

网络优先数字出版时间: 2015-11-26

网络优先数字出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/45.1075.N.20151126.1018.032.html>

红树植物卤蕨地上部分提取物的生物活性初报^{*}

Study on Biological Activity of Extracts from the Aerial Part of Mangrove Plant *Acrostichum aureum*

苏志维¹, 马仲辉², 梁益其³, 何碧娟¹, 陈波^{1**}

SU Zhi-wei¹, MA Zhong-hui², LIANG Yi-qi³, HE Bi-juan¹, CHEN Bo¹

(1. 广西科学院, 广西南宁 530007; 2. 广西大学农学院, 广西南宁 530003; 3. 中国科学院华南植物园, 广东广州 510650)

(1. Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530003, China; 3. South China Botanical Garden, CAS, Guangzhou, Guangdong, 510650, China)

摘要:【目的】研究红树植物卤蕨(*Acrostichum aureum*)地上部分的乙醇提取物及其不同极性部位萃取物对我国3种高发性肿瘤细胞株(MCF-7, A549, HepG2)和3种微生物菌株(金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* Rosenbach、大肠杆菌 *Escherichia coli*、痤疮丙酸杆菌 *Propionibacterium acnes*)的生长抑制作用。

【方法】采用MTT法测定其对所选3种人肿瘤细胞株的细胞毒性;采用改良的刃天青显色法,测定对3种微生物菌株的体外抗菌作用的最低抑菌浓度(MIC)。【结果】卤蕨地上部分的不同极性部位提取物对所选人肿瘤细胞株和微生物菌株表现出不同程度的生长抑制作用,其中乙酸乙酯萃取部位对3种细胞株具有很好的细胞毒性,IC₅₀值均低于20 μg/mL,对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和痤疮丙酸杆菌的MIC分别为125 μg/mL、125 μg/mL、62.5 μg/mL;正丁醇萃取部位的细胞毒活性和抑菌作用次之;石油醚萃取部位和水层对所选细胞株和菌株几乎不表现抑制作用。【结论】卤蕨地上部分乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部位具有较好的细胞毒活性和抑菌作用,值得进行进一步活性追踪、分离纯化,以期获得具有药用价值的活性先导化合物。

关键词: 卤蕨 提取物 细胞毒活性 抑菌活性

中图分类号: R932 文献标识码: A 文章编号: 1002-7378(2015)04-0292-04

Abstract:【Objective】The cytotoxic activities and the minimal inhibitory concentration (MIC) of various extractions of the aerial part of *Acrostichum aureum* were investigated respectively on three human cancer cell lines (MCF-7, A549, HepG2) and microorganisms (*Staphylococcus aureus* Rosenbach, *Escherichia coli*, *Propionibacterium acnes*). 【Methods】

The cytotoxic activities were tested *in vitro* by MTT assay. The MIC values were determined by improved resazurin colorimetric method. 【Results】The various extractions of the aerial part of *A. aureum* display different levels of cytotoxic and antimicrobial activities. The ethyl acetate extract was exhibited noticeable cytotoxicity against the tested cancer cell lines (IC₅₀ < 20 μg/mL), as well as show potent antimicrobial activities with the MIC values of 125 μg/mL, 125 μg/mL and 62.5 μg/mL against *Staphylococcus*

收稿日期: 2015-05-13

修回日期: 2015-05-19

作者简介: 苏志维(1985-), 女, 助理研究员, 主要从事天然产物化学研究。

* 广西科学院基本科研业务费项目(15YJ22HY06), 广西自然科学基金青年基金项目(2015GXNSFBA139026), 广西自然科学基金项目(2012GXNSFEA053001)和广西中药质量标准研究重点实验室开放课题项目(桂中重开201408)资助。

** 通讯作者: 陈波(1954-), 男, 研究员, 主要从事近海海洋动力学研究, E-mail: cbgxkxy@163.com。

aureus Rosenbach, *Escherichia coli* and *Propionibacterium acnes*, respectively. The cytotoxic and antimicrobial activities of *n*-butanol extract was next to that of ethyl acetate extract. The petroleum ether and water soluble part were found to be no effects on all the tested cancer cell lines and microorganism lines. **【Conclusion】**The ethyl acetate extract is exhibited noticeable cytotoxicity and antimicrobial activities, which is worth to further investigate the constituents of *A. aureum* by activity tracking assay to develop of more lead compounds.

