

引用:黄兴文,刘炜.苗药吉祥草配伍余甘子抗Lewis肺癌细胞增殖组分的筛选[J].中医导报,2023,29(11):6-10.

苗药吉祥草配伍余甘子抗Lewis肺癌细胞增殖组分的筛选*

黄兴文¹,刘炜²

(1.广东云浮中医药职业学院,广东 云浮 527400;
2.贵州中医药大学第二附属医院,贵州 贵阳 550001)

[摘要] 目的:探索吉祥草和余甘子配伍后治疗非小细胞肺癌的药效物质,为吉祥草配伍余甘子在抗肿瘤制剂开发方面的研究提供实验依据。方法:采用鲜药榨汁、传统水煎、渗漉为提取方法制得吉祥草配伍余甘子的不同提取物,以Lewis肺癌细胞体外实验模型作为评价手段,优选药材的最佳提取方法;通过膜分离技术,将最佳提取方法的提取物分段截留得到不同分子量区间段组分,以Lewis肺癌细胞体外实验模型作为评价手段优选最佳的分子量区间段。结果:吉祥草配伍余甘子对Lewis肺癌细胞增殖抑制作用的最佳提取方法为95%乙醇渗漉法。95%乙醇渗漉提取物对Lewis肺癌细胞增殖抑制作用的最佳分子量区间段组分为分子量10~30 KD与分子量 ≤ 1 KD组分。结论:苗药吉祥草配伍余甘子对Lewis肺癌细胞具有增殖抑制作用,抑制作用最佳组分为95%乙醇渗漉的分子量10~30 KD与分子量 ≤ 1 KD组分。

[关键词] 肺癌;Lewis肺癌细胞;吉祥草;余甘子;渗漉;膜分离技术;苗药

[中图分类号] R291.608 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2023)11-0006-05

DOI: 10.13862/j.cn43-1446/r.2023.11.002

Screening of Anti-Lewis Lung Cancer Cells Proliferation Components of Miao Medicine *Reineckia Carnea* Combined with *Phyllanthus Emblica*

HUANG Xingwen¹, LIU Wei²

(1.Guangdong Yunfu Vocational College of Traditional Chinese Medicine, Yunfu Guangdong 527400, China;

2.The Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang Guizhou 550001, China)

[Abstract] Objective: To explore the effective material of Miao medicine *Reineckia carnea* combined with *Phyllanthus emblica* for the treatment of non-small cell lung cancer in order to provide further experimental evidence for the research of the development of anti-tumor agents. Methods: Fresh juice, traditional medicine decoction, and percolation extraction method prepared different extracts of *Reineckia carnea* compatibility of *Phyllanthus emblica*. The best extraction method of medicinal materials was selected by using Lewis lung cancer cell in vitro experimental model as evaluation method. The extracts of the best extraction method were segmented to obtain different molecular weight interval components through the membrane separation technology. Then in vitro experimental model of Lewis lung cancer cells was applied to obtain the optimal molecular weight interval. Results: The best extraction method of *Reineckia carnea* compatibility with *Phyllanthus emblica* is 95% ethanol osmoticization. The best molecular weight interval components of 95% ethanol percolation extract are 10-30 KD and ≤ 1 KD components. Conclusion: Miao medicine *Reineckia carnea* combined with *Phyllanthus emblica* can inhibit the proliferation of Lewis lung cancer cells. And the optimal components for inhibitory effect are components with a molecular weight of 10-30 KD and a molecular weight of ≤ 1 KD, which are permeated with 95% ethanol.

[Keywords] lung cancer; Lewis lung cancer cells; *Reineckia carnea*; *Phyllanthus emblica*; percolation extraction; membrane separation technique; Miao medicine

*基金项目:国家自然科学基金项目(82160952)

