

张芳娟,牛颜冰,申少斐. 牡丹种皮乙酸乙酯提取物抗癌活性研究[J]. 江苏农业科学,2020,48(4):192-197.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.04.036

牡丹种皮乙酸乙酯提取物抗癌活性研究

张芳娟,牛颜冰,申少斐

(山西农业大学生命科学院,山西太谷 030801)

摘要:研究了牡丹种皮乙酸乙酯提取物对人源性乳腺癌细胞株(MCF-7)的增殖抑制率及细胞活性的影响。制备不同浓度梯度的牡丹种皮乙酸乙酯提取物作用于 MCF-7 细胞,通过细胞形态学分析,AO/PI 双染色,MTT 法和线粒体膜电位法检测 MCF-7 细胞的生长活力,增殖抑制能力和线粒体膜电位变化。研究结果表明,当牡丹种皮乙酸乙酯提取物质量浓度为 5 mg/mL 时,对 MCF-7 细胞的抑制效果最佳,细胞抑制率可达 89.67%,并且在药物作用下,细胞活性和线粒体膜电位均明显下降。牡丹种皮乙酸乙酯提取物对乳腺癌细胞 MCF-7 的生长有抑制作用,能够降低细胞活性,促使 MCF-7 细胞线粒体膜电位降低,诱导细胞产生凋亡现象。

关键词:牡丹种皮;乙酸乙酯提取物;MCF-7 细胞;细胞活性

中图分类号: R284.2; R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)04-0192-05

癌症是剥夺人类生命的重要疾病之一,全球患癌人数在不断增加,癌症已经成为危害社会发展、人类生活以及健康的主要因素之一^[1]。全球范围内,每年约有 120 万的女性被乳腺癌折磨,超过 50% 的人死亡^[2],每年增加的乳腺癌患者数量达 20 多万,其中青年得病率占同期患者的 20%,并呈逐渐上升趋势^[3-4]。在我国癌症排行榜中,肝癌、乳腺癌、肺癌居于前十。近年来,由于人们生活习性、饮食等方面的变化,我国乳腺癌的发生率增长近 3%,对女性健康产生极大影响,相关部门已将其列为重点防治对象。为减弱其发病率和死亡率应适时做一些早期检查,同时加强女性对乳腺癌疾病的认识^[5]。

牡丹(*Paeonia suffruticosa*)是我国的本土花卉。2011 年国家卫生部正式将凤丹(*P. ostii* T. Hong et J. X. Zhang)和紫斑牡丹(*P. rockii*)的籽仁油作为新资源食品应用(中华人民共和国卫生部 2011 年第 9 号公告)^[6]。牡丹籽油中含丰富的不饱和脂肪酸^[7],兼具保健和药用价值。牡丹种皮作为牡丹榨

油后的副产物,鲜少有关于其的应用研究。刘普等于 2014 年对牡丹饼粕的化学成分进行分析,首次在该品种中分离得到 10 个低聚芪类化合物,并通过有机波谱分析明确了这些物质的组成^[8];Gao 等于 2017 年对牡丹种子研究分析其 10 种低聚芪化合物在癌细胞中的抗增殖和抗转移的作用,并且研究发现芪类化合物(Suffruticosol A、Suffruticosol B、Suffruticosol C)是牡丹种子所特有的^[9]。

目前,关于牡丹种皮提取物对癌细胞作用效果的研究报道较少。本试验以牡丹种皮乙酸乙酯提取物为研究对象,设置不同的药物浓度梯度作用于乳腺癌 MCF-7 细胞,研究其对 MCF-7 细胞的细胞活性、增殖抑制作用等的影响,为牡丹种皮今后的药用价值提供一定的理论依据,同时增强牡丹种皮的附加价值,符合循环经济发展的新方向。

1 材料与方法

1.1 试验材料

牡丹种子为山西汾河牡丹实业股份有限公司提供油用牡丹凤丹种子;MCF-7 人源性乳腺癌细胞株为中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心提供。

DMEM 培养基,FBS 胎牛血清,美国 GIBCO 实验室;胰蛋白酶,美国 Sigma 公司;双抗,北京全式金生物技术有限公司;吖啶橙(acridine orange,简称 AO)、碘化丙啶(propidium iodide,简称 PI)、Hoechst33342 染液、JC-1 染色剂,江苏凯基生物技

