

无梗五加果实3种提取物对人肝癌细胞SMMC-7721增殖和凋亡的影响

刘玉强*, 管美玉, 孙建之, 才 谦*(辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)09-1252-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.09.24

摘要 目的:研究无梗五加果实3种提取物对人肝癌细胞SMMC-7721增殖、细胞周期和凋亡的影响,为明确其抗肿瘤作用机制提供参考。方法:采用MTT法考察低、中、高质量浓度的无梗五加果实乙醇提取物(0.92、1.84、3.68 mg/mL)、粗多糖提取物(0.06、0.12、0.24 mg/mL)和精多糖提取物(0.04、0.08、0.16 mg/mL)分别作用24、36、48 h后对人肝癌细胞SMMC-7721的增殖抑制作用;采用流式细胞术考察1.84 mg/mL乙醇提取物、0.24 mg/mL粗多糖提取物和0.16 mg/mL精多糖提取物分别作用24 h后对人肝癌细胞SMMC-7721细胞周期和细胞凋亡的影响。以上试验均设阴性对照(只加细胞不加药物)。结果:与阴性对照比较,无梗五加果实3种提取物均可显著抑制人肝癌细胞SMMC-7721的增殖($P<0.01$),显著降低G₀/G₁、G₂/M期细胞的百分率($P<0.01$),显著升高S期细胞的百分率($P<0.01$),显著升高细胞凋亡率($P<0.05$),其中以无梗五加果实乙醇提取物的作用最为明显。结论:无梗五加果实3种提取物均能抑制人肝癌细胞SMMC-7721的增殖,阻滞其细胞周期于S期,诱导其凋亡。

关键词 无梗五加果实;乙醇提取物;粗多糖提取物;精多糖提取物;人肝癌细胞SMMC-7721;增殖;凋亡

Effects of 3 Extracts of *Acanthopanax sessiliflorus* Fruits on the Proliferation and Apoptosis of Human Hepatocarcinoma Cells SMMC-7721

LIU Yuqiang, GUAN Meiyu, SUN Jianzhi, CAI Qian (College of Pharmacy, Liaoning University of TCM, Liaoning Dalian 116600, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of 3 extracts of *Acanthopanax sessiliflorus* fruits on the proliferation and apoptosis of human hepatocarcinoma cells SMMC-7721, and to provide reference for confirming the mechanism of anti-tumor effect. METHODS: MTT assay was adopted to investigate the effects of low-mass concentration, medium-mass concentration and high-mass concentration of ethanol extract (0.92, 1.84, 3.68 mg/mL), crude polysaccharide extract (0.06, 0.12, 0.24 mg/mL) and refined polysaccharide extract (0.04, 0.08, 0.16 mg/mL) from *A. sessiliflorus* fruits on the proliferation and apoptosis of SMMC-7721 cells after treated for 24, 36, 48 h, respectively. Flow cytometry was used to investigate the effects of 1.84 mg/mL ethanol extract, 0.24 mg/mL crude polysaccharide extract and 0.16 mg/mL refined polysaccharide extract on cell cycle and cell

从各方面进行综合考虑。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社, 2015:277.
- [2] 贾敏如, 张艺. 中国民族药辞典[M]. 北京:中国中医药出版社, 2016:1322-1324.
- [3] 刘德军, 冯维洗. 桔梗[M]. 北京:中国中医药出版社, 2001:13-15.
- [4] 杨洪升, 杨娜, 李爽, 等. 东北药食同源植物[J]. 中国科技信息, 2017, 19(9):59-61.
- [5] 陆海洋, 彭华胜, 桂双英, 等. 桔梗质量评价的沿革与变迁[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(9):1637-1640.
- [6] 李盈, 王举涛, 桂双英, 等. 桔梗的化学成分及药理作用研

究进展[J]. 食品与药品, 2016, 18(1):72-75.

