

杨梅醇与 5-对氟苄氧基杨梅醇的制备及其对人肝癌 HepG₂ 细胞活性的影响

童晔玲, 戴关海*, 任泽明, 陈璇, 聂晓静, 杨锋(浙江省中医药研究院, 杭州 310007)

摘要: 目的 体外观察杨梅醇与 5-对氟苄氧基杨梅醇(myricanol 5-fluorobenzyloxy ether, 5FEM)对人肝癌细胞 HepG₂ 活性的影响。方法 制备杨梅醇与 5FEM, 杨梅醇(25, 12.5, 6.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、5FEM(25, 12.5, 6.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)作用于 HepG₂ 细胞, 实时细胞分析系统记录 96 h 细胞指数, 观察杨梅醇与 5FEM 对 HepG₂ 细胞增殖和迁移的影响。结果 杨梅醇与 5FEM 对 HepG₂ 细胞的增殖和迁移均有较好的抑制作用, 且呈现较好的量效关系, 相等剂量下, 5FEM 的作用优于杨梅醇。结论 杨梅醇与 5FEM 能有效抑制 HepG₂ 细胞的增殖和迁移。

关键词: 杨梅醇; 5-对氟苄氧基杨梅醇; 人肝癌 HepG₂ 细胞; 细胞增殖; 细胞迁移

中图分类号: R285.4 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2018)03-0375-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.03.014

引用本文: 童晔玲, 戴关海, 任泽明, 等. 杨梅醇与 5-对氟苄氧基杨梅醇的制备及其对人肝癌 HepG₂ 细胞活性的影响[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(3): 375-378.

Preparation of Myricanol and Myricanol 5-fluorobenzyloxy Ether and its Effect on the Activity of HepG₂ Cells

TONG Yeling, DAI Guanhai*, REN Zeming, CHEN Xuan, NIE Xiaojing, YANG Feng(Zhejiang Institute of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the activity of myricanol and myricanol 5-fluorobenzyloxy ether (5FEM) on liver cancer of cell HepG₂ *in vitro*. **METHODS** Myricanol (25, 12.5 and 6.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and 5FEM (25, 12.5 and 6.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) were prepared to act on HepG₂ cells, real time cellular analysis was used to record 96 h cell index (CI) to observe the effect of Myricanol and 5FEM on the proliferation and migration of HepG₂ cells. **RESULTS** Myricanol and 5FEM could inhibit the proliferation and migration of HepG₂ cells, showing a dose-effect curve. The effect of 5FEM was better than myricanol at the same dose. **CONCLUSION** Myricanol and 5FEM can effectively inhibit the proliferation and migration of HepG₂ cells.

KEY WORDS: myricanol; myricanol 5-fluorobenzyloxy ether; HepG₂ cell; proliferation; migration

杨梅(*Myrica rubra* Sieb. et Zucc)系杨梅科杨梅属植物, 有较好的药用和食用价值。杨梅树皮味苦、性温, 含有黄酮类、环状二芳基庚烷类、单宁类、三萜类等多种化合物^[1], 具有抗病毒、抗菌、抗氧化、抗炎、抗肿瘤等活性^[2-5]。杨梅醇是从杨梅树皮中提取的环状二芳基庚烷类化合物, 笔者前期研究发现杨梅醇具有显著的抗肿瘤活性, 对人肺腺癌 A549、人早幼粒白血病 HL-60、人肝癌 HepG₂ 细胞均有较好的抑制作用^[6-7]。现将结构修饰后的 5-对氟苄氧基杨梅醇(myricanol 5-fluorobenzyloxy ether, 5FEM)与杨梅醇的抗 HepG₂ 活性进行比较。

