

- [2] 柯雪帆, 赵章忠, 张玉萍, 等. 《伤寒论》和《金匮要略》中的药物剂量问题[J]. 中国中医药杂志, 1983(12): 36-38.
- [3] 李杰, 刘长江. 心理应激对大鼠下丘脑、胃黏膜 CRF 基因表达的影响及中药干预的实验研究[J]. 中医杂志, 2002, 43(9): 699-700.
- [4] 王泽凤, 王敏, 史新萍. 半夏泻心汤在胃肠疾病方面的应用[J]. 中国实用医药, 2009, 4(9): 167-168.
- [5] 李志强, 常红娟. 半夏泻心汤抗抑郁作用实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(4): 280-282.
- [6] Yanaka A, Suzuki H, Shibahara, et al. EGF promotes gastric mucosal restitution by activating Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange of epithelial cells [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002, 282(5): 866-876.
- [7] 徐俊, 宋于刚, 武金宝, 等. 应激性溃疡大鼠血浆 EGF 水平和胃上皮细胞凋亡的变化[J]. 苏州大学学报: 医学版, 2004, 24(2): 160-163, 175.
- [8] Celebi N, Turkyilmaz, Gonul B, et al. Effects of epidermal growth factor microemulsion formulation on the healing of stress-induced gastric ulcers in rats[J]. J Control Release, 2002, 83(2): 197-210.
- [9] Akbulut KG, Gonul B, Turkyilmaz A, et al. The role of epidermal growth factor formulation on stress ulcer healing of the gastric mucosa[J]. Surg Today, 2002, 32(10): 880-883.
- [10] Kontuiek PC, Brzozowski T, Duda A, et al. Epidermal growth factor and prostaglandin E(2) accelerate mucosal recovery from stress-induced gastric lesions via inhibition of apoptosis [J]. J Physiol Paris, 2001, 95(1-6): 361-367.

(责任编辑: 骆欢欢)

## 夏枯草对 3 种肿瘤细胞抑制作用的实验研究

沈亚芬<sup>1</sup>, 丁勤霞<sup>1</sup>, 宋利斌<sup>1</sup>, 朱曙东<sup>1</sup>, 沈金根<sup>2</sup>

1. 浙江省中医院, 浙江 杭州 310000; 2. 桐乡市第一人民医院, 浙江 桐乡 324500

**[摘要]** 目的: 探索夏枯草粗提物对 3 种肿瘤细胞(淋巴瘤细胞株 Jurkat、人肺癌细胞株 A-549、子宫内膜癌细胞株 Ishikawa)生长抑制作用, 为夏枯草抗癌机制的深入研究提供实验参考依据。方法: 以不同浓度的夏枯草粗提物供试液作用于 3 种肿瘤细胞, 采用 MTT 法计算其 IC<sub>50</sub> 值, 观察药物对 3 种肿瘤细胞的抑制作用, 同时设置空白组、对照组、阳性对照组。结果: 夏枯草粗提物对 Jurkat 细胞、A-549 细胞、Ishikawa 细胞 IC<sub>50</sub> 值分别为 59.628 mg/mL、53.917 mg/mL、48.017 mg/mL, 且夏枯草对 3 种肿瘤细胞的抑制率在一定范围内随药物浓度增加而加强。结论: 夏枯草对 Jurkat 细胞、A-549 细胞、Ishikawa 细胞的增殖具有一定的抑制作用, 对抗癌机制的研究以及临床抗癌药物的筛选具有一定的参考价值。

**[关键词]** 夏枯草; 肿瘤; 细胞株; MTT 法; 体外增殖

**[中图分类号]** R73; R285 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415(2015)05-0273-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.05.129

夏枯草为唇形科多年生草本植物夏枯草(*Prunella vulgaris* L.)的干燥成熟果穗<sup>[1]</sup>, 性寒, 味微苦、甘、辛, 主入肝经、胆经, 具有清火明目、散结消肿、清热活血、祛痰止咳的功效<sup>[2-4]</sup>。现代药理研究表明, 夏枯草具有降血糖、抗菌消炎、抗病毒感染、调节免疫、降血压、降血脂、保肝利胆等作用<sup>[5]</sup>。此外, 该药材对多种肿瘤细胞具有明显的抑制作用<sup>[6]</sup>。笔者采用 MTT

法研究夏枯草粗提物对 3 种肿瘤细胞(淋巴瘤细胞株 Jurkat、肺癌细胞株 A-549、子宫内膜癌细胞株 Ishikawa)体外增殖的影响, 为其抗癌机制的深入研究以及临床用药提供实验依据。

