

## 杏花雨注射液对小鼠抗肿瘤作用的研究

牛 培<sup>1</sup>,徐月清<sup>1</sup>,巴伟松<sup>2</sup>,李 娟<sup>3</sup>,王 晶<sup>4</sup>,杜 宁<sup>5</sup>,王 乾<sup>1</sup>

(1. 河北大学 基础医学院,河北 保定 071000; 2. 定州市人民医院,河北 定州 071012; 3. 解放军 252 医院,河北 保定 071000; 4. 北京万金阳光医药科技有限公司,北京 100038; 5. 保定市妇幼保健院,河北 保定 071000)

**摘要:** **目的** 观察杏花雨注射液对肝癌(H<sub>22</sub>)模型小鼠的抑瘤作用。**方法** (1)抑瘤作用的研究:取昆明种小鼠,随机分为杏花雨 17.5 mg/kg、35 mg/kg、70 mg/kg 剂量组,以及环磷酰胺(20 mg/kg)对照组及模型组,每组小鼠均于右前肢腋窝下接种肝癌 H<sub>22</sub> 瘤细胞。接种 24 h 后给药,每日 1 次。连续 7 d,于末次给药 24 h 后,处死小鼠并剥出瘤块称重,计算抑瘤率。(2)增效作用的研究:取昆明种小鼠 40 只,随机分为模型对照组、杏花雨 17.5 mg/kg 剂量组、环磷酰胺(5 mg/kg)组、二药物合用组(杏花雨 17.5 mg/kg、环磷酰胺 5 mg/kg),每组小鼠均于右前肢腋窝接种瘤。24 h 后给药,每天 1 次,连续 7 d。于末次给药后 24 h,处死小鼠,剥出瘤块称重,计算抑瘤率。**结果** (1)抑瘤作用:杏花雨注射液可以显著的抑制肝癌 H<sub>22</sub> 模型小鼠肿瘤的生长,17.5 mg/kg、35 mg/kg、70 mg/kg 剂量组的抑瘤率分别为 22.60 %、48.84 %、40.22 % ( $P < 0.01$ ),环磷酰胺的抑瘤率为 57.12 % ( $P < 0.01$ )。(2)增效作用:杏花雨注射液 17.5 mg/kg 剂量组、环磷酰胺(5 mg/kg)组、以及二药物合用组抑瘤率分别为 18.07 %、23.88 %、34.59 % ( $P < 0.01$ )。**结论** 杏花雨注射液单独用药能够明显抑制荷瘤肿瘤细胞生长;与环磷酰胺合用能明显提高抑瘤效果。

**关键词:** 杏花雨注射液;抗肿瘤作用;抑瘤率;增效

**中图分类号:** R979.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-490X(2009)-06-0011-04

### Study of the anti-tumor effect of Xinghuayu injection in mice

Niu Pei<sup>1</sup>, Xu Yueqing<sup>1</sup>, Ba Weisong<sup>2</sup>, et al.

(1. College of Basic Medical Science, Hebei University, Baoding 071000, China; 2. People's Hospital of Dingzhou Badoing, Hebei 071000)

**Abstract: Objective** To explore the anti-tumor effect of Xinghuayu injection in liver cancer(H<sub>22</sub>)model mice. **Methods** (1)Study on the anti-tumor effect: Kunming mice were divided into three groups: Xinghuayu injection dose group, cyclophosphamide control group with the dose of 20mg/kg and model group. Doses of 17.5mg/kg, 35mg/kg, 70mg/kg were administered to the Xinghuayu injection group, every mouse was inoculated tumor cell under the right forelimb axillary. The administration was started at 24 hours post inoculation and it was made once a day, which lasted 7 days. At 24 hours after the last administration, the mice was sacrificed and the tumor mass was unhooked to weight, then the tumor inhibitory rate was calculated. (2)Study on Synergism: 40 Kunming mice were randomly divided into model group, xinghuayu injection group with the dose of 17.5mg/kg, cyclophosphamide group with the dose of 5mg/kg, the combination group(xinghuayu 17.5mg/kg and cyclophosphamide 5mg/kg), every mouse was inoculated tumor cell under the right forelimb axillary. The administration was started at 24 hours post inoculation and it was made once a day, which lasted 7 days. At 24 hours after the last administration, the mice was sacrificed and the tumor mass was unhooked to weight. **Results** (1) anti-tumor effects: the Xinghuayu injection could significantly inhibit the growth of the liver cancer (H<sub>22</sub>) in model mice, the tumor inhibitory rate of the three groups, in which the dose respectively were 17.5mg/kg, 35mg/kg,

