

## 漏芦抗肺癌活性部位的筛选

周婷<sup>1,2</sup>, 王程成<sup>1,2</sup>, 封亮<sup>1</sup>, 谭晓斌<sup>1\*</sup>, 贾晓斌<sup>1</sup>

(1. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 江苏南京 210028; 2. 江苏省中医药研究院, 江苏南京 210028)

**摘要:** 目的 筛选漏芦 *Rhaponticum uniflorum* (L.) DC. 体内外抗肺腺癌的活性部位, 并对其化学成分进行解析。方法 漏芦经有机溶剂提取, 其残渣再经水提, 共5个活性部位与人肺腺癌细胞 A549 和 H1299 共孵育, 从中筛选抗肺癌活性最强的部位; 并观察它们对 Lewis 接种 C57BL/6J 荷瘤小鼠抑瘤率、胸腺指数、脾脏指数的影响, 验证其体内抗肺癌作用。采用 UPLC-Q-TOF-MS-MS 对该活性部位进行解析。**结果** 漏芦抑制 A549 细胞增殖作用的提取物依次为正丁醇 (半数抑制浓度 IC<sub>50</sub> 为 205.43 μg/mL) > 乙酸乙酯 (IC<sub>50</sub> 为 244.22 μg/mL) > 二氯甲烷 (IC<sub>50</sub> 为 350.40 μg/mL); 漏芦抑制 H1299 细胞增殖作用的提取物依次为正丁醇 (IC<sub>50</sub> 为 315.87 μg/mL) > 乙酸乙酯 (IC<sub>50</sub> 为 356.13 μg/mL) > 二氯甲烷 (IC<sub>50</sub> 为 416.13 μg/mL)。漏芦提取物抑制 Lewis 荷瘤小鼠肿瘤增长的作用排序为正丁醇高剂量组 (37.43%) > 正丁醇低剂量组 (32.91%) > 乙酸乙酯高剂量组 (25.87%) > 乙酸乙酯低剂量组 (21.15%)。漏芦抗肺癌活性部位的主要成分为三萜类、甾醇类和植物激素类等。**结论** 漏芦体内外抗肺癌作用最强的部位为正丁醇部位, 该部位主要的成分为以齐墩果酸和熊果酸为代表的三萜类, 以 β-谷甾醇和豆甾醇为代表的甾醇类, 以 β-蜕皮甾酮、漏芦素甲为代表的植物激素类。

**关键词:** 漏芦; 活性部位; 抗肺癌; 成分

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)10-2099-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.10.002

## Screening of active fractions from *Rhaponticum uniflorum* (L.) DC. for anti-lung cancer

ZHOU Ting<sup>1,2</sup>, WANG Cheng-cheng<sup>1,2</sup>, FENG Liang<sup>1</sup>, TAN Xiao-bin<sup>1\*</sup>, JIA Xiao-bin<sup>1</sup>

(1. The Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China; 2. Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To screen the active fractions from *Rhaponticum uniflorum* (L.) DC. for anti-lung cancer *in vivo* and to analyze its chemical composition. **METHODS** The five active fractions of organic extract of *R. uniflorum* plus aqueous extract of decoction dregs were incubated with human lung adenocarcinoma cells A549 and H1299 to screen the strongest active fraction. Tumor inhibition rate, thymus index, and spleen index were observed on Lewis transplanted C57BL/6J-bearing mice. UPLC/Q-TOF-MS-MS was used to analyze the chemical composition of active fractions. **RESULTS** The fraction from *R. uniflorum* inhibited the proliferation of A549 and H1299 cells from the strongest to the least strong were n-butanol (IC<sub>50</sub> 205.43 μg/mL) > ethyl acetate (IC<sub>50</sub> 244.22 μg/mL) > dichloromethane (IC<sub>50</sub> 350.40 μg/mL), and n-butanol (IC<sub>50</sub> 315.87 μg/mL) > ethyl acetate (IC<sub>50</sub> 356.13 μg/mL) > dichloromethane (IC<sub>50</sub> 416.13 μg/mL), respectively. The fraction from *R. uniflorum* inhibited the Lewis tumor-bearing mice tumor growth in the order of n-butanol high dose group (37.43%) > n-butanol low dose group (32.91%) > ethyl acetate high dose group (25.87%) > ethyl acetate low dose group (21.15%). The main chemical compositions of active fractions for anti-lung cancer are comprised terpenes, sterols and plant hormones. **CONCLUSION** The strongest active fraction from *R. uniflorum* for anti-lung cancer *in vivo*

收稿日期: 2015-12-14

作者简介: 周婷 (1990—), 女, 硕士, 从事中药活性物质基础研究。Tel: (025) 85608672, E-mail: jsnjxzs@163.com

\* 通信作者: 谭晓斌 (1971—), 男, 副研究员, 从事中药活性物质基础研究。Tel: (025) 85608672, E-mail: njtxb@hotmail.com

is n-butanol fraction, which contains oleanolic acid and ursolic acid as triterpenes, beta-sitosterol and stigmasterol as sterols, and beta-ecdysterone and rhaponticum as plant hormones.

