

Hela 细胞增殖抑制模型结合离心超滤质谱 筛选中药抗癌药物

魏忠宝¹, 马 蕾², 刘 舒², 刘志强², 石 毅³, 曲晓波¹

(1. 长春中医药大学, 吉林 长春 130117; 2. 中国科学院长春应用化学研究所, 吉林 长春 130022;

3. 吉林大学药学院, 吉林 长春 130012)

摘要:采用基于 MTT 比色法的 Hela 细胞增殖抑制模型评价中药提取物的抗癌活性, 并利用离心超滤质谱方法对活性最强的中药提取物中抗癌活性成分进行筛选和鉴定。结果表明, 长春花提取物对 Hela 细胞增殖的抑制活性最强, 与阳性对照药阿霉素相当, 且抑制活性与给药浓度呈正相关。延胡索提取物在 3 个不同给药浓度下也可以显著抑制 Hela 细胞的增殖。三尖杉、黄连和喜树果提取物在高浓度时能够显著抑制 Hela 细胞的增殖, 而刺五加提取物则没有明显抑制作用。利用离心超滤质谱从长春花提取物中筛选得到 2 种存活素基因启动子片段结合剂和 6 种钙调蛋白结合剂, 经多级串联质谱分析鉴定, 分别为蛇根碱、鸡骨常山碱、它波宁、环氧长春碱、长春新碱和 21'-氧代环氧长春碱。本研究可为中药抗癌药物的筛选提供一种简便、快速的方法。

关键词:离心超滤质谱; Hela 细胞; 中药; 筛选; 抗癌

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2017)04-0494-09

doi: 10.7538/zpxb.2017.0006

In vitro Screening of Anti-Cancer Agents from Traditional Chinese Medicine Using the Hela Cell Proliferation Inhibition Model Coupled with Centrifugal Ultrafiltration Mass Spectrometry

WEI Zhong-bao¹, MA Lei², LIU Shu², LIU Zhi-qiang², SHI Yi³, QU Xiao-bo¹

(1. Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China;

2. Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China;

3. School of Pharmaceutical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract: The Traditional Chinese medicine (TCM) has the characteristics of abundant resources, mild effect, and good anti-cancer effect, so research and development of anti-cancer drugs from TCM has become a hot spot. However, because the TCM extract has complex components and the pharmacological effects of TCM are usually a result of the cooperation of the multiple bioactive components binding to different biological targets, it was difficult to clarify the mechanism and foundation of the bioactivities of TCM. In

收稿日期: 2017-01-05; 修回日期: 2017-02-17

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(21073178); 吉林省科技发展计划项目——自然科学基金项目(20150101077JC)资助

作者简介: 魏忠宝(1978—), 男(汉族), 吉林敦化人, 博士研究生, 中药学专业。E-mail: 781639055@qq.com

通信作者: 曲晓波(1955—), 女(汉族), 吉林人, 教授, 从事中药学研究。E-mail: quxiaobo0504@hotmail.com

this study, the Hela cell proliferation inhibition model coupled with centrifugal ultrafiltration mass spectrometry was established to screen the anti-cancer agents from TCM. Firstly, the antiproliferative effect of TCM extracts on the Hela cell lines was investigated by the MTT colorimetric method. And then, the promoter DNA of survivin gene and the protein calmodulin were selected as the cancer-related biological targets and the centrifugal ultrafiltration mass spectrometry method was used to screen and identify active components acting on the selected targets from strongest active extracts. The results showed that *Catharanthus Roseus* extract had the strongest inhibitory activity on Hela cell proliferation and the inhibitory activity was positively correlated to the concentration. *Rhizoma Corydalis* extract also had significant inhibitory activity on Hela cell proliferation at three different concentrations. *Folium et Ramulus Cephalotaxi*, *Rhizoma Picrorhizae* and *Fructus Camptothecae Acuminatae* extracts could significantly inhibit the Hela cell proliferation at high concentrations, while *Acanthopanax Senticosus* extract had no significant inhibitory effect on the Hela cell proliferation. Two binders of promoter DNA of survivin gene were screened from *Catharanthus Roseus* extract by centrifugal ultrafiltration mass spectrometry, and they were identified as serpentine and alstonine by multiple tandem mass spectrometry. Six binders of protein calmodulin were screened from *Catharanthus Roseus* extract and identified as serpentine, alstonine, tabersonine, leurosine, vincristine and 21'-oxo-leurosine. This study demonstrated the promising application of centrifugal ultrafiltration mass spectrometry in the screening of active components from TCM. The results could not only provide scientific references to the mechanism of the anti-cancer effects of the chemical components or the TCM extracts but also provide a rapid, sensitive and powerful platform for screening the bio-active components from TCM by using centrifugal ultrafiltration mass spectrometry.

