

玛咖生物碱对人肝癌细胞 Bel-7402 和 H22 荷瘤小鼠的抑制作用

王爱华¹, 刘英梅², 王丽丽², 安然¹

(1. 山东中医药大学第二附属医院, 山东济南 250001) (2. 山东省药学科学院, 山东济南 250001)

摘要: 探究玛咖生物碱对 Bel-7402 细胞体外抗肝癌活性及体内抗 H22 肝癌活性的影响。通过 0.5% 的盐酸 95% 乙醇溶液提取获得玛咖生物碱粗提物, 并通过进一步的酸溶碱沉方法纯化获得玛咖生物碱, 通过 MTT 法测定不同剂量玛咖生物碱对 Bel-7402 细胞抑制率的影响, 并进一步通过体内抗肝癌 H22 荷瘤小鼠试验, 考察不同剂量玛咖生物碱体内抗肝癌活性影响。细胞实验表明, 不同剂量组玛咖生物碱对 Bel-7402 细胞有一定的抗肝癌活性, 其抗癌活性高低顺序为: 玛咖生物碱高剂量组 > 玛咖生物碱中剂量组 > 玛咖生物碱低剂量组。体内抗肝癌试验表明, 玛咖生物碱高、中剂量组具有显著的抗肝癌活性。可见, 玛咖生物碱具有一定的抗肝癌活性, 这为玛咖生物碱活性的研究提供新的方向。

关键词: 玛咖; 生物碱; 抗肝癌

文章编号: 1673-9078(2018)11-52-56

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.11.009

Inhibition of Bel-7402 Human Hepatoma Cells and H22 Tumor-bearing Mice by Maca Alkaloids

WANG Ai-hua¹, LIU Ying-mei², WANG Li-li², AN Ran¹

(1. Shandong Traditional Chinese Medicinal University Second Affiliated Hospital, Jinan 250001, China)

(2. Shandong Academy of Pharmaceutical Sciences, Jinan 250001, China)

Abstract: The effects of maca alkaloid on the anti-hepatocarcinoma activity of Bel-7402 cells *in vitro* and the anti-H22 liver cancer activity *in vivo* were investigated. Maca alkaloid crude extract was obtained by 0.5% hydrochloric acid and 95% ethanol solvents, and maca alkaloid was further purified by acid dissolution and alkali precipitation method. The anti-hepatocarcinoma activity of maca alkaloids was determined by MTT method and the anti-H22 liver cancer activity *in vivo*. The cell experiments showed that maca alkaloids of different doses exhibited an anti-liver cancer activity towards Bel-7402 cell, and the decreasing order of the activity was maca alkaloids high-dose group > maca alkaloids middle-dose group > maca alkaloids low-dose group. The *in vivo* anti-liver cancer results showed that maca alkaloids at high or middle doses had a significant anti-liver cancer activity. The results demonstrated that maca alkaloids exhibit an anti-liver cancer activity, which would provide a new direction for the study of maca alkaloid activity.

Key words: maca; alkaloid; anti-liver cancer

肝癌作为我国常见的恶性肿瘤之一, 具有生长迅速、易扩散等特点^[1-4]。现今用于肿瘤治疗的药物按原料差异可分为化学药和中药, 化学药物具有见效快等优点, 但是长期服用毒、副作用大, 中药抗肿瘤药物作为现今研究的热点, 已在控制肝癌病情的发展, 介入肝癌治疗等方面具有广泛的应用。现今市场上存在一系列中药抗肿瘤药物, 如参一胶囊。

玛咖作为新资源食品, 含有多糖、蛋白质等营养成分, 除此之外, 含有生物碱、玛咖烯、玛咖酰胺、芥子油苷等活性成分, 具有抗疲劳、抗氧化等^[5-9]活性。

收稿日期: 2018-06-11

作者简介: 王爱华, 女, 副主任药师, 研究方向: 中药学

生物碱作为玛咖中有效活性成分, 总结发现, 其研究主要集中于抗疲劳、抗氧化、降血糖^[10-12], 尚未涉及对抗肿瘤活性的研究。本试验通过体外细胞实验与体内抗肝癌活性试验考察玛咖生物碱抗肿瘤活性, 以期对玛咖生物碱的活性研究提供新的方向。

