

胀果甘草药渣总黄酮和甘草查尔酮 A 的制备及其体外抗肿瘤活性研究

韩龙哲¹, 张娟^{2*}, 倪慧², 刘芬³, 李宁^{3*}, 贾晓光²

1. 延边大学附属医院 病理科, 吉林 延吉 133000

2. 新疆维吾尔自治区中药民族药研究所, 新疆 乌鲁木齐 830002

3. 沈阳药科大学 中药学院 基于靶点的药物设计与研究教育部重点实验室, 辽宁 沈阳 110016

摘要: **目的** 研究胀果甘草药渣总黄酮和其指标性成分甘草查尔酮 A 的制备及其体外抗肿瘤活性。**方法** 利用大孔树脂柱色谱、聚酰胺柱色谱等方法, 制备甘草药渣总黄酮, 并结合色谱法和波谱法分离鉴定指标性甘草查尔酮 A, 应用 HPLC 法测定了总黄酮中甘草查尔酮 A。应用 A549、H1792、Calu-1 3 种人癌细胞系, 采用 MTT 法和流式细胞术法系统评价甘草药渣总黄酮和甘草查尔酮 A 的体外抗肿瘤活性和作用机制。**结果** 制备得到甘草药渣总黄酮, 并从中分离鉴定了特征性指标性成分甘草查尔酮 A, 测定其在甘草药渣总黄酮中质量分数为 7.41%。甘草药渣总黄酮和甘草查尔酮 A 对 A549、H1792、Calu-1 人癌细胞系均具有显著的抑制活性, 可诱导肿瘤细胞凋亡。经流式细胞术检测, 推测其作用机制为诱导肿瘤细胞凋亡。**结论** 甘草查尔酮 A 为胀果甘草药渣总黄酮发挥体外抗肿瘤活性的有效成分。

关键词: 胀果甘草药渣总黄酮; 甘草查尔酮 A; 体外抗肿瘤活性; 细胞凋亡

中图分类号: R284.1; R285.5; R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2013)05-0668-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.05.003

Preparation and antitumor activities *in vitro* of total flavonoids from residues of *Glycyrrhiza inflata* and licochalcone A

HAN Long-zhe¹, ZHANG Juan², NI Hui², LIU Fen³, LI Ning³, JIA Xiao-guang²

1. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, China

2. Xinjiang Institute of Chinese Materia Medica and Ethical Materia Medica, Urumqi 830002, China

3. Key Laboratory of Structure-Based Drug Design & Discovery, Ministry of Education, School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: Objective To prepare the total flavonoids and its characteristic constituent licochalcone A from the residues of *Glycyrrhiza inflata*, which were further assayed for the antitumor activities *in vitro*. **Methods** The total flavonoids and licochalcone A were purified by chromatography. The structure of licochalcone A was identified on the basis of spectral data. The concentration of licochalcone A was determined by HPLC analysis method. Using MTT and flow cytometry, the antitumor activities *in vitro* were tested against A549, H1792, and Calu-1 human cancer cell lines. **Results** The total flavonoids and licochalcone A were prepared respectively and the concentration of licochalcone A was determined as 7.41% in the total flavonoids. The total flavonoids and licochalcone A showed the significant antitumor activities against the above three cancer cell lines. Its possible mechanism was the induction of apoptosis. **Conclusions** Licochalcone A is the effective antitumor constituent of the total flavonoids from the residues of *G. inflata*.

Key words: total flavonoids from residues of *Glycyrrhiza inflata*; licochalcone A; antitumor activities *in vitro*; apoptosis

甘草为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *G. inflata* Batal.或光果甘草 *G. glabra* L.的干燥根及根茎, 味甘, 生用偏寒, 炙用偏温, 归脾、胃、心、肺经, 具有补益心脾、缓急

收稿日期: 2013-07-17

基金项目: 新疆维吾尔自治区科技支撑计划项目 (201333102); 新疆维吾尔自治区卫生厅青年科技人才专项科研项目 (2012Y06)