通信作者:刘炜,E-mail:liuwei20001002@126.com

吉祥草和余甘子均收载于《贵州十大苗药研究》。吉祥草[*Reineckia carnea* (Andr.) Kunth.]又名小叶万年青、观音草等,为百合科吉祥草属植物。吉祥草味甘,性凉,具有清肺止咳、解毒利咽、凉血止血等作用,为贵州十大苗药之一^[1-2]。吉祥草是苗族人民用于治疗肺部疾病(肺燥咳嗽、阴虚咳嗽等)的常用药^[3]。余甘子(*Phyllanthus emblica* L.)别名橄榄、滇橄榄、油柑子、山油甘、庵摩勒、牛甘子、喉甘子等,为大戟科叶下珠属植物余甘子的干燥成熟果实^[4],具有清热凉血、消食健胃、生津止咳等功效^[5-7],主要用于治疗咳嗽、喉痛、口干、血热血瘀、消化不良等^[5]。余甘子系藏族、苗族等民族习用药材^[4,8]。2020年国际癌症研究中心(International Agency for Research on Cancer, IARC)发布的全球癌症负担的最新统计数据显示,全球肺癌死亡病例约180万例,居全球癌症死亡病例的首位^[9-10]。我国肺癌的发病率和死亡率也居高不下,2020年中国新发肺癌约82万例,死亡约71万例^[9]。藏医学中,早已有以余甘子为主药的方剂治疗肺癌的历史^[11-12]。吉祥草18 g与余甘子9 g配伍,是在邱德文教授分别对两味药深入研究并在临床抗肿瘤应用方面取得成效的基础上确立的^[13]。课题组前期已进行了吉祥草配伍余甘子抗非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer)的药效学研究^[13]。因此本研究将两种苗族及藏族具有民族特色的治疗肺癌的习用药材配伍在一起,利用方剂配伍原理、膜分离技术有机结合起来,以体外细胞模型作为评价手段,探索两药配伍后治疗非小细胞肺癌的有效物质,以期吉祥草配伍余甘子抗肿瘤制剂开发提供实验依据。

1 材 料

1.1 细胞株 Lewis肺癌细胞株(昆明细胞库,编号:KCB 20781YJ)。

1.2 药物与试剂 吉祥草:采购于贵州贵阳,经贵州中医药大学药教研室孙庆文教授鉴定为百合科吉祥草属植物吉祥草[*Reineckia carnea* (Andr.) Kunth]。

余甘子:采购于贵州贵阳,经贵州中医药大学药教研室孙庆文教授鉴定为大戟科叶下珠属植物余甘子的成熟果实(*Phyllanthus emblica* L.)。

康莱特注射液(浙江康莱特药业有限公司,批号:1706236-1);DMEM高糖培养基(美国Hyclone公司,批号:SH30021.01B);胰蛋白酶-EDTA消化液(0.25%)(美国Hyclone公司,批号:SH30061.01);双抗(青链霉素混合液)(美国Hyclone公司,批号:SV30064);四甲基偶氮唑蓝(MTT)(美国Solarbio公司,批号:M8180);二甲基亚砜(DMSO)(美国Amresco公司,批号:0231-500mL);磷酸盐缓冲液(美国Solarbio公司,批号:P1010-2);胎牛血清(澳大利亚AusGeneX公司,批号:FBS500-S)。

1.3 仪器设备 超滤膜(上海摩速科学器材有限公司,型号:MSC80001, MSC80005, MSC80010, MSC80030);超滤杯(上海摩速科学器材有限公司,型号:MSC800);氮气瓶(山东永安合力特种装备有限公司,型号:10L);磁力加热搅拌器(常州普天仪器制造有限公司,型号:79-1);板式酶标仪(北京市新风机电技术公司,型号:ZS-2);8联排移液器(德国普兰德有限公司,型号:Transferpette-820-200 μ L);移液器[芬兰百得实

实验室仪器(中国)有限公司,型号:1-ch100 μ L];超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司,型号:BHC-1300);二氧化碳培养箱(日本三洋公司,型号:MCO-175);奥林巴斯生物显微镜(日本奥林巴斯公司,型号:CKX-41);25 cm正方透气盖斜口细胞培养瓶(美国Corning公司,型号:430639-25 cm);75 cm正方透气盖斜口细胞培养瓶(美国Corning公司,型号:430641-75 cm);96孔细胞培养板(美国Corning公司,型号:3599);针头式滤器(33 mm,0.22 μ m PES膜)(美国Millipore公司,型号:SLGP033RB)。

2 方 法

2.1 吉祥草配伍余甘子不同组分制备

2.1.1 不同提取方法组分制备 通过鲜药榨汁、传统水煎、渗漉等提取方法制得吉祥草配伍余甘子的不同提取物。

水煎液组:称取干药材吉祥草36 g,余甘子18 g,即 $m(\text{吉祥草}):m(\text{余甘子})=2:1$ 。按传统的水煎煮法,加入8倍量的水浸泡30 min,提取2次,每次提取时间1 h,合并两次提取液,减压干燥得到提取物,使用时配至所需浓度。

