

· 化学与分析 ·

基于组效关系的石上柏挥发油抗肿瘤有效成分的辨识

黎丹, 李三华, 杨龙江, 管勇林, 王刚*
(遵义医学院药学院, 贵州遵义 563000)

[摘要] 目的: 基于 GC-MS 分析, 建立了石上柏挥发油的化学成分与其抑制人肺癌 A459 细胞株和肝癌 7721 细胞株的谱效关系模型, 寻找与药效显著相关的活性成分。方法: 采用噻唑蓝法 (MTT) 测定石上柏挥发油抑制人肺癌 A459 细胞和肝癌 7721 细胞活性, 以半数抑制浓度 (IC_{50}) 为评价指标; 采用 GC-MS 分析, 确定了 11 个特征峰; 利用 Simca-p11.5 软件的正交投影偏最小二乘法 (Orthogonal Partial least squares, OPLS) 和 SPSS 18.0 软件的双变量相关分析 (Bivariate), 研究特征峰与药效的相关性, 根据 S-载荷图、变异权重参数值 (variable importance in projection, VIP) 和皮尔逊相关系数 (Pearson) 来辨识显著活性成分。结果: GC-MS 分析石上柏共得到 71 个化合物, 鉴定出其中 64 个化合物, 其相对峰面积分别占总峰面积的 98.19%。主要包括萜类、脂肪酸及其烃类化合物。不同产地石上柏挥发油对 A549 和 7721 细胞株具有一定的抑制作用, 其中抑制 A549 细胞最高的 IC_{50} 为 $46.81 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (S6); 抑制 7721 细胞最高的 IC_{50} 为 $34.02 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (S5)。通过 OPLS 和 Bivariate 数据分析, 发现 5 个挥发油成分, 即芳樟醇、橙花叔醇、新植二烯、亚油酸甲酯、植酮, 与石上柏挥发油抑制肺癌 A549 细胞和肝癌 7721 细胞活性显著相关。结论: 该方法能快速、有效地建立石上柏挥发油谱效相关关系, 可为石上柏挥发油化学成分药理性质的研究提供参考依据。

[关键词] 谱效关系; 石上柏; 挥发油; 挥发油; 正交投影偏最小二乘法; 气相色谱-质谱联用

[中图分类号] R284.1; R29 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)02-0044-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018020044

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171011.1348.004.html>

[网络出版时间] 2017-10-11 13:48

Composition Activity Relationship of *Selaginella doederleinii* Volatile Oil Based on Anticancer Activity

LI Dan, LI San-hua, YANG Long-jiang, GUAN Yong-lin, WANG Gang*
(School of Pharmacy, Zunyi Medical College, Zunyi 563000, China)

[Abstract] **Objective:** The composition-activity relationship (CAR) model of volatile oil from *Selaginella doederleinii* was established to recognize the active compounds based on GC-MS analysis. **Method:** MTT method was adopted to mensurate the inhibition effects of the volatile oil from various habit at against human lung cancer A459 cell and hepatocellular carcinoma 7721 cell line. Half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was used as the evaluation index and 11 characteristic peaks of the volatile oil were identified by GC-MS. The orthogonal partial least squares (OPLS) and bivariate correlation analysis was respectively performed on SIMCA-P 11.5 and SPSS 18.0 software to construct the CAR model of *S. doederleinii* volatile oil. **Result:** The results showed that five peaks, including peak 1, 8, 10, 3 and 9, were significantly related to anti-tumor activity according to scores plot from 11 peaks screened, variable importance in projection (VIP) values in OPLS and Pearson correlation coefficient in bivariate correlation analysis. Peak 1, 8, 10, 3 and 9 were identified as linalool, nerolidol, methyl

[收稿日期] 20170611(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81560569); 贵州省中医药管理局级项目(D-449); 遵义医学院博士启动基金项目(F-742)

[第一作者] 黎丹, 在读硕士, 从事中药质量评价工作, Tel:0851-28609461, E-mail: 13984515977@163.com

[通信作者] *王刚, 博士, 教授, 从事天然产物研究, Tel:0851-28609461, E-mail: wg8855350@163.com

linolenate, methyl linoleate and phytone, respectively. **Conclusion:** This method can quickly and effectively establish the spectrum-effect relationship for volatile oil from *S. doederleinii*, providing experimental basis for studying their pharmacological properties.

