

# 大蒜 3 个有效部位配伍对 3 种人胃癌细胞的杀伤作用

薛欣, 张立石, 王瑞海, 柏冬, 鞠大宏, 刘丽梅\*

(中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的: 观察大蒜 3 个有效部位组合物对 3 种人胃癌细胞的杀伤作用, 筛选有效部位组合物最佳配伍比例。方法: 以大蒜 3 个有效部位(大蒜油、大蒜总多糖、大蒜总皂苷)为研究对象, 选用  $L_{16}(4^5)$  正交表设计分组、给药, 以胃癌细胞代谢 MTT 活力(抑瘤百分率)作为考察指标, 采用 SPSS 软件对实验数据进行处理。结果: 大蒜 3 个有效部位对 MKN45 细胞杀伤作用的主次顺序为大蒜油(1<sup>#</sup>) > 大蒜总多糖(2<sup>#</sup>) > 大蒜总皂苷(5<sup>#</sup>), 其最佳配比为 1<sup>#</sup>: 2<sup>#</sup>: 5<sup>#</sup> = 1: 20: 10。大蒜 3 个有效部位对 AGS 细胞抑制率影响无明显差别, 其最佳配比为 1<sup>#</sup>: 2<sup>#</sup>: 5<sup>#</sup> = 1: 13. 3: 3. 3。大蒜总皂苷对人胃癌 HGC-27 细胞抑制率的影响显著( $P < 0.01$ ), 影响的主次顺序为大蒜总皂苷 > 大蒜油 > 大蒜总多糖, 其最佳配比为 1<sup>#</sup>: 2<sup>#</sup>: 5<sup>#</sup> = 1: 200: 50。结论: 3 种人胃癌细胞对大蒜 3 个有效部位组合物的杀伤作用的敏感性不同, 3 个有效部位组合对 3 种人胃癌细胞杀伤作用的最佳配比浓度亦不相同。

**[关键词]** 大蒜油; 大蒜总多糖; 大蒜总皂苷; 人胃癌细胞; 正交试验

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)07-0238-04

## Cytotoxic Effect of Components Formula of Three Garlic Components on Three Human Gastric Carcinoma Cells

XUE Xin, ZHANG Li-shi, WANG Rui-hai, BAI Dong, JU Da-hong, LIU Li-mei\*

(Institute of Basic Theory of Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medicine Sciences, Beijing 100700, China)

**[收稿日期]** 2011-11-28

**[基金项目]** “重大新药创制”科技重大专项平台子课题(2009ZX09301-005-11)

**[第一作者]** 薛欣, 博士, 副研究员, 从事肿瘤免疫研究, Tel: 010-64014411-2556, E-mail: xuexinmed@163.com

**[通讯作者]** \*刘丽梅, 学士, 研究员, 从事中药药效物质基础研究, Tel: 010-64014411-2592, E-mail: liulimeihrb@sina.com

达可以有效促进肝癌细胞凋亡。

目前认为, 肿瘤发病的一个途径是细胞过度增殖, 另一途径是凋亡受阻或细胞死亡不足, 导致病变组织内肿瘤细胞存活延长, 细胞群体存活与死亡的平衡破坏, 存活大于死亡, 肿瘤细胞净增长数目加大。凋亡相关基因的表达异常导致细胞增殖过多和凋亡减少<sup>[5]</sup>。因此, 抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡已成为肿瘤治疗的重要手段之一。

本研究结果表明, 黄芪多糖对 HepG2 细胞的凋亡具有促进作用。增加 caspase-3 的活性, 增加线粒体膜电位的降低, 并降低 Bel-2 表达; 黄芪多糖可以降低 ERK1/2 的表达从而促进 HepG2 细胞的凋亡。本实验初步探讨了黄芪多糖促进 HepG2 细胞凋亡的机制, 为进一步研究黄芪多糖影响肿瘤细胞生长的机制奠定了一定的基础。

