

黄荆子提取物对人卵巢癌 CoC1 细胞生长的影响

邓宇傲¹, 谢宛玉², 曹建国³

(1. 暨南大学第二临床医学院深圳市人民医院 妇科, 广东 深圳 518020; 2. 南华大学第一附属医院 妇科;
3. 湖南师范大学医学院 药学工程实验室)

摘要: **目的** 观察 4 种黄荆子提取物 (EVn-10、EVn-20、EVn-30、EVn-50) 对人卵巢癌 CoC1 细胞生长的影响, 筛选出抑制增殖活性最强的提取物。 **方法** 体外培养人卵巢癌 CoC1 细胞, 分为 4 个实验组及 3 个对照组, 以不同浓度的提取物及对照药物孵育 48 h, MTT 比色法测定四种提取物对人卵巢癌 CoC1 细胞增殖活性的影响。 **结果** 4 种黄荆子提取物对人卵巢癌 CoC1 细胞增殖活性均有抑制作用, 以 EVn-50 效价最高, 其 IC_{50} 为 $1.02 \mu\text{g/mL}$, 效价强度与 DDP (IC_{50} 为 $0.82 \mu\text{g/mL}$) 接近。 **结论** 黄荆子乙酸乙酯提取物 EVn-50 能有效抑制人卵巢癌 CoC1 细胞增殖和生长。

关键词: 卵巢肿瘤; 黄荆子; 黄荆子乙酸乙酯提取物

中图分类号: R737.31

文献标识码: A

文章编号: 2095-1116(2011)06-0637-03

Effect of the Extract of the Vitex Negundo Seed on the Growth of Human Ovarian Cancer CoC1 Cell Line

DENG Yu-ao, XIE Wan-yu, CAO Jian-guo

(Department of Gynecology, Shenzhen, People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518020, China)

Abstract: **Objective** To investigate the therapeutic effect of four species of extracts from Vitex negundo seed (EVn-10, EVn-20, EVn-30, EVn-50) on human ovarian cancer CoC1 cell line in vitro, thus to get the most effective one. **Methods** CoC1 cells that cultured in vitro were divided into four experimental groups (EG) and three control groups (CG); Cells were treated with different concentrations extract in EG and CG done with control drug; The viability of CoC1 cells was determined by MTT assay. **Results** Four species of extracts of Vitex negundo seed all inhibited viability of CoC1 cells. The acetoacetate extract of Vitex negundo seed (EVn-50) was the strongest in those, and its IC_{50} value was $1.02 \mu\text{g/mL}$. It was near to DDP (IC_{50} value was $0.82 \mu\text{g/mL}$). **Conclusions** The acetoacetate extract of Vitex negundo seed (EVn-50) can inhibit viability and growth of human ovarian cancer CoC1 cell line.

Key words: ovarian cancer; vitex negundo seed; the acetoacetate extract of vitex negundo seed

卵巢癌是严重威胁全世界妇女生命健康的疾病, 是妇科三大恶性肿瘤之一, 其死亡率位居妇科恶性肿瘤之首^[1]。近年来新辅助化疗^[2]及保留生育功能的手术方式得到重视, 化疗在卵巢癌治疗中的地位进一步提高; 但大多数化疗药物存在无选择性而毒副作用大, 体内代谢快、特别对产生多重耐药性的肿瘤药效低等缺点。因此, 寻找卵巢癌治疗药物作用新靶标、设计、合成和筛选高效、毒副作用较轻

的卵巢癌治疗新候选药物具有重大社会效益和临床应用价值。近年紫杉醇、羟基喜树碱成功开发上市, 大大激发了人们从天然植物和中草药中寻找抗肿瘤药物的热情。

黄荆子 (Vitex negundo seed) 为黄荆的果实, 是载入中国药典的中药品种^[3]。药理学研究证实黄荆子提取物具有广泛的药理作用, 近年来, 其抗肿瘤作用引起了人们的极大兴趣。本文对采用天然植物