1 材料与仪器

1.1 实验药物与试剂

7402 肝癌细胞, 由山东省医科院提供; 无水乙醇 (分析纯), 天津市富宇精细化工有限公司; 甲醇 (色谱纯), Tedia 公司; 新生牛血清 (FBS), 浙江天材生

物科技有限公司; RPMI 1640 培养液, 美国 GE Healthcare Life Sciences 公司; DMSO(分析纯), 国药集团化学试剂有限公司; 胰蛋白酶, 美国 GE Healthcare Life Sciences 公司; 磷酸缓冲溶液 (PBS), 博士得生物有限公司; 注射用顺铂, 齐鲁制药有限公司; 青链霉素混合液 (双抗), 北京索莱宝科技有限公司; 氢氧化钠 (分析纯), 天津市富宇精细化工有限公司; 乙酸乙酯 (分析纯), 天津市富宇精细化工有限公司; 玛咖, 经山东中医药大学高德民老师鉴定为植物玛咖。

1.2 实验仪器

电热恒温水浴锅, 北京市永光明医疗仪器厂; 分析天平 (万分之一), 上海菁海仪器有限公司; 旋转蒸发器, 巩义市予华仪器有限责任公司; SHB-B95 型循环水式多用真空泵, 郑州长城科工贸有限公司; 冰箱, 青岛海尔股份有限公司; 紫外光栅分光光度计, 莱伯泰科 UV9100B; 高效液相色谱仪 (Agilent 1200 型高效液相色谱仪), 安捷伦公司; FA2004N 电子天平, 上海菁海仪器有限公司; MemmertCO₂ 培养箱, 北京五洲东方科技有限公司; CKX41 显微镜, 日本 OLYMPUS 公司; LEGEND MICRO17 离心机, 美国 Thermo 公司; Multiskan Mk3 型酶标仪, 美国 Thermo 公司; NEST 96 孔细胞培养板, 无锡耐恩生物科技有限公司; LDEX-70FBS 型立式蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂; 101-3 型干燥箱, 上海市实验仪器总厂。

1.3 实验内容

1.3.1 玛咖生物碱的制备

1.3.1.1 玛咖生物碱的提取与分离

将 100 g 玛咖与 0.5% 的盐酸 95% 乙醇于 75 °C 下进行加热回流提取三次, 每次 2 h, 药物与溶剂比例为 1 g: 20 mL。合并提取液, 双层滤纸抽滤, 将抽滤后的提取液进行浓缩, 得浸膏, 后用 0.5% 的盐酸洗, 调节 pH 值为 1~2, 冷藏静置 24 h。将静置后的溶液抽滤, 弃去沉淀, 用乙酸乙酯等按体积比为 1:1 进行萃取三次, 取水层将其浓缩至无乙酸乙酯味为止, 后用氢氧化钠溶液调整 pH 值至 10, 冷藏静置 24 h, 抽滤, 沉淀用蒸馏水洗去残留的氢氧化钠, 干燥, 即得玛咖生物碱。

1.3.1.2 玛咖生物碱的测定

通过酸碱滴定法测定生物碱的含量, 将定量过量 0.01 mol/L 的稀硫酸溶液中和玛咖生物碱, 再用 0.02 mol/L 的氢氧化钠溶液标定剩余的稀硫酸, 计算出硫酸的剩余量, 得到生物碱的含量, 试验过程中以甲基

红为指示剂。生物碱纯度按下式计算。

$$\text{玛咖生物碱}(\%) = \frac{C_{H_2SO_4} \times V_{H_2SO_4} \times 2 - C_{NaOH} \times V_{NaOH}}{278.44} \times M$$