Key words: *Acrostichum aureum*, extractions, cytotoxicity, antimicrobial activity

0 引言

【研究意义】随着陆地药用资源的日益减少,以及人类面临癌症、传染病等重大疾病的严峻挑战,开发海洋药物已迫在眉睫^[1]。红树是海洋植物的重要组成部分,生长在海陆临界处,因生存环境高盐、强光照度、根部长期缺氧的特异性,其次代谢产物具有结构新颖、环境友好和生物活性显著等特点,因此,研究和开发红树植物潜在的药用价值对人类具有重大意义。根据最新植物分类 APG III 分子系统,凤尾蕨科(Pteridaceae)卤蕨属(*Acrostichum*)^[2]共有 4 种植物,遍布于亚洲热带海岸、大西洋的非洲西岸、美洲东岸以及大洋洲沿岸,属于嗜热广布性种类,在我国分布有 2 种,为卤蕨(*Acrostichum aureum* L.)和尖叶卤蕨(*Acrostichum speciosum* Willd.),主要分布于广东、广西、台湾、福建、海南。卤蕨是红树林植物中的主要树种之一,又是仅有的一种蕨类植物,兼具低等维管植物和红树林植物的双重特性,特殊的植物分类地位奠定了卤蕨植物次生代谢产物的特殊性,既有与其他红树植物不同的活性物质,又有普通蕨类植物不具备的活性物质。卤蕨属植物具有很好的药用价值,国内外沿岸居民常用来治疗创伤、风湿、感染性疾病、象皮病、哮喘等疾病,其药用价值逐渐被世界各地的科学家所关注^[3,4]。**【前人研究进展】**澳大利亚学者 Uddin 及其研究团队从孟加拉的卤蕨中分离得到 13 个单体化合物,其中包括 3 个结构新颖的化学成分(1 个邻苯二甲酸酯以及 2 个硫酸酯取代的倍半萜烯类化合物)^[3,5,6];同时利用 MTT 法对从孟加拉国卤蕨中分离得到的单体化合物进行了胃癌细胞毒活性评估,发现 pterosins 等多种化合物对胃癌细胞株的增殖都有显著的抑制作用^[3,6,7]。戴好富等^[8]研究了我国海南红树植物卤蕨提取物对 Hela 癌细胞的抑制作用,发现其 IC₅₀ 值达 6.3 μg/mL。这都显示了从卤蕨植物中发现天然抗癌活性先导化合物的巨大潜力。马来西亚学者 Howyee 等^[9]发现卤蕨甲醇提取

物具有显著的抗氧化作用及酪氨酸酶抑制作用,其中 DPPH 自由基清除活性法测得其抗氧化 IC₅₀ 值为 0.54 mg/mL,酪氨酸酶抑制活性的抑制率为 33.3%。黄初升等^[10]对卤蕨的过挥发性成分及元素进行了分析。**【本研究切入点】**迄今为止,国内外对红树植物卤蕨的研究仅限于简单的一些植物化学成分的研究,鲜有系统的卤蕨化学成分研究及活性报道,特别是有关广西沿海的卤蕨植物的研究更是少。因此,对广西产的卤蕨植物进行系统的化学成分及生物活性研究非常有必要。**【拟解决的关键问题】**选择采自广西防城石角的卤蕨植物地上部分为研究对象,选用多种我国发生率高的主要癌症(肺癌,肝癌,乳腺癌)细胞株和微生物菌株,测定卤蕨地上部分提取物对它们的生长抑制作用,为后续的活性追踪,分离纯化得到具有显著抗肿瘤和抗菌作用的活性先导化合物奠定基础,加快卤蕨植物的活性物质成分研究进展。