Key words: centrifugal ultrafiltration mass spectrometry; Hela cell lines; traditional Chinese medicine; screen; anti-cancer

中草药具有资源丰富、作用温和以及抗肿瘤疗效确切等特点,已成为抗肿瘤药物研发的热点^[1-2]。然而,中药资源库庞大、中药化学成分复杂,并且其药效的发挥往往是多个活性成分作用于不同的生物靶分子的共同结果,如何有效、快速筛选并鉴定抗癌活性成分已成为目前研究中药抗癌药物亟待解决的问题之一。充分利用现代肿瘤学的研究成果并结合现代分析技术,建立科学合理的抗肿瘤药物筛选模型和高效可靠的方法,是研制疗效好、作用机理清楚的中药抗肿瘤新药的唯一途径。

质谱技术具有高灵敏度、高选择性和应用快捷等优点,在中药复杂体系研究中得到了广泛应用^[3-4],尤其与其他分离分析技术的联用,可以实现对中药复杂体系中活性成分的快速筛选和鉴定^[5]。其中,离心超滤质谱技术常用于

研究小分子药物与生物靶分子之间的相互作用,主要原理是将药物与生物靶分子混合,得到活性分子—生物靶分子复合物和游离的非活性小分子混合溶液,将混合溶液置于可以按分子质量不同截留部分化合物的超滤管中,通过离心使生物靶分子及其复合物被膜挡在一侧,游离态的小分子则自由通过超滤膜,实现活性分子与非活性分子的分离,然后,利用 LC/MS 联用技术对这些活性分子进行分离和鉴别。该方法应用简单、操作便捷,可以针对与疾病相关的生物靶分子,从复杂体系中快速筛选得到活性成分,同时借助质谱强大的定性能力对活性成分进行结构解析。该方法已被广泛应用于中药复杂体系活性成分筛选研究^[6-7]。

本研究拟采用 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐比色法(MTT 比色法)考察

中药提取物对 Hela 细胞的增殖抑制作用^[8], 对其抗癌活性进行初步评价。然后, 选取与肿瘤细胞增殖和凋亡密切相关的存活素基因启动子 DNA 片段和钙调蛋白作为靶点^[9-12], 利用离心超滤质谱法对抑制活性最强的中药提取物进行活性成分的进一步筛选与鉴定。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

LTQ XLTM 线性离子阱质谱仪: 美国 Thermo 公司产品, 配有电喷雾离子源 (ESI) 及 Xcalibur 1.2 数据处理系统; Waters H-Class 超高效液相色谱仪: 美国 Waters 公司产品, 配有光电二级阵列管检测器和 Empower 色谱工作站; Eppendorf 5810R 台式高速冷冻离心机: 德国 Eppendorf 公司产品; GENios 酶标仪: 瑞士 Tecan 公司产品; Cary50 紫外-可见分光光度计: 美国 Varian 公司产品; CO₂ 培养箱: 日本 Sanyo 公司产品; 超净工作台: 江苏安泰公司产品。

1.2 主要材料与试剂

Hela 细胞株: 由中科院细胞库提供; 合成存活素基因启动子片段 (MW 8526.5 Da) 对应的两条单链 DNA 序列为 5'-ACGCGGCGG-GAGGA-3' 和 5'-TCCTCCCGCCGCGT-3'; 大连宝生物工程有限公司合成; 钙调蛋白 (MW 16 792 u): 美国 Sigma-Aldrich 公司产品; 阿霉素单体: 浙江海正药业股份有限公司产品; 长春花、三尖杉、延胡索、黄连和刺五加: 购于同仁堂长春药店; 喜树果: 中国药品生物制品检定所产品; PRMI1640 细胞培养液: 美国 Hyclone 公司产品; 胎牛血清: 杭州四季青公司产品; 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT), 二甲基亚砜 (DMSO): 美国 Sigma 公司产品; 24 和 96 孔细胞培养板: 美国 Falcon 公司产品; YM-3 超滤膜 (截留分子质量为 3 ku, 超滤膜材质为再生纤维素): 美国 Millipore 公司 Amicon Ultra-0.5 系列产品; 醋酸铵和醋酸钙: 均为色谱级, 美国 Fluka 公司产品; 甲醇: 色谱级, 美国 Fisher Chemical 公司产品; 纯净水: 经美国 Milli-Q 水处理系统纯化。

1.3 样品制备

1.3.1 中药提取物制备 称取 2 g 干燥的中药材粉末, 加入 20 mL 75% 乙醇-水溶液, 室温

超声提取 40 min。然后, 取上清液置于 40 °C 水浴中, 氮气吹干, 用 100 μL DMSO 溶解并用水定容至 5 mL, 得到生药含量为 0.4 g/mL 提取液。过 0.22 μm 有机相滤膜制得的储备液于 4 °C 保存, 备用。

1.3.2 双链 DNA 的合成 将单链 DNA 分子分别溶于 Milli-Q 水中, 配制成 2 mmol/L 储备液。分别取 100 μL 含两条互补单链 DNA 分子的溶液于 200 μL 100 mmol/L 醋酸铵溶液中混合, 90 °C 下保持 15 min, 然后缓慢冷却至室温并过夜, 即退火形成浓度为 500 μmol/L 双链 DNA 溶液。

1.3.3 钙调蛋白配制 将钙调蛋白加少量 Milli-Q 水溶解, 钙调蛋白浓度通过紫外分光光度计测定并调整至 180 μmol/L, 其浓度根据 $\epsilon_{280\text{nm}} = 3\,300\text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 确定, 于 -20 °C 保存备用。实验开始时, 将 20 μL 不含钙离子的钙调蛋白储备液用 80 μL 12.5 mmol/L 醋酸钙-62.5 mmol/L 醋酸铵溶液稀释, 于 25 °C 水浴中反应 10 min, 得到终浓度为 36 μmol/L 钙离子和钙调蛋白 (Ca²⁺ · CaM) 复合物溶液。