式中: C 为溶液浓度, V 为溶液体积, M 为玛咖生物碱样品质量。

根据上述公式测得的玛咖生物碱纯度为 88.91%。

1.3.2 细胞实验

1.3.2.1 细胞培养与药物处理

将肝癌细胞 Bel-7402 放于含有新生牛血清、青链霉素混合液的 1640 培养液, 在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中进行培养, 后进行细胞换液和传代培养, 将带有细胞的培养液均匀地加在加样槽中, 吹打均匀, 用血球计数板计数, 平均 $4 \times 10^4 \sim 6 \times 10^4$ 个细胞, 然后用排枪吸取细胞加入 96 孔板中, 放入培养箱中, 培养 24 h 进行肝癌细胞活力考察。

1.3.2.2 药物处理与分组

将待测品用不含血清的 1640 培养液溶解, 通过 0.22 μm 微孔滤膜进行过滤, 配成 0.5 mg/mL 玛咖生物碱溶液、1 mg/mL 玛咖生物碱溶液、2 mg/mL 玛咖生物碱溶液, 将其放入冰箱。等到细胞生成到约占每个孔的 80%, 将 96 孔板从培养箱中取出, 拍出培养液, 然后加入每个孔的药物 100 μL, 每个浓度重复 5 个孔, 以顺铂为阳性对照, 1640 培养基为阴性对照, 放入培养箱, 培养 24 h, 考察肝癌细胞活力。

1.3.2.3 MTT 法检测细胞增殖

避光条件下, 每个孔加入 MTT 20 μL, 4 h 后, 用注射器将溶液吸出, 加入 DMSO, 另外选取三个孔加入 DMSO 做空白, 用酶标仪测定在 490 nm 处的 OD 值, 记录数据。抑制率计算公式, 如下:

抑制率 = $1 - (\text{加药组平均 OD 值} - \text{较零组平均 OD 值}) / (\text{阴性组平均 OD 值} - \text{较零组平均 OD 值})$ 。

1.3.3 体内抗肿瘤活性研究

1.3.3.1 H22 肝腹水瘤的传代及接种

将 H22 荷瘤小鼠正常喂养一周, 在无菌环境下进行腹水传代, 将传代后的小鼠正常饲喂一周, 脱颈椎处死, 于无菌环境下吸取腹腔腹水, 加入生理盐水进行稀释, 将混悬液进行腋下接种, 每只接种 0.2 mL。

1.3.3.2 分组及给药

将接种后的小鼠随机分为 6 组, 每组 10 只, 分为空白对照组 (吐温-80 溶液)、荷瘤小鼠对照组 (吐温-80 溶液)、单独顺铂给药组 (顺铂: 2 mg/kg)、生物碱低剂量给药组 (玛咖生物碱: 0.5 g/kg)、生物碱中剂量给药组 (玛咖生物碱: 1.0 g/kg)、生物碱高剂量给药组 (玛咖生物碱: 2.0 g/kg), 正常喂养, 并于接种后的第 3 日进行灌胃给药。空白组、荷瘤小鼠组:

每只每天灌胃 0.2 mL 的吐温-80；阳性药组：每只每天注射 0.2 mL 的顺铂，连续给药 3 d 后，停药 7 d，如此反复；单独生物碱给药组：每只每天灌胃 0.2 mL 的玛咖生物碱吐温-80 溶液。

1.3.3.3 小鼠体重测定

将灌胃前小鼠与灌胃后小鼠分别测定体重，观察是否有显著性差异。

1.3.3.4 瘤重及抑瘤率的计算

连续用药 18 d 后，将小鼠脱颈椎处死，称取瘤重，计算各组药物的抑瘤率。计算公式如下：

抑瘤率 (%) = $\frac{\text{荷瘤小鼠对照组平均瘤重} - \text{用药组平均瘤重}}{\text{荷瘤小鼠对照组平均瘤重}} \times 100\%$

