doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2021.02.010

莪术醇的分离鉴定及体外抗肿瘤作用机制研究

罗球珠,李穗晖,黄楚燕

(广州中医药大学第一附属医院,广东 广州 510407)

摘要:目的 探讨莪术醇的分离鉴定方法及体外抗肿瘤作用机制。**方法** 莪术油减压蒸馏,收集重结晶得莪术醇,采用油醚－乙酸乙酯条带显色;体外培养宫颈癌细胞、肺癌细胞,采用四氮唑盐(MTT)法检测宫颈癌细胞、肺癌细胞的增殖情况;试验分为模型组、莪术醇组和莪术油组,采用流式细胞仪检测凋亡率,采用蛋白质印迹法检测肿瘤细胞Ki67和PCNA蛋白表达水平。**结果** 减压蒸馏可分离得到莪术醇,其纯度为89.57%。莪术醇及莪术油均可有效抑制宫颈癌细胞、肺癌细胞的增殖,且莪术醇对宫颈癌细胞、肺癌细胞的抑制率高于莪术油。与模型组相比,莪术醇组和莪术油组细胞凋亡率、半胱氨酸蛋白酶3(Caspase－3)及B淋巴细胞瘤－2(Bcl－2)相关X蛋白(Bax)表达水平显著升高,Ki67,PCNA及Bcl－2蛋白表达水平显著降低($P<0.05$);与莪术油组相比,莪术醇组细胞凋亡率、Caspase－3及Bax蛋白表达水平显著升高,Ki67,PCNA及Bcl－2蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。**结论** 莪术油通过减压蒸馏分离出的莪术醇,可有效抑制肿瘤细胞增殖并促进其凋亡,且莪术醇效果显著优于莪术油。

关键词:宫颈癌;莪术醇;莪术油;抗肿瘤;细胞增殖;细胞凋亡

中图分类号:R932;R284.2;R285.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1006－4931(2021)02－0038－04

Isolation and Identification of Curcumol and Its Anti－Tumor Mechanism *in Vitro*

LUO Qiuzhu, LI Suihui, HUANG Chuyan

(*The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, China* 510407)

Abstract: Objective To investigate the isolation and identification of curcumol and its anti－tumor mechanism *in vitro*. **Methods** *Zedoary turmeric* oil was extracted by vacuum distillation and recrystallized to obtain curcumol, which was identified by oleyl ether－ethyl acetate strip. Cervical cancer cells and lung cancer cells were cultured *in vitro*, and their proliferation was detected by MTT. The cells were divided into model group, curcumol group and *Zedoary turmeric* oil group. The apoptosis rate was detected by flow cytometry, and the expression of Ki67 protein and PCNA protein in tumor cells was detected by Western blot. **Results** Curcumol could be isolated by vacuum distillation, and its purity was 89.57%. Both curcumol and *Zedoary turmeric* oil could effectively inhibit the proliferation of cervical cancer cells and lung cancer cells, and the inhibition rate of curcumol on cervical cancer cells and lung cancer cells is higher than that of *Zedoary turmeric* oil. Compared with those in the model group, the apoptosis rate and the expression levels of Caspase－3 and Bax protein in curcumol group and *Zedoary turmeric* oil group were significantly increased, while the expression levels of Ki67, PCNA and Bcl－2 protein in curcumol group and *Zedoary turmeric* oil group were significantly decreased($P<0.05$). Compared with those in *Zedoary turmeric* oil group, the apoptosis rate and the expression levels of Caspase－3 and Bax protein in curcumol group were significantly increased, while the expression levels of Ki67, PCNA and Bcl－2 protein in curcumol group were significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion** Curcumol isolated from *Zedoary turmeric* oil by vacuum distillation can effectively inhibit the proliferation of tumor cells and promote their apoptosis, and the effect of curcumol is significantly better than that of *Zedoary turmeric* oil.

