

猫眼草乙酸乙酯部分的抗肿瘤活性研究*

张彦^{1,2**}, 郑蕾^{1,2}, 何昊^{1,2}, 申旭霁^{1,2}, 雷佼佼¹, 刘强¹, 梁晶晶¹

(1. 西安医学院药学院 西安 710021; 2. 西安医学院药物研究所 西安 710021)

摘要:目的:分离猫眼草乙酸乙酯部分提取物,对其指标成分进行含量测定,并对其抗肿瘤活性进行体外细胞实验研究,以期对猫眼草的利用与开发提供理论基础,为开发天然的抗肿瘤药提供新的方向和更多的选择。方法:高效液相色谱法测定乙酸乙酯部分槲皮素与没食子酸的含量;溶剂洗脱法对猫眼草乙酸乙酯部分进行分离;MTT法测定不同浓度的猫眼草乙酸乙酯各组分对乳腺癌ZR-75-30细胞生长的抑制作用。结果:猫眼草乙酸乙酯部分含有槲皮素19.99%,没食子酸55.04%。从猫眼草乙酸乙酯部分得到17个流份合并为6个组份。猫眼草乙酸乙酯部分分离的各组分(浓度 $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ – $150\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 范围)对乳腺癌细胞ZR-75-30的生长有抑制作用,且呈现一定的梯度关系,随着药物浓度的升高,对乳腺癌细胞的生长抑制率增强。其中组分2的抗肿瘤活性最强。结论:猫眼草乙酸乙酯部分提取物含有黄酮和酚酸类成分,各组分对乳腺癌细胞生长均有抑制作用。

关键词:猫眼草 乙酸乙酯部分 MTT 抗肿瘤活性

doi:10.11842/wst.2017.10.024

中图分类号:R284

文献标识码:A

猫眼草为大戟科华北大戟(*Euphorbia lunulata* Bge)的全草,又名耳叶大戟、细叶猫眼草^[1],性微寒,有毒;主要功效有镇咳祛痰、利尿消肿、拔毒止痒以及散结逐水等;民间常用其治疗慢性气管炎等疾病^[2]。在我国各地猫眼草作为传统中药泽漆的代用品,在肿瘤治疗方面有广泛应用^[3,4],尤其在陕西南部民间将其称为女儿茶,将其炒茶或煎汤治疗癌性腹水。目前虽有对其抗肿瘤活性研究的报道,但多限于化学成分研究方面^[5-9]。文献显示猫眼草中含有二萜、三萜、黄酮、有机酸类物质,其中有抗肿瘤活性因子^[10-15]。本课题组之前采用系统分离的方法得到不同极性的提取部分,发现乙酸

乙酯和氯仿部分抗肿瘤活性最强^[16]。因此,有必要对猫眼草乙酸乙酯部分进行含量测定与进一步分离及抗肿瘤活性研究。具体研究如下:

1 材料与方法

1.1 试药与细胞

猫眼草饮片2 kg由陕西省户县中医院提供,经西安医学院生药教研室汪兴军老师鉴定为猫眼草(*Euphorbia lunulata* Bge),在西安医学院药学综合实验室三进行系统溶剂分离(流程如图1),得到乙酸乙酯浸膏7.38 g。

槲皮素标准品(成都艾科达化学试剂有限公司,批号201603181);没食子酸标准品(中国药品生物制品

收稿日期:2017-08-05

修回日期:2017-10-13

* 国家自然科学基金(81603265):基于炎症和NF- κ B信号通路的重楼皂苷抗肿瘤体内药效物质基础及作用机制研究,负责人:何昊;陕西省中医药管理局科研课题:基于“峻下-消肿”理论对猫眼草诱导肝癌细胞凋亡的药效物质基础研究(JCMS024),负责人:张彦;西安医学院国基金培育项目(2016GJFY07):基于EGFR靶点的木鳖子抗乳腺癌活性成分及作用机制研究,负责人:郑蕾;西安医学院国基金培育项目(2016GJFY06):基于VEGF/KDR通路的黄芩苷抑制肿瘤血管新生作用机制研究,负责人:申旭霁;西安医学院2016年大学生创新基金项目(2016DXS1-18):基于psbA-trnH基因片段的大戟属植物的DNA鉴定研究,负责人:刘强;陕西省大学生创新训练计划S201711840023基于rDNA的ITS2条形码序列鉴定大戟属药用植物,负责人:梁晶晶。

