

密花香薷总黄酮体外抗氧化及抗肿瘤活性研究

任秋蓉, 王亚男*, 王 玥, 陈 红, 辛文媛, 马丹炜

四川师范大学生命科学学院, 成都 610101

摘要:通过超声波法提取、D101 大孔吸附树脂纯化密花香薷总黄酮, 体外抗氧化试验和 MTT(四甲基偶氮唑盐)法评价其抗氧化和抗肿瘤活性。结果表明, 总黄酮对羟自由基($\cdot\text{OH}$)、DPPH 自由基(DPPH \cdot)和超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)均具有清除能力, 其中对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除能力优于 VC; MTT 实验结果显示总黄酮对 4 株细胞均有不同程度的抑制效应, 并呈现时间和剂量依赖性($P < 0.05$)。其中对入宫颈癌 Hela 细胞 48 h 抑制效应最明显, IC_{50} 值为 0.5 mg/mL; 形态观察显示, 在总黄酮作用下, SMMC-7721 和 Hela 细胞逐渐变圆, 粘附性降低, 细胞表面皱缩, 产生细胞碎片, 显示出明显的细胞毒性, AO/EB 染色观察发现随着总黄酮处理浓度的增加, 凋亡细胞的数量也在逐渐增加。本研究结果表明密花香薷总黄酮具有很好的抗氧化活性, 可作为一种天然抗氧化剂, 且总黄酮对肿瘤细胞生长有一定的抑制效应, 可作为抗肿瘤药物进一步研究。

关键词:密花香薷; 总黄酮; 抗氧化; 抗肿瘤

中图分类号: R96

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.1.003

In vitro Antioxidant Activity and Anti-tumor Activity of Total Flavonoids from *Elsholtzia densa* Benth.

REN Qiu-rong, WANG Ya-nan*, WANG Yue, CHEN Hong, XIN Wen-yuan, MA Dan-wei

College of Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, China

Abstract: The total flavonoids from *Elsholtzia densa* Benth. were extracted by ultrasonic extraction method and purified with D101 macroporous adsorption resin. *In vitro* antioxidant test and MTT assay were used to evaluate its antioxidant and anti-tumor activity. The results showed the total flavonoids had good scavenging ability on hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), DPPH free radical (DPPH \cdot) and super oxide anion radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Its scavenging capacity for $\text{O}_2^{\cdot-}$ was better than that of VC. MTT assay results showed that the total flavonoids from *E. densa* significantly inhibited the growth of four cell lines in a dose- and time-dependent manner ($P < 0.05$). At 48 h treatment, the inhibitory effect of flavonoid was better on human cervical carcinoma Hela cells (IC_{50} 0.5 mg/mL) than other cells. Morphological observation revealed that SMMC-7721 and Hela cell lines showed cytotoxicity including cell wrinkle, reduction of cellular cohesiveness and breakage of cell membranes after treatment with the *E. densa* total flavonoids. AO/EB staining showed that the number of apoptotic cells was gradually increased with the increasing of the concentration of total flavonoids. The results suggested that *E. densa* total flavonoids had excellent antioxidant activity and can be used as a natural antioxidant. It also had inhibitory effect on growth of tumor cells, and can be used as a potential anticancer drug for further study.

Key words: *Elsholtzia densa* Benth.; total flavonoids; antioxidant activity; anti-tumor activity

密花香薷 (*Elsholtzia densa* Benth.) 系唇形科 (Labiatae) 香薷属 (*Elsholtzia*) 一年生草本植物, 别称咳嗽草、野紫苏、臭香薷、蟋蟀巴、香艳等^[1]。密花香薷是一种很重要的蜜源植物, 具有很高的蜜源价

值^[2]。它广泛分布于我国陕西、四川、山西、青海、西藏、甘肃等地, 常出现在林缘、高山、草甸、河边、山坡荒地及海拔 1800 ~ 4100 m 的地域^[3]。香薷是常用的藏药, 有祛暑化湿、发散风寒的功效, 民间常用于治疗瘫痪、癆伤吐血、感冒、疫毒等病症^[4], 同时还可作为调料和茶品使用, 是一种药食兼用的植物种类^[5]。密花香薷一直作为香薷的替代品全草入药及食用, 具有治疗夏季感冒、发热无汗、中暑性急性胃炎、口臭、小便不利等的功效, 还能够祛除蚊

收稿日期: 2016-07-25 接受日期: 2016-11-14

基金项目: 四川省教育厅四川高等学校成果转化重大培育项目 (16CZ0005); 四川省教育厅重点项目 (16ZJA0056); 四川省高校重点实验室四川濒危药用植物资源实验室项目 (SCYZ201409); 四川师范大学开放实验项目 (2016)

* 通讯作者 Tel: 86-013982032367; E-mail: yanan.w@163.com

虫^[6]等。香薷类植物虽然民间用药较多,但目前缺乏对其功效的系统科学研究。本研究拟以四川藏区高原产密花香薷植株为材料,通过超声波法提取密花香薷总黄酮,以体外抗氧化试验评价其抗氧化能力,并以正常人肝细胞(L02)、人肝癌细胞(SMMC-7721)、人乳腺导管癌细胞(MDA-MB-453)和人宫颈癌细胞(Hela)作为受试细胞,通过MTT试验评价其抗肿瘤活性,以期为藏区密花香薷植物资源的开发利用提供科学依据。

