

不同植物中柯里拉京的含量测定及其 对人胃癌细胞增殖的抑制作用

林志灿^{1,2}, 郑 溢^{1,2}, 李 旒^{1,2}, 林靖怡², 林河通^{1*}, 明艳林^{1,2*}

(1. 福建农林大学食品科学学院, 福建 福州 350002;

2. 厦门华侨亚热带植物引种园, 厦门市植物引种检疫与植物源产物重点实验室, 福建 厦门 361002)

摘要: 建立高效液相色谱(HPLC)测定柯里拉京含量的方法, 比较不同植物材料中柯里拉京的含量, 筛选出柯里拉京含量高的植物, 并初步研究柯里拉京对人胃癌细胞增殖的抑制作用. HPLC 结果显示: 龙眼核、叶下珠全草、龙眼壳、榄仁树叶和纤梗叶下珠全草的柯里拉京含量较高, 依次为 643, 619, 569, 271 和 159 $\mu\text{g/g}$. 通过体外实验初步研究了柯里拉京对人胃癌细胞生长的抑制作用, 噻唑蓝(MTT)法测得柯里拉京对人胃癌 SGC7901 细胞的半抑制浓度(IC_{50})为 $(42.46 \pm 3.31) \mu\text{mol/L}$; 吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB)和 Hoechst33258 染色结果表明, 柯里拉京能诱导人胃癌 SGC7901 细胞凋亡. 建立的 HPLC 检测方法能较快速、准确地检测出不同植物的柯里拉京含量, 所测的 12 种材料中龙眼核的柯里拉京含量最高; 柯里拉京具有抑制人胃癌 SGC7901 细胞增殖的活性, 并且能够诱导其凋亡.

关键词: 柯里拉京; 高效液相色谱; 含量测定; 抗胃癌活性

中图分类号: R 282.71

文献标志码: A

文章编号: 0438-0479(2016)06-0847-06

柯里拉京(corilagin, β -1-O-galloyl-3, 6-(R)-hexahydroxydiphenoyl-D-glucose), 又名鞣云实精, 属可水解鞣质, 相对分子质量 634.45, 分布在叶下珠(*Phyllanthus urinaria* L.)^[1]、龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.)^[2]、余甘子(*Phyllanthus emblica* Linn.)^[3]和榄李(*Lumnitzera racemosa* Willd.)^[4]等多种植物中, 是老鹳草(*Geranium wilfordii* Maxim.)、叶下珠等中草药及制剂的指标成分, 但关于柯里拉京单体的研究近几年才逐渐深入.

已有研究发现柯里拉京具有抗氧化^[5]、抗炎^[6]、保护肝脏^[7]等活性, 特别是有良好的抗肿瘤^[1]活性, 在体外可显著抑制人肝癌^[8]、卵巢癌^[9]、喉癌^[10]、胆管癌^[11]等多种癌细胞的生长, 在体内也可以明显抑制卵巢癌和肝癌移植瘤细胞的生长, 且对正常卵巢上皮细胞毒性非常低^[9,12].

目前, 柯里拉京的主要来源是植物提取. 随着柯里拉京的需求量越来越大, 急需寻找可大量提取柯里拉

京的植物, 但关于柯里拉京在植物中的分布、含量等的研究报道很少. 近年来, 厦门华侨亚热带植物引种园对柯里拉京的提取制备及其抗肿瘤活性进行了较深入的研究, 并已申请柯里拉京作为抗癌植物新药的国家发明专利^[13]. 本研究在前期工作的基础上选择 10 种植物 12 个部位的材料, 建立高效液相色谱(HPLC)测定方法对它们进行柯里拉京的含量测定, 通过比较筛选出其中柯里拉京含量较高的植物, 并在体外实验中检测柯里拉京对人胃癌 SGC7901 细胞的抑制效果.

1 材料与方法

1.1 材 料

6 科 8 属 10 种植物的 12 个部位为供试植物样品: 叶下珠全草、纤梗叶下珠(*P. tenellus* Roxb.)全草、锐尖叶下珠(*P. debilis* Klein ex Willd.)全草、铁苋菜(*Acalypha australis* L.)全草、火炭母

收稿日期: 2016-03-22 录用日期: 2016-08-01

基金项目: 国家自然科学基金(81274149); 厦门市重点实验室项目(3502Z20130038); 厦门市科技创新项目(3502Z20062008); 厦门市科技计划项目(3502Z20142003)

* 通信作者: xmyanlin@gmail.com

引文格式: 林志灿, 郑溢, 李旒, 等. 不同植物中柯里拉京的含量测定及其对人胃癌细胞增殖的抑制作用[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2016, 55(6): 847-852.

