

仙鹤草多糖的提取及其体外抗脑胶质瘤 U251 活性研究

朱侃¹, 张顛², 汪景¹, 徐秀泉^{2*}

(1. 无锡市第二人民医院, 江苏 无锡 214002; 2. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013)

[摘要] **目的:**优化仙鹤草多糖的提取工艺并测定其对脑胶质瘤 U251 细胞生长的抑制作用。**方法:**采用正交设计实验方法对影响仙鹤草多糖得率的提取温度、提取时间、料液比等 3 因素进行优化;采用 MTT 比色法测定仙鹤草多糖对 U251 细胞株增殖的抑制率,应用倒置相差显微镜观察仙鹤草多糖对肿瘤细胞形态结构的影响。**结果:**仙鹤草多糖提取的最佳工艺条件为:提取温度 90 ℃,提取时间 3 h,料液比 1:20,在此条件下,仙鹤草总多糖得率可达 1.85%。仙鹤草总多糖对脑胶质瘤 U251 细胞株增殖具有明显的体外抑制作用($P < 0.01$),且表现出浓度依赖关系,IC₅₀ 为 1.35 g·L⁻¹。经仙鹤草多糖处理后,U251 细胞显示典型的凋亡形态变化。**结论:**优选的提取工艺简便,高效;仙鹤草总多糖的抗肿瘤效果显著,其抗肿瘤机制可能与诱导肿瘤细胞凋亡有关。

[关键词] 仙鹤草;总多糖;正交设计;脑胶质瘤 U251;凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)12-0188-04

Extraction of Total Polysaccharides from *Agrimonia pilosa* and Evaluation of its Inhibitory Activity on Human Glioblastoma U251 Cells *in vitro*

ZHU Kan¹, ZHANG Chan², WANG Jing¹, XU Xiu-quan^{2*}

(1. The Second People's Hospital of Wuxi, Wuxi 214002, China;

2. College of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

[Abstract] **Objective:** The optimum extraction technology of total polysaccharides from *Agrimonia pilosa* was established and its inhibitory activity on human glioblastoma U251 cells *in vitro* was evaluated. **Method:** The orthogonal test was implied to optimize the extraction process conditions of total polysaccharides. With the extraction rate as the index, the extraction temperature, extraction time and liquid-material ratio were optimized. MTT assay was used to determine the effect of total polysaccharides on cell growth inhibitory. Morphological changes of the U251 cells were observed through inverted phase contrast microscope. **Result:** The optimum extraction conditions were determined as following: extraction temperature 90 ℃, extraction time 3 hours and liquid-material ratio of 1:20. Under these conditions the maximal yield of total polysaccharides reached 1.85%. Total polysaccharides from *A. pilosa* could inhibit the hyperplasia of glioblastoma U251 cells in dose-dependent manner ($P < 0.01$) and its IC₅₀ reached 1.35 g·L⁻¹. After treatment with polysaccharides U251 cells showed apoptosis morphology. **Conclusion:** The optimized extraction technology is effective and simple. Total polysaccharides from *A. pilosa* significantly inhibited tumor cell growth *in vitro* by inducing apoptosis of tumor cells.

[Key words] *Agrimonia pilosa*; total polysaccharides; orthogonal test; glioblastoma U251 cells; apoptosis

仙鹤草为蔷薇科龙芽草属植物龙芽草的全草,在我国具有悠久的药用历史,主要用于治疗衄血、咯

血、尿血、便血、崩漏等各种出血证^[1]。现代药理学研究表明,仙鹤草水提物对食管癌 Eca109、肝癌

[收稿日期] 20111117(002)

[基金项目] 江苏大学大学生科研立项项目(10A137)

[第一作者] 朱侃,主治医师,学士,主要从事耳鼻喉疾病的诊断与治疗研究。

[通讯作者] *徐秀泉,讲师,博士生,主要从事天然活性成分提取分离及活性研究, Tel:0511-85038403, E-mail:xxq781026@sohu.com.

SMMC-7721、人白血病细胞系 HL-60 表现出较强的抑制作用,并能够诱导肿瘤细胞凋亡^[2-4],而多糖是仙鹤草水提物的主要化学成分,但至今为止鲜有对仙鹤草多糖活性的报道。本文采用正交设计法优化仙鹤草多糖的水提醇沉工艺,采用 MTT 法研究仙鹤草多糖对体外培养的脑胶质瘤 U251 细胞的生长抑制作用,并初步探讨其作用机制,为该中药材的深入研究奠定理论基础。