[Key words] composition activity relationship (CAR); *Selaginella doederleinii*; volatile oil; orthogonal partial least squares (OPLS); GC-MS

石上柏属于蕨类卷柏科卷柏属植物,多年生草本,也叫深绿卷柏,多分布在我国贵州、四川、重庆、广西等地。味甘、涩,性温平,传统中医理论认为其可以治疗咽喉肿痛、肺热咳嗽^[1],具有清热解毒、活血化瘀、祛风除湿等功效^[2]。临床上主要用于治疗鼻咽癌、绒毛膜上皮癌、消化道癌、宫颈癌、肺癌、肝癌^[3-5]等;同时对多种感染性炎症,特别对上呼吸道、急性扁桃腺炎、肺炎等效果显著^[6]。

目前关于石上柏的研究以抗肿瘤作用为主,但仍不够系统和深入,导致活性部位和活性成分不明确以及没有可行的质量标准,石上柏药材品种的混乱及质量的参差不齐必将对该植物的开发使用产生不利的影响。因此,对石上柏进行活性部位和活性成分的跟踪筛选,阐明其活性物质基础;以活性成分为指标评价其品质及谱效关系,以确保药物有效可控。

中药谱效关系是在中药指纹图谱研究基础上,开展的关于中药指纹图谱与中药药效相关性的一种科学研究方法,该方法揭示了药效相关性,阐明了药效活性成分,为探索建立反映中药内在质量的评价方法和中药药效物质基础的研究提供了一种新的方向和思路^[7]。陆世银等^[8]考察岩黄连提取物对抑制 HSC-T6 细胞增殖活性效果,采用正交投影偏最小二乘法(Orthogonal Partial least squares, OPLS)对 9 个岩黄连提取物进行 HPLC 表征分析并确定了 21 个共有峰,其中有 6 个峰具有显著的抑制活性。符继红等^[9]通过 GC-MS 结合偏最小二乘法(PLS)发现薰衣草挥发油成分中芳樟醇抑制金黄色葡萄球菌活性最强。

本研究基于 GC-MS 分析,利用 Simca-p11.5 软件的双变量相关(bivariate)数据分析^[10],根据 S-载荷图、变异权重参数(variable importance in projection, VIP)和皮尔逊(Pearson)相关系数来研究特征峰与药效的相关性,寻找抑制人肺癌 A459 细胞株和肝癌 7721 细胞株起显著作用的有效活性成分,可用于揭示石上柏挥发油的抗肿瘤药效物质基础,并指导石上柏挥发油的指纹图谱质量评价及抗肿瘤活性成分的筛选。

1 材料

HP 6890/HP 5973N 型 GC-MS 联用仪(美国惠普公司),WD-9417B 型酶标仪(苏州奇乐电子科技有限公司),2BW2 型循环水式多用真空泵(淄博群英真空泵制造有限公司),5810R 型高速离心机(德国 Eppendorff 公司),CO₂ 恒温培养箱(美国 Forma 公司),SCV4AI 型超净工作台(美国 Shellab 公司)。

实验用石上柏药材采自于贵州、重庆、四川、广西等 10 个产地,经遵义医学院天然药物研究所张玉金副教授鉴定为卷柏科植物石上柏 *Selaginella doederleinii* 的全草,标本存放于遵义医学院生药学实验室。来源信息见表 1。

表 1 石上柏产地来源信息

Table 1 *Selaginella doederleinii* habitats and resource

No.	采集地
S1	广西玉林中药材市场
S2	广西南宁中药材市场
S3	广西桂林百合中药材公司
S4	贵州遵义四面山
S5	贵州遵义蒲老场
S6	贵州赤水四洞沟
S7	重庆武胜药材市场
S8	重庆潼南县药材市场
S9	四川成都荷花池中药材市场
S10	四川中药材公司

高糖 DMEM 培养基,胰蛋白酶(trypsin),二甲基四氮唑蓝(MTT)(上海百灵威公司);新生胎牛血清(杭州四季青公司);磷酸钠、青霉素、链霉素、二甲基亚砷(DMSO)和乙二胺四乙酸二钠(EDTA)(成都长征化玻试剂公司);人肺腺癌 A549(批号 160308)和人肝癌 7721 细胞株(批号 160312)均购于中科院上海细胞库。

2 方法与结果

2.1 石上柏挥发油 GC-MS 分析

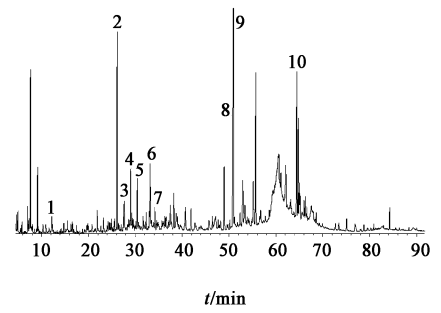
2.1.1 挥发油的制备 按照 2015 年版《中国药典》四部附录中记载的水蒸气蒸馏法,提取不同产地石上柏挥发性成分。选取 10 批干燥的石上柏全

