

栀子多糖的抗肿瘤活性研究^①



石若夫^{1,2}, 李大力², 田春宇¹, 王关林³, 方宏筠³

(1. 大连理工大学 化工学院, 辽宁 大连 116012; 2. 南京理工大学 化工学院, 江苏 南京 210094; 3. 辽宁师范大学 生命科学学院, 辽宁 大连 116029)

SHI R F

摘 要: 采用 3 种不同的方法分别测定了栀子(*Gardenia jasminoides* Eills) 多糖对 3 种不同肿瘤细胞的抑制情况, 结果表明, 栀子多糖具有比较广谱的抑瘤效应。土豆碟法测定栀子多糖对根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) C58 诱导植物根瘤的最高抑制率为 68.4% (1.258 mg/mL 栀子多糖); MTT 法测定栀子多糖对人红白血病细胞 K562 的无毒剂量约为 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 低毒剂量约为 14.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 半致死剂量约为 62.61 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 栀子多糖对人红白血病 K562 细胞的抑制率为 63.2%; 实体瘤称重法测定栀子多糖对小鼠腹水肝癌 H_{2a} 实体瘤的抑制情况表明, 栀子多糖口服给药效果优于注射给药的效果, 500 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 的栀子多糖口服对小鼠肝癌实体瘤的抑制率达 49%。

关键词: 栀子; 多糖; 抗肿瘤活性

中图分类号: Q949.781.1; R733

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2002)04-0067-04

研究表明, 许多种植物多糖都具有抗肿瘤活性, 特别是一些中药的水溶性多糖。医学界普遍认为, 多糖作为抗肿瘤药物与其提高免疫系统功能有关。从结构上分析, 杂多糖比同多糖抗癌活性更强。栀子(*Gardenia jasminoides* Eills) 多糖是由鼠李糖、岩藻糖、甘露糖等 5 种单糖按一定比例组成的易溶于水的大分子。孟延发等^[1]通过活细胞计数法测定了栀子多糖对腹水肝癌细胞和 S-180 肉瘤细胞具有较好的抑制作用, 其抑制率分别达到 58% 和 51%。为了考察栀子多糖抑制肿瘤细胞的广谱性, 作者选择了 3 种抗肿瘤测定方法分别就栀子多糖对植物根癌农杆菌引起的根瘤、人红白血病 K562 细胞和小鼠腹水肝癌 H_{2a} 实体瘤的抑制情况进行了研究。

1 材料和方法

1.1 栀子多糖

来自于栀子悬浮细胞提取物。

1.2 土豆碟法^[2]测定栀子多糖抑制根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) 诱导根瘤

1.2.1 实验材料的制备

1.2.1.1 细菌液制备 根癌农杆菌 C58, 培养条件 YEB 液体培养基, 28 °C 下振摇 24 h。

1.2.1.2 样品液的制备 将样品溶解于 1 mL 二甲基亚砜(DMSO)中, 另取 1 mL DMSO 作阴性对照。

1.2.1.3 接种液的制备 将 1.5 mL 水, 2.0 mL 菌液和 0.5 mL 样品(或 DMSO)在试管中混合。

1.2.1.4 琼脂培养基的制备 每个样品制备 3 个 1.5% 琼脂培养基(10 cm 直径的培养皿)。

1.2.1.5 土豆碟的制备 将土豆洗净并在升汞中浸泡 20 min 以上, 无菌水洗去升汞。切去两端, 用打

① 收稿日期: 2002-01-15

作者简介: 石若夫(1970-), 男(满族), 辽宁锦州人, 博士研究生, 研究方向: 生物化学。

* 本实验在辽宁师范大学生物工程重点实验室完成。

孔器制成土豆条,再用小刀切成3~5 mm厚的小片,取5片小心放到琼脂培养基上。

1.2.2 操作 在每个土豆碟上滴0.05 mL接种液,然后用封口膜密封培养皿边缘以防气逸,倒置于27 °C培养箱中(黑暗),16 d后统计肿瘤数目。

$$\text{抑瘤率}(\%) = (\text{对照生瘤数} - \text{样品生瘤数}) / \text{对照生瘤数} \times 100$$

1.3 MTT法测定栀子多糖对人红白血病K562细胞的抑制作用

1.3.1 细胞株及其培养 人红白血病细胞敏感株K562由大连医科大学提供。接种于含10%小牛血清、100 μg庆大霉素的RPMI 1640培养基中,在37 °C、饱和湿度及5% CO₂细胞培养箱中传代培养。