1 材料

1.1 细胞株 人脑胶质瘤 U251 细胞由江苏大学药学院高静教授惠赠。

1.2 药品与试剂 仙鹤草 *Agrimonia pilosa* Ledeb. 购自江苏镇江九泰医药有限公司,经江苏大学药学院宋晶博士鉴定为蔷薇科植物仙鹤草的全草,粉碎过 16 目筛备用。葡萄糖对照品(国药集团化学试剂有限公司进口分装,批号 20071214),乙醇,石油醚,苯酚,浓硫酸及其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器 UV-2550 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),DHG-9145 鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司),FD-1-50 型冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司),RE-52A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),BS110S 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),UPI-1 型纯水机(成都超纯科技有限公司),TS100 Nikon 倒置相差显微镜(Nikon 公司,日本),SPEETRA 酶标仪(Molecular Devices)。

2 方法

2.1 标准曲线的绘制 根据改进蒽酮测定多糖含量^[5]准确称取 105 ℃ 干燥至恒重的葡萄糖 10.0 mg,将其定容至 100 mL 量瓶中,得到 100 mg·L⁻¹ 的溶液。精密吸取该溶液 0,0.1,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL 于试管中,并以去离子水补至 1.0 mL,加入蒽酮混合液 4 mL,混匀后,沸水浴加热 20 min,冷却后于 620 nm 处测定吸光度。以对照品溶液浓度为横坐标 X,吸光度测定值为纵坐标 Y,做标准曲线,得线性回归方程为 $Y = 0.0049X - 0.0071$, $R^2 = 0.9994$ 。结果表明,在 10~100 mg·L⁻¹ 葡萄糖质量浓度与吸光度间成良好线性关系。

2.2 仙鹤草粗多糖的提取 称取经脱脂后仙鹤草干燥粉末 2.5 g,置于 100 mL 圆底烧瓶中按设计的料液比加入蒸馏水,于恒温水浴中浸提,趁热抽滤,提取液经旋转蒸发器浓缩至原液的 1/5,缓缓加入 95% 的乙醇至终浓度达 80%,产生大量沉淀。沉淀于冰箱中静置过夜,抽滤,依次用无水乙醇、丙酮淋

洗后,加适量水复溶,冷冻干燥,得仙鹤草粗多糖。称取粗多糖适量,溶解,蒽酮法测定吸光度,计算多糖得率。

采用单因素试验考察提取温度、提取时间、料液比对仙鹤草多糖提取率的影响,依据单因素实验结果确定因素水平范围,按 3 因素 3 水平表进行 L₉(3³) 正交试验。

2.3 仙鹤草总多糖的抗脑胶质瘤 U251 活性分析

将仙鹤草总多糖依次对半稀释成系列浓度梯度,过滤除菌。取对数生长期的脑胶质瘤 U251 细胞株,胰酶 24 h 消化后,将细胞密度调整为 1×10^4 / mL。在 96 孔细胞培养板中,每孔加入 100 μL 细胞悬液培养 24 h 后加入 100 μL 不同浓度梯度的仙鹤草总多糖(终质量浓度分别为 0,0.5,1.0,1.5,2.0 g·L⁻¹),空白对照孔加入完全培养基。培养 48 h 后,吸弃孔内培养基,加入 100 μL 1 g·L⁻¹ MTT,37 ℃ 继续培养 4 h,弃去上清,加入 150 μL DMSO,摇床摇匀,1 h 后用酶标仪测 570 nm 处的吸光值(A),记录结果并计算抑制率并计算其 IC₅₀ 值。同时在倒置相差显微镜下观测细胞的形态变化。

$$\text{抑制率} = \left[\frac{\text{对照组平均 } A_{570} - \text{给药组平均 } A_{570}}{\text{对照组平均 } A_{570} - \text{空白组平均 } A_{570}} \right] \times 100\%$$

3 结果

3.1 单因素实验

3.1.1 提取温度对多糖得率的影响 在固定料液比 1:20 的条件下,分别在 50,60,70,80,90 ℃ 下浸提 3 h。随着提取温度的升高,仙鹤草多糖的得率逐渐增大,但提取温度 80 ℃ 后,多糖得率趋于稳定,所以选择 70~90 ℃ 为提取适宜温度。

3.1.2 提取时间对多糖得率的影响 固定提取温度 80 ℃,料液比 1:20,分别提取 1,2,3,4,5 h,提取 1 次。随着提取时间的延长,多糖得率逐渐提高,在 4 h 后再延长提取时间,多糖得率略有下降,从节省能源、减少生产周期考虑,提取时间以 3~4 h 为宜。

3.1.3 料液比对多糖得率的影响 在 80 ℃ 采用液料比 1:10,1:15,1:20,1:25,1:30 加入蒸馏水加热浸提 3 h,提取 1 次。随着液料比的增加,多糖提取率也随之缓慢增加,这是因为溶剂增多则更多的多糖溶解于水中,但到达 1:20 时出现最高点,液料比继续增加,提取率呈下降趋势并进入平台,故以 1:20 左右为宜。

