

文章编号: 1674-8085(2021)06-0025-05

柿子叶有效部位的抗肿瘤活性研究

刘 彬¹, 宋明霞^{2,3}, 李东妮², 牛佳晓², *邓先清^{2,3}

(1. 井冈山大学附属医院, 江西, 吉安 343000; 2. 井冈山大学医学部, 江西, 吉安 343009;

3. 井冈山大学中药资源和功能分子研究中心, 江西, 吉安 343009)

摘 要: 以柿子叶为研究对象, 采用 70%乙醇回流提取柿子叶的有效成分。提取物浓缩后加水搅拌, 依次用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇四种溶剂进行梯度萃取, 浓缩各相, 加上乙醇粗提物共得到六种干燥浸膏。采用 CCK 试剂检测法, 测定六种浸膏对两组癌细胞人宫颈癌细胞 *Hela*、肺癌细胞 A549 和正常细胞人肾上皮细胞 293 的生长抑制作用。结果表明, 六种浸膏均具有较强抗肿瘤活性, 其中二氯甲烷层和正丁醇层对 *Hela* 细胞抑制活性最好, 其 IC_{50} 分别为 0.24、0.26 mg/mL, A549 细胞则对乙酸乙酯层更为敏感, 其 IC_{50} 值低至 0.03 mg/mL。此外, 六种浸膏对正常人肾上皮细胞 293 也显示出明显的抑制作用, 尤其是乙酸乙酯层, IC_{50} 值达到 0.93 mg/mL。研究证实了柿子叶具有明显抗肿瘤活性, 且其活性成分复杂, 在各相中均有分布, 但又对不同细胞株活性各有差异, 提示在后续的活性追踪中可以根据活性需求, 选择恰当的柿子叶有效部位进行研究。

关键词: 柿子叶; 提取物; 有效部位; 抗肿瘤活性; CCK 法

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI:10.3669/j.issn.1674-8085.2021.06.005

ANTITUMOR ACTIVITY OF EFFECTIVE FRACTION OF PERSIMMON LEAVES

LIU Bin¹, SONG Ming-xia^{2,3}, LI Dong-ni², NIU Jia-xiao², *DENG Xian-qing^{2,3}

(1. The Affiliated Hospital of Jinggangshan University, Ji'an, Jiangxi 343000, China;

2. School of Medicine, Jinggangshan University, Ji'an, Jiangxi 343009, China;

(3. Research Center of Chinese Medicinal Resources and Functional Molecules of Jinggangshan University, Ji'an, Jiangxi 343009, China)

Abstract: In this research, the active ingredient of the dried persimmon leaves as study object was extracted by alcohol reflux extraction. The crude extracts were extracted with petroleum ether, dichloromethane, ethyl acetate and n-butanol in turn, and totally six kinds of dry extracts were obtained. CCK assay was used to detect the growth inhibition of six extracts on human cervical cancer cells, lung cancer cells and human renal epithelial cells. The results showed that all the six extracts had strong anti-tumor activity, with IC_{50} of 0.24 and 0.26 mg/mL, respectively. While the A549 cells were more sensitive on the ethyl acetate phase, with IC_{50} of 0.03 mg/mL. What's more, the six extracts showed inhibition against the normal cells 293, especially the ethyl acetate phase, which showed the IC_{50} of 0.93 mg/mL against the normal cells 293. This study confirmed that persimmon leaves had obvious anti-tumor activity, and its active components were complex and distributed in each extract phases. The activities of the extract phases against the different cell lines were different. It suggested that in the follow-up

收稿日期: 2021-04-11; 修改日期: 2021-06-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(21562028); 江西省卫计委科技计划项目(20185476); 江西省教育厅科技计划项目(GJJ160761)

作者简介: 刘 彬(1985-), 男, 河南南阳人, 主治医师, 硕士, 主要从事恶性肿瘤研究(E-mail: zdan10@163.com);

宋明霞(1983-), 女, 山西介休人, 副教授, 博士, 主要从事抗菌与抗肿瘤药物研究(E-mail: freexiaoxiao83@aliyun.com);

李东妮(2000-), 女, 河北张家口人, 井冈山大学医学部药学专业 2018 级本科生(E-mail: 1511459841@qq.com);

牛佳晓(2000-), 女, 宁夏银川人, 井冈山大学医学部药学专业 2018 级本科生 (E-mail: 1531001189@qq.com);

*邓先清(1984-), 男, 湖南衡阳人, 副教授, 博士, 主要从事先导物的发现与优化工作(E-mail: dengxianqing1121@126.com).

activity tracking, the appropriate effective parts could be selected for research according to the research aim.

