

土荆芥种子总黄酮提取条件的优化和抗肿瘤活性评价

郝俊玫,王亚男*,钱瑞华,李海赢,武靖松,马丹炜

四川师范大学生命科学学院,成都 610101

摘要:为优化土荆芥种子总黄酮提取条件并评价其抗肿瘤活性。选用不同极性有机溶剂石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和蒸馏水单独或依次为溶剂,采用微波-超声波辅助法提取土荆芥种子总黄酮,得到7种提取物;HPLC法测定提取物中槲皮素和山奈酚的含量,结果显示,石油醚-乙酸乙酯-正丁醇提取物(S6)中总黄酮含量最高为96.39 mg/g;乙酸乙酯提取物(S2)中槲皮素含量最高为0.602 mg/g,S6中山奈酚含量最高为0.479 mg/g;MTT法评价其抗肿瘤活性,结果显示7种提取物对6种细胞的增殖均有不同程度的抑制作用($P < 0.05$),对人正常肝细胞L02的抑制效果最低,其中S6的抗肿瘤活性最佳,对SMMC-7721细胞的 IC_{50} 值为0.43 mg/mL,仅为L02细胞的14.98%;S6可诱导SMMC-7721细胞形态结构发生改变,细胞骨架重组。实验表明石油醚-乙酸乙酯-正丁醇提取物的总黄酮含量最高,溶解性最好,且抗肿瘤活性最强。

关键词:土荆芥;黄酮;提取条件;不同溶剂;抗肿瘤

中图分类号:TQ28;R284

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)2-0200-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.2.004

Extraction conditions optimization and antitumor activity evaluation of total flavonoids from seeds of *Chenopodium ambrosioides*

HAO Jun-mei, WANG Ya-nan*, QIAN Rui-hua, LI Hai-ying, WU Jing-song, MA Dan-wei

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

Abstract: To optimize the extraction conditions of total flavonoids from seeds of *Chenopodium ambrosioides* and evaluate its anti-tumor activity. Different polar organic solvents such as petroleum ether, ethyl acetate, n-butanol and distilled water were used as solvents alone or in sequence, 7 extracts from seeds of *C. ambrosioides* were extracted by microwave-ultrasonic. The content of quercetin and kaempferol in 7 extracts were determined by HPLC. MTT method was used to evaluate their antitumor activity. Petroleum ether-ethyl acetate-n-butanol extract (S6) had the highest total flavonoid content of 96.39 mg/g among the 7 extracts. The HPLC results showed that the highest content of quercetin was 0.602 mg/g when ethyl acetate (S2) was used as the solvent. However, when petroleum ether-ethyl acetate-n-butanol (S6) was used as the extraction agent, the highest content of kaempferol was 0.479 mg/g. The MTT results showed 7 extracts had varying degrees of inhibitory effect on the proliferation of six kinds of cells ($P < 0.05$) and the lowest inhibitory effect on normal human liver cells L02. S6 had the best anti-tumor activity among them, and the IC_{50} value of it on SMMC-7721 cells was 0.43 mg/mL, only 14.98% of the L02 cells; S6 can induce morphological changes and cytoskeletal reorganization of SMMC-7721 cells. In conclusion, extract (S6) using petroleum ether-ethyl acetate-n-butanol from seeds of *Chenopodium ambrosioides* has the highest content of total flavonoids, the best solubility, and the strongest anti-tumor activity.

Key words: *Chenopodium ambrosioides*; flavone; extraction condition; different solvents; anti-tumor

土荆芥 (*C. ambrosioides*) 为藜科一年或多年生草本植物^[1], 广泛分布于世界温带至热带地区, 在

我国南方和北方的大部分地区均有分布^[2]。土荆芥全株含有丰富的挥发油、黄酮、生物碱等, 具有抗菌、抑虫、抗肿瘤和抗氧化等功效^[3,4]。在抗肿瘤方面, 土荆芥叶醇提物可抑制腹腔内艾氏固体瘤和腹水瘤的形成, 显著提高荷瘤小鼠存活率^[5]; 全株醇提物可抑制 MCF-7 细胞增殖^[6]; 在土荆芥的不同器

收稿日期:2019-09-02 接受日期:2020-01-16

基金项目:四川省教育厅重点项目(16ZA0056)

* 通信作者 Tel:86-28-84480656; E-mail yanan_w@163.com

官中,所含黄酮类物质成分差异较大,从种子中提取的次生代谢产物含量高于根和茎^[7,8]。

在植物次生代谢物质的提取方面,提取溶剂对提取物的成分影响较大,对其抗肿瘤活性方面影响也较大。Zeng 等^[9]研究长根静灰球不同溶剂提取物的体外抗肿瘤作用,发现正丁醇提取物对 MDA-MB-231 细胞活力有较明显的抑制作用;不同溶剂海芋提取物抗肿瘤效果也不尽相同,乙酸乙酯和丙酮提取物有较好的细胞毒活性,而海芋的环己烷、石油醚、乙醇和水提取物对各种细胞株的 IC₅₀ 剂量都比较大^[10]。有关不同溶剂对土荆芥提取物成分及其抗肿瘤活性成分的影响报道较少,本研究选用不同极性有机溶剂石油醚、乙酸乙酯、正丁醇以及蒸馏水单独或依次为溶剂,采用微波超声波组合合成/萃取仪提取四川产土荆芥种子总黄酮,采用 HPLC 法测定其槲皮素和山奈酚的含量,MTT 法评价其抗肿瘤活性,以期筛选土荆芥种子总黄酮最佳提取条件,为四川产土荆芥作为潜在抗肿瘤药物的开发利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

