

Comparison of Inhibitory Effects of Polysaccharides from *Hedyotis Diffusa* on Different Tumor Cells in Different Extraction Processes

Jingqian Feng¹ Jiangyan Li² Jian'gang Wang³

1. Medical College of Quzhou Vocational and Technical College, Quzhou, Zhejiang, 324000, China
2. Quzhou Traditional Chinese Medicine Hospital, Quzhou, Zhejiang, 324000, China
3. Luzhou Ruicaotang Pharmaceutical Co., Ltd., Quzhou, Zhejiang, 324000, China

Abstract

Objective: To optimize the optimum extraction method of polysaccharides from *Hedyotis diffusa*. **Methods:** Microwave extraction, ultrasonic extraction, alkaline water extraction, enzymatic extraction, and heat reflux extraction of *Hedyotis diffusa* were compared. Based on the extraction rate of polysaccharides, a better extraction process was screened out, and two tumors, Hep G2 and A549, were determined. Inhibition rate of cells. **Results:** The best extraction technology of *Hedyotis diffusa* is microwave-assisted extraction. The extraction rate of *H. diffusa* polysaccharide is 11.25 ~ 13.58%, and its inhibition rate on Hep G2 and A549 tumor cells is greater than 16%. **Conclusion:** The preferred microwave extraction method of *Hedyotis diffusa* is stable, feasible and easy to operate. The obtained *Hedyotis diffusa* polysaccharide has a certain antitumor effect.

Keywords

Hedyotis diffusa; polysaccharide; extraction; tumor suppressive effect

Fund Project

This project is funded by the Scientific Research Program of the Zhejiang Provincial Department of Education (Project No.: Y201329429).

不同提取工艺的白花蛇舌草多糖对肿瘤细胞的抑制效果比较

冯敬骞¹ 李姜言² 汪建刚³

1. 衢州职业技术学院医学院, 中国·浙江 衢州 324000
2. 衢州市中医医院, 中国·浙江 衢州 324000
3. 衢州瑞草堂医药有限公司, 中国·浙江 衢州 324000

摘要

目的: 优选白花蛇舌草中多糖的最佳提取方法。**方法:** 比较微波提取、超声提取、碱水提取、酶法提取、加热回流提取白花蛇舌草, 以多糖的提取率为指标, 筛选出较优提取工艺, 并测定对 Hep G2、A549 两种肿瘤细胞的抑制率。**结果:** 白花蛇舌草的最佳提取工艺为微波辅助提取法, 其白花蛇舌草多糖的提取率在 11.25~13.58%, 其对 Hep G2、A549 两种肿瘤细胞的抑制率均大于 16%。**结论:** 优选的白花蛇舌草微波提取法工艺稳定可行、操作简便, 所得的白花蛇舌草多糖有一定的抑瘤效果。

关键词

白花蛇舌草; 多糖; 提取; 抑瘤效果

基金项目

本项目受浙江省教育厅高校科研项目资助(项目编号: Y201329429)。

1 引言

白花蛇舌草为茜草科植物白花蛇舌草 *Hedyotis diffusa* Willd. 的全草, 始载于《名医别录》^[1], 别名蛇舌草、蛇针草、蛇总管等, 是我国民间常用的中草药, 现收载于湖南、河南、

浙江等多个省份的中药材标准和中药炮制规范, 使用广泛。

白花蛇舌草性寒, 味苦、甘, 归心、肝、脾经, 具有清热解毒、利尿消肿之功效, 常用于肠痈, 疮疖肿毒, 咽喉肿痛, 毒蛇咬伤, 湿热黄疸, 肾炎, 肝硬化, 早期淋巴结核, 口腔炎, 小便不利等,

现多用于各种癌症的预防和治疗^[2]。

国际上对白花蛇舌草化学成分的研究较多,综合近几十年来国内外相关的文献报道,白花蛇舌草主要含有黄酮类、多糖类,还含有萜醌类、萜类、挥发油等成分。其中对多糖类和黄酮类成分做了很多的探索研究,如:凌育超^[3]对白花蛇舌草中的多糖进行了提取、分离、结构鉴定和含量测定,发现多糖的含量在15%以上,主要由鼠李糖、葡萄糖、半乳糖及甘露糖等单糖组成。樊民广等^[4]采用苯酚-硫酸法对白花蛇舌草中多糖的含量进行了测定,结果测得三批药材的含量均在10%以上;刘志刚等^[5]对白花蛇舌草多糖的提取醇沉工艺进行了研究,初步确定为:以总量18倍水提取2次,首次10倍量水,浸泡30min,提取2.5h,第2次8倍量水,提取1.5h;将提取液浓缩至流浸膏,边搅拌边加入计算量的乙醇使含醇量达80%,静置6h后离心,即得。

