

白花蛇舌草提取物对结肠癌细胞抑制作用的实验研究

伍治平¹⁾, 金从国¹⁾, 李 佳¹⁾, 陈晓群¹⁾, 姚 乾¹⁾, 朱启顺²⁾

(1) 昆明医科大学第三附属医院肿瘤研究所, 云南昆明 650118; 2) 云南大学生命科学院, 云南昆明 650091)

[摘要] **目的** 探讨白花蛇舌草乙醇提取物对 BALB/c 小鼠 CT-26 结肠癌细胞株增殖的抑制作用. **方法** 采用甲基噻唑蓝 (MTT) 法测定不同浓度白花蛇舌草乙醇提取物对 CT-26 细胞株的生长抑制作用, 计算半数抑制浓度 (IC₅₀). **结果** 在同一浓度下, 白花蛇舌草乙醇提取物对 CT-26 细胞的抑制作用随着作用时间的延长而增强, 0.08 mg/mL 的白花蛇舌草乙醇提取物作用 CT-26 细胞 24 h、48 h、72 h, 细胞抑制率分别为 (16.67 ± 9.35)%, (34.66 ± 9.23)%, (40.07 ± 9.16)%. 白花蛇舌草乙醇提取物作用 24 h、48 h、72 h 的 IC₅₀ 值分别为 0.315, 0.155, 0.115. 在同一作用时间内, 白花蛇舌草乙醇提取物对 CT-26 细胞的抑制率随着药物浓度的增加而增加, 在 72 h 内不同浓度药物 (0.06 mg/mL, 0.08 mg/mL, 0.10 mg/mL, 0.12 mg/mL, 0.14 mg/mL, 0.16 mg/mL, 0.18 mg/mL, 0.20 mg/mL) 作用下, 细胞抑制率分别为 (35.46 ± 3.59)%, (40.07 ± 9.16)%, (40.77 ± 6.92)%, (52.81 ± 1.87)%, (54.22 ± 2.35)%, (68.72 ± 3.71)%, (70.04 ± 8.03)%, (71.84 ± 3.12)%. **结论** 白花蛇舌草乙醇提取物可以抑制 BALB/c 小鼠 CT-26 结肠癌细胞株的增殖, 其对 CT-26 细胞增殖的抑制作用呈现时效和量效的关系.

[关键词] 白花蛇舌草; BALB/c 小鼠 CT-26 结直肠癌细胞株; IC₅₀; MTT; 抑制作用

[中图分类号] R73**[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2013) 10 - 0031 - 04

Inhibition of Colon Cancer Cells by Ethanol Extract of Oldenlandia Diffusa

WU Zhi - ping¹⁾, JIN Cong - guo¹⁾, LI Jia¹⁾, CHEN Xiao - qun¹⁾, YAO Qian¹⁾, ZHU Qi - shun²⁾

(1) Cancer Institute, The 3rd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650118;
2) School of Life Science, Yunnan University, Kunming 650091, China)

[Abstract] **Objective** To explore the inhibitory effect of the ethanol extract of Oldenlandia diffusa on the proliferation of CT-26 colon cancer cells which come from BALB/c mice. **Method** We determined the inhibitory effect of different concentrations of ethanol extract of Oldenlandia diffusa on CT-26 cells' proliferation by using methyl thiazolyl tetrazolium (MTT), and calculated the 50% inhibiting concentration (IC₅₀). **Results** As to the same concentration, the inhibitory effect of the ethanol extract of Oldenlandia diffusa on CT-26 cells was increased with time, for example: after treated with 0.08 mg/mL of ethanol extract of Oldenlandia diffusa for 24 h, 48 h and 72 h, the inhibitory rates of CT-26 cells were (16.67 ± 9.35)%, (34.66 ± 9.23)% and (40.07 ± 9.16)%, respectively. After treating CT-26 cancer cells for 24 h, 48 h and 72 h, the IC₅₀ values of the ethanol extract of Oldenlandia diffusa were 0.315, 0.155 and 0.115 mg/mL, respectively. In the same treatment time, the inhibitory effect of the ethanol extract of Oldenlandia diffusa on CT-26 cells was increased with the increase of concentration: after treatment for 72 h with different concentrations (0.06 mg/mL, 0.08 mg/mL, 0.10 mg/mL, 0.12 mg/mL, 0.14 mg/mL, 0.16 mg/mL, 0.18 mg/mL and 0.20 mg/mL) of the ethanol extract of Oldenlandia diffusa, the inhibitory

[基金项目] 云南省卫生厅科技计划基金资助项目 (2011WS0065)

[作者简介] 伍治平 (1957~), 男, 云南昆明市人, 学士, 研究员, 主要从事中药抗癌药物研究工作.

