

DOI:CNKI:11-3495/R. 20110524. 1343. 010

大蒜 3 个有效部位联合应用对人胃癌 MKN45 细胞的杀伤作用

薛欣,张立石,柏冬,王瑞海,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:观察大蒜有效部位及其组合物对人胃癌 MKN45 细胞杀伤的作用。方法:采用体外大鼠脾淋巴细胞增殖实验和 MTT 法测定细胞杀伤作用,筛选出具有免疫增强作用和细胞毒作用的大蒜有效部位进行组合,并对大蒜有效部位及其组合物对肿瘤细胞杀伤作用进行对比,运用正交试验筛选出大蒜 3 个有效部位联合应用对人胃癌 MKN45 细胞杀伤作用的最佳配比。结果:大蒜总多糖+大蒜总皂苷(2#+5#)对大鼠淋巴细胞增殖具有明显的促进作用,大蒜油、大蒜总多糖、大蒜总皂苷(1:1:1)的联合应用,其杀伤肿瘤细胞的作用(IC_{50} 13.3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)明显优于同等剂量的 2 个有效部位组合及大蒜油的单独用药(IC_{50} 35 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。对 MKN45 细胞杀伤作用的顺序为大蒜油 > 大蒜多糖 > 大蒜总皂苷,3 个有效部位组合最佳配比为大蒜油:大蒜多糖:大蒜总皂苷 1:2:1。结论:3 个部位联合应用对肿瘤细胞的杀伤作用最强,并且组合物最大优势是在扶正、祛邪的同时,可能减少大蒜油的刺激性。

[关键词] 大蒜油;大蒜总多糖;大蒜总皂苷;人胃癌 MKN45 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(2011)14-0152-04

Cytotoxic Effect of Combined Treatment of Three *Cirsii Japonici* Herba Components on Human Gastric Carcinoma MKN45 Cells

XUE Xin, ZHANG Li-shi, BAI Dong, WANG Rui-hai, JU Da-hong, LIU Li-mei*
(Institute of Basic Theory of Chinese Medicine, China academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the cytotoxic effect of joint treatment of three *Cirsii Japonici* Herba components on human gastric carcinoma MKN45 cells. **Method:** MTT assay of rat lymphocyte and MKN45 cells proliferation in vitro were used to determine the effective components of *Cirsii Japonici* Herba. Orthogonal test were used to determine the optimum proportion of three components of *Cirsii Japonici* Herba on human gastric carcinoma MKN45 cells. **Result:** The combined treatment of *Cirsii Japonici* Herba polysaccharides and saponins (2# + 5#) significantly improved the lymphocyte proliferation of the cells. The cytotoxic activity of the combined treatment of *Cirsii Japonici* Herba oil, polysaccharides and saponins (1:1:1) to MKN45 cells (IC_{50} 13.3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) was obviously stronger than that of the combination of any two components or *Cirsii Japonici* Herba oil used alone (IC_{50} 35 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). The order of cytotoxic activity of three components of *Cirsii Japonici* Herba is oil > polysaccharides > saponins. The optimum proportion of three *Cirsii Japonici* Herba components on MKN45 cells was oil :

[收稿日期] 2011-03-13

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

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

[网络出版时间] 2011-05-24 13:43

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110524.1343.010.html>

polysaccharides: saponins 1:2:1. **Conclusion:** The combined treatment of three *Cirsii Japonici Herba* components had the strongest killing activity to human gastric carcinoma MKN45 cells. Except the effects of Fuzheng and Quxie come from the combined treatment, cytotoxicity and irritation of the *Cirsii Japonici Herba* oil were also decreased by the combined treatment.

[Key words] *Cirsii Japonici Herba* oil; *Cirsii Japonici Herba* polysaccharides; *Cirsii Japonici Herba* saponins; human gastric carcinoma MKN45 cells; orthogonal test

