

银杏叶聚戊烯醇同系物体外抑制乳腺癌
MCF-7 细胞株增殖作用及机制研究

丁香,黄小芳,张应辉*

(中国人民解放军第一八一医院药剂科,广西 桂林 541002)

〔摘要〕 目的:研究银杏叶聚戊烯醇同系物体外抑制 MCF-7 细胞增殖的作用并初步探讨作用机制。方法:经制备反相高效液(RT-HPLC)获得银杏叶聚戊烯醇同系物,MTT 法检测其对 MCF-7 细胞增殖的影响,选取抑制细胞增殖作用强的同系物 P3,用流式细胞仪检测 5, 10, 20 mg·L⁻¹ P3 对 MCF-7 细胞周期、细胞凋亡的影响。结果:经提取分离获得 10 个银杏叶聚戊烯醇同系物,依次命名为 P1,P2,P3……P10,其中 P3 对 MCF-7 细胞株增殖的抑制作用最强,IC₅₀为 10.32 mg·L⁻¹,其作用机制低浓度时以阻滞细胞周期于 G₂/M 期为主,高浓度可诱导凋亡。结论:银杏叶聚戊烯醇同系物 P3 为银杏叶提取物抑制 MCF-7 增殖的活性成分,其作用机制与阻滞细胞周期,诱导细胞凋亡有关。

〔关键词〕 银杏叶;聚戊烯醇同系物;制备 RT-HPLC;MCF-7;细胞周期

〔中图分类号〕 R285.5 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2012)19-0244-05

Growth-inhibiting Effect and its Molecular Mechanism of Polyprenols
from *ginkgo biloba* on Breast Cancer Cells MCF-7 *in vitro*

DING Xiang, HUANG Xiao-fang, ZHANG Ying-hui*

(Department of Pharmacy, the 181st Hospital of Chinese People's Liberation Army, Guilin 541002, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To study the growth-inhibiting effect of polyprenols from *Ginkgo biloba* on breast cancer cells MCF-7 *in vitro* and the related molecular mechanism. **Method:** Polyprenols were extracted by preparative Reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). The growth-inhibiting effect of polyprenols from *Ginkgo biloba* on breast cancer cells MCF-7 was evaluated *in vitro*. The polyprenols with best antiproliferative effect was screened and figured out. The influence of polyprenol P3 (5, 10, 20 mg·L⁻¹) on mitotic cycle and apoptosis of MCF-7 cells was analyzed with flow cytometry. **Result:** Ten polyprenol monomers were obtained by preparative RP-HPLC, and were orderly named P1, P2, P3……P10. The best effective growth-inhibiting on MCF-7 cells was P3 with IC₅₀ of 10.32 mg·L⁻¹. At low concentration, its mechanism appeared to be delaying on G₂/M of mitotic cycle, and at high concentration to be inducing cell apoptosis. **Conclusion:** Polyprenol P3 from *Ginkgo biloba* could inhibit growth of breast cancer MCF-7 cells *in vitro*. Its molecular mechanism is linked with delaying on mitotic phase (G₂/M) and inducing cell apoptosis.

〔Key words〕 *Ginkgo biloba* leaves; polyprenols; RP-HPLC; MCF-7 cells; mitotic cycle.

银杏叶为银杏科植物的叶,目前报道的活性成分为黄酮苷、萜内酯、银杏多糖、聚戊烯醇类化合物

〔收稿日期〕 20120307(018)

〔第一作者〕 丁香,硕士,主管药师,从事中药活性成分分析、药理作用机制研究, Tel: 0773-3843453, E-mail: GXdingxiang@163.com

〔通讯作者〕 *张应辉,硕士,副主任药师,从事药理学研究工作, Tel:0773-3843453, E-mail:1135038142@qq.com

等^[1]。聚戊烯醇在体内主要以 α 端饱和的 C₈₀ ~ C₁₁₅聚戊烯醇同系物的形式存在,与体内多萜醇结构类似,作为糖载体参与糖蛋白的生物合成。国内外研究表明,聚戊烯醇在抗肿瘤、放化疗增敏、增强免疫等方面有药理作用。银杏被誉为植物中的熊猫,是我国的特有植物资源,开发利用这一特色资源具有潜在价值。本研究利用制备高效液相色谱从银杏叶中分离聚戊烯醇同系物样品,开展体外抗肿瘤

