



# 细胞连续亲和-HPLC测定8种蟾蜍甙烯与MGC-803细胞亲和量及抗肿瘤活性相关分析

蒋洁君<sup>1</sup>, 尤奋强<sup>2</sup>, 马宏跃<sup>1\*</sup>, 周婧<sup>1</sup>, 张军峰<sup>1</sup>,  
詹臻<sup>1</sup>, 唐于平<sup>1</sup>, 段金赓<sup>1</sup>, 丁安伟<sup>1</sup>

(1. 南京中医药大学江苏省方剂研究重点实验室, 江苏南京 210046;  
2. 南京中医药大学昆山附属医院, 江苏昆山 251300)

**[摘要]** 目的:采用细胞连续亲和研究蟾蜍甙烯(Bu)与肿瘤细胞的生物亲和作用,分析其与抗肿瘤活性的相关性。方法:将蟾酥氯仿提取物与胃癌细胞 MGC-803 混合培养,高效液相色谱测定上清液和细胞内 8 种 Bu 的含量,计算亲和率。结果:亲和后细胞上清液中 Bu 总减少率、细胞内游离 Bu 的含量百分率和两者差值(与细胞裂解物的亲和率)、抑制 MGC-803 活性( $1/IC_{50}$ )相关系数  $r$  分别是 0.82( $P < 0.05$ ), -0.04, 0.83( $P < 0.05$ )。结论:8 种蟾蜍甙烯与 MGC-803 发生不同程度亲和。其与肿瘤细胞或细胞裂解物的亲和率与抗肿瘤活性有显著相关性。

**[关键词]** 蟾蜍甙烯;MGC-803;细胞连续亲和;高效液相色谱

临床和实验研究表明中药蟾酥具有抗肿瘤活性。蟾蜍甙烯是蟾酥抗肿瘤的活性物质,对人肝癌、胃癌、结肠癌和宫颈癌等细胞具有抑制活性<sup>[1-5]</sup>,其机制可能涉及诱导肿瘤细胞凋亡、分化,并通过影响 bcl-2 基因的表达及 fasl mRNA 水平发挥作用。蟾蜍甙烯类化合物具有显著的构-效关系,其化学结构的微小差异,致使抗肿瘤活性的差异<sup>[5-6]</sup>,其原因可能是不同蟾蜍甙烯与肿瘤细胞或其受体细胞膜  $Na^+ - K^+ - ATPase$  之间亲和力的差异。为了验证该推测,本研究采用细胞连续亲和-HPLC 测定蟾酥中具有显著抗肿瘤活性的 8 种甙烯与胃癌 MGC-803 细胞的亲和量,并分析其与抗肿瘤活性的相关性。

## 1 材料

**1.1 仪器** Waters 2695 高效液相色谱,PowerWave X 340 型酶标仪(美国 BIO-TEK Instruments 公司),CKX31SF 型倒置显微镜(Olympus 公司)。

**[稿件编号]** 20100326015

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金项目(30901894);教育部新教师基金项目(20093237120013);霍英东教育基金会第十二届高等院校青年教师基金项目(121044);江苏省中医药局项目(LZ09017);南京中医药大学青年自然基金项目(09XZR21)

**[通信作者]** \* 马宏跃,副教授, Tel: (025) 85811625, E-mail: hongyuema@126.com

**[作者简介]** 蒋洁君,硕士研究生, Tel: (15195993227), E-mail: jiangji\_118@126.com

**1.2 试药和试剂** 蟾酥氯仿提取物及对照品:日蟾毒它灵(gamabufotalin, Gtl)、沙蟾毒精(arenobufagin, Arg)、远华蟾毒精(telocinobufagin, Tel)、蟾毒它灵(bufotalin, Btl)、蟾毒灵(bufalin, Bul)、华蟾毒精(cinobufalin, Cbl)、去乙酰蟾毒它灵(desacety-bufotalin, Deb)、噁根草昔元(hellebrigenin, Hel)均由南京中医药大学方剂重点实验室提供,对照品纯度均大于 95%。DMEM 培养基(美国 Gibco 公司),小牛血清(杭州四季清)。甲醇(色谱纯),乙腈(色谱纯,美国 Tedia 公司)。超纯水,噻唑蓝(MTT,美国 Amresco 公司)。其余试剂均为分析纯。

