

单面针茎不同极性部位抗菌及对 MCF-7 细胞抑制活性的研究

肖水平, 詹济华, 张雨林, 谭 洋, 孟英才, 裴 刚*

湖南中医药大学, 长沙 410208

摘要: 研究单面针茎不同极性部位的抗菌及抗肿瘤活性。本实验通过微孔比浊法比较了单面针茎各极性部位对 3 种革兰氏阴性菌: 大肠杆菌、铜绿假单胞菌、幽门螺杆菌, 4 种革兰氏阳性菌: 表皮葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、藤黄微球菌、金黄色葡萄球菌共 7 种细菌进行抗菌能力评价; 以 MTT 法测定了各极性部位对乳腺癌细胞 MCF-7 的生长抑制活性。实验结果表明, 单面针茎各极性部位对本实验所有菌株, 尤其是革兰氏阳性菌均有较强的抑制作用, 其中以氯仿部分的抗菌效果最佳; 本实验所有样品对 MCF-7 细胞均有较好的抑制作用, 同样氯仿浸膏的抑制活性最强, 对实验细胞株的半数抑制浓度 IC_{50} 为 $2.35 \pm 0.97 \times 10^{-1}$ mg/mL, 正丁醇浸膏部分的 IC_{50} 值分别为 $3.19 \pm 0.54 \times 10^{-1}$ mg/mL, 然而乙酸乙酯浸膏部分则相对最弱, 其 IC_{50} 值为 $6.47 \pm 0.94 \times 10^{-1}$ mg/mL。本实验结果揭示有望从氯仿、正丁醇浸膏中分离得到抗菌、抗乳腺癌活性较强的单体化合物, 为单面针的后续开发提供了科学的依据。

关键词: 单面针; 提取物; 抗菌; 乳腺癌

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.9.021

Antibacterial and Inhibitory Effects of Different Extracts from Stem of *Zanthoxylum dissitum* Hemsl on MCF-7 Cell

XIAO Shui-ping, ZHAN Ji-hua, ZHANG Yu-ling, TAN Yang, MENG Ying-cai, PEI Gang*

Hunan University of Chinese of Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: The aim of this study was to investigate the antibacterial and inhibitory activities of the different extracts of *Zanthoxylum dissitum* Hemsl Stem on the proliferation of MCF-7 cells. All the extracts were evaluated for their antibacterial activities against three gram-negative bacteria: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori* and four gram-positive bacteria: *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* using micro-porous turbidimetry method. In addition, their cytotoxic activities were measured against breast cancer cells MCF-7 by MTT assay. The results showed that all the extracts displayed great inhibition effects on the tested bacteria, especially those gram-positive bacterial, the chloroform part showed the highest activity, notably; All of the parts showed significant inhibitory effects on the proliferation of MCF-7 cells, among which, the chloroform part exhibited highese antineoplastic activities with IC_{50} of $2.35 \pm 0.97 \times 10^{-1}$ mg/mL. Moreover, the IC_{50} of n-butanol part was $3.19 \pm 0.54 \times 10^{-1}$ mg/mL. However, the ethyl acetate extract was weakest with IC_{50} of $6.47 \pm 0.94 \times 10^{-1}$ mg/mL. These results suggested that the chloroform and n-butanol extract possibly contained compounds with significantly antibacterial and antitumor activities. This research provided a scientific basis for the development of *Z. dissitum*.

Key words: *Zanthoxylum dissitum* Hemsl.; extracts; antibacterial; breast cancer

单面针 (*Zanthoxylum dissitum* Hemsl) 又名蚬壳花椒, 为芸香科花椒属植物, 其根、茎、茎皮、叶均可入药, 主要分布于广东、湖南、湖北等地^[1]。现代研究显示单面针中亲脂性成分具有良好的抑菌作用,

