

本文引文格式:李童,谢欣,雷智冬,等.龙脷叶萃取部位的抗肿瘤活性筛选研究[J].
右江民族医学院学报,2022,44(4):519-522.

【论著与临床报道】

龙脷叶萃取部位的抗肿瘤活性筛选研究

李童¹,谢欣¹,雷智冬^{2,3},黄锁义^{2,4}

1. 右江民族医学院基础医学院,广西 百色 533000;
2. 右江民族医学院药学院,广西 百色 533000;
3. 广西中医药大学药学院,广西 南宁 530000;
4. 广西高校右江流域特色民族药研究重点实验室,广西 百色 533000)

摘要:目的 研究龙脷叶石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和水溶剂萃取部位的抗肿瘤活性。方法 龙脷叶的乙醇提取物分别经石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和水溶剂萃取、浓缩后得到各部位浸膏,用CCK-8法检测这4个不同极性萃取部位对3种肿瘤细胞株体外生长的抑制作用,并计算其半数抑制浓度(IC₅₀值)。结果 石油醚萃取部位和乙酸乙酯萃取部位对3种肿瘤细胞株的体外生长均有抑制作用,其中乙酸乙酯萃取部位的抗肿瘤活性最好,乙酸乙酯萃取部位对人胃癌(SGC-7901)、人乳腺癌(MCF-7)、人肝癌(BEL-7404)细胞株的IC₅₀值分别为0.60 mg/mL,0.59 mg/mL,0.49 mg/mL。结论 龙脷叶乙醇提取物的石油醚、乙酸乙酯萃取部位均具有一定的抗肿瘤作用,其中乙酸乙酯萃取部位抗肿瘤活性最好。

关键词:龙脷叶;肿瘤细胞;抗肿瘤;活性筛选

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:1001-5817(2022)04-0519-04
doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2022.04.009

Screening of the extraction sites with antitumor activity in *Sauropus spatulifolius* Beille

Li Tong¹, Xie Xin¹, Lei Zhidong^{2,3}, Huang Suoyi^{2,4}

1. College of Basic Medicine, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;
2. College of Pharmacy, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;
3. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, Guangxi, China;
4. Guangxi Key Laboratory for Research on Characteristic Nationality Medicine of Youjiang River Basin, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: Objective To explore the antitumor activity of the extraction sites of *Sauropus spatulifolius* Beille which were extracted by petroleum ether, ethyl acetate, n-butanol and water solvent, respectively.

Methods The ethanol extracts of *Sauropus spatulifolius* Beille were extracted and concentrated with petroleum ether, ethyl acetate, n-butanol and water, respectively, to get the extractum. The CCK-8 method was adopted to detect the inhibitory effects of four extraction sites on the growth of three tumor cell lines *in vitro* and half the inhibitory concentrations (IC₅₀) were calculated. **Results** The petroleum ether and ethyl acetate extraction sites from *Sauropus spatulifolius* Beille had inhibitory effects on the growth of three tumor cell lines *in vitro*, and the ethyl acetate extraction sites had the best anti-tumor activity. The IC₅₀ values of ethyl acetate ex-

基金项目:广西重点研发计划项目(桂科 AB18221095);右江民族医学院高层次人才科研项目(01002018079)

第一作者简介:李童(1995—),女,在读硕士研究生,研究方向:从事天然药物免疫机制研究、医学检验研究,E-mail:2570788948@qq.com

通讯作者简介:黄锁义(1964—),男,本科,二级教授,硕士研究生导师,研究方向:主要从事天然产物化学、天然药物免疫机制、中药化学、食品卫生等研究,E-mail:huangsuoyi@163.com

traction sites for human gastric cancer (SGC-7901), human breast cancer (MCF-7) and human liver cancer (BEL-7404) cells were 0.60 mg/mL, 0.59 mg/mL and 0.49 mg/mL, respectively. **Conclusion** Both petroleum ether and ethyl acetate extraction sites from ethanol extracts of Parapleuria showed certain anti-tumor activity, and the ethyl acetate extracts had the best antitumor activity.

