

紫花地丁总香豆素提取工艺优化及其抗氧化和抗肿瘤活性考察^Δ

陈仁强^{1,2*}, 刘 桢¹, 胡慧玲¹, 李林锋¹, 张 春^{1#} (1. 西南医科大学药学院, 四川 泸州 646000; 2. 西南医科大学附属医院药学部, 四川 泸州 646000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)20-2471-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.20.08



摘要 目的 优化紫花地丁总香豆素的提取工艺,并评价其纯化物的体外抗氧化活性和抗肿瘤活性。方法 在单因素实验的基础上,以紫花地丁总香豆素得率为响应值,以液料比、提取时间、乙醇体积分数为变量,采用响应面法优化紫花地丁总香豆素的提取工艺并验证。采用1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)法、2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)法和2-苯基-4,4,5,5-四甲基咪唑啉-3-氧代-1-氧(PTIO)法评价紫花地丁总香豆素纯化物的抗氧化活性。采用CCK-8法检测其对人宫颈癌细胞HeLa、人胆管细胞肝癌细胞HCCC-9810、人肝癌细胞HepG2、人乳腺癌细胞MDA-MB-231和人非小细胞肺癌细胞A549的抑制作用;采用Hoechst 33258染色法检测其对HCCC-9810细胞凋亡形态的影响,并测定细胞中乳酸脱氢酶(LDH)和超氧化物歧化酶(SOD)含量。结果 最优提取工艺为液料比25:1(mL/g)、提取时间1.9 h、乙醇体积分数68%;3次验证实验的紫花地丁总香豆素平均得率为(21.10±0.17)mg/g, RSD为0.80%($n=3$),与预测值(20.79 mg/g)的相对误差为1.49%。紫花地丁总香豆素纯化物对DPPH和ABTS自由基的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为21.54、17.11 μg/mL,略高于抗坏血酸的15.21、12.45 μg/mL;对PTIO自由基的IC₅₀为1 422.01 μg/mL,远高于抗坏血酸的37.20 μg/mL;对上述5种细胞的IC₅₀分别为(113.18±15.97)、(51.17±1.72)、(134.15±11.75)、(171.83±15.27)、(93.38±4.65) μg/mL;能促进HCCC-9810细胞凋亡,增加其LDH含量并降低SOD含量。结论 成功优化了紫花地丁总香豆素的提取工艺;所得提取物的纯化物具有抗氧化活性和抗肿瘤活性。

关键词 紫花地丁;总香豆素;提取工艺;抗氧化作用;抗肿瘤作用

Optimization of the extraction technology of total coumarin from *Viola yedoensis* and its antioxidant and anti-tumor activities

CHEN Renqiang^{1,2}, LIU Zhen¹, HU Huiling¹, LI Linfeng¹, ZHANG Chun¹ (1. School of Pharmacy, Southwest Medical University, Sichuan Luzhou 646000, China; 2. Dept. of Pharmacy, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Sichuan Luzhou 646000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To optimize the extraction technology of total coumarin from *Viola yedoensis* and to evaluate its *in vitro* antioxidant and anti-tumor activities of its purified product. **METHODS** On the basis of single factor experiments, the extraction technology of total coumarin from *V. yedoensis* was optimized by the response surface methodology, using yield of total coumarin from *V. yedoensis* as response value, solid-liquid ratio, extraction time and ethanol volume fraction as variables. The verification tests were conducted. The antioxidant activity of purified product of total coumarin from *V. yedoensis* was evaluated by 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) method, 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) acid ammonium salt (ABTS) method and 2-phenyl-4, 4, 5, 5-tetramethylimidazoline-3-oxide-1-oxyl (PTIO) method. CCK-8 assay was used to determine the inhibitory effect of it on human cervical cancer cells HeLa, human intrahepatic bile duct cancer cells HCCC-9810, human hepatocellular carcinoma cells HepG2, human breast cancer cells MDA-MB-231 and human non-small cell lung cancer cells A549. The apoptosis morphology of HCCC-9810 cells was detected by Hoechst 33258 staining, and lactate dehydrogenase (LDH) and superoxide dismutase (SOD) content were determined. **RESULTS** The optimal extraction technology included solid-liquid ratio was 25:1 (mL/g), extraction time was 1.9 h, ethanol volume fraction was 68%. Average yield of total coumarin from *V. yedoensis* was (21.10±0.17) mg/g, and RSD was 0.80% ($n=3$), relative error of which with predicted value (20.79 mg/g) was 1.49%. The median inhibitory concentrations (IC₅₀) of purified product of total coumarin from *V. yedoensis* to DPPH and ABTS free radicals were 21.54 and 17.11 μg/mL, which were slightly higher than that of ascorbic acid (15.21, 12.45 μg/mL). The IC₅₀ to PTIO free radicals was 1 422.01 μg/mL, which was far higher the that of ascorbic acid (37.20 μg/mL). The IC₅₀ values of total coumarin from *V. yedoensis* to above 5 cells were (113.18±15.97), (51.17±1.72), (134.15±11.75), (171.83±15.27) and (93.38±4.65) μg/mL, respectively. Total coumarin from *V. yedoensis* induced the apoptosis of HCCC-9810 cells and