** 通讯作者:张彦,副教授,硕士,主要研究方向:中药成分与药效活性。

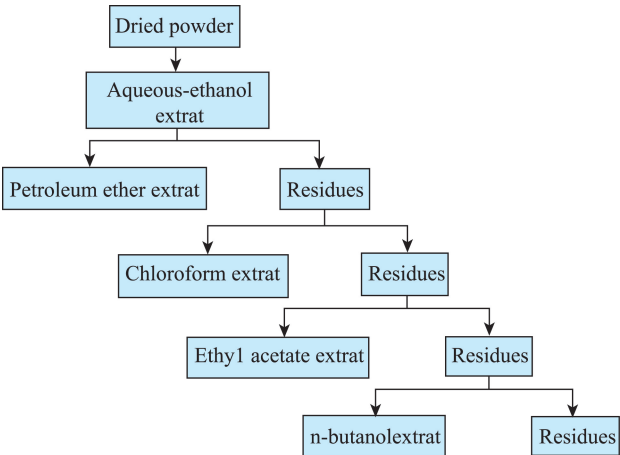


图1 猫眼草乙酸乙酯浸膏提取工艺图

表1 线性关系的考察结果

编号	1	2	3	4	5	6
进样量(μg/μL)	0.004	0.008	0.020	0.032	0.040	0.060
峰面积	156.30	289.40	746.80	1 150.60	1 470.70	2 290.40

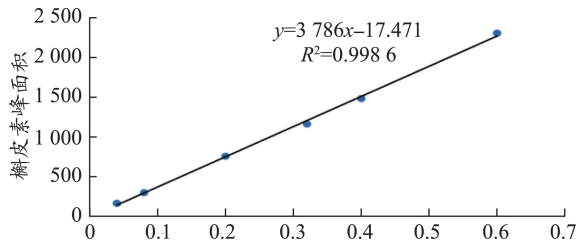


图2 槲皮素标准曲线

检定所,批号110831-200302)。

乳腺癌细胞ZR-75-30(购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库)。

1.2 仪器与材料

电子天平(赛的利斯科学仪器有限公司),二氧化碳培养箱 Thermo 311(赛默飞世尔生物化学制品有限公司),倒置显微镜 IX739(日本奥林巴斯),超净工作台(CJ-2S 104),低速台式离心机(上海安亭科学仪器厂),自动全波长酶标仪(1510- 02340, Thermo Scientific),多头磁力加热搅拌器(常州国华电器有限公司),冰箱BCD-301WD(海尔公司),细胞计数板(科昊生物工程责任有限公司),电子天平AX224ZH(奥豪斯仪器有限公司),微量振荡器XK96-3(江苏新康医疗器械有限公司),电热恒温水浴锅DZKW-D-2(北京市永光明医疗仪器厂),涡旋仪QL-901(海门市其林贝尔仪器制造有限公司),96孔板(TCP 01096),Agilent 1220高效液相色谱仪。

甲醇(分析纯,批号201603181,天津市河东区红岩试剂厂),RPMI1640培养基(赛默飞世尔生物化学制品有限公司),胎牛血清(浙江航天生物科技有限公司),四甲基偶氮唑蓝MTT(生化级,Sigma),二甲基亚砜(DMSO,AR,天津市河东区红岩试剂厂),DMSO(DH105-7,科昊生物工程责任有限公司),胰蛋白酶(上海蓝季生物有限公司),氯化钠AR(上海实验试剂有限公司),氯化钾AR(天津市致远化学试剂有限公司),双抗(青霉素和链霉素),碳酸氢钠,石油醚(天津市富宇精细化工有限公司),乙酸乙酯(广东省化学试剂工程技术研究开发中心),柱层析硅胶(青岛海洋化工厂)。

1.3 色谱条件

1.3.1 测定槲皮素色谱条件

色谱柱 Agilent 5 HC-C18(2)(4.6×250 mm, 5 μm); 流动相:甲醇-0.4%磷酸溶液(50:50);流速:1 mL·min⁻¹; 检测波长:360 nm;柱温:室温;进样量:10 μL。

1.3.2 测定没食子酸色谱条件

色谱柱 Agilent 5 HC-C18(2)(4.6×250 mm, 5 μm); 流动相:甲醇-0.01%磷酸溶液(7:93);流速:1 mL·min⁻¹; 检测波长:273 nm;柱温:室温;进样量:10 μL。

