

董蒙蒙, 喻 樊, 刘 佳, 等. 中华补血草 5 种黄酮类化合物抗氧化和抗肿瘤活性的比较[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(2): 297–299.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.02.097

中华补血草 5 种黄酮类化合物抗氧化和抗肿瘤活性的比较

董蒙蒙¹, 喻 樊¹, 刘 佳², 汤新慧¹, 高 静², 徐永新¹

(1. 盐城师范学院生命科学与技术学院, 江苏盐城 224002; 2. 江苏大学药学院, 江苏镇江 212013)

摘要:比较研究 5 种中华补血草黄酮类化合物——异鼠李素、槲皮素、异槲皮苷、木樨草素、芹菜素的体外抗氧化和抗肿瘤活性。运用 MTT 试验, 检测 5 种中华补血草黄酮类化合物对 HepG2 和 Hela 肿瘤细胞体外增殖的影响; 运用 DPPH 自由基清除试验, 检测中华补血草黄酮的体外抗氧化活性。研究结果可知, 5 种中华补血草黄酮类化合物均显示一定抗氧化和抗肿瘤活性, 但其活性强弱存在差异。本试验条件下其抗肿瘤活性由强到弱的顺序为: 木樨草素 > 槲皮素 > 异鼠李素、芹菜素 > 异槲皮苷; 体外抗氧化能力由强到弱的顺序为: 槲皮素 > 木樨草素 > 异鼠李素 > 芹菜素 > 异槲皮苷。结果表明, 中华补血草黄酮类化合物木樨草素、槲皮素、异鼠李素、芹菜素等为中华补血草抗肿瘤作用的重要活性成分, 抗肿瘤作用与其抗氧化活性有关。

关键词:中华补血草; 黄酮; 抗肿瘤; 抗氧化

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)02-0297-03

白丹花科补血草属植物中华补血草 [*Limonium sinense* (Girard) Kuntze], 别称匙叶草、盐衣草、海菠菜、海赤芍等, 为多年生泌盐草本植物, 喜生于盐渍化的低洼湿地上, 主要分布于我国东北、华北、华东等滨海地区^[1-2]。据记载, 中华补血草各部位均可入药, 有清热解毒、止血散瘀、祛风消炎、抗癌、抗衰老的功效。民间常用其根治疗肝癌, 用叶治疗胃溃疡和胃癌, 用花治疗宫颈癌及各种出血^[3-4]。现代药理学研究发现, 该植物具有抗氧化、护肝、抗病毒、抑制肿瘤细胞体外增殖等多种药理活性^[5-11]。笔者研究显示, 该植物根醇提物安全低毒, 能增强机体免疫力, 对抗化疗药物 5-Fu 的免疫抑制作用, 且其本身也具有显著抗肿瘤活性^[12-13]。

中华补血草化学成分十分丰富, 含有鞣质、黄酮类、生物碱、多糖、萜类、脂肪族化合物、氨基酸、矿物质、维生素等^[5,14-16]。特别是中华补血草总酚含量很高, 占根提取物的 55.55%, 主要包括黄酮类、鞣质和酚酸等, 其中黄酮类含量高达 24.60%^[8], 目前, 已在中华补血草提取物中发现槲皮素、异槲皮苷、木樨草素、芹菜素、北美圣草素、高北美圣草素、杨梅树皮素及其苷类等 20 多种黄酮类化合物^[15,17-18]。已有研究证实, 黄酮类化合物具有广泛的生物活性和多种药理作用, 如抗氧化、抗炎、抗诱变、抑制肿瘤形成与生长等。近年来, 关于黄酮类化合物在肿瘤、心脑血管疾病等方面的应用研究已

经比较深入, 加上其低毒性的特点, 已成为天然药物和功能性食品研发的热点之一。近期有学者研究发现, 中华补血草总黄酮类化合物具有显著抑制肿瘤细胞体外增殖作用^[19], 其同属植物二色补血草中分离得到的黄酮类化合物也具有显著抗肿瘤活性^[20], 黄酮类化合物可能是该属植物抗肿瘤作用的活性成分。