药效研究,明确其抗肿瘤活性成分及药理作用。

1 材料

1.1 仪器 LC-6A 高效液相色谱系统(日本岛津公司),LAMBDA25 UV/VIS Spectrometer,旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂公司),ESQUIRE HTC 型离子阱质谱仪(德国布鲁克道尔顿公司),CO₂ 培养箱(美国 Forma scientific Inc 公司),倒置光学显微镜(德国 Zeiss Axiovert 200),超净工作台(苏州净化设备厂),酶联免疫检测仪(美国 Thermo Labsystems 公司),FACS Aria II 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.2 药材与试剂 银杏叶于 10 月份采集于桂林市黑山植物园,经中国人民解放军第一八一医院药剂科乔化民主任药师鉴定为银杏科植物 *Ginkgo boloba* L. 的叶,洗净后于 60 ℃ 烘干,粉碎备用。注射用顺铂,德州德药制药有限公司,批号 110601;氟尿嘧啶注射液,上海旭东海普药业有限公司,批号 101002;注射用盐酸多柔比星,浙江海正药业股份有限公司,批号 111007。人乳腺癌 MCF-7 细胞株购于中科院上海细胞库。The Cycle TES PLUS DNA Reagent Kit, FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I 美国 BD。

2 方法

2.1 色谱条件 YWG-C₁₈ 色谱柱(10 μm, 300 mm × 20 mm),流动相为异丙醇-甲醇-正己烷-水(50:25:10:4),检测波长 215 nm,流速 10 mL·min⁻¹,进样量 100 μL。

分析色谱: ODS-C₁₈ 柱(5 μm, 250 mm × 4.6 mm),线性梯度洗脱,流动相由异丙醇-甲醇-正己烷-水(50:25:15:4)变为异丙醇-正己烷(3:7),流速 1 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。

2.2 供试品溶液制备 称取 30 g 干燥银杏叶粉于烧瓶中,加入 200 mL 石油醚(60~90 ℃)超声提取 1 h,重复 3 次,至聚戊烯醇化合物提取完全,以 TLC 检测,碘蒸气显色。合并滤液,旋转蒸发除去石油醚,加入 20 倍体积丙酮,磁力搅拌至溶解后,于 4 ℃ 静置 4 h,抽滤除去蜡质、纤维素等沉淀,旋转蒸发得油状聚戊烯醇提取物。以上步骤重复 3 次,共投入 120 g 干燥银杏叶粉,获得浸膏 3.78 g。浸膏以适量石油醚-乙酸乙酯(10:1)溶解,过 100~140 目硅胶柱纯化,流动相为石油醚→石油醚-乙酸乙酯(10:1)梯度洗脱,洗脱速率 3 mL·min⁻¹,收集聚戊烯醇乙酸乙酯组分,旋转蒸发得浅色油状物 1.53 g。将油状物以正己烷溶解,配成 0.403 g·mL⁻¹ 溶液,供制备色谱用。采用 RT-HPLC 对样品进行分离制备,分

别收集 10 个峰标号为 1~10 个样品,经 HPLC 分析检测为单峰,以质谱分析。

2.3 聚戊烯醇同系物体外抗肿瘤作用 将分离的 10 个样品加少量吐温-80 边研磨边加灭菌注射用水配制成所需浓度,阳性对照药物选用顺铂、5-Fu、ADM 以灭菌注射用水配成所需浓度备用。根据预实验结果,接种一定数量的细胞于 96 孔培养板,保证在整个试验中细胞处于对数生长期,并在药物作用终止时对照组细胞的 A 值约在 1.0 左右。以每孔 190 μL (约 5 × 10⁴ 个/孔)接种于 96 孔板,培养 24 h 待细胞贴壁后,分别加入聚戊烯醇同系物样品、阳性对照 10 μL,设置 6.25, 12.5, 25, 50, 100 mg·L⁻¹ 共 5 个浓度梯度,每个样品设 5 个复孔。另外设空白对照孔 4 个,只加完全培养基 200 μL,不加细胞;设阴性对照孔 4 个,只加细胞悬液 190 μL。孵育 48 h 每孔加入 10 μL MTT (5 g·L⁻¹),继续培养 4 h 后吸去上清液,加入 DMSO 150 μL/孔,平板震荡器振荡 5 min,充分溶解蓝紫色颗粒,空白孔调零,用酶标仪以 570 nm, 630 nm 波长测定吸光度(A)值,计算细胞增殖抑制率。实验重复 3 次^[2-3]。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照组 } A - \text{实验组 } A}{\text{对照组 } A} \times 100\%$$

