

中药研究

马甲子叶提取物抗肿瘤活性部位的筛选

武蕊娟^{1,2} 谭 镭² 詹 雁² 阮 佳² 徐 超²

(1 成都中医药大学, 成都, 610075; 2 四川省中医药科学院, 成都, 610041)

摘要 目的: 从药用植物马甲子叶醇提物中分离筛选具有抗肿瘤作用的活性组分。方法: 采用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取马甲子叶醇提物, 并将这三个萃取部位进行体外抗肿瘤实验, 再把筛选得到的具有较好抗肿瘤活性的部位进行硅胶柱层析分离, 并采用 MTT 法对分离得到的组分进行体外抗肿瘤活性比较。结果: 通过体外抗 HepG-2 细胞和 HeLa 细胞实验表明, 乙酸乙酯萃取部位具有较好抗肿瘤活性。通过硅胶柱分离, 获得 5 个组分, 通过 MTT 实验发现这 5 个组分中, 石油醚: 乙酸乙酯为 1:1 和 1:2 洗脱所得到的两个组分具有明显的体外抗肿瘤活性, 其中石油醚: 乙酸乙酯为 1:2 的洗脱具有更好的杀伤作用, 对 HepG-2 细胞和 HeLa 细胞的 IC_{50} 分别为 45.79, 13.16 $\mu\text{g/mL}$ 。结论: 从马甲子叶醇提物乙酸乙酯部位中分离得到 2 种具有抗肿瘤作用的活性组分, 为进一步分离抗肿瘤活性成分提供一定的指导作用。

关键词 马甲子叶提取物; 抗肿瘤活性; 溶剂法和硅胶柱分离法; MTT; 活性组分

Study of Effective Anti-tumor Activity Parts from Leaves of *Paliurus ramosissimus*

Wu Ruijuan^{1,2}, Tan Lei², Zhan Yan², Ruan Jia², Xu Chaoqun²

(1 Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China; 2 Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China)

Abstract Objective: To separate and select anti-tumor activity part from the leaves of *Paliurus ramosissimus*. **Methods:** Extracts from the leaves of *Paliurus ramosissimus* were extracted with petroleum ether, ethyl acetate and n-butyl alcohol respectively. In vitro anti-tumor experiments were performed at the three extract sites. The optimal site with best anti-tumor activity then was screened by silica gel column chromatography, and MTT assay was used for the comparison of components obtained for antitumor activity. **Results:** In vitro anti HepG-2 cells and HeLa cell experiments showed that ethyl acetate fraction extracts had good anti-tumor activity. Separated by a silica gel column, five components were collected by MTT assay, which found that when the ratio of petroleum ether: ethyl acetate were 1:1 and 1:2, both eluted fraction group had in vitro anti-tumor activity and when the ration of the elution of petroleum ether to ethyl acetate was 1:2 the anti-tumor function was better. IC_{50} of HepG-2 cells and HeLa cells were 45.79 and 13.16 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ respectively. **Conclusion:** Two kinds of active ingredients with anti-tumor effect were separated from the leaves of *Paliurus ramosissimus* by ethyl alcohol, which may provide guidance for the further separation of anti-tumor active ingredient.

Key Words Extracts from the leaves of *Paliurus ramosissimus*; Anti-tumor effect; Solvent and silica gel column separation; MTT; Active ingredient

中图分类号: R284.2 文献标识码: A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.02.038

马甲子 *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. 系鼠李科马甲子属植物, 又名铁篱笆、铜钱树。在我国长江流域以南各省均有分布, 多生于丘陵林边灌丛中或荒山草地上。其根、果实、叶均可供药用, 根能除寒活血, 解热消肿, 治疗跌打损伤及心腹疼痛; 果实能化瘀止血, 活血止痛, 台湾地区民间用于治疗牙痛和腹痛^[1-2]; 叶能治疗无名肿痛, 民间多用于治痢疮溃疡等。也有报道证实马甲子醇提物具有镇咳祛

痰的功效^[3-4]。经课题组的前期研究证实其叶也具有抗肿瘤方面的作用且疗效较好。此次实验主要从马甲子叶醇提物中分离出具有抗肿瘤作用的活性组分, 对其中活性成分进行活性追踪并分离纯化, 为阐明马甲子的抗肿瘤作用机制奠定物质基础。