1 材料与仪器

1.1 受试细胞株

人正常肝L02细胞、人肝癌SMMC-7721细胞、人乳腺导管癌MDA-MB-453细胞、人宫颈癌Hela细胞由四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室提供。

1.2 供试材料

密花香薷植株采集于四川省阿坝藏族羌族自治州红原县,经四川师范大学生命科学学院马丹炜教授鉴定为唇形科香薷属植物密花香薷 *Elsholtzia densa* Benth., 全株使用。将采集的植株在阴凉处晾干,剪成小段,打粉备用。

1.3 主要试剂

硫酸亚铁、双氧水、水杨酸、抗坏血酸, DPPH, Tris、盐酸、邻苯三酚(成都市新都区木兰镇工业开发区); RPMI-1640 培养基、DMEM 培养基、新生牛血清、胰蛋白酶(成都哈里生物工程有限公司); 噻唑蓝 MTT(美国 Sigma 公司); 氟尿嘧啶(中国食品药品检定研究院)。

1.4 主要仪器

旋转蒸发仪 RE-52CS(上海雅荣生化仪器设备有限公司); 超声波清洗器 KQ5200E(昆山市超声波仪器有限公司, 超声波频率 40 kHz, 超声波功率 150W); 循环水式多用真空泵 CHASHB-3A(北京恒奥德科技有限公司); 中草药粉碎机(天津市泰斯仪器有限公司); 真空干燥机(北京博医康实验仪器有限公司); 玻璃层析柱(成都凌云玻璃仪器设备厂); 土壤筛(浙江上虞道虚化验仪器设备厂); CO₂ 恒温培养箱(赛默 Thermo 成都军能海尔思科技有限公司); 低速离心机 SC-2554(安徽中科中佳科学仪器有限公司); 多功能细胞分析仪(MD/Spectra Max M2); 倒置显微镜(DMLLED 型, Leica)。

2 实验方法

2.1 总黄酮成分提取及纯化

2.1.1 总黄酮提取

超声波法提取总黄酮,将密花香薷植株干粉过土壤筛后,称取 30 g,装入烧杯中,按料液比大约 1:30 加入 50% 乙醇溶液,超声波提取 30 min,后抽滤,收集滤渣,重复上述步骤 2 次,合并 3 次滤液,旋转蒸发仪减压蒸馏得密花香薷总黄酮粗提取物。

2.1.2 大孔吸附树脂预处理

将 D101 大孔吸附树脂置于容器中用蒸馏水洗 2~3 次,95% 乙醇反复浸泡洗涤,洗至 1 份 95% 乙醇于 3 份水中不产生白色浑浊后用蒸馏水洗净乙醇,再用 2% 盐酸浸泡 2~3 h,水洗至中性,5% NaOH 溶液浸泡 2~3 h,再水洗至中性,备用。

2.1.3 总黄酮纯化

称取 5 g 未纯化黄酮的浸膏,溶于 500 mL 纯化水中,过层析柱,后用 50% 乙醇洗脱,收集洗脱液,再次用旋转蒸发仪减压蒸馏得浸膏。将所得浸膏置于锥形瓶中,用纱布扎紧瓶口,真空干燥 1 h,收集物料粉末,称重按以下公式计算得率:

$$\text{提取物得率}(\%) = \frac{\text{纯化后提取物质量}(\text{g})}{\text{密花香薷全草粉末质量}(\text{g})} \times 100\%$$

2.2 抗氧化活性测定

2.2.1 羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除率的测定

采用水杨酸法,利用 Fenton 反应产生 $\cdot\text{OH}$ 。依次取 2 mL EP 管编号,各加入 200 μL 1.8 mol/mL 硫酸亚铁溶液和 150 μL 1.8 mol/mL 水杨酸-乙醇溶液,混合均匀后分别加入 140 μL 不同浓度的样品溶液,最后各加入 10 μL 0.03% H₂O₂ 溶液,充分混匀后,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min,510 nm 波长下测定吸光度 A; 以蒸馏水代替样品溶液测定吸光度 A₀; 以抗坏血酸 VC 代替样品溶液作为阳性对照。蒸馏水为参比液。重复 3 次,清除率按以下公式计算:

$$\text{清除率}(\%) = (A_0 - A) / A_0 \times 100\%$$

2.2.2 DPPH (DPPH \cdot) 清除率的测定

采用 DPPH 法,依次取 2 mL EP 管编号,各加入 400 μL 1 mol/L DPPH 溶液,后分别加入等体积 400 μL 不同浓度的样品溶液,充分混匀,避光静置 30 min,517 nm 波长下测定吸光度 A; 以 95% 乙醇代替样品溶液测定吸光度 A₀; 以抗坏血酸 VC 代替样品溶液作为阳性对照。蒸馏水为参比液。重复 3 次,清除率按以下公式计算:

$$\text{清除率}(\%) = (A_0 - A) / A_0 \times 100\%$$

2.2.3 对超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)清除率的测定

采用邻苯三酚法,依次取 2 mL EP 管编号,各加入 500 μ L 0.1 mol/L pH = 8.2 Tris-HCl 溶液和 150 μ L 双蒸水,混匀后分别加入 150 μ L 不同浓度的样品溶液,在 25 $^{\circ}$ C 水浴中保温 20 min,取出后立即加入 300 μ L 在 25 $^{\circ}$ C 水浴中保温 20 min 的 3 mmol/L 邻苯三酚溶液,充分混匀,常温下反应 9 min,320 nm 波长下测定吸光度 A;以双蒸水代替 3 mmol/L 邻苯三酚溶液测定吸光度 A_x ;以双蒸水代替样品溶液测定吸光度 A_0 ;以抗坏血酸 VC 代替样品溶液作为阳性对照。馏水为参比液。重复 3 次,清除率按以下公式计算:

$$\text{清除率}(\%) = [A_0 - (A - A_x)] / A_0 \times 100\%$$

2.3 抗肿瘤活性测定

2.3.1 MTT 法检测细胞增殖

将 L02 细胞、SMMC-7721 细胞、MDA-MB-453 细胞、Hela 细胞分别以 8×10^4 个/mL 接种于 96 孔板中,每孔 100 μ L。预培养 20 h,待细胞贴壁后,加入 98 μ L 新鲜培养基及 2 μ L 密花香薹总黄酮溶液使每孔终浓度为 1、1.5、2、2.5、3 mg/mL 的完全培养液,每浓度设 5 个平行孔。并设空白对照、阴性对照、溶剂对照(25% 乙醇)和阳性对照(80 μ g/mL 氟尿嘧啶),分别连续培养 8 h、24 h、48 h 后,加入 20 μ L 5 mg/mL 的 MTT 溶液,继续培养 4 h,弃去上清液,加入 150 μ L DMSO,置微量振荡器振荡 10 min 使结晶完全溶解,用多功能细胞分析仪检测 490 nm 波长处吸光度(A)值:

$$\text{细胞活力}(\%) = A_{\text{处理组}} / A_{\text{25\% 乙醇对照}} \times 100\%$$

2.3.2 倒置显微镜观察细胞形态

将 SMMC-7721 细胞和 Hela 细胞以 3×10^5 /mL 接种于 6 孔板中,每孔 1 mL。预培养 20 h 后,加入 1 mL 含不同浓度密花香薹总黄酮的培养液,使其终

浓度为 1、2、3 mg/mL。并设 25% 乙醇为溶剂对照,培养 24 h 后,在倒置相差显微镜下观察并拍照。

2.3.3 荧光显微镜观察细胞凋亡

前期细胞培养处理见 2.3.2,胰蛋白酶消化, PBS 重悬,取 50 μ L 细胞悬液,加 2 μ L AO/EB 染液(100 μ g/mL AO 和 100 μ g/mL EB 等体积混匀制成),轻轻吹打混匀,取 12 μ L 混合后的细胞悬液滴在洁净载玻片上,加盖玻片后立即置荧光显微镜下观察并拍照。

2.4 统计分析

采用 SPSS17.0 处理数据, LSD 法分析显著性差异,双变量法分析相关性, Probit 法分析 IC_{50} 值,使用 Microsoft Excel 2003 作图。

3 结果与分析

3.1 密花香薹总黄酮得率

30 g 密花香薹植株干粉通过超声波提取、D101 大孔吸附树脂纯化后得到的总黄酮化合物质量为 0.826 g,总黄酮得率为 2.75%。

3.2 密花香薹总黄酮抗氧化作用

3.2.1 清除羟自由基(\cdot OH)

表 1 显示,各浓度密花香薹总黄酮都可清除 \cdot OH,且随着浓度的增加,密花香薹总黄酮浓度与 \cdot OH 的清除率呈正相关关系, $P = 0.061$, $r = 0.861$,总黄酮 IC_{50} 值为 0.183 mg/mL, VC 的 IC_{50} 值为 0.072 mg/mL,总黄酮对 \cdot OH 的清除率弱于 VC。

3.2.2 清除 DPPH 自由基(DPPH \cdot)

表 2 显示,密花香薹总黄酮浓度与 DPPH \cdot 清除率呈显著的正相关关系 $P = 0.000$, $r = 0.995$,总黄酮 IC_{50} 值为 0.046 mg/mL, VC 的 IC_{50} 值为 0.008 mg/mL,总黄酮对 DPPH \cdot 的清除率弱于 VC。

表 1 密花香薹总黄酮对羟自由基(\cdot OH)清除率

Table 1 Hydroxyl free radical (\cdot OH) scavenging rate of total flavonoids from *E. densa*

总黄酮 Total flavonoids		VC	
浓度 Concentration (mg/mL)	清除率 Scavenging rate (%)	浓度 Concentration (mg/mL)	清除率 Scavenging rate (%)
0.01	16.00%	0.01	16.57%
0.02	22.99%	0.02	23.74%
0.04	32.55%	0.04	36.28%
0.08	43.33%	0.08	47.37%
0.16	44.32%	0.16	71.32%