**KEY WORDS:** *Rhaponticum uniflorum* (L.) DC.; active fraction; anti-lung cancer; chemical composition

漏芦来源于菊科植物祁州漏芦 *Rhaponticum uniflorum* (L.) DC. 的干燥根, 具有清热、解毒、消痈、除肿等功效<sup>[1]</sup>。漏芦主要成分为三萜类、植物激素类、甾醇类、酚酸类等<sup>[2]</sup>。文献报道漏芦提取物有诱导肿瘤细胞凋亡、调控肿瘤发生过程的相关酶、逆转多药耐药性、提高机体免疫力、化学预防肿瘤等作用<sup>[3-5]</sup>。漏芦的化学成分和抗肿瘤作用研究已经有了较好的基础, 但是漏芦抗肿瘤的活性部位和活性部位成分的研究并不明确。本研究建立体内抗肺癌模型, 筛选漏芦抗肺癌的活性部位, 对活性部位的成分进行解析, 为漏芦抗肺癌的物质基础研究提供依据。

## 1 实验材料

1.1 药材与试剂 漏芦, 产地河北(批号 2013060701), 购自河北安国万联中药饮片有限公司, 经南京中医药大学吴德康教授鉴定为菊科植物祁州漏芦 *Rhaponticum uniflorum* (L.) DC. 的干燥根; 对照品齐墩果酸(批号 110709-200505, 纯度 99.4%) 购自中国食品药品检定研究院;  $\beta$ -蜕皮甾酮(批号 MUST-12122111, 纯度  $\geq 98\%$ )、黄独乙素(批号 MUST-12050812, 纯度  $\geq 98\%$ )、坡模酸(批号 MUST-13102507, 纯度  $\geq 98\%$ )、熊果酸(批号 MUST-13020602, 纯度  $\geq 98\%$ ) 购自成都曼思特生物科技有限公司; 胎牛血清、RPMI 1640 培养基、PBS 缓冲盐、胰蛋白酶均购于美国 Gibco 公司; 顺铂(DDP, 批号 20121104, 南京制药厂有限公司); 羧甲基纤维素钠(CMC-Na, 批号 20130420, 杭州普修生物科技有限公司); 环磷酰胺(CTX, 批号 12071721, 南京制药厂有限公司); 四甲基偶氮唑蓝(MTT, 批号 EXP2014/12, 南京生兴生物有限公司); 化学试剂均为分析纯。

1.2 仪器 Waters Q-TOF Synapt G2 质谱仪(Waters MS Technologies, 美国); 生物安全柜(Class II Biosafety Cabinet, 美国 Labconco 公司); 酶标仪(Multiskan spectrum, 美国 Thermo 公司); Nikon Eclipse TS100 倒置显微镜(XDS-1B, 日本尼康公司); CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(HERA cell 150, 美国 Thermo 公司)。

1.3 细胞与动物 A549、H1299 和 Lewis 肺癌细胞株购自南京凯基生物科技发展有限公司; C57

BL/6J 小鼠, 雄性, 6~8 周龄, 体质量 20~24 g, 由上海斯莱克动物中心提供, 合格证号 SCXK(沪) 2012-0004。

## 2 实验方法

2.1 漏芦的提取 称取漏芦 2.0 kg, 加 8 倍量 80% 乙醇回流提取 2 次, 每次 2 h, 过滤, 得到醇提液和药渣。将漏芦醇提液合并, 减压浓缩, 留取适量作为醇提部位, 余下的醇提浓缩液依次用二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取。药渣再加入 8 倍量蒸馏水, 提取 2 次, 每次 2 h, 水提液与萃余下的水溶液合并, 得到水提部位<sup>[6]</sup>, 共得漏芦醇提、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇、水提 5 个提取部位。

2.2 漏芦不同溶剂提取物抑制 A549、H1299 细胞增殖的作用 取对数期的细胞, 消化后调整细胞密度为  $1.0 \times 10^4$ /mL。接种于 96 孔板中, 每孔 100  $\mu$ L, 每组设 6 个复孔, 置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育。24 h 后, 吸去培养基, 加入药液使得药物的终质量浓度分别为 63、125、250、500、1 000 生药  $\mu$ g/mL。设定空白孔(空白培养基)、阳性对照孔(顺铂, 给药质量浓度为 10  $\mu$ g/mL), 置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中。24 h 后, 加入 MTT 10  $\mu$ L, 继续孵育 4 h 后, 每孔加 100  $\mu$ L DMSO 溶液, 振荡 10 min 后, 置酶标仪 570 nm 下测定吸光度值(A), 实验平行操作 3 次<sup>[7-8]</sup>。计算肿瘤细胞生长抑制率, 采用 SPSS 17.0 计算半数抑制浓度 IC<sub>50</sub>。计算公式如下:

$$\text{抑制率} = \frac{A_{\text{空白}} - A_{\text{给药}}}{A_{\text{空白}}} \times 100\%$$

