

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.03.011

广东省凤尾蕨属植物抗白血病药物研究

曾德贵¹, 冯东辉²

(1. 广东省深圳市慢性病防治中心, 广东 深圳 518020; 2. 中国科学院大学深圳医院, 广东 深圳 518107)

摘要:目的 探讨广东地区5种常见凤尾蕨属植物半边旗、剑叶凤尾蕨、刺齿凤尾蕨、蜈蚣草和井栏边草对白血病细胞生长的抑制作用。方法 用乙醇经索氏提取器分别提取5种植物的有效成分,以二甲基亚砜分别配制供试品溶液;将供试品溶液加入对数生长期的人早幼粒白血病 HL-60 细胞株(简称 HL-60 细胞)和人慢性髓样白血病 K562 细胞株(简称 K562 细胞)中,采用台盼蓝染色法染色,统计细胞存活率。结果 半边旗、剑叶凤尾蕨、刺齿凤尾蕨、蜈蚣草和井栏边草对 HL-60 细胞和 K562 细胞的生长均有抑制作用,其中半边旗和刺齿凤尾蕨对 HL-60 细胞生长的抑制作用较强,4.0 g/L 半边旗和刺齿凤尾蕨乙醇提取物中,HL-60 细胞的存活率均为 0;半边旗和蜈蚣草对 K562 细胞生长的抑制作用较强,4.0 g/L 半边旗和蜈蚣草乙醇提取物中,K562 细胞的存活率分别为 0 和 7.70%。结论 5 种凤尾蕨属植物对 HL-60 细胞的生长抑制作用强于 K562 细胞;除半边旗外,刺齿凤尾蕨和蜈蚣草可能是潜在的抗白血病药物。

关键词:半边旗;剑叶凤尾蕨;刺齿凤尾蕨;蜈蚣草;井栏边草;人早幼粒白血病 HL-60 细胞株;人慢性髓样白血病 K562 细胞株

中图分类号:R932;R285.5

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)03-0041-03

Anti-Leukemia Effect of *Pteris* Plants from Guangdong Province

ZENG Degui¹, FENG Donghui²

(1. Shenzhen Center for Chronic Disease Prevention and Control, Shenzhen, Guangdong, China 518020; 2. Shenzhen Hospital of University of Chinese Academy of Sciences, Shenzhen, Guangdong, China 518107)

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effects of five common *Pteris* plants including *Pteris semipinnata*, *Pteris ensiformis*, *Pteris dispar*, *Pteris vittata* and *Pteris multifida* from Guangdong Province on the growth of leukemia cell lines. **Methods** The active ingredients from five *Pteris* plants were extracted with ethanol by the Soxhlet's extractor, and the test solution was prepared with dimethyl sulfoxide (DMSO). The test solution was added to the human promyelocytic leukemia HL-60 cell line (hereinafter referred to as HL-60 cells) and human chronic myeloid leukemia K562 cell line (hereinafter referred to as K562 cells) during