50%乙醇渗漉组:称取干药材吉祥草36 g,余甘子18 g,即 $m(\text{吉祥草}):m(\text{余甘子})=2:1$ 。剪碎,50%乙醇润湿,装筒,排气,往渗漉筒加入50%乙醇浸渍12 h后按1 mL/min渗漉速度渗漉,溶剂为药材质量的15倍,收集渗漉液,减压干燥得到提取物,使用时配至所需浓度。

95%乙醇渗漉组:称取干药材吉祥草36 g,余甘子18 g,即 $m(\text{吉祥草}):m(\text{余甘子})=2:1$ 。剪碎,95%乙醇润湿,装筒,排气,往渗漉筒加入95%乙醇浸渍12 h后按1 mL/min渗漉速度渗漉,溶剂为药材质量的15倍,收集渗漉液,减压干燥得到提取物,使用时配至所需浓度。

鲜药组:称取新鲜药材吉祥草36 g,余甘子18 g,即 $m(\text{吉祥草}):m(\text{余甘子})=2:1$ 。剪碎,加适量的水用榨汁机搅拌至碎,压榨取汁,减压干燥得到提取物,使用时配至所需浓度。

2.1.2 不同分子量区间段组分制备 按“2.1.1”优选出的最佳提取方法制备组分,并将其减压浓缩至生药质量浓度为0.2 g/mL,从超滤杯的加料口加入,通过软管连接氮气瓶与超滤杯;将装好的超滤杯放在磁力搅拌器,打开磁力搅拌器使搅拌转子以合适的转速转动,打开氮气瓶阀,调整压力为0.10~0.22 MPa,收集膜分离产物;超滤膜使用顺序依次为MWCO 30 KD、MWCO 10 KD、MWCO 5 KD、MWCO 1 KD,得到膜分离产物分子量 ≥ 30 KD组分、分子量10~30 KD组分(不含10 KD、30 KD)、分子量5~10 KD组分(不含5 KD,含10 KD)、分子量1~5 KD组分(不含1KD,含5KD)、分子量 ≤ 1 KD组分。不同分子量的膜分离产物用95%乙醇复溶转移至已恒重的蒸发皿减压干燥得到不同分子量区间段组分,使用时配至所需浓度。

2.2 接种细胞 取对数生长期的Lewis肺癌细胞株以0.25%胰蛋白酶消化制成单细胞悬液,显微镜下计数细胞量,调整至 1×10^5 个/mL细胞悬液,接种于96孔细胞培养板上,铺板过程中需不断轻摇混悬液使细胞分布均匀。放入37 $^{\circ}$ C,5% CO_2 恒温培养箱培养,待细胞覆盖孔底达90%时进行实验。

2.3 吉祥草配伍余甘子不同组分干预

2.3.1 不同提取方法组分干预 取水煎液组分、50%乙醇渗漉组分、95%乙醇渗漉组分及鲜药组分用适量的DMSO助溶,

之后分别用无血清DMEM培养基按10倍梯度稀释,DMSO最终含量 $\leq 0.1\%$,用0.22 μm 滤器过滤除菌即可用于干预细胞。康莱特注射液(阳性药)用生理盐水稀释15倍后作为母液备用。参考文献[13]计算,体外实验药物质量浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)= $50 \times D/5\ 000/50\% \times 10^3$ 。D为临床用药剂量[$\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$]。根据预实验过程中的结果设定始浓度,用无血清DMEM培养基按10倍梯度稀释。各组设4个浓度,分别将不同提取方法的4种药物组分及康莱特注射液加入细胞孔板,分别为鲜药组、水煎液组、50%乙醇渗漉组、95%乙醇渗漉组、康莱特阳性组、0.1% DMSO溶媒剂组、对照组(不含干预药物,其余步骤一致)、调零孔(不含干预药物、细胞,其余步骤一致)。每孔100 μL ,各组设置3个平行孔,放入37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 恒温培养箱继续培养24、48 h。