本研究采用 MTT(四甲基噻唑蓝)法, 研究中华补血草中 5 种含量丰富的黄酮类化合物——异鼠李素、槲皮素、异槲皮苷、木樨草素、芹菜素^[15,18]对肿瘤细胞体外增殖的抑制作用, 并运用自由基清除试验比较其体外抗氧化活性, 以期中华补血草抗肿瘤作用的物质基础研究和该植物的进一步开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器 Spectra Max190 酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司生产; Thermo Form 311 型 CO₂ 培养箱, 美国 Thermo Scientific 公司生产; TS100 型倒置光学显微镜, 日本 Nikon 公司生产; R205B 型旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂生产; MIS-3020 全自动高压灭菌器, 日本三洋电机公司生产。

1.1.2 试剂 MTT(四甲基噻唑蓝), 德国 Sigma 公司生产; 胎牛血清、胰蛋白酶, 美国 Hyclone 公司产品; DMEM 培养基, 美国 Gibco 公司产品; 其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 细胞株 人肝癌 HepG2 细胞株、人宫颈癌 Hela 细胞株, 均购自中国科学院上海细胞生物研究所。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 取处于对数生长期、状态良好的 HepG2 或 Hela 细胞, 加入适量胰蛋白酶消化液, 使贴壁细胞脱落, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液配制细胞悬液, 计数, 并将细胞密度调整至 4.0×10^4 个/mL。取细胞悬液接种

收稿日期: 2014-10-22

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81102817); 国家级大学生创新创业训练计划(编号: 201210324004); 江苏省高等学校大学生实践创新训练计划(编号: 2012JSSPITP2373); 江苏省滩涂生物资源与环境保护重点实验室开放项目(编号: JLCBE10006)。

作者简介: 董蒙蒙(1991—), 女, 江苏连云港人, 主要从事植物药药理药化学习和研究。E-mail: 1249050523@qq.com。

通信作者: 汤新慧, 博士, 教授, 主要从事植物药药理药化研究。Tel: (0515)88233191; E-mail: xinhuitang@sina.com。

于 96 孔板, 100 μL /孔, 置恒温 CO_2 培养箱中, 在 37°C 、5% CO_2 及饱和湿度条件下培养。24 h 后, 将上述 96 孔板中的 HepG2 或 Hela 细胞分组, 吸弃各孔内培养液, 分别加入 6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 $\mu\text{mol/L}$ 异鼠李素、槲皮素、异槲皮苷、木樨草素、芹菜素, 20 $\mu\text{mol/L}$ 5-Fu (阳性对照), 每组设 4 个平行孔, 并设阴性对照组 (细胞培养液)、空白组 (DMEM 细胞悬液), 给药后继续培养。

1.2.2 MTT 试验 按“1.2.1”节中方法在肿瘤细胞中加入 5 种中华补血草黄酮类化合物孵育 48 h 后, 吸弃孔内培养液, 加入无血清培养基 100 μL , MTT (5.0 g/L), 20 μL /孔, 37°C 孵育 4 h。吸弃孔内培养液, 加入 MTT (1 g/L), 100 μL /孔, 继续培养 4 h, 终止培养。吸弃孔内培养液, 加入 DMSO, 100 μL /孔, 振荡使蓝紫色结晶物充分溶解, 用空白组调零, 置酶标仪 570 nm 波长处测定各孔吸光度 ($D_{570\text{nm}}$), 记录结果并计算样品的抑制率: 抑制率 = $(1 - D_1/D_0) \times 100\%$ 。式中: D_1 为供试样品的吸光度; D_0 为阴性对照的吸光度。