Key words: Sauropus spatulifolius Beille; tumor cell; anti-tumor; activity screening

龙脷叶具有润肺止咳、通便之功效,在民间使用广泛,其具有较好的抗炎和镇痛作用^[1]。目前,国内外对壮药龙脷叶的研究主要有:基因组序列以及合成^[2-3]、抗菌活性^[4]、化学成分^[5]、抗氧化^[6]等,但未报道龙脷叶对 SGC-7901、MCF-7、BEL-7404^[7] 3 种癌细胞抗肿瘤作用的研究,为弥补空缺,本实验对此进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 SGC-7901、MCF-7、BEL-7404 细胞株,均购于中国科学院昆明细胞库。

1.1.2 药品与试剂 龙脷叶,购自广西壮族自治区玉林市,经右江民族医学院覃道光副教授鉴定为大戟科守宫木属植物。(RPMI)1640、DMEM 基础培养基(美国 Gibco 公司);胎牛血清(FBS)(美国 GEMINI 公司);Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒(碧云天公司);95%乙醇、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、DMSO(二甲基亚砷)(成都科龙化工试剂厂)。

1.1.3 仪器 DMi8M 倒置显微镜(德国 Leica 公司);Mithras LB 943 多功能酶标仪(德国 Berthold 公司);W-O 系列恒温水浴锅(郑州长城科工贸有限公司);BC-R501 旋转蒸发器(上海贝凯生物化工设备有限公司);Alpha1-2 真空冷冻干燥机(德国)。

1.2 龙脷叶各部位的提取 以常规方法将晾干的龙脷叶粉碎成小颗粒,制备成 25 kg,用 6 倍量体积的 95%乙醇按以下方法进行回流提取,80℃恒温水浴加热回流 3 次,每次 2 h,抽滤,合并滤液,旋转蒸发器回收溶剂,得到浸膏,加入等体积的纯水,形成混悬液,再用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇依次进行萃取,分别抽滤合并石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和水溶剂萃取液,用旋转蒸发器回收溶剂,得到各个溶剂浸膏,即石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物及水溶剂萃取物,用真空冷冻干燥机干燥,保存于 4℃冰箱中,备用。使用前用 DMSO(二甲基亚砷)溶解后再用完全培养基调整至实验所需的浓度,现配现用。

1.3 测定 4 个萃取部位对 SGC-7901、MCF-7 和 BEL-7404 细胞增殖抑制作用

1.3.1 细胞的培养与铺板 3 种细胞株的培养条件含 10%胎牛血清(FBS)和 1×青链霉素的 RPMI-1640 或 DMEM 培养基,于 37℃、5%CO₂、饱和湿度培养箱中静置培养。取正处于对数生长期的 3 种细胞株,使

用胰酶进行消化,将细胞浓度调整为适宜的密度 5×10^4 个/毫升,100 μL 等量接种于 96 孔板,在培养箱中静置培养 24 h,待细胞贴壁生长,给药前观察细胞生长状态是否良好。

1.3.2 药物分组与给药 每株细胞分调零组(仅加培养液),空白对照组(含细胞液和培养液),阴性对照组(含细胞液和对应实验组中各浓度 DMSO 的培养液),实验组(含细胞液、培养液以及药物)。待细胞贴壁培养 24 h 后,更换为含不同浓度的药物的培养基继续培养(每孔加入含不同浓度药物的培养基 100 μL),分别作用 48 h,4 种萃取物由低到高分为 6 组(0.05 mg/mL,0.1 mg/mL,0.2 mg/mL,0.4 mg/mL,0.8 mg/mL,1.6 mg/mL)。调零组、对照组和实验组均设 3 个复孔。

1.3.3 以 CCK8 法检测细胞活力 药物作用 48 h 后,先观察其生长状态,弃去旧的培养基,每孔加入含有 5% CCK8 的完全培养基 90 μL,37℃避光孵育适宜时间 1~2 h,于 450 nm 处读取各孔 OD 值。肿瘤细胞生长抑制率(IR%) = $1 - \frac{(\text{实验组 OD 值} - \text{调零组 OD 值})}{(\text{对照组 OD 值} - \text{调零组 OD 值})} \times 100\%$ 。通过 GraphPad Prism5 软件计算药物作用于 3 种细胞株的 IC₅₀ 值。

