

左旋多巴结晶母液萃取物对抑制 NG108-15 细胞增殖作用的研究^{*}

赵小超¹, 张雯艳², 李学坚^{2**}, 柴玲³, 黄艳³

(1. 宿迁市中医院, 江苏宿迁 223800; 2. 广西中医药大学, 广西南宁 530200; 3. 广西中药质量标准研究重点实验室, 广西南宁 530022)

摘要: 本实验研究不同极性萃取溶剂制备的左旋多巴结晶母液萃取物体外抑制 NG108-15 细胞增殖的作用。在以猫豆为原料生产左旋多巴过程中, 分别用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇对结晶母液浓缩物进行萃取, 然后采用四氮唑盐法(MTT法)检测各萃取物体外对 NG108-15 细胞增殖的抑制作用。实验结果显示, 与空白组比较, 石油醚、乙酸乙酯和正丁醇的萃取物对 NG108-15 细胞增殖均表现出明显的抑制作用($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且抑制作用随着浓度的增加而增强; IC_{50} 分别为 $37.14 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $44.89 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $49.03 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。说明左旋多巴结晶母液对 NG108-15 肿瘤细胞的增殖有显著的抑制作用, 提示母液中含有一些具有良好抑制肿瘤细胞活性的成分, 有待进一步研究开发。

关键词: 猫豆 左旋多巴 萃取物 MTT法 NG108-15 细胞

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 1002-7378(2019)04-0297-04

0 引言

左旋多巴(Levodopa)是治疗帕金森综合征(Parkinson's Disease, PD)的经典药物, 历经 100 多年的研究发展依然是治疗 PD 的首选药物之一, 主要用于帕金森病和肝昏迷, 也可用于治疗心力衰竭、消化性溃疡病、溢乳症、某些脑梗死后精神症状、促进小儿生长发育、增强性功能、神经性疼痛等^[1-3]病症。长期服用左旋多巴会引起一些不良反应, 如剂量终止恶化、

胃肠道反应、开关现象和服务器异常非自主运动(AIM)等^[4-6]。生产左旋多巴的工艺主要有化学合成法、植物提取法、微生物转化法以及新兴的代谢转化法等^[7-13]方法。目前, 国内生产左旋多巴以从猫豆中提取为主, 生产过程中存在大量的废水, 处理起来极其麻烦, 大大增加了成本, 一旦处理不当就会对环境带来严重污染; 另外, 从猫豆中提取天然左旋多巴的纯化工艺复杂, 成本大, 且杂质含量高难以控制质量。综合分析, 左旋多巴生产中亟待解决的关键问题就是

^{*} 广西中药质量标准研究重点实验室开放课题基金项目(桂中重开 201507)资助。

【作者简介】

赵小超(1988—), 男, 主管中药师, 主要从事中药化学、中药药理学等研究。

【**通信作者】

李学坚(1965—), 男, 教授级高级工程师, 硕士生导师, 主要从事中药有效成分筛选、中药新产品开发研究, E-mail: 1211856948@qq.com。

【引用本文】

DOI: 10.13657/j.cnki.gxkxyxb.20191210.004

赵小超, 张雯艳, 李学坚, 等. 左旋多巴结晶母液萃取物对抑制 NG108-15 细胞增殖作用的研究[J]. 广西科学院学报, 2019, 35(4): 297-300.

ZHAO X C, ZHANG W Y, LI X J, et al. Inhibition effects of levodopa crystallization mother liquor extracts on NG108-15 cell proliferation [J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2019, 35(4): 297-300.

其结晶母液的富集。目前,暂无左旋多巴结晶母液的萃取物活性研究的相关报道。因此,本文对左旋多巴结晶母液的萃取物进行活性研究,拟为左旋多巴生产工艺废水的处理及再利用提供参考依据,进一步有利于天然左旋多巴的质量控制,增加经济效益。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 精制母液

左旋多巴结晶母液由广西邦尔药业有限公司提供,是以猫豆为原料生产左旋多巴的精制工艺过程中的生产废水。

1.1.2 试剂

DMEM 培养基 (MULTICELL, 批号: 319006015), 无菌 PBS (BOSTER, 批号: 03C02A21), 胎牛血清 (FBS, Biological Industries, 批号: 1729601), 胰蛋白酶-EDTA 消化液 (Solarbio, 批号: 20170306), 青链霉素混合液 (Solarbio, 批号: 20171025), MTT (Sigma, 批号: 298-93-1); 95% 乙醇、石油醚 (60~90℃)、乙酸乙酯、正丁醇、DMSO 等试剂均为分析纯; HAT: 5 mmol/L 次黄嘌呤钠, 20 μmol/L 氨蝶呤, 0.8 mmol/L 胸腺嘧啶的混合物 (Sigma, 批号: 1212508)。

