

文章编号:1001-6880(2018)2-0294-06

裂果薯皂苷的特征图谱及总皂苷中有效组分的抗肿瘤活性研究

罗舜仁¹,邱汉琛²,陈燕燕¹,黄修影¹,廖智红¹,刘布鸣³,梁钢^{1*}¹广西医科大学药学院,南宁530021;²贺州市人民医院;³广西中药质量标准研究重点实验室,南宁530022

摘要:采用高效液相色谱紫外及蒸发光散射检测器建立裂果薯总皂苷(SFSP_{60%})的特征图谱,乙腈-水为流动相梯度洗脱,检测波长203 nm,柱温30 °C,流速1 mL/min,进样量10 μL。以ELSD色谱图中SFSP_{60%}色谱峰为参照,采用面积归一法计算出裂果薯皂苷I(SPHS I)相对百分比为84.28%,裂果薯皂苷II(SPHS II)为3.02%,化合物1为2.21%,化合物2为6.31%,化合物3为2.73%,化合物1~3可能是母核类似的皂苷类化合物。取对数生长期的人肝癌SMMC-7721细胞,给药组分别加入0、0.25、0.5、2.4 μg/mL的SFSP_{60%}、SPHS I、SPHS II和SPHS I+II(SPHS I和SPHS II各占比96.54%、3.46%)培养24 h、48 h、72 h,采用MTT法观察并计算细胞增殖抑制率和IC₅₀。结果显示给药组对SMMC-7721细胞的增殖抑制作用呈现时间与剂量依赖性(*P*均<0.05),且活性大小:SFSP_{60%}<SPHS I,SPHS II<SPHS I+II。证明在总皂苷中是SPHS I和SPHS II发挥主要抗肿瘤作用,且抗肿瘤作用是各组分共同作用的结果。为裂果薯中有效组分的抗肿瘤活性研究提供了参考以及有效组分的合理配比提供了新思路。

关键词:裂果薯;裂果薯总皂苷;裂果薯皂苷特征图谱;裂果薯皂苷I;裂果薯皂苷II;肿瘤细胞增殖

中图分类号:O657.7+2;R966

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.2.020

The Characteristic Spectra of Saponins of *Schizocapsa Plantaginea Hance* and the Antitumor Activity of Effective Components in the Total Saponins

LUO Shun-ren¹, QIU Han-chen², CHEN Yan-yan¹, HUANG Xiu-ying¹, LIAO Zhi-hong¹, LIU Bu-ming³, LIANG Gang^{1*}¹College of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; ²Hezhou People's Hospital;³Guangxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards, Nanning 530022, China

Abstract: The characteristic spectra of total saponins of *Schizocapsa plantaginea Hance* (SFSP_{60%}) were established by High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet and Evaporative Light Scattering Detector. Acetonitrile-water mobile phase gradient Elution. The detection wavelength was 203 nm, the column temperature was 30 °C and the flow rate was 1 mL/min. Sample volume 10 μL. Reference to the SFSP_{60%} chromatographic peaks in the ELSD chromatogram. Area normalization method is used to calculate saponin I of *Schizocapsa plantaginea Hance* (SPHS I) accounted for 84.28% (The relative percentage), the saponin II of *Schizocapsa plantaginea Hance* (SPHS II) was 3.02%, the compound 1 was 2.21%, the compound 2 was 6.31%, the compound 3 was 2.73%, Compounds 1-3 may be nucleosomal similar saponins. Take the logarithmic growth phase SMMC-7721 cells, cells in the administration group were added to 0, 0.25, 0.5, 2.4 μg/mL SFSP_{60%}, SPHS I, SPHS II and SPHS I + II (SPHS I and SPHS II accounted for 96.54%, 3.46%) for 24, 48, 72 h. MTT assay was used to detect the proliferation inhibition rate of SMMC-7721 cells in order to finally calculate its half inhibitory concentration (IC₅₀). The results showed that the inhibitory effect of the administration group on the proliferation of SMMC-7721 cells was in a time-and dose-dependent manner (all *P*<0.05), and the viability size was SFSP60%<SPHS I,SPHS II<SPHS I+II. It was proved that SPHS I and SPHS II play the main antitumor effect in total saponins, and the anti-tumor effect is the result of the interaction of each component.

