

多穗柯挥发性组分分析及抗癌活性的初步研究

燕妮, 王佐, 高雄, 张媛媛, 林晓蓉, 李斌, 陈忠正

(华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

摘要: 本研究以多穗柯为材料, 采用同时蒸馏萃取法 (SDE) 提取挥发性组分, 通过气质联用仪 (GC-MS) 分析挥发性组分组成, 并以 Hepa1c1c7 小鼠肝癌细胞模型, 以细胞存活率大于 50%, 诱导醌还原酶 (QR) 活性等于或大于 2 为活性指标, 研究多穗柯挥发性组分及其主要单体物质的抗癌活性。结果显示, GC-MS 共鉴定出 80 种多穗柯挥发性物质, 占总挥发性组分相对百分含量的 92.56%, 其中酮类、醇类和醛类物质是多穗柯挥发性组分的主要类型, 其主要成分有香叶基丙酮、 β -紫罗酮、壬醛和桉油烯醇等。抗癌活性鉴定表明, 多穗柯挥发性组分的浓度为 (27.50 ± 0.10) $\mu\text{g/mL}$ 时可诱导 QR 活性达到倍增, 具有较强的抗癌活性; 其中芳樟醇、香叶基丙酮和壬醛三个主要挥发性单体成分诱导 QR 活性达到倍增的浓度分别为 (54.53 ± 0.10) $\mu\text{g/mL}$ 、 (283.10 ± 0.10) $\mu\text{g/mL}$ 和 (297.77 ± 0.12) $\mu\text{g/mL}$ 。

关键字: 多穗柯; 挥发性组分; 成分分析; 抗癌活性

文章编号: 1673-9078(2017)3-35-39

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.3.006

Analysis of the Volatile Components of *Lithocarpus polystachyus* Rehd. and a Preliminary Study of Their Anticancer Activity

YAN Ni, WANG Zuo, GAO Xiong, ZHANG Yuan-yuan, LIN Xiao-rong, LI Bin, CHEN Zhong-zheng

(South China Agricultural University, College of Food Science, Guangzhou 510642, China)

Abstract: *Lithocarpus polystachyus* Rehd. was selected as a starting material to extract volatile components using simultaneous distillation extraction (SDE) method. The composition of volatile components was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Subsequently, the anticancer activities of the volatile components and major monomeric substances of *Lithocarpus polystachyus* Rehd. were studied using mouse hepatoma cells (Hepa1c1c7). A cell viability of greater than 50% and quinone reductase (QR) induction activity greater than or equal to 2 were set as the activity indicators. The results showed that a total of over 80 types of major volatile compounds were identified by the GC-MS analysis, accounting for 92.56% of the total volatiles. Ketones, alcohols, and aldehydes were the major chemical types. Among them, geranylacetone, β -ionone, nonanal, and spathulenol were the most abundant volatile components. The measurement of anti-cancer activity indicated that the induced QR activity was amplified when the concentration of volatile components of *Lithocarpus polystachyus* Rehd. was (27.50 ± 0.10) $\mu\text{g/mL}$. And the concentrations of linalool, geranylacetone, and nonanal, the three main volatile components that enhanced the induced QR activity, were (54.53 ± 0.10) $\mu\text{g/mL}$, (283.10 ± 0.10) $\mu\text{g/mL}$, and (297.77 ± 0.12) $\mu\text{g/mL}$, respectively.