Citation: LIN Z C, ZHENG Y, LI N, et al. Determination of contents of corilagin in different plants and its inhibitory activity on gastric cancer cell proliferation[J]. Journal of Xiamen University(Natural Science), 2016, 55(6): 847-852. (in Chinese)



(*Polygonum chinense* L.) 带叶嫩枝、三白草(*Saururus chinensis* (Lour.) Baill.) 叶、榄仁树(*Terminalia catappa* L.) 叶、龙眼壳、龙眼核、荔枝(*Litchi chinensis* Sonn.) 壳、荔枝核、石榴(*Punica granatum* L.) 籽, 12 种材料均由厦门华侨亚热带植物引种园专家鉴定; 柯里拉京对照品购自成都瑞芬思生物科技有限公司(产品号: 23094-69-1), 纯度 > 98%; 色谱纯乙腈、甲醇、吡啶橙(AO)购自 Sigma 公司; 溴化乙锭(EB)购自生工生物工程(上海)股份有限公司; Hoechst33258 购自碧云天生物技术研究; 新生胎牛血清(FBS)购自美国 Hyclone 公司; 细胞培养基 RPMI1640 购自美国 Gibco 公司; 其他试剂均为国产分析纯; 人胃癌 SGC7901 细胞购自中国科学院上海细胞生物学研究所。

1.2 方法

1.2.1 HPLC 条件

色谱柱, Waters XBridge™ Shield RP18(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 二极管阵列(DAD)检测器, 检测波长 280 nm; 柱温 30 °C; 流动相流速 1 mL/min; 进样量 20 μL; 流动相为乙腈(A)-0.1% (体积分数) 磷酸水溶液(B)。洗脱程序: 0~10 min, V(A):V(B) = 15:85; 10.01~15 min, V(A):V(B) = 20:80; 15.01~20 min, V(A):V(B) = 25:75。

1.2.2 标准曲线的绘制

精密称取柯里拉京对照品 2.5 mg, 50% (体积分数, 下同) 甲醇定容至 10 mL, 得到 0.25 mg/mL 的标准溶液。将标准溶液分别稀释成质量浓度为 25, 50, 75, 100, 125 μg/mL, 各进样 20 μL, 按 1.2.1 条件进行 HPLC 分析, 记录峰面积, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

1.2.3 植物样品制备及其柯里拉京的含量测定

精密称取烘干粉碎的植物样品 5 g, 95% (体积分数, 下同) 乙醇 25 mL 常温下浸渍提取 3 次, 每次 12 h。合并提取液用旋转蒸发器于旋蒸瓶中真空浓缩至干, 50% 甲醇溶解并定容至 10 mL 即得样品提取液。其中, 龙眼壳、龙眼核以及叶下珠的样品提取液稀释 10 倍后, 与其他样品提取液分别经 0.22 μm 的滤膜过滤后取 20 μL, 按 1.2.1 进行 HPLC 分析, 记录峰面积, 根据标准曲线计算出样品中柯里拉京的含量。

1.2.4 细胞培养及分组

人胃癌 SGC7901 细胞常规培养于含 10% (体积

分数) 热灭活 FBS、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素的 RPMI1640 完全培养基中, 于 37 °C 恒温、5% (体积分数) CO₂ 及饱和湿度条件下培养。人胃癌 SGC7901 细胞经胰酶消化、磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后悬浮于培养基中, 台盼蓝染色计数活细胞后, 调节细胞悬浮液密度至 3×10^4 mL⁻¹; 在平底 96 孔板中, 每孔接种 100 μL, 使每孔中细胞总数约为 3 000, 培养过夜; 次日, 向每孔中加入 200 μL 用培养基稀释的柯里拉京, 柯里拉京作用浓度分别为 0, 6.25, 25, 50, 75, 100 μmol/L。

