

本文引用:李玲,刘湘丹,詹济华,罗林明,袁志鹰,周小江,陈乃宏.卷丹百合化学成分抗肿瘤活性研究[J].湖南中医药大学学报,2018,38(10):1133-1136.

卷丹百合化学成分抗肿瘤活性研究

李玲¹,刘湘丹¹,詹济华²,罗林明³,袁志鹰^{1,3},周小江^{1,3},陈乃宏^{1,3*}

(1.湖南中医药大学药学院,湖南长沙410208;2.衡阳市中心医院,湖南衡阳421001;
3.湖南省中药饮片标准化及功能工程技术研究中心,湖南长沙410208)

[摘要] 目的 对卷丹百合化学成分进行抗肿瘤活性研究。方法 采用CCK-8法对百合中分离得到的对香豆酸、没食子酸、芦丁、 β -胡萝卜素进行体外抗肿瘤细胞A549、胃癌细胞SGC-7901和HGC-27活性研究。结果 对香豆酸对肺癌A549及胃癌SGC-7901细胞增殖具有较弱的抑制活性,高浓度400 $\mu\text{g/mL}$ 的增殖抑制率分别为30.74%和33.32%,均表现出浓度依赖性。没食子酸对胃癌HGC-27细胞增殖具有明显的抑制作用,且作用随着浓度增大而明显增强,其最高浓度100 $\mu\text{g/mL}$ 的抑制率高达79.90%。芦丁对肺癌A549细胞增殖具有弱抑制作用,高浓度200 $\mu\text{g/mL}$ 的增殖抑制率为26.84%;其对胃癌SGC-7901、HGC-27细胞也有抑制作用,高浓度200 $\mu\text{g/mL}$ 的增殖抑制率分别为35.63%和34.98%。结论 卷丹百合中对香豆酸、没食子酸和芦丁有抑制肿瘤活性作用,可为今后卷丹百合的开发和利用提供一定理论依据。

[关键词] 卷丹百合;化学成分;抗肿瘤;肺癌细胞;胃癌细胞

[中图分类号]R284.2;R285.5 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.10.009

A Study on the Antitumor Activity of Chemical Constituents from *Lilium lancifolium* Thunb.

LI Ling¹, LIU Xiangdan¹, ZHAN Jihua², LUO Linming³, YUAN Zhiying^{1,3}, ZHOU Xiaojiang^{1,3}, CHEN Naihong^{1,3*}

(1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hengyang Central Hospital, Hengyang, Hunan 421001, China; 3. Hunan Engineering Technology Center of Standardization and Function of Chinese Herbal Decoction Pieces, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To study the antitumor activity of chemical constituents from *Lilium lancifolium* Thunb. **Methods** CCK-8 assay was used to investigate the *in vitro* antitumor activity of p-coumaric acid, gallic acid, rutin, and β -carotene, which were extracted from *Lilium lancifolium* Thunb., against the lung cancer cell A549 and the gastric cancer cells SGC-7901 and HGC-27. **Results** p-Coumaric acid showed a relatively weak inhibitory activity against the proliferation of lung cancer A549 cells and gastric cancer SGC-7901 cells, with inhibition rates of 30.74% and 33.32%, respectively, at a high concentration of 400 $\mu\text{g/mL}$, showing a concentration-dependent characteristic in both cases. Gallic acid had a significant inhibitory effect on the proliferation of gastric cancer HGC-27 cells, and the effect was significantly enhanced with the increase in concentration, with an inhibition rate of 79.90% observed at the highest concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$. Rutin had a weak inhibitory effect on the proliferation of lung cancer A549 cells, with an inhibition rate of 26.84% observed at a high concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$; it also had inhibitory effects on gastric cancer cells SGC-7901 and HGC-27, with inhibition rates of 35.63% and 34.98%, respectively, at a high concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$. **Conclusion** The constituents of p-Coumaric acid, gallic acid, and rutin from *Lilium lancifolium* Thunb. show some antitumor activities, which could provide a theoretical basis for further development and utilization of *Lilium lancifolium* Thunb.