Key words: *Lithocarpus polystachyus* Rehd.; volatile components; composition analysis; anti-cancer activity

随着人类生活环境和生活方式的改变以及医学的进步, 一般性的传染病逐渐被控制, 癌症则成为严重危害人类健康的主要疾病之一。由于肿瘤发病的多阶段性及相关因素交互作用的复杂性, 人类尚未发现癌症治疗的有效方法, 因此癌症预防成为人们抵御癌症侵

收稿日期: 2016-04-27

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS-23)

作者简介: 燕妮 (1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物提取及活性研究

通讯作者: 陈忠正 (1974-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品科学、食品生物技术等; 李斌 (1960-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品化学与营养

袭的重要策略。II 相解毒酶包括醌还原酶 (QR)、过氧化氢酶 (CAT) 及谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 等, 因能清除体内多种致癌物而起到良好的防癌抗癌作用^[1]。因此, 从天然植物化合物中寻找能诱导 II 相解毒酶表达的活性组分对防癌抗癌具积极意义。QR 又称 DT-硫辛酰胺脱氢酶, 主要在肿瘤的诱发阶段发挥预防作用。小鼠肝癌细胞 Hepa1c1c7 的 QR 表达稳定、对诱导物响应好, 已发展为一种简便快捷进行抗癌活性物质筛选的细胞模型^[2]。

植物中的活性成分包括挥发性组分和非挥发性组分。非挥发性组分种类繁多, 包括黄酮类化合物、类胡萝卜素类化合物和异硫氰酸盐类化合物^[3]等, 并呈

现很好的抗癌活性。植物挥发性组分较复杂,主要包括烃、萜烯等碳氢化合物和醇、醛、酮、酸、醚、酯和内酯等含氧化合物,其可防治心血管疾病、糖尿病、老年痴呆^[4,5]及癌症等重大疾病,并主要通过诱导细胞凋亡和抑制癌细胞增殖发挥癌症预防作用^[6]。

多穗柯(*Lithocarpus polystachys* Rehd.)属壳斗科栎属常绿植物,主要分布于我国长江以南地区,是民间常用的饮用植物和传统中草药,具有清热利尿、滋润肝肾等功效。多穗柯中主要含有黄酮类化合物、三萜类化合物、二氢查耳酮衍生物、多穗柯棕色素、多糖以及氨基酸、微量元素等物质,具降血糖、降血压、抑菌、抗癌及抗炎等多种生物活性。以往研究主要集中在其非挥发性物质分离提取及其功能研究方面,鲜有关于多穗柯挥发性物质的研究报道。为此,本研究以多穗柯为材料,通过同时蒸馏萃取法(SDE)提取挥发性组分,采用GC-MS进行组分分析,利用Hepa1c1c7小鼠肝癌细胞模型研究其挥发性组分的抗癌活性,以期多穗柯资源挥发性组分的开发利用提供前期的研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

多穗柯叶2014年10月采自广西壮族自治区百色市那坡县;小鼠肝癌细胞株Hepa1c1c7购于美国模式培养物储存库(ATCC)。

1.2 主要试剂及仪器设备

1.2.1 实验试剂

胎牛血清、青霉素-链霉素双抗、 α -MEM培养基、胰蛋白酶,Life公司;结晶紫、洋地黄皂苷、甲萘醌、四甲基偶氮唑蓝、6-磷酸葡萄糖、6-磷酸葡萄糖脱氢酶、台盼蓝、NADP和FAD, Sigma公司;十二烷基磺酸钠和牛血清白蛋白,北京普博欣生物科技有限公司;二氯甲烷(分析纯),上海凌峰试剂有限公司。

1.2.2 仪器设备

HERAcell 150i CO₂培养箱, Thermo公司; BT 25S/BS 124S电子天平, Mettler Toledo公司; Ckx41显微镜, Olympus公司; Spectra Max Plus酶标仪, Molecular Devices公司; HSC-12B氮吹仪, 天津市恒奥发展有限公司; SB-5200 DTD超声波清洗机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; Milli-Q超纯水系统, Millipore公司; GCMS-QP2010 Ultra, 日本岛津公司。

1.3 实验方法

1.3.1 SDE法提取多穗柯挥发性组分

称取100 g粉碎样品置于1 L圆底烧瓶中,按照1:5 (*m/V*)料水比加入一级水,混合均匀后将圆底烧瓶置于SDE装置的一端,用电热套加热,保持微沸;装置的另一端连接装有60 mL二氯甲烷的圆底烧瓶,用55 °C恒温水浴加热。提取3 h后,将所得二氯甲烷萃取液用氮气吹干,直至无二氯甲烷溶液残留,得到的样品密封-20 °C保存。

