

## 37种植物提取物对人乳腺癌细胞及脂肪酸合酶抑制作用

李夏冰<sup>1</sup>, 高全<sup>2</sup>, 汤锋<sup>1</sup>, 马晓丰<sup>3</sup>, 姚曦<sup>1</sup>, 荀航<sup>1\*</sup>, 岳永德<sup>1</sup><sup>1</sup>国际竹藤中心, 国家林业局竹藤科学与技术重点实验室, 北京 100102; <sup>2</sup>安徽农业大学, 植物保护学院, 合肥 230036; <sup>3</sup>中国科学院大学, 生命科学学院, 北京 101407

**摘要:** 本文用 CCK-8 法筛选了 37 种植物提取物对人乳腺癌细胞抑制作用。研究结果表明: 黄山栎 [*Koelreuteriabipinnata* Franch. var. *integrifoliola* (Merr.) T. Chen. ]、南五味子 [*Kadsuralongipedunculata* Finet et Gagnep. ]、糙叶树 [*Aphanantheaspera* (Thunb.) Planch. ]、大血藤 [*Sargentodoxacuneata* (Oliv.) Rehd. ] 和黄杜鹃 [*Rhododendron molle* (Blum) G. Don. ] 5 种植物提取物对人乳腺癌细胞具有显著抑制活性。在终浓度为 100 mg/L 时, 其对肿瘤细胞的抑制率分别为 76.68 ± 0.16%、71.02 ± 0.12%、62.70 ± 1.26%、61.54 ± 0.35% 和 55.79 ± 1.71%。进一步筛选 5 种植物石油醚相、乙酸乙酯相、正丁醇相和水相的对人乳腺癌细胞及脂肪酸合酶 (FAS) 的抑制活性, 其中黄山栎正丁醇相抗具有显著的细胞毒性, IC<sub>50</sub> 为 19.93 mg/L; 5 种植物提取物不同溶剂部位对 FAS 均表现出一定的抑制活性, 黄山栎的正丁醇相对 FAS 的抑制活性最强, 在浓度 100 mg/L 下抑制率为 84.32%。为进一步寻找高效、新型的抗肿瘤药物提供理论依据。

**关键词:** 植物提取物; 乳腺癌; 抗肿瘤活性; 脂肪酸合酶; 黄山栎

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.4.019

## Inhibitory Effects of 37 Plant Extracts on Human Breast Cancer Cells and Fatty Acid Synthase

LI Xia-bing<sup>1</sup>, GAO Quan<sup>2</sup>, TANG Feng<sup>1</sup>, MA Xiao-feng<sup>3</sup>, YAO Xi<sup>1</sup>, XUN Hang<sup>1\*</sup>, YUE Yong-de<sup>1</sup>

<sup>1</sup>International Centre for Bamboo and Rattan, Key Laboratory of Science and Technology of Bamboo and Rattan, State Forestry Administration, Beijing 100102, China; <sup>2</sup>Anhui Agriculture University, School of plant protection; Hefei 230036, China; <sup>3</sup>University of Chinese Academy of Sciences, College of Life Sciences, Beijing 101407, China

**Abstract:** The ethanol extracts of 37 plants were screened for their inhibitory effects on human breast cancer cells by CCK-8 method. Some plant extracts presented significant proliferation inhibition activity, such as *Koelreuteriabipinnata* Franch. var. *integrifoliola* (Merr.) T. Chen., *Kadsuralongipedunculata* Finet et Gagnep., *Aphanantheaspera* (Thunb.) Planch., *Sargentodoxacuneata* (Oliv.) Rehd. and *Rhododendron molle* (Blum) G. Don.. The inhibition rates of above plants were 76.68 ± 0.16%, 71.02 ± 0.12%, 62.70 ± 1.26%, 61.54 ± 0.35% and 55.79 ± 1.71% at the concentration of 100 mg/L, respectively. Further bio-assay guided screening showed that the n-butanol fraction of *K. bipinnata* exhibited the significant cytotoxicity with IC<sub>50</sub> value of 19.93 mg/L. The inhibitory activities of the different extracts on fatty acid synthase were also measured. The results showed that the n-butanol fraction of *K. bipinnata* had the highest inhibition activity with inhibition rate of 84.32% at a concentration of 100 mg/L. The results provided a basis for further investigation of novel and high efficient anti-tumor drugs.

**Key words:** plant extracts; breast cancer; anti-tumor activity; fatty acid synthase; *Koelreuteriabipinnata* Franch. var. *integrifoliola* (Merr.) T. Chen.

