

# 无根中蛇葡萄素的提取及其对黑色素瘤的抑制作用

刘德育 丘明祺<sup>①</sup> 梁婷韵

(中山医科大学化学教研室, 广州, 510089)

**摘要** 目的: 从民间传统中草药无根中用具有较高产率而又简便实用的方法提取其主要有效成分蛇葡萄素, 通过对小鼠 B16 黑色素瘤的抑制来考察其抗肿瘤药效。方法: 采用经改进的甲醇提取、水重结晶的方法进行提取分离; 急性毒性实验采用对小鼠一次腹腔注射测定药物的 LD<sub>50</sub>; 以 MTT 法测定药物对肿瘤细胞的抑制作用。结果: 蛇葡萄素的提取率为 10.3%; 对昆明小鼠一次腹腔注射 LD<sub>50</sub> 为 1 025 mg/kg; 对 C57 小鼠 B16 黑色素瘤细胞的 IC<sub>50</sub> 为  $9.8 \times 10^{-5}$  mol/L。结论: 与氮烯咪胺比较, 蛇葡萄素可能是一种高效低毒的新的细胞毒型抗肿瘤植物药。

**关键词** 蛇葡萄素/治疗应用; 黑色素瘤, 实验性/药物疗法; 抗肿瘤药, 植物; 中草药, 提取; 药物筛选试验, 抗肿瘤; 蛇葡萄素/分离和提纯

中图分类号 R 979.1

## Extraction and Isolation of Ampelopsin from *Ampelopsis Cantoniensis* Planch and Its Inhibitory Effect on B16 Melanoma

Liu Deyu Qiu Mingqi Liang Tingyun

(Department of Chemistry, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

**Abstract Objective:** Using the simple and feasible method, the ampelopsin is extracted and isolated from a traditional Chinese herbal drug, *Ampelopsis cantoniensis* Planch. The inhibitory effect of ampelopsin on mouse B16 melanoma cells was studied in order to inspect the antitumor activity. **Methods:** Methyl alcohol extraction and water recrystallization was adopted to get ampelopsin. Acute toxicity of the ampelopsin by a single ip (intraperitoneal) injection in KM mouse was evaluated. The inhibitory effect of the drug on tumor cells was evaluated by MTT *in vitro* drug sensitivity assay. **Results:** The yield for the ampelopsin was 10.3%. The LD<sub>50</sub> for the natural product was 1 025 mg/kg by ip single administration in KM mouse. The IC<sub>50</sub> value of ampelopsin for the C57 mouse B16 melanoma cells was  $9.8 \times 10^{-5}$  mol/L. **Conclusion:** Contrasting the dacarbazine (DTIC), ampelopsin probably is a potent new antitumor natural drug with high antitumor effect and low toxicity.

**Subject headings** ampelopsin/therapeutic use; melanoma, experimental/drug therapy; antineoplastic agents, phytogetic; Chinese herbal drugs, plant extracts; drug screening assays, antitumor; ampelopsin/isolation & purification

无根为葡萄科蛇葡萄属植物粤蛇葡萄 [*Ampelopsis cantoniensis* (Hook. et Arn.) Planch.] 的根或全株, 主要盛产于我国华南一带, 是民间传统用药, 功用消炎解毒, 主治骨髓炎、急性淋巴结炎、急性乳腺炎、脓疱疹、湿疹、丹毒、疖肿等<sup>[1]</sup>。王玫馨等<sup>[2]</sup> 对其化学成分进行研究, 首次从中分离得到其主要成分黄酮类化合物蛇葡萄素及杨梅黄素。

赖力等人<sup>[3]</sup> 对蛇葡萄素的提取工艺作了研究。国外仅有越南学者<sup>[4]</sup> 从 1993 年开始对粤蛇葡萄中的蛇葡萄素进行结构鉴别、含量测定以及抗氧化作用的研究。还未见有其它药理作用研究的报道。最近日本的 Hase Koji 等人<sup>[5]</sup> 发现在 *Hovenia dulcis* Thunb. 中, 对由 CCl<sub>4</sub> 或半乳糖胺/脂多糖诱导的实验肝损害起保护作用的有效成分为蛇葡萄素。本

