

番荔枝子脂肪油化学成分及其抗肿瘤活性

邱燕, 陈勇, 陈建伟, 王玉, 徐莎莎, 邱海龙, 李祥*
(南京中医药大学药学院, 南京 210023)

[摘要] 目的:研究番荔枝子脂肪油化学成分及体外抑制肿瘤细胞增殖活性。方法:对番荔枝子脂肪油进行甲酯化后,应用气相色谱(GC)分析与混合对照品对照,分析其主要化学成分及采用峰面积归一化法测定其相对含量。选取人肝癌细胞(SMMC-7721和HepG2),人宫颈癌细胞(Hela),人肺癌细胞(A-549),人乳腺癌细胞(MCF-7),用MTT法研究番荔枝子脂肪油的体外抑制肿瘤细胞增殖活性。结果:番荔枝子脂肪油部位脂肪酸的相对质量分数为80.9%,其中不饱和脂肪酸的相对质量分数达51.1%;番荔枝子脂肪油对上述5种人肿瘤细胞抑制作用半数抑制浓度(IC₅₀)分别为10.4,0.57,30.3,44.3,6.7 mg·L⁻¹。结论:番荔枝子脂肪油中主要含有油酸、亚油酸、棕榈酸和硬脂酸,其对肝癌 HepG2 细胞有选择性抑制其增殖作用。

[关键词] 番荔枝子; 脂肪油; 气相色谱; 人肿瘤细胞

[中图分类号] R284.1;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)21-0109-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014210109

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140915.1122.013.html>

[网络出版时间] 2014-09-15 11:22

Chemical Constituents and Antitumor Activity of Fatty Oil from *Annona squamosa* Seeds

QIU Yan, CHEN Yong, CHEN Jian-wei, WANG Yu, XU Sha-sha, QIU Hai-long, LI Xiang*
(College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the components and antitumor activity against human tumor cell lines of fatty oil of *Annona squamosa* seeds. **Method:** The samples were derivated by methyl esterification, the components were identified by gas chromatography (GC) analysis and comparison of references, and the relative amount of these components were determined by peak area normalization method. *In vitro* anti-proliferative activity of the fatty oil against human liver cancer (SMMC-7721 and HepG2), human uterine cervix cancer (Hela), human lung cancer (A549) and human breast cancer (MCF-7) cell lines were tested by MTT assay. **Result:** The major chemical constituents of the fatty oil were fatty acid (80.9%), and the content of unsaturated fatty acid were 51.1%. The IC₅₀ of the fatty oil against the 5 human cancer cell lines tested above was 10.4, 0.57, 30.3, 44.3, 6.7 mg·L⁻¹ respectively. **Conclusion:** The main components of the fatty oil of *A. squamosa* seeds were methyl palmitate, methyl stearate, methyl oleate and methyl linoleic acid. They showed high selective inhibition towards the proliferation of HepG2 cell line.

[Key words] *Annona squamosa* seeds; fatty oil; gas chromatography; human tumor cells

《广东省中药材标准》记载番荔枝子有消积杀虫之功,临床主要用于恶疮肿痛、驱虫等^[1]。本课题

组前期研究表明其富含一类抗肿瘤活性成分番荔枝内酯类化合物(annonaceous acetogenins,

[收稿日期] 20131229 (004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81274057,81403082);国家教育部博士点专项基金项目(20113237110009);江苏省高校优势学科建设工程项目(ysxk-2010);江苏省自然科学基金项目(SBK2012853);南京中医药大学青年自然科学基金项目(13XZR23)

[第一作者] 邱燕,在读硕士,中药师,从事中药化学与分析研究,Tel:13776654077,E-mail:qiuyan0816@163.com

[通讯作者] *李祥,教授,博士生导师,从事中药化学研究,Tel:025-85811512,E-mail:lixiang_8182@163.com

ACGs)^[2]。有研究报道了番荔枝树皮中的脂肪酸类^[3]和挥发性成分^[4]以及其果皮中的环肽类成分^[5]。番荔枝子中主要成分为脂肪油,尚未有其成分分析及活性研究的报道。本论文首次应用气相色谱分析了其主要成分及相对含量,并研究了其对不同肿瘤细胞增殖的抑制活性。

1 材料

1.1 仪器与试剂 6820 型气相色谱仪(FID 检测器,Agilent),SrAdv 型色谱工作站(上海军锐信息技术有限公司),KQ-100 型超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司),1/1 万 FA1004 电子分析天平(上海天平仪器厂),1/1 万 Sartorius 电子分析天平(赛多利斯科学仪器),DHG-910 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司),离心机(上海兰科仪器有限公司),DK-S22 型电热恒温水浴锅(上海精密实验设备有限公司),超净工作台(苏州净化),倒置生物显微镜(日本 Olympus),酶标仪(美国 Beckman),CO₂ 孵育箱(日本 SANYO),DMEM 培养基(美国 Gibco,批号 125513),新生牛血清(NBS,杭州四季青,批号 0458),双抗青-链霉素(美国 Amresco,分装),胰蛋白酶(美国 Gibco),磷酸盐缓冲液(PBS,自制),二甲基亚砜(DMSO,美国 Amresco,批号 0235),四甲基偶氮唑盐(MTT,美国 Biosharp,批号 0792),5-氟尿嘧啶(5-Fu,四川康益,批号 080403)及柱色谱硅胶(100~200 目,200~300 目,青岛海洋化工厂,批号 20100420),其他试剂均为分析纯。