Key words: persimmon leaf; effective fraction; antitumor activity

近年来科研工作者们对天然产物中抗肿瘤活性成分的研究越来越广泛,研究表明,多种天然产物具有抗肿瘤的作用,其中就包括黄酮类、生物碱类、植物多糖类、木脂素类等化合物^[1-2]。从天然产物中寻找具有抗肿瘤活性的药物组分成为目前抗肿瘤药物研究的重要途径之一,但大多数天然产物的具体抗肿瘤作用机制还不够明确,需要被进一步阐明。总之,含有抗肿瘤活性成分的天然产物资源丰富且种类繁多,是潜在的抗肿瘤药物,具有广阔的开发应用前景^[3]。

柿树生长在热带和温带,其中我国柿树产量占世界总产量的 50%以上,总体资源丰富^[4]。柿子叶中含有黄酮类、鞣质、香豆精类化合物、多糖及有机酸等多种物质,具有抗氧化、降血脂、通利血脉、清热解毒、生津止渴作用^[5-6]。目前柿子叶在保健领域应用较为广泛,如柿子叶作为主要原料的柿子茶是我国多地民间传统饮料^[7],而其在药用治疗领域的研究报道较少。柿叶的主要有效成分是黄酮类化合物,其中的芦丁、槲皮素等成分具有广泛的抗肿瘤活性^[8]。因此,研究柿子叶及其提物的抗肿瘤活性,并进行其物质基础分析,对柿子叶的综合开发具有重要价值。

柿叶中的黄酮多以甙类形式存在,提取时多采用水、甲醇、乙醇作溶剂。吉林大学牛凤兰等人^[9]采用水提和醇提获得了柿子叶粗提物,然后直接用初提物对 Hela (人宫颈癌细胞) 和 H22 (小鼠肝癌细胞) 用 MTT 检测法进行抗肿瘤活性测试,柿子叶水/乙醇初提物对这两种细胞在 0.78 mg/mL 及以上浓度时显示出明显的抑瘤作用。但也存在这一些不足之处:粗提物有待进一步的分离,缺乏正常细胞对照,MTT 检测法误差较大,未计算出 IC₅₀ 值数据没有直观的对比性;晏亦林等人^[10]研究了柿叶总黄酮的最佳提取工艺,确定最佳提取工艺为 70%乙醇提取 3 次,溶剂用量依次为 8 倍、8 倍和 6 倍,提取时间依次为 2、1、1 h;而石锦芹等^[11]用正交设计方法研究出乙醇提取柿叶总黄酮的最佳条件为用 15 倍柿叶重的 50%乙醇水溶液,在 75℃下浸提 3 h。

本实验以柿子叶为研究对象,采用 70%乙醇回

流提取柿子叶的有效成分。提取物浓缩后加水搅拌,依次用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇四种溶剂进行梯度萃取,浓缩石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇和水相,加上乙醇粗提物一共得到六种干燥浸膏。采用比 MTT 法更为准确的 CCK 法来评价各浸膏对两组癌细胞人宫颈癌细胞 Hela、肺癌细胞 A549 和一组正常细胞人肾上皮细胞 293 的生长抑制作用。通过本实验,获得柿子叶提取物及各极性组份的体外抗肿瘤活性数据,为柿子叶的抗肿瘤方面的药用资源开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

SSW-420-2S 型电热恒温水槽(上海博讯有限公司), WT30001B 电子天平(常州万泰天平仪器有限公司), ZNHW 型电热套(上海羌强仪器设备有限公司), MAS-II 微波提取器(上海新仪微波化学科技有限公司), 旋转蒸发器 RE-5299 (上海凌科智能科技有限公司), DHG-9075A 电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司), iMark 酶标仪(美国伯乐公司), Toppette 单道可调式移液枪(大龙兴创有限公司), 多通道手动可调移液器(法国吉尔森公司), DG160C 型一斤装中药材粉碎机(浙江省瑞安市飞达药材器械厂), 恒温细胞培养箱(德国 Binder 公司), SW-CJ-2D 型双人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司), KXQ-LS 高压灭菌仪(上海博讯有限公司), XSB-1A 生物倒置显微镜(深圳星明光学仪器有限公司), KL04A 台式高性能低速离心机(湖南凯达科学仪器有限公司), Medium-Q 去离子超纯水机(上海和泰仪器有限公司)等。

