参考文献

[1] Choi AJ, Ryter SW. Autophagy in inflammatory diseases[J]. Int J Cell Biol, 2011, 2011: 732 – 798.

[2] Palomo I, Contreras A, Alarcon LM, et al. Elevated concentration of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in individuals with metabolic syndrome[J]. Nitric Oxide, 2011, 24(4): 224 – 228.

[3] 胡丽贞,李雅杰,薛宏凤,等. 莱菔硫烷对高脂环境下心肌细胞保护作用[J]. 中国公共卫生, 2013(10): 1466 – 1469.

[4] Wells SM, Holian A. Asymmetric dimethylarginine induces oxidative and nitrosative stress in murine lung epithelial cells[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007, 36(5): 520 – 528.

[5] Chen Y, Xu X, Sheng M, et al. PRMT-1 and DDAHs-induced ADMA upregulation is involved in ROS- and RAS-mediated diabetic retinopathy[J]. Exp Eye Res, 2009, 89(6): 1028 – 1034.

[6] Tain YL, Huang LT. Restoration of asymmetric dimethylarginine-nitric oxide balance to prevent the development of hypertension[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(7): 11773 – 11782.

[7] Ando R, Ueda S, Yamagishi S, et al. Involvement of advanced glycation end product-induced asymmetric dimethylarginine generation in endothelial dysfunction[J]. Diab Vasc Dis Res, 2013, 10(5): 436 – 441.

[8] Shirakawa T, Kako K, Shimada T, et al. Production of free methylarginines via the proteasome and autophagy pathways in cultured cells[J]. Mol Med Rep, 2011, 4(4): 615 – 620.

收稿日期: 2014 – 11 – 27 (吴少慧编辑 郑新校对)

· 实验研究 ·

赖氨熊果酸增溶及对肝癌细胞增殖抑制作用*

张丽娟[1], 钟家亮[2], 张宜欣[1]

摘 要: 目的 制备赖氨熊果酸并探讨其增溶作用及对肝癌 Bel7402 细胞增殖的抑制作用。**方法** 采用共研磨法制备赖氨熊果酸,采用粉末 X 射线衍射法(PXRD)、红外光谱(IR)法对赖氨熊果酸进行表征,采用高效液相色谱法(HPLC)测定赖氨熊果酸的增溶作用,采用噻唑蓝(MTT)法观察赖氨熊果酸对肝癌 Bel7402 细胞增殖的抑制效果。**结果** 共研磨法制备赖氨熊果酸得率为 95.2%,纯度为 98.2%,赖氨熊果酸的溶解度为 49.69 μg/mL,明显高于赖氨酸 – 熊果酸物理混合物在水中的溶解度 1.87 μg/mL;赖氨熊果酸对肝癌 Bel7402 细胞增殖的抑制作用明显增强,在浓度 10、20 μmol/L 时,与相同浓度 5-FU(阳性对照)比较,赖氨熊果酸对肝癌 Bel7402 细胞的抑制作用差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 赖氨熊果酸增溶作用明显,对肝癌细胞增殖具有明显抑制作用,作为新一代高效低毒的抗肿瘤药物具有一定开发价值。

关键词: 赖氨熊果酸; 增溶作用; 高效液相色谱(HPLC); 噻唑蓝(MTT)法; 抗肿瘤活性

中图分类号: R 735.7 **文献标志码**: A **文章编号**: 1001-0580(2016)10-1322-04 DOI: 10.11847/zgggws2016-32-10-07

Preparation, characterization and antitumor effect of ursolic acid lysinate

ZHANG Li-juan*, ZHONG Jia-liang, ZHANG Yi-xin (* *Department of Biochemistry, Molecular Biology and Cell Biology, Yanjing Medical College, Capital Medical University, Beijing* 101300, China)

