

竹节蓼石油醚部位抗肿瘤活性组分的筛选

方春生,杨燕军*,宋卉,赵珍东,聂阳

广东食品药品职业学院,广州 510520

摘要:对竹节蓼石油醚部位分离所得组分进行了体外抗肿瘤活性筛选。MTT法研究硅胶吸附层析分离所得组分对肿瘤细胞株PC-3、A549增殖的影响,相差显微镜观察细胞形态变化,DAPI染色法检测细胞凋亡形态学,薄层色谱结合理化性质分析有效组分中的成分,波谱数据鉴定结构。结果显示分离所得的5种组分中,C_{6,8}对PC-3有增殖抑制作用;C₂₁₋₂₄、C₂₅₋₂₈对PC-3、A549有较强的增殖抑制作用,且呈量效关系,作用后细胞形态发生了明显改变,DAPI染色结果显示二者都促进了肿瘤细胞的凋亡;薄层色谱分析出有效组分中共含5种化合物,其中单体C₇鉴定为羽扇豆醇;C₂₁₋₂₄、C₂₅₋₂₈组分初步鉴定为甾体和三萜类化合物。

关键词:竹节蓼;抗肿瘤活性;MTT;细胞凋亡;羽扇豆醇

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.7.015

Screening Anti-tumor Components in Petroleum Ether Extracts from *Homalocladium platycladum*

FANG Chun-sheng, YANG Yan-jun*, SONG Hui, ZHAO Zhen-dong, NIE Yang

Guangdong food and drug vocational college, Guangdong 510520, China

Abstract: The object of this study was to screen the anti-tumor active fraction of petroleum ether extracts from *Homalocladium platycladum* *in vitro*. MTT assay was used to study the anti-tumor efficacy of the various fractions isolated from the petroleum ether extracts against tumor cell lines PC-3 and A549. Phase contrast microscopy was used to observe the cell morphological changes after treated with the active fractions. DAPI staining method was used to determine the apoptosis of PC-3 and A549 cells induced by the active fractions. Thin layer chromatography combined with physical and chemical properties analysis was used to detect components in the active fractions, NMR analysis was used to identify the structure of monomer. Results indicated that the C₂₁₋₂₄, C₂₅₋₂₈ of the 5 separated fractions was the anti-tumor active fractions, which significantly inhibited the growth of PC-3 and A549 with dose and time-dependent manner, C_{6,8} only had inhibitory effect on the proliferation of PC-3. Phase contrast microscopy observation also showed the two fractions can significantly alter the cell morphology and confirmed the reliability of the MTT results. DAPI staining results showed that C₂₁₋₂₄ and C₂₅₋₂₈ induced cell apoptosis of PC-3 and A549. TLC results showed that there have 5 components in the 3 active fractions, C₇ isolated from C_{6,8} was a monomer and identified as lupeol; C₂₁₋₂₄ and C₂₅₋₂₈ was identified as steroid and triterpenoid compounds.

Key words: *Homalocladium platycladum*; anti-tumor activity; MTT; apoptosis; lupeol

竹节蓼(*Homalocladium platycladum*)为蓼科竹节蓼属植物,主要分布于广东广西境内,以茎叶入药,性味甘淡,有行血祛瘀,消肿止痛的功效。广东潮汕地区常把其作为民间草方用于肿瘤疾病治疗,效果显著。虽药用历史悠久,但迄今为止还未见对

其进行中药现代化的开发和利用。检索国内外文献发现,仅有关于其形态解剖和生药学鉴别的研究^[1,2];其化学成分、药理特性及临床研究较少,药效活性仅有少量关于抗菌的活性报道^[3,4],而抗肿瘤有效成分研究至今未见报道。课题组对产于广东澄海竹节蓼的前期研究表明,乙酸乙酯和石油醚萃取部位是其抗肿瘤的有效活性部位^[5]。为从中进一步分离筛选出抗肿瘤有效成分,我们采用硅胶柱层析技术对具有活性的两个部位作进一步的细分,其中石油醚部位分离得到了白色结晶状成分,具有

收稿日期:2016-03-10 接受日期:2016-05-10

基金项目:广东省科技计划(2014A020210016);广东省科技计划(2011B031700072);广东省自然科学基金(S2013010013484);广东省中医药局项目(20141202);广东食品药品职业学院级项目(2013YZ008)

* 通讯作者 Tel:86-20-28854995; E-mail: yangyj@gdzy. edu. cn

较高的继续研究价值。本论文采用 MTT 法和细胞形态观察法考察石油醚部位 5 个分离组分的体外抗肿瘤作用并筛选出活性组分,在此基础上采用 DAPI 荧光染色法研究了活性组分对肿瘤细胞的凋亡影响,利用薄层色谱和理化性质分析了有效组分中的成分,核磁共振波谱鉴定分离所得单体化合物的结构,为竹节蓼中的有效成分筛选和药用开发利用提供科学依据。

