

柴胡桂枝汤挥发油的GC-MS分析及对人肺腺癌A549细胞体外增殖的抑制作用研究^Δ

文冉^{1*},李壮壮²,杜以晴¹,杨勇¹,容蓉¹,吕青涛^{1#}(1.山东中医药大学药学院,济南 250355;2.中国海洋大学药学院,山东青岛 266100)

中图分类号 R285;R932 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)01-0029-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.01.06

摘要 目的:研究复方柴胡桂枝汤挥发油的组成成分,并评价其对人肺腺癌A549细胞体外增殖的抑制作用。方法:根据2015年版《中国药典》(四部)通则2204挥发油测定法中甲法提取柴胡桂枝汤中的挥发油。采用气相色谱-质谱联用法(GC-MS)结合Kováts指数分析其挥发油成分,并采用峰面积归一化法计算各成分的相对含量。以不同质量浓度顺铂(4、8、16、32、64 mg/L)为阳性对照,采用MTT法检测不同质量浓度柴胡桂枝汤挥发油(25、50、100、200、400 mg/L)作用48 h后对A549细胞体外增殖的抑制作用;另设阴性对照组(加细胞但不加药物)。结果:从挥发油中共分离出71个成分,鉴定出其中59个成分,其峰面积之和占总峰面积的84.99%。其中,相对含量较高的成分为芳姜黄烯(17.65%)、 β -甜没药烯(9.57%)、 β -罗勒烯(7.05%)、 α -姜黄烯(5.35%)、2,5-二甲苯基甲醛(4.24%)、异丁酸芳樟酯(2.70%)、 α -雪松烯(2.48%)、 δ -杜松烯(2.07%)。与阴性对照组比较,4~64 mg/L顺铂组和25~400 mg/L柴胡桂枝汤挥发油组细胞的增殖率均显著降低($P<0.05$);顺铂和柴胡桂枝汤挥发油对A549细胞体外增殖的半数抑制浓度分别为10.150、73.526 mg/L。结论:柴胡桂枝汤挥发油中主要以芳姜黄烯、 β -甜没药烯、 β -罗勒烯、 α -姜黄烯等成分为主,其对A549细胞的体外增殖具有一定的抑制作用。

关键词 柴胡桂枝汤;挥发油;气相色谱-质谱联用法;Kováts指数;人肺腺癌A549细胞

GC-MS Analysis of Volatile Oil from Chaihu Guizhi Decoction and Study on Inhibitory Effects on *in vitro* Proliferation of Human Lung Adenocarcinoma A549 Cells

WEN Ran¹, LI Zhuangzhuang², DU Yiqing¹, YANG Yong¹, RONG Rong¹, LYU Qingtao¹(1. College of Pharmacy, Shandong University of TCM, Jinan 250355, China; 2. College of Pharmacy, Ocean University of China, Shandong Qingdao 266100, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the composition of the volatile oil from Compound chaihu guizhi decoction, and to evaluate its *in vitro* anti-proliferative activity on human lung adenocarcinoma A549 cells. **METHODS:** The volatile oil from Chaihu guizhi decoction was extracted according to the steam distillation method of general rules 2004 in the 2015 edition of *Chinese Pharmacopoeia* (part IV). The volatile oil components were analyzed by GC-MS combined with Kováts index, and the relative content of each component was calculated by peak area normalization method. Using different concentrations of cisplatin (4, 8, 16, 32, 64 mg/L) as positive control, MTT assay was used to detect the inhibitory effects of different concentrations of volatile oil from Chaihu guizhi decoction (25, 50, 100, 200, 400 mg/L) on *in vitro* proliferation of A549 cell after 48 h of treatment. Negative control group (with cells but without drugs) was set up. **RESULTS:** A total of 71 chemical components were isolated from the volatile oil, among which there were 59 compounds identified, sum of peak areas accounting for 84.99% of the total peak area. The compounds with relatively high content included ar-curcumene (17.65%), β -bisabolene (9.57%), β -ocimene (7.05%), α -curcumene (5.35%), 2,5-dimethylbenzaldehyde (4.24%), linalyl isobutyrate (2.70%), α -cedrene (2.48%), δ -cadinene (2.07%). Compared with negative control group, the proliferation rate of cells were decreased significantly in 4-64 mg/L cisplatin groups and 25-400 mg/L volatile oil from Chaihu guizhi decoction groups ($P<0.05$). IC_{50} of cisplatin and volatile oil from Chaihu guizhi decoction to *in vitro* proliferation of A549 cells were 10.150 and 73.526 mg/L. **CONCLUSIONS:** The volatile oil from Chaihu guizhi decoction mainly includes ar-curcumene, β -bisabolene, β -ocimene, α -curcumene, which shows certain inhibitory effect on *in vitro* proliferation of A549 cells.