1.1.3 肿瘤细胞

NG108-15 肿瘤细胞购于上海细胞生物研究所细胞库, 是小鼠神经细胞瘤与大鼠神经胶质细胞杂交瘤细胞。

1.1.4 实验仪器

超净工作台 (SW-CJ-1FD), CO₂ 细胞培养箱 (MCO-18AIC, SAYO), 全波长酶标仪 (TECAN1510, INFINITE 200 PRO 德国), 高速离心机 (Thermo SCIENTIFIC), 倒置显微镜 (DMI3000B, Leica), 冰箱 (BCD-268WBCS, Haier), 高压蒸气灭菌锅 (HV-50, HIRAYAMA); Research plus 系列可调微量移液器 (德国 Eppendorf 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 供试品萃取物的制备

左旋多巴精制工序的结晶母液, 用 NaOH 水溶液调节至 pH 值为 6.0, 减压浓缩成稠膏, 60℃ 真空烘干, 得干膏 5.28 kg。然后粉碎, 用 10 倍量 95% 乙醇回流提取 4 次, 每次提取时间 2 h, 过滤, 合并提取液, 减压回收乙醇, 得醇提物 150.81 g。醇提物用 600 mL 蒸馏水混悬, 先后用石油醚 (60~90℃) (萃

取 5 次)、乙酸乙酯 (萃取 5 次) 和正丁醇 (萃取 5 次) 进行萃取, 回收溶剂, 得到不同极性萃取物, 分别为石油醚萃取物 5.88 g、乙酸乙酯萃取物 3.95 g、正丁醇萃取物 57.82 g。3 个不同极性部位萃取物即为供试品原料。

1.2.2 细胞培养

参照文献[14]的做法, 有修改。NG108-15 的细胞培养液为 10% FBS + 1% HAT + DMEM, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 1~2 d 更换 1 次培养液, 每天观察细胞状态, 保证细胞状态良好。

1.2.3 MTT 法直接给药

参照文献[14]的做法, 有修改。取对数生长期的 NG-108 细胞, 倒置显微镜下观察状态良好, 消化混悬均匀并调整细胞浓度为 3×10^5 个/mL, 接种于 96 孔培养板中, 每孔加 200 μL 细胞混悬液, 置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h。吸去培养液, 分组加入药液, 共分为 5 组: 空白组、石油醚供试组、乙酸乙酯供试组、正丁醇供试组和对照组 (纯度为 98.8% 左旋多巴配置成的不同浓度对照品溶液)。空白组设 6 个复孔, 每孔加 200 μL 培养液; 供试组和对照组均分别设 7 个不同浓度, 分别为 $6.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $12.50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 每个浓度设 6 个复孔, 每孔加 200 μL 供试品溶液; 加药后在培养箱中继续培养 48 h 后离心吸去溶液, 加 PBS 溶液, 每孔 200 μL, 再加 MTT 溶液, 每孔 10 μL, 继续培养 4 h, 弃上清液。每孔加 200 μL 二甲基亚砜, 摇床轻轻振荡 (转速为 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 10 min, 570 nm 波长处测 OD 值, 计算细胞抑制率 (IR) 和半数抑制浓度 (IC₅₀), 计算公式: $\text{IR} = [1 - (\text{给药细胞 OD 值} - \text{板底 OD 值}) / (\text{空白细胞 OD 值} - \text{板底 OD 值})] \times 100\%$, $\lg \text{IC}_{50} = X_m - I(P - (3 - P_m - P_n) / 4)$, 其中, X_m: lg 最大剂量, I: lg (最大剂量/相邻剂量), P: 阳性反应率之和, P_m: 最大阳性反应率, P_n: 最小阳性反应率。

1.2.4 数据分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间采用 *t* 检验进行比较, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示有统计学显著性差异。

2 结果与分析

如表 1 所示, 石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物和正丁醇萃取物体外对 NG108-15 细胞增殖均具有明

显的抑制作用 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且随着浓度的增加抑制作用增强。给药浓度为 $6.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 萃取物的抑制率均超过 10%; 给药浓度为 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 抑制率基本达到 95% 左右。3 种萃物体外对 NG108-15 细胞增殖的抑制作用 IC_{50} 分别为 $37.14 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $44.89 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $49.03 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。通过对比 IC_{50} 数值可以看出, 石油醚萃物体外对 NG108-15 细胞增殖的抑制作用最强, 乙酸乙酯萃取物的抑制作用次之, 正丁醇萃取物的抑制作用最弱。