作者简介: 韩龙哲 (1976—), 男, 讲师、主治医师, 从事天然产物抗突变及抗肿瘤作用研究。Tel: (0433)2660121 E-mail: han_longzhe@163.com

*通信作者 张娟 (1983—), 女, 助理研究员, 从事天然药物的分析及制剂研究。Tel: (0991) 8855334 E-mail: ezhangjuane76@sina.com

李宁 (1979—), 女, 河北保定人, 副教授, 博士, 从事天然药物化学研究。Tel: (024)23986475 E-mail: liningsypharm@163.com

止痛、调和药性、泻火解毒、润肺止咳的功效。甘草富含三萜和黄酮类成分,其中五环三萜类化合物甘草酸是主要有效成分之一。医药生产企业常采用水、含水乙醇、碱性溶液从甘草药材中提取甘草酸,提取后剩余的甘草药渣通常作为工业废料弃去^[1]。甘草药渣中富含大量的黄酮类化合物,其结构与甘草药材中所含黄酮类化合物相似,同时在工业生产的过程中也有新类型的化合物产生^[2-3]。本课题组的前期研究发现,甘草药渣总黄酮与甘草总黄酮相比,抗肿瘤活性大大增强。两者的化学成分对比分析结果表明,甘草药渣总黄酮中甘草查尔酮 A 的量大大提升,为其最主要特征性成分。基于此,本实验进一步对甘草药渣总黄酮及其特征性成分甘草查尔酮 A 进行了制备和分离鉴定,并对其体外抗肿瘤活性进行了研究。

1 仪器与材料

ARX—300 核磁共振光谱仪 (TMS 内标,瑞士 Bruker 公司); Agilent 1260 Infinity 高效液相色谱仪; Mettler Toledo XP6 百万分之一电子分析天平; AL204 千分之一电子分析天平 (梅特勒-托利多公司); MILLI—Q 超纯水仪; SB25—12DTN 超声波清洗机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); 吸光度 (A) 值测试所用酶标仪 (奥地利 Tecan 公司); 96 孔细胞培养板 (Costar 公司)。

薄层色谱用硅胶 GF254 (10~40 μm , 青岛海洋化工厂); 柱色谱用硅胶 (51~71 μm , 青岛海洋化工厂), 聚酰胺 (30~60 目, 浙江台州生化塑料厂); 甘草查耳酮 A 对照品, 自制, 质量分数 >98%; 其他试剂均为市售分析纯。

抗肿瘤活性测试所用 RPMI1640 培养基为 Gibco 公司生产; 牛血清为天津市灏洋生物制品有限公司生产; 甲基偶氮唑盐 (MTT) 为美国 Sigma 公司生产; 二甲基亚砜 (DMSO)、NaCl、KCl、 KH_2PO_3 、 Na_2HPO_3 、 NaHCO_3 等均为沈阳化学试剂厂生产。

甘草药渣为新疆产胀果甘草水提取甘草酸后所得, 原植物由新疆维吾尔自治区中药民族药研究所倪慧研究员鉴定和提供。

2 方法与结果

2.1 甘草药渣总黄酮的制备

甘草药渣 10 kg, 经 95%乙醇加热回流提取 3 次, 每次 2 h, 减压回收溶剂。浓缩后的药液经 HPD100 大孔树脂纯化, 分别以水、75%乙醇、100%

乙醇洗脱。富集 75%乙醇洗脱部分, 得 75%乙醇洗脱物; 经聚酰胺柱色谱分离纯化, 以甲醇-水梯度洗脱, 收集 60%甲醇洗脱物, 即得甘草药渣总黄酮。

2.2 甘草查尔酮 A 的分离鉴定

取甘草药渣总黄酮 20 g, 经硅胶柱色谱 (柱内径 3 cm, 空白硅胶 200 g, 拌样硅胶 30 g) 分离, 以二氯甲烷-甲醇为洗脱剂梯度洗脱。二氯甲烷-甲醇 (9:1) 洗脱流分 (1.2 g) 经聚酰胺柱色谱分离 (柱内径 4 cm, 聚酰胺填料 40 g), 以甲醇-水梯度洗脱, 甲醇-水 (6:4) 洗脱部分经重结晶, 得甘草查尔酮 A (170 mg)。