<sup>①</sup> 广东药学院药学班 98 届毕业生

文作者<sup>[6]</sup>首次发现其中的蛇葡萄素及杨梅黄素都是很强的酪氨酸酶抑制剂。在此基础上本文进行了蛇葡萄素抗小鼠 B16 黑色素瘤的体外实验,并做了急性毒性试验,发现蛇葡萄素对黑色素瘤的抑制率与目前临床抗黑色素瘤的首选药氮烯咪胺相当,而毒性却更低。对蛇葡萄素的提取工艺也作了进一步研究,获得了收率高而又简单、经济的提取方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

粤蛇葡萄(干品)及其粗炮制品无根,均由广东省连州市白云山白茶有限公司提供;氮烯咪胺(DTIC),南京制药厂,批号 971007;MTT[3-(4,5-双甲基-2-噁)-2,5-二苯基溴化四氮唑蓝],JANSSEN;DG3022A 酶联免疫检测仪;日立 U2000 型双光束紫外分光光度计;昆明小白鼠,18~22 g,雌雄各半,中山医科大学医学实验动物中心提供;C57/BL6 小鼠黑色素瘤 B16 细胞株,中山医科大学医学实验动物中心细胞库提供。

### 1.2 蛇葡萄素的提取

参照文献方法<sup>[3]</sup>并作一些修改。称取原料药,粉碎后,分别用适量甲醇回流提取 3 次,合并提取液,滤过,回收甲醇后,加入适量水,用氯仿反复萃取至氯仿层无色,上层液减压蒸馏除去残余甲醇后,经静置、析晶、过滤,所得固体再用水和活性炭反复重结晶去杂质,低温干燥后得淡黄色针状结晶。

### 1.3 蛇葡萄素的鉴定

薄层层析:分别取杨梅黄素、所得晶体及二者的混合物溶于甲醇中,点样于含 5 g/L 羧甲基纤维素二钠的硅胶 H 薄层板,用氯仿-醋酸乙酯-甲酸(5:4:0.5)展开,10 g/L FeCl<sub>3</sub> 显色后分别呈现紫色斑点。紫外光谱:晶体配成浓度为 10 mg/L 的甲醇溶液,测定紫外吸收光谱。

### 1.4 急性毒性实验

称取所得晶体用  $\varphi = 50\%$  二甲亚砜配制所需的各浓度。将小白鼠雌雄分开,随机分成 6 组[不同药物浓度 5 组及不含药物的  $\varphi = 50\%$  二甲亚砜空白对照 1 组]。腹腔注射给药后饲养观察 7 d,最后统计各组死亡数。

### 1.5 体外抗肿瘤实验

采用常用的抗肿瘤药物敏感筛选法——MTT

(四氮唑蓝)法<sup>[7]</sup>。试验细胞浓度为  $1.4 \times 10^5/L$ ,药物用无血清的 RPMI 1640 培养液稀释。每个实验孔加入细胞悬液 100  $\mu L$ 、药物 100  $\mu L$ ,37  $^{\circ}C$  培养 72 h 后,加入 MTT(5 g/L)10  $\mu L$ ,4 h 后再加入二甲亚砜 150  $\mu L$ ,于 570 nm 用酶标仪测定各孔吸光度。每种实验孔采用 6 个实验复孔。

## 2 结果

### 2.1 蛇葡萄素的提取与鉴定

200 g 无根提取得到蛇葡萄素 20.6 g,收率为 10.3%。将所得晶体经薄层层析,得到一个斑点,其 R<sub>f</sub> 值为 0.29。紫外光谱数据为:  $\lambda_{max, MeOH} (\log \epsilon)$ : 290.5(4.27), 226.5(4.41)。这些结果与经聚酰胺柱色谱分离所得的对照品相同。