化学技术提取分离获得的4种黄荆子提取物进行体外抗人卵巢癌 CoC1 细胞活性的筛选实验。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人卵巢癌 CoC1 细胞系购于中国典型培养物保藏中心(中国武汉市)。

1.1.2 受试物 四种黄荆子提取物均由中南大学药学院周应军博士惠赠。具体情况见表1。

表1 4种黄荆子提取物的性状

代号	部位名称	性状	剂量
EVn-10	水洗部位	淡黄色粉末	200 mg
EVn-20	氨水洗部位	棕黄色粉末	200 mg
EVn-30	90%乙醇洗部位	棕黄色粉末	200 mg
EVn-50	乙酸乙酯提取部位	棕褐色粉末	200 mg

1.1.3 药品 注射用 DDP 冻干粉剂:齐鲁制药有限公司生产,批号:6030052DB;规格:20 mg/支。

1.1.4 试剂 溴化四甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、RPMI-1640 培养基为美国 Sigma 公司产品;新生小牛血清由杭州四季青生物工程材料有限公司生产。

1.2 方法

1.2.1 黄荆子提取物的配制 称取各提取物各 2.5 mg,用 10 μ L DMSO 溶解后,加入 PBS 分别配成 0.5 mg/mL 的母液 5 mL;经 0.45 μ m 滤菌膜过滤后,再在无菌条件下将滤液经过 0.22 μ m 滤菌膜过滤除菌,密封包装后置于 4℃ 冰箱中保存,临用前按所需浓度稀释。

1.2.2 细胞培养 用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640,置 5% CO₂、37℃、饱和湿度条件下培养,每 2 ~ 3 天传代一次。

1.2.3 MTT 的配置 称取 MTT 0.5 g 溶于 100 mL PBS,浓度为 5 mg/mL,过滤除菌分装,-20℃ 保存备用,2 周内使用。

1.2.4 MTT 比色法筛选黄荆子有效提取物 实验方法参考文献[4]。取处于对数生长期人卵巢癌 CoC1 细胞,制备单细胞悬液,调节细胞浓度为 5.0×10^4 个/mL 后,接种于 96 孔细胞培养板,每孔 100 μ L,分别加入各黄荆子提取物,调节终浓度分别为 0.1、0.3、1.0、3.0、10.0 μ g/mL;阳性对照组加入 DDP,调节终浓度为 0.1、0.3、1.0、3.0、

10.0 μ g/mL,同时设置本底对照(调零)组:加入等量细胞悬液和完全培养基,不加 MTT 液;空白对照组:加入等量细胞悬液和完全培养基;溶媒对照组:加入等量细胞悬液和含 0.02% DMSO,10 μ L/孔。每组设 3 个复孔,置 CO₂ 培养箱中孵育 48 h 后,加入 MTT 液(5 mg/mL)10 μ L/孔,继续培养 4 h,加入 100 μ L/孔 DMSO,轻摇 5 min 待紫蓝色沉淀物充分溶解;用酶标仪以 570 nm 波长测定吸光度(A 值)。按下式计算细胞增殖抑制率:IR(%)=(1-药物处理组 A 均值/溶媒对照组 A 均值)×100%;IC₅₀ 值的计算按寇氏改良孙式综合算法计算,公式为:IC₅₀ = Ig⁻¹{x_m - I[$\sum$ p - (3 - p_m - p_n)/4]}(x_m 为最高药物浓度的对数值,i 为浓度比的对数,p 为抑制率,p_m 为最大抑制浓度,p_n 为最小抑制浓度)。以上实验重复 2 次。

1.3 统计学方法

各实验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS Windows 11.5 软件,单向方差分析(One-way ANOVA)进行样本均数间多重比较,两两比较应用 Student's t 及 SNK 法检验,以 P<0.05 为差异有显著性,采用 Sigmpilot 软件绘图。