^Δ基金项目 四川省科技计划项目(No.2021YJ0114);泸州市人民政府-西南医科大学科技战略合作项目(No.2019LZXNYDJ49)

*第一作者 硕士研究生。研究方向:天然药物活性与中药药理。
E-mail:renqiangchen@126.com

#通信作者 教授,硕士生导师,博士。研究方向:分子生药学与中药药理。E-mail:zc83good@126.com

increased the content of LDH, as well as decreased the content of SOD. **CONCLUSIONS** The extraction technology of total coumarin from *V. yedoensis* is optimized successfully; the purified product of obtained extract has good antioxidant and anti-tumor activities.

KEYWORDS *Viola yedoensis*; total coumarin; extraction technology; antioxidant effect; anti-tumor effect

紫花地丁是堇菜科堇菜属植物紫花地丁 *Viola yedoensis* Makino 的干燥全草,具有清热解毒、凉血消肿的功效^[1]。现代药理研究证实,紫花地丁具有抗菌、抗肿瘤等多种生物活性^[2]。已有研究表明,紫花地丁提取物可通过靶向蛋白酶等方式抑制肺癌细胞侵袭,对人非小细胞肺癌细胞 A549 具有抑制作用,且其黄酮类成分还具有显著的抗氧化活性^[3-5]。

香豆素类成分是植物中一类重要的次生代谢产物,具有抗凝血、抗菌、抗病毒等多种生物活性^[6]。紫花地丁含有丰富的香豆素类成分,如秦皮乙素、秦皮甲素等^[7]。本研究拟采用乙醇回流提取法提取紫花地丁总香豆素,利用响应面法优化其提取工艺,并初步评价所得纯化物的抗氧化活性和抗肿瘤活性,旨在为该药材的开发与利用提供参考依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括 Cary60 型紫外-可见分光光度计、Multiskan Go 型多功能酶标分析仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),CKX53-SLP 型倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司),TS2R-LS 型荧光倒置显微镜(日本 Nikon 公司),TD-5Z 型低速离心机(四川蜀科仪器有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

紫花地丁药材(批号 2001004)购自亳州市远光中药饮片厂,由西南医科大学药学院中药资源与鉴定教研室庄元春副教授鉴定为真品。

秦皮乙素对照品(批号 5483,纯度 99.3%)购自上海诗丹德生物技术有限公司;无水乙醇、过硫酸钾、抗坏血酸(批号 20190528,纯度 99.7%)均购自成都金山化学试剂有限公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、2-苯基-4,4,5,5-四甲基咪唑啉-3-氧代-1-氧(2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-3-oxide-1-oxyl, PTIO)(批号分别为 BTSJ18X80、BTSJ2020-0602)均购自成都润泽本土化工有限公司;2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) acid ammonium salt, ABTS,批号 L1803054]购自阿拉丁试剂(上海)有限公司;CCK-8 试剂盒(批号 TN618)购自北仁化学科技(北京)有限公司;Hoechst 33258 试剂盒(批号 20210708)购自北京索莱宝科技有限公司;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒(批号分别为 20210721、

20201223)均购自南京建成生物工程研究所;水为超纯水。

1.3 细胞

人宫颈癌细胞 HeLa、人胆管细胞型肝癌细胞 HCCC-9810、人肝癌细胞 HepG2、人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和人非小细胞肺癌细胞 A549 均购自中国科学院上海生科院细胞资源中心。

2 方法与结果

2.1 紫花地丁总香豆素含量的测定

采用紫外-可见分光光度法测定紫花地丁总黄酮的含量(以秦皮乙素计)。

2.1.1 标准曲线的绘制 精密称取秦皮乙素对照品适量,用甲醇溶解,得质量浓度为 354 $\mu\text{g/mL}$ 的储备液,贮存于 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内,备用。取上述储备液 1 mL,以甲醇定容于 10 mL 量瓶内,得质量浓度为 35.4 $\mu\text{g/mL}$ 的母液。分别取该母液 0.50、0.75、1.00、1.25、1.50 mL,用甲醇定容于 5 mL 量瓶内,使用紫外-可见分光光度计于 350 nm 处测定吸光度。以秦皮乙素的质量浓度为横坐标(x)、吸光度为纵坐标(y)绘制标准曲线,得秦皮乙素的回归方程为 $y=0.065\ 5x-0.023\ 6$ ($R^2=0.999\ 3$),提示其检测质量浓度的线性范围为 3.54~10.63 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.1.2 供试品溶液的制备 将干燥紫花地丁药材粉碎,过四号筛后保存,备用。称取上述粉末 3.00 g,装于无纺布内密封,采用乙醇回流提取法提取 2 次,过滤,合并滤液后用乙醇定容至 250 mL 量瓶内,即得供试品溶液。

