

· 基础研究 ·

文冠果壳提取物体外抑制 HepG₂ 细胞
增殖活性部位筛选研究[△]

张严磊*, 施欢贤, 李世映, 段金康, 宋忠兴, 唐志书

(陕西中医药大学/陕西省中药资源产业化协同创新中心, 陕西 咸阳 712083)

[摘要] 目的: 筛选文冠果壳体外抑制肝癌 HepG₂ 细胞增殖活性部位。方法: 分别用水、10%、30%、50%、70%、95% 的乙醇水溶液, 从文冠果壳中提取得到 A、B、C、D、E 和 F 6 个提取部位(XSHE), 采用 MTT 法来筛选抑制肝癌细胞 HepG₂ 增殖的活性部位。结果: 显示 6 个提取部位均有抑制 HepG₂ 细胞增殖作用, 其中提取部位 F(95% 乙醇水溶液提取物)抑制 HepG₂ 细胞增殖作用最强, 当 95% XSHE 给药质量浓度为 75.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 其对 HepG₂ 细胞增殖的抑制率高达 (80.44 $\pm$ 2.33)%, 高于等浓度的阳性对照丝裂霉素 C(MMc), 且 HepG₂ 细胞在 95% XSHE 干预下形态发生变化, 具体表现为细胞皱缩, 细胞间隙变大, 从培养板脱落等作用。结论: 文冠果壳提取物在体外具有良好的抑制 HepG₂ 增殖的生物活性, 为我们进一步探索文冠果壳提取物抗肿瘤作用机制奠定了基础。

[关键词] 文冠果壳提取物; 抑制 HepG₂ 细胞增殖; 筛选

Screen of Activity Part of Inhibiting Proliferation of HepG₂ Cell Lines from *Xanthoceras sorbifolia* Shell

ZHANG Yan-lei*, SHI Huan-xian, LI Shi-ying, DUAN Jin-ao, SONG Zhong-xing, TANG Zhi-shu

(Shaanxi University of Chinese Medicine/Shaanxi Collaborative Innovation Center of Industrialization of Traditional Chinese Medicine Resources, Xianyang 712083, China)

[Abstract] **Objective:** To screen the activity part of inhabiting the multiplication of HepG₂ cell line from *Xanthoceras sorbifolia* shell. Method: *X. sorbifolia* shell was extracted using water, 10%, 30%, 50%, 70% and 95% ethanol, and six different parts A, B, C, D, E and F were obtained, which were exerted in the experiment of inhabiting the multiplication of HepG₂ cell line by MTT method. **Results:** The results showed that all extracts of *X. sorbifolia* shell showed activity of inhibiting the proliferation of cells of HepG₂, among them the section F possessed the strongest antitumor activity, the inhibition of part F reached as high as 80.44%. **Conclusion:** *X. sorbifolia* shell extract has good biological activity in inhibiting the proliferation of HepG₂ *in vitro*, which has laid a foundation for further explore the anti-tumor mechanism of *X. sorbifolia* shell extract.

[Keywords] extract of *Xanthoceras sorbifolia* shell; inhibiting the proliferation of HepG₂ cells; screen

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20171115002

文冠果 *Xanthoceras sorbifolia* Bunge 属无患子科 Sapindaceae 文冠果属, 该植物较特殊, 是一属一种, 原产中国西北, 属木本油料植物, 为中国特有的民间植物^[1]。其叶^[2]、花^[3]、果壳^[4]、果柄^[5]、种皮^[6]等皆含有多种化学成分, 有抗风湿、祛风、消肿止痛等功效, 是传统蒙药的一种, 临床上主要用其茎秆治疗风湿性关节炎等^[7-10]。文冠果是国家战略储备木本油料作物之一, 目前对于文冠果资源的开发利用, 主要以文冠果种仁油为主; 文冠果的茎叶以及果壳、种皮

等几乎没有开发利用。本课题组前期围绕文冠果资源的叶和果壳做了大量工作, 发现文冠果叶提取物^[11]及多糖^[12]皆有明显的生物活性。文冠果壳占了文冠果果实生物质量的很大一部分, 但是基本当作废弃物处理。本课题组前期利用文冠果壳制备了糠醛及活性炭, 实现了文冠果废弃物资源的高值化开发利用。本文将就其提取物抑制人体 HepG₂ 细胞的增殖生物活性进行探索性研究, 从而为文冠果资源的综合开发利用提供理论基础与科学依据。

