

红松种鳞多酚抗肿瘤作用的研究

符群¹, 徐明慧¹, 高小棠¹, 王振宇^{2*}

(1. 东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040; 2. 哈尔滨工业大学食品科学与工程学院, 黑龙江哈尔滨 150090)

符群¹, 徐明慧¹, 高小棠¹, 王振宇^{2*}

摘要 [目的] 研究红松种鳞多酚对癌细胞体外增殖的抑制作用。[方法] 分别采用不同浓度红松多酚提取液对人骨髓神经母细胞瘤细胞株 SH-SY5Y、人肺腺癌细胞株 A549、人皮肤癌细胞株 A375、人肝癌细胞株 HepG2、人卵巢癌细胞株 SKOV3 这 5 种常见的肿瘤细胞进行试验, 采用 MTT 法检测体外细胞增殖抑制率。[结果] 红松多酚提取物对 SH-SY5Y、HepG2、SKOV3 的抑制作用不明显, 而对 A549、A375 均有抑制效果。[结论] 在红松多酚提取液固形物含量为 0.4 mg/ml 时, 其对 A549 细胞抑制效果最佳, 在该浓度下, 红松多酚提取液对人肺腺癌细胞 A549 的抑制率可达 55%。

关键词 红松; 多酚; 抗肿瘤; MTT

中图分类号 S791.26 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)27-0925-03

Study on the Antitumor Properties of Korean Pine Scale Polyphenols

FU Qun¹, XU Ming-hui¹, GAO Xiao-tang¹, WANG Zhen-yu^{2*} (1. School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040; 2. School of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang 150090)

Abstract [Objective] To study inhibition effect of Korean pine scale polyphenols on cancer cell in vitro proliferation. [Method] Using different concentration of Korean pine scale polyphenols extract, experiments were conducted on human bone marrow neuroblastoma cell line SH-SY5Y and A549 lung adenocarcinoma cancer cells and human skin cancer cell lines A375, human liver cancer cell line HepG2, human ovarian cancer cell lines SKOV3. MTT was used to detect the inhibition rate on in vitro cell proliferation. [Result] Korean pine polyphenols extracts have no obvious inhibition effect on SH-SY6Y, HepG2, SKOV3, while have inhibition effect on A549 and A375. [Conclusion] When the solid content in Korean pine polyphenols extracts is 0.4 mg/ml, the inhibition effect on A549 can up to 55%.

Key words Korean pine; Polyphenols; Anti-tumor; MTT

肿瘤(Tumor)是机体在各种致癌因素作用下,局部组织的某一个细胞在基因水平上失去对其生长的正常调控,导致其克隆性异常增生而形成的异常病变。由于肿瘤的产物(包括异位激素产生)或异常免疫反应(包括交叉免疫、自身免疫和免疫复合物沉积等)引起内分泌、神经、造血、消化、骨关节、肾脏、皮肤等系统发生病变,引起相应的临床症状,称为副肿瘤综合症。肿瘤是细胞异常增生性疾病,严重危及人类的生命,尤其是癌肿。长期以来,人们为寻找安全有效的抗癌药物,对大量中药材进行抗癌活性筛选,目前已发现先导多酚类可以抑制肿瘤细胞的生长^[1]。

红松又名果松,属于松科植物,国家Ⅱ级重点保护野生植物,主要分布在我国东北长白山到小兴安岭一带,红松材质轻软,不易变形,防腐能力强。目前,人们从松科植物中已分离出挥发性成分、三萜、二萜、木质素、二苯乙烯和黄酮等类型化合物,主要有抗真菌、抗细菌、抗肿瘤、抗 HIV、抗氧化、趋避昆虫等活性,部分化合物可作为食品添加剂^[2]。除此之外,在红松中还能提取出许多酚类物质,因此红松除具有使用价值外,还在保健、医学、药用等方面有巨大的开发潜力。诸多研究表明,针叶树种的种皮、树皮、种鳞等各个不同部位皆含有多酚类化合物,并且多为传统树木开发利用业中的废弃部分,这造成了资源的极大浪费。由于松多酚特有的超强活性,使得其质量评价成为重要的研究课题,建立有效的评价系统必将为其高效利用提供坚实的保障。