Abstract: Objective To prepare and characterize ursolic acid lysinate, and to study the antitumor effect of ursolic acid lysinate on human hepatoma cell line Bel7402. **Methods** Ursolic acid lysinate was prepared by co-grinding 1:1 molar mixture of ursolic acid and lysine for 12 hours. Characterization of ursolic acid lysinate was achieved by powder X-ray diffraction and infrared spectroscopy techniques. High performance liquid chromatography (HPLC) method was used to study the solubilization of ursolic acid lysinate. The 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method was used to assay the antitumor activity of ursolic acid lysinate. **Results** The solubility of ursolic acid lysinate was improved significantly as compared to ursolic acid in water. The antitumor activity on human hepatoma cell line Bel7402 of ursolic acid lysinate was enhanced significantly than that of ursolic acid. **Conclusion** The water solubility and antitumor effect on human hepatoma cell line of ursolic acid lysinate may be potentially useful for its application as a new pharmaceutical formulation in cancer treatment in the future.

Key words: ursolic acid lysinate; solubilization; HPLC; MTT; antitumor activity

熊果酸又名乌索酸、乌苏酸,属于 α – 香树脂醇型非极性的五环三萜类化合物,是女贞子、山楂、陆英等多种药用植物中的重要化学成分,具有抗糖尿病[1]、降脂[2]、抗炎[3]、免疫调节[4]、抗心血管疾病[5]等多种生物学效应,许多含有熊果酸的中药材在临床用于保肝、镇痛、强心等方面。近年来研究发现,熊果酸具有预防肿瘤形成、诱导肿瘤细胞凋亡、阻滞肿瘤细胞增殖周期、诱导肿瘤细胞分化、防止肿

* **基金项目**: 北京市教育委员会科技发展计划面上项目(KM200910025014); 首都医科大学燕京医学院科研启动基金(2015)

作者单位: 1. 首都医科大学燕京医学院生化分子生物学与细胞生物学教研室,北京 101300; 2. 上海医药工业研究院分析测试中心

作者简介: 张丽娟(1970 –),湖北公安人,女,副教授,硕士,主要从事中药作用机理与分子生物学研究。

数字出版日期: 2015 – 11 – 12 14:36

数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20151112.1436.018.html

瘤细胞侵袭转移等作用[6-12]。但由于熊果酸具有强疏水性,其生物利用度很低;另外,含有羧基的药物对胃肠道刺激较大,而且羧基在人体中的代谢不稳定,限制其应用。研究表明,熊果酸 3 位羟基和 17 位羧基是熊果酸维持抗肿瘤活性的关键基团[13]。虽从熊果酸母体结构入手进行化学修饰和结构改造,设计合成了许多有效的熊果酸衍生物[14-17],但是这些衍生物并不能完全改善熊果酸在水中的溶解度。本研究利用赖氨酸与熊果酸成盐,观察在水中溶解度及对人肝癌 Bel7402 肿瘤细胞的体外抑制作用,旨在为熊果酸的进一步开发利用提供技术支持。

1　材料与方法

1.1　主要试剂与仪器　人肝癌细胞株 bel7402(中国医学科学院肿瘤医院);1640 培养基(上海博耀生物科技有限公司);熊果酸(南京泽朗医药科技有限公司,纯度≥98.5%);赖氨酸(北京欣经科生物技术有限公司);熊果酸对照品(中国食品药品检定研究院,110742 ~ 201220);乙腈(色谱纯,美国 Fisher CHEMICAL 有限公司)。Bruker D8 ADVANCE 粉末衍射仪(德国布鲁克有限公司);Nicolet 5700 型傅里叶变换红外光谱仪(美国 Thermo Nicolet 公司);Angilent 1200 高效液相色谱仪(美国安捷伦有限公司),WD-2102A 型酶标仪(北京六一仪器厂)。

1.2　赖氨熊果酸制备　精密称取等摩尔比的熊果酸(2 283.50 mg)与赖氨酸(730.95 mg)混合均匀,于 25 ℃置于球磨机中研磨 12 h,收集产物,即得白色粉末状赖氨熊果酸(2 868.34 mg),得率为 95.2%,经高效液相色谱(HPLC)检测其纯度为 98.2%。

1.3　赖氨熊果酸表征

1.3.1　粉末 X 射线衍射分析(PXRD)　X 射线衍射图谱的摄取采用粉末衍射仪,测定条件为 vertical goniometer,Ni-filter 单色器,Theta/Theta 连续扫描,电压 40 kV,电流 40 mA,扫描速度 8°/min,LynxEye 检测器,扫描范围 3° ~ 80°。