KEYWORDS Chaihu guizhi decoction; Volatile oil; GC-MS; Kováts index; Human lung adenocarcinoma A549 cells

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81873220, No.81774167);山东省重大科技创新工程项目(No.2018CXGC1307)

* 硕士研究生。研究方向:天然药物化学成分及化学分析。电话:0531-89628081。E-mail:1907602151@qq.com

通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:中药及复方活性成分与质量控制。电话:0531-89628081。E-mail:luqingtao9@163.com

柴胡桂枝汤出自《伤寒论》,为东汉末年中医名家张仲景创立的经典方剂,由小柴胡汤和桂枝汤加减而来,全方由柴胡、桂枝、黄芩、人参、甘草、半夏、生姜、芍药、大枣共9味中药组成^[1]。随着人们对经方的深入研究,

发现柴胡桂枝汤在现代临床可用于治疗呼吸系统类、神经系统类、消化系统类和运动系统类等疾病,如其在感冒^[2]、失眠^[3]、抑郁症^[4]、功能性消化不良^[5]、颈椎病^[6]等的治疗中具有独特优势。另有报道发现,柴胡桂枝汤中桂枝的挥发性成分桂皮醛联合热疗,可通过调控活性氧和丝裂原活化蛋白激酶家族来诱导非小细胞肺癌 A549 细胞的凋亡^[7];生姜中的 8-姜辣素可通过表皮生长因子/信号转导与转录活化因子/细胞外调节蛋白激酶通路来调节结直肠癌细胞的增殖和迁移^[8],而生姜中的 6-姜辣素可通过诱导细胞周期阻滞、活性氧的产生和线粒体膜电位的破坏从而促进人胃癌 (AGS) 细胞的凋亡^[9]。由此可见,柴胡桂枝汤挥发油的单一成分具有一定的抗癌药效。那么,柴胡桂枝汤挥发油是否具有体外抗癌作用值得探究,加之目前针对柴胡桂枝汤挥发油组成的基础研究较少,故本研究采用气相色谱-质谱法 (GC-MS) 对柴胡桂枝汤挥发油的成分进行分析,结合 Kováts 指数 (KI 值) 对挥发油组分进行准确定性,为柴胡桂枝汤挥发油组成成分的研究提供基础数据,同时评价该挥发油对人肺腺癌 A549 细胞体外增殖的抑制作用,旨在为柴胡桂枝汤的进一步开发利用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

7000B 型三重四极杆 GC-MS 联用仪 (美国 Agilent 公司); AE240 型十万分之一电子天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司); 立式压力蒸汽灭菌器 (上海申安医疗器械厂); 热电 Thermo MK3 酶标仪 (上海赛默飞生物有限公司); HF90 型 CO₂ 恒温培养箱 (上海力申科学仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

柴胡 (批号: 17090609)、桂枝 (批号: 17092603)、黄芩 (批号: 17041516)、甘草 (批号: 17082005)、生姜 (批号: 17030803)、人参 (批号: 17031503)、大枣 (批号: 17052411)、半夏 (批号: 17071501)、白芍 (批号: 17072801) 等饮片均购自山东省中医院,由山东中医药大学药学院李峰教授鉴定均符合 2015 年版《中国药典》(一部) 标准; 注射用顺铂 (山东齐鲁制药有限公司, 批号: H37021358, 规格: 20 mg); 正构烷烃混合标准品 C₈~C₃₆ (美国 Sigma-Aldrich 公司, 批号: 11521014, 纯度: ≥ 98%); MTT 试剂 (江苏凯基生物技术有限公司, 批号: 14069927); 胎牛血清 (FBS, 美国 HyClone 公司, 批号: LT22906); DMEM 高糖培养基 (美国 Gibco 公司, 批号: 8118192); 二甲基亚砜 (DMSO, 北京索莱宝科技有限公司, 批号: 6768521); 其余试剂均为分析纯, 水为自制双蒸水。

