

◇ 药学研究 ◇

野木瓜果实总皂苷体外抗肿瘤作用研究

祝小波,李宇婷,朱欣婷,刘云,李大玉,范芳,李长福

(遵义医学院生化教研室,贵州 遵义 563000)

摘要:目的 研究野木瓜果实总皂苷对人肺癌细胞 A549、人肝癌细胞 BEL-7402 和人胃癌细胞 SGC-7901 增殖的影响。**方法** 将生长状态良好的 A549 细胞、BEL-7402 细胞和 SGC-7901 细胞分为 7 组:阴性对照组,野木瓜果实总皂苷组(40、80、160、320、640 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)组和丝裂霉素组(10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$),药物作用 12、24、48 h 后,MTT 法测定细胞增殖抑制率。**结果** 野木瓜果实总皂苷能显著抑制 A549 细胞、BEL-7402 细胞和 SGC-7901 细胞的增殖,呈一定剂量和时间依赖关系,作用 A549 细胞 12、24、48 h 的半数抑制浓度(IC_{50})分别为 492.38、293.43、141.84 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;作用 BEL-7402 细胞 12、24、48 h 的 IC_{50} 分别为 427.74、243.91、101.79 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;作用 SGC-7901 细胞 12、24、48 h 的 IC_{50} 分别为 463.35、256.77、113.22 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。**结论** 野木瓜果实总皂苷有明显抑制 A549 细胞、BEL-7402 细胞和 SGC-7901 细胞体外增殖的作用,其中 BEL-7402 细胞对野木瓜果实总皂苷最为敏感。

关键词:野木瓜;总皂苷;体外;抗肿瘤作用

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.06.005

Anti-tumor effect of total saponins from the fruit of *Stauntonia chinensis* DC in vitro

ZHU Xiaobo, LI Yuting, ZHU Xinting, LIU Yun, LI Dayu, FAN Fang, LI Changfu

(Department of Biochemistry, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563000, China)

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of total saponins from the fruit of *Stauntonia chinensis* DC on human lung cancer cell (A549), human hepatocellular cell (BEL-7402) and human gastric cancer cell (SGC-7901) *in vitro*. **Methods** The A549 cells, BEL-7402 cells and SGC-7901 cells were randomized into seven groups: negative control group, total saponins (40, 80, 160, 320, 640 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) groups and mitomycin (10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) group. The proliferation inhibition rate in each group was calculated by MTT after incubated with drugs for 12, 24, 48 h. **Results** The total saponins from the fruit of *Stauntonia chinensis* DC could significantly inhibit the proliferation of A549 cells, BEL-7402 cells and SGC-7901 cells were in dose-and time-dependent. A549 cells were incubated for 12, 24, 48 h by total saponins, IC_{50} were 492.38, 293.43, 141.84 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively. BEL-7402 cells were incubated for 12, 24, 48 h by total saponins, IC_{50} were 427.74, 243.91, 101.79 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively. SGC-7901 cells were incubated for 12, 24, 48 h by total saponins, IC_{50} were 463.35, 256.77, 113.22 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively. **Conclusions** The total saponins from the fruit of *Stauntonia chinensis* DC could obviously inhibit the proliferation of A549 cells, BEL-7402 cells, and SGC-7901 cells. Among them, BEL-7402 cells were the most sensitive to the total saponins.

Key words: *Stauntonia chinensis* DC; Total saponins; *In vitro*; Anti-tumor activity

野木瓜 (*Stauntonia chinensis* DC) 为木通科 (Lardizabalaceae) 野木瓜属植物^[1], 系民间草药, 广泛分布于中国,《景岳全书·本草》记载:木瓜可入脾、肺、肝、肾四经,有舒经、活络、化湿和胃之功效,《中国药典》1977 年版和 2010 年版均收载过该品种,其根、茎、叶具有祛风止痛及舒经活络的功效^[2]。

贵州正安县盛产野木瓜,于 1996 年被国务院发展研究中心等单位授予“中国野木瓜之乡”称号,在其独有的地理环境下,造就了正安野木瓜果实独特的品味,具有皮薄、肉厚、质嫩、味甘酸等优良品质^[3],集观赏、药用、食用价值于一体,是重要经济植物。野木瓜具有抗炎镇痛、神经阻滞、放射增敏、护肝等功效,临床上常用野木瓜注射液治疗风湿关节痛、坐骨神经痛、三叉神经痛等痛症^[4-5]。野木瓜含有多种化学成分^[6],三萜皂苷类是其主要的活性物质,目前已分离出多种野木瓜皂

