

# 三脉菝葜醇提物及其不同极性萃取部位的抗肿瘤作用研究<sup>△</sup>

鲁 遇<sup>1,2\*</sup>, 余英才<sup>2</sup>, 梁永红<sup>1#</sup>(1.江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室/创新药物与高效节能降耗制药设备国家重点实验室,南昌 330004;2.江西中医药大学生物化学教研室,南昌 330004)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)19-2645-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.19.11

**摘要** 目的:研究三脉菝葜醇提物及其不同极性萃取部位的抗肿瘤作用,为其抗肿瘤活性部位的筛选提供参考。方法:采用MTT法检测不同质量浓度的三脉菝葜醇提物及其石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和水层萃取部位对人肝癌细胞株HepG2、人肺癌细胞株A549、人乳腺癌细胞株MCF-7和MDA-MB-231、人宫颈癌细胞株HeLa以及人卵巢癌细胞株HO-8910的增殖抑制率,并计算其半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。将80只KM小鼠通过右前肢腋部皮下接种S180细胞悬液的方法复制荷瘤小鼠模型,并按体质量随机分为8组,即模型组(生理盐水,每天灌胃2次),环磷酰胺(阳性药物)组(0.025 g/kg,每天腹腔注射给药1次),三脉菝葜醇提物高、中、低剂量组和醇提物乙酸乙酯萃取部位高、中、低剂量组(以浸膏计给药剂量均分别为0.1、0.05、0.025 g/kg,每天灌胃2次),每组10只;各组小鼠均连续给药14 d;末次给药后禁食不禁水12 h,检测各组小鼠的抑瘤率、脾指数和胸腺指数。结果:体外试验表明,三脉菝葜及其不同极性萃取部位对6种肿瘤细胞的增殖抑制作用均呈现明显的量-效关系。其中以醇提物乙酸乙酯萃取部位的作用最强,其对各种肿瘤细胞的IC<sub>50</sub>在40~210 μg/mL范围内,对MCF-7细胞、MDA-MB-231细胞和HeLa细胞的IC<sub>50</sub>分别为70.56、83.58、44.67 μg/mL。体内实验表明,各给药组小鼠的瘤质量较模型组均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),并且三脉菝葜醇提物高剂量组和醇提物乙酸乙酯萃取部位高、中剂量组小鼠瘤质量显著低于环磷酰胺组( $P<0.01$ );环磷酰胺组、三脉菝葜醇提物高剂量组和醇提物乙酸乙酯萃取部位高、中剂量组小鼠脾指数较模型组显著降低( $P<0.01$ ),环磷酰胺组小鼠胸腺指数较模型组和其他各给药组均显著升高( $P<0.01$ )。结论:在4个极性部位中,三脉菝葜醇提物乙酸乙酯萃取部位的抗肿瘤效果最佳,并且免疫抑制作用较小。

