

文章编号: 1674-7054(2015)02-0163-05

钩枝藤提取物的生物活性

蔡彩虹¹ 梅文莉¹ 王 辉¹ 董文化¹ 谭光宏² 戴好富¹(1. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所/农业部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室 /
海南省黎药资源天然产物研究与利用重点实验室 海南 海口 571101; 2. 海南医学院 海南省热带病
重点实验室 海南 海口 571101)

摘 要: 通过观察钩枝藤乙醇提取物治疗感染了伯氏疟原虫小鼠的感染率和存活率判断钩枝藤乙醇提取物的抗疟活性; 采用 MTT 法测定钩枝藤乙醇提取物体外细胞毒活性; 采用滤纸片琼脂扩散法测定钩枝藤乙醇提取物抗菌活性; 采用 Ellman 比色法测试钩枝藤乙醇提取物抗乙酰胆碱酯酶活性。结果表明, 该提取物能较好地抑制伯氏疟原虫的生长, 改善小鼠的存活状况; 对人白血病细胞 K562、胃癌细胞 SGC-7721、肝癌细胞 BEL-7402 均具有较好的抑制作用; 对人体病原菌和农业病原菌表现出较强的抑菌活性; 对乙酰胆碱酯酶表现出一定的抑制作用, 但不如阳性对照他克林。

关键词: 钩枝藤; 抗疟; 细胞毒活性; 抗菌; 抗乙酰胆碱酯酶

中图分类号: R 961

文献标志码: A

钩枝藤科(Ancistrocladaceae)植物是热带藤本植物,属钩枝藤属(*Ancistrocladus* Wall),该属共有20个种,在我国只有1种,即钩枝藤[*Ancistrocladus tectorius* (Lour.) Merr.]别名本蓬藤、本叶藤^[1]。钩枝藤在海南作为民间药主要有治疗疟疾、消炎止泻、行气和散结等功效^[2]。1974年,法国学者Foucher等^[3]从钩枝藤属植物*A. ealaensis*中分离得到3种萘基异喹啉类生物碱,分别是hamatine、ancistrocladinine和ancistroealaensine,从此,国内外学者对钩枝藤属植物化学成分和药理活性产生了浓厚兴趣,并且发现钩枝藤科植物具有多种生物活性。1994年,Boyd等^[4]发现从钩枝藤属植物*A. korupensis*中分离得到的萘基异喹啉生物碱具有抗HIV的活性; Alicia等^[5]报道,从钩枝藤属植物*A. congolensis*叶中得到的生物碱Ancistrocladinium B显示出了较好的抗利什曼原虫(*Leishmania major*)活性,可抑制利什曼原虫的生长; Bringmann等^[6]研究发现钩枝藤属植物*A. barteri*和*A. abbreviatus*的CH₂Cl₂提取物具有杀灭光滑扁卷螺的作用; Bringmann等^[7]发现从钩枝藤属植物*A. congolensis*叶中提取到的生物碱Dioncophylline A对草地夜蛾的幼虫具有毒杀作用; Sharma等^[8]认为钩枝藤属植物*A. heneanus*根和叶的乙醇提取物具有解痉作用。鉴于海南岛上的黎族人民常用钩枝藤的水提物治疗疟疾、寄生虫感染等,中国人民解放军187医院和广州市医药工业研究所发现钩枝藤的总生物碱对大白鼠W-256有抑制作用^[9],而乙酰胆碱酯酶抑制剂被广泛用于治疗阿尔茨海默病、运动失调等多种神经系统疾病^[10],有望从钩枝藤中找到具有抗乙酰胆碱酯酶作用的活性成分。为此,本研究中心对钩枝藤粗提物的生物活性进行研究,以期为进一步寻找钩枝藤的活性成分及药用植物钩枝藤的开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 钩枝藤[*Ancistrocladus tectorius* (Lour.) Merr.]枝条于2011年5月采于海南省昌江县,

