

文章编号: 1674-8085(2018)03-0098-04

金铃子散的半仿生提取及抗癌活性研究

*戴 一, 艾甜碧

(安徽新华学院药学院, 安徽, 合肥 230088)

摘 要: **目的** 研究金铃子散的半仿生提取及抗癌活性。**方法** 将金铃子散进行半仿生提取, 提取物通过 MTT 法研究其抗癌活性。**结果** 金铃子散用含 20%乙醇的半仿生液提取效果较佳, 且抗癌活性较好, 尤其对人肝癌 HepG2 细胞具有抗癌活性。**结论** 金铃子散半仿生提取物均表现出一定的抗癌活性, 为其临床抗癌应用提供科学依据。

关键词: 金铃子散; 半仿生提取; 抗癌活性

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI:10.3969/j.issn.1674-8085.2018.03.020

SEMI-BIONIC EXTRACTION AND ANTICANCER ACTIVITY OF JINLINGZI SAN

*DAI Yi, AI Tian-bi

(School of Pharmaceutical Sciences, Anhui Xinhua College, Hefei, Anhui 230088, China)

Abstract Objective: To explore semi-bionic extraction and anticancer activity of Jilingzi San. **Methods:** Jinlingzi San was extracted by semi-bionic extraction and the extracts were assayed by MTT to study the anticancer activity. **Results:** Jinlingzi San could be extracted well by solution of semi-bionic extraction containing 20% ethanol to get the best active fraction against cancer cell, especially HepG2 cell. **Conclusion:** Semi-bionic extraction of Jilingzi San had anticancer activity, which provided the reference for clinical application.

Key words: Jinlingzi San; semi-bionic extraction; anticancer activity

金铃子散出自《素问·病机气宜保命集》, 由延胡索、川楝子两味药 1:1 比例配伍组成。该方以延胡索活血行气, 川楝子泄肝火、疏肝行气, 二药相配, 一温一寒, 一血一气, 配伍后能活血散瘀、行气镇痛, 为治疗胸痛、脘腹疼痛的常用药方^[1]。因此, 镇痛抗炎是金铃子散前期研究的重点^[2-3]。当今金铃子散临床上也用于癌症的治疗, 且取得了积极的效果^[4], 与其组方药材功效吻合。川楝子又名金铃子, 为楝科植物川楝 *Melia toosendan* Sieb et Zucc 的干燥成熟果实, 文献报道川楝子所含的柠檬苦素类三萜具有较强抗癌活

性, 如川楝素可通过多种途径抑制肿瘤细胞生长^[5-6]。延胡索 (*Corydalis yanhusuo* W. T. Wang ex Z. Y. Su et C. Y. Wu), 又名玄胡索、元胡等, 为罂粟科、紫堇属草本植物, 主要含生物碱类活性成分, 如延胡索乙素、小檗碱等, 亦具有较强的抗癌活性^[7-8]。金铃子散常以酒服用, 但酒精度未有明确的考察及记载, 同时金铃子散含有生物碱, 提取溶剂的酸碱性对其成分溶出具有一定影响, 且金铃子散服用过程需通过胃肠的酸碱环境。鉴于以上两方面原因, 本实验以不同浓度乙醇半仿生液对金铃子散进行半仿生提取, 即在不同浓度

收稿日期: 2018-01-02; 修改日期: 2018-03-02

基金项目: 安徽省教育厅自然科学研究重点项目(KJ2016A301); 国家级大学生创新创业训练计划创新 (201412216005)

作者简介: *戴 一(1979-), 男, 安徽利辛人, 副教授, 硕士, 主要从事天然产物结构修饰及化学药物合成研究(E-mail:daiyiii@163.com);

艾甜碧(1993-), 女, 安徽安庆人, 安徽新华学院药学院制药工程专业 2012 级本科生(E-mail:1874182952@qq.com)。

乙醇存在条件下,简单模拟胃液酸性环境及肠液碱性环境在 37℃ 温度振荡提取,并对提取物进行抗癌活性研究,为金铃子散的抗癌临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