1.2 试剂与材料

干柿子叶(产自于山西,经井冈山大学医学部药学系梁昌教授鉴定),甘油(美国阿拉丁工业公司),二甲亚砜(国药集团化学试剂有限公司,分析纯 AR),96 孔细胞培养板(北京杰辉博高生物技术有限公司),Trypsin (+EDTA)(北京全式金生物技术有限公司),TransDetect Cell Counting Kit (CCK)

(北京全式金生物技术有限公司, 6×5 mL), DMEM/HIGH GLUCOSE(HyClone 公司), Fetal Bovine Serum (北京全式金生物技术有限公司), Phosphate Buffered Saline (PBS) (北京全式金生物技术有限公司), Hela (人宫颈癌细胞)、293 (人肾上皮细胞)、A549 (肺癌细胞) 均由延边大学药学院全哲山教授课题组赠送提供。

1.3 方法

1.3.1 柿子叶初步提取物的制备

干柿子叶粉碎成 80 目粉末, 精密称取 50 g 用 70% 的乙醇加热回流连续提取 3 次, 溶剂用量按质量体积比依次为 8 倍、8 倍和 6 倍, 提取时间分别依次为 2、1、1 h。将 3 次所得滤液合并减压旋干, 得粗提物浸膏, 称重后取 200 mg 备用, 余下的用于下一步的梯度萃取。

1.3.2 对柿子叶初提物进行梯度萃取

将初提物浸膏先用少量水溶解 ($m/v = 1:15$), 再依次用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇四种溶液按等体积比进行梯度萃取, 每种溶剂分别萃取 3 次。将 4 种萃取液包括最后水层在 $40 \sim 70$ °C 下减压旋干, 得到相应的五种浸膏, 分别称重并计算萃取率。

1.3.3 不同浓度待测物的配制

将待测物即初提物、石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇、水相六种浸膏用分析天平各自精密称取 200 mg, 溶解于 1 mL DMSO 中, 如果化合物不易溶解可超声微热助溶, 全部配置成 200 mg/mL 的初始浓度, 于 4 °C 保存备用。

1.3.4 细胞毒性实验

采用 CCK-8 法测定各相浸膏的细胞毒性。将细胞进行复苏、传代后, 使用含体积比为 10% 的牛胎儿血清和 100 U/mL 的双抗 (青霉素-链霉素混合物) 的 DMEM 高糖培养基。将处于对数生长期的细胞用消化液胰蛋白酶 (0.25% in PBS; pH 7.4) 消化 2 min, 加入 DMEM 培养基 5 mL 终止消化, 离心, 移取上层液, 加入 15 mL DMEM 培养基, 置 37°C, 5% CO₂ 孵育, 每 24 h 换 1 次培养基。

细胞长满后计数, 制成 1×10^4 /mL 的细胞悬液, 接种于 96 孔培养板内, 置 37 °C, 5% CO₂ 孵育 24 h 后, 弃去原培养液。设空白对照和供试品组, 每组

8 复孔。空白对照组加入新鲜细胞培养液 100 μ L。供试品组加入新鲜细胞培养液 100 μ L 和 10 μ L 不同浓度的待测药液, 使药液终浓度为 0.125、0.25、0.5、1、2、4、8、16 mg/mL, 置 37 °C, 5% CO₂ 孵育 12~24 h。然后向每个小孔加入 20 μ L CCK-8 溶液, 置 37 °C, 5% CO₂ 孵育 3 h。使用酶标仪在 450 nm 下测其光密度, 对于高度浑浊的细胞悬液可以设定 600 nm 或以上作为参比波长, 进行双波长测定。最后根据不同浓度药液对细胞的生长抑制率, 计算其半抑制浓度 IC₅₀ 值。

2 实验结果与分析

2.1 不同极性溶剂的萃取率比较

50 g 干燥柿子叶乙醇提取得 12.16 g 黑褐色初提物浸膏, 出膏率为 24.32%。将初提物水溶后, 分别用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取, 水相残留最多, 石油醚相最少, 说明醇提物中, 大极性物质更多, 小极性的组分较少。各相的萃取率见表 1。

表 1 六种浸膏的萃取率或出膏率*

Table 1 Extraction rate or extraction rate of six extracts

萃取相	重量(g)	萃取率 (%)
乙醇初提物	12.16	24.32
石油醚相	0.42	0.84
二氯甲烷相	1.74	3.48
乙酸乙酯相	1.49	2.98
正丁醇相	2.35	4.70
水相	3.06	6.12

