

芳樟树叶乙醇提取物的抗癌作用

苏远波, 李清彪, 姚传义, 卢英华, 洪金庆

(厦门大学化学化工学院化学工程与生物工程系, 化学生物学福建省重点实验室, 厦门 361005)

摘 要: 探讨了芳樟树叶乙醇提取物各部分的抗癌作用。采用系统溶剂法从芳樟树叶得到一系列提取物, 运用 MTT 和集落形成实验法考察各提取物对体外培养的人肺癌 95-D 细胞、人口腔表皮样癌 KB 细胞和肝癌 HepG2 细胞增殖的影响。结果发现石油醚部分 A1、氯仿部分 A2 和乙酸乙酯部分 A3 对 3 种肿瘤细胞的增殖和集落形成均有不同程度的抑制作用, 且给药量与细胞抑制和集落形成明显的正相关关系。因此, 芳樟树叶乙醇提取物在体外有明显的抗肿瘤作用, 且抗癌有效组分很可能在它的石油醚部分、氯仿部分以及乙酸乙酯部分。

关键词: 芳樟树叶; 乙醇提取物; 抗肿瘤

中图分类号: R 979.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-6613 (2006) 02-0200-05

Antitumor action of ethanolic extractives from *camphor* leaves

SU Yuanbo, LI Qingbiao, YAO Chuanyi, LU Yinghua, HONG Jinqing

(Department of Chemical and Biochemical Engineering, School of Chemistry and Chemical Engineering,
Key Lab for Chemical Biology of Fujian Province, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract: The *in vitro* antitumor action of the different parts of ethanolic extractives from *Camphor* leaves, which were obtained by the technique of solvent-refining, was investigated in this paper. The dried *Camphor* leaves were submitted to ethanol (95% v/v) extraction and then the ethanolic extract was extracted again by petrol-ether, chloroform, ethyl acetate, methanol and water successively, and five extractives - A1, A2, A3, A4 and A5, were attained correspondingly. Using MTT and colony-forming methods, the five extractives were tested for the cytotoxicity on high metastatic lung carcinoma cells (95-D), human oral epidermoid carcinoma (KB) and the human hepatoma cell line (HepG2). The extractives A1, A2 and A3, showed the significant antitumor action when compared with the controls. The three extractives inhibited the tumor cells viability in concentration - dependent characteristics. These investigations suggested that the extract from *camphor* leaves had the function of antitumor *in vitro*, which was reported here firstly.

Key words: *camphor* leaves; ethanolic extractive; antitumor

芳樟系樟属植物中重要的经济树种, 在我国主要分布于南方各省区。福建省厦门牡丹香化实业公司成功培育了牡丹一号纯种芳樟, 叶油芳樟醇含量超过 96%, 樟脑含量低于 0.2%, 是优良的香精香料原料树种^[1]。樟叶乙醇提取物在防腐、抗菌领域已有大量研究^[2~5], 同时, 樟叶油在香料^[6]、医药^[7]和化工合成^[8]等方面也有着广泛应用, 但从樟叶中提取分离抗癌药物的尝试国内外尚未见报道。本文作者主要就牡丹一号纯种芳樟树叶乙醇提取物的抗癌活性检测方面进行研究, 为进一步提取分离有抗

癌活性的天然有机化合物提供参考。

本研究先用系统溶剂法对芳樟树叶进行处理得到芳樟树叶乙醇提取物的 5 个部分, 分别是石油醚部分 A1、氯仿部分 A2、乙酸乙酯部分 A3、甲醇部分 A4 以及水溶性部分 A5; 然后, 采用一种 20 世纪 80 年代建立起来的, 并已被美国国立癌症研究所 (NCI) 采用的新型筛选技术——MTT 快速比色

收稿日期 2005-10-20; 修改稿日期 2005-11-18。

第一作者简介 苏远波 (1976—), 男, 硕士研究生。联系人 李清彪, 教授, 系主任。电话 0592-2183088; E-mail kelqb@xmu.edu.cn。

法^[9~11]以及集落形成实验^[12], 选3种组织的癌细胞(95-D、KB与HepG2), 对芳樟树叶乙醇提取物各部分进行了体外抗癌试验, 研究芳樟树叶乙醇提取物各部分的抗肿瘤活性。