癌症是困扰人类的重大难题之一, 严重威胁人类健康<sup>[1]</sup>。药物治疗作为治疗癌症的有效手段始于 20 世纪 40 年代, 经过 70 多年的发展, 目前全球

临床应用的抗肿瘤药物约 100 多种。随着研究的深入, 发现市场上现有的化疗药物在杀灭癌细胞的同时也会损伤人体的正常细胞, 其作用机制仍然有较大的局限性, 从而不可避免的造成了毒副作用, 也限制了最大药物注射量, 同时还给患者带来更大的痛苦。

收稿日期: 2016-11-23 接受日期: 2017-02-14

基金项目: 国际竹藤中心基本科研业务经费 (1632015012)

\* 通讯作者 E-mail: xunhang@icbr.ac.cn

天然产物极其丰富多样,且作为纯天然药物在肿瘤治疗中因疗效确切,副作用小等优点,成为抗肿瘤药物的重要来源<sup>[2,3]</sup>。当今国际上临床常用的植物源抗肿瘤药物,应用最为广泛的是紫杉醇<sup>[4]</sup>、喜树碱<sup>[5]</sup>、长春花碱<sup>[6]</sup>、白藜芦醇<sup>[7]</sup>、鬼臼毒素<sup>[8]</sup>等。随着研究的不断推进,发现这些药物也存在选择性差、易产生毒副作用和耐药性,抗肿瘤药物的研发也逐渐从传统的细胞毒药物转向具有靶向功能的抗肿瘤的药物。

脂肪酸合酶(fatty acid synthase, FAS)是一个大分子酶复合物,由7个不同的功能域组成,在体内以乙酰辅酶A、丙二酸单酰辅酶A和NADPH为底物,催化合成长链饱和脂肪酸<sup>[9]</sup>。FAS广泛存在于动植物细胞中,是高等动物内源性脂肪酸合成的关键酶。大量的研究表明,FAS在人乳腺癌、前列腺癌等肿瘤细胞中异常高表达,相反,在人体大多数正常组织细胞中FAS几乎不表达<sup>[10,11]</sup>。FAS的高表达导致合成更多的脂肪酸,这可能是为癌细胞的快速繁殖提供能量。FAS在肿瘤细胞及正常细胞中表达量的差异使其成为癌症靶向治疗的潜在靶点<sup>[12-14]</sup>。

为了筛选新型的抗肿瘤药物,本实验选用实验室现有的FAS表达量最高的人乳腺癌细胞(MDA-MB-231)测定了37种植物提取物抑制活性,并且检测优选出的高活性植物提取物对FAS的抑制作用,旨在为创制和发展新的抗肿瘤药物提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

构树 *Broussonetiapyrifera* (Linn.) L' Hert. ex Vent. (叶)、络石 *Trachelospermumjasminoides* (Lindl.) Lem. (茎、叶)、黄杜鹃 *Rhododendron molle* (Blum) G. Don. (茎、叶)、紫藤 *Sweet wisteria sinensis* (Sims) Sweet. (茎、叶)、白屈菜 *Chelidonium-majus* L. (全草)、苦豆子 *Sophoraalopeuroides* L. (果实)、夹竹桃 *Neriumindicum* Mill. (叶)、糙叶树 *Aphananthespera* (Thunb.) Planch. (叶)、大血藤 *Sargentodoxacuneata* (Oliv.) Rehd. (茎、叶)、南五味子 *Kadsuralongipedunculata* Finet et Gagnep. (叶)、钩吻 *Gelsemiumelegans* (Gardn. & Champ.) Benth. (花、叶)、黄山栾 *Koelreuteriabipinnata* Franch. var. *integrifoliola* (Merr.) T. Chen (叶)、白背叶 *Mallotusapelta* (Lour.) Muell. Arg. var. *apelta* (叶)、绿叶地锦 *Parthenocissuslaetevirens* Rehd (茎、叶)、飞燕草 *Consoli-*

*daajacis* (L.) Schur (全草)、石菖蒲 *Acorustatarinowii* Schot (全草)、芸实 *Caesalpinia decapetala* (Roth) Alston (茎、叶)、乌柏 *Sapiumsebiferum* (Linn.) Roxb. (叶)、杜英 *Elaeocarpusdecipiens* Hemsl. (叶)、美国凌霄 *Campsisradicans* (L.) Seem. (茎、叶)、水蓼 *Polygonumhydropiper* L. (茎、叶)、葎草 *Humulus scandens* (Lour.) Merr. (全草)、七叶树 *Aesculus chinensis* Bunge (叶)、山玉兰 *Magnolia delavayi* Franch. (叶)、扶芳藤 *Euonymus fortunei* (Turcz.) Hand. -Mazz. *Puerarialobata* (Willd.) Ohwi (茎、叶)、珍珠莲 *Ficussarmentosa* Buch. -Ham. ex J. E. Sm. var. *henryi* (King ex Oliv.) Corner (叶)、盐肤木 *Rhus chinensis* Mil (叶)、华东野胡桃 *Juglans cathayensis* Dode var. *formosana* (Hayata) A. et R. H. Chang (叶)、青檀 *Pteroceltistatarinowii* Maxim. (叶)、鸡矢藤 *Paederiascandens* (Lour.) Merr. (茎、叶)、香花崖豆藤 *Millettiadielsiana* Harms (茎、叶)、粉叶爬山虎 *Parthenocissusthomonii* (Laws.) Planch. (茎、叶)、山胡椒 *Lindera glauca* (Sieb. et Zucc.) Bl. (茎、叶)、狭叶山胡椒 *Lindera angustifolia* Cheng (茎、叶)、大果山胡椒 *Lindera praecox* (Sieb. et Zucc.) Bl. (茎、叶)、豚草 *Ambrosia artemisiifolia* L. (全草)。以上实验所用植物样品采集于安徽地区,由安徽省林科院胡一民副研究员鉴定。