2.3.2 不同分子量区间段组分干预 最佳提取方法组分经膜分离技术得到的不同区间段组分,分子量 $\geq 30\ \text{KD}$ 、分子量10~30 KD 、分子量5~10 KD 、分子量1~5 KD 、分子量 $\leq 1\ \text{KD}$,用适量的DMSO助溶,之后分别用无血清DMEM培养基按10倍梯度稀释,DMSO最终含量 $\leq 0.1\%$,用0.22 μm 滤器过滤除菌即可用于干预细胞。康莱特注射液用生理盐水稀释15倍后作为母液用,无血清DMEM培养基按10倍梯度稀释。各组设3个浓度。分别将不同分子量区间段组分及康莱特注射液加入细胞孔板,分别为分子量 $\geq 30\ \text{KD}$ 组、分子量10~30 KD 组、分子量5~10 KD 组、分子量1~5 KD 组、分子量 $\leq 1\ \text{KD}$ 组、康莱特阳性组、对照组(含细胞,不加药物干预)、调零孔(不含干预药物、细胞,其余一致)。每孔100 μL ,各组设置3个平行孔,放入37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 恒温培养箱继续培养24 h。

2.4 MTT法呈色及酶标仪检测 分别于药物作用24、48 h各取出1批96孔板进行MTT实验。取出96孔板,弃培养基,每孔加入质量浓度为5 mg/mL 的MTT溶液30 μL ,避光继续培养4 h,吸出每孔内上清液,加入DMSO 150 μL ,轻轻振荡至结晶充分溶解,用酶标仪在540 nm 波长下测定每孔的吸光度值(A),进行数据整理,实验重复2次。

$$\text{细胞增殖抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{试药组OD值} - \text{调零孔OD值}}{\text{对照组OD值} - \text{调零孔OD值}}\right) \times 100\%$$

100%

2.5 统计学方法 采用SPSS 26.0统计软件进行数据统计,计量资料以“均数 \pm 标准差”($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料符合正态分布且方差齐,采用单因素方差分析进行比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 不同提取方法组分干预结果 鲜药组、水煎液组、50%乙醇渗漉组对Lewis肺癌细胞不呈增殖抑制作用。干预24 h,95%乙醇渗漉组3 600.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、360.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、36.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抑制率分别为46.74%、22.35%、10.49%;康莱特阳性组666.700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、66.670 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、6.667 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抑制率分别为47.75%、36.26%、21.40%。干预48 h,95%乙醇渗漉组3 600.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、360.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、36.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抑制率分别为47.54%、21.88%、10.05%;康莱特阳性组666.700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、66.670 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、6.667 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抑制率分别为52.23%、36.90%、22.28%。干预24 h抑制率与48 h比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。(见表1、图1~3)

表1 不同提取方法的组分 OD 值及抑制率比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	给药剂量/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$	24 h		48 h	
		OD值	抑制率/%	OD值	抑制率/%
对照组	—	0.411 \pm 0.004	—	0.451 \pm 0.042	—
溶媒组	0.1%DMSO	0.407 \pm 0.003	0.91 \pm 0.75	0.448 \pm 0.007	0.61 \pm 1.54
水煎液组	3 600.0	0.509 \pm 0.006	-26.44 \pm 1.67	0.661 \pm 0.036	-52.34 \pm 4.47
	360.0	0.455 \pm 0.005	-12.14 \pm 1.03	0.567 \pm 0.039	-28.69 \pm 2.74
	36.0	0.480 \pm 0.009	-18.73 \pm 2.37	0.627 \pm 0.046	-43.83 \pm 2.14
	3.6	0.587 \pm 0.032	-46.65 \pm 3.31	0.653 \pm 0.033	-50.96 \pm 6.51
50%乙醇渗漉组	3 600.0	0.447 \pm 0.021	-12.32 \pm 1.44	0.523 \pm 0.043	-17.58 \pm 3.51
	360.0	0.411 \pm 0.017	-0.60 \pm 3.68	0.456 \pm 0.050	-0.46 \pm 3.64
	36.0	0.561 \pm 0.021	-39.84 \pm 5.33	0.537 \pm 0.040	-21.10 \pm 1.61
	3.6	0.629 \pm 0.022	-57.90 \pm 5.02	0.588 \pm 0.043	-33.39 \pm 2.97
95%乙醇渗漉组	3 600.0	0.235 \pm 0.014 ^a	46.74 \pm 2.63	0.262 \pm 0.029 ^a	47.54 \pm 1.49
	360.0	0.336 \pm 0.029 ^a	22.35 \pm 1.86	0.363 \pm 0.044 ^a	21.88 \pm 3.01
	36.0	0.373 \pm 0.011 ^a	10.49 \pm 3.02	0.409 \pm 0.039 ^a	10.05 \pm 1.71
	3.6	0.458 \pm 0.084	-9.83 \pm 2.26	0.477 \pm 0.043	-7.28 \pm 1.35
鲜药组	3 600.0	0.638 \pm 0.013	-60.17 \pm 2.72	0.823 \pm 0.064	-93.04 \pm 3.09
	360.0	0.639 \pm 0.018	-60.42 \pm 4.30	0.754 \pm 0.039	-75.93 \pm 5.82
	36.0	0.674 \pm 0.031	-69.55 \pm 7.21	0.713 \pm 0.040	-67.29 \pm 7.54
	3.6	0.644 \pm 0.027	-61.73 \pm 6.30	0.726 \pm 0.033	-68.81 \pm 6.52
康莱特阳性组	666.700	0.231 \pm 0.015 ^a	47.75 \pm 3.05	0.245 \pm 0.041 ^a	52.23 \pm 4.15
	66.670	0.275 \pm 0.012 ^a	36.26 \pm 1.95	0.304 \pm 0.038 ^a	36.90 \pm 2.47
	6.667	0.332 \pm 0.009 ^a	21.40 \pm 2.08	0.361 \pm 0.040 ^a	22.28 \pm 2.11
	0.667	0.502 \pm 0.008	-23.11 \pm 2.48	0.531 \pm 0.041	-21.19 \pm 1.94

