

长叶胡颓子体外抑制肿瘤细胞增殖的研究

刘韩英¹, 冉瑞智^{1*}, 李玉山², 彭璇²

1. 恩施土家族苗族自治州中心医院, 湖北 恩施 445000

2. 湖北民族学院, 湖北 恩施 445000

摘要: **目的** 研究长叶胡颓子乙醇提取物、三萜酸部位、熊果酸对 4 株肿瘤细胞增殖的体外抑制作用以及熊果酸抗肿瘤作用机制。**方法** 采用 MTT 法测定长叶胡颓子乙醇提取物、三萜酸部位和熊果酸在 25、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 时对人胃癌细胞 SGC-7901、BGC-823、肠癌细胞 LOVO、HCT-8 实体瘤细胞增殖的体外抑制作用; 并在上述药物剂量下, 观察熊果酸作用 72 h 后对 SGC-7901 细胞形态的影响, 以及作用 24 h 后对 SGC-7901 细胞凋亡的诱导作用。**结果** 长叶胡颓子乙醇提取物、三萜酸部位、熊果酸对 4 株肿瘤细胞的增殖具有较强的体外抑制作用, 其中对于胃癌细胞的抑制作用为熊果酸>三萜酸部位>乙醇提取物; 对肠癌细胞的抑制作用为三萜酸部位>熊果酸>乙醇提取物, 同时熊果酸能显著改变 SGC-7901 细胞的形态, 并且 SGC-7901 细胞的凋亡率与熊果酸的剂量呈相关性。**结论** 三萜酸是长叶胡颓子发挥体外抗肠癌细胞增殖作用的主要有效部位; 熊果酸是其发挥体外抗胃癌细胞增殖作用的主要活性成分, 熊果酸抑制胃癌细胞增殖机制为诱导细胞凋亡, 为开发新的抗癌药物提供参考。

关键词: 长叶胡颓子; 三萜酸; 熊果酸; 抗肿瘤作用

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2014)02-0135-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.02.006

Inhibition of cancer cells proliferation *in vitro* of *Elaeagnus bockii*

LIU Han-ying¹, RAN Rui-zhi¹, LI Yu-shan², PENG Xuan²

1. The Central hospital of Enshi Tujia-Miao Autonomous Prefecture, Enshi 445000, China

2. Hubei University for Nationalities, Enshi 445000, China

Abstract: **Objective** To study the inhibitory effects of alcohol extracts, triterpenic acid fractions, ursolic acid from *Elaeagnus bockii* on the *in vitro* proliferation of four cancer cells, and the anticancer mechanism of ursolic acid. **Methods** The inhibitory effects of the alcohol extracts, triterpenic acid fractions and ursolic acid at the concentration of 25, 50, 100, and 200 $\mu\text{g/mL}$ on human gastric cancer cells SGC-7901, BGC-823, colon cancer cells LOVO, HCT-8 were measured by MTT assay; SGC-7901 cell morphology was observed after treated by ursolic acid for 72 h, and the induction of SGC-7901 cell apoptosis was observed after treated by ursolic acid for 24 h. **Results** The alcohol extracts, triterpenic acid fractions, ursolic acid from *E. bockii* had the effective inhibitory effects on the *in vitro* proliferation of four cancer cells. The inhibitory rate of the alcohol extracts, triterpenic acid fractions, and ursolic acid on the proliferation of human gastric cancer cells was ursolic acid > triterpenic acid parts > alcohol extracts; The inhibitory rate on the proliferation of human intestinal cancer cells was triterpenic acid parts > ursolic acid > alcohol extracts. Ursolic acid could significantly affect the morphology of SGC-7901 cell. The rate of apoptosis markedly elevated along with the increased concentration increasing of ursolic acid. **Conclusion** Triterpenic acid is the main active component on the proliferation of human intestinal cancer cell *in vitro*. The ursolic acid is the main anticancer effective component on the proliferation of gastric cancer cell *in vitro*. The anticancer mechanism of ursolic acid is inducing the cell apoptosis, and provides the theoretical basis for new anticancer drug.