### [参考文献]

- [1] Altaca G, Demiralay E, Kalayci S A, et al. Giant malignant gastrointestinal stromal tumor presenting as an intraabdominal abscess [J]. J Gastrointest Liver Dis, 2009, 18(4): 515.
- [2] Lee K Y, Jeon Y J. Macrophage activation by polysaccharide isolated from Astragalus membranaceus [J]. Int Immunopharmacol, 2005, 5(7/8): 1225.
- [3] Webb C P, Van A L, Wigler M H, et al. Signaling pathways in Ras-mediated tumorigenicity and metastasis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(15): 8773.
- [4] Widmann C, Gibson S, Jarpe M B, et al. Mitogen activated protein kinase: conservation of a three kinase module from yeast to human [J]. Physiol Rev, 1999, 79(1): 143.

[责任编辑 古云侠]

**[ Abstract ] Objective:** To investigate the killing effect and determine the optimum proportion of components formula of three garlic components on three human gastric carcinoma cells. **Method:** With three garlic effective parts (garlic oil, garlic total polysaccharides, garlic total saponins) as the research object, group and administration in orthogonal test were designed according to  $L_{16}(4^5)$  orthogonal chart. MTT activities of human gastric carcinoma cell metabolism [inhibition rate (%)] were used as indexes and data were analyzed by SPSS software. **Result:** The killing activity of three garlic effective parts is oil (1<sup>#</sup>) > polysaccharides (2<sup>#</sup>) > saponins (5<sup>#</sup>). The optimum proportion of three garlic components on MKN45 cells was 1<sup>#</sup>: 2<sup>#</sup>: 5<sup>#</sup> = 1: 20: 10. There was no significant difference of three garlic components in affecting the inhibition rate on AGS cells. The optimum proportion of three garlic components on AGS cells was 1<sup>#</sup>: 2<sup>#</sup>: 5<sup>#</sup> = 1: 13.3: 3.3. Garlic total saponins (5<sup>#</sup>) had significant effect on the inhibition rate of HGC-27 cells ( $P < 0.01$ ). The killing activity of three garlic effective parts was saponins > oil > polysaccharides. The optimum proportion of three garlic components on HGC-27 cells was 1<sup>#</sup>: 2<sup>#</sup>: 5<sup>#</sup> = 1: 200: 50. **Conclusion:** Three human gastric carcinoma cells had different sensitivity to the killing activity of three garlic effective parts. The optimum proportions of three garlic components to three human gastric carcinoma cells were also distinct.

**[ Key words ]** garlic oil; garlic total polysaccharides; garlic total saponins; human gastric carcinoma cells; orthogonal test

作者曾经报道大蒜油、大蒜总多糖、大蒜总皂苷的组合应用(已申报专利)对MKN45细胞的杀伤作用明显优于同等剂量的两个有效部位组合及大蒜油的单独用药<sup>[1]</sup>,本文进一步对大蒜3个有效部位组合物对人胃癌AGS、HGC-27细胞杀伤作用进行了考察,本次报道3个有效部位组合物对3种胃癌细胞杀伤作用最佳配比的筛选。

## 1 材料

**1.1 药物与试剂** 大蒜3个有效部位:大蒜油(1<sup>#</sup>)、大蒜总多糖(2<sup>#</sup>)、大蒜总皂苷(5<sup>#</sup>)由本所中药质量分析室制备并提供;RPMI1640培养基、胎牛血清,GIBCO公司;Ham's F12,DMEM培养基,Thermo公司;胰蛋白酶,Amresco公司;MTT,DMSO,Sigma公司。

**1.2 细胞** 胃癌细胞株MKN45细胞购自北京协和细胞资源中心,胃癌细胞株AGS,HGC-27细胞购自中国科学院上海生命科学研究所以。

**1.3 细胞培养** MKN45细胞用含10%新生牛血清的1640培养,AGS用含10%新生牛血清的Ham's F12培养,HGC-27用含10%新生牛血清的DMEM培养,培养液中含有100 U·mL<sup>-1</sup>青霉素,100 mg·L<sup>-1</sup>链霉素,37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养,取对数生长期的细胞用于实验。

