

文章编号:1673-1689(2008)01-0109-04

## 白首乌提取物体外抗肝癌 Bel7402 活性物质的筛选

毕芳<sup>1,2</sup>, 郭文杰<sup>1,2</sup>, 陶文沂<sup>\*1,2</sup>

(1. 江南大学生物工程学院, 江苏无锡 214122; 2. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏无锡 214122)

**摘要:**以 Bel7402, L02 两株细胞为筛选模型, 研究了滨海白首乌抗癌活性。用乙醇做溶媒, 通过对不同提取条件下提取的产物进行体外细胞毒活性试验及优化, 确定了滨海白首乌抗癌活性物质的最佳提取条件为: 温度 37 °C, 时间 2 h, 料液比为 1:10, 提取 1 次。醇提物经过大孔吸附树脂、硅胶柱进一步分离, 得到活性成分最佳的组分 II, 经过定性研究, 确定此组分是由甾体、三萜、酚类、生物碱为主及少量的糖类组成。

**关键词:**白首乌; 肝癌; 细胞毒活性; 抗肿瘤; 条件优化

中图分类号: TS 201.4

文献标识码: A

## Screening of Bioactive Substances from the Root of *Cynanchum auriculatum* Royleex Wight by Anti-Liver Cancer Bel7402 *in vitro*

BI Fang<sup>1,2</sup>, GUO Wen-jie<sup>1,2</sup>, TAO Wen-yi<sup>\*1,2</sup>

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** By using Bel7402, L02 cell lines as the screening model, the anti-tumor activity of the root of *Cynanchum auriculatum* Royleex Wight was studied. The cytotoxicity of ethanol elution by different extraction condition was studied by determining cell growth curve *in vitro*. The viability of cells was assessed in the MTT assay, by the IC<sub>50</sub> values the best extracting conditions were confirmed as the temperature 37 °C for 2 h in solid/ethanol ratio 1:10 and the extracting only once. The fraction II of the ethanol elution was separated through resin and gel and identified by chemical method. It was consisted mainly of steroidal, triterpene, hydroxybenzene, alkaloid and a little sugar.

**Key words:** the root of *Cynanchum auriculatum* Royleex Wight; liver cancer; cytotoxic activity; anticancer; optimize condition

白首乌为萝藦科植物牛皮消的块根, 又名地精、红内消, 别名“交藤”、飞来鹤、白何首乌、何首

收稿日期: 2006-12-21.

作者简介: 毕芳(1980-), 女, 河北唐山人, 医学硕士, 主要从事微生物与生化药学方面的研究. bifang1980@yahoo.com.cn

\* 通讯作者: 陶文沂(1946-), 男, 江苏无锡人, 工学博士, 教授, 博士生导师. 主要从事发酵工程和生物制药方面的研究. Email: wytiao@jiangnan.edu.cn

乌。全国以“白首乌”为名的有数种,如戟叶牛皮消 *Cynanchum bungei* Decne 的块根、飞来鹤(耳叶牛皮消) *C. auriculatum* Royle ex Wight 的根、隔山消 *C. wilfordi* Hemsl 的根、青洋参 *C. otophyllum* Schneid 的根等。但1977年版的《中国药典》以“白首乌”药名收入的为萝藦科植物戟叶牛皮消<sup>[1]</sup>。首乌的主要化学成分是含磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine)、磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine)、磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol)及C21甾甙等。

白首乌C<sub>21</sub>甾甙能够清除超氧阴离子自由基<sup>[2]</sup>和羟自由基,能够极其显著地提高小鼠的免疫功能和抗氧化能力<sup>[3]</sup>,是白首乌中公认的主要活性成分。宋俊梅等<sup>[4]</sup>研究表明,总甾甙通过腹腔注射给药时,能够显著延长荷S180瘤小鼠的寿命,但通过灌胃给药时,仅表现出抑制肿瘤的倾向,却无统计学意义。这说明活性物质的给药途径对其显效能力具有非常显著的影响,而给药途径的影响与其药理作用机制具有密切的关系。

陈捷等通过总结近10年来有关白首乌抗癌活性成分的实验研究来探讨其抗癌机理。结果发现,白首乌甾甙抗肿瘤作用与其表面活性样作用有关;白首乌甾甙与其诱导肿瘤细胞凋亡有关,同时发现白首乌新苷A、B也有显著的抗癌作用<sup>[5]</sup>。体外试验表明,白首乌的提取物对Hce-8693, PC3, HeLa, PAA 4株癌细胞都有较强的抑制作用,但对肝癌的抑制作用报道较少。近年来作者所在研究室对江苏滨海出产的耳叶白首乌的提取物进行了研究,作者研究了白首乌乙醇提取物抗肝癌活性成分的提取分离。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验仪器