- [7] INADA A, MURATA H, SOMEKAWA M, et al. Phytochemical studies of seeds of medicinal plants II. A new dihydroflavonol glycoside and a new 3-methyl-1-butanol glycoside from seeds of *Platycodon grandiflorum* A.DC.[J]. *Chem Pharm Bull*, 1992, 40(11):3081-3083.
- [8] HE ZD, QIAO CF, HAN QB. New triterpenoid saponins from the roots of *Platycodon grandiflorum*[J]. *Tetraedron*, 2005, 61(8):2211-2215.
- [9] 何美莲, 程小卫, 陈家宽, 等. 桔梗皂苷类成分及其质量分析[J]. 中药新药与临床药理, 2005, 16(6):457-460.
- [10] MAZOL I, GLENSK M, CISOWSKI W, et al. Polyphenolic compounds from *Platycodon grandiflorum* A.DC.[J]. *Acta Pol Pharm*, 2004, 61(3):203-208.
- [11] 邹霞霜, 单进军, 谢彤, 等. 桔梗皂苷D的研究进展[J]. 中成药, 2014, 36(4):823-827.

* 副教授, 博士。研究方向:中药药剂学。电话:0411-85890145。E-mail:liuyuqiang@126.com

通信作者:副教授, 博士。研究方向:中药化学。电话:0411-85890122。E-mail:caiqianmail@sina.com

(收稿日期:2017-07-24 修回日期:2017-09-15)

(编辑:刘 萍)

apoptosis after treated for 24 h. The above tests were all negative control (only adding cells without drugs). RESULTS: Compared with negative control, 3 extracts of *A. sessiliflorus* fruits could significantly inhibit the proliferation of SMMC-7721 cells ($P < 0.01$), could significantly decrease the percentage of SMMC-7721 cells in G₀/G₁ and G₂/M phase ($P < 0.01$), could significantly increase the percentage of SMMC-7721 cells in S phase ($P < 0.01$) and the apoptosis rate of SMMC-7721 cells ($P < 0.05$); especially the effects of ethanol extract from *A. sessiliflorus* fruits were the most obvious. CONCLUSIONS: Three extracts of *A. sessiliflorus* fruits can inhibit the proliferation of human hepatocarcinoma SMMC-7721 cells, block SMMC-7721 cells in S phase and induce the apoptosis of SMMC-7721 cells.

KEYWORDS *Acanthopanax sessiliflorus* fruits; Ethanol extract; Crude polysaccharide extract; Refined polysaccharide extract; Human hepatocarcinoma cells SMMC-7721; Proliferation; Apoptosis

无梗五加 [*Acanthopanax sessiliflorus* (Rupr. et Maxim.) Seem] 为五加科五加属一种重要的药用植物,主产于东北、河北、朝鲜等地^[1],其果实具有补肝肾、强筋骨的功效,主治肝肾亏虚、小儿行迟和筋骨痿软等症^[2-3],临床上主要用无梗五加制剂治疗白细胞减少症和脾肾阳虚型眩晕症^[4]。另有报道称,无梗五加果实中多糖成分具有免疫调节、抗肿瘤的药理作用^[5]。在本研究中,笔者拟采用MTT法考察无梗五加果实乙醇提取物、粗多糖提取物和精多糖提取物在不同给药时间、不同浓度下对人肝癌细胞SMMC-7721的增殖抑制作用,确定最佳作用时间和最佳给药浓度。并在此基础上,进一步研究无梗五加果实3种提取物对人肝癌细胞SMMC-7721细胞周期和凋亡的影响,从而明确其体外抑瘤作用机制。

1 材料

1.1 仪器

SUNRISE 酶标仪(瑞士Tecan公司);FACE Vantage SE 流式细胞仪(美国BD公司);AE31 倒置相差显微镜(德国Motic公司);冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);FA1004 电子天平(上海越平科学仪器有限公司)。

1.2 药材与试剂

无梗五加果实购自辽宁省丹东农业科学院,由辽宁中医药大学药用植物教研室王冰教授鉴定为 *Acanthopanax sessiliflorus* (Rupr. et Maxim.) Seem 的干燥果实;细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒(凯基生物技术有限公司,批号:KGA108);MTT(美国Sigma公司);胰蛋白酶、RPMI 1640 培养基、胎牛血清(美国Gibco公司);其他试剂均为分析纯,细胞试验用水为三级纯化水。

1.3 细胞

人肝癌细胞株 SMMC-7721 购自北京北纳创联生物技术研究院。

2 方法

2.1 无梗五加果实3种提取物对人肝癌细胞SMMC-7721细胞增殖的影响

2.1.1 无梗五加果实3种提取物的制备 (1)乙醇提取物的制备。取无梗五加果实粗粉1 kg,石油醚回流提取3次,每次2 h,药渣晾干,加80%乙醇回流提取3次,每次2 h,滤过,合并提取液,浓缩,干燥得无梗五加果实乙