红色粉末 (甲醇)。三氯化铁-铁氰化钾反应呈阳性, 示有酚羟基存在。¹H-NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.00 (2H, d, $J=8.6$ Hz, H-2', 6'), 7.96 (1H, d, $J=15.5$ Hz, H- β), 7.62 (1H, d, $J=15.5$ Hz, H- α), 7.55 (1H, s, H-6), 6.90 (2H, d, $J=8.6$ Hz, H-3', 5'), 6.54 (1H, s, H-3), 6.24 (1H, dd, $J=17.5, 10.5$ Hz, H-2''), 4.90 (1H, m, H-3''), 4.94 (1H, m, H-3''), 3.83 (3H, s, OCH_3), 1.45 (6H, s, H-5''-H-6'')。理化性质、¹H-NMR 数据分析和与文献对照^[4], 确证了其结构。

2.3 甘草药渣总黄酮中甘草查尔酮 A 的测定

2.3.1 色谱条件 TSKgel-C₁₈ ODS-100Z 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 A 为乙腈, B 为 0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱条件见表 1; 检测波长为 280 nm; 柱温为 16 $^{\circ}\text{C}$; 体积流量为 1.0 mL/min; 进样量为 10 μL 。

表 1 梯度洗脱条件

Table 1 Conditions of gradient elution

时间/min	流动相 A 比例	时间/min	流动相 A 比例
0~10	15%~20%	50~58	52%~55%
10~12	20%~23%	58~63	55%~55%
12~26	23%~23.7%	63~70	55%~56%
26~30	23.7%~32%	70~85	56%~80%
30~50	32%~52%		

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取甘草查耳酮 A 对照品 3.693 mg, 置于 2 mL 量瓶中, 甲醇溶解并加至刻度, 摇匀, 密封, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 即得。

2.3.3 供试品溶液的制备 精密称取甘草药渣总黄酮干燥粉末 15.0 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解并加至刻度, 摇匀, 离心 10 min, 取上清液,

即得。

2.3.4 线性回归方程的制备 精密吸取甘草查耳酮 A 对照品溶液 0.720 mL, 置于 2 mL 量瓶中, 甲醇溶解并加至刻度, 摇匀, 作为对照品母液。取 1 mL 母液于 2 mL 量瓶中, 甲醇溶解并加至刻度, 摇匀。按此方法逐级稀释, 配制得 6 种质量浓度的对照品溶液, 依次注入高效液相色谱仪, 按照以上色谱条件测定峰面积, 回归后得其线性回归方程 $Y=10\,616X-60.449$, $R^2=0.999\,7$, 甘草查耳酮 A 的线性范围为 20.8~664.8 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3.5 精密度试验 取甘草查耳酮 A 对照品溶液, 注入高效液相色谱仪, 连续进样 6 次, 测定峰面积, 计算得甘草查耳酮 A 峰面积的 RSD 值为 0.94%。

2.3.6 重复性试验 取甘草药渣总黄酮样品 3 份, 制备供试品溶液, 平行进样 2 次, 按照以上色谱条件测定, 并根据线性回归方程计算甘草查耳酮 A 的质量分数, 结果甘草查耳酮 A 质量分数的 RSD 值为 2.48%。

2.3.7 稳定性试验 取甘草药渣总黄酮供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、12、24、48 h 进样 10 μL , 按以上色谱条件测定甘草查耳酮 A 的峰面积, 计算得其 RSD 值为 0.57%, 结果表明供试品溶液在室温放置 48 h 稳定。

2.3.8 回收率试验 精密称取甘草药渣总黄酮干燥粉末 15.0 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加入 0.166 mg/mL 甘草查耳酮 A 对照品溶液 0.660 mL, 甲醇溶解并加至刻度, 摇匀, 离心 10 min, 取上清液, 即得供试品溶液, 平行制备 3 份。按以上色谱条件计算甘草查耳酮 A 的质量分数, 其平均回收率为 101.80%, RSD 值为 2.10%。