### 1.2 试剂

DMEM 高糖培养基 (1507989)、胎牛血清 (1527494) 均购于 Gibco; CCK-8 试剂盒 (GW769) 购于 Dojindo 公司; PBS、0.25% 胰酶-EDTA、青霉素、链霉素、乙酰辅酶A (SLBB2002V)、二甲基亚砷 (DMSO)、丙二酸单酰辅酶A (O21M5057v)、NADPH 和二硫苏糖醇 (DTT) 购于 Sigma 公司; 96 孔细胞培养板、细胞培养瓶购于 Corning 公司。无水乙醇、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇为分析纯, 购于北京化工股份有限公司。

细胞株: 实验用人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 购于中国科学院上海细胞库。细胞培养在含有 10% 的胎牛血清 DMEM 高糖培养中, 于 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 恒温饱和湿度的培养箱中培养, 贴壁细胞用 0.25% 胰酶消化。

脂肪酸合酶(FAS): 由中国科学院大学生命科学院酶学课题组从新鲜鸡肝中分离提纯, 其制备和储存采用 Tian 报道的方法<sup>[15]</sup>。

### 1.3 仪器与设备

真空冷冻干燥仪(美国 LABCONCO);旋转蒸发器(日本东京理化 EYELA N-1000);超声波清洗器(昆山超声波仪器有限公司 KQ-500);无菌操作台(哈尔滨东联电子技术公司 BCN-1360);二氧化碳培养箱(上海力康 HF90);倒置显微镜(德国莱卡 DM 500ICC50 HD);多功能读板机(美国分子仪器 M5);细胞计数器(美国 Invitrogen)。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 植物样品制备

植物样品经自然阴干后粉碎过筛,准确称取样品 100 g,依次用 95%、80%、70% 乙醇按料液比 1:20 浸提 24 h,合并提取液,于 50 °C 减压浓缩得植物样品提取物浸膏,冷冻干燥、置于棕色样品瓶密封保存于 -20 °C,待用。

植物提取物用少量纯水溶解,按样品:萃取相 = 1:3,依次用石油醚萃取、乙酸乙酯、正丁醇萃取,重复 3 次,合并萃取液。减压蒸馏,冷冻干燥,得到不同溶剂部位样品,待用。

#### 1.4.2 细胞活力测定

MDA-MB-231 用 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基、100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素在 37 °C 二氧化碳饱和湿度培养箱中培养。体外对肿瘤细胞毒力测量采用 CCK-8 法。取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞制成浓度为  $5 \times 10^4$  个/mL 的细胞悬液,接种于 96 孔板中。每孔体积为 200  $\mu$ L,生化培养箱培养 24 h。待细胞贴壁后,吸去培养基,加入不含血清的培养基配置的药液 200  $\mu$ L,继续培养 12 h 后,吸去药液,每孔加入含 10% 的 CCK-8 的培养基 100  $\mu$ L,继续孵化 4 h,多功能读板机 450 nm 下测定各孔吸光度值(A)。每组设 4 个复孔,同时设置空白组(加入不含药物的培养基)和对照组(以白藜芦醇替代植物提取物)。

计算肿瘤细胞增殖抑制率 =  $(A_{\text{空白组}} - A_{\text{给药孔}}) \div A_{\text{对照孔}} \times 100\%$

筛选出植物不同溶剂萃取部位的实验,分别按 0、10、20、40、60、80、100 mg/L 浓度进行暴露。

#### 1.4.3 FAS 抑制活性测定

FAS 活性测定采用分光光度法,以 5  $\mu$ mol/L 乙酰辅酶 A,10  $\mu$ mol/L 丙二酸单酰辅酶 A,35  $\mu$ mol/L NADPH 为底物,在含有 1 mmol/L EDTA,1 mmol/L DTT,100 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$  缓冲液(pH =