1.3 细胞

人肺腺癌细胞株 A549 购自山东省中医院。

2 方法

2.1 柴胡桂枝汤挥发油的提取

取柴胡桂枝汤处方 10 倍量的药材, 粉碎后过三号筛, 加入 8 倍质量水, 按 2015 年版《中国药典》(四部) 通则 2204 挥发油测定法中甲法^[10]提取该复方中的挥发油。加热回流提取 8 h 后, 冷却, 收集挥发油, 经无水硫酸钠干燥后, 称质量并计算其得率 (挥发油质量/药材总质量×100%) 为 1.12%。

2.2 溶液的制备

2.2.1 挥发油样品溶液 取挥发油样品适量, 用三氯甲烷稀释成质量浓度为 65 g/L 的溶液 (以挥发油质量计), 作为样品溶液, 待 GC-MS 进样分析。

2.2.2 正构烷烃 C₈~C₃₆ 标准品溶液 取正构烷烃标准品 C₈~C₃₆ 适量, 加三氯甲烷稀释成 5 mg/L 的标准品溶液, 待 GC-MS 进样分析。

2.2.3 体外增殖试验挥发油母液 取挥发油样品适量, 用 DMSO 稀释, 制备成质量浓度为 35 g/L (以挥发油质量计) 的溶液, 作为体外抗增殖试验的母液。

2.3 柴胡桂枝汤挥发油的 GC-MS 分析

2.3.1 GC 条件 石英毛细管色谱柱: Agilent HP-5 MS (250 μm×0.25 μm, 30 m); 载气: 氦气 (纯度为 99.999%); 载气流速: 1.0 mL/min; 载气压力: 7.652 2 psi; 隔膜吹扫速率: 1 mL/min; 进样口温度: 250 °C; 升温程序: 初始温度 100 °C 并保持 10 min, 以 2 °C/min 速率升至 150 °C 并保持 15 min, 再以 2 °C/min 速率升至 280 °C 并保持 18 min; 进样量: 1.0 μL; 分流比: 20:1; 溶剂延迟时间: 3 min。

2.3.2 MS 条件 离子源: 电子轰击源 (EI); 离子源温度: 230 °C; 电离能量: 70 eV; 传输线温度: 280 °C; 扫描范围: 质荷比 (*m/z*) 35~1 000。

2.3.3 样品分析 在全扫描 (SCAN) 检测模式下, 分别取“2.2.1”项下挥发油样品溶液和“2.2.2”项下正构烷烃 C₈~C₃₆ 标准品溶液, 按“2.3.1”“2.3.2”项下条件进样分析, 记录总离子流图。根据 Vanden Dool 和 Kratz 线性程序升温的 KI 原理, 利用公式求得各成分的 KI 值 [KI = 100*n* + 100(*t_x* - *t_n*)/(*t_{n+1}* - *t_n*), 式中 *n* 为碳原子数, *t_x* 为被分析组分 *x* 的保留时间, *t_n*、*t_{n+1}* 分别为碳原子数为 *n* 和 *n*+1 的正构烷烃标准品的保留时间], 并与 NIST 11 质谱库中检索得到的 KI 值进行比对, 从而对挥发油成分进行定性分析, 最后通过峰面积归一化法计算各组分的相对含量。

2.4 柴胡桂枝汤挥发油对 A549 细胞体外增殖的抑制作用考察

将处于对数生长期的 A549 细胞制备成 5×10⁴ 个/mL 的单细胞悬液, 以 100 μL/孔接种于 96 孔培养板中 (取 2 块培养板, 分别用来考察顺铂和柴胡桂枝汤挥发油的体