收稿日期:2018-12-09

基金项目:山西农业大学博士科研启动基金(编号:2016YJ02);山西省重点研发计划重点项目(编号:201703D211001);国家现代农业产业技术体系(编号:CARS-21)。

作者简介:张芳娟(1994—),女,甘肃天水人,硕士研究生,主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail:18306891750@163.com。

通信作者:申少斐,副教授,主要从事功能活性天然产物的研发和利用研究。E-mail:shenshaofei@nwfufu.edu.cn。

术股份有限公司;MTT、PBS 缓冲液,北京索莱宝科技有限公司。其他试剂均为国产分析纯等级。试验所涉及细胞培养相关的溶液均已无菌处理。

1.2 主要仪器

CO₂ 恒温培养箱,美国 Thermo 公司;超净工作台,美国 Thermo 公司;移液枪,德国 Eppendorf 公司;SZX16 型显微镜,日本 Olympus 公司;CKX41 型倒置荧光显微镜,日本 Olympus 公司;TC20 自动细胞计数器,美国 Thermo 公司;KDC-40 型离心机,安徽中科中佳科学仪器有限公司;超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 牡丹种皮乙酸乙酯提取物的制备 称取适量牡丹籽粕粉末,加入 60% 乙醇,利用闪式提取器进行提取。将提取液离心处理后取上清,在温度为 70 ℃ 条件下减压蒸发去除乙醇,将乙醇提取物与超纯水混合,超声完全溶解,获得水悬液,之后放置于分液漏斗中;加适量乙酸乙酯,振荡混匀,静置分层,上层为乙酸乙酯层,经一系列处理后冷冻干燥得到乙酸乙酯提取物(ZT),称质量。

1.3.2 细胞培养 采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,依照 Song 等的方法^[10] 在温度为 37 ℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养,之后取对数生长期的细胞用于后续试验研究。

1.3.3 四甲基偶氮唑盐微量酶反应(MTT)法检测细胞致死率 MTT 法能够对细胞活性进行检测^[11]。MTT 可使细胞线粒体中琥珀酸脱氢酶还原成较难溶的蓝色结晶,之后通过二甲基亚砜(DMSO)将其溶解,在 490 nm 下测量吸光度(*D*)。本试验通过 MTT 法检测药物作用下 MCF-7 细胞的致死率。

(1)取处于对数生长期的 MCF-7 细胞,经胰蛋白酶消化处理后,DMEM 培养基制成细胞悬液,接种于 96 孔板,每孔 100 μL。(2)放入 CO₂ 恒温培养箱中孵育至细胞贴壁。(3)贴壁后弃去原有培养液,分别加入 90 μL 不同质量浓度(1、2、3、4、5 mg/mL)牡丹种皮乙酸乙酯提取物,3 个重复,试验设置阴性对照组和阳性对照组,调零孔(仅含有 DMEM 培养基),放入培养箱培养。(4)药物处理 24、36、48、72 h 后,各组每孔加入 MTT 溶液 10 μL,90 μL 新鲜培养基,置于培养箱中连续孵育 4~6 h。(5)弃上清,每孔加入 110 μL 甲臞(formazan)溶解液,摇床上低速振荡 10 min,使结晶物完全溶解。(6)酶联免疫检测仪 490 nm 处进行每孔 *D* 值的收集,每组

设定 3 个复孔。(7)计算相关的细胞抑制率。

细胞抑制率 = (阴性对照组 *D* 值 - 试验组 *D* 值) / 阴性对照组 *D* 值 × 100%。

1.3.4 细胞染色 AO 能够透过正常细胞完整的细胞膜,在荧光显微镜下激发出的绿色荧光是 AO 与细胞中的 DNA 结合,而激发出的橘黄色或橘红色荧光则是其与细胞中的 RNA 结合^[12]。PI 则无法透过正常细胞的细胞膜进入细胞内,但是能够穿过凋亡或已经死亡细胞破损的细胞膜进入细胞内,在荧光显微镜下激发出的红色荧光是由于其嵌入到凋亡细胞双链 DNA 中^[13]。本试验利用 AO/PI 双染法^[14] 和 Hoechst 33342 染色法在显微镜下观察在药物作用下 MCF-7 细胞的形态变化,分析正常细胞与凋亡细胞的分布情况。

