

# 毛冬瓜对肝癌细胞株 SMMC-7721 的抑制作用

王晓明, 杨祖立, 施 意, 许传莲

(浙江理工大学生命科学院分子酶学与蛋白质组学实验室, 杭州 310018)

**摘 要:** 研究用系统溶剂法对毛冬瓜 80% 甲醇微波提取物进行初步分离, 应用 MTT 比色法测定毛冬瓜不同溶剂的提取部位对肝癌细胞株 SMMC-7721 的生长抑制作用。结果表明, 氯仿提取物和乙酸乙酯提取物表现出显著的抑制作用( $IC_{50}$  分别为  $221.82 \mu\text{g/mL}$  和  $563.64 \mu\text{g/mL}$ )。对于正常肝细胞株 L-02, 氯仿提取物也具有显著抑制作用, 乙酸乙酯提取物的抑制作用则不明显。

**关键词:** 毛冬瓜; 系统溶剂法; MTT 法; 抗肿瘤活性

**中图分类号:** R285.5 **文献标识码:** A

## 0 引 言

毛冬瓜(*Actinidia eriantha* Benth.) 又名毛花杨桃, 为猕猴桃科猕猴桃属植物毛花杨桃的根及叶。生于山坡、山谷、溪边及林边灌木丛中, 分布于浙江、福建、广西等地。其根全年采集, 淡微辛, 其叶夏秋采集, 微苦辛。《中药大辞典》记载毛冬瓜有清热解毒, 治肺热失音、胃癌、鼻咽癌、乳癌等作用<sup>[1]</sup>。肝癌是较为常见的恶性肿瘤, 我国每年死于肝癌的人数约占全世界的一半。作为浙江省民间常用的治疗癌症的草药, 当前对于毛冬瓜化学成分及其生物活性有一些研究<sup>[2-6]</sup>, 其中前者的主要研究对象是三萜类和多糖类, 后者的主要研究对象是抗肿瘤活性和免疫调控功能。本实验以肝癌细胞株 SMMC-7721 作为体外筛选模型, 进行毛冬瓜各提取部位的抗肿瘤活性研究, 并以正常肝细胞株 L-02 为阳性对照细胞、抗癌药阿霉素为阳性对照药, 以确定有效化学部位, 为进一步分离毛冬瓜中的抗癌单体化合物及其作用机制研究提供依据。

## 1 材料试剂和仪器

### 1.1 药 材

样品于 2008 年 10 月采于浙江遂昌, 经浙江中医药大学陈瑞林副教授鉴定为猕猴桃科猕猴桃属植物毛冬瓜(*Actinidia eriantha* Benth.)。

### 1.2 细胞株

肝癌细胞株 SMMC-7721 和阳性对照肝细胞株 L-02 由浙江理工大学新元医学与生物技术研究提供。

### 1.3 药品与试剂

DMEM 培养基、FBS(Gibco 公司); MTT、DMSO(Sigma 公司); 阿霉素(Alexis 公司); 甲醇、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇等均为分析纯试剂(杭州华东医药公司)。

### 1.4 仪 器

R-250 旋转蒸发仪(上海申胜生物技术有限公司); 低温冷冻干燥机(德国 Marin Christ 公司); HWL07-

3 型微波炉(杭州博泉生物科技有限公司);DJ-10A 型高速粉碎机(上海鼎广机械设备有限公司);SHZ-DIII 型循环水真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司);Forma Series II 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(Thermo 公司);酶标仪(Tecan 公司);Forma -80℃ ULT Freezer 型超低温冰箱(Thermo 公司);TE2000-U 型荧光显微镜(Nikon 公司);TS100 型荧光显微镜(Nikon 公司)。

## 2 方 法

### 2.1 毛冬瓜提取物及部位的制备

毛冬瓜 1 kg,粉碎并过 60 目筛后置于三角瓶中,按照料液比 1 g/5mL 加入 80%甲醇(MeOH),浸泡过夜。进行微波提取,提取条件:温度 50℃,功率 180 W,重复提取 3 次,每次 5 min,过滤合并提取液。用氯仿(Chlo)、乙酸乙酯(EtOAc)、水饱和正丁醇(*n*-BuOH)依次对提取液进行萃取,工艺流程见图 1。

