

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.24.010

大棚栽培和仿野生栽培铁皮石斛正丁醇提取物体外生物活性比较*

廖 娴¹, 梁芷韵¹, 胡 莉², 黄月纯¹, 杨丽娥^{1△}

(1. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学第一临床医学院, 广东 广州 510006)

摘要:目的 比较大棚栽培和仿野生栽培来源的铁皮石斛正丁醇提取物体外生物活性。方法 采用 ABTS 自由基清除法和铁离子还原/抗氧化能力(FRAP)法检测提取物的体外抗氧化活性;采用 CCK-8 法检测大鼠心肌细胞 H9c2 的活力,评价提取物的体外抗衰老作用;检测肝癌细胞 HepG2 活力,评价提取物的体外抗肿瘤作用,检测巨噬细胞 RAW264.7 释放一氧化氮(NO)水平,评价提取物的体外免疫调节作用。结果 在质量浓度分别为 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/mL 时,2 种提取物的 ABTS 自由基清除能力和 FRAP 总抗氧化能力相当($P > 0.05$)。在质量浓度分别为 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 及 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$ 时,2 种提取物对 t-BHP 诱导 H9c2 细胞衰老的防护作用及对 HepG2 细胞增殖的抑制作用相当($P > 0.05$);在质量浓度分别为 100 $\mu\text{g/mL}$ 和 200 $\mu\text{g/mL}$ 时,仿野生栽培来源提取物对 RAW264.7 细胞 NO 释放的促进作用显著强于大棚栽培来源提取物($P < 0.05$)。结论 2 种来源的正丁醇提取物在体外抗氧化、抗衰老和抗肿瘤方面的活性相当;在免疫调节方面,仿野生栽培来源提取物优于大棚栽培来源提取物。

关键词:铁皮石斛;大棚栽培;仿野生栽培;正丁醇提取物;体外生物活性

中图分类号:R932;R285 文献标志码:A 文章编号:1006-4931(2022)24-0043-04

Comparison of *in Vitro* Bioactivity of *n*-Butanol Extract from *Dendrobium Officinale* Cultivated in Greenhouse Condition and Imitating Wild Condition

LIAO Xian¹, LIANG Zhiyun¹, HU Li², HUANG Yuechun¹, YANG Li'e¹

(1. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, China 510405; 2. The First Clinical School of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, China 510006)

Abstract: Objective To compare the *in vitro* bioactivity of *n*-butanol extract from *Dendrobium officinale* cultivated in greenhouse

* 基金项目:广东省中医药局科研项目[20202060]。

第一作者:廖娴,女,硕士研究生,主管中药师,研究方向为中药质量标准及活性成分,(电子信箱)liao_xian89@163.com。

△通信作者:杨丽娥,女,硕士研究生,主管中药师,研究方向为中药质量标准研究、指纹图谱分析及活性成分,(电子信箱)254598235@qq.com。

肉萎缩情况,改善因肌肉萎缩带来的体质量增长缓慢或降低的影响。

综上所述,本研究中所建方法结果准确、重复性好,可用于五色培元固本方的质量评价。五色培元固本方能有效改善由CKD引起的PEW并发症。本研究确定了大鼠CKD-PEW模型的可行性,并为后续深入开展五色培元固本方的药效物质基础研究奠定了一定基础。