收稿日期:2009-05-12

基金项目:河北省科技厅项目(编号:062761399)

作者简介:牛 培(1979-),男,河北保定人,助教。

70mg/kg, were 22.60%, 48.84%, 40.22% ( $P < 0.01$ ), the tumor inhibitory rate of the cyclophosphamide was 57.12% ( $P < 0.01$ ). (2) The synergism: the inhibitory tumor rate of the xinghuayu group (17.5mg/kg), cyclophosphamide group (5mg/kg) and the combination group respectively were 18.07%, 23.88%, 34.59% ( $P < 0.01$ ).

**Conclusion** Xinghuayu injection can significantly inhibit the growth of the tumor cells; using xinghuayu injection with cyclophosphamide can significantly improve the killing tumor effects.

**Key words:** xinghuayu injection; anti-tumor effects; the inhibitory tumor rate; synergism

恶性肿瘤是目前危害人类健康最严重的一类疾病。虽然世界各国每年都在投入大量人力、物力对肿瘤进行研究,并取得了较大进展,但迄今肿瘤的预防和治疗仍然缺少根本有效的方法。因此寻找有效的抗癌药物和方法是医学界面临的重要课题。

中药是我国传统用来防治疾病的方法。中药治疗恶性肿瘤,无论是在减轻临床症状,提高生存质量,防止复发转移,延长生存期,还是在与放化疗配合,增效减毒等方面都有很好的效果<sup>[1]</sup>。在研究中人们发现许多中药、中药活性成分(如多糖、苷类)及中药复方都具有很好的免疫调节作用,在一定剂量范围内能增强机体免疫功能,或使紊乱的机体免疫状态恢复正常。临床与实验研究证明,中药之所以能延缓肿瘤发展或抑制肿瘤,主要是通过改善机体的免疫功能,提高机体的功能状况实现的<sup>[2]</sup>。研究还发现,一些中药的有效成分和复方制剂能够抑制肿瘤组织新生血管的生成,从而发挥其抗肿瘤作用<sup>[3]</sup>。

银杏(Ginkgo biloba)是银杏科银杏属植物,叶作为药用在我国已有五千年的历史,药物成分研究表明,银杏叶化学成分主要有黄酮类、萜类、内酯类、酚酸类以及生物碱、聚异戊二烯等。黄酮类为主要有效成分之一,本实验所用到的杏花雨注射液为改进提取工艺后得到的银杏叶提取物,其黄酮苷含量高达 49.79%。黄酮类化合物具有抗氧化、抗衰老、免疫调节和抗肿瘤等作用,其中抗肿瘤作用是研究的热点之一,已有很多的文献报道<sup>[4]</sup>。杏花雨注射液有效成份中黄酮苷含量最多,是主要有效成分。由此推断其可能具有较好的抗肿瘤活性。本实验旨在通过研究杏花雨注射液对肝癌(H<sub>22</sub>)模型小鼠肿瘤生长状况的影响,观察银杏黄酮的抗肿瘤活性,从而为其更好的应用于临床提供客观而科学的依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 药品及仪器 杏花雨注射液为经工艺改进

后制得的银杏叶提取物注射液,经南京药科大学药物检测中心检测:每 5 mL 中含总提取物 17.5 mg,其中银杏黄酮苷 8.7 mg,占提取物的 49.8%,萜内酯 4.4 %<sup>[4]</sup>。注射用环磷酰胺(上海华联制药有限公司),TG3288 电子分析天平(上海天平仪器厂)。