大蒜为百合科葱属植物 *Allium sativum* L. 的鳞茎,性温,味辛辣,归脾、胃、肺经^[1],在我国民间药用已有几千年的历史,《本草纲目》中就有其药用价值的精辟记载。大蒜中含有多种活性成分,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^[2-3]。现代基础研究和临床实验证明:大蒜油、大蒜多糖、大蒜总皂苷都具有降血脂、抗真菌、抗病毒、抗凝血和保护心血管系统、增强机体免疫、抗氧化的活性^[2]。另外,临床已证明大蒜素能抑制进展期胃癌组织细胞生长、增殖,并促进胃癌细胞凋亡^[4]。大蒜素注射液可减轻顺铂化疗的不良反应,提高患者的生活质量^[5]。大蒜中含硫有机化合物通过多种途径抑制肿瘤细胞的增殖^[2]。大蒜总多糖以果聚糖为主,能拮抗非特异性肿瘤药物阿霉素所致心肌细胞凋亡,从而减轻对心肌细胞产生的毒性,保护心肌细胞^[6]。大蒜总皂苷主要为甾体皂苷,螺甾皂苷 eruboside-B 具有与甘草次酸相似的体内抗肿瘤作用,具有细胞毒作用,可对抗包括 BC1, Lu1, Col2, KB 和 KB-V 等多种细胞株^[7]。由于大蒜油具有强烈的刺激性,限制了其作为抗癌药的临床应用,因此,我们拟将大蒜的各有效部位进行组合,从对大鼠机体免疫功能及对人胃癌 MKN45 细胞杀伤作用的角度探讨抗肿瘤作用,以期获得最佳的抗肿瘤效果的同时尽可能的降低大蒜油的刺激性。

1 材料

1.1 药物与试剂 大蒜3个有效部位:大蒜油(1#)、大蒜总多糖(2#)、大蒜总皂苷(5#)由本所中药质量分析室制备并提供。顺铂由齐鲁制药有限公司生产(批号905011CF)。RPMI1640培养基、胎牛血清(Gibco公司)。胰蛋白酶(Amresco公司)。MTT, DMSO, 淋巴细胞分离液, ConA(刀豆球蛋白A)(Sigma公司)。WST溶液(快速细胞增殖试剂盒, Biovision公司)。

1.2 胃癌细胞株 MKN45细胞购自北京协和细胞

资源中心。

1.3 动物 SD大鼠,雄性,体重(180±10)g,清洁级,购于中国药品生物制品检定所实验动物中心,合格证号SCXK(京)2009-0017。

2 方法

2.1 体外大鼠脾淋巴细胞增殖实验 常规方法取脾,淋巴细胞分离液分离淋巴细胞,取 1×10^6 /mL脾细胞悬液100 μL加入96孔板,将不同质量浓度的大蒜不同部位提取物及其组合各100 μL加入实验孔,使终质量浓度分别为0.625, 0.156, 0.039, 0.009 8 g·L⁻¹,同时设立空白对照和阳性对照组。空白对照组加入100 μL无菌生理盐水,阳性对照组加入100 μL Con A(终质量浓度为5 μg·mL⁻¹)。每浓度设3个复孔,培养72 h。每孔加入5 g·L⁻¹WST溶液20 μL,继续培养4 h,在酶标仪450 nm波长读取各孔吸光度(A),以A代表淋巴细胞增殖水平。

2.2 MKN45细胞培养 MKN45细胞用含10%新生牛血清的1640培养(培养液中含有NaHCO₃ 2 g, 100 U·mL⁻¹青霉素, 100 μg·mL⁻¹链霉素),在37℃, 5% CO₂培养箱中培养,取对数生长期的细胞用于实验。

2.3 细胞增殖的抑制率及药物半数抑制浓度(IC₅₀) 收集对数生长期MKN45细胞,以 2×10^4 个/孔的密度加入96孔板,每孔100 μL。用不同质量浓度的大蒜不同部位提取物及其组合处理细胞,终质量浓度分别为10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 5, 0.156, ……0.000 64 g·L⁻¹,同时设空白对照、阴性对照和阳性对照组,顺铂作为阳性对照组,终质量浓度为25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78, 0.04, 0.02 μL·mL⁻¹。每浓度设3个复孔,培养48 h。每孔加入5 g·L⁻¹MTT溶液10 μL, 37℃培养4 h,去上清,每孔加入200 μL DMSO,震荡溶解,在酶标仪570 nm处测A,计算细胞抑制率,绘制细胞增殖抑制曲线并测定IC₅₀。

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

2.4 最佳配比筛选 大蒜 3 部位联合应用最佳配比的筛选用正交试验法。

3 结果

3.1 对大鼠淋巴细胞增殖的影响 与对照组比较,

大蒜总皂苷(5#)、大蒜多糖 + 大蒜总皂苷(2# + 5#)对大鼠淋巴细胞增殖具有明显的促进作用 ($P < 0.05$),其中以大蒜多糖 + 大蒜总皂苷(2# + 5#)的促淋巴细胞增殖作用更明显一些,见表 1。