**关键词** 三脉菝葜;醇提物;不同部位;抗肿瘤;小鼠

## Study on Anti-tumor Effect of Ethanol Extract of *Smilax trinervula* and Its Different Polar Extract Parts

LU Yu<sup>1,2</sup>, YU Yingcai<sup>2</sup>, LIANG Yonghong<sup>1</sup>(1.Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education/State Key Laboratory of Efficient Energy-saving and Consumption-reducing Pharmaceutical Equipment, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China; 2.Biochemistry Laboratory of Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the anti-tumor effect of ethanol extract of *Smilax trinervula* and its different polar extract parts, and to provide reference for the screening of anti-tumor active parts. METHODS: MTT method was used to detect the inhibitory rates of different concentrations of ethanol extract of *S. trinervula*, its petroleum ether, ethyl acetate, *n*-butanol and water layer extract parts to the proliferation of human hepatocellular carcinoma cell line HepG2, human lung cancer cell line A549, human breast cancer cell line MCF-7 and MDA-MB-231, human cervical cancer cell line HeLa and human ovarian cancer cell line HO-8910. Semi-inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) was calculated. A total of 80 KM mice were subcutaneously inoculated with S180 cell suspension in right forelimb axilla to induce tumor-bearing mice model. The mice were randomly divided into 8 groups: e.g. model group (normal saline, twice a day, i.g.), cyclophosphamide (positive drug) group (0.025 g/kg, once a day, i.p.), *S. trinervula* ethanol extract high-dose, medium-dose and low-dose groups, ethyl acetate part of ethanol extract high-dose, medium-dose and low-dose groups (0.1, 0.05, 0.025 g/kg by extract, twice a day, i.g.), with 10 rats in each group. The mice in each group were given medicine for consecutive 14 days. The inhibition rate, spleen index and thymus index of mice in each group were measured after fasting for 12 hours after the last administration. RESULTS: *In vitro* experiments showed that *S. trinervula* and different polar extracts inhibited the proliferation of 6 kinds of tumor cells in significant dose-effect manner, especially ethyl acetate part of ethanol extract. IC<sub>50</sub> of it to tumor cells was 40-210 μg/mL, that of it to MCF-7, MDA-MB-231 and HeLa cells were 70.56, 83.58, 44.67 μg/mL, respectively. *In vivo* experiments showed that the tumor mass of mice were decreased significantly in each administrations ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), the tumor mass of mice in *S. trinervula* ethanol extract high-dose group, ethyl acetate part of ethanol extract high-dose and medium dose groups were significantly lower than cyclophosphamide group ( $P<0.01$ ). The spleen index of

<sup>△</sup> 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81560640);江西省自然科学基金资助项目(No.20171BAB205089);江西中医药大学校级科研项目(No. 20132R0047)

\* 硕士研究生。研究方向:天然药物抗肿瘤活性研究。E-mail: luyu19930923@163.com

# 通信作者:讲师,博士。研究方向:中药药效物质基础研究。E-mail: liangli4@126.com

mice was decreased significantly in cyclophosphamide group, *S. trinervula* ethanol extract high-dose group, ethyl acetate part of ethanol extract high-dose and medium dose groups, compared with model group ( $P < 0.01$ ); thymus index of mice in cyclophosphamide group was increased significantly, compared with model group and other administration groups ( $P < 0.01$ ). CONCLUSIONS: The ethyl acetate part of ethanol extract of *S. trinervula* has the best anti-tumor effect and less immunosuppressive effect.

**KEYWORDS** *Smilax trinervula*; Ethanol extract; Different parts; Anti-tumor; Mice

近年来,恶性肿瘤的发病率和病死率均逐年上升,癌症已成为我国居民的第一位死亡原因,疾病负担沉重<sup>[1]</sup>。目前,临床上使用的抗肿瘤药普遍存在治疗窗窄、药品不良反应相对较大、采用冲击疗法易导致过量中毒等问题<sup>[2]</sup>。而研究发现,一些天然药物能够抑制肿瘤的生长,对肿瘤的转移和复发有一定的抑制效果,且对放疗、化疗具有“增效减毒”的作用<sup>[3]</sup>,具有较大的开发研究价值。三脉菝葜(*Smilax trinervula* Miq.)为菝葜科菝葜属植物,主要分布于我国江西、浙江、福建等地,亦分布于日本<sup>[4]</sup>。菝葜属植物以根茎入药,具有利湿去浊、祛风除痹、解毒散瘀的作用,常用于治疗小便淋浊、带下过多、风湿痹痛、疔疮痈肿等病症<sup>[5]</sup>。现代研究发现,该属植物具有抗肿瘤<sup>[6]</sup>、防治动脉粥样硬化<sup>[7]</sup>、抗炎<sup>[8]</sup>等多种药理作用,民间多将三脉菝葜用于治疗疮痈肿痛。据相关研究发现,从三脉菝葜中提取获得的数个单体成分(如薯蓣皂苷、薯蓣次苷)具有一定的体外抗肿瘤活性<sup>[9-10]</sup>,但关于三脉菝葜更多抗肿瘤活性成分的筛选和进一步的体内抗肿瘤作用的研究较少。基于此,本研究采用MTT法考察三脉菝葜醇提取物及其不同极性部位萃取物的对6种肿瘤细胞增殖的体外抑制效果,并考察体外抗肿瘤效果较强的部位对S180荷瘤小鼠的肿瘤生长抑制效果,旨在为进一步阐明三脉菝葜的抗肿瘤活性部位及其进一步开发利用提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