1.1.2 实验药品的配制 取杏花雨注射液分别制成大剂量组(含银杏叶提取物 3.50 g/L)。中剂量组(含提取物 1.750 g/L)和小剂量组(含提取物 0.875 g/L)。取环磷酰胺粉末溶于无菌生理盐水中,分别配成溶液浓度为 1 g/L、0.25 g/L 两种,临用前配制。

1.1.3 瘤株 小鼠肝癌 H<sub>22</sub> 细胞株由河北医科大学药理学教研室提供。

1.1.4 实验动物 清洁级昆明种小鼠,90 只,体重 18 g~22 g,雌雄兼用,由河北医科大学实验动物中心提供。

### 1.2 实验方法

1.2.1 对小鼠肝癌 H<sub>22</sub> 的抑制作用<sup>[5]</sup> 取生长 7 d 的肝癌 H<sub>22</sub> 腹水型小鼠颈椎脱臼处死,固定于蜡盘上,用无菌空针吸取乳白色腹水,用无菌生理盐水稀释,混合均匀制备瘤细胞悬液,调整肿瘤细胞浓度为  $1 \times 10^7$ /mL 备用。取昆明种小鼠 50 只,右前肢腋窝下常规消毒,每只小鼠皮下注射瘤细胞悬液 0.2 mL。接种次日,将小鼠按体重随机分为 5 组,每组 10 只小鼠,分别为:模型对照组、杏花雨注射液 3 个剂量组及环磷酰胺阳性对照组,并且记录药前体重。杏花雨注射液 3 个剂量组给药剂量分别为:17.5 mg/kg、35 mg/kg 及 70 mg/kg,阳性对照(环磷酰胺)组给药剂量为 20 mg/kg,模型对照组给予同等容积的生理盐水,以上各组均采用腹腔注射,给药容积为 200 mL/kg,每天 1 次,连续给药 7 d。于末次给药后 24 h,颈椎脱臼处死小鼠,剥出瘤块称重,并称体重,计算肿瘤平均重量及肿瘤抑制率,以上实验重复 3 次。肿瘤抑制率计算公式如下:

抑制率(%)= $\frac{\text{对照组平均瘤重}-\text{给药组平均瘤重}}{\text{对照组平均瘤重}}$

×100 %

1.2.2 杏花雨对环磷酰胺抑瘤的增效作用<sup>[9]</sup> 瘤细胞悬液的制备方法同前,取昆明种小鼠 40 只,右前肢腋窝下常规消毒,每只小鼠皮下注射瘤细胞悬液 0.2 mL。接种次日,将小鼠按体重随机分为 4 组,每组 10 只小鼠,分别为:模型对照组、杏花雨注射液(17.5 mg/kg)组、环磷酰胺(5 mg/kg)组、杏花雨注射液(17.5 mg/kg)+环磷酰胺(5 mg/kg)组。模型对照组与杏花雨注射液(17.5 mg/kg)组给药剂量及方法同前,环磷酰胺组给药剂量为 5 mg/kg,采用腹腔注射,给药容积为 200 mL/kg。合用组中杏花雨注射液采用腹腔注射,环磷酰胺采用皮下注射,两药给药容积均为 200 mL/kg,每天 1 次,连续给药 7 d。于末次给药后 24 h,颈椎脱臼处死小鼠,剥出瘤块称重,计算肿瘤平均重量及肿瘤抑制率,以上实验重复 3 次。肿瘤抑制率计算公式同上。

1.3 统计处理 结果以均数±标准差表示,组间比较采用 t 检验,以 P<0.05 为差异有显著意义。

2 结果

2.1 对小鼠肝癌 H<sub>22</sub> 的抑制作用 杏花雨注射液 17.5 mg/kg,35 mg/kg,70 mg/kg 3 个剂量对荷瘤(H<sub>22</sub>)小鼠均有明显的抑瘤作用,与模型对照组比较,具有显著性差异(P<0.01)。其中杏花雨注射液 35 mg/kg 剂量组抑瘤率达 48.84 %。结果见表 1。

