

异常黑胆质成熟剂中各单味药对 HL-60 细胞增殖的抑制作用

木拉提·克扎衣别克¹, Brigitte Kopp², Sonja Prinz², Ruxandra Popescu², 哈木拉提·吾甫尔¹

1. 新疆医科大学维吾尔医药系, 乌鲁木齐 830011
2. 维也纳大学生药系, 维也纳 A-1090, 奥地利

摘要 异常黑胆质成熟剂是维吾尔医复方制剂, 由甘草、红枣、破布木、牛舌草、铁线蕨、地锦草、小茴香、薰衣草、蜜蜂花和刺糖 10 味药组成, 用于治疗由异常黑胆质所导致的肿瘤、糖尿病和心血管疾病等。研究了异常黑胆质成熟剂中各单味药 (除刺糖外) 对 HL-60 细胞增殖的抑制作用。HL-60 细胞暴露于各单味药两种不同提取物 (二氯甲烷和甲醇), 于 37℃、CO₂ 体积分数为 5% 的恒温孵箱中培养后 24、48、72 h, 用台盼蓝染色法检测细胞存活率。结果表明, 各单味药的二氯甲烷提取物除小茴香外均显著降低 HL-60 癌细胞的存活率 ($P < 0.05$)。在甲醇提取物中, 只有甘草和地锦草两味药的甲醇提取物可显著降低 HL-60 癌细胞的存活率 ($P < 0.05$)。与各单味药甲醇提取物相比, 其二氯甲烷提取物均显著降低 HL-60 癌细胞的存活率 ($P < 0.05$)。结果显示, 破布木、地锦草、铁线蕨、甘草、红枣、薰衣草、牛舌草和蜜蜂花 8 味药的二氯甲烷提取物和甘草、地锦草两味药的甲醇提取物均能抑制 HL-60 癌细胞的体外增殖。各单味药二氯甲烷提取物对 HL-60 细胞增殖的抑制作用均明显强于其相应的甲醇提取物。

关键词 异常黑胆质成熟剂; 单味药; 薄层色谱; HL-60 细胞; 细胞存活率

中图分类号 R291.5

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2009)19-0094-05

Antiproliferative Activity of Individual Herbs of Abnormal Savda Munziq on HL-60 Cells

KIZAIBEK Murat¹, KOPP Brigitte², PRINZ Sonja², POPESCU Ruxandra², UPUR Halmurat¹

1. Faculty of Traditional Uighur Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China
2. Department of Pharmacognosy, University of Vienna, Vienna A-1090, Austria

Abstract Abnormal Savda Munziq (Patent no. C082130082.8) is a herbal formula composed of ten medicinal herbs, namely *Glycyrrhiza uralensis*, *Ziziphus jujuba*, *Cordia dichotoma*, *Anchusa italica*, *Adiantum capillus-veneris*, *Euphorbia humifusa*, *Foeniculum vulgare*, *Lavandula angustifolia*, *Melissa officinalis* and *Alhagi pseudoalhagi*. It is used in traditional Uighur medicine for the

treatment and prevention of cancer, diabetes and cardiovascular diseases. This paper studies the antiproliferative activity of individual herbs of Abnormal Savda Munziq (*except Alhagi pseudoalhagi*) on HL-60 cells. Cell viability of HL-60 cells exposed to CH₂Cl₂ extract and MeOH extract of each herb was determined by the trypan blue exclusion method after 24 h, 48 h and 72 h of incubation (37°C, 5% CO₂), respectively. As a result, except for *Foeniculum vulgare*, CH₂Cl₂ extracts of all herbs significantly reduce the viability of HL-60 cells ($P < 0.05$); MeOH extracts of only two herbs, namely *Glycyrrhiza uralensis* and *Euphorbia humifusa*, significantly reduce the viability of HL-60 cells ($P < 0.05$). The cell viability of cells exposed to CH₂Cl₂ extract of all herbs was shown to be significantly lower than that of cells exposed to its MeOH extract ($P < 0.05$). The results clearly show that the CH₂Cl₂ extracts of eight herbs, namely *Cordia dichotoma*, *Euphorbia humifusa*, *Adiantum capillus-veneris*, *Glycyrrhiza uralensis*, *Ziziphus jujuba*, *Lavandula angustifolia*, *Anchusa italica*, *Melissa officinalis* and the MeOH extracts of two herbs, namely *Glycyrrhiza uralensis* and *Euphorbia humifusa*, have *in vitro* antiproliferative activity on HL-60 cells. The antiproliferative activity of CH₂Cl₂ extract of each herb is stronger

收稿日期: 2009-08-18

基金项目: 高等学校科技创新工程重大项目培育资金项目 (708058); 新疆医科大学科研创新基金项目 (200702)