1.2.3 DPPH 自由基清除试验 向 96 孔板中分别加入 100 μL 含不同浓度异鼠李素、槲皮素、异槲皮苷、木樨草素、芹菜素、维生素 C (阳性对照) 的甲醇溶液, 再分别加入 100 μL 0.2 mmol/L DPPH 甲醇溶液, 各化合物实际终浓度分别为 6.25、12.50、25.00、50.00、100.00、200.00 $\mu\text{mol/L}$, 混合均匀, 室温下避光反应 30 min, 于 517 nm 波长处测定吸光度, 记为 D_1 ; 同时测定不加 DPPH 的样品空白吸光度 (D_j) 和加 DPPH 但不加样品 (以样品溶解液替代) 的吸光度 (D_k)。自由基清除率计算公式如下: 清除率 = $[1 - (D_1 - D_j)/D_k] \times 100\%$ 。

1.2.4 统计分析 所有试验均进行 3 次平行试验 ($n=3$), 使用 SPSS 11.0 统计软件进行数据分析, 组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 中华补血草 5 种黄酮类化合物对离体培养的 HepG2 细胞增殖的影响

中华补血草黄酮类化合物对离体培养的 HepG2 细胞增殖的影响见图 1。5 种补血草黄酮类化合物中异鼠李素、槲皮素、木樨草素、芹菜素在 6.25 ~ 100.00 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内, 对 HepG2 肿瘤细胞体外增殖均显示不同程度的抑制活性, 抑制作用随着浓度的增高而增强, 随着浓度升高至 50 $\mu\text{mol/L}$ 时, 化合物对肿瘤细胞增殖的抑制程度趋于平缓。对 HepG2 肿瘤细胞抑制活性由强到弱的顺序为: 木樨草素 > 槲皮素 > 异鼠李素 > 芹菜素 > 异槲皮苷。其中 100 $\mu\text{mol/L}$ 木樨草素、槲皮素、异鼠李素对 HepG2 细胞的增殖抑制作用与 20 $\mu\text{mol/L}$ 5-Fu (抑制率 54.3%, 图中未显示) 没有明显差异。异槲皮苷对 HepG2 细胞体外增殖的抑制作用较弱, 100 $\mu\text{mol/L}$ 异槲皮苷的 HepG2 增殖抑制率仅为 20.3%。

2.2 中华补血草 5 种黄酮类化合物对离体培养的 Hela 细胞增殖的影响

5 种中华补血草黄酮类化合物作用 48 h 对 Hela 肿瘤细胞生长的抑制作用见图 2。可见 6.25 ~ 100.00 $\mu\text{mol/L}$ 异鼠李素、槲皮素、木樨草素、芹菜素可显著抑制 Hela 肿瘤细胞体外增殖活性, 抑制作用亦随着浓度的增高而增强, 100 $\mu\text{mol/L}$ 4 种化合物对 Hela 肿瘤细胞抑制活性由强到弱的顺序为: 木

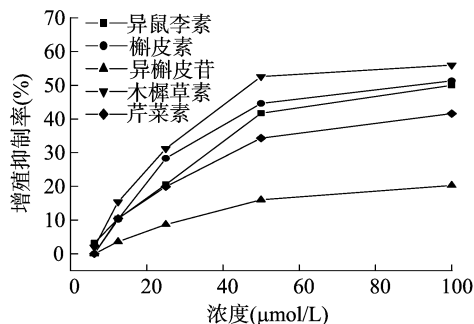


图1 中华补血草 5 种黄酮类化合物对 HepG2 细胞体外增殖的抑制效果比较

樨草素 > 槲皮素 > 异鼠李素 > 芹菜素。木樨草素和槲皮素对 HepG2 细胞的增殖抑制作用与 20 $\mu\text{mol/L}$ 5-Fu (抑制率 40.2%) 没有明显差异。6.25 ~ 100.00 $\mu\text{mol/L}$ 异槲皮苷对 Hela 肿瘤细胞体外增殖无明显影响。