白花蛇舌草最重要的药理活性是抗肿瘤,早在几十年前,民间就以白花蛇舌草治疗腹部肿瘤,并作为放疗、化疗后的辅助用药。抗肿瘤活性仍是当前研究的热点,被国内外学者一直高度关注,诸多研究表明白花蛇舌草中所含的多糖具有较好的抗肿瘤活性。白花蛇舌草多糖可促进免疫抑制小鼠脾淋巴细胞的增殖,提高NK细胞活性,能显著提高小鼠血清白介素2、白介素6和肿瘤坏死因子 α 的水平($P < 0.01$),进而提高免疫抑制小鼠的免疫功能^[6]。白花蛇舌草对肿瘤组织血管、淋巴管的生成具有明显抑制作用,如白花蛇舌草提取物可通过抑制人肾癌GRC-1细胞中基质金属蛋白酶2(MMP-2)和MMP-9蛋白的表达而抑制肿瘤组织的血管生成^[7-8]。白花蛇舌草可使人胃癌SGC-7901细胞出现细胞核裂解、染色体形态异常,使该细胞DNA呈现片段化,细胞周期阻滞于G1期,并上调Bax基因的表达,下调Bcl-2基因的表达,从而诱导SGC-7901细胞的凋亡^[9]。白花蛇舌草对结肠癌原代细胞、HCT-116细胞、Lovo细胞、HT-29细胞以及DLD-1细胞均具有明显的降低细胞活力、促进细胞凋亡的作用,具体机制可能与哺乳动物雷帕霉素靶点(MTOR)抑制、p53抑癌基因活化以及表皮生长因子受体、血小板衍生生长因子受体降解密切相关^[10-12]。

如何快速、高效地从白花蛇舌草中提取出多糖并测定其含量和肿瘤细胞的抑制效果,将为白花蛇舌草的进一步开发和利用奠定基础。

2 材料与仪器

白花蛇舌草购自衢州瑞草堂医药有限公司,产于浙江衢州开化县,经衢州瑞草堂医药有限公司汪建刚鉴定为茜草科植物白花蛇舌草 *Hedyotis diffusa* Willd. 的干燥全草。所用试剂均为国产分析纯,购自中国医药集团上海化学试剂公司。

人肝癌细胞系 Hep G2 和人肺腺癌细胞系 A549(浙江省医学科学院馈赠)。

NJL07-5型双波反应器:南京杰全微波设备有限公司;超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司;UV-1900紫外可见分光光度计:岛津企业管理(中国)有限公司;台式离心机KA-1000C:上海安亭科学仪器厂等。

3 方法与结果

3.1 白花蛇舌草多糖的测定

3.1.1 对照品溶液的制备

精密称取105℃干燥至恒重的葡萄糖对照品50mg,加水溶解并定容至100mL精密吸取10mL稀释定容至100mL,摇匀,即得0.05mg/mL葡萄糖对照品溶液。

3.1.2 标准曲线的绘制

分别精密吸取0.05mg/mL葡萄糖对照品溶液0、0.30、0.60、1.00、1.50、2.00mL置25mL具塞试管中,加水补足至2.00mL,分别加4%苯酚溶液1.00mL混匀,迅速加入浓硫酸7.0mL摇匀,于40℃水浴中反应30min后取出,置冰水浴中5min冷却至室温,取出,以第一份为空白,照分光光度法在490nm波长处测定吸光度值,绘制标准曲线,经回归得线性方程为 $A=0.1058C+0.1015$ ($r=0.9997$),结果表明葡萄糖在0~0.1mg与吸光度呈良好的线性关系。