1.2.5 噻唑蓝(MTT)法测定计算细胞的存活率

按 1.2.4 处理后, 培养 48 h, 向每孔中加入 20 μL 5 mg/mL MTT 溶液(溶于 PBS), 继续培养 4~8 h; 用真空泵吸去培养液, 加入 200 μL PBS 洗涤后离心, 并小心地吸去 PBS; 每孔加入 200 μL 二甲基亚砜(DMSO), 置于微孔振荡器上, 以 500 r/min 震荡 20 min, 测定 492 nm 处的吸光度(OD); 计算细胞在柯里拉京作用后的存活率(每个浓度设 6 个孔, 重复 3 次):

$$\text{存活率} = [1 - (OD_{\text{空白}} - OD_{\text{药物}}) / OD_{\text{空白}}] \times 100\%.$$

1.2.6 AO/EB 和 Hoechst33258 染色

AO/EB 荧光染色: 按 1.2.4 处理后, 培养 24 h; AO 和 EB 按体积比 1:1 混合后, 混合液与培养基以体积比 1:3 再混合配成染色液; 将细胞培养板培养液去除, 每孔加入 200 μL AO/EB 染色液, 孵育 1~2 min, 显微镜下拍照。

Hoechst33258 染色: 按 1.2.4 处理后, 培养 24 h, 将细胞培养板培养液去除; Hoechst33258 与 75% 乙醇按体积比 1:2 混合配成染色液; 每孔加入 200 μL Hoechst33258 染色液, 避光孵育 10 min, 显微镜下拍照。

2 结果与分析

2.1 HPLC 分析

按 1.2.1 进行 HPLC 分析, 如图 1 中箭头所示, 样品的 HPLC 谱图中柯里拉京的峰均在 7.7 min 左右, 说明柯里拉京的保留时间及分离度都比较理想。

2.1.1 柯里拉京标准曲线

根据不同质量浓度对照品溶液所测得数据, 得出回归方程为 $Y = 24\,742.3X + 1.033\,33$ ($R = 0.994\,7$), 表明柯里拉京在 0~125 μg/mL 范围内峰面积与质量浓度呈良好的线性关系, 可见本研究确定