[Keywords] *Lilium lancifolium* Thunb.; chemical constituent; antitumor; lung cancer cell; gastric cancer cell

[收稿日期]2018-06-13

[基金项目]国家中医药标准化项目(ZYBZH-Y-HUN-24);湖南省中药饮片标准化及功能工程技术研究中心开放课题(BG201706)。

[作者简介]李玲,女,副教授,研究方向:天然产物研究与开发。

[通讯作者]*陈乃宏,男,研究员,博士研究生导师,E-mail:chennh@imm.ac.cn。

百合为百合科(Lilaceae)百合属(*Lilium*)植物,是重要的药食同源植物之一,在北温带和亚热带地区分布广泛,我国以华中及西南地区为主,其中湖南隆回、江苏宜兴、甘肃兰州、浙江湖州栽培历史悠久,为全国“四大百合产区”^[1]。《中华人民共和国药典》中规定正品百合为百合科植物卷丹 *Lilium lancifolium* Thunb.、百合 *Lilium brownii* F.E. Brown var. *viridulum* Baker 或细叶百合 *Lilium pumilum* DC. 的干燥肉质鳞叶,气微,味微苦,归肺、心经,有润肺止咳,清心安神之功效,主治咳嗽、咳痰、咯血、虚烦惊悸、失眠多梦^[2-3]。目前,中药百合在对肿瘤治疗方面也备受关注,研究发现百合水提物、醇提物、多糖、皂苷及生物碱等具有一定的抗肿瘤作用,但是百合单体化合物抗肿瘤作用却研究较少,因此,本实验将对百合单体化合物抗肿瘤活性开展研究,以期百合的进一步开发应用提供实验依据。

1 材料与仪器

1.1 原材料

百合于2017年采自湖南隆回县,经湖南中医药大学药学院周小江教授鉴定为百合科植物卷丹 *Lilium lancifolium* Thunb.的干燥肉质鳞叶。

1.2 实验细胞株

肺癌细胞(A549),胃癌细胞(SGC-7901和HGC-27)均购于中科院上海细胞库。

1.3 实验药物与试剂

对香豆酸、没食子酸、芦丁、 β -胡萝卜素由实验室自制;DMEM高糖培养基、胎牛血清(FBS)、PBS、0.25%胰蛋白酶-EDTA消化液、青霉素、链霉素(美国Gibco公司),CCK-8试剂盒(七海生物有限公司)。

1.4 实验仪器

N-1300旋转蒸发仪(日本EYEL4),ZF₇三用紫外分析仪(巩义市予华仪器有限责任公司),-80℃冰箱(BIOBASE博科),恒温水浴锅(北京市医疗设备厂),超净台工作台(苏州安泰空气技术有限公司),CO₂培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司),BSA1245-CW电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司),ELx 800酶标仪(美国Bio Tek公司)。

2 实验方法

2.1 化合物的制备

取100 kg卷丹百合,用70%乙醇提取、浓缩

后得浸膏13 kg,用水分散后,依次用氯仿、乙酸乙酯、正丁醇等进行系统溶剂萃取,得到氯仿部位浸膏(583.19 g)、乙酸乙酯部位浸膏(174.80 g)、正丁醇部位浸膏(852.68 g)。