2 方法与结果

2.1 高效液相色谱法测定猫眼草乙酸乙酯部分槲皮素的含量

2.1.1 供试品溶液及槲皮素对照品的制备

精密称定猫眼草乙酸乙酯部分提取物0.012 5 g,置具塞锥形瓶中,精密加入80%的甲醇100 mL,密封,称定重量,超声提取5 min,取出,再称定重量,用80%甲醇补足减失重量,摇匀滤过。精密量取20 mL,加入25%盐酸7 mL,置85℃水浴中水解30 min,取出冷却,转移至50 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀滤过,取续滤液,即得50 μg·mL⁻¹供试液。

取槲皮素对照品,精密称定,加80%的甲醇制成每1 mL含40 μg的溶液,即40 μg·mL⁻¹的对照品溶液。

2.1.2 方法学考察

2.1.2.1 线性关系考察

按照表1,在“1.3.1”项的色谱条件下进行线性关系考察,标准曲线结果如图2。以峰面积对进样量作线性回归,得线性范围和回归方程为槲皮素:Y=378 6X-17.471, r=0.999 3,线性范围0.004 μg/μl-0.060 μg/μl。

2.1.2.2 精密度考察

精密吸取上述浓度为 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 槲皮素对照品溶液 $10 \mu\text{L}$, 按“1.3.1”项的色谱条件连续进样6次, 并记录其色谱图, 测定其峰面积, 结果见表2。

所得的平均峰面积值为 1464.20 , 其相对偏差RSD为2.51%, 结果表明该仪器具有良好的精密度。

2.1.2.3 稳定性考察

精密吸取相同批次所制备的同一份供试品溶液, 于室温下放置, 分别在0、4、6、8、10、12 h按“1.3.1”项的色谱条件进样, 记录其色谱图, 测定槲皮素的峰面积, 结果见表3。

由表3可知, 在12 h内槲皮素的平均峰面积值为 357.60 , RSD为2.26%, 表明12 h内的稳定性良好。

2.1.2.4 重复性试验

精密称取相同批次的猫眼草提取物粉末6份, 每份约 0.1 g , 按“2.1.1”项下方法平行制备供试品溶液, 分别精密吸取供试品溶液 $10 \mu\text{L}$, 注入高效液相色谱仪中, 按“1.3.1”项的色谱条件进行测定, 并记录其色谱图, 计算其含量。结果见表4。

由表4可知测得猫眼草提取物中槲皮素的平均含量为19.66%, RSD值为2.76%。

2.1.2.5 加样回收率试验

取已知含量的猫眼草提取物粉末6份, 每份约 0.05 g , 精密称定, 分别精密加入浓度为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的槲皮素储备液 10 mL , 按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液并在“1.3.1”项的色谱条件下进行含量测定, 并记录其色谱图, 后计算其回收率加样回收率结果见表5。

由表5可知所得的平均回收率为98.19%, 其RSD值为2.27%, 表明该方法回收率良好。

2.1.3 猫眼草乙酸乙酯部分中槲皮素的含量测定

分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 $10 \mu\text{L}$, 按“1.3.1”项的色谱条件进样, 测定, 记录色谱图。色谱图如下:

由图3、图4和表6可得: 猫眼草乙酸乙酯部分供

表2 精密度试验结果

编号	进样量/ μL	峰面积	平均峰面积	RSD/%
1	10	1478.90	1464.20	2.51
2	10	1500.20		
3	10	1407.60		
4	10	1433.80		
5	10	1467.60		
6	10	1497.20		

表3 稳定性实验结果

编号	时间/h	槲皮素峰面积	平均峰面积	RSD/%
1	0	357.60	357.60	2.26
2	4	368.70		
3	6	349.90		
4	8	362.80		
5	10	359.80		
6	12	346.90		

表4 重复性试验结果

编号	含量/%	平均含量/%	RSD/%
1	18.97	19.66	2.76
2	19.91		
3	19.97		
4	20.02		
5	20.13		
6	18.96		

试品溶液与槲皮素对照品溶液在相同的保留时间内有色谱峰出现, 色谱峰的峰形好, 且基线稳定。因此猫眼草乙酸乙酯部分含有槲皮素, 计算得供试品溶液中槲皮素含量为19.99%。

2.2 高效液相色谱法测定乙酸乙酯部分没食子酸含量

2.2.1 供试品溶液和没食子酸对照品溶液的制备

按“2.1.1”项下供试品溶液的制备方法制备供试品溶液。

取没食子酸对照品, 精密称定, 加80%的甲醇制成每 1 mL 含 $20 \mu\text{g}$ 的溶液, 即 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

表5 加样回收率结果

编号	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.1999	0.20	0.4067	101.70	98.19	2.27
2	0.1876	0.20	0.3707	95.64		
3	0.1762	0.20	0.3668	97.50		
4	0.2003	0.20	0.3897	97.35		
5	0.2011	0.20	0.4012	100.02		
6	0.1987	0.20	0.3865	96.94		

