

骆驼刺正丁醇萃取部位中单体化合物的分离纯化及其对人宫颈癌HeLa细胞的影响研究^Δ

刘雪松^{1*}, 马晓玲², 石磊岭², 阿勒腾图娅², 张大鹏¹, 李 宁³, 魏鸿雁^{2#}(1.新疆大学生命科学与技术学院, 乌鲁木齐 830046; 2.新疆维吾尔自治区中药民族药研究所, 乌鲁木齐 830002; 3.沈阳药科大学中药学院, 沈阳 110016)

中图分类号 R966 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)04-0506-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.04.15

摘 要 目的:分离纯化骆驼刺正丁醇萃取部位中的单体化合物,并探讨其对人宫颈癌HeLa细胞增殖、迁移的影响。方法:采用硅胶柱、Sephadex LH-20凝胶色谱柱、制备型高效液相色谱等方法对骆驼刺正丁醇萃取部位进行分离纯化,根据理化性质和波谱(质谱、氢谱、碳谱等)数据分析、鉴定化合物结构。以人宫颈癌HeLa细胞为对象,以5-氟尿嘧啶(5-FU)为阳性对照,采用四甲基偶氮唑盐法检测经各化合物不同剂量(均为6.25、12.5、25、50、100、200 μg/mL)预处理后的细胞抑制率,并计算半数抑制浓度(IC₅₀),以筛选活性单体;采用划痕实验考察上述活性单体(均为50 μg/mL)对HeLa细胞迁移能力的影响;采用金氏公式评价5-FU与上述活性单体分别联用[(3.125+6.25)、(6.25+12.5)、(12.5+25)、(25+50) μg/mL]的效果。结果:从骆驼刺正丁醇萃取物部位中共分离得到6个化合物,分别鉴定为紫柳素(I)、3',4',7-三羟基异黄酮(II)、对甲氧基苯乙酸(III)、4-羟基苯乙酮(IV)、橙黄胡椒酰胺(V)、原儿茶醛(VI)。与空白对照组比较,5-FU和各化合物(5-FU:6.25~200 μg/mL各剂量,化合物I:12.5~200 μg/mL各剂量,化合物II:25、50、200 μg/mL,化合物III:6.25、100、200 μg/mL,化合物IV:50、100、200 μg/mL,化合物V:12.5、25、200 μg/mL,化合物VI:6.25~200 μg/mL各剂量)均可显著升高细胞抑制率,且化合物I、V、VI的IC₅₀值均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其中化合物I、VI的IC₅₀值相对较低。5-FU与化合物I、VI组细胞的迁移距离均较空白对照组显著缩小($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);5-FU分别与化合物I、VI联用后,对HeLa细胞的增殖具有相加或增强的协同抑制作用(增效指数均大于0.9)。结论:化合物I~VI均为首次从骆驼刺属植物中分离得到,紫柳素和原儿茶醛是其正丁醇萃取部位的活性单体。这2种活性单体均可抑制人宫颈癌HeLa细胞的增殖和迁移,具有较强的体外细胞抑制作用,且与5-FU联用后的抑制作用强于两者分别单用。

关键词 骆驼刺;正丁醇萃取部位;单体化合物;抗肿瘤活性;增殖;迁移;联合用药;人宫颈癌Hela细胞

Separation and Purification of *Alhagi sparsifolia* *n*-butanol Extract Monomeric Compounds and Study on Their Effects on Human Cervical Cancer HeLa Cells

LIU Xuesong¹, MA Xiaoling², SHI Leiling², Aletengtuya², ZHANG Dapeng¹, LI Ning³, WEI Hongyan²(1. College of Life Sciences and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China; 2. Xinjiang Uygur Autonomous Region Institute of Traditional Chinese Medicine and Ethnic Medicine, Urumqi 830002, China; 3. School of Traditional Chinese Medicine, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To separate and purify *Alhagi sparsifolia n*-butanol extract monomeric compounds, and to investigate its effects on the proliferation and metastasis of human cervical cancer HeLa cells. METHODS: The *n*-butanol extract was separated and purified by silica gel column, Sephadex LH-20 gel column and prep-HPLC. The structures of compounds were analyzed and

[15] LOOR G, KONDAPALLI J, SCHRIEWER JM, et al.

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81460662);乌鲁木齐市天山区科学技术计划项目(No.20180012)

* 硕士研究生。研究方向:天然产物活性。E-mail:992414497@qq.com

通信作者:研究员。研究方向:天然产物开发与利用。E-mail:284762528@qq.com

Menadiene triggers cell death through ROS-dependent mechanisms involving PARP activation without requiring apoptosis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 49(12): 1925-1936.

(收稿日期:2018-05-10 修回日期:2018-12-06)

(编辑:张元媛)