收稿日期:2017-09-07 接受日期:2017-11-23

基金项目:国家自然科学基金(81460620);广西自然科学基金(2014GXNSFDA118025);广西中药质量标准研究重点实验室开放课题(201105)

*通信作者 Tel:86-018977161522;E-mail:lianggang22@aliyun.com

Which provided a reference for the study of the viability of effective components in *Schizocapsa plantaginea Hance* and a new idea for the rational allocation of effective components.

Key words: *Schizocapsa plantaginea Hance*; total saponins

of *Schizocapsa plantaginea* Hance; characteristics of Saponins of *Schizocapsa plantaginea* Hance;SPHS I ;SPHS II ;tumor cell proliferation

裂果薯,拉丁名为 *Schizocapsa plantaginea* (Hance) Drenth,别名水田七、届头鸡及水萝卜等,为蒟蒻薯科植物,裂果薯作为一种广西特色中草药,也属壮、瑶药,在广西产量丰富,已有一定种植规模,药材价廉易得,根茎入药,具有清热解毒,消肿止痛,收敛止血等功效。本课题组选择性地对 29 种广西民间抗肿瘤中草药提取物和含药血清进行了筛选,从中发现百合纲百合亚纲百合目蒟蒻薯科裂果薯属植物裂果薯醇提物和皂苷成分具有明显抑制人肝癌细胞和鼻咽癌细胞增殖的作用^[1,2],对人肝癌裸鼠移植瘤与血管生成也有抑制作用^[3]。

中药 HPLC 色谱图能够全面反映中药所含物质成分,是一种切实可行且为国内外广泛接受的质量评价模式。但单纯的色谱图无法反映各成分与药效关系。谱效关系的研究就是用统计学方法分析 HPLC 色谱图数据与药效、毒效数据,明确各成分与药效、毒效的相关性以及贡献大小,有利于更准确反映中药内在质量^[4,5]。中药成分的差异与药效的不同是有关联的^[6],需要进一步分析谱效关系,明确各色谱峰与药效的关系。目前国内外仍未见有关裂果薯总皂苷有效组分特征图谱的研究报道,本课题组经裂果薯成分追踪确定了其皂苷组分具有明显抗肿瘤作用,并建立了提取分离裂果薯总皂苷及其两种主要单体成分的方法,为此,本研究拟开展裂果薯总皂苷的特征性图谱测定,并分析了其中各组分的配比关系,探究总皂苷中发挥抗肿瘤作用的主要有效组分及它们发挥抗肿瘤活性的最优比例,为后继的研究提供参考,也为天然中药复方及新药的研发开拓新的思路。

1 仪器与实验材料

1.1 仪器

Waters1525-2707-2489-2424 高效液相色谱仪,包括二元泵,自动进样器,柱温箱,2489 紫外检测器,2424 蒸发光散射检测器; Agilent 5 TC-C₁₈ 色谱柱 (250 × 4.6 mm, 5 μm); 电子天平 (XS205):瑞士梅特勒-托利多公司;数显恒温水浴锅 (HH-4):国华电器有限公司;超声波清洗器 (KQ5200B):昆山市超声仪器有限公司。

1.2 实验材料

甲醇(赛默飞世尔科技有限公司,色谱纯);乙

腈(赛默飞世尔科技有限公司,色谱纯);水(屈臣氏蒸馏水);氮气(广西瑞达化工科技有限公司,浓度 99.9%);0.45 μm 微孔滤膜。裂果薯块茎购自广西壮族自治区资源县瓜里乡,由广西壮族自治区中医药研究院黄云峰教授鉴定为 *Schizocapsa plantaginea* Hance。SMMC-7721 细胞购自中国科学院上海细胞库。DMEM 高糖培养基、胎牛血清和胰蛋白酶购自 Cyclone 公司。MTT 购自 AM-RESCO 公司。