1 材料与方法

1.1 供试材料 红松种鳞采自长白山;人肺腺癌细胞株 A549、人骨髓神经母细胞瘤细胞株 SH-SY5Y、人皮肤癌细胞株 A375、人肝癌细胞株 HepG-2、人卵巢癌细胞株 SKOV3 均由哈尔滨医科大学药学院提供;高糖 DMEM 培养液、胰蛋白酶-EDTA 消化液,购自北京索莱宝科技有限公司(Beijing Solarbio Science & Technology Co. Ltd)。

1.2 研究方法

1.2.1 红松多酚的制备。称取 200 g 干燥红松种鳞粉末于烧杯中,以 1:20 比例(m/V)加入 60% 乙醇 4 000 ml。在 50 ℃、2 400 Hz 条件下超声 1 h,将烧杯中提取液和残渣一同过纱布,保留提取液,将残渣放入烧杯中,继续以 1:20 比例(m/V)加入 60% 乙醇 4 000 ml,在 50 ℃、2 400 Hz 条件下超声 1 h。将 2 次得到的红松种鳞多酚提取液合并,在 45 ℃ 的条件下于旋转蒸发仪中浓缩。将预处理活化后的 AB-8 树脂装柱,层析法纯化多酚提取液,旋转蒸发溶剂,收集多酚纯化液(纯度达 45%)。采用 Folin-Ciocalteu 法^[3]测定多酚含量。

1.2.2 细胞培养。将肿瘤细胞培养于含 10% 小牛血清高糖 DMEM 培养液中,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中传代培养^[4-6]。

1.2.3 红松多酚对肿瘤细胞抑制率的测定。采用 MTT 比色法检测细胞增殖抑制率^[7-9]。取对数生长期的 A549 细胞,用适量 0.25% 的 EDTA-胰蛋白酶将贴壁的细胞充分消化,再用新鲜的 DMEM 细胞培养液制成 5 × 10⁴ 个/ml 的细胞悬液,按每孔 100 μl 接种于 96 孔培养板中^[10],空白列用 PBS 代替细胞悬液,将 96 孔培养板放置于 37 ℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养 12 h 后,分别加入 5 μl 终浓度为 1.0、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1 mg/ml 的多酚纯化液,每浓度

基金项目 国家自然科学基金面上项目(C160131170510)。

作者简介 符群(1974-),女,黑龙江哈尔滨人,高级工程师,博士研究生,研究方向:植物活性成分分离与功能。* 通讯作者,教授,博士生导师,从事天然产物化学与活性成分功能研究。

收稿日期 2014-08-11

设6个重复,另外设置1个对照组,继续培养24 h后,每孔中加入10 μ l MTT溶液(5 mg/ml),培养4 h后取出。吸弃各孔中的上清液,并向每孔加入200 μ l的二甲基亚砜(DMSO)。在恒速振荡器上振摇20 min,用酶标免疫测定仪在490 nm波长下测定各孔的吸光值(OD)。按公式(I)计算红松多酚纯化液对肿瘤细胞的生长抑制率。

$$I = \left(1 - \frac{OD_2 - OD_0}{OD_1 - OD_0}\right) \times 100\% \quad (I)$$

式中, I 为红松多酚纯化液对肿瘤细胞的生长抑制率(%); OD_0 为空白组的吸光值; OD_1 为对照组的吸光值; OD_2 为试验组的吸光值。

2 结果与分析

2.1 红松多酚对 SH-SY5Y 细胞增殖的影响

选取浓度范围为0.1~1.0 mg/ml多酚纯化液,对其进行SH-SY5Y肿瘤细胞增殖的抑制试验,红松多酚纯化液对SH-SY5Y肿瘤细胞抑制效果如图1所示。

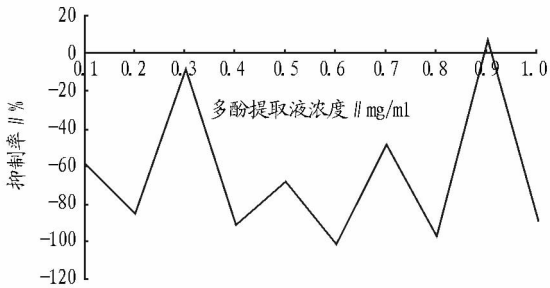


图1 红松多酚对SH-SY5Y细胞增殖的影响

由图1可以看出,红松多酚提取物对SH-SY5Y细胞生长的抑制效果不明显,总体趋势是对该细胞生长起到一定的促进作用,SH-SY5Y细胞抑制率没有明显地随红松多酚提取液浓度变化而变化。