1 材料

1.1 药物

杨梅醇与 5FEM 均为本实验室制备; 杨梅醇

对照品(云南西力生物技术有限公司, 批号: BBP01843; 纯度: 98%)。

1.2 细胞株

人肝癌 HepG₂ 细胞(中国科学院细胞库), 本实验室液氮保存。

1.3 试剂

RPMT-1640 培养液(吉诺生物医药技术有限公司, 批号: 16011505); 胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司, 批号: 20160323); 0.25%胰蛋白酶(含 0.02%EDTA, 吉诺生物医药技术有限公司, 批号: 2016062902); PBS(吉诺生物医药技术有限公司, 批号: 2016061304); 0.4%台盼蓝(Sigma 公司, 批号: 20151025); 甲苯、无水乙醇、石油醚、碳酸钾(K₂CO₃)、丙酮、氯仿(CHCl₃)、碳酸铯

基金项目: 浙江省科技计划项目(2015F10015、2013F50020、2017C33169)

作者简介: 童晔玲, 女, 硕士, 副研究员 Tel: (0571)88849082 E-mail: tongyeling@sina.com *通信作者: 戴关海, 男, 硕士, 研究员 Tel: (0571)88849082 E-mail: 13989494472@163.com

(Cs_2CO_3)、氢氧化钠(NaOH)、二氯甲烷(DCM)、二甲基亚砷(DMSO)、盐酸、无水硫酸镁、丙酮等均为分析纯,由汇普化工仪器有限公司提供。

1.4 仪器

RE2000A 型旋转式减压蒸发仪(成都市蜀华西部科技中心有限公司);Centrifuge 5810R 低温离心机(Eppendorf 公司);BS210S 电子天平(Sartorius 公司);层析柱(江苏建湖玻璃有限公司);SKB-III型水泵(河南太康科教器材厂);Waters H-class 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);核磁氢谱分析仪:Varian AS 400 FT-NMR spectrometer (400.13 MHz, 美国 Varian);3111 型 CO_2 培养箱(Thermo 公司);HR40-II-A2 型医用净化工作台(青岛海尔特种电器有限公司);CK40-F200 型倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司);xCELLigence RTCA DP 多功能实时无标记细胞分析仪、E-Plate 16(批号:20160310)、CIM-Plate 16 检测板(批号:20160308)均来自艾森生物(杭州)有限公司;超低温冰箱(Thermo 公司);TC-20 细胞计数仪(Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 杨梅醇的制备

取干燥清洁的杨梅树皮药材 1 000 g,剪碎,置于蒸馏烧瓶中,加 3 000 mL 的 80%乙醇,80 °C 水浴回流提取 2 次,每次 2 h,合并 2 次提取液,过滤,滤液减压浓缩,回收乙醇,干燥,得醇提物,醇提物加水热溶后,依次用 1.6 倍量石油醚、氯仿各萃取 2 次,合并各萃取液,分别于旋转蒸发仪上 80 °C 回收溶剂,真空减压干燥至恒重,得氯仿萃取物,再用凝胶柱结合用 TLC、UPLC 分离得到杨梅醇。

2.2 5FEM 的制备

在圆底烧瓶中加入杨梅醇 0.05 g,溶于 5 mL 丙酮中,搅拌溶解,加入 K_2CO_3 0.063 g,搅拌 1 h 后,加入 4-氟苄溴 0.085 g,避光、室温下反应。TLC 检测反应至杨梅醇点消失。将得到的反应液用旋转蒸发仪蒸去溶剂,加入 0.1 g 硅胶拌样。取 300~400 目硅胶装柱,压实后用石油醚压柱 3 次,将拌好的样品用刮刀刮出(尽量刮净),装样。用石油醚-乙酸乙酯(3:1)做层析液,连续收集层析液,点板确定所含产品的纯度,收集层析液,合并,旋干。旋干后得到的黄色固体即为 5FEM。

2.3 细胞培养

人肝癌 HepG₂ 细胞用含 10%胎牛血清的 1640

培养液,置 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养,取对数生长期的细胞用台盼蓝染色,检测细胞存活率 $\geq 95\%$,即可用于实验。