3.1.3 白花蛇舌草多糖提取率和质量分数的测定

取白花蛇舌草多糖粗品加水溶解,定容至250mL精密量取2.5mL,稀释定容至100mL,取续滤液按2.1.2项下方法操作,测定吸光度值为 A_i ,由线性方程求得质量浓度 C_i ,计算多糖的提取率。

$$\text{提取率}/(\%) = \frac{\text{多糖质量}}{\text{药材质量}} * 100\% \quad (\text{公式1})$$

3.2 不同提取方法所得多糖的提取率比较

3.2.1 超声提取法

称取白花蛇舌草粉末(20目)10g,精密称定,置于锥

形瓶中,加水 100mL,超声提取 3 次,每次 20min,得到提取液 1。

3.2.2 微波提取法

称取白花蛇舌草粉末(20目)10g,精密称定,置于锥形瓶中,加水 100mL,采用微波提取装置,低火提取 3 次,每次 20min,得到提取液 2。

3.2.3 加热回流法

精密称取白花蛇舌草粉末(20目)10g,加水 100mL 加热回流 3 次,每次 1.0h,得到提取液 3。

3.2.4 碱水提取法

加 pH9~10 的 Ca(OH)₂ 水溶液 100mL 加热回流 3 次,每次 1.0h,得到提取液 4。

3.2.5 酶提取法

称取白花蛇舌草粉末(20目)10g,精密称定,置于锥形瓶中,将纤维素酶 0.4g 加入 pH4.4 的 HAc-NaAc 缓冲液 50mL 预活 5min 后倒入锥形瓶中,置 50℃水浴中保温 24h,加水 50mL,调 pH 至 6~7,加热回流 3 次,每次 1.0h,第 2 次和第 3 次的加水量均为 100mL,得到提取液 5。

3.2.6 样品的处理及结果

将上述五组的提取液滤过,滤液减压浓缩至 10mL,加 90%乙醇 50mL 醇沉,离心,将沉淀加水 100mL 溶解,离心,取上清液减压浓缩至 10mL,再加 95%乙醇 50mL 醇沉,离心,得沉淀,即为白花蛇舌草多糖样品,按 3.1.3 测定样品中的多糖提取率,结果见表 1^[13-16]。

表 1 不同提取方法的白花蛇舌草多糖提取率测定结果

| 样品 | 提取方法 | 提取率(%) |
|-------|------|--------|
| 提取液 1 | 超声提取 | 3.16 |
| 提取液 2 | 微波提取 | 12.78 |
| 提取液 3 | 加热回流 | 9.01 |
| 提取液 4 | 碱水提取 | 7.29 |
| 提取液 5 | 酶提取 | 6.52 |

由表 1 可以看出,微波提取的提取率明显高于其他 4 种方法。此外,微波提取法所用的时间较短(缩短为传统加热回流提取法的 1/7),所需设备简单、操作简便,故可选择微波提取法提取白花蛇舌草多糖。

3.2 不同提取方法所得多糖对肿瘤细胞的抑制效果比较

采用 CCK-8 法测定对肿瘤细胞的抑制作用,在 96 孔板

上接种两种人源肿瘤细胞,每孔 100mL,每个剂量 6 个复孔,Hep G2、A549 细胞种板密度均为 4×10^4 个/mL。种板 15 h 后,每孔更换新的培养液,空白对照组中加入 100mL 新培养液,实验组每孔加入 90mL 新培养液,进行细胞染毒。DMSO 无细胞毒性的浓度为 0.1% 及以下,为确保提取物中 DMSO 对细胞无毒性,在实际实验操作中以 DMSO 的体积比进行梯度稀释,控制其最终浓度不超过 0.1%。每孔加入 10mL 稀释后的样品溶液(根据预实验探索的抑癌作用浓度,以最佳浓度进行试验,加入 Hep G2 细胞板孔的样品浓度为 30.0 mg/mL,加入 A549 细胞板孔的样品浓度为 6.0 mg/mL),继续培养 72 h 后,每孔加入 10mL CCK-8 在酶标仪测定 450 nm 吸光度(A)值,计算细胞抑制率,结果见表 2^[13-16]。

$$\text{抑制率}/(\%) = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}}{A_{\text{对照}}} * 100\% \quad (\text{公式 } 2)$$

表 2 不同提取方法所得多糖对肿瘤细胞的抑制效果

| 样品 | 提取方法 | Hep G2 | | A549 | |
|-------|------|--------|--------|------|-----------|
| | | A 值 | 抑制率(%) | A 值 | 抑制率(%) |
| 提取液 1 | 超声提取 | 0.86 | 11.63 | 0.87 | 10.49026 |
| 提取液 2 | 微波提取 | 0.79 | 18.62 | 0.81 | 16.772896 |
| 提取液 3 | 加热回流 | 0.82 | 15.71 | 0.83 | 14.160994 |
| 提取液 4 | 碱水提取 | 0.84 | 13.12 | 0.86 | 11.817184 |
| 提取液 5 | 酶提取 | 0.85 | 12.07 | 0.87 | 10.870242 |