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$ 。

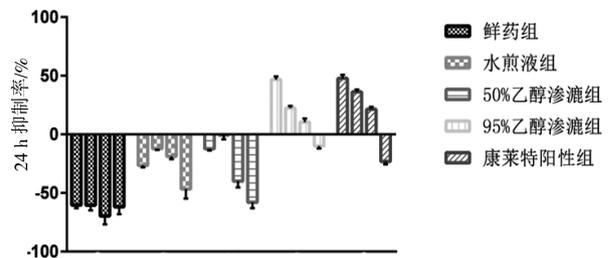


图1 不同提取方法组分干预 24 h 抑制率比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

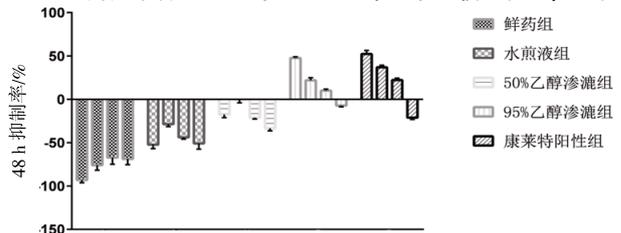


图2 不同提取方法组分干预 48 h 抑制率比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

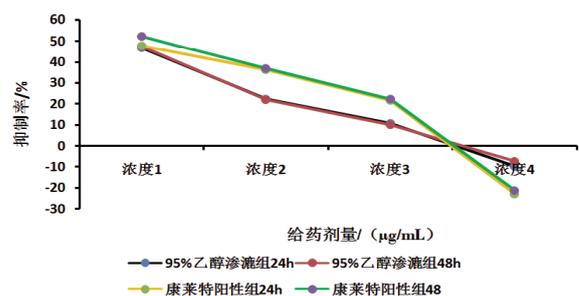


图3 95%乙醇渗漉组、康莱特阳性组抑制率曲线图

3.2 不同分子量区间段组分干预结果 分子量10~30 KD组: 3 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抑制率为24.26%, 360 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抑制率为15.05%; 分子量 ≤ 1 KD组: 3 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抑制率为30.81%, 360 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抑制率为19.95%; 康莱特阳性组: 666.700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抑制率为41.06%, 66.670 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抑制率为19.54%。上述各组OD值与对照组比较, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。(见表2、图4)

分子量 ≥ 30 KD组: 3 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抑制率为10.12%; 分子量5~10 KD组: 3 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抑制率为10.02%; 分子量1~5 KD组: 3 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抑制率为10.79%, 36 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抑制率为9.48%; 分子量 ≤ 1 KD组: 36 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抑制率为8.23%。上述各组OD值与对照组比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。(见表2、图4)