1.4 实验条件

1.4.1 色谱条件 色谱柱: 迪马 C18 柱 (150 mm × 4.6 mm × 5 μm); 流动相: A 为乙腈, B 为 0.5% 醋酸水溶液; 流动相流速: 0.5 mL/min; 进样量: 10 μL; 检测波长: 270 nm; 柱温: 30 °C; 梯度洗脱程序: 0~15 min (10%~24% A); 15~30 min (24%~100% A); 30~60 min (100% A)。

1.4.2 质谱条件 电喷雾电离源 (ESI), 正离子全扫描模式, 扫描范围 m/z 100~1 000; 喷雾电压: 4.5 kV; 毛细管温度: 240 °C; 鞘气和辅助气均为 N₂, 流速分别为 27 L/h 和 90 L/h; 碰撞气为 He; 碰撞诱导解离实验条件: 串联能量 25 eV, 碰撞时间 30 ms; 采用 Thermo 公司 Xcalibur 1.2 软件采集并处理数据。

1.5 MTT 比色法考察中药提取物对 Hela 细胞的增殖抑制作用

取 100 μL 对数生长期的 Hela 细胞, 以 1×10^4 个/孔的浓度接种到 96 孔培养皿中, 过夜培养 24 h 后, 分别加入 80 μL 阿霉素和中药提取物, 使其终浓度分别为 0.75、1.5、3.0 g/L, 每个浓度设 5 个复孔 (共 6 组平行实验)。未加药物的细胞作为对照组, 培养基作为空白调零

孔。分别培养 24 h 后,加入 20 μL 浓度为 5 g/L MTT,继续培养 4 h,舍弃上清液,每孔加入 200 μL DMSO,酶标仪或者培养箱中低速振荡 10 min,使结晶溶解,用酶标仪检测 490 nm 处吸光度 A 值。测定时,用空白孔调零。细胞生长抑制率 = (对照组 - 实验组)/对照组 $\times$ 100%。实验重复 6 次,所有数据均表示为平均值 $\pm$ 标准差 (Mean $\pm$ SD),并进行 t 检验分析。

1.6 离心超滤质谱筛选

离心超滤质谱法主要通过比较靶分子加入前后,溶液中游离的药物成分的浓度变化来推断药物与靶分子的结合程度。加入靶分子后,游离药物的浓度降低程度越大,药物与靶分子的作用力越强。由于色谱峰积分面积与其在溶液中的浓度成正比,故可以利用色谱峰积分面积在生物靶分子加入前后的变化程度来反映其对应的化合物与生物靶分子的结合程度。假设对照组(不加靶分子)药物的色谱峰积分面积为 A_c ,实验组(加入靶分子)药物的色谱峰积分面积为 A_e ,则药物与靶分子的结合强度可表示为: Binding Degree = $(A_c - A_e)/A_c$ 。用这种计算方法对不同的复杂体系中各组与靶分子的相对结合强度进行比较。

1.6.1 离心超滤质谱筛选双链 DNA 结合剂

用 50 mmol/L 醋酸铵溶液将 DNA 储备液和长春花提取物储备液分别稀释为 25 $\mu\text{mol/L}$ 和 5 g/L。实验组为稀释的 DNA 靶分子溶液与长春花提取物溶液,按照体积比 4 : 1 混合,终体积为 200 μL 。将混合溶液置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 30 min 后,吸取 180 μL 至超滤管中,以 13 000 r/min 离心 30 min。然后向滤膜上方加入 150 μL 50 mmol/L 醋酸铵洗脱溶液,以 13 000 r/min 离心 30 min,重复 3 次,收集洗脱液,冷冻干燥。冻干后的样品用 60 μL 甲醇-水溶液 (1 : 1, V/V) 充分溶解,待 LC-MS/MS 分析。对照组不加 DNA 靶分子,其他溶液条件和处理方法与实验组相同。

1.6.2 离心超滤质谱筛选钙调蛋白结合剂

用含 10 mmol/L Ca^{2+} 的 50 mmol/L 醋酸铵溶液将长春花提取物储备液稀释为 5 g/L。实验组为 $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{CaM}$ 复合物溶液与长春花提

取物稀释溶液,按照体积比 4 : 1 混合,终体积为 200 μL 。将混合溶液置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 20 min 后,吸取 100 μL 至超滤管中,以 13 500 r/min 离心 30 min。然后向滤膜上方加入 100 μL 含 10 mmol/L Ca^{2+} 的 50 mmol/L 醋酸铵洗脱溶液,以 13 500 r/min 离心 30 min,重复 3 次,收集洗脱液,冷冻干燥。冻干后的样品用 40 μL 甲醇-水溶液 (1 : 1, V/V) 充分溶解,待 LC-MS/MS 分析。对照组不加 $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{CaM}$ 复合物,其他溶液条件和处理方法与实验组相同。