2.3 漏芦不同溶剂提取物抑制 Lewis 荷瘤小鼠肿瘤增长的作用 取对数期的 Lewis 细胞, 胰酶消化后, 离心(2 000 r/min, 2 min), 收集底部细胞配制成细胞悬液, 调整细胞密度为  $1.0 \times 10^7$ /mL。先用酒精棉球将小鼠右前肢腋下擦湿消毒, 用注射器吸取 600  $\mu$ L 的细胞悬液接种 3 只小鼠后, 再吸取 600  $\mu$ L 接种下面 3 只。次日称重。随机分为模型组, 阳性组, 乙酸乙酯高、低剂量组, 正丁醇高、低剂量组, 每组 6 只。称取适量漏芦提取部位, 研磨成粉末, 加入 0.5% CMC-Na, 得漏芦提取部位悬液。模型组灌胃生理盐水, 每日 0.3 mL/次; 阳

性组腹腔注射环磷酰胺 [30 mg/(kg · d)], 每日 0.2 mL/次; 给药组 [高剂量组 30 g 生药/(kg · d)], 低剂量组 15 g 生药/(kg · d)] 灌胃药液, 每日 0.3 mL/次。14 d 后, 称重后处死小鼠, 剥取瘤块、脾脏、胸腺, 称重<sup>[9-10]</sup>。计算荷瘤小鼠的抑瘤率、脏器指数。计算公式如下。

$$\text{抑瘤率} = \frac{\text{模型组瘤重} - \text{药物组瘤重}}{\text{模型组瘤重}} \times 100\%$$

$$\text{脏器指数} = \frac{\text{脏器质量/g}}{\text{小鼠体质量/g}} \times 100$$

## 2.4 液质联用条件

2.4.1 色谱条件 色谱柱: Waters Acquity C<sub>18</sub> (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm)。流动相: 乙腈 (A) -0.1% 冰乙酸水溶液 (B)。梯度洗脱 0 ~ 2 min, 2% A; 2 ~ 5 min, 2% ~ 15% A; 5 ~ 10 min, 15% ~ 35% A; 10 ~ 15 min, 35% ~ 45% A; 15 ~ 20 min, 45% ~ 65% A; 20 ~ 28 min, 65% ~ 100% A。体积流量 0.2 mL/min; 进样量 2 μL; 柱温 30 °C。

2.4.2 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI), 锥孔电压 23 V, 毛细管电压 1.3 kV, 雾化器压力 40 psi, 电离电压 40 V, 离子源温度 120 °C, 去溶剂化气流温度 350 °C, 气流量 700 L/h, 检测质量范围 *m/z* 50 ~ 1 500。离子极性: 正离子模式 (positive)。

2.4.3 溶液的配制 对照品溶液: 分别精密称取 β-蜕皮甾酮 1.00 mg、黄独乙素 1.03 mg、坡模酸 1.02 mg、齐墩果酸 1.03 mg、熊果酸 1.02 mg, 分别定容至 10 mL, 加甲醇至刻度, 摇匀, 备用。

供试品溶液: 称取漏芦粉末约 10.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中。加 8 倍量 80% 乙醇回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并滤液, 减压浓缩, 滤过, 备用。

2.5 数据处理方法 实验数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  有统计意义。

## 3 实验结果

3.1 漏芦不同溶剂提取物抑制 A549、H1299 细胞增殖的作用

3.1.1 漏芦不同溶剂提取物抑制肺癌细胞 A549 增殖的作用 漏芦不同溶剂提取物抑制 A549 增殖的作用由大到小依次为: 正丁醇部位 > 乙酸乙酯部位 > 二氯甲烷部位, 抑制 A549 增殖的 IC<sub>50</sub> 分别为 (205.43 ± 16.10)、(244.22 ± 10.34)、(350.40 ± 19.67) μg/mL。在不同部位中, 质量浓度越大,

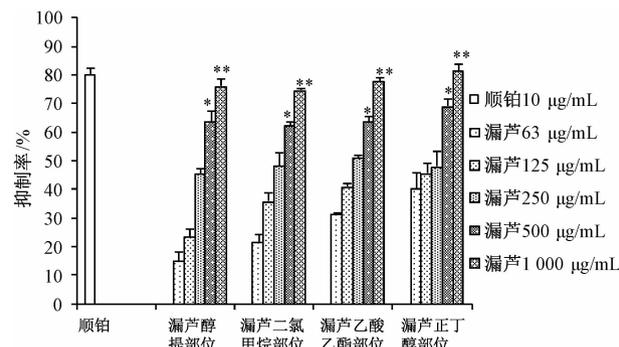
抑制率越高, 漏芦不同溶剂提取物抑制 A549 增殖的作用呈剂量依赖性。与醇提组比, 正丁醇组和乙酸乙酯组抑制 A549 增殖的 IC<sub>50</sub> 有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 漏芦正丁醇部位抑制 A549 增殖作用最强, 乙酸乙酯部位次之, 水部位大于 1 000 μg/mL, 体外无明显抑制活性, 见表 1、图 1。