1.3.2 操作过程^[3] 向96孔板分别加入100 μL新鲜的RPMI 1640培养基,加入栀子多糖(150 μg/mL)100 μL,在板上做倍比稀释,最后一孔的100 μL样品弃去,使培养体积均为100 μL。对照组加入等体积的RPMI 1640培养基。药物作用48 h后,加入MTT储存液(5 mg/mL)10 μL/孔。37 °C、5% CO₂培养箱中孵育4 h。弃掉各孔内培养液,加入二甲亚砜100 μL/孔,振荡器振荡5 min至细胞内和周围的颗粒充分溶解,室温放置数分钟,用全自动酶标仪测定每孔吸光度值(490 nm)。取3孔平均值计算生长率和抑制率。

$$\text{生长率}(\%) = \text{实验组 O.D 值} / \text{对照组 O.D 值} \times 100$$

$$\text{抑制率}(\%) = 1 - \text{生长率}$$

1.4 实体瘤称重法测定栀子多糖对小鼠腹水肝癌Hca f实体瘤的抑制

1.4.1 接种实体瘤 Hca f腹水肝癌细胞由大连医科大学病理生理教研室提供。断椎杀死已形成腹水的第二代小鼠,从腹腔内取出腹水。用0.9% NaCl稀释癌细胞,使其癌细胞个数为 1.0×10^7 /mL,取0.2 mL(含癌细胞 2×10^6 个)注射到小鼠的右腋下,使其长出实体瘤。

1.4.2 BALB-c小鼠的随机分组 BALB-c小鼠,体重20 g ± 2 g,由大连医科大学动物中心提供。随机分组,每组10只荷瘤小鼠,雌雄各半,(1)对照组,不给药;(2)口服给药,剂量50 mg/(kg·d);(3)口服给药,剂量250 mg/(kg·d);(4)口服给药,剂量500 mg/(kg·d);(5)注射给药,剂量50 mg/(kg·d);(6)注射给药,剂量250 mg/(kg·d);(7)注射给药,剂量500 mg/(kg·d)。接种实体瘤第4天形成病理模型后开始给药。

1.4.3 抑瘤率的计算 给药10 d后,将小鼠断椎处死,剥离肿瘤,并用纸吸干所带的血及体液,精确称重。

$$\text{抑瘤率}(\%) = (A - B) / A \times 100$$

式中:A—第三对照组的平均瘤重;B—各给药组的平均瘤重。

2 结果与分析

2.1 土豆碟法测定栀子多糖对根癌农杆菌诱导根瘤的抑制情况

表1 栀子多糖对根癌农杆菌诱导干瘤的抑制效果

Table 1 Anti tumor effect of *G. jasmnoides* Eills on the tumor induced by *A. tumefaciens*

多糖质量浓度/(mg·mL ⁻¹) polysaccharide concn.	生瘤数 tumor number	抑瘤率/% anti tumor ratio
对照 control	19	0.0
0.377	15	21.0
0.629	13	31.5
0.944	11	42.1
1.258	6	68.4

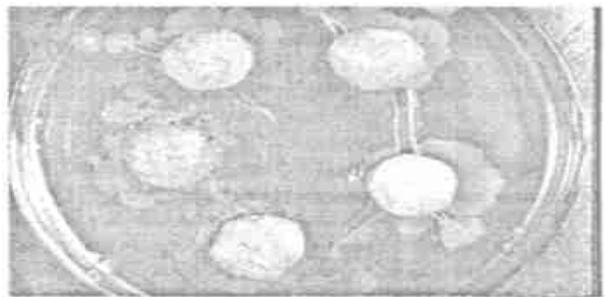


图1 根癌农杆菌在土豆碟上生瘤的情况

Fig. 1 The tumor induced by *A. tumefaciens*

土豆碟法是一种比较敏感的抗肿瘤药物的初筛工具。美国国立肿瘤研究所(NCI)的Matthew Suffness博士用双盲法对土豆碟法和3种固体肿瘤细胞毒性法检测已知抗3PS(P-388,体内抗肿瘤活性的化合

物)的准确性做了比较, 结果表明, 土豆碟法是一种很好的预测方法, 与体内活性相关性极好 ($P = 0.008$)。McLaughlin 等^[4-5]已用此法证实从多种植物中分离得到的几十种化合物具有抗肿瘤活性。从表 1 可以看出, 栀子多糖对根癌农杆菌在土豆碟上形成的肿瘤的抑制具有明显的剂量依赖性。图 1 为根癌农杆菌在土豆碟上生瘤的情况。