2 结果与讨论

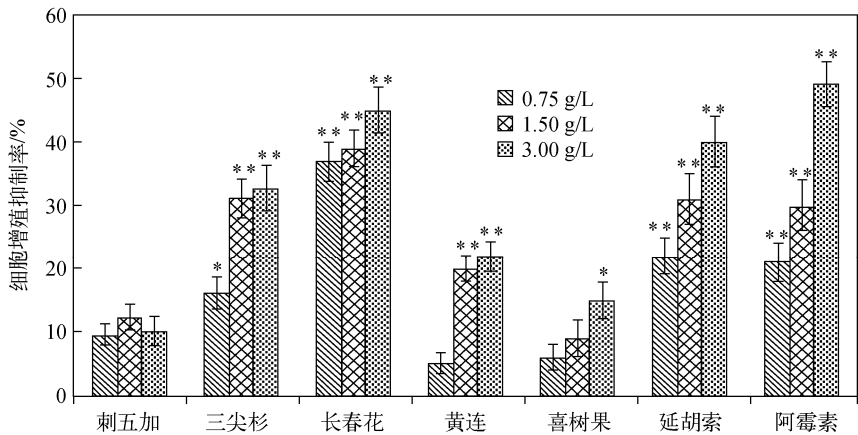
2.1 中药提取物对 Hela 细胞增殖的抑制作用

分别将长春花、延胡索、三尖杉、喜树果、黄连和刺五加等 6 种中药提取物在 0.75、1.5 和 3.0 g/L 浓度下对 Hela 细胞作用 24 h。结果表明,均对 Hela 细胞增殖有不同程度的抑制作用。其中,长春花提取物对 Hela 细胞增殖的抑制活性最强,浓度为 3.0 g/L 时的抑制率为 45%,与阳性对照药阿霉素接近 (3.0 g/L 时的抑制率为 48.8%),且抑制活性与给药浓度呈正相关;延胡索提取物在 3 个不同浓度下也可以显著抑制 Hela 细胞的增殖;三尖杉、黄连和喜树果提取物在高浓度时能够显著抑制 Hela 细胞的增殖;而刺五加提取物则没有明显地抑制作用,结果示于图 1。

2.2 长春花提取物中双链 DNA 结合剂的离心超滤质谱筛选

2.2.1 离心超滤质谱筛选 长春花提取物与目标 DNA 反应,用离心超滤方法将与双链 DNA 结合的药物和未结合的药物分离,分别进行 LC/MSⁿ 分析。长春花提取物与双链 DNA 作用后的和不加双链 DNA 对照组的液相色谱图示于图 2。当提取物中的成分与双链 DNA 发生特异性结合后,对应化合物的峰面积将小于其对照组。结果表明,共检测到 2 种化合物可以与双链 DNA 结合,结合率分别为 40.38% 和 47.73%。

紫外吸收数据显示,这 2 种化合物具有类似的紫外吸收峰,即均在 247 nm 和 306 nm 有最大紫外吸收,说明这 2 种化合物可能具有相似的母核结构。



注：* 代表 $P<0.05$ vs 对照组，** 代表 $P<0.01$ vs 对照组

图 1 6 种中药提取物在 3 种浓度下对 Hela 细胞增殖的抑制率 (Mean±SD, $n=6$)

Fig. 1 Inhibition rates of 6 kinds of Chinese herbal extracts on Hela cell proliferation at three different concentrations (Mean±SD, $n=6$)

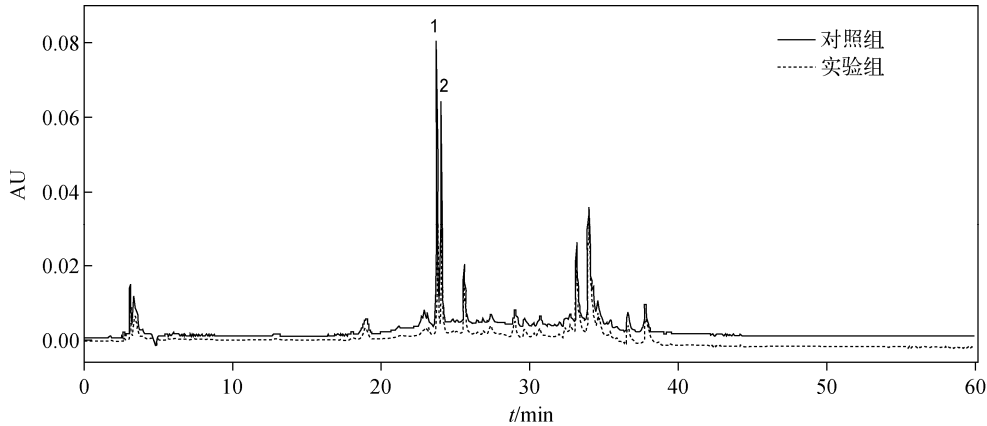


图 2 长春花提取物经过双链 DNA 结合剂筛选之后的液相色谱图

Fig. 2 Ultrafiltration HPLC chromatogram of the extracts from *Catharanthus roseus*

2.2.2 活性成分的 LC/MSⁿ 鉴定 在电喷雾质谱正离子扫描模式下,化合物 1 的全扫描质谱图、 m/z 349 二级串联质谱图、 m/z 317 和 m/z 263 三级串联质谱图示于图 3。化合物 1 和 2 的准分子离子均为 m/z 349,由此判断,这 2 个化合物互为同分异构体,且根据其相对分子质量信息,并结合文献报道,初步判定它们可能分别为蛇根碱和鸡骨常山碱^[11]。为了确认其结构,分别对这 2 个化合物进行了串联质谱研究。结果显示,它们具有相同的碎裂规律。 m/z 349 离子在串联质谱中得到的主要碎片离子为 m/z 317 和 m/z 263,即准分子离子峰丢