表 1 杏花雨注射液对小鼠肝癌 H<sub>22</sub> 的抑制作用

分组	n	剂量 mg/kg	肿瘤重量 g( $\bar{x}\pm s$ )	抑瘤率(%)
模型对照组	10	—	2.32±0.71	—
杏花雨	10	17.5	1.79±0.55*	22.60
杏花雨	10	35.0	1.19±0.38*	48.84
杏花雨	10	70.0	1.42±0.53*	40.22
环磷酰胺	10	20.0	0.59±0.29*	57.12

\*:与模型对照组相比 P<0.01

2.2 对环磷酰胺抗 H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠肿瘤生长的增效作用 杏花雨注射液(17.5 mg/kg)与环磷酰胺(5 mg/kg)合用的抑瘤作用好于两者单用,各组与模型对照组比较,均有显著性差异(P<0.01)。合用组抑瘤率高于单独应用杏花雨注射液组(17.5 mg/kg)及单独应用环磷酰胺(5 mg/kg)组(P<0.05)。提示杏花雨注射液能够提高环磷酰胺的抑瘤效果。结果见

表 2。

表 2 杏花雨注射液对环磷酰胺抗 H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠肿瘤生长的增效作用

组别	n	剂量 mg/kg		肿瘤重量 g( $\bar{x}\pm s$ )	抑瘤率 (%)
		环磷酰胺	杏花雨		
模型对照组	10	—	—	3.37±0.71	—
杏花雨	10	0	17.5	2.76±0.58**	18.07
环磷酰胺	10	5	0.0	2.56±0.50**	23.88
环磷酰胺+杏花雨	10	5	17.5	2.20±0.62**	34.59

注:\*与模型对照组相比 P<0.01,\*与杏花雨和环磷酰胺合用组相比 P<0.05

3 讨论

近年来,随着中医药科技研究的不断深入,从天然植物中寻找抗肿瘤药物已经成为新药研发的一个重要方向,其中银杏是倍受关注的植物之一。杏花雨注射液是新研制的银杏叶提取物(EGb)注射液,其黄酮苷含量为 49.79 %,萜烯为 4.4 %。本课题组以往的研究表明<sup>[9]</sup>,杏花雨注射液对衰老小鼠的记忆功能有一定的保护作用<sup>[9]</sup>;能降低血浆和全血粘度,降低血小板的聚集,加速血小板聚集后的解聚。同时银杏叶提取物有较强的抗氧化损伤作用,对心肌缺血再灌注损伤具有一定的对抗作用<sup>[7]</sup>。近来多项体外研究表明,银杏叶提取物有明显的抗肿瘤活性。其在抑制肿瘤细胞的增殖、促进其凋亡、抑制肿瘤组织血管的形成、增强肿瘤组织对放、化疗的敏感性等方面都具有很好的作用<sup>[8]</sup>。并认为 EGb 抗肿瘤作用主要与黄酮类有关,许多研究表明黄酮类化合物具有良好的抗肿瘤活性,可以通过多种途径抑制肿瘤的生长。杏花雨黄酮苷含量高,因此本课题组设计了该实验旨在观察杏花雨注射液的体内抗肿瘤作用。

首先对杏花雨注射液的抑瘤作用进行了研究,实验结果表明,杏花雨注射液对肝癌 H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠的肿瘤生长有明显的抑制作用,且抑瘤率可达 48.84 %。可能与其主要含有黄酮苷有关。而关于萜烯类化合物抗肿瘤的研究报道相对较少。此外,课题组还设计研究了杏花雨对环磷酰胺抑制 H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠肿瘤生长的增效作用。环磷酰胺为目前广泛应用的烷化剂,主要用于肿瘤免疫,对于多种肿瘤有明显的抑制作用,同时也是科研实验中的常用药品。实验结果表明杏花雨注射液与环磷酰胺联用