2.3.9 样品测定结果 取甘草药渣总黄酮适量, 制备供试品溶液, 进样测定, 根据线性回归方程计算得其中甘草查耳酮 A 的质量分数为 7.41%。色谱图见图 1。

2.4 体外抗肿瘤活性测试

2.4.1 MTT 法检测甘草药渣总黄酮、甘草查耳酮 A 对人癌细胞系的体外抗肿瘤活性^[5-6] 使用 DMSO 溶解甘草药渣总黄酮, 配成质量浓度为 100 mg/mL 的储备液, 甘草查耳酮 A 配成 100 mmol/L 的储备液, 储存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。临用时用相应的培养液将其稀释, 甘草药渣总黄酮稀释为 50、100 $\mu\text{g/mL}$, 甘草查耳酮 A 稀释为 100、75、50、25、12.5 $\mu\text{mol/L}$ 进行实验。DMSO 配制的样品进行实验时, DMSO 的

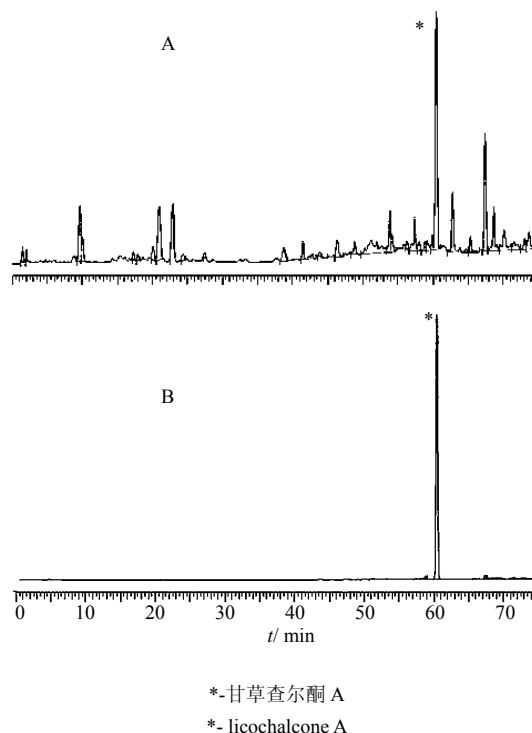


图 1 甘草药渣总黄酮 (A) 和甘草查耳酮 A 对照品 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of total flavonoids from residues of *G. inflata* (A) and licochalcone A reference substance (B)

终浓度为 0.1%。阳性对照药物依托泊苷浓度为 100、50、25、10、1 $\mu\text{mol/L}$ 。

取对数生长期的细胞, 调整适当的细胞浓度, 接种于 96 孔板内, 100 μL /孔, 培养于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱内。培养 24 h 后加药, 作用 48 h。分设空白组、给药组和阳性对照组, 每组设 6 个复孔。药物作用 48 h 后, 将细胞与 0.25 mg/mL MTT 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下共同孵育 3~4 h, 离心, 小心吸除培养液后每孔加入 100 μL DMSO, 完全溶解后使用酶标仪于 492 nm 测定其 A 值。最后以空白组 A 值为细胞存活率 100%, 抑制率为 0, 计算各组细胞的抑制率。以依托泊苷为阳性对照药物, 对 H1792、Calu-1、A549 人癌细胞系的 IC_{50} 值分别为 34.1、19.6、23.8 $\mu\text{mol/L}$ 。甘草药渣总黄酮和甘草查耳酮 A 的活性测试结果见表 2。

细胞抑制率 = $1 - \frac{\text{加药组 } A \text{ 值}}{\text{对照组 } A \text{ 值}}$

结果表明, 甘草药渣总黄酮在测试浓度 (50、100 $\mu\text{g/mL}$) 下对 H1792、Calu-1、A549 3 种人癌细胞系均具有显著的生长抑制活性, 作用强度呈现剂量相关性, 对 H1792 细胞系的抑制活性最强。甘草