1 材料与仪器

1.1 芳樟树叶

实验所用的芳樟树叶均为福建省厦门市牡丹香化有限公司人工培植牡丹一号纯种芳樟干树叶(水蒸气蒸馏提取精油后的纯种芳樟树叶)。

1.2 癌细胞株

人肺癌细胞(95-D)由厦门大学生命科学学院抗癌研究中心提供, 人口腔表皮样癌细胞(KB)和肝癌细胞株(HepG2)来源于中国科学院上海细胞生物研究所细胞库。各癌细胞株均用RPMI-1640培养液(含10%的小牛血清, 100 KU/L青霉素, 100 mg/L链霉素), 在37℃、5%CO₂、相对湿度100%条件下培养。

1.3 仪器及试剂

R-205型旋转蒸发仪, 上海申胜生物技术有限公司; 超净台, 苏州净化设备有限公司; Multiskan MK3酶标仪, Thermo Electron Corporation; CO₂恒温细胞培养箱, Forma Scientific, Inc; Olympus倒置显微镜, American Optical, Inc。

PBS溶液(pH=7.4); RPMI-1640培养基; 0.25%胰酶消化液; 小牛血清; 青霉素; 链霉素; 四氮唑蓝(MTT); 二甲基亚砜(DMSO)等。

2 实验方法

2.1 芳樟树叶提取液制备

称取干燥纯种芳樟干树叶1 kg, 粉碎并过20目筛, 用95%乙醇室温下浸提3次。合并滤液, 减压回收乙醇, 得到乙醇浸膏, 真空冷冻干燥后, 得到乙醇干膏, 再分别用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、甲醇和水依次提取, 得到石油醚部分A1、氯仿部分A2、乙酸乙酯部分A3、甲醇部分A4以及水溶性部分A5。各部分溶液在4 000 r/min离心10 min, 取上清液, 除去有机溶剂, 得到一系列样品。用DMSO溶解稀释样品, 按比例配制浓度分别为25.00 mg/mL、12.50 mg/mL、6.25 mg/mL、3.13 mg/mL、1.56 mg/mL和0.78 mg/mL的样品溶液, 经0.2 μm微孔滤膜过滤, 4℃冰箱内保存备用。

2.2 癌细胞株的抑制实验

取对数生长的癌细胞, 以0.25%胰蛋白酶消化后, 用培养液稀释至5×10⁴个/mL, 接种于96孔板, 放入37℃、

5%的CO₂培养箱过夜, 待细胞贴壁, 各实验组和空白组分别加入等体积的不同剂量样品溶液和RPMI 1640培养液, 实验组及空白组均平行6孔。继续培养72 h, 分别在加药前及加药后的24 h、48 h、72 h于倒置显微镜下观察不同时期细胞的生长状态及细胞形态。

2.3 MTT法测定

加药后72 h, 每孔加入20 μL MTT(5 mg/mL), 继续培养4 h。吸去上清液, 加入DMSO 150 μL/孔, 振荡10 min, 使结晶物充分溶解。用酶标仪在570 nm波长处测其OD值, 根据下式计算细胞抑制率。

$$\text{细胞抑制率} = \frac{\text{对照组OD值} - \text{实验组OD值}}{\text{对照组OD值}} \times 100\%$$

并由线性回归法求得IC₅₀值^[13]。半数抑制率IC₅₀是指细胞生长抑制率为50%时的提取物浓度。对数据进行统计学处理。

2.4 集落形成实验

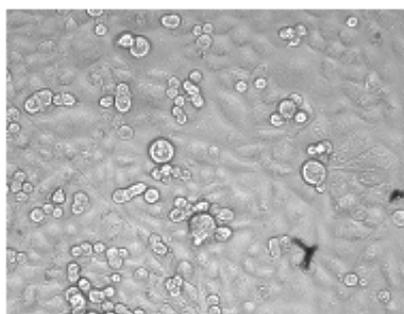
取50℃左右5%的琼脂1份, 迅速加入9份37℃的新鲜RPMI 1640培养液, 混合均匀, 取出0.8 mL置于2 mL的平皿中, 室温使琼脂凝固备用(此即为底层琼脂)。将对数生长期的细胞制成1×10³个/mL的细胞悬液, 并将各种浓度样品溶液加入到细胞液中, 空白组加入等体积的DMSO, 各取出0.9 mL加药后的细胞悬液置于已铺有底层琼脂的平皿中, 每皿中立即加入温度在50℃左右的3%琼脂0.1 mL, 混合均匀, 在37℃、5%CO₂饱和湿度条件下培养15天, 于显微镜下计数细胞集落数(不少于50个细胞)。各组平行样品3个。按下式计算药物对癌细胞集落形成抑制率:

$$\text{癌细胞集落形成抑制率} = \frac{1 - \text{实验组平均集落数}}{\text{对照组平均集落数}} \times 100\%$$

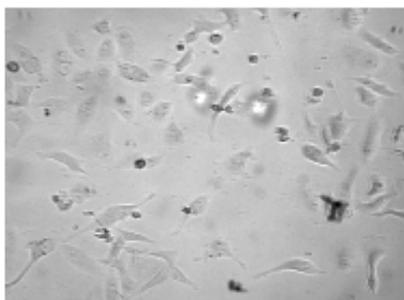
3 结果与讨论

3.1 癌细胞在药物A1作用前后的细胞形态

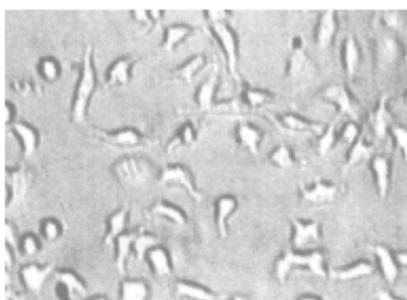
在倒置相差显微镜下观察3种癌细胞的形态变化如图1所示。当A1浓度为160 μg/mL, 作用48 h后, 实验组各细胞生长状态与空白组有明显差别, 空白组细胞呈贴壁生长, 有伪足伸出, 形态各异, 细胞透明折光性强, 细胞界限清晰, 核分裂明显; 在A1作用48 h后, 95-D细胞仍依稀可见完整细胞, 表明A1对95-D细胞的抑制率不是很高, 而KB细胞和HepG2细胞在药物作用48 h后, 基本看不见完整细胞的存在, 表明A1对这两种癌细胞的杀伤力较强。由癌细胞抑制实验可知, A1对3种癌细胞的作用较强烈, 其细胞形态变化较有代表性, 因此, 这里只以3种细胞在A1作用下的形态变化为例。



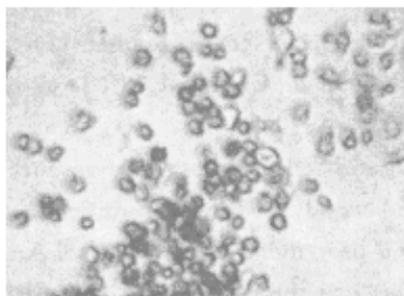
(1) 95-D 细胞对照



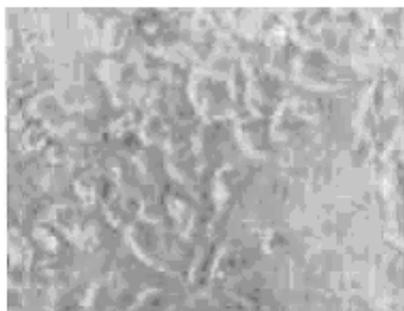
(2) 药物作用后95D细胞



(3) KB 细胞对照



(4) 药物作用后KB 细胞



(5) HepG2 细胞对照



(6) 药物作用后HepG2 细胞

图1 石油醚部分A1作用前后95-D, KB和 HepG2细胞的形态观察

3.2 提取液对体外癌细胞生长的抑制效果

各实验组加入40~320 μg/mL提取物后,各癌细胞生长受抑制情况如图2~图4所示,A1和A2对体外培养的95-D细胞、KB细胞和HepG2细胞的增殖表现出较强的抑制作用,且呈现剂量-效应关系(见图2~图4)。A3对3种癌细胞生长有一定的抑制作用,但不是很强;而A4以及A5在测定浓度范围内则没有显示出明显的抗癌活性。