土荆芥于 2016 年 9 月下旬在四川省成都市净居寺的废弃荒地采集,经四川师范大学生命科学学

院马丹炜教授鉴定为藜科藜属植物土荆芥(*C. ambrosioides*)。将采集的土荆芥植株置于阴凉通风处,晒干后收集其种子,磨碎放于密封袋中备用。

人正常肝 L02 细胞、人宫颈癌 Hela 细胞、人肝癌 HepG2、Hep3b 细胞、SMMC-7721 和人结肠癌 HT29 细胞均由四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室提供。

1.2 仪器与试剂

祥鹤电脑微波超声波组合合成/萃取仪(北京祥鹤科技发展有限公司);Agilent Technologies 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司);

石油醚、乙酸乙酯、正丁醇(成都科龙化工试剂厂);槲皮素、山奈酚(西安天美生物科技公司);噻唑蓝(MTT, Biosharp 生物公司);5-氟尿嘧啶(中国食品药品检定研究院);鬼笔环肽(上海翊圣生物科技有限公司)。

1.3 土荆芥种子总黄酮的制备与纯化

称取 40 g 土荆芥种子,按料液比 1:6 加入溶剂,浸泡 1 h,微波为 300 Hz,超声波为 275 Hz,微波与超声波比例为 1:2。其它条件如表 1 所示,得到 S1 ~ S7 提取物。采用 D101 大孔吸附树脂纯化 S1 ~ S7 提取物,收集液再次用旋转蒸发仪减压蒸馏,并进行真空干燥。

表 1 土荆芥种子总黄酮提取方法

Table 1 Extraction methods of total flavonoids from *C. ambrosioides* seeds

组别 Group	溶剂 Solvent				提取条件 Extraction condition	
	石油醚 Petroleum ether	乙酸乙酯 Ethyl acetate	正丁醇 Butyl alcohol	蒸馏水 Distilled water	温度 Temperature(℃)	时间 Time(min)
S1	+	-	-	-	60	30
S2	-	+	-	-	77	60
S3	-	-	+	-	117	48
S4	-	-	-	+	100	30
S5	+	-	-	-	60	30
	-	+	-	-	77	60
S6	+	-	-	-	60	30
	-	+	-	-	77	60
S7	-	-	+	-	117	48
	+	-	-	-	60	30
	-	+	-	-	77	60
	-	-	+	-	117	48
	-	-	-	+	100	30

注: S1: 石油醚提取物; S2: 乙酸乙酯提取物; S3: 正丁醇提取物; S4: 蒸馏水提取物; S5: 石油醚-乙酸乙酯依次提取物; S6: 石油醚-乙酸乙酯-正丁醇依次提取物; S7: 石油醚-乙酸乙酯-正丁醇-蒸馏水依次提取物,下同;“+”使用该溶剂提取;“-”表示不使用该溶剂提取。

Note: S1: Petroleum ether extract; S2: Ethyl acetate extract; S3: Butyl alcohol extract; S4: Distilled water extract; S5: Petroleum ether-ethyl acetate sequential extract; S6: Petroleum ether-ethyl acetate-butyl alcohol sequential extract; S7: Petroleum ether-ethyl acetate-butyl alcohol-distilled water sequential extract.

1.4 土荆芥种子总黄酮含量测定

1.4.1 标准溶液制备和标准曲线的确定

按 Qian 等^[3]的方法配置标准溶液,按照紫外-可见分光光度法,在波长 510 nm 测定其吸光度。以吸光度为纵坐标(Y),浓度为横坐标(X),作标准曲线图。

1.4.2 样品总黄酮含量测定

分别称取纯化后的 S1 ~ S7 提取物各 0.2 g,配制浓度为 2 mg/mL 的母液。量取上述各样品母液 1

mL,同“1.4.1”中芦丁标准溶液的配制方法,按照紫外-可见分光光度法,在波长 510 nm 处测定其吸光度值,并根据线性回归方程计算各样品中总黄酮类物质含量^[3]。

1.5 土荆芥种子总黄酮中槲皮素和山奈酚含量测定

1.5.1 标准品溶液的配制和线性曲线的确定

以甲醇为溶剂,配制浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 的槲皮素标品母液和 300 $\mu\text{g/mL}$ 的山奈酚标品母液,备用。两种标品溶液的配制见表 2。

表 2 槲皮素和山奈酚标品溶液浓度

Table 2 Concentrations of quercetin and kaempferol standard solutions

样品 Sample	浓度 Concentration($\mu\text{g/mL}$)					
槲皮素 Quercetin	20	10	5	2.5	1.25	0.625
山奈酚 Kaempferol	60	30	15	7.5	3.75	1.875

将 0.1% 甲酸用抽滤泵经有机滤膜抽滤后放入超声波清洗仪中进行脱气,以相同的方法处理 100% 乙腈。然后分别用 0.1% 甲酸、100% 乙腈冲柱,流速为 3.00 mL/min,再用 100% 乙腈冲基线至平滑。

按以下色谱条件进样: C_{18} 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 进样量为 10 μL ; 柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$; 乙腈-0.1% 甲酸 (35: 65) 作为流动相,柱流量为 1.0 mL/min; 在波长为 360 nm 处进行检测。以峰面积为纵坐标(Y),对应浓度为横坐标(X),进行线性回归计算,得其回归方程^[11]。

1.5.2 样品总黄酮溶液的配制

分别称取纯化后的 S1 ~ S7 提取物,用溶液配制浓度为 200 mg/mL 的溶液。进样的色谱条件同“1.5.1”中槲皮素和山奈酚标准溶液的检测方法,在波长 360 nm 处测定其对应峰面积值,并根据线性回归方程计算各样品中槲皮素和山奈酚的物质含量^[12]。

