

美洲大蠊不同提取物及不同提取方法对 肿瘤细胞的细胞毒性作用

余昕¹, 周洁¹, 欧丽兰¹, 钱瑞¹, 廖芳², 张丹^{1*}

(1. 西南医科大学, 四川 泸州 646000; 2. 成都市新都区中医医院, 成都 610500)

[摘要] **目的:**研究美洲大蠊不同提取物及不同提取方法对肿瘤细胞的细胞毒性,为美洲大蠊的抗肿瘤细胞研究提供实验依据。**方法:**以人肝癌 SMMC-7721 细胞株,红白血病细胞株 K562,人结肠癌细胞株 HCT116 3 种肿瘤细胞为研究对象,采用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法,比较不同的提取物(乙醇提取液、石油醚部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位)和不同的提取方法(渗漉法、超声法、回流法)对 3 种肿瘤细胞的体外抗肿瘤活性。**结果:**美洲大蠊乙醇提取液和乙酸乙酯部位对上述肿瘤细胞增殖均有不同程度的抑制作用,其中以乙醇提取液的活性最强;3 种提取方法提取的美洲大蠊均表现出不同程度的体外抗肿瘤活性,其中以渗漉法提取的美洲大蠊对 3 种肿瘤细胞的抑制作用最强,所计算出的半数抑制浓度(IC₅₀)均最小。**结论:**美洲大蠊乙醇提取液的体外抗肿瘤活性最强,乙酸乙酯部位次之,美洲大蠊宜选择渗漉法提取。

[关键词] 美洲大蠊; 提取物; 提取方法; 肿瘤细胞; 细胞毒性

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)15-0153-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016150153

Tumor Cytotoxicity of Different Extracts and Different Extraction Methods of *Periplaneta americana*

YU Xin¹, ZHOU Jie¹, OU Li-lan¹, QIAN Rui¹, LIAO Fang², ZHANG Dan^{1*}

(1. Southwest Medical University, Luzhou 646000, China;

2. The Traditional Chinese Medicine Hospital of Xindu District, Chengdu 610500, China)

[Abstract] **Objective:** To study the tumor cytotoxicity of different extracts and different extraction methods of *Periplaneta americana*. **Method:** Cell counting kit-8 (CCK-8) method was used to compare the anti-tumor activities of different extracts (ethanol extract, petroleum ether fraction, ethyl acetate fraction and n-butanol fraction) and different extraction methods (percolation method, ultrasonic method, and reflux method) on three kinds of tumor cells (human liver cancer SMMC-7721 cells, human erythroleukemia K562 cells, and human colon cancer cell line HCT116). **Result:** The ethanol extract and ethyl acetate fraction of *P. americana* had inhibitory effect on the proliferation of above tumor cells in varying degrees, and the activity was strongest for ethanol extract; *P. americana* extracted by three extraction methods showed antitumor activity in vitro in varying degrees, and the percolation method had the strongest inhibitory effect on three kinds of tumor cells with minimal IC₅₀ values. **Conclusion:** Ethanol extract of *P. americana* had strongest in vitro antitumor activity, followed by ethyl acetate fraction, and percolation method shall be used for extraction.

[Key words] *Periplaneta americana*; extract; extraction method; tumor cell; cytotoxicity

美洲大蠊属蜚蠊科昆虫的干燥全体,始载见于《神农本草经》^[1]。据研究报道,美洲大蠊具有抗肿瘤、促进组织修复、抗菌、抗病毒、抗氧化、抗炎、镇痛、保肝、增强免疫力等多种药理作用^[2-4]。肿瘤是

瘤、促进组织修复、抗菌、抗病毒、抗氧化、抗炎、镇痛、保肝、增强免疫力等多种药理作用^[2-4]。肿瘤是

[收稿日期] 20150227(015)

[基金项目] 四川省教育厅青年基金项目(14ZB0164);四川省科技厅基金项目(2015JY0098)