醇提取物178.2 g,得率为17.82%。(2)粗多糖的制备。取无梗五加果实粗粉1 kg,用8倍量水提取3次,每次2 h,滤过,滤液减压浓缩后,加入95%乙醇使含醇量达到50%,静置24 h,将沉淀冷冻干燥,得粗多糖提取物12.1 g,得率为1.21%。(3)精多糖的制备。取无梗五加果实粗粉1 kg,按照上述粗多糖的制备方法制备得到粗多糖,再将粗多糖提取物用水溶解制成一定浓度的溶液,采用Sevage法进行脱蛋白(Sevage试剂中氯仿和正丁醇的比例为3:1,粗多糖溶液和Sevage试剂的比例为4:1,混合振荡,以达到除去蛋白的目的)^[6],将除去蛋白的多糖溶液进行减压浓缩,冷冻干燥,得精多糖提取物8.0 g,得率为0.8%。

2.1.2 给药溶液的制备 根据各提取物收率的不同,按生药量均为5、10、20 mg/mL将3种提取物分别制备成不同质量浓度的药液,其中乙醇提取物给药浓度分别为0.92、1.84、3.68 mg/mL,粗多糖的给药浓度分别为0.06、0.12、0.24 mg/mL,精多糖的给药浓度分别为0.04、0.08、0.16 mg/mL,微孔滤膜过滤,备用。

2.1.3 细胞培养 按照常规贴壁细胞的培养方法将人肝癌细胞SMMC-7721接种于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液中,在温度为37℃、5%CO₂、饱和湿度的条件下进行培养,隔天换液并传代1次,选取对数生长期的细胞用于研究。

2.1.4 MTT法检测 选取培养了2~3 d、处于对数生长期并且生长状态良好的人肝癌细胞SMMC-7721,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗1~2次,再用0.25%的胰酶进行消化传代,等到细胞状态趋于变圆的时候,使用培养液清洗,然后吹打细胞将其制成细胞悬液。采用细胞计数板进行细胞计数,用RPMI 1640培养液将细胞稀释至 5×10^4 个/mL的密度,然后接种于96孔细胞培养板中,每孔100 μL,将其置于CO₂培养箱中继续进行培养12 h,待细胞贴壁完全后,进行试验分组。试验分为3种提取物的不同质量浓度的给药组(浓度设置见“2.1.2”项下)、阴性对照组(加细胞,但不加药液)和空白调零组(只加培养液,供酶标仪调零用),每组设立5个复孔,将细胞置于CO₂培养箱中继续进行培养。在培养24、36、48 h后,分别在避光条件下每孔加入20 μL(5 mg/mL) MTT溶液,再次将细胞置于CO₂培养箱中继续进行培养4 h,吸

净孔内上清液,然后每孔加入150 μL二甲基亚砜(DMSO),等到紫色的结晶充分溶解后,使用酶标仪在492 nm波长处进行扫描^[1],测定光密度(OD)值,计算无梗五加果实各提取物对人肝癌细胞SMMC-7721的增殖抑制率^[6-8]:细胞增殖抑制率(%)=(1-给药组平均OD值/阴性对照组平均OD值)×100%。

2.2 无梗五加果实3种提取物对人肝癌细胞SMMC-7721细胞周期和凋亡的影响

2.2.1 无梗五加果实3种提取物给药溶液的制备 根据前期MTT试验确定的各提取物抑制人肝癌细胞SMMC-7721细胞增殖的最佳浓度,将无梗五加乙醇提取物、粗多糖、精多糖分别加水溶解制备成质量浓度分别为1.84、0.24、0.16 mg/mL的溶液,微孔滤膜过滤,备用。