7.0)中 37 °C 下温育,加入 15 ~ 20  $\mu$ g FAS 启动反应,监测 340 nm 波长处光密度变化,反应中 NADPH 氧化为 NADP<sup>+</sup>,摩尔消光系数为  $6.02 \times 10^3$ ,由初速度得到酶反应速度计算 FAS 的酶活性,反应总体积为 2 mL。

配制浓度 100 mg/L 植物提取物溶液,加入测活体系中,再加入 FAS 启动反应,测定酶的活性为 A,以空白溶剂测得结果  $A_0$  为对照。 $A/A_0$  为反应后的剩余活性, $(1-A/A_0) \times 100\%$  为抑制率 I。此抑制是抑制剂和酶的非共价快速结合的结果,通常为可逆抑制。

#### 1.4.4 统计学处理

所有样品平行实验 4 次,实验结果用  $X \pm s$  表示,采用邓肯氏新复极差检验法(DMRT 法)进行多重比较。所有  $\text{IC}_{50}$  均是由 Origin 软件按照抑制率对浓度 Logit 作图拟合求出。

## 2 结果与讨论

### 2.1 植物提取物对 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞增殖抑制作用

利用 CCK-8 法对 37 种植物醇提取物进行体外抗肿瘤活性筛选,结果如表 1 显示:在终浓度为 1000 mg/L 时,大多数植物提取物对 MDA-MB-231 均表现出明显的抑制活性。通过 DMRT 法进行多重分析比较,显示糙叶树、南五味子、大血藤、飞燕草、律草、黄杜鹃、黄山栾、络石、白屈菜、山胡椒对 MDA-MB-231 的抑制率作用与阳性对照白藜芦醇在浓度为 1000 mg/L 下对 MDA-MB-231 抑制作用差异不显著,具有显著的抑制活性,其抑制率分别为  $96.73 \pm 0.52\%$ 、 $93.86 \pm 0.65\%$ 、 $93.77 \pm 0.34\%$ 、 $93.37 \pm 0.10\%$ 、 $92.86 \pm 0.27\%$ 、 $92.29 \pm 0.33\%$ 、 $91.67 \pm 0.28\%$ 、 $91.20 \pm 0.13\%$ 、 $90.22 \pm 0.22\%$ 、 $89.50 \pm 0.43\%$ 。白藜芦醇在浓度为 1000 mg/L 时,对 MDA-MB-231 细胞抑制率为  $94.36 \pm 0.11\%$ 。

在终浓度为 100 mg/L 时,大多数提取物对 MDA-MB-231 的抑制活性普遍较弱,黄山栾和南五味子植物提取物抑制率较高,其抑制率分别  $76.68 \pm 0.16\%$ 、 $71.02 \pm 0.12\%$ 。白藜芦醇在浓度为 100 mg/L 下,对 MDA-MB-231 细胞抑制率为  $75.20 \pm 0.77\%$ 。通过 DMRT 法进行多重分析比较,显示黄山栾和南五味子对 MDA-MB-231 细胞的抑制作用与白藜芦醇抑制作用差异不显著,表明黄山栾和南

表 1 CCK8 法检测 37 种植物粗提物对 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )Table 1 The inhibitory effects of crude extracts from 37 kinds of plant extracts on MDA-MB-231 cells with CCK8 assay ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

