

细叶卷柏提取物的体外抗肿瘤活性

李娟^{1,2}, 陈科力^{2*}, 徐嘉成²

(1. 广西壮族自治区广西植物研究所, 广西桂林 541006; 2. 湖北中医学院药学院, 湖北省和教育部共建中药资源和中药复方重点实验室, 武汉 430065)

摘要: 利用 MTT 法检测细叶卷柏乙酸乙酯和正丁醇提取物对 HeLa 细胞生长的抑制作用, 利用流式细胞术 (FCM) 比较不同提取物对细胞凋亡的影响。结果显示: 细叶卷柏的乙酸乙酯和正丁醇部位抑制细胞生长和诱导细胞凋亡作用均有明显的剂量依赖性。乙酸乙酯部位的 IC₅₀ 值为 1.927 μg/mL, 正丁醇部位的 IC₅₀ 值为 24.600 μg/mL。因此, 细叶卷柏乙酸乙酯部位的体外抗肿瘤活性相对较强, 其次是其正丁醇部位, 水提部位相对较弱。细叶卷柏是一种潜在的抗肿瘤药用植物。

关键词: 细叶卷柏; 抗肿瘤; MTT; FCM

中图分类号: Q946 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2008)05-0690-04

Anti-tumor activities *in vitro* of extracts from *Selaginella labordei*

LI Juan^{1,2}, CHEN Ke-Li^{2*}, XU Jia-Cheng²

(1. Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China; 2. Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of TCM Resource and TCM Compound Co-constructed by Hubei Province and Ministry of Education, Wuhan 430065, China)

Abstract: MTT assays were used to evaluate effects of ethyl acetate and n-butanol extracts from *Selaginella labordei* on inhibiting cell proliferation. Flow cytometry (FCM) was used to detect cell apoptosis rate. The results showed that ethyl acetate and n-butanol extracts had a distinctive dose-dependent relation in inhibiting cell proliferation and inducing cell apoptosis. The IC₅₀ values of ethyl acetate and n-butanol extracts were 1.927 μg/mL and 24.600 μg/mL respectively. So ethyl acetate extracts possessed stronger anti-tumor activity, and n-butanol extracts the next, water extracts were relatively weak. *S. labordei* is a potential medical plant with anti-tumor activities.

Key words: *S. labordei*; anti-tumor activities; MTT; FCM

卷柏属 (*Selaginella*) 植物属于蕨类植物石松纲卷柏科, 分布广泛, 资源丰富, 是地球上古代和现代植物界中的一个重要组成部分, 我国约有 60 余种, 其中 20 多种可以作为药用, 多具有清热解毒, 活血止血等功效, 其中一些在我国广泛地应用于治疗病毒性肝炎、癌症等多种疾病 (徐宏峰等, 2004; 余艳等, 2007)。在该属植物中已发现了一些具有抗肿

瘤、抗病毒作用的活性成分 (Sun 等, 1997; Lin 等, 2000; Silva 等, 1995; Ma 等, 2001; Ma 等, 2003)。

细叶卷柏 (*S. labordei*) 在我国民间被认为具有清热利湿、消炎、止血等功效, 用以治疗小儿疳积、口腔炎、外伤出血、湿热黄疸以及慢性肝炎等疾病。据报道, 细叶卷柏有较强的抗氧化、抑制黄嘌呤氧化酶和脂氧化酶的活性 (Chen 等, 2005; 黎莉等, 2006,

收稿日期: 2007-12-24 修回日期: 2008-03-10

基金项目: 国家自然科学基金 (30470193) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470193)]

作者简介: 李娟 (1982-), 女, 湖南湘乡人, 硕士, 研究方向为植物化学, E-mail: lj198207@sina.com.

* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: kelichen@126.com)

2007),以及较强的抗病毒活性(张巧玲等,2005),并能显著下调结肠癌细胞中表达环氧化酶 II (COX-2)的基因 mRNA(Chen 等,2005),表明它可能有潜在的抗肿瘤作用。本文对其乙酸乙酯,正丁醇和水提取物的抗肿瘤活性进行了研究,为进一步发掘细叶卷柏的药用价值和活性成分的分离提供借鉴。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

细叶卷柏(*S. labordei*)全草,原植物于 2004 年 7 月采自江西庐山,由中南民族大学万定荣教授鉴定。样品标本存放于湖北中医学院中药标本中心。

1.2 试剂

DMSO(二甲基亚砷)、胰蛋白酶、氯霉素、青霉素、EDTA(Amresco 公司);RPMI 1640(GIBCO 公司);MTT、PI(Sigma 公司);新生牛血清(三利生物制品厂);甲醇、乙酸乙酯、正丁醇等其它试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器

SHELLRB CO₂ 恒温细胞培养箱(Sheldon);CK2-TRC-3 倒置显微镜(Olympus);SHZ-82A 恒温振荡器(国华企业);SUNRISE 酶标仪(tecan 公司);FACSCalibur 流式细胞仪(BD 公司);90-2 型定时恒温磁力搅拌器(上海沪西分析仪器厂);PHS-3C pH 计(上海雷磁仪器厂)等。

1.4 细胞株

宫颈癌细胞 HeLa 由武汉大学中国典型培养物保藏中心(CCTCC)提供。

1.5 样品制备

细叶卷柏干燥全草用 10 倍量 95%乙醇渗漉,合并渗漉液,减压浓缩至小体积,水分散后依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇提取,分别得到石油醚部位(Ⅱ)、乙酸乙酯部位(Ⅲ)。正丁醇部位(Ⅳ)和剩余的水部位(Ⅰ),所得各部位分别减压浓缩,得各部位的干膏。精密称取水(Ⅰ)、石油醚(Ⅱ)、乙酸乙酯(Ⅲ)、正丁醇部位(Ⅳ)等各部位的干膏 10 mg,用 DMSO 溶解(DMSO 的终浓度<1%),备用。临用时用细胞培养液稀释至所需浓度。阴性对照组加入同浓度的 DMSO 溶液。

1.6 细叶卷柏提取物对体外培养肿瘤细胞形态的影响

HeLa 细胞培养于含 10%新生牛血清的 RPMI1640 培养液中,5% CO₂,37 °C 培养箱内常规传

代培养,取对数生长期细胞用于实验。细胞传代培养 24 h 后,加入不同提取物,培养 24 h 后,在 Olympus 倒置显微镜下观察细胞形态变化。

1.7 细叶卷柏提取物对体外培养肿瘤细胞生长的抑制作用

取对数期细胞制成细胞悬液,稀释至浓度为 $2.5 \times 10^3 \sim 50 \times 10^3$ /mL,接种于 96 孔培养板内,每孔 200 μ L,24 h 后倾出培养液,加入含不同浓度提取液的培养液,终浓度分别为 1,10,40,80 μ g/mL,每一浓度组均设 4 孔。对照孔加含等量 DMSO 的培养液,空白调零组加 200 μ L 培养液(不含细胞)。在加药后 24 h 加入 MTT 溶液 20 μ L,继续培养 4 h,小心倒去培养液,加入 200 μ L DMSO,在酶标仪上测定各孔 A 值,测定波长为 492 nm。按下列公式计算抑制率(IR); $IR(\%) = (1 - \text{给药孔平均 A 值} / \text{对照孔平均 A 值}) \times 100\%$,半数细胞抑制浓度 IC₅₀ 为抑制一半细胞生长所需的药物浓度。具体步骤见参考文献(Sargent,2003;Mosmann,1983)。

1.8 细叶卷柏提取物对细胞凋亡的影响

细胞生长 24 h 以后,分别加入不同提取物继续培养 12 h(终浓度 50 μ g/mL)。0.25%胰酶消化细胞,经 PBS 清洗后,离心去上清,用 70%的冰乙醇固定。检测前离心,用 PBS 清洗后,弃上清液。后加入 1 mL 染色液(含 PI 0.1 mg/mL,RNase 0.1 mg/mL),室温避光 20 min,过 300 目尼龙网后上机,用 CELLQuest 软件分析,测定凋亡细胞的比例。

1.9 统计学分析

采用 SPSS10.5 软件系统,不同处理组间抑制率的比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果与分析

