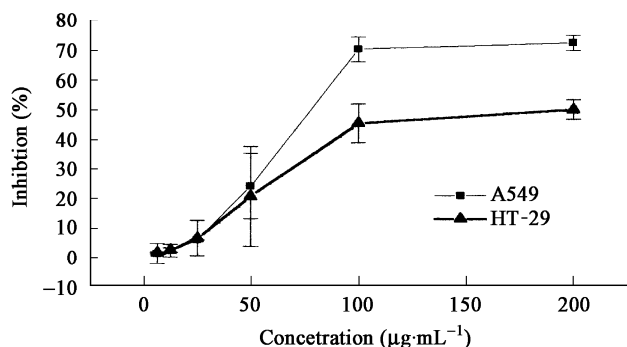


图 1 鸡血藤黄酮类组分对 A549 和 HT-29 细胞系的增殖抑制作用

表 2 鸡血藤黄酮类组分( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )作用 24 h 对 A549 和 HT-29 细胞周期的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3, \%$ )

药物终浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	A549			HT-29		
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
0	60.59 ± 3.14	30.98 ± 2.57	8.43 ± 0.59	47.13 ± 1.08	42.50 ± 4.77	14.61 ± 1.51
50	60.99 ± 4.16	26.67 ± 2.70	12.34 ± 2.80	41.58 ± 5.00	42.78 ± 4.23	15.64 ± 2.60
75	51.95 ± 3.61 <sup>1)</sup>	33.05 ± 4.38	15.01 ± 0.77 <sup>1)</sup>	42.45 ± 8.10	36.16 ± 5.05	21.39 ± 7.04
100	46.61 ± 2.25 <sup>1)</sup>	39.38 ± 7.11 <sup>1)</sup>	14.00 ± 4.89 <sup>1)</sup>	39.40 ± 8.54	34.62 ± 6.23	25.98 ± 8.04 <sup>1)</sup>
150	50.99 ± 0.30 <sup>1)</sup>	34.78 ± 2.11	14.24 ± 1.86 <sup>1)</sup>	32.34 ± 7.21 <sup>1)</sup>	39.31 ± 10.27	28.35 ± 7.74 <sup>1)</sup>

注:与对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ 。

### 4 讨论

鸡血藤是一味养血活血中药,中医古籍记载用于治疗月经不调、血虚萎黄、风湿痹痛等症。鸡血藤来源品种较多,2002 年版中国药典将豆科植物密花豆(*Spatholobus suberectus* Dunn)作为鸡血藤正品<sup>[5]</sup>。

**3.2 鸡血藤黄酮类组分对小鼠 Lewis 肺癌的抑制作用** 鸡血藤黄酮类组分体内具有一定抗肿瘤作用,呈剂量依赖关系,高剂量对小鼠移植性 Lewis 肺癌的抑制率可达 31.01% (见表 1)。

表 1 鸡血藤黄酮类组分对小鼠 Lewis 肺癌的抑制作用( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

组别	剂量 ( $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	体重(g) (开始/结束)	瘤重 (g)	抑瘤率 (%)
荷瘤对照组	—	19.47 ± 0.87/22.70 ± 2.15	2.58 ± 0.86	—
CTX 组	0.03	20.28 ± 0.48/23.34 ± 2.01	0.82 ± 0.56 <sup>1)</sup>	68.22
鸡血藤黄酮组	0.15	19.57 ± 1.16/21.01 ± 2.28	1.95 ± 0.89 <sup>1)</sup>	24.42
	0.30	19.10 ± 0.53/21.85 ± 1.93	1.91 ± 0.88 <sup>1)</sup>	25.97
	0.60	18.61 ± 0.76/20.44 ± 2.24	1.78 ± 1.12 <sup>1)</sup>	31.01

注:与荷瘤对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ 。

**3.3 鸡血藤黄酮类组分对肿瘤细胞周期的影响** 鸡血藤黄酮类组分对肿瘤细胞周期具有明显阻滞作用。药物作用 24 h, A549 细胞系表现为 S 和 G<sub>2</sub>/M 期阻滞, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞百分率减少,在  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  间呈剂量依赖关系。HT-29 细胞系则表现为 G<sub>2</sub>/M 期阻滞, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞百分率下降,呈量效关系(见表 2)。

**3.4 鸡血藤黄酮类组分对荷瘤小鼠血象的影响** 环磷酰胺组白细胞明显减少,而鸡血藤黄酮类组分对荷瘤小鼠造血系统没有抑制作用。相反,荷瘤小鼠红细胞、白细胞和血小板数量随用药量的提高显示出增高的趋势。高剂量组小鼠红细胞数量比对照组提高 40.52%,且具有统计学差异,  $P < 0.05$  (见表 3)。

鸡血藤具有刺激骨髓造血功效<sup>[6]</sup>,但有关其抗肿瘤作用的报道甚少,通常认为鸡血藤能通过提高 NK 细胞和 LAK 细胞活性以及刺激细胞因子分泌间接发挥抗肿瘤作用<sup>[7]</sup>。我们的研究发现,鸡血藤具有直接抗肿瘤活性。鸡血藤水煎剂体外对六种细胞