[通讯作者] 朱启顺. E-mail: qshzh@ynu.edu.cn

rates of CT-26 cells were $(35.46 \pm 3.59) \%$, $(40.07 \pm 9.16) \%$, $(40.77 \pm 6.92) \%$, $(52.81 \pm 1.87) \%$, $(54.22 \pm 2.35) \%$, $(68.72 \pm 3.71) \%$, $(70.04 \pm 8.03) \%$ and $(71.84 \pm 3.12) \%$, respectively. **Conclusion** The ethanol extract of *Oldenlandia diffusa* can inhibit the proliferation of CT-26 colon cancer cells from BALB/c mice in a time and dose dependent manner.

[**Key words**] *Oldenlandia diffusa*; BALB/c mice CT-26 colon cancer cell strain; IC_{50} ; MTT; Inhibition

化疗作为癌症的治疗方法之一,被广泛应用于肿瘤的治疗,但目前所采用的大剂量给药的化疗方法和所使用的化疗药物,毒副作用大,在治疗肿瘤的同时,也对人体正常细胞具有杀伤作用,引起患者恶心、呕吐、脱发、血小板减少、白细胞死亡等。因此,寻找毒副作用小而效果明显的肿瘤治疗药和采用小剂量给药的化疗方法,则成为目前肿瘤化学治疗的方向之一。近年来的研究证明,中医药在大肠癌的治疗过程中具有确切的疗效,表现为改善临床症状、延长生存期、提高生活质量、控制疼痛、防止复发等方面,与化疗配合,尚有增效减毒的作用,在治疗大肠癌中有不可替代的优势^[1]。目前已有大量传统的中草药被证实具有抑癌作用,如蒿甲醚的抑癌及抗血管生成作用^[2]等。

白花蛇舌草 (*Oldenlandia diffusa* Willd. Roxb 或 *Hedyotis diffusa* Willd.) 为茜草科耳草属一年生草本植物,别名蛇舌草,蛇利草,目目生珠草,小叶锅巴草等,始载于《广西中药志》,我国分布广泛,主要分布于我国西南地区与浙江,福建,广州等地^[3]。中药以全草入药,具有清热解毒,活血化瘀,消肿止痛等功效。近年来大量研究报道表明白花蛇舌草具有增强免疫力,抗氧化作用和抑瘤作用等功效。另据报道,不同工艺白花蛇舌草提取物抗肿瘤作用有差异:乙醇提取物 > 冷水提取物 > 煎煮提取物^[4]。但白花蛇舌草乙醇提取物的抗肿瘤作用的物质基础及作用机制目前并不十分明确,并且其对结肠癌抑制作用的文献报道也不多。本研究通过建立 BALB/C 小鼠皮下 CT26 结肠癌动物模型,探讨白花蛇舌草乙醇提取物对小鼠 CT26 结肠癌的抑癌作用及其可能机制,为结肠癌的治疗提供一种新的药物选择。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 BALB/c 小鼠 CT-26 结直肠癌细胞株,购自美国 ATCC 公司,保存于液氮。

1.1.2 药物 白花蛇舌草乙醇提取物,由云南大学化学科学与工程学院高诚伟教授提供。

1.1.3 试剂 胎牛血清购自中国医学科学生物工

程研究所; RPMI 1640、PBS 以及青霉素和链霉素混合液购自 GIBCO 公司; 0.25% 胰蛋白酶购自 Hyclone 公司; DMSO 购自 SIGMA 公司; MTT 购自 SIGMA 公司。

