

乌骨藤中白桦酯酸的提取分离及抗肿瘤活性

倪冲,裴志东,张镒小,李春雪,张慧*,康廷国*
(辽宁中医药大学药学院,辽宁 大连 116600)

[摘要] 目的:对乌骨藤中白桦酯酸进行提取分离,并探讨其抗肿瘤活性。方法:采用硅胶柱色谱法、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱法及半制备高效液相色谱法,对白桦酯酸进行提取分离,并采用结晶紫法,以细胞死亡率为检测指标,观察白桦酯酸在不同质量浓度 1~500 mg·L⁻¹ 情况下,对细胞密度为 1×10⁴/孔的 4 种肿瘤细胞分别作用 12,24,36,48 h 的生长抑制作用。结果:白桦酯酸对人宫颈癌细胞 HeLa、人胃癌细胞 MGC、人乳腺癌细胞 MCF-7 具有很好的增殖抑制作用,并呈剂量依赖效应,在质量浓度为 500 mg·L⁻¹ 作用 48 h 时,对 HeLa 细胞及 MGC 细胞的死亡率分别为 77.9%,81.7%,质量浓度为 100 mg·L⁻¹ 作用 48 h 时,对 MCF-7 的细胞死亡率为 74.1%,但对人乳腺导管癌细胞(ZR 株)作用不显著。结论:白桦酯酸对 HeLa, MGC, MCF-7 肿瘤细胞具有抗肿瘤活性,对 ZR 株肿瘤细胞作用不明显。

[关键词] 白桦酯酸;乌骨藤;提取分离;抗肿瘤

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)09-0172-04

Study on Extraction, Isolation and Antitumor Activity of Betulinic Acid from *Caulis Marsdeniae tenocissimae*

NI Chong, PEI Zhi-dong, ZHANG Jia-xiao, LI Chun-xue, ZHANG Hui*, KANG Ting-guo*
(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** Extraction and isolation of betulinic acid from *Marsdenia tenacissima* and investigate the anti-tumor activity were investigated. **Method:** By using silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 chromatography and semi-preparative reversed phase liquid chromatograph, extraction and isolation of betulinic acid, and MTT assay was applied in demonstrating effect on antitumor effect in four tumor cells with different concentrations and at different action time. **Result:** The growth of cervical cancer cells HeLa, gastric cancer cells MGC, breast cancer MCF-7 was significantly inhibited by betulinic acid with a manner of dose-dependence. After 48 h, the cell death rate of HeLa and MGC was 77.9%, 81.7%, respectively. When the concentration of the sample was 500 mg·L⁻¹, the cell death rate of MCF-7 was 74.1%, when the concentration of the sample was 100 mg·L⁻¹, the effect on ducal carcinoma cells was not significant. **Conclusion:** Betulinic acid has an anti-tumor activity on HeLa, MGC, MCF-7.

[Key words] betulinic acid; *Marsdeniae tenocissimae*; extraction and isolation; anti-tumor

乌骨藤为萝藦科牛奶菜属植物通关藤

[收稿日期] 20110906(006)

[基金项目] 中国博士后科学基金特别项目(200902550);辽宁省教育厅基金资助项目(2009T066);大连科技局青年基金项目(2009J22DW040)

[第一作者] 倪冲,硕士研究生,从事中药质量评价及创新药物开发, Tel: 15998619397, E-mail: faanmoiloyo@163.com。

[通讯作者] * 康廷国,教授, E-mail: kangtg@lnutcm.edu.cn
* 张慧,副教授, E-mail: syyyes@163.com

Marsdenia tenocissima(Roxb) Wight et Arn 的干燥藤茎,具有消炎、清热解毒、散结止痛等功效。现代药理临床证实本品具有调节免疫功能,抗肿瘤等作用^[1]。目前其单味药材制成的注射液作为治疗消化道癌的一线药物广泛应用于临床^[2],是临床必用的抗肿瘤药物之一。为探明其抗肿瘤的活性成分,本试验从乌骨藤中提取分离了白桦酯酸,进行了结构确证和纯度分析,并采用结晶紫法^[3]进行了体外抗肿瘤活性研究,为乌骨藤的新药研发奠定基础。

1 材料

1.1 药材 乌骨藤购于安国市杏林药材有限公司,经辽宁中医药大学中药鉴定教研室翟延君教授鉴定为 *Marsdenia tenacissima* (Roxb.) Wight et Arn. 的干燥藤茎。