identified according to physicochemical properties and spectrum (mass spectrum, hydrogen spectrum, carbon spectrum) data. Using human cervical cancer HeLa cells as objects, 5-FU as positive control, MTT assay was used to detect the inhibitory rate of HeLa cells pretreated with different doses of compounds (6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$); IC_{50} was calculated to screen active monomers. Scratch test was used to investigate the effects of above active monomers (all 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on the migration ability of HeLa cells. Kim's formula was used to evaluate the effects of 5-FU separately combined with above active monomers [(3.125+6.25), (6.25+12.5), (12.5+25), (25+50) $\mu\text{g}/\text{mL}$]. RESULTS: Six compounds were isolated from the *n*-butanol extract part of *A. sparsifolia* and identified as butin (I), 3', 4', 7-trihydroxyisoflavone (II), *p*-methoxyphenylacetic acid (III), 4-hydroxyacetophenone (IV), aurantiamide acetate (V), protocatechualdehyde (VI). Compared with blank control group, 5-FU and each compound (5-FU: 6.25-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, compound I: 12.5-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$; compound II: 25, 50, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$; compound III: 6.25, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$; compound IV: 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$; compound V: 12.5, 25, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$; compound VI: 6.25-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) could significantly increase the cell inhibition rate. IC_{50} of compound I, V, VI were decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and those of compound I and VI were lower relatively. The migration distance of cells in 5-FU and compound I and VI groups were decreased significantly, compared with blank control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). 5-FU separately combined with compound I and VI showed additive and enhanced inhibitory effects on the proliferation of HeLa cells (synergistic index > 0.9). CONCLUSIONS: Compounds I - VI are isolated from *Alhagi* for the first time. Butin and protocatechualdehyde are active monomers of its *n*-butanol extract part. Above two monomers can inhibit the proliferation and migration of human cervical cancer HeLa cells, with strong inhibitory effect *in vitro*, and stronger inhibitory effect combined with 5-FU than any compound alone.

KEYWORDS *Alhagi sparsifolia*; *n*-butanol extract part; Monomeric compounds; Antitumor activity; Proliferation; Migration; Drug combination; Human cervical cancer HeLa cells

骆驼刺(*Alhagi sparsifolia* Shap.)为豆科骆驼刺属植物^[1],是新疆干旱沙漠地区特有的一种落叶灌木,也是沙漠戈壁“三宝”之一,具有开通阻滞、止咳祛痰、清除异常黏液质等功效,是治疗腹痛腹胀、痢疾腹泻、风湿病以及滋补强壮、平衡体液、改善异常胆液质的常用药材^[2-3]。宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤,全球每年约有新发病例50万,并呈逐年递增和年轻化的趋势,严重威胁女性的生命健康^[4]。我国是宫颈癌高发国家,每年新发病例约13.5万,约占全球每年宫颈癌新发病例总量的1/3^[5]。目前,新型放疗化疗综合治疗手段虽有助于提高中晚期和复发转移宫颈癌患者的治疗效果,但由于毒副作用较大等原因,其临床应用受到了一定的限制^[6]。因此,学者一直致力于探索恶性肿瘤细胞增殖、转移等相关机制,以寻求更好的治疗药物^[7]。本课题组前期研究发现,骆驼刺正丁醇萃取部位抗肿瘤(尤其是宫颈癌)和免疫调节的作用最强^[8-11]。故本研究在此基础上,对骆驼刺的正丁醇萃取部位进行分离、纯化及结构鉴定;同时,以体外培养人宫颈癌HeLa细胞为对象,对其活性单体进行筛选,并对活性单体的协同作用进行初探,以期为骆驼刺活性成分治疗宫颈癌的后续研究提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

BC-J80S型CO₂培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);ELx800型全自动酶标仪(美国BioTek公司);ARX-300型核磁共振仪、AV-600型核磁共振仪(德国Bruker公司);API 2000型液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)仪(美国Sciex公司);FTIR6700型红外光

谱仪(美国Nicolet公司);ZF-6型三用紫外线分析仪(上海嘉鹏科技有限公司);SPD-20A型高效液相色谱仪(日本Shimadzu公司);Eclipse Ts2型倒置显微镜(日本Nikon公司);DZF-2B型电热真空干燥箱(北京市永光明医疗仪器有限公司);V-100型旋转蒸发仪、CCA-1111型冷却水循环装置(上海爱朗仪器有限公司);RE-5210A型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);SHB-III型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);SW-CJ-2F型洁净工作台(苏州尚田洁净技术有限公司);Mikro 220R型冷冻离心机(德国Hettich公司);UPT-I-5T/L型优普超纯水机(成都超纯科技有限公司);THZ-02型台式恒温振荡器(中国科学院新疆分院科学仪器厂)。

1.2 药材、药品与试剂

骆驼刺采自新疆吐鲁番地区,经新疆维吾尔自治区中药民族药研究所王果平研究员鉴定为豆科骆驼刺属植物骆驼刺(*A. sparsifolia* Shap.)的地上部分。

5-氟尿嘧啶(5-FU)原料药(上海旭东海普药业有限公司,批号:FA161012;临用前以相应培养基稀释至0.25 g/10 mL);DMEM高糖培养基(批号:L0T20170511-0135)、胎牛血清(FBS,批号:TBD0110HYT)、0.25%胰蛋白酶(批号:L0T20170612-0085)、青霉素-链霉素双抗(PS,批号:L0T20170310-0146)均购自天津灏洋华科生物制品科技有限公司;磷酸盐缓冲溶液(PBS,美国Boster公司,批号:11D16B30, pH 7.2);四甲基偶氮唑盐(MTT,美国Sigma公司,批号:1212U0516);硅胶G薄层板、硅胶GF254薄层板(青岛海洋化工有限公司);RyC₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm ,大连江申分离科学技术公司);

开放 ODS 色谱柱[100 mm×4.6 mm, 15 μm, YMC(中国)公司]; Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶色谱柱(80 cm×1.3 cm, 40 μm, 英国 GE Healthcare Bio-Science AB 公司); HPD100 大孔吸附树脂(粒径:0.3~1.25 mm, 沧州宝恩化工有限公司); 甲醇为色谱纯, 石油醚、乙醇、乙酸乙酯、正丁醇、硫酸、二甲基亚砜(DMSO)等试剂均为分析纯, 水为去离子水。