### 2.2 抗肿瘤活性测试样品的配制

毛冬瓜不同溶剂的提取部位及总提取物用二甲基亚砜(DMSO)溶解,再用培养基稀释,浓度设置为:Chlo 层为 4.5、45、225、450 μg/mL;EtOAc 层和 *n*-BuOH 层分别为 10、100、500、1 000 μg/mL;MeOH 总提物为 6、60、300、600 μg/mL。阳性对照阿霉素用 DMSO 溶解后再用培养基稀释,浓度为 0.028、0.055、0.11、0.22、0.44、0.88 μg/mL。

### 2.3 MTT 比色法测试毛冬瓜不同部位抗肿瘤活性

将肝癌细胞株 SMMC-7721 和正常肝细胞株 L-02 培养于 10 cm 培养皿中,培养液为含有 10% FBS 的 DMEM,培养条件为 37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度,每隔 2 d 用 0.25% 的胰酶消化传代。将对数生长期(贴壁长满 80%左右)的细胞消化后,在 96 孔板于每孔加入 100 μL 细胞液,细胞密度为 10 000 个/孔,空白对照组只加 100 μL 培养液。96 孔板细胞培养过夜后,空白对照组再加 100 μL 培养液,溶剂对照组每孔加入 100 μL 1% DMSO,受试细胞组每孔加入不同浓度的毛冬瓜各提取部位溶液 100 μL。96 孔板每孔总体系为 200 μL,每个浓度设 3 个重复孔,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中,继续培养 72 h 后每孔加入 10 μL 的 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)溶液(5 mg/mL),继续培养 4 h,待针状结晶形成后弃上清,每孔再加入 150 μL DMSO,慢摇 10 min 左右,使结晶充分溶解。

在波长 595 nm 处测定各孔吸光值,并按下列公式计算细胞存活率:

存活率 =  $\frac{\text{实验组吸光度 A 均值} - \text{空白对照组吸光度 A 均值}}{\text{细胞对照组吸光度 A 均值} - \text{空白对照组吸光度 A 均值}} \times 100\%$

实验重复 3 次,应用统计学软件 DPS 进行显著性检验和方差分析,求得半抑制浓度 IC<sub>50</sub>。

## 3 结 果

### 3.1 系统溶剂法获得的各提取部位

对不同溶剂的提取部位称重,计算得率(相当于总提物),结果见表 1。

### 3.2 阳性对照药阿霉素对肝癌细胞株 SMMC-7721 和正常肝细胞株 L-02 的作用

以临床抗癌药阿霉素为阳性对照,结果如表 2 所示,对于肝癌细胞株 SMMC-7721,在所设定的浓度范围内,表现为极其显著的剂量依赖性抑制作用,IC<sub>50</sub> 为 0.18 μg/mL。阿霉素对正常肝细胞株 L-02 也具有抑制作用,但未在所设定的浓度梯度范围内求得 IC<sub>50</sub>。

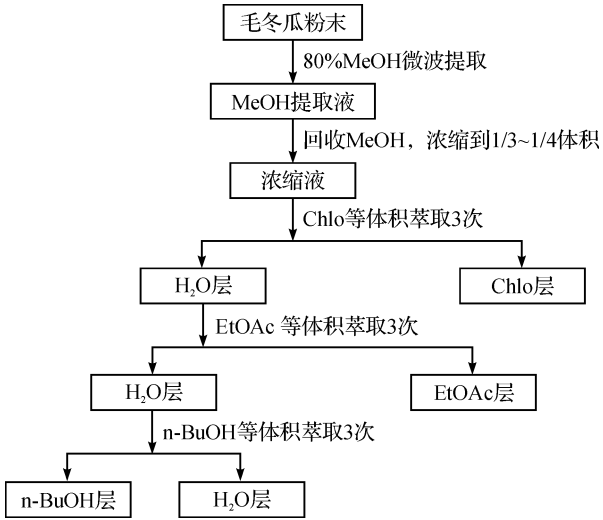


图 1 毛冬瓜化学提取工艺流程

表 1 各提取部位净重及得率

| 不同溶剂提取部位       | 净重/g | 得率/% |
|----------------|------|------|
| Chlo           | 1.32 | 0.13 |
| EtOAc          | 0.71 | 0.07 |
| <i>n</i> -BuOH | 5.80 | 0.58 |