外增殖抑制作用),将细胞置于37℃、5%CO₂细胞培养箱中培养24h待细胞贴壁后,弃上清,然后将细胞分为顺铂组、柴胡桂枝汤挥发油组(分别用1块板),试验均设阴性对照组。顺铂组分别添加含10%FBS和不同质量浓度顺铂(4、8、16、32、64 mg/L,剂量参考文献[11]设置)的DMEM培养基,柴胡桂枝汤挥发油组分别添加含10%FBS和不同质量浓度挥发油(25、50、100、200、400 mg/L,以挥发油质量计,剂量由前期试验摸索得出)的DMEM培养基,阴性对照组仅加入含10%FBS和0.1% DMSO的DMEM培养基(记为0 mg/L组),并另设不含细胞但加入含10%FBS和0.1% DMSO的DMEM培养基的空白对照组,每组均设置5个复孔。加药后,将各组细胞置于37℃、5%CO₂细胞培养箱中培养48h,再在每孔避光加入MTT溶液(5 mg/mL)10 μL,继续培养4h,弃上清;每孔加入DMSO溶液150 μL,于摇床上振摇15 min,采用酶标仪测定490 nm波长处各孔的吸光度(A),计算各组细胞的增殖抑制率[增殖抑制率=(A_{阴性对照}-A_{挥发油})/(A_{阴性对照}-A_{空白对照})×100%],并采用GraphPad Prism 7.00软件计算药物的半数抑制浓度(IC₅₀)。试验重复3次。

2.5 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析。试验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用LSD检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 柴胡桂枝汤挥发油成分的GC-MS分析结果

在柴胡桂枝汤挥发油中共分离出71个成分,通过质谱库检索和人工图谱解析,并结合KI值比对,初步鉴定了其中59个挥发性成分,占挥发油总峰面积的84.99%,包括烯炔类成分(序号1~18的化合物)的相对含量总和为51.47%、醛类成分(序号19~33的化合物)的相对含量总和为13.62%、醇类成分(序号34~43的化合物)的相对含量总和为5.29%、酯类成分(序号44~49的化合物)的相对含量总和为6.68%、酸类成分(序号50~53的化合物)的相对含量总和为2.14%、酚类成分(序号54~55的化合物)的相对含量总和为0.77%、其他类成分(序号56~59的化合物)的相对含量总和为5.03%。其中,含量较高的化合物为芳姜黄烯(17.65%)、β-甜没药烯(9.57%)、β-罗勒烯(7.05%)、α-姜黄烯(5.35%)、2,5-二甲苯基甲醛(4.24%)、异丁酸芳樟酯(2.70%)、α-雪松烯(2.48%)、δ-杜松烯(2.07%)。正构烷烃混合标准品总离子流图见图1,柴胡桂枝汤挥发油总离子流图见图2,柴胡桂枝汤挥发油成分鉴定和相对含量测定结果见表1。

3.2 柴胡桂枝汤挥发油对A549细胞体外增殖的抑制作用

与阴性对照组比较,顺铂不同质量浓度组和柴胡桂

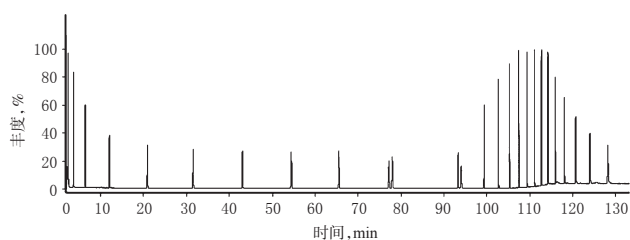


图1 正构烷烃C₈~C₃₆标准品的总离子流图

Fig 1 TIC chromatograms of C₈-C₃₆ control

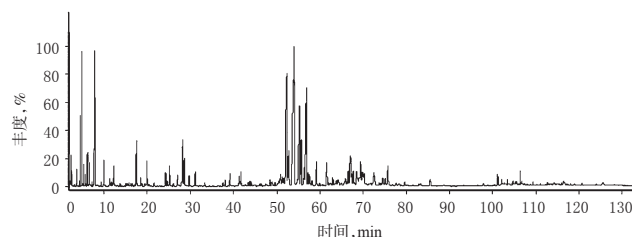


图2 柴胡桂枝汤挥发油的总离子流图

Fig 2 TIC chromatograms of volatile oil from Chaihu guizhi decoction

表1 柴胡桂枝汤挥发油成分鉴定和相对含量测定结果
Tab 1 Component identification and relative content determination results of volatile oil from Chaihu guizhi decoction

