

· 研究论文 ·

仿刺参水溶性海参皂苷的分离纯化及其抑瘤活性研究

樊廷俊^{1*}, 袁文鹏^{1,2}, 丛日山¹, 杨秀霞¹, 王卫卫¹, 荆 昭¹

(1. 中国海洋大学海洋生命学院海洋生物系, 山东 青岛 266003; 2. 山东省科学院生物研究所, 山东 济南 250014)

摘要: 为了获得具有显著抑瘤活性的水溶性海参皂苷样品, 利用大孔树脂柱、硅胶柱和葡聚糖凝胶柱对水溶性海参皂苷进行了分离纯化, 并对其体内外抑瘤活性和诱导肿瘤细胞凋亡进行了检测。研究结果显示, 大孔树脂柱的 70%乙醇洗脱组分以及硅胶柱色谱的部分纯化组分 (pSC-2 和 pSC-3) 对 HeLa 细胞、A-549 肺癌细胞、SGC-7901 胃癌细胞和 Bel-7402 肝癌细胞均具有显著的抑瘤活性; 经过葡聚糖凝胶柱色谱, 获得了纯度均在 99.6%以上、具有三萜类皂苷性质的 SC-2 和 SC-3 纯化样品, 发现 SC-2 纯化样品不仅能浓度和时间依赖性地抑制 HeLa 细胞的体外增殖, 还能剂量依赖性地抑制 S180 实体瘤的体内生长, 提高荷瘤小鼠的胸腺指数和脾指数。细胞凋亡检测结果显示, SC-2 纯化样品可剂量依赖性地诱导 HeLa 细胞凋亡, SC-2 纯化样品 (10 和 50 mg·L⁻¹) 处理 12 h 的 HeLa 细胞均出现了 DNA 片段化。可见, 水溶性海参皂苷 SC-2 纯化样品具有显著的抑瘤活性, 其机制可能是通过诱导肿瘤细胞发生凋亡来实现的。

关键词: 水溶性海参皂苷; 抑瘤活性; 细胞凋亡; 大孔树脂柱; 硅胶柱; 凝胶柱色谱

中图分类号: Q58; R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2009)01-0025-07

Studies on the purification of water-soluble holothurian glycosides from *Apostichopus japonicus* and their tumor suppressing activity

FAN Ting-jun^{1*}, YUAN Wen-peng^{1,2}, CONG Ri-shan¹, YANG Xiu-xia¹,
WANG Wei-wei¹, JING Zhao¹

(1. Department of Marine Biology, College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Research Institute of Biology, Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China)

Abstract: To obtain water-soluble holothurian glycosides with high tumor suppressing activities from *Apostichopus japonicus*, macroporous resin, silica gel and gel-filtration column chromatography were used to purify the water-soluble holothurian glycosides, and their tumor suppressing activity and inducing apoptosis of tumor cells were examined in this study. The 70% ethanol fraction of macroporous resin column, the pSC-2 and pSC-3 fractions from silica gel column showed very strong tumor suppressing activity towards HeLa cells, A-549 lung cancer cells, SGC-7901 stomach cancer cells and Bel-7402 liver cancer cells. SC-2 and SC-3 fraction purified from Sephadex LH-20 gel-filtration column chromatography, with a purity above 99.6%, all had the properties of triterpenoid glycosides. Purified SC-2 fraction had remarkable tumor suppressing activity on HeLa cells in a dose- and time-dependent manner, and had prominent tumor suppressing activity to mouse S₁₈₀ solid tumors in a dose-dependent manner. Besides, the SC-2 fraction also had remarkable ability in elevating mouse thymus index and spleen index. The purified SC-2 fraction could induce apoptosis of HeLa cells in a dose-dependent manner, and DNA fragmentation of HeLa cells occurred after treated 12 h with 10 mg·L⁻¹ and 50 mg·L⁻¹ of SC-2 fractions. From the results, it can be concluded that the purified SC-2 fraction of water-soluble holothurian glycosides has extremely strong tumor suppressing activity, and the suppression is realized by inducing tumor cells to undergo apoptosis. This study lays solid foundation for development of highly effective new natural anticancer agents from

收稿日期: 2008-07-10.

基金项目: 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金资助项目(03BS110).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-532-82031637, E-mail: tjfan@mail.ouc.edu.cn

sea cucumbers.

Key words: water-soluble holothurian glycoside; tumor suppressing activity; apoptosis; macroporous resin column; silica gel column; gel-filtration column chromatography

海参皂苷(holothurian glycosides)又称海参素(holothurin),是棘皮动物海参体内含量丰富的主要次生代谢产物,一般为三萜皂苷成分,它不仅对海参的生存(防卫、捕食等)具有重要意义^[1,2],而且还具有抗肿瘤^[3]、抗真菌^[4]、细胞毒^[5~7]、溶血^[8]等广泛的药理活性。

对海参皂苷抗肿瘤活性的研究开始于 1990 年,现已从 10 余种海参中分离纯化出海参皂苷,发现其对小鼠白血病细胞、人胃癌细胞、肠癌细胞、肝癌细胞、肺癌细胞、肾癌细胞、口腔上皮癌细胞、鼻咽癌细胞、黑色素瘤细胞、乳腺癌细胞、卵巢癌细胞、前列腺癌细胞和 HeLa 细胞等多种癌细胞具有显著的抑瘤活性^[9~13]。从阿氏辐肛参(*Actinopyga agassizi*)分离纯化出的海参皂苷,还可显著抑制小鼠肉瘤 S₁₈₀ 和 Krebs-2 腹水瘤的体内生长^[7,14],进一步证明海参皂苷是一类很有前景的抗肿瘤先导化合物。