MK-II型酶标仪、3111型二氧化碳培养箱(美国Thermo Scientific公司);TS100-F型倒置显微镜(日本Nikon公司);RE-5205型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);DZF-6030B型真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);HHS-11-2型电热恒温水浴锅(上海博迅实业有限公司);TDZ4A-WS型低速台式离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);SW-CJ-2F型洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);BS124S型万分之一天平[奥多利斯科学仪器(北京)有限公司]。

### 1.2 药品与试剂

三脉菝葜药材于2016年9月份采自江西省宜丰县黄岗山垦殖场,由江西中医药大学黄慧莲教授鉴定为百合科植物三脉菝葜(*S. trinervula* Miq.)的根茎;DMEM高糖培养基(美国Hyclone公司,批号:AAJ207791);胎

牛血清(浙江杭天生物科技股份有限公司,批号:20170124);MTT(批号:303HC510)、试验用顺铂粉末(批号:320B022,纯度: $\geq 98.5\%$ )、胰蛋白酶-EDTA消化液(批号:20170623)、青链霉素混合液(100 $\times$ )(批号:20170625)、二甲基亚砜(DMSO,批号:20180608)均购自北京索莱宝公司;试验用环磷酰胺粉末(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:L1729054,纯度:97%);乙醇、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇等试剂均购自国药集团化学试剂有限公司,均为分析纯。

### 1.3 动物

健康SPF级KM小鼠, $\delta$ ,体质量( $20 \pm 2$ )g,90只,由江西中医药大学动物实验中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(赣)2018-0003。小鼠购入后,SPF级标准饲养,饲养和实验期间予以自由摄食和饮水,并观察小鼠饮食和毛发状况。饲养和实验期间的操作符合国家科学技术部颁布的《实验动物管理条例》<sup>[11]</sup>。

### 1.4 细胞株

人肝癌细胞株HepG2、人肺癌细胞株A549、人乳腺癌细胞株MCF-7和MDA-MB-231、人宫颈癌细胞株HeLa、人卵巢癌细胞株HO-8910以及小鼠肉瘤细胞株S180均来源于中国科学院上海细胞生物研究所细胞库。

## 2 方法

### 2.1 三脉菝葜醇提取物及其各极性部位萃取物的制备

称取干燥的三脉菝葜根茎14kg,切碎,用70%乙醇加热回流提取3次,每次1h,过滤后合并滤液,减压浓缩至无醇味,得到三脉菝葜提取物总浸膏740g(得率:5.286%)。取总浸膏675g混悬于适量的蒸馏水中,依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取,减压浓缩后分别得到三脉菝葜醇提取物各部位萃取物浸膏:石油醚部位萃取部位5.5g(得率:0.043%)、乙酸乙酯部位萃取部位65.9g(得率:0.516%)、正丁醇萃取部位123g(得率:0.963%);并将余下的水液减压浓缩,得到三脉菝葜醇提取物水层部位372.2g(得率:2.915%)。

### 2.2 待测样品溶液的制备

根据预试验结果,分别称取三脉菝葜醇提取物浸膏200mg、醇提取物石油醚萃取部位和醇提取物乙酸乙酯萃取部位浸膏各50mg、醇提取物正丁醇萃取部位浸膏100mg和水层部位浸膏200mg,置于1mL不同量瓶中,用DMSO溶解并定容至1mL,得到不同质量浓度(均以浸

膏量计)的母液:三脉菝葜醇提物为200 mg/mL、醇提物石油醚萃取部位和醇提物乙酸乙酯萃取部位均为50 mg/mL、醇提物正丁醇萃取部位为100 mg/mL、醇提物水层部位为200 mg/mL。取上述母液,用0.22 μm微孔过滤器过滤后,置于4℃冰箱中保存,备用。临用前,取适量溶液用完全培养基(含1%青链霉素混合液和10%胎牛血清的高糖DMEM培养基)稀释到所需质量浓度。

### 2.3 细胞培养

从-80℃冰箱中取出各细胞株,将冻存管置于37℃水浴锅中水浴约1 min,完全解冻后,转入含5 mL完全培养基的离心管中,以1 000 r/min离心3 min,弃上清液,加入6 mL完全培养基,置于37℃、含5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养,复苏后24 h更换培养基,之后每2~3 d对细胞进行一次传代,细胞传代2次以上可用于试验。