1.3 细胞

人宫颈癌 HeLa 细胞由中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心提供。

2 方法

2.1 正丁醇萃取部位的提取、分离与纯化

取干燥的骆驼刺地上部分 9 kg, 用 70% 乙醇以料液比 1:10(m/V, kg/L) 于 70 °C 加热回流提取 3 次, 每次 2 h, 合并提取液, 减压回收后得浸膏 1 550 g。浸膏加水 9 L 分散, 用正丁醇萃取 3 次, 每次 9 L, 合并萃取液, 于 50 °C 旋转蒸干, 即得正丁醇萃取部位 260.0 g, 得率为 16.77% (按正丁醇萃取部位质量与浸膏质量之比计算)。取上述骆驼刺正丁醇萃取部位 250 g, 经 HPD100 大孔吸附树脂柱, 以乙醇-水(100:0~0:100, V/V) 梯度洗脱, 洗脱液合并、浓缩, 得 30% 乙醇洗脱部分浸膏 120.0 g 和 90% 乙醇洗脱部分浸膏 75.0 g。取 90% 乙醇洗脱部分浸膏 70.0 g, 经硅胶(100~200 目) 柱, 以二氯甲烷-甲醇(100:1, 90:1, V/V) 梯度洗脱, 经薄层色谱鉴别后合并, 得 4 个流份(Fr.1~Fr.4)。Fr.1 经开放 ODS 柱色谱, 以甲醇-水(100:1, V/V) 洗脱, 得 Fr.1.1; 对 Fr.1.1 进行制备型高效液相色谱(色谱柱为 RyC₁₈) 分离, 得化合物 I (13.4 mg) 和化合物 II (20.3 mg)。Fr.2 经开放 ODS 柱色谱, 以甲醇-水(80:1, V/V) 洗脱, 得 Fr.2.2A 和 Fr.2.2B; 对 Fr.2.2A 和 Fr.2.2B 进行制备型高效液相色谱分离, 分别得化合物 III (13.2 mg) 和化合物 IV (12.3 mg)。Fr.3 经开放 ODS 柱色谱, 以甲醇-水(30:1, V/V) 洗脱, 得 Fr.3.3; 对 Fr.3.3 进行制备型高效液相色谱分离, 得化合物 V (13.4 mg)。Fr.4 经开放 ODS 柱色谱, 以甲醇-水(5:1, V/V) 洗脱, 得化合物 VI (13.2 mg)。

2.2 结构鉴定

结合熔点等理化性质, 采用质谱(MS)、氢谱(¹H-NMR)、碳谱(¹³C-NMR)、红外(IR)等波谱手段对化合物 I~VI 进行结构鉴定。

2.3 抗 HeLa 细胞增殖活性单体的筛选

2.3.1 细胞培养 将 HeLa 细胞从液氮中取出, 迅速置于 37 °C 水浴锅中解冻, 取适量至离心管中, 加入细胞培养液(含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基, 下同) 3 mL, 以 1 000 r/min 离心 5 min 后, 弃去上清液, 将沉淀重悬于细胞培养液 1 mL 中, 并转移至细胞培养瓶内, 加入细胞

培养液 5 mL, 混匀, 置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中进行培养; 每 2 天更换细胞培养液 1 次, 并于显微镜下观察细胞形态, 备用^[12-14]。

2.3.2 活性单体筛选 取“2.3.1”项下对数生长期的 HeLa 细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶消化后制成单细胞悬液并计数。用细胞培养液将细胞密度调整至 6×10⁴ 个/mL, 按 100 μL/孔接种至 96 孔板中, 于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h 后, 将细胞随机分为空白对照组、5-FU 组和各化合物组(各给药组剂量均为 6.25、12.5、25、50、100、200 μg/mL, 剂量设置均参考文献[15]), 空白对照组给予等体积的细胞培养液, 其余各给药组给予相应剂量的药物(均以细胞培养液为溶剂)。每组设置 3 个复孔, 于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 48 h 后, 加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液(以生理盐水为溶剂, 10 μL/孔) 作用 4 h, 弃去上清液, 加入 DMSO 适量(100 μL/孔), 于摇床上振荡 5~10 min 使完全混匀。使用全自动酶标仪于 570 nm 波长处检测各孔的吸光度, 计算细胞抑制率(E) [E=(1-各给药组平均吸光度/空白对照组平均吸光度)×100%], 并推算半数抑制浓度(IC₅₀, 即当存活细胞数减少一半时所需的药物浓度^[16]), 以筛选活性较强(即 IC₅₀ 值相对较小)的单体。上述试验重复 3 次。

2.4 细胞划痕实验

取“2.3.1”项下对数生长期的 HeLa 细胞, 用细胞培养液将细胞密度调整至 1×10⁵ 个/mL, 按 400 μL/孔接种至 48 孔板中, 于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养过夜, 用 200 μL 枪头在细胞培养皿中均匀划痕后, 用 PBS 清洗 3 次, 加入不含 FBS 的细胞培养液(即不含 FBS 的 DMEM 高糖培养基, 下同) 后, 立即使用倒置显微镜拍照(时间点为 0 h); 随后将细胞随机分为空白对照组、5-FU 组和“2.3”项下筛选所得活性较强化合物组(各给药组剂量均为 50 μg/mL, 剂量设置参考本课题组前期研究成果^[6]及“2.3.2”项下测算的 IC₅₀ 值), 空白对照组给予等体积的不含 FBS 的细胞培养液, 其余各给药组给予相应剂量的药物(均以不含 FBS 的细胞培养液为溶剂)。每组设置 3 个复孔, 分别于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24、48 h 后, 用倒置显微镜观察划痕愈合程度并拍照。与 0 h 相比, 48 h 时划痕缝隙缩小的差值即为 HeLa 细胞的迁移距离^[17-18]。上述试验重复 3 次。