1.3.2 多穗柯挥发性组分成分分析

1.3.2.1 测定条件

色谱条件:HP-INNOWAax弹性石英毛细管柱(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m);进样口温度为230 °C;载气为高纯氦气,纯度>99.999%,流速1 mL/min;起始柱温为40 °C,保持2 min,以3 °C/min升至110 °C保持2 min,然后以5 °C/min升至170 °C保持2 min,再以10 °C/min升至230 °C保持1 min,不分流进样。

MS条件:EI电离源,电子轰击能量70 eV;电子倍增器电压350 V,质量扫描范围35~335 *m/z*。

1.3.2.2 数据处理

利用WILEY和NIST两个谱库对得到的质谱图进行串联检索,选择较高匹配度的检索结果,并与相关文献数据比对进行定性;采用峰面积归一化法定量,以每个组分峰面积占总色谱峰面积之比表示其相对含量,从而确定挥发性组分的相对百分含量。

1.3.3 细胞培养与传代

小鼠肝癌细胞Hepa1c1c7经解冻复苏后,培养于37 °C、5%的CO₂培养箱中,培养液为89% α -MEM培养基、10% FBS(经热处理和活性炭吸附)、1%青霉素(100 U/mL)和链霉素(100 μ g/mL),每隔3 d继代一次。

1.3.4 诱导QR活性测定

参照Prochask和Santamaria的方法^[7]

(1)接种细胞:取小鼠肝癌细胞Hepa1c1c7细胞接种于96孔板,每孔200 μ L,铺板浓度为 5×10^3 个/孔,于37 °C、含5%的CO₂培养箱中培养24 h;(2)加样:弃去旧培养液,添加含有不同浓度多穗柯挥发性组分的新鲜培养液,150 μ L/孔培养48 h;(3)测定:两块相同的板分别做上标记:A板和B板,分别弃去旧培养液,B板每孔加50 μ L的0.08% (*m/V*)洋地黄皂苷(含2 mM EDTA溶液),轻微震荡30 min。用酶标仪测定490 nm波长下10 min内反应液中吸光值变化的动力学曲线。A板每孔加入100 μ L结晶紫溶液,染色15 min,在水中漂洗干净;再加入0.5% SDS溶液振荡1 h,用酶标仪测定610 nm吸光值。样品的相对QR诱导活性用CD值(Concentration to double

relative QR specific activity, CD) 表示, 定义为使相对 QR 诱导活性值达到倍增时对应的样品浓度。以细胞活力>0.5 (即 IC₅₀>50%), 同时相对 QR 活性≥2 作为样品具有抗癌活性的筛选指标, 所测定样品重复 2 次以上, 结果以平均数±标准偏差来表示。

醌还原酶诱导活性的计算方法:

$$\text{相对QR活性} = \frac{(\text{样品OD}_{490} - \text{空白OD}_{490}) / (\text{样品OD}_{610} - \text{空白OD}_{610})}{(\text{对照OD}_{490} - \text{空白OD}_{490}) / (\text{对照OD}_{610} - \text{空白OD}_{610})}$$

$$\text{细胞活力} = \frac{\text{样品OD}_{610} - \text{空白OD}_{610}}{\text{对照OD}_{610} - \text{空白OD}_{610}}$$

1.3.5 数据统计分析

组间数据比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 并利用 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析, $p < 0.05$ 为差异有统计学意义, $p < 0.01$ 为具有显著差异性。

2 结果与分析

2.1 多穗柯挥发性组分成分鉴定与分析

本研究采用 SDE 法从多穗柯中提取得到的挥发性组分具有特殊的青甜香, 利用 GC-MS 技术对提取的挥发性物质进行了组分鉴定分析, 结果如表 1 和表 2 所示。

