

助于缩小创口面积，而煅炉甘石没有明显效果，这可能是因为炉甘石的碱性较煅炉甘石略强，对创面的收敛功效较强。动脉缺血、静脉淤血和局部的失神经或神经病变是导致慢性难愈性创面的直接原因，创面局部的成纤维细胞和表皮细胞的分裂繁殖速度减慢和细胞外基质合成减少、分解加速是创面经久不愈的病理基础，因而促进创面的血液循环对于促进创面愈合非常重要^[2]。炉甘石和煅炉甘石均可以促进肉芽组织中的新生毛细血管生成，加快毛细血管生长，改善血液循环。其中煅炉甘石作用更为明显，能够加速创口愈合，对于深达肌层的小面积全层皮肤缺损创面模型具有良好的疗效，具有生肌作用。

成纤维细胞是创面愈合过程中的主体细胞，其生物学效应在创面修复中起着至关重要的作用。成纤维细胞增殖或迁移，使伤口处细胞数量显著增加，从而实现胶原合成、分泌与沉积的增加，填充皮肤缺损，促进创面愈合；相反，成纤维细胞增殖或迁移缓慢，伤口处细胞数量增加缓慢，胶原合成、分泌与沉积缓慢，则创面难以愈合^[7-8]。炉甘石和煅炉甘石在促进肉芽组织中的新生毛细血管生成的同时，还可以促进成纤维细胞增生，增加受损创面的血供，加速创口愈合，其中煅炉甘石的生肌作用较明显。

炉甘石、煅炉甘石均能够改善创面的血液循环，加速创面的新陈代谢，促进伤口成纤维细胞和毛细血管的形成，加快肉芽组织增生，从而加速皮肤创

口的愈合。这与历代临床用于治疗疮疡等完全吻合。

创面修复愈合是多种细胞、生长因子和细胞外基质之间相互作用的动态过程。新生毛细血管的生成和生长以及成纤维细胞的增殖受很多因素的调控，如细胞因子、细胞外基质降解酶及其组织抑制因子等，炉甘石具体作用机制有待于进一步研究。

参考文献：

- [1] 贺美林，孔庆云，雷翠云. 生肌法治疗慢性皮肤溃疡研究进展[J]. 湖北中医杂志，2009，31(4)：62-64.
- [2] 易成刚，郭树忠，陈建宗. 生肌类中药的理论与实验研究[J]. 中国临床康复，2004，8(29)：6470-6471.
- [3] 中华人民共和国卫生部药政局. 中国医院制剂规范[M]. 北京：中国医药科技出版社，1995：96.
- [4] 刘慧，孙志强，王徽. 炉甘石临床应用研究进展[J]. 齐鲁药事，2010，29(8)：489-490.
- [5] 陈平，张自强，施展，等. 生肌玉红膏促进大鼠背部创面愈合的实验研究[J]. 云南中医中药杂志，2010，31(5)：58-59.
- [6] 李祥，刘元芬，项晓人，等. 石膏炮制前后的生肌药效比较研究[J]. 中西医结合学报，2006，4(6)：624-627.
- [7] 王振宜，李斌，唐汉钧，等. 祛瘀生肌法对 SD 大鼠创面模型新生肉芽组织中转化生长因子- β 的动态影响[J]. 上海中医药大学学报，2008，22(5)：48-51.
- [8] 张玮. 几类常用外用中药成分对人皮肤成纤维细胞胶原代谢的调节作用[D]. 北京：北京中医药大学，2006：8-9.

(编辑：梁进权)

吉祥草及其果实不同提取部位的体外抗肿瘤活性筛选

刘 海¹，杨建琼²，马华谋²，徐小军² (1. 赣南医学院，江西 赣州 341000；2. 赣南医学院第一附属医院，江西 赣州 341000)

摘要：目的 探讨吉祥草及其果实的乙醇提取物及其不同溶剂萃取部位对肿瘤细胞的体外抑制作用，筛选抗肿瘤活性部位。**方法** 以人肾透明细胞腺癌 786-O 细胞、人结肠癌 HT-29 细胞及人肺腺癌 A549 细胞为供试细胞，采用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法对吉祥草及其果实的不同提取部位进行体外抗肿瘤活性筛选。**结果** 吉祥草乙醇提取部位、正丁醇分离部位及其果实乙酸乙酯分离部位、正丁醇分离部位对肿瘤细胞均有不同程度的抑制作用，其中吉祥草正丁醇分离部位对 786-O、HT-29、A549 的细胞毒性较强，其半数抑制浓度(IC₅₀) 分