3.3 毛冬瓜总提取物及各提取部位对肝癌细胞株 SMMC-7721 的抑制作用

毛冬瓜氯仿层(Chlo)、乙酸乙酯层(EtOAc)、水饱和正丁醇层(*n*-BuOH)和总提取物(MeOH)都对肝癌细胞株 SMMC-7721 具有显著的剂量依赖性抑制作用,如表 3 所示。其中氯仿层作用最显著,IC<sub>50</sub>为 221.82 μg/mL,乙酸乙酯层作用也较显著,IC<sub>50</sub>为 563.64 μg/mL,水饱和和正丁醇层(*n*-BuOH)和总提取物(MeOH)则未在设定的浓度范围内得到其 IC<sub>50</sub>。培养 72 h 后,SMMC-7721 未加药的细胞状态如图 2(a)所示,在氯仿层和乙酸乙酯层 IC<sub>50</sub> 的浓度作用下的细胞状态分别如图 2(b)、图 2(c)所示(放大倍数为 100×),加药组细胞数量减少,呈片状和梭状。加入 MTT 2.5 h 后,SMMC-7721 未加药的细胞状态如图 3(a)所示,在氯仿层和乙酸乙酯层 IC<sub>50</sub> 的浓度作用下的细胞状态分别如图 3(b)、图 3(c)所示(放大倍数为 200×),加药组细胞变黑、死亡。

表 3 SMMC-7721 细胞株经各部位处理后的存活率

| 剂量/<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | 存活率/%( $\bar{x}\pm s$ ) | 剂量/<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | 存活率/%( $\bar{x}\pm s$ ) |                    | 剂量/<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | 存活率/%( $\bar{x}\pm s$ ) |
|-----------------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------|--------------------|-----------------------------|-------------------------|
|                             | Chlo                    |                             | EtOAc                   | <i>n</i> -BuOH     |                             | MeOH                    |
| 0                           | 100.00                  | 0                           | 100.00                  | 100.00             | 0                           | 100.00                  |
| 4.5                         | 99.42 $\pm$ 6.62        | 10                          | 98.06 $\pm$ 5.02        | 100.26 $\pm$ 5.82  | 6                           | 99.49 $\pm$ 10.11       |
| 45                          | 86.22 $\pm$ 7.31*       | 100                         | 90.00 $\pm$ 8.27        | 101.35 $\pm$ 6.54  | 60                          | 89.04 $\pm$ 7.93        |
| 225                         | 45.05 $\pm$ 4.40**      | 500                         | 55.19 $\pm$ 3.41**      | 91.13 $\pm$ 2.14   | 300                         | 84.74 $\pm$ 2.62        |
| 450                         | 14.01 $\pm$ 3.54**      | 1000                        | 19.38 $\pm$ 8.38**      | 85.12 $\pm$ 2.18** | 600                         | 78.85 $\pm$ 3.82*       |

注: \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ ,与空白对照组相比

表 2 细胞经阿霉素处理后的存活率

| 阿霉素剂量<br>/(μg/mL) | 细胞存活率/%( $\bar{x}\pm s$ ) |              |
|-------------------|---------------------------|--------------|
|                   | SMMC-7721                 | L-02         |
| 0                 | 100.00                    | 100.00       |
| 0.028             | 96.29±1.57                | 99.66±2.42   |
| 0.055             | 83.80±2.38**              | 95.70±1.26   |
| 0.11              | 76.55±4.51**              | 93.15±1.78*  |
| 0.22              | 50.07±4.11**              | 91.36±2.43** |
| 0.44              | 12.90±2.64**              | 84.24±1.46** |
| 0.88              | 4.26±2.16**               | 78.17±2.84** |