### 2.2 小鼠腹腔注射蛇葡萄素的 LD<sub>50</sub>

采用 Bliss 法计算半数致死量(LD<sub>50</sub>)及其可信限,经 3 次叠代计算,得到 LD<sub>50</sub> 为 1 025 mg/kg,95% 可信限为表 913~1 174 mg/kg,可信限率为 12.73% (表 1)。

表 1 蛇葡萄素对昆明小鼠的急性毒性试验

Table 1 Acute toxicity assay of ampelopsin by a single ip in KM mouse

Groups	n	D / (mg · kg <sup>-1</sup> )	n <sub>d</sub> / 1	r <sub>d</sub> / %
Control	10	0	0	0
1	10	580	0	0
2	10	750	1	10
3	10	1000	4	40
4	10	1320	9	90
5	10	1760	10	100

n<sub>d</sub>, number of death; r<sub>d</sub>, death rate

### 2.3 蛇葡萄素的体外细胞毒抗肿瘤效果

5 个成等差系列浓度的药物组、2 个不同浓度的 DTIC 阳性对照组,以及不含药物的阴性对照组,测得各种实验复孔的吸光度平均值 A (n=6),由此计算抑制率 r<sub>i</sub> (表 2)。

运用 SPSS PC/Windows V 6.0 统计软件经回归作曲线拟合,得一条三次曲线回归方程:  $c / (mmol \cdot L^{-1}) = 7.41 \times 10^{-2} - 6.01 \times 10^{-3} \cdot I + 1.09 \times 10^{-4} \cdot I^2 + 4.5 \times 10^{-7} \cdot I^3$ , R = 0.9999, 计算并获蛇葡萄素的

半数抑制浓度。

表2 蛇葡萄素对 C57 小鼠 B16 黑色素瘤的体外抑制作用

Table 2 *In vitro* inhibitory effect of ampelopsin on C57 mouse B16 melanoma cell (n = 6)

Group	c / (mol·L) <sup>-1</sup>	A / 1	r <sub>i</sub> / %
1	5 × 10 <sup>-4</sup>	0.162 ± 0.004	79.8
2	1 × 10 <sup>-4</sup>	0.398 ± 0.031	50.2
3	2 × 10 <sup>-5</sup>	0.510 ± 0.034	36.2
4	4 × 10 <sup>-6</sup>	0.555 ± 0.040	30.6
5	8 × 10 <sup>-7</sup>	0.578 ± 0.050	27.8
DTIC	1 × 10 <sup>-4</sup>	0.680 ± 0.040	15.0
	4 × 10 <sup>-4</sup>	0.282 ± 0.015	64.7
Control	0	0.800 ± 0.061	

(DTIC), 其对小鼠的单剂量腹腔给药的 LD<sub>50</sub> 为 859 mg/kg<sup>[11]</sup>, 本文测得其在 4 × 10<sup>-4</sup> mol/L 的浓度下对 B16 黑色素瘤的抑瘤率为 64.7%。而所提取的蛇葡萄素在 5 × 10<sup>-4</sup> mol/L 的浓度下对 B16 黑色素瘤的抑瘤率为 79.8%, 对小鼠的单剂量腹腔给药的 LD<sub>50</sub> 为 1 025 mg/kg。初步显示蛇葡萄素对 B16 黑色素瘤的抑制效果比 DTIC 好, 但毒性更低。经采用 C57 小鼠进行体内移植 B16 黑色素瘤的抑瘤预实验, 发现肿块明显萎缩, 其结果及抗癌机理将另行发表。由于无根中的蛇葡萄素含量很高, 实验显示出有较低的毒性及较高的抗肿瘤活性, 因此具有很高的开发价值。

(中山医科大学实验动物中心黄冰和黄文革老师协助作了肿瘤细胞抑制实验和小鼠急性毒性实验, 谨致谢意)

