

# 毛花猕猴桃氯仿萃取物抗肿瘤活性研究

郭辉辉, 应 帅, 王晓明, 金秀芳, 马丛丛, 许传莲

(浙江理工大学生命科学院, 杭州 310018)

**摘 要:** 对毛花猕猴桃根甲醇提取物进行初步分离,对所得氯仿萃取物活性部位进行定性以及体外抗肿瘤活性研究。使用系统溶剂法分离毛花猕猴桃根甲醇提取物,获得氯仿萃取物。使用显色反应对氯仿萃取物进行初步定性。以紫杉醇为阳性对照药,通过MTT法检测毛花猕猴桃根甲醇提取物的氯仿萃取活性部位对肝癌细胞株BEL-7404增殖的抑制作用。结果表明毛花猕猴桃氯仿萃取物的主要成分可能为生物碱类物质。氯仿萃取物对BEL-7404有明显的增殖抑制作用并呈剂量依赖性关系,其 $IC_{50}$ 为114.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

**关键词:** 毛花猕猴桃; 系统溶剂法; 氯仿萃取物; MTT法; 抗肿瘤活性

**中图分类号:** R285.5      **文献标志码:** A

## 0 引 言

肝癌是一种高发的恶性肿瘤,目前治疗肝癌的方法主要包括手术治疗、放射疗法以及化学疗法。化学疗法对抑制肿瘤的转移和防止复发具有积极的意义,因而寻求新的有效的抗肿瘤活性结构一直是肿瘤治疗的热点。天然药物以其作用机制独特、效果显著、毒副作用较小,越来越受到人们的关注。据统计,当今使用于临床的化疗药物中有接近50%属于天然产物或者来自其衍生物<sup>[1]</sup>。

生物碱是目前研究发展得最快的一类新的天然物质。它们能通过抑制细胞端粒酶活性、抗肿瘤扩散及转移、诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞增殖、细胞毒作用等多个方面<sup>[2]</sup>发挥抗肿瘤作用,其代表药物紫杉醇以其良好的疗效广泛运用于临床。我国拥有丰富的植物药物资源,拥有众多传统天然抗肿瘤植物,目前正成为寻找新的有效的抗肿瘤药物的重要来源。

毛花猕猴桃(*Actinidia eriantha* Benth.)为猕猴桃科猕猴桃属植物,《中药大辞典》记载其有清热利湿,活血消肿,解毒;治肺热失音,淋浊,带下,颜面

丹毒,淋巴结炎,痈疮肿毒的功能<sup>[3]</sup>。《福建中草药》则记载其有治疗胃癌,鼻咽癌,乳癌等功能。而其作为浙江少数民族用药畲药的一种,在畲族中被广泛用于肿瘤治疗。本实验选取了毛花猕猴桃根的氯仿萃取物为研究对象,对其进行了初步的定性分析。以临床抗癌药紫杉醇为阳性对照药,以肝癌细胞株BEL-7404作为体外抗肿瘤活性筛选模型<sup>[4-6]</sup>,对毛花猕猴桃氯仿萃取物抗肿瘤作用进行研究,并初步研究了作用机制。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料、试剂

毛花猕猴桃根(2011年04月购于浙江遂昌,并由浙江中医药大学陈锡林副教授鉴定)、DMEM培养基(Gibco公司)、FBS(天津灏洋生物技术有限责任公司)、DMSO(二甲基亚砷, Sigma-Aldrich公司)、噻唑蓝(3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide(MTT, Sigma公司)、紫杉醇(杭州长征化学试剂有限公司)、甲醇、氯仿、苦味酸、碘化铋钾、碘-碘化钾等试剂均为分析纯。

### 1.2 细胞株

肝癌细胞株BEL-7404由浙江理工大学新元医

学与生物技术研究所提供。

### 1.3 仪器

Forma Series II 型 CO<sub>2</sub> 培养箱 (Thermo 公司); Varioscan Flash 酶标仪 (Thermo 公司); Forma -80°C ULT Freezer 型超低温冰箱 (Thermo 公司); TE2000-U 型荧光显微镜 (Nikon 公司); TS100 型荧光显微镜 (Nikon 公司); R-250 型旋转蒸发器 (上海申胜生物技术有限公司); 低温冷冻干燥机 (德国 Marin Christ 公司); HWL07-3 型微波炉 (杭州博泉生物技术有限公司); DJ-10A 型高速粉碎机 (上海鼎广机械设备有限公司); SHZ-DIII 型循环水真空泵 (巩义市予华仪器有限责任公司)。

