

不同采收期紫玉盘中抗癌活性的初步研究

黄永林¹, 龚受基², 阮俊¹, 徐庆²

(1. 广西壮族自治区 广西植物研究所, 广西 桂林 541006; 2. 桂林医学院, 广西 桂林 541004)
中国科学院

摘要: 对不同采收期紫玉盘植物提取物, 采用 SRB 法观察其对人口腔上皮癌细胞株(KB)生长的影响进行抗癌活性检测, 结果发现抗癌活性物质随采收期的不同其活性具有显著差异, 10 月份采收的紫玉盘植物提取物体外抗癌活性最强。

关键词: 紫玉盘; 抗癌活性; 采收期

中图分类号: Q946 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2007)05-0801-02

Primary study on anticancer activity of *Uvaria microcarpa* in different harvest time

HUANG Yong-Lin¹, GONG Shou-Ji², RUAN Jun¹, XU Qing²

(1. *Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuangzu Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China;* 2. *Guilin Medical College, Guilin 541004, China*)

Abstract: SRB was used to examine the inhibition rate of different harvest time and different *Uvaria microcarpa* extracts to the KB cell, the result shows that different harvest times lead to different inhibition rate and the October extracts have the highest inhibition rate to the KB cell.

Key words: *Uvaria microcarpa*; anticancer activity; harvest times

紫玉盘(*Uvaria microcarpa*)为番荔枝科紫玉盘属植物, 分布于我国广西、广东和台湾等省区。紫玉盘味苦、性甘, 微温, 民间用于治疗消化不良, 腹胀腹泻, 跌打损伤, 腰腿疼痛等症(江苏新医学院, 1997)。国内外学者对紫玉盘属植物的抗癌活性进行了大量的研究(符立梧等, 1997; 杨早, 2005; 杨世林等, 2000), 但未见有对其进行不同采收期抗癌活性进行比较研究的报道。我们对采自广西的紫玉盘植物进行抗癌活性筛选, 发现了与文献报道不同的体外抗癌活性部位(张小玲等, 2005), 同时还发现, 在同一地点不同采收期的样品体外抗癌生物活性成分随着时间变化具有显著差异。本实验以体外对 KB 细胞抑制率为指标, 通过全年每月定时采收同一地点紫玉盘植物进行体外抗癌生物活性检测, 并进行比较, 发现其抗癌生物活性成分分布的基本规

律, 对深入研究紫玉盘及紫玉盘属其它植物抗癌生物活性成分分布规律有一定的指导意义, 同时对其它植物生物活性成分的筛选也有一定的参考价值。

1 仪器、材料和试剂

1.1 仪器

MCO-15AC CO₂ 培养箱(日本三洋公司), 倒置显微镜(XSB-IA)(上海长方光学仪器有限公司), 超净工作台(天津尘埃净化设备厂), 96 孔细胞培养板(美国 Coming 公司), 细胞培养盒(美国 Coming 公司), 550 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司), R-114 型旋转蒸发仪(瑞士 Büchi 公司)。

1.2 材料

药材于 2004 年 1 月至 12 月每月中旬采自广西

收稿日期: 2005-12-18 修回日期: 2006-11-20

基金项目: 广西自然科学基金(0342002-3)[Supported by Natural Science Foundation of Guangxi(0342002-3)]

作者简介: 黄永林(1974-), 男, 广西桂林人, 助理研究员, 从事天然产物开发利用研究, (E-mail)hyl@gxib.cn.

防城。经广西植物研究所分类室刘演副研究员生药鉴定为紫玉盘属植物紫玉盘(*U. microcarpa*)。人口腔上皮癌细胞株(KB)引自中国科学院上海药物研究所。

1.3 试剂

RPMI1640(GIBCOU 公司), SBR(Sulforhadmine B)(北京瀛海针细化工厂), 小牛血清(美国 Invitrogen Corporation 公司), 乙醇为工业级, 醋酸、三氯醋酸、氯仿、乙酸乙酯均为分析纯, 水为重蒸馏水。

2 实验方法

2.1 紫玉盘提取物的制备

将同一地点, 每月定时采收的样品, 阴干, 粉碎过 40 目, 用乙醇提取 3 次, 时间分别为 3 h, 2 h, 2 h, 过滤, 合并滤液, 滤液减压浓缩至稠膏状, 加 1.5 倍水混悬, 氯仿萃取 5 次, 每次 250 mL, 剩余混悬液用乙酸乙酯萃取 5 次, 每次 250 mL, 合并乙酸乙酯萃取溶液浓缩至膏状, 待用。