### 3 讨论

#### 3.1 蛇葡萄素的提取

无根中蛇葡萄素的含量与药物采集的季节以及炮制的方法有很大关系。粤北地区人民通常在端午节前后于清晨露水蒸发前采摘粤蛇葡萄, 并作简单炮制, 其中蛇葡萄素含量很高, 本文取得了 10.3% 的提取率。但若直接采用未炮制的原植物, 则提取率很低。

采用水提取乙醇沉淀色谱柱分离的方法所得提取率仅有约 2%<sup>[3]</sup>, 而且步骤繁杂。本文采用甲醇提取氯仿萃取活性碳吸附, 再用水重结晶方法, 不但提取率高很多, 而且方法简便, 所得单体的药用纯度高, 适合大量生产。

用水重结晶得到的产物含  $\frac{5}{2}$  结晶水, 为浅黄色针状结晶, 分子式以 C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O<sub>8</sub> ·  $\frac{5}{2}$ H<sub>2</sub>O 表示, 相对分子质量为 365.3<sup>[8]</sup>。

蛇葡萄属植物全世界共有 20 多种, 我国发现有 15 种。在这些植物中也曾报道有几种含有蛇葡萄素, 但含量都很低。陈缙光测定了无根中蛇葡萄素的含量, 达 25.2% 之高<sup>[9]</sup>。周天达等人从显齿蛇葡萄 (*Ampelopsis grossedentata*) 中用甲醇重结晶提得蛇葡萄素, 测得小鼠的腹腔注射 LD<sub>50</sub> 为 1.41 g/kg<sup>[10]</sup>, 略高于本文测得的 LD<sub>50</sub> 数值, 这可能是采用不同溶剂进行重结晶造成的晶体结构的差异。

#### 3.2 蛇葡萄素对 B16 黑色素瘤的抑制作用

本文所采用的阳性对照药为目前被认为对黑色素瘤单一给药效果最好的化疗药氮烯咪胺

#### 参 考 文 献

- 1 江苏新医学院. 中药大辞典, 上册. 上海: 上海科学技术出版社, 1986. 342
- 2 王玫馨, 刘文染, 黄爱东, 等. 无根黄酮类成分的分 离和鉴定. 中药材, 1989, 12(7): 28
- 3 赖力, 张琳萍, 周清凯, 等. 蛇葡萄素提取工艺研究. 天然产物研究与开发. 1995, 7(1): 88
- 4 Phung T V, Pham T K, Nguyen T H. Antioxidant activity of *Ampelopsis cantoniensis* Planch. Tap Chi Duoc Hoc, 1995 (1): 14
- 5 Hase K, Ohsugi M, Xiong Q, et al. Hepatoprotective effect of *Hovenia dulcis* Thunb. on experimental liver injuries induced by carbon tetrachloride of *d*-galactosamine/lipopolysaccharide. Biol Pharm Bull, 1997, 20(4): 381
- 6 刘德育, 雷焕强. 杨梅黄素及蛇葡萄素对酪氨酸酶的抑制作用. 生物化学杂志, 1996, 12(5): 618
- 7 韩锐, 主编. 抗癌药物研究与实验技术. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997. 284~286
- 8 Budavani S. The Merck Index. 12 ed. Whitehouse Station, N J: Merck & Co Inc. 1996. 97
- 9 陈缙光, 王玫馨, 蔡沛祥, 等. 无根中蛇葡萄素和杨梅素的含量测定. 中药材, 1997, 20(1): 21
- 10 周天达, 周雪仙. 藤茶中双氢黄酮醇的分离、结构鉴定及其药理活性. 中国药学杂志, 1996, 31(8): 458
- 11 Venditti J M. Antitumor activity of DTIC (NSC-45388) in animals. Cancer Treat Rep, 1976 60(2): 135

(1998-07-01 收稿 1999-01-20 修回)