1 材料与amp;方法

1.1 主要仪器与试剂

恒温 CO₂ 细胞培养箱(日本 Sanyo 公司),智能生化培养箱(SPX 型,宁波东南仪器有限公司),净化生物超净工作台(上海智城分析仪器公司),光学显微镜(重庆奥特光学仪器公司),全自动酶标仪(奥地利 Tecan 公司),N-1100V-W 旋转蒸发器(日本东京理化株式会社)。所用试剂均为分析纯。

1.2 生物材料

红树植物样品于 2014 年 5 月采自广西防城城市石角,经广西大学植物科学系马仲辉博士鉴别为凤尾蕨科卤蕨属植物卤蕨,植物标本保藏于广西大学农学院植物标本馆,编号为:MZH0188。

供试人肿瘤细胞株:人肺癌细胞 A549、人肝癌细胞 HepG2 和人乳腺癌细胞 MCF-7,保藏于中国科学院华南植物园植物资源保护与可持续利用重点实验室。

供试菌株:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus*

aureus Rosenbach)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)和痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*),保藏于中国科学院华南植物园植物资源保护与可持续利用重点实验室。

1.3 提取物制备

卤蕨地上部分 5 kg,阴干粉碎后用 95%乙醇溶液浸泡提取 3 次,每次浸泡 7 d,提取液合并后减压浓缩得乙醇浸膏,加蒸馏水成混悬液,依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取,减压浓缩至干分别得石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取部位及水溶部位。真空干燥,配制 1 mg/mL 的 DMSO 样品溶液。

1.4 生物活性研究

细胞毒活性测定,采用 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)法^[11]进行:(a)收集对数生长期的肿瘤细胞以 1×10^5 /mL 的浓度接种于 96 孔板,100 μ L/孔,于 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂培养箱中培养 24 h,使细胞贴壁;(b)吸去上清液,加入含实验所需浓度样品液的维持液,于 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂培养箱中培养 48 h;(c)弃药液,每孔加含 5 mg/mL 的 MTT 20 μ L,继续培养 4 h;(d)终止培养,弃孔内培养液,加 DMSO 150 μ L/孔,置于摇床上震荡 10 min,使结晶充分溶解,于酶标仪 570 nm 处测各孔吸光值。实验同时设置调零孔(培养基,MTT,DMSO),对照孔(细胞,相同浓度的药物溶解介质 DMSO,培养液,MTT,DMSO);(e)计算:细胞抑制率%=[(对照-本底)-(给药-本底)]/(对照-本底)×100%。供试样品浓度为 100 μ g/mL,以阿霉素为阳性对照物。

抗菌活性测定,采用改良后的刃天青显色法测量样品的最低抑菌浓度(MIC)^[12],使用 96 孔板稀释梯度技术,可以在同一时间测定多种物质对不同菌株的 MIC。先将 100 μ g/mL 的指示剂溶液(刃天青)放置到无菌的 96 孔板上的第 12 列的孔里;约 7.5 mL 的指示剂溶液与 5 mL 的供试菌溶液(10^8 CFU/mL)混合,接着转移 100 μ L 到第 1 至第 11 列剩余的所有测试孔中;待测样品(1 mg/mL)溶液 100 μ L 加入到第一列板孔中,混匀,使得该孔中的待测样品浓度为 500 μ g/mL;再从 A 孔取出 100 μ L 的溶液转移到 B 孔中,接下列用同样的方法(倍增稀释)到第 H 孔中,再从最后一孔中取出 100 μ L 丢弃,以保证每一列的孔中的溶液均为 100 μ L;将加好样品的孔板放入到恒温培养箱,37 $^{\circ}$ C 培养 5~6 h,直到孔板的染色变成粉红色的生长色;最后,根据颜色变化判断活性,颜色从粉红色到蓝色为有活