1.3.3.5 免疫指数计算

将 2.3.3 中小鼠，取脾脏、胸腺，称定重量，计算各组药物的脾脏指数与胸腺指数。

脾脏指数 = $\frac{\text{脾脏重量}}{\text{体重}} \times 10$

胸腺指数 = $\frac{\text{胸腺重量}}{\text{体重}} \times 10$

1.3.4 数据统计分析

以上数据通过 SPSS statistics 17.0 方差分析进行，One-Way ANOVA 进行数理统计。

2 结果分析

2.1 细胞实验结果

2.1.1 MTT 法测定各组分对肝癌 Bel-7402 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

细胞实验作为玛咖生物碱抗肝癌活性的初步筛选试验。根据细胞实验结果，发现玛咖生物碱高剂量给药组抑瘤率可达 81.49%，表明玛咖生物碱具有显著的抗肝癌 Bel-7402 细胞的效果。并且玛咖中、高剂量组抑瘤率达到 50% 以上，表明玛咖生物碱具有有效的体外抗肝癌活性，且随着剂量的增加，其抑瘤率逐渐增加，呈现一定的剂量依赖性。此细胞实验结果为进一步的体内实验提供一定的参考。

表 1 不同浓度的玛咖生物碱对 Bel-7402 肝癌细胞的抑制率

Table 1 Inhibition rate of different concentration of maca alkaloid on Bel-7402 hepatocellular carcinoma cells

组别	浓度/ (mg/mL)	抑制率/%
玛咖生物碱高剂量组	2.0	81.49±0.56
玛咖生物碱中剂量组	1.0	76.09±1.58
玛咖生物碱低剂量组	0.5	43.27±2.91

2.1.2 药物作用后肝癌细胞的形态变化

不同组的肝癌细胞 Bel-7402 在培养 24 h 后，通

过显微镜观察，其细胞形态变化如图 1。图 1a 为肝癌细胞 Bel-7402 的正常形态，呈多边形，用药之后出现不同程度的萎缩，萎缩程度越明显，则说明细胞抑制率越大。由图 1 可以看出，不同给药组对肝癌细胞均有不同程度的抑制作用。玛咖生物碱高剂量组>玛咖生物碱中剂量组>玛咖生物碱低剂量组。

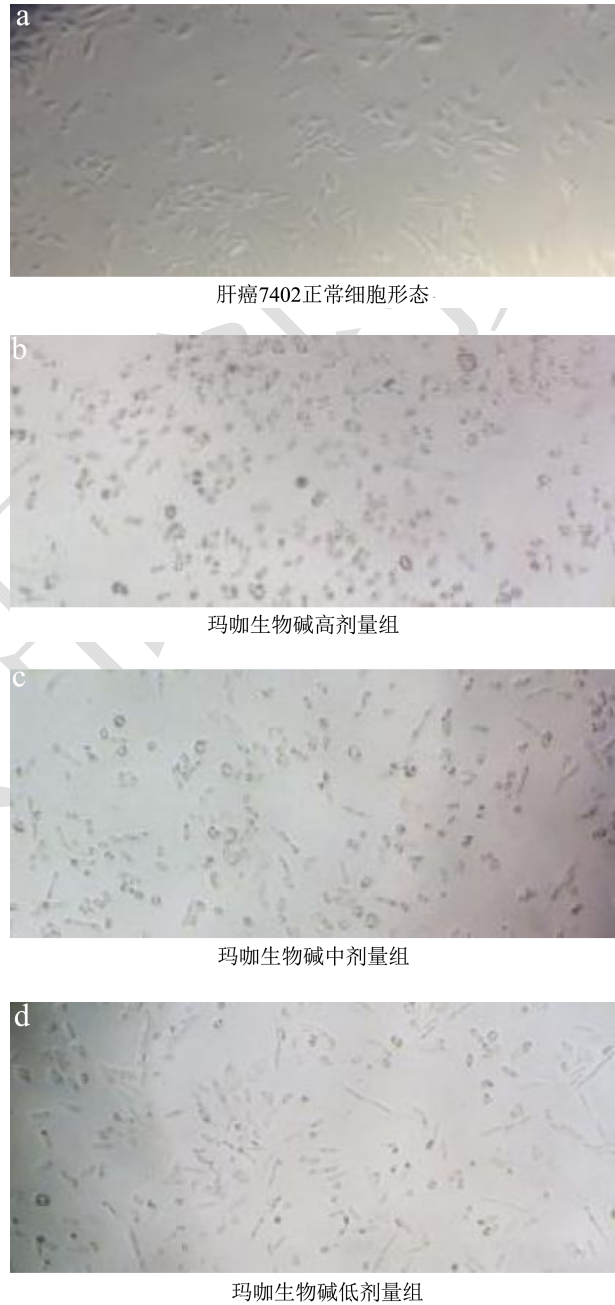


图1 不同组别细胞用药24 h后的显微成像

Fig.1 Microimaging of cells in different groups after 24h of administration (x200)

