

槲寄生抗肿瘤有效成份提取及其对乳腺癌细胞的抑制作用

夏超¹, 郑马庆², 刘媛², 陈群英¹, 陈妍³, 黄新恩³, 许潇月³, 沈波^{3*}

(¹南京工业大学江苏省药物研究所有限公司, 江苏 南京 210009; ²南京工业大学药学院, 江苏 南京 211816; ³南京医科大学附属肿瘤医院内科, 江苏 南京 210009)

[摘要] 目的:从槲寄生中分离、提取抗肿瘤有效组份,并观察该组份对乳腺癌细胞生长的影响。方法:采用经典提取分离方法,利用槲寄生生物碱不同酸碱度在不同溶剂中溶解度不同,分离提取槲寄生不同组份;将槲寄生不同组份溶解并制成系列浓度的溶液后,加入到乳腺癌细胞中,观察该系列组份对乳腺癌细胞生长的影响。结果:采用经典提取分离法得到 5 个组份,利用生物碱不同酸碱度在不同溶剂中溶解性不同分离并纯化后,得到 5 个组份。这 10 个组份体外对乳腺癌细胞生长均有不同的抑制作用,且组份 5 能显著抑制乳腺癌细胞生长,对乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 以及 MDA-MB-435 的 IC₅₀ 分别为 3.24、4.80 μg/mL。结论:槲寄生系列提取组份在体外对乳腺癌细胞的增殖具有不同的抑制作用,且组份 5 作用最强。

[关键词] 槲寄生;乳腺细胞系;IC₅₀

[中图分类号] R737.9

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)11-1313-03

doi: 10.7655/NYDXBNS20161106

Effective anti-tumor component separation of *Viscum coloratum* (kom) Nakai and its anti-tumor activity in breast cancer cells

Xia Chao¹, Zheng Maqing², Liu Yuan², Chen Qunying¹, Chen Yan³, Huang Xin'en³, Xu Xiaoyue³, Shen Bo^{3*}

(¹Jiangsu Provincial Institute of Materia Medica, Nanjing Tech University, Nanjing 210009; ²School of Pharmaceutical Sciences, Nanjing Tech University, Nanjing 211816; ³Department of Internal Medicine, Jiangsu Cancer Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** To separate and extract effective components from *Viscum coloratum* (Kom.) Nakai and investigate their effects on the proliferation of breast cancer cells. **Methods:** The classical separation and extraction methods were used firstly, and then according to different solubilities of alkaloids from *Viscum coloratum* (Kom.) Nakai in various solvents with different pHs, different components were extracted and obtained. The components were dissolved and cultured with breast cancer cells *in vitro*. **Results:** About 10 components were obtained and different inhibition effects were observed in co-culture with breast cancer cells. Component 5 inhibited the proliferation of breast cancer cells significantly *in vitro* and the IC₅₀ for breast cancer cell line MDA-MB-435 and MDA-MB-231 was 3.24 mg/mL and 4.80 μg/ml, respectively. **Conclusion:** *In vitro*, series of extracts from *Viscum coloratum* (Kom) Nakai inhibited on breast cancer cells proliferation, and component 5 had significant inhibition effects on the cancer cells.

[Key words] *Viscum coloratum*(Kom) Nakai; breast cancer cell line; IC₅₀

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(11): 1313-1315, 1396]

槲寄生为桑寄生科槲寄生属半寄生性常绿灌木或小灌木。该物种在临床上具有显著抗肿瘤作用,为近年来从植物药中寻找有效抗肿瘤成分的研究

热点之一。在国外,由槲寄生开发上市的品种有多个^[1]。我国槲寄生与欧洲白果槲寄生同源,而且天然资源丰富,分布较广,亟待开发。槲寄生主要活性成分包括糖蛋白、槲寄生毒素、黄酮、生物碱、多糖、脂类等^[1-4]。专家预测,槲寄生有望成为继紫杉醇之后又一种天然抗癌药物。