表 1 各组体外对 NG108-15 细胞增殖的抑制作用数据 ($X \pm S, n=5$)

Table 1 Inhibition data of each group on NG108-15 cell proliferation in vitro ($X \pm S, n=5$)

组别 Group	浓度 Concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	OD 值 OD value	抑制率 Inhibition rate (%)	IC_{50} ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
空白组 Blank	—	0.888 ± 0.179	—	—
左旋多巴 对照组 Levodopa control group	6.25	0.780 ± 0.022	3.2	
	12.5	0.735 ± 0.034	8.8	
	25	$0.654 \pm 0.072^{**}$	18.6	
	50	$0.368 \pm 0.067^{**}$	54.4	
	100	$0.046 \pm 0.005^{**}$	94.3	
	200	$0.042 \pm 0.002^{**}$	94.8	
石油醚组 Petroleum ether group	400	$0.093 \pm 0.006^{**}$	88.4	44.56
	6.25	0.885 ± 0.065	17	
	12.5	$0.780 \pm 0.030^{\#\#}$	26.9	
	25	$0.703 \pm 0.010^{**\#\#}$	34.0	
	50	$0.474 \pm 0.034^*$	55.6	
	100	$0.294 \pm 0.021^{**\#\#}$	72.5	
乙酸乙 酯组 Ethl ace- tate group	200	$0.056 \pm 0.004^{**}$	94.7	
	400	$0.031 \pm 0.005^{**\#\#}$	97.1	37.14
	6.25	$0.732 \pm 0.129^{**}$	15.3	
	12.5	$0.669 \pm 0.155^{**}$	22.9	
	25	$0.602 \pm 0.139^{**}$	30.6	
	50	$0.470 \pm 0.167^{**}$	45.6	
正丁醇组 N-butanol group	100	$0.259 \pm 0.086^{**\#\#}$	70.1	
	200	$0.015 \pm 0.002^{**\#\#}$	98.3	
	400	$0.017 \pm 0.002^{**\#\#}$	98.0	44.89
	6.25	0.717 ± 0.020	12.0	
	12.5	$0.631 \pm 0.021^{**\#\#}$	22.6	
	25	$0.570 \pm 0.031^{\#\#}$	29.9	
	50	$0.477 \pm 0.085^{\#}$	41.3	
	100	$0.262 \pm 0.024^{**\#\#}$	67.8	
	200	$0.018 \pm 0.002^{**\#\#}$	97.9	
	400	$0.015 \pm 0.010^{**\#\#}$	98.2	49.03

注: 与空白组比较, $* P < 0.05$, $** P < 0.01$; 与左旋多巴组比较, $\# P < 0.05$, $\#\# P < 0.01$

Note: Compared with blank, $* P < 0.05$, $** P < 0.01$; compared with levodopa control group, $\# P < 0.05$, $\#\# P < 0.01$

3 讨论

本实验通过 MTT 法检测左旋多巴结晶母液(精制工序的废水)的石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物和正丁醇萃物体外对 NG108-15 细胞增殖的抑制作用, 提示左旋多巴结晶母液中含有某些具有抗肿瘤活性的化学成分。通过实验对比, 可以发现废水不同极性萃取物随着极性的增强, 其对 NG108-15 细胞增殖的抑制作用强度减弱, 抗肿瘤活性同样具有此规律, 这给今后开展深入研究提供方向。废水来自天然左旋多巴的生产过程中精制工艺, 其化学成分极有可能包含天然左旋多巴的相关物质, 即存在某种天然左旋多巴的相关物对 NG108-15 细胞增殖具有抑制作用, 此信息对于天然左旋多巴的相关物研究具有重要意义。另有研究者发现, 猫豆乙醇提取物不仅能有效刺激 3T3-L1 脂肪细胞消耗葡萄糖, 改善胰岛素抵抗^[15], 还能显著降低糖尿病小鼠体内的高血糖水平并同时改善伴随 I 型糖尿病所导致的机体氧化应激^[16]。左旋多巴结晶母液是以猫豆为原药材生产天然左旋多巴的精制工序废水, 也就是说其结晶母液与猫豆提取物之间可能存在交叉, 或许结晶母液中亦存在某种成分具有改善胰岛素抵抗等作用, 有待进一步研究考证。

4 结论

左旋多巴结晶母液的石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物和正丁醇萃物体外对 NG108-15 细胞增殖具有明显的抑制作用, 即具有一定的抗肿瘤活性, 但具体的有效成分等信息仍需要进一步深入研究。

参考文献

- [1] HAN L, XIE Y H, WU R, et al. Traditional Chinese medicine for modern treatment of Parkinson's Disease [J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2017, 23 (8): 635-640.
- [2] MENDELSON A M, JOHNSON C E, BROWN C E, et al. Hemodynamic and clinical effects of oral levodopa in children with congestive heart failure [J]. Journal of the American College of Cardiology, 1997, 30 (1): 237-242.
- [3] 陈吉成, 张翠平. 左旋多巴的临床新用途 [J]. 中国社区医师: 医学专业, 2012, 14 (25): 18-19.
- [4] CAIX X, KONG Y, ZHAO H, et al. Effects of levodopa on dopaminergic neurons and induced dyskinesia [J].