作者简介: 木拉提·克扎衣别克, 助理研究员, 研究方向为天然药物生药学, 电子信箱: shipager@yahoo.com.cn; 哈木拉提·吾甫尔 (通信作者, 中国科协所属全国学会个人会员登记号: S253002398M), 教授, 研究方向为新疆重大疾病的中维西医干预, 电子信箱: halmurat@263.net

2.2 各单味药对 HL-60 细胞增殖的抑制作用

2.2.1 待测溶液配制

精确称取甘草、红枣、破布木、牛舌草、铁线蕨、地锦草、小茴香、薰衣草和蜜蜂花 9 味药二氯甲烷提取物和甲醇提取物,各约 20 mg,分别溶于 96%乙醇,配成浓度为 20.0 mg/mL 的待测溶液,超速离心(14 000 r/min,10 min),备用。用前以 0.45 μm 的微孔滤膜过滤。

2.2.2 细胞培养

HL-60 细胞培养基含 10%小牛血清、1% L-谷氨酰胺和 1%青霉素-链霉素的 RPMI 1640,置于 37℃、5%CO₂ 体积分数的恒温孵箱中培养,隔 3 天传代 1 次,每次传代时培养基中细胞密度保持在 0.1×10⁶/mL。

2.2.3 台盼蓝染色法检测细胞存活率

取对数生长期细胞,用细胞培养基将其细胞密度调整为 0.1×10⁶/mL,加至 12 孔培养板中(每孔 2.0 mL),分为 19 组,每组设 3 个平行孔。培养 24 h 后,第 1 组加入 96%乙醇 10.05 μL,作为空白对照组,其余 18 个组依次加入甘草二氯甲烷、甘草甲醇、红枣二氯甲烷、红枣甲醇、破布木二氯甲烷、破布木甲醇、牛舌草二氯甲烷、牛舌草甲醇、铁线蕨二氯甲烷、铁线蕨甲醇、地锦草二氯甲烷、地锦草甲醇、小茴香二氯甲烷、小茴香甲醇、薰衣草二氯甲烷、薰衣草甲醇、蜜蜂花二氯甲烷和蜜蜂花甲醇的提取物的待测溶液各 10.05 μL(各提取物在细胞培养基中的终浓度均为 100 μg/mL),于恒温孵箱中培养后 24、48、72 h 后,取 1.0 mL,用台盼蓝染色法检测细胞存活率。

2.2.4 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计学软件对各单味药作用于 HL-60 细胞 72 h 后的细胞存活率进行多重比较。对数据进行方差齐性检验,若数据满足方差齐性要求,则采用 Tukey 检验;若不能满足方差齐性要求,则采用 Dunnett T3 检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2.2.5 实验结果

甘草、红枣、破布木、牛舌草、铁线蕨、地锦草、小茴香、蜜蜂花和薰衣草 9 味药的二氯甲烷提取物、甲醇提取物分别作用于 HL-60 细胞 24、48、72 h 后各组细胞存活率见表 3。

实验方差齐性检验表明,Levene 统计量为 3.215, $P=0.001$,认为方差不齐($P<0.05$),故采用 Dunnett T3 检验,结果见表 4。可以看出,除小茴香外,9 味药的二氯甲烷提取物均能明显降低 HL-60 癌细胞存活率。在所有甲醇提取物中,只有甘草和地锦草 2 味药的甲醇提取物可降低 HL-60 癌细胞存活率。各单味药二氯甲烷提取物降低 HL-60 细胞体外存活率的作用均明显强于其相应的甲醇提取物。

2.3 各单味药、Extr-4 和 SPE-40 的 TLC 对比

2.3.1 待测溶液配制

精确称取 Extr-4、SPE-40 各约 20 mg,溶于 60%乙醇,分别配成浓度为 20、6 mg/mL 的待测溶液,备用;称取各单味药二氯甲烷提取物和甲醇提取物,其中二氯甲烷提取物溶于氯

表 3 暴露于单味药两种不同提取物的 HL-60 细胞的体外存活率

Table 3 *In vitro* cell viability of HL-60 cells exposed to two different extracts from each individual herb