1.3.4 统计学方法 采用 SPSS 23 软件进行统计分析,计量资料结果以 $(\bar{x} \pm s)$ 描述,对各组的数据均进行方差齐性检验,若方差齐,多样本均数比较采用 One-Way ANOVA,组间两两比较采用 LSD 法,若方差不齐,则采用 Kruskal-Wallis 秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 个萃取部位对 SGC-7901、MCF-7 和 BEL-7404 细胞株增殖的抑制作用 龙脷叶石油醚、乙酸乙酯萃取物对 SGC-7901 细胞增殖均有抑制作用,其肿瘤细胞存活率随药物浓度减少而增大,抑制作用随药物浓度增大而增加,见表 1;对 MCF-7 细胞的抑制作用随药物浓度增加而增强,正丁醇和水溶剂萃取物两个部位萃取物活性差,见表 2;对 BEL-7404 细胞的抑制作用随药物浓度增加而增强,正丁醇和水溶剂萃取物两个部位萃取活性差,无法计算 IC₅₀ 值,见表 3。

2.2 比较 4 个萃取物对 SGC-7901、MCF-7 和 BEL-7404 细胞株的 IC₅₀ 值 龙脷叶的 4 个萃取物对 SGC-

表 1 龙俐叶 4 个萃取部位对 SGC-7901 细胞增殖的影响

组别	药物浓度/ (mg · mL ⁻¹)	SGC-7901 (OD)	细胞抑 制率/%	IC ₅₀ / (mg · mL ⁻¹)
空白对照组	—	0.79±0.01	—	—
石油醚萃取物	0.05	0.78±0.02	0.00	0.78
	0.1	0.79±0.01	0.00	
	0.2	0.84±0.02 ^a	0.00	
	0.4	0.82±0.01 ^b	0.00	
	0.8	0.29±0.01 ^a	58.62	
	1.6	0.02±0.02 ^a	96.01	
乙酸乙酯萃取物	0.05	0.78±0.02	0.00	0.60
	0.1	0.75±0.05	0.00	
	0.2	0.76±0.04	6.75	
	0.4	0.56±0.02	26.25	
	0.8	0.27±0.01 ^a	60.60	
	1.6	0.01±0.01 ^a	98.92	
正丁醇萃取物	0.05	0.71±0.02 ^a	8.10	/
	0.1	0.71±0.02 ^a	0.89	
	0.2	0.68±0.02 ^a	16.82	
	0.4	0.67±0.01 ^a	12.12	
	0.8	0.69±0.01 ^a	0.44	
	1.6	0.06±0.02 ^a	0.00	
水溶剂萃取物	0.05	0.67±0.00 ^a	13.59	/
	0.1	0.66±0.01 ^a	7.77	
	0.2	0.64±0.01 ^b	21.37	
	0.4	0.63±0.2	17.01	
	0.8	0.66±0.01 ^b	3.97	
	1.6	0.62±0.01 ^a	0.00	

注：①表内计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示；②与空白对照组比，
a: $P < 0.01$, b: $P < 0.05$ 。

表 2 龙俐叶 4 个萃取部位对 MCF-7 细胞增殖的影响

组别	药物浓度/ (mg · mL ⁻¹)	MCF-7 (OD)	细胞抑 制率/%	IC ₅₀ / (mg · mL ⁻¹)
空白对照组	—	0.68±0.02	—	—
石油醚萃取物	0.05	0.82±0.04 ^a	0.00	1.22
	0.1	0.81±0.06 ^a	0.00	
	0.2	0.80±0.05 ^a	0.00	
	0.4	0.67±0.04	0.00	
	0.8	0.41±0.03 ^a	32.48	
	1.6	0.20±0.03 ^a	63.40	
乙酸乙酯萃取物	0.05	0.67±0.01	4.42	0.59
	0.1	0.69±0.02	0.00	
	0.2	0.65±0.01 ^b	8.52	
	0.4	0.46±0.02 ^a	23.79	
	0.8	0.18±0.01 ^a	70.51	
	1.6	0.05±0.01 ^a	90.32	
正丁醇萃取物	0.05	0.72±0.04 ^b	0.00	/
	0.1	0.75±0.02 ^a	0.00	
	0.2	0.77±0.03 ^a	0.00	
	0.4	0.82±0.03 ^a	0.00	
	0.8	0.78±0.01 ^a	0.00	
	1.6	0.69±0.02	0.00	
水溶剂萃取物	0.05	0.74±0.01	0.00	/
	0.1	0.74±0.06	0.00	
	0.2	0.74±0.02	0.00	
	0.4	0.79±0.06 ^a	0.00	
	0.8	0.86±0.04 ^a	0.00	
	1.6	0.76±0.03 ^a	0.00	

