

蟾皮活性组分的分离与体外抗肿瘤活性考察

曹伟¹, 刘聪燕², 陈彦^{1,2*}, 袁菱¹, 王莹¹

(1. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013; 2. 江苏省中医药研究院
中药新型给药系统重点实验室, 国家中医药管理局中药释药系统重点研究室, 南京 210028)

[摘要] **目的:** 分离蟾皮活性组分并考察大孔树脂不同洗脱部位对肺癌细胞 A549 生长的抑制作用。**方法:** 采用静态吸附-洗脱试验筛选大孔树脂型号, 单因素试验优选蟾皮活性组分的大孔树脂纯化工艺。建立乙醇洗脱液中总生物碱和 4 种蟾毒二烯内酯类成分的含量测定方法, 通过 MTT 试验测定不同洗脱部位对肺癌细胞 A549 的抑制率。**结果:** AB-8 型大孔树脂对蟾皮总生物碱和 4 种二烯内酯类成分均具有较好的吸附分离性能, 4 个不同乙醇洗脱部位对肺癌细胞 A549 均表现出抑制作用, 30% 乙醇和 70% 乙醇洗脱液的细胞抑制率较高, IC_{50} 分别为 1.83, 2.23 $mg \cdot L^{-1}$ 。**结论:** 大孔树脂可用于分离纯化蟾皮中活性组分, 不同洗脱部位对肺癌细胞 A549 的抑制率呈现一定的浓度依赖性, 30% 乙醇和 70% 乙醇洗脱部位可作为蟾皮抗肿瘤制剂的重点有效组分。

[关键词] 蟾皮; 活性组分; 大孔树脂; 分离纯化工艺; 肺癌; 抑制率; 静态吸附-洗脱试验

[中图分类号] R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0017-04

[doi] 10.11653/syjf2013240017

Separation and *in vitro* Antitumor Activity Investigation of Active Constituents from Toad Skin

CAO Wei¹, LIU Cong-yan², CHEN Yan^{1,2*}, YUAN Ling¹, WANG Ying¹

(1. School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;

2. Key Laboratory of Novel Drug Delivery System of Chinese Meteria Medica, Jiangsu Provincce Academy of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Drug Delivery System of Chinese Meteria Medica, State Administration of Traditional Chinese Medicine of the People's Republic of China, Nanjing 210028, China)

[Abstract] **Objective:** To isolate active constituents from toad skin and investigate inhibition effect of different macroporous resin elution parts on growth of lung cancer cell line A549. **Method:** Type of macroporous resin was screened by static adsorption-elution test, single factor tests were adopted to optimize separation and purification technology of active constituents from toad skin. Assay methods of total alkaloids and four bufadienolides were established, inhibition rate of different elution parts on lung cancer cell line A549 was determined by MTT assay. **Result:** AB-8 macroporous absorption resin was selected with a better adsorption separation property for total alkaloids and four bufadienolides from toad skin, four different elution parts exhibited certain inhibition effect on lung cancer cell line A549, 30% and 70% ethanol eluent showed stronger inhibition effect with IC_{50} of 1.83 and 2.23 $mg \cdot L^{-1}$, respectively. **Conclusion:** Macroporous absorption resin could be used for separation and purification of active constituents from toad skin, inhibition effect of different elution parts on lung cancer cell line A549 showed a certain concentration-dependent, 30% and 70% ethanol elution parts could be used as key active ingredients in antitumor preparations of toad skin.