2.1.3 总香豆素含量及得率的测定 取“2.1.2”项下供试品溶液 5 mL 于 10 mL 离心管内,以 1 000 r/min 离心 4 min,取上清液 3 mL,置于 100 mL 量瓶内,用乙醇定容,使用紫外-可见分光光度计于 350 nm 处测定吸光度,代入“2.1.1”项下回归方程计算总香豆素的质量浓度并按下式计算得率: $Y=NV/C/M$ [式中, Y 为紫花地丁总香豆素得率(mg/g), N 为稀释倍数, V 为供试品溶液总体积(mL), C 为总香豆素质量浓度(mg/mL), M 为紫花地丁的质量(g)]。在此之前,按 2020 年版《中国药典》(四部)“分析方法验证指导原则”进行方法学考察,结果均符合相关规定^[8]。

2.2 紫花地丁总香豆素提取工艺的优化

2.2.1 单因素实验 按“2.1.2”项下方法操作,采用乙醇回流提取法提取紫花地丁总香豆素。设置乙醇体积分数为 65%,提取时间为 2 h,提取 2 次,考察不同液料比[10:1、15:1、20:1、25:1、30:1, mL/g (下同)]对紫花地丁总香豆素得率的影响;设置乙醇体积分数为 65%,液料

比为20:1,提取2次,考察不同提取时间(1、1.5、2、2.5、3 h)对紫花地丁总香豆素得率的影响;设置液料比为10:1,提取时间为1 h,提取2次,考察不同乙醇体积分数(35%、45%、55%、65%、75%)对紫花地丁总香豆素得率的影响。结果见图1。

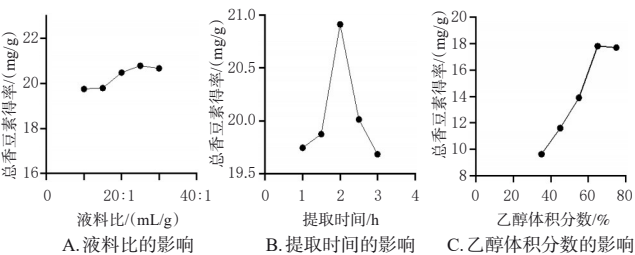


图1 液料比、提取时间、乙醇体积分数对紫花地丁总香豆素得率的影响

由图1A可知,在液料比从15:1升至25:1的过程中,紫花地丁总香豆素得率逐渐增加;当继续增加液料比,其得率反而降低。当液料比为25:1时,紫花地丁总香豆素得率最高(20.79 mg/g)。由图1B可知,在提取时间从1 h延长至2 h的过程中,紫花地丁总香豆素得率逐渐升高,并在2 h时达到最大值(20.91 mg/g);当提取时间超过2 h后,其得率急剧下降,可能与提取时间过长会导致某些热稳定性较差的香豆素遭到破坏降解有关。由图1C可知,随着乙醇体积分数的逐渐增加,紫花地丁总香豆素得率呈先急剧上升后缓慢下降的趋势;当乙醇体积分数为65%时,紫花地丁总香豆素得率最高(17.82 mg/g)。

2.2.2 响应面实验 在单因素实验的基础上,本研究利用Box-Behnken设计原理进行3因素3水平的响应面实验:以紫花地丁总香豆素得率(Y)为响应值,以液料比(A)、提取时间(B)、乙醇体积分数(C)为变量,优化紫花地丁总香豆素提取工艺。具体的因素与水平见表1,实验设计与结果见表2。

表1 紫花地丁总香豆素提取工艺优化响应面实验的因素与水平

水平	$A/(mL/g)$	B/h	$C/\%$
-1	20:1	1.5	55
0	25:1	2	65
1	30:1	2.5	75

采用Design Expert 8.0.6软件对表2结果进行回归分析,得多元二次回归方程 $Y=20.65-0.16A-0.17B+0.79C-0.31AB+0.54AC+0.17BC-0.46A^2-0.34B^2-0.17C^2$;随后,对回归方程进行方差分析,结果见表3。由表3可知,所得多元二次回归方程的 F 为12.30($P<0.01$),说明该模型的拟合度良好。3个因素中,因素 C 对模型有显著影响($P=0.0005$);在二次项中, A^2 、 C^2 亦对模型有显著影响($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而 B^2 对模型的影响不显著($P>0.05$)。