取乙酸乙酯部位浸膏137.4 g(留样37.4 g),其余部分进行硅胶(100~120目)柱层析分离,干法拌样140 g硅胶(100~120目),湿法装柱1600 g硅胶(100~120目)(二氯甲烷),以二氯甲烷-甲醇进行梯度洗脱,每3000 mL流份接在一起,共收集25份流份。每份流份经浓缩后,薄层色谱识,合并相同流份,得E1-E9。E1(8.1 g)与硅胶拌样,以环己烷-氯仿进行梯度洗脱,得到Fr1-Fr35, Fr25样品出现白色粉末结晶,回收溶剂,抽滤得到化合物1(20 mg),经对照品比对鉴定为胡萝卜苷。E2(3.2 g)与硅胶拌样,以二氯甲烷-甲醇进行梯度洗脱,得到Fr1-Fr35,第Fr10~Fr11经氯仿-甲醇重结晶,得淡黄色结晶,即化合物2(30 mg),通过¹³C-NMR与¹H-NMR核磁数据比对,鉴定为对香豆酸^[4]。E8(7.2 g),用硅胶干法拌样,湿法装柱,以乙酸乙酯-甲醇进行梯度洗脱,Sephadex LH-20进一步纯化,得到化合物3(8 mg)和化合物4(10 mg),化合物3经对照品比对鉴定为芦丁;化合物4,其¹³C-NMR、¹H-NMR核磁数据与文献报道一致,确定该化合物为没食子酸^[5]。

2.2 细胞培养

从-80℃冰箱内取出需要复苏的细胞,置于提前预热的恒温水浴锅内37℃快速解冻,用移液器迅速将冻存管内的解冻后的细胞液移至10% FBS和1%双抗(青霉素、链霉素)DMEM完全培养液中,800 r/min离心5 min,弃去上清液,加入6 mL DMEM完全培养液,混匀后将细胞液移至25 cm培养瓶中,轻轻晃动培养瓶,使细胞液均匀分散,置于含5%CO₂,37℃及具有一定湿度的培养箱内培养。细胞培养3~4 d传代1次。

2.3 细胞铺板

待培养细胞生长到对数生长期后,将细胞消化,制成细胞悬液,细胞计数后,在96孔板中按100 μ L孔的比例接种细胞悬液(1.0×10^5 个/mL),将培养板放在37℃,5% CO₂培养箱中培养24 h。

2.4 加药干预

从培养箱中取出培养板,吸出旧培养液,每孔加入100 μ L无血清含双抗的DMEM培养液,饥饿12 h

后去掉培养液,加入 25、50、100、200、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 药物的 DMEM 完全培养液,溶剂对照组加入完全培养液,每孔 100 μL ,每组设置 5 个复孔,置于培养箱中继续培养 24 h。

2.5 CCK-8 法检测细胞增殖抑制率

24 h 后,取出培养板,弃去每孔中的细胞培养液,在适当避光条件下加入 CCK-8 溶液与含双抗 DMEM 培养液以 10:100 比例新鲜配制的显色液,每孔 100 μL ,置于培养箱中孵育 0.5 h,置于酶联免疫检测仪中,在波长为 450 nm 处检测其吸光度(OD)值。根据每组测得的 OD 值,计算出药物对受试细胞的增殖抑制率。计算方法如下:

增殖抑制率(%)=(1-实验组 OD 值/对照组 OD 值) \times 100%

2.6 统计学方法

实验数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计学处理,方差齐用单因素方差分析,并进行组间多重比较;方差不齐用非参数秩和检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 对香豆酸对肿瘤细胞增殖的影响

3.1.1 对香豆酸对肺癌 A549 细胞增殖的影响 对香豆酸在浓度为 200~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内对肺癌 A549 细胞增殖具有显著的抑制作用 ($P<0.01$, $P<0.001$),但其抑制作用较弱,其最大抑制率仅有 30.74%。具体见表 1。

表 1 对香豆酸对肺癌 A549 细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	OD 值	抑制率/%
对照组	-	0.914 \pm 0.042	-
对香豆酸	50	0.856 \pm 0.041	6.34
	100	0.830 \pm 0.062*	9.19
	200	0.766 \pm 0.061**	16.19
	400	0.633 \pm 0.043***	30.74

注:与对照组比较,* $P<0.05$;** $P<0.01$;*** $P<0.001$ 。

3.1.2 对香豆酸对胃癌细胞增殖的影响 对香豆酸在浓度为 100~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内对胃癌 SGC-7901 细胞增殖具有显著的抑制作用 ($P<0.01$, $P<0.001$),其最高浓度(400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的增殖抑制率为 33.32%。具体见表 2。