2.2.2 无梗五加果实3种提取物对人肝癌细胞SMMC-7721细胞周期的影响 取培养至对数生长期的人肝癌细胞SMMC-7721,用0.25%的胰酶消化,用滴管吹打至单细胞悬液,调整细胞密度为 1×10^5 个/mL,接种于6孔板中,每孔1 mL。将试验分为无梗五加果实乙醇提取物组(1.84 mg/mL)、粗多糖组(0.24 mg/mL)、精多糖组(0.16 mg/mL)和阴性对照组,将细胞置于37 ℃、5% CO₂的饱和湿度细胞培养箱中培养24 h后,给药组每孔分别给予无梗五加果实各提取物1 mL,阴性对照组每孔加入1 mL细胞培养液,每组设3个复孔。将培养板置于37 ℃、5% CO₂的饱和湿度细胞培养箱中培养48 h后,收集细胞,制备单细胞悬液,以802×g离心5 min,用预冷的PBS洗涤细胞2次,然后以离心半径为5 cm、3 000 r/min离心5 min,去上清,加入400 μL的碘化丙啶(PI),混匀,4 ℃避光反应30 min,采用流式细胞仪检测488 nm波长处的红色荧光,ModFit细胞周期拟和软件进行分析。

2.2.3 无梗五加果实3种提取物对人肝癌细胞SMMC-7721细胞凋亡的影响 取培养至对数生长期的人肝癌细胞SMMC-7721,按“2.2.2”项下方法进行消化、接种、给药、培养。培养48 h后,收集细胞及相应的细胞上清液,用PBS洗涤细胞2次,802×g离心5 min,去上清,加入荧光素FITC标记的膜联蛋白V(FITC-Annexin V)5 μL,混匀,再加入PI染液5 μL,混匀,室温避光反应5~15 min,1 h内进行流式细胞仪检测,采用Cell Quest软件分析细胞凋亡情况^[9-14]。

2.3 统计学方法

采用SPSS 17.0软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析和t检验进行组间比较。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞增殖抑制率测定结果

无梗五加果实3种提取物对人肝癌细胞SMMC-7721细胞的增殖均有一定抑制作用。与阴性对照组比较,在给药24、48 h后各给药组细胞的OD值均显著降低

($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且乙醇提取物中浓度组和精多糖高浓度组细胞在培养36 h后的OD值显著降低($P < 0.05$)。比较各给药组细胞在给药24、36、48 h后结果可知,在给药48 h后3种提取物对细胞增殖的抑制作用最强。粗多糖和精多糖的给药浓度越高,抑制作用越强,存在一定的量效关系;而乙醇提取物对细胞的增殖抑制作用则不存在量效关系,中浓度给药时抑制作用最强,结果见表1。

表1 无梗五加果实3种提取物对人肝癌细胞SMMC-7721细胞增殖的影响结果

Tab 1 Effects of 3 extracts from *A. sessiliflorus* fruits on the proliferation of SMMC-7721 cells

组别	浓度, mg/mL	24 h		36 h		48 h	
		OD值	抑制率, %	OD值	抑制率, %	OD值	抑制率, %
阴性对照组		0.938 8 ± 0.038 2		1.365 6 ± 0.036 8		1.638 0 ± 0.030 1	
乙醇提取物低浓度组	0.92	0.474 4 ± 0.005 2**	49.47	0.964 4 ± 0.078 3	29.38	1.059 6 ± 0.103 8*	35.31
乙醇提取物中浓度组	1.84	0.448 2 ± 0.002 4**	52.26	0.786 7 ± 0.027 9*	42.39	0.691 2 ± 0.012 4**	57.80
乙醇提取物高浓度组	3.68	0.532 4 ± 0.006 2**	43.29	0.986 2 ± 0.005 1	27.78	0.988 8 ± 0.063 3**	39.63
粗多糖低浓度组	0.06	0.660 3 ± 0.009 6**	29.67	1.240 0 ± 0.006 5	9.20	1.135 2 ± 0.039 9*	30.70
粗多糖中浓度组	0.12	0.505 4 ± 0.005 2**	46.17	1.100 2 ± 0.009 5	12.84	0.949 9 ± 0.033 0*	42.01
粗多糖高浓度组	0.24	0.481 3 ± 0.053 7**	48.73	1.072 1 ± 0.009 1	21.49	0.735 7 ± 0.005 7*	55.09
精多糖低浓度组	0.04	0.711 8 ± 0.009 8**	24.18	1.224 3 ± 0.007 9	10.34	1.081 4 ± 0.038 0*	33.54
精多糖中浓度组	0.08	0.541 6 ± 0.002 3**	42.31	1.062 8 ± 0.002 5	22.17	0.993 5 ± 0.047 5**	39.35
精多糖高浓度组	0.16	0.472 4 ± 0.029 0*	49.68	0.877 1 ± 0.038 5*	48.85	0.716 8 ± 0.009 5**	56.24