2.5 联合用药效果评价

取“2.3.1”项下对数生长期的 HeLa 细胞, 用细胞培养液将细胞密度调整至 1×10⁵ 个/mL, 按 100 μL/孔接种至 96 孔板中, 于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养过夜后, 将细胞随机分为 5-FU 联合“2.3”项下筛选所得活性较强化合物的不同剂量组[(3.125+6.25)、(6.25+12.5)、(12.5+25)、(25+50) μg/mL; 剂量设置参考本课题组前期研究成

果^[8]),空白对照组给予等体积细胞培养液,其余各给药组给予相应剂量的药物(均以细胞培养液为溶剂)。每组设置3个复孔,于37℃、5%CO₂条件下培养48h后,加入5mg/mL的MTT溶液作用4h,吸弃上清液,加入DMSO适量(100μL/孔),于摇床上振荡5~10min使完全混匀^[19]。按“2.3.2”项下方法检测各孔吸光度并计算*E*,并采用金氏公式^[20]评价药物联用效果: $q = E_{a+b} / (E_a + E_b - E_a \times E_b)$ (式中,“*q*”为增效指数;“*E_{a+b}*”为两药联用抑制率;“*E_a*”“*E_b*”分别为各药抑制率);其中,0.85 < *q* < 1.15为相加作用,1.15 < *q* < 20为增强作用,0.55 < *q* < 0.85为拮抗作用。上述试验重复3次。

2.6 统计学方法

采用SPSS 13.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析。*P* < 0.05为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 I:淡黄色针晶。分子式:C₁₆O₅H₁₄,分子量:286,熔点(mp):330~332℃。电子轰击质谱(EI-MS):*m/z* 287[M+H]⁺。¹H-NMR(CD₃OD,600MHz)δ:7.65(1H,d,*J*=8.4Hz,H-5),6.98(1H,d,*J*=1.8Hz,H-2'),6.82(1H,dd,*J*=1.8,7.8Hz,H-6'),6.80(1H,d,*J*=7.8Hz,H-5'),6.51(1H,dd,*J*=2.4,8.4Hz,H-6),6.36(1H,d,*J*=2.4Hz,H-8),5.35(1H,dd,*J*=3.0,12.6Hz,H-2),2.98(1H,dd,*J*=12.6,16.2Hz,H-3b),2.65(1H,dd,*J*=2.4,16.2Hz,H-3a)。¹³C-NMR(CD₃OD,150MHz)δ:190.5(C-4),165.2(C-7),164.4(C-9),146.2(C-4'),145.9(C-3'),132.0(C-5),129.4(C-1'),119.2(C-6'),116.0(C-2'),115.2(C-5'),114.7(C-6),111.1(C-8),103.6(C-10),80.5(C-2),44.7(C-3)。以上波谱数据与文献[21]基本一致,故确定该化合物为紫柳素,其结构式见图1A。

化合物 II:淡褐色粉末。分子式:C₁₅O₅H₈,分子量:268,mp:271~272℃。UV(甲醇) λ_{max} :261、326nm。EI-MS:*m/z* 269[M+H]⁺。¹H-NMR(CD₃OD,600MHz)δ:6.83(1H,s,H-8),6.84(1H,dd,*J*=8.0,2.0Hz,H-6'),6.84(1H,d,*J*=8.0Hz,H-5'),6.94(1H,dd,*J*=8.5,2.0Hz,H-6),7.01(1H,d,*J*=2.0Hz,H-2'),8.06(1H,d,*J*=8.5Hz,H-5),8.11(1H,s,H-2)。¹³C-NMR(CD₃OD,150MHz)δ:103.2(C-8),116.3(C-6),116.4(C-5'),117.5(C-2'),118.2(C-10),121.7(C-6'),124.8(C-1'),126.1(C-3),128.5(C-5),146.2(C-3'),146.7(C-4'),154.7(C-2),159.8(C-9),164.6(C-7),178.2(C-4)。以上波谱数据与文献[22]基本一致,故确定该化合物为3',4',7-三羟基异黄酮,其结构式见图1B。