性,若颜色无变化则无活性,发生颜色变化的最低稀释浓度认为是待测化合物的 MIC。在一个 96 孔板,可同时测定 3 个样品(3 个重复)以及 1 个阳性对照(红霉素)和 1 个阴性对照(DMSO)。

2 结果与分析

2.1 细胞毒活性

如表 1 所示,卤蕨地上部分乙醇提取物及其不同极性萃取物对所选供试肿瘤细胞 A549、HepG2 和 MCF-7 表现出不同程度的细胞毒活性,其中乙酸乙酯萃取部位对所选细胞株具有较好的抑制作用,其 IC₅₀ 值均低于 20 μ g/mL;正丁醇萃取部位对所选细胞株的细胞毒活性 IC₅₀ 值在 45.03~56.68 μ g/mL;石油醚萃部位和水溶部位对 3 种供试细胞株几乎不显示细胞毒活性,其 IC₅₀ 值均大于 100 μ g/mL。

表 1 卤蕨地上部分乙醇提取物及其不同极性部位萃取物的细胞毒活性

Table 1 Cytotoxic activity of various extractions of aerial part of *A. aureum* on three cancer cell lines

| 萃取物 Extractions | IC ₅₀ (μ g/mL) | | |
|------------------------|--------------------------------|-------|-------|
| | MCF-7 | A549 | HepG2 |
| 石油醚 Petroleum ether | >100 | >100 | >100 |
| 乙酸乙酯 Ethyl acetate | 12.12 | 8.97 | 15.73 |
| 正丁醇 N-butanol | 50.56 | 45.03 | 56.68 |
| 水 Distilled water | >100 | >100 | >100 |
| 乙醇 Ethanol | 21.32 | 19.69 | 26.88 |

2.2 抑菌活性

如表 2 所示,卤蕨地上部分乙醇提取物及其不同极性部位萃取物对所选供试菌株具有不同程度的抑制作用。乙醇提取物的 MIC 均为 250 μ g/mL;乙酸乙酯萃取物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和痤疮丙酸杆菌的 MIC 分别为 125 μ g/mL、125 μ g/mL、62.5 μ g/mL;正丁醇萃取物对 3 种供试菌种的 MIC 较乙酸乙酯萃取物的弱些,分别为 250 μ g/mL、250 μ g/mL、125 μ g/mL;石油醚萃取部位和水层对所选供试菌株的 MIC 均大于 500 μ g/mL,几乎不表现抑制作用。另外,痤疮丙酸杆菌是引发青春痘的主要细菌,实验表明卤蕨植物的乙酸乙酯萃取物对此菌的抑制作用最好,其 MIC 值为 62.5 μ g/mL,文献[9]报道卤蕨植物的甲醇提取物能有效抑制酪氨酸酶活性,对肌肤具有明显的美白作用,因此推断,卤

蕨不仅具有药用作用还具有潜在的润肤美白作用。

表 2 卤蕨地上部分乙醇提取物及其不同极性部位萃取物的抑菌活性

Table 2 MIC values of various extractions of aerial part of *A. aureum* on three microorganisms

| 萃取物 Extractions | MIC($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | |
|------------------------|---|-------------------------|--------------------------------|
| | <i>Staphylococcus aureus</i> Rosenbach | <i>Escherichia coli</i> | <i>Propionibacterium acnes</i> |
| 石油醚 Petroleum ether | >500 | >500 | >500 |
| 乙酸乙酯 Ethyl acetate | 125 | 125 | 62.5 |
| 正丁醇 N-butanol | 250 | 250 | 125 |
| 水 Distilled water | >500 | >500 | >500 |
| 乙醇 Ethanol | 250 | 250 | 250 |