从多穗柯中提取的挥发性组分共含有 87 种物质, 鉴定出结构的有 80 种物质, 占总挥发性组分的 92.56%。醇类、醛类和酮类是主要的香气类型, 分别占总挥发性组分的 17.07%、14.28%和 30.87%。在物质组成上, 醇类物质数量最多有 17 种, 酚类物质数量最少仅 1 种。相对含量占比最高的酮类物质, 主要组分包括香叶基丙酮 (16.91%)、 β -紫罗酮 (4.08%) 和 6,10,14-三甲基-2-十五烷酮 (3.28%) 等。多穗柯挥发性组分中单体含量大于 1% 的有 24 种, 其中香叶基丙酮、 β -紫罗酮、2,4,4-三甲基戊烷-1,3-二基双 (2-甲基丙酸酯)、邻二甲苯、6,10,14-三甲基-2-十五烷酮、桉油烯醇和壬醛含量均大于 3%, 分别占比 16.91%、4.08%、4.01%、3.52%、3.28%、3.14%和 3.13%。

表 1 多穗柯挥发性成分种类及相对含量

Table 1 Types of volatiles and relative content of *Lithocarpus polystachyus* Rehd

	醇类	酯类	酮类	酚类	醛类	烃类	羧酸类	其他类	合计
组分数量/种	17	5	10	1	14	15	4	14	80
组分含量/%	17.07	7.44	30.87	1.13	14.28	7	2.99	11.78	92.56

表 2 多穗柯挥发性成分的组成分析

Table 2 GC-MS analysis results of volatile components of *Lithocarpus polystachyus* Rehd

序号	化合物名称	相对含量 /%	保留时间 /min	序号	化合物名称	相对含量 /%	保留时间 /min
1	香叶基丙酮	16.91	33.76	41	十五烷	0.65	20.19
2	β -紫罗酮	4.08	35.79	42	香叶醇	0.63	35.73
3	2,4,4-三甲基戊烷-1,3-二基双 (2-甲基丙酸酯)	4.01	34.33	43	十八烷	0.59	32.11
4	邻二甲苯	3.52	6.26	44	六氢假紫罗酮	0.56	27.97
5	6,10,14-三甲基-2-十五烷酮	3.28	40.40	45	十三醛	0.56	30.64
6	桉油烯醇	3.14	40.19	46	十二醇	0.56	36.85
7	壬醛	3.13	15.81	47	1,1-二 (对十二烷) 十六烷	0.51	36.16
8	(E)-6-甲基-3,5-庚二烯-2-酮	2.81	23.89	48	4,6-二甲基十二烷	0.48	10.15
9	十七醛	2.59	38.16	49	2,4-癸二烯醛	0.47	32.30
10	吡啶	2.51	7.76	50	己酸	0.46	33.64
11	邻苯二甲酸二异丁酯	2.06	47.37	51	(Z)-3,7-二甲基-2,6-辛二烯醛	0.44	27.55
12	2-十三醇	2.05	25.80	52	2,6,10-三甲基十四烷	0.44	34.99
13	芳樟醇	1.73	22.47	53	8-甲基十七烷	0.43	18.23