Key words: *Elaeagnus bockii* Diels; triterpenic acid; ursolic acid; anticancer effect

长叶胡颓子 *Elaeagnus bockii* Diels 是胡颓子科胡颓子属的一种, 主要分布在长江流域及以南地区^[1], 属于珍贵的药食两用植物, 主要用于治疗支气管哮喘、感冒咳嗽、肠炎、风湿性关节炎、腰腿痛、腹

收稿日期: 2013-07-12

基金项目: 湖北省卫生厅科研基金项目 (JX2C42)

作者简介: 刘韩英 (1968—), 女, 湖北恩施人, 中级职称, 从事临床放射免疫治疗与研究。Tel: (0718)8435481 E-mail: 1732027915@qq.com

*通信作者 冉瑞智 (1966—), 男, 湖北恩施人, 主任医师, 长期从事临床肿瘤的治疗与研究。Tel: (0718)8435481 E-mail: 2833617729@qq.com

泻、痢疾、肺病等^[1-4]。研究表明长叶胡颓子具有明显的免疫调节和抗炎作用^[5]，其果实的水煎液对胃癌细胞的增殖有显著抑制作用^[6]。本实验利用 MTT 法考察了长叶胡颓子乙醇提取物、三萜酸部位、熊果酸对人胃癌细胞 SGC-7901、BGC-823、肠癌细胞 LOVO、HCT-8 实体瘤细胞增殖的体外抑制作用，研究表明三萜酸是发挥体外抗肠癌细胞增殖作用的有效部位，熊果酸是发挥体外抗胃癌细胞增殖的活性成分，该项研究揭示了长叶胡颓子抗肿瘤作用的物质基础，对于开发利用长叶胡颓子药用资源具有重要意义。

1 材料

1.1 试剂与仪器

RPMI-1640 培养基(批号 23400-021, 美国 Gibco 公司); KGA102 FITC-Annexin V/PI 染色试剂盒、AnnexinV 凋亡试剂盒(南京赛泓瑞生物科技有限公司); 新生小牛血清(郑州益康生物工程有限公司); 二甲基亚砜(DMSO, 济南谷瑞特化工有限公司); 四甲基偶氮唑蓝(MTT)、冷磷酸缓冲液(PBS)、胰酶+0.02% EDTA(美国 Sigma 公司); MCO—15AC CO₂ 培养箱(日本 Sanyo 公司); CoulterXL—4 流式细胞仪(美国 Beckman 公司); BY68—MK3 自动酶标仪(东西仪科技有限公司); IX71 倒置显微镜(日本 Olympus 公司); 96 孔微孔振荡器(金坛市梅香仪器制造厂); 96 孔培养板; 细胞培养瓶; 细胞培养皿等。所用溶剂均为分析纯(南京化学试剂有限公司)。

1.2 细胞系

人胃癌细胞 SGC-7901、BGC-823, 肠癌细胞 LOVO、HCT-8 均购自上海艾研生物科技有限公司。

1.3 药材

实验用长叶胡颓子药材采自湖北恩施州巴东县, 经湖北民族学院李玉山高级实验师鉴定为胡颓子科胡颓子属长叶胡颓子 *Elaeagnus bockii* Diels 的果实。熊果酸购于成都植化纯有限公司(批号 20120114, 质量分数>98%)。

2 方法

2.1 长叶胡颓子乙醇提取物的制备

长叶胡颓子干燥果实 5 kg, 10 倍量 75% 乙醇回流提取 3 次, 抽滤, 减压回收溶剂得粗提物, 真空干燥得乙醇浸膏。

2.2 长叶胡颓子三萜酸部位的制备

长叶胡颓子药粉用 10 倍量 1% NaOH 的 50% 乙醇溶液超声提取 2 次, 滤过。残渣用 10 倍量 95%

乙醇加热回流提取 2 次, 滤过。合并上述滤液, 加酸水进行酸化(pH≤3), 静置 12 h, 滤过, 沉淀用水洗至近中性, 用 95% 乙醇溶解, 加入 3% 活性炭, 加热回流 30 min, 滤过, 45 °C 真空干燥得三萜酸部位粗品。X-5 大孔树脂用 4 BV 80% 乙醇-1% NaOH(1:5) 以 3 mL/min 洗脱富集纯化, 以熊果酸为对照品, 在 545 nm 处测定吸光度(A)值, 计算得三萜酸质量分数为 75%。

2.3 细胞的培养

人胃癌细胞 SGC-7901、BGC-823、肠癌细胞 LOVO、HCT-8 均系实验室常规培养, 细胞接种于含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 完全培养液中。于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度恒温培养箱中生长。