2.2 小鼠体重变化结果

由图 2 可知，玛卡生物碱剂量组小鼠体重无显著性差别。单独顺铂给药，小鼠减轻具有显著性的差异，

表明顺铂对小鼠体重存在一定的副作用。相对空白组,不同剂量给药组给药后体重均有不同程度减轻,但无显著性差异,表明,玛咖生物碱相对市场上主要用于抗肿瘤的化疗药顺铂无显著副作用。

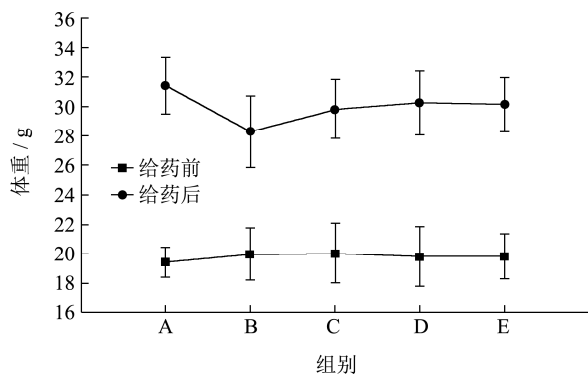


图2 各组给药后小鼠体重变化情况

Fig.2 Effects of different groups on weight (mean±SD)

注: A: 荷瘤小鼠对照组; B: 单独顺铂给药组; C: 玛咖生物碱高剂量组; D: 玛咖生物碱中剂量组; E: 玛咖生物碱低剂量组。

2.3 体内抗肝癌试验结果

表2 药物对H22 荷瘤小鼠的肿瘤抑制率

Table 2 Effects of different groups on tumor weight (mean±SD)

名称	数量/只	抑瘤率/%
荷瘤小鼠对照组	8	-
单独顺铂给药组	10	63.41±1.59**
玛咖生物碱高剂量组	10	50.88±0.98*
玛咖生物碱中剂量组	10	49.88±2.69*
玛咖生物碱低剂量组	10	39.30±1.99

注: *: $p<0.05$; **: $p<0.01$ 。

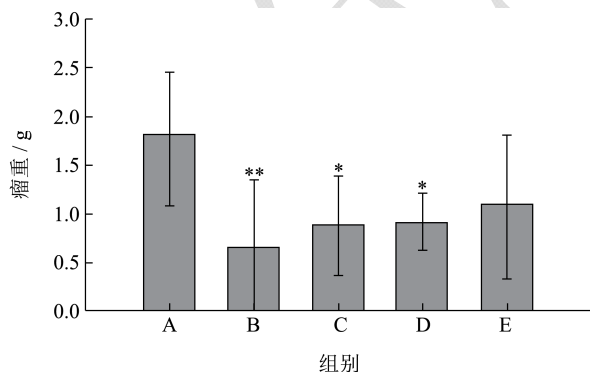


图3 不同组别小鼠瘤重

Fig.3 Effects of different groups on tumor weight (mean±SD)

注: *: $p<0.05$, **: $p<0.01$ 与空白组相比。A: 荷瘤小鼠对照组; B: 单独顺铂给药组; C: 玛咖生物碱高剂量组; D: 玛咖生物碱中剂量组; E: 玛咖生物碱低剂量组。