收稿日期：2013-01-11

作者简介：刘海，男，工程师，研究方向：药物制剂研究。Email: liuhaiuser@163.com。通讯作者：杨建琼，讲师，研究方向：天然产物活性成分研究。Email: yangjianqiong2010@163.com。

基金项目：江西省科技厅青年科学基金资助项目(20132BAB215033)；江西省卫生厅中医药科研基金项目(2012A132)。

别为: 92.78, 96.04, 63.24 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 果实正丁醇分离部位对 786-O、HT-29、A549 细胞有一定的增殖抑制作用, 其 IC_{50} 分别为: 179.03, 189.67, 329.95 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结论 吉祥草正丁醇分离部位是吉祥草主要的抗肿瘤活性部位。

关键词: 吉祥草; 抗肿瘤活性; 四甲基偶氮唑盐比色法

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2013)04-0337-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.04.003

In-vitro Screening of Anti-tumor Active Extracts from Herb of *Reineckia carnea* and Its Fruits

LIU Hai¹, YANG Jianqiong², MA Huamou², XU Xiaojun² (1. Gannan Medical College, Ganzhou 341000 Jiangxi, China; 2. The First Affiliated Hospital of Gannan Medical College, Ganzhou 341000 Jiangxi, China)

Abstract: Objective To screen the anti-tumor activity of the extracts from the herb of *Reineckia carnea* and its fruits. **Methods** With human kidney clear cell adenocarcinoma 786-O cells, human colon carcinoma HT-29 cells and human pulmonary adenocarcinoma A549 cells as the tested cells, the in-vitro anti-tumor activity of ethanol extract, n-butanol extract and acetoacetate extract isolated from the herb of *Reineckia carnea* and its fruits was measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) colorimetry. **Results** Ethanol extract and n-butanol extract from the herb of *Reineckia carnea*, and acetoacetate extract and n-butanol extract from its fruits showed various anti-tumor activity on the tumor cells. The 50 % inhibiting concentration (IC_{50}) of n-butanol extract from the herb of *Reineckia carnea* against 786-O, HT-29 and A549 cell lines was 92.78, 96.04 and 63.24 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively; n-butanol extract from the fruits of *Reineckia carnea* had certain proliferation-inhibitory effect on 786-O, HT-29 and A549 cell lines, the IC_{50} being 179.03, 189.67 and 329.95 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. **Conclusion** n-butanol extract from the herb of *Reineckia carnea* is the main anti-tumor active part.

Keywords: *Reineckia carnea*; Anti-tumor activity; Methyl thiazolyl tetrazolium colorimetry

天然药物对肿瘤等疑难病症具有独特疗效和毒副作用小的特点^[1], 因此, 从天然药物尤其是民族药物中寻找新的抗肿瘤活性成分具有十分重要的现实意义。吉祥草 *Reineckia carnea* (Andr.) Kunth. 为百合科吉祥草属植物吉祥草的全草, 又名观音草、小叶万年青等。百合科植物中的一些甾体皂苷类化合物具有很强的抗肿瘤活性^[2], 如从百合科虎眼万年青分离得到的胆甾醇类皂苷 OSW-1 及其同系物, 对恶性肿瘤细胞具有极强的毒性, 近年来对吉祥草的化学成分研究表明其含有的母核结构和 OSW-1 相似的甾体皂苷类等化合物^[3-7]。目前对吉祥草抗肿瘤方面的生物活性研究尚未见文献报道。本文以 3 株肿瘤细胞为供试细胞, 对吉祥草及其果实的不同提取部位进行了抗肿瘤活性的比较研究。

1 材料与方法

1.1 仪器 IX71 智能型倒置荧光相差显微镜(日本

Olympus 公司); 连续光谱多功能酶标仪 (Varioskan Flash, 美国 Thermo Fisher 公司); CKX 41 倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司); Rotavapor R-220 旋转蒸发仪(瑞士 Büchi 公司); FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司); Forma 311 CO_2 培养箱(美国 Thermo 公司)。

1.2 药物及试剂 吉祥草及吉祥草果实(采集于贵州清镇, 经贵阳中医学院陈德媛教授鉴定为百合科吉祥草 *Reineckia carnea* (Andr.) Kunth.); RPMI-1640 培养基和 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司); 胎牛血清和新生小牛血清(美国 Gibco 公司); 四甲基偶氮唑盐 (MTT, 美国 Sigma 公司); 其他试剂均为分析纯。