注: \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ ,与空白对照组相比

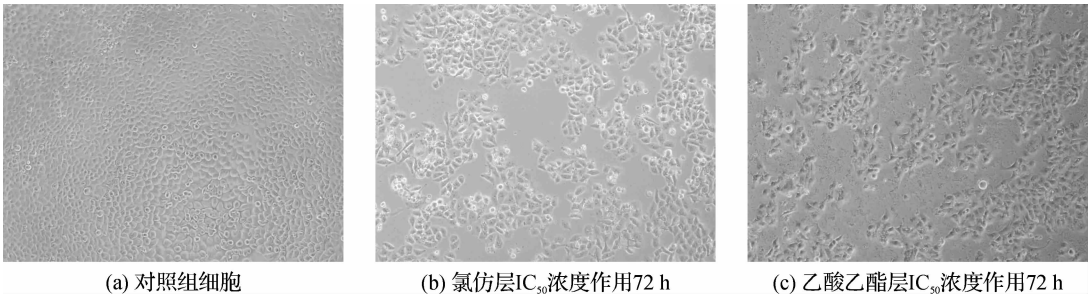


图 2 药物作用前后 SMMC-7721 细胞形态变化(放大倍数 100×)

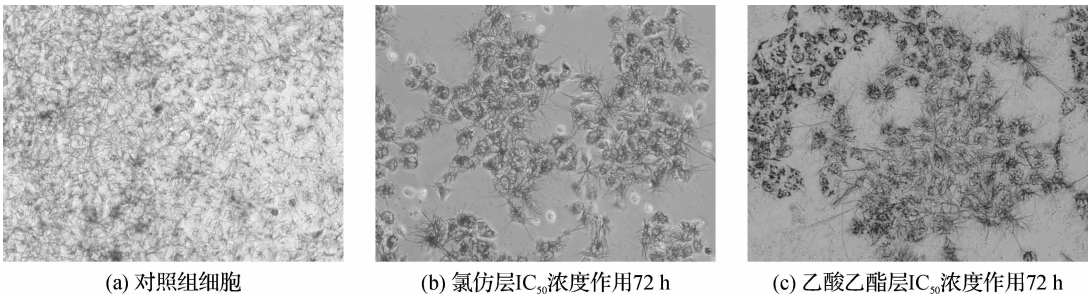


图 3 加入 MTT 2.5 h 后 SMMC-7721 细胞形态变化(放大倍数 200×)

3.4 毛冬瓜总提取物及各提取部位对正常肝细胞株 L-02 的抑制作用

从表 4 中可以看出,氯仿层(Chlo)对正常肝细胞株 L-02 具有一定的抑制作用;乙酸乙酯层(EtOAc)、水饱和和正丁醇层(*n*-BuOH)、总提取物(MeOH)几乎无抑制作用。培养 72 h 后,L-02 未加药的细胞状态如图 4(a)所示,经氯仿层(Chlo)最大剂量 450 μg/mL 作用后的细胞状态如图 4(b)所示(放大倍数为 100×),可见细胞数量有所减少。加入 MTT 2.5 h 后,未加药的 L-02 细胞状态如图 5(a)所示,经氯仿层(Chlo)最大剂量作用后的细胞状态如图 5(b)所示(放大倍数为 200×),可见受药物作用后部分细胞变黑、死亡。