注:与阴性对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. negative control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.2 细胞周期测定结果

与阴性对照组比较,乙醇提取物组、粗多糖组和精多糖组G₀/G₁、G₂/M期细胞百分率显著降低($P < 0.01$),S期细胞百分率显著增加($P < 0.01$),其中乙醇提取物的作用效果优于粗多糖和精多糖。细胞周期检测的流式图见图1,测定结果见表2。

3.3 细胞凋亡率测定结果

与阴性对照组比较,乙醇提取物组、粗多糖组和精多糖组细胞的凋亡率均显著升高($P < 0.05$),其中以乙醇提取物组细胞凋亡率最高。阴性对照组、乙醇提取物组、粗多糖组和精多糖组细胞总凋亡率分别为5.6%、50.2%、17.9%、20.8%,细胞凋亡检测的流式图见图2。

4 讨论

本研究首先采用MTT法检测无梗五加果实乙醇提取物、粗多糖和精多糖的抗肿瘤活性,分别设立24、36和48 h这3个给药时间,每种提取物设立高、中、低3个给药浓度,通过对给药时间和给药浓度进行筛选,发现乙醇提取物、粗多糖提取物和精多糖提取物均在48 h后药效最强。在给药剂量方面,发现粗多糖提取物和精多糖提取物都是在高浓度时药效最强,而乙醇提取物则是在中浓度时药效最强,故确定乙醇提取物、粗多糖和精多

糖的最佳给药浓度分别是1.84、0.24、0.16 mg/mL。在采用MTT法明确了无梗五加果实3种提取物对人肝癌细胞

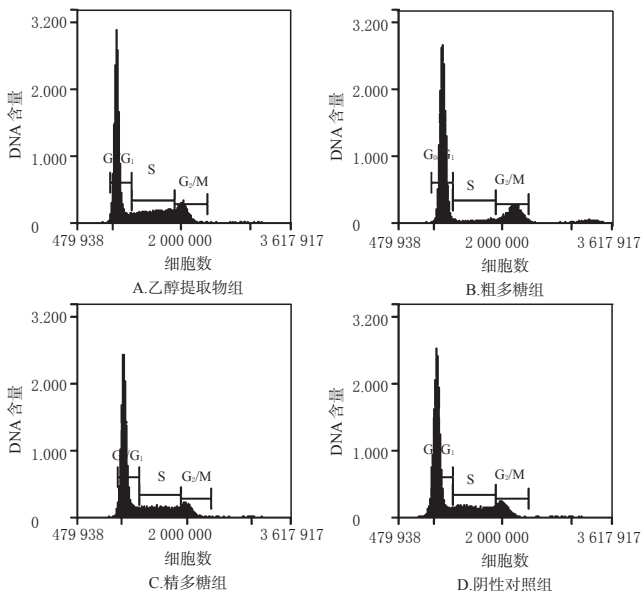


图1 细胞周期检测的流式图

Fig 1 Flow charts of cell cycle detection

表2 无梗五加果实3种提取物对人肝癌细胞SMMC-7721细胞周期的影响结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 Effects of 3 extracts from *A. sessiliflorus* fruits on cell cycle of SMMC-7721 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	细胞周期分布, %		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
阴性对照组	63.02 ± 3.25	6.62 ± 0.64	29.28 ± 0.84
乙醇提取物组	55.83 ± 6.48**	24.21 ± 2.18**	20.34 ± 2.51**
粗多糖组	58.42 ± 5.89**	21.53 ± 3.26**	19.52 ± 1.24**
精多糖组	58.75 ± 4.25**	22.24 ± 4.02**	19.29 ± 0.98**