**1.4 MTT法测定细胞增殖的抑制率** 收集对数生长期MKN45,AGS,HGC-27细胞,按照 $L_{16}(4^5)$ 正交表每种细胞分成16组,每组设3个复孔,分别以 $2 \times 10^4$ /孔的密度将3种细胞加入96孔板,每孔100

μL。参照表1,3,5将不同质量浓度的大蒜3个有效部位1<sup>#</sup>,2<sup>#</sup>,5<sup>#</sup>加入细胞中,37℃培养48h。每孔加入5 g·L<sup>-1</sup> MTT溶液10 μL,37℃培养4h,去上清,每孔加入200 μL DMSO,震荡溶解,在酶标仪570 nm处测吸光度(A),计算细胞抑制率。

$$\text{细胞抑制率} = \frac{(A_{\text{阴性对照组}} - A_{\text{实验药物组}}) / (A_{\text{阴性对照组}} - A_{\text{空白组}})}{\times 100\%}$$

**1.5 统计学分析** 采用SPSS 10.0软件对有效部位不同配比对胃癌细胞的抑瘤率进行方差分析;利用正交试验结果对抑瘤率进行极差分析。

## 2 结果

选用 $L_{16}(4^5)$ 正交表,以胃癌细胞代谢MTT活力(抑瘤百分率)作为考察指标,进行正交试验,筛选大蒜有效部位1<sup>#</sup>,2<sup>#</sup>及5<sup>#</sup>组合应用的最佳配比,其因素水平见表1,4,7。正交试验中1<sup>#</sup>,2<sup>#</sup>,5<sup>#</sup>的浓度根据以往1<sup>#</sup>,2<sup>#</sup>,5<sup>#</sup>分别抑制3种胃癌细胞生长的IC<sub>50</sub>确定。中剂量为IC<sub>50</sub>的平均值,低剂量为IC<sub>50</sub>的1/2,高剂量为IC<sub>50</sub>的2倍。大蒜有效部位不同配比对胃癌细胞的抑瘤率正交试验结果见表2,5,8,方差分析的结果见表3,6,9。

表1 MKN45细胞因素水平表

| 水平 | A(1 <sup>#</sup> 药物浓度)<br>/g·L <sup>-1</sup> | B(2 <sup>#</sup> 药物浓度)<br>/g·L <sup>-1</sup> | C(5 <sup>#</sup> 药物浓度)<br>/g·L <sup>-1</sup> |
|----|--|--|--|
| 1  | 0  | 0  | 0  |
| 2  | 0.05   | 0.5  | 0.5  |
| 3  | 0.1  | 1.0  | 1.0  |
| 4  | 0.2  | 2.0  | 2.0  |

表 2 MKN45 细胞抑瘤率正交试验结果

| No    | A      | B      | C      | D | E | 抑瘤率/% |
|-------|--------|--------|--------|---|---|-------|
| 1     | 1      | 1      | 1      | 1 | 1 | 0.0   |
| 2     | 1      | 2      | 2      | 2 | 2 | 25.4  |
| 3     | 1      | 3      | 3      | 3 | 3 | 51.7  |
| 4     | 1      | 4      | 4      | 4 | 4 | 42.8  |
| 5     | 2      | 1      | 2      | 3 | 4 | 53.6  |
| 6     | 2      | 2      | 1      | 4 | 3 | 42.6  |
| 7     | 2      | 3      | 4      | 1 | 2 | 43.1  |
| 8     | 2      | 4      | 3      | 2 | 1 | 53.2  |
| 9     | 3      | 1      | 3      | 4 | 2 | 49.0  |
| 10    | 3      | 2      | 4      | 3 | 1 | 41.2  |
| 11    | 3      | 3      | 1      | 2 | 4 | 59.7  |
| 12    | 3      | 4      | 2      | 1 | 3 | 53.7  |
| 13    | 4      | 1      | 4      | 2 | 3 | 34.5  |
| 14    | 4      | 2      | 3      | 1 | 4 | 45.5  |
| 15    | 4      | 3      | 2      | 4 | 1 | 49.5  |
| 16    | 4      | 4      | 1      | 3 | 2 | 58.6  |
| $k_1$ | 29.975 | 34.275 | 40.225 |   |   |       |
| $k_2$ | 48.125 | 38.675 | 45.550 |   |   |       |
| $k_3$ | 50.900 | 51.000 | 49.850 |   |   |       |
| $k_4$ | 47.025 | 52.075 | 40.400 |   |   |       |
| R     | 20.925 | 17.8   | 9.625  |   |   |       |