基金项目:贵州省卫生厅项目(gzjwkj2014-2-161)

通信作者:李长福,男,教授,硕士生导师,研究方向:肿瘤分子生物学, E-mail:lcfl967@126.com

苷^[7-10]。有研究表明,野木瓜皂苷能有效抑制白血病细胞的增殖^[11],而关于野木瓜皂苷作用其他癌症的研究报道甚少。因此,本实验采用乙醇浸提、D101 大孔树脂纯化的方法制备野木瓜果实总皂苷,通过观察不同剂量的野木瓜果实总皂苷体外对人肺癌细胞 A549、人肝癌细胞 BEL-7402 和人胃癌细胞 SGC-7901 增殖的影响,探讨其抗肿瘤活性,为野木瓜果实总皂苷抗肿瘤作用的进一步研究奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 细胞 人肝癌细胞 BEL-7402 购自南京凯基生物有限公司,人肺癌细胞 A549、人胃癌细胞 SGC-7901 均由遵义医学院医学与生物医学研究中心惠赠。

1.2 原料与试剂 野木瓜果实(贵州天楼食品有限公司);D101 大孔树脂(天津波鸿树脂科技有限公司);丝裂霉素(批号:1022A029)、MTT、二甲基亚砜(DMSO),北京索莱宝生物科技有限公司);RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司);胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司);实验所用试剂均为分析纯。

1.3 主要仪器 倒置光学显微镜(日本 Olympus);R-210 旋转蒸发仪(瑞士 Büchi 公司);722E 型分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司);imark 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);KL-UP-III 型超纯水器(台湾艾柯公司)。

2 方法

2.1 野木瓜果实总皂苷的制备 将野木瓜果实切片,烘干粉碎,称取野木瓜干粉 500 g,以料液比 1:20 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 加入 70% 乙醇浸泡 24 h,70 °C 水浴提取 2 h,重复 2 次,过滤,减压浓缩,适量去离子水复溶,等体积石油醚脱脂 3 次后,以等体积水饱和正丁醇萃取 3 次,合并正丁醇层,减压浓缩,得总皂苷提取物,以适量水复溶总皂苷提取物,过 D101 大孔树脂,分别以水、50% 乙醇洗脱,收集 50% 乙醇洗脱液,减压浓缩,得总皂苷。参考张婷婷等的方法^[12],测定以上制备的野木瓜果实总皂苷含量为 56.83%。

2.2 细胞培养 A549 细胞、BEL-7402 细胞和 SGC-7901 细胞用含 10% 胎牛血清、100 $\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素和 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素的 RPMI 1640 完全培养基,于 37 °C、5% CO_2 条件下培养,每 2 d 换一次液,取生长状态良好的细胞用于实验。

2.3 MTT 法测定总皂苷的抗肿瘤活性 取生长状态良好的 A549 细胞、BEL-7402 细胞和 SGC-7901

细胞,0.25% 胰酶消化,将细胞密度调为 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$,每孔加入 100 μL 细胞悬液,接种于 96 孔培养板中,于 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后,加入培养基稀释的不同浓度的总皂苷,终浓度分别 40、80、160、320、640 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,同时设置不加药阴性对照组和 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的丝裂霉素组,每组 3 个复孔。药物孵育 12、24、48 h 后,吸去培养液,每孔中加入新的培养基 100 μL 和 MTT 试剂 20 μL ,继续培养 4 h 后,吸去培养液,每孔加入 100 μL DMSO,酶标仪读取 490 nm 处吸光光度值(OD),重复 3 次实验。按照以下公式计算抑制率 = $(1 - \text{药物组 OD 值} / \text{对照组 OD 值}) \times 100\%$ 。

2.4 统计学方法 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS17.0 软件对数据进行单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 野木瓜果实总皂苷对 A549 细胞增殖的影响