- Neural Regeneration Research, 2010, 5(2): 92-97.
- [5] EGGERT K, SCHRADER C, HAHN M, et al. Continuous jejunal levodopa infusion in patients with advanced parkinson disease: Practical aspects and outcome of motor and non-motor complications [J]. *Clinical Neuropharmacology*, 2008, 31(3): 151-166.
- [6] 左旋多巴的药理作用和不良反应[N]. *上海中医药报: 中医·问药*, 2009-05-19(3).
- [7] 罗栋源. 从猫豆中提取左旋多巴的清洁生产工艺研究[D]. 武汉: 湖北工业大学, 2011.
- [8] 蒋伟哲. 猫豆产业链支撑技术研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2008.
- [9] 蒋宇, 余从田, 吴正钧. 猫豆与左旋多巴的检测及生产工艺研究进展[J]. *食品工业*, 2014, 35(4): 145-149.
- [10] 罗栋源, 魏璇, 龚琴, 等. 膜工艺提取猫豆左旋多巴的研究[J]. *化学与生物工程*, 2011, 28(1): 26-32.
- [11] MISRA L, WAGNER H. Extraction of bioactive principles from *Mucuna pruriens* seeds [J]. *Indian Journal of Biochemistry and Biology*, 2007, 44(1): 56-60.
- [12] 汪桂芳, 李传润, 曹政, 等. 从猫豆中提取左旋多巴的膜分离工艺探索[J]. *安徽化工*, 2014, 40(1): 17-20.
- [13] 徐晓俞, 李爱萍, 吴凌云, 等. 蚕豆花左旋多巴提取工艺优化[J]. *中国农学通报*, 2014, 30(34): 56-60.
- [14] 吴燕春, 钟振国, 谢金鲜, 等. 绞股蓝提取物体外对 NG-108 细胞增殖影响的实验研究[J]. *时珍国医国药*, 2013, 24(6): 1362-1363.
- [15] 宋家乐, 钱波, 桂中玉, 等. 猫豆乙醇提取物对 3T3-L1 脂肪细胞糖脂代谢的影响[J]. *现代食品科技*, 2017, 33(10): 7-12.
- [16] 宋家乐, 李佳星, 黄泖禹, 等. 猫豆乙醇提取物对糖尿病小鼠血糖和抗氧化能力的影响[J]. *食品科技*, 2017, 42(5): 213-218.

Inhibition Effects of Levodopa Crystallization Mother Liquor Extracts on NG108-15 Cell Proliferation

ZHAO Xiaochao¹, ZHANG Wenyan², LI Xuejian², CHAI Ling³, HUANG Yan³

(1. Suqian Hospital of Chinese Medicine, Suqian, Jiangsu, 223800, China; 2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, 530200, China; 3. Guangxi Quality Standard of Chinese Medicine Research Laboratory, Nanning, Guangxi, 530022, China)

Abstract: The proliferation inhibition effect of levodopa crystallization mother liquor extracts prepared by different polar extraction solvents on NG108-15 cell *in vitro* was investigated. In the process of producing levodopa from *Stizolobium cochinchinensis* (Lour), petroleum ether, ethyl acetate and n-butanol were used to extract the crystallization mother liquor concentrate respectively, and then MTT assay was used to detect the inhibitory effect of each extract on the proliferation of NG108-15 cell. The experimental results showed that, compared with the blank group, the extracts of petroleum ether, ethyl acetate and n-butanol all showed a significant inhibitory effect on the proliferation of NG108-15 cell ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the inhibitory effect became stronger while the extract concentrations increased. The IC_{50} was $37.14 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $44.89 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $49.03 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. It shows that the levodopa crystal mother liquor has a significant inhibitory effect on the proliferation of NG108-15 tumor cell, suggesting that the mother liquor contains some components that have good tumor cell inhibitory activity, which needs further research and development.

Key words: *Stizolobium cochinchinensis* (Lour), levodopa, extract, MTT assay, NG108-15 cell

责任编辑: 米慧芝