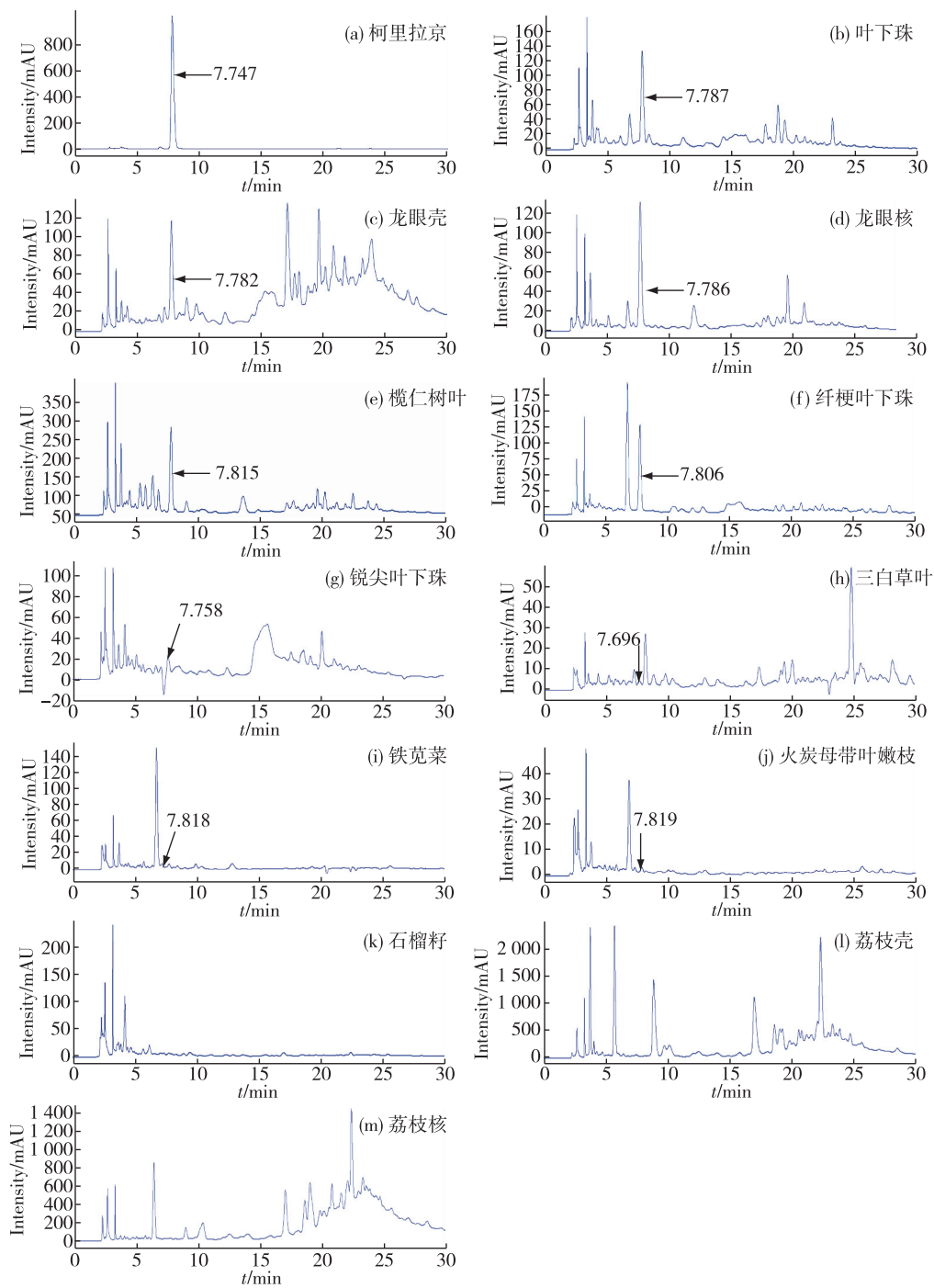


图 1 柯里拉京对照品(a)和各样品(b~m)的 HPLC 谱图
Fig. 1 HPLC spectra of corilagin standard (a) and samples (b-m)

的 HPLC 条件能较好地实现 12 种材料的柯里拉京与其他成分分离,从而能较快速、准确地测定样品中柯里拉京的含量。

2.1.2 精密度试验

以 20 μL 的 100 $\mu\text{g/mL}$ 柯里拉京对照品溶液为样品进行 HPLC 分析,重复 6 次,测得柯里拉京含量

的相对标准差(RSD)为 3.3%,表明仪器精密度良好。

2.1.3 重复性试验

精密称取龙眼核粉末 6 份,按 1.2.3 方法制备,按 1.2.1 测定龙眼核的柯里拉京含量,其 RSD 为 1.9%,表明方法的重复性良好。

2.1.4 回收率试验

根据 10 种植物的取材部位的不同,选择龙眼核、龙眼壳、叶下珠全草和榄仁树叶 4 种样品进行回收率试验.精密称取 5 g 上述 4 种样品各 3 份,分别加入与样品含量相当的柯里拉京对照品.按 1.2.3 方法提取、制备,按 1.2.1 分析计算.结果表明,柯里拉京在龙眼核、龙眼壳、叶下珠全草及榄仁树叶中的平均回收率分别为 100.3% (RSD 为 4.6%),102.8% (RSD 为 3.7%),101% (RSD 为 5.9%),95.2% (RSD 为 4.0%).

2.2 不同植物的柯里拉京含量

根据各供试植物样品的峰面积,代入 2.1.1 所得的回归方程,计算出 12 种样品中柯里拉京的含量(表 1).结果表明:在所测的 12 种样品中,龙眼核与叶下珠的柯里拉京含量较高,分别为 643 和 619 $\mu\text{g/g}$,远高于其他样品;与叶下珠同是大戟科的其他 3 种植物样品中,柯里拉京含量差别甚大,叶下珠中柯里拉京的含量是铁苋菜的 286.57 倍,是同属纤梗叶下珠的 3.89 倍,是锐尖叶下珠的 9.12 倍.

2.3 柯里拉京对人胃癌 SGC7901 细胞生长的影响

如图 2 结果所示,柯里拉京对人胃癌 SGC7901 细胞的生长具有明显的抑制作用.随着柯里拉京浓度的升高,SGC7901 细胞的存活率也相应降低,呈浓度依赖性.在柯里拉京浓度由 6.25 $\mu\text{mol/L}$ 增加到 100

$\mu\text{mol/L}$ 时,SGC7901 细胞的存活率由 97.4% 下降到 12.4%,其中柯里拉京浓度为 25~50 $\mu\text{mol/L}$ 时存活率下降最快.根据存活率用 SPSS 19.0 软件计算得柯里拉京对 SGC7901 细胞的半数抑制浓度(IC_{50})为 $(42.46 \pm 3.31) \mu\text{mol/L}$.