表2 密花香薷总黄酮对 DPPH· 的清除率

Table 2 DPPH· scavenging rate of total flavonoids from *E. densa*

总黄酮 Total flavonoids		VC	
浓度 Concentration (mg/mL)	清除率 Scavenging rate (%)	浓度 Concentration (mg/mL)	清除率 Scavenging rate (%)
0.01	18.51%	0.003	7.50%
0.02	25.09%	0.005	26.79%
0.03	32.71%	0.008	44.28%
0.04	42.86%	0.011	67.13%
0.05	54.46%	0.013	83.63%
0.06	63.99%	0.016	93.90%

3.2.3 清除超氧阴离子($O_2^{\cdot -}$)

IC₅₀值为 0.218 mg/mL, VC 的 IC₅₀ 值为 1.166 mg/mL, 总黄酮对 $O_2^{\cdot -}$ 的清除率强于 VC。

表3显示,密花香薷总黄酮浓度与 $O_2^{\cdot -}$ 清除率呈显著的正相关关系, $P=0.001$, $r=0.992$, 总黄酮

表3 密花香薷总黄酮对超氧阴离子($O_2^{\cdot -}$)的清除率Table 3 Superoxide anion scavenging rate of total flavonoids from *E. densa*

总黄酮 Total flavonoids		VC	
浓度 Concentration (mg/mL)	清除率 Scavenging rate (%)	浓度 Concentration (mg/mL)	清除率 Scavenging rate (%)
0.18	17.14%	0.2	33.36%
0.20	35.47%	0.4	38.80%
0.22	51.41%	0.8	47.92%
0.24	69.26%	1.6	60.20%
0.26	76.73%	3.2	72.68%

3.3 密花香薷总黄酮抗肿瘤作用

3.3.1 总黄酮对4种细胞增殖的影响

MTT 实验结果见图1,除 L02 细胞 8 h 处理组以外,密花香薷总黄酮对4株细胞均有不同程度的抑制效应,并呈现时间和剂量依赖性($P < 0.05$)。4株细胞各时间段 IC₅₀ 值见表4。总体上,密花香薷总

黄酮对人正常细胞 L02 抑制效应较小,且短时间处理对其具有促进作用。而对于其他3株癌细胞均具有较强抑制效应,存在时间与剂量依赖性,24 h 处理时,密花香薷总黄酮对 SMMC-7721 细胞抑制效应最明显,IC₅₀ 值为 2.28 mg/mL; 而 48 h 处理时,对 HeLa 细胞抑制效应最明显,IC₅₀ 值为 0.5 mg/mL。

表4 密花香薷总黄酮对4株细胞 IC₅₀Table 4 IC₅₀ of total flavonoids from *E. densa* on 4 cell lines

时间 Time	IC ₅₀ (mg/mL)			
	L02	SMMS-7721	MDA-MB-453	Hela
8 h	-	4.4	3.07	4
24 h	2.73	2.28	3.04	2.54
48 h	1.73	1.32	2.9	0.5

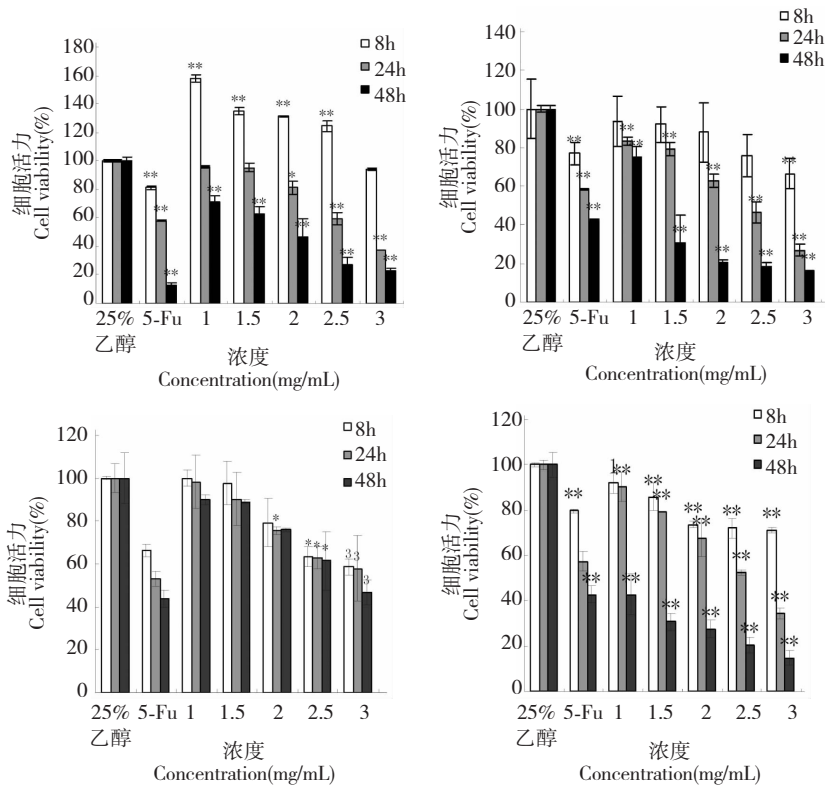


图1 密花香薷总黄酮对 L02 细胞、SMMC-7721 细胞、MDA-MB-453 细胞、Hela 细胞的增殖影响

Fig. 1 Effect of total flavonoids from *E. densa* on the proliferation of L02 cells, SMMC-7721 cells, MDA-MB-453 cells and HeLa cells