3.2 正交试验设计 依据单因素预试验结果确定因素水平范围,按照 L₉(3³) 正交试验表进行仙鹤草总多糖的提取,正交实验因素与水平设计及结果分

析见表 1~3。

表 1 正交试验因素水平

水平	A	B	C
	提取温度/℃	提取时间/h	料液比
1	70	2	1:15
2	80	3	1:20
3	90	4	1:25

表 2 仙鹤草总多糖提取工艺正交试验安排

实验号	因素			提取率 /%
	A	B	C	
1	1	1	1	1.58
2	1	2	2	1.74
3	1	3	3	1.62
4	2	1	2	1.69
5	2	2	3	1.79
6	2	3	1	1.70
7	3	1	3	1.72
8	3	2	1	1.83
9	3	3	2	1.75
K_1	1.647	1.663	1.703	
K_2	1.727	1.787	1.727	
K_3	1.767	1.690	1.710	
R	0.120	0.124	0.024	
主次顺序	$B > A > C$			
最优水平	$A_3 B_2 C_2$			

直观分析结果表明,影响总多糖提取率因素的主次顺序为 $B > A > C$,即在一定范围内,提取时间对总

表 3 总多糖提取率正交实验方差分析

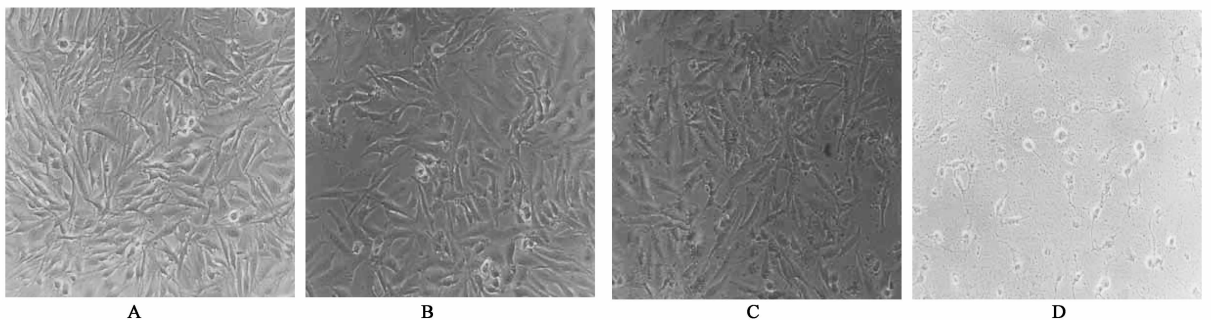
方差来源	偏差平方和	自由度	F	P
乙醇浓度	0.022	2	21.82	<0.05
提取时间	0.025	2	24.81	<0.05
料液比	0.001	2	1.00	
误差	0.005	8		

注: $F_{0.05(2,2)} = 19.00$ 。

多糖得率影响最大,其次是提取温度和料液比。仙鹤草总多糖提取的最佳工艺条件为: $A_3 B_2 C_2$,即按照 1:20 的料液比在 90℃ 下超声提取 3 h。

3.3 工艺验证实验 为验证仙鹤草总多糖提取正交设计方案最佳条件的适用性,按照最佳试验条件重复试验 3 次,计算是仙鹤草总多糖得率,求其平均值为 1.85%,高于正交设计表中的任何结果,说明各因素之间有相互关系,采用正交设计方法可以较为准确的对实验条件进行优化。

3.4 仙鹤草总多糖对脑胶质瘤 U251 细胞株的抑制增殖作用 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 $g \cdot L^{-1}$ 对脑胶质瘤 U251 细胞株的增殖均有抑制作用,且表现出呈浓度依赖关系,各组抑制率间均有显著性差异 ($P < 0.05$),48 h 时当仙鹤草总多糖质量浓度为 2 $g \cdot L^{-1}$ 时对脑胶质瘤 U251 细胞增殖的抑制率达到 72.9%,其 IC_{50} 1.35 $g \cdot L^{-1}$ 。倒置显微镜下观察,对照组细胞生长旺盛,大小均一,贴壁生长,细胞轮廓清楚,透明饱满,细胞间结构紧密,随着多糖浓度的增加,细胞体积逐渐变小,细胞间接触变松,贴壁能力减弱,染色质浓缩,凋亡小体逐渐形成,出现明显的凋亡形态学变化,说明仙鹤草多糖抗脑胶质瘤 U251 机制可能与诱导肿瘤细胞凋亡有关(图 1)。



A. 阴性对照组;B. 0.5 $g \cdot L^{-1}$ 仙鹤草总多糖处理组;C. 1.0 $g \cdot L^{-1}$ 仙鹤草总多糖处理组;D. 2.0 $g \cdot L^{-1}$ 仙鹤草总多糖处理组

图 1 脑胶质瘤 U251 细胞株倒置相差显微镜图 ($\times 100$)