尤其是对金黄色葡萄球菌、沙门氏菌有显著的抑菌作用^[2]。目前, 以单面针为主要成分中成药也有上市, 如妇科千金片和妇科外用洗液等。另外, 单面针抗肿瘤活性也有相关报道^[3-5], 然而, 目前人们主要倾向于以单个化合物为研究对象对单面针的药理活性进行探讨, 而未曾从各极性部位着手综合研究比较其抗菌、抗乳腺癌活性的强弱。故本实验从单面针的不同极性部位出发, 对其进行抗菌、抗乳腺癌的

收稿日期: 2016-04-20 接受日期: 2016-06-15

基金项目: 湖南省“225”工程骨干人才培养对象(2013-13); 2015年湖南省研究生创新课题(CX2015B334); 湖南省十二五重点学科中药学

* 通讯作者 Tel: 86-013467548983; E-mail: peigang@hotmail.com

定位活性筛选,以各极性部位的活性强弱为指导,为后续化合物的分离工作提供参考。

1 材料与仪器

1.1 原材料

单面针茎于2013年2月由湖南省株洲市千金股份有限公司提供,经湖南林业科学院药用植物研究所所长王晓明鉴定为芸香科花椒属崖椒亚属植物单面针(*Zanthoxylum dissitum* Hemsl.)干燥的根茎。

1.2 实验菌株、细胞

大肠杆菌(*Escherichia coli*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*);细胞株:雌激素阳性乳腺癌细胞 MCF-7 (ER+)以上均由湖南中医药大学医学基础微生物与免疫学教学中心惠赠。

1.3 实验试剂

营养琼脂、营养肉汤(杭州微生物试剂有限公司生产);布氏琼脂、布氏肉汤、微生物培养基添加剂(青岛高科园海博生物技术有限公司);胎牛血清(杭州四季青公司);DMEM 高糖培养基、胰酶、PBS 缓冲液(美国 Hyclone 公司);二甲基亚砷(DMSO, Solarbio 公司);5-氟尿嘧啶(5-FU, Sigma 公司)。

1.4 主要仪器设备

立式压力蒸汽灭菌锅(浙江新丰医疗器械有限公司);电子天平(Shimadzu corporation);CO₂ 恒温培养箱(上海博讯实业有限公司);Wellscan MK3 酶标仪(Lzbsystems Dragom 公司);XD-101 倒置显微镜(JNOEC 集团)。

2 实验方法

2.1 体外抗菌实验

2.1.1 供试药的制备

取单面针茎药材 1.50 kg,用 75% 乙醇回流提取 3 次,每次提取 2 h,减压回收乙醇,浓缩至浸膏,用少量水将浸膏分散成流体状,分别以氯仿、乙酸乙酯、正丁醇进行系统溶剂萃取,回收溶剂得到相应浸膏,备用。

根据本课题组前期的抗菌活性初筛结果,精密称取单面针氯仿浸膏、乙酸乙酯浸膏、正丁醇浸膏 100 mg,均以 0.50 mL DMSO 超声溶解,备用。

2.1.2 实验菌株的活化和菌悬液的制备

用接种环分别均匀挑取适量的 7 种实验菌株,接种于 10 mL 的营养肉汤中(幽门螺杆菌接种于布氏肉汤中),37 °C 培养 24 h,激活细菌,幽门螺杆菌则参照祝雯雯等^[6] 蜡烛缸法进行细菌培养。24 h 后取适量菌液接种于营养琼脂斜面上培养 24 h,每个标准菌株各取一个斜面,以无菌的 PBS 缓冲溶液将其洗脱,制成细菌原液,并以营养肉汤进行稀释,同时以血细胞计数板对不同浓度的菌液计数,将细菌浓度调整为 10⁸ CFU/mL,为细菌悬液,备用。