化合物 III:浅黄色针状结晶。分子式:C₉O₃H₁₀,分子

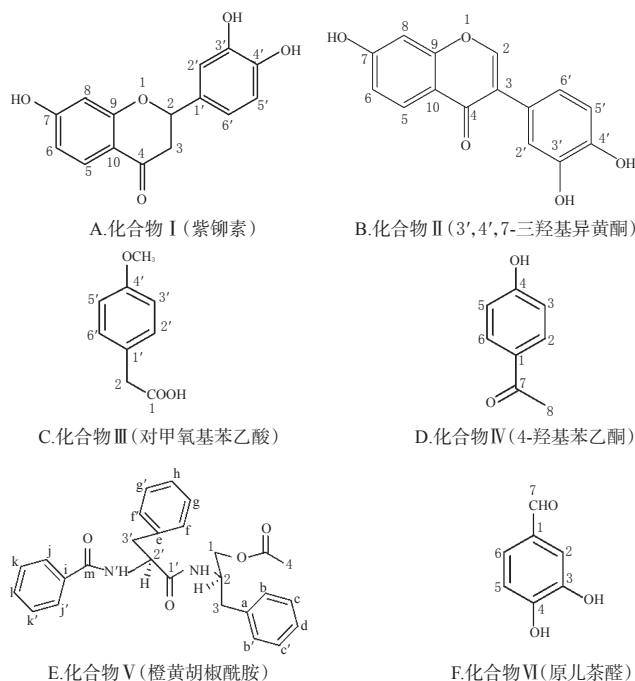


图1 化合物 I~VI 的结构式

Fig 1 Structures of compounds I-VI

量:166,mp:85~87℃。EI-MS:*m/z* 167[M+H]⁺。¹H-NMR(CD₃OD,600MHz)δ:3.56(2H,s,H-2),6.76(2H,dd,*J*=8.5,1.5Hz,H-2',6'),7.13(2H,dd,*J*=8.5,1.5Hz,H-3',5'),3.70(3H,s,4'-OCH₃)。 ¹³C-NMR(CD₃OD,150MHz)δ:172.7(C-1),40.2(C-2),115.5(C-1'),130.4(C-2',6'),115.1(C-3',5'),154.8(C-4'),52.1(4'-OCH₃)。以上波谱数据与文献[23]基本一致,故确定该化合物为对甲氧基苯乙酸,其结构式见图1C。

化合物 IV:白色粉末。分子式:C₈O₂H₈,分子量:136,mp:108~111℃。EI-MS:*m/z* 137[M+H]⁺。¹H-NMR(CD₃OD,600MHz)δ:7.89(2H,d,*J*=8.4Hz,H-2,6),6.83(2H,d,*J*=8.4Hz,H-3,5),2.52(3H,s,8-CH₃)。 ¹³C-NMR(CD₃OD,150MHz)δ:130.4(C-1),132.2(C-2,6),116.5(C-3,5),164.4(C-4),199.6(C-7),26.3(C-8)。以上波谱数据与文献[24]基本一致,故确定该化合物为4-羟基苯乙酮,其结构式见图1D。

化合物 V:白色针状晶体。分子式:C₂₇O₄N₅H₂₈,分子量:444,mp:179~181℃。IR(CHCl₃,KBr) λ_{max} :3313、1726、1661、1632、1579、1264、746、698cm⁻¹。EI-MS:*m/z* 445[M+H]⁺。¹H-NMR(CDC₁₃,600MHz)δ:1.96(3H,s,4-CH₃),2.75(1H,ddd,*J*=15.90,9.20,6.41Hz,b'-H),3.07(1H,dd,*J*=10.26,16.42Hz,b-H),3.22(1H,dd,*J*=5.99,16.42Hz,c'-H),3.84(1H,dd,*J*=5.12,13.46Hz,H-2),3.92(1H,dd,*J*=6.16,13.34Hz,H-2'),4.35(1H,m,d-H),4.78(1H,ddd,*J*=7.19,10.26,9.23Hz,c-H),6.03(1H,d,*J*=8.55Hz,-N'H),6.73(1H,d,*J*=7.69

Hz, -NH), 7.05 (1H, m, f'-H), 7.21 (1H, m, f-H), 7.30 (2H, m, H-k, k'), 7.42 (2H, t, $J=7.27$ Hz, H-j, j'), 7.51 (2H, d, $J=7.27$, 1.21 Hz, H-g, g'), 7.70 (4H, dd, $J=7.27$, 1.21 Hz, H-3', 3), 8.01 (2H, s, H-h, I). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz) δ : 20.77 (C-3'), 37.49 (C-c'), 49.51 (C-2), 55.03 (C-2'), 64.61 (C-4), 126.77 (C-I), 127.06 (C-j, j'), 127.17 (C-b), 128.61 (C-k, k'), 128.65 (C-c, d), 128.72 (C-h, g), 129.15 (C-b', g'), 129.31 (C-f', f), 131.91 (C-1), 133.75 (C-i), 136.67 (C-a), 136.72 (C-e), 167.11 (C-m), 170.25 (C-1'), 170.74 (C-3)。以上波谱数据与文献[25]基本一致,故确定该化合物为橙黄胡椒酰胺,其结构式见图1E。

化合物VI: 无色针状结晶。分子式: $\text{C}_7\text{O}_3\text{H}_6$, 分子量: 138, mp: 153~155 °C。EI-MS: m/z 139 [M+H]⁺。 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 600 MHz) δ : 9.68 (1H, s, 7-CHO), 7.30 (1H, m, H-6), 7.28 (1H, brs, H-2), 6.90 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 150 MHz) δ : 193.1 (C-7), 153.7 (C-4), 147.2 (C-3), 130.8 (C-1), 126.4 (C-6), 116.2 (C-5), 115.3 (C-2)。以上波谱数据与文献[26]基本一致,故确定该化合物为原儿茶醛,其结构式见图1F。

3.2 活性单体的筛选结果

与空白对照组比较,5-FU和各化合物(5-FU:6.25~200 $\mu\text{g/mL}$ 各剂量,化合物I:12.5~200 $\mu\text{g/mL}$ 各剂量,化合物II:25、50、200 $\mu\text{g/mL}$,化合物III:6.25、100、200 $\mu\text{g/mL}$,化合物IV:50、100、200 $\mu\text{g/mL}$,化合物V:12.5、25、200 $\mu\text{g/mL}$,化合物VI:6.25~200 $\mu\text{g/mL}$ 各剂量)均可使细胞抑制率显著升高,且5-FU以及化合物I、V、VI的 IC_{50} 值均显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。其中,化合物I、VI的 IC_{50} 值相对较低,提示两者对HeLa细胞增殖的抑制活性更强,详见表1。因此,选择这2个化合物作为活性单体进行后续试验。