参考文献

- [1] 邓 聪,魏连波,汪东涛,等.慢性肾衰竭营养不良大鼠骨骼肌细胞凋亡及中药的干预实验[J].中华中医药学刊,2018,36(1):53-56.
- [2] LYDIA N, COLLINS A, JOEL O, et al. Prevalence and associated factors of protein-energy wasting among patients with chronic kidney disease at Mulago hospital, Kampala-Uganda: a cross-sectional study[J]. BMC Nephrology, 2018, 19(1): 139.
- [3] PABLO M, BELÉN V, MOLINA MD, et al. The effect of high-volume online haemodiafiltration on nutritional status and body composition: the ProtEin Stores prEservaTion (PESET) study[J]. Nephrology Dialysis Transplantation, 2018, 33(7): 1223-1235.
- [4] 张莉薇,盛梅笑.慢性肾脏病蛋白质-能量消耗的中医研究进展[J].浙江中医药大学学报,2017,41(3):257-261.
- [5] 胡 蓉,王明清,魏连波,等.人参养荣汤对慢性肾衰竭大鼠骨骼肌萎缩的影响[J].中国中西医结合杂志,2020,40(11):1360-1366.
- [6] 郑敏麟,骆丹岚,阮诗玮.益肾降浊冲剂对慢性肾功能衰竭肾脏的保护作用及其对肾脏自由基、肾小管 Caspase-3 和 Caspase-9 表达的影响[J].中华中医药杂志,2019,34(8):3460-3464.
- [7] 李罗德,邹 会,晏子友,等.肾衰方治疗慢性肾衰竭患者营养不良临床观察[J].湖北中医杂志,2019,41(2):9-11.
- [8] 张 琦,简聪聪,姚大红,等.慢性肾病药物研发进展[J].中草药,2021,52(17):5120-5131.
- [9] 晏子友,胡良伟,沈金峰,等.肾衰方对维持性血液透析的临床疗效分析[J].中华中医药学刊,2021,39(6):14-17.
- [10] 沈金峰,胡 芳,黄 伟,等.健脾益肾解毒法对慢性肾脏病患者瘦素、CRP 的影响[J].中药药理与临床,2019,35(3):165-168.

(收稿日期:2022-03-11;修回日期:2022-07-19)

condition and imitating wild condition. **Methods** ABTS free radical scavenging method and iron ion reduction / antioxidant capacity (FRAP) method were used to detect the antioxidant activity of the extract *in vitro*. The activity of rat cardiomyocytes (H9c2 cells) was detected by CCK - 8 method to evaluate the anti - aging effect of the extract *in vitro*, and the activity of HepG2 cells was detected by CCK - 8 method to evaluate the anti - tumor effect of the extract *in vitro*. The level of nitric oxide (NO) released by RAW264.7 macrophages was detected to evaluate the immunoregulatory effect of the extract *in vitro*. **Results** The ABTS radical scavenging capacity of the two extracts was equivalent to the total antioxidant capacity of FRAP at the mass concentration of 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg / mL ($P > 0.05$). The protective effect of the two extracts at the mass concentrations of 25, 50, 100 and 200 $\mu\text{g} / \text{mL}$ on the senescence of H9C2 cells induced by t - BHP and the inhibitory effect on the proliferation of HepG2 cells were similar to those of the two extracts at the mass concentrations of 50, 100, 200 and 400 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ($P > 0.05$). At the mass concentrations of 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and 200 $\mu\text{g} / \text{mL}$, the effect of extracts from the imitating wild condition on NO release in RAW264.7 macrophages was significantly stronger than that of extracts from the greenhouse condition ($P < 0.05$). **Conclusion** The two *n* - butanol extracts have similar antioxidant, anti - aging and anti - tumor activities *in vitro*. In terms of immune regulation, the potency of extracts from imitating wild condition was better than that from greenhouse cultivation.

Key words: *Dendrobium officinale*; cultivated in greenhouse condition; cultivated in imitating wild condition; *n* - butanol extract; *in vitro* bioactivity

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)为兰科石斛属多年生草本植物^[1],具有益胃生津、滋阴清热功效,常用于热病伤津、口干烦渴、病后虚热不退等病症^[2]。由于其生长条件苛刻,自然产量极少,加之长期过度采挖,导致野生资源濒临绝种^[3]。为解决野生铁皮石斛资源短缺问题,规模化铁皮石斛大棚栽培、人工仿野生栽培等方式作为资源可持续开发利用的新模式在国内不断发展成熟^[4]。铁皮石斛栽培于浙江、云南、广西、广东、福建、贵州、四川、江西等地,但由于产地和栽培技术的不同,导致各地药材品质差异较大。研究发现,铁皮石斛最主要活性成分为多糖类成分,其在抗氧化、抗肿瘤、提高免疫力、保肝和保护胃肠等方面具有明显的药理作用^[4-5]。目前,对大棚栽培和仿野生栽培铁皮石斛的研究侧重于其化学成分的组成和含量分析,对不同栽培方式的生物活性研究则较少。因此,本研究中评价了大棚栽培和仿野生栽培两种栽培方式下的铁皮石斛正丁醇提取物体外抗氧化、抗衰老、免疫调节和抗肿瘤方面的生物活性,为后期其栽培方式的选择提供理论参考。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与细胞