[第一作者] 余昕,硕士,实验师,从事中药学方面研究,Tel:0830-3162291,E-mail:yuxin8303@163.com

[通讯作者] *张丹,博士,副教授,从事中药学方面研究,Tel:0830-3162291,E-mail:ppkfoot7@163.com

威胁人类身体健康的严重疾病,由于美洲大蠊独特的生理机制,近几年引起了广大科研工作者对其在抗肿瘤方面研究的热忱,通过体内和体外实验研究均表明美洲大蠊对多种肿瘤都具有较好的抑制作用,如何正春等^[5-8]将美洲大蠊的乙醇提取物通过聚酰胺柱色谱划段得到不同部位,采用噻唑蓝(MTT)法检测所得部位对12株肿瘤细胞(人食管癌细胞 ECA109,人胃癌细胞 BGC-823,人结肠腺癌细胞 LS174T,人鼻咽癌细胞 CNE,人肺腺癌细胞 K549,人口腔表皮样癌细胞 KB,人红白血病细胞 K562,人早幼粒白血病细胞 HL60,小鼠淋巴瘤细胞 P388D1,卵巢癌细胞 HO8910,宫颈癌细胞 Hela 和前列腺癌细胞 PC3)的细胞毒性,结果表明美洲大蠊提取物中存在对肿瘤细胞生长具有抑制作用的物质;胡艳芬等^[9]采用 MTT 法研究发现美洲大蠊提取物 C II-3 对 3 株人肺癌细胞(人大细胞肺癌细胞 NCI-H460,人小细胞肺癌细胞 NCI-H446 及人肺腺癌细胞 A549)生长均有抑制作用,但是对美洲大蠊抗肿瘤活性部位及提取工艺筛选的报道至今未见。

同时,笔者查阅文献发现在细胞毒性的研究中细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法比以往的 MTT 法更为灵敏,且操作简便,重复性好^[10-11],故本文采用 CCK-8 法,比较美洲大蠊不同的提取部位和不同的提取方法对人肝癌 SMMC-7721 细胞、人红白血病细胞 K562 和人结肠癌细胞 HCT116 的体外抗肿瘤活性,对美洲大蠊体外抗肿瘤的活性部位进行筛选,对美洲大蠊的提取方法进行比较,以期为美洲大蠊进一步的抗肿瘤研究提供科学依据。

1 材料

1.1 细胞株 人肝癌 SMMC-7721 细胞株(中国科学院上海药物研究所),红白血病细胞株 K562(四川大学华西医学中心),人结肠癌细胞株 HCT116(四川大学华西医学中心)。

1.2 药物及试剂 美洲大蠊(*Periplaneta americana*,四川好医生药业,药材由西南医科大学生物鉴定室税丕先教授鉴定为蜚蠊科美洲大蠊的干燥全体,粉碎为粗粉,60℃干燥,备用),CCK-8(碧云天生物技术研究所批号 JK021),胎牛血清(天津灏洋生物制品科技责任有限公司,批号 NYM1035),RPMI-1640 培养液(美国 Gibco 公司,批号 NYH0953),顺铂(DDP)注射液(云南个旧生物药业有限公司,批号 110701),其余试剂均为分析纯。

1.3 仪器 A1104-N 型分析天平(上海民桥精密科学仪器有限公司),BUCHI 型组合旋转蒸发仪(瑞士

Buchi 公司),LGJ-18C 型冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂有限公司),DZKW-4 型电子恒温水浴锅(北京化玻联联医疗器械公司),DHG-9077A 型电热恒温干燥箱(上海精宏实验设备有限公司),DNM-9602 型全自动酶标工作站(北京普朗集团),CKX41 型倒置显微镜及 MDF-192 型超低温冰箱(日本 SANYO 公司),SW-CJ-1F 型单人双面净化工作台(苏州净化设备有限公司),WJ-2 型 CO₂ 培养箱(上海跃进医疗器械厂),LDZX-40BI 型高压消毒锅(上海申安医疗器械厂)。

2 方法

2.1 美洲大蠊不同提取部位对 3 种肿瘤细胞增殖的影响

2.1.1 阳性对照样品配制 将 1 g·L⁻¹顺铂(DDP)用培养液分别按 0.1,1,10 mg·L⁻¹质量浓度配制。

2.1.2 供试样品的制备 称取美洲大蠊药材粗粉,加入 90% 乙醇浸泡 48 h,再用 10 倍量的 90% 乙醇渗漉,得到乙醇渗漉液,减压回收乙醇,得到提取液 A,以石油醚、乙酸乙酯、正丁醇依次萃取,得到石油醚部位 B,乙酸乙酯部位 C,正丁醇部位 D。取美洲大蠊不同提取部位旋转蒸发至无醇味,冷冻干燥成为粉末,得到不同部位的提取物。取各提取物,加水或二甲亚砜(DMSO)溶解,再加入适量水配置为不同浓度梯度进行加板,所有样品均经过一次性滤膜过滤灭菌。

2.1.3 细胞培养 用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 的完全培养基,将上述 3 种肿瘤细胞置于 37℃ 5% CO₂ 饱和湿度培养箱内常规培养。