1.3.5 线粒体膜电位检测 癌细胞内线粒体膜电位的高低能够表示细胞生长活性的强弱,正常的癌细胞中线粒体膜电位比较高,而细胞发生凋亡时早期的一个标志事件即线粒体膜电位降低。JC-1 荧光染料^[15] 通常用来检测细胞线粒体膜电位,其以单体和多聚体的状态与细胞结合,在显微镜下可呈现出绿色或红色荧光。正常状态下的细胞线粒体膜电位较高,JC-1 聚集在线粒体基质上,生成多聚体,表现出红色荧光;相反,当细胞线粒体膜电位降低时,JC-1 则不能聚集,只能以单体形式存在,表现为绿色荧光^[16]。

本试验通过染色剂 JC-1 对乙酸乙酯提取物作用后的 MCF-7 细胞进行染色,将细胞(细胞密度为 1 × 10⁶ CFU/mL)接种于 48 孔板,次日用 0、1、3 mg/mL 乙酸乙酯提取物作用于细胞。48 h 后冲去原有培养基,加入配制好的染液,于培养箱中避光放置 20 min。用 PBS 洗涤 2~3 次,之后在显微镜下观察 MCF-7 细胞的线粒体膜电位变化情况。

2 结果与分析

2.1 MTT 法结果

不同浓度乙酸乙酯提取物作用于 MCF-7 细胞 72 h 后细胞的形态变化情况见图 1,发现对照组中的细胞生长良好,呈贴壁生长状态,杂质少,细胞轮廓较为清晰,细胞密度大;而上药组中细胞形态发生变化,形状变小,出现死亡或凋亡细胞以及细胞残渣和废弃物。说明乙酸乙酯提取物对 MCF-7 细胞有明显的抑制作用,并且其对细胞的抑制效果随着药物浓度的增大而增大。

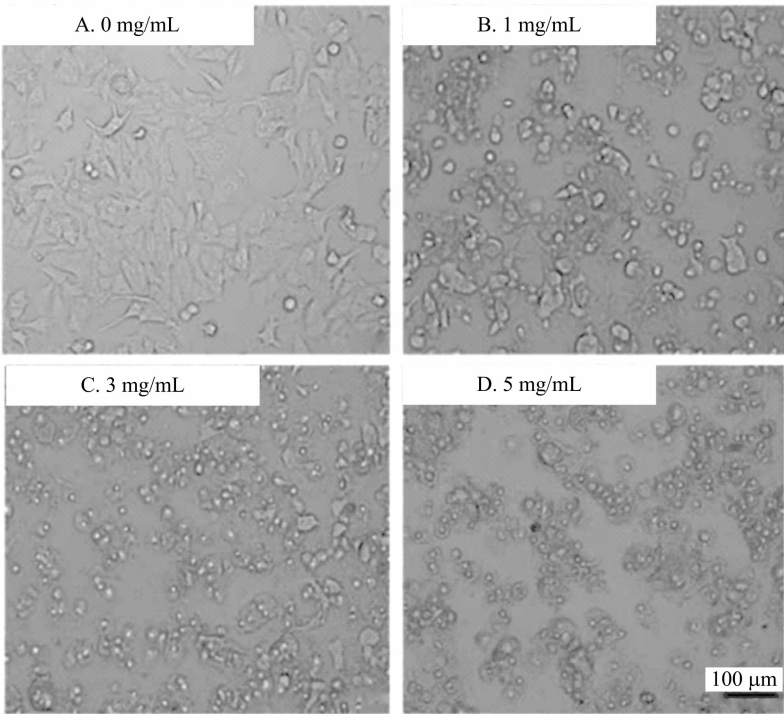


图1 乙酸乙酯提取物作用下 MCF-7 的形态变化(MTT 法)

表 1 显示,随着药物浓度和作用时间的增大,细胞抑制率呈上升趋势,当药物作用 72 h 后,ZT 质量浓度为 5 mg/mL 时,药物对细胞的抑制效率最佳,

细胞抑制率为 89.67%,说明牡丹种皮乙酸乙酯提取物对 MCF-7 细胞有明显的抑制作用,并且抑制效果呈现出一定的时间依赖性和剂量依赖性。

表 1 不同浓度乙酸乙酯提取物及作用时间对 MCF-7 细胞生长的影响

乙酸乙酯质量浓度 (mg/mL)	24 h		36 h		48 h		72 h	
	D 值	抑制率(%)	D 值	抑制率(%)	D 值	抑制率(%)	D 值	抑制率(%)
对照	1.301 ± 0.009		1.299 ± 0.01		1.269 ± 0.006		1.284 ± 0.007	
1	1.144	8.40	0.985	21.14	0.815	34.43	0.717	42.30
2	1.133	11.07	0.951	25.35	0.736	40.21	0.573	54.31
3	1.025	19.10	0.868	31.76	0.643	48.15	0.449	63.82
4	0.954	24.35	0.750	40.31	0.535	56.61	0.273	78.26
5	0.895	29.14	0.674	46.80	0.386	68.57	0.129	89.67