序号	成分	t _r ,min	相对含量,%	分子式	CAS号	保留指数	
						KI	KI ⁺
1	芳姜黄烯	52.35	17.65	C ₁₅ H ₂₂	4176-6-1	1 482	1 472
2	β-甜没药烯	55.23	9.57	C ₁₅ H ₂₄	495-61-4	1 507	1 500
3	β-罗勒烯	7.83	7.05	C ₁₀ H ₁₆	13877-91-3	1 026	1 024
4	α-姜黄烯	58.16	5.35	C ₁₅ H ₂₂	644-30-4	1 534	1 539
5	α-雪松烯	48.41	2.48	C ₁₅ H ₂₄	50894-66-1	1 448	1 447
6	δ-杜松烯	56.36	2.07	C ₁₅ H ₂₄	483-76-1	1 518	1 514
7	愈创木烯	66.56	1.31	C ₁₅ H ₂₄	88-84-6	1 609	1 651
8	β-花柏烯	51.28	1.12	C ₁₅ H ₂₄	18431-82-8	1 473	1 474
9	α-葎澄茄油烯	39.15	0.91	C ₁₅ H ₂₄	17699-14-8	1 366	1 366
10	β-榄香烯	41.32	0.83	C ₁₅ H ₂₄	515-13-9	1 385	1 387
11	2-龙脑烯	5.29	0.63	C ₁₀ H ₁₆	4501-58-1	931	932
12	α-葎草烯	48.86	0.56	C ₁₅ H ₂₄	6753-98-6	1 451	1 454
13	β-月桂烯	5.73	0.40	C ₁₀ H ₁₆	123-35-3	976	979
14	α-异松油烯	11.30	0.39	C ₁₀ H ₁₆	586-62-9	1 087	1 078
15	β-金合欢烯	49.60	0.34	C ₁₅ H ₂₄	18794-84-8	1 458	1 449
16	(+)-香橙烯	47.49	0.30	C ₁₅ H ₂₄	489-39-4	1 439	1 439
17	姜烯	43.36	0.27	C ₁₅ H ₂₄	495-60-3	1 403	1 492
18	β-人参烯	37.55	0.27	C ₁₅ H ₂₄	117-39-5	1 352	1 385
19	2,5-二甲苯基甲醛	4.93	4.24	C ₁₀ H ₁₀ O	5779-94-2	946	948
20	苯甲醛	4.53	1.86	C ₇ H ₆ O	100-52-7	960	982
21	α-柠檬醛	28.59	1.83	C ₁₀ H ₁₆ O	5392-40-6	1 272	1 249
22	柠檬醛	25.21	1.38	C ₁₀ H ₁₆ O	5392-40-5	1 241	1 241
23	正己醛	2.46	0.57	C ₆ H ₁₂ O	66-25-1	803	806
24	香茅醛	18.53	0.52	C ₁₀ H ₁₆ O	106-23-0	1 174	1 132
25	庚醛	3.77	0.51	C ₇ H ₁₄ O	111-71-7	903	905
26	3-甲氧基肉桂醛	12.09	0.41	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	56578-36-0	1 101	1 170
27	肉桂醛	6.04	0.38	C ₉ H ₈ O	104-55-2	988	985
28	视黄醛	102.26	0.38	C ₂₀ H ₃₀ O	116-31-4	2 088	2 066
29	邻甲氧基肉桂醛	24.65	0.38	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	1504-74-1	1 232	1 220
30	十二醛	44.08	0.34	C ₁₂ H ₂₂ O	112-54-9	1 410	1 386
31	α-己基肉桂醛	83.32	0.28	C ₁₃ H ₂₀ O	101-86-0	1 739	1 748