收稿日期: 2015-01-16

基金项目: 2013年度公益性行业(农业)科研专项(201303117), 国家科技支撑计划课题(2013BAI1B04)

作者简介: 蔡彩虹(1987-),女,硕士, E-mail: caicaihong0606@126.com

通信作者: 戴好富(1974-),男,博士,研究员,研究方向: 天然产物化学, E-mail: daihaofu@itbb.org.cn

经中国热带农业科学院热带生物技术研究所代正福副研究员鉴定,凭证标本(No. TX 20110512) 存放于中国热带农业科学院热带生物技术研究所。

1.1.2 抗疟测试材料 抗氯喹伯氏疟原虫 Anka 株(*Plasmodium berghei* Anka) 来自海南医学院海南省热带病重点实验室; 健康昆明种小鼠(体质量 18 ~ 22 g) 购自海南省实验动物中心。

1.1.3 肿瘤细胞株 人胃癌细胞 SGC-7901、慢性髓原白血病细胞 K562 和人肝癌细胞 SEL-7402 均购于中科院上海细胞库。

1.1.4 人体病原菌 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC51650 由海南省药品检验所提供。

1.1.5 植物病原菌 烟草青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*) 由云南大学生物资源保护利用重点实验室莫明和教授提供。香蕉枯萎镰刀菌 4 号生理小种(*Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 4) ,西瓜枯萎镰刀菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. niveum) 棉花枯萎镰刀菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum) 由中国热带农业科学院热带生物技术研究所曾会才研究员提供。

1.1.6 抗乙酰胆碱酯酶活性测试材料 乙酰胆碱酯酶、碘化硫代乙酰胆碱、二硫代二硝基苯甲酸(DNTB) 、他克林均购自 Sigma 公司。

1.1.7 培养基 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA) : 马铃薯 200 g ,葡萄糖 20 g ,琼脂 20 g ,定容至 1 L; 牛肉膏蛋白胨琼脂培养基(NA) : 牛肉膏 3 g ,蛋白胨 10 g ,NaCl 5 g ,定容至 1 L ,pH7.4 ~ 7.6; 肿瘤细胞株采用 RPMI1640 完全培养基。

1.2 样品的提取 钩枝藤枝条(68.0 kg) 晒干后加工成粉末,然后用 95% 乙醇浸提 3 次,每次 7 d。所得滤液经真空减压浓缩至无醇味,得到乙醇提取物(4.6 kg) 。

1.3 方法

1.3.1 抗疟活性^[11-12] 选取体质量 18 ~ 22 g 的健康小鼠 20 只,每只小鼠腹腔接种约 2×10^7 个伯氏疟原虫,随机分为空白对照组和注射钩枝藤乙醇提取物的治疗组,每组 10 只。将钩枝藤乙醇提取物用生理盐水配制成浓度为 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混悬液,对小鼠进行腹腔注射,剂量为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,对照组小鼠给予同等剂量生理盐水。小鼠饲养于 24 °C 相对湿度 60% 的独立送风隔离笼具中,给喂标准鼠饲料,饮用自来水。小鼠感染疟原虫后第 2 天开始给药,连续治疗 5 d,每天取小鼠尾部静脉血做薄血涂片,姬氏染色后镜检,计算 1 000 个红细胞的疟原虫感染率。