2.2 栀子多糖体外抑制人红白血病细胞 K562 的效果

栀子多糖对人红白血病细胞 K562 的无毒剂量约为 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 低毒剂量约为 14.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 半致死剂量 (LD50) 约为 62.61 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 栀子多糖对人红白血病细胞 K562 的抑制率为 63.2%, 如图 2。而相同剂量的栀子多糖对 Hca f 腹水肝癌细胞和 S-180 肉瘤细胞的抑制率分别为 58% 和 51%^[1]。

阿霉素是目前公认的一种抗肿瘤效果较好的化学药物, 作为 MTT 法的阳性对照, 分别测定了其无毒剂量、低毒剂量和半致死剂量等, 分别是 0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.477 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.3 栀子多糖抑制小鼠腹水肝癌实体瘤的效果

栀子多糖口服给药的效果比注射给药的效果好。在口服给药 500 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 的条件下, 栀子多糖对小鼠肝实体瘤的抑制率达到 49%, 瘤重为对照组的一半。而皮下注射的效果明显不如口服给药的效果, 在剂量为 500 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 时, 其抑制率只有 24% 左右。表 2 详细列出了栀子多糖对 Hca f 肝癌细胞的抑制情况。

3 讨论

采用 3 种不同的方法分别测定了栀子多糖对 3 种不同肿瘤的抑制情况。栀子多糖具有比较广谱的抑瘤效应, 对根癌农杆菌引起的植物根瘤、人红白血

病 K562 细胞以及 Hca f 肝癌实体瘤都有较好的抑制效果。孟延发等^[1]用体外细胞计数法测定栀子多糖对 S-180 肉瘤细胞和腹水肝癌细胞的抑制作用。其中栀子多糖对腹水肝癌细胞的抑制率 51%, 与本试验实体瘤称重的实验结果(49%)相近。另外, 在活体抑瘤实验中, 作者发现不同给药途径的抑瘤效果是不同的。口服给药效果优于注射给药效果可以解释为栀子多糖需要某些消化过程的参与, 特别是某些消化酶的加工, 才能促进其抗肿瘤活性, 但这还只是猜想, 不是栀子多糖抑瘤活性的全部机制。栀子多糖抗肿瘤活性还与栀子多糖的抗氧化活性有关, 这方面的内容作者将另文发表。

参考文献:

[1] 孟延发, 刘景会, 李志孝, 等. 栀子多糖的分离纯化及其基本性质[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 1993, 29(2): 109-112.
 [2] 杰利 L·麦克劳林, 顾哲明. 两种简易的抗肿瘤活性初筛方法[J]. 中国中药杂志, 1997, 22(10): 617-619.
 [3] OVERBAUGH J M, LALL E P, MARINO V A, et al. Purification and preliminary characterization of a monomeric glutathione s transferase from tetrahymena thermophila [J]. Architecture Biochemistry Biophysics, 1988, 261: 227-232.
 [4] MCLAUGHLIN J L. Methods in Plant Biochemistry[M]. London: Academic Press, 1991, 6: 1-6.
 [5] MCLAUGHLIN J L. Human Medical Agents from Plants[M]. Washington: American Chemical Society, 1993. 112-120.

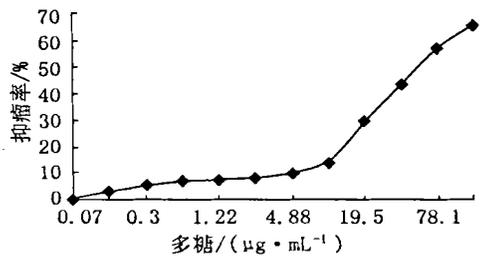


图 2 栀子多糖对人红白血病的抑制作用
 Fig. 2 The restrain effect of *G. jasminoides* Eills on the erythroleukemia

表 2 栀子多糖对 Hca f 肝癌实体瘤的抑制作用

Table 2 Anti tumor effect of *G. jasminoides* on Hca f tumor cells in BALB c mouse