槲寄生生物碱是槲寄生中有效抗肿瘤成分。研

[基金项目] 江苏省卫生厅中医药管理局基金资助(LZ13232);吴阶平基金资助(320.6750.14193)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: Shenbo987@126.com

究表明槲寄生生物碱因产地、提取方法不同,得到的生物碱种类各异,抗肿瘤作用亦不同。本研究从国产红果槲寄生中提取其生物碱,进行抗肿瘤作用研究。

1 材料和方法

1.1 材料

红果槲寄生药材购自安徽省药材公司,经中国药科大学中药学院刘惠娟副教授鉴定为金桑寄生科槲寄生属植物槲寄生的变型植物红果槲寄生的带叶茎枝。样品存于江苏省药物研究所有限公司。

人乳腺癌细胞系 MDA-MB-435、MDA-MB-231 均购自于中国医学科学院上海细胞所。所有细胞培养于含 10% FBS、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的 DMEM 培养液中,于 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 培养。细胞密度达 80%~90% 时用 0.25% 胰酶消化传代。

DMEM 培养液、胎牛血清、胰蛋白酶(Gibco 公司,美国),MTT、DMSO(Sigma 公司,美国),其余试剂均为国产分析纯试剂;RE-52A 型旋转蒸发器(上海荣亚生化仪器厂),PHS-3C 显示 pH 计(上海精密科学仪器有限公司),WJ-160A-III 二氧化碳细胞培养箱(上海新苗医疗器械制造),DNM-9606 酶标分析仪(北京普朗新技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 槲寄生生物碱的提取

取干燥红果槲寄生嫩茎枝及叶 20 kg 粉碎,以 10 倍量的 75% 乙醇渗漉提取,提取液减压浓缩至无醇味。取一半蒸干得部位(组份 1),依次以石油醚、三氯甲烷、醋酸乙酯、正丁醇萃取,减压浓缩得石油醚(组份 2)、三氯甲烷(组份 3)、醋酸乙酯(组份 4)、正丁醇(组份 5) 4 个部位。余用 2% 的硫酸溶解、过滤,取酸水滤液用氯仿萃取,分液得氯仿层(弱碱性生物碱)和酸水层(中强、强碱性生物碱),将氯仿层用 2% 的氢氧化钠萃取,分液得碱水层和有机溶剂层(组份 6,非酚性弱碱性生物碱),在碱水层中加入氯化铵,再用氯仿萃取,氯仿层得(组份 7,酚性弱碱性生物碱);将上述的酸水层用氨水调 pH 9~10,然后用氯仿萃取,分液得有机溶剂和碱水层,有机溶剂层用 2% 氢氧化钠萃取,得碱水层和有机溶剂层(组份 8,非酚性叔胺性生物碱),在碱水层中加入氯化铵,用氯仿萃取,氯仿层得(组份 9,酚性叔胺生物碱);碱水层用氨水调 pH > 12 用正丁醇萃取,分液,正丁醇层为(组份 10,水溶性生物碱)。将制得的非酚性弱碱性生物碱(组份 6)、酚性弱碱性生物碱

(组份 7)、非酚性叔胺性生物碱(组份 8)、酚性叔胺性生物碱(组份 9)和水溶性生物碱(组份 10)这 5 个生物碱组份干燥。

1.2.2 槲寄生生物碱对肿瘤细胞生长的影响

采用 MTT 法观察槲寄生提取物对乳腺癌细胞生长的影响。试验时,取对数生长期细胞,胰酶消化成单个细胞后,调整细胞密度为 5×10^4 个/mL,按 100 μL /孔加入 96 孔板细胞培养板中,在 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中过夜。次日移去培养液,加入含各组份的无血清培养液继续培养 72 h。本试验设阴性对照(即溶媒对照)。培养结束后每孔加入 5% MTT 10 μL ,37 $^\circ\text{C}$ 培养 4 h 后,取出培养板,弃上清,每孔加 DMSO 100 μL ,摇床振荡 5 min 后,使蓝色结晶全部溶解,于自动酶标仪内 37 $^\circ\text{C}$ 温育 10 min,490 nm 波长测定吸光度。计算各组份对肿瘤细胞增殖的抑制率。细胞增殖抑制率(%)=[(对照组平均吸光度值-试验组平均吸光度值)/对照组平均吸光度值] \times 100%。