### 1.4 试验方法

#### 1.4.1 毛花猕猴桃根氯仿萃取物样品的制备

取毛花猕猴桃干燥根部, 粉碎, 过 80 目筛。称取毛花猕猴桃根部粗粉 5 kg, 用体积分数为 80% 的甲醇 35 L 进行微波提取, 提取条件为: 温度 40°C, 功率 140 W, 每次提取 7 min, 反复提取 3 次, 过滤后合并提取液。减压浓缩回收甲醇提取液至无醇味, 将所得的水悬液使用等体积的氯仿进行萃取, 萃取 3 次, 合并萃取液, 减压浓缩, 冷冻干燥, 得毛花猕猴桃氯仿萃取物冻干粉末。

#### 1.4.2 毛花猕猴桃根氯仿萃取物生物碱显色反应

取氯仿萃取物粉末, 使用酸性甲醇溶解, 配置成终浓度为 5 mg/mL 供试液, 过滤, 得澄清滤液。取上述滤液 3 管, 各 2 mL, 于每管中分别滴加苦味酸试液 1~2 滴; 碘-碘化钾试液 1~2 滴; 碘化铋钾试液 3~4 滴, 同时设置空白组对照; 观察上述各管中是否有沉淀及颜色变化。

#### 1.4.3 细胞培养和样品溶液配制

将肝癌细胞株 BEL-7404 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 置于 37°C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的细胞培养箱中培养, 每隔 48 h 更换新鲜培养基。每隔 3 d 使用含 EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化后传代。

将毛花猕猴桃氯仿萃取物冻干粉末用 DMSO 配置成 40 mg/mL 的母液, 12 000 r/min, 10 min 离心, 取上清, 过滤除菌后分装待用。

#### 1.4.4 MTT 法检测细胞增殖

取对数生长期的 BEL-7404, 接种于 96 孔板内, 每孔加入 190 μL 细胞液, 调整细胞密度, 每孔种入 3 000 个细胞。接种后培养 8 h, 待细胞贴壁后, 使用

培养基将上述氯仿萃取物母液稀释, 在实验组培养孔中加入 10 μL 不同浓度的氯仿萃取物溶液, 使培养孔中氯仿萃取物的终浓度分别为 200、175、150、137.5、125、112.5、100、87.5 μg/mL, 同时设置终浓度为 0.5% 的 DMSO 溶剂对照组和终浓度分别为 3.325、1.663、3.325 × 10<sup>-1</sup>、1.663 × 10<sup>-1</sup>、3.325 × 10<sup>-2</sup>、1.663 × 10<sup>-2</sup> μg/mL 的紫杉醇阳性对照组、空白调零组, 各组均设置 3 个复孔。将加药后的 96 孔板放回培养箱中继续培养 72 h, 取出培养板, 每孔加入新鲜配置的 0.5 mg/mL MTT 溶液 10 μL, 继续培养 4 h, 取出培养板, 3 000 r/min, 10 min 离心, 吸弃上清, 每孔加入 150 μL DMSO, 于摇床上摇动 10 min, 使培养孔中的蓝紫色结晶充分溶解, 用酶标仪在 490 nm 处测定各孔吸光度 (A), 计算样品对细胞生长的抑制率, 并计算 IC<sub>50</sub> 值。实验重复 3 次。使用下列公式计算抑制率:

抑制率 =

$$\frac{\text{溶剂对照组吸光度 } A \text{ 均值} - \text{实验组吸光度 } A \text{ 均值}}{\text{溶剂对照组吸光度 } A \text{ 均值} - \text{调零组吸光度 } A \text{ 均值}} \times 100\%$$

#### 1.4.5 统计学分析

以均数 ± 标准误 (Mean ± SEM) 表示, 所有数据采用 PASW statistics 18 统计学软件进行分析。

## 2 结果

### 2.1 毛花猕猴桃根氯仿萃取物显色反应

毛花猕猴桃根氯仿萃取物甲醇溶液, 在滴加苦味酸试液后, 产生黄白色沉淀; 滴加碘化铋钾试液后, 溶液产生橘红色沉淀; 滴加碘-碘化钾溶液后产生棕色沉淀, 可见三个典型的生物碱显色反应皆成阳性, 提示毛花猕猴桃氯仿萃取物的主要化合物可能为生物碱类物质。

### 2.2 氯仿萃取物对肝癌细胞株 BEL-7404 的增殖抑制作用

在所设定的 87.5~200 μg/mL 给药浓度范围内, 毛花猕猴桃根氯仿萃取物对肝癌细胞株 BEL-7404 有显著的增殖抑制作用, 结果如表 1 所示。由所得的数据可知, 随着给药浓度的增高, 氯仿萃取物对 BEL-7404 的抑制率越高, 可见氯仿萃取物对 BEL-7404 的抑制作用呈剂量依赖性关系。在 200 μg/mL 给药浓度下作用 72 h 抑制率达到 85% 以上, 半抑制浓度 IC<sub>50</sub> 约为 114.8 μg/mL。阳性对照药紫杉醇组呈现相似的抑制规律, 其半抑制浓度 IC<sub>50</sub> 约为 6.999 × 10<sup>-1</sup> μg/mL。