表2 干预24 h不同分子量区间段组分OD值及抑制率比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	给药剂量/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$	OD值	抑制率/%
对照组	—	0.601 \pm 0.019	—
溶媒组	(0.1% DMSO)	0.598 \pm 0.022	0.52 \pm 0.70
分子量 ≥ 30 KD组	3 600	0.546 \pm 0.020 ^b	10.12 \pm 1.37
	360	0.613 \pm 0.025	-2.29 \pm 1.73
	36	0.637 \pm 0.029	-6.72 \pm 1.96
分子量10~30 KD组	3 600	0.470 \pm 0.015 ^a	24.26 \pm 0.79
	360	0.520 \pm 0.021 ^a	15.05 \pm 2.19
	36	0.589 \pm 0.013	1.97 \pm 1.66
分子量5~10 KD组	3 600	0.546 \pm 0.015 ^b	10.02 \pm 1.03
	360	0.594 \pm 0.020	1.06 \pm 1.36
	36	0.605 \pm 0.020	-0.96 \pm 1.18
分子量1~5 KD组	3 600	0.542 \pm 0.018 ^b	10.79 \pm 1.08
	360	0.574 \pm 0.016	4.90 \pm 1.25
	36	0.549 \pm 0.014 ^b	9.48 \pm 0.71
分子量 ≤ 1 KD组	3 600	0.435 \pm 0.007 ^a	30.81 \pm 1.57
	360	0.493 \pm 0.014 ^a	19.95 \pm 1.10
	36	0.556 \pm 0.013 ^b	8.23 \pm 1.20
康莱特阳性组	666.700	0.380 \pm 0.007 ^a	41.06 \pm 1.07
	66.670	0.496 \pm 0.014 ^a	19.54 \pm 0.79
	6.667	0.562 \pm 0.014	7.02 \pm 1.02

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$ 。

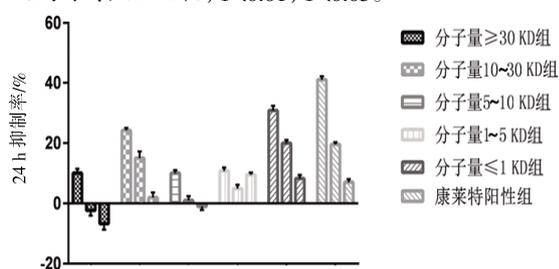


图4 干预24 h不同分子量区间段组分抑制率比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

4 讨 论

吉祥草在苗族地区使用时大多数用鲜品,鲜果嚼服也是余甘子的民间常用药形式^[4]。本研究参照屠呦呦在研究青蒿素过程中查阅古医籍的启示(“青蒿一握,水一升渍,绞取汁服”)及苗族、藏族民间鲜品直接入药的习惯,结合渗漉提

取具有常温状态下操作,不容易破坏热敏性有效成分,能提取完全、节能的优点,在传统水煎的基础上同时设计鲜药榨汁、渗漉法常温提取药效成分。不同提取方法组分干预实验结果表明:鲜药组、水煎液组、50%乙醇渗漉组对Lewis肺癌细胞不呈增殖抑制作用;95%乙醇渗漉组及康莱特阳性组对Lewis肺癌细胞增殖有抑制作用。这可能预示抑制Lewis肺癌细胞增殖的活性成分极性较小,而鲜药榨汁、水煎煮及50%乙醇提取的成分极性相对较大。前期对吉祥草配伍余甘子的研究显示60%、95%乙醇渗漉组对小鼠非小细胞肺癌有抑制作用,水煎组分无抑制作用^[12]。吉祥草的水提组分或水溶性好的成分药效偏向于止咳、化痰、抗炎^[14-16],而95%乙醇提取组分或在95%乙醇提取组分基础上用不同溶剂萃取的部位倾向于抗肿瘤的作用^[17-24]。余甘子鲜果汁、水提组分以维生素、多糖等极性大的组分为主,含有黄酮类成分和少量的酚酸类成分。其药效倾向于抗氧化、抗衰老^[25]、抗诱导突变^[26]、增强免疫力^[27]、抗炎^[28]。余甘子中的酚酸类成分是其抗肿瘤最主要的活性成分^[29-31]。余甘子总酚酸为醇溶性成分,也溶于水,但是95%、70%乙醇组分抑制肿瘤细胞增殖的作用优于水提组分^[32]。余甘子中的酚酸类与黄酮类配伍使用,可提高肿瘤抑制率^[32-33]。95%乙醇渗漉组及康莱特阳性组的增殖抑制作用呈剂量依赖性,表现为随着药物浓度的升高增殖抑制作用增强。本研究结果表明,95%乙醇渗漉组的增殖抑制最低剂量为36 $\mu\text{g}/\text{mL}$,康莱特阳性组的增殖抑制最低剂量为6.667 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。综上所述,95%乙醇渗漉组分对Lewis肺癌细胞有明显增殖抑制作用,优选出提取方法为95%乙醇渗漉法。