转下页

接上页

14	4-己基-2,5-二氧化咪喃-3-乙酸	1.6	39.77	54	6-甲基-2-(2-环氧乙基)-5-庚烯	0.41	17.73
15	3,6,9,12-四氧十四烷-1-醇	1.36	46.98	55	十六烷	0.4	17.85
16	1,1,2-三氯乙烷	1.29	10.84	56	二氢猕猴桃内酯	0.38	44.45
17	β -环柠檬醛	1.27	24.57	57	反式-橙花叔醇	0.37	38.56
18	2-十一烯醛	1.16	30.33	58	藏红花醛	0.36	25.60
19	2,4-二叔丁基苯酚	1.13	40.09	59	异香橙烯	0.35	25.20
20	(3E,5Z)-6,10-二甲基-3,5,9-十一烷三烯-2-酮	1.09	40.62	60	二十烷	0.35	26.16
21	1-硅杂环-2,5-二烯	1.08	30.39	61	氧化石竹烯	0.35	36.61
22	鲸蜡醇	1.06	45.24	62	壬醇	0.33	26.99
23	辛醇	1.03	22.78	63	植烷	0.32	31.39
24	姜黄烯	1.01	31.01	64	正十三烷	0.3	12.04
25	戊乙二醇	0.99	46.55	65	苜醇	0.3	34.42
26	十七烷	0.98	28.50	66	6-甲基-2-(2-环氧乙基)-5-庚烯	0.26	18.92
27	大马士酮	0.97	32.50	67	1,7,7-三甲基-2-降冰片烯	0.26	20.60
28	十六烷	0.96	24.23	68	苯乙醇	0.26	35.31
29	十四醛	0.95	35.58	69	棕榈酸异丙酯	0.26	42.99
30	戊乙二醇	0.91	46.33	70	十四烷	0.24	16.08
31	甲位紫罗兰酮	0.88	33.39	71	反式-2-辛烯醛	0.23	17.17
32	正己醇	0.83	14.38	72	四甘醇单甲醚	0.23	46.42
33	柠檬醛	0.82	29.68	73	2,2,2-三氟乙酰胺	0.22	30.80
34	反式-2-壬烯醛	0.81	21.49	74	2,6,11-三甲基十二烷	0.18	12.13
35	1-十五醇	0.81	47.81	75	5-乙基-2-甲基辛烷	0.17	5.16
36	壬酸	0.79	41.54	76	1-乙酰基-1-环己烯	0.17	6.18
37	反,顺-2,6-壬二烯醛	0.76	23.56	77	法尼基丙酮	0.16	44.99
38	癸醛	0.73	20.11	78	3-乙酸基十二烷	0.14	16.91
39	溴化香叶酯	0.73	34.74	79	甲基庚烯酮	0.13	13.60
40	柏木脑	0.71	39.87	80	正辛基醚	0.12	43.28

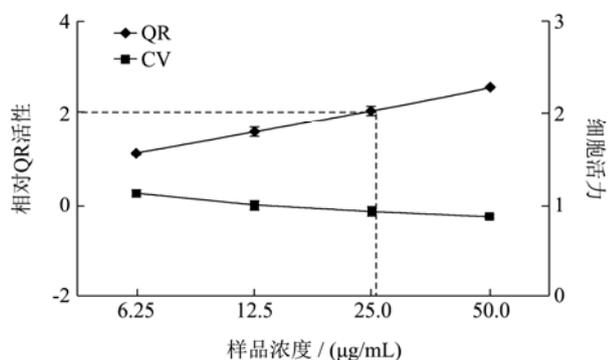


图1 多穗柯挥发性组分诱导 QR 活性

Fig.1 QR activity induced by the volatiles in *Lithocarpus polystachyus* Rehd

2.2 多穗柯挥发性组分的抗癌活性

为分析 SDE 法提取多穗柯挥发性物质的抗癌活性,本研究利用 Hepal1c7 小鼠肝癌细胞模型进行了挥发性组分诱导 QR 活性的测定,结果如图 1 所示。由图 1 可知,多穗柯挥发性组分在细胞活力大于 50% 的前提下,诱导 Hepal1c7 细胞 QR 活性达到倍增的浓度为(27.50±0.10) µg/mL,并呈剂量依赖效应,表明其具有较强的抗癌活性。