草,粉碎,称量 200 g,置于 5 000 mL 圆底烧瓶中,加入水 2 500 mL,采用水蒸气蒸馏法,蒸馏约 5 h;馏出液用石油醚连续萃取 3 次,每次 20 mL;合并萃取液,用无水硫酸钠干燥过夜,减压回收石油醚,得到 0.25 ~ 0.32 g 挥发油(淡黄色液体)。

2.1.2 分析条件 GC 分析条件:HP-5MS 弹性石英毛细管柱(0.25 mm × 30 m, 0.25 μm),采用程序升温(50 °C 保持 5 min,以 10 °C · min⁻¹ 升至 200 °C,恒温 5 min,又以 5 °C · min⁻¹ 升至 250 °C,恒温 10 min),气化室温度 260 °C,载气为高纯氦气(99.999%),载气流量 1.0 mL · min⁻¹,进样量 1 μL,分流比 20:1。

MS 分析条件:离子源为 EI 源,离子源温度 230 °C,四极杆温度 150 °C,倍增器电压 1 994 kV,接口温度 250 °C,电子能量 70 eV,发射电流

34.6 μA,溶剂延迟 4 min,质量范围 *m/z* 10 ~ 550。见图 1,表 2。



1. 芳樟醇;2. β-石竹烯;3. 橙花叔醇;4. 紫罗兰酮;5. 香橙烯;6. 斯巴醇;7. 雪松醇;8. 新植二烯;9. 植酮;10. 亚油酸甲酯;11. 亚麻酸甲酯

图 1 石上柏挥发油总离子流

Fig. 1 GC-MS profile of essential oil from buds of *Selaginella doederleinii* volatile oil

表 2 不同产地石上柏挥发油成分比较

Table 2 Chemical constituent comparison of *Selaginella doederleinii* volatile oil from various habitat

No.	<i>t_R</i> /min	化学成分	分子式	相对质量分数/%									
				S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	4.95	庚醛	C ₇ H ₁₄ O	-	-	-	0.40	0.85	0.41	-	2.44	0.27	-
2	5.82	α-蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	-	-	0.35	0.15	-	0.24	-	-	-	-
3	7.04	水芹烯	C ₁₀ H ₁₆	-	-	-	-	1.56	0.66	-	-	-	-
4	7.32	辛烯	C ₈ H ₁₆ O	-	-	4.06	1.58	0.42	0.21	0.91	3.34	2.51	-
5	7.65	2-戊基-呋喃	C ₉ H ₁₄ O	3.75	4.29	2.02	1.95	4.35	3.28	1.14	2.16	2.36	2.07
6	7.86	3-辛醇	C ₈ H ₁₈ O	-	-	-	0.23	-	-	0.31	0.81	0.25	-
7	9.16	桉油精	C ₁₀ H ₁₈ O	1.52	-	-	-	-	1.37	-	-	-	-
8	10.88	4-壬酮	C ₉ H ₁₈ O	-	-	-	0.35	-	0.41	-	-	-	-
9	12.13	芳樟醇	C ₁₀ H ₁₈ O	1.59	0.71	0.71	1.04	0.41	1.38	0.03	1.14	0.98	0.38
10	12.24	壬醛	C ₉ H ₁₈ O	0.29	-	0.79	0.56	-	0.34	-	-	-	-
11	14.77	2-壬烯醛	C ₉ H ₁₈ O	-	-	-	0.31	-	0.27	-	-	-	-
12	19.62	4-羟基-3-壬烯酸	C ₉ H ₁₆ O ₂	-	-	-	0.20	-	0.13	-	0.63	-	-
13	20.75	1-甲基-臭樟脑	C ₁₁ H ₁₀	-	-	-	0.39	-	0.05	-	0.24	-	-
14	21.29	壬酸	C ₉ H ₁₈ O ₂	-	-	-	0.54	-	-	-	-	-	-
15	21.85	2,4-癸二烯醛	C ₁₀ H ₁₆ O	-	-	-	0.64	3.61	0.68	1.04	-	-	0.51
16	24.03	5-戊基-呋喃酮	C ₉ H ₁₆ O ₂	-	-	-	-	0.27	0.17	0.23	-	-	-
17	25.16	十四烷	C ₁₄ H ₃₀	0.59	-	-	0.35	-	-	0.39	0.33	0.63	-
18	25.47	癸酸	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	-	-	-	0.49	-	0.14	-	-	-	-
19	25.57	氢化紫罗兰酮	C ₁₃ H ₂₆ O	-	-	-	0.48	-	0.32	-	-	-	1.22
20	26.11	β-石竹烯	C ₁₅ H ₂₄	8.99	0.23	2.12	0.60	0.36	5.60	0.98	0.44	0.13	0.27
21	27.48	α-石竹烯	C ₁₅ H ₂₄	0.43	-	-	-	-	0.28	0.52	-	-	-
22	27.62	橙花叔醇	C ₁₅ H ₂₆ O	1.24	0.00	0.88	0.00	0.58	1.47	0.56	1.15	1.09	0.23