3.3 划痕实验结果

与空白对照组比较,5-FU与化合物I、VI组细胞的迁移距离均显著缩小,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),详见图2、表2。

3.4 联合用药效果评价结果

不同剂量的5-FU与化合物I、VI分别联合作用48 h后,各组细胞的 q 值均大于0.9,即两者联用对HeLa细胞的增殖具有相加或增强的协同抑制作用,详见表3。

4 讨论

宫颈癌是临床上最为常见的妇科恶性肿瘤。近年来,该病的发病率日益升高,且患者呈年轻化的趋势^[4,27],故寻找有效的治疗方法刻不容缓。本课题组前期研究结果显示,骆驼刺正丁醇萃取部位具有较强的抗肿瘤活

表1 不同剂量单体化合物对HeLa细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 1 Effects of different doses of monomeric compounds on the proliferation of HeLa cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	E, %	$\text{IC}_{50}, \mu\text{g/mL}$	组别	E, %	$\text{IC}_{50}, \mu\text{g/mL}$
空白对照组	0.17 ± 0.05	218.60 ± 3.34	化合物IV 50 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.22 ± 0.07	205.41 ± 3.15
5-FU 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.53 ± 0.08**	9.51 ± 0.64**	化合物IV 100 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.35 ± 0.02**	
5-FU 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.75 ± 0.03**		化合物IV 200 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.48 ± 0.06**	
5-FU 25 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.62 ± 0.04**		化合物V 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.13 ± 0.07	
5-FU 50 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.86 ± 0.02**		化合物V 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.26 ± 0.03	
5-FU 100 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.78 ± 0.05**		化合物V 25 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.12 ± 0.06	
5-FU 200 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.93 ± 0.07**		化合物V 50 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.36 ± 0.05**	
化合物I 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.25 ± 0.07	44.73 ± 1.63**	化合物V 100 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.43 ± 0.03**	
化合物I 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.47 ± 0.02**		化合物V 200 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.37 ± 0.08**	
化合物I 25 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.39 ± 0.01**		化合物V 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.12 ± 0.02	104.44 ± 1.28*
化合物I 50 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.41 ± 0.02**		化合物V 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.28 ± 0.06*	
化合物I 100 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.64 ± 0.09**		化合物V 25 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.34 ± 0.04**	
化合物I 200 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.82 ± 0.04**		化合物V 50 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.19 ± 0.01	
化合物II 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.19 ± 0.03	199.62 ± 3.01	化合物V 100 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.22 ± 0.03	
化合物II 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.22 ± 0.01		化合物V 200 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.65 ± 0.03**	
化合物II 25 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.47 ± 0.03**		化合物VI 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.32 ± 0.03**	23.12 ± 0.86**
化合物II 50 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.30 ± 0.06**		化合物VI 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.45 ± 0.02**	
化合物II 100 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.22 ± 0.01		化合物VI 25 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.73 ± 0.04**	
化合物II 200 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.57 ± 0.02**		化合物VI 50 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.68 ± 0.01**	
化合物III 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.31 ± 0.08**	299.31 ± 3.68	化合物VI 100 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.74 ± 0.08**	
化合物III 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.26 ± 0.06		化合物VI 200 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.52 ± 0.07**	
化合物III 25 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.14 ± 0.04				

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note: vs. blank control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

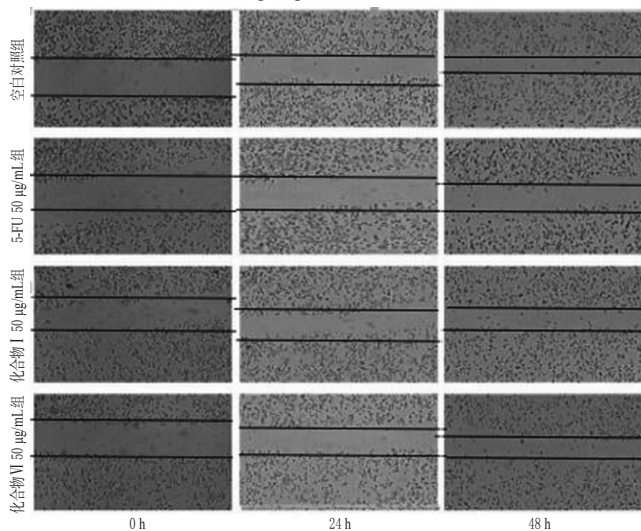


图2 化合物I、VI对HeLa细胞迁移的影响

Fig 2 Effects of compounds I, VI on the migration of HeLa cells

性^[8-11]。故本研究在此基础上,以传统的周期特异性抗肿瘤药物5-FU作为阳性对照(对多种实体瘤如结肠直肠癌、胃癌、肝癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌等均具有一定的治疗作用^[28-29]),以人宫颈癌HeLa细胞为对象,在骆驼刺正丁醇萃取部位分离、纯化的基础上,对其抗肿瘤活性单体进行筛选,以期为宫颈癌的早期诊断、治

表2 化合物 I、VI 对 HeLa 细胞迁移距离的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab 2 Effects of compounds I, VI on migration distance of HeLa cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	迁移距离,mm	组别	迁移距离,mm
空白对照组	2.93±0.09	化合物 I 50 μg/mL 组	1.96±0.06*
5-FU 50 μg/mL 组	1.38±0.04**	化合物 VI 50 μg/mL 组	2.07±0.07*

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note: vs. blank control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$