1 材料与仪器

1.1 实验材料

人前列腺癌细胞株 PC-3 购自中山大学实验动物中心,人肺癌细胞株 A549 为广东省中医药科学院馈赠。竹节蓼采自广东澄海,经广东食品药品职业学院刘晓春副教授鉴定为蓼科竹节蓼属植物竹节蓼的干燥全草。

1.2 主要试剂

RPMI-1640 液体培养基、胎牛血清,美国 Gibco 公司;PBS、胰蛋白酶,北京 Solarbio 公司;MTT,碧云天生物技术研究所;细胞级 DMSO, Biosharp 生物科技公司;DAPI,美国 Sigma 公司;其它试剂均为国产分析纯。

1.3 主要仪器

Buchisepacore 中压制备色谱系统(MPLC),UV 光度计 C-635,流分收集器 C-660,瑞士 Buchi 公司;柱色谱用硅胶(300~400 目)及薄层色谱硅胶 H(10~40 μm),青岛海洋化工有限公司;N-1001 旋转蒸发器,上海爱朗仪器有限公司;薄层层析硅胶 G 板(10×20 cm),德国 Merck 公司;MSC1.2 生物安全柜、Model 311 CO₂ 培养箱、MK3 酶标仪,美国 Thermo Forma 公司;Leica 倒置相差显微镜,Leica 荧光显微镜,德国莱卡公司;BP211D 电子分析天平,德国 sartorius 公司;DRX-400 型超导核磁共振仪,德国 Bruker 公司。

2 实验方法

2.1 竹节蓼石油醚部位的硅胶柱层析分离和配制

竹节蓼全草 785 g,切碎,以 95% 乙醇回流提取二次,合并提取液浓缩,所得浸膏以热水溶解,再分别以石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,浓缩各萃取部分,所得浓缩液倒入蒸发皿至溶剂挥干,得石油醚萃取部分 8.33 g。石油醚部分干法拌样,以中压制备色谱分离,流速 50 mL/min,限定压力 50 bar,洗脱液

按 80 mL/瓶收集,以石油醚为初始洗脱溶剂,石油醚:乙酸乙酯不同比例梯度洗脱,石油醚:乙酸乙酯 = 50:1 洗脱分别获得 C₆₋₈、C₂₁₋₂₄、C₂₅₋₂₈ 部分;石油醚:乙酸乙酯 = 25:1 洗脱获得 D 部分;石油醚:乙酸乙酯 = 1:1 洗脱获得 F 部分。准确称取竹节蓼石油醚部位各分离组分,紫外照射灭菌后 DMSO 助溶,RP-MI-1640 培养基配置成浓度为 1.0 mg/mL 的储备液,4 °C 冰箱保存,使用时以含 10% 胎牛血清的 RP-MI-1640 完全培养基稀释至所需浓度,DMSO 终浓度小于 0.1%。

2.2 MTT 法测定石油醚部位分离组分对肿瘤细胞增殖的影响

肿瘤细胞株 PC-3 和 A549 在 RPMI-1640 完全培养基中培养至对数生长期时,用 0.25% 胰酶消化成细胞悬液,调整细胞浓度至 5×10^4 个/mL,按每孔 100 μL 接种于 96 孔板中,待细胞完全贴壁后,弃去原培养基,加入配置好的含不同药物浓度的新鲜完全培养基,药物终浓度分别为 10、20、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$,空白对照组只加入完全培养基,每组设 4 个平行孔,重复实验 3 次。细胞给药培养 24、48 h 后,弃培养基,每孔加入含 MTT(终浓度为 0.5 mg/mL)无血清 RPMI-1640 培养基 100 μL ,继续培养 4 h;小心弃去培养基,每孔加入 150 μL DMSO,振荡至完全溶解后,酶标仪测定 492 nm 处的吸光度(OD)值。以 4 个复孔的平均值代入下列公式计算:细胞抑制率 = $(1 - \text{OD}_{\text{加药}} / \text{OD}_{\text{对照}}) \times 100\%$ 。

2.3 倒置相差显微镜观察有效组分对肿瘤细胞结构的影响

分别取浓度为 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 的 PC-3 和 A549 细胞株按每孔 1 mL 接种于 6 孔板,待细胞完全贴壁后,弃去培养基,将 MTT 实验结果中增殖抑制作用明显的分离组分 C₂₁₋₂₄、C₂₅₋₂₈ 用 RPMI-1640 完全培养基配制成最终浓度为 20、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,与只含完全培养基的对照组一起分别加入至 2 种细胞所在的 6 个孔中,培养 24 h 后,在倒置相差显微镜下观察记录各组细胞形态的变化,实验重复 3 次。