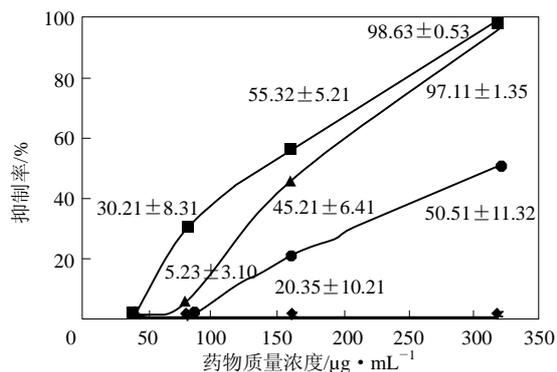


图2 各提取液对95-D细胞的生长抑制

数据表示: $\bar{X} \pm S$, $n=6$; $P < 0.01$ 与对照组比较
 ■—A1; ▲—A2; ●—A3; ✕—A4; ◆—A5

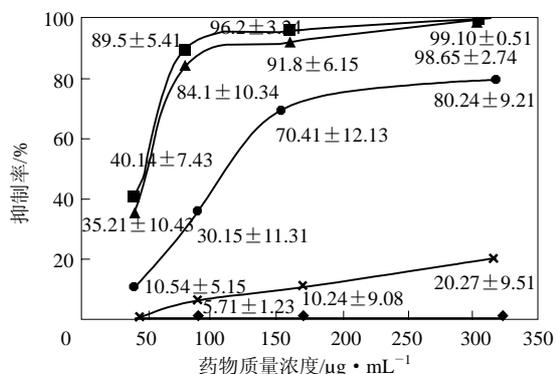


图3 各提取液对KB细胞的生长抑制

数据表示: $\bar{X} \pm S$, $n=6$; $P < 0.01$ 与对照组比较
 ■—A1; ▲—A2; ●—A3; ✕—A4; ◆—A5

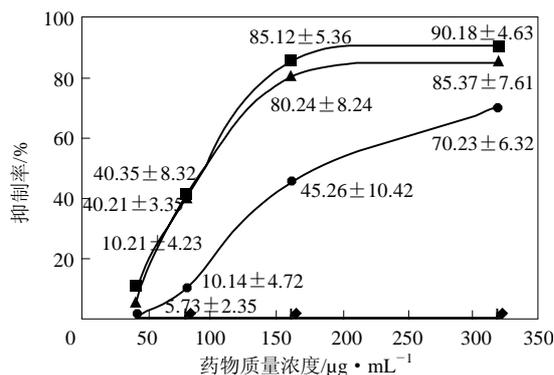


图4 各提取液对HepG2细胞的生长抑制

数据表示: $\bar{X} \pm S$, $n=6$; $P < 0.01$ 与对照组相比较

■—A1; ▲—A2; ●—A3; ✕—A4; ◆—A5

3.3 提取液体外抗癌作用的比较

乙醇提取物各部分的 IC_{50} 值如表1所示。由表1可知,石油醚部分A1的 IC_{50} 分别为151.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (95-D)、46.87 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (KB)和96.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (HepG2),均小于其余各部分的 IC_{50} ,这表明在乙醇提取物各部分中,A1的体外抗癌活性最高;而A4以及A5则检测不到有体外抗癌活性。A1、A2和A3对KB细胞的抑制作用最强,其 IC_{50} 分别达到46.87 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (95-D)、64.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (KB)和119.61 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (HepG2)。

表1 提取液的 IC_{50} 值 ($\bar{X} \pm S$, $n=3$)

药物	$IC_{50}/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$		
	95-D	KB	HepG2
A1	151.62 ± 3.58	46.87 ± 2.54	96.34 ± 2.94
A2	165.36 ± 4.21	64.50 ± 3.62	96.51 ± 3.67
A3	320.17 ± 2.87	119.61 ± 3.48	176.39 ± 2.89
A4	—	—	—
A5	—	—	—

注:“—”代表对癌细胞没有抑制作用。

3.4 提取物对细胞集落形成的影响

在空白组,细胞分裂增殖速度快,每皿中细胞集落数多,且组成每一集落的细胞数亦多,可达几百个。在含低剂量提取物的平皿中,癌细胞形成的集落少,组成集落的细胞数目也明显低于空白组。不同剂量的各提取物对各癌细胞集落形成的抑制率见表2,A1的3个剂量组对3种肿瘤细胞株集落形成的抑制作用都最强。而A4和A5基本没有抑制作用。A1、A2和A3对KB细胞的抑制率都比较高,当浓度为160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时分别达到了96.89%、90.53%和71.53%,而A4和A5对3种癌细胞株基本没有抑制作用,所得结果与MTT法结果基本吻合。