序列 No.	样品名称 Sample name	提取率 Extraction rate(%)	抑制率 Inhibition rate(%)	
			100 mg/L	1000 mg/L
1	枸树	11.86	43.60 ± 0.75ef	60.78 ± 1.57jkl
2	络石	12.98	1.90 ± 0.77nop	91.20 ± 0.13ab
3	黄杜鹃	23.34	61.54 ± 0.35c	92.29 ± 0.33a
4	紫藤	10.21	-0.50 ± 0.38pq	26.60 ± 1.61q
5	白屈菜	16.86	43.54 ± 1.59ef	90.22 ± 0.22ab
6	苦豆子	12.88	5.69 ± 1.89no	60.66 ± 1.34jkl
7	夹竹桃	17.98	28.15 ± 3.01i	64.43 ± 0.39hij
8	糙叶树	25.39	62.70 ± 1.26c	96.73 ± 0.52a
9	大血藤	18.98	55.79 ± 1.71d	93.77 ± 0.34a
10	南五味子	21.92	71.02 ± 0.12b	93.86 ± 0.65a
11	钩吻	13.10	2.29 ± 1.01nop	58.00 ± 2.91lmn
12	黄山栾	27.12	76.68 ± 0.16a	91.67 ± 0.28a
13	白背叶	27.73	41.28 ± 0.66ef	68.80 ± 1.68gh
14	绿叶地锦	17.12	3.98 ± 2.97nop	55.23 ± 3.58mn
15	飞燕草	14.92	31.38 ± 2.85hi	93.37 ± 0.10a
16	石菖蒲	12.83	17.61 ± 1.35jk	59.52 ± 0.90lkm
17	芸实	16.92	41.70 ± 2.84ef	73.49 ± 0.61ef
18	乌柏	17.02	35.39 ± 3.85gh	54.75 ± 0.86n
19	杜英	28.93	22.92 ± 1.68j	53.81 ± 1.49no
20	美国凌霄	13.77	19.53 ± 1.69jk	63.08 ± 1.48ijk
21	水蓼	15.02	6.31 ± 1.68mn	79.56 ± 0.88cd
22	葎草	17.01	46.37 ± 0.46de	92.86 ± 0.27a
23	七叶树	17.82	-4.93 ± 1.12q	40.79 ± 1.60p
24	山玉兰	19.25	4.15 ± 4.75nop	42.78 ± 1.05p
25	扶芳藤	13.03	44.64 ± 1.02e	67.16 ± 1.61ghi
26	葛藤	14.92	28.45 ± 0.67i	69.49 ± 1.98fg
27	珍珠莲	21.21	11.27 ± 2.43lm	42.36 ± 3.33p
28	盐肤木	23.12	-1.62 ± 0.77pq	6.78 ± 2.86s
29	华东野核桃	25.92	1.90 ± 1.53nop	26.18 ± 2.68q
30	青檀	15.11	-1.52 ± 1.58pq	6.79 ± 0.84s
31	鸡矢藤	12.83	-0.69 ± 2.03pq	11.62 ± 1.17r
32	香花崖豆藤	13.21	18.10 ± 0.84jk	59.70 ± 1.70jklm
33	粉叶爬山虎	10.18	-1.26 ± 0.99pq	50.11 ± 1.97o
34	山胡椒	21.87	19.35 ± 2.12jk	89.50 ± 0.43ab
35	狭叶山胡椒	19.21	21.14 ± 2.41j	81.19 ± 0.50c
36	大果山胡椒	16.21	13.98 ± 1.03kl	76.02 ± 0.71de
37	豚草	13.98	-0.21 ± 0.24opq	63.60 ± 0.40ijk
阳性对照	白藜芦醇		75.20 ± 0.77ab	94.36 ± 0.11a

注:数值 = 平均值 ± 标准误 ( $n=4$ ), 采用邓肯氏新复极差检验法 (DMRT 法) 进行多重比较, 列中相同字母表示差异不显著, 检验的显著水平为  $P=0.05$ 。

Note: Values were mean ± S. E. ( $n=4$ ). Values in a line followed by same letters are not significantly different ( $P=0.05$ ) according to Duncan's Multiple comparison (DMRT).

五味子对MDA-MB-231具有显著的抑制活性;糙叶树、大血藤和黄杜鹃也具有突出的抑制活性,抑制率分别为 $62.70 \pm 1.26\%$ 、 $61.54 \pm 0.35\%$ 、 $55.79 \pm 1.71\%$ 。

由以上结果可知,黄山栾、南五味子、糙叶树、大血藤和黄杜鹃这5种植物可能含有抗肿瘤活性成分,值得进一步追踪研究。

## 2.2 不同溶剂萃取部位对MDA-MB-231抑制作用

CCK-8法继续研究黄山栾、南五味子、糙叶树、大血藤和黄杜鹃不同萃取部位对MDA-MB-231人乳腺癌细胞增殖抑制作用,结果如图1所示:糙叶树、南五味子、大血藤对MDA-MB-231细胞增殖均有一定抑制作用。石油醚和乙酸乙酯相抑制活性较

高, $IC_{50}$ 均小于 $50 \text{ mg/L}$ ,确定石油醚和乙酸乙酯萃取相为有效部位。其中抑制作用最强的部位分别为:糙叶树乙酸乙酯相, $IC_{50}$ 为 $21.07 \text{ mg/L}$ ;南五味子石油醚相, $IC_{50}$ 为 $29.63 \text{ mg/L}$ ;大血藤乙酸乙酯相, $IC_{50}$ 为 $23.01 \text{ mg/L}$ 。正丁醇和水相抑制作用较弱,在低浓度下还具有一定的营养作用;黄杜鹃和黄山栾不同部位均对MDA-MB-231具有较强抑制作用,不同部位对MDA-MB-231抑制作用强弱依次为:石油醚相>乙酸乙酯相>正丁醇相>水相,活性最强为石油醚相, $IC_{50}$ : $25.87 \text{ mg/L}$ ;黄山栾不同部位对MDA-MB-231抑制活性依次是:正丁醇相>乙酸乙酯相>石油醚相>水相,活性最强为正丁醇相, $IC_{50}$ : $19.93 \text{ mg/L}$ 。