1.3.2　傅立叶红外光谱分析　采用衰减全反射傅立叶变换红外光谱仪(attenuated total reflectance-fourier transform infrared spectroscopy, ATR-FTIR)测定,光谱范围 4 000 ~ 650 cm^{-1},分辨率为 4.000 cm^{-1},扫描次数 16 次,测定红外吸收光谱。

1.4　增溶作用分析　HPLC 色谱柱为 Agilent Eclipse XDB C_{18}(250 × 4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈:水 = 90:10;流速为 1.0 mL/min;柱温为 30 ℃;进样量为 10 μL;检测波长为 210 nm。

1.4.1　标准曲线建立　精密称取熊果酸对照品 25.10 mg,移至 25 mL 容量瓶中,使用甲醇溶剂定容,配制成浓度为 1 004.0 μg/mL 储备液。精密吸取 0.05、0.10、0.50、1.00、2.50、5.00 mL 至 10 mL 容量瓶中,用流动相稀释至刻度,获得 6 种浓度样品,分别为 5.00、10.04、50.20、100.40、251.00、502.00 μg/mL。分别精密吸取 6 种浓度溶液各 10 μL 注入液相色谱仪,重复进样 3 次,记录色谱图及峰面积,以样品浓度数据为横坐标,以检测获得的峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。

1.4.2　精密度测定　精密量取浓度为 251.00 μg/mL 的熊果酸溶液 10 μL 注入液相色谱仪,重复进样 6 次,记录色谱图及峰面积,计算样品平均峰面积相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

1.4.3　稳定性测定　精密量取熊果酸溶液,分别于 0、1、2、4、8、12 h 取 10 μL 注入液相色谱仪,每个样品平行进样 3 次。记录色谱图及峰面积,计算 RSD 值。

1.4.4　赖氨熊果酸溶解度测定　分别称取过量熊果酸、赖氨熊果酸、赖氨酸-熊果酸物理混合物悬浮于 20 mL 水中,置于水平摇床中,在 25 ℃下震摇 8 h,分别于 1、2、3、4、6、8 h 取样,取样后以水补足溶液量,样品溶液经 0.22 μm 滤膜过滤后上 HPLC 检测。

1.5　肝癌 bel7402 细胞增殖抑制作用检测　采用 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 比色法[18-21],人肝癌细胞株 bel7402,以含体积分数 10% 胎牛血清,100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 1640 培养基,在 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度下培养,24 h 后细胞贴壁生长,每 3 ~ 4 d 传代 1 次,取对数生长期的 bel7402 细胞制成 2×10^5 个/mL 的细胞悬液,加入 96 孔培养板中,每孔 200 μL,待细胞贴壁生长后弃去培养液;二甲亚枫(DMSO)溶解,1640 培养液分别稀释熊果酸、赖氨熊果酸、5-氟尿嘧啶(5-FU,阳性对照)至终浓度为 5、10、20、40、80 μmol/L,空白孔加入 1640 培养液,对照组加入 0.1% dimethylsulphoxide (DMSO);每个浓度设 3 个平行孔;采用酶标仪在490 nm处测定吸光度(A)值,空白孔调零,取平均值,计算细胞生长抑制率。

2　结　果

2.1　赖氨熊果酸表征

2.1.1　粉末 X 射线衍射分析(图 1)　Powder X-ray diffraction (PXRD)图谱显示,熊果酸属晶态化合物,具有尖锐的特征衍射峰;赖氨酸属于结晶度较差的晶态化合物,赖氨酸、熊果酸(1:1)物理混合物的主要衍

中国公共卫生 CPH

射峰含有熊果酸和赖氨酸的衍射峰,为 2 种成分衍射峰的物理叠加;赖氨熊果酸为非晶态化合物,因而无明显尖锐衍射峰,表现为弥散衍射峰,表明通过研磨过程赖氨酸与熊果酸形成了新的物相赖氨熊果酸。