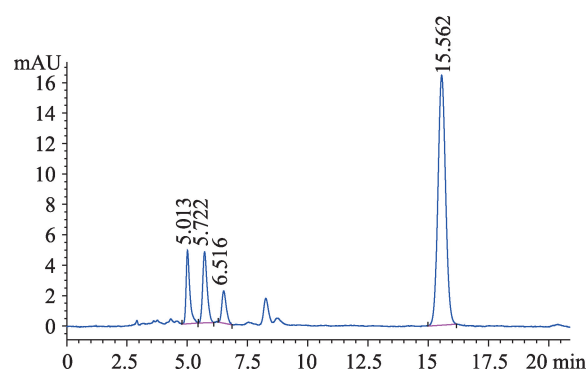


图3 供试品溶液色谱图

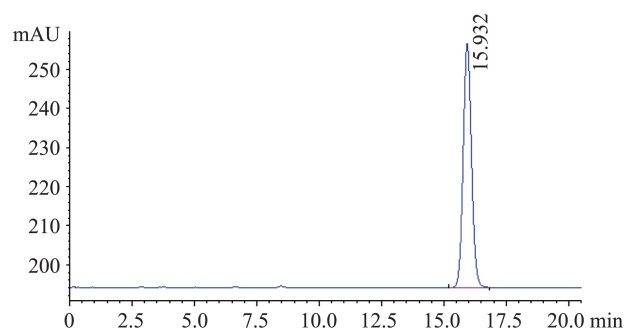


图4 槲皮素对照品色谱图

表6 供试品溶液和槲皮素标准品溶液保留时间与峰面积比较

	保留时间(min)	峰面积
供试品溶液	15.56	362.87
槲皮素对照品溶液	15.93	1 452.02

表7 线性关系实验结果

编号	1	2	3	4	5	6
进样量 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0.020	0.040	0.080	0.120	0.600	0.200
峰面积	52.90	105.70	216.80	327.90	445.50	529.60

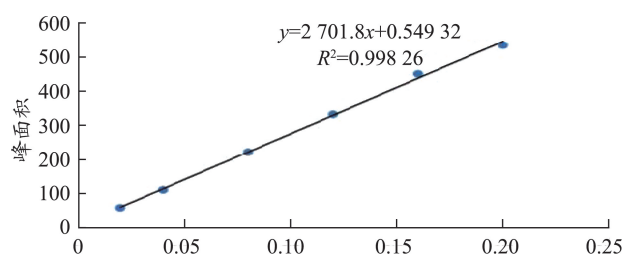


图5 没食子酸标准曲线

2.2.2 方法学考察

2.2.2.1 线性关系考察

按照表7,在“1.3.2”项的色谱条件下进行线性关系考察,标准曲线结果如图5。以峰面积对进样量作线性回归,得线性范围和回归方程为没食子酸: $Y=2701.8X+$

表8 精密度实验结果

编号	进样量/ μL	峰面积	平均峰面积	RSD/%
1	10	529.70	531.90	1.02
2	10	525.10		
3	10	532.50		
4	10	528.10		
5	10	539.90		
6	10	535.90		

表9 稳定性实验结果

编号	时间/h	没食子酸峰面积	平均峰面积	RSD/%
1	0	738.60	738.20	1.48
2	4	725.40		
3	6	755.50		
4	8	744.90		
5	10	735.80		
6	12	728.90		

0549 3, $r=0.9993$, 线性范围 $0.020\text{--}0.20\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

2.2.2.2 精密度考察

精密吸取上述浓度为 $20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 没食子酸对照品溶液 $10\text{ }\mu\text{L}$, 按“1.3.2”项的色谱条件连续进样6次, 并记录其色谱图, 测定其峰面积, 精密度试验结果见表8。

由表8可知平均峰面积值为531.90, 其相对偏差(RSD)为1.02%, 结果表明该仪器具有良好的精密度。

2.2.2.3 稳定性考察

精密吸取相同批次所制备的同一份供试品溶液, 于室温下放置, 分别在0、4、6、8、10、12 h按“1.3.2”项的色谱条件进样, 记录其色谱图, 测定槲皮素的峰面积, 稳定性试验结果见表9。