1.3.2 细胞毒活性 将钩枝藤乙醇提取物用细胞培养基配制成 $5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.32, 0.16 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的样品溶液,同等质量浓度的紫杉醇溶液作为阳性对照。以 K562,SGC-7901 和 BEL-7402 细胞为指示瘤株,采用 MTT^[13] 法测定样品细胞毒体外活性。选择对数生长期的细胞,并将其制成单细胞悬浮液,于 96 孔板上按 $50\,000 \text{ 个} \cdot \text{L}^{-1}$ 接种每孔 90 μL ,SGC-7901 和 BEL-7402 培养 24 h 后加入配好的样品溶液 10 μL ,K562 不经过 24 h 培养可直接加样品 10 μL ; 接着连续培养 72 h 后取出加入 15 μL 用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 配制的浓度为 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MTT 溶液(pH7.4) ,37 °C 培养 4 h 后,弃上清液,每孔再加入 100 μL DMSO,于微量振荡器上振荡融解。在波长为 490 nm 下,用酶标仪测量各孔的吸光度(A) ,按公式计算抑制率和 IC_{50} 值。以样品浓度为横坐标,抑制率为纵坐标,利用 origin 软件拟合出抑制率的曲线图。样品活性结果以 IC_{50} (半数抑制浓度) 表示,当抑制率为 50 % 时的样品浓度即是细胞毒活性的 IC_{50} 值。

$$\text{生长抑制率} = \left(1 - \frac{\text{用药组平均 } A \text{ 值}}{\text{阴性对照组平均 } A \text{ 值}} \right) \times 100$$

1.3.3 抗菌活性 采用滤纸片法^[14] 测定钩枝藤乙醇提取物的抗菌活性,将配制好的琼脂培养基倒入平板中作为供试无菌平板,将供试菌株制成浓度为 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7 \text{ cfu} \cdot \text{L}^{-1}$ 的菌悬液,菌悬液用棉签蘸取涂布于供试无菌平板上,制成含菌平板。将提取物用氯仿配成浓度为 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液,取 25 μL 样品溶液滴加到直径为 6 mm 的灭菌滤纸上,待滤纸上的溶剂挥发后即可放置在含菌平板上(测抗金黄色葡萄球菌活性用硫酸卡那霉素作为阳性对照,测抗烟草青枯菌活性用硫酸链霉素作为阳性对照,其他病原菌以多菌灵作为阳性对照) ,放置 20 min 后,再放入培养箱 37 °C 下暗培养。24 h 后用游标卡尺测定其抑菌圈直径。

1.3.4 乙酰胆碱酯酶抑制活性 参照 Elman 方法^[15-16] 测定化合物抗乙酰胆碱酯酶活性。待测物用含 2% DMSO 的磷酸缓冲液配制成质量浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液。取 110 μL 磷酸缓冲液(pH8.0) ,10 μL 待测物和 40 μL 乙酰胆碱酯酶($0.02 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$) 于 96 孔板中,于 30 °C 下温育 30 min,加入 DTNB($2.48 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)

和碘化硫代乙酰胆碱($1.81\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)等体积混合液 $40\text{ }\mu\text{L}$,反应体系共 $200\text{ }\mu\text{L}$, 30 min 后,于 405 nm 处酶标仪进行检测。待测样品反应终浓度为 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,阳性对照为他克林,反应终浓度为 $0.08\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,阴性对照为DMSO,终浓度为 0.1% ,各处理3个重复。按照 $(E-S)/E\times 100\%$ 计算化合物对乙酰胆碱酯酶的抑制率(E 为阴性对照平均吸光值, S 为待测物的平均吸光值)。

2 结果与分析

2.1 抗疟活性 本实验以伯氏疟原虫感染的小鼠为动物模型,使用钩枝藤乙醇提取物进行治疗,通过小鼠存活率和红细胞感染率判断样品的抗疟活性。由图1可知,使用钩枝藤乙醇提取物进行治疗后,治疗组的疟鼠存活率比对照组有明显改善。由表1可知,治疗组疟原虫发育缓慢及感染率较低,在第5天,对照组的感染率达 43.42% ,而治疗组感染率为 17.02% ,通过 t 检验得出治疗组与对照组有显著差异($P<0.05$),说明钩枝藤乙醇提取物具有抗疟作用,对伯氏疟原虫在小鼠体内的发育有较好的抑制作用。