目前,对海参皂苷的提取主要采用有机溶剂萃取法,不仅成本高和易污染环境,而且所得海参皂苷制品的水溶性差,需要添加二甲基亚砷促进溶解,尽管具有显著的肿瘤抑制活性,但在很大程度上限制了其在医学临床上的应用^[3,15,16]。袁文鹏等^[15]和丛日山等^[17]成功从仿刺参(*Apostichopus japonicus*)水抽提液中分离并部分纯化出抗真菌活性高的水溶性海参皂苷,有效地避免了有机溶剂萃取法所制备的海参皂苷的诸多弊端和不足。但从仿刺参水抽液中部分纯化出的水溶性海参皂苷仍含有结构不同甚至类别不同的皂苷成分,不同皂苷成分的抑瘤活性也不尽相同。

为了探明海参皂苷中究竟哪种皂苷组分具有最强的抑瘤活性,本文利用大孔树脂柱、硅胶柱和葡聚糖凝胶过滤柱对仿刺参水溶性海参皂苷进行了分离纯化,并对各种纯化组分的抑瘤活性进行了研究,旨在筛选出具有强抑瘤活性的皂苷组分,为利用水溶性海参皂苷研制高效抗肿瘤药物奠定基础。

材料与方法

材料 冻干仿刺参(*Apostichopus japonicus*)加工废弃液由青岛海美伦生物工程有限公司提供,分装后置 -20 °C 冻存备用; A-549 肺癌细胞株, SGC-7901 胃癌细胞株和 Bel-7402 肝癌细胞株由烟台大学药

院提供, HeLa 宫颈癌细胞株为本实验室冻存复苏。昆明种小鼠购自山东省医学科学院实验动物中心。环磷酸酰胺(CTX)购自美国 Sigma-Aldrich 公司。AB-8 型大孔树脂购自天津南开化工厂, Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶购自 Pharmacia 公司,所用硅胶(200~300 目)及硅胶板购自青岛海洋化工厂,旋转蒸发仪购自上海亚荣生化仪器厂,冷冻干燥机购自美国西盟公司, Agilent1100 型高压液相色谱(HPLC)仪、RID 检测器和 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 型 HPLC 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 0.5 μm) 购自美国 Agilent 公司, E200-pix4500 摄影显微镜购自日本 Nikon 公司; HPLC 色谱柱洗脱流动相所用乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

水溶性海参皂苷的大孔树脂柱色谱 水溶性海参皂苷的制备参照丛日山等^[17]的方法进行。称取水溶性海参皂苷冻干品 4 g 溶于 100 mL 去离子水中,上样于预处理的 AB-8 型大孔树脂柱(30 mm × 300 mm)中,然后分别用 30%、50%、70%、80%和 95%的乙醇溶液各 300 mL 进行洗脱,分部收集各种洗脱组分,经旋转蒸发和冷冻干燥后备用。

水溶性海参皂苷的硅胶柱色谱 对于具有高抑瘤活性的大孔树脂柱洗脱组分,再上样于常压硅胶柱(15 mm × 200 mm),利用 *n*-BuOH-EtOAc-H₂O (4:1:5) 混合展开剂进行连续洗脱,控制流速 0.2 mL·min⁻¹,分部收集洗脱组分(每管 5 mL)。洗脱组分经硅胶板薄层色谱检测后,合并迁移率相同的洗脱组分,经旋转蒸发和冷冻干燥后备用。

水溶性海参皂苷的凝胶柱色谱 对于具有抑瘤活性的硅胶柱色谱组分,分别进一步上样于 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱(10 mm × 500 mm),利用 50%甲醇溶液进行洗脱,控制流速 0.2 mL·min⁻¹,分部收集洗脱组分(每管 5 mL),洗脱组分经硅胶板薄层色谱检测后,合并迁移率相同的洗脱组分,经旋转蒸发和冷冻干燥后备用。

水溶性海参皂苷纯化样品的鉴定 纯度鉴定参照袁文鹏等^[15]的方法进行。称取水溶性海参皂苷纯化样品的冻干品 0.5 mg,用去离子水配制成质量浓度为 0.5 g·L⁻¹的水溶液,取 20 μL 溶液上样于 HPLC 柱,在 25 °C 用乙腈-水(36:100)的流动相进行洗脱(流速为 1 mL·min⁻¹),检测 A₂₀₃ 值,根据高压液相色谱确

