

雪松松针总皂苷的超声提取工艺优选及体外抗肿瘤活性研究^Δ

李 师^{1,2*}, 雷艳萍¹, 石晓峰^{1,3#}, 刘东彦³, 王斌利¹, 张莉霞¹ [1. 甘肃中医药大学药学院/甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室, 兰州 730030; 2. 北京中医药大学药学院, 北京 100029; 3. 甘肃省医学科学研究院药物研究所, 兰州 730050]

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)31-4406-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.31.26

摘 要 目的: 优选雪松松针总皂苷的超声提取工艺, 并考察其体外抗肿瘤活性。方法: 采用紫外分光光度法测定雪松松针总皂苷的含量。在单因素试验基础上, 以乙醇体积分数、液料比、提取时间为因素, 根据 Box-Behnken 设计进行试验, 以雪松松针总皂苷含量为响应值进行响应面分析, 对雪松松针总皂苷的超声提取工艺进行优化。考察所制雪松松针总皂苷对人肺癌 A549 细胞、人肝癌 HepG2 细胞和人胃癌 MKN45 细胞增殖的影响, 并计算半数抑制浓度(IC₅₀)。结果: 优选工艺为乙醇体积分数 73%, 液料比 13:1, 提取 2 次、每次 65 min; 以此工艺所得雪松松针总皂苷平均含量为 6.693 mg/g, 与预测值 6.508 mg/g 的相对误差为 2.84%。雪松松针总皂苷对 A549、HepG2、MKN45 细胞的增殖均有抑制作用, 且呈明显的浓度依赖性, IC₅₀ 分别为 (63.98 ± 6.79)、(154.91 ± 10.20)、(176.32 ± 14.26) μg/ml。结论: 优选的雪松松针总皂苷的超声提取工艺合理、可行; 其对 A549、HepG2、MKN45 细胞增殖均有一定的抑制作用, 其中对 A549 细胞作用最为明显。
关键词 雪松松针; 总皂苷; 超声提取工艺; Box-Behnken 响应面法; 抗肿瘤活性; 体外

Optimization of the Ultrasonic Extraction Technology of Total Saponins from Pine Needle of *Cedrus deodara* and Study on Its *in vitro* Antitumor Activity

LI Shi^{1,2}, LEI Yanping¹, SHI Xiaofeng^{1,3}, LIU Dongyan³, WANG Binli¹, ZHANG Lixia¹ (1. School of Pharmacy, Gansu University of TCM/Key Laboratory of Chemistry and Quality of TCM of the College of Gansu Province, Lanzhou 730030, China; 2. School of Pharmacy, Beijing University of TCM, Beijing 100029, China; 3. Institute of Materia Medica, Gansu Academy of Medical Science, Lanzhou 730050, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To optimize the ultrasonic extraction technology of total saponins from pine needles of *Cedrus deodara* (TSPNCD), and to investigate its *in vitro* antitumor activity. **METHODS:** The content of TSPNCD was determined by UV spectrophotometry. Based on single factor test, ethanol volume fraction, solvent-material ratio and extraction time were selected as influential factors during ultrasonic extraction. According to Box-Behnken design, using the content of TSPNCD as response value, response surface analysis was conducted and used to optimize the ultrasonic extraction technology of TSPNCD. The effects of TSPNCD on the proliferation of human lung cancer A549 cells, human hepatocellular carcinoma HepG2 cells and human gastric cancer MKN45 cells were detected, and IC₅₀ of them were calculated. **RESULTS:** Optimal technology was that extraction solvent was 73% ethanol; solvent-material ratio was 13:1; ultrasonic extraction times was twice, each time for 65 min. Under the above conditions, the average content of TSPNCD reached 6.693 mg/g, and relative error between it and predicted value (6.508 mg/g) was 2.84%. TSPNCD inhibited the growth of A549 cells, HepG2 cells and MKN45 cells in a dose-dependent manner, with the IC₅₀ values of (63.98 ± 6.79), (154.91 ± 10.20), (176.32 ± 14.26) μg/ml, respectively. **CONCLUSIONS:** The ultrasonic extraction technology was verified as reasonable and feasible. TSPNCD has certain inhibitory effect on the proliferation of A549 cells, HepG2 cells and MKN45 cells, especially for A549 cells.