2.4 MTT 实验

取对数期 SGC-7901、BGC-823、LOVO、HCT-8 细胞, 以 $4 \times 10^3 \sim 6 \times 10^3$ /孔活细胞接种于 96 孔板, 细胞悬液 150 μL/孔。于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度恒温培养箱中培养 24 h。待细胞贴壁后, 加入含不同浓度试药的 RPMI-1640 培养液 50 μL, 使药物终质量浓度为 25、50、100、200 μg/mL, 并设立对照组和空白组, 对照孔接种等量活细胞, 但不加入药物, 空白孔不接种细胞, 对照组和空白组只加入 200 μL 培养液, 每个浓度设 5 个复孔。继续孵育 72 h 后分别加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液, 20 μL/孔。继续培养 4 h 后, 吸去上清液, 加入 DMSO 200 μL, 微型混合器震荡 10 min, 充分溶解。在 490 nm 检测波长下, 用酶标仪测量每孔的 A 值, 用复孔 A 的平均值进行比较。根据 A 值判定药物对细胞增殖的影响, 并计算药物对肿瘤细胞的抑制率, 同时以 Bliss 法计算半数抑制浓度(IC₅₀)^[7]。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{对照组}} - A_{\text{实验组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})$$

2.5 熊果酸对 SGC-7901 细胞形态的影响

用 25、50、100、200 μg/mL 熊果酸分别处理 SGC-7901 细胞 72 h, 在倒置显微镜下观察各自细胞形态, 并与正常肿瘤细胞相比较。

2.6 熊果酸对 SGC-7901 细胞凋亡的诱导作用

用 25、50、100、200 μg/mL 熊果酸分别处理对数期的 SGC-7901 细胞 24 h, 用胰酶消化后, 收集 2×10^5 个细胞, 按照 KGA102 FITC-Annexin V/PI 染色试剂盒说明书操作, 采用流式细胞仪检测并计算凋亡率, 试验重复 3 次。

2.7 统计学处理

所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 12.0 统计软件进行统计分析, 组间采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 胡颓子乙醇提取物、三萜酸部位和熊果酸对肿瘤细胞增殖的体外抑制作用

比较 3 种药物对 4 株人肿瘤细胞增殖的抑制作用, 见图 1。结果表明在 200 $\mu\text{g/mL}$ 下作用 72 h 后对 SGC-7901、BGC-823 细胞的抑制率均为熊果酸 > 三萜酸部位 > 乙醇提取物; 三萜酸部位和熊果酸对 SGC-7901、BGC-823 细胞的抑制率均大于 60%, 三者之间无统计学差异; 对 LOVO、HCT-8 细胞的抑制率均为三萜酸部位 > 熊果酸 > 乙醇提取物, 三者之间无统计学差异。三萜酸部位和熊果酸对 LOVO、HCT-8 细胞的抑制率均大于 70%。熊果酸作为胡颓子三萜酸的主要成分, 其抑制胃癌细胞增殖的作用明显优于三萜酸, 提示熊果酸是长叶胡颓子的主要抗胃癌成分之一, 三萜酸部位是抗肠癌的有效部位。

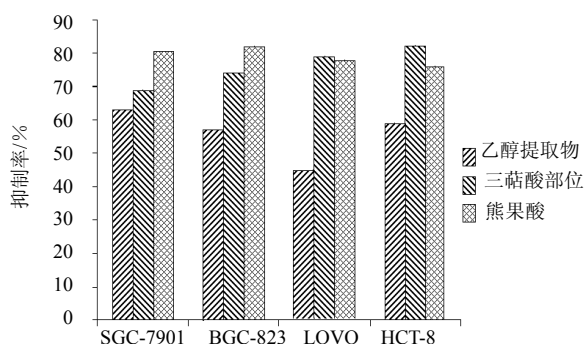


图 1 长叶胡颓子醇提取物、三萜酸部位、熊果酸对肿瘤细胞增殖的抑制作用

Fig. 1 Inhibitory effects of the ethanol extracts, triterpenic acid fractions and ursolic acid on the proliferation of cancer cells

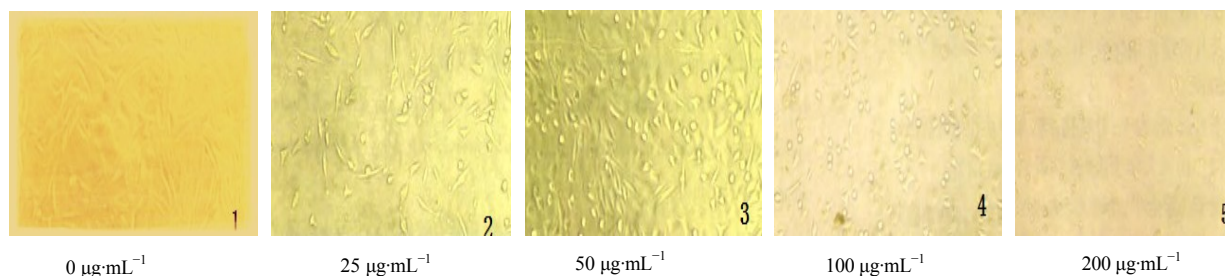


图 3 不同质量浓度熊果酸对 SGC-7901 细胞形态的影响

Fig. 3 Changes on morphology of SGC-7901 cell treated by ursolic acid at different mass concentrations from *E. bockii*