注:与对照组(25%乙醇)比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note:compared with control (25% ethanol),* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

3.3.2 总黄酮对 SMMC-7721 细胞、Hela 细胞形态的影响

在 MTT 试验的基础上选择 SMMC-7721 细胞和 HeLa 细胞,观察总黄酮作用 24 h 后细胞形态变化(图 2A,B)。对照组 SMMC-7721 细胞(图 A-a)呈梭形生长,HeLa 细胞(图 B-a)呈方形聚集式生长,两株细胞均粘附性好,折光性强,出现明显的分裂相;当低剂量的总黄酮(1 mg/mL)处理时,SMMC-7721 细胞(图 A-b)和 HeLa 细胞(图 B-b)均出现少数细胞形态变成圆形,细胞粘附性降低现象;总黄酮中剂量(2 mg/mL)处理时,均出现大多数细胞形态变成圆形,且细胞皱缩现象(图 A-c,B-c);而高剂量总黄酮(3 mg/mL)处理时,两株细胞全部变成圆形(图 A-d,B-d),且皱缩现象明显,表现出明显的细胞毒性,大部分细胞死亡。

3.3.3 AO/EB 染色观察总黄酮诱导 SMMC-7721 细胞和 HeLa 细胞凋亡

密花香薷总黄酮作用 SMMC-7721 细胞和 HeLa 细胞 24 h 后,经 AO/EB 双重染色,在荧光显微镜下

可清晰地区分活细胞(VNA)、早期凋亡细胞(VA)、晚期凋亡细胞(NVA)和坏死细胞(NVNA)(图 3A,B)。活细胞核呈正常结构着绿色,早期凋亡细胞核呈圆珠状或固缩状着绿色,晚期凋亡细胞核呈圆珠状或固缩状着红色,坏死细胞核呈正常结构着红色。与对照组相比,经 1、2 和 3 mg/mL 的密花香薷总黄酮处理的 SMMC-7721 细胞和 HeLa 细胞均出现早期凋亡细胞、晚期凋亡细胞和坏死细胞,其中晚期凋亡细胞数目随浓度的增加而增加。

4 讨论

4.1 密花香薷总黄酮抗氧化活性

人类肿瘤、冠心病、中风、震颤麻痹症、老年性痴呆等疾病几乎都与氧自由基(ROS)有关,文献报道表明许多植物中提取的天然黄酮类化合物具有明显的抗氧化活性,因此从植物中筛选出高效低毒且经济有效的天然黄酮类抗氧化剂成为当今研究者研究的热点^[7-8]。狭叶香科(*Teucrium polium* L.)甲醇提取物的四个主要黄酮类化合物具有清除 DPPH· 的

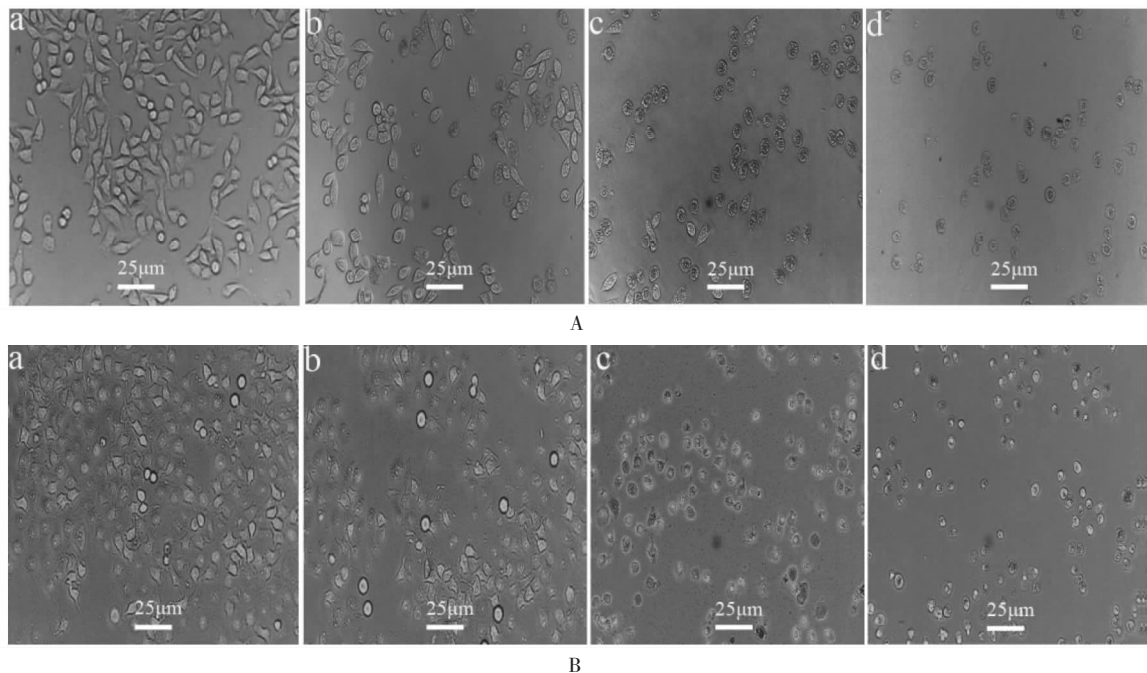


图2 密花香薹总黄酮对 SMMC-7721 细胞、Hela 细胞形态的影响

Fig. 2 Effect of total flavonoids from *E. densa* on the morphology of SMMC-7721 and HeLa cells