如表中所示,阳性药顺铂与荷瘤小鼠对照组相比具有显著的抑制作用;单独中、高剂量生物碱给药组

相对荷瘤小鼠对照组,抑制率分别为49.88%、50.88%,具有显著的抑瘤效果,但是抑瘤率相差不大,分析原因可能是因为随着剂量的增加,抑瘤率增加,但是有效含量有一定的阈值,因此剂量的再次增加,使得药效不在显著提高,而玛咖生物碱低剂量组尚未达到有效含量,因此没有显著地抗肿瘤活性。

2.4 免疫指数实验结果

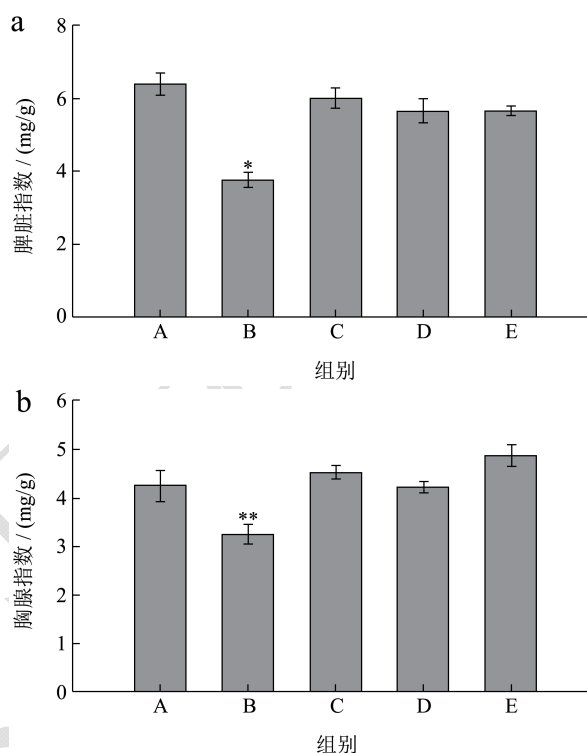


图4 不同组别对免疫指数的影响

Fig.4 Effects of different groups on immune index

注: *: $p<0.05$, **: $p<0.01$ 与空白组相比; A: 荷瘤小鼠对照组; B: 单独顺铂给药组; C: 玛咖生物碱高剂量组; D: 玛咖生物碱中剂量组; E: 玛咖生物碱低剂量组。

通过上述实验结果可知,顺铂单独给药组,其脾脏指数、胸腺指数明显减轻,且具有显著性差异,分析原因,可认为,顺铂化疗药治疗肿瘤具有一定的毒性,而不同剂量组玛咖生物碱抗肿瘤活性与免疫活性无显著性关联,玛咖生物碱抗肿瘤的机制仍需进一步分析。

3 结论

3.1 恶性肿瘤是当今严重威胁人类生命与健康的主要问题之一。市场上现今主要治疗肿瘤的药物分为化药和中药提取物等。化药存在见效快,毒、副作用大的缺点。中药提取物符合传统中医理论扶正祛邪的观点,使得药物的毒、副作用减轻。

3.2 现今,对玛咖生物碱的研究主要集中于抗疲劳

等,并未对抗肿瘤活性进行涉及,本试验创新性的探究玛咖生物碱抗肿瘤活性。本试验将玛咖采用酸溶碱沉方法获得纯度为 88.91%的玛咖生物碱,并采用 Bel-7402 细胞进行体外抗肿瘤细胞实验进行活性筛选,确定不同剂量玛咖生物碱在体内、外抗肝癌活性的影响。通过体外实验发现,玛咖生物碱高、中、低剂量组均对肝癌细胞有一定的抑制作用,其抑瘤率为:玛咖生物碱高剂量组>玛咖生物碱中剂量组>玛咖生物碱低剂量组,呈现剂量相关性。

3.3 通过进一步的体内实验确定不同剂量组玛咖生物碱对抗 H22 荷瘤小鼠的影响,结果发现,玛咖生物碱高、中剂量均有显著的抗肿瘤活性,抑瘤率分别为 50.88%、49.88%。相对阳性药顺铂组相比,不同玛咖生物碱给药组抑瘤率虽然低于阳性药组,但是其免疫指数(脾脏指数与胸腺指数)与空白组相比没有显著性的差异,表明,玛咖生物碱相对市场上普遍使用的阳性药顺铂毒、副作用小。并且玛咖生物碱抗肝癌活性与免疫调节无关,具体抗肝癌机制仍需进一步探讨。此实验研究为玛咖生物碱活性研究提供新的思路与方向,同时为抗肝癌活性的研究提供新的参考。