定被测组分的纯度。

参照丛日山等^[17]的方法分别进行泡沫试验、沉淀反应、Molish 反应和 Libermann-Burchard 反应, 鉴定所得皂苷纯化样品的性质。

各种水溶性海参皂苷组分的体外抑瘤活性检测 HeLa、SGC-7901、A-549 和 Bel-7402 肿瘤细胞株, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液在 5% CO₂、37 °C 培养条件下进行常规培养, 待生长至对数期后, 调整细胞数至 $1 \times 10^8/L$, 按 180 μL /孔将细胞悬液接种于 96 孔培养板中, 培养 12 h 后加入终质量浓度分别为 2、4、10、20 和 50 $mg \cdot L^{-1}$ 的不同水溶性海参皂苷样品, 每个浓度设 3 个平行孔, 阴性对照孔加入不含药物的培养液, 阳性对照孔加入 10 $mg \cdot L^{-1}$ 环磷酰胺 (CTX), 培养 12 h 后进行光学显微镜观察和照相, 继续培养 72 h 后每孔加入 MTT 20 μL (5 $g \cdot L^{-1}$), 继续培养 4 h 后吸出培养液, 每孔再加入二甲基亚砜 100 μL 溶解, 用酶标仪检测 A_{492} , 按“死亡率% = $[A_{492}(\text{阴性对照}) - A_{492}(\text{样品组})] / [A_{492}(\text{阴性对照}) - A_{492}(\text{空白对照})]$ ”计算死亡率, 用 Logit 法计算半数抑制量 IC₅₀ 值。

SC-2 纯化样品体外诱导 HeLa 细胞凋亡的吖啶橙/溴化乙锭双染色鉴定 吖啶橙/溴化乙锭双染色参照 Spector 等^[18]的方法进行。分别收集不同浓度 SC-2 组分处理 12 h 后的 HeLa 细胞, 将细胞数调整至 $2 \times 10^9 \sim 2 \times 10^{10}/L$ 。取细胞悬液 0.1 mL, 加入吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB)溶液(100 $mg \cdot L^{-1}$ AO 溶液-100 $mg \cdot L^{-1}$ EB 溶液为 1:1) 4 μL , 于室温下染色 1 min 后滴在无荧光载玻片上, 加盖玻片后置荧光显微镜观察并拍照。

SC-2 纯化样品体外诱导 HeLa 细胞凋亡的 DNA 琼脂糖凝胶电泳鉴定 分别收集不同浓度 SC-2 组分处理 12 h 后的 HeLa 细胞, 按照李凌等^[19]的方法抽提 DNA, 分别溶于 TE 缓冲液 20 μL 中。取 DNA 样品 5 μL 用 15 $g \cdot L^{-1}$ 琼脂糖凝胶(含 0.5 $mg \cdot L^{-1}$ EB)进行电泳, 电泳后将琼脂糖凝胶置紫外检测仪中观察和照相记录。

SC-2 纯化样品对小鼠 S₁₈₀ 实体瘤的体内抑瘤活性检测 小鼠 50 只, 于右侧腋下接种 S₁₈₀ 细胞悬液 ($1 \times 10^{10}/L$) 0.2 mL, 24 h 后将荷瘤小鼠随机分为空白对照组, 20 $mg \cdot kg^{-1}$ CTX 给药组, SC-2 纯品 2、5、10 和 20 $mg \cdot kg^{-1}$ 给药组, 每组 10 只小鼠。各 SC-2 纯品给药组(灌胃给药)每 24 h 给药 1 次, 每只小鼠 0.2 mL, 连续给药 10 d; 而 CTX 给药组(腹腔注射给药)每 48 h 给药 1 次, 每只小鼠 0.2 mL, 连续给药 5 次。末次给药 24 h 后, 脱颈椎处死小鼠, 个体称重后剥取瘤组

织、胸腺和脾脏, 分别称重后, 按“抑瘤率% = $(1 - \text{给药组平均瘤重} / \text{对照组平均瘤重}) \times 100\%$ ”计算抑瘤率, 按“脏器指数 = 脏器重量 / 10 g 体重”分别计算胸腺指数和脾脏指数。

统计学处理 数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据处理均采用 t 检验。

结果

1 水溶性海参皂苷大孔树脂洗脱组分的抑瘤活性检测

不同大孔树脂乙醇洗脱组分处理 Bel-7402 肝癌细胞、A-549 肺癌细胞、SGC-7901 胃癌细胞和 HeLa 细胞的 MTT 检测结果显示, 30%乙醇洗脱组分没有肿瘤生长抑制活性; 50%乙醇洗脱组分在 50 $mg \cdot L^{-1}$ 时才表现出一定的肿瘤生长抑制活性; 70%、80%和 95%的洗脱组分均具有很强的肿瘤生长抑制活性, 以 70%洗脱组分的抑制活性最强。其中, 70%乙醇洗脱组分对 Bel-7402 肝癌细胞, A-549 肺癌细胞, SGC-7901 胃癌细胞和 HeLa 细胞的 IC₅₀ 值分别为 9.67、8.63、10.33 和 10.35 $mg \cdot L^{-1}$ 。结果显示, 70%乙醇洗脱组分与 80%及 95%乙醇洗脱组分的 IC₅₀ 值之间具有显著性差异 ($P < 0.05$)。见表 1。

Table 1 Effects of different ethanol elute fractions of water-soluble holothurian glycosides from macroporous resin column on the growth of several tumor cell strains

Tumor cell strain	Macroporous resin fraction	IC ₅₀ /mg·L ⁻¹
Bel-7402 human liver cancer cell	30% Alcohol elute fraction	—
	50% Alcohol elute fraction	429.37
	70% Alcohol elute fraction	9.67*
	80% Alcohol elute fraction	11.19
	95% Alcohol elute fraction	11.49
A-549 human lung cancer cell	30% Alcohol elute fraction	—
	50% Alcohol elute fraction	—
	70% Alcohol elute fraction	8.63*
	80% Alcohol elute fraction	10.45
	95% Alcohol elute fraction	10.51
SGC-7901 human stomach cancer cell	30% Alcohol elute fraction	—
	50% Alcohol elute fraction	—
	70% Alcohol elute fraction	10.33*
	80% Alcohol elute fraction	11.18
	95% Alcohol elute fraction	11.96
HeLa cell	30% Alcohol elute fraction	—
	50% Alcohol elute fraction	—
	70% Alcohol elute fraction	10.35*
	80% Alcohol elute fraction	11.51
	95% Alcohol elute fraction	10.68