[△] [基金项目] 陕西省重点产业创新链(群)——社会发展领域项目(2018ZDCXL-SF-01-06)

* [通信作者] 张严磊, 讲师, 研究方向: 中药资源绿色产业化开发; E-mail: nwuzyl@163.com

1 仪器和材料

多功能酶标仪(Thermo Fisher Scientific, 美国); 高速离心机(Thermo Fisher Scientific, 美国); 流式细胞仪(Thermo Fisher Scientific, 美国); 电子显微镜(Olympus Japan); CO₂细胞培养箱(Thermo Fisher Scientific, 美国)。

MTT (Sigma USA); 双抗 (Hyclone Utah); DMEM 培养基 (Hyclone Utah); 四季青胎牛血清 (Hyclone Utah); 丝裂霉素 C (Sigma USA); HepG₂ 细胞(中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心); PI(碘化丙啶)(上海碧云天生物技术有限公司); 文冠果壳(陕西杨凌普天农业科技有限公司)。

2 方法

2.1 样品提取与所需溶液的配制

2.1.1 样品的提取 分别称取6份文冠果壳粉末, 每份2.00 kg, 按料液比例(m/V)1:10, 分别加入水和10%、30%、50%、70%、95%乙醇水溶液, 水浴回流提取, 总共提取3次、每次1 h, 过滤, 合并滤液。滤液浓缩浸膏、冷冻干燥、粉碎, 得文冠果壳提取部位(XSHE)A、B、C、D、E、F备用。

2.1.2 样品溶液及对照品的配制 分别精密称取对照品丝裂霉素 C (MMc) 和各文冠果壳提取部位粉末5.00 mg, 分别用空白培养基溶解(超声助溶), 并定容至5.00 mL, 分别得到质量浓度为1.00 mg·mL⁻¹的对照品溶液和质量浓度为1.00 mg·mL⁻¹样品溶液母液, -80℃保存, 备用。

2.1.3 完全细胞培养基的配制 往500.00 mL DMEM培养基中, 按比例10:1加入50.00 mL已灭活的胎牛血清, 之后, 加入5.00 mL的双抗(100 U·L⁻¹青霉素和100.00 μg·mL⁻¹链霉素), 摇匀, 即得。

2.2 细胞培养

将HepG₂细胞置于25.00 mL细胞培养瓶中, 用移液枪吸入5.00 mL的完全培养基, 吹匀, 放置于恒温37℃、5% CO₂的培养箱培育, 待HepG₂细胞生长达到95%融合度时, 加入0.25%的胰蛋白酶2.00 mL消化, 传代, 3 d传代1次。

2.3 细胞冻存

待HepG₂细胞生长达到95%汇合度时, 用2.00 mL 0.25%的胰蛋白酶消化, 加入2.00 mL的冻存液[空白培养基-二甲亚砜-胎牛血清(5:4:1)], 吹打, 使HepG₂细胞脱离瓶壁, 之后将HepG₂细胞转入冻存管中, 分别在4℃、-20℃恒温30 min、

-80℃恒温72 h后, 液氮保存。

2.4 不同溶剂XSHE抑制HepG₂细胞增殖活性部位筛选

2.4.1 实验分组 空白组: 100.00 μL完全DMEM培养基; 样品组: 质量浓度分别为25.00、50.00、100.00 μg·mL⁻¹文冠果壳不同溶剂提取物; 每组设6个复孔。

2.4.2 HepG₂细胞增殖活性检测 待HepG₂细胞生长达到95%汇合时, 用2.00 mL 0.25%的胰蛋白酶消化后, 加入2.00 mL的完全培养基, 吹打, 使HepG₂细胞脱落瓶壁。之后用移液枪将细胞吹匀, 计数后, 按细胞接种浓度为 2×10^5 个·mL⁻¹用培养基调整, 接种至96孔板上, 接种体积为100.00 μL/孔。放置于5% CO₂的培养箱中, 37℃恒温培养, 24 h后将100.00 μL“2.4.1”中各组药物加至96孔板中, 培养24 h后将MTT溶液15.00 μL加至各培养孔, 放入培养箱孵育4 h后去除培养基, 加入150.00 μL DMSO, 放回培养箱, 孵育15 min后在波长450 nm下测吸光度(A)值, 按公式(1)计算细胞抑制率。

$$\text{细胞抑制率}(\%) = [1 - (A_{\text{空白}} - A_{\text{样}}) / A_{\text{空白}}] \times 100\% \quad (1)$$