1.2 细胞系 人宫颈癌细胞 HeLa; 人胃癌细胞 MGC; 人乳腺癌细胞 MCF-7 等购自中国科学院上海细胞生物所; 人乳腺导管癌细胞 ZR 购自北京百星高科技开发有限公司。

1.3 仪器 Waters 半制备高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), Sephadex LH-20 凝胶(Pharmacia 公司), 96 孔无菌培养板(美国 Costar 公司), 血球计数板(上海求精生化仪器厂), DMEM 培养基(美国 GIBCO 公司), SUNRISE 酶标仪(瑞士 TECAN 公司)。

1.4 试剂 小牛血清(NBCS)(杭州四季青生物工程材料有限公司), 胰蛋白酶、四氮唑盐(MTT)(美国 GIBCO 公司), 甲醇为色谱纯(天津科密欧), 其他试剂为分析纯。

2 方法

2.1 白桦酯酸的提取分离

2.1.1 提取 取乌骨藤干燥藤茎粗粉(过 60 目筛)50 kg, 以 8 倍量 70% 乙醇提取 2 h, 70% 乙醇 6 倍量提取 2 h, 合并提取液, 减压浓缩至浸膏, 加水溶解, 分别以石油醚、乙酸乙酯和水饱和正丁醇依次萃取 3 次, 合并正丁醇萃取液, 减压回收正丁醇并浓缩得浸膏 392 g。

2.1.2 分离 取正丁醇部分(114 g), 经硅胶(200~300 目)柱层析分离, 以三氯甲烷-甲醇梯度洗脱, 分段接收, 共得到 26 个流分。其中流分 2 再经硅胶柱层析色谱分离, 分别以石油醚-乙酸乙酯溶剂系统梯度洗脱, 收集体积比为 100:6 和 100:18 洗脱部分; 流分 4 再经硅胶柱层析色谱分离, 分别以氯仿-乙酸乙酯溶剂系统梯度洗脱, 收集体积比为 100:15 洗脱部分, 再经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离, 收集氯仿-甲醇混合溶剂(1:2)洗脱部分。取上述 3 个洗脱部分, 经 TLC 检识, 成分有所交叉, 故将三者合并, 甲醇超声溶解, 备用。

2.1.3 纯化 取上述溶液, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 注入半制备液相色谱仪。色谱条件为色谱柱 Phenomenex Kromasil C₁₈ (250 mm $\times$ 10 mm, 5 μm); 流动相甲醇-水(98:2); 进样质量浓度 5 g $\cdot$ L⁻¹; 进样量 600 μL , 流速 4 mL $\cdot$ min⁻¹; 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长 210 nm。根据色谱峰出峰时间接受流分, 分离得到化合物 I 23.6 mg, 化合物 II 30.1 mg 和化合物 III

27.1 mg。取化合物 II, 经氯仿-甲醇重结晶, 得白桦酯酸, 经 HPLC 测定, 纯度为 96.87%^[4]。

2.1.4 结构测试 取化合物 II 进行 HRMS, IR, NMR 的结构测试。

2.2 白桦酯酸抗肿瘤活性的研究

2.2.1 试剂的配制 结晶紫溶液: 称取适量结晶紫固体, 溶解于生理盐水中, 使结晶紫质量浓度为 0.1%。用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, -20 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

磷酸盐缓冲溶液(PBS): 取 8.0 g NaCl, 0.2 g KCl, 0.2 g KH₂PO₄, 3.49 g Na₂HPO₄ $\cdot$ 12H₂O, 加三蒸水 1 000 mL 溶解, 调 pH 7.2~7.4, 250 mL 分装, 用装有 0.22 μm 和 0.45 μm 的不锈钢无菌微孔滤膜滤器过滤除菌, -4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

培养液: 取 RPMI1640 培养基干粉 1 袋(1 L), 搅拌溶解于 900 mL 三蒸水中, 用磁力搅拌器搅拌至全部溶解后, 加入 NaHCO₃ 2.0 g, 100 U $\cdot$ mL⁻¹ 的青霉素, 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素及 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴灭活的胎牛血清 10 mL, 补加三蒸水至最终体积, 再用磁力搅拌器搅拌均匀。调整培养液的 pH 至 7.2~7.4。用装有 0.22 μm 和 0.45 μm 的不锈钢无菌微孔滤膜滤器过滤除菌, 250 mL 分装于无菌玻璃瓶, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