由表9可知, 12 h内槲皮素的平均峰面积值为738.2, RSD为1.48%, 表明猫眼草提取物溶液在12 h内的稳定性良好。

2.2.2.4 重复性试验

精密称取相同批次的猫眼草提取物粉末6份, 每份约0.1 g, 按“2.2.1”项下方法平行制备供试品溶液, 分别精密吸取供试品溶液 $10\text{ }\mu\text{L}$, 注入高效液相色谱仪中, 按“1.3.2”项的色谱条件进行测定, 并记录其色谱图, 计算其含量。

由表10可知, 猫眼草提取物中没食子酸的平均含量为 $55.18\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD值为1.38%。结果见表10。

2.2.2.5 加样回收率试验

由表11可知, 平均回收率为99.23%, 其RSD值为2.55%, 表明该方法的回收率良好。

2.2.3 猫眼草乙酸乙酯部分中没食子酸含量测定

分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL,按“1.3.2”项的色谱条件进样,测定,记录色谱图。色谱图如下:

由图 6、图 7 和表 12 可知:猫眼草乙酸乙酯部分供试品溶液与没食子酸对照品溶液在相同的保留时间内有色谱峰出现,色谱峰的峰形好,且基线稳定。因此,猫眼草乙酸乙酯部分含有没食子酸,计算得供试品溶液中没食子酸含量为 55.04%。

2.3 猫眼草乙酸乙酯部分的初步分离

猫眼草乙酸乙酯部分干浸膏 5 g 经硅胶柱层析(100–200 目),梯度洗脱系统依次为:石油醚、石油醚:乙酸乙酯(8:2)、石油醚:乙酸乙酯(7:3)、石油醚:乙酸乙酯(6:4)、石油醚:乙酸乙酯(5:5)、石油醚:乙酸乙酯(4:6)、乙酸乙酯、乙酸乙酯:甲醇(5:5)、乙酸乙酯:甲醇(4:6)、甲醇,等体积回收,薄层检识,合并滤液,使用恒温水浴锅挥干溶剂得各部分浸膏。操作流程如下图 8。

2.4 猫眼草乙酸乙酯部分各组分的抗肿瘤活性比较

2.4.1 猫眼草乙酸乙酯部分各组分药液的配制

精密称取猫眼草各组分浸膏,溶于 DMSO 中(终浓度<0.5%),涡旋震荡,配成终浓度为 0.1 g·mL⁻¹ 药液。4℃冰箱保存,使用前用相应培养液稀释。

表 10 重复性试验结果

编号	含量/%	平均含量/%	RSD/%
1	54.92	55.18	1.38
2	56.02		
3	55.49		
4	54.98		
5	55.76		
6	53.89		

2.4.2 细胞培养与实验分组

取对数生长期的乳腺癌细胞 ZR-75-30,胰酶消化计数,调整细胞密度为 40 000 mL⁻¹,180 μL 等量接种于 96 孔培养板,培养 24 h,待细胞贴壁。

每株细胞分实验组和阴性对照组,实验组给予猫眼草乙酸乙酯层各组分浸膏,各组分浸膏按药物浓度由低到高分为 4 组,分别为 50 μg·mL⁻¹ 组、75 μg·mL⁻¹ 组、100 μg·mL⁻¹ 组、150 μg·mL⁻¹ 组,每孔 20 μL,阴性对照组加入等量的细胞培养液(DMSO<0.5%)。实验组与对照组均设 3 个复孔。加药后将细胞培养板放于 37℃,5% CO₂ 的细胞培养箱中分别孵育 48 h。

2.4.3 MTT 检测

实验终止前,每孔加入 100·L MTT 溶液(5 mg·mL⁻¹),继续放入细胞培养箱孵育 4 h。孵育结束时甩去培养液,各孔加入 150 μL DMSO 终止反应,振荡摇匀使结晶

表 11 加样回收实验结果

编号	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.275 2	0.25	0.530 2	100.95	99.23	2.55
2	0.268 3	0.25	0.511 4	98.66		
3	0.281 4	0.25	0.530 9	99.90		
4	0.279 2	0.25	0.499 6	94.40		
5	0.267 7	0.25	0.518 3	100.11		
6	0.274 6	0.25	0.531 3	101.33		