2 实验方法

2.1 SFSP、SPHS I 和 SPHS II 的提取和分离

80% 乙醇常压提取裂果薯块茎,醇提物含量为 85.31%,石油醚、乙酸乙酯、正丁醇依次萃取醇提物,正丁醇萃取部位经 D101 大孔吸附树脂富集皂苷,50%~95% 的乙醇梯度洗脱;60% 乙醇组分用硅胶柱,经氯仿-甲醇-水(8:1:0.05,6:1:0.05,4:1:0.05)梯度洗脱,收集合并洗脱液,多次纯化,再经氯仿-甲醇(1:1) Sephadex LH-20 柱洗脱,多次纯化后得到裂果薯甾体皂苷化合物 SPHS I 和 SPHS II。

2.2 裂果薯总皂苷的 HPLC 特征图谱分析

2.2.1 SPHS I 、SPHS II 和 SPHS I + II 溶液的制备

精密称取单体 SPHS I 、SPHS II 和 SPHS I + II ,分别配置成 1.42 mg/mL 溶液,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备

精密称取 2.1 项下所得的 SFSP_{60%} 10 mg,置于 5 mL 量瓶中用甲醇溶解、定容,并用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

2.2.3 色谱条件

色谱柱:Agilent 5 TC-C₁₈ (250 × 4.6 mm, 5 um);流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱程序:0~15 min,30%~48% A;15~30 min,48%~52% A;30~40 min,52%~55%;40~45 min,55% A,流速:1 mL/min,柱温:30 °C,检测器:紫外检测器/蒸发光散射检测器,检测波长:203 nm,进样量 10 μL,氮气压力 2.5 × 10⁵ Pa,增益 300,漂移管温度 70 °C,气体压力 25 psi,气体流速 2.12 slpm。

2.3 SFSP_{60%} 、SPHS I 、SPHS II 和 SPHS I + II 对 SMMC-7721 细胞增殖的影响观察

取处在对数生长期的 SMMC-7721 细胞以 1 ×

10^5 个 /mL 为密度接种于 96 孔板中, 设立空白对照组和不同浓度给药组, 且空白对照和不同浓度给药组每组设立 4 个平行孔。培养箱中培养 24 h 后弃去培养液, 给药组分别加入含有 0.625、1.25、2.5、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SFSP_{60%}, 0.25、0.5、2、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SPHS I、SPHS II 和 SPHS I + II (以 96.54% SPHS I 和 3.46% SPHS II 配置成的混合溶液) 的培养液 200 μL , 对照组不加药物。分别孵育 24、48、72 h 后移除培养液, 加入 200 μL 含 0.5 mg/mL 的 MTT 的 DMEM 培养液孵育 4 h。4 h 后弃去培养液, 每孔加入 DMSO 100 μL , 在 15 min 内用酶标仪在 490 nm 波长处测吸光度, 并计算细胞增殖抑制率。使用 SPSS 软件进行回归分析计算 IC₅₀。

3 实验结果

3.1 SFSP_{60%} 的提取分离及 SPHS I、SPHS II 的分子结构

裂果薯块茎醇提物正丁醇萃取部位经 D101 大孔吸附树脂用乙醇梯度洗脱后即得到 SFSP, 由于本实验使用的是 60% 乙醇洗脱的组分, 即之后称其为 SFSP_{60%}; 硅胶柱和 Sephadex LH-20 柱对 60% 乙醇组分进行分离纯化, 得到 SPHS I 和 SPHS II, 采用 NMR 技术进行结构鉴定, 其中裂果薯皂苷 I 与文献中 Yokosuka A^[7] 等人研究一致, 其结构为:

(25S)-spirost-5-en-3 β -yl- O - α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- O -[O - β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucopyranoside, 分子式为: C₅₁H₈₂O₂₁, 在此简称 SPHS I, 其分子结构式见图 1。

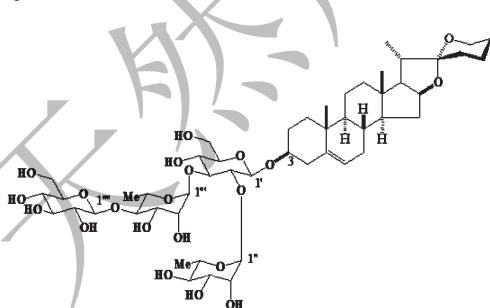


图 1 SPHS I 分子结构式

Fig. 1 The molecular structure of taccacoside I

裂果薯皂苷 II 与文献中邱芳龙^[8] 等人研究一致, 其结构为:

Yamogenin 3- O -[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]-

[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranoside, 分子式: C₄₅H₇₂O₁₆, 在此简称 SPHS II, 其分子结构式见图 2。

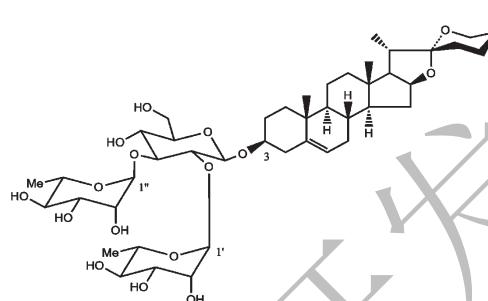


图 2 SPHS II 分子结构式

Fig. 2 The molecular structure of taccacoside II

3.2 特征图谱方法学考察

3.2.1 精密度考察

取同一供试品溶液, 按 2.2.3 项下色谱条件连续进样 6 次, 测得色谱峰面积和保留时间的 RSD 均小于 2%, 表明仪器精密度良好。

3.2.2 重复性考察

取同一批样品 6 份, 精密称定, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.3 项下色谱条件分别进样测定, 色谱峰面积和保留时间的 RSD 均小于 2%, 表明方法的重现性良好。

3.2.3 稳定性考察

取同一供试品溶液, 室温放置, 按 2.2.3 项下色谱条件分别于 0、4、8、12、24、48 h 进样, 测定色谱峰面积和保留时间的 RSD 均小于 2%, 结果表明, 供试品在 48 h 内稳定性良好。

3.3 裂果薯的特征图谱分析

如图 3 所示, 试验条件下, 裂果薯总皂苷 SFSP_{60%} 蒸发光散射检测器色谱图在 0~30 min 出现了 5 个明显的特征峰, 表明在 SFSP_{60%} 中至少存在 5 种化合物, 经与单体的对照, 我们确定了其中的 2 个特征峰, 分别为 SPHS I 和 SPHS II, 其纯度均大于 95%, 由于 ELSD 对皂苷类成分的高灵敏度, 并且在相同的色谱条件下能在同一个色谱图出峰, 所以化合物 1~3 可能也是与 SPHS I 和 SPHS II 母核类似的皂苷类化合物。根据面积法, 计算出 SPHS I 和 SPHS II 在 SFSP_{60%} 中相对百分比为 84.28% 和 3.02%, 化合物 1 为 2.21%, 化合物 2 为 6.31%, 化合物 3 为 2.73%。本课题组在研究中发现 SFSP_{60%} 对肝癌有明显的增殖抑制作用, 但是无法明确是哪

些组分发挥主要的作用。假设在 SFSP_{60%} 中只含有 SPHS I 和 SPHS II, 计算得出它们所占相对百分比为 96.54% 和 3.46%, 以此比例配制成的药液为 SFSP I + II, 用于进行接下来的药物抗肿瘤活性研究。