2.2 人口腔上皮癌细胞株(KB)的培养

人口腔上皮癌细胞常规培养于 37 °C、5% CO₂ 的饱和湿度培养箱内, 培养液为 10% 的小牛血清、100 u/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素等物质组成的 RPMI1640 培养液, 用 0.25% 的胰蛋白酶消化传代。

2.3 SRB 试验

将增殖良好, 处于指数增长期的细胞, 用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液将细胞分到 96 孔细胞培养板孔中, 每孔含 3×10^4 个细胞。将紫玉盘提取物最终浓度定为 0.16 μg/mL, 0.8 μg/mL, 4 μg/mL, 20 μg/mL 的药液加入到 96 孔细胞培养板孔中, 在 37 °C、5% CO₂ 的饱和湿度培养箱内培养 72 h, 弃去培养液, 轻轻甩干, 用滤纸吸干板孔中的培养液。每孔中轻轻加入 4 °C 预冷的 50% 三氯醋酸溶液 50 μL, 静置片刻, 将 96 孔板移入 4 °C 冰箱放置 30 min, 取出, 以去离子水冲洗培养板 4 遍, 每孔再加 0.4% SRB(以 1% 醋酸配制)染色剂 50 μL, 室温下染色 30 min, 弃去各孔内液体, 用 1% 醋酸溶液冲洗 5 遍, 除去未结合的染料, 每孔中加入 pH 为 10.0 的 Tris 缓冲液 100 μL(10 mmol/L), 置平板振荡器振荡 5 min, 用酶标仪在 515 nm 波长检测吸光度 A 值。按下列公式计算细胞抑制率:

细胞抑制率 = (1 - 用药组吸光度 A 值) / 对照组吸光度 A 值 × 100%, 并以 SPSS 软件统计。

3 结果与分析

将全年每月定时采收同一地点的紫玉盘植物, 按 2.1 项方法制备紫玉盘提取物, 按 2.3 项方法进行体外抗肿瘤活性检测, 结果如表 1、2。

表 1 不同采收期、不同剂量紫玉盘提取物对 KB 细胞的抑制率

Table 1 Inhibition rate of *U. microcarpa* in different harvest time and different extracts dosages to the KB cell

月份 Month	剂量 (细胞抑制率%) Dosage (μg/mL) Cell inhibition rate (%)			
1	0.16(0)	0.8(0)	4(0)	20(9.0)
2	0.16(0)	0.8(0)	4(0)	20(11.6)
3	0.16(0)	0.8(0)	4(0)	20(15.3)
4	0.16(0)	0.8(0)	4(2.5)	20(18.7)
5	0.16(0)	0.8(0)	4(7.6)	20(20.4)
6	0.16(0)	0.8(0)	4(15.0)	20(23.0)
7	0.16(0)	0.8(9.5)	4(18.9)	20(45.6)
8	0.16(1.7)	0.8(14.1)	4(23.5)	20(68.3)
9	0.16(3.6)	0.8(20.9)	4(27.8)	20(87.8)
10	0.16(6.3)	0.8(31.2)	4(37.5)	20(100.0)
11	0.16(3.9)	0.8(21.4)	4(23.6)	20(80.9)
12	0.16(1.2)	0.8(5.8)	4(17.6)	20(64.3)

表 2 10 月份紫玉盘提取物对 KB 细胞的抑制率

Table 2 Inhibition rate of *U. microcarpa* extracts in October to the KB cell

剂量 Dosage (μg/mL)	A	KB 细胞抑制率 KB cell inhibition rate (%)	IC ₅₀ (μg/mL)
	0.004 ± 0.001		
	0.020 ± 0.007		
0.16	0.019 ± 0.005	6.3	
0.8	0.015 ± 0.004	31.2	2.58
4	0.014 ± 0.001	37.5	
20	0.004 ± 0.006	100	

P < 0.01, 与 DMSO 组比较 P < 0.01, VSDMSO.

结果表明, 不同采收期紫玉盘提取物对体外人口腔上皮癌细胞(KB)抑制生物活性具有明显的差别, 9 月、10 月、11 月份采收的紫玉盘生物抑制活性较强, 10 月份生物抑制活性最强, IC₅₀ 达到 2.58 μg/mL, 且具有显著性差异(P < 0.01), 其它月份采收的紫玉盘提取物生物抑制活性较弱。

4 讨论

(1) 本实验采用 NCI 近年推荐的一种抗癌药物 (下转第 785 页 Continue on page 785)

表 4 花芽形态分化进程
Table 4 The course of flower bud differentiation

观察时期 Date (day/month)	30/10	6/11	11/16	11/23	11/30	12/7	12/14	12/21	12/28	1/1	1/4	1/8	1/11	1/14	20/1	26/1
花芽分化指数(%)Index of flower bud differentiation	0	11.3	22.4	23.3	20.6	22.0	23.6	32.0	32.8	32.5	50.4	72.9	86.9	96.7	100	100

