

新疆阿魏树脂不同极性部位对人肺癌细胞的体外抑制作用研究

高 源^{1Δ}, 邢亚超^{2,1Δ}, 郭俐含¹, 李艳然¹, 倪 慧³, 卿德刚³, 李 宁^{1*}

1. 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

2. 扬子江药业集团上海海尼药业有限公司, 上海 201318

3. 新疆维吾尔自治区中药民族药研究所, 新疆 乌鲁木齐 830002

摘 要: **目的** 研究新疆阿魏的提取物、不同极性部位以及倍半萜香豆素类化合物对人肺癌细胞的体外抑制作用, 明确新疆阿魏树脂的活性成分。**方法** 应用 MTT 法检测新疆阿魏树脂提取物 (100 mg/mL)、不同极性部位 (100 mg/mL) 和倍半萜香豆素化合物 (100、50、10、1、0.1 $\mu\text{mol/L}$) 对人肺癌细胞系 A549、H292、H1792、H460 作用 48 h 后生长的抑制作用, 采用抑制率和 IC_{50} 为指标衡量其活性。**结果** 新疆阿魏树脂氯仿提取物在 100 mg/mL 质量浓度下对 A549、H292、H1792、H460 细胞系的抑制率分别为 75.45%、65.39%、46.54%、73.68%。低极性部位在 100 mg/mL 质量浓度下对 4 种细胞系的生长抑制率分别为 88.74%、80.62%、60.11%、92.35%。从低极性部位中分离得到的主要倍半萜香豆素类化合物 farnesiferol B、farnesiferone A、farnesiferol C、多花素宁, 其中 farnesiferol C、多花素宁的 IC_{50} 分别为 35.49、15.44、44.25、21.63 $\mu\text{mol/L}$ 和 23.60、17.90、38.33、12.35 $\mu\text{mol/L}$, 表现出显著的生长抑制作用, 且具有剂量相关性。**结论** 新疆阿魏树脂的低极性部位为体外抑制人肺癌细胞生长作用的活性部位, 其所含有的高含量倍半萜香豆素类化合物 farnesiferol C 为其主要活性成分。

关键词: 新疆阿魏树脂; 人肺癌细胞; 倍半萜香豆素; farnesiferol C; 抑制作用

中图分类号: R284.2; R286.4 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2015)04-0366-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2015.04.004

Inhibition of different fractions from *Ferula sinkiangensis* resin on human lung cancer cells *in vitro*

GAO Yuan¹, XING Ya-chao^{2,1}, GUO Li-han¹, LI Yan-ran¹, NI Hui³, QING De-gang³, LI Ning¹

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

2. Shanghai Haini Pharmaceutical Co. Ltd., Yangtze River Pharmaceutical Group, Shanghai 201318, China

3. Xinjiang Institute of Chinese Materia Medica and Ethnodrug, Urumqi 830002, China

Abstract: Objective To study inhibitory action *in vitro* on human lung cancer cells of extract, different fractions, and sesquiterpene coumarins from *Ferula sinkiangensis* resin, and to clarify its effective constituent. **Methods** Using MTT method, inhibitory actions of chloroform extract (at concentration of 100 mg/mL), different polarity fractions (at concentration of 100 mg/mL), and sesquiterpene coumarins (at different concentrations of 100, 50, 10, 1, and 0.1 $\mu\text{mol/L}$) from *F. sinkiangensis* resin were tested on A549, H292, H1792, and H460 cell lines after 48 h co-incubation. The inhibition rate and IC_{50} values were calculated to assay their effects. **Results** The chloroform extract from *F. sinkiangensis* resin exhibited significant inhibitory action at 100 mg/mL against A549, H292, H1792, and H460 human lung cancer cells with inhibition rates as 75.45%, 65.39%, 46.54%, and 73.68%, respectively. And the low polarity fraction had inhibitory action at 100 mg/mL against the four human lung cancer cells with inhibition rates as 88.74%, 80.62%, 60.11%, and 92.35%, respectively. Sesquiterpene coumarins farnesiferol B, farnesiferone A, farnesiferol C, and polyanthinin were isolated from low polarity fraction, and farnesiferol C and polyanthinin showed significant inhibitory action on growth of human lung cancer cells with dose dependent manner. The IC_{50} values of farnesiferol C were 35.49, 15.44, 44.25, and 21.63