SH-SY5Y在10%胎牛血清高糖DMEM培养基,37 $^{\circ}$ C,5% CO_2 的培养条件下,平均2~3 d传代1次,比较同样培养条件下的其他肿瘤细胞,可观察到SH-SY5Y培养液变色、变浊时间短,细胞生长周期短,繁殖极快。由此推断可能由于SH-SY5Y生长极快而造成红松多酚提取物对SH-SY5Y细胞生长的抑制效果不明显;而红松多酚提取物中含有的营养成分可能对SH-SY5Y细胞的生长起到一定的促进作用。

2.2 红松多酚对 A549 细胞增殖的影响

在预试验基础上,选取浓度范围为0.1~1.0 mg/ml多酚提取液,对其进行A549肿瘤细胞增殖的抑制试验,红松多酚提取液对A549肿瘤细胞的抑制效果见图2。

由图2可知,红松多酚提取物在高浓度时对A549细胞有促进生长的作用;在低浓度(0.5,0.4,0.1 mg/ml)时对A549细胞生长有明显的抑制作用。采用SPSS中的ANOVA进行组间显著性统计分析,结果表明,红松多酚提取物浓度为0.5,0.4,0.1 mg/ml时,其对A549的抑制率与对照组相比均有极显著差异($P < 0.01$),但红松多酚提取物浓度与细胞抑制率之间没有明显的剂效关系。

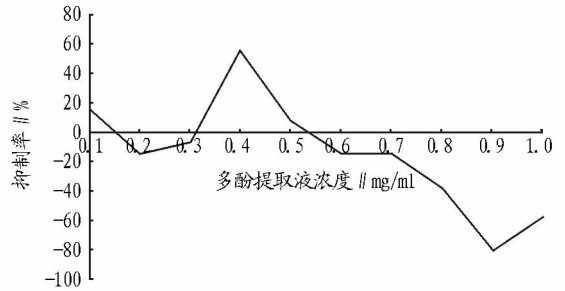


图2 红松多酚对A549细胞增殖的影响

从图2可以明显看出,当红松多酚提取物浓度在0.4 mg/ml附近时,对A549细胞生长抑制率明显高于其他浓度,抑制率能够达到55%以上。说明当红松多酚提取物为0.4 mg/ml时,其抑制效果最明显。

红松多酚提取物对A549肿瘤细胞作用的 IC_{50} 值为0.418,说明当作用在A549细胞的红松多酚提取物浓度为0.418 mg/ml时,能够使得A549细胞的死亡数量达到50%,即有1/2的细胞死亡。

2.3 红松多酚对 A375 细胞增殖的影响

在预试验基础上,选取浓度范围为0.1~1.0 mg/ml多酚提取液,对其进行A375肿瘤细胞增殖的抑制试验,红松多酚对A375肿瘤细胞的抑制作用见图3。

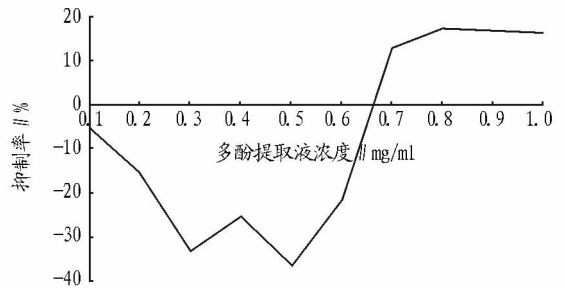


图3 红松多酚对A375细胞增殖的影响

由图3可知,红松多酚提取物在高浓度(1.0,0.9,0.8,0.7 mg/ml)时对A375细胞的生长起抑制作用。利用SPSS中的ANOVA进行组间显著性统计分析,结果表明,红松多酚提取物浓度为1.0,0.9,0.8,0.7 mg/ml时,其对A375的抑制率与对照组相比均有极显著差异($P < 0.01$),而在低浓度(0.6,0.5,0.4,0.3,0.2,0.1 mg/ml)时对A375细胞的生长起促进作用。

