

4 种吴茱萸属植物叶片和果实的乙醇提取物及其体外抗肿瘤活性

靳桐^a, 印敏^a, 管福琴^a, 李冬玲^b, 佟海英^b, 冯煦^a, 单宇^{a, ①}, 王奇志^{a, ①}

[江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园); a. 江苏省植物资源研究与利用重点实验室,
b. 江苏省农业种质资源保护与利用平台, 江苏 南京 210014]

Ethanol extracts from leaves and fruits of four *Evodia* species and their *in vitro* antitumor activities JIN Tong^a, YIN Min^a, GUAN Fuqin^a, LI Dongling^b, TONG Haiying^b, FENG Xu^a, SHAN Yu^{a, ①}, WANG Qizhi^{a, ①} (Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences; a. Jiangsu Key Laboratory for the Research and Utilization of Plant Resources, b. Jiangsu Provincial Platform for Conservation and Utilization of Agricultural Germplasm, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2021, 30(2): 77-79

Abstract: Total extracts of 80% (volume fraction) ethanol (hereinafter referred to as total extracts) and its dichloromethane, ethyl acetate, and water fractions were obtained from leaves and fruits of four *Evodia* J. R. et G. Forst. species by using reflux extraction and solvent extraction, and their *in vitro* antitumor activities and toxicities were evaluated by using MTT method. The results show that the extraction rates of total extracts from leaves and fruits of *E. ailanthifolia* Pierre, *E. austrosinensis* Hand.-Mazz., *E. daniellii* (Benn.) Hemsl., and *E. delavayi* Dode are in the range of 13.00%–30.35%. The pharmacological experiment result shows that at the drug concentration of 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the inhibition rates of total extracts and its water fraction from leaves of *E. ailanthifolia*, ethyl acetate fraction of total extracts from fruits of *E. austrosinensis*, and total extracts from fruits of *E. daniellii* on breast cancer cell MDA-MB-231 and hepatoma cell HepG2 are higher than 50%, those of dichloromethane fraction of total extracts from leaves of *E. ailanthifolia* on three tumor cells are all higher than 50%, those of ethyl acetate fraction of total extracts from leaves of *E. ailanthifolia* on breast cancer cell MDA-MB-231 and colon cancer cell LoVo are higher than 50%, and their inhibition rates on the normal human aortic smooth muscle cell HASMC are lower than 40%. Therefore, above extracts have potential values as a source of natural antitumor drug.

关键词: 吴茱萸属; 抗肿瘤活性; MTT法; 毒性评价

Key words: *Evodia* J. R. et G. Forst.; antitumor activity; MTT method; toxicity evaluation

中图分类号: Q946; R284.2; R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2021)02-0077-03

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2021.02.12

吴茱萸属(*Evodia* J. R. et G. Forst.)植物的提取物及单体化合物不仅具有镇痛抗炎^[1]、改善胃肠道功能^[2]、保护心血管^[3]和治疗阿尔茨海默病^[4]等作用,还具有抑制乳腺癌^[5]、结肠癌^[6]、肝癌^[7]和黑色素瘤^[8]等肿瘤相关疾病的药理活性。目前,对吴茱萸属植物的研究主要集中在《中华人民共和国药典》中收录的吴茱萸[*E. rutaecarpa* (Juss.) Benth.]、石虎[*E. rutaecarpa* var. *officinalis* (Dode) Huang]和疏毛吴茱萸[*E. rutaecarpa* var. *bodinieri* (Dode) Huang]3种基源植物^[9]。本课题组前期对吴茱萸属植物的资源调查和化学成分动态分析等方面进行了研究^[10-12]。依据亲缘关系和生源合成途径,同属植物在化学成分和药理活性方面具有相似性^[13]。

鉴于此,本文以云南吴茱萸(*Evodia ailanthifolia* Pierre)、华南吴茱萸(*E. austrosinensis* Hand.-Mazz.)、臭檀吴茱萸[*E. daniellii* (Benn.) Hemsl.]和丽江吴茱萸(*E. delavayi* Dode)为研究对象,通过回流提取和分段萃取的方法获得4种植物叶片和果实的不同极性提取物,采用MTT法测定各提取物对3种肿瘤细胞(包括乳腺癌细胞MDA-MB-231、结肠癌细胞LoVo和肝癌细胞HepG2)增殖的抑制率,并考察其对正常细胞(人主动脉平滑肌细胞HASMC)的毒性作用,从而评价其安全性,以期探究这4种吴茱萸属植物的药理活性,并为中药吴茱萸的同属植物资源在医药方面的综合利用提供参考依据。

收稿日期: 2020-09-26

基金项目: 江苏省林业科技创新与推广项目(LYKJ[2020]09); 江苏省植物资源研究与利用重点实验室开放基金项目(JSPKLB201925; JSPKLB202051)

作者简介: 靳桐(1994—),女,山西长治人,硕士研究生,主要从事植物天然产物化学方面的研究。

①通信作者 E-mail: shanyu@cnbg.net; wangqizhi@cnbg.net

引用格式: 靳桐, 印敏, 管福琴, 等. 4种吴茱萸属植物叶片和果实的乙醇提取物及其体外抗肿瘤活性[J]. 植物资源与环境学报, 2021, 30(2): 77-79.