1.6 细胞培养

L02、SMMC-7721、HepG2、Hep3b、Hela 和 HT29 细胞分别接种在加有 10% 新生牛血清的改良型 1640 培养基或 DMEM 培养基中,在 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养。取对数生长期细胞用于试验。

1.7 MTT 法检测细胞增殖

制备上述 6 株细胞的细胞悬液,以浓度 8×10^4 个/mL、每孔 100 μL 接种于 96 孔板中。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养过夜,每孔加 100 μL 新鲜培养基,按照表 3 加入 2 μL 不同浓度的土荆芥种子提取物溶液。各浓度重复 5 次,设置溶剂对照 (1% DMSO)、阴性对照和阳性对照 (80 $\mu\text{g/mL}$ 5-氟尿嘧啶)。共培养 24 h 后,加入 20 μL MTT 培养 4 h,除上清,加 150 μL DMSO。酶标仪检测 490 nm 波长处的吸光度 A 值,计算细胞增殖抑制率 (细胞增殖抑制率 = $[1 - A_{\text{处理组}} / A_{\text{溶剂对照}}] \times 100\%$)。

表 3 各样本处理浓度

Table 3 Processing concentrations of samples

样本 Sample	对照组 Control (%)	组 1 Group 1 (mg/mL)	组 2 Group 2 (mg/mL)	组 3 Group 3 (mg/mL)	组 4 Group 4 (mg/mL)	组 5 Group 5 (mg/mL)
S1	1	0.125	0.25	0.5	1	2
S2	1	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9
S3	1	0.2	0.4	0.6	0.8	1
S4	1	0.000 5	0.005	0.05	0.5	5
S5	1	0.125	0.25	0.5	1	2
S6	1	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9
S7	1	0.000 5	0.005	0.05	0.5	5

注:对照组:1% DMSO;S1 ~ S7 同表 1。

Note: Control: 1% DMSO; S1-S7 are the same as Table 1.

1.8 倒置显微镜观察细胞形态

制备浓度为 4×10^5 个/mL 的 SMMC-7721 细胞的细胞悬液,以每孔 1 mL 接种在 6 孔板上。5% CO_2 、37 °C 培养箱中培养过夜后,每孔加 1 mL 新鲜培养基,并加入 20 μL S6 溶液,使其终浓度分别为 0.1、0.3 和 0.7 mg/mL,并设置溶剂对照(1% DMSO)。培养 24 h 后,用倒置显微镜观察并拍照。

1.9 细胞集落形成试验

前期 SMMC-7721 细胞的培养和不同浓度 S6 溶液的处理方法同“1.8”,同时设置溶剂对照(1% DMSO)。各浓度的 S6 溶液作用 SMMC-7721 细胞后,孵育至明显观察到细胞集落,除上清,PBS 清洗,2.5% 戊二醛溶液固定 20 min,PBS 清洗 3 次,Giemsa 染液染色 30 min,PBS 清洗 6 孔板直至完全脱色后,倒置显微镜观察,并拍照。

1.10 荧光显微镜观察细胞骨架

SMMC-7721 细胞的培养和不同浓度 S6 溶液的处理方法同“1.8”,并设溶剂对照(1% DMSO)。各浓度的 S6 溶液作用 SMMC-7721 细胞 24 h 后,弃去培养基,用 PBS 清洗后,每孔加浓度为 1% 的 Triton X-100/M 缓冲液 1 mL,在 25 °C 下静置 20 min;弃去 Triton X-100/M 缓冲液,再次用 PBS 清洗 10 min,重复 3 次;2.5% 的戊二醛固定(4 °C,15 min),再次用 PBS 清洗 3 次;200 μM 鬼笔环肽染色 20 min,PBS 重复清洗 3 次后,使用荧光显微镜观察并拍照。

1.11 统计分析

采用 SPSS 20.0 处理数据,单因素 ANOVA 方差分析显著性差异($P < 0.05$),使用 Microsoft Excel 2003 和 GraphPad Prism 7.04 作图。

2 结果与分析

2.1 土荆芥种子提取物总黄酮提取率及含量测定

选用不同极性溶剂,采用微波超声波辅助萃取土荆芥种子总黄酮,D101 大孔吸附树脂纯化粗提取物,最后得率见表 4,S6 的提取率最高为 3.97%,S1 的提取率最低为 0.28%。黄酮的标准曲线见图 1,其回归线方程为 $Y = 0.0058X - 0.0004$, $R^2 = 0.9999$,线性范围为 0 ~ 50 $\mu\text{g/mL}$ 。S1 ~ S7 中总黄酮含量见表 4,S6 中总黄酮含量最高为 96.39 mg/g。

2.2 土荆芥种子总黄酮中槲皮素和山奈酚含量分析

采用高效液相色谱仪对梯度稀释后的不同浓度槲皮素和山奈酚标准品溶液进行分析,槲皮素和山奈酚标准曲线分别如图 2(A)和 2(B)所示,并根据浓

表 4 不同溶剂土荆芥种子总黄酮的提取率及含量

Table 4 Extraction rate and content of total flavonoids from seeds of *C. ambrosioides*

样品 Sample	提取率 Extraction rate (%)	总黄酮含量 Total flavonoid (mg/g)
S1	0.28	12.64 ± 0.142 ^f
S2	0.78	73.80 ± 0.219 ^c
S3	3.41	82.41 ± 0.036 ^b
S4	2.63	39.63 ± 0.035 ^d
S5	0.92	63.18 ± 0.322 ^d
S6	3.97	96.39 ± 0.017 ^a
S7	1.85	20.40 ± 0.321 ^e

注:S1 ~ S7 同表 1;结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $n = 2$,同列数据肩标小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$),肩标字母相同或无字母标注表示差异不显著($P > 0.05$)。

Note: S1 - S7 are the same as table 1; The results are expressed in $\bar{x} \pm s$, $n = 2$, In the same column of data, the difference between the lower case letters of shoulder mark is significant ($P < 0.05$), and the difference between the same or no letter mark of shoulder mark is not significant ($P < 0.05$).

