

猫须草提取物体外抗肿瘤活性部位研究

郑英换, 潘显茂*, 李兰婷 (海南省药物研究所, 海南海口 570311)

摘要 [目的]研究猫须草不同提取物对多种肿瘤细胞生长抑制的影响,筛选出猫须草的抗肿瘤活性部位。[方法]采用MTT法体外抗肿瘤活性试验研究猫须草提取物分别对人回盲肠癌细胞(HCT-8)、人肝癌细胞(BEL-7402)和人非小细胞肺癌细胞(A549)的生长抑制作用。[结果]猫须草乙醇提取物分别经石油醚萃取、乙酸乙酯萃取后对3种肿瘤细胞均具有良好的抑制活性,而正丁醇萃取物和水层的水层无抗肿瘤活性作用。[结论]该研究为后续开展的抗肿瘤活性化学成分单体的提纯和体内抗肿瘤药理试验研究提供理论依据。

关键词 猫须草;肾茶;体外抗肿瘤试验;DMSO 肿瘤细胞毒性

中图分类号 R284 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)12-0177-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2020.12.050



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on Anti-tumor Active Parts *in vitro* of the Extracts from *Clerodendranthus spicatus*

ZHENG Ying-huan, PAN Xian-mao, LI Lan-ting (Hainan Institute of Pharmacology, Haikou, Hainan 570311)

Abstract [Objective] The research aimed to study the different extracts of *Clerodendranthus spicatus* on growth inhibition of various tumor cells, and to screen out the anti-tumor active sites. [Method] MTT colourometry was used to determine the inhibitory effect of the different extracts of *Clerodendranthus spicatus* on HCT-8, BEL-7402 and A549 human tumor cells *in vitro*. [Result] The petroleum ether extract and ethyl acetate extract of *spicatus* had inhibitory activity on three kinds of human tumor cells, but the n-butanol extract and the water extract had no anti-tumor activity. [Conclusion] This research provides a theoretical basis for the subsequent purification of anti-cancer active chemical constituent monomers and *in vivo* anti-tumor pharmacological test research.

Key words *Clerodendranthus spicatus*; Kidney tea; Anti-tumor activity *in vitro*; Tumor cytotoxicity of DMSO

猫须草(*Clerodendranthus spicatus* (Thunb.) C. Y. Wu)为唇形科肾茶属植物,又名肾茶、猫须公,主要分布在我国海南、广西、广东、云南等热带亚热带地区,是一种多年生草本植物,为民间传统中草药^[1-2]。猫须草味甘淡、性凉、微苦,具有清热祛湿、排石利尿的功效,民间主要用于急性慢性肾炎、膀胱炎、尿路结石等多种泌尿系统疾病^[3-4]。现代研究表明,猫须草含有黄酮类、二萜类、甾体类、水溶性酚酸类等多种化学成分,并具有抗炎解热镇痛、抗菌、抗氧化、利尿、保肝保肾、降糖降血脂及抗肿瘤等多项药理作用^[5-7]。其中猫须草的体外抗肿瘤活性作用研究相对较少,笔者主要通过研究猫须草醇提取物用水分散经石油醚萃取、乙酸乙酯萃取、正丁醇萃取和萃取后水层4种萃取物分别对人非小细胞肺癌细胞A549、人回盲肠癌细胞HCT-8、人肝癌细胞BEL-7402的生长抑制作用,初步筛选出猫须草抗癌细胞活性部位,为后续开展的抗肿瘤活性化学成分单体的提纯和体内抗肿瘤药理试验研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 药材与细胞株。猫须草购自海南省万宁市,由郑希龙博士鉴定;人非小细胞肺癌细胞A549、人回盲肠癌细胞HCT-8、人肝癌细胞BEL-7402均购自中国科学院细胞库。

1.1.2 主要仪器。Hei-VAP advantage 减压旋转蒸发器(德国海道尔夫);YRE-2020A 智能数显恒温水浴锅(杭州亿捷科技);DM IL LED 相差倒置显微镜(LEICA 德国公司);BPN-170RWP 二氧化碳培养箱(上海一恒);F-50 酶标仪