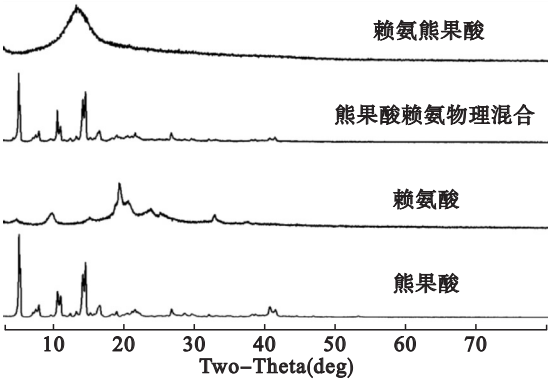

图 1　赖氨熊果酸粉末 X 射线衍射分析图谱

2.1.2　傅立叶红外光谱分析(图 2)　熊果酸具有乌苏烷型骨架,分子中存在特征的偕二甲基及羧基,这些结构在 IR 谱图上均可得到确认。波数 1 383 和 1 375 cm^{-1}处的特征双峰为 C-4 连接的偕二甲基的 C-H 面内弯曲振动吸收;1 710 cm^{-1}附近为 C-28 羧基的 $\upsilon_{C=O}$吸收;在波数 3 521 和 999 cm^{-1}附近分别可见 C-3 羟基的伸缩振动吸收和面外弯曲振动吸收。赖氨酸在 IR 谱图上可见-NH_3 的弯曲振动吸收(1 573 cm^{-1})和 – COO – 的对称伸缩振动吸收(1 404 cm^{-1});赖氨酸与熊果酸物理混合物的红外光谱差别不大;赖氨熊果酸的 IR 谱图中 C-28 羧基的 $\upsilon_{C=O}$吸收减弱, 1 029 cm^{-1}附近出现强 υ_{C-O-C}伸缩振动峰。提示,成盐反应是通过熊果酸的 C-28 羧基与赖氨酸结构中氨基进行的。

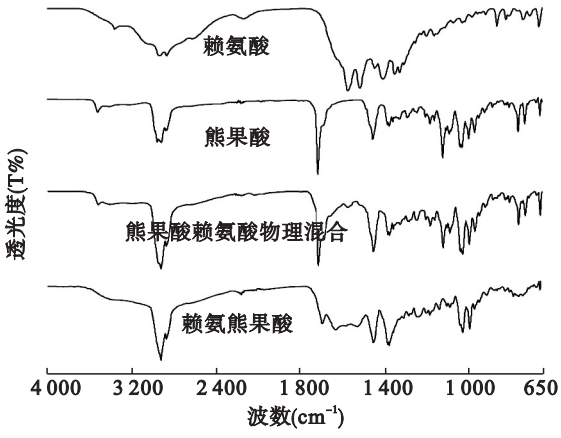

图 2　赖氨熊果酸傅立叶红外光谱分析图谱

2.2　赖氨熊果酸增溶作用分析

2.2.1　熊果酸与赖氨熊果酸 high performance liquid chromatography (HPLC)图谱(图 3)　HPLC 分析表明,熊果酸溶液在 5.00 ~ 502.00 μg/mL 浓度范围内,回归线性方程为 $Y = 4.729X + 5.732$,相关系数 $R^2 = 1.000$($n = 6$),表明其线性关系良好;精密度测定结果表明,样品平均峰面积 RSD 为 0.28%,稳定性测定结果表明,样品平均峰面积为 0.86%,表明利用高效液相色谱法测定熊果酸含量方法稳定性良好。HPLC 图谱显示,赖氨熊果酸与熊果酸具有相同的保留时间。提示,在溶液中赖氨熊果酸容易变回熊果酸,因此具有熊果酸的相应特性,可发挥相应的生物活性。