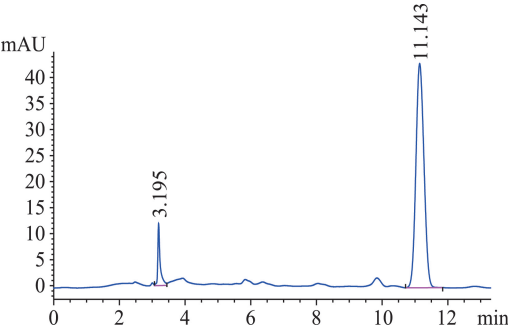


图 6 供试品溶液色谱图

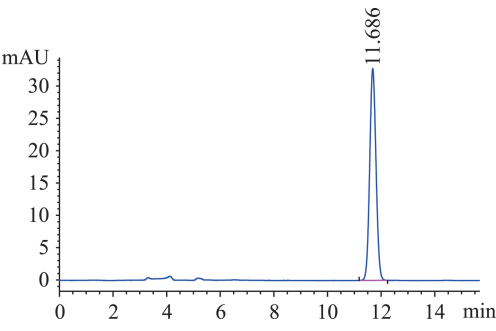


图 7 没食子酸对照品溶液色谱图

表 12 供试品溶液和槲皮素标准品溶液保留时间与峰面积比较

	保留时间(min)	峰面积
供试品溶液	11.14	735.58
没食子酸对照品溶液	11.68	534.55

物充分溶解。用酶标仪测量各孔在 490 nm 波长处的光密度 OD 值,取 3 孔 OD 值求平均值,结果见表 15。

依据下式计算肿瘤细胞生长抑制率 IR%,结果见表 16 和图 9。

$$IR\% = \left(1 - \frac{\text{给药组OD均值}}{\text{对照组OD均值}}\right) \times 100\%$$

由表 16 和图 9 可得,在浓度 50 μg·mL⁻¹–150 μg·mL⁻¹ 范围内随着药物浓度的增大,组分一、组分二、组分三、组分四、组分五、组分六对乳腺癌 ZR-75-30 对乳腺癌 ZR-75-30 细胞生长均有抑制作用。细胞生长抑制率增大。其中组分二和组分五对乳腺癌细胞的生

长抑制作用较强。

3 结果与讨论

综上所述,由高效液相结果可知猫眼草乙酸乙酯部分含有黄酮类物质和酚酸类物质。由 MTT 结果可知极性较小的组分二和极性较大的组分五均有较强抗肿瘤活性,提示可能猫眼草中含有两类抗肿瘤的活性物质,本研究首次发现这一现象。结合相关文献可推测,二萜或三萜类成分为极性小的抗肿瘤活性成分^[17-18],黄酮和有机酸类为极性较大的抗肿瘤活性成分^[20]。该假设有待于进一步实验予以证实。

抗肿瘤活性研究结果表明,在浓度 50 μg·mL⁻¹–75 μg·mL⁻¹ 范围内,猫眼草乙酸乙酯部分各组分均对乳腺癌细胞 ZR-75-30 的生长有抑制作用。组分一、组分二、组分三、组分五均呈现一定的梯度关系,随着

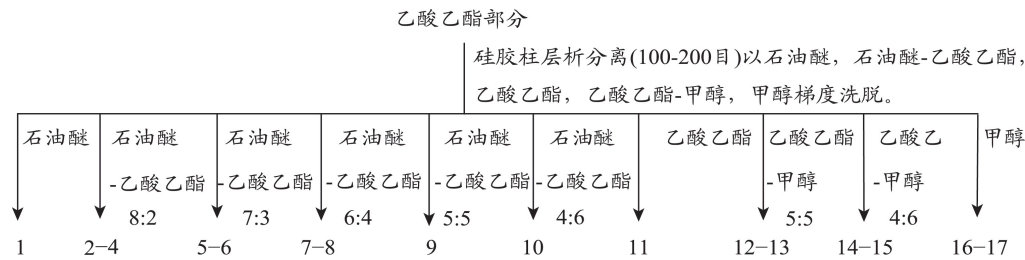


图 8 乙酸乙酯部分分离流程图

表 13 合并滤液序号与所得组分表

组分	组分一	组分二	组分三	组分四	组分五	组分六
合并滤液序号	1	2-4	5-6	7-11	12-13	14-17

表 14 猫眼草乙酸乙酯层各组分浸膏量与加入 DMSO 溶剂量

	组分一	组分二	组分三	组分四	组分五	组分六
浸膏量/mg	3.8	7.2	10.7	12.3	2.1	1.3
与原药材质量比/mg·kg ⁻¹	2.80	5.31	7.90	9.08	1.55	0.96
DMSO 溶剂量/μL	38	72	107	123	21	13