2.4 DAPI 荧光染色法观察有效组分对肿瘤细胞凋亡的影响

取消化后的对数生长期 PC-3 和 A549 细胞,按照 5×10^4 细胞每孔接种到 96 孔板中,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 。待细胞贴壁后换液,加入不同浓度的竹节蓼石油醚部位有效组分 C₂₁₋₂₄、C₂₅₋₂₈,组别:空白、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,每种药物设置 5 个复孔,每次培养 24 h。24 h

后吸除孔中液体,PBS轻洗3次,每孔加入甲醇配置的DAPI染液50 μL ,孵育20 min后,弃染液,甲醇轻轻洗2次,立即置于荧光显微镜下观察。

2.5 有效活性组分的初步分离和鉴定

C_{6-8} 部分经反复分离纯化、重结晶得单体化合物 C_7 ,核磁共振仪测定其氢谱(^1H NMR)、碳谱(^{13}C NMR)数据,结合文献进行物质鉴定。分别取适量单体 C_7 和有效组分 C_{6-8} 、 C_{21-24} 、 C_{25-28} 分别溶解于200 μL 丙酮中,用点样毛细管,在同一硅胶G板上按1~2 cm的间隔分别点样,以摸索的最佳分离条件石油醚-乙酸乙酯(5:1, v/v)为展开剂展开,展距约15 cm,取出晾干后365 nm紫外灯下检视,并用铅笔圈出荧光点,后喷以香草醛-浓硫酸试剂,观察显色结果,再105 $^{\circ}\text{C}$ 加热7 min至斑点显色固定,记录结果。结合各组分的物理形态和颜色,用改良碘化铋钾试剂显色分离晾干后的薄层板,检测是否含生物碱;分别取适量各组分固体,进行醋酐-浓硫酸反应,检测是否含甾体和三萜类化合物;分别取适量各组分,溶解于乙醇中,进行盐酸-镁粉反应,检测是否含有黄酮类化合物;油斑反应检测是否含挥发油、油脂类成分。

2.6 统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm S$ 表示,统计分析采用SPSS 17.0统计学软件,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 实验结果

表1 竹节蓼石油醚部位分离组分对肿瘤细胞PC-3增殖的影响($\bar{x} \pm S, n=3$)

Table 1 Effect of different fractions of *H. platycladum* petroleum ether extract on cell proliferation of tumor cell PC-3 ($\bar{x} \pm S, n=3$)

组别	h	$\lambda = 492 \text{ nm}$	药物浓度 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)					
			对照 $p=0$	$p=10$	$p=20$	$p=50$	$p=100$	$p=200$
C_{6-8}	t=24	OD	0.80 \pm 0.08	0.72 \pm 0.08	0.64 \pm 0.07	0.58 \pm 0.10 *	0.42 \pm 0.03 * *	0.29 \pm 0.04 * *
		p 抑制/%	0	10.2 \pm 2.4	19.6 \pm 1.6	28.2 \pm 5.6	47.2 \pm 2.2	63.6 \pm 2.6
	t=48	OD	0.99 \pm 0.06	0.84 \pm 0.04 *	0.75 \pm 0.11 *	0.67 \pm 0.04 * *	0.50 \pm 0.07 * *	0.35 \pm 0.02 * *
		p 抑制/%	0	15.4 \pm 1.7	24.2 \pm 7.4	32.6 \pm 0.6	49.4 \pm 4.8	64.5 \pm 4.3
C_{21-24}	t=24	OD	0.75 \pm 0.08	0.62 \pm 0.07	0.53 \pm 0.10 *	0.41 \pm 0.04 * *	0.31 \pm 0.05 * *	0.19 \pm 0.03 * *
		p 抑制/%	0	18 \pm 8.6	30.6 \pm 7.6	46.1 \pm 0.7	59.6 \pm 5.0	75.3 \pm 3.4
	t=48	OD	0.98 \pm 0.03	0.78 \pm 0.1 *	0.71 \pm 0.05 * *	0.51 \pm 0.01 * *	0.41 \pm 0.05 * *	0.20 \pm 0.02 * *
		p 抑制/%	0	21.4 \pm 8.8	27.9 \pm 4.3	48.4 \pm 0.8	58 \pm 6.6	80 \pm 2.2
C_{25-28}	t=24	OD	0.71 \pm 0.06	0.63 \pm 0.09	0.54 \pm 0.07 *	0.40 \pm 0.10 * *	0.26 \pm 0.03 * *	0.15 \pm 0.03 * *
		p 抑制/%	0	11.5 \pm 4.9	24.7 \pm 5.8	44.3 \pm 9.4	63.6 \pm 1.9	79.1 \pm 2.1
	t=48	OD	1.03 \pm 0.06	0.82 \pm 0.04 * *	0.69 \pm 0.05 * *	0.51 \pm 0.06 * *	0.26 \pm 0.05 * *	0.14 \pm 0.04 * *
		p 抑制/%	0	11.5 \pm 4.9	24.7 \pm 5.8	44.3 \pm 9.4	63.6 \pm 1.9	79.1 \pm 2.1