1.2.3 槲寄生提取物对肿瘤细胞生长的抑制作用

为进一步观察槲寄生提取物对肿瘤细胞抑制作用的强度。试验时,向已培养好细胞的 96 孔板中,加入系列浓度的槲寄生提取液,经过一定时间培养后,按照本研究 1.2.2 中方法加入 5% MTT 培养液,并测定吸光度值,以药物对数浓度为横坐标,抑制率为纵坐标作图,计算抑制 50% 细胞生长的浓度(IC_{50})。

2 结果

2.1 槲寄生生物碱组份的分离

红果槲寄生经经典提取分离法处理分离后,获得 5 个组份,依次为 75% 乙醇提取物(组份 1)、石油醚萃取物(组份 2)、三氯甲烷萃取物(组份 3)、醋酸乙酯萃取物(组份 4)、正丁醇萃取物(组份 5)。由于槲寄生中所含生物碱酸碱度各不相同,强碱性的生物碱在水相中完全解离,而弱碱性生物碱在水中发生不完全解离,这样在分离过程中,生物碱盐分布在水相,而部分弱碱性的生物碱则进入有机相^[5]。因此,在分离过程中,通过调节生物碱溶液的酸碱度来控制可进入有机相的部分,从而达到分离生物碱组份的目的。本研究中,通过槲寄生生物碱不同酸碱段在不同溶剂中溶解度不同,分离得到另外 5 个组份,依次为非酚性弱碱性生物碱(组份 6)、酚性弱碱性生物碱(组份 7)、非酚性叔胺性生物碱(组份 8)、酚性叔胺性生物碱(组份 9)和水溶性生物碱(组

份 10)。以上各组份经过进一步浓缩,真空干燥后,用于肿瘤细胞试验研究。

2.2 槲寄生生物碱不同组份对肿瘤细胞生长的影响

将红果槲寄生生物碱提取组份用 DMSO 溶解后配置成 4 mg/mL 的母液。试验时,各组份用无血清培养液稀释,终浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$,用于细胞试验研究,观察槲寄生生物碱不同组份提取物对乳腺癌肿瘤细胞生长的影响。光镜下,阴性对照组(含 0.25% DMSO 无血清培养液)乳腺癌细胞生长状态良好,说明 0.25% DMSO 溶剂对乳腺癌细胞生长无影响;槲寄生生物碱不同组份提取物对乳腺癌细胞系 MDA-MB-231、MDA-MB-435 均可产生不同程度的抑制作用(图 1)。其中,采用经典提取分离法得到的组份 5 对两种乳腺癌细胞系抑制作用最为显著,分别为阴性对照的 12.4%、28.4%。

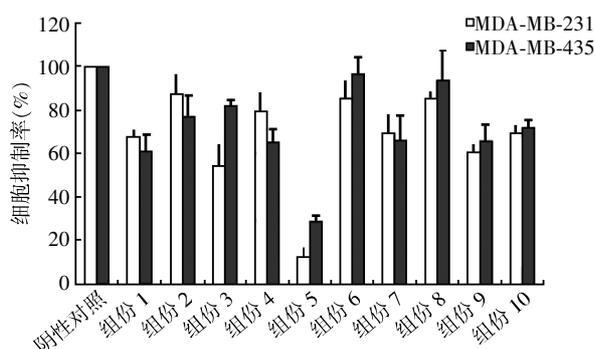


图 1 槲寄生生物碱不同组份对乳腺癌细胞生长的影响

Figure 1 Influence of different components extracted from *Viscum coloratum* (Kom) Nakai on breast cancer cell growth