表 1 漏芦不同溶剂提取物抑制肺癌细胞 A549、H1299 增殖的 IC<sub>50</sub> ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Tab. 1 IC<sub>50</sub> of extracted fractions of *Rhaponticum uniflorum* (L.) DC. inhibiting A549, H1299 lung cancer cell proliferation ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	IC <sub>50</sub> /(生药 μg·mL <sup>-1</sup> )	
	A549	H1299
漏芦醇提部位	375.47 ± 23.70	428.87 ± 7.98
漏芦二氯甲烷部位	350.40 ± 19.67	416.13 ± 10.45
漏芦乙酸乙酯部位	244.22 ± 10.34*	356.13 ± 11.30*
漏芦正丁醇部位	205.43 ± 16.10*	315.87 ± 13.72*
漏芦水提部位	> 1 000	> 1 000

注: 与漏芦醇提部位比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$



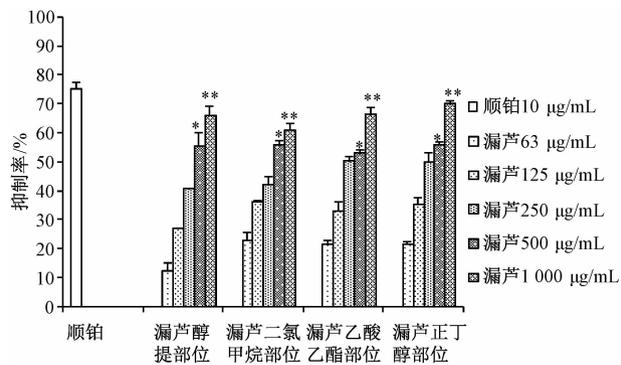
注: 与漏芦 63 μg/mL 比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

图 1 漏芦不同溶剂提取物抑制肺癌细胞 A549 增殖的作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 1 Effects of extracted fraction of *Rhaponticum uniflorum* (L.) DC. inhibiting A549 lung cancer cell proliferation ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

3.1.2 漏芦不同溶剂提取物抑制肺癌细胞 H1299 增殖的作用 漏芦不同溶剂提取物抑制 H1299 增殖的作用由大到小依次为: 正丁醇部位 > 乙酸乙酯部位 > 二氯甲烷部位, 抑制 H1299 增殖的 IC<sub>50</sub> 分别为 (315.87 ± 13.72)、(356.13 ± 11.30)、(416.13 ± 10.45) μg/mL。在不同部位中, 质量浓度越大, 抑制率越高, 漏芦不同溶剂提取物抑制 H1299 增殖的作用呈剂量依赖性。与醇提组比, 正丁醇组和乙酸乙酯组抑制 H1299 增殖作用有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 漏芦正丁醇部位抑制 H1299 增殖作用最强, 乙酸乙酯部位次之, 水提物大于 1 000 μg/mL, 体外

无明显抑制活性，见表1、图2。



注：与漏芦 63 µg/mL 比较，\*  $P < 0.05$ ，\*\*  $P < 0.01$

图2 漏芦不同溶剂提取物抑制肺癌细胞 H1299 增殖的作用 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 2 Effects of extracted fraction of *Rhaponticum uniflorum* (L.) DC. inhibiting H1299 lung cancer cell proliferation ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

### 3.2 漏芦对 Lewis 荷瘤小鼠肿瘤、胸腺、脾脏的影响

3.2.1 漏芦不同溶剂提取物对荷瘤小鼠肿瘤的影响 漏芦给药组抑瘤率从大到小依次为：正丁醇高剂量组 > 正丁醇低剂量组 > 乙酸乙酯高剂量组 > 乙酸乙酯低剂量组，抑瘤率分别为  $(37.43 \pm 4.80)\%$ 、 $(32.91 \pm 7.31)\%$ 、 $(25.87 \pm 4.75)\%$ 、 $(21.15 \pm 5.31)\%$ 。漏芦给药组小鼠瘤重由小到大依次为：正丁醇高剂量组 < 正丁醇低剂量组 < 乙酸乙酯高剂量组 < 乙酸乙酯低剂量组，瘤重分别为  $(2.49 \pm 0.58)$ 、 $(2.54 \pm 0.95)$ 、 $(3.24 \pm 0.42)$ 、 $(3.31 \pm 0.26)$  g。

与模型组比，给药组瘤重有显著性差异 ( $P < 0.05$ )，漏芦乙酸乙酯和正丁醇部位对 Lewis 肿瘤的增长有抑制作用；与低剂量组比，高剂量组瘤重有显著性差异 ( $P < 0.05$ )，漏芦乙酸乙酯和正丁醇部位对漏芦 Lewis 肿瘤增长的抑制作用呈现剂量依赖性；与乙酸乙酯高剂量组比，正丁醇高剂量组瘤重有显著性差异 ( $P < 0.05$ )，漏芦正丁醇部位抑制小鼠肿瘤增长的作用更强，见表2、图3。

3.2.2 漏芦不同溶剂提取物对荷瘤小鼠胸腺、脾脏的影响 与模型组比，给药组胸腺指数有显著性差异 ( $P < 0.05$ )，小鼠胸腺指数升高，漏芦乙酸乙酯和正丁醇部位能调节荷瘤小鼠的免疫力；与正丁醇低剂量组比，正丁醇高剂量组胸腺指数有显著性差异 ( $P < 0.05$ )，正丁醇对小鼠免疫力的调节作用呈现剂量依赖性；与乙酸乙酯高剂量组比，正