从图 2 可以看出,乙酸乙酯提取物对 MCF-7 细胞有较强的抑制效果,药物质量浓度相同时,细胞生长抑制率随着药物作用时间的延长而增加;药物作用时间一定时,药物质量浓度越大,对细胞的抑制效果越佳。

2.2 Hoechst 33342 染色

利用 Hoechst 33342 染液对 MCF-7 细胞进行活力检测,不同浓度乙酸乙酯提取物作用下 MCF-7 细胞的形态变化见图 3,发现对照组中的细胞生长状态正常,活性良好,细胞与染液结合,被染成均匀的蓝色。而给药组中的细胞在药物作用下,形态产生变化,体积变小,与染液结合后,蓝色荧光增强,并且随着药物浓度的增加,细胞死亡的数量越来越多。

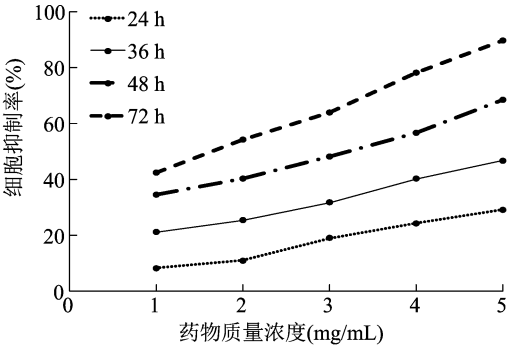


图2 不同质量浓度乙酸乙酯提取物及作用时间对 MCF-7 的抑制率

2.3 AO/PI 双染

本试验通过牡丹乙酸乙酯提取物对 MCF-7 细胞生长作用的影响来评估提取物的抗癌活性。不

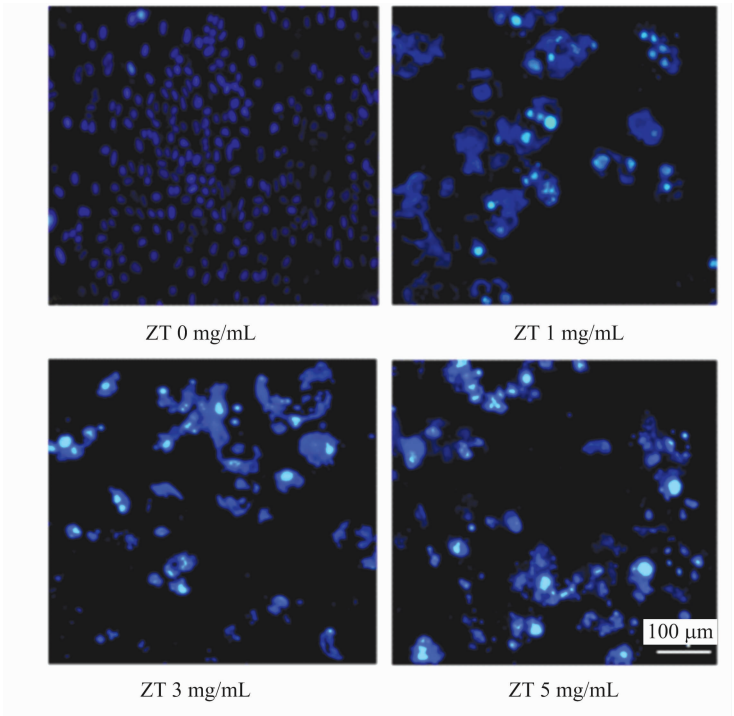


图3 Hoechst33342 染色观察乙酸乙酯提取物(ZT)对 MCF-7 细胞形态的影响

同浓度乙酸乙酯提取物作用于 MCF - 7 细胞 48、72 h 后的形态变化见图 4,结果表明,对照组中激发出的绿色荧光区域较多,红色荧光则鲜有出现,表明细胞生长状态良好。与对照组比较,给药组中绿色荧光区域较少,并且变暗,而指示凋亡小体的红

