

韭黄提取物抗肿瘤活性研究及UPLC-Q-Orbitrap HR/MS分析

国光梅, 王丽, 李立郎, 王瑜, 朱海燕, 安正斌, 李珂, 宋晶睿, 杨小生, 李齐激*

(贵州省天然产物研究中心, 贵州医科大学省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵州贵阳 550014)

摘要: 为研究韭黄提取物不同萃取部位的抗肿瘤活性及化学组成, 运用 MTT 法、划痕实验分别检测不同萃取部位提取物对 A549 细胞增值和迁移的影响, 流式细胞术检测活性部位 (HC-Ea) 处理后细胞周期分布情况, Western Blot 检测 HC-Ea 作用后 A549 细胞中周期相关蛋白 CDK2、CDK4、CDC25A、Cyclin A2 的表达; 超高压液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱技术 (UPLC-Q-Orbitrap HR/MS) 分析 HC-Ea 的化学成分。A549 细胞经萃取部位处理后抑制率随浓度增加而增加, HC-Ea 在 24、48 及 72 h 的抑制质量浓度 (IC_{50} 值) 分别为 50.81、32.09 和 25.02 $\mu\text{g/mL}$ 。与 DMSO 组相比, 50、100 及 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 HC-Ea 剂量组均能抑制划痕愈合率, 抑制作用随药物浓度增加而增强。A549 细胞经 HC-Ea 处理 48 或 72 h, 各浓度组细胞 S 期比例显著升高, 且呈剂量依赖关系。与 DMSO 组相比, HC-Ea 各浓度组 A549 细胞中 CDK2、CDK4、CDC25A、Cyclin A2 蛋白表达降低, 其中高浓度组表现尤为突出。UPLC-Q-Orbitrap HR/MS 从韭黄提取物中检出 25 个化合物, 其中含氮化合物 10 个、有机酸类 8 个。韭黄抗肿瘤活性与物质组成的研究为韭黄产业化应用提供了新的借鉴。

关键词: 韭黄; 活性部位; 抗肿瘤; UPLC-Q-Orbitrap HR/MS; 化学成分

文章编号: 1673-9078(2024)12-23-31

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.12.1237

Antitumor Activity and UPLC-Q-Orbitrap HR/MS Analysis of *Allium senescens* Extract

GUO Guangmei, WANG Li, LI Lilang, WANG Yu, ZHU Haiyan, AN Zhengbin, LI Ke,

SONG Jingrui, YANG Xiaosheng, LI Qiji*

(Natural Products Research Center of Guizhou Province, State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550014, China)

Abstract: The antitumor activity and chemical composition of extracts from different *Allium senescens* tissues are presented in this study. MTT assays and scratch tests were used to detect the effects of different plant tissue extracts on the A549 cell proliferation and migration. Cell cycle distribution in control and treated cells was detected by flow cytometry and the expression of cycle-related proteins (CDK2, CDK4, CDC25A, and Cyclin A2) in A549 cells treated with HC-Ea

引文格式:

国光梅,王丽,李立郎,等.韭黄提取物抗肿瘤活性研究及UPLC-Q-Orbitrap HR/MS分析[J].现代食品科技,2024,40(12):23-31.

GUO Guangmei, WANG Li, LI Lilang, et al. Antitumor activity and UPLC-Q-Orbitrap HR/MS analysis of *Allium senescens* extract [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(12): 23-31.

收稿日期: 2023-10-16

基金项目: 贵州省省级科技计划项目资助 (黔科合支撑[2021]一般 110)

作者简介: 国光梅 (1988-), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 天然产物、药食用物质研究与开发、科研管理, E-mail: 574704990@qq.com

通讯作者: 李齐激 (1985-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 食药植物资源化学与利用, E-mail: leeqiji@126.com

were measured by western blot. The chemical composition of each HC-Ea was analyzed by UPLC-Q-Orbitrap HR/MS. Inhibition of A549 cell proliferation increased with increasing concentration, with respective HC-Ea inhibitory concentrations (IC_{50} values) of 50.81, 32.09 and 25.02 $\mu\text{g/mL}$ observed at 24, 48, and 72 h, respectively. Compared with DMSO, 50, 100, and 200 $\mu\text{g/mL}$ doses of each HC-Ea reduced the scratch healing rate, with their inhibitory effects intensifying with increasing drug dosage. Following treatment of A549 cells with HC-Ea for 48 or 72 h, the proportion of S phase cells in each concentration group increased significantly in a dose-dependent manner. Compared with DMSO treated cells, the expression of CDK2, CDK4, CDC25A, and Cyclin A2 protein in A549 cells in each HC-Ea treated group was reduced, especially with high concentration exposure. A total of 25 compounds from *Allium senescens* extract were detected by UPLC-Q-Orbitrap HR/MS, including 10 nitrogen compounds and 8 organic acids. This research on the antitumor activity and chemical composition of *Allium senescens* provides a new reference for industrial applications.

Key words: *Allium senescens*; active site; antitumor; UPLC-Q-Orbitrap HR/MS; chemical compositions

韭黄 (*Allium senescens*) 属百合科多年生草本植物, 又名黄韭、韭菜白^[1], 为韭菜在避光的环境下经软化栽培后完全黄化的产物, 具有独特的辛香气味, 是我国重要的葱类蔬菜之一^[2,3]。作为我国传统药食同源植物, 韭黄含有丰富的蛋白质、矿物质、维生素、甙类和苦味质等, 其味道鲜美, 能够提升食欲^[4,5]。中医学认为, 韭黄性温, 具有滋补肝肾、壮阳固精、暖腰膝、驱寒通便等作用。现代医学认为, 经常食用韭黄可有效预防心血管疾病、延缓衰老、降血糖、抗菌等作用。韭黄中的主要化学成分有含硫化合物、含氮化合物、黄酮类化合物、甾体皂苷类化合物及有机酸酯类化合物等^[6]。