2.1.4 美洲大蠊不同提取部位对 3 种肿瘤细胞增殖的影响 选取对数生长期的肿瘤细胞,配成密度为(4×10⁴~5×10⁴)个/mL 的细胞悬液,按每孔 90 μL 接种到 96 孔培养板中,置于 37℃ 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养 24 h,受试组分别加入 10 μL 不同浓度的样品(样品最终质量浓度为 12.5,25,50,100,200,400 mg·L⁻¹),空白组(DMSO)和阳性药(DDP 质量浓度为 0.1,1,10 mg·L⁻¹),空白孔仅给予等体积的培养基,每组设 3 个复孔。加药后将 96 孔板置于 37℃ 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中继续培养 48 h,每孔加 CCK-8 10 μL,置于 37℃ 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中继续培养 2 h,以 450 nm 为测量波长,630 nm 为参考波长测定各孔的吸光度 A,每个实验至少重复 3 次。按如下公式计算细胞增殖抑制率,采用 LOGIT 法计算半数抑制浓度(IC₅₀)。

$$\text{抑制率} = [1 - (A_{\text{给药组}} - A_{\text{空白孔}}) / (A_{\text{阳性组}} - A_{\text{空白孔}})] \times 100\%$$

2.2 美洲大蠊不同的提取方法对 3 种肿瘤细胞增殖的影响

2.2.1 渗漉法 取药材粗粉 100 g, 用石油醚浸泡脱脂, 药渣用 90% 乙醇搅拌均匀后, 密闭放置, 至药粉膨胀充分后, 装入渗漉筒, 用 10 倍量的 90% 乙醇浸泡 48 h, 按 $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的速度进行渗漉, 收集其滤液, 置 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下减压浓缩, 定容。

2.2.2 超声法 取药材粗粉 100 g, 用石油醚浸泡脱脂, 药渣用 10 倍量的 90% 乙醇浸泡 48 h, 超声 1 h (连续 3 次), 过滤, 药渣再用 8 倍量的 90% 乙醇超声 2 次, 每次 1 h (连续 3 次), 过滤, 合并滤液, 置 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下减压浓缩, 定容。

2.2.3 乙醇回流法 取药材粗粉 100 g, 用石油醚浸泡脱脂, 药渣用 10 倍量的 90% 乙醇浸泡 48 h, 回流 1 h, 过滤, 药渣再用 8 倍量的 90% 乙醇回流 2 次, 每次 1 h, 过滤, 合并滤液, 置 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下减压浓缩, 定容。

2.2.4 阳性对照样品配制 同 2.1.1 项。

2.2.5 供试样品的制备 取上述 3 种不同提取方法所得的提取液减压浓缩至 1:2 (mL:g), 再冷冻干燥成粉末。取各供试品, 加水或 DMSO 溶解, 再加入适量水, 配置为不同浓度梯度进行加板, 所有样品均经过一次性滤膜过滤灭菌。

2.2.6 细胞培养 同 2.1.3 项。

2.2.7 美洲大蠊不同提取方法对 3 种肿瘤细胞增殖的影响 同 2.1.4 项。

2.3 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 所有结果数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 美洲大蠊不同提取部位对 3 种肿瘤细胞增殖的影响 美洲大蠊的石油醚部位 B, 正丁醇部位 D, 剩余液 E 对人肝癌细胞株 SMMC-7721, 人红白血病细胞株 K562, 人结肠癌细胞株 HCT116 均无明显抑制作用, 不能计算 IC_{50} 。但美洲大蠊乙醇提取液 A, 乙酸乙酯部位 C 对上述 3 种肿瘤细胞增殖均有不同程度的抑制作用, 其中以乙醇提取液 A 的活性最强。见图 1, 表 1。

3.2 美洲大蠊不同提取方法对 3 种肿瘤细胞增殖的影响 美洲大蠊采用乙醇渗漉法、超声法、回流法提取对人肝癌细胞株 SMMC-7721, 人红白血病细胞株 K562, 人结肠癌细胞株 HCT116 均表现出不同程度的体外抗肿瘤活性, 其中采用渗漉法提取的美洲大蠊对 3 种肿瘤细胞的抑制作用最强, 所计算出的