### 2.4 MTT法检测三脉菝葜提取物及其不同极性萃取部位的体外抗肿瘤活性

取对数期生长期细胞,使用胰酶消化后用完全培养基调整混悬液中细胞密度为 $5 \times 10^4$  mL<sup>-1</sup>,按每孔100 μL的量将细胞悬液接种至96孔板中,板周围一圈加入100 μL磷酸盐缓冲液(PBS),以防止边缘效应。将细胞置于37℃、含5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养24 h后,吸除上清液,加入相应的含药培养基。根据预试验结果,三脉菝葜醇提物及其不同极性萃取部位分别设定5个给药质量浓度(均按浸膏量计):三脉菝葜醇提物和醇提物正丁醇萃取部位均为1 000、500、400、300、200 μg/mL,醇提物石油醚萃取部位为200、150、100、75、50 μg/mL,醇提物乙酸乙酯萃取部位为200、100、75、50、37.5 μg/mL,醇提物水层部位为2 000、1 500、1 000、500、250 μg/mL,每个质量浓度均设5个复孔,每孔加入含药培养基100 μL。并另设立阳性药物(顺铂)对照(分别用完全培养基将顺铂制成质量浓度为16、4、1、0.25、0.062 5 μg/mL的溶液,每个质量浓度设5个复孔,每孔加入含药培养基100 μL)和空白对照(每孔加入100 μL完全培养基,即单孔细胞不给药,作常规培养)。给药后继续培养48 h,吸除上清液,每孔加入含MTT溶液(5 mg/mL)10 μL的无血清培养基110 μL,继续孵育4 h后终止培养并吸除上清液,加入DMSO溶液100 μL,振荡10 min,使结晶充分溶解(整个过程避光),然后使用酶标仪于490 nm波长处测定各孔吸光度(A)值,记录结果,按照以下公式计算细胞增殖抑制率:细胞增殖抑制率(%)=(1-A<sub>给药孔</sub>/A<sub>空白对照孔</sub>)×100%。并使用SPSS 22.0软件计算三脉菝葜醇提物及其各极性萃取部位对肿瘤细胞的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。

### 2.5 三脉菝葜醇提物及其乙酸乙酯部位对S180实体瘤小鼠的体内抗肿瘤活性

常规操作复苏肉瘤S180细胞,并进行传代培养至对数生长期。用生理盐水调整细胞密度为 $2 \times 10^7$  mL<sup>-1</sup>,每

只小鼠腹腔注射0.5 mL细胞悬液。饲养7 d后,观察发现小鼠腹部膨隆如球状,说明腹水生长旺盛。颈椎脱臼处死小鼠,无菌操作抽取腹水,生理盐水调整小鼠腹水中S180细胞密度为 $2 \times 10^7$  mL<sup>-1</sup>。另取80只小鼠,于每只小鼠腋下接种0.2 mL腹水细胞悬液<sup>[12]</sup>复制S180实体瘤小鼠模型。24 h后,按体质量随机将80只小鼠随机分为模型组(生理盐水,20 mL/kg)、环磷酰胺(阳性药物)组(0.025 g/kg),三脉菝葜醇提物高、中、低剂量组(0.1、0.05、0.025 g/kg,以浸膏计)和醇提物乙酸乙酯萃取部位高、中、低剂量组(0.1、0.05、0.025 g/kg,以浸膏计),每组10只。除环磷酰胺组小鼠每天腹腔注射给药1次外,其余各组小鼠均每天灌胃2次相应药液/生理盐水,各组小鼠均连续给药14 d(参考相关文献<sup>[5,13]</sup>,根据体表面积换算法和生药量折算,三脉菝葜醇提物及其乙酸乙酯萃取部位高、中、低剂量组小鼠的给药量分别相当于成人日给药25、12.5、6.25 g,与菝葜的临床日用量10~15 g符合;环磷酰胺组小鼠给药量亦根据成人临床常用量折算得到),给药期间各组小鼠自由饮食。末次给药后,予以各组小鼠禁食处理12 h,之后处死小鼠,剥离其瘤组织和肝、脾及胸腺组织,称质量,计算抑瘤率和脏器(脾、胸腺)指数,计算方法如下:抑瘤率(%)=(模型组瘤质量-给药组瘤质量)/模型组瘤质量×100%;脏器(脾、胸腺)指数(%)=脏器(脾、胸腺)质量/体质量×100%。