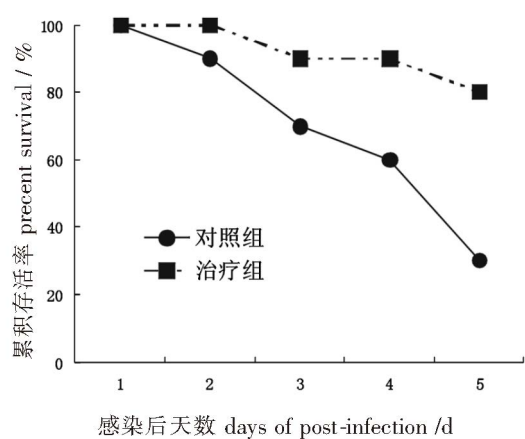


图1 对照组和治疗组小鼠存活率的比较
Fig. 1 Comparison of the percent survival of the mice between the control and the treatment with *Ancistrocladus tectorius*

表1 对照组和治疗组小鼠感染率的比较

分组 Group	感染率 Infection / %				
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
治疗组 Treatment	1.11 ± 0.22	2.48 ± 0.65	3.37 ± 0.73	5.63 ± 0.57	17.02 ± 0.55
对照组 Control	1.30 ± 0.24	10.18 ± 0.48	13.28 ± 0.46	29.74 ± 0.69	43.42 ± 0.86

注: 数据为平均值 ± 标准差, 为10次平行实验的结果

Note: $\bar{x} \pm s, n=10$

2.2 细胞毒活性 以MTT法测定钩枝藤乙醇提取物对人慢性髓原白血病细胞K562、胃癌细胞SGC-7721和人肝癌细胞BEL-7402的细胞毒活性结果见表2。钩枝藤乙醇提取物对这3株肿瘤细胞均有良好的抑制活性,与阳性对照紫杉醇的抑制活性相当。

表2 钩枝藤枝条的肿瘤细胞毒活性

Tab. 2 Cytotoxicities of the EtOH fraction of *Ancistrocladus tectorius*

样品 Sample	半抑制浓度 IC_{50} values / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		
	K562	SGC-7721	BEL-7402
钩枝藤乙醇提取物 EtOH extract of <i>A. tectorius</i>	6.84 ± 0.68	4.6 ± 0.56	4.9 ± 0.92
阳性对照紫杉醇 Taxol, Positive control	5.1 ± 0.82	3.2 ± 0.70	4.5 ± 0.54

注: 数据为平均值 ± 标准差, 为3次平行实验的结果

Note: $\bar{x} \pm s, n=3$

2.3 抗菌活性

2.3.1 抗人体病原菌活性 钩枝藤乙醇提取物对金黄色葡萄球菌的抑制活性测定结果: 钩枝藤乙醇提取物的抑菌圈直径为 $24.8\pm 1.06\text{ mm}$,阳性对照硫酸卡那霉素的抑菌圈直径为 $26.1\pm 1.12\text{ mm}$,说明钩枝藤乙醇提取物的抑菌作用与阳性对照相当。

2.3.2 抗农业病原菌活性 钩枝藤乙醇提取物对农业病原菌(香蕉枯萎镰刀菌、西瓜枯萎镰刀菌、棉花枯萎镰刀菌和烟草青枯菌)的拮抗活性的测定结果见表3。由表3可见,钩枝藤乙醇提取物对农业病原菌都有一定的抑菌活性。

表3 钩枝藤乙醇提取物抗农业病原菌活性

Tab.3 Activities the EtoH fraction of *Ancistrocladus tectorius* against agricultural pathogens

样品 Sample	抑菌圈直径 Inhibit diameters /mm			
	香蕉枯萎病 <i>F. oxysporum</i> f. sp. cubense race 4	西瓜枯萎病 <i>F. oxysporum</i> f. sp. niveum	棉花枯萎病 <i>F. oxysporum</i> f. sp. vasinfectum	烟草青枯病 <i>R. solanacearum</i>
钩枝藤乙醇提取物 EtoH extract of <i>A. tectorius</i>	10.75 ± 0.88	12.46 ± 0.06	8.93 ± 0.96	8.7 ± 0.32
阳性对照 Positive control	28.50 ± 0.32	26.82 ± 1.20	26.77 ± 0.64	11.4 ± 0.85