D	t = 24	p 抑制/%	0	19.9 ± 4.8	32.6 ± 3.4	50.8 ± 5.0	74.4 ± 3.1	86.4 ± 3.1
		OD	0.79 ± 0.04	0.70 ± 0.07	0.67 ± 0.06 *	0.66 ± 0.05 *	0.63 ± 0.02 * *	0.51 ± 0.06 * *
	t = 48	p 抑制/%	0	11.3 ± 5	14.5 ± 5.5	15.8 ± 4.6	20.2 ± 2	34.8 ± 4.7
		OD	0.95 ± 0.10	0.98 ± 0.07	0.96 ± 0.06	0.83 ± 0.15	0.69 ± 0.07 *	0.48 ± 0.08 * *
F	t = 24	p 抑制/%	0	3.4 ± 8.9	1.2 ± 5.4	12.6 ± 7.2	27.2 ± 2.8	49.9 ± 4.2
		OD	0.74 ± 0.08	0.65 ± 0.04	0.63 ± 0.08	0.66 ± 0.01	0.68 ± 0.07	0.49 ± 0.05 *
	t = 48	p 抑制/%	0	12 ± 4.3	14.3 ± 10.4	11.1 ± 9.7	8.7 ± 4.7	33.8 ± 7.3
		OD	1.05 ± 0.05	1.02 ± 0.04	1.04 ± 0.01	0.97 ± 0.05	1.03 ± 0.05	0.74 ± 0.11 *
		p 抑制/%	0	3.3 ± 1.8	0.9 ± 3.6	8.0 ± 2.1	1.4 ± 9.7	29.2 ± 13.2

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与相同时间点空白对照组比较。

Note: compared with negative control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 2 竹节蓼石油醚部位分离组分对肿瘤细胞 A549 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of different fractions of *H. platycladum* petroleum ether extract on cell proliferation of tumor cell A549 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	h	$\lambda = 492 \text{ nm}$	药物浓度 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)					
			对照 p=0	p=10	p=20	p=50	p=100	p=200
C6-8	t = 24	OD	0.87 ± 0.09	0.81 ± 0.10	0.72 ± 0.13	0.68 ± 0.06 *	0.71 ± 0.11	0.65 ± 0.09 *
		p 抑制/%	0	6.9 ± 5.1	17.9 ± 7.7	20.0 ± 4.2	19.2 ± 6.5	25.2 ± 5.1
	t = 48	OD	1.01 ± 0.09	0.96 ± 0.08	0.94 ± 0.05	0.95 ± 0.08	0.94 ± 0.12	0.79 ± 0.08 *
		p 抑制/%	0	5.3 ± 5.1	6.9 ± 4.9	5.6 ± 5.1	7.4 ± 3.3	21.7 ± 2.1
C21-24	t = 24	OD	0.86 ± 0.03	0.73 ± 0.02 * *	0.61 ± 0.04 * *	0.49 ± 0.06 * *	0.39 ± 0.04 * *	0.22 ± 0.02 * *
		p 抑制/%	0	15.5 ± 2.1	28.7 ± 7.0	43.1 ± 7.2	54.8 ± 5.2	74.6 ± 1.7
	t = 48	OD	1.04 ± 0.09	0.87 ± 0.03 *	0.73 ± 0.12 *	0.62 ± 0.09 * *	0.40 ± 0.06 * *	0.20 ± 0.02 * *
		p 抑制/%	0	15.4 ± 4.4	29.8 ± 7.3	40.7 ± 3.9	61.6 ± 2.5	80.7 ± 1.6
C25-28	t = 24	OD	0.86 ± 0.04	0.69 ± 0.07 *	0.59 ± 0.04 * *	0.48 ± 0.01 * *	0.33 ± 0.06 * *	0.17 ± 0.02 * *
		p 抑制/%	0	20.4 ± 4.4	31.6 ± 1.3	44.3 ± 1.8	62.0 ± 4.9	80.5 ± 1.7
	t = 48	OD	0.96 ± 0.08	0.77 ± 0.01 * *	0.64 ± 0.00 * *	0.49 ± 0.02 * *	0.33 ± 0.04 * *	0.14 ± 0.01 * *
		p 抑制/%	0	20.0 ± 6.1	33.2 ± 5.5	49.3 ± 4.1	65.2 ± 4.5	85.0 ± 2.0
D	t = 24	OD	0.76 ± 0.12	0.74 ± 0.11	0.65 ± 0.10	0.64 ± 0.09	0.55 ± 0.09 *	0.55 ± 0.09 *
		p 抑制/%	0	1.8 ± 0.4	13.9 ± 1.0	15.8 ± 2.3	27.2 ± 0.6	27.1 ± 0.6
	t = 48	OD	0.95 ± 0.11	0.99 ± 0.07	0.95 ± 0.15	0.88 ± 0.15	0.86 ± 0.07	0.74 ± 0.10
		p 抑制/%	0	-4.1 ± 5.5	0 ± 4.4	7.4 ± 5.4	9.3 ± 3.5	22.4 ± 2.0
F	t = 24	OD	0.85 ± 0.06	0.82 ± 0.05	0.73 ± 0.07	0.76 ± 0.13	0.61 ± 0.02 * *	0.62 ± 0.01 * *
		p 抑制/%	0	2.7 ± 12.0	12.6 ± 13.4	9.3 ± 20.7	28.1 ± 3.0	26.8 ± 4.2
	t = 48	OD	1.03 ± 0.06	0.96 ± 0.06	0.96 ± 0.07	0.98 ± 0.09	0.86 ± 0.05 *	0.90 ± 0.12
		p 抑制/%	0	6.9 ± 1.3	7.3 ± 2.2	5.1 ± 3.8	16.0 ± 9.1	13.6 ± 7.0