Each IC₅₀ was calculated as the mean value, $n=3$. * $P < 0.05$ vs 80% and 95% alcohol elute fraction. “—” stand for no IC₅₀ value

2 水溶性海参皂苷硅胶柱色谱组分的硅胶板薄层色谱

具有高抑瘤活性的 70%乙醇洗脱组分进行常压硅胶柱色谱后分部收集洗脱组分, 经硅胶板薄层色谱检测后合并迁移率相同的洗脱组分, 共获得 4 种洗脱组分 pSC-1 (第 3~5 号组分, 迁移率均为 0.85 ± 0.01)、pSC-2 (第 8~10 号组分, 迁移率均为 0.57 ± 0.01)、pSC-3 (第 15~17 号组分, 迁移率均为 0.44 ± 0.01) 和 pSC-4 (第 24~26 号组分, 迁移率均为 0.35 ± 0.01)。

3 水溶性海参皂苷硅胶柱纯化样品的抑瘤活性检测

硅胶柱纯化样品 pSC-1、pSC-2、pSC-3 和 pSC-4 分别利用 MTT 法进行抑瘤活性检测(表 2)。pSC-1 无抑制肿瘤生长的作用, pSC-2、pSC-3 和 pSC-4 均显示了较强的抑瘤活性。

Table 2 Effects of different ethanol elute fractions of water-soluble holothurian glycosides from silica gel column on the growth of several tumor cell strains

Tumor cell strain	Silica gel fraction	IC ₅₀ /mg·L ⁻¹
Bel-7402 human liver cancer cell	pSC-1 fraction	—
	pSC-2 fraction	3.04*
	pSC-3 fraction	3.15*
	pSC-4 fraction	7.82
A-549 human lung cancer cell	pSC-1 fraction	—
	pSC-2 fraction	4.13*
	pSC-3 fraction	4.11*
	pSC-4 fraction	8.95
SGC-7901 human stomach cancer cell	pSC-1 fraction	—
	pSC-2 fraction	4.41*
	pSC-3 fraction	4.26*
	pSC-4 fraction	7.15
HeLa cell	pSC-1 fraction	—
	pSC-2 fraction	3.23*
	pSC-3 fraction	3.49*
	pSC-4 fraction	6.83

Each IC₅₀ was calculated as the mean value. $n=3$. * $P<0.05$ vs pSC-4 fraction. “—” stand for no IC₅₀ value

4 水溶性海参皂苷葡聚糖凝胶柱色谱组分的硅胶板薄层色谱

将具有高抑瘤活性的硅胶柱色谱组分 pSC-2 和 pSC-3 进一步上样于 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱, 分部收集洗脱组分, 经硅胶板薄层色谱检测后合并迁移率相同的洗脱组分, 共获得 SC-2 (第 18~20 号组分, 迁移率均为 0.55 ± 0.01) 和 SC-3 (第 17~19 号组分, 迁移率均为 0.45 ± 0.01) 两种纯化组分。

5 水溶性海参皂苷纯化样品纯度的高压液相色谱鉴定

SC-2 和 SC-3 纯化样品在高压液相色谱图中均为单一洗脱峰, SC-2 的出峰时间约为 11 min, 面积归一

化程度为 99.6% (图 1A); SC-3 的出峰时间约为 8 min, 面积归一化程度高达 99.8% (图 1B)。

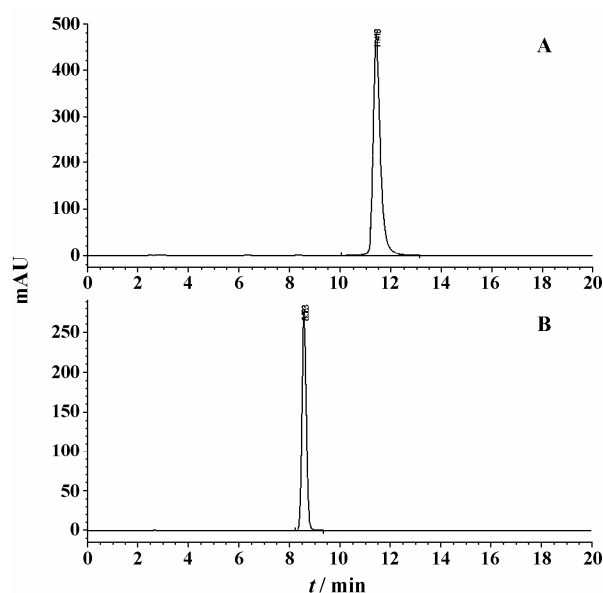


Figure 1 HPLC chromatogram of purified water-soluble holothurian glycosides from Sephadex LH-20 gel filtration column. A: Purified SC-2 fraction; B: Purified SC-3 fraction