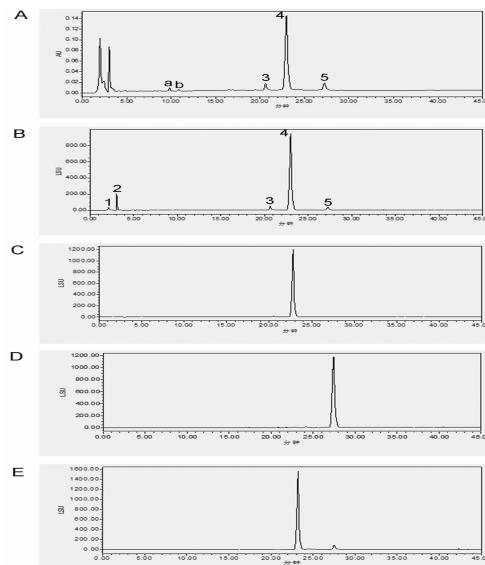


图 3 SFSP_{60%} 的紫外高效液相色谱图 (A) 及 SFSP_{60%} (B)、SPHS I (C)、SPHS II (D) 和 SFSP I + II (E) 的 ELSD 高效液相色谱图

Fig. 3 SFSP_{60%} UV High Performance Liquid Chromatography (A) and SFSP_{60%} (B), SPHS I (C), SPHS II (D) and SFSP I + II (E) ELSD High Performance Liquid Chromatography

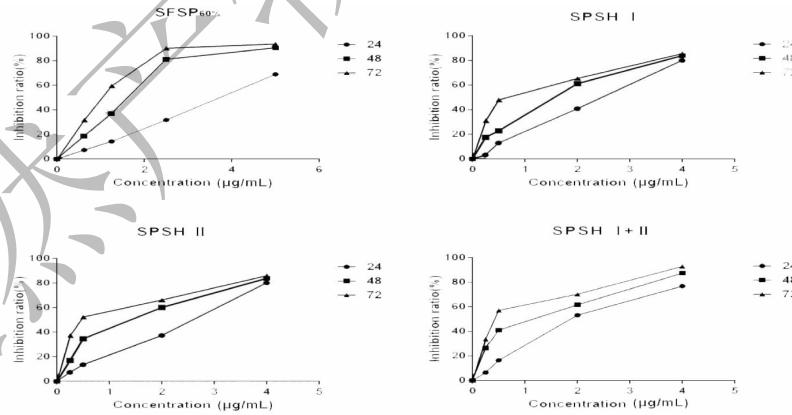


图 4 SFSP_{60%}、SPHS I、SPHS II 及 SFSP I + II 对人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖的影响

Fig. 4 Effects of SFSP_{60%}, SPHS I, SPHS II and SFSP I + II on the proliferation of human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells

寻求肝癌新的治疗方法和药物具有十分重要意义。本课题组选择性地对 29 种广西民间抗肿瘤中草药提取物和含药血清进行了筛选, 从中首次发现裂果薯的醇提物和皂苷成分具有明显抑制人肝癌细胞增

3.4 SFSP_{60%}、SPHS I、SPHS II 和 SFSP I + II 对 SMMC-7721 细胞增殖的影响

0.625、1.25、2.5、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 SFSP_{60%}，0.25、0.5、2、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 SPHS I、SPHS II 和 SFSP I + II 作用于 SMMC-7721 细胞 24、48、72 h 后, 细胞增殖受到不同程度的抑制, SFSP_{60%}、SPHS I、SPHS II 及 SFSP I + II 对 SMMC-7721 细胞的增殖抑制作用呈现时间与剂量依赖性 (P 均 < 0.05)。详见图 4。SFSP_{60%} (含量: 98.55%) 在 24、48、72 h 时的 IC_{50} 值分别为 3.75、1.56、0.95 $\mu\text{g}/\text{mL}$, SPHS I (纯度: 96.91%) 在 24、48、72 h 时的 IC_{50} 值分别为 2.048、1.193、0.632 $\mu\text{g}/\text{mL}$, SPHS II (纯度: 98.07%) 在 24、48、72 h 时的 IC_{50} 值分别为 1.941、1.054、0.499 $\mu\text{g}/\text{mL}$, SFSP I + II 在 24、48、72 h 时的 IC_{50} 值分别为 1.728、0.799、0.470 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。以纯度为 100% 作标准, 将 SPHS I 和 SPHS II 进行折算后, SPHS I 相对 IC_{50} 值为 1.985、1.156、0.613 $\mu\text{g}/\text{mL}$, SPHS II 相对 IC_{50} 值为 1.903、1.034、0.489 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