1.1.4 主要仪器 一次性细胞培养瓶和细胞培养板 (GIBCO 公司), 二氧化碳培养箱、生物安全柜 (Forma 公司), 倒置显微镜 (Leica 公司), BALB/c 小鼠饲养 IVC 系统 (苏州苏杭实验动物设备厂), 高速低温离心机 (Heraeus 公司), Bio-Rad550 型酶标仪 (Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 CT-26 细胞的复苏 从 -80°C 冰箱内取出细胞,立即放入 38°C 的水浴锅内,并摇动,使其在 1 min 内迅速溶解,用酒精擦拭外壳,全部转入离心管,加入适量完全培养基 (改良型 1640 培养液 +10% FBS+1% 青霉素与链霉素混合液),以 1 000 r/min 的转速离心 5 min; 小心吸去上清液,加入少量完全培养基,小心吹打,使细胞悬浮均匀,然后转入培养瓶,加入 2~3 mL 的完全培养基,摇匀,使细胞均匀分散在培养瓶底面,镜检细胞后放入 37°C , 5% CO_2 培养箱内培养。

1.2.2 培养换液 每天镜检细胞形态,观察细胞数目,并作详细记录。如果观察到培养基内漂浮的死亡细胞过多或培养基变色,便要进行换液。先去旧的培养基,用生理盐水清洗 2 遍后,加入 2~3 mL 新的完全培养基,放入 37°C , 5% CO_2 培养箱内继续培养。

1.2.3 传代 当细胞大约长到铺满培养瓶底的 80% 时 (处于对数生长期), 为避免细胞过多而造成生长抑制要对细胞进行传代培养。首先倒掉旧的培养基,用生理盐水清洗 2~3 遍,加入适量 0.25% 胰酶恰好覆盖培养瓶底,置于培养箱内消化 3~5 min, 镜检观察大部分细胞变圆浮起,立即加入适量的完全培养基终止消化,小心吹打数次以使细胞脱落,悬浮,转入离心管,以 1 000 r/min 的转速离心 5 min; 吸去上清液,加入少量完全培养基吹打使细胞悬浮,将细胞悬液平均分到 2 个新的培养瓶中,每个培养瓶中加 2~3 mL 完全培养基,摇匀使细胞分散均匀,镜检后放入 37°C , 5% CO_2 培养箱内培养。

1.2.4 细胞计数 倒掉旧的培养基, 用生理盐水清洗 2~3 遍, 充分清洗去除漂浮的死细胞, 加入适量 0.25% 胰酶恰好覆盖培养瓶底, 置于培养箱内消化 3~5 min, 镜检观察大部分细胞变圆浮起, 立即加入完全培养基终止消化, 小心吹打数次, 使细胞充分混匀, 吸取 20 μL 用生理盐水稀释 10 倍, 用血球计数板进行计数, 剩余细胞以传代处理并置于培养箱内继续培养. 准备干净的血球计数板, 在计数区上盖上盖玻片, 将稀释好的细胞悬液充分混匀, 用移液器将细胞悬液从计数板中间平台两侧的沟槽内沿盖玻片的下边缘滴入, 让细胞悬液充满计数区, 勿使气泡产生, 并用吸水纸吸去沟槽中流出的多余细胞悬液. 静置 5 min, 细胞沉降到计数板上, 不再随液体漂移. 将细胞计数板放置于显微镜的载物台上, 先在低倍镜下找到计数区, 再转换高倍镜观察并计数. 25 格 \times 16 格的细胞计数板计算公式: 细胞数 / mL = 80 小格内细胞个数 / 80 \times 400 \times 10 000 \times 稀释倍数. 根据用血球计数板计数得到结果, 用完全培养基调整细胞浓度为 1×10^5 个 / mL.