6 水溶性海参皂苷纯化样品的性质鉴定

对纯化样品 SC-2 和 SC-3 的性质鉴定结果显示, 它们在泡沫试验、沉淀反应、Molish 反应和 Libermann-Burchard 反应中均呈阳性, 说明 SC-2 和 SC-3 均具有三萜类皂苷的性质。

7 SC-2 纯化样品的体外抑瘤活性检测

MTT 检测结果显示, SC-2 对 HeLa 细胞的增殖有显著抑制作用, 且抑制作用呈浓度和时间依赖性, 随着浓度的增加和处理时间的延长其抑制作用逐渐增强(表 3、4)。

8 SC-2 纯化样品对体外培养 HeLa 细胞的作用

经 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ SC-2 纯化样品处理 12 h 后, HeLa 细胞形态与空白对照组相近, 细胞数量显著减少, 胞内出现明显的空泡(图 2A, B); $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ SC-2 纯化样品处理 12 h 后, HeLa 细胞皱缩变圆, 细胞数量显著减少

Table 3 Concentration-dependent inhibitory effect of purified SC-2 on HeLa cell proliferation

Group	Dose/mg·L ⁻¹	A ₄₉₂	Inhibiting rate/%
Control	—	1.81 ± 0.18	—
CTX	20	$1.16 \pm 0.13^{**}$	35.87
	2	$1.32 \pm 0.02^{**}$	27.27
SC-2 ^a	10	$0.10 \pm 0.01^{**}$	92.61
	50	$0.07 \pm 0.02^{**}$	96.34

$n=3$, $\bar{x} \pm s$. ^aPeriod of SC-2 treatment is 72 h. $^{**}P<0.01$ vs control group

Table 4 Time-dependent inhibitory effect of purified SC-2 on HeLa cell proliferation

Time/h	A_{492}		Inhibiting rate/%
	Control	Purified SC-2 fraction ^a	
12	0.44 ± 0.02	0.26 ± 0.01**	40.93
24	0.98 ± 0.05	0.15 ± 0.01**	84.87
48	1.64 ± 0.11	0.14 ± 0.02**	91.69
72	1.92 ± 0.04	0.15 ± 0.02**	92.29

$n=3$, $\bar{x} \pm s$. ^aThe concentration of purified SC-2 is 10 mg·L⁻¹.

** $P < 0.01$ vs control group

(图 2C); 50 mg·L⁻¹ SC-2 纯化样品处理 12 h 后, 细胞皱缩变圆, 许多细胞裂解和脱落(图 2D)。

不同浓度 SC-2 纯化样品处理 HeLa 细胞的 AO/EB 双染色结果显示, 2 mg·L⁻¹ SC-2 处理 12 h 后, 约有 10% 以上的 HeLa 细胞发生了凋亡; 10 mg·L⁻¹ SC-2 处理 12 h 后, 约有 80% 以上的 HeLa 细胞发生了凋亡; 50 mg·L⁻¹ SC-2 处理 12 h 后, HeLa 细胞几乎全部凋亡(图 3)。

DNA 琼脂糖凝胶电泳结果证实, 2 mg·L⁻¹ SC-2 纯化样品处理 12 h 后, HeLa 细胞 DNA 没有出现明显的梯状条带; 10 和 50 mg·L⁻¹ SC-2 纯化样品处理 12 h 后, HeLa 细胞 DNA 在电泳图谱上出现了明显的梯状条带, 即出现了 DNA 的片段化(图 4)。

9 SC-2 纯化样品对小鼠 S₁₈₀ 实体瘤的体内抑瘤活性

对小鼠 S₁₈₀ 实体瘤的称重结果显示, SC-2 纯化样品能显著抑制小鼠 S₁₈₀ 实体瘤的生长, 其抑制作用呈剂量依赖性(图 5)。其中, 2、5、10 和 20 mg·kg⁻¹ 灌胃给予 SC-2 的平均抑瘤率分别为 33.88%、38.93%、47.84% 和 51.01% ($P < 0.01$), 而 20 mg·kg⁻¹ 腹腔注射给予 CTX 的平均抑瘤率为 51.79% ($P < 0.01$)。

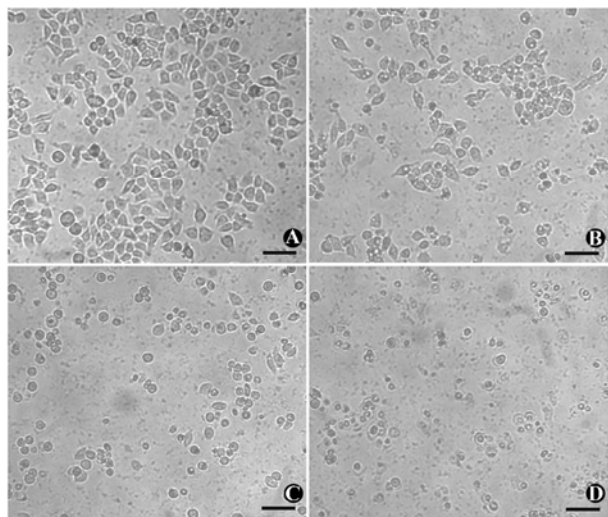


Figure 2 Morphology of HeLa cells after treated 12 h *in vitro* with purified SC-2 at different concentrations. A: Control; B: SC-2 (2 mg·L⁻¹); C: SC-2 (10 mg·L⁻¹); D: SC-2 (50 mg·L⁻¹). Bar: 120 μm