注:A:SMMC-7721 细胞;B:Hela 细胞;a:溶剂对照(25%乙醇);b:1 mg/mL 密花香薹总黄酮;c:2 mg/mL 密花香薹总黄酮;d:3 mg/mL 密花香薹总黄酮。

Note: A:SMMC-7721 cells, B:Hela cells. a:solvent control (25% ethanol), b:1 mg/mL total flavonoids from *E. densa*, c:2 mg/mL total flavonoids from *E. densa*, d:3 mg/mL total flavonoids from *E. densa*

能力^[9]。柿子(*Diospyros kaki* L.)叶总黄酮提取物具有很好的还原力和清除 $\cdot\text{OH}$ 、DPPH \cdot 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的能力^[10]。鼠尾草(*Salvia officinalis* L.)甲醇提取物中的黄酮类化合物对稳定自由基 DPPH \cdot 具有明显的清除作用^[11]。本研究结果表明,密花香薹总黄酮对 $\cdot\text{OH}$ 、DPPH \cdot 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 均具有清除能力,且均呈现正相关关系,其 IC_{50} 值分别为0.183 mg/mL、0.046 mg/mL、0.218 mg/mL。与 VC 对比,密花香薹总黄酮对 $\cdot\text{OH}$ 和 DPPH \cdot 的清除能力弱于 VC;而对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除能力强于 VC,其 IC_{50} 值仅为 VC 的 18.9%。根据上述结果可知,密花香薹总黄酮具有很好的抗氧化活性,对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除能力最强,可作为一种天然抗氧化剂开发利用。

4.2 密花香薹总黄酮抗肿瘤活性

肿瘤是死亡率很高的疾病之一,因此肿瘤的预防和治疗备受关注。近年来研究发现,从许多植物中提取所得的黄酮类化合物可通过提高抗氧化物酶的活性、清除自由基、诱导肿瘤细胞凋亡等多种渠道发挥抗肿瘤作用,且具有天然低毒的特点,因此研究天然黄酮类化合物作为抗肿瘤药物成为当前热

点^[12,13]。巴西植物巴豆(*Croton betulaster* Müll. Arg.)中的3种黄酮类化合物能抑制人胶质瘤细胞(GL-15)生长并诱导其凋亡^[14]。韩国柑橘(*Citrus aurantium* L)类黄酮能在体内和体外抑制非小细胞肺癌细胞(A549)生长和转移^[15]。荔枝(*Litchi chinensis* Sonn.)所分离鉴定的6种黄酮类化合物对人肝癌细胞(HepG2)、HeLa 细胞、A549 细胞、人乳腺癌细胞(MCF-7)具有不同程度的抑制效应^[16]。本研究结果表明,密花香薹总黄酮对人正常细胞 LO2 抑制效应较小,且短时间处理对其具有促进作用。而对于其他3株癌细胞均具有较强抑制效应($P < 0.05$)。8 h 和 24 h 处理时,密花香薹总黄酮对 SMMC-7721 细胞抑制效应最明显;48 h 处理时,对 HeLa 细胞抑制效应最明显,且 48 h 处理时间下对 SMMC-7721 细胞和 HeLa 细胞的抑制效应均比 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氟尿嘧啶作用明显。显微观察发现,在密花香薹总黄酮作用下,SMMC-7721 细胞和 HeLa 细胞出现逐渐变圆,粘附性降低,细胞表面皱缩的现象,产生细胞碎片,显示出明显的细胞毒性,且 AO/EB 染色观察发现随着总黄酮处理浓度的增加,凋亡细胞