1.3 细胞株 人结肠癌 HT-29 细胞和人肾透明细胞腺癌 786-O 细胞(赣南医学院科研中心); 人肺腺癌 A549 细胞(来源于美国 ATCC 细胞库)。

1.4 供试药提取与分离 吉祥草干燥全草 10 kg, 粉碎, 用 95 % 的乙醇加热回流提取 3 次, 每次 3 h,

滤过，合并滤液，减压浓缩，得乙醇浸膏。在乙醇浸膏中加入适量蒸馏水制成混悬液，然后依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取，分别合并萃取液，减压浓缩，分别得到石油醚浸膏(40 g)、乙酸乙酯浸膏(340 g)和正丁醇浸膏(1.20 kg)。

吉祥草干燥果实 2 kg，用 95 %的乙醇加热回流提取 3 次，按上述方法提取分离后分别得到石油醚浸膏(5 g)、乙酸乙酯浸膏(40 g)和正丁醇浸膏(260 g)。

1.5 供试溶液的制备 分别称取已干燥至恒重的吉祥草及其果实的乙醇、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇浸膏 0.5 g，精密称定，用二甲基亚砜(DMSO)溶解于 10 mL 容量瓶中，配制成质量浓度为 50 g·L⁻¹ 的各提取部位供试液，即乙醇提取部位、石油醚分离部位、乙酸乙酯分离部位和正丁醇分离部位，4 ℃冰箱保存，临用前用培养液稀释分别配制成不同浓度各提取部位供试液，并使各提取部位所含 DMSO 的体积分数小于 0.1 %。

1.6 细胞培养 在 5 %CO₂、37℃条件下，用含 10 %胎小牛血清的 RPMI-1640 培养液传代培养 786-O 细胞，DMEM 培养基添加 10 %胎牛血清后分别传代培养 A549 细胞和 HT-29 细胞，实验用细胞均处于对数生长期。

1.7 细胞增殖抑制实验^[8] 分别取对数生长期细胞接种于 96 孔板培养，常规条件培养 24 h 后，分组并分别加入经培养基稀释的不同浓度各提取部位供试液(200 μL)，同时设置对照组孔(加入等体积的培养液)，见表 1~ 表 3。各组均设 6 个复孔，置 5 %CO₂、37 ℃孵箱培养，作用 24 h 后每孔加入 MTT(5 g·L⁻¹) 20 μL，孵育 4 h 后，小心吸弃孔内上清液，每孔加入 DMSO 150 μL，振荡待蓝色晶体溶解后，酶标仪于 570 nm (参考波长 630 nm) 处检测每孔的吸光度(A)值，确定药物对肿瘤细胞的抑制率。细胞的生长抑制率(%)=[1 - 实验组(A_{570 nm} - A_{630 nm})/ 对照组(A_{570 nm} - A_{630 nm})] × 100 %。采用 lgC- 抑制率回归分析法计算半数抑制浓度(IC₅₀)。

1.8 统计学处理方法 应用 SPSS 13.0 统计软件，组间比较用 *t* 检验，*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 吉祥草及其果实的不同提取部位对 786-O、HT-29、A549 细胞的增殖抑制作用 见表 1~ 表 3。吉祥

草全草的乙醇提取部位、正丁醇分离部位及其果实乙酸乙酯分离部位、正丁醇分离部位对肿瘤细胞均有不同程度的抑制作用，其中全草正丁醇分离部位对 786-O、HT-29、A549 的细胞毒性较强，其 IC₅₀ 分别为：92.78，96.04，63.24 mg·L⁻¹；果实正丁醇分离部位对 3 株肿瘤细胞也有一定的增殖抑制作用，其 IC₅₀ 分别为：179.03，189.67，329.95 mg·L⁻¹。从结果数据分析可知，全草正丁醇分离部位的抗肿瘤活性大于果实正丁醇分离部位，其对 3 株肿瘤细胞中的 A549 细胞的增殖抑制作用最强且呈剂量依赖性。

表 1 各提取部位对 786-O 细胞作用 24 h 后的增殖抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, *n*=3)

Table 1 Inhibitory effects of different parts of *Reineckia carnea* on 786-O cells after co-culturing for 24 h