SHZ-88 水浴恒温振荡器(常州市国立试验设备研究所);酶标仪(美国安捷伦科技公司);FA2004 型电子天平(上海民桥精密科学仪器有限公司);8510E-DTH 超声提取器(美国必能信公司);旋转蒸发器 RE-3000(上海亚荣生化仪器厂);DZF-6020 型真空干燥箱(上海三发科学仪器有限公司)。

1.2 试剂与材料

延胡索、川楝子(购置于亳州药材市场,产地湖北,经安徽新华学院庆兆老师鉴定);DEME 培养基(hyclone 公司,批号:AC10220185);MTT(碧云天公司);其他试剂均为分析纯。材料:人宫颈癌 HeLa 细胞及人肝癌 HepG2 细胞来自于美国菌种保藏中心即 ATCC 公司(美国)。

2 方法

2.1 半仿生溶液的配制

以磷酸盐缓冲液配制配制 0、20%、40%、60% 浓度的乙醇溶液,每种浓度乙醇液分别调 pH 值制成 pH=2 和 pH=10 的溶液各一份,共得 8 份半仿生溶液,即:磷酸盐缓冲液(pH=2)、磷酸盐缓冲液(pH=10)、20%乙醇磷酸盐缓冲液(pH=2)、20%乙醇磷酸盐缓冲液(pH=10)、40%乙醇磷酸盐缓冲液(pH=2)、40%乙醇磷酸盐缓冲液(pH=10)、60%乙醇磷酸盐缓冲液(pH=2)、60%乙醇磷酸盐缓冲液(pH=10),备用。

2.2 金铃子散的半仿生提取^[9]

称取金铃子散 4 份,每份 5 g,每份用 pH=2 和 10 的同种半仿生溶液先后提取,固液比 1 g:10 mL,提取温度 37℃,摇床上震荡 30 min,提取液合并,浓缩至干,称重,计算浸膏得率。

2.3 MTT 实验^[10]

MTT 实验主要使用人宫颈癌 HeLa 细胞株、人肝癌 HepG2 细胞株。取处于对数生长期的肿瘤细胞,以 0.25% 胰蛋白酶消化后,用 DEME 培养液稀释悬浮,接种于 96 孔板,每孔加入 100 μ L,5000 个细胞。常规培养 12 h 后,试验组每孔加入适量不同浓度(6 个浓度)的金铃子散半仿生提取物,每个浓度设 3 个复孔,同时设阴性对照组。培养 48 h 后,每孔加入 15 μ L MTT 生理盐水溶液(5 g·L⁻¹),继续避光培养 4 h。弃上清,每孔加入 150 μ L 的 DMSO,于酶标仪上测定波长 490 nm 时的吸光度。计算细胞增殖抑制率:抑制率(%)=(1-实验组吸光度/对照组吸光度)×100%。并根据各浓度的抑制率,采用 LOGIT 法计算半数抑制浓度(IC₅₀)。

3 结果与讨论

3.1 金铃子散的半仿生提取得膏率

半仿生提取是通过模拟胃肠道环境研究口服药物在胃肠中转运而设计的一种提取方法,以期尽可能保留原药中的有效成分,不同于西药中的天然产物开发模式,符合中医药传统的整体观、系统观,体现了中药多成分复合作用的特点^[11]。金铃子散分别用不同半仿生溶液提取后,能较好地保留复方中的成分。通过半仿生提取,金铃子散各提取组得膏率见表 1,可见随着乙醇浓度的升高,提取率略有降低,但幅度不大。鉴于半仿生溶液总体乙醇浓度都不太高,说明金铃子散的半仿生提取物以极性较大成分为主,与文献报道延胡索主要含生物碱,川楝子中主要含多氧原子萜类成分吻合,这些化学成分的极性适合于低浓度的乙醇提取。所得干浸膏用于抗癌活性实验,鉴于提取物为混合物,浓度以 mg/L 表示。