KEYWORDS Pine needles of *Cedrus deodara*; Total saponins; Ultrasonic extraction technology; Box-Behnken response surface methodology; Antitumor activity; *in vitro*

sulin delivery[J]. *Int J Nanomedicine*, 2014, doi: 10.2147/IJN.S59075.

[10] Sieval A, Thanou M, Verhoef J, *et al.* Preparation and

Δ 基金项目: 甘肃省科技支撑计划项目(No. 甘财教[2012]197号); 兰州市人才创新创业项目(No. 2014-RC-62); 甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室开放基金项目(No. zzy-2015-02)

* 博士研究生。研究方向: 中药化学及中药制剂质量标准。电话: 0931-2302664。E-mail: 736663549@qq.com

通信作者: 主任药师。研究方向: 中药化学及中药制剂质量标准。电话: 0931-2302664。E-mail: shixiaofeng2005@sina.com

NMR characterization of highly substituted n-trimethyl chitosan chloride[J]. *Carbohydrate Polymers*, 1998, 36(2): 157.

[11] 于书海, 王军, 何文. 不同季铵化程度的 N-三甲基壳聚糖对双氯芬酸钠体外经皮吸收的影响研究[J]. *中国药师*, 2013, 16(3): 337.

[12] 叶仕锋, 陈日来, 李玉珍, 等. 他克莫司类脂囊泡的构建及表征[J]. *中国药房*, 2015, 26(34): 4 853.

(收稿日期: 2016-01-29 修回日期: 2016-03-25)
(编辑: 邹丽娟)

雪松[Cedrus deodara (Roxb.) G. Don.]是松科(Pinaceae)植物雪松属(Cedrus trew)树种的泛称,该属共有4种,包括雪松(C. deodara)、黎巴嫩雪松(C. libani)、短叶雪松(C. brevifolia)和北非雪松(C. atlantica),间断地分布在喜马拉雅山、亚洲西部(黎巴嫩、叙利亚和土耳其)、塞浦路斯及北非(摩洛哥和阿爾及利亚)^[1]。其针叶药用历史悠久,主要化学成分为黄酮类、苯丙素类、皂苷类、甾体类、多糖类及针叶胶等^[2-3]。

皂苷是苷元为三萜或甾体类化合物的一类糖苷,主要分布于陆地高等植物中,也少量存在于海星和海参等海洋生物中。对皂苷的研究主要集中在人参皂苷、柴胡皂苷、三七皂苷、绞股蓝总皂苷等,该类化合物具有多种生物活性,也具有抗肿瘤的作用^[4-7]。然而有关雪松松针皂苷类化合物的研究较少,仅发现雪松松针总三萜皂苷提取工艺研究的报道^[8]。笔者前期通过对雪松松针提取物体内抗肿瘤的实验研究,证实了雪松松针醇提取物对H22肝癌、S180肉瘤荷瘤小鼠具有一定的抗肿瘤活性。为了得到高纯度雪松松针总皂苷并探讨其抗肿瘤功效,本实验拟采用紫外-可见分光光度法,以人参皂苷Rb₁为对照品,建立雪松松针总皂苷的含量测定方法;采用单因素试验和Box-Behnken响应面法对雪松松针总皂苷的超声提取工艺参数进行优化;采用CCK-8法,选用人肺癌细胞株A549、人肝癌细胞株HepG2及人胃癌细胞株MKN45进行体外增殖抑制试验,以期对雪松松针的抗癌物质基础研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

UV-240紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);AE260万分之一分析天平(瑞士Mettler Toledo公司);CP225D十万分之一电子分析天平(德国Sartorius公司);X-mark酶标仪(美国Bio Rad公司);TDZ4-WS台式低速离心机(湘仪离心机仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

人参皂苷Rb₁对照品(成都曼斯特生物科技有限公司,批号: MUST-14032301,纯度: ≥98%);RPMI 1640培养基、DMEM培养基(美国HyClone公司);McCoy's 5A Medium培养基(美国Gibco公司);二甲基亚砜(DMSO,北京索莱宝科技有限公司,批号: 20150417);四季青胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司);CCK-8试剂盒(日本同仁化学研究所,批号: JV872);其余试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