为评价各因素的交互作用,本研究采用Design Ex-

表2 紫花地丁总香豆素提取工艺优化响应面实验的设计与结果

序号	$A/(mL/g)$	B/h	$C/\%$	$Y/(mg/g)$
1	25:1	1.5	55	18.99
2	25:1	2	65	20.71
3	20:1	1.5	65	19.83
4	30:1	2	55	17.66
5	25:1	1.5	75	20.10
6	20:1	2	55	18.69
7	25:1	2	65	20.37
8	25:1	2	65	20.98
9	25:1	2.5	55	17.85
10	20:1	2	75	19.30
11	25:1	2.5	75	19.64
12	25:1	2	65	20.52
13	30:1	2.5	65	19.26
14	20:1	2.5	65	20.56
15	30:1	1.5	65	19.76
16	25:1	2	65	20.67
17	30:1	2	75	20.43

表3 紫花地丁总香豆素提取工艺优化响应面实验的方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	14.72	9	1.64	12.30	0.0016
A	0.20	1	0.20	1.52	0.2579
B	0.24	1	0.24	1.77	0.2245
C	4.94	1	4.94	37.16	0.0005
AB	0.37	1	0.37	2.80	0.1379
AC	1.17	1	1.17	8.81	0.0208
BC	0.12	1	0.12	0.89	0.3775
A^2	0.90	1	0.90	6.76	0.0354
B^2	0.47	1	0.47	3.56	0.1010
C^2	5.75	1	5.75	43.22	0.0003
残差	0.93	7	0.13		
失拟项	0.72	3	0.24	4.62	0.0868
纯误差	0.21	4	0.05		
总和	15.65	16			

pert 8.0.6软件绘制响应面图及等高线图,结果见图2。由图2可知,液料比与乙醇体积分数的交互作用较明显,其对紫花地丁总香豆素得率的影响最大。

利用Design Expert 8.0.6软件求解上述多元二次回归方程,得紫花地丁总香豆素的最优提取工艺为:液料比25.5:1、提取时间1.89 h、乙醇体积分数68.43%,预测紫花地丁总香豆素得率为20.79 mg/g。考虑到实际操作的可性,本研究将最优提取工艺参数调整为:液料比25:1、提取时间1.9 h、乙醇体积分数68%。按此提取工艺进行3次验证实验,得紫花地丁总香豆素平均得率为 (21.10 ± 0.17) mg/g, RSD为0.80%($n=3$),与预测值的相对误差为1.49%,表明该提取工艺稳定、可行。

2.3 紫花地丁总香豆素纯化物的制备

按“2.2”项下最优提取工艺制得紫花地丁总香豆素提取物,按照相关文献的方法^[9],使用HPD-100型大孔吸附树脂以50%乙醇洗脱,得到紫花地丁总香豆素纯化物(淡黄色粉末,总香豆素含量以秦皮乙素计为43.8%)。