## 2 方法

**2.1 样品制备** 精密称取蟾酥氯仿提取物、日蟾毒它灵、沙蟾毒精、远华蟾毒精、蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾毒精、去乙酰蟾毒它灵、噁根草昔元对照品各 1 mg,溶于 1 mL 纯甲醇中作为母液保存备用。

**2.2 标准曲线的标定** 取对照品溶液,一定体积进样,以对照品进样量( $\mu g$ )为横坐标,峰面积积分为纵坐标,绘制标准曲线。

**2.3 MGC-803 增殖** 取对数生长期细胞制成  $1 \times 10^5$  个/mL 的单细胞悬液,以 100  $\mu L$ /孔接种于 96 孔板培养。24 h 后加入不同浓度的含药培养基 100  $\mu L$ ,浓度梯度为 0(对照),0.125,0.25,0.5,1.0  $mg \cdot L^{-1}$ ,设 6 个复孔。72 h 后每孔加入 20  $\mu L$  MTT



液,培养4 h,酶标仪测每孔  $A_{490}$ 。抑制率 =  $(1 - A_{加药组}/A_{对照组}) \times 100\%$ , 计算  $IC_{50}$ 。

**2.4 细胞连续亲和** 细胞接种于6孔板中,加入  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  蟾酥药液  $500 \mu\text{L}/\text{孔}$ ,共孵育3 h。吸出上清液加入另接种细胞的6孔板进行连续亲和,3 h后吸出合并药液1 mL备用。PBS洗涤所有已亲和细胞3次,加纯水  $500 \mu\text{L}/\text{孔}$  超声裂解,合并,离心上清液备用。以无血清培养基同法制得空白萃取液。以不经过细胞亲和的蟾酥氯仿提取物药液1 mL作为对照。氮气吹干样品,加入  $200 \mu\text{L}$  甲醇溶解,取  $50 \mu\text{L}$  进样 HPLC 分析。

**2.5 色谱条件** 依利特 ODS- $C_{18}$  色谱柱 ( $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$ ); 流动相 A 为 0.3% 的乙酸水溶液,流动相 B 为乙腈,梯度洗脱:  $0 \sim 15 \text{ min}$ ,  $28\% \sim 54\% \text{ B}$ ;  $15 \sim 30 \text{ min}$ ,  $54\% \text{ B}$ ; 柱温  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ; 流速  $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

**2.6 统计分析** 采用 SPSS 软件 pearson correlation 分析,  $P < 0.05$  为有显著性意义。

### 3 结果

#### 3.1 8种蟾蜍甾烯(Bu)抑制 MGC-803 增殖活性

8种 Bu 抑制 MGC-803 增殖效果不同,其活性顺序为  $\text{Gtl} > \text{Arg} > \text{Cbl} > \text{Hel} > \text{Bul} > \text{Btl} > \text{Tel} > \text{Deb}$  (表1)。

表1 8种蟾蜍甾烯类化合物对 MGC-803 细胞的  $IC_{50}$  ( $n=6$ )

化合物	$IC_{50}$
日蟾毒它灵 Gtl	$0.02 \pm 0.15$
蟾毒灵 Bul	$0.27 \pm 0.07$
蟾毒它灵 Btl	$0.30 \pm 0.05$
远华蟾毒配基 Tel	$0.60 \pm 0.02$
去乙酰蟾毒它灵 Deb	$0.78 \pm 0.06$
华蟾毒灵 Cbl	$0.08 \pm 0.02$
沙蟾毒精 Arg	$0.04 \pm 0.03$
嚏根草苷元 Hel	$0.09 \pm 0.02$

**3.2 8种蟾蜍甾烯与 MGC-803 细胞亲和量分析** 对 2.4 项下空白培养基对照、空白细胞裂解液对照、未经亲和药液、亲和后药液、亲和后细胞裂解液进行 HPLC 分析,相关数据见表2,3和图1。空白的细胞裂解液未检测到蟾酥中的成分,证明其对蟾蜍甾烯类成分与细胞作用无干扰。