[收稿日期] 20130730(002)

[基金项目] 江苏省中医药领军人才项目(LJ200913)

[第一作者] 曹伟, 在读硕士, 从事药剂学研究, Tel:18013821610, E-mail:cwxyz_love@126.com

[通讯作者] * 陈彦, 研究员, 硕士生导师, 从事中药新型给药系统研究, Tel:025-85608672, E-mail:y.chen202@hotmail.com

[**Key words**] toad skin; active constituents; macroporous resin; separation and purification technology; lung cancer; inhibition rate; static adsorption-elution test

蟾皮功能清热解毒、利水消胀^[1],具有抗肿瘤、抗乙肝病毒等药理活性,临床用于治疗原发性肝癌、肺癌、肠癌及慢性乙型肝炎等疾病^[2]。现代医学研究表明蟾皮中抗肿瘤活性成分有两类:一类为水溶性成分,主要为吲哚类生物碱;另一类为脂溶性成分,主要以蟾毒二烯内酯类为主,属于强心甙类化合物,可分为游离型和结合型化合物,其中游离型称为蟾毒配基,如蟾毒灵、蟾毒它灵、华蟾酥毒基等,结合型称为蟾蜍毒素,如脂蟾毒配基-3-硫酸酯、远华蟾蜍精-3-单辛酸酯、蟾毒灵-3-丁二酰精氨酸酯等,此类化合物的结构特点为 17 位碳原子上连有一个 α -吡喃酮基^[3-6]。本实验运用大孔树脂分离纯化蟾皮醇提物,得到 4 个不同洗脱部位,采用 MTT 测定 4 个不同洗脱部位对肺癌细胞 A549 的抑制率,为蟾皮抗肿瘤制剂的开发利用提供依据。

1 材料

1260 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),MV-2802 型紫外-可见分光光度计[尤尼柯(上海)仪器有限公司],AB135-S 型分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司),Milli-Q 型超纯水设备(美国 Millipore 公司),ERA CELL 500 型 CO₂ 细胞培养箱、MK3 型全自动酶标仪(美国 Thermo Forma 公司)。

HPD100,HPD500,DM130,AB-8 型大孔树脂(沧州宝恩吸附材料科技有限公司),RPMI-1640 培养粉(美国 GIBCO 公司),灭菌小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),0.25% 胰蛋白酶液、A549 肺癌细胞株(南京凯基科技发展有限公司),蟾毒它灵、蟾毒灵对照品(上海同田生物技术有限公司,批号分别为 10102631,11070631),华蟾素毒基、酯蟾毒配基、5-羟色胺盐酸盐对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110803-200605,110718-200507,111656-200401),蟾皮(购自江苏扬州,经南京中医药大学药学教研室吴德康教授鉴定为蟾蜍科动物中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor 的干燥皮),乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总生物碱的含量测定^[7]

2.1.1 线性关系考察 精密称取 5-羟色胺对照品 3.02 mg,加水溶解并定容至 10 mL,分别精密量取

该对照品溶液 0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL 于 5 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,得系列对照品稀释液。精密量取上述稀释液各 4.0 mL 于 10 mL 量瓶,各加入 15% 对二甲氨基苯甲醛盐酸溶液 5.0 mL,加水稀释定容,摇匀后放置 30 min,以水作空白,分别于 555 nm 处测定吸光度(A),以质量浓度(C)为横坐标,A 为纵坐标,得回归方程 $A = 0.0324C + 0.0549$ ($r = 0.9997$),表明 5-羟色胺在 4.8 ~ 24.2 mg·L⁻¹ 与 A 呈良好线性关系。

2.1.2 样品测定 取样品溶液 2.0 mL,15% 对二甲氨基苯甲醛盐酸溶液 5.0 mL,加水定容至 10 mL,放置 30 min,于 555 nm 处测定 A,计算总生物碱含量。

2.2 不同蟾毒内酯的含量测定

2.2.1 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μ m),流动相乙腈-水(40:60),柱温 25 $^{\circ}$ C,检测波长 296 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 10 μ L。

2.2.2 对照品溶液制备 分别精密称取干燥至恒重的蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基对照品 2.06,2.00,2.00,2.03 mg,分别置于 5 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得 4 种成分的对照品贮备液,备用。