表 3 MKN45 细胞方差分析表

| 来源   | Type III SS | f  | $\bar{X}^2$ | F       | P     |
|------|-------------|----|-------------|---------|-------|
| 修正模型 | 2 287.435   | 9  | 254.159     | 1.612   | 0.289 |
| 截矩   | 30 997.337  | 1  | 30 997.337  | 196.549 | 0.000 |
| A    | 1 083.364   | 3  | 361.121     | 2.290   | 0.178 |
| B    | 949.643     | 3  | 316.548     | 2.007   | 0.215 |
| C    | 254.428     | 3  | 84.809      | 0.538   | 0.674 |
| 误差   | 946.245     | 6  | 157.708     |         |       |
| 总和   | 34 231.017  | 16 |             |         |       |
| 修正总和 | 3 233.680   | 15 |             |         |       |

注： $R^2 = 0.707$  (校正  $R^2 = 0.268$ )。

表 2 MKN45 细胞极差结果表明,3 个有效部位对 MKN45 细胞杀伤作用的主次顺序为大蒜油(1<sup>#</sup>) > 大蒜总多糖(2<sup>#</sup>) > 大蒜总皂苷(5<sup>#</sup>),最佳组合配比为  $A_3B_4C_3$ ,即大蒜油:大蒜总多糖:大蒜总皂苷 = 1:20:10。表 3 MKN45 细胞方差分析结果表明,三因素对实验结果均无显著性影响。

表 4 AGS 细胞因素水平表

| 水平 | A(1 <sup>#</sup> 药物浓度)<br>/g·L <sup>-1</sup> | B(2 <sup>#</sup> 药物浓度)<br>/g·L <sup>-1</sup> | C(5 <sup>#</sup> 药物浓度)<br>/g·L <sup>-1</sup> |
|----|--|--|--|
| 1  | 0  | 0  | 0  |
| 2  | 0.15   | 0.5  | 0.5  |
| 3  | 0.3  | 1.0  | 1.0  |
| 4  | 0.6  | 2.0  | 2.0  |

表 5 AGS 细胞抑瘤率正交试验结果

| No    | A      | B      | C      | D | E | 抑瘤率/% |
|-------|--------|--------|--------|---|---|-------|
| 1     | 1      | 1      | 1      | 1 | 1 | 0.9   |
| 2     | 1      | 2      | 2      | 2 | 2 | 47.8  |
| 3     | 1      | 3      | 3      | 3 | 3 | 48.7  |
| 4     | 1      | 4      | 4      | 4 | 4 | 37.4  |
| 5     | 2      | 1      | 2      | 3 | 4 | 54.5  |
| 6     | 2      | 2      | 1      | 4 | 3 | 61.3  |
| 7     | 2      | 3      | 4      | 1 | 2 | 35.1  |
| 8     | 2      | 4      | 3      | 2 | 1 | 47.9  |
| 9     | 3      | 1      | 3      | 4 | 2 | 43.6  |
| 10    | 3      | 2      | 4      | 3 | 1 | 30.2  |
| 11    | 3      | 3      | 1      | 2 | 4 | 58.6  |
| 12    | 3      | 4      | 2      | 1 | 3 | 51.1  |
| 13    | 4      | 1      | 4      | 2 | 3 | 28.4  |
| 14    | 4      | 2      | 3      | 1 | 4 | 37.3  |
| 15    | 4      | 3      | 2      | 4 | 1 | 44.4  |
| 16    | 4      | 4      | 1      | 3 | 2 | 52.1  |
| $k_1$ | 33.700 | 31.850 | 43.225 |   |   |       |
| $k_2$ | 49.700 | 44.150 | 49.450 |   |   |       |
| $k_3$ | 45.875 | 46.700 | 44.375 |   |   |       |
| $k_4$ | 40.550 | 47.125 | 32.775 |   |   |       |
| R     | 16.000 | 15.275 | 16.675 |   |   |       |