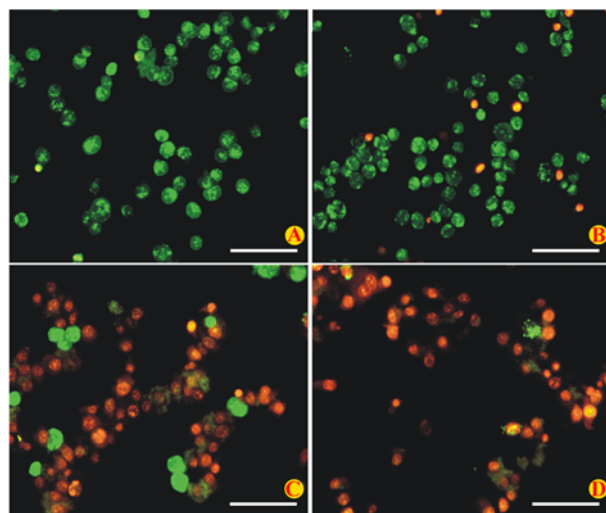


Figure 3 AO/EB double-fluorescent staining of HeLa cells after treated 12 h with purified SC-2 at different concentrations. A: Control; B: SC-2 (2 mg·L⁻¹); C: SC-2 (10 mg·L⁻¹); D: SC-2 (50 mg·L⁻¹). Apoptotic cells with their nuclei in orange fluorescence, while nonapoptotic cells with their nuclei in lightgreen fluorescence. Bar: 100 μm

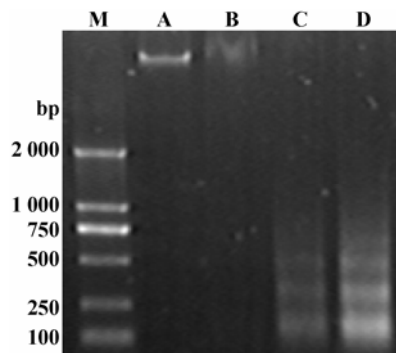


Figure 4 Electrophoresis pattern of DNA extracted from HeLa cells treated with purified SC-2 at different concentrations. M: DL2000 marker; A: Without any SC-2 treatment; B: Treated with 2 mg·L⁻¹ SC-2 for 12 h; C: Treated with 10 mg·L⁻¹ SC-2 for 12 h; D: Treated with 50 mg·L⁻¹ SC-2 for 12 h

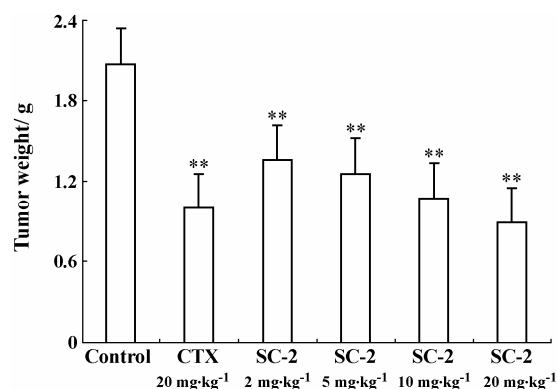


Figure 5 Inhibitory effect of purified SC-2 on the growth of mouse S₁₈₀ solid tumors *in vivo*. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs control group

10 SC-2 纯化样品对小鼠免疫器官指数的影响

对小鼠胸腺和脾脏的称重及其分析结果 (表 5) 显示, SC-2 纯化样品能显著提高小鼠的胸腺指数 ($P<0.01$) 和脾指数 ($P<0.05$), 且随着浓度的增大对免疫器官指数的提高作用越强; 而 CTX 给药组反而显著降低小鼠的胸腺指数 ($P<0.01$) 和脾指数 ($P<0.01$)。结果显示, SC-2 纯化样品给药组与 CTX 给药组之间具有显著性差异 ($P<0.01$)。

Table 5 Effect of purified SC-2 on the exponent of mouse immune organs

Group	Dose /mg·kg ⁻¹	Thymus index (×10 ²)	Spleen index (×10 ²)
Control	—	3.00 ± 0.58	5.15 ± 1.19
CTX (ip)	20	2.34 ± 0.34**	4.32 ± 0.91**
SC-2 (ig)	2	5.24 ± 1.00**△△	5.81 ± 1.58*△△
	5	5.76 ± 1.51**△△	6.07 ± 0.94**△△
	10	5.70 ± 1.92**△△	6.84 ± 1.87**△△
	20	5.75 ± 1.63**△△	6.87 ± 1.71**△△

$n=10$, $\bar{x} \pm s$. * $P<0.01$, ** $P<0.01$ vs control group; △△ $P<0.01$ vs CTX treatment group

讨论

癌症是威胁人类健康的最严重的疾病之一, 其死亡率居世界第 2 位, 目前的治疗手段主要以手术、放疗、化疗为主, 但至今仍未找到一个治愈癌症的有效方案。近年来, 抗肿瘤药物筛选及其开发应用已成为各国学者攻克癌症的研究热点^[6,7]。海参皂苷具有显著的抗肿瘤活性、抗新生血管生成活性以及多种免疫调节作用, 因此是抗肿瘤药物筛选的重要对象^[3,16]。本研究旨在分离纯化出水溶性海参皂苷的强抑瘤活性组分, 并对其抑瘤机制进行初步研究, 为利用水溶性海参皂苷研制高效抗肿瘤药物奠定基础。