Key words: cervical cancer; curcumol; *Zedoary turmeric* oil; anti－tumor; cell proliferation; apoptosis

目前对肿瘤特别是恶性肿瘤的治疗,常采用手术治疗和化学治疗(简称化疗)[1－2]。肿瘤化疗药物的选择是目前重要的研究方向之一[3]。莪术醇又名姜黄醇,为白色针状晶体,主要是从莪术油中提取而来,具有抗肿瘤作用,临床用于治疗宫颈癌效果较好[4]。但莪术油中含β－榄香烯等成分,不良反应较多,需提纯后使用[5]。本研究中对莪术醇进行了分离鉴定,并探讨其体外抗肿瘤效果。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试药与细胞

仪器:970CRT/XP型荧光分光光度计(上海仪电分析仪器有限公司);TGL－16M型离心机(济南来宝医疗器械有限公司);CytoFLE型流式细胞仪(贝克曼有限公司);WMS－1037型细显微镜(上海无陌光学仪器有限公司);ZSP－350S型细胞培养箱(上海左乐仪器有限公司);蛋白电泳及转膜仪及相关系统(美国伯乐公司)。

试药:复方莪术油栓(湖北四环制药有限公司,国药准字H20054798,规格为每枚50 mg);B淋巴细胞瘤－2(Bcl－2)抗体(批号为20190603)、Bcl－2相关X蛋白(Bax)抗体(批号为20190606),半胱氨酸蛋白酶3(Caspase－3)抗体(批号为20190601),均购自Santa Cruz Biotechnology公司;RPMI 1640培养基(广州威佳科技有限公司);Ki67抗体、PCNA抗体均购自艾博抗中国公司;青霉素钠、磷酸缓冲液(天津科密欧有限公司);

第一作者:罗球珠,女,大学本科,主管中药师,研究方向为中药学,(电子信箱)qiu1393@126.com。

A Annexin V－FITC 凋亡检测试剂盒（上海贝博生物科技公司，批号为 BB－4101）；其余试剂均为分析纯，水为纯化水。

细胞：宫颈癌细胞及肺癌细胞（中国科学院细胞库）。

1.2 方法

莪术醇的分离与鉴定[6－7]：取莪术油样品 50 mL，置圆底烧瓶中减压蒸馏（208～216 ℃），收集馏分，用石油醚洗涤，用无水乙醇将馏分重结晶为白色晶，重复操作 3 次，得莪术醇供试品。莪术醇对照品和提取的莪术醇以石油醚溶解，采用油醚－乙酸乙酯显色，以紫外－可见分光光度法，于 520 nm 波长处测定并比较对照品和供试品的吸光度（*OD*）。

肿瘤细胞增殖的检测：在 5% CO_2、37 ℃条件下培养宫颈癌细胞、肺癌细胞，在 RPMI 1640 培养基中加入青霉素和链霉素各 100 U/mL。取上述培养的对数生长期细胞接种至 96 孔板中，接种密度为 5 000 个/孔，分别加入 1.0，2.0，5.0，10.0，20.0 mg/mL 的莪术醇供试品和对照品继续培养 72 h，加入 20 μL MTT 溶液，静置 4 h，去上清液后使用二甲基亚砜（DMSO）振荡溶解，在 570 nm 波长处测定 *OD*。抑制率（%）=（1－*OD*）/ *OD* × 100%。

宫颈癌细胞蛋白表达的检测：试验分为模型组、莪术醇组、莪术油组，分别加入相应培养液培养宫颈癌细胞。4 ℃下离心 10 min，裂解后取上清。用 10% SDS－聚丙烯酰胺凝胶电泳法后半干法电转至聚偏二氟乙烯（PVDF）膜上，37 ℃下封闭 2 h，TBST 清洗 3 次，加入相应抗体，常规孵育。加入 ECL 化学发光试剂，将 PVDF 膜放入暗盒，压上 X 胶片，然后取出胶片显影、定影、清洗。将目的蛋白的灰度值与内参蛋白 β－actin 条带灰度值比值为目的蛋白的相对表达水平。

宫颈癌细胞凋亡的检测：分组与培养同上，将上述宫颈癌细胞离心 5 min（4 ℃，5 *g*）；收集细胞，分别加入 100 μL 的 Binding Buffer 及 5 μL 的 PI 和 Annexin V－FITC，在室温条件下避光孵育，加入 400 μL 的 Binding Buffer 后以流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism5 软件绘图及统计分析。多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD 法，检验水准 α = 0.05。

2 结果

2.1 莪术醇的鉴定

莪术醇供试品与对照品在同一位置显色（见图 1），*OD* 值及纯度见表 1。

2.2 肿瘤细胞增殖结果

结果见图 2。莪术醇对宫颈癌细胞、肺癌细胞的抑制率均高于莪术油，莪术油对宫颈癌细胞、肺癌细胞的半数致死浓度（LD_{50}）分别为 9.01 mg/mL，9.91 mg/mL；莪术醇分别为 8.21 mg/mL，10.01 mg/mL。