续表 1

Continued tab 1

序号	成分	t_r, min	相对含量, %	分子式	CAS号	保留指数	
						KI	KI*
32	α -(2-甲基亚丙基)-苯乙醛	21.60	0.28	$C_{11}H_{16}O$	26643-91-4	1 207	1 183
33	α -环柠檬醛	11.94	0.26	$C_{10}H_{16}O$	432-24-6	1 099	1 096
34	7-杜松醇	65.93	1.54	$C_{15}H_{26}O$	5937-11-1	1 604	1 606
35	香叶醇	27.08	0.83	$C_{15}H_{26}O$	106-24-1	1 258	1 232
36	β -桉叶油醇	63.81	0.71	$C_{15}H_{26}O$	473-15-4	1 585	1 580
37	视黄醇	102.05	0.37	$C_{20}H_{30}O$	68-26-8	2 081	2 053
38	α -红没药醇	71.44	0.36	$C_{15}H_{26}O$	515-69-5	1 651	1 641
39	香叶基香叶醇	110.20	0.33	$C_{20}H_{30}O$	24034-73-9	2 252	2 201
40	沉香螺醇	62.43	0.31	$C_{15}H_{26}O$	78-70-6	1 572	1 570
41	人参炔醇	104.70	0.30	$C_{17}H_{30}O$	21852-80-2	2 699	2 383
42	α -杜松醇	59.94	0.28	$C_{15}H_{26}O$	5937-11-1	1 550	1 579
43	α -松油醇	17.75	0.27	$C_{10}H_{18}O$	10482-56-1	1 165	1 172
44	异丁酸芳樟酯	19.93	2.70	$C_{14}H_{20}O_2$	78-35-3	1 190	1 194
45	单油酸甘油酯	114.21	1.13	$C_{21}H_{40}O_2$	111-03-5	3 202	3 214
46	邻苯二甲酸二丁酯	73.68	1.04	$C_{16}H_{22}O_4$	84-74-2	1 671	1 671
47	(-)-乙酸龙脑酯	29.74	0.66	$C_{12}H_{20}O_2$	5655-61-8	1 283	1 273
48	肉豆蔻酸丁酯	106.35	0.60	$C_{18}H_{34}O_2$	110-36-1	2 452	2 366
49	香茅醇乙酸酯	38.08	0.56	$C_{12}H_{22}O_2$	67650-82-2	1 357	1 331
50	4-乙酰基苯甲酸	24.27	0.93	$C_{10}H_{10}O_3$	586-89-0	1 235	1 236
51	芥酸	125.45	0.51	$C_{22}H_{42}O_2$	112-86-7	2 325	2 547
52	视黄酸	107.87	0.44	$C_{20}H_{30}O_2$	302-79-4	2 210	2 252
53	硬脂酸	105.46	0.27	$C_{18}H_{36}O_2$	1957-11-4	2 179	2 187
54	1,4 α -二甲基-1,7-异丙基-1-萘酚	77.64	0.48	$C_{15}H_{18}O$	934557-66-1	1 703	1 714
55	异丁子香酚	9.36	0.29	$C_{10}H_{12}O_2$	97-54-1	1 053	1 051
56	冰片	17.54	3.31	$C_{10}H_{16}O$	507-70-0	1 162	1 160
57	2-十一烷酮	31.12	0.98	$C_{11}H_{22}O$	112-12-9	1 296	1 274
58	对异丙基甲苯	7.59	0.45	$C_{10}H_{14}$	99-87-6	1 022	1 025
59	异冰片	15.80	0.29	$C_{10}H_{16}O$	124-76-5	1 143	1 146

注：“KI”为公式计算而得，“KI*”为质谱库检索而得

Note: “KI” is calculated by the formula; “KI*” is retrieved from the mass spectrometry library

枝汤挥发油不同质量浓度组细胞的增殖抑制率均显著升高($P < 0.05$),且均呈一定的浓度依赖趋势。经计算,顺铂和柴胡桂枝汤挥发油对 A549 细胞体外增殖的 IC_{50} 分别为 10.150、73.526 mg/L。各组细胞的体外增殖抑制率测定结果见表 2。

4 讨论

柴胡桂枝汤由 9 味中药组成,化学构成复杂,其挥发油中同系物及同分异构体众多,单凭质谱检索数据库无法达到较高匹配度。KI 值是一种重现性较好的定性参数,仅与固定相的性质、柱温有关^[12]。黄庆晖等^[13]采用超临界流体萃取法提取柴胡桂枝汤中的挥发油,依靠质谱数据库检索比对鉴定出挥发油中 28 种成分,占挥发油总成分的 85%。本研究采用 2015 年版《中国药典》(四部)通则 2204 挥发油测定法中甲法提取柴胡桂枝汤中的挥发油,采用 GC-MS 法测定并结合 KI 值对挥发油组分进行定性分析,共鉴定出了其中 59 个成分,其峰面积之和占总峰面积的 84.99%。相比之下,本研究更能够对挥发油中更多组分进行表征。虽然超临界流体萃取法与