参考文献

- [1] Yu Y, Lang Q, Chen Z, et al. The efficacy for unresectable hepatocellular carcinoma may be improved by transcatheter arterial chemoembolization in combination with a traditional Chinese herbal medicine formula: a retrospective study [J]. Cancer, 2009, 115(22): 5132-5138
- [2] Meng MB, Cui YL, Guan YS, et al. Traditional Chinese medicine plus transcatheter arterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma [J]. J Altern Complement Med, 2008, 14(8): 1027-1042
- [3] Shu X, McCulloch M, Xiao H, et al. Chinese herbal medicine and chemotherapy in the treatment of hepatocellular carcinoma: A meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Integr Cancer Ther, 2005, 4(3): 219-229
- [4] 杜琴,胡兵,沈克平.补益中药抗肝癌作用研究概况[J].中药材,2010,33(09):1512-1516
DU Qin, HU Bing, SHEN Ke-ping, et al. Research on the anti-liver cancer effect of Chinese medicine tonic herbs [J]. Journal of Chinese Medicine Materials, 2010, 33(09): 1512-1516
- [5] 孙晓东,唐辉,杜萍,等.丽江玛咖的营养成分分析及多糖体外的抗氧化作用[J].光谱实验室,2013,30(5):2356-2371
SUN Xiao-dong, TANG Hui, DU Ping, et al. Nutritive composition analysis of Lijiang maca and antioxidant effect of polysaccharide *in vitro* [J]. Spectrographic Laboratory, 2013, 30(5): 2356-2371
- [6] 李玉龙,张雪,刘清波,等.玛咖功能与营养成分研究进展及发展前景[J].现代农业科技,2015,21:288-292
LI Yu-long, ZHANG Xue, LIU Qing-bo, et al. Research progress and development prospect of maca function and nutrition composition [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2015, 21: 288-292
- [7] 尹子娟,杨成金,尹品耀,等.玛咖的营养成分及功效研究进展[J].云南农业科技,2012,5:61-64
YIN Zi-juan, YANG Cheng-jin, YIN Pin-yao, et al. Advances in nutritional composition and efficacy of maca [J]. Yunnan Agricultural Science and Technology, 2012, 5: 61-64
- [8] 郑茜,张庆贺,卢丹,等.吉林产玛咖的化学成分研究[J].中草药,2014,45(17):2457-2460
ZHENG Qian, ZHANG He-dan, LU Dan, et al. Study on the chemical constituents of maca from Jilin province [J]. Journal of Chinese Medicine Materials, 2014, 45(17): 2547-2460
- [9] 周严严,赵海誉,司南,等.药用植物玛咖研究新进展[J].中国中药杂志,2015,40(23):4521-4530
ZHOU Yan-yan, WANG Hai-yu, SI Nan, et al. New progress in research on maca, a medicinal plant [J]. Journal of Chinese Materia Medica, 2015, 40(23): 4521-4530
- [10] 查圣华.玛咖活性成分及抗疲劳功能研究[D].中国科学院大学(中国科学院过程工程研究所),2016
ZHA Sheng-hua. Study on active components and anti-fatigue function of maca [D]. University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences), 2016
- [11] 杜广香.玛咖生物碱的分离纯化及抗氧化活性研究[D].广州:华南理工大学,2011
DU Guang-xiang. Isolation and purification of maca alkaloid and its antioxidant activity [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2011
- [12] 张利军.玛咖对 2 型糖尿病降糖作用及机理研究[D].中国科学院大学(中国科学院过程工程研究所),2017
ZHANG Li-jun. Study on the hypoglycemic effect and mechanism of maca on type 2 diabetes [D]. University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences), 2017