A　　B

A. 对照品　B. 供试品

图 1　对照品与供试品油醚－乙酸乙酯显色比较

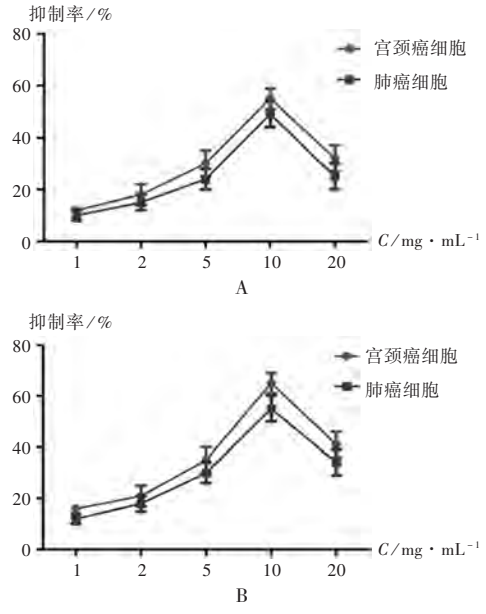
A. Reference substance　B. Test substance

Fig. 1　Comparison of the oleyl ether－ethyl acetate strip of reference and test substance

表 1　莪术醇吸光度比较

Tab. 1　Absorbance comparison of curcumol

待测成分	*OD*	纯度（%）
供试品	0.398 7	89.57
对照品	0.445 1	99.99



A. 莪术油　B. 莪术醇

图 2　肿瘤细胞增殖结果

A. *Zedoary turmeric* oil　B. Curcumol

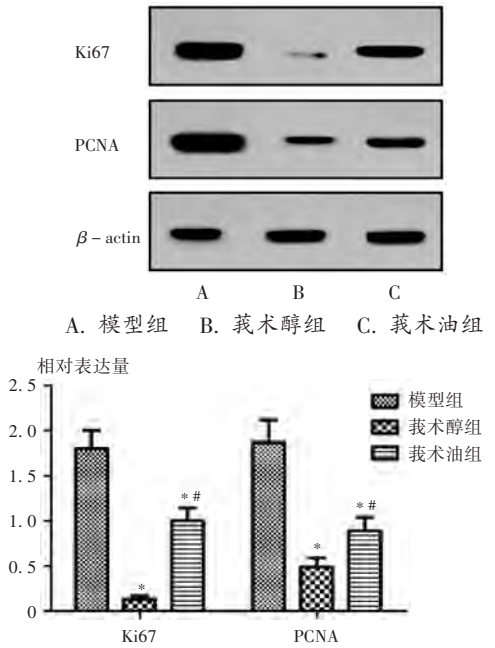
Fig. 2　The proliferation of tumor cells

2.3 蛋白表达及细胞凋亡结果

各组细胞增殖蛋白表达情况见图 3，细胞凋亡蛋白表达情况见图 4，细胞凋亡情况见图 5。

3 讨论

莪术油属常见氢化蒎类混合物，目前主要分离方法包括柱分离法和薄层色谱法[8]。莪术醇与莪术油中其他成分的结晶温度不同，也可使用减压蒸馏法或重结晶法



A. 模型组 B. 莪术醇组 C. 莪术油组

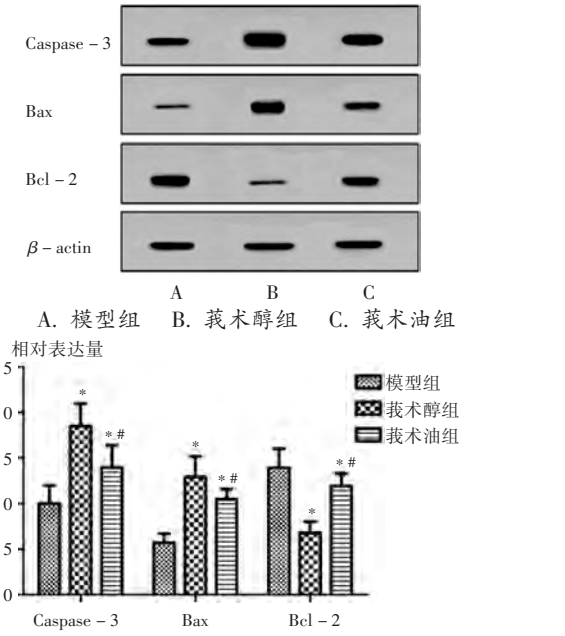
注：与模型组比较，* $P<0.05$；与莪术油组比较，# $P<0.05$。下图同。

图 3 肿瘤细胞 Ki67 和 PCNA 蛋白表达

A. Model group B. Curcumol group C. *Zedoary turmeric* oil group

Note: Compared with those in model group, * $P<0.05$; compared with those in curcumol group, # $P<0.05$; as well as the following tables.