1.3 药材

雪松松针于2012年6月采自甘肃省兰州市,经甘肃省医学科学研究院何福江研究员、石长栓副研究员鉴定为松科雪松属植物雪松[Cedrus deodara (Roxb.) G. Don.]的松针。

1.4 细胞株

人胃癌MKN45细胞株、人肺癌A549细胞株、人肝癌HepG2细胞株均由甘肃省医学科学研究院转化医学中心提供。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液 准确称取粉碎过20目筛的雪松松针粉末1.00 g,置于50 ml锥形瓶中,加入70%乙醇溶液20 ml,超声(160 W、40 kHz)提取2次,每次1 h,合并2次提取液,过滤,滤液减压回收乙醇至无醇味,再加入蒸馏水30 ml充分溶解,水液经石油醚萃取(50 ml×2次)后,再用水饱和正丁醇溶液萃取

(50 ml×2次),然后合并正丁醇萃取液。正丁醇萃取液经氨试液充分洗涤(100 ml×2次)后,再用正丁醇饱和水溶液洗涤(100 ml×2次),最后减压回收正丁醇,残渣用甲醇溶解并定容至25 ml量瓶中,即得。

2.1.2 人参皂苷Rb₁对照品溶液 精密称取人参皂苷Rb₁对照品5.0 mg,置于10 ml量瓶中,以甲醇溶解并定容至刻度;吸取2.5 ml置于25 ml量瓶中,用甲醇稀释并定容至刻度,摇匀,即得质量浓度为50 μg/ml的人参皂苷Rb₁对照品溶液。

2.2 总皂苷含量测定

2.2.1 检测波长的选择 供试品溶液和人参皂苷Rb₁对照品溶液经5%香草醛-冰醋酸和高氯酸(1:4)混合液处理后显色,在300~700 nm波长范围内进行全波长扫描。结果在540 nm波长处有最大吸收,故本试验将540 nm作为检测波长。

2.2.2 线性关系考察 精密吸取人参皂苷Rb₁对照品溶液0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、2.4、2.8 ml,分别置于10 ml具塞试管中,于80℃水浴中挥干溶剂,加入新制备的5%香草醛-冰醋酸溶液0.2 ml和高氯酸溶液0.8 ml,摇匀,密塞,80℃恒温水浴加热15 min后,置冰水浴冷却20 min,然后各加入冰醋酸6 ml,摇匀,静置10 min。在540 nm波长下,以空白试剂为参比测定吸光度。以人参皂苷Rb₁含量(x, μg)为横坐标、吸光度(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程: $y = 0.0034x + 0.0277$ ($r = 0.9996$)。结果表明,人参皂苷Rb₁质量在20~140 μg范围内与吸光度呈良好的线性关系。

2.2.3 精密度试验 精密吸取人参皂苷Rb₁对照品溶液1.20 ml,共6份,按照“2.2.2”项下方法操作,测得溶液吸光度分别为0.241、0.240、0.240、0.242、0.241、0.241, RSD为0.31% ($n = 6$)。结果表明,该仪器精密度良好。

2.2.4 稳定性试验 精密吸取供试品溶液0.2 ml,按照“2.2.2”项下方法操作,显色10 min后,室温放置0、5、10、15、20、25、30、35 min后分别测定。测得吸光度分别为0.192、0.191、0.191、0.190、0.192、0.192、0.191、0.189, RSD为0.56% ($n = 8$)。结果表明,供试品溶液显色反应在35 min内稳定。

2.2.5 重复性试验 准确称取雪松松针粉末1.00 g,共6份,按“2.1.1”项下方法操作平行制备6份供试品溶液,再分别精密吸取供试品溶液各0.25 ml,按照“2.2.2”项下操作方法测定吸光度。结果测得吸光度分别为0.234、0.230、0.236、0.231、0.232、0.228,其平均值和RSD分别为0.232和1.23% ($n = 6$)。结果表明,该操作方法重复性良好。

2.2.6 加样回收率试验 准确称取雪松松针粉末0.50 g,共6份,分别加入人参皂苷Rb₁对照品30 μg,按“2.1.1”项下方法操作平行制备6份供试品溶液,然后分别精密吸取各供试品溶液0.25 ml,按照“2.2.2”项下操作方法测定吸光度,计算含量及回收率。结果,其平均回收率和RSD分别为96.97%和1.96% ($n = 6$),表明该方法准确度较好。