色荧光则愈发明显,随着给药时间的增加,红色荧光区域不断扩大,说明对 MCF - 7 细胞进行给药治疗后,出现了细胞凋亡现象,且随着作用时间和药物浓度的增加,细胞凋亡现象愈加明显。

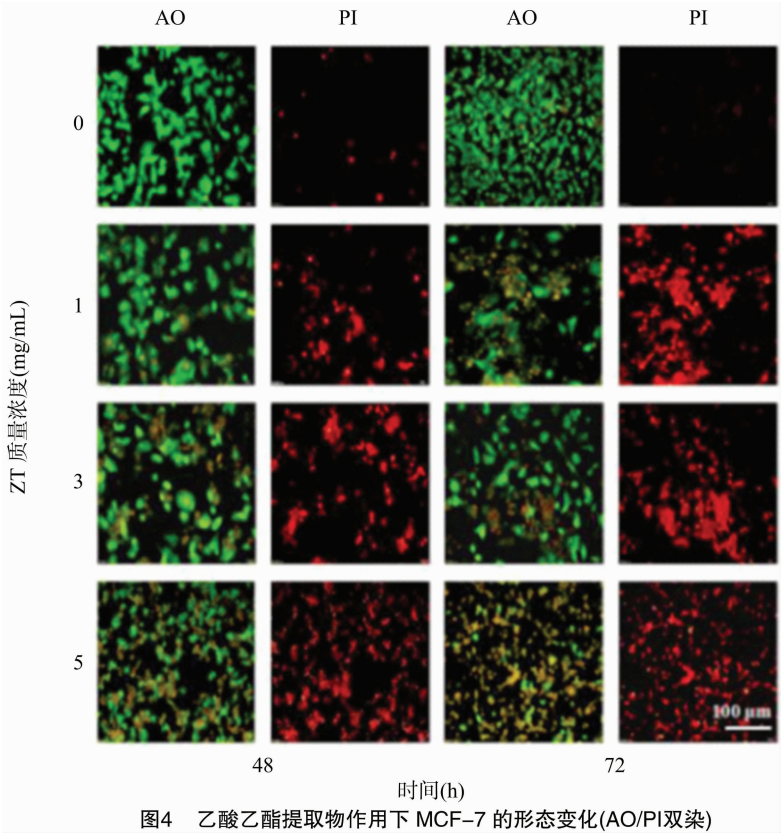


图4 乙酸乙酯提取物作用下 MCF-7 的形态变化(AO/PI双染)

2.4 JC-1 染色

不同浓度药物作用 48 h 后 MCF-7 细胞线粒体膜电位的变化情况见图 5,可以明显观察到,同正常的细胞相比,给药组中的细胞随着药物浓度的增加,其荧光现象表现为红色荧光区域逐渐变少、变

暗,而绿色荧光区域增多、变亮,说明细胞内的线粒体膜电位降低,JC-1 没有聚集于线粒体基质内,因而被激发出绿色荧光,这种现象表明牡丹种皮提取物可以造成线粒体膜电位下降,诱导细胞产生凋亡,并且呈一定的剂量依赖性。