2.4 P3 对 MCF-7 细胞周期、细胞凋亡的影响 收集 0, 5, 10, 20 mg·L⁻¹ P3 作用 24 h 后的 MCF-7 细胞,调整细胞密度为 1 × 10⁵ 个,用 The CycleTES PLUS DNA Reagent Kit 处理后,上流式细胞仪检测,激发波长 488 nm,用 ModFit 软件分析 P3 对细胞周期的影响。同法收集细胞,用 FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I 处理后,上流式细胞仪检测,激发波长 488 nm,用 ModFit 软件分析 P3 对细胞凋亡的影响。

2.5 统计学处理 利用 SPSS 17.0 统计软件分析,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据比较采用方差分析,两组比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为有统计意义。

3 结果

3.1 制备 HPLC 分离聚戊烯醇同系物单体 经制备 HPLC 对样品进行分离,共得到 1~10 号组分,见图 1,经 HPLC 分析(*n* = 3)检测,均为单峰。按文献[2]色谱条件进行实验,图谱一致,本研究对流动相进行调整,得到更好的分离效果^[4]。

3.2 紫外光谱鉴定 对样品进行 109~500 nm 范围紫外扫描,样品 λ_{max} = 210 nm,见图 2。

3.3 质谱分析 10 个分子离子峰(*m/z*)为 805, 886, 952, 1 008, 1 087, 1 140, 1 223, 1 277, 1 364,

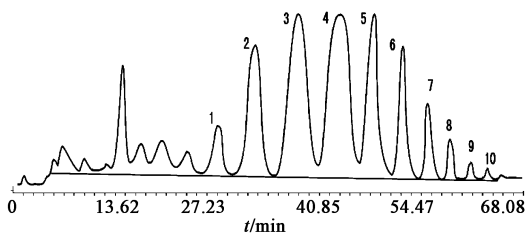


图 1 聚戊烯醇同系物分析型 HPLC

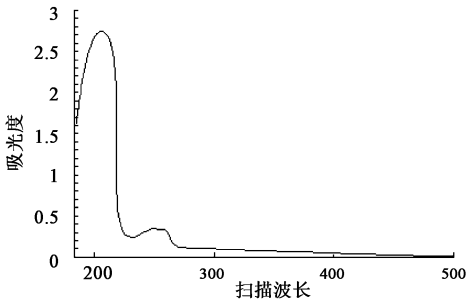


图 2 聚戊烯醇同系物紫外扫描图

1 431,与文献[2]结果一致,应是异戊烯基单元数为 11~20 的是个聚戊烯醇乙酸乙酯单体,依次命名为 P1,P2……P10。

3.4 聚戊烯醇同系物对 MCF-7 细胞株增殖抑制作用 聚戊烯醇同系物、阳性对照药物对 MCF-7 细胞株作用 48 h 后的抑制率见图 3,4,IC₅₀ 结果见表 1。实验结果表明,本研究分离的聚戊烯醇同系物单体对 MCF-7 细胞株增殖抑制作用存在差异,P3 的抑制作用最为明显,IC₅₀ = 10.32 mg · L⁻¹,对 P3