0.25% 胰蛋白酶: 取 2.5 g 胰蛋白酶, 加 PBS 缓冲液 500 mL 溶解, 调 pH 7.2~7.4, 装有 0.22 μm 和 0.45 μm 的不锈钢无菌微孔滤膜滤器过滤除菌, 20 mL 分装, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.2.2 药液的配制 受试药物: 取白桦酯酸 50 mg, 加乙醇定容至 10 mL。使其质量浓度为 5 g $\cdot$ L⁻¹, 精密量取适量, 加入含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液稀释制成 1, 10, 50, 100, 500 mg $\cdot$ L⁻¹ 溶液, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 备用。阳性对照药: 取 5-FU 注射液, 加入含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液稀释制成 1, 10, 50, 100, 500 mg $\cdot$ L⁻¹ 的溶液, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 备用。

2.2.3 细胞培养 取用胰酶消化后收集的细胞, 用 PBS 洗涤 1~2 次后, 制备成单细胞悬液, 细胞计数后接种于培养瓶中。细胞单层接种在含有 10% 新生小牛血清的培养液中。培养液为 RPMI-1640(GIBCO)、谷氨酰胺(GIBCO)质量浓度为 3%, 培养温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂, 一般为 2~3 d 传代 1 次。

2.2.4 肿瘤细胞的体外生长抑制实验 取肿瘤细胞以 1 $\times$ 10⁴/孔的密度接于 96 孔板(NUNCTM,

Denmark) 中, 培养 24 h 后待细胞贴壁后, 换成含有上述不同浓度受试药物以及含有阳性对照药物 5-FU 的 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液, 每孔 100 μL , 同时设空白对照, 分别培养 12, 24, 36, 48 h。采用结晶紫染色法^[9], 即结晶紫染液 50 μL 在常温下染色 10 min 后, 在酶标仪 (ELX 800) 在 595 nm 处测定存活细胞 A , 每个实验平行 3 次, 通过测定 A 来确定活细胞的数量^[10], 计算细胞死亡率。

细胞生长抑制率 = $(1 - A_{\text{加药组}} / A_{\text{对照组}}) \times 100\%$

2.3 统计学方法 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验, 以 SPSS 16.0 软件处理, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 白桦酯酸的结构确证 白色针状结晶 (氯仿-甲醇), mp 285 ~ 287 $^{\circ}\text{C}$, Libermann-Burchard 反应阳性, 10% 硫酸乙醇溶液 105 $^{\circ}\text{C}$ 加热后显紫色。HRMS $[M-H]^{-}$ m/z : 455.351 3。IR (KBr) cm^{-1} : 3 465, 3 451 (- OH), 3 078 (- C = CH₂), 2 939 ~ 2 872 (- CH₂ - CH₃), 1 690 (- CO - OH), 1 643 (C = C), 1 049, 879 (C = CH₂)。¹H-NMR (C₅D₅N, 300 MHz) δ : 1.77 (3H, s, H-30), 0.81, 1.00, 1.04, 1.06, 1.22 (各 3H, s, Me-23, 24, 25, 26, 27), 3.46 (1H, m, H-3), 4.76 (1H, s, H-29b), 4.94 (1H, s, H-29a); ¹³C-

NMR (C₅D₅N, 300MHz) δ : 39.5 (C-1), 28.3 (C-2), 78.1 (C-3), 39.3 (C-4), 55.9 (C-5), 18.8 (C-6), 34.8 (C-7), 41.1 (C-8), 51.0 (C-9), 37.5 (C-10), 21.2 (C-11), 26.1 (C-12), 38.6 (C-13), 42.9 (C-14), 31.2 (C-15), 32.9 (C-16), 56.6 (C-17), 47.8 (C-18), 49.8 (C-19), 151.4 (C-20), 30.3 (C-21), 37.5 (C-22), 28.7 (C-23), 16.3 (C-24), 16.4 (C-25), 16.4 (C-26), 14.9 (C-27), 178.9 (C-28), 110.0 (C-29), 19.5 (C-30)。以上数据与文献^[5]报道一致, 为此确定该化合物为白桦酯酸 (betulinic acid)。结构式如图 1。

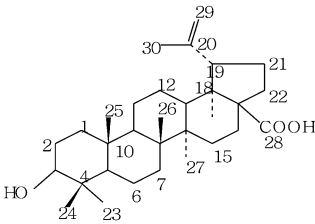


图 1 白桦酯酸的化学结构

3.2 对人宫颈癌细胞 HeLa 的生长抑制作用 实验结果表明, 细胞死亡率随给药剂量的增加而增加。在受试样品培养 48 h, 质量浓度为 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 抑瘤率为 77.9%, 与阳性对照 5-FU 抑瘤作用基本相当; 细胞死亡率与浓度关系见表 1。