2 结 果

4 种黄荆子提取物对人卵巢癌 CoC1 细胞增殖活性均有抑制作用,呈浓度依赖性;其中,以黄荆子乙酸乙酯提取物 EVn-50 抑制 CoC1 细胞活性作用最强,其 IC₅₀ 为 1.02 μ g/mL,效价强度与 DDP(IC₅₀ 为 0.82 μ g/mL)接近(图1、表2)。

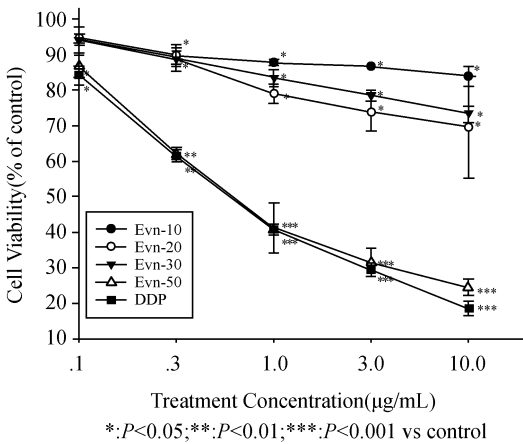


图1 4种黄荆子提取物抑制 CoC1 细胞增殖活性

表 2 4 种黄荆子提取物对 CoCl 细胞增殖的影响 (n=9)

药物	浓度	A ₅₇₀	IR(%)	IC ₅₀ (μg/mL)
Medium	0	1.849 ± 0.025	0	
DMSO	0.02%	1.821 ± 0.030	1.51	
DDP	0.1	1.556 ± 0.027 ^a	15.85	
(μg/mL)	0.3	1.137 ± 0.017 ^b	38.51	
	1.0	0.754 ± 0.015 ^b	59.22	
	3.0	0.544 ± 0.019 ^b	70.58	
	10.0	0.344 ± 0.021 ^b	81.40	0.82
EVn-10	0.1	1.743 ± 0.016	5.73	
(μg/mL)	0.3	1.659 ± 0.031 ^a	10.28	
	1.0	1.623 ± 0.009 ^a	12.22	
	3.0	1.604 ± 0.005 ^a	13.25	
	10.0	1.551 ± 0.028 ^a	16.12	11 060.7
EVn-20	0.1	1.748 ± 0.012	5.46	
(μg/mL)	0.3	1.649 ± 0.019 ^a	10.82	
	1.0	1.461 ± 0.027 ^a	20.98	
	3.0	1.366 ± 0.054 ^a	26.12	
	10.0	1.287 ± 0.143 ^a	30.39	38.66
EVn-30	0.1	1.740 ± 0.036	5.90	
(μg/mL)	0.3	1.638 ± 0.033 ^a	11.41	
	1.0	1.544 ± 0.024 ^a	16.50	
	3.0	1.450 ± 0.015 ^a	21.58	
	10.0	1.354 ± 0.023 ^a	26.77	108.03
EVn-50	0.1	1.604 ± 0.031 ^a	13.25	
(μg/mL)	0.3	1.150 ± 0.017 ^b	37.80	
	1.0	0.763 ± 0.070 ^b	58.73	
	3.0	0.583 ± 0.039 ^b	68.47	
	10.0	0.455 ± 0.023 ^b	75.39	1.02

a: P < 0.05, b: P < 0.01, vs control 比较

3 讨 论

黄荆(*Vitex negundo* L.)系被子植物马鞭草科牡荆属植物,别名荆柴、牡荆、黄荆条,广泛分布于我国 20 余省,以秦巴山区最为丰富。黄荆的果实、叶、枝及根入药,其味辛苦,性温,有清热解表、利湿解毒、止咳祛痰及缓解支气管痉挛的作用。黄荆子是黄荆的果实,《本草纲目拾遗》记载^[5]:“黄荆子性温,味辛、苦;归膀胱、肝、胃经。用于风热感冒头痛、齿龈肿痛、目赤多泪、目暗不明、头晕目眩”。