注: 数据为平均值 ± 标准差, 为3次平行实验的结果

Note: $\bar{x} \pm s$, $n=3$

2.4 抗乙酰胆碱酯酶活性 从表4可见,钩枝藤乙醇提取物对乙酰胆碱酯酶有一定的抑制作用,但不如他克林。

表4 钩枝藤乙醇提取物抗乙酰胆碱酯酶活性

Tab.4 AChE inhibitory activity (%) of the EtoH extract of *A. tectorius*

样品 Sample	乙酰胆碱酯酶抑制率/% Percentage of inhibition at 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
钩枝藤乙醇提取物 EtoH extract of <i>A. tectorius</i>	30.94 ± 0.05
他克林 ^a Tacrine	58.61 ± 0.13 ^b

注: 数据为平均值 ± 标准差, 为3次平行实验的结果; a 阳性对照 b 浓度为0.08 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

Note: $\bar{x} \pm s$, $n=3$; a Positive control, b concentration at 0.08 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

3 讨论

钩枝藤提取物的生物活性实验结果表明,钩枝藤具有较好的抗疟、抗肿瘤、抗人体病原菌、抗农业病原菌以及抑制乙酰胆碱酯酶活性的作用。迄今,疟疾仍是重要虫媒传染病之一,全球每年约2.5亿人感染疟疾,死于恶性疟疾的患者约250万人。随着耐氯喹恶性疟原虫株的不断出现,氯喹在恶性疟原虫的治疗中已停止使用^[11]。钩枝藤在海南岛民间一直被用于治疗疟疾,钩枝藤科植物的特征性化学成分是萘基异喹啉类生物碱,该类生物碱具有良好的抗疟作用。采用疟鼠体内治疗的方法测定钩枝藤抗疟活性的实验结果表明,钩枝藤乙醇粗提物能抑制恶性疟原虫在小鼠体内的生长发育,改善小鼠的生存环境;钩枝藤乙醇粗提物对慢性髓原白血病细胞 K562、人胃癌细胞 SGC-7721 和人肝癌细胞 BEL-7402 均表现出较强的抑制活性, IC_{50} 值与阳性对照的紫杉醇 IC_{50} 值相近,可见钩枝藤对这3株肿瘤细胞的抑制作用与紫杉醇的抑制作用相当,因此,对钩枝藤的化学成分进行系统研究有望能开发出抗肿瘤药物。通过体外生物活性筛选,发现钩枝藤乙醇粗提物对农业病原菌(棉花枯萎病、香蕉枯萎病、西瓜枯萎病、烟草青枯病)和人体病原菌(金黄色葡萄球菌)有一定的抑菌作用,尤其在抗金黄色葡萄球菌的作用上,其抑菌圈与阳性对照硫酸卡那霉素相当。钩枝藤乙醇提取物还对乙酰胆碱酯酶有一定的抑制作用,有望通过从钩枝藤中分离提取乙酰胆碱酯酶抑制剂为开发治疗神经退行性疾病药物提供科学依据。

参考文献:

- [1] 陈焕镛. 海南植物志(第一卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1964: 515-516.
- [2] 戴好富. 黎族药志(第二册) [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2008: 124-125.