1.2 试药与细胞株 对照品:SupelcoTM 37 Component FAME Mix(Sigma 公司),纯度>99%。正己烷为色谱纯(禹王试剂有限公司),石油醚(30~60℃)、氢氧化钠、甲醇、三氟化硼-乙醚溶液、氯化钠、无水硫酸钠均为分析纯;水为蒸馏水。

番荔枝子购自广东澄海,经南京中医药大学中药鉴定学教研室陈建伟教授鉴定为番荔枝科植物番荔枝 *Annona squamosa* L. 的干燥成熟种子。

人肝癌细胞株 SMMC-7721 和 HepG2,人宫颈癌细胞株 HeLa,人肺癌细胞株 A-549 和人乳腺癌细胞株 MCF-7,均为南京中医药大学基础医学院保存细胞株。

2 方法

2.1 气相色谱分析

2.1.1 色谱条件 DB-WAX 色谱柱(0.32 mm×30 m,0.25 μm),载气(N₂)流量 1.0 mL·min⁻¹,进样口温度 250℃,检测器温度 260℃,升温程序 50℃保

持 3 min,以 25℃·min⁻¹的速度升温至 200℃,保持 5 min,再以 3℃·min⁻¹的速度升温至 230℃,保持 20 min,分流比 2:1,进样量 1 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备 对照品 SupelcoTM 37 Component FAME Mix 质量浓度为 10 g·L⁻¹,按照所需用正己烷稀释成相应浓度即可。

2.1.3 番荔枝子脂肪油提取 称取番荔枝子 500 g 粉碎(20 目),用 10 倍量石油醚渗漉,渗漉液减压回收得番荔枝子脂肪油。

2.1.4 甲酯化处理 取上述油脂 100 mg,精密称定,置于 10 mL 具塞玻璃管中。加入 0.5 mol·L⁻¹ 氢氧化钠-甲醇溶液 4 mL,置 60℃ 水浴皂化 40 min(至油珠完全消失),冷却至室温,加入 14% 三氟化硼-甲醇 2 mL,继续水浴 5 min,冷却至室温,加入正己烷 2 mL,饱和氯化钠 2 mL,振摇,静置分层,取上清液 200 μL,正己烷定容至 5 mL,取适量溶液无水硫酸钠脱水,12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,即得。

2.1.5 对照品与样品色谱行为 按照 2.1.1 色谱条件,进行番荔枝子脂肪油甲酯化样品及对照品溶液检测,样品与对照品在相同的保留时间处有相应的色谱峰,且与杂质峰得到较好的分离。

2.2 体外抑制肿瘤细胞活性

2.2.1 供试样品的制备 番荔枝子脂肪油及阳性药 5-Fu 用单培(不加血清的培养液)分别稀释成 6 个不同浓度作为供试样品(DMSO 助溶,终质量分数<0.1%)。

2.2.2 细胞培养 细胞培养于含 10% 新生牛血清,1×10⁵ U·L⁻¹ 青霉素,100 mg·L⁻¹ 链霉素的 DMEM 培养基内,37℃ 和 5% CO₂ 饱和湿度培养箱内培养。3~4 d 传代 1 次。

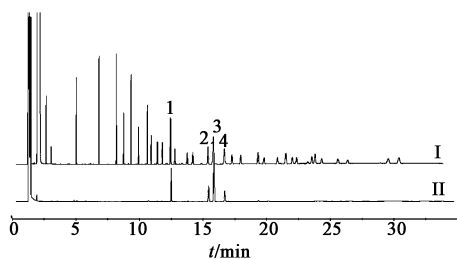
2.2.3 MTT 法测定细胞增殖的抑制率 参考文献[6-7]方法,将细胞培养至对数生长期和 80% 融合度后,以 0.25% 胰酶溶液消化,用含 10% 新生牛血清的相应培养液制成单细胞悬液,进行细胞计数后,将细胞密度调整为 5×10⁴ 个/mL。以每孔 100 μL 的体积接种于 96 孔板,培养 24 h。将已贴壁的细胞分为 3 组:正常对照组、实验药物组、阳性对照组。实验组加入不同浓度的药物,每孔 20 μL,对照组加入等体积的超纯水代替药物,阳性组加入等体积不同浓度的 5-Fu 代替药物。每浓度设 6 个复孔,培养 72 h。每孔加入 5 g·L⁻¹ MTT 溶液 10 μL,37℃ 继续孵育 4 h,弃去上清液,每孔加入 150 μL DMSO,用涡旋振荡器振荡摇匀后,在酶标仪 490 nm 处测吸光度(A),计算细胞抑制率和药物半数抑制浓度(IC₅₀)。