虽然韭黄的抗肿瘤活性研究鲜见报道, 但同属其它植物已有研究且具有较好的抗肿瘤活性。其主要作用机制是影响多种作用于细胞周期的蛋白表达量, 阻碍 DNA 合成, 减缓肿瘤细胞增殖速率而达到抑制肿瘤细胞生长的目的^[7]。韭黄作为我国常用蔬菜, 进入市场销售前需经过切制处理以便于包装和美观, 而切制过程直接导致约 15% 的韭黄被浪费, 目前尚未有较好的处理方法。课题组在服务乡村振兴过程中, 结合同属植物抗肿瘤活性基础和如何利用好韭黄切制物, 对韭黄进行了生物活性测试, 发现乙酸乙酯萃取部位对 A549 细胞表现出较好的抑制活性。因此, 本研究进一步对其抗肿瘤活性进行筛选, 深入分析 HC-Ea 对 A549 细胞迁移、细胞周期及 A549 细胞中 CDK2、CDK4、CDC25A、Cyclin A2 蛋白表达的影响, 同时利用 UPLC-Q-Orbitrap HR/MS 技术对活性部位的化学成分进行鉴定分析, 以期为进一步阐释韭黄的药效物质基础和

开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系

人非小细胞肺癌细胞 A549 细胞, 购于美国 ATCC 细胞库。采用 DMEM 培养基 (含 5% 胎牛血清) 在含有 5% CO_2 、湿度为 95% 的 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中进行孵育。

1.1.2 试剂

DMEM 培养基、胰酶、胎牛血清, 美国 GIBCO 公司; 双抗, 德国 BI 公司; RIPA 裂解液、PMSF 蛋白酶抑制剂, 上海碧云天生物技术有限公司; RNA 酶抑制剂, 日本 Takara 公司; BCA 蛋白浓度检测试剂盒、细胞培养级 DMSO、碘化丙锭 PI 溶液、蛋白还原型上样缓冲液 (5 \times)、彩虹 180 光谱蛋白 Marker (10~180 ku), 北京索莱宝科技有限公司; SmartPAGETM Precast Protein Gel Plus 12 Wells 预制胶, 天地人和生物科技有限公司; PVDF 膜 0.45 μm , 密理博 (Millipore) 公司; 超敏 ECL 化学发光试剂盒, 苏州新赛美生物科技有限公司; 细胞周期蛋白依赖性激酶 -2 (Cyclin-dependent Kinases 2, CDK2) 抗体、细胞周期蛋白依赖性激酶 -4 (Cyclin-Dependent Kinases 4, CDK4) 抗体、细胞周期调控因子 CDC25A 抗体、细胞周期蛋白 A2 (Cell Cycle Protein A2, CyclinA2) 抗体、 β -actin 抗体、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗兔免疫球蛋白 (IgG) 购于中国正能。

韭黄样品购自安顺普定县韭黄种植基地。

1.1.3 仪器

SW-CJ-1D 型超净工作台, 苏州净化; ChemiScope 3000mini 型蛋白成像系统, 上海勤翔科学仪器有限公司; TS2 FL 型倒置荧光显微镜, 尼康映像仪器销售(中国)有限公司; CCL-240B-8 型 CO₂ 恒温培养箱, 新加坡艺思高科技有限公司; NovoCyte 2040R 流式细胞仪, 美国 ACEA 公司; Countess II 型细胞计数仪, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 1645050 型电泳仪, 美国 BIO-RAD 公司; VICTOR Nivo 型酶标仪, 美国 PerkinElmer 公司; Thermo Scientific Q Exactive-MS 高分辨质谱仪, 美国 Thermo Fisher。

1.2 方法

1.2.1 样品的制备

称取新鲜韭黄 100 g, 加 10 倍量体积分数 70% 乙醇回流提取 2 次, 提取时间分别为 2、1.5 h, 合并 2 次滤液, 减压浓缩至无醇味, 加水至 100 mL 制成混悬液, 依次使用适量石油醚、乙酸乙酯各萃取 3 次, 分别合并减压浓缩萃取液、干燥为浸膏。萃取后的剩余水溶液, 减压浓缩、干燥, 即得石油醚部位 (Petroleum Ether Extract, HC-Pe)、乙酸乙酯部位 (Ethyl Acetate Extract, HC-Ea) 和水部位 (Aqueous Extract, HC-W)。精密称取各部位样品适量, 加入 DMSO 溶解, 制成质量浓度为 200 mg/mL 的储备液。使用时用 DMEM 培养基稀释储备液, 得到不同质量浓度的韭黄不同极性部位供试品溶液。

1.2.2 MTT法检测A549细胞存活率

将生长状态良好且处于对数生长期的 A549 细胞铺于 96 孔板中, 细胞浓度为 7 000 个/孔, 体积为 90 μL。以 DMSO 为对照组, 设置药物终质量浓度分别为 12.5、25、50、100、200 μg/mL, 每个质量浓度同时设置 5 个复孔。待细胞贴壁后在每孔中分别加入 10 μL 稀释后的药物, 轻轻拍匀后置于恒温箱中培养 24、48 或 72 h。用倒置荧光显微镜拍取细胞形态后, 在每孔中加入 20 μL MTT (5 mg/mL), 混匀后继续放入培养箱中孵育 4 h, 轻轻将上清液弃去, 然后每孔中加入 DMSO 160 μL, 置于摇床上, 避光振摇 10 min 使甲臜完全溶解后置于酶标仪 490 nm 下检测每个孔的 OD 值。重复试验 3 次。抑制率计算公式:

$$C_v = \frac{A_2 - A_1}{A_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

C_v ——抑制率, %;

A_1 ——给药组的吸光度值;