### 2.6 统计学方法

采用SPSS 22.0统计学软件进行数据分析。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 $t$ 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 三脉菝葜醇提物及其不同极性萃取部位对6种肿瘤细胞的体外增殖抑制作用测定结果

三脉菝葜醇提物及其不极性萃取部位对6种肿瘤细胞的抑制作用均呈现明显的量-效关系。其中以三脉菝葜醇提物乙酸乙酯萃取部位对肿瘤细胞的增殖抑制作用最强,对各种肿瘤细胞的IC<sub>50</sub>在40~210 μg/mL之间,其对MCF-7细胞的IC<sub>50</sub>为70.56 μg/mL,对MDA-MB-231细胞的IC<sub>50</sub>为83.58 μg/mL,对HeLa细胞的IC<sub>50</sub>为44.67 μg/mL,这提示三脉菝葜的抗肿瘤有效成分可能集中在醇提物乙酸乙酯萃取部位。但与传统的抗肿瘤药物顺铂相比,三脉菝葜醇提物及其各极性萃取部位对6种肿瘤细胞的IC<sub>50</sub>均较高。三脉菝葜醇提物及其不同极性萃取部位对肿瘤细胞的增殖抑制率测定结果见表1,IC<sub>50</sub>测定结果见表2。

### 3.2 三脉菝葜醇提物及其乙酸乙酯萃取部位对S180荷瘤小鼠的抑瘤作用测定结果

3.2.1 三脉菝葜醇提物及其乙酸乙酯萃取部位对S180荷瘤小鼠肿瘤生长的影响 三脉菝葜醇提物及其

表1 三脉菝葜醇提取物及其不同极性萃取部位对肿瘤细胞的增殖抑制率测定结果(%)

Tab 1 Inhibition rates of ethanol extract of *S. trinervula* and different polar extract part on tumor cells(%)

样品	质量浓度, $\mu\text{g/mL}$	HepG2	A549	MCF-7	MDA-MB-231	HeLa	HO-8910
三脉菝葜醇提取物	1 000	83.68	62.30	84.79	83.67	75.62	73.15
	500	42.57	28.10	80.24	66.73	46.32	48.92
	400	31.70	18.74	62.52	56.46	38.97	29.90
	300	12.81	16.46	37.32	42.17	31.23	2.44
	200	3.90	8.99	2.85	28.46	18.87	-12.43
	0	0	0	0	0	0	0
醇提取物石油醚萃取部位	200	72.40	45.16	87.49	75.18	87.86	68.18
	150	52.90	31.23	66.66	63.79	62.99	48.12
	100	33.47	28.52	39.37	40.10	26.65	31.08
	75	19.96	18.28	25.85	33.38	16.55	25.26
	50	15.65	10.24	18.66	24.65	9.78	13.45
	0	0	0	0	0	0	0
醇提取物乙酸乙酯萃取部位	200	75.55	69.52	81.35	76.26	85.05	49.11
	100	40.46	11.07	80.89	74.02	66.10	14.11
	75	28.18	5.63	64.76	71.21	59.70	12.01
	50	19.38	2.91	31.7	64.03	53.36	3.54
	37.5	5.48	5.67	5.56	54.00	48.30	0.70
	0	0	0	0	0	0	0
醇提取物正丁醇萃取部位	1 000	74.45	80.59	79.43	84.00	88.65	76.17
	500	52.21	42.02	56.41	74.1	23.47	65.95
	400	46.00	28.14	36.00	65.21	12.02	49.27
	300	40.58	26.46	22.44	53.02	9.82	40.27
	200	31.76	15.08	11.35	44.47	5.84	37.44
	0	0	0	0	0	0	0
醇提取物水层部位	2 000	77.71	56.00	65.76	80.28	79.02	73.07
	1 500	62.11	35.82	54.16	73.22	64.08	55.10
	1 000	48.75	19.32	42.50	51.39	42.93	38.52
	500	24.06	9.86	28.32	13.59	22.45	18.77
	250	17.00	6.34	6.90	3.17	16.02	10.50
	0	0	0	0	0	0	0
顺铂	16	84.01	78.49	80.35	84.2	92.48	84.94
	4	83.00	71.24	62.08	71.74	91.93	83.57
	1	62.16	22.08	39.07	44.43	45.54	46.65
	0.25	27.71	13.18	10.85	17.12	41.76	22.93
	0.062 5	15.39	7.07	2.17	7.75	25.23	10.61