2.1 细叶卷柏提取物对体外培养肿瘤细胞形态的影响

加入乙酸乙酯和正丁醇提取物的 HeLa 细胞均有不同程度的受损现象,细胞密度明显降低,细胞的体积变小,变形,某些细胞出现皱缩、变圆、甚至脱落现象。而加入水和石油醚提取物的细胞与阴性对照相比区别不大。

2.2 细叶卷柏提取物对体外培养肿瘤细胞生长的抑制作用

从实验结果可以看到:细叶卷柏水和石油醚提取物对 HeLa 细胞生长的抑制作用没有明显的剂量依赖关系,而乙酸乙酯和正丁醇提取物可以看到明

表 1 细叶卷柏乙酸乙酯和正丁醇提取物对 HeLa 细胞的抑制作用

Table 1 Antiproliferative effects of EtOAc and n-butanol extracts on HeLa cell line

样品 Sample	浓度 Concentration (μg/mL)	OD 值 OD value (x̄±s)	抑制率 Inhibition ratio(%)	IC ₅₀ (μg/mL)
阴性对照 Control	—	0.608±0.134	0	0
乙酸乙酯提取物 EtOAc extracts	1	0.346±0.057**	43.14	1.927
	10	0.208±0.043**	65.77	
	40	0.088±0.032**	85.48	
	80	0.081±0.065**	86.70	
正丁醇提取物 n-butanol extracts	1	0.519±0.072*	14.71	24.600
	10	0.360±0.076**	40.74	
	40	0.280±0.045**	53.89	
	80	0.206±0.077**	66.05	

与对照组比较 Compared with control * P<0.05, ** P<0.01, n=4.

显的剂量依赖关系,其 IC₅₀ 值见表 1。乙酸乙酯提取物和正丁醇提取物抑制细胞生长作用较强。

2.3 细叶卷柏提取物对体外培养肿瘤细胞凋亡的影响

由表 2 可知,细叶卷柏乙酸乙酯和正丁醇提取物对细胞凋亡的影响呈剂量依赖性,在高浓度下细胞凋亡率高。而水提取物即便在 100 μg/mL

表 2 细叶卷柏不同提取物对细胞凋亡的影响 (n=4)
Table 2 Effects of extracts on inducing HeLa cell apoptosis (%)

提取物 Extracts	浓度 Concentration (μg/mL)			
	0	25	50	100
乙酸乙酯提取物 EtOAc	1.12	3.80	17.64	43.14
正丁醇提取物 n-butanol	1.12	2.71	10.01	20.00
水提取物 Water	1.12	—	—	3.27