失质量数为 32 u(CH_4O)和 86 u($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2$)的碎片。继续对碎片离子 m/z 317 和 m/z 263 进行串联质谱分析, m/z 317 离子碎裂主要产生 m/z 289、263、271、247 等碎片离子。 m/z 263 离子碎裂主要产生 m/z 261、235、205 等碎片离子。根据串联质谱分析,推测化合物 1 和 2 分别为蛇根碱和鸡骨常山碱。据文献报道,蛇根碱和鸡骨常山碱在液相色谱中难以分离,且相比之下,蛇根碱的出峰时间较早。因此,化合物 1 可能为蛇根碱,化合物 2 可能为鸡骨常山碱^[13]。化合物 1 可能的质谱裂解途径示于图 4。

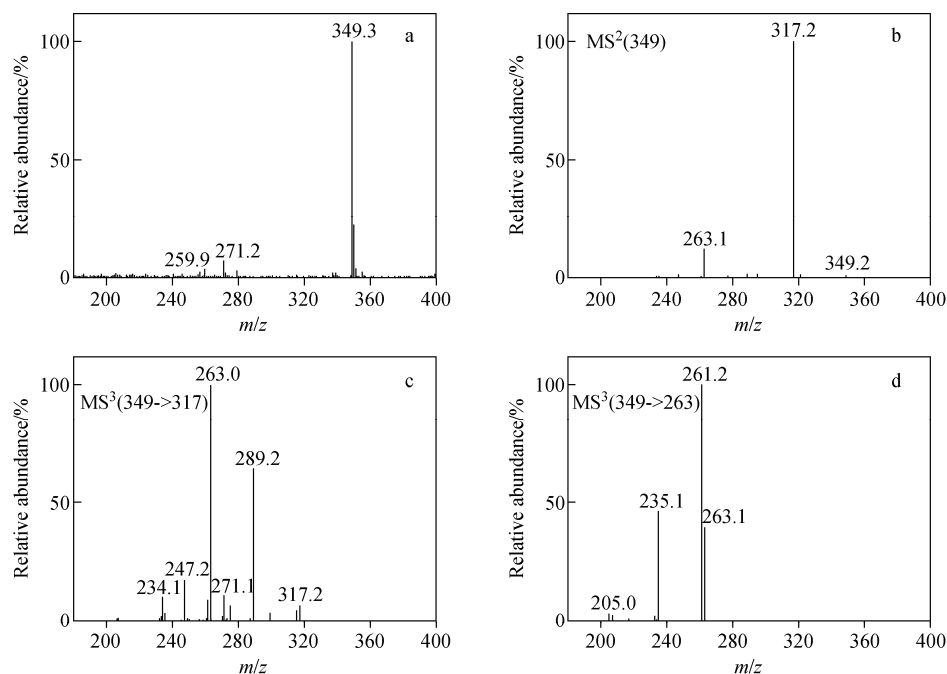


图 3 化合物 1 的全扫描质谱图(a)、 m/z 349 二级串联质谱图(b)、 m/z 317(c)和 m/z 263(d)三级串联质谱图

Fig. 3 Full mass spectrum of compound 1 (a), MS^2 spectrum of m/z 349 (b), MS^3 spectrum of m/z 317 (c) and m/z 263 (d)