2.2.7 样品含量测定 准确称取雪松松针粉末1.00 g,共3份,按“2.1.1”项下方法操作制备供试品溶液,然后分别精密吸取各供试品溶液0.25 ml,按照“2.2.2”项下操作方法测定吸光度,计算含量。结果,雪松松针总皂苷的平均含量为5.958 mg/g, RSD为0.74% ($n = 3$)。

2.3 单因素试验考察提取工艺

对雪松松针总皂苷超声提取过程中的4个影响因素(乙醇浓度、液料比、提取时间、提取次数)进行单因素试验。

2.3.1 乙醇浓度对雪松松针总皂苷含量的影响 准确称取雪松松针粉末 1.00 g,共 6 份,分别以 40%、50%、60%、70%、80%、90%乙醇作为提取溶剂,液料比 20:1,超声提取 2 次,每次 60 min。然后按“2.1.1”项下方法操作制备供试品溶液,再分别精密吸取各供试品溶液 0.2 ml,按“2.2.2”项下操作方法测定吸光度,并计算雪松松针总皂苷的含量,结果见图 1。

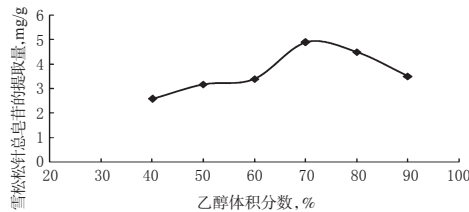


图 1 乙醇体积分数对雪松松针总皂苷提取量的影响
Fig 1 The effects of ethanol volume fraction on the content of TSPNCD

由图 1 可知,随着乙醇体积分数的升高,雪松松针中总皂苷的含量也逐渐增加,当乙醇体积分数达到 70% 时,总皂苷的含量达到最大值;之后随着乙醇体积分数的增加,总皂苷的含量反而下降。究其原因可能是由于高体积分数乙醇对脂溶性成分提取量增加,而对皂苷提取量降低。故本试验选择 70% 乙醇作为提取溶剂。

2.3.2 液料比对雪松松针总皂苷提取量的影响 准确称取雪松松针粉末 1.00 g,共 8 份,以 70% 乙醇作为提取溶剂,液料比分别为 5:1、8:1、10:1、12:1、15:1、18:1、20:1、25:1,超声提取 2 次,每次 60 min。然后按“2.1.1”项下方法操作制备供试品溶液,再分别精密吸取各供试品溶液 0.2 ml,按“2.2.2”项下操作方法测定吸光度,并计算雪松松针总皂苷的含量,结果见图 2。

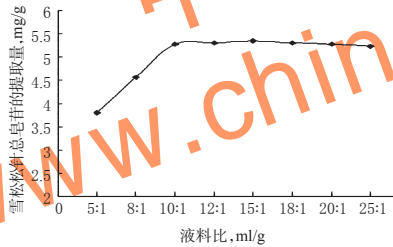


图 2 液料比对雪松松针总皂苷提取量的影响
Fig 2 The effects of solvent-material ratio on the content of TSPNCD

由图 2 可知,随着液料比的增大,雪松松针总皂苷的提取量逐渐增加,当液料比为 10:1 时总皂苷的提取量达到最大值;之后随着液料比的增大,总皂苷的提取量变化不大,逐渐趋于平衡状态。故本试验选择液料比为 10:1 较为适宜。

2.3.3 提取时间对雪松松针总皂苷提取量的影响 准确称取雪松松针粉末 1.00 g,共 6 份,以 70% 乙醇作为提取溶剂,以液料比为 10:1,超声提取时间分别定为 15、30、45、60、75、90 min,提取 2 次。然后按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,再分别精密吸取各供试品溶液 0.2 ml,按“2.2.2”项下操作方法测定吸光度,并计算雪松松针总皂苷的含量,结果见图 3。

由图 3 可知,随着提取时间的增加,雪松松针中总皂苷的提取量逐渐增大,当提取时间为 60 min 时总皂苷的提取量达到最大值;之后随着提取时间的增加,总皂苷的含量并没有发生明显的变化。故确定本试验的超声提取时间为 60 min。