1 材料和方法

1.1 材料

云南吴萸、华南吴萸和丽江吴萸于2014年10月采自云南西双版纳,臭檀吴萸于2014年9月采自江苏连云港。参照LY/T 1211—1999中的方法,在植物停止生长前1个月左右,分别从每种植物同一植株树冠中上部向阳面采集适量叶片和果实。以上植物样品均由江苏省中国科学院植物研究所袁昌齐研究员鉴定,植物标本保存于江苏省中国科学院植物研究所天然产物化学研究中心。

乳腺癌细胞MDA-MB-231、结肠癌细胞LoVo、肝癌细胞HepG2及人主动脉平滑肌细胞HASMC购自中国科学院上海生科院细胞资源中心。高糖型DMEM培养基(1×)、1640培养基(1×)、胎牛血清(FBS)和青霉素-链霉素购自美国Invitrogen公司。

1.2 方法

1.2.1 提取方法 取上述4种吴茱萸属植物的叶片和果实,于55℃烘干至恒质量,各取300g,按料液比($m:V$)1:8加入体积分数80%乙醇,回流提取3次,每次3h,抽滤后合并滤液,分别用R-100旋转蒸发器(瑞士Buchi公司)减压浓缩至流浸膏300mL,取5mL作为总提取物留样;然后分别依次加入150mL二氯甲烷和乙酸乙酯,于48℃水浴旋转萃取3次,每次10min,分别合并萃取液并浓缩,于55℃烘干至恒质量,分别得到二氯甲烷部位和乙酸乙酯部位,剩余浸膏于55℃干燥至恒质量作为水部位。以上浸膏各取0.1g,用二甲基亚砜(DMSO)配置成质量浓度10mg·mL⁻¹的溶液。测定前,将其加入含体积分数10%胎牛血清的培养基中,稀释至给药浓度10μg·mL⁻¹。

1.2.2 细胞增殖抑制率的测定方法 MDA-MB-231、HepG2和HASMC细胞培养于含体积分数10%胎牛血清和体积分数1%青霉素-链霉素的DMEM培养基中,LoVo细胞培养于相同方法配制的1640培养基中,然后置于体积分数5%CO₂、温度37℃、饱和湿度的细胞培养箱中培养,每隔1d更换培养液进行细胞传代。取处于对数生长期的细胞进行活性测定,调整细胞浓度为1×10⁵mL⁻¹,接种于96孔板,每孔100μL细胞悬浮液。阳性对照组为10mg·mL⁻¹吴茱萸碱(EVO),溶剂为DMSO;空白对照组为不含药物的DMSO。给药组和阳性对照组均用培养液稀释至100μg·mL⁻¹,空白对照组进行同等倍数的稀释,每孔加药体积均为10μL,使最终给药浓度为10μg·mL⁻¹。将96孔培养板置于37℃培养箱中孵育72h;然后向各孔中加入10μL 5mg·mL⁻¹MTT(溶剂为PBS缓冲液),置于培养箱中继续孵育4h后吸出培养液,向各孔加入100μL DMSO,振荡10min。用Infinite M200酶标仪(瑞士Tecan公司)在波长570nm处测量每孔的吸光度(OD)。实验设置3次重复。

1.3 数据处理和分析

根据公式“各部位提取率=(各部位浸膏质量/原植物样品干质量)×100%”计算各部位样品的提取率。根据公式“细胞增殖抑制率=(1-给药组或阳性对照组的OD值/空白对照组OD值)×100%”计算样品对细胞的增殖抑制率。采用SPSS 22.0统计分析软件对实验数据进行统计和分析。

2 结果

2.1 4种吴茱萸属植物叶片和果实提取物的提取率

结果表明:4种吴茱萸属植物叶片和果实体积分数80%乙醇总提取物(以下简称总提取物)的提取率在13.00%~30.35%之间,其中,云南吴萸果实的提取率最高(30.35%),臭檀吴萸叶片及丽江吴萸叶片和果实的提取率均高于20%。