表2 三脉菝葜醇提取物及其不同极性萃取部位对肿瘤细胞的 $\text{IC}_{50}$ 测定结果( $\mu\text{g/mL}$ )

Tab 2  $\text{IC}_{50}$  of ethanol extract of *S. trinervula* and its different polar extract part on tumor cells ( $\mu\text{g/mL}$ )

样品	HepG2	A549	MCF-7	DA-MB-231	HeLa	HO-8910
三脉菝葜醇提取物	553.575	796.941	374.143	348.544	515.379	606.368
醇提取物石油醚萃取部位	135.292	240.045	108.226	110.228	123.262	144.259
醇提取物乙酸乙酯萃取部位	116.821	163.148	70.562	83.577	44.673	202.100
醇提取物正丁醇萃取部位	426.678	548.789	502.068	245.193	632.021	354.961
醇提取物水层部位	977.285	>1 000	>1 000	>1 000	>1 000	>1 000
顺铂	0.692	2.479	2.350	1.476	0.456	1.021

乙酸乙酯萃取部位对S180荷瘤小鼠肿瘤生长具有较强的抑制效果,且具有一定的量-效关系。与模型组比较,各给药组小鼠的瘤质量均不同程度降低,且差异均有统计学意义( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );与环磷酰胺组比较,三

脉菝葜醇提取物高剂量组和三脉菝葜醇提取物乙酸乙酯萃取部位高、中剂量组小鼠瘤质量降低更为明显( $P<0.01$ ),抑瘤率均在85%以上。各组小鼠的瘤质量及抑瘤率测定结果见表3。

表3 各组小鼠的瘤质量及抑瘤率测定结果( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Tab 3 Tumor mass and inhibitory rate of mice in each group( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量, g/kg	瘤质量, g	抑瘤率, %
模型组		2.29 ± 0.88	
环磷酰胺组	0.025	0.87 ± 0.33**	62.22
三脉菝葜醇提取物高剂量组	0.1	0.33 ± 0.19***	85.67
三脉菝葜醇提取物中剂量组	0.05	0.99 ± 0.55*	56.98
三脉菝葜醇提取物低剂量组	0.025	1.19 ± 0.30*	47.98
醇提取物乙酸乙酯萃取部位高剂量组	0.1	0.33 ± 0.29***	85.85
醇提取物乙酸乙酯萃取部位中剂量组	0.05	0.33 ± 0.18***	85.48
醇提取物乙酸乙酯萃取部位低剂量组	0.025	1.68 ± 0.71*	26.96

注:与模型组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与环磷酰胺组比较,## $P<0.01$

Note: vs. model group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ; vs. cyclophosphamide group, ## $P<0.01$

3.2.2 三脉菝葜醇提取物及其乙酸乙酯萃取部位对S180荷瘤小鼠脏器指数的影响 与模型组比较,环磷酰胺组、三脉菝葜醇提取物高剂量组和三脉菝葜醇提取物乙酸乙酯萃取部位高、中剂量组小鼠的脾指数均显著降低( $P<0.01$ ),且环磷酰胺组小鼠胸腺指数也显著降低( $P<0.01$ ),而其余给药组上述指标差异无统计学意义( $P>0.05$ );与环磷酰胺组比较,三脉菝葜醇提取物中、低剂量组和醇提取物乙酸乙酯萃取部位低剂量组小鼠的脾指数显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),三脉菝葜各给药组小鼠的胸腺指数均显著升高( $P<0.01$ )。以上结果提示,三脉菝葜较环磷酰胺具有较小的免疫抑制作用。各组小鼠脾指数和胸腺指数测定结果见表4。