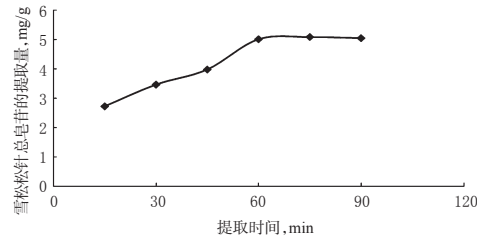


图 3 提取时间对雪松松针总皂苷提取量的影响
Fig 3 The effects of extraction time on the content of TSPNCD

2.3.4 提取次数对雪松松针总皂苷提取量的影响 准确称取雪松松针粉末 1.00 g,共 3 份,以 70% 乙醇作为提取溶剂,液料比为 10:1,超声提取时间为 60 min,提取 3 次。分次按“2.1.1”项下方法操作制备供试品溶液,然后分别精密吸取各供试品溶液 0.2 ml,按“2.2.2”项下操作方法测定吸光度,计算雪松松针总皂苷的含量。结果,提取第 1 次测得含量分别为 38.03、37.15、35.97 $\mu\text{g/g}$,平均含量为 37.05 $\mu\text{g/g}$;提取第 2 次测得含量分别为 27.44、25.38、26.56 $\mu\text{g/g}$,平均含量为 26.46 $\mu\text{g/g}$;提取第 3 次后均未检测到雪松松针总皂苷。结果表明,在提取 2 次后即可将雪松松针中的总皂苷提取完全,故本试验中确定提取次数为 2 次。

2.4 响应面法优化提取工艺

2.4.1 方案设计及试验结果 参考单因素试验结果及文献方法^[9-11],选择乙醇体积分数(X_1 ,%)、液料比(X_2 ,ml/g)、提取时间(X_3 ,min)为因素,采用 Box-Behnken 法进行 3 因素 3 水平的试验设计,以雪松松针总皂苷含量(Y)为响应值进行响应面分析。因素与水平见表 1, Box-Behnken 试验设计与结果见表 2。

表 1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels			
因素	水平		
	-1	0	1
X_1 , %	60	70	80
X_2 , ml/g	1:5	1:10	1:15
X_3 , min	45	60	75

表 2 Box-Behnken 试验设计与结果

Tab 2 Design and results of Box-Behnken design				
试验号	X_1	X_2	X_3	总皂苷含量,mg/g
1	1	1	0	5.74
2	1	-1	0	3.98
3	0	0	0	6.16
4	-1	-1	0	3.75
5	0	0	0	6.06
6	0	1	1	5.66
7	0	-1	1	3.10
8	-1	1	0	4.77
9	-1	0	1	3.80
10	1	0	1	4.82
11	0	1	-1	3.57
12	0	0	0	6.21
13	-1	0	-1	2.95
14	1	0	-1	3.32
15	0	-1	-1	3.44
16	0	0	0	6.13
17	0	0	0	6.19

2.4.2 模型的建立及显著性分析 利用 Design-Expert 8.0.5 软

件对表2数据进行回归统计分析。得二元多项回归模型为 $Y=-58.98+1.20X_1-0.06X_2+0.69X_3+3.70\times10^{-3}X_1X_2+1.08\times10^{-3}X_1X_3+8.10\times10^{-3}X_2X_3-9.05\times10^{-3}X_1^2-0.027X_2^2-6.77\times10^{-3}X_3^2$, $R^2=0.994\ 2$,表明回归方程拟合度良好,结果可靠。方差分析结果见表3。

表3 方差分析结果

方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	25.10	9	2.79	303.53	<0.000 1	极显著
X_1	0.84	1	0.84	91.25	<0.000 1	极显著
X_2	3.74	1	3.74	407.01	<0.000 1	极显著
X_3	2.10	1	2.10	228.66	<0.000 1	极显著
X_1X_2	0.14	1	0.14	14.90	0.006 2	非常显著
X_1X_3	0.11	1	0.11	11.49	0.011 6	显著
X_2X_3	1.48	1	1.48	160.65	<0.000 1	极显著
X_1^2	3.45	1	3.45	375.28	<0.000 1	极显著
X_2^2	1.98	1	1.98	215.00	<0.000 1	极显著
X_3^2	9.76	1	9.76	1 062.11	<0.000 1	极显著
残差	0.064	7	9.19×10^{-3}			
失拟项	0.051	3	0.017	4.88	0.079 9	
误差	0.014	4	3.45×10^{-3}			
总和	25.17	16				
校正系数	$R^2=0.994\ 2$	$R_{adj}=0.967\ 0$				