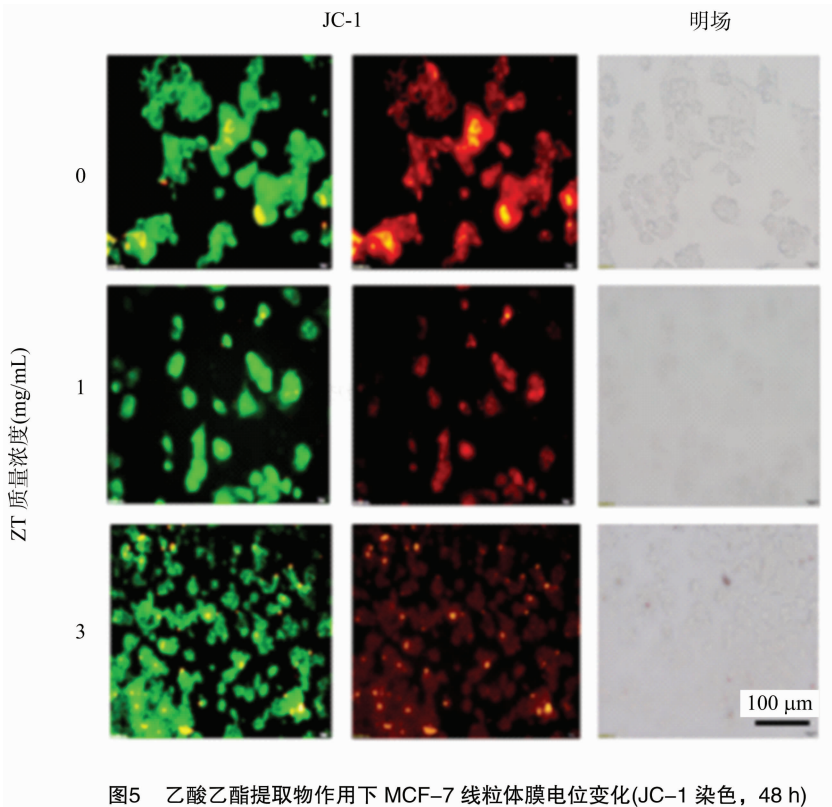


图5 乙酸乙酯提取物作用下 MCF-7 线粒体膜电位变化(JC-1 染色, 48 h)

3 讨论与结论

本试验以牡丹榨油后的种皮为材料,采用乙酸乙酯溶剂对其进行提取。提取物作用于 MCF-7 细胞,之后通过 AO/PI 双染、Hoechst 33342 染色、MTT 法和 JC-1 染色等对 MCF-7 细胞的细胞形态、增殖抑制率、生长活力等进行分析研究。结果发现,乙酸乙酯提取物作用于 MCF-7 细胞后,细胞形态产生变化,形状变小,呈浑浊状态,部分细胞死亡;细胞抑制率随着药物质量浓度的增大和作用时间的延长而升高,在药物质量浓度为 5 mg/mL,作用 72 h 后,细胞抑制率可达 89.67%;细胞活力明显降低。试验结果表明,牡丹种皮乙酸乙酯提取物对 MCF-7 细胞的增殖作用有一定的抑制性,呈现出一定的剂量依赖性和时间依赖性,并且细胞线粒体膜电位也随着药物作用浓度的增加呈下降趋势,绿色荧光区域增多、变亮,而红色荧光区域逐渐变少、变暗,表明牡

丹种皮乙酸乙酯提取物可促使 MCF-7 细胞线粒体膜电位降低,诱导细胞产生凋亡。本研究为今后牡丹种皮的回收利用提供了一定的研究基础,可增强牡丹种皮的附加价值,符合循环经济发展的方向。

参考文献:

[1] Duda D G, Duyverman A M, Kohn M, et al. Malignant cells facilitate lung metastasis by bringing their own soil[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(50): 21677-21682.

[2] 邓 珊. 姜黄素及其衍生物对乳腺癌 MCF-7 细胞的抗肿瘤作用及其作用机制[D]. 西安:陕西师范大学, 2015.

[3] Rapiti E, Fioretti G, Vekooijen H M, et al. Survival of young and older breast cancer patients in Geneva from 1990—2001 [J]. European Journal of Cancer, 2005, 41(10): 1446-1452.

[4] Foo C S, Su D, Chong C K, et al. Breast cancer in young Asian women: study on survival[J]. ANZ Journal of surgery, 2005, 75(7): 566-572.

[5] 陈 瑜, 夏海鸥, Oakley D, 等. 妇女乳腺癌及其早期筛查知识、态度、行为的相关性研究[J]. 护理研究, 2007(28): 34-37.

李少鹏,胡宗玉,张天兵,等. 基于质量差异的翠碧 1 号烟叶分切研究及应用[J]. 江苏农业科学,2020,48(4):197-202.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.04.037

基于质量差异的翠碧 1 号烟叶分切研究及应用

李少鹏, 胡宗玉, 张天兵, 纪铭阳, 许 强, 毛文龙, 胡钟胜, 张 莉

(江苏中烟工业有限责任公司,江苏南京 210019)

摘要:为探索烟叶原料合理的分切方法及在生产线上的应用,以福建省三明市产的翠碧一号 C3F 烟叶为研究对象,将整片烟叶切成 14 段,并对各段烟叶进行常规化学成分及感官质量检测、聚类 and 差异分析。结果表明,翠碧一号 C3F 等级烟叶各分切段通过聚类可分为 3 个类,叶基、叶中、叶尖分切长度比分别为 33.33%、40.00%、26.67%。3 个类别中,除浓度、劲头和香气量指标以叶尖最高外,其余各感官指标均以叶中最高;叶基整体质量最差,其杂气(木质气和青杂气)较显露,烟碱含量最低。通过质量差异分析可确定三明烟叶 C3F 适宜的分切方式为切除叶基 20 cm,切后烟叶品质改善,工业适用性进一步提升;叶基通过配方打叶合理使用,实现了单片烟叶的价值最大化。