样品	提取溶剂	细胞存活率/%		
		24 h 后	48 h 后	72 h 后
空白对照	—	100.0±9.3	100.0±1.1	100.0±6.4
甘草	CH ₂ Cl ₂	12.1±1.5	3.8±0.2	2.4±0.5
	MeOH	61.5±3.3	17.0±1.9	8.1±1.2
红枣	CH ₂ Cl ₂	23.0±2.9	6.8±0.7	4.9±0.6
	MeOH	89.5±3.8	94.7±4.6	88.2±6.9
破布木	CH ₂ Cl ₂	75.3±4.5	54.5±3.8	55.8±3.2
	MeOH	96.2±7.6	95.4±6.3	98.5±3.1
牛舌草	CH ₂ Cl ₂	42.7±2.2	17.7±2.5	6.0±0.2
	MeOH	88.3±3.8	85.2±0.6	79.2±3.0
铁线蕨	CH ₂ Cl ₂	24.3±4.8	7.80±0.3	4.2±0.9
	MeOH	84.1±9.8	71.3±3.7	72.5±1.8
地锦草	CH ₂ Cl ₂	7.5±0.7	8.4±0.6	4.5±0.3
	MeOH	84.5±3.8	14.2±1.0	11.8±0.7
小茴香	CH ₂ Cl ₂	72.2±11.7	72.3±3.6	77.9±1.2
	MeOH	72.2±31.6	87.5±4.5	91.2±3.8
蜜蜂花	CH ₂ Cl ₂	23.5±3.0	8.6±0.6	6.1±0.5
	MeOH	87.0±6.0	96.1±2.4	94.2±4.8
薰衣草	CH ₂ Cl ₂	13.0±3.5	4.7±0.4	4.8±0.3
	MeOH	76.5±13.8	76.5±2.3	65.5±5.0

仿, 甲醇提取物溶于甲醇, 配成浓度为 10 mg/mL 的待测溶液,备用。

2.3.2 显色剂配制

显色剂选用固蓝 B 盐 (FBS)、天然产物/聚乙二醇试剂 (NP/PEG)。

1) FBS。取固蓝 B 盐,加入 100 mL 水溶解即得。薄层板喷以 6~8 mL 显色剂,吹干后于自然光下检视。喷 10% NaOH 的乙醇溶液能改善色斑,便于观察^[17]。

2) NP/PEG。薄层板先喷以 1%二苯基硼酸-2-氨基乙基酯甲醇溶液,再喷以 5%聚乙二醇 4000 乙醇溶液,吹干后于 366 nm 紫外光下检视^[17]。

2.3.3 色谱条件及结果

按文献^[17]方法试验,取供试品溶液即 Extr-4、Extr-2(异常黑胆质成熟剂经过大孔吸附树脂柱后用 20%乙醇洗脱所得提取物,与本文无关)、Extr-3(异常黑胆质成熟剂总皂苷提取物,与本文无关)以及甘草、红枣、DA(一种天然药物,与本文无关)、破布木、牛舌草、铁线蕨、地锦草等的二氯甲烷提取物及其甲醇提取物各 10 μL,点于同一硅胶 60 F₂₅₄ 板上,以氯仿-甲醇-水(70:22:3.5,V/V/V)为展开剂,上行展开,待展开剂前沿离顶端约 1.5 cm 时,将色谱板取出,挥干溶剂后用 FBS 喷雾显色,在自然光下检视并成像,结果见图 1(a)。

按文献^[17]方法进行试验,取供试品溶液即 SPE-40 以及

性有机组分的体外抗癌活性。

4 结论

破布木、地锦草、铁线蕨、甘草、红枣、薰衣草、牛舌草和蜜蜂花 8 味药的二氯甲烷提取物以及甘草和地锦草 2 味药的甲醇提取物均能明显降低 HL-60 癌细胞的存活率。各单味药的二氯甲烷提取物对 HL-60 细胞增殖的抑制作用均明显强于其相应的甲醇提取物。

薄层色谱分析结果表明,牛舌草、铁线蕨、地锦草和甘草可能含有酚类化合物,其中甘草尤其二氯甲烷提取物显出明显的褐色斑点,提示甘草可能含有丰富的酚类化合物, Extr-4 与甘草在相同的位置显相同颜色的斑点,提示 Extr-4 所含酚类化合物可能至少部分来自甘草。薄层色谱分析结果还提示, SPE-40 中黄酮类化合物可能分别来自地锦草、铁线蕨、薰衣草、牛舌草、小茴香和蜜蜂花 6 味药。

参考文献 (References)