仪器:CPA225D型分析天平(德国Sartorius公司);5424R型高速离心机(德国Eppendorf公司);OptiMair™型超净工作台(新加坡Esco公司);DM2500型荧光倒置显微镜(德国Leica公司);UFE500型烘箱(德国Memmert公司);MPR - 440F型低温冰箱(日本Panasonic公司);Epoch型全波长酶标仪(美国BioTek公司);Forma 310型CO₂恒温培养箱(美国Thermo公司);Vi - CELL XR型细胞计数仪(美国Beckman公司);AI 800型超灵敏多功能成像仪(美国GE公司);SBS40型恒温水浴摇床(英国Stuart公司)。

试剂:DMEM培养基(批号为11965118)、RPMI -

1640培养基(批号为11875119)、胎牛血清(批号为10100147)、0.25%胰蛋白酶(批号为25200056)、青霉素 - 链霉素(批号为15140122),均购自美国Gibco公司;牛血清白蛋白(BSA,批号为A5611)、脂多糖(LPS,批号为L4391)、磷酸(批号为438081)、磺胺(批号为1117990100)、维生素C(VC,批号为PHR1008)、维生素E(VE,批号为47783)、ABTS(批号为11557)、氯化三苯四氮唑(TPTZ,批号为T1253)、总抗氧化能力试剂盒(FRAP法,批号为MAK369)、三氯化铁(FeCl₃,批号为451649)、硫酸亚铁七水合物(FeSO₄·7H₂O,批号为12354)、叔丁基过氧化氢(t - BHP,批号为458139)、5 - 氟尿嘧啶(5 - FU,批号为343922),均购自美国Sigma公司;一氧化氮(NO)含量测定试剂盒(批号为S0021S)、CCK - 8测定试剂盒(批号为C0042)、磷酸盐缓冲液(PBS,批号为C0221A)、双蒸水(ddH₂O,批号为ST876),均购自上海碧云天公司;硫酸、苯酚、无水乙醇均为分析纯。大棚栽培铁皮石斛和仿野生栽培铁皮石斛,经广州中医药大学第一附属医院黄月纯主任中药师鉴定为铁皮石斛*Dendrobium officinale* Kimura et Migo的茎。

细胞:大鼠心肌细胞H9c2、巨噬细胞RAW264.7、人肺癌细胞HepG2,均购自中国广州吉妮欧生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 提取液制备

分别称取仿野生和大棚栽培铁皮石斛50.0 g,加70%乙醇800 mL回流提取2次,每次1 h,合并滤液;挥去乙醇液,水液用正丁醇提取2次,每次150 mL,合并滤液,挥干,即得正丁醇提取物。取适量,精密称定,溶于DMEM培养基中制成质量浓度为4 mg / mL的提取物母液,经0.22 μm 滤膜滤过,取续滤液,即得。后续试验以DMEM培养基稀释至所需质量浓度。

1.2.2 抗氧化活性检测

ABTS 自由基清除能力^[6]:移取质量浓度为 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/mL 的提取液各 0.1 mL, 置试管中, 分别加 3.9 mL ABTS 工作液, 涡旋混合 10 s, 室温避光条件下反应 20 min, 以酶标仪测定 730 nm 波长处的吸光度(OD)值。以水溶性维生素 C(Trolox)为参照物绘制标准曲线, 提取液对 ABTS 自由基的清除效果以 Trolox 等效抗氧化能力(TEAC)值表示。分别以 ddH₂O 和 VC(终质量浓度均为 0.2 mg/mL)为阴性对照和阳性对照。

FRAP 总抗氧化能力^[6]:移取质量浓度为 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/mL 的提取液各 0.1 mL, 置试管中, 分别加新配的 FRAP 工作液 0.9 mL, 涡旋混合 10 s, 37 °C 避光条件下反应 2 h, 以酶标仪测定 590 nm 波长处的 OD 值。以 FeSO₄ 绘制标准曲线, 并将 OD 值转化为对应的 FRAP 值。分别以 ddH₂O 和 VC(终质量浓度均为 0.2 mg/mL)为阴性对照和阳性对照。