2.5 95% XSHE对HepG₂细胞增殖及细胞形态的影响

2.5.1 实验分组 空白组: 100.00 μL完全DMEM培养基; 阳性对照(MMc)组: 质量浓度为75.00 μg·mL⁻¹; 样品组: 质量浓度分别为12.50、25.00、50.00、75.00 μg·mL⁻¹的95% XSHE; 每组设6个复孔。

2.5.2 95% XSHE干预后HepG₂细胞增殖活性检测 待HepG₂细胞生长达到95%融合时, 用2.00 mL 0.25%的胰蛋白酶消化后, 加入2.00 mL的完全培养基, 用移液枪吹打, 使细胞脱落瓶壁。轻轻将细胞吹匀, 在计数板计数后, 按细胞接种浓度为 2×10^5 个·mL⁻¹用培养基调整, 接种至96孔板上, 接种体积为100.00 μL/孔。放置于5% CO₂培养箱中, 37℃恒温培养24 h后, 将100.00 μL 2.5.1中各组药物加至96板中, 将细胞放回培养箱, 培养24 h, 之后将15.00 μL MTT溶液加至培养孔放入培养箱孵育4 h后去除培养基, 加入150.00 μL DMSO, 放回培养箱, 孵育15 min后在波长450 nm下测A值, 按公式(1)计算细胞抑制率。此外, 在电镜下, 观察HepG₂细胞在不同浓度的95% XSHE干预后的形态变化, 拍照, 分析。

2.6 统计学分析

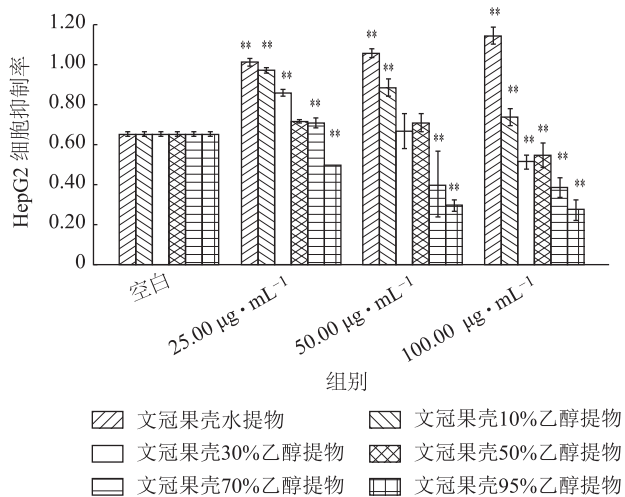
数据使用SPSS 19.0软件处理(SPSS Inc., Chi-

cago), 计量资料用($\bar{x} \pm s$)形式表示。实验组间, 采用 t 检验, $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 表示有统计学差异。

3 结果

3.1 不同溶剂 XSHE 抑制 HepG₂ 细胞增殖活性的筛选结果

利用经典的 MTT 法分析文冠果壳各溶剂提取物对 HepG₂ 活力的影响, 结果如图 1 所示。在 $25.00 \sim 100.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 文冠果壳各提取物中除文冠果壳水提物、文冠果壳 10% 乙醇水溶液 (10% XSHE) 表现出促进 HepG₂ 增殖作用外。其余溶剂提取物对 HepG₂ 细胞表现出不同程度的毒性作用, 且与空白组相比有显著性差异 ($P < 0.01$)。其中, 95% XSHE 对 HepG₂ 细胞活力的抑制效果尤为明显, 且表现出良好的量效关系。当 95% XSHE 给药质量浓度为 $100.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 其对 HepG₂ 细胞毒性作用达到 $(72.68 \pm 0.21) \%$ 。



注: 与空白组对比, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$; 下同。

图1 不同溶剂 XSHE 对 HepG₂ 细胞抑制作用

3.2 95% XSHE 对 HepG₂ 细胞增殖的影响

基于 3.1 初步筛选结果, 本课题组进一步研究 95% XSHE 与 HepG₂ 细胞增殖之间的量效关系, 结果如图 2 所示。不同浓度 95% XSHE 对 HepG₂ 细胞活力均展现了较好的抑制作用, 相较于空白组, 有统计学差异 ($P < 0.01$), 且给药浓度与 HepG₂ 细胞存活率之间表现出良好的负相关性, 当 95% XSHE 给药浓度为 $75.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 其对 HepG₂ 细胞增殖的抑制率高达 $(80.44 \pm 2.33) \%$, 高于等浓度的阳性对照 MMc 组 ($P < 0.05$)。