2.3 多穗柯挥发性组分单体抗癌活性

为探明多穗柯挥发性组分中含量大于 1.5%的主

要单体物质的抗癌活性，结合已报道的研究选取香叶基丙酮、壬醛以及芳樟醇三种单体物质，仍利用 Hepa1c1c7 小鼠肝癌细胞模型研究其抗癌活性，结果见图 2、图 3 和图 4。在细胞活力达到 50% 的条件下，图 2 的结果表明，香叶基丙酮诱导 QR 达到倍增的浓度为(283.10±0.10) μg/mL；图 3 的壬醛诱导 QR 达到倍增的浓度为(297.77±0.12) μg/mL；图 4 的芳樟醇诱导 QR 达到倍增的浓度为(54.53±0.10) μg/mL。多穗柯这三种挥发性单体物质的抗癌活性分析显示，三种单体物质均具有一定的抗癌活性。

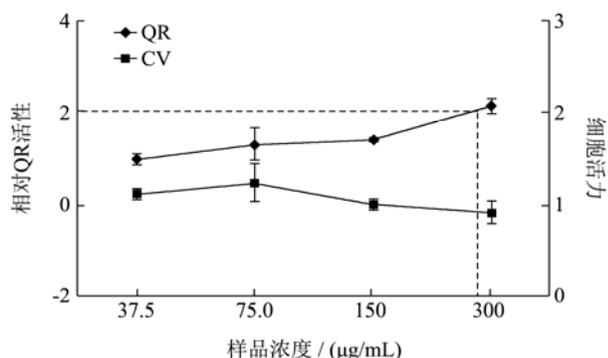


图 2 香叶基丙酮诱导 QR 活性

Fig.2 QR activity induced by geranylacetone

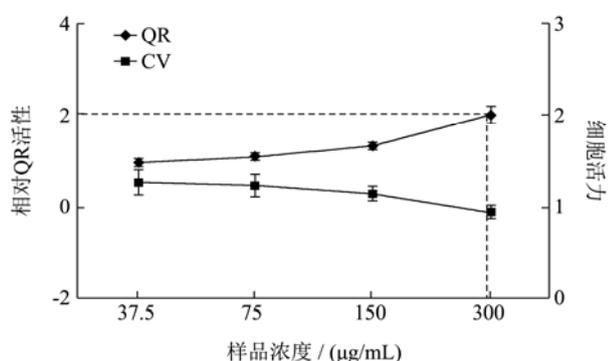


图 3 壬醛诱导 QR 活性

Fig.3 QR activity induced by nonanal

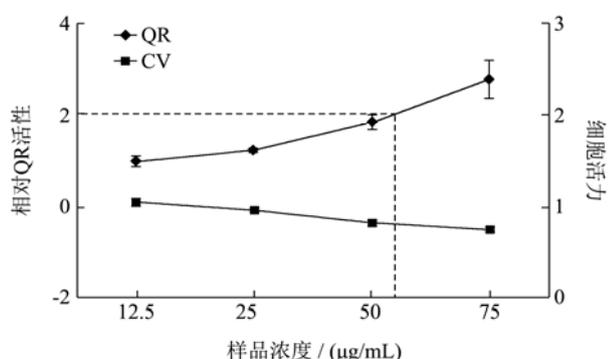


图 4 芳樟醇诱导 QR 活性

Fig.4 QR activity induced by linalool

Sun 等人研究发现，芳樟醇通过诱导人前列腺癌细胞 DU14 凋亡从而发挥抗癌作用^[8]。Xu 等人研究表

明，香叶基丙酮是粘细菌中次级代谢产物，其可能具抗肿瘤活性^[9]。Rigano 等人研究发现，壬醛是金雀花挥发物主要成分，其可能具有抑制人黑色素瘤细胞增殖活性^[10]。多穗柯这三种挥发性单体物质抗癌活性都较总挥发性组分抗癌活性低。Wang 等人研究表明土荆芥挥发性组分抗癌效果强于两个主要单体物质对异丙基甲苯和 α-松油烯^[11]。