抑制率 = $(1 - A_{\text{药物组}}/A_{\text{对照组}}) \times 100\%$

IC₅₀用 Logit 法计算。实验重复 3 次。

3 结果

3.1 脂肪酸的成分分析及相对含量 取番荔枝子脂肪油甲酯化样品及对照品溶液,按 2.1 色谱条件,对番荔枝子脂肪油甲酯化样品及对照品溶液进行检测,样品与对照品在相同的保留时间处有相应的色谱峰,如图 1 所示。各成分相对含量见表 1。根据面积归一化法计算荔枝子脂肪油含脂肪酸相对质量分数为 80.9%,其中不饱和脂肪酸(油酸、亚油酸)质量分数为 51.1%。



1. 棕榈酸甲酯;2. 硬脂酸甲酯;3. 油酸甲酯;4. 亚油酸甲酯

图 1 37 种混合脂肪酸甲酯对照品 (I)
及番荔枝子脂肪油甲酯化样品 (II) 色谱

表 1 番荔枝子脂肪油甲酯化样品的成分及相对含量

成分	t_R/min	相对质量分数/%
棕榈酸	12.533	17.1
硬脂酸	15.478	12.7
油酸	15.899	41.7
亚油酸	16.749	9.4

3.2 番荔枝子脂肪油体外抑制肿瘤细胞活性 番荔枝子脂肪油对 5 种肿瘤细胞表现出不同程度的增殖抑制作用,其中对 HepG2 细胞有较高的抑制活性,其 IC₅₀为 $5.7 \times 10^{-1} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,见表 2。

表 2 番荔枝子脂肪油对人不同肿瘤细胞株的抑制作用 ($n=3$)

化合物	IC ₅₀ /mg·L ⁻¹				
	SMMC-7721	HepG2	Hela	A549	MCF-7
番荔枝子脂肪油	44.3	5.7×10^{-1}	30.3	44.3	6.7
5-Fu	3.2×10^{-1}	1.4×10^{-1}	2.2×10^{-1}	8.2×10^{-3}	2.3×10^{-2}

4 讨论

为了番荔枝子的合理利用,本实验分析了其化学成分。对番荔枝子脂肪油进行甲酯化后,虽然应用 GC-MS 技术可快速定性分析其化学成分,但是 MS 技术在鉴定未知化合物,尤其是手性化合物结构方面有其局限性。故本实验采用气相色谱与混合对照品对照,结果显示番荔枝子脂肪油主要成分为

脂肪酸(80.9%),其中不饱和脂肪酸相对含量为 51.1%。通过考察番荔枝子脂肪油对 5 种人肿瘤细胞增殖抑制作用实验,笔者发现其具有一定抑制肿瘤细胞增殖活性,尤其对人肝癌 HepG2 细胞有较强的选择性抑制活性。癌细胞和正常组织在脂质代谢上有着根本的区别,利用不饱和脂肪酸可达到治疗肿瘤同时不伤害正常组织的目的^[8]。但是本实验未能揭示番荔枝子脂肪油中是否含有番荔枝内酯类化合物,这类化合物有强大的抑制多种肿瘤细胞增殖的活性^[9]。本实验提示番荔枝子中主要成分脂肪油有一定的抗肿瘤应用方面的价值,但其发挥作用的具体药效成分还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药材标准. 第一册[S]. 广州:广东科技出版社,2004:194.
- [2] Yang H J, Li X, Tang Y P, et al. Supercritical fluid CO₂ extraction and simultaneous determination of eight annonaceous acetogenins in *Annona genus* plant seeds by HPLC-DAD method[J]. J Pharm Biomed Anal, 2009, 49(1):140.
- [3] Chavan M J, Wakte P S, Shinde D B. Saturated long-chain hydrocarbons from *Annona squamosa* L. bark [J]. Nat Prod Res, 2009, 23(5):455.
- [4] Chavan M J, Shinde D B, Nirmal S A. Major volatile constituents of *Annona squamosa* L. bark [J]. Nat Prod Res, 2006, 20(8):754.
- [5] Wu P, Wu M, Xu L X, et al. Anti-inflammatory cyclopeptides from exocarps of sugar-apples[J]. Food Chem, 2014, 152(2):23.
- [6] Scudiero D A, Shoemaker R H, Paull K D, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines[J]. Cancer Res, 1988, 48(17):4827.
- [7] 唐朝辉,张岩,李娜,等. 澳洲茄边碱提取纯化工艺及其抗肿瘤作用的研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(16):2192.
- [8] Simonsen N, Van't Veer P, Strain J J, et al. Adipose tissue omega-3 and omega-6 fatty acid content and breast cancer in the EURAMIC study [J]. Am J Epidemiol, 1998, 147(4):342.
- [9] Bermejo A, Figadere B, Zafra-Polo M C, et al. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action[J]. Nat Prod Rep, 2005, 22(2):269.

[责任编辑 邹晓翠]