1.2.3 对 H9c2 细胞衰老的保护作用

采用 CCK-8 法^[7]。取对数生长期 H9c2 细胞适量, 用 DMEM 培养基配成 1 × 10⁵ / mL 的细胞混悬液, 以每孔 100 μL 接种于 96 孔板。细胞贴壁 24 h 后, 吸出培养基, 加入终质量浓度分别为 25, 50, 100, 200 μg/mL 的提取液, 孵育 2 h, 吸出提取液; 加入 100 μL t-BHP (200 μmol/L) 溶液, 处理 2 h, 吸出溶液; 加入新鲜 DMEM 培养基, 继续孵育 24 h。以酶标仪测定 450 nm 波长处的 OD 值, 并计算 H9c2 细胞存活率。分别以 PBS 和 VC(终质量浓度均为 0.5 mg/mL)为阴性对照和阳性对照。

1.2.4 对巨噬细胞 RAW264.7 的免疫调节作用

取对数生长期的 RAW264.7 细胞适量, 用 DMEM 培养基配成 5 × 10⁵ / mL 的细胞混悬液, 以每孔 100 μL 接种于 96 孔板。细胞贴壁 24 h 后, 吸出培养基, 加入终质量浓度分别为 25, 50, 100, 200 μg/mL 的提取液, 孵育 24 h, 收集上清液, 测定 NO 水平。分别以 PBS 和 LPS(终质量浓度均为 10 μg/mL)为阴性对照和阳性对照^[8]。

1.2.5 对肝癌细胞 HepG2 增殖的抑制作用

采用 CCK-8 法^[9]。取对数生长期 HepG2 细胞适量, 用 RPMI-1640 培养基配成 1 × 10⁵ / mL 的细胞混悬液, 以每孔 100 μL 接种于 96 孔板。细胞贴壁 24 h 后, 吸出培养基, 加入终质量浓度分别为 50, 100, 200, 400 μg/mL 的提取液, 孵育 48 h。以酶标仪测定 450 nm 波长处的 OD 值, 并计算 HepG2 细胞增殖抑制率。分别以 PBS 和 5-FU(终质量浓度均为 50 μg/mL)为阴性对照和阳性对照。

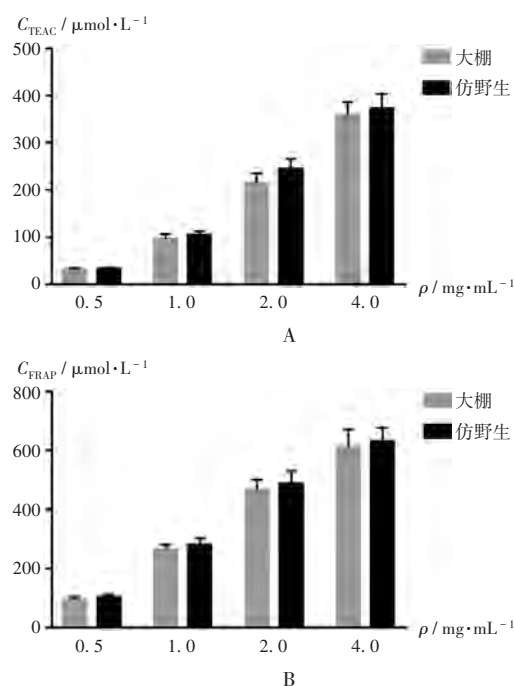
1.3 统计学处理

实验数据采用 SPSS 统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示, 行独立样本 *t* 检验; 计数资料以率(%)表示, 行 χ^2 检验; 利用 GraphPad Prism 7.0 统计学软件作图。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体外抗氧化活性

随着提取液质量浓度的升高, TEAC 值及 FRAP 值均逐渐升高, 且呈浓度依赖性。结果表明, 大棚栽培来源与仿野生栽培来源的铁皮石斛正丁醇提取物, 在 0.5 ~ 4.0 mg/mL 质量浓度范围内, ABTS 自由基清除能力及 FRAP 总抗氧化能力均相当(P > 0.05)。详见图 1。