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与相同时间点空白对照组比较。

Note: compared with negative control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3.2 MTT 筛选有效组分 C21-24、C25-28 对肿瘤细胞 PC-3、A549 形态的影响

培养 24 h 后相差倒置显微镜下观察各组细胞的形态变化情况。PC-3 和 A549 细胞对照组均贴壁生长良好,形态大小均匀,细胞贴壁紧密,胞质透亮,增殖旺盛。而经过 C₂₁₋₂₄、C₂₅₋₂₈ 不同浓度作用过的 2

种肿瘤细胞,可以观察到细胞数量随着药物浓度的增加而减少,且都有明显的形态变化。PC-3 细胞在浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 的 C₂₁₋₂₄、C₂₅₋₂₈ 作用下显示部分细胞收缩变圆,形态呈现出不规则;至 50 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞已经明显皱缩变小,与邻近细胞分离,胞浆内有颗粒物生成,边缘呈现毛刺状;100 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞数目

明显减少, C_{25-28} 作用下的 PC-3 细胞还可见许多颗粒状凋亡小体。A549 细胞在不同浓度的 C_{21-24} 、 C_{25-28} 作用下也呈现出随着浓度增加, 细胞数量发生明显的减少, 细胞形态发生体积固缩, 细胞边缘不规则, 形态不一等变化; A549 细胞在 50 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ C_{25-28} 作用下胞浆内有明显的颗粒物生成; 形态学显示 C_{25-28} 对 A549 细胞形态的影响比 C_{21-24} 更为明显, 细胞数量也减少的更多, 与 MTT 实验结果吻合。

3.3 MTT 筛选有效组分 C_{21-24} 、 C_{25-28} 对肿瘤细胞 PC-3、A549 细胞凋亡形态学的影响

DAPI 染色结果显示, PC-3 和 A549 细胞经 C_{21-24} 、 C_{25-28} 处理后, 均出现了明显的细胞凋亡特征。

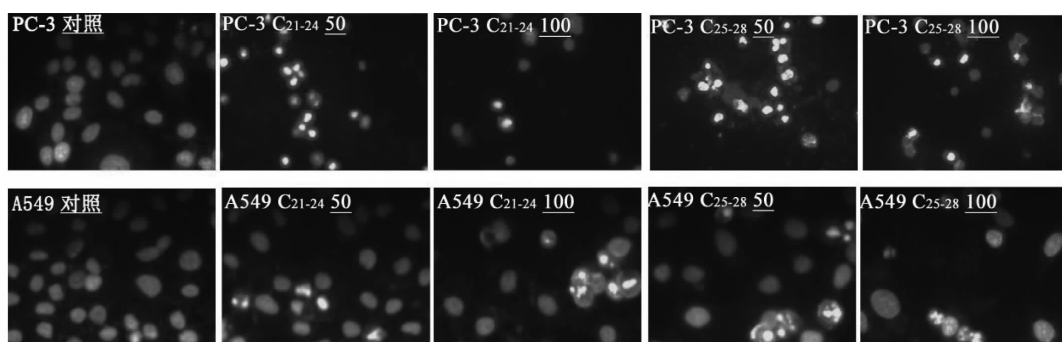


图 1 DAPI 染色法观察 C_{21-24} 、 C_{25-28} 对 PC-3、A549 细胞凋亡形态学的影响 ($\times 400$)

Fig. 1 Effect of C_{21-24} and C_{25-28} on PC-3 and A549 cell histology in various groups by DAPI fluorescence staining ($\times 400$)