- [3] FOUCHER J P, POUSSET J L, CAVE L, et al. L'ancistrocladonine et L'ancistroealaensine deux alcaloides nouveaux isles de L'Ancistrocladus ealaensis [J]. Phytochemistry, 1974, 13(7): 1253–1256.
- [4] BOY M R, HALLOCK Y F, CARDELLINA J H, et al. Anti-HIV michellamines from *Ancistrocladus korupensis* [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 1994, 37(12): 1740–1745.
- [5] ALICIA P S, FABER J H, GULDER T, et al. Activities of naphthylisoquinoline alkaloids and synthetic analogs against *Leishmania major* [J]. Antimicrobial agents and Chemotherapy, 2007, 51(1): 188–194.
- [6] BRINGMANN G, HOLENZ J, ASSI L, et al. Molluscicidal activity of naphthylisoquinoline alkaloids from *Triphyophyllum* and *Ancistrocladus speices* [J]. Planta Med, 1996, 62: 556–557.
- [7] BRINGMANN G, HOLENZ J, WIESEN B, et al. Dioncophylline A as a growth-retarding agent against the herbivorous insect *Spodoptera littoralis*: structure-activity relationships [J]. J Nat Prod, 1997, 60(4): 342–347.
- [8] SHARMA S C, SHUKLA Y N, TANDON J S. Alkaloids and terpenoids of *Ancistrocladus heyneanus*, *Sagittaria sagitifolia*, *Lyonia Formosa* and *Hedychium spicatum* [J]. Phytochemistry, 1975, 14: 578–579.
- [9] 陈政雄, 王保德, 秦国伟, 等. 钩枝藤中生物碱的分离和鉴定 [J]. 药学学报, 1981, 16(7): 519–523.
- [10] 楼影函, 查晓明, 张莉莉, 等. 来源于天然产物的乙酰胆碱酯酶抑制剂研究进展 [J]. 药学进展, 2012, 36(9): 385–393.
- [11] 赵灿熙, 雷颖, 吴艳, 等. 菊花乙醇提取物抗疟效应实验研究(一) [J]. 中华中医学杂志, 1997, 21(1): 26–27.
- [12] 许琴英, 唐卉, 曾锦芬, 等. 苦艾对伯氏疟原虫的抗疟实验研究 [J]. 中国热带医学, 2006, 6(10): 1782–1783.
- [13] MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. J. Immunol M., 1983, 65(1/2): 55–63.
- [14] 崔海滨, 梅文莉, 韩壮, 等. 海洋真菌 095407 的抗菌活性代谢产物的研究 [J]. 中国药物化学杂志, 2008, 18(2): 131–134.
- [15] ELLMAN G L, COURTNEY K D, ANDRES V J, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity [J]. Biochem Pharmacol, 1961, 7(2): 88–95.
- [16] YANG D L, WANG H, GUO Z K, et al. Fragrant agarofuran and eremophilane sesquiterpenes in agarwood 'Qi-Nan' from *Aquilaria sinensis* [J]. Phytochemistry Letters, 2014, 8: 121–125.

Biological Activity of the Extracts from *Ancistrocladus tectorius*

CAI Caihong, MEI Wenli, WANG Hui, DONG Wenhua, TAN Guanghong, DAI Haofu

- (1. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology / Ministry of Agriculture Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops / Hainan Key Laboratory for Research and Development of Natural Products from Li Folk Medicine, CATAS, Haikou 571101, China;
2. Key Laboratory for Tropical Diseases, Hainan Medical College, Haikou 571101, China)

Abstract: *Ancistrocladus tectorius* was extracted with ethyl alcohol (EtOH), and the active constituents of the EtOH and their biological activities against malaria were determined. Mice infected with *Plasmodium berghei* were treated with the EtOH extract, and its cytotoxic activity was assayed by the MTT method. The antimicrobial activities of the EtOH extract were tested by the paper disk diffusion method, and its acetylcholinesterase inhibitory activity was detected by using the Ellman's colorimetric method. The results indicated that the EtOH extract of *A. tectorius* inhibited the growth of malaria parasites and improved the survival rate of the mice infected with *P. berghei*. It also possessed inhibitory activity against K562, SGC-7721 and BEL-7402 cell lines, as well as human and agricultural pathogens. Moreover, it showed lower inhibitory activity against acetylcholinesterase than Tacrine.

Key words: *Ancistrocladus tectorius*; anti-malarial; cytotoxic activity; antibacterial; AChE inhibitory activity