MTT 检测结果表明,A549 细胞经野木瓜果实总皂苷分别作用 12、24、48 h 后,在各个孵育时间段,所设给药浓度对细胞增殖均有一定的抑制作用,当浓度分别为 160 ~ 640、80 ~ 640、40 ~ 640 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,能显著抑制 A549 细胞增殖($P < 0.05$),且伴随给药浓度增大,对细胞增殖抑制作用也增强,呈剂量依赖关系;在给药浓度一定时,药物作用时间越长,抑制作用越强,呈时间依赖关系。当浓度为 640 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,药物作用 12、24、48 h 后,细胞增殖抑制率分别为 54.77%、72.80%、88.80%,经 SPSS 17.0 软件计算,野木瓜果实总皂苷作用 A549 细胞 12、24、48 h 的半数抑制浓度(IC_{50})分别为 492.38、293.43、141.84 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,见表 1。

3.2 野木瓜果实总皂苷对 BEL-7402 细胞增殖的影响

MTT 检测结果表明,BEL-7402 细胞经野木瓜果实总皂苷分别作用 12、24、48 h 后,在各个孵育时间段,所设给药浓度对细胞增殖均有一定的抑制作用,当浓度分别为 160 ~ 640、80 ~ 640、40 ~ 640 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,能显著抑制细胞增殖($P < 0.05$),且伴随给药浓度增大,对细胞增殖抑制作用也增强,呈剂量依赖关系;在给药浓度一定时,药物作用时间越长,抑制作用越强,呈时间依赖关系。当浓度为 640 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,药物作用 12、24、48 h,细胞增殖抑制率分别为 61.68%、77.36%、92.49%,经 SPSS 17.0 软件计算,野木瓜果实总皂苷作用 BEL-7402 细胞 12、24、48 h 的 IC_{50} 分别为 427.74、243.91、101.79 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,见表 2。

表 1 野木瓜果实总皂苷对 A549 细胞生长的 48 h 内的抑制作用/($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	12 h		24 h		48 h	
		OD 值	抑制率/%	OD 值	抑制率/%	OD 值	抑制率/%
阴性对照组	—	0.933 ± 0.106	—	1.239 ± 0.107	—	1.669 ± 0.054	—
野木瓜果实总皂苷组	40	0.899 ± 0.099	3.64	1.151 ± 0.123	7.10	1.437 ± 0.066 ^a	13.88
	80	0.860 ± 0.106	7.82	1.056 ± 0.113 ^a	14.77	1.222 ± 0.158 ^b	26.78
	160	0.741 ± 0.071 ^a	20.58	0.864 ± 0.101 ^b	30.27	0.729 ± 0.103 ^b	56.32
	320	0.549 ± 0.060 ^b	41.16	0.562 ± 0.059 ^b	54.64	0.346 ± 0.051 ^b	79.27
	640	0.422 ± 0.041 ^b	54.77	0.337 ± 0.045 ^b	72.80	0.187 ± 0.037 ^b	88.80
丝裂霉素组	10	0.548 ± 0.058 ^b	41.26	0.380 ± 0.024 ^b	69.33	0.187 ± 0.017 ^b	88.80
F 值		18.57		52.32		108.44	
P 值		<0.001		<0.001		<0.001	

注:与阴性对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$ 。

表 2 野木瓜果实总皂苷对 BEL-7402 细胞生长的 48 h 内的抑制作用/($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	12 h		24 h		48 h	
		OD 值	抑制率/%	OD 值	抑制率/%	OD 值	抑制率/%
阴性对照组	—	0.715 ± 0.067	—	0.954 ± 0.093	—	1.612 ± 0.163	—
野木瓜果实总皂苷组	40	0.681 ± 0.052	4.76	0.874 ± 0.081	8.39	1.296 ± 0.131 ^a	19.60
	80	0.642 ± 0.053	10.21	0.790 ± 0.095 ^a	17.19	0.893 ± 0.076 ^a	44.60
	160	0.551 ± 0.048 ^a	22.94	0.590 ± 0.056 ^a	38.16	0.581 ± 0.074 ^a	63.96
	320	0.416 ± 0.035 ^a	41.82	0.388 ± 0.045 ^a	59.33	0.261 ± 0.041 ^a	83.81
	640	0.274 ± 0.038 ^a	61.68	0.216 ± 0.018 ^a	77.36	0.121 ± 0.033 ^a	92.49
丝裂霉素组	10	0.425 ± 0.038 ^a	40.56	0.259 ± 0.024 ^a	72.85	0.127 ± 0.015 ^a	92.12
F 值		33.90		63.08		126.77	
P 值		<0.001		<0.001		<0.001	