* 萃取率或出膏率: 单一溶剂提取所得浸膏的干重 g / 柿子叶重量 g * 100%

2.2 六种浸膏对 Hela 细胞和 A549 细胞的抑制活性比较

表 2 是柿子叶六种浸膏对 Hela 细胞的抑制率。如表 2 所示, 粗提物在 0.5 mg/mL 浓度时对 Hela 细胞表现出明显的抑制作用, 并且随着浓度的增大, 抑制率逐步提升, 在最大测试浓度 16 mg/mL 下显示出 93.58% 的抑制率。石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取相和水相均对 Hela 细胞表现出剂量依赖性的抑制作用, 在 16 mg/mL 浓度下均显示出了 90% 以上的抑制率。

表 2 柿子叶六种浸膏对 Hela 细胞的抑制率

Table 2 Inhibition rate of six extracts from persimmon leaves on Hela cells

浓度 (mg/mL)	对 Hela 细胞的抑制率 (%)					
	初提物	石油醚	二氯甲烷	乙酸乙酯	正丁醇	水相
0.125	3.44	-	45.32	8.58	41.08	8.85
0.25	6.67	-	49.17	34.75	47.00	17.00
0.5	26.08	-	64.83	35.25	62.75	19.92
1	48.17	8.42	67.08	45.17	65.25	27.25
2	57.92	25.75	70.00	66.58	69.00	55.92
4	65.08	41.67	76.92	70.75	81.33	73.50
8	72.08	46.92	88.25	78.50	84.17	78.08
16	93.58	94.25	97.33	94.75	91.42	94.92

表 3 是柿子叶六种浸膏对 A549 细胞的抑制率。如表 2 所示，粗提物在 0.5 mg/mL 浓度时对 A549 细胞的抑制率为 23.26%，随着浓度的增大，抑制率逐步提升，在最大测试浓度 16 mg/mL 下显示出 91.82%的抑制率。石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取相和水相也对 A549 细胞表现出剂量依赖性的抑制作用。但在 16 mg/mL 浓度下，只有乙酸乙酯相表现出 90%以上的抑制率，其他几相的抑制率在 58.26%~75.78%。

表 3 柿子叶六种浸膏对 A549 细胞的抑制率

Table 3 Inhibition rate of six extracts from persimmon leaves on A549 cells

浓度 (mg/mL)	对 A549 细胞的抑制率 (%)					
	初提物	石油醚	二氯甲烷	乙酸乙酯	正丁醇	水相
0.125	7.04	-	25.15	53.94	-	7.45
0.25	14.80	4.50	39.74	58.66	3.60	17.11
0.5	23.26	24.76	43.57	67.09	20.37	25.67
1	31.31	25.15	46.24	69.03	34.67	34.85
2	56.14	33.79	49.16	70.37	61.29	41.12
4	67.27	38.58	61.21	72.08	61.99	44.79
8	83.70	43.65	66.10	89.76	63.23	52.53
16	91.82	58.23	75.78	95.94	67.06	62.48

为了比较各种浸膏对 Hela 细胞和 A549 细胞的抑制活性高低，采用 GraphPad Prism 5.0 软件对抑制率进行了非线性拟合，得到了各萃取相抗肿瘤活性的 IC₅₀ 值。如表 4 所示，乙醇粗提物对 Hela 细胞和 A549 细胞的 IC₅₀ 分别为 1.67、1.75 mg/mL，石油醚相活性最差，IC₅₀ 值分别为 5.53、11.11 mg/mL，其次是水相，IC₅₀ 值分别为 1.85、6.02 mg/mL。值得一提的是乙酸乙酯相对 A549 细胞的抑制活性十

分优越，其 IC₅₀ 低至 0.03 mg/mL。

表 4 六种浸膏抑制 Hela 和 A549 细胞生长的 IC₅₀ 值

Table 4 IC50 of six extracts from persimmon leaves inhibited the growth of Hela and A549 cells

	IC ₅₀ (mg / mL)	
	Hela	A549
乙醇初提物	1.67 ± 0.05	1.75 ± 0.03
石油醚相	5.53 ± 0.05	11.11 ± 0.09
二氯甲烷相	0.26 ± 0.08	1.23 ± 0.05
乙酸乙酯相	1.35 ± 0.04	0.03 ± 0.28
正丁醇相	0.28 ± 0.05	2.30 ± 0.09
水相	1.85 ± 0.03	6.02 ± 0.05