表 4 L-02 细胞株经各部位处理后的存活率

| 剂量/<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | 存活率/%( $\bar{x}\pm s$ ) | 剂量/<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | 存活率/%( $\bar{x}\pm s$ ) |                  | 剂量/<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | 存活率/%( $\bar{x}\pm s$ ) |
|-----------------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------|------------------|-----------------------------|-------------------------|
|                             | Chlo                    |                             | EtOAc                   | <i>n</i> -BuOH   |                             | MeOH                    |
| 0                           | 100.00                  | 0                           | 100.00                  | 100.00           | 0                           | 100.00                  |
| 4.5                         | 100.33 $\pm$ 2.82       | 10                          | 100.61 $\pm$ 3.65       | 99.26 $\pm$ 3.87 | 6                           | 103.57 $\pm$ 3.67       |
| 45                          | 100.57 $\pm$ 3.13       | 100                         | 95.68 $\pm$ 2.43        | 98.58 $\pm$ 4.19 | 60                          | 100.95 $\pm$ 3.08       |
| 225                         | 92.15 $\pm$ 4.40        | 500                         | 93.23 $\pm$ 1.61        | 95.89 $\pm$ 6.29 | 300                         | 98.29 $\pm$ 1.61        |
| 450                         | 58.65 $\pm$ 8.06**      | 1000                        | 90.61 $\pm$ 2.52        | 90.67 $\pm$ 3.51 | 600                         | 99.71 $\pm$ 3.61        |

注: \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ ,与空白对照组相比

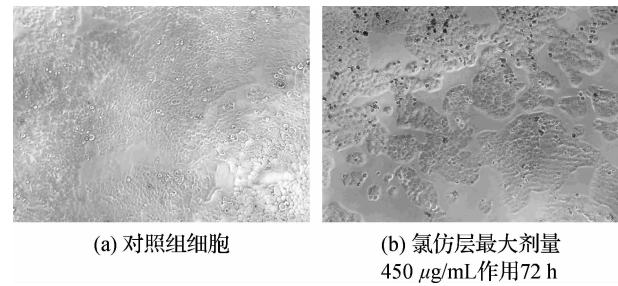


图 4 药物作用前后 SMMC-7721 细胞形态变化  
(放大倍数 100 $\times$ )

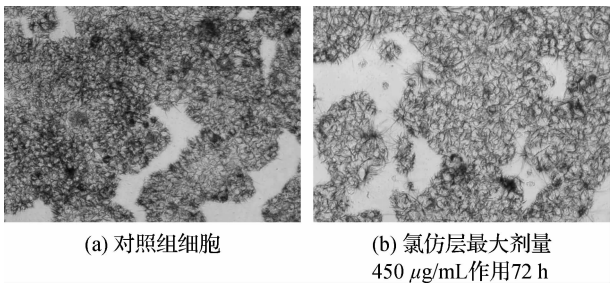


图 5 加入 MTT 2.5 h 后 SMMC-7721 细胞形态  
变化(放大倍数 200 $\times$ )

4 讨 论

天然药物有效成分的提取方法有热提取法,渗漉法<sup>[7]</sup>,超声提取法<sup>[8]</sup>和微波提取法<sup>[9]</sup>等。其中微波辅助提取的原理是通过高频电磁波直接与待分离物的作用,使被提取物与样品基体快速分离,具有速度快、效率高等优点。本实验采用微波提取法与系统溶剂法<sup>[10-11]</sup>,获得毛冬瓜不同溶剂的提取物。

阳性对照药阿霉素属于临床抗生素类药物,其抗癌机制是嵌入 DNA 的相邻碱基对中使 DNA 链裂解。以 L-02 作为阳性对照细胞株,可以在一定程度上反映出药物对正常肝细胞的细胞毒作用。由于在毛冬瓜各提取部位的最高药物浓度中,溶剂 DMSO 的浓度为 1%,已对细胞有所损伤,所以设置溶剂对照组,在数据处理时扣除此部分误差。阳性对照药为阿霉素,其最大剂量 0.88  $\mu\text{g/mL}$  的 DMSO 溶剂终浓度为 0.075%,对细胞损伤可以忽略,因而未设溶剂对照。