表 15 猫眼草乙酸乙酯部分各组分不同浓度下的光密度 OD 平均值比较

组分 \ 浓度	空白	50 μg·mL ⁻¹	75 μg·mL ⁻¹	100 μg·mL ⁻¹	150 μg·mL ⁻¹
组分一	0.662 2	0.606 6	0.5799	0.549 8	0.503 5
组分二	0.662 2	0.571 5	0.532 3	0.486 2	0.410 5
组分三	0.662 2	0.620 4	0.596 2	0.558 3	0.476 8
组分四	0.662 2	0.605 3	0.585 5	0.537 9	0.530 5
组分五	0.662 2	0.533 9	0.508 2	0.481 5	0.436 5
组分六	0.662 2	0.563 5	0.492 9	0.539 4	0.513 9

表 16 猫眼草乙酸乙酯部分各组分不同浓度下
对乳腺癌细胞生长抑制率比较

组分	50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
组分一	8.40%	12.83%	16.97%	23.96%
组分二	13.40%	19.62%	26.58%	38.01%
组分三	6.31%	9.97%	15.69%	28.00%
组分四	8.59%	11.58%	18.77%	19.21%
组分五	19.37%	23.25%	27.29%	34.08%
组分六	14.90%	25.56%	18.54%	22.40%

药物浓度的升高对乳腺癌细胞的生长抑制率增强。组分四和组分六不呈现梯度关系,对于这一实验现象,有待后续实验来阐明。

中药因具有低毒、多靶点、多途径、不易耐药、可提高免疫力等特点,使其在肿瘤的预防和治疗中受到重视。猫眼草作为中药泽漆的常见民间代用品,在我国各地有虽多有应用,但用法用量、临床适应病证均不统一^[3,20-26]。文献鲜有对其化学成分与作用机制的系统研

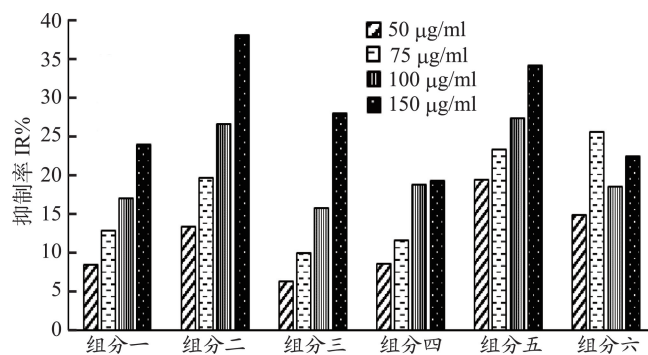


图 9 乙酸乙酯部分各组分不同浓度下对乳腺癌细胞生长抑制率 IR% 比较图

究,因此通过现代研究手段来阐明其主要成分与抗肿瘤活性与机制并深入探讨其构效关系是十分必要的^[11,12,14,15]。另外,现有对猫眼草抗肿瘤活性研究多在胃癌及肝癌中^[11,14],鲜有对其抗乳腺癌方面的活性评价。因此本课题组开展猫眼草对乳腺癌肿瘤的抑制作用研究是十分有意义的。本课题将为民间中医药在肿瘤治疗及临床运用提供研究基础。