表 1 样品浓度和作用时间与细胞死亡率关系 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

受试细胞	样品名称	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞死亡率/%			
			12 h	24 h	36 h	48 h
HeLa	白桦酯酸	1	6.6 $\pm$ 3.6	4.2 $\pm$ 2.8	15.2 $\pm$ 2.9	32.6 $\pm$ 3.6
		10	5.4 $\pm$ 2.6	5.4 $\pm$ 1.7	26.4 $\pm$ 4.4	49.3 $\pm$ 2.8
		50	10.2 $\pm$ 2.3	15.8 $\pm$ 2.6	34.7 $\pm$ 3.7	57.1 $\pm$ 1.8
		100	16.0 $\pm$ 1.9	23.2 $\pm$ 1.3	52.2 $\pm$ 2.9	70.8 $\pm$ 3.6
		500	21.6 $\pm$ 1.4	47.0 $\pm$ 3.1	75.5 $\pm$ 3.5	77.9 $\pm$ 2.9
	5-FU	1	1.2 $\pm$ 5.1	1.7 $\pm$ 3.2	2.2 $\pm$ 4.1	1.5 $\pm$ 3.6
		10	14.1 $\pm$ 2.3	16.8 $\pm$ 2.1	29.5 $\pm$ 3.6	32.4 $\pm$ 3.9
		50	35.7 $\pm$ 2.9	43.3 $\pm$ 3.8	59.2 $\pm$ 3.4	62.5 $\pm$ 2.5
		100	53.6 $\pm$ 2.4	77.9 $\pm$ 2.6	80.2 $\pm$ 3.3	91.6 $\pm$ 3.7
		500	72.4 $\pm$ 3.7	74.3 $\pm$ 2.2	85.8 $\pm$ 2.3	95.6 $\pm$ 2.8
MGC	白桦酯酸	1	5.6 $\pm$ 2.3	12.2 $\pm$ 2.6	17.4 $\pm$ 2.1	20.0 $\pm$ 1.8
		10	11.4 $\pm$ 2.0	20.8 $\pm$ 2.2	29.7 $\pm$ 3.2	33.5 $\pm$ 3.5
		50	18.2 $\pm$ 2.5	23.4 $\pm$ 2.3	37.1 $\pm$ 3.4	50.6 $\pm$ 2.8
		100	23.5 $\pm$ 3.3	28.1 $\pm$ 2.7	47.6 $\pm$ 2.3	58.6 $\pm$ 2.2
		500	38.5 $\pm$ 2.0	45.9 $\pm$ 2.4	65.9 $\pm$ 3.1	81.7 $\pm$ 2.9
	5-FU	1	0.3 $\pm$ 1.8	0.5 $\pm$ 2.7	1.9 $\pm$ 1.4	2.6 $\pm$ 2.5
		10	13.2 $\pm$ 2.8	11.7 $\pm$ 3.4	22.5 $\pm$ 2.5	29.4 $\pm$ 1.6
		50	37.3 $\pm$ 2.2	44.1 $\pm$ 2.5	57.3 $\pm$ 2.8	61.8 $\pm$ 2.4
		100	44.8 $\pm$ 2.6	57.3 $\pm$ 1.7	71.4 $\pm$ 2.3	79.2 $\pm$ 1.9
		500	73.0 $\pm$ 1.1	79.8 $\pm$ 2.5	86.1 $\pm$ 2.0	88.5 $\pm$ 1.8
MCF-7	白桦酯酸	1	—	11.1 $\pm$ 2.4	26.1 $\pm$ 3.1	24.3 $\pm$ 2.4
		10	—	29.3 $\pm$ 2.6	31.2 $\pm$ 2.5	32.4 $\pm$ 2.7
		100	—	43.2 $\pm$ 2.0	37.1 $\pm$ 2.3	74.1 $\pm$ 2.6
	5-FU	1	—	1.1 $\pm$ 3.2	2.3 $\pm$ 3.9	6.1 $\pm$ 1.9
		10	—	11.5 $\pm$ 2.8	29.4 $\pm$ 2.2	32.9 $\pm$ 2.3
		100	—	62.4 $\pm$ 2.7	77.3 $\pm$ 1.7	83.7 $\pm$ 1.8
ZR	白桦酯酸	1	—	29.3 $\pm$ 2.6	38.1 $\pm$ 2.4	35.1 $\pm$ 1.9
		10	—	32.0 $\pm$ 3.1	40.2 $\pm$ 2.7	42.2 $\pm$ 2.0
		100	—	36.1 $\pm$ 2.4	44.0 $\pm$ 2.6	48.3 $\pm$ 2.5
	5-FU	1	—	1.4 $\pm$ 2.6	1.8 $\pm$ 3.3	2.1 $\pm$ 2.6
		10	—	10.7 $\pm$ 2.5	18.1 $\pm$ 1.6	26.3 $\pm$ 3.2
		100	—	47.2 $\pm$ 2.0	58.0 $\pm$ 2.4	73.1 $\pm$ 2.9