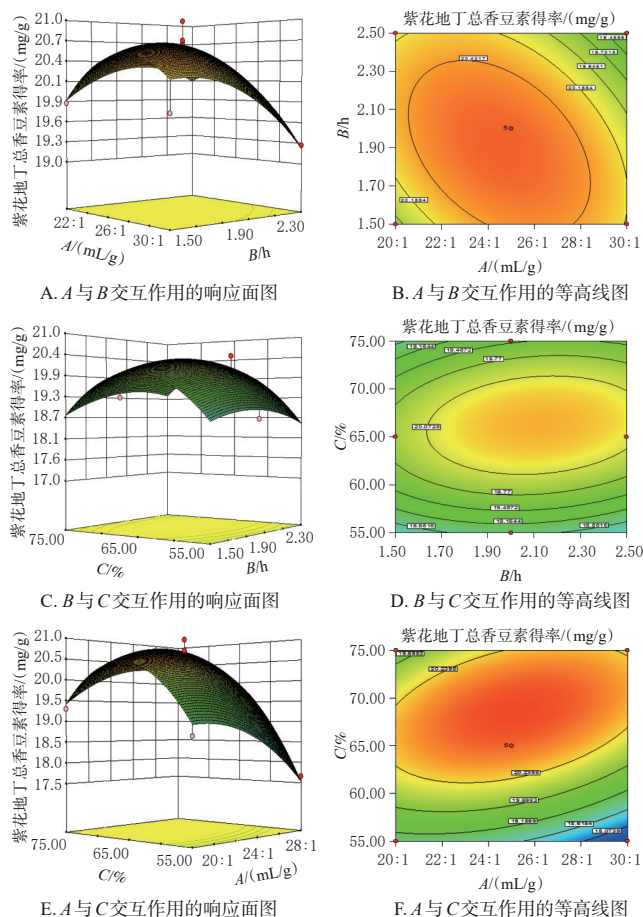


图2 因素A、B、C交互作用对紫花地丁总香豆素得率影响的响应面和等高线图

2.4 紫花地丁总香豆素抗氧化活性的评价

2.4.1 DPPH 自由基清除率 参照相关文献的方法^[10],称取DPPH 8.00 mg,加一定量95%乙醇超声溶解并稀释,制成浓度为0.2 mmol/L的DPPH溶液。分别吸取95%乙醇100 μL和DPPH溶液100 μL于96孔板中,避光反应30 min,于517 nm处测定各孔的吸光度。将紫花地丁总香豆素纯化物用95%乙醇溶解并稀释至4、8、16、32、64、128、256 μg/mL,以相同质量浓度的抗坏血酸作为阳性对照,分别吸取上述待测液100 μL于96孔板中,再加入的DPPH溶液或95%乙醇100 μL混合,避光反应30 min,于517 nm处测定各孔的吸光度,按下式计算DPPH自由基清除率: $\text{DPPH 自由基清除率} = [A_0 - (A_1 - A_2)] / A_0 \times 100\%$ (式中, A_0 为95%乙醇+DPPH溶液的吸光度, A_1 为待测液+DPPH溶液的吸光度, A_2 为待测液+95%乙醇的吸光度)。实验重复3次。结果(图3A)显示,与抗坏血酸比较,紫花地丁总香豆素纯化物对DPPH自由基的清除能力稍弱;紫花地丁总香豆素纯化物和抗坏血酸对DPPH自由基的半数抑制浓度(IC_{50})分别为21.54、15.21 μg/mL。

2.4.2 ABTS 自由基清除率 在相关文献方法^[11]的基础上稍做改进,取7.4 mmol/L的ABTS乙醇溶液、2.6 mmol/L的过硫酸钾溶液各2 mL,混合后,避光放置16 h,

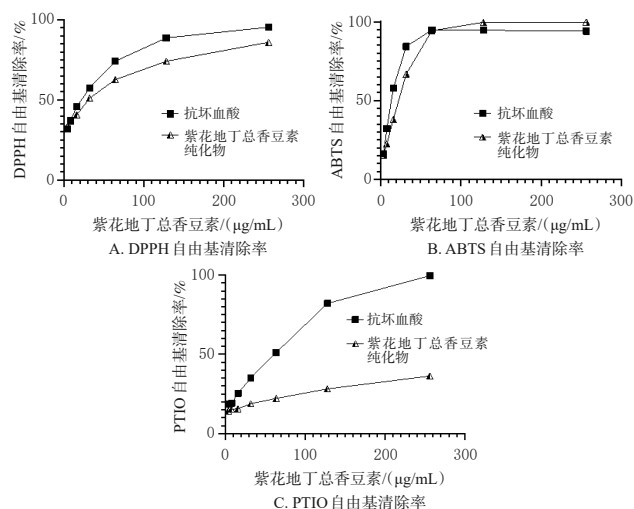


图3 紫花地丁总香豆素纯化物对DPPH、ABTS和PTIO自由基的清除情况

得ABTS储备液。将上述储备液用50%乙醇稀释后,得ABTS工作液(在734 nm处的吸光度宜为 0.70 ± 0.02)。将紫花地丁总香豆素纯化物用50%乙醇溶解并稀释至4、8、16、24、32、64、128、256 μg/mL,以相同质量浓度的抗坏血酸作为阳性对照,分别吸取上述待测液40 μL于96孔板中,再加入ATBS工作液或50%乙醇160 μL,摇匀,避光反应8 min,于734 nm处测定各孔的吸光度,按下式计算ABTS自由基清除率: $\text{ABTS 自由基清除率} = [A_0 - (A_1 - A_2)] / A_0 \times 100\%$ (式中, A_0 为50%乙醇40 μL+ABTS工作液160 μL的吸光度, A_1 为待测液40 μL+ABTS溶液160 μL的吸光度, A_2 为待测液40 μL+50%乙醇160 μL的吸光度)。实验重复3次。结果(图3B)显示,与抗坏血酸比较,紫花地丁总香豆素纯化物对ABTS自由基的清除能力稍弱,紫花地丁总香豆素纯化物和抗坏血酸对ABTS自由基的 IC_{50} 分别为17.11、12.45 μg/mL。