因此，对于多穗柯挥发性组分强抗癌功效的研究，可在进一步分离纯化其组成的基础上，筛选可能的抗癌活性组分，并深入研究其抗癌功效及其可能的作用机理。

3 结论

3.1 多穗柯 SDE 法提取的挥发性组分经 GC-MS 分析，鉴定出 80 种化学组分，占总挥发性组分的 92.56%，其中酮类物质 30.87%，醇类物质 17.07%，醛类物质 14.28%，酯类物质 7.44%，烃类物质 7%，羧酸类物质 2.99%，酚类物质 1.13%，其他化合物 11.78%。挥发性组分中单体含量大于 1% 的有 24 种，大于 3% 的有 7 种，包括香叶基丙酮、β-紫罗酮、2,4,4-三甲基戊烷-1,3-二基双(2-甲基丙酸酯)、邻二甲苯、6,10,14-三甲基-2-十五烷酮、桉油烯醇和壬醛，其中具有青甜香的酮类物质香叶基丙酮含量最高达 16.91%。

3.2 基于 Hepa1c1c7 小鼠肝癌细胞模型的抗癌活性鉴定表明，多穗柯 SDE 法提取的挥发性组分诱导 QR 活性达到倍增的浓度为(27.50±0.10) μg/mL，并呈现剂量依赖效应。挥发性组分含量大于 1.5% 的香叶基丙酮、壬醛及芳樟醇单体化合物诱导 QR 达到倍增的浓度分别为(283.10±0.10) μg/mL、(297.77±0.12) μg/mL 和 (54.53±0.10) μg/mL，抗癌活性均低于总挥发性组分。

参考文献

- [1] Gu J Q, Park E J, Vigo J S, et al. Activity-guided isolation of constituents of *Renealmia nicolaioides* with the potential to induce the phase II enzyme quinone reductase [J]. Journal of Natural Products, 2002, 65(11): 1616-1620
- [2] Moon Y J, Wang X D, Morris M E. Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism [J]. Toxicology in Vitro, 2006, 20(2): 187-210
- [3] Wang H, Khor T O, Yang Q, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of phase ii drug metabolizing/antioxidant enzymes gene response by anticancer agent sulforaphane in rat lymphocytes [J]. Molecular Pharmaceutics, 2012, 9(10): 2819-2827
- [4] Hu H, Lei L, Chen X, et al. Effects of qingxin kaiqiao recipe

- volatile oil on expressions of GFAP and caspase-3 in the cortex and hippocampus of AD rats [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2013, 33(7): 927-932
- [5] Deng M, Huang L, Fang Y. Effects of total *Ginsenosides* and volatile oil of *acorus tatarinowii* co-administration on ability of learning and memory and apoptosis in Alzheimer's disease mice model induced by d-galactose and aluminium chloride [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2015, 38(5): 1018-1023
- [6] Tilaoui M, Mouse H A, Jaafari A, et al. Chemical composition and antiproliferative activity of essential oil from aerial parts of a medicinal herb *Artemisia herba-alba* [J]. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2011, 21(4): 781-785
- [7] Prochaska H J. Screening strategies for the detection of anticarcinogenic enzyme inducers [J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 1994, 5(7): 360-368
- [8] Sun X, Wang S, Li T, et al. Anticancer activity of linalool terpenoid: apoptosis induction and cell cycle arrest in prostate cancer cells [J]. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2015, 14(4): 619-625
- [9] Xu F, Tao W, Sun J. Identification of volatile compounds released by myxobacteria *Sorangium cellulosum* AHB103-1 [J]. African Journal of Microbiology Research, 2011, 5(4): 353-358
- [10] Rigano D, Russo A, Formisano C, et al. Antiproliferative and cytotoxic effects on malignant melanoma cells of essential oils from the aerial parts of *Genista sessilifolia* and *G. tinctoria* [J]. Natural Product Communications, 2010, 5(7): 1127-1132
- [11] Wang Y, Wu J, Ma D, et al. Anticancer effects of *Chenopodium ambrosioides* L. essential oil on human breast cancer MCF-7 cells in vitro [J]. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2015, 14(10): 1813-1820