项目 items	瘤质量/ g^1 mass of tumor	抑制率/% anti tumor ratio
对照 control group	2.801 ± 0.677	
口服给药组 ig group		
50 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$	2.465 ± 0.570	11.99
250 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$	1.848 ± 0.632	34.02
500 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$	1.405 ± 0.967	49.83
注射给药组 ip group		
50 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$	2.383 ± 1.034	14.92
250 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$	2.227 ± 0.553	20.05
500 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$	2.122 ± 0.835	24.24

1) $P < 0.01$, 与对照组相比效果显著。

ANTI-TUMOR ACTIVITY OF *GARDENIA JASMINOIDES* EILLS POLYSACCHARIDE

SHI Ruofu^{1,2}, LI Dali², TIAN Chuyi¹, WANG Guanglin³, FANG Hongjun³

(1. Chemical Institute of Dalian University of Technology, Dalian 116012, China;

2. Chemical Engineering College, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094, China;

3. Life Science Institute of Liaoning Normal University, Dalian 116029, China)

Abstract: Effect of *Gardenia jasminoides* Eills polysaccharide (GJEP) on three kinds of tumor cells were studied with three different methods respectively. Results show that GJEP has wide ranging anti-tumor activity. Effect of GJEP on tumor induced by *Agrobacterium tumefaciens* C58 was determined with potato chips method, and the restrain ratio of 1.258 mg/mL GJEP is 68.14%; Effect of GJEP on erythroleukemia was determined with MTT method, and no poisonous dose is 0.4 μg/mL, low poisonous dose is 14.33 μg/mL and median lethal dose is 62.61 μg/mL. Restrain ratio of 100 μg/mL GJEP on erythroleukemia is 63.2%; Restrain ratio of GJEP on ascites liver cancer Hcrf tumor in BALB/c mice was determined with weight tumor method, which shows that the result of ig is better than that of ip, and restrain ratio of 500 mg/(kg·day) GJEP (ig) on ascites liver cancer Hcrf tumor in BALB/c mice is 49%.

Key words: *Gardenia jasminoides* Eills; polysaccharide; anti-tumor activity

(上接66页)

7.6 图表的标注

文中图、表要少而精,并附相应的英文对照,插图一般不超过4个。图应精心设计,大小适中。结构式不应夹杂于行文中,而应以适当的化学名称或分子式书写,行文中的分子式应写成一行。表格设计要合理,一律用三线表(必要时可加辅助线)。表内数字上、下对齐,相邻栏内的数字或内容相同时,不能用“同上”、“同左”……,而应一一标注,表内“空白”代表未测或无此项,“—”代表未发现,“0”代表实测结果为零。

7.7 谱图

论文中出现的核磁共振(NMR)、高效液相层析(HPLC)、质谱(MS)、红外光谱(IR)、紫外光谱(UV)等的结果,请按通用的国际纯粹化学与应用化学联合会规则(IUPAC rules)写出,一般不用谱图表示。

7.8 参考文献

择主要的列入,不可引用非公开出版的书、刊。所引文献应在正文引用处右上角标出文献序号。文献著录格式如下:

7.8.1 期刊 作者.题名[J].期刊名,出版年,卷号(期号):页码.

例1:高景德,王祥珩.交流电机的多回路理论[J].清华大学学报,1987,27(1):1-8.

例2:MILES T R, MILES T R Jr. Overview of biomass gasification in the USA[J]. Biomass, 1989, 18(2):163-168.

7.8.2 专著 作者.书名(版次——第1版不标注)[M].出版地:出版者,出版年.页码.

例:竺可桢.物候学[M].北京:科学出版社,1973.1-3.

7.8.3 专利 专利所有者.专利题名[P].专利国别:专利号,出版日期.

以上格式中“[]”内为文献类型代号——专著M,论文集C,期刊J,学位论文D,报告R,标准S,专刊P

7.9 基金项目

指文章产出的资助背景,并在圆括号内注明其项目编号。

7.10 中图分类号

为从期刊文献的科属性实现族性检索,并为文章的分类统计创造条件,请采用《中国图书馆分类法》(第4版)进行分类。

7.11 作者简介

来稿请注明第一作者的出生年,性别(民族——汉族可省略),籍贯,职称,学位及研究方向。为了便于学术交流,凡在本刊发表文章,可同时刊登第一作者照片。

8 稿件请挂号邮寄:江苏省南京市锁金五村16号林产化工研究所《林产化学与工业》编辑部。邮政编码:210042

电话:(025)5482493; 传真:(025)5413445; <http://lchx.dinajournal.net.cn>; E-mail:lchx@chinajournal.net.cn

《林产化学与工业》编辑委员会