药理学研究证实:黄荆子提取物具有抗炎、解热镇痛作用^[6],抗氧化作用^[7],抗菌作用^[8],杀虫作用^[9],降血糖作用和调节内分泌、免疫作用^[10]。近年来,其抗肿瘤作用引起了人们的极大兴趣,黄荆子提取物对人肺癌细胞(PC-12)、人结肠癌细胞(HCT116)、人口腔鳞状细胞癌细胞(KB)、人乳腺癌细胞(MCF-7)及人宫颈癌细胞(Hela)等多种肿瘤细胞的生长有显著抑制作用。

本文采用 MTT 比色法筛选 4 种黄荆子提取物对人卵巢癌细胞增殖活性的影响。结果显示,黄荆

子乙酸乙酯提取物 EVn-50 对人卵巢癌 CoCl 细胞具有明显增殖抑制作用,且呈浓度依赖性, EVn-50 在 0.1、0.3、1.0、3.0、10.0 μg/mL 浓度时对 CoCl 细胞的相对增殖活性的抑制率分别为 13.25%、37.80%、58.73%、68.47%、75.3%, IC₅₀ 值为 1.02 μg/mL,其效价明显高于其它 3 种黄荆子提取物 EVn-10、EVn-20、EVn-30。

总之,本实验结果证实,黄荆子中确实存在抗肿瘤有效提取物,且上述 4 种提取物中,以乙酸乙酯提取物 EVn-50 对人卵巢癌 CoCl 细胞的增殖抑制作用最强。该实验将为研究黄荆子提取物的抗肿瘤作用提供初步实验依据,其具体化学组分是否能抑制卵巢癌细胞的生长以及在体治疗卵巢癌的有效性有待进一步探讨。

参考文献:

[1] Nunez-Cruz S, Connolly DC, Scholler N. An orthotopic model of serous ovarian cancer in immunocompetent mice for in vivo tumor imaging and monitoring of tumor immune responses[J]. J Vis Exp,2010,28 (45):2146.

[2] Weinberg LE,Rodriguez G,Hurteau JA. The role of neoadjuvant chemotherapy in treating advanced epithelial ovarian cancer[J]. J Surg Oncol,2010,101 (4):334-343.

[3] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:化学工业出版社,2005. 252-253.

[4] Cao JG,Tang XQ,Shi SH. Multidrug resistance reversal in human gastric carcinoma cells by neferine[J]. World J Gastroenterol,2004,10(20):3062-3064.

[5] 赵学敏. 本草纲目拾遗[M]. 北京:中国中医药出版社,1998. 2356.

[6] Tandon VR,Gupta RK. Vitex negundo Linn (VN) leaf extract as an adjuvant therapy to standard anti-inflammatory drugs[J]. Indian J Med Res,2006,124(4):447-450.

[7] Ono Masateru,Nishida Yoichiro,Masuoka Chikako,et al. Lignan Derivatives and a Norditerpene from the Seeds of Vitex negundo[J]. Journal of Natural Products,2004,67 (12):2073-2075.

[8] Sathiamoorthy B,Gupta P,Kumar M,et al. New antifungal flavonoid glycoside from Vitex negundo[J]. Bioorg Med Chem Lett,2007,17(1):239-242.

[9] Yuan L,Xue M,Liu Y,et al. Toxicity and oviposition-deterrence of Vitex negundo extracts to Plutella xylostella[J]. Ying Yong Sheng Tai Xue Bao,2006,17(4):695-698.

[10] Villaseñor IM,Lamadrid MR. Comparative anti-hyperglycemic potentials of medicinal plants[J]. J Ethnopharmacol,2006,104(1-2):129-131.

(此文编辑 蒋湘莲)