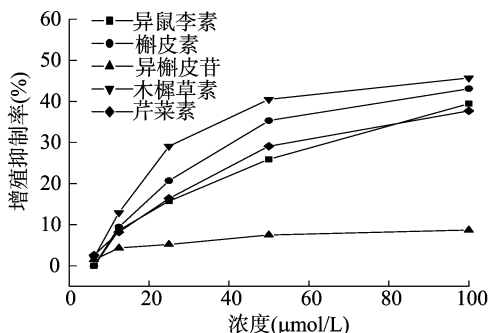


图2 中华补血草 5 种黄酮类化合物对 Hela 细胞体外增殖的抑制效果比较

2.3 中华补血草 5 种黄酮类化合物对 DPPH 自由基的清除作用

5 种化合物在 6.25 ~ 200.00 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内均具有良好的 DPPH 自由基清除活性, 并随浓度的增加, 清除作用增强 (图 3)。其中, 槲皮素对 DPPH 自由基清除作用最强, 200 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素的 DPPH 自由基清除率最高, 达 87.3%, 高于阳性对照维生素 C 组, 5 种黄酮化合物自由基清除活性强弱顺序为: 槲皮素 > 木樨草素 > 异鼠李素 > 芹菜素 > 异槲皮苷。

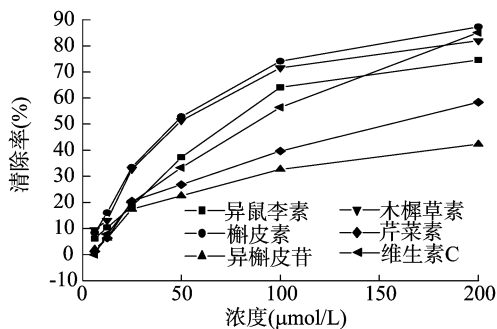


图3 中华补血草 5 种黄酮类化合物对 DPPH 自由基的清除效果比较

3 讨论与结论

黄酮类化合物, 别称生物类黄酮, 是以色酮环和苯环为基本结构的一类化合物的总称, 为植物的次级代谢产物, 广泛分

布于自然界。目前已发现的黄酮类单体化合物达 9 000 多种,研究证明,黄酮类化合物具有多种生物活性。近年来研究发现,黄酮类化合物可通过提高抗氧化物酶的活性、清除自由基、诱导肿瘤细胞凋亡等多种渠道发挥抗肿瘤作用^[21],相关抗肿瘤活性引起了广泛关注。目前已有多个黄酮类化合物作为抗肿瘤药物进入临床。黄酮类化合物已成为今后新药开发研究中值得重视的资源,具有良好的开发利用前景。

中华补血草中黄酮类化合物含量丰富,已有研究显示,补血草属植物黄酮类化合物具有显著抗肿瘤活性,黄酮类化合物可能是中华补血草抗肿瘤作用的有效成分。本研究比较了中华补血草 5 种含量丰富的黄酮化合物——异鼠李素、槲皮素、异槲皮苷、木犀草素、芹菜素对肿瘤细胞体外增殖的抑制作用。MTT 试验结果表明,中华补血草中 5 种黄酮类化合物均具有一定的体外抗肿瘤活性,但活性强弱存在差异。木犀草素、槲皮素、异鼠李素抗肿瘤活性较强,芹菜素次之,而异槲皮苷对 HepG2 细胞体外增殖显示较弱抑制作用,对 HeLa 肿瘤细胞体外增殖则无明显影响。比较结构类似的 2 种化合物槲皮素与异槲皮苷发现,二者抗肿瘤活性存在明显差异,可能是因为分子中 C₃ 位的羟基被糖基取代,而 C₂ - C₃ 位双键是黄酮化合物抗肿瘤活性的一个关键因素,因此异槲皮苷抗肿瘤活性显著下降^[22]。

为进一步明确中华补血草黄酮类化合物的抗肿瘤机制,本研究运用 DPPH 自由基清除试验,比较 5 种黄酮类化合物的体外抗氧化活性,发现 5 种化合物在本试验浓度范围内均具有良好的 DPPH 自由基清除活性,并随浓度的增加清除作用增强。其中槲皮素、木犀草素、异鼠李素抗氧化活性较强,异槲皮苷、芹菜素较弱。进一步研究发现,5 种黄酮的抗肿瘤活性与抗氧化活性强弱比较接近,但并不完全一致,表明中华补血草黄酮类化合物抗氧化活性是其发挥抗肿瘤作用的重要因素,其他抗肿瘤机制还有待于进一步研究阐明。