2.4.3 PTIO 自由基清除率 参照相关文献的方法^[12],称取PTIO 7.50 mg,溶于磷酸盐缓冲液(pH7.4,下同)15 mL中,得质量浓度为0.5 mg/mL的PTIO溶液。将紫花地丁总香豆素纯化物用磷酸盐缓冲液溶解并稀释至4、8、16、32、64、128、256 μg/mL,以相同质量浓度的抗坏血酸作为阳性对照,分别吸取上述待测液40 μL于96孔板中,再加入PTIO溶液或磷酸盐缓冲液160 μL,摇匀,避光反应2 h,于557 nm处测定各孔的吸光度值,按下式计算PTIO自由基清除率: $\text{PTIO 自由基清除率} = [A_0 - (A_1 - A_2)] / A_0 \times 100\%$ (式中, A_0 为磷酸盐缓冲液40 μL+PTIO溶液160 μL的吸光度, A_1 为待测液40 μL+PTIO溶液160 μL的吸光度, A_2 为待测液40 μL+磷酸盐缓冲液160 μL的吸光度)。实验重复3次。结果(图3C)显示,与抗坏血酸比较,紫花地丁总香豆素纯化物对PTIO自由基的清除能力较弱,紫花地丁总香豆素纯化物和抗坏血酸对PTIO自由基的 IC_{50} 分别为1 422.01、37.20 μg/mL。

2.5 紫花地丁总香豆素纯化物抗肿瘤活性的评价

2.5.1 细胞存活率 参考相关文献的方法^[13],取对数生长期的HeLa、HCCC-9810、HepG2、MDA-MB-231、A549细胞,分别用胰蛋白酶消化,离心后调整细胞密度为 1×10^5 个/mL,按每孔0.1 mL接种于96孔板中,于37℃、5%CO₂条件下培养24 h,吸出原培养基,每孔加入含药培养基(参考预实验结果,将紫花地丁总香豆素纯化物的质量浓度分别设置为20、60、100、140、180、220、260、300 μg/mL)100 μL(每质量浓度设置3个复孔),同时设置空白孔(只含培养基)和对照孔(含细胞和培养基)。常规培养24 h,加入CCK-8试剂10 μL,继续培养45 min,使用酶标仪于450 nm处测定各孔的光密度(OD)并按下式计算细胞存活率:细胞存活率=(OD₁-OD₀)/(OD₂-OD₀)×100%(式中,OD₀、OD₁、OD₂分别为空白孔、含药孔、对照孔的OD)。结果显示,紫花地丁总香豆素纯化物对上述5种肿瘤细胞均有一定的抑制作用,其IC₅₀分别为(113.18±15.97)、(51.17±1.72)、(134.15±11.75)、(171.83±15.27)、(93.38±4.65) μg/mL。

2.5.2 细胞凋亡形态 由“2.5.1”项下结果可知,紫花地丁总香豆素纯化物对HCCC-9810细胞的抑制作用相对较强,因此选取对数生长期的HCCC-9810细胞,按“2.5.1”项下方法配制细胞悬液并接种于6孔板中,培养过夜,在参考预实验结果的基础上,以0(对照组)、20、60、180 μg/mL的紫花地丁总香豆素纯化物(每组设置3个复孔)作用24 h后,吸出培养基,细胞用磷酸盐缓冲液清洗2次,以Hoechst 33258试剂染色后,置于倒置相差显微镜和荧光倒置显微镜下观察细胞的凋亡形态并拍照。结果(图4)显示,对照组细胞呈近椭圆形,染色后呈蓝色且均匀、浅淡;随紫花地丁总香豆素纯化物浓度的增加,含药组细胞数量逐渐减少,细胞核开始出现明显的固缩或分裂,多数细胞核呈现出较强的蓝白色碎块状荧光,即典型的凋亡细胞核特征。

2.5.3 肿瘤细胞中LDH、SOD含量 按“2.5.2”项下接种、培养HCCC-9810细胞,待作用24 h后,吸出培养基,细胞用磷酸盐缓冲液清洗2次,消化,以1 000 r/min离心5 min,超声(功率180 W,频率40 kHz)后收集于2 mL离心管内,使用酶标仪检测各组细胞中LDH、SOD含量,严格按照各试剂盒说明书操作。采用SPSS 17.0软件进行统计分析并使用GraphPad Prism 8软件绘图,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。结果(图5)显示,20、60、180 μg/mL的紫花地丁总香豆素纯化物可显著增加HCCC-9810细胞中LDH含量,并可显著降低细胞中SOD含量($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