续表 2

No.	t_R /min	化学成分	分子式	相对质量分数/%									
				S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
23	28.57	环葵完	$C_{10}H_{20}$	-	0.42	-	0.26	0.71	0.50	-	-	-	-
24	28.77	萘	$C_{12}H_{10}$	-	-	1.21	0.78	-	-	-	0.63	1.08	-
25	29.00	β -紫罗兰酮	$C_{13}H_{20}O$	3.13	0.52	3.32	1.54	3.55	1.73	0.21	1.47	1.47	0.32
26	29.30	十五烷	$C_{15}H_{32}$	-	2.31	-	2.42	-	0.42	2.14	3.17	4.16	-
27	29.74	β -榄香烯	$C_{15}H_{24}$	-	-	-	0.18	-	-	0.89	-	-	-
28	30.12	香橙烯	$C_{15}H_{24}$	2.29	0.85	0.04	1.14	0.51	0.56	0.47	0.06	1.46	0.20
29	30.43	二苯并呋喃	$C_{12}H_8O$	0.27	0.19	0.60	1.34	1.99	1.61	1.13	1.43	0.69	0.25
30	31.65	榄香醇	$C_{15}H_{26}O$	-	-	-	0.30	-	0.43	-	-	0.22	-
31	32.95	芴	$C_{13}H_{10}$	-	-	-	2.02	3.20	-	-	-	0.52	-
32	33.00	斯巴醇	$C_{15}H_{24}O$	0.00	0.65	0.83	1.58	0.62	0.52	1.44	0.72	0.00	0.95
33	33.18	石竹烯氧化物	$C_{15}H_{24}O$	-	1.45	-	-	-	2.31	-	-	-	-
34	33.80	十六烷	$C_{16}H_{32}$	-	-	1.88	2.67	-	-	2.62	2.66	4.08	-
35	34.15	雪松醇	$C_{15}H_{26}O$	1.13	0.77	0.85	0.04	0.43	0.89	0.03	0.70	0.93	0.60
36	38.71	3,7,11-三甲基-十二烷醇	$C_{15}H_{32}O$	-	-	-	0.44	-	1.13	-	-	-	-
37	38.96	16-葵烯醛	$C_{18}H_{34}O$	-	-	-	-	2.27	0.42	-	-	-	-
38	40.50	十七烷	$C_{17}H_{36}$	0.98	-	-	0.78	-	0.20	-	0.85	0.93	-
39	41.86	十八醛	$C_{18}H_{34}O$	-	-	-	-	2.73	1.00	-	-	-	-
40	42.73	十三烷酸	$C_{15}H_{30}O_2$	-	-	-	0.42	-	0.25	-	-	-	-
41	45.73	菲	$C_{14}H_{10}$	-	-	-	2.61	9.04	0.59	-	2.82	0.69	-
42	46.97	十四烷酸	$C_{13}H_{26}O_2$	-	-	-	1.50	-	0.25	-	-	-	-
43	47.67	十八烷	$C_{18}H_{38}$	-	-	-	0.28	-	0.28	-	-	-	-
44	50.18	蒎烷	$C_{10}H_{18}$	-	-	-	0.85	-	-	-	1.86	-	-
45	50.19	新植二烯	$C_{20}H_{38}$	2.52	0.65	0.86	1.31	0.05	1.32	0.48	2.01	1.71	0.59
46	50.91	植酮	$C_{18}H_{36}O$	20.25	4.29	9.65	5.86	14.63	11.75	13.7	5.87	7.32	27.71
47	52.34	邻苯二甲酸异丁酯	$C_{16}H_{22}O_4$	0.53	5.51	3.22	2.53	4.46	0.44	0.30	2.74	3.58	6.91
48	53.38	9-十八烯酸	$C_{18}H_{34}O_2$	-	1.23	-	0.86	3.93	1.42	-	1.19	1.83	-
49	53.88	十九烷	$C_{19}H_{40}$	-	-	-	-	-	0.20	0.41	-	-	-
50	55.13	十六烷酸甲酯	$C_{18}H_{30}O$	-	-	-	9.14	3.59	2.62	0.63	11.49	14.4	-
51	55.71	异植醇	$C_{20}H_{40}O$	0.52	-	-	0.32	-	0.27	0.75	0.54	-	-
52	56.50	酞酸二丁酯	$C_{16}H_{22}O_4$	0.18	0.71	0.32	0.95	0.39	0.26	1.05	0.85	0.92	0.21
53	60.61	十六烷酸	$C_{16}H_{32}O_2$	20.79	36.19	27.62	22.11	3.81	17.28	13.77	1.82	0.57	0.42
54	62.09	十七烷酸	$C_{17}H_{34}O_2$	1.46	1.18	2.83	2.00	0.35	1.49	0.20	1.11	0.29	0.34
55	63.14	十八烷酸	$C_{18}H_{36}O_2$	0.68	0.93	0.66	0.76	0.45	0.67	0.53	0.68	0.41	0.56
56	64.45	亚油酸甲酯	$C_{19}H_{34}O_2$	2.80	2.31	5.29	4.25	3.10	5.34	5.33	5.91	5.83	2.62
57	64.75	亚麻酸甲酯	$C_{19}H_{32}O_2$	2.92	1.69	3.47	4.50	1.74	3.06	3.71	6.21	5.91	2.64
58	65.13	十八烷酸甲酯	$C_{19}H_{38}O_2$	0.61	-	-	0.69	3.88	0.62	1.01	-	-	-
59	65.57	十九烷酸甲酯	$C_{20}H_{40}O_2$	-	0.22	-	-	-	0.48	-	-	-	-
60	66.01	植醇	$C_{20}H_{40}O$	-	-	-	2.55	-	0.83	6.1	-	-	-
61	68.60	1-乙酰基-吡咯烷	$C_6H_{11}NO$	-	-	0.33	-	-	0.43	-	-	-	1.16
62	68.29	十九烷酸	$C_{19}H_{38}O_2$	-	-	-	-	1.11	-	-	0.75	-	-
63	75.08	二十烷	$C_{20}H_{42}$	-	-	-	-	-	0.61	1.01	-	0.21	-
64	84.28	二十一烷	$C_{21}H_{44}$	0.61	4.98	3.35	-	1.94	0.62	1.43	1.37	1.49	1.19