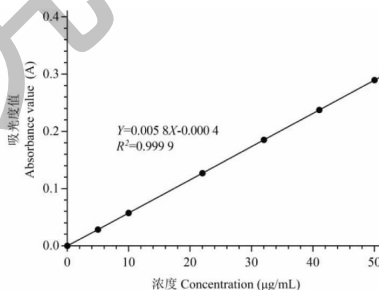


图 1 黄酮标准曲线

Fig. 1 Standard curve of flavonoids

度和峰面积计算线性回归方程,槲皮素标品的线性回归方程为 $Y = 35.18879X - 2.88693e^{-1}$,相关性 $R^2 = 0.99994$,残留标准误差为 3.03639,出峰保留时间为 6.940 min;山奈酚标品的线性回归方程为 $Y = 14.95723X - 4.29125$,相关性 $R^2 = 0.99994$,残留标准误差为 3.77841,出峰保留时间为 11.756 min。

如表 5 结果所示,S1 ~ S7 中槲皮素和山奈酚的含量不同。S2 中槲皮素含量最高为 0.602 mg/g,S6 中槲皮素含量次之,为 0.531 mg/g,S5 和 S3 中槲皮素含量分别为 0.481 和 0.412 mg/g;S6 中山奈酚的含量最高,为 0.479 mg/g。而 S1、S4 和 S7 样品中未检测到槲皮素和山奈酚的成分。

2.3 土荆芥种子总黄酮对 6 株供试细胞增殖的抑制作用

MTT 法检测 S1 ~ S7 对各细胞的抑制效果及 IC_{50} 值见图 4 和表 6。综合来看,当分别用 S1 ~ S7

作用于细胞 24 h 时, S1 ~ S7 均不同程度的抑制 6 株供试细胞的增殖, 且具有浓度依赖性 ($P < 0.05$)。其中 S2、S5 和 S6 抗肿瘤作用优于其余 4 种。S6 对 HeLa、SMMC-7721 和 HepG2 细胞的增殖抑制效果较强, IC_{50} 值分别为 0.37、0.43 和 0.66 mg/mL, 对人正

常肝细胞 L02 几乎没有抑制作用。因 S2 和 S5 的溶解效果较差, 故本研究后续试验中均选 S6 即土荆芥种子石油醚-乙酸乙酯-正丁醇提取物 (petroleum ether-ethyl acetate-n-butanol extract of *C. ambrosioides* seeds) 进行抗肿瘤作用研究。

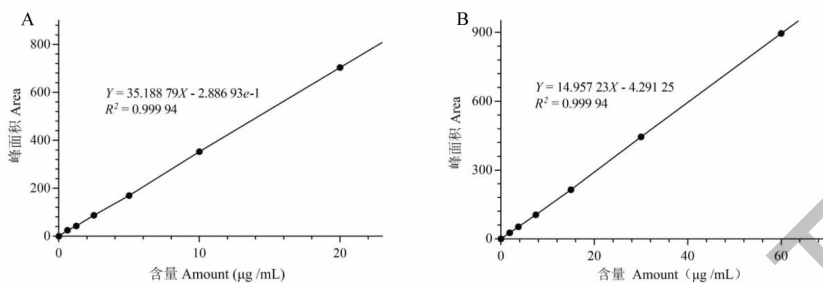


图 2 槲皮素 (A) 和山奈酚 (B) 标准曲线

Fig. 2 Standard curve of quercetin (A) and kaempferol (B)