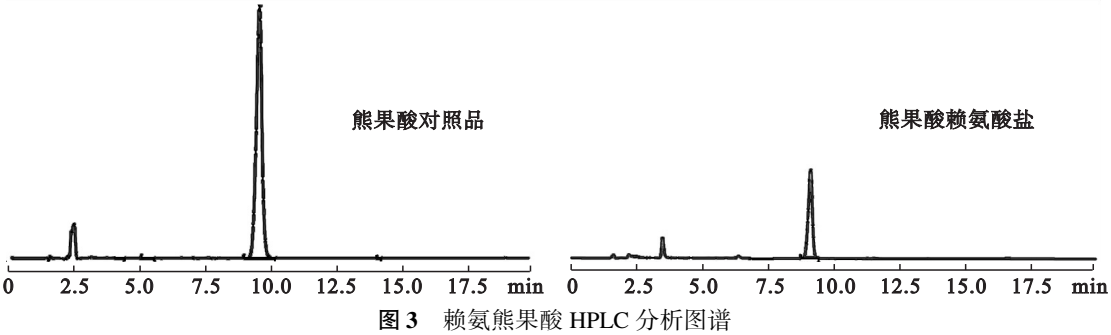

图 3　赖氨熊果酸 HPLC 分析图谱

2.2.2　赖氨熊果酸增溶作用　分别将熊果酸、赖氨熊果酸、赖氨酸 – 熊果酸物理混合物的饱和溶液取样 10 μL 进样,重复测定 3 次,取平均值,以峰面积计算熊果酸的含量。结果表明,熊果酸不溶于水,赖氨熊果酸在不同取样点的溶解度分别为 48.99、49.70、49.69、49.68、49.68、49.69 μg/mL,其饱和溶解度为 49.69 μg/mL,高于赖氨酸 – 熊果酸物理混合物在水中的溶解度 1.87 μg/mL,赖氨熊果酸成盐后明显改善了熊果酸的水溶性。

2.3　赖氨熊果酸对肝癌 Bel7402 细胞增殖抑制作用(表 1)　浓度在 5 ~ 80 μmol/L 范围内,赖氨熊果酸对肿瘤细胞具有明显抑制作用,呈剂量依赖性;当浓度为 10、20 μmol/L 时,与 5-fluorouracil (5-FU)(阳性对照)比较,赖氨熊果酸对肿瘤细胞的抑制作用差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1　赖氨熊果酸对肝癌 bel7402 细胞增殖抑制作用(%, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	浓度(μmol/L)					
	0(对照)	5	10	20	40	80
熊果酸	0	5.1 ± 2.7	13.9 ± 3.3	29.4 ± 2.5	41.8 ± 1.2	51.3 ± 1.8
赖氨熊果酸	0	18.6 ± 3.7[a]	55.4 ± 2.5[a,]	58.5 ± 2.2[a,]	67.8 ± 2.7[a]	81.5 ± 1.7[a]
5-FU	0	28.5 ± 2.8[b]	54.4 ± 1.2	60.4 ± 1.7	78.6 ± 2.1[b]	98.8 ± 2.0[b]

注:与熊果酸比较,a $P < 0.05$;与赖氨熊果酸比较,b $P < 0.05$。

3　讨　论

近年来,植物来源的药物倍受重视。中国植物资源丰富,中草药中含有大量的天然活性成分,许多具有生物活性的天然产物由于其水溶性差,限制了进一步开发和利用。赖氨酸同时具有羧基和氨基,容易形成兼性离子,可以利用羧基或氨基与极性基团及水分子形成氢键,从而带动熊果酸在水中溶解,增加熊果酸在水中的溶解度。熊果酸抗肿瘤作用的优势主要在于它在抑制肿瘤细胞的同时,不仅少见不良反应,还能在一定程度上提高机体免疫力,因此受到人们的广泛关注。本研究采用研磨法制备赖氨熊果酸,利用赖氨酸的水溶性,提高熊果酸的溶解度,结果显示,通过成盐反应,赖氨熊果酸的溶解度明显改善。本研究结果还表明,通过与赖氨酸成盐,熊果酸对肝癌 bel7402 细胞的抑制作用明显提高,其具体机制值得进一步探讨。

参考文献

[1] 王琳,王冠梁,刘甲寒,等. 熊果酸通过过氧化物酶增殖受体 α 和 γ 信号通路改善 KKAy 小鼠肝脏胰岛素抵抗的机制[J]. 中西医结合学报,2012,10(7):793 – 799.