进行下一步抗肿瘤作用机制研究。

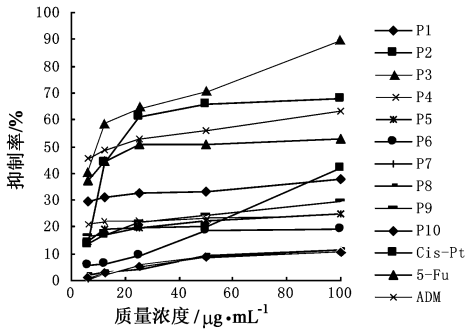


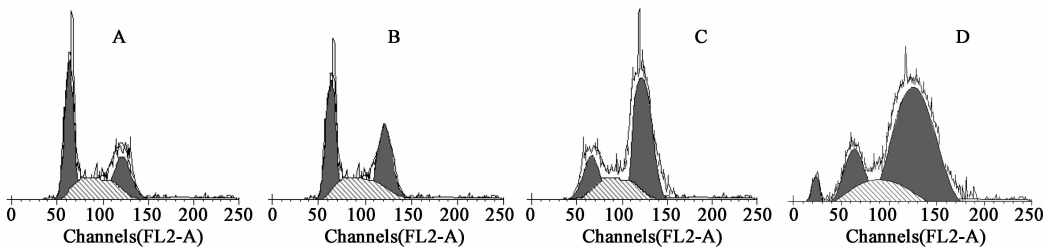
图 3 聚戊烯醇同系物、阳性对照药物对 MCF-7 细胞株增殖抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

表 1 聚戊烯醇同系物 P3,阳性对照药物

对 MCF-7 细胞株的 IC ₅₀				μg · mL ⁻¹
P3	Cis-Pt	5-Fu	ADM	
10.30 ± 2.53	26.48 ± 2.75	41.36 ± 3.31	14.28 ± 2.25	

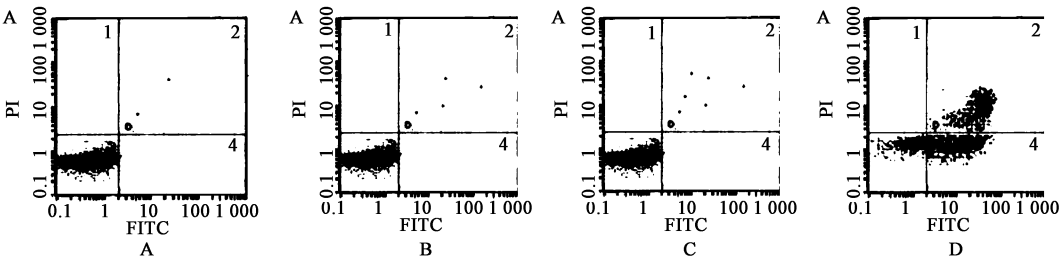
3.5 P3 对 MCF-7 细胞周期的影响 P3 对 MCF-7 细胞株作用 24 h 后,G₂/M 期细胞比例明显增加,且 20 mg · L⁻¹ P3 处理后的细胞出现凋亡峰,见图 4,表 2。

3.6 P3 对 MCF-7 细胞凋亡的影响 P3 质量浓度为 5,10 μg/mL 时,诱导细胞凋亡作用不明显,当 P3 质量浓度为 20 mg · L⁻¹ 时,MCF-7 细胞凋亡率为 (28.7 ± 2.53)%,见图 5,表 2 证明高浓度 P3 可诱导 MCF-7 细胞凋亡。



A. 阴性对照组;B. 5 mg · L⁻¹ 组;C. 10 mg · L⁻¹ 组;D. 20 mg · L⁻¹ 组

图 4 P3 对 MCF-7 细胞周期的影响



A. 阴性对照组;B. 5 mg · L⁻¹ 组;C. 10 mg · L⁻¹ 组;D. 20 mg · L⁻¹ 组

图 5 P3 对 MCF-7 细胞凋亡的影响

表 2 P3 对 MCF-7 细胞周期分布、细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /mg·L ⁻¹	细胞周期分布/%			凋亡率 /%
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
阴性对照	—	47.4 ± 4.32	44.8 ± 2.46	7.8 ± 2.21	1.7 ± 0.85
P3	5	39.6 ± 3.64	32.2 ± 2.68	28.2 ± 3.42	1.9 ± 1.03
	10	27.4 ± 2.47	25.7 ± 3.41	46.9 ± 4.26	3.3 ± 1.35
	20	26.3 ± 3.64	19.3 ± 1.53	54.4 ± 3.74	28.7 ± 2.53