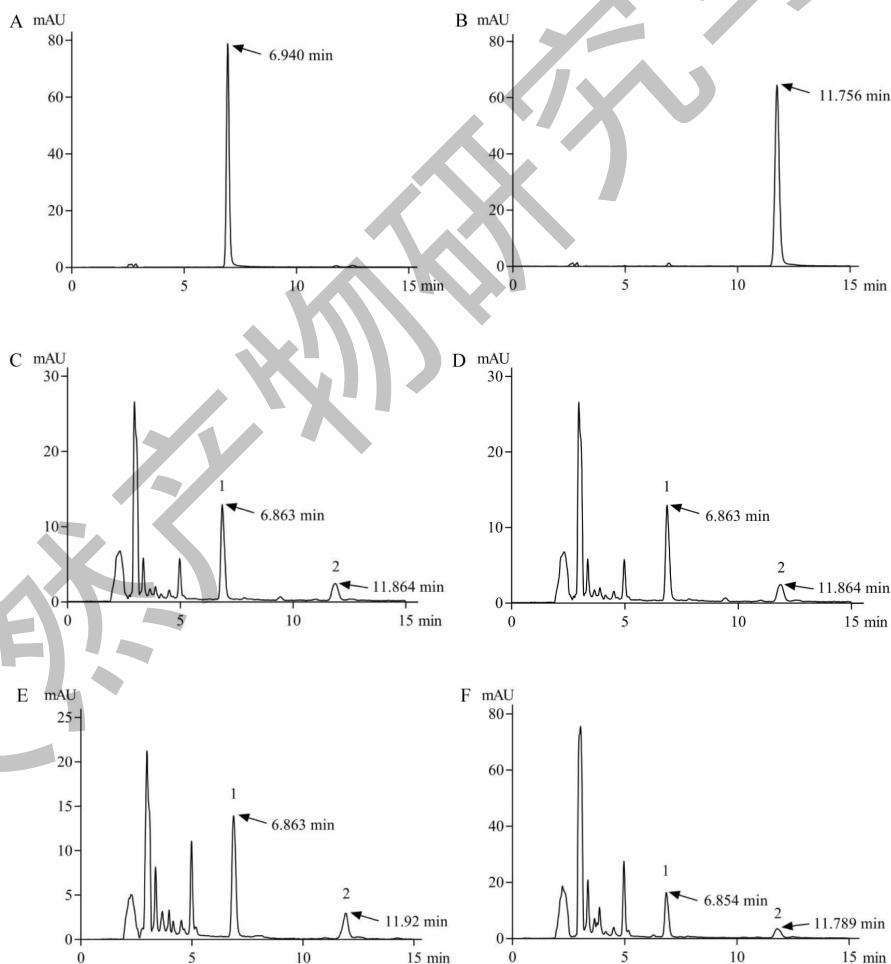


图 3 槲皮素和山奈酚含量测定的高效液相色谱图

Fig. 3 High performance liquid chromatogram of determination of quercetin and kaempferol

注: S1 ~ S7 同表 1; A: 槲皮素标品; B: 山奈酚标品; C: S2; D: S3; E: S5; F: S6; 1: 槲皮素; 2: 山奈酚。Note: S1-S7 are the same as table 1;

A: Standard product of quercetin; B: Standard product of kaempferol; C: S2; D: S3; E: S5; F: S6; 1: Quercetin; 2: Kaempferol.

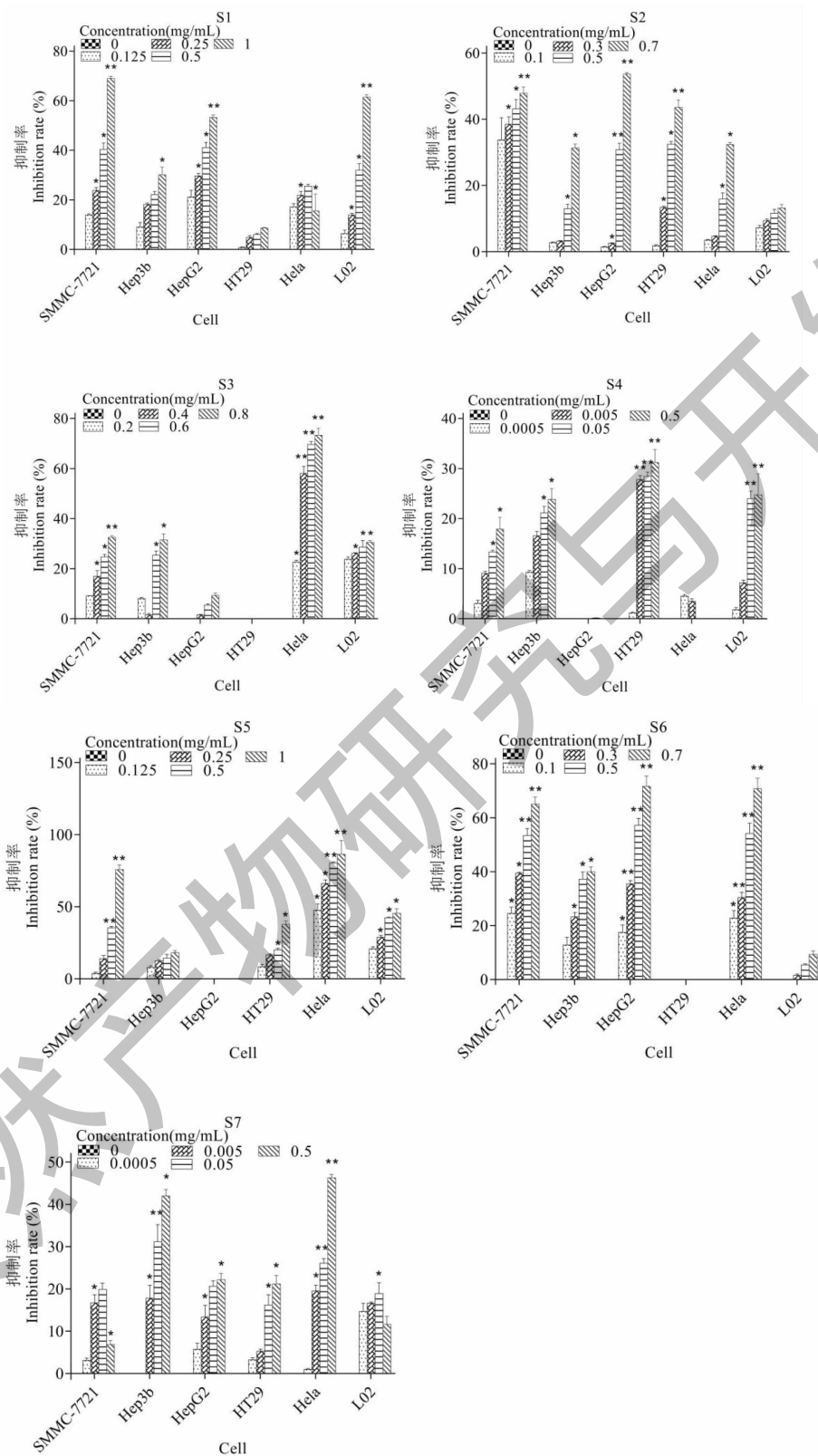


图4 S1~S7对L02、HeLa、SMMC-7721、Hep3b、HepG2和HT29细胞增殖的影响

Fig. 4 Effects of S1-S7 on proliferation of L02, HeLa, SMMC-7721, Hep3b, HepG2 and HT29 cells

注: S1~S7同表1; 0 mg/mL: 1% DMSO对照; *表示显著差异($P < 0.05$); **表示差异极显著($P < 0.01$)。

Note: S1-S7 are the same as table 1; Control of 1% DMSO; * represents difference $P < 0.05$; ** represents highly dominant difference $P < 0.01$.