通过 GC-MS 化学工作站数据处理系统,按峰面积归一化法计算出各挥发性成分在挥发油中的相对质量分数。通过 HPMSD 化学工作站检索 WileyNist05 质谱图库和 Nist05 标准质谱图库解析,匹配度要求 >95%,共分离出 71 个化合物,鉴定出其中 64 个化合物,其相对峰面积分别占总峰面积的 98.19%。挥发油成分主要包括萜类,脂肪酸及其烃类化合物。其中脂肪酸类化合物在 10 个产地石上柏中含量最高。

萜类主要包括了石竹烯, β -紫罗兰酮,芳樟醇,橙花叔醇,新植二烯,匙叶桉油烯醇,柏木脑,香橙烯等化合物,特别是石竹烯含量相对较高,在 1 号产地最高(8.99%),在 7 号产地最低(0.13%)。萜类成分在 10 个产地中含量有所不同,广西产地和贵州产地所含萜类成分含量较高,而重庆和四川产地含量较低。萜类化合物生物活性广泛,本样品中芳樟醇不仅可以有效地抑制多种肿瘤细胞增殖而且能够诱导肿瘤细胞凋亡和分化^[11]。石竹烯可以强烈诱导谷胱甘肽的活性肽转移酶到小鼠肝脏和小肠,从而起到抑制肿瘤的作用^[12]。

脂肪酸类包括了饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸,不饱和脂肪酸主要含有亚油酸甲酯、亚麻酸甲酯等化合物,亚油酸甲酯、亚麻酸甲酯能够减轻血液中胆固醇和甘油酸三脂^[13],但他们的含量在不同产地石上柏中有所不同,亚麻酸甲酯在 8 号产地样品中含量最高(6.21%),在 2 号产地样品中含量最低(1.69%)。亚油酸甲酯在 7 号产地样品中含量最高(5.91%),在 2 号产地样品中含量最低(2.31%)。重庆产地和四川产地样品中所含饱和脂肪酸含量较高,而贵州产地和广西产地样品中含量较低。

不同产地样品挥发油成分会不同,并且相同化学成分的含量也不同,这可能与当地的气候条件、土壤条件、纬度、海拔、日照强度、培养条件及其他因素有关。结果表明不同产地石上柏挥发油成分有明显差异,可作为考察依据。经查阅文献,发现萜类成分和不饱和脂肪酸具有抗肿瘤作用^[14-15],因此笔者选择 10 个产地样品中 11 个含量较高的萜类化合物及饱和脂肪酸(芳樟醇, β -石竹烯,橙花叔醇,紫罗兰酮,香橙烯,斯巴醇,雪松醇,新植二烯,植酮,亚油酸甲酯,亚麻酸甲酯)作为研究对象,寻找与抗肿瘤作用相关的活性成分。