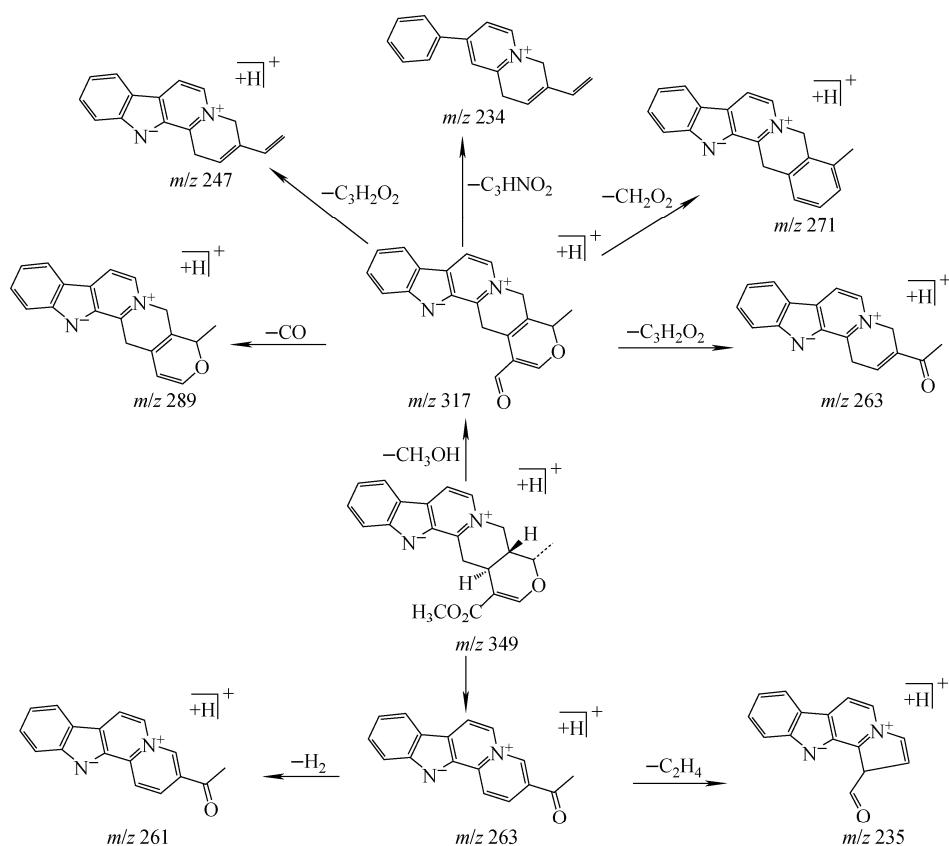


图 4 化合物 1 可能的质谱裂解途径

Fig. 4 Fragmentation pathways of compound 1

2.3 长春花提取物中钙调蛋白结合剂的离心超滤质谱筛选

2.3.1 离心超滤质谱筛选 利用离心超滤质谱技术考察长春花提取物中各组分与蛋白靶分子之间的相互作用。提取物与钙调蛋白作用后和不加钙调蛋白对照组的液相色谱图示于图 5。当提取物中的成分与靶分子发生特异性结合后,对应的化合物峰面积将小于对照组。结果表明,共检测到 6 种化合物可以与钙调蛋白结合,其结合率分别为 32.32%、34.41%、17.95%、3.13%、20.04%和 46.00%。

2.3.2 活性成分的 LC/MSⁿ 鉴定 在电喷雾质谱正离子扫描模式下,这 6 种化合物按照出

峰顺序对应的准分子离子峰分别为 m/z 349、349、337、810、825 和 823。为确定化合物结构,对其进行了串联质谱分析,结果列于表 1。

化合物 1 和 2 的鉴定参照 2.2.2 节。化合物 3 在串联质谱中丢失 32 u 和 60 u 产生 m/z 305(100%)和 m/z 277 特征碎片离子,分别对应丢失中性分子 CH₃OH 和 HCO₂CH₃。通过文献检索,这与它波宁的串联质谱规律是一致的,因而推测该化合物可能为它波宁^[14]。

在电喷雾正离子扫描模式下,化合物 4、5 和 6 的准分子离子峰均为[M+H]⁺和[M+K]⁺离子。串联质谱中均存在丢失最小分子质量 18 u 的碎片离子,即丢失 1 分子的 H₂O,说明

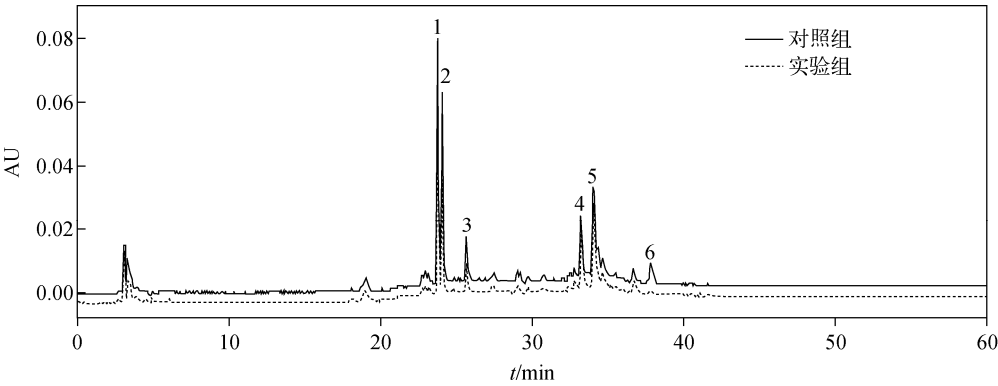


图 5 长春花提取物经过钙调蛋白结合剂筛选之后的液相色谱图

Fig. 5 Ultrafiltration HPLC chromatograms of the extracts from *Catharanthus roseus*

表 1 长春花提取物中钙调蛋白结合剂的质谱信息

Table 1 Mass spectrometry information of calmodulin binders screened from *Catharanthus Roseus* extract

化合物编号 No.	保留时间 t_R /min	质荷比 m/z	质谱数据 MS ⁿ	化学式 (MW)	化合物鉴定 Identification
1	23.5	349	[MS ²]349>317,263 [MS ³]317>289,263,271,247,234 [MS ³]263>261,235,205	C ₂₁ H ₂₀ N ₂ O ₃ (348)	蛇根碱 Serpentine
2	24.3	349	[MS ²]349>317,263 [MS ³]317>289,263,271,247,234 [MS ³]263>261,235,205	C ₂₁ H ₂₀ N ₂ O ₃ (348)	鸡骨常山碱 Alstonine
3	25.9	337	[MS ²]337>305,277,252,222,206,194 [MS ³]305>287,277,262,195	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₂ (336)	它波宁 Tabersonine
4	33.2	809	[MS ²]809>791,749,731,717,647,540 [MS ³]749>731,689,647,540,490,353	C ₄₆ H ₅₆ N ₄ O ₉ (808)	环氧长春碱 Vinleurosine
5	34.3	825	[MS ²]825>807,765,663,556 [MS ³]765>705,663,556,530,341	C ₄₆ H ₅₆ N ₄ O ₁₀ (824)	长春新碱 Vincristine
6	38.1	823	[MS ²]823>805,763,731,554 [MS ³]763>731,661,554,522	C ₄₆ H ₅₄ N ₄ O ₁₀ (822)	21'-氧代环氧长春碱 21'-oxo-leurosine