表5 土荆芥种子提取物中槲皮素及山奈酚含量

Table 5 Contents of quercetin and kaempferol in extracts from seeds of *C. ambrosioides*

样品 Sample	槲皮素 Quercetin (mg/g)	山奈酚 Kaempferol (mg/g)
S1	0.000	0.000
S2	0.602 ± 0.002 ^a	0.462 ± 0.010 ^a
S3	0.412 ± 0.004 ^c	0.337 ± 0.022 ^c
S4	0.000	0.000
S5	0.481 ± 0.080 ^c	0.378 ± 0.008 ^b
S6	0.531 ± 0.028 ^b	0.479 ± 0.008 ^a
S7	0.000	0.000

注: S1 ~ S7 同表 1; 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $n = 3$, 同列数据肩标小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$), 肩标字母相同或无字母标注表示差异不显著 ($P < 0.05$)。

Note: S1-S7 are the same as table 1; The results are expressed in $\bar{x} \pm s$, $n = 3$, In the same column of data, the difference between the lower case letters of shoulder mark is significant ($P < 0.05$), and the difference between the same or no letter mark of shoulder mark is not significant ($P < 0.05$).

表6 S1 ~ S7 对 6 株细胞的 IC₅₀ 值 (mg/mL)Table 6 IC₅₀ value of S1-S7 on six cells (mg/mL)

样品 Sample	细胞种类 Cell type					
	SMMC-7721	Hep3b	HepG2	HT29	Hela	L02
S1	0.92 ± 0.037	1.88 ± 0.077	1.03 ± 0.045	8.20 ± 0.470	5.74 ± 1.772	1.03 ± 0.045
S2	0.79 ± 0.089	1.28 ± 0.054	0.67 ± 0.009	0.84 ± 0.029	1.18 ± 0.029	4.0 ± 0.144
S3	1.25 ± 0.110	1.01 ± 0.028	2.87 ± 0.222	-	0.43 ± 0.023	2.34 ± 0.337
S4	11.56 ± 1.569	1.93 ± 0.368	-	24.36 ± 0.215	-	125 ± 0.326
S5	0.69 ± 0.041	4.84 ± 0.246	-	1.99 ± 0.088	0.20 ± 0.041	1.13 ± 0.052
S6	0.43 ± 0.028	1.14 ± 0.042	0.66 ± 0.031	-	0.37 ± 0.039	2.87 ± 0.247
S7	0.18 ± 0.001	9.25 ± 0.163	1.82 ± 0.075	13.40 ± 2.170	3.82 ± 0.403	-

注: S1 ~ S7 同表 1; “-”表示无抗肿瘤作用。

Note: S1-S7 are the same as Table 1; “-” means no antitumor effect.

2.4 S6 对 SMMC-7721 细胞形态变化的影响

溶剂对照组的 SMMC-7721 细胞呈舒展状贴壁生长, 有明显的细胞分裂相出现 (图 5a); 随着 S6 处理浓度的增大, SMMC-7721 细胞形态、粘附性和折

光性均发生变化, 细胞粘附力下降, 逐渐开始皱缩变圆, 高剂量组大部分细胞悬浮死亡 (图 5b ~ d)。表明 S6 对 SMMC-7721 细胞具有显著的细胞毒性。

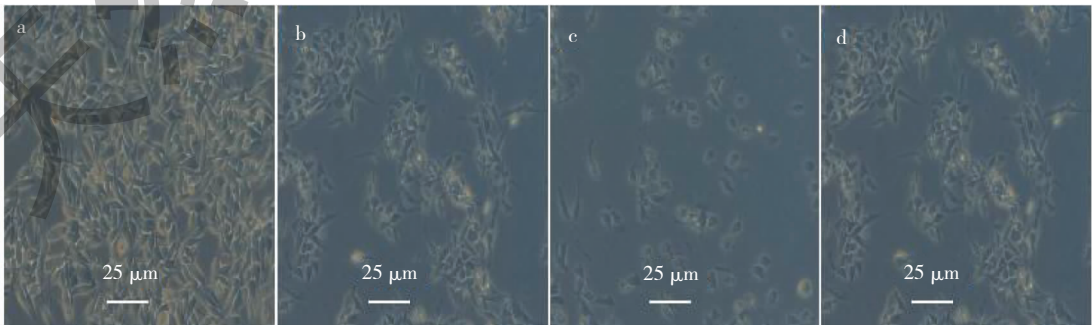


图5 S6 对 SMMC-7721 细胞形态的影响

Fig. 5 Effect of S6 on the morphology in SMMC-7721 cells

注: a: 1% DMSO 对照; b: 0.1 mg/mL S6; c: 0.3 mg/mL S6; d: 0.7 mg/mL S6, 下同。Note: a: control of 1% DMSO; b: 0.1 mg/mL of S6; c: 0.3 mg/mL of S6; d: 0.7 mg/mL of S6, the same below.

