

不同溶剂对鸡血藤提取物总黄酮含量 及抗肿瘤活性的影响

程悦¹, 王志宇², 王冬梅^{1*}, 刘浩文¹, 陈建萍^{2*}

(1. 中山大学药学院生药学与天然药物化学实验室, 广州 510006;
2. 香港大学中医药学院, 香港)

[摘要] 目的: 探讨不同溶剂对鸡血藤提取物中的总黄酮含量和抗肿瘤活性的影响。方法: 分别用不同浓度的乙醇水溶液、丙酮水溶液作为提取溶剂, 利用回流法、超声提取法制备鸡血藤提取物; 采用四甲基嘧啶蓝 (MTT) 法测定提取物对结肠癌 HT-29 细胞增殖的抑制活性; 采用分光光度法测定提取物中总黄酮含量; 采用 HPLC 法测定提取物中芒柄花素含量。结果: 60% 乙醇回流 60 min 所得提取物总黄酮含量最高并且对 HT-29 细胞增殖的抑制活性最强。结论: 鸡血藤抗肿瘤活性提取物的制备以 60% 乙醇回流提取为佳。

[关键词] 鸡血藤; 抗肿瘤; 总黄酮; 芒柄花素; 细胞毒性; 提取工艺

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)09-0142-04

Total Flavonoids and its Anti-tumor Activities by Different Solvent Extract from *Spatholobus suberectus*

CHENG Yue¹, WANG Zhi-yu², WANG Dong-mei^{1*}, LIU Hao-wen¹, CHEN Jian-ping^{2*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China;
2. School of Chinese Medicine, The University of Hong Kong, Hong Kong, China)

[Abstract] **Objective:** To study the total flavonoids and anti-tumor activities of different solvent extract from *Spatholobus suberectus* and determine the extraction solvent and extraction method. **Method:** Using ethanol or acetone aqueous solution as the solvent, different extracts were prepared from *S. suberectus* by refluxing or ultrasonic extraction. The inhibitory activity on the proliferation of HT-29 cancer cell was determined by MTT; The content of total flavonoids and formononetin were determined by spectrophotometry and HPLC, respectively. **Result:** The content of total flavonoids and the cytotoxic activity were highest in the 60% ethanol 60 min-refluxing extract. **Conclusion:** Using 60% ethanol as extraction solvent, refluxing as extraction method, obtained extract from *S. suberectus* showed highest anti-tumor activity on HT-29 cancer cell.

[Key words] *Spatholobus suberectus*; anti-tumor; total flavonoids; formononetin; cytotoxic activity; extraction

鸡血藤为豆科密花豆属植物密花豆 *Spatholobus suberectus* 的干燥藤茎; 主治腰膝酸痛, 麻木瘫痪, 月

经不调, 血虚萎黄, 风湿痹痛等症; 现代临床常用鸡血藤 (单用或以鸡血藤为主组方) 治疗各种原因 (如

[收稿日期] 2010-12-13

[第一作者] 程悦, 硕士研究生, 从事中草药药效物质基础研究, Tel: 020-39943043, E-mail: chengyue888@163.com

[通讯作者] * 王冬梅, 副教授, 硕士生导师, 从事天然药物化学与中草药质量标准化研究, Tel: 020-39943042, E-mail: lsswdm@mail.sysu.edu.cn

* 陈建萍, 副教授, 博士生导师, 从事中药药理学 (心脑血管、肿瘤) 研究, Tel: 0852-95147068, E-mail: jjpchen@yahoo.com

放化疗、血液系统疾病)引起的白细胞、血小板及红细胞等全血象减少的疾病^[1]。鸡血藤化学成分复杂,药理作用多样,文献报道^[2]从密花豆中曾分离得到黄酮、三萜和甾醇等多种成分,其中黄酮类成分含量最多,芒柄花素是其特征成分之一。近年来对其研究主要围绕鸡血藤刺激骨髓造血功能,对其抗肿瘤活性研究较少,现经实验研究发现鸡血藤粗提物及其总黄酮分离产物在细胞水平和整体动物水平都表现出抗肿瘤活性^[3-4]。本文主要对鸡血藤抗肿瘤活性提取物的提取工艺进行初步研究,以对结肠癌 HT-29 细胞的增殖抑制活性和总黄酮含量为指标,探讨不同溶剂和不同提取方法对抗肿瘤活性提取物的影响,为鸡血藤药材后续提取分离及抗肿瘤活性研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试药材 鸡血藤,产地广西,购自香港大学中医药学院临床教研中心大药房,经中山大学药学院生药学与天然药化实验室杨得坡教授鉴定为豆科植物密花豆 *Spatholobus suberectus* 的藤茎。