表2 芳樟树叶提取物对肿瘤细胞形成集落的抑制率

药物	浓度 / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	各癌细胞集落形成抑制率 ($\bar{X} \pm S$, $n=3$)		
		95-D	KB	HepG2
A1	40	—	39.08 ± 0.72	10.01 ± 0.53 ^①
	80	28.69 ± 1.02 ^①	87.37 ± 0.53 ^①	39.36 ± 0.83 ^①
	160	53.06 ± 1.86 ^②	96.89 ± 1.06 ^②	80.90 ± 3.97 ^②
A2	40	—	33.78 ± 0.48 ^①	5.56 ± 0.59
	80	5.08 ± 0.95	88.95 ± 1.16 ^①	34.27 ± 1.15 ^①
	160	41.14 ± 2.15 ^②	90.53 ± 0.36 ^②	77.98 ± 0.99 ^②
A3	40	—	9.71 ± 0.15	—
	80	—	28.95 ± 1.41 ^①	11.21 ± 0.74 ^①
	160	18.14 ± 1.16 ^②	71.53 ± 0.92 ^②	44.98 ± 0.57 ^②
A4	40	—	—	—
	80	—	4.68 ± 0.36	—
	160	—	11.14 ± 2.81 ^①	—
A5	40	—	—	—
	80	—	—	—
	160	—	—	—

注:与正常对照组比较,①表示 $P < 0.05$,②表示 $P < 0.01$,“—”代表对癌细胞没有抑制作用。

4 结论

MTT癌细胞抑制实验结果表明,芳樟树叶乙醇提取物的石油醚部分A1对人肺癌细胞(95-D)、人口腔表皮样癌细胞(KB)和肝癌细胞(HepG2)的增殖抑制作用都是最强的、氯仿部分A2和乙酸乙酯A3次之,而甲醇部分A4及水溶性部分A5对癌细胞基本没有抑制作用。

癌细胞集落形成实验结果与MTT法测的实验结果基本一致,进一步验证了芳樟树叶提取物的抗肿瘤活性。

芳樟树叶乙醇提取物的石油醚部分A1、氯仿部分A2以及乙酸乙酯部分A3对3种癌细胞都有不同程度的抑制作用,芳樟树叶的抗癌有效成分很可能主要存在于这三部分中。对芳樟树叶化学成分的研究表明,芳樟树叶除了含二萜类化合物外,还含有结构比较特殊的黄酮类、木脂素类、香豆素类等化合物,这些成分对于抗肿瘤活性化合物的筛选具有广阔的研究开发前景,而最值得关注的是二卞基丁内酯型木脂素类化合物,它是具有较高的抗肿瘤活性的木脂素类化合物。因此,对芳樟树叶中具体抗癌化合物的分离纯化定性等方面的研究仍很必要,是下一步研究工作重点。

参 考 文 献

- [1] 林翔云, 江崇基, 林君如, 等. [J]. 香料香精化妆品, 2002, 1:16~19.
- [2] 刘学群, 杜爱玲, 王春台, 等. [J]. 华中农业大学学报, 1996, 15(4): 333 - 337.
- [3] 甘聃, 陈功雨, 熊健, 等. [J]. 化工时刊, 2003, 17(1): 51 - 52.
- [4] 吴传茂, 吴周和, 伍业松. [J]. 氨基酸和生物资源, 2000, 22(2): 41-42.
- [5] Chang S T, Chen P F, Chang S C. [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2001, 77: 123 - 127.
- [6] Câmara J S, Herbert P, Marques J C, et al. [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 513: 203 - 207.
- [7] Viticchi C, Piantanelli L, Rossano F, et al. [J]. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 1996, 23, (1): 39 - 45.
- [8] Mukul K, Yoshinori A. [J]. *Chemical Physics Letters*, 2003, 374: 521 - 526.
- [9] Mosmann T. [J]. *J. Immunol Methods*, 1983, 65: 55 - 59.
- [10] Kirkpatrick D L. [J]. *Leukemia Res.*, 1990, 14: 459 - 464.
- [11] Hansen M B, Nielsen S E, Berg K. [J]. *J. Immunol Methods*, 1989, 119: 203 - 210.
- [12] Gianluca S B, Antonio D S, Alessandro C, et al. [J]. *J. Hepatol*, 1999, 30(5): 868 - 872.
- [13] 王松桂. 线性统计模型: 线性回归与方差分析[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999.