近年来天然药物以其疗效好、毒副性小等优点在肿瘤治疗中应用广泛。有研究发现,氧化苦参碱能通过基因表达调控促进肝癌细胞的凋亡<sup>[12]</sup>。毛冬瓜作为民间抗肿瘤药物,当前国内外对其研究已有数篇报道。本研究以肝癌细胞株 SMMC-7721 为筛选模型,通过活性跟踪 MTT 法对毛冬瓜各提取部位进行了抗肿瘤活性筛选。结果显示,氯仿层虽然对肝癌细胞株具有极其显著的抑制作用,但对正常肝细胞株 L-02 也有一定的抑制作用,这应该是药物自身的作用结果,与溶剂氯仿无关。因为氯仿层经过浓缩回收溶剂、真空冻干后得到药粉,然后在配置成溶液的过程中又经过进一步稀释,已经不含残留氯仿。乙酸乙酯层对 SMMC-7721 同样具有较显著的抑制作用,但对 L-02 几乎无抑制作用。经两者作用后,肝癌细胞数量减少,呈片状和梭状,可能是它们诱导了细胞凋亡。本文对毛冬瓜抗肝癌活性进行了初步研究,结果显示氯仿层和乙酸乙酯层是毛冬瓜具有抗肝癌活性的主要部位,在后续的实验中将对其活性物质进行分离与鉴定,以明确具有抗癌活性的药物分子,并对其作用机制进行进一步研究。

参考文献:

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1977: 440.  
[2] Xu Hai-shun, Wu Yuan-wen, Xu Shi-fang, et al. Antitumor and imminomodulatory activity of polysaccharides from the roots of Actinidia eriantha[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2009, 125: 310-317.  
[3] Sun Hong-xiang, Wang Hui, Xu Hai-shun, et al. Novel polysaccharide adjuvant from the roots of Actinidia eriantha with dual Th1 and Th2 potentiating activity[J]. Vaccine, 2009, 27: 3984-3991.

- [4] 郭 维, 范玉兰, 郑绿茵. 毛冬瓜根挥发油化学成分分析[J]. 广西植物, 2009, 29(4): 564-567.
- [5] Huang C S, Zhang Z X, Li G S, et al. Isolation and identification of two new triterpenes from *Actinidia eriantha*[J]. *Acta Botanica Yunnanica*, 1988, 10: 93-100.
- [6] Huang C S, Chen X H. Isolation and identification of a new triterpene from *Actinidia eriantha* Benth[J]. *Natural Product Research and Development*, 1992, 4: 27-30.
- [7] 桑 彤, 谢培德. 延胡索渗漉提取工艺的优选[J]. 基层中药杂志, 2000, 14(3): 35-36.
- [8] 秦秀蓉, 汤 燕. 超声法提取延胡索有效部分的工艺研究[J]. 成都中医药大学学报, 2005, 28(4): 47-52.
- [9] 段 蕊, 王 蓓, 时海峡. 微波法提取银杏叶黄酮最佳工艺的研究[J]. 淮海工学院学报, 2001, 10(3): 46-48.
- [10] 王 彬, 王 锐, 贾正平, 等. 瑞香狼毒系统溶剂法分离提取部位的体外抗肿瘤活性[J]. 中药材, 2004, 27(5): 355-357.
- [11] 韩 伟, 郝金玉, 薛泊勇. 微波辅助提取青蒿素的研究[J]. 中成药, 2002, 24(2): 83-86.
- [12] Song G, Luo Q, Qin J, et al. Effects of oxymatrine on proliferation and apoptosis in human hepatoma cells[J]. *Colloids Surf B Bioiniferfaces*, 2006, 48(1): 1-5.

## The Inhibiting Effect of *Actinidia Eriantha* Benth. on Liver Cance Line SMMC-7721

WANG Xiao-ming, YANG Zu-li, SHI Yi, XU Chuan-lian

(Lab of Molecular Enzyme & Proteomics, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** Using the method of systematic solution, we makes elementary isolation of the extracts of *Actinidia eriantha* Benth. extracted by 80% menthol with the assistance of microwave. Then the authors studies their inhibiting effect on the liver cancer line SMMC-7721 by MTT. The results show that the Chloroform extract has the most striking inhibition effect, and its  $IC_{50}$  is 221.82  $\mu\text{g/mL}$ . Then is the Ethyl Acetate extract and its  $IC_{50}$  is 563.64  $\mu\text{g/mL}$ . As for the normal liver cell line L-02, the Chloroform extract also has an inhibition effect, while the inhibition effect of Ethyl Acetate is not striking.

**Key words:** *actinidia eriantha* benth. ; systematic solution; MTT; anti-cancer activity

(责任编辑: 许惠儿)