关键词:质量差异;烟叶;分切;应用;化学成分;感官质量

中图分类号: TS44 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)04-0197-06

烟叶原料在卷烟工业企业的发展中具有至关重要的地位,是决定卷烟产品品质的基础性要素,是影响卷烟产品内在质量稳定的关键因素。由于大田生长期同一叶片的不同区段(叶尖、叶中和叶基)所受的光照条件不同,所以同一叶片的不同区段内含物质的代谢、转化和积累的程度不同,导致同一叶片的不同区段在外观、化学成分、感官质量等方面存在一定

的差异^[1-7]。这些差异不仅影响烟叶的精细化配方和加工性能,而且还降低了烟叶可用性^[8-9]。

因此,研究人员根据单片烟叶质量差异,研究不同的分切方法以提高打叶复烤烟叶质量。陈伟等根据烟叶中石油醚提取物含量的高低将烟叶从叶尖到叶基依次分切为 3 段^[10]。刘江豫等利用单片烟叶外观质量差异进行烟叶分切,将 X2F、C3F 切为 2 段,将 B2F 切为 3 段,以此提升烟叶使用价值^[11]。杨晨龙等分别对玉溪 K326 和昆明红大 2 个品种 3 个典型等级初烤烟叶进行纵向等面积分切,并分析不同分切部位的近红外漫反射光谱,可将烟叶分切为叶基和非叶基 2 类^[12]。胡巍耀等提出了

收稿日期:2019-11-25

基金项目:江苏中烟工业有限责任公司项目(编号:201904)。

作者简介:李少鹏(1979—),男,河南新乡人,硕士,工程师,主要从事原料研究与评价。E-mail:45807036@qq.com。

通信作者:张 莉,硕士,工程师,主要从事原料研究与评价。E-mail:zhangli@jszygs.com。

[6] 中华人民共和国卫生部. 卫生部关于批准元宝枫籽油和牡丹籽油作为新资源食品的公告[R]. 2011.

[7] 刘 普,李小方,王永威,等. 油用牡丹籽饼粕中低聚芪类含量测定方法研究[J]. 中国粮油学报,2016,31(4):138-141,146.

[8] 刘 普,牛亚琪,邓瑞雪,等. 紫斑牡丹籽饼粕低聚芪类成分研究[J]. 中国药学杂志,2014,49(12):1018-1021.

[9] Gao Y, He C. Antiproliferative and antimetastasis effects of ten oligostilbenes from the seeds of *Paeonia suffruticosa* on human cancer cells[J]. *Oncology Letters*, 2017, 13(6):4371-4377.

[10] Song J J, Wang Y W, Teng M Y, et al. Cordyceps militaris induces tumor cell death via the caspase-dependent mitochondrial pathway in HepG2 and MCF-7 cells[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2016, 13(6):5132-5140.

[11] Choudhary G K, Singh S P. Cytotoxic potential of rhizome extracts of *Hedychium spicatum* L. in HepG2 cell line using MTT[J]. *Indian Journal of Animal Sciences*, 2017, 87(3):313-315.

[12] Liu M, Li R, Tang Y, et al. New applications of the acridine orange fluorescence staining method: screening for circulating tumor cells[J]. *Oncology Letters*, 2017, 13(4):2221-2229.

[13] Zhang N, Fan Y X, Li C, et al. Cell permeability and nuclear DNA staining by propidium iodide in basidiomycetous yeasts[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(9):4183-4191.

[14] Liu W M, Li L, Wang J C, et al. Dynamic trapping and high-throughput patterning of cells using pneumatic microstructures in an integrated microfluidic device[J]. *Lab on a Chip*, 2012, 12(9):1702-1709.

[15] Wolosin J M, Zamudio A, Wang Z. Application of JC1 for non-toxic isolation of cells with MDR transporter activity by flow cytometry[J]. *PLoS One*, 2017, 12(4):e0174905.

[16] Hu C, Zhuang X, Wei Y, et al. Comparison of mitochondrial function in boar and bull spermatozoa throughout cryopreservation based on JC-1 staining[J]. *Cryo Letters*, 2017, 38(1):75-79.