收稿日期: 2015-03-01

基金项目: 沈阳药科大学大学生创新创业计划项目

作者简介: 高 源 (1992—), 男, 河北唐山人, 沈阳药科大学中药学院食品药理学研究方向学生。E-mail: 373233293@qq.com

邢亚超 (1990—), 女, 山东聊城人, 硕士研究生, 主要从事天然药物化学研究。E-mail: xing.yachao@163.com

*通信作者 李 宁 (1979—), 女, 河北保定人, 副教授, 博士, 主要从事天然药物化学研究。Tel: (024) 23986475 E-mail: liningsypharm@163.com

Δ 对文章有同等贡献, 为共同第一作者

$\mu\text{mol/L}$, and those of polyanthrin were 23.60, 17.90, 38.33, and 12.35 $\mu\text{mol/L}$. **Conclusion** Low polarity fraction is considered as the effective part of *F. sinkiangensis* resin for inhibitory activities against human lung cancer cell lines, and the sesquiterpene coumarin farnesiferol C isolated from it is main active constituent.

Key words: *Ferula sinkiangensis* resin; human lung cancer cells; sesquiterpene coumarins; farnesiferol C; inhibitory action

新疆阿魏 *Ferula sinkiangensis* K. M. Shen 属伞形科阿魏属植物, 其药用部位根或茎的树脂收录于《中国药典》2010 年版一部^[1]。阿魏属植物中含多种化学成分, 以倍半萜香豆素、倍半萜化合物以及多硫化物为其化学特性, 倍半萜化合物及其酯、内酯多具有生物活性^[2]。近年来由于发现其中具有抗肿瘤物质而备受关注, 如新疆阿魏树脂不同分离部位对结肠癌细胞 HCT116 具有抑制作用^[3], *F. szowitsiana* DC. 中 umbelliprenin 具有诱导急性 T 细胞白血病细胞凋亡的作用^[4], 又如意大利学者 Poli 等^[5]发现大茴香 *F. communis* L. 和 *F. arrigonii* Bocchieri 中胡萝卜烷型倍半萜对人结肠癌细胞具有抗增殖作用。Huang 等^[6]从全裂叶阿魏 *F. dissecta* (Ledeb.) Ledeb. 根中分离得到两个新的倍半萜苯甲酸酯 syreiteate A、B 对人宫颈癌细胞具有抗增殖作用。为了阐明新疆阿魏树脂的抗肿瘤作用及其活性成分, 本课题组采用人肺癌细胞系 A549、H292、H1792、H460 对新疆阿魏的提取物、不同极性部位以及化合物进行了体外抗肿瘤活性研究, 以期为阿魏的进一步开发和利用提供依据。

1 材料与仪器

新疆阿魏为伞形科阿魏属新疆阿魏 *Ferula sinkiangensis* K. M. Shen 的根茎中得到的树脂, 由新疆维吾尔自治区中药民族药研究所提供, 经新疆维吾尔自治区中药民族药研究贾晓光研究员鉴定。

胎牛血清 (批号 1339728) 购自 Gibco BRL, RPMI-1640 培养基 (批号 307964) 购于 Gibco 公司, 四甲基偶氮唑盐 (MTT, 批号 111108) 购自美国 Sigma 公司。顺铂为上海旭东海普药业有限公司生产, 二甲基亚砜 (DMSO) 由沈阳化学试剂厂生产。

薄层色谱及制备型薄层用硅胶 GF₂₅₄、柱色谱用硅胶 (200~300 目) 均由青岛海洋化工厂生产, ODS (10~30 μm) 为天津化学试剂二厂色谱技术开发公司产品; Sephadex LH-20 为瑞士 Pharmacia 公司产品; 柱色谱试剂规格均为分析纯, 其中所用石油醚为中沸程 (60~90 $^{\circ}\text{C}$); HPLC 用溶剂均为色谱纯。

CO₂ 培养箱为美国 Forma 公司产品, V1.23 全

自动酶标分析仪为 Multiskan Ascent 产品, 96 孔细胞培养板由 Costar 公司生产, HPLC 应用 Shimadzu CTO-6A 高效液相色谱仪。

人肺癌细胞系 A549、H460、人黏液表皮样肺癌细胞系 H292、人肺腺癌细胞系 H1792 均购自南京科佰生物科技有限公司, 批号分别为 CBP60084、CBP60138、CBP60187、CBP60166。