2.3 槲寄生提取物对乳腺癌细胞的抑制作用

为进一步观察槲寄生生物碱组份 5 对乳腺癌细胞系 MDA-MB-231、MDA-MB-435 的抑制作用,特将本组份制成系列浓度的培养液。研究发现,随着给药浓度的增加,槲寄生生物碱提取组份 5 对肿瘤细胞抑制作用增强,当浓度达 20 $\mu\text{g/mL}$ 时,对肿瘤细胞抑制作用更为明显。MDA-MB-231 和 MDA-MB-435 的 IC_{50} 值分别为 3.24、4.80 $\mu\text{g/mL}$ (图 2)。

3 讨论

槲寄生为桑寄生科半寄生常绿小灌木,常寄生于桑科、茶科、山毛茛科、芸香科、蔷薇科和豆科等 29 科 50 余种植物上。槲寄生中含多种活性成分,现已从槲寄生中分离得到挥发油、黄酮、有机酸等小分子化合物以及多肽、蛋白、多糖等高分子化合物。

槲寄生作为一种天然抗肿瘤药物一直受到世

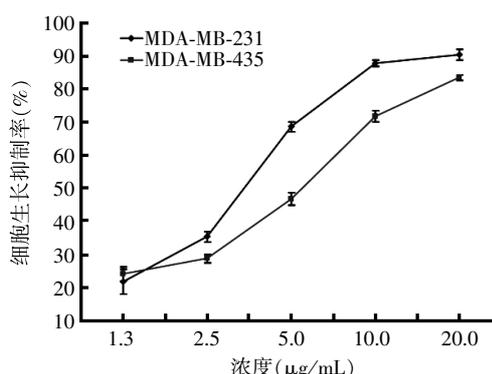


图 2 槲寄生提取组份 5 对乳腺癌细胞生长抑制作用

Figure 2 Curve of the fifth component extracted from *Viscum coloratum* (Kom) Nakai for the growth inhibition of breast cancer cells

人的关注。目前,世界上对欧洲及韩国产槲寄生提取物的抗肿瘤作用研究较多,相关报道显示,英、德、法、荷兰、比利时等国家已对数万名癌症患者使用槲寄生治疗各种肿瘤,且疗效显著。欧洲上市槲寄生制剂有 Iscador[®]、Helixor[®]、Plenosol[®] 等,并已取得非常好的临床效果^[1-3]。槲寄生作为一种天然抗肿瘤药物值得进一步研究和利用,专家预测“槲寄生”有望成为继紫杉醇之后又一种天然的抗癌药。

目前,国内研究开发的槲寄生相关产品很少。我国槲寄生与欧洲白果槲寄生同源,而且天然资源丰富,分布较广,亟待开发。红果槲寄生是桑寄生科槲寄生属植物,药用部位是干燥带叶茎枝,在我国使用很久。为进一步观察槲寄生中各组份对肿瘤细胞的生长抑制作用,本研究将槲寄生组份进行分离,采用经典提取分离法及利用生物碱不同酸碱段在不同溶剂中溶解度的不同,共得到 10 种组份,其中,利用中药有效成分经典提取分离法进行系统分离得到组份 1~5,利用生物碱不同酸碱度在不同溶剂中溶解度不同进行分离纯化得到组份 6~10。为观察这 10 种组份对肿瘤细胞生长的抑制作用,选择常见的恶性肿瘤乳腺癌细胞系进行研究。本研究中,槲寄生 10 种分离组份对乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 及 MDA-MB-435 均有一定的抑制作用,其中采用醋酸乙酯萃取分离的组份 5 对两种肿瘤细胞均具有很好的抑制作用,终浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 时对两种肿瘤细胞的抑制率分别为 87.6% 和 71.6%,其 IC_{50} 值分别为 3.24、4.80 $\mu\text{g/mL}$ 。研究表明:槲寄生提取物可以从多个方面影响肿瘤细胞的活性,如细胞凋亡、细胞周期、蛋白合成、血管生成以及免疫调节等^[6]。本研究采用经典分离法得到的组份虽对

(下转第 1396 页)