为了获得具有强抑瘤活性且成分单一的水溶性海参皂苷纯品, 本文利用海参皂苷的水提取物依次进行了 AB-8 型大孔树脂柱色谱、常压硅胶柱色谱和 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱。AB-8 型大孔树脂柱的 70%、80% 和 95% 乙醇溶液的洗脱组分, 对体外培养的 HeLa 细胞、A-549 肺癌细胞、SGC-7901 胃癌细胞和 Bel-7402 肝癌细胞均具有显著的增殖抑制活性, 以 70% 乙醇溶液洗脱组分的体外抑瘤活性最强; 具有显著抑瘤活性的 70% 乙醇溶液洗脱组分经常压硅胶柱色谱纯化获得了具有抑瘤活性的 4 部分纯化组分, 以 pSC-2 和 pSC-3 组分对上述 4 种癌细胞的体外抑瘤活性最强; 具有强体外抑瘤活性的 pSC-2 和 pSC-3 组分经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱进一步纯

化后, 获得了 SC-2 和 SC-3 两种新的纯化样品, 其纯度分别为 99.6% 和 99.8%, 均具有三萜类皂苷的性质。

SC-2 纯化样品对体外培养 HeLa 细胞有显著的增殖抑制作用, 且其抑制作用呈剂量和时间依赖性。为了进一步验证 SC-2 纯化样品的抑瘤活性, 作者又以小鼠 S₁₈₀ 实体瘤模型进行了其体内抑瘤活性研究, 发现 2、5 和 10 mg·kg⁻¹ 灌胃给予 SC-2 纯化样品均能显著抑制小鼠 S₁₈₀ 实体瘤的生长, 其抑制率分别高达 33.88%, 38.93% 和 47.84% ($P<0.01$), 进一步证明 SC-2 纯化样品具有很强的体内和体外抑瘤活性。该结论与方柱五角瓜参 (*Pentacta quadrangularis*) 中 Philinopside A 和 E (一种新的硫酸化皂苷) 的研究结果相似^[3,16], 只是 Philinopside A 和 E 并非水溶性海参皂苷。

免疫系统是机体抵抗各类病原体感染和捕杀肿瘤细胞的高效防御系统, 其中的胸腺和脾脏两种免疫器官是淋巴细胞和其他免疫细胞发生、分化、成熟、定居、增殖和产生免疫应答的主要场所, 而机体的胸腺指数和脾指数则能直接反映出免疫应答的强弱^[20-22]。本研究对荷瘤小鼠免疫器官指数的检测结果显示, SC-2 纯化样品能显著提高 S₁₈₀ 荷瘤小鼠的胸腺指数 ($P<0.01$) 和脾指数 ($P<0.05$), 而 CTX 给药组则显著降低小鼠的胸腺指数 ($P<0.01$) 和脾指数 ($P<0.01$), 且 SC-2 纯化样品给药组与 CTX 给药组之间具有显著性差异 ($P<0.01$)。表明 SC-2 纯化样品不仅具有体内抑瘤活性, 而且还能显著提高荷瘤小鼠的胸腺指数和脾指数, 这在国内外尚属于首次报道。

尽管目前许多研究结果表明, 海参皂苷具有细胞毒作用^[5-7, 23], 但海参皂苷在体外是否可以引发肿瘤细胞的凋亡, 目前还没有文献报道。目前, 琼脂糖凝胶电泳中 DNA 梯状条带的出现以及吖啶橙/溴化乙锭双染色已成为鉴别细胞凋亡与否的重要特征^[19, 24]。为了验证 SC-2 纯化样品抑瘤活性的作用机制, 本研究首次对 SC-2 纯化样品处理所引起的 HeLa 细胞凋亡进行了研究, 发现 SC-2 纯化样品 (2~50 mg·L⁻¹) 可诱导 HeLa 细胞发生凋亡, 并呈现出剂量依赖效应, 且 SC-2 纯化样品 (10 和 50 mg·L⁻¹) 处理 12 h 的 HeLa 细胞出现了 DNA 片段化, 首次证明了水溶性海参皂苷 SC-2 纯化样品的抑瘤活性是通过诱发 HeLa 细胞发生细胞凋亡来实现的。该研究结果与方柱五角瓜参 (*P. quadrangularis*) 中的 Philinopside A 和 E 的研究结果一致^[3, 16], 与海星皂苷的三氟乙酸降解物可诱导 U87MG (人胶质母细胞瘤细胞) 细胞

凋亡的研究报道也是相似的^[25], 但本文所用样品为水溶性海参皂苷的纯化样品, 并进行了 DNA 片段化鉴定, 研究结论更加可信。

由此可见, 本文利用 AB-8 型大孔树脂柱色谱、常压硅胶柱色谱和 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱从仿刺参水抽提物中纯化出了水溶性海参皂苷纯化样品, 该新纯化样品具有较强的体内和体外抑瘤活性, 其抑瘤活性是通过诱导肿瘤细胞发生细胞凋亡来实现的, 为利用水溶性海参皂苷纯化样品研制新型高效海洋抗肿瘤药物奠定了基础。目前, 正在进行仿刺参水溶性海参皂苷纯化样品的规模化生产工艺及其抑瘤活性的广谱性研究。