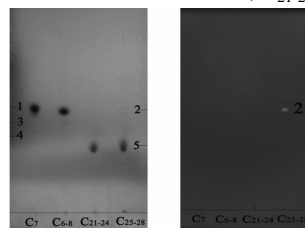
3.4 有效活性组分的初步分离和鉴定结果

化合物 C_7 为白色粉末, ^1H NMR (400 MHz, CD_3Cl) δ : 4.68 (1H, d, H-29b), 4.56 (1H, d, H-29a), 3.20 (1H, brs, H-3), 2.39 (1H, m, H-19), 1.68 (3H, s, H-30), 1.02 (3H, s, H-27), 0.97 (3H, s, H-26), 0.94 (3H, s, H-23), 0.83 (3H, s, H-28), 0.79 (3H, s, H-25), 0.76 (3H, s, H-24); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3Cl) δ : 38.7 (C-1), 27.4 (C-2), 79.0 (C-3), 38.9 (C-4), 55.3 (C-5), 18.3 (C-6), 34.3 (C-7), 40.8 (C-8), 50.4 (C-9), 37.2 (C-10), 20.9 (C-11), 25.1 (C-12), 38.0 (C-13), 42.8 (C-14), 27.4 (C-15), 35.6 (C-16), 43.0 (C-17), 48.2 (C-18), 47.9 (C-19), 151.0 (C-20), 29.8 (C-21), 40.0 (C-22), 28.0 (C-23), 15.4 (C-24), 16.1 (C-25), 16.0 (C-26), 14.5 (C-27), 18.0 (C-28), 19.3 (C-29), 109.3 (C-30)。以上数据与文献^[6,7]报道的羽扇豆醇数据一致, 鉴定该化合物为羽扇豆醇。

图 2 薄层色谱结果显示: C_7 为单体化合物, 香草醛-浓硫酸显色呈紫红色, R_f 值约为 0.48; C_{6-8} 含

图 1 结果显示, PC-3 和 A549 细胞空白对照细胞核饱满, 胞浆丰富, 形状呈圆形或椭圆形, 荧光着色均匀。经 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 C_{21-24} 、 C_{25-28} 处理后, PC-3 细胞出现了细胞核固缩, 体积明显减小, 且荧光深染; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 由于细胞凋亡后而随培养基漂浮移走细胞增多, 染色细胞核数量明显减少, 细胞核体积减小, 见致密深染荧光。A549 细胞经过 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 C_{21-24} 、 C_{25-28} 处理后, 出现了细胞核碎裂, 染色体 DNA 呈深染的团块状、颗粒状分布, 提示出现了明显的细胞凋亡现象; 且随药物浓度增加, 出现细胞核变异的凋亡细胞也在增多。

有 3 个成分, 分别位于色谱图位点 1 (紫红色, $R_f = 0.48$)、3 (灰紫色, $R_f = 0.46$)、4 (浅粉色, $R_f = 0.37$) 上, 其中位点 1 的 R_f 值和显色与 C_7 一致, 说明为同一物质, 从斑点大小和显色深浅程度可知 C_7 为 C_{6-8} 组分中的主要成分; C_{21-24} 中含有 2 个成分, 分别位于色谱图位点 4 (浅粉色, $R_f = 0.37$)、5 (紫色, $R_f = 0.30$), 其中位点 5 上为主要成分, C_{21-24} 形状为白色



a. 香草醛-浓硫酸显色 b. 365nm 紫外灯显色

图 2 石油醚部位有效活性组分和单体的薄层色谱图 (1-5 位点代表相同 R_f 值的斑点)

Fig. 2 TLC chromatogram of activity fractions and monomer from Petroleum Ether Extracts (a. color of Vanillin-sulfuric acid reagent; b. color of 365nm UV light; 1-5 represented the points with the same R_f value)

针状结晶,说明主成分纯度较高; C_{25-28} 含有3个成分,色谱图位点2($R_f=0.47$)在365 nm显示白色荧光,而香草醛-浓硫酸喷后无显色,另外2个位点与 C_{21-24} 相同,显示为相同物质。

组分 $C_{6,8}$ 为白色块状粉末, C_{21-24} 为白色针状结晶, C_{25-28} 为微黄色稍粘粉末状。改良碘化铋钾试剂喷洒展开晾干后的薄层板,结果无显色,说明各组分不含生物碱。盐酸-镁粉反应结果显示溶液无变色,说明各组分不含黄酮类。油斑反应结果显示滤纸上无油斑,说明各组分不含挥发油、油脂类。醋酐-浓硫酸反应实验结果显示, C_{25-28} 溶液显示黄、红色, C_{21-24} 溶液显示黄、蓝绿色; C_{25-28} 溶液显示黄、红、紫、蓝、墨绿色,颜色变化较慢。根据上述理化性质初步确定 $C_{6,8}$ 主要为三萜类化合物,其分离出的羽扇豆醇即为三萜化合物, C_{21-24} 主要为甾体皂苷类化合物, C_{25-28} 主要为甾体和三萜皂苷类化合物。