1.2.5 MTT 比色法 取 3 个 96 孔板, 在细胞板的外周各孔均加入 200 μL 的生理盐水, 其它各孔每孔用移液器加入细胞浓度为 1×10^5 个 / mL 的细胞悬液 200 μL , 使每孔细胞数 2.0×10^4 个, 其中设置空白对照组 1 个包括 6 个复孔、实验组 9 个在此后的实验中依次用于加入不同浓度的药液 (0.06、0.08、0.10、0.12、0.14、0.16、0.18、0.20 mg/mL), 每个浓度的药物组均设 6 个复孔, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h; 取出 96 孔板, 用移液器小心吸去上清液, 实验组每孔分别加入用完全培养液配制的相应浓度的药物溶液 200 μL , 每个浓度 6 个复孔. 空白对照组加 200 μL 的完全培养液, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中分别培养 24 h、48 h、72 h; 称取 10 mg MTT 溶于 2 mL PBS 中, 过滤, 取滤液 1.5 mL 与 13.5 mL 完全培养基混匀; 取出已培养到相应时间的培养板, 用 25 mL 注射器吸干孔内的液体, 每孔加入 200 μL MTT 溶液, 放入培养箱内继续孵育 4 h, 去除 MTT, 每孔加入 150 μL DMSO, 暗处振荡 15 min, 450 型 ELISA-Reader 酶标仪 (Bio-Rad 公司) 490 nm 主波长, 630 nm 副波长检测吸光度. 以对照组细胞活力为 100%, 按公式计算不同浓度白花蛇舌草乙醇提取物对 CT-26 细胞增殖的抑制率:

$$\text{细胞抑制率 (\%)} = \frac{1 - \text{药物组吸光度}}{\text{对照组吸光度}} \times 100\%$$

借助 SPSS17.0 软件求的 IC_{50} 值.

2 结果

MTT 法检测白花蛇舌草乙醇提取物处理后 BALB/c 小鼠 CT-26 结肠癌细胞的抑制率及半数抑制浓度 (IC_{50}). MTT 法检测不同浓度的白花蛇舌草乙醇提取物对 BALB/c 小鼠 CT-26 结肠癌细胞作用不同时间后细胞的抑制率, 见表 1. 由表中可见, 经 0.06 mg/mL、0.08 mg/mL、0.10 mg/mL、0.12 mg/mL、0.14 mg/mL、0.16 mg/mL、0.18 mg/mL、0.20 mg/mL 的白花蛇舌草乙醇提取物处理 24 h、48 h、72 h 后, CT-26 细胞生长均受到不同程度的抑制, 抑制率随药物浓度和作用时间的增加而增大, 重复测量的方差分析结果显示, 不同浓度各组之间以及同一浓度不同时间各组之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$). 实验结果表明白花蛇舌草乙醇提取物对大肠癌 CT-26 细胞的增殖抑制不仅具有量效关系而且还具有一定的时间依赖关系. 量效时效关系曲线见图 1.

各浓度白花蛇舌草乙醇提取物作用 72 h 后, 利用 SPSS17.0 分别计算白花蛇舌草乙醇提取物作用 CT-26 细胞 24 h、48 h、72 h 的半数抑制浓度, 见表 2. 由表 2 可见随着作用时间的延长, 白花蛇舌草对 CT-26 细胞的半数抑制浓度 (IC_{50}) 逐渐减小, 其中 CT-26 细胞作用 24 h 的 IC_{50} 为 0.315 mg/mL, 48 h 的 IC_{50} 为 0.155 mg/mL, 72 h 的 IC_{50} 为 0.115 mg/mL.

3 讨论

流行病学研究结果提示大肠癌是一种典型的与环境 and 生活方式有关癌症, 环境因素作用大于种族和遗传因素. 中医学的湿聚学说认为大肠癌是由于饮食不节, 醉饮无时, 恣食肥腻; 或久坐湿地, 或寒温失节, 湿邪侵入; 或情志失调, 脾胃不和和湿邪留滞肠道, 湿毒凝聚, 反复发而成^[1].

白花蛇舌草为民间常用药, 现代研究表明其具有广泛的药理活性, 尤其以增强免疫与抗肿瘤活性引起中外学者极大的关注, 而且目前已有相应的注射剂性白花蛇舌草药液应用与临床, 适应症为呼吸道感染、扁桃体炎、肺炎、胆囊炎、阑尾炎、痈疔脓肿及手术后感染及癌症辅助治疗. 研究表明, 白花蛇舌草能够通过刺激机体的免疫系统抵抗肿瘤的生长和其他疾病的发生, 从而对小鼠和人产生免疫调节作用^[4].