表4 各组小鼠脾指数和胸腺指数测定结果( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Tab 4 Spleen index and thymus index of mice in each group( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量, g/kg	脾指数, %	胸腺指数, %
模型组		0.72 ± 0.13	0.23 ± 0.10
环磷酰胺组	0.025	0.31 ± 0.10**	0.05 ± 0.04**
三脉菝葜醇提取物高剂量组	0.1	0.31 ± 0.08**	0.25 ± 0.07**
三脉菝葜醇提取物中剂量组	0.05	0.49 ± 0.22*	0.20 ± 0.06**
三脉菝葜醇提取物低剂量组	0.025	0.54 ± 0.18**	0.27 ± 0.12**
醇提取物乙酸乙酯萃取部位高剂量组	0.1	0.34 ± 0.12**	0.27 ± 0.07**
醇提取物乙酸乙酯萃取部位中剂量组	0.05	0.34 ± 0.08**	0.26 ± 0.09**
醇提取物乙酸乙酯萃取部位低剂量组	0.025	0.62 ± 0.16**	0.23 ± 0.03**

注:与模型组比较,\* $P<0.01$ ;与环磷酰胺组比较,## $P<0.05$ ,### $P<0.01$

Note: vs. model group, \* $P<0.01$ ; vs. cyclophosphamide group, ## $P<0.05$ , ### $P<0.01$

#### 4 讨论

本研究采用MTT法,考察了三脉菝葜醇提取物及其

不极性萃取部位对人肝癌细胞株 HepG2、人肺癌细胞株 A549、人乳腺癌细胞株 MCF-7、MDA-MB-231、人宫颈癌细胞株 HeLa 和人卵巢癌细胞株 HO-8910 在内的共计 6 种肿瘤细胞株的增殖抑制作用,初步筛选了三脉菝葜醇提物的抗肿瘤活性部位。结果发现,三脉菝葜醇提物乙酸乙酯萃取部位的细胞增殖抑制效果最强,呈现明显的量-效关系,并且三脉菝葜醇提物乙酸乙酯萃取部位对人乳腺癌细胞 MCF-7 ( $IC_{50}$  为  $70.56 \mu\text{g/mL}$ )、MDA-MB-231 ( $83.58 \mu\text{g/mL}$ ) 和人宫颈癌细胞 HeLa ( $44.67 \mu\text{g/mL}$ ) 的体外增殖表现出较好的抑制效果,这提示三脉菝葜抗肿瘤活性成分可能集中在三脉菝葜乙酸乙酯萃取部位。结合相关研究结果发现,三脉菝葜与菝葜科其他属植物的抗肿瘤活性部位相一致,但三脉菝葜醇提物乙酸乙酯萃取部位对肿瘤细胞的抑制效果强于菝葜科其他属植物的乙酸乙酯萃取部位 ( $IC_{50}$  大多在  $100\sim 300 \mu\text{g/mL}$  之间)<sup>[14-16]</sup>。顺铂属于细胞周期的非特异性药物,具有细胞毒性,可抑制肿瘤细胞 DNA 复制过程,并损伤其细胞膜上的结构,有较强的广谱抗肿瘤作用。在本研究中,三脉菝葜醇提物及其不同极性萃取部位对 6 种肿瘤细胞的  $IC_{50}$  均较顺铂高,这与本研究中所用样品为粗提物有一定关系,三脉菝葜中体外抗肿瘤效果更强的成分有待进一步分离提纯。