2.5 S6 对 SMMC-7721 细胞集落形成的影响

SMMC-7721 细胞集落形成试验是通过观察结晶紫的染色程度来作为评判标准的,结果显示,S6

浓度越高,结晶紫染色越浅,表明 SMMC-7721 细胞形成的集落数越少(图 6),进一步说明 S6 对 SMMC-7721 细胞的生长具有抑制作用。

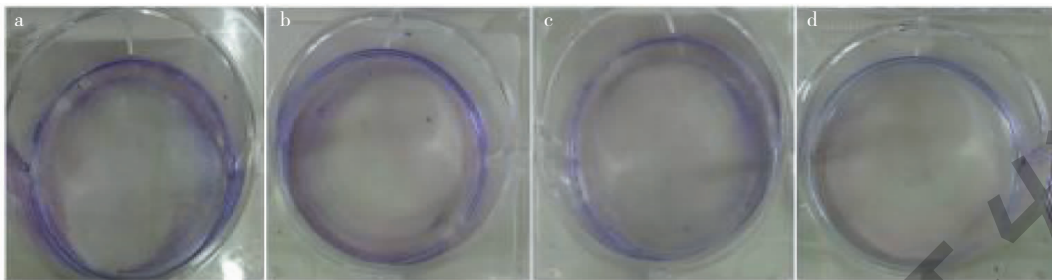


图 6 S6 对 SMMC-7721 细胞集落形成试验结果

Fig. 6 Clone formation assay of S6 in SMMC-7721 cells

2.6 S6 对 SMMC-7721 细胞骨架结构的影响

鬼笔环肽染色结果如图 7 所示,与溶剂对照组相比(图 7a),随着 S6 处理浓度的增加,细胞的荧光

强度逐渐减弱(图 7 b、c、d),且细胞体积皱缩变小,微丝在细胞内弥散分布,高浓度 S6 处理组(0.6 mg/mL)中出现排列紊乱的现象。

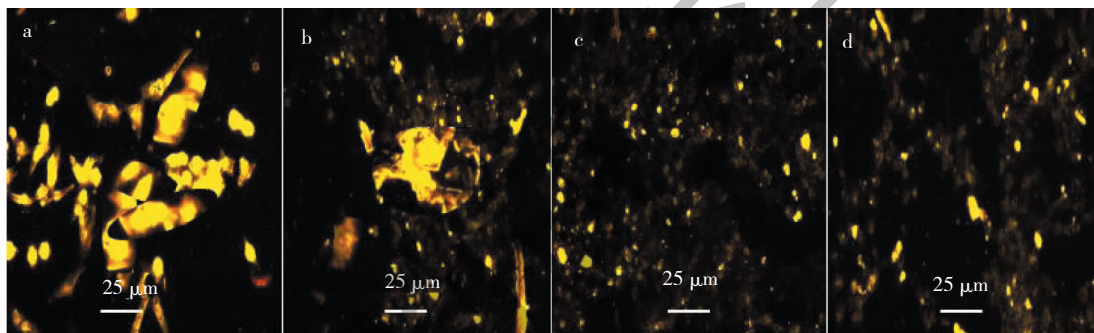


图 7 S6 对 SMMC-7721 细胞骨架的影响

Fig. 7 Effects of S6 on the cytoskeleton in SMMC-7721 cells

3 讨论与结论

天然产物黄酮类化合物的提取方法主要有索氏提取、有机溶剂萃取、超声波提取法、微波萃取法等,提取溶剂常以有机溶剂为主^[13-15]。本研究选择不同极性有机溶剂石油醚、乙酸乙酯、正丁醇以及蒸馏水单独或依次为溶剂,采用微波超声组合合成/萃取仪提取四川产土荆芥种子总黄酮,结果显示,经正丁醇提取的 S3 和 S6 总黄酮提取率明显较其他溶剂高(3.41% 和 3.97%),以石油醚为溶剂提取率最低(0.28%)。表明总黄酮的提取率可能与溶剂极性有关,黄酮类化合物多以极性稍大的苷元形式存在,一般易溶于强极性溶剂中^[16],根据相似相溶的原理,溶剂极性越强,总黄酮的提取率可能越高,该结果与 Shen 等^[17]研究极性越强的溶剂提取加拿大一枝花总黄酮得率越高的结果基本一致。而 S4 和 S7 中总黄酮提取率较低,可能是因许多黄酮类化合

溶或微溶于水^[18]。槲皮素和山奈酚是多种植物黄酮的主要成分,且具有明显的抗肿瘤作用^[19-21],本研究中对 S1 ~ S7 中槲皮素、山奈酚的含量测定显示,不同溶剂总黄酮提取物中槲皮素和山奈酚的含量不同,S2 中槲皮素含量最高,为 0.602 mg/g,S6 中山奈酚含量最高,为 0.479 mg/g,表明较高极性溶剂乙酸乙酯和正丁醇提取的槲皮素和山奈酚含量较高,这与 Gu^[22]和 Wang^[23]等测定不同植物有机溶剂提取物中槲皮素和山奈酚含量的研究结果一致。

提取溶剂除对提取物的成分影响较大,对其抗肿瘤活性也会产生相应的影响。Duan 等^[24]发现血人参石油醚部位、醋酸乙酯部位、正丁醇部位、水部位及乙醇提取物均有一定抑制肿瘤生长的作用。其中以乙酸乙酯部位的作用最佳。本研究中对 S1 ~ S7 抗肿瘤作用评价显示 7 种提取物的抗肿瘤作用