Fig. 3 The expression of Ki67 and PCNA protein in tumor cells



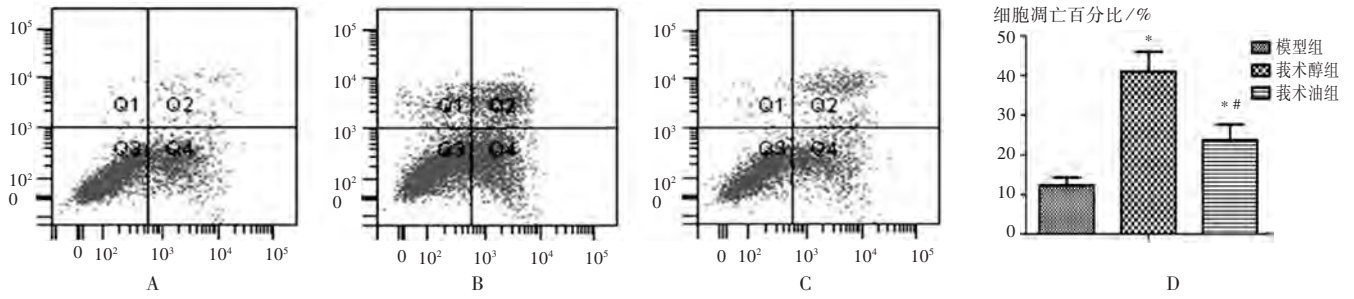
A. 模型组 B. 莪术醇组 C. 莪术油组

图 4 Caspase – 3、Bax 和 Bcl – 2 表达情况

A. Model group B. Curcumol group C. *Zedoary turmeric* oil group

Fig. 4 The expression of Caspase – 3, Bax and Bcl – 2

来分离，操作简单，对于纯度要求不高的莪术醇是较为合理的提取方法[6]。莪术醇的检测方法主要有红外分光光度法、气相色谱法等。本试验中采用减压蒸馏和重结晶后使用红外分光光度法检测，所得莪术醇纯度接近



A. 模型组 B. 莪术醇组 C. 莪术油组 D. 数据统计

图 5 流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况

A. Model group B. Curcumol group C. *Zedoary turmeric* oil group D. Data statistics histogram

Fig. 5 The apoptosis of each group detected by flow cytometry

90%，说明本试验成功提纯并鉴定了莪术醇。

莪术醇具有抑制肿瘤细胞增殖、侵袭等作用，同时可加快肿瘤细胞凋亡[9]。本研究中 MTT 试验结果显示，莪术醇对宫颈癌细胞、肺癌细胞均有较高的抑制率，且均高于莪术油对宫颈癌细胞抑制率。莪术醇对肿瘤细胞也有一定抑制作用，可能是因为莪术醇作用了肿瘤细胞的线粒体，使其受到抑制，影响其增殖能量代谢，从而抑制肿瘤细胞的增殖。蛋白质印迹试验结果显示，增殖细胞周期相关核抗原 Ki67 和 PCNA 表达水平均降低，说明肿瘤细胞分裂减慢。可能因为莪术醇中含有抑制增殖蛋白的氢化萘类化合物，减弱了其增殖能力。马希中[10]研究发现，莪术醇抑制癌细胞增殖，作用机制与下调 PCNA 基因的表达相关，与本研究结论一致。

调控细胞凋亡可有效阻滞肿瘤进展[11]。Caspase 家族是调控细胞凋亡的重要基因之一，主要包括 Caspase – 3 及 Caspase – 9 等促凋亡基因，其水平升高说明细胞趋向凋亡。Bcl – 2 和 Bax 也是较常见调控凋亡的基因，其中 Bcl – 2 为抗凋亡蛋白，Bax 为促凋亡蛋白[12]。本试验中发现，莪术油组和莪术醇组促凋亡蛋白表达水平均显著升高，抗凋亡蛋白表达水平显著降低；相比莪术油组，莪术醇组 Caspase – 3 和 Bax 蛋白表达水平均显著升高。同时，使用莪术醇的效果优于莪术油。莪术油中除了莪术醇可有效促进肿瘤细胞的凋亡外，还存在其他成分，使用同等浓度的两种物质，莪术醇的相对浓度