表 2 甘草药渣总黄酮和甘草查尔酮 A 对 H1792、Calu-1 和 A549 人癌细胞系的生长抑制活性 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Inhibitory activities of total flavonoids from residues of *G. inflata* and licochalcone A against H1792, Calu-1, and A549 cancer cell lines ($\bar{x} \pm s$)

测试样品	测试浓度	抑制率/%		
		H1792	Calu-1	A549
空白	0 $\mu\text{g/mL}$	0.00 $\pm$ 0.42	0.00 $\pm$ 0.57	0.00 $\pm$ 0.77
甘草药渣总黄酮	50 $\mu\text{g/mL}$	45.69 $\pm$ 1.35***	14.98 $\pm$ 1.92**	15.55 $\pm$ 0.64***
	100 $\mu\text{g/mL}$	67.32 $\pm$ 1.87***	45.59 $\pm$ 1.76***	38.83 $\pm$ 1.29***
甘草查耳酮 A	0 $\mu\text{mol/L}$	0.00 $\pm$ 1.60	0.00 $\pm$ 0.15	0.00 $\pm$ 0.41
	12.5 $\mu\text{mol/L}$	-11.65 $\pm$ 1.54**	-11.19 $\pm$ 2.88**	19.60 $\pm$ 2.26**
	25 $\mu\text{mol/L}$	38.33 $\pm$ 2.37***	17.33 $\pm$ 1.94***	37.29 $\pm$ 1.66***
	50 $\mu\text{mol/L}$	53.43 $\pm$ 1.71***	47.37 $\pm$ 1.01***	67.65 $\pm$ 1.57***
	75 $\mu\text{mol/L}$	84.29 $\pm$ 0.14***	73.57 $\pm$ 2.10***	75.80 $\pm$ 1.67***
	100 $\mu\text{mol/L}$	97.08 $\pm$ 0.41***	79.61 $\pm$ 0.22***	72.42 $\pm$ 2.06***

与空白组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

查尔酮 A 在低浓度 (12.5 $\mu\text{mol/L}$) 下对 H1792、Calu-1 人癌细胞系具有生长促进作用, 在高浓度下具有显著的生长抑制作用, 作用强度呈现剂量相关性; A549 人癌细胞系在测试浓度下均表现出显著的生长抑制活性, 在浓度低于 75 $\mu\text{mol/L}$ 时, 作用强弱呈现剂量相关性。

2.4.2 流式细胞术法检测甘草药渣总黄酮、甘草查尔酮 A 体外诱导 H1792 细胞凋亡^[7] 根据 MTT 实验结果, 应用 Annexin V-FITC/PI 双染的方法考察甘草药渣总黄酮和甘草查尔酮 A 对 H1792 细胞系体外诱导凋亡的作用。收集对数期的 H1792 细胞, 调整细胞悬液浓度至 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 接种于 6 孔板内; 3 mL/

孔, 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 条件下孵育 24 h 待细胞贴壁, 小心吸弃孔内培养基, 每孔加入含指定浓度梯度的药物或含 0.1% DMSO (空白对照) 的完全培养基; 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 条件下孵育 24、48 h 后, 小心吸弃孔内培养基, 胰酶适度消化细胞, 用培养液吹打, 转移至 1.5 mL 离心管中, 1 200 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 用 1 mL PBS 洗 2 次, 再加入 100 μL 预冷的 Annexin V 结合缓冲液吹匀, 依次加入 5 μL Annexin V 和 5 μL 碘化丙啶 (PI), 混合均匀, -4 $^\circ\text{C}$ 反应 15 min。反应结束后, 每管加入 400 μL Annexin V 结合缓冲液, 混匀, 滤过, 上机检测。结果见图 2。