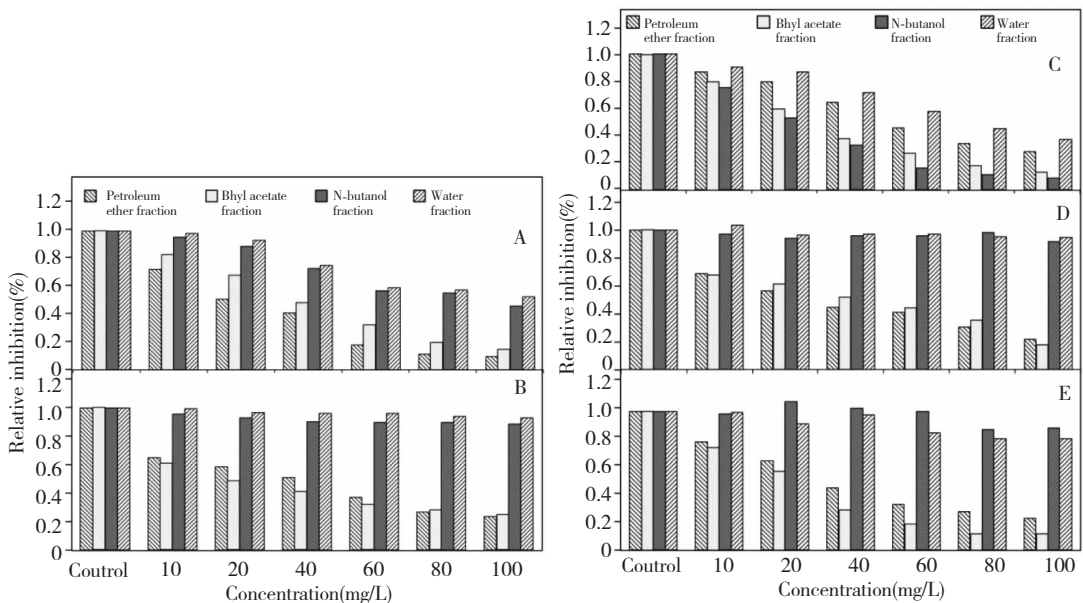


图1 黄杜鹃(A)、糙叶树(B)、黄山栾(C)、南五味子(D)及大血藤(E)的不同溶剂萃取部位对MDA-MB-231细胞增殖影响

Fig. 1 Effects of *R. molle* (A), *A. aspera* (B), *K. bipinnata* (C), *K. longipedunculata* (D) and *S. cuneata* (E) on cell proliferation of MDA-MB-231

图2是上述5种植物最强活性部位对MDA-MB-231人乳腺癌细胞的增殖抑制和形态学影响。1是对照组照片,可以看出对照组细胞生长良好,细胞正常贴壁生长,膜表面光滑,胞体较大;给药组(2-6)细胞形态变化明显,图2、5、6细胞数目明显减少,悬浮于培养液表面,图3、4细胞形态收缩变圆,这些都是典型的细胞凋亡状态。

从植物中寻找开发新型的抗肿瘤药物具广阔前景。由于植物源的药物结构的多样性,作用机制独特等特点,植物源抗肿瘤药物的筛选已是研究重点。

文中筛选出的高活性植物大血藤、南五味子和黄杜鹃为我国传统药用植物。有文献报道从大血藤提取分离出酚酸类<sup>[16]</sup>化合物和南五味子中分离木脂素和三萜类<sup>[17]</sup>化合物具有抗肿瘤活性;黄杜鹃植株各部位含有多种毒素,如闹羊花素II、III、麻醉木素、杜鹃花素等<sup>[18]</sup>,其中多数为四环二萜类化合物,被报道具有不同程度的神经麻痹作用。糙叶树、黄山栾一般为景观树种,对其化学成分和活性研究数据相对较少。国内外对这5种植物对MDA-MB-231人乳腺癌细胞的抑制活性均未见报道。实验通过筛选5

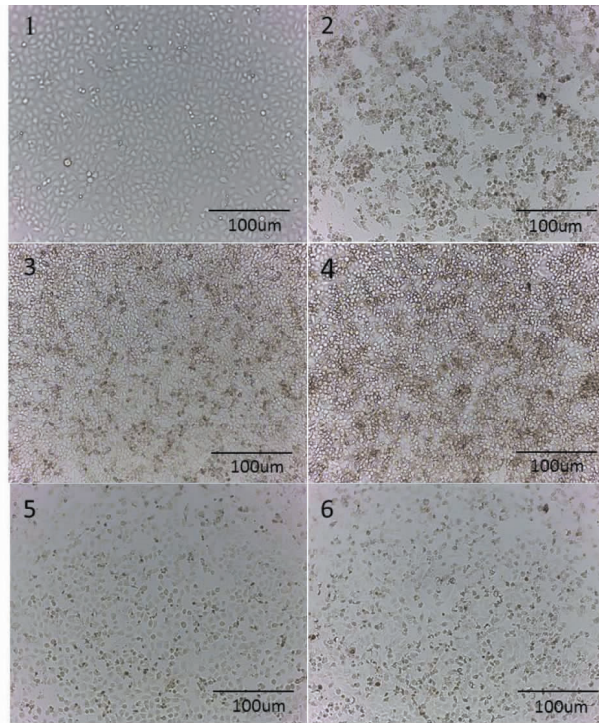


图2 倒置显微镜下对照组(1)及给药组(2-6)的细胞形态照片

Fig. 2 Cellular morphology of control(1) and drug treatment group(2-6)