虽然高浓度的红松多酚提取物能够抑制A375细胞的生长,但抑制率并不高,红松多酚提取物的浓度为0.9 mg/ml时,其对A375细胞的抑制率仅达到17.15%。利用SPSS中的ANOVA进行组间显著性统计分析,1.0,0.9,0.8,0.7 mg/ml各浓度间抑制效果差异不显著。

通过计算,可以得出红松多酚提取物对A375细胞的 IC_{50} 为12.282 mg/ml。说明当作用于A375细胞的红松多酚提取物浓度为12.282 mg/ml时,A375细胞死亡数量达到50%,即有1/2的A375细胞在红松多酚提取物的作用下死亡。但A375肿瘤细胞的 IC_{50} 值与A549肿瘤细胞的 IC_{50} 数值相比大很多,因此可以认为A549肿瘤细胞对红松多酚更为

敏感。

2.4 红松多酚对 HepG-2 细胞增殖的影响 在预试验基础上,选取浓度范围为 0.1~1.0 mg/ml 多酚提取液,对其进行 HepG-2 肿瘤细胞增殖的抑制试验,该作用剂量范围内,多酚提取液对 HepG-2 细胞的抑制效果如图 4 所示。

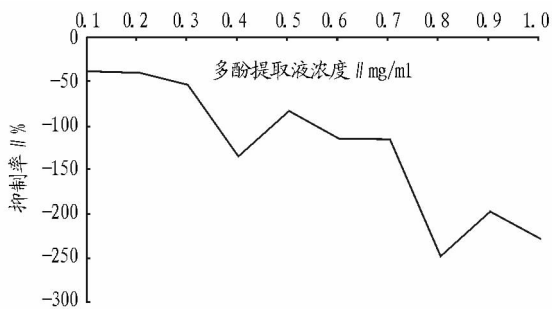


图 4 红松多酚对 HepG-2 细胞增殖的影响

由图 4 可以知,红松多酚提取物对 HepG-2 细胞有明显的促生长作用,并在高红松多酚浓度时,这种促进作用非常明显,且存在一定的剂效关系,即随着红松多酚提取物浓度的增加,其对 HepG-2 细胞生长的促进作用越显著。推测可能是 HepG-2 细胞在 10% 胎牛血清高糖 DMEM 培养基,37 °C,5% CO₂ 的培养条件下,红松多酚给予 HepG-2 细胞营养,更利于其生长。

2.5 红松多酚对 SKOV3 细胞增殖的影响 通过预试验,选取 0.1~1.0 mg/ml 多酚浓度范围进行 SKOV3 肿瘤细胞增殖的抑制试验,红松多酚提取物对 SKOV3 肿瘤细胞的抑制作用见图 5。

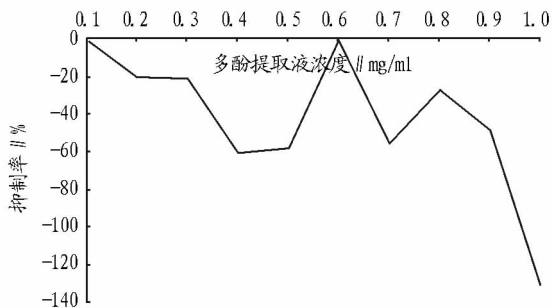


图 5 红松多酚对 SKOV3 细胞增殖的影响

由图 5 可知,红松多酚提取物对 SKOV3 细胞的生长起到促进作用,低浓度的红松多酚提取物对 SKOV3 细胞生长

促进作用相对较弱,而高浓度的红松多酚提取物对 SKOV3 细胞有相对较强的促进生长作用,并且这种促进作用与红松多酚提取物浓度存在一定的剂效关系,即随着红松多酚提取物浓度的增加,红松多酚对 SKOV3 细胞生长的促进作用越显著。推测可能是 SKOV3 细胞在 10% 胎牛血清高糖 DMEM 培养基,37 °C,5% CO₂ 的培养条件下,红松多酚给予其营养,更有利于 SKOV3 细胞的生长。