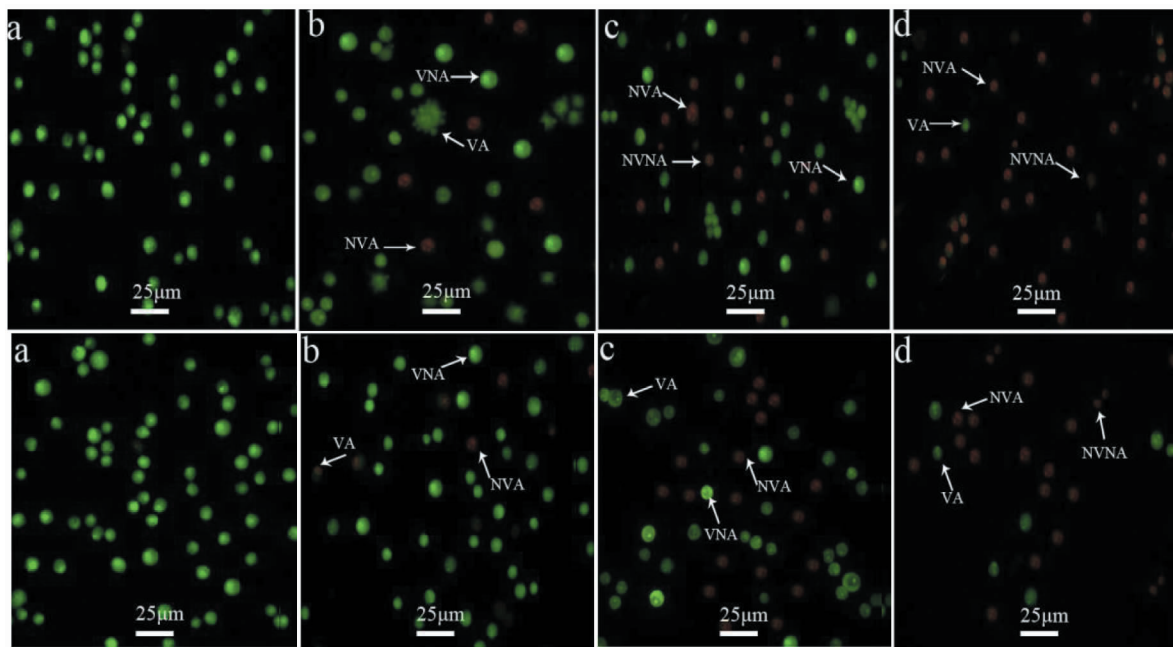


图3 AO/EB染色观察密花香薷总黄酮诱导 SMMC-7721 细胞和 HeLa 细胞凋亡

Fig. 3 Effects of total flavonoids from *Elsholtzia densa* Benth. induced apoptosis of SMMC-7721 cells and HeLa cells with AO/EB stained

注: A: SMMC-7721 细胞; B: HeLa 细胞. a: 溶剂对照(25% 乙醇); b: 1 mg/mL 密花香薷总黄酮; c: 2 mg/mL 密花香薷总黄酮; d: 3 mg/mL 密花香薷总黄酮。

Note: A: SMMC-7721 cells, B: HeLa cells. a: solvent control (25% ethanol), b: 1 mg/mL total flavonoids from *E. densa*, c: 2 mg/mL total flavonoids from *E. densa*, d: 3 mg/mL total flavonoids from *E. densa*

的数量也在逐渐增加。以上结果表明,密花香薷总黄酮具有一定的细胞毒性,能抑制肿瘤细胞生长,且在 48 h 处理时间下对 HeLa 细胞的抑制作用最强。

研究表明,某些化疗药物通过诱导氧化应激,抑制癌细胞增殖甚至导致其凋亡^[17],但同时也会影响正常细胞。如顺铂会同时改变癌细胞和正常细胞的氧化还原状态,导致细胞内的 ROS 水平升高,这就限制了顺铂的临床应用。LI Y 等研究发现,当顺铂与大黄素联合应用时,抑制骨肉瘤 MG-63 细胞增殖的效应增强,原因是大黄素抵消了顺铂诱导的氧化应激反应^[18]。因此,在肿瘤治疗联合用药的药物资源开发中,既有抗氧化活性又有抗肿瘤活性的密花香薷具有较好的开发潜力。

5 结论

超声波法提取密花香薷总黄酮的得率为 2.75%;密花香薷总黄酮具有很好的体外抗氧化活性,对 O_2^- 的清除能力最强。密花香薷总黄酮具有一定的细胞毒性,能抑制肿瘤细胞生长,对 HeLa 细胞的抑制作用较强,可作为抗肿瘤药物进一步深入

研究。

参考文献

- 1 Zhang J(张继), Wang ZH(王振恒), Yao J(姚健), et al. The analysis of the essential oil from *Elsholtzia densa* Benth. components. *Acta Pratacult Sin* (草业学报), 2005, 2: 112-116.
- 2 Qu C(瞿纯), Dong X(董霞). The research and utilization of *Elsholtzia nectar* plants. *J Bee* (蜜蜂杂志), 2009, 8: 41-42.
- 3 Bao JY(包锦渊), Li JQ(李军乔), Zhang LL(张璐璐), et al. Qualitative analysis of effective constituent of *Elsholtzia densa* Benth. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2011, 1: 202-204.
- 4 Shi XF(石晓峰), Sheng W(沈薇), Li DX(李德杏), et al. Experimental study of bacterostatic effects and dermal toxicity of *Elsholtzia cilita* essential oil *in vitro*. *China Pharm* (中国药师), 2007, 10: 556-557.
- 5 Li JE(李景恩), Nie SP(聂少平), Yang MY(杨美艳), et al. Determination of content of polysaccharides in *Herba Moslae*. *Food Sci* (食品科学), 2008, 29: 487-490.