次健壮的秋梢作为来年的结果母枝提供了理论依据。

参考文献:

- 赵宝军. 1997. 树莓花芽分化的研究[J]. 北方园艺, 4:35-37
- Li CY(李长纓), Jian YC(简元才), Du GC(杜广岑), et al. 1999. Research of evaluation method and standard of Sea cabbage's winter habit(甘蓝冬性鉴定方法及标准的研究)[J]. *Acta Agric Boreali-Sin*(华北农学报), 14(3):123-127
- Li YZ(李永忠), Ma WH(马蔚红). 1994. Preliminary study of Mango flower bud differentiation in weat of Guangdong(粤西地区芒果花芽分化初步研究)[J]. *J Guangxi Trop Crop Sci Tech*(广西热带农业科技), 2:15-17
- Lin SZ(林淑增), Chen ZW(陈宗苇). 1981. The first researchful reports of Mango flower bud differentiation(芒果花芽分化研究初报)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), 8(4):9-14
- Rao MM, Bojappa KM. 1979. Fruit-bud differentiation in Mango "AlpLonso and Totapuri" under tropical raing conditions[J]. *Sci Hort*, 10(1):95-99
- Ravishankar H. 1979. Studies on fruit bud diffetentiationand flowering in mango (*Mangifera india* L.) CV[J]. *Alphonso and Totapuri Hort Abs*, 49(5)38-70
- Samon JA, Li GX(李国华). 1989. Cultivation of overseas Mango(国外芒果栽培)[J]. *J Yunnan Trop Crop Sci Tech*(云南热带农业科技), 4:43-48
- Tao YL(陶月良), Zeng GW(曾广文), Zhu C(朱成). 2002. The morphological and anatomical studies on differentiation of floral buds in cucumbers(黄瓜花芽起始分化的形态解剖研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), 22(3)
- Wang CY(王彩云), Gao LP(高莉萍), Lu DF(鲁涤非), et al. 2002. Study on flower bud morphological differentiation of *Osmanthus fragrans* 'Houban Jingui'('厚瓣金桂'桂花花芽形态分化的研究)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), 29(1):52-56
- Xu MX(许明宪), Huang SZ(黄尚志). 1962. The physiological differentiation and morphological differentiation of apple flower bud(苹果花芽的生理分化和形态分化)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), 1(2):137-140
- Xue MN(薛妙男), Wei AH(韦安华), Chen TT(陈腾土), et al. 1991. A study on differentiation of the flower buds in Shatinyu Hort(沙田柚花芽分化研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), 11(2):177-180

(上接第 802 页 Continue from page 802)

筛选新方法, SRB(suforhodamine B)法(王青青等, 2000), 这种筛选方法比以前常用的 MTT 筛选方法更简单、快速、敏感, 结果更准确、可靠。

(2) 本实验仅对紫玉盘属植物中紫玉盘植物进行不同采收期抗癌生物活性研究, 发现了其分布规律, 抗癌生物活性成分将另文发表。但是, 要弄清其积累规律, 以及同属中其它植物抗癌生物活性物质的分布、积累规律等相关问题, 还有待进一步研究。

本研究得到广西植物研究所刘演副研究员的大力帮助, 特此致谢!

参考文献:

江苏新医学院. 1997. 中药大辞典[M]. 上海: 上海人民出版社:

3 955

- 张小玲, 阮俊, 宋芸娟, 等. 2005. 广西产紫玉盘提取物抗肿瘤活性的粗筛[J]. 南华大学学报·医学版, 32(5):695-696
- 杨早. 2005. 番荔枝科植物抗肿瘤作用研究概况[J]. 安徽医药, 9(7):484-485
- 杨世林, 余竞光, 徐丽珍. 2000. 番荔枝科植物化学成分及其抗肿瘤活性[J]. 中国医学科学院学报, 8(22):376-82
- Fu LW(符立梧), Pan QC(潘启超), Chen WS(陈文森), et al. 1997. The cytotoxicity of the amnonaceous acetogenins *in vitro*(阿蒂莫耶番荔枝总内酯体外抗肿瘤作用)[J]. *Chin J Cancer*(癌症), 16(6):409
- Wang QQ(王青青), Yu H(余海). 2000. Studies on application of SRB cytotoxicity assay in evaluating anti-cancer drugs(SRB 显色法用于抗癌药物敏感性试验的研究)[J]. *Bull Sci Tech*(科技通报), 16(2):104-107