表 2 各组细胞的体外增殖抑制率测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)Tab 2 Inhibition rate of *in vitro* proliferation of A549 cell in each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

考察样品	质量浓度,mg/L	增殖抑制率, %
顺铂	0 mg/L(阴性对照组)	1.932 ± 0.923
	4 mg/L	10.768 ± 1.612*
	8 mg/L	37.266 ± 1.883*
	16 mg/L	65.132 ± 1.955*
	32 mg/L	90.971 ± 2.131*
柴胡桂枝汤挥发油	0 mg/L(阴性对照组)	2.259 ± 1.912
	25 mg/L	18.692 ± 1.754*
	50 mg/L	26.233 ± 2.376*
	100 mg/L	70.481 ± 2.792*
	200 mg/L	80.428 ± 2.816*
	400 mg/L	81.304 ± 1.875*

注:与阴性对照组比较,* $P < 0.05$

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

传统提取方法相比,不残留有机溶剂、萃取速度快,但其局限性为设备造价高、对脂溶性成分溶解能力强、对水溶性成分溶解能力差。相比而言,按挥发油测定法中甲法提取挥发油的成本低廉,并且更贴近柴胡桂枝汤水煎服的用药方式。

近年来,多采用放化疗、靶向药物等手段治疗肺癌。顺铂是一种细胞周期非特异性的抗肿瘤药物,同时也是目前应用最广泛的实体瘤治疗药物之一^[14],故本研究以顺铂为阳性对照药物来考察柴胡桂枝汤挥发油对 A549 细胞体外增殖的影响。本研究结果显示,柴胡桂枝汤挥发油对 A549 细胞的体外增殖具有一定的抑制作用,该作用虽不及顺铂(IC_{50} 明显高于顺铂),但考虑到顺铂在肿瘤的治疗过程中易产生耐受现象,且对肝脏毒副作用大^[15],因此寻求有效、低毒的天然抗肿瘤药物仍有重要意义。

从《伤寒论》首载柴胡桂枝汤,到现代临床的古方新用,该方的适用范围逐渐扩大,其在神志病治疗方面也得到了运用^[16]。目前有临床报道称,柴胡桂枝汤挥发油可能通过降低兴奋性氨基酸/抑制性氨基酸的比值、增强自由基清除能力、阻止过氧化物生成以及减少一氧化氮(NO)神经毒性来发挥抗癫痫作用^[17-18]。柴胡桂枝汤挥发油组分较多,其中姜辣素类成分在柴胡桂枝汤挥发油定性分析结果中有体现且占比较大。有研究指出,柴胡桂枝汤挥发油中的姜辣素、单萜类、丁香酚等主要成分在抗氧化与抗癫痫过程中可能发挥了一定的作用^[19]。并且,姜辣素能够调节与癌症有关的多种细胞信号通路,包括核因子 κB (NF- κB)、信号转导子和转录激活因子 3(STAT3)、激活蛋白 1(AP-1)、 β -连环蛋白、表皮生长因子受体(EGFR)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和促炎介质肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、环氧合酶 2(COX-2)

等,发挥其体内外抗癌作用^[20]。据报道,在乌拉坦诱导的小鼠肺癌模型中,6-姜辣素可诱导小鼠肺组织中抗原重组蛋白1(MSR1)、脂肪酸受体蛋白36(CD36)和葡萄糖调节蛋白78(GRP78)的表达,升高肺泡细胞因子 γ -干扰素(IFN- γ)和白细胞介素12(IL-12)的水平,降低IL-10和转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)的水平,增加M1巨噬细胞比例,降低M2巨噬细胞比例,减少肺部肿瘤结节数和直径,改善肺组织病理结构异常^[21]。由此也可推测,姜辣素类成分或为柴胡桂枝汤挥发油抑制肺癌细胞A549增殖的潜在活性成分之一。

综上所述,本研究利用GC-MS法结合KI值鉴定出了柴胡桂枝汤挥发油中59个化学成分,其中以芳姜萜、 β -甜没药烯、 β -罗勒烯、 α -姜萜烯等成分为主;柴胡桂枝汤挥发油对A549细胞的体外增殖具有一定的抑制作用,但具体作用机制还需进一步的探究。

参考文献

[1] 姚海强.柴胡桂枝汤方证研究[D].北京:北京中医药大学,2013.