A. ABTS 自由基清除能力 B. FRAP 总抗氧化能力

图 1 抗氧化活性检测情况

A. ABTS radical scavenging capacity B. FRAP total antioxidant capacity

Fig. 1 Results of antioxidant activity test

2.2 对 H9c2 细胞衰老的防护作用

随着提取液质量浓度的升高, H9c2 细胞存活率逐渐升高, 且呈一定的浓度依赖性。结果表明, 在 25 ~ 200 μg/mL 质量浓度范围内, 大棚栽培来源与仿野生栽培来源的铁皮石斛正丁醇提取物对 t-BHP 诱导 H9c2 细胞衰老的防护作用相当(P > 0.05)。详见图 2。

2.3 对巨噬细胞 RAW264.7 的免疫调节作用

随着提取液质量浓度的升高, RAW264.7 细胞的 NO 释放量也逐渐增加, 且呈一定的浓度依赖性。结果表明, 在质量浓度分别为 100 μg/mL 和 200 μg/mL 时, 仿野生栽培来源铁皮石斛正丁醇提取物对 RAW264.7 细胞 NO 释放的促进作用显著强于大棚栽培来源提取物(P < 0.05, P < 0.01)。详见图 3。

2.4 对肝癌细胞 HepG2 增殖的抑制作用

在 50 ~ 400 μg/mL 质量浓度范围内, 提取液均可一定程度抑制 HepG2 细胞生长, 在相同质量浓度下, 大棚栽培来源与仿野生栽培来源的铁皮石斛正丁醇提取

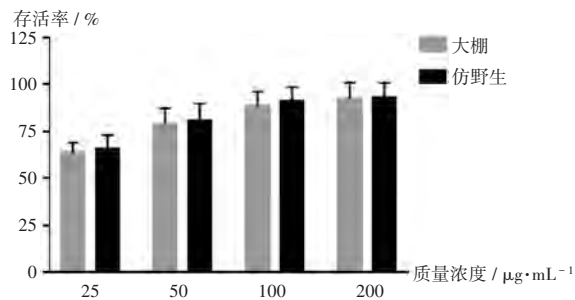


图2 H9c2细胞存活情况
Fig. 2 Survival situation of H9c2 cells

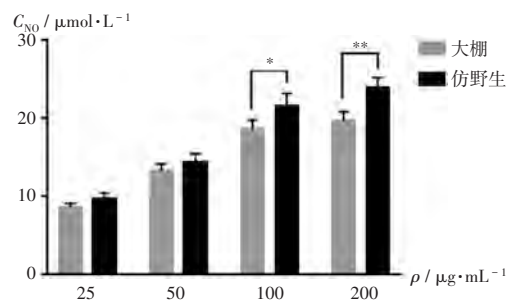


图3 巨噬细胞RAW264.7 NO释放情况
Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

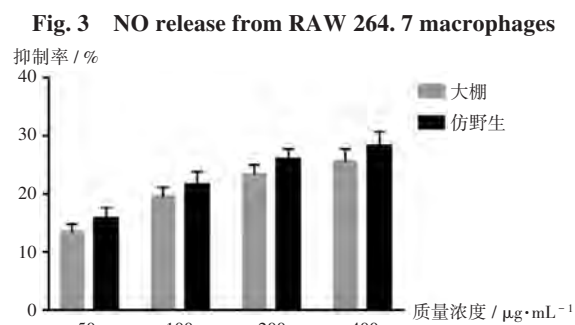


图4 肝癌细胞HepG2增殖抑制情况
Fig. 4 Inhibition of HepG2 cells proliferation

物对HepG2细胞增殖的抑制作用相当($P > 0.05$)。详见图4。

3 讨论

通过比较不同种源铁皮石斛的黄酮苷类成分特征图谱及丰度的差异,可将其区分为丹霞铁皮种、浙江本地种、云南广南种及广西铁皮兰种4种种源,且不同种源仿野生与大棚栽培的铁皮石斛品质也存在差异^[10]。浙江本地种铁皮石斛在仿野生栽培、大棚栽培、纯野生栽培方式下的多糖、甘露糖、醇溶性浸出物等多种成分含量存在差异^[11]。