2.2 对肿瘤细胞增殖的抑制作用

在10μg·mL⁻¹给药浓度下,吴茱萸属4种植物叶片和果实总提取物及其二氯甲烷部位、乙酸乙酯部位和水部位对3种肿瘤细胞及1种正常细胞增殖的抑制率见表1。结果显示:云南吴萸叶片总提取物及其水部位、华南吴萸果实总提取物的乙酸乙酯部位以及臭檀吴萸果实总提取物对乳腺癌细胞MDA-MB-231和肝癌细胞HepG2的抑制率均高于50%,云南吴萸叶片总提取物的二氯甲烷部位对3种肿瘤细胞的抑制率均高于50%,云南吴萸叶片总提取物的乙酸乙酯部位对乳腺

表1 4种吴茱萸属植物叶片和果实乙醇提取物对细胞增殖的抑制率($\bar{X} \pm SD$)

Table 1 Inhibition rate of ethanol extracts from leaves and fruits of four *Evodia* J. R. et G. Forst. species on cell proliferation ($\bar{X} \pm SD$)

提取物 ¹⁾ Extract ¹⁾	细胞增殖抑制率/% ²⁾ Inhibition rate on cell proliferation ²⁾			
	MDA-MB-231	LoVo	HepG2	HASMC
云南吴萸 <i>Evodia ailanthifolia</i>				
T _L	53.11±4.10a	35.22±2.11b	60.22±3.22a	18.99±0.94c
DCM _L	51.86±0.97c	60.13±1.24b	74.16±2.00a	39.23±8.46d
EAC _L	63.41±3.17a	50.12±0.98b	12.75±4.90c	11.54±5.95c
W _L	51.86±0.97a	18.88±3.45b	53.47±3.87a	26.07±0.89b
T _F	67.09±6.10c	80.22±1.39b	74.22±0.81c	90.11±3.00a
DCM _F	94.79±1.07a	95.44±0.25a	95.13±0.56a	95.10±0.33a
EAC _F	94.70±0.23a	92.24±0.33a	90.70±7.80a	94.98±0.08a
W _F	63.41±3.17bc	61.29±3.29c	74.99±5.71ab	88.95±0.86a
华南吴萸 <i>Evodia austrosinensis</i>				
T _L	95.33±6.97a	40.70±5.37c	84.08±1.06ab	83.56±1.22b
DCM _L	84.53±4.31a	29.49±8.08c	92.89±0.72a	65.18±2.53b
EAC _L	77.24±0.55b	50.36±5.58c	91.25±0.75a	93.67±0.40a
W _L	94.62±0.13a	22.61±2.59c	91.55±0.61a	68.44±4.16b
T _F	50.57±2.12b	13.45±5.11c	73.10±1.21a	45.97±3.41b
DCM _F	96.03±0.36a	94.01±0.63a	95.23±0.31a	92.40±1.27a
EAC _F	82.64±2.48a	19.20±2.85b	80.14±1.78a	25.63±6.05b
W _F	-11.23±3.23b	6.76±7.05a	7.28±7.02a	6.24±5.68a

续表1 Table 1 (Continued)

提取物 ¹⁾ Extract ¹⁾	细胞增殖抑制率/% ²⁾ Inhibition rate on cell proliferation ²⁾			
	MDA-MB-231	LoVo	HepG2	HASMC
臭檀吴茱萸 <i>Evodia daniellii</i>				
T _L	3.20±1.08b	30.55±8.37a	35.07±2.10a	35.36±1.22a
DCM _L	20.66±4.26b	19.97±4.11b	22.67±9.08b	88.73±0.35a
EAC _L	12.21±3.59b	42.51±7.57a	15.91±4.90b	7.21±1.52c
W _L	-5.22±2.11d	12.70±3.90b	37.05±6.17a	4.68±3.84c
T _F	50.85±1.46b	18.87±4.96d	75.03±7.23a	31.38±2.11c
DCM _F	87.00±2.82a	15.14±3.72c	66.69±2.20b	65.37±1.58b
EAC _F	89.74±2.47a	23.03±7.82d	74.69±4.29b	50.05±5.67c
W _F	3.32±2.38d	12.51±10.84b	51.37±7.81a	11.91±2.30c
丽江吴茱萸 <i>Evodia delavayi</i>				
T _L	3.19±5.29b	5.63±2.08b	23.44±1.50a	5.39±0.88b
DCM _L	-18.21±3.25c	12.68±6.93a	5.95±4.98b	6.76±2.02b
EAC _L	22.61±3.37b	21.17±4.09b	43.13±4.75a	19.92±4.78b
W _L	6.23±2.36a	4.63±5.06a	7.23±2.58a	8.94±5.07a
T _F	85.09±6.03a	26.77±0.75b	75.90±8.05a	80.43±3.24a
DCM _F	77.04±3.43b	23.71±6.76c	93.90±0.16a	95.11±0.10a
EAC _F	30.67±4.52b	23.89±6.44b	76.96±11.85a	72.04±1.62a
W _F	81.71±1.56b	12.13±2.69c	94.07±0.31a	95.00±0.15a
EVO	53.84±4.51a	55.30±2.95a	58.85±5.98a	49.20±5.10a