系(A549、HT-29、PG、PANC-1、SMMC-7721、IEC-6)有生长抑制作用(待发表),对小鼠移植性H<sub>22</sub>肝癌和Lewis肺癌也有一定抑瘤效果。但是,鸡血藤水煎剂在动物实验中表现出一定程度的毒性,实验结果也不太稳定。因此,有必要对鸡血藤抗癌活性成分进行分离、提取和纯化。

表 3 鸡血藤黄酮类组分对荷瘤小鼠血象的作刚( $\bar{x} \pm s, n=20$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	WBC (×10 <sup>9</sup> /L)	RBC (×10 <sup>12</sup> /L)	PLT (×10 <sup>9</sup> /L)
荷瘤对照组	—	18.75±5.60	4.96±1.72	489.45±172.26
CTX 组	0.03	12.09±5.32 <sup>1)</sup>	6.61±1.57	835.50±189.45 <sup>1)</sup>
鸡血藤黄酮组	0.15	18.26±4.40	5.47±1.79	550.27±167.29
	0.30	22.74±9.06	5.95±1.81	539.83±154.20
	0.60	21.58±7.86	6.97±1.87 <sup>1)</sup>	612.83±173.99

注:与荷瘤对照组比较<sup>1)</sup>P<0.05

中药成分分析研究发现,鸡血藤非挥发性物质中含有大量黄酮类化合物,目前已发现有34种,包括黄酮类(去甲氧基甘石黄素)、异黄酮类(芒柄花素)、二氢黄酮类(密花豆素)、拟雌内酯类(苜蓿内酯)、查尔酮类(异甘草素)、花青素类(原儿茶酸)、黄烷醇类(表儿茶素)等<sup>[8]</sup>。大量文献报道<sup>[9]</sup>,黄酮类化合物具有高效、低毒的抗肿瘤活性,例如:槲皮素(queretin)、槲草黄素(luteolin)、染料木黄酮(genistein)等,但人们对鸡血藤中大多数黄酮类化合物的药理活性知之甚少,因此,我们采用柱层析技术分离提取得到富含黄酮类化合物的鸡血藤组分(总黄酮含量约为27%),经离体和整体实验证实,该组分具有较好的抗肿瘤活性,体外IC<sub>50</sub>值比水提物降低一倍,体内抑瘤率可达31.1%。

化疗药物通常抑制骨髓造血,产生严重的毒副作用,而鸡血藤黄酮类组分未表现出明显毒性,通过对动物外周血象的分析发现,白细胞和血小板数量未下降,而红细胞数量明显增加,增长率可达40.52%,这对改善肿瘤晚期贫血和化疗引起的骨髓抑制是有益的。

对黄酮类化合物抗肿瘤机制的研究认为<sup>[10]</sup>,该类化合物能阻断细胞周期,诱导细胞凋亡;抑制细胞信号转导过程中的关键酶(酪氨酸蛋白激酶、蛋白激酶C、磷酸酰肌醇3激酶α);抑制拓扑异构酶II,影

响DNA合成;促进抑癌基因表达,抑制癌基因表达等。我们的实验也发现,鸡血藤黄酮类组分对肿瘤细胞周期具有调控作用,可以明显阻滞肺癌细胞系A549于S和G<sub>2</sub>/M期,阻滞肠癌细胞系HT-29于G<sub>2</sub>/M期,因此调控细胞周期有可能是鸡血藤活性成分的主要抗癌机制之一,值得深入研究。

本次实验结果表明,鸡血藤黄酮类组分具有直接抗肿瘤活性,而且表现出低毒的特点,该组分当中的黄酮类化合物值得进一步研究。这些黄酮类化合物的组成、分子结构、代谢途径、相互作用、抗癌活性、药效靶点等,均有待进一步阐释。

### [参考文献]

[1] 王笑民.论益气活血法治疗肿瘤[J].中国中医药信息杂志,1998,5(10):11-12.

[2] Ha ES, Lee EO, Yoonm TJ, et al. Methylene Chloride Fraction of *Spatholobi Caulis* Induces Apoptosis via Caspase Dependent Pathway in U937[J]. Cells. Biol Pharm Bull. 2004 Sep, 27(9):1348-1352.

[3] 赵世元,王乃平,钟振国,等.甘草总黄酮诱导肝癌细胞凋亡的实验研究[J].广西医科大学学报,2005,22(2):235-237.

[4] 董波,陈肖华,张浩,等.一种改进的用于测定细胞周期的细胞制备方法[J].军事医学科学院院刊,2002,26(2):124-129.

[5] 崔艳君,陈若芸.鸡血藤化学和药理研究进展[J].天然产物研究与开发,2002,15(4):72-78.

[6] 王东晓,陈孟莉,殷建芬,等.鸡血藤活性成分SS8对骨髓抑制小鼠造血祖细胞增殖的作用[J].中国中药杂志,2003,28(2):152-155.

[7] 戴关海,杨锋,沈翔,等.鸡血藤对S180小鼠细胞毒细胞活性影响的实验研究[J].中国中医药科技,2001,8(3):164-165.

[8] 林茂,李守珍,三川潮,等.密花豆藤化学成分的研究[J].中草药,1989,20(2):5-8.

[9] Lambert JD, Hong J, Yang GY, et al. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations[J]. Am J Clin Nutr, 2005 Jan, 81(1 Suppl):284S-291S.

[10] 黄华艺,查锡良.黄酮类化合物抗肿瘤作用研究进展[J].中国新药与临床杂志,2002,21(7):428-433.