表 1 大蒜 3 个有效部位及其组合不同质量浓度对大鼠脾淋巴细胞增殖(A)的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	0.625 g·L ⁻¹	0.156 g·L ⁻¹	0.039 g·L ⁻¹	0.009 8 g·L ⁻¹
1#	0.398 ± 0.004	0.404 ± 0.019	0.399 ± 0.013	0.395 ± 0.005
2#	0.383 ± 0.004	0.409 ± 0.018	0.411 ± 0.006	0.401 ± 0.005
5#	0.576 ± 0.029 ²⁾	0.451 ± 0.017	0.425 ± 0.005	0.414 ± 0.005
2# + 5#	0.591 ± 0.015 ²⁾	0.462 ± 0.013 ¹⁾	0.465 ± 0.003 ¹⁾	0.456 ± 0.014 ¹⁾

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$; 空白对照 $A = 0.427 \pm 0.008$, ConA 5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组 $A = 0.603 \pm 0.054$ ²⁾

3.2 对人胃癌 MKN45 细胞生长的抑制作用(IC₅₀)

总体上,1#,1# + 2#,1# + 5#,1# + 2# + 5#抑制 MKN45 细胞生长的 IC₅₀大致在同一水平,其中以大蒜油、大蒜多糖、大蒜总皂苷(1# + 2# + 5#)3 部位组合的抑制作用最强,见表 2。

表 2 大蒜 3 个部位及其组合对 MKN45 细胞生长的抑制作用

组别	IC ₅₀ /μg·mL ⁻¹
1#	35.0
2#	> 10 000.0
5#	1 293.3
2# + 5#	2 383.3
1# + 5#	43.7
1# + 2#	35.0
1# + 2# + 5#	13.3
顺铂	2.3

3.3 大蒜 3 个部位最佳配比筛选 为了筛选 1#,2#及 5#联合应用的最佳配比,我们选用 L₁₆(4⁵)正交表,以对胃癌 MKN45 细胞的抑瘤率作为考察指标,进行正交试验。其因素水平见表 3。

表 3 因素水平

水平	A	B	C
	1#/g·L ⁻¹	2#/g·L ⁻¹	5#/g·L ⁻¹
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

采用正交设计软件,对不同配伍中对胃癌细胞的抑制率进行直观分析,采用 SPSS 软件对不同配伍的抑制率进行方差分析,结果见表 4,5。

表 4 正交设计 L₁₆(4⁵)及抑瘤率直观分析

No	A	B	C	D	E	抑瘤率/%
1	1	1	1	1	1	-0.4
2	1	2	2	2	2	27.0
3	1	3	3	3	3	51.6
4	1	4	4	4	4	41.1
5	2	1	2	3	4	57.6
6	2	2	1	4	3	44.9
7	2	3	4	1	2	42.5
8	2	4	3	2	1	53.5
9	3	1	3	4	2	50.1
10	3	2	4	3	1	38.9
11	3	3	1	2	4	62.5
12	3	4	2	1	3	57.2
13	4	1	4	2	3	33.7
14	4	2	3	1	4	49.3
15	4	3	2	4	1	53.7
16	4	4	1	3	2	60.8
k ₁	29.825	35.241	41.952			
k ₂	49.649	40.022	48.882			
k ₃	52.171	52.588	51.118			
k ₄	49.364	53.158	39.057			
R	22.921	17.915	12.061			

方差分析结果表明,大蒜油(A)、大蒜总多糖(B)、大蒜总皂苷(C)三因素对实验结果均无显著性影响,各因素对人胃癌 MKN45 细胞抑制率的高低顺序为大蒜油(A) > 大蒜多糖(B) > 大蒜总皂苷(C),各因素取最佳水平,对于 MKN45 细胞杀伤作用的最佳配比组合为 A₃B₄C₃,即大蒜油:大蒜总多糖:大蒜

总皂苷1:2:1。

表5 方差分析

来源	SS	<i>f</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
修正模型	2 651.464	9	294.607	1.728	0.260
截矩	32 764.176	1	32 764.176	192.162	0.000
<i>A</i>	1 288.491	3	429.497	2.519	0.155
<i>B</i>	975.541	3	325.180	1.907	0.230
<i>C</i>	387.433	3	129.144	0.757	0.557
误差	1 023.019	6	170.503		
总和	36 438.658	16			
修正总和	3 674.483	15			