由表 2 可知,微波提取所得多糖对两种肿瘤细胞的抑制效果均高于其他 4 种方法。

综上,可选择微波提取法提取白花蛇舌草多糖,为进一步的研究和开发积累实验基础。

4 讨论

因在微波提取前需加水浸泡药材,使水分子能深入到药材内部,为比较研究相对一致,各组药材均设置浸泡 1h。微波辐射时细胞内外同时加热,有利于目标成分的萃取。在本实验条件下,各组经浸泡 1h 后,能使提取率提高到 5.21~10.26%。

按确定的微波提取工艺提取 3 批白花蛇舌草,其白花蛇舌草多糖的提取率在 11.25~13.58%,其对 Hep G2、A549 两种肿瘤细胞的抑制率均大于 16%,结果表明该工艺稳定可行,

可作为白花蛇舌草多糖提取的较优方法。

参考文献

- [1] 张贵君. 常用中药鉴定大全 [M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1993, 278-279.
- [2] 王骁, 范焕芳, 李德辉, 等. 白花蛇舌草的抗癌作用研究进展 [J]. 中国药房, 2019, 30(10): 1428-1431.
- [3] Sheng-Yun Lin, Chu-Yun Shen, Jian-Ping Jiang, et al. Apoptosis of multiple myeloid cells induced by polysaccharides extracts from *Hedyotis diffusa* and its mechanism [J]. *China Medical Abstracts (Internal Medicine)*, 2013, 34(2):337-340.
- [4] Jianyu Feng, Yiyi Jin, Jun Peng, et al. *Hedyotis diffusa* willd extract suppresses colorectal cancer growth through multiple cellular pathways [J]. *Oncology Letters*, 2017, 14(6):8197.
- [5] CuiJian, Wang Shun-chun, Shi Shan-song, et al. Structural Characterization of a Glucan isolated from *Hedyotis diffusa* Wild [J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2006, 29(9): 912-916.
- [6] 瞿俊勇, 田梦, 贺建华, 等. 白花蛇舌草多糖对免疫抑制小鼠的免疫调节作用研究 [J]. *中药材*, 2015, 38 (9) : 1942-1945.
- [7] 肖云, 伍治平, 金从国, 等. 白花蛇舌草提取物抗小鼠结肠癌血管生成的实验研究 [J]. *昆明医科大学学报*, 2013, 34 (10) : 53-57.
- [8] 刘岩, 张春阳, 张大田, 等. 白花蛇舌草提取物诱导人肾癌 GRC-1 细胞凋亡及抑制血管生成的实验研究 [J]. *山东医药*, 2011, 51 (8) : 97-98.
- [9] 焦凯贺, 邵淑丽, 陈丽, 等. 白花蛇舌草诱导胃癌 SGC-7901 细胞凋亡 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37 (7) : 3060-3065.
- [10] Xiao-Cui Liu, Hongran Li, Tong Kang, 等. The effect of fermentation conditions on the structure and anti-tumor activity of polysaccharides from *Cordyceps gunnii* [J]. *RSC Advances*, 2019, 9(32):18205-18216.
- [11] 浦飞飞, 陈凤霞, 夏平. 白花蛇舌草抗肿瘤化学成分和作用机制的研究进展 [J]. *癌症进展*, 2019, 17(17):1985-1988+1996.
- [12] 车宏伟, 杨海宁, 谭晓川, 张宇佳, 郑稳生. 白花蛇舌草不同提取部位抗肿瘤作用研究进展 [J]. *亚太传统医药*, 2019, 15(03):191-193.
- [13] 吴仪君, 刘小芳, 李万忠, 王荣申, 石玮玮, 阎芳. 白花蛇舌草不同极性部位抗血管生成及抗氧化活性研究 [J]. *中医药导报*, 2018, 24(17):50-54.
- [14] 刘志强, 王博龙. 基于网络药理学探讨白花蛇舌草主要成分的抗癌机制 [J]. *中成药*, 2018, 40(08):1827-1832.
- [15] 曾永长, 梁少瑜, 吴俊洪, 李仲秋, 吴正治. 白花蛇舌草化学成分及其抗肿瘤活性 [J]. *中成药*, 2018, 40(08):1768-1772.
- [16] 赵浩如, 李瑞, 林以宁, 等. 白花蛇舌草不同提取工艺对抗肿瘤活性的影响 [J]. *中国药科大学学报*, 2002, 33(6):510-513.