表 6 AGS 细胞方差分析表

| 来源   | Type III SS | f  | $\bar{X}^2$ | F       | P     |
|------|-------------|----|-------------|---------|-------|
| 修正模型 | 1 788.194   | 9  | 198.688     | 0.835   | 0.612 |
| 截矩   | 28 844.085  | 1  | 28 844.085  | 121.253 | 0.000 |
| A    | 579.100     | 3  | 193.033     | 0.811   | 0.532 |
| B    | 618.924     | 3  | 206.308     | 0.867   | 0.508 |
| C    | 590.170     | 3  | 196.723     | 0.827   | 0.525 |
| 误差   | 1 427.302   | 6  | 237.884     |         |       |
| 总和   | 32 059.581  | 16 |             |         |       |
| 修正总和 | 3 215.497   | 15 |             |         |       |

注： $R^2 = 0.556$  (校正  $R^2 = 0.110$ )

表 5 AGS 细胞极差结果表明,3 个有效部位对 AGS 细胞抑制率影响无明显差别,最佳组合配比为  $A_2B_4C_2$ ,即大蒜油:大蒜总多糖:大蒜总皂苷 = 1:13.3:3.3。表 6 AGS 细胞方差分析结果表明,三因素对实验结果均无显著性影响。

表 7 HGC-27 细胞因素水平表

| 水平 | A(1 <sup>#</sup> 药物浓度)<br>/g·L <sup>-1</sup> | B(2 <sup>#</sup> 药物浓度)<br>/g·L <sup>-1</sup> | C(5 <sup>#</sup> 药物浓度)<br>/g·L <sup>-1</sup> |
|----|--|--|--|
| 1  | 0  | 0  | 0  |
| 2  | 0.005  | 0.5  | 0.5  |
| 3  | 0.01   | 1.0  | 1.0  |
| 4  | 0.02   | 2.0  | 2.0  |

表8 HGC-27 细胞细胞抑瘤率正交试验结果

| No    | A      | B      | C      | D | E | 抑瘤率/% |
|-------|--------|--------|--------|---|---|-------|
| 1     | 1      | 1      | 1      | 1 | 1 | -1.0  |
| 2     | 1      | 2      | 2      | 2 | 2 | 68.8  |
| 3     | 1      | 3      | 3      | 3 | 3 | 64.2  |
| 4     | 1      | 4      | 4      | 4 | 4 | 56.7  |
| 5     | 2      | 1      | 2      | 3 | 4 | 71.1  |
| 6     | 2      | 2      | 1      | 4 | 3 | 30.5  |
| 7     | 2      | 3      | 4      | 1 | 2 | 56.0  |
| 8     | 2      | 4      | 3      | 2 | 1 | 65.4  |
| 9     | 3      | 1      | 3      | 4 | 2 | 69.3  |
| 10    | 3      | 2      | 4      | 3 | 1 | 55.6  |
| 11    | 3      | 3      | 1      | 2 | 4 | 36.5  |
| 12    | 3      | 4      | 2      | 1 | 3 | 70.0  |
| 13    | 4      | 1      | 4      | 2 | 3 | 57.3  |
| 14    | 4      | 2      | 3      | 1 | 4 | 66.0  |
| 15    | 4      | 3      | 2      | 4 | 1 | 70.7  |
| 16    | 4      | 4      | 1      | 3 | 2 | 35.6  |
| $k_1$ | 47.175 | 49.175 | 25.400 |   |   |       |
| $k_2$ | 55.750 | 55.225 | 70.150 |   |   |       |
| $k_3$ | 57.850 | 56.850 | 67.225 |   |   |       |
| $k_4$ | 57.400 | 56.925 | 56.400 |   |   |       |
| $R$   | 10.675 | 7.750  | 44.750 |   |   |       |