表2 漏芦不同溶剂提取物对荷瘤小鼠肿瘤的作用 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Tab. 2 Effects of extracted fractions of *Rhaponticum uniflorum* (L.) DC. on mice bearing Lewis lung carcinoma ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

组别	瘤重/g	抑制率/%
模型组	3.58 ± 0.71	—
环磷酰胺组	1.37 ± 0.20	61.45 ± 2.61
漏芦乙酸乙酯低剂量组	3.31 ± 0.26 *	21.15 ± 5.31
漏芦乙酸乙酯高剂量组	3.24 ± 0.42 **	25.87 ± 4.75
漏芦正丁醇低剂量组	2.54 ± 0.95 *	32.91 ± 7.31
漏芦正丁醇高剂量组	2.49 ± 0.58 ***	37.43 ± 4.80

注：与模型组比较，\*  $P < 0.05$ ；漏芦高剂量组与低剂量组比较，#  $P < 0.05$ ；漏芦正丁醇高剂量组与乙酸乙酯高剂量组比较，\*\*  $P < 0.05$

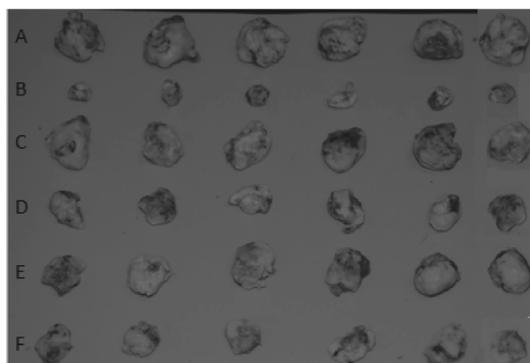


图3 漏芦不同溶剂提取物对荷瘤小鼠 Lewis 肿瘤的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Fig. 3 Extracted fractions of *Rhaponticum uniflorum* (L.) DC. inhibiting mice bearing Lewis lung carcinoma ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

图3 漏芦不同溶剂提取物对荷瘤小鼠 Lewis 肿瘤的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Fig. 3 Extracted fractions of *Rhaponticum uniflorum* (L.) DC. inhibiting mice bearing Lewis lung carcinoma ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

丁醇高剂量组胸腺指数有显著性差异 ( $P < 0.05$ )，漏芦正丁醇部位调节免疫力作用更强，见表3。

与模型组比，漏芦高剂量组脾脏指数有显著性差异 ( $P < 0.05$ )，小鼠脾脏指数升高，漏芦乙酸乙酯和正丁醇部位能调节荷瘤小鼠的免疫力；与低剂量组比，高剂量组脾脏指数有显著性差异 ( $P < 0.05$ )，漏芦乙酸乙酯和正丁醇部位对小鼠免疫力的调节作用呈现剂量依赖性；与乙酸乙酯高剂量组比，正丁醇高剂量组脾脏指数有显著性差异 ( $P < 0.05$ )，漏芦正丁醇部位调节免疫力作用更强，见表3。