第一作者:曾德贵,男,大学本科,副主任药师,研究方向为医院药学,(电子信箱)zengdegui2011@163.com。

- 疾病的研究进展[J]. 解剖科学进展,2018,24(4):424-427.
- [19] 郑 铨,程金科. 蛋白质 SUMO 化修饰与疾病[J]. 生命科学, 2018,30(4):473-479.
- [20] 张东威,塔 娜,呼布沁,等. VEGF 及其受体表达与缺血性脑卒中的关系及研究进展[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版),2017,32(6):547-549.
- [21] 朱慧渊,韦克克,张 琛,等. 基于情志致病理论探讨脑卒中神经-内分泌-免疫网络调控机制[J]. 陕西中医药大学学报,2019,42(5):28-30.
- [22] 吴 坚. 中医治疗出血性脑卒中用药规律研究[D]. 南京:南京中医药大学,2016.
- [23] HEURTEAUX C, LAIGLE C, BLONDEAU N, et al. Alpha-linolenic acid and riluzole treatment confer cerebral protection and improve survival after focal brain ischemia[J]. Neuroscience, 2006, 137(1):241-251.
- [24] 颜俊杰,黄静雯,金陆飞,等. 儿茶素应用于心血管疾病的研究进展[J]. 四川生理科学杂志,2018,40(4):316-318.
- [25] 周露露,高 原,牛知慧,等. 茶叶中儿茶素的药理作用及其研究进展[J]. 辽宁化工,2018,47(4):316-318.
- [26] 刘 旭,程艳芹,崔晓博,等. 中药川芎心肌缺血保护作用的谱效学研究[J]. 中国药业,2016,25(15):9-12.
- [27] 刘亚鹭,徐士欣,张军平,等. 川芎-当归药对有效成分在缺血性脑卒中应用的研究进展[J]. 华西药学杂志,2018, 33(6):550-553.
- [28] THUSHARA RM, HEMSHEKHAR M, SANTHOSH MS, et al. Crocin, a dietary additive protects platelets from oxidative stress-induced apoptosis and inhibits platelet aggregation[J]. Mol Cell Biochem, 2013, 373(1/2):73-83.
- [29] 何新康,叶夷露,潘蓓蓓,等. 西红花素对大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护作用及神经行为学影响[J]. 中国临床药理学与治疗学,2016, 21(3):282-286.
- [30] 王 艳. 双孔钾通道 TREK-1 在急性脑缺血中的作用研究[D]. 兰州:兰州大学,2014.
- [31] 樊启猛,杨岩涛,肖美凤,等. 基于分子对接技术的补阳还五汤成分与缺血性脑卒中靶点的相互作用研究[J]. 中草药, 2019,50(17):4200-4208.
- [32] SUN JY, CAI SX, YAN N, et al. Docking and 3D-QSAR studies of influenza neuraminidase inhibitors using three dimensional holographic vector of atomic interaction field analysis[J]. Europ J Med Chem, 2010,45(3):1008-1014.
- [33] DILLER DJ, MERZ KM JR. High throughput docking for library design and library prioritization[J]. Proteins, 2001,43(2): 113-124.
- [34] 翁 曼. 基于关联规则的近十五年卒中后抑郁中医用药规律研究[D]. 济南:山东中医药大学,2017.
- (收稿日期:2021-03-24;修回日期:2021-07-14)

the logarithmic growth stage, and the cell survival rate was counted by the trypan blue staining. **Results** *Pteris semipinnata*, *Pteris ensiformis*, *Pteris dispar*, *Pteris vittata* and *Pteris multifida* could inhibit the growth of HL-60 cells and K562 cells. Among them, *Pteris semipinnata* and *Pteris dispar* showed the stronger inhibition on the growth of HL-60 cells, and the survival rate of HL-60 cells was zero in 4.0 g/L of ethanol extracts of *Pteris semipinnata* and *Pteris dispar*. *Pteris semipinnata* and *Pteris vittata* showed the stronger inhibition on the growth of K562 cells, and the survival rate of K562 cells was zero in 4.0 g/L of ethanol extracts of *Pteris semipinnata* and *Pteris vittata*. **Conclusion** The inhibitory effect of five *Pteris* plants on the growth of HL-60 cells is stronger than that on the growth of K562 cells. In addition to the *Pteris semipinnata*, *Pteris dispar* and *Pteris vittata* may be potential anti-leukemia herbs.

Key words: *Pteris semipinnata*; *Pteris ensiformis*; *Pteris dispar*; *Pteris vittata*; *Pteris multifida*; human promyelocytic leukemia HL-60 cell line; human chronic myeloid leukemia K562 cell line

凤尾蕨属植物为传统中药材,目前已发现300余种该属植物,我国约有66种,有24种可入药^[1]。半边旗 *Pteris semipinnata* L、剑叶凤尾蕨 *Pteris ensiformis* Burm、刺齿凤尾蕨 *Pteris dispar* kze、蜈蚣草 *Pteris vittata* 和井栏边草 *Pteris multifida* 是广东地区常见的凤尾蕨属植物,具有清热利湿、利尿、消食、杀虫等功效,民间常用于治疗疳疮、湿疹、蛇虫咬伤等^[2]。半边旗的水提物和醇提物抗肿瘤作用好,且无明显毒性^[3],其作为民间常用中草药被收载为广东地区地方习用药材标准品种,其余4种药用植物的抗肿瘤研究在国内外均少见报道。为了充分利用广东地区的中草药资源,本研究中探讨了这5种药物对人早幼粒白血病 HL-60 细胞株(简称 HL-60 细胞)和人慢性髓样白血病 K562 细胞株(简称 K562 细胞)的生长抑制作用,以开发新的抗白血病药物。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与细胞

仪器:371 型 CO₂ 孵箱、ST 40R 型超速离心机(美国 Thermo Fisher 公司);ME104E 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司,精度为 0.001 g);Malab WT100-2 型水浴箱(杭州米欧仪器有限公司);索氏提取器(北玻股份有限公司,规格为 50 mL);37XB 型倒置生物显微镜(上海豫光仪器有限公司)。

试剂:半边旗、剑叶凤尾蕨、刺齿凤尾蕨、蜈蚣草均采自广东湛江湖光岩地区,井栏边草采自广东省广州市郊,经广东省中药研究所曾庆钱主任中药师鉴定均为正品;RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司,批号为 1737734);新生牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司,批号为 20190202);甲醇、乙醇、二甲基亚砜均为分析纯。