2.2.3 线性关系考察 精密量取对照品贮备液适量,配制 4 种成分的系列对照品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,以对照品质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基回归方程分别为 $Y = 4.5697X + 3.5967$ ($r = 0.9998$), $Y = 5.0647X + 4.5467$ ($r = 0.9995$), $Y = 7.2805X - 24.8070$ ($r = 0.9997$), $Y = 5.0848X + 7.6371$ ($r = 0.9995$),线性范围依次为 5.2 ~ 206.0,5.0 ~ 100.0,10.0 ~ 400.0,5.1 ~ 101.5 mg·L⁻¹。

2.2.4 样品测定 取不同部位的洗脱液适量,用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,取续滤液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算 4 种蟾毒内酯成分的含量。

2.3 蟾皮提取液的制备 取蟾皮 400 g,剪碎后粗粉碎,加 10 倍量 90% 乙醇回流提取 2 次,每次 1.5 h,滤过,合并滤液,减压浓缩(-0.08 MPa,50 $^{\circ}$ C)至无醇味,将浓缩液用同体积的石油醚萃取 2 次以除去油脂类成分,调整药液体积至生药质量

浓度 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 备用。

2.4 蟾皮活性组分的分离

2.4.1 大孔树脂型号的选择^[8] 精确量取预处理好的不同型号 (HPD100, HPD500, DM130, AB-8) 干树脂各 2.0 g , 分别置于具塞锥形瓶中, 各加入蟾皮提取液 20 mL , 于室温置振荡床中振荡 24 h , 吸取上清液, 于 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min , 测定 4 种树脂吸附前后药液中蟾毒内酯和总生物碱的含量, 计算静态吸附量, 结果见表 1。

表 1 不同型号大孔树脂对蟾皮活性组分的静态吸附量

树脂型号	蟾毒它灵	蟾毒灵	华蟾素毒基	脂蟾毒配基	总生物碱
HPD100	160.6	220.3	439.9	228.0	523.6
HPD500	142.8	190.2	440.7	247.6	537.8
DM130	183.2	245.1	430.7	270.8	557.1
AB-8	191.1	229.7	463.8	287.5	578.3

将已吸附好的树脂抽滤干, 加 50 mL 水洗脱, 弃去洗脱液, 加 90% 乙醇 20 mL 洗脱, 收集洗脱液, 于室温下置振荡床中振荡解吸 24 h , 吸取上清液, 于 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min , 测定 4 种蟾毒内酯和总生物碱的含量, 计算洗脱率, 结果见表 2。

表 2 不同型号大孔树脂对蟾皮活性组分的静态洗脱率 %

树脂型号	蟾毒它灵	蟾毒灵	华蟾素毒基	脂蟾毒配基	总生物碱
HPD100	83.93	76.41	85.11	81.78	80.23
HPD500	83.47	81.73	82.86	74.66	78.89
DM130	88.18	84.79	79.62	80.71	84.57
AB-8	91.76	92.45	87.18	81.79	86.43

由表 1, 2 可知, AB-8 型树脂对蟾皮活性组分的静态吸附量、静态洗脱量及静态洗脱率均高于其他 3 种大孔树脂。

2.4.2 上样量考察 取预处理好的 AB-8 型大孔树脂 5 g , 湿法装柱 (柱体积 10 mL), 连续加入蟾皮提取液, 以 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速通过树脂柱, 收集流出液, 每 10 mL 为 1 份, 测定蟾毒内酯和总生物碱的含量, 结果见图 1, 显示当上样量为 2 BV 时, 流出液中未检测到 4 种蟾毒内酯和总生物碱, 当上样量 $> 2 \text{ BV}$ 时, 部分成分开始泄漏, 故确定上样液吸附流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 上样量 2 BV 。

2.4.3 蟾皮活性组分的洗脱 取 AB-8 型大孔树脂 5 g , 湿法装柱, 加入蟾皮提取液 2 BV 上样, 用 3 BV 水洗除杂, 依次用体积分数为 30% , 50% , 70% , 90% 的乙醇溶液各 5 BV 以 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速洗