[2] 徐楠.柴胡桂枝汤加减治疗感冒后低热不解的临床效果观察[J].临床合理用药杂志,2019,12(23):45-46.

[3] 程元洪.柴胡桂枝汤治疗失眠[J].中国社区医师,2018,34(24):79-81.

[4] LIU Y, CAO CM, DING HJ. Study on the anti-depressant effect of Chaihu Guizhi decoction and its mechanisms of actions[J]. AJTCAM, 2014, 11(2):273-276.

[5] 邓一聪,董丽雪.功能性消化不良应用柴胡桂枝汤加减治疗的临床疗效观察[J].黑龙江中医药,2019,48(3):13-14.

[6] 刘显红,郑安敏.柴胡桂枝汤临床运用举隅[J].光明中医,2019,34(22):3499-3502.

[7] PARK J, BAEK SH. Combination therapy with cinnamaldehyde and hyperthermia induces apoptosis of A549 non-small cell lung carcinoma cells via regulation of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase family[J]. Int J Mol Sci, 2020. DOI: 10.3390/ijms21176229.

[8] HU SM, YAO XH, HAO YH, et al. 8-gingerol regulates colorectal cancer cell proliferation and migration through the EGFR/STAT/ERK pathway[J]. Int J Oncol, 2020, 56(1):390-397.

[9] MANSINGH DP, SUNANDA OJ, SALI VK, et al. [6]-Gingerol-induced cell cycle arrest, reactive oxygen species generation, and disruption of mitochondrial membrane potential are associated with apoptosis in human gastric cancer (AGS) cells[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2018. DOI: 10.1002/jbt.22206.

[10] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:203.

[11] 陈红玲,荣家闵,李鹏程,等.芦荟苷联合顺铂对A549细胞增殖和凋亡的影响[J].化学试剂,2020,42(9):1033-1038.

[12] 徐杨斌,侯静林,童俊,等.气相色谱保留指数在定性分析中的应用研究进展[J].香料香精化妆品,2017,10(3):59-63.

[13] 黄庆晖,马红霞,夏鑫华,等.超临界CO₂流体萃取法提取柴胡桂枝汤挥发油化学成分的研究[J].国医论坛,2012,27(4):45-47.

[14] 莫琳,刘馨,杨慧敏,等.芹菜素影响非小细胞肺癌A549细胞顺铂敏感性的RAD51基因调控机制研究[J].中国药房,2020,31(6):708-714.

[15] 刘剑,徐韶东.常见铂类抗肿瘤药物不良反应的比较与防治[J].中国药房,2013,24(30):2857-2859.

[16] 查政.柴胡桂枝汤在神志病治疗中的运用及机理探讨[J].国医论坛,2017,32(2):4-7.

[17] 黄庆辉,高飞,刘忠民,等.柴胡桂枝汤挥发油对脆性X综合征基因敲除小鼠旷场行为和氨基酸递质影响[J].解剖学研究,2012,34(3):206-211.

[18] 陈盛强.柴胡桂枝汤挥发油对Fmr1基因敲除小鼠的治疗作用和机制探讨[D].长沙:中南大学,2012.

[19] 高飞. Fmr1基因敲除小鼠听源性癫痫的生化机制及其柴胡桂枝汤挥发油的干预作用[D].广州:广州医学院,2010.

[20] NAFEES S, ZAFARYAB M, MEHDI SH, et al. Anti-cancer effect of gingerol in cancer prevention and treatment[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2020. DOI: 10.2174/1871520620666200918100833.

[21] 姚静静. 6-姜辣素调控巨噬细胞防治肺癌的作用机制研究[D].开封:河南大学,2019.

(收稿日期:2020-10-05 修回日期:2020-11-25)

(编辑:林静)

《中国药房》杂志——中文核心期刊,欢迎投稿、订阅