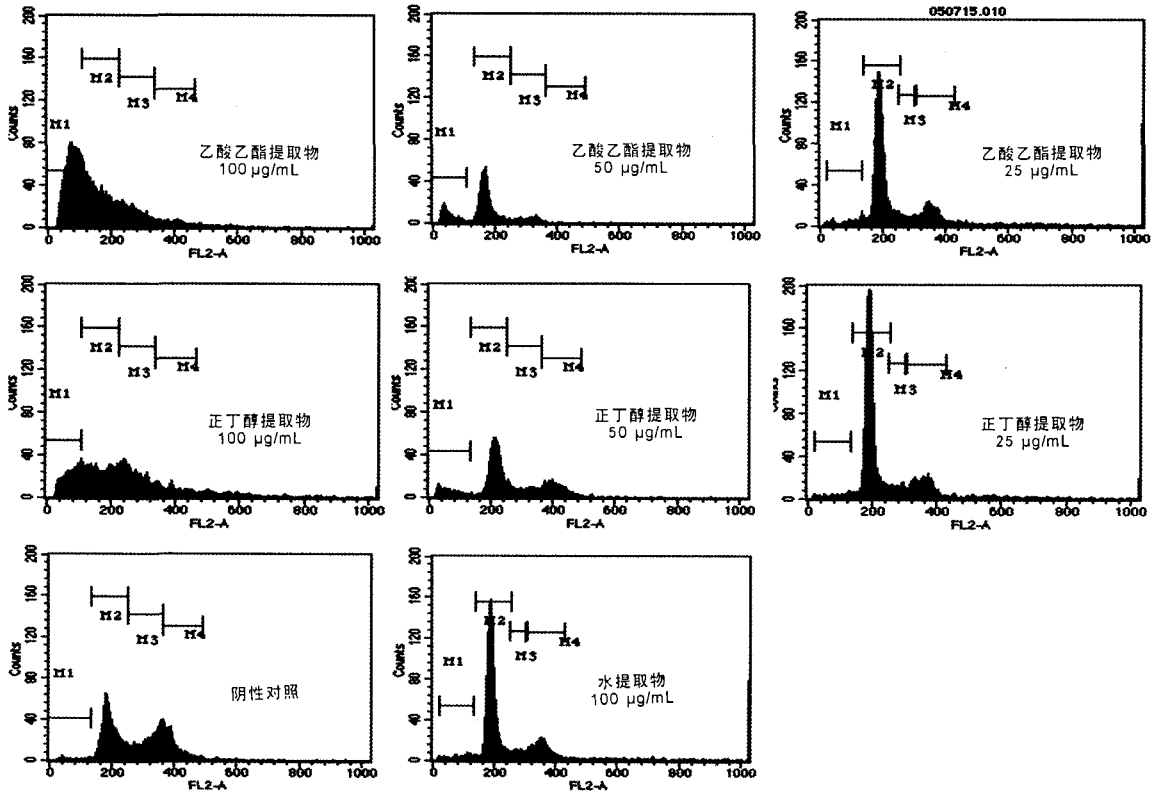


图 1 细叶卷柏不同提取物对细胞凋亡的影响

Fig. 1 Effects of extracts on inducing HeLa cell apoptosis

Counts: 细胞数目; FL2-A: 荧光通道 2-面积; M1: 凋亡峰; M2: G0/G1 期; M3: S 期; M4: G2 期。

下诱导细胞凋亡作用与阴性对照也没有显著性差异。同时从 FCM 图中可以看到在 100 μg/mL 下,加入乙酸乙酯提取物的细胞其周期分布较阴性对照区别较大,大部分细胞处于凋亡期,看不到明显的 G1/G0 和 G2 期。因此乙酸乙酯提取物对细胞凋亡的影响大于正丁醇提取物,远大于水提取物。

3 讨论

该实验发现细叶卷柏乙酸乙酯部位体外抗肿瘤活性相对较强,其次是正丁醇部位,水提部位相对较弱。而石油醚部位通常为去除鞣质等干扰性成分。

用体外筛选的方法选择有活性的抗肿瘤药物, 是世界上广泛应用的筛选方法。经体外筛选, 如果中药提取物的 $IC_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$, 且呈现剂量依赖性, 该药即被认为有杀伤作用(司徒镇强等, 1996)。细叶卷柏的乙酸乙酯提取物 IC_{50} 值为 $1.92 \mu\text{g/mL}$, 细胞毒作用呈剂量依赖性。因此, 细叶卷柏乙酸乙酯提取物抑制 HeLa 细胞的作用非常显著, 具有继续开发研究的价值。

据报道, 卷柏属药用植物具有抗肿瘤、调节机体免疫功能等多种功效, 该研究证实细叶卷柏中的乙酸乙酯提取物具有显著的体外抗肿瘤活性。

参考文献:

- 司徒镇强, 吴军正. 1996. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司: 1
- 徐宏峰, 陈科力, 万定荣. 2004. 卷柏属药用植物化学和药理研究进展[J]. 中华实用医药杂志, 4(12): 1 078—1 082
- Chen KL, Geoff W, Plumb, et al. 2005. Antioxidant activities of extracts from five anti-viral medicinal plants[J]. *J Ethnopharmacol*, 96: 201—205
- Li L(黎莉), Chen KL(陈科力), Zhu TM(朱田密). 2006. Inhibition of lipoxygenase by the extracts from the medicinal plants of *Selaginella*(卷柏属 7 种药用植物提取物对脂氧化酶的抑制活性)[J]. *Chin Hosp Pharm J*(中国医院药学杂志), 26(12): 1 514—1 517
- Li L(黎莉), Chen KL(陈科力), Zhu TM(朱田密), et al. 2007. Investigation on Xantine Oxidase inhibitory activities *in vitro* of extracts from the medicinal plants of *Selaginella*(卷柏属 7 种药用植物的提取物抑制黄嘌呤氧化酶的活性研究)[J]. *J Chin Med Mat*(中药材), 30(4): 445—447
- Lin LC, Kuo YC, Chou CJ. 2000. Cytotoxic biflavonoids from *Selaginella delicatula*[J]. *J Nat Prod*, 63(5): 627—630
- Ma LY, Ma SC, Wei F, et al. 2003. Uncinoside A and B, two new antiviral chromone glycosides from *Selaginella uncinata*[J]. *Chem Pharm Bull(Tokyo)*, 51(11): 1 264—1 267
- Ma SC, But PP, Ooi VE, et al. 2001. Antiviral amentoflavone from *Selaginella sinensis*[J]. *Biol Pharm Bull*, 24(3): 311—312
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. *J Immunol Methods*, 65: 55—63
- Sargent JM. 2003. The use of the MTT assay to study drug resistance in fresh tumour samples[J]. *Recent Results Cancer Res*, 161: 13—25
- Silva GL, Chai H, Gupta MP, et al. 1995. Cytotoxic biflavonoids from *Selaginella willdenowii*[J]. *Phytochemistry*, 40(1): 129—134
- Sun CM, Syu WJ, Huang YT, et al. 1997. Selective cytotoxicity of ginkgetin from *Selaginella moellendorffii*[J]. *J Nat Prod*, 60(4): 382—384
- Yu Y(余艳), Cui GH(崔国华), Li ZC(李忠超), et al. 2001. Preliminary studies of RAPD markers for ten *Selaginella* species from Guangdong Province(广东省十种卷柏属植物 RAPD 初步分析)[J]. *Guihaia*(广西植物), 27(1): 48—52
- Zhang QL(张巧玲), Yang ZQ(杨占秋), Chen KL(陈科力), et al. 2005. Investigation on anti-Coxsackievirus B3 effect of several medicinal plant extracts *in vitro*(4 种药用植物提取物体外抗柯萨奇病毒 B3 作用的研究)[J]. *Med J Wuhan Univ*(武汉大学学报(医学版)), 26(2): 157—160
- tematic significance(中国滇芎属果实解剖特征及分类学意义)[J]. *J Plant Res Environ*(植物资源与环境学报), 14(4): 1—6
- Pu GZ(蒲高忠), Liu QX(刘启新). 2006. The micromorphological features of pericarp surface of *Physospermopsis* and *Trachydium*(Apiaceae) in China and its taxonomic significance(中国伞形科滇芎属及其近缘属果实表面微形态特征的分类学意义)[J]. *J Plant Res Environ*(植物资源与环境学报), 15(3): 1—6
- Shan RH. 1937. Studies of Umbelliferae of China II(Apioideae; Scandiceae, Coriandreae, Symrnceae)[J]. *Sinensia*, 8(1): 79—92
- Shan RH(单人骅), She ML(余孟兰), Wang TS(王铁僧), et al. 1986. New taxa of the Chinese Umbelliferae(2)[中国伞形科新分类群(二)] [J]. *Acta Phytotax Sin*(植物分类学报), 24(4): 304—316
- özcan T. 2002. SEM observations on petals and fruits of some Turkish endemic *Bupleurum*(Umbelliferae) species[J]. *Bot J Linnean Society*, 138: 441—449
- özcan T. 2004. Analysis of the fruit surfaces in *Bupleurum*(Umbelliferae) with SEM[J]. *Plant Sys Evol*, 247(1—2): 61—74
- Wang PL(王萍莉), Pu FT(溥发鼎). 1994. Pollen morphology of *Tongoloo*, a endemic genus in China and its taxonomic significance(中国特有属—东俄芹属的花粉形态及其分类学意义)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), 16(4): 357—361
- Wolff H. 1925. Umbelliferae[J]. *Notizbl Bot Gart Berlin*, 9: 279
- Wolff H. 1929. Umbelliferae Asiaticae novae relictiae[M]//Fedde F. Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis. Berlin-Dahle; Fabeckstrasse Press, 27: 179—192
- Wu ZY, Raven PH, Hong DY. 2005. Flora of China[M]. Science Press(Beijing) and Missiouri Botanical Garden Press(St. Louis), 14: 1—205

(上接第 579 页 Continue from page 579)