

蛇莓不同极性提取物体外抗肿瘤活性研究

倪洁微¹, 宣贵达^{2*}¹浙江大学医学院附属妇产科医院, 杭州 310006; ²浙江大学城市学院, 杭州 310015

摘要: 本文以蛇莓为研究对象, 以不用极性的有机溶剂提取蛇莓中不同的活性成分, 通过对各提取物肿瘤细胞的细胞药效学评价, 初步了解蛇莓不同极性成分抗肿瘤作用的情况, 为进一步开发利用蛇莓资源提供科学依据。实验采用 MTT 法对蛇莓石油醚、乙酸乙酯和正丁醇提取物进行细胞毒性研究。以细胞增殖抑制率为指标, 探讨了蛇莓不同极性溶剂提取物对 HeLa、HepG2 以及 MCF-7 细胞系的增殖抑制作用及细胞形态学的影响。结果表明, 三种不同极性溶剂提取物抗肿瘤作用从强到弱依次为石油醚部分 > 乙酸乙酯部分 > 正丁醇部分, 而三种溶剂的极性从大到小依次为正丁醇 > 乙酸乙酯 > 石油醚。结果显示蛇莓中极性较小的组分对肿瘤细胞的抑制作用较强。

关键词: 蛇莓; 提取物; 抗肿瘤

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.S.032

Anti-tumor Activity of Different Polar Extracts from *Indian Mockstrawberry Herb*NI Jie-wei¹, XUAN Gui-da^{2*}¹Women's Hospital School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China;²City College of Zhejiang University, Hangzhou 310015, China

Abstract: In this study, we aimed on the extracts of *Indian Mockstrawberry Herb*. Organic solvents of various polarities (Petroleum ether, ethyl acetate and butanol) were used to extract the different components in the herb. The in vitro cytotoxicity of the extracts was evaluated by MTT assay to obtain a scientific basis for the further exploitation and application. IC₅₀ was used as evaluation criteria. The result showed that the extracts could significantly inhibited the growth of the cells of HeLa, HepG2 and MCF-7. And as the polarity of organic solvents used reduced, the anti-tumor activity of the corresponding extract increased obviously. The sequence of anti-tumor activity, from strong to week, was petroleum ether section, ethyl acetate section and butanol section. And the sequence of the three solvents, also from strong to week, was butanol, ethyl acetate and ether. In conclusion, the component of *Duchesnea indica* herb with high polarity possesses a superior anti-tumor activity ageist tumor cells.

Key words: *Indian Mockstrawberry Herb*; extract; anti-tumor activity

恶性肿瘤是严重威胁人类健康的常见病和多发病, 亦是世界医学的一大难题。从植物中寻找具有抗肿瘤活性的化合物, 通过研究各类活性成分的构效关系, 并进行化学改造与结构修饰, 研究其半合成的衍生物, 以寻找疗效高、毒副作用低、耐药性小、适于工业化生产的抗癌新药, 已成为国际上抗肿瘤药物研究的热点之一^[1]。

蛇莓蔷薇科, 多年生草本, 全草供药用, 有清热解毒、活血散瘀、收敛止血作用, 又能治毒蛇咬伤。从蛇莓中已分离出和做了鉴定的化合物主要为酚酸类, 黄酮类和三萜类等^[2]。现代研究表明蛇莓有抗

肿瘤, 提高免疫、抗菌等作用。本实验通过比较蛇莓不同极性部分提取物对肿瘤细胞的影响, 为进一步研究蛇莓抗肿瘤作用的活性成分提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器、材料与试剂

仪器: 粉碎机(上海淀久中药机械制造有限公司)、循环式多用真空泵 SBH-III(A(河南省太康科教器材厂)、旋转蒸发器 RE-52AA(上海亚荣生化仪器厂)、酶标仪(上海淀久中药机械制造有限公司)、CO₂ 培养箱(中国无锡普莱玛仪器设备有限公司)、单人超净台(河南省太康科教器材厂)、倒置显微镜(北京普析仪器有限公司)、低速台式离心机(上海

精宏实验设备有限公司),超低温冰箱(上海精宏实验设备有限公司),电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司)。