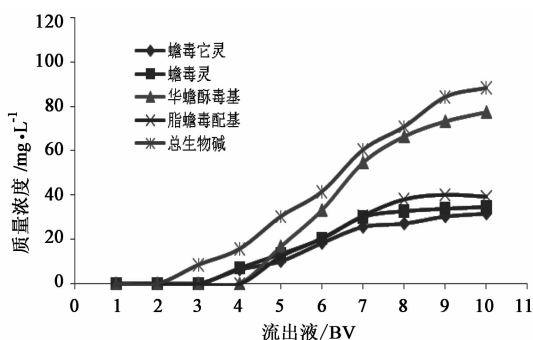


图 1 蟾皮活性组分的 AB-8 型树脂纯化工艺上样量考察

脱, 收集不同体积分数乙醇洗脱液, 测定不同洗脱部位中 4 种蟾毒内酯和总生物碱的含量, 结果见图 2。表明用 30% 乙醇洗脱时, 生物碱成分可被洗脱且在洗脱液用量为 5 BV 时, 洗脱液中总生物碱含量达最大值, 而蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基和脂蟾毒配基基本不能被洗脱; 随乙醇体积分数的增大, 总生物碱洗脱量减小, 但 4 种蟾毒内酯的洗脱量在增大, 当乙醇体积分数达 70% 时, 4 种蟾毒内酯的洗脱量达最大值。

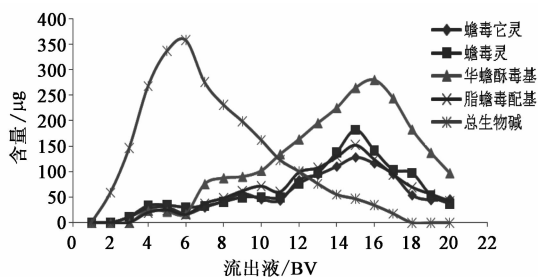


图 2 蟾皮活性组分的洗脱曲线

2.5 不同洗脱部位对 A549 细胞的增殖抑制作用

2.5.1 供试溶液的配制 将收集的 30% , 50% , 70% , 90% 乙醇洗脱液减压回收乙醇, 减压干燥的提取物分别标记为 P30, P50, P70, P90, 备用。分别称取 P30, P50, P70, P90 适量, 加二甲基亚砜 (DMSO) 溶解, 分别用 PBS 溶液稀释得 P30 质量浓度分别为 $484.0, 96.8, 19.4, 3.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, P50 分别为 $522.0, 104.4, 20.9, 4.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, P70 分别为 $472.0, 94.4, 18.9, 3.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, P90 分别为 $528.0, 105.6, 21.1, 4.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列溶液。

2.5.2 MTT 试验 将对数生长期的肺癌细胞 A549 用胰酶消化, 用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基将其配制成浓度 5×10^4 个/mL 的单细胞悬液, 接种于 96 孔培养板上, 每孔 $100 \mu\text{L}$, 培养 24 h , 弃去培养基, 每孔加入无血清培养基 $90 \mu\text{L}$ 及不同质量浓度的蟾皮供试品溶液 $10 \mu\text{L}$, 阳性对照组给予

50 mg·L⁻¹的顺铂溶液,空白对照组给予等体积 PBS 溶液。继续培养 36 h,每孔分别加入 MTT 溶液(5 g·L⁻¹)10 μL,培养 4 h 后终止,弃去上清液,每孔加入 DMSO 100 μL,用微型振荡器振荡 10 min,用酶标仪测定每孔吸光度(A),检测波长 550 nm,参比波长 690 nm,平行测定 3 次,计算药液对细胞生长的抑制率,见图 3。

$$\text{细胞生长抑制率} = [1 - (\bar{A}_{\text{试验组}} / \bar{A}_{\text{空白对照组}})] \times 100\%$$