本研究根据药效物质“组合筛选”思路与方法^[34]进行了不同分子量区间段组分干预实验。多种分离技术最大程度去除无效成分,富集有效成分,并以分离产物为“基本构造单元”研究“基本构造单元”与药效效应的关系。95%乙醇渗漉组分经不同截留分子量的膜分离得到不同分子量区间段组分,分别为分子量 ≥ 30 KD组分、分子量10~30 KD组分、分子量5~10 KD组分、分子量1~5 KD组分、分子量 ≤ 1 KD组分。结果表明,各分子量区间段组分对Lewis肺癌细胞呈不同程度增殖抑制作用。分子量 ≥ 30 KD组、分子量10~30 KD组、分子量5~10 KD组、分子量1~5 KD组、分子量 ≤ 1 KD组最高抑制率分别为10.12%、24.26%、10.02%、10.79%、30.81%;分子量 ≥ 30 KD组、分子量5~10 KD组、分子量1~5 KD组增殖抑制最低浓度为3 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$;分子量10~30 KD组与分子量 ≤ 1 KD组增殖抑制最低浓度分别为360、36 $\mu\text{g}/\text{mL}$;分子量10~30 KD组与分子量 ≤ 1 KD组的增殖抑制作用呈剂量依赖性,表现为随着药物浓度的升高增殖抑制作用增强。黄酮类、生物碱类、皂苷类、蒽醌类、酚酸类等成分是“天然组合化学库”的主体,其分子量一般小于1 000^[35]。综上所述,分子量10~30 KD组分与分子量 ≤ 1 KD组分对Lewis肺癌细胞增殖抑制作用最强;体外细胞模型优选出的最佳分子量区间段组合为分子量10~30 KD与分子量 ≤ 1 KD。

参考文献

- [1] 邱德文,杜江.中华本草·苗药卷[M].贵阳:贵州科技出版社,2005:254-255.