3.3 95% XSHE 对 HepG₂ 细胞形态的影响

通过比较各组细胞形态, 可以看出 HepG₂ 细胞

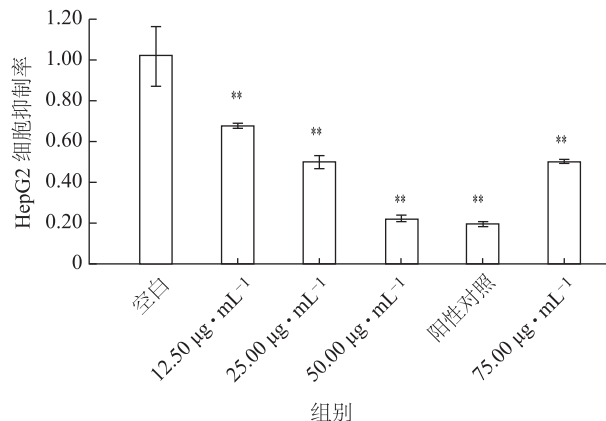


图2 95% XSHE 对 HepG₂ 细胞增殖的影响

在不同浓度 95% XSHE 干预后其形态有较为明显变化, 结果如图 3 所示。正常情况下, HepG₂ 细胞贴壁紧凑, 细胞间隙小, 形态不一, 假足向周围铺展, 边缘难分; 与空白组相比, HepG₂ 细胞在不同质量浓度 95% XSHE 干预后, 细胞皱缩, 并且随着给药质量浓度的上升, 细胞皱缩越发明显, 细胞间隙变得更大, 尤其是在质量浓度为 $75.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 95% XSHE 干预下, 细胞皱缩成圆形尤为明显, 细胞假足几乎不向周围铺展, 边缘易见, 细胞间隙最大, 并且有从培养板脱落的趋势。而在阳性药 MMc 干预下, 细胞同样可见上述现象, 且漂浮于培养板。

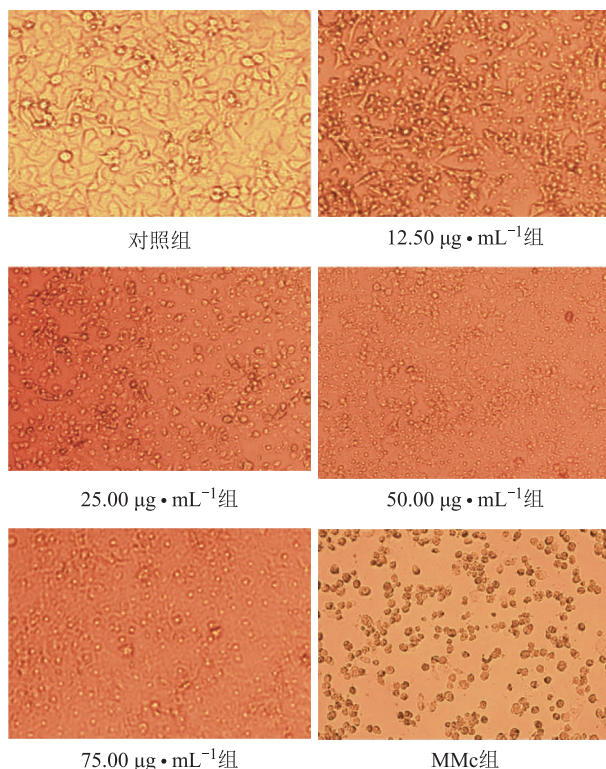


图3 95% XSHE 对 HepG₂ 细胞形态的影响

4 小结与讨论

本研究结果显示,在25.00~100.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,文冠果壳各提取物中除水提物、10%乙醇水溶液的XSHE对HepG₂细胞活力没有明显抑制作用外,文冠果壳其余溶剂提取物均对HepG₂细胞活力有抑制作用,相较于空白组而言,皆有统计学差异($P < 0.01$)。其中,95% XSHE抑制HepG₂细胞活力效果最强,当95% XSHE的给药质量浓度为75.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,其抑制作用能达到(80.44 ± 2.67)%,高于等质量浓度的阳性对照MMc。此外,研究还发现,质量浓度为100.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的95% XSHE对HepG₂细胞的抑制作用不如75.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的95% XSHE强;分析认为,可能是由于100.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的XSHE对HepG₂细胞呈现了一定的促增殖作用,也可能是药物质量浓度过大,在酶标仪下有较大的吸收,从而干扰了测量结果。HepG₂细胞在95% XSHE干预下形态发生变化,具体表现为细胞皱缩,细胞间隙变大,从培养板脱落等作用。