2.4 细胞形态学观察

倒置显微镜观察经杨梅醇与 5FEM 作用后的细胞形态学改变。

2.5 实时细胞分析系统检测杨梅醇与 5FEM 对 HepG₂ 细胞增殖的影响

取对数生长期的 HepG₂ 细胞,胰酶消化后制成单细胞悬液,调整细胞浓度为 $5 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$,先在 E-Plate 板上每孔放入 50 μL 培养基测基线,随后加入 100 μL 细胞悬液,置 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养 24 h,记录细胞指数(cell index, CI)。24 h 后加入杨梅醇(25, 12.5, 6.25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)和 5FEM(25, 12.5, 6.25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),同时设正常对照组、5-FU 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组,每组设 3 复孔,继续培养 72 h,记录 CI 值。

2.6 实时细胞分析系统检测杨梅醇与 5FEM 对 HepG₂ 细胞迁移的影响

取对数生长期的 HepG₂ 细胞,胰酶消化后制成单细胞悬液,调整细胞浓度为 $4 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$,先在 CIM-Plate 板下室每孔放入 165 μL 含血清培养基,随后装配上室后加入 30 μL 无血清培养基测基线,再加入 100 μL 无血清细胞悬液,置 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养 24 h,记录 CI 值。24 h 后加入杨梅醇(25, 12.5, 6.25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)和 5FEM(25, 12.5, 6.25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),同时设正常对照组、5-FU 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组,每组设 3 复孔,继续培养 72 h,记录 CI 值。

2.7 统计学方法

各组数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用方差分析,所有数据均由 SPSS 17.0 统计软件进行处理, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 杨梅醇与 5FEM 的制备

分离得到杨梅醇的纯度为 98.2%,5FEM 为 0.057 g,5FEM 核磁氢谱图见图 1。

3.2 细胞形态学观察

细胞经杨梅醇与 5FEM 处理 48 h 后,镜下均可见细胞由贴壁不同程度脱落,光镜下见细胞变圆,体积缩小,细胞质内可见较多颗粒,并出现片状无细胞生长区。对照组细胞呈多角形,贴壁生长,几乎无脱落,光镜下见细胞完整,胞质饱满,相邻细胞生长融合成片。结果见图 2。

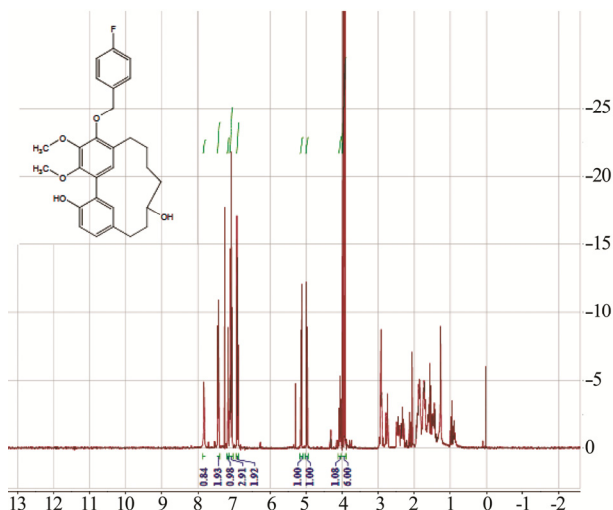


图1 5FEM核磁氢谱图

Fig. 1 5FEM nuclear magnetic spectrum



图2 细胞形态学观察(100×)

A-对照组; B-杨梅醇 12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; C-5FEM 12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

Fig. 2 Cell morphological observation(100×)

A-control group; B-myricanol group(12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); C-5FEM group (12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

3.3 杨梅醇与5FEM对HepG₂细胞增殖的影响

给药后, 杨梅醇(25, 12.5, 6.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、5FEM(25, 12.5, 6.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组的CI值均低于正常对照组, 且呈剂量相关性。结果见图3。