4 讨论与结论

中药资源丰富,是研发具有自主知识产权创新药物的重要物质和思想来源,诸多由中药提取的天然活性成分转化为新药或先导化合物的实例便很好的说明了这点,所以中药的活性成分研究是中药现代化的重要组成部分^[8,9]。肿瘤疾病作为世界性的医学难题,寻找有效的治疗药物一直是各国研究的热点;目前超过60%的抗癌药物直接或间接来源于天然成分,植物来源的抗肿瘤药物因其生物相容性好、副作用小等优势,使其在抗肿瘤药物中所占比例越来越高^[10]。我国中药资源丰富,一些在民间作为草方偏方治疗肿瘤疾病的中草药便成为很好的抗癌药物活性成分筛选来源。

课题组前期根据民间访问采取了5种中草药进行研究,发现竹节蓼的总提取物具有较强的抗肿瘤活性,后采用系统溶剂提取法对竹节蓼进行初步分离,得到乙酸乙酯、石油醚、正丁醇以及萃取残留4个不同部位,经过体外4种肿瘤细胞的抗肿瘤活性筛选研究,结果显示乙酸乙酯和石油醚部位有较好的抗肿瘤作用。本实验采用硅胶柱层析技术对具有活性的石油醚部位进行梯度洗脱,借助薄层色谱分析检识,合并含相同斑点的流分,再经减压回收和干燥。其中石油醚部位分离得到的 $C_{6,8}$ 、 C_{21-24} 、 C_{25-28} 组分白色结晶粉状成分,D和F组分呈膏状;分离合并还得到了其它一些组分,由于样品获得量少且在初筛试验中对几种肿瘤细胞均无增殖抑制效果,无继

续研究价值,故未列出。

MTT实验因操作简便、结果可靠而公认为有效的体外抗肿瘤活性成分筛选方法。本研究MTT实验结果显示 C_{21-24} 、 C_{25-28} 组分对肿瘤细胞PC-3和A549具有较强的细胞毒作用,能够抑制癌细胞的生长增殖,其抑制率与浓度和时间均呈明显的依赖关系。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义,结果显示2种肿瘤细胞经 C_{21-24} 、 C_{25-28} 各浓度处理后,相对于空白对照组,除 C_{21-24} 在10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对PC-3细胞无差异外,其他各组均有显著性差异;各组作用48 h后的抑制率都高于24 h组,显示有时效关系。 C_{25-28} 在浓度越高、作用时间越长时,对肿瘤细胞PC-3增殖抑制效果强于 C_{21-24} ;相差显微镜结果也显示经中高浓度 C_{25-28} 处理后的PC-3,形态变化更为明显。 C_{25-28} 在各浓度组对A549的生长抑制率要优于 C_{21-24} ;相差显微镜结果也显示 C_{25-28} 组的A549细胞形态变化更大。 $C_{6,8}$ 对PC-3也显示了一定的增殖抑制,但对A549却影响不大,显示其中也具有抗肿瘤活性的物质。MTT实验中,在结束细胞培养添加MTT试剂之前,相差显微镜下观察到的细胞数量和形态变化情况与MTT实验结果较吻合,也从侧面证实了MTT实验结果的可靠性。

细胞核凝聚固缩、染色质DNA呈特征性片段化断裂是细胞凋亡的典型特征,DAPI荧光染色法可以直观看出这些变化,是研究细胞是否发生凋亡的常规手段之一。为了研究MTT实验结果中有效成分 C_{21-24} 、 C_{25-28} 是否促进了肿瘤细胞的凋亡,药物组采用接近各组 IC_{50} 的浓度50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和较高浓度100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。相对于空白对照组,经 C_{21-24} 、 C_{25-28} 处理后的PC-3细胞核发生了明显的浓缩变小;100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组的细胞核数目明显减少,凋亡细胞也少了许多,原因是有些细胞已经死亡,在染色之前已经流失。A549经 C_{21-24} 、 C_{25-28} 处理后,细胞核内发生了染色质浓缩,断裂呈致密大小不等的蓝色荧光亮点,且随着浓度增高,可见凋亡细胞也在增多。

以活性检测为导向的有效成分筛选具有针对性强和效率高的优点,是中药抗肿瘤活性物质筛选的常用方法。本研究以体外抗肿瘤活性为导向筛选出了竹节蓼石油醚部位的有效组分,并对有效组分进行了分离和基本的鉴定。薄层色谱从3个活性组分中总共分离出了5种成分,且三个组分共同含有1个成分。 $C_{6,8}$ 为白色块状粉末组分, $C_{6,8}$ 含有3个成分,从中分离出的 C_7 经鉴定为羽扇豆醇。羽扇豆醇