¹⁾ T_L: 叶片总提取物 Total extracts from leaves; DCM_L: 叶片总提取物的二氯甲烷部位 Dichloromethane fraction of total extracts from leaves; EAC_L: 叶片总提取物的乙酸乙酯部位 Ethyl acetate fraction of total extracts from leaves; W_L: 叶片总提取物的水部位 Water fraction of total extracts from leaves; T_F: 果实总提取物 Total extracts from fruits; DCM_F: 果实总提取物的二氯甲烷部位 Dichloromethane fraction of total extracts from fruits; EAC_F: 果实总提取物的乙酸乙酯部位 Ethyl acetate fraction of total extracts from fruits; W_F: 果实总提取物的水部位 Water fraction of total extracts from fruits; EVO: 吴茱萸碱(阳性对照) Evodiamine (positive control).

²⁾ MDA-MB-231: 乳腺癌细胞 Breast cancer cell; LoVo: 结肠癌细胞 Colon cancer cell; HepG2: 肝癌细胞 Hepatoma cell; HASMC: 人主动脉平滑肌细胞 Human aortic smooth muscle cell. 同行中不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercases in the same row indicate the significant ($P < 0.05$) difference.

癌细胞 MDA-MB-231 和结肠癌细胞 LoVo 的抑制率均高于 50%, 且对正常的人主动脉平滑肌细胞 HASMC 的抑制率均低于 40%, 表明其对肿瘤细胞的选择性较好, 可作为天然抗肿瘤物质资源。

本研究得到的是粗有效提取物, 由于粗有效提取物中化学成分较复杂, 具体发挥药效的是哪一种或哪几种成分还有待进一步分离、纯化及结构鉴定, 其有效部位的提取工艺也有待进一步研究。此外, MTT 法只适用于抗肿瘤前体药物的体外初筛实验, 有效提取物的抗肿瘤活性还有待通过动物体内实验和进一步的机制探究进行验证。

参考文献:

- [1] 谢梅林, 薛洁, 艾华, 等. 吴茱萸提取物调脂、镇痛及抗炎作用实验研究[J]. 中草药, 2005, 36(4): 572-574.
- [2] 李晓红, 史瑞, 刘礼剑, 等. 左金丸及其拆方治疗萎缩性胃炎模型大鼠的疗效观察[J]. 中国中医基础医学杂志, 2012, 18(4): 383-385.
- [3] TIAN K M, LI J J, XU S W, et al. Rutaecarpine: a promising cardiovascular protective alkaloid from *Evodia rutaecarpa* (Wu Zhu Yu)[J]. Pharmacological Research, 2019, 141: 541-550.
- [4] FANG Z, TANG Y, YING J, et al. Traditional Chinese medicine for anti-Alzheimer's disease: berberine and evodiamine from *Evodia rutaecarpa*[J]. Chinese Medicine, 2020, 15: 82.
- [5] DU J, SUN Y, LU Y Y, et al. Berberine and evodiamine act synergistically against human breast cancer MCF-7 cells by inducing cell cycle arrest and apoptosis[J]. Anticancer Research, 2017, 37(11): 6141-6151.
- [6] HUANG J, CHEN Z H, REN C M, et al. Antiproliferation effect of evodiamine in human colon cancer cells is associated with IGF-1/HIF-1 α downregulation[J]. Oncology Reports, 2015, 34(6): 3203-3211.
- [7] ZHAO S, XU K, JIANG R, et al. Evodiamine inhibits proliferation and promotes apoptosis of hepatocellular carcinoma cells via the Hippo-Yes-Associated Protein signaling pathway[J]. Life Sciences, 2020, 251: 117424.
- [8] LIN H, LIN L, CHOI Y, et al. Development and *in-vitro* evaluation of co-loaded berberine chloride and evodiamine ethosomes for treatment of melanoma[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2020, 581: 119278.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020年版(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 178.
- [10] SU X L, XU S, SHAN Y, et al. Three new quinazolines from *Evodia rutaecarpa* and their biological activity[J]. Fitoterapia, 2018, 127: 186-192.
- [11] 王奇志, 严奇, 靳桐, 等. 吴茱萸属植物中喹啉生物碱的分布、生物活性和化学合成[J]. 植物资源与环境学报, 2019, 28(4): 84-98.
- [12] 李懿恒, 黄佳楠, 刘潇, 等. 吴茱萸和臭辣吴茱萸果实化学成分及不同采收时间主要成分含量的变化[J]. 植物资源与环境学报, 2018, 27(1): 112-114.
- [13] 赖新梅, 杨雪梅, 陈梅妹, 等. 基于植物亲缘关系的中药功效频数统计分析[J]. 情报探索, 2014(2): 18-19.

(责任编辑: 张明霞)