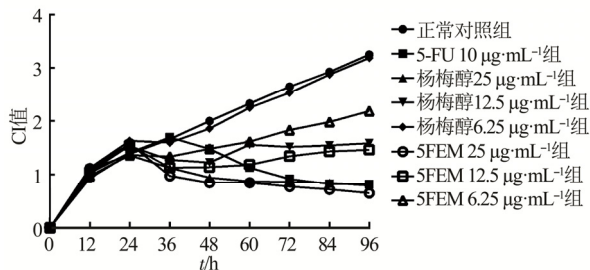


图3 杨梅醇和5FEM对HepG₂细胞增殖的影响

Fig. 3 The effect of myricanol and 5FEM on cell proliferation

给药后 24, 48 h, 与正常对照组相比, 杨梅醇(25, 12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、5FEM(25, 12.5, 6.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组的CI值均显著减低($P<0.01$)。与5-FU组相比, 杨梅醇(25, 12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和5FEM(25, 12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的24 h CI值明显降低($P<0.01$); 杨梅醇 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组与5FEM 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组的48 h CI值显著降低($P<0.01$)。结果见表1。

3.4 杨梅醇与5FEM对HepG₂细胞迁移的影响

给药后, 杨梅醇(25, 12.5, 6.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、

5FEM(25, 12.5, 6.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组的CI值均低于正常对照组, 且呈剂量相关性。结果见图4。

表1 杨梅醇和5FEM对HepG₂细胞增殖的影响($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The effect of myricanol and 5FEM on cell proliferation($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

组别	浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	CI 值	
		给药后 24 h	给药后 48 h
正常对照组	—	2.014 $\pm$ 0.012	2.660 $\pm$ 0.011
5-FU 组	10	1.475 $\pm$ 0.011 ¹⁾	0.911 $\pm$ 0.006 ¹⁾
杨梅醇组	25	0.945 $\pm$ 0.004 ¹⁾²⁾	0.855 $\pm$ 0.006 ¹⁾²⁾
	12.5	1.237 $\pm$ 0.014 ¹⁾²⁾	1.522 $\pm$ 0.004 ¹⁾²⁾
	6.25	1.873 $\pm$ 0.035 ²⁾	2.538 $\pm$ 0.008 ¹⁾²⁾
5FEM 组	25	0.850 $\pm$ 0.001 ¹⁾²⁾	0.844 $\pm$ 0.003 ¹⁾²⁾
	12.5	1.142 $\pm$ 0.004 ¹⁾²⁾	1.346 $\pm$ 0.001 ¹⁾²⁾
	6.25	1.492 $\pm$ 0.006 ¹⁾	1.841 $\pm$ 0.005 ¹⁾²⁾

注: 与正常对照组相比, ¹⁾ $P<0.01$; 与5-FU组相比, ²⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with 5-FU group, ²⁾ $P<0.01$.

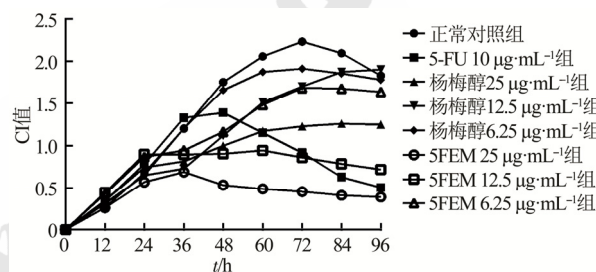


图4 杨梅醇和5FEM对HepG₂细胞迁移的影响

Fig. 4 The effect of Myricanol and 5FEM on cell migration

给药后 24, 48 h, 与正常对照组相比, 杨梅醇(25, 12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、5FEM(25, 12.5, 6.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组的CI值显著减低($P<0.01$)。与5-FU组相比, 杨梅醇(25, 12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和5FEM(25, 12.5, 6.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的24 h CI值明显降低($P<0.01$); 杨梅醇 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和5FEM(25, 12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的48 h CI值显著降低($P<0.01$)。结果见表2。