表3 漏芦不同溶剂提取物对荷瘤小鼠胸腺和脾脏的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

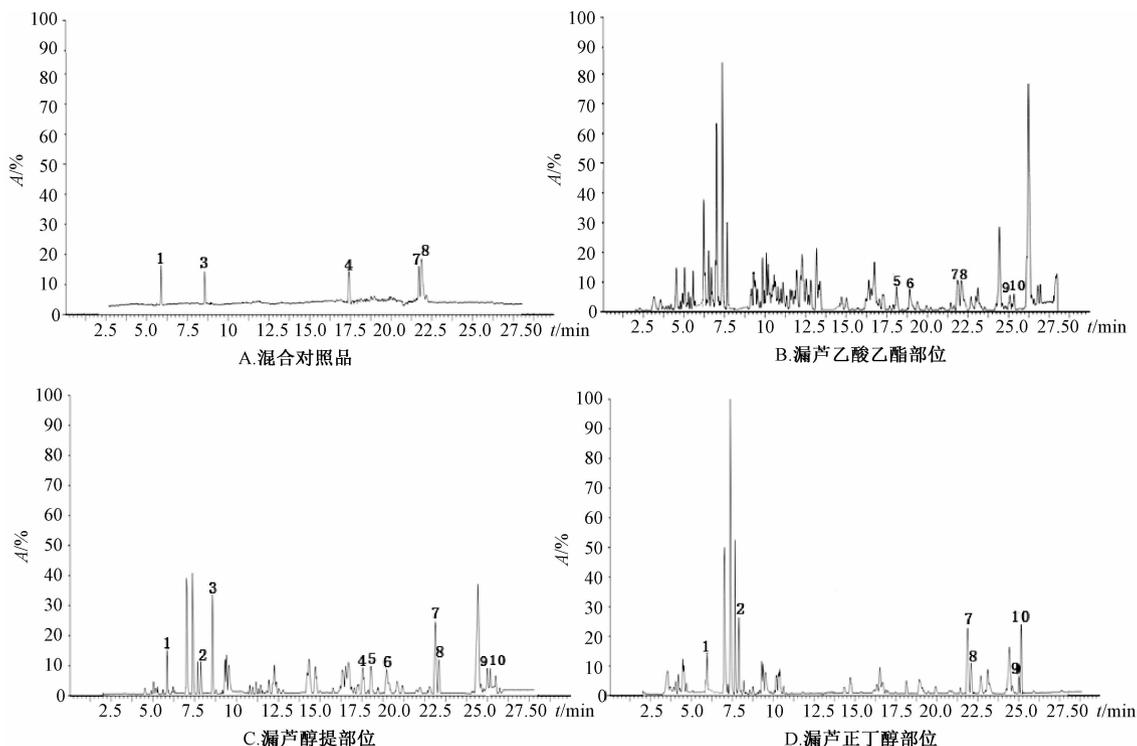
Tab. 3 Effect of extracted fractions of *Rhaponticum uniflorum* (L.) DC. on mice thymus and spleen ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	胸腺质量/mg	胸腺指数/(mg·g <sup>-1</sup> )	脾脏质量/mg	脾脏指数/(mg·g <sup>-1</sup> )
模型组	10.48 ± 2.27	0.37 ± 0.07	108.60 ± 21.40	3.58 ± 0.66
环磷酰胺组	7.63 ± 1.94	0.30 ± 0.08	52.02 ± 8.42	2.16 ± 0.31
漏芦乙酸乙酯低剂量组	12.25 ± 4.26	0.44 ± 0.16*	97.87 ± 34.86	3.62 ± 1.36
漏芦乙酸乙酯高剂量组	12.70 ± 3.58	0.47 ± 0.12*	134.05 ± 25.01	4.71 ± 0.73*#
漏芦正丁醇低剂量组	12.52 ± 3.32	0.49 ± 0.12*	84.57 ± 12.91	3.31 ± 0.43
漏芦正丁醇高剂量组	21.13 ± 1.46	0.81 ± 0.04**#	164.95 ± 32.24	6.31 ± 1.29**#

注:与模型组比较,\* $P < 0.05$ ;漏芦高剂量组与低剂量组比较,# $P < 0.05$ ;漏芦正丁醇高剂量组与乙酸乙酯高剂量组比较,\*\* $P < 0.05$

3.3 UPLC/Q-TOF-MS-MS 对漏芦萜类、甾醇类、植物激素类的解析 混合对照品和漏芦醇提部位在正离子模式下有较好的响应值,见图4。参照对照品解析出来的有1、3、4、7、8号峰,它们分别是β-蜕皮甾酮、黄独乙素、坡模酸、齐墩果酸和熊果

酸,它们的化学结构式见图5。参照文献和一级、二级质谱信息<sup>[11-15]</sup>,推测2、5、6、9、10号峰分别为漏芦素甲、胡萝卜苷、土克甾酮、β-谷甾醇和豆甾醇,见表4。



1. β-蜕皮甾酮 3. 黄独乙素 4. 坡模酸 7. 齐墩果酸 8. 熊果酸

1. β-hydroxyecdysone 3. diosbulbin B 4. pomolic acid 7. oleanolic acid 8. ursolic acid

图4 混合对照品和漏芦不同溶剂提取物总离子流图

Fig. 4 Total ion chromatograms of extracted fractions of mixed reference substance and extracted fractions of *Rhaponticum uniflorum* (L.) DC.

#### 4 讨论

本研究中发现漏芦乙酸乙酯和正丁醇部位均能抑制肺癌细胞 A549 和 H1299 增殖,漏芦正丁醇部位抑制作用优于乙酸乙酯部位;漏芦乙酸乙酯和正丁醇部位均能抑制 Lewis 移植性荷瘤小鼠肿瘤的增

长,正丁醇部位抑制作用优于乙酸乙酯部位。研究表明,漏芦抗肺癌活性最强的部位是正丁醇部位,水提部位对肺癌细胞无明显的抑制作用,这与传统水煎服药有明显差异。这可能是因为某些脂溶性的抗肺癌活性成分未提取出来,传统水煎提取的大多

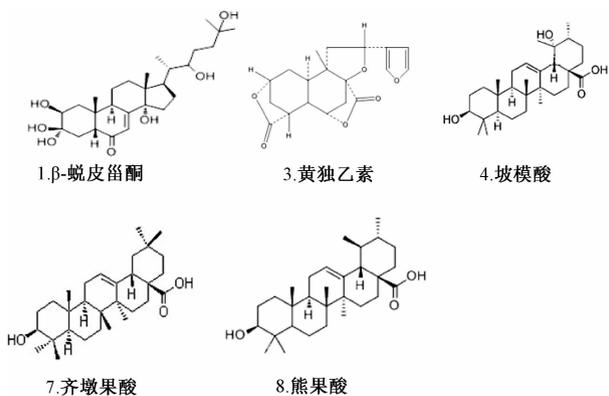


图5 漏芦不同溶剂提取物成分的化学结构式

Fig. 5 Chemical structures of extracted fractions of *Rhaponticum uniflorum* (L.) DC.