后,可以增强环磷酸胺对  $H_{22}$  荷瘤小鼠的疗效,提示杏花雨注射液是一种有效的化疗药物的增效剂,具有良好的临床应用前景以及进一步的研究价值。

由以上实验结果可以看出,杏花雨注射液具有较好的抗肿瘤活性,而其通过何种机制发挥抗肿瘤作用,有待于做进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] 杨传标,徐克成. 中药的抗肿瘤作用[J]. 国际医药卫生导报, 2004, 10(18): 9-12
- [2] 杜 鹏. 中药抗肿瘤免疫的研究进展[J]. 中医药临床杂志, 2004, 16(5): 507-508
- [3] 李 滨, 齐凤琴, 李燕敏, 等. 补中益气汤抗肿瘤作用的实验研究[J]. 中医药学报, 2006, 34(1): 22-23
- [4] 赵 刚, 和水祥. 银杏叶提取物的抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 国外医学中医中药分册, 2005, 27(5): 276-278
- [5] 巴卫松, 李立平, 徐月清, 等. 高含量银杏黄酮苷注射液的质量研究[J]. 河北职工医学院学报, 2003, 20(3): 1-3
- [6] 李利平, 牛 培, 徐月清, 等. Effect of High-Pure ginkgetin injection on memory function and superoxide dismutase activity in myocardial tissues[J]. 中国临床康复, 2005, 10(15): 171-173
- [7] 章红燕, 侯桂兰, 何福根, 等. 银杏叶总黄酮和银杏内酯对心脑血管作用的研究进展[J]. 浙江临床医学, 2008, 10(4): 543-544
- [8] 王晓玲, 李江涛, 徐瑞荣, 等. 肿瘤的中医治疗对策[J]. 癌症进展, 2008, 6(6): 41-42
- [9] 杨传标, 徐克成. 中药的抗肿瘤作用[J]. 国际医药卫生导报, 2004, 10(18): 9-12
- [10] 杜 鹏. 中药抗肿瘤免疫的研究进展[J]. 中医药临床杂志, 2004, 16(5): 507-508
- [11] 李 滨, 齐凤琴, 李燕敏, 等. 补中益气汤抗肿瘤作用的实验研究[J]. 中医药学报, 2006, 34(1): 22-23
- [12] 赵 刚, 和水祥. 银杏叶提取物的抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 国外医学中医中药分册, 2005, 27(5): 276-278
- [13] 巴卫松, 李立平, 徐月清, 等. 高含量银杏黄酮苷注射液的质量研究[J]. 河北职工医学院学报, 2003, 20(3): 1-3
- [14] 李利平, 牛 培, 徐月清, 等. Effect of High-Pure ginkgetin injection on memory function and superoxide dismutase activity in myocardial tissues[J]. 中国临床康复, 2005, 10(15): 171-173
- [15] 章红燕, 侯桂兰, 何福根, 等. 银杏叶总黄酮和银杏内酯对心脑血管作用的研究进展[J]. 浙江临床医学, 2008, 10(4): 543-544
- [16] 王晓玲, 李江涛, 徐瑞荣, 等. 肿瘤的中医治疗对策[J]. 癌症进展, 2008, 6(6): 41-42
- [17] 董士民, 白 杰, 刘坤申. 螺内酯氨氯沙坦及两者和用对 AMI 大鼠心肌胶原重建醛固酮合成酶基因及胶原 mRNA 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(9): 1839-1842
- [18] 董志琴, 刘坤申, 彭应心, 等. 慢性心力衰竭的醛固酮逃逸现象及螺内酯干预[J]. 中华心血管杂志, 2001, 29(11): 660-662
- [19] 董志琴, 刘坤申, 彭应心, 等. 螺内酯对慢性心力衰竭患者醛固酮水平及心功能的影响[J]. 中国循环杂志, 2002, 17(4): 269-277
- [20] 董 琦, 刘坤申. 急性心肌梗死后螺内酯干预对左室重构的影响[J]. 中华心血管病杂志, 2005, 33(33): 315-319
- [21] 董士民, 白 杰, 刘坤申. 螺内酯氨氯沙坦及两者和用对 AMI 大鼠心肌胶原重建醛固酮合成酶基因及胶原 mRNA 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(9): 1839-1842
- [22] Ricci R, Coletta C, Ceci V, et al. Effect of early treatment with captopril and metoprolol singly and together on postinfarction left ventricular remodeling[J]. American Heart Journal, 2001, 142(4): 704-713
- [23] Li YY, McTieman CF, Feldman AM. Interplay of matrix metalloproteinase- s, tissue inhibitors of metalloproteinase and their regulators in cardiac matrix remodeling[J]. Cardiac Res, 2000, 46: 214-224
- [24] Khattar R S, Senior R, Soman P, et al. Regression of left ventricular remodeling in chronic heart failure: Comparative and combined effects of captopril and carvedilol[J]. American Heart Journal, 2001, 142(4): 704-713
- [25] Molkenkin JD, Lu JR, Antos CL, et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiachypertrophy[J]. Cell. 1998, 93: 215-228
- [26] Takeda Y, Yoneda T, Demura M, et al. Calcineurin inhibition attenuates mineralocorticoid-induced cardiac hypertrophy[J]. Circulation, 2002, 105: 677-679
- [27] Robert V, Heymes C, Silvestre JS, et al. Angiotensin AT1 receptor subtype as a cardiac target of Aldosterone: role in Aldosterone-salt-induced fibrosis[J]. Hypertension, 1999, 33: 981-986
- [28] Wang J, Yu L, Solenberg PJ, et al. Aldosterone stimulates angiotensin- converting enzyme expression and activity in rat neonatal cardiac myocytes[J]. J Card Fail, 2002, 8: 167-174
- [29] Swynghedauw B. Are Adult cardiocytes still able to proliferate[J]. Arch Mal Coeur, 2003, 96(12): 1225-1230
- [30] Sadoshima J, Takahashi T. Molecular characterization of the stretched induced adaptation of cultured cardiac cells: an in vitro model load-induced cardiac hypertrophy[J]. J Biol Chem, 1992, 267: 10551-10560