注:(1)MDA-MB-231 孵育 DMSO(0.1%, 溶剂对照), 孵育时间为 12 h; (2~6) 依次为 MDA-MB-231 孵育黄杜鹃石油醚相、糙叶树乙酸乙酯相、黄山栾正丁醇相、南五味子乙酸乙酯相和大血藤乙酸乙酯相, 孵育时间为 12 h(100 mg/L)。

Notes:(1) MDA-MB-231 incubated with 0.1% DMSO(control) for 12h; (2~6) MDA-MB-231 incubated with petroleum ether fraction of *R. molle*, ethylacetate fraction of *A. aspera*, n-butanol fraction of *K. bipinnata*, ethylacetate fraction of *K. longipedunculata*, ethylacetate fraction of *S. cuneata* for 12 h(100 mg/L)

种植物不同萃取部位对人乳腺癌细胞的抑制作用, 筛选出有活性效部位, 其  $IC_{50}$  均  $< 30$  mg/L, 并且对 MDA-MB-231 抑制作用呈剂量依赖关系, 最高抑制率均达到 80% 以上, 被认为具有继续研究的价值<sup>[19]</sup>。糙叶树和大血藤的主要活性部位是乙酸乙酯相, 南五味子和黄杜鹃主要活性部位是石油醚相, 有效成分都为较弱极性部位, 其有效成分可能为萜类、挥发性油类物质等; 黄山栾的正丁醇相对 MDA-MB-231 在体外抑制作用最强, 有效活性成分极性相对较大, 可能为黄酮苷类、多糖类物质等, 这些需进一步研究。

### 2.3 不同溶剂萃取部位对 FAS 的抑制作用

大量文献报道, 对 FAS 具有抑制作用的植物提取物对肿瘤细胞都具有一定的抑制作用, 如 Ryu 等从丹参<sup>[20]</sup>根部粗提物中分离出 18 种活性成分, 他们对人肿瘤细胞卵巢癌、结肠癌等均有细胞毒作用。Shiow Y 等实验证实草莓提取物能够有效抑制人 A549 肺上皮癌细胞的增殖, 用草莓提取物预处理鼠

JB6 P + 表皮细胞, 可阻止 TPA 诱导的细胞恶性转化<sup>[21]</sup>。

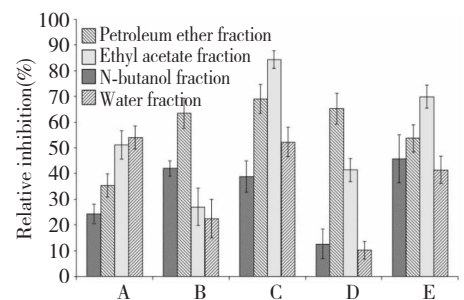


图3 黄杜鹃(A)、糙叶树(B)、黄山栾(C)、南五味子(D)及大血藤(E)不同溶剂萃取部位对 FAS 抑制活性的影响

Fig. 3 Effects of different extracts of *R. molle*(A), *A. aspera*(B), *K. bipinnata*(C), *K. longipedunculata*(D) and *S. cuneata*(E) on FAS inhibition

通过分光光度法测定 5 种植物不同溶剂萃取部位(浓度为 100 mg/L)对 FAS 的抑制作用, 结果如

图3所示,5种植物提取物不同溶剂部位对FAS都表现出了显著的抑制活性。黄山栾的高活性部位为乙酸乙酯相和正丁醇相。其中,正丁醇相对FAS抑制率最高,为84.32%,乙酸乙酯相抑制率为71.21%;南五味子和糙叶树的乙酸乙酯相、大血藤的正丁醇相也具有较高的活性,对FAS的抑制率分别为:66.78%、64.21%、68.45%;黄杜鹃的正丁醇相和水相对FAS也有一定的抑制作用,分别为:53.31%、50.01%。通过以上数据推断,以上各活性部位对FAS的抑制中浓度均 $<100\text{ mg/L}$ 。