表4 漏芦不同溶剂提取物化合物的质谱信息

Tab. 4 Mass spectrometry information of extracted fractions of *Rhaponticum uniflorum* (L.) DC.

编号	化合物	保留时间/min	分子量	检测离子 $m/z$	一级碎片	二级碎片
1	β-蜕皮甾酮	5.869	480	481 [M + H] <sup>+</sup>	481, 459, 228, 209	481, 475, 201, 118
2	漏芦素甲	7.900	508	509 [M + H] <sup>+</sup>	509, 340, 209	-
3	黄独乙素	8.536	344	383 [M + K] <sup>+</sup>	383, 367, 317, 209	383, 367
4	坡模酸	17.487	472	511 [M + K] <sup>+</sup>	511, 397, 231	511, 228, 184
5	胡萝卜苷	18.124	576	577 [M + H] <sup>+</sup>	577, 354, 308	577, 385, 193, 147
6	土克甾酮	18.860	496	497 [M + H] <sup>+</sup>	497, 330	497, 184
7	齐墩果酸	21.762	456	913 [2M + H] <sup>+</sup>	913, 457, 439, 411	913, 411, 203, 184
8	熊果酸	21.801	456	913 [2M + H] <sup>+</sup>	913, 457, 439, 191	913, 411, 203, 147
9	β-谷甾醇	25.077	414	415 [M + H] <sup>+</sup>	415, 378, 355, 279	-
10	豆甾醇	26.089	412	413 [M + H] <sup>+</sup>	413, 393	413, 393, 184, 149

文献报道齐墩果酸、熊果酸和坡模酸等三萜类能诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞增殖、抑制肿瘤细胞侵袭转移，β-谷甾醇和豆甾醇能阻滞肿瘤细胞周期、逆转多药耐药性，咖啡酸和迷迭香酸具有细胞毒性、直接杀伤肿瘤细胞的作用，蜕皮甾酮植物激素类可提高免疫<sup>[16-22]</sup>。本研究显示漏芦乙酸乙酯部位和正丁醇部位主要成分是以齐墩果酸和熊果酸为代表的三萜类，以β-谷甾醇、豆甾醇为代表的甾醇类和以β-蜕皮甾酮、漏芦素甲为代表的植物激素类，这两个活性部位体内外抗肺癌作用显著，与文献报道一致。漏芦乙酸乙酯部位和正丁醇部位体内外抗肺癌药效的差异有待研究，相关成分仍须进一步解析和确认<sup>[23-24]</sup>。

参考文献:

[1] 吴普. 神农本草经[M]. 太原: 山西科学技术出版社, 2010: 72.  
[2] Zhang X P, Zhang J, Dong M, et al. Chemical constituents of plants from the genus *Rhaponticum* [J]. *Chem Biodivers*, 2010, 7(3): 594-609.  
[3] 包小妹, 罗素琴. 祁州漏芦化学成分和药理学研究进展

是中药水溶性成分，大部分脂溶性成分被忽略，而这些成分可能也是发挥药效的活性成分。根据中医药理论，中药是通过多组分的协同作用发挥整体综合效应，漏芦中的脂溶性和水溶性药效成分通过协同作用发挥整体抗肺癌的作用。鉴于这一点，笔者对漏芦进行初步的醇提和水提，再用不同有机溶剂对醇提液进行萃取，富集得到不同的有效部位，对各提取部位留样，逐步展开 HPLC 和 MS 分析，同时进行体内外抗肺癌活性部位/成分筛选。漏芦抗肺癌的脂溶性和水溶性活性成分都是研究的重点，本课题组将对漏芦水提部位和不同溶剂提取部位展开深入的研究。

[J]. 亚太传统医药, 2011, 7(9): 176-177.  
[4] Rocha Gda G, Simões M, Lúcio K A, et al. Natural triterpenoids from *Cecropia lyratiloba* are cytotoxic to both sensitive and multidrug resistant leukemia cell lines[J]. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15(23): 7355-7360.  
[5] Wang J M, Ji L L, Branford-White C J., et al. Antitumor activity of *Dioscorea bulbifera* L. rhizome in vivo[J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(2): 388-394.  
[6] 汪毅. 禹州漏芦化学成分及其生物活性研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2008.  
[7] Sui C G, Meng F D, Li Y, et al. Antiproliferative activity of rosamultic acid is associated with induction of apoptosis, cell cycle arrest, inhibition of cell migration and caspase activation in human gastric cancer (SGC-7901) cells[J]. *Phytomedicine*, 2015, 22(9): 796-806.  
[8] Sun Z H, Bu P. Downregulation of phosphatase of regenerating liver-3 is involved in the inhibition of proliferation and apoptosis induced by emodin in the SGC-7901 human gastric carcinoma cell line[J]. *Exp Ther Med*, 2012, 3(6): 1077-1081.  
[9] 金爱花, 许惠仙, 刘文静, 等. 祁州漏芦对 H22 小鼠肝癌皮下移植瘤的抑瘤作用及其机制初探[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(5): 165-167.  
[10] 白勇, 孙安盛, 吴芹. 沙苑子总黄酮和百草酸的体内外抗肿瘤作用[J]. *中成药*, 2014, 36(4): 684-690.