(TECAN 奥地利公司);Countess II 全自动细胞计数仪(Thermo Scientific);LMQ.C-80EP 立式蒸汽压力灭菌器(山东新华仪器装备有限公司);BSA124S-CW 分析天平(赛多利斯)。

1.1.3 试剂。DMEM 高糖培养液、RPIM 1640 培养液、小牛血清、胰酶消化液、PBS、青霉素-链霉素溶液,均购自 GBIGO 公司;MTT, SIGMA 公司;95%乙醇、石油醚(I)、正丁醇、乙酸乙酯,均为分析纯,来自西陇科学;DMSO,分析纯,来自广东光华科技。

1.2 试验方法

1.2.1 猫须草处理方法。取干燥猫须草全草适量粉碎,采用95%乙醇静置提取7d,药液减压浓缩至无醇味浸膏,加适量蒸馏水混悬后依次用石油醚(I)、乙酸乙酯、正丁醇萃取,并分别浓缩萃取液,回收得猫须草石油醚萃取物(MP1)、乙酸乙酯萃取物(MP2)、正丁醇萃取物(MP3)和萃取后水层(MP4)4种组分浸膏。分别称取上述浸膏适量,用二甲基亚砜助溶,过滤除菌,低温保存备用。临用前用完全培养基梯度稀释至相应浓度。

1.2.2 体外抗肿瘤活性试验。取对数生长期细胞用0.25%胰酶消化计数,分别采用含10%小牛血清细胞完全培养液(A549用高糖DMEM完全培养液,HCT-8和BEL-7402用RPIM 1640完全培养液)制成 5.5×10^4 个/mL的细胞悬液,并接种于96孔培养板中,每孔180 μ L,置37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱培养过夜后,分别加入不同浓度的猫须草萃取物溶液20 μ L。4种猫须草萃取物均设5个剂量组,每组6个复孔,同时设有空白对照组(加20 μ L培养液)和调零组(200 μ L培养液,无细胞),置37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱分别培养24、48 h后,弃液,PBS洗板1次,加入100 μ L无血清培养基和20 μ L 5 mg/mL MTT溶液,继续培养4 h,弃液,每孔加150 μ L DMSO避光振荡(37 $^{\circ}$ C)混匀10 min。酶标仪492 nm波长处测定各孔吸光

基金项目 海南省属科研院所技术开发专项(KYYS-2018-39)。

作者简介 郑英换(1990—),女,海南海口人,助理工程师,从事药理学研究。*通信作者,工程师,从事中药学研究。

收稿日期 2020-01-06

度(OD),各孔调零后取平均值计算细胞生长的抑制率,抑制率=(1-样品组 OD 值/阴性对照组 OD 值)×100%^[8-9]。

正式试验前为排除 DMSO 作为溶剂对各个肿瘤细胞的毒性影响,采用以上试验步骤,设置不同体积分数的 DMSO 溶液分别测定其对 BEL-7402、A549 和 HCT-8 细胞的毒性作用,从而选择合适的药物配比浓度,减小 DMSO 溶剂对试验结果的影响。计算不同体积分数 DMSO 对细胞生长的抑制率。

1.3 数据统计 试验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 20.0 对试验数据进行统计学处理,DMSO 数据采用单因素方差分析进行组间比较;计算猫须草各萃取物的细胞半数抑制浓度

(IC_{50})。

2 结果与分析

2.1 DMSO 作为溶剂对肿瘤细胞的影响 从 3 种肿瘤细胞分别经不同体积分数的 DMSO 处理 24、48 h 后的细胞生长抑制率(表 1)可以看出,与 DMSO 体积分数为 0 的空白对照组比较,当 DMSO 体积分数 ≤ 0.6% 时,对 HCT-8 肿瘤细胞毒性作用差异无统计学意义($P > 0.05$),影响弱;当 DMSO 体积分数 ≤ 0.5% 时,对 A549 肿瘤细胞毒性作用差异无统计学意义($P > 0.05$),影响弱;当 DMSO 体积分数 ≤ 0.4% 时,对 BEL7402 肿瘤细胞毒性作用差异无统计学意义($P > 0.05$),影响弱。