1.2 仪器 TU-1810 紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),HPLC 色谱仪、岛津 LC-20AB 泵、岛津 SIL-20A 自动进样器、岛津 SPD-M20A 二极管阵列检测器(日本岛津公司),Ultimate AQ-C₁₈ 色谱柱(5 μm, 4.6 mm × 250 mm);ELK-800 型酶联免疫检测仪(Bio-Tek);TS100F 倒置显微镜(日本 Nikon 公司),Millipore 超纯水系统;通用水套 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司)。

1.3 试剂 芒柄花素(纯度 > 99%,HPLC,西安慈缘生化科技有限公司);1640 培养基(美国 Gibco 公司),胎牛血清(FBS)(美国 Hyclone 公司);四甲基噻唑蓝(MTT)、dm5825 抗生素(青、链霉素)均购自美国 Sigma 公司;乙醇、丙酮为国产分析纯试剂。人结肠癌细胞 HT-29 由香港大学中医药学院提供。

1.4 鸡血藤提取物的制备 称取鸡血藤药粉(过 20 目筛)6 份,每份约 15 g,分别以水、30% 乙醇、60% 乙醇、95% 乙醇、60% 丙酮、丙酮为提取溶剂,以料液比 1:10(W:V)加入溶剂,加热回流提取 60 min,提取液过滤后,浓缩至干,得鸡血藤提取物,称重。称取鸡血藤药粉(过 20 目筛)2 份,每份约 15 g,以 150 mL 60% 乙醇为提取溶剂,分别用超声波法对药材进行提取 30 min、先超声 30 min 再加热回流提取 30 min,提取液过滤后,浓缩至干,得鸡血藤提

取物,称重。

1.5 鸡血藤提取物中总黄酮的含量测定

1.5.1 对照品溶液的制备 精密称取芒柄花素对照品 5.2 mg,用 95% 乙醇溶解并稀释至 25 mL,摇匀,作为对照品储备液。

1.5.2 标准曲线绘制 总黄酮取 95% 乙醇 1 mL 置 10 mL 量瓶中,加入蒸馏水稀释至刻度,作为空白溶液。精密吸取上述对照品储备液 0.1,0.2,0.3,0.4,0.5 mL 分别置于 10 mL 量瓶中,加入 1 mL 95% 乙醇,用蒸馏水稀释至刻度,摇匀,在 250 nm 处测定吸收度。以对照品吸光度(A)为纵坐标,以对照品溶液的浓度(g·L⁻¹)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程。

1.5.3 供试品溶液的制备与测定 精密称取 1.4 项下的 1 至 8 号样品各 1 mg,置 10 mL 量瓶中,加入 1 mL 95% 乙醇 1 mL,用蒸馏水稀释至刻度,摇匀,得供试品溶液。取供试品溶液在 250 nm 处测定 A,代入回归方程,计算不同提取物中总黄酮的含量。

1.6 鸡血藤提取物中芒柄花素的含量测定 采用 HPLC 法测定鸡血藤不同提取物中的芒柄花素含量。

1.6.1 色谱条件 以乙腈和水为流动相,乙腈 0~10 min (10%~15%),10~35 min (15%~30%),35~45 min (30%~60%),45~60 min (60%~90%;流速 1 mL·min⁻¹;进样量 20 μL;检测波长 250 nm)。

1.6.2 标准曲线绘制 吸取一定量的芒柄花素对照品储备液,稀释至芒柄花素为 5.5 ng·μL⁻¹ 的溶液,依次进样 5,10,20,40,80 μL,以峰面积对对照品溶液系列含量(ng)进行回归,绘制芒柄花素标准曲线,得回归方程。

1.6.3 供试品溶液的制备与测定 精密称取 1.4 项下的 1 至 8 号样品各 10 mg,置 10 mL 量瓶中,加入甲醇定容至刻度,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜过滤,得供试品溶液。将各供试品按 1.6.1 下条件进行 HPLC 分析,记录峰面积,代入回归方程,计算不同提取物中芒柄花素的含量。

1.7 鸡血藤提取物对人结肠癌 HT-29 细胞的细胞毒性 采用 MTT 法测定各提取物对 HT-29 细胞增殖的抑制活性。人结肠癌细胞 HT-29 培养在含 RPMI 1640 培养液中(含 100 mL·L⁻¹ 加热灭活胎牛血清,青霉素,链霉素各 10 × 10⁵ U·L⁻¹),培养条件为 37 °C,5% CO₂,2~3 d 换液 1 次。取对数生长期