表2 8种蟾蜍甾烯类成分标准曲线

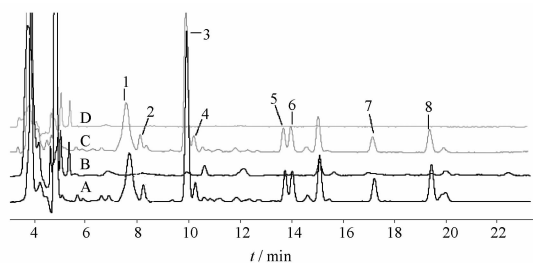
No.	化合物	$t_R/\text{min}$	标准曲线	$r$	线性范围/ng
1	Gtl	7.51	$Y = 242.09X + 228.65$	0.999 6	0.51 ~ 465
2	Arg	8.11	$Y = 686.05X - 271.32$	0.999 7	0.39 ~ 1 236
3	Hel	9.88	$Y = 764.57X + 370.18$	0.999 6	0.61 ~ 1 366
4	Deb	10.20	$Y = 398X + 370.28$	0.999 3	0.97 ~ 418
5	Btl	13.68	$Y = 541.96X + 49.88$	0.999 9	0.53 ~ 1 707
6	Tel	14.03	$Y = 679.75X + 150$	0.999 7	0.87 ~ 1 621
7	Bul	17.22	$Y = 520.77X + 523.96$	0.999 9	0.50 ~ 1 315
8	Cbl	19.44	$Y = 907.15X - 32.32$	0.999 8	0.77 ~ 387

表3 蟾酥中8种蟾蜍甾烯与 MGC-803 细胞的亲和量

化合物	实测量/ng			计算量/ng		亲和率/%		
	A	C	B	A - C	A - B - C	细胞总亲和率	细胞裂解物亲和率	胞内游离率
Gtl	255.92	55.56	24.68	200.36	175.68	78.29	68.65	9.64
Arg	557.57	81.37	0.75	476.2	475.45	85.41	85.27	0.13
Hel	757.34	550.5	4.46	206.84	202.38	27.31	26.72	0.59
Deb	146.79	131.19	15.53	15.6	0.07	10.63	0.05	10.58
Btl	155.42	115.66	5.69	39.76	34.07	25.58	21.92	3.66
Tel	160.55	128.81	13.86	31.74	17.88	19.77	11.14	8.63
Bul	158.63	106.61	15.95	52.02	36.07	32.79	22.74	10.05
Cbl	168.76	110.64	3.36	58.12	54.76	34.44	32.45	2.00

注:A. 未经细胞亲和的药液;B. 亲和后细胞裂解液;C. 经过细胞亲和的药液。

未亲和药液(A),经过细胞亲和药液(C)和计算的细胞总亲和量(A - C)中8种 Bu 含量见表3,



A. 未经细胞亲和的药液; B. 亲和后细胞裂解液; C. 经过细胞亲和的药液; D. 空白细胞裂解液; 色谱峰编号对应的化合物名称同表2。

图1 空白细胞裂解液、蟾酥氯仿提取物与 MGC-803 细胞相互作用的 HPLC 图

与 MGC-803 总亲和率  $[(A - C)/A \times 100\%]$  顺序为 Arg > Gtl > Cbl > Bul > Hel > Btl > Tel > Deb。

已亲和的 MGC-803 细胞经裂解、离心后的上清液中 8 种 Bu 含量 (B) 见表 3, 细胞内游离 Bu 的含量百分率  $(B/A \times 100\%)$  顺序为 Deb > Bul > Gtl > Tel > Btl > Cbl > Hel > Arg。

计算与 MGC-803 细胞裂解物结合的 Bu 量  $(A - B - C)$  见表 3, 与细胞裂解物的亲和率  $[(A - B - C)/A \times 100\%]$  顺序为 Arg > Gtl > Cbl > Hel > Bul > Btl > Tel > Deb。

**3.3 相关性分析** 8 种蟾蜍甙烯化合物与 MGC-803 发生不同程度亲和。亲和后细胞上清液中 Bu 总减少率与抑制 MGC-803 增殖的相关系数  $r$  是 0.82 ( $P < 0.05$ ), 细胞内游离 Bu 的含量百分率与抑制 MGC-803 活性  $(1/IC_{50})$  的相关系数  $r$  则是 -0.04。通过两者差值, 即间接测得 Bu 与细胞裂解物的亲和率和其抑制 MGC-803 活性  $(1/IC_{50})$  的相关系数  $r$  为 0.83 ( $P < 0.05$ )。