表3 不同剂量联合用药的 q 值

Tab 3 The q values of combined medication of different doses

组别	q	组别	q
5-FU 3.125 μg/mL+化合物 I 6.25 μg/mL 组	0.93*	5-FU 3.125 μg/mL+化合物 VI 6.25 μg/mL 组	1.10*
5-FU 6.25 μg/mL+化合物 I 12.5 μg/mL 组	0.95*	5-FU 6.25 μg/mL+化合物 VI 12.5 μg/mL 组	0.97*
5-FU 12.5 μg/mL+化合物 I 25 μg/mL 组	0.91*	5-FU 12.5 μg/mL+化合物 VI 25 μg/mL 组	1.31**
5-FU 25 μg/mL+化合物 I 50 μg/mL 组	1.17**	5-FU 25 μg/mL+化合物 VI 50 μg/mL 组	1.46**

注:“+”为“相加”作用,“++”为“增强”作用

Note: “+” means “additive” effect, “++” means “enhanced” effect

疗以及延长患者生存时间、提高患者生存质量提供参考。

本研究采用 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、ODS 柱色谱、制备型高效液相色谱等技术对骆驼刺正丁醇萃取部位中的有效成分进行分离和富集,结合其理化性质以及 MS、IR、核磁共振等波谱技术对化合物结构进行鉴定。结果显示,本研究共分离得到紫柳素(I)、3',4',7-三羟基异黄酮(II)、对甲氧基苯乙酸(III)、4-羟基苯乙酮(IV)、橙黄胡椒酰胺(V)和原儿茶醛(VI)等6个化合物,且均为首次从该属植物中分离得到,可为后续该属植物的化学成分研究提供参考。本研究以 5-FU 为阳性对照,采用 MTT 法对上述 6 个化合物的体外抑制活性进行评价。结果显示,与空白对照组比较,5-FU 和各化合物(5-FU: 6.25~200 μg/mL 各剂量,化合物 I: 12.5~200 μg/mL 各剂量,化合物 II: 25、50、200 μg/mL,化合物 III: 6.25、100、200 μg/mL,化合物 IV: 50、100、200 μg/mL,化合物 V: 12.5、25、200 μg/mL,化合物 VI: 6.25~200 μg/mL 各剂量)均可使细胞抑制率显著升高,其中化合物 I、V、VI 的 IC_{50} 值较空白对照组显著降低,且化合物 I、VI 的 IC_{50} 值相对较低,提示其抑制活性更强,这也与本课题组前期研究结果^[8]相吻合。

当临床诊断为原发肿瘤时,约有 50% 的患者已发生了远处转移,且大多数恶性肿瘤患者实质上死于肿瘤细胞的转移及转移所引发的复杂性病症,可见肿瘤的侵袭和转移是导致恶性肿瘤患者死亡的主要原因之一^[18]。划痕实验是评价细胞迁移能力的经典方法:当单层细胞长满时,人为制造一块空白区域(即划痕)后,处于其边

缘的细胞会向空白区域移动,直至愈合,以此来考察受试药物/化合物对细胞迁移能力的影响^[30]。本课题组前期研究发现,骆驼刺提取物对人宫颈癌 HeLa 细胞具有明显的抑制作用,提示其可能具有开发为抗肿瘤药物的潜质,但关于其对宫颈癌侵袭转移的作用尚未见相关报道。故本研究以 5-FU 为阳性对照,采用划痕实验考察活性单体(化合物 I、VI)对 HeLa 细胞迁移的抑制作用。结果显示,与空白对照组比较,5-FU 与化合物 I、VI 组细胞的迁移距离均显著缩小,提示这 2 个化合物可抑制 HeLa 细胞的体外迁移。其中,化合物 I 的抗肿瘤作用未见相关报道,化合物 VI 的抗肿瘤作用与文献报道^[30]基本一致。

联合用药是指两种或两种以上药物同时或先后应用,其主要目的是为了增强疗效或减轻毒副作用,但有时也可能会产生相反的效果^[31]。故本研究对 5-FU 与化合物 I、VI 的联用效果进行了初探。结果发现,不同剂量 5-FU 分别与化合物 I、VI 联用后对 HeLa 细胞均具有相加或增强的抑制作用($q>0.9$),提示两者具有一定的协同效应。同时,本研究在药物剂量上选择了更低的剂量(即 5-FU 3.125 μg/mL+化合物 I 或化合物 VI 6.25 μg/mL),也得到了类似的结果,进一步证实了两者的协同作用。

综上所述,本研究从骆驼刺正丁醇萃取物中共分离得到了 6 个化合物,其中紫柳素和原儿茶醛是其正丁醇萃取部位的活性单体。上述两种单体均可抑制人宫颈癌 HeLa 细胞的增殖与迁移,具有较强的体外细胞抑制作用,且与 5-FU 联用后的抑制作用强于两者分别单用。但本研究仅从细胞水平初步探讨了骆驼刺正丁醇萃取部位活性单体化合物对宫颈癌细胞增殖、迁移的抑制作用,故其具体机制仍需后续研究进一步验证。

参考文献

- [1] 米克热木·沙衣布扎提,蒋志惠,吾买尔江·牙合甫,等.传统维药骆驼刺刺糖有效成分及药理作用研究进展[J].中药材,2016,39(10):2397-2399.
- [2] 韩曾娇.刺糖多糖对巨噬细胞 RAW264.7 的免疫调节及信号通路的研究[D].乌鲁木齐:新疆医科大学,2017.
- [3] 波拉提·马卡比力,熊元君,贾晓光,等.骆驼刺糖中黄酮、异黄酮类化学成分研究[J].新疆中医药,2010,28(2):53-55.
- [4] 刘静,余梦红,张丛敏,等.紫杉醇联合洛铂介入栓塞给药化疗宫颈癌的临床观察[J].中国药房,2017,28(17):2374-2377.
- [5] LERTKHACHONSUK AA, YIP CH, KHUHAPREMA T, et al. Cancer prevention in Asia: resource-stratified guide-