粉碎机:上海淀久中药机械制造有限公司制造;恒温水浴锅:GKC上海电理仪器厂制造;JJ-1精密定时电动搅拌器:江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司制造;旋转蒸发器:BUCHI ROTAVAPOR R-200型;DZF-6090真空干燥箱:上海益恒实验仪器有限公司制造;二氧化碳培养箱:Thermo Forma公司制造;Multiskan MK3酶标仪:芬兰Multiskan公司制造;层析柱40 mm×400 mm;大孔吸附树脂AB-8:上海华羚树脂有限公司生产;96孔细胞培养板:美国Costar公司生产。

### 1.2 试验材料

1.2.1 材料 白首乌块根,江苏滨海出产。

1.2.2 细胞株 Bel7402, L02 由江南大学生物工程学院金坚教授惠赠。

1.2.3 试剂 工业乙醇,氯仿(分析纯),甲醇(分析纯);RPMI 1640 细胞培养基,GIBCO 公司产品;MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium],Sigma 公司产品;小牛血清,上海华美生化试剂公司产品。

### 1.3 试验方法

1.3.1 提取分离 称量白首乌干燥块根160 g,粉碎后,搅拌均匀并用EtOH萃取,并分别对提取温度、时间、溶剂浓度、提取次数等进行单因素考察。减压回收溶剂,得EtOH提取浓缩物12.6 g。各因素得到的样品上柱后分别以不同浓度的EtOH做洗脱剂,得到不同浓度的洗脱物,减压回收溶剂后,在45℃真空浓缩、干燥。

1.3.2 白首乌分离组分的定性分析 甾体三萜类:醋酐浓硫酸法;黄酮类:盐酸镁粉反应;糖苷类:盐酸镁粉反应;酚类:三氯化铁溶液显色;生物碱:碘-碘化钾试剂显色。

### 1.4 体外活性试验

1.4.1 体外传代人肿瘤细胞株的培养 复苏的Bel7402, L02 细胞在含10%小牛血清的RPMI1640培养液内,置37℃、饱和湿度、5%CO<sub>2</sub>条件下培养,并以0.25 g/dL胰蛋白酶消化传代。

1.4.2 白首乌分离组对Bel7402, L02 细胞株生长增殖的影响 参照文献[7-8],培养48 h后将不同药物按不同浓度分别以150 μL/孔加入96孔板。每个实验组设3个复孔,另设无药物的阴性对照组。培养板置于37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养48 h后,用PBS缓冲溶液洗涤后,分别加0.5 μg/mL的MTT 100 μL/孔,继续孵育4 h后弃去,然后每孔加DMSO 150 μL/孔,置于37℃培养箱中孵育10 min,用酶标仪于570 nm下测定吸光度值A,并计算细胞生长抑制率。细胞生长抑制率=(1-实验组A/阴性对照组A)×100%。

## 2 结果与讨论

### 2.1 以 Bel 7402, L02 细胞为筛选模型,提取条件的优化

不同的提取条件下提取的产物组成可能有所不同,以Bel7402, L02两株细胞为筛选模型,以乙醇做溶媒,通过对不同的提取条件下提取的产物进行体外细胞毒活性试验及优化,可以确定白首乌抗癌活性物质的最佳提取条件。

白首乌块根经粉碎后,工业乙醇搅拌提取,通

过不同的时间、温度、料液比确定最佳提取条件。从单因素分析的结果来看,白首乌用乙醇提取 2 h 后对肝癌细胞株 Bel7402 的活性最高,同时对正常肝细胞 L02 的毒性最小,见图 1;从提取温度的效果来看,虽然随着提取温度的升高,提取物对正常肝细胞的损害逐渐减小,但是对 Bel7402 的活性却大大降低了,因此选择 37 °C 的提取温度应当是较好的选择,见图 2;从不同的料液比提取的产物的活性来看,虽然以失去了一定的抗癌活性为代价,但是大大降低了对肝细胞的损伤,有利于临床的应用,因此采用 1:10 的比例,见图 3;从提取次数的对比可以看出,较少的提取次数可以大大减少非活性物质的带入,见表 1。