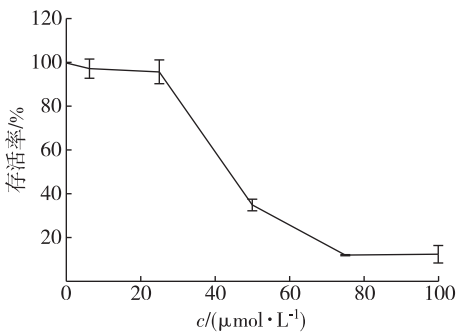


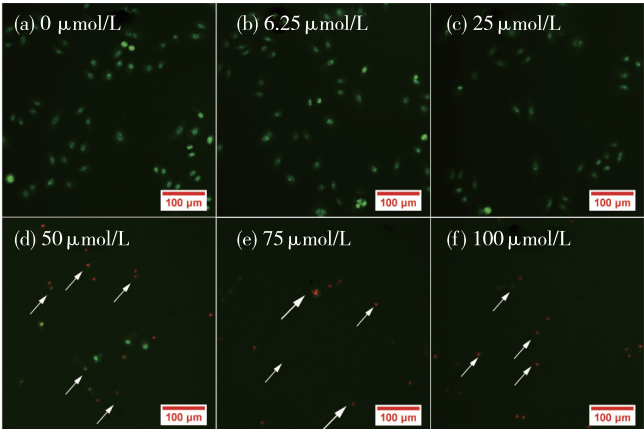
图 2 柯里拉京对胃癌细胞 SGC7901 的抑制作用
Fig. 2 Inhibition effect of corilagin on the growth of SGC7901 cells

2.4 AO/EB 染色观察细胞凋亡

AO 和 EB 是 2 种不同的荧光核酸染料:AO 能透过细胞膜完整的细胞,嵌入细胞核 DNA,使之发出明亮的绿色荧光;EB 只能透过细胞膜破损的细胞,与细胞核 DNA 结合,发出橘红色荧光.AO/EB 双染色时,凋亡细胞发橙色、橘红色荧光.如图 3 所示:人胃癌 SGC7901 细胞在柯里拉京浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 及以上时发橙色、橘红色荧光,凋亡特征十分明显(图中箭头所指);而浓度在 25 $\mu\text{mol/L}$ 及以下时未观察到明显

表 1 不同植物材料的柯里拉京含量
Tab. 1 Contents of corilagin in different samples

植物名	拉丁学名	科	属	部位	含量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$
铁苋菜	<i>Acalypha australis</i> L.	大戟科	铁苋菜属	全草	2.16
火炭母	<i>Polygonum chinense</i> L.	蓼科	蓼属	叶、枝条	3.76
三白草	<i>Saururus chinensis</i> (Lour.) Baill.	三白草科	三白草属	叶	5.73
榄仁树	<i>Terminalia catappa</i> L.	使君子科	诃子属	叶	271
龙眼	<i>Dimocarpus longan</i> Lour.	无患子科	龙眼属	壳	569
				核	643
叶下珠	<i>Phyllanthus urinaria</i> L.	大戟科	叶下珠属	全草	619
纤梗叶下珠	<i>P. tenellus</i> Roxb.	大戟科	叶下珠属	全草	159
锐尖叶下珠	<i>P. debilis</i> Klein ex Willd.	大戟科	叶下珠属	全草	67.90
石榴籽	<i>Punica granatum</i> L.	石榴科	石榴属	籽	—
荔枝	<i>Litchi chinensis</i> Sonn.	无患子科	荔枝属	核	—
				壳	—



箭头所指为凋亡细胞(下同).

图 3 AO/EB 染色观察不同浓度柯里拉京作用 24 h 后人胃癌 SGC7901 细胞的凋亡情况
Fig. 3 Effect of various concentrations of corilagin on the apoptosis of SGC7901 cells by staining with AO/EB

的发橙色、橘红色荧光的细胞.以上结果表明,柯里拉京能诱导人胃癌 SGC7901 细胞凋亡.

2.5 Hoechst33258 染色观察细胞凋亡

Hoechst33258 是一种可以穿透细胞膜的蓝色荧光染料,对细胞的毒性较低.其为特异性 DNA 染料,与 A-T 键结合,对死细胞或经 70% 冷乙醇固定的细胞可立即染色;而活细胞的着色是渐进性的,在 10 min 内可达饱和.在荧光显微镜下,活细胞核呈弥散均匀荧光,出现细胞凋亡时,细胞核或细胞质内可见浓染致密的颗粒块状荧光.如图 4 所示:人胃癌 SGC7901 细胞在柯里拉京浓度为 50 μmol/L 时大部分为浓染致密的颗粒块状荧光,凋亡特征十分明显(如图中箭头所指);而在 25 μmol/L 时仅观察到少量的浓染致密的颗粒块状荧光,无明显的凋亡现象.以上结果表明,柯里拉京能诱导人胃癌 SGC7901 细胞凋亡,与 AO/EB 染色结果一致.