2.1.3 最小抑菌浓度(MIC)的测定

将菌悬液接种于 96 孔板中,其中第一列为 100 液体培养基(空白培养基),第 2 列每孔以及第 2~8 行各孔均加入 100 μL 细菌悬液,从第 1 行第 3 孔开始各孔加入 180 μL 细菌悬液,20 μL 样品溶液,以二倍稀释法对各孔进行逐步稀释,每个浓度平行三个复孔。加样稀释完毕后,迅速放置于酶标仪中 450 nm 波长下进行光密度(OD)值测定。之后将 96 孔放置于 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h,指示菌为幽门螺杆菌的 96 孔板,则连同蜡烛缸一起放入培养箱中微需氧进行培养 48 h,培养一定时间后取出,在相同波长下测定各孔的 OD 值,并计算供试药的抑菌 OD 值^[7]。

供试药的抑菌 OD 值 =

$$\frac{\text{培养后 OD 值(加药孔 - 空白孔)}}{\text{培养前 OD 值(加药孔 - 空白孔)}}$$

其中供试药的抑菌 OD 值越小,其抑菌效果越强。供试药的最小抑菌浓度(MIC)则综合供试药的抑菌 OD 值和涂布一定琼脂平板的结果共同得出。

2.2 抗肿瘤活性实验

2.2.1 供试药的制备

精密称取单面针各极性部位浸膏 10 mg,均以 1 mL DMSO 超声溶解,备用。

2.2.2 细胞培养

将 MCF-7 (ER+) 细胞接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中,37 °C,5% CO₂ 的无菌培养条件下,定期观察,每周换液 3 次,0.25% 的胰酶进行消化传代,取对数生长期的细胞开展活性实验。

2.2.3 细胞铺板

吸取 100 μL 细胞数约为 1×10⁴/mL 的细胞悬浮液于 96 孔板中,分为空白组(不加药物)、供试样品组、阳性对照组(5-FU)。供试品组按 10~1.25 mg/mL 不同药物浓度进行给药,阳性对照组则在 1.31

$\times 10^{-2} \sim 1.31 \times 10^{-3}$ mg/mL 浓度范围内设置不同的浓度梯度进行给药,每个浓度设置 3 个复孔,培养 24 h,平行 3 次。

2.2.4 MTT 检测

加药培养 24 h 后,取出 96 孔板,各孔中加入 10 μ L MTT 后放入培养箱中继续培养。4 h 后将各孔中的液体快速弃去,并依次加入 100 μ L DMSO,均匀敲击 10 min 后于 490 nm 处用酶标仪测定吸光度。

3 结果与分析

3.1 MIC 值测定

以微孔比浊法测定单面针茎各极性部位抗菌 MIC 值,其中指示菌为幽门螺杆菌的样品组,以阿莫西林和甲硝唑为阳性对照药,其余 6 种实验菌株均选择以阿莫西林和头孢拉定为阳性药,其实验结果如表 1 所示。单面针茎各样品组对本实验所选的实验菌株的 MIC 有一定的差异:氯仿浸膏部分对所有

表 1 单面针茎不同极性部位对 7 种革兰氏细菌最小抑菌浓度 (mg/mL)

Table 1 MIC of different parts from stem of *Z. dissitum* against 7 gram bacteria (mg/mL)

| 组别 Group | MIC (mg/mL) | | | | | | |
|----------------------------------|----------------------|----------------------|------------------|-----------------------|----------------------|------------------|------------------|
| | 革兰氏阴性菌 Gram-negative | | | | 革兰氏阳性菌 Gram-positive | | |
| | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>H. pylori</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>M. luteus</i> | <i>S. aureus</i> |
| 氯仿浸膏 Chloroform extract | 2.50 | 5.00 | 10.00 | 0.63 | 2.50 | 0.63 | 2.50 |
| 乙酸乙酯浸膏 Ethyl acetate extract | 0.63 | 20.00 | 20.00 | 5.00 | 10.00 | 10.00 | 20.00 |
| 正丁醇浸膏 N-Butyl alcohol extract | >20.00 | >20.00 | 20.00 | 0.63 | 5.00 | 2.50 | 20.00 |
| 阿莫西林 Amoxicillin | 0.38 | 6.00 | 0.63 | 0.63 | 0.63 | 0.63 | 2.50 |
| 头孢拉定 Cephadrine | >20.00 | >20.00 | - | 0.63 | 0.63 | 0.63 | 0.63 |
| 甲硝唑 Metronidazole | - | - | 2.50 | - | - | - | - |

注:“-”表示未进行实验。

Note:“-” indicated not tested.