### 1 材料与方法

1.1 细胞株 淋巴瘤细胞株 Jurkat、肺癌细胞株 A-549 购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库, 子宫内膜癌细胞株

**[收稿日期]** 2014-11-30

**[作者简介]** 沈亚芬(1974-), 女, 主管中药师, 研究方向: 中药材重金属含量测定。

Ishikawa 由浙江大学医学院附属妇产科医院妇科肿瘤实验室馈赠。

1.2 药品与试剂 夏枯草购自萧山医药公司。MEM 培养液(HyClone 公司,批号:NWL0507);优级胎牛血清(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司,批号:TBD21HY);胰蛋白酶(0.25% Trypsin-EDTA, Gibco,批号:1023133);DMSO(二甲基亚砜, Sigma,批号:D8370);MTT(四甲基偶氮唑盐, Solarbio,批号:M8180);其余试剂为分析纯;阿霉素(Solarbio,批号:P1421,规格:10 mL/支)。

1.3 仪器与设备 酶标仪(BIORAD,日本);无菌净化工作台(苏州净化设备厂);显微镜(Olympus IX41);二氧化碳培养箱(NV-2500E,美国);微量振荡器(江苏金坛市中大仪器厂);电子天平(BP-2110,德国)。

1.4 癌细胞株的常规培养 将 Jurkat 细胞、A-549 细胞、Ishikawa 细胞置于 37℃,5%CO<sub>2</sub>,湿度 95% 细胞培养箱培养。培养细胞生长 1 天后更换培养液,待细胞生长到 80%~90% 时,弃去培养液,以 PBS 磷酸盐缓冲液清洗 1~2 次,加 1 mL 0.25% 胰蛋白酶,37℃ 下消化 1 min,弃去胰蛋白酶,加入 5~6 mL 培养液吹打,分装至 2 个不同的培养瓶中,补加培养液,标记,放入培养箱培养。

1.5 夏枯草供试液的制备 对药材以水煎法提取 2 h,加入乙醇,至乙醇浓度为 75%,制得夏枯草粗提物,取夏枯草粗提物适量,精密称定,溶于 DMSO 中,用细胞培养液分别稀释配制成含生药浓度为 24.2 mg/mL, 48.4 mg/mL, 60.5 mg/mL, 84.7 mg/mL, 121.0 mg/mL 的供试液。供试液中 DMSO 浓度控制在 1% 以下。

1.6 MTT 比色法测定药物的抗癌活性 取对数生长期的淋巴瘤 Jurkat 细胞、肺癌 A-549 细胞、子宫内膜癌 Ishikawa 细胞( $5 \times 10^4$  mL<sup>-1</sup>)接种于 96 孔培养板,每孔接种细胞悬浮液 200  $\mu$ L,置于 37℃、湿度为 95%、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h。待细胞完全贴壁后,吸出培养液。实验组:加入上述不同浓度的夏枯草供试液;阳性对照组:加入浓度分别为 0.04  $\mu$ g/mL, 0.16  $\mu$ g/mL, 0.63  $\mu$ g/mL, 2.50  $\mu$ g/mL, 9.86  $\mu$ g/mL 的阿霉素试液;空白组:只加入细胞培养液;对照组:加入细胞培养液和癌细胞;每个浓度均为 4 孔,每孔加入体积为 200  $\mu$ L,培养 48 h 后,每孔加入浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20  $\mu$ L,培养 4 h 后,小心吸掉孔板中的培养液,每孔加入 150  $\mu$ L DMSO,低速振荡 10 min 使结晶物充分溶解,在酶标仪上测定各孔 OD 值,测定波长 570 nm,计算细胞的生长抑制率。以上实验平行做两次,计算平均值。细胞生长抑制率(%)=(对照孔测定的平均 OD 值 - 加药组测定的平均 OD 值)/(对照孔测定的平均 OD 值 - 空白孔测定的平均 OD 值)×100%。

1.7 统计学方法 所有数据均以 SPSS17.0 进行分析,计数资料以率或构成比表示,行  $\chi^2$  检验;计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,

行 *t* 检验。

## 2 结果

各组对肿瘤细胞增殖的抑制作用比较,见表 1、表 2、表 3。不同浓度的供试液对 3 种肿瘤细胞的增殖均有一定的抑制作用,IC<sub>50</sub> 值分别为 59.628 mg/mL、53.917 mg/mL、48.017 mg/mL,并且在一定范围内,夏枯草对细胞的抑制率随药物的浓度增加而加强,呈现一定的剂量依赖性。