A_2 ——对照组的吸光度值。

1.2.3 HC-Ea对A549细胞迁移的影响

将生长状态良好且处于对数生长期的 A549 细胞以每毫升 3×10^5 个的密度铺于 6 孔板中, 培养至细胞融合率达 80%~90% 时, 用 200 μL 吸头划痕, PBS 洗去漂浮细胞及碎片 2 次, 加入新鲜培养基, 倒置显微镜下观察, 每孔随机选取 6 个视野拍照 (0 h)。再将 A549 细胞分为 DMSO、50、100 及 200 μg/mL 的 HC-Ea 加药组进行加药, 继续培养 24 h, 于相同视野拍照 (24 h)。Image J 软件分析计算划痕面积, 根据下式计算划痕愈合率。

$$B = \frac{S_0 - S_{24}}{S_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

B ——划痕愈合率 (Hr), %;

S_0 ——0 h 划痕面积;

S_{24} ——24 h 划痕面积。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞周期

将生长状态良好且处于对数生长期的 A549 细胞按每毫升 3×10^5 的密度铺于 6 孔板中, 每孔 2 mL, 待细胞贴壁后以 DMSO 为对照组, 分别在每孔中加入质量浓度为 50、100 及 200 mg/mL 的 HC-Ea 2 μL。37 °C 培养 24、48 或 72 h 后收集细胞, PBS 洗涤 2 遍, 加入预冷的体积分数 70% 乙醇 500 μL -20 °C 固定过夜。离心去除乙醇, PBS 洗涤 2 次, 每管中加入细胞周期染液 [RNase A (100 μg/mL)+PI (50 μg/mL)+PBS] 500 μL。混匀后室温避光孵育 30~60 min。离心去除染料, PBS 洗涤 2 次, 最后用 PBS 200 μL 重悬, 过 300 目筛后用流式细胞仪上机检测。

1.2.5 Western蛋白印迹

将生长状态良好且处于对数生长期的 A549 细胞按每毫升 3×10^5 的密度铺于 60 mm×60 mm 的皿中, 每皿 3 mL。待细胞贴壁后以 DMSO 为对照组, 分别在每皿中加入质量浓度为 50、100 及 200 mg/mL 的 HC-Ea 3 μL。置于培养箱中培养 48 h, 用预冷的 PBS 洗 2 遍, 加入含 PMSF 的 RIPA 裂解液 (PMSF:RIPA=1:100), 置于冰上裂解 30 min, 8 000 r/min 离心 10 min, 收

集上清液,用BCA法测定蛋白浓度,调整样品浓度至同一水平。加热使蛋白变性5 min,进行SDS-PAGE电泳转至PVDF膜,用体积分数5%的脱脂奶粉封闭1 h,一抗4℃孵育过夜,1×TBST洗3遍,二抗室温孵育2 h,1×TBST再洗3遍,加入显影液后用蛋白成像系统进行扫膜。

1.2.6 UPLC-Q-Orbitrap HR/MS分析韭黄乙酸乙酯部位化学成分

1.2.6.1 供试品溶液的制备

取适量已制备的韭黄乙酸乙酯部位样品,加入体积分数70%乙醇溶液溶解过0.45 μm微孔滤膜备用,得供试品溶液。

1.2.6.2 色谱条件

色谱柱: Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C18 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 流量0.3 mL/min; 柱温40℃; 流动相A: 0.1% (V/V) 甲酸-乙腈; 流动相B: 0.1% (V/V) 甲酸-水。梯度洗脱(0~2 min: 5% A; 2~42 min: 5% A→95% A; 42~47 min: 95% A; 47.1~50 min: 5% A); 进样量10 μL。

1.2.6.3 质谱条件

质谱仪: Thermo Scientific Q Exactive-MS 高分辨质谱仪; 喷雾电压: 3.0 kV (+)/2.5 kV (-); 毛细管温度: 320℃, 探头加热器温度: 350℃; 离子源: HESI-II; 鞘气流速: 35 arb, 辅助气流速: 10 arb, S-Lens 分辨率: 60, 在100~1500 m/z 范围内进行全扫描分析。

1.2.7 数据分析

所有统计分析均使用Graphpad 6.01软件进行,试验重复进行3次,数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组样本进行单因素方差分析,组间比较采用t检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。Xcalibur 4.2软件结合mz Vault、mz Cloud数据库进行质谱分析。

2 结果与讨论

2.1 韭黄提取物对A549细胞增殖抑制的影响

MTT结果显示,A549细胞经韭黄提取物处理后,抑制率随样品质量浓度的增加而增加,其中HC-Ea在24、48及72 h对A549细胞均表现出最强的抑制作用,其半抑制浓度(IC₅₀值)分别为50.81、32.09及25.02 μg/mL(图1a),因此后续试验选择HC-Ea进行深入研究。倒置荧光显微镜下观察结果显示,A549细胞经HC-Ea处理24、48及72 h后,