- [11] 李希强,王金辉,王素贤,等. 祁州漏芦中的植物甾酮类成分[J]. 沈阳药科大学学报, 2000, 17(4): 260-262.
- [12] 程捷恺,张永红,张自义,等. 祁州漏芦中蜕皮甾酮类化学成分的研究[J]. 高等学校化学学报, 2002, 23(11): 2084-2088.
- [13] 果德安,楼之岑,高从元,等. 祁州漏芦蜕皮甾酮类化学成分的研究[J]. 药学学报, 1991, 26(6): 442-446.
- [14] 张喜萍,杨雁,吴明,等. 祁州漏芦根的化学成分研究[J]. 中草药, 2010, 41(6): 859-862.
- [15] 张永红,张建钢,谢捷明,等. 祁州漏芦根中的三萜成分[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(23): 1833-1836.
- [16] Youn H, Jeong J C, Jeong Y S. Quercetin potentiates apoptosis by inhibiting nuclear factor-kappa B signaling in H460 lung cancer cells[J]. *Bio Pharm Bull*, 2013, 36(6): 944-951.
- [17] Yi T, Kabha E, Papadopoulos E, et al. 4EGI-1 targets breast cancer stem cells by selective inhibition of translation that persists in CSC maintenance, proliferation and metastasis[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(15): 6028-6037.
- [18] Gangemi R, Amaro A, Gino A, et al. ADAM10 correlates with uveal melanoma metastasis and promotes *in vitro* invasion [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2014, 27(6): 1138-1148.
- [19] Albert A B, Savarimuthu I, Gabriel M P, et al. Chemopreventive potential of  $\beta$ -Sitosterol in experimental colon cancer model—an *in vitro* and *in vivo* study[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2010, 10: 24.
- [20] Shanthi S. V, Raosaheb K K, Rana P S, et al.  $\beta$ -sitosterol induces G1 arrest and causes depolarization of mitochondrial membrane potential in breast carcinoma MDA-MB-231 cells [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2013, 13: 280.
- [21] Rzepecka-Stojko A, Kabała-Dzik A, Mozdierz A, et al. Caffeic acid phenethyl ester and ethanol extract of propolis induce the complementary cytotoxic effect on triple-negative breast cancer cell lines[J]. *Molecules*, 2015, 20(5): 9242-9262.
- [22] Han S, Yang S, Cai Z, et al. Anti-Warburg effect of rosmarinic acid via miR-155 in gastric cancer cells [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 2695-2703.
- [23] Feng L, Jia X B, Shi F, et al. Identification of two polysaccharides from *Prunella vulgaris* L. and evaluation on their anti-lung adenocarcinoma activity [J]. *Molecules*, 2010, 15(8): 5093-5103.
- [24] Mark S, Bobbi H, Schanz H. D, et al. *In vitro* anticancer activity of twelve chinese medicinal herbs [J]. *Phytother Res*, 2005, 19(7): 649-651.

## 紫草提取物对果蝇肠道损伤的保护作用

丁秋然, 张宏, 洛方舟, 金丽华\*  
(东北林业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

**摘要:** **目的** 探究紫草 *Arnebia euchroma* 水提取物对果蝇肠道损伤的保护作用与保护机制。**方法** 利用十二烷基硫酸钠 (SDS) 与百草枯诱导野生型黑腹果蝇肠道损伤, 分析喂食正常培养基与含紫草培养基的果蝇生存率。通过免疫染色法检测果蝇肠道前体细胞数量、处于分裂期的干细胞数量、肠道上皮细胞内活性氧自由基水平与死亡细胞的数量, 并用 Axioskop 2 plus 型荧光显微镜观察肠道形态学变化。**结果** 喂食含 10% 紫草水提取物可以明显提高果蝇的生存率、显著抑制肠道损伤引起的前体细胞与肠道干细胞的过度增殖、降低肠道上皮细胞的死亡, 结果具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。此外, 10% 紫草提取物还可以降低肠道上皮细胞内活性氧的水平, 保护和维持肠道形态。**结论** 紫草水提取物对 SDS 与百草枯诱导的果蝇肠道损伤具有保护作用。

**关键词:** 紫草; 水提取物; 黑腹果蝇; 十二烷基硫酸钠; 百草枯; 肠道损伤; 肠道上皮细胞

**中图分类号:** R285.5

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-1528(2016)10-2105-07

**doi:**10.3969/j.issn.1001-1528.2016.10.003

## Protective effect of *Arnebia euchroma* aqueous extract on gut injury of fruit fly

DING Qiu-ran, ZHANG Hong, LUO Fang-zhou, JIN Li-hua\*

收稿日期: 2015-12-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31270923); 黑龙江省科学基金项目 (C2016010)

作者简介: 丁秋然 (1990—), 女, 硕士生, 从事果蝇天然免疫研究。Tel: 15244681784, E-mail: 805969264@qq.com

\* 通信作者: 金丽华 (1970—), 女, 教授, 从事细胞与分子免疫学, 遗传与发育方向研究。Tel: 15046109867, E-mail: lhjin2000@hotmail.com