表2 杨梅醇和5FEM对HepG₂细胞迁移的影响($n=3$)

Tab. 2 The effect of myricanol and 5FEM on cell migration($n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	CI 值	
		给药后 24 h	给药后 48 h
正常对照组	—	1.782 $\pm$ 0.024	2.238 $\pm$ 0.004
5-FU 组	10	1.381 $\pm$ 0.013 ¹⁾²⁾	0.908 $\pm$ 0.011 ¹⁾²⁾
杨梅醇组	25	1.011 $\pm$ 0.009 ¹⁾²⁾	1.234 $\pm$ 0.003 ¹⁾²⁾
	12.5	1.146 $\pm$ 0.022 ¹⁾²⁾	1.710 $\pm$ 0.008 ¹⁾²⁾
	6.25	1.659 $\pm$ 0.003 ²⁾	1.918 $\pm$ 0.008 ¹⁾²⁾
5FEM 组	25	0.535 $\pm$ 0.003 ¹⁾²⁾	0.456 $\pm$ 0.003 ¹⁾²⁾
	12.5	0.909 $\pm$ 0.003 ¹⁾²⁾	0.858 $\pm$ 0.006 ¹⁾³⁾
	6.25	1.177 $\pm$ 0.010 ¹⁾²⁾	1.700 $\pm$ 0.014 ¹⁾²⁾

注: 与正常对照组相比, ¹⁾ $P<0.01$; 与5-FU组相比, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with 5-FU group, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.05$.

4 讨论

杨梅醇属于环状二芳基庚烷类化合物,在杨梅树皮中含量丰富(达到0.7%),杨梅醇具有多种生物学活性,包括逆转阿尔茨海默氏病^[8]、抑制一氧化氮的产生^[9]、预防肝损伤^[10]、抗雄激素活性^[11]、诱导肿瘤细胞凋亡^[12]等作用。

目前,对杨梅醇的结构修饰仍处于初步研究阶段,而对杨梅醇进行结构修饰用于抗肿瘤的研究仍是一片空白。本课题组通过结构修饰得到了25个杨梅醇衍生物,并获得了相关专利^[13]。课题组前期研究发现,不同剂量的杨梅醇、5-苄氧基杨梅醇、5FEM及5-对溴苄氧基杨梅醇($3.13\sim 100.0\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)对A549、HepG₂及HL-60细胞均有明显的抑制作用,并有很好的量效关系,其中5FEM对HL-60细胞抑制作用尤为明显,而对正常细胞HLF1的毒性较5-苄氧基杨梅醇及5-对溴苄氧基杨梅醇小,这为5FEM的进一步开发应用提供了依据。

课题组又运用RTCA技术对杨梅醇和5FEM的抗人肝癌HepG₂细胞活性进行了评价。RTCA技术是一种建立在阻抗基础上的瞬时细胞电感应连续记录系统^[14],与传统的MTT法、同位素掺入法等相比具有无标记、非损伤、自动、实时、连续检测的技术优势,可以全程动态记录处理之后细胞的效应变化,获得效应变化起始时间点,最大效应的时间点等多种信息,适用于细胞生物学研究的各个领域,尤其对肿瘤学研究具有其独特的优势,可应用于肿瘤细胞增殖、迁移、凋亡,以及免疫细胞对肿瘤细胞的杀伤等众多领域,从而进行抗肿瘤药物的筛选。