表 1 不同体积分数 DMSO 对肿瘤细胞生长抑制率的影响

Table 1 Effect of different volume fractions of DMSO on tumor cell growth inhibition rate

体积分数 Volume fraction//%	A549		BEL-7402		HCT-8	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
	1.00	11.6±1.6**	15.5±2.3**	9.5±4.7**	24.5±4.2**	11.2±3.0**
0.80	9.8±2.1**	10.3±3.4**	8.7±3.8**	21.6±3.5**	9.3±1.5**	13.4±3.6**
0.60	6.3±2.2**	8.8±2.4**	5.1±1.8*	14.9±3.5**	1.2±2.4	4.1±2.0
0.50	2.5±1.5	3.6±3.0	4.7±2.4*	6.5±4.5*	2.4±3.3	2.8±2.1
0.40	0.9±3.7	3.5±2.8	3.3±1.5	5.1±1.8	0.1±2.1	2.3±2.9
0.20	2.2±1.7	-1.1±3.3	1.1±2.6	-0.3±3.5	2.3±2.7	2.5±3.7
0.10	0.6±2.4	2.1±1.8	-2.5±3.3	1.4±2.2	-0.4±3.5	1.9±2.6
0.05	1.9±1.1	0.5±3.3	2.8±3.7	-0.4±3.1	2.7±2.6	-0.8±3.1

注:与 DMSO 体积分数为 0 的空白对照组比较,**表示 $P < 0.01$; * 表示 $P < 0.05$

Note:Compared with the blank control group with DMSO volume fraction of 0,** means $P < 0.01$; * means $P < 0.05$

2.2 猫须草萃取物对肿瘤细胞的影响 MTT 比色法检测结果表明,猫须草石油醚萃取物与乙酸乙酯萃取物对 3 种肿瘤细胞均呈现不同程度的抗癌活性;正丁醇萃取物与萃取后的水层均无肿瘤细胞抑制作用。由表 2~4 可见,猫须草石油醚萃取物对 HCT-8 肿瘤细胞作用最强,并随着浓度的升高而增强;对 BEL-7402 和 A549 的抑制作用虽较弱,但呈现良好的浓度依赖性。猫须草乙酸乙酯萃取物对 3 种细胞的抑制作用强度相当,对 A549、HCT-8 细胞的抑制作用呈现良好的浓度依赖性,但对 BEL-7402 细胞的抑制强度高低浓度时有反复,量效关系较差。

表 2 猫须草萃取物对 HCT-8 肿瘤细胞生长抑制率的影响

Table 2 The effect of the extract of *Clerodendranthus spicatus* on the growth inhibition rate of HCT-8 tumor cells

浓度 Concentration μg/mL	MP1		MP2	
	24 h	48 h	24 h	48 h
	500	71.8±2.5	92.1±1.4	66.2±1.9
250	50.8±2.0	79.9±3.5	45.6±2.1	78.9±2.2
125	35.1±3.4	60.5±2.5	24.8±4.2	19.9±3.6
62.5	13.2±4.1	28.0±2.2	7.0±4.4	8.2±4.0
31.25	4.0±3.2	8.1±2.4	2.2±1.6	0.9±3.6

2.3 猫须草萃取物对肿瘤细胞的 IC_{50} 值 比较猫须草石油醚萃取物和乙酸乙酯萃取物对 3 种肿瘤细胞的半数抑制浓度 IC_{50} (表 5)可知,2 种萃取物对 HCT-8 的作用最显著,作用 48 h 时 IC_{50} 分别为 109.63 和 194.61 μg/mL;石油醚萃取物对

A549 细胞的抑制强度与作用时间长短关系最密切,当作用 24 h 时 $IC_{50} > 600.00$ μg/mL,当作用时间延长至 48 h 时 IC_{50} 为 273.01 μg/mL。乙酸乙酯萃取物对 BEL-7402 和 A549 细胞作用强度相当,48 h 时 IC_{50} 分别为 283.05 和 238.61 μg/mL。