3 讨论与结论

本研究参考相关文献建立了针对柯里拉京含量测定的 HPLC 法.结果表明,利用该方法测定 10 种植物(12 个部位)中柯里拉京含量,能实现 12 种材料的柯里拉京与其他成分较好的分离,且基线平稳,分析时间适中.因此,本研究建立的 HPLC 法可作为快速测定植物中柯里拉京含量的手段之一.

目前,植物提取还是柯里拉京的主要来源.本研究测定的 12 种材料经比较后,结果显示龙眼核与叶下

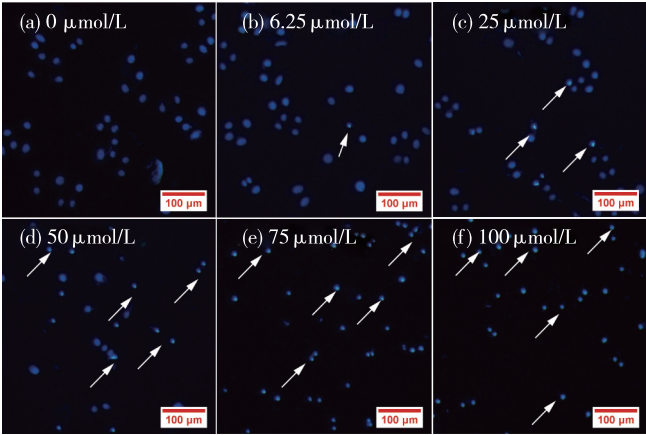


图 4 Hoechst33258 染色观察不同浓度柯里拉京作用 24 h 后人胃癌细胞 SGC7901 的凋亡情况
Fig. 4 Effect of various concentrations of corilagin on the apoptosis of SGC7901 cells by staining with Hoechst33258

珠中柯里拉京含量较高.随着龙眼酒、龙眼罐头、桂圆干、龙眼膏等龙眼深加工产品的不断增多^[14],大量的龙眼核被当作加工废弃物.叶下珠为一年生草本,高 10~60 cm,产于河北、山西、陕西、华东、华中、华南、西南等省区^[15],分布广,易采集.根据本研究的结果,龙眼核与叶下珠都可以作为柯里拉京大量提取的植物来源.

柯里拉京对肿瘤细胞的生长具有广泛的抑制效应^[16],而对正常细胞(NOE01, NOE02, NOE03)的毒性作用非常低^[9],因此柯里拉京在抗肿瘤方面的应用越来越引起重视.本研究对柯里拉京抑制人胃癌 SGC7901 细胞生长的活性进行检测,MTT 实验结果表明柯里拉京对人胃癌 SGC7901 细胞的增殖具有抑制作用;AO/EB 和 Hoechst33258 染色观察发现人胃癌细胞经柯里拉京处理后,在一定的浓度下展现出明显的凋亡特征.

本研究为筛选适合进行柯里拉京大规模提取的植物提供了科学的方法,确定龙眼核与叶下珠都可作为柯里拉京大量提取的植物来源,这对柯里拉京的规模化提取制备具有指导意义.此外,通过研究柯里拉京对人胃癌细胞增殖的抑制作用,证实了柯里拉京的抗胃癌活性,为深入研究柯里拉京抗胃癌的机制提供了一定的基础.

参考文献:

[1] 张树峰,明艳林,林毅,等.叶下珠属植物活性成分柯里拉京研究进展[J].亚热带植物科学,2010,39(4):79-83.