表 1 金铃子散半仿生提物得膏率

Table 1 The yield of Semi-bionic extraction from Jinlingzi San

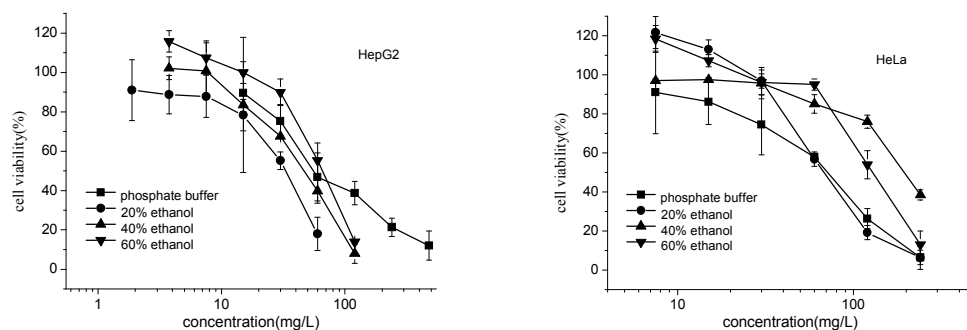
提取溶剂	药材重(g)	干膏重(g)	得膏率(%)
磷酸盐缓冲液	5.007	0.7295	14.57
20%乙醇磷酸盐缓冲液	4.9988	0.6750	13.50
40%乙醇磷酸盐缓冲液	5.0074	0.6308	12.60
60%乙醇磷酸盐缓冲液	5.0194	0.5787	11.53

3.2 金铃子散的半仿生提取物 MTT 活性实验

MTT 法以其快速、简单的操作,广泛用于药物的筛选。对金铃子散进行半仿生提取物进行 MTT 抗癌活性实验,结果见图 1。对 HepG2 细胞,四种半仿生溶液(即分别由纯磷酸缓冲液、20%乙醇磷酸盐缓冲液、40%乙醇磷酸盐缓冲液和 60%乙醇磷酸盐缓冲液配制的半仿生提取液)提取物 IC_{50} 值分别为 88.20、32.02、47.23、105.50 mg/L。从 IC_{50} 值来看,含 20%乙醇的半仿生溶液提取物活性最好,其次为含 40%乙醇的半仿生溶液提取物,最差的为含 60%乙醇的半仿生溶液提取物;对 HeLa 细胞,四种半仿生溶液(即分别由纯磷酸缓冲液、20%乙醇磷酸盐缓冲液、40%乙醇磷酸盐缓冲液和 60%乙醇磷酸盐缓冲液配制的半仿生提取液)提取物 IC_{50} 值分别为 72.26、67.58、194.90、128.95 mg/L。从 IC_{50} 值来看,含 20%乙醇的半仿生溶液提取物活性与不含乙醇的半仿生溶液提取物活性差别不大,但均强于另外两种半仿生溶液提取物。可见,金铃子散半仿生提取物对 HeLa 细胞、HepG2 细胞均表现

出一定的抗癌活性。在两株细胞中,且含 20%乙醇的半仿生溶液所提取出的产物,活性均好于其他半仿生溶液所得的提取物,尤其是在人肝癌 HepG2 细胞中表现尤为明显。