2.2 抗肿瘤作用 肿瘤细胞在 1640 培养基中培养,培养基中含有 L-谷氨酰胺 2 nmol·L⁻¹,10% 胎

牛血清,链霉素 100 U·mL⁻¹和青霉素 100 U·mL⁻¹。在 37 ℃ 条件下,用 5% CO₂ 常规培养。每 3 d 放置于倒置显微镜观察 1 次细胞生长情况,待细胞铺满培养瓶 70% 以上时,采用 0.25% 胰蛋白酶传代,备用。取人肺腺癌 A549 和人肝癌 7721 细胞悬液接种于 96 微孔培养板,细胞密度约为 1 × 10⁵ 个/mL,每孔 100 μL。设置 5 个调零孔,5 个阴性对照孔,培养 12 h 后,分别加入各产地的石上柏挥发油,每孔 10 μL,药物作用时间 48 h,加入 MTT 20 μL,继续放入 CO₂ 培养箱培养 4 h,吸去培养液,加入 DMSO 150 μL,调零孔同样加入 DMSO 150 μL。平板震荡器震荡 20 min,用酶标仪在 490,580 nm 处测定去除本底吸收后的吸光度 A。按下列公式计算不同产地石上柏挥发油的抑制率。抑制率(%) = (A_{阴性对照组} - A_{实验组}) / A_{阴性对照组} × 100%。实验设两个组:阴性对照组(无药物)和实验组(不同产地的石上柏样品溶液)。阴性对照组,样品组每个浓度都分别设 5 个复孔,每块板重复在酶标仪上检测 3 次,结果取平均值。根据不同产地不同浓度的石上柏萃取物计算抗肿瘤的半数抑制浓度(IC₅₀)。见表 3。

表 3 石上柏挥发油抑制人肺癌 A549 和肝癌 7721 细胞的 IC₅₀
Table 3 IC₅₀ of *Selaginella doederleinii* volatile oil on A549 cells and 7721 cell mg·L⁻¹

No.	肺癌 A549	肝癌 7721	No.	肺癌 A549	肝癌 7721
S1	94.50	70.63	S6	46.81	35.92
S2	89.37	57.39	S7	102.28	83.60
S3	84.26	64.63	S8	117.60	78.31
S4	52.69	45.58	S9	123.58	106.64
S5	62.74	34.02	S10	143.31	89.86

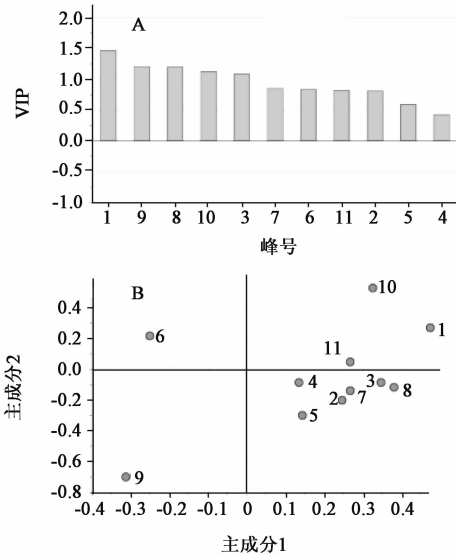
从表 3 可以看出,不同产地石上柏挥发油对 A549 和 7721 细胞株具有一定的抑制作用,但不同来源的石上柏药材制备的挥发油,对肺癌和肝癌细胞的抑制作用存在较大的差异,其中抑制 A549 细胞最高的 IC₅₀ 为 46.81 mg·L⁻¹(S6),最低的是 143.31 mg·L⁻¹(S10);抑制 7721 细胞最高的 IC₅₀ 为 34.02 mg·L⁻¹(S5),最低的是 106.64 mg·L⁻¹(S9)。总体来说,贵州产地的石上柏抗肿瘤效果最好,而四川产地的石上柏效果较差。

2.3 OPLS 分析 OPLS 是一种改进的偏最小二乘法,在代谢组学中常被用于筛选潜在标志物^[16],通过 SIMCA-P 11.5 软件(瑞典 umetrics 公司)分析,根据 S-载荷图和变异权重系数等信息来判断 X 对 Y

的贡献大小,一般认为 S-载荷图中距原点越远的变量贡献越大,VIP 值越大的变量贡献也越大。 $R^2Y = \sum (\hat{y}_i - \bar{y})^2 / \sum (y_i - \bar{y})^2$, R^2Y 为多元线性相关系数, y_i 为第 i 项自变量; \bar{y} 为自变量平均数。VIP = δ_i / \bar{X}_i , δ_i 为第 i 项标准差, \bar{X}_i 为第 i 项平均数。