(编辑 史来娣)

· 化工专利 ·

一种综合利用磷肥及磷化工工业废水的方法

【公开(公告)号】CN1724340 【公开(公告)日】2006.01.25

一种综合利用磷肥及磷化工工业废水的方法, 涉及酸性废水的处理与利用方法。本方法包括: (1)将磷矿石粉碎或研磨至矿物单体解离, 加入清水搅拌调成矿浆; (2)按比例加入酸性废水, 充分搅拌, 调整矿浆 pH 值为 3~5; (3)调好的矿浆进入浮选机, 同时加入浮选捕收剂, 充气、刮泡, 即得到磷精矿。适用的磷矿石是碳酸盐型磷矿石, 其中含 MgO 的质量分数为 1%~15%; 加入清水所制成的矿浆含矿量为 40%±15%; 加入酸性废水与原矿的比例通常为 (0.2~0.7) 1; 适用的磷矿石选矿方法是反浮选工艺。使用本发明方法, 不仅可以保证磷矿石产品质量, 节约选矿生产中调整剂和水的费用, 同时节约大量的酸性废水的处理费用, 适用于高浓度磷复肥生产企业的废水处理与利用。

一种生态环保肥料的配制及工艺

【公开(公告)号】CN1721373 【公开(公告)日】2006.01.18

一种生态环保肥料的配制及工艺, 是由壳聚糖、菜籽粕水解提取物、蚯蚓提取物、海藻提取物、微量元素、过氧化氢、抗坏血酸、乙酸、植酸、柠檬酸、水组成。依照上述原料组成的配方及生产工艺配制的产品, 经大田试验, 均显著提高农产品产量质量, 减少农药化肥施用, 保护生态环境, 有着广阔的市场前景。

一种纯化煤液化油中芳烃的方法

【公开(公告)号】CN1718685 【公开(公告)日】2006.01.11

本发明公开了一种纯化煤液化油中芳烃的方法。该方法是将芳烃体积分数在 30% 以上的煤液化油精馏出 110~250 馏分, 再经萃取分离后, 得到混合芳烃油和非芳烃油; 混合芳烃油经进一步吸附分离后, 得到富芳烃油和贫芳烃油, 富芳烃油作为芳烃溶剂油组分, 非芳烃油和贫芳烃油可作为柴油调合组分。此外, 非芳烃油和贫芳烃油也可分别经吸附分离, 分离出的芳烃油作为芳烃溶剂油组分, 烷烃油作

为柴油调合组分。本发明与现有技术相比, 充分利用了煤液化油中芳烃含量高的特点, 最大量地分离出芳烃组分, 其余馏分可作为柴油高调合组分, 使原料油的吨增值率明显提高。

一种焦化废水处理及回用技术

【公开(公告)号】CN1721344 【公开(公告)日】2006.01.18

本发明涉及一种新型的焦化废水处理及回用技术, 其特点是采用物理化学方法处理焦化废水, 去除焦化废水中的氨氮、酚、氰、悬浮物等污染物, 使其达到可以回用的标准, 然后将处理后的焦化废水作为生产用水回用到转炉除尘、焦化洗氨、烧结等内部其他系统, 基本实现水不下河、废水零排放, 同时对焦化废水中的部分化学物质加以回收, 从而变废为宝。该技术克服了生化法处理焦化废水需补加 2~10 倍稀释用新鲜水、初期投入大、运行成本高、运行不稳定、占地面积大等缺陷, 不仅降低了焦化废水的处理成本, 而且为企业节约了大量的生产用水。

一种光触媒复合材料的制备方法

【公开(公告)号】CN1724143 【公开(公告)日】2006.01.25

本发明公开了一种在泡沫金属或斜拉金属网上复合纳米光催化材料的光触媒复合材料的制备方法。所采用的技术方案为: 首先, 以泡沫金属或者金属网作为基体, 对其表面进行电化学阳极氧化处理, 使其表面形成大比表面积的纳米晶态结构; 其次, 将经过上述处理的基体在含有铜和稀土元素的低浓度瓦特液中复合闪镀, 形成结合层与扩散层; 然后, 在已经配置好的具有光催化活性的有机钛溶胶中进行电泳浸渍, 取出后风干; 最后, 将风干后的基体置于低温烧结炉中进行烧结, 得到光触媒复合材料。利用本发明得到的产品化学性质稳定, 风阻低, 比表面积大, 光催化活性高, 抗菌性能优良, 可在自然光下反应, 应用于空气净化、饮用水、污水处理行业。

(摘自“中国化工在线”www.chemsina.com)