表 1 各组对 Jurkat 细胞增殖抑制作用比较

组别	浓度	孔数	OD 平均值	抑制率(%)	IC <sub>50</sub> 值
空白组	0	8	0.02	-	
对照组	0	8	0.57	-	-
夏枯草(mg/mL)	24.2	8	0.48	16.4	
	48.4	8	0.33	43.6 <sup>①</sup>	
	60.5	8	0.27	54.5 <sup>②</sup>	59.628
	84.7	8	0.21	65.5 <sup>②</sup>	
	121.0	8	0.13	80.0 <sup>②</sup>	
阿霉素( $\mu$ g/mL)	0.04	8	0.42	27.3 <sup>②</sup>	
	0.16	8	0.29	50.9 <sup>②</sup>	
	0.63	8	0.12	81.8 <sup>②</sup>	0.148
	2.50	8	0.05	94.5 <sup>②</sup>	
	9.86	8	0.03	98.2 <sup>②</sup>	

与对照组比较,① $P < 0.05$ ,② $P < 0.01$

表 2 各组对 A-549 细胞增殖抑制作用比较

组别	浓度	孔数	OD 平均值	抑制率(%)	IC <sub>50</sub> 值
空白组	0	8	0.04	-	
对照组	0	8	1.82	-	-
夏枯草(mg/mL)	24.2	8	1.43	21.9	
	48.4	8	1.26	31.5 <sup>①</sup>	
	60.5	8	0.79	57.9 <sup>②</sup>	53.917
	84.7	8	0.44	77.5 <sup>②</sup>	
	121.0	8	0.20	91.0 <sup>②</sup>	
阿霉素( $\mu$ g/mL)	0.04	8	1.12	39.3 <sup>①</sup>	
	0.16	8	0.59	69.1 <sup>②</sup>	
	0.63	8	0.40	79.8 <sup>②</sup>	0.065
	2.50	8	0.21	90.4 <sup>②</sup>	
	9.86	8	0.17	92.7 <sup>②</sup>	

与对照组比较,① $P < 0.05$ ,② $P < 0.01$

## 3 讨论

癌症严重威胁着人类的生命安全,有效的抗癌药物的筛选对癌症的治疗具有重要的意义。MTT 法利用外源性 MTT 与活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶反应生成水不溶性的蓝紫色结晶甲瓞,并在细胞中进行沉积,而死细胞却不呈现这种现象,以此反映活细胞存在的数量。在一定的细胞数范围内,产生 MTT 结晶的量与活细胞数目成正比<sup>[7]</sup>。此种方法准确性高,重

表 3 各组对 ISHikawa 细胞增殖抑制作用比较

组别	浓度	孔数	OD 平均值	抑制率(%)	IC <sub>50</sub> 值
空白组	0	8	0.03	-	
对照组	0	8	0.72	-	-
	24.2	8	0.61	15.9	
	48.4	8	0.43	42.0 <sup>①</sup>	
夏枯草(mg/mL)	60.5	8	0.21	73.9 <sup>②</sup>	48.017
	84.7	8	0.09	91.3 <sup>②</sup>	
	121.0	8	0.06	95.7 <sup>②</sup>	
	0.04	8	0.60	17.4	
	0.16	8	0.41	44.9 <sup>②</sup>	
阿霉素(μ g/mL)	0.63	8	0.26	66.7 <sup>②</sup>	0.255
	2.50	8	0.06	95.7 <sup>②</sup>	
	9.86	8	0.05	97.1 <sup>②</sup>	

与对照组比较, ①P<0.05, ②P<0.01

现性好, 灵敏度高, 且经济适用等优点。目前已广泛应用于抗肿瘤药物活性的筛选、一些生物活性因子的活性检测、细胞毒性试验等<sup>[8]</sup>。实验研究表明, 夏枯草对肺癌细胞、胃癌细胞 SGC-7901、淋巴瘤细胞 Raji、食管癌 Eca-109 细胞等具有一定的抑制作用<sup>[9]</sup>。其中李军等<sup>[10]</sup>报道夏枯草可以有效的激活 P53 蛋白、抑制 Bcl-2 蛋白的表达, 促使淋巴瘤细胞 Raji 的凋亡。本文采用 MTT 法研究了夏枯草粗提物对 Jurkat 细胞、A-549 细胞增殖的影响、同时首次研究了夏枯草粗提物对 ISHikawa 细胞增殖生长的影响, 结果显示与对照组比较, 夏枯草对 Jurkat、A-549、ISHikawa 3 种肿瘤细胞均有一定的抑制作用, 其 IC<sub>50</sub> 值分别为 59.628 mg/mL、53.917 mg/mL、48.017 mg/mL, 且一定浓度范围内, 药物对 3 种肿瘤细胞的抑制率呈现剂量依赖性。通过对夏枯草体外抗肿瘤细胞活性进行初步筛选, 为该药材抗癌机制深入研究及临床用药奠定