2.3 六种浸膏对正常细胞 293 的细胞毒性比较

六种浸膏对 293 细胞的 IC₅₀ 值见表 5。乙醇初提物对正常细胞的 IC₅₀ 为 2.04 mg/mL，该值与癌细胞的 IC₅₀ 值相比略有偏高，但相差不大，各萃取相对癌细胞和正常细胞的抑制程度也相差不大，这说明柿子叶提取物的抗癌细胞活性没有选择性，对正常细胞同样显示出抑制作用。此外从表 5 可以看出，石油醚相对正常细胞的抑制活性也是最低的，说明石油醚相中含有抗肿瘤有效成分相对较少。

表 5 六种浸膏抑制 293 细胞生长的 IC₅₀ 值

Table 5 IC50 value of six extracts from persimmon leaves inhibiting the growth of 293 cells

	IC ₅₀ (mg / mL)
乙醇初提物	2.04 ± 0.44
石油醚相	5.56 ± 0.51
二氯甲烷相	1.17 ± 0.18
乙酸乙酯相	0.93 ± 0.49
正丁醇相	1.34 ± 0.54
水相	0.75 ± 0.10

3 结论

在本实验中，通过采用乙醇回流提取工艺先提取出柿子叶初提物，然后依次用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇四种极性从小到大排列的溶剂依次进行梯度萃取，获得不同极性的有效成分，加上水相和初提物总共得到六种浸膏。对这六种浸膏采用 CCK-8 检测法分别对人宫颈癌细胞(Hela)、肺癌细胞(A549) 和人肾上皮细胞（293）的生长抑制进行了测定。药理实验结果显示，柿子叶乙醇提取物，以及不同极性组分对人宫颈癌细胞(Hela)、肺癌细胞(A549) 和人肾上皮细胞（293）的生长均有较明

显的抑制作用。对于 Hela 细胞,各萃取相的活性顺序是:二氯甲烷相>正丁醇相>乙酸乙酯相>水相>石油醚相;对于 A549,各萃取相的活性顺序是:乙酸乙酯相>二氯甲烷相>正丁醇相>水相>石油醚相。二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇三种浸膏的抗癌效果最好,但是它们对 293 细胞的细胞毒性也相对较大。

总之,本研究进一步确定了柿子叶提取物具有显著的抗肿瘤活性,同时对正常细胞液显示出细胞毒性,而其细胞生长抑制的有效部位主要是二氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇相,说明其有效组分属于中等极性的化学成分。本研究为后续柿子叶中抗肿瘤化学成分和物质基础研究提供了一定依据。

参考文献:

- [1] 戴一,白娟,陶阿丽,等. 姜黄素-二氯乙酸偶联物的合成及抗肿瘤活性研究[J].井冈山大学学报:自然科学版,2021,42(1): 26-29.
- [2] 刘志强,王博龙. 基于 TCMSP 抗肿瘤中药小分子 EGFR-TKI 的研究[J].井冈山大学学报:自然科学版,

2018, 39(2): 87-92.

- [3] 李慧娟,赵玉丛,樊国燕,等.天然产物中抗肿瘤活性成分的研究进展[J]. 现代牧业, 2018, 2(3): 31-34.
- [4] 江维克,周涛.柿叶——一种具有巨大开发潜力的资源[J].贵阳中医学院学报, 1997(2): 52-52.
- [5] 纪莉莲,张强华,崔桂友.柿叶抗菌活性的研究及活性成分的分离鉴定[J]. 食品科学, 2003, 24(3): 129-131.
- [6] 欧阳平,贝伟剑,赖文岩,等.柿叶黄酮对缺氧复氧以及晚期糖基化终产物诱导的乳鼠心肌细胞凋亡的影响[J].南方医科大学学报, 2003, 23(7): 680-682.
- [7] 林娇芬. 富含多种功效成分的柿叶保健茶的研究[D].福州:福建农林大学, 2005.
- [8] 翟广玉,马海英,邵蕾. 槲皮素及其衍生物的抗肿瘤活性研究进展[J].化学试剂, 2015, 37(2): 97-103.
- [9] 牛凤兰,董卿,宋丽君,等. 柿叶提取物体外抑瘤作用初步研究[J].食品科学, 2007,28(8): 475-478.
- [10] 晏亦林,杨桂兴,李云秋,等. 柿叶总黄酮提取方法研究[J].中药材, 2003, 26(11): 811-812.
- [11] 石锦芹,黄绍华,胡欣恺,等. 柿叶黄酮类化合物乙醇提取工艺的研究[J].南昌大学学报:理科版,1999(3): 264-267.