4 讨论

肝癌是全球常见的恶性肿瘤之一, 每年全球肝细胞癌的发病率占总癌症发病率的第 5 位, 而死亡率仅次于肺癌、胃癌排第 3 位。在我国广西、广东等肝癌高发区肝癌死亡率超过总癌症死亡率 50% 以上, 严重危害劳动人民的健康与生命安全。因此,

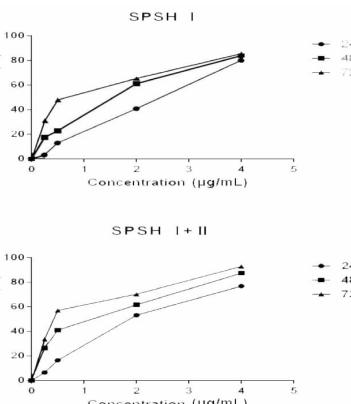


图 4 SFSP_{60%}、SPHS I、SPHS II 及 SFSP I + II 对人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖的影响

殖和血管生长的作用, 因此本研究选择人 SMMC-7721 细胞来进行药物的抗肿瘤活性研究。本研究将不同浓度的 SFSP_{60%}、SPHS I、SPHS II 和 SFSP I + II 作用于 SMMC-7721 细胞, 发现 SMMC-7721 细

胞增殖抑制率升高,且呈剂量、时间依赖性,表明 SFSP_{60%}、SPHS I、SPHS II 和 SPHS I + II 均能抑制 SMMC-7721 细胞的增殖,但其具体机制有待进一步探索。

目前,测定皂苷类的方法有很多^[9,10],但因其含有共轭键,所以使用紫外检测器在 $\lambda = 203$ nm 检测时,皂苷类成分在此波长下为末端吸收,且吸收较差,梯度洗脱时受流动相影响很大,基线不稳定,如人参、重楼皂苷等^[11,12],人参皂苷为三萜皂苷,相对受干扰程度较低,而对重楼皂苷等甾体皂苷影响较大,灵敏度较低,溶剂峰较大且基线有漂移。本研究使用了紫外检测和蒸发光散射检测两种检测器,如图 3 所示,对比可见蒸发光散射检测器不受外部环境干扰,流动相在检测器中蒸发,不干扰检测,且对皂苷成分灵敏度高,吸收好。

目前国内外仍未见有裂果薯总皂苷指纹图谱或特征图谱的研究报道,本研究建立了裂果薯大孔吸附树脂 60% 组分总皂苷的特征图谱,为今后裂果薯总皂苷指纹图谱的研究提供了条件参考;除此之外,目前针对新靶点、提高选择性和针对常见实体瘤,寻找新型的化学结构和新作用机制的药物研究是新趋势,从课题组前期的研究中发现裂果薯醇提物即总皂苷在体内既能抑制人肝癌细胞生长又能抑制瘤组织血管生成^[3],在体外也有一样的作用^[1,2],且特征图谱中也可看到有 5 个共有峰的存在,其中除了分离提纯的 SPHS I 和 SPHS II,提示我们在总皂苷中还可能存在着能够抗实体肿瘤的单体药物,同时该总皂苷特征性图谱和组分图谱的谱效关系比较分析,也有助于我们确定和发现具有明显抗肿瘤作用的裂果薯皂苷组分的成分组成和比例,为以裂果薯皂苷组分作为抗肿瘤新药研发提供了实验依据。