试剂:蛇莓(产于江苏宿迁,粉碎后备用)、乙醇(95%工业酒精,太仓新太酒精有限公司)、MTT(Sigma公司),RPMI 1640培养基(含双抗,杭州科易生物技术有限公司),DEME培养基(Gibico公司),0.25%胰酶细胞消化液(杭州科易生物技术有限公司),PBS(杭州科易生物技术有限公司),新生牛血清(杭州四季青生物工程公司),DMSO(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)细胞:Hela、HepG2、MCF-7细胞株(浙江大学城市学院药分实验室提供)。

1.2 试验方法

1.2.1 超声辅助法提取蛇莓工艺优化^[3]

将蛇莓全草粉碎,称取粉末50g,根据预实验结果选择室温下浸泡24h后进行超声辅助提取,并对乙醇浓度(A)、超声时间(B)、超声功率(C)、料液比(D)四因素应用 $L_9(3^4)$ 正交试验表实施方案,每组提取一次,减压回收溶剂,得蛇莓浸膏。

1.2.2 蛇莓不同极性成分提取^[4]

取蛇莓浸膏加水热浴后,依次用2~3倍量石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,收集各萃取液,回收溶剂并减压浓缩,分别得到蛇莓不同极性溶剂提取物浸膏。

1.2.3 蛇莓不同提取物体外抗肿瘤作用研究^[5-7]

将蛇莓不同提取物浸膏溶解,溶解后用PBS稀

释至所需浓度(见表2~4)。取对数生长期细胞,以每孔100 μ L(约 1×10^4 细胞)接种于96孔板,置于5%的CO₂培养箱,37 $^{\circ}$ C培养,观察。24h后细胞贴壁,分别加入不同浓度的待测样品100 μ L,每个浓度设4个复孔,另设对照组(细胞、相同浓度的药物溶解介质、培养液、MTT、DMSO)和空白调零组(培养基、MTT、DMSO),于5%的CO₂培养箱,37 $^{\circ}$ C孵育48h后每孔加入浓度为5g/mL的MTT10 μ L,继续培养4h,后移去培养液,每孔加入DMSO100 μ L,平板振荡器振荡15min,充分溶解蓝紫色颗粒。用酶标仪测定570nm处吸光值(OD)。通过以下公式计算细胞存活抑制率。

$$I_{48h}(\%) = \frac{A_{control} - A_{treat}}{A_{control}} \times 100\%$$

式中: $I_{48h}\%$ —48h细胞增殖抑制率; $A_{control}$ —空白对照组570nm处的吸光度; A_{treat} —实验组570nm处的吸光度。

2 结果与分析

2.1 超声辅助法提取蛇莓-正交试验^[8]

采用 $L_9(3^4)$ 重复正交试验设计,考察乙醇浓度(A)、超声时间(B)、超声功率(C)、料液比(D)。4种因素对提取率的影响,每种因素取3个水平。试验所得浸膏按以下公式计算得率 $W = m(g)/M(g) \times 100\%$,其中m为提取所得浸膏质量,M为药材实际质量,每组试验重复3次取其平均值。

表1 正交试验结果及极差分析

Table 1 Design and results of orthogonal experiments

试验号 No.	(A)乙醇浓度 Ethanol concentration	(B)超声时间 Ultrasonic time	(C)超声功率 Ultrasonic power	(D)料液比 Solid/liquid ratio	浸膏提取率 Extraction yield (%)
1	1(60%)	1(10 min)	1(60 W)	1(1:10)	12.0
2	1(60%)	2(20 min)	2(80 W)	2(1:20)	13.0
3	1(60%)	3(30 min)	3(100 W)	3(1:30)	11.8
4	2(75%)	1(10 min)	2(80 W)	3(1:30)	8.2
5	2(75%)	2(20 min)	3(100 W)	1(1:10)	7.4
6	2(75%)	3(30 min)	1(60 W)	2(1:20)	9.4
7	3(90%)	1(10 min)	3(100 W)	2(1:20)	4.0
8	3(90%)	2(20 min)	1(60 W)	3(1:30)	3.6
9	3(90%)	3(30 min)	2(80 W)	1(1:10)	2.8
K1	12.27	8.07	8.33	7.40	
K2	8.33	8.00	8.00	8.80	

K3	3.47	8.00	7.73	7.87
极差 R	4.41	0.04	0.30	0.71

从表 1 的极差分析可以看出 4 个因素对蛇莓提取含量的影响大小为 $A > D > C > B$, 即因素对提取率影响顺序:乙醇浓度 > 料液比例 > 超声功率 > 超声时间。并得出该正交实验的最佳组合为 $A_1 D_2 C_2 B_2$, 即乙醇浓度为 60%, 料液比例为 1:20, 超声功率为 80 W, 超声 60 min。在最佳条件下重复实验, 得率约为 15.0%, 并在此条件下用蛇莓粉末制得 412 g 蛇莓浸膏。