细胞:HL-60 细胞(上海生物化学与细胞生物学研究所);K562 细胞(广州市肿瘤研究所)。

1.2 方法

细胞培养:将 HL-60 细胞和 K562 细胞置含 10% 灭活小牛血清、 1×10^5 U/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 RPMI-1640 完全培养基中,置温度为 37℃、饱和和相

对湿度为 0.05% 的 CO₂ 孵箱中培养。在细胞数达 1×10^9 个/L 前用完全培养基重新悬浮,并以 1:3 细胞数的比例传代,取对数生长期的细胞进行后续试验。

供试品溶液制备:取半边旗、剑叶凤尾蕨、刺齿凤尾蕨、蜈蚣草、井栏边草各 2 g,剪碎,过 80 目筛,制成粗粉,分别置索氏提取器中,加入 95% 乙醇适量,回流提取 6 h,提取液用甲醇定容至 50 mL 容量瓶中;并以 6 000 r/min 的速率离心 15 min,分别准确量取 10 mL,50℃ 水浴至甲醇蒸干,加入二甲基亚砜,配制成质量浓度分别为 0.5、1.0、2.0、4.0 g/L 的系列供试品溶液。

细胞生长抑制试验:取对数生长期的 HL-60 细胞和 K562 细胞,用完全培养基稀释至 $(1.0 \sim 2.0) \times 10^8$ 个/L,分别装入 24 孔培养板,每孔 1 mL,每孔细胞分别加入 1 μL 不同质量浓度的供试品溶液,另吸取 1 μL 二甲基亚砜作为对照(供试品质量浓度为 0 g/L),做 3~6 个平行孔,将细胞置温度为 37℃、饱和相对湿度为 0.05% 的 CO₂ 孵箱中培养 24 h,分别取出,用台盼蓝染色,3 min 内用计数板统计活细胞数和死细胞数,采用 37XB 型倒置生物显微镜观察,死细胞显淡蓝色;活细胞拒染,颜色无明显变化。以公式[细胞存活率(%) = 活细胞数 / 细胞总数 × 100%]计算细胞存活率。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 21.0 统计学软件分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,组间比较行 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对 K562 细胞生长的抑制

由表 1 可知,5 种凤尾蕨属植物对 K562 细胞的生长均有抑制作用;半边旗对 K562 细胞生长的抑制作用最强,其次为蜈蚣草。

2.2 对 HL-60 细胞生长的抑制

由表 2 可知,5 种凤尾蕨属植物对 HL-60 细胞的生长均有抑制作用;半边旗和刺齿凤尾蕨对 HL-60 细胞生长的抑制作用较强,试验浓度范围内两者的作用差异不显著,而剑叶凤尾蕨和蜈蚣草的抑制作用较弱。

表1 5种凤尾蕨属植物对K562细胞生长的抑制作用比较

Tab. 1 Comparison of inhibitory effects of five *Pteris* plants on the growth of K562 cells

质量浓度 (g/L)	活细胞数($\bar{X} \pm s, \times 10^4$)					细胞存活率(%)				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
0	17.31 ± 0.92	17.34 ± 0.92	17.30 ± 0.91	17.33 ± 0.94	17.23 ± 0.90					
0.5	17.25 ± 1.61	14.72 ± 1.70	16.62 ± 1.61	14.21 ± 1.60	12.62 ± 1.65*	100.00	85.00	96.05	85.12	60.71
1.0	11.93 ± 1.21*	11.02 ± 1.24*	14.12 ± 1.21*	11.52 ± 1.24*	7.21 ± 1.22*	68.23	74.02	81.52	66.53	37.10
2.0	8.90 ± 0.81*	9.26 ± 0.81*	11.32 ± 0.82*	7.72 ± 0.82*	1.44 ± 0.81*	51.42	55.51	65.40	45.12	13.20
4.0	6.33 ± 1.61*	4.32 ± 0.61*	10.33 ± 0.64*	1.32 ± 0.64*	-	36.45	24.32	59.21	7.70	0

注:A为剑叶凤尾蕨,B为刺齿凤尾蕨,C为井栏边草,D为蜈蚣草,E为半边旗;-为未检测到;与0 g/L比较,* $P < 0.05$ 。表2同。

Note:A is *Pteris ensiformis*,B is *Pteris dispar*,C is *Pteris multifida*,D is *Pteris vittata*,and E is *Pteris semipinnata*;- indicates that living cells was not detected;Compared with those of 0 g/L,* $P < 0.05$ (for Tab. 1-2).