3.3 对人胃癌细胞 MGC 的生长抑制作用 实验发现,受试样品能够较好的抑制 MGC 细胞的增殖,并呈较好的量效关系,在受试样品培养 48 h,质量浓度为 $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,抑瘤率为 81.7%,与阳性对照 5-FU 抑瘤作用基本相当;细胞死亡率与质量浓度关系见表 1。

3.4 对人乳腺癌细胞 MCF-7 和人乳腺导管癌细胞 ZR 的生长抑制作用 实验结果显示,受试样品对于人乳腺癌细胞 MCF-7 有很好的杀伤作用,其中 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 在作用 48 h 时,细胞死亡率可以达到 74.1%,而对人乳腺导管癌细胞 ZR 抑制作用不强。细胞死亡率与浓度关系见表 1。

4 讨论

本实验采用了硅胶柱色谱法、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱法及半制备高效液相色谱法,从乌骨藤中分离得到的白桦酯酸,其为五环三萜类化合物,并通过 IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 等方法进行了结构确证。

通过对肿瘤细胞的体外活性研究,采用结晶紫法,证实白桦酯酸对人宫颈癌 HeLa 细胞、人胃癌 MGC 细胞均具有明显的抑制作用,在受试样品培养 48 h 后,质量浓度为 $500\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,与阳性对照 5-FU 的生长抑制作用基本相当,且细胞死亡率与浓度呈明显的量效关系。同时白桦酯酸对人乳腺癌细胞 MCF-7 也显示出明显的细胞生长抑制作用,而对人乳腺导管癌细胞 ZR 抑制作用不强。

文献报道乌骨藤药材中的活性成分以 C_{21} 甾体皂苷类成分为主,本实验从乌骨藤提取分离得到的白桦酯酸为五环三萜类成分,通过上述体外抗肿瘤活性研究证实,乌骨藤的抗肿瘤的活性成分不单纯

为 C_{21} 甾体皂苷类成分,其含有的五环三萜类化学成分也可能是其活性成分之一。

[参考文献]

[1] 王月敏,夏素霞.乌骨藤药材中绿原酸的含量测定方法研究[J].中国实验方剂学杂志,2007,13(7):12.

[2] 王垦,郭志雄,消癌平注射液联合 NP 方案治疗晚期肺癌 56 例近期疗效观察[J].肿瘤基础与临床,2009,22(1):47.

[3] 陈玉龙,苗艳艳.肿瘤病机研究思路[J].新中医,2007,39(4):91.

[4] 张慧,翟延君,初正云,等.乌骨藤中五环三萜类化合物的分离鉴定[J].分析化学,2007,35(9):1377.

[5] 林朝展,祝晨薇,邓贵华,等.枇杷叶紫珠化学成分研究[J].中药材,2010,35(7):861.

[6] 王连荣,吴伟康.25 味中药对小鼠类风湿性关节炎脾脏淋巴细胞增殖反应的影响[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(6):234.

[7] 刘婷,李春英,梁爱华,等.玉米提取物的抗肿瘤作用研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(18):210.

[8] 陈玉龙,苗艳艳,吕翠田.健脾和胃类方对肿瘤细胞生长抑制的比较研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(3):112.

[9] 刘长暖,刘兰,王志军,等.应用结晶紫染色法测定干扰素效价[J].中国生物制品学杂志,1999,12(1):36.

[10] Itoh S, Hatton T, Havashi H, et al. Antiproliferative effect of IL-1 is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase in human melanoma cell A375 [J]. J Immunol, 1999, 162: 7434.

[责任编辑 聂淑琴]