了基础。

[参考文献]

[1] 梁杰康, 张琳, 严晓明. HPLC- ECI- MS/MS 鉴定夏枯草的主要化学成分[J]. 中国中医药, 2013, 11(14): 153- 154.

[2] 张明智, 郑晓珂, 刘宏民, 等. 夏枯草提取物体外诱导 EL-4 细胞凋亡的实验研究[J]. 江苏中医药, 2008, 40(4): 80- 83.

[3] 郑学芝, 郑学海, 李佳, 等. 夏枯草提取物对人食管癌 Eca-109 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国食物与营养, 2012, 18(9): 74- 73.

[4] 张明智, 张可杰, 王庆端, 等. 夏枯草对淋巴瘤细胞增殖的影响[J]. 医药论坛杂志, 2007, 28(1): 54- 55.

[5] 许松日, 金光, 李文, 等. 夏枯草醇提取物对正常大鼠离体胸主动脉环的舒张作用[J]. 四川中医, 2010, 28(4): 52- 53.

[6] 张丽丹, 苏洁, 吕圭源, 等. 夏枯草的药理研究与临床应用[J]. 海峡药学, 2011, 23(5): 143- 145.

[7] 张淼, 董宝婧, 苗芳, 等. 夏枯草提取物的抗氧化活性[J]. 草业科学, 2012, 29(9): 1477- 1481.

[8] 贾晓斌, 封亮, 陈彦, 等. 夏枯草肺癌化学预防物质基础研究思路与方法[J]. 中草药, 2009, 40(2): 316- 318.

[9] 李艳丽. 夏枯草水提取物对自发性高血压大鼠降压作用的研究[J]. 中外医学研究, 2012, 10(30): 147.

[10] 李军, 杨慧玲. 夏枯草诱导人淋巴瘤 Raji 细胞凋亡及其机制[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(13): 2528- 2529.

(责任编辑: 骆欢欢)

· 书讯 · 《血液科专病中医临床诊治》由人民卫生出版社出版。本书立足中医临床, 侧重治疗, 突出实用, 对血液专科部分疾病的中医临床诊断治疗的经验及其研究成果进行认真总结, 以现代医学病名为纲, 收载临床常见、具有中医药优势、疗效较好的血液及造血系统疾病, 如缺血性贫血、溶血性贫血、巨幼细胞性贫血、再生障碍性贫血、急性白血病、慢性白血病等共计 13 种, 每个疾病分概述、病因病机、临床表现、实验室和其他辅助检查、诊断要点、鉴别诊断、治疗、难点与对策、经验与体会、现代研究、评述等项内容介绍。本书特点之一为立足中医临床, 侧重对治疗方法和经验的全面深入总结, 即在明确西医诊断基础上介绍确实有效的中医、中西医结合及西医的综合治疗方法和经验, 既突出中医药特色与优势, 又不回避中西医结合及西医的长处, 比较客观地反映了当前血液专科的中医临床实际, 且内容丰富, 临证治疗思路清晰, 实用价值高。特色之二是本书的可读性强, 为集中体现作者的临证经验和处理棘手问题的水平及独到见解, 特在难点与对策、经验与体会中总结了作者多年临床的经验; 为开阅读者临证思路, 特汇集了中医血液专科前辈、专家们临床实践的精华, 在医案精选、名医专家论坛栏目详细介绍给读者, 以期能提高广大临床工作者的诊疗水平。因此, 本书为一部深入总结该专科临床医疗和研究成果的高级参考读物, 可供中医、中西医结合临床、教学、科研工作者学习参考, 也可作为血液科培训专科专病技术人才的辅导读物。每册定价 58 元。需要者请汇款到广州市番禺区广州大学城外环东路 232 号广州中医药大学《新中医》编辑部发行科收, 邮政编码 510006, 电话 020- 39354129。