表 3 猫须草萃取物对 BEL-7402 肿瘤细胞生长抑制率的影响

Table 3 The effect of the extract of *Clerodendranthus spicatus* on the growth inhibition rate of BEL-7402 tumor cells

浓度 Concentration μg/mL	MP1		MP2	
	24 h	48 h	24 h	48 h
	600	57.6±3.3	65.2±2.3	63.2±3.7
400	34.5±4.3	47.7±1.0	50.9±2.6	59.8±1.7
200	24.1±1.3	32.8±1.3	25.4±2.5	29.4±2.4
100	20.5±2.7	31.7±2.1	26.2±5.5	29.2±2.5
50	7.0±3.8	18.9±4.1	2.2±2.3	5.7±3.2

表 4 猫须草萃取物对 A549 肿瘤细胞生长抑制率的影响

Table 4 The effects of the extract of *Clerodendranthus spicatus* on the growth inhibition rate of A549 tumor cells

浓度 Concentration μg/mL	MP1		MP2	
	24 h	48 h	24 h	48 h
	600	46.7±1.2	64.9±2.9	66.9±5.0
400	28.5±3.8	53.2±0.5	51.5±2.6	82.1±0.8
200	15.4±2.1	46.3±0.6	30.1±4.7	39.9±0.5
100	11.9±2.9	37.6±1.8	15.0±4.3	22.0±1.8
50	9.3±2.7	17.0±4.3	6.3±4.3	8.8±1.6

表 5 猫须草萃取物对肿瘤细胞 IC₅₀ 值Table 5 The IC₅₀ value of the extract of *Clerodendranthus spicatus* against tumor cells

猫须草组分 Components of <i>Clerodendranthus spicatu</i>	HCT-8		BEL-7402		A549	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
石油醚萃取物 Petroleum ether extract	235.07	109.63	596.91	558.60	>600.00	273.01
乙酸乙酯萃取物 Ethyl acetate extract	294.65	194.61	385.26	283.05	385.92	238.61

μg/mL

3 讨论与结论

DMSO 作为万能溶剂是许多脂溶性药物进行细胞试验中常见的溶媒,但是在保证药物溶解度的情况下也要考虑 DMSO 对细胞的毒性作用,避免其对研究结果产生不良影响。不同的细胞对 DMSO 的耐受能力不同,且与生产厂家有一定关系^[10]。笔者通过对作为溶媒的 DMSO 进行预试验,选择合适的体积分数范围进行正式试验可减少 DMSO 对试验结果的影响,有效提高试验结果的准确性。

猫须草作为民间常用中草药被广泛应用,多年来研究者们对其研究不断,因其具有良好的保肾利尿作用,已被开发成多种保健茶饮^[1]。目前,猫须草研究多限于化学成分和药效学的研究,但其活性成分的提纯和药物作用机理的深入研究相对较少。笔者通过此次抗肿瘤活性成分研究发现,猫须草经乙醇提取、石油醚萃取、乙酸乙酯萃取后对 HCT-8、BEL-7402、A549 肿瘤细胞均具有良好的活性作用,为后续开展的活性化学成分的研究和体内抗肿瘤药理学研究提供新

的研究方向。

参考文献

- [1] 许娜,许旭东,杨峻山.猫须草的研究进展[J].中草药,2010,41(5):848-852.
- [2] 李金雨,康龙泉.猫须草的研究和开发利用进展[J].江西农业学报,2010,22(3):99-104.
- [3] 姜帅,邹德志,徐建平,等.肾茶的传统应用调查与研究进展[J].中国现代中药,2015,17(9):980-987.
- [4] 侯志勇,王立强,梁振生.肾茶提取物药理作用的最新研究进展[J].中国医药科学,2011,1(2):26-27,30.
- [5] 任文辉,洪丽芳.猫须草的药理作用研究进展[J].中草药,2013,44(20):2946-2950.
- [6] 陈小芳,马国需,黄真,等.傣药肾茶中水溶性酚酸类化学成分的研究[J].中草药,2017,48(13):2614-2618.
- [7] 王伟辰,章靛.傣药猫须草的药学研究进展[J].海峡药学,2018,30(11):52-54.
- [8] 何国浓,王邦才,王辉,等.中药藤梨根提取物体外抗肿瘤活性部位的筛选[J].中华中医药杂志,2017,32(6):2683-2685.
- [9] 吴昆,程文明,李春如,等.桦褐孔菌抗肿瘤活性部位的筛选及化学成分研究[J].安徽医科大学学报,2016,51(10):1468-1472.
- [10] 刘小平,刘华,王小军,等.不同厂家二甲亚砷对人肺腺癌 A549 细胞生长的影响[J].甘肃中医药大学学报,2016,33(3):16-19.