综上所述,冠果壳提取物在体外具有良好的抑制HepG₂增殖的生物活性,为我们进一步探索文冠果壳提取物抗肿瘤作用机制奠定了基础。

参考文献

- [1] 周荣汉. 中药资源学[M]. 北京:中国医药科技出版社,1993:331-339.
- [2] 马养民,王佩,文冠果叶化学成分的研究[J]. 中成药,2010,32(10):1750-1753.
- [3] 赵丹丹,李丹毅,华会明,等. 文冠果花中一个新的单萜类化合物[J]. 中草药,2013,44(1):11-15.
- [4] 李占林,李丹毅,李锐,等. 文冠果果壳中一个新生物碱[J]. 药学报,2006,41(12):1197-1200.
- [5] 李巍,李锐. 文冠果果柄的化学成分研究[J]. 中草药,2008,39(3):334-337.
- [6] 王颖,潘英,邢亚超,等. 文冠果种皮化学成分的分离与鉴定[J]. 中国药物化学杂志,2013,23(5):397-399.
- [7] 纪雪飞,刘新霞,吴喆,等. 文冠果壳提取物对 β -淀粉样蛋白致动物学习记忆障碍的改善作用[J]. 沈阳药科大学学报,2007,24(4):232-237,253.
- [8] 商辉,孙妍. 文冠果的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国药房,2015,26(30):4316-4320.
- [9] 暴雪,高英,玉荣,等. 柱前衍生化-HPLC法测定文冠果种仁油中脂肪酸含量[J]. 北方药学,2012,9(1):3-4.
- [10] 申登峰. 甘肃省文冠果产业发展分析[J]. 草业科学,2010,27(5):157-160.
- [11] 张严磊,施欢贤,雷莉妍,等. 文冠果叶抑制人肝癌细胞HepG₂增殖和抗氧化活性部位的筛选[J]. 中国现代中药,2016,18(11):1451-1453,1469.
- [12] 张严磊,施欢贤,雷莉妍,等. 文冠果叶多糖超声辅助提取工艺及其药效学初步研究[J]. 中国现代中药,2016,18(12):1636-1640.

(收稿日期 2017-11-15)

(上接第1082页)

本文比较过超声提取和热回流提取对DC含量测定的影响,结果显示无统计学差异,因超声提取操作方便,故最终选择超声提取。考察过甲醇、70%甲醇、50%甲醇、30%甲醇作为提取溶剂,超声时间分别为30、45、60 min时的提取效率,实验结果表明最佳提取工艺为70%甲醇超声45 min。本文建立的含量测定方法简便、准确、重复性好,含量测定结果表明川芎中均含有较高含量的DC,可为川芎药材质量标准的制定及资源的开发利用提供参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:40-41.
- [2] 金玉青,洪远林,李建蕊,等. 川芎的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中药与临床,2013,4(3):44-48.
- [3] 郝淑娟,张振学,田洋,等. 川芎化学成分研究[J]. 中国

现代中药,2010,12(3):22-25.

- [4] 常新亮,马云保,张雪梅,等. 川芎化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2007,32(15):1533-1536.
- [5] 杜旌畅,谢晓芳,熊亮,等. 川芎挥发油的化学成分与药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志,2016,41(23):4328-4333.
- [6] 李喆,刘娜,王磊,等. 不同浓度川芎水提取物对化学缺氧细胞的作用比较[J]. 蚌埠医学院学报,2017,41(2):151-153.
- [7] 张晶晶,杨占峰. 川芎水提物体外抗氧化活性的研究[J]. 唐山师范学院学报,2016,38(2):38-40.
- [8] Wang H B, Ji G, MARK. J, et al. Novel antioxidant compounds from Tart Cherries[J]. J Nat Prod, 1999, 62(1): 86-88.
- [9] Cardoso C L, Bolzani V D S, Silva D H S, et al. The absolute configuration of 1-(3', 4'-dihydroxycinnamoyl) cyclopentane-2, 3-diol from the Amazonian tree *Chimarrhis turbinata*[J]. J Nat Prod, 2006, 69(7):1046-1050.

(收稿日期 2018-04-19)