参考文献

- 马金双, 程用谦. 中国植物志第44卷第3分册. 北京: 科学出版社, 1997.
- 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第四册. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 802-804.
- 郑健, 庞德湘. 庞德湘教授治癌常用药对撮萃. 深圳中西医结合杂志, 2012, 22(2): 90-93.
- 张中建. 自拟猫眼止痛膏治疗癌痛的临床观察. 河南肿瘤学杂志, 2004, (4): 301.
- 张文静, 翁连进, 易立涛, 等. 猫眼草化学成分的研究. 中草药, 2016, 47(04): 554-558.
- 刘超, 孙会, 王维婷, 等. 猫眼草化学成分研究. 中药材, 2015, 38(03): 514-517.
- Liu C, Liao Z X, Liu S J. Two new diterpene derivatives from *Euphorbia lunulata* Bge and their anti-proliferative activities. *Fitoterapia*, 2014, 96: 33-38.
- Yang, Z G, Jia, L N, Shen Y. Inhibitory Effects of Constituents from *Euphorbia lunulata* on Differentiation of 3T3-L1 Cells and Nitric Oxide Production in RAW264. 7 Cells. *Molecules*, 2011, 16(10): 8305-8318.
- Nishimura T, Wang, LY, Kusano K. Flavonoids that mimic human ligands from the whole plants of *Euphorbia lunulata*. *Chem Pharmace Bulle*, 2005, 53(3): 305-308.
- 张文静. 猫眼草的化学成分及抗肿瘤活性研究. 福州: 华侨大学硕士学位论文, 2016.
- 王亚萍, 陈镨, 惠起源. 中草药猫眼草提取物诱导人胃癌细胞凋亡可能分子机制的探讨. 现代肿瘤医学, 2015, 23(08): 1169-1171.
- 王亚萍. 中草药猫眼草提取物诱导人胃癌 SGC-7901 细胞凋亡的研究. 延安: 延安大学硕士学位论文, 2015.
- 戎晋华. 猫眼草抗氧化、抗肿瘤作用有效成分的研究. 青岛: 青岛科技大学硕士学位论文, 2014.
- 王珏, 李眺帆, 谢普, 等. 猫眼草的抗肿瘤活性成分研究. 中草药, 2012, 43(10): 1891-1895.
- Gao F, Fu Z Y; Tian H Y., The *Euphorbia lunulata* Bge extract inhibits proliferation of human hepatoma HepG2 cells and induces apoptosis. *J Buon*, 2013, 18(2): 491-495.
- 张彦, 雷姣姣, 郑蕾, 等. 猫眼草提取物对乳腺癌 2R-75-30 细胞抑制作用的研究. 中医药导报, 2017, 23(15): 34-35+39.
- 李军, 吴霜, 赵明, 等. 猫眼草中 1 个新假白榄烷型二萜. 中草药, 2015, 46(14): 2045-2047.
- 赵明, 吴霜, 李军, 等. 猫眼草化学成分研究. 中国中药杂志, 2014, 39(12): 2289-2294.
- 杨黎彬, 李康伟, 刘少静, 等. 猫眼草不同药用部位总黄酮含量测定. 应用化工, 2014, 43(01): 187-188+191.
- 苏海方, 张立亭. 张鸣鹤治疗类风湿关节炎经验浅析. 山西中医, 2013, 29(10): 7-8.
- 杜丽, 赵泉霖. 郭宝荣运用清热解毒法治疗糖尿病经验. 湖南中医杂志, 2014, 30(07): 28-29+42.
- 猫眼草治疗老年慢性气管炎的疗效观察. 新医药学杂志, 1972, (02): 14-15.
- 闫宝环, 刘建震, 董淑梅, 等. 猫眼草治疗颈部溃疡型淋巴结核的临

- 床观察. 中药药理与临床, 2015, 31(02): 170-171.
- 24 万鲲, 王世岭. 猫眼草提取物对人增生性瘢痕成纤维细胞抑制作用的研究. 中国药物应用与监测, 2007, (01): 37-39.
- 25 李峰, 王宁. 猫眼草治疗刺痒. 中国民间疗法, 2009, 17(06): 63.
- 26 滕上仁, 栗秀玲. 猫眼草治疗银屑病 10 例疗效观察. 中国社区医师, 2005, (21): 34.

Study on Antitumor Activity of Ethyl Acetate Extract of *Euphorbia lunulata* Bge

Zhang Yan^{1,2}, Zheng Lei^{1,2}, He Hao^{1,2}, Shen Xuji^{1,2}, Lei Jiaojiao¹, Liu Qiang¹, Liang Jingjing¹

(1. College of Pharmacy, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China;

2. Institute of Medicine, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China)

Abstract: The ethyl acetate extract of *Euphorbia lunulata* Bge was separated and researched on anticancer activity about it with in vitro cell experiments, in order to provide a theoretical basis for the exploit and utilization of *E. lunulata* and more options to develop natural anticancer drugs. Quercetin and Gallic Acid in ethyl acetate were extracted by HPLC, which the ethyl acetate extract of *E. lunulata* was separated and extracted by solvent system. The MTT was used to measure the inhibition of each component with different concentration from ethyl acetate extract to the 2R-75-30 breast cancer cell. The results showed that Quercetin and Galic Acid of ethyl acetate extract were 19.99% and 55.04%, respectively. There were 17 component from the ethyl acetate extract, and finally merged into six fractions. Each component (the concentration of 50 $\mu\text{g/ml}$ –150 $\mu\text{g/ml}$ range) from ethyl acetate extract of *E. lunulata* could inhibit the growth of ZR-75-30 breast cancer cell. And a certain gradient relationship with the drug concentration increased with the inhibition rate enhancement on the 2R-75-30 breast cancer cell's growth. The 2nd fraction showed the highest activity. It was concluded that there were flavonoids and phenolic acids in ethyl acetate extract. Each component from the extract showed inhibition on the growth of breast cancer cell if it was further separated. This study was designed to provide a theoretical basis to exploit the anticancer drugs from *E. lunulata*.

Keywords: *Euphorbia lunulata* Bge, ethyl acetate extract, MTT, antitumor activity

(责任编辑:张 静,责任译审:王 晶)