参考文献:

- [1]董必慧. 江苏沿海滩涂中华补血草的保护性研究[J]. 中国野生植物资源,2005,24(6):28-30.
- [2]郭巧生,苏筱娟. 江苏省沿海滩涂野生药用植物生物多样性及其保护[J]. 中国野生植物资源,1999,18(3):30-32.
- [3]江苏新医学院. 中药大辞典:第 2 部[M]. 上海:上海科技出版社,1977.
- [4]宋立人. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999.
- [5]Lin L C, Chou C J. Flavonoids and phenolics from *Limonium sinense* [J]. Planta Medica,2000,66(4):382-383.
- [6]Kuo Y, Lin L C, Tsai W J, et al. Samarangenin B from *Limonium sinense* suppresses herpes simplex virus type 1[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy,2002,46(9):2854.
- [7]李均,陈炳华,苏安玲. 中华补血草根提取物抗氧化活性的初步研究[J]. 福建师范大学学报:自然科学版,2008,24(3):83-87,108.
- [8]曲有乐,高欣,崔宇鹏. 中华补血草抗氧化活性研究[J]. 海峡药学,2012,24(12):33-36.
- [9]Chaung S, Lin C C, Lin J, et al. The hepatoprotective effects of *Limonium sinense* against carbon tetrachloride and β -D-galactosamine intoxication in rats[J]. Phytotherapy Research,2003,17(7):784.
- [10]Tang X H, Gao J, Chen J, et al. Mitochondrial modulation is involved in the hepatoprotection of *Limonium sinense* extract against liver damage in mice[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2008, 120(3):427-431.
- [11]Tang X H, Gao J, Chen J, et al. Expression of VDAC regulated by extracts of *Limonium sinense* Kuntze root against CCl₄-induced liver damage[J]. International Journal of Molecular Sciences,2007,8:204-213.
- [12]汤新慧,高静,徐力致. 中华补血草用于制备抗肿瘤药物的用途的制作方法:中国,ZL200610086169.9[P]. 2006-09-06.
- [13]汤新慧,徐力致,高静. 中华补血草根提取物抗肿瘤活性的实验研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(4):917-918.
- [14]Tang X H, Yan L F, Gao J, et al. Antitumor and immunomodulatory activity of polysaccharides from the root of *Limonium sinense* Kuntze [J]. International Journal of Biological Macromolecules,2012,51(5):1134-1139.
- [15]刘兴宽. 中华补血草的化学成分研究[J]. 中草药,2011,42(2):230-233.
- [16]汤新慧,沈敏. 补血草属植物化学成分及药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药,2007,18(8):1874-1876.
- [17]魏友霞,王军宪,姚鸿萍. 补血草属植物化学成分和药理作用研究进展[J]. 西北药学杂志,2007,22(4):222-224.
- [18]喻樊. HPLC 法同时测定濒危植物——中华补血草中异槲皮苷、桑色素、槲皮素、木犀草素和芹菜素的含量[J]. 药物分析杂志,2014,34(4):632-635.
- [19]张铭清. 中华补血草黄酮抑制白血病细胞增殖的初探[J]. 安徽农学通报,2011,17(1):54-55.
- [20]张连茹. 二色补血草水溶性多糖、多酚类和挥发性成分的研究[D]. 武汉:武汉大学,2004.
- [21]张玉萌,郑作文. 黄酮类化合物抗肿瘤作用分子机制研究进展[J]. 中国药物应用与监测,2006,3(6):50-53.
- [22]Rubio S, Quintana J, Lopez M, et al. Phenylbenzopyrones structure-activity studies identify betuletol derivatives as potential antitumoral agents[J]. European Journal of Pharmacology,2006,548(1/2/3):9-20.