- [1] 阿不都热依木, 哈木拉提. 异常黑胆质成熟剂和清除剂抗氧化作用的 ESR 研究[J]. 中药新药与临床药理, 2001, 12(6): 420.
Abudureyimu, Hamulati. *Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology*, 2001, 12(6): 420.
- [2] 李林, 哈木拉提·吾甫尔, 陈艳, 等. 异常黑胆质成熟剂和清除剂对氧化应激的相关蛋白表达及其凋亡的影响 [J]. 科技导报, 2008, 26(10): 43-48.
Li Lin, Upur Hamulati, Chen Yan, *et al. Science & Technology Review*, 2008, 26(10): 43-48.
- [3] 陈艳, 李林, 武贵臻, 等. 异常黑胆质成熟剂与清除剂对 H₂O₂ 诱导的淋巴细胞 NF-κB 表达的影响 [J]. 新疆医科大学学报, 2005, 28(4): 296-299.
Chen Yan, Li Lin, Wu Guizhen, *et al. Journal of Xinjiang Medical University*, 2005, 28(4): 296-299.
- [4] Yusup A, Upur H, Umar A, *et al.* Protective effects of Munziq and Mushil of Abnormal Savda to mitochondrial oxidative damage [J]. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 2004, 18(4): 471-476.
- [5] Yusup A, Upur H, Baudrimont I, *et al.* Cytotoxicity of abnormal Savda Munziq aqueous extract in human hepatoma (HepG2) cells [J]. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 2005, 19(4): 465-472.
- [6] Upur H, Yusup A, Baudrimont I, *et al.* Inhibition of cell growth and cellular protein, DNA and RNA synthesis in human hepatoma (HepG2) cells by ethanol extract of abnormal Savda Munziq of traditional Uighur medicine [J]. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2008, 10(15): 1-9.

- [7] Amat N, Upur H, Ablimit A, *et al.* Immunomodulatory effects of Abnormal Savda Munziq, a traditional Uighur medicine, on the combined stress mice[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, 122(1): 42-47.
- [8] 木拉提·克扎衣别克, 哈木拉提·吾甫尔, 库吐比江·阿木提. 异常黑胆质成熟剂总糖和总皂苷含量测定[J]. 科技导报, 2009, 27(9): 39-42.
Kizaibek Murat, Upur Hamulati, Amut Kutubjan. *Science & Technology Review*, 2009, 27(9): 39-42.
- [9] 木拉提·克扎衣别克, 阿不都热依木·玉苏甫, 哈木拉提·吾甫尔. 异常黑胆质成熟剂总黄酮和总酚的含量测定 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(3): 519-522.
Kizaibek Murat, Yusup Abdirm, Upur Hamulati. *Lishizhen Medicine and Materia Medica*, 2009, 20(3): 519-522.
- [10] 木拉提·克扎衣别克. 异常黑胆质成熟剂活性组分及其抑制 HL-60 细胞增殖作用的研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学维吾尔医药系, 2009: 38-49.
Kizaibek Murat. Bioactive fraction of Abnormal Savda Munziq and its antiproliferative activity on HL-60 cells[D]. Urumqi: Faculty of Traditional Uigher Medicine, Xinjiang Medical University, 2009: 38-49.
- [11] 阿不都热依木·玉苏甫, 哈木拉提·吾甫尔, 希尔艾力·吐尔逊, 等. 异常黑胆质成熟剂黄酮类化合物诱导 HePG2 细胞凋亡机制的研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(11): 1068-1071.
Yusup Abdirm, Upur Hamulati, Tursun Xirali, *et al. China Journal of Chinese Materia Medica*, 2007, 32(11): 1068-1071.
- [12] Yusup A, Upur H, Tursun X, *et al.* The effect of abnormal Savda Munziq total flavonoids on the proliferation, apoptosis and correlative gene expression in human hepatoma (HepG2) cells [J]. *Toxicology Letters*, 2006, 164(S1): S250.
- [13] 玛依努尔·艾力, 哈木拉提·吾甫尔. 维吾尔药异常黑胆质成熟剂总黄酮逆转肝癌细胞耐药性的作用[J]. 中国中医药信息杂志, 2007, 14(9): 31-33.
Aili Mayinur, Upur Hamulati. *Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine*, 2007, 14(9): 31-33.
- [14] 玛依努尔·艾力, 哈木拉提·吾甫尔, 阿不力孜, 等. 维吾尔药异常黑胆质成熟剂总黄酮对 Bel/Fu 细胞株多药耐药性及 mRNA 表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2007, 14(11): 27-28.
Aili Mayinur, Upur Hamulati, Abliz, *et al. Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine*, 2007, 14(11): 27-28.
- [15] Daniel M. Medicinal plants: Chemistry and properties [M]. Enfield, NH: Science Publishers, 2006: 11.
- [16] Levintow L, Eagle H. Biochemistry of cultured mammalian cells [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1961, 30(1): 605-640.
- [17] Wagner H, Bladt S. Plant drug analysis: A thin layer chromatography Atlas[M]. Springer, 1996.

(责任编辑 吴晓丽)

勘 误

《科技导报》2009 年第 17 期“科学顿悟”栏目文章“如何支持年轻科研人员”(武夷山, 第 123 页)的第 3 自然段中,“我是 1985 年考入中国科技情报研究所(即中国科技信息研究所)研究生班的”,应为“我是 1982 年考入中国科技情报研究所(即中国科技信息研究所)研究生班的”。特此更正。

(本刊编辑部)