的 HT-29 细胞每孔 100 μL 接种于 96 孔板, 细胞密度为 5×10^3 /孔, 培养 24 h 待细胞贴壁后, 换无血清培养基进行细胞同步化 12 h。设 8 个药物组及对照组, 每组 6 个复孔, 药物组每组加入 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的提取物药液 10 μL (含 2% DMSO), 90 μL 无血清培养基, 使其终质量浓度为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 对照组加入 10 μL 含 2% DMSO 的磷酸盐缓冲液和 90 μL 无血清培养基, 置于细胞培养箱中继续培养 48 h 取出, 加入新配置的 MTT 溶液 ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 每孔 10 μL , 继续培养 4 h, 弃上清, 加入 DMSO 150 μL , 振荡 15 min, 用酶联免疫检测仪于 540 nm 波长下测每孔的 A 。按如下公式求出增殖抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{(A_{\text{对照组}} - A_{\text{药物组}})}{A_{\text{对照组}}} \times 100\%$$

2 结果

2.1 鸡血藤提取物对 HT-29 细胞增殖的抑制活性

由表 1 可知, 各溶剂的提取物对 HT-29 细胞的增殖均有一定程度的抑制活性, 说明鸡血藤提取物有抗癌效果, 其中以 60% 乙醇提取物的活性最强; 而在提取方法中, 60% 乙醇回流 60 min 所得提取物对 HT-29 细胞增殖的抑制活性高于超声提取物和超声回流联用提取物。

表 1 鸡血藤不同提取物对 HT-29 细胞增殖的抑制活性 ($n=6$)

编号	提取物样品	抑制率/%
1	水回流 60 min	35.28
2	30% 乙醇回流 60 min	43.82
3	60% 乙醇回流 60 min	62.20
4	95% 乙醇回流 60 min	58.84
5	60% 丙酮回流 60 min	56.92
6	100% 丙酮回流 60 min	55.91
7	60% 乙醇超声 30 min	56.78
8	60% 乙醇超声 30 min + 回流 30 min	54.98

2.2 各鸡血藤提取物中总黄酮和芒柄花素含量的测定

结果显示, 鸡血藤总黄酮质量浓度 $2.08 \sim 10.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好, 回归方程: $Y = 0.1130X - 0.0203$, $r^2 = 0.9990$; 芒柄花素 $27.5 \sim 220 \text{ ng}$ 线性关系良好, 回归方程 $Y = 11629X - 51906$, $r^2 = 0.9998$ 。

由表 2 可以看出, 不同溶剂的提取物中总黄酮含量结果以 60% 乙醇提取物最高, 而提取方法中, 用 60% 乙醇回流提取 60 min 的总黄酮含量最高。

鸡血藤芒柄花素含量测定结果显示, 提取物中芒柄花素的含量较少, 以丙酮提取物中含量最高, 但其总黄酮含量低于 60% 乙醇提取物。

表 2 鸡血藤不同提取物的质量及其中总黄酮和芒柄花素的含量

编号	提取物样品	提取物质量/g	总黄酮 /%	芒柄花素 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
1	H_2O 回流 60 min	1.353	5.47	0.085
2	30% 乙醇回流 60 min	2.573	7.39	0.135
3	60% 乙醇回流 60 min	2.333	10.05	0.218
4	95% 乙醇回流 60 min	1.760	7.17	0.286
5	60% 丙酮回流 60 min	2.736	8.35	0.182
6	100% 丙酮回流 60 min	0.640	4.78	0.527
7	60% 乙醇超声 30 min	2.143	7.63	0.184
8	60% 乙醇超声 30 min + 回流 30 min	2.533	9.86	0.214

3 讨论

有研究报道, 鸡血藤提取物在体内外均具有显著的抗肿瘤疗效, 采用聚酰胺柱色谱法从鸡血藤提取物中分离获得的有效部位, 经薄层鉴定、显色反应和高效液相色谱确定富含黄酮类化合物, 体外抗肿瘤活性最强^[5]。鸡血藤中的黄酮类成分包括异黄酮类, 如芒柄花素 (formononetin)、芒柄花苷 (ononin)、樱黄素 (prunetin) 等; 二氢黄酮类, 如密花豆素; 拟雌内酯类, 如苜蓿内酯 (medicagol) 等; 查尔酮类, 如异甘草素 (isoliquiritigenin)、2', 4', 3, 4-四羟基查尔酮 (2', 4', 3, 4-tetrahydroxy chalcone); 花青素类, 如表儿茶素 (epicatechin)、原儿茶酸 (protocatechuic acid)、儿茶素 (catechin) 等^[6-9]。