注：①表内计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示；②与空白对照组比，
a: $P < 0.01$, b: $P < 0.05$ 。

表 3 龙俐叶 4 个萃取部位对 BEL-7404 细胞增殖的影响

组别	药物浓度/ (mg · mL ⁻¹)	BEL-7404 (OD)	细胞抑 制率/%	IC ₅₀ / (mg · mL ⁻¹)
空白对照组	—	1.05±0.02	—	—
石油醚萃取物	0.05	1.13±0.02 ^a	0.00	0.64
	0.1	1.11±0.01 ^a	0.00	
	0.2	1.10±0.02 ^a	0.00	
	0.4	0.97±0.02 ^a	7.94	
	0.8	0.22±0.04 ^a	79.03	
	1.6	0.03±0.01 ^a	96.75	
乙酸乙酯萃取物	0.05	1.12±0.02 ^a	0.00	0.49
	0.1	1.10±0.01 ^a	0.00	
	0.2	0.98±0.02 ^a	10.25	
	0.4	0.68±0.02 ^a	34.73	
	0.8	0.20±0.01 ^a	80.36	
	1.6	0.03±0.01 ^a	97.21	
正丁醇萃取物	0.05	1.04±0.01	0.00	/
	0.1	0.97±0.04 ^a	3.25	
	0.2	0.96±0.03 ^a	12.50	
	0.4	1.00±0.01 ^b	4.77	
	0.8	1.06±0.03	0.00	
	1.6	1.02±0.02	0.00	
水溶剂萃取物	0.05	0.97±0.01 ^a	5.34	/
	0.1	0.98±0.03 ^a	2.72	
	0.2	0.99±0.03 ^a	9.74	
	0.4	0.98±0.02 ^a	6.32	
	0.8	1.02±0.02	1.14	
	1.6	1.04±0.04	0.00	

注：①表内计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示；②与空白对照组比，
a: $P < 0.01$, b: $P < 0.05$ 。

7901、MCF-7 和 BEL-7404 细胞的抑制作用,从图 1、图 2、图 3 可见,龙俐叶的石油醚、乙酸乙酯萃取物对 SGC-7901、MCF-7、BEL-7404 细胞的体外增殖均有抑制作用,其细胞存活率随着药物浓度增大从而减小,增殖抑制作用与药物浓度成正比,呈依赖性;正丁醇、水溶剂萃取物对 3 种细胞进行 48 h 干预后,其存活率未见减少,相反增多。龙俐叶的石油醚、乙酸乙酯萃取物对 SGC-7901 细胞的 IC₅₀ 分别为 0.78 mg/mL 和 0.60 mg/mL;对 MCF-7 细胞的 IC₅₀ 分别为 1.22 mg/mL 和 0.59 mg/mL;对 BEL-7404 细胞的 IC₅₀ 分别为 0.64 mg/mL 和 0.49 mg/mL。其中,正丁醇和水部位萃取物活性差,计算不出 IC₅₀ 值,乙酸乙酯萃取物对 3 种肿瘤细胞的抗增殖作用最强。