3.2 抗肿瘤活性测定

单面针茎各极性部位浸膏及阳性对照药 5-FU 对 MCF-7 (ER +) 细胞作用 24 h 后,于倒置显微镜

实验菌株都显示出了较强的抑制作用,且对 *S. epidermidis* 和 *M. luteus* 的 MIC 值为 0.63 mg/mL;乙酸乙酯浸膏对 *E. coli* 的抑制效果最好;正丁醇浸膏对 *S. epidermidis* 抑制效果最佳。

从上述抗菌实验结果得出,单面针茎各极性部位浸膏对本实验所选实验菌株均具有抑制活性,其中对本实验所选的革兰氏阳性菌的抑制效果更优,从氯仿部分浸膏的抗菌活性来看,有望从中分离得到具有广谱抗菌效果的单体化合物,另外,也提示我们,抗菌活性强的化合物可能集中在极性相对较小的部分。

本实验各样品组的 MIC 实验结果进一步证明了单面针茎不同提取物对本实验所选菌株有抑制作用,同时因为各样品组对实验菌株的敏感性不同,所以实验所测得的 MIC 值会有一定的差异,这与本课题组前期对各样品组进行活性初筛所得的实验结果相一致。

下观察各组细胞的生长情况,并结合 MTT 实验结果,计算各样品组对 MCF-7 (ER +) 细胞的 IC₅₀ 值,结果如表 2。

表 2 单面针茎各极性部位对乳腺癌细胞作用 24 h 后的半数抑制浓度 ($n=9, \bar{x} \pm s$)

Table 2 IC₅₀ of MCF-7 cells after treatment with different extracts from stem of *Z. dissitum* for 24 h ($n=9, \bar{x} \pm s$)

| 组别 Group | 乳腺癌 (ER +) 细胞株 IC ₅₀ \pm SD MCF-7 (ER +) cell line IC ₅₀ \pm SD (mg/mL) |
|-------------------------------|--|
| 氯仿浸膏 Chloroform extract | $2.35 \pm 0.97 \times 10^{-1}$ |
| 乙酸乙酯浸膏 Ethyl acetate extract | $6.47 \pm 0.94 \times 10^{-1}$ |
| 正丁醇浸膏 N-butyl alcohol extract | $3.19 \pm 0.54 \times 10^{-1}$ |
| 5-氟尿嘧啶 5-FU | $4.27 \times 10^{-3} \times 10^{-1}$ |

参考体外抑瘤药物疗效评价标准^[8],并通过 MTT 实验计算各极性部位的 IC₅₀ 值,我们发现氯仿浸膏组对 MCF-7(ER+) 的抑制活性最强,其 IC₅₀ 值为 $2.35 \pm 0.97 \times 10^{-1}$ mg/mL,正丁醇浸膏部分对实验细胞株的抑制活性较强,IC₅₀ 值为 $3.17 \pm 0.54 \times 10^{-1}$ mg/mL,乙酸乙酯浸膏部分 $6.47 \pm 0.94 \times 10^{-1}$ mg/mL 的抑制活性则相对最弱。

另外,在倒置显微镜下观察细胞形态变化,同样也是判断细胞凋亡的一个黄金准则之一。在样品浓度为 1mg/mL 时,各样品组对 MCF-7(ER+) 细胞作用 24 h 后,能致 55%~77% 的细胞凋亡,阳性对照组在浓度为 1.31×10^{-4} mg/mL 时能致 88% 以上的癌细胞凋亡,于光镜下可明显观察到癌细胞胞浆浓缩、核固缩、呈碎片状态等一系列细胞凋亡的现象。

综上所述,单面针茎各极性部位对本实验细胞株均有不同程度的抑制作用,且体外对该细胞均无杀伤作用,而其中氯仿浸膏部分显示出了相对最强的抑制活性,有望从中获得抑癌活性较强的单体化合物。