#### 4 讨论

生物色谱技术以活性细胞为分离载体, 以中药提取物为对象, 提取物中的成分依据与细胞是否具有特异亲和能力而分离<sup>[7]</sup>。吴茜等<sup>[8]</sup>建立了活性细胞固相萃取-色谱、质谱联用技术用以筛选中药体系中与靶细胞结合成分。并应用该技术筛选了当归补血汤提取物中与内皮细胞有特异性亲和作用的成分<sup>[9]</sup>。洪敏等<sup>[10]</sup>以肝细胞为活性细胞建立细胞萃取-HPLC 法并分析栀子中保肝作用的活性成分。细胞亲和和色谱法是研究中药化学成分与细胞亲和力的有效手段。

通过作者前期的抗肿瘤实验筛选, 发现蟾酥中

日蟾毒它灵、沙蟾毒精、远华蟾毒精、蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾毒精、去乙酰蟾毒它灵、噶根草苷元具有显著抗肿瘤活性作用, 而脂蟾毒配基在类似浓度没有显著抗肿瘤活性。此外, 一些文献研究结果也表明上述几种物质是主要抗肿瘤活性成分<sup>[11-13]</sup>。因此在本研究中采用细胞连续亲和法, 测定了这 8 种蟾蜍甙烯与 MGC-803 细胞的亲和量并计算亲和率。测得总亲和率的顺序为 Arg > Gtl > Cbl > Bul > Hel > Btl > Tel > Deb。测得细胞内游离 8 种蟾蜍甙烯的亲和率顺序为 Deb > Bul > Gtl > Tel > Btl > Cbl > Hel > Arg。通过两者差值, 即间接计算细胞裂解物结合率的顺序为 Arg > Gtl > Cbl > Hel > Bul > Btl > Tel > Deb。

8 种蟾蜍甙烯抑制胃癌细胞 MGC-803 顺序为 Gtl > Arg > Cbl > Hel > Bul > Btl > Tel > Deb。Gtl 和 Arg 与 MGC-803 细胞亲和率最高, 这与它们抗肿瘤活性最好相一致。Deb 的亲和率最低, 其活性也是最弱的。经统计分析, 肿瘤细胞或细胞裂解物对 Bu 的亲和率, 与其抗肿瘤活性具有显著相关性, 提示 8 种蟾蜍甙烯的抗肿瘤活性与其与肿瘤细胞的结合能力呈正相关; 而透过细胞膜游离在细胞内的蟾蜍甙烯的含量百分率与抗肿瘤活性无显著相关性, 这可能与蟾蜍甙烯抑制肿瘤细胞增殖的作用机制有关。一般认为蟾蜍甙烯类化合物抑制肿瘤细胞增殖的机制主要是通过激活细胞膜上  $Na^+ - K^+ - ATP$  酶信号通路 src/EGFR/ERK/P21 发生抑制肿瘤细胞增殖作用<sup>[14-15]</sup>。但要阐明蟾酥抗肿瘤的具体作用机制还需进一步探讨和研究。

本研究表明肿瘤细胞或细胞裂解物对蟾酥中 8 种蟾蜍甙烯的亲和率, 和其抗肿瘤活性显著相关。其与肿瘤细胞的亲和能力可能是该类化合物抗肿瘤活性差异的原因之一。

#### [参考文献]

- [1] 苏永华, 尹西才, 谢觉民, 等. 三种蟾毒单体对 SMMC-7721 和 BEL-7402 人肝癌细胞生长的抑制作用[J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(4): 393.
- [2] 吴兴新, 孙洋, 周晓斌, 等. 蟾毒它灵对人胃癌 BGC-823 细胞的促凋亡作用[J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(2): 117.
- [3] 范钰, 郑树, 赵刚. 蟾蜍灵对结肠癌 SW-480 细胞 polo-like kinase-1 表达及细胞凋亡的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(3): 491.
- [4] 王鹏, 吴军, 李敏, 等. 华蟾毒精抑制 HeLa 细胞增殖作用机制的探讨[J]. 中华肿瘤杂志, 2005, 27(12): 717.