1 材料与方法

1.1 药材 马甲子鲜叶, 于 2014 年 5 月 7 日采于四川省成都市牧马山, 经四川省中医药科学院舒光

基金项目: 四川省科技支撑计划(编号: 15ZC1978); 四川省科研院所科技成果转化资金项目(编号: 14010139); 四川省公益性科研院所其基本科研业务专项

作者简介: 武蕊娟(1989.08—), 女, 硕士在读, 研究方向: 中药新药与新型给药系统研究, E-mail: 344354319@qq.com

通信作者: 徐超群(1963.09—), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 中药新药与新型给药系统研究, E-mail: chaoqun_xu@sina.com

明研究员鉴定为鼠李科马甲子属植物马甲子 *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir 的鲜叶。

1.2 药品与试剂 DMEM/HIGH GLUCOSE 培养基,胎牛血清 (Hyclone,美国),3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT),青霉素、链霉素 (Amresco,美国),胰蛋白酶 (Gibco,美国),其他试剂均为分析纯。人肝癌细胞 HepG-2、人宫颈癌细胞 HeLa (四川大学华西药学院靶向药物及释药系统教育部重点实验室提供),96 孔板。

1.3 仪器 Thermo Forma 系列 CO₂ 培养箱 (Sanyo, 日本); Model-550 型酶联免疫检测仪 (Bio-Rad, 美国); SW-CJ-2D 型超净工作台 (苏州市净化设备总厂); 倒置显微镜 (型号: Fx-35DX, Nikon); 离心机 (型号: TGL-16G, 上海医用分析仪器厂)。

2 方法^[5-10]

2.1 溶剂法和硅胶柱分离法提取不同组分 称取马甲子鲜叶适量,粉碎,用 10 倍量 95% 乙醇浸渍提取 2 d,过滤,减压浓缩,浓缩液冷冻干燥得马甲子叶醇提物。马甲子叶醇提物依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,分别得到以上 3 个部位及水溶液层,将各溶剂挥干,备用。将以上萃取得到的乙酸乙酯部位采用硅胶柱色谱分离,分别用石油醚:乙酸乙酯为 15:1,5:1,3:1,1:1 和 1:2 配制的不同极性溶剂洗脱得到 5 个组分 (P1, P2, P3, P4 和 P5),蒸去溶剂,备用。

2.2 MTT 法测细胞增殖的抑制率 样品配制:马甲子各萃取部位和乙酸乙酯部位不同组分分别用异丙醇超声溶解,1 000 r/min 离心 2 次,0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,用培养基稀释至所需浓度,备用。

按文献方法^[11-12]复苏两种细胞,常规培养。取对数生长期的 HepG-2、HeLa 细胞,均制备成浓度为 6.25 × 10⁴ 个/mL 的单细胞悬液,接种于 96 孔板,每孔 160 L (即每孔接种 1.0 × 10⁴ 个细胞),37 ℃、5% CO₂ 培养箱培养至细胞贴壁后,加入不同浓度的药物,设阳性对照 0.025 mg/mL 5-Fu 注射液、阴性对照、空白对照组,复孔 4 个,继续培养 48 h。吸去上清液,用含 0.5 mg/mL MTT 的无血清 DMEM 孵育 3 h 后,弃上清液,每孔加入 150 μL DMSO,在酶标仪上于 490 nm 处检测各吸光度 OD 值。实验重复 3 次。按下列公式计算细胞生长抑制率:

抑制率 = 1 - (实验组 OD 值 - 空白对照组 OD 值) / (阴性对照组 OD 值 - 空白对照组 OD 值) × 100%。

表 1 马甲子醇提物不同萃取部位作用于 HepG-2 细胞 24 h 的实验结果

浓度 /μg/mL	抑制率/%			
	石油醚部位	乙酸乙酯部位	正丁醇部位	水部位
40	21.55 ± 0.63	27.83 ± 0.45	—	—
60	26.78 ± 0.37	30.02 ± 0.58	—	—
80	32.11 ± 0.53	37.82 ± 0.33	—	—
100	36.47 ± 0.39	44.67 ± 0.79	—	—
200	45.25 ± 0.36	52.15 ± 0.61	—	—
400	62.04 ± 0.58	64.93 ± 0.42	16.11 ± 0.41	—