(上接第 7 页)

ventricular remodeling after myocardial infarction in rats [J]. Eur Heart J, 2002, 21(Suppl): 72-80

- [4] Sanbe A, Tanonaka K, Kobayasi R, et al. Effects of long-term therapy with ACE inhibitors, captopril, enalapril, on myocardial energy metabolism in rates with heart failure following myocardial infarction [J]. J Mol Cell Cardiol, 1995, 27(6): 2209-2222
- [5] Molkenkin JD, Lu JR, Antos CL, et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiachypertrophy[J]. Cell. 1998, 93: 215-228
- [6] Takeda Y, Yoneda T, Demura M, et al. Calcineurin inhibition attenuates mineralocorticoid-induced cardiac hypertrophy[J]. Circulation, 2002, 105: 677-679
- [7] Robert V, Heymes C, Silvestre JS, et al. Angiotensin AT1 receptor subtype as a cardiac target of Aldosterone: role in Aldosterone-salt-induced fibrosis[J]. Hypertension, 1999, 33: 981-986
- [8] Wang J, Yu L, Solenberg PJ, et al. Aldosterone stimulates angiotensin- converting enzyme expression and activity in rat neonatal cardiac myocytes[J]. J Card Fail, 2002, 8: 167-174
- [9] Swynghedauw B. Are Adult cardiocytes still able to proliferate[J]. Arch Mal Coeur, 2003, 96(12): 1225-1230
- [10] Sadoshima J, Takahashi T. Molecular characterization of the stretched induced adaptation of cultured cardiac cells: an in vitro model load-induced cardiac hypertrophy