与DMSO组比较,细胞数量减少、形态发生变化,并有细胞死亡碎片产生(图1b)。

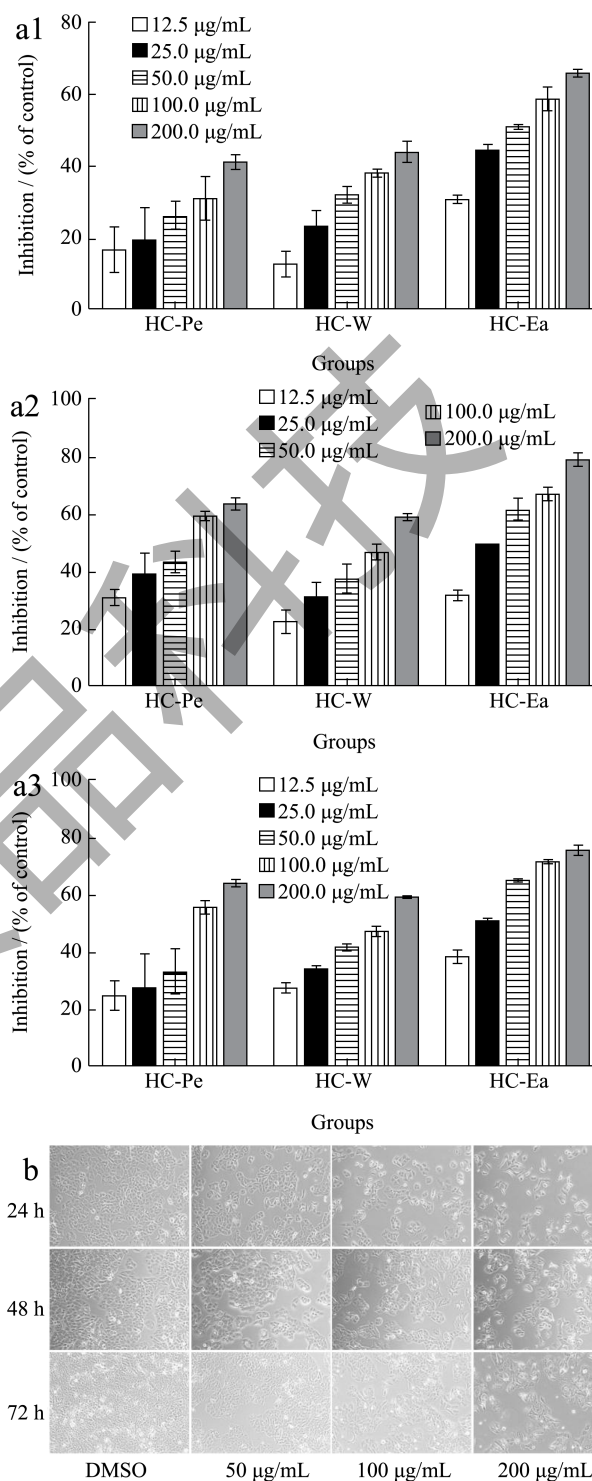


图1 韭黄提取物对A549细胞增殖的抑制作用

Fig.1 The inhibitory effect of *Allium senescens* extract on the proliferation of A549 cells

注: a1~a3为HC-Pe、HC-W及HC-Ea(12.5、25、50、100及200 μg/mL)对A549细胞作用24、48及72 h的抑制率; b为HC-Ea(50、100及200 μg/mL)对A549细胞作用24、48及72 h后细胞数量和形态的改变(×100)。

2.2 HC-Ea对A549细胞迁移的影响

划痕实验结果显示,与DMSO组相比,50、100及200 μg/mL的HC-Ea剂量组均能抑制划痕愈合率,且抑制强度随药物质量浓度的增加而增强,见图2。

2.3 HC-Ea对A549细胞周期的影响

试验结果显示,当A549细胞经过HC-Ea处理24 h时,各质量浓度组细胞S期比例升高未呈剂量依赖关系,但处理48或72 h时,各质量浓度组细胞S期比例显著升高,且呈剂量依赖关系,试验结果说明HC-Ea能

够明显诱导A549细胞S期阻滞。见图3及表1~3。

表1 HC-Ea处理24 h对A549细胞周期各时相的影响
Table 1 The effect of HC-Ea treatment for 24 h on the cell cycle of A549 cells ($\bar{X} \pm s, n=3$)

组别	G ₁	S	G ₂
DMSO	60.76 ± 1.25	26.56 ± 1.85	11.96 ± 0.98
50 μg/mL	62.16 ± 1.43	22.81 ± 2.88	14.40 ± 2.11
100 μg/mL	55.02 ± 1.34**	33.06 ± 3.80	10.51 ± 3.94
200 μg/mL	59.33 ± 3.55	23.42 ± 2.88	16.08 ± 3.13

注:与DMSO组相比,** $P < 0.01$ 。

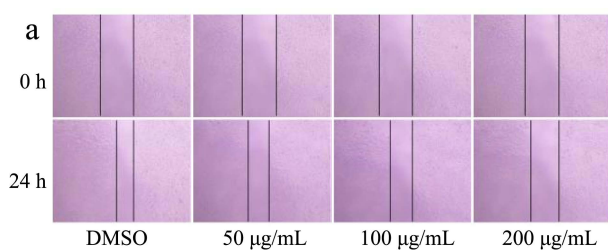


图2 HC-Ea对A549细胞的划痕愈合率(×40)

Fig.2 The scratch healing rate of HC-Ea on A549 cells (×40)