由表3可知,模型 $P<0.000\ 1$,表明试验建立的模型极显著;失拟项 $P=0.079\ 9>0.05$,没有显著性影响,说明数据没有异常点;一次项 X_1 、 X_2 、 X_3 和二次项 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 均对试验结果有极显著影响($P<0.000\ 1$);BC对试验结果有极显著影响($P<0.000\ 1$), X_1X_2 对试验结果有非常显著的影响($P<0.01$), X_1X_3 对试验结果有显著影响($P<0.05$),这说明考察因素对试验结果存在交互作用。模型的校正系数 $R^2=0.994\ 2$,表明回归方程拟合度良好,可以用此模型分析和预测雪松松针总皂苷的提取工艺。

2.4.3 响应面分析 根据回归模型作出相应的响应面图和等高图,考察拟合响应面的形状,分析超声提取各因素对雪松松针总皂苷含量的影响,结果见图4。

等高线的形状可以反映交互作用的强弱,椭圆形表示两因素交互作用显著,圆形则表示交互作用不显著。由图4可以看出,各因素间交互作用显著,作用大小排列依次为 $X_2X_3>X_1X_2>X_1X_3$ 。由响应面图可知,超声提取时间对雪松松针总皂苷的含量影响最为显著,表现为曲线较陡;乙醇浓度和料液比对雪松松针中总皂苷含量的影响显著,表现为曲线平滑。

2.4.4 验证试验 利用Design-Expert 8.0.5软件对回归方程进行求解,得到雪松松针总皂苷的最优提取工艺条件为:乙醇体积分数72.26%,液料比13.39:1,超声提取2次、每次64.77 min。考虑到实际试验条件的可操作性,将工艺参数调整为:乙醇体积分数73%,液料比13:1,超声提取2次、每次65 min。在此最优提取工艺条件下,取10 g样品进行工艺验证试验,平行5次,计算得雪松松针中总皂苷的平均含量为6.693 mg/g($RSD=2.84\%,n=5$),与预测值6.508 mg/g相差0.185 mg/g,相对误差为2.84%,表明优选工艺条件准确、可靠。

2.5 雪松松针总皂苷对不同肿瘤细胞增殖的抑制作用

参考文献方法^[12-15]进行细胞复苏、传代、消化并计数。分

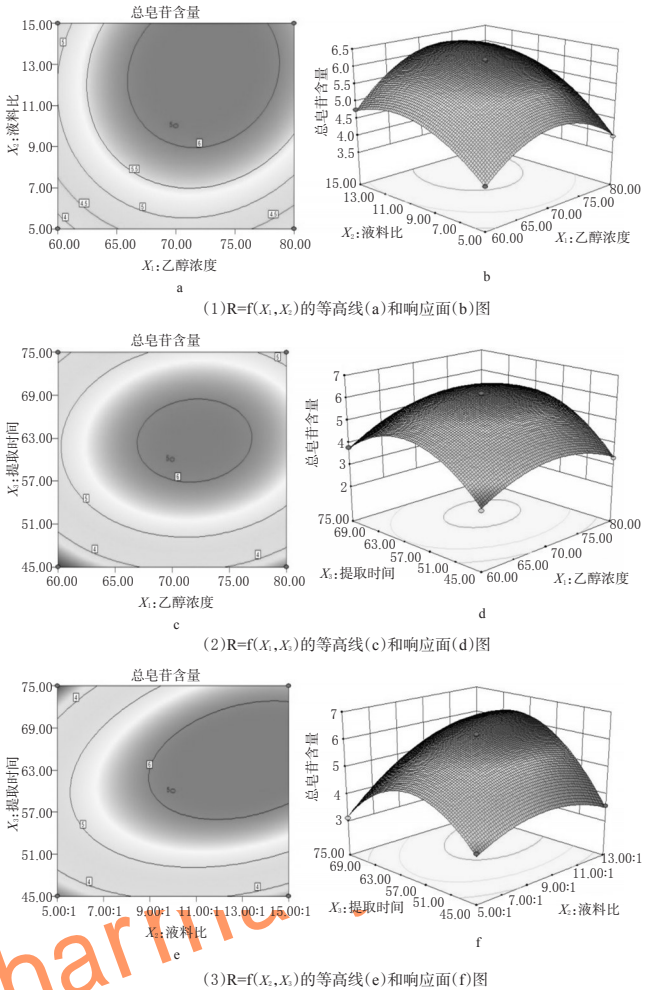


图4 因素和响应值关系的等高线图和响应面图
Fig 4 Contour map and response surface plot of the relationship of factors with response value