注:与阴性对照组比较,^a $P < 0.01$ 。

表 3 野木瓜果实总皂苷对 SGC-7901 细胞生长的 48 h 内的抑制作用/($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	12 h		24 h		48 h	
		OD 值	抑制率/%	OD 值	抑制率/%	OD 值	抑制率/%
阴性对照组	—	0.652 ± 0.031	—	0.807 ± 0.100	—	1.323 ± 0.153	—
野木瓜果实总皂苷组	40	0.622 ± 0.034	4.60	0.738 ± 0.092	8.55	1.091 ± 0.126 ^a	17.54
	80	0.591 ± 0.031 ^a	9.36	0.656 ± 0.082 ^a	18.71	0.813 ± 0.101 ^b	38.55
	160	0.503 ± 0.021 ^b	22.85	0.521 ± 0.055 ^b	35.44	0.521 ± 0.080 ^b	60.62
	320	0.406 ± 0.024 ^b	37.73	0.373 ± 0.031 ^b	53.78	0.212 ± 0.045 ^b	83.98
	640	0.261 ± 0.023 ^b	59.97	0.172 ± 0.013 ^b	78.69	0.107 ± 0.016 ^b	91.91
丝裂霉素组	10	0.369 ± 0.035 ^b	43.40	0.196 ± 0.032 ^b	73.26	0.069 ± 0.011 ^b	94.78
F 值		76.36		44.93		89.75	
P 值		<0.001		<0.001		<0.001	

注:与阴性对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$ 。

3.3 野木瓜果实总皂苷对 SGC-7901 细胞增殖的影响 MTT 检测结果表明,SGC-7901 细胞经野木瓜

果实总皂苷分别作用 12、24、48 h 后,在各个孵育时间段,所设给药浓度对细胞增殖均有一定的抑制作

用,当浓度分别为 160 ~ 640、80 ~ 640、40 ~ 640 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,能显著抑制细胞增殖($P < 0.05$),且伴随给药浓度增大,对细胞增殖抑制作用也增强,呈剂量依赖关系;在给药浓度一定时,药物作用时间越长,抑制作用越强,呈时间依赖关系。当浓度为 640 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,药物作用 12、24、48 h,细胞增殖抑制率分别为 59.97%、78.69%、91.91%,经 SPSS 17.0 软件计算,野木瓜果总皂苷作用 SGC-7901 细胞 12、24、48 h 的 IC_{50} 分别为 463.35、256.77、113.22 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,见表 3。

4 讨论

目前,我国恶性肿瘤发生率和病死率居高不下^[13],随着工业化进程的加速,生活环境的污染,以及居民饮食结构的不合理和癌症防治知识匮乏等原因,恶性肿瘤发生率和病死率或将呈上升趋势。临床上主要采用手术、放疗和化疗等方法治疗恶性肿瘤,但手术往往不能达到完全切除的目的,且放疗和化疗费用高,毒副作用大,在化疗过程中肿瘤细胞常产生耐药性,严重影响治疗效果,因此,从中药资源中寻找高效、低毒、廉价的抗癌新药,对资源的开发和肿瘤的治疗具有重要的意义。

皂苷是一类结构比较复杂的化合物,按皂苷元化学结构的不同,可分为甾体皂苷和三萜皂苷,广泛分布于蔷薇科、木通科、百合科、豆科、五加科、山茶科、无患子科等植物中^[14]。已有文献报道,人参、黄芪、三七等多种中药材的皂苷类物质具有抗肿瘤活性^[15-17]。野木瓜是我国传统中药,其根、茎、叶及果实均可入药^[18],具有抗炎、镇痛功效,其化学成分十分丰富,含有五环三萜皂苷类、木脂素苷类、苯乙醇苷类、黄酮苷类及酚类等多种物质,其中三萜皂苷类是其重要的活性物质。