注:与DMSO组相比,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

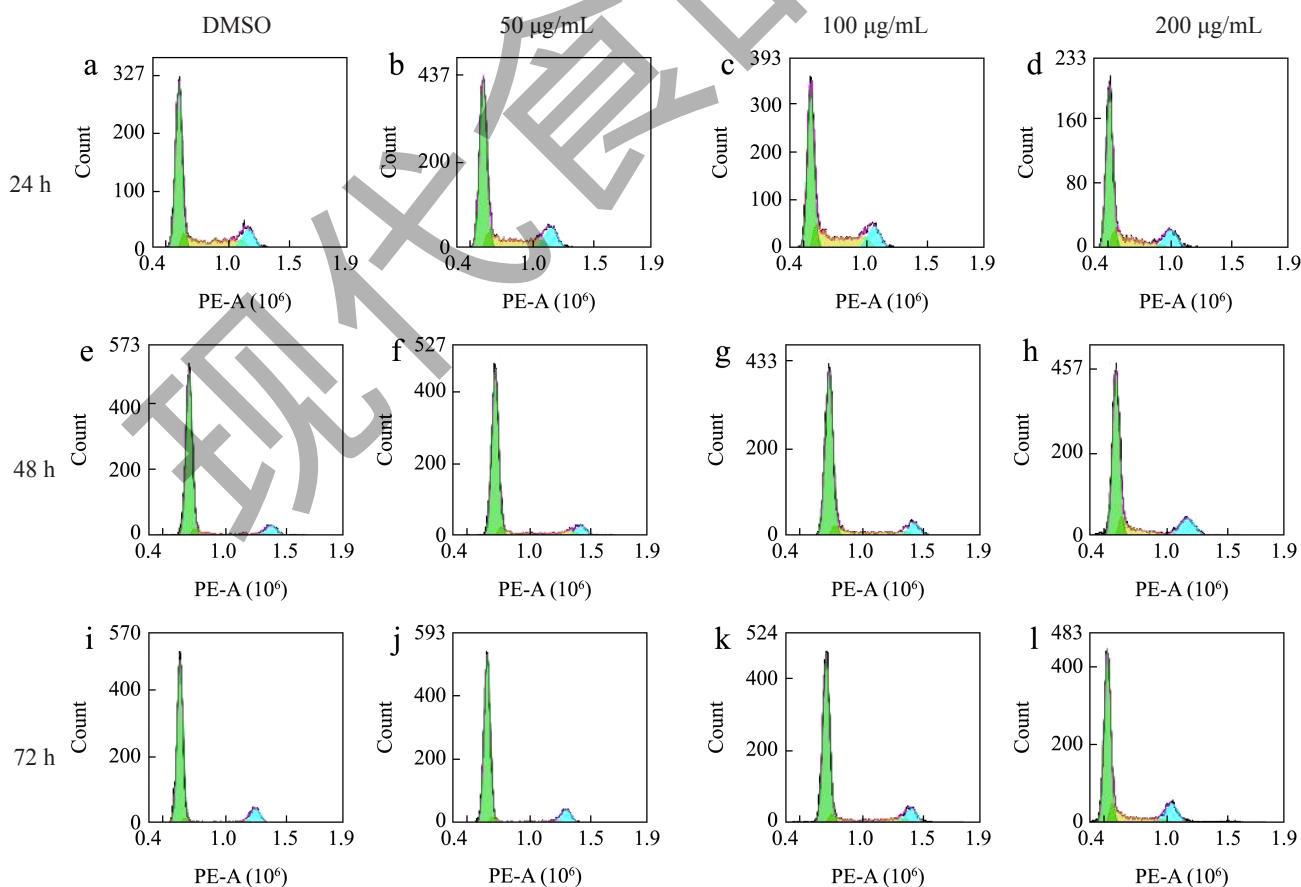


图3 HC-Ea对A549细胞周期的影响

Fig.3 The effect of HC-Ea on the cell cycle of A549 cells

表 2 HC-Ea处理48 h对A549细胞周期各时相的影响

Table 2 The effect of HC-Ea treatment for 48 h on the cell cycle of A549 cells ($\bar{X} \pm s, n=3$)

组别	G ₁	S	G ₂
DMSO	79.55 ± 0.25	11.17 ± 0.35	8.37 ± 0.13
50 μg/mL	78.98 ± 1.32	12.13 ± 1.88	8.01 ± 1.31
100 μg/mL	73.43 ± 0.23***	16.38 ± 0.70***	9.25 ± 0.44*
200 μg/mL	66.57 ± 1.61***	17.65 ± 0.51***	13.25 ± 1.45**

注: 与 DMSO 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

表 3 HC-Ea处理72 h对A549细胞周期各时相的影响

Table 3 The effect of HC-Ea treatment for 72 h on the cell cycle of A549 cells ($\bar{X} \pm s, n=3$)

组别	G ₁	S	G ₂
DMSO	80.15 ± 1.02	8.89 ± 0.68	10.18 ± 1.36
50 μg/mL	80.34 ± 0.80	10.27 ± 2.24	8.65 ± 2.25
100 μg/mL	74.99 ± 1.27**	13.85 ± 0.18***	10.48 ± 1.31
200 μg/mL	68.38 ± 3.45**	17.22 ± 0.78***	12.73 ± 2.19

注: 与 DMSO 组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

2.4 HC-Ea对A549细胞中CDK2、CDK4、CDC25A、Cyclin A2蛋白表达的影响

结果如图 4 所示, 与 DMSO 组相比, HC-Ea 各浓度组 A549 细胞中 CDK2、CDK4、CDC25A、Cyclin A2 蛋白表达降低, 其中高质量浓度组表现得尤为突出。

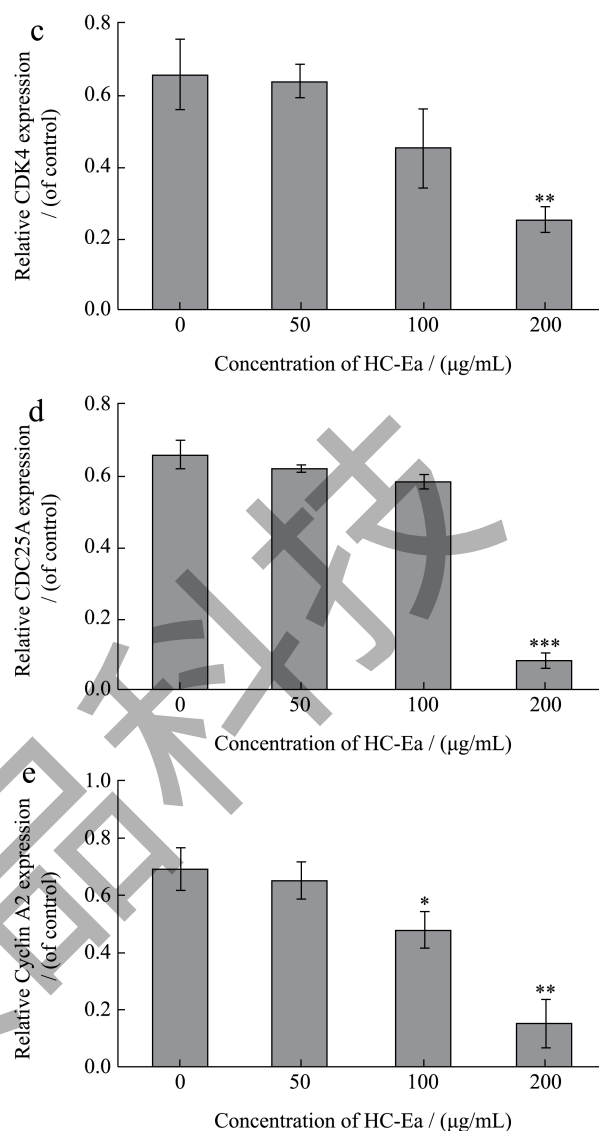
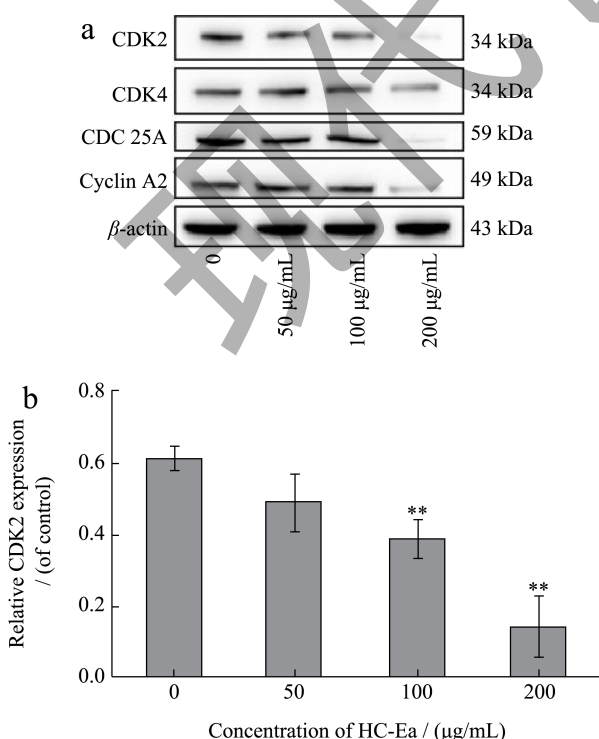