3.2 没食子酸对胃癌 HGC-27 细胞增殖的影响

没食子酸在浓度为 25~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内对人

表 2 对香豆酸对胃癌 SGC-7901 细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	OD 值	抑制率/%
对照组	-	0.477 \pm 0.013	-
对香豆酸	50	0.435 \pm 0.011	8.80
	100	0.394 \pm 0.014***	17.55
	200	0.346 \pm 0.012***	27.61
	400	0.318 \pm 0.020***	33.32

注:与对照组比较,* $P<0.05$;** $P<0.01$;*** $P<0.001$ 。

胃癌 HGC-27 细胞增殖具有显著的抑制作用,与溶剂对照组比较具有统计学意义 ($P<0.05$, $P<0.01$),其最高浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抑制率高达 79.90%。具体见表 3。

表 3 没食子酸对胃癌 HGC-27 细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	OD 值	抑制率/%
对照组	-	0.858 \pm 0.044	-
没食子酸	15	0.827 \pm 0.037	3.59
	25	0.743 \pm 0.023*	13.36
	50	0.214 \pm 0.019***	75.02
	100	0.172 \pm 0.003***	79.90

注:与对照组比较,* $P<0.05$;** $P<0.01$;*** $P<0.001$ 。

3.3 芦丁对肿瘤细胞增殖的影响

3.3.1 芦丁对肺癌细胞增殖的影响 100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芦丁对肺癌 A549 细胞增殖具有较弱的抑制活性,与对照组相比具有统计学意义 ($P<0.01$)。见表 4。

表 4 芦丁对肺癌 A549 细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	OD 值	抑制率/%
对照组	0	0.724 \pm 0.012	-
芦丁	25	0.709 \pm 0.032	2.07
	50	0.683 \pm 0.069	5.62
	100	0.564 \pm 0.020**	22.10
	200	0.530 \pm 0.019**	26.84

注:与对照组比较,* $P<0.05$;** $P<0.01$;*** $P<0.001$ 。

3.3.2 芦丁对胃癌细胞增殖的影响 100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芦丁可显著抑制胃癌 SGC-7901 细胞增殖,与对照组相比具有统计学意义 ($P<0.001$);50~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芦丁也对胃癌 HGC-27 细胞增殖具有抑制活性,与对照组相比具有显著性差异 ($P<0.01$, $P<0.001$)。具体见表 5 和表 6。

3.4 胡萝卜苷对肿瘤细胞增殖的影响

10~80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胡萝卜苷对胃癌细胞 HGC-27 细胞增殖均没有抑制活性。具体结果见表 7。

表5 芦丁对胃癌 SGC-7901 细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	OD 值	抑制率/%
对照组	0	0.572±0.008	-
芦丁	25	0.571±0.017	0.22
	50	0.561±0.009	1.97
	100	0.391±0.015***	31.73
	200	0.368±0.028***	35.63

注:与对照组比较,*** $P<0.001$ 。

表6 芦丁对胃癌 HGC-27 细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	OD 值	抑制率/%
对照组	0	0.647±0.013	-
芦丁	25	0.629±0.021	2.76
	50	0.566±0.020**	12.45
	100	0.471±0.028***	27.15
	200	0.420±0.032***	34.98

注:与对照组比较,** $P<0.01$;*** $P<0.001$ 。

表7 胡萝卜苷对胃癌 HGC-27 细胞增殖的作用 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	OD 值	抑制率/%
对照组	0	0.566±0.006	-
胡萝卜苷	10	0.590±0.028	-
	20	0.595±0.020	-
	40	0.561±0.027	-
	80	0.559±0.030	-