表1 不同浓度氯仿萃取物对 BEL-7404 细胞株的抑制率 ( $\bar{x} \pm s$ )

给药种类	给药浓度/( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	抑制率/%
氯仿萃取物	200	85.31 $\pm$ 0.0226**
	175	81.84 $\pm$ 0.0732**
	150	77.30 $\pm$ 0.1043**
	137.5	72.35 $\pm$ 0.1932**
	125	44.61 $\pm$ 0.2182*
	112.5	38.76 $\pm$ 0.2419*
	100	32.91 $\pm$ 0.1535**
	87.5	12.00 $\pm$ 0.095*
	3.325	82.71 $\pm$ 0.0576**
	1.6631	79.22 $\pm$ 0.0523**
紫杉醇	3.325 $\times 10^{-1}$	57.76 $\pm$ 0.1381**
	1.663 $\times 10^{-1}$	7.09 $\pm$ 0.1531
	3.325 $\times 10^{-2}$	5.48 $\pm$ 0.1822
	1.663 $\times 10^{-2}$	8.98 $\pm$ 0.2521

注: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with control.

### 3 讨论

#### 3.1 毛花猕猴桃根氯仿萃取物样品的制备

微波提取法<sup>[7]</sup>具有提取效率高、选择性好、能耗低、设备简单便于操作等优点,用于处理大批量样品有着突出的优点,陈雷等<sup>[8]</sup>使用微波萃取提取丹参中有效成分,结果显示 4 min 所得到的有效成分的提取率与索氏提取 180 min 的提取率相当,远高于超声提取 30 min 的产率。此结果充分体现了密闭微波萃取法快速、高效的优点。本实验采用微波提取法提取毛花猕猴桃根粗粉,通过正交实验法优化提取条件得出温度 40 $^{\circ}\text{C}$ ,功率 140 W,料液比 1:7 (g:mL),每次 7 min,提取 3 次为最佳条件。

#### 3.2 毛花猕猴桃氯仿萃取物成分及其抗肿瘤活性

由三个生物碱鉴别反应可知氯仿萃取物中主要成分为生物碱类物质。在目前对毛花猕猴桃根部化学成分的研究中,只有研究其挥发油的具体成分<sup>[9]</sup>,报道的大部分是萜类,而生物碱类物质并未见报道。在对其抗肿瘤活性的报道中,目前对毛花猕猴桃活性的研究仅见有报道其多糖成分具有抗肿瘤活性,作为疫苗佐剂应用<sup>[10]</sup>,Xu 等<sup>[11]</sup>研究了毛花猕猴桃根部分得的总糖和 4 种多糖组分,并在体内实验中证明了其对 S180、H22 肿瘤小鼠有明显的抑制肿瘤作用;同时通过研究所得多糖成分对 S180、H22 肿瘤小鼠细胞免疫和体液免疫实验,提示多糖成分可以提高 T、B-cell 的活性。增强特异性和非特异性细胞溶解活性,对抗自身肿瘤细胞,由此证明毛花猕猴桃提取多糖可以提高机体的免疫反应来实现其抗

肿瘤作用。

由本实验中所得的实验数据可知,毛花猕猴桃氯仿萃取物在体外抗肿瘤活性筛选实验中,对肝癌细胞株 BEL-7404 细胞的增殖存在着显著抑制作用,且这种抑制作用呈现出浓度依赖性关系。由显色反应可知,氯仿萃取物中含有生物碱类物质,而目前研究中,最常见的生物碱类抗肿瘤机制有两类:一类是直接杀伤肿瘤细胞;另一类是干扰细胞周期的有丝分裂阶段,抑制肿瘤细胞的分裂和增殖<sup>[12]</sup>。此外,生物碱类抗肿瘤成分在促进肿瘤细胞凋亡<sup>[13-15]</sup>、提高机体免疫力<sup>[16]</sup>以及诱导肿瘤细胞分化方面<sup>[17]</sup>亦表现出一定的作用。

综上所述,推测毛花猕猴桃根对肿瘤细胞的抑制作用,可能是多靶点协同作用的过程。一方面多糖类物质可以促使机体提高其自身免疫能力,对抗机体中存在的肿瘤细胞,另一方面,其中的小分子化合物可能通过细胞毒性直接杀伤肿瘤细胞。

在本研究中利用 MTT 法初步测定分析了氯仿萃取物对肝癌细胞 BEL-7404 的增殖抑制作用,根据体外抗肿瘤活性筛选实验的结果,指导下一步的活性成分分离,并为进一步深入研究其抗肿瘤作用机制提供了初步实验依据。关于其氯仿萃取物有效成分及其抗肿瘤的作用分子机制有待深入研究。