- lines from the Asian Oncology Summit 2013[J]. *Lancet Oncol*, 2013, 14(12):e497-e507.
- [6] MOHANTY G, GHOSH SK. Risk factors for cancer of cervix, status of screening and methods for its detection [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2015, 291(2):247-249.
- [7] 孙婧, 金卢阳, 王慧莹, 等. Eps8 与恶性肿瘤增殖、转移和预后的相关研究进展[J]. *中国实验血液学杂志*, 2013, 21(2):493-497.
- [8] 张贵杰, 李宁, 熊元君, 等. 骆驼刺的化学成分研究[J]. *中国药学杂志*, 2009, 44(12):897-899.
- [9] 马晓玲, 魏鸿雁, 徐晓琴, 等. 骆驼刺提取物体内外抗肿瘤作用及机制研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2015, 27(3):517-520.
- [10] 马晓玲, 魏鸿雁, 贾晓光, 等. 骆驼刺胶囊对大鼠长期毒性的实验研究[J]. *中药药理与临床*, 2014, 30(2):113-115.
- [11] 马晓玲, 徐建国, 夏提古丽·阿不利孜, 等. 骆驼刺提取物对免疫抑制小鼠迟发型超敏反应的作用[J]. *新疆医学*, 2017, 47(10):1103-1105.
- [12] FAN L, STRASSER-WEIPPL K, LI JJ, et al. Breast cancer in China[J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(7):e279-e289.
- [13] WU C, QIU S, LIU P, et al. Rhizoma amorphophalli inhibits TNBC cell proliferation, migration, invasion and metastasis through the PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2018. DOI:10.1016/j.jep.2017.09.033.
- [14] HE K, HE J, WANG S, et al. HSHIP induces S-phase arrest and growth inhibition in cervical cancer HeLa cells[J]. *J Genet Genomics*, 2010, 37(4):249-255.
- [15] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2005:202-204.
- [16] 刘庭波, 李秀琴, 王文峰, 等. 大黄素衍生物E11的筛选及对多发性骨髓瘤细胞增殖抑制和诱导凋亡作用的研究[J]. *中国实验血液学杂志*, 2018, 26(5):1407-1413.
- [17] QIONG MX, ZHAN S, WEN JH, et al. Antitumor activity of Pulsatilla chimensis (Bunge) Regel saponins in human liver tumor 7402 cells in vitro and in vivo[J]. *Phytomedicine*, 2012, 19(3/4):293-300.
- [18] 梁迎春. 白头翁皂苷单体抗肿瘤生长、转移作用及其机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- [19] 邓丽芬, 王艳红, 贾庆安, 等. 索拉非尼联合5-氟尿嘧啶对人肝癌细胞株MHCCLM3增殖的抑制作用及其机制[J]. *中华肝脏病杂志*, 2013, 21(11):845-849.
- [20] 常明向, 吴梅梅, 李瀚旻. 姜黄素与甘草次酸联用对肝癌HepG2细胞增殖的抑制作用[J]. *药物评价研究*, 2017, 40(1):42-47.
- [21] 赵萍萍, 霍仕霞, 彭晓明, 等. 驱虫斑鸠菊中紫柳素、紫柳花素的分离及其对人A375黑素瘤细胞黑素合成作用的影响[J]. *中国药学杂志*, 2013, 48(20):1724-1727.
- [22] 赵焕新, 白虹, 李巍, 等. 苏木化学成分的研究[J]. *食品与药品*, 2010, 12(5):176-180.
- [23] 邵红军, 房立真, 刘吉开. 西澳粘滑菇的化学成分研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2010, 22(5):786-788.
- [24] 石磊岭, 马国需, 杨峻山, 等. 天山假狼毒的化学成分研究[J]. *中草药*, 2016, 47(2):223-226.
- [25] 汤俊, SUPINYA T, 王峥涛, 等. 蚬壳花椒茎中的橙黄胡椒酰胺[J]. *中国药学*, 2003, 12(4):231-233.
- [26] 刘世杰. 毛支清口服液的质量控制、制备工艺及抗炎作用研究[D]. 北京: 中央民族大学, 2013.
- [27] 张怀念, 张咏莉. 宫颈癌分子遗传机制及其相关基因功能研究[J]. *安徽医药*, 2015, 19(2):219-221.
- [28] 李津. 氨肽酶N抑制剂与5-FU及其衍生物联合抗肿瘤活性研究[D]. 济南: 山东大学, 2015.
- [29] MUHAMMAD K. PD-L1单链抗体的筛选、抗体偶联药物的制备以及抗肿瘤活性的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2018.
- [30] 李希哲, 黄海燕, 赵威, 等. 桂枝化合物的分离与鉴定及神经保护作用[J]. *沈阳药科大学学报*, 2016, 33(1):14-19.
- [31] 谢雁鸣, 王连心, 王永炎. 临床联合用药机制研究的探讨[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(18):3424-3426.

(收稿日期:2018-04-23 修回日期:2018-11-28)

(编辑:张元媛)

《中国药房》杂志——RCCSE 中国核心学术期刊, 欢迎投稿、订阅