别取对数生长期的人胃癌MKN45细胞、人肺癌A549细胞、人肝癌HepG2细胞,用0.25%胰酶消化后离心,除去上清液,用培养基(A549、HepG2细胞用RPMI 1640培养基,MKN45细胞用DMEM培养基)稀释成 5×10^4 个/ml的细胞悬液,以每孔100 μ l接种于96孔培养板中,并置于37℃、5%CO₂培养箱中培养过夜。弃去培养液,将细胞分为试验组、阴性对照组和空白对照组,其中A549细胞试验组分别加入终质量浓度为10、20、40、80、120 μ g/ml的雪松松针总皂苷溶液,HepG2和MKN45细胞试验组分别加入终质量浓度为40、80、120、160、200 μ g/ml的雪松松针总皂苷溶液。每个质量浓度设3个复孔,同时设1个平行空白对照孔,阴性对照孔则加入含0.1%DMSO的完全培养基。然后将96孔板置于37℃、5%CO₂培养箱中继续培养48 h后,各孔加入CCK-8溶液10 μ l,混匀,置于培养箱中继续培养2 h。用酶标仪于450 nm波长处测定吸光度(A)值,计算细胞增殖抑制率:细胞增殖抑制率=[1-(A_{试验组}-A_{空白对照组})/(A_{阴性对照组}-A_{空白对照组})] \times 100%。应用SPSS 19.0软件求其半数抑制浓度(IC₅₀),结果见图5。

结果显示,雪松松针总皂苷对人肺癌A549细胞、人肝癌HepG2细胞和人胃癌MKN45细胞的增殖均有较强的抑制作用,呈明显的浓度依赖关系,抑制作用大小依次为A549>

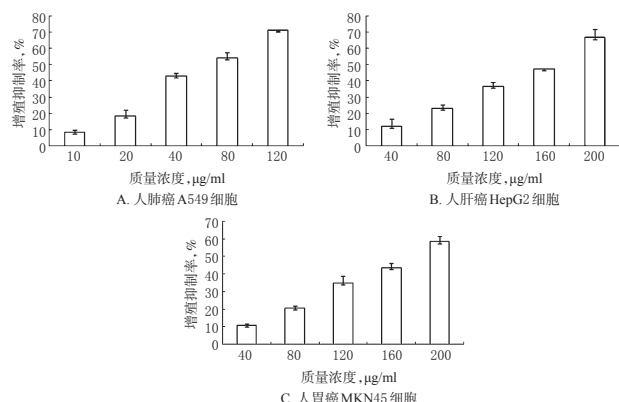


图5 雪松松针总皂苷对不同肿瘤细胞生长的抑制作用

Fig 5 Inhibitory effects of TSPNCD on *in vitro* proliferation of different tumor cells

HepG2>MKN45, IC_{50} 分别为 (63.98 ± 6.79) 、 (154.91 ± 10.20) 、 (176.32 ± 14.26) $\mu\text{g/ml}$; 其中雪松松针总皂苷对 A549 细胞抑制作用最强, 当质量浓度为 120 $\mu\text{g/ml}$ 时, 抑制率达 71.29%。

3 讨论

3.1 雪松松针总皂苷的提取工艺优化

许文凤等^[16]采用正交试验对雪松松针总三萜皂苷的提取工艺进行了研究, 得到的最佳提取工艺条件为浸提温度 70 $^{\circ}\text{C}$ 、浸提时间 2 h、料液比 1:20、乙醇体积分数 70%, 该工艺不但费时且得率较低。本研究在单因素试验的基础上, 采用 Box-Behnken 响应面法对雪松松针总皂苷的超声提取工艺参数进行了优化, 并通过回归方程的分析, 得到了其最佳工艺条件为乙醇体积分数 73%、液料比 13:1、提取 2 次、每次提取 65 min。在此条件下测得的总皂苷含量为 6.693 mg/g, 与模型预测值相接近, 说明此方法具有较高的精确度和预测性, 经验证工艺合理、可行。