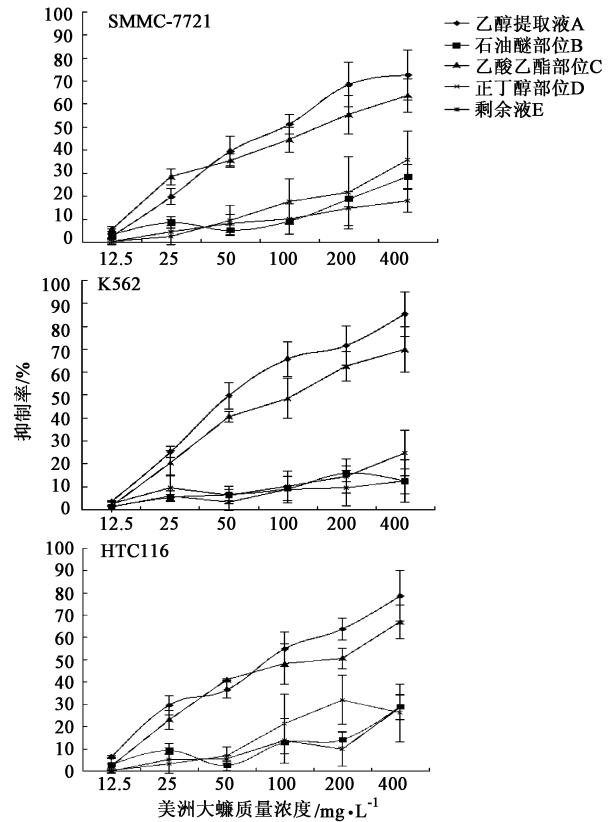


图 1 美洲大蠊不同提取部位对 SMMC-7721, K562, HCT116 细胞增殖抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effects of different extract of *Periplaneta americana* on inhibition rate curve of SMMC-7721, K562, HCT116 cell ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 1 美洲大蠊不同提取部位对不同肿瘤细胞的 IC_{50} ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 IC_{50} of different cancer cells with different extract of

<i>Periplaneta americana</i> ($\bar{x} \pm s, n = 3$)		$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$		
提取部位	K562	SMMC-7721	HCT116	
乙醇提取液 A	80.79 ± 12.36	115.70 ± 15.35	98.32 ± 17.96	
石油醚部位 B	-	-	-	
乙酸乙酯部位 C	128.93 ± 23.71	147.59 ± 21.48	144.87 ± 26.07	
正丁醇部位 D	-	-	-	
剩余液 E	-	-	-	
DDP	2.66 ± 0.67	4.18 ± 1.37	6.09 ± 1.05	

IC_{50} 均最小, 故美洲大蠊宜选择渗漉法作为提取方法。见图 2, 表 2。

4 讨论

本文采用的 CCK-8 是一种基于 WST-8 [化学名: 2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺基苯)-2H-四唑单钠盐] 的广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的快速高灵敏度检测试剂盒, 已成为 MTT 的一种升级替代产品。目前, CCK-8 法在药物筛选、细胞增殖测定、细胞毒性测定、肿瘤药敏试验以及生物因子的活性检测等方面应用非常广泛^[12-14]。

本文采用系统溶剂法结合活性跟踪法对美洲大

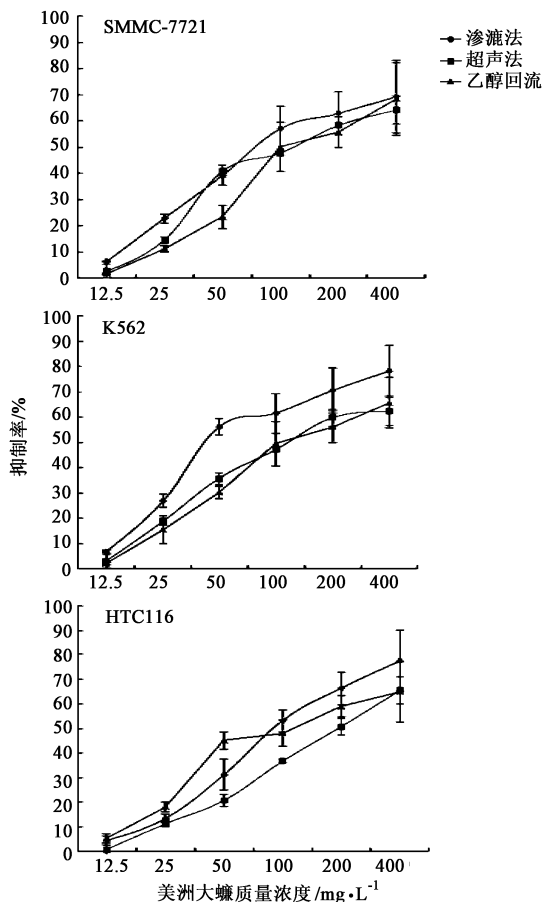


图 2 美洲大蠊不同提取方法对 SMMC-7721, K562, HCT116 细胞增殖的浓度抑制率曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effects of different extract of *Periplaneta americana* on inhibition rate curve of SMMC-7721, K562, HCT116 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表 2 美洲大蠊不同提取方法对不同肿瘤细胞的 IC₅₀ ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 IC₅₀ of different cancer cells with different extract of *Periplaneta americana* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