- [2] PRASAD K N, YANG B, ZHAO M, et al. High pressure extraction of corilagin from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit pericarp [J]. Sep Purif Technol, 2009, 70(1): 41-45.
- [3] 冀静, 杨继家, 廖琦, 等. 藏药余甘子中三种酚酸类成分的 HPLC 含量测定研究 [J]. 中药与临床, 2012, 3(4): 14-16, 19.
- [4] LIN T C, HSU F L, CHENG J T. Antihypertensive activity of corilagin and chebulinic acid, tannins from *Lumnitzera racemosa* [J]. Journal of Natural Products, 1993, 56(4): 629-632.
- [5] KINOSHITA S, INOUE Y, NAKAMA S, et al. Antioxidant and hepatoprotective actions of medicinal herb, *Terminalia catappa* L. from Okinawa Island and its tannin corilagin [J]. Phytomedicine, 2007, 14(11): 755-762.
- [6] ZHAO L F, XIUMIN Y U, QIAN D C, et al. Effect of Corilagin on anti-inflammation in HSV-1 encephalitis and HSV-1 infected microglia [J]. European Journal of Pharmacology, 2010, 635(1/2/3): 79-86.
- [7] DUAN W, YU Y, ZHANG L. Antiatherogenic effects of phyllanthus emblica associated with corilagin and its analogue [J]. Yakugaku Zasshi, 2005, 125(7): 587-591.
- [8] MING Y L, ZHENG Z Z, CHEN L H, et al. Corilagin inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation by inducing G2/M phase arrest [J]. Cell Biology International, 2013, 37(10): 1046-1054.
- [9] JIA L Q, JIN H H, ZHOU J Y, et al. A potential anti-tumor herbal medicine, Corilagin, inhibits ovarian cancer cell growth by blockage of TGF- β /AKT/ERK signaling pathways [J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2013, 13(1): 1-11.
- [10] 康健, 张岩岩, 陈冬, 等. 柯里拉京对人喉癌 Hep-2 细胞生长的研究 [J]. 中药药理与临床, 2012, 28(6): 24-27.
- [11] GU Y, XIAO L F, MING Y L, et al. Corilagin suppresses cholangiocarcinoma progression through Notch signaling pathway in vitro and in vivo [J]. International Journal of Oncology, 2016, 48(5): 1868-1876.
- [12] MING Y L, CHEN H L, LIANG J, et al. Corilagin is the major active compound from *Phyllanthus niruri* L. extracts with antitumor activities in hepatocellular carcinoma [C]// The 4th International Conference on Drug Discovery and Therapy (4th ICDDT). Dubai: UAE, 2012.
- [13] 明艳林, 郁茵华, 陈良华, 等. 柯里拉京在制备抗肿瘤药物中的应用: 中国, CN101879173A [P]. 2010-07-09.
- [14] 林娟. 龙眼的开发与利用 [J]. 海峡药学, 2014, 26(3): 35-37.
- [15] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1994: 93.
- [16] 刘朝阳, 王德昌, 陈玉武, 等. 柯里拉京抗肿瘤和致突变作用实验研究 [J]. 肿瘤防治杂志, 2003, 10(5): 469-472.

Determination of Contents of Corilagin in Different Plants and Its Inhibitory Activity on Human Gastric Cancer Cell Proliferation

LIN Zhican^{1,2}, ZHENG Yi^{1,2}, LI Ni^{1,2}, LIN Jingyi², LIN Hetong^{1*}, MING Yanlin^{1,2*}

(1. College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

2. The Research and Development Center for Medicinal Plants and Plant Medicine, Xiamen Overseas Chinese Subtropical Plant Introduction Garden, Xiamen 361002, China)

Abstract: To filter plants with high corilagin content, a high performance liquid chromatography (HPLC) method was established for determination of corilagin contents in different plants, and the anti-gastric cancer activity of corilagin was also investigated by thiazolyl blue (MTT) assay, acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) staining, and Hoechst 33258 staining. HPLC analyses showed that longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed, *Phyllanthus urinaria* L., longan shell, *Terminalia catappa* L. leaf and *P. tenellus* Roxb. contained higher levels of corilagin, which were 643, 619, 569, 271 and 159 $\mu\text{g/g}$ respectively. MTT assay results showed that gastric cancer cells SGC7901 had IC_{50} value of $(42.46 \pm 3.31) \mu\text{mol/L}$ with corilagin treatment. AO/EB staining and Hoechst 33258 staining showed that corilagin induced apoptosis of gastric cancer cells SGC7901. As a conclusion, the conditions of HPLC explored in this study can quickly and accurately detect corilagin content of different plants, and longan seed contains the highest level of corilagin among the 12 kinds of plant samples, and corilagin exhibits anti-gastric cancer activity.

Key words: corilagin; high performance liquid chromatography (HPLC); content determination; anti-gastric cancer activity