本实验结果显示,野木瓜果总皂苷对人肺癌细胞 A549、人肝癌细胞 BEL-7402 和人胃癌细胞 SGC-7901 的增殖均具有一定的抑制作用,且伴随给药浓度的增大和给药时间的延长,抑制作用也增强,呈剂量和时间依赖关系。其中作用 A549 细胞 12、24、48 h 的 IC_{50} 分别为 492.38、293.43、141.84 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;作用 BEL-7402 细胞 12、24、48 h 的 IC_{50} 分别为 427.74、243.91、101.79 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;作用 SGC-7901 细胞 12、24、48 h 的 IC_{50} 分别为 463.35、256.77、113.22 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结果显示,在各个孵育时间段中,BEL-7402 细胞的 IC_{50} 最小,其次是 SGC-7901 细胞,A549 细胞最大,表明 BEL-7402 细胞对野木瓜果总皂苷最敏感,SGC-7901 细胞次之,

A549 细胞最差,这预示野木瓜果总皂苷可能在抗肝癌方面有较好的前景。

参考文献

- [1] 孙帅,谢培山.野木瓜的研究进展[J].中药新药与临床药理,2011,22(6):696-700.
- [2] 宋发军,杨芳,许德红,等.野木瓜藤茎部位总皂苷闪式提取工艺[J].中南民族大学学报(自然科学版),2010,29(3):29-32.
- [3] 王文平,郭祀远,李琳,等.野木瓜多糖中糖醛酸含量测定[J].食品科技,2007,32(10):84-86.
- [4] YANG J, XIONG Q, ZHANG J, et al. The Protective Effect of Stauntonia Chinensis Polysaccharide on CCl_4 -induced Acute Liver Injuries in Mice[J]. Int J Biomed Sci,2014,10(1):16-20.
- [5] YING C, NING W, YING L, et al. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of the extracts of Stauntonia chinensis[J]. Pak J Pharm Sci,2014,27(5):1317-1325.
- [6] 吴虹,魏伟,吴成义.木瓜化学成分及药理活性的研究[J].安徽中医学院学报,2004,23(2):62-64.
- [7] WANG HB, YU DQ, LIANG XT, et al. Yemoside YM7, YM11, YM13, and YM14: Four Nortriterpenoid Saponins from Stauntonia chinensis[J]. Planta Med,1989,55(3):303-306.
- [8] WANG HB, YU DQ, LIANG XT, et al. Structures of two nortriterpenoid saponins from Stauntonia chinensis[J]. J Nat Prod,1990,53(2):313-318.
- [9] GAO H, ZHANG X, WANG NL, et al. Triterpenoid saponins from Stauntonia chinensis[J]. J Asian Nat Prod Res,2007,9(2):175-182.
- [10] HAO G, ZHAO W, LEI Y, et al. Five new bidesmoside triterpenoid saponins from Stauntonia chinensis[J]. Magn Reson Chem,2008,46(7):630-637.
- [11] 叶文博,李兴玉,吴宗祎,等.野木瓜皂甙对 HL60 肿瘤细胞增殖的影响[J].上海师范大学学报(自然科学版),2007,36(1):65-68.
- [12] 张婷婷,李静,王成永.木瓜总皂苷提取工艺研究[J].安徽医药,2009,13(2):143-144.
- [13] 曾倩,崔芳芳,宇传华,等.中国癌症发病、死亡现状与趋势分析[J].中国卫生统计,2016,33(2):321-323.
- [14] 钟露苗.三萜皂苷提取分离和结构鉴定技术[J].中医药学刊,2004,22(4):760-762.
- [15] KIM SJ, KIM AK. Anti-breast cancer activity of Fine Black ginseng (Panax ginseng Meyer) and ginsenoside Rg5[J]. J Ginseng Res,2015,39(2):125-134.
- [16] AUYEUNG KK, CHO CH, KO JK. A novel anticancer effect of Astragalus saponins: Transcriptional activation of NSAID-activated gene[J]. Int J Cancer,2009,125(5):1082-1091.
- [17] HE F, DING Y, LIANG C, et al. Antitumor effects of dammarane-type saponins from steamed Notoginseng[J]. Pharmacogn Mag,2014,10(39):314-317.
- [18] 刘勇,刘贤旺,范崔生.野木瓜属药用植物资源及开发价值[J].江西中医学院学报,2006,18(6):41-42.

(收稿日期:2016-09-26,修回日期:2016-12-11)