为 C_{6-8} 的主要成分,该物质具有抗肿瘤活性,主要通过激活 Bax、caspase-3 表达和降低 Bcl-2 表达等方式对肿瘤细胞进行诱导凋亡和增殖抑制^[11,12],本研究为首次从竹节蓼中分离得到该物质。 C_{21-24} 中含有 2 种成分,且此 2 种成分 C_{25-28} 也都含有; C_{21-24} 形状呈结晶状,薄层结果也显示其中一种成分占比较大,且该成分也存在于 C_{25-28} 中,应为下一步重点研究对象。 C_{25-28} 的第三种物质具有荧光且不被香草醛-浓硫酸显色,通过与 C_{21-24} 物质形态的比较,还能推测该物质应是微黄色且具有粘性,具体为何种物质还有待鉴定。石油醚部位提取的成分主要为非极性脂溶性物质,课题组根据分离组分的颜色和外形特征,主要考察了是否含有甾体和三萜类、生物碱、黄酮类、挥发油和油脂类成分,结果显示 C_{6-8} 主要为三萜类化合物, C_{21-24} 主要为甾体皂苷类化合物, C_{25-28} 主要为甾体和三萜皂苷类化合物。

本研究结果为今后竹节蓼石油醚部位抗肿瘤活性单体成分的分离、鉴定,确定其化学结构,进而研究其抗肿瘤机理及开发利用提供了一定的科学依据。

参考文献

- 1 Yan PH(颜萍花), Tang YR(唐玉荣), Zeng XY(曾祥燕), et al. Pharmacognostic authentication study on *Homalocladium platycladum*. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2015, 11: 2682-2684.
- 2 Budel JM, Farago PV, Duarte MDR, et al. Morpho-anatomical study of the cladodes of *Homalocladium platycladum* (F. J. Muell.) L. H. Bailey (Polygonaceae). *Rev bras Farmacogn*, 2007, 17: 39-43.
- 3 Koochak H, Seyyednejad SM, Motamedi H. Preliminary study on the antibacterial activity of some medicinal plants of

- Khuzestan (Iran). *Asian Pac J Trop Med*, 2010, 3: 180-184.
- 4 Nuria MC. Antibacterial activities from Jangkang [*Homalocladium platycladum* (F. Muell) Bailey] leaves. *Mediagro*, 2010, 6: 9-15
- 5 Fang CS(方春生), Yang YJ(杨燕军), Song H(宋卉), et al. Study on the anti-tumor activities *in vitro* of the different extract fractions of *Homalocladium platycladum*. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2014, 12: 2865-2868.
- 6 Tong XG(仝晓刚), Cheng YX(程永现). Chemical constituents from *Acorus tatarinowii*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2011, 23: 404-409.
- 7 Gong YH(龚运淮), Ding LS(丁立生). Nuclear magnetic resonance spectroscopy^a nalysis of natural products. Yunnan: Yunnan science and Technology Publishing House, 2006. 339.
- 8 Yao XS(姚新生). 中药活性成分研究与中药现代化. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharm*(中药新药与临床药理), 2003, 14: 73-75.
- 9 Zhu DY(朱大元). Studies on active ingredients of TCM-The Essential Part of TCM's Modernization. *Prog Chem*(化学进展), 2009, 1: 24-29.
- 10 Cragg GM, Newman DJ. Nature: a vital source of leads for anticancer drug development. *Phytochem Rev*, 2009, 8: 313-331.
- 11 Prasad S, Nigam N, Kalra N, et al. Regulation of signaling pathways involved in lupeol induced inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human prostate cancer cells. *Mol Carcinogenesis*, 2008, 47: 916-924.
- 12 Prabhu B, Sivakumar A, Sundaresan S. Diindolylmethane and lupeol modulates apoptosis and cell proliferation in N-butyl-N-(4-Hydroxybutyl) nitrosamine initiated and dimethylarsinic acid promoted rat bladder carcinogenesis. *Pathol Oncol Res*, 2016, Accepted.

(上接第 1083 页)

- 12 Jung HA, Yoon NY, Bae HJ, et al. Inhibitory activities of the alkaloids from *Coptidis Rhizoma* against aldose reductase. *Arch Pharm Res*, 2008, 31: 1405-1412.
- 13 Wang DW, Liu ZQ, Guo MQ, et al. Structural elucidation and identification of alkaloids in *Rhizoma Coptidis* by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 2004, 39: 1356-1365.
- 14 Lee WC, Kim JK, Kang JW, et al. Palmatine attenuates D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced fulminant hepatic

failure in mice. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48: 222-228.

- 15 Li YB, Zhang TJ, Zhang XL, et al. Chemical fingerprint analysis of *Phellodendri Amurensis Cortex* by ultra performance LC/Q-TOF-MS methods combined with chemometrics. *J Sep Sci*, 2010, 33: 3347-3353.
- 16 Yao S(姚舜), Liu RM(柳仁民), Huang XF(黄雪峰), et al. Methodology research of high-speed counter-current chromatography in separation of natural products. *Chin J Nat Med*, 2008, 6: 13-19.