金铃子散主要由延胡索及川楝子组成,所含成分主要为生物碱及含氧较多的三萜,极性较大。本次实验采用的半仿生提取,较贴近药物在体内的吸收过程,经历了酸碱环境,对于酸性及碱性成分的提取具有针对性;同时,又搭配一定的乙醇,有利于化学成分的溶出,比较适合延胡索中的生物碱成分及川楝子中的含氧萜类成分的提取。可见,低浓度乙醇有助于金铃子散抗癌活性成分的溶出,与金铃子散文献记载用酒服用有一定吻合,是金铃子散抗癌活性成分提取的较佳选择。另外,从 60%乙醇半仿生液提取物表现出来的结果也印证了这一结论。实验结果表明 20%乙醇半仿生液提取物抗癌活性较佳,说明金铃子散以酒送服有一定依据,且酒精度不宜太高,也符合古代酿酒酒精度不高的实际。



(磷酸盐缓冲液; 20%乙醇磷酸盐缓冲液; 40%乙醇磷酸盐缓冲液; 60%乙醇磷酸盐缓冲液)

图 1 金铃子散半仿生提取物 MTT 实验结果

Fig.1 The results of MTT assay to Semi-bionic extraction from Jinlingzi San

4 小结

金铃子散为延胡索与川楝子以 1:1 的配比组成的经典名方,在临床镇痛抗炎中发挥了重要的作用,近年来从两味组方药材中分离出了许多抗癌成分,为金铃子散的临床扩展应用提供了依据。作为抗癌方剂,金铃子散主要用于治疗食管癌^[6]。但其具体的药理作用物质基础不明,未见文献报

道。本实验结合金铃子散以酒送服的给药方式,采用半仿生法提取金铃子散,对提取物进行细胞毒性试验,结果显示,金铃子散的提取物确实具有一定的抗癌活性,为金铃子散的合理提取提供了依据,即低浓度 20%乙醇半仿生提取。提取物表现出的抗癌活性为金铃子散的抗癌活性进一步研究提供了依据。由于提取物包含成分复杂,具体发挥抗癌的活性成分有待进一步研究,也是金

铃子散今后抗癌活性研究的重要方向。

参考文献:

- [1] 王绪前. 金铃子散使用沿革[J].湖北中医学院学报, 1993,1(1):25-26.
- [2] 朱爱江,方步武,吴咸中,等. 金铃子散的抗炎作用研究[J].中药药理与临床,2008,24 (3) :1-3.
- [3] 戴一,贾晓益,王海菲. 金铃子散抗炎有效部位筛选及质谱表征[J].井冈山大学学报:自然科学版,2015, 36(1):103-106.
- [4] 曹志成,刘洁华. 癌中西医面面观[M].上海:上海科学技术出版社,2009:247.
- [5] Ju J, Qi Z, Cai X, et al. Toosendanin induces apoptosis through suppression of jnk signaling pathway in hl-60 cells[J]. Toxicol In Vitro, 2013, 27(1):232-238.
- [6] Wang G, Feng C C, Chu S J, et al. Toosendanin inhibits growth and induces apoptosis in colorectal cancer cells through suppression of akt/gsk-3 β /beta-catenin pathway[J]. Int J Oncol, 2015,47(5):1767-1774.
- [7] Zhao Y,Gao J L,Ji J W, et al. Cytotoxicity enhancement in mda-mb-231 cells by the combination treatment of tetrahydropalmatine and berberine derived from corydalis yanhusuo w. T. Wang[J]. J Intercult Ethnopharmacol, 2014,3(2): 68-72.
- [8] Shi J,Zhang X,Ma Z,et al. Characterization of aromatase binding agents from the dichloromethane extract of corydalis yanhusuo using ultrafiltration and liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Molecules, 2010, 15(5):3556-3566.
- [9] 张黎莉. 均匀设计法优选二妙丸方药的半仿生提取工艺[J]. 中国中药杂志,2012,37 (16) :2396-2399.
- [10] Aryal S, Hu C M J, Zhang L F. Polymer-cisplatin conjugate nanoparticles for acid-responsive drug delivery [J].ACS nano,2010,4(1):251-258.
- [11] 杨茉,周晶. 半仿生技术在复方中药提取中的应用进展[J].时珍国医国药,2008,19 (8) :1946-1947.