表 2 马甲子醇提物不同萃取部位作用于 HeLa 细胞 24 h 的实验结果

浓度 /μg/mL	抑制率/%			
	石油醚部位	乙酸乙酯部位	正丁醇部位	水部位
40	22.94 ± 0.64	26.03 ± 0.56	—	—
60	27.51 ± 0.38	29.10 ± 0.54	—	—
80	33.78 ± 0.45	35.69 ± 0.62	—	—
100	43.45 ± 0.61	42.18 ± 0.80	—	—
200	50.31 ± 0.53	54.38 ± 0.49	—	—
400	65.02 ± 0.47	66.54 ± 0.57	18.54 ± 0.46	—

表 3 马甲子醇提物乙酸乙酯部位不同组分作用于 HepG-2 细胞 24 h 的实验结果

浓度 /g/mL	抑制率/%				
	P1	P2	P3	P4	P5
40	—	15.22 ± 0.33	20.92 ± 0.49	42.59 ± 0.53	59.94 ± 0.61
60	—	21.61 ± 0.74	25.66 ± 0.46	47.44 ± 0.74	62.80 ± 0.57
80	—	22.27 ± 0.52	31.63 ± 0.42	52.23 ± 0.65	68.15 ± 0.52
100	—	28.56 ± 0.69	33.09 ± 0.77	61.21 ± 0.47	70.34 ± 0.43
200	—	35.51 ± 0.44	43.51 ± 0.51	75.53 ± 0.56	79.11 ± 0.78
400	—	57.90 ± 0.45	53.92 ± 0.58	84.33 ± 0.44	87.76 ± 0.65

表 4 马甲子醇提物乙酸乙酯部位不同组分作用于 HeLa 细胞 24 h 的实验结果

浓度 /μg/mL	抑制率/%				
	P1	P2	P3	P4	P5
40	—	15.57 ± 0.73	6.56 ± 0.85	47.70 ± 0.63	69.01 ± 0.52
60	—	21.45 ± 0.59	10.73 ± 0.49	52.81 ± 0.60	80.56 ± 0.41
80	—	28.44 ± 0.63	16.41 ± 0.56	66.69 ± 0.47	88.59 ± 0.64
100	—	30.27 ± 0.66	22.04 ± 0.58	70.15 ± 0.53	89.63 ± 0.44
200	—	61.78 ± 0.51	33.57 ± 0.61	76.42 ± 0.38	93.39 ± 0.75
400	—	79.95 ± 0.78	60.30 ± 0.55	90.32 ± 0.49	95.92 ± 0.47

3 结果

3.1 不同极性部位对 HepG-2 细胞、Hela 细胞增殖的抑制作用 实验结果显示,马甲子石油醚和乙酸乙酯部位对 HepG-2 和 HeLa 细胞的增殖有较强的抑制作用,正丁醇及水溶液部分则无明显作用。石油醚部位作用于 HepG-2 和 HeLa 细胞 24 h 的 IC₅₀ 分别为 223.17,180.80 g/mL;乙酸乙酯部位作用于 HepG-2 和 HeLa 细胞 24 h 的 IC₅₀ 分别为 138.29,125.11 g/mL。2 个部位对 HepG-2 和 Hela 细胞增殖