图 4 HC-Ea 对 A549 细胞中 CDK2、CDK4、CDC25A、Cyclin A2 蛋白表达的影响

Fig.4 Effect of HC-Ea on the expression of CDK2、CDK4、CDC25A and Cyclin A2 in A549 cells

注: 与 DMSO 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

本文率先筛选了韭黄提取物的抗癌作用, 并对其作用机制进行探讨, 发现 HC-Ea 可通过抑制肺癌细胞 A549 的增殖、影响细胞形态及阻滞细胞周期来实现抑制癌细胞生存。

在测定 HC-Ea 对 A549 细胞凋亡及周期影响的试验中, 发现 HC-Ea 对 A549 细胞凋亡没有明显的影响, 但能明显将 A549 细胞阻滞于 S 期, 为了探讨 HC-Ea 对 A549 细胞 S 期相关蛋白的影响, 我们采用 Western 蛋白印迹法观察了 CDK2、CDK4、CDC25A、及 Cyclin A2 等与 S 期相关蛋白的表达情况, 结果经 HC-Ea 处理后 A549 细胞中 CDK2、CDK4、CDC25A、及 Cyclin A2 明显下调。细胞周

期的进程与相关周期蛋白的含量变化息息相关,细胞周期的调控主要依赖于 Cyclin 与 CDK 组成的蛋白激酶复合物来完成^[8],S 期阻滞在大部分的恶性肿瘤发病中发挥着重要作用,Cyclin A2-CDK2 是细胞 S 期主要的复合物,能启动 DNA 的复制^[9-11]。CDK2 可与 Cyclin A2 结合形成二聚体,其中 CDK2 为主要催化亚基,Cyclin A2 为调节亚基,Cyclin A2-CDK2 复合物通过催化特定底物的磷酸化而实现对细胞周期不同时期的推进和转化^[12]。本实验结果显示 HC-Ea 处理后,A549 细胞中 Cyclin A2 和 CDK2 明显下调,使得细胞中的 DNA 复制失败将其阻滞在 S 期。CDK4^[13]和 CDC25A^[9]是细胞周期进程的关键性蛋白,其表达下调能阻滞细胞周期的进程。CDK2 和 CDK4 是 CDC25A 的下游蛋白,CDC25A 被抑制会导致 CDK2 和 CDK4 表达的下降,最终将 A549 细胞阻滞于 S 期。

2.5 韭黄乙酸乙酯部位化学成分分析

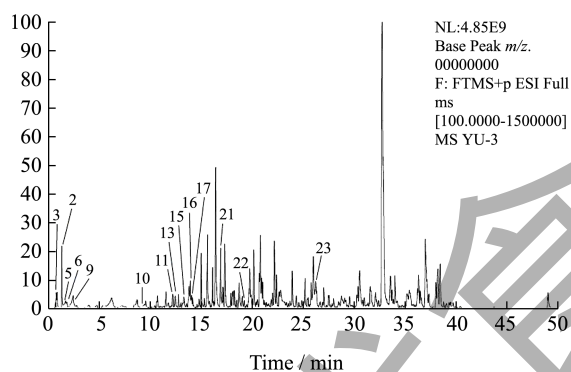


图 5 正离子模式下 HC-Ea 的总离子流图

Fig.5 The UPLC-Q-Orbitrap HR/MS total ion chromatogram of HC-Ea in positive ion mode

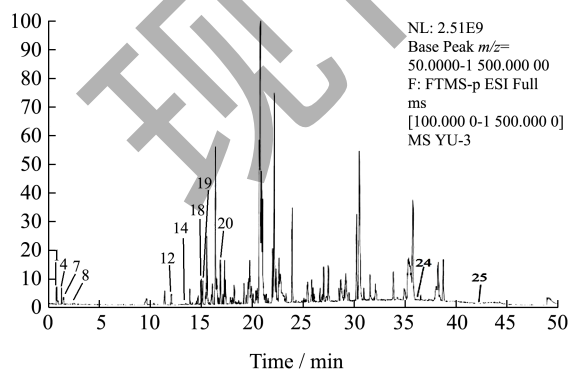


图 6 负离子模式下 HC-Ea 的总离子流图

Fig.6 The UPLC-Q-Orbitrap HR/MS total ion chromatogram of HC-Ea in negative ion mode