表9 HGC-27 细胞方差分析表

| 来源   | Type III SS | $f$ | $\bar{X}^2$  | $F$    | $P$   |
|------|-------------|-----|--------------|--------|-------|
| 修正模型 | 5397.129    | 9   | 599.681      | 7.060  | 0.014 |
| 截矩   | 47613.208   | 1   | 47613.208560 | 560    | 0.000 |
| A    | 299.100     | 3   | 99.700       | 1.174  | 0.395 |
| B    | 161.911     | 3   | 53.970       | 0.635  | 0.619 |
| C    | 4936.117    | 3   | 1645.372     | 19.371 | 0.002 |
| 误差   | 509.632     | 6   | 84.939       |        |       |
| 总和   | 53519.969   | 16  |              |        |       |
| 修正总和 | 5906.761    | 15  |              |        |       |

注: $R^2=0.914$  (校正  $R^2=0.784$ )。

表8结果表明,3个有效部位对HGC-27细胞抑制率影响的主次顺序为大蒜总皂苷>大蒜油>大蒜总多糖,最佳组合配比为 $A_3B_4C_2$ ,即大蒜油:大蒜总多糖:大蒜总皂苷1:200:50。表9方差分析结果表明,大蒜总皂苷对人胃癌HGC-27细胞抑制率的影响显著( $P<0.01$ ),大蒜油、大蒜总多糖对实验结果均无显著性影响。

综合上述结果,3种人胃癌细胞对大蒜3个有效部位组合的杀伤作用的敏感性不同,3个有效部

位组合对3种人胃癌细胞杀伤作用的最佳配比亦不相同。

### 3 讨论

每味中药含有多种成分,而在方剂中发挥作用的往往是某一类或几类成分,有些成分则是无效成分。利用现代先进的分离技术,将中药中的多种活性组分(有效部位)分离出来,进行配伍组合,明确主要部位,提高疗效,减少杂质干扰,降低毒副作用,这是中药现代化的目的所在<sup>[2-3]</sup>。本课题研究的大蒜虽然是单味中药,但其含有多种成分,主要为挥发油类、氨基酸类、糖类、苷类(硫苷类、甾体苷类)、肽类、酶类、维生素及微量元素等。课题通过化学分离、药效学指标筛选出功能组分(有效部位),以功能组分配伍创制物质基础基本清楚、具有质量标准的组分中药,体现中医药特色。课题以大蒜的3个有效部位组方,集大蒜的水溶性和脂溶性成分于一体,各部位抗癌的作用机制不同,既可以提高抗肿瘤的效果,又可以增强免疫功能,体现大蒜多环节、多靶点、整体调节的综合治疗特点。

前期笔者对大蒜提取的不同部位进行了细胞毒作用和免疫增强作用的考察,确定了大蒜油、大蒜总多糖、大蒜总皂苷3个有效部位<sup>[1]</sup>,我们运用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验对其组合应用的最佳配比进行了筛选,如表1~9所示:大蒜3个有效部位的不同配比的确对肿瘤细胞的杀伤效果有影响,3种人胃癌细胞对大蒜3个有效部位组合的杀伤作用的敏感性不同,3个有效部位组合对3种人胃癌细胞杀伤作用的最佳配比亦不相同。说明大蒜3个有效部位组合对3种人胃癌细胞杀伤作用的机制是不同的。体内抗肿瘤最佳配比和抗肿瘤机制有待于进一步探讨。

### [参考文献]

- [1] 薛欣,张立石,柏冬,等.大蒜3个有效部位联合应用对人胃癌MKN45细胞的杀伤作用[J].中国实验方剂学杂志.2011,17(14):152.
- [2] 王阶,郭丽丽,王永炎.中药方剂有效成(组)分配伍研究[J].中国中药杂志,2006,31(1):5.
- [3] 张伯礼,王永炎.方剂关键科学问题的基础研究—以组分配伍研制现代中药[J].中国天然药物.2005,3(5):258.

[责任编辑 古云侠]