注:与阴性对照组比较, **P<0.01

Note: vs. negative control group, **P<0.01

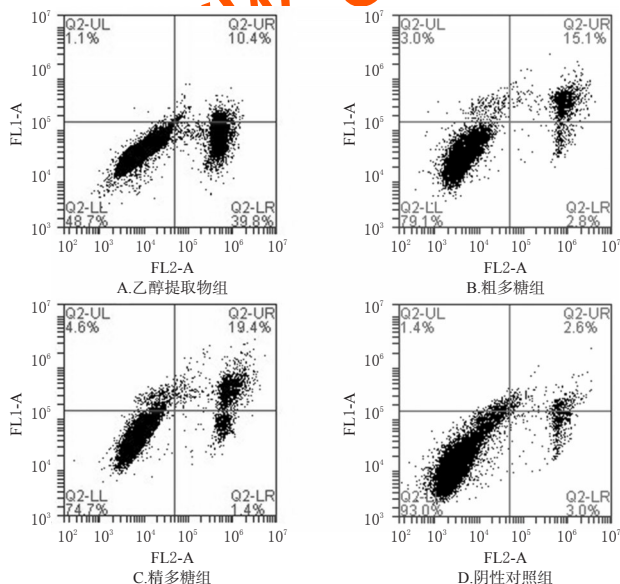


图2 各组细胞凋亡检测的流式图

Fig 2 Flow charts of cell apoptosis detection

胞SMMC-7721的抑制作用后,进一步采用PI染色法和FITC-Annexin V/PI双染色法分别观察无梗五加果实3种提取物对人肝癌细胞SMMC-7721细胞周期和细胞凋亡的影响。研究发现,各提取物均可显著降低G₀/G₁和G₂/M期细胞的百分率,显著升高S期细胞百分率,诱导细胞的凋亡。

试验中之所以对粗多糖和精多糖分别进行考察,是因为粗多糖与精多糖相比,主要区别是粗多糖含有一定量的蛋白质。分别考察粗多糖和精多糖抗肿瘤作用的目的,主要就是排除蛋白质的干扰,为后续实验进一步筛选抗肿瘤有效部位及单体奠定基础。

综合分析以上试验结果,可初步推测无梗五加果实3种提取物的抗肿瘤作用可能是通过抑制肿瘤细胞的增殖和诱导细胞凋亡而产生的。

参考文献

- [1] 高凤兰,孙振方,哈永年,等.无梗五加原植物及其生态分布[J].中国中医药科技,1997,4(2):106.
- [2] 淳于家龙,郭丽娜,张常顺.无梗五加化学成分与药理活性的研究进展[J].中国药业,2002,11(12):73-74.
- [3] 杨勤福.无梗五加的研究[J].中医研究,1999,12(6):14-15.
- [4] 孙振方,高凤兰,杜秀华,等.无梗五加片治疗白细胞减少症临床观察[J].中国中医药科技,1997,4(2):107.
- [5] 冯颖,孟宪军,王建国,等.无梗五加果多糖组成及生物活性的研究[J].食品科学,2008,29(4):378-380.
- [6] 梁颖,张晓莉,陶冀,等.红花多糖对人肝癌SMMC-7721细胞增殖的抑制作用[J].中医学报,2011,39(5):32-35.
- [7] 包永睿,王帅,孟宪生,等.白茅根水提取物对人肝癌细胞株SMMC-7721细胞周期及细胞凋亡的影响[J].时珍国医药,2013,24(7):1584-1586.
- [8] 张晓莉,程翔,刘洋,等.红花多糖对人肝癌SMMC-7721细胞Bcl-2与Bax基因转录及蛋白表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(14):239-244.
- [9] 梁曾妮妮,易有金,郭雨桐,等.灵芝多糖联合5-氟尿嘧啶对LoVo细胞增殖及凋亡的影响[J].中成药,2012,34(11):2068-2072.
- [10] 王晶.秦皮乙素诱导人肝癌细胞SMMC-7721凋亡的机制研究[J].中成药,2012,34(11):2059-2063.
- [11] 刘丽敏.氯化两面针碱诱导人肝癌细胞HepG2凋亡及机制研究[J].时珍国医药,2012,23(11):2760-2762.
- [12] 吴勃岩,王雪,王君龙,等.熟地黄多糖对H22、S180荷瘤小鼠抑瘤作用及存活时间的影响[J].中医药信息,2012,29(6):19-21.
- [13] 陈萍,张莅峡,刘泓,等.红毛五加粗多糖的抗肿瘤作用及免疫作用[J].中国药学杂志,1993,28(6):351-353.
- [14] 张彦火,祝晨蓀.雷公藤红素对体外人肝癌HepG2细胞增殖、凋亡的影响及机制研究[J].中国药房,2017,28(10):1342-1345.

(收稿日期:2017-09-27 修回日期:2017-11-11)

(编辑:林 静)