(上接第 160 页)

N 197.7 kg/hm²、P 56.0 kg/hm²、K 171.9 kg/hm²¹。我国小麦、水稻和玉米的氮肥当季利用率在 8.9%~78.0%,平均为 28.7%;磷肥当季利用率在 3.0%~49.3%,平均为 13.1%;钾肥当季利用率在 4.5%~82.8%,平均为 27.3%。化肥当季利用率较低,也间接提升了土壤有效磷和速效钾含量^[22]。

参考文献

- [1] 黄昌勇,徐建明.土壤学[M].北京:中国农业出版社,2000.
- [2] 黄云.植物营养学[M].北京:中国农业出版社,2014.
- [3] 王政权.地统计学及在生态学中的应用[M].北京:科学出版社,1999.
- [4] 史舟,李艳.地统计学在土壤学中的应用[M].北京:中国农业出版社,2006.
- [5] 冯晓,乔淑,胡峰,等.土壤养分空间变异研究进展[J].湖北农业科学,2010,49(7):1738-1741.
- [6] 李旭,王海燕,杨晓娟,等.基于地统计学的土壤养分空间变异研究进展[J].广东农业科学,2012(22):65-69,76.
- [7] 中华人民共和国国家统计局.中国统计年鉴 2011[M].北京:中国统计出版社,2011.
- [8] 安徽省土壤普查办公室.安徽土壤[M].北京:科学出版社,1994.
- [9] 李德成,张甘霖,王华.中国土系志·安徽卷[M].北京:科学出版社,2017.
- [10] 安徽省统计局,国家统计局安徽调查总队.安徽省统计年鉴 2011[M].

北京:中国统计出版社,2011.

- [11] 马渝欣,李徐生,李德成,等.江淮丘陵区农田表层土壤有机碳空间变异:以定远县为例[J].土壤,2014,46(4):638-643.
- [12] 赵明松,李德成,张甘霖,等.江淮丘陵地区土壤养分空间变异特征:以安徽省定远县为例[J].土壤,2016,48(4):762-768.
- [13] 张甘霖,龚子同,杨金玲,等.土壤调查实验室分析方法[M].北京:科学出版社,2012.
- [14] 包土旦.土壤农化分析[M].北京:中国农业出版社,2000.
- [15] 余建英,何旭宏.数据统计分析与 SPSS 应用[M].北京:人民邮电出版社,2003.
- [16] NIELSEN D R,BOUMA J.Soil spatial variability:Proceedings of a workshop of the ISSS and SSSA, Las Vegas[M]. Wageningen, The Netherlands: PUDOC Scientific Publishers,1985.
- [17] 全国土壤普查办公室.中国土壤[M].北京:中国农业出版社,1998.
- [18] 高静,朱捷,黄益国,等.农作物秸秆还田研究进展[J].作物研究,2019,33(6):597-602.
- [19] YANG Y R,WANG X X,ZHANG T L, et al.Utilization of crop straw resources in Anhui province, China[J].Bulgarian journal of agricultural science, 2014,20(6):1302-1310.
- [20] 王永露,陶盛林,张兆冬,等.“3414”施肥方案对皖中地区小麦产量和经济效益的影响[J].安徽农学通报,2017,23(16):70-72.
- [21] 张兆冬,许福文,欧康泉,等.定远县水稻“3414”施肥的效果[J].农技服务,2008,25(8):37,39.
- [22] 闫湘,金继运,何萍,等.提高肥料利用率技术研究进展[J].中国农业科学,2008,41(2):450-459.