2 方法与结果

2.1 极性部位的制备

新疆阿魏树脂 900 g 用氯仿回流提取 3 次, 2 h/次, 浓缩得提取物浸膏 558 g。取 300 g 浸膏经硅胶柱色谱分离, 以石油醚-丙酮系统梯度洗脱。石油醚-丙酮 (100:0~100:5) 洗脱馏分为低极性部位 (56.7 g), 石油醚-丙酮 (100:6~10:1) 洗脱馏分为中等极性部位 (67.5 g), 石油醚-丙酮 (8:1~10:1) 洗脱馏分为高极性部位 (20 g)。

2.2 细胞培养

取对数生长期的细胞, 以内含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液稀释为 $5 \times 10^3/\text{L}$ 细胞悬浮液, 接种于 96 孔板内, 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 培养于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 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。

2.3 添加试剂

待测提取物和各极性部位样品以二甲基亚砜 (DMSO) 溶解, 配成质量浓度均为 100 mg/L 的母液, 储存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。临用时提取物和各极性部位样品用相应的培养液稀释为 100 mg/mL。待测化合物样品以 DMSO 溶解, 配成质量浓度均为 100 mmol/L 的母液, 储存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。临用时用相应的培养液将其稀释为 100、50、10、1、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 。DMSO 配制的样品进行实验时, DMSO 的终浓度为 0.1%。阳性药顺铂浓度分别为 100、50、10、1、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 。将上述含药培养液加入 96 孔板中, 放置于与细胞培养相同条件的培养箱中培养 48 h。分设空白组、给药组和阳性对照组, 每组设 4 个复孔。

2.4 MTT 法检测

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 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 570 nm 测定其吸光度 (A) 值。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。采用 LOGIT 法计算药物半数抑制浓度 (IC_{50})。

$$\text{抑制率} = (1 - A_{\text{给药}}) / A_{\text{空白}}$$

2.5 提取物及不同极性部位对人肺癌细胞的体外抑制作用

MTT 法活性结果显示新疆阿魏氯仿提取物和

不同极性部位对人肺癌细胞系 A549、H292、H1792、H460 的生长具有抑制作用。低极性成分和中等极性成分为主要活性部位, 且低极性成分活性强于中等极性成分。根据阿魏中化学成分分布的特点, 低极性部位中主要是含氧取代基团数目较少、环系结构较多的低极性倍半萜香豆素类化合物, 提示这类成分可能为新疆阿魏树脂抗肿瘤活性的物质基础。见表 1。

表 1 新疆阿魏树脂氯仿提取物和不同极性部位对人肺癌细胞的抑制作用

Table 1 Inhibitory actions of extract and different polarity fractions from *F. sinkiangensis* resin against human lung cancer cells

样品	质量浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	抑制率/%			
		A549	H292	H1792	H460
氯仿提取物	100	75.45 $\pm$ 1.33	65.39 $\pm$ 1.09	46.54 $\pm$ 1.97	73.68 $\pm$ 1.24
低极性部位	100	88.74 $\pm$ 1.04	80.62 $\pm$ 0.97	60.11 $\pm$ 1.29	92.35 $\pm$ 0.71
中等极性部位	100	50.07 $\pm$ 1.57	47.13 $\pm$ 2.17	34.26 $\pm$ 2.45	66.41 $\pm$ 1.74
高极性部位	100	5.81 $\pm$ 0.46	12.09 $\pm$ 0.82	4.89 $\pm$ 0.34	17.44 $\pm$ 1.61
顺铂	50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	75.23 $\pm$ 1.39	82.88 $\pm$ 0.78	69.24 $\pm$ 1.48	89.13 $\pm$ 1.08

2.6 化合物的制备

低极性部位共分为 Fr.1~Fr.4。Fr.4 经硅胶吸附柱色谱石油醚-醋酸乙酯 (100:0~1:1) 洗脱, 其中石油醚-醋酸乙酯 (10:1) 洗脱流份经重结晶、展开系统为石油醚-醋酸乙酯 (8:1) 的制备薄层色谱得到化合物 1 (2.0 g, 0.413%); 石油醚-醋酸乙酯 (10:8) 洗脱流份经硅胶柱色谱石油醚-二氯甲烷 (8:1) 重结晶得到化合物 2 (728.8 mg, 0.151%)。Fr.3 经硅胶吸附柱色谱环己烷-醋酸乙酯 (100:4~1:1) 洗脱, 其中硅胶柱色谱环己烷-醋酸乙酯 (100:8) 洗脱流份经重结晶得到化合物 3 (1.6 g, 0.331%); 环己烷-醋酸乙酯 (10:1) 洗脱流份经 ODS 柱色谱、HPLC 色谱甲醇-水 (78:22) 分离得化合物 4 (20.5 mg, 0.004%)。利用波谱技术, 综合对比文献, 鉴定化合物 1~4 分别为

farnesiferol B^[7]、farnesiferone A、farnesiferol C、多花素宁 (polyanthinin), 均为倍半萜香豆素类化合物。