综合上述总黄酮含量和 HT-29 细胞增殖抑制活性实验结果, 60% 乙醇回流所得提取物中总黄酮含量最高并且对 HT-29 细胞增殖的抑制活性最强, 因此, 对于鸡血藤抗肿瘤活性提取物的制备选择以 60% 乙醇回流提取为佳。本研究结果对下一步提取工艺的深入优化和抗癌活性机制的研究提供了重要依据。

[参考文献]

- [1] Chen Y H, Liu P, Zhang Z P. Effects of *Spatholobus suberectus* the granulopoiesis and monocyclopoiesis in mice [J]. Chin Pharm J, 1999, 34 (5): 305.

DOI:CNKI:11-3495/R.20110314.0943.014

桂枝茯苓胶囊对子宫内膜异位症大鼠脾脏 CD4⁺T淋巴细胞数和NK细胞杀伤活性的影响

胡春萍¹, 胡婷婷², 蔡雪婷¹, 王志刚¹, 卢悟广¹, 万贵平¹, 曹鹏^{1*}

(1. 江苏省中医药研究院, 南京 210028;

2. 南京市江北人民医院, 南京 210035)

[摘要] 目的:观察桂枝茯苓胶囊对子宫内膜异位症(EMs)模型大鼠脾脏CD4⁺T淋巴细胞数和NK细胞杀伤活性的影响。方法:改进制作大鼠子宫内膜异位症动物模型,ig桂枝茯苓胶囊0.256,1.024 g·kg⁻¹,28 d后取脾脏,分离淋巴细胞,采用流式细胞分析术测定大鼠脾脏中CD4⁺T淋巴细胞数;将分离的NK细胞与K562细胞共孵育后,MTT法检测其杀伤活性。结果:低剂量组CD4⁺T淋巴细胞数比模型组提高19.0%,NK细胞杀伤活性提高54.1%,具有显著意义。结论:桂枝茯苓胶囊可显著提高CD4⁺T淋巴细胞数和NK细胞杀伤活性。

[关键词] 桂枝茯苓胶囊;子宫内膜异位症;CD4⁺T细胞;NK细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)09-0145-04

Effects of Guizhi Fuling Capsule on Quantity of CD4⁺T Lymphocytes and Cytotoxic Activity of NK Cells in Spleen of Rats with Endometriotics

HU Chun-ping¹, HU Ting-ting², CAI Xue-ting¹,

WANG Zhi-gang¹, LU Wu-guang¹, WAN Gui-ping¹, CAO Peng^{1*}

(1. Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Jiangsu Province Institute of

Traditional Chinese Medicine, Nanjing, 210028, China;

2. People's Hospital of Nanjing Jiangbei District, Nanjing, 210035, China)

[收稿日期] 2010-12-03

[基金项目] 康缘中医药科技创新基金项目(HV0813KY)

[第一作者] 胡春萍,副研究员,从事中药药理研究,Tel:025-85608666,E-mail:njhcp66@126.com

[通讯作者] *曹鹏,副研究员,从事分子药理学研究,Tel:025-85608666,E-mail:pcao79@yahoo.com

[网络出版时间] 2011-03-14 09:43

- [2] 林茂. 密花豆藤化学成分的研究. 中草药[J]. 1989, 20(2): 5.
- [3] 唐勇,王笑民,何薇,等. 鸡血藤提取物体外抗肿瘤实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2007, 13(4): 306.
- [4] 唐勇,何薇,王玉芝,等. 鸡血藤黄酮类组分抗肿瘤活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(2): 51.
- [5] 唐勇,富琦,何薇,等. 鸡血藤抗肿瘤有效部位诱导A549肺癌细胞非凋亡性程序化死亡的研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(16): 2040.
- [6] 崔艳君,刘屏,陈若芸,等. 鸡血藤有效成分研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(2): 121.
- [7] 严启新,李萍,王迪. 鸡血藤脂溶性化学成分的研究[J]. 中国药科大学学报, 2001, 32(5): 336.
- [8] 严启新,李萍,胡安明. 鸡血藤化学成分的研究[J]. 中草药, 2003, 34(10): 876.
- [9] 成军,梁鸿,王媛,等. 中药鸡血藤化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(12): 1153.
- (责任编辑 何伟)