3 结论

(1)通过比较 5 种细胞的平均 OD 值和细胞抑制率可以发现,红松种鳞多酚提取物对人骨髓神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y、人肝癌细胞 HepG-2 和人卵巢癌细胞 SKOV3 的抑制作用不明显,而在一定浓度下对人肺腺癌细胞 A549 和人皮肤癌细胞 A375 均有抑制效果。比较二者与红松种鳞多酚提取物作用时间 24 h 的 IC₅₀ 发现,人肺腺癌细胞 A549 的 IC₅₀ 为 0.418 mg/ml,而人皮肤癌细胞 A375 的 IC₅₀ 为 12.282 mg/ml。A549 细胞的 IC₅₀ 远远低于 A375 细胞的 IC₅₀,可见人肺腺癌细胞 A549 比人皮肤癌细胞 A375 在红松种鳞多酚辅助治疗癌症方面具有更实际的研究意义。

(2)人肺腺癌细胞 A549 在红松种鳞多酚提取物固形物含量为 0.4 mg/ml 时,平均 OD 值最低,细胞抑制率最高。在该浓度下,红松多酚提取物对人肺腺癌细胞 A549 的抑制率能达到 55% 以上。

参考文献

- [1] 吴琦玮. 中药有效成分靛玉红对肿瘤细胞抑制作用的研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2007.
- [2] 杨佳倩. 红松和马尾松化学成分研究[D]. 海口: 海南大学, 2008.
- [3] SINGLETON V L, ORTHOFER R, LAMUELA-RAVENTOS R M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent[J]. *Methods in Enzymology*, 1999, 299: 152-178.
- [4] 刘西岭, 辛华, 谭玲玲. 北沙参水提法不同提取物体外抗肿瘤的研究[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(20): 9481-9482.
- [5] 全吉淑, 程静, 刘春彦, 等. 大豆异黄酮联合顺铂对 A549 细胞增殖和凋亡的影响[J]. *营养学报*, 2011, 33(5): 506-509.
- [6] 李健, 韩增胜, 李青旺. 龙葵多糖抗肿瘤和免疫调节作用的研究[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(33): 14589-14590.
- [7] 丁霞, 高思国, 李冠业, 等. 龙葵不同提取部位体外抗肿瘤作用的研究[J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(5): 1244-1246.
- [8] 赵欣, 王强. 普洱茶粗提物的体外抗癌及体内抗肿瘤转移效果研究[J]. *营养学报*, 2013, 35(6): 563-566.
- [9] 王翠平. 籽瓜抗氧化及抗肿瘤活性研究[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(29): 17833-17836.
- [10] 黄兰兰, 石国庆, 卢春霞. 影响动物细胞体外培养因素[J]. *黑龙江动物繁殖*, 2005, 13(4): 16-17.
- [11] 陈吓冬, 陈国奖. 平衡配方施肥对甘薯产量的效应分析[J]. *上海农业科技*, 2009(6): 114-123.
- [12] 王小晶, 蔡国学, 王洋, 等. 氮磷钾分期施肥对甘薯产量和品质的影响[J]. *中国农学通报*, 2011, 27(7): 188-192.
- [13] 余左, 朱大双, 丁蕾, 等. 甘薯平衡施肥增产效应试验[J]. *江西农业学报*, 2007, 19(2): 114-116.
- [14] 潘祥华, 林鑫, 陈芦根, 等. 配方施肥对甘薯新品种宁薯 6 号产量的影响[J]. *江西农业学报*, 2009, 21(10): 50-51.
- [15] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 106-489.
- [16] 潘祥华, 卓敏, 张祖金, 等. 高产鲜食加工兼用型甘薯新品种福宁薯 12 号的选育[J]. *福建农业学报*, 2011, 26(4): 733-736.

(上接第 9333 页)

参考文献

- [1] 苗艳芳. 豫西旱地氮磷钾肥配施对甘薯产量的影响[J]. *土壤肥料*, 2003, 19(3): 11-13.
- [2] 罗凤来. 甘薯氮磷钾肥平衡施用效应分析[J]. *土壤肥料*, 2003(4): 32-35.
- [3] 章明清, 李娟, 孔庆波, 等. 福建甘薯氮磷钾施肥指标研究[J]. *土壤通报*, 2012, 43(4): 861-866.
- [4] 史春余, 王振林, 赵秉强, 等. 钾营养对甘薯某些生理特性和产量形成的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2002, 8(1): 81-85.
- [5] 唐忠厚, 李洪民, 张爱君, 等. 长期定位施肥对甘薯块根产量及其主要品质的影响[J]. *浙江农业学报*, 2010, 22(1): 57-61.