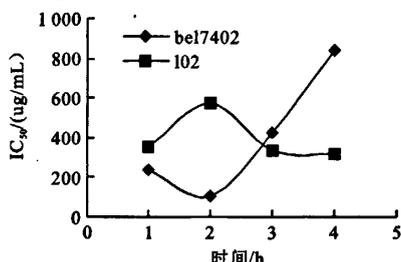


图 1 不同提取时间对白首乌粗提物的 IC<sub>50</sub> 的影响

Fig. 1 Effect of extraction time on IC<sub>50</sub> of *Cynanchum auriculatum*

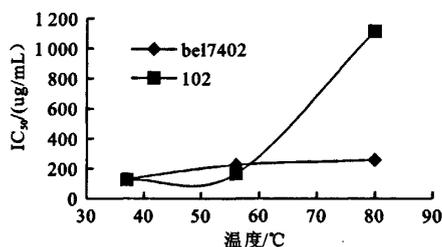


图 2 不同提取温度对白首乌粗提物的 IC<sub>50</sub> 的影响

Fig. 2 Effect of extraction temperature on IC<sub>50</sub> of *Cynanchum auriculatum*

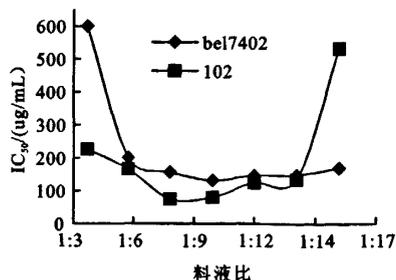


图 3 不同料液比对白首乌粗提物的 IC<sub>50</sub> 的影响

Fig. 3 Effect of ratio of material to liquid on IC<sub>50</sub> of *Cynanchum auriculatum*

表 1 不同提取次数对白首乌粗提物的 IC<sub>50</sub> 的影响

Tab. 1 Effect of extraction times on IC<sub>50</sub> of *Cynanchum auriculatum*

细胞株	提取次数		
	1	2	3
Bel7402	65.11	300.74	350.89
L02	67.33	330.44	386.90

## 2.2 最佳条件提取物的树脂和硅胶柱洗脱分离条件和安全性探索

根据白首乌提取物对两株细胞的活性试验结果,综合各单因素分析,确定白首乌乙醇提取的最佳条件为:温度 37 °C,时间 2 h,料液比为 1:10,提取次数为一次。提取物经 AB-8 大孔吸附树脂吸附,以体积分数 10%,30%,50%,70%,95% 的醇洗脱,在较低的体积分数下洗脱的物质基本上没有活性,但是随着洗脱液体积分数的增加,尤其当洗脱液的体积分数超过 50% 时,得到的分离物的活性越来越高,其洗脱物的 IC<sub>50</sub> 见表 2。

表 2 不同体积分数洗脱液对洗脱物 IC<sub>50</sub> 的影响

Tab. 2 Effect of eluent concentration on IC<sub>50</sub> of eluate

细胞种类	洗脱液体积分数/%				
	10	30	50	70	95
Bel7402	无	无	166.89	112.10	61.70
L02	无	无	188.16	135.99	93.88

由此收集 50%~95% 的醇洗脱物,浓缩后进一步经硅胶柱分离,以氯仿:氯仿:甲醇(40:1,20:1,10:1,5:1)、甲醇逐级进行洗脱分离,得到 8 个组分。从表 3 可以看出,尽管 I 组分的安全性最大,但是由于应用于抑制肿瘤细胞的 IC<sub>50</sub> 高达 746 μg/mL,如果应用于临床,必将给患者带来很大的痛苦,兼顾两个方面的效果,II 组分最具应用前景。

表 3 不同组分的安全性考察

Tab. 3 Review of the security of different eluate

细胞种类	安全性考察 (μg/mL)							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Bel7402	745.98	64.75	81.85	57.32	72.32	110.29	47.15	96.03
L02	2860.51	138.98	74.89	68.24	69.12	78.56	68.38	99.07
安全指数	3.83	2.15	0.91	1.19	0.96	0.71	1.45	1.03

## 2.3 白首乌组分 II 中活性成分的定性分析

长期以来,白首乌作为保健品或者作为药品主要的问题就是它的安全问题。陆琮明<sup>[9]</sup>等人对白首乌片的安全性毒理学进行了研究,结果表

明:小鼠经口 LD<sub>50</sub> 大于 10 g/kg,为实际无毒,但是 30 d 喂养试验显示,白首乌片在一定的剂量下,出现了明显的毒性作用:兴奋性增高,易激怒且明显消瘦,动物体重呈下降趋势,食物利用率低,动物陆续死亡。推算得到 60 kg 体重的人体,一天允许摄入白首乌片 2.4 g,作为食品显然是不合适的。如果可以分离出毒性较小、药物活性较高的组分,则白首乌做为抗癌药物还是具有光明前景的。经过对组分 II 的初步定性研究,确定此组分主要由甾体、三萜、酚类、生物碱及少量的糖类组成,见表 4。