它们均含有一OH 基团。同时,其丢失 60 u 产生的碎片离子丰度最高,即丢失 HCO_2CH_3 ,对应的碎片离子分别为 m/z 749、765、763,说明它们均含有一 OCOCH_3 基团。最为重要的是,化合物 4、5 和 6 在串联质谱中均存在开环碎裂(碎片离子分别为 m/z 540、556、554)和丢失一分子吡啶生物碱(碎片离子分别为 m/z 353、

355、367)的特征碎片离子,示于图 6。这种特征碎片离子与其母核结构和取代基密切相关。由串联质谱规律可知,这 3 个化合物有类似的母核结构,其差别在于取代基。通过查阅文献,推测化合物 4、5 和 6 分别为环氧长春碱、长春新碱和 21'-氧代环氧长春碱^[14]。

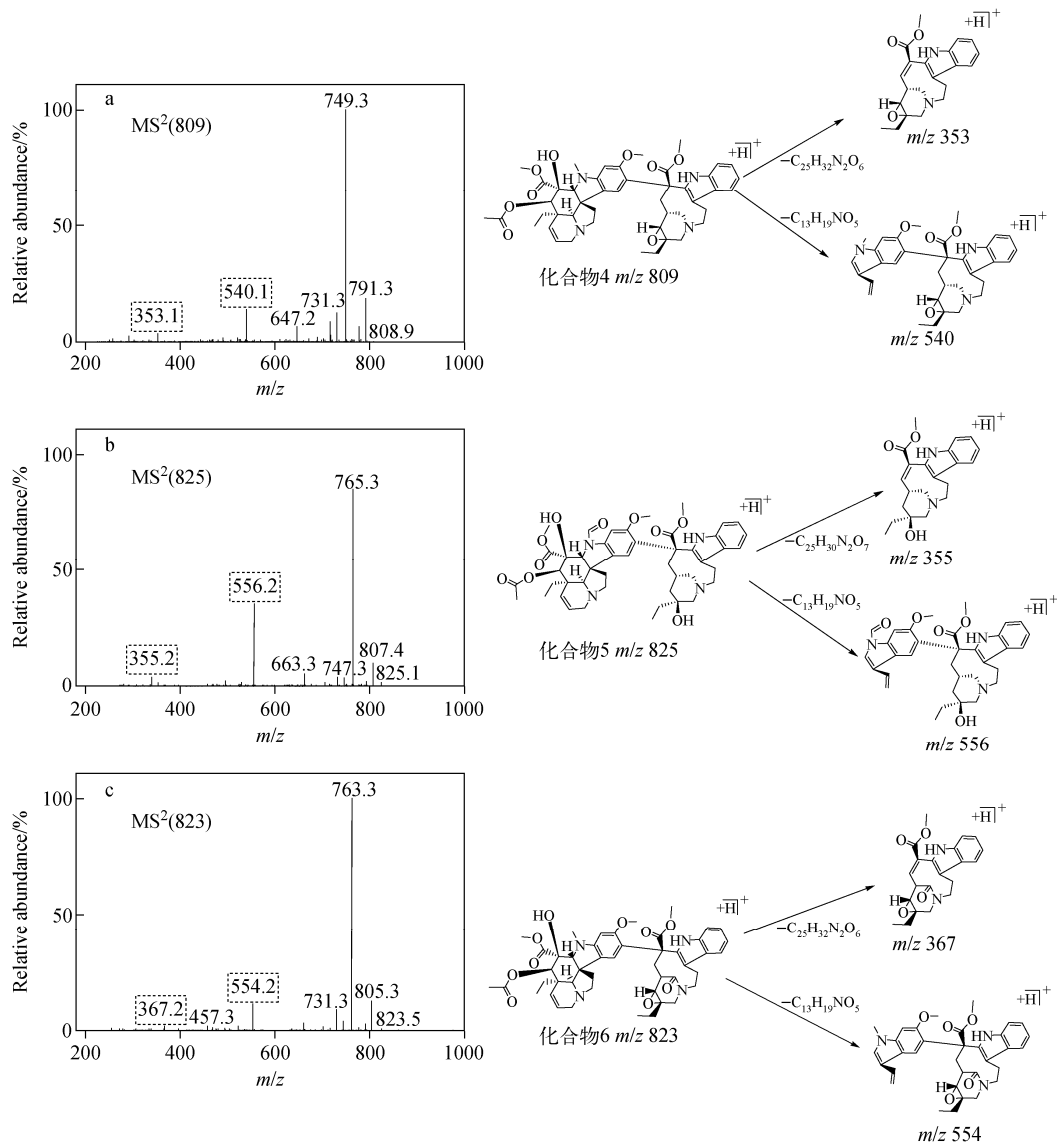


图 6 化合物 4 (a), 5 (b) 和 6 (c) 的二级串联质谱图及特征离子碎裂途径

Fig. 6 MS² spectrum and fragmentation pathways of compound 4 (a), 5 (b) and 6 (c)