4 讨论与结论

通过查阅文献和本课题组的前期预实验结果证明,单面针植物中含有丰富的生物碱、黄酮、三萜、苯丙素类等化合物^[9,10]。并且,我们前期预实验及薄层检识表明氯仿、正丁醇浸膏部分中生物碱含量居多,而乙酸乙酯部分则以苯丙素类化合物居多。结合活性实验结果,推测氯仿和正丁醇部分的生物碱成分可能是单面针抗菌、抗癌活性的主要活性成分。目前本课题组正针对氯仿和正丁醇这两部分进行进一步的化学成分分离及活性的研究,以期能够发现新的活性单体化合物,寻找抗菌、抗肿瘤活性更强的天然药物制剂。

抗菌及抗肿瘤的活性筛选实验表明单面针茎各极性部位具有良好的抗菌、抗肿瘤效果,且氯仿萃取物部分的活性最强的,开发价值较高,但因未对正常细胞的进行细胞毒性试验,所以提示我们在日后开发氯仿部分的药物研发时,得注意其用量。

随着生活水平的日渐提高,人们对食品安全及身体健康问题的关注度也随之大幅度的提升了,而临床上抗生素的长期滥用,已导致致病菌二度感染和耐药性的产生^[11];而早期肝癌的治疗以化疗和放疗为主,毒副作用十分明显,预后效果不佳,所以开发新型高效且安全的抗菌、抗肿瘤活性的药物也俨然成为当今的一个热点^[12]。药用植物绿色、天

然,大多数情况下都廉价、易得,不失为解决上述问题的一条重要捷径。我国地大物博,具有药用植物丰富且中医用药理论基础牢固的独特优势,这也为我们开发单面针、开发新型药物提供了一个较好的契机。

综上所述,本实验结果表明单面针的提取物具有良好的抗菌、抗肿瘤效果,具有深度开发研究的价值,但其抗菌、抗肿瘤活性的具体机理并不清楚,有待进一步的深入探究。

参考文献

- 1 State Administration of Traditional Chinese Medicine, Chinese Materia Medica Editorial Board(国家中医药管理局中华本草编委会). *Chinese Materia Medica*. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999. Vol 4, 3815.
- 2 Ma YZ (马英姿), Wang P (王平), Yang Y (袁园), et al. Bacteriostasis and chemical components of the neutral lipophilic components in *Zanthoxylum dissitum*. *Scientia Silvae Sinicae* (林业科学), 2010, 46: 162-165.
- 3 Yang Y (袁园), Xiao C (肖灿), Liao XH (廖新华), et al. Inhibitory action of nitidine and zanthobungeanine on lung adenocarcinoma A549 cell. *Anti-tumor Pharm* (肿瘤学), 2011, 1: 30-32.
- 4 Feng YY (冯燕英), Liu HG (刘华钢), Liang Y (梁燕), et al. Reversion of Multi-drug resistance by nitidine chloride on A2780 taxol cell. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2015, 21: 95-99.
- 5 Zhang JH (张华君), Liu HG (刘华钢), Liang Y (梁燕), et al. Reversion of multi drug resistance by nitidine chloride on KB/ADM cell. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学), 2015, 21: 87-90.
- 6 Zhu WW (祝雯雯), Fu S (傅爽), Sun W (孙雯), et al. Survival status of Helicobacter pylori in artificially environmental media. *Chin J Health Lab Tech* (中国卫生检验杂志), 2013, 23: 641-643.
- 7 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I, 11.
- 8 Zhang JT (张均田). *Modern Pharmacology Experiment Methodology* (现代药理实验方法学). Beijing: Beijing Medical University and China Xie-he Medical University Joint Publishing House, 1998. 819.
- 9 Tang J (汤俊), Zhu W (朱卫). Studies on the chemical constituents of *Zanthoxylum dissitum* Hemsl. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1995, 26: 563-565.