超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱技术具有灵敏度高、检测效率高、分辨率高、

质量精度高等特点^[14,15]。对韭黄乙酸乙酯有效部位的检测分析首次采用了 UPLC-Q-Orbitrap HR/MS 技术,图 5、图 6 分别为正离子模式和负离子模式下的离子流图。根据 mz Vault、mz Cloud 数据库进行匹配,同文献数据比对从 HC-Ea 部位鉴定出化合物共 25 个,化学成分的分析见表 4。

从韭黄乙酸乙酯有效部位中鉴定出化合物 25 个,其中 10 个含氮化合物、主要是腺嘌呤、尿苷、腺苷;8 个有机酸类化合物,主要是癸二酸、壬二酸、阿魏酸;3 个黄酮类化合物、香豆素类化合物及其它类化合物各 2 个,与韭黄中的含氮化合物及有机酸类成分相关报道一致^[16,17]。

2.5.1 含氮化合物

从韭黄乙酸乙酯部位中共鉴定出 10 个含氮化合物(化合物 1、2、3、4、5、6、7、8、9、11),其中有 7 个核苷类成分(化合物 3~9),经查阅文献有报道韭菜中含有此类化合物^[18]。核苷类化合物是生物细胞维持生命活动的基本组成元素,参与 DNA 代谢过程,具有抗肿瘤、抗病毒、基因治疗等多种生物活性^[19],其中虫草素作为抗肿瘤新药成分被开发,发现其具有治疗白血病的作用^[20]。

2.5.2 有机酸类

从韭黄乙酸乙酯部位中鉴定出 8 个有机酸类化合物(化合物 10、12、14、15、19、20、24、25),主要是不饱和脂肪酸和酚酸。不饱和脂肪酸能够增强细胞活性,预防细胞老化,提高记忆力,促进血液循环,改善思维能力,降低血粘度^[7]。研究发现酚酸的促氧化作用可能与其诱导细胞凋亡的活性和抗肿瘤增长有关^[21],其中阿魏酸及其代谢物能够显著抑制人肝癌细胞 HepG2 的增殖^[22]。

2.5.3 黄酮类

韭黄乙酸乙酯部位中鉴定出 3 个黄酮类化合物(化合物 13、17、18),此类化合物性质较为稳定,不容易被分解,且具备抑菌、抗氧化、抗衰老、降血脂的功效。研究发现山萘酚在体内作用于大量信号靶点,具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化、神经保护、抗菌等药理活性^[23]。

2.5.4 香豆素类

韭黄乙酸乙酯部位中鉴定出 2 个香豆素类成分(化合物 16、21),其中的 (+)-松脂素- β -D-吡喃葡萄糖苷具有抗炎、抗氧化、抗菌、抗癌、抗病毒、抗过敏、神经保护等作用。

表 4 HC-Ea的化学成分分析

Table 4 Chemical composition analysis of HC-Ea

编号	t_R /min	离子模式	化合物	分子式	理论值(m/z)	测定值(m/z)	误差值($\times 10^{-6}$)	类型
1	0.885	[M-H] ⁻	L- 天门冬氨酸	C ₄ H ₇ NO ₄	132.030 2	132.030 7	3.635 5	a
2	1.316	[M+H] ⁺	烟酰胺	C ₆ H ₆ N ₂ O	123.055 3	123.055 1	-1.625 3	a
3	0.898	[M+H] ⁺	腺嘌呤	C ₅ H ₅ N ₅	136.061 8	136.061 4	-2.939 8	a
4	1.372	[M-H] ⁻	尿苷	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	243.062 3	243.061 3	-3.908 5	a
5	1.468	[M+H] ⁺	腺苷	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	268.104 0	268.103 1	-3.394 2	a
6	1.534	[M+H] ⁺	虫草素	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₃	252.109 2	252.108 2	-4.006 2	a
7	1.569	[M-H] ⁻	肌苷	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₅	267.073 5	267.072 6	-3.332 4	a
8	2.541	[M-H] ⁻	胸苷	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₅	241.083 0	241.082 0	-4.106 5	a
9	2.537	[M+H] ⁺	胸腺嘧啶	C ₅ H ₆ N ₂ O ₂	127.050 2	127.049 9	-2.361 3	a
10	9.661	[M+H] ⁺	苯甲酸	C ₇ H ₆ O ₂	123.044 1	123.043 9	-0.975 3	b
11	12.067	[M+H] ⁺	哈尔满碱	C ₁₂ H ₁₀ N ₂	183.091 7	183.091 3	-1.802 4	a
12	12.116	[M-H] ⁻	对羟基肉桂酸	C ₉ H ₈ O ₃	163.040 1	163.038 8	-8.034 8	b
13	12.692	[M+H] ⁺	丁香醛	C ₉ H ₁₀ O ₄	183.065 2	183.064 8	-1.966 5	d
14	13.452	[M-H] ⁻	鞣花酸	C ₁₄ H ₆ O ₈	300.997 9	300.998 3	1.229 2	b
15	13.246	[M+H] ⁺	阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	195.065 2	195.064 7	-2.358 2	b
16	14.629	[M+H] ⁺	(+)- 松脂素 - β -D- 吡喃葡萄糖苷	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₁	521.201 7	521.201 7	-0.038 4	c
17	14.721	[M+H] ⁺	山奈酚	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287.055 0	287.054 3	-2.612 7	d
18	14.736	[M-H] ⁻	紫云英苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.093 3	447.092 3	-2.281 4	d
19	15.174	[M-H] ⁻	壬二酸	C ₉ H ₁₆ O ₄	187.096 5	187.096 4	-0.427 6	b
20	16.672	[M-H] ⁻	十二烷二酸	C ₁₂ H ₂₂ O ₄	229.143 4	229.143 6	0.698 3	b
21	16.947	[M+H] ⁺	甲氧基香豆素	C ₁₀ H ₈ O ₃	177.054 6	177.054 0	-3.727 7	c
22	19.311	[M+H] ⁺	5- 羟基 - 四氢萘酮	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	163.075 4	163.074 8	-3.556 6	e
23	26.318	[M+H] ⁺	甘草次酸	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	471.346 9	471.345 0	-4.073 4	e
24	36.286	[M-H] ⁻	α - 亚麻酸	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	279.231 9	279.230 9	-3.438 0	b
25	42.283	[M-H] ⁻	亚麻酸乙酯	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	307.263 2	307.262 2	-3.189 4	b