4 讨论

将单因素实验和正交实验设计方法有效结合对仙鹤草总多糖的工艺条件进行优化,获得最佳提取

工艺条件:提取温度 90℃,提取时间 3 h,料液比 1:20,在此条件下仙鹤草总多糖得率为 1.85%,工艺切实可行。多糖是一种具有多种生物活性的大分子

通莲 I 号方及其拆方对食管癌 Eca109 细胞增殖及细胞周期的影响

贾永森^{1*}, 李继安¹, 韩炳生², 陈树山³

(1. 河北联合大学中医学院, 河北唐山 063000; 2. 深圳市中医院, 广东深圳 518020;
3. 唐山市中医医院, 河北唐山 063000)

[摘要] 目的:研究通莲 I 号方及其拆方在不同浓度下对食管癌 Eca109 细胞形态和生长周期的调节作用;探讨该方抑制食管癌细胞增殖的机制。方法:将 Eca109 细胞以 1×10^6 个/皿密度接种于 $\Phi 100$ mm 培养皿中,以 10% 小牛血清 DMEM 培养液培养,37 °C,5% 饱和湿度的 CO₂ 培养箱孵育,细胞贴壁 24 h,分别加入浓度为 25 ~ 3 200 mg·L⁻¹ 倍比梯度的通莲 I 号方(T)、清热解毒拆方(Q)、活血行气拆方(H)、滋阴养血拆方(Z)等 4 方提取液,孵育 48 h 后,MTT 比色法检测细胞增殖变化、光镜观察细胞形态、流式细胞技术(FCM)测定细胞周期。结果:T,Q,H 的 IC₅₀ 值分别为 386,771,729 mg·L⁻¹;与空白对照组(C)相比,T,Q,H 3 方显著影响 Eca109 细胞周期变化:G1 期细胞所占比率分别为 69.43%,60.84%,61.90%。同时,T,Q,H 组细胞的 S 期与 C 组比较,均有显著性差异($P < 0.05$),T 方作用最强。而 Z 方对细胞的抑制作用较弱,与 C 组无显著性差异。结论:通莲 I 号方通过抑制细胞进入 S 增殖期从而干预食管癌 Eca109 细胞生长,各拆方具有协同作用,全方作用最优。

[关键词] 食管癌; Eca109 细胞; 通莲 I 号方; 细胞周期

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)12-0191-04

Effect of Tonglian Decoction and its Formulae on Cell Proliferation and Cell Cycle of Cell Line Eca109 of Esophageal Carcinoma

JIA Yong-sen^{1*}, LI Ji-an¹, HAN Bing-sheng², CHEN Shu-shan³

(1. Traditional Chinese Medicine (TCM) College of Hebei United University, Tangshan 063000, China;
2. TCM Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518020, China;

[收稿日期] 20111114(009)

[基金项目] 唐山市科学技术研究与发展计划课题(11150205A-7);深圳市科技研发资金项目(ZYA201007060089A);河北联合大学博士科研启动基金(BS09034);河北联合大学青年科学基金(QK032/2010)

[通讯作者] * 贾永森,医学博士,讲师,从事肿瘤疾病中医方证基础研究,Tel:0315-3725103,E-mail:jiayongsen@126.com

物质,具有显著的抗肿瘤、抗氧化、抗炎活性^[6-7],但是仙鹤草多糖的生理活性至今鲜有报道,本实验研究发现仙鹤草总多糖可抑制脑胶质瘤 U251 细胞株的增殖,并呈现剂量依赖性,其作用机制可能与诱导肿瘤细胞凋亡有关。该研究结果为药用植物的深入研究提供了良好的理论依据。

[参考文献]

[1] 武晓丹,金哲雄. 仙鹤草的研究进展[C]. 第一届全国中药商品学术大会论文集,2008:297.

[2] 马丽萍,赵培荣,王留兴,等. 仙鹤草水提液对食管癌 Eca109 细胞生长的抑制作用[J]. 郑州大学学报:医学版,2007,42(1):149.

[3] 邹夏慧. 仙鹤草抗肝癌 SMMC-7721 细胞作用的实验研究[D]. 南昌:江西医学院,2005.

[4] 高凯民,周玲,陈金英,等. 仙鹤草煎剂对 HL-60 细胞的体外诱导凋亡作用[J]. 中药材,2000,23(9):561.

[5] 刘倩,白素芬,喇孝瑾,等. 二精丸多糖两种测定方法的比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(8):32.

[6] 牟华. 姬松茸多糖对 HT-29 细胞与内皮细胞侵袭、黏附的影响和作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(9):216.

[7] 刘光建,王璐,王菲菲,等. 鱼腥草多糖对小鼠肝、肾、心肌和脑组织抗氧化作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(8):207.

[责任编辑] 聂淑琴