#### 参考文献:

- [1] Newman D J, Cragg G M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010[J]. *Journal of Natural Products*, 2012, 75(3): 311-335.
- [2] 唐洪波,沈宝茗. 中药及提取物抗肿瘤的研究进展[J]. *西南军医*, 2012, 14(1): 92-94.
- [3] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1977: 440.
- [4] 沈文娟,岳亮,何英翠,等. 天然药物常用提取技术与方法研究概况[J]. *中南药学*, 2011, 9(2): 127-130.
- [5] Khodayar Gholivand, Fatemeh Ghaziani, Zahra Shariatnia. Antitumor activities of some new 1,3,2-oxaza- and 1,3,2-diazaphosphorinanes against K562, MDA-MB-231, and HepG2 cells[J]. *Medicinal Chemistry Research*, 2012, 21(9): 2185-2195.
- [6] Guo Zizhao, Zhuang Chunlin, Zhu Lingjian. Structure-activity relationship and antitumor activity of thio-benzodiazepines as p53-MDM2 protein-protein interaction inhibitors[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2012, 56(10): 10-16.
- [7] Liu Xia, Gan Qiang, Feng Changgen. Synthesis, characterization and antitumor activity of rare earth substitu-

- ted phosphotungstates containing 5-fluorouracil [J]. *Journal of Rare Earths*, 2012, 30(6): 604-608.
- [8] 陈雷, 杨屹, 张新祥. 密闭微波辅助萃取丹参中有效成分的研究[J]. *高等学校化学学报*, 2004, 25(1): 35-38.
- [9] 郭维, 范玉兰, 郑绿茵. 毛冬瓜根挥发油化学成分分析[J]. *广西植物*, 2009, 29(4): 564-567.
- [10] Sun Hongxiang, Wang Hui, Xu Haishun, et al. Novel polysaccharide adjuvant from the roots of *Actinidia eriantha* with dual Th1 and Th2 potentiating activity[J]. *Vaccine*, 2009, 27(30): 3984-3991.
- [11] Xu Haishun, Wu Yuanwen, Xu Shifang, et al. Antitumor and immunomodulatory activity of polysaccharides from the roots of *Actinidia eriantha*[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, 125(2): 310-317.
- [12] 叶友进, 王春雷, 芦柏震. 植物生物碱抗肿瘤的研究进展[J]. *医药导报*, 2012, 31(7): 901-904.
- [13] 冯龄鑫, 刘淑萍, 丁爱萍. 中国红树科植物角果木中 Dolabrane 型二萜的抗肿瘤作用[J]. *齐鲁医学杂志*, 2010, 25(3): 198-202.
- [14] Letasiova S, Jantova S, Miko M, et al. Effect of berberine on proliferation, biosynthesis of macromolecules, cell cycle and induction of intercalation with DNA, dsDNA damage and apoptosis in Ehrlich ascites carcinoma cell[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2006, 58(2): 263-270.
- [15] 魏晓霞, 李鹏, 许建华. 灵芝三萜组分 GLA 体内外抗肿瘤作用的研究[J]. *福建医科大学学报*, 2010, 44(6): 417-420.
- [16] 许冬青, 王明艳, 龚婕宁. 巴豆生物碱诱导人胃癌细胞 SGC-7901 分化及分子机制的研究[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2005, 15(7): 545-546.
- [17] 王明娟, 刘铭, 刘伟. 甘肃棘豆生物碱部位体内抗肿瘤作用及对免疫功能的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2009, 29(11): 1009-1011.

## Study on Antineoplastic Activity of Chloroform Extraction of *Actinidia Eriantha Benth*

GUO Hui-hui, YING Shuai, WANG Xiao-ming, JIN Xiu-fang, MA Cong-cong, XU Chuan-lian  
(School of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** This study preliminarily separates methanol extract of *actinidia eriantha benth* root, determines the nature of active site of chloroform extraction obtained and studies invitro antineoplastic activity. It separates methanol extract of *actinidia eriantha benth* root with systematic solvent method and obtains chloroform extraction, preliminarily determines the nature of chloroform extraction by using chromogenic reaction and detects the inhibiting effect of active site of chloroform extraction of methanol extract of *actinidia eriantha benth* root on liver cancer cell line BEL-7404 proliferation with MTT method with TAX as positive control medicine. The result shows that the main component of chloroform extraction of *actinidia eriantha benth* might be alkaloid substance. Chloroform extraction has significant proliferation inhibiting effect on BEL-7404 and presents dosage dependency. Its  $IC_{50}$  is 114.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**Key words:** *actinidia eriantha benth*; systematic solvent method; chloroform extraction; MTT method; antineoplastic activity

(责任编辑:许惠儿)