根据体外细胞试验结果,本研究进一步选取三脉菝葜醇提物及其乙酸乙酯萃取部位进行体内抗肿瘤实验,观察其对 S180 荷瘤小鼠肿瘤生长的抑制效果。结果表明,在  $0.2 \text{ g/kg}$  日给药剂量下的三脉菝葜醇提物及其乙酸乙酯部位萃取部位,以及在  $0.1 \text{ g/kg}$  日给药剂量下的醇提物乙酸乙酯部位萃取部位对 S180 荷瘤小鼠肿瘤生长的抑制作用均较强,抑瘤率均在 85% 以上,均强于  $0.025 \text{ g/kg}$  日剂量下的环磷酰胺。另外,环磷酰胺虽具有广谱的抗肿瘤作用,在临床上广泛使用,但同时其具有较为明显的免疫抑制作用。脏器指数反映的是其中淋巴细胞增殖的水平,是一个相对直观的免疫抑制指标<sup>[8]</sup>。在本研究中,可见给药后环磷酰胺组小鼠的脾指数、胸腺指数均显著降低,而三脉菝葜醇提物中、低剂量组及三脉菝葜醇提物乙酸乙酯萃取部位低剂量组小鼠较环磷酰胺组小鼠的脾指数显著升高,三脉菝葜醇提物及其乙酸乙酯萃取部位各剂量组较环磷酰胺组小鼠的胸腺指数亦显著升高,这提示三脉菝葜醇提物及其乙酸乙酯萃取部位与环磷酰胺相比,对小鼠的免疫抑制作用较小,毒副作用相对较低。

综上所述,三脉菝葜醇提物乙酸乙酯萃取部位具有较强的抗肿瘤效果,三脉菝葜的抗肿瘤活性成分可能集中在该萃取部位。本研究通过体内、外抗肿瘤研究结果表明了三脉菝葜对肿瘤具有抑制作用,并初步筛选了其

抗肿瘤活性部位,但关于其具体的抑瘤成分和作用机制还需要进一步明确。

## 参考文献

- [1] 陈万青,孙可欣,郑荣寿,等. 2014 年中国分地区恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2018, 27(1): 1-14.
- [2] 刘敬弢,张艳华. 抗肿瘤治疗药物监测与合理应用研究进展[J]. 中国新药杂志, 2015, 16(24): 1916-1920.
- [3] LING C, YUE X, LING C. Three advantages of using traditional Chinese medicine to prevent and treat tumor[J]. *J Integr Med*, 2014, 12(4): 331-335.
- [4] 汪发缙,唐进,陈心启,等. 中国植物志: 第 15 卷[M]. 北京: 科学出版社, 1978: 196.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2015 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 308.
- [6] HU LL, CHEN DS, WANG YY, et al. Smilax China L. rhizome extract inhibits nuclear factor- $\kappa$ B and induces apoptosis in ovarian cancer cells[J]. *Chin J Integr Med*, 2015, 21(12): 907-915.
- [7] 匡双玉,李熠,匡稳定,等. 菝葜乙酸乙酯提取物对 THP-1 源性荷脂细胞胆固醇蓄积及 SREBP-1 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(3): 137-140.
- [8] KHAN I, NISAR M, EBAD F, et al. Anti-inflammatory activities of sieboldogenin from Smilax China Linn.: experimental and computational studies[J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 121(1): 175-177.
- [9] 刘敏,朱根华,梁芳,等. 三脉菝葜的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(3): 446-450.
- [10] 余江丽,朱根华,梁芳,等. 三脉菝葜中苯丙素类化学成分研究[J]. 中药材, 2016, 39(4): 782-785.
- [11] 实验动物管理条例[J]. 实用器官移植电子杂志, 2016, 4(2): 66-67.
- [12] 李学涛,程岚,姜英,等. 长春碱亲水基修饰阳离子脂质体对荷瘤小鼠的抗肿瘤作用研究[J]. 中国药房, 2015, 26(31): 4339-4341.
- [13] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 33-34.
- [14] 吴先闯,宋卫中,宋晓勇,等. 菝葜乙酸乙酯部位对 H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠的抑瘤作用及其机制研究[J]. 中国药房, 2016, 27(31): 4370-4372.
- [15] 廖子君,郑琪,赵征,等. 菝葜皂苷对胃癌 BGC-823 细胞 Bcl-2、Bax 凋亡蛋白表达影响的实验研究[J]. 中国医药指南, 2018, 16(18): 1-2.
- [16] 于丽秀,胡丽玲,廖婧,等. 菝葜不同提取部位对卵巢癌细胞的活性影响[J]. 中国药师, 2015, 18(3): 373-375.

(收稿日期: 2019-05-18 修回日期: 2019-08-01)

(编辑: 林 静)