本研究结果显示,杨梅醇和5FEM对HepG₂细胞的增殖和迁移均有较好的抑制作用,且呈现较好的量效关系,相等剂量下,5FEM的作用优于杨梅醇,这可能与降低HepG₂细胞中caspase-9和Bcl-2基因和蛋白的表达水平,提高p21基因和蛋白以及Bax蛋白的表达水平相关^[1,6-7]。本研究结果为杨梅醇和5FEM抗肿瘤新药的进一步研发提供了实验依据,本课题组后续也将继续进行杨梅醇和5FEM抗肿瘤作用机制的研究。

REFERENCES

- [1] DAI G H, MENG G M, TONG Y L, et al. Growth-inhibiting and apoptosis-inducing activities of myricanol from the bark of *Mcarubra* in human lung adenocarcinoma A549 cells [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(11): 1490-1496.
- [2] DAI G H, TONG Y L, REN Z M, et al. Effect of extracts from bark of *Myrica rubra* on resisting human lung adenocarcinoma A549 cells *in vitro* [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*(中华中医药学刊), 2013, 31(1): 81-82.
- [3] TONG Y L, DAI G H, REN Z M, et al. Inhibition effect of Chloroform extracts from Yangmei(*Myrica Rubra*) bark on lewis lung cancer of mice [J]. *Chin J Tradit Med Sci Technol* (中国中医药科技), 2016, 23(1): 50-52.
- [4] MOCHIDA K. Anti-influenza virus activity of *Myrica rubra* leaf ethanol extract evaluated using Madino-Darby canine kidney(MDCK) cells [J]. *Biosci, Biotechnol, Biochem*, 2008, 72(11): 3018-3020.
- [5] CHEN X, TONG Y L, REN Z M, et al. Effect of myricanone on cell apoptosis and cell cycle in human lung adenocarcinoma A549 cells [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2015, 30(10): 3656-3658.
- [6] DAI G H, TONG Y L, REN Z M, et al. Inhibition effects of myricanol on A549, HL-60 and HepG2 proliferation [J]. *Chin J Tradit Med Sci Technol*(中国中医药科技), 2016, 23(1): 52-54.
- [7] CHEN X, TONG Y L, REN Z M, et al. Influence of myricanol on expression of Caspase-9, Bcl-2, p21 and Bax in human hepatoma HepG2 cells [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*(中华中医药杂志), 2015, 30(10): 3656-3658.
- [8] JONES J R, LEBAR M D, JINWAL U K, et al. The diarylheptanoid (+)-aR, 11S-myricanol and two flavons from bayberry(*Myrica cerifera*) destabilize the microtubule-associated protein tau [J]. *J Nat Prod*, 2011, 74(1): 38-44.
- [9] TAO J, MORIKAWA T, TOGUCHIDA I, et al. Inhibitors of nitric oxide production from the bark of *Myrica rubra*: structures of new biphenyl type diarylheptanoid glycosides and taraxerane type triterpene [J]. *Bioorg Med Chem*, 2002, 10(12): 4005-4012.
- [10] OHTA S, SAKURAI N, KAMOGAWA A, et al. Protective effects of the bark of *Myrica rubra* Sieb. et Zucc. on experimental liver injuries [J]. *Yakugaku Zasshi*, 1992, 112(4): 244-252.
- [11] MATSUDA H, YAMAZAKI M, MATSUO K, et al. Anti-androgenic activity of Myricae cortex-isolation of active constituents from bark of *Myrica rubra* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2001, 24(3): 259-263.
- [12] ZHANG J, YAMADA S, OGIHARA E, et al. Biological activities of triterpenoids and phenolic compounds from *Myrica cerifera* bark [J]. *Chem Biodiversit*, 2016, 13(11): 1601-1609.
- [13] DAI G H, LI Z H, TONG Y L, et al. Myricanol derivatives and their preparation methods and applications: China, 201510501517.3 [P]. 2017-06-27.
- [14] YAN G J, PEI Y F, ZHU Z H, et al. Research progress in application of real-time cell-based assay(RTCA) [J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2014, 49(3): 169-173.

收稿日期: 2017-07-24

(本文责编: 蔡珊珊)