上述结果显示,SFSP_{60%} 在 24、48、72 h 的 IC₅₀ 为 3.75、1.56、0.95 $\mu\text{g}/\text{mL}$,SPHS I 和 SPHS II 的相对 IC₅₀ 分别为 1.985、1.156、0.613 和 1.903、1.034、0.489 $\mu\text{g}/\text{mL}$,可以看出 SPHS I 和 SPHS II 的活性大于 SFSP_{60%} 且约为其 0.5 倍,表明皂苷的活性在提纯之后会比总皂苷更好;虽然在提取分离过程或者液相色谱图中,SPHS I 的含量都远远大于 SPHS II,但是他们的活性相差不大,可见在药物中占比的大小不一定会影响药物的活性;除此之外,在滇重楼皂苷^[13]中,皂苷元 C-3 位连接糖链时,糖的数目及种类、连接方式及组成类型都可能对抗肿瘤活性产生影响。乌骨藤皂苷^[14] II 比 I 多了一个葡萄糖,因此对荷人宫颈腺癌裸鼠的抑瘤率产生较大的差别。而

SPHS II 可能是因为比 SPHS I 糖链中少了一个葡萄糖,所以体外抗肿瘤活性相对较大。

池婕^[6]等人用高效液相色谱法建立了雷公藤制剂的指纹图谱并分析了其谱效关系,在色谱图中,发现 11 个共有峰所代表的化学成分均对小鼠脾淋巴细胞增殖有抑制作用,证明雷公藤的药效是多成分协同起效的结果。而本研究中 SPHS I + II 在 24、48、72 h 的 IC₅₀ 为 1.728、0.799、0.470 $\mu\text{g}/\text{mL}$,其活性约为 SFSP_{60%} 的 1 倍且大于 SPHS I 和 SPHS II,表明在 SFSP_{60%} 中也许其余的组分对药物的活性没有增强的作用,可能还会减弱药物的整体活性,对比之下,本研究发现天然药物的有效组分多成分共同作用不一定是协同作用,组分之间也可能存在拮抗作用,从而导致 SPHS I + II 抗肿瘤活性明显大于裂果薯总皂苷且优于单体。除此之外,研究还发现在 SFSP_{60%} 中是 SPHS I 和 SPHS II 发挥着主要的作用,而且 SPHS I 和 SPHS II 以特定的比例配比能发挥协同作用,增强药效,也为天然药物有效组分的合理配比提供新的思路。

参考文献

- 1 Sun YW (孙悦文). Targeted screening anti-cancer from herbal medicine in Guangxi and the isolation and anti cancer research of steroidal saponins from Schizocapsa Plantaginea Hance [D]. Guangxi Medical University, 2013.
- 2 Wang JN (王金妮). Screening and research selective anti-hepatoma drugs from the traditional Chuang and Yao medicine in Guangxi by tyrosine kinase, angiogenesis as antitumor drug targets [D]. Guangxi Medical University, 2012.
- 3 Ou MC (欧明春), Sun YW (孙悦文), Liu BM (刘布鸣), et al. Effects of ethanol extract from Schizocapsa plantaginea on growth the angiogenesis of Human hepatocellular carcinoma xenografts in Nude Mice [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2015, (08): 106-110.
- 4 Deng SH (邓书鸿), Nie L (聂磊). Research progress of analytical methods and data processing techniques of spectral effects in traditional Chinese medicine [J]. Chin Med Mat (中药材), 2010, (11): 1819-1823.
- 5 Qin KM (秦昆明), Zheng LJ (郑礼娟), Shen BJ (沈保家), et al. Application of spectrum-effect relationship in Chinese medicine research and related thinking [J]. Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2013, 38 (1): 26-31.
- 6 Chi J (池婕), Lin B (林兵), Liu ZH (刘志宏), et al. Fingerprint and spectrum-effect relationships on Tripterygium glycosides preparation [J]. Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2015, (08): 1479-1483.