[2] 李迪,王冠梁,山梦雅,等. 熊果酸对 3T3 – L1 脂肪细胞胰岛素抵抗模型 CAP 表达的影响[J]. 中西医结合学报,2012,10(8):886 – 893.

[3] 曾光,陈芳,熊新贵,等. 熊果酸对 CIA 大鼠关节炎症及骨质破坏的影响[J]. 湖南中医药大学学报,2013,33(7):3 – 7.

[4] 冯英杰,任会勋,袁育康,等. 熊果酸免疫调节作用的初步研究[J]. 西安交通大学学报:医学版,2006,27(6):541 – 543.

[5] 王杰军,王兵,郭静,等. 熊果酸体外抑制血管形成的研究[J]. 第二军医大学学报,2002,21(11):1071 – 1073.

[6] 刘蔷,向谨逸,桂军宏. 熊果酸对人胃癌细胞株 MGC – 803 增殖的影响及机制[J]. 实用医学杂志,2007,23(21):3318 – 3320.

[7] 陈国庆,沈宜,段红,等. 熊果酸诱导人食管癌细胞 Eca – 109 凋亡的作用及机制[J]. 中药新药与临床药理,2008,19(6):454 – 458.

[8] 郭万松,周悦,孙任任,等. 熊果酸对膀胱癌 T – 24 细胞生长的影响[J]. 中国老年学杂志,2011,31(1):269 – 270.

[9] 齐云秋,刘宏建,潘芦羚,等. 熊果酸对人骨肉瘤 MG63 细胞的影响[J]. 中华实验外科杂志,2010,27(11):1651 – 1653。

[10] 姚宏斌,梁惠,刘颖,等. 熊果酸对小鼠 H22 移植瘤的抑制作用研究[J]. 癌变 畸变突变,2013,25(1):1 – 6.

[11] 唐丹,李剑萍,郑锡凤,等. 熊果酸通过 STAT3 通路调控胃癌细胞增殖和凋亡[J]. 中国药理学通报,2012,28(2):179 – 184.

[12] 赵洪昌,王莹,赵文静. 熊果酸诱导人白血病 HL – 60 细胞凋亡作用[J]. 中国实验诊断学,2012,16(8):1383 – 1385.

[13] 李彩莲,冯锋援. 熊果酸衍生物构效关系研究进展[J]. 药学进展,2011,35(1):23 – 30.

[14] 朱建勤,陈晖,王少戎,等. 熊果酸半乳糖苷偶联物的合成及保肝活性[J]. 高等学校化学学报,2013,34(7):1660 – 1666.

[15] 李霞,白雪,吴科,等. 熊果酸 – 3′ – 取代丙醇酯衍生物的合成及抗肿瘤活性研究[J]. 有机化学,2012,32(4):703 – 708.

[16] 李财虎,杨聪玲,张宽,等. 新型熊果酸苯并咪(噻)唑连苯酯合成及抗炎活性测定[J]. 有机化学,2012,32(1):133 – 137.

[17] 张文娟,陈少鹏,陆鑫,等. 熊果酸衍生物的合成及抗肿瘤血管生成活性[J]. 高等学校化学学报,2010,31(11):2206 – 2217.

[18] Ahmad S, Ahmad A, Schneider KB, et al. Cholesterol interferes with the MTT assay in human epithelial-like (A549) and endothelial (HLMVE and HCAE) cells[J]. Int J Toxicol, 2006, 25(1):17 – 23.

[19] Seidl K, Zinkernagel AS. The MTT assay is a rapid and reliable quantitative method to assess *Staphylococcus aureus* induced endothelial cell damage[J]. J Microbiol Methods, 2013, 92(3):307 – 309.

[20] 张幸,梁梅花,黄文君,等. 芒柄花黄素诱导膀胱癌细胞凋亡作用[J]. 中国公共卫生,2015,31(3):314 – 317.

[21] 王雷鸣,梁冰,李淑芳,等. 漆姑草水提物对 K562 细胞凋亡及细胞周期影响[J]. 中国公共卫生,2014,30(12):1520 – 1522.

收稿日期: 2015-07-03　　(解学魁编辑　郑新校对)