本研究将不同产地石上柏挥发油的 11 个特征峰相对峰面积数据和肺癌细胞 IC₅₀ 或者肝癌细胞 IC₅₀ 数据分别作为 X 和 Y , 导入软件, 采用 OPLS 分析, 提取 2 个主成分后, 肺癌模型参数为 $R^2Y_1 = 0.808$, $R^2Y_2 = 0.728$ 。肝癌模型参数为 $R^2Y_1 = 0.803$, $R^2Y_2 = 0.716$ 。

从 S-载荷图和变异权重系数图(图 2, 3, 选取 VIP > 1 的变量^[17]) 可见, 对肺癌细胞抑制率有较大贡献的特征峰依次为 1 > 9 > 8 > 10 > 3 号峰, 对肝癌细胞抑制率有较大贡献的特征峰依次为 10 > 1 > 8 > 11 > 9 > 3 号峰, 各峰对应物质中, 芳樟醇、橙花叔醇、亚麻酸甲酯、亚油酸甲酯对不同癌细胞的抗肿瘤活性已有文献报道^[18], 新植二烯和植酮是否具有抑制癌细胞活性, 目前尚无文献参考, 还有待实验验证。



A. 变异权重系数数值直方; B. S-载荷(图 3 同)

图 2 石上柏挥发油抑制肺癌 11 个特征峰的 OPLS 分析

Fig. 2 OPLS of 11 characteristic peaks from orthogonal partial least squares on *Selaginella doederleinii* volatile oil against human lung cancer cell line (A549)

为了验证所选 5 个色谱峰对药物活性的贡献大小, 以这 5 个峰的相对峰面积数据为 X , 肺癌细胞 IC₅₀ 或者肝癌细胞 IC₅₀ 数据设为 Y , 重新进行 OPLS 分析。提取 2 个主成分后, 肺癌模型参数为 $R^2Y_1 =$

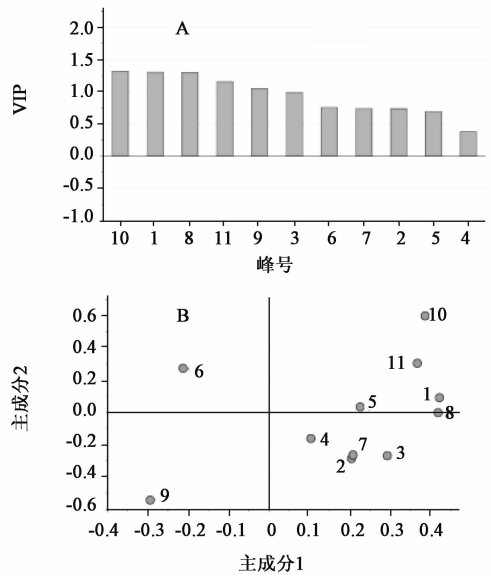


图 3 石上柏挥发油抑制肝癌 11 个特征峰的 OPLS 分析

Fig. 3 OPLS of 11 characteristic peaks from orthogonal partial least squares on *Selaginella doederleinii* volatile oil against human liver cancer cell (7721)

0.777, $R^2Y_2 = 0.673$; 肝癌模型参数为 $R^2Y_1 = 0.782$, $R^2Y_2 = 0.669$ 。表明新模型对肺癌和肝癌细胞仍然具有较强的解释能力。因此, 可认为芳樟醇等 5 个成分为石上柏挥发油抑制肝癌和肺癌细胞增殖的活性成分。

另采用双变量 (Bivariate) 相关性分析 (SPSS 18.0 软件), 计算 10 个产地石上柏挥发油的 11 个特征峰相对峰面积和肺癌细胞 IC₅₀ 或者肝癌细胞 IC₅₀ 之间的相关系数, 结果见表 4。皮尔逊相关系数显示了 11 个特征峰的峰面积和肿瘤细胞 IC₅₀ 之间的相关程度, 其中 1, 8, 10, 3, 9 号特征峰与肿瘤细胞抑制率相比较具有显著相关性 ($P < 0.05$), 与 OPLS 分析结果一致。而 11 号峰与肝癌细胞抑制率显著相关 ($P < 0.05$), 但与肺癌细胞抑制率没有显著相关性。