组别	浓度 /mg·L ⁻¹	抑制率 /%	IC ₅₀ /mg·L ⁻¹	组别	浓度 /mg·L ⁻¹	抑制率 /%	IC ₅₀ /mg·L ⁻¹
全草	25	12.12 ± 0.60	124.05	果实	50	3.89 ± 0.38	741.50
乙醇	50	18.16 ± 1.02**		乙醇	100	8.56 ± 0.74	
	100	37.83 ± 2.60**			200	20.79 ± 1.77	
	200	70.42 ± 3.51**			400	35.89 ± 3.12	
	400	83.56 ± 1.65**			800	47.66 ± 2.47	
全草	100	4.03 ± 0.21**	> 1000	果实	100	6.12 ± 0.53	> 1000
石油醚	200	7.15 ± 0.31**		石油醚	200	11.80 ± 0.81	
	400	16.02 ± 0.99*			400	20.12 ± 1.35	
	800	23.12 ± 1.18			800	25.32 ± 1.79	
	1600	37.25 ± 1.86			1600	42.31 ± 2.28	
全草乙	50	6.12 ± 0.22**	956.09	果实乙	50	2.97 ± 0.25	341.20
酸乙酯	100	9.48 ± 0.57		酸乙酯	100	10.33 ± 0.81	
	200	15.05 ± 0.63**			200	31.22 ± 2.02	
	400	30.25 ± 1.27**			400	60.40 ± 2.72	
	800	48.36 ± 1.69**			800	78.88 ± 3.63	
全草正	25	10.12 ± 0.67**	92.78	果实正	50	6.36 ± 0.48	179.03
丁醇	50	30.46 ± 1.55**		丁醇	100	23.63 ± 1.23	
	100	63.56 ± 2.92			200	60.56 ± 3.82	
	200	76.23 ± 2.44*			400	87.98 ± 4.05	
	400	86.17 ± 3.88			800	92.62 ± 4.72	

注：与相同部位、相同剂量的果实组比较，**P* < 0.05，***P* < 0.01。

3 讨论

本实验在细胞水平上探讨了吉祥草及其果实不同提取部位的体外抗肿瘤活性，结果表明，吉祥草全草的乙醇提取部位、正丁醇分离部位以及果实乙酸乙酯分离部位、正丁醇分离部位对 786-O、HT-29、A549 肿瘤细胞均有不同程度的抑制作用；相同提取部位、相同剂量相比较，除全草乙酸乙酯

表 2 各提取部位对 HT-29 细胞作用 24 h 后的增殖抑制作用
($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Inhibitory effects of different parts of *Reineckia carnea* on HT-29 cells after co-culturing for 24 h

组别	浓度 /mg·L ⁻¹	抑制率 /%	IC ₅₀ /mg·L ⁻¹	组别	浓度 /mg·L ⁻¹	抑制率 /%	IC ₅₀ /mg·L ⁻¹
全草	25	6.24 ± 0.48	118.94	果实	50	5.24 ± 0.46	838.91
乙醇	50	18.79 ± 1.05**		乙醇	100	10.41 ± 0.64	
	100	46.56 ± 1.58**			200	32.92 ± 2.33	
	200	75.38 ± 2.86**			400	35.21 ± 1.90	
	400	85.23 ± 3.84**			800	40.23 ± 1.72	
全草	100	4.05 ± 0.32**	> 1000	果实	100	6.12 ± 0.51	> 1000
石油醚	200	10.53 ± 0.48		石油醚	200	11.80 ± 0.79	
	400	14.78 ± 1.22**			400	20.12 ± 0.92	
	800	25.73 ± 1.68			800	25.32 ± 1.46	
	1600	35.49 ± 1.89*			1600	42.31 ± 2.58	
全草乙	50	2.53 ± 0.12	830.70	果实乙	50	2.24 ± 0.17	388.67
酸乙酯	100	7.59 ± 0.32**		酸乙酯	100	10.12 ± 0.67	
	200	13.78 ± 0.89**			200	32.19 ± 2.32	
	400	28.89 ± 2.05**			400	55.25 ± 2.65	
	800	47.89 ± 2.49**			800	70.72 ± 2.75	
全草正	25	8.12 ± 0.35	96.04	果实正	50	7.63 ± 0.67	189.67
丁醇	50	31.03 ± 1.09**		丁醇	100	30.01 ± 2.16	
	100	65.14 ± 2.54**			200	62.93 ± 2.95	
	200	75.56 ± 4.68*			400	77.87 ± 4.12	
	400	85.47 ± 4.61			800	87.82 ± 4.65	