2.7 倍半萜香豆素类化合物对人肺癌细胞的体外抑制作用

对从新疆阿魏树脂活性部位中分离的倍半萜香豆素测试在 100、50、10、1、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下对人肺癌细胞系 A549、H292、H1792、H460 生长的抑制作用, 计算 IC_{50} 值, 结果见表 2。可见 farnesiferol C、多花素宁对 A549、H292、H1792、H460 细胞作用 48 h 后均表现出显著的生长抑制作用, 且具有剂量相关性。farnesiferol C 对 H292 的抑制活性以及多花素宁对 A549、H292、H460 的抑制活性均强于阳性药顺铂。farnesiferol B 对 A549、H292、H460 细胞均表现出显著的生长抑制作用。farnesiferone A 对 H292 细胞的生长具有显著的抑制活性。

表 2 新疆阿魏树脂中倍半萜香豆素对人肺癌细胞生长的抑制作用

Table 2 Inhibitory actions of sesquiterpene coumarins from *F. sinkiangensis* resin against human lung cancer cells

化合物	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$			
	A549	H292	H1792	H460
farnesiferol B	84.32 $\pm$ 1.22	65.21 $\pm$ 1.44	>100	54.12 $\pm$ 1.38
farnesiferone A	>100	78.45 $\pm$ 1.29	>100	>100
farnesiferol C	35.49 $\pm$ 1.35	15.44 $\pm$ 1.44	44.25 $\pm$ 0.94	21.63 $\pm$ 1.62
多花素宁	23.60 $\pm$ 1.01	17.90 $\pm$ 1.09	38.33 $\pm$ 1.27	12.35 $\pm$ 0.78
顺铂	23.97 $\pm$ 1.17	21.42 $\pm$ 0.87	29.33 $\pm$ 1.04	18.46 $\pm$ 1.22

3 讨论

结合化合物的含量和活性结果分析,高含量 farnesiferol C 为新疆阿魏树脂主要活性成分之一。本研究系统探讨阿魏树脂不同活性部位的体外抗肺癌细胞生长的活性,并以此活性为导向分离得到了倍半萜香豆素类活性成分。在此基础上,本研究组将进一步研究活性成分 farnesiferol C 的体内抗肿瘤作用,并阐明其作用机制,为从新疆阿魏中发现新的抗肿瘤药物奠定基础。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010: 176.
- [2] 邢亚超, 李 宁, 薛 洁. 阿魏属植物化学成分研究进展 [J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(9): 730-741.
- [3] 周龙龙, 张海英, 任 燕, 等. 新疆阿魏树脂不同分离部位对结肠癌细胞 HCT116 的抑制作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19 (23): 183-186.
- [4] Gholami O, Jeddi-Tehrani M, Iranshahi M, *et al.* Umbelliprenin from *Ferula szowitsiana* activates both intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis in Jurkat T-CLL cell line [J]. *Iran J Pharm Res*, 2013, 12(3): 371-376.
- [5] Poli E, Appendino G, Sacehetti G, *et al.* Antiproliferative effects of daucane esters from *Ferula communis* and *F. arrigonii* on human colon cancer cell lines [J]. *Phytother Res*, 2005, 19: 152-157.
- [6] Huang J, Han H Y, Li G Y, *et al.* Two new terpenoid benzoates with antitumor activity from the roots of *Ferula dissecta* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2013, 15(10): 1100-1106.
- [7] 杨俊荣. 臭阿魏、新疆阿魏和多伞阿魏的化学成分研究[D]. 北京: 中国协和医科大学中国医学科学院, 2006.
- [8] Iranshahi M, Amin G, Shafiee A. A new coumarin from *Ferula persica* [J]. *Pharm Bio*, 2004, 42(6): 440- 442.
- [9] 杨俊荣, 敬 松, 李志宏, 等. 新疆阿魏化学成分研究 [J]. 中国现代中药, 2007, 32(22): 2382-2384.
- [10] Hofer O, Widhalm M, Greger H. Circular dichroism of sesquiterpene-umbelliferone ethers and structure elucidation of a new derivative isolated from the gum resin "Asa Foetida" [J]. *Monatshefte fvr Chemie*, 1984, 115: 1207-1218.