3 结论

本研究基于 MTT 比色法,采用 Hela 细胞增殖抑制模型,并结合离心超滤质谱方法,建立了中药抗癌药物的筛选及其活性成分鉴定方法。

结果显示,在筛选的 6 种中药提取物中,长春花提取物抑制 Hela 细胞增殖的活性最强。利用离心超滤质谱方法对长春花提取物中的抗癌活性成分进行进一步筛选和鉴定,结果表明,长春花

中含量较高的2种成分——蛇根碱和鸡骨常山碱与存活素基因启动子片段和钙调蛋白均有较强的作用。该结果有助于探讨长春花提取物的抗癌活性成分及可能的作用机制。本研究方法的建立,不仅可以对中药资源库中具有抗癌活性的中药进行快速筛选,并且有助于发现其中主要的活性成分和可能的作用机制,为中药抗癌药物的筛选提供了一种简便、快速的方法。

参考文献:

- [1] LEE C Y, HSIEH S L, HSIEH S, et al. Inhibition of human colorectal cancer metastasis by notoginsenoside R1, an important compound from *Panax notoginseng*[J]. *Oncology Reports*, 2017, 37(1): 399-407.
- [2] DAI S X, LI W X, HAN F F, et al. In silico identification of anti-cancer compounds and plants from traditional Chinese medicine database[J]. *Scientific Reports*, 2016, (6): 25 462-25 470.
- [3] 王子健,刘颖,刘思斌,等. UPLC-HRMSⁿ 结合高能诱导裂解快速鉴定麦冬中高异黄酮类成分[J]. *质谱学报*, 2016, 37(6): 481-491.
WANG Zijian, LIU Ying, LIU Siyi, et al. Rapid identification of homoisoflavonoids in ophiopogon japonicas based on UPLC-HRMSⁿ combined HCD method[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2016, 37(6): 481-491(in Chinese).
- [4] 张加余,蔡伟,李云,等. HPLC/LTQ-Orbitrap MSⁿ 结合 MDF 数据挖掘技术快速鉴定藏白蒿绿原酸类似物[J]. *质谱学报*, 2015, 36(4): 321-327.
ZHANG Jiayu, CAI Wei, LI Yun, et al. Rapid characterization of chlorogenic acids analogues in *artemisia younghusbandii* using HPLC/LTQ-Orbitrap MSⁿ coupled with MDF data mining technology[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2015, 36(4): 321-327(in Chinese).
- [5] 李雪,王倩倩,徐晨,等. 中药质谱分析方法及应用研究[J]. *中国科学:化学*, 2014, 44(5): 701-709.
LI Xue, WANG Qianqian, XU Chen, et al. The method and application on mass spectrometry analysis of Chinese medicine research[J]. *Scientia Sinica Chimica*, 2014, 44(5): 701-709(in Chinese).
- [6] WANG J, ZHENG M Z, CHEN L N, et al.

Rapid screening, separation, and detection of hydroxyl radical scavengers from total flavonoids of *Ginkgo biloba* leaves by chromatography combined with molecular devices[J]. *Journal of Separation Science*, 2016, 39(21): 4 158-4 165.

- [7] 周慧,宋凤瑞,刘志强,等. 超滤质谱技术在药物小分子与生物靶分子相互作用研究中的应用[J]. *化学进展*, 2010, 22(11): 2 207-2 214.
ZHOU Hui, SONG Fengrui, LIU Zhiqiang, et al. Applications of ultrafiltration mass spectrometry in the studies on interaction between small drug molecule and biological target[J]. *Progress in Chemistry*, 2010, 22(11): 2 207-2 214(in Chinese).
- [8] SEN A, OZBAS T S, BITIS L. Bioactivity-guided isolation of anti-proliferative compounds from endemic *Centaurea kilaea*[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2017, 55(1): 541-546.
- [9] LIN K Y, CHENG S M, TSAI S L, et al. Delivery of a survivin promoter-driven antisense survivin-expressing plasmid DNA as a cancer therapeutic: a proof-of-concept study[J]. *Oncotargets and Therapy*, 2016, (9): 2 601-2 613.
- [10] CHAI S J, QIAN Y J, TANG J F, et al. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II gamma, a critical mediator of the NF-kappa B network, is a novel therapeutic target in non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Letters*, 2016, 380(2): 609-610.
- [11] MA L, WANG Z F, LIU S, et al. Screening calmodulin-binding ligands using intensity-fading matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2013, 27(13): 1 527-1 534.
- [12] MA L, LIU S, XU N S, et al. Interactions of ginsenosides with DNA duplexes: a study by electrospray ionization mass spectrometry and UV absorption spectroscopy[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2014, 25(8): 1 179-1 184.
- [13] HISIGER S, JOLICOEUR M. Analysis of *Catharanthus roseus* alkaloids by HPLC[J]. *Phytochemistry Reviews*, 2007, 6(2/3): 207-234.
- [14] ELSAYED A, HANDY G A, CORDELL G A. Catharanthus alkaloids XXXIII. 21' oxo-leurosine from *Catharanthus roseus* (apocynaceae) [J]. *Journal of Natural Products*, 1980, 43(1): 157-161.