注:a $R^2 = 0.722$ (校正 $R^2 = 0.304$)。

4 讨论

大蒜的成分复杂,其活性成分主要是大蒜油和大蒜皂苷^[8],它们均具有抗肿瘤活性。大蒜油具有强烈的抗肿瘤活性,曾被用于各种肿瘤治疗的研究中。如表2所示:大蒜油对人胃癌MKN45细胞杀伤作用较强,IC₅₀为35 μg·mL⁻¹,但强烈的刺激性及气味限制了其抗肿瘤治疗的临床应用。因此,我们首先采用包合材料将大蒜油进行了包合,减少了刺激性和气味,并拟将大蒜的各个有效部位进行组合,以期在获得最佳的抗肿瘤效果的同时尽可能地降低大蒜油的刺激性。大蒜总皂苷是大蒜主要的活性部位之一,也具有一定的杀伤肿瘤细胞的作用(IC₅₀为1 293.3 μg·mL⁻¹),故其作为联合应用的有效部位之一。大蒜总多糖虽不具有直接杀伤肿瘤细胞的作用(IC₅₀>10 000.0 μg·mL⁻¹),但可增强免疫力,大蒜总多糖与大蒜总皂苷(2# + 5#)联合应用具有促淋巴细胞增殖的作用,故大蒜多糖也作为联合应用的有效部位之一。如表2所示:大蒜油、大蒜总多糖、大蒜总皂苷两两组合(1# + 2#, 1# + 5#)与同等剂量大蒜油的杀伤肿瘤细胞的作用相近;而大蒜油、大蒜总多糖、大蒜总皂苷(1:1:1)的联合应用,其杀伤肿瘤细胞的作用(IC₅₀为13.3 μg·mL⁻¹)明显优于同等剂量的两两组合及大蒜油单独应用(IC₅₀为35 μg·mL⁻¹)。由于3个有效部位联合应用时,大蒜油的用量只相当于大蒜油的单独用的1/3,故3个部位联合应用在不影响杀伤肿瘤细胞作用的同时,减少了大蒜油的用量,即减少了刺激性。

从3个有效部位的急性毒性试验结果来看(待发表的结果),大蒜油小鼠口服LD₅₀(582.10 ± 62.87) mg·kg⁻¹,大蒜总皂苷小鼠口服LD₅₀(17.09 g·kg⁻¹),大蒜总多糖小鼠口服最大给药剂量动物没

有死亡。综合3个有效部位急性毒性结果和体外对肿瘤细胞的抑制作用可以看出,大蒜油、大蒜总多糖、大蒜总皂苷3个有效部位组合在一起(1# + 2# + 5#)与同剂量大蒜油(1#)相比,对肿瘤的抑制作用相近,但可能毒性更小,因为总多糖和总皂苷的LD₅₀小于大蒜油。由此推测,3个部位组合在一起最大的优势是在扶正、祛邪的同时,能减少刺激性。

本研究以大蒜的3个有效部位组方,集大蒜的水溶性和脂溶性成分在一起,抗癌的作用机制不同,将体现大蒜多靶点综合治疗的特点。

中药配伍对中药的药效有很大的影响,同一种中药的不同成分种类配伍对药效也有很大的影响,我们运用L₁₆(4⁵)正交试验对大蒜油、大蒜总多糖、大蒜总皂苷联合应用的最佳配比进行了筛选,如表4、5所示:对人胃癌MKN45细胞的抑制率的高低顺序为大蒜油(*A*)>大蒜多糖(*B*)>大蒜总皂苷(*C*),对于MKN45细胞杀伤作用的最佳配伍组合为大蒜油:大蒜多糖:大蒜总皂苷1:2:1。由此可见,大蒜组分的不同配比的确对肿瘤细胞的杀伤效果有影响,这也符合中药用药整体协同的规律。

[参考文献]

- [1] 中国药典[S]. 二部. 北京:化学工业出版社,2010:附录29.
- [2] 王本祥. 现代中药药理与临床[M]. 天津:天津科技翻译出版公司,2004:124.
- [3] 赵余庆,徐晶,高志,等. 不同产地大蒜中微量元素的研究[J]. 中草药,1993,28(2):77.
- [4] 张志栋,李勇,焦志凯,等. 胃镜下局部注射大蒜素对进展期胃癌细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2008,28(2):108.
- [5] 刘文利,王惠兰. 大蒜素注射液减轻化疗不良反应及提高患者生活质量的临床观察[J]. 河北医药,2009,31(4):414.
- [6] 余薇,吴基良,汪晖,等. 大蒜多糖对阿霉素所致心肌细胞损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报,2005,21(9):1104.
- [7] Nishino H, Yoshioka K, Iwashima A, et al. Glycyrrhetic acid hibits tumor-promoting activity of teleocidin and 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two stage mouse skin carcinogenesis[J]. Jpn J Cancer Res, 1986,77:33.
- [8] 罗红. 大蒜总皂苷的抗缺氧生物活性作用及机制研究[D]. 中国博士学位论文全文数据库,2009,(07).

[责任编辑 何伟]