表2 5种凤尾蕨属植物对HL-60细胞生长的抑制作用比较

Tab. 2 Comparison of inhibitory effects of five *Pteris* plants on the growth of HL-60 cells

质量浓度 (g/L)	活细胞数($\bar{X} \pm s, \times 10^4$)					细胞存活率(%)				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
0	11.72 ± 0.81	11.74 ± 0.80	11.72 ± 0.84	11.72 ± 0.81	11.72 ± 0.81					
0.5	9.42 ± 0.54	6.01 ± 0.92*	10.21 ± 1.63	8.72 ± 1.03*	5.23 ± 0.72*	80.52	51.30	88.00	74.12	44.90
1.0	8.52 ± 1.45*	1.23 ± 0.54*	7.42 ± 0.93*	8.23 ± 1.72*	1.11 ± 0.33*	72.90	10.41	63.41	70.50	9.61
2.0	4.60 ± 1.23*	0.23 ± 0.10*	0.31 ± 0.10*	5.03 ± 1.21*	-	39.34	2.10	2.80	42.70	0
4.0	1.61 ± 0.24*	-	-	1.52 ± 0.24*	-	13.70	0	0	13.21	0

3 讨论

半边旗中二萜类有效成分 pterisolic acid G(PAG)可提高 Bax/Bcl-2 基因和蛋白质的比值,从而诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡^[4];5F(11 α -羟基-15-氧-16-烯-贝壳杉烷-19-酸)可有效减少酵母多糖诱导的腹膜炎小鼠血清中一氧化氮、肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素6、白细胞介素10、单核细胞趋化蛋白1的含量,从而减轻炎症反应^[5]。半边旗主要通过抑制肿瘤细胞的DNA与RNA和蛋白质合成^[6-7],阻断肿瘤细胞的细胞周期^[8],起到杀伤肿瘤细胞、抑制肿瘤细胞生长的作用。

药用植物亲缘学研究结果表明,亲缘关系近的植物含有结构相似的化学成分,结构相似化学成分的生理活性多相似^[9],根据该原理从凤尾蕨属其他种类植物中寻找具有更强抗肿瘤活性的对映贝壳杉烷型二萜类药物。本研究结果表明,与半边旗同属的凤尾蕨属植物剑叶凤尾蕨、刺齿凤尾蕨、蜈蚣草和井栏边草也具有抗白血病作用,但半边旗和刺齿凤尾蕨对HL-60细胞的抑制作用较强,4.0 g/L半边旗和刺齿凤尾蕨乙醇提取物中,HL-60细胞的存活率均为0;半边旗和蜈蚣草对K562细胞的抑制作用较强,4.0 g/L半边旗和蜈蚣草乙醇提取物中,K562细胞的存活率分别为0和7.70%。

综上所述,5种凤尾蕨属植物均可抑制HL-60细胞和K562细胞的生长,但对HL-60细胞的生长抑制

作用强于K562细胞;除半边旗外,刺齿凤尾蕨和蜈蚣草可能是潜在的抗白血病药物。

参考文献

[1] 管玉格,胡文忠,石玉生,等. 凤尾蕨属植物中萜类成分及其生物活性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(3):219-227.

[2] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴(第一册)[M]. 北京:科学出版社,2016:148-152.

[3] 叶华,梁念慈,郑学宝. 半边旗有效成分5F抗肿瘤作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2014,26(12):2082-2087.

[4] 张森旺,卢晓芬,何晓虹,等. 半边旗二萜类成分PAG通过ROS诱导的线粒体凋亡克服肝癌多药耐药[J]. 广东医学院学报,2016,4(34):365-369.

[5] 叶华,龚先玲,李立,等. 半边旗5F对腹膜炎小鼠血清NO和细胞因子的影响[J]. 药学研究,2014,12(33):683-685.

[6] 杨斌,刘序森,袁泉恒. 半边旗中二萜类化合物5F诱导人胰腺癌细胞凋亡机制的探讨[J]. 中华中医药杂志,2010,11(3):355-358.

[7] 龚先玲,陈志红,梁念慈,等. 半边旗中二萜类化合物5F葡萄糖苷的分离鉴定及其抗肿瘤作用[J]. 中成药,2010,32(2):257-260.

[8] 何承伟,梁念慈,莫丽儿,等. 半边旗中抗肿瘤有效成分6F对HL-60细胞周期的影响及体外增效作用[J]. 癌症,1998,17(3):191-194.

[9] 汤国星,丹阳. 药用植物亲缘学的创建——肖培根院士访谈录[J]. 科学文化评论,2016,13(6):79-91.

(收稿日期:2021-02-23;修回日期:2021-08-17)