注: a. 含氮化合物; b. 有机酸类; c. 香豆素类; d. 黄酮类; e. 其他类。

2.5.5 其它类

韭黄乙酸乙酯部位中鉴定出 2 个其它类成分(化合物 22、23), 化合物 23 为五环三萜类化合物甘草次酸, 该化合物具有抗炎、抗氧化、免疫调节和抗纤维化等多种药理作用^[24]。

3 结论

本研究通过检测韭黄提取物不同萃取部位对 A549 细胞增殖作用, 发现韭黄提取物乙酸乙酯部位(HC-Ea) 可通过抑制肺癌细胞 A549 的增殖、影响细胞形态及阻滞细胞于 S 期来实现抑制癌细胞生存, 具有显著的肿瘤抑制活性。超高液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱技术(UPLC-Q-Orbitrap

HR/MS) 对 HC-Ea 化学成分分析共鉴定化合物 25 个, 其中含氮化合物 10 个、有机酸类 8 个, 结合活性数据与文献分析这两类成分可能为韭黄主要的抗肿瘤药效物质。这些研究结果进一步加深了我们对韭黄的认识, 也为韭黄产业化应用提供了新的借鉴。

参考文献

- [1] 李莎莉, 吴琦, 徐帅, 等. 韭菜生物活性及其药食资源开发进展[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(9): 197-202.
- [2] 李红. 韭黄绿色生产技术与效益分析[J]. 甘肃农业, 2021, 6: 83-85.
- [3] 国光梅, 李立郎, 魏福晓, 等. 韭黄发酵前后挥发性风味成分及游离氨基酸变化分析[J]. 中国酿造, 2023, 42(9): 131-

- 137.
- [4] 郭勇. 韭黄无公害生产栽培技术[J]. 种子科技, 2019, 37(5): 97-100.
- [5] 胡家艺, 牟方婷, 石黎琳, 等. 夏季和冬季普定县韭黄韭菜的营养与香气成分分析[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(3): 197-204.
- [6] 李莎莉. 韭菜有效成分的提取及生物活性研究[D]. 武汉: 武汉工程大学, 2018.
- [7] HSING A W, CHOKKALINGAM A P, GAO Y T, et al. Allium vegetables and risk of prostate cancer: a population-based study [J]. J Natl Cancer Inst, 2002, 94(21): 1648-1651.
- [8] 郑楠, 徐扬. 细胞周期蛋白依赖性激酶2的功能及其抑制剂的研 究[J]. 中国细胞生物学学报, 2021, 43(4): 815-827.
- [9] 柳香香, 孙达权, 许键炜, 等. 亚砷酸钠对SH-SY5Y细胞周期的影响及MPST过表达的干预[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(5): 634-639.
- [10] GLUSTEIN P M, ALBERTO P A, GUILLERMO C R G, et al. Arsenic-induced S phase cell cycle lengthening is associated with ROS generatio, p53 signaling and CDC25A expression [J]. Chem Biol Interact, 2015, 238: 170-179.
- [11] KOKONTIS J M, LIN H P, JIANG S S, et al. Androgen suppresses the proliferation of androgen receptor-positive castration-resistant pros-tate cancer cells via inhibition of Cdk2, CyclinA, and Skp2 [J]. PLoS One, 2014, 9(10): e109170.
- [12] 南娟, 回成程, 司彦坡, 等. 冬凌草活性成分Rabdotermin F 诱导肺癌细胞A549凋亡及其周期阻滞研究[J]. 中药材, 2023, 46(4): 1006-1010.
- [13] 朱春燕, 马爱珍, 黄勇, 等. 人参皂苷Rd抑制人非小细胞肺癌A549细胞的生长及作用机制[J]. 临床肿瘤学杂志, 2022, 27(1): 1-7.
- [14] ZHOU L, YANG Y, WANG X, et al. Berberine stimulates glucose transport through a mechanism distinct from insulin [J]. Metabolism, 2007, 56: 405-412.
- [15] 黄李璐, 夏厚林, 冯丽萍, 等. 木芙蓉叶乙酸乙酯部位抗氧化与抗炎作用研究及UPLC-Q-Orbitrap HRMS分析[J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35(9): 1528-1539.
- [16] 钟思丽, 袁明华. 氧弹燃烧—离子色谱法测定韭菜和韭黄中硫、氮、氯的含量[J]. 广东化工, 2017, 44(10): 201-202.
- [17] 刘建涛, 赵利, 苏伟, 等. 韭菜中生物活性成分及其分子生物学 的研究进展[J]. 食品科技, 2006, 8: 67-70.
- [18] 桑圣民, 夏增华, 毛士龙, 等. 中药韭子化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2000, 5: 30-32.
- [19] 丁兴杰, 熊亮, 周勤梅, 等. 天然核苷类成分的化学结构和 药理活性研究进展[J]. 成都中医药大学学报, 2018, 41(2): 102-108.
- [20] NAKAMURA K, SHINOZUKA K, YOSHIKAWA N. Anticancer and antimetastatic effects of cordycepin, an active component of *Cordyceps sinensis* [J]. Journal of Pharmacological Sciences, 2015, 127(1): 53-56.
- [21] 郑丽芳. 酚类抗氧化剂的结构修饰和促氧化机制研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2007.
- [22] 郑必胜, 杨文涵, 徐秋雄. 阿魏酸及其结肠代谢物的抗肿瘤活性[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2022, 50(8): 30-40, 70.
- [23] 刘祖浩. 山萘酚脂质体的制备及其抗肿瘤研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2021.
- [24] AWAD A B, YOUNG A L, FINK C. The effect of unsaturated fatty acid on membrane composition and signal transduction in HT-29 human colon cancer cells [J]. Cancer Lett, 1996, 108: 25-33.