表 1 MTT 法检白花蛇舌草处理后 CT-26 细胞的抑制率 [%，(x̄ ± s)]

Tab. 1 Inhibition rate of CT-26 cells treated with Oldenlandia diffusa by MTT assay [%，(x̄ ± s)]

浓 度	24 h	48 h	72 h
0.06	15.09 ± 9.42*	27.04 ± 8.78*	35.46 ± 3.59
0.08	16.67 ± 9.35* [△]	34.66 ± 9.23* [△]	40.07 ± 9.16 [△]
0.10	20.56 ± 6.05* [△]	39.16 ± 11.89* [△]	40.77 ± 6.92 [△]
0.12	23.15 ± 7.17* [△]	46.52 ± 4.37* [△]	52.81 ± 1.87 [△]
0.14	25.18 ± 7.33* [△]	46.67 ± 2.48* [△]	54.22 ± 2.35 [△]
0.16	27.59 ± 7.22* [△]	53.22 ± 8.53* [△]	68.72 ± 3.71 [△]
0.18	29.63 ± 6.51* [△]	55.62 ± 6.14* [△]	70.04 ± 8.03 [△]
0.20	32.59 ± 5.65* [△]	56.18 ± 3.03* [△]	71.84 ± 3.12 [△]

与 72 h 比较，*P < 0.05；与 0.06 组比较，[△]P < 0.05。

表 2 MTT 法检测白花蛇舌草乙醇提取物对 CT-26 的半数抑制浓度(IC₅₀) (mg/mL)

Tab. 2 50% inhibiting concentration (IC₅₀) of CT-26 cells treated with Oldenlandia diffusa by MTT assay(mg/mL)

项 目	24 h	48 h	72 h
IC ₅₀	0.315 mg/mL	0.155 mg/mL	0.115 mg/mL

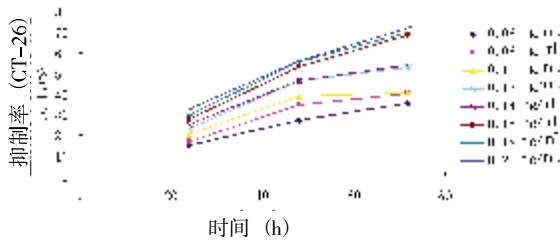


图 1 MTT 法检测白花蛇舌草对 CT-26 细胞抑制作用的量效时效关系曲线

Fig. 1 Dose-effect and Time-effect curve of Oldenlandia diffusa on CT-26 cells by MTT assay

本研究结果显示，随着白花蛇舌草乙醇提取物浓度的增加，对大肠癌 CT-26 细胞株增殖的抑制率逐渐增高，表明白花蛇舌草乙醇提取物对大肠癌 CT-26 细胞株的抑制作用具有一定的量效关系；

研究结果还显示，随着白花蛇舌草乙醇提取物对大肠癌 CT-26 细胞株作用时间的增加，对大肠癌 CT-26 细胞株增殖的抑制率逐渐增高，表明白花蛇舌草乙醇提取物对大肠癌 CT-26 细胞株的抑制作用具有明显的时间效应关系。

综上所述，白花蛇舌草乙醇提取物对大肠癌 CT-26 细胞的抑制作用具有一定的时效和量效关系。

[参考文献]

[1] 翁国爱,阮捷,卢晓峰. 中医药治疗大肠癌研究进展[J]. 中医药学报,2010,38(4):107-111.
 [2] 伍治平,朱启顺,魏万里. 蒿甲醚对大鼠原位脑胶质瘤抑瘤及抗血管生成的实验研究[J]. 昆明医科大学学报,2012,39(4):29-33.
 [3] 黄建荣,刘咏梅,喻志标. 白花蛇舌草化学成分和药理活性研究进展[J].中成药,2005,27(11):1329-1331.
 [4] 赵浩如,李瑞,林以宁. 白花蛇舌草不同提取工艺对抗肿瘤活性的影响[J]. 中国药科大学学报,2002,33(6):510-515.

(2013-05-10 收稿)