4 讨论

本研究对文献报道的分离银杏叶聚戊烯醇同系物的色谱条件进行改进,采用 RP-HPLC 制备分离 10 个银杏叶聚戊烯醇同系物单体,分离效果较好,经质谱分析,与文献一致^[4-5]。

目前对银杏叶聚戊烯醇同系物多集中于分离纯化,以及聚戊烯醇总提取物的抗肿瘤作用研究^[7-8],而对总提取物中发挥抗肿瘤作用的药效成分研究报道较少^[9-15]。本研究在获得 10 个银杏叶聚戊烯醇同系物单体后,测定其对人乳腺癌 MCF-7 细胞株增殖的抑制作用,发现 P3 的抑制作用最强,而其余 9 种单体的抑制作用不明显。这一现象可能与银杏叶聚戊烯醇同系物的相对分子质量有关。实验研究表明,聚乙烯醇类化合物的脂溶性较强,作用于细胞后,相对分子质量小的物质更容易被跨膜转运,观察实验结果可发现,P1,P2,P3 的抑制细胞增殖作用均强于其余 7 种,而 P3 的作用最强可能与其分子结构有关,需进一步研究。

本研究通过流式细胞仪对 P3 阻滞人乳腺癌 MCF-7 细胞周期、诱导细胞凋亡的作用进行了探讨。肿瘤细胞在药物作用后出现有丝分裂阻滞,表现为细胞的 G₁ 期、G₂ 期时间延长,阻止受损的 DNA 进入 S 期修复、复制或在 M 期继续分裂,该现象被称为 G₁ 期阻滞、G₂ 期阻滞。G₁ 期阻滞有充分的时间修复受损的 DNA,而因损伤的细胞则由 P53 蛋白诱导凋亡而消除。由于多数肿瘤细胞存在 P53 突变,因此肿瘤细胞较少出现 G₁ 期阻滞。G₂/M 期阻滞可使受损 DNA 的损伤被“固定”下来,形成不可逆 DNA 损伤^[16-18]。本研究发现银杏叶聚戊烯醇同系物 P3 低剂量时可阻滞 MCF-7 细胞周期于 G₂/M 期,高剂量可诱导细胞凋亡。P3 的抗肿瘤作用机制以及构效关系有待进一步研究,且银杏叶聚戊烯醇同系物在银杏叶中含量较低,提取分离步骤较为繁琐,在研究其药理活性的同时,进行化学合成研究,可为其药理活性的开发提供物质基础。

[参考文献]

[1] 夏晓晖,张宇,郝砚彬,等. 银杏叶化学成分研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(9):100.

[2] Kawada K, yonei T, Ueoka H, et al. Comparison of the mosensitivity test: clonogenic assay versus MTT assay [J]. Acta Medokayama, 2002, 56(3):129.

[3] El-Khoury V, Gomez D, Liautaud-Roger F, et al. Effects of the histone deacetylase inhibitor trichostatin A on nuclear texture and c-jun gene expression in drug-sensitive and drugresistant human H69 lung carcinoma cells [J]. Cytometry, 2004, 62A(2): 109.

[4] 孙磊,李春斌,范圣第. 银杏叶聚戊烯醇类化合物的制备与分析[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(12):2528.

[5] 杨克迪,陈钧,童张法. 反相高效液相色谱法制备银杏叶中聚戊烯醇同系物单体[J]. 色谱, 2003, 21(1):49.

[6] 王成章,沈兆邦,谭卫红,等. 银杏叶聚戊烯醇的化学、纯化和药效研究[J]. 天然产物研究与开发, 2000,13(2):43.

[7] 全燕,马振山,李先端,等. 银杏总内酯提取物制备工艺的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(6):7.

[8] 许明淑,邢新会,罗明芳,等. 银杏叶黄酮的酶法强化提取工艺条件研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(4): 2.

[9] 高凌,亢寿海,张琴芬,等. 银杏叶聚戊烯醇抗癌作用的初步研究[J]. 江苏药学与临床研究, 2003, 11(1):1.

[10] 王章成,沈兆邦,高凌. 银杏叶聚戊烯醇联合化疗肿瘤的药效研究[J]. 林产化学与工业, 2003, 23(3): 15.