- [5] 梁研,李萍,余伯阳,等. HPLC/MS对蟾蜍甾萜类化合物在大鼠胃肠道中的吸收和转化的初步研究[J]. 中国天然药物, 2007,4(5):285.
- [6] 董文波,吴补领,朱明慧,等. 蟾酥制剂的临床疗效和作用特点[J]. 中华医药杂志,2003,2(10):26.
- [7] 李萍,齐炼文,闻晓东,等. 中药效应物质基础和质量控制研究的思路与方法[J]. 中国天然药物,2007,5(1):1.
- [8] 吴茜,毕志明,李萍,等. 基于整体观的中药药效物质基础的生物活性筛选/化学在线分析研究新进展[J]. 中国药科大学学报,2007,38(4):289.
- [9] Li S L, Li P, Sheng L H, et al. Live cell extraction and HPLC-MS analysis for predicting bioactive components of traditional Chinese medicines [J]. J Pharm Biomed Anal, 2006, 41(2):576.
- [10] 洪敏,马宏宇,朱荃. 肝细胞萃取-HPLC分析法的建立及其在栀子保肝效应物质初步分析中的应用[J]. 中国中药杂志, 2009,34(4):450.
- [11] Ye Min, Guo Hui, Guo Hongzhu, et al. Simultaneous determination of cytotoxic bufadienolides in the Chinese medicine ChanSu by high-performance liquid chromatography coupled with photodiode array and mass spectrometry detections [J]. J Chromatogr B, 2006, 838:86.
- [12] 李强. 蟾酥中蟾毒配基类化合物的抗肿瘤研究进展[J]. 实用药物与临床, 2009, 12(2):132.
- [13] 刘俊珊,张冬梅,栗原博,等. 蟾酥及其活性成分抗肿瘤作用研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2009, 36(2):115.
- [14] Li Z, Cai T, Tian J, et al. Naktide, a Na/K-ATPase-derived peptide Src inhibitor, antagonizes ouabain-activated signal transduction in cultured cells[J]. J Biol Chem, 2009, 284:21066.
- [15] Kurosawa M, Numazawa S, Tani Y, et al. ERK signaling mediates the induction of inflammatory cytokines by bufalin in human monocytic cells [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2000, 278(3):500.

## Cell continuous extraction-HPLC determination biological affinity of 8 bufadienolides on MGC-803 cells and their correlation with anti-tumor activities

JIANG Jiejun<sup>1</sup>, YOU Fenqiang<sup>2</sup>, MA Hongyue<sup>1\*</sup>, ZHONG Jing<sup>1</sup>, ZHANG Junfeng<sup>1</sup>, ZHAN Zhen<sup>1</sup>,  
TANG Yuping<sup>1</sup>, DUAN Jin'ao<sup>1</sup>, DING Anwei<sup>1</sup>

(1. Jiangsu Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine Formulae Research, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

2. Affiliated Hospital, Nanjing University of Chinese Medicine, Kunshan 215300, China)

[Abstract] **Objective:** To study the bioaffinity between 8 bufadienolides (Bu) and tumor cells and analyze the correlation between the bioaffinity and the anti-tumor activities of Bu. **Method:** Mix and cultivate the chloroform extract of Chansu and MGC-803. Measure the content of 8 Bu in supernatant and cells using HPLC and calculate their affinity rate. **Result:** The coefficient correlation between the decrease of Bu in cell supernatant after affinity and its MGC-803 restrictive activities, and between the content percentage of the free Bu in free cells with its MGC-803 restrictive activities, and between the difference between the decrease and the percentage and its MGC-803 restrictive activities is  $r=0.82$  ( $P<0.05$ ),  $r=-0.04$  and  $r=0.83$  ( $P<0.05$ ) respectively. **Conclusion:** Eight Bu have different levels of affinity with MGC-803 which correlate with their anti-tumor activities.

[Key words] bufadienolides; MGC-803 cells; cell affinity; HPLC

doi:10.4268/cjcm20110225

[责任编辑 张宁宁]