也不尽相同。S6 和 S4 对 SMMC-7721 细胞的 IC₅₀ 值分别为 0.43 和 11.56 mg/mL, 相差 27 倍, 表明不同溶剂对提取物的抗肿瘤作用影响较大。同一种提取物对不同细胞的抑制效果也不尽相同, 如 S6 对 HeLa 和 SMMC-7721 细胞的抑制作用大于 HepG2、Hep3b 和 L02 细胞, 但对 HT29 未检测到抑制作用。

在土荆芥种子总黄酮的提取中, 综合不同溶剂提取物的总黄酮含量、溶解性和抗肿瘤作用, 以 S6 (石油醚-乙酸乙酯-正丁醇) 提取方案为最佳选择。进一步以 SMMC-7721 细胞为靶标研究显示, S6 可导致该细胞粘附性和折光性下降, 逐渐皱缩变圆至悬浮死亡, 表明 S6 对 SMMC-7721 细胞具有明显的细胞毒性, 同时集落形成实验显示其具有抑制细胞集落形成的能力; 鬼笔环肽染色后显示, 经 S6 处理后, 细胞的荧光强度逐渐减弱, 微丝在细胞内弥散分布, 排列紊乱, 表明 S6 可能影响细胞骨架重组, 提示 S6 提取物对 SMMC-7721 细胞的毒性与细胞骨架有关。有关 S6 提取物的抗肿瘤作用机制有待进一步深入研究。

参考文献

- Zhou J, Ma DW, Chen YT, et al. Effects of volatile allelochemicals from *Chenopodium ambrosioides* on the stomata guard cells in leaf epidermis of *Vicia faba* [J]. *Guihaia* (广西植物), 2016, 36: 963-968.
- Ding Y, Hong WX, Zuo SP, et al. Chemical Mechanism for biological invasion of Alien species *Chenopodium ambrosioides* [J]. *Chin Agr Sci Bull* (中国农学通报), 2017, 33: 127-131.
- Qian RH, Reng QR, Huang J, et al. Study on the identification and antioxidant and antibacterial activity of total flavonoids from *Chenopodium ambrosioides* L. in Sichuan Province [J]. *Food Ind* (食品工业), 2018, 39: 167-171.
- Degenhardt RT, Farias IV, Grassi LT, et al. Characterization and evaluation of the cytotoxic potential of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* [J]. *Rev Bras Farmacogn*, 2016, 26(1): 56-61.
- Nascimento FRF, CruzGVB, Pereira PVS, et al. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment [J]. *Life Sci*, 2006, 78: 2650-2653.
- Zhu XH, Zhang DY, Zhong SH, et al. Effect of ethanol extract from *Chenopodium ambrosioides* L on the proliferation of MCF-7 cells [J]. *J Sichuan Norm Univ* (四川师范大学学

- 报), 2017, 40: 531-535.
- Li JH. Determination of total flavonoid in *Chenopodium ambrosioides* [J]. *J Liupanshui Norm Univ* (六盘水师范高等专科学校学报), 2005, 23(3): 24-25.
- Nie XN. Constituents and bioactivity of volatile oil from *Chenopodium ambrosioides* L [D]. Xi'an: Shaanxi Normal University (陕西师范大学), 2011.
- Zeng QH, Ye Y, Liu Y, et al. Extraction and antitumor activity of active ingredients in *Bovistella radicata* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2018, 30: 102-108.
- Zhao J. anticancer effects of different solvent extracts from *Alocasia macrorrhiza in vitro* [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2008, 25: 1865-1866.
- Zhao JW, Wei h, Zhao SX et al. Toxicity of *Chenopodium ambrosioides* alkaloids to *Musca domestica* and influence on insecticides sensibility [J]. *Entomol J East Chin* (华东昆虫学报), 2007, 2(1): 64-69.
- Pan X, Chen HC. HPLC determination of quercetin and kaempferol in *Herba Chenopdii Ambrosioidis* [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2008, 9: 1500-1502.
- Kang K, Li X, Wang WT. Current status of research on extraction methods of flavonoids [J]. *Forum Sci Technol Chin* (科技论坛), 2016 3(22): 3.
- Zhao Z, Liu P, Wang S, et al. Optimization of ultrasound, microwave and Soxhlet extraction of flavonoids from *Milletia speciosa* Champ. and evaluation of antioxidant activities *in vitro* [J]. *J Food Meas Charact*, 2017, 11: 1947-1958.
- Feng J, Peng XM, Li CQ, Wang T. Research and development of flavonoids in natural products [J]. *Guid J Tradit Chin Med Pharmacol* (中医药导报), 2018, 24(4): 71-74.
- Wei XH, Zhang JB. *Natural Pharmaceutical Chemistry* [M]. Beijing: Peking University Press, 2013.
- Shen X, Wang ZH, Chen LQ, et al. Antioxidant activity of extracts from *Solidago canadensis* [J]. *Guihaia* (广西植物), 2018, 38: 299-305.
- Zhou YM. Study on extraction purification and antioxidative effects of flavonoids in tatar buckwheat bran [D]. Xi'an: Shaanxi Normal University (陕西师范大学), 2008.
- Li TT. Nutritional value and exploitation prospect of flavonoids in ice vegetable [J]. *Xiandai Nongcun Keji* (现代农村科技), 2018(3): 60.
- Li W, Du B, Wang T, et al. Kaempferol induces apoptosis in human HCT116 colon cancer cells via the ataxia-telangiectasia mutated-p53 pathway with the involvement of p53 upregulated modulator of apoptosis [J]. *Chem-Biol Interact*, 2009, 177: 121-127.