ABTS自由基清除能力测试和FRAP法测定总抗氧化能力广泛用于评价提取物、提取部位等的体外抗氧化活性^[6]。本研究中基于上述两种实验的结果,初步推断在一定质量浓度范围内,大棚栽培和仿野生栽培来源的铁皮石斛正丁醇提取物的体外抗氧化活性及效价相当。t-BHP诱导的H9c2细胞衰老模型可评价提取物抗衰老活

性^[7]。本研究中基于该模型的实验结果,初步推断在一定质量浓度范围内,大棚栽培和仿野生栽培来源的铁皮石斛正丁醇提取物对t-BHP诱导H9c2细胞衰老的保护作用及效价相当。肝癌细胞HepG2可初步评价提取物的抗肿瘤活性^[9]。本研究结果提示,大棚栽培和仿野生栽培来源受铁皮石斛正丁醇提取物均具有一定的抑制HepG2细胞增殖的作用,且作用及效价相当。铁皮石斛可通过多途径、多层次提高机体免疫功能^[6]。巨噬细胞在免疫系统的调节过程发挥关键作用,常被用于体外免疫活性的研究。巨噬细胞被激活后释放信号传导因子NO,进而参与免疫调节过程^[8, 12]。本研究中与大棚栽培来源铁皮石斛正丁醇提取物比较,仿野生栽培来源提取物可促进巨噬细胞释放更多的NO,故初步判断仿野生栽培来源铁皮石斛正丁醇提取物免疫调节作用相对较强。

综上所述,大棚栽培来源和仿野生栽培来源铁皮石斛正丁醇提取物体外抗氧化、抗衰老和抗肿瘤方面的活性相当;后者免疫调节能力优于前者。

参考文献

- [1] 罗迪, 庞璐, 赵兴, 等. 浅析《本草纲目》中铁皮石斛的功能主治[J]. 湖南中医杂志, 2013, 29(3): 108-109.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 295.
- [3] 李娟, 李顺祥, 黄丹, 等. 铁皮石斛资源、化学成分及药理作用研究进展[J]. 科技导报, 2011, 29(18): 74-79.
- [4] 焦连魁, 曾燕, 张继聪, 等. 石斛属优质地道药材生产技术概述[J]. 中国现代中药, 2021, 23(4): 734-740.
- [5] 奚航献, 刘晨, 刘京晶, 等. 铁皮石斛化学成分、药理作用及其质量标志物(Q-marker)的预测分析[J]. 中草药, 2020, 51(11): 3097-3109.
- [6] 鲍素华, 查学强, 郝杰, 等. 不同分子量铁皮石斛多糖体外抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(21): 123-127.
- [7] 赵誉, 张凤, 赵筱萍, 等. 参麦注射液保护氧化损伤心肌细胞线粒体的机制研究[J]. 浙江大学学报(医学版), 2018, 47(5): 507-513.
- [8] 张凯月, 李春楠, 兰梦, 等. 鹿胎肽对巨噬细胞RAW264.7的免疫调节作用[J]. 食品工业科技, 2021, 42(1): 342-347.
- [9] 鲍丽娟, 王军辉, 罗建平. 4种石斛水提物对人宫颈癌HelaS3细胞和肝癌HepG2细胞的抑制作用[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(36): 15968-15970.
- [10] 梁芷韵, 谢镇山, 黄月纯, 等. 铁皮石斛黄酮苷类成分HPLC特征图谱优化及不同种源特征性分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(1): 22-28.
- [11] 徐丽红, 周鑫, 郑蔚然, 等. 不同仿野生栽培铁皮石斛多品质指标的比较[J]. 浙江农业科学, 2018, 59(7): 1253-1257.
- [12] 王晓斐, 李永. 基于免疫作用增强的试验研究——以石斛多糖为例[J]. 商丘师范学院学报, 2019, 35(6): 30-32.

(收稿日期: 2022-03-10; 修回日期: 2022-07-12)