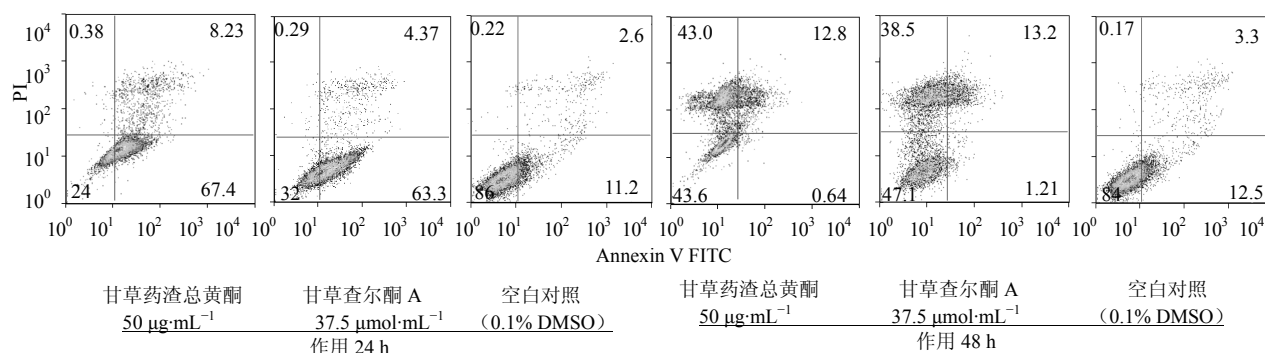


图 2 甘草药渣总黄酮和甘草查尔酮 A 诱导 H1792 细胞凋亡的流式细胞术分析结果

Fig. 2 Results of flow cytometry on apoptosis of H1792 cancer cells treated with total flavonoids from residues of *G. inflata* and licochalcone A

结果显示, H1792 细胞在 50 $\mu\text{g/mL}$ 甘草药渣总黄酮作用 24 h 后, 早期细胞凋亡率为 67.4%, 晚期细胞凋亡率为 8.23%, 作用 48 h 后早期细胞凋亡率为 0.64%, 晚期细胞凋亡率为 12.8%, 细胞死亡率 43.0%。H1792 细胞在 37.5 $\mu\text{mol/L}$ 甘草查尔酮 A 作用 24 h 后, 早期细胞凋亡率为 63.3%, 晚期细胞凋亡率为 4.37%, 作用 48 h 后, 早期细胞凋亡率为 1.21%, 晚期细胞凋亡率为 13.2%, 细胞死亡率 38.5%。

3 讨论

本研究阐明了甘草酸工业生产尾料甘草药渣是一种潜在的抗肿瘤药物资源。与传统的甘草总黄酮相比, 甘草药渣总黄酮具有黄酮含量高、抗肿瘤活性增强、主成分明确、来源丰富、价格低廉等诸多优点。甘草药渣总黄酮具有显著的体外抗肿瘤活性, 其作用机制为诱导肿瘤细胞早期凋亡, 其发挥抗肿瘤作用的主要有效成分为甘草查尔酮 A。因此, 甘草药渣总黄酮和甘草查尔酮 A 有望成为天然抗肿瘤药物的重要来源。

参考文献

- [1] 刘 芬, 李 宁, 倪 慧, 等. 甘草药渣的研究进展 [J]. 中国现代中药, 2011, 13(2): 6-9.
- [2] 刘 芬, 倪 慧, 卿德刚, 等. 甘草药渣化学成分的分离与鉴定 [J]. 中国药物化学杂志, 2011, 21(4): 312-314.
- [3] 张 娟, 刘 芬, 李 宁, 等. UPLC-TOF-MS 法鉴定胀果甘草药渣中黄酮类成分 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(6): 558-561.
- [4] 杨 琳, 车庆明, 毕 诚, 等. 甘草废渣中黄酮成分的研究 [J]. 中草药, 2007, 38 (5): 671-673.
- [5] Zheng W, Gao X, Gu Q, *et al.* Antitumor activity of daphnodorins from *Daphne genkwa* roots [J]. *Int Immunopharmacol*, 2007, 7(2): 128-134.
- [6] Zhan Z J, Fan C Q, Ding J, *et al.* Novel diterpenoids with potent inhibitory activity against endothelium cell HMEC and cytotoxic activities from a well-known TCM plant *Daphne genkwa* [J]. *Bioorg Med Chem*, 2005, 13(3): 645-655.
- [7] Shapiro H M. *Practical Flow Cytometry* [M]. Second Edition. New York: Alan R Liss Inc, 1988: 370.