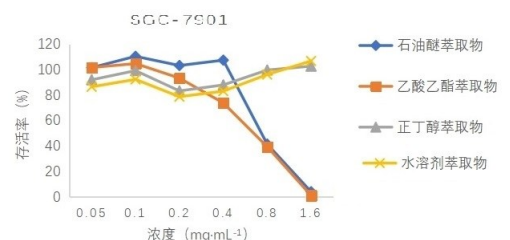


图 1 4 个萃取部位对 SGC-7901 细胞活力的影响

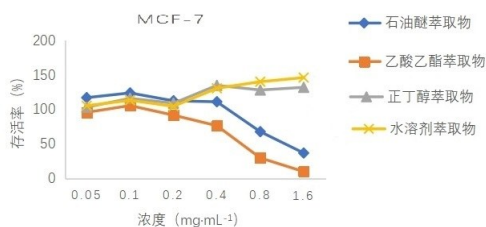


图 2 4 个萃取部位对 MCF-7 细胞活力的影响

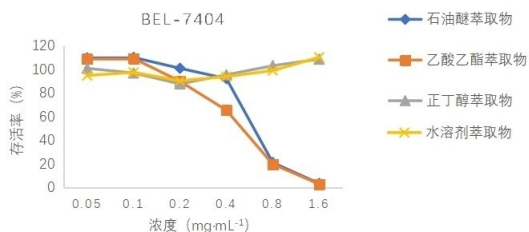


图 3 4 个萃取部位对 BEL-7404 细胞活力的影响

3 讨论

本实验结果表明,龙俐叶石油醚、乙酸乙酯萃取部位对 3 种肿瘤细胞株均产生抑制效果,细胞的存活率随着药物浓度的增大而减弱,抑制率随着药物浓度的增大而增强,具有剂量依赖性;其中,龙俐叶乙酸乙酯萃取物对 SGC-7901、MCF-7、BEL-7404 的 IC_{50} 值最小,说明乙酸乙酯萃取物对 3 种肿瘤细胞相对比较敏感,抗肿瘤活性最好。龙俐叶乙醇提取物的石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和水溶剂萃取部位体外抗肿瘤活性大小依次为:乙酸乙酯萃取部位>石油醚萃取部位;正丁醇和水部位萃取物的抗肿瘤作用不明显。本研究结果表明,龙俐叶乙醇提取物的石油醚、乙酸乙酯、正丁醇

和水溶剂萃取部位中,筛选出乙酸乙酯萃取部位是抗肿瘤活性最佳的部位。

本课题组对龙俐叶等壮药药材的抗氧化研究已经做了大量前期研究工作,现进一步对其抗肿瘤作用进行研究,筛选出其活性部位,为进一步分离抗肿瘤活性单体化合物以及研究抗肿瘤作用机制奠定坚实的基础。后期可参考刘森等^[8]试验设计,探讨其作用机制。

参考文献:

- [1] 丘琴,陈明伟,甄汉深,等. 龙俐叶茎显微和薄层色谱鉴别的研究[J]. 广西植物, 2016, 36(11): 1330-1334.
- [2] 徐世强,梅瑜,曹阳,等. 龙俐叶转录组分析及黄酮类生物合成相关基因的挖掘[J]. 广东农业科学, 2020, 47(7): 36-44.
- [3] CAI S K, ZHOU F, GU Y, et al. The complete chloroplast genome sequence of *Sauropus spatulifolius* Beille[J]. Mitochondrial DNA Part B, 2020, 5(2): 1703-1704.
- [4] 何显科,宁丽,韦锦斌,等. 龙俐叶乙酸乙酯萃取物液相色谱-质谱联用分析及体外抗菌活性的实验研究[J]. 广西医科大学学报, 2019, 36(4): 542-546.
- [5] 韦建华,李亚楠,莫惠雯,等. 壮药龙俐叶化学成分的研究(I)[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(2): 289-291.
- [6] 陆秋娜,李兆叠,郑鸿娟,等. 龙俐叶提取物的抗氧化活性研究[J]. 湖北农业科学, 2017, 56(1): 89-90, 94.
- [7] 李庭树,黄锁义. 鸡骨草提取物体内抗肿瘤活性研究[J]. 右江民族医学院学报, 2020, 42(6): 690-697.
- [8] 刘森,彭丽云,朱名毅,等. 水茄提取物体外抗肿瘤活性成分的筛选及其作用机制研究[J]. 右江民族医学院学报, 2016, 38(2): 157-159, 167.

收稿日期: 2022-02-22; 修回日期: 2022-03-14