3 讨论

本研究在不同产地石上柏挥发油 GC-MS 分析的基础上, 建立了肺癌细胞 (A549) 和肝癌细胞 (7721) 的谱效关系模式, 采用正交投影偏最小二乘法 and 双变量相关分析法, 根据 S-载荷图, VIP 和 Pearson 相关系数来辨识显著活性成分。从 11 个特征峰中找到了 5 个对石上柏挥发油抗肿瘤作用贡献较大的色谱峰, 有助于揭示石上柏挥发油抗肿瘤药效物质基础, 提高了质量评价的针对性, 简化了评价指标的个数。并为石上柏的深入开发和利用提供依据。

表 4 石上柏挥发油 11 个特征峰与抑制肺癌细胞或肝癌细胞 IC₅₀ 之间的皮尔逊相关系数

Table 4 Pearson correlation index between 11 characteristic peaks and IC₅₀ of *Selaginella doederleinii* volatile oil against human lung cancer cell line and human liver cancer cell line

峰号	肺癌皮尔逊 相关系数	肝癌皮尔逊 相关系数	峰号	肺癌皮尔逊 相关系数	肝癌皮尔逊 相关系数
1	0.807 ²⁾	0.720 ²⁾	7	0.455	0.355
2	0.418	0.348	8	0.649 ²⁾	0.713 ²⁾
3	0.591 ¹⁾	0.498 ¹⁾	9	-0.532 ¹⁾	-0.502 ¹⁾
4	0.228	0.176	10	0.555 ¹⁾	0.658 ²⁾
5	0.245	0.384	11	0.455	0.626 ¹⁾
6	0.425	0.362			

注:与肿瘤细胞抑制率相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

[参考文献]

[1] 黄建勇,李少光,李宇翔,等. 石上柏的研究概况[J]. 海峡药学,2013,25(7):18-21.

[2] 高红霞,张佐妹,薛桂荣. 卷柏中总黄酮提取工艺的研究[J]. 黑龙江医药科学,2010,33(5):64-65.

[3] 戴卫波,梅全喜,曾聪彦. 石上柏化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. 中国药业,2011,20(2):15-16.

[4] 黎霜,黄可龙. 深绿卷边的研究进展[J]. 时珍国医国药,2010,21(10):2637-2640.

[5] 赵倩,王彩霞,李艳玲. 石上柏化学成分及生物活性的研究[J]. 中草药,2013,44(23):3270-3275.

[6] 丁奇. 石上柏与江南卷柏等混用品的比较鉴定研究[J]. 现代中药研究与实践,2015,13(12):153-156.

[7] 曾令军,林兵,宋洪涛. 中药谱效关系的研究进展及关键问题讨论[J]. 中国中药杂志,2015,40(8):1425-1432.

[8] 陆世银,郑华,程邦. 基于组效关系的壮药岩黄连抑制 HSC-T6 细胞增殖活性成分辨识研究[J]. 中草药,2017,48(7):1354-1361.

[9] 符继红,唐军,廖享,等. 基于抑菌活性成分的薰衣草精油组效关系研究[J]. 质谱学报,2015,36(5):403-410.

[10] 王灯节,刘廷,狄留庆. 基于组效关系的姜黄挥发油抗肿瘤活性成分辨识研究[J]. 中草药,2015,46(23):3447-3454.

[11] 姜冬梅,朱源,余江南,等. 芳樟醇药理作用及制剂研究进展[J]. 中国中药杂志,2015,40(18):3530-3533.

[12] 李小宝,陈光英,宋小平,等. 皂帽花果实挥发油成分及抗肿瘤活性研究[J]. 中药材,2013,36(11):1786-1788.

[13] 王向群,陈丽娟,吴丹. n-3 多不饱和脂肪酸抗肿瘤机制的研究进展[J]. 实用癌症杂志,2011,26(3):321-325.

[14] 王晖,陈克能. ω-3 多不饱和脂肪酸与肿瘤[J]. 肿瘤代谢与营养电子杂志,2014,21(3):121-125.

[15] 陈静,单圆鸿,严沁. 一种基于液相色谱-质谱技术进行血清代谢组学研究的方法:从代谢指纹到潜在标志物[J]. 中国科学(B辑:化学),2009,39(10):1268-1276.

[16] 刘永霞,朱小丽,陈玉华,等. 雄激素非依赖前列腺癌细胞系代谢组学的初步研究[J]. 分析化学,2011,39(3):305-311.

[17] 李小宝,陈光英,宋小平,等. 皂帽花果实挥发油成分及抗肿瘤活性研究[J]. 中药材,2013,36(11):1786-1788.

[18] 张大帅,钟琼芯,宋鑫明,等. 筋欐花椒叶挥发油的 GC-MS 分析及抗菌抗肿瘤活性研究[J]. 中药材,2012,35(8):1263-1267.

[责任编辑 顾雪竹]