2.2 蛇莓不同极性成分提取结果分析

412 g 蛇莓浸膏用溶剂萃取后分别得石油醚部分 27 g, 乙酸乙酯 49 g, 正丁醇 74 g。结果表明提取率:正丁醇 > 乙酸乙酯 > 石油醚。

2.3 蛇莓不同提取物体外抗肿瘤作用结果分析

表 2~4 数据结果显示, 三种溶剂各自的提取物

其抗肿瘤细胞药效从强到弱依次为石油醚部分、乙酸乙酯部分、正丁醇部分。三种溶剂对应的极性从大到小依次为正丁醇、乙酸乙酯、石油醚。由三者对不同细胞系的细胞半数抑制率 IC_{50} 得出, 石油醚提取物对肿瘤细胞的生长抑制作用最为显著, 正丁醇提取物的肿瘤细胞抑制作用在三者当中最弱。此外, 相比于正丁醇提取物, 石油醚提取物和乙酸乙酯提取物均对以上三种细胞系中的 MCF-7 细胞生长抑制能力最强, 而正丁醇提取物对 HeLa 细胞生长抑制能力相对显著。产生该现象的原因可能与药物进入细胞的难易程度有关。

图 1 为蛇莓石油醚提取物对细胞的增值抑制和形态学影响的图片, 结果显示对照组细胞(左)生长良好, 细胞正常贴壁生长, 膜表面光滑, 胞体较大; 给

表 2 蛇莓石油醚提取物对细胞的增值抑制影响

Table 2 Effects of petroleum ether extract on cell proliferation

石油醚提取物 Petroleum ether extract ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Hela		HepG2		MCF-7	
	A 值 Absorption	抑制率 Inhibition rate (%)	A 值 Absorption	抑制率 Inhibition rate (%)	A 值 Absorption	抑制率 Inhibition rate (%)
-	0.87 \pm 0.17	-	0.82 \pm 0.14	-	0.79 \pm 0.12	-
50	0.73 \pm 0.14	16.05	0.72 \pm 0.11	12.27	0.52 \pm 0.09	34.07
100	0.55 \pm 0.09	36.10	0.51 \pm 0.10	37.12	0.43 \pm 0.15	46.37
200	0.41 \pm 0.11	53.58	0.32 \pm 0.09	60.74	0.27 \pm 0.09	65.62
400	0.26 \pm 0.08	70.49	0.21 \pm 0.09	73.93	0.24 \pm 0.06	70.03
800	0.06 \pm 0.05	92.84	0.14 \pm 0.05	82.82	0.08 \pm 0.04	89.59
IC_{50}		165.45		182.91		110.29

表 3 蛇莓乙酸乙酯提取物对细胞的增值抑制影响

Table 3 Effects of ethyl acetate extract on cell proliferation

乙酸乙酯提取物 Ethyl acetate extract ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Hela		HepG2		MCF-7	
	A 值 Absorption	抑制率 Inhibition rate (%)	A 值 Absorption	抑制率 Inhibition rate (%)	A 值 Absorption	抑制率 Inhibition rate (%)
-	0.70 \pm 0.11	-	0.79 \pm 0.09	-	0.79 \pm 0.12	-
50	0.60 \pm 0.08	11.27	0.70 \pm 0.14	11.43	0.68 \pm 0.10	13.38
100	0.56 \pm 0.06	30.15	0.54 \pm 0.06	31.75	0.47 \pm 0.08	40.76
200	0.33 \pm 0.13	49.28	0.49 \pm 0.12	38.41	0.33 \pm 0.13	57.96
400	0.20 \pm 0.07	61.33	0.33 \pm 0.09	58.10	0.23 \pm 0.10	70.70
800	0.12 \pm 0.05	89.59	0.23 \pm 0.07	70.48	0.16 \pm 0.08	79.30
IC_{50}		209.29		303.72		189.34