黄山栾正丁醇相对FAS抑制活性显著,是所有提取物中活性最强的,这与上述的人乳腺癌细胞的筛选结果具有一定相关性。从以上的结果推断,黄山栾提取物可能存在某种成分或多种成分协同作用来抑制FAS活力从而诱导癌细胞凋亡。

### 3 结论

本研究从37种植物醇提取物中,筛选出11种对MDA-MB-231人乳腺癌细胞增殖具有抑制作用的植物(序号为:1、3、5、8、9、10、12、13、17、22、25),黄山栾、南五味子、糙叶树、大血藤和黄杜鹃5种植物提取物抑制活性显著。其中3号黄杜鹃、8号糙叶树、9号大血藤、10号南五味子、12号黄山栾均为首次报道对人乳腺癌细胞增殖具有抑制作用,在浓度为 $100\text{ mg/L}$ 时候,抑制率均 $>50\%$ ,表明这些植物中可能含有抗肿瘤的活性成分。通过利用不同溶剂萃取,继续追踪活性成分的有效部位,结果显示5种提取物不同溶剂部位抑制程度不同。糙叶树乙酸乙酯相、南五味子石油醚相、大血藤乙酸乙酯相,黄杜鹃石油醚相和黄山栾的正丁醇相抑制活性分别最高,确定其有效活性部位,其中黄山栾正丁醇对MDA-MB-231抑制活性最强, $IC_{50}$ 为 $19.93\text{ mg/L}$ 。

分别检测5种植物不同萃取部位对FAS抑制作用,实验结果显示,浓度为 $100\text{ mg/L}$ 下,不同溶剂部位对FAS均有明显的抑制作用,其中黄山栾正丁醇部位抑制作用最强,抑制率达到84.32%,这与上述细胞结果有一定的相关性。FAS是治疗癌症的潜在靶标,表明这些植物提取物中可能存在某些成分通过抑制FAS活力从而引其了MDA-MB-231细胞活力下降、凋亡。这为我们找寻新型靶标的抗肿瘤药物提供了一定依据,关于这些植物提取物有效成分的追踪的分离,以及是否是通过抑制FAS这一靶标来诱导人乳腺癌细胞凋亡,我们还将进一步的研

究工作来证明。已有的实验数据和结果,对我们天然植物开发利用以及研究出新型抗肿瘤药物具有重要意义。

### 参考文献

- 1 World cancer report 2014;International Agency for Research on Cancer,2014.
- 2 Zhang J(张靖),Yang L(杨柳),Gao WY(高文远). Advances in studies on natural antitumor drugs. *Chin Tradit Her Drugs*(中草药),2010,41:1014-1020.
- 3 Yin XL,Zhou JB,Jie CF,*et al.* Anticancer activity and mechanism of *Scutellariabarabata* extract on human lung cancer cell line A595. *Life Sci*,2004,75:2233-2244.
- 4 Slichenmyer WJ,Vonhoff DD. Taxol;a new and effective anticancer drug. *Anti-Cancer Drugs*,1991,2:519-530.
- 5 Venditto VJ,Simanek EE. Cancer therapies utilizing the camptothecins;a review of the *in vivo* literature. *Molecular Pharm*,2010,7:307-349.
- 6 Ma YP(马一平). Inhibition of vinorelbine on invasion and metastasis of breast cancer cell and its mechanism. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药),2013,44:1786-1792.
- 7 Asaduzzaman K(阿萨). Anticancer effects of resveratrol by regulating activities of antioxidant enzymes. Wuhan:Central South University(中南大学),PhD. 2013.
- 8 Xi WL(席文立),Shi JP(师俊萍),Zhang Y(章莹),*et al.* Synthesis of podophyllotoxinderivative and its *in vitro* antitumor activities. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2014,26:594-596.
- 9 Xie YF(谢艳方),Li J(李珺),Zou H(邹洪),*et al.* Screening of fatty acid synthase inhibitor from traditional Chinese medicine on antitumor. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2010,22:539-541.
- 10 Semenkovich CF,Coleman T,Groforth R. Physiologic concentrations of glucose regulate fatty acid synthase activity in HepG2 cells by mediating fatty acid synthase mRNA stability. *Biol Chem*,1993,268:6961-6970.
- 11 Menendez JA,Decker JP,Lupu R,*et al.* In support of fatty acid synthase (FAS) as a metabolic oncogene: extracellular acidosis acts in an epigenetic fashion activating FAS gene expression in cancer cells. *Cell Biochem*,2005,94(1):1-4.
- 12 Li XH(李向红),Hou YT(侯永泰). Fatty acid synthase: Specific target for cancer therapy. *Acta Biochim Biophys Sin*(生物化学与生物物理学报),2003,35(1):1-5.
- 13 Haase D,Schmidl S,Ewald C,*et al.* Fatty acid synthase as a novel target for meningioma therapy. *Neuro-Oncology*,2010,12:844-854.