3 结论

通过对卤蕨地上部分乙醇提取物及其不同极性部位萃取物的细胞毒活性和抑菌活性进行研究分析,卤蕨植物粗提物具有较好的生物活性,其中以乙酸乙酯萃取部位的细胞毒活性和抗菌活性为佳。因其具有丰富的生物资源,值得进一步地进行活性跟踪、分离纯化,以期得到具有药用价值或美白润肤作用的活性先导化合物,进一步探讨卤蕨植物的药用价值和开发利用红树植物资源。

参考文献:

[1] 关美君,林文翰,丁源. 海洋药物——二十一世纪中国药学研究的新热点[J]. 中国海洋药物,2001,20(1):1. Guan M J, Lin W H, Ding Y. Marine drugs the new hot spot of Chinese pharmaceutical research in twenty-first Century [J]. Chin J Mar Drugs, 2001, 20(1):1.

[2] Bremer B, Bremer K, Chase M, et al. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III [J]. Botanical Journal of the Linnean Society, 2009, 161: 105-121.

[3] Uddin S J, Jason T L H, Beattie K D, et al. (2S,3S)-sulfated pterisin C, a cytotoxic sesquiterpene from the Bangladeshi mangrove fern *Acrostichum aureum* [J]. Journal of Natural Products, 2011, 74(9): 2010-2013.

[4] 钟晓,刘红星,黄初升,等. 红树林植物卤蕨属的化学成分及生物活性研究进展[J]. 广西师范学院学报:自然

科学版,2012,29(3):41-45.

Zhong X, Liu H X, Huang C S, et al. Advances in chemical composition and biological activity of mangrove *Acrostichum aureum* genus [J]. Journal of Guangxi Teachers Education University: Natural Science Edition, 2012, 29(3): 41-45.

- [5] Uddin S J. Cytotoxicity Screening of Bangladeshi Medicinal Plants and Isolation and Structural Elucidation of Novel Anti-cancer Compounds from *Acrostichum aureum* [M]. Brisbane: Griffith University, 2011.
- [6] Uddin S J, Grice D, Tiralongo E. Evaluation of cytotoxic activity of patriscabratine, tetracosane and various flavonoids isolated from the Bangladeshi medicinal plant *Acrostichum aureum* [J]. Pharmaceutical Biology, 2012, 50(10): 1276-1280.
- [7] Uddin S J, Grice I D, Tiralongo E. Cytotoxic effects of Bangladeshi medicinal plant extracts [J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2011, 10: 1-7.
- [8] 戴好富,梅文莉,洪葵,等. 海南 16 种红树植物的肿瘤细胞毒活性筛选[J]. 中国海洋药物, 2005, 24(6): 44-46. Dai H F, Mei W L, Hong K, et al. Screening of the tumor cytotoxic activity of sixteen species of mangrove plants in Hainan [J]. Chin J Mar Drugs, 2005, 24(6): 44-46.
- [9] Lai H Y, Lim Y Y, Tan S P. Antioxidative, tyrosinase inhibiting and antibacterial activities of leaf extracts from medicinal ferns [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2009, 73(6): 1362-1366.
- [10] 崔亚飞. 阔叶猕猴桃根部, 卤蕨根部的抗氧化活性与化学成分的研究 [D]. 南宁: 广西师范学院, 2012. Cui Y F. The Investigation of Antioxidant Activity and Chemical Constituents for Root of *Actinidia Latifolia* (Gardn. Et Champ.) Merr and *Acrostichum Aureum* linn [D]. Nanning: Guangxi Teachers Education University, 2012.
- [11] Su Z W, Hao J, Xu Z F, et al. A new quassinoid from fruits of *Brucea javanica* [J]. Natural Product Research, 2013, 27(21): 2016-2021.
- [12] Drummond A J, Waigh R D. Recent Research Developments in Phytochemistry [M]. Pandalai S G (eds.). India: Research Signpost, 2000: 143-152.

(责任编辑:竺利波)