注：与相同提取部位、相同剂量的果实组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

部位对 786-O、HT-29 的细胞毒性弱于果实外，全草其他分离部位对 3 株细胞的作用强度均大于果实相应分离部位。另外，全草及果实正丁醇分离部位对 786-O、HT-29、A549 肿瘤细胞均有不同程度的增殖抑制作用，其中全草作用 24 h 的 IC₅₀ 分别为：92.78，96.04，63.24 mg·L⁻¹；果实的 IC₅₀ 分别为：179.03，189.67，329.95 mg·L⁻¹。从表中数据分析可知，全草正丁醇分离部位的抗肿瘤活性大于果实正丁醇分离部位，其对 A549 的细胞毒性最强且呈剂量依赖关系。通过本实验，我们初步确定吉祥草中富含甾体皂苷类化合物的正丁醇分离部位为吉祥草主要的抗肿瘤活性部位，有望从中优选出活性强、毒性低的药物候选分子，为创制自主知识产权的新型抗肿瘤药物奠定基础。

参考文献：

[1] 徐宏，杜江. 苗药观音草在民间的使用及开发应用情况[J]. 中国民

表 3 各提取部位对 A549 细胞作用 24 h 后的增殖抑制作用
($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3 Inhibitory effects of different parts of *Reineckia carnea* on A549 cells after co-culturing for 24 h

组别	浓度 /mg·L ⁻¹	抑制率 /%	IC ₅₀ /mg·L ⁻¹	组别	浓度 /mg·L ⁻¹	抑制率 /%	IC ₅₀ /mg·L ⁻¹
全草	25	35.23 ± 1.97	30.81	果实	50	3.12 ± 0.25	903.14
乙醇	50	68.47 ± 3.28**		乙醇	100	8.63 ± 0.65	
	100	85.56 ± 3.93**			200	18.56 ± 1.17	
	200	89.41 ± 4.78**			400	32.14 ± 1.74	
	400	93.75 ± 6.28**			800	40.63 ± 1.83	
全草	100	6.52 ± 0.25**	>1000	果实	100	4.15 ± 0.35	> 1000
石油醚	200	17.89 ± 0.84**		石油醚	200	7.36 ± 0.57	
	400	20.63 ± 1.19**			400	15.64 ± 1.20	
	800	35.79 ± 2.39			800	35.21 ± 2.67	
	1600	42.35 ± 2.31			1600	45.23 ± 2.62	
全草乙	50	7.23 ± 0.52**	527.51	果实乙	50	2.53 ± 0.18	607.10
酸乙酯	100	15.46 ± 0.82		酸乙酯	100	15.35 ± 0.42	
	200	31.82 ± 1.94*			200	28.23 ± 0.98	
	400	43.52 ± 1.57*			400	36.68 ± 1.96	
	800	57.21 ± 2.46*			800	50.56 ± 2.52	
全草正	25	35.15 ± 1.44	63.24	果实正	50	4.78 ± 0.42	329.95
丁醇	50	43.26 ± 2.25**		丁醇	100	10.56 ± 0.89	
	100	60.23 ± 3.37**			200	32.43 ± 2.01	
	200	70.42 ± 4.51**			400	62.31 ± 3.18	
	400	75.56 ± 3.55**			800	78.65 ± 3.54	

注：与相同提取部位、相同剂量的果实组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

族医药杂志，2006，12(5)：43-44.

[2] 王惠，刘姣，鲍延伟，等. 化学合成具有抗肿瘤活性甾体皂苷的研究进展[J]. 中国药物化学杂志，2008，18(1)：71-78.

[3] 杨建琼，汪冶，晏晨，等. 吉祥草化学成分的研究[J]. 天然产物研究与开发，2010，22(2)：245-247.

[4] Xing PP, Wu Q, Wu ZW, et al. A new pregnane-type glycoside from *Reineckia carnea* [J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2011, 20: 347-351.

[5] 陈苓丽，韩娜，王艺纯，等. 吉祥草化学成分的分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报，2011，28(11)：875-878.

[6] Zhang ZQ, Chen JC, Yan J, et al. Three steroids with unique structural feature of 5β-spirostan-1β, 3β, 17α-trihydroxyl from *Reineckia carnea*[J]. Chem Pharm Bull, 2011, 59(1)：53-56.

[7] 刘海，杨建琼，熊亮，等. 吉祥草化学成分和药理活性研究[J]. 中成药，2012，34 (9)：157.

[8] 曾永长，梁少瑜，罗佳波，等. 白花蛇舌草水提部位体内外抗肿瘤实验研究[J]. 中药新药与临床药理，2011，22(5)：521-524.

(编辑：梁进权)