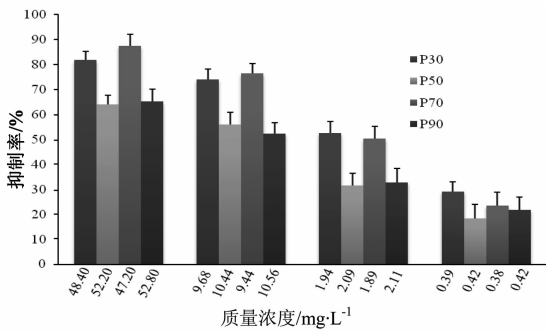


图 3 蟾皮活性组分的 AB-8 型树脂不同洗脱部位对肺癌细胞 A549 的抑制率

由图 3 可知,4 个不同洗脱部位对肺癌细胞 A549 的抑制率呈一定的质量浓度依赖性,P30 和 P70 的细胞抑制率较高。采用 SPSS 11.5 软件计算 P30,P50,P70,P90 的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为 1.83,10.62,2.23,10.45 mg·L⁻¹,P30 和 P70 具有较低的 IC₅₀,且经成分分析,P30 中主要成分为生物碱,P70 中主要成分为蟾毒二烯内酯类,成分相对较为清楚,故 P30 和 P70 可作为蟾皮抗肿瘤制剂的重点有效组分进行研究。

3 讨论

已有研究表明蟾皮中生物碱主要为吲哚类生物碱,故选取 5-羟色胺为对照品,采用 UV 测定蟾皮中总生物碱含量。蟾毒二烯内酯类成分的含量测定则以蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基和脂蟾毒配基 4 种成分的总含量为指标,采用 HPLC 测定不同体积分数乙醇洗脱液中 4 种成分的含量,检测时发现选用乙腈-水作流动相,具有保留时间短、分离效果好、峰形理想等优点。由于低体积分数乙醇洗脱液中 4 种成分的含量较低,不利于检测,需要对洗脱液进行浓

缩后再测定。

通过对不同洗脱部位的体外抗肿瘤活性研究发现,蟾皮中抗肺癌的活性组分不仅有水溶性成分(生物碱)亦有脂溶性成分(蟾毒二烯内酯类),需采用 LC-MS-MS 等手段对不同洗脱部位中成分进一步表征,并结合动物模型,以确证其抗肺癌活性。目前对蟾皮的研究多集中于水溶性成分,如华蟾素注射液等^[9],应增加对蟾皮中水溶性、脂溶性成分的深入研究,为最大限度地发挥蟾皮中药效成分的作用提供依据,有利于蟾皮抗肿瘤制剂的深层次研发。

[参考文献]

[1] 江苏中医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986:2713.

[2] 代丽萍,高慧敏,王智民,等. 蟾皮化学成分的分离与结构鉴定[J]. 药学学报,2007,42(8):858.

[3] QI F H, LI A Y, Inagaki Y, et al. Antitumor activity of extracts and compounds from the skin of the toad *Bufo bufo gargarizans* Cantor [J]. Int Immunopharmacol, 2011,11(3):342.

[4] GAO H, Popescu R, Kopp B, et al. Bufadienolides and their antitumor activity[J]. Nat Prod Rep,2011,28(5):953.

[5] Steyn P S, van Heerden F R. Bufadienolides of plant and animal origin[J]. Nat Prod Rep,1998,15(4):397.

[6] WANG D L, QI F H, TANG W, et al. Chemical constituents and bioactivities of the skin of *Bufo bufo gargarizans* Cantor [J]. Chem Biodivers, 2011, 8(4):559.

[7] 丁秀年,张群林,张艳. 分光光度法测定华蟾素分散片中吲哚类生物碱的含量[J]. 安徽医药,2007,11(12):1093.

[8] 朱浩,侯世祥,孙毅,等. 大孔吸附树脂吸附纯化不同中药有效部位特性研究[J]. 中国中药杂志,2000,25(11):666.

[9] 代丽萍,王智民,高慧敏,等. 蟾皮和华蟾素注射液中蟾毒噁啉含量测定[J]. 中国中药杂志,2007,32(3):224.

[责任编辑 仝燕]