- [2] 王颖,董雪静,朱华.民族药吉祥草的本草考证[J].湖北农业科学,2022,61(4):93-97.
- [3] 杨晓琴.吉祥草对呼吸道炎症的作用及其机制研究[D].贵阳:贵州大学,2019.
- [4] 邱德文,杜江.贵州十大苗药研究[M].北京:中医古籍出版社,2008:122-123,170-173.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].北京:中国医药科技出版社,2020:186.
- [6] 尹可欢,罗晓敏,丁翼,等.余甘子及其活性成分肝保护作用及机制的研究进展[J].中草药,2022,53(1):295-307.
- [7] 李雪冬,潘烨华,田雨闪,等.余甘子的本草考证及其现代研究中若干问题的探讨[J].中草药,2022,53(18):5873-5883.
- [8] 仇敏,黄浩洲,林俊芝,等.基于专利视角的余甘子全产业链开发现状分析与评述[J].中草药,2020,51(12):3355-3364.
- [9] 支修益,师建国,田艳涛,等.《2022年中国肺癌患者生存质量白皮书》要点解读[J].中国胸心血管外科临床杂志,2023,30(8):1083-1088.
- [10] 王悠清.2020年全球癌症统计报告[J].中华预防医学杂志,2021,55(3):398.
- [11] 潘慧清,朱平,魏学明,等.藏药余甘子研究概况[J].甘肃中医药大学学报,2019,36(2):84-88.
- [12] 黄诗娅.苗药吉祥草配伍余甘子抗非小细胞肺癌(NSCLC)的物质基础研究[D].贵阳:贵阳中医学院,2015.
- [13] 刘晓东,杨广育,赵玉琴,等.体外测试肿瘤化疗敏感性指标的研究[J].实用肿瘤学杂志,1992,6(3):39-40.
- [14] 金兆磊,赵超,陈华国,等.吉祥草药材抗炎、止咳作用及谱效关系[J].食品与生物技术学报,2013,32(5):556-559.
- [15] HAN N, CHANG C L, WANG Y C, et al. The in vivo expectorant and antitussive activity of extract and fractions from *Reineckia carnea*[J]. J Ethnopharmacol, 2010, 131(1):220-223.
- [16] 张元,杜江,许建阳,等.吉祥草总皂苷溶血、止咳、化痰、抗炎作用的研究[J].武警医学,2006,17(4):282-284.
- [17] 刘海,杨建琼,熊亮,等.吉祥草乙醇提取物诱导人肺癌A549细胞凋亡机制的初步探讨[J].中国医院药学杂志,2013,33(19):1580-1584.
- [18] 刘海,杨建琼,马华谋,等.吉祥草及其果实不同提取部位的体外抗肿瘤活性筛选[J].中药新药与临床药理,2013,24(4):337-340.
- [19] 杨建琼,马华谋,刘海,等.吉祥草提取物体外抗肿瘤活性研究[J].中药材,2013,36(4):618-621.
- [20] 刘海,杨建琼,熊亮,等.吉祥草提取物对人结肠癌HT-29细胞体外抑制作用的研究[J].时珍国医国药,2013,24(5):1103-1105.
- [21] 白彩虹,邹坤,贺海波,等.吉祥草乙酸乙酯部位对人宫颈癌Caski细胞抑制作用及COX-2基因表达与BCI-2蛋白家族关系的研究[J].中药药理与临床,2013,29(6):45-50.
- [22] 杨小姣,白彩虹,邹坤,等.吉祥草中甾体皂苷RCE-4对宫颈癌裸鼠移植瘤的抑制作用[J].第三军医大学学报,2016,38(5):476-482.
- [23] 刘海,杨建琼,马华谋,等.吉祥草中甾体皂苷成分及其抗肿瘤活性研究[J].中药新药与临床药理,2015,26(3):348-351.
- [24] 王桂萍,付雪娇,邹坤,等.保护性自噬对吉祥草皂苷RCE-4诱导的人宫颈癌Ca Ski细胞凋亡的抑制作用[J].中药药理与临床,2013,29(5):42-45.
- [25] 崔炳权,林元藻.余甘子的抗衰老作用研究[J].时珍国医国药,2007,18(9):2100-2102.
- [26] DHIR H, ROY A K, SHARMA A, et al. Modification of clastogenicity of lead and aluminium in mouse bone marrow cells by dietary ingestion of *Phyllanthus emblica* fruit extract[J]. Mutat Res Toxicol, 1990, 241(3):305-312.
- [27] 崔炳权,何震宇,杨泽民,等.余甘子提取物对小鼠免疫功能的影响[J].时珍国医国药,2010,21(8):1920-1922.
- [28] 宋琳琳,沙靖全,赵宏,等.余甘子提取物对大鼠佐剂性关节炎的干预作用[J].时珍国医国药,2014,25(11):2580-2582.
- [29] ZHANG Y J, NAGAO T, TANAKA T, et al. Antiproliferative activity of the main constituents from *Phyllanthus emblica*[J]. Biol Pharm Bull, 2004, 27(2):251-255.
- [30] PINMAI K, CHUNLARATTHANABHORN S, NGAMK-ITIDECHAKUL C, et al. Synergistic growth inhibitory effects of *Phyllanthus emblica* and *Terminalia bellerica* extracts with conventional cytotoxic agents: Doxorubicin and cisplatin against human hepatocellular carcinoma and lung cancer cells[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(10):1491-1497.
- [31] LUO W, ZHAO M M, YANG B, et al. Antioxidant and antiproliferative capacities of phenolics purified from *Phyllanthus emblica* L. fruit[J]. Food Chem, 2011, 126(1):277-282.
- [32] 王飞.余甘子抗癌化学物质组分及作用机制研究[D].沈阳:辽宁中医药大学,2011.
- [33] 朱英环,孟宪生,包永睿,等.余甘子总酚酸和总黄酮配伍抑制肝癌细胞增殖及对免疫功能的调节作用[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(3):132-135.
- [34] 郭立玮,朱华旭,潘林梅.基于复杂体系原理的中药复方药效物质“组合筛选”思路与方法[J].中草药,2009,40(4):505-508.
- [35] 郭立玮,陆敏,付廷明,等.基于中药复方小分子药效物质组“溶液结构”特征的膜分离技术优化原理与方法初探[J].膜科学与技术,2012,32(1):1-11.

(收稿日期:2023-02-24 编辑:蒋凯彪)