3.4 熊果酸对 SGC-7901 细胞凋亡的诱导作用

熊果酸作用 24 h 后, 与对照组相比, 随着熊果酸质量浓度的增大, G_0/G_1 期细胞增多, 出现 G_0/G_1 期阻滞, S 期和 G_2/M 期细胞数减少, 同时凋亡率逐渐增高, 结果表明细胞周期和凋亡率与对照组相

3.2 熊果酸对肿瘤细胞增殖的体外抑制作用

观察 25、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 熊果酸分别作用肿瘤细胞 72 h 后的抑制作用, 结果见图 2。熊果酸对 4 株肿瘤细胞均有一定的抑制作用, 在 25~200 $\mu\text{g/mL}$ 时对 SGC-7901、BGC-823 细胞的抑制作用呈对数相关性, 其 IC_{50} 值分别为 78.64、95.12 $\mu\text{g/mL}$; 对 LOVO、HCT-8 细胞的抑制作用呈剂量相关性, 其 IC_{50} 值分别为 167.51、172.01 $\mu\text{g/mL}$ 。其中, 熊果酸在 50~200 $\mu\text{g/mL}$ 时对 SGC-7901、BGC-823 细胞抑制作用明显, 较其他细胞有显著性差异。

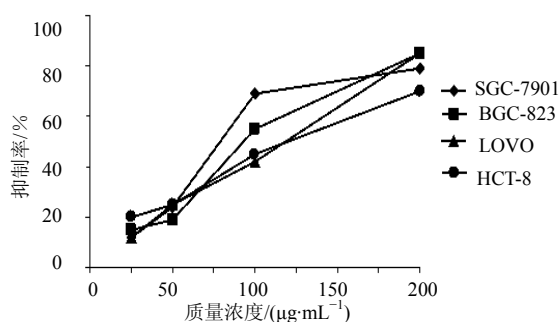


图 2 熊果酸对肿瘤细胞增殖的抑制作用

Fig. 2 The inhibitory effects of the ursolic acid on the proliferation of cancer cells

3.3 熊果酸对 SGC-7901 细胞形态的影响

熊果酸作用 72 h 后, 对照组 SGC-7901 细胞呈短梭形, 贴壁生长, 大小不一, 在 25、50 $\mu\text{g/mL}$ 时出现漂浮、皱缩等; 随着药物质量浓度增加到 100、200 $\mu\text{g/mL}$, 此现象明显增加, 同时伴有细胞碎片, 200 $\mu\text{g/mL}$ 时最为明显, 说明熊果酸能使 SGC-7901 细胞形态变化或死亡, 见图 3。

比均有显著性差异, 见表 1。

4 讨论

恶性肿瘤已成为现代人类健康的主要杀手, 由于化疗药物有骨髓抑制、血液学毒性等副反应, 因此, 众多研究者乐于从天然产物中寻找高效、低毒的抗肿

表 1 熊果酸对 SGC7901 细胞周期和凋亡率的影响

Table 1 Cell cycle distribution and apoptosis of SGC7901 cells after treated with ursolic acid

熊果酸/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	细胞周期			凋亡率/%
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
0 (对照)	24.36 $\pm$ 1.24	52.32 $\pm$ 1.22	23.32 $\pm$ 1.25	2.36 $\pm$ 0.14
25	36.24 $\pm$ 2.01	42.34 $\pm$ 1.29	21.42 $\pm$ 2.32	6.31 $\pm$ 1.24
50	47.64 $\pm$ 2.33*	38.67 $\pm$ 2.28*	13.69 $\pm$ 2.57*	22.34 $\pm$ 2.21*
100	58.37 $\pm$ 3.27**	31.78 $\pm$ 2.63**	9.85 $\pm$ 2.67**	36.24 $\pm$ 3.21**
200	66.31 $\pm$ 2.36**	27.19 $\pm$ 3.24**	6.5 $\pm$ 3.09**	47.34 $\pm$ 1.45**