- 6 Li G (李刚), Shen HM (沈慧敏), Zhang XH (张新虎). Preliminary research of insecticidal activity of acetone extracts from sixteen species of poisonous plants in the Tianzhu Grassland of Gansu Province to *Mythimna seperata*. *J Gansu Agric Univ* (甘肃农业大学学报), 2009, 4:101-104.
- 7 Qiao XY (乔小燕), Ma CL (马春雷), Chen L (陈亮). Plant flavonoid biosynthesis pathway and regulation of important genes. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2009, 21:354-360.
- 8 Amić D, Davidović-Amić D, Beslo D, et al. SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids. *Curr Med Chem*, 2007, 14:827-845.
- 9 Sharififar F, Dehghn-Nudeh G, Mirtajaldini M. Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. *Food Chem*, 2009, 112:885-888.
- 10 Sun L, Zhang J, Lu X, et al. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49:2689-2696.
- 11 Hamrouni-Sellami I, Rahali F Z, Rebey I B, et al. Total phenolics, flavonoids, and antioxidant activity of Sage (*Salvia officinalis* L.) plants as affected by different drying methods. *Food Bioproc Technol*, 2012, 6:806-817.
- 12 Dong MM (董蒙蒙), Yu F (喻樊), Liu J (刘佳), et al. Comparison antioxidant and antitumor activity of 5 flavonoids from *Limonium sinense* (Girard) Kuntze. *Jiangsu Agric Sci* (江苏农业科学), 2015, 43:297-299.
- 13 Nancy ER, Ho CT, Li SM. Efficacious anti-cancer property of flavonoids from citrus peels. *Food Sci Human Wellness*, 2014, 3:104-109.
- 14 Paulo LCC, Sandra RV, Bruno PSP, et al. Flavonoids from the Brazilian plant *Croton betulaster* inhibit the growth of human glioblastoma cells and induce apoptosis. *Brazilian J Pharmacognosy*, 2016, 26:34-43.
- 15 Kwang-II P, Hyeon-Soo P, Mun-Ki K, et al. Flavonoids identified from Korean *Citrus aurantium* L. inhibit Non-Small Cell Lung Cancer growth *in vivo* and *in vitro*. *J Funct Foods*, 2014, 7:287-297.
- 16 Wen LR, Wu D, Jiang YM, et al. Identification of flavonoids in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) leaf and evaluation of anti-cancer activities. *J Funct Foods*, 2014, 6:555-563.
- 17 Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Dis*, 2013, 12:931-947.
- 18 Li Y, Hu R, Song T, et al. Emodin mitigates the oxidative stress induced by cisplatin in osteosarcoma MG63 cells. *Oncol Lett*, 2016, 12:1981-1985.
- (上接第 13 页)
- 2 Xu L (徐磊), Ye ZY (叶朝阳), Zhou Y (周燕), et al. Rabbit articular chondrocyte dedifferentiation during *in vitro* expansion. *Chin J Tissue Eng Res* (中国组织工程研究), 2013, 17:3626-3634.
- 3 Luo J, Nikolaev AY, Imai S, et al. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell*, 2001, 107:137-148.
- 4 Alcendor RR, Gao S, Zhai P, et al. SIRT1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circul Res*, 2007, 100:1512-1521.
- 5 Elmali N, Esenkaya I, Harma A, et al. Effect of resveratrol in experimental osteoarthritis in rabbits. *Inflamm Res*, 2005, 54:158-162.
- 6 Guan LX (关炼雄), Duan L (段莉), Huang JH (黄江鸿), et al. 软骨细胞去分化研究进展. *Int J Orthopaed* (国际骨科学杂志), 2014, 35:250-253.
- 7 Zhang J (张聚), Liu SQ (刘斯奇), Xu NZ (徐宁志). Senescence: General features and current progress on the research. *Chin J Cell Biol* (中国细胞生物学学报), 2013, 35(1):1-16.
- 8 Lu JH (陆峻泓), Li Q (李卿), Liu W (刘伟), et al. Age-related changes of the expression of extracellular matrix *in vitro* cultured chondrocytes. *Chin J Orthop Trauma* (中华创伤骨科杂志), 2003, 5:225-228.
- 9 Liu B (刘弼), Lei M (雷鸣), Xiao DM (肖德明). 抗衰老基因 SIRT1 对骨关节炎的防治影响. *Orthoped J China* (中国矫形外科杂志), 2012, 20:1402-1404.
- 10 Wang J, Gao JS, Chen JW, et al. Effect of resveratrol on cartilage protection and apoptosis inhibition in experimental osteoarthritis of rabbit. *Rheumatol Int*, 2012, 32:1541-1548.
- 11 Jang M, Cai L, Udeani GO, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 1997, 275:218-220.
- 12 Gu LL (古丽丽), Liu LY (刘立亚), Ma QQ (马芹芹), et al. Regulation of resveratrol on the apoptosis of human umbilical Vein endothelial cells induced by hydrogen peroxide. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2012, 23:1427-1430.
- 13 Chan WH, Chang YJ. Dosage effects of resveratrol on ethanol-induced cell death in the human K562 cell line. *Toxicol Lett*, 2006, 161(1):1-9.
- 14 Loeser RF, Shanker C. Autocrine stimulation by insulin-like growthfactor1 and insulin-like growth factor2 mediates chondrocytes survival *in vitro*. *Anhritis Rheum*, 2000, 43:1552-1559.