4 讨论

目前,百合抗肿瘤方面的研究主要集中于百合的粗提取物,卷丹百合水提取物对肺腺癌 A549 细胞具有抑制作用,其机制可能与诱导肿瘤细胞凋亡有关^[6]。百合生物碱和甲醇提取物均可使胃癌 SGC-7901 细胞周期阻滞于 G2/M 期,并诱导该胃癌细胞凋亡^[7]。百合多糖在体内外对 H22 肝癌^[8-9]、HepG-2 肝癌^[10]、SGC-7901 胃癌^[11]和 Lewis 肺癌^[12]等具有较好的抗癌作用,其可能的作用机制主要包括提高对肿瘤细胞的免疫力、诱导肿瘤细胞凋亡等。百合中皂苷类成分也具有一定的抗肿瘤作用,体外研究显示百合总皂苷对 A549 人肺癌细胞表现出显著的抑制活性^[13]。但是百合单体化合物抗肿瘤作用却鲜有研究,因此,本实验对百合单体化合物抗肿瘤活性进行了研究。

通过查阅文献,选取了对香豆酸、没食子酸、芦丁和 β -胡萝卜苷未做过研究的肿瘤细胞株进行体外抗肿瘤活性筛选。对香豆酸对肺癌 A549 及胃癌

SGC-7901 细胞增殖具有较弱的抑制活性,高浓度 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的增殖抑制率分别为 30.74%和 33.32%,均表现出浓度依赖性。没食子酸对胃癌 HGC-27 细胞增殖具有明显的抑制作用,且作用随着浓度增大而明显增强,其最高浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抑制率高达 79.90%。芦丁对肺癌 A549 细胞增殖具有弱抑制作用,高浓度 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的增殖抑制率为 26.84%;其对胃癌 SGC-7901、HGC-27 细胞也具有抑制作用,高浓度 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的增殖抑制率分别为 35.63%、34.98%。而化合物胡萝卜苷在该实验浓度下对胃癌细胞 HGC-27 细胞增殖均没有表现出抑制活性。

综上所述,卷丹百合中对香豆酸、没食子酸和芦丁有一定的抑制肿瘤活性,可为今后卷丹百合的开发和利用提供参考。

参考文献:

- [1] 黄蕙萍.百合的研究现状[J].中国药业,2010,19(8):88-88.
- [2] 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.
- [3] 罗林明,裴刚,覃丽,等.中药百合化学成分及药理作用研究进展[J].中药新药与临床药理,2017(6):824-837.
- [4] 芦雪霞,蒋建勤.葎草的化学成分研究[J].药学与临床研究,2013,21(3):230-232.
- [5] 尚小雅,李帅,王映红,等.红绒毛羊蹄甲的化学成分研究[J].中国中药杂志,2006,31(23):1953-1955.
- [6] 艾庆燕,赵豫凤,王爱红,等.卷丹百合体外对肺腺癌 A549 细胞抑制作用的实验研究[J].陕西中医,2015,36(4):497-499.
- [7] 贾蕾.百合对人胃癌 SGC-7901 细胞的增殖抑制作用及其机制的探讨[D].延安:延安大学,2015.
- [8] 弥曼,李汾,任利君,等.百合多糖的分离纯化及抗肿瘤作用[J].西安交通大学学报(医学版),2009,30(2):177-180.
- [9] 李汾,袁秉祥,弥曼,等.纯化百合多糖抗肿瘤作用和对荷瘤小鼠免疫功能的影响[J].现代肿瘤医学,2008,16(2):188-189.
- [10] 何洪.百合多糖诱导肿瘤细胞凋亡作用机制的研究[D].延吉:延边大学,2013.
- [11] 杨颖,李汾.百合中性多糖对 5-FU 增效减毒作用及其对体外对肿瘤细胞的抑制作用[J].延安大学学报(医学科学版),2013,11(2):8-11.
- [12] SUN X, GAO R L, XIONG Y K, et al. Antitumor and immunomodulatory effects of a water-soluble polysaccharide from Lili Bulbus in mice.[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 102(1):543-549.
- [13] 雷卢恒.卷丹百合不同居群鳞茎提取物的抗氧化及肺癌细胞抑制特性研究[D].咸阳:西北农林科技大学,2015.