抗肿瘤药物作为一把双刃剑,既能够把患者从死神手里夺回来,但同时由于其具有很强的毒副作用,也可能会给癌症患者带来巨大的痛苦,甚至死亡,所以寻找更安全的抗肿瘤药物是目前科研工作者亟待解决的首要问题。随着中草药的效用被世

界各国越来越多的科学家的认可,从天然中草药中寻找抗肿瘤药物以及其它活性物质的研究日渐受到重视。随着人们对天然产物的了解增多,从自然界分离的天然药物会越来越受到人们的信赖。

表 4 白首乌中组分 II 中活性成分的定性分析

Tab. 4 The qualitative analysis of the eluate II

检测物质	检测结果
甾体三萜类	溶液界面呈红色,试管内溶液逐渐由红—紫—蓝—绿—污绿
黄酮类	显红色
糖类苷类	紫红色的环产生
酚类	呈蓝色斑点
生物碱	显棕色斑点

## 参考文献(References):

- [1] 谢崇源. 白首乌、白何首乌与何首乌. 广西中医学院学报, 2001, 4(4): 97—99  
XIE Chong-yuan. *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight, *Auriculate swallowwort* and *Polygonum multiflorum* Thunb [J]. *Journal of Guangxi Traditional Chinese Medical University*, 2001, 4(4): 97—99. (in Chinese)
- [2] 张冬冬, 陶文沂, 崔凤杰, 等. 响应面法优化白首乌中抗氧化成分的提取[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(5): 81—87.  
ZHANG Dong-dong, TAO Wen-yi, CUI Feng-jie, et al. Optimization of the processing parameters for the extraction of antioxidants from *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight using response surface methodology[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, 25(5): 81—87. (in Chinese)
- [3] 宋俊梅. 白首乌 C21 甾体抗氧化作用的研究[J]. 食品科学, 2001, 22(12): 22—25.  
SONG Jun-mei. Antioxidation study on Baishouwu C21 steroidal glycosides[J]. *Food Science*, 2001, 22(12): 22—25. (in Chinese)
- [4] 宋俊梅, 王增兰, 丁霄霖, 等. 白首乌 C21 总甾体对 S180 腹水瘤抑制作用的研究[J]. 山东轻工业学院学报, 2002, 16(2): 51—54.  
SONG Jun-mei, WANG Zeng-lan, DING Xiao-lin, et al. On anti-tumor activity of C<sub>21</sub> general steroidal glycosides from *Cynanchum auriculatum* to S(180) ascites tumor[J]. *Journal of Shandong Institute of Light Industry (Natural Science Edition)*, 2002, 16(2): 51—54. (in Chinese)
- [5] 陈捷, 李晓玲, 贾立. 白首乌抗癌活性成分的实验研究浅述[J]. 陕西中医, 2001, 22(9): 565.  
CHEN Jie, LI Xiao-ling, JIA Li. Illustration of studying on anti-liver cancer components of *Cynanchum auriculatum* [J]. *Shaanxi Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2001, 22(9): 565. (in Chinese)
- [6] 裴月湖, 吴立军. 天然药物化学实验[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005. 263—283.
- [7] 骆文静, 王文亮, 李泊, 等.  $\beta$ -胡萝卜素抑制人肝癌细胞株 SMMC 7721 增殖的研究[J]. 卫生研究, 2001, 30(4): 213—214.  
LUO Wen-jing, WANG Wen-liang, LI Bo, et al. Inhibitory effects of  $\beta$ -carotene on hepatic cancer cell line SMMC-7721 [J]. *Journal of Hygiene Research*, 2001, 30(4): 213—214. (in Chinese)
- [8] 刘萍, 陶文沂, 孙震, 等. 松口蘑菇丝体蛋白质诱导细胞凋亡[J]. 无锡轻工大学学报, 2001, 20(6): 599—603.  
LIU Ping, TAO Wen-yi, SUN Zhen, et al. The Apoptotic Effect of active protein from *Tricholoma matsutake* Mycelium [J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 2001, 20(6): 599—603. (in Chinese)
- [9] 陆琼明, 张小强, 翟成凯, 等. 白首乌片的安全性毒理学研究[J]. 南京铁道医学院学报, 1998, 17(4): 261—263.  
LU Zong-ming, ZHANG Xiao-qiang, ZHAI Cheng-kai, et al. Toxicology study on food safety of *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight [J]. *Journal of Nanjing Railway Medical College*, 1998, 17(4): 261—263. (in Chinese)

(责任编辑:李春丽)