3.2 雪松松针总皂苷的体外抗肿瘤活性

本试验采用 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖, 与较传统的 MTT 法比较具有操作简便、无损失、结果准确、重现性好等特点^[17]。结果显示, 雪松松针总皂苷对人肺癌 A549 细胞、人肝癌 HepG2 细胞和人胃癌 MKN45 细胞的增殖均有较强的抑制作用, 其中尤以对 A549 细胞抑制作用最强; 当雪松松针总皂苷质量浓度为 120 $\mu\text{g/ml}$ 时, 增殖抑制率达 71.29%。这提示雪松松针总皂苷在治疗人肺癌方面具有较好的应用前景。然而, 有关雪松松针总皂苷抗肿瘤的物质基础、体内抗肿瘤作用及其机制的研究尚未进行, 有待在后续研究中完成。

参考文献

- [1] 郑万, 傅立国. 中国植物志: 第七卷[M]. 北京: 科学出版社, 1978: 167.
- [2] 白朝辉, 石晓峰, 刘东彦, 等. 雪松松针的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国药师, 2012, 15(12): 1 791.
- [3] 李师, 刘东彦, 石晓峰, 等. 雪松松针正丁醇部位的化学成分研究[J]. 中草药, 2014, 45(18): 2 602.
- [4] 权恺, 刘群. 人参皂苷抗癌活性的最新研究进展[J]. 医学研究生学报, 2015, 28(4): 427.
- [5] 吴正平. 柴胡皂苷的药理研究进展[J]. 宜春学院学报: 自然科学版, 2007, 29(2): 126.
- [6] 杨琳, 林万程, 施家乐. 三七总皂苷药理作用的研究进展[J]. 安徽医药, 2014, 18(5): 963.
- [7] 李露, 范红艳, 戴婷, 等. 绞股蓝总皂苷的药理作用研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2015, 36(2): 147.
- [8] 杨安平, 柯俊东. 响应曲面法优选黄芩总皂苷的提取工艺[J]. 天津药学, 2015, 27(2): 6.
- [9] 廖红丹. 响应面法优化茯苓苦瓜子胶囊粗多糖和总皂苷的综合提取工艺[J]. 中国药房, 2016, 27(1): 92.
- [10] 韦蒙, 许新恒, 李俊龙, 等. 滇重楼茎叶总皂苷提取工艺优化及其体外抗氧化活性分析[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(10): 13 794.
- [11] 李玉泽, 李真, 张东东, 等. 响应面法优选竹根七总皂苷提取工艺[J]. 中南药学, 2015, 13(8): 811.
- [12] 刘明健, 瞿鼎, 陈彦, 等. 丁酰半乳糖酯修饰的薏苡仁组分微乳的制备及其体外抗肿瘤活性研究[J]. 中草药, 2015, 46(18): 2 696.
- [13] 姜程曦, 宋娇, 林良义, 等. 以成纤维细胞生长因子受体 1 为靶点的姜黄素类似物的抗肿瘤活性研究[J]. 中草药, 2015, 46(16): 2 434.
- [14] 李辉敏, 姜登钊, 殷嫦嫦. 刺头复叶耳蕨总提取物与总黄酮体外抗肿瘤活性的比较研究[J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(9): 1 037.
- [15] 严铭铭, 吴程彦, 尉忠贤, 等. 黄花草木犀总皂苷体外抗肿瘤作用研究[J]. 吉林中医药, 2015, 35(2): 191.
- [16] 许文凤, 王文君, 徐明生, 等. 雪松松针总三萜皂苷的提取工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(6): 312.
- [17] 熊建文, 肖化, 张镇西. MTT 法和 CCK-8 法检测细胞活性之测试条件比较[J]. 激光生物学报, 2007, 16(5): 559.

(收稿日期: 2016-05-02 修回日期: 2016-07-26)

(编辑: 林 静)

《中国药房》杂志——《化学文摘》(CA) 收录期刊, 欢迎投稿、订阅