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

瘤成分。长叶胡颓子主要有黄酮类、三萜类、甾体类、蒽醌类等化学成分^[8], 其中三萜酸主要成分熊果酸、齐墩果酸具有广泛的生物学效应, 包括抗肿瘤、对肝损伤保护、抗菌消炎和抗病毒作用^[9], 二者通过诱导肿瘤细胞凋亡和坏死, 能有效抑制胃、肠、肝等消化系统肿瘤细胞的增殖^[10]。本研究选取长叶胡颓子乙醇提取物、三萜酸部位、熊果酸为实验对象, 分别以胃癌和肠癌细胞进行抗癌活性筛选, 比较了各部位的抗癌活性, 并一定程度揭示了抑制肿瘤细胞增殖的机制。

研究结果显示长叶胡颓子抑制胃癌细胞增殖的活性成分主要是熊果酸, 其抑制率达到 80%; 抑制肠癌细胞增殖的活性成分集中在三萜酸部位, 抑制率亦达到 80%, 具体是何种三萜酸或者多成分协同增效还有待进一步研究。

细胞形态学实验揭示了熊果酸能够使肿瘤细胞形态发生明显变化, 肿瘤细胞生长受到抑制, 使细胞积聚在 G₁ 期, 并出现分化^[11]。熊果酸能通过上调凋亡蛋白和抑制抗凋亡因子的表达来发挥抗肿瘤作用, 熊果酸具有细胞毒、抗血管生成、抑制肿瘤细胞形成、逆转作用及抗侵袭性^[7]。已有研究证实, 长叶胡颓子果实水煎液能有效抑制大鼠结肠炎炎症反应^[12], 同时能够增强荷瘤鼠细胞免疫功能^[13], 果实中熊果酸能增强小鼠免疫反应^[14], 本研究为开发新的抗肿瘤药物提供参考, 表明长叶胡颓子可以作为抗肿瘤药物候选药物。然而目前未见有关此成分单独或与熊果酸联合抗肿瘤作用的研究报道, 仅见有关熊果酸结构修饰抗肿瘤活性研究^[15-16]。

参考文献

- [1] 陈 新. 川渝地区长叶胡颓子属药用植物资源研究 [J]. 成都中医药大学学报, 2001, 24(2): 40-42.
- [2] 赵 鑫. 长叶胡颓子 (长叶胡颓子科), 短肋羽扇 (蕨

纲: 羽扇科) 和假柴龙树 (茶茱萸科) 的化学成分和生物活性 [D]. 上海: 华东师范大学, 2006.

- [3] 郭明娟, 江洪波, 田祥琴, 等. 胡颓子叶的化学成分 [J]. 华西药学杂志, 2008, 23(4): 381-383.
- [4] 代 黔, 王园园, 葛月宾. 胡颓子叶对豚鼠离体气管平滑肌收缩功能的影响 [J]. 中草药, 2013, 44(10): 1305-1308.
- [5] 李玉山, 林 平, 谭志鑫, 等. 长叶胡颓子对大鼠结肠炎损伤的保护作用 [J]. 中国公共卫生, 2006, 22(8): 987-988.
- [6] 林 萍. 胡颓子对人胃癌细胞增殖抑制的实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(9): 2148-2149.
- [7] 钱晓萍, 徐敬宣, 林 黎, 等. 中药石见穿提取物熊果酸体外抑制肿瘤细胞增殖的实验研究 [J]. 现代肿瘤医学, 2012, 20(11): 2244-2248.
- [8] 娄方明. 长叶胡颓子与中华青荚叶化学成分研究 [D]. 成都: 西南大学, 2006.
- [9] 熊 斌, 雷志勇, 陈 虹. 熊果酸药理学研究进展 [J]. 国外医学: 药学分册, 2004, 31(3): 133-136.
- [10] 张明发, 沈雅琴. 熊果酸和齐墩果酸的抗消化系统肿瘤作用 [J]. 上海医药, 2011, 32(12): 606-611.
- [11] Huang C S, Ma V Y, Goranso A, *et al*. Resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a p53-dependent pathway [J]. *Carcinogenesis*, 1999, 20(2): 237-242.
- [12] 李玉山. 长叶胡颓子对大鼠实验性结肠炎作用的研究 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(8): 1397-1398.
- [13] 伍 杨, 邓明会. 长叶胡颓子对荷瘤鼠细胞免疫功能影响 [J]. 中国公共卫生, 2010, 26(5): 576-577.
- [14] 伍 杨, 邓明会, 林 平. 胡颓子熊果酸对小鼠免疫功能的影响 [J]. 四川中医, 2006, 24(3): 35-37.
- [15] 白锴凯, 陈芬玲, 郑允权, 等. 氨基酸改性熊果酸衍生物的合成及对胃癌细胞的抑制作用 [J]. 中国药杂志, 2012, 47(4): 265-269.
- [16] 马 丹. 五环三萜酸衍生物的合成及其抗肿瘤活性研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2010.