抑制率有明显的量效关系。水提物部位对 2 种细胞体外增值均无明显的抑制作用,正丁醇部位在最大浓度 400 g/mL 才有抑制作用。

3.2 不同组分对 HepG-2 细胞、HeLa 细胞增殖的抑制作用

乙酸乙酯部位采用硅胶柱层析分离得到的

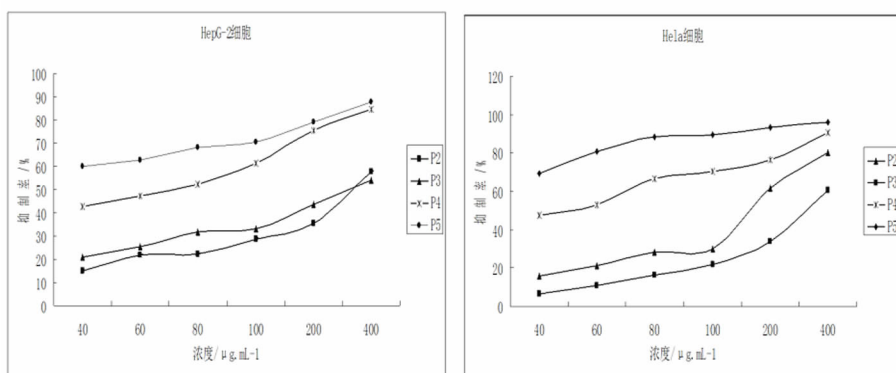


图 1 不同组分对 HepG-2 和 HeLa 细胞增殖的抑制曲线

4 讨论

本实验以人肝癌细胞 HepG-2 和人宫颈癌细胞 HeLa 的体外抗肿瘤活性为指标,用不同极性溶剂对马甲子醇提物进行萃取分离得到的 4 个溶剂部位,并对 4 个溶剂部位采用 MTT 法测定抗肿瘤活性。实验结果表明,石油醚和乙酸乙酯部位的抗肿瘤活性较明显,其中乙酸乙酯部位的抗肿瘤活性最强。故将乙酸乙酯部位过硅胶柱层析分离,洗脱得到 5 个组分,得到活性较好的 P4 和 P5 组分,为马甲子分离得到有效抗肿瘤活性单体提供了有效的实验基础。

由于中药活性成份多而复杂,并且成份之间有可能存在相互作用,作用机制也各有不同。目前研究表明,应用中药和其中的有效成分预防和治疗肿瘤可以达到更好的效果。目前对马甲子的研究主要集中在其根、茎、果实中化学成分的分离鉴定,而马甲子叶中化学成分的研究还未见报道^[13-15],课题组拟对马甲子的抗肿瘤药效物质基础及其作用机制进行深入研究,为进一步将马甲子开发成一个新的抗肿瘤药物提供实验依据。

参考文献

- [1] 丁磊,张东明. 铁篱笆果化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2006,31(24):2049-2051.
- [2] 朱华,张可峰,高雅,等. 马甲子的生药学研究[J]. 广西中医药,2008,31(1):56-57.
- [3] 韦国峰,覃道光,黄志文. 马甲子镇咳祛痰作用及化学成分的提取分离[J]. 右江民族医学学报,1998,20(2):1-3.
- [4] 韦国峰,覃道光,黄志文. 马甲子镇咳祛痰作用的研究[J]. 数理

5 个组分中,P4 和 P5 2 个组分对 HepG-2、HeLa 细胞增殖具有显著的抑制作用。其中 P4 组分抑制 HepG-2 和 HeLa 细胞 24 h 的 IC_{50} 分别为 62.91, 45.79 g/mL。P5 组分抑制 HepG-2 细胞和 HeLa 细胞 24 h 的 IC_{50} 分别为 26.11, 13.16 g/mL。

医药学杂志,1999,12(2):1-4.

- [5] 何颖,董珊,张春. 马甲子叶抑菌有效部位的筛选[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(7):159-162.
- [6] 张梦美,叶晓川,黄必胜,等. 白藜抗肿瘤活性部位的筛选研究[J]. 湖北中医药大学学报,2012,14(2):40-42.
- [7] Xu T, Pang Q Y, Zhou D, et al. Proteomic Investigation into betulinic acid-induced apoptosis of human cervical cancer HeLa cells[J]. PLOS ONE,2014,9(8):1-11.
- [8] 白云,刘萍,贾博宇,等. 中药抗肿瘤作用的研究进展[J]. 中国药师,2014,17(8):1406-1409.
- [9] 刘玉红,马艳,蔡海超,等. 茶藨子木层孔菌多糖硫酸酯的体内抗肿瘤作用研究[J]. 山东中医杂志,2015,34(2):124-125.
- [10] 陈贵兵,徐迎新,梁凯,等. 雷公藤生物碱系列组分对人 CIK、HCT116 及 HepG-2 细胞的增殖抑制作用[J]. 现代中医药,2014,34(3):76-78.
- [11] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版公司,2007:79-80.
- [12] 梁欣娜,张兴攀,滕红丽,等. 中药及有效成分抗肿瘤作用研究[J]. 时珍国医国药,2013,24(1):119-121.
- [13] Hyun-Kyung Lee, Haeng-Byoung Lee, Cheol-Soo Kim, et al. Anti-helicobacter pylori activity of methanol extracts from Korean native plant species in Jeju island[J]. Agric Chen Biotechnol,2004,47(2):91-96.
- [14] Shoen-Sheng Lee, Cheng-Jen Lin, Karin C. Liu. Two triterpenes from Paliurus ramosissimus[J]. J. Natural Products, 1992, 55(5):602-606.
- [15] Hui-yi Lin, Chung-Hsiung Chen, Karin C. S. Chen Liu et al. 14-membered cyclopeptides from Paliurus ramosissimus and P. Hemsleyanus[J]. Helvetica Chimica Acta,2003,86(1):127-138.

(2015-06-16 收稿 责任编辑:张文婷)