References

- [1] Zou ZR, Yi YH, Zhang SY, et al. Progress in studies of sea cucumber glycosides [J]. Chin Mar Drugs (中国海洋药物), 2004, 1: 46-53.
- [2] Yan B, Li L, Yi YH, et al. Study on bioactive triterpene glycosides of sea cucumber *Holothuria scabra* Jaeger [J]. Acad J Second Mil Med Univ (第二军医大学学报), 2005, 26: 626-631.
- [3] Tian F, Zhang X, Tong Y, et al. PE, a new sulfated saponin from sea cucumber, exhibits anti-angiogenic and anti-tumor activities *in vitro* and *in vivo* [J]. Cancer Biol Ther, 2005, 4: 874-882.
- [4] Shimada S. Antifungal steroid glycoside from sea cucumber [J]. Science, 1969, 163: 1462.
- [5] Pettit GR, Herald CL, Herald DL. Antineoplastic agents XLV: sea cucumber cytotoxic saponin [J]. J Pharm Sci, 1976, 65: 1558-1559.
- [6] Drozdova OA, Aviirov SA, Kalinin VI, et al. Cytotoxic triterpene glycosides from the far-eastern sea cucumber belonging to the genus *Cucumaria* [J]. Liebigs Ann Chem, 1997, 2351-2356.
- [7] Zou ZR, Yi YH, Wu HM, et al. Intercedensides A-C, three new cytotoxic triterpene glycosides from the sea cucumber *Mensamaria intercedens* Lampert [J]. J Nat Prod, 2003, 66: 1055-1060.
- [8] Kalinin VI, Prokofieva NG, Likhatskaya GN, et al. Hemolytic activities of triterpene glycosides from the holothurian order Dendrochirotida: some trends in the evolution of this group of toxins [J]. Toxicon, 1996, 34: 475.
- [9] Pettit GR, Herald CL, Herald DL. Antineoplastic agents. XLV: Sea cucumber cytotoxic saponins [J]. J Pharm Sci, 1976, 65: 1558-1559.
- [10] Miao HN, Dai JL. Progress in studies of marine antitumor bioactive substances [J]. Prog Biotechnol (生物工程进展), 1995, 15: 8-14.
- [11] Miyamoto T, Togawa K, Higuchi R, et al. Six newly identified biologically active triterpenoid glycoside sulfates from the sea cucumber *Cucumaria echinata* [J]. Liebigs Ann Chem, 1990, 453-460.
- [12] Wang XH, Li L, Yi YH, et al. Two new triterpene glycosides from sea cucumber *Stichopus variegatus* Semper [J]. Chin J Nat Med (中国天然药物), 2006, 4: 176-180.
- [13] Wu J, Yi YH, Wu HM, et al. Studies on the *in vitro* antifungal and antitumor activities of nobiliside A from the sea cucumber *Holothuria nobilis* Selenka [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2007, 23: 139-140.
- [14] Zhang HZ. Distribution, isolation and extraction of glycosides from Echinoderms [J]. Chin Mar Drugs (中国海洋药物), 1983, 2: 109-117.
- [15] Yuan WP, Cong RS, Yang XX, et al. Purification and antifungal activity examination of water-soluble holothurian glycosides from *Apostichopus japonicus* [J]. J Shandong Univ (山东大学学报), 2007, 42: 69-73.
- [16] Tong Y, Zhang X, Tian F, et al. Philinopside A, a novel marine-derived compound possessing dual anti-angiogenic and anti-tumor effects [J]. Int J Cancer, 2005, 114: 843-853.
- [17] Cong RS, Yuan WP, Fan TJ, et al. Isolation of water-soluble holothurian glycoside from *Apostichopus japonicus* and studies of its antifungal activity [J]. Period Ocean Univ Chin (中国海洋大学学报), 2006, 36: 959-964.
- [18] Spector DL, Goldman RD, Leinwand LA. Cell: A Laboratory Manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998: 102-117.
- [19] Li L, Fan TJ, Yang XX, et al. Effects and antioxidative activities of flavone on human corneal endothelial cells *in vitro* [J]. Int J Ophthalmol (国际眼科杂志), 2008, 8: 881-885.
- [20] Gu LG. Medical Immunology and Microbiology (医学免疫学与微生物学) [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2004.
- [21] Liang ZQ, Xiong ZX. The effects of *Auricularia delicata* polysaccharides on immunological function in mice [J]. J Yunan Normal Univ (云南师范大学学报), 1998, 18: 88-91.
- [22] Ma L, Lin ZB. Effects of Tremella polysaccharides on interleukin-2 production of mouse spleen cells [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1992, 27: 1-4.
- [23] Zou ZR, Yi YH, Wu HM, et al. Intercedensides D-I, cytotoxic triterpene glycosides from the sea cucumber *Mensamaria intercedens* Lampert [J]. J Nat Prod, 2005, 68: 540-546.
- [24] Lewis J, Wesselingh SL, Griffin DE, et al. Alphavirus-induced apoptosis in mouse brains correlates with neurovirulence [J]. J Virol, 1996, 70: 1828-1835.
- [25] Cheng G, Zhang X, Tang HF, et al. Asterosaponin 1, a cytostatic compound from the starfish *Culcita novaeguineae*, functions by inducing apoptosis in human glioblastoma U87MG cells [J]. J Neurooncol, 2006, 79: 235-241.