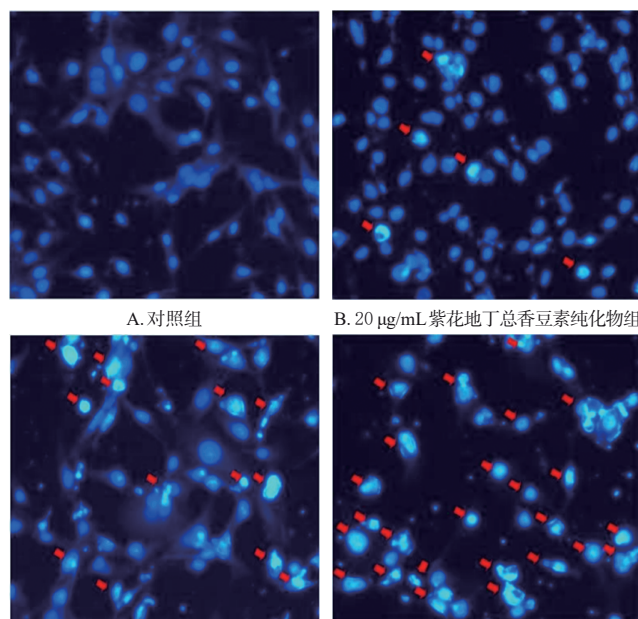
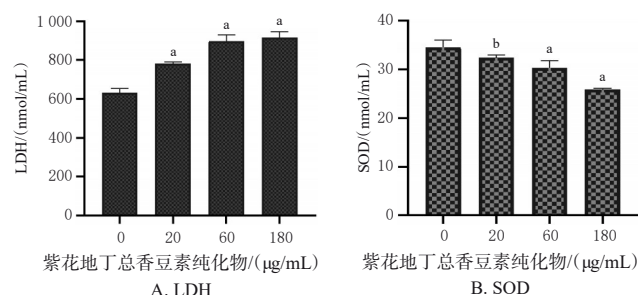


图4 紫花地丁总香豆素纯化物对HCCC-9810细胞凋亡影响的荧光显微图(Hoechst 33258染色,×200)



a: 与对照组比较, $P<0.01$; b: 与对照组比较, $P<0.05$

图5 紫花地丁总香豆素纯化物对HCCC-9810细胞中LDH和SOD含量的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 结论

本研究采用单因素实验和响应面实验对紫花地丁总香豆素的提取工艺进行了优化,得最优提取工艺为液料比25:1,提取时间1.9 h,乙醇体积分数68%。验证实验显示,该工艺稳定、可行。

DPPH和ABTS为氮自由基,DPPH自由基及ABTS自由基清除法被广泛用于中药提取物体外抗氧化活性研究领域^[14]。在此基础上,本研究还选择了PTIO自由基清除法考察体外抗氧化活性。PTIO是一种常用的一氧化氮清除剂,其带电基团为氧原子^[12]。本研究结果显示,紫花地丁总香豆素纯化物对DPPH、ABTS自由基的清除能力略弱于抗坏血酸,但对PTIO自由基的清除能力较弱,这可能是由于PTIO自由基清除法主要用于水相体系,而紫花地丁总香豆素水溶性较低,故其清除效果不佳。

抗肿瘤活性研究显示,紫花地丁总香豆素纯化物对HeLa、HCCC-9810、HepG2、MDA-MB-231、A549细胞均有一定的抑制作用,其中对HCCC-9810细胞的抑制效

果最强,其IC₅₀相对最低,因此进一步考察了紫花地丁总香豆素纯化物对HCCC-9810细胞凋亡形态的影响,发现紫花地丁总香豆素纯化物能促进该细胞的凋亡。细胞中的LDH含量与细胞膜的完整性相关,凋亡细胞越多,LDH含量越高^[15]。细胞中的SOD可抵抗细胞的氧化应激反应,其含量变化可以反映细胞活力的高低,细胞活力越高,SOD含量越高^[16]。本研究结果显示,随着紫花地丁总香豆素纯化物质量浓度的增加,HCCC-9810细胞中LDH含量逐渐增加,SOD含量逐渐降低。

综上所述,本研究优化了紫花地丁总香豆素的提取工艺,所得提取物的纯化物具有抗氧化活性和抗肿瘤活性。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2020年版. 北京:中国医药科技出版社,2020:352.
- [2] 李永生,何希瑞,杨燕,等. 紫花地丁化学成分与药理活性研究新进展[J]. 环球中医药,2013,6(4):313-318.
- [3] HUANG S F, CHU S C, HSIEH Y H, et al. *Viola yedoensis* suppresses cell invasion by targeting the protease and NF- κ B activities in A549 and lewis lung carcinoma cells[J]. Int J Med Sci, 2018, 15(4):280-290.
- [4] 袁会成,赵良存,万学娜,等. 紫花地丁多糖对A549细胞增殖抑制机理的研究[J]. 热带医学杂志,2020,20(8):1005-1008.
- [5] 张琳,陈雅思. 紫花地丁总黄酮的抗氧化作用研究[J]. 粮食与食品工业,2021,28(1):55-58.
- [6] 郭鹏杰,林志健,张晓朦,等. 香豆素类化合物毒理研究及安全性思考[J]. 中国中药杂志,2020,45(3):518-522.
- [7] OSHIMA N, NARUKAWA Y, TAKEDA T, et al. Collage-

nase inhibitors from *Viola yedoensis*[J]. J Nat Med, 2013, 67(1):240-245.

- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[S]. 2020年版. 北京:中国医药科技出版社,2020:480-483.
- [9] 冯倩,郑伟,关永霞,等. 紫花地丁中秦皮乙素、总香豆素大孔树脂纯化工艺研究[J]. 现代中药研究与实践,2020,34(4):39-43.
- [10] 李欣坪,王蒙蒙,王子晨,等. 滇黄芩茎叶乙醇提取物及其不同溶剂萃取部位的抗氧化和降脂活性研究[J]. 中国药房,2021,32(2):220-225.
- [11] 李原,赵振刚. 凤眼果壳多酚的抗氧化和抗人肺癌细胞A549增殖活性[J]. 现代食品科技,2021,37(4):16-24.
- [12] 王钦波,王晓东. PTIO 自由基清除分析法的pH值效应与黄芩素及黄芩苷的构效分析[J]. 现代医院,2019,19(1):145-148,153.
- [13] 彭梦媛,邱峰,黄丹,等. 姜黄素对胰腺癌SW1990细胞耐吉西他滨的逆转作用及机制研究[J]. 中国药房,2019,30(9):1192-1197.
- [14] 陈建平,李琳,苏健裕. 姜黄素的抗氧化及抗肿瘤活性研究[J]. 现代食品科技,2014,30(12):6,11-15.
- [15] ELFERINK J G. Changes of plasma membrane permeability in neutrophils treated with polycations[J]. Inflammation, 1991, 15(2):103-115.
- [16] BATINIC-HABERLE I, TOVMASYAN A, ROBERTS E R, et al. SOD therapeutics: latest insights into their structure-activity relationships and impact on the cellular redox-based signaling pathways[J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 20(15):2372-2415.

(收稿日期:2022-03-31 修回日期:2022-09-09)

(编辑:邹丽娟)

(上接第2470页)

- [8] 李涛,刘红梅,鲁晔,等. 中药塞络通胶囊I期临床安全性、耐受性试验研究[J]. 中国新药杂志,2012,21(1):62-67.
- [9] 黄岩. 建立阿司匹林PK-PD数学模型,模拟不同给药剂量、方法和低顺应性服药的效果研究[D]. 北京:北京协和医学院,2010.
- [10] DUNCOMBE J, KITAMURA A, HASE Y, et al. Chronic cerebral hypoperfusion: a key mechanism leading to vascular cognitive impairment and dementia. Closing the translational gap between rodent models and human vascular cognitive impairment and dementia[J]. Clin Sci (Lond), 2017, 131(19):2451-2468.
- [11] 张征,陈忠. 颈动脉硬化狭窄与认知功能损害的研究[J]. 心肺血管病杂志,2022,41(3):324-327.
- [12] 北京中西医结合学会卒中专业委员会. 慢性脑缺血中西医结合诊疗专家共识[J]. 中国中西医结合杂志,2018,38(10):1161-1167.
- [13] 太史叶子,赵阳,安庆,等. 慢性脑缺血与认知功能障碍及阿尔茨海默样病理生理改变[J]. 中风与神经疾病杂

志,2020,37(3):280-284.

- [14] 王大鹏,吴一芳,海舰. 神经血管单元在慢性脑低灌注致认知功能障碍中的作用[J]. 中华全科医师杂志,2017,16(3):244-246.
- [15] 潘之光,毛颖,孙凤艳. 血管内皮生长因子促损伤脑内神经血管单元的重构[J]. 生理学报,2017,69(1):96-108.
- [16] WEI X, JESSA S, KLEINMAN C L, et al. Mapping angiopoietin 1 expression in the developing and adult brain[J]. Dev Neurosci, 2021, 43(6):321-334.
- [17] 德吉曲宗,李其富,何俐. 碱性成纤维细胞生长因子与缺血性脑血管疾病的关系研究进展[J]. 华西医学,2008,23(4):905-906.
- [18] 田甜,何君艺,樊素雄,等. α 7烟碱型乙酰胆碱受体对缺血再灌注损伤影响的研究现状[J]. 中国临床药理学杂志,2020,36(18):2914-2917.
- [19] 宋海庆,高利. 慢性脑缺血中西医结合诊疗的建议[J]. 中国临床医生杂志,2019,47(10):1137-1139.

(收稿日期:2022-03-25 修回日期:2022-08-23)

(编辑:邹丽娟)