[11] 何晓松,高凌,戴美红,等. 银杏叶聚戊烯醇抑制 S180 细胞端粒酶活性的研究[J]. 中国药理通讯, 2003, 12(3):30.

[12] 高凌,亢寿涛,张能芳,等. 银杏叶聚戊烯醇对一致性肝癌的治疗作用[J]. 中医药学刊, 2004, 22(1):73.

均匀设计法筛选三七、山楂有效部位
组合物剂量配比

贺燕,温富春,纪凤兰,丁涛,徐惠波*
(吉林省中医药科学院,长春 130021)

[摘要] 目的:研究确定三七、山楂(SS)组合物中 2 个有效部位最佳配比剂量的有效方法。方法:按照 $U_6(6^4)$ 表将小鼠随机分为山楂叶总黄酮:三七叶总皂苷 200:15,100:1.875,50:30,25:3.75,12.5:60,6.25:7.5($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)6 个剂量给药组,连续给药 5 d 后,采用小鼠腹腔注射异丙肾上腺素和断头致急性脑缺血两种模型观察小鼠存活时间,分别得出多元回归方程,推算 2 个有效部位的最佳配比。结果:确定 SS 组合物中山楂叶总黄酮:三七叶总皂苷最佳组合比例为 20:15 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,即配比为 4:3,此时药效作用明显($P<0.05$)。结论:运用均匀设计与药效学验证相结合的方法可确定有效部位组合物的最佳配比。

[关键词] 三七;山楂;有效部位组合物;均匀设计
[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)19-0248-04

Uniform Design for Optimizing Proportion of Effective Components
from *Panax Notoginseng* and *Crataegus pinnatifida* Bge.

HE Yan, WEN Fu-chun, JI Feng-lan, DING Tao, XU Hui-bo*
(Jilin Academy of Chinese Medical Science, Changchun 130021, China)

[Abstract] **Objective:** To explore effective way to optimize the proportion of effective components from *Panax notoginseng* and *Crataegus pinnatifida* Bge. **Method:** According to table $U_6(6^4)$ in uniform design, mice were divided into 6 treatment groups, the ratios between flavonoids of *Crataeguspinnatifida* and total saponins of *P. notoginseng* were 200:15, 100:1.875, 50:30, 25:3.75, 12.5:60, 6.25:7.5 ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) accordingly. The treatments lasted for 5 days. Then, survival time of mice were evaluated by two models, isoproterenol injection

[收稿日期] 20120305(014)
[基金项目] 吉林省科技厅重点项目(20060907-01)
[第一作者] 贺燕,硕士,主治医师,从事药理学研究工作,Tel:0431-86816880,E-mail:yebaihe-yan@163.com
[通讯作者] *徐惠波,研究员,从事新药研发工作,Tel:0431-86058637,E-mail:lxuhuibo@yahoo.com.cn

[13] 王成章,沈兆邦,郑光耀,等. 银杏叶聚戊烯基磷酸酯体内外抗肿瘤的生物活性研究[J]. 林产化学与工业, 2006, 26(3):13.

[14] 王成章,沈兆邦,高凌. 银杏叶聚戊烯醇抗肿瘤的生物活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2002, 14(5):18.

[15] 黑子清,吴伟康,孙惠兰,等. 银杏叶提取物对高脂胆固醇喂饲家兔血管神经酰胺含量和泡沫细胞凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(2):60.

[16] Marit K, Henriette C S, H é la S, et al. The G_1 -S

checkpoint in fission yeast is not a general DNA damage checkpoint [J]. Cell Sci, 2008 121(8):4047.

[17] Ver ó nica R B, Sandra G E, Noelia Sr, et al. Different S/M checkpoint responses of tumor and non-tumor cell lines to DNA replication inhibition[J]. Cancer Res. , 2007, 67(11):11648.

[18] Gergia I T, Kaliopi N M, Gabriel E P, et al. Checkppoint abrogation in G_2 compromises repair of chromosomal breaks in ataxia telangiectasia cells[J]. Cancer Res, 2005, 65(9):11292.

[责任编辑 李玉洁]