提取方法	K562	SMMC-7721	HCT116
渗漉提取	79.54 ± 16.85	112.82 ± 18.43	115.56 ± 19.36
超声提取	147.90 ± 28.68	145.53 ± 23.64	181.65 ± 28.29
乙醇回流	151.59 ± 24.97	155.67 ± 29.46	133.59 ± 27.98
DDP	3.03 ± 0.88	4.56 ± 1.63	5.28 ± 1.47

蠊体外抗肿瘤的活性部位进行筛选,考察了美洲大蠊的乙醇提取液、石油醚部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位和剩余液对人肝癌细胞 SMMC-772, 人红白血病细胞 K562 和人结肠癌细胞 HCT116 细胞增殖的影响,发现石油醚部位、正丁醇部位和剩余液均无明显抑制作用,而乙醇提取液和乙酸乙酯部位对上述肿瘤细胞增殖均有不同程度的抑制作用,其中以乙醇提取液的活性最强,乙酸乙酯部位次之。

美洲大蠊含有大量的脂肪油,在前期细胞毒性实验中发现脂肪油对肿瘤细胞株无抑制作用,为无效成分,故先采取石油醚脱脂后再进行提取方法的

研究。本文比较了乙醇渗漉法、超声法和回流法提取的美洲大蠊对人肝癌 SMMC-7721 细胞、人红白血病细胞 K562 和人结肠癌细胞 HCT116 的体外抗肿瘤活性,结果提示 3 种提取方法的提取物均表现出不同程度的体外抗肿瘤活性,以渗漉法提取的药液活性最强,故美洲大蠊宜选择渗漉法作为提取方法。

本文对美洲大蠊的不同提取物和不同提取方法的抗肿瘤活性进行了研究,其最佳的提取工艺仍需要进一步的寻找,其抗肿瘤的活性成分也待进一步的分离纯化,还应深入研究其抗肿瘤的机制。

[参考文献]

- [1] 孙星衍. 神农本草经[M]. 北京:商务印书馆,1955:90.
- [2] 何正春,彭芳,宋丽艳,等. 美洲大蠊化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志,2007,32(21):2326-2331.
- [3] 史未名. 美洲大蠊的药用研究进展[J]. 中国民族民间医药,2012,21(3):50-51.
- [4] 汤雁利,李罡,李启艳. 康复新药理作用的研究进展[J]. 西北药学杂志,2014,29(1):103-106.
- [5] 何正春,王晓雨,胡明辉,等. 美洲大蠊提取物对 3 株人体呼吸系统肿瘤细胞的细胞毒性研究[J]. 中国现代药物应用,2009,7(3):1-2.
- [6] 何正春,胡明辉,王晓雨,等. 美洲大蠊提取物对 3 株人及小鼠白血病细胞的细胞毒性研究[J]. 云南中医中药杂志,2009,30(5):56-57.
- [7] 何正春,王晓雨,杨雷香,等. 美洲大蠊提取物对 3 株消化系统肿瘤细胞的细胞毒性研究[J]. 药物研究,2009,18(9):11-12.
- [8] 何正春,王晓雨,杨雷香,等. 美洲大蠊提取物对 3 株人体生殖系统肿瘤细胞的细胞毒性研究[J]. 西北药学杂志,2009,24(4):271-272.
- [9] 胡艳芬,吕小满,刘光明,等. 美洲大蠊提取物对 3 株人肺癌细胞的体外抑制作用[J]. 大理学院学报,2009,8(12):1-3.
- [10] 侯春梅,李新颖,叶伟亮,等. MTT 法和 CCK8 法检测悬浮细胞增殖的比较[J]. 军事医学科学院院刊,2009,33(4):400-401.
- [11] 陈冲,焦宁,徐瑞荣,等. 台盼蓝拒染法、MTT 法、CCK-8 法在研究 As₂O₃ 细胞毒性作用中的意义[J]. 中国医药导报,2013,10(12):24-26.
- [12] 许丽萍. CCK-8 法检测 AT#9 对肿瘤细胞的生长抑制作用[J]. 北方医学,2012,9(1):43-44.
- [13] 赵惠君,周妮娜,谢晓恬. CCK-8 法检测阿糖胞苷对白血病细胞株增殖抑制作用[J]. 临床儿科杂志,2012,30(5):460-463.
- [14] 刘爱旗,夏璐. CCK-8 法与 MTT 法检测兔成纤维细胞活性的比较研究[J]. 中国医学创新,2013,10(2):12-13.

[责任编辑 周冰冰]