表4 蛇莓正丁醇提取物对细胞的增值抑制影响
Table 4 Effects of n-butanol extract on cell proliferation

正丁醇提取物 n-Butanol ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Hela		HepG2		MCF-7	
	A 值 Absorption	抑制率 Inhibition rate (%)	A 值 Absorption	抑制率 Inhibition rate (%)	A 值 Absorption	抑制率 Inhibition rate (%)
-	0.88 \pm 0.13	-	0.77 \pm 0.09	-	0.69 \pm 0.14	-
50	0.83 \pm 0.08	3.71	0.71 \pm 0.15	8.44	0.68 \pm 0.16	2.57
100	0.65 \pm 0.14	27.71	0.65 \pm 0.13	15.26	0.61 \pm 0.13	10.66
200	0.47 \pm 0.12	43.71	0.52 \pm 0.10	30.79	0.43 \pm 0.07	36.40
400	0.31 \pm 0.04	64.29	0.45 \pm 0.08	42.21	0.38 \pm 0.05	44.85
800	0.28 \pm 0.05	66.57	0.23 \pm 0.03	70.45	0.30 \pm 0.05	56.25
IC ₅₀		319.62		429.12		490.68

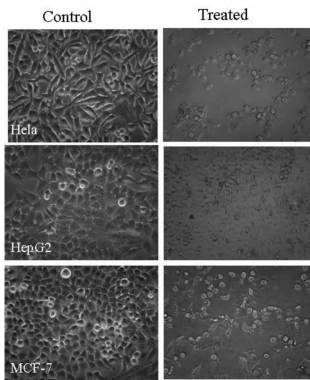


图1 倒置显微镜下对照组(左侧)及给药组(右侧)的细胞形态照片

Fig. 1 Cellular morphology of control group (left) and drug treatment group (right)

药组细胞(右)形态变化明显,数目明显减少,细胞收缩变圆,悬浮于培养液表面,是典型的细胞凋亡状态。

3 讨论与结论

近年来,从植物有效成分发掘新抗癌药物用于肿瘤治疗已成为当前一个新的研究方向,中医中药治癌具有较强的整体观念。对多数的肿瘤病人来说,局部治疗并不能根治,而中医由于从整体观念出发,对于改善患者的局部症状和全身状况都具有重要的作用。可以弥补手术治疗、放射治疗、化学治疗的不足。

本实验以体外肿瘤细胞培养、MTT 细胞比色法,检测了蛇莓对 HeLa、HepG2、MCF 细胞体外生长特性的影响,发现其对上述三种细胞的体外生长具有明显的抑制作用,诱导细胞凋亡,且极性较小的组

分对肿瘤细胞的抑制作用较强,为今后蛇莓抗肿瘤有效成分的筛选及抗肿瘤作用机理提供了一定的理论依据,但其是否具有其他方面的抑癌作用以及作用机制仍有待体内实验进一步研究。

参考文献

- Liang BB(梁蓓蓓), Liu HG(刘华钢). Research progress of natural anti-tumor medicine. *Bull Chin Cancer*(中国肿瘤), 2007, 16:705-708.
- Wang HY(王海英), Zhang C(张翠). 蛇莓的药用研究进展. *Shanghai Med Pharm J*(上海医药), 2009, 30(2):67-69.
- Teng HY(滕海英), Zhu GQ(祝国强), Huang P(黄平). 正交试验设计实例分析. *Pharm Care Res*(药学服务与研究), 2008, 8:75-76.
- Xu J(徐静), Li X(黎晓), Li JL(李加林), et al. 金边瑞香不同提取物体内抗肿瘤作用的比较. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2010, 21:1440-1441.
- Saravanakumar G, Min KH, Min DS, et al. Hydrotropic oligomer-conjugated glycol chitosan as a carrier of paclitaxel: Synthesis, characterization and *in vivo* biodistribution. *J Control Release*, 2009, 140:210-217.
- Wen XH(文翔昊), Li C(李冲), Guo L(郭露), et al. 莲花清瘟胶囊对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖抑制与诱导凋亡作用的观察. *Strait Pharm J*(海峡药学), 2014, 26:235-238.
- Zhong ZG(钟振国), Liang H(梁红), Zhong YN(钟益宁), et al. Experimental study on antitumor effect of gallic *in vitro*. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2009, 20:1954-1955.
- Geng KK(耿魁魁), Liu S(